



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109164183 A

(43)申请公布日 2019.01.08

(21)申请号 201811147658.X

(22)申请日 2018.09.29

(71)申请人 中国检验检疫科学研究院
地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲3号

(72)发明人 沈国林 李文涛 崔媛 于文莲
李海山 徐宝梁 宋乃宁

(74)专利代理机构 北京兆君联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 11333
代理人 刘俊玲

(51)Int.Cl.
G01N 30/02(2006.01)
G01N 30/72(2006.01)
G01N 30/34(2006.01)
G01N 30/86(2006.01)

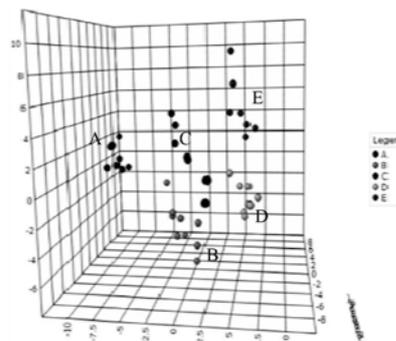
权利要求书2页 说明书7页 附图5页

(54)发明名称

肝脏损伤相关差异性内源性标志物及其筛选方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种肝脏损伤生物标志物,它是以下代谢物中的任意两种以上的组合物:乳酸、LysoPC(16:0)、LysoPC(18:0)或LysoPC(18:1(11Z))。本发明还提供所述肝脏损伤标志物组合物在制备肝脏损伤检测试剂中的应用,以及肝脏损伤标志物的筛选方法。本发明的方法能够筛选出具有较强的灵敏性和特异性的肝脏损伤生物标志物,所述标志物可以在肝脏组织病理尚未出现明显损伤的情况下表现出显著性差异,能够更好的用于肝脏损伤的预防和发现。



1. 一种肝脏损伤生物标志物,它是以下代谢物中的任意两种以上的组合物:乳酸、LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0) 或LysoPC (18:1 (11Z))。

2. 权利要求1所述的肝脏损伤生物标志物,它是以下各组合物中的任意一种:

乳酸和LysoPC (16:0) 的组合物,

乳酸和LysoPC (18:0) 的组合物,

乳酸和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,

LysoPC (16:0) 和LysoPC (18:0) 的组合物,

LysoPC (16:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,

LysoPC (18:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,

乳酸、LysoPC (16:0) 和LysoPC (18:0) 的组合物的组合物,

乳酸、LysoPC (16:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,

乳酸、LysoPC (18:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,

LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,

或者,

乳酸、LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物。

3. 权利要求1或2任意一项所述的肝脏损伤生物标志物,进一步包括2-羟基丁酸、亚油酸、缬氨酸、L-乙酰肉碱、油酸、LysoPC (18:2 (9Z, 12Z))、白胺酸、LysoPC (16:1 (9Z))、LysoPC (20:3 (5Z, 8Z, 11Z)) 中的任意一种或两种以上的组合物。

4. 权利要求1所述的肝脏损伤生物标志物,是缬氨酸 (L-Valine)、LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0)、LysoPC (18:1 (11Z))、乳酸 (Lactic acid)、LysoPC (18:2 (9Z, 12Z))、二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid)、白胺酸 (L-Leucine)、LysoPC (18:3 (6Z, 9Z, 12Z))、油酸 (Oleic acid)、肌酸 (Creatine)、肉毒碱 (L-Carnitine)、LysoPC (17:0)、LysoPC (16:1 (9Z))、LysoPC (20:3 (5Z, 8Z, 11Z))、亚油酸 (Linoleic acid)、LysoPC (20:1 (11Z))、L-乙酰肉碱 (L-Acetylcarnitine)、2-羟基丁酸 (2-Hydroxybutanoic acid) 和花生四烯酸 (Arachidonic acid) 的组合物。

5. 权利要求1所述的生物标志物在制备检测肝脏损伤的试剂盒中的应用,其特征在于:将所述的生物标志物作为检测目标来制备检测肝脏损伤的试剂盒。

6. 检测肝脏损伤的试剂盒,其中含有用于检测权利要求1所述的生物标志物的试剂。

7. 一种肝脏损伤生物标志物的筛选方法,具体包括样品前处理、数据采集、内源性代谢物的鉴定、多元统计数据处理;步骤如下:

1) 按照常规方法处理肝脏样品,使其符合LC-MS/MS²分析进样条件;

2) 将步骤1) 处理后的样品做LC-MS/MS²分析,完成代谢物谱图数据采集,获得代谢物色谱保留时间和质荷比;其中,

使用特征色谱条件为:色谱条件:A流动相为含0.1%甲酸及2mmol/L甲酸铵的水溶液,D流动相为乙腈。肝脏样品测定的梯度洗脱程序:0-1.0min,95%A;1.0-5.0min,95%-40%A;5.0-8.0min,40%-0%A;8.0-11.0min,0%A;11.0-14.0min,0%-40%A;14.0-15.0min,40%-95%A;15.0-18.0min,95%A,分析时间0~18min,每次进样5 μ L,流速为0.25mL/min,色谱柱:ACQUITY BEH C18 1.7 μ m,2.1 \times 50mm,色谱柱温度为30 $^{\circ}$ C,自动进样器的温度保持在4 $^{\circ}$ C;

