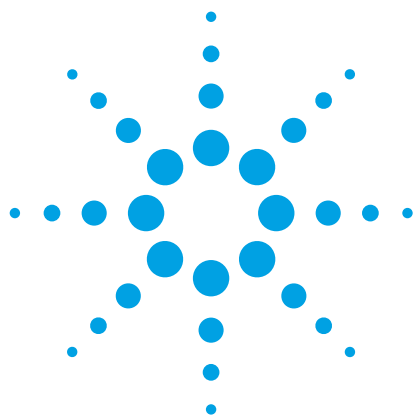




采用 GC/Q-TOF 对小鼠大脑中阿片制剂诱导的变化进行代谢组学研究

应用简报

代谢组学

作者

Manhong Wu, Ming Zheng,

David Clark, Gary Peltz

麻醉系

医学院

斯坦福大学

斯坦福, 加利福尼亚州

Peyman Sahbaie

退伍军人事务部

帕洛阿尔托医疗保健系统

帕洛阿尔托, 加利福尼亚州

Sofia Aronova 和 Stephan Baumann

安捷伦科技有限公司

圣克拉拉市, 加利福尼亚州

摘要

本研究阐明了小鼠大脑中阿片制剂诱导的代谢变化。通过将 Agilent 7200 系列 GC/Q TOF MS 的 EI MS、EI MS/MS 和 PCI 功能与 Agilent MassHunter 软件工具相结合, 获得了一个非常灵活且全面的用于鉴定代谢组学差异的工作流程。采用该工作流程可以区分吗啡敏感性和吗啡耐受性的小鼠品系, 确定吗啡给药后小鼠的反应差异, 并且采用不同的技术鉴定化合物。



Agilent Technologies

前言

在美国以及其他一些工业化国家，处方类阿片镇痛剂的滥用显著增加 [1, 2]。因此需要采取新的方法，并重新评价目前对麻醉药物成瘾机制的认识。

人类对麻醉药物具有不同程度的成瘾敏感性，同样地，不同小鼠品系对这些药物的敏感性也明显不同 [3,4]。因此，本文使用一种阿片依赖的小鼠模型来解决上述问题。

代谢组学是研究吗啡成瘾性生化过程的一个强大的方法，因为它提供了有关系统生理状态最直接的信息。关于介导神经行为响应的代谢变化，目前已知的信息非常有限。临床上重要的阿片响应很可能是通过阿片诱导的代谢变化介导的。

本文所述的研究运用了一种非靶向代谢组学方法，该方法使用气质联用系统 (GC/MS) 来表征小鼠不同品系中阿片诱导的代谢变化，展现了它们对吗啡敏感度的极大不同。为了充分利用精确质量信息、全谱的灵敏度、MS/MS 功能以及 EI 和 CI 模式，我们使用了 Agilent 7200 GC/Q-TOF。本方法结合了 Agilent MassHunter 和 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件的全部功能，用于鉴定和确认这些品系小鼠中浓度发生变化的代谢物。我们特别想要鉴定在吗啡给药后不同品系间出现的代谢物浓度差异，因为这些变化有助于我们理解吗啡成瘾的机制。本代谢组学研究揭示了吗啡敏感性小鼠品系的对照组和吗啡给药组之间的腺苷浓度存在显著变化。我们还观察到两个品系间一些其他代谢物的浓度变化，包括腺苷 5'-单磷酸盐、甘油酸、胆固醇和神经递质、N-乙酰天门冬氨酸谷氨酸。

实验部分

材料

C57BL/6 和 129Sv1 品系小鼠（雄性，7–8 周），来自杰克逊实验室（巴尔港，缅因州）。吗啡来自 Sigma 化学品公司（圣路易斯，密苏里州）。

仪器

本文联用 Agilent 7890B 气相色谱系统和 Agilent 7200 GC/Q-TOF 系统进行研究。仪器条件列于表 1。

表 1. 气相色谱和质谱条件

气相色谱运行条件	
色谱柱	Agilent DB-5 MS 超高惰性色谱柱， 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm 膜厚 (部件号 122-5532UI)
进样量	1 μL
分流模式比例	分流比 10:1 (EI) 及不分流 (PCI 和 MS/MS)
进样口温度	250 °C
柱温箱升温程序	60 °C 下保持 1 min， 以 10 °C/min 的速度升至 325 °C 保持 3.5 min
载气	氦气，1 mL/min，恒流
传输线温度	290 °C
质谱条件	
离子化模式	EI，正离子 CI (20% 甲烷流量)
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
质量范围	40 – 600 m/z
谱图采集速率	5 Hz，以棒状图和轮廓图两种模式采集

样品前处理

小鼠连续 4 天吗啡给药，或在同一时间段给予生理盐水作为对照。从 8 周大的雄性 C57BL/6（吗啡敏感性）和 129Sv1（吗啡耐受性）小鼠中收集脑干组织，分别平行收集 7-8 只。采用 Folch 方法提取代谢物 [5]。收集水相萃取液，真空干燥，然后采用盐酸羟胺的吡啶饱和溶液进行甲氧化衍生，再采用 N-甲基-N-（三甲基硅烷基）三氟乙酰胺 (MSTFA) 和 1% 三甲基氯硅烷 (TMCS) 进行硅烷化衍生。

