

妊娠期糖尿病孕妇血清和头发的代谢组学鉴定

陈旭阳, 韩顶立, 张 华

(重庆医科大学附属第一医院妇产科、中国-加拿大-新西兰联合母胎医学实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)孕妇的血清和头发的代谢物,并探索 GDM 的潜在生物标记。**方法:**49 个 GDM 孕妇纳入病例组和 44 个孕妇作为对照组,招募于妊娠 26~28 周。运用气相色谱-质谱联用仪和液相色谱-质谱联用仪来检测孕妇血液及头发标本代谢物。**结果:**在血清中鉴定出 747 种代谢物,在头发中鉴定出 545 种代谢物,其中分别有 23 种和 31 种代谢物在 GDM 组和对照组之间有统计学差异,Amphibine H($P=0.001$)、油酰乙醇胺(N -Oleylethanolamine, $P=0.005$)、3,4-Methylenepimelic acid($P=0.043$)、25-Methyl-21-tritriacontene-1,9,11-triol($P=0.004$)等在 GDM 组中明显升高,胡椒酸($P=0.029$)、2,2,9,9-Tetramethyl-undecan-1,10-diol($P=0.017$)、刺桐碱($P=0.004$)、Docosahexaenoyl Ethanolamide($P=0.021$)等在 GDM 组中明显降低。在这些差异代谢物中,油酰乙醇胺有最好区分 GDM 与正常孕妇的能力,ROC 曲线下面积为 0.846($95\%CI=0.757\sim0.920$, $P=0.005$)。**结论:**代谢组学可以帮助解释促进 GDM 发展的代谢机制。孕妇头发中发现的代谢物油酰乙醇胺能够区分 GDM,提示孕妇头发有作为生物标记物来源的可能。

【关键词】妊娠期糖尿病;代谢组学;气相色谱-质谱法;液相色谱-质谱法

【中图分类号】R714.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-12-11

Identification of metabolomics profiling in maternal urine and hair for gestational diabetes mellitus

Chen Xuyang, Han Dingli, Zhang Hua

(Department of Obstetrics and Gynaecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Canada - China - New Zealand Joint Laboratory of Maternal and Fetal Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the maternal metabolome on serum and hair associated with gestational diabetes mellitus (GDM) and to explore the potential biomarker of GDM. **Methods:** A total of 49 GDM cases and 44 controls were recruited at 26 to 28 weeks of gestation. The serum and hair metabolomes were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). **Results:** Of the 747 metabolites identified in serum and 545 metabolites identified in hair, 23 and 31 were significantly different between GDM and control, respectively. For example, Amphibine H ($P=0.001$), N -Oleylethanolamine ($P=0.005$), 3,4-Methylenepimelic acid ($P=0.043$), 25-Methyl-21-tritriacontene-1,9,11-triol ($P=0.004$) were increased in GDM. For instance, piperic acid ($P=0.029$), 2,2,9,9-Tetramethyl-undecan-1,10-diol ($P=0.017$), Lenticin ($P=0.004$), Docosahexaenoyl Ethanolamide ($P=0.021$) were decreased in GDM. And of the all significant metabolites, N -Oleylethanolamine had the greatest ability to classify GDM status, with area under the receiver operating characteristic curve of 0.846 ($95\%CI=0.757$ to 0.920 , $P=0.005$). **Conclusion:** Metabolomics can assist with the elucidation of metabolic mechanisms underpinning GDM development. The

metabolite (N -Oleylethanolamine) that could classify GDM status was identified in the hair of participants; highlighting the potential of maternal hair as a source of biomarkers.

