

• 短篇论著 •

血清氨基酸在炎症性肠病中的诊断效能评价

童天颖¹, 张洁², 徐润灏², 王震华^{1△}

(上海交通大学医学院附属仁济医院: 1. 消化科; 2. 检验科, 上海 200120)

摘要:目的 探讨血清氨基酸在炎症性肠病(IBD) 中的潜在诊断价值。方法 回顾性分析接受高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS) 法检测的 223 例 IBD 患者[153 例克罗恩病(CD) 患者纳入 CD 组, 70 例溃疡性结肠炎(UC) 患者纳入 UC 组] 和 125 例健康体检者(HC 组) 的 10 项血清氨基酸[精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、瓜氨酸(Cit)、鸟氨酸(Orn)、谷氨酸(Glu)] 水平。比较 HC 组、IBD 组及其不同亚型组的血清氨基酸水平的差异; 运用二元 Logistic 回归方法建立回归模型; 受试者工作特征(ROC) 曲线评估回归模型在 IBD 中的诊断能力。结果 与 HC 组比较, 5 项血清氨基酸水平在 IBD 组及其不同亚型(CD 组和 UC 组) 组中均出现明显变化, 表现为 Gly、Leu、Pro 和 Orn 明显升高, Tyr 明显下降($P < 0.05$)。结合二元 Logistic 回归分析结果, 将 Gly、Tyr、Leu、Pro 和 Orn 纳入回归模型, 该回归模型在 IBD 中具有较强的诊断能力, ROC 曲线下面积(AUC) 为 0.908(95% CI: 0.873~0.936), 灵敏度为 87.44%, 特异度为 81.60%。结论 血清氨基酸组成变化与 IBD 关系密切, 检测血清氨基酸在辅助诊断 IBD 中具有潜在价值。

关键词: 炎症性肠病; 氨基酸; 高效液相色谱-串联质谱法; 代谢组学; 克罗恩病; 溃疡性结肠炎

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.16.026

中图法分类号: R446.1

文章编号: 1673-4130(2020)16-2028-03

文献标识码: B

炎症性肠病(IBD) 包括克罗恩病(CD) 和溃疡性结肠炎(UC) 两种主要类型, 是一种引起胃肠道炎症反应的慢性特发性疾病^[1], 在过去的几十年间, 其在亚洲的发病率日益增加, 成为影响全球健康的疾病负担^[2]。IBD 的病因及发病机制目前仍不明确, 其诊断依赖于内镜、组织病理学和影像学等检查^[3-4], 但由于上述检查手段存在侵入性及成本高等缺点, 在 IBD 患者临床筛查及常规监测中仍存在限制性, 为临床医生迅速诊断 IBD 患者带来困难。因此, 非侵入性的、经济可靠的生物标志物是 IBD 辅助诊断的重要手段。代谢组学是近年来迅速发展的一种新技术, 用于检测、鉴定和量化特定环境下生物体代谢的低相对分子质量代谢物。代谢途径异常与 IBD 密切相关, 是 IBD 发生和发展中的关键事件, 被认为是 IBD 的特征性改变之一^[5], 其中氨基酸代谢在调节肠道健康的途径中发挥重要作用, 参与蛋白质合成、基因表达、氧化应激及免疫调节等过程^[6-10]。本研究回顾性分析了 223 例 IBD 患者与 125 例健康体检者 10 项血清氨基酸水平的差异, 并结合二元 Logistic 回归分析结果, 建立回归模型, 进而探究该模型在 IBD 中的诊断效能, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2016 年 8 月至 2019 年 1 月本院收治的经内镜检查、组织病理学及影像学确诊的 IBD

患者共 223 例作为 IBD 组, 包括 153 例 CD 患者(CD 组) 和 70 例 UC 患者(UC 组); 其中男 150 例, 女 73 例; 平均年龄(35.45 ± 13.64) 岁。根据蒙特利尔分型^[11], CD 组患者病变部位包括回肠末段 67 例, 结肠 22 例, 回结肠 64 例; CD 组中病变部位无狭窄及穿透患者 86 例, 发生病变部位狭窄患者 67 例, 发生病变部位穿透患者 0 例, 发生肛瘘病变 93 例; UC 组患者病变范围包括直肠 3 例, 左半结肠 31 例, 广泛结肠 36 例。选择同期于本院进行健康体检者 125 例纳入健康对照(HC) 组, 内镜检查及影像学检查结果均未见异常, 其中男 71 例, 女 54 例; 平均年龄(49.18 ± 11.70) 岁。

