

# 甲亢患者血清和尿液的核磁共振 代谢组学研究

危阳洋<sup>1,2</sup>, 王彩虹<sup>3</sup>, 李伟<sup>2</sup>, 董继扬<sup>2</sup>, 陈忠<sup>1,2</sup>

(1. 厦门大学材料学院生物材料系, 2. 物理与机电工程学院物理系, 福建省等离子体与磁共振研究重点实验室, 厦门 361005; 3. 厦门大学附属第一医院内分泌科, 厦门 361002)

**摘要** 应用基于核磁共振(NMR)的代谢组学方法, 研究甲状腺功能亢进(简称甲亢)患者和健康人群的血清和尿液, 分析甲亢疾病的特征代谢物. 实验收集 33 个甲亢患者和 17 个健康志愿者的血清样品以及 53 个甲亢患者和 58 个健康志愿者的尿液样品, 采用多元统计分析方法研究甲亢组和对照组血清和尿液中的内源性代谢差异. 结果表明, 甲亢组血清中的胆碱、葡萄糖和三甲胺等物质的含量升高, 而 VLDL, LDL 和胆固醇等脂质以及乳酸、糖蛋白和丙氨酸等代谢物的含量下降; 甲亢组尿液中的葡萄糖、柠檬酸、牛磺酸以及肌氨酸等代谢物的含量升高, 而马尿酸、TMAO、甲酸和琥珀酸等代谢物的含量下降. 结果表明, 甲亢病不仅影响了糖类、脂类和蛋白质三大物质的代谢, 还对能量代谢、肝肠循环和肠道微生物等多个生理系统产生显著影响, 并且可能造成肝脏及肾脏等器官的损伤.

**关键词** 基于核磁共振的代谢组学; 甲亢; 体液; 主成分分析

中图分类号 O657.2

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)02-0279-06

代谢组学是后基因组时代的一个重要的研究领域, 它是关于定量描述生物体内源性代谢物质的整体及其对内因和外因变化应答规律的科学, 是系统生物学的重要组成部分<sup>[1]</sup>. 与传统的单指标或少数几项指标综合的诊断方式相比, 代谢组学从整体性观点出发, 系统地研究了生物体内源性代谢产物的变化及其发展规律, 能够全面、即时地反映机体的变化信息. 近年来, 代谢组学越来越多地应用于疾病的研究, 并已经在 I 型<sup>[2,3]</sup>、II 型糖尿病<sup>[4-6]</sup>、高血压<sup>[7]</sup>、脂肪肝<sup>[8]</sup>以及心血管等疾病<sup>[9]</sup>的研究中取得初步成果.

甲状腺功能亢进(简称甲亢)是一种自身免疫性疾病, 是由多种原因引起的甲状腺激素分泌过多所导致的一种常见的内分泌疾病. 研究表明, 甲亢不仅导致体内多种物质代谢的紊乱, 还影响心血管和神经等多个生理系统. 基于传统的分子生物学研究方法研究甲亢病存在一定的困难, 而从整体性出发的代谢组学研究方法用于甲亢病的研究尚未见文献报道.

以 NMR 为主要分析手段的代谢组学通常称为基于 NMR 的代谢组学<sup>[10]</sup>. 本文采用这一方法, 研究了甲亢患者与正常人的血液和尿液内源性代谢物的变化, 利用主成分分析(Principal components analysis, PCA)方法, 寻找甲亢病的可能特征代谢物, 并从代谢途径方面给出相应的解释.

## 1 实验部分

### 1.1 样品采集与制备

样品由厦门市第一医院专职医务人员采集. 血液样品共 50 个, 包括 33 个甲亢患者(甲亢组)和 17 个健康志愿者(正常对照组)的血液; 尿液样品共 111 个, 包括 53 个甲亢患者(甲亢组)和 58 个健康志愿者(正常对照组)的尿液. 甲亢组的血液和尿液样品采自厦门市第一医院的甲亢患者志愿者(年龄范

收稿日期: 2009-04-14.

基金项目: 卫生部科学研究基金-福建省卫生教育联合攻关计划项目(批准号: WKJ2008-2-36)和福建省自然科学基金(批准号: 2009J01299)资助.

