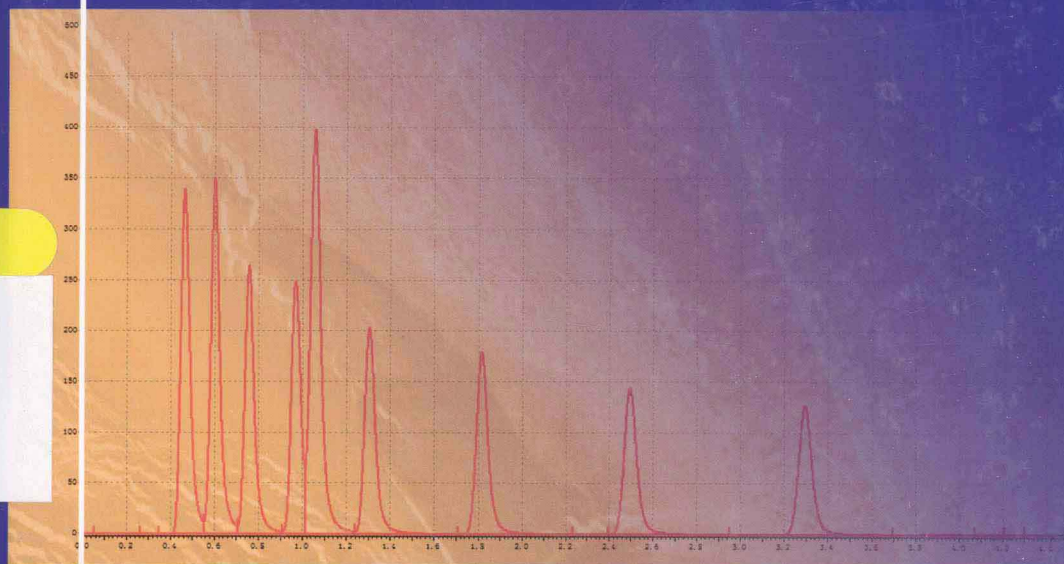


CLINICAL METABOLOMICS

临床代谢组学

主编 杜智 刘树业 刘运德



天津出版传媒集团

 天津科技翻译出版有限公司

临床代谢组学

Clinical Metabolomics

主 编 杜 智 刘树业 刘运德

天津出版传媒集团

 天津科技翻译出版有限公司

图书在版编目(CIP)数据

临床代谢组学 / 杜智, 刘树业, 刘运德主编. -- 天津:
天津科技翻译出版有限公司, 2013.5.

ISBN 978-7-5433-3200-3

I. ①临… II. ①杜…②刘…③刘… III. ①代谢—研究
IV. ①Q493.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 048566 号

出 版:天津科技翻译出版有限公司

出 版 人:刘 庆

地 址:天津市南开区白堤路 244 号

邮 政 编 码:300192

电 话:(022)87894896

传 真:(022)87895650

网 址:www.tsttpc.com

印 刷:山东鸿杰印务集团有限公司

发 行:全国新华书店

版本记录:787×1092 16 开本 18.5 印张 470 千字

2013 年 5 月第 1 版 2013 年 5 月第 1 次印刷

定 价:100.00 元

(如发现印装问题,可与出版社调换)

编委会

主 编 杜 智 刘树业 刘运德

副主编 顾春刚 张建东

编 委 (以姓氏笔画为序)

马亚楠 王素梅 田亚琼 杜振华 范志娟 张 立
张 磊 张 磊(同名) 张 蕾 张凤美 高 洁
高翠红 康 华

序

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门新兴的学科。它是研究关于生物体被扰动后(如基因改变和环境变化)其代谢物(内源性代谢物质)种类、数量及其变化规律的科学,通过揭示内在和外在因素的影响下代谢整体的变化轨迹来反映某种病理生理过程中所发生的一系列生物事件。

代谢组学正处于快速发展的阶段,日益成为研究的热点。高通量、高分辨率的分析技术与生物信息学相整合,为生物代谢层面进行研究提供了了解生物体的独特视角,在药物开发、临床诊断和预防及营养科学等方面将发挥越来越大的作用。

代谢组学分析的方法及技术程序,在不同的研究领域各有特点,一般包括样品的采集、预处理、样品分析、数据采集和数据分析及解释。根据研究对象、研究目的等不同,具体步骤也有所不同。但无论其采用磁共振、质谱、色谱-质谱联用等方法还是采用常见的统计模式如主成分分析法和偏最小二乘法,其结果分析总是体现了整合趋势及由定性到定量的趋势,乃至对机体中不同来源的生物样品(尿样、血样、组织样等)进行分析、数据比较和综合评价,使代谢组学的结果更完整、更准确。这种定量分析不仅是代谢组学研究者也一直是临床诊断学家所追求的目标。

