

[文章编号] 1000-1182(2010)03-0311-04

一氢核磁共振的血浆代谢组学分析维生素B₁₂对地塞米松诱导腭裂小鼠的阻抑作用

吴晓华¹ 黄瀚¹ 徐滨¹ 周京琳¹ 孔祥丽¹ 石冰¹ 黄静² 李伟¹

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学; 2.四川大学华西药学院 天然药物学系, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 采用基于一氢核磁共振(¹H-NMR)的代谢组学方法研究使用维生素B₁₂后, 阻抑本已诱发的唇腭裂发育早期过程的变化, 并评估其可行性。方法 选取对照组和实验组各12只怀孕17.5 d的C57BL/6J雌鼠, 分别是仅注射维生素B₁₂的孕鼠和注射维生素B₁₂后再注射过量地塞米松引起腭裂的孕鼠, 处理动物的血浆样本, 并且观察B₁₂对腭裂产生率的影响。利用核磁共振技术检测血浆内源性小分子代谢产物, 通过主成分分析方法(PCA)确定代谢物成分的变化。结果 根据2组腭裂是否发生, PCA得分散点图产生了显著的差别。结论 核磁共振的代谢组学方法是一种可行和有效的方法, 可以深入探索唇腭裂的发病机制, 并且为以后研究维生素B₁₂的代谢机制奠定了基础。

[关键词] 代谢组学; 腭裂; 维生素B₁₂

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.03.21

Analyzing the inhibition of vitamin B₁₂ to dexamethasone-induced palatognathous mouse using ¹H-nuclear magnetic resonance based metabonomics method WU Xiao-hua¹, HUANG Han¹, XU Bin¹, ZHOU Jing-lin¹, KONG Xiang-li¹, SHI Bing¹, HUANG Jing², LI Wei¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Natural Medicine, West China College of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** Metabonomic analysis has been increasingly used to monitor metabolic abnormalities in cells and their micro-environment in order to detect the biomarkers recently. This study evaluated the feasibility of applying ¹H-nuclear magnetic resonance(¹H-NMR) based metabonomic method to detect the differences of the early development of cleft palate in the plasma from control group and experimental group. **Methods** Pregnant mice(in-bred C57BL/6J strain) with vitamin B₁₂ injected only were assigned as the control group, pregnant mice with excessive Dex, injected after vitamin B₁₂ as the experimental group, each group includes 12 mice. And the effect of B₁₂ to rate of cleft palate was observed. The technology of nuclear magnetic resonance(NMR) was used to detect the endogenous small molecule metabolites. Finally, changes of metabolites ingredients were ascertained by using the method of principal component analysis(PCA). **Results** There was significant difference in PCA scores plot between the two groups according to whether cleft palate occurred. **Conclusion** The ¹H-NMR based metabonomic approach might be used as a feasible and efficient method for a deep exploration of the pathogenesis of cleft lip and palate and an early exploration of the mechanism of vitamin B₁₂.

[Key words] metabonomics; cleft palate; vitamin B₁₂

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后, 系统生物学的重要组成部分, 也是目前组学领域研究的热点之一。代谢组学是通过考察生物体系受到内部或外部刺激或扰动后(如某个特定基

因变异或环境变化), 而导致的基因表达、蛋白质合成变化而引起的其代谢产物的变化或代谢产物随时间的变化, 来研究生物体系代谢途径的一种技术^[1]。基于核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)的代谢组学技术是目前研究和应用较多的一种, 可利用高分辨率的NMR技术测定生物体液样本^[1-2], 得到的海量数据通过模式识别和主成分分析(principal component analysis, PCA)^[3-4]提取出代谢特征及其

[收稿日期] 2009-11-08; [修回日期] 2010-03-13

[基金项目] 教育部科学技术研究重大基金资助项目(307022)

[作者简介] 吴晓华(1986—), 女, 山西人, 硕士

[通讯作者] 李伟, Tel: 028-85503494

相关的内源性小分子代谢物组成成分变化规律,建立相关代谢谱图,从整体上阐释机体的代谢变化,以及与特性变化之间的联系,并将这些信息与相关的病理生理过程结合起来。

唇腭裂(cleft of lip with or without palate, CLP)是人类最常见的先天性畸形之一,群体发病率约为1‰~2‰,发病率具有地区差异性,在中国其发病率高达1.82%。其病因非常复杂,目前倾向认为是由多种基因和环境因素共同作用的结果。基因、环境之间的相互作用也受到广泛关注,包括母亲吸烟、饮酒、服用抗癫痫药物、止吐药物、孕前孕期服用维生素、母亲的新陈代谢情况和接触农药等。CLP病因学的研究为其预防和治疗提供了思路,孕期的保健对预防和降低唇腭裂的发生具有重要意义。

