

液相色谱-质谱研究高尿酸血症大鼠血清代谢组学

石拓^{1,2}, 卢存龙¹, 李龙³, 朱厚鑫^{1,2}, 周岩冰^{1*}

(1. 青岛大学附属医院 胃肠外科, 山东 青岛 266005; 2. 青岛大学 医学部, 山东 青岛 266003;
3. 威海市中心医院, 山东 威海 264400)

摘要:目的 利用液相色谱-串联质谱技术,研究高尿酸血症(HUA)大鼠整体代谢谱的改变,筛选与高尿酸血症相关的潜在生物标志物。方法 通过腺嘌呤和氧嗪酸钾灌胃3周,同时自由进食含10%酵母膏饲料方法建立高尿酸血症大鼠模型。采用基于超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS/MS)的代谢组学方法,运用主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)分析比较模型组与正常大鼠血清的代谢谱差异。结果 与对照组大鼠相比,在高尿酸模型组大鼠中发现并鉴定出14种潜在生物标志物,分别为尿酸、次黄嘌呤、尿囊素、肌酐、马尿酸、犬尿氨酸、色氨酸、硫酸吡啶酚、硫酸对甲酚、牛磺酸、棕榈酸、硬脂酸、溶血磷脂酰胆碱(LPC)(17:0)和LPC(18:0)。提示,高尿酸血症影响大鼠嘌呤代谢、氨基酸代谢、胆汁酸代谢、脂肪酸代谢及菌群代谢。结论 本研究筛选出高尿酸模型大鼠血清中的14种差异代谢物,有助于解释高尿酸血症引起的代谢改变,可望为高尿酸血症的早期筛查、诊断和治疗提供帮助。

关键词: 高尿酸血症;胰岛素抵抗;代谢组学;超高效液相色谱-质谱

中图分类号:R589.7 文献标志码:A

Metabolomic research on hyperuricemia in rats using UPLC-MS/MS

SHI Tuo^{1,2}, LU Cun-long¹, LI Long³, ZHU Hou-xin^{1,2}, ZHOU Yan-bing^{1*}

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266005; 2. Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266003; 3. Weihai Central Hospital, Weihai 264400, China)

Abstract: Objective To investigate the comprehensive serum metabolic profiles of hyperuricemia(HUA) rats and to identify potential biomarkers of hyperuricemia by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Hyperuricemia rat model was established by consistent intragastric administration of adenine and potassium oxazinate for 3 weeks, rats were fed with 10% yeast extract at the same time. The metabolomics method based on ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS), principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used to find the difference of serum metabolic profiles between hyperuricemia model and control groups. **Results** Comparing with control rats, 14 potential biomarkers were identified in hyperuricemia rats, including uric acid, hypoxanthine, allantoin, creatinine, hippuric acid, kynurenine, tryptophan, indoxyl sulfate, p-cresol sulphate, taurine, palmitic acid, stearic acid, lyso-phosphatidylcholine(LPC)(17:0) and LPC(18:0). The results showed that hyperuricemia affected purine metabolism, amino acid metabolism, bile acid metabolism, fatty acid metabolism and gut microbiota metabolism in

收稿日期:2018-07-18 修回日期:2018-11-29

基金项目:国家自然科学基金(81572314)

* 通信作者(corresponding author):zhouyanbing999@aliyun.com

rats. **Conclusions** Fourteen different serum metabolites of hyperuricemia model rats were examined, which were helpful to explain the metabolic profiles changes caused by hyperuricemia, and to facilitate early screening, diagnosis and treatment of hyperuricemia.

Key words: hyperuricemia; insulin resistance; metabolism; ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是由嘌呤代谢异常引起的代谢性疾病。近年来随着人民生活水平提高和饮食结构变化,HUA的患病率逐年增高^[1]。大量研究表明HUA不仅是痛风的生化基础,还与心血管疾病、肾脏疾病、糖尿病有关^[2-3]。代谢组学是通过考察生物体系受刺激或扰动后,以其代谢产物的变化或其随时间的变化来研究生物体系代谢途径的一门科学。超高效液相色谱-质谱(ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS/MS)联用技术,因具有较高的灵敏度和分辨率,以及较宽的动态范围被广泛用于代谢组学研究^[4]。

