

甲基苯丙胺使用障碍者戒断期血清代谢组学特征分析

彭素芳 苏杭 陈天真 李晓彤 阮晓璐 赵敏

200030 上海交通大学医学院附属精神卫生中心

通信作者: 赵敏, Email: drzhaomin@sh163.net

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.11.002

【摘要】目的 探索甲基苯丙胺使用障碍者戒断期外周血代谢组学特点。**方法** 2017年7月在上
海市高境强制隔离戒毒所招募戒断期甲基苯丙胺使用障碍者40例, 社会招募健康对照者40名。采用非
靶向气相色谱-质谱联合技术, 检测外周血清中代谢产物。**结果** 甲基苯丙胺使用障碍戒断期患者相
对于健康对照者, 年龄及体重指数(BMI) 差异无统计学意义($P > 0.05$), 但氨基酸代谢通路及嘌呤代谢通
路相关代谢产物发生明显改变[倍数变化(FC) > 1.5 , $P < 0.05$]。**结论** 甲基苯丙胺对外周代谢产生的
影响持续存在, 在戒断期仍可观察到氨基酸代谢及嘌呤代谢通路的异常。

【关键词】 甲基苯丙胺; 使用障碍; 戒断期; 代谢组学; 血清

基金项目: 国家自然科学基金项目(81771436); 国家自然科学基金联合基金重点项目(U1502228);
国家重点研发计划资助项目(2017YFC1310400); 上海市精神卫生中心院级课题(2017-YJ-03)

Analysis of serum metabonomics in patients with methamphetamine induced withdrawal disorder in nervous system Peng Sufang, Su Hang, Chen Tianzhen, Li Xiaotong, Ruan Xiaolu, Zhao Min
Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China
Corresponding author: Zhao Min, Email: drzhaomin@sh163.net

【Abstract】Objective To explore the metabonomics characters of peripheral blood in withdrawal period
of methamphetamine abusers. **Methods** A total of 40 abstinent methamphetamine abusers were recruited from
Shanghai Gaojing Forced Isolation Detoxification Institute, and 40 health controls were recruited from social in
July 2017. Gas chromatography-mass spectrometry technology was used to detect metabolic products in serum.
Results Compared with healthy controls, the age and body mass index (BMI) of abstinent methamphetamine
abusers were not significant different ($P > 0.05$), but metabolic products in amino acid metabolic pathways and
purine metabolic pathways were changed significantly ($FC > 1.5$, $P < 0.05$). **Conclusions** Methamphetamine
abuse influences the metabolic process persistently, amino acid and purine metabolic disturbance still can be
observed in the abstinent period.

【Key words】 Methamphetamine; Use disorders; Abstinence period; Metabonomics; Serum

Fund programs: National Nature Science Foundation of China (81771436); Key Project of National Nature
Science Mutual Foundation (U1502228); National Key Research & Development Plan(2017YFC1310400);
College Subject of Shanghai Mental Health Center (2017-YJ-03)

甲基苯丙胺是一种新型合成的毒品, 是精神兴奋性活性物质, 近年来迅速流行, 已逐渐成为主导毒品。新型毒品更易成瘾, 对中枢神经系统的损伤更为严重, 造成精神性疾病的危险更大。但相对于传统毒品来说, 目前对新型毒品的研究较为薄弱, 缺乏有效的防治措施, 诊断主要依靠症状学及相应的量表, 缺乏客观、准确的诊断标准及预后判断指标。近年来兴起的代谢组学技术, 通过考察生物体

系受刺激或扰动前后代谢产物轮廓及其动态变化, 研究生物体系的代谢网络^[1], 有望为临床的诊断及治疗提供客观的生物标记物。近几年来, 随着代谢组学技术平台的完善, 代谢组学在精神疾病领域, 如精神分裂症、抑郁症、双相情感障碍、阿尔茨海默病等疾病中, 均发现了可作为疾病严重程度及治疗监测的潜在生物标记物^[2-5]。代谢组学的研究在物质成瘾领域尚属起步阶段, 有关物质成瘾的代谢组

