

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.15.001

• 基础研究 •

基于 UPLC-MS 技术筛选 db/db 小鼠血清和组织中的小分子
2 型糖尿病标志物 *刘武伟¹ 袁道祎¹ 韩敏露¹ 黄靓雯² 谢 瑛^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025; 2 上海交通大学医学院瑞金医院呼吸与重症医学科 上海 200025)

摘要 目的: 2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 发病持续增长, 并发症致死率高, 疾病无法根治需长期用药维持, 所以 2 型糖尿病的早期诊断和预防十分重要。故本研究探究 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠不同疾病进程中血清和组织代谢谱的变化, 筛选密切相关的小分子代谢产物, 为 2 型糖尿病早诊和预防提供参考。**方法:** 本研究利用超高效液相色谱联用四极杆时间飞行质谱 (UPLC-QTOF/MS) 技术, 以 8, 12, 16 周龄三个不同阶段 db/db 小鼠及其对照的血清和组织为研究对象, 进行非靶向代谢组学研究。利用 MarkerView 提取采集到的数据, 通过 SMICA-P 软件进行主成分分析 (PCA) 和 OPLS-DA 建模分析, 对数据进行降维处理, 结合 t 检验筛选出特异性的差异代谢物, 联合二元逻辑回归建立诊断模型。**结果:** 随着病程发展, 显示出更多代谢紊乱。二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA), 酪氨酸 (Tyrosine) 和亮氨酸 (Leucine) 三个代谢物在 T2DM 模型 db/db 小鼠及其野生对照组血清和组织中具有显著性差异, 差异倍数明显且与随疾病进程呈现正负相关性。经过二元逻辑回归建立联合诊断模型, 三种代谢物组合的诊断模型为 $\text{Logit}[P=\text{T2DM}] = -6.052 * [\text{EPA}] + 5.837 * [\text{Tyrosine}] + 1.985 * [\text{Leucine}] - 14.092$ 。根据此模型建立受试者工作特征曲线 (Receiver operating characteristic curve, ROC), 曲线下面积 (Area under curve, AUC) 为 0.988, 灵敏度和特异性均为 98.1%。**结论:** EPA, Tyrosine 和 Leucine 可被认为是最典型的 T2DM 标志物, 值得进一步探讨, 为 2 型糖尿病的发生风险和治疗提供参考。

关键词: 2 型糖尿病; 代谢组学; 标志物**中图分类号:** R-33; R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)15-2801-07UPLC-MS Based Screening of Type 2 Diabetes Mellitus Micromolecule
Markers in Serum and Tissues of db/db Mice*LIU Wu-wei¹, YUAN Dao-yi¹, HAN Min-lu¹, HUANG Jing-wen², XIE Ying^{1Δ}

(1 Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China;

2 Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: The incidence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) continues to increase and the mortality rate of its complications is high. The disease cannot be completely cured and needs to be controlled by medicines for a long time, so it is important to early diagnose and prevent. Therefore, this study explored the changes of serum and tissue metabolic profiles in different disease processes of db/db mice. **Methods:** Based on the Ultra-high performance liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS), non-targeted metabolomics was studied in serum and tissues of db/db mice and their controls at the age of 8, 12 and 16 weeks. The specific differential metabolites were screened by PCA, OPLS-DA and t-test, then the diagnosis model was established by binary logistic regression. **Results:** More metabolic disorders were shown with the development of the disease. The levels of eicosapentaenoic acid (EPA), tyrosine and leucine had significant differences in the serum and tissues of db/db mice and their controls, which were positively and negatively correlated with the progression of the disease. A joint diagnosis model based on the three metabolites for the detection of T2DM was established as follows: $\text{Logit}[P=\text{T2DM}] = -6.052 * [\text{EPA}] + 5.837 * [\text{Tyrosine}] + 1.985 * [\text{Leucine}] - 14.092$. The Receiver operating characteristic curve (ROC) was constructed according to the diagnosis model. Outstanding diagnostic efficiency had been achieved with area under curve (AUC) of 0.988, sensitivity and specificity both of 98.1%. **Conclusion:** EPA, tyrosine and leucine can be regarded as the most typical T2DM markers.

Key words: Type 2 diabetes mellitus; Metabolomics; Biomarker**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R587.1 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2021)15-2801-07

* 基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1309701); 国家十三五新药创制重大专项(2018ZX09734005)

作者简介: 刘武伟(1997-), 硕士研究生, 主要研究方向: 药物分析与代谢组学, E-mail: liuwuweiaish163@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者: 谢瑛(1982-), 女, 硕士生导师, 副研究员, 主要研究方向: 药物分析与代谢组学,

E-mail: xyshirley@sjtu.edu.cn, 电话: 13916719113

(收稿日期: 2021-02-03 接受日期: 2021-02-27)

前言

糖尿病是全球最常见的代谢紊乱疾病,目前我国患病人数位于全球第一,2型糖尿病(T2DM)占全部患病人数的90%以上^[1,2]。T2DM与胰岛素抵抗(IR)和胰岛 β 细胞功能异常有关^[3-5],但其病因和发展的具体机制仍未完全了解。尽管在治疗和新药开发方面有所改善,但现行的治疗策略仍无法阻止病情进展同样无法预防并发症的发生发展,50%的患者在确诊后10年内需要胰岛素治疗^[6]。迫切需要评估某些代谢物与T2DM风险和症状之间的相关性,判断是否可以作为标志物帮助创建有效的干预措施来管理这些疾病。Yeli Wang^[7]通过一项巢式病例对照研究发现血浆胎球蛋白-A水平与纳入研究的中国人群患T2DM的风险呈正相关;Marina^[8]等对完全建立糖尿病的12周龄db/db小鼠的不同生物基质进行高分辨率1H-NMR和2D-NMR光谱分析,发现葡萄糖和谷氨酸在九种生物基质中均显着增加;Yonghai Lu^[9]等利用LC-MS和GC-MS发现支链氨基酸和游离脂肪酸是中国成年人糖尿病发展的有效预测因子,表明了溶血磷脂预测糖尿病的潜力。但是这些研究尚未表明疾病进程中代谢物的改变。T2DM是一种典型性代谢类疾病,后期会引起机体多器官多系统的代谢紊乱。在本研究中,我们利用代谢组学依赖的高通量工艺和技术,通过对不同周龄T2DM模型db/db小鼠及其野生对照的血清、肝、肾和后肢脂肪组织为样本,以UPLC-MS/MS为技术手段,探究T2DM的潜在代谢标志物和疾病发展过程中代谢物轮廓的改变,为T2DM提供重要的洞察的先决条件(或风险因素)参考,减少T2DM带来的社会压力和经济压力。

