

警犬血浆内源性代谢物的气相色谱-质谱分析

刘亚玲¹ 吴德华² 徐汉坤² 黄克和¹ 贺星亮²

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京, 210095; 2. 公安部南京警犬研究所, 南京, 210012)

摘要 利用气相色谱-质谱技术对德国牧羊犬、史宾格犬和拉布拉多犬三个警用品种犬的血浆进行了分析研究。结果发现,犬的血浆中有200多种物质,而这三个品种犬血浆共有的内源性代谢物有38种,主要是氨基酸、脂肪酸、糖类等小分子量的化合物。通过对检测到的38种共有内源性代谢物比较分析,发现部分代谢物的含量在三个品种之间存在差异。

关键词 气相色谱-质谱 德国牧羊犬 史宾格犬 拉布拉多犬 血浆 内源性代谢物

1 前言

代谢组学是一门在新陈代谢的动态进程中系统研究代谢产物的变化规律,揭示机体生命活动代谢本质的科学^[1]。色谱-质谱联用(GC-MS)技术具有较强的分离分析能力,灵敏度高,操作简便,是对代谢物进行逐一定性定量分析时不可缺少的手段^[2-4],而且有商品化的标准质谱数据库^[5],可对代谢物的结构进行快速鉴定,适合于代谢组学分析。代谢组学测定的对象主要是生物体液^[6],而血液^[7,8]和尿液^[9]是含有许多内源性代谢物的复杂体液,具有易获得、对机体损伤小的特点,被广泛应用于临床研究。大多数疾病可引起体内代谢水平发生变化,从而使体液中的代谢物发生相应的改变。对这些由疾病引起的代谢产物进行分析,有助于更好地理解病变过程及机体内物质的代谢途径,还有助于发现疾病的生物标记物^[10]和辅助临床诊断。该技术已广泛应用于医学研究,但用于犬类疾病研究少有报道。为了警犬疾病的诊断,笔者建立了一种利用GC-MS技术进行犬血浆内源性代谢物分析的方法,并对三个警用品种健康犬的血浆内源性代谢物的差异性进行了研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

7890A/5975C 气相色谱-质谱联用仪(美国Agilent公司),配有Agilent HP-5MS毛细管柱(30m×0.25mm,0.25μm);Agilent色谱工作站和

NIST2008 质谱数据库。

二十二烷(分析纯,Supelco公司),甲氧胺盐酸盐(分析纯,Aldrich公司),N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺(MSTFA)和三甲基氯硅烷(TMCS)(均为分析纯,Regis公司),吡啶(分析纯,Fluka公司),乙腈(色谱纯,Sigma公司),正庚烷(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),氦气(高级纯)。

2.2 实验方法

2.2.1 实验动物和样品采集

德国牧羊犬,史宾格犬和拉布拉多犬各10头(健康成年的2~4岁公犬,公安部南京警犬研究所提供)。专人饲养,1犬1舍。日粮为公安部南京警犬研究所生产的成年犬用膨化颗粒饲料。

犬前肢静脉采血5 mL于5 mL EDTA抗凝管内,然后离心10 min(1500r/min),移取血浆,置于-20℃下保存备用。

2.2.2 样品预处理

样品解冻后,取100 μL,加入250 μL乙腈,充分混匀,冰浴10 min后离心分离(10000r/min,10min)。取上层血浆乙腈萃取液250 μL置入衍生化反应瓶,N₂吹干。加15mg/mL的甲氧胺吡啶溶液50 μL混匀,70℃下脎化1h后加衍生化试剂(MSTFA:TMCS=100:1,V/V)50 μL,混匀静置。1h后加含二十二烷(内标,0.10 mg/mL)的正庚烷100 μL,混匀后离心分离(3000r/min,10min),移取上清液到微量进样管,供GC-MS分析。

作者简介:刘亚玲,女,1982年出生,硕士研究生,研究方向为小动物疾病。E-mail: liuyaling2007@163.com

通讯作者:吴德华、黄克和。

2.2.3 GC-MS 分析条件

进样口温度 270℃,不分流进样,进样量 1 μ L,溶剂延迟 5min。程序升温,初始温度 80℃,保持 5min,然后以 10℃/min 的速度从 80℃升至 300℃,保持 5min。接口温度 280℃,离子源温度 230℃,电离电压 70 eV,四极杆温度 150℃。氦气作为载气,流速 1mL/min。全扫描,45~550 m/z。

2.2.4 数据分析

根据 GC-MS 总离子流图中各峰的保留时间选择共有峰,获取各峰与内标峰的峰面积数据,用相对峰面积(与内标峰的比值)表示代谢物的含量。利用 NIST2008 质谱数据库对检测到的内源性代谢物进行鉴定,并用 SPSS16.0 对实验数据进行统计分析。

