

不同肿瘤类型异常黑胆质证患者体内代谢变化观察

陈 音^{1,2} 钟美佐¹ 哈木拉提·吾甫尔³
巴吐尔·买买提明³ 邓皖利² 王 锐² 玛依拉·卡米力江³

摘要 目的 探讨不同肿瘤类型异常黑胆质证患者体内代谢变化。**方法** 选择 142 例异常黑胆质证肿瘤患者,另设立健康对照组(对照组,50 名),获取血浆¹H NMR 谱图,所得自由衰减信号进行分段积分、数据归一化后用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)进行模式识别。**结果** 与对照组比较,患者组亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、丙氨酸、肌酸、乳酸、肌醇、糖(α -葡萄糖、 β -葡萄糖)、不饱和脂类、极低密度脂蛋白(VLDL)减少($P < 0.05$),糖蛋白、肉碱增多($P < 0.05$)。**结论** 异常黑胆质证不同类型肿瘤患者,具有相似的代谢组学的变化。

关键词 异常黑胆质证;代谢组学;肿瘤;异病同治

Metabolic Changes in Abnormal Savda Patients with Different Types of Tumor: a Clinical Observation CHEN Yin^{1,2}, ZHONG Mei-zuo¹, UPUR Halmurat³, MAMTIMIN Batur³, DENG Wan-li², WANG Rui², MAYILA Kamilijiang³ 1 Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha (410013), China; 2 Department of Oncology, Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi (830011), China; 3 Xinjiang Medical University, Urumqi (830011), China

ABSTRACT Objective To explore *in vivo* metabolic changes in abnormal savda patients with different types of tumor. **Methods** A total of 142 abnormal savda patients with common cancer types were enrolled in this study, and 50 healthy volunteers were recruited as the control group. For each sample, the ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) based metabonomic analysis was performed. The free attenuation signal was computed subsection integral. Data obtained were analyzed by the Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). **Results** Compared with the control group, leucine, isoleucine, valine, histidine, phenylalanine, tyrosine, alanine, creatine, lactic acid, inositol, alpha- and beta-glucose, unsaturated lipids, very low density lipoprotein (VLDL) significantly decreased ($P < 0.05$), while glycoprotein and carnitine significantly increased ($P < 0.05$) in the abnormal Savda group. **Conclusion** Abnormal savda patients with different types of tumor had similar metabonomics changes.

KEYWORDS abnormal savda; metabonomics; tumor; treating different diseases by the same method

维吾尔医学的理论核心是体液论^[1],相同体液类型的不同疾病治疗原则相同,也就是“异病同证,同证同治”。维吾尔医学认为异常体液的堆积是导致疾病的关键,特别是异常黑胆质性体液,异常黑胆质作为体内各种体液即黑胆质、黏液质、胆液质和血液质等发生异常变化的最终产物,与其他体液相比较,其致病性、

危险性、恶性程度最高,在维医不同肿瘤四种异常体液分型中,异常黑胆质证的构成比达 72%^[2],是哮喘、高血压病、肿瘤等复杂性疾病发生、发展的主要原因^[3]。

目前常见肿瘤如肺癌^[4]、乳癌^[5]、胃肠道肿瘤^[6]的代谢组学研究分别开展,相同中医证型的不同肿瘤类型患者体内是否存在共性的代谢变化,能很好的解释中医的“异病同治”的内涵。本研究通过核磁共振(NMR)技术结合模式识别分析方法,分析不同肿瘤类型异常黑胆质证患者血清差异代谢物差异。

基金项目:973 计划前期研究专项(No. 2011CB512004)

作者单位:1.中南大学湘雅医院肿瘤科(长沙 410013);2.新疆医科大学第四附属医院肿瘤一科(乌鲁木齐 830011);3.新疆医科大学(乌鲁木齐 830011)

