

全谱二维液相-QTOF 系统用于大鼠抑郁症的非靶向代谢组学研究

LCMS-QTOF-031

摘要: 本文利用全谱二维液相系统结合四极杆-飞行时间质谱对抑郁症大鼠血浆进行了非靶向代谢组学分析。基于全谱二维液相系统,共找到 8083 个特征峰,其中第一维 2713 个,第二维 5370 个。正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)表明正常组与模型组有显著差异,共找到 247 种变量投影重要性(VIP)大于 1 的候选差异性代谢物,经数据库比对鉴定出 44 种,主要包括 39 种脂质、2 种氨基酸、3 种生物碱,主要影响的通路包括甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷氨酸代谢等。

关键词: 全谱二维液相 四极杆-飞行时间质谱 非靶向代谢组学 抑郁症

抑郁症(depression)是当前造成非致死健康损失的最主要因素,重度抑郁症是致残率最高的疾病之一。据统计,全球有 3.22 亿人口患有抑郁症,占总人口的 4.4%,中国和印度是患者最为集中的地区。据调查,2010-2019 年中国老年人抑郁症患病率高达 26%,2015-2019 年中国产妇产后抑郁症检出率为 15%。抑郁症对患者及其家庭影响巨大,患病率持续上升,引起了越来越多的社会关注。

目前抑郁症的病理机理并不明确,在研究方面有不少病因假说,较为公认的有细胞因子假说、单胺假说、神经可塑性假说。尽管关于抑郁症的病因存在不少假说,但是这些假说都有其局限性,不能完全解释清楚抑郁症的发生。因此,仍然需要开展更多的研究来揭示抑郁症。

代谢组学是研究特定生物体系中整体代谢物水平及其变化规律的独立学科,是疾病研究的重要手段之一。代谢组学研究中的一大困难是代谢物极性跨度大,难以用一种方法完成分析。本研究利用全谱二维液相系统,可以同时完成高极性和低极性的代谢物分析,大大节省了实验工作量和分析时间。该系统与岛津四极杆-飞行时间质谱 LCMS-9030 结合,可以进行宽极性目标物的非靶向代谢组学全组分研究。

本研究利用全谱二维液相-QTOF 系统,以非靶向代谢组学的工作流程分析了健康大鼠和抑郁症大鼠的血浆样品,发现 44 种差异性代谢物,主要为脂质,此外还有氨基酸、生物碱等代谢产物,主要影响甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷氨酸代谢。

■ 实验部分

1.1 抑郁症大鼠模型构建

采用慢性不可预知轻度应激(Chronic unpredictable mild stress, CUMS)建立抑郁症大鼠模型,建模 28 天,每天随机给予 1-2 种压力源。通过大鼠体重、旷场实验行为学得分、糖水偏好率、高架十字迷宫开放臂滞留时间、强迫游泳实验挣扎行为得分等 5 个指标共同评价抑郁症大鼠模型构建是否成功。

1.2 样品采集及处理

模型建立并评价完成后,采用眼眦静脉采血方式收集大鼠血液于抗凝管,随后将血液离心(4000 rpm, 8 min),小心吸取上层淡黄色血浆于已标记的离心管,用冰盒带回,储存在 -80°C 冰箱。

样品解冻后,取 50 μ L 大鼠血浆,加入 200 μ L 甲醇沉淀蛋白,再加入 50 μ L 异丙醇,涡旋 60 s,在 10°C 下以 14,000 rpm 的转速离心 10 min,取 250 μ L 上清,真空冷冻干燥,50 μ L 异丙醇:水(50:50)复溶,上机分析。正常组与模型组各取 12 份样品进行分析,每份样品各取 10 μ L,均匀混合,制成质量控制(QC)样品。QC 样品在样品分析前连续进样 6 针,之后每分析 6 个样品插入 2 针 QC,通过 QC 样全程监测数据质量。

1.3 仪器

仪器装置由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用,其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱(第一维为 HILIC 亲水作用色谱柱,第二维为 C8 反相色谱柱)、一个定量环、一个高压十通阀构成,检测器为

LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪，具体连接方式及操作流程、原理参考应用报告（《全谱二维液相系统开发及性能验证》）。

全谱二维液相的具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{5R}

输液泵：LC-30AD × 4

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

检测器：SPD-M40

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

十通阀：FCV-36AH

1.4 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：

第一维：SeQuant® ZIC®-cHILIC 150 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm

第二维：Kinetex® 150 mm × 2.1 mm I.D., 2.6 μm

流动相：

第一维：

A：水：乙腈 (95:5) (0.1% 甲酸 + 5 mM 乙酸铵)；

B：乙腈：水 (95:5) (0.1% 甲酸 + 5 mM 乙酸铵)

第二维：

A：水；

B：乙腈：异丙醇 (60:40) (5 mM 乙酸铵)

进样体积：2 μL

流速：0.4 mL/min

柱温：45°C

洗脱方式：梯度洗脱（表 1）

质谱条件

离子源：ESI

加热模块温度：400°C

接口电压：4.00 kV (+), -3.00 kV (-)

接口温度：300°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

扫描模式：MS1 Scan (m/z 50 - 1000)

干燥气：氮气 10 L/min

MS2 DDA (m/z 50 - 1000)

加热气：空气 10 L/min

ID：OFF

脱溶剂管温度：250°C

表 1 液相梯度时间程序

时间 (min)	单元	命令	值
0.00	泵	B.Conc	90
0.00	泵	B.Conc3	20
0.00	柱温箱	CTO.RVR	0
1.50	泵	B.Conc	90
2.00	柱温箱	CTO.RVR	1
18.00	泵	B.Conc3	20
20.00	泵	B.Conc	60
22.00	泵	B.Conc	60
22.00	柱温箱	CTO.RVR	0
22.10	泵	B.Conc	90
35.00	泵	B.Conc3	100

39.50	泵	B.Conc3	100
39.60	泵	B.Conc3	20
40.00	泵	B.Conc3	20
40.00	泵	B.Conc	90
40.00	控制器	Stop	

1.5 数据处理

采用 Signpost MS 软件对谱图数据处理（离子提取、峰对齐、峰匹配、峰强度校正）后，将数据导入 SIMCA 软件进行统计分析，找出差异性代谢物，依据精确 m/z 及 MS^2 谱图在 MS DIAL 及 HMDB 等平台搜索确认代谢物种类，然后在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析。

■ 结果与讨论

2.1 色谱图与色谱峰

血浆样品典型色谱图如图 1 所示。

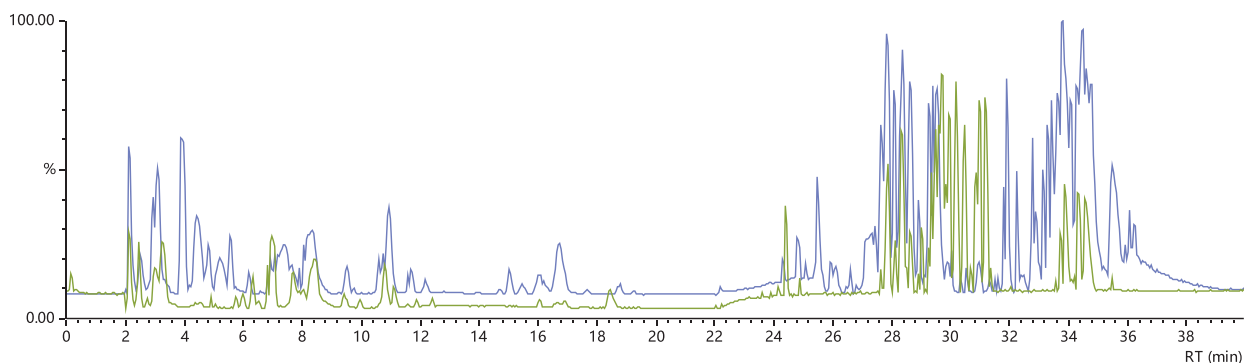


图 1 QC 样品 BPC 图（蓝：正模式；绿：负模式）

所有样品经过峰提取与峰对齐处理后，共得到 8083 个特征峰；经过 80% 规则（在 80% 以上的样品中都有检出）筛选后，还剩 2875 个特征峰；在这 2875 个特征峰中，剔除在 QC 样品中峰面积 $RSD > 30\%$ 特征峰，还剩 2752 个，将这 2752 个特征峰导入 SIMCA 软件，用于统计分析（表 2）。

表 2 血浆样品分析特征峰数

特征峰数	正模式		负模式	
	第一维	第二维	第一维	第二维
初始	1484	3184	1229	2186
80% 规则筛选	568	984	420	923
QC 样 $RSD < 30\%$	551	882	411	908
VIP > 1	45	101	32	69

