

[文章编号] 1000-1182(2009)02-0147-03

·临床研究·

非综合征性唇腭裂患者血浆代谢组学的初步研究

宋具昆^{1,2} 周京琳¹ 罗洪² 石冰¹ 黄静³ 李伟¹

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.贵州省人民医院 口腔科, 贵州 贵阳 550002; 3.四川大学华西药学院 药物化学系, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 初步研究非综合征性唇腭裂患者可能存在的代谢机制, 同时探讨基于核磁共振(NMR)的代谢组学技术在临床应用中的可行性。方法 分别收集10例非综合征性唇腭裂患者和10例正常人的血浆, 在核磁共振仪上对血浆样本进行采样, 获得一系列原始的一维NMR谱图, 然后使用MESTRE-v4.7软件对NMR谱图进行积分简化数据, 将谱图分解成212个区域进行积分, 得到积分强度, 利用SIMCA-P 11.0软件对积分强度进行主成分分析。结果 非综合征性唇腭裂患者和正常人的血浆代谢存在差异, 至少存在3种不同的代谢产物, 分别为三羟丁酸 γ 甲基类物质、精氨酸和缬氨酸。非综合征性唇腭裂患者血浆代谢产物以缬氨酸和三羟丁酸 γ 甲基类物质为主, 而正常人血浆代谢产物则以精氨酸为主。结论 通过代谢组学技术, 可以初步探讨非综合征性唇腭裂患者的代谢机制, 同时该技术有望应用于临床。

[关键词] 代谢组学; 非综合征性唇腭裂; 主成分分析

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A

A preliminary investigation on plasma of non-syndromic cleft lip and/or palate using nuclear magnetic resonance-based metabonomics SONG Ju-kun^{1,2}, ZHOU Jing-lin¹, LUO Hong², SHI Bing¹, HUANG Jing³, LI Wei¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Stomatology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China; 3. Dept. of Pharmacochimistry, West China College of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To access the feasibility of employing metabonomics method in clinical studies. This pilot study intends to introduce nuclear magnetic resonance(NMR)-based metabonomics method to elucidate the metabolism of non-syndromic cleft lip and/or palate(NSCLP) patients. **Methods** High-resolution ¹H NMR spectroscopy was performed on blood plasma obtained from NSCLP and non-malformed children. All signal of ¹H NMR spectra were recognized within MESTRE-v4.7, and the ¹H NMR spectra integration into bins(or buckets) across the spectral regions of bin 0.04 was performed automatically in MESTRE-v4.7. The resulting data matrix was further analyzed, which was performed by SIMCA-P 11.0. The principal component analysis(PCA) was applied to the centered data to explore any clustering behavior of the samples. **Results** The results demonstrated the metabonomic difference in plasma between NSCLP and non-malformed children at least lies in 3-Hydroxybutyrate γ -CH₃, arginine and valine. Arginine excretion appeared to be higher in the non-malformed children population, while NSCLP population excreted higher concentrations of 3-Hydroxybutyrate γ -CH₃ and valine. **Conclusion** The present study clearly demonstrated the great potential of the NMR-based metabonomics approach in elucidating the NSCLP plasma metabolism and the possibility of application in clinic diagnosis and screening.

[Key words] metabonomics; non-syndromic cleft lip and/or palate; principal component analysis

非综合征性唇腭裂是口腔颌面部最常见的先天性发育畸形, 占整个颌面部面裂畸形的70%以上。该病发病因素复杂, 对其病因学的研究意义重大。若能明确其发病原因, 并采取有效的干预措施, 有

望从根本上预防该疾病的发生。目前, 对唇腭裂的病因学研究取得了一定的进展, 如发现唇腭裂是多因素遗传疾病, 与孕期吸烟、用药等因素有关等^[1-3], 但其确切的代谢机制和发病原因尚不清楚。本文通过研究非综合征性唇腭裂患者血浆的代谢机制, 推断其潜在的发病原因, 同时探讨基于核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)的代谢组学在临床

