

# 岛津 4in1 组学技术对小鼠动脉粥样硬化的代谢组和脂质组学研究

## LCMS-QTOF-078

**摘要：** 本文使用岛津特色产品全谱二维液相 +LCMS-9050，采用宽极性、正负离子同时扫描模式对动脉粥样硬化模型小鼠血浆样本进行了非靶向代谢组学和脂质组学分析。通过对疾病组、对照组和 QC 质控组数据进行单因素（Fold Change 和 T 检验）和多元统计分析（PCA 和 OPLS-DA）筛查差异性代谢物，以及比对 MS<sup>1</sup> 和 MS<sup>2</sup> 谱图共找到 110 个差异成分，涉及氨基酸、溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）、溶血磷脂酰胆碱（LPC）等内源物，为小鼠动脉粥样硬化的代谢组学和脂质组学研究提供应用参考。

**关键词：** 4in1 组学技术 小鼠动脉粥样硬化 代谢组学 脂质组学

### 技术特点：

- ❖ 体现 4 in 1 组学技术特色，适合非靶向代谢组学和脂质组学分析。
- ❖ 结合 MetaboAnalyst、MS DIAL 等多种数据处理方式筛查与鉴定差异性代谢物。

动脉粥样硬化（Atherosclerosis, AS）是一种常见的大动脉疾病，是动脉管壁的一种长期的慢性炎症性疾病，也是动脉硬化的主要原因，是导致动脉壁增厚和失去弹性的疾病。随着世界人口中年龄因素以及越来越多的肥胖患者和糖尿病患者的出现，AS 及其并发症（冠心病）每年导致的人类死亡人数高居不下，严重危害人类健康。因此探寻有效的干预药物对于防治动脉粥样硬化相关疾病具有重要意义。

本文采用岛津 4in1 代谢组学技术，利用全谱二

维和四极杆飞行时间质谱 LCMS-9050 联用系统，对动脉粥样硬化小鼠血浆样本进行宽极性目标物的非靶向代谢组学和脂质组学的全组分研究，共发现 110 个差异性代谢物，包括氨基酸、溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）、溶血磷脂酰胆碱（LPC）等内源物。该技术实现了 1 针分析即可达到传统 4 针分析效果，节省了 3/4 的实验工作量和分析时间，且极大减少质谱负担。本文为 4in1 组学技术的应用提供相关案例参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 动脉粥样硬化小鼠模型构建

以喂食普通饲料小鼠作为对照组，以喂食高脂饲料小鼠作为疾病模型组，喂养 12 周后，进行模型的评价。包括血脂水平检测，ELASA 法检测炎症因子，免疫荧光检测主动脉巨噬细胞的表达，以及 HE 染色，masson 染色评价主动脉病变情况。

### 1.2 样品采集及处理

取 50  $\mu$ L 血浆放入 EP 管中，加入 250  $\mu$ L 预冷的甲醇 / 异丙醇（4:1, v/v），涡旋混匀，放置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱，沉淀蛋白，离心 10 min（13000 rpm, 4 $^{\circ}$ C），取上清液，干燥，加入 100  $\mu$ L 的异丙醇 / 水（1:1, v/v），涡旋复溶，离心取上清液，用于进样分析。各待测物上清液均匀混合，制为 QC 样本，进样分析。

### 1.3 仪器



22.0	泵	B.Conc	60
22.1	泵	B.Conc	90
45.0	控制器	Stop	

表 2 二维液相的时间程序（初始流动相 B 为 20%）

时间 (min)	单元	处理命令	值
24.0	泵	B.Conc3	20
25.0	泵	B.Conc3	70
33.0	泵	B.Conc3	80
35.0	泵	B.Conc3	90
40.0	泵	B.Conc3	90
42.0	泵	B.Conc3	95
43.0	泵	B.Conc3	100
43.1	泵	B.Conc3	20
45.0	控制器	Stop	

表 3 阀切换程序（初始 Oven Valve 2=0）

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.70	柱温箱	Oven Valve 2	1
24.0	柱温箱	Oven Valve 2	0
45.0	控制器	Stop	

