

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.03.002

文章编号: 1005-8982(2020)03-0007-05

## 气相色谱-质谱联用技术对小鼠急性肝损伤的代谢物及相关代谢通路的研究\*

马小芬, 苏比努尔·巴克, 李珍, 李德龙, 马晓丽  
(新疆医科大学药学院, 新疆乌鲁木齐 830011)

**摘要:** **目的** 采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术探究四氯化碳 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤后肝组织代谢物的变化, 筛选相关代谢通路。**方法** 腹腔注射 0.1% CCl<sub>4</sub>(V/V) 橄榄油溶液复制诱导小鼠急性肝损伤模型, 对照组和模型组小鼠肝组织样品经预处理、衍生后, 进行基于 GC-MS 的代谢全谱分析, 利用 Metabo Analyst 3.0 统计软件进行在线数据分析, 观察两组的差异代谢物并分析相关代谢通路。**结果** 通过 GC-MS 检测分析共找到 33 种可能的内源性物质, 通过图谱指认出 14 种物质, 利用基于偏最小二乘判别分析(PLS-DA)能清晰地将两组样本分开, 通过标志代谢物分析可能的代谢通路。**结论** 基于 GC-MS 的代谢组学技术可用于急性肝损伤小鼠动物模型的评价研究。

**关键词:** 急性肝损伤; 气相色谱-质谱; 代谢物

**中图分类号:** R575

**文献标识码:** A

## Study on metabolites and related metabolic pathways of acute liver injury in mice by gas chromatography-mass spectrometry\*

Xiao-fen Ma, Subinur·Barker, Zhen Li, De-long Li, Xiao-li Ma  
(School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

**Abstract: Objective** To investigate the changes of liver tissue metabolites induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in mice after acute liver injury by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and to screen related metabolic pathways. **Method** A model of acute liver injury induced by intraperitoneal injection of 0.1% CCl<sub>4</sub> (V/V) olive oil was established. The liver tissue samples of the blank control group and the model group were pretreated and derivatized to perform GC-MS based metabolism. Online data analysis using Metabo Analyst 3.0 was used to observe differential metabolites in the two groups and analyze relevant metabolic pathways. **Result** A total of 33 possible endogenous substances were identified by GC-MS analysis. 14 substances were identified by the map. The partial least squares method was used to distinguish the two groups of samples clearly and analyzed possible metabolic pathways by marker metabolites. **Conclusion** GC-MS metabolomics techniques can be used to evaluate animal models of acute liver injury in mice.

**Keywords:** acute liver injury; gas chromatography-mass spectrometry; metabolites

急性肝损伤是引起肝硬化、肝癌的重要因素<sup>[1]</sup>, 四氯化碳 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤是经典的肝损伤模型之

一<sup>[2-5]</sup>, 其损伤肝细胞的主要机制是通过强氧化性自由基及脂质过氧化物的产生, 造成肝脏组织损伤<sup>[6]</sup>。如

收稿日期: 2019-08-08

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81760753, 81460493)

[通信作者] 马晓丽, E-mail: 1065158755@qq.com

何从代谢组学角度研究  $\text{CCl}_4$  导致急性肝损伤的作用机制, 发现致毒标志物将有助于对这一经典肝毒性物质的中毒机制的认识。

目前, 基于高分辨核磁共振<sup>[7]</sup> (nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)<sup>[8]</sup>、液相色谱-质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 等<sup>[9]</sup> 代谢组学分析技术被广泛地应用于标志物的筛查和分析<sup>[10]</sup> 及疾病诊断、毒理学研究、新药研发与药物筛选等<sup>[11]</sup>, 其中 GC-MS 被认为是分析组织代谢产物的标准技术之一<sup>[12]</sup>。本文应用 GC-MS 代谢组学技术探寻  $\text{CCl}_4$  致小鼠急性肝损伤的肝组织代谢标志物; 运用 Metabo Analyst 3.0 在线代谢组分析工具进行基于偏最小二乘判别分析 (partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA) 的代谢物查找及代谢通路分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

**1.1.1 仪器** GC-MS 联用仪 (GC: waters, MS: Agilent 7683B series)、可视氮吹仪、KQ-500DE 型超声仪 (昆山超声仪器有限公司), HH-S4 恒温水浴锅 (金坛市医疗仪器厂), 低温离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), HV-3 静音无油空压机 (济南浩伟实验仪器有限公司)。