2.2 差异性代谢物查找

正交偏最小二乘判断分析（OPLS-DA）结果显示，正常组与模型组可以明显地区分，表明抑郁症大鼠与正常大鼠血浆代谢产物有显著差异（图 2）。

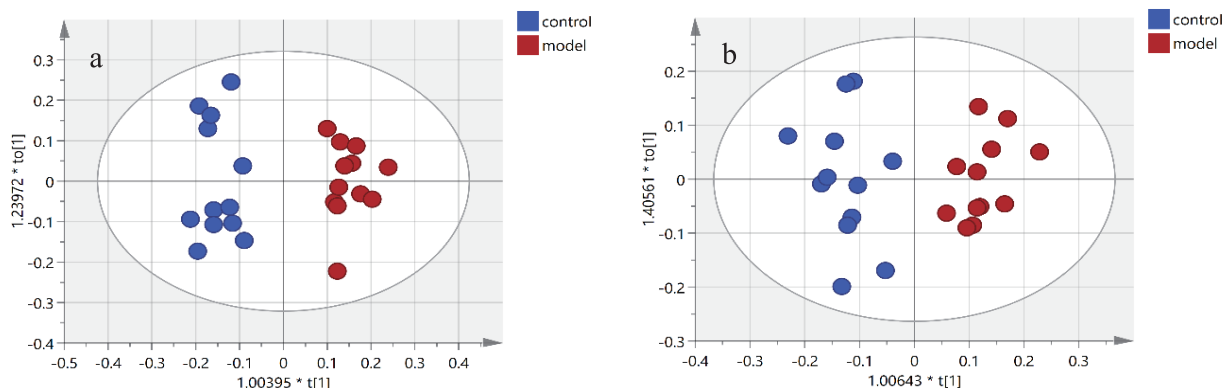


图 2 正常组与模型组 OPLS-DA 得分图 (a: 正模式; b: 负模式)

以交叉验证的方式对上述 OPLS-DA 模型进行验证, 结果表明: 正模式下截距 $R^2=0.594$, $Q^2=-0.475$, 负模式下 $R^2=0.481$, $Q^2=-0.617$, 模型可靠, 没有过拟合 (图 3)。

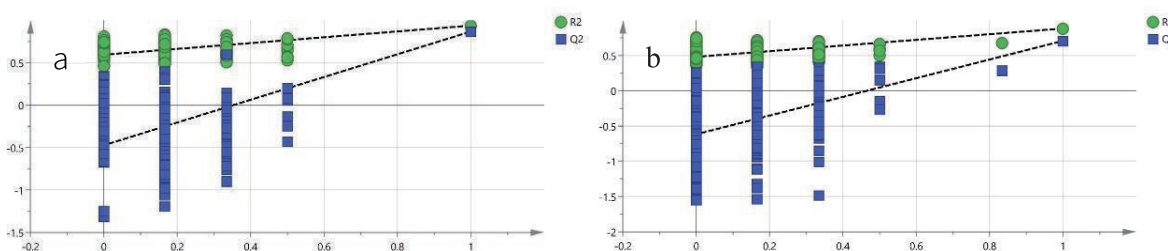


图 3 OPLS-DA 交叉验证结果 (a: 正模式; b: 负模式)

通过变量投影重要性 (variable importance of projection, VIP) 筛选差异性代谢物, 选取 $VIP > 1$ 的特征峰, 二维色谱正负模式下候选差异性代谢物共 247 个 (表 2)。

2.3 差异性代谢物鉴定

将 247 个 $VIP > 1$ 的候选差异性代谢物进行 t 检验, 将 $p < 0.05$ 的物质谱图导入 MS-DIAL 软件, 通过精确 m/z 和 MS^2 谱图匹配进行鉴定 (图 4), 所得结果与 HMDB 平台比对, 共鉴定出 44 种差异性代谢物, 包括 39 种脂质, 此外还有脯氨酸、谷氨酸、肉碱、甜菜碱和脯氨酸甜菜碱; 所有物质质量测定误差 < 3 ppm; 16 种物质浓度水平上调, 另外 28 个浓度下调; 29 个物质 t 检验 $p < 0.01$ (表 3)。

