

代谢组学方法研究奶牛注射氯霉素后牛奶中的生物标志物

王世成 李国琛 王颜红* 胡小燕 张红

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

摘 要 建立了高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 技术研究牛奶代谢组学的方法。样品用乙腈提取, 经浓缩富集, 采用 HPLC-MS 技术研究了注射氯霉素后牛奶中内源性代谢物随时间的变化情况。结果表明, 注射氯霉素后, 牛奶的代谢指纹图谱中 8 个谱峰的变化随给药及停药时间呈现一定升降规律; 采用偏最小二乘判别分析法 (PLS-DA) 可将给药组与空白组样品完全分开; 鉴定了对组间差异贡献较大的化合物为单羟基十八碳二烯酸 (HODE), HODE 可以作为注射氯霉素后奶牛体内代谢应激产生的内源性生物标志物。

关键词 牛奶; 氯霉素; 代谢组学; 生物标志物; 单羟基十八碳二烯酸

1 引 言

代谢组学是测定生物体受病理生理刺激和基因修饰所产生的与时间相关的多元代谢产物的一门新学科^[1]。通过分析生物体液和组织中内源性代谢物, 代谢组学可以寻找代谢物变化与整体生物学状况的关系^[2]及生物标志物, 已广泛应用于药物毒性和机理^[3, 4]、疾病诊断和动物模型^[5, 6]等研究。

代谢组学以液相色谱-质谱 (LC-MS)^[7]、气相色谱-质谱 (GC-MS)^[8]、核磁共振谱 (NMR)^[9]等方法为主要研究手段。其中 LC-MS 以其广泛适用性、优良分离性能和较高灵敏度已被广泛应用于复杂体系中的靶标分析。Ninonuevo 等^[10]应用高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 和基质辅助激光解吸电离傅立叶变换离子回旋共振质谱 (MALDI-FTICR-MS) 技术分析了人乳中低聚糖组成。Fong 等^[11]采用蛋白质组学技术研究了牛奶乳清蛋白的组成变化。应用代谢组学技术研究外源物质对牛奶主要成分, 如蛋白质、碳水化合物、脂类等成分变化影响鲜有报道。

氯霉素是对革兰氏阳性、阴性细菌均有抑制作用的广谱抗生素。由于氯霉素对生物体有很大的毒副作用, 作为兽用药可能对畜禽产品的食用安全产生影响。本研究以注射氯霉素后奶牛所产牛奶为研究对象, 利用代谢组学技术, 高效分离和鉴定了在氯霉素影响下牛奶差异成分, 筛选出氯霉素对牛奶影响的内源性生物标志物。本研究结果有助于阐明抗生素对畜禽类产品的食用安全影响机理。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

2695 液相色谱仪 (Waters 公司), Quattro Premier XE 质谱仪及 Masslynx V4.1 软件 (Waters 公司); LTQ Orbitrap XL hybrid 高分辨质谱仪 (Thermo Fisher 公司)。13 (S) 羟基-9, 11-十八碳二烯酸 (13-HODE, 美国 Cayman 公司); 氯霉素 (纯度 > 99%, 中国药品生物制品检定所); 注射氯霉素 (0.25 g/2 mL, 批号 0801141, 郑州羚锐制药有限公司)。

2.2 实验材料和样品制备

选取健康成年奶牛 10 头, 随机分成两组: 空白组 5 头, 给药组 5 头, 实验期间正常喂料。给药组每日按体重注射氯霉素 25 mg/kg 连续用药 5 d 停药 5 d 从给药前日至停药期结束, 每日收集给药组和空白组牛奶 1 L, -70 °C 冷冻保存, 供代谢组分析。

2.3 样品处理

冷冻的牛奶在室温下融化, 取 50 mL, 加 50 mL 乙腈沉淀蛋白, 加 2~3 g NaCl 振荡, 静置分层。取

2009-12-15 收稿; 2010-04-07 接受
本文系中科院知识创新重要方向项目 (No. KSCX2-YW-N-035) 和沈阳市科技计划项目 (No. 2007GX-49) 资助
* E-mail: wangyl@iae.ac.cn

