

基于 LCMS-IT-TOF 的代谢组学方法研究大鼠血清中 TNBS 诱导急性结肠炎的潜在标志物

LCMS-IT-TOF-038

摘要：本文建立了一种使用岛津的 LCMS-IT-TOF 进行从血清代谢指纹中筛选潜在标志物的方法，该方法系统地描述了从数据采集、数据集预处理、模式识别到潜在标志物筛选的过程。利用 LCMS-IT-TOF 进行数据采集，结合 Profiling solution 代谢组学软件处理数据，然后导入统计分析软件建立 OPLS 模型，来表明急性肠炎大鼠与健康大鼠的代谢存在明显差异，经过模型识别、多级质谱结构鉴定以及代谢组学库比对等，确认 8 种化合物为潜在标志物。

关键词：大鼠血清 TNBS 急性结肠炎代谢组学 LCMS-IT-TOF

代谢组学是通过考察生物体系受刺激或扰动后其代谢产物的变化，揭示机体生命代谢活动的本质的科学，与基因组和蛋白质组学不同，代谢组学的研究对象是分子质量小于 1000 的所有内源性代谢物。

据估计，人体中各类内源性小分子代谢物成千上万。体液中各种代谢物的浓度范围和物理化学性质差异很大，目前没有一种分析技术能对体液中所有的代谢物进行分析。NMR、质谱与多种分离手段联用成为代谢组学中的重要分析工具，如：液相色谱-质谱联用(LC-MS)、气相色谱-质谱联用等。从代谢组学分析产生的海量数据中发现潜在标志物，需要借助多变量模式识别方法。无师监督的模式识别方法包括主成分分析(PCA)、聚类分析(HCE)等，有师监督的方法包括判别分析(DA)、偏最小二乘分析(PLS)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)，正交校正的偏最小二乘分析(OPLS)等。当变量数量远

大于样品数量时，PLS 或 PLS-DA 模型容易过拟合。根据模式识别模型抽提出对分类有重要贡献的化合物后，还需要进一步验证这些化合物的差异性。

近年来，急性结肠炎(IBD)的发病率不断增加，但是对其确切病因尚不清楚。目前 IBD 的诊断主要依赖于侵入性方法，如内窥镜；但是这通常限制了早期诊断与治疗。而采用代谢组学的方法可以筛查出影响该病的潜在标志物，这将为发展非侵入性和敏感的诊断方法提供有用的数据参考。

本文以患有急性结肠炎大鼠血清样本为例，以离子阱飞行时间质谱系统为分析平台，使用 Profiling solution 软件对数据进行处理，再运用 Simca-P 软件作为统计分析手段，描述利用代谢组学技术从代谢指纹图谱中发现潜在标志物的方法。可供相关研究人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超快速液相色谱仪与离子阱-飞行时间串联质谱仪联用系统。具体配置为 LC-20ADXR×2(输液泵)，DGU-20A₃(在线脱气机)，SIL-20AC(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，CBM-20A(系统控制器)，LCMS-IT-TOF(离子阱-飞行时间串联质谱仪)，LCMSsolution Ver. 3.6(色谱工作站)，Profiling solution (代谢组学分析软件)，Simca-P (统计分析软件)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：UFLCXR 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm×150 mm, 2.2 μm)

流动相：A 相：0.1 % 甲酸

B 相：乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	5
3.00	Pumps	Pump B Conc.	25
15.00	Pumps	Pump B Conc.	95
17.00	Pumps	Pump B Conc.	95
17.50	Pumps	Pump B Conc.	5
20.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-IT-TOF

离子源：ESI，正负离子同时扫描

扫描范围：MS¹：m/z 100-1000；

加热模块温度：200°C

CDL 温度：200°C

雾化气流速：1.5 L/min

干燥气流速：10 L/min

离子源电压：+4.5 kV，3.5kV

检测器电压：1.60 kV

离子累积时间：50 ms

校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数

1.3 样品制备

1.3.1 样品采集

采用大鼠眼眶静脉丛取血的方法进行血样采集，每只大鼠采集 1.5 mL 血液，新鲜采集的血液收集在含 100 μL 1% 肝素钠的 EP 管中，于 3500 g 离心 10 min 分离血浆。

