

论著·基础研究

超高效液相色谱–四极杆飞行时间质谱联用技术分析人类唾液代谢组的性别依赖性

李晶^{1,2}, 刘思^{1,2}, 雷和花¹, 王玉兰^{1#}, 唐惠儒^{3#}

1. 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉磁共振中心, 中国科学院武汉物理与数学研究所, 武汉 430071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 复旦大学生命科学院, 上海 200438

[摘要] 目的· 研究人类唾液代谢组的性别依赖性。方法· 使用基于超高效液相色谱–四极杆飞行时间质谱 (UHPLC-Q-TOFMS) 联用的代谢组学技术, 检测分析年龄、体质量指数、生活及洁牙条件匹配的 5 位男性与 5 位女性健康志愿者的唾液样本代谢物组成, 再通过与已有数据库对比和标准品验证鉴定唾液中的代谢物群, 确定 2 组样品中差异具有统计学意义的代谢物。结果· 鉴定了人类唾液中的 13 种氨基酸、6 种胆碱代谢物、15 种肉碱类代谢物、4 种鞘氨醇类代谢物、7 种溶血磷脂酰胆碱和 3 种有机酸等 48 种代谢物。发现苯丙氨酸、乙酰基肉碱、丙酰基肉碱、丁酰基肉碱、异丁酰基肉碱、异戊酰基肉碱和鞘氨醇的含量在女性唾液中显著高于男性样本。结论· 人类唾液中含有丰富的代谢物信息, 唾液代谢组研究必须考虑其性别依赖性。

[关键词] 唾液; 代谢组学; 超高效液相色谱–四极杆飞行时间质谱; 性别依赖

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.08.006 **[中图分类号]** O657.63 **[文献标志码]** A

Gender dependence of metabolomic phenotypes for human saliva using ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry

LI Jing^{1,2}, LIU Si^{1,2}, LEI He-hua¹, WANG Yu-lan^{1*}, TANG Hui-ru^{3#}

1. State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, National Center for Magnetic Resonance in Wuhan, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

[Abstract] Objective · To investigate the gender-related metabolomic differences in human saliva. Methods · The saliva metabolomic profiles of 5 male and 5 female healthy volunteers with matched age, body mass index (BMI), living and tooth-brushing condition were acquired using ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Metabolites were identified using publicly accessible databases and further confirmed individually with standard compounds. Both multivariate and univariate statistics were conducted to find inter-gender differences. Results · Forty-eight metabolites in human saliva were identified including 13 amino acids, 6 choline metabolites, 15 carnitines, 4 sphinganine metabolites, 7 lysophosphatidylcholine and 3 organic acids. Levels of phenylalanine, acetyl carnitine, propionyl carnitine, butyryl carnitine, isobutyryl carnitine, isovaleryl carnitine and sphinganine were higher in the saliva of females than that of males. Conclusion · Rich metabolic information present in human saliva with significant gender difference which ought to be taken into consideration in study on the metabolomics of saliva.

[Key words] saliva; metabolomics; ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry; gender dependence

人类从出生到衰老的过程中都伴随着生理水平的性别差异。抑郁症^[1]、帕金森病^[2]、肺癌^[3]等多种疾病的发病率也存在一定的性别依赖性。因此, 无论是生理还是病理生理过程分子机制的研究必须考虑性别差异^[4]。不同性别个体之间的代谢速率和激素含量等差异很可能会引起生物样品中代谢物含量的性别依赖性。代谢组学技术是发现并确定该依赖性的有效手段。

代谢组学是关于生物体代谢组对病理生理刺激或者遗传改变应答规律的科学^[5]。其应用已经辐射到基因功能、

毒理机制、疾病发生发展分子机制等多个领域^[6]。研究者已经采用代谢组学技术较系统地研究了人类血清和尿液代谢组的性别依赖性, 发现不同性别个体在能量代谢、胆碱代谢、脂代谢等多个方面存在显著差异^[7]。因为上述体液的代谢组携带着体内每个细胞的代谢信息, 与生殖发育相关的性别依赖性会在其中有所体现。但是, 表面上与生殖发育的相关性并不密切的唾液等多种其他生物体液的代谢组是否也存在性别依赖性, 尚无明确报道。

