DOI:10.16016/j.1000-5404.201508046

阿尔茨海默病和帕金森病患者血清代谢组学研究

张静丽,李江超,黎冰林,王丽京,杨永霞 (510006 广州,广东药学院基础学院)

[摘要] **目的** 研究阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)和帕金森病(Parkinson's disease,PD)患者血清代谢物的变化。**方法** 收集正常人和临床确诊的 AD 和 PD 患者的血清,采集各组血清样品的 NMR ^{1}H 谱,运用主成分分析法(principalcomponentanalysis, PCA)和正交最小偏二乘判别法(orthogonal partial leastsquares-discriminant analysis,OPLS-DA)分析。**结果** PCA 和 OPLS-DA 分析显示正常人、AD 患者和 PD 患者的血清代谢特征存在明显差异。与正常人相比,AD 患者血清中异亮氨酸和乳酸含量明显升高($P<0.05$),脂质、谷氨酰胺、肌酸和葡萄糖含量明显降低($P<0.05$);PD 患者血清中乳酸和谷氨酰胺含量升高($P<0.05$,$P<0.01$),葡萄糖的含量降低($P<0.01$);与 AD 患者相比,PD 患者血清中脂质、乳酸和谷氨酰胺含量明显升高($P<0.05$,$P<0.01$),而异亮氨酸、丙氨酸和葡萄糖的含量明显降低($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** AD 患者与 PD 患者在血清代谢水平上具有明显差异,具有明显变化的代谢物(谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、脂质、乳酸和葡萄糖)有可能作为潜在血清代谢标记物,为临床区分 AD 和 PD 提供参考。

[关键词] 阿尔茨海默病;帕金森病;代谢组学;核磁共振氢谱
[中图法分类号] R349.1; R742.5; R745.7 [文献标志码] A

Serum metabolic differences between the patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases

Zhang Jingli, Li Jiangchao, Li Binglin, Wang Lijng, Yang Yongxia (School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510006, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the serum metabolic changes in the patients with Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). **Methods** Serum samples of normal human, AD and PD patients diagnosed clinically were collected, and then NMR ^{1}H spectra were performed and analyzed by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** PCA and OPLS-DA analyses showed that there were great differences in serum metabonomics among normal human, AD and PD patients. Compared with normal people, AD patients had higher levels of isoleucine and lactate ($P<0.05$), and lower levels of lipid, glutamine, creatine and glucose ($P<0.05$), while the levels of lactate and glutamine were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and that of glucose was decreased in PD patients ($P<0.01$). The serum levels of lipid, lactate and glutamine were significantly higher ($P<0.05$, $P<0.01$), while those of isoleucine, alanine and glucose were lower in the PD patients than the AD patients ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Distinct differences exist in the serum metabolic profiles between the AD and PD patients, and these distinct metabolites may serve as potential biomarkers to distinguish AD from PD in clinical practise.

[**Key words**] Alzheimer's disease; Parkinson's disease; metabonomics; NMR ^{1}H spectra

Supported by the Innovative Project of Science and Technology of Guangdong Province (2013KJCX0108) and the Project of Medical Foundation of Guangdong Provincial Health Department (A2013312). Corresponding author: Yang Yongxia, E-mail:sheepma@163.com