#### 质谱条件

离子源：ESI	接口温度：300°C
接口电压：+4.5 kV	DL 温度：250°C
雾化气：氮气 3.0 L/min	加热块温度：400°C
干燥气：氮气 10.0 L/min	扫描模式：MS <sup>1</sup> SCAN (m/z 50-1000)
加热气：空气 10.0 L/min	MS <sup>2</sup> DDA (m/z 50-1000)

#### 1.5 数据处理

① 采用 MS DIAL 软件对原始数据（对照组、疾病组和 QC 组）进行峰提取、对齐，得到 Data Matrix；② 将 Data Matrix 导入 MetaboAnalyst 平台进行数据过滤、归一化处理、单因素统计分析（Fold Change 和 T 检验）、多元统计分析（PCA 和 OPLS-DA），找出差异性特征峰；③ 依据精确 *m/z* 及 MS<sup>2</sup> 谱图在 MS-DIAL 软件及 HMDB 平台搜索确认代谢物种类及生信分析。



图 2 代谢组学数据处理基本思路

## ■ 结果与讨论

### 2.1 不同色谱方法比较

将 QC 样品分别使用 HILIC 方法、RPLC 方法和全谱二维方法分析。由 BPC 色谱图结果显示，RPLC 色谱峰在死时间有较多共流出组分，且低极性组分分离度不佳；HILIC 色谱图上在死时间也同样出现较多共流出组分峰，不利于后续代谢组学分析。全谱二维色谱方法结合了 HILIC 和 RPLC 这两者的优势，将低极性与高极性目标物分别转移至各自适合的色谱体系中进行分离，有效地提高了峰容量与分离度，MS 色谱图见图 5。

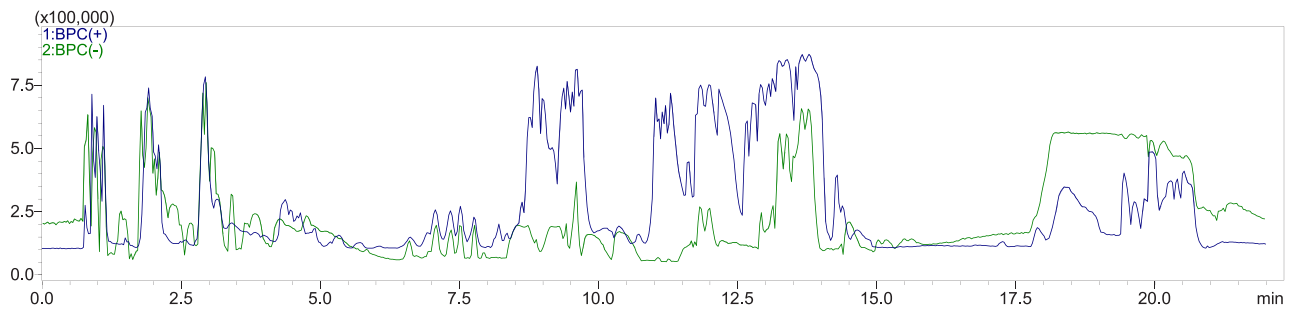


图 3 QC 样品 BPC 色谱图 (HILIC 方法)

