

谷氨酸和皮质酮诱导的 PC12 抑郁症细胞模型差异性的¹H NMR 代谢组学研究

何小燕¹, 陈建丽¹, 向欢², 高耀¹, 田俊生^{1*}, 秦雪梅^{1*}, 杜冠华³

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 体育学院, 山西 太原 030006;
3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 应用¹H NMR 代谢组学技术分析皮质酮 (corticosterone, CORT) 和谷氨酸 (glutamate, Glu) 诱导 PC12 细胞后, 细胞及其培养液中代谢产物的变化, 比较诱导后的细胞与空白对照组代谢产物的差异性, 并结合多元统计分析分析和代谢通路分析探讨两种诱导方式所致抑郁症细胞模型的特点, 为抑郁症疾病研究中模型的选择及作用机制研究提供依据。结果显示在 CORT 刺激下, 细胞内外共发现 36 个差异代谢产物; Glu 刺激下细胞内外发现 42 个差异代谢产物。其中, 两种方式刺激后细胞内外相同的差异代谢物分别有 13 个和 19 个。相关性分析结果显示 CORT 刺激下, 丝氨酸和 2-氧基异亮氨酸与多数差异代谢物相关; Glu 刺激下, 乳酸和谷胱甘肽与多数差异代谢物相关; 由此推测, CORT 刺激下, 其影响的主要是脂肪和脂肪酸的转化以及细胞膜结构, 而 Glu 刺激下, 主要对糖酵解过程以及抗氧化过程有影响。

关键词: 代谢组学; 皮质酮; 谷氨酸; PC12 细胞; 抑郁症模型

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0245-08

Comparative study of the corticosterone and glutamate induced PC12 cells depression model by ¹H NMR metabolomics

HE Xiao-yan¹, CHEN Jian-li¹, XIANG Huan², GAO Yao¹, TIAN Jun-sheng^{1*},
QIN Xue-mei^{1*}, DU Guan-hua³

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. Physical Education Departments, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: This study was designed to analyze the change of metabolites in the PC12 cells and its medium induced by corticosterone (CORT) and glutamate (Glu) by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) metabolomics. The multivariate statistical analysis was employed to identify the difference between control groups and induced groups, respectively. In addition, metabolite pathway analysis was performed to explore the characteristic of CORT-induced and or Glu-induced PC12 cells depression model, and to provide the references for the selection of *in vitro* depression models as well as the further understanding of the mechanism on depressive disorders. We found 36 differential metabolites in CORT-induced PC12 cells and medium and 42 in Glu-induced PC12 cells. Furthermore, correlation analysis results show that serine and 2-oxoisoleucine

收稿日期: 2016-06-04; 修回日期: 2016-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81441096); 山西省科技计划资助项目 (201603D321077); 山西省科技创新重点团队资助项目 (201605D131045-18); 山西省重点实验室资助项目 (201605D111004).

*通讯作者 Tel: 86-351-7019297, Fax: 86-351-7018379, E-mail: jstian@sxu.edu.cn; qinxm@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0543

were associated with most differential metabolites in CORT-induced PC12 cells. Lactate and glutathione were significantly correlated to the vast majority of differential metabolites in Glu-induced PC12 cells. We speculated that CORT-induced PC12 cell models may affect the fatty acid metabolism and cell membrane structure, and Glu-induced PC12 cell models may have a difference in the glycolysis and antioxidants.

Key words: metabolomics; corticosterone; glutamate; PC12 cell; depression

抑郁症是一种常见的精神障碍,以持续的情绪低落为主要特征。据世界卫生组织 (WHO) 统计有超过 3.5 亿的人群遭受过抑郁症^[1]。抑郁症不仅会影响人的情绪与心理状态,而且会导致人的认知功能损伤^[2]。抑郁症的发生不仅显著降低了患者的生存质量,而且给患者及其家庭、社会带来了巨大的经济压力^[3]。

尽管抑郁症给人类带来了巨大的负担,但其发病机制仍未完全阐明。疾病机制的研究离不开模型,抑郁症动物模型已较为成熟^[4],而体外细胞模型尚不完善。本实验室前期已采用代谢组学技术从临床样本^[5]、动物模型^[6]、药物干预^[7]等方面对抑郁症及抗抑郁中药进行了一系列研究,为从多层次全面研究抑郁症,本实验室拟对抑郁症细胞模型进行研究。

目前体外实验中常用于建立抑郁症模型的有 PC12 细胞^[8]、SH-SH5Y 细胞^[9]、原代培养的神经细胞^[10]等。PC12 细胞来源于褐家鼠肾上腺髓质嗜铬瘤,具有神经内分泌细胞的一般特征。由于 PC12 细胞具有操作简单、容易获得等特点,使其在抑郁症研究中应用广泛^[11]。建立 PC12 抑郁症细胞模型时常用的刺激包括谷氨酸 (glutamate, Glu)^[11]和皮质酮 (corticosterone, CORT)^[12]等。