通讯作者:哈木拉提·吾甫尔, Tel: 15199019689, E-mail: chen-yin713@163.com

材料与方法

1 诊断标准及维医辨证分型标准 肿瘤诊断依

据中华医学会《临床诊疗指南·肿瘤学分册》^[7]; 维吾尔异常黑胆质证辨证标准按照《维吾尔医学诊断学》^[8]。

2 纳入及排除标准 纳入标准:符合诊断标准及辨证分型标准; 年龄 18 ~ 80 岁; 自愿参加本研究, 签署知情同意书。排除标准:正在接受其他其他抗癌治疗。

3 一般资料 142 例均为 2012 年 5—12 月就诊于新疆医科大学第四附属医院肿瘤治疗中心住院部恶性肿瘤患者, 其中肺癌 35 例, 乳癌 19 例, 肠癌 22 例, 胃癌 19 例, 肝癌 16, 食管癌 11 例, 妇科肿瘤 6 例, 前列腺癌 6 例, 肾癌 5 例, 淋巴瘤 3 例; 其中男 59 例, 女 83 例; 平均年龄(59 ± 7) 岁。另选择 50 名本院体检中心健康志愿者作为健康对照组(对照组), 其中男 20 名, 女 30 名; 平均年龄(56 ± 6) 岁。两组年龄及性别比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 观察指标及方法 用枸橼酸钠抗凝管采集各组清晨空腹肘静脉血 5 mL, 静置 30 min, 室温 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 500 μL, -80 °C 保存。

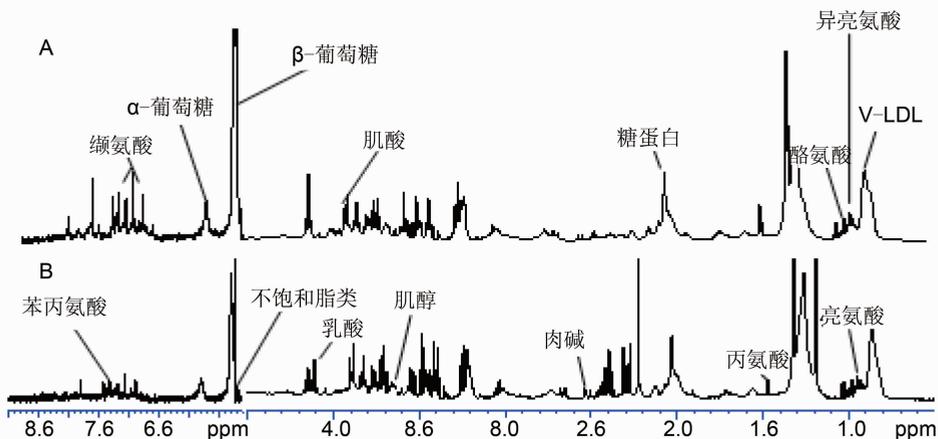
4.1 ¹H NMR 谱图测定 样品在室温中解冻, 取 200 μL 血浆加 400 μL 用重水配制的生理盐水, 室温放置 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液 550 μL 加到 5 mm 核磁管内。¹H NMR 谱测定在 INOVA600 MHz 核磁共振波谱仪(美国)上采用 CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 脉冲序列进行。测试温度 25 °C, 扫描次数(nt) = 128, 采样取出点数(np) = 32768, 对¹H NMR 频率 = 599.95 MHz, 谱宽(sw) = 10 000 Hz, 每次信号采集时间(at) = 1.64 s, 采用预饱和和方法压制水峰。

4.2 ¹H NMR 谱图处理方法及分析 定标以 α - 葡萄糖化学位移 5.233 ppm 的质子信号为标准。在 8.5 ~ 0.5 ppm 范围把谱图以每段为 0.003 ppm 进行自动积分, 积分值进行归一化处理。去掉水峰的信号范围 5.20 ~ 4.66 ppm。将所得数据导入 SIMCA-P+11 软件进行正交偏最小二乘判别(Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA)。

OPLS-DA 建立模型的质量评价参数为 R²X、R²Y 和 Q²。R²X 描述模型的优化程度、表示 X 的总变异, R²Y 表示模型解释能力, 描述反应变量 Y 的变异百分比, 参数 Q² 描述模型的累积预测程度及预测结果的真实性的。本研究两组的差异性代谢成分通过代谢物相关系数来确定, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。依据文献[9]以皮尔森相关系数显著性差异检测(Pearson's product moment correlation coefficient)确定 0.273 作为代谢物含量变化是否具有显著性的阈值($n = 50$), 差异有统计学意义($P < 0.05$)的代谢物相关系数 $|r| > 0.273$, $|r|$ 值越大表示差异性越大、反之越小。利用代谢组学¹H-¹H 同核相关谱(COSY 谱)、质子全相关谱(TOCSY 谱)、J-分解谱(J-Resolved 谱)等确定对照组与患者组血浆差异性代谢成分。

