

## 基于中心碳代谢分析技术的肝胆系统疾病靶向代谢组学研究

徐圣弢, 吴琼, 刘佃花, 王琳召, 谭蔚锋, 陈俊

### Serum metabolomics study on benign liver lesions and hepatic malignancies by central carbon pathway metabolites

XU Shengtao, WU Qiong, LIU Dianhua, WANG Linzhao, TAN Weifeng, CHEN Jun

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202302040>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 基于LC-MS技术的二氢丹参酮 I 抗肝纤维化肝脏代谢组学研究

Metabolomics study of dihydrotanshinone I on hepatic fibrosis with LC-MS technology

药学实践与服务. 2021, 39(5): 403-408, 471 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202101035

#### 基于UPLC-Q-TOF/MS平台的结晶肾损伤小鼠的尿液代谢组学研究

Urinary metabolomics study on mice renal injury caused by calcium oxalate crystal based on UPLC-Q-TOF/MS platform

药学实践与服务. 2019, 37(2): 126-134 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.006

#### 基于GC-MS技术的金钱草干预结晶肾损伤小鼠血清代谢组学研究

Metabolomics study of Lysimachiae Herba on mice with crystallization kidney injury by GC-MS

药学实践与服务. 2019, 37(4): 332-336 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.009

#### 芪附汤对大鼠抗阿霉素心脏毒性作用的血清气相色谱-质谱代谢组学研究

Protective effect of Qifu decoction on adriamycin-induced cardiac injury based on GC-MS serum metabolomics

药学实践与服务. 2018, 36(4): 313-317 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.006

#### 代谢组学在白血病中的研究进展

Research progress of metabolomics in leukemia

药学实践与服务. 2019, 37(5): 385-389,399 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.001

#### 合生元益生菌治疗自发性高血压相关机制的代谢组学研究

Metabonomics study on the antihypertensive mechanism of lactobacillus and bifidobacterium in the spontaneous hypertensive rats

药学实践与服务. 2019, 37(2): 141-145 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.008



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 研究报告 ·

## 基于中心碳代谢分析技术的肝胆系统疾病靶向代谢组学研究

徐圣弢<sup>1</sup>, 吴琼<sup>2</sup>, 刘佃花<sup>3</sup>, 王琳召<sup>4</sup>, 谭蔚锋<sup>5</sup>, 陈俊<sup>3</sup> (1. 海军军医大学附属东方肝胆外科医院药剂科, 上海 200438; 2. 南部战区总医院药剂科, 广东 广州 510010; 3. 上海交通大学医学院附属仁济医院宝山分院, 上海 200444; 4. 青岛滨海学院附属医院, 山东 青岛 266000; 5. 同济大学附属同济医院肝胆外科中心, 上海 200065)

**[摘要]** **目的** 采用超高效液相色谱三重四级杆质谱技术(UPLC-QQQ-MS)对肝胆疾病患者血浆样本内源性中心碳代谢相关化学成分进行分析, 寻找肝胆系统病变的可能特征代谢物及显著改变的代谢通路。**方法** 招募健康志愿者 32 人、胆管囊肿患者 23 人、胆道结石患者 19 人、肝癌患者 45 人及肝门部胆管癌患者 50 人, 采集血浆样本, 进行 UPLC-QQQ-MS 分析, 采用 MPP 软件进行统计分析, 结合模式识别分析各组间代谢组差异, 研究肝胆疾病显著改变代谢通路及可能致病机制。**结果** 代谢组学分析得到胆管囊肿患者 15 个、胆道结石患者 7 个、肝癌患者 7 个和肝门部胆管癌患者 3 个与健康人血浆中存在显著性差异的可能生物标志物, 并分别富集胆管囊肿患者 8 条、胆道结石患者 4 条、肝癌 4 条和肝门部胆管癌患者 1 条在体内显著改变的代谢通路。**结论** 根据上述鉴别的差异代谢物和富集的代谢通路结果, 表明肝脏病变主要影响了机体的能量代谢及氨基酸的代谢与运输, 而磷酸肌醇代谢在胆管囊肿、胆道结石、肝癌和肝门部胆管癌中均显著改变。

**[关键词]** 中心碳代谢; 代谢靶标分析; 胆管囊肿; 肝癌; 肝门部胆管癌

**[文章编号]** 2097-2024(2023)12-0753-07 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202302040

## Serum metabolomics study on benign liver lesions and hepatic malignancies by central carbon pathway metabolites

XU Shengtao<sup>1</sup>, WU Qiong<sup>2</sup>, LIU Dianhua<sup>3</sup>, WANG Linzhao<sup>4</sup>, TAN Weifeng<sup>5</sup>, CHEN Jun<sup>3</sup> (1. Department of pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Department of pharmacy, General Hospital of Southern Theatre Command, Guangzhou 510010, China; 3. Baoshan Branch, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200444, China; 4. The Affiliated Hospital of Qingdao Binhai University, Qindao 266000, China; 5. Hepatobiliary Surgery Center, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China)