出有机相,加NaCl至饱和并重新分层,3000 g离心,再取有机相,加正己烷脱脂 3 次,每次 20 mL,弃去正己烷层,乙腈层旋蒸 (< 40 ℃)至近干后用氮气吹干。用 1 mL 乙腈溶解,离心,过 0.45 μm 滤膜,待测。

2.4 色谱质谱条件

XBridge C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 3.0 mm, 5 μm); 流速 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃。流动相 A 为乙腈, B 为水 (含 0.1% 乙酸)。梯度洗脱程序: 0~30 min 60%~80% A; 30~40 min 80%~95% A; 40~45 min 95% A。进样体积 20 μL。

ESI 负电离模式扫描,毛细管电压 2.0 kV, 锥孔电压 40 V, 离子源温度 120 ℃, 锥孔气流速 100 L/h, 去溶剂气流速 300 L/h, 去溶剂气温度 300 ℃。

喷雾电压 3.5 kV; 透镜电压 100 V; 毛细管温度 275 ℃; 毛细管电压 36 V; 鞘流气体流速 8 arb。

3 结果与讨论

3.1 空白组和给药组牛奶代谢指纹图谱的变化规律

给药 5 d 后,5 头奶牛的牛奶图谱均与空白组和停药组相比存在显著的差异。通过观察总离子流图,选取了 8 个差异峰,获得相应的选择离子扫描图,发现空白组和给药组之间图谱差异更显著 (图 1)。以峰高稳定的 6 号峰为标准,分别计算了选取的 8 个峰的峰面积与 6 号峰的峰面积的百分比,以评价各谱峰的变化趋势。空白、给药 5 d 及停药 5 d 后,3 组牛奶图谱中各谱峰的变化百分比见表 1。给药 5 d 后,1~8 号 (6 号峰除外) 峰均呈升高的趋势,9 号峰呈下降趋势;停药 5 d 后,1~8 号峰 (2 和 6 号峰除外) 呈下降的趋势,9 号峰呈升高趋势,与空白组水平相当。

表 1 给药及停药前后牛奶代谢指纹图谱中的主要谱峰相对 6 号峰面积百分比变化

Table 1 Variations of area percentage of main chromatographic peaks to 6th peak during medicine treated and withdrawal period

谱峰 Peaks	暴露时间 Retention time (min)	质荷比 Mass to charge ratio (m/z)	峰面积 Peak area		
			给药前 Before injection	给药后 After injection	停药后 After withdrawal
1	10.5	295	0.0	20.0 ↑	3.6 ↓
2	17.9	299	13.4	38.7 ↑	39.8 -
3	24.2	301	2.5	17.7 ↑	0.6 ↓
4	25.2	277	9.5	59.0 ↑	9.6 ↓
5	26.3	227	4.3	16.2 ↑	6.6 ↓
7	30.7	303	25.5	44.2 ↑	15.1 ↓
8	33.3	279	11.1	16.6 ↑	12.3 ↓
9	39.0	255	124.0	31.1 ↓	73.5 ↑

3.2 给药前后同一头奶牛所产牛奶的变化规律

采用 XCMS 软件^[12]对总离子流图中的色谱峰进行校正、滤噪和归一化处理,得峰面积百分比,利用 SMCA-P 11.5 软件进行 PLS-DA 统计分析。给药前后给药组 5 头奶牛的牛奶图谱变化规律相似,以同一头奶牛为例加以说明 (见图 2)。考察 11 d (给药前 1 d 给药 5 d 停药 5 d) 内 5 头奶牛所产牛奶的选择离子流图发现,随着给药和停药天数的增加,相应的谱峰分别呈现增大或减小的变化趋势。1 号峰在给药 5 d 内出现并逐渐增强,停药 1 d 后显著增强,停药 2 d 后达到最高;停药 5 d 后基本消失。2 号峰在给药 5 d 后达到最高,停药 5 d 后变化不明显;3 和 7 号峰在停药 1 d 后开始出现,后又随停药期逐渐降低。