1.3.2 样品的前处理

血样收集后立即于 3500g 离心 10 分钟分离血浆（-80°C 的话冰上解冻），准确取 200μL 移入 2 mL EP 管后加入 10 μL DL-2-chlorophenylalanine (0.1mg/mL) 内标，再加入 800 μL 提取溶剂（甲醇 - 乙腈 - 丙酮，1:1:1）涡旋 30s，于 10000 rpm 4°C 离心 15 分钟，分离上清于氮气吹干，加入 80 μL 甲醇及 20μL 纯净水溶解后，10000 rpm 4°C 离心 20 min，上清移至新瓶，氮气密封，备用。

样品共两组：一组是控制组（20 个样品），指没有得病大鼠，一组是 TNBS 模型组（20 个样品），指喂食 TNBS 药物后得急性肠炎的大鼠。

结果讨论

2.1 样品的色谱图

控制组和 TNBS 模型组的色谱图如下：

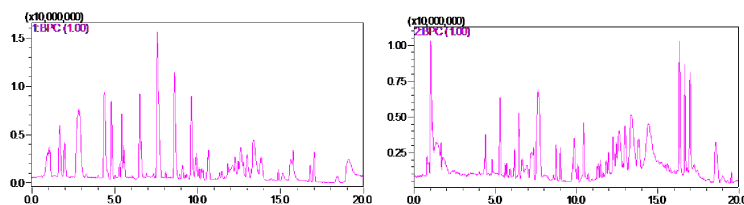


图 1 控制组的 BPC 色谱图（左图为正模式，右图为负模式）

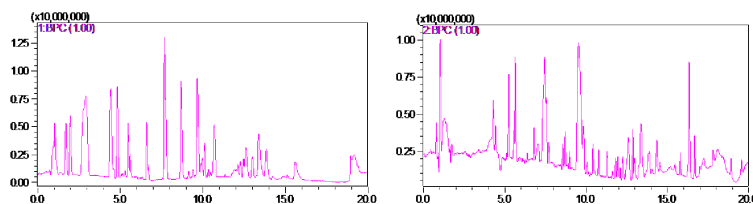


图 2 TNBS 模型组的 BPC 色谱图（左图为正模式，右图为负模式）

2.2 精密度实验

针对两组样品，在样品采集时就准备了质控样(QC 样品)。以 QC 样来监控数据采集的稳定性，每 10 针样品进行一次 QC 样品，得到的精密度数据如表 2。

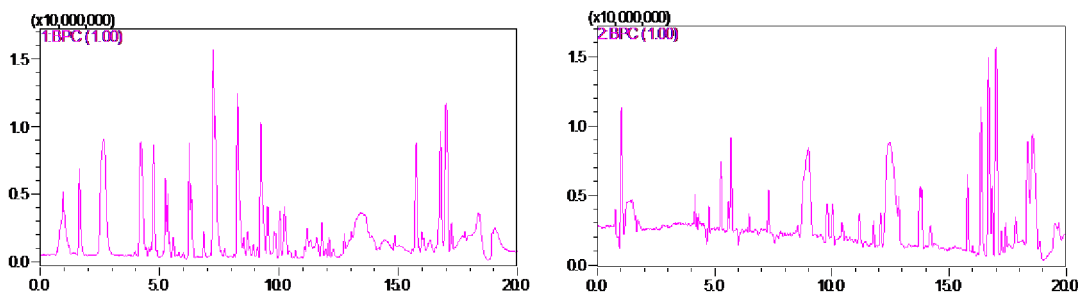


图 3 QC 样品的 BPC 色谱图 (左图为正模式, 右图为负模式)

