

# 轻稀土镧、铈急性生物效应的血清 $^1\text{H}$ NMR 谱代谢组学研究

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

**摘要** 采用现代核磁共振和模式识别技术, 通过分析腹腔注射给药  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  (2, 10 和 50 mg/kg 体重) 和  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  (2, 10 和 50 mg/kg 体重) 48 h 后大鼠血清的核磁共振氢谱, 由内源性代谢物浓度的变化研究了两种稀土化合物在大鼠体内的急性生物效应, 利用主成分分析法对两者进行了分类比较. 在低剂量(2 mg/kg 体重)组  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  和  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  血清中, 乳酸和肌酸酐等内源性代谢物浓度发生了微小变化; 在高剂量组(10 和 50 mg/kg 体重)中, 含量变化较大的重要内源性代谢物包括 3-羟丁酸、丙氨酸、肌酸酐、丙酮、乙酸、琥珀酸和葡萄糖等, 其中 3-羟丁酸和丙氨酸等在 La 的剂量组中变化较大, Ce 的剂量组血清中丙酮、琥珀酸和葡萄糖含量变化明显. 实验结果表明, 低剂量 La 和 Ce 的毒性较低, 并对机体影响较小, 高剂量则对大鼠肝脏造成损伤, 且 Ce 的毒性大于 La.

**关键词** 轻稀土; 血清; 核磁共振; 模式识别; 生化效应

**中图分类号** O657.2

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2006)03-0438-05

随着稀土化合物在工业、农业和医药等领域中的广泛应用, 稀土元素越来越多地进入生态环境, 并通过食物链进入生物体内, 因此科学的评价稀土在生物体内造成的生物效应及稀土安全剂量已成为重要的研究课题<sup>[1]</sup>. 核磁共振(NMR)技术是在分子水平上对生物体液、器官组织等进行无损伤分析的重要方法, 具有简便、全面、信息量大和非破坏性等优点. 随着高场 NMR 的发展, NMR 的灵敏度和分辨率有了很大的提高, 但同时也增加了体液 $^1\text{H}$  NMR 谱的复杂性, 仅靠肉眼观察和分析很难从谱图中得到全部的生化信息<sup>[2~5]</sup>. 模式识别(Pattern recognition, PR)技术是一种多元分析方法, 利用它对体液 $^1\text{H}$  NMR 谱图提取的数据进行处理和分析, 可以得到有价值的生物信息<sup>[6]</sup>. 最常用的 PR 方法是主成分分析(Principal component analysis, PCA), 其主要思想是将众多信息和变量集中到几个主成分(Principal component, PC)上, 利用这些主成分描述数据集所包含的重要信息, 进行分类比较<sup>[6,7]</sup>. 利用基于 NMR 技术和模式识别相结合的代谢组学方法研究稀土镧和铈化合物的毒性已取得了较好的结果<sup>[8~10]</sup>.

镧和铈是稀土微肥“常乐”的两种主要成分( $\text{La}_2\text{O}_3$ 占 30.48%,  $\text{CeO}_2$ 占 54.67%), 本文采用现代核磁共振和模式识别技术, 通过分析腹腔注射给药  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  和  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  48 h 后大鼠血清的核磁共振氢谱, 由内源性代谢物浓度的变化研究这两种稀土化合物在大鼠体内的急性生物效应, 利用主成分分析方法对两者进行了分类比较.

## 1 实验部分

### 1.1 动物实验

选用体重为 250~300 g 的成年雄性 Wistar 大鼠 35 只, 随机分成 7 组在代谢笼中分别喂养(控制环境的温度、湿度及昼夜循环), 对照组大鼠腹腔注射生理盐水, 实验组大鼠分别按硝酸镧(腹腔注射 2, 10 和 50 mg/kg 体重)和硝酸铈(腹腔注射 2, 10 和 50 mg/kg 体重)给药. 48 h 后, 将大鼠断颈处死取

收稿日期: 2005-05-16.

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

血, 经过离心分离得到血清样品, 并立即冷冻, 于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  储存待测.

