论著·临床研究

乙型病毒性肝炎、原发性肝细胞癌患者血清代谢组学研究*

杨文涛[1],谢宝刚[2],徐颜美[3],刘亚兰[2],邹书兵[4△]

(1. 南昌大学第二附属医院器官移植科,江西南昌 330006;2. 南昌大学药学院,江西南昌 33006;3. 南昌大学第二附属医院检验科,江西南昌 330006;4. 南昌大学第二附属医院肝胆外科,江西南昌 330006)

摘　要:目的　研究乙型病毒性肝炎、原发性肝细胞癌(HCC)患者及健康体检者代谢物变化。**方法**　收集 49 例 HCC、29 例乙型肝炎 DNA 阴性、26 例乙型肝炎 DNA 阳性患者血清作为病例组,收集 46 例健康体检者血清作为对照组,采用 AvanceⅡ-600MHz 核磁共振仪检测血清中小分子代谢产物,通过聚类分析筛选出各组的特征代谢物。**结果**　与对照组比较,乙型肝炎 DNA 阴性组患者血清中有 12 种代谢物质差异有统计学意义($P<0.05$),乙型肝炎 DNA 阳性组患者血清中有 15 种代谢物质差异有统计学意义($P<0.05$);肝癌组患者血清中有 21 中代谢物质差异有统计学意义($P<0.05$),其中苯乙尿酸水平上升,其他代谢物下降。与 DNA 阳性组比较,乙型肝炎 DNA 阴性组患者血清中有 14 种代谢物质差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　核磁共振氢谱可有效筛查出 2 型肝炎、HCC 患者之间有显著差异的血清代谢物,在无创诊断 HCC 方面具有广阔的应用前景。

关键词:磁共振波谱学;　磁共振成像;　癌,肝细胞;　肝炎,乙型;　代谢组学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.008　　**中图法分类号:**R735.7;R445.2

文章编号:1673-4130(2019)01-0029-05　　**文献标识码:**A

Metabonomic studies on the serum of the patients with viral hepatitis B and Hepatocellular carcinoma*

YANG Wentao[1], *XIE Baogang*[2], *XU Yanmei*[3], *LIU Yalan*[2], *ZOU Shubing*[3△]

(1. *Department of Organ Transplant, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi* 330006, *China*; 2. *College of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi* 330006, *China*; 3. *Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi* 330006, *China*; 4. *Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi* 330006, *China*)

Abstract: Objective　To explore the metabolite composition of the serum samples from the hepatitis, Hepatocellular carcinoma (HCC) patients and healthy controls. **Methods**　The serum samples from 49 patients with HCC, 29 hepatitis B patients with negative DNA, 26 hepatitis B patients with positive DNA were collected as case group, and 46 healthy as control group. The small molecular metabolites were detected AvanceⅡ-600MHz, and the characteristic metabolites were screened by cluster analysis. **Results**　Compared with the control group, there were 12 metabolites have the significant differences in the DNA negative hepatitis group, and 15 metabolites in the DNA positive hepatitis group, 21 metabolites in the HCC group. Among the metabolites with significant differences in HCC, phenyletic acid was increased and other metabolites were decreased. Fourteen metabolites have the significant differences between the DNA negative hepatitis group with DNA positive hepatitis group. **Conclusion**　Nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy (NMR) can effectively screen the serum metabolites with significant differences between hepatitis B and HCC patients, and has broad prospects in the further non-invasive diagnosis of HCC.

Key words: magnetic resonance spectroscopy;　magnetic resonance imaging;　carcinoma, hepatocellular;　hepatitis B;　metabolomics

原发性肝细胞癌(HCC)是最常见的原发性恶性　肿瘤之一,全球每年超过 65 万人死于 HCC,且其发病

*　**基金项目:**江西省科技支撑计划项目(20151BBG70158),江西省教育厅项目(GJJ150277)。

作者简介:杨文涛,男,主治医师,主要从事肝胆疾病代谢组学分析方向的研究。　△　**通信作者**,E-mail:zousb999@163.com。

本文引用格式:杨文涛,谢宝刚,徐颜美,等. 乙型病毒性肝炎、原发性肝癌患者血清代谢组学研究[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(1):29-33.

