

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.24.009

基于 $^1\text{H-NMR}$ 技术的肝癌尿液样品代谢组学研究*

胡雪芳 王彦[△] 贾孟琪 王薇薇 闫超

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的:探索区分健康对照组与肝癌患者的潜在标志代谢物。**方法:**运用 SIMAC 13.0 软件对数据进行多元分析方法 PCA、PLS 及 OPLS 的方法分析。**结果:**应用 SPSS 21.0 统计软件对其数据进行 ROC 曲线分析,发现肝癌患者在 α -葡萄糖、 β -葡萄糖和肌酐的代谢路径上都发生了一定的异常变化。这 3 个代谢物拟合综合变量的 ROC 曲线的 AUC 值为 0.972(灵敏度为 90.6%,特异性为 92.9%),说明此代谢标记物组具有较高的诊断准确度。**结论:** α -葡萄糖、 β -葡萄糖和肌酐可以作为区分健康对照人群与肝癌患者的潜在标志代谢物。

关键词:NMR;氨基酸;肝癌;尿液;代谢组学

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)24-4647-05

1H-NMR Based Metabonomic Investigation of the Urine of Liver Cancers Patients*

HU Xue-fang, WANG Yan[△], JIA Meng-qi, WANG Wei-wei, YAN Chao

(College of Pharmacy, School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: The purpose of this article was to study the different metabolites of urine between liver cancers and normal group by $^1\text{H-NMR}$ technology. **Methods:** This research analysed the data using the multivariate analysis method PCA, PLS and OPLS by SIMAC 13.0. **Results:** SPSS 21.0 statistical software was applied to analyze the ROC curve of the data. The concentration changes of α -glucose, β -glucose and creatinine were found in the metabolic pathways between liver cancers patients and normal group. The AUC value of the ROC curve of the three metabolites fitted with synthetic variables is 0.972 (sensitivity is 90.6%, specificity is 92.9%). This metabolic marker group has high diagnostic accuracy. **Conclusion:** These three urine metabolites can be used as potential marker metabolites to distinguish normal control group and liver cancers patients.

Key words: NMR, amino acid; Liver cancers; Urine; Metabonomic

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)24-4647-05

前言

肝细胞癌(HCC)是一种恶性肝脏疾病,在全球常见恶性肿瘤中排名第六,在致命癌症中排名第三,探索肝癌早期诊断和疗效评价的代谢标记物具有重要意义^[1]。目前,已有较多用血液、尿液、组织等作为标本探索肝相关疾病标记物的研究。如 Bertino 等^[2]发现在血液样本中 AFP、 α -L-岩藻糖苷酶(AFU)和甲胎蛋白异质体(AFP-L3)等物质有明显变化,可作为肿瘤标记物;齐素文等^[3]采用 $^1\text{H-NMR}$ 分析了 HBV 肝硬化患者和酒精性肝硬化患者的组织样本后,发现肌酸、谷氨酸、谷氨酰胺、异丁酸和乙酸乙酯是区分 HBV 肝硬化患者和酒精性肝硬化患者的生物标记物;汤靓等^[4]采用 LC-MS 研究小鼠血液和肝脏组织,发现棕榈酰肉碱、二氢鞘氨醇和胆汁酸衍生物等代谢标记物;Shariff 等^[5]研究丙型肝炎病毒感染的埃及人中肝癌、肝硬化

和健康对照组的尿液,鉴定出肌酸、肌酐、甘氨酸、柠檬酸盐、马尿酸盐、氧化三甲胺和肉毒碱 7 种代谢物^[6]。Chen 等人^[7]联合 GC-TOFMS 和 UPLC-QTOFMS 两个平台对血清、尿液两种样本肝癌、肝血管瘤及健康对照组进行研究,鉴定出与胆汁酸、糖酵解、游离脂肪酸、蛋氨酸、尿素循环等代谢有关的血清代谢物及尿液代谢物^[8]。但目前采用 $^1\text{H-NMR}$ 分析技术,以尿液为研究对象,分析肝癌标记物的文献少,只有 Shariff 等针对丙型肝炎病毒感染引起的肝癌尿液样品做了相关研究^[9]。因此,本研究将以 $^1\text{H-NMR}$ 技术为平台,对健康对照组和肝癌患者的尿液样品进行数据采集,结合多变量统计分析寻找和确定与肝癌相关的小分子代谢标记物,以期对肝癌早期诊断、个体化治疗方案等提供依据^[10]。

