

环磷酰胺对小鼠免疫抑制作用过程中代谢通路变化的代谢组学研究

师萱, 阳勇, 秦伟瀚, 徐嘉红, 杨大坚, 郭延垒*

(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

【摘要】 目的 采用代谢组学方法, 研究环磷酰胺对小鼠免疫抑制作用过程中代谢通路的变化。**方法** 采用流式细胞术了解免疫细胞变化情况, 通过建立偏最小二乘法模型多结果进行判别。以偏最小二乘法模型中变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)参数筛选潜在的生物标志物, 通过统计分析确定差异性代谢物, 借助代谢组学小分子化合物快速鉴定分析软件系统对差异性代谢物进行进一步鉴定分析, 通过搜库及运算最终确定差异代谢物质9种, 通路富集结果分析差异代谢通路3条。**结果** 环磷酰胺对正常机体的不饱和脂肪酸的生物合成、线粒体脂肪酸代谢、甘油磷脂代谢、甾类激素的生物合成、花生四烯酸代谢、脂肪酸代谢、嘧啶的生物合成等代谢通路均产生明显影响。**结论** 环磷酰胺在正常组与实验组中影响最重要的代谢通路为花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢和嘧啶代谢。

【关键词】 环磷酰胺; 免疫抑制; 代谢组学; 代谢通路

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2017) 05-0539-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.05.013

Metabolomic analysis of the changes of pathways in immunosuppressive mechanism caused by cyclophosphamide in mice

SHI Xuan, YANG Yong, QIN Wei-han, XU Jia-hong, YANG Da-jian, GUO Yan-lei*

(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

【Abstract】 Objective To investigate the changes of metabolic pathways in the process of immunosuppression in mice caused by cyclophosphamide by metabolomic analysis. **Methods** Flow cytometry was used to detect the changes of immune cells, and the results were analyzed using partial least squares model. The potential biomarkers were screened by variable importance in projection (VIP) parameters in the partial least squares model, and the differential metabolites were determined by statistical analysis. The differential metabolites were identified using the metabolomics rapid identification and analysis software. Nine kinds of metabolites were identified by searching and calculation, and result of pathway enrichment showed three differential metabolic pathways. **Results** Cyclophosphamide had a significant effect on the biosynthesis of unsaturated fatty acids, metabolism of mitochondrial fatty acids, metabolism of glycopospholipid, biosynthesis of steroid hormones, metabolism of arachidonic acid, metabolism of fatty acids, and the biosynthesis of pyrimidine. **Conclusions** The most important metabolic pathways affected by cyclophosphamide in the normal body are the metabolism of arachidonic acid, glycopospholipid and pyrimidine.

【Key words】 Cyclophosphamide; Immunosuppression; Metabolomics; Metabolic pathway

Corresponding author: GUO Yan-lei. Email: guoyanlei1210@cqacmm.com

【基金项目】 重庆市科委应用开发(重大)项目(cstc2014yykfC10004);(cstc2014yykfC10005);重庆市科委基本业务费(2016cstc-jbky-01912);重庆市科委社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2017shmsA130090、cstc2017shmsA130035)。

【作者简介】 师萱, 助理研究员, 研究方向: 食品科学。E-mail: shixuan0932@126.com

【通讯作者】 郭延垒, 助理研究员, 研究方向: 中药药代动力学与代谢组学。E-mail: guoyanlei1210@cqacmm.com

人体依靠由自身细胞免疫和体液免疫组成的强大免疫力,抵御着种类庞大、数量繁多的各种疾病。正常情况下,异物物质侵入机体后,免疫细胞将产生包围、分解、吞噬、消灭和清除作用。但是,过度免疫反应产生的大量免疫细胞和堆积的大量免疫球蛋白,将导致组织损害和器官功能障碍而形成原发性的自身免疫性疾病^[1-3]。

