

生物样本库不同存储时间的 胎盘组织代谢组学检测 results 分析

向飞艳, 陈雨佳, 肖晗

【摘要】

目的 基于非靶代谢组学分析生物样本库不同存储年限胎盘组织代谢组学特征及其差异。

方法 分别抽取液氮存储年限为 7、6、5、4、3 年的各 10 例胎盘组织样本, 通过非靶向质谱技术检测分析胎盘代谢物水平。

结果 鉴定出的二级代谢物中, 除无法分类外, 检测到的代谢物以 13% 氨基酸、多肽和类似物, 8% 脂肪酸和缀合物为主, 随着保藏时间的延长, D-甘露糖、5'-氧化肌苷、L-苏氨酸升高, 新烟碱、5-羟基吡啶乙酸降低。受影响的代谢通路靠前的有卵巢类固醇生成通路、糖尿病心肌通路、含血清素的神经突触通路、肌糖磷酸代谢通路、嗅觉传导通路, 但总体变化程度不显著。

结论 液氮储存 3 ~ 7 年对胎盘样本代谢物的稳定性影响不大, 可作为一种较好的胎盘样本低温存储方式。

【关键词】 液氮保藏; 胎盘; 生物样本库; 非靶向代谢组学

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2025, 20(5):529-534

中图分类号: R318.52

文献标识码: A

文章编号: 1673-713X (2025) 05-0529-06

胎盘是母胎能量和营养物质转换的最重要器官^[1], 在能量代谢、免疫防御以及内分泌中起关键作用。高质量的胎盘组织样本库将生物标志物的发现和涉及胎盘功能障碍疾病的分子研究成为可能。基于微阵列的胎盘组织基因表达谱已被用于发现疾病特异性生物标志物^[2], 有研究表明, 胎盘中的代谢特征能反映胎盘微环境的变化, 这有利于探究母胎并发症的发生与发展机制。

代谢组学是近年来继基因组学、转录组学、蛋白质组学后的热门研究^[3]。代谢组是指某一生物或细胞在特定时期内所有低分子代谢产物的集合, 可以揭示取样时该样本的生理状态。

生物样本库的胎盘组织样本是通过液氮快速冷冻收集, 并冻存于液氮环境。一般认为在液氮环

境下, 细胞代谢处于绝对静止状态, 整体稳定^[4]。但保存时限仍然存在不确定性。本研究拟对本样本库冻存时限 7 年以内的的胎盘组织样本进行代谢组学检测, 评估在液氮冻存环境下, 不同冻存年限的胎盘组织代谢组学的状态。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 选取生物样本库不同液氮冻存年限的胎盘组织样本共计 50 例, 其中 7 年的 10 例 (A 组, 入库时间 2016 年 12 月), 6 年的 10 例 (B 组, 入库时间 2017 年 12 月), 5 年的 10 例 (C 组, 入库时间 2018 年 12 月), 4 年的 10 例 (D 组, 入库时间 2019 年 12 月), 3 年的 10 例 (E 组, 入库时间 2020 年 12 月)。50 例组织样本均来源于正常妊娠产妇, 排除妊娠期疾病如糖尿病、高血压等。样本采集已获得我院伦理委员会的批准和产妇的知情同意。所有样本一次性出库送至公司, 同一批次进行检测。

胎盘采集与处理方法: 胎盘娩出后, “六点法”采样, 每个样本大小为 2 cm × 1 cm × 1 cm, 用 0.9% 的生理盐水冲洗干净, 分别放入 6 个 2 mL 冻存管中, 置液氮保存。

1.1.2 仪器 Thermo Vanquish 超高效液相系统和 Thermo Orbitrap Exploris 120 质谱检测器为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; ACQUITY UPLC® HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱为美国 Waters 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 检测分析 精确称量适量样本于 2 mL 离心管中, 准确加入 1000 μL 组织提取液 [75% (甲醇: 氯仿 = 9:1), 25% H₂O], 加入钢珠; 放入组织

作者单位: 430014 湖北, 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院 (武汉市妇幼保健院) 生物样本库