## 1.2 样品核磁共振检测

将血清样品放入 5 mm NMR 样品管中. 样品量为 0.5 mL, 其中含 0.05 mL 重水用于锁场, 0.05 mL 缓冲溶液(0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/0.2\text{ mol/L NaH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7.0)用以消除 pH 变化引起的谱图化学位移变化, 以肌酸酐  $\delta$  3.06 的甲基氢峰为内标. 血清样品的 <sup>1</sup>H NMR 谱图在 Bruker Av-600 型 NMR 仪上测试, 采用 CPMG[ $90^\circ - (\tau - 180^\circ - \tau)n$ -acquisition( $\tau = 200\text{ }\mu\text{s}$ ,  $n = 100$ )]自旋回波序列, 结合预饱和方法采集信号: FID 采集为 32 次, 32 k 数据点, 延迟为 6 s, 采用  $90^\circ$  偏转角.

## 1.3 血清样品 <sup>1</sup>H NMR 谱数据处理

采用 MestRe-C 2.3 版本软件(<http://qobru.e.usc.es>)对大鼠血清的<sup>1</sup>H NMR 谱按  $\delta$  0.04 间隔从  $\delta$  0 ~ 10 分段进行数据提取, 除去水峰  $\delta$  4.6 ~ 5.0, 对余下的 238 段谱图进行积分<sup>[5,11]</sup>, 采用自编程序进行主成分分析.

# 2 结果与讨论

## 2.1 腹腔注射硝酸镧和硝酸铈 48 h 后大鼠血清 <sup>1</sup>H NMR 谱分析

血清组成均一性高, 含有血液中几乎所有小分子化合物, 而生物大分子少且含量低, 可消除由于生物大分子 NMR 谱峰较宽带来的干扰, 便于采用 NMR 方法进行生理、病理的对照研究. 图 1 为硝酸镧和硝酸铈 10 mg/kg 体重剂量组与对照组血清的 <sup>1</sup>H NMR 谱图, 血清中代表性代谢物 <sup>1</sup>H NMR 谱峰的化学位移<sup>[12,13]</sup>及其信号强度变化列于表 1. 从图 1 及表 1 数据可见, 给药各剂量硝酸镧和硝酸铈的大鼠血清中主要代谢物的浓度变化情况. 结果表明, 给药 48 h 后, 几乎所有硝酸镧实验组大鼠血清 <sup>1</sup>H NMR 谱中均出现酮体 3-羟基丁酸信号增强的现象, 而丙酮仅在给药硝酸铈实验组大鼠血清中含量有所上升. 由于脂肪酸在肝脏中经  $\beta$ -氧化生成的乙酰辅酶 A 转变为丙酮、乙酰乙酸和 3-羟基丁酸等中间产物(即酮体), 其中 3-羟基丁酸的转化受 3-羟基丁酸脱氢酶的催化, 丙酮的转化则与乙酰乙酸脱羧酶有关<sup>[14]</sup>. 这两种酶都依附于肝线粒体内膜上, 血清中 3-羟基丁酸和丙酮含量上升说明稀土离子的引入可能造成这两种酶的代谢异常, 导致酮体在血清中的积累超出了外围组织的正常氧化能力, 从而影响了肝的正常生理功能, 因此 3-羟基丁酸和丙酮都可以作为急性肝损伤的标志物. 说明虽然硝酸镧和硝酸铈都引起了肝功能失调, 但它们对机体产生影响的机理可能不同.