[基金项目] 广东省科技创新项目(2013KJCX0108);广东省卫生厅医学基金(A2013312)
[通信作者] 杨永霞,E-mail: sheepma@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151207.1701.005.html(2015-12-07)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)和帕金森病(Parkinson's disease,PD)是最常见的慢性神经退行性疾病(neurodegenerative diseases),主要发生于中老年。随着我国人口老龄化的加剧,AD及PD的发病率日益升高。AD的主要神经病理特征包括神经组织中脑淀粉样蛋白(amyloid betaprotein,Aβ)的沉积,神经斑块的形成和神经元纤维的缠结[1]。其临床主要表现为认知、计算能力和运动障碍等症状[2]。PD的主要病理特征是黑质致密部中多巴胺能神经元的缺失,黑质神经元中胞浆内包涵体的形成,PD的临床主要症状有震颤、僵直、运动不能、运动迟缓等[3]。目前,AD和PD的诊断主要以临床和神经心理的评估为基础,同时通过磁共振成像(MRI)和正电子发射体层扫描(PET)等辅助手段确定。但由于这些技术复杂的检测程序及昂贵的检测费用,临床上并未能广泛应用。AD和PD均属于神经系统疾病,临床表现相似,所以这两种疾病的误诊也时有发生[4-5]。因此,寻找AD和PD患者临床生物标志物将为两种疾病的无创诊断提供依据。

代谢组学(metabonomics)是继基因组学、转录组学、蛋白质组学后的一门新兴学科,是研究生物体受内外刺激所产生的所有代谢变化的科学。近年来,代谢组学技术在疾病临床诊断中应用广泛。2002年,Brindle等[6]通过核磁共振氢谱和模式识别技术研究人体血清的变化,建立了冠心病的代谢组学诊断方法;2007年,Marchesi等[7]采用代谢组学方法研究罗恩病和溃疡性结肠炎患者粪便的提取物变化,为无创诊断胃肠病提供了一种可能;2007年,Psihogios等[8]将代谢组学的方法运用到研究肾小球肾炎患者尿液代谢物质的改变,为早期肾损害的评估和肾功能的检测提供依据。本研究利用基于核磁共振氢谱的代谢组学技术,分析阿尔茨海默病患者和帕金森病患者血清代谢物的变化,找出区分AD和PD的生物标志物,以期为临床二者的无创区别诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年佛山精神病健康中心和东莞精神病健康中心正常人、AD患者和PD患者血清样本各16例。本研究遵照《赫尔辛基宣言》的原则实施。

1.2 主要材料

磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)等为国产分析纯,水(D_2O)购自青岛腾龙科技有限公司。500 MHz Bruker AVANCE Ⅲ核磁共振波谱仪,5 mm核磁管,Heraeus台式冷冻离心机(KDC-220HR),ZH-2-BLENDER振荡器。

1.3 血样采集与预处理

取静脉血1.0 mL,3 000 r/min常温离心20 min,取上清液放入-80 ℃冰箱待用。NMR测定前的血清处理:血清常温解冻后,离心(14 000 r/min,10 min),取上清液300 μL,加入100 μL的重水和150 μL的0.2 mol/L磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L Na_2HPO_4/NaH_2PO_4,pH=7.4),转入5 mm核磁管混匀,于4 ℃冰箱保存。

1.4 数据采集和处理

血清测定使用Bruker AVANCE 500 MHz核磁共振仪,调用Carr-Purcell-Meiboom-Gill [recycle delay-90 ℃-(τ-180 ℃-τ)$_n$-acquisition]脉冲序列。NMR测定相关参数:回波时间100 ms,谱宽10 000 Hz,采样点数32 k,采样累加次数128次,温度298 K,自由感应衰减(free induction decay,FID)信号经过32 k傅立叶变换转为NMR谱图。对每份血清样本分别进行数据采集。将NMR图谱文件夹导入Topspin(Version 2.0,Bruker Biospin),以乳酸峰(δ 1.33)为化学位移参考峰,对图谱进行手动相位校正和基线校正。根据二维NMR谱和文献[9-10]报道对图谱中的各代谢物进行谱峰归属,并对所有的NMR ^{1}H谱用AMIX(Version 2.0 Bruker Biospin,Germany)进行自动积分。为了消除剩余水峰引起的影响,将积分区间4.7~5.2的积分值设为零,对产生的所有积分数据进行归一化处理,以Excel文件格式保存,用于进行模式识别分析。