【Key words】 gestational diabetes mellitus; metabonomics; gas chromatography-mass spectrometry; liquid chromatography-mass spectrometry

作者介绍: 陈旭阳, Email: 522454363@qq.com,

研究方向: 妊娠期糖尿病发病机制研究。

通信作者: 张 华, Email: zh2844@gmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81571453, 81771607);
国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号: 81701477);
国家自然科学基金外国青年学者研究基金项目(编号:
81650110522); 国家外专局 111 计划资助项目(编号: Yuwaizhuan
(2016)32]; 重庆市卫生计生委医学科研计划重点资助项目
(编号: 2017ZDXM008)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181225.1356.002.html>
(2018-12-26)

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是妊娠前糖代谢正常, 妊娠期才出现的糖尿病, 糖尿病孕妇中 90% 以上为 GDM, 糖尿病合并妊娠者不足 10%^[1]。过去 20 年 GDM 的发病率持续增加, 已成为最常见的妊娠期并发症之一。在中国, 高达 20% 的孕妇患 GDM^[2]。GDM 将对母儿造成近远期不良影响, 包括增加巨大儿、新生儿低血糖、肩难产等风险^[3], 儿童期肥胖症和 2 型糖尿病的风险亦增高, 女性后代更易发生 GDM; 母亲则在分娩后 5~10 年易患 2 型糖尿病^[4]。然而, GDM 的发病机制仍不清, 没有发现其明确的生物标志物, 以至于临床上难以早期预测和预防。

代谢物是生物系统中所含有的大量低分子化合物。代谢组学则是一种研究这些代谢物的强大组学策略, 生物体内的代谢组可以反映出生理状态和外界环境刺激下的表型改变^[5]。代谢组学通常被用于研究代谢紊乱, 识别疾病的生物标志物^[6-8]。因此, 代谢分析可作为一种潜在的工具, 用于识别 GDM 的生物标志物, 并阐明与其发展相关的代谢机制。已有关于 GDM 孕妇的血液标本研究^[9], 并得到了较好的结果。但由于标本的来源、稳定性、可重复取样性决定了血液并不是妊娠期筛查项目的最佳标本。相比之下, 头发较稳定, 能较长时间地保留内源性化合物以及外界环境影响, 且取样时孕妇依从性好。故本实验运用气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatography-mass spectrometry, GC/MS) 和液相色谱-质谱联用仪 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS) 来检测孕妇血液及头发标本代谢物, 以此鉴定 GDM 发病过程中的代谢信息, 并着眼于其生物标志物的筛选。

1 材料与方法

1.1 实验材料

甲醇、氢氧化钠、硫酸、氢氧化钾、氯仿、碳酸氢、2,3,3,3-D4-丙氨酸、氯甲酸甲酯 (MCF) 和吡啶购于美国 Sigma 公司; 乙腈、甲酸、甲酸铵购于美国 Thermo Fisher 公司; 本研究中所用化学试剂均为分析纯。Ostro 96 孔通过式样品制备板购于美国 Waters 公司, 珠打管购于德国 SARSTEDT 公司。

超低温冷冻干燥系统 (美国 Labconco 公司), 恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司), Bioprep-24 生物样品均质仪 (杭州奥盛仪器有限公司), GC7890 型气相色谱

仪联合 MSD5975 型质谱仪系统 (美国 Agilent 公司), Acquity UPLC I-Class 系统联合 Xevo G2 Qtof 质谱系统 (美国 Waters 公司)。

1.2 样本采集与材料

在此病例对照试验中, 49 名 GDM 孕妇和 44 名正常孕妇招募于重庆医科大学附属第一医院, 医学伦理由重庆医科大学医学研究伦理委员会审批通过 (审批号 2015009)。所有受试孕妇均于孕 24~28 周进行 75 g 口服糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 来鉴定是否患有 GDM, 诊断标准采用国际糖尿病和妊娠研究组协会指南 (空腹血糖 ≥ 5.1 mmol/L, 或 75 g OGTT 后 1 h 血糖 ≥ 10 mmol/L, 或 75 g OGTT 后 2 h 血糖 ≥ 8.5 mmol/L)。于孕 26~28 周采取血清及头发标本, 收取的血液标本至少凝结 30 min, 于 4 °C, 3 000 r/min 离心 10 min 后收取上清液再于 4 °C, 4 000 r/min 离心 10 min, 收取上层血清并分装保存 -80 °C 备用。头发标本取于孕妇头部枕骨区, 距头皮 0.5 cm 剪下并用铝箔封闭保存于 4 °C。并采集孕妇和胎儿信息。