3 结果与讨论

3.1 GC-MS 分析方法考察

3.1.1 仪器精密度

取同一样品,连续进样 6 次,计算各峰与内标峰的相对峰面积的相对标准偏差(RSD),血浆共有峰 RSD 在 1.75%和 2.14%之间,说明仪器精密度良好。

3.1.2 样品稳定性

取同一样品,分别在 0、4、8、12、18、24 h 进样,计算各峰与内标峰的相对峰面积的相对标准偏差(RSD),血浆共有峰 RSD 在 1.89%和 2.32%之间,说明样品在 24h 之内是稳定的。

3.1.3 制备重复性

平行制备 6 份样品,计算各峰与内标峰的相对峰面积的相对标准偏差(RSD),血浆共有峰 RSD 在 1.75%和 2.04%之间,说明样品重复性良好。

3.2 血浆内源性代谢物的主要组分

机体代谢会随饮食、肠道微生物菌群、运动、遗传等因素而发生变化,所有这些因素都可能影响血浆代谢物的谱图和浓度。史宾格犬血浆 GC-MS 分析总离子流图见图 1。

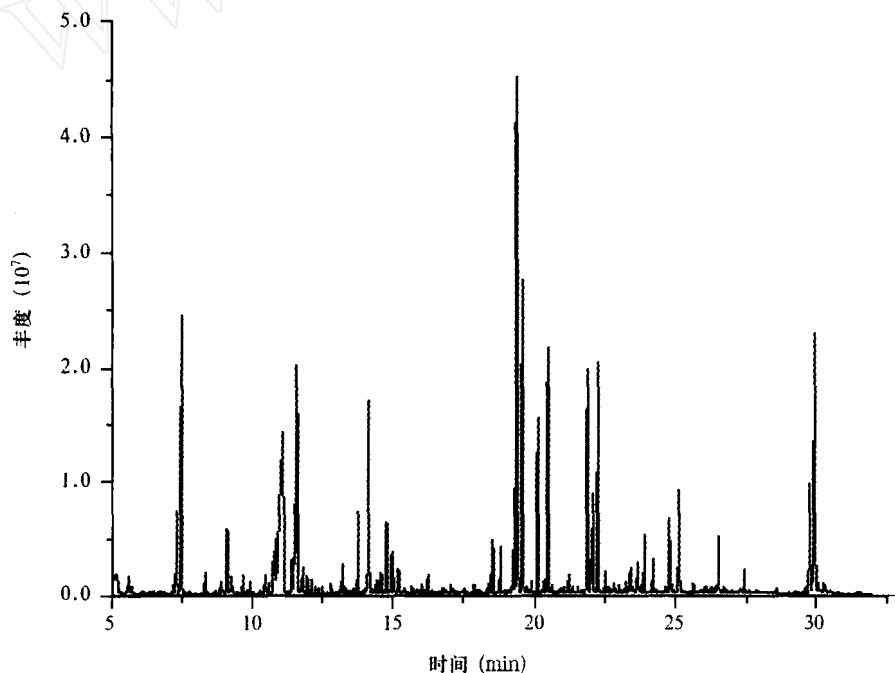


图 1 史宾格犬血浆 GC-MS 分析总离子流图

根据犬血浆 GC-MS 总离子流图,经 NIST2008 质谱数据库鉴定,发现犬血浆中含有 200 多种物质。主要是氨基酸、脂肪酸、糖类、核酸、有机酸、激素等小分子量化合物。