1 材料和方法

1.1 实验仪器和试剂

超高效液相色谱系统(Nexera X2 UPLC System, Shimadzu, Japan):配有LC-30 AD二元梯度泵, DGU-20A5R在线脱气机, SIL-30AC自动进样器, CTO-30A柱温箱;四极杆高分辨飞行时间质谱仪(Triple TOF 5600+, Sciex, USA):配有电喷雾离子化(Electron Spray Ionization, ESI), 独立校准溶剂输送系统(Calibration delivery system):配有独立的大气压化学离子化(Atmospheric-pressure Chemical Ionization, APCI)离子源; Analyst® TF1.6数据采集处理工作站。

同位素内标 Cholic-2,2,4,4-d₄ acid (CHO-d₄), Acetyl-d₃-L-carnitine Hydrochloride (ACE-d₃), 1-nonadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine, chloroform (LPC19:0), L-Tryptophan-d₅ (Trp-d₅)和 L-Phenylalanine-d₂ (Phe-d₂)均由美国 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)公司购得;色谱级甲醇(Methanol, MeOH)、乙腈(Acetonitrile, CAN)、叔丁基甲醚(Methyl tert-butyl ether, MTBE)、乙酸乙酯(Ethyl acetate)和正己烷(N-hexane)购自MERCK(Darmstadt, Germany)公司;色谱级甲酸(formic acid, FA)购自美国 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)公司;超纯水产自Milli-Q纯水系统(Millipore, Bedford, MA, USA)。

1.2 动物样本

自发性2型糖尿病雄性db/db小鼠及其野生对照小鼠幼

鼠均购自常州卡文斯实验动物有限公司,将野生型小鼠作为对照组,db/db小鼠作为实验组,每组6只动物,分别饲养至8、12、16周龄,8周龄实验组动物体重 42.8 ± 1.8 ,血糖 28.8 ± 1.7 ,对照组体重 20.6 ± 1.0 ,血糖 13.5 ± 1.2 ;12周龄实验组体重 44.5 ± 1.5 ,血糖 31.2 ± 2.3 ,对照组体重 21.1 ± 0.9 ,血糖 13.8 ± 1.1 ;16周龄小鼠实验组体重 46.9 ± 1.6 ,血糖 31.3 ± 2.1 ,对照组动物体重 23.4 ± 0.8 ,血糖 31.3 ± 2.1 ,对照组体重 23.4 ± 0.8 ,血糖 14.0 ± 0.8 。动物房12h昼夜交替,温度为26℃,动物自由摄食饮水。动物进行实验前禁食不禁水12小时,在早晨8点解剖动物。

1.3 实验方法

1.3.1 血清样本的处理方法 各组小鼠用异氟烷(Isoflurane)气体麻醉后,摘眼球取血,在室温下放置30 min,13000 rpm离心10 min,取上层清液置于-80℃冻存,直至检测。血清样本在冰上融化后,取100 μ L血清于玻璃管中,加入20 μ L内标溶液(100 nM L-Trp-d₅, 100 nM CHO-d₄, 50 nM LPC 19:0, 200 μ M L-Phe-d₄, 500 nM Ace-d₃等量混合),加入750 μ L甲醇沉淀蛋白,涡旋3 min,加入2.5 mL MTBE,涡旋3 min,最后加入650 μ L水进行液液萃取,涡旋3 min,在冰上孵育10 min后离心。离心条件为4℃,13000 rpm,10 min。取出上清液在室温真空条件下挥干,检测时用100 μ L 80%乙腈复溶,检测亲脂性代谢物。第一次离心后的下层液体转移到Ep管中,4℃,13000 rpm,10 min离心,取上清液真空挥干后用100 μ L 50%甲醇复溶,取上清液进样,分析检测亲水性代谢物,进样量均为5 μ L。

1.3.2 组织样本的处理方法 各组别小鼠取血结束后,小鼠脱颈处死,对小鼠进行解剖,分别取出肾、肝和后肢皮下脂肪组织,生理盐水冲洗出去血液,在液氮中冻存,储存在-80℃,直至检测。组织样本在冰上解冻,称取 50 ± 1 mg到2 mL研磨管中,加入1.6 mL 50%的冷甲醇溶液并放入6颗3 mm的小磁珠,加入20 μ L内标,均质,提取亲水性代谢物。在4℃,13000 rpm,10 min的条件下离心,取上清液真空挥干后使用100 μ L 50%甲醇溶液复溶。在第一步离心后的沉淀中继续加入1.2 mL 2:1:1的乙酸乙酯/正己烷/甲醇(V:V:V),加入20 μ L内标,均质,提取亲脂性代谢物。在4℃,13000 rpm,10 min条件下离心,取上清液真空挥干后使用100 μ L 80%乙腈溶液复溶。5 μ L进入LC/MS-MS系统检测分析。

1.3.3 数据采集 超高效液相色谱系统配合ESI电离源的四极杆飞行时间质谱仪TRIPLE TOF 5600, Waters ACQUITY C18 column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)作为亲脂性代谢物分析柱, Waters ACQUITY HSS T3 column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m)为亲水性代谢物分析柱,皆在正离子运行模式下进行数据采集。亲脂性代谢物数据采集时, A相为水相(0.1%甲酸), B相为乙腈(0.1%甲酸)。色谱梯度如下所示, 0-1 min, 30%B; 1-4 min, 30%B-50%B; 4-15 min, 50%B-100%B; 15-20 min, 100%B; 20-23 min, 100%B-30%B; 25 min, 停止。亲水性代谢物数据采集时, A相为水相(0.1%甲酸), B相为甲醇(0.1%甲酸)。血清样品色谱梯度如下所示, 0-1 min, 5%B; 1-7.5 min, 5-75%B; 7.5-15 min, 75-100%B; 15-17.5 min, 100%B; 17.5-18 min, 100-5%B; 20 min, 停止。组织样品的色谱梯度如下所示, 0-2 min, 1%B; 2-8 min, 1-85%B; 8-12 min, 85-100%B; 12-20 min, 100%B; 20-22 min,

