

# 不同证型非小细胞肺癌患者肿瘤组织代谢组学研究

马俊杰<sup>1,2</sup> 王小龙<sup>2</sup> 刘会平<sup>1,3</sup>

**摘要** **目的** 研究非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中医证型与肿瘤组织代谢组学的相关性。**方法** 120 例 NSCLC 患者按照中医辨证分为虚证组和实证组,每组 60 例;同期收集体检为肺部结节良性者 60 例作为对照组。运用胸腔镜技术获取 3 组肿瘤或良性结节组织,运用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)法观察其代谢物成分的变化,运用主成分分析(PCA)及偏最小二乘法(PLS-DA)对其进行差异性研究,在此基础上,对虚证、实证组具有差异性的代谢化合物进行 ROC 曲线分析,并计算曲线下面积(AUC)以进一步评估其对证型诊断的敏感性。**结果** 两肿瘤组(虚证组、实证组)与对照组比较:16 个化合物存在差异,其中十六酸、柠檬酸、丙酮酸、丙氨酸、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱、亚油酸、油酸、乳酸、肌醇含量肿瘤组高于对照组,缬氨酸、葡萄糖、谷氨酰胺、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸含量对照组高于肿瘤组;虚证组与实证组比较:10 个化合物存在差异,其中柠檬酸、丙酮酸、丙氨酸、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱、乳酸、肌醇含量虚证组高于实证组,缬氨酸、葡萄糖、谷氨酰胺含量实证组高于虚证组。差异化合物的 ROC 曲线分析示:乳酸及葡萄糖 AUC > 0.8 ( $P < 0.01$ ),肌醇、磷酸胆碱及甘油磷酸胆碱 AUC > 0.7 ( $P < 0.01$ ),而缬氨酸、柠檬酸、谷氨酰胺、丙氨酸及丙酮酸 AUC > 0.6 ( $P < 0.05$ )。**结论** NSCLC 中医证型与肺癌组织代谢组学存在一定相关性;乳酸、葡萄糖、肌醇、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱、缬氨酸、柠檬酸、谷氨酰胺、丙氨酸及丙酮酸为其敏感的诊断化合物,而以前 4 者最为敏感。

**关键词** 胸腔镜;中医证型;非小细胞肺癌;代谢组学

Metabolomics Study on Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Different Chinese Medical Syndromes MA Jun-jie<sup>1,2</sup>, WANG Xiao-long<sup>2</sup>, and LIU Hui-ping<sup>1,3</sup> 1 Basic Medical College, Nanjing University of TCM, Nanjing (210023), China; 2 Department of Oncology, Jiangsu Shuyang Hospital, Jiangsu (223600), China; 3 Department of Thoracic Surgery, BenQ Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing (210021), China

**ABSTRACT** **Objective** To study the relationship between Chinese medical syndrome types and metabolomics of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. **Methods** Totally 120 NSCLC patients were assigned to asthenia syndrome group and sthenia syndrome group, 60 in each group. Meanwhile, 60 cases of benign pulmonary nodules in physical examinations were recruited as the control group. Tumor tissues or benign pulmonary nodules tissues were obtained by thoracoscope. Changes of their metabolites were observed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Their differences were studied using principal component analysis (PCA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA). ROC curve analysis was performed in different metabolic compounds of sthenia and asthenia syndromes groups. The area under the curve (AUC) was calculated to evaluate the sensitivity of diagnosing syndrome types. **Results** Compared with the control group, difference existed in 16 compounds. Of them, contents of citric acid, pyruvic acid, alanine, choline phosphate, glycerol phosphate choline, linoleic acid, oleic acid, lactic acid, inositol were more in the two tumors group than in the control group. Difference existed in 10 compounds between the sthenia syndrome group and the asthenia syndrome

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81273639);江苏省中医药管理局科技项目(No.LB13042)

作者单位:1.南京中医药大学基础医学院(南京 210023);2.江苏省沐阳中医院肿瘤科(江苏 223600);3.南京医科大学附属南京明基医院胸外科(南京 210021)