Glu 是主要的内源性兴奋性神经递质之一,其在中枢神经系统中起重要作用。谷氨酸循环障碍与抑郁症的发生发展有密切关系^[13]。Glu 与胱氨酸 (cystine, Cys) 两者通过偶联转运, Cys 在细胞内迅速被还原成半胱氨酸,一部分参与细胞内重要自由基清除剂谷胱甘肽的合成,另一部分则出胞氧化成 Cys,重新参与 Glu-Cys 系统循环。而 Glu-Cys 转运功能依赖于 Glu 及 Cys 跨膜浓度差高低,高浓度的 Glu 可使得 Cys 摄取被阻滞,造成自由基堆积,广泛攻击细胞超微结构,尤其是线粒体,介导后续反应,导致神经细胞损伤乃至死亡。此外,高浓度 Glu 过度刺激谷氨酸受体会导致 Ca^{2+} 超载,过量 Ca^{2+} 沉积在线粒体,干扰线粒体呼吸链功能,氧自由基生成增多,使得膜通透性增强, Ca^{2+} 过度也可激活细胞内信号传导系统导致细胞功能紊乱而发生损伤^[14, 15]。

CORT 是糖皮质激素 (glucocorticoids, GC) 的一种,是 HPA 轴 (hypothalamic-pituitary-gonadal, HPA) 的终末产物, CORT 浓度的显著增加可导致神经元损伤,发生抑郁样行为^[16]。已有研究表明多数抑郁症患者 HPA 轴功能过度激活,而 HPA 轴的亢进与应激有重要关系,长期应激状态下, HPA 轴持续激活使得体内 GC 含量增加,促使神经胶质细胞释放 Glu,从而引起神经元细胞损伤或凋亡。此外, GC 与糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 结合,使其活化,促使神经元生存的基因表达下调和促进神经元凋亡基因表达上调,导致神经元细胞发生凋亡^[17]。

由此可见, Glu 与 CORT 诱导神经元细胞损伤的机制有相似之处也有不同之处,已有研究中两种刺激方式均有使用,但二者所致的抑郁症模型是否有差异、细胞内外代谢产物有何异同、哪一种与临床抑郁症疾病的发生发展更为接近,目前尚不清楚。本研究旨在以 PC12 细胞为研究对象,采用 ¹H NMR 代谢组学及代谢通路分析技术对 Glu 和 CORT 诱导所致的抑郁症细胞模型的差异代谢物进行比较分析,探寻两种诱导方式所致抑郁症细胞模型的差异和特点,为合理选择体外细胞模型提供依据。

材料与方法

材料 PC12 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库 (中国上海), RPMI 1640 培养液、胎牛血清 (Hyclone, Logan, USA), 胰蛋白酶 (北京索莱宝科技有限公司), CORT (中国成都化夏化学试剂有限公司), Glu (中国上海生工生物工程有限公司), 重水 (美国默克试剂), 2,3,3-三甲基甲硅烷基丙酸 (TSP) (美国默克试剂), 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4)。

实验仪器 细胞培养箱 (中国力申科学仪器有限公司), 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司), SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机和超声波细胞粉碎机 UP-250 (宁波新芝生物科技股份有限公司), Bruker 600 MHz Avance III NMR 谱仪 (德国布鲁克公司)。

细胞培养与收集 PC12 细胞生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 接种等量的细胞于 175 cm^2 的培养瓶中培养。当细胞生长至 60% 时, 分别采用 $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORT 和 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu 刺激 36 h (空白组除外)。细胞计数后, 分别收集 6 个培养瓶中的细胞和培养基。培养液置于 50 mL 离心管中, $1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集上清液, 液氮中速冻, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。0.25% 的胰蛋白酶消化至细胞皱缩变圆后加入等量血清终止消化, $1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后, PBS 洗涤沉淀 2 次, 离心后将细胞沉淀于液氮中速冻, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

细胞及培养液 ^1H NMR 分析 参考文献^[18], 取出细胞和培养液置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中, 使其融化。培养液提取方法为取 2 mL 培养液直接于 5 mL EP 管中冻干。细胞提取方法为: 反复冻融细胞 5 次后, 加入甲醇-水 (1:2) 1 mL , 于冰上超声破碎 15 min (超声设置为运行 5 s, 停顿 9 s), $4\text{ }^\circ\text{C}$ $13000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清后向沉淀中加入甲醇水溶液 1 mL , 重复上述操作, 收集两次上清液于 5 mL EP 管中冻干。

细胞和培养液冻干后加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 重水配制的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4), 其中分别含有 0.005% 和 0.02% TSP, $4\text{ }^\circ\text{C}$ $13000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清于 5 mm NMR 管中进行测试。所有样品均于 Bruker 600 MHz Avance III NMR 谱仪上测试完成。采用 NOSEY 序列测试, 弛豫延迟 320 ms, 谱宽 12019.12 Hz , 扫描次数为 64 次。

