

魔角旋转核磁共振代谢组学方法对镧、铈急性生物效应的比较研究

廖沛球, 吴惠丰, 张晓宇, 李晓晶, 李中峰, 李伟生, 吴亦洁, 裴奉奎
(中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

摘要 利用高分辨魔角旋转核磁共振(MAS ^1H NMR)技术对腹腔注射不同剂量[2, 10, 50 mg/kg(体重)]的硝酸镧[$\text{La}(\text{NO}_3)_3$]和硝酸铈[$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$]的雄性 Wistar 大鼠肝、肾组织的 MAS ^1H NMR 谱进行比较分析, 研究了 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 和 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 的急性生物效应, 并结合模式识别技术对不同剂量 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 和 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 的急性生物效应进行了分类. 研究表明, $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 对大鼠的急性毒性主要表现为肝毒, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 对大鼠肝、肾同时造成损伤. 该方法可用于其它稀土及金属化合物的毒性预测和毒理学研究.

关键词 魔角旋转核磁共振; 代谢组学; 组织; 稀土; 生物效应

中图分类号 O657.2 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2006)08-1448-05

核磁共振波谱分析是目前唯一无损伤研究活体组织的方法. 近年来, 随着核磁共振谱仪灵敏度和分辨率的提高, 魔角旋转核磁共振波谱技术已被成功地应用到研究生物组织上, 例如大鼠肝脏^[1-3], 哺乳动物肾脏^[4,5], 人类前列腺^[6]以及大鼠睾丸组织等^[7]. 生物组织在核磁共振实验中会由于磁化率不均匀、分子运动受限等因素而引起谱线增宽. 这些因素利用固体核磁共振中的魔角旋转(Magic angle spinning, MAS)方法可以消除^[8].

基于 NMR 的代谢组学方法^[9]主要利用核磁共振技术和模式识别方法对生物体液和组织进行系统测量和分析. 模式识别(Pattern recognition, PR)属于多元分析方法, 是借助计算机揭示隐含于事物内部规律的一种综合技术. 模式识别中的主成分分析(Principal components analysis, PCA)是一种应用广泛的降维技术, 它是将原变量进行转换, 使少数几个新变量变成原变量的线性组合, 同时, 这些变量要尽可能多地表征原变量的数据结构而不丢失信息^[10]. MAS ^1H NMR 谱结合 PCA 方法已经成为研究完整组织代谢变化的良好技术^[1-3,11].

随着稀土在农业、工业、药物和日常生活中的广泛应用, 稀土化合物可以通过食物链进入生态环境和人体^[12,13], 因此, 阐述稀土化合物在人体内的急、慢性生物效应已成为重要的研究课题. 利用 ^1H NMR 技术分析大鼠体液, 研究轻稀土镧和农用稀土微肥常乐(La, Ce 是农用稀土微肥的主要成分)的生物效应, 用 NMR-PR 方法研究重稀土镱引起的急性肝和肾损伤已有文献报道^[14-17].

本文采用魔角旋转核磁共振技术分析腹腔注射不同剂量 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 和 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 大鼠肝、肾组织的 MAS ^1H NMR 谱, 研究了稀土化合物在大鼠体内的急性生物效应, 利用模式识别中的 PCA 方法进一步对不同剂量 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 和 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 的生物效应进行了比较.

1 实验部分

1.1 动物实验

选用体重(250 ± 20) g 成年雄性 Wistar 大鼠(吉林大学白求恩医学部实验动物部提供)35 只, 随机分为 7 组, 每组 5 只, 严格按照要求饲养, 昼夜有规律地自由摄食饮水, 保证取样的平行程度. $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 和 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 以生理盐水溶解, 向对照组大鼠的腹腔内注射生理盐水, 向实验组大鼠的腹腔

收稿日期: 2005-07-05.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20575065)资助.

联系人简介: 裴奉奎(1940 年出生), 男, 研究员, 博士生导师, 从事现代核磁共振波谱学研究. E-mail: peifk@ciac.jl.cn

内分别注射不同剂量[2, 10, 50 mg/kg(体重)]的 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 和 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 的生理盐水溶液. 将注射硝酸镧、硝酸铈生理盐水溶液的大鼠和注射生理盐水的对照组大鼠在 48 h 后取左肝、肾组织, 并于液氮中迅速冻结. 所有组织样品于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 贮存, 直至 NMR 测试.