学研究不多,且主要以动物为对象进行研究。本研究采用代谢组学的方法,以甲基苯丙胺使用障碍戒断期患者为研究对象进行血清学检测,寻找差异表达的代谢产物,为甲基苯丙胺客观诊断提供新的思路。

对象与方法

1. 研究对象: 选择 2017 年 7 月在上海市高境强制隔离戒毒所接受治疗的男性甲基苯丙胺使用障碍者 40 例作为试验组。入组标准: (1) 符合美国精神病学学会 DSM-5 中甲基苯丙胺中重度使用障碍的诊断标准; (2) 年龄 18~45 岁。排除标准: (1) 既往有颅脑外伤或癫痫发作史; (2) 有心脏起搏器植入或脑内有金属植入物的患者; (3) 有重大躯体疾病、重型精神障碍及其他脑器质性精神障碍的患者。同期在上海地区社会招募 40 名健康人群作为对照组。入组标准: 年龄 18~45 岁, 男性。排除标准: (1) 既往有重大躯体疾病; (2) 患有精神疾病或物质滥用。本研究经上海市精神卫生中心伦理委员会批准, 纳入研究对象均获得患者知情同意。

2. 样品采集及制备: 在清晨空腹条件下, 使用标准血清管, 采取患者静脉血 10 ml, 室温放置 30 min, 4 °C 3000 r/min 离心 10 min (离心机半径 10 cm), 取上层血清 50 μ l, 与 10 μ l 内标混合, 轻微混匀, 加入 200 μ l 预冷的甲醇/氯仿(体积比 3 : 1), 充分混合后, 14 000 \times g, 4 °C 离心 20 min。取 200 μ l 上清液, 装入自动进样玻璃瓶(Agilent Technologies, Foster City, CA, USA)。放入真空离心浓缩仪(Labconco, Kansas City, MO, USA) 中 5 min, 去除氯仿溶剂, 再转移到低温冷冻干燥机完全冻干。完全干燥的样本恢复室温后, 充入高纯氮气保护(Parker Balston, Lancaster, NY, USA), 自动压盖保存, 置于自动衍生平台 XploreMET(MetaboProfile, 上海, 中国) 进行硅烷化衍生。简要步骤如下: 加入 50 μ l 的甲氧胺吡啶溶液(20 mg/ml), 在 30 °C 孵育 2 h 后, 加入 50 μ l 甲基三甲基甲硅烷基三氟乙酰胺(MSTFA) [1% 三甲基氯硅烷(TMCS)] 在 37.5 °C 孵化 1 h。在此衍生过程中, 衍生好的样本由进样臂自动进样。

3. 色谱-质谱条件: 本研究采用基于硅烷化衍生的气相色谱时间飞行质谱联用仪器(gas chromatography-time of flight mass spectrometry, GC-TOFMS) (LECO Corp, St. Joseph, MI, 美国) 作为非靶向代谢组学 XploreMET 的分析色谱质谱仪。GC-TOFMS 的硬电离方式得到的碎片离子使代谢物根据标准品库鉴定准确性更高, 且 GC-TOFMS 经衍生

化后检出的代谢物能覆盖更广的代谢通路; 自动化衍生和物质鉴定的步骤减少了人为操作误差。以氦气为载气, 恒定流速 1.0 ml/min。注入和传输接口的温度均为 270 °C。源温度为 220 °C。升温程序: 起始温度 80 °C, 保持 2 min, 以 12 °C/min 的速度升温至 300 °C, 保持 4.5 min, 40 °C/min 升温至 320 °C, 保持 1 min。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 描述, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 XploreMET 系统软件对代谢组学数据进行处理、解释, 软件中的统计包由 R 语言编写, 对数据进行偏最小二乘法判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PSL-DA)。对数据进行对数转换($\log_2 x$), 基本满足正态分布及方差齐性后, 进行独立样本 *t* 检验。根据倍数变化(fold change, FC) 及 *t* 检验所得的 *P* 值筛选差异性代谢物, 当 $FC > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 时, 提示该代谢物具有统计学意义。使用 NIST 2014 数据库和已有标准品对其进行验证, 并经 MetaboAnalyst 3.0 分析相关代谢通路。使用 XploreMET 软件采用专属算法 hypergeometric 进行代谢通路富集分析(Metabolic Pathway Enrichment Analysis, MPEA), 当富集分析 $P < 0.05$, 影响因子(Impactor factor, IF) > 0.02 时, 提示该代谢通路影响显著。在 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库中查询相关代谢通路, 绘制代谢通路网络关系图。