^1H NMR 图谱采用 MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain) 软件进行处理。以 TSP 校准化学位移 (TSP 0 ppm), 校准相位和基线后, 谱图中 δ 4.76~4.82 ppm 处切除残留水峰, 并以 0.01 ppm 对谱图 δ 0.70~9.00 ppm 进行分段积分, 以总峰面积进行归一化后生成 Excel 数据文件, 将其导入 SIMCA-P (Version 13.0, Umetric, Sweden) 软件中进行多元统计学分析, 根据 $P<0.05$ 和 $\text{VIP}>1$ 筛选出差异代谢物。

进一步将差异代谢产物峰面积采用皮尔森相关系数分析细胞内外代谢物的相关程度。为分析两种刺激方式对代谢通路的影响, 将差异代谢物导入 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst>) 中进行差异通路分析, 分析结果中每条通路的影响值 (impact value, IV) 用来评价和差异代谢物的相关性, $\text{IV}>0.1$ 的通路被认为其与诱导损伤的相关性较高。

结果

1 图谱指认与分析

图 1 为细胞 (A) 及培养液 (B) 的 ^1H NMR 图谱, 参考文献并应用 Chenomx NMR suit 软件 (Chenomx Inc, Edmonton, AB, Canada, version 7.5) 以及 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 数据库对图谱中的主要化学成分进行指认, 结果见表 1。

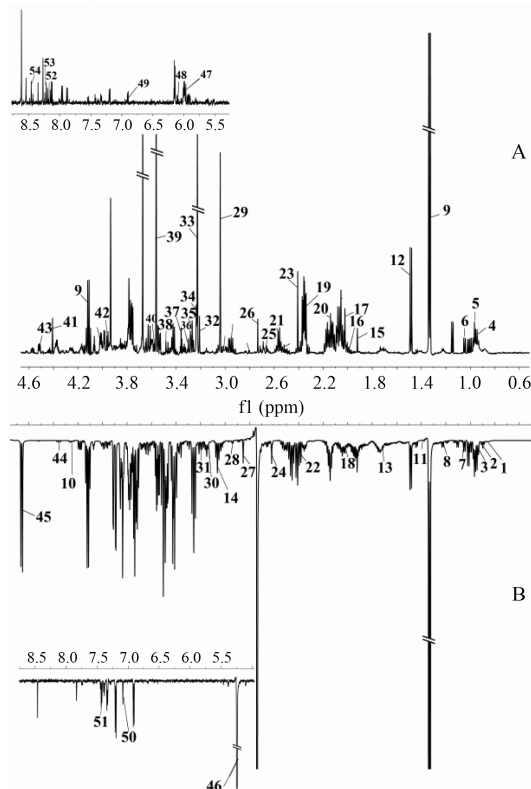


Figure 1 Typical ^1H NMR spectrum of PC12 cells (A) and medium (B). The metabolites labeled with numbers are listed in Table 1

2 多元统计分析

运用 SIMCA-P 软件对积分数据进行处理, 采用有监督的 PLS-DA 对所有样本进行 ^1H NMR 代谢轮廓分析, 结果见图 2 (PLS-DA 模型参数分别为 a: $R^2X=0.698$, $R^2Y=0.999$, $Q^2Y=0.993$; b: $R^2X=0.824$, $R^2Y=0.996$, $Q^2Y=0.993$; c: $R^2X=0.668$, $R^2Y=0.997$, $Q^2Y=0.981$; d: $R^2X=0.824$, $R^2Y=0.996$, $Q^2Y=0.567$)。由图 2 可知, 空白组和两种模型组的细胞与培养液均沿 $t[1]$ 轴明显分开, 表明 CORT 和 Glu 刺激 PC12 细胞后, 对细胞的正常代谢均产生了比较显著的影响。进一步对 PLS-DA 进行模型验证, 累积 200 次的 R^2 和 Q^2 都低于原始值, Q^2 在纵轴上的截距为负值, 表明所建立的参数模型未发生过拟合, 故 PLS-DA 散点图的模型验证成立, 结果可靠。

Table 1 Chemical shift and multiplicity of identified metabolites from cells extracts (C) and medium extracts (M)

