

新疆维吾尔族和汉族大学生尿液代谢轮廓差异分析

宋培培¹ 马玉花¹ 韩萍¹ 刘洋² 王吉德¹ 封顺^{*1}

¹(新疆大学化学化工学院, 乌鲁木齐 830046) ²(沈阳彦程生物制品有限公司, 沈阳 110000)

摘 要 以新疆两个主要世居民族(维吾尔族和汉族)大学生人群尿样为研究对象,采用气相色谱-质谱联用技术对 35 名维吾尔族和 37 名汉族大学生人群尿样进行分析,考察两民族大学生尿液代谢轮廓间的差异。采用正交信号校正-偏最小二乘法判别分析结果表明,维吾尔族和汉族大学生人群尿样代谢轮廓存在着明显差异,聚类明显。实验发现和鉴定出 9 种差异代谢物,其中 7 种为内源性代谢物,2 种为外源性代谢物。研究表明,相关代谢组学研究可从源头避免或减少非疾病因素引入的差异变量,除年龄、性别等因素外,还需充分考虑族别因素的影响。

关键词 代谢组学; 气相色谱-质谱; 维吾尔族; 汉族; 尿液

1 引言

代谢组学作为系统生物学的重要组成部分,已成为继基因组学、转录组学、蛋白质组学之后兴起的一个新的组学研究热点^[1-2]。在疾病代谢组学研究中,采样环节起着举足轻重的作用,生物样本的代表性与所鉴定出的相关疾病生物标志物的可靠性与准确性有着直接关系。众多因素影响着生物样本中代谢物的组成与含量,如饮食习惯、外界压力、抽烟与否以及参加锻炼频率与强度等,导致代谢组学研究结果有极大的可变性^[3-9]。在动物实验中,通过严格控制外部生理条件,可最大化降低或消除这些因素的影响。但对人类相关疾病组学研究过程中,该方法并不可行。如 Saito 等^[4]研究了血液基质、年龄和性别对高加索人种代谢物轮廓的影响,证实这些因素均会导致个体间代谢物在种类和数量的不同; Lenz 等^[5]发现,由于英国和瑞典健康人群饮食和文化不同,导致尿液轮廓间存在差异,在瑞典健康人群中,Trimethylamine N-oxide 含量高于英国健康人群; Dumas 等^[6]发现,由于饮食、基因和肠道微生物因素,日本、芝加哥和中国的健康人群的尿液轮廓存在差异。上述研究表明,人种、饮食文化等差异会对生物样本中代谢物的组成与含量产生较大影响。新疆地理环境和自然生态条件复杂,民族分布及其生活方式独特,地方性高发病种类繁多,并且表现出一定的民族性^[10,11]。这除与民族遗传等基因因素相关外,民族文化和饮食习惯的差异也是导致这种现象的一个重要原因。为深入研究新疆地方性高发病,在进行相关代谢组学研究过程中,就必须充分考虑族别因素的影响。基于此,本研究以新疆两个人口最多的世居民族维吾尔和汉族为对象,采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对这两个民族健康大学生尿样进行分析,探索由于族别因素导致的尿液轮廓间差异,并通过生物统计学方法发现和鉴别两个人群尿样中差异代谢物,为新疆多发性疾病早期诊断与相关标志物的筛选提供参考。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

QP2010 Ultra GC-MS (日本 Shimadzu 公司), Coulter Avanti J-25 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)。

N,O-双(三甲基硅烷基)乙酰胺(BSTFA, 98%, Aladdin 试剂); 三甲基氯硅烷(TMCS)、甲氧基胺盐酸盐(98%, Alfa Aesar 试剂); 吡啶(分析纯, 北京化工厂), 十二酸(色谱纯, 上海试剂一厂)。

2015-04-17 收稿; 2015-06-03 接受

本文系国家自然科学基金资助项目(Nos. 21075105, 21165017)和新疆维吾尔自治区教育厅支撑项目(No. XJEDU201010)

* E-mail: fengshun@xju.edu.cn

2.2 样品处理

2.2.1 样品收集 于新疆大学收集 35 例(男 18、女 17) 维吾尔族和 37 例(男 16、女 21) 汉族的大学生晨起尿样, 年龄 19 ~ 28 岁, 志愿者身体健康, 一星期之内未服用任何药物, 24 h 内未饮用含咖啡因的饮品。72 例样本收集后, 在 2 h 内进行处理, 4℃ 下 3000 g 离心 10 min, 除去固形物, 上清液置于 -80℃ 保存。