1.5 模式识别分析

将归一化后的数值导入SIMCA-P+12.0软件(Umetrics Sweden)进行主成分分析(principal component analysis,PCA)和正交偏最小二乘判别法(orthogonal partial leastsquares-discriminant analysis,OPLS-DA)的模式识别分析。在PCA无监管分析中,我们以归一化积分面积作为X变量,分析结果用得分图(score plot)表示。OPLS-DA有监管分析以归一化积分面积作为X变量,分析结果以得分图和载荷图(loading plot)表示。Score图可以直观地给出各样本在空间上的位置,loading图给出两类间的代谢物变化。本研究采用correlation coefficient coded-loading相关图,将OPLS-DA模型中loading和correlation coefficient值直接导入MATLAB(The MathWorks,Inc,USA)脚本进行处理,得到相关图谱。为进一步验证该模型的准确性,进行PLS回归分析。将数据集按5∶3的比例随机划分为训练集和测试集,将5/8的数据集用于模型的建立,3/8的数据集用于测试所建立模型的性能。

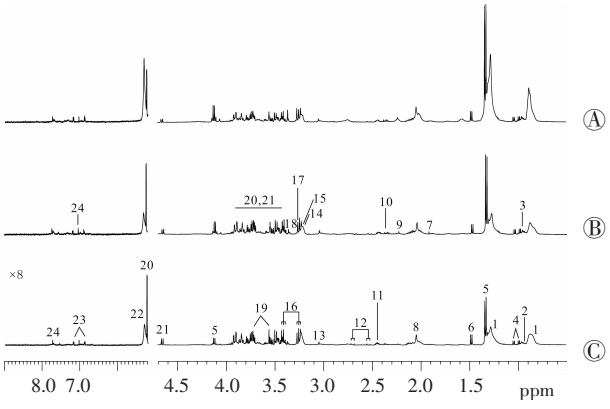
1.6 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,计量资料用$\bar{x} \pm s$表示,对各组血清NMR ^{1}H谱的归一化积分值行t检验,$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清的NMR ^{1}H谱

图1为正常人、AD和PD血清的NMR ^{1}H谱,主要的代谢物:脂类物质(lipid,0.89,1.27)、亮氨酸/异亮氨酸(leucine/isoleucine,0.93,1.00)、缬氨酸(valine,0.97,1.04)、乳酸(lactate,1.33,4.11)、丙氨酸(alanine,1.48)、乙酸(acetate,1.91)、N-乙酰糖蛋白(NAC,n-acetyl glycoproteins,2.04)、乙酰乙酸(acetoacetate,2.22)、谷氨酸(glutamate,2.36)、谷氨酰胺(glutamine,2.41)、柠檬酸(citrate,2.52,2.69)、肌酸(creatine,3.02)、胆碱(choline,3.21)、磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱(PC/GPC,phosphocholine/glycerolphosphocholine,3.22)、牛磺酸(taurine,3.43)、氧化三甲胺(TMAO,3.27)、脯氨酸(proline,3.34)、肌醇(myo-inositol,3.56,3.66)、葡萄糖(glucose,3.70~3.90)、不饱和脂类物质(unsaturated lipid,5.23)、酪氨酸(tyrosine,6.87,7.17)、1-甲基组氨酸(1-methylhistidine,7.77)。AD和PD患者血清中乳酸含量明显高于正常人。