[收稿日期] 2008-06-10; [修回日期] 2008-09-25

[作者简介] 宋具昆(1979-), 男, 贵州人, 住院医师, 硕士

[通讯作者] 李伟, Tel: 028-61153331

应用中的可行性。

1 材料和方法

1.1 试验仪器

本试验使用的主要仪器有: Bruker Avance DRX 600核磁共振仪(Bruker公司, 德国); XYJ80-2低速离心机(江苏金坛实验仪器有限公司); MR1812高速离心机(Jouan公司, 法国); 4 mL肝素钠抗凝管(Becton Dickinson公司, 美国); FD-1冷冻干燥机(北京博康实验仪器有限公司)。

1.2 研究对象的选择

随机选择2004—2005年在四川大学华西口腔医院唇腭裂外科行手术治疗的非综合征性唇腭裂患者10例作为病例组, 其中单纯性腭裂患者6例, 唇裂并发腭裂患者4例; 女性8例, 男性2例; 年龄6~19岁, 平均年龄(12.6 ± 6.5)岁。同时随机选择2004—2005年在四川大学华西医学中心妇幼保健院查体的健康人10例作为对照组, 女性8例, 男性2例; 年龄7~20岁, 平均年龄(13.0 ± 5.1)岁。病例组纳入标准: 诊断为非综合征性唇腭裂的患者, 无其他系统性疾病。排除标准: 1)患有综合征性唇腭裂如Shprintzen综合征或Robbin综合征者; 2)患有先天性代谢缺陷如枫糖尿症患者; 3)临床生化结果异常者, 或者患有血液系统疾病者; 4)传染病患者如获得性免疫缺陷综合征、B或C型肝炎等^[4-5]。

1.3 研究方法

1.3.1 样本采集及处理 样本采集前, 2组研究对象要求空腹6 h。样本采集于上午9时左右在室温下进行。抽取研究对象静脉血液4 mL, 缓慢注入4 mL肝素钠抗凝管中, 室温下1 500 r/min低速离心10 min, 以去除全血中血细胞等大分子物质。离心后用移液枪吸取上清液(即血浆)2 mL放入EP管内, 进行二次离心(4℃下20 000 r/min离心10 min), 以去除血浆中的杂质, 保留血浆中的小分子代谢物质。离心后吸取上清液1.8 mL放入干净的EP管内, 将样本进行冻干处理, 然后保存在-20℃低温冰箱中备用。

1.3.2 NMR数据的采集 将冻干处理过的血浆样本在室温下解冻, 将450 μ L解冻样本移入干净的核磁管内, 以体积比1:10的比例缓慢加入重水至500 μ L, 混匀, 静置5 min。每个样本制备完成后直接在核磁共振仪上进行光谱采集, 获得原始的一维氢谱。光谱采集在室温下进行, 采样点数是32 k, 累加次数128次, 核磁共振仪实际工作频率为600.13 MHz。扫描对水峰进行抑制的原始一维氢谱, 可以获得131 072个数据点, 其峰宽度为7 788.16 Hz, 最小频率为-1 073.15 Hz。扫描未进行水峰抑制的氢谱同样

可获得131 072个数据点, 其峰宽度为7 183.91 Hz, 最小频率为-651.29 Hz。

1.3.3 NMR数据后加工过程和化学计量分析方法 所有样本的自由感应衰减(free induction decay, FID)信号导入MESTRE-v4.7软件进行傅里叶转换(Fourier transform, FT), 获得一维NMR谱图, 将所获得的谱图进行基线调整。由于 $\delta 4.52 \sim 6.00$ 含有水峰^[6-7], 该区域的化学位移被排除在外。将各个样本的氢谱 $\delta 0 \sim 4.52$ 及 $\delta 6 \sim 10$ 按bin 0.04为单位进行分割, 得到212个化学位移值段, 进一步按各化学位移值段分别积分, 即得到与各个化学位移值段相对应的积分值, 这样就简化了原始数据(图1)。对每个样本进行光谱采集, 可获得20组数据, 构成1个 $n \times d$ 二维矩阵(其中 n 为样本组数, d 为积分区间数), 这样更具有统计学意义。将数据导入Excel文件中备用。使用SIMCA-P 11.0软件对该二维矩阵进行化学计量处理, 主要进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。