当然,临床代谢组学也有其明显的不足,如很难同时对所有代谢物进行分析,仪器设备价格昂贵,操作人员的专业性很强,数据库尚不完善,临床应用也缺乏经验等等。但随着更多的研究者加入到代谢组学研究中,基于血、尿中代谢物的异常来诊断疾病的方法也正向着实用性方向发展,带来了临床应用中的广阔前景。但我们也必须清楚地认识到,最有效地研究生命与疾病的现象需同时监测基因表达、蛋白质及代谢产物等多个层面,这也是系统生物学真髓之所在。相信随着其方法的不断完善和优化,代谢组学研究必将成为人类更高效、更准确地诊断疾病的一种有力手段。

本书的作者们给读者提供了许多代谢组学研究的方法、手段和实例,同时结合他们自己的工作为代谢组学在临床检验和实验诊断中的应用做了有

益的探索并提出了一些问题和思考。本书不仅仅是一本理论书籍,更是一本理论和实际相结合的总结和参考。尤为可取的是本书本身就是将系统生物学、信息学和临床检验相结合的一个有益的尝试,因为作者们都是临床医生或者是临床检验一线的工作者。相信他们的努力也为我们正在努力打造的检验医师队伍的成長提供一些有益的经验。

未来检验医师可能是拥有最多交叉知识,最多实践技能的医师,希望有志于检验医师的年轻人更多地读书,开拓自己的知识面,更多地掌握如本书所阐述的新理论和新知识。

让我们共同努力。

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive characters that appear to be 'JSC'.

前言

代谢组学是针对疾病和健康两种状态进行代谢物全谱检测,寻找与疾病相关的一组差异物,从它们所在的被上调或下调的代谢通路上找到关键的代谢酶,研究其上游的调控基因。质谱技术已经成为代谢组学研究的主要技术,液相色谱技术在其研究中也较高地位。超高效液相色谱(UPLC)/高分辨飞行时间质谱(TOFMS)技术及联机的 Marker Lynx 自动化数据处理软件的应用为复杂生物混合物提供了更好的分离分析能力。

近年来,代谢组学的研究飞速发展,从 Devaux 等人于上世纪 70 年代第一次提出代谢轮廓分析,到 90 年代后期,随着基因组学的提出,Oliver 于 1997 年提出代谢组学的概念,之后很多植物化学家开展了这方面的研究。1999 年 Nicholson 等提出 metabolomics 的概念,并在疾病诊断、药物筛选等方面做了大量的卓有成效的工作。它引导人们从一个全新的、系统生物学的视角去认识生命科学未来的发展,与此同时,更加坚定了我们进行代谢组学研究、推广代谢组学科学的信心。目前,代谢组学研究已渗透到生命科学各领域(基础医学、临床医学、药学、毒理学等)。同时,促进了生命科学与生物信息学的紧密结合。大大丰富了生物信息学的内涵,推动了生物信息学的相关技术。

临床代谢组学是代谢组学最重要的拓展方向之一,也是代谢组学最重要的应用领域。目前,临床代谢组学的主要内容是以系统生物学的思路构建代谢组学技术与临床实验诊断治疗技术相结合的全新技术平台,在疾病的预防、早期诊断和治疗等方面推进基础医学与临床医学的结合,以期在人类重要疾病的防治方面取得重大突破。

作者实验室利用超高效液相色谱与质谱联用技术平台对肝脏疾病(肝炎、肝硬化、肝癌等)患者的血液、尿液及组织分别进行了检测。其目的是寻找肝脏疾病发生发展过程中具有诊断、监测价值的生物标志物。通过病例跟踪研究和大规模的循证医学研究逐步建立疾病区分模型及指纹图谱并进行标志物的筛选,使其能够应用于肝脏疾病的早期诊断、进展检测、转移及复发的预测,寻找药物靶点以用于药物的使用。

代谢组学方面的书籍虽然有很多,但是大部分偏向于基础理论的介绍,很少有一本系统全面的书籍介绍代谢组学和临床各种疾病研究的关系。为了适应现在代谢组学高速发展的需要,满足广大科学工作者,尤其是与临床研究密切相关的研究者的需要,作者在前期的科学研究工作的基础上,撰写了

本书。

作为天津市人工细胞重点实验室,天津医科大学三中心临床学院的重要组成部分,他们所做的许多研究工作得到了临床方面工作伙伴的大力支持和学术支撑。本书在撰写过程中特别是在相关疾病的基础研究中,得到了李彤教授、韩涛教授、王毅军教授、舒桂明教授、王凤梅教授等同仁的大力支持和帮助。在此,我要深深地感谢这些和我们一起工作的同事和朋友,感谢他们在临床病例的选择、各种数据的处理以及试验结果的解释等方面的宝贵支持。感谢中国药科大学药物代谢动力学重点实验室 & 代谢组学研究室阿基业研究员、生物医学研究院蛋白质组中心杨芑原教授、金红教授以及天津市出入境检验检疫所许洪主任的指导与帮助。感谢 Thermo Fisher 公司工程师的技术支持。