唾液是一种与食物消化、防止微生物入侵与保持日常

[作者简介] 李晶(1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: lijing_sunny@outlook.com。

[通信作者] 王玉兰, 电子信箱: yulan.wang@wipm.ac.cn。唐惠儒, 电子信箱: Huiru_Tang@fudan.edu.cn。# 为共同通信作者。



口腔润滑等重要生理功能密切相关的生物体液^[8]。它由口腔内的多种腺体分泌产生，含有白蛋白和黏蛋白等蛋白质、电解质、氨基酸、有机酸和脂类等多种小分子代谢物，其代谢物组成受到生理、病理和环境等多种因素的共同影响^[9]。相比于组织、血液、脑脊液等生物样本，唾液的收集便捷而具有非侵入性。因此，唾液被越来越多的研究人员应用到代谢组学研究中^[10]。

液相色谱-质谱联用技术是代谢组学研究的常用检测分析手段之一，能够对复杂生物样品进行先分离后检测，并且具有检测灵敏度高的优点，可用于分析相对分子质量在50~3 000的多种代谢物^[11]。本文采用基于超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱（ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC-Q-TOFMS）联用技术的代谢组学方法，分析健康男性与女性唾液的代谢物组成及其性别依赖性。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

色谱纯甲酸、甲醇和乙腈全部购买于Sigma-Aldrich（中国）试剂有限公司。配制唾液样品与色谱流动相时所用的超纯水全部取自于Elix Advantage System（德国Merck Millipore有限公司）超纯水系统（电阻率>18.2 MΩ/cm）。L-丙氨酸、β-丙氨酸、γ-氨基丁酸、L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-胱氨酸、L-瓜氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酸、L-甘氨酸、L-组氨酸、L-高胱氨酸、L-羟脯氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-甲基-L-组氨酸、3-甲基-L-组氨酸、L-鸟氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、甘氨酰肌氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-苏氨酸、L-肉毒碱盐酸盐、L-乙酰基肉碱、L-丙酰基肉碱、L-丁酰基肉碱、L-异丁酰基肉碱、L-戊酰基肉碱、L-异戊酰基肉碱、L-2-甲基丁酰基肉碱、L-羟基丁酰基肉碱、L-己酰基肉碱、L-甲基丙二酰基肉碱、L-3-羟基异戊酰基肉碱、L-戊二酰基肉碱、L-辛酰基肉碱、L-3-甲基戊二酰基肉碱、L-癸酰基肉碱、L-十二烷酰基肉碱、反式5-十四烷酰基肉碱、L-肉豆蔻酰基肉碱、L-3-羟基己酰基肉碱、L-十八烷酰基肉碱等分析纯标准品购买于Sigma-Aldrich（中国）试剂有限公司。三甲胺N-氧化物二水合物、甜菜碱、N-二甲基甘氨酸盐酸盐、氯化胆碱、L-α-甘油磷酸胆碱、氯化乙酰胆碱、氯化磷酸胆碱钙盐四水合物等分析纯标准品购买于阿拉丁化学试剂有限公司（上海）。

1.2 唾液样品收集与处理

本研究选取年龄（25~30岁）、体质量指数（BMI）（18.5~23.9 kg/m²）和生活条件等匹配的5位男性与5位女性健康志愿者作为研究对象（收集样品前后2周均无明显急性病或慢性病）。在获得10位志愿者知情同意的情况下收集其唾液样本。为确保刷牙条件的匹配及一致性，样本收集前4日早晚都要求10人用同一品牌的牙刷与牙膏刷牙，第5日早上起床后用预先准备好的2 mL超纯水漱口20 s，将漱口水收集在指定的离心管并在-80℃冰箱内保存。