通信作者: 肖晗, Email: tjxiaohan1980@163.com

收稿日期: 2024-12-05

研磨器中, 50 Hz 研磨 60 s, 重复上述操作 2 次; 室温超声 30 min, 冰上放置 30 min; 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取全部上清液于离心管中, 浓缩干燥; 准确加入 200 μ L 50% 乙腈溶液配制 2-氯-L-苯丙氨酸溶液 (4 μ g/mL) 复溶样品, 过滤液加入到检测瓶, 用于 LC-MS 检测。

1.2.2 HPLC 色谱 流速 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 2 μ L。正离子模式, 流动相为 0.1% 甲酸乙腈 (B1) 和 0.1% 甲酸水 (A1), 梯度洗脱程序为: 0~1 min, 8% B1; 1~8 min, 8%~98% B1; 8~10 min, 98% B1; 10~10.1 min, 98%~8% B1; 10.1~12 min, 8% B1。负离子模式, 流动相为乙腈 (B2) 和 5 mmol/L 甲酸铵水 (A2), 梯度洗脱程序为: 0~1 min, 8% B2; 1~8 min, 8%~98% B2; 8~10 min, 98% B2; 10~10.1 min, 98%~8% B2; 10.1~12 min, 8% B2。

1.2.3 质谱 电喷雾离子源, 正负离子模式分别采集数据。正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 -2.50 kV, 鞘气 40 arb, 辅助气 10 arb。毛细管温度 325 °C, 以分辨率 60 000 进行一级全扫描, 一级离子扫描范围 100~1000 m/z, 并采用 HCD 进行二级裂解, 碰撞能量为 30%, 二级分辨率为 15 000, 采集信号前 4 离子进行碎裂, 同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

1.2.4 数据处理与分析 首先通过 Proteowizard 软件包 (v3.0.8789) 中 MSConvert 工具将原始质谱下机文件转换为 mzXML 文件格式。采用 R XCMS (v3.12.0) 软件包进行峰检测、峰过滤、峰对齐处理, 得到代谢物定量列表, 参数设置有 bw = 2, ppm = 15, peakwidth = c (5, 30), mzwid = 0.015, mzdif = 0.01, method = “centWave”。然后通过基于质量控制 (QC) 样本的支持向量回归校正, 消除系统误差, 并在质控与质保过程中过滤掉 QC 样本中 RSD > 30% 的物质, 用于后续的数据分析。根据统计检验计算 *P* 值、OPLS-DA 降维方法计算变量投影重要度 (VIP)、fold change 计算组间差异倍数, 来衡量各代谢物含量对样本分类判别的影响强度和解释能力, 辅助标志代谢物的筛选。当 *P* < 0.05 和 VIP > 1 时, 认为代谢物分子具有统计学显著差异。采用 MetaboAnalyst 软件包对筛选的差异代谢物进行功能通路富集和拓扑学分析。富集得到的通路采用 KEGG Mapper 可视化工具进行差异代谢物与通路图的浏览。

2 结果

2.1 数据稳定性

在基于质谱技术的代谢组学研究中, 为了获得可靠且高质量的代谢组学数据, 需进行质量控制。质量控制是获得具有稳定性和准确性代谢组结果的必要步骤。理论上, 质量控制样本都是相同的, 但是在样本提取、检测分析过程中会有系统误差, 导致质量控制样本间会有差异, 差异越小说明方法稳定性越高、数据质量越好。图 1 所示质量控制样本 PCA 得分图, 红点代表质量控制样本, 其余颜色点为样本。可见质量控制样本具有聚集趋势, 说明在 95% 置信区间内重复性良好。

2.2 5 组样本的总体代谢物构成和 PCA 分析

对检测到的 588 种代谢物进行分类, 一级结构结果为: 23% 的物质无法分类、17% 脂酰基、15% 类固醇和类固醇衍生物、7% 器官氧化复合物、6% 苯和取代衍生物、5% 有机氮化合物、3% 孕烯醇酮脂类、3% 酚类等。二级结构结果为: 32% 的物质无法分类, 13% 氨基酸、多肽和类似物, 8% 脂肪酸和缀合物, 6% 醇和多元醇, 5% 类花生酸, 4% 碳水化合物和碳水化合物缀合物, 4% 胺类, 2% 苯甲酸及其衍生物, 2% 嘌呤和嘌呤衍生物, 2% 胆甾烷类固醇, 2% 亚麻酸及其衍生物。多元统计分析采用 PCA 主成分分析。5 组的胎盘代谢存在明显重叠, 提示各组代谢物水平差异不大, 保藏时间对胎盘代谢的影响较小 (图 2)。