**[Abstract]** **Objective** To screen potential metabolites and significantly altered metabolic pathways of liver lesions by central carbon pathway metabolites. **Methods** 32 healthy volunteers (HC), 23 patients with biliary cysts (CYST), 19 patients with biliary stones (Stone), 45 patients with hepatocellular carcinoma (HCC), and 50 patients with hilar cholangiocarcinoma (HCCA) were recruited. Their serum samples were collected for UPLC-QQQ-MS analysis and further MPP statistical analysis. Pattern recognition was further used to discovery the differences in metabolome between groups, and to explore the significantly altered metabolic pathway and possible pathogenic mechanism of liver diseases. **Results** A total of 15, 7, 7, and 3 metabolites and a total of 8, 4, 4, and 1 metabolic pathway that were significantly different in serum between CYST, Stone, HCC, HCCA and healthy controls were identified and enriched through serum metabolomics analysis, respectively. **Conclusion** According to the above identified differential metabolites and enriched metabolic pathway results, it is shown that liver lesions mainly involved in the energy metabolism and amino acid metabolism & transport, in addition, inositol phosphate metabolism were significantly changed both in CYST, Stone, HCC and HCCA.

**[Key words]** UPLC-QQQ-MS; metabolic target analysis; biliary cyst; liver cancer; hilar cholangiocarcinoma

肝脏作为人体物质能量最重要的代谢枢纽, 承

**[基金项目]** 上海市科学技术委员会科研项目课题 (10495810400); 上海市卫生局青年科研基金(2009Y065)

**[作者简介]** 徐圣弢, 本科, 药师, Tel: 13681693417, Email: 1004060962@qq.com

**[通信作者]** 谭蔚锋, 主任医师, 研究方向: 肝胆恶性肿瘤的诊断和治疗, Email: twf1231@163.com; 陈俊, 副主任药师, 研究方向: 药物分析, Email: chenjuntdj@126.com

担了体内糖、蛋白质、脂肪、维生素、激素等大部分物质的代谢过程与生物转化作用<sup>[1-3]</sup>。目前, 肝脏疾病的筛查和早期诊断主要依靠两类检查手段: 影像学检查和肝脏肿瘤标志物检测<sup>[4]</sup>。CT 等影像学检测手段在分辨率和准确性上不具优势, 而现有的肿瘤标志物主要是基于基因水平和蛋白水平发现的, 无法满足肝脏疾病的早期诊断筛查所需的特异

度和敏感度。因此,寻找高敏感性、高特异性、非侵入性的肝脏疾病诊断标志物是一项紧迫且具有挑战性的任务。

目前,从系统和综合的观念出发探索生命现象的本质规律日益成为生命科学研究的主流。代谢组学的研究,一般包括样品的采集及制备、样品的检测、代谢物数据的预处理、多变量统计分析和代谢途径分析等步骤。代谢组学作为系统生物学的重要组成部分,可以利用临床上较容易取得的体液样本,比如血浆、尿液或唾液等,分析其中的代谢物来反应不同生理或病理状态<sup>[5]</sup>,已广泛应用于生理评价、疾病诊断和预后等领域<sup>[6-7]</sup>,代谢组学分析也可应用于发现新的代谢调控机制和发现新的代谢通路。代谢组学的研究对象为相对分子质量<1 000道尔顿的代谢小分子,通过同时定量测定和定性分析这些小分子代谢物,监测特定代谢物的动态规律变化,还原相关联生物事件,提示生物体的病理生理变化实质和机制所在,最终为疾病的早期诊断提供重要信息<sup>[8]</sup>。

液质联用技术因色谱选择性好、分辨率与灵敏度高优点,已广泛应用于疾病相关生物标志物代谢组学研究中,然而受代谢物识别、数据挖掘和生物标志物鉴定等因素的影响,有关肝脏疾病相关代谢途径及整体代谢产物的全面定性定量分析仍然不足<sup>[9]</sup>。基于LC-MS/MS检测技术的中心碳代谢分析方法,可用于体内215种内源性中心碳代谢物的分析,首先使用LC-QQQ-MS采集数据,然后使用MH Quant对采集的数据与数据库进行匹配和定量分析,之后把定量数据导入MPP进行差异分析和路径分析,与常规液质联用方法相比,更为简单、灵敏、稳健,极大的简化了数据分析步骤,大大节省了生物标志物的鉴别时间。因此,本研究纳入胆管囊肿、胆道结石、肝癌、肝门部胆管癌和健康志愿者样本,采用UPLC-MS/MS检测技术结合中心碳代谢物小分子数据库筛查方法及多元统计分析筛选肝胆系统疾病显著改变的生物标志物及代谢通路,尝试揭示肝胆系统病变的可能致病机制。

## 1 仪器和试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪,包括在线脱气机,二元泵,自动进样器,柱温箱;Agilent 6410 三重四级杆质谱仪,配有电喷雾离子源(Agilent, 美国);Mass Hunter B4.0 色谱工作站(Agilent, 美国);Micro17R 低温离心机(Thermo, 美国);Vortex 6 型

涡旋混合器(其林贝尔,海门);Arium mini 超纯水机(Sartorius, 美国)。

### 1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯(Honeywell, 美国),甲酸为色谱纯(SIGMA, 美国),三丁胺为色谱纯(GC, 纯度≥99%),冰醋酸为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