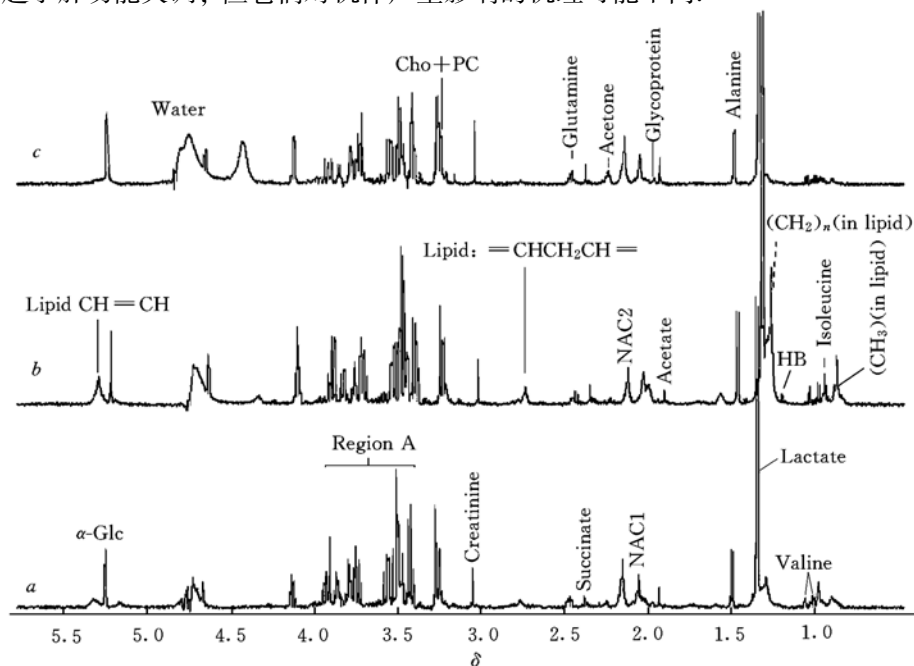


Fig. 1 600 MHz high-resolution <sup>1</sup>H CPMG NMR spectra of serum from control and two rare earth-treated rats

a. The control; b. 10 mg/kg body weight  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ ; c. 10 mg/kg body weight  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ .

Table 1 Assessment of metabolites in serum from La<sup>3+</sup> and Ce<sup>3+</sup> dosed rats after 48 h\*

Metabolite	Chemical shift( $\delta$ ) and multiplicity	2 mg/kg body weight		10 mg/kg body weight		50 mg/kg body weight	
		La	Ce	La	Ce	La	Ce
Lipoprotein CH <sub>3</sub>	0.84	—	—	↑	—	↑	—
Valine	0.97(d)	—	—	↑	—	↑	—
3-D-Hydroxybutyrate	1.20(d)	↑	—	↑	—	↑↑	↑
Lactate	1.33(d)	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑↑
Alanine	1.48(d)	—	—	↑	—	↑	—
Acetate	1.93(s)	—	—	—	↑	—	↑
Glycoprotein	2.06	—	—	—	↑	—	↑
Acetone	2.24(s)	—	—	—	↑	—	↑
Succinate	2.40(s)	—	—	—	↑	—	↑
Glutamine	2.48(m)	—	—	—	—	—	—
Lipid: =CHCH <sub>2</sub> *CH=	2.72	↑	—	↑	—	↑	—
Creatinine	3.06(s)	↑	↑	↑	↑	↑	↑
TMAO	3.27(s)	—	↑	↑	↑	↑	↑
$\alpha$ -Glucose	5.22(d)	—	—	—	↓	—	↓

\* Abbreviations and keys: s, singlet; d, double; t, triplet; m, complex multiplet; —, not detectably different from control level; ↑, a detectable but minor elevation in concentration; ↑↑, an obvious elevation in concentration compared with control levels; ↓, a minor decrease (20%—50%) from control levels.

在给药低剂量(2 mg/kg 体重)硝酸镧和硝酸铈的大鼠血清的 <sup>1</sup>H NMR 谱中, 代谢物谱峰强度未发生变化. 但随给药剂量的增加, 给药(10 和 50 mg/kg 体重)硝酸镧的大鼠血清中缬氨酸和丙氨酸等氨基酸含量逐渐上升, 血中氨基酸含量的上升是肝昏迷的独特标志<sup>[15]</sup>. 另外, 血清中丙氨酸的代谢与血中谷丙转氨酶有关, 而谷丙转氨酶是急性肝功能受损的标志物<sup>[16]</sup>, 这可能是由于 La<sup>3+</sup> 与氨基酸分解代谢有关的酶结合, 影响了酶的正常生理功能, 造成肝细胞不能有效地摄取氨基酸, 导致血清中氨基酸增加, 并随稀土量的增加肝损伤也渐趋严重. 在给药高剂量(50 mg/kg 体重)硝酸铈的大鼠血清中, 肌酸酐、乙酸和琥珀酸等的含量明显增加, 葡萄糖含量则有所降低.