2.3 差异代谢物鉴定

2.3.1 差异代谢物数量比较 结合单变量分析和多元统计分析结果, 以 VIP > 1, *P* < 0.05 进行差异代谢物筛选。在二级鉴定中, 鉴定出的 600 余种代谢物中, 共计有 100 余种有差别的代谢物, 随着保存时间的延长, 差异代谢物的数量呈现增加趋势 (表 1)。

2.3.2 二级差异代谢物火山图 图中每一个点表示一种代谢物。点的大小表示 VIP 值的大小, 红色点代表差异上调, 蓝色点代表差异下调, 灰色点则表示未满足差异筛选条件的代谢物。默认显示 *P* 值最小的前 5 个代谢物名称。横坐标 log₂ (FC), 表示某代谢物在两样本中定量值差异倍数的 log₂ 的对数值; 纵坐标 -log₁₀ (*P* 值) 表示。横坐标绝对值越大, 说明某代谢物在两样本间的表达量倍数差异越大; 纵坐标值越大, 表明差异表达越显著, 筛选得到的差异表达代谢物越可靠。定量值变化越大, 差异越显著的代谢物分布在左右两端 (图 3)。



图 1 质量控制样本 PCA 得分图
Figure 1 QC sample PCA score plot

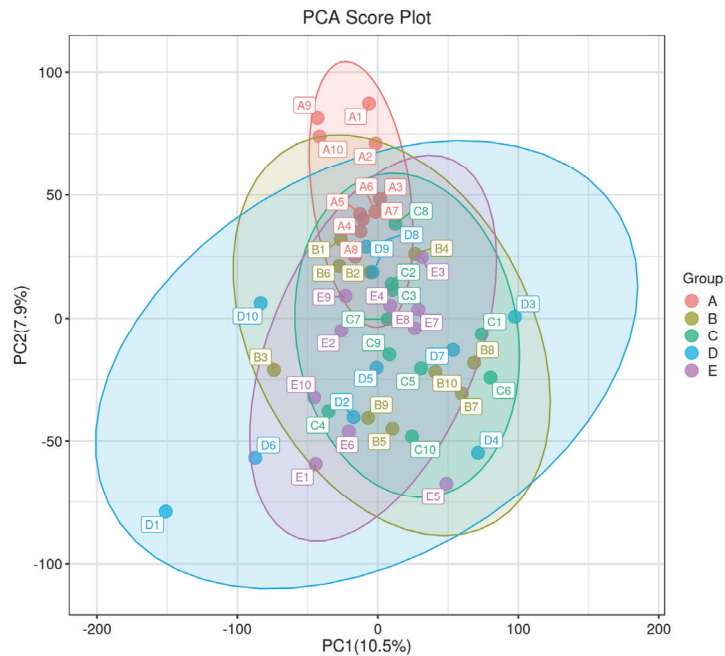


图 2 5 组样本的 PCA 主成分分析
Figure 2 PCA principal component analysis of five sample groups

表 1 不同组别差异代谢物数量比较

Table 1 Compare the number of differential metabolites in different groups

比较组别	Group	上调 Up	下调 Down	共计 Total
A vs E		62	82	144
B vs E		39	31	70
C vs E		33	53	86
D vs E		18	34	52

A 组与 E 组比较,新烟碱、羟基吡啶乙酸降低,苏氨酸、D-甘露糖、5'-氧化肌苷升高。B 组与 E 组比较,N-苯甲酰基-L-精氨酸、D-阿拉伯糖、3 α -羟基-5 β -孕(甾)烷-20-酮上调,二氢尿嘧啶、左旋谷酰胺下调。C 组与 E 组比较,胆固醇硫酸盐、全反式维甲酸上调,尿苷、马尿酸、柠檬烯-1,2-二醇下调。D 组与 E 组比较,胆固醇硫酸盐、阿维