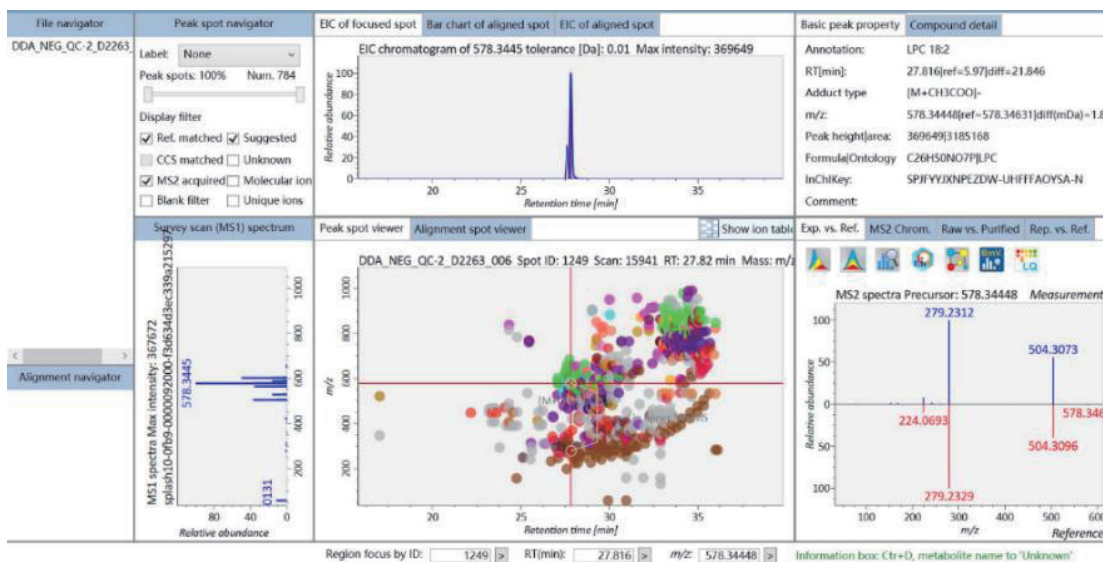


图 4 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

表 3 差异性代谢物鉴定结果表

编号	物质	模式	R.T.(min)	实测 m/z	理论 m/z	误差 (ppm)	上 / 下调 *
1	Proline betaine	+	4.96	144.1013	144.1019	0.59	-↑ ⁺
2	Uric acid	-	7.14	167.0199	167.0210	1.10	-↑ ⁺⁺
3	Proline	+	7.17	116.0698	116.0706	0.78	-↑ ⁺
4	Carnitine	+	7.71	162.1119	162.1125	0.53	-↑ ⁺⁺
5	Glutamic acid	+	12.56	148.0599	148.0600	0.09	↓ ⁺⁺
6	LPC(20:5)	+	27.08	542.3233	542.3241	0.80	-↑ ⁺
7	LPC(20:4)	-	27.77	602.3444	602.3463	1.89	↓ ⁺
8	LPC(18:2)	+	27.89	542.3207	542.3217	0.98	-↑ ⁺⁺
9	LPC(16:0)	+	28.34	518.3209	518.3217	0.80	-↑ ⁺⁺
10	LPC(18:1)	+	28.41	522.3544	522.3554	0.98	-↑ ⁺
11	LPC(17:0)	+	28.90	510.3547	510.3554	0.67	↓ ⁺⁺
12	LPC(20:2)	+	28.91	548.3701	548.3711	0.97	↓ ⁺⁺
13	LPC(18:0)	-	29.23	568.3597	568.3620	2.32	↓ ⁺
14	LPC(20:1)	+	29.66	572.3679	572.3687	0.79	↓ ⁺
15	Oleic acid	-	30.38	281.2484	281.2486	0.19	-↑ ⁺
16	Stearic acid	-	31.11	283.2654	283.2643	1.13	↑ ⁺⁺
17	PC(38:7)	+	32.87	826.5347	826.5357	0.98	-↑ ⁺⁺
18	PC(42:10)	+	32.97	854.5682	854.5694	1.16	↓ ⁺⁺
19	PC(40:8)	+	33.16	830.5688	830.5694	0.61	↓ ⁺⁺
20	PC(37:6)	+	33.22	792.5534	792.5538	0.36	↓ ⁺⁺
21	DG(44:10)	+	33.25	739.5247	739.5272	2.50	-↑ ⁺⁺
22	PC(35:4)	+	33.42	768.5529	768.5538	0.91	↓ ⁺⁺
23	PC(40:7)	+	33.43	832.5840	832.5851	1.10	↓ ⁺⁺
24	PC(38:6)	-	33.52	850.5577	850.5604	2.74	-↑ ⁺⁺
25	PE(34:2)	+	33.65	716.5216	716.5225	0.91	-↑ ⁺
26	PC(42:8)	+	33.65	858.6005	858.6007	0.25	↓ ⁺⁺
27	PC(36:4)	-	33.72	826.5580	826.5604	2.44	↓ ⁺
28	PC(32:1)	+	33.79	732.5530	732.5538	0.73	-↑ ⁺
29	DG(36:3)	+	34.02	641.5119	641.5115	0.43	↓ ⁺⁺
30	PE(38:4)	-	34.07	766.5372	766.5392	2.01	↓ ⁺⁺
31	PC(37:4)	+	34.07	796.5839	796.5851	1.22	↓ ⁺⁺
32	DG(34:1)	+	34.12	617.5133	617.5115	1.84	↓ ⁺⁺
33	DG(36:4)	+	34.13	634.5398	634.5405	0.74	↓ ⁺⁺
34	PC(42:7)	+	34.20	860.6149	860.6164	1.46	↓ ⁺⁺
35	PC(36:2)	-	34.59	830.5893	830.5917	2.38	↓ ⁺⁺
36	TG(60:12)	+	35.62	968.7688	968.7702	1.40	↓ ⁺⁺