吸取50 μL上述唾液样品，加入含有2.7%（体积分数）甲酸的150 μL冷甲醇（在冰箱4℃预冷24 h）。涡旋30 s再离心（4℃，16 099×g）10 min后，取上清液（约150 μL）用孔径为0.22 μm尼龙滤膜过滤并装入配有内衬管的色谱样品瓶。将每个唾液样品各取10 μL混合后用上述样品处理方法配制质控样品，用于仪器稳定性与重复性验证。每个样品重复采样3次（3个技术重复）。

1.3 色谱-质谱参数设置

本文所用仪器为Agilent 1290 Infinity色谱仪串联Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF质谱仪。色谱柱为C18反相色谱柱（ACQUITY UPLC HSS T3 C18柱，1.8 μm，2.1 mm×100 mm）；柱温为40℃，流速为0.5 mL/min，进样量为1 μL；流动相分别为含有0.1%甲酸的超纯水（A相）和含有0.1%甲酸的色谱纯乙腈（B相）；色谱分离过程采用逐段线性洗脱梯度，在1 min内保持B相为1%，3 min时B相升至15%，6 min时B相升至50%，9 min时B相升至95%并持续至12 min；进样前在初始流动相条件下平衡色谱柱5 min。质谱仪鞘气温度为350℃，流速为8 L/min；干燥气流速为350℃，流速为9 L/min；正离子检测模式下，毛细管电压为4 000 V，喷嘴电压为500 V，雾化器压力为45 psi（1 psi=6 895 Pa）；负离子检测模式下，毛细管电压为-3 500 V，喷嘴电压为-1 000 V，雾化器压力为40 psi。为了对代谢物进行鉴定，本文还分别采集了质控样品（即各组的平均化样本）在碰撞能为10、20和40 V条件下的质谱数据，所得母离子及碎片离子用于代谢物定性。

1.4 代谢物鉴定及组间差异分析

原始数据导入Profinder B.06.00软件（美国Agilent科技公司）进行保留时间校正与特征峰提取，获得包括特征峰质荷比、保留时间与峰强度等信息的二维数据集。主成分分析（principal component analysis, PCA）及偏最小二乘法分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-



DA) 等多变量统计数据分析采用 SIMCA-P11.5 软件(瑞典 Umetrics 公司)完成。PCA 分析与 OPLS-DA 分析中都使用样品体积归一化(即单位体积样品中给定信号的峰面积)与 Pareto-Scaling(变量除以变量方差的平方根)对原始数据进行预处理。得分图用来表现每组样品代谢组的聚集程度,其中 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 分别表示 OPLS-DA 模型中不同代谢物变量 X 解释率、不同分组变量 Y 解释率和模型预测率。负载图描述组间的显著差异代谢物。本实验中相关系数的阈值为 0.497,如果负载图中相关系数的绝对值大于 0.497,则表示特征峰变量在 2 组之间存在统计学差异。采用 SPSS 14.0 软件(美国 International Business Machines 公司)对上述差异代谢物的统计差异进行再验证($P<0.05$)。最后,利用 MassHunter B.06.00 软件(美国 Agilent 科技公司)提取差异代谢物特征峰,比照已有数据库 Metlin^[12](Metabolite Link)

和 HMDB^[13](Human Metabolome Database)中代谢物的母离子及较高丰度特征性碎片对其结构进行推定,而后使用标准品进行 UHPLC-Q-TOFMS 分析,通过保留时间和质谱碎片对代谢物结构做进一步鉴定。

2 结果

2.1 代谢组数据的质量控制评价

首先,对所获的二维数据集进行无监督的 PCA 分析。结果表明,无论是正离子还是负离子模式质谱检测,质控样品均呈现紧密聚集(图 1),3 次重复采样数据也呈现精密聚集,说明实验过程中仪器系统稳定且所获数据可靠,因此无须质控校正。同时男女志愿者样品有一定分离,表明唾液代谢组存在性别依赖性,有必要进行深入数据挖掘分析。