No.	Metabolite	Group	δ_{H} /ppm (<i>J</i> in Hz)	Sample
1	Lipid-CH ₃		0.82	M
2	2-Oxoisoleucine	γ CH ₃ , α CH ₃	0.90 (t, 6.0), 1.10 (d, 6.0)	M
3	2-Oxoleucine	CH ₃ , CH ₂	0.93 (d, 6.0)	M
4	Isoleucine	δ CH ₃ , γ CH ₃	0.94 (t, 6.6), 1.01 (t, 7.2)	C, M
5	Leucine	δ CH ₃ , δ CH ₃	0.96 (d, 6.6), 0.97 (d, 6.0)	C, M
6	Valine	γ CH ₃ , γ CH ₃	0.99 (d, 7.2), 1.04 (d, 7.2)	C, M
7	2-Oxovaline	CH ₃	1.12 (d, 6.0)	M
8	3-Hydroxybutyrate	CH ₃	1.21 (d, 6.0)	M
9	Lactate	CH ₃ , CH	1.33 (d, 6.6), 4.11 (q, 7.2)	C, M
10	Threonine	γ CH ₃ , α CH, β CH	1.33 (d, 6.6), 3.59 (d, 4.8), 4.26 (m)	M
11	Lipid-CH ₂ -		1.40	M
12	Alanine	β CH ₃ , α CH	1.48 (d, 7.2), 3.78 (d, 7.2)	C, M
13	Lysine	δ CH ₂ , β CH ₂ , ϵ CH ₂ , α CH	1.72 (m), 1.90 (m), 3.01 (t, 9.0), 3.74 (t, 7.2)	M
14	Ornithine	δ CH ₂ , δ CH ₂ , γ CH ₂ , ϵ CH ₂ , β CH	1.75 (m), 1.85 (m), 1.94 (m), 3.06 (t, 7.8)	M
15	Acetate	CH ₃	1.92 (s)	C, M
16	Proline	γ CH ₃ , β CH ₂ , δ CH ₂ , δ' CH ₂ , α CH	2.01 (m), 2.07 (m), 3.34 (m), 3.45 (m), 4.13 (m)	C
17	<i>N</i> -Acetylaspartate	CH ₃ , CH ₂ , CH ₂	2.02 (s), 2.49 (dd, 10.2, 15.6)	C
18	Pyroglutamate	Half β CH ₂ , γ CH ₂ , Half β CH ₂ , α CH	2.04 (m), 2.42 (m), 2.52 (m), 4.18 (dd, 3.6)	M
19	Glutamate	β CH ₂ , β' CH ₂ , γ CH ₂ , α CH	2.09 (m), 2.10 (m), 2.36 (m), 3.77 (m)	C, M
20	Methionine	CH ₃ , δ CH ₂	2.14 (s), 2.64 (t, 7.8)	C, M
21	Glutathione	Glu β , Glu γ , Cys β , Cys α	2.16 (m), 2.56 (m), 2.94 (m)	C
22	Pyruvate	β CH ₃	2.38 (s)	M
23	Succinate	CH ₂	2.41 (s)	C, M
24	Methylamine	CH ₃	2.62 (s)	M
25	Aspartate	β CH ₂ , β' CH ₂	2.68 (q, 9.0), 2.82 (dd, 3.6, 17.4)	C, M
26	Dimethylamine	CH ₃	2.73 (s)	C, M
27	Methylguanidine	CH ₃	2.85 (s)	M
28	Asparagine	γ CH ₂ , γ CH ₂ , β CH	2.87 (q), 2.95 (dd), 4.01 (q)	M
29	Creatine	CH ₃ , CH ₂	3.04 (s), 3.93 (s)	C
30	Ethanolamine	α CH ₂ , β CH ₂	3.15 (t, 7.2), 3.83 (t)	M
31	Cystine	γ CH ₂ , γ CH ₂ , β CH	3.19 (q), 3.39 (dd), 4.41 (q)	M
32	Choline	N(CH ₃) ₃	3.21 (s)	C
33	<i>O</i> -Phosphocholine	N(CH ₃) ₃	3.22 (s)	C
34	Sn-glycerol-3-phosphocholine	N(CH ₃) ₃	3.23 (s)	C
35	Taurine	CH ₂ SO ₃ , NCH ₂	3.25 (t, 6.0), 3.43 (t, 6.0)	C
36	Myo-inositol	C5H, C1,3H, C4,6H, C2H	3.28 (t, 9.0), 3.54 (dd, 3, 6.6), 3.63 (t, 9.6), 4.07 (t, 3.0)	C, M
37	Methanol	CH ₃	3.36 (s)	C, M
38	Methyl phosphate	CH ₃	3.47 (d, 10.2)	C
39	Glycine	CH ₂	3.56 (s)	C, M
40	Glycerol	β CH ₂ , β' CH ₂	3.56 (dd, 9.6, 3.6), 3.eny5 (dd, 11.4, 4.2)	C, M
41	1,3-Dihydroxyacetone	β CH ₂ , β' CH ₂	3.58 (s), 4.41 (s)	C
42	Serine	β CH, γ CH ₂ , γ' CH ₂	3.84 (dd), 3.95 (q, 3.6), 3.99 (dd, 3.6, 8.4)	C, M
43	Adenosine monophosphate	C5H-ribose, C4H-ribose, C3H-ribose, C1H-ribose, CH-ring, CH-ring	4.01 (m), 4.37 (m), 4.51 (m), 6.14 (m), 8.27 (s), 8.61 (s)	C
44	<i>trans</i> -4-Hydroxy-l-proline	4CH	4.36 (q)	M
45	β -Glucose	β C1H	4.65 (d, 1.2)	C, M
46	α -Glucose	CH	5.23 (d, 3.0)	C, M
47	Uridine diphosphate	C1H-ribose, CH-ring, CH-ring	5.96 (s), 5.97 (d), 7.97 (d)	C
48	Inosine	CH-ribose, CH-ring, CH-ring	6.11 (d, 6.0), 8.24 (s), 8.35 (s)	C
49	Tyrosine	C3,5H-ring, C2,6H-ring	6.91 (d, 8.4), 7.19 (d, 4.2)	C, M
50	Histidine	5CH, 3CH	7.08 (s), 7.38 (s)	M
51	Phenylalanine	2CH, 4CH, 3CH	7.33 (m), 7.38 (m), 7.43 (m)	M
52	Oxypurinol	CH	8.18 (s)	C
53	Hypoxanthine	N-(2)CH=N, N-(7)CH=N	8.2 (s), 8.22 (s)	C
54	Formate	CH	8.46 (s)	C, M