1.2 动物组织的核磁共振实验

将肝肾组织切成碎块, 用质量分数为 0.9% 的氯化钠重水溶液浸润 3 min 后取出, 装入 4 mm 直径的氧化锆转子中, 于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下在 Bruker Av-600 型 NMR 仪上采用预饱和方法测试 MAS ^1H NMR 谱. FID 采样次数为 16, 数据点 64 K, 延迟时间 10 s, 偏转角 54.7° , 采样时间均为 0.911 s. 所有 MAS ^1H NMR 谱宽均为 8 992.806 Hz. 以乳酸在化学位移 $\delta = 1.33$ 的甲基氢峰作为内标.

1.3 MAS ^1H NMR 数据处理及主成分分析

使用软件 MestRe-C 2.3 版本 (<http://qobru.e.usc.es/jsgroup/MestRe-C>) 及自编程序将 MAS ^1H NMR 谱按 $\delta 0.04$ 从 $\delta 0 \sim 10$ 分段. 除去水峰的 $\delta 4.7 \sim 5.1$, 对余下的 235 段谱图积分. 取注射硝酸镧、硝酸铈生理盐水溶液实验组和注射生理盐水对照组 48 h 后大鼠的肝肾组织的 MAS ^1H NMR 谱图数据分别进行主成分分析分类.

2 结果与讨论

2.1 腹腔注射硝酸镧、硝酸铈 48 h 后大鼠肝组织 MAS ^1H NMR 谱及 PCA 分析

表 1 和图 1 分别为给药硝酸镧[50 mg/kg(体重)]、硝酸铈[50 mg/kg(体重)]和对照组大鼠肝组织中的代谢物归属及变化和 MAS ^1H NMR 谱的比较结果.

Table 1 Assessment of metabolites in liver and kidney tissue from La^{3+} and Ce^{3+} dosed rats after injecting for 48 h*

Metabolites of liver tissue	Chemical shift(δ) and multiplicity	10 mg/kg (body weight)		50 mg/kg (body weight)		Metabolites of kidney tissue	Chemical shift(δ) and multiplicity	10 mg/kg (body weight)		50 mg/kg (body weight)	
		La	Ce	La	Ce			La	Ce	La	Ce
Bile acid	0.70 (s)	—	—	↑	—	Triglyceride	0.91	↑	↑	↑	↑
Triglyceride	0.91	↑	↑	↑	↑↑	Leu + Ieu	0.95	—	↑	—	↑
Valine	0.99 (d)	—	—	—	—	Valine	0.99 (d)	—	—	—	—
Triglyceride	1.29	—	↑	—	↑	Triglyceride	1.29	—	↑	—	↑
Lactate	1.33 (d)	—	↑	—	↑↑	Lactate	1.33 (d)	—	—	—	—
Alanine	1.47 (d)	—	—	—	—	Alanine	1.47 (d)	—	—	—	—
Triglyceride	1.57, 2.23	↑	—	↑	—	Lysine	1.69 (m)	—	—	—	—
Lysine	1.69 (m)	—	—	—	—	Glutamine	2.39 (m)	—	—	—	—
Triglyceride	2.00, 2.75, 5.32	↑	↑	↑	↑	Aspartate	2.68 (dd)	—	—	—	—
Glutamine	2.39 (m)	—	—	—	—	Lysine	3.02 (t)	—	—	—	—
Choline	3.20 (s)	—	—	—	—	Creatinine	3.06 (s)	—	↑	—	↑
GPC	3.24 (s)	—	—	—	—	Choline	3.20 (s)	—	↓	—	↓
TMAO + Betaine	3.27	—	—	—	—	GPC	3.24 (s)	—	—	—	—
Taurine	3.42 (t)	—	—	—	—	TMAO + Betaine	3.28	—	↓	—	↓
Glc + glycogen	3.50—4.00	↓	↓	↓	↓	Taurine	3.42 (t)	—	—	—	—
β -Glucose	4.63 (d)	↓	↓	↓	↓	Glycine	3.57 (s)	—	—	—	—
α -Glucose	5.22 (d)	↓	↓	↓	↓	Sugars + amino acid	3.50—4.00	—	—	—	—
Glycogen	5.40	↓	↓	↓	↓	Betaine	3.89 (s)	—	↑	—	↑

* Abbreviations and keys: s, singlet; d, double; t, triplet; m, complex multiplet; —, not detectably different from the control level; ↑, a detectable but minor elevation in concentration, of up to 2 times control; ↑↑, an elevation in concentration corresponding to 2 to 3 times control levels; ↓, a minor decrease (20%—50%) from the control levels.