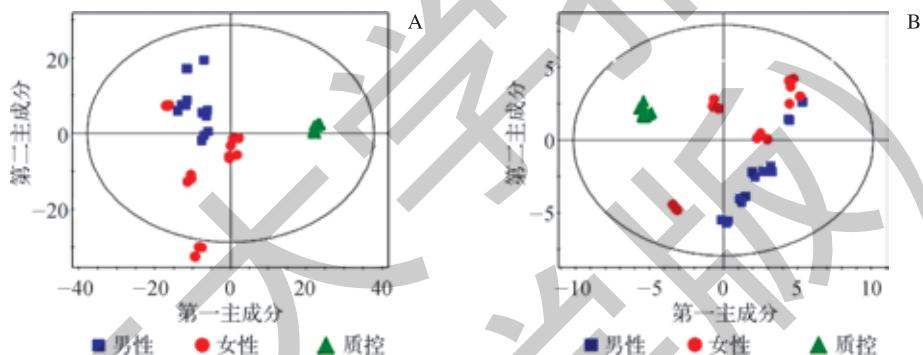


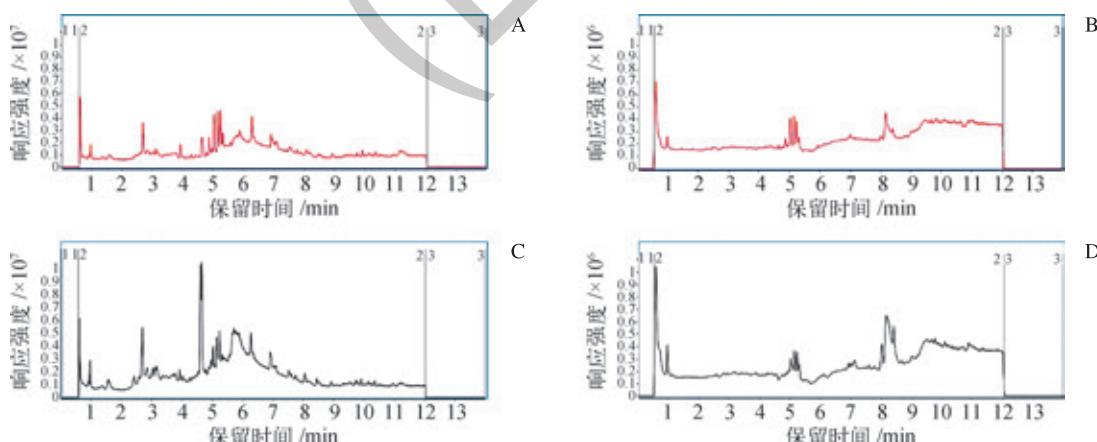
图 1 不同性别人类唾液的正离子(A)与负离子(B)模式质谱检测获得的代谢组数据的 PCA 得分图

Fig 1 PCA score plots from the mass spectrometry data in positive (A) and negative (B) mode for human saliva of different genders

2.2 人类唾液代谢组性别依赖性代谢组分析

UHPLC-Q-TOFMS 分析所获的总离子流色谱图(total ion chromatogram, TIC)(图 2)表明,无论是正离子检测模式还是负离子检测模式下均可获得高质量代谢轮廓

图,表明此技术的可行性。同时,正离子谱中保留时间 2~5 min 的区域及负离子谱中保留时间 5~9 min 的区域有明显的差异,说明男性与女性健康志愿者的唾液代谢轮廓谱有明显的差异。



注: A 和 B. 男性个体唾液正离子(A)、负离子(B) TIC 图谱; C 和 D. 女性个体唾液正离子(C)、负离子(D) TIC 图谱。

图 2 人类唾液总离子流色谱图

Fig 2 TIC of human saliva



质谱图的解析发现人类唾液含有丰富的代谢物信息。通过对比代谢物数据库中的二级质谱信息及使用标准品再验证, 对人类唾液中所含的13种氨基酸、6种胆碱代谢物、15种肉碱类代谢物、4种鞘氨醇类代谢物、7种溶血磷脂酰胆碱和三羧酸循环中的3种小分子有机酸等48种代谢物进行了鉴定(表1)。这些代谢物覆盖多条途径。同时, 由图2发现, 不同性别个体的唾液中代谢物种类并无较大差异, 但部分代谢物的浓度存在一定的性别依赖性。

