

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00067

早期肾透明细胞癌患者血清的核磁共振氢谱代谢组研究

李 育, 赵靖霞, 杨根金, 张 薇, 娄子洋*

第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 应用核磁共振一维氢谱($^1\text{H NMR}$)的代谢组学技术区分早期肾透明细胞癌(ccRCC)患者和健康人的血清代谢物差异。**方法** 选取11例低级ccRCC患者(均为I~II级)和16例健康人的血清,用Bruker 600 MHz核磁共振谱仪采用cpmgpr1d脉冲序列并做单脉冲压制水峰检测 $^1\text{H NMR}$ 。用主成分分析法(PCA)和偏最小二乘判别分析法(PLS-DA)分析血清代谢物的改变。**结果** 结合PCA和PLS-DA统计方法,结果表明与健康人比较,低级ccRCC患者血清中的低密度脂蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)、异亮氨酸、丙氨酸、N-乙酰糖蛋白(NAC)、乙酰乙酸、谷氨酰胺、牛磺酸、1-甲基组氨酸和苯丙氨酸的含量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);乳酸、醋酸盐、丙酮酸、胆碱类物质、甘油和葡萄糖的含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** $^1\text{H NMR}$ 技术能显著区分早期的ccRCC患者和健康人的血清代谢物差异,为ccRCC的早期诊断提供了一种新的有效方法。

[关键词] 磁共振波谱学;代谢;肾透明细胞癌;诊断

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0067-04

Analysis of serum metabolite composition in patients with early stage clear cell renal cell carcinoma by $^1\text{H NMR}$ spectroscopy metabonomic study

LI Yu, ZHAO Jing-xia, YANG Gen-jin, ZHANG Wei, LOU Zi-yang*

Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To characterize the serum metabolite composition of patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) by using nuclear magnetic resonance ^1H ($^1\text{H NMR}$) spectroscopy. **Methods** The $^1\text{H NMR}$ spectra were obtained for the serum samples of 11 patients with low grade (I - II) ccRCC and 16 healthy humans, and the spectra data were analyzed by principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) to demonstrate the metabonomic changes. **Results** PCA and PLS-DA results showed that there were noticeable differences in metabonomics between the ccRCC patients and healthy controls. The levels of low-density lipoprotein, very low-density lipoprotein, isoleucine, alanine, N-acetylglycoprotein, acetoacetate, glutamine, taurine, 1-methylhistidine, and phenylalanine were significantly increased in the ccRCC patients ($P < 0.05$, $P < 0.01$); and lactate, acetate, pyruvate, choline, glycerol, and glucose were significantly decreased compared with those in the healthy controls ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Serum $^1\text{H NMR}$ spectroscopy combined with PCA and PLS-DA can identify the difference in serum metabonomes between ccRCC patients and healthy controls, which may offer a novel way for diagnosis of ccRCC.

[Key words] magnetic resonance spectroscopy; metabolism; clear cell renal cell carcinoma; diagnosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 67-70]

肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是肾原发性肿瘤中最常见的恶性肿瘤,约占成人肾脏恶性肿瘤的80%~90%^[1]。该肿瘤早期病症不明显,近30%的ccRCC患者在初诊时即发现转移^[1]。近30年ccRCC的发病率和病死率逐步上升,因此寻找到早期ccRCC的诊断方法对该疾病的诊治十分重要。基于代谢组学的核磁共振(NMR)技术能检测到血清中的脂类、糖类、氨基酸等小分子

的含量及结构等特征信息,从分子水平研究肿瘤患者与健康人的代谢差别,能更早地监测到无症状早期肿瘤的发生和发展,并能寻找到肿瘤恶变的生物标志物,为肿瘤的临床诊断提供科学依据。目前国内外用核磁共振一维氢谱($^1\text{H NMR}$)对早期ccRCC的代谢组研究报道较少。Gao等^[2]用 $^1\text{H NMR}$ 谱研究发现ccRCC患者的血清代谢物在肿瘤的不同阶段与健康人相比有明显差异。杨永霞等^[3]用高分辨

[收稿日期] 2011-11-21 **[接受日期]** 2011-12-09

[作者简介] 李 育, 硕士. E-mail: liyu@smmu.edu.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871335, E-mail: louziyang@126.com