2.2.2 样品前处理 尿样在室温下解冻混合均匀, 取 200 μL 上清液, 按体积比 1: 4 加入冷丙酮 800 μL , 4℃ 静置 5 h, 沉淀蛋白; 在 4℃ 下 12000 g 离心 15 min, 取上清液, 冷冻真空干燥。在残留干燥物中加入 34 μL 15 g/L 甲氧胺盐酸盐, 无水吡啶为复溶液, 涡旋 5 min 充分溶解后, 加入 7 μL 5 mg/mL 月桂酸标准溶液(内标物), 另加 34 μL 衍生化试剂(BSTFA: TMCS = 99: 1) 超声振荡 5 min, 使之充分反应。37℃ 衍生 30 min, 缓慢升温至 65℃, 衍生化反应结束, 冷却至室温后进行 GC-MS 分析。

为检验仪器和分析方法的重现性和稳定性, 本实验使用质量控制(Quality control, QC) 样品, QC 样品由每例样品各取适量混合而得, 样品检测过程中, 每检测 7 个样品后运行 1 次 QC 样品, 以衡量系统的稳定性。

2.3 色谱-质谱条件

Rxi-5Sil MS 色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm); 进样口温度, 280℃; 分流比, 100: 1; 载气, 99.999% 高纯 He, 1.0 mL/min; 色谱柱温度, 初始温度 60℃, 保持 2 min, 以 10℃/min 由 60℃ 提升至 80℃, 再以 25℃/min 升至 160℃, 以 10℃/min 升至 280℃, 保持 2 min; 进样量 0.1 μL 。

EI 离子源: 温度 200℃; 电子能量, 70 eV; 扫描方式, 全扫描模式, 扫描范围 m/z 50 ~ 600。谱库: Wiley 229. L, Wiley 7. L 和 NIST 08. L。

2.4 数据处理

GC-MS 产生的原始数据首先采用 GC-MS Solution 软件进行预处理, 以斜率 1000 min, 半峰宽为 2 进行基线校正和自动峰值检测; 以内标月桂酸为标准进行归一化处理后, 将数据导入 SIMCA-P 11.5 Demo 和 17.0 SPSS 软件进行多维统计分析。

3 结果与讨论

3.1 生物统计学分析

采用 SIMCA-P 11.5 Demo 软件对所得数据进行正交信号校正-偏最小二乘法判别分析(Orthogonal signal correction filtered partial least-squares discriminant analysis, OSC-PLS-DA)。如图 1A 所示, 维吾尔族和汉族大学生尿样聚类明显, 两组样本达到了良好分离(模型参数 $R^2 X = 0.691$, $Q^2(\text{cum}) = 0.333$), 说明两组尿样轮廓间存在显著差异。为了检验模型重现性是否良好和模型中的数据是否过拟合, 避免监督性学习方法获得分类结果的偶然性, 每个模型都经过 100 次内交叉验证(Cross validation, CV), 结果见图 1B。CV 以 R^2 和 Q^2 回归线与 y 轴的截距值作为标准衡量模型是否过拟合。本次实验结果中 Q^2

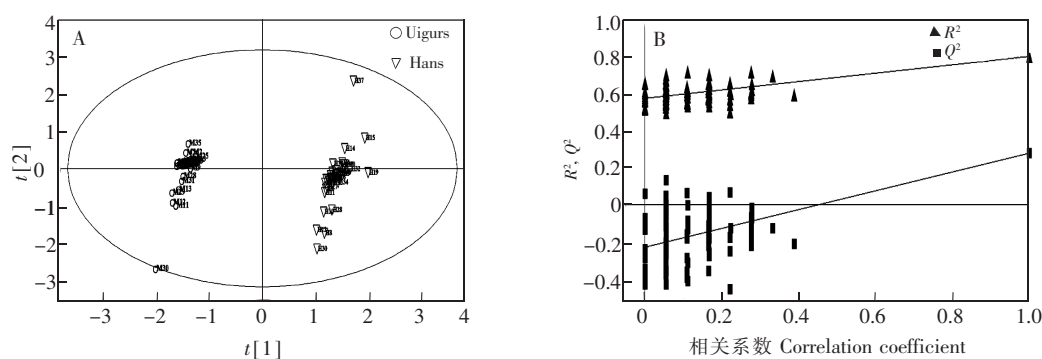


图 1 (A) 维吾尔族和汉族大学生尿液的 OSC-PLS-DA 得分图; (B) 该模型的交叉验证图

Fig. 1 (A) Score plot of PLS-DA model with orthogonal signal correction (OSC) filtering. Han (Circle), Uigur (Triangle); (B) Validation of the model in (A) using 100 permutations