表1 人类唾液中鉴定的代谢物
Tab 1 Identified metabolites in human saliva

代谢物	化学式	母离子	碎片离子
L-脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺ (116.070 6)	70.065 9
L-缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺ (118.086 3)	72.080 8
L-苏氨酸	C ₄ H ₉ NO ₃	[M+H] ⁺ (120.065 5)	102.054 5
L-异亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺ (132.101 9)	86.096 4
L-亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₃	[M+H] ⁺ (132.101 9)	86.096 4
L-天冬氨酸	C ₄ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺ (134.044 8)	88.039 4
L-赖氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺ (147.112 8)	101.107 0
L-谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	[M+H] ⁺ (148.060 5)	102.055 0
L-甲硫氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	[M+H] ⁺ (150.058 3)	104.052 8
L-组氨酸	C ₆ H ₉ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺ (156.076 8)	110.071 3
L-苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺ (166.086 2)	120.081 0
L-酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺ (182.081 1)	136.076 0
L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺ (205.097 2)	146.060 7
胆碱	C ₅ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺ (104.107 0)	60.081 9
甜菜碱	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺ (118.086 3)	59.074 0
磷酸胆碱	C ₅ H ₁₄ NO ₄ P	[M+H] ⁺ (184.073 3)	124.999 6
甘油磷酸胆碱	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	[M+H] ⁺ (258.110 1)	104.107 0
肌酸	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺ (132.076 8)	90.055 5
肌酐	C ₄ H ₉ N ₃ O	[M+H] ⁺ (114.066 2)	44.052 4
肉碱	C ₇ H ₁₅ NO ₃	[M+H] ⁺ (162.112 5)	85.029 5
乙酰基肉碱	C ₉ H ₁₇ NO ₄	[M+H] ⁺ (204.123 0)	85.029 5
丙酰基肉碱	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	[M+H] ⁺ (218.138 7)	85.029 5
戊二基肉碱	C ₁₂ H ₂₁ NO ₆	[M+H] ⁺ (276.144 2)	85.029 5
羟丙酰基肉碱	C ₁₂ H ₂₃ NO ₅	[M+H] ⁺ (262.164 9)	85.029 5
3-甲基戊二基肉碱	C ₁₃ H ₂₃ NO ₆	[M+H] ⁺ (290.159 8)	85.029 5
丁酰基肉碱	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺ (232.154 3)	85.029 5
异丁酰基肉碱	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺ (232.154 3)	85.029 5
戊酰基肉碱	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	[M+H] ⁺ (246.170 0)	85.029 5

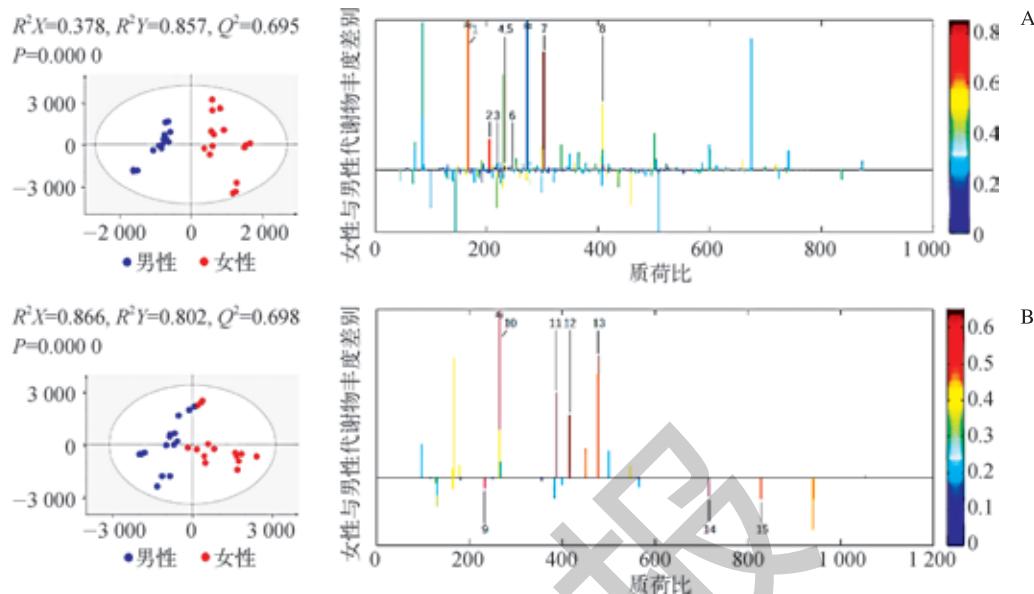
(续表1)