3.3 数据处理及判别分析

针对空白组和给药组各 5 个牛奶样本的总离子流图 (图 2),采用 XCMS 软件^[7]对采集的色谱峰进行峰对齐、保留时间校正和滤噪处理,剔除溶剂和氯霉素峰的积分值,将其余 246 个谱峰的峰面积归一化处理。处理后的数据采用 Simca 软件进行 PLS-DA 分析,提取 2 个主成分后两组样本实现了完全分离。

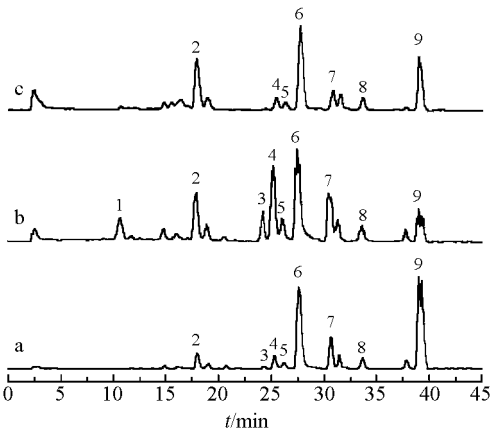


图 1 牛奶样品选择离子色谱图

Fig 1 SM chromatograms of milk from cows

(a) 给药前 (Before injected with chloramphenicol); (b) 连续给药 5 d (After continually injected with chloramphenicol for 5 days); (c) 停药 5 d (After withdrawal for 5 days)。

(图 3a)。观察其载荷图(图 3b)发现, 绝大多数谱峰分布离原点较近, 包括 1 号峰在内的少数谱峰距原点较远, 说明这些峰对组间差异贡献较大。

3 4 生物标志物的结构解析

根据上述分析, 本研究重点考察了变化显著、贡献率大的 1 号峰, 鉴定其化学结构, 并探讨了其对氯霉素的代谢响应机理。采用高分辨质谱确定了 1 号峰的单同位素精确质量数为 295.2258, 结合子离子碎片, 确定其分子式为 $C_{18}H_{32}O_3$ ($[M - H]^-$ 精确质量数为 295.2273)。通过碎片解析, 检索 PubChem、KEGG、HMDB、LIPID MAPS 等数据库, 并参考文献 [13~ 15], 判断其可能为单羟基十八碳二烯酸 (9-羟基-十八碳二烯酸 (9-HODE) 和 13-羟基-十八碳二烯酸 (13-HODE) 的混合物。采用标准品对照法, 确认

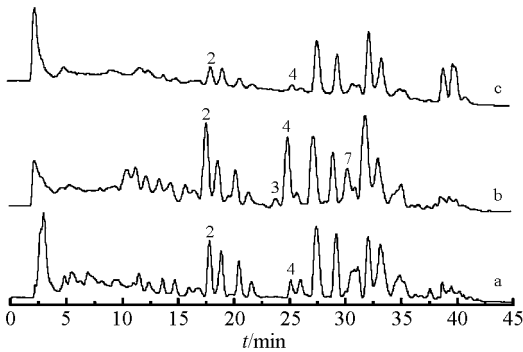
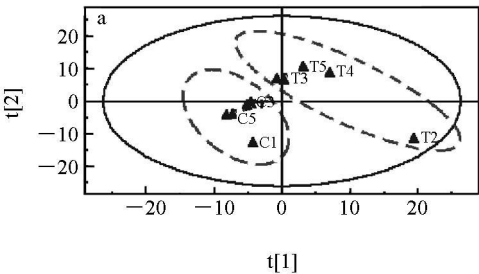