1.2 仪器与试剂 使用主要仪器包括 API3200MD 三重四级杆质谱仪(美国 ABSciex 公司)、Shimadzu 系列液相色谱仪(日本岛津公司)、Hitachi7600 全自动生化分析仪(日本日立公司); 使用主要试剂包括氨基酸代谢谱分析试剂盒(上海可力梅塔生物医药科技有限公司)、甲醇(HPLC 级, MERCK 公司)。

1.3 方法 样品处理: 采用含促凝剂真空采血管采集所有研究对象空腹静脉血 4 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。取 10 μ L 待测标本、氨基酸低值质控品 RQCL 及氨基酸高值质控品 RQCH 于 EP 管中, 分别加入 40 μ L 氨基酸标本稀释液, 振荡混匀, 2 000 r/min 离心 5 min。设置氮吹仪温度 50 $^{\circ}$ C, 吹

△ 通信作者, E-mail: zhenhuawang@126.com。

本文引用格式: 童天颖, 张洁, 徐润灏, 等. 血清氨基酸在炎症性肠病中的诊断效能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(16): 2028-2030.

干;加入复融液 100 μ L 至 96 孔板内,以 600 r/min 离心 5 min。高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法:色谱条件如下,分析柱为 XbridgeC18(3.0 $\times$ 50 mm, 3.5 μ m,美国 waters 公司),流动相 A 为水,流动相 B 为甲醇,梯度洗脱,总分析时间为 13 min,流速为 0.5 mL/min,进样量为 8 μ L。质谱条件如下,电喷雾离子源,负离子扫描,雾化气压力为 40 psi,辅助加热器压力为 60 psi,气帘气压力为 20 psi,碰撞气压力为 6 psi,离子源电压为-4 500 V,离子源温度为 600 $^{\circ}$ C;MRM 扫描分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。采用二元 Logistic 回归建立合适的诊断模型。

表 1 各组 10 项血清氨基酸指标比较[$M(P_{25}, P_{75})$,nmol/L]						
组别	<i>n</i>	Arg	Gly	Val	Tyr	Leu
HC 组	125	115.48(97.20,135.15)	333.14(286.31,364.53)	283.61(244.82,321.69)	82.17(72.42,91.74)	174.31(149.69,204.43)
IBD 组	223	106.00(83.23,133.71)	398.33(324.21,477.56)	306.94(250.46,376.72)	72.72(59.51,84.92)	236.00(186.48,291.26)
CD 组	153	109.01(84.17,137.71)	394.66(324.06,486.18)	310.49(259.75,366.54)	73.97(61.49,84.91)	238.62(189.59,290.74)
UC 组	70	101.86(81.28,128.55)	401.38(324.16,467.34)	302.30(237.16,401.87)	67.84(54.67,85.35)	210.84(172.18,291.67)
$P_{IBD\ vs.\ HC}$		0.017	<0.001	0.005	<0.001	<0.001
$P_{CD\ vs.\ HC}$		0.056	<0.001	0.003	<0.001	<0.001
$P_{UC\ vs.\ HC}$		0.020	<0.001	0.154	<0.001	<0.001
$P_{CD\ vs.\ UC}$		0.432	0.747	0.647	0.187	0.103