使用特征质谱条件为:离子源:ESI(±),离子源参数:喷雾电压:3000V;蒸发温度:350℃;毛细管温度:350℃;S-lens RF:50;一级全扫描(Full scan)的分辨率:70000,扫描范围:70-1050m/z;二级数据依赖性扫描(Full MS/dd-MS2):分辨率:17500;AGC target:1e⁵;Maximun TT:50ms;NCE:20,40,60;

3) 针对步骤2)得到的代谢物谱数据进行内源性代谢物的鉴定,建立内源性代谢物的数据库;

4) 对步骤3)建立的内源性代谢物的数据库进行多元统计数据处理,找出肝脏损伤与否的代谢模式差异和明显的分类趋势,最后按照常规方法进行差异代谢物筛选。

8. 权利要求7所述的筛选方法,其特征在于:步骤3)所述的内源性代谢物的鉴定利用高分辨质谱mzCloud获取每一个内源性代谢物的小数点5位的精确质量数,并通过每个内源性代谢物的分子式来识别,再利用Tracefinder软件建立内源性代谢物的数据库。

9. 权利要求7所述的筛选方法,其特征在于:步骤4)所述的多元统计数据处理利用Tracefinder软件建立的数据库自动采集相应内源性代谢物的峰面积,再利用MetaboAnalyst3.0网站分析,绘制PCA和PLS-DA模型图,找出肝脏损伤与否的代谢模式差异和明显的分类趋势,最后根据VIP>1的标准选出具有显著性差异的内源性代谢物。

肝脏损伤相关差异性内源性标志物及其筛选方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种内源性代谢标志物,尤其涉及一种与肝脏损伤相关的差异性内源性标志物,及其筛选方法和在检测肝脏损伤中的应用。

背景技术

[0002] 肝脏又是新陈代谢的重要器官。体内的物质,包括摄入的食物,都会在肝脏内进行重要的化学变化:有的物质经受化学结构的改造,有的物质在肝脏内被加工,有的物质经转变而被排泄体外,有的物质如蛋白质、胆固醇等在肝脏内合成。肝脏可以说是人体内一座化工厂,它担负着几乎所有外来物质的代谢、解毒作用。近年来,肝损伤发病率逐年上升,主要是因为药物所致肝损伤,目前已知有200多种药物可引起不同程度的肝损伤。进入体内的药物大多数在肝脏内通过生物转化,生成无活性的代谢产物而解毒,但是通过细胞色素P450酶系的作用,可以产生有活性的,甚至是有潜在毒性的代谢产物。肝脏已经成为毒性物质损害的主要靶器官。由于肝脏的功能受损是一个隐蔽而长期的过程,目前,血液天冬氨酸氨基转移酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)是常用于检测肝功能的两项指标,但其由于缺乏特异性和敏感性而不能及时地发现肝损伤状况。目前亟需我们建立一种能够早期、准确地评价肝脏损伤的方法,以弥补现有检测方法的不足。

[0003] 代谢组学是研究生物体自身生理病理状态和生物体对外源性物质的生化效应的有力手段,它所关注的是代谢通路中分子量小于1000的小分子代谢物的变化。代谢组学应用核磁共振、液相色谱质谱联用和气相色谱质谱联用等平台来检测内源性代谢物的改变可以跨过广泛的生化通路,强调毒性作用机制并鉴定出肝脏毒性的潜在生物标识物。

[0004] 因此,有必要利用代谢组学技术发现肝脏损伤生物,使肝脏损伤的发现较现有检测方法提前,能够更好地用于肝脏损伤的预防和发现,可以提前进行相关治疗,弥补现有检测方法的不足。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的在于:提供一种肝脏损伤生物标志物,能够有效用于肝脏损伤的预防和发现。

[0006] 本发明的另一个目的在于:提供所述肝脏损伤标志物组合物在制备肝脏损伤检测试剂中的应用。

[0007] 本发明的再一个目的在于:提供一种筛选肝脏损伤标志物的方法及其筛选模型的建立方法,能够筛选出具有较强的灵敏性和特异性的肝脏损伤生物标志物。

[0008] 本发明实现上述目的的方案如下:

[0009] 首先,本发明提供一种肝脏损伤生物标志物,它是以下代谢物中的任意两种以上的组合物:乳酸、LysoPC(16:0)、LysoPC(18:0)或LysoPC(18:1(11Z));

[0010] 具体的组合物可以是:

[0011] 乳酸和LysoPC(16:0)的组合物,

- [0012] 乳酸和LysoPC (18:0) 的组合物,
- [0013] 乳酸和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,
- [0014] LysoPC (16:0) 和LysoPC (18:0) 的组合物,
- [0015] LysoPC (16:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,
- [0016] LysoPC (18:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,
- [0017] 乳酸、LysoPC (16:0) 和LysoPC (18:0) 的组合物,
- [0018] 乳酸、LysoPC (16:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,
- [0019] LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物,
- [0020] 或者,
- [0021] 乳酸、LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0) 和LysoPC (18:1 (11Z)) 的组合物。
- [0022] 本发明优选的肝脏损伤生物标志物,进一步包括2-羟基丁酸、亚油酸、缬氨酸、L-乙酰肉碱、油酸、LysoPC (18:2 (9Z, 12Z))、白胺酸、LysoPC (16:1 (9Z))、LysoPC (20:3 (5Z, 8Z, 11Z)) 中的任意一种或两种以上的组合物。
- [0023] 本发明最优选的所述肝脏损伤生物标志物,是缬氨酸 (L-Valine)、LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0)、LysoPC (18:1 (11Z))、乳酸 (Lactic acid)、LysoPC (18:2 (9Z, 12Z))、二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid)、白胺酸 (L-Leucine)、LysoPC (18:3 (6Z, 9Z, 12Z))、油酸 (Oleic acid)、肌酸 (Creatine)、肉毒碱 (L-Carnitine)、LysoPC (17:0)、LysoPC (16:1 (9Z))、LysoPC (20:3 (5Z, 8Z, 11Z))、亚油酸 (Linoleic acid)、LysoPC (20:1 (11Z))、L-乙酰肉碱 (L-Acetylcarnitine)、2-羟基丁酸 (2-Hydroxybutanoic acid) 和花生四烯酸 (Arachidonic acid) 的组合物。
- [0024] 本发明进一步提供所述的生物标志物在制备检测肝脏损伤的试剂盒中的应用;所述的应用,是将本发明所述的生物标志物作为检测目标来制备检测肝脏损伤的试剂盒。
- [0025] 本发明还提供一种检测肝脏损伤的试剂盒,其中含有用于检测本发明所述的生物标志物的试剂。
- [0026] 本发明还提供一种肝脏损伤生物标志物筛选方法,是利用高分辨质谱建立包括脂肪类、糖类、激素类、神经递质类和脏器损伤相关物质的数据库,建立各类内源性物质的检测方法,利用Tracefinder软件定性分析肝脏样品中的内源性物质,最后利用MetaboAnalyst3.0网站分析肝脏内源性代谢物的差异,绘制PCA和PLS-DA模型图,根据VIP>1选出具有显著性差异的内源性代谢物,作为肝脏损伤的标志性内源性代谢物。
- [0027] 本发明所述的筛选方法具体包括样品前处理、数据采集、内源性代谢物的鉴定、多元统计数据处理;步骤如下:
- [0028] 1) 按照常规方法处理肝脏样品,使其符合LC-MS/MS²分析进样条件;
- [0029] 2) 将步骤1) 处理后的样品做LC-MS/MS²分析,完成代谢物谱图数据采集,获得代谢物色谱保留时间和质荷比;其中,
- [0030] 使用特征色谱条件为:色谱条件:A流动相为含0.1%甲酸及2mmol/L甲酸铵的水溶液, D流动相为乙腈。肝脏样品测定的梯度洗脱程序:0-1.0min,95%A;1.0-5.0min,95%-40%A; 5.0-8.0min,40%-0%A;8.0-11.0min,0%A;11.0-14.0min,0%-40%A;14.0-15.0min,40%-95%A;15.0-18.0min,95%A,分析时间0~18min,每次进样5 μ L,流速为0.25mL/min,色谱柱: ACQUITY BEH C18 1.7 μ m,2.1 \times 50mm,色谱柱温度为30 $^{\circ}$ C,自动进样

器的温度保持在4℃；

[0031] 使用特征质谱条件为：离子源：ESI(±)，离子源参数：喷雾电压：3000V；蒸发温度：350℃；毛细管温度：350℃；S-lens RF:50；一级全扫描(Full scan)的分辨率：70000，扫描范围：70-1050m/z；二级数据依赖性扫描(Full MS/dd-MS2)：分辨率：17500；AGC target： $1e^5$ ；Maximun TT:50ms；NCE:20,40,60；

[0032] 3) 针对步骤2)得到的代谢物谱数据进行内源性代谢物的鉴定，建立内源性代谢物的数据库；

[0033] 4) 对步骤3)建立的内源性代谢物的数据库进行多元统计数据处理，找出肝脏损伤与否的代谢模式差异和明显的分类趋势，最后按照常规方法进行差异代谢物筛选。

[0034] 本发明所述的筛选方法中，步骤3)所述的内源性代谢物的鉴定优选利用高分辨质谱 mzCloud获取每一个内源性代谢物的小数点5位的精确质量数，并通过每个内源性代谢物的分子式来识别，再利用Tracefinder软件建立内源性代谢物的数据库。