1.3 GC/MS 样本预处理与衍生化

血清样本预处理: 在干净的 1.5 mL EP 管中加入 150 μ L 血清样本和 20 μ L 内参 2,3,3,3-D4-丙氨酸 (10 mmol/L) 混匀, 然后加入预冷的甲醇 510 μ L, 涡旋混匀 30 s 后放于 -20 °C 保存 30 min, 再于 4 °C, 17 000 g 离心 15 min, 吸取 480 μ L 上清液于干净 EP 管, 于真空离心蒸发浓缩器抽干 7 h, 冻存于 -80 °C 存储备用。

头发样本预处理: 首先分别用蒸馏水和甲醇清洗 2 次, 称量 5~6 mg 头发, 并放于玻璃管中, 同时加入 400 μ L 氢氧化钾 (1 mol/L) 和 20 μ L 内参 2,3,3,3-D4-丙氨酸 (10 mmol/L)。在 54 °C 孵育 30 min 后, 4 000 r/min 离心 5 min。再于 54 °C 孵育样本 18 h。加入 67 μ L 硫酸 (3 mol/L) 中和碱性环境。再加入 1 mL 甲醇以消除盐及蛋白质的影响。4 000 r/min 离心 5 min 后吸取 350 μ L 上清液于干净 EP 管中, 于真空离心蒸发浓缩器抽干 8 h, 冻存于 -80 °C 存储备用。

衍生化: 取 200 μ L 氢氧化钠 (1 mol/L) 加入抽干的样本中, 涡旋混匀后, 移入干净的玻璃管中。添加 167 μ L 甲醇和 34 μ L 吡啶。添加 20 μ L MCF, 涡旋振荡 30 s, 再次添加 20 μ L MCF, 涡旋振荡 30 s, 添加 400 μ L 氯仿, 振荡 10 s。加入 400 μ L 碳酸氢钠 (50 mmol/L), 振荡 10 s。以 1 500 r/min 离心 5 min 后, 弃上层液体后, 添加少量硫酸钠, 吸取管内多余的水, 吸取下层有机层用于 GC/MS 分析。

1.4 LC/MS 样本预处理

血清样本预处理: 血清样本采用 Ostro96 孔通过式样品制备板去除蛋白质和磷脂。每孔加入 100 μ L 血清样本和 400 μ L 乙腈 (含 1% 甲酸) 混匀, 将样品制备板通过正压处理装置获取过滤液, 吸取过滤液于干净 EP 管中, 于真空离心蒸发浓缩器抽干 7 h, 冻存于 -80 °C 存储备用。样本溶于 50 μ L

5%的乙腈,再用于 LC/MS 分析。

头发样本预处理:首先分别用蒸馏水和甲醇清洗两次,称量 20 mg 头发放入珠打管,于生物样品均质仪破碎研磨头发样本致粉末状,加入 700 μ L 甲醇、乙腈和 2 mmol/L 甲酸铵混合溶液(2:2:1;v/v/v)作为代谢物萃取液,放入振荡孵箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 18 h。然后以 10 000 r/min,10 min 离心 2 次,取 400 μ L 上清液于干净 EP 管中,在真空离心蒸发浓缩器抽干 8 h,冻存于 -80 $^{\circ}$ C 存储备用。样本溶于 200 μ L 10%的乙腈,再用于 LC/MS 分析。

1.5 GC/MS 分析

气相色谱-质谱联用仪分析衍生样本,采用 Agilent GC7890 系统以及 MSD5975 质谱 EI(70eV 发射电子)。气相柱子(ZB-1701,30 m $\times$ 250 μ m id $\times$ 0.15 μ m,5 m guard column,Phenomenex)用于分离非极性化合物。进样口温度为 290 $^{\circ}$ C,采用不分流模型,氮气流速为 1 mL/min。气相烤箱首先设定在 45 $^{\circ}$ C 维持 2 min,以 9 $^{\circ}$ C/min 的速度上升到 180 $^{\circ}$ C 并维持 5 min,然后 40 $^{\circ}$ C/min 的速度上升到 220 $^{\circ}$ C 并维持 5 min,40 $^{\circ}$ C/min 的速度上升到 240 $^{\circ}$ C 并维持 11.5 min,最后 40 $^{\circ}$ C/min 的速度上升到 280 $^{\circ}$ C 并维持 7 min。连接杆温度、质谱四级杆以及质谱离子源的温度分别为 250 $^{\circ}$ C、230 $^{\circ}$ C 以及 150 $^{\circ}$ C。质谱检测范围是 38~550 m/z,扫描速度是 3.12 scans/sec。