**1.1.2 试剂** 甲氧胺盐酸盐、N-甲基-(三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺 (MSTFA)、三甲基-氯硅烷 (TMCS)、分析纯、十七烷酸 (美国 Sigma 公司), 甲醇、乙腈 (美国 Fisher chemicals 公司), 色谱纯、吡啶 (天津大茂化学试剂厂, 生产批号: 20150612), 分析纯、实验用水取自新疆医科大学超纯水。

### 1.2 实验动物及分组

SPF 级雄性昆明种小鼠, 体重  $(20.0 \pm 2.0)$  g, 由新疆医科大学动物中心提供, 所有动物饲养按照国家动物实验规定执行。将适宜喂养的 22 只小鼠随机分为对照组和模型组, 每组 11 只。对照组和模型组小鼠适应性灌胃生理盐水 0.5 ml 3 d 后, 模型组腹腔注射 0.1%  $\text{CCl}_4$  橄榄油溶液 10 ml/kg, 对照组腹腔注射生理盐水橄榄油溶液 10 ml/kg。小鼠于模型复制后禁食不禁水 12 h, 立即断颈处死, 快速取出完整肝脏, 生理盐水洗净残血, 除去结缔组织, 滤纸拭干, 称重; 准确称取 0.50 g 肝脏, 按 1 : 9 (g : ml)

加入冰生理盐水, 冰浴下手动匀浆, 4 000 r/min 离心 5 min, 分离得到 10% 肝匀浆上清液, 置入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱冷冻保存备用。

### 1.3 肝组织病理切片

取小鼠左叶相同位置肝组织, 用  $4^\circ\text{C}$  生理盐水冲尽残血, 滤纸拭干, 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察肝组织切片的病理形态学变化。

### 1.4 GC-MS 代谢组学分析

**1.4.1 样品前处理** 参考文献 [13-14] 将置于  $-80^\circ\text{C}$  冷冻保存的样品复溶后取 100  $\mu\text{l}$  置于 2 ml EP 管内, 加入 250  $\mu\text{l}$  乙腈溶液混匀, 涡旋 1.5 min, 冰浴超声 10 min,  $4^\circ\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液置于 2 ml EP 管内用氮吹干。加 15 g/L 甲氧胺吡啶溶液 50  $\mu\text{l}$  混匀,  $70^\circ\text{C}$  下脗化 1 h 后加入衍生化试剂 (MSTFA : TMCS=100 : 1) 50  $\mu\text{l}$  混匀, 静止。1 h 后加含十七烷酸的乙腈溶液 (0.9 mg/ml) 150  $\mu\text{l}$  混匀,  $4^\circ\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于内插管内置于微量进样瓶待测。

**1.4.2 GC-MS 条件** 升温程序为:  $85^\circ\text{C}$  保持 5 min 后, 以  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  上升至  $300^\circ\text{C}$ , 保持 10 min; 进样量: 2  $\mu\text{l}$ , 不分流进样; 进样口温度:  $270^\circ\text{C}$ ; 接口温度:  $270^\circ\text{C}$ ; 离子源温度:  $230^\circ\text{C}$ ; 电离电压: 70 eV; 四极杆温度:  $150^\circ\text{C}$ ; 载气: 高纯氦气, 1.0 ml/min; 扫描方式: 全扫描 60 ~ 600 m/z。每次进样时均用甲醇和乙腈清洗进样针各 4 次, 避免前一次样品影响结果。

**1.4.3 GC-MS 图谱数据处理** GC-MS 的总离子流图 (TIC) 中共有的峰和具有代表性的峰被提取出来, 并对所有的峰进行手动峰面积积分, 获取各个峰与内标峰的保留时间及峰面积导入 Excel 表内备用, 用样品峰面积与内标峰的比值 (相对峰面积) 表示代谢物的含量。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 和 Metabo Analyst 3.0 统计软件, 对归一化后峰面积相对值导入 SIMCA-P12.0 统计软件进行 PLS-DA 分析<sup>[15]</sup>, 最大化地显示出组间的差异。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。使用 PLS-DA 模型中变量重要性投影 (variable importance in the projection, VIP) 和两独立样本  $t$  检验来共同评价可能的内源性代谢物相对峰面积的差异, 只有同时满足  $\text{VIP} > 1$  和  $P < 0.05$  的代谢物才被认为是潜在生物