乙酸是短链脂肪酸氧化的产物: 乙酰乙酸 + 乙酰辅酶 A → 乙酰乙酸辅酶 A + 乙酸, 因此, 乙酸含量的上升也表明在肝线粒体中进行的脂肪代谢出现紊乱. 琥珀酸是三羧酸循环的中间物, 三羧酸循环是糖有氧代谢的主要途径, 与催化糖的有氧分解以及蛋白质合成有关的酶分布在线粒体基质中, 有可能在大量稀土离子进入大鼠体内后, 影响了相关酶的活性, 因而出现一些代谢物异常现象. 血中葡萄糖降低可能是由于高剂量组中胰岛素水平增加引起的, 这是内分泌系统受到影响的表<sup>[17]</sup>.

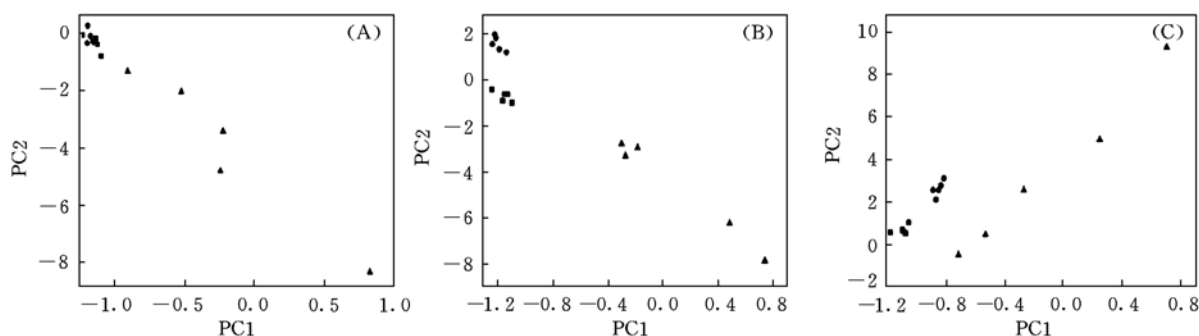
在所有实验组中乳酸含量均明显上升, 表明缺氧代谢增加. 硝酸镧和硝酸铈高剂量组大鼠血清中均有肌酸酐含量增加的现象, 而血清中肌酸酐含量取决于肾脏的排泄能力, 含量增加表明肾功能不足<sup>[8]</sup>. 说明随硝酸镧和硝酸铈给药剂量的增加, 机体损伤加剧, 不但造成肝损伤, 而且也造成特定部位的肾损伤.

## 2.2 大鼠血清 <sup>1</sup>H NMR 谱数据的主成分分析

主成分分析法是一种多元统计分析技术, 其主要成分(PC)是由原始变量按照一定的权重因子经线性组合而成的新变量, 这些变量要尽可能多地表征原变量的数据特征而不丢失信息, 新变量互不相关, 要求第一个 PC 包含数据集的最大方差, 第二个 PC 则较小一些, 最后由两种主成分作图分类, 可以很好地解释原始数据的重要信息<sup>[6,18]</sup>. 利用主成分分析方法处理由 <sup>1</sup>H NMR 谱提取出来的数据, 可以直观描述由于外源性化合物的影响引起体内代谢模式的变化<sup>[7]</sup>.

图 2 为给药 La 和 Ce 的不同剂量组与对照组大鼠血清 <sup>1</sup>H NMR 谱数据主成分分析分类图, 由图 2 可见, 除了低剂量(2 mg/kg 体重)硝酸镧外, 其它样本与对照组均有清晰分类. 在 10 mg/kg 体重剂量组[图 2(B)]中, 镧剂量组在 PC2 方向上贡献较大, 而铈剂量组在 PC1 和 PC2 上都有贡献; 在 50 mg/kg 体重剂量组[图 2(C)]中, 两种稀土离子在 PC1 和 PC2 上均有较大贡献, 说明较高剂量 La 和 Ce 对机体都产生了较大影响, 但又不尽相同.