[0035] 本发明所述的筛选方法中，步骤4)所述的多元统计数据处理优选利用Tracefinder软件建立的数据库自动采集相应内源性代谢物的峰面积，再利用MetaboAnalyst3.0网站分析，绘制PCA和PLS-DA模型图，找出肝脏损伤与否的代谢模式差异和明显的分类趋势，最后根据VIP>1的标准选出具有显著性差异的内源性代谢物。

[0036] 本发明还提供一种肝脏损伤早期诊断模型的建立方法，具体包括样品前处理、数据采集、内源性代谢物的鉴定、多元统计数据处理；步骤如下：

[0037] 1) 收集不少于100例的肝脏组织样品，每个样品按照常规方法处理至符合LC-MS/MS²分析进样条件；

[0038] 2) 将步骤1)处理后的样品做LC-MS/MS²分析，完成代谢物谱图数据采集，获得代谢物色谱保留时间和质荷比；其中，

[0039] 使用特征色谱条件为：色谱条件：A流动相为含0.1%甲酸及2mmol/L甲酸铵的水溶液，D流动相为乙腈。肝脏样品测定的梯度洗脱程序：0-1.0min,95%A；1.0-5.0min,95%-40%A；5.0-8.0min,40%-0%A；8.0-11.0min,0%A；11.0-14.0min,0%-40%A；14.0-15.0min,40%-95%A；15.0-18.0min,95%A，分析时间0~18min，每次进样5μL，流速为0.25mL/min，色谱柱：ACQUITY BEH C18 1.7μm,2.1×50mm，色谱柱温度为30℃，自动进样器的温度保持在4℃；

[0040] 使用特征质谱条件为：离子源：ESI(±)，离子源参数：喷雾电压：3000V；蒸发温度：350℃；毛细管温度：350℃；S-lens RF:50；一级全扫描(Full scan)的分辨率：70000，扫描范围：70-1050m/z；二级数据依赖性扫描(Full MS/dd-MS2)：分辨率：17500；AGC target： $1e^5$ ；Maximun TT:50ms；NCE:20,40,60；

[0041] 3) 针对步骤2)得到的代谢物谱数据进行内源性代谢物的鉴定，建立内源性代谢物的数据库；

[0042] 4) 对步骤3)建立的内源性代谢物的数据库进行多元统计数据处理，找出肝脏正常的样品与肝脏损伤的样品代谢模式的差异和明显的分类趋势，筛选出肝脏损伤样品中差异性内源性代谢物作为肝脏损伤标志物，并基于这些标志物的数据建立肝脏损伤早期诊断模型。

[0043] 本发明所述的模型建立方法中，步骤3)所述的内源性代谢物的鉴定优选利用高分

辨质谱mzCloud获取每一个内源性代谢物的小数点5位的精确质量数,并通过每个内源性代谢物的分子式来识别,再利用Tracefinder软件建立内源性代谢物的数据库。

[0044] 本发明所述的模型建立方法中,步骤4)所述的多元统计数据处理优选利用Tracefinder软件建立的数据库自动采集相应内源性代谢物的峰面积,再利用MetaboAnalyst3.0网站分析,绘制PCA和PLS-DA模型图,找出肝脏损伤与否的代谢模式差异和明显的分类趋势,根据VIP>1的标准选出具有显著性差异的内源性代谢物,最终基于这些代谢物建立肝脏损伤早期诊断模型。

[0045] 本发明提出前临床缺乏特异性和敏感性发现肝脏损伤的研究方法。本发明通过优化数据采集中的特征色谱和特征质谱条件,使采集到的样本数据更加准确,为进一步的筛选差异性内源性物质奠定基础,再结合高分辨质谱的灵敏度和正负离子全扫描的特点,筛选出的肝脏损伤生物标志物具有较强的灵敏性和特异性。它们可以在肝脏组织病理尚未出现明显损伤的情况下表现出显著性差异,能够更好的用于肝脏损伤的预防和发现。

