

原发性肺癌患者血清的代谢组学初步研究^{*}

田 舍, 江建新, 张 浩, 张 宏, 孙诚谊^{**}

(贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 分析原发性肺癌患者血清中小分子代谢产物的改变。方法: 利用质子核磁共振(¹H NMR)检测 18 例肺癌(病例组)和同期 17 例正常体健者(对照组)血清中小分子代谢产物 α-葡萄糖、不饱和脂肪酸、肌酐、丙氨酸、谷氨酸盐、丙三醇、苏氨酸、异亮氨酸、低密度脂蛋白、3-羟丁酸、脂类以及极低密度脂蛋白含量, 通过主成分分析法比较两组受检者血清中小分子代谢产物含量的变化。结果: ¹H NMR 图谱能明显区分实验组和对照组血清小分子代谢产物, 实验组血清中 α-葡萄糖、不饱和脂肪酸及肌酐含量较对照组明显增加, 丙氨酸、谷氨酸盐、丙三醇、苏氨酸、异亮氨酸、低密度脂蛋白、3-羟丁酸、脂类及极低密度脂蛋白较对照组明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 原发性肺癌患者血清中小分子代谢产物与正常体健者存在差异, 原发性肺癌患者血清丙氨酸、谷氨酸盐、丙三醇、苏氨酸以及异亮氨酸可能成为原发性肺癌诊断标志物。

[关键词] 肺肿瘤; 代谢组学; 质子核磁共振; 诊断; 生物学标志物

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)08-0915-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.08.012

Primary Study of Serum Metabonomic on Patients with Primary Pulmonary Carcinoma

TIAN She, JIANG Jianxin, ZHANG Hao, ZHANG Hong, SUN Chengyi

(The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the change of small and medium molecular metabolites in blood serum in patients with primary pulmonary carcinoma. **Methods:** ¹H NMR was adopted to detect the content of small and medium molecular metabolite, including Alpha-glucose, unsaturated fatty acid, creatinine, alanine, glutamate, glycerol, threonine, isoleucine, low density lipoprotein, 3-hydroxybutyrate, lipids, and very low density lipoprotein, in 18 blood specimens from patients with primary pulmonary carcinoma(experimental group) and 17 specimens from healthy controls(control group). The changes of serum small and medium molecular metabolites in the two groups were analyzed and compared by Partial Least Squares (PLS). **Results:** MR ¹H map can clearly distinguish between experimental group and control group in terms of serum small molecule metabolites. In the experimental group, the serum alpha-glucose, unsaturated fatty acid and creatinine content increased significantly compared with those in control group, while alanine, glutamate, glycerol, threonine, isoleucine, low density lipoprotein, 3-hydroxybutyrate, lipids and very low density lipoprotein decreased significantly compared with those in control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** There exist differences in serum of small molecular metabolites between patients with primary pulmonary carcinoma and normal healthy people. In patients with primary pulmonary carcinoma, serum alanine, glutamate, glycerol, threonine, isoleucine may be the biomarkers in the diagnosis of primary pulmonary carcinoma.

[Key words] lung cancer; metabonomics; proton nuclear magnetic resonance; diagnosis; biomarkers

^{*} [基金项目] 贵州省卫生计生委科学技术基金项目(gzwmkj2014-1-004); 贵阳市科技计划项目[(2010)筑科农合字第1-社-19号]

^{**} 通信作者 E-mail: chengyisun@medmail.com.cn

网络出版时间: 2016-08-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160823.1343.006.html>

我国肺癌发病率已达到 61.4/10 万,由于肺癌起病隐匿,患者对治疗的依从性较差和可普遍运用的检测手段缺乏,确诊的肺癌患者 80% 已属于晚期,5 年生存率 <15%^[1]。早期诊断和早期治疗是预防肺癌发生和降低死亡率最有效的方法,早期诊断的肺癌患者,5 年生存率可达到 80%,根治切除后 5 年生存率可达到 35%~50%^[2]。因此,寻找一种高特异性、高敏感性的非损伤性的肿瘤诊断标志物应用于临床变得十分必要。代谢组学研究是比较分析健康状态与疾病状态下小分子代谢产物表达的差异,可帮助寻找各种疾病早期诊断的生物标志物,用于疾病预后及治疗效果的评判^[3]。基于核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)的代谢组学方法可以在受检者体内或体外快速、无损损伤性地对代谢物含量的比较分析。本研究采用¹H NMR 观察原发性肺癌患者血清中小分子代谢产物的变化,分析原发性肺部肿瘤患者血清特征代谢谱,从中筛选代表性小分子标志物,以期对原发性肺癌的早期诊断提供新的分子标记。