结 果

1 两组血浆¹H NMR 谱图比较(图 1) 两组之间代谢物, 亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、酪氨酸、丙氨酸、糖蛋白、β-葡萄糖、α-葡萄糖、肌醇、乳酸、肌酸、苯丙氨酸、不饱和脂类、极低密度脂蛋白(V-LDL)、肉碱出现差异性变化。



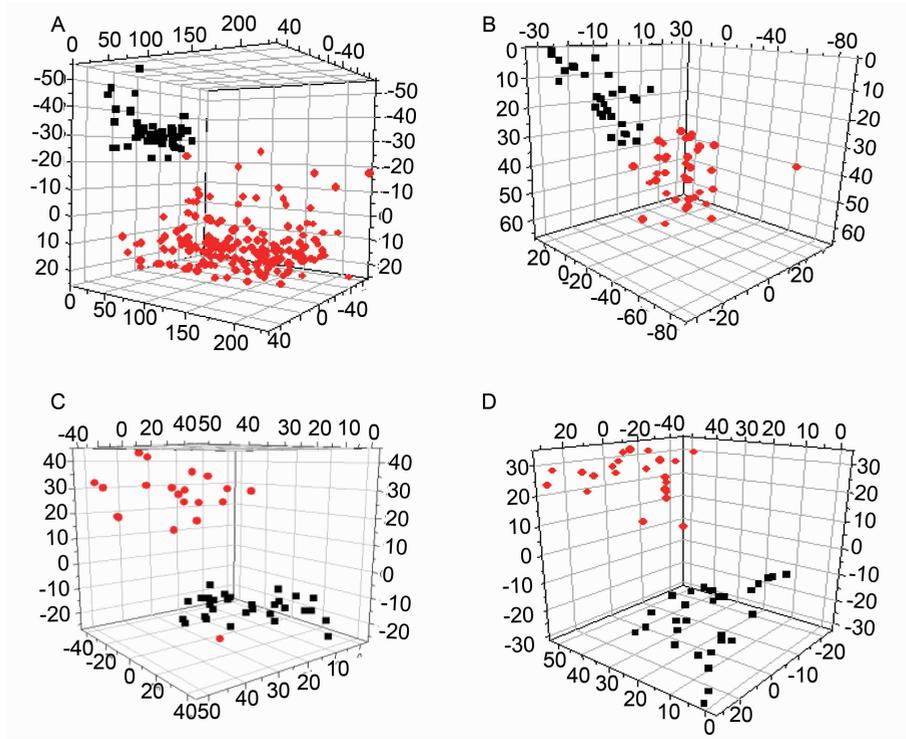
注:A 为对照组;B 为患者组;CPMG 脉冲序列(δ0.5 ~ 5 mg/L)比原图(δ5.1 ~ 9 mg/L)扩大了 4 倍

图 1 两组血清 15 种差异性代谢物¹H NMR 谱图

2 ¹HNMR 谱图 OPLS-DA 空间分布分析(图 2) 对照组—患者组 R²X = 0.35, R²Y = 0.80, Q² = 0.79, 对照组—肺癌组 R²X = 0.31, R²Y = 0.88, Q² = 0.74, 两组空间分布显示异常黑胆质肺癌组与对照组存在明显的空间区分, 为对照组—乳癌组 R²X =

0.48, R²Y = 0.87, Q² = 0.80; 对照组—肠癌组 R²X = 0.41, R²Y = 0.91, Q² = 0.82, 对照组与患者组及各患者亚组血浆代谢物组分存在明显差异。