## 2 方法和结果

### 2.1 样品采集和处理

海军军医大学附属东方肝胆外科医院伦理委员会审核并通过了本研究的样品收集方案及流程。所有招募患者都签署了知情同意书并表示愿意参与本研究<sup>[10]</sup>。采集志愿者静脉血5 ml,置抗凝(EDTA)管中,在4℃下3 000 g离心10 min,取上清置样本管,储存于-80℃冰箱中待用,避免在分析前经历两次以上的冻融循环。

从-80℃冰箱取出样品,室温解冻,取50 μl,分别加入150 μl的乙腈用于沉淀蛋白,涡旋1 min后,在4℃下12 000 g离心10 min,吸取100 μl上清液转移至进样小瓶,进样分析。质量控制(QC)样品则通过合并等量不同血清样品制备得到。

### 2.2 液质联用分析条件

#### 2.2.1 色谱条件

色谱分离采用Extend C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm, Agilent),柱温35℃。流动相A为97%水+3%甲醇溶液含10 mmol/L TBA和15 mmol/L冰醋酸,流动相B为甲醇溶液含10 mmol/L TBA和15 mmol/L冰醋酸,采用梯度洗脱,洗脱程序:0~2.5 min, 0% B; 2.5~7.5 min, 0%~20% B; 7.5~13 min, 20%~45% B; 13~20 min, 45%~99% B; 20~24 min, 99% B;流速为250 μl/min,进样量为2 μl。

#### 2.2.2 质谱条件

离子源为AJSESI,离子源参数设置:干燥气温度150℃;干燥气流速13 L/min;雾化器压力45 psi;鞘气温度325℃;鞘气流速12 L/min;毛细管电压2 000 V,喷嘴电压500 V,负离子模式下采用动态多反应离子检测(dMRM)模式扫描。

### 2.3 数据处理与模式识别

本实验首先通过MH Quant方法对UPLC-QQQ-MS采集的原始数据与数据库中所有化合物进行匹配和定量分析,其次将定量分析得到的数据导入MPP(Mass Profiler Professional)软件进行统计分析,之后将MPP处理得到的192个差异代谢物

组成的矩阵导入 SIMCA-P 11.0(Umetrics, Sweden) 进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)。通过交叉验证参数  $Q^2Y$  和  $R^2Y$  对所构建的模型质量进行评判。应用单因素方差分析(one-way ANOVA)对有显著性差异的变量在健康对照组、胆管囊肿组、胆道结石组、肝癌组和肝门部胆管癌组中的平均含量进行分析,并进行多组间的两两比较。当变量满足  $P$  值小于 0.05 且 VIP(OPLS-DA 多维分析得到的代谢物重要性参数)大于 1, 认为其为潜在的生物标志物。为了进一步揭示肝脏良性病变与肝脏恶性肿瘤显著改变的代谢通路, 将上述鉴别得到的差异代谢小分子及其相对含量导入 MetaboAnalyst 平台(<http://www.metabolanalyst.ca>), 应用 MetPA(<http://metpa.metabolomics.ca/>)进行具有先验经验的智能通路分析。

### 3 结果

#### 3.1 参与患者的临床资料

剔除年龄性别及其他影响代谢的慢性疾病等混杂因素对研究结果的影响, 最终共收集 169 份血浆样本, 包含 23 名胆管囊肿患者, 19 名胆道结石患者, 45 名肝癌患者, 50 名肝门部胆管癌患者, 以及 32 名健康志愿者纳入本次靶向代谢组学分析研究, 各组样本群体之间不存在任何人口统计和基线特征的显著差异(包括年龄、性别、体质量指数、有无糖尿病等), 从而排除了人口统计和基线特征差异相关混杂因素对实验结果的影响。

#### 3.2 多元统计分析

为了探索肝脏病变改变的代谢物群, 对 UPLC-QQQ-MS 采集经 MPP 软件处理后所得数据进行多元统计分析。首先, 对不同分组方式, 包括: ①正常组、胆管囊肿、胆道结石、肝癌、肝门部胆管癌; ②正常组、肝脏良性病变(胆管囊肿&胆道结石)、肝脏恶性肿瘤(肝癌&肝门部胆管癌); ③正常组、肝脏良性病变(胆管囊肿&胆道结石)、肝癌; ④正常组、肝脏良性病变(胆管囊肿&胆道结石)、肝门部胆管癌的数据分别采用非监督的主成分分析(PCA)来探讨各组之间的代谢组差异及其相关性。如图 1 所示, 在 PCA 的三维得分图中可以看到: 组与组之间存在明显的分离趋势, 另外, PCA 得分图中 QC 样品的分布集中, 表明本研究采用的方法稳定性和重现性良好, 分析获得的数据可信。

进一步采用 200 次置换检验的方法对模型进行验证, 置换检验的原理即验证初始模型是否与置换检验的模型过拟合, 如图 1 所示, 所有分组数据

经置换后的  $R^2(\text{cum})$  和  $Q^2(\text{cum})$  值(左侧)均要小于初始值(右侧), 且  $Q^2(\text{cum})$  的回归线(蓝色)截距为负值, 上述结果表明模型未过拟合, 不同分组方式所构建的偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)分类模型稳健性好, 表明具有很好的预测能力及可靠性。