附图说明

[0046] 图1A是实施例1中动物实验高分辨质谱检测所得正离子全扫描总离子流图。

[0047] 图1B是实施例1中动物实验高分辨质谱检测所得负离子全扫描总离子流图。

[0048] 图1C是实施例1中动物实验高分辨质谱检测所得丙氨酸色谱图。

[0049] 图1D是实施例1中动物实验高分辨质谱检测所得丙氨酸相应的精确质量数和分子式。

[0050] 图2a是实施例1中动物实验肝脏损伤各组多元统计分析的PCA得分图。

[0051] 图2b是实施例1中动物实验肝脏损伤各组多元统计分析的PLS-DA三维得分图。

[0052] 图3A是实施例1中动物实验正常对照组肝脏组织切片图。

[0053] 图3B是实施例1中动物实验3mg/kg TCC灌胃染毒组肝脏组织切片图。

[0054] 图3C是实施例1中动物实验10mg/kg TCC灌胃染毒组肝脏组织切片图。

[0055] 图3D是实施例1中动物实验30mg/kg TCC灌胃染毒组肝脏组织切片图。

[0056] 图3E是实施例1中动物实验90mg/kg TCC灌胃染毒组肝脏组织切片图。

具体实施方式

[0057] 除非特殊定义,本发明描述所用的术语是在有关技术领域中公知的术语。标准的化学符号及缩写符号可以与其全名互换使用。

[0058] 除非特殊指明,本发明所用到但未明确阐述或简单阐述的技术和方法是指本技术领域通常使用的技术和方法,可按照本领域公知的技术和方法进行。试剂盒的使用是根据制造商或供应商提供的说明书进行。

[0059] 实施例1.

[0060] 一种筛选肝脏损伤生物标志物筛选方法,以实验动物的筛选为例,方案如下:

[0061] 1. 试剂:三氯卡班(TCC)购自Sigma-Aldrich公司,75%乙醇购自上海振兴化工厂,色谱级乙腈、甲醇和甲酸购自Sigma-Aldrich公司。

[0062] 2. 动物实验:Male 5-6w old C57BL/6小鼠常规喂养,自由饮水,饲养室光10h,黑暗14h,温度21-25℃,湿度30%-70%,60只小鼠随机分为5组,每组12只,分别为正常对照

组、3mg/kg TCC灌胃染毒组、10mg/kg TCC灌胃染毒组、30mg/kg TCC灌胃染毒组和90mg/kg TCC灌胃染毒组,正常对照组给予等体积的溶媒灌胃,每天1次,连续35天。灌胃35天后,小鼠通过乙醚麻醉后取血,用全自动生化仪检测生化指标(见表1),然后通过二氧化碳吸入法处死小鼠,取出肝脏,并称重肝脏重量(见表2)。部分肝脏用10%福尔马林浸泡用于病理切片,剩余肝脏冻存于液氮中用于代谢组学检测。

[0063] 表1

[0064]

Biochemical indices	Control	3 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
AST (IU/L)	120.5±24.5	91.8±16.8	106.4±23.4	135.4±29.6	120.3±29.0
ALP (IU/L)	117.4±11.0	128.3±13.7	144.9±13.4**	139.8±15.5*	139.1±16.3*
TP (g/L)	53.6±1.2	55.3±2.3	54.4±3.3	58.0±3.5*	57.2±2.9*
GLU (mmol/L)	7.2±2.2	6.6±1.2	5.1±1.1*	6.4±1.9	6.4±1.2
T4 (ng/ml)	9.2±1.2	10.2±2.3	11.0±1.4	10.3±2.2	10.5±3.6
CHE (U/L)	4949.2±189.0	5059.0±406.8	5496.6±487.8*	5608.0±250.3*	5197.6±249.7*

[0065] 表2

[0066]

Group	Body weight(g)	Liver weight(g)	Liver weight index(%)
Control	25.06±1.63	1.10±0.04	4.43±0.33
3 mg/kg	24.51±1.12	1.01±0.12	4.13±0.31
10 mg/kg	23.04±1.11*	0.91±0.07**	3.94±0.33*
30 mg/kg	23.24±1.08*	0.96±0.08**	4.11±0.16*
90 mg/kg	22.98±1.04**	0.99±0.06**	4.15±0.14*

[0067] 3. 肝脏样品的高分辨质谱检测

[0068] 色谱条件:A流动相为含0.1%甲酸及2mmol/L甲酸铵的水溶液,D流动相为乙腈。肝脏样品测定的梯度洗脱程序:0-1.0min,95%A;1.0-5.0min,95%-40%A;5.0-8.0min,40%-0%A;8.0-11.0min,0%A;11.0-14.0min,0%-40%A;14.0-15.0min,40%-95%A;15.0-18.0min,95%A,分析时间0~18min,每次进样5μL,流速为0.25mL/min,色谱柱:ACQUITY BEH C18 1.7μm,2.1×50mm,色谱柱温度为30℃,自动进样器的温度保持在4℃。在电喷雾离子源(ESI)正负离子模式下采集数据,喷雾电压:3000V;蒸发温度:350℃;毛细管温度:350℃;S-lens RF:50;一级全扫描(Full scan)的分辨率:70000,扫描范围:70-1050m/z。二级数据依赖性扫描(Full MS/dd-MS2):分辨率:17500;AGC target:1e⁵;Maximun TT:50ms;NCE:20,40,60。小鼠肝脏样品用超纯水(含50%甲醇)按1:10的质量体积比进行匀浆,取匀浆液50μL,加入含内标的(甲醇:乙腈=1:1)沉淀剂450μL,涡旋混匀60s,13000rpm离心10min,吸取5μL进行测定。正离子内标为普萘洛尔,负离子内标为甲苯磺丁脲。测定得正离子全扫描总离子流图(图1A)、负离子全扫描总离子流图(图1B)、丙氨酸色