1 对象与方法

1.1 研究对象

随机抽取 2012 年 1 月~2013 年 12 月诊断为原发性肺癌患者 18 例作为病例组,男性 15 例,女性 3 例,平均(44.6±1.47)岁。纳入标准:胸部 X 线检查发现肺部孤立性结节或肿物,有分叶或毛刺;肺癌高危人群,有咳嗽或血痰,胸部 X 线检查发现局部性病变,经积极抗炎或抗结核治疗 2~4 周无效或病变增大;节段性肺炎在 2~3 个月内发展成为肺叶不张,或肺叶不张短期内发展成为全肺不张;短期内出现无其他原因的一侧增长性血性胸水,或一侧多量血性胸水伴随肺不张或胸膜结节状改变着;明显咳嗽、气急,胸片显示双肺粟粒样或弥漫性病变,排除粟粒性肺结核、肺转移瘤、肺真菌病者;胸片发现肺部肿物,伴有肺门或纵膈淋巴结肿大,并出现上腔静脉阻塞、喉返神经麻痹或伴有远处转移表现者^[2]。选取同期健康体检者 17 例为对照组,男性 8 例,女性 9 例,平均(40.2±1.97)岁,入选标准:既往身体健康,无长期服药史,无重大疾病史以及近期无感染史,无吸毒及酗酒史。病例组与对照组在年龄、性别、血常规、血生化分析结果等比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。所有入选对象均签署知情同意书,研究获得医院伦理委员会

批准。

1.2 方法

1.2.1 样本的采集 所有入选者采集血清前未使用任何药物及治疗干预,于清晨室温下取空腹 8 h 后静脉血 8 mL,室温下自然凝固后 3 000 g 离心 10 min,收集上清液,编号,置 -80℃ 冷冻备用。向已编号试管中依次加入 TSP 重水(D₂O)溶液(1 g/L)100 μL,血清 500 μL 及 D₂O 50 μL,充分震荡混匀后,13 000 g 离心 10 min。取 500 μL 上清加入 5 mm 核磁共振管中待用,当样本全部溶解呈匀质透明时,进行核磁检测。

1.2.2 NMR 数据采集及分析 采用核磁共振仪(型号 Bruker AV-600)检测,检测温度为 26.85℃。以三甲基硅烷(TMS)信号峰定位化学位移(ppm)进行调零。调整基线后以 0.04 ppm 为间隔,从 0~8 ppm 对谱图进行积分处理,对谱峰进行相位校正,进行傅立叶变换(MestRec 软件)得到 ¹H NMR 谱图,以 0.01 ppm 进行分段积分。将积分按每张谱的总积分强度归一化。所得数据输出并转换到 Excel 文件保存。

1.3 统计学方法

数据用 SPSS 22.0 统计软件分析。计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对照组与病例组男女比例采用 χ^2 检验,两组间生化指标比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。代谢组学分析是将 Excel 格式数据输入到 SIMCA-P 软件,用主成分分析(principle component analysis, PCA)进行多元统计分析。为消除非实验因素的影响,强化组间差异,本研究对数据进行正交信号校正处理(orthogonal signal correction, OSC),然后采用偏最小二乘法(partial least square, PLS)进行回归分析,分段积分值作为自变量(X),样本的分类变量作为因变量(Y),分析结果以前两个主成分分别作得分图和载荷图。基于 PC 的输出载荷图(loading plot)可判定 95% 的可信区间内的代谢物。

2 结果

病例组血清¹H-NMR 图谱(图 1),利用 SIMCA-P 10.0 软件进行 PCA 分析获得血清中小分子代谢产物散点图,用以区分 2 组人群,在血清¹H NMR 谱的得分图中,病例组与正常对照组能明显区分开(图 1),通过检测血清样品,得到血清¹H NMR 图谱(图 2)。根据化学位移进行分段积分,