3 对照组与患者组血浆主要差异性代谢物相关性分析(表 1) 两组有 15 种代谢物组分存在显著差异。



注:A 为对照组—患者组分析;B 为对照组—肺癌组分析;C 为对照组—乳癌组分析;D 为对照组—肠癌组分析, ■代表健康人群;◆代表患者

图 2 ¹HNMR 谱图 OPLS-DA 分析空间分布图

表 1 对照组与患者组血浆主要差异性代谢物相关性

序号	代谢物	化学位移	归属	r		
				肺癌	乳癌	胃肠癌
1	亮氨酸	δ-CH ₃ , δ-CH ₃	0.95(d), 0.97(d)	-0.72	-0.72	-0.68
2	异亮氨酸	δ-CH ₃ , β-CH ₃ , β-CH	0.93(t), 1.00(d), 1.96(m)	-0.48	-0.52	-0.66
3	缬氨酸	CH ₃ , CH ₃	0.98(d), 1.04(d)	-0.88	-0.83	-0.89
4	酪氨酸	H ₃ /H ₅ , H ₂ /H ₆	6.88(d), 7.18(d)	-0.62	-0.70	-0.74
5	丙氨酸	CH ₃	1.47(d)	-0.87	-0.85	-0.88
6	糖蛋白	NHCO-CH ₃	2.03(s)	0.59	0.55	0.50
7	β-葡萄糖	C-H ₂ , C-H ₄ , C-H ₃ , C-H ₁	3.24(dd), 3.40(t), 3.49(t), 4.64(d)	-0.83	-0.88	-0.89
8	α-葡萄糖	C-H ₂ , C-H ₁	3.53(dd), 5.23(d)	-0.76	-0.72	-0.77
9	肌醇	H ₄ /H ₆	3.65(dd)	-0.43	-0.60	-0.60
10	乳酸	CH ₃ , CH	1.33(d), 4.11(q)	-0.85	-0.82	-0.84
11	肌酸	CH ₃ , CH ₂	3.03(s), 3.93(s)	-0.50	-0.74	-0.64
12	苯丙氨酸	H ₂ /H ₆ , H ₃ /H ₅	7.33(m), 7.43(m)	-0.74	-0.87	-0.81
13	不饱和脂类	=CHCH ₂ CH=, =CHCH ₂ CH ₂ =, =CHCH ₂ CH ₂ =, =CHCH ₂ CH ₂ =	5.26(m), 5.28(m), 5.30(m), 5.32(m)	-0.68	-0.54	-0.60
14	V-LDL	CH ₃ (CH ₂) _n , CH ₃ CH ₂ CH ₂ C, =CH ₃ CH ₂ (CH ₂) _n	0.85(m), 0.88(m), 1.27(m)	-0.73	-0.69	-0.52
15	肉碱	CH ₂ (COO)	2.45(dd)	0.65	0.64	0.68

注:s 为单峰;d 为双峰;t 为三重峰;q 为四重峰;m 为多重峰;dd 为双重峰;ddd 为三重峰;ddd 为三重峰;ddd 为三重峰;r 为负数代表对照组代谢物含量高于患者组;r 为正数代表患者组代谢物含量高于对照组;r 绝对值越大代表两者差异越大

患者组亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、酪氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、 β -葡萄糖、 α -葡萄糖、乳酸、肌醇、肌酸、不饱和脂类及脂类较对照组显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);糖蛋白、肉碱较对照组增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

维吾尔医学认为包括异常黑胆质在内的“证”,不仅包括一定的病理生理状态,而且代表疾病发展过程中某一阶段的动态表现。异常体液的堆积、“燃烧”,最终产生异常黑胆质的过程是一个由量变到质变的缓慢的过程,也是机体自我调节功能由代偿到失代偿转换的过程。异常黑胆质性体液浓度较高时,局部组织容易发生黑胆质性的凝结,导致肿瘤等疾病。代谢组学方法检测出的一系列小分子代谢产物是机体在特定环境下(如病理状态),经过复杂的生化反应后在血液或尿液表现出来的最终结果^[10-12]。通过不同肿瘤的代谢组学研究,寻找不同肿瘤共同的异常黑胆质证的共性的代谢组学的变化,揭示“异病同证”的本质。