1.6 LC/MS 分析

液相分析使用 Waters Acquity UPLC I-Class 系统及 Xevo G2 Qtof 质谱检测。血清标本采用 Acquity UPLC BEH HILIC column(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7 μ m,Waters),正离子模型,0.1%甲酸作流动相 A,100%乙腈作流动相 B,流速 0.45 mL/min。分析时间为 14 min,流动相 A 的浓度梯度最初为 99%,3 min 时下降到 85%,7 min 时为 50%,9 min 时为 5%,12 min 时为 1%,然后回到最初的 99%。毛细管电压 3 kV,采样锥电压 25 V,发射源温度 120 $^{\circ}$ C,脱溶剂温度 300 $^{\circ}$ C,数据采集使用质谱单一化模型和 MSE 功能,扫描质量范围 50~1 200 m/z,扫描时间 0.2 s。头发标本采用 Acquity UPLC HSS T3 column(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.8 μ m,Waters),正离子模型,0.1%甲酸作

流动相 A,100%乙腈作流动相 B,流速 0.45 mL/min。分析时间为 20 min,流动相 A 的浓度梯度最初为 99%,1 min 时下降到 95%,3 min 时为 60%。17 min 时为 2%,18 min 时为 1%,然后回到 98%。毛细管电压 2.7 kV,采样锥电压 25 V,发射源温度 120 $^{\circ}$ C,脱溶剂温度 350 $^{\circ}$ C,数据采集使用质谱单一化模型和 MSE 功能,扫描质量范围 50~1 500 m/z,扫描时间 0.2 s。

1.7 数据处理与统计分析

GC/MS 数据结合 MCF 质谱库数据,使用 AMDIS 软件识别化合物,匹配度>70%且保留时间与数据库差异小于一分钟的代谢物作为鉴定结果。LC/MS 数据使用 Progenesis QI 软件处理,数据库查询以人类代谢物数据库(human metabolome database,HMDB)为主,数据库配比得分 $\geq$ 44.5 的代谢物作为鉴定结果。数据均使用 R 软件做 t 检验,Mann-Whitney 检验和 logistics 回归统计分析,质谱数据采用 logistics 回归分析并将孕妇年龄和孕前 BMI 作为混杂因素加以校正,代谢通路分析应用京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)在线数据库评估代谢活跃得分,检验水准 $\alpha=0.05$ 。R 软件绘制差异代谢物及代谢通路线图。差异代谢物的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve,ROC)曲线由 Metaboanalyst 3.0 计算绘制。

2 结 果

2.1 孕妇及胎儿一般情况

孕妇及胎儿的基本信息见表 1。由于分组需要,在 GDM 组和正常组之间,75 g OGTT 空腹,1 h 和 2 h 的血糖值均有统计学差异。相比于正常组来说,GDM 组的年龄和孕前 BMI 都偏大,并且分娩时间较早。2 组间胎儿的出生情况基本无差异。

2.2 代谢组学分析

血清标本一共在 GC/MS 里鉴定出 95 个代谢物,在 LC/MS 里鉴定出 652 个代谢物,其中 23 个代谢物(5 个来自 GC/

表 1 孕妇及胎儿一般情况 [$M(Q_1,Q_3)$, $\bar{x} \pm s$]

一般情况	GDM组 ($n=49$)	正常组 ($n=44$)	统计量值	P 值
年龄(岁)	32(29,34)	29(27,33)	731.500	0.008 ^a
孕前 BMI(kg/m ²)	21.6(20.2,24.6)	20.7(19.0,21.8)	755.500	0.013 ^a
OGTT_空腹(mmol/L)	5.0 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 0.3	-5.499	0.000 ^b
OGTT_1h(mmol/L)	10.6 $\pm$ 1.7	7.6 $\pm$ 1.2	-9.979	0.000 ^b
OGTT_2h(mmol/L)	9.4(8.7,10.6)	6.9(6.0,7.6)	150.500	0.000 ^a
孕周(周)	39.2 $\pm$ 1.2	39.8 $\pm$ 1.1	2.258	0.026 ^b
胎儿出生体质量(g)	3 299 $\pm$ 450	3 380 $\pm$ 415	0.907	0.367 ^b
胎儿头围(cm)	34.0(33.9,35.0)	34.8(34.0,35.0)	696.000	0.317 ^a
胎儿身高(cm)	49.6 $\pm$ 2.0	49.9 $\pm$ 1.6	0.862	0.391 ^b