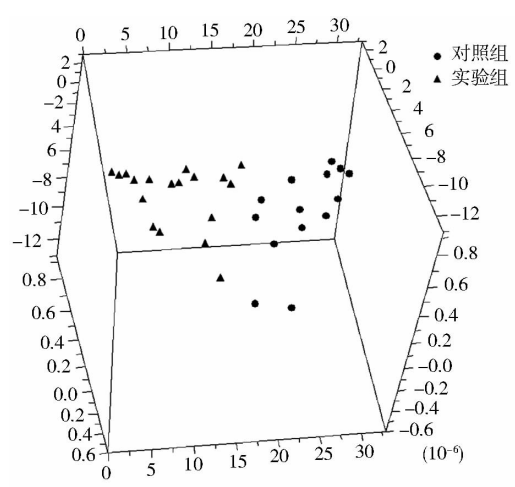
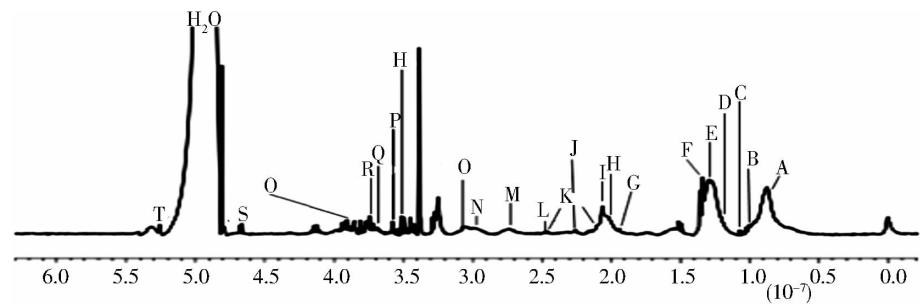


图 1 病例组与对照组血清¹H NMR 谱中三维积分图
Fig. 1 Three dimensional integral map of serum ¹H NMR in experimental group and control group

通过 *t* 检验方法筛选出具有统计学意义的化学位移段,经过¹H NMR 图谱比对小分子代谢物,发现病例组血清中 α-葡萄糖、不饱和脂肪酸及肌酐含量较对照组明显增加,丙氨酸、谷氨酸盐、丙三醇、苏氨酸、异亮氨基酸、低密度脂蛋白、3-羟丁酸、脂类及极低密度脂蛋白较对照组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

肿瘤作为一种基因疾病,可以认为是一种代谢性的疾病,当肿瘤基因开始突变与抑癌基因的失活,从细胞基因改变开始到细胞生理状态的改变,细胞代谢状态始终贯穿于肿瘤的发生发展的整个过程中。机体代谢物的整体相关图谱可反映细胞、组织或器官的生理状态,系统比较不同生理状态、不同实验条件下的相关性图谱,可区分处于不同生理状态的细胞、组织或器官^[3]。



注: A 为低密度脂蛋白, B 为缬氨酸, C 为异丁酸盐, D 为三羟基丁酸, E 为海藻盐, F 为乳酸盐, G 为乙酸盐, H 为糖蛋白, I 为乙酰半胱氨酸, J 为乙酰乙酸盐, K 为谷氨酰胺, L 为天冬氨酸盐, M 为二甲胺, N 为赖氨酸, O 为肌酐, P 为丙三醇, Q 为谷氨酸盐, R 为丙氨酸, S 为 β-葡萄糖, T 为 α-葡萄糖

图 2 被检血清代谢组分 600.13 MHz 单脉冲¹H NMR 图谱
Fig. 2 600.13 MHz single pulse ¹H NMR map of serum metabolic components

表 1 病例组患者血清水溶性代谢物
Tab. 1 Water soluble metabolites in serum of patients in experimental group

代谢产物	定位信号峰化学 位移(10 ⁻⁶)	变化趋势 ⁽¹⁾
α-葡萄糖	5.24、3.76、3.72	增加
肌酐	3.92	增加
丙氨酸	3.76	增加
谷氨酸/谷氨酰胺	3.68、2.08	减少
丙三醇	3.64	减少
苏氨酸	3.6	减少
异亮氨酸	1.28、0.93	减少
低密度脂蛋白	1.24	减少
3-羟丁酸	1.2	减少
极低密度脂蛋白	0.88	减少
胆固醇	0.72	减少

⁽¹⁾ 与对照组比较的变化趋势

本研究发现,原发性肺癌患者机体出现糖代谢亢进和脂肪代谢的减弱,这可能是因为肺部肿瘤的生长摄取了患者血清中大量能量物质,机体为保证其他正常器官机体能量代谢需要,须增加有氧化途径中的“原料”而出现糖代谢亢进和脂肪代谢的减弱,丙氨酸、支链氨基酸等作为能量物质参与机体糖异生代谢,补偿机体因为慢性消耗缺少的能量^[4-5]。同时因为糖类代谢的亢进,造成血清中脂肪代谢途径的抑制,引起脂类相关代谢产物的降低。

氨基酸代谢不仅对于机体合成代谢有重要作用,对于肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭能力同样具有重要的意义。某些氨基酸如同肿瘤标志物一样,在肺癌、皮肤癌、前列腺癌、结肠和乳腺癌不同的肿瘤