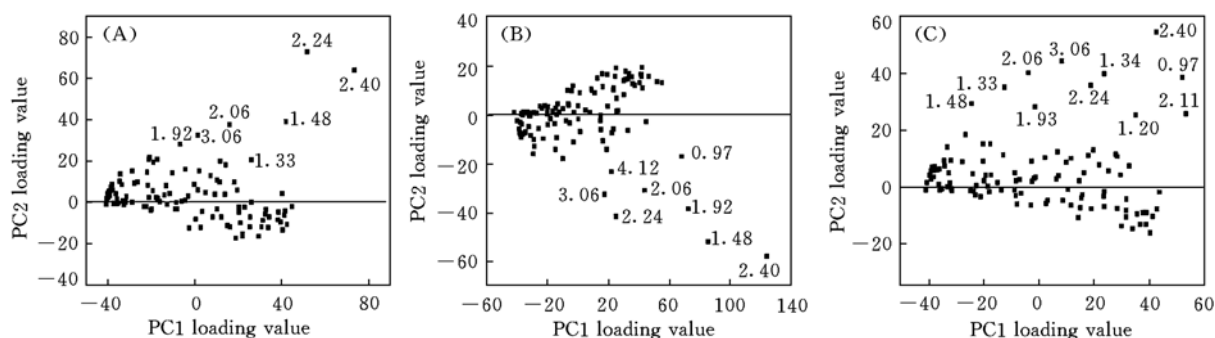
PC 负载图表示 NMR 共振峰对 PC 值的贡献, 给药 La 和 Ce 不同剂量组与对照组的血清谱图的二



**Fig. 2** Plots of PC1 vs. PC2 based on the <sup>1</sup>H NMR spectra descriptors of the serum samples from control (■), La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-treated (●) and Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-treated (▲) rats

(A) La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (2 mg/kg body weight) and control; (B) La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (10 mg/kg body weight) and control; (C) La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (50 mg/kg body weight) and control.

维负载图如图 3。由图 3(A) 可见, 在低剂量(2 mg/kg 体重)组中, 对 PCA 分类贡献比较大的为内源性代谢物, 包括琥珀酸( $\delta$  2.40)、丙酮( $\delta$  2.24)和肌酸酐( $\delta$  3.06)等, 并且主要为 PC1 方向上的。与表 1 数据对照可发现, 这些代谢物的变化都是由于 Ce<sup>3+</sup> 的引入引起的。从高剂量的二维负载图[图 3(C)]中, 在 PC1 和 PC2 上贡献较大的代谢物包括琥珀酸( $\delta$  2.40)、丙酮( $\delta$  2.24)、丙氨酸( $\delta$  1.48)、缬氨酸( $\delta$  0.97)、肌酸酐( $\delta$  3.06)、乙酸( $\delta$  1.93)和 3-羟基丁酸( $\delta$  1.20)等, 在这些代谢物中氨基酸( $\delta$  0.97, 1.48 和 1.34)及 3-羟基丁酸( $\delta$  1.20)是由 La<sup>3+</sup> 引起的, 其它对 PCA 分类贡献较大的代谢物都与 Ce<sup>3+</sup> 离子的生化效应有关。由主成分分析图中可知, La<sup>3+</sup> 和 Ce<sup>3+</sup> 的引入引起了肝以及局部肾的损伤, 这与血清谱图分析结果基本一致。



**Fig. 3** Scatter loading plots of PC1 vs. PC2 based on the <sup>1</sup>H NMR spectra descriptors of the serum samples showing the contribution of integral regions of the NMR spectrum to the separation

(A) La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (2 mg/kg body weight) and control; (B) La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (10 mg/kg body weight) and control; (C) La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (50 mg/kg body weight) and control.

由上述结果可知, 利用 <sup>1</sup>H NMR 技术测定给药 48 h 后大鼠血清中内源性代谢物的含量变化结果表明, 硝酸镧、硝酸铈都对肝脏造成了一定程度的损伤, 并随剂量增加而加剧。在高剂量时, 在影响肝功能的同时也造成了肾功能不足。在同一剂量条件下, 镧、铈对机体都产生一定急性毒性, 但强弱有所不同, 例如, 在 10 mg/kg 体重剂量时, 给药 Ce 和 La 的大鼠血清中的酮体、肌酸酐、乙酸等明显变化, 而琥珀酸、葡萄糖仅在 Ce 的血清中变化, 说明相同剂量铈的影响比镧大, 这与主成分分析所得结果基本一致。