谱图(图1C)和丙氨酸相应的精确质量数和分子式(图1D)。

[0069] 4. 数据分析:利用Tracefinder软件建立的数据库自动采集相应内源性代谢物的峰面积,再利用MetaboAnalyst3.0网站分析,绘制PCA得分图(图2a)和PLS-DA模型图(图2b),从图2a、2b可以看出,对照组和TCC各组能够明确分开,说明两组实验动物在代谢模式上表现出了显著性差异并体现出分类趋势。

[0070] 最后根据VIP>1的标准选出如下具有显著性差异的内源性代谢物(见表3)。

[0071] 表3

[0072]

代谢物	VIPvalue	时间(min)	Adduct	m/z
乳酸	5.5899	0.6	M-	89.02441
LysoPC(16:0)	5.3392	7.39	M+	496.33976
LysoPC(18:0)	4.9186	8.21	M+	524.37106
LysoPC(18:1(11Z))	4.3125	7.52	M+	522.35541
2-羟基丁酸	3.7848	0.65	M-	103.04006
亚油酸	3.7552	8.93	M-	279.23295
缬氨酸	3.6482	0.57	M+	118.08625
L-乙酰肉碱	3.5452	0.57	M+	204.12303
油酸	3.2766	9.41	M-	281.24860
LysoPC(18:2(9Z,12Z))	3.1742	6.84	M+	520.33976
白胺酸	2.9105	0.57	M+	132.10190
LysoPC(16:1(9Z))	2.6621	6.83	M+	494.32411
LysoPC(20:3(5Z,8Z,11Z))	2.4632	7.33	M+	546.35514
肌酸	1.2720	0.57	M+	132.07675
LysoPC(18:3(6Z,9Z,12Z))	1.2697	6.7	M+	518.32411
LysoPC(17:0)	1.2477	7.77	M+	510.35541
肉毒碱	1.2231	0.57	M+	162.11246
LysoPC(20:1(11Z))	1.1476	8.34	M+	550.38671
花生四烯酸	1.1214	8.75	M-	303.23295
二十二碳六烯酸	1.1088	8.63	M-	327.23295

[0073]

[0074] 由上表中可见,按照本实施例的筛选方法筛选得到20种与肝脏损伤的内源性代谢标志物,现有研究已经证实这些代谢物与肝脏的多种代谢通路密切相关,其VIP值越大对应肝脏损伤的机率越大,20种标志物中,乳酸、LysoPC (16:0)、LysoPC (18:0) 或LysoPC (18:1 (11Z)) 的VIP 值均高达4.3以上,属于与肝脏损伤高度相关的代谢标志物,其余标志物的VIP值也都高于 1.1,能够对肝脏的损伤起到很好的标志作用。

[0075] 病理研究:小鼠采用二氧化碳吸入法处死后取冲洗干净的肝脏放入10%中性福尔马林溶液中固定,依次经组织修切、石蜡包埋、常规切片、HE染色、酒精梯度脱水、透明、封片进行光学显微镜组织病理学观察,病理学切片如图3A-3E所示,其中图3A体现了正常对照组的肝脏组织微观结构,图3B-图3E体现了不同剂量TCC灌胃染毒组肝脏组织微观结构,各灌胃染毒组呈现出不同程度的肝细胞水肿,验证了肝脏损伤的发生。