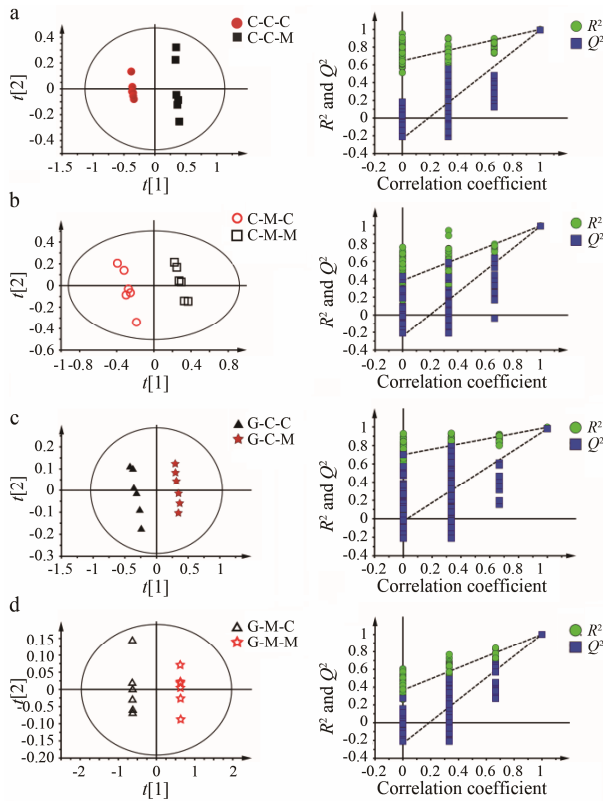


Figure 2 PLS-DA scores plot (left) and PLS-DA validation plot (right). a: CORT-induced PC12 cell vs control; b: CORT-induced PC12 cell medium vs control; c: Glu-induced PC12 cell vs control; d: Glu-induced PC12 cell medium vs control. C/G: CORT/Glu; C/M: cell/medium; C/M: control/model, eg. C-C-M: CORT-induced PC12 cell group

为了进一步发现两种抑郁症模型的异同, 经过 PLS-DA 分析, 得到 VIP 值, 选出 VIP>1 的代谢产物, 并将这些代谢产物的峰面积导入 Excel 软件进行 *t*-test ($P<0.05$) 筛选出差异代谢物, 结果见表 2。

由表 2 可知, 在 CORT 刺激下, 细胞内发现 15 个差异代谢产物, 培养液中 21 个; 在 Glu 刺激下细胞中发现 16 个差异代谢产物, 培养液中 26 个。其中, 两种方式在细胞内外相同的差异代谢物分别为 13 个和 19 个。

3 相关性分析

相关性分析结果如图 3 所示。由图 3 可知两种诱导方式导致细胞内外代谢产物相关性差异较大, 表明两种诱导方式可能对细胞内外物质交换的影响程度不同。进一步筛选相关性大于 0.7 的代谢产物进行分析, 发现在 CORT 刺激下, 2-氧基异亮氨酸 (2-oxoisoleucine) 和丝氨酸 (serine) 与多数差异代谢物有较强相关性, 而 Glu 刺激下谷胱甘肽 (glutathione) 和乳酸 (lactate) 与多数差异代谢物相关性较强。丝氨酸是一种非必需氨基酸, 在脂肪和脂肪酸的新

Table 2 The different metabolites of CORT and Glu-induced PC12 cell. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control