100-1%B;25 min, 停止。优化后的质谱参数为雾化气(GS1):55psi; 辅助加热气 (GS2):55psi; 气帘气 (CUR):35psi; 温度(TEM):600℃; 分布电位(DP):85V; 碰撞能量(CE):10V; 毛细管电压(IS):5500V。采用信息依赖性扫描(IDA)采集二级质谱, 碰撞能量为 35V。每 10 个实测样本采集 1 个 QC 样本来评价方法的稳定可靠性。

1.4 数据分析

采用 MarkerView1.2.1(AB SCIEX, USA)提取一级质谱数据, 经保留时间校正和 Total Area 归一化后导入 SIMCA 进行多维统计分析。进行非监督性的主成分 (Principal component analysis, PCA) 分析和监督性的正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 分析, 以 VIP (Variable importance in projection) >1, C1FJK 不跨越 0 值和 |Pcorr|<0.52 为标准筛选差异代谢物。使用 IBM SPSS

Statistics version 20.0 进行统计学处理, 符合正态分布的变量采用独立样本 T 检验, 不符合正态分布的变量采用非参数 Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 具有显著性差异。利用 PeakView (AB SCIEX, USA) 提取潜在差异代谢物的二级质谱, 借助 METLIN (metlin.scripps.edu) 和 HMDB (Human Metabolome Database) 鉴定代谢产物。鉴定后的代谢物进行代谢组学网络通路分析和受试者工作特征曲线分析。

2 结果

2.1 db/db 小鼠及野生对照血清和组织的 TIC 图

建立的 UPLC-QTOF-MS 方法所采集到的总离子流 (TIC) 图 1 所示, 血清和组织样本的提取代谢物代谢轮廓明显不同。利用 MarkerView 在血清样本中一共提取到 842 个代谢物进行建模分析, 在组织样本中 1031 个代谢物进行建模分析。

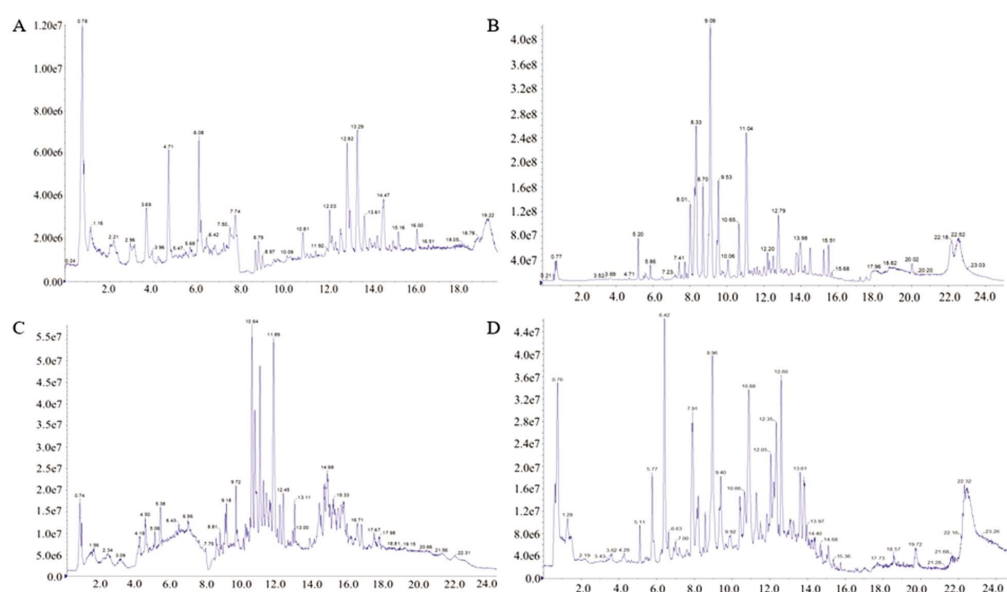


图 1 不同代谢物的总离子流图

注:A.血清亲水性代谢物总离子流图;B.血清亲脂性代谢物总离子流图;
C.组织亲水性代谢物总离子流图;D.组织亲脂性代谢物总离子流图。

Fig.1 LC-MS total ion chromatography (TIC) of hydrophilic

Note: (A) and lipophilic (B) metabolites in serum and hydrophilic (C) and lipophilic (D) metabolites in tissue.

2.2 差异代谢物筛选

通过非监督性的 PCA 分析检验数据质量, 数据建模以观察不同样本的总体分布以及质控样本的聚集状态。在 PCA 图 (Fig.2A) 中, $R^2X=0.674$; 在 PCA 图 (Fig.2C) 中, $R^2X=0.602$; 在 PCA 图 (Fig.2E) 中, $R^2X=0.743$; 在 PCA 图 (Fig.2G) 中, $R^2X=0.654$, 均大于 0.5, 且 QC 紧密聚集在一起, 说明样本采集期间仪器稳定, 数据重现性好, 稳定可靠。为了进一步放大组间差异, 采用监督性 OPLS-DA 的模式识别分析方法重新建模, 筛选潜在的差异代谢物。在 OPLS-DA 图 (Fig.2B.2D) 中, db/db 小鼠组和野生型小鼠组血清代谢分离明显, 这两个模型的 R^2X 分别为 0.556 和 0.521, R^2Y 为 0.981 和 0.92, Q^2 分别为 0.97 和 0.865。说明这两个模型的预测成功率高达 97% 和 86.5%。在 OPLS-DA 图 (Fig.2F.2H) 中, db/db 小鼠组和野生型小鼠组组织代谢分离十分明显, 这两个模型的 R^2X 分别为 0.747 和 0.56, R^2Y 为