魔角旋转¹H NMR 谱研究肾脏肿瘤组织,发现肿瘤组织与正常组织的代谢物也有显著差异。本实验用¹H NMR 结合主成分分析法(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘判别分析法(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)针对早期 ccRCC 患者(均为 I ~ II 级)和健康人血清中的代谢改变,探索用¹H NMR 谱方法找出早期 ccRCC 患者和健康人的代谢差异,从而找到诊断早期 ccRCC 的生物标志物。

1 对象和方法

1.1 样本收集 2011 年 1 月至 6 月从第二军医大学长海医院收集 ccRCC 患者血清 50 例和健康人血清 16 例,实验获得长海医院医学伦理委员会的批准,并已被采血者和患者的同意。选取其中 11 例 ccRCC 患者血清纳入本实验。纳入标准:(1)确诊为 ccRCC;(2)均为 I ~ II 级 ccRCC;(3)原发性肿瘤未有明显转移;(4)未接受放化疗及手术者。排除标准:(1)伴有其他恶性肿瘤;(2)伴有其他严重疾病;(3)肿瘤晚期。抽血前空腹禁食 8 h,均于上午 7:00 抽取静脉血 3 ml,4℃ 离心(1 200×g, 5 min)吸取血

清,并保存于-80℃ 冰箱中。

1.2 样品预处理 取 200 μl 血清,并在血清中加入 60 μl 2,2,3,3-三甲基甲硅烷基丙酸(TSP, 1 mg/ml)和 340 μl 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4),振荡混匀后加入到 5 mm 核磁样品管中。

1.3 ¹H NMR 实验 所有样品均在 Bruker 600 MHz NMR 谱仪上完成,每个样品都做¹H 谱实验,采用 cpmgpr1d 脉冲序列并做单脉冲压制水峰。相关参数如下:预饱和时间 2 s,谱宽 7 288.63 Hz,采样点数 64 k,叠加 128 次,循环 128 次,恒温 298 K。自由感应衰减(free induction decay, FID)信号经过傅立叶变换转为¹H NMR 图谱,化学位移以 TSP δ0 定标并校对相位。

2 结果

2.1 ccRCC 患者与健康人血清¹H NMR 图谱比较分析 图 1A 和 1B 分别是 ccRCC 患者和健康人血清典型的¹H NMR 谱,图 1B 中显示健康人血清中的主要代谢物集中在 0.7~8.0 之间,根据文献[4-6]对 NMR 谱中的代谢物信号进行指认。

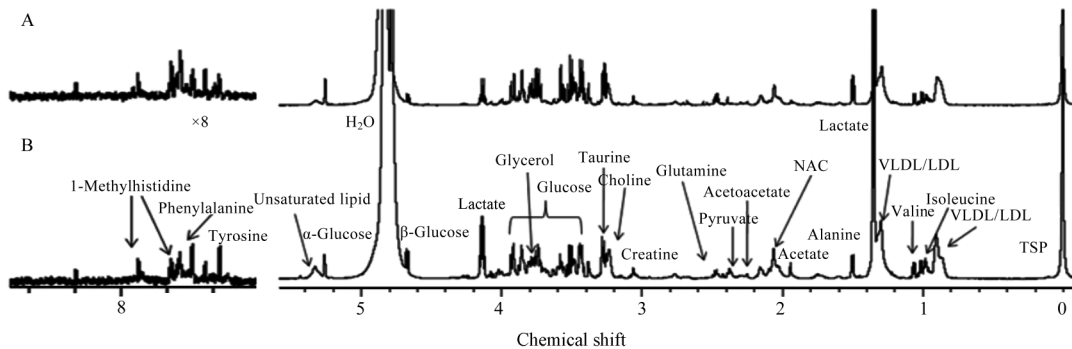


图 1 ccRCC 患者(A)与健康人(B)血清典型¹H NMR 图谱

Fig 1 Representative ¹H NMR spectra of serum from ccRCC patients(A) and healthy controls(B)

ccRCC: Clear cell renal cell carcinoma; LDL: Low-density lipoprotein; VLDL: Very low-density lipoprotein; NAC: N-acetylglycoprotein

2.2 统计学分析结果

2.2.1 数据分析 应用 Bruker Topspin 1.3 对所有¹H NMR 谱进行自动积分(0.7~9.0),积分间隔 0.02。为消除残余水峰的影响,水峰所在 4.70~5.20 区间的积分值设为零。为了减小不同样品浓度差异带来的误差,在进行模式识别前对各分段积分值进行归一化处理(每个区间的积分值与总积分值的比值)。归一化的积分数据以 Excel 文件贮存,导入 SIMCA-P 11.5 软件分别进行 PCA 和 PLS-DA 统计分析,结果见图 2 和图 3。主成分积分值集中于椭圆形的 95%CI 内,二者之间无交叉和重叠