通讯作者:马俊杰, Tel:15850531120, E-mail: majunjie\_2@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.06.0659

group. Of them, citric acid, pyruvic acid, alanine, choline phosphate, glycerol phosphate choline, lactic acid, and inositol were more in the asthenia syndrome group than in the sthenia syndrome group. Contents of valine, glucose, and glutamine were more in the sthenia syndrome group than in the asthenia syndrome group. ROC curve analyses of different compounds indicated that AUC of lactic acid and glucose was more than 0.8 ( $P < 0.01$ ); AUC of inositol, choline phosphate, and glycerol phosphate choline was more than 0.7 ( $P < 0.01$ ); AUC of valine, citric acid, glutamine, alanine, and pyruvic acid was more than 0.6 ( $P < 0.05$ ). Conclusions There existed certain correlation between CM syndrome types and metabolomics of lung cancer. Lactic acid, glucose, inositol, choline phosphate, glycerol phosphate choline, valine, citric acid, glutamine, alanine, pyruvic acid were sensitive diagnostic compounds, and the first four kinds were most sensitive compounds.

KEYWORDS thoracoscope; Chinese medical syndrome type; non-small cell lung cancer; metabolomics

代谢组学是目前中医药机制研究的热点,其从代谢网络终端表象的整体角度反映生物体的功能水平,与中医整体观念相一致<sup>[1]</sup>。近年来,该技术被广泛运用于中医证型的研究中,其通过分析不同证型患者体内异常代谢状态的差异性,为“证”的研究提供了相对客观的物质基础<sup>[2]</sup>,然前期临床代谢组学研究较多围绕患者血清或者尿液进行,对病变组织进行代谢组学研究却较少涉及<sup>[3]</sup>,此大大影响了对中医“证”的认识。鉴于此,本研究在临床收集 120 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者(虚、实证各 60 例),运用胸腔镜技术,对其肿瘤组织进行代谢组学分析,以期揭示可能存在的代谢化合物差异,为临床该病中医诊疗提供新线索,现报道如下。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 西医诊断标准 NSCLC 诊断标准参照 2004 年 WHO 肺及胸膜肿瘤组织学分类修订方案<sup>[4]</sup>,并根据 UICC 及 AJCC 专家组提出的诊断标准对其进行分期和病理学分型,TNM 分期,诊断为 NSCLC,病理分型为腺癌,形态分型为结节型,分期为ⅢA、ⅢB 期<sup>[5]</sup>,所有病例均通过 3 名高年资病理医师复查取得一致病理诊断;肺部良性孤立性结节由结节组织病理活检确诊。

1.2 中医诊断标准 参照《中药新药临床指导原则》<sup>[6]</sup>,诊断为虚证、实证。其中虚证主要表现为神疲懒言,倦怠乏力,语声低微,或伴口干咽燥,潮热盗

汗,脉细无力等;而实证主要表现为咳嗽多痰,大便干结,尿液偏黄,发热口渴,舌质红,舌苔黄腻,或伴舌质紫黯有瘀斑,舌下静脉曲张明显,脉涩实有力等。

2 纳入标准 NSCLC:(1)符合 NSCLC 诊断标准及中医辨证分型标准;(2)分期为ⅢA、ⅢB 期;(3)病理分型为腺癌;(4)形态分型为结节型;(5)初次手术,尚未行化疗、放疗及分子靶向治疗;(6)年龄 18~75 岁;(7)体力状况(KPS)评分≥60 分,估计存活时间≥6 个月;(8)愿意签署知情同意书患者。

肺部良性孤立性结节:(1)组织病理活检确诊者;(2)年龄 18~75 岁;(3)愿意签署知情同意书患者。

3 排除标准 (1)术后发生远处转移,并得到病理或影像学(CT、MRI、ECT、PET-CT 等)证实;(2)有先天性疾病;(3)精神病患者;(4)合并有心脑血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病;(5)妊娠、哺乳期妇女及过敏体质患者。