1 材料与方法

* 基金项目:上海市科委科研项目(16142200300, 17142201000);上海市引进技术的吸收与创新专项(XC-ZXSJ-02-2016-11);上海市标准化推进专项(17DZ2201500)

作者简介:胡雪芳(1982-),女,研究生,主要研究方向:代谢组学,E-mail: huxuefang12345@126.com

[△] 通讯作者:王彦(1971-),女,博士生导师,教授,主要研究方向:代谢组学,中药药效物质基础研究,E-mail: wangyan11@sjtu.edu.cn,电话:021-34205673

(收稿日期:2018-04-27 接受日期:2018-05-23)

1.1 材料

核磁共振波谱(NMR)仪(Bruker AVANCE-III 400MHz)、ThermoFisher 超速离心机、SAMSUNG 低温冰箱、Sartorius 电子天平、KQ-250DB 数控型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)、Sartorius pH 计、Eppendorf 移液枪、核磁管(青岛腾龙微波科技有限公司)、Axygen 离心管。

氨基酸对照品:丝氨酸(Ser)、组氨酸(His)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、甲硫氨酸(Met)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、色氨酸(Trp)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、半胱氨酸(Cys)、胱氨酸(Cy2)、烟酰胺(Nia)、鸟氨酸(Orn)、牛磺酸(Tau)、瓜氨酸(Cit)和羟脯氨酸(Hyp)(纯度均大于 99%,国药集团化学试剂有限公司);重水(Aldrich),氘代三甲基硅烷基丙酸钠盐(3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt, TSP, Aldrich),磷酸一氢钠(分析纯,上海实验试剂有限公司),磷酸二氢钾(分析纯,永华化学科技有限公司)。肝癌患者尿液和健康对照组尿液(收集者均签署知情同意书,收集方案得到东方肝胆医院伦理委员会批准)。

1.2 方法

1.2.1 样品的配置 将尿液样品从低温冰箱中取出放置于室温,待溶解后取 350 μ L 至离心管中,加 300 μ L 混合磷酸盐缓冲剂 (0.2 M Na₂HPO₄- KH₂PO₄ 的 D₂O 溶液,含有 0.05% TSP,

pH 值 7.45),摇晃均匀。静置 15 分钟后,放入超速离心机中,以 11 000 r/min 的高速离心 15 min,取出,取上清液 550 μ L 放入外径为 5 mm 的核磁管中待测。

1.2.2 采集参数 用预饱和的 noesygppr1d 脉冲序列进行测定,采集参数:谱宽(SW)为 4606 Hz,混合时间(D8)为 0.1 s,弛豫延迟时间(D1)为 3 s,采集点数(TD)为 32 k,采集时间(AQ)为 3.6 s,空采次数(DS)为 4 次,扫描次数(ns)为 1000 次^[1]。

1.2.3 数据处理 使用 ACD2016 软件对采集的 NMR 图谱进行手动的定标、相位校正和基线校正的处理。对每张图谱按照每段 0.04 ppm 的宽度分段进行积分,区域段 4.6 ppm~6.5 ppm 之间的积分删除以避免残余水饱和度和尿素的影响。对每张图谱的积分值进行归一化处理,所得数据输出并保存到 Excel 文件中,得到一个 65 $\times$ 187 的数据矩阵,矩阵每一行代表一个样本,每一列与相应的化学位移区间(变量)对应。

1.3 统计学分析

为查看健康对照组和肝癌患者两类样本之间代谢产物的变化,使用核磁共振波谱仪(Bruker AVANCE-III 400MHz)分别采集其尿液样本的 ¹H-NMR 谱图,代表性图谱如图 1 所示。对照组和肝癌患者的 ¹H-NMR 谱有明显的不同,特别是脂肪区(3.0-4.0 ppm),这部分主要是葡萄糖的亚甲基质子吸收电场能量跃迁到高能态形成的吸收,表示在这两组样本中葡萄糖代谢显著的不同。