说明 ccRCC 患者和健康人标本显著分开,二者血清代谢物存在显著差异。

2.2.2 t 检验 将归一化的原始数据做 t 检验,ccRCC 患者与健康人血清代谢物浓度变化比较见表 1。

3 讨论

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后新发展起来的一门新组学技术,代谢物居于基因和蛋白质的下游,代谢物水平变化可以说明生物体对外源刺激和病理变化的综合应答。NMR 作为代谢组学的主要研究手段,其优点有:样品前处理

简单;可在接近生理条件下进行;对所有代谢物的检测无偏向性,得到的数据较为全面且真实可靠^[5]。

根据本实验结果,在 ccRCC 早期,人体内主要是以下几个代谢通路发生较明显的改变。

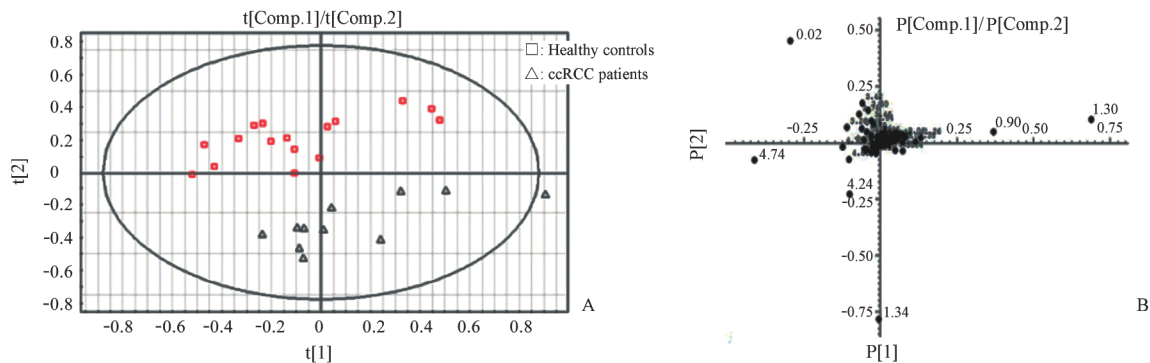


图 2 ccRCC 患者与健康人血清代谢物 PCA 结果

Fig 2 PCA results of serum metabolite from healthy controls and ccRCC patients

PCA: Principal component analysis; ccRCC: Clear cell renal cell carcinoma. A: Score plot; B: Loading plot

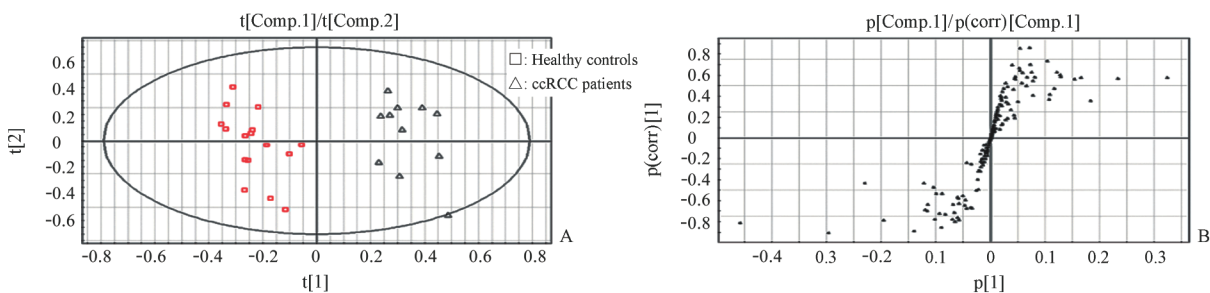


图 3 ccRCC 患者与健康人血清代谢物 PLS-DA 结果

Fig 3 PLS-DA results of serum metabolite from healthy controls and ccRCC patients

PLS-DA: Partial least squares-discriminant analysis; ccRCC: Clear cell renal cell carcinoma. A: Score plot; B: Loading plot

表 1 ccRCC 患者与健康人血清代谢物浓度变化比较

Tab 1 Comparison of changes in serum metabolites between ccRCC patients and healthy controls

$n=11, \bar{x} \pm s, m_B / (\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1})$