分析 3 组大鼠肝组织的 MAS ^1H NMR 谱可以看出, 注射高剂量[10, 50 mg/kg(体重)]硝酸镧、硝酸铈生理盐水溶液实验组大鼠的肝组织中的重要代谢物含量变化包括甘油三酸酯含量的上升和肝糖元、葡萄糖含量的下降. 大鼠肝组织中甘油三酸酯含量的上升, 可能暗示 La^{3+} 和 Ce^{3+} 直接影响在肝实质细胞线粒体中进行的脂肪酸 β -氧化代谢关键酶的活性; 而肝脏中糖元含量的下降可能是由于 La^{3+} 和 Ce^{3+} 直接影响肝糖元的合成、储存和分解过程所致.

在实验中, 注射硝酸镧生理盐水溶液最高剂量[50 mg/kg(体重)]实验组大鼠肝组织代谢物中胆

汁酸含量上升;注射硝酸铈生理盐水溶液高剂量[10, 50 mg/kg(体重)]实验组大鼠的肝组织代谢物乳酸含量升高,且甘油三酸酯含量的变化随给药剂量增加而上升,但没有显示胆汁酸含量的变化.胆汁酸含量的上升即胆汁郁积可能是由于胆管上皮细胞增生造成胆道堵塞所致. Waters 等^[1]在对典型肝毒模型化合物异硫氰酸 α -萘酯的生物效应研究中发现,当胆管上皮细胞增生时,肝组织中的胆汁酸含量明显上升.故推测,50 mg/kg(体重)硝酸镧对大鼠机体代谢除了扰乱肝细胞线粒体的能量代谢外,对胆汁代谢也产生了一定影响.注射硝酸铈生理盐水溶液组大鼠的肝脏中乳酸含量增加表明无氧代谢增加.注射低剂量硝酸镧[2 mg/kg(体重)]生理盐水溶液组大鼠肝组织中的内源性代谢物除肝糖元和葡萄糖含量有所降低外,并未产生明显变化.注射低剂量硝酸铈[2 mg/kg(体重)]生理盐水溶液组大鼠肝组织中内源性代谢物含量基本不变.

由以上结果可知,向大鼠腹腔注射高剂量[10, 50 mg/kg(体重)]硝酸镧和硝酸铈对其肝脏均造成不同程度的损伤,但损伤的机理和程度可能有所不同.向大鼠腹腔注射低剂量硝酸镧[2 mg/kg(体重)]对其肝组织只有轻微的损伤,而向大鼠腹腔注射低剂量硝酸铈对其肝组织没有明显损伤.对注射不同剂量[2, 10, 50 mg/kg(体重)]的3组大鼠肝组织的MAS ^1H NMR谱进行PCA分类(图2)获得了平行的结果.从图2可看出,注射高剂量硝酸镧、硝酸铈[10, 50 mg/kg(体重)]组[图2(B)和(A)]与对照组样本各自分开,分类清楚,说明稀土镧、铈对大鼠肝组织造成的损伤程度不同,且损伤机理不尽相同;而注射低剂量硝酸镧、硝酸铈[2 mg/kg(体重)]组和对照组[图2(C)]聚类,说明低剂量硝酸镧、硝酸铈对大鼠肝组织的损伤不明显.

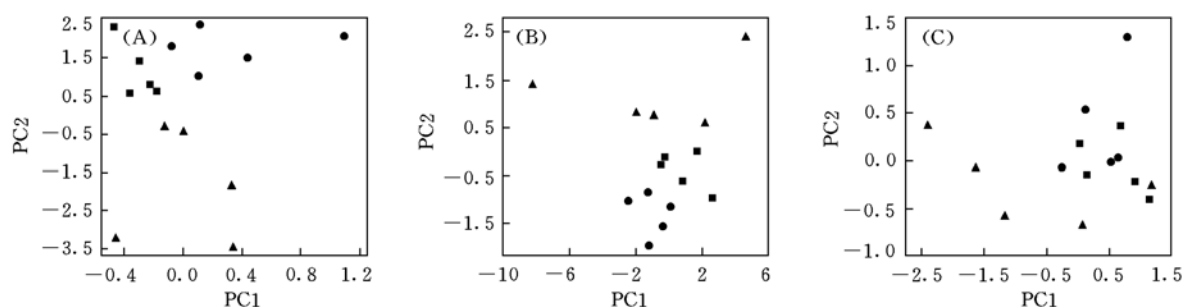


Fig. 2 Plots of PC1 vs. PC2 based on the ^1H NMR spectra descriptors of the liver tissue samples from the control(■), $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ -treated(●) and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ -treated(▲) rats

(A) 50 mg/kg(body weight) $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ and the control; (B) 10 mg/kg(body weight) $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ and the control; (C) 2 mg/kg(body weight) $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ and the control. Principal components 1 and 2 embody more than 97.0% of the data variance.