目前,在代谢组学研究中发展起来的正交偏最小方差判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)是将正交信号校正方法(orthogonal signal correction, OSC)与偏最小二乘法(partial least square, PLS)进行结合从而对 PLS 进行修正的分析方法,较之与前期的各种方法能最大化地凸显模型内部不同组别之间的差异,较好区分疾病组与对照组^[13],利用代谢组学技术采用 OPLS-DA 建模,其中每个点代表一个谱峰段。通常在样本分组方向上如果谱峰段偏离零点越远,表明这个谱峰段对分类的贡献越大,越有可能是潜在的特征代谢物。本研究发现不同类型肿瘤的异常黑胆质证患者血浆同健康人代谢模式都出现明显的分离趋势,提示异常黑胆质证由于病理状态代谢谱表现出有明显差异。分别观察异常黑胆质证型中的不同的肿瘤类型如肺癌、乳癌、肠癌同总体的趋势相同,提示代谢谱有共同的特征。与对照组比较,不同肿瘤类型的异常黑胆质证组血浆中依靠外源性食物摄取的必须氨基酸:亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸;由组织蛋白降解或体内合成的非必须氨基酸:络氨酸、丙氨酸显著减少;不饱和脂类、VLDL、 β -葡萄糖、 α -葡萄糖显著减少,提示异常黑胆质组患者存在能量代谢的异常,表现为氨基酸代谢异常,糖、脂类代谢的紊乱。Hanahan D 等^[14]在 2011 年将能量代谢异常归为癌细胞的十大特征之一。肿瘤对氨基酸的大量需求,近乎掠夺,国内

外一些学者称癌肿为宿主的“氮陷阱”^[15]。癌细胞摄取利用氨基酸的速度明显快于健康细胞,机体肌肉组织蛋白合成下降,肿瘤组织蛋白合成增加。肿瘤细胞具有葡萄糖依赖性:以葡萄糖为能量底物,脂肪酸是荷瘤状态下宿主利用的主要能源物质。推测不同肿瘤类型的异常黑胆质证患者血浆中的氨基酸、葡萄糖、脂类显著减少,是由于能量的需求增加,供给相对不足,葡萄糖和蛋白质转化增加,脂解作用增强,机体的营养不断被掠夺,机体的营养状况不断恶化。

肌酸是氨基酸代谢能量储存和利用的重要化合物。本研究中不同肿瘤类型的异常黑胆质证组血浆肌酸明显少于对照组,推测可能的机制是由于合成肌酸的相关氨基酸的大量减少有关。

本研究中不同肿瘤类型的异常黑胆质证组较对照组血浆乳酸减少,肿瘤生物学特征是对糖的摄取和糖无氧酵解处于增高状态,采用糖酵解的方式进行能量代谢^[16]。肿瘤细胞由氧化磷酸化转向糖酵解,可以减少破坏 DNA 的氧自由基的产生,有利于肿瘤细胞的分裂增殖^[17]。肿瘤组织通过糖酵解通路产生大量乳酸。这与本研究异常黑胆质证组乳酸减少的结果不同,推测异常黑胆质证组血浆中乳酸的减少可能的原因是肿瘤细胞也可以摄取和利用乳酸^[18],分泌至细胞外的乳酸可以作为有氧呼吸肿瘤细胞的主要的能源来源。亦有研究显示胃癌组织内葡萄糖明显减少而乳酸大量的堆积,使血浆内的乳酸减少^[19]。维医理论认为“病久必黑,病重必黑”是否异常黑胆质证的肿瘤患者的乳酸随病程的变化呈动态变化,有待于进一步的研究证实。

作为细胞内信号传递至细胞核的胞内第二信使的前体的磷脂酰肌醇,第二信使的浓度和分布变化是重要的信号转导方式^[20]。近年来发现,这条通路的活性异常不仅能导致细胞恶性转化,还与肿瘤细胞的侵袭转移行为相关^[21]。推测不同肿瘤异常黑胆质证患者血浆肌醇的减少,与患者的荷瘤状态有关。

生物体内糖蛋白作为细胞的重要组分发挥着各种生物活性,具有独特的生物学功能,如细胞识别、信号传递等。在肿瘤、感染等发生、发展时,肿瘤细胞表面的糖蛋白可以部分或全部的可脱落进入血循环并中和血中的抗体,抑制细胞免疫功能,削弱机体的抗肿瘤能力。肿瘤的发生、发展、侵袭伴随着相关糖蛋白的糖基化改变,癌细胞表面的糖类结构改变在癌症的病程中扮演了重要角色^[22],本研究中不同肿瘤异常黑胆质证患者糖蛋白增多,推测与肿瘤细胞的生长、侵袭有直接的关系。提示异常黑胆质证患者肿瘤细胞活跃,处于积极生长的过程中。由于糖氧化供能障碍,使脂肪动