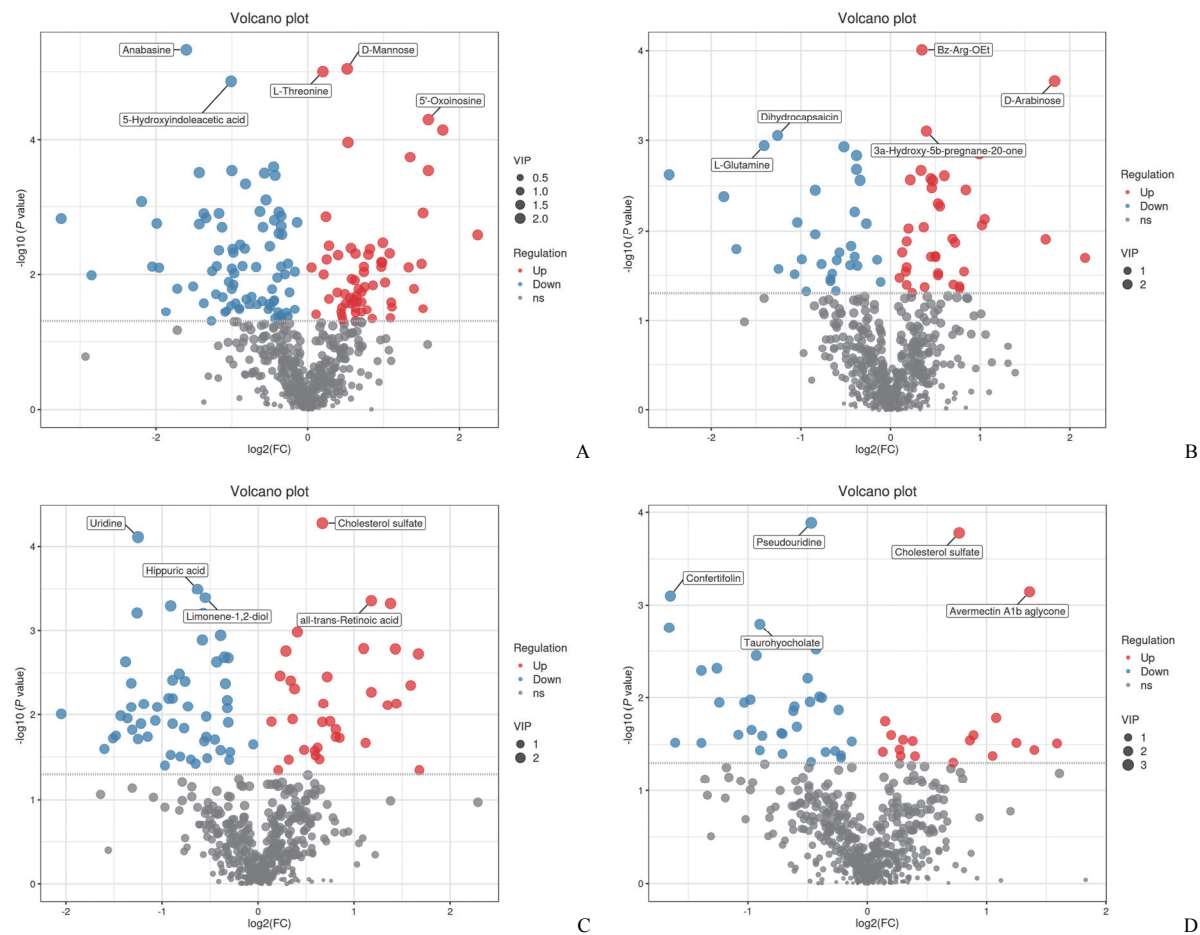


图 3 各组二级差异代谢物火山图 (A: A vs E; B: B vs E; C: C vs E; D: D vs E)

Figure 3 Comparison of volcanic maps of secondary differential metabolites (A: A vs E; B: B vs E; C: C vs E; D: D vs E)

菌素 A1b 苷元上调, 假尿 (嘧啶核) 苷、密叶辛木素、牛磺胆酸下调。

2.3.3 调整后的二级差异代谢物比较 将参数设置为 $FDR < 0.05$, 差异倍数 > 2 , 得到的差异数量见表 2, 其中 A 组与 E 组比较, 一共有 14 个差异物质, 5 个升高, 9 个下调。