本研究拟采用超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS)检测高尿酸血症大鼠血清代谢物的变化,通过主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)寻找潜在的生物标志物,并由此探索高尿酸血症大鼠体内的代谢变化,为高尿酸血症的早期诊断及治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及试剂盒:腺嘌呤(纯度98%,规格20 g/瓶)、酵母膏(规格500 g)和氧嗪酸钾(纯度98%,规格5 g/瓶)(上海源叶生物有限公司);甲醇、乙腈和甲酸(色谱纯,Merck公司)。大鼠空腹胰岛素(FINS)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和黄嘌呤氧化酶(XOD)Elisa试剂盒(江苏雨桐生物科技有限公司);稳豪倍易型血糖仪及试纸[强生(中国)医疗器材公司]。

1.1.2 实验动物:20只8周龄SPF级Wistar雄性大鼠,体质量(280 ± 20)g[济南朋悦动物有限公司,合格证号:SCXK(鲁)20140007]。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和处理:模型组大鼠(HUA, $n=10$)

用每日腺嘌呤0.1 mg/kg和氧嗪酸钾1.5 mg/kg体质量灌胃3周,同时自由进食含10%酵母膏的饲料。空白对照组(CON, $n=10$)给予实验室标准饲料饮食,并每日给予1 mL/100 g体质量的0.9%氯化钠溶液灌胃。造模第21天处死大鼠内眦取血,以3 000 r/min离心10 min,取血清冷冻贮藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.2.2 血清生化指标的检测:血清尿酸(uric acid, UA)、三酰甘油(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-c)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-c)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和肌酐(creatinine, Cr)水平以全自动生化分析仪(Hitachi 7600A, Japan)检测。空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)以血糖仪进行检测。使用Elisa试剂盒检测FINS、IL-6和TNF- α 及XOD。胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)通过公式 $\text{FPG}\times\text{FINS}/22.5$ 计算。

1.2.3 代谢组学的分析:色谱条件:采用ACQUITY UPLC BEH C18 column (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , Waters, UK)进行色谱分离,色谱柱柱温为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,流速为0.4 mL/min,其中A流动相为水和0.1%甲酸,B流动相为甲醇和0.1%甲酸。采用0~2 min,100%流动相A;2~11 min,0~100%流动相B;11~13 min,100%流动相B;13~15 min,0~100%流动相A进行洗脱。每个样本的上样体积为10 μL 。

质谱条件:采用高分辨串联质谱Xevo G2-XS QTOF (Waters, UK)分别进行正负离子模式采集。正离子模式毛细管电压和锥孔电压分别为3 kV和40 V。负离子模式毛细管电压及锥孔电压分别为1 kV和40 V。采用MSE模式进行centroid数据采集,一级扫描范围为50~1 200 Da,扫描时间为0.2 s,对所有母离子按照20到40 eV的能量进行碎裂,采集所有的碎片信息,扫描时间为0.2 s。

1.3 统计学分析

原始质谱数据采用Progenesis QI(version 2.2)

(Waters, UK) 软件进行峰检测、峰对齐以及归一化。进一步数据分析采用 metaX 软件进行 *t* 检验、变异倍数分析 (fold change analysis)、主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)。本研究采用 PLS-DA 模型前两个主成分的 VIP 值, 结合单变量分析所得差异倍数 (fold-change) 和 *q*-value 值来筛选差异代谢物。筛选条件: 1) VIP ≥ 1; 2) fold-change ≥ 1.2 或者 ≤ 0.8333; 3) *q*-value < 0.05, 三者取交集得到差异离子。基于生物学数据库 KEGG (<http://www.kegg.jp/>) 和 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 进行生物标志物的鉴定和代谢通路分析。血清一般指标数据应用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 血清一般指标

与对照组相比, HUA 组 UA、BUN、Cr、FPG、FINS、HOMA-IR、TG、TC、LDL-c、XOD、IL-6 和 TNF-α

明显增高 ($P < 0.01$), HDL-c 降低 ($P < 0.01$) (表 1), 高尿酸血症模型大鼠构建成功。

2.2 血清代谢组学数据

HUA 组大鼠与对照组大鼠差异倍数分析结果 (fold change 小于等于 0.833 3 或大于等于 1.2 且 *q* value 值小于 0.05 的点标注为红色, 其余点为蓝色) (图 1)。两组大鼠正负离子模式下 PCA 得分图 (图 2), HUA 组与对照组分离明显。图 3 为正负离子模式下 HUA 组与对照组的 PLS-DA 得分图, 两组间有明显的分离趋势, 提示 HUA 组与对照组血清代谢谱有差异。根据质荷比和二级质谱数据, 比对网络数据库, 鉴定出高尿酸血症大鼠血清中 14 种潜在生物标志物 (表 2), 其中尿酸、色氨酸及棕榈酸的典型二级质谱图 (图 4), 两组间有显著差异。