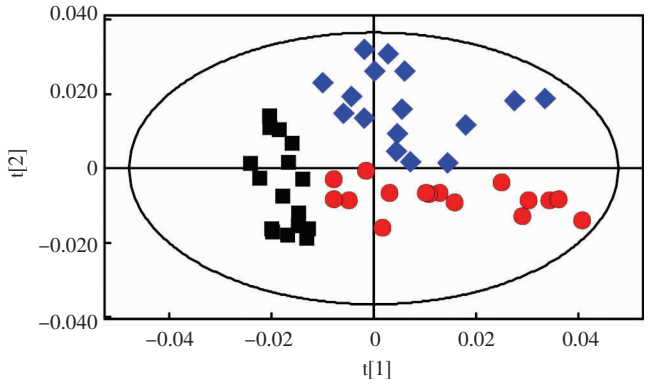


1:脂类物质;2:异亮氨酸;3:亮氨酸;4:缬氨酸;5:乳酸;6:丙氨酸;7:乙酸;8:N-乙酰糖蛋白;9:乙酰乙酸;10:谷氨酸;11:谷氨酰胺;12:柠檬酸;13:肌酸;14:胆碱;15:磷脂酰胆碱/甘油磷脂酰胆碱;16:牛磺酸;17:氧化三甲胺;18:脯氨酸;19:肌醇;20:α-葡萄糖;21:β-葡萄糖;22:不饱和脂类物质;23:酪氨酸;24:1-甲基组氨酸

图1 PD(A)、AD(B)患者和正常人(C)血清NMR ^{1}H谱

2.2 模式识别分析

正常人、AD和PD患者血清NMR ^{1}H谱的PCA得分见图2。正常人、AD和PD患者血清样本可以明显区分开,表明3组样本具有不同的代谢特征。



■:正常人;●:AD患者;◆:PD患者

t[1]:第一主成分;t[2]:第二主成分(R^2=85.7%,Q^2=82.3%)

图2 正常人、AD和PD患者血清PCA分析结果

为了得到对区分样本有贡献的代谢物变化,进一步进行OPLS-DA分析,结果见图3。正常人和AD患者、正常人和PD患者、AD和PD患者血清样本均在t[1]维可以明显区分开,且可得到对区分有较大贡献的代谢物。与正常人相比,AD患者血清中异亮氨酸和乳酸的含量升高,而脂质、谷氨酰胺和肌酸含量降低;PD患者血清中乳酸和谷氨酰胺的含量升高;与AD患者相比,PD患者血清中脂质、乳酸和谷氨酰胺含量升高,异亮氨酸和丙氨酸的含量降低。进一步的模型预测实验表明样本预测值与实验观测值相近,并没有异常值出现,并且样本都均匀分布于过原点45°直线周围,说明此模型具有良好的稳定性和泛化能力(预测能力,图4)。