No	Metabolite	Cell		Medium	
		CORT	Glu	CORT	Glu
1	Lactate	↓**	↓**	↑**	↓**
2	Acetate	↑**			
3	<i>N</i> -Acetylaspartate	↑**	↓**		
4	Glutamate	↓**	↓**		↑**
5	Glutathione	↓**	↓*		
6	Succinate	↓**	↓**		
7	Dimethylamine	↑*	↓**		
8	Aspartate	↑**	↑*		↓**
9	Creatine	↓**			
10	Choline	↑**	↑**		
11	<i>O</i> -Phosphocholine	↑**	↓**	↑**	↓**
12	Sn-glycerol-3-phosphocholine	↑**	↑**		
13	Myo-inositol	↑**	↑**	↓**	↓**
14	Glycine	↑*	↓*		
15	Serine	↑**	↑**	↑**	↓**
16	Valine			↑**	↓**
17	Taurine		↑**		
18	Alanine		↓**	↓**	↓**
19	Glycerol		↑**		↓**
20	2-Oxoisoleucine			↓**	↓**
21	Isoleucine			↑**	↓**
22	Leucine			↑**	↓**
23	2-Oxovaline			↑**	↓**
24	3-Hydroxybutyrate			↑**	↓**
25	Pyruvate			↓**	↑**
26	Pyroglutamate			↓**	↓**
27	Lysine			↓**	↓**
28	Ornithine			↓**	↓**
29	α -Glucose			↓**	↓**
30	β -Glucose			↓**	
31	Phenylalanine			↑**	↓**
32	Histidine			↑**	↓*
33	Asparagine			↑*	↑**
34	Tyrosine			↑**	↓**
35	Methylguanidine				↑**
36	Methylamine				↓**
37	Cystine				↓**

陈代谢中发挥着作用, 此外丝氨酸在细胞膜的制造加工以及包围神经细胞的鞘的合成中都发挥着作用^[19]。细胞可以从甘氨酸中合成丝氨酸, 并且还是合成嘌呤、胸腺嘧啶、胆碱的前体。研究表明丝氨酸对映异构体的合成与代谢异常可能在抑郁症的发生中发挥着重要作用^[20]。谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成, 其具有抗氧化的能力^[21], 其含量的显著降低与由 Glu 损伤 PC12 细胞的机制具有一致性。

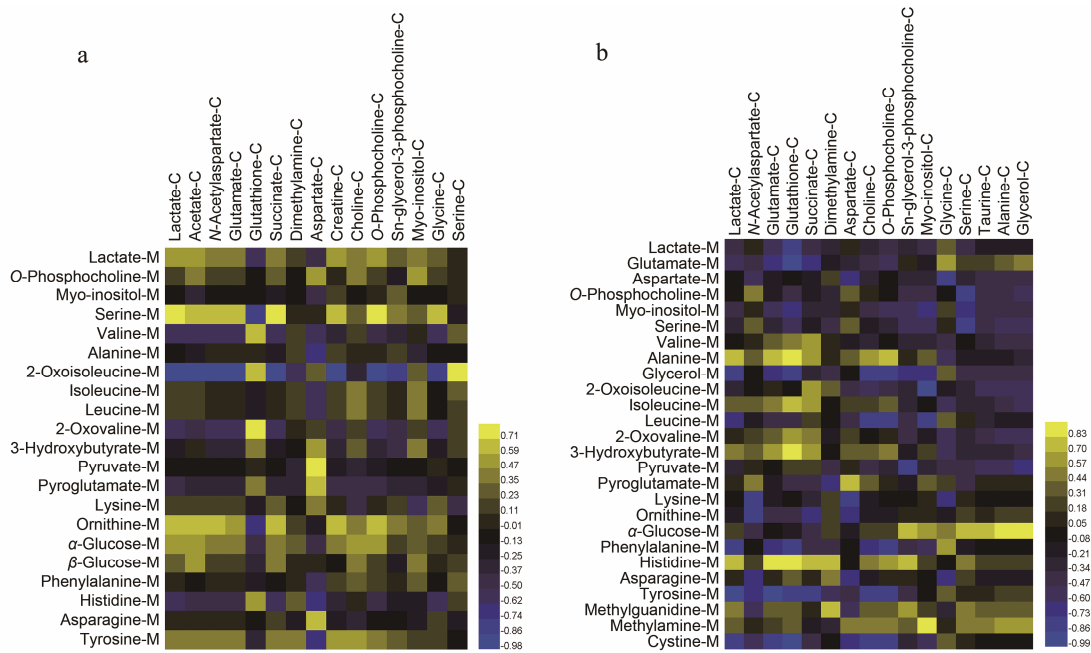


Figure 3 Correlation analysis about the different metabolites of cell (C) and medium (M). a: CORT-induced PC12 cell and medium; b: Glu-induced PC12 cell and medium

4 代谢通路分析

对差异代谢物进行通路分析, 结果如图 4 所示。结果表明 CORT 刺激后, 13 条代谢通路发生显著变化, 包括氨酰转运 RNA 合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 谷胱甘肽代谢, 苯丙氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 丙酮酸代谢, 丁酸甲酯代谢, TCA 循环, 组氨酸代谢, 赖氨酸降解, 谷氨酸和谷氨酸盐代谢, 肌醇磷酸盐代谢。而 Glu 刺激后, 15 条代谢通路表现出明显的变化,

