

代谢组学技术及其在医学检验中的应用*

和昱辰 综述, 张 波[△] 审校
(第三军医大学, 重庆 400038)

关键词: 代谢组学; 医学检验; 实验诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1016-03

生命的物质代谢是一个生生不息的过程,任何生理生理过程都会影响体内物质新陈代谢的进程,继而使体液中代谢物质发生一系列的变化。通过在宏观水平上比较机体正常生理与疾病病理状态的不同,或是一种疾病病理进程上代谢产物的不同,可以帮助寻找与疾病诊断和病理相关的标志代谢物(biomarker),进而建立相关疾病代谢物的生物化学标志物模型。由此,代谢组学应运而生。作者现就代谢组学技术进展及其在医学检验中的应用做一综述。

1 代谢组学的概念与研究内容

1.1 概念 作为“代谢组学之父”的 Nicholson 教授于 1999 年提出了代谢组学概念,他将代谢组学(metabolomics)定义为:通过分析生物体系受到干扰或应激后的内源性代谢产物的变化,或者随时间变化而变化的代谢物组,来研究生物学状况和基因功能调节的现代生物医学分支学科。即代谢组学是研究生物体系(细胞、组织或生物体)在某一特定生理时期内,对所有低相对分子质量代谢产物的变化进行定性及定量分析的一种研究宏观生物体系的新兴学科^[1]。

1.2 研究内容 代谢组学是紧随转录组学、基因组学和蛋白质组学之后发展起来的又一项新的组学技术,这几种“组学”密切联系并共同构成了系统生物学的研究内核,见图 1。

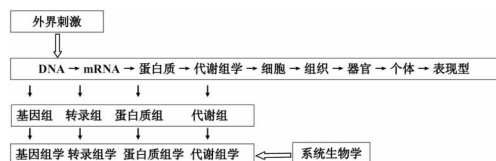


图 1 系统生物学各部分关系

代谢组学的研究对象是代谢物组。所谓代谢物组是指某一生物或细胞在维持生物体正常功能、参与生物体新陈代谢和生长发育的低相对分子质量内源性代谢产物的群,其相对分子质量通常都小于 1 000^[2]。

2 代谢组学技术与方法

代谢组学研究的主要步骤为:样品的收集处理、仪器分析、数据结果解析。这就要求生物样本(例如血液、尿液、组织细胞液等)稳定性好,预处理样本后再进行相应的检测分析,继而获得代谢组学数据,最后对原始数据进行处理和解析,获取代谢组学信息。

2.1 样品采集与保存 包括代谢组学在内的任何研究,都首先要设计方案的严谨性和可行性,必须先确保样品采集来源的合理性和代表性,数量、质量是否满足要求,必须将样本差异

对分析研究所产生的影响降到最低。同时,在代谢物组分析测试过程中也要有严格的质量控制监督。再者,样品应尽可能保留最原始的代谢物组,避免因样品保存导致成分变化。

2.2 代谢物分析测试技术 如何选择合适的方法对样品中的代谢物组分进行全面分析,是代谢物组学研究的关键。因为在现有技术条件下,很难依据单一的分析方法来建立较为全面的代谢组学模型,故联用技术和多种方法进行综合分析是较好的研究手段。目前,包括有核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、液相色谱(liquid chromatography, LC)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)、液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometer, LC-MS)等技术。

2.2.1 NMR 技术 NMR 技术是使用最常用的代谢组学研究技术之一,是利用原子核的自旋角动量在外加磁场作用下能量跃迁的原理发展起的分析信息技术。常用种类包括:氢核磁共振波谱法(¹H-NMR)、碳核磁共振波谱法(¹³C-NMR)和磷核磁共振波谱法(³¹P-NMR),其中以 ¹H-NMR 应用最为广泛,具有样品处理简单、进样量少、快速、无损、重复性好等优点。但灵敏度低是 NMR 技术最大的缺点。随着 NMR 技术的快速发展,常用检测方式有原位活体组织萃取液的高分辨氢核磁共振波谱法、生物体液的立体高分辨氢核磁共振波谱法和原位活体组织的高分辨氢核磁共振波谱法及活体定域 MR 谱等^[3]。随着这些代谢组学技术的发展和广泛应用,对肿瘤的早期诊断和预后监测有重大意义^[4]。