维生素B₁₂(vitamin B₁₂, 简称B₁₂)是水溶性维生素,又称钴胺素,是一组有钴结合咕啉环的红色类咕啉化合物的总称,是维持人体正常代谢和机能不可缺少的一种微量营养素。研究^[5-6]发现,B₁₂缺乏与出生缺陷、巨幼红细胞性贫血、神经管畸形等不良妊娠结局及乳腺癌等的发生有关,并严重影响器官生长发育,尤其对未出生的胎儿。

近来,地塞米松诱导小鼠腭裂的动物模型已成为研究腭裂病因、发病机制及治疗的重要工具^[7-8]。本实验的目的就是利用代谢组学的新方法,以C57BL/6J小鼠为模型,研究在地塞米松引起小鼠胚胎致畸过程中,维生素类药物B₁₂对母鼠血浆内代谢物组成的影响,研究唇腭裂的机制和预防方法,并为孕期服用维生素预防唇腭裂的原理开辟新途径。

1 材料和方法

1.1 动物的饲养、建模与样本采集

成年C57BL/6J小鼠:雄性20~25 g;雌性16~20 g,购自四川大学实验动物中心。动物自由摄食饮水,雌雄分笼饲养于IVC级动物房7 d以适应环境。饲养室条件为:光照12 h,黑暗12 h;室温20~22 ℃;相对湿度30%~40%。第8天,以每笼雌雄2:1比例合笼,共计30笼。

于每日交配的中点(8:30 am),检查各笼雌鼠阴道,如发现精栓,则初步认为此鼠受孕,称重、做标记,并记为孕第0天(emergency 0, E0),放入空笼饲养以待观察。认真核对记录日期,对E9~E10的雌鼠再次称重,如体重未明显增加,则认为假孕,重新合笼;如体重增加2 g以上则确定怀孕,随机分配进入对照组和实验组,每组累积12只,对照组于E9~E11的15:00 pm连续3 d腹腔注射B₁₂ 5 mg·kg⁻¹,实验组也于E9~E11的15:00 pm连续3 d腹腔注射B₁₂

5 mg·kg⁻¹,另外于E10~E12的10:00 am连续3 d腹腔注射地塞米松6 mg·kg⁻¹。

E17.5 d, 2组孕鼠分别称重后处死并获取血浆样本,置于内含100 μL左右锂-肝磷酯抗凝剂的容器中,并迅速在3 000 g下低速离心10 min,提取的上清液再于30 000 g下高速离心10 min,2次提取上清。经梯度离心后,除去大分子不溶性物质而剩余小分子水溶性物质^[9],贮藏在-80 ℃冰箱中以备核磁检测使用。

剥离每只孕鼠的胚胎,逐个剪下腭胚突。正常情况下,孕17.5 d的胚胎腭胚突已经融合^[10],在20倍体视显微镜下可清晰观察到其融合情况,记录每只孕鼠发生腭裂的胚胎数与总胚胎数并照片,用来作后期统计分析。

1.2 孕鼠血浆的基于¹H-核磁共振(¹H-nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR)图谱采集

冻存的血浆样本于37 ℃水浴中融化,提取其中的200 μL,并加入300 μL重水,形成500 μL混合液后注入5 mm核磁管,多次混合均匀。

使用Bruker AV -600 MHz超导傅立叶变化核磁共振波谱仪(Biospin公司,德国),在600.13 MHz(周围探针温度27 ℃)和5 mm PATXI探针条件下,调用一维的弛豫时间编辑(carr-purcell-meiboom-gill, CPMG)脉冲序列,采用预饱和方式抑制水峰,所取参数参照Zhou等^[11]研究。经检测得到的自由感应衰减(free induction decay, FID)信号经过傅立叶变换转为一维的¹H-NMR谱图。以1.26×10⁻⁶位置处的乳酸定标,使用TopSpin 1.3(Biospin公司,德国)软件进行相位和基线校正。

1.3 ¹H-NMR数据处理和PCA分析

使用MestReC(4.8.1.1版本)软件,对图谱的0~9×10⁻⁶区域,按每段为0.04×10⁻⁶进行分段积分,同时排除以溶剂峰为中心的部分。将由此导出的所有积分数据分组和排序,用Excel文件格式保存。先将2组积分值标准化,再使用SIMCA-P11.0软件(Umetrics AB公司,瑞典)将所得数据进行PCA统计分析。

1.4 统计学分析

使用SPSS 13.0统计软件处理2组孕鼠的胚胎腭裂发生率。

2 结果

2.1 2组孕鼠胚胎唇腭裂发生率及χ²检验

2组腭胚突发育情况见图1。计算2组样本的腭裂发生率的检验统计量:χ²=8.02,得出的结果具有统计学意义(P<0.005),说明实验组的腭裂发生率高于对照组(表1)。