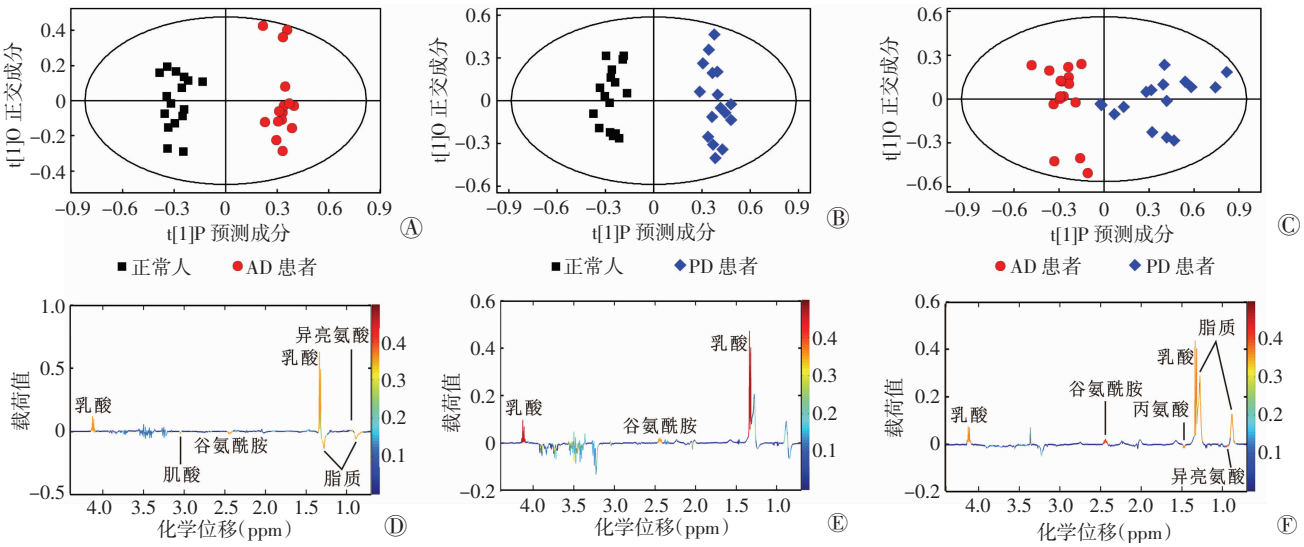
2.3 统计分析结果

为了进一步确定AD和PD患者血清代谢变化,找出差异有统计意义的差异代谢物,将OPLS-DA分析结果得到的对样本区分有贡献的血清代谢物积分值进行统计学分析,结果表明,脂质、异亮氨酸、乳酸、丙氨酸、谷氨酰胺、肌酸和葡萄糖的变化差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$,表1)。

表1 正常人、AD和PD患者血清代谢组归一化面积统计分析

代谢物	化学位移	正常人($\bar{x}\pm s$,%)	AD患者($\bar{x}\pm s$,%)	PD患者($\bar{x}\pm s$,%)
脂质	0.93(m),1.32(m)	26.71±0.13	24.20±1.36^a	27.97±1.84^c
异亮氨酸	0.93(t)	1.27±0.03	1.36±0.04^a	1.23±0.03^d
乳酸	1.33(d),4.11(q)	10.94±1.06	13.41±0.49^a	18.09±2.40^{bc}
丙氨酸	1.46(d)	1.11±0.09	1.19±0.04	1.03±0.10^c
谷氨酰胺	2.41(m)	0.71±0.05	0.56±0.09^a	0.83±0.05^{ad}
肌酸	3.04(s)	0.40±0.05	0.30±0.02^a	0.33±0.03
葡萄糖	3.40~3.90	20.40±1.43	17.74±0.54^a	15.81±1.14^{bc}

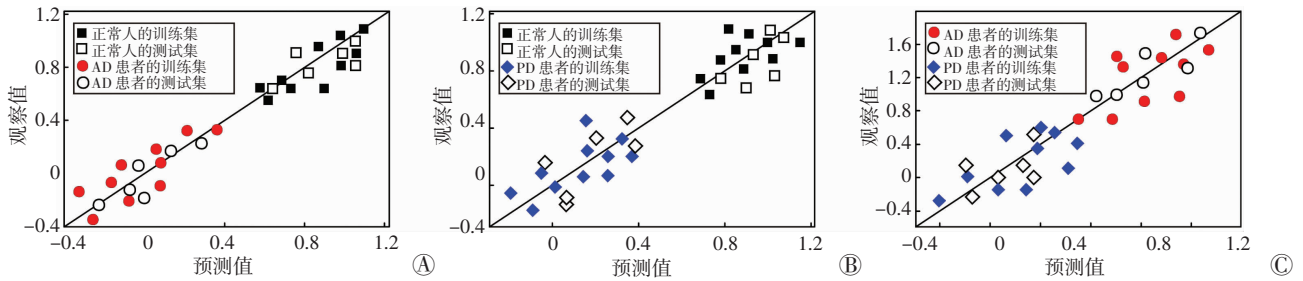
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常人比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与AD患者比较



■:正常人;●:AD 患者;◆:PD 患者

A~C:得分图;D~F:载荷图;A、D:正常人、AD 患者($R^2X=60.4\%$, $Q^2Y=93.6\%$);B、E:正常人、PD 患者($R^2X=67.1\%$, $Q^2Y=93.2\%$);C、F:AD、PD 患者($R^2X=61.8\%$, $Q^2Y=66.1\%$)