员代偿性增强,作为脂肪酸分解氧化的关键物质,肉碱浓度迅速上升^[23]。

相同证型的肿瘤患者表现出蕴藏于异常黑胆质证后的代谢组学的变化,表现为氨基酸代谢异常,糖、脂类代谢的紊乱,葡萄糖和蛋白质转化增加,脂解作用增强,肌酸、肌醇减少,血浆肉碱及糖蛋白的增多,基于¹HNMR 不同肿瘤代谢组学的观察,为进一步认识维医异常黑胆质的发病机制与维医独特的治疗原则提供了初步基础。

参 考 文 献

- [1] 哈木拉提·吾甫尔.维吾尔医学气液体液论及其现代研究[M]. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社, 2003:44-52.
- [2] 哈木拉提·吾甫尔.维吾尔医异常黑胆质新论[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社, 2008:7-12.
- [3] 穆哈姆德·艾克拜尔.维吾尔医学治疗与诊断原则[M]. 第4版. 乌鲁木齐:新疆卫生出版社,1972:117-181.
- [4] 牛艳洁,江银玲,许长江,等.代谢组学方法分析肺癌患者血清和尿液小分子代谢产物的初步研究[J].中国肺癌杂志, 2012, 15(4): 195-201.
- [5] Bathan TF, Jansen LK, Sitter B, et al. MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status[J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 104(2): 181-189.
- [6] Feng B, Zheng MH, Zheng YF, et al. Normal and modified urinary nucleosides represent novel biomarkers for colorectal cancer diagnosis and surgery monitoring [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20(12): 1913-1919.
- [7] 中华医学会.临床诊疗指南·肿瘤学分册[M].北京:人民卫生出版社, 2011:1-239.
- [8] 买买提明·沙比尔.维吾尔医学诊断学[M]. 乌鲁木齐:新疆科技出版社,1993:135-148.
- [9] 巴吐尔·买买提明,哈木拉提·吾甫尔,豪富华.异常黑胆质型与非异常黑胆质型肿瘤患者血浆代谢组学差异分析[J].科技导报, 2009, 27(20): 39-43.
- [10] Xu J, Bjursell MK, Himrod J, et al. A genomic view of the human bacteroides thetaiotaomicron symbiosis[J]. Science, 2003, 299(5615): 2074-2076.
- [11] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut [J]. Science, 2001, 292(5519): 1115-1118.
- [12] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care [J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(5): 431-438.
- [13] 阿基业.代谢组学数据处理方法-主成分分析[J].中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 481-489.
- [14] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [15] Medina MA. Glutamine and cancer [J]. Nutrition, 2001, 131(3): 2539.
- [16] Stubbs M, Bashford CL, Griffiths JR. Understanding the tumor metabolic phenotype in the genomic era [J]. Curr Mol Med, 2003, 3(1): 49-59.
- [17] Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond [J]. Cell, 2008, 134(5): 703-707.
- [18] Wang Q, Morris ME. The role of monocarboxylate transporter 2 and 4 in the transport of γ -hydroxybutyric acid in mammalian cells [J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35(8): 1393-1399.
- [19] 孙敏,王海洋,徐瑾.基于代谢组学的胃癌组织和血浆的糖代谢研究[J].胃肠病学, 2011, 16(10): 610-612.
- [20] Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17(5): 615-675.
- [21] 孙晓杰,黄常志.PI3K-Akt 信号通路与肿瘤[J].世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 306-311.
- [22] 范振符,陈智周,范飞舟.糖基化改变与肿瘤的基础研究标记[J].免疫分析与临床, 2010, 17(2): 122-126.
- [23] 王勇,李中峰,陈建新,等.基于冠心病心肌缺血血瘀证小型猪血清核磁共振代谢组学的研究分析[J].化学研究简报, 2011, 39(8): 1274-1278.

(收稿:2013-06-08 修回:2014-01-20)