联系人简介: 董继扬, 男, 博士, 副教授, 主要从事核磁共振代谢组学研究. E-mail: jydong@xmu.edu.cn

围为 22 ~ 55 岁, 由于女性的甲亢发病率较高, 因此志愿者的男女比例为 1:3 左右); 正常对照组样品来自健康的志愿者(年龄范围为 19 ~ 45 岁, 男女比例为 1:1). 收集后的血液样品经离心(6000 r/min, 4 °C 下离心 10 min)得到血清, 放入 -80 °C 冰箱保存; 尿液样品收集后经离心(6000 r/min, 4 °C 下离心 10 min)得到上清液, 放入 -25 °C 冰箱保存.

## 1.2 核磁共振检测

将 500  $\mu\text{L}$  血清与 250  $\mu\text{L}$  磷酸盐缓冲液[0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7.4,  $\text{D}_2\text{O}$ (99.9%)]混合, 以消除 pH 变化对化学位移的影响. 加入适量的 DSS(2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid)作为化学位移零点的定标. 用 5 mm 样品管, 在 Varian NMR System 500 MHz 谱仪上采集样品的一维  $^1\text{H}$  NMR 谱. 实验采用 5 mm HCN 三共振探头, 温度 300 K, 谱宽 5 kHz, 信号累加 256 次, 采用 NO-EPR-CPMG(NOEPR, Nuclear overhauser effect spectroscopy with PResaturation; CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence)脉冲序列进行数据采样, 其中预饱和和模块用于抑制水峰信号, 自旋回波模块用于抑制由蛋白和脂蛋白等物质产生的宽峰.

取解冻后的尿液样品 500  $\mu\text{L}$ , 加入 250  $\mu\text{L}$  缓冲液[0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7.4,  $\text{D}_2\text{O}$ (99.9%)], 并加入适量的 DSS 作为化学位移定标物. 用 5 mm 样品管, 在 Varian NMR System 500 MHz 谱仪上采集样品的  $^1\text{H}$  NMR 谱. 实验采用 5 mm HCN 三共振探头, 温度 300 K, 谱宽 5 kHz, 信号累加 128 次, 用预饱和脉冲序列(NOEPR)采样并抑制水峰信号.

## 1.3 谱图预处理

采用 MestRe-C 2.3 软件(<http://qobruce.usc.es/jsigroup/MestRe-C>)及自编软件对谱图进行手动调相、基线校正和谱峰对齐. 对于尿液样品, 去除尿素峰和残余水峰( $\delta$  4.6 ~ 6.0)后, 对  $\delta$  0.2 ~ 10.0 区域按  $\Delta\delta = 0.04$  等间隔分段积分; 对于血清样品, 在  $\delta$  0.2 ~ 4.6 区域按  $\Delta\delta = 0.02$  等间隔分段积分. 将积分数据归一化后构成数据矩阵, 并利用 PCA 方法对数据矩阵进行统计分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 甲亢患者血清的 $^1\text{H}$ NMR 分析

甲亢患者与正常人血清样品的  $^1\text{H}$  NMR 谱图如图 1 所示. 图 1 中标出了一些常见的代谢物, 如缬氨酸(Valine,  $\delta$  0.97, 1.04)、乳酸(Lactate,  $\delta$  1.33)、丙氨酸(Alanine,  $\delta$  1.48)、糖蛋白(Glycoprotein,  $\delta$  2.02 ~ 2.06)、肌氨酸酐(Creatinine,  $\delta$  3.05, 4.05)、胆碱(Choline,  $\delta$  3.21)和葡萄糖(Glucose,  $\delta$  3.2 ~ 4.0)等.