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)作为常用烷化剂类抗肿瘤药物和细胞毒性药物,临床上主要用于治疗肿瘤、自身免疫性疾病和器官移植等,但是环磷酰胺对免疫功能和造血系统存在抑制作用的不良反应,目前临床尚无有效的防治手段。环磷酰胺对处于有丝分裂循环周期的细胞产生破坏和杀灭作用,因此对活化增殖的细胞具有细胞毒性作用,表现为对免疫相关细胞呈现出较强的免疫抑制作用,所以环磷酰胺在免疫抑制研究中常作为阳性对照物,如对细胞免疫、体液免疫和巨噬细胞活性测定研究^[4-6]。

代谢通路的变化研究在疾病发生发展的机制,药物的作用机制研究及阐释中具有重要意义。通过前期研究发现环磷酰胺对小鼠的体液免疫产生明显抑制作用,但是,在体液免疫抑制作用的过程中代谢通路的变化暂无研究。因此,本实验通过环磷酰胺对小鼠的体液免疫产生过程中代谢通路的变化研究,对环磷酰胺在自身免疫性疾病的作用机制等方面的研究具有重要意义^[7,8]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验采用雄性 KM 小鼠 20 只,9 周龄,体重(18 ± 3) g,由重庆市中药研究院实验动物中心提供【SCXK(渝)2012-0006】。饲养于重庆市中药研究院屏障环境中【SYXK(渝)2012-000】。

1.1.2 仪器与试剂

Triple TOF 4600 高分辨质谱系统(美国 AB Sciex 公司);LC-30AD 超高效液相系统(日本 Shimadzu 公司);CytoFLEX 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);Microfuge 20R 高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司);涡旋振荡器(德国 IKA 公司);XS-105 十万分之一精密电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX, 美国 Sigma 公司),甲酸(formic acid, Sigma-Aldrich 公司,批号:56302-10ML),抗体试剂盒(MolCpx FITC MAB

0.5MG 17A2, PERCP-CY5.5 MAB 0.1 MG 1D3; PE MAB 0.2MG GK1.5; CD8A PE-CY5 MAB 0.1MG 53-6.72168; APC MAB 0.1MG 53-7.3; 美国 BD 公司),水、腈、甲醇均为质谱级(美国 Fisher 公司),其他试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

在 SPF 清洁级环境中适应性喂养 3 d 后,将 20 只小鼠随机分为空白对照组和实验组各 10 只,每笼 5 只。实验组按照剂量灌胃给予环磷酰胺 20 mg/kg^[9],空白对照组给予同体积的生理盐水。连续给药 7 d,每天称重,于第 8 天取全血于 EP 管中,静置后离心取血清备用^[10,11]。

1.2.2 全血检测

另取全血,采用流式细胞仪检测 T、B 细胞及亚群等指标,包括 CD3⁺/CD8⁺、CD3⁺/CD4⁺、CD19⁺/CD5⁺、CD19⁻/CD5⁻、CD19⁺/CD5⁻、CD3⁺等指标。

1.2.3 血清样品处理及 QC 样品制备

精密吸收小鼠血清样品 50 μL 置 1.5 mL EP 管中,加入甲醇 150 μL 后于涡旋仪上混匀 2 min,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 3 μL 进样,进行 UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析。另取处理后样品各 20 μL 混合后混匀作为 QC 样品。

1.2.4 Triple TOF 4600 高分辨质谱系统的分析条件

系统选用 Kinetex XB-C18 柱(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm),流动相为含 0.1% 甲酸的超纯水(A)/乙腈(B),采用梯度洗脱程序:起始 B 为 10% 并持续 1.00 min;1.00 ~ 8.00 min B 变为 80%,并持续至 12.00 min;12.01 min B 变为 10% 并持续至 15.00 min。流速为 300 μL/min;柱温为 30℃。

Triple TOF 4600 高分辨质谱系统采用 ESI 离子源,分别采用 Positive 离子化方式和 Negative 离子化方式;质量扫描范围 m/z 100 ~ 1000;鞘气为 55 Psi,辅助气为 55 Psi;气帘气为 25 Psi,雾化温度 600℃,采用 TOF-MS-Product Ion-IDA 扫描模式,TOF/MS 一级预扫描和触发的二级扫描 Product Ion-IDA 离子累积时间分别为 250、100 ms,采用动态背景扣除(DBS)作为二级触发条件,解簇电压 80 V,CE 碰撞能量为 35 eV, CES 碰撞能量叠加为(35 ± 15) eV。

