

· 临床检验研究论著 ·

血小板激活血浆代谢物研究

顾春刚

(天津市第三中心医院检验科, 天津 200170)

摘要:目的 基于液质联用的代谢组学研究平台对健康体检人员血小板激活前后血浆代谢轮廓进行分析,以寻找可用于监测和评估疾病病程的特征代谢物,预防血栓性疾病的发生。方法 利用液质联用检测血小板激活对照组(A组)和激活组(B组)的代谢轮廓,构建主成分分析图和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)图,利用统计学方法进行非参数检验,通过查询数据库,获取代谢物信息。结果 依据 OPLS-DA 模型中筛选具有区分意义的特征离子,以 $VIP > 1$,并且排除在 VIP 图和系数图上置信区间包含零的变量,共筛选出 36 个特征离子。通过差异表达物质离子在组间的相对倍数关系筛选 10 倍以上的物质 17 种。结论 发现的 17 种物质中,有些与脂类代谢有关,有些与细胞信号转导有关,有些了解尚少,这些物质的筛选可为血小板活化标志物的研究提供参考。

关键词:血小板活化; 血浆; 代谢组学; 统计学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)01-0034-03

Study on plasma metabolite activated by platelet

Gu Chungang

(Department of Clinical Laboratory, Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 200170, China)

Abstract: Objective To explore plasma metabolite profiles through analyzing platelet before and after activation plasma metabolite profiles tested by the high performance liquid chromatography combined with a LTQ Orbitrap XL mass spectrometry (HPLC-LTQ Orbitrap XL MS). **Methods** Plasma metabolite profiles of control group (Group A) and platelet activation group (Group B) were tested by the high performance liquid chromatography combined with a LTQ Orbitrap XL mass spectrometry (HPLC-LTQ Orbitrap XL MS). We constructed principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) diagram, used nonparametric statistical methods for the inspection and queried the database for metabolites information. **Results** We screened out 36 characteristic ions, depending on $VIP > 1$ and excluding variable which included zero in the confidence interval of VIP diagram and systemic diagram. HPLC-MS platform showed ionic concentration difference by getting the relative ionic weight. We screened out 17 ions by ionic concentration difference above tenfold between groups. **Conclusion** The 17 ions include metabolite of lipids, cellular signal transduction molecule, metabolite of proteins, hormones like molecule and so on. They may be a promising tool in monitoring and assessing disease.

Key words: platelet activation; plasma; metabonomics; statistics

在血栓形成研究中血小板活化标志物的研究是其中的一个热点。代谢组学作为系统生物学的重要组成部分,是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门新兴的学科。鉴于真正“全面地、不带任何偏倚地”捕获代谢物信息,在现阶段很难实现。因此,大多数研究者利用现有的技术平台分析、鉴别出样本中尽可能多的代谢物来分析不同状态生物体的代谢轮廓^[1-2],期望找到某 1 个或某 1 组灵敏度、特异性强的代谢物,用以描述及区别生物体系统的不同状态。针对血小板系统则有可能筛选出血小板激活的特征标志物。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 HPLC 及 LTQ Orbitrap XL 质谱仪均购自美国 Thermo Fisher 公司;液相色谱系统为 Thermo Fisher 公司的 Accela 超高效液相色谱系统,色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD 反相 C18 柱(2.1 mm×50 mm, 1.9 μm);标准品购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 公司;附属设备包括 Multi-fugeX1R 低温高速离心机(美国 Thermo 公司);QL-901 微型漩渦混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血小板激活模型 随机选取天津市第三中心医院健康

查体人员(年龄 32~56 岁,排除心脑血管、肿瘤、静脉血栓等血栓类病史,排除阿司匹林、氯吡格雷等抗血小板聚集药用药史),男 11 例、女 15 例,要求血小板计数范围(200~300)×10⁹/L。静脉采集抗凝血(枸橼酸钠抗凝剂)2 mL,分离富血小板血浆(PPP),分别加 150 μL PPP 到 A 管(对照组)和 B 管(激活组)。A 管加入 17 μL 生理盐水,B 管内加入 17 μL 胶原试剂(体系终浓度约 10 μg/mL),保持摇动 15 min 待测。