率仍在逐年增加[1-2]。HCC 患者早期无明显临床症状，发生隐匿，易发生转移，往往在发现时已为肝癌晚期，因此，尽早发现和治疗是提高 HCC 患者生存率的关键。当前肝癌诊断方法有临床症状、病理检查、血清甲胎蛋白、影像学超声和 CT 检查等，但这些方法存在创伤性、灵敏度不高和病症确定困难等缺点[3-4]。因此，寻找与肝癌发生、发展紧密相关的特征代谢物，有望为肝癌尽早诊断提供可靠、安全和灵敏的生物学指标具有重要的临床价值。核磁共振氢谱（^{1}H NMR）是代谢组学研究最常使用的检测方法，是一种高通量生物代谢物指纹检测技术，基于原子的自旋特性通过磁场和射频脉冲而作用于原子核，氢原子普遍存在于代谢物中[5-6]。^{1}H NMR 具有对样品非破坏性、检测物质多样性和准确、分辨率高等优点[7]。本研究应用^{1}H NMR 方法研究了 HCC 患者血清的代谢组特征，旨在筛选出可靠的标志性代谢物。

1　资料与方法

1.1　标本来源　收集南昌大学第二附属医院感染性疾病科及肝胆外科收治的肝炎及 HCC 患者血清作为病例组，诊断标准参照《乙型病毒性肝炎诊断标准》（WS299-2008）[8]。同期收集各项体检指标正常的健康体检者血清作为对照组。所有研究对象均签署知情同意书，于清晨空腹采取静脉血 3 mL，3 000 r/min 离心 10 min，获得血清标本，置于－80 ℃冰箱保存备用。

1.2　样品预处理　室温解冻保存的血清样品，每管吸取 200 μL，加入 800 μL 甲醇沉淀蛋白，充分漩涡振荡后静置 10 min，12 000 r/min 离心 5 min，再取上清液 850 μL 于干净的 1.5 mL EP 管中，使用高速真空旋转蒸发仪烘干。烘干后加入 460 μL 蒸馏水将浓缩物复溶，涡旋振荡，超声至溶解，取上清液 445 μL 至 EP 管中，依次加入磷酸缓冲液 50 μL，TSP 重水溶液 50 μL，涡旋振荡混匀，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 500 μL 装入 5 mm 核磁管中，进行^{1}H NMR 检测。

1.3　^{1}H NNR 试验　采用 Avance Ⅱ-600MHz 核磁共振仪（Bruker 公司）检测。打开气源开关，待输出气压平稳，按启动程序按钮，将样品放入核磁共振仪中，打开联机电脑上 Topspin 软件，输入 edc 对核磁样品进行命名区分，输入 Lock 选用实验样品所用的氘代试剂比例 90%H_2O＋10%D_2O 锁场；输入 Atma 命令进行自动调谐以获得最佳灵敏度；输入 topshim 使样品处于一个均匀的磁场中，匀场完全后输入 zg 进行采样使重新扫描产生结果，扫描采样结束后在命令行输入 tr 保存已采集的数据点。再直接输入 fp 及 apk 相位转换处理得完整^{1}H NMR 谱图。