#### 3.3 代谢物筛选方法和生物学意义解释

代谢物被确认为潜在生物标志物之前需要经过仔细的筛选。首先根据 S-plot 筛选有显著差异的代谢变量, 整个过程基于协方差相关性原理执行, 从而减少了代谢物筛选过程中出现假阳性的概率。如图 1 所示, S-plot 主要来自预测模型中的第一主成分, 而第一主成分几乎涵盖了分析数据的大部分变量, 在 S-plot 图上偏离原始点越远的变量对组间的分离趋势贡献越大, 这些变量被认为可能是潜在的生物标志物; 其次, 变量重要性投影(VIP)反映了变量的重要性, 在这里被用来过滤模型中的重要代谢变量, 通常认为 VIP 大于 1 的变量可能是潜在的生物标志物, 进一步对多元统计分析筛选得到的差异代谢物采用单因素方差分析做单元统计分析,  $P$  值小于 0.05 的变量被认为差异有统计学意义。基于以上标准, 共筛选到 15 个胆管囊肿显著相关的潜在生物标志物, 包括肌醇、L-山梨糖、D-甘露糖、牛磺酸、L-苏氨酸、L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、L-天冬氨酸、乳酸、 $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸、2-甲基-1-丁醇、丙酮酸、丙二酸、顺式乌头酸和反式乌头酸; 7 个胆道结石显著相关的潜在生物标志物, 包括肌醇、L-苏氨酸、L-谷氨酸、丙二酸、 $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸、顺式乌头酸和反式乌头酸; 7 个肝癌显著相关的潜在生物标志物, 包括肌醇、L-天冬氨酸、2-甲基-1-丁醇、丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、顺式乌头酸和反式乌头酸和 3 个肝门部胆管癌显著相关的潜在生物标志物, 包括肌醇、L-山梨糖和 D-甘露糖, 具体结果及其变化趋势见表 1。

### 4 讨论

#### 4.1 对患者血浆样本中涉及的代谢路径进行深入探索

代谢组学研究的不仅是找到肝脏病变导致的机体代谢组改变, 更希望发现肝脏病变后显著改变的代谢通路, 这些显著改变的代谢通路对于揭示肝脏病变的可能致病机制非常重要, 因此, 本研究通过 MetPA 平台的智能通路分析表征肝脏良性病变与肝脏恶性肿瘤显著改变的代谢通路, 既而进一步探讨肝脏病变的可能致病机制。通过考察代