1.2.2 上样检测 取 A、B 管各 100 μL 与 400 μL 的甲醇混合,剧烈振荡 30 s 后,于 4 °C 静置 5 min,后在 15 000×g、4 °C 下离心 15 min,取上清液上样。采用正离子扫描模式,数据采集贯穿 15 min 的色谱洗脱,采集范围在 50~1 000 m/z,质谱分辨率设定为 100 000。二级质谱检测采用碰撞诱导解离模式(CID)能量设定在 35(标准化碰撞能量),碰撞气为高纯氦气。

1.3 统计学处理 将上述 HPLC-LTQ Orbitrap XL 平台分析得到的数据直接导入到 MZmine 2.0 软件进行数据前处理^[3],包括峰的检测、比对和标准化(以每个样品的总峰面积作为标准化因子)等。利用 MZmine 2.0 对数据按照提取离子色谱峰强度信噪比 $S/N > 30$,保留时间(RT)偏移不超过 ±0.1 min 及质荷比(m/z)偏差不得超过 ±0.02 的规则进行峰的识别、

匹配及归一化处理。将所得数据导入到 SIMCA-P+12.0.1.0 (瑞典 Umetrics 公司) 进行分析。通过 SIMCA-P+12.0.1.0 的模式识别方法来构建主要成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 模型^[4-5], 潜在标志物根据 VIP 值、VIP 置信区间进行初步筛选, 然后利用 SPSS 17.0 (美国 SPSS 公司) 对筛选出的变量进行配对样本非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总离子流图 采用 HPLC-MS 平台获取实验与对照组血清总离子流图 (TIC), 见图 1。从图中发现激活组和对对照组血浆中小分子物质含量确实存在差异。

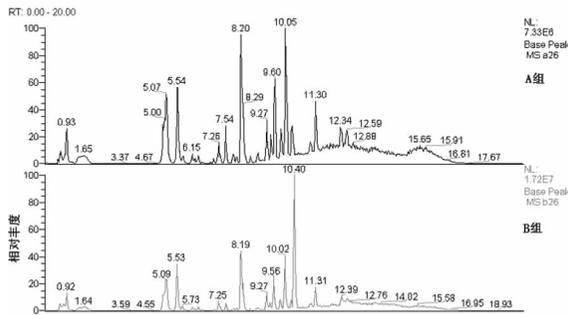


图 1 对照组 (A) 和激活组 (B) 的总离子流图

2.2 代谢轮廓对血小板激活状态的区分能力 PCA 模型显示对血小板激活与对照组的主成分区分聚类趋势。通过构建 OPLS-DA 模型分析, 该模型具有很好的拟合性和预测能力 ($R^2Y=97.7\%$, $Q^2=96.9\%$)。

依据 OPLS-DA 模型中筛选具有区分意义的特征离子, 以 $VIP > 1$, 并且排除在 VIP 图和系数图上置信区间包含零的变量, 共筛选出 36 个特征离子, 这些离子在 S-plot 图上都具有较

明显的离群点, 见图 2。

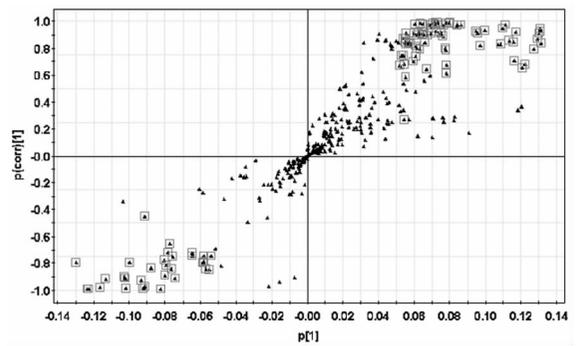


图 2 特征离子的 S-plot 图

以提取离子色谱峰积分面积计算有区分意义的特征物相对含量, 在血小板激活组和对对照组间进行非参数检验, 所有 36 个特征离子在两组间的相对含量差异均存在统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 物质鉴定 首先根据筛选出的变量重新设定仪器参数, 对质控溶液进行 MS/MS 扫描, 获得这些代谢物的二级质谱图; 然后利用精确 m/z 和 MS/MS 图谱搜索 Mass Frontier 6.0 自带数据库, Medlin 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/medline), KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/g/ligand.html>) 和 HMDB 数据库 (<http://hmdb.ca/>), 经过结构推导得出初步结果; 最后通过与标准品的 MS/MS 质谱图对比得到鉴定。