3.3 共有内源性代谢物

在对不同品种犬的内源性代谢物的谱图进行分析后发现,有 38 种内源性代谢物是三个品种犬所共

有的,结果见表 1。

3.4 共有内源性代谢物含量的变化

运用 SPSS16.0 对三个品种犬的血浆内源性代谢物的相对峰面积进行单因素方差分析,并作 Bonferroni T 检验。

部分代谢物的含量在不同品种之间存在一定差异,见表 2。

表 1 三个品种犬(各 10 头)血浆中的共有内源性代谢物

序号	保留时间 (min)	内源性代谢物	匹配度
1	7.526	2-Hydroxypropionic acid (乳酸)	937
2	8.381	L-Alanine (L-丙氨酸)	843
3	10.518	L-Valine (L-缬氨酸)	875
4	11.453	L-Leucine (L-亮氨酸)	898
5	11.529	Glycerol (甘油)	926
6	11.650	Phosphoric acid (磷酸)	842
7	11.800	L-Isoleucine (L-异亮氨酸)	861
8	11.991	Glycine (甘氨酸)	880
9	12.048	Butanedioic acid (琥珀酸)	921
10	12.828	Serine (丝氨酸)	924
11	13.215	L-Threonine (L-苏氨酸)	943
12	14.324	Aminomalonic acid (氨基丙二酸)	912
13	14.919	L-Methionine (L-蛋氨酸)	901
14	14.965	L-Proline (L-脯氨酸)	933
15	15.057	Aspartic acid (天冬氨酸)	859
16	16.074	Ornithine (鸟氨酸)	854
17	16.235	L-Phenylalanine (L-苯丙氨酸)	906
18	17.125	L-Lysine (L-赖氨酸)	905
19	17.853	Phosphoric acid, 2,3-dihydroxypropyl ester (磷酸甘油酯)	798
20	17.876	Glutamine (谷氨酰胺)	868
21	18.268	Methy-L-histidine (甲基组氨酸)	954
22	18.384	DL-Ornithine (DL-鸟氨酸)	881
23	18.453	Citrate (柠檬酸)	931
24	19.106	Fructose (果糖)	991
25	19.256	Mannose (甘露糖)	814
26	19.395	Glucose (葡萄糖)	829
27	19.579	Galactose (半乳糖)	872
28	19.625	L-Tyrosine (L-酪氨酸)	934
29	20.232	Palmitelaidic acid (十六碳烯酸)	830
30	20.480	Hexadecanoic acid (软脂酸)	918
31	21.225	Myo-Inositol (肌醇)	895
32	22.005	9,12-Octadecadienoic acid (亚油酸)	854
33	22.051	Oleic acid (油酸)	888
34	22.259	Octadecanoic acid (硬脂酸)	869
35	23.356	Arachidonic acid (花生四烯酸)	967
36	24.846	Monopalmitin (单软脂酸甘油酯)	830
37	26.256	Monostearin (单硬脂酸甘油酯)	995
38	29.744	Cholesterol (胆固醇)	919

表2 三个品种犬之间内源性代谢物相对峰面积的比较

内源性代谢物	德国牧羊犬 (均值±标准差)	史宾格犬 (均值±标准差)	拉布拉多犬 (均值±标准差)
乳酸	0.82±0.31	0.96±0.30	1.01±0.35
丙氨酸	0.15±0.06	0.14±0.06	0.15±0.04
L-缬氨酸	0.20±0.04	0.16±0.05	0.16±0.05
L-亮氨酸	0.24±0.05	0.19±0.05	0.22±0.04
甘油	0.36±0.13	0.32±0.06	0.31±0.01
磷酸	0.94±0.10	1.18±0.23	1.12±0.26
L-异亮氨酸	0.11±0.02	0.07±0.03	0.09±0.03
甘氨酸	0.15±0.03	0.11±0.03	0.11±0.03
琥珀酸	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.00
丝氨酸	0.09±0.00	0.06±0.02	0.06±0.01
L-苏氨酸	0.19±0.06 ^a	0.10±0.02 ^b	0.14±0.02
氨基丙二酸	0.03±0.05	0.01±0.00	0.01±0.00
L-蛋氨酸	0.06±0.02	0.04±0.01	0.05±0.02
L-脯氨酸	0.30±0.02 ^a	0.23±0.04	0.20±0.05 ^b
天冬氨酸	0.10±0.02	0.08±0.02	0.07±0.01
鸟氨酸	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00
L-苯丙氨酸	0.09±0.01 ^a	0.07±0.02	0.06±0.01 ^b
L-赖氨酸	0.02±0.00	0.03±0.01	0.03±0.00
磷酸甘油酯	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.00
谷氨酰胺	0.02±0.02	0.01±0.01	0.02±0.01
甲基组氨酸	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
DL-鸟氨酸	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.00
柠檬酸	0.06±0.04	0.04±0.02	0.04±0.00
果糖	0.02±0.01 ^a	0.01±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b
甘露糖	0.05±0.02	0.07±0.02	0.04±0.02
葡萄糖	2.85±0.19	3.11±0.12	2.96±0.35
半乳糖	1.15±0.09 ^a	0.99±0.54 ^b	0.94±0.12 ^b
L-酪氨酸	0.11±0.03 ^a	0.06±0.02 ^b	0.07±0.02 ^b
十六碳烯酸	0.02±0.15	0.02±0.01	0.01±0.00
软脂酸	0.72±0.06	0.79±0.03	0.79±0.03
肌醇	0.13±0.02 ^a	0.08±0.01 ^b	0.08±0.01 ^b
亚油酸	0.10±0.08	0.11±0.04	0.08±0.01
油酸	0.45±0.04 ^a	0.11±0.03 ^b	0.10±0.00 ^b
硬脂酸	0.65±0.03 ^a	0.76±0.04 ^b	0.73±0.04 ^b
花生四烯酸	0.02±0.01 ^a	0.03±0.00 ^b	0.03±0.01 ^b
单软脂酸甘油酯	0.05±0.00 ^a	0.04±0.00 ^b	0.04±0.00 ^b
单硬脂酸甘油酯	0.02±0.00 ^a	0.18±0.01 ^b	0.15±0.07 ^b
胆固醇	0.68±0.15	0.58±0.08	0.59±0.07