3 讨论

尿酸是人体嘌呤代谢的最终产物, 次黄嘌呤和黄嘌呤是嘌呤代谢中尿酸的前体, 而黄嘌呤氧化酶

表 1 高尿酸血症模型组与对照组生化资料比较
Table 1 Serum biochemical data of HUA group and CON group ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

group	UA/($\mu\text{mol/L}$)	BUN/(mmol/L)	Cr/($\mu\text{mol/L}$)	FPG/(mmol/L)	FINS/(mU/L)	HOMA-IR	TG/(mmol/L)
CON	145.6 ± 6.37	13.68 ± 1.47	64.81 ± 8.52	5.15 ± 0.74	10.38 ± 0.62	1.52 ± 0.11	0.89 ± 0.16
HUA	199.5 ± 12.8 *	6.19 ± 0.67 *	109.65 ± 10.6 *	7.17 ± 0.64 *	14.18 ± 0.65 *	2.23 ± 0.16 *	1.67 ± 0.11 *
group	TC/(mmol/L)	LDL-c/(mmol/L)	HDL-c/(mmol/L)	XOD/(U/L)	IL-6/(ng/L)	TNF-α/(ng/dl)	
CON	1.57 ± 0.26	0.86 ± 0.12	1.14 ± 0.23	8.61 ± 0.43	10.02 ± 0.63	24.42 ± 1.16	
HUA	2.34 ± 0.27 *	1.46 ± 0.11 *	0.97 ± 0.08 *	13.70 ± 0.57 *	17.80 ± 1.00 *	36.98 ± 0.92 *	

* $P < 0.05$ compared with CON.

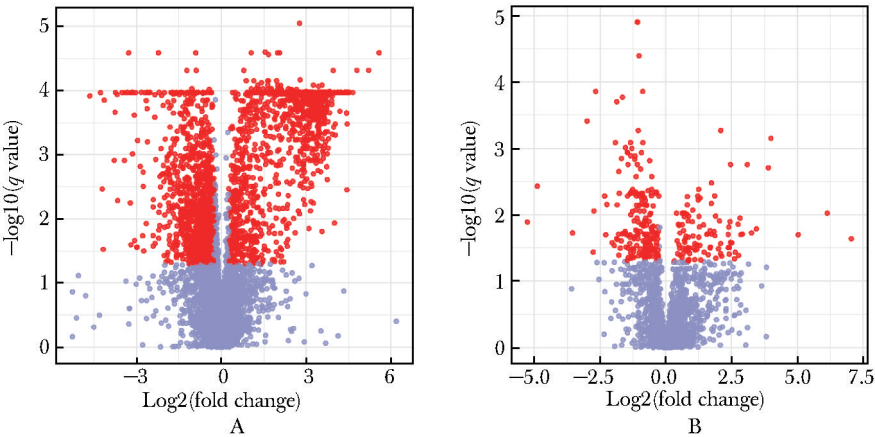


图 1 正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下 HUA 组与对照组火山图

Fig 1 Volcanic map in positive ion (A) and in negative ion (B) scan modes of rats in CON group and HUA group