学标志物<sup>[16-17]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤模型病理变化

对照组小鼠肝组织病理切片与模型组比较, 模型组小鼠的肝细胞排列紊乱, 部分肝细胞内见大小不等的脂滴空泡, 另有部分区域小叶内肝细胞点状、灶状滑丝, 伴有碎片状肝细胞浸润, 肝中央静脉及肝血窦充血, 坏死灶区有较多淋巴细胞浸润。见图 1。

### 2.2 GC-MS 结果

2.2.1 NIST 图谱中各代谢物图谱 通过 XCMS Online 软件进行肝组织样品数据采集, 得到各组典型 TIC, 通过 TIC 中提取的峰面积一一在 NIST 谱库中进行对比找到 33 种共有代谢物质, 通过参考文献 [18]

进行查询比对出 14 种可能的内源性代谢物。见图 2。

2.2.2 PLS-DA 结果 归一化后峰面积相对值的 PLS-DA 分析结果见图 3, 可看出模型组各小鼠间比较分散, 这可能是模型复制后个体差异造成的。3D 图中对照组与模型组两组间有差异, 且具有明显的聚类特征。表明小鼠肝组织的生理环境及物质代谢发生变化可能是 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤<sup>[19]</sup>。

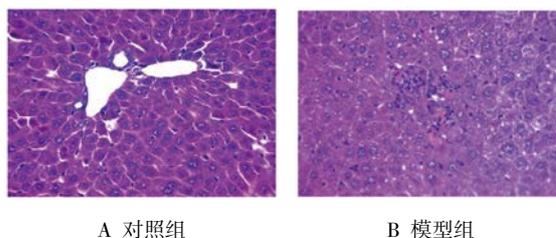
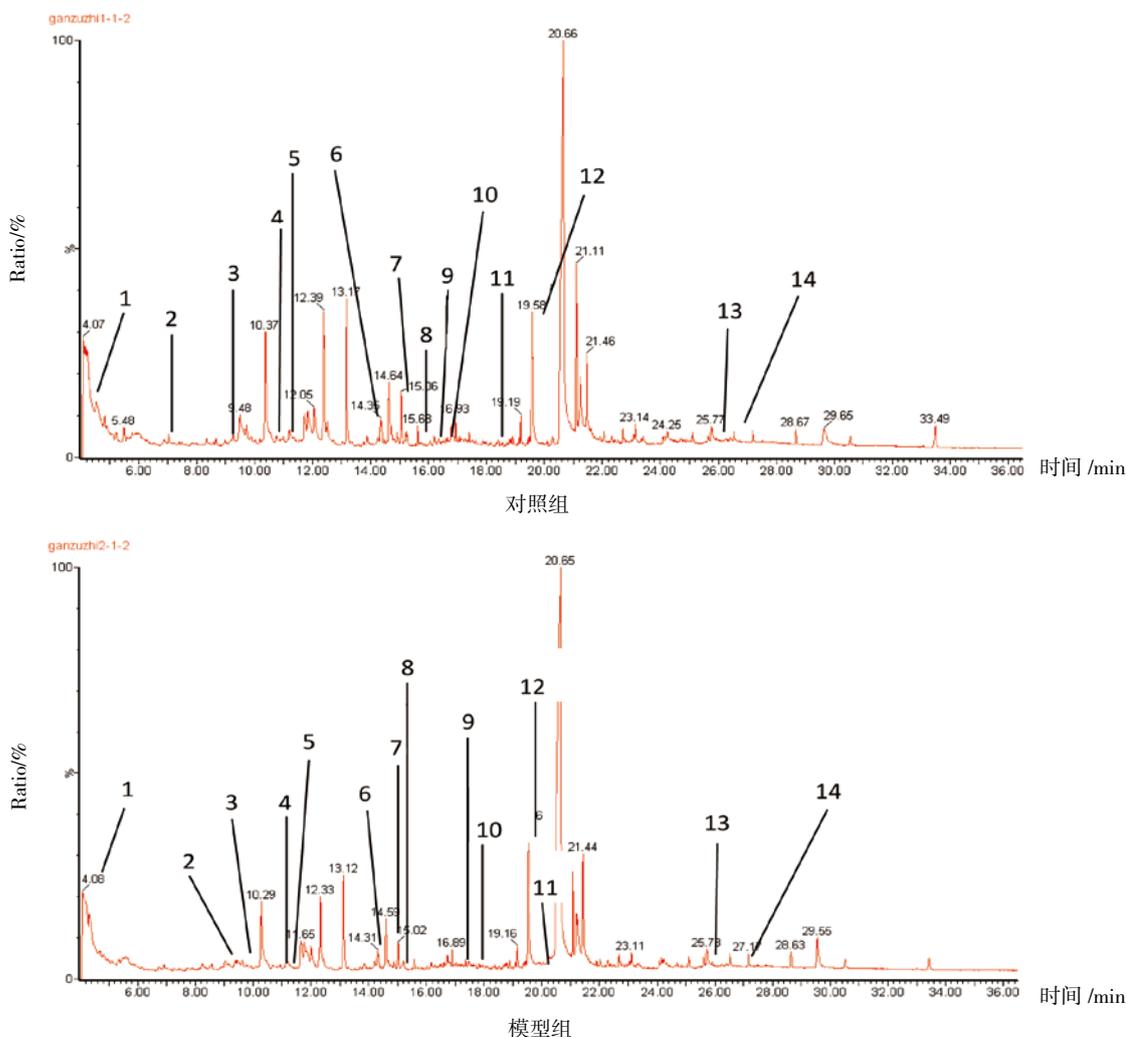