2.2.2 MS 技术 MS 技术是一种与光谱并列的谱学方法,通过相对分子质量/电荷比(m/z)的不同,用电场(或电磁场)将不同物质区分开,再通过对信号进行探测来确定其质量。与 NMR 相比,其具有灵敏度高、分辨率强及特异性好的优点^[5],但其样品前处理较复杂。近年来,发展较快的高分辨飞行时间 MS 技术、三重四级杆 MS 技术和串联四级杆线性离子阱 MS 技术等常用于代谢组学研究中。

GC-MS 联用:指 GC 仪经接口与 MS 仪结合而构成的 GC-MS 的分析技术,主要用于分离挥发性化合物,有效率高、灵敏度好、用量少、应用范围广等优点。

LC-MS 联用:主要应用于低挥发性或非挥发性、热稳定性差的极性化合物。因 GC 必须由已知标准作参照,无法直接从色谱图给出未知物的定性分析,也不能测量包括蛋白质、多肽、多聚物的大分子化合物,而 LC 可弥补这一缺点。现常用的

* 基金项目:第三军医大学临床创新基金(SWH2012LC12);第三军医大学回国人员启动基金(SWH2011LC022);重庆市攻关课题(应用技术开发类, CSTC2012gg-yyjs10046)。 作者简介:和昱辰,女,在读研究生,主要从事抑郁症的代谢组学研究工作。 [△] 通讯作者: E-mail: zhangbocq@aliyun.com。

LC 技术有 HPLC 及超高效液相色谱法 (ultra-performance liquid chromatography, UPLC) 等。

毛细管电泳 (CE)-MS 联用: 是以毛细管为分离通道, 根据离子的迁移速度、电荷及颗粒大小对样本中各组分进行分离, 与传统的分离方法相比, CE 的特点是简单、高效、快速和微量。

2.3 代谢组学数据处理 代谢组学要如何对样本中所有代谢

物组进行系统、整体的研究呢? 这就必须依赖多元统计分析的数据提取方法。其常见应用方法有主成分分析、聚类分析、主成分判别分析、偏最小二乘法-判别分析、辨别式功能分析、非线性回归等。同时, 代谢组学数据解析离不开各种代谢途径和生物化学数据库, 见表 1。

表 1 常用与代谢产物相关数据库

| 编号 | 数据库名称 | 网址 |
|----|-----------------------------|---|
| 1 | 人类代谢组数据库 | http://www.hmdb.ca/ |
| 2 | 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) | http://www.gebome.ad.jp/kegg/ |
| 3 | 连接图数据库 (Connection Map, DB) | http://www.stke.org/ |
| 4 | METLIN | http://metlin.scripps.edu/ |
| 5 | 寄生虫数据库 (PathDB) | http://www.ncgr.org/pathdb/ |
| 6 | 限制酶数据库 (EMP) | http://www.empproject.com/ |
| 7 | 生物催化和降解数据库 (UMBBD) | http://umbbd.ahc.umn.edu/ |
| 8 | 大肠杆菌生物学综合数据库 (EcoCyc) | http://ecocyc.org/ |
| 9 | 新陈代谢途径和酶数据库 (Metacyc) | http://ecocyc.org/ |
| 10 | 配体数据库 (LIGAND) | http://www.genome.ad.jp/ligand/ |
| 11 | 生物化学途径 (ExPASy) | http://www.expasy.ch/cgi-bin/search-biochem-index |
| 12 | 互联网主要代谢途径 (MMP) | http://home.wxs.nl/pvsanten/mmp/mmp.html |
| 13 | 博士植物化学和民族植物学数据库 (Duke) | http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/ |
| 14 | 大学天然产物数据库 (Arizona) | http://npd.chem.arizona.edu/about.asp/ |

3 代谢组学研究的优、缺点

与其他临床研究技术相比, 代谢组学显示出了其独特的优点: (1) 创伤小, 无需穿刺提取活检组织, 利用体液、尿液和血液等生物系统代谢物进行疾病诊断, 实现快速、非侵袭性诊断; (2) 结果内容丰富, 可以得到整体水平的信息; (3) 快速、大量, 平均检测时间为 5~20 s, 可一次性扫描 96 孔板上全部的样品; (4) 分析检测容易, 一切外源性刺激最终都会导致代谢物的变化; (5) 代谢物种类跟基因和蛋白的数目相比, 数量很小, 便于分析; (6) 由于代谢物存在于组织中任何部分, 故该研究技术更适用于临床检测。