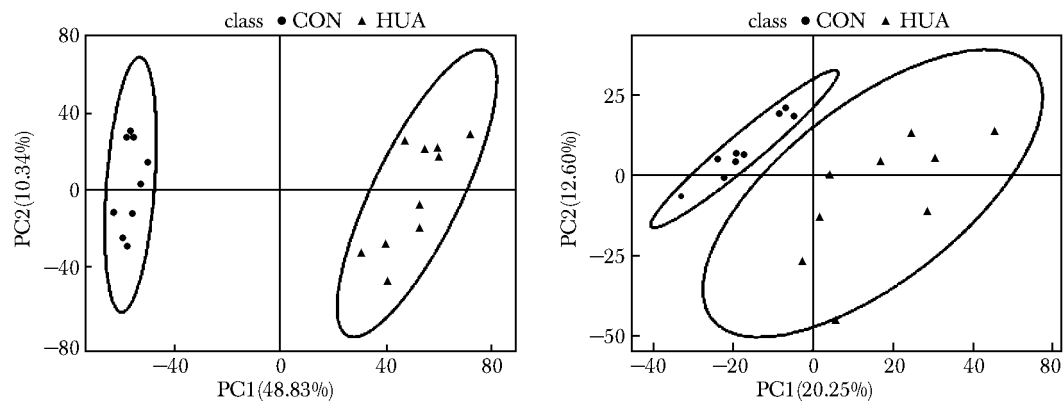


图2 正离子(A)和负离子(B)模式下HUA组与对照组PCA得分图

Fig 2 PCA scores scatter plot in positive ion (A) and in negative ion (B) scan modes of rats from CON group and HUA group

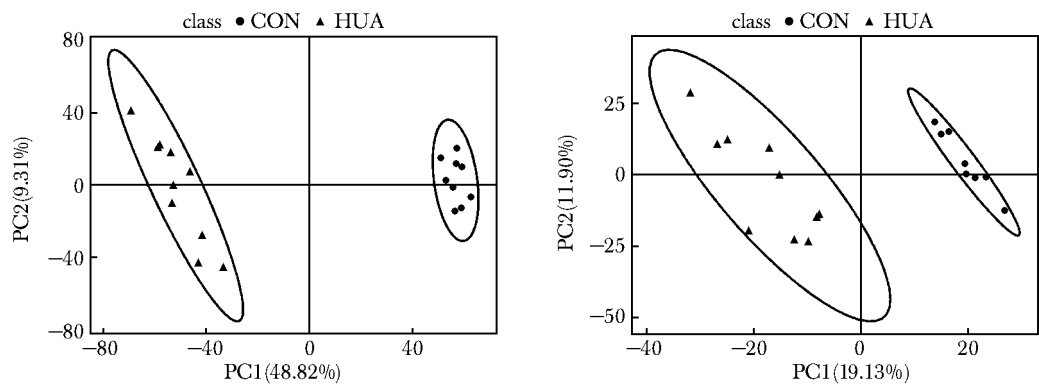


图3 正离子(A)和负离子(B)模式下HUA组与对照组PLS-DA得分图

Fig 3 PLS-DA scores scatter plot in positive ion (A) and in negative ion (B) scan modes of rats from CON group and HUA group

表2 高尿酸血症大鼠的血清代谢谱

Table 2 Serum metabolomic profile of HUA rats

method	tR/(t/min)	m/z	formula	metabolite	fold change	related pathway
ESI+	3.47	137.0452	C ₅ H ₄ N ₄ O	hypoxanthine	0.59 *	purine metabolism
	0.96	141.0400	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	allantoin	1.46 *	purine metabolism
	0.59	114.0658	C ₄ H ₇ N ₃ O	creatinine	2.46 *	arginine and proline metabolism
	7.12	302.3048	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	stearic acid	2.82 *	fatty acid metabolism
	6.61	274.2738	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	palmitic acid	1.55 *	fatty acid metabolism
	0.60	125.0139	C ₂ H ₇ NO ₃ S	taurine	1.33 *	bile acid metabolism
	5.41	231.0747	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	kynurenine	1.32 *	tryptophan metabolism
	3.81	227.0791	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	tryptophan	0.78 *	tryptophan metabolism
ESI-	0.63	167.0196	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	uric acid	1.64 *	purine metabolism
	4.20	178.0495	C ₉ H ₉ NO ₃	hippuric acid	2.70 *	phenylalanine metabolism
	3.96	212.0008	C ₈ H ₇ NO ₄ S	indoxyl sulfate	4.31 *	tryptophan metabolism
	4.68	187.0056	C ₇ H ₈ O ₄ S	p-cresol sulfate	5.61 *	microbial metabolism
	9.59	522.3549	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	lysoPC(18:0)	0.48 *	glycerolphospholipid metabolism
	9.15	509.3496	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	lysoPC(17:0)	0.45 *	glycerolphospholipid metabolism

* q-value<0.05 compared with CON.