由于时间仓促,水平有限,尽管笔者在编写过程中做了大量努力,书中仍可能存在不妥之处,希望广大读者多多指正。

刘树业

2012 年 11 月于天津

目录

第一章 代谢组学概述	1
第一节 代谢组学的概念	1
第二节 系统生物学时代的代谢组学	2
第三节 代谢组学的研究方法和分析技术	3
第四节 代谢组学在各研究领域中的应用	13
第五节 展望	15
第二章 生物样品的制备	17
第一节 代谢组学的研究材料	18
第二节 代谢组学样品收集和处理遵循的原则	18
第三节 常用生物样品的制备技术	18
第三章 代谢组学的分析方法	25
第一节 质谱分析法的内容	25
第二节 质谱名词与术语	27
第三节 质谱分析方法与技术	30
第四节 质谱联用技术	46
第五节 质谱仪性能指标	54
第四章 代谢组学数据处理常用方法	60
第一节 数据预处理	62
第二节 数据分析	66
第三节 数据解释	82
第四节 展望	82
第五章 代谢组学在肿瘤中的应用	87
第一节 肿瘤概述	87
第二节 肿瘤代谢组学	90
第三节 代谢组学在肿瘤中的应用	91
第四节 肺癌的代谢组学研究	93
第五节 胃癌的代谢组学研究	101
第六节 乳腺癌的代谢组学研究	106
第七节 方法学考察结果	108
第八节 大肠癌的代谢组学研究	112
第九节 食管癌的代谢组学研究	119
第十节 代谢组学在其他肿瘤中的应用	121
第六章 代谢组学在肝脏疾病中的应用	126
第一节 基于液质联用的肝硬化不同阶段代谢轮廓研究	127

第二节 基于 HPLS-MS 的 HCC 患者组织代谢组学研究	133
第三节 LC/MS 技术在肝衰竭动物模型和人工肝疗效评估中的应用	140
第四节 肝移植患者血浆代谢组学初步研究	146
第七章 代谢组学在心血管疾病中的应用	159
第一节 概述	159
第二节 代谢组学在高血压病中的临床应用	165
第三节 代谢组学在冠心病中的临床应用	171
第四节 代谢组学在心力衰竭中的临床应用	178
第八章 代谢组学在内分泌系统疾病中的应用	185
第一节 概述	185
第二节 糖尿病	187
第三节 代谢组学在糖尿病中的应用	194
第四节 甲亢	199
第五节 代谢组学在甲亢中的应用	201
第六节 痛风	203
第七节 代谢组学在痛风中的应用	207
第九章 代谢组学与中医证型	212
第一节 中医学与代谢组学概论	212
第二节 基于代谢组学的中医肾病研究	222
第三节 高血压病与中医证型的代谢组学研究	225
第四节 高脂血症及动脉粥样硬化症的中医代谢组学研究	232
第五节 中医糖尿病的代谢组学研究	234
第六节 肝病的代谢组学研究	236
第七节 其他疾病的代谢组学研究	241
第十章 代谢组学在神经系统疾病中的应用	249
第一节 中风病人的代谢组学研究	250
第二节 运动神经元病的代谢组学研究	252
第三节 帕金森综合症的代谢组学研究	253
第四节 亨廷顿舞蹈症及 Batten 病的代谢组学研究	255
第五节 抑郁症的代谢组学研究	255
第六节 精神分裂症的代谢组学研究	256
第七节 双相情感障碍的代谢组学研究	257
第十一章 代谢组学在营养学中的临床应用	261
第一节 概述	261
第二节 肥胖症的代谢组学研究	263
第三节 高脂血症的代谢组学研究	274

蛋白质组学之后新近发展起来的一门学科,是系统生物学^[7]重要的组成部分。

第二节 系统生物学时代的代谢组学

在系统生物学时代,代谢组学对于基因功能的深入研究和生命个体的整体性认识具有重要意义。它与我们熟知的基因组学、转录组学和蛋白质组学等概念既有联系又有区别。

一、代谢组学与基因组学、转录组学和蛋白质组学的区别

Nicholson 认为,基因组和蛋白质组测量的价值比大多数人想象的要有限得多。

就生物体系而言,DNA、RNA 和蛋白质是生物学事件或过程发生的物质基础,但这个事件或过程有可能发生,也可能不发生,而代谢物的存在则反映了生命过程中已经发生了的生物化学反应,代谢物的变化正是对生物事件或过程的反映。因此,有学者认为代谢组学是“组学”研究的终端。基因组学、转录组学和蛋白质组学分别从 DNA、RNA 和蛋白质层面探寻生命的活动,而实际上细胞内许多生命活动是发生在代谢物层面的,如细胞信号释放(cell signaling)、能量传递、细胞间通信等都是受代谢物调控的。

绝大多数生物由宿主和与之共进化且共生的客体共同组成,是所谓的超级生物体(superorganism)。譬如,一个健康的人体由人体和与之共生的菌群两部分组成。因此,研究人体显然需要对人本身、菌群及其相互作用所发生的生物事件进行整体性认识。但是,体内菌群中菌种繁多而且多数暂时无法进行体外培养,对这个共生体仅仅从基因组和蛋白质组水平进行研究,存在必然的困难和方法上的不足。况且仅肠道菌群的细胞数量和基因组规模就至少为人体的 10 倍。因此,仅仅研究宿主本身