数据处理与统计分析

使用 MassHunter 定量分析软件包中的未知物分析工具对数据进行色谱峰解卷积处理，然后通过 Agilent Fiehn GC/MS 代谢组学保留时间锁定 (RTL) 谱库进行对比来鉴定化合物。使用分子结构关联 (MSC) 软件进一步验证初步鉴定化合物的结构。

采用 Mass Profiler Professional (MPP) 这一多变量统计分析软件工具包进行统计分析。它可用于数据聚类的图形化分析，还可以确定成对条件间化合物浓度的显著差异。

结果与讨论

色谱峰解卷积和谱库搜索

使用未知物分析工具的色谱峰解卷积可以在每个样品中找到大约 700 个成分（图 1）。使用 Agilent-Fiehn 代谢组学 MS 谱库指定相应的命中匹配，每个样品中大约 70-100 个成分的匹配因子得分大于 50。在 MPP 过滤掉所有不展现明显变化的成分后，未鉴定的成分，以及那些通过 Agilent-Fiehn 谱库鉴定的成分，均根据 NIST MS 谱库进行搜索，以确认已鉴定成分和鉴定 Agilent-Fiehn 谱库中不存在的成分。对于一些在任何一个谱库中均没有很好匹配但又展现出明显变化的高丰度成分，我们将使用其他分析步骤，如采用 PCI 和 EI MS/MS 对其经验式进行解析，以及采用精确质量信息和分子结构关联 (MSC) 软件工具来推测其结构，这些将在稍后介绍。

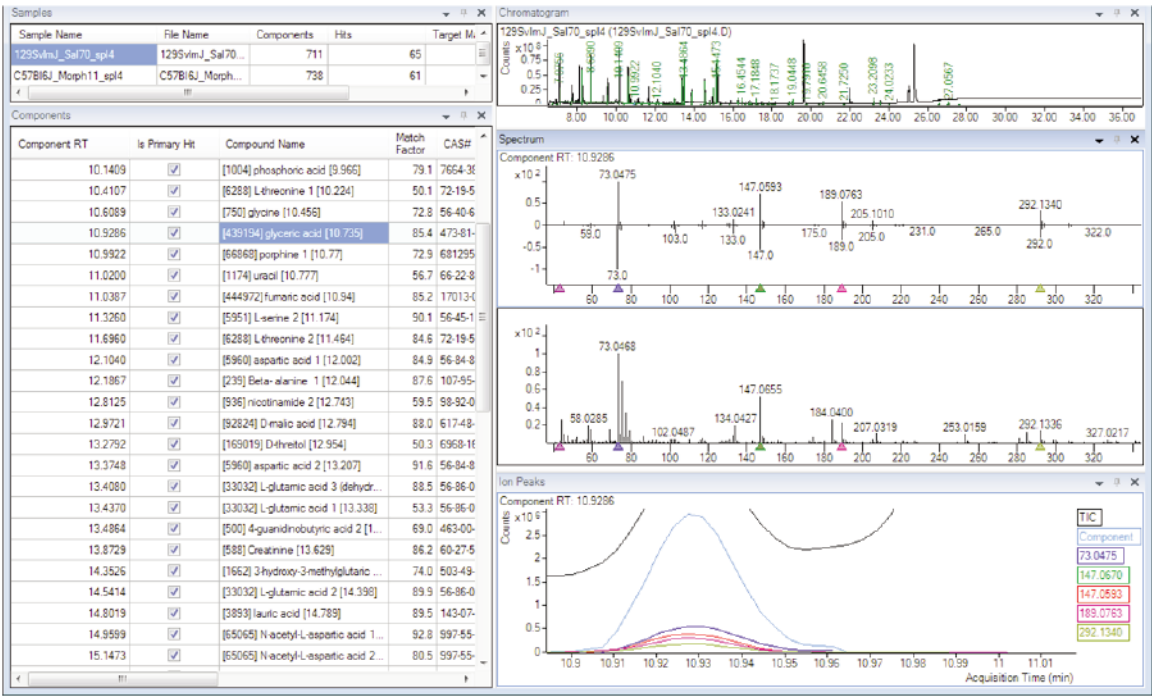


图 1. 采用未知物分析工具进行解卷积和初步的谱库搜索。右下角的图展示了具有相同峰形的成分的解卷积离子，从而证实了它们都来自相同的成分

每个样品中先期使用 Agilent-Fiehn 单位质量代谢组学谱库得到鉴定的大约 60 种代谢物利用精确质量信息进行确证。这可以使我们排除任何的假阳性结果。将 MassHunter 定性分析软件中的碎片分子式标注 (FFA) 工具与谱库搜索结果相结合, 可以使我们很容易地确证鉴定的化合物 (图 2)。当碎片的分子式为谱库搜索所鉴定分子式的子集时, 将此碎片注释并标记为绿色。这对于快速确证化合物的身份非常有用 (图 2)。大多数鉴定到的代谢物是氨基酸、有机酸和糖类 (图 3)。