0.982 和 0.973, Q^2 分别为 0.944 和 0.918。说明这两个模型的预测成功率高达 94.4% 和 91.8%。所建模型的 R^2Y 和 Q^2 均在 0.5 以上, 且差值小于 0.3, 表明模型的区分程度和预测能力均较好, 可继续特征变量的筛选。以 $VIP>1$ 和 $|Pcorr|>0.52$, 配合独立样本 t 检验, 对多维统计分析筛选到的变量进行单维统计分析, 选择各模型中 $P<0.05$ 的变量。最终, 在三个不同时期的血清和组织样本中筛选并鉴定出 18 个共同具有的潜在差异代谢物, 如表 1 所示。12 周龄和 16 周龄动物实验组和对照组各有一部分差异代谢物, 对相关关联的代谢物进行通路富集分析, 结果如图 3 所示。通过差异代谢物聚类分析以热图的形式可视化共同鉴定出的代谢物在动物实验组和对照组血清和组织中的相对水平, 如图 4 所示。

2.3 ROC 诊断模型的建立

以 $VIP>1$, $|Pcorr|>0.52$ 和在疾病进程中差异倍数明显且具

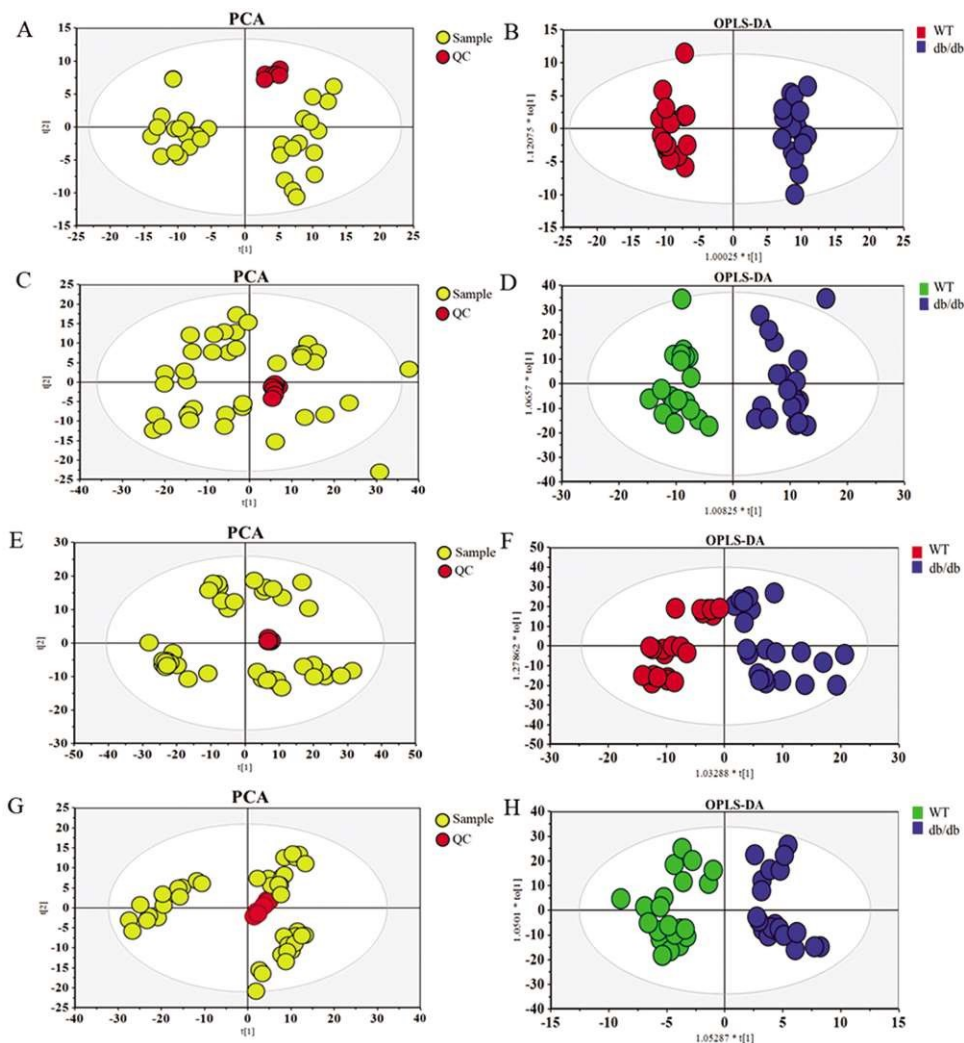


图2 db/db 小鼠及其野生对照多维统计分析结果

注:A.db/db 小鼠和对照血清亲水性代谢物的 PCA 图;B. db/db 小鼠和对照血清亲水性代谢物的 OPLS-DA 平面散点图;C.db/db 小鼠和对照血清亲脂性代谢物的 PCA 图;D. db/db 小鼠和对照血清亲脂性代谢物的 OPLS-DA 平面散点图;E.db/db 小鼠和对照组织亲水性代谢物的 PCA 图;F. db/db 小鼠和对照组织亲水性代谢物的 OPLS-DA 平面散点图 G.db/db 小鼠和对照组织亲脂性代谢物的 PCA 图;H. db/db 小鼠和对照组织亲脂性代谢物的 OPLS-DA 平面散点图。

Fig.2 Multivariate statistical analysis of db/db mice and WT controls.

Note: A. Score plot for PCA model of hydrophilic metabolites in db/db mice and controls serum. B. Score plot for OPLS-DA model of hydrophilic metabolites in db/db mice and controls serum. C. Score plot for PCA model of lipophilic metabolites in db/db mice and controls serum. D. Score plot for OPLS-DA model of lipophilic metabolites in db/db mice and controls serum. E. Score plot for PCA model of hydrophilic metabolites in db/db mice and controls tissue. F. Score plot for OPLS-DA model of hydrophilic metabolites in db/db mice and controls tissue. G. Score plot for PCA model of lipophilic metabolites in db/db mice and controls tissue. H. Score plot for OPLS-DA model of lipophilic metabolites in db/db mice and controls tissue.