代谢物	化学式	母离子	碎片离子
异戊酰基肉碱	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	[M+H] ⁺ (246.170 0)	85.029 5
己酰基肉碱	C ₁₃ H ₂₅ NO ₄	[M+H] ⁺ (260.185 6)	85.029 5
辛酰基肉碱	C ₁₅ H ₂₉ NO ₄	[M+H] ⁺ (288.216 8)	85.029 5
肉豆蔻酰基肉碱	C ₂₁ H ₄₁ NO ₄	[M+H] ⁺ (372.310 8)	85.029 5
亚麻油酰基肉碱	C ₂₈ H ₄₅ NO ₄	[M+H] ⁺ (424.342 1)	85.029 5
十八酰基肉碱	C ₂₅ H ₄₉ NO ₄	[M+H] ⁺ (428.373 4)	85.029 5
鞘氨醇*	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	[M+H] ⁺ (302.305 4)	—
C16 鞘氨醇*	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	[M+H] ⁺ (274.274 1)	—
植物鞘氨醇*	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	[M+H] ⁺ (318.300 3)	—
2-氨基十四碳-3-醇*	C ₁₄ H ₃₁ NO	[M+H] ⁺ (230.247 8)	—
溶血磷脂酰胆碱(16:1)*	C ₂₄ H ₄₈ NO ₂ P	[M+H] ⁺ (494.324 1)	184.073 9
溶血磷脂酰胆碱(16:0)*	C ₂₄ H ₅₀ NO ₂ P	[M+H] ⁺ (496.339 8)	184.073 9
溶血磷脂酰胆碱(18:0)*	C ₂₆ H ₅₄ NO ₂ P	[M+H] ⁺ (524.371 1)	184.073 9
溶血磷脂酰胆碱(18:1)*	C ₂₆ H ₅₂ NO ₂ P	[M+H] ⁺ (522.355 4)	184.073 9
溶血磷脂酰胆碱(18:3)*	C ₂₆ H ₄₈ NO ₂ P	[M+H] ⁺ (518.324 1)	184.073 9
溶血磷脂酰胆碱(20:0)*	C ₂₈ H ₅₈ NO ₂ P	[M+H] ⁺ (552.402 4)	184.073 9
溶血磷脂酰胆碱(20:3)*	C ₂₈ H ₅₂ NO ₂ P	[M+H] ⁺ (546.355 4)	184.073 9
柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻ (191.019 7)	111.008 7
异柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻ (191.019 7)	111.008 7
琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻ (117.019 3)	73.030 0

注: * 表示代谢物因缺少标准品而只通过数据库检索与质谱碎片进行了推定;
—表示无相关特征性碎片。

其次, 对上述数据的OPLS-DA分析发现模型的交叉验证-残差分析(cross validation-analysis of variance, CV-ANOVA)验证所获P值均远小于0.05, 表明2类不同性别个体的唾液的代谢组具有显著差异, 其负载图(图3)中标出了差异代谢物的质谱信号。再次, 将OPLS-DA分析中有显著差异的代谢物的质谱特征数据进行单变量统计再验证。结果发现, 女性唾液中L-苯丙氨酸、乙酰基肉碱、丙酰基肉碱、丁酰基肉碱、异丁酰基肉碱、异戊酰基肉碱和鞘氨醇的含量显著高于来自男性的样品(表2)。另外, 结果还发现, 在正离子检测模式下, 女性唾液中质荷比为408.290 1的代谢物的含量显著高于男性样品; 在负离子检测模式下, 女性唾液中质荷比为234.161 2、266.176 2、388.293 9、416.325 2、479.228 7、716.520 2和829.500 1的代谢物的含量也与男性样品表现出显著性差异。这些代谢物因没有标准品而尚未得到鉴定。