统计分析工作流程

常是一个繁琐耗时的过程。MPP 软件非常适合于过滤、数据解析、样品模型创建和预测; 它能够高效评估复杂数据和噪声数据。MPP 提供了简单易懂的工作流程, 可以帮助用户确定如何最好地评估其数据。对于经验更丰富的用户而言, MPP 还提供了不同的统计操作, 用户为了优化他们的数据分析, 可以采用多种不同的途径处理数据 (更多详情, 请参见 Mass Profiler Professional 产品样本 5990-4164CHCN)。

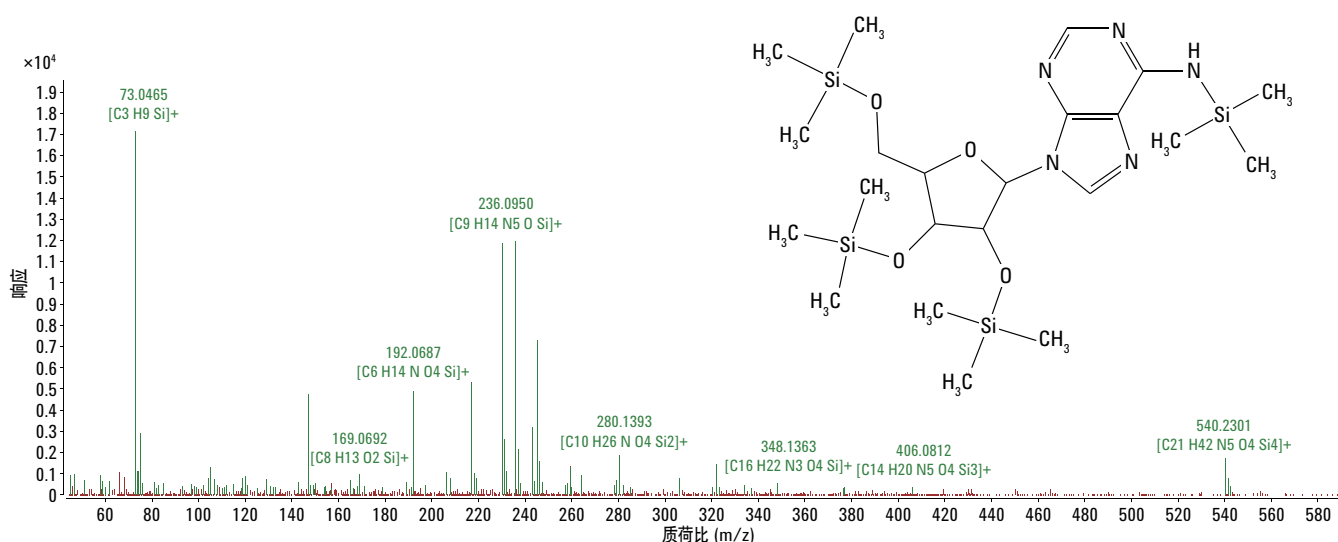


图 2. 使用 Agilent MassHunter 定性分析软件中的 FFA 工具得到的某个化合物 (腺苷) 的标注质谱图。当在谱库中发现命中目标时, FFA 会自动识别分子离子 (MI), 并且根据命中目标的经验式和精确质谱数据分配碎片分子式。这些标注的离子以绿色表示。如果未能找到某离子碎片的满意匹配, 该离子在谱图中就会显示为原始色 (红色)

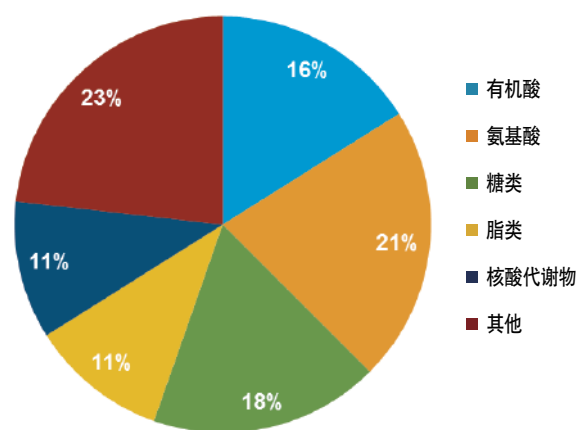


图 3. 采用 AgilentFiehn 谱库鉴定的 60 种化合物的代谢物分类分布

一旦在未知物分析软件中完成了解卷积，有关化合物的信息就会以一种基于 xml 的化合物交换文件格式 (.CEF) 保存。这些文件被导入到 MPP 中，以确定在成对条件或小鼠品系间，哪些化合物的含量水平有显著的变化。MPP 工作流程中的一个重要步骤就是化合物过滤器的正确设置，以确保数据中的绝大部分噪音被滤除，从而不会对统计分析造成干扰。数据内在的变异程度的大小采用主成分分析 (PCA) 进行评估（图 4 和图 5），然后进行显著性和倍数变化分析，采用火山图直观展示（图 6 和图 7）。