2.3.4 二级差异代谢物 Z-score 图 筛选标准为 $FDR < 0.05$, 差异倍数 > 2 , 横坐标为代谢物在组中相对含量经过换算的 Z-score 数值, 纵坐标为代谢物名称, 点的颜色代表不同组别。越靠近右侧, 说明当前代谢物在该组中相对含量较高。A 组与 E 组比较, 24-脱氢胆固醇、去氧胆酸、5'-氧化肌酐含量较高, 新烟碱、5-羟基吡啶乙酸含量较低 (图 4)。

2.3.5 KEGG 通路分析 采用 MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca) 对差异代谢物列表进行 KEGG 通路富集分析。富集方法基于超几何分布检验, 拓扑分析采用点度中心性 degree 法, 拓扑分析旨在根据给定基因或代谢物在途径中的位置来评估其是否在生物学反应中起重要作用。

表 2 调整后的二级差异代谢物比较

Table 2 Comparison of secondary differential metabolites after adjustment

比较组别	Group	上调	Up	下调	Down	共计	Total
A vs E		5		9		14	
B vs E		0		0		0	
C vs E		0		1		1	
D vs E		0		0		0	

图中数字表示通路上对应的代谢物数目。颜色与 P 值相关, 颜色越红, P 值越小, 颜色越蓝, P 值越大。A 与 E 组比较, 其中影响靠前的通路有卵巢类固醇生成通路, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路, 含血清素的神经突触通路, β -丙氨酸代谢通路, 花生四烯酸代谢通路。调整 $FDR < 0.05$, 差异倍数 > 2 后, A 与 E 组比较 (图 5), 受影响的代谢通路靠前的有卵巢类固醇生成通路、糖尿病心肌通路、含血清素的神经突触通路、肌糖磷酸代谢通路、嗅觉传导通路。

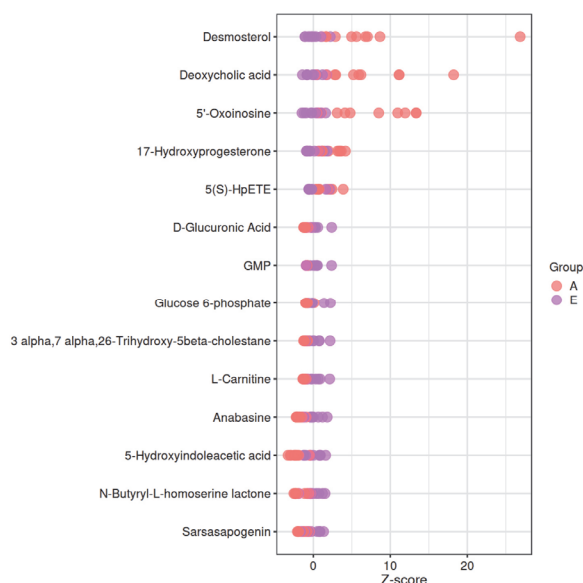


图 4 A vs E 二级差异代谢物 Z-score 图

Figure 4 Z-score plot of secondary differential metabolites (A vs E)

3 讨论

本研究探讨不同来源的胎盘样本在液氮中保存不同年限代谢组学的变化。选择 5 个时长维度, 每个存储时段 10 例样本进行检测。结果发现, 98% 的分析代谢物在储存的 7 年内保持稳定, 有 2% 的代谢物会发生变化。存储年限到达 7 年时, 有部分代谢物会发生变化, 其中 24-脱氢胆固醇、去氧胆酸、5'-氧化肌酐上升, 新烟碱、5-羟基吡啶乙酸下降, 差异代谢物 KEGG 通路富集分析提示卵巢类固醇生成通路、糖尿病心肌通路、含血清素的神经突触通路、肌糖磷酸代谢通路、嗅觉传导通路影响最大。在分析时尚未发现某种代谢物随着时间的推移有持续升高或是降低趋势。因此, 胎盘代谢组在液氮冻存 7 年的长期储存效果是足够稳定的。超过 7 年后卵巢类固醇生成通路可能会受影响。