的基因或蛋白质,最多只能认识正常人体的一小部分。尿液和血液代谢组包含了人体内每一个细胞的代谢信息(包括宿主和菌群),也包含了宿主和菌群代谢活动的相互作用。

事实上,近来人们已经使用代谢组学方法研究宿主和菌群代谢的相互作用,证实了其可行性,而且已逐渐成为一个引人注目的研究热点。如今,以代谢组学为基础的全局系统生物学(global systems biology)思想已经诞生并且正处于快速发展阶段。代谢组学的出现和快速发展主要得益于核磁共振(NMR)和质谱(MS)等复杂系统分析技术与多变量海量数据挖掘和数学建模技术的发展。在后基因组时代,代谢组学和转录组学、蛋白组学等构成了系统生物学研究的重要组成部分(见图 1-1)。

二、金属组学

目前,在代谢组学快速发展的同时,新的“组学”还在不断出现。2002 年日本学者 Haraguchi 等^[8]首先提出了融合原子光谱/质谱分析和分子生物功能研究的崭新研究领域——金属组学(Metallomics),引起了该研究领域科学家们的广泛关注。生物体内的代谢物如有机酸、氨基酸、多糖、蛋白质、DNA 等与金属形成金属有机物,是一系列生物金属。生物金属中参与金属离子配位的有机配基主要是含氧、硫、氮及磷的功能基团。金属组学是整合生物金属中金属有机配体的结合形态及其生理功能活性的新概念。金属组学和代谢组学一样,都需要依靠分析化学,特别是光谱化学技术的支持,它正成为分析化学家的一个重要战略方向。