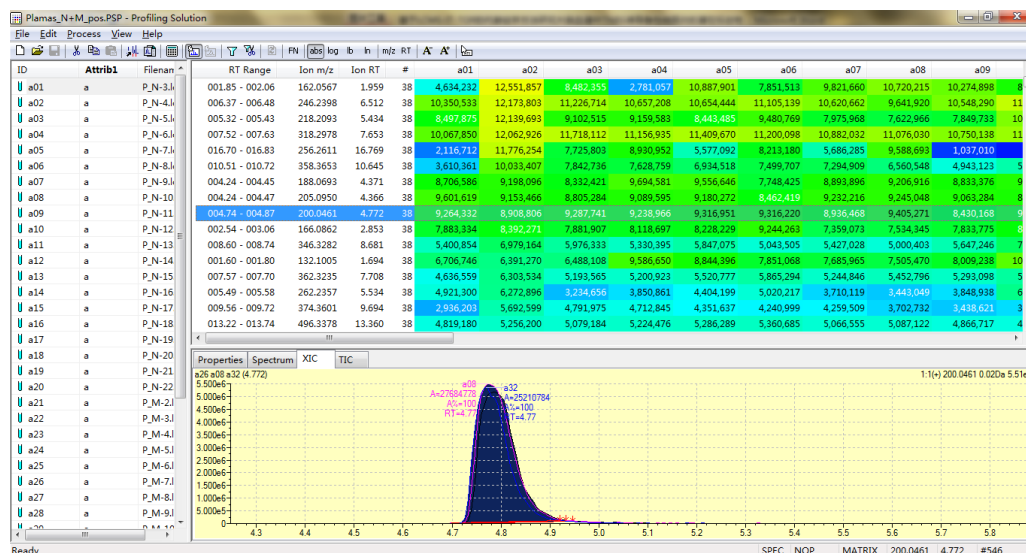
表 2 分析方法的精密度 (n=8)

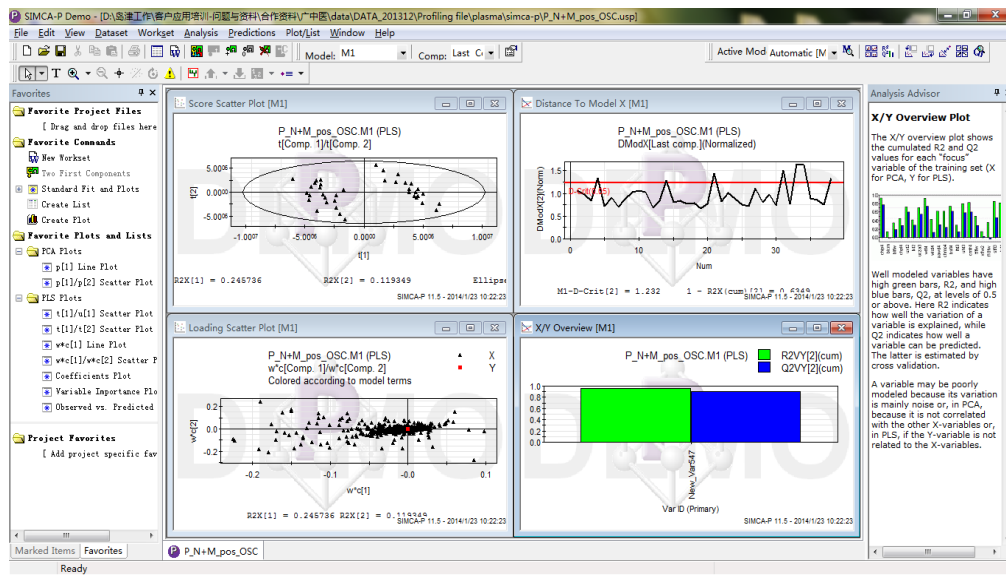
NO	名称	相对标准偏差 RSD%		
		R.T	m/z	Area
1	2-氯苯丙氨酸	0.23	2.61E-04	1.77
2	苯乙酰甘氨酸	0.20	4.04E-04	3.53
3	对甲酚葡萄糖苷酸	0.19	1.03E-04	0.91
4	LysoPC(16:0)	0.07	1.76E-04	3.95