1.3 统计学方法

将所得的原始数据通过 MarkView 软件转化后用进行峰识别、峰对齐、扣除溶剂峰、杂质峰的处理,滤噪等处理,导出的数据表得到由一系列三维矩阵。

统计方法采用 Simaca-P 13.5 软件包中主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 进行多维统计分析。并采用有监督模式和无监督模式的方式判别分析,并借助 HMDB、METLIN、Mass Bank、Meta-bo Analyst、KEGG 等开源数据库进行谱库比对,结合化学模式识别方法,最终判断出生物体的病理生理状态,基因功能可能的改变等,并找出可能与之相关的代谢通路,建立数学模型,进行系统的差异化分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组均数比较采用独立样本 *t* 检验;所有检验水平 $\alpha = 0.05$ (双侧),以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 全血检测结果

T 抑制细胞对体液免疫和细胞免疫起负向调节作用的 T 细胞亚群,T 辅助细胞具有协助体液免疫和细胞免疫的功能。采用流式细胞仪检测 T、B 细胞及亚群等指标发现,实验组与对照组比较,总 T

细胞和 T 辅助细胞上升明显,而 T 抑制细胞出现下降现象;总 B 细胞明显降低,同时,B1 细胞和 B2 细胞均出现下降。说明环磷酰胺对 T 抑制细胞和 T 辅助细胞均产生明显影响,同时对 B1 细胞和 B2 细胞均产生不同程度影响(如表 1 所示)。

2.2 QC 样品检测分析结果

QC 样品检测结果主要用于判断样品数据采集过程中仪器的重现性与稳定性。通过连续 10 次连续进样分析结果可知,UPLC/Q - TOF - MS/MS 质谱系统在连续进样中快速平衡,连续进样至第 10 次重现性良好,适合大批量样品数据采集(如图 1 所示)。

2.3 正常组与实验组代谢组学分析

为了研究将正常组与实验组代谢通路变化,将所得的原始数据通过 MarkView 软件转化后用进行峰识别、峰对齐、扣除溶剂峰、杂质峰的处理,滤噪等处理,导出的数据表得到由一系列三维矩阵,并进行偏最小二乘法(PLS - DA)分析代谢谱变化,研究发现正常组与实验组存在明显差异(如图 2 所示,参数见表 2)。

表 1 流式细胞仪检测结果

Tab.1 The results of flow cytometry analysis

组别 Groups	总 T 细胞 Total T cells	总 B 细胞 Total B cells	T 抑制细胞 Ts cells	T 辅助细胞 Th cells	B1 细胞 B1 cells	B2 细胞 B2 cells	
			CD3 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD19 ⁺ /CD5 ⁺	CD19 ⁺ /CD5 ⁻	
对照组 Control group	均值 Mean	37.39	2.12	25.30	59.08	37.14	3.39
实验组 Model group	均值 Mean	58.21 **	1.04 **	16.92 *	73.44 *	17.84 *	2.35 *

注:实验组比对照组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the CON group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