有显著正负相关性的代谢物,筛选到二十碳五烯酸 (EPA),酪氨酸 (Tyrosine),亮氨酸 (Leucine) 三个差异代谢物可作为预期的潜在诊断标志物,如图 (Fig.3A) 所示。对选定的三个代谢物进行联合诊断的二元逻辑回归分析,并建立回归方程和联合诊断的 ROC 曲线,以敏感性 (Sensitivity)、特异性 (Specificity) 和曲线下面积 (AUC) 验证其诊断效能。结果表明 EPA、酪氨酸和亮氨酸三者联合诊断时具有最高的诊断性能,且 $P < 0.05$, 建立的诊断模型公式为: $\text{Logit}[P=\text{T2DM}] = -6.052 \times [\text{EPA}] + 5.837 \times [\text{Tyrosine}] + 1.985 \times [\text{Leucine}] - 14.092$, $[P=\text{T2DM}]$ 的分界值 (cut off) 为 0.47。此诊断模型中, $[P=\text{T2DM}]$ 是预测为 T2DM 的概率, $[\text{EPA}]$, $[\text{Tyrosine}]$ 与 $[\text{Leucine}]$ 分别表示生物体内 EPA, Tyrosine 和 Leucine 的水平。如图 (Fig.3B) 所示,代谢物组合的 ROC 曲

线下面积 (AUC) 为 0.988 (95%CI:0.967-1.000, Sensitivity=98.1%, Specificity=98.1%)。结果表明此代谢物组合具有优良的诊断效能,EPA, Tyrosine 和 Leucine 可以作为 T2DM 预期的标志物。

3 讨论

对于 T2DM 预防和早诊标志物的探究具有非常重要的意义。我们需要利用新兴的技术手段,更优化的平台条件以求获得特异性更强,灵敏度更高的标志物应用于 T2DM。代谢组学作为系统生物学的一个分支,分为靶向代谢组学和非靶向代谢组学。非靶向代谢组学,即对细胞、组织或者体液中的小分子代谢物做全面的分析^[10]。生物体液、细胞和组织中的代谢处于稳定的动态平衡中,先前我们在基因和蛋白层面探寻生命活动,

表1 区分 db/db 小鼠和健康对照(NC)的潜在诊断标志物

Table 1 Potential diagnostic biomarkers between db/db mice and normal controls(NC)

Metabolites	Serum Fold Change (T2DM/NC)			Tissue Fold Change (T2DM/NC)		
	8W	12W	16W	8W	12W	16W
Linoleic acid	0.63	0.51	0.51	0.91	0.78	0.81
Linoelaidic acid	0.76	0.67	0.64	0.91	0.78	0.74
Hydroxyeicosate- traenoic acid	1.89	1.87	1.87	1.15	1.22	1.25
Palmitic acid	1.69	1.60	1.74	1.15	1.25	1.44
Eicosapentaenoic acid	0.79	0.70	0.60	0.86	0.78	0.65
Cholesterol	1.23	1.30	1.31	1.20	1.36	1.52
PAF C-18	1.40	1.68	2.03	1.15	1.21	1.43
Lysine	1.26	1.24	1.28	1.87	1.80	2.05
Glutamine	0.85	0.85	0.87	0.83	0.76	0.64
Leukotriene B4	1.46	1.60	2.00	1.25	1.43	1.64
Adenylic acid	1.28	1.30	1.51	1.14	1.22	1.26
Fructose	1.21	1.21	1.26	1.56	1.53	1.56
Glucose	2.51	2.56	2.52	1.34	1.71	1.91
Tryptophan	0.77	0.78	0.79	0.81	0.74	0.69
Tyrosine	1.73	1.95	2.12	1.30	1.44	1.70
Leucine	1.42	2.00	2.23	1.64	1.75	2.12
LysoPC(18:1)	1.29	1.34	1.23	1.36	1.47	1.70
LysoPC(18:2)	1.27	1.31	1.27	1.32	1.43	1.59

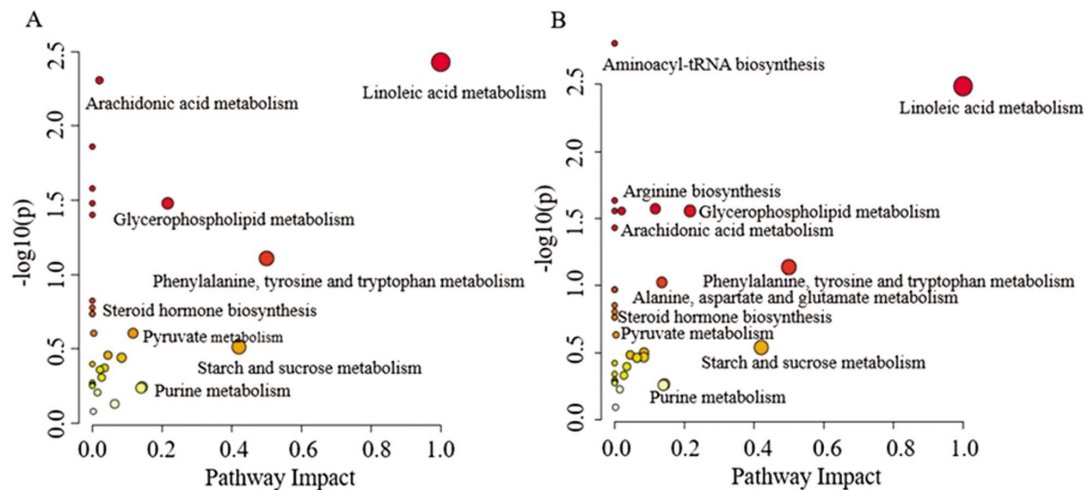


图3 12 周龄(A)和 16 周龄(B)db/db 小鼠和野生对照代谢通路富集分析

Fig.3 Joint Pathway Analysis for metabolic pathway in 12 weeks (A) and 16 weeks (B) db/db mice and controls

而实际上细胞内许多生命活动是发生在代谢物层面的^[11]。生物体功能的异常最终体现在生物体液和组织内成分的变化。病理生理状态引起体内反应,代谢产物反映受代谢酶或者核酸调节导致的内源物质浓度、通量和比例^[12]。所以,从生物体液和组织中小分子代谢物的角度研究 T2DM 这种代谢紊乱性疾病是一个很好的渠道。近年来,代谢组学已被广泛应用于恶性肿瘤^[13-15],神经退行性疾病^[16,17],冠心病等心血管疾病^[18,19]以及肝肾脏疾病