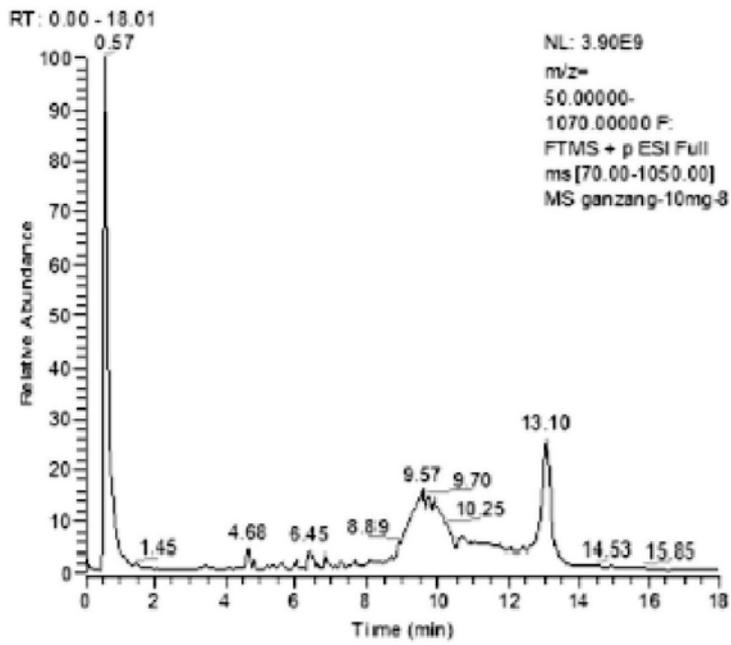


图1A

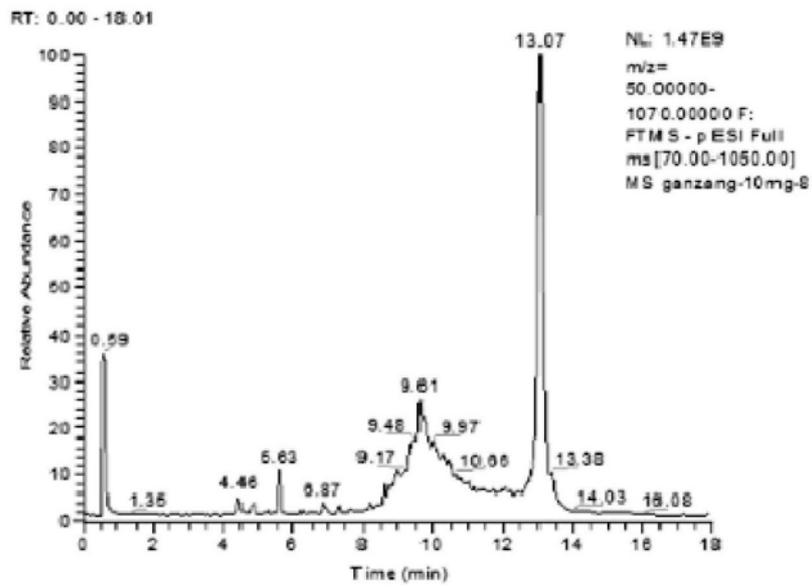


图1B

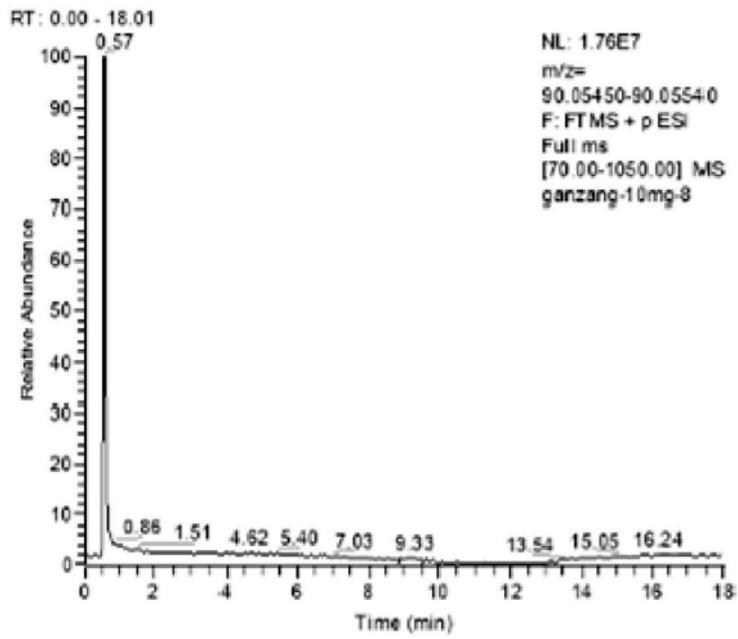


图1C

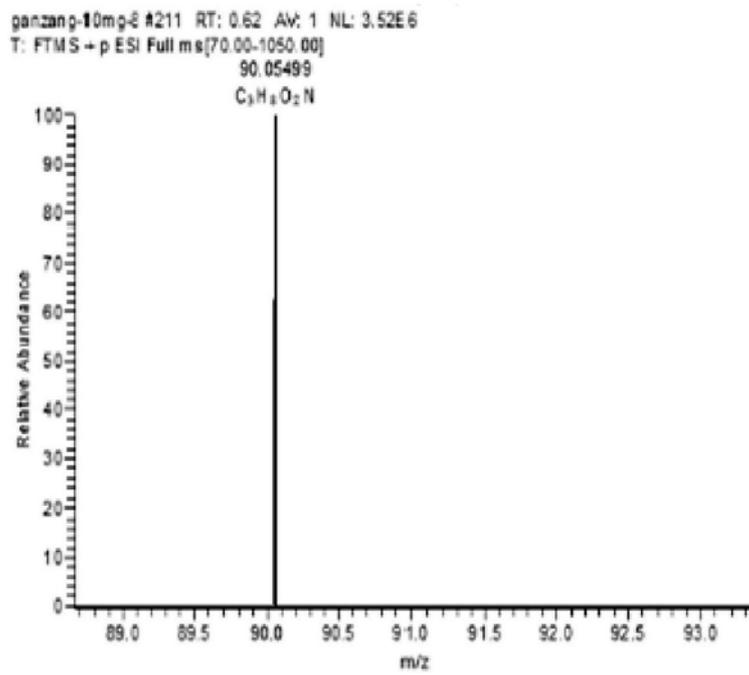


图1D

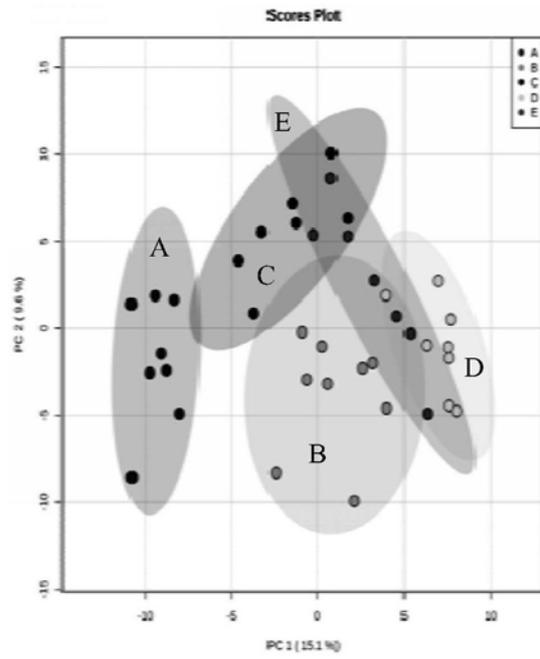


图2a

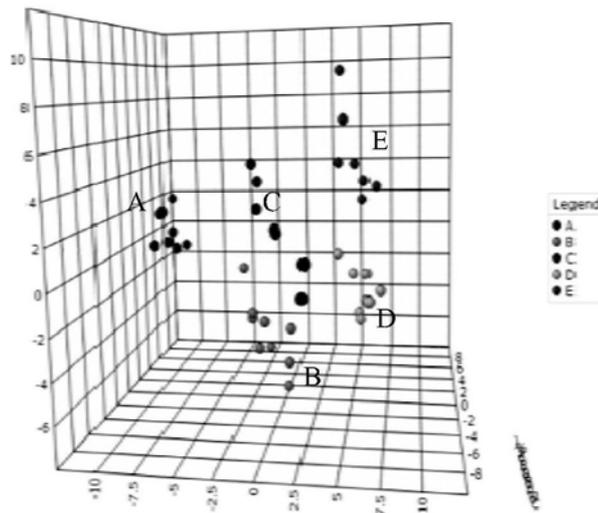