有研究通过对比液氮速冻、RNAlater 保护剂和 -80°C 保存的胃肠道肿瘤组织样本的 DNA 和 RNA 纯度、完整性, 蛋白质浓度及完整性, 在小于 2 年、3~5 年和大于 6 年的时间, 发现长期低温冻存对样本 DNA 的影响较小, 冻存超过 6 年 RNA 和蛋白质开始发生降解^[5]。通过评估低温冻存 0~10 年胃癌样本的核酸与蛋白质质量(液氮速冻后 -80°C 保存), 发现长期低温冻存对 DNA 影响最小, 超过 5 年 RNA 和大分子量蛋白质降解较多, 但中、小分子量蛋白质保存完好^[6]。为了研究

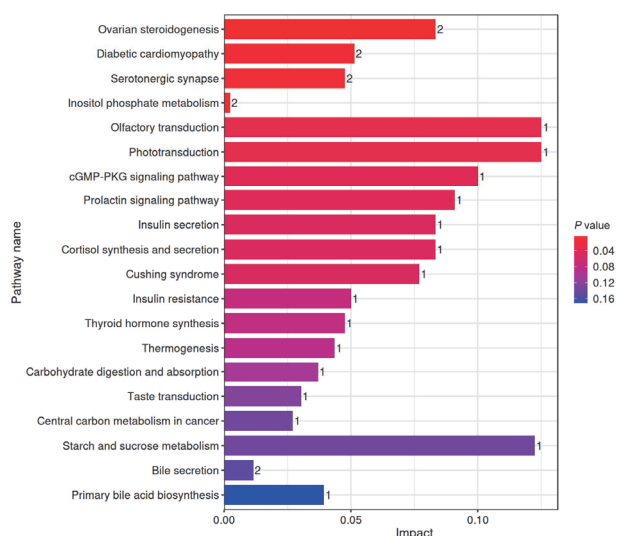


图 5 A vs E 差异代谢物 KEGG 富集的代谢通路

Figure 5 Differential metabolites pathway of KEGG (A vs E)

长期储存对人类乙二胺四乙酸(EDTA)血浆代谢组学的潜在影响, Wagner-Golbs 等^[7]对储存长达 16 年的 EDTA 血浆样本进行了代谢组学分析。231 个测试的血浆代谢物中只有 2% 在前 7 年的储存中发生了改变。受影响较大的包括复杂脂质、脂肪酸、能量代谢分子和氨基酸。人类血浆代谢组在 -80°C 下长期储存 7 年是足够稳定的, 但在更长时间的储存中会发生显著的变化。因此, EDTA 血浆样本的回顾性研究, 最好在储存的前 7 年内进行分析。也有研究者分析血液样本在冻存前不同的处理因素(离心延迟时间、暂存温度等)对代谢组学结果的影响, 发现冻存前的处理因素与乳酸的改变有关, 建议大规模的队列分析时剔除乳酸影响因素^[8]。

当温度降至液氮温度时, 细胞组织中所有的生物化学、生物物理过程处于停止状态, 使用液氮保存是目前保存生物大分子活性的最理想方法。WHO-IARC 生物样本库推荐 -130°C 作为 RNA 长期存储的最优温度。 -140°C 深低温可使胞内一切生物处于失活状态, 可维持 RNA 及其他生物大分子的完整性及功能长达 50 个月。液氮的应用分为气相(-140°C)和液相(-196°C)两种, 实际操作时需要空间、经费、操作安全性等因素综合考量。

已有研究表明, 胎盘在妊娠并发症中具有特殊的代谢特征, 通过胎盘的代谢组学研究有可能揭示妊娠并发症中母胎界面代谢异常的本质^[9]。大规模

的母婴队列样本会收集大量的组织样本, 样本的采集、处理、存储对样本后续的研究至关重要。生物样本库的样本采集、运输、处理、存储采取标准化的流程, 将样本分析前的处理因素同质化、均一化, 以减少样本分析前变量对实验结果的影响。同时, 在样本存储过程中, 对保藏设备温控实行 24 小时监控管理, 定期开展室内质控, 实现样本全流程的质控管理, 目的都是为项目研究提供高质量的样本。