^[20,21]。特异标志物和代谢谱的探究,也被应用于 T2DM 及其亚型 (Isolated Postchallenge Diabetes) 的区分^[22],或 T2DM 中某一代谢途径或某类代谢产物的研究^[23,24],尚未发现对 T2DM 进程中不同生物基质高通量代谢轮廓的分析。代谢组学的技术手段主要包括液相色谱-质谱联用 (LC-MS),气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 和毛细管电色谱-质谱联用 (CE-MS) 等。LC-MS 以其高通量、软电离和良好的代谢物覆盖率,高灵敏度和稳定性,

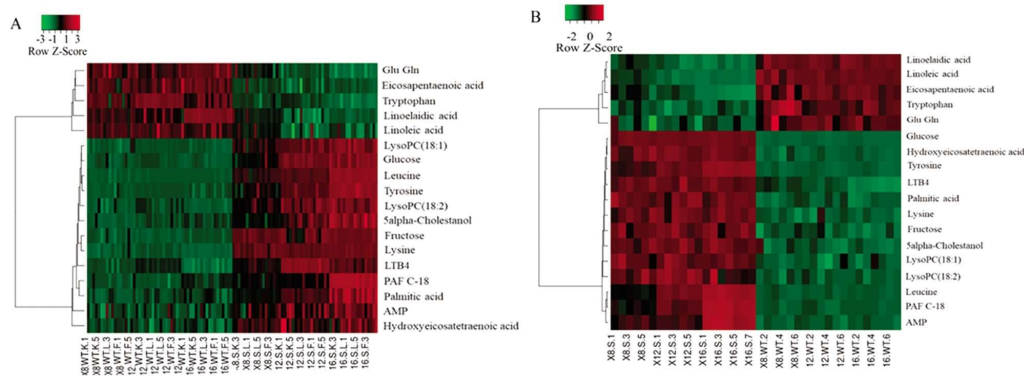


图 4 db/db 小鼠和健康对照组织(A)和血清(B)的差异代谢物热图

Fig.4 Heatmap of difference metabolites of db/db mice and normal controls(NC)

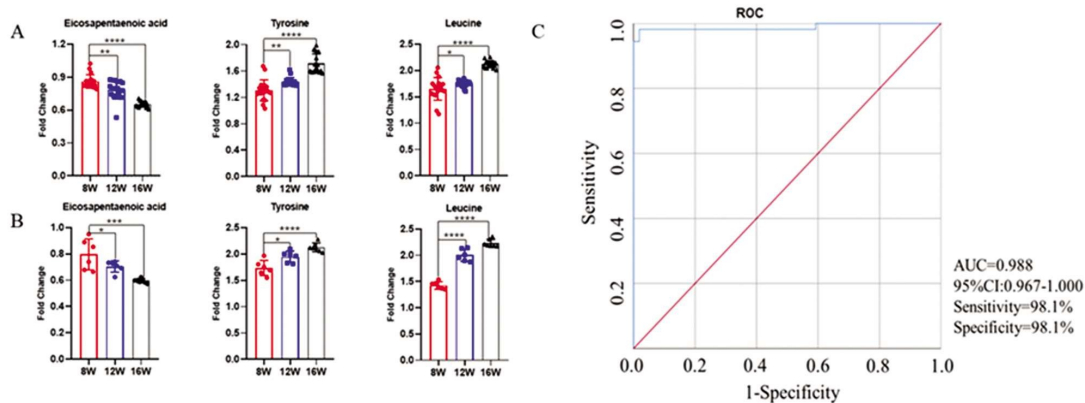


图 5 联合诊断依据和结果

注:组织(A)和血清(B)中随时间变化的 EPA, Tyrosine 和 Leucine 水平和 C. EPA, Tyrosine 和 Leucine 联合诊断的 ROC 曲线

Fig.5 EPA, Tyrosine and Leucine levels in tissue(A) and serum(B) over time; C. ROC curve for combination of EPA, Tyrosine and Leucine to diagnose

成为代谢组学研究最广泛的平台。所以,本研究首次利用 U-PLC-QTOF/MS 对 36 只不同年龄 T2DM 模型 db/db 小鼠和野生对照组血清和不同部位组织的非靶向代谢组学研究,一共成功筛选鉴定到共同存在的 18 中差异代谢物,在 12 和 16 周龄的样本中另外鉴定出多种差异代谢物。其中 EPA, Tyrosine, Leucine 在不同时期实验组和对照组小鼠血清和组织中变化显著,且与疾病进展呈现一定的相关性。利用二元逻辑回归建立联合诊断模型,认为 EPA, Tyrosine, Leucine 可以作为潜在的诊断标志物。

糖尿病患者人数目前持续在以惊人的速度增长,是对人类健康具有极大威胁。根据国际糖尿病联盟(IDF)最新报告,2019 年全球约 4.63 亿 20-79 岁成人患糖尿病。中国已成为全球范围糖尿病增长最快的地区并且成为世界糖尿病第一大国。T2DM 的危险因素有很多,主要分为不可改变的遗传因素和可改变的环境因素,多病因共同导致 T2DM 高发病率。疾病特征为终身性的慢性高血糖,是目前已知并发症最多的一种疾病,长期血糖增高累及大血管、微血管等,并危害心、脑、肾、肝、神经、眼、足等^[25],并发症的出现也是造成 T2DM 患者死亡的最大原因。药物很难逆转并发症,所以尽早预防糖尿病迫在眉睫。糖尿病中长期血糖控制最广泛使用的生物标志物是糖基化血红蛋白(HbA1c),HbA1c $\geq 6.5\%$ 和 5.7-6.4%分别用于诊断糖尿病和前驱糖尿病^[26]。HbA1c 提供了一些有关糖尿病进展和发生并发症的风险的预后信息,但是也存在一定的局限性。在本研究中,我

们利用 T2DM 模型动物 db/db 小鼠及其野生对照组血清和不同部位组织代谢组学分析,筛选得到多种差异代谢物后,应用二元逻辑回归分析建立诊断模型,得到诊断效能最高的 EPA, Tyrosine 和 Leucine 代谢物组合,ROC 曲线的 AUC 高达 0.988,具有高特异性和高灵敏度,可以为 T2DM 的早期诊断,预防和治疗提供参考。