图 1 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤小鼠肝组织的组织病理学观察 (HE × 400)

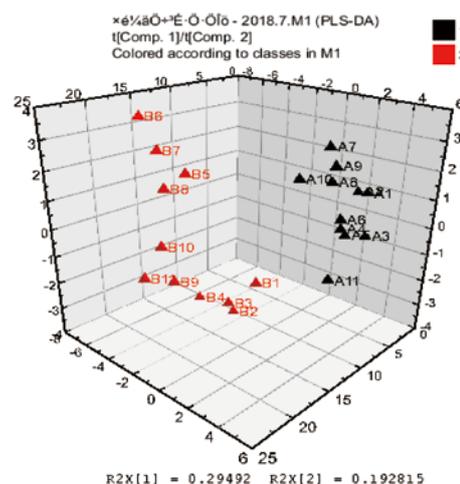


1: 葡萄糖醛酰胺; 2: 硬脂酸; 3: D- 酪氨酸; 4: 花生四烯酸; 5: D- 亮氨酸; 6: 棕榈酸; 7: 腺嘌呤; 8: 甘氨酸; 9: D- 葡萄糖; 10: 脂肪酸; 11: 苯甲酸; 12: D- 半乳糖; 13: 麦角固醇; 14: 脯氨酸。

图 2 GC-MS 各代谢物质谱图谱

**2.2.3 差异性代谢物及潜在生物学标志物** 根据对照组和模型组内源性代谢物相对峰面积的差异, 分析发现 5 种可能的差异性代谢物 ( $P < 0.05$ ), 包括葡萄糖醛酰胺、D- 酪氨酸、腺嘌呤、D- 葡萄糖和麦角固醇。由表中的  $VIP > 1$  同时结合  $t$  检验结果可以说明这 5 种代谢差异物是  $CCl_4$  肝损伤的可能潜在代谢标志物。见表 1。

**2.2.4 通路分析** 将 10 个通过模式识别筛选出的差异代谢物导入 Metabo Analyst 3.0 网站进行代谢通路分析。可知  $CCl_4$  模型复制后主要对机体的甲硫氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、嘌呤代谢等代谢通路产生影响。见图 4。



黑色为对照组, 红色为模型组。

图 3 两组小鼠肝组织样品 3D PLS-DA 得分图

表 1 与  $CCl_4$  诱导的小鼠急性肝损伤相关的差异代谢物

可能的内源性物质	保留时间 /min	VIP	归一化峰面积相对值 ( $\bar{x} \pm s$ )	
			对照组	模型组
葡萄糖醛酰胺	4.176	1.29	0.362 7 ± 0.072 9	0.234 8 ± 0.074 8
D- 酪氨酸	9.386	1.75	0.039 9 ± 0.008 9	0.006 2 ± 0.004 4
腺嘌呤	15.018	1.87	0.026 1 ± 0.001 2	0.004 0 ± 0.001 3
D- 葡萄糖	15.817	1.66	0.015 2 ± 0.002 5	0.004 8 ± 0.002 3
麦角固醇	26.095	1.46	0.218 9 ± 0.104 0	0.004 4 ± 0.001 1