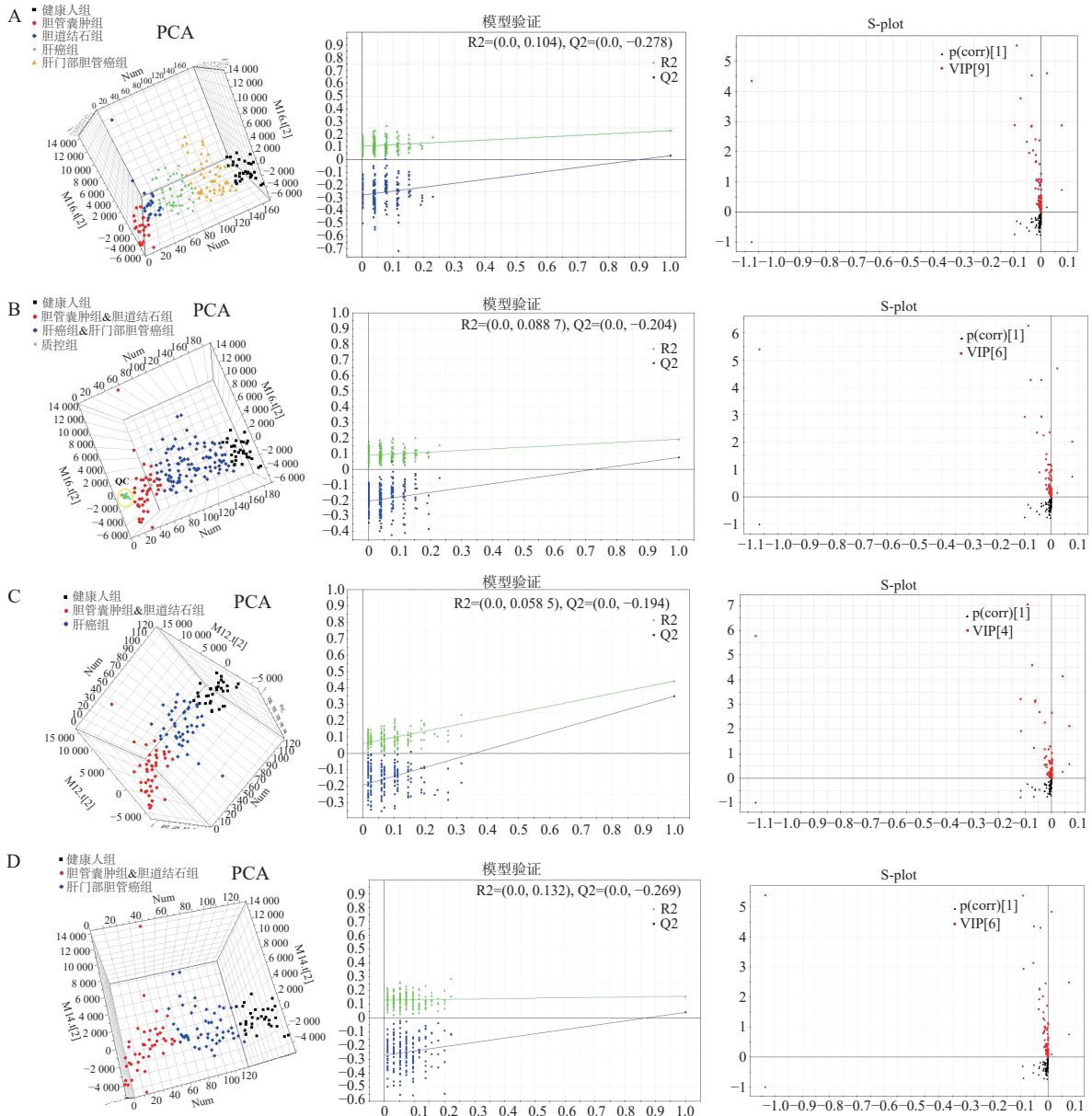


图1 基于UPLC-QQQ-MS的PCA得分图、相应的交叉验证图及S-plot图

A.健康人组 vs 胆管囊肿组 vs 胆道结石组 vs 肝癌组 vs 肝门部胆管癌组; B.健康人组 vs (胆管囊肿&胆道结石) vs (肝癌&肝门部胆管癌) vs QC; C.健康人组 vs (胆管囊肿&胆道结石) vs 肝癌; D.健康人组 vs (胆管囊肿&胆道结石) vs 肝门部胆管癌

谢通路所处的节点位置重要性作为代谢通路显著性评价指标,在代谢通路拓扑分析中,设置代谢通路的重要值大于0.10时,可被认为是潜在的靶标代谢通路。图2中所有代谢通路都以圆点表示,结合P值及重要性,圆点越大颜色越深表明其在代谢网络中所处的节点位置越重要。结果表明胆管囊肿显著改变了8条代谢通路,结果如图2A所示,具体包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(Alanine, aspartate and glutamate metabolism),牛磺酸和次牛磺酸代谢(Taurine and hypotaurine metabolism),丙酮酸代谢(Pyruvate metabolism),三羧酸循环(TCA cycle),苯丙氨酸代谢(Phenylalanine metabolism),谷氨酰胺和谷氨酸代谢(D-Glutamine

and D-glutamate metabolism),磷酸肌醇代谢(Inositol phosphate metabolism)以及淀粉和蔗糖代谢(Starch and sucrose metabolism);胆道结石显著改变了4条代谢通路,结果如图2B所示,具体包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,谷氨酰胺和谷氨酸代谢,磷酸肌醇代谢以及淀粉和蔗糖代谢;肝癌显著改变了4条代谢通路,结果如图2C所示,具体包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,丙酮酸代谢(Pyruvate metabolism),三羧酸循环(TCA cycle)和磷酸肌醇代谢;肝门部胆管癌显著改变了1条代谢通路:磷酸肌醇代谢,结果如图2D所示。上述代谢通路富集分析结果提示肝脏病变显著改变了机体的能量转换、物质转化、氨基酸的代谢和转运,说明这些

表1 鉴别的潜在生物标志物

序号	组分	VIP	p 值	Trend <sup>1</sup>	Trend <sup>2</sup>	Trend <sup>3</sup>	Trend <sup>4</sup>	Trend <sup>5</sup>	Trend <sup>6</sup>	Trend <sup>7</sup>	Trend <sup>8</sup>
1	肌醇	5.52	0.00	↓*	↑**	↑*	↑*	↑***	↑***	↓	↓
2	L-山梨酸	2.04	0.00	↓***	↑	↑	↑*	↑***	↑***	↓	↑
3	D-甘露醇	1.03	0.00	↓**	↑	↑	↑*	↑***	↑***	↓	↓
4	牛磺酸	1.66	0.00	↓*	↓	↓	↑	↑	↑***	↑	↑*
5	L-苏氨酸	1.69	0.00	↓***	↓*	↓	↑	↑***	↑***	↑*	↑**
6	L-谷氨酸	2.88	0.00	↓***	↓*	↓	↑	↑***	↑***	↑*	↑**
7	L-苯丙氨酸	2.32	0.00	↓***	↓	↓	↑	↑**	↑***	↑	↑***
8	L-天冬氨酸	1.59	0.00	↓*	↓	↓***	↑	↑	↑**	↑	↑*
9	尿酸	3.77	0.76	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
10	半乳糖酸	1.08	0.38	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓
11	D-葡萄糖酸	1.90	0.19	↓	↑	↑	↑	↑*	↑	↓	↓
12	乳酸	4.53	0.00	↓***	↓	↑	↓	↑***	↑***	↑	↓
13	L-色氨酸	1.09	0.06	↓	↑	↑	↑	↑	↑**	↑	↑
14	α-D-葡萄糖-1-磷酸二钠盐	1.04	0.00	↑***	↑***	↑	↑	↓***	↓***	↓**	↓***
15	2-甲基-1-丁醇	2.84	0.00	↓**	↓	↑*	↑	↑***	↑***	↑*	↑
16	丙酮酸	2.86	0.00	↓**	↓	↑*	↑	↑***	↑***	↑*	↑
17	2-丁酮酸	1.26	0.13	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓
18	丙二酸	2.37	0.00	↓***	↓***	↓***	↓	↑	↑***	↑	↑***
19	琥珀酸	2.41	0.24	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
20	α-酮戊二酸	1.96	0.04	↓	↑	↑*	↑	↑**	↑	↑	↑
21	戊酮酸	1.05	0.66	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
22	DL-异柠檬酸	4.35	0.13	↓	↓	↑	↑	↑	↑*	↑	↑
23	顺式-乌头酸	2.87	0.00	↑*	↑**	↑	↓	↓	↓***	↓	↓***
24	反式-乌头酸	4.60	0.00	↑**	↑***	↑**	↑	↓	↓*	↓	↓**
25	4-吡哆酸	1.01	0.40	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑
26	水杨酸	1.07	0.43	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑

注: Trend<sup>1</sup>: 胆管囊肿 vs 健康对照; Trend<sup>2</sup>: 胆道结石 vs 健康对照; Trend<sup>3</sup>: 肝癌 vs 健康对照; Trend<sup>4</sup>: 肝门部胆管癌 vs 健康对照; Trend<sup>5</sup>: 肝癌 vs 胆管囊肿; Trend<sup>6</sup>: 肝门部胆管癌 vs 胆管囊肿; Trend<sup>7</sup>: 肝癌 vs 胆道结石; Trend<sup>8</sup>: 肝门部胆管癌 vs 胆道结石; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

代谢在肝脏系统疾病中具有重要的调节作用。后续可进一步分析差异蛋白,探究具体涉及的信号通路,深入探讨这些通路在肝胆系统疾病发病机制中的作用。

#### 4.2 代谢标志物组可能成为潜在的临床疾病早期诊断手段

肝门部胆管癌因发病隐匿,易被误诊为胆道结石、胆管囊肿等,且其预后极差。如果能够在肝癌早期就及时发现并及时治疗,将会大大提高肝门部胆管癌患者的生存期及生存质量。肝癌的术前诊断主要依靠CT、超声或MRI等影像学检查。CT等影像学检测手段在分辨率和准确性上不具优势,无法满足该疾病早期诊断筛查所需的特异度和敏感度。因此,寻找高敏感性、高特异性、非侵入

性的生物标志物具有重要的临床诊断意义。本研究认为与肝脏疾病进程相关的潜在生物标志物的含量变化应该呈现规律的上调或下调,基于这一原则筛选到的差异代谢物对于肝癌的早期诊断和筛查具有更重要的意义。如图3所示,胆管囊肿患者、肝门部胆管癌患者与健康志愿者相比,天冬氨酸和丙二酸含量均呈明显下调趋势,而反式乌头酸含量均呈明显上调趋势,而肝癌以胆管囊肿为比较时,未找到规律上调或下调的差异代谢物,具体如图3A;胆道结石患者、肝癌患者与健康志愿者相比,丙二酸含量均呈明显下调趋势,而肌醇和反式乌头酸含量均呈明显上调趋势,具体如图3B;胆道结石患者、肝门部胆管癌患者与健康志愿者相比,肌醇含量均呈现明显上调趋势,具体如图3C。综