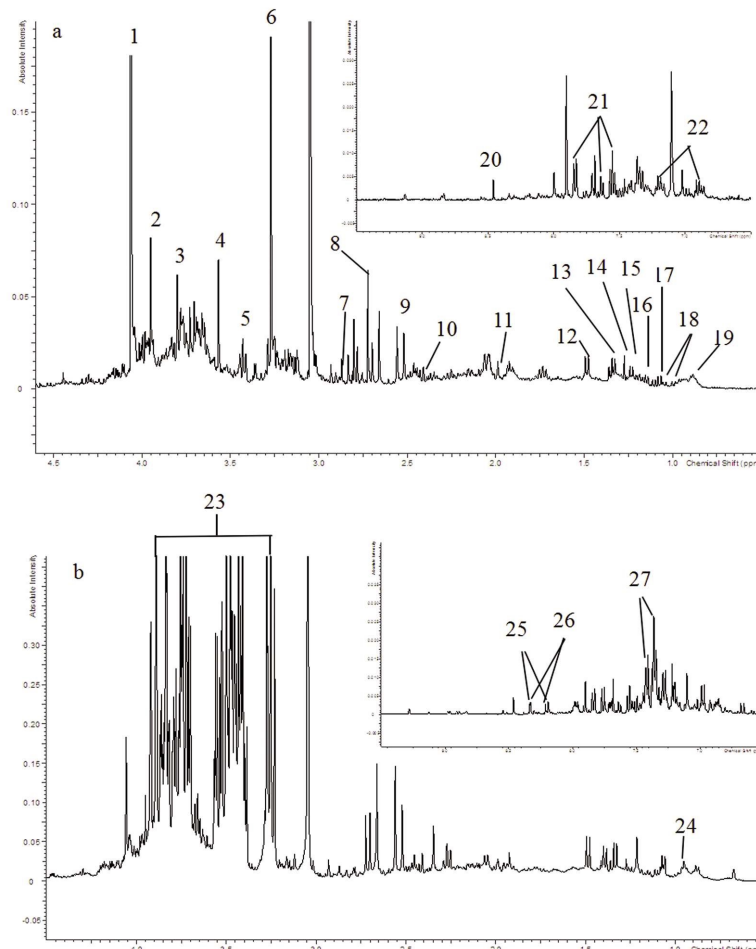


图 1 尿液核磁共振 400MHz ¹H-NMR 谱:(a)健康对照组,(b)肝癌患者

Fig.1 Typical 400MHz ¹H-NMR spectra of urine samples: (a)Normal Controls, (b)HU model group

对所有健康对照组和肝癌患者样本的 ^1H -NMR 谱图进行采集后,根据我们已建立的氨基酸谱图数据和相关文献^[2],共鉴别出 27 种代谢产物,如表 1 所示。表中的标号和图 1 中的标

号相对应,表明了图 1 中特征代谢物的出峰位置。表 1 中鉴定出的特征代谢物主要有氨基酸、脂肪酸和一些小分子胺类物质,这些物质将为我们发现代谢标记物提供物质基础。

表 1 氢谱中编号与对应的特征代谢物信息

Table 1 The information of numbers and metabolites in ^1H -NMR spectra

Number	Characteristic Metabolite	Characteristic Chemical Shift(δ , ppm)
1	Creatinine	4.06(s),3.06(s)
2	Creatine	3.95(s),3.03(s)
3	Guanidinoacetic Acid	3.79(s)
4	Glycine	3.56(s)
5	Taurine	3.45(t),3.25(t)
6	Trimethylamine N-oxide(TMAO)	3.27(s)
7	Trimethylamine(TMA)	2.87(s)
8	Dimethylamine(DMA)	2.72(s)
9	Citric Acid	2.67(d),2.54(d)
10	Succinic Acid	2.41(s)
11	Acetate	1.94(s)
12	Alanine	1.47(d)
13	Lactic Acid	1.33(d)
14	3-Hydroxyl Isovaleric Acid	1.27(s)
15	Methylmalonic Acid	1.23(d)
16	3- Hydroxyl Butyric Acid	1.19(d)
17	Isobutyric Acid	1.05(d)
18	Valine	1.03(d),0.98(d)
19	Butyric Acid	0.88(t)
20	Formic Acid	8.46(s)
21	Hippuric Acid	7.83(d),7.64(t),7.55(t)
22	Tyrosine	7.89(d),7.18(d)
23	Glucose	3.53(dd),3.72(dd),3.24(dd), 3.40(t),3.47(ddd),3.49(t), 3.70(dd),3.90(dd)
24	2- Hydroxyl Butyric Acid	0.95(t)
25	Hypoxanthine Riboside	8.35(s),8.22(s)
26	Allopurinol	8.33(s),8.17(s)
27	Phenaceturic Acid	7.40(d),7.35(m)