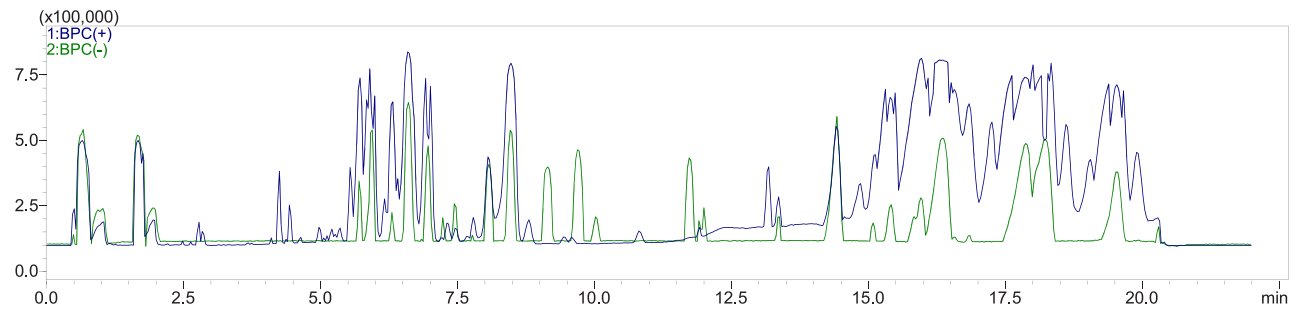


图 4 QC 样品 BPC 色谱图 (RPLC 方法)

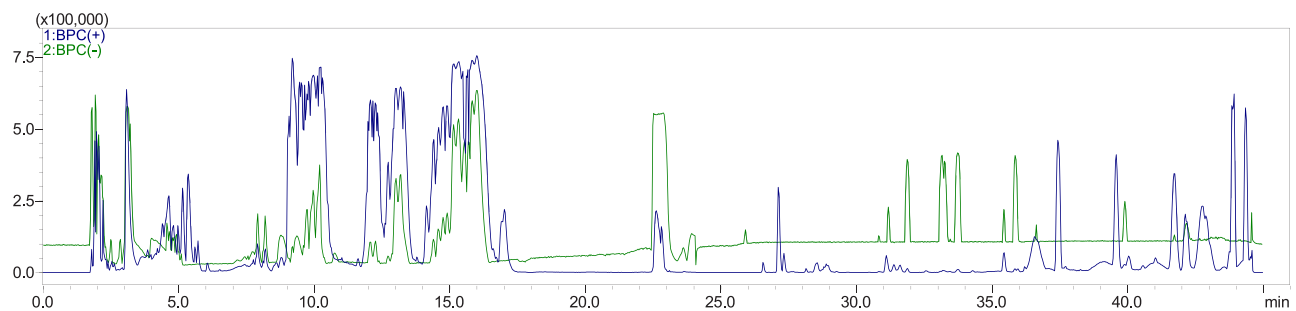


图 5 QC 样品 BPC 色谱图 (全谱二维液质联用方法)

### 2.2 差异性代谢物查找

#### 2.2.1 主成分分析 (PCA)

将对照组、模型组与 QC 质控样品数据导入 MetaboAnalyst 进行主成分分析 (PCA)，结果显示，各组样本之间表现出明显的分离趋势，表明动脉粥样硬化小鼠与正常小鼠血浆代谢产物差异显著；质控组中的平行样本聚集度高，表明仪器状态稳定，测定过程中未出现明显偏差，说明各组血浆代谢产物数据的稳定性较好。