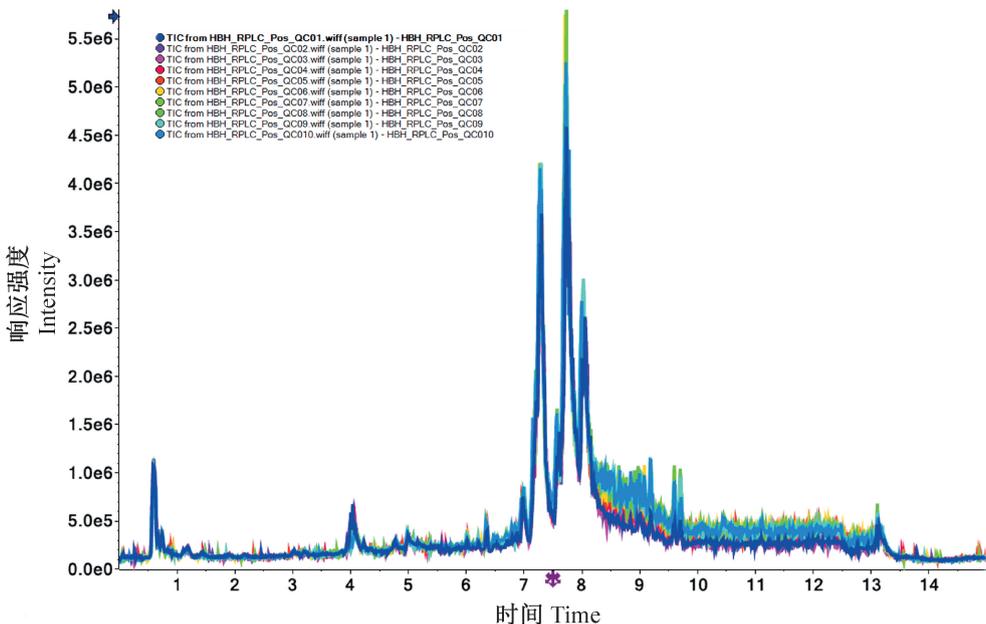


图 1 QC 样品重复十次进样的总离子流叠加图

Fig.1 The overlay chart of TIC spectra of the QC samples repeated ten times

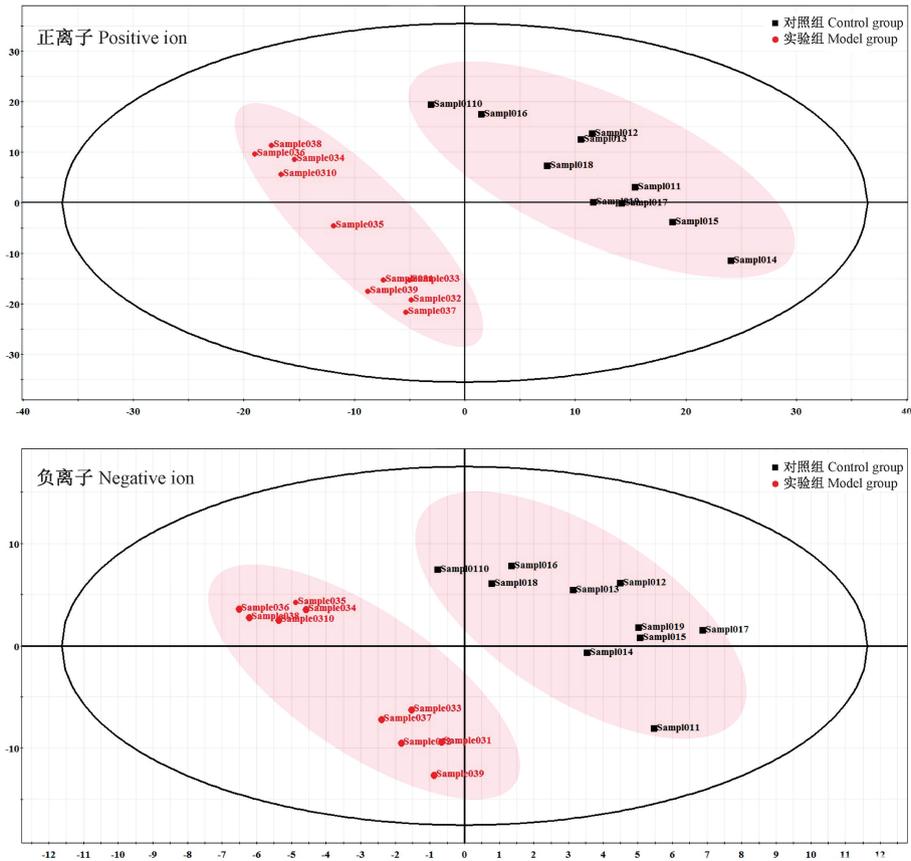


图 2 正负两种离子模式下小鼠血清样品 PLS-DA 分析后的 Score plot 图

Fig. 2 The score plot chart of PLS-DA of mouse serum samples by positive ion and negative ion modes