结 果

1. 研究对象一般情况: 试验组年龄为(35.03 \pm 6.82) 岁, 体重指数(BMI) 为(24.44 \pm 3.64) kg/m²; 对照组年龄为(33.03 \pm 8.57) 岁, BMI 为(23.54 \pm 3.23) kg/m², 两组比较差异无统计学意义($t=1.29, 1.31, P > 0.05$)。

2. GC-TOFMS 分析结果: 见图 1。通过 PLS-DA 分析可见试验组与对照组区别良好, 提示两组被试者外周血清中确实存在代谢差异 [$R^2_x=0.225, R^2_y=0.953, Q^2=0.784; P(R^2_x)=0.001, P(Q^2)=0.001$]。通过 *t* 检验($P < 0.05$) 筛选, 找出差异表达的代谢产物 46 种, 在 KEGG 信息库中查询代谢通路, 能够找到代谢通路差异表达的代谢产物 22 种。

3. 代谢通路分析: 使用 XploreMET 软件采用专属算法 hypergeometric 进行 MPEA。根据通路影响值及 *P* 值得到 5 条显著改变的通路: (1) 精氨酸合成; (2) 丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢; (3) 半胱氨酸

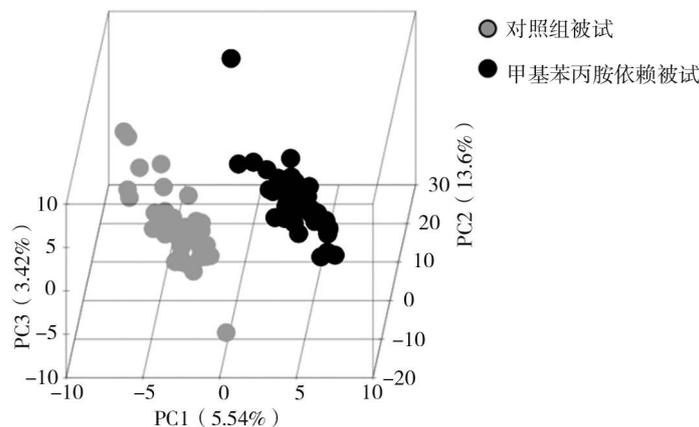


图1 PLS-DA分析图

和蛋氨酸代谢; (4) 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸生物合成、抗坏血酸盐和醛酸代谢; (5) 嘌呤代谢(富集分析 $P < 0.05$, $IF > 0.02$)。在KEGG数据库中查询代谢通路, 得到网络关系图, 见图2(见本期封二)。

讨论

本研究发现, 甲基苯丙胺成瘾患者在戒断期, 外周代谢物的改变主要集中在氨基酸代谢, 最为明显的通路为精氨酸合成通路, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路。此外, 嘌呤代谢通路也发生明显改变。

代谢组学的研究在物质成瘾领域尚属起步阶段, 有关物质成瘾, 尤其是甲基苯丙胺成瘾的代谢组学研究不多, 主要以动物为对象进行研究。能量代谢异常被认为是甲基苯丙胺导致的毒性和成瘾的生化基础^[6-9]。有研究发现甲基苯丙胺的毒性和能量代谢的受损相关^[6]。在苯丙胺给药大鼠的血清中发现了能量代谢的增加。连续5 d给药后, 给药组和对照组之间的差异会变小^[7]。在大脑样本中观察到的结果是矛盾的, 有能量代谢的升高, 也有降低^[8-9]。这些差异可能来源于药物处理的剂量、频率及持续时间的不同。在高剂量、高频率或长时程给药后, 能量的储备可能被耗尽^[7]。本研究招募的甲基苯丙胺成瘾患者基本在戒断2个月左右。故本研究中未发现戒断期患者能量代谢异常, 可能与其能量储备被消耗有关。此外, 苯丙胺可导致神经系统激活和抑制水平下降^[7]。苯丙胺类药物导致血清/血浆中神经递质紊乱, 主要集中在谷氨酸-谷氨酰胺-GABA系统^[7], 中枢神经递质的改变更为多样化^[9-10]。重复的苯丙胺给药导致多种神经递质的紊乱、氧化应激和抗氧化剂的失衡, 以及部分脑区