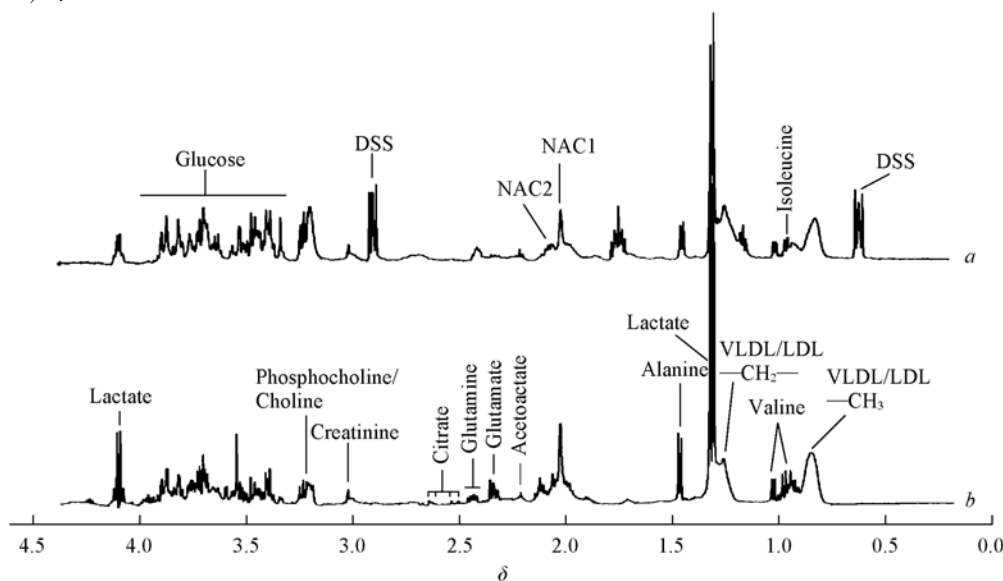


Fig. 1 Typical  $^1\text{H}$  NMR spectra of serum from hyperthyroidism (a) and healthy (b) individuals  
NAC1, NAC2: N-acetyl glycoprotein signals.

## 2.2 甲亢患者血清样品的 $^1\text{H}$ NMR 谱 PCA 分析

为了分析正常组和甲亢组的内源性代谢物差异, 找出甲亢组的特征代谢物, 我们采用 PCA 方法对血清样品的数据矩阵进行统计分析. 图 2 为相应的 PC1-PC2 得分图和负载图.

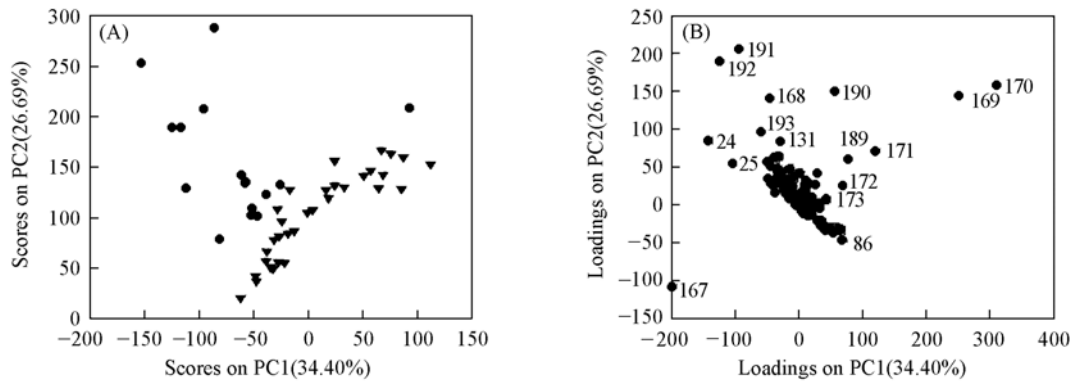


Fig. 2 Score (A) and loading (B) plots of  $^1\text{H}$  NMR spectra of serum from healthy (●) and hyperthyroidism (▼) groups

图 2(A) 表明, 在血清  $^1\text{H}$  NMR 谱的 PC1-PC2 得分图中, 甲亢组与正常对照组能够明显地区分开. 甲亢患者因为有着比较明显的病理特征, 所以甲亢组的样本点的分布相对比较集中; 正常人的个体差异比较大, 因此, 对照组的样本点的分布相对比较分散. 图 2(B) 为相应的 PCA 负载图, 其中每个点代表一个谱峰段. 通常, 在样本分组方向上如果谱峰段偏离零点越远, 表明这个谱峰段对分类的贡献越大, 越有可能是潜在的特征代谢物.

谱峰段的挑选方法: 从 PCA 负载图中选择对分类贡献较大的谱峰段 (包括一些不太明显的谱峰段), 先进行代谢物的归属, 删除外源性物质 (如 DSS) 以及无法归属的谱峰段 (比如噪声段), 再用  $t$  检验的方法筛选出具有生物学统计意义的代谢物.