为负值(−0.232),证实所建模型不存在过拟合,模型有效,预测能力良好^[12],可应用于维吾尔族和汉族大学生尿样的聚类分析。

3.2 差异代谢物筛选

在 OSC 滤噪的 PLS-DA 模型中 Variable importance in the projection (VIP) 是一种广泛使用的变量挑选方法^[12],VIP 间接反映了代谢物和所研究样本之间的关系。本研究以 $VIP > 1$ ^[13] 和显著性 t 检验 $p < 0.05$ 为标准对代谢物进行了筛选,共鉴定出 9 种代谢物在维吾尔族和汉族大学生尿液中存在显著性差异,所得结果按 VIP 由大到小列于表 1。

表 1 维吾尔族和汉族大学生尿液样本的 9 个差异代谢物
Table 1 Nine significant differences in Uigur versus Han urinary samples

No.	Metabolites	HMDB*	VIP value	p-Value ($\times 10^{-2}$)
1	3-羟基异丁酸 (S)-3-Hydroxyisobutyric acid	HMDB 00435	2.51	0.03
2	琥珀酸 Succinic acid	HMDB 00254	1.74	3.76
3	α -N-苯乙酰-L-谷氨酰胺 α -N-Phenylacetyl-L-Glutamine	HMDB 06344	1.66	3.56
4	甘油 Glycerol	HMDB 00131	1.61	3.18
5	乳酸丁酯 Butyl lactate	HMDB 40254	1.60	3.66
6	丙二醇 1,2-Propylene Glycol	HMDB 01881	1.52	2.39
7	赤藓糖醇 Erythritol	HMDB 02994	1.45	3.37
8	肌醇 Myo-inositol	HMDB 02256	1.39	2.53
9	左旋葡聚糖 Levoglucosan	HMDB 00640	1.32	0.53

HMDB: Human metabolomics databas; VIP: Variable importance in the projection.

为进一步验证所鉴定的差异代谢物的可靠性,分别通过人类代谢组学数据库(Human metabolomics databas ,HMDB)、代谢物二级质谱数据库(Metabolite and tandem MS databas ,METLIN) 和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ,KEGG) 等数据库对 9 种差异代谢物进行检索,结果发现,它们均为尿液代谢物,进一步验证了实验结果的可靠性。其中 7 种差异代谢物为内源性物质(图 2),主要涉及碳水化合物代谢、氨基酸代谢和三羧酸循环代谢途径。它们在两组尿样中的变化趋势也各不相同,有升有降,而尿液中内源性物质的含量与饮食文化或基因等因素有着直接或间接的关系。乳酸丁酯和丙二醇为外源性代谢物,它们含量的高低与摄入的食物或香精有直接关系。上述结果表明,维吾尔族和汉族健康大学生人群尿样中存在着多种差异代谢物,导致这种现象的原因与民族文化,特别是饮食文化的差异有关。

特别需要说明的是,在两组尿样中, α -N-苯乙酰-L-谷氨酰胺在维吾尔族大学生尿液样本中含量明显高于汉族大学生,其过度表达预示着患有肝脾气虚症的可能性更高^[14]。但在本实验过程中所采集的尿液样本均来自于年轻的健康大学生人群, α -N-苯乙酰-L-谷氨酰胺含量偏高并不能说明维吾尔族大学生比汉族人群患有肝脾气虚症的可能性更高,可能只是与民族文化和传统或民族基因间差异有关,而且新疆实际情况也与这一可能性相反,乙肝携带率汉族高于维吾尔族^[11]。上述实际结果说明民族文化和传统或民族基因的差异也会导致不同族别人群尿液样本中代谢物的种类和含量存在着差异,会严重干扰相关疾病生物标志物的发现和鉴定。

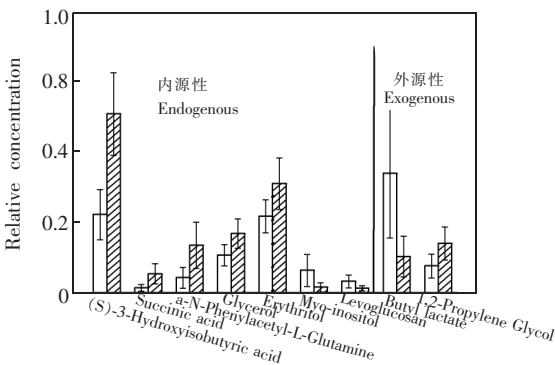


图 2 差异代谢物在维吾尔族和汉族大学生尿液样品中浓度差异。空白框代表汉族尿液样品;条纹框代表维吾尔族尿液样品。

Fig. 2 Comparison of relative concentrations of metabolites differentially expressed in urine samples of Uigur and Han undergraduates . Han (Blank) ; Uigur (Stripe)