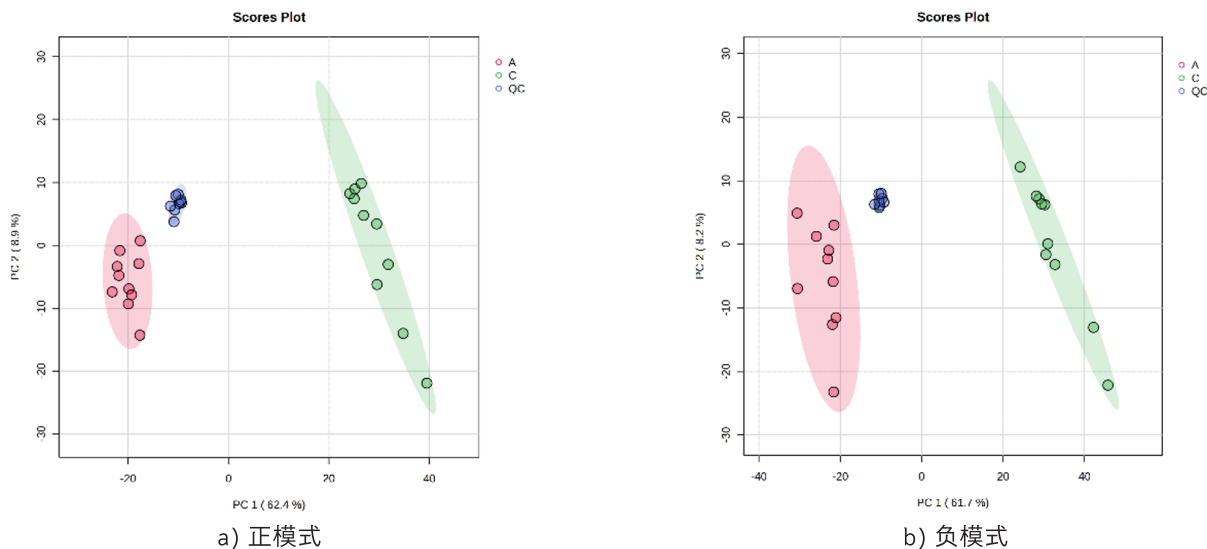


图6 PCA 得分图 (A: 模型组, C: 对照组, QC: 质控)

### 2.2.2 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

对照组与模型组的 OPLS-DA 分析结果如图 7 所示, 模型中各组样品均位于 95% 置信区间内, 2 组样本点间完全分离, 无重叠区域, 区分效果较好, 表明动脉粥样硬化小鼠与正常小鼠血浆代谢产物具有显著差异。

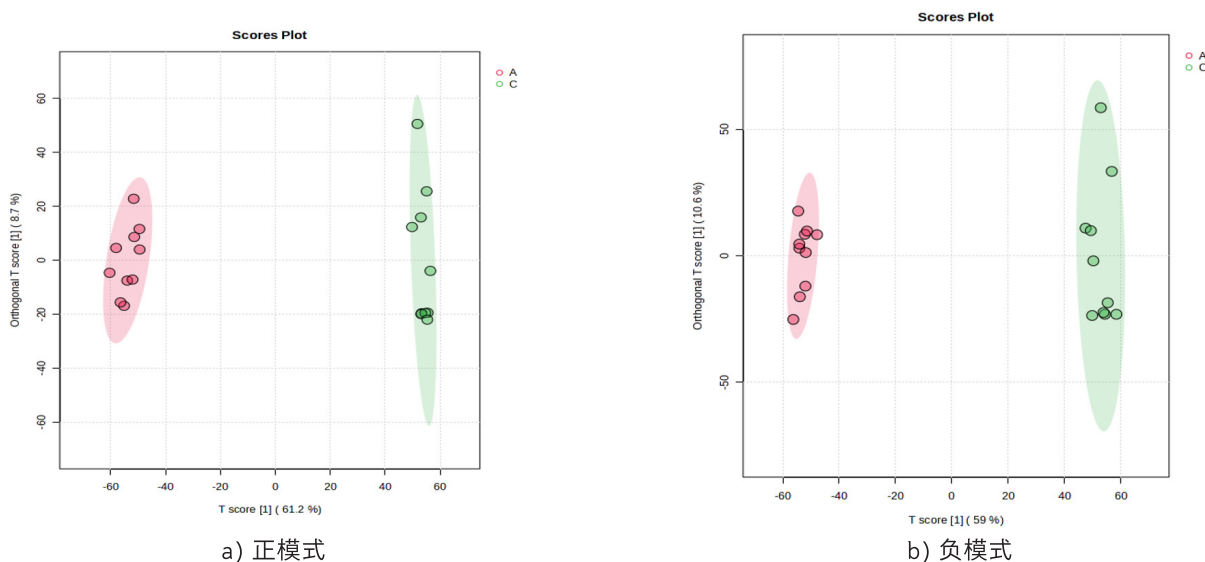


图7 OPLS-DA 得分图 (A: 模型组, C: 对照组)

此外, 模型验证结果见图 8, R2Y 和 Q2 分别代表所建模型的解释率和预测能力, 它们的值越接近于 1 表明模型的拟合度越好, 可信度越高, 正离子模式下 R2Y=0.989, Q2=0.987, 负离子模式下 R2Y=0.982, Q2=0.981, 表明模型稳健可靠。