2.2 腹腔注射硝酸镧和硝酸铈 48 h 后大鼠肾组织的 MAS ^1H NMR 谱及 PCA 分析

注射硝酸镧[50 mg/kg(体重)]、硝酸铈[50 mg/kg(体重)]和对照组大鼠肾组织的 MAS ^1H NMR 谱比较见图 3, 肾组织中代谢物的归属及变化列于表 1. 通过比较注射不同剂量[2, 10, 50 mg/kg(体重)]的硝酸镧、硝酸铈与对照组大鼠肾组织的 MAS ^1H NMR 谱发现,注射高剂量硝酸镧组[10, 50 mg/kg(体重)]的 MAS ^1H NMR 谱中除甘油三酸酯的甲基峰强度略有升高外,其余代谢物的含量并

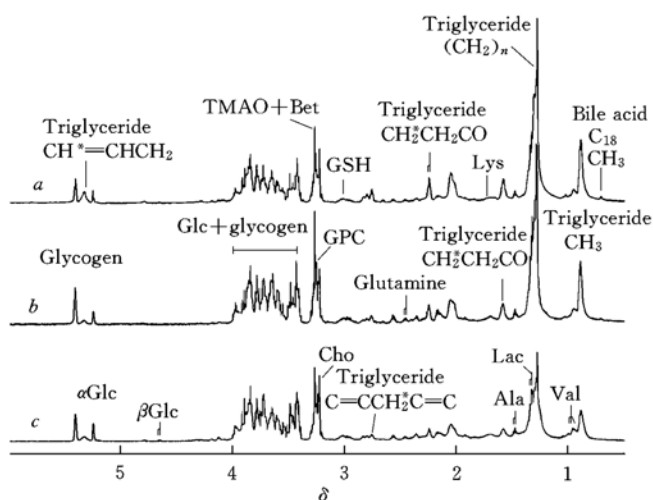


Fig. 1 600 MHz MAS ^1H NMR spectra of liver tissues from the control and two rare earth-treated rats

a. 50 mg $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ /kg body weight; b. 50 mg $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ /kg body weight; c. the control.

无明显变化. 而从注射硝酸铈 48 h 后大鼠肾组织的 MAS ^1H NMR 谱图发现, 注射高剂量硝酸铈组 [10, 50 mg/kg (体重)] 大鼠肾组织中的代谢物含量发生了明显变化, 甘油三酸酯甲基峰强度明显升高, 肌酸酐峰强度增强, 同时氨基酸 (亮氨酸和异亮氨酸) 峰上升, 甘油磷酸胆碱、甜菜碱峰下降. 较高强度的甲基峰可能意味着肾组织细胞膜中的短链脂肪含量处于主导地位. 另外, 由于肾组织细胞膜环境的改变可以缩短甘油三酸酯自旋-自旋弛豫时间, 从而导致甘油三酸酯终端甲基谱峰强度上升^[10].

因此可认为注射 10, 50 mg/kg (体重) 硝酸镧、硝酸铈 48 h 后大鼠肾组织细胞膜的正常功能受到影响. 注射 10 和 50 mg/kg (体重) 硝酸铈 48 h 后大鼠肾组织代谢物中甘油磷酸胆碱、甜菜碱含量有所降低, 这可能意味着肾脏调节终尿渗透压功能减弱, 此时大鼠排尿量增加, 出现多尿症. 动物实验期间, 发现注射 10 和 50 mg/kg (体重) 硝酸铈 48 h 内, 大鼠排尿量确实明显增加. 血清中肌酸酐含量上升是一个重要的肾乳头受损标志, 而肾组织中的肌酸酐含量上升, 可能与血清中肌酸酐含量上升有关. 因此, 肾组织中肌酸酐含量上升可能是一个肾损伤 NMR 标志.