除了与 CORT 刺激后相同的通路以外, 还包括牛磺酸与亚牛磺酸的代谢以及甘油酯代谢。这些代谢通路主要涉及能量代谢、氨基酸代谢等。

讨论

抑郁症已成为人类健康的主要负担之一, 研究抑郁症的发病机制对改善抑郁症状具有重要意义, 而体外细胞模型的不完善是阐明抑郁症发生机制研究的主要障碍之一。通过对抑郁症细胞模型的深入分析研究, 对于深刻阐释抑郁症的发病机制及药物干预作用机制具有重要的指导意义。而代谢组学作为系统生物学的重要组成部分, 从代谢产物的整体轮廓分析评价疾病模型是重要的手段之一。

细胞在进行生命活动的过程中时刻都需要进行物质交换, 细胞从外环境中吸收营养物质等, 排出代谢产物等, 因而要全面分析细胞的状态, 必须从细胞内外整体分析。通过对细胞内外物质进行相关性分析对于研究细胞内外物质交换有一定意义, 另外相关性强的物质可能在代谢过程中相互涉及。而细胞物质交换的过程与能量代谢以及细胞膜的完整性有重要关系。

本研究从 CORT 和 Glu 刺激诱导的 PC12 细胞中发现其差异代谢产物, 并对差异代谢产物进一步进行相关性分析以及通路分析, 发现 Glu 诱导下, 谷胱甘肽以及乳酸与多数差异代谢产物具有相关性;

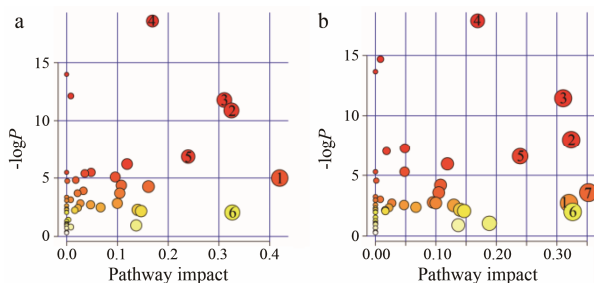


Figure 4 Summary diagram of pathway analysis. The greater values of the pathway impact and $-\log P$, the higher correlation of different metabolites between groups, displayed with the larger circle in the picture. The P values from enrichment analysis, the pathway impact value calculated from pathway topology analysis. a: CORT-induced cell group pathway analysis; b: Glu-induced cell group pathway analysis. 1: Pyruvate metabolism; 2: Glycine, serine and threonine metabolism; 3: Alanine, aspartate and glutamate metabolism; 4: Aminoacyl-tRNA biosynthesis; 5: Glutathione metabolism; 6: *D*-Glutamine and *D*-glutamate metabolism; 7: Taurine and hypotaurine metabolism

CORT 诱导下, 丝氨酸、2-氧基异亮氨酸与多数代谢差异物有显著相关; 而在通路分析中, CORT 与 Glu 两种诱导方式, 无显著差别。其中在抑郁症患者和模型动物体内均发生了甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸、谷胱甘肽、丙酮酸和肌醇磷酸等代谢紊乱, 说明 CORT 和 Glu 刺激 PC12 细胞后发生的代谢变化与抑郁症患者及模型的代谢变化有一定吻合^[22-24]。其差异代谢物引起的通路变化基本相同, 而相关分析的结果却不相同。在进行通路分析时, 考虑的是差异代谢物在代谢通路中的位置情况, 而进行相关分析时, 考虑的是细胞内外物质质量的相关关系, 因此在进行分析时需要结合两者的结果。本研究中, 通路分析发现两种刺激方式导致的显著差异通路基本相同, 而相关分析进行筛选的结果却显示有所差异。CORT 诱导产生的差异代谢物主要与培养基中丝氨酸和 2-氧基异亮氨酸相关性较强, 在细胞中丝氨酸主要参与脂肪与脂肪酸的代谢, 并在细胞膜的制造加工中起重要作用。而丝氨酸与多数差异代谢物的相关说明丝氨酸在代谢过程中与这些差异代谢物可能通过脂肪和脂肪酸代谢等途径有所关联, 进一步推测 CORT 刺激下可能主要影响脂肪和脂肪酸的代谢。而 Glu 诱导下, 细胞内谷胱甘肽以及乳酸与多数物质相关, 根据谷胱甘肽的功能以及乳酸等的代谢途径, 推测 Glu 诱导的 PC12 细胞更倾向于影响糖酵解以及抗氧化过程, 同时有研究表明, 芍药苷可以通过抗氧化机制保护 Glu 诱导的 PC12 细胞^[11]。然而有些不足的是, 这些结果仍然需要进一步验证。