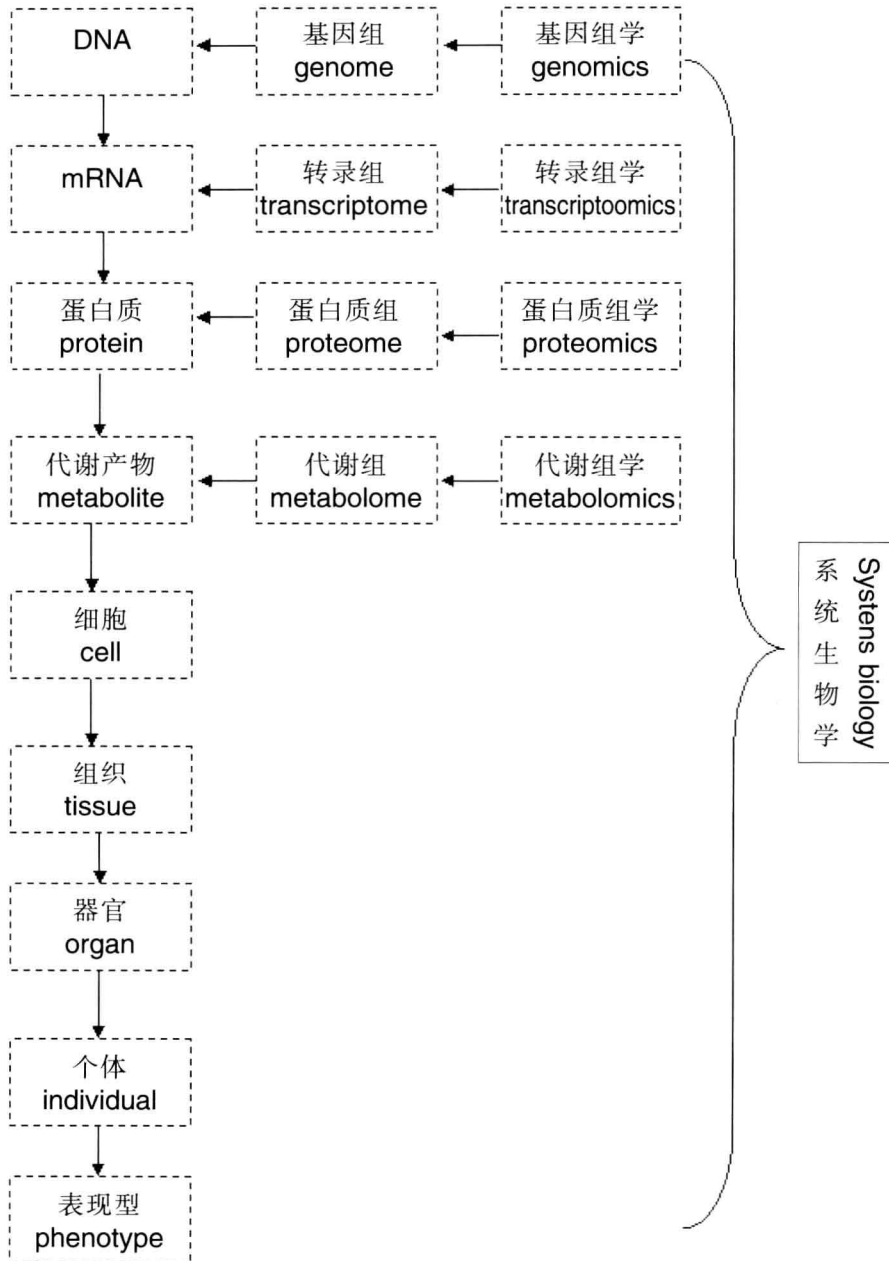


图 1-1 代谢组学与系统生物学

第三节 代谢组学的研究方法和分析技术

代谢组学正是研究代谢组 (metabolome) ——生物体内源性代谢物质的动态整体的一门学科。其研究对象大都是相对分子质量在

1 000 以内的小分子物质。先进分析检测技术结合模式识别和专家系统等计算分析方法是代谢组学研究的基本方法。

一、代谢组学的研究方法

体液中的代谢物质与细胞、组织和整体水平的生物化学状态密切相关。正常状态下机体中的代谢物组成处在一个动态的平衡当中。当机体受到毒性物质、代谢障碍或者生理因素影响时,细胞、组织,甚至整体水平会发生代谢的变化应答,导致生物体液中的代谢物种类和浓度的变化。代谢组学就是通过检测代谢物水平的整体和动态变化,提取相关的生物代谢标志物群体或标志物簇(biomarker clusters),在此基础上寻找所受影响的相关代谢途径,确立代谢网络调控机制。

代谢组学作为一门刚刚起步的新学科,其技术平台还很不成熟,目前还没有一种技术能对所有的分子进行分析,因此,各种技术的组

合成了当前主要的研究手段。代谢组学研究思路大致包括:前期的样品制备,中期的代谢产物分离、检测与鉴定和后期的数据分析与模型建立三个部分。

代谢组研究一般包括以下流程:首先,给研究对象引入一定的外源性刺激,该刺激既可以是基因的改变(剔除或导入)、转录水平的更改、蛋白质水平的变化,也可以是不导致基因和转录水平发生变化的某环境因素。其次,采集相关样品如尿液、血液、组织、细胞和培养液,甚至整个生物体的生物样品,以反映时空信息。实验设计中对样品收集的时间、部位、种类、样本群体等应给予充分考虑。再次,用核磁共振、质谱、色谱等分析手段检测其中代谢物的种类、含量、状态及其变化,建立代谢组数据(见图 1-2)。

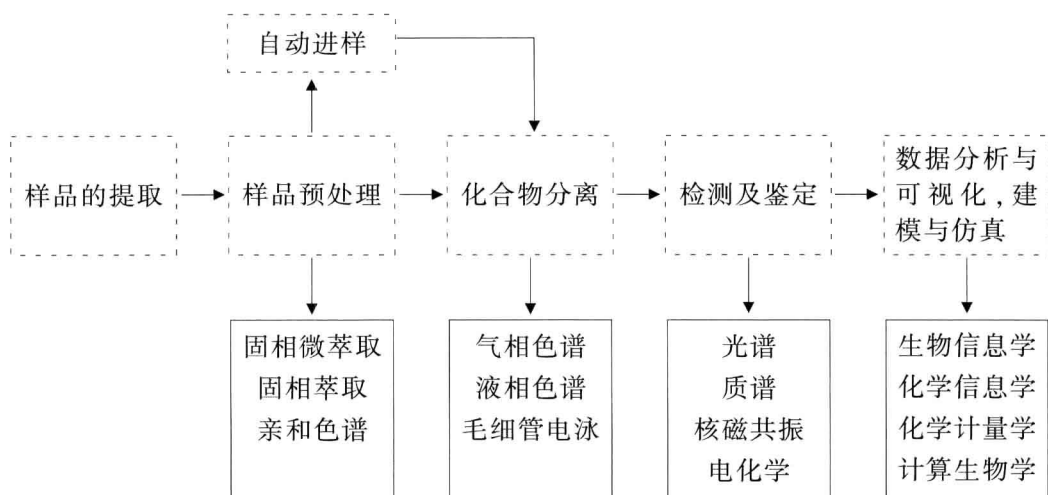


图 1-2 代谢组研究的技术流程

二、代谢组学分析技术

生命大科学的一个主要特征就是对技术平台的依赖,代谢组学工作的开展同样离不开技术平台的支撑,尤其是高通量和大规模的分析技术。同时,仪器和分析技术的快速发展也大大推进了代谢组学的进步。代谢物整体水平

的检测分析,必须依赖分析化学中的各种谱学技术,包括磁共振波谱、质谱、色谱、红外和拉曼光谱、紫外-可见光谱等及其方法获取代谢组数据。因此,分析化学在代谢组学研究中具有基础性的重要作用。