4 一般资料 120 例均为 2009 年 1 月—2012 年 12 月就诊于南京医科大学附属南京明基医院及江苏省沭阳中医院的 NSCLC 患者,按照中医不同证型分成两组,虚证组、实证组各 60 例;同期收集体检肺部良性结节者 60 例,设为对照组,经胸腔镜取出组织病理证实为肺部良性孤立性结节,3 组间基线比较(表 1),差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。研究由江苏省沭阳中医院伦理委员会批准,伦理批号:2010SL-020-02,符合伦理规范。

表 1 各组一般资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 例数 | 年龄<br>(岁)     | 性别(例) |    | TNM 分期(例) |    | 肿瘤(结节)<br>直径(cm) | 切口数(例) |     |     | 手术时间<br>(min)  | 术中出血量<br>(mL)  |
|----|----|---------------|-------|----|-----------|----|------------------|--------|-----|-----|----------------|----------------|
|    |    |               | 男     | 女  | ⅢA        | ⅢB |                  | 3 个    | 4 个 | 5 个 |                |                |
| 对照 | 60 | 55.35 ± 12.54 | 42    | 18 | —         | —  | 2.89 ± 1.29      | 31     | 19  | 10  | —              | —              |
| 实证 | 60 | 56.15 ± 15.22 | 39    | 21 | 33        | 27 | 2.93 ± 1.28      | 30     | 18  | 12  | 131.58 ± 42.38 | 116.56 ± 42.12 |
| 虚证 | 60 | 53.32 ± 13.26 | 41    | 19 | 34        | 26 | 3.01 ± 1.41      | 29     | 19  | 12  | 129.23 ± 37.38 | 102.75 ± 36.87 |

## 5 研究方法

### 5.1 胸腔镜肺癌组织及良性结节组织活检术

采用 Storz 260 型胸腔镜及 Stryker 成像系统。麻醉成功后,标准侧卧位,腰桥抬高,使术侧的肋间隙相对扩大。常规消毒铺巾,术中单肺通气。于腋中线第 7 或第 8 肋间做一 1.2 cm 小切口为观察孔,置入直径 10 mm 的 0° 胸腔镜,探查胸腔并依据需活检的靶组织位置及毗邻关系,在胸腔镜引导下做其余操作孔。术中定位找出靶组织后,置入卵圆钳于病灶周围定出楔形切除范围,用直线切割缝合器将活检靶组织切除。切除的标本置入内镜标本袋后取出,送病理检查<sup>[7]</sup>。

### 5.2 新鲜取的肺癌组织及良性结节组织代谢组学研究

#### 5.2.1 气相色谱-质谱(GC-MS)样本预处理

新鲜取的相同部位肺癌组织及良性结节组织用 PBS 洗 3 次,1 g 肿瘤组织放入 1 mL PBS 中,并在小玻璃皿中匀浆,组织匀浆 1 200 r/min,1 min 离心后收集上清液备检查, -20 ℃ 保存。试验时取 100  $\mu$ L 匀浆液,加入 10  $\mu$ L 内标(17 碳脂肪酸 6 mg/mL),加入 1 000  $\mu$ L 乙腈,涡旋混合 1 min,冰浴超声 10 min,18 000 r/min,4 ℃ 离心 5 min。取上清置干净试管中,氮气吹干。加入 50  $\mu$ L 甲氧胺吡啶溶液(15 mg/mL),混匀,30 ℃ 2 h。加衍生化试剂(MST-FA:TMCS=100:1,V/V)50  $\mu$ L,混匀静置。1 h 后移取上清液到微量进样管,供 GC-MS 分析。

5.2.2 GC-MS 分析 具体实验条件如下:气相条件:分流比为 2:1;进样量 0.5  $\mu$ L。进样口温度:280 ℃;接口温度:250 ℃。升温程序:80 ℃,保持 2 min,以 10 ℃/min 升至 140 ℃,以 4 ℃/min 升至 240 ℃,再以 10 ℃/min 升至 280 ℃,保持 3 min。离子源温度:200 ℃。载气:高纯度氦气。质谱条件:载气