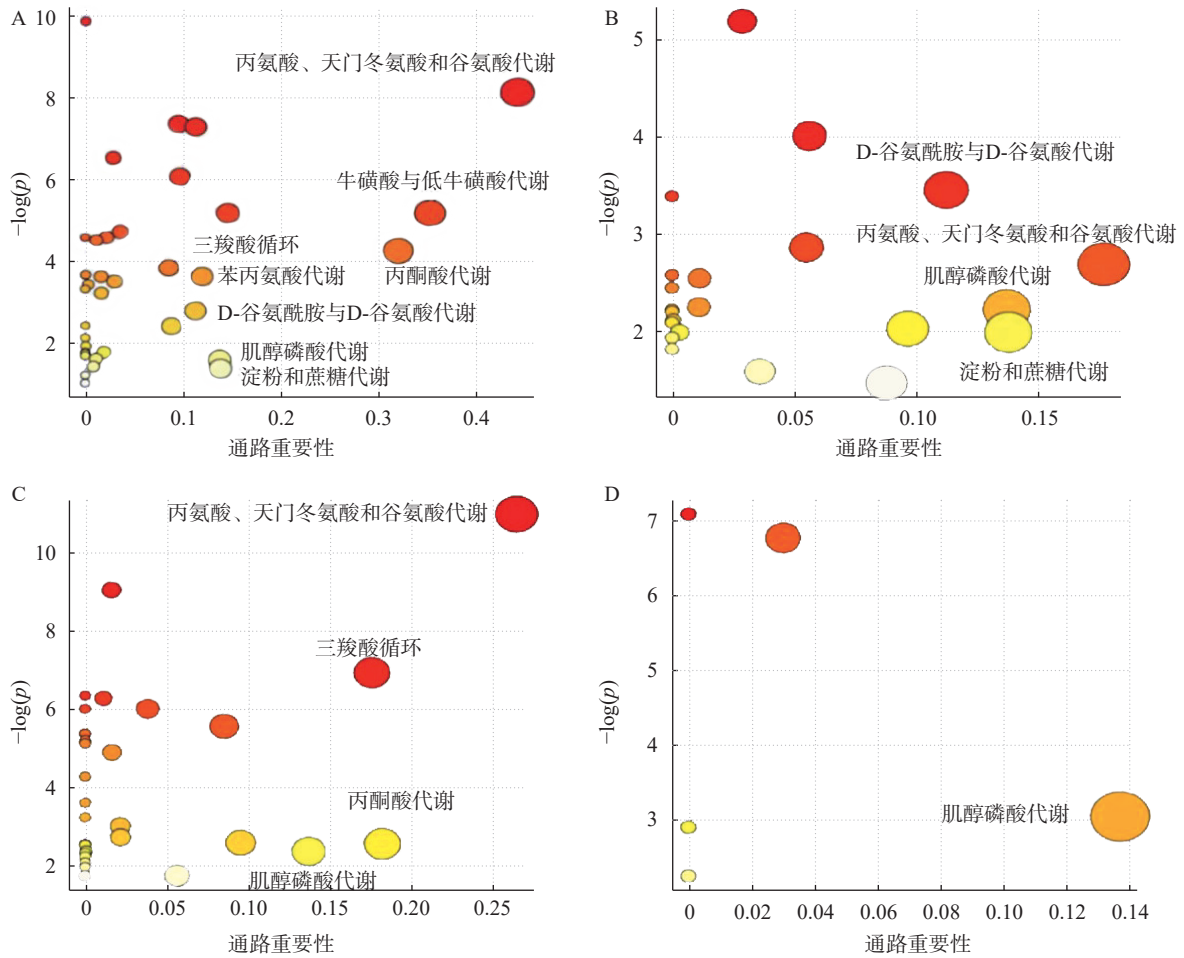


图2 IPA分析方法得到的肝脏病变相关重要代谢通路

A.胆管囊肿; B.胆道结石; C.肝癌; D.肝门部胆管癌

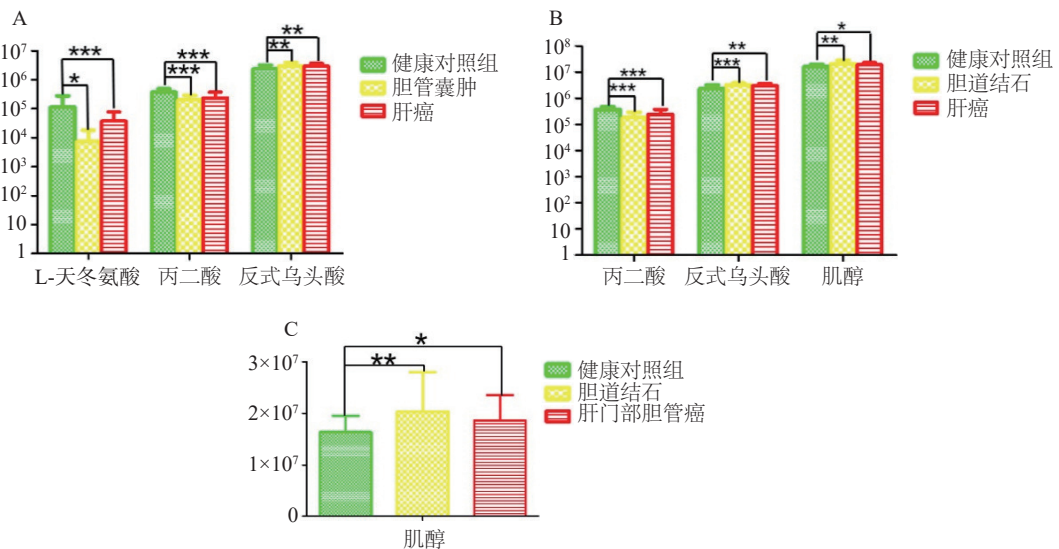


图3 潜在生物标志物在健康对照组、胆管囊肿、胆道结石、肝癌和肝门部胆管癌患者中平均含量比较

A.胆管囊肿、肝癌相关潜在生物标志物; B.胆道结石、肝癌相关潜在生物标志物; C.胆道结石、肝门部胆管癌相关潜在生物标志物;

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与健康对照组比较

上,虽然研究发现了在肝脏系统疾病进程中具有相同变化趋势的差异代谢物,然而这些差异代谢物在肝脏系统疾病患者体内的平均水平并没有显著差

异,可能原因是样本量还不够大,个体间的差异掩盖了组间的差异,然而具体真实的原因还有待后续进一步研究探索。

## 5 结论

本研究运用 UPLC-QQQ-MS 技术结合 DMRM 数据库及化学计量学方法进行了胆管囊肿、胆道结石、肝癌、肝门部胆管癌患者和健康志愿者血清的代谢组学研究,分别鉴定出 15 个、7 个、7 个和 3 个在胆管囊肿患者、胆道结石患者、肝癌患者和肝门部胆管癌患者与健康人血清中存在显著性差异的潜在生物标志物,并根据这些显著性差异的代谢物分别富集到 8 条、4 条、4 条、1 条在胆管囊肿患者、胆道结石患者、肝癌和肝门部胆管癌患者体内显著改变的代谢通路。根据上述鉴别的差异代谢物和富集的代谢通路结果,表明肝脏病变主要影响了机体的能量代谢及氨基酸的代谢与转运,而磷酸肌醇代谢在胆管囊肿、胆道结石、肝癌、肝门部胆管癌中均显著改变。