面对如此繁多的分析检测方法,我们在实际研究工作中如何进行选择是非常重要的。理

想的检测分析方法必须具备同步检测的无偏向性;不依赖检测者的客观性、良好的分辨率和重现性、高灵敏度和系统性或整体性、分子结构信息的丰富性和原位定量研究的可行性;样品制备的简易性和高通量分析可操作性;活体或原位检测分析的可能性和便捷性、较低的样品检测分析成本等。

与构成核酸的4种碱基和构成蛋白质的20多种氨基酸不同,小分子代谢物的结构种类繁多,理化性质差异巨大,含量极微且动态范围极宽(7~9数量级),时空分布的差异明显,相互作用方式复杂,无论定性、定量还是动态追踪,目前尚无完善的代谢物扩增技术和分析平台。当前的代谢组研究的核心技术是核磁共振技术和质谱技术,现有的分析方法基本上可以归为三类:核磁共振波谱法、色谱-质谱联仪法和色谱-核磁-质谱联仪法。

(一)核磁共振技术

1. 核磁共振原理

自然界中的一种现象,即原子核可以吸收强磁场中存在的一定频率的电磁辐射。艾西德·艾萨克·瑞白(Isidor Isaac Rabi)(1898-1988),一位出生于澳大利亚的美国物理学家,于1938年最先发现核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)现象。从那时起,核磁共振开始被用于氢原子的探测(例如碳氢化合物中的氢原子),并成为一种研究人体的非破坏性方式。核磁共振(NMR)仪器可以直接控制并探测原子核的运动。

在1950年,Proctor等人研究发现,质子的共振频率与其结构(化学环境)有关。化合物分子中同种核由于与其相连接的原子或原子团的不同,所处的化学环境就不同,也就是说被测核的核外电子的状态与电子云的密度是不同的。因此导致其对外加磁场产生的屏蔽作用也不同,也就是说这些核实际所受的磁场强度是不同的,分裂的磁能级间隔也不同。由于这个原因,它们将在稍微不同的频率处出现共振

吸收。根据不同基团中核的化学位移在各自特定的区域内出现的特点可以确定化合物分子中官能团的种类。邻近基团之间有相互作用会导致谱峰有更精细的裂分,利用这种裂分、裂距的大小与形状可进一步确定分子内部相邻的基团的连接关系,最后便可推断分子的化学结构。核磁共振波谱分析法(NMR)是分析分子内各官能团如何连接的确切结构的强有力的工具。

2. 核磁共振特点

核磁共振技术具有明显的优势:①没有偏倚性,对样品中所有的物质灵敏度是一样的,而质谱存在离子化程度和基质干扰等问题;②具有无损伤性,可探测化合物内部结构而不破坏样品,样品不需要繁琐处理,可在接近生理条件下进行实验,因而便于活体、原位的动态检测;③可以进行实时和动态的检测,可设计多种编辑手段,实验方法灵活多样。NMR氢谱的谱峰与样品中各化合物的氢原子是一一对应的,所测样品中的每一个氢原子在图谱中都有其相关的谱峰,图谱中信号的相对强弱反映样品中各组分的相对含量。因此,NMR方法很适合研究代谢产物中的复杂成分。目前常用的是1D-NMR,比如Brindle等^[9]应用NMR研究高血压患者血清的代谢谱特征;Lehnhardt等^[10]应用NMR研究原发性和继发性脑肿瘤的代谢谱差异等。1D-NMR光谱的信息量大,但不可避免地存在峰图的重叠,影响了随后的分析,而2D-NMR大大地改善了1D-NMR峰图的质量,一些研究者开始应用2D-NMR开展代谢组研究,如Choi等^[11]为了研究被烟草花叶病毒感染烟草的代谢谱变化,应用2D-NMR方法,结果发现5绿原酸等代谢物明显增多。

代谢组中代谢物质的响应系数相同,因此可以进行一次性同步、无偏向的检测,而且具有良好的原位定量效果;检测具有优异的重现性、高通量和较低的单位样品检测成本;特别是新发展的高分辨魔角旋转(HR-

MA_s)、活体磁共振波谱(MRS)和磁共振成像(MRI)等技术能够无创、整体、快速地获得机体某一指定活体部位的NMR谱,直接鉴别和解析其中的化学成分,因此在代谢组学研究中占据重要地位。

但它的缺点是检测灵敏度相对较低,很难同时测定生物体系中共存的浓度相差较大的代谢产物,所需硬件的投资也较大。采用现有成熟的超低温探头技术,其检测灵敏度在纳克级水平,另外仪器购置的一次性投入费用较大。

(二) 色谱与质谱联用技术

相对于NMR灵敏度低、检测动态范围窄等弱点,现代MS技术的优势是具有很高的灵敏度和专属性,可以实现对多个化合物的同时快速分析与鉴定;在过去的几十年里,色谱技术因其卓越的分选性能、高灵敏度已被广泛用于复杂体系(如体液)中的靶标分析(如标记物分析)。近年来,越来越多的研究者将质谱及其色谱联用技术用于代谢组学的研究。而且液相色谱-质谱联用仪(LC/MS)避免了气相色谱-质谱联用仪(GC/MS)中繁杂的样品前处理,能鉴别和分析各类化合物及其在复杂生物样品基质中含量极低的代谢物类型,现已成为生物分析中的首选方法。目前,与质谱联用的色谱技术主要有液相色谱(LC)、气相色谱(GC)和毛细管电泳(CE)。LC可以直接分析不挥发性化合物、极性化合物、热不稳定化合物,分析范围广。相关的MS技术主要有:

1. 气相色谱/质谱联机(gas chromatography-mass spectrometer, GC/MS)

首先需对样品进行衍生化处理,增加样品的稳定性和挥发性,以利于用GC/MS中的气相色谱仪进行分离。随后,质谱仪可以对气相色谱中的每一个峰以1min的间隔进行扫描,获得每个峰的质谱图。每个峰所代表的化合物的分子结构可以通过其碎片峰的类型和质/荷比(m/z值)结合有关质谱数据库来进行鉴定,

其含量可以通过峰面积的大小来定量。

由于需要对样品进行衍生化处理,这一步骤额外费时,甚至引起样品的变化。衍生化处理限制了GC/MS的应用范围,无法分析热不稳定性物质和分子量较大的代谢产物。

2. 液相色谱/质谱联机(liquid chromatography-mass spectrometer, LC/MS)

原理和气相色谱/质谱联机基本相同,样品不需要衍生化处理,多用于难以衍生化、不稳定及不易挥发,分子量较大的样品的前处理。缺点是分离效率不高,分析的时间相对较长,没有化合物数据库可供检索和比对,样品的鉴别还需进一步的分析。为了区分异构体,有关代谢产物用液相进行纯化并分部收集后,须再用核磁共振进行结构解析。如Yang等^[12]利用LC/MS方法结合主成分分析法比较肝炎、肝硬化与肝癌病人的尿液代谢谱的差异,结果发现一组尿代谢物与肝癌的相关性优于传统单一的甲胎蛋白。LC/MS和GC/MS的选择性和灵敏度都较好,但分析的时间相对较长。

3. 毛细管电泳/质谱(capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE/MS)

微量样本是研究中经常面对的难题,CE/MS所需样品量少,并且分离样品的速度和效率优于LC/MS和GC/MS,往往10min内就能完成一个样品的分析过程。已广泛应用于代谢组的研究中,如Sato等^[13]选择了CE/MS进行了水稻叶的代谢物检测,成功地检测出88种代谢物,这些代谢物涉及糖酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径、光呼吸作用和氨基酸的生物合成等。

色谱联用法总体来说具有良好的客观性和分辨率,一次性仪器购置投资相对较少,但该方法属于有偏向的选择性检测方法,需要对样品有介入性和破坏性而不利于在体和原位分析;需要对样品进行较为复杂的制备而且通量有限;对代谢组中各代谢物的原位定量十分

繁琐,未知代谢物的定性(结构确定)有相当的难度。

(三) 色谱-核磁-质谱联用法

近来,STOCSY (statistical total correlation spectroscopy)思想的诞生和方法学突破,使“波谱集成理论”和相应的方法方面取得了长足进步,不仅为疾病和毒理相关的代谢途径相关性建立了研究方法,也为系统生物学中转录组、蛋白质组和代谢组的整合提供了重要方法,解决了分子流行病学研究中药物服用的调查准确性问题,也为色谱-超低温核磁-质谱的有效结合奠定了基础。

从重现性等角度看,超高效液相色谱-质谱和气相色谱-质谱方法有一定的优势,随着方法学的发展,该方法应该还会有较大的改进空间。其中,色谱的分辨率和色谱柱进样前后的稳定性或重现性,质谱中对不同代谢物质的离子化效率以及离子化抑制问题对代谢物定量的影响,以及未知代谢物定性(结构确定)等方面的问题,都是亟待解决的问题。

无论 NMR、色谱和质谱都有各自的优缺点,为了充分发挥各种技术的优势,有研究者将三种技术联合应用于代谢组的研究。如 Lenz 等^[14]应用 ¹H NMR 和高效液相色谱(HPLC)及 MS 技术相结合研究庆大霉素的肾毒性和尿液的内源性代谢物变化,结果发现葡萄糖增加,三甲胺 N 氧化物(trimethylamine N oxide, TMAO)降低等变化特点。

目前,磁场强度的不断提高使核磁代谢谱分辨率逐步提高,超低温探头的完善让 NMR 的检测灵敏度有了相当程度的提高。以“统计全相关理论”和“波谱集成理论”为基础的 NMR-MS 相关谱学方法的诞生为新的代谢组学方法提供了新的发展空间。

(四) 代谢组学数据分析

代谢组学属于整体认识的思想,它所强调的代谢特征或代谢时空整体变化不是传统意

义上的某种代谢物或少数几种代谢物含量和存在方式的变化,通过代谢组变化获取的“生物标志物簇”也只是代谢组学研究的一个初级阶段性目标,而建立代谢特征或代谢时空变化规律与生物体特性变化之间的有机联系,才是代谢组学研究的根本目标。因此,对代谢组数据分析处理至关重要。