注:a, P 值来自 Mann-Whitney 检验;b; P 值来自 t 检验

MS, 18 个来自 LC/MS) 在 GDM 组和正常组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。在头发标本里, GC/MS 鉴定出 154 个代谢物, LC/MS 鉴定出 391 个代谢物, 其中 31 个代谢物 (7 个来自 GC/MS, 24 个来自 LC/MS) 在 GDM 组和正常组之间有差异。图 1 显示了所有差异代谢物在 2 组间的比值差异, 氨基酸、氨基酸衍生物、苯衍生物和有机酸类代谢物在 2 组间既有升高又有降低, 其中有机酸类代谢物在总的差异代谢物中比例最大。同时不饱和脂肪酸在血清中较多, 且在 GDM 组中多数是减少的。相反, 脂肪酸衍生物在血清中很少, 而在头发里发现较多, 在 GDM 组中多数也是减少的。

鉴定出的代谢物运用 KEGG 数据库分析出了 44 个具有差异性的代谢通路, 其中 6 个来自血清, 38 个来自头发。图 2 显示了差异代谢通路在 2 组间比值差异, 其中碳水化合物代谢、氨基酸代谢、外源性物质降解代谢为主要的代谢通路, 且这些代谢通路在 GDM 组大多是升高的。同时 2 型糖尿病代谢通路及胰岛素分泌通路在 GDM 组是升高的。

所有差异代谢物均由 Metaboanalyst 3.0 计算分析 ROC 曲线在孕妇头发里发现的油酰乙醇胺有最好的 ROC 曲线下面积 (AUC), $AUC = 0.846$ ($95\% CI = 0.757 \sim 0.920$, $P = 0.005$, 图 3)。