挑选对分类贡献较大并有可能是特征代谢物的谱峰和谱峰段 190 ~ 193, 168, 160, 130 ~ 132, 115, 71 ~ 72, 62 ~ 70 和 24 ~ 25 等, 将这些谱峰和谱峰段与相应的可能代谢物列在表 1 中.

Table 1 Bins with greater contribution to group distinct and their corresponding potential metabolites\*

Index of bins	$^1\text{H}$ NMR, $\delta$	Potential metabolite	Change	Index of bins	$^1\text{H}$ NMR, $\delta$	Potential metabolite	Change
190—193	0.84—0.93	Lipid, Cholesterin, VLDL, LDL	↓↓	115	2.36	Pyruvate	↓
168	1.33	Lactate	↓↓	71—72	3.21	Choline	↑
160	1.46	Alanine	↓	62—70	3.24—3.40	Glucose	↑
130—132	2.02—2.06	Glycoprotein	↓↓	24—25	4.12—4.14	Lactate	↓↓

\* Abbreviations and keys: ↑: detectable elevation from control levels; ↓: detectable reduction from the control levels; ↓↓: obviously reduction from control levels.

可见, 甲亢患者血液中的胆固醇、VLDL 和 LDL 等脂质含量显著降低, 乳酸、糖蛋白、丙氨酸和丙酮酸的含量减少, 同时胆碱和葡萄糖的含量增加. 血液中葡萄糖含量的显著增加可能是甲亢患者体内的糖异生作用增强的结果. 肝脏是糖代谢的主要器官, 肝糖原加速分解以及其它非糖物质转化为葡萄糖速率的增加使血糖含量增高. 甲亢患者血液中乳酸和丙酮酸含量的减少表明甲亢使体内糖酵解和厌氧呼吸减少<sup>[11]</sup>. VLDL、LDL 和胆固醇等脂质的信号也明显减弱, 甲亢引起脂类代谢的紊乱, 总的效果是导致血脂的含量降低, 血脂清除率增加<sup>[12~16]</sup>. 乙酰基糖蛋白信号 NAC1, NAC2 (*N*-Acetyl glycoprotein signals) 以及丙氨酸含量的降低表明, 甲亢患者体内蛋白质和氨基酸的分解代谢加强. 其原因可能是甲亢使肝脏中某些分解蛋白质和氨基酸代谢的酶活性增加, 导致血液中氨基酸含量的降低<sup>[17]</sup>.

此外, 胆碱的代谢包含胆碱和磷脂酰胆碱, 它是细胞膜和磷脂脂蛋白的组成成分, 对细胞膜的完整性和脂类的代谢发挥着重要的作用<sup>[18]</sup>. 甲亢患者血清中胆碱含量的增加可能破坏了细胞膜通透性, 导致对细胞结构产生了损伤<sup>[18]</sup>.

### 2.3 甲亢患者尿液的 $^1\text{H}$ NMR 分析

图3是甲亢患者和健康人尿液的典型 $^1\text{H}$  NMR谱图. 图3中标出了一些常见的代谢物, 如乳酸(Lactate,  $\delta$  1.33)、丙氨酸(Alanine,  $\delta$  1.46)、柠檬酸(Citrate,  $\delta$  2.56, 2.72)、二甲胺(Dimethylamine, DMA,  $\delta$  2.73)、肌氨酸酐(Creatinine,  $\delta$  3.03, 4.05)、肌氨酸(Creatine,  $\delta$  3.02, 3.92)、氮氧三甲胺(TMAO,  $\delta$  3.27)、甘氨酸(Glycine,  $\delta$  3.57)、葡萄糖(Glucose,  $\delta$  3.2~4.0)、马尿酸(Hippurate,  $\delta$  7.73, 7.64)和甲酸盐(Formate,  $\delta$  8.44)等.