患者中表现出异常表达,但是在慢性消耗性疾病中与正常人没有太大差别^[3,6-11]。肿瘤在肺部的生长,不仅影响人体呼吸、循环系统,同样会引起机体能量代谢方面的改变,并造成整体代谢状态的改变,导致机体内一些氨基酸代谢相关的酶发生代谢状态改变,造成氨基酸的异常表达,为肿瘤组织提供能量,构建自己生长发育所需相关蛋白,而且还能逃逸宿主免疫系统的肿瘤细胞杀伤作用和免疫监视等作用^[12]。氨基酸还可作为信号分子,参与到肿瘤细胞调控细胞各种信号通路中,并作为原癌基因下游作用蛋白对自身进行调控、参与细胞能量相关代谢调控信号通路形成,控制细胞的增殖周期、生长以及侵袭能力^[13-14]。

代谢组学作为生物系统定性和定量的手段,在自然产物的分析、基因功能检测得到了长足的发展。本文通过¹H-NMR 方法对原发性肺癌患者血清中代谢物的筛查,结果发现肺癌患者血清中 α -葡萄糖、不饱和脂肪酸及肌酐含量较健康者明显增加,丙氨酸、谷氨酸盐、丙三醇、苏氨酸、异亮氨酸、低密度脂蛋白、3-羟丁酸、脂类及极低密度脂蛋白较对照组明显减少($P < 0.05$)。对于符合上述代谢结果变化的患者应高度重视,列为原发性肺癌高危人群。¹H-NMR 为临床诊断工作提供一条研究疾病机制的重要手段,为肺癌在早期及作出诊断及治疗,对患者生理代谢功能的调节,有助于延长患者的生存期。

4 参考文献

- [1] 龙莉艳,张桂云. 肺癌研究文献的循证计量分析[J]. 中国循证医学杂志, 2008 (12): 1105-1111.
- [2] 支修益,石远凯,于金明. 中国原发性肺癌诊疗规范(2015 版)[J]. 中华肿瘤杂志, 2015(37): 67-78.
- [3] Camacho D, de la Fuente A, Mendes P. The origin of correlation in metabolomics data[J]. Metabolomics, 2005 (1): 53-63.
- [4] Gaurav K, Goel RK, Shukla M, et al. Glutamine: A novel approach to chemotherapy-induced toxicity [J]. Indian J Med Paediatr Oncol, 2012 (1): 13-20.
- [5] 范志娟,田亚琼,刘宝阳,等. 中分化 HCC 患者组织中游离氨基酸水平变化[J]. 营养学报, 2015 (1): 96-98.
- [6] 张国滨,张晋,徐恒周,等. 支链氨基酸氨基转移酶 1 在恶性胶质瘤中的表达及意义[J]. 中华神经外科杂志, 2015 (12): 1259-1262.
- [7] Kumar SS, Rao MR, Balasubramanian MP. Antiproliferative role of indigofera aspalathoides on 20 methylcholanthrene induced fibrosarcoma in rats. [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2012(12): 966-974.
- [8] Sinha S, Ekka M, Sharma U, et al. Assessment of changes in brain metabolites in Indian patients with type-2 diabetes mellitus using proton magnetic resonance spectroscopy[J]. BMC Res Notes, 2014(7): 7-14.
- [9] Varol S, Özdemir HH, Cevik MU, et al. Protective effects of l-glutamine against toxicity of deltamethrin in the cerebral tissue [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2016 (12): 1005-1011.
- [10] Wang Q, Sun T, Cao Y, et al. A dried blood spot mass spectrometry metabolomic approach for rapid breast cancer detection [J]. Cancer, 2016(9): 1389-1398.
- [11] Lopes-Pires ME, Naime AC, Almeida Cardelli NJ, et al. PKC and AKT modulate cGMP/PKG signaling pathway on platelet aggregation in experimental sepsis, 2015 (9): e0137901.
- [12] Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer [J]. Trends Biochem Sci, 2010(35): 427-433.
- [13] Chakrabarti G, Silvers MA, Ilcheva M. Tumor-selective use of DNA base excision repair inhibition in pancreatic cancer using the NQO1 bioactivatable drug, β -lapachone [J]. Sci Rep, 2015 (5): 17066.
- [14] Brown DM, Williams H, Ryan KJ, et al. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and serine biosynthetic pathway genes are co-ordinately increased during anabolic agent-induced skeletal muscle growth [J]. Sci Rep, 2016(6): 22090-22102.

(2016-03-25 收稿, 2016-07-01 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华