

· 综 述 ·

## 肝脏疾病研究中代谢组学方法进展\*

肖忠华<sup>1</sup>综述, 李 晶<sup>2</sup>审校

(重庆三峡医药高等专科学校: 1. 检验教研室; 2. 药理教研室, 重庆 404120)

**关键词:** 代谢组学方法; 代谢组学技术平台; 多变量统计分析; 肝脏疾病

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.23.035

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)23-2424-03

肝脏疾病在发达国家和发展中国家都是共同的公共健康问题<sup>[1-4]</sup>, 而承担着机体主要的合成、分解、转化和排泄等代谢过程的肝脏在疾病期必然伴随代谢途径的改变和代谢物水平的变化。代谢组学是系统研究生物体细胞、组织、机体中小分子量代谢物质, 以展现生物体在生物体基因组、生物体蛋白质组和生物体所处环境相互作用下生物体代谢情况的一门系统生物学, 一般分为以下 4 个研究层次, 即代谢靶标分析、代谢轮廓分析、代谢组学分析、代谢指纹分析<sup>[5]</sup>。代谢指纹分析层次上代谢组学研究步骤一般包括: (1) 采集样本并进行代谢物质分析前处理; (2) 代谢物质分离分析与鉴定; (3) 数据分析; (4) 代谢物质功能分析。目前, 肝脏疾病代谢组学研究主要在代谢指纹层次上开展。本文对肝脏疾病代谢组学研究中研究者广泛探索的代谢物质分离分析与鉴定、数据统计分析 2 个方面进行综述。

### 1 代谢物分析与鉴定技术

代谢物分析与鉴定是代谢组学的核心部分, 当前肝脏疾病代谢组学研究中代谢物分离分析与鉴定的主要技术平台主要包括基于质谱鉴定技术的气相色谱-质谱(gas chromatograph-mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱-质谱(liquid chromatograph-mass spectrometry, LC-MS)、超高效液相色谱-质谱(ultra performance liquid chromatograph-mass spectrometry, UPLC-MS)、毛细管电泳-质谱(capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS)和氢谱核磁共振(proton nuclear magnetic resonance, HNMR)等。

HNMR 最早用于代谢组学研究中<sup>[6]</sup>, HNMR 广泛适用于肝脏疾病代谢组学组织、血清、尿液等样本, 具有高效、耐受性好、重现性高, 样品前处理简单、定性鉴定和定量不同种类的代谢物等特点。Godoy 等<sup>[6]</sup>在丙型肝炎尿代谢组学中应用 300 MHz 低场 HNMR 技术有效识别丙型肝炎患者和健康人群。分辨率和灵敏度更高的高场 HNMR 技术在肝脏疾病代谢组学中应用更多。应用 500 MHz 高场 HNMR 技术分析肝硬化患者血清, 与健康人群对照, 发现轻微慢性肝衰竭肝硬化患者血清高密度脂蛋白和磷酸胆碱比严重肝衰竭肝硬化患者上调更多, 而乳酸、丙酮酸、葡萄糖、氨基酸和肌酐水平则刚好相反<sup>[7]</sup>; 应用 600 MHz 高场 HNMR 技术研究控制组、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组、HCC 肺癌转移组大鼠组织, 与控制组大鼠组织对照, 发现 HCC 组和 HCC 肺癌转移组组织葡萄糖和糖原均下调, 低密度脂蛋白/高密度脂蛋白比值、低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白比值、异亮氨酸、亮氨酸、谷氨酰胺、异丁酸、乙酸盐、3-羟基丁酸在 HCC 上调而在 HCC 肺癌转移组里只轻微上调; 丙氨酸和甘氨酸在 HCC 组初期上调而