A: 实验组未融合的胚突; B: 实验组不完全融合的胚突; C: 实验组融合的胚突; D: 对照组融合的胚突。

图1 2组腭胚突融合情况的照片 体视显微镜 ×20

Fig 1 Photos of fusion situation of embryonic palatal shelves in two groups stereomicroscope ×20

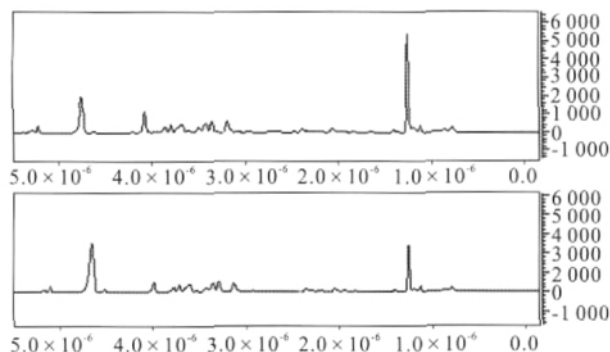
表1 2组胚胎腭裂发生率的比较

Tab 1 Comparison of incidence of cleft of palate in the embryos between two groups

组别	未融	融合	腭裂发生率/%
实验组	8	58	12.12
对照组	0	62	0
合计	8	120	6.25

2.2 2组孕鼠血浆¹H-NMR图谱和PCA分析结果

图2所示为对照组和实验组血浆的一维¹H-NMR谱图。它是以血浆中各种物质的氢原子作为此物质的标志,不同位移代表了不同的物质,且信号强弱反映出该物质浓度的大小。



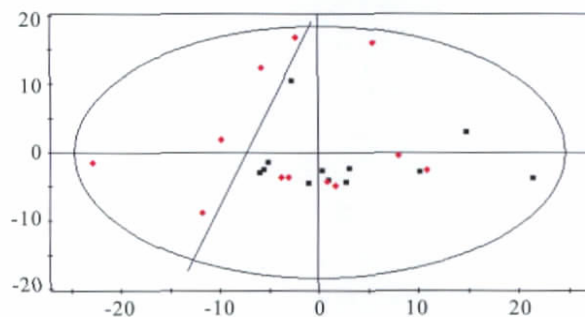
上: 对照组; 下: 实验组。

图2 2组血浆的¹H-NMR图

Fig 2 ¹H-NMR spectras of plasma from two groups

PCA是双线性的分解作用和未经监控的方法,能够用于检查原始数据和降低其到合适的信息容量,即降低复杂性。PCA通过2D或3D图谱^[13, 12]的形式表达了原始的n维变化。本实验选取对¹H-NMR谱变化影响最大的2个PC值,作PCA得分散点图(图3)。图中显示2组样本所代表的主成分积分值,位于(95%可信区间)4个区域内;但并非确切的以2组不同分组划分,而是以直线所示左右区域划分,左边代表实验组中发生腭裂的5个样本,右边代表对照、实验组中未发生腭裂的共计19个样本;直线两边的

样本之间并无重大交叉和重叠,这说明发生腭裂样本与未腭裂样本之间的代谢物组谱存在显著的差异,血浆的代谢组学分析能够较好地反映出来。



黑色: 对照组; 红色: 实验组。

图3 2组血浆的PCA得分散点图

Fig 3 PCA-score plot of plasma from two groups

3 讨论

本实验为代谢组学的探索性研究,主要探讨利用代谢物组¹H-NMR模式识别的方法,来体现致畸动物模型在维生素B₁₂拮抗剂的保护作用下,其妊娠过程中血浆早期代谢物组的变化以及B₁₂的代谢产物。初步结果表明,此分析方法能够区分2组,且代谢组成存在显著差异。

首先,验证了B₁₂对胚胎腭裂实验小鼠的保护作用。唇腭裂的机制研究^[13]表明,孕妇孕期摄取一定剂量的B₁₂,能够有效降低后代胎儿唇腭裂的发生率。根据上述研究,本实验采用5 mg·kg⁻¹的剂量,并选择正常腭胚突已完成融合的孕17.5 d^[10]做直观形态学检查来验证致畸效果,并与徐滨等^[14]之前研究的地塞米松致畸作用的腭裂率作比较,可以认为实验组的腭裂发生率低于地塞米松组,结果显示实验组的腭裂发生率已从徐滨等的20%降低到10%左右,且低于地塞米松组,由此证明了其保护作用,并可进一步利用代谢组学方法分析B₁₂的代谢物组。

其次,证明了存在代谢组差异并进行分析。一

些平行文献^[11,15]证明了NMR和MS光谱学数据分析的化学计量学方法的有效性和可信性。也有大量有关核磁数据的分析,说明模式识别分析和复合变量统计是分组的有效模型,并发现了疾病组和对照组^[16]的关系。本实验采用PCA方法,将2组样本复杂而庞大的代谢物组信息进行数学降维,再进一步分析处理这些信息,得到直观和形象的PCA得分散点图,可清晰地观察到腭裂个体与正常个体的差别。