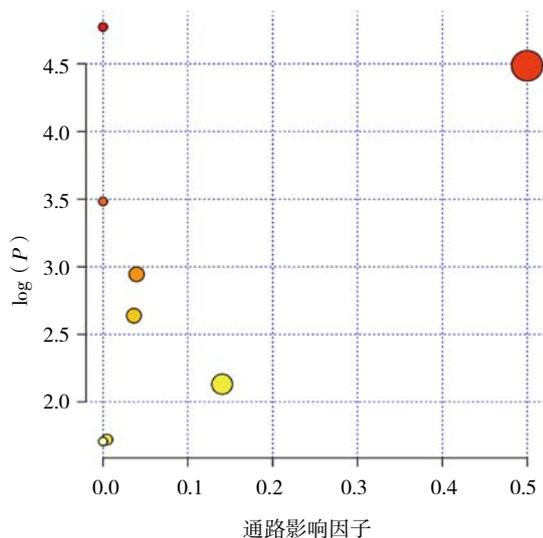


图 4 两组差异代谢物引起的代谢通路变化

### 3 讨论

本研究采用 GC-MS 技术对  $CCl_4$  所致急性肝损伤小鼠进行肝组织的代谢组学研究。采用 PLS-DA 等

多元分析模式识别方法及传统的 SPSS 17.0 统计进行分析, 共筛选出 5 个生物标志物, 分别是葡萄糖醛酰胺、D- 酪氨酸、腺嘌呤、D- 葡萄糖、麦角固醇。经 Metabo Analyst 3.0 数据分析,  $CCl_4$  所致急性肝损伤小鼠主要对机体的甲硫氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、嘌呤代谢等代谢通路产生影响。

$CCl_4$  是一种经典的肝毒药物, 从代谢组学角度找出一些具有特异性变化规律的代谢物, 全面揭示其生物效应。小鼠经  $CCl_4$  模型复制后, 肝组织切片表明其肝细胞明显坏死, 表明小鼠肝组织的生理环境及物质代谢发生变化可能是  $CCl_4$  致肝损伤<sup>[19]</sup>。对肝脏组织中的代谢物查找发现其肝脏组织损伤主要表现在能量供给阻碍, 以及氨基酸代谢紊乱, 小鼠肝细胞循环受到抑制, 并且由于脂蛋白合成受阻, 是脂肪酸从肝脏到血浆的分泌和转运机能明显下降。特别是肝组织中酪氨酸物质含量下降, 这种结果很可能是由于氨基酸在肝脏的转运受到阻碍, 因此其相互转化受阻, 其直接的表现参与机体能量代谢的相关通路和循

环比如苯丙氨酸代谢通路及三羧酸循环受到抑制, 进而引发一系列的级联反应, 最终表现出肝衰竭的相应表征。

苯丙氨酸属于芳香族氨基酸是苯丙酮酸和酪氨酸的主要合成原料, 均在苯丙氨酸代谢通路中有着重要作用, 机体内酪氨酸的含量会引起某些代谢中间产物的变化而导致肝功能损伤或肾小管缺陷。甲硫氨酸是含硫必需氨基酸, 机体内甲硫氨酸不足会使细胞内蛋白质的合成受到影响, 进而引起肝功能障碍。YADAK 等<sup>[20]</sup> 研究发现嘌呤脱氧核苷可导致肝脏发生毒性, 嘌呤脱氧核苷在机体内的变化最终体现在嘌呤代谢通路中。本研究中小鼠肝组织酪氨酸物质含量下降及嘌呤代谢物变化可能与代谢通路间密切相关, 但具体影响急性肝损伤嘌呤代谢通路的物质并不清楚, 有待进一步深入研究。

本研究成功地将代谢组学分析方法引入急性肝损伤的研究中, 并通过在线数据库分析影响肝脏病理变化的相关代谢通路, 为深入探讨急性肝损伤模型的作用机制奠定了一定的实验基础。