注: A. 正离子模式; B. 负离子模式。图中特征峰的序号与表 2 代谢物的序号对应。负载图中颜色冷暖表示特征峰对区分组间差异贡献的大小, 颜色越暖(红色)表示特征峰与分组变量之间相关系数的绝对值越大; 颜色越冷(蓝色)表示特征峰与分组变量之间相关系数的绝对值越小。

图 3 不同性别人类唾液代谢组 OPLS-DA 负载图

Fig 3 OPLS-DA loading plot in the human saliva metabolome of different genders

表 2 差异代谢物列表

Tab 2 Metabolites of significance difference

序号	代谢物	质荷比	保留时间 /min	检测模式	相关系数	P 值	变化比例
1	L- 苯丙氨酸	166.086 2	2.69	ESI+	0.605	0.005 1	2.90
2	乙酰基肉碱	204.123 0	0.96	ESI+	0.673	0.000 1	3.60
3	丙酰基肉碱	218.138 7	2.09	ESI+	0.622	0.000 8	3.32
4	丁酰基肉碱	232.154 3	3.17	ESI+	0.812	0.002 3	2.34
5	异丁酰基肉碱	232.154 3	3.09	ESI+	0.597	0.000 0	3.53
6	异戊酰基肉碱	246.170 0	4.00	ESI+	0.639	0.001 5	2.35
7	鞘氨醇	302.305 4	7.52	ESI+	0.730	0.002 0	1.18
8	U1	408.209 1	3.06	ESI+	0.536	0.036 1	2.85
9	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O	234.161 2	8.56	ESI-	-0.580	0.005 8	0.70
10	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	266.176 2	8.17	ESI-	0.621	0.005 1	2.51
11	U2	388.293 9	6.93	ESI-	0.646	0.015 2	2.59
12	U3	416.325 2	7.60	ESI-	0.569	0.001 9	2.41
13	C ₂₅ H ₃₆ O ₉	479.228 7	8.41	ESI-	0.544	0.000 5	1.52
14	U4	716.520 2	9.43	ESI-	-0.572	0.129 7	0.75
15	C ₄₀ H ₈₀ O ₁₃ P ₂	829.500 1	5.14	ESI-	-0.513	0.400 3	0.81

注: 变化比例表示女性唾液代谢物丰度均值与男性唾液代谢物丰度均值之比; ESI+ 表示正离子模式, ESI- 表示负离子模式; U1、U2、U3、U4 均为未知代谢物, 化学式由数据库计算所得, 但并未确定代谢物的具体名称。

3 讨论

UHPLC-Q-TOFMS 检测技术和多变量统计学方法是分析代谢物差异的重要手段。本研究采用该手段挖掘唾液中丰富的代谢物信息以发现人类唾液代谢组的性别依赖性。

女性个体的血液^[14]与尿液^[15]中的苯丙氨酸含量高于男性, 血清中苯丙氨酸含量性别依赖性高于其他必需氨基酸^[16]。我们发现的唾液中苯丙氨酸含量的性别依赖性可能与上述体液中的发现有关, 但鉴于唾液中苯丙氨酸可能来自于口腔微生物自身的生物合成及与其宿主的共代谢等