另外,从实验结果可看出,虽然实验组与腭裂组胚胎腭裂率有差别,但不具有统计学差异;此外实验组与对照组胚胎腭裂率也有显著差别,仍然比对照组高出许多,说明药物的保护作用不够强烈,由此推断出 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量可能偏低还不够准确,需深入研究以探明能够完全抑制腭裂的合适剂量。

从2组主成分分析图可看出,并非以实验组和对照组区分,而是以是否发生腭裂区分,证明了此方法可建立起较好的腭裂模型。发生腭裂的5个样本中具有其他样本没有的唇腭裂标志代谢物,而未发生腭裂的19个样本也分为对照组12个样本和实验组7个样本,可反映出 B_{12} 作用后代谢物组的变化。

对药物作用机制的相关研究表明, B_{12} 作为一种辅酶,影响DNA的表达,多种脂类和蛋白质的合成,最终导致代谢物组的改变。已探索的生理功能有:1)作为甲基转移酶的辅因子,参与蛋氨酸、胸腺嘧啶等的合成,因此 B_{12} 可促进蛋白质的生物合成,缺乏时影响婴幼儿的生长发育。2)保护叶酸在细胞内的转移和贮存。有研究^[17]表明,孕妇怀孕早期必须保证足够的叶酸盐,而补充叶酸可降低早产率和提高婴儿出生重量;动物实验^[17]也表明,妊娠的9~11 d期间加入反代谢物后引起的叶酸缺乏导致90%大鼠唇裂;另有动物研究^[18]表明,叶酸和 B_6 、 B_{12} 复合维生素的加入可降低单独的唇裂或腭裂。 B_{12} 的加入可能促进了叶酸的产生和代谢,从而促进了腭胚突的正常发育,真正起到保护剂的作用。

[参考文献]

[1] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2):153-161.

[2] Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, et al. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids[J]. *Concepts Magn Reson*, 2000, 12(5):289-320.

[3] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance[J]. *Prog NMR Spectrosc*, 2001, 39(1):1-40.

[4] Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, et al. Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids[J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13(6):471-478.

[5] Bender DA. Non-nutritional uses of vitamin B6[J]. *Br J Nutr*, 1999, 81(1):7-20.

[6] Ebara S, Toyoshima S, Matsumura T, et al. Cobalamin deficiency results in severe metabolic disorder of serine and threonine in rats[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1568(2):111-117.

[7] Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, et al. TGF- β 3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases[J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(5):1457-1466.

[8] Montenegro MA, Rojas M, Dominguez S, et al. Differences in extracellular matrix components and cell density during normal and dexamethasone-treated secondary palate development in two strains of mice with different susceptibility to glucocorticoid induced-clefting[J]. *Craniofac Genet Dev Biol*, 1998, 18(2):100-106.

[9] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州:浙江大学出版社, 2004:250.

ZENG Su. Drug metabolism[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2004:250.

[10] Grili-Linde A. Molecular control of secondary palate development[J]. *Dev Biol*, 2007, 301(2):309-326.

[11] Zhou J, Xu B, Huang J, et al. ^1H NMR-based metabonomic and pattern recognition analysis for detection of oral squamous cell carcinoma[J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 401(1/2):8-13.

[12] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11):1181-1189.

[13] Van Rooij IA, Swinkels DW, Blom HJ, et al. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts[J]. *Am Obstet Gynecol*, 2003, 189(4):1155-1160.

[14] 徐滨, 周京琳, 何苇, 等. 地塞米松致C57BL/6J小鼠胚胎腭裂的代谢物组 ^1H -NMR模式识别探讨[J]. *生物医学工程学杂志*, 2009, 26(2):366-370.

XU Bin, ZHOU Jing-lin, HE Wei, et al. Investigation on dexamethasone induced cleft palate in embryos of C57BL/6J mice by ^1H -NMR pattern recognition of metabolites group[J]. *J Biomedical Engineering*, 2009, 26(2):366-370.

[15] Keun HC, Ebbels TMD, Antti H, et al. Improved analysis of multivariate data by variable stability scaling: Application to NMR-based metabolic profiling[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 490:265-276.

[16] Holmes E, Foxall PJD, Nicholson JK, et al. Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of ^1H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states[J]. *Anal Biochem*, 1994, 220(2):284-296.

[17] Heid MK, Bills ND, Hinrichs SH, et al. Folate deficiency alone does not produce neural tube defects in mice[J]. *J Nutr*, 1992, 122(4):888-894.

[18] Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, et al. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid preconceptionally[J]. *Lancet*, 1995, 346(8972):393-396.