从注射 10 和 50 mg/kg (体重) 硝酸铈 48 h 后大鼠肾组织的 MAS ^1H NMR 谱观察到氨基酸含量上升, 这可能与尿液中氨基酸含量上升相似, 是由于肾小管受损而导致重吸收能力下降引发的结果. 由此推断, 肾组织中亮氨酸与异亮氨酸含量上升可能是由于大鼠肾小管受损所致. 注射高剂量硝酸镧 [10, 50 mg/kg (体重)] 的大鼠肾组织中的甘油三酸酯含量有所上升, 但由于肾组织中的其它代谢物含量并没有发生很明显的变化, 因此推测可能并未发生严重的肾功能障碍.

注射不同剂量硝酸镧、硝酸铈的大鼠与对照组大鼠肾组织 MAS ^1H NMR 谱的 PCA 分析结果 (图 4) 与上述所得结果相似. 从图 4 发现, 注射 10 和 50 mg/kg (体重) 硝酸镧样本和对照组聚类, 而注射 10 和 50 mg/kg (体重) 硝酸铈样本和硝酸镧以及对照组清晰分类, 其中 10 和 50 mg/kg (体重) 每组各有一个样本和对照组聚类的比较靠近, 这可能是由于个体差异的原因造成的. 注射 2 mg/kg (体重) 硝酸镧和硝酸铈样本和对照组样本聚类, 没有分开.

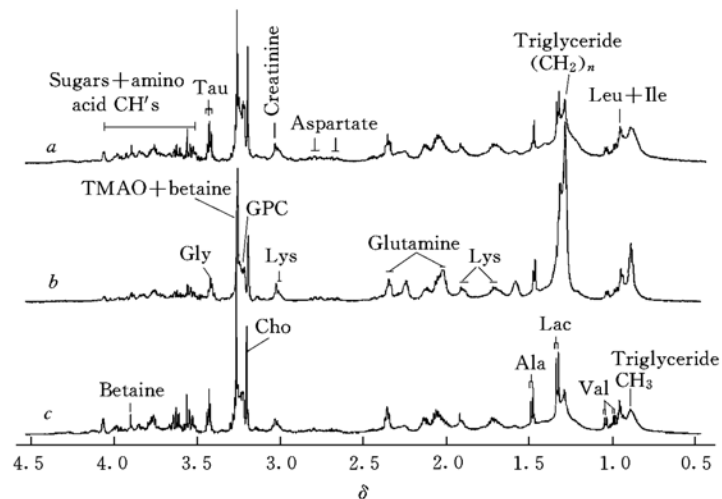


Fig. 3 600 MHz MAS ^1H NMR spectra of kidney tissues from control and two rare earth-treated rats

a. 50 mg $\text{La}(\text{NO}_3)_3/\text{kg}$ body weight injected; b. 50 mg $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3/\text{kg}$ body weight injected; c. the control.

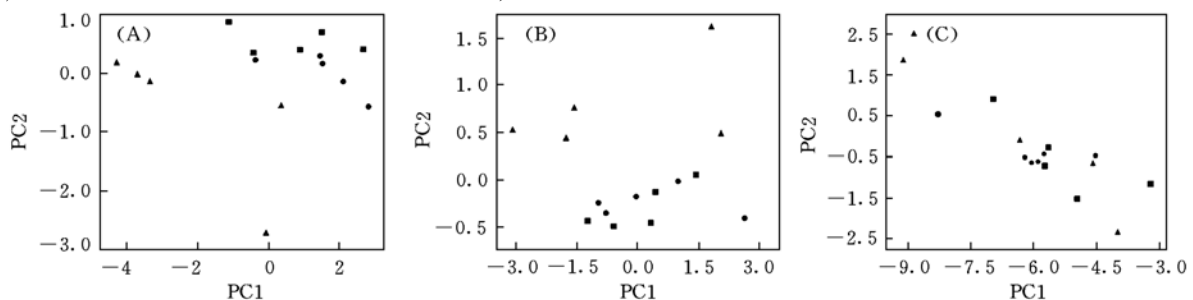


Fig. 4 Plots of PC1 vs. PC2 based on the ^1H NMR spectra descriptors of the kidney tissue samples from the control (■), $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ -treated (●) and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ -treated (▲) rats

(A) 50 mg/kg (body weight) $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ injected and the control; (B) 10 mg/kg (body weight) $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ injected and the control; (C) 2 mg/kg (body weight) $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ injected and the control. Principal components 1 and 2 embody more than 93.0% of the data variance.