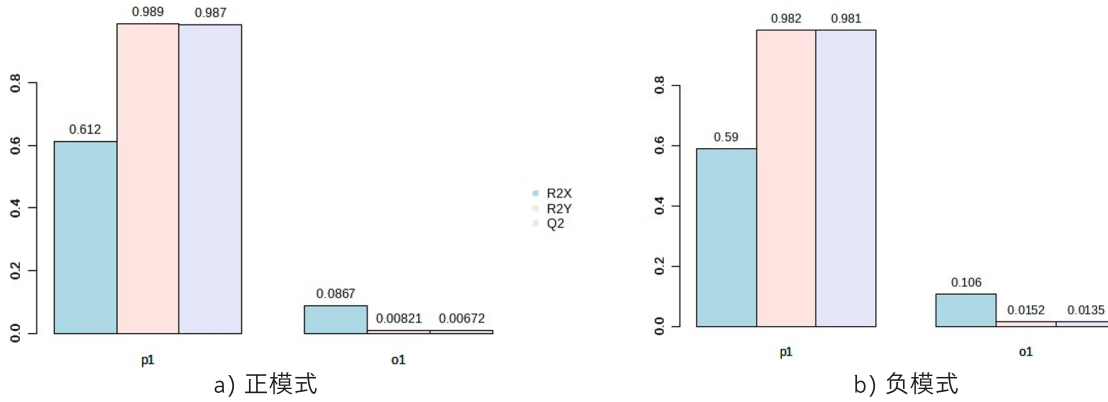


图 8 模型验证图

对模型进行置换检验，通过观察模型在 100 次随机置换检验，绘制置换检验图（图 9）。结果表明，正模式和负模式下 P 值均小于 0.01，模型没有过拟合。

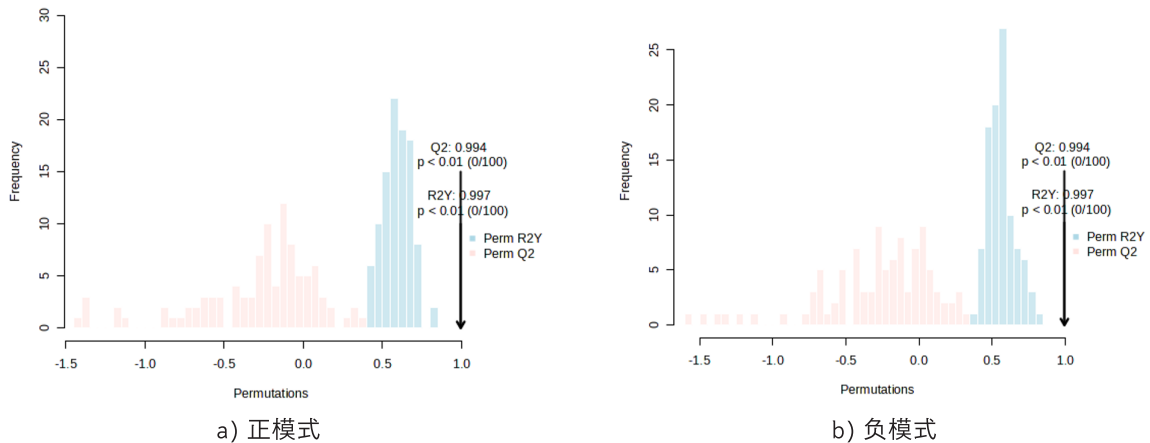


图 9 OPLS-DA 100 次置换检验结果

### 2.2.3 差异代谢物火山图

对正、负模式下检测到的所有离子峰进行差异分析，采用火山图进行可视化展示（图 10），动脉粥样硬化小鼠与正常小鼠在正离子和负离子模式下共筛选出差异表达离子峰分别为 3291 和 3068 个，其中正模式下浓度水平上调的离子峰有 2128 个、下调有 1163 个，负模式上调的有 2050 个、下调的有 1018 个。