从表 2 可知: 保留时间的 RSD % < 1 %, 质荷比的 RSD % < 5 E-04, 峰面积的 RSD % < 5 %; 分析方法的精密度良好。

2.3 统计分析结果

将两组的共 40 个样品数据经 Profiling solution 代谢组学分析软件处理后, 然后导入 Simca-P 统计分析软件进行分析。





使用 Simca-P 软件建立 OPLS 模型，区分 TNBS 作用的患病组和健康对照组，进而筛选出潜在标志物。具体结果如表 3。

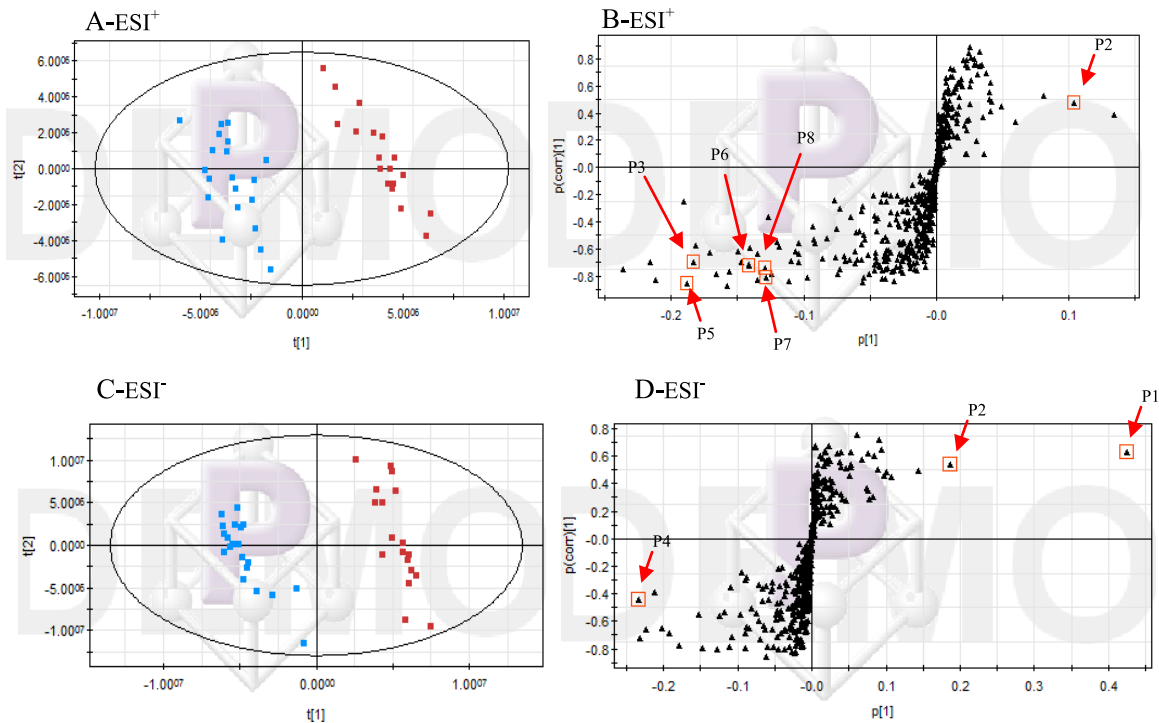


图4 样品的 OPLS 图和 S-plot

(A 和 B 图分别是正模式的 OPLS 图和 S-plot 图, C 和 D 图分别是负模式的 OPLS 图和 S-plot 图, 其中 A 和 C 图中 ■ 表示正常组, ■ 表示模型组)

表 3 潜在标记物

No.	Ion mode	R.T(min)	m/z	VIP 值	P值	强度变化	分子式	化合物
P1	ESI ⁻	5.645	283.0823	8.03	4.25E-04	↑	C ₁₃ H ₁₆ O ₇	p-cresol glucuronide
P2	ESI ⁻	5.562	192.0681	3.37	4.49E-03	↑	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	Phenylacetylglucine ^a
	ESI ⁺	5.567	194.0802	2.22	5.27E-03	↑		
P3	ESI ⁺	3.291	232.1514	3.57	1.21E-03	↓	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	Butyrylcarnitine
P4	ESI ⁻	16.67	303.2321	6.82	2.05E-02	↑	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Arachidonic acid
P5	ESI ⁺	12.979	496.3377	3.97	1.78E-05	↑	C ₂₄ H ₅₀ O ₇ NP	LysoPC(16:0)
P6	ESI ⁺	15.615	524.3690	3.23	4.86E-04	↑	C ₂₆ H ₅₄ O ₇ NP	LysoPC(18:0)
P7	ESI ⁺	12.246	520.3371	2.66	2.34E-05	↑	C ₂₆ H ₅₀ O ₇ NP	LysoPC(18:2)
P8	ESI ⁺	13.832	522.3536	2.55	1.05E-03	↑	C ₂₆ H ₅₂ O ₇ NP	LysoPC(18:1)