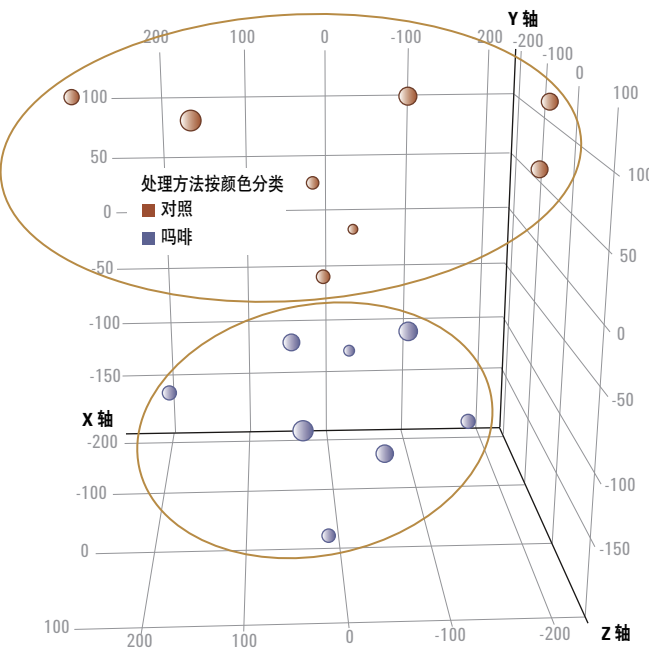


图 4. 针对 129Sv1 品系小鼠，对照与吗啡给药的小鼠的 PCA 结果证实了存在两个不同的集群。在聚类分析中，每个条件下（对照，红色；吗啡，蓝色）平行分析了 8 份生物样本（小鼠）。对于 C57BL/6 品系小鼠，我们得到了类似的图形

采用主成分分析进行数据评估

PCA 是一种经常用于数据降维的非监督多变量统计分析技术。它将测定的变量转换为不相关的主成分，每个主成分都是原始变量的线性组合。图 4 和图 5 展示了 PCA 分析的典型实例。PCA 图展示了对照组和吗啡给药组的完美分离，两个小鼠品系也实现了分离。

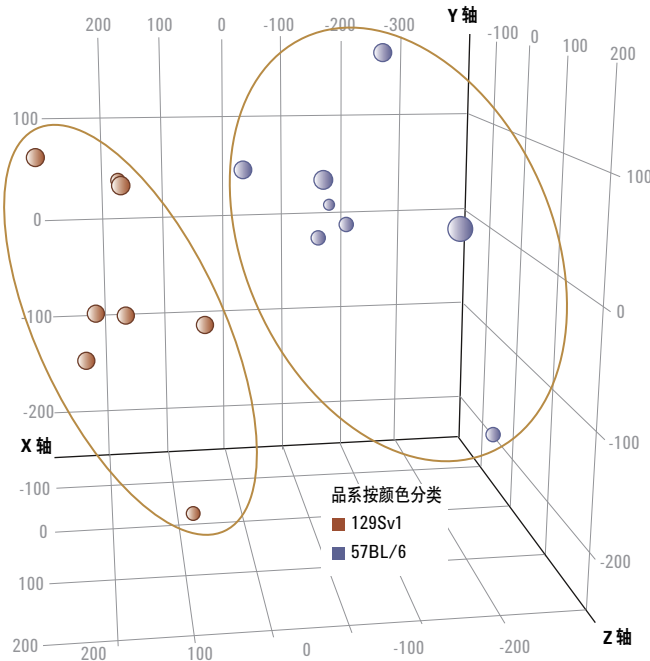


图 5. 在没有吗啡给药情况下，品系间的比较所得的 PCA 结果展示了两个不同的集群。在聚类分析中，每个小鼠品系（129Sv1，红色；57BL/6，蓝色）平行分析了 8 份生物样本（小鼠）。比较吗啡给药后相同的品系，我们得到了类似的图形

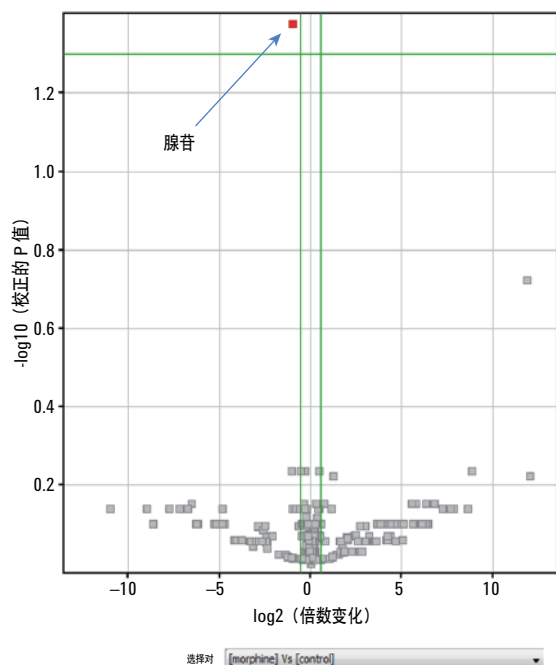


图 6. 对于吗啡给药与对照的吗啡敏感性小鼠 (C57BL/6), 浓度 vs. 概率值倍数变化的火山图。在 C57BL/6 品系中, 与对照相比, 吗啡给药小鼠的腺苷浓度下降 ($p < 0.05$), 并且它是两种条件下唯一浓度发生显著变化的化合物。绿线表示临界值 $p = 0.05$ (纵轴), 以及倍数变化 1.5 (x 轴)