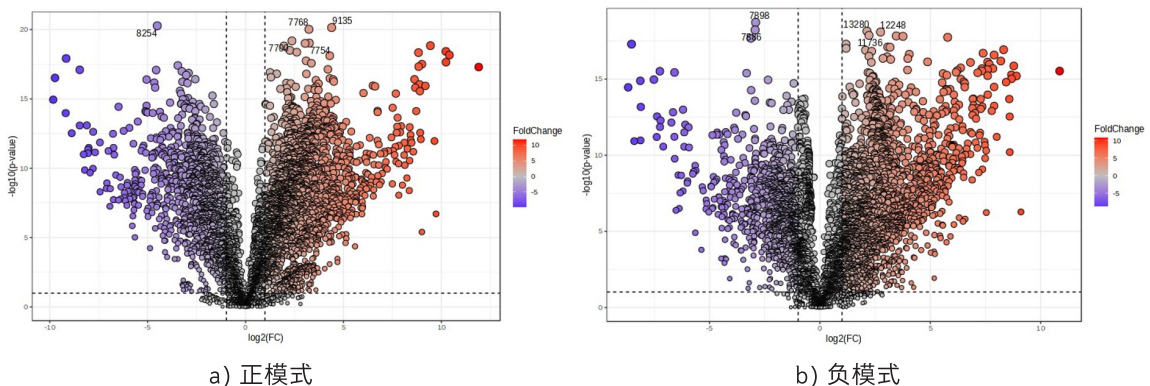


图 10 对照组和模型组的火山图

### 2.2.4 结合单变量和多元统计分析结果筛选差异物

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, 认为对组间差异贡献较大, 是潜在的差异性代谢物。将所有 VIP > 1 的候选差异性代谢物进行单变量统计结果 (P-value 与 Fold change) 筛选, 将 Fold change ≤ 0.5 / Fold change ≥ 2 且 P-value < 0.05 的物质取交集。最终正模式下筛选得到 2692 个差异物质, 负模式下筛选得到 1716 个差异物质, 即认为是本实验中模型组与对照组的差异性代谢物。

### 2.3 差异性代谢物鉴定

使用 MS-DIAL 软件, 通过精确 m/z 和 MS<sup>2</sup> 谱图匹配对得到的差异离子峰进行鉴定 (图 11)。剔除外源性物质等不可能存在于小鼠血浆中的物质, 将所得结果与 HMDB 平台比对, 共鉴定出 110 个差异性代谢物, 包括氨基酸、溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 等内源代谢物, 表 4 为部分差异性代谢物鉴定结果表。相对于对照组, 模型组的 61 种物质浓度水平上调, 另外 49 种物质浓度下调。所有化合物物质荷比测定误差 < 3 ppm。