表 2 正负两种离子模式下小鼠血清样品 PLS-DA 分析结果参数表

Tab. 2 The parameter table of PLS-DA on the mouse serum samples by positive ion and negative ion modes

组别 Groups	R2X	R2Y	Q2
正离子 Positive ion	0.561	0.991	0.938
负离子 Negative ion	0.354	0.917	0.568

2.4 差异物质的解析

正常组与实验组出现明显差异,为了研究造成两组之间的差异性物质,采用 PLS-DA 模型进一步进行处理。PLS-DA 模型中变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)参数筛选潜在的生物标志物, VIP 值是两组中含量显著改变的差异物质的值, $VIP > 1, P < 0.05$ 时,说明对应的代谢物是差异性代谢物。通过代谢组学小分子化合物快速鉴定分析软件系统(OSI/SMMS, 大连达硕信息技术有限公司)对差异性代谢物进行进一步鉴定分析,以 MS1 和 MS2 强度(加权法)进行运算最终鉴定代谢物 15 种。以 $P < 0.05, VIP > 1.00$ 为差异物质判断规则,最终确定差异代谢物质 9 种(如表 3)。

2.5 差异代谢通路富集分析

作为小分子物质,差异性代谢物在机体内多参与

重要功能的调控,为了研究其各自发挥重要作用,借助 KEGG 网络数据库,找出其具体位置,并对各差异性代谢物相关代谢通路运用 Metaboanalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 系统进行通路富集,找出通路之间关联,最终确定正常组与实验组代谢通路的差异与关联(如图 3 所示)。

3 结论与讨论

通过分析发现,环磷酸胺对正常机体的不饱和脂肪酸的生物合成、线粒体脂肪酸代谢、甘油磷脂代谢、甾类激素的生物合成、花生四烯酸代谢、脂肪酸代谢、嘧啶的生物合成等代谢通路均产生明显影响。通过通路富集结果显示,环磷酸胺在正常组与实验组中影响最重要的代谢通路为花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢和嘧啶代谢。

环磷酸胺能抑制免疫细胞,又能抑制骨髓的造血功能,因此对于机体的损害是全身性的毒性作用^[12,13]。环磷酸胺对处于有丝分裂循环周期的细胞产生破坏和杀灭作用,因此对活化增殖的细胞具有细胞毒性作用,表现为对免疫相关细胞呈现出较强的免疫抑制作用,所以环磷酸胺在免疫抑制研究中常作为

阳性对照物, 同时也有报道与代谢组学研究相关研究 是相关研究重点, 因此并未引起足够重视。
中。但是对于环磷酰胺对正常机体的相关研究却不

表 3 差异代谢物质鉴定结果

Tab. 3 Characterization results of the differential metabolites

序号 ID	质荷比 m/z (Da)	中文名 Name	分子式 Formula	P 值 P value	差异变量 VIP	差异确认 Confirmation
1	496.3392	1-十六酰-SN-丙三醇-磷酸胆碱	C24H50NO7P	0.211	1.02	NO
2	457.156	2'-脱氧尿苷	C9H12N2O5	0.0001	1.75	YES
3	303.2313	17- α -甲基睾酮	C20H30O2	0.03	1.06	YES
4	302.3059	DL-二氢鞘氨醇	C18H39NO2	0.007	1.45	YES
5	522.356	油酰磷酸胆碱	C26H52NO7P	0.049	1.08	YES
6	380.2557	鞘氨醇-1-磷酸	C18H38NO5	0.028	1.04	YES
7	391.2844	邻苯二甲酸二异辛酯	C24H38O4	0.026	0.62	NO
8	284.2952	硬脂酰胺	C18H37NO	0.487	0.38	NO
9	305.2475	顺式-8,11,14-二十烷三烯酸	C20H34O2	0.762	0.69	NO
10	283.2644	胆固醇月桂酸酯	C39H68O2	0.481	1.03	NO
11	281.2506	反式-11-十八烯酸	C18H34O2	0.017	1.33	YES
12	279.2345	β -亚麻酸	C18H32O2	0.003	1.02	YES
13	255.2352	棕榈酸	C16H32O2	0.003	1.05	YES
14	303.2337	花生四烯酸	C20H32O2	0.258	1.04	NO
15	307.2647	11,14-二十碳二烯酸 C20:2	C20H36O2	0.019	2.11	YES

注: YES 为最终确定差异代谢物质, NO 为未确定。

Note. "YES" is the metabolic substances for the final differences; "NO" meant not sure.