胶质细胞增生^[8]。本研究中发现丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路异常, 相关代谢产物表达改变明显, 和动物实验结果一致, 说明甲基苯丙胺成瘾在戒断期仍然会导致谷氨酸系统的代谢异常。之前研究发现, 甲基苯丙胺成瘾将导致长期的认知功能损伤, 可能和持续的觅药及高复吸风险有关, 这种认知功能的损伤和前额叶及伏隔核谷氨酸系统功能异常有关^[11]。苯丙胺成瘾大鼠戒断后, 伏隔核区谷氨酸有比较明显的下降^[12], 但前额叶皮层谷氨酸浓度明显升高^[13]。应用磁共振波谱(magnetic resonance spectroscopy, MRS)进行研究发现, 戒断期甲基苯丙胺成瘾患者前额叶皮层谷氨酸水平同样高于健康对照组^[14], 说明谷氨酸系统的功能异常在甲基苯丙胺成瘾的急性期及戒断期持续存在。在本研究中, 戒断期的患者血清中仍能检测到谷氨酸代谢产物的异常, 和前人的结果能够相互印证。Maker等^[15]的研究发现, 使用甲基苯丙胺(1 mmol/L)处理B50大鼠神经母细胞瘤细胞48 h后, 非靶向代谢组学分析结果提示, 氨基酸代谢发生明显改变, 谷氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸升高明显, 和本研究结果部分一致。说明氨基酸代谢的紊乱在急性期及戒断期都持续存在, 外周血清中的代谢产物变化和神经细胞有部分重合。外周代谢产物有作为生物标记物的潜力。

在既往研究中没有明显嘌呤代谢异常的报道, 可能与成瘾戒断及物种差异有关。既往研究基本以啮齿类动物为研究对象, 多集中在急性期, 和戒断期甲基苯丙胺成瘾的人类代谢特点有所差别。

本研究第一次以人为研究对象, 探索甲基苯丙胺成瘾患者在戒断期的外周代谢产物特点。发现甲基苯丙胺能造成成瘾者外周代谢的持续改变, 主要集中在氨基酸代谢和嘌呤代谢途径。其中, 谷氨酸

代谢的异常和既往研究一致,可能和甲基苯丙胺患者长期慢性认知功能损伤有关。代谢组学作为新兴的组学技术,在其他疾病领域广泛开展,有潜力发现外周生物标记物^[16]。本研究采用非靶向代谢组学检测方法,发现在甲基苯丙胺成瘾患者戒断期部分代谢产物的改变,接下来的研究可采用靶向代谢组学方法,验证差异表达的代谢产物。并进一步深入探讨导致谷氨酸代谢异常的可能调控机制,以及成瘾的各个阶段代谢产物特征的改变,为筛选甲基苯丙胺使用障碍的诊断、治疗、预后判断的生物标记物提供新的思路。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 研究设计为彭素芳、赵敏,研究执行为彭素芳、苏杭、陈天真、李晓彤、阮晓璐,数据分析、论文撰写为彭素芳