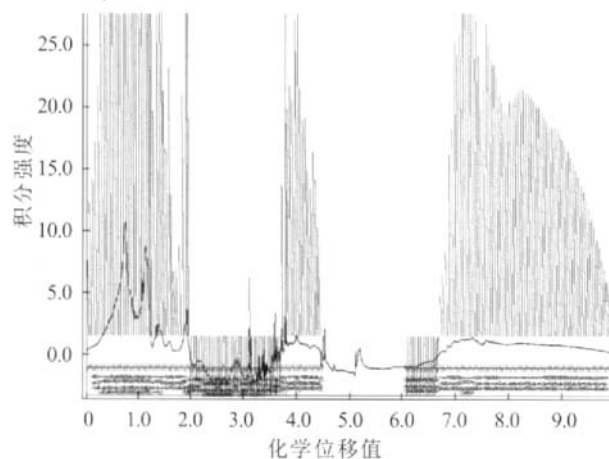


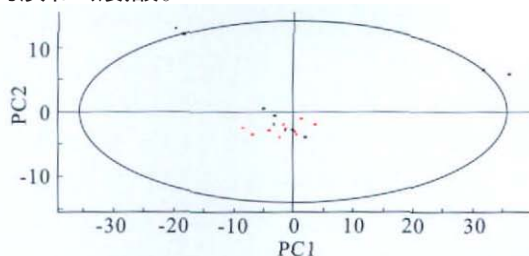
图1 以bin 0.04为单位对原始一维氢谱进行桶形积分

Fig 1 Integration into bins(or buckets) across the spectral regions of bin 0.04 was performed

2 结果

本研究中所建立的新变量模型含有9个主成分(principal component, PC), 前2个主成分(PC1和PC2)的累积贡献率为93.5%, 说明所建立的变量具有很好的预测性。前2个主成分的PC图见图2。由图2可以看出, 对照组样本间变异较大, 病例组样本间则具有高度相似性, 但这2个主成分不能完全区分2组的样本。第2和第3个主成分(PC2和PC3)的PC图见图3, 这2个主成分可以区分病例组和对照组, 因此笔者选用PC2和PC3作为研究对象。图4为PC2和PC3的因子负荷图, 可见图中大多数点集中于原点, 表现为重叠点, 即具有相同的代谢产物, 也就是说病例组和对照组具有相同的代谢产物; 但是

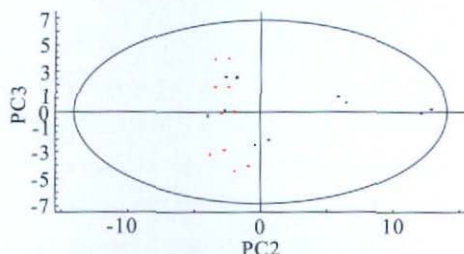
有少数的点远离原点, 这些点所代表的化合物造成了某些样本间血浆代谢物的差异, 主要表现为氨基酸及脂类物质的异常代谢。对这些异常代谢物作进一步分析, 引起这种差异的代谢物的NMR峰主要集中在 δ 1.20、 δ 1.80、 δ 3.60(图4)。对发生变化的NMR谱峰进行分析, 这些化学位移值分别代表一些氨基酸及脂类物质, 如精氨酸、缬氨酸和三羟丁酸 γ 甲基类物质等^[6-8]。对照组血浆代谢产物中以精氨酸为主, 而病例组血浆代谢产物则含有三羟丁酸 γ 甲基类物质和缬氨酸。