流速,1.0 mL/min。电离方式:EI,电子能量 70 eV。扫描范围:50 ~ 800 m/z。

根据 GC-MS 总离子流图中各峰保留时间挑选共有峰,获取各峰与内标峰的峰面积数据,用相对峰面积(与内标峰的比值)表示代谢物的相对含量,并运用 PCA 以及 PLS-DA 区分各种间差异性。精密度实验:取同一样品连续进样 6 次,计算各相对峰面积的相对标准偏差(RSD)。代谢物鉴定:利用 NIST 质谱数据库对共有的内源性代谢物作鉴定,以通常匹配度 > 80% 的鉴定结果作为较为可信的物质。

5.2.3 针对虚证、实证组具有差异性的代谢化合物绘制 ROC 曲线,并计算 AUC 以进一步评估其对证型诊断的敏感性。

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验,多组间比较采用单因素方差分析;PCA 及 PLS-DA 应用 SIMCA-P 11.5 软件;采用 ROC 曲线 AUC 分析各差异化合物虚实证间敏感性。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 3 组样品的代谢谱分析(图 1) 总离子流色谱图显示:3 组样品中 RSD < 30% 的色谱峰的峰面积总和占该样品总峰面积的比例均 > 80%,说明这些方法的重复性较好,满足代谢组学方法的要求。

2 3 组样品的 PCA 及 PLS-DA 分析(图 2-4) 对 3 组样品的代谢数据进行了 PCA 及 PLS-DA 分析,表示模型解释能力的参数  $R^2Y = 0.78$  和表示模型预测能力的参数  $Q^2Y = 0.45$ ,而且  $R^2Y\text{-intercept} = 0.42$  和  $Q^2Y\text{-intercept} = -0.29$ ,这些参数说明不存在过拟合现象(图 2)。