1.4　^{1}H NMR 谱的数据预处理和聚类分析　采用 Topspin 软件将所有样品^{1}H NMR 谱进行自动积分，手动进行相位校正和基线校准。应用 Matlab 软件对不同指纹图谱进行处理，将所有样本指纹图谱达到较高拟合度。为减少样品浓度误差带来的干扰，将处理好的^{1}H NMR 全谱数据进行归一化，根据不同组别样品进行分组编号，观察样品的聚离程度，删除异常点，再输入 SIMCA-P＋分析软件进行多元统计模式识别分析，包括主成分分析（PCA）、偏最小二乘法判别分析（PLS-DA）和正交校正偏最小二乘法-判别分析（OPLS-DA），所有类聚分析 scale 均采用 UV 及 CTR 中心化处理算法，以分辨所有样品不同代谢状态。通过 PLS-DA 模型和 OPLS-DA 模型的变量分析获得重要影响值（VIP，其值越大提示该变量越重要）及 Loadings 值绘制得到 VIP 荷载图，以颜色对核磁峰的 VIP 值进行编码，颜色越红表示该代谢物差异越显著，颜色越蓝表示该代谢物差异越不明显。将候选特征峰 VIP 值＞1.5 的差异变量所在区间找出来，结合核磁峰的化学位移和峰形分裂特征，利用 2 维全相关谱（TCOSY）、网络数据库（http://www.bmrb.wisc.ed，http://mdl.imv.liu.se，http://www.hmdb.ca）及借助标准品对照鉴定和确证特征代谢物。根据^{1}H NMR 图谱选择峰形干扰较小部分进行积分，得差异代谢物积分值将其进行对数加 5 变换，再采用 SPSS19.0 统计软件对 4 组数据进行方差分析，筛选与肝癌发生、发展相关的血清特征代谢物组。

1.5　统计学处理　采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行分析，对乙型肝炎、HCC、健康体检组血清代谢物的归一化面积值进行方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　各组研究对象血清^{1}H NMR 谱代谢物成分及比较　健康对照组、肝炎 DNA 阴性组、肝炎 DNA 阳性、肝癌研究对象血清^{1}H NMR 图谱中化学位移从 δ 为 0.5～2.3 的区域，放大后可明显看出 4 组之间相同轮廓的相对峰高存在差异。见图 1。

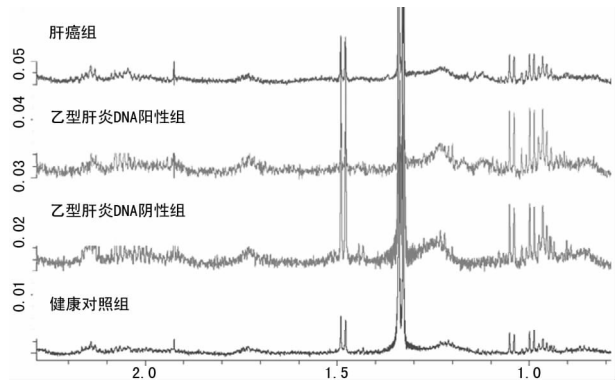
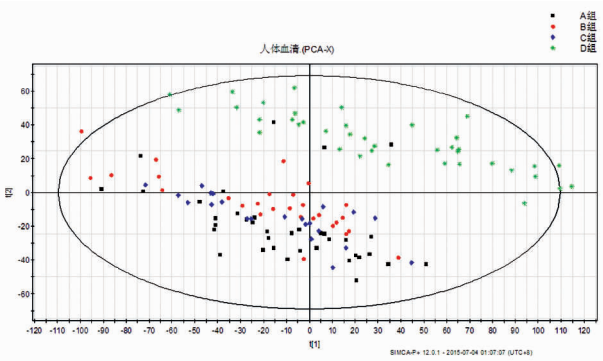