注：“a”：表示已用标准物质确认；

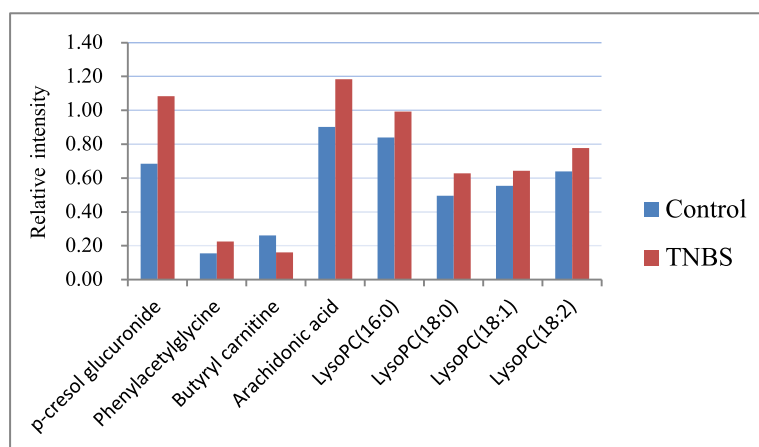


图 5 比较两组中潜在化合物的差异

2.4 识别潜在标志物

将统计分析筛查出的有差异性的可能物质 m/z 放到 Metlin 药物代谢数据库进行搜索，然后根据 MSⁿ 质谱图来进一步推测出可能物质的结构信息；最后结合药理以及代谢规律等信息来最终判断出可能的潜在标志物。

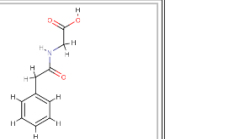
METLIN ID	MASS	Δppm	NAME	MS/MS	STRUCTURE
4237	[M+H] ⁺ m/z 194.0812 M 193.0739	7	Phenylacetylglucine Formula: C ₁₀ H ₁₁ NO ₃ CAS: 500-98-1	View	

图 6 P2(m/z 194.08) Metlin 库搜索出的结果

P2 多级质谱图

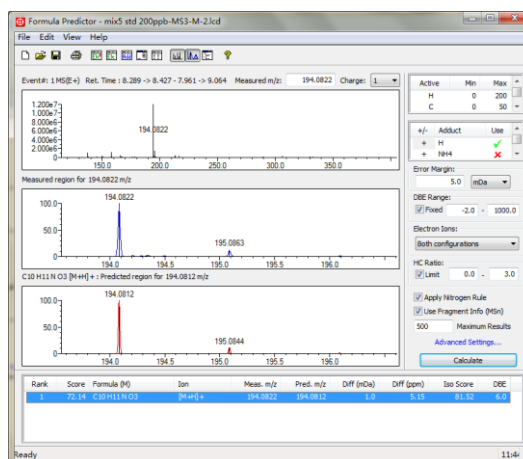
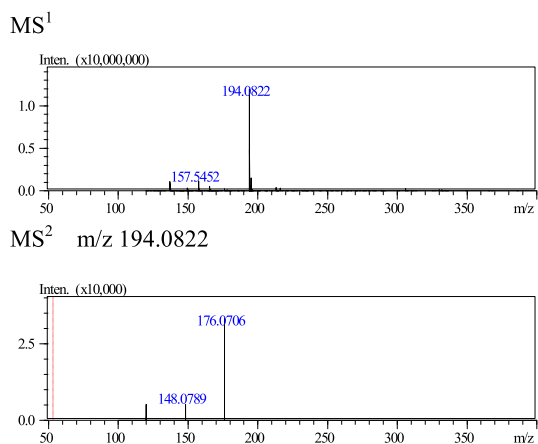


图 7 P2(m/z 194.08) 多级质谱图的预测结果

由图 6 和图 7 内容可推测出 P2 化合物可能是 Phenylacetylglucine，最后用标样确认是该化合物。

Phenylacetylglucine (苯乙酰甘氨酸) 是一种肠道微生物共代谢物，其水平增加可能会干扰肠道菌群平衡中发挥作用。因此，可能成为研究肠道疾病的潜在标志物。

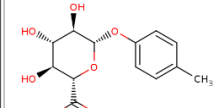
METLIN ID	MASS	Appm	NAME	MS/MS	STRUCTURE
62424	[M-H] ⁻ m/z 283.0823 M 284.0896	0	p-Cresol glucuronide Formula: C ₁₃ H ₁₆ O ₇ CAS:	NO	