References

- 1 Huang Z Z , Chen Y J , Hang W , Gao Y , Lin L , Li D Y , Xing J C , Yan X M. *Metabolomics* , **2013** , 9(1) : 119 – 129
- 2 Theodoridis G , Gika H G , Wilson I D. *Mass. Spectrom. Rev.* , **2011** , 30(5) : 884 – 906
- 3 Lenz E M , Bright J , Wilson I D , Morgan S R , Nash A F P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **2003** , 33(5) : 1103 – 1115
- 4 Saito K , Maekawa K , Pappan K L , Urata M , Ishikawa M , Kumagai Y , Saito Y. *Metabolomics* , **2014** , 10(3) : 402 – 413
- 5 Lenz E , Bright J , Wilson I , Hughes A , Morrisson J , Lindberg H , Lockton A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **2004** , 36(4) : 841 – 849
- 6 Dumas M E , Maibaum E C , Teague C , Ueshima H , Zhou B , Lindon J C , Nicholson J K , Stamler J , Elliott P , Holmes E , Chan Q. *Anal. Chem.* , **2006** , 78(7) : 2199 – 2208
- 7 Psihogios N G , Gazi I F , Elisaf M S , Seferiadis K I , Bairaktari E T. *NMR Biomed.* , **2008** , 21(3) : 195 – 207
- 8 Slupsky C M , Rankin K N , Wagner J , Fu H , Chang D , Weljie A M , Saude E J , Lix B , Adamko D J , Shah S , Greiner R , Sykes B D , Marrie T J. *Anal. Chem.* , **2007** , 79(18) : 6995 – 7004
- 9 Zhang S , Liu L , Steffen D , Ye T , Raftery D. *Metabolomics* , **2012** , 8(2) : 323 – 334
- 10 LI Lin-Lin , MAO Xin-Min , ZHANG Yue-Ming , RAN Xin-Jian , NU Li-Man , ZHOU Kang , DU Jing-Yu , YANG Yong-Xin , WU Li-Ya , BAI Li , KA De-Er , WANG Sai-Gang , LIN Ren-Yong , LI Nian-Dong. *Chin. J. Endocrinol. Metab.* , **2005** , 21(2) : 141 – 142.
李琳琳 , 毛新民 , 张月明 , 冉新建 , 努丽曼 , 周康 , 杜景玉 , 杨永新 , 邬利娅 , 白丽 , 卡德尔 , 王赛刚 , 林仁勇 , 李念东. *中华内分泌代谢杂志* , **2005** , 21(2) : 141 – 142
- 11 MAO Ying , GU Jia-Yi , DU Shou-Hong , XIANG Yang. *Mod Prevent. Med.* , **2014** , 41(20) : 3778 – 3789
毛英 , 顾佳怡 , 杜守洪 , 向阳. *现代预防医学* , **2014** , 41(20) : 3778 – 3789
- 12 Mahadevan S , Shah S L , Marrie T J , Slupsky C M. *Anal. Chem.* , **2008** , 80(19) : 7562 – 7570
- 13 Chong I G , Jun C H. *Chem. Intell. Lab. Syst.* , **2005** , 78(1) : 103 – 112
- 14 Zhang A H , Sun H , Han Y , Yuan Y , Wang P , Song G C , Yuan X X , Zhang M , Xie N , Wang X J. *Analyst* , **2012** , 137(18) : 4200 – 4208

Metabolite Profiling of Human Urine from Uygur and Han Undergraduates Population in Xinjiang

SONG Pei-Pei¹ , MA Yu-Hua¹ , HAN Ping¹ , LIU Yang² , WANG Ji-De¹ , FENG Shun^{* 1}

¹(College of Chemistry and Chemical Engineering , Xinjiang University , Urumqi 830046 , China)

²(YanCheng biological products Co. , Ltd , Shenyang 110000 , China)

Abstract The aim of this study was to investigate the inter-individual variability of the metabolic urinary profile between Uygur and Han healthy populations , the largest population in Xinjiang. Totally 72 urine samples (35 Uygur and 37 Han undergraduates) were collected and analyzed based on a gas chromatography–mass spectrometric platform. The data were analyzed by orthogonal signal correction filtered partial least-squares discriminant analysis to screen variations reflecting metabolic characteristics between the two groups. Totally 9 metabolites were differentially expressed between two groups. Among which , seven compounds were endogenous metabolites , and the other two metabolites were exogenous. The results showed that non-disease specific factors should be diminished or decreased to improve the accuracy and reliability of relative biomarkers in multi-ethnic co-existed region , and the factor of ethic should be taken into accounts seriously besides age , sex.

Keywords Metabonomics; Gas chromatography–mass spectrometry; Uygur; Han; Urine

(Received 17 April 2015; accepted 3 June 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21075105 , 21165017)