图 2 牛奶中乙腈提取物的总离子色谱图
Fig 2 Total ion chromatogram of milk from cows
(a) 给药前 (Before injected with chloramphenicol); (b) 连续给药 5 d (After continually injected with chloramphenicol for 5 days); (c) 停药 5 d (After withdrawal for 5 days)。

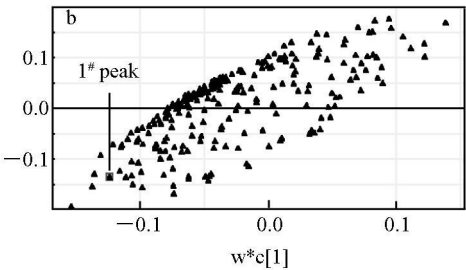


图 3 空白组 (C) 和给药组 (T) 的 PLS-DA 得分图 (a) 和载荷图 (b)
Fig 3 Scores plot (a) and loading plot (b) of control group (C) and treated group (T)

了 13-HODE 的存在。由图 4 可见, 13-HODE 的主要碎片离子为 m/z 277 $[M - H - H_2O]^-$, m/z 195 $[M - H - C_6H_{12}O]^-$, 9-HODE 的主要碎片离子为 m/z 179 $[M - H - C_6H_{12}O_2]^-$, m/z 171 $[M - H - C_9H_{16}]^-$ [16]。

3 5 HODE 的响应机制分析

HODE 一般为脂类中的亚油酸与体内产生的活性氧自由基发生反应而生成的产物 [17, 18]。有研究指出, 氯霉素在生物体内可以通过微粒体细胞色素 P450 的作用产生自由基 [19], 氯霉素的毒性体现在其在体内生物转化产生的氧自由基对生物大分子造成伤害 [20~ 22]。因此, 可以推断注射一定剂量的氯霉素后, 奶牛体内产生活性氧自由基, 活性氧自由基氧化细胞膜中的不饱和脂肪酸 [23]。由于脂质膜中的不饱和脂肪酸以亚油酸和油酸为主 [23], 因此, 活性氧自由基很可能作用于亚油酸的 C_9 或 C_{13} 位, 分别形成 9-羟基-十八碳二烯酸和 13-羟基-十八碳二烯酸二种异构体。

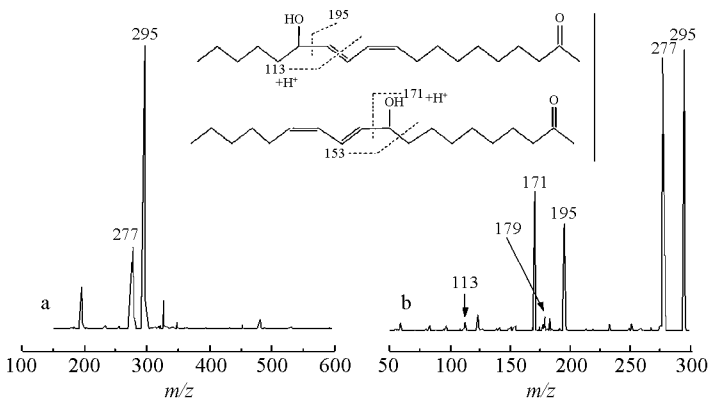


图 4 (a) 图 1b 中 1 号峰的负离子质谱图; (b): m/z 295.2 的子离子质谱图
Fig 4 (a): Negative ion mass spectrum of peak 1 in Fig 1b; (b): Daughter ion mass spectrum of m/z 295.2

研究结果表明, 单羟基十八碳二烯酸 (HODE) 很可能是氯霉素作用于奶牛体内产生的活性氧自由基与亚油酸的反应产物, 可以作为注射氯霉素后奶牛体内应激产生的生物标志物。