注：数据上角标 a、b 表示差异显著 (P<0.05)。

德国牧羊犬 L-苏氨酸、L-酪氨酸、果糖、半乳糖、肌醇、油酸、单软脂酸甘油酯的含量显著高于史宾格犬, L-脯氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、果糖、半乳糖、肌醇、油酸、单软脂酸甘油酯的含量显著高于拉布拉多犬, 而硬脂酸、花生四烯酸和单硬脂酸甘油酯的含量显著低于史宾格犬和拉布拉多犬。

4 结 论

建立了一种基于气相色谱-质谱技术的代谢组学分析方法, 并将其用于健康犬血浆内源性代谢物的研究。利用 NIST 质谱数据库快速鉴定代谢物, 结果发现德国牧羊犬, 史宾格犬和拉布拉多犬血浆中有 200 多种内源性代谢物, 但仅有 38 种是三个品种犬所共有的。天冬酰胺、色氨酸、谷氨酸、组氨酸、十二烷酸、十五酸、D-木糖、D-核糖、阿拉伯糖、丙酮酸、吡啶乙酸、乙酰乙酸、壬酸等大量代谢物并不为三个品种犬所共有。这可能与犬的个体差异、饮食、肠道微生物菌群、运动、遗传以及年龄等因素有关。

对三个品种犬共有的 38 种血浆内源性代谢物进行统计分析, 发现部分代谢物的含量在德国牧羊犬与史宾格犬, 德国牧羊犬与拉布拉多犬之间存在一定的差异, 而史宾格犬和拉布拉多犬之间差异不显著。其中 L-酪氨酸、果糖、半乳糖、肌醇、油酸、单软脂酸甘油酯的含量德国牧羊犬显著高于史宾格犬和拉布拉多犬; 硬脂酸、花生四烯酸和单硬脂酸甘油酯的含量显著低于史宾格犬和拉布拉多犬。另

外, L-苏氨酸德国牧羊犬高于史宾格犬, L-脯氨酸、L-苯丙氨酸德国牧羊犬高于拉布拉多犬。本文将 GC-MS 技术用于代谢组学的研究, 建立了健康犬的血浆内源性代谢物谱, 为警犬临床疾病诊断进行了有益的探索。

参考文献

- 1 管恩泽, 朱萱萱, 王广基等. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(1): 11-15
- 2 黄欣, 龚益飞, 王毅等. 高等化学学报, 2008, 29(4): 714-719
- 3 Lenz E M, Wilson I D. Proteome Research, 2007, 6(2): 443-458
- 4 夏建飞, 梁琼麟, 胡坪等. 分析化学, 2009, 37(1): 136-143
- 5 Halket J M, Waterman D, Przyborowska A M, et al. Experimental Botany, 2005, 56(410): 219-243
- 6 Pasikanti, K K, Ho P C, Chan E C Y. Chromatography B, 2008, 871: 202-211
- 7 Jiye A, Trygg J, Gullberg J, Johansson A I, et al. Analytical Chemistry, 2005, 77(24): 8086-8094
- 8 Huang X, Gong Y F, Yu K, et al. Chin J Anal Chem, 2007, 35(12), 1736-1740
- 9 Jiye A, Huang Qing, Wang Guangji, et al. Analytical Biochemistry, 2008, 379: 20-26
- 10 Yang J, Xu G W, Hong Q F, et al. Chromatography B, 2004, 813(1-2): 53-58

收稿日期: 2009-08-20

Analysis of endogenous metabolites in plasma of police dogs by gas chromatography-mass spectrometry.
Liu Yaling¹, Wu Dehua², Xu Hankun², Huang Kehe¹, He Xingliang² (1. School of Animal Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 2100952; 2. Nanjing Police Dog Research Institute of Ministry of Security, Nanjing, 210012)

The endogenous metabolites in plasma of three species of police dogs (German Shepherd, English Springer Spaniel, and Labrador Retriever) were analyzed by GC-MS. It has been found that there are more than 200 metabolites in canine plasma, but only 38 metabolites are commensal endogenous metabolites in three species. The commensal endogenous metabolites are mainly low molecular weight compounds such as amino acids, fatty acids, carbohydrates, and so on. Analytical results demonstrate that the concentrations of some endogeneous metabolites are different among three species of police dogs.