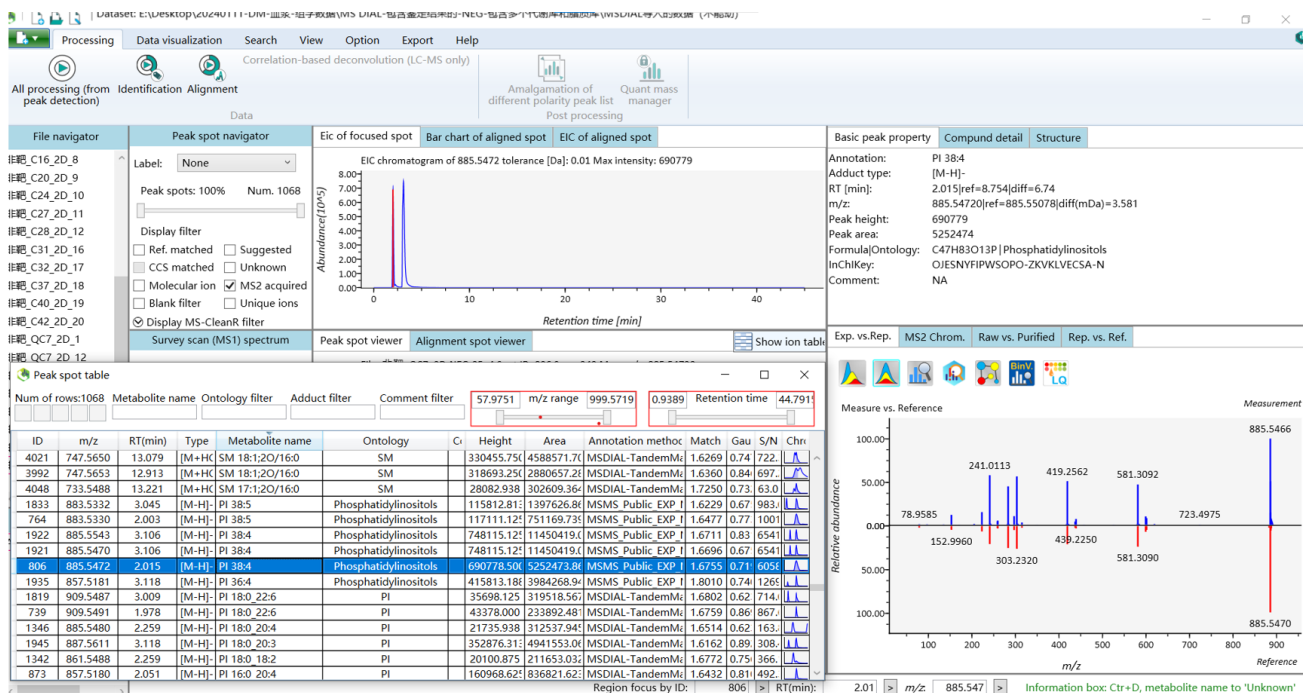


图 11 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

表 4 部分差异性代谢物鉴定结果表 (VIP>1, p<0.05, FC≤0.5 或 FC≥2)

编号	内源物	加合方式	实测 m/z	理论 m/z	误差 (ppm)	R.T. (min)	上 / 下调 *
1	2-Hydroxybutyric acid	[M-H] <sup>-</sup>	103.0393	103.0392	0.97	2.80	↑
2	L-Carnitine	[M+H] <sup>+</sup>	162.1123	162.1125	-1.23	23.10	↑
3	L-Tyrosine	[M-H] <sup>-</sup>	180.0658	180.0660	-1.11	8.41	↑
4	O-ACETYLCARNITINE	[M+H] <sup>+</sup>	204.1230	204.1230	0.00	22.81	↑
5	Pantothenate	[M-H] <sup>-</sup>	218.1031	218.1034	-1.33	2.88	↑

6	D-erythro-Sphingosine	[M+H] <sup>+</sup>	300.2897	300.2897	0.00	2.94	↑
7	Arachidonic acid	[M-H] <sup>-</sup>	303.2318	303.2320	-0.63	1.96	↓
8	Docosahexanoic acid	[M-H] <sup>-</sup>	327.2318	327.2327	-2.75	30.78	↓
9	Stearoyl-L-Carnitine	[M+H] <sup>+</sup>	428.3728	428.3734	-1.40	12.47	↑
10	LPE O-16:1	[M+H] <sup>+</sup>	438.2971	438.2979	-1.83	7.59	↑
11	1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	[M+H] <sup>+</sup>	454.2927	454.2928	-0.22	8.19	↑
12	LPE O-18:1	[M-H] <sup>-</sup>	464.3142	464.3146	-0.86	7.26	↑
13	LPE 18:0	[M-H] <sup>-</sup>	480.3097	480.3096	0.27	7.08	↑
14	LPC 16:1-SN2	[M+H] <sup>+</sup>	494.3239	494.3241	-0.40	15.49	↑
15	LPE 20:4	[M-H] <sup>-</sup>	500.2779	500.2783	-0.72	7.77	↓
16	LPC O-18:1	[M+H] <sup>+</sup>	508.3758	508.3762	-0.79	14.06	↑
17	LPG 18:1	[M-H] <sup>-</sup>	509.2889	509.2884	0.98	3.82	↑
18	LPC 17:0-SN1	[M+H] <sup>+</sup>	510.3551	510.3554	-0.59	15.41	↓
19	1-heptadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	[M+H] <sup>+</sup>	510.3552	510.3554	-0.39	15.48	↓
20	LPC O-18:0	[M+H] <sup>+</sup>	510.3914	510.3918	-0.78	16.28	↑