图 3　正常人、AD 和 PD 患者的血清 OPLS-DA 分析结果



A:正常人、AD 患者;B:正常人、PD 患者;C:AD、PD 患者

图 4　正常人、AD 和 PD 患者血清代谢组模型预测

3　讨论

阿尔茨海默病和帕金森病是慢性神经退行性疾病,由于神经系统的特殊性,采用病理等常规检测手段诊断比较困难。临床诊断主要依靠临床表现和神经心理的评估,具有一定的主观性和不确定性。研究表明代谢组学技术在疾病的临床诊断中有广泛应用[6-8]。因此,寻找二者的代谢改变有可能对临床诊断具有重要意义。本研究利用代谢组学分析方法研究 AD 和 PD 患者血清代谢物变化,寻找 AD 和 PD 患者血清的潜在生物标记物,为两种疾病的无创诊断提供依据。本研究显示,与正常人相比,AD 患者血清中异亮氨酸和乳酸的含量升高,而脂质、谷氨酰胺、肌酸和葡萄糖含量降低;PD 患者血清中乳酸和谷氨酰胺和含量升高,葡萄糖的含量降低;与 AD 患者相比,PD 患者血清中脂质、乳酸和谷氨酰胺含量升高,异亮氨酸、丙氨酸和葡萄糖的含量降低。

本研究表明部分能量代谢的相关物质发生了明显的变化。葡萄糖在 AD 和 PD 患者血清中均有明显降低,且 PD 与 AD 相比,葡萄糖的含量的降低更为显著。在不同的 AD 转基因小鼠的血清中也发现葡萄糖的含量有明显的降低[11-13]。葡萄糖含量的降低可能预示着能量代谢的紊乱,本研究表明 PD 比 AD 的情况更为严重。同时还发现,乳酸在 AD 和 PD 患者血清中均有明显升高,且 PD 与 AD 相比,乳酸的含量的升高更为显著,可能预示着糖酵解过程的紊乱。此外,肌酸在 AD 患者血清中是下调的,可能与线粒体功能障碍有关,在 González-Domínguez 等[14] 对 AD 患者血清的研究中也发现了同样的变化。

氨基酸在 AD 和 PD 患者血清中具有明显的变化。在 AD 患者血清中,异亮氨酸的含量升高而谷氨酰胺的水平下降。AD 的病理变化与神经传导物质有关,神经传导物质合成途径的改变将引起突触过程的失败,导致神经退行性疾病的发生,在这个病理过程中,

谷氨酸代谢通路的调节发生异常[15]。AD 患者血清中谷氨酰胺水平降低,而 PD 患者血清中谷氨酰胺有明显的升高,与 Jiménez-Jiménez 等[16]对 PD 患者血清的研究结果相一致。说明二者血清中谷氨酸代谢通路紊乱,且在 AD 和 PD 病理过程中的调节不同。因此,血清谷氨酰胺变化可能对二者的区别诊断具有重要意义。PD 与 AD 相比,异亮氨酸和丙氨酸的含量降低,表明这两种氨基酸代谢异常在 PD 患者中更为明显。

脂质在 AD 患者血清中降低。在 AD 中,脂质的变化可能与膜脂质的失调、氧化应激和血管变化有关[17]。膜脂质代谢的异常将导致细胞膜的破坏,是神经退行性疾病的最重要的特征[18]。因此,脂质在 AD 患者血清中降低可能与细胞膜的变化密切相关。

综上所述,代谢组学可以明显地区分正常人、AD 和 PD 患者血清样本,并且可筛选出两种疾病的代谢标志物。这些代谢物的改变可能为 AD 和 PD 的临床区别诊断提供辅助的代谢依据。

参考文献:

[1] Li J C, Han L, Wen Y X, *et al*. Increased permeability of the blood-brain barrier and Alzheimer's disease-like alterations in slit-2 transgenic mice[J]. J Alzheimers Dis, 2015, 43(2): 535 – 548. DOI: 10.3233/JAD-141215

[2] McKhann G, Drachman D, Folstein M, *et al*. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease[J]. Neurology, 1984, 34(7): 939 – 944.