红色: 非综合征性唇腭裂组; 黑色: 对照组

图2 PC1和PC2主成分的PC图

Fig 2 The scores of PC1 versus PC2



红色: 非综合征性唇腭裂组; 黑色: 对照组

图3 PC2和PC3主成分的PC图

Fig 3 The scores of PC2 versus PC3

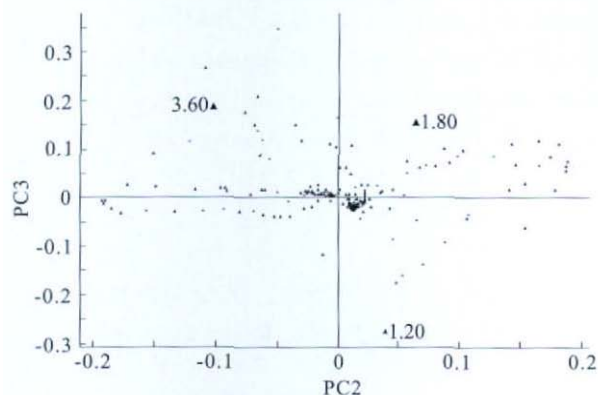


图4 PC2和PC3的因子负荷图

Fig 4 The loadings plot for PC2 versus PC3

3 讨论

先天性唇腭裂危害着口腔颌面器官的形态及功能, 严重影响了出生人口素质及母婴身心健康。从遗传学上, 该疾病可分为综合征性唇腭裂与非综合征性唇腭裂, 其中非综合征性唇腭裂最为多见。非综合征性唇腭裂是一个复杂的、由遗传和环境因素

相互作用所致的疾病, 其代谢产物可能会出现异常表达。本研究运用代谢组学对10例非综合征性唇腭裂患者和10例正常人进行分析, 初步了解非综合征性唇腭裂患者的代谢机制。结果发现, 非综合征性唇腭裂患者和正常人在血浆代谢产物上存在差异, 其差异主要表现在某些氨基酸的异常代谢上, 如精氨酸和缬氨酸。正常人血浆代谢产物中以精氨酸为主, 而非综合征性唇腭裂患者血浆代谢产物则含有三羟丁酸 γ 甲基类物质和缬氨酸。精氨酸是鸟氨酸循环中的重要组成成分, 具有极其重要的生理功能, 在婴幼儿发育中起着重要的作用, 若缺乏则不能维持婴幼儿正常的生长与发育。缬氨酸为必需氨基酸, 作用于黄体、乳腺及卵巢, 其功能主要是维持神经系统功能正常。三羟丁酸 γ 甲基类物质在血浆中表现为低密度脂蛋白, 在某些肿瘤患者血浆中表现为高表达的岩藻糖甲基脂蛋白。

本研究结果提示, 运用代谢组学技术可以早期筛查某种疾病并探讨其代谢机制, 也说明在此基础上推断其潜在的发病原因是可行的。但本研究仅仅在技术方法上进行了一些探索, 得出了部分有意义的结果, 在下一步工作中, 笔者拟从两方面进行深入的研究: 一方面严格控制受试者的饮食, 主要是禁止食用含有鱼肉和樱桃等食品, 因为代谢组学容易受到饮食习惯、生活方式和文化差异等因素的影响; 另一方面应扩大样本含量, 使其更具有统计学意义。研究生物体液最有效和全面的方法是对其基因、蛋白质表达水平和代谢浓度同时进行监测。如何把代谢组学数据和转录组学、蛋白质组学、遗传学、酶学、代谢途径和表现型分析的数据整合在一起, 并给出生物学功能的解释是很艰巨的任务。它们的整合除了需要适当的数据库外, 还需要多种先进的数学分析方法。随着基因组学、蛋白质组学和代谢组学认识的不断深入和研究工作的不断积累, 这些技术必将会越来越广泛地应用于生物医学研究之中。

[参考文献]

- [1] 代礼, 缪蕾, 周光萱, 等. 1996~2000年中国围产儿腭裂畸形发生状况分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(1): 35-37.
DAI Li, MIAO Lei, ZHOU Guang-xuan, et al. The prevalence analysis of cleft palate in Chinese perinatals: 1996~2000[J]. West China J Stomatol, 2004, 22(1): 35-37.
- [2] 袁奎封, 来庆国, 李德仁, 等. 转化生长因子- α 基因多态性与山东汉族人非综合征性唇腭裂的关系[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(6): 533-535.
YUAN Kui-feng, LAI Qing-guo, LI De-ren, et al. Relationship

用;2)在微种植体植入后,即刻用牙周塞治剂压迫整个植入区2周,以利于黏膜的愈合和健康,后期加强局部卫生,可以有效控制牙龈炎症;3)将前牙区的牵引钩放置于尖牙远中,整体内收6颗前牙,避免拐角区尖牙牙龈的压迫,避免炎症反应。