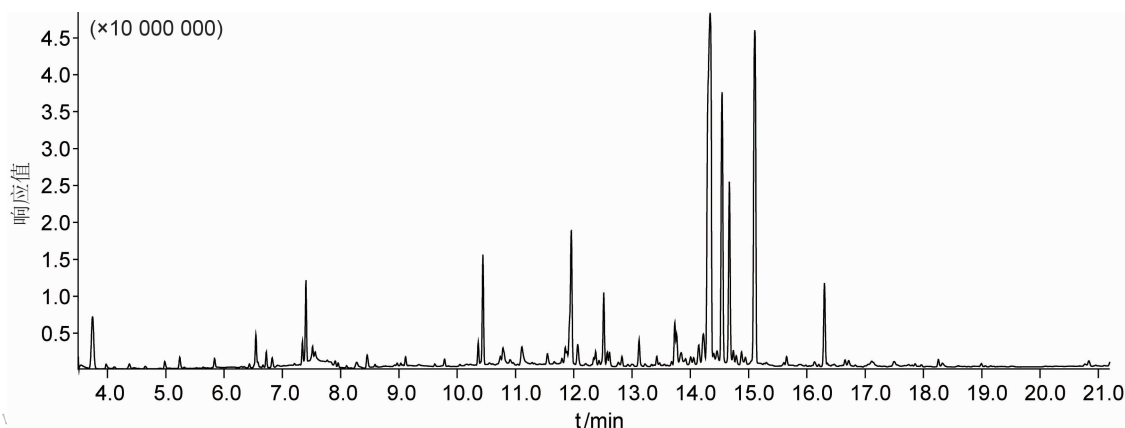


图 1 GC-MS 分析总离子流色谱图

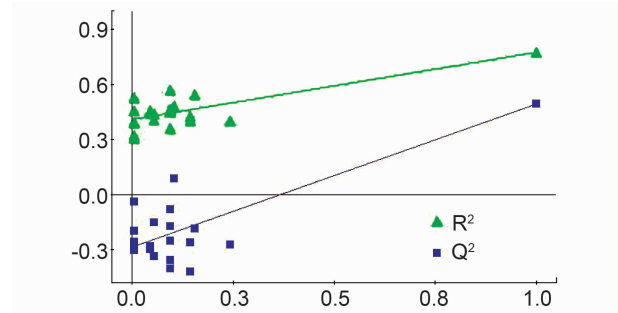
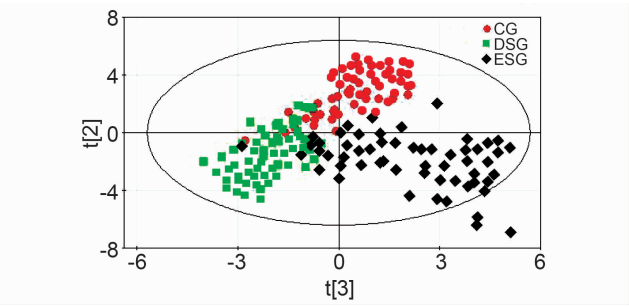


图2 PLS-DA 模型判别图

进一步利用 NIST 质谱数据库对共有的内源性代谢物作鉴定,以通常匹配度 >80% 的鉴定结果作为较为可信的物质,共发现 87 种代谢化合物,并运用 PCA 及 PLS-DA 分析其差异性,其中主成分积分值集中分布于椭圆形得分图的不同区域(图 3、4)。



注:CG 为对照组;ESG 为实证组;DSG 为虚证组;图 4 同  
图 3 3 组患者肿瘤组织代谢物的 PCA 分析图

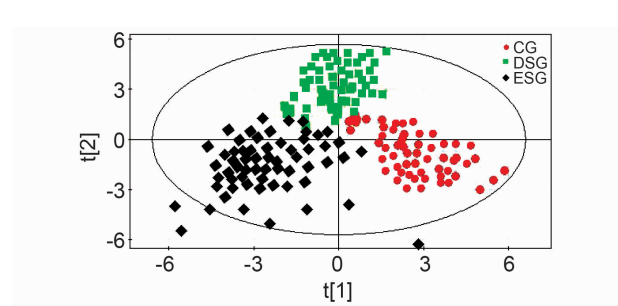
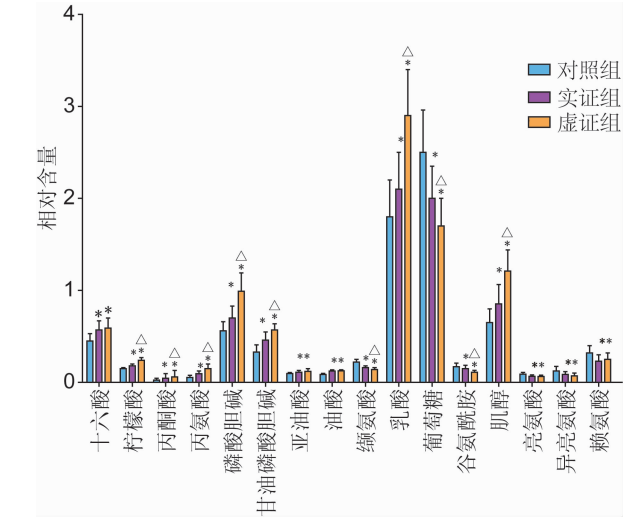


图 4 3 组患者肿瘤组织代谢物的 PLS-DA 分析图

3 3 组具有差异性的代谢产物含量比较(图 5)按照 VIP 值(>1 为重要因素)依次排列 3 组样品的差异化合物,两肿瘤组(虚证组、实证组)与对照组比较:16 个化合物存在差异,其中十六酸、柠檬酸、丙酮酸、丙氨酸、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱、亚油酸、油酸、乳酸、肌醇含量肿瘤组高于对照组,缬氨酸、葡萄糖、谷氨酰胺、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸含量对照组高于肿瘤组;虚证组与实证组比较:10 个化合物存在差异,其中柠檬酸、丙酮酸、丙氨酸、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱、乳酸、肌醇含量虚证组高于实证组,缬氨酸、葡萄糖、谷氨



注:与对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与实证组比较, $\Delta P < 0.01$