Note: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m, multiple.

采集 65 个样本(30 个健康对照组和 35 个肝癌患者)得到 NMR 谱图,数据处理整理成 Excel 表后,运用 SIMCA 13.0 统计软件进行 PCA 分析。PCA 分析使用“UV(unitvariance scaling)”的中心化换算数据标度换算方式,结果如图 2 所示。

通过无监督的 PCA 统计分析,我们能够发现健康对照组与肝癌患者在二维得分图上有部分分开的趋势,说明组间差异在尿液代谢组层面得到了一定的体现,提示相对于健康对照组而言,肝癌患者的代谢谱发生了部分改变。

为了进一步排除组内误差的干扰,消除非疾病因素及其它随机误差的影响,最大化组间差异,以便寻找组间差异性代谢物,我们采用监督性的 OPLS 分析方法更好地去除与样品分组不相关的差异,对不同组间的血清样本代谢全谱进行区分考察^[13]。另外,由于图 1 PCA 得分图中有四个样本点(n18,n19,HU-210,HU-211)落在 95%置信区间之外,这四张原始图谱与其它图谱有明显的差异,则这四个样本作为离群点去除;部分重叠区(HU-212)的原始图谱与其它图谱也有明显的差异,则这个样本

也作为异常点去除。

健康对照组和肝癌患者的分类信息被作为反应变量, NMR 数据作为 X 变量, 将 60 个样本(28 个健康者和 32 个肝癌患者) 采集得到的代谢组学数据集使用中心化换算(unitvariance scaling, UV)的数据标度换算方式建立 OPLS 模型, 结果如

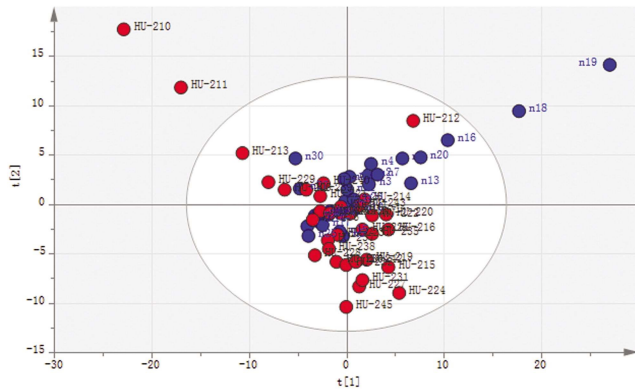


图 2 样本 1H-NMR 谱的 PCA 得分图

注:(●)为健康对照组;(●)为肝癌患者

Fig.2 PCA score plots of 1H-NMR spectra

The symbols represent the different class: Normal Controls (●);

HU model group (●)

筛选显著性代谢物是代谢组学分析中重要的一步, 常用的筛选标准有 VIP 值, VIP 值大于 1 的变量, 才有统计学意义^[14]。变量的 VIP 值越大暗示该变量差异性越强, 对模型的贡献率也越大。同时要进 t-test 检验($P < 0.05$), 选取健康对照组和肝癌患者之间具有显著差异的变量, 共有特征性变量 62 个。

2 结果

结合已经解析的氢谱, 可以从 62 个特征性变量中分析得 12 个详细的特征代谢物: 丁酸、缬氨酸、2- 羟基丁酸、柠檬酸、二甲胺、肌酸酐、肌酸、 α - 葡萄糖、 β - 葡萄糖、牛磺酸、马尿酸和甲酸。