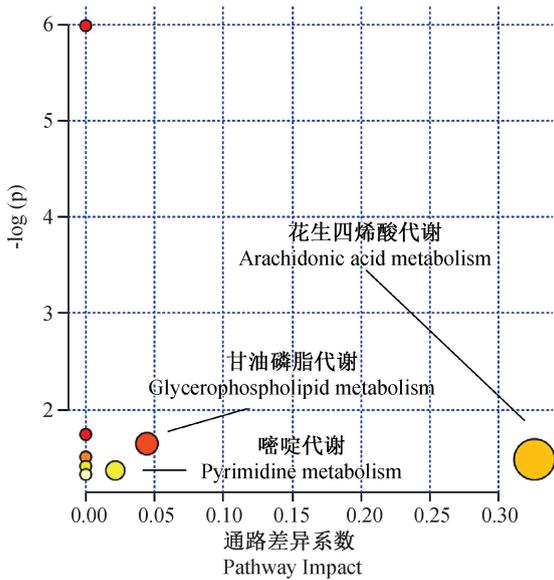


图 3 通路富集分析结果图

Fig. 3 The chart of pathway view analysis results

在本研究中, 环磷酰胺对正常机体产生明显影响, 不仅体现在机体生物学生理指标和免疫细胞的变化, 还通过代谢组学研究深入到相关作用机制的分子水平变化, 对于后期相关研究采用环磷酰胺作为阳性对照物时, 提供相关对照研究结果, 具有一定的借鉴意义。

参 考 文 献

[1] 曹雪涛. 免疫学前沿进展(第三版) [M]. 人民卫生出版社, 2014.
[2] Abul K. 基础免疫学(第四版) [M]. 北京大学医学出版社,

2014.
[3] 周光炎. 免疫学原理(第三版) [M]. 科学出版社, 2013.
[4] 张云波. 环磷酰胺对免疫系统的影响 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(30): 12040-12042.
[5] Blank, N, Lisenko K, Pavel P, et al. Low-dose cyclophosphamide effectively mobilizes peripheral blood stem cells in patients with autoimmune disease [J]. Eur J Haematol, 2016, 97(1): 78-82.
[6] Rosenberg AS, Pariser AR, Diamond B, et al. A role for plasma cell targeting agents in immune tolerance induction in autoimmune disease and antibody responses to therapeutic proteins [J]. Clin Immunol, 2016, 165: 55-59.
[7] 张铎, 徐厚恩. 卫生毒理学基础 [M]. 北京: 北京医科大学, 北京协和医科大学联合出版社, 1990; 219.
[8] Tajti J, Stefani E, Appel SH. Cyclophosphamide alters the clinical and pathological expression of experimental autoimmune gray matter disease [J]. J Neuroimmunol, 1991. 34(2-3): 143-51.
[9] 钟金凤, 方热军. 环磷酰胺免疫抑制机制及在动物模型上的应用 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(10): 1541-1543.
[10] Werth VP. Pulse intravenous cyclophosphamide for treatment of autoimmune blistering disease. Is there an advantage over oral routes? [J]. Arch Dermatol, 1997. 133(2): 229-230.
[11] 邹一贺, 王丽君, 邓慧君, 等. 靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达对溃疡性结肠炎的作用 [J]. 中药实验动物学报, 2016, 24(6): 585-587.
[12] 吕新勇, 周军, 孙晓萍, 等. 人參多糖注射液对环磷酰胺增效减毒作用实验研究 [J]. 中药研究, 2013, 16(6): 1372.
[13] 赵丽. 雷公藤多甙与环磷酰胺治疗难治性肾病综合征的对照观察 [J]. 河北医药, 2009, 31(16): 2160-2161.