组别	<i>n</i>	Ala	Pro	Cit	Orn	Glu
HC 组	125	486.28(423.73,570.79)	189.93(159.80,219.94)	30.94(23.79,36.63)	129.77(104.70,150.29)	238.58(188.93,276.90)
IBD 组	223	478.11(385.99,608.79)	219.72(181.27,273.23)	30.24(23.81,38.80)	171.13(127.23,274.98)	257.34(199.39,323.08)
CD 组	153	469.51(381.39,608.73)	222.85(184.30,281.60)	30.05(24.08,38.41)	190.76(132.62,307.23)	260.93(206.88,328.82)
UC 组	70	483.58(388.79,618.83)	209.40(171.73,264.98)	31.83(23.11,40.83)	158.37(114.86,198.78)	255.16(183.26,303.56)
$P_{IBD\ vs.\ HC}$		0.664	<0.001	0.598	<0.001	0.002
$P_{CD\ vs.\ HC}$		0.570	<0.001	0.779	<0.001	0.001
$P_{UC\ vs.\ HC}$		0.975	0.020	0.448	<0.001	0.161
$P_{CD\ vs.\ UC}$		0.722	0.134	0.638	0.001	0.202

2.2 ROC 曲线分析 5 项候选氨基酸及回归模型在 IBD 中的潜在诊断价值 采用 ROC 曲线进一步分析 5 项候选氨基酸在 IBD 患者中的诊断效能,结果发现单独运用 Gly、Tyr、Leu、Pro 和 Orn 作为诊断指标时,未见较好的诊断效能(AUC 均<0.80),见表 2。因此,进一步对血清氨基酸及年龄运用二元 Logistic 回归进行分析以建立合适的诊断模型。纳入 Logistic 回归模型的参数选择标准如下:(1)在 IBD 组与 HC 组、CD 组与 HC 组、UC 组与 HC 组中均出现明显变化,差异有统计学意义($P<0.05$);(2)在二元 Logistic 回归分析结果中差异有统计学意义($P<0.05$)。最终,纳入了 Gly、Tyr、Leu、Pro 和 Orn 5 项候选氨基酸并建立回归模型,ROC 曲线分析显示,采用回归模型明显提高了单个氨基酸在 IBD 中的诊断效能,

采用受试者工作特征(ROC)曲线进行诊断效能评价。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 10 项血清氨基酸指标比较 与 HC 组比较,IBD 组甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、脯氨酸(Pro)、鸟氨酸(Orn)和谷氨酸(Glu)水平明显升高,而精氨酸(Arg)和酪氨酸(Tyr)水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组丙氨酸(Ala)和瓜氨酸(Cit)水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 HC 组相比,UC 组 Arg 水平明显降低,CD 组 Val 和 Glu 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。仅有 5 项血清氨基酸(Gly、Tyr、Leu、Pro、Orn)变化在 IBD 组及其不同亚型中均出现明显改变($P<0.05$),见表 1。

AUC 为 0.908(95%CI:0.873~0.936),灵敏度和特异度分别为 87.44%、81.60%。见表 2。

表 2 ROC 曲线分析 5 项候选血清氨基酸及回归模型在 IBD 中的潜在诊断价值			
指标	AUC(95%CI)	灵敏度[% (95%CI)]	特异度[% (95%CI)]
Gly	0.709(0.658~0.756)	64.13(57.5~70.4)	62.40(53.3~70.9)
Tyr	0.645(0.593~0.696)	68.61(62.1~74.6)	48.80(39.8~57.9)
Leu	0.760(0.712~0.804)	70.40(63.9~76.3)	68.80(59.9~76.8)
Pro	0.651(0.598~0.701)	61.43(54.7~67.9)	61.60(52.5~70.2)
Orn	0.722(0.672~0.769)	67.26(60.7~73.4)	63.20(54.1~71.6)
回归模型	0.908(0.873~0.936)	87.44(82.4~91.5)	81.60(73.7~88.0)

3 讨 论

代谢异常为 IBD 的特征性改变之一,血液通常被

认为是代谢物库,血液中的代谢物可能是 IBD 发生、发展过程中的代表性生物标志物^[5]。最近的代谢组学研究显示氨基酸代谢可能与 IBD 的发病机制相关^[12]。

氨基酸几乎是所有类型细胞的基本代谢物质,在维持肠道健康中发挥重要作用,不仅充当肠黏膜细胞中用于蛋白合成的底物,也是参与主要代谢途径的调节剂^[8]。在过去的队列研究中发现,IBD 患者血清及粪便中氨基酸水平异常^[10]。KOLHO 等^[13]发现在儿童 IBD 患者中 Orn 和 Pro 等代谢物质升高;BOSCH 等^[14]发现 Leu 和 Val 在 IBD 患者粪便中明显升高,这也与本研究结果一致,这可能与 IBD 患者在炎症反应状态下蛋白质作为分解代谢的能源潜在利用增加相关。此外,有证据表明一些氨基酸在缓解肠道炎症反应中发挥作用,例如 L-精氨酸,是一氧化氮合成的一种前体,与疾病的炎症反应程度呈负相关^[15]。