代谢物倍数变化分析

完成 PCA 分析后, 我们针对吗啡敏感性和耐受性小鼠 (分别为 C57BL/6 和 129Sv1) 的吗啡给药和对照样品进行倍数变化 (FC) 分析。首先, 我们确定了条件间和小鼠品系间任何给定化合物的浓度出现生物学显著倍数变化的大小。该分析鉴定出了在所选择类别间具有重大丰度差异的化合物 (实体)。

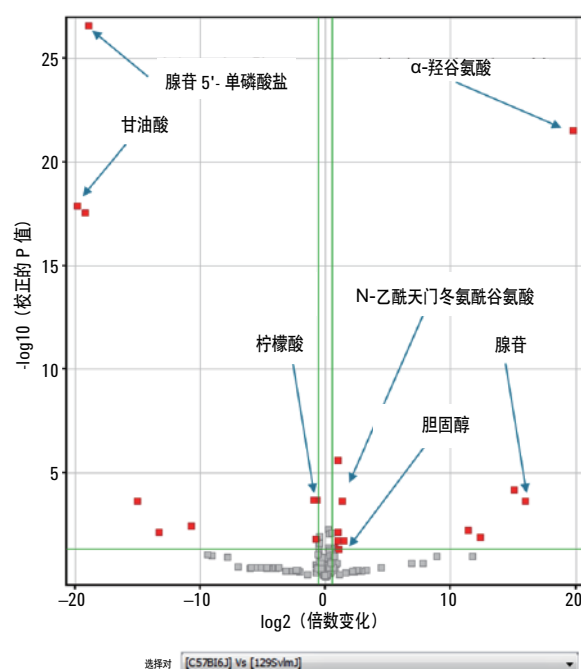


图 7. 对于吗啡敏感性小鼠 (C57BL/6) 与吗啡耐受性小鼠 (129Sv1), 浓度 vs. 概率值倍数变化的火山图。两个品系间有 21 种化合物的浓度显著不同 ($p < 0.05$)。绿线表示临界值 $p = 0.05$ (纵轴), 以及倍数变化 1.5 (x 轴)

接下来, 为了确定倍数变化分析所得到的评估成对条件或品系之间的差异是否具有统计显著性, 我们进行了一系列 t 检验。倍数变化分析和统计显著性的结果用火山图表示。针对 C57BL/6 (吗啡敏感性) 小鼠, 通过比较吗啡给药和对照样品的结果, 我们注意到腺苷是唯一表现出统计学上显著变化的化合物: 与对照相比, 吗啡给药小鼠的腺苷浓度下降 ($p < 0.05$; 图 6)。与此相反, 比较未吗啡给药的 C57BL/6 和 129Sv1 小鼠, 我们发现一些化合物 (包括腺苷、腺苷 5' 单磷酸盐、甘油酸、胆固醇、神经递质和 N-乙酰天门冬氨酸) 具有显著的倍数变化 ($p < 0.05$, 图 7), 表明两个小鼠品系间存在显著的代谢差异。

采用 EI MS/MS 和 PCI 确定未知物的经验式

采用 MassHunter 定性分析软件中的 FFA 工具，结合精确质量/高分辨质谱信息与分子式生成工具 (MFG)，有助于确定碎片可能的分子式。然而，EI 中得到的分子离子时常不确定，使确定化合物正确的注释和缩小其分类范围非常困难。使用精确质量 7200 GC/Q-TOF 系统具有诸多优势，其一就是它可以通过 PCI 和 EI 离子化技术，采用 MS 和 MS/MS 获得更多信息。本研究中的一个例子就是相对于对照组，在 10.34 min 时流出的一个未知化合物在吗啡耐受性 129Sv1 小鼠品系进行吗啡给药后逐渐积累，但是在吗啡敏感品系中，它的浓度却没有显著的变化（图 8）。

我们可以对 EI 扫描中产生的离子进行 MS/MS 实验分析，以在 EI 质谱中鉴定高丰度母离子的子离子，从而辨别出可能的干扰物质。通过这种方法，您就可以很容易地滤除较高 m/z 的干扰离子。从图 9 可以看出， m/z 129.1022 和 m/z 72.0808 离子不是作为母离子的 m/z 228.0665 离子的子离子。实际上，虽然 m/z 129.1022 和 72.0808 离子的丰度在两个小鼠品系间是不同的，但是 m/z 228.0665 离子及其子离子的丰度却并不如此，这表明 m/z 228.0665 离子可能属于与未知物共流出的一个不同的化合物。因此，MS/MS 可以帮助我们辨别出质谱中的干扰物质。