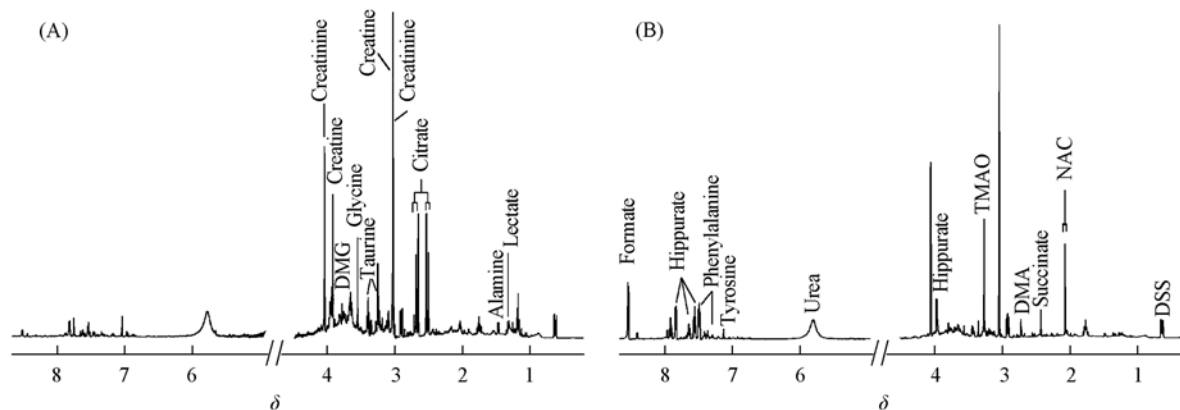


Fig. 3 Typical  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine from hyperthyroidism (A) and healthy (B) individuals

TMAO: Trimethyl-*N*-oxide; DMA: dimethylamine; DMG: dimethylglycine.

### 2.4 甲亢患者尿液样品 $^1\text{H}$ NMR 谱的 PCA 分析

对尿液样品的数据矩阵进行 PCA 分析, 可得到 PC1-PC2 的得分图和负载图, 如图4所示. 由图4可见, 甲亢组和对照组的样本在 PC1-PC2 得分图中能明显区分, 说明两组分的尿液代谢物中存在显著差异.

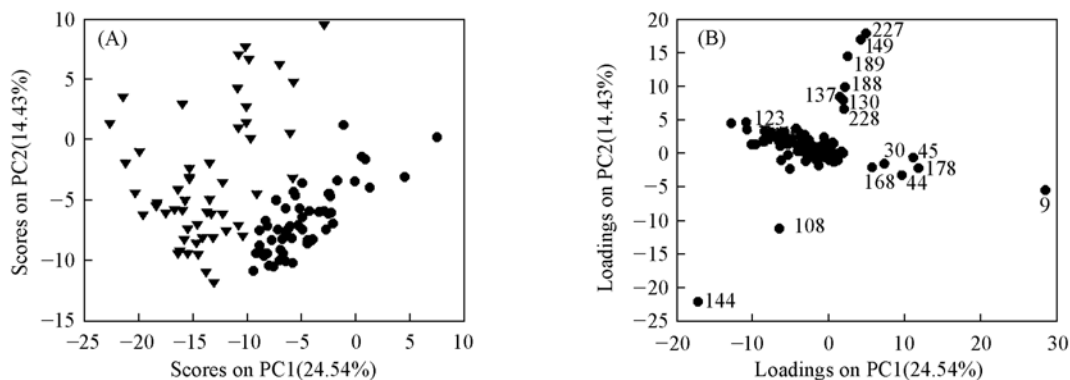


Fig. 4 Scores (A) and loading (B) plots of urine samples from healthy (●) and hyperthyroidism (▼) groups

在 PCA 负载图中, 通常在分组方向上偏离中心零点最远的那些谱峰段即是最有可能存在特征代谢物的谱峰段. 在尿液的 PCA 负载图[图2(B)]中选择特征谱峰段结果列在表2中.

Table 2 Bins with greater contribution to group distinct and their corresponding potential marked metabolites\*

Index of bins	$^1\text{H}$ NMR, $\delta$	Potential metabolite	Change	Index of bins	$^1\text{H}$ NMR, $\delta$	Potential metabolite	Change
168	2.37	Pyruvate	↓↓	127	3.57	Glycine	↑↑
166	2.39	Succinate	↓↓	113—126	3.60—4.00	Glucose	↑↑
155—160	2.62—2.77	Citrate	↑↑	108	4.12	Lactate	↓
144	3.03	Creatinine	↑	44—45	7.50—7.85	Hippurate	↓↓
135—136	3.24—3.26	Taurine	↑↑	9	8.44	Formate	↓↓
137	3.27	TMAO	↑				

\* Abbreviations and keys: ↑: detectable elevation from control levels; ↓: detectable reduction from the control levels; ↑↑: obviously elevation from control levels; ↓↓: obviously reduction from control levels.