用于代谢组数据分析处理的化学计量学方法很多,但大体包括两类:非监督性(unsupervised)和监督性(supervised)方法。最常见的非监督性方法为主成分分析法(principal component analysis, PCA),最常见的监督性方法为偏最小二乘法(partial least square, PLS)为基础的分析。这两种方法常常以所谓的 score-plot 和 loading-plot 的形式输出分析结果,前者表征对比代谢组之间的区别和相似程度,而后者给出导致其区别(或相似性)的贡献变量及其贡献程度。这些变量可以是核磁谱中的化学位移(即代谢物质)、色谱中的保留时间(代谢物或其色谱特性)、质谱中的质荷比(分子量或其分数)。PCA 在不作任何介入和无任何假设的前提下给出待分析各代谢组的内在区别,而 PLS 则有一定的假设。对这些方法,尤其是监督性方法的选择都是有一定条件的,也正是因为如此,使用监督性分析方法时要格外注意假设的基础和成立性。

代谢组研究的对象可以是细胞、组织或者生物机体整体。但由于研究对象十分复杂,影响因素较多,且数据挖掘需要使用多变量数据分析方法,代谢组学对实验设计要求格外严格。使用多变量数据分析方法,表征代谢组特征的动态模型,确定和研究相关代谢物变化涉及的代谢途径,进而联系该变化规律,从不同层次和水平上阐述生物体对相应刺激的响应。

在“Web of knowledge”检索网站,按照 metabonomics、metabolic profiling 和 metabolite profiling、metabolomics 检索 SCI 文章,分别得到如下结果:

metabolomics、metabonomics、metabolic profiling、metabolite profiling

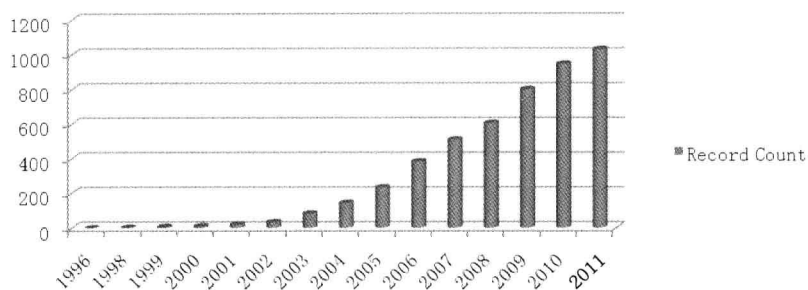


图 1-3 以“metabonomics, metabolic profiling, metabolite profiling, metabolomics”为关键词检索 1996-2011 年间的论文数量

metbnonomics

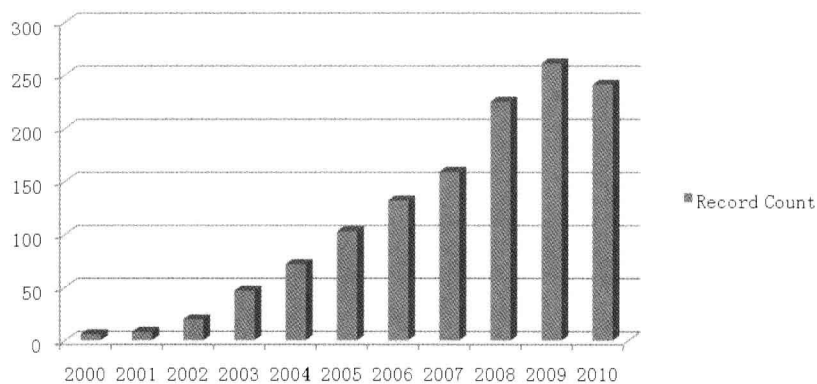


图 1-4 以“metabonomics”为关键词检索 2000-2010 年间的论文数量

metabolic profiling

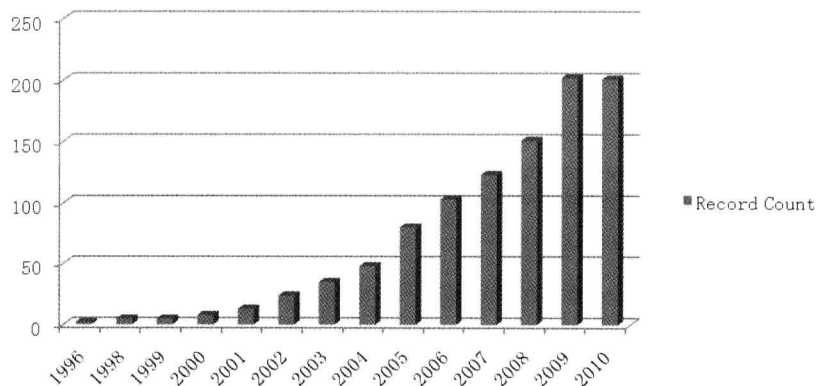


图 1-5 以“metabolic profiling”为关键词检索 1996-2010 年间的论文数量