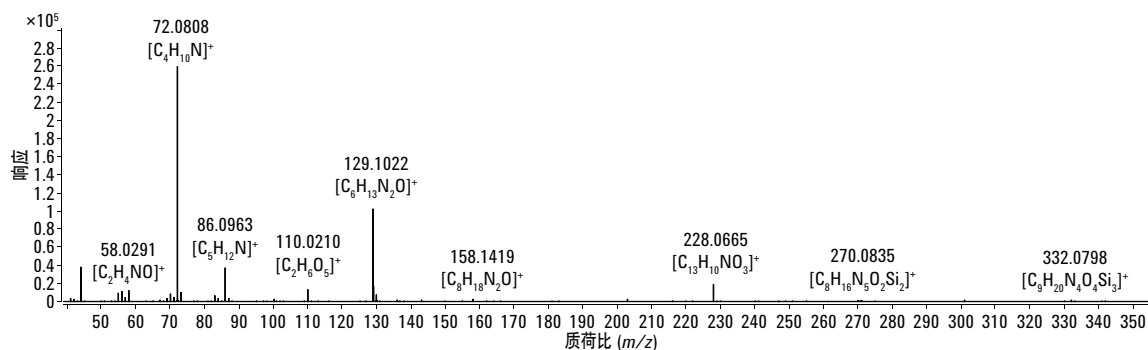


图 8. 在吗啡给药的 129Sv1 小鼠中累积的 10.34 min 流出的未知物峰的 EI 谱图。使用 Agilent MassHunter 定性分析软件的 MFG 工具对质谱峰进行标注

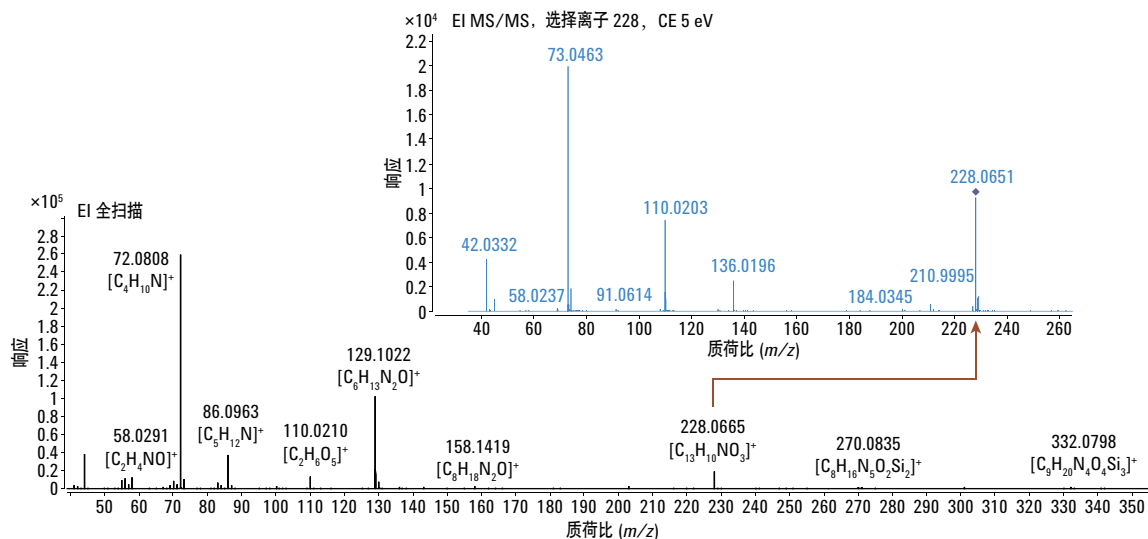


图 9. 利用 Agilent 7200 GC/Q-TOF 系统进行 MS/MS 分析可以在目标峰中发现污染化合物。在这种情况下，谱图中具有最高丰度的两个离子 (m/z 72.0808 和 m/z 129.1022) 明显不是来自离子 m/z 228.0665，说明该离子很可能是一个污染物。比较吗啡给药与对照条件下的结果，通过追踪这些离子的丰度变化，我们证实了这种假设

随后我们使用 MS 模式中的 PCI，甲烷作为试剂气，鉴定出分子离子为 m/z 158.1419 离子，它的甲烷加合物可以帮助我们确定其分子式 ($C_8H_{19}N_2O$ ；图 10)。较高的同位素丰度得分和同位素质量间距得分提高了鉴定结果的可靠性。获得准确的经验式是化