图 5 3 组患者肿瘤组织代谢产物的差异

酰胺含量实证组大于虚证组。  
4 虚、实证组患者差异化合物敏感性评估(图 6, 表 2) 进一步对虚证、实证组具有差异性的 10 个化合物进行 ROC 曲线 AUC 分析比较差异性,并按照 AUC 面

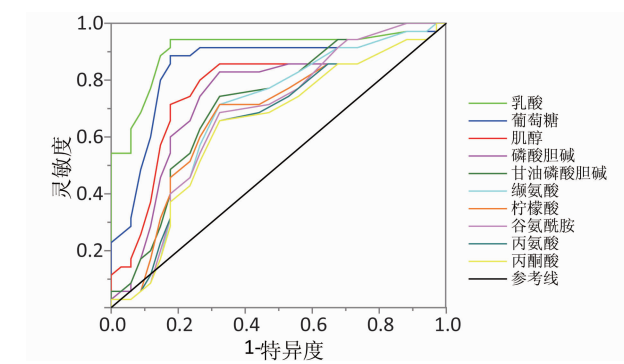


图 6 虚、实证组患者肿瘤组织代谢化合物  
相对含量差异 ROC 曲线

表 2 虚、实证组患者肿瘤组织代谢化合物相对含量  
差异 ROC 曲线的 AUC 比较

| 代谢化合物  | AUC      | $S_{\bar{x}}$ | P 值         | 95% CI            |
|--------|----------|---------------|-------------|-------------------|
| 乳酸     | 0.905 30 | 0.040 25      | 6.50763 E-9 | 0.827 40-0.985 20 |
| 葡萄糖    | 0.850 46 | 0.050 82      | 5.58617 E-7 | 0.750 81-0.950 03 |
| 肌醇     | 0.768 08 | 0.061 17      | 1.28787 E-4 | 0.648 17-0.887 97 |
| 磷酸胆碱   | 0.738 56 | 0.063 74      | 7.28358 E-4 | 0.611 62-0.861 49 |
| 甘油磷酸胆碱 | 0.720 17 | 0.062 24      | 0.001 66    | 0.598 18-0.842 16 |
| 缬氨酸    | 0.684 45 | 0.066 03      | 0.008 43    | 0.555 03-0.813 88 |
| 柠檬酸    | 0.676 05 | 0.065 75      | 0.011 92    | 0.547 18-0.804 92 |
| 谷氨酰胺   | 0.673 95 | 0.066 72      | 0.012 97    | 0.543 17-0.804 73 |
| 丙氨酸    | 0.647 48 | 0.067 65      | 0.035 17    | 0.514 89-0.780 07 |
| 丙酮酸    | 0.639 08 | 0.068 14      | 0.046 99    | 0.505 53-0.772 63 |

积的大小评估化合物的敏感性,其中乳酸及葡萄糖  $AUC > 0.8$ ,肌醇、磷酸胆碱及甘油磷酸胆碱  $> 0.7$ ,而缬氨酸、柠檬酸、谷氨酰胺、丙氨酸及丙酮酸  $> 0.6$ 。

## 讨 论

NSCLC 为目前临床常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率呈上升趋势,而中西医结合治疗的优势日益明显<sup>[8]</sup>。辨证作为治疗的前提,在临床具有重要指导意义,由于现代疾病谱的发展、患者个体特异性及医者主观性等各种因素,可能会影响辨证准确性,故中医诊断方法亦应该与时俱进<sup>[9]</sup>。

随着具有微创特点的胸腔镜技术在临床逐渐被普及,中医对肺癌的辨证亦进入了微观辨证时代<sup>[10]</sup>,其不仅可用于疾病的诊断治疗,同时亦可对患者各种内在功能进行检测,为疾病预后判断提供线索,本课题组前期在胸腔镜下取肿瘤组织进行研究,发现虚证患者较实证患者肿瘤免疫较低<sup>[11]</sup>,且其肿瘤更容易发生转移<sup>[12]</sup>,此符合中医“有诸内者必形于诸外”的司揣思想。本研究在前期研究基础上,胸腔镜下采集 NSCLC 虚、实证型患者的肿瘤组织,并结合代谢组学这一目前肺癌研究的热点<sup>[13]</sup>,通过分析其证型相关代谢化合物的差异性,更进一步充实中医微观辨证的内涵。