考虑研究的目的是筛选血小板激活后差异表达明显的标志物, 由于 HPLC-MS 平台获取相对离子量反映出物质浓度差异, 故通过差异表达物质离子组间的相对倍数关系 (组均值比), 筛选 10 倍以上的物质 17 种, 见表 1。

表 1 激活组和对对照组具有区分能力的特征代谢物离子鉴定结果

质核比 (m/z)	特征物质	中文名	状态	激活组 / 对照组
265.02	Prephenate	预苯酸盐	上调	100
140.067	L-Valine	L-缬氨酸	上调	149
225.033	Succinylacetoacetate	琥珀酰丙酮	上调	861
383.113	Dityrosine	二酪氨酸	上调	18
453.339	MG(22 : 0/0 : 0/0 : 0)	单酰甘油	下调	0.01
276.725	DG[14 : 1(9Z)/14 : 0/0 : 0]	二酰甘油	下调	0.015
240.23	Farnesol	法尼醇	下调	0.007
209.115	3-Oxodecanoic acid	3-氧化奎酸	下调	0.018
288.287	Heptadecanoic acid	十七(烷)酸	下调	0.01
207.063	Lipoic acid	硫辛酸	下调	0.017
339.287	Alpha-Linolenoyl ethanolamide	α -亚麻酰基乙醇胺	上调	100
399.251	MG[20 : 5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0 : 0/0 : 0]	单酰甘油	上调	115 584
426.353	Oleoylcarnitine	油酰基肉碱	上调	60
562.322	LysoPC(18 : 0)	溶血磷脂酸	下调	0.02
550.382	LysoPC[20 : 1(11Z)]	溶血磷脂酸	下调	0.018
510.387	LysoPC(O-18 : 0)	溶血磷脂酸	下调	0.02
299.138	Enterolactone	肠内酯	上调	57

3 讨 论

血小板激活后发生了什么,一直是学者们研究的热点问题,就代谢物方面,诸如血小板活化因子(PAF)、溶血磷脂酸(LPA)、花生四烯酸(AA)国内外文献都有不少报道,但是对血小板激活直接或间接产生了哪些物质缺乏系统评估。从美国国立生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)检索来看,血小板激活的横断研究也鲜有报道。从对血小板激活横断研究到筛选出特征离子,进而研究这些离子所代表物质在疾病中的表现,有可能发现新的血小板激活标志物,这正是本研究的意义所在。

3.1 血浆代谢轮廓中脂类的代谢变化 血小板激活是一个复杂的过程,细胞膜在参与血小板激活中起着重要的作用。溶血磷脂酸是一种细胞膜脂类衍生物^[6],是磷脂中最简单、最小的分子。近几年对于溶血磷脂酸的研究发现,血浆溶血磷脂酸可由凝血酶活化的血小板迅速产生^[7],是在凝血和血栓形成过程中早期释放的物质,它很可能就是一个较好的血栓形成前的分子标记物。它可以提示血小板处于活化状态。由于血小板经过活化产生的溶血磷脂酸的作用有正反馈的特点,因此溶血磷脂酸又可以促进血小板聚集和促进血栓的形成。在本研究中,3种溶血磷脂酸[LysoPC(18:0)、LysoPC(20:1(11Z))、LysoPC(O-18:0)]呈明显下调,与之前学者的研究结果不吻合,这3种溶血磷脂酸与学者们研究的溶血磷脂酸之间的关系以及代谢机制还有待于进一步研究。

单酰甘油和二酰甘油是三酰甘油的前体,也是磷脂代谢的代谢物; α -亚麻酰基乙醇胺是构成膜结合的磷脂成分;油酰基肉碱是脂质代谢的参与物质等。这些物质与血小板激活机制的关系还有待于研究,但是这些物质在血小板激活前后的明显变化,有可能成为血小板激活标志物。

3.2 血浆代谢轮廓中血小板信号分子的变化 血小板的跨膜信号转导机制至今没能清楚阐述,一方面是由于血小板激动剂常结合不止一个受体;另一方面,被激活的血小板迅速释放颗粒内容物,它们作为次级激动剂起放大效应。大体上讲,血小板主要包括以下几个通路:磷脂酶 C 2β (PLC β)通路、酪氨酸蛋白激酶(PTK)通路、磷脂酰肌醇 23 激酶(PI32K)通路、丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)通路、环磷酸腺苷 2 蛋白激酶 A(cAMP2PKA)通路和磷脂酶 A 2 (PLA 2)生成四烯酸通路等^[8]。