以上结果表明, 相对于健康人而言, 甲亢患者尿液中的代谢物也发生了明显的改变. 其中, 甲亢患者尿液中葡萄糖和甘氨酸的含量显著增加, 意味着肾小管对低分子量化合物的重吸收降低, 是肾损伤的重要标志<sup>[19]</sup>. 柠檬酸是三羧酸循环的中间产物, 三羧酸循环是有氧代谢的主要途径, 柠檬酸的增加表明有氧代谢的增强<sup>[20]</sup>. 乳酸的减少表明厌氧呼吸的减少, 与血液中乳酸含量的显著降低一致. 尿液中牛磺酸的增加是肝损伤的重要标志<sup>[21]</sup>. 肌氨酸酐和肌酸的增加是肌肉当中磷酸肌酸加快分解的结果, 原因可能是由于甲亢分泌过多的甲状腺激素促进了肌肉的分解, 使尿液中肌氨酸酐的含量升高. 甲酸是一种正常的新陈代谢产物, 它参与一碳单位的代谢, 甲酸的减少可能影响一碳单位的代谢. 马尿酸以及马尿酸的前体物质是由肠道菌群代谢所产生的, 肠道环境的改变导致了马尿酸的减少<sup>[22,23]</sup>. 在服用抗菌剂药物的动物实验中, 随着抗菌剂对肠道微生物环境的破坏, 尿液中马尿酸和TMAO的含量减少<sup>[24]</sup>, 并且随着肠道环境的恢复, 尿液中马尿酸和TMAO的含量开始逐渐升高<sup>[25]</sup>. 因此, 甲亢尿液中马尿酸和TMAO的含量减少表明肠道微生物环境可能遭到了破坏.

### 3 结 论

采用基于 NMR 的代谢组学方法研究甲亢患者的血清和尿液, 得到了乳酸和胆碱等甲亢疾病的特征代谢物. 对这些特征代谢物的代谢途径的分析发现, 甲亢不仅影响了糖、脂类和蛋白质的代谢, 也导致了能量代谢、肝肠循环和氨基酸等其它代谢系统的紊乱. 甲亢患者血液中三甲胺显著增加, 尿液中过量的葡萄糖和甘氨酸等代谢物表明肾脏受到了损伤. 同时, 甲亢患者尿液中牛磺酸的增多表明肝脏也受到了损伤. 此外, 血液中胆碱的增多和尿液中马尿酸的减少还表明甲亢可能导致细胞毒性和肠道环境的破坏.

与传统临床的单指标诊断方法相比, 代谢组学方法更全面、整体地分析甲亢所导致的机体变化, 这种代谢物的“整体模式”或“指纹”比单一靶标具有更好的一致性和预见性, 能全面系统地反映人体的各项病理生理信息. 因此, 本文的研究结果不仅对甲亢疾病的诊断和治疗具有重要意义, 还能为甲亢发病机制的研究提供新的科学依据.