由上述分析可知,通过对完整组织的 MAS ^1H NMR 谱分析并结合模式识别方法可以研究稀土对器官特定部位造成的损伤.对稀土镧、铈急性生物效应的研究表明,注射高剂量[10, 50 mg/kg(体重)]硝酸镧和硝酸铈后,大鼠的肝脏都受到程度不同的损伤,且损伤机理不尽相同;注射高剂量硝酸铈[10, 50 mg/kg(体重)]还对大鼠肾脏造成了明显损伤,并在 48 h 内没有恢复,注射高剂量硝酸镧[10, 50 mg/kg(体重)]则没有对大鼠肾脏造成明显损伤.而注射低剂量[2 mg/kg(体重)]硝酸镧和硝酸铈对大鼠肝、肾组织的损伤均不明显.

参 考 文 献

- [1] Waters N. J., Holmes E., Williams A. *et al.*. *Chem. Res. Toxicol.* [J], 2001, **14**: 1401—1412
- [2] Wang Y. L., Bollard M. E., Keun H. *et al.*. *Anal. Biochem.* [J], 2003, **323**: 26—32
- [3] Waters N. J., Holmes E., Waterfield C. J. *et al.*. *Biochem. Pharmacol.* [J], 2002, **64**: 67—77
- [4] Garrod S., Humphreys E., Connor S. C. *et al.*. *Magn. Reson. Med.* [J], 2001, **45**: 781—790
- [5] Griffin J. L., Walker L. A., Shore R. F. *et al.*. *Xenobiotica* [J], 2001, **31**: 377—385
- [6] Cheng L. L., Wu C. L., Smith M. R. *et al.*. *FEBS Lett.* [J], 2001, **494**: 112—116
- [7] Griffin J. L., Walker L. A., Shore R. F. *et al.*. *FEBS Lett.* [J], 2000, **486**: 224—229
- [8] Lowe I. *Phys. Rev. Lett.* [J], 1959, **2**: 285—287
- [9] Nicholson J. K., Lindon J. C., Holmes E. *Xenobiotica* [J], 1999, **29**(2): 1181—1189
- [10] XU Lu(许 禄), SHAO Xue-Guang(邵学广). *Methods of Chemometrics(化学计量学方法)* [M], Beijing: Science Press, 2004: 131—138
- [11] Griffin J. L., Walker L. A., Garrod S. *et al.*. *Comparat. Biochem. Physiol.* [J], 2000, **127**: 357—367
- [12] NI Jia-Zuan(倪嘉缵). *Bioinorganic Chemistry of Rare Earth Elements(稀土生物无机化学)* [M], Beijing: Science Press, 2000
- [13] Evans C. H. *Biochemistry of Lanthanides* [M], New York: Plenum Press, 1990
- [14] Feng J. H., Li X. J., Pei F. K. *et al.*. *Anal. Biochem.* [J], 2002, **301**: 1—7
- [15] Wu H. F., Zhang X. Y., Pei F. K. *et al.*. *J. Inorg. Biochem.* [J], 2005, **99**: 644—650
- [16] Wu H. F., Zhang X. Y., Pei F. K. *et al.*. *Anal. Biochem.* [J], 2005, **339**: 242—248
- [17] WU Hui-Feng(吴惠丰), ZHANG Xiao-Yu(张晓宇), LI Xiao-Jing(李晓晶) *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2005, **26**(7): 1321—1324

Comparative Investigation on Acute Biological Effect of Lanthanum and Cerium by MAS ^1H NMR-based Metabonomic Approach

LIAO Pei-Qiu, WU Hui-Feng, ZHANG Xiao-Yu, LI Xiao-Jing, LI Zhong-Feng,

LI Wei-Sheng, WU Yi-Jie, PEI Feng-Kui*

(Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract High-resolution magic-angle-spinning(MAS) ^1H NMR spectroscopic and pattern recognition(PR) based methods were applied to compare the different acute biochemical effects between $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ - and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ -treated rats. Male Wistar rats were treated with various doses(2, 10, 50 mg/kg body weight) of $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$, and MAS ^1H NMR spectra of the intact liver and kidney tissues were analyzed by using principal components analysis to extract metabolic information. The target lesion of $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ to liver and $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ to both liver and kidney were found by MAS ^1H NMR-PR methods. This work illustrated that the combination of NMR and pattern recognition technique is a powerful method to study the biochemical effects induced by xenobiotics.

Keywords Magic-angle spinning NMR; Metabonomics; Tissue; Rare earths; Biological effects

(Ed.: S, I)