正如本研究结果所示,不仅发现了 16 种肺癌与肺部良性结节组织之间的显著差异性化合物,同时亦对 2 种不同证型肿瘤患者在代谢水平做出了科学鉴别,丰富了传统中医的虚、实正邪观。此外本课题组进一步探索了虚实证型的敏感性诊断指标,其中以乳酸、葡萄糖、肌醇及磷酸胆碱最为敏感的诊断化合物,而甘油磷酸胆碱、缬氨酸、柠檬酸、谷氨酰胺、丙氨酸及丙酮酸次之。有学者研究发现,乳酸等代谢产物在肿瘤患者中显著升高而葡萄糖的降低是由于 warburg 效应的持续存在,是肿瘤细胞能量代谢异常即糖代谢增强的结果<sup>[14]</sup>,而肌醇、磷酸胆碱作为肿瘤细胞能量代谢及脂质代谢异常时的反应物,在机体免疫功能低下及肿瘤细胞增殖时候显著增加<sup>[15]</sup>,本研究发现虚、实证型最敏感的鉴别诊断物乳酸、肌醇及磷酸胆碱在虚证中显著高于实证组,而葡萄糖则较低,此结果说明 NSCLC 虚证患者较实证患者肿瘤能量、糖类、脂质代谢更为活跃,同时其机体免疫功能较差而肿瘤细胞增殖速度更快,此也许可以从代谢组学角度解释前期我们的研究结果。

综上所述,本研究对 NSCLC 常见中医证型进行总结归纳,围绕正、邪相关的两大主证展开研究,并运

用胸腔镜技术,通过对两证型所对应代谢组学的差异性研究,为中医证型研究提供微观线索。

## 参 考 文 献

- [1] 陈海彬,周红光,俞晓忆,等. 代谢组学在中药现代化研究中的应用[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(6): 831-835.
- [2] 杨宇峰,张冰冰,徐娜,等. 基于代谢组学的中医证本质研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 2074-2077.
- [3] 高扬,张安晶,胡元会. 代谢组学在中医证候研究中的应用进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(6): 710-716.
- [4] Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, et al. WHO classification of tumors: pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart[M]. Lyon: IARC Press, 2004: 26-67.
- [5] Stephen B, Carolyn C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(6): 1471-1474.
- [6] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 216-224.
- [7] 叶剑飞,白宏宇,王圆,等. 定位技术在电视胸腔镜诊治孤立性肺小结节中的应用[J]. 中国肺癌杂志, 2012, 15(2): 103-105.
- [8] 朱明章,吴万垠. 中医专病专方联合化疗治疗Ⅲ~Ⅳ期非小细胞肺癌的 Meta 分析[J]. 肿瘤, 2013, 33(6): 534-545.
- [9] 黄敏娜,贾英杰,孙一予,等. 肺癌中医辨证分型的物质基础研究概况[J]. 中医杂志, 2012, 53(2): 166-169.
- [10] 李灿东,甘慧娟,林雪娟. 中医证研究的思路与方法探讨[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(1): 142-145.
- [11] 马俊杰,刘会平,周春祥. 运用胸腔镜技术探索细支气管肺泡细胞癌证型与 Th1/Th2 关系[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(8): 1069-1071.
- [12] 马俊杰,刘会平,张以来. 基于胸腔镜技术探索 BAC 证型与肿瘤转移关系[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(5): 1114-1118.
- [13] 周炜,周颖,齐激扬. 代谢组学在肺癌肿瘤标志物的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(4): 313-316.
- [14] Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, et al. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications[J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(3): 267-274.
- [15] 刘会君,王馨远,汤晓东,等. 基于代谢组学的挥发性肺癌标志物的研究进展[J]. 分析科学学报, 2012, 28(5): 715-720.

(收稿:2014-06-21 修回:2015-03-10)