图 8 P1(m/z 283.08) Metlin 库搜索出的结果

P1 多级质谱图

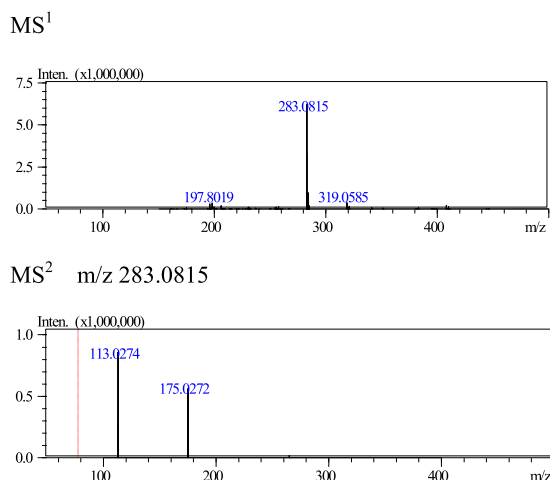
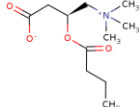
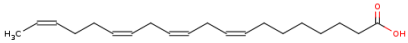
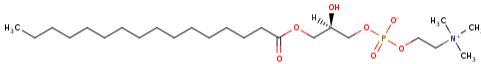
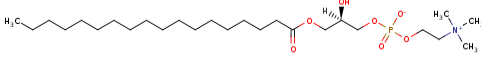
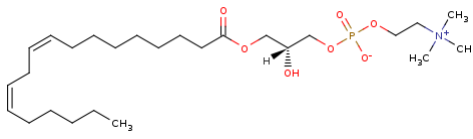
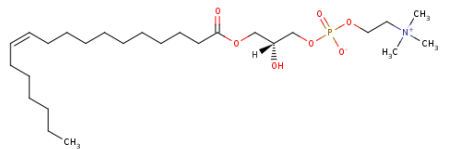


图 9 P1(m/z m/z 283.08) 多级质谱图的预测结果

根据图 8 和图 9 内容推测 P1 可能是 p-cresol glucuronide。此化合物作用与 P1 类似，可能成为研究肠道疾病的潜在标志物。

其他物质的 Metlin 库搜索出的结果如下：

MASS	NAME	STRUCTURE
P3 [M+H] ⁺ <u>m/z</u> 232.1543 M 231.1471	Butyryl -L-carnitine Formula: C11H21NO4 CAS: 25576-40-3	
P4 [M-H] ⁻ <u>m/z</u> 303.2329 M 304.2402	8Z,11Z,14Z,18Z -eicosatetraenoic acid Formula: C20H32O2 CAS:	
P5 [M+H] ⁺ <u>m/z</u> 496.3398 M 495.3325	LysoPC(16:0) Formula: C24H50NO7P CAS:	
P6 [M+H] ⁺ <u>m/z</u> 524.3711 M 523.3638	LysoPC(18:0) Formula: C26H54NO7P CAS:	
P7 [M+H] ⁺ <u>m/z</u> 520.3398 M 519.3325	LysoPC(18:2(9Z,12Z)) Formula: C26H50NO7P CAS:	
P8 [M+H] ⁺ <u>m/z</u> 522.3554 M 521.3481	LysoPC(18:1(11Z)) Formula: C26H52NO7P CAS:	

P5-P8 为溶血磷脂酰胆碱类物质，他们具有一定的促炎特性，LysoPCs 水平上调结果与急性结肠炎存在一定的粘膜炎症相一致。

结论

使用岛津的 LCMS-IT-TOF 建立了一个从血清代谢指纹中筛选潜在标志物的方法，该方法系统地描述了从数据采集、数据集预处理、模式识别到潜在标志物筛选的过程。通过 OPLS 方法建立的模型表明急性肠炎大鼠与健康大鼠的代谢存在明显差异，同时该模型能对未知样品进行正确分类，8 种化合物经过筛选被确认为潜在标志物，8 种物质分别为 Phenylacetylglycine、p-cresol glucuronide、Butyryl-L-carnitine、8Z,11Z,14Z,18Z-eicosatetraenoic acid 以及 4 个溶血磷脂酰胆碱 (PC16:0, PC18:0, PC18:2, PC18:1)。