Chemical shift	Metabolite	ccRCC	Healthy control	Changing direction
0.86, 1.26	LDL	0.075±0.030 5	0.049±0.021 4	↑ *
0.90, 1.30	VLDL	0.047±0.015 6	0.033±0.012 2	↑ *
0.94	Isoleucine	0.009±0.001 0	0.008±0.001 7	↑ *
1.02	Valine	0.007±0.001 0	0.007±0.001 8	—
1.32, 4.10	Lactate	0.004±0.000 6	0.008±0.002 5	↓ **
1.42	Alanine	0.003±0.000 9	0.001±0.000 7	↑ **
1.94	Acetate	0.004±0.000 9	0.006±0.001 3	↓ **
2.06	NAC	0.024±0.003 9	0.020±0.003 1	↑ **
2.22	Acetoacetate	0.001 3±0.000 4	0.000 6±0.000 6	↑ **
2.34	Pyruvate	0.002±0.000 5	0.003±0.000 7	↓ **
2.46	Glutamine	0.008±0.002 0	0.006±0.001 1	↑ **
3.06	Creatine	0.006±0.001 2	0.006±0.001 3	—
3.22	Choline	0.019±0.004 1	0.022±0.004 0	↓ *
3.42	Taurine	0.037±0.006 1	0.028±0.006 1	↑ **
3.66	Glycerol	0.005±0.001 1	0.006±0.000 7	↓ **
3.70-3.90	Glucose	0.011±0.002 0	0.014±0.001 9	↓ **
4.66	β-Glucose	0.009±0.002 2	0.017±0.004 0	↓ **
5.26	α-Glucose	0.014±0.001 9	0.013±0.002 7	—
5.3	Unsaturated lipid	0.007±0.002 1	0.008±0.003 3	—
6.90, 7.22	Tyrosine	0.000 4±0.000 2	0.000 3±0.000 3	—
7.10, 7.78	1-Methylhistidine	0.000 2±0.000 2	0.000 1±0.000 2	↑ *
7.34, 7.42	Phenylalanine	0.000 5±0.000 2	0.000 4±0.000 3	↑ *

“↓” Indicates decrease; “↑” Indicates increase; “—” Indicates no change. ccRCC: Clear cell renal cell carcinoma; LDL: Low-density lipoprotein; VLDL: Very low-density lipoprotein; NAC: N-acetylglycoprotein. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs healthy control

3.1 脂代谢 ccRCC 患者血清中低密度脂蛋白(LDL, 0.86、1.26)和极低密度脂蛋白(VLDL, 0.90、1.30)的含量增加,表明机体内的脂代谢紊乱。其中 LDL 是运输肝合成的内源性胆固醇的主要形式, VLDL 是运输内源性三酰甘油的主要形式,二者含量增加是胰岛素抵抗脂肪代谢紊乱的主要标志,导致机体内的三酰甘油和胆固醇的升高。而甘油(glycerol, 3.66)是三酰甘油分解代谢的主要产物,其含量的降低说明三酰甘油的分解代谢加剧。LDL 的含量增加致使机体内胆固醇的含量升高,胆固醇蓄积在动脉壁上和肝脏中,有可能导致动脉硬化和增加肝脏的代谢负担^[7]。胆碱类物质(choline, 3.22)是细胞膜重要组成成分,作为一种贮存的脂类来源,胆碱的含量降低与肿瘤细胞的快速增殖有关,导致磷脂的代谢加速^[8]。因此 LDL、VLDL 的含量增加和胆碱的含量下降是诊断早期 ccRCC 的重要生物标志物,在肿瘤早期,机体的脂肪代谢就被快速增长的肿瘤细胞严重破坏。

3.2 糖代谢 葡萄糖(glucose, 3.70~3.90)含量降低,根据“瓦伯格效应(Warburg effect)”,指即使在氧充足的条件下,肿瘤细胞仍然偏好采用糖酵解进行葡萄糖代谢获取能量。说明由于肿瘤细胞生长繁殖加快,加速了葡萄糖的酵解过程,因此葡萄糖含量的降低也是诊断早期 ccRCC 的重要生物标志物之一^[7,9]。葡萄糖含量降低与以往研究报道^[9]一致,但本实验结果得出 ccRCC 早期患者血清中的乳酸(lactate, 1.32、4.10)和丙酮酸(pyruvate, 2.34)浓度下降,与 Gao 等^[2]用¹H NMR 谱研究 ccRCC 患者血清中的乳酸与丙酮酸浓度增加的结论不同。分析原因可能是本研究的主要研究对象是 ccRCC 早期,在肿瘤初期机体的自我调节能力也相应调整,乳酸循环代谢加快,防止机体由于乳酸堆积引起中毒,这有待进一步的研究验证。