参 考 文 献

- [1] 许国旺,路鑫,杨胜利.代谢组学研究进展[J].中国医学科学院学报, 2007, 29(6): 701-711. DOI: 1000-503X(2007)06-0701-11.
Xu GW, Lu X, Yang SL. Recent Advances in Metabonomics[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2007, 29(6): 701-711.
- [2] Mouly S, Bloch V, Peoc'h K, et al. Methadone dose in heroin-dependent patients: role of clinical factors, comediations, genetic polymorphisms and enzyme activity[J]. Br J Clin Pharmacol, 2015, 79(6): 967-977. DOI: 10.1111/bcp.12576.
- [3] Zheng P, Fang Z, Xu XJ, et al. Metabolite signature for diagnosing major depressive disorder in peripheral blood mononuclear cells[J]. J Affect Disord, 2016, 195: 75-81. DOI: 10.1016/j.jad.2016.02.008.
- [4] Rodríguez Cerdeira C, Sánchez-Blanco E, Sánchez-Blanco B, et al. Protein biomarkers of mood disorders[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2017, 30(1): 7-12. DOI: 10.1177/0394632016681017.
- [5] Proitsi P, Kim M, Whitley L, et al. Association of blood lipids with Alzheimer's disease: A comprehensive lipidomics analysis[J]. Alzheimers Dement, 2017, 13(2): 140-151. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.08.003.
- [6] Shima N, Miyawaki I, Bando K, et al. Influences of methamphetamine-induced acute intoxication on urinary and plasma metabolic profiles in the rat[J]. Toxicology, 2011, 287(1/3): 29-37. DOI: 10.1016/j.tox.2011.05.012.
- [7] Zheng T, Liu L, Shi J, et al. The metabolic impact of methamphetamine on the systemic metabolism of rats and potential markers of methamphetamine abuse[J]. Mol Biosyst, 2014, 10(7): 1968-1977. DOI: 10.1039/c4mb00158e.
- [8] Bu Q, Lyu L, Yan G, et al. NMR-based metabonomic in hippocampus, nucleus accumbens and prefrontal cortex of methamphetamine-sensitized rats[J]. Neurotoxicology, 2013, 36: 17-23. DOI: 10.1016/j.neuro.2013.02.007.
- [9] McClay JL, Adkins DE, Vunck SA, et al. Large-scale neurochemical metabolomics analysis identifies multiple compounds associated with methamphetamine exposure[J]. Metabolomics, 2013, 9(2): 392-402. DOI: 10.1007/s11306-012-0456-y.
- [10] Adkins DE, McClay JL, Vunck SA, et al. Behavioral metabolomics analysis identifies novel neurochemical signatures in methamphetamine sensitization[J]. Genes Brain Behav, 2013, 12(8): 780-791. DOI: 10.1111/gbb.12081.
- [11] Parsegian A, See RE. Dysregulation of dopamine and glutamate release in the prefrontal cortex and nucleus accumbens following methamphetamine self-administration and during reinstatement in rats[J]. Neuropsychopharmacology, 2014, 39(4): 811-822. DOI: 10.1038/npp.2013.231.
- [12] Nelson CL, Milovanovic M, Wetter JB, et al. Behavioral sensitization to amphetamine is not accompanied by changes in glutamate receptor surface expression in the rat nucleus accumbens[J]. J Neurochem, 2009, 109(1): 35-51. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.05911.x.
- [13] Darna M, Beckmann JS, Gipson CD, et al. Effect of environmental enrichment on dopamine and serotonin transporters and glutamate neurotransmission in medial prefrontal and orbitofrontal cortex[J]. Brain Res, 2015, 1599: 115-125. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.12.034.
- [14] Crocker CE, Bernier DC, Hanstock C, et al. Prefrontal glutamate levels differentiate early phase schizophrenia and methamphetamine addiction: a (1)H MRS study at 3Tesla[J]. Schizophr Res, 2014, 157(1/3): 231-237. DOI: 10.1016/j.schres.2014.05.004.
- [15] Maker GL, Green T, Mullaney I, et al. Untargeted Metabolomic Analysis of Rat Neuroblastoma Cells as a Model System to Study the Biochemical Effects of the Acute Administration of Methamphetamine[J]. Metabolites, 2018, 8(2). DOI: 10.3390/metabo8020038.
- [16] Wang L, Wu N, Zhao TY, et al. The potential biomarkers of drug addiction: proteomic and metabolomics challenges[J]. Biomarkers, 2016; 1-8. DOI: 10.1080/1354750X.2016.1201530.

(收稿日期: 2018-07-16)

(本文编辑: 戚红丹)