代谢组学在阐明疾病机制,以及确定用于诊断和监测疾病的生物标志物中存在潜在价值,液相色谱与质谱联用是最常用的代谢组学研究方法之一,使代谢相关的生物标志物在临床中的运用成为可能。但由于代谢物质存在多样性,且易受外在环境影响,因此,单个生物标志物在诊断中仍存在局限性。此外,尽管 CD 和 UC 在临床表现中存在相似性,但由于生物学行为存在差异而导致其氨基酸变化有所不同,因此,筛查 IBD 患者的临床潜在生物标志物时寻找在不同亚型中存在共性变化的物质更为重要。本研究的回归模型中纳入了 5 项在 IBD 组及其亚型中均出现变化的物质。该回归模型在 IBD 中具有较好的诊断能力,AUC 为 0.908,灵敏度和特异度分别为 87.44%、81.60%。

作为一项探索性研究,本研究仅为代谢谱检测在临床诊断中运用的初探,因缺乏前瞻性数据,在后续研究中需进一步完善代谢谱在 IBD 中的应用,对 IBD 患者的代谢变化进行纵向追踪。

综上所述,血清氨基酸水平的改变与 IBD 关系密切,且血清氨基酸在作为筛查 IBD 患者的辅助诊断工具中存在价值。

参考文献

[1] PIZARRO T T, STAPPENBECK T S, RIEDER F, et al. Challenges in IBD research: preclinical human IBD mechanisms[J]. *Inflam Bowel Dis*, 2019, 25(suppl 2): S5-S12.

[2] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies[J]. *Lancet*, 2018, 390(10114): 2769-2778.

[3] BETTENWORTH D, BOKEMEYER A, BAKER M, et al. Assessment of Crohn's disease-associated small bowel strictures and fibrosis on cross-sectional imaging: a systematic review[J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1115-1126.

[4] 吴开春, 梁洁, 冉志华, 等. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018 年·北京)[J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38(9): 796-813.

[5] LLOYD-PRICE J, ARZE C, ANANTHAKRISHNAN A N, et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases[J]. *Nature*, 2019, 569: 655-662.

[6] HE F, WU C, LI P, et al. Functions and signaling pathways of amino acids in intestinal inflammation[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 9171905.

[7] VIDAL-LLETJOS S, BEAUMONT M, TOME D, et al. Dietary protein and amino acid supplementation in inflammatory bowel disease course: what impact on the colonic mucosa? [J] *Nutrients*, 2017, 9(3): 310-320.

[8] TAKUMI K, IKUE T, RYUICHIRO A, et al. Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 8452-8459.

[9] BAO X, FENG Z, YAO J, et al. Roles of dietary amino acids and their metabolites in pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Med Inflamm*, 2017, 2017: 6869259.

[10] LAI Y, XUE J, LIU C W, et al. Serum metabolomics identifies altered bioenergetics, signaling cascades in parallel with exposome markers in crohn's disease[J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 449-550.

[11] SATSANGI J. The montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications[J]. *Gut*, 2006, 55(6): 749-753.

[12] FRANZOSA E A, SIROTA-MADI A, AVILA-PACHECO J, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease[J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(2): 293-305.

[13] KOLHO K L, PESSIA A, JAAKKOLA T, et al. Faecal and serum metabolomics in paediatric inflammatory bowel disease[J]. *J Crohns Colitis*, 2017, 11(3): 321-334.

[14] BOSCH S, STRUYS E A, VAN GAAL N, et al. Fecal amino acid analysis can discriminate de novo treatment-naïve pediatric inflammatory bowel disease from controls[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2018, 66(5): 773-778.

[15] SINGH K, GOBERT A P, COBURN L A, et al. Dietary arginine regulates severity of experimental colitis and affects the colonic microbiome[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 66.