图 1　各组研究对象血清^{1}H NMR 谱代谢物成分及比较

2.2　各组研究对象组血清^{1}H NMR 图谱聚类分析

2.2.1　PCA　健康对照组和乙型肝炎组代谢物聚集在左下区域，而肝癌组代谢物聚集在右上区域，提示乙型肝炎组与健康者代谢特征存在相似性，并能较好地与肝癌组区分开。见图 2。

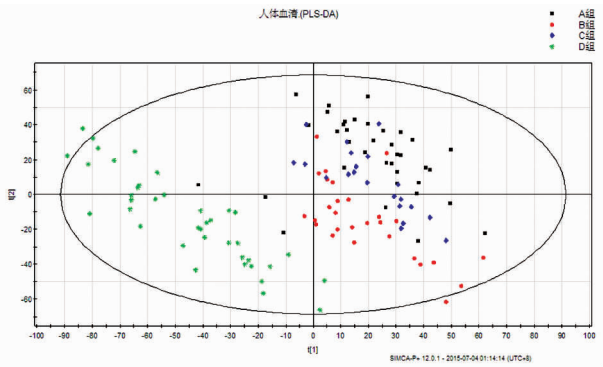
2.2.2　PLS-DA　健康对照组和乙型肝炎组代谢物聚集在右侧区域,而肝癌组代谢物聚集在左侧区域。见图 3。



注:A 组为健康对照组;B 组为乙型肝炎 DNA 阴性组;C 组为乙型肝炎 DNA 阳性组;D 组为肝癌组

图 2　各组研究对象血清样品 ^{1}H NMR 检测结果 PCA 得分图

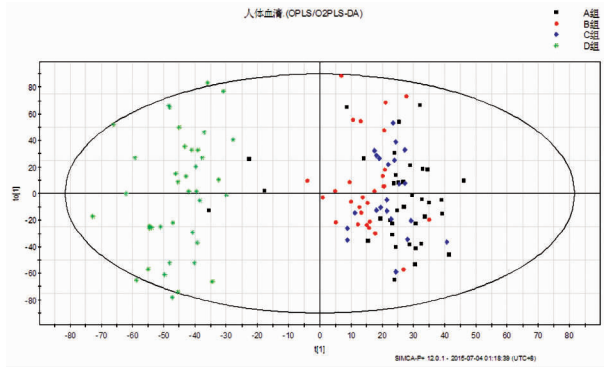
2.2.3　OPLS-DA　各组样品聚类明显,且左边肝癌组与其他组能显著区分。见图 4。



注:A 组为健康对照组;B 组为乙型肝炎 DNA 阴性组;C 组为乙型肝炎 DNA 阳性组;D 组为肝癌组

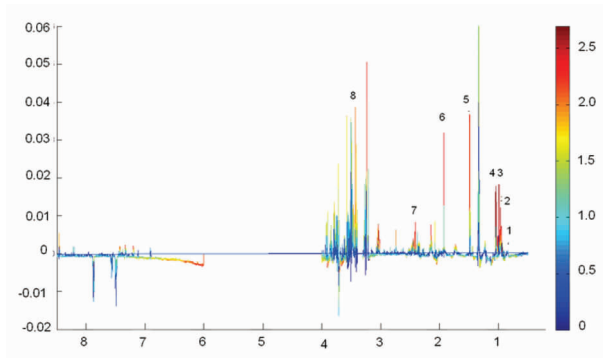
图 3　各组研究对象血清样品 ^{1}H NMR 检测结果 PLS-DA 得分图