合物鉴定工作流程早期步骤之一，并且它还可以帮助我们确定化合物是否为目标物，或者在本研究的情况下，明确该化合物不是我们研究的重点。

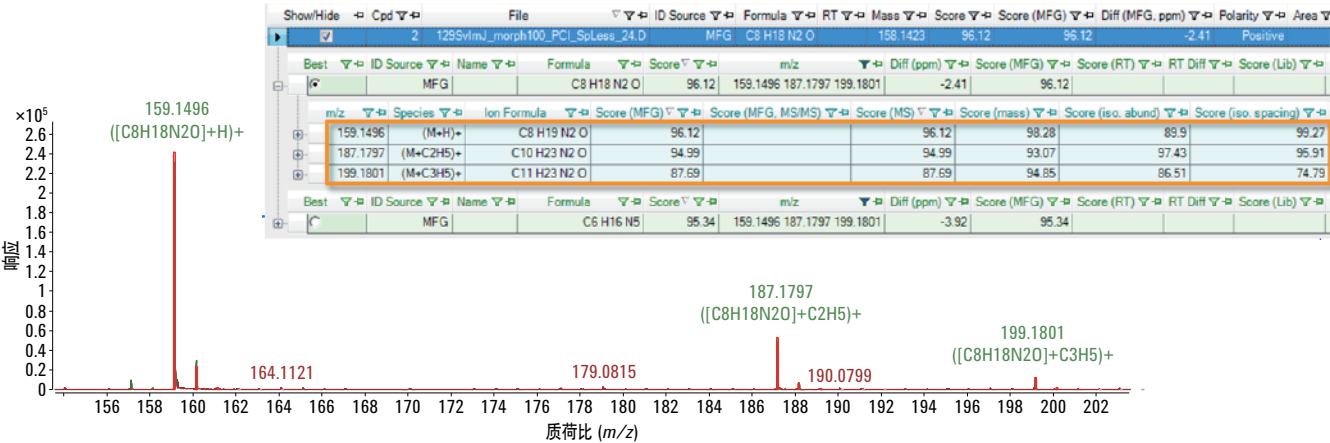


图 10. 10.34 min 流出的未知化合物的甲烷 PCI 质谱数据，确证了该分子离子是 m/z 158.1419，另外，其极高的质量准确度、同位素丰度，以及同位素质量间隔得分也提高了鉴定结果的可靠性。应用 MFG 与 FFA 后，PCI 谱图显示了典型的 m/z 158.1419 PCI 甲烷加合物：159.1496 (M+H)+、187.1797 (M+C₂H₅)⁺ 和 199.1801 (M+C₃H₅)⁺。以红色表示叠加的理论间隔同位素丰度。FFA 工作流程的结果表格显示在质谱图上方

使用分子结构关联工具验证初步鉴定化合物的结构

鉴于吗啡敏感小鼠品系 C57BL/6 中累积的 α -羟谷氨酸是通过使用 NIST 谱库而非 Agilent-Fiehn RTL 谱库得到初步鉴定的, 我们需要采用其他步骤来证实该化合物的鉴定结果。首先, 我们使用 EI 质谱的精确质量信息和 MassHunter 定性分析软件中的 MFG 工具, 证实了 α -羟谷氨酸的经验式与标注的碎片离子是一致的 (图 11)。然后采用 MSC 软件进一步验证初步鉴定化合物的结构

(图 12)。首先, 我们以 CEF 文件的形式将谱图导入 MSC, 在 MSC 中利用精确质量信息预测碎片的分子式。然后, 搜索 ChemSpider 数据库, 找到所有可能的结构异构体。 α -羟谷氨酸以及另外两个结构具有最高的匹配得分 (92.88)。除了高匹配得分, α -羟谷氨酸还比另外两种具有相同得分的结构具有更多的文献参考。虽然这种确证并不是完全明晰的, 但它还是提供了对初步鉴定化合物的进一步验证。