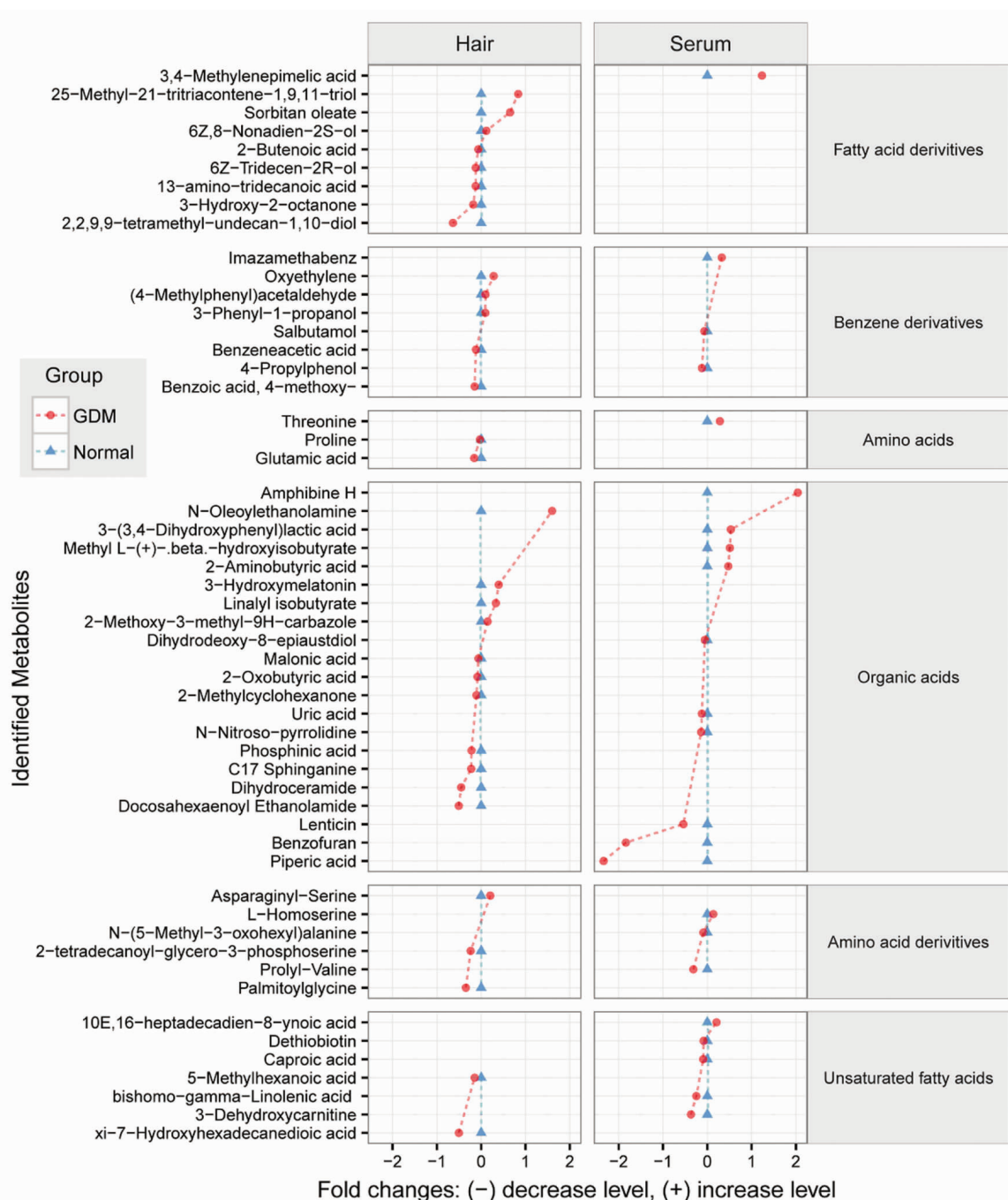


图 1 差异代谢物在 GDM 组和对照组的比值

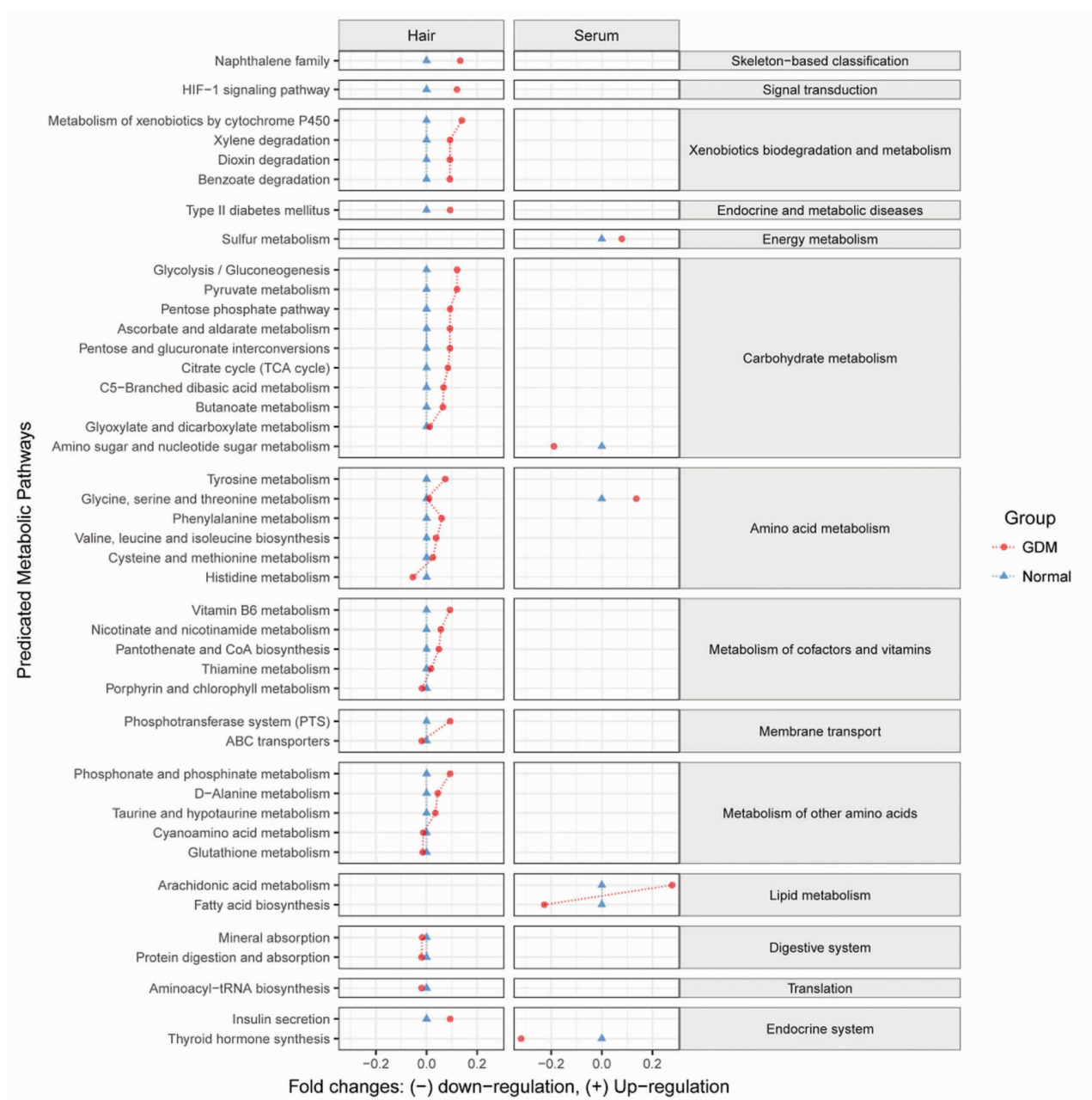


图2 差异代谢通路在GDM组和对照组的比值

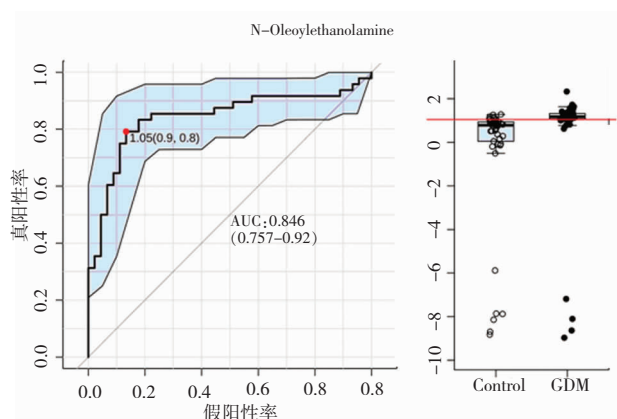


图3 油酰乙醇胺的 ROC 曲线

3 讨论

糖尿病患者慢性的高糖环境会对组织结构和器官功能产生毒性作用,包括胰岛。虽然已经有不同的生化通路解释了葡萄糖的毒性作用机制,但这些通路的共同点则是过量活性氧的形成,长时间的活性氧暴露引起慢性氧化应激,进而导致胰岛素基因表达与胰岛素分泌缺陷以及细胞凋亡增加^[10]。虽然大量研究证实 GDM 与 2 型糖尿病有诸多相似之处,但 GDM 的发病机制还尚未明确。目前临床上检测 GDM 的手段有限,缺乏早期检测能力,只能在孕

24~28 周依靠 OGTT 来判断,此时孕妇的孕周已经较大,外加孕妇早期对于疾病的认识不足,会使孕妇及胎儿较长时间暴露于高糖环境,造成不利影响。因此,临床上迫切希望发现 GDM 的生物标志物来早期检测 GDM,进而较早发现 GDM 的高危孕妇并加以干预以减少不良结局。