2.3　健康对照组、乙型肝炎组、HCC 组研究对象血清聚类差异获得候选特征峰　各组研究对象 VIP 荷载图结果见图 5。



注:A 组为健康对照组;B 组为乙型肝炎 DNA 阴性组;C 组为乙型肝炎 DNA 阳性组;D 组为肝癌组

图 4　各组研究对象血清样品 ^{1}H NMR 检测结果 OPLS-DA 得分图



注:1 为脂质;2 为亮氨酸;3 为异亮氨酸;4 为缬氨酸;5 为丙氨酸;6 为醋酸;7 为琥珀酸;8 为牛磺酸

图 5　各组研究对象血清 ^{1}H NMR 图谱 VIP 荷载图

2.4　与肝癌发生、发展相关的血清特征代谢物组的筛选　各组研究对象相关特征峰信息见表 1。

表 1　各组研究对象相关特征峰信息

特征代谢物	δ^{1}H	VIP	积分区间	Lgs+5($\bar{x}\pm s$,归一化峰面积 s)			
				健康对照组(n=46)	乙型肝炎 DNA 阴性组(n=29)	乙型肝炎 DNA 阳性组(n=26)	肝癌组(n=49)
亮氨酸	0.94(d) 3.72(t) 1.96(m)	2.45	0.950～0.980	3.035±0.013△	3.018±0.021△	3.112±0.014*#△	2.707±0.023
异亮氨酸	0.91(d) 3.65(d) 1.95(m) 0.99(t)	2.61	0.980～1.002	2.942±0.012△	2.850±0.019*△	2.945±0.014#△	2.515±0.025
缬氨酸	1.02(d) 3.60(d) 2.26(m) 0.98(d)	2.64	1.030～1.043	2.667±0.013△	2.576±0.013*△	2.664±0.014#△	2.261±0.023
乳酸	1.04(d) 4.11(q) 1.32(d)	2.32	1.310～1.350	4.288±0.022△	4.098±0.037*△	4.295±0.024#△	3.729±0.030
丙氨酸	1.48(d) 3.78(q)	2.32	1.470～1.500	3.271±0.012△	3.160±0.009*△	3.305±0.019#△	2.860±0.028

续表 1　各组研究对象相关特征峰信息

特征代谢物	δ^1H	VIP	积分区间	Lgs+5($\bar{x}\pm s$,归一化峰面积 s)			
				健康对照组(n=46)	乙型肝炎 DNA 阴性组(n=29)	乙型肝炎 DNA 阳性组(n=26)	肝癌组(n=49)
醋酸	1.91(s)	2.32	1.920～1.928	2.661±0.016△	2.714±0.021*△	2.717±0.023*△	2.168±0.032
琥珀酸	2.41(s)	2.09	2.402～2.415	2.446±0.021△	2.450±0.030△	2.563±0.012*#△	2.136±0.019
谷氨酸	2.08(m) 2.34(m) 3.75(m)	2.37	2.352～2.366	2.255±0.015△	2.251±0.038△	2.460±0.015*#△	1.976±0.028
谷氨酰胺	2.15(m) 2.44(m) 3.77(m)	1.9	2.455～2.471	2.475±0.012△	2.414±0.019*△	2.355±0.028*△	2.085±0.027
赖氨酸	3.76(t) 1.89(m) 1.72(m) 3.01(t)	2.29	3.014～3.023	2.698±0.015△	2.712±0.065△	2.956±0.049*#△	2.248±0.036
胆碱	3.2(s) 4.05(t) 3.51(t)	1.82	3.200～3.212	2.878±0.025△	2.812±0.055△	2.8561±0.043*#△	2.471±0.035
甜菜碱	3.26(s) 3.93(s)	1.63	3.262～3.278	3.165±0.010△	3.123±0.017*△	3.166±0.016△	2.847±0.026
磷酸胆碱	3.22(s) 4.21(t) 3.61(t)	2.26	3.220～3.235	3.115±0.021△	2.974±0.028*△	3.106±0.03#△	2.563±0.039
牛磺酸	3.25(t) 3.42(t)	2.06	3.418～3.434	3.270±0.01△	3.216±0.014*△	3.23±0.012*△	2.935±0.025
肌酐	3.03(s) 3.92(s)	3.13	3.035～3.041	1.991±0.037△	1.939±0.029△	1.952±0.035△	1.494±0.036
甘氨酸	3.57(s)	1.87	3.562～3.576	2.853±0.012△	2.801±0.011*△	2.896±0.015*#△	2.451±0.029
酪氨酸	6.89(d) 7.18(d)	1.81	2.455～0.013	2.454±0.021△	2.354±0.021△	2.478±0.014△	2.221±0.028
苯丙氨酸	7.40(m) 7.33(m) 7.35(m)	2.05	7.400～7.440	2.667±0.016△	2.636±0.019△	2.719±0.010*#△	2.413±0.023
苯乙尿酸	7.43(m) 7.37(m) 3.75(m) 3.68(m)	1.54	7.460～7.515	2.668±0.015△	2.822±0.079△	2.716±0.020#△	2.906±0.048
尿苷	7.88(d) 5.92(d) 5.90(d) 4.36(m)	1.74	7.860～7.956	2.464±0.019△	2.071±0.017*△	1.916±0.025*#△	1.587±0.025
甲酸	8.45(s)	1.99	8.456～8.462	2.015±0.019△	2.071±0.017△	1.916±0.025*※△	1.587±0.025