## 参 考 文 献

- [1] NI Jia-Zuan(倪嘉缙). Bioinorganic Chemistry of Rare Earth Elements(稀土生物无机化学)[M], Beijing: Academic Press, 2000
- [2] Lindon J. C., Holmes E., Nicholson J. K.. Prog. NMR Spectrosc. [J], 2001, 39: 1—40
- [3] LI Xiao-Jing(李晓晶), FENG Jiang-Hua(冯江华), PEI Feng-Kui(裴奉奎) et al.. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2001, 22(11): 1904—1906

- [ 4 ] Feng Jiang-Hua, Li Xiao-Jing, Pei Feng-Kui *et al.*. Anal. Biochem. [J], 2002, **301**: 1—7
- [ 5 ] Holmes E., Nicholls A. W., Linton J. C. *et al.*. NMR Biomed. [J], 1998, **11**: 235—244
- [ 6 ] 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
- [ 7 ] YAN Xian-Zhong(颜贤忠), ZHAO Jian-Yu(赵剑宇), PENG Shuang-Qing(彭双清) *et al.*. Chin. J. Magn. Reson. (波谱学杂志) [J], 2004, **21**(2): 263—271
- [ 8 ] Wu Hui-Feng, Zhang Xiao-Yu, Li Xiao-Jing *et al.*. Anal. Biochem. [J], 2005, **340**: 99—105
- [ 9 ] 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
- [ 10 ] Wu Hui-Feng, Zhang Xiao-Yu, Li Xiao-Jing *et al.*. J. Inorg. Biochem. [J], 2005, **99**: 644—650
- [ 11 ] Linton J. C., Holmes E., Nicholson J. K. *et al.*. Annu. Rep. NMR. Spectrosc. [J], 1999, **38**: 1—88
- [ 12 ] Spraul M., Nicholson J. K., Foxall P. J. D. *et al.*. Anal. Chem. [J], 1995, **67**: 793—811
- [ 13 ] Holmes E., Foxall P. J. D., Spraul M. *et al.*. J. Pharm. Biomed. Anal. [J], 1997, **15**: 1647—1659
- [ 14 ] Solanky K. S., Balley N. J. C., Beckwith-Hall B. M. B. *et al.*. Anal. Biochem. [J], 2003, **323**: 197—204
- [ 15 ] Grootveld M., Bell J. D., Halliwell B. *et al.*. J. Biol. Chem. [J], 1989, **264**(8): 4417—4422
- [ 16 ] Waters N. J., Holmes E., Williams A. *et al.*. Chem. Res. Toxicol. [J], 2001, **14**: 1401—1412
- [ 17 ] SHEN Tong(沈 同), WANG Jing-Yan(王镜岩). Biochemistry(生物化学)[M], Beijing: Higher Education Press, 1993
- [ 18 ] Holmes E., Bonner F. W., Sweatman B. C. *et al.*. Mol. Pharmacol. [J], 1992, **42**: 922—930

## Investigation on the Acute Biochemical Effects of Light Rare Earths(Lanthanum and Cerium) by NMR-Based Metabonomic Approaches

LI Zhong-Feng, WU Hui-Feng, ZHANG Xiao-Yu, LI Xiao-Jing,  
LIAO Pei-Qiu, LI Wei-Sheng, PEI Feng-Kui \*

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

**Abstract**  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and pattern recognition method were used to assess acute biochemical effects of light rare earths. Male Wistar rats were treated with both  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  and  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  at doses of 2, 10 and 50 mg/kg body weight. Serum samples from the rats dosed with the two kinds of light rare earths were gained after 48 h and analyzed by 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra. Each NMR spectra was data-processed to provide 238 intensity-related descriptors as input coordinates in a multidimensional space and analyzed by pattern recognition method. Many low-molecular weight metabolites were identified by  $^1\text{H}$  NMR spectra of rat serum. An increase in ketone bodies, creatinine, lactate, succinate and various amino acids(valine, leucine and glutamine) were found from the higher doses(10 and 50 mg/kg body weigh) of rare earths-treated groups, together with a decrease of glucose in the serum from  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ -dosed groups. Those results may mean that high-dosage of La and Ce impair the specific region of liver. The similar toxicities with various mechanisms for La and Ce were implicated by NMR-based metabonomic approach.  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  exhibited a higher toxicity than  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  at the same doses.

**Keywords** Light rare earth; Serum; Nuclear magnetic resonance(NMR); Pattern recognition; Biochemical effects

(Ed. : K, G)