本研究则首次联合运用 GC/MS 和 LC/MS 检测 GDM 孕妇的不同生物样本。在 GDM 组的血清中发现 2-氨基丁酸明显升高。2-氨基丁酸可以促进谷胱甘肽的合成,谷胱甘肽是一种具有抗氧化能力的重要肽类。众所周知,谷胱甘肽合成的失调被认为是导致多种与氧化应激相关病理状况的发病机制。同时,2-氨基丁酸可通过谷丙转氨酶生成中间化合物酮戊二酸,进而转化成羟基丁酸,羟基丁酸这种代谢物已被研究发现可以在非糖尿病人群中作为胰岛素抵抗的早期生物标志物,可能与增加的脂质氧化和氧化应激相关^[11-12]。值得关注的是,在 GDM 和正常孕妇的所有差异代谢物中,头发里发现的油酰乙醇胺有最高 ROC 曲线下面积(AUC= 0.846, 95%CI= 0.757~0.920),能最准确地区分正常妊娠与 GDM。油酰乙醇胺是过氧化物酶体增殖物激活受体- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α , PPAR- α)的激动剂,能激活 PPAR- α ^[13]。PPAR- α 是参与脂类代谢的一种转录因子,它的激活发生在胰岛素抵抗的情况下会增加机体对能量原料缺乏的反应,即细胞无法获取可用的血糖,因而机体通过糖异生和脂解作用来产生 ATP^[13]。PPAR- α 的激活可以增强脂解作用,因此在 GDM 孕妇头发里发现的大量油酰乙醇胺可能提示高水平的 PPAR- α 激活和脂解作用,之前有学者也在糖尿病中观察到这种高水平的脂解作用^[14]。

血液标本需要损伤性采样和立即处理,如不能及时分析,也需存储在特定的条件下。此外血液受饮食和日常活动影响,代谢物成分是非常短暂的,因此血液标本受限于研究长期影响因素。相反,头发每月生长 1 cm 左右,在生长过程中能吸收内源性化合物和环境中的化学物质,能反映较长时间代谢物在孕妇体内的变化情况。头发同时也是非损伤性采样,处理也比血液更简单,更有效率。在资源匮乏地区,头发是用于寻找生物标志物更加实际的来源。结合油酰乙醇胺的生物合理性及较高的 AUC,提示其作为潜在的预测生物标志物的可能。头发中发现较多的差异代谢通路,同时还强化孕妇头发作为代谢和生物信息资源来筛查孕早期并发症的重要性。相比于需要损伤性采样以及代谢物高度

动态改变的血液样本,孕妇的头发更易于采集和稳定,并且存储条件要求低,对于资源匮乏、采样困难的地区尤为重要。但是这一发现需要在更大的样本量以及孕早期得到验证。

综上所述,本研究结果提示利用代谢组学的方法可以发现 GDM 的相关代谢物改变。相比孕妇血液中发现的 2-氨基丁酸,头发里发现的油酰乙醇胺可以较好地鉴别 GDM 状态。未来的研究可以考虑将油酰乙醇胺作为孕早期 GDM 高危女性的一个潜在早期生物标志物。

参 考 文 献

- [1] 谢 幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013.
- [2] Zhu WW, Yang HX, Wang C, et al. High prevalence of gestational diabetes mellitus in Beijing; effect of maternal birth weight and other risk factors[J]. Chin Med J(Engl), 2017, 130(9): 1019-1025.
- [3] Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground[J]. Lancet, 2009, 373(9677): 1789-1797.
- [4] Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review[J]. Diabetes Care, 2002, 25(10): 1862-1868.
- [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] Connor SC, Hansen MK, Corner A, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics data to aid biomarker discovery in type 2 diabetes[J]. Mol Biosyst, 2010, 6(5): 909-921.
- [7] Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(2): 431-440.
- [8] Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease[J]. Cell, 2008, 134(5): 714-717.
- [9] Dudzik D, Zorawski M, Skotnicki M, et al. Metabolic fingerprint of gestational diabetes mellitus[J]. J Proteomics, 2014, 103: 57-71.
- [10] Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(41): 42351-42354.
- [11] Landaas S. The formation of 2-hydroxybutyric acid in experimental animals[J]. Clin Chim Acta, 1975, 58(1): 23-32.
- [12] Gall WE, Beebe K, Lawton KA, et al. α -hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10883.
- [13] Guzman M, Lo Verme J, Fu J, et al. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α) [J]. J Biol Chem, 2004, 279(27): 27849-27854.
- [14] Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans[J]. J Lipid Res, 1994, 35(2): 177-193.

(责任编辑:冉明会)