代谢组学研究也有许多不足之处: (1) 代谢物组分析手段只是新兴技术, 刚起步, 尚无任何一个技术可以同时同时对机体全部代谢物组进行分析; (2) 数据分析手段还需要发展; (3) 生物体代谢物组的稳定性较难控制; (4) 代谢物组的仪器设备价格较高, 所需较强的专业性, 一般实验室难以开展; (5) 缺乏关于代谢物组全面、标准的数据库; (6) 容易受生理、药理效应影响, 导致假阳性结果; (7) 体液的选择具有局限性, 如神经系统病理学研究时, 尿液与脑脊液所得结果会有区别。

4 代谢组学在临床检验诊断中的应用

以往的疾病诊断, 主要集中在检测与疾病相关的系统的生物标志物, 但代谢组学分析是从宏观上分析机体整体的代谢物组变化。

4.1 循环系统疾病诊断 Brindle 等^[6]应用 NMR 技术, 建立的冠心病代谢组学诊断模型, 这种判别心血管疾病及其严重程度的诊断新模式, 有着高达 92% 的敏感性及 89% 的特异性, 可以区分不同病变程度患者。Nasokawa 等^[7]用 GC-MS 技术对冠状动脉支架术后狭窄患者的血清进行分离, 共发现 83 种

显著变化的化合物, 并以其中异丁胺、肌氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、牛磺酸、核酮糖、葡萄糖和色氨酸 8 种生物标志物为指标, 对术后再狭窄患者进行诊断, 有着 83% 的准确率。因此, 代谢组学技术在心脏疾病的诊断中具有独特优势和潜力。

4.2 消化系统疾病诊断 Marchesi 等^[8]建立的基于 ¹H-NMR 技术的代谢组学诊断模型, 可以早期、快速并且非侵袭性的诊断肠炎。Yin 等^[9]建立的基于 UPLC-Q-TOF-MS 的代谢组学模型, 发现了与肠痿相关的 9 个生物标志物。Chen 等^[10]以血清中血脂酰胆碱, 长链和中链酰基肉碱等的代谢终产物为研究对象, 建立的 HPLC-MS 的代谢组学诊断模型, 可以有效区分肝炎、肝硬化及肝癌患者。

4.3 泌尿系统疾病诊断 Psihogios 等^[11]建立的基于 ¹H-NMR 技术评估肾小管间质损害程度的模型, 对肾小管间质轻、中、重等不同程度损害进行区分, 有着高达 96% 的敏感性和 99% 的特异性。Tzovaras 等^[12]建立的基于 NMR 技术来研究高尿酸血症模型, 发现苯丙氨酸、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酸、乙酸盐等生物标志物有助于疾病的早期诊断。

4.4 内分泌系统疾病诊断 Makinen 等^[13]建立的基于 NMR 的 2 型糖尿诊断代谢组学模型, 有着高达 95.5% 的敏感性和 87.1% 的特异性。Floegel 等^[14]利用 GC-MS 技术研究有机酸在 2 型糖尿病患者尿液中的水平变化, 鉴别出了 5 种与疾病发生相关的生物标记物, 可以用于 2 型糖尿病的诊断。

4.5 肿瘤的诊断 Odunsi 等^[15]应用 ¹H-NMR 技术建立依据血清标志物鉴别上皮性卵巢癌的诊断模型, 有着 100% 的敏感性和特异性。Corona 等^[16]用串联 MS 法进行血清代谢组学研究, 发现包括不同类别的代谢产物, 如丝氨酸、组氨酸、色氨酸、胱氨酸和甘油磷脂等在乳腺癌诊断中有重要意义。

4.6 其他疾病的诊断 代谢组学技术还应用免疫性疾病研究中,Romick-Rosendale 等^[17]建立基于¹H-NMR 检测系统性红斑狼疮患者尿液的代谢组学模型,可以在早期区分不同类型的系统性红斑狼疮患者。同时,代谢组学也可用于产妇早产的预测。

5 展 望

代谢组学研究的不断发展,使其广泛应用于临床疾病的诊断、药物开发、营养与食品安全学、微生物等领域。目前,代谢组学的研究还处于初级阶段,但结合代谢组学技术发展有效的疾病诊断方法已成为生物医学领域的前沿和热点,已在临床诊断领域展示出了广阔的应用前景。

参考文献

[1] Goodacre R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation; seeing the wood with the trees[J]. J Exp Bot, 2005, 56(410): 245-254.