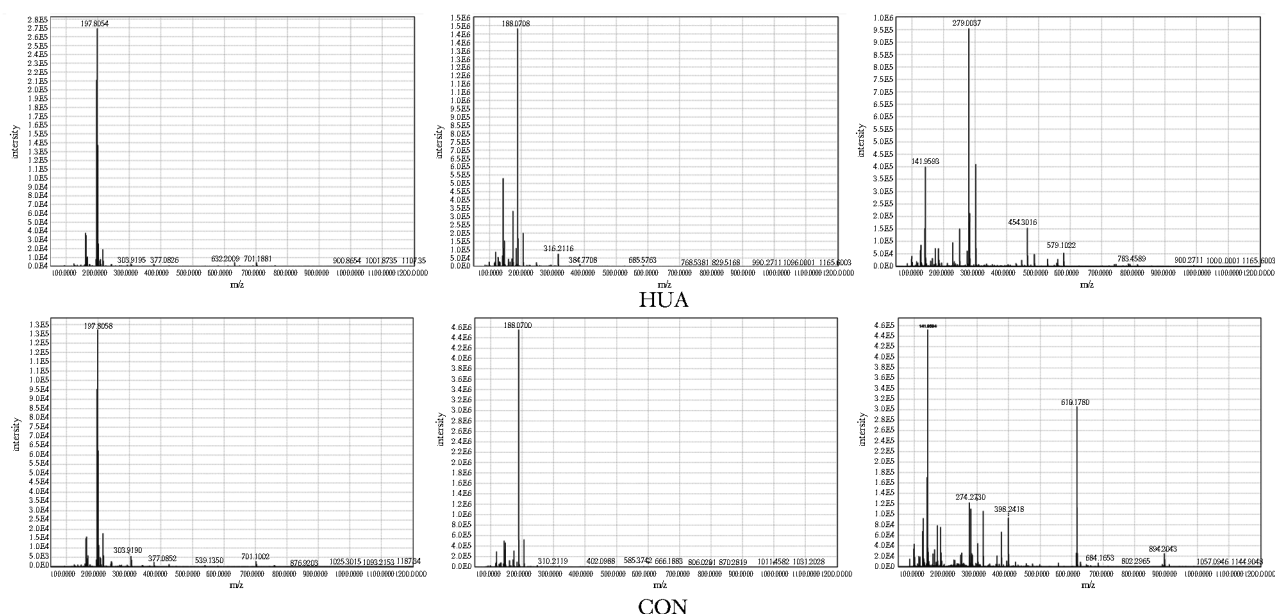


图4 模型组(上)与对照组(下)差异代谢物的典型二级质谱峰图

Fig 4 Typical secondary mass spectrometry peak of differential metabolites between HUA group (up) and CON group (down)

(XOD)是催化次黄嘌呤及黄嘌呤逐步转化为尿酸的唯一限速酶。HUA 组大鼠 XOD 活性升高及尿酸前体水平降低提示在 HUA 组大鼠中嘌呤代谢过度激活,尿酸生成增多。

HUA 组大鼠与对照组相比色氨酸水平降低,犬尿氨酸及硫酸吲哚酚等色氨酸的下游代谢产物水平升高;提示,高尿酸血症与色氨酸代谢紊乱相关。已有报道高尿酸血症可能通过抑制多药耐药蛋白 4 和耐药乳腺癌蛋白影响色氨酸代谢^[5]。血肌酐水平升高表明高尿酸血症引起大鼠肾脏损害。此外,硫酸吲哚酚和硫酸对甲酚作为肠源性尿毒素毒症,其水平的增加进一步提示,HUA 组大鼠存在肾脏功能损伤及肠道微生态的改变^[6]。马尿酸作为菌群失衡的生物标志物^[7],HUA 组大鼠中其水平降低提示 HUA 组大鼠中肠道菌群失衡

及菌群代谢异常。

以往研究发现高尿酸血症与胰岛素抵抗密切相关^[8],与本研究结果一致,HUA 组中 FBG、FINS 和 HOMA-IR 均高于对照组。高胰岛素血症抑制尿酸的排泄,高尿酸血症与胰岛素抵抗之间存在相互促进作用^[9]。本研究发现,HUA 组中棕榈酸及硬脂酸水平升高。棕榈酸和硬脂酸被认为是引起炎症反应、内质网应激和胰岛素抵抗的重要原因^[10]。结合血清炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平升高,表明高尿酸血症引起大鼠胰岛素抵抗及氧化应激水平增加。脂质代谢异常是与高尿酸血症相关的代谢特征^[11]。本研究结果也显示高尿酸血症大鼠溶血磷脂酰胆碱(LPC)(17:0)和 LPC(18:0)显著下降。提示,尿酸升高导致脂质代谢紊乱,可能与心血管疾病相关^[12]。