Glu 和 CORT 诱导 PC12 细胞所致抑郁症模型的方法是目前比较常用的方法。但 PC12 细胞有几种分化形式, 其不同的分化类型对细胞代谢产物可能会有影响, 因而在进行代谢组学研究中要控制好细胞的传代次数, 且要考虑是否为分化细胞及分化的类型。此外, 虽然 Glu 和 CORT 诱导是较为常用的方式, 但是仍存在其他方式, 如炎症诱导方式、单胺类神经递质再摄取等, 因此在今后的研究中应对这些因素诱导所致的模型给予关注。

References

- [1] Heidi L. If depression were cancer [J]. *Nature*, 2014, 515: 182-184
- [2] Wang D, Li L. The research progress of cognitive dysfunction in patients with depression [J]. *Chin J Psychiatry (中华精神科杂志)*, 2015, 48: 115-122
- [3] Peter S. Defeating the dementors [J]. *Science*, 2012, 338: 67.
- [4] Boldizsar C, Eberhard F, Ove W, et al. Animal models of major depression and their clinical implications [J]. *Prog Neuro-psychoph*, 2016, 64: 293-310.
- [5] Liu CC, Tian JS, Du GH, et al. Plasma metabolite biomarkers for the therapeutic response in depressed patients by the traditional Chinese medicine formula Xiaoyaosan: a ^1H NMR-based metabolomics approach [J]. *J Affect Disorders*, 2015, 185: 156-163.
- [6] Shi BY, Tian JS, Qin XM, et al. A ^1H NMR plasma metabolomic study of acute and chronic stress models of depression in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 241: 86-91.
- [7] Tian JS, Peng GJ, Du GH, et al. Dynamic analysis of the endogenous metabolites in depressed patients treated with TCM formula Xiaoyaosan using urinary ^1H NMR-based metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158: 1-10.
- [8] Jiang BP, Liu YM, Le L, et al. Cajaninstilbene acid prevents corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells by inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34: 1015-1026.
- [9] Adeosun S, Albert P, Austin M, et al. 17β -Estradiol-induced regulation of the novel 5-HT1A-related transcription factors NUDR and Freud-1 in SH SY5Y cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32: 517-521.
- [10] Jonathan S, Wayne D, Robert D, et al. Putative neuroprotective and neurotoxic kynurenine pathway metabolites are associated with hippocampal and amygdalar volumes in subjects with major depressive disorder [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2015, 40: 463-471.
- [11] Mao QQ, Zhong XM, Feng CR, et al. Protective effects of paeoniflorin against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells via antioxidant mechanisms and Ca^{2+} antagonism [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30: 1059-1066.
- [12] Zheng M, Liu C, Pan F, et al. Protective effects of flavonoid extract from *Apocynum venetum* leaves against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31: 421-428.
- [13] Liu YM, Shen SN, Pan RL, et al. Cajaninstilbene acid protects corticosterone-induced injury in PC12 cells by inhibiting oxidative and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis [J]. *Neurochem Int*, 2014, 78: 43-52.
- [14] Li XB, Huang JZ, Wang ZC. Role of glutamate receptor in depression [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志)*, 2005, 24: 601-605.
- [15] Bleich S, Romer K, Wiltfang J, et al. Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action [J]. *Int J Geriatr Psych*, 2003, 18: S33-S40
- [16] Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory

- amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system [J]. *Annu Rev Pharmacol*, 2010, 29: 365–402.
- [17] Joanna W, Aarthi G, Liisa G, et al. Parity modifies the effects of fluoxetine and corticosterone on behavior, stress reactivity, and hippocampal neurogenesis [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 105: 443–453
- [18] Zhou XH. Role of P13K/Akt/FoxO3a Pathway in the Protective of Venlafaxine Against Corticosterone Cell Death Induction in PC 12 Cells (PI3K/Akt/FoxO3a 通路在文拉法辛保护皮质酮诱导 PC12 细胞的损伤中的作用) [D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2010.
- [19] Li H, Zhu W, Zhang L, et al. The metabolic responses to hepatitis B virus infection shed new light on pathogenesis and targets for treatment [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8421
- [20] Meunier CN, Dallérac G, Le RN, et al. *D*-Serine and glycine differentially control neurotransmission during visual cortex critical period [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0151233
- [21] Liu ZQ, Gu XH, Yang YJ, et al. *D*-Serine in the nucleus accumbens region modulates behavioral sensitization and extinction of conditioned place preference [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2016, 143: 44–56.
- [22] Leong PK, Wong HS, Chen J, et al. Differential action between schisandrin A and schisandrin B in eliciting an anti-inflammatory action: the depletion of reduced glutathione and the induction of an antioxidant response [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0155879
- [23] Xia XT, Sun N, Tian JS, et al. Study on discovering potential biomarkers of depression and drug intervention of paroxetine based on ¹H NMR metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 593–596.
- [24] Liu XJ, Li ZY, Li ZF, et al. Urinary metabonomic study using a CUMS rat model of depression [J]. *Magn Reson Chem*, 2012, 50: 187–192.