References

- Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. *Xenobiotica*, **1999**, 29(11): 1181~1189
- HUANG Xin(黄欣), GONG Yifei(龚益飞), YU Ke(虞科), CHENG Yiyu(程翼宇). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(12): 1736~1740
- Lindon J C, Keun H C, Ebbels T M D, Holmes E, Nicholson J K. *Pharmacogenomics*, **2005**, 6(7): 691~699
- Keun H C. *Pharmacol Therapeut*, **2006**, 109(1/2): 92~106
- Chen M J, Zhao L P, Jia W. *Proteome Res*, **2005**, 4(6): 2391~2396
- Gerszten R E, Wang T J. *Nature*, **2008**, 451(2): 949~952
- Pham-Tuan H, Kaskavelis L, Daykin C A, Janssen H G. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 789(2): 283~301
- LN Yun-Jing(林云径), WANG Jin(汪晋), WANG Yi(王毅), QU Hai-Bin(瞿海斌), CHENG Yiyu(程翼宇). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(9): 1257~1260
- Brindle J T, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson J K, Bethell H W L, Clarke S, Schofield P M, McKilligan E, Mosedale D E, Grainger D J. *Nat Med*, **2002**, 8(12): 1439~1444
- Ninonuevo M R, Park Y, Yin H, Zhang J W and R E, Clowers B H, German J B, Reeman S E, Kilken K, Grimm R, Lebrink C B. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54(20): 7471~7480
- Fong Y B, Norris C S, Palmato K P. *Int. Dairy J.*, **2008**, 18(1): 23~46
- Smith C A, Wanta E J, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(3): 779~787
- Kerwin J L, Torvik J J. *Anal. Biochem.*, **1996**, 237(1): 56~64
- Li Z, Tran V H, Duke R K, Ng M C H, Yang D, Duke C C. *Chem. Phys. Lipids*, **2009**, 158(1): 39~45
- Stavri M, Mathew K T, Gibbons S. *Phytochem.*, **2006**, 67(14): 1530~1533
- Tyurina Y Y, Tyurin V A, Epperly M W, Greenberger J S, Kagan V E. *Free Radical Bio. Med*, **2008**, 44(3): 299~314
- Spiteller G. *Mech. Ageing Dev.*, **2001**, 122(7): 617~657
- Nagy L, Tontoz P, Alvarez J G A, Chen H W, Evans R M. *Cell*, **1998**, 93(2): 229~240
- Mañes J M, Sanchez Jiménez F. *Front Biosci*, **1999**, 4: D339~D345
- Farambi E O, Adamoye O A, Emerek G O. *Pharmacol. Toxicol.*, **2002**, 91(3): 129~134
- Livingstone D R. *Mar. Pollut. Bull.*, **2001**, 42(8): 656~666
- Monari M, Foschi J, Cortesi P, Rosmini R, Cattani O, Serrazanetti G P. *Chemosphere*, **2008**, 73(3): 272~280
- Sánchez Juanes F, Alonso J M, Zancada L, Hueso P. *Int. Dairy J.*, **2009**, 19(5): 273~278

Study of Potential Biomarkers in Milk from Cows Treated with Chloramphenicol by Metabonomic Approach

WANG Shicheng, WANG Yirong*, LI Guocheng, HU Xiaoyan, ZHANG Hong

(Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016)

Abstract HPLC-MS-based metabonomic approach was established for the metabonomic analysis of milk components between normal cows and cows treated with chloramphenicol. Endogenous metabolites of the milk samples were analyzed by HPLC-MS after the extraction and. The results showed that (1) After chloramphenicol was injected from the corresponding chromatographs, it was found that the treated group and the control group were significantly different in which some peaks changed regularly with the medicine-treated time. (2) The control group and treated group were successfully discriminated by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), (3) Molecular formula of one indicating peak was $C_{18}H_{32}O_3$, hydroxyoctadecadienoic acid (HODE), which could be the potential biomarker indicating the metabolic response to chloramphenicol.

Keywords Milk, Chloramphenicol, Metabonomics, Biomarker, Hydroxyoctadecadienoic acid

(Received 15 December 2009; accepted 7 April 2010)