### 【参考文献】

- [1] 胡聪,吴琳静,熊印华,等. 脂质组学在肝脏疾病中的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(1): 6-12.
- [2] 文露,彭芳. 肝病患者粪便上清代谢组学研究及肠道菌群对代谢的影响 [J]. *医学综述*, 2017,23(6): 5.
- [3] 罗小芳,茹清静. 代谢组学在肝脏疾病研究中的应用 [J]. *云南中医学院学报*, 2015, 38(5): 97-100.
- [4] 柏兆方,董方,柴焯,等. 肝癌血清学早期筛查与诊断标志物研究进展 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2016, 25(5): 589-593.
- [5] 王淑凤. 基于 LC-MS/MS 技术的肝细胞癌患者血清代谢组学研究[D]. 北京:军事科学院,2021. DOI:10.27193/d.cnki.gjsky.2021.000071.
- [6] 厉颖,李灿委,范孟然,等. 酒精性肝病的代谢组学研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(7): 944-947.
- [7] 魏艳平,李艳灵,夏梦瑶,等. 代谢组学在乳腺癌生物标志物中的应用进展 [J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(6): 988-999.
- [8] ZAMPIERI M, SEKAR K, ZAMBONI N, et al. Frontiers of high-throughput metabolomics[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 36: 15-23.
- [9] 李胜男,原永芳. 代谢组学技术在肝毒性生物标志物筛选中的应用 [J]. *医学综述*, 2017, 23(11):2131-2134, 2139.
- [10] ZHOU J B, MIN Z H, ZHANG D, et al. Enhanced frequency and potential mechanism of B regulatory cells in patients with lung cancer[J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 304.
- [收稿日期] 2023-02-22 [修回日期] 2023-11-29  
[本文编辑] 崔俐俊
- 
- (上接第 752 页)
- [17] 周春红,许霓珊,曹惠慧,等. 白花蛇舌草抗肝癌作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(10): 757-758.
- [18] 林霄月. 半枝莲多糖提取纯化与组成分析及抗肝癌活性研究 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2021: 19-40.
- [19] YANG P W, CHEN T T, ZHAO W X, et al. *Scutellaria barbata* D. Don and *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxb crude extracts inhibit hepatitis-B-virus-associated hepatocellular carcinoma growth through regulating circRNA expression[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114110.
- [20] SHI L P, CHEN T T, YUAN Z, et al. Apoptosis and antitumor effects between  $\beta$ -elemene and astragaloside and drug mechanism analysis[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2018, 31(5 Special): 2271-2276.
- [21] 潘攀. 小柴胡汤防治原发性肝癌 TACE 患者术后并发症的临床研究 [D]. 南宁:广西中医药大学, 2018: 17-29.
- [22] 张雯雯,蒋吟嘯,杨丹,等. 小柴胡汤联合经导管动脉栓塞化疗治疗原发性肝癌的有效性与安全性的系统评价 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2020, 20(2): 149-153, 157.
- [23] 李晋,徐尚福,李远洋,等. 小柴胡汤对肝纤维化大鼠肝脏 MMP-2、TIMP-2 表达的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(5): 1066-1068, 1119.
- [24] 胡睿. Nrf2/ARE 信号通路参与小柴胡汤抗大鼠肝纤维化的机制研究 [D]. 遵义:遵义医学院, 2018: 9-24.
- [25] 赵锦燕,刘丽雅,张毓宸,等. 小柴胡汤对人肝癌细胞 Huh7 细胞凋亡的影响 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2016, 11(6): 746-749.
- [26] 邵和一. 小柴胡汤含药血清联合顺铂对 Hep-G2 肝癌细胞凋亡的影响 [D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2018: 9-29.
- [27] 章红燕,何福根,姜建伟. 小柴胡汤对 H22 肝癌小鼠瘤细胞的增殖抑制作用及其作用机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(6): 1386-1388.
- [28] 袁满,张君利,傅风华,等. 鲜茵陈提取物对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的作用 [J]. *中医药信息*, 2020, 37(6): 45-49.
- [29] 谭章斌,丁文俊,徐由财,等. 茵陈蒿汤抑制 JAK2/STAT3 信号通路调控肝癌细胞增殖与凋亡 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2021, 26(3): 295-299.
- [30] 王淑平. 茵陈蒿汤治疗妊娠期肝内胆汁淤积症湿热内蕴型的临床研究及其对 Th17/Treg 平衡的影响 [D]. 广州:广州中医药大学, 2020: 23-39.
- [31] JIANG S L, HU X D, LIU P. Immunomodulation and liver protection of Yinchenhao Decoction against concanavalin A-induced chronic liver injury in mice[J]. *J Integr Med*, 2015, 13(4): 262-268.
- [收稿日期] 2022-08-24 [修回日期] 2023-02-27  
[本文编辑] 李春德