对 12 个特征代谢物应用 SPSS 21.0 统计软件对其进行 ROC 曲线分析, ROC 曲线下面积(AUC) > 0.7 才有一定的准确性。根据 ROC 曲线下面积(AUC)的大小, 确定哪些关键差异代谢物变量可以成为肝癌尿液生物标记物。其中, 3 个代谢物符合筛选标准: 肌酸酐: AUC=0.892; α - 葡萄糖: AUC=0.748; β - 葡萄糖: AUC=0.900。应用 SPSS 21.0 统计软件的逻辑回归算法(logistic regression)将其拟合为一个综合变量(multivariable), 并以此变量在两组中的拟合值绘制 ROC 曲线, 得出该标记物综合变量的曲线下面积(AUC 值)。

ROC 曲线如图 4 所示: 区分健康对照组和肝癌患者的 AUC 值为 0.972(灵敏度为 90.6%, 特异性为 92.9%)。由此可知, 此代谢标记物组具有较高的诊断准确度。因此, 这 3 个尿液代谢物可以作为区分健康对照组与肝癌患者的潜在标记代谢物。

3 讨论

从以上尿液差异代谢物可以见: 相比于健康对照组, 肝癌患者在 α - 葡萄糖、 β - 葡萄糖和肌酸酐等代谢路径上都发生一定的异常变化, 肝癌患者尿液中肌酸酐的含量下降, 葡萄糖的

图 3 所示。如图所示, 健康对照组和肝癌患者被成功区分开, 模型质量参数为 $R^2X[4]=0.342$, $R^2Y[4]=0.963$, $Q^2[4]=66.9\%$ 。表示模型概括了前 4 类主成分信息的 34.2%, 能解释因变量 96.3% 的变异信息, 模型可预测准确度为 66.9%。

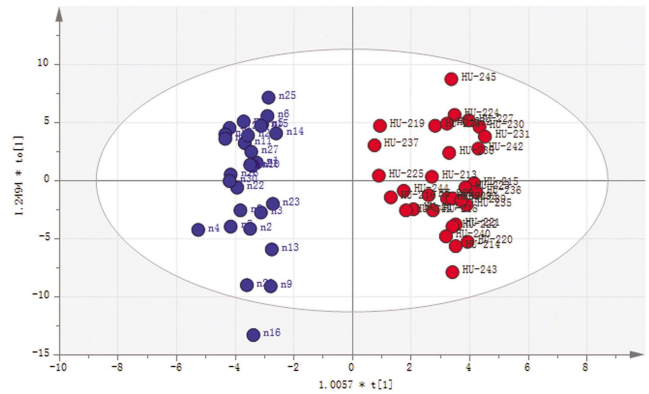


图 3 样本 1H-NMR 谱的 OPLS 得分图

注:(●)为健康对照组;(●)为肝癌患者

Fig.3 OPLS score plots of 1H-NMR spectra

The symbols represent the different class: Normal Controls (●);

HU model group (●)

含量增长^[15]。

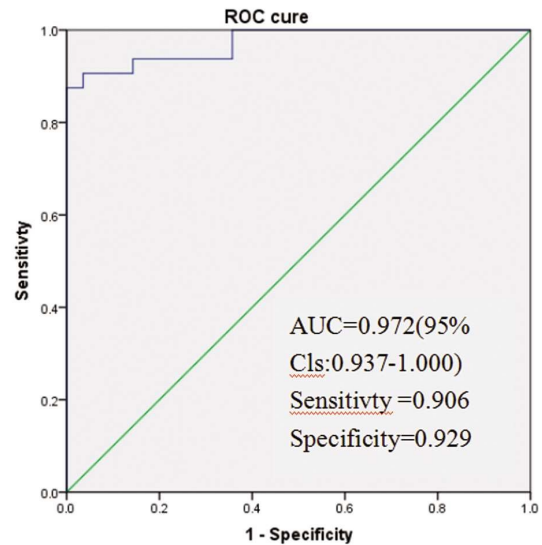


图 4 α - 葡萄糖、 β - 葡萄糖和肌酸酐拟合的代谢物综合变量区分肝癌组和健康组的 ROC 分析

Fig.4 ROC curve analysis of the ability of urinary metabolites including α -glucose, β -glucose and creatinine to discriminate between sample from normal Control and HU model group