[2] Tweeddalle H, Notley-Mcrob L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of Escherichia coli, as revealed by global metabolite pool (“metabolome”) analysis[J]. J Bacteriol, 1998, 180(19): 5109-5116.

[3] Lenz EM. Nuclear magnetic resonance (NMR)-based drug metabolite profiling[J]. Methods Mol Biol, 2011, 708(4): 299-319.

[4] Bathen TF, Sitter B, Sjobakk TE, et al. Magnetic resonance metabolomics of intact tissue: a biotechnological tool in Cancer diagnostics and treatment evaluation[J]. Cancer Res, 2010, 70(17): 6692-6696.

[5] Paige LA, Mitchell MW, Krishnan KR. A preliminary metabolomic analysis of older adults with and without depression[J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2007, 22(5): 418-423.

[6] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR based metabolomics[J]. Nat Med, 2002, 8(12): 1439-1444.

[7] Hasokawa M, Shinohara M, Tsugawa H, et al. Identification of biomarkers of stent restenosis with serum metabolomic profiling using gas chromatography/mass spectrometry[J]. Circ J, 2012, 76(8): 1864-1873.

[8] Marchesi JR, Holmes E, Khan F, et al. Rapid and noninvasive metabolomic characterization of inflammatory bowel disease[J]. J Proteome Res, 2007, 6(2): 546-551.

[9] Yin P, Zhao X, Li Q, et al. Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultraperformance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS)[J]. Proteome Res, 2006, 5(9): 2135-2143.

[10] Chen S, Kong H, Lu X, et al. Pseudotargeted metabolomics method and its application in serum biomarker discovery for hepatocellular carcinoma based on ultra high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2013, 85(17): 8326-8333.

[11] Psihogios NG, Kalaitzidis RG, Dimou S, et al. Evaluation of tubulointerstitial lesions' severity in patients with glomerulonephritides: an NMR-based metabolomic study[J]. J Proteome Res, 2007, 6(9): 3760-3770.

[12] Tzouvaras VT, Psihogios NG, Kostara CE, et al. Evaluation of the proximal tubular function in individuals with primary renal hypouricemia: an NMR-based metabolomic study[J]. NMR Biomed, 2009, 22(10): 1072-1083.

[13] Mäkinen VP, Soininen P, Forsblom C, et al. Diagnosing diabetic nephropathy by ¹H NMR metabolomics of serum[J]. MAGMA, 2006, 19(6): 281-296.

[14] Floegel A, Stefan N, Yu Z, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach[J]. Diabetes, 2013, 62(2): 639-648.

[15] Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, et al. Detection of epithelial ovarian Cancer using ¹H-NMR-based metabolomics[J]. Int J Cancer, 2005, 113(5): 782-788.

[16] Corona G, Polesel J, Fratino L, et al. Metabolomics biomarkers of frailty in elderly breast Cancer patients[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(7): 898-902.

[17] Romick-Rosendale LE, Brunner HI, Bennett MR, et al. Identification of urinary metabolites that distinguish membranous lupus nephritis from proliferative lupus nephritis and focal segmental glomerulosclerosis[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(6): R199.

(收稿日期:2013-12-25)

• 综 述 •

形态定量技术在乳腺针吸细胞学中的应用*

龚 平 综述, 郭华雄 审校

(华中科技大学同济医学院附属荆州医院/荆州市中心医院病理科, 湖北荆州 434020)

关键词:形态定量; 乳腺癌; 针吸细胞学; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-1018-03

乳腺癌(mammary carcinoma)是人类最常见的恶性肿瘤,近年来乳腺癌的发病率有明显上升趋势。大量研究表明,提高乳腺癌生存率和降低病死率的决定性因素并非完全在于治疗手段的改善,最为关键的因素是乳腺癌的早期发现、早期诊断。细胞学特别是针吸细胞学,是早期筛查乳腺癌良、恶性疾病的重要方法。但由于方法学的缺陷,依靠传统的镜下形态学观察

手段,仍有近 10% 的患者不能明确诊断。随着自然科学的发展,在细胞形态学领域,图像分析技术进行了较多的尝试应用。本文就形态定量技术在乳腺针吸细胞学中的应用现状及进展进行综述。

1 乳腺针吸细胞银染核仁形成区(AgNOR)研究

AgNOR 反映了细胞核的增殖活性^[1]。近些年研究认为

* 基金项目:荆州市重点项目(20072PE1-1)。 作者简介:龚平,男,副主任技师,主要从事肿瘤组织与细胞形态学定量研究与诊断工作。