不同生物基质中共同具有显著性差异的 18 种小分子代谢物种类繁多,T2DM 引起多种代谢改变,主要涉及氨基酸代谢、糖代谢、亚油酸代谢、不饱和脂肪酸、甘油磷脂代谢等,最终作为标志物的 3 个代谢物与氨基酸代谢和脂肪酸代谢相关。氨基酸是生物体蛋白质合成的必要原料及调节信号,其还参与氧化应激、细胞自噬、增殖和凋亡等重要生命活动的调节,其也是糖异生的底物之一^[27]。遗传代谢性疾病导致参与其代谢的相关蛋白或酶发生缺陷导致氨基酸谱的改变。Leucine 是一种支链氨基酸,对机体的糖脂代谢具有调控作用^[28]。Leucine 对胰岛素释放的促进作用和对 mTOR-S6K 信号途径的激活作用仅次于葡萄糖,对腺苷酸活化的蛋白激酶(AMPK)的抑制作用也高于其他氨基酸^[29]。Leucine 缺乏时通过对 GCN2 信号通路的激活和 mTOR/S6K 信号通路的下调增加机体对胰岛素的敏感性^[30]。此外 Leucine 还能够增加骨骼肌胰岛素的敏感性和降低血糖,抵抗动物在高脂条件下饲养诱导的肥胖^[31]。Tyrosine 属于芳香氨基酸,Marta^[32]在研究中也报告了 T2DM 患者较高的 Tyrosine,但对出现这一表现的机制我们尚不清楚。先前的很多研究表明

氨基酸水平升高和 T2DM 可能有关系,T2DM 患者由于处在高消耗状态,虽然游离氨基酸的水平升高,但总体可能仍处于不足状态。EPA 是来源与海洋动物油脂的一种脂肪酸,内源性的 EPA 由亚麻酸转化而来,帮助降低胆固醇和甘油三酯的含量,促进体内饱和脂肪酸代谢,能够降低 T2DM 发病过程种伴随的动脉粥样硬化、心血管等疾病的发生^[3]。同时 EPA 还可以通过调节血栓素降低 T2DM 微血管病变的发病率。本研究发现 Tyrosine,Leucine 水平的升高和 EPA 水平的降低可能与 T2DM 进程相关,表明这三种代谢物可以作为 T2DM 诊断的潜在标志物。随着疾病进展,代谢紊乱情况加剧,12 和 16 周龄动物的代谢差异中出现了花生四烯酸代谢、丙酮酸代谢和嘌呤代谢异常,还涉及类固醇激素的改变,这些代谢异常可能与能量代谢、免疫抑制、生物合成和氧化应激等相关,也预示着血管性病变、肾性病变、酮症酸中毒、性腺功能减退等系列并发症的发生。

本研究以 UPLC-QTOF/MS 技术为手段,以 db/db 小鼠及其野生对照组的血清和肝、肾、后肢脂肪组织为研究对象,探究疾病进展过程中的小分子代谢物和代谢通路的改变,并寻找良好的 T2DM 诊断标志物。结果表明 EPA, Tyrosine 和 Leucine 联合诊断 T2DM 时诊断效果良好,ROC 曲线 AUC 为 0.988,灵敏度和特异性均为 98.1%,可以作为标记物为 T2DM 的诊疗和发生发展机制提供参考,也可作为靶标进行进一步探究。本研究可以进一步通过靶向代谢组学对筛选到的差异代谢物进行绝对定量,对已鉴定生物标志物进行确认或验证,还需要多中心大样本的人源样本验证,结合临床数据,对疾病做出更有效预测。

参考文献(References)

- [1] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843
- [2] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes [J]. Lancet, 2017, 389(10085): 2239-2251
- [3] Cali AM, Man CD, Cobelli C, et al. Primary defects in beta-cell function further exacerbated by worsening of insulin resistance mark the development of impaired glucose tolerance in obese adolescents[J]. Diabetes Care, 2009, 32(3): 456-461
- [4] Steppel JH, Horton ES. Beta-cell failure in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus[J]. Curr Diab Rep, 2004, 4(3): 169-175
- [5] Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance[J]. Physiol Rev, 2018, 98(4): 2133-2223
- [6] Turner RC, Cull CA, Frighi V, et al. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group[J]. Jama, 1999, 281(21): 2005-2012
- [7] Wang Y, Koh WP, Jensen MK, et al. Plasma Fetuin-A Levels and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in A Chinese Population: A Nested Case-Control Study[J]. Diabetes Metab J, 2019, 43(4): 474-486
- [8] Mora-Ortiz M, Nuñez Ramos P, Oregioni A, et al. NMR metabolomics identifies over 60 biomarkers associated with Type II Diabetes impairment in db/db mice[J]. Metabolomics, 2019, 15(6): 89
- [9] Lu Y, Wang Y, Ong CN, et al. Metabolic signatures and risk of type 2 diabetes in a Chinese population: an untargeted metabolomics study using both LC-MS and GC-MS[J]. Diabetologia, 2016, 59(11): 2349-2359
- [10] Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, et al. Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2016, 27(12): 1897-1905
- [11] Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, et al. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(6): 353-367
- [12] Wishart DS. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes[J]. Physiol Rev, 2019, 99(4): 1819-1875
- [13] Mazzone PJ, Wang XF, Han X, et al. Evaluation of a Serum Lung Cancer Biomarker Panel[J]. Biomark Insights, 2018, 13: 1177271917 751608
- [14] Ganti S, Taylor SL, Abu Aboud O, et al. Kidney tumor biomarkers revealed by simultaneous multiple matrix metabolomics analysis [J]. Cancer Res, 2012, 72(14): 3471-3479
- [15] Roig B, Rodríguez-Balada M, Samino S, et al. Metabolomics reveals novel blood plasma biomarkers associated to the BRCA1-mutated phenotype of human breast cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17831
- [16] Czech C, Berndt P, Busch K, et al. Metabolite profiling of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31501
- [17] Lewitt PA, Li J, Lu M, et al. 3-hydroxykynurenine and other Parkinson's disease biomarkers discovered by metabolomic analysis[J]. Mov Disord, 2013, 28(12): 1653-1660
- [18] Qamar W, Alqahtani S, Ahamad SR, et al. Untargeted GC-MS investigation of serum metabolomics of coronary artery disease patients[J]. Saudi J Biol Sci, 2020, 27(12): 3727-3734
- [19] Hartiala JA, Tang WH, Wang Z, et al. Genome-wide association study and targeted metabolomics identifies sex-specific association of CPS1 with coronary artery disease[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10558
- [20] Maciejewska D, Marlicz W, Ryterska K, et al. Changes of the Fatty Acid Profile in Erythrocyte Membranes of Patients following 6-Month Dietary Intervention Aimed at the Regression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)[J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2018, 2018: 5856201
- [21] Klepacki J, Klawitter J, Klawitter J, et al. A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based targeted metabolomics kidney dysfunction marker panel in human urine [J]. Clin Chim Acta, 2015, 446: 43-53
- [22] Liu L, Wang M, Yang X, et al. Fasting serum lipid and dehydroepiandrosterone sulfate as important metabolites for detecting isolated postchallenge diabetes: serum metabolomics via ultra-high-performance LC-MS[J]. Clin Chem, 2013, 59(9): 1338-1348
- [23] Chen S, Akter S, Kuwahara K, et al. Serum amino acid profiles and risk of type 2 diabetes among Japanese adults in the Hitachi Health Study[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7010
- [24] Rhee EP, Cheng S, Larson MG, et al. Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans[J]. J Clin Invest, 2011, 121(4): 1402-1411