途径, 其唾液中含量性别依赖性的生物学意义尚需深入研究。鞘氨醇是构成磷脂的母体结构, 参与细胞膜的合成、细胞间信息传递和脂类代谢等多种生命活动。人体内所有细胞都能合成鞘氨醇, 其中脑组织的合成效率最高^[17]。女性唾液中鞘氨醇的含量高于男性个体可能与激素介导的脂肪合成与分解相关。乙酰基肉碱、丙酰基肉碱、丁酰基肉碱、异丁酰基肉碱、异戊酰基肉碱是人体内含量较丰富的脂酰肉碱类代谢物, 是细胞质中游离脂肪酸转运进入线粒

体的中间载体^[18]。本文发现女性唾液中乙酰基肉碱、丙酰基肉碱、丁酰基肉碱、异丁酰基肉碱、异戊酰基肉碱等一系列肉碱的含量均高于男性, 表现出显著的性别依赖性, 这与脂酰肉碱类代谢物在血浆中的发现不完全一致^[19-20]。尽管唾液中上述代谢物的生理学意义尚需深入研究, 但本研究的这些发现表明了人类唾液代谢组学研究的可行性, 并为之奠定了技术与数据基础。本研究提示唾液代谢组研究需要考虑其性别依赖性。

参·考·文·献

- [1] Ahl R, Lindgren R, Cao Y, et al. Risk factors for depression following traumatic injury: an epidemiological study from a scandinavian trauma center[J]. Injury, 2017, 48(5): 1082-1087.
- [2] Perrin A, Nosova E, Co K, et al. Gender differences in Parkinson's disease depression[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2016, 36: 93-97.
- [3] Isla D, Majem M, Vinolas N, et al. A consensus statement on the gender perspective in lung cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2016, 19(5): 527-535.
- [4] Bertram HC, Eggers N, Eller N. Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification[J]. Anal Chem, 2009, 81(21): 9188-9193.
- [5] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [6] 刘玉敏, 魏珍玉, 陈昕, 等. 基于GC-TOFMS技术的缺血性脑卒中代谢组学研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(2): 207-211.
- [7] Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, et al. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabolomics[J]. Anal Biochem, 2006, 352(2): 274-281.
- [8] Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles[J]. Metabolomics, 2016, 6(1): 78-95.
- [9] Álvarez-Sánchez B, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Study of sample preparation for metabolomic profiling of human saliva by liquid chromatography-time of flight/mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2012, 1248: 178-181.
- [10] Takeda I, Stretch C, Barnaby P, et al. Understanding the human salivary metabolome[J]. NMR Biomed, 2009, 22(6): 577-584.
- [11] Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies[J]. Trac Trends Anal Chem, 2005, 24(4): 285-294.
- [12] Tautenhahn R, Cho K, Uritboonthai W, et al. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(9): 826-828.
- [13] Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: the human metabolome database[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: D521-D526.
- [14] Proenza AM, Roca P, Crespi C, et al. Blood amino acid compartmentation in men and women with different degrees of obesity[J]. J Nutr Biochem, 1998, 9(12): 697-704.
- [15] Xu J, Yang S, Cai S, et al. Identification of biochemical changes in lactovegetarian urine using ¹H NMR spectroscopy and pattern recognition[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 396(4): 1451-1463.
- [16] Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, Galache-Osuna JG, et al. Determination of essential amino acids in human serum by a targeting method based on automated SPE-LC-MS/MS: discrimination between arteriosclerotic patients[J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 70: 476-484.
- [17] 孙九丽, 林慧珍, 荀萍. 鞘脂代谢及其相关疾病研究进展[J]. 生物技术, 2011, 21(5): 93-97.
- [18] Clark RH, Chace DH, Spitzer AR, et al. Impact of L-carnitine supplementation on metabolic profiles in premature infants[J]. J Perinato, 2017, 37(5): 566-571.
- [19] Reuter SE, Evans AM, Chace DH, et al. Determination of the reference range of endogenous plasma carnitines in healthy adults[J]. Ann Clin Biochem, 2008, 45: 585-592.
- [20] Carter AL, Stratman FW. Sex steroid regulation of urinary excretion of carnitine in rats[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1982, 17(2): 211-215.

[收稿日期] 2017-05-02

[本文编辑] 崔黎明