37	TG(56:9)	+	35.66	918.7539	918.7545	0.61	↓ ⁺⁺
38	TG(58:10)	+	35.70	944.7702	944.7702	0.00	↓ ⁺⁺
39	TG(54:7)	+	35.72	894.7538	894.7545	0.74	↓ ⁺
40	TG(58:9)	+	35.78	946.7860	946.7858	0.12	↓ ⁺⁺
41	TG(56:7)	+	35.94	922.7846	922.7858	1.22	↓ ⁺
42	TG(58:8)	+	35.95	948.8001	948.8015	1.46	↓ ⁺⁺
43	TG(56:6)	+	36.10	924.8003	924.8015	1.22	↓ ⁺
44	TG(54:3)	+	36.41	902.8168	902.8171	0.25	↓ ⁺

*: ↑上调, ↓下调, + p < 0.05, ++ p < 0.01.

2.4 通路分析

将表 3 中鉴定出的 63 个物质导入 MetaboAnalyst 平台进行通路分析, 发现患抑郁症大鼠主要受影响的代谢通路有甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷氨酸代谢等 (图 5)。

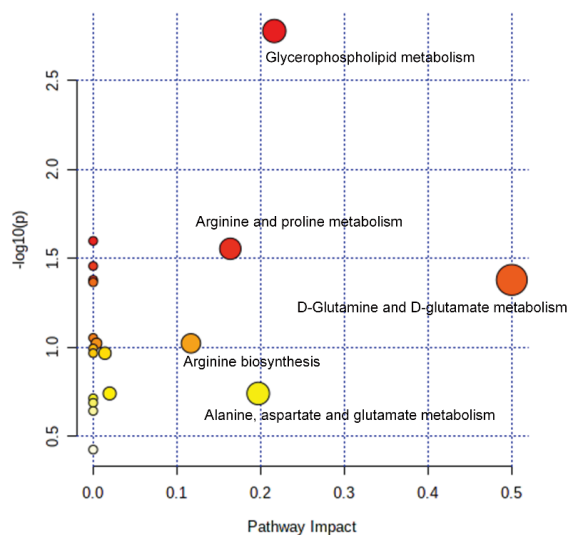


图 5 抑郁大鼠受影响的主要代谢通路

■ 结论

本文利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用, 对抑郁症大鼠血浆进行了非靶向代谢组学研究。全谱二维液相系统扩大了代谢物分析的极性范围, 加上 Q-TOF 的高分辨定性能力, 共找到 8083 个特征峰, 其中 2713 种于第一维亲水相色谱流出, 5170 种于第二维反相色谱流出。OPLS-DA 分析表明, 正常组与模型组血浆成分有显著区别, 利用 VIP 值 >1 筛查到 247 种差异性代谢物, 通过准确 m/z 及 MS² 库搜索鉴定出 44 种, 包括 39 种脂质、2 种氨基酸、3 种生物碱。这些差异性代谢物主要影响甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、谷氨酸代谢等。本研究增进了对抑郁症的认识, 同时表明全谱二维液相系统作为一种有力的工具可帮助研究者一次性分析极性跨度更大的代谢物。

岛津应用云