\*: ↑ 上调, ↓ 下调

## 2.4 通路分析

使用 KEGG 数据库, 将鉴定得到的 110 个差异代谢物在 MetaboAnalyst 平台进行通路富集分析, 综合统计学 P 值和路径影响结果, 发现影响的通路主要有磷脂生物合成、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成等 (图 12~13)。

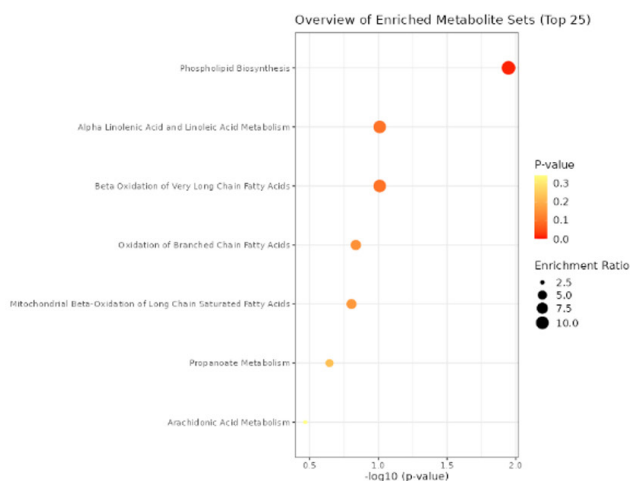


图 12 Metabolites 富集分析

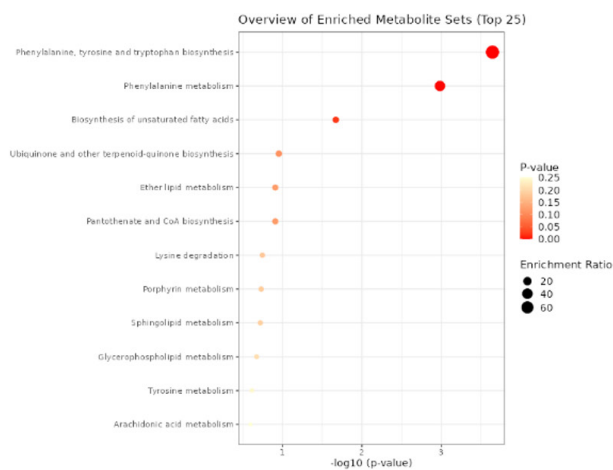


图 13 Lipids 富集分析

## ■ 结论

本文通过代谢组学研究方法，利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用仪，非靶向分析动脉粥样硬化小鼠血浆样品的内源代谢物变化。统计结果表明，质控组数据聚集性强；模型组与对照组血浆成分有显著区别。通过准确  $m/z$  及  $MS^2$  库搜索鉴定出 110 种内源物，包括氨基酸、溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 等。这些差异性代谢物主要影响磷脂生物合成、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成等。本研究表明全谱二维液相系统是宽极性、多组分数据库“通用型”分离平台，扩大了代谢物分析的极性范围，加上高分辨质谱 LCMS-9050 具有正负模式同时扫描功能，可节省 3/4 的样品分析时间，能帮助代谢组学和脂质组学研究者一次分析极性跨度更大的代谢物。

### 参考文献：

[1] Meng Ding, Luwei Zheng, Xiaolin Hua, Mengxuan Chen, Qisheng Zhong, Taohong Huang, Ping Li, Hua Yang. Simultaneous metabolomics and lipidomics analysis based on 4in1 online analysis system reveal metabolic signatures in atherosclerotic mice. *Talanta*, Volume 283, 2025, 127109.

岛津应用云