#### 参 考 文 献:

- [1] 沈海林. KLF4 在急性肝损伤中通过抑制 apelin 保护肝脏的研究 [D]. 开封: 河南大学, 2017.
- [2] LI S Q, WANG D M, SHU Y J, et al. Proper heat shock pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride and accelerates liver repair in mice[J]. *Journal of Toxicologic Pathology*, 2013, 26(4): 365-373.
- [3] ZHANG W, DONG Z, CHANG X J, et al. Protective effect of the total flavonoids from apocynum venetum L. on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in vitro and in vivo[J]. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2018, 74(2): 301-312.
- [4] ABDELHAFEZ O H, FAWZY M A, FAHIM J R, et al. Hepatoprotective potential of malvaviscus arboreus against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): 202-236.
- [5] BOLANLE J D, ADETORO K O, BALARABE S A, et al. Hepatocurative potential of vitex doniana root bark, stem bark and leaves extracts against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats[J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2014, 4(6): 480-500.
- [6] 赵鑫, 苟小军, 陈龙, 等. 花旗松素预防 CCl<sub>4</sub> 致大鼠急性肝损伤的代谢组学研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(8): 82-86.
- [7] 龚梦鹃, 巫圣乾, 岳贺, 等. 基于 1H-NMR 护肝片抗大鼠急性肝损伤的代谢组学研究 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(12): 1766-1770.
- [8] OLIVER F. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling[J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2016, 114: 3041-30432.
- [9] 赵小梅, 刘歆颖, 续畅, 等. 基于 LC-MS 代谢组学的雷公藤多苷致肝毒性生物标志物的初步筛查 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(19): 3851-3858.
- [10] GONZÁLEZ-PEIA D, DANUTA D, GARCÍA A, et al. Metabolomic fingerprinting in the comprehensive study of liver changes associated with onion supplementation in hypercholesterolemic wistar rats[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 267-280.
- [11] 古秀娟, 曾娅莉, 邓建军, 等. 代谢组学技术在抗结核新药研发中的应用研究进展 [J]. *中国药房*, 2019, 30(4): 560-565.
- [12] TUSHAR H M, SOURAV R C, JOEL C, et al. Metabolomic alterations in invasive ductal carcinoma of breast: a comprehensive metabolomic study using tissue and serum samples[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(2): 2678-2696.
- [13] 黄欣. 代谢组学方法研究水飞蓟宾对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. *高等学校化学学报*, 2008, 29(4): 714-719.
- [14] ZHAO D S, JIANG L L, FAN Y X, et al. Investigation of Dioscorea bulbifera rhizome-induced hepatotoxicity in rats by a multi-sample integrated metabolomics approach[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2017, 30(10): 1865-1873.
- [15] 盛云华, 乔靖怡, 金若敏, 等. 基于 1H-核磁共振代谢组学研究黄药子乙醇提取物致肝损伤的潜在生物标志物 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(4): 306-316.
- [16] 龚梦鹃, 巫圣乾, 岳贺, 等. 基于血清和肝代谢组学研究护肝片的保肝作用 [J]. *中国药房*, 2017, 28(34): 4776-4780.
- [17] 张艳花, 王东琴, 李晓伟, 等. 基于 1H-NMR 代谢组学技术寻找 CCl<sub>4</sub> 致大鼠急性肝损伤的代谢标志物 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(1): 11-16.
- [18] 黄欣, 龚益飞, 虞科, 等. 基于气相色谱-质谱的代谢组学方法研究四氯化碳致小鼠急性肝损伤 [J]. *分析化学*, 2007(12): 1736-1740.
- [19] 涂灿, 何琴, 周元园, 等. 基于代谢组学的大黄对正常和肝纤维化大鼠双向作用对比研究 [J]. *药理学学报*, 2018, 53(7): 1139-1147.
- [20] YADAK R, SILLEVIS SMITT P, van GISBERGEN M W, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy caused by thymidine phosphorylase enzyme deficiency: from pathogenesis to emerging therapeutic options[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2017, 2(15): 11-31.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 马小芬, 苏比努尔·巴克, 李珍, 等. 气相色谱-质谱联用技术对小鼠急性肝损伤的代谢物及相关代谢通路的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(3): 7-11.