注:δ^1H 表示代谢化合物氢的位移;s、d、t、m、q 分别表示代谢产物的峰型为单重峰、双重峰、三重峰、多重峰、四重峰;与健康对照组比较,* $P<0.05$;与肝炎 DNA 阴性组比较,# $P<0.05$;与肝癌组比较,△ $P<0.05$

3　讨　论

代谢异常是肿瘤发生的又一重要原因,肝脏是人体重要的物质代谢器官,肝癌的代谢物研究备受关注。核磁共振技术在代谢组学研究中最为常用,其优点在于不破坏样本的结构和性质、对化合物检测无偏倚、实验方法灵活、预处理简单、可设计多种编辑手段、并可在接近生理条件下进行实验。

目前,已有部分文献报道,利用代谢组学技术寻找肝癌特征生物指标物[9-10]。早在 2003 年 ROONEY 等[11]成功利用 NMR 技术对乳酸诱导下发生脂肪变的小鼠肝脏组织进行了代谢组学检测,结果发现,实验组小鼠葡萄糖、甜菜碱和三甲胺 N-氧化物水平均存在显著差异,提示该技术可行。随后 YIN 等[12]应用高效液相色谱-电喷雾质谱(HPLC-MS)联合技术分

析慢性乙型肝炎、急性肝衰竭患者血清代谢组学，结果发现，4 种溶血卵磷脂和 1 种胆汁酸可作为诊断肝衰竭的潜在血清标记物。CAO 等[13]采用 UPLC-MS 技术发现，LC 与 HCC 患者排泄物中的原溶血卵磷脂、尿胆素、鹅去氧胆酸二聚体差异具有统计学意义（$P<0.05$），提示胆酸合成与分泌及溶血卵磷脂的吸收障碍在 LC 和 HCC 发展过程中具有重要因素。我国学者 WANG 等[14]同样应用 HPLC-MS 技术发现了 13 种潜在生物标记物显著干扰肝癌的关键代谢途径，如有机酸、脂肪酸、胆汁酸、磷脂类和肠道菌群等的代谢。TAN 等[15]应用 HPLC-MS 分析比较了肝癌和肝硬化患者血清代谢变化，结果发现，二氢神经鞘氨醇和植物鞘氨醇在 HCC 下降明显，可能作为 HCC 的肿瘤标志物，并表明代谢组学研究中许多脂类代谢产物在肝癌患者血清与健康者血清中存在较大差异。

为进一步探索乙型肝炎、肝癌患者有显著差异的代谢物标志物，本研究基于^{1}H NMR 技术对健康者、乙型肝炎 DNA 阴性者、乙型肝炎 DNA 阳性者和 HCC 患者血清代谢物进行了分析。与对照组比较，乙型肝炎 DNA 阴性组患者血清中有 12 种代谢物质，如乳酸、丙氨酸、磷酸胆碱等显著降低；乙型肝炎 DNA 阳性组患者血清中有 15 种代谢物质差异具有统计学意义（$P<0.05$），其中 5 种物质，如亮氨酸、牛磺酸等水平下降，9 种代谢物质，如醋酸、胆碱等水平上升。与乙型肝炎 DNA 阳性患者比较，乙型肝炎 DNA 阴性患者血清中有 14 种代谢物质具有显著差异，其中 4 种代谢物，如谷氨酰胺、甲酸水平下降，10 种代谢物，如亮氨酸、乳酸水平上升。乙型肝炎 DNA 阴性组、乙型肝炎 DNA 阳性组与健康对照组之间均存在水平有差异的代谢物，提示在乙型肝炎期某些代谢物水平已出现明显紊乱，也为寻找肝癌发生、发展相关特征代谢物提供了证据。此外，本研究还筛选出 21 种与 HCC 发生、发展相关的代谢物标志物，其中仅有苯乙尿酸水平上升，其他代谢物，如异亮氨酸、胆碱、缬氨酸等均下降。