### 参 考 文 献

- [1] Nicholson J. K., Lindon J. C. . Nature[J], 2008, **455**: 1054—1056
- [2] Makinen V. P., Soininen P., Forsblom C., *et al.* . Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med. [J], 2006, **19**: 281—296
- [3] ZHANG Jie(张洁), YAN Li-Juan(严丽娟), LIN Lin(林琳), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(11): 2171—2173
- [4] Yang J., Xu G. W., Hong Q. F., *et al.* . J. Chromatogr. B[J], 2004, **813**: 53—58
- [5] Yuan K. L., Kong H. W., Guan Y. F., *et al.* . J. Chromatogr. B[J], 2007, **850**: 236—240
- [6] Xu J. J., Zhang J., Dong J. Y., *et al.* . Anal. Bioanal. Chem. [J], 2009, **393**: 1657—1668
- [7] Akira K., Imachi M., Hashimoto T. . Hypertension Research[J], 2005, **28**: 425—430
- [8] Dumas M. E., Barton R. H., Toye A., *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 2006, **103**: 12511—12516
- [9] Brindle J. T., Antti H., Holmes E., *et al.* . Nat. Med. [J], 2002, **8**: 1439—1444
- [10] Tang H. R., Wang Y. L. . Prog. Biochem. Biophys[J], 2006, **33**: 401—417
- [11] Liao P. Q., Wei L., Zhang X. Y., *et al.* . Anal. Biochem. [J], 2007, **364**: 112—121
- [12] Guerrero A., Pamplona R., Portero-Otin M., *et al.* . Free Radic. Biol. Med. [J], 1999, **26**: 73—80
- [13] Costantini F., Pierdomenico S. D., De Cesare D., *et al.* . Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. [J], 1998, **18**: 732—737
- [14] Magsino C. H., Hamouda W., Ghanim H., *et al.* . Metab-Clin. Exp. [J], 2000, **49**: 799—803
- [15] Gredilla R., Barja G., Lopez-Torres M. . Free Radic. Res. [J], 2001, **35**: 417—425
- [16] Nedvidkova J., Haluzik M., Bartak V., *et al.* . Proceedings of the 8th Symposium on Catecholamines and Other Neurotransmitters in Stress[C], New York: Acad. Sciences, 2003: 541—549
- [17] Platell C., Kong S. E., Mccauley R., *et al.* . J. Gastroenterol Hepatol[J], 2000, **15**: 706—717
- [18] Ye H. Q., Gan L., Yang X. L., *et al.* . J. Ethnopharmacol[J], 2006, **103**: 366—371
- [19] Bairaktari E., Katopodis K., Siamopoulos K. C., *et al.* . Clinical Chemistry[J], 1998, **44**: 1256—1261
- [20] Psihogios N. G., Gazi I. F., Elisaf M. S., *et al.* . NMR Biomed. [J], 2008, **21**: 195—207

- [21] Timbrell J. A. . *Toxicology*[J], 1998, **129**: 1—12
- [22] Delaney J. , Neville W. A. , Swain A. , *et al.* . *Biomarkers*[J], 2004, **9**: 271—290
- [23] Waters N. J. , Waterfield C. J. , Farrant R. D. , *et al.* . *J. Proteome Res.* [J], 2006, **5**: 1448—1459
- [24] Daykin C. A. , Van Duynhoven J. P. M. , Groenewegen A. , *et al.* . *J. Agric. Food. Chem.* [J], 2005, **53**: 1428—1434
- [25] Wei L. , Liao P. Q. , Wu H. F. , *et al.* . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [J], 2009, **234**: 314—325

## NMR-based Metabonomics Study on Serum and Urine of Hyperthyroidism

WEI Yang-Yang<sup>1,2</sup>, WANG Cai-Hong<sup>3</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, DONG Ji-Yang<sup>2\*</sup>, CHEN Zhong<sup>1,2</sup>

(1. *Department of Biomaterials, College of Materials*, 2. *Fujian Key Laboratory of Plasma and Magnetic Resonance, Department of Physics, School of Physics and Mechanical & Electrical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China*;  
3. *Department of Endocrinology, Xiamen First Hospital, Xiamen University, Xiamen 361002, China* )

**Abstract** Nuclear magnetic resonance(NMR) based metabonomics was applied to study the hyperthyroidism by analyzing metabolic profiling of serum and urine. The purpose of this study is to determine an array of characteristic metabolites in serum and urine samples from hyperthyroidism patients and then to interpret these metabolites in possible metabolic pathway. Serum samples from 33 hyperthyroidism patients together with 17 healthy volunteers and urine samples from 53 hyperthyroidism patients with 58 healthy volunteers were collected. Differences in endogenous metabolites were detected on serum and urine samples from the hyperthyroidism group and control group using multivariate statistical analysis. The results show that the hyperthyroidism group has elevated levels of choline, glucose and declined levels of VLDL, LDL, cholesterol, lactate, glycoprotein and alanine in serum samples relative to the healthy group. In urine samples, the hyperthyroidism group show increased levels of glucose, citrate, taurine and creatinine as well as decreased levels of hippurate, trimethylamine-*N*-oxide, formate and succinate. These results indicate that hyperthyroidism have not only disturbed the carbohydrate metabolism, lipid metabolism and protein metabolism but also influenced energy metabolism, hepatoenteral circulation and gut microflora and caused liver and kidney injury.

**Keywords** NMR-based metabonomics; Hyperthyroidism; Biofluid; Principle component analysis

(Ed. : H, J, Z)