肌酸(creatine)能够为肌肉与神经细胞提供能量, 是一种含氮的有机酸, 自然存在于脊椎动物体内^[16]。由于人体内三磷酸腺苷(ATP)储存量很少, 进行运动时现有的 ATP 很快会消耗完, 肌酸可以迅速地再次合成 ATP 以提供能量, 满足人体运动所需^[17]。肝癌患者因癌细胞的破坏致使肝脏受损, 其肌酸的合成受到限制, 其正常分解和排出量水平都将下降。

血液流经肾小球时, 血液中的尿素、水、无机盐和葡萄糖等物质经过肾小球滤过, 过滤到肾小囊中, 构成原尿^[18]。当尿液流

经肾小管时,原尿中对人体有用的全部葡萄糖、大部分水和无机盐,被肾小管再次重吸收,回到肾小管周边毛细血管的血液里^[19]。原尿经由肾小管的重吸收,剩下的水和无机盐、尿素等就成为了尿液^[20]。尿液中葡萄糖的含量增长说明肾小管重吸收下降,是肾损伤的首要标记。其次,肝脏代谢的肝脏毒素扰动导致糖原分解增加或糖原储存减少,这也是尿中葡萄糖含量增长的另一大原因^[21]。

本研究采用基于 ¹H-NMR 技术代谢组学方法并结合多维及单维统计学分析演示肝癌患者相较于健康对照组尿液代谢的变化,研究最终得到 3 个代谢标记物:α- 葡萄糖、β- 葡萄糖和肌酸酐能够区分健康组和肝癌患者, 将其拟合为一个变量后,在 ROC 分析中,AUC=0.900,灵敏度与特异性均大于 0.8。这些代谢产物的发现可能有利于肝癌的初期诊断。

参考文献(References)