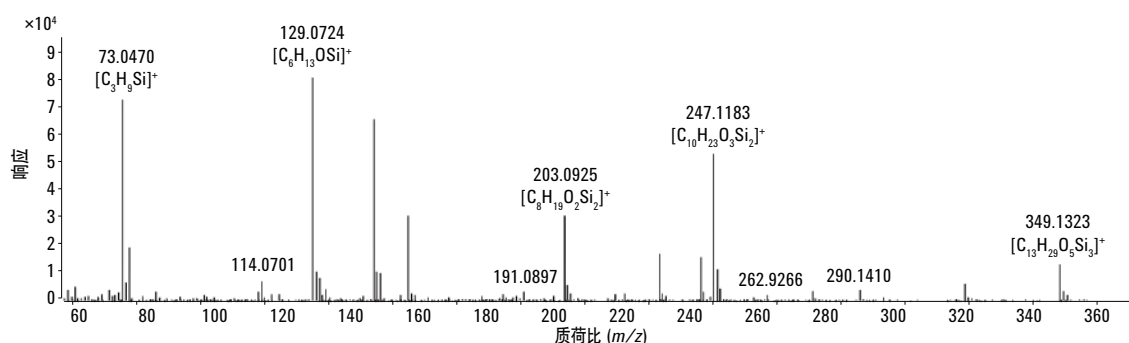


图 11. 采用精确质量信息和 MFG 鉴定可能的碎片分子式, 从而确证了吗啡敏感性品系 C57BL/6 中累积的化合物为 α -羟谷氨酸

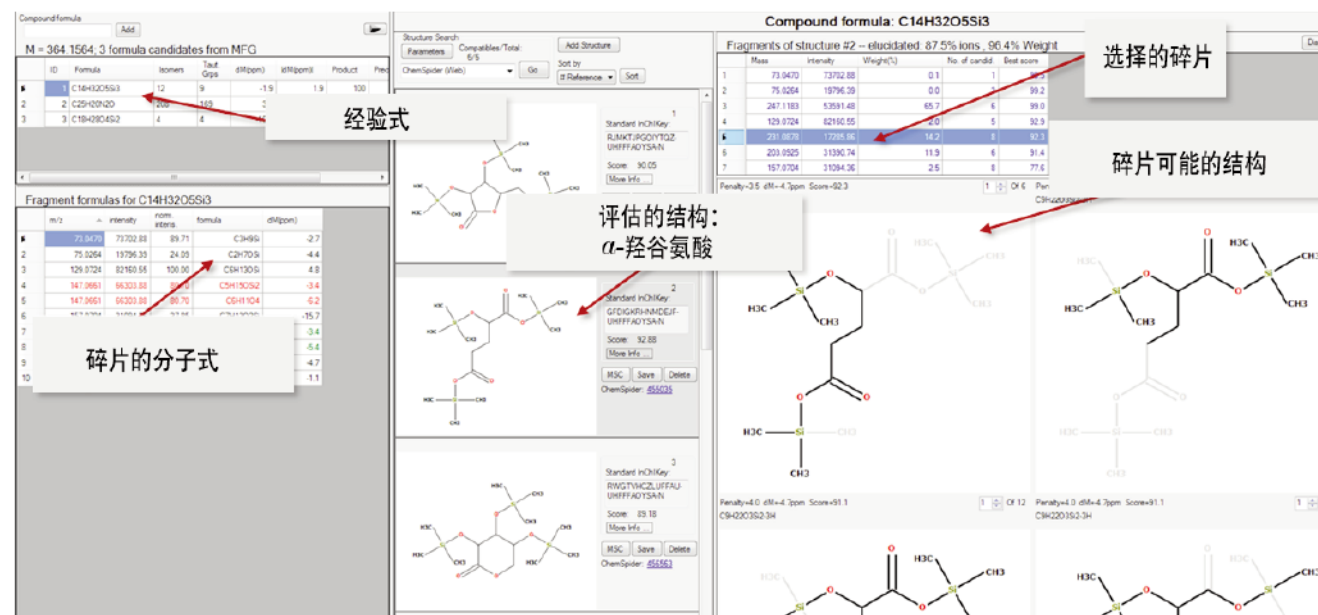


图 12. 使用分子结构关联工具对初步鉴定的化合物 α -羟谷氨酸结构的验证结果。根据相对于所建议分子式的质量误差, 以及需要断裂多少化学键来生成所建议分子式的罚分, 我们对每个单独的碎片离子进行了排序

结论

Agilent 7200 GC/Q-TOF 为代谢组学研究提供了诸多有用的特性，如精确质量信息、全谱模式的高灵敏度、MS/MS 功能，以及在 EI 和 CI 模式间可以轻易切换的能力。众多 Agilent MassHunter 和 Agilent Mass Profiler Professional 软件功能的使用，如解卷积、统计分析、碎片分子式自动标注，以及结构解析等，可以帮助我们鉴定和确证在吗啡敏感性和耐受性小鼠品系中浓度发生变化的代谢物。我们应用 GC/MS 和 LC/MS 方法获得了更完整的代谢组图谱，并且本文结果与以往的 LC/MS 的发现 [3] 相吻合。

参考文献

1. D. N. Juurlink and I. A. Dhalla, "Dependence and addiction during chronic opioid therapy", *J Med Toxicol* 8, 393-399 (2012)
2. W. Linq, L. Mooney, M. Hillhouse, "Prescription opioid abuse, pain and addiction: clinical issues and implications", *Drug Alcohol Rev* 3, 300-305. (2011)
3. D. Liang, G. Liao, J. Wang, J. Usuka, Y. Y. Guo, G. Peltz, J. D. Clark "A genetic analysis of opioid-induced hyperalgesia in mice", *Anesthesiology* 104, 1054-1062 (2006a)
4. S. B. Smith, C. L. Marker, C. Perry, G. Liao, S.G. Sotocinal, J. S. Austin, K. Melmed, J. D. Clark, G. Peltz, K. Wickman, J. S. Mogil, "Quantitative trait locus and computational mapping identifies Kcnj9 (GIRK3) as a candidate gene affecting analgesia from multiple drug classes", *Pharmacogenet Genomics* 18, 231-241 (2008)
5. J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues", *J Biol Chem.* 226, 497-509 (1957)

更多信息

有关我们产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：

www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 6 月 25 日，中国印刷
5991-2481CHCN



Agilent Technologies