总之, 获得高质量的样本, 以标准化的方式收集和存储, 以尽量减少甚至排除混杂因素。液氮储存 3~7 年对胎盘样本代谢物的稳定性影响不大, 可作为一种较好的胎盘样本低温存储方式。

参考文献

- [1] Basso O, Rasmussen S, Weinberg CR, et al. Trends in fetal and infant survival following preeclampsia[J]. *JAMA*, 2006, 296(11):1357-1362.
- [2] Wolfe LM, Thiagarajan RD, Boscolo F, et al. Banking placental tissue: an optimized collection procedure for genome-wide analysis of nucleic acids[J]. *Placenta*, 2014, 35(8):645-654.

- [3] Garwolińska D, Kot-Wasik A, Hewelt-Belka W. Pre-analytical aspects in metabolomics of human biofluids - sample collection, handling, transport, and storage[J]. *Mol Omics*, 2023, 19(2):95-104.
- [4] Ørnskov D, Waldstrøm M, Thomsen LT, et al. Quality control of biospecimens in a Danish clinical cytology biobank[J]. *Biopreserv Biobank*, 2023, 21(2):184-190.
- [5] Wu B, Sun RL, Yang XN, et al. Effect of cryopreservation of gastrointestinal tumor samples on their biomacromolecules[J]. *J Jinzhou Med Univ*, 2022, 43(4):6-13. (in Chinese)
吴彬, 孙溶励, 杨心妮, 等. 低温冻存胃肠道肿瘤样本对其生物大分子的影响[J]. *锦州医科大学学报*, 2022, 43(4):6-13.
- [6] Zhang JN, Ji J, Liu BY, et al. Quality control of nucleic acids and protein of freeze-preserving gastric cancer samples[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2016, 43(1):27-34. (in Chinese)
张佳年, 计骏, 刘炳亚, 等. 深低温冻存胃癌样本的核酸与蛋白质质量控制研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2016, 43(1):27-34.
- [7] Wagner-Golbs A, Neuber S, Kamlage B, et al. Effects of long-term storage at -80 °C on the human plasma metabolome[J]. *Metabolites*, 2019, 9(5):99.
- [8] Alexander JL, Wyatt NJ, Camuzeaux S, et al. Considerations for peripheral blood transport and storage during large-scale multicentre metabolome research[J]. *Gut*, 2024, 73(2):379-383.
- [9] Jiang Z, Ye X, Cao D, et al. Association of placental tissue metabolite levels with gestational diabetes mellitus: a metabolomics study[J]. *Reprod Sci*, 2024, 31(2):569-578.

Analysis of metabolomics detection results of placental tissues with different storage times in biological sample bank

XIANG Feiyan, CHEN Yujia, XIAO Han

【Abstract】

Objective The objective of this study was to evaluate the metabolomic characteristics and variances of placenta tissues stored for different durations in a biological sample bank using non-targeted metabolomics analysis.

Methods Ten placental tissue samples stored in liquid nitrogen for 7, 6, 5, 4, and 3 years were collected and subjected to analysis of placental metabolite levels utilizing non-targeted mass spectrometry technology.

Results Among the identified secondary metabolites, excluding unclassifiable ones, the placenta predominantly consisted of 13% amino acids, peptides, and analogues, as well as 8% fatty acids, and conjugates. Over time, the levels of D-mannose, 5'-oxidized inosine, and L-threonine increased, while anabasine and 5-hydroxyindoleacetic acid decreased. The impacted metabolic pathways included ovarian steroidogenesis, diabetic cardiomyopathy, serotonergic synapse, inositol phosphate metabolism, and olfactory transduction pathways; however, the overall changes were not significant.

Conclusion The findings suggest that storing placental samples in liquid nitrogen for 3 - 7 years has minimal impact on the stability of their metabolites, indicating that it serves as a suitable low-temperature storage method for placental samples.

【Keywords】 liquid nitrogen cryopreservation; placenta; biobank; untargeted metabolomics

Author Affiliation: Center of Biospecimen Management, Wuhan Children's Hospital (Wuhan Maternal and Child Healthcare Hospital), Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Hubei 430014, China

Corresponding Author: XIAO Han, Email: tjxiaohan1980@163.com