目前,越来越多的正畸医师使用微种植体支抗。本研究结果提示,为了保证术后长期稳定性,应避免微种植体距离牙根过近;在根间距较窄时,可以选择直径较细的微种植体;如果希望施加较大的矫治力,需要使用直径较粗的微种植体时,应选择根间距较大的牙槽纵隔或选择颧牙槽嵴、磨牙后区等无牙部位。此外,为了减少微种植体局部的牙龈炎症反应,其头部应尽量小,植入部位应尽可能位于附着龈区域;同时应保证微种植体周围清洁。微种植体植入定位方法非常重要,但目前关于这方面的研究尚不多见,若能研制出可靠便捷的定位方法,必将提高微种植体支抗的临床成功率。

[参考文献]

- [1] Park HS. A new protocol of the sliding mechanics with micro-implant anchorage(M. I. A)[J]. Korea J Orthod, 2000, 30(6): 677-685.
- [2] Park HS, Bae SM, Kyung HM, et al. Micro-implant anchorage for treatment of skeletal Class I bialveolar protrusion[J]. J Clin Orthod, 2001, 35(7): 417-422.
- [3] Kuroda S, Sugawara Y, Deguchi T, et al. Clinical use of mini-screw implants as orthodontic anchorage: Success rates and post-

operative discomfort[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2007, 131(1): 9-15.

- [4] Kyung HM, Park HS, Bae SM, et al. Development of orthodontic micro-implants for intraoral anchorage[J]. J Clin Orthod, 2003, 37(6): 321-328.
- [5] Huang LH, Shotwell JL, Wang HL. Dental implants for orthodontic anchorage[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2005, 127(6): 713-722.
- [6] Park HS. An anatomical study using CT images for the implantation of micro-implants[J]. Korea J Orthod, 2002, 32(6): 435-441.
- [7] 曹采方. 牙周病学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 84-85.
CAO Cai-fang. Periodontology[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 84-85.
- [8] 冯莉, 孟令强, 李雅娟. 口腔微生物对种植体周围炎的影响[J]. 国际口腔医学杂志, 2008, 35(增刊): 302-305.
FENG Li, MENG Ling-qiang, LI Ya-juan. The effect of oral microorganism to inflammation of peri-implant[J]. Int J Stomatol, 2008, 35(Suppl): 302-305.
- [9] 王震东, 顾永佳, 王林, 等. 解剖结构对微种植体支抗稳定性影响的实验分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(增刊): 18-20.
WANG Zhen-dong, GU Yong-jia, WANG Lin, et al. Experimental study in Beagle dog about effects of anatomic structures approaching embedded position on microimplant anchorage[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(Suppl): 18-20.
- [10] Sung JH, Kyung HM, Bae SM, et al. Microimplants in orthodontics[M]. Daegu, Korea: Dentos Inc., 2006: 21.

(本文编辑 吴爱华)

(上接第149页)

- between transforming growth factor- α gene polymorphism and non-syndromic cleft lip with cleft palate[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(6): 533-535.
- [3] Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate[J]. Clin Genet, 2002, 61(4): 248-256.
 - [4] Lenz EM, Bright J, Wilson ID, et al. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: A ^1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects[J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 36(4): 841-849.
 - [5] Lenz EM, Bright J, Wilson ID, et al. A ^1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33(5): 1103-1115.

- [6] Tang H, Wang Y, Nicholson JK, et al. Use of relaxation-edited one-dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma[J]. Anal Biochem, 2004, 325(2): 260-272.
- [7] Robertson DG, Reilly MD, Sigler RE, et al. Metabonomics: Evaluation of nuclear magnetic resonance(NMR) and pattern recognition technology for rapid *in vivo* screening of liver and kidney toxicants[J]. Toxicol Sci, 2000, 57(2): 326-337.
- [8] Hiraide H, Okamura S, Hayashi T, et al. The urinary excretion of pyridinium cross-links as markers of bone metastasis in breast cancer[J]. Breast Cancer, 1994, 1(2): 103-108.

(本文编辑 吴爱华)