[3] Nobre R J, Almeida L P. Gene therapy for Parkinson's and Alzheimer's diseases: from the bench to clinical trials[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(31): 3434 – 3445.

[4] 李江涛, 秦志红, 许爱琴. 早期帕金森病 22 例误诊分析[J]. 临床医学, 2013, 33(3): 115 – 116. DOI: 10.3969/j.issn.1003-3548.2013.03.064

[5] Pahwa R, Lyons K E. Early diagnosis of Parkinson's disease: recommendations from diagnostic clinical guidelines[J]. Am J Manag Care, 2010, 16(Suppl Implications): S94 – S99.

[6] Brindle J T, Antti H, Holmes E, *et al*. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabonomics[J]. Nat Med, 2002, 8(12): 1439 – 1444. DOI: 10.1038/nm802

[7] Marchesi J R, Holmes E, Khan F, *et al*. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease[J]. J Proteome Res, 2007, 6(2): 546 – 551. DOI: 10.1021/pr060470d

[8] Psihogios N G, Kalaitzidis R G, Dimou S, *et al*. Evaluation of tubulointerstitial lesions´severity in patients with glomerulonephritides: an NMR-based metabonomic study[J]. J Proteome Res, 2007, 6(9): 3760 – 3770. DOI: 10.1021/pr070172w

[9] Nicholson J K, Foxall P J, Spraul M, *et al*. 750 MHz 1H and 1H-13C NMR spectroscopy of human blood plasma[J]. Anal Chem, 1995, 67(5): 793 – 811. DOI: 10.1021/ac00101a004

[10] Li D, Zhang L, Dong F, *et al*. Metabonomic changes associated with atherosclerosis progression for LDLR-/- mice[J]. J Proteome Res, 2015, 14(5): 2237 – 2254. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00032

[11] Jiang N, Yan X, Zhou W, *et al*. NMR-based metabonomic investigations into the metabolic profile of the senescence-accelerated mouse[J]. J Proteome Res, 2008, 7(9): 3678 – 3686. DOI: 10.1021/pr800439b

[12] Hu Z P, Browne E R, Liu T, *et al*. Metabonomic profiling of TASTPM transgenic Alzheimer's disease mouse model[J]. J Proteome Res, 2012, 11(12): 5903 – 5913. DOI: 10.1021/pr300666p

[13] Graham S F, Holscher C, McClean P, *et al*. 1H NMR metabolomics investigation of an Alzheimer's disease (AD) mouse model pinpoints important biochemical disturbances in brain and plasma[J]. Metabolomics, 2013, 9(5): 974 – 983. DOI: 10.1007/s11306-013-0516-y

[14] González-Domínguez R, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza J L. Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(28): 7137 – 7148. DOI: 10.1007/s00216-014-8102-3

[15] Lin A P, Shic F, Enriquez C, *et al*. Reduced glutamate neurotransmission in patients with Alzheimer's disease—an *in vivo* 13C magnetic resonance spectroscopy study[J]. MAGMA, 2003, 16(1): 29 – 42. DOI: 10.1007/s10334-003-0004-x

[16] Jiménez-Jiménez F J, Molina J A, Vargas C, *et al*. Neurotransmitter amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease[J]. J Neurol Sci, 1996; 141(1/2): 39 – 44.

[17] González-Domínguez R, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza J L. Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 98: 321 – 326. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.05.023

[18] Klein J. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids[J]. J Neural Transm (Vienna), 2000, 107(8/9): 1027 – 1063. DOI: 10.1007/s007020070051

(**收稿**:2015-08-11;**修回**:2015-10-23)

(编辑 王小宾)