3.3 氨基酸代谢 人体必需氨基酸的异亮氨酸(isoleucine, 0.94)和苯丙氨酸(phenylalanine, 7.34、7.42)的含量都增加,说明体内氨基酸代谢紊乱。其中异亮氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸都参与三羧酸循环,证明体内的三羧酸循环可能被破坏,虽然在本实验中缬氨酸(valine, 1.02)的浓度改变不具有统计学意义,但作为也参与三羧酸循环的人体必需氨基酸,随着肿瘤恶性程度的增加,其含量很有可能会发生明显变化^[7,10]。在正常条件下,人体内过量的苯丙氨酸在苯丙氨酸羟化酶参与下羟化成酪氨酸(tyrosine, 6.90、7.22)排除体内,而本实验中苯丙氨酸的含量增加,但酪氨酸含量变化没有统计学意义,有可能在肿瘤早期苯丙氨酸羟化酶含量减少,从而影响苯丙氨酸

的代谢,这些推论有待进一步验证。

3.4 其他代谢物 N-乙酰糖蛋白(N-acetylglycoprotein, NAC, 2.06)的含量增加,提示人体内凝血机制可能出现异常。乙酰乙酸(acetoacetate, 2.22)含量增加,提示肾脏中脂肪酸分解代谢加快^[6]。牛磺酸(taurine, 3.42)是重要的抗氧化物质,在 ccRCC 患者血清中含量增加,说明在 ccRCC 早期,肾细胞通过增加合成牛磺酸来抵制自由基的危害。

综上所述, ccRCC 患者血清和健康人血清的¹H NMR 谱具有明显不同的代谢特征。本实验表明, ccRCC 患者血清中的 LDL、VLDL、异亮氨酸、丙氨酸、NAC、乙酰乙酸、谷氨酰胺、牛磺酸、1-甲基组氨酸和苯丙氨酸的含量增加;乳酸、醋酸盐、丙酮酸、胆碱类物质、甘油和葡萄糖的含量降低,而且差异均有统计学意义。提示基于 NMR 和模式识别的代谢组学方法能发现 ccRCC 患者血清的代谢特征以及相关生化过程的改变,可以从分子水平更好地认识 ccRCC 的发生机制,为 ccRCC 的诊断提供可靠的分子水平上的代谢证据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 翟羽佳, 谭晓洁, 侯建国, 肖建如, 徐丹枫, 余永伟, 等. 汉族人肾透明细胞癌细胞系的建立[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 479-484.
Zhai Y J, Tan X J, Hou J G, Xiao J R, Xu D F, Yu Y W, et al. Establishment of clear cell renal cell carcinoma lines of Han nationality in China[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 479-484.
- [2] Gao H C, Dong B, Liu X, Xuan H Q, Huang Y R, Lin D H. Metabolic profiling of renal cell carcinoma: high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis[J]. Anal Chim Acta, 2008, 624: 269-277.
- [3] 杨永霞, 梁华庚, 李承龙. 肾脏肿瘤组织的高分辨魔角旋转核磁共振¹H 谱研究[J]. 江苏医药, 2010, 36: 446-448.
- [4] Gao H C, Lu Q, Liu X, Cong H, Zhao L C, Wang H M, et al. Application of ¹H NMR-based metabolomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis[J]. Cancer Sci, 2009, 100: 782-785.
- [5] Tran T, Ross B, Lin A. Magnetic resonance spectroscopy in neurological diagnosis [J]. Neurol Clin, 2009, 27: 21-25.
- [6] Kronenberg F. Emerging risk factors and markers of chronic kidney disease progression[J]. Nat Rev Nephrol, 2009, 12: 677-689.
- [7] 周爱儒. 生物化学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 79-136.
- [8] 罗湘建, 曹亚. 肿瘤能量代谢机制研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38: 585-592.
- [9] Catchpole G, Platzer A, Weikert C, Kempkensteffen C, Johansson M, Krause H, et al. Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma[J]. Cell Mol Med, 2011, 15: 109-118.
- [10] Kim K, Aronov P, Zakharkin S O, Anderson D, Perroud B, Thompson I M, et al. Urine metabolomics analysis for kidney cancer detection and biomarker discovery[J]. Mol Cell Proteomics, 2009, 8: 558-570.

[本文编辑] 尹 茶