图2b

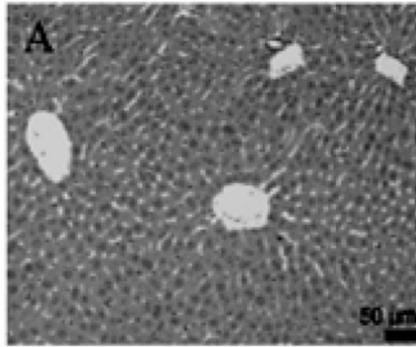


图3A

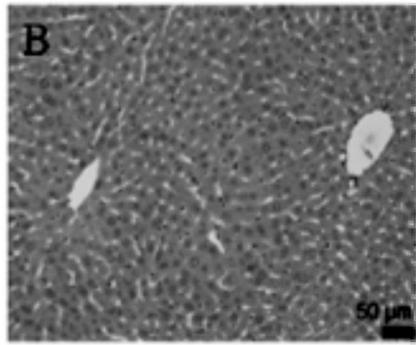


图3B

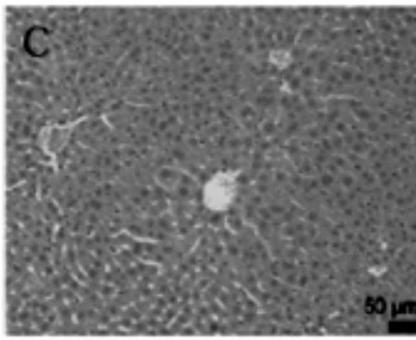


图3C

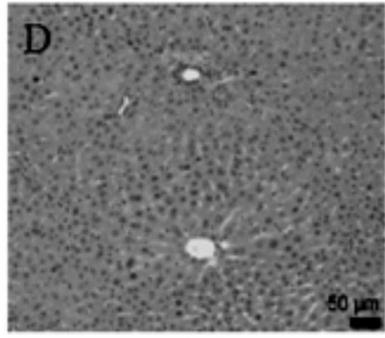


图3D

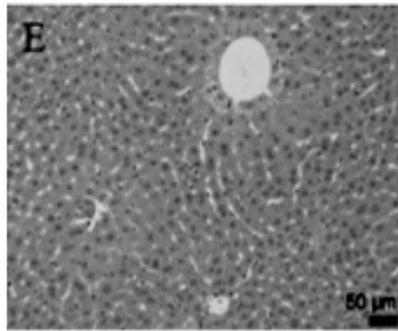


图3E