苯乙尿酸是嘌呤代谢产物，其水平增多，可能与肝脏病变时代谢障碍所致。饮酒是高尿酸血症的相关危险因素，也是肝脏损伤的直接危险因素，但苯乙尿酸代谢增多与肝癌发生、发展的机制仍需进一步研究探讨。

4　结　　论

本研究通过^{1}H NMR 有效筛查出乙型肝炎、肝癌患者之间 21 种具有显著差异的血清代谢物，在无创诊断 HCC 方面具有广阔应用前景。但由于存在种族、地域等差异，该结果仍需进一步的多中心实验证实。

参考文献

[1] LLOVET J M,BURROUGHS A,BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet,2003,362(9399):1907-1917.

[2] TORRE L A,BRAY F,SIEGEL R L,et al. Global cancer statistics,2012[J]. CA Cancer J Clin,2015,65(2):87-108.

[3] XIE D Y,REN Z G,ZHOU J,et al. Critical appraisal of Chinese 2017 guideline on the management of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Surg Nutr,2017,6(6):387-396.

[4] AYUSO C,RIMOLA J,VILANA R,et al. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines[J]. Eur J Radiol,2018,101(1):72-81.

[5] EVERETT J R. A new paradigm for known metabolite identification in metabonomics/metabolomics:metabolite identification efficiency[J]. Comput Struct Biotechnol J,2015,13(1):131-144.

[6] EMWAS A H. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research[J]. Methods Mol Biol,2015,1277(1):161-193.

[7] CARTLIDGE C R,U MRA,Alkhatib A M A,et al. The utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma:review of urine-based ^{1}H NMR studies - what the clinician needs to know[J]. Int J Gen Med,2017,10(3):431-442.

[8] 李黎，崔富强，张国民，等. 乙型肝炎诊断标准(WS299-2008)解读[J]. 中国预防医学杂志，2014,48(9):758-761.

[9] AMATHIEU R,TRIBA M N,GOOSSENS C,et al. Nuclear magnetic resonance based metabolomics and liver diseases:recent advances and future clinical applications[J]. World J Gastroenterol,2016,22(1):417-426.

[10] KIMHOFER T,FYE H,TAYLOR-ROBINSON S,et al. Proteomic and metabonomic biomarkers for hepatocellular carcinoma:a comprehensive review[J]. Br J Cancer,2015,112(7):1141-1156.

[11] ROONEY O M,TROKE J,NICHOLSON J K,et al. High-resolution diffusion and relaxation-edited magic angle spinning ^{1}H NMR spectroscopy of intact liver tissue[J]. Magn Reson Med,2003,50(5):925-930.

[12] YIN P,WAN D,ZHAO C,et al. A metabonomic study of hepatitis B-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by using RP-LC and HILlC coupled with mass spectrometry[J]. Mol BioSyst,2009,5(8):868-876.

[13] CAO H,HUANG H,XU W,et al. Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta,2011,691(1/2):68-75.

[14] WANG B,CHEN D,CHEN Y. et al. Metabonomic profiles discriminate hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Proteome Res,2012,11(2):1217-1227.

[15] TAN Y,YIN P,TANG L,et al. Metabolomics study of stepwise hepatocarcinogenesis from the model rats to patients:potential biomarkers effective for small hepatocellular carcinoma diagnosis[J]. Mol Cell Proteomics,2012,11(2):M111.

（收稿日期:2018-08-10　修回日期:2018-10-16）