- [1] 史海达,史宪杰.原发性肝癌肿瘤标记物的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(23): 60
Shi Hai-da, Shi Xian-jie. The research progress of tumor markers in primary hepatocellular carcinoma [J]. The world's newest medical information digest, 2017, 17(23): 60
- [2] Bertino G, Ardiri A, Malaguamera M, et al. Hepatocellular carcinoma serum markers[J]. Semin Oncol, 2012, 39(4): 410-433
- [3] 齐素文,涂植光,戴勇.HBV 肝硬化不同阶段血清代谢物组的研究[J].重庆医科大学,2012,(5): 1-103
Qi Su-wen, Tu Zhi-guang, Dai Yong. Studies on serum metabolites in different stages of HBV cirrhosis [J]. Chongqing Medical University, 2012, (5): 1-103
- [4] 汤靓,周伟平,王红阳.DEN 诱导大鼠肝癌模型的代谢组学研究[J].第二军医大学,2010,(06): 1-105
Tang Liang, Zhou Wei-ping, Wang Hong-yang. Metabonomic Investigations of DEN induced hepatocellular carcinoma in SD rats [J]. Second Military Medical University, 2010, (06): 1-105
- [5] Shariff MI, Gomaa AI, Cox IJ, et al. Urinary metabolic biomarkers of hepatocellular carcinoma in an Egyptian population: a validation study[J]. J Proteome Res, 2011, 10(4): 1828-1836
- [6] 李欣遥,彭芳.代谢组学在肝细胞性肝癌中的研究进展[J].医学综述,2017,23(06): 1127-1130
Li Xin-yao, Peng Fang. The research progress of metabolomics in hepatocellular carcinoma[J]. Medical review, 2017, 23(06): 1127-1130
- [7] Chen T, Xie G, Wang X, et al. Serum and urine metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cell Proteomics, 2011, 10(7): 1
- [8] 张天明,王玉平,等.肝癌肿瘤标记物的研究进展[J].胃肠病学和肝病杂志,2016,25(08): 852-856
Zhang Tian-ming, Wang Yu-ping, et al. The research progress of tumor markers in liver cancer[J]. Journal of gastroenterology and hepatology, 2016, 25(08): 852-856
- [9] 陈筱静,罗东,罗林丽,等.代谢组学的发展及临床应用[J].华西医学,2014,(6): 178-180
Chen Xiao-jing, Luo Dong, Luo Lin-li, et al. The development and clinical application of metabolomics[J]. West China Medical Journal, 2014, (6): 178-180
- [10] 樊梦鹏,巫圣乾.基于 ¹H-NMR 护肝片抗大鼠急性肝损伤的代谢组学研究[J].中国药理学通报,2017,33(12): 1766-1770
Gong Meng-juan, Wu Sheng-qian. Study on the metabolomics of acute liver injury in rats treated with ¹H-NMR [J]. Chinese pharmacology bulletin, 2017, 33(12): 1766-1770
- [11] 吴先富,张琪.定量核磁共振法测定去水卫矛醇的含量[J].药物分析杂志,2017,37(01): 181-184
Wu Xian-fu, Zhang Qi. Quantitative nuclear magnetic resonance (NMR) method was used to determine the content of methadol [J]. Journal of pharmaceutical analysis, 2017, 37(01): 181-184
- [12] 马丽娜,毛新民,马晓丽,等.蛋白干预对气阴两虚 2 型糖尿病大鼠氨基酸代谢谱的影响[J].中国中药杂志,2016,41(22): 4226-4233
Ma Li-na, Mao Xin-ming, Ma Xiao-li, et al. Effect of protein intervention on the amino acid metabolism of two type 2 diabetic rats[J]. Chinese medicine journal, 2016, 41(22): 4226-4233
- [13] 汪旋.三种典型复杂生物体系代谢组学的 NMR 研究[D].中国科学院研究生院(武汉物理与数学研究所),2016,(05): 1-150
Wang Xuan. The NMR study of three typical complex biological systems metabolomics [D]. Graduate school of Chinese academy of sciences (wuhan institute of physics and mathematics), 2016, (05): 1-150
- [14] 邢智华.脂质代谢组学的研究进展[J].饲料博览,2016,(09): 18-20
Xing Zhi-hua. Research progress of lipid metabolomics[J]. Feed expo, 2016, (09): 18-20
- [15] 阳玉中,李佳,韦星.基于 ¹H-NMR 的代谢组学在心血管疾病中的应用[J].中国动脉硬化杂志,2016,24(05): 533-536
Yang Yu-zhong, Li Jia, Wei Xing. The application of metabolomics in cardiovascular diseases based on ¹H-NMR[J]. Chinese journal of atherosclerosis, 2016, 24(05): 533-536
- [16] 徐啸翔,曹辉,傅开元,等.咬合干扰致大鼠咬肌能量代谢产物含量变化[J].北京大学学报(医学版),2017,49(01): 25-30
Xu Xiao-xiang, Cao Ye, Fu Kai-yuan, et al. The changes of energy metabolites in rat muscle were caused by occlusal interference [J]. Journal of Peking University (medical edition), 2017, 49(01): 25-30
- [17] 周多奇,龚莉,钱振宇.肌酸激酶的生理功能与运动[J].安庆师范学院学报(自然科学版),2016,22(03): 113-118
Zhou Duo-qi, Gong Li, Qian Zhen-yu. The physiological function and motion of creatine kinase[J]. Journal of anqing normal university (natural science edition), 2016, 22(03): 113-118
- [18] Tsakelidou E, Virgiliou C, Valianou L, et al. Sample Preparation Strategies for the Effective Quantitation of Hydrophilic Metabolites in Serum by M_μLti-Targeted HILIC-MS/MS[J]. Metabolites, 2017, 7(2)
- [19] 陈玉.模拟游戏在初中生物教学中的行动研究[D].云南师范大学,2015: 1-73
Chen Yu. Study on the action of simulation game in junior high school biology teaching[D]. Yunnan Normal University, 2015: 1-73
- [20] 汤柳英.环境镉暴露人群尿液中小分子代谢产物表征差异研究[D].暨南大学,2015: 1-56
Tang Liu-ying. Study on the characterization of small molecular metabolites in the urine of cadmium exposed population [D]. Jinan University, 2015: 1-56
- [21] 陶金忠,郭延生.奶牛产后血浆 ¹H-NMR 代谢组学分析[J].畜牧兽医学报,2016,47(01): 198-206
Tao Jin-zhong, Guo Yan-sheng. Analysis of plasma ¹H-NMR metabolomics in dairy cows [J]. Xiamen University, 2016, 47(01): 198-206