- [17] Celano CM, Villegas AC, Albanese AM, et al. Depression and Anxiety in Heart Failure: A Review [J]. *Harv Rev Psychiatry*, 2018, 26(4): 175-184
- [18] Chialà O, Vellone E, Klompstra L, et al. Relationships between exercise capacity and anxiety, depression, and cognition in patients with heart failure[J]. *Heart Lung*, 2018, 47(5): 465-470
- [19] Hiriscau EI, Bodolea C. The Role of Depression and Anxiety in Frail Patients with Heart Failure[J]. *Diseases*, 2019, 7(2): 45
- [20] Angermann CE, Ertl G. Depression, Anxiety, and Cognitive Impairment : Comorbid Mental Health Disorders in Heart Failure [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2018, 15(6): 398-410
- [21] Dellafiore F, Chung ML, Alvaro R, et al. The Association Between Mutuality, Anxiety, and Depression in Heart Failure Patient-Caregiver Dyads: An Actor-Partner Interdependence Model Analysis [J]. *J Cardiovasc Nurs*, 2019, 34(6): 465-473
- [22] Norman JF, Kupzyk KA, Artinian NT, et al. The influence of the HEART Camp intervention on physical function, health-related quality of life, depression, anxiety and fatigue in patients with heart failure[J]. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2020, 19(1): 64-73
- [23] Trevizan FB, Miyazaki MCOS, Silva YLW, et al. Quality of Life, Depression, Anxiety and Coping Strategies after Heart Transplantation [J]. *Braz J Cardiovasc Surg*, 2017, 32(3): 162-170
- [24] Yost G, Bhat G, Mahoney E, et al. Reduced Anxiety and Depression in Patients With Advanced Heart Failure After Left Ventricular Assist Device Implantation[J]. *Psychosomatics*, 2017, 58(4): 406-414
- [25] 田立群, 郑琼莉, 赵波. β 受体阻滞剂治疗阵发性心房颤动的疗效及其与患者精神状态的关系[J]. *临床内科杂志*, 2014, 31(1): 43-46
- [26] 梁艺, 张景昌, 黄学成, 等. 心理干预对冠心病慢性心力衰竭合并焦虑、抑郁患者的疗效分析 [J]. *中国临床医生杂志*, 2017, 45(2): 47-49
- [27] 张霞, 刘中洋, 张玲, 等. 氟哌噻吨美利曲辛治疗伴焦虑抑郁的慢性阻塞性肺疾病的 meta 分析[J]. *华西医学*, 2020, 35(1): 28-34
- [28] 邱爱平, 王靖怡, 刘胜姣. 心理护理干预对老年慢性心力衰竭患者情绪、心功能及生活质量的影响 [J]. *海南医学*, 2020, 31(13): 1766-1768
- [29] 左静, 郑婷婷. 积极心理干预辅助认知行为干预在伴有抑郁的老年慢性心力衰竭患者中的应用[J]. *中国健康心理学杂志*, 2019, 27(11): 1726-1729
- [30] 易烛光, 杨秀海, 任娟娟, 等. 氟哌噻吨美利曲辛联合 SIT 对变应性鼻炎伴焦虑(抑郁)状态患者的疗效分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 31(1): 34-37, 42
- [31] 欧阳星文, 汪贵忠, 赵文强, 等. 射频消融术联合氟哌噻吨美利曲辛对快速心律失常患者的治疗效果观察 [J]. *山东医药*, 2017, 57(20): 60-62

(上接第 2807 页)

- [25] Ma RCW. Epidemiology of diabetes and diabetic complications in China[J]. *Diabetologia*, 2018, 61(6): 1249-1260
- [26] Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020[J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(Suppl 1): S14-s31
- [27] Bröer S, Bröer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms [J]. *Biochem J*, 2017, 474(12): 1935-1963
- [28] Zhang L, Li F, Guo Q, et al. Leucine Supplementation: A Novel Strategy for Modulating Lipid Metabolism and Energy Homeostasis [J]. *Nutrients*, 2020, 12(5)[Epub ahead of print]
- [29] Newsholme P, Brennan L, Rubi B, et al. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2005, 108(3): 185-194
- [30] Xiao F, Huang Z, Li H, et al. Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways[J]. *Diabetes*, 2011, 60(3): 746-756
- [31] Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, et al. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms [J]. *Diabetes*, 2007, 56(6): 1647-1654
- [32] Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(5): 833-846
- [33] O'Mahoney LL, Matu J, Price OJ, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids favourably modulate cardiometabolic biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1): 98