参考文献:

- [1] Liu R, Han C, Wu D, *et al.* Prevalence of hyperuricemia and gout in mainland China from 2000 to 2014: A systematic review and meta-analysis[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 762820.doi:10.1155/2015/762820.
- [2] 苗志敏,赵世华,王颜刚,等. 山东沿海居民高尿酸血症及痛风的流行病学调查[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006: 421-425.
- [3] Wang Z, Lin Y, Liu Y, *et al.* Serum uric acid levels and

- outcomes after acute ischemic stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53: 1753-1759.
- [4] Luan H, Wang X, Cai Z. Mass spectrometry-based metabolomics: Targeting the crosstalk between gut microbiota and brain in neurodegenerative disorders[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2017: 1-12.
- [5] Dankers AC, Mutsaers HA, Dijkman HB, *et al*. Hyperuricemia influences tryptophan metabolism via inhibition of multidrug resistance protein 4 (MRP4) and breast cancer resistance protein (BCRP) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832: 1715-1722.
- [6] Dou L, Bertrand E, Cerini C, *et al*. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair [J]. *Kidney Int*, 2004, 65: 442-451.
- [7] Calvani R, Miccheli A, Capuani G, *et al*. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2010, 34: 1095-1098.
- [8] Richette P, Poitou C, Manivet P, *et al*. Weight Loss, xanthine oxidase, and serum urate levels: A prospective longitudinal study of obese patients[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2016, 68: 1036-1042.
- [9] Kim TH, Lee SS, Yoo JH, *et al*. The relationship between the regional abdominal adipose tissue distribution and the serum uric acid levels in people with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2012, 4: 3-4.
- [10] Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, *et al*. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study [J]. *The Lancet Diabetes Endo*, 2014, 2: 810-818.
- [11] 张淑丽, 王怡萍, 杜振霞, 等. 基于 UPC~2-Q/TOF-MS 技术的果糖诱导高尿酸血症大鼠血清脂质代谢组学研究[J]. *中国中药杂志*, 2016: 1135-1139.
- [12] Xu Q, Zhang M, Abeysekera IR, *et al*. High serum uric acid levels may increase mortality and major adverse cardiovascular events in patients with acute myocardial infarction[J]. *Saudi Med J*, 2017, 38: 577-585.

新闻点击

全球暖化将导致米饭营养流失

据英国《BBC 新闻》(BBC NEWS)2018-05-24 报道,科学家 5 月 23 日提醒,燃烧化石燃料导致二氧化碳(CO₂)排放量增加情况下,米将丧失部分蛋白质和维生素含量,使得数以百万计民众面临营养不良风险。

这项刊登在“科学进展”(Science Advances)期刊的报告指出,这项变化对以米饭为主食的东南亚冲击尤其严重。

研究的共同作者、美国华盛顿大学(University of Washington)流行病学教授德鲁诺斯基(Adam Drewnowski)说:“我们发现全球暖化、气候变迁、特别是温室气体 CO₂,会影响我们吃的植物的营养含量。”

这项研究是根据日本和中国的实地调查,模拟到了本世纪下半叶大气中的 CO₂ 浓度,预估达 568 至 590 ppm。目前刚刚超过 400 ppm。实验中,将 18 种不同品种的水稻种在开放田地,这块区域外用 17 m 宽的八边形塑胶管围住,释放额外的 CO₂。研究人员发现,生长在 CO₂ 浓度高的环境下,米内含的铁、锌、蛋白质和维生素 B₁、B₂、B₅ 和 B₉ 全都减少,这些营养成分有助身体将食物转换成能量。

与现在的 CO₂ 环境相比,蛋白质含量平均下降 10.3%,铁下降 8%,而锌下降 5.1%。维生素 B6 和钙未受影响,且多数品种的维生素 E 增加。

研究指出,CO₂ 多寡会影响植物结构和生长、增加碳水化合物含量以及减少蛋白质和矿物质含量。

研究人员表示,CO₂ 浓度越高意味着接触氮越少,这也会影响维生素含量。

刘晓荻 译
王欣 编