本研究发现溶血磷脂酸、二酰甘油、法尼醇等是细胞信号转导的信号分子。最近研究发现 G 蛋白介导的溶血磷脂酸信号转导途径至少有 4 种:(1)刺激磷脂酶 C 和磷脂酶 D;(2)抑制腺苷酸环化酶^[9-10];(3)激活 Ras 及其下游的 Raf/MAPK 途径^[11];(4)Rho 信号。这些信号转导途径对细胞的增殖、生长、分化及功能有极其重要的意义。二酰甘油由磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸经磷脂酶 C 剪切生成,也可以由磷脂酸生成,在磷脂酰丝氨酸和 Ca²⁺协同下激活蛋白激酶 C(PKC)。活化的 PKC 引起一系列的丝、苏氨酸残基磷酸化调节代谢。法尼醇来自于法尼基二磷酸的信号分子,是类异戊二烯和胆固醇生物合成的中间产物。法尼醇可能有控制降解 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-COA)的作用。

3.3 血浆代谢轮廓中其他代谢物的变化 预苯酸是为生物合

成芳香族氨基酸(苯丙氨酸,酪氨酸)的中间体,生物体内含苯环的天然化合物有一大半是由预苯酸转换过来的;琥珀酰丙酮是公认的分析诊断酪氨酸血症 I 型的指标;硫辛酸是类似维生素的抗氧化剂等,这些物质在血小板激活前后变化差异明显,可以提示血小板的激活状态,但与血小板激活代谢机制的关系还不是很清楚,距离临床实用还有一定距离,需进一步的研究。

血小板的激活是一个复杂的过程,对它的了解还不够全面。除了血浆代谢标志物外,还可以从血小板膜蛋白、胞浆内容物、核酸等方面着手,选取特异的、能快速检测的、成本低的、检测方便的一个物质或多个物质组合,从一个角度或多个角度反映血小板激活情况。本研究仅用胶原在体外模拟血小板激活,并不能完全反映体内激活血小板方式的多样性,如二磷酸腺苷(ADP)、凝血酶、胶原、肾上腺素、花生四烯酸等。本研究选取差异在 10 倍以上的代谢物,可能一些有意义的代谢物被遗漏;所选的物质只是单方面的反映代谢的变化。有些物质对其了解较少,如何将其与血小板激活联系到一起,如何将这些标志物组合在一起还未知。鉴于本研究所限,对血小板激活标志物的探讨还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 53(1/2): 155-171.
- [2] Steinfath M. Metabolite profile analysis: from raw data to regression and classification[J]. *Physiol Plant*, 2008, 132(2): 150-161.
- [3] Katajamaa M, Oresic M. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 26(2): 179.
- [4] Yin P. A metabonomic study of hepatitis B-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by using RP-LC and HILIC coupled with mass spectrometry[J]. *Mol Biosyst*, 2009, 5(8): 868-876.
- [5] 陈静. 一种基于液相色谱-质谱技术进行血清代谢组学的方法: 从代谢指纹到潜在标志物[J]. *中国科学(B辑:化学)*, 2009, 39(10): 1268.
- [6] 张兆辉. 溶血磷脂酸与缺血性脑损伤[J]. *国外医学神经医学神经外科分册*, 2006, 33(2): 259-261.
- [7] Gerrard JM. Increased phosphatidic acid and decreased lysophosphatidic acid in response to thrombin is associate with inhibition of platelet aggregation[J]. *Biochem Cell Biol*, 2008, 86(9/10): 432-439.
- [8] 卢建. 受体信号转导系统与疾病[M]. 山东科学技术出版社, 2001: 93.
- [9] Jalink K, Hordijk PL, Moolenaar WH. Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 198(2): 185-186.
- [10] Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, a multi-functional phospholipid messenger[J]. *J Biol Chem*, 2008, 270(7): 12949-12952.
- [11] Van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, et al. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathway mediated by G proteins[J]. *Cell*, 2007, 60(1): 45-54.

(收稿日期: 2013-09-10)