在转移组下调(比控制组高), 而乳酸、乙酸乙酯、胆碱则反之<sup>[8]</sup>。对于组织样本, 高分辨率魔角核磁共振(high resolution-magic angle spinning nuclear magnetic resonance, HR-MAS NMR)是更有力的技术平台。Martínez-Granados 等<sup>[9]</sup>采用 HR-MAS NMR 研究慢性肝炎引起的肝硬化患者离体肝活检组织, 结果发现慢性肝炎引起的肝硬化患者离体肝活检组织中谷氨酸、磷脂乙醇胺、磷酸胆碱、不饱和脂肪酸上调, 谷氨酰胺、天冬氨酸、游离胆碱和葡萄糖下调, 而谷氨酸、谷氨酰胺、葡萄糖似乎与肝硬化分期相关。相对于传统的高场 HNMR, HR-MAS NMR 需要的样本量更小, 组织样本可不经溶剂提取而降低代谢物歧视, 因而易观察到完整组织代谢物及其代谢物相互作用, 甚至少量的蛋白和半流动的细胞膜脂类物质, 其结果可补充肝脏疾病组织病理学依据和证实磁共振(magnetic resonance, MR)诊断结果而成为辅助肝脏疾病的诊断的有力工具<sup>[10-13]</sup>。

基于质谱技术的 GC-MS、LC-MS、UPLC-MS、CE-MS 更普遍应用于肝脏疾病体液代谢组学研究中。GC-MS 是应用较早的代谢组学技术<sup>[14]</sup>, 通过 GC-MS 代谢组学技术研究控制组、HCC 组、HCC 肺癌转移组大鼠尿液和血清结果表明在 HCC 中 7 种氨基酸(血管紧张素 II、异亮氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺、酪氨酸)显著升高, 谷氨酸降低; 转移组苯丙氨酸和酪氨酸上调而谷氨酸下调; 丝氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺、蔗糖醇、5-羟基脯氨酸、2, 3, 4-三羟基丁酸转移组低于 HCC 组, 除乳酸外, 所有鉴定的代谢物转移组都比 HCC 更低; 在尿液中, 丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸在 HCC 组升高相对于健康组, 而在转移组未发现, 丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、乳酸、2, 4--二羟基嘧啶、3-氨基丙酸、苹果酸、5-羟基脯氨酸、葡萄糖酸在转移组里更低, 2-甲基琥珀酸在转移组更高<sup>[15]</sup>。尽管 GC-MS 重现性好、灵敏度高<sup>[16]</sup>, 但是 GC-MS 只能分析热稳定性高的代谢物, 往往需要对样品里的代谢物进行蛋白沉淀、提取和两步衍生, 而提取和衍生的效率却很少有系统的研究。LC-MS 技术具有高通量、能分离复杂样品的特点, Chen 等<sup>[17]</sup>在肝癌尿液代谢组学研究中采用超高效液相色谱质谱技术, 联用亲水色谱模式和反相色谱模式, 亲水色谱模式下鉴定的几种代谢物与精氨酸和脯氨酸代谢相关而反相色谱模式下与脂肪酸氧化相关的代谢物被发现, 克服了之前采用一维反相色谱质谱忽略极性代谢物鉴定的缺陷。Soga 等<sup>[18]</sup>应用 CE-MS 技术对不同肝脏疾病血清代谢物进行分析, 进一步结合 LC-MS 多反应监控发现  $\gamma$ -谷氨酰胺二肽水平可以作为不同肝脏疾病分型依据; Chen 等<sup>[19]</sup>在肝细胞癌血清和尿代谢组学研究中采用气相色谱飞行质谱和超高效液相色谱四极杆飞行

\* 基金项目: 重庆市教委自然科学基金资助项目(KJ111802)。

质谱 2 种技术平台, 鉴定了 40 个血清代谢物和 31 个尿代谢物; 可以预见整合应用不同代谢组学技术、整合应用不同的样本更有利于“全景式”揭示肝脏疾病代谢物或对目标代谢物进行定量分析。

目前, 肝脏疾病代谢组学研究都去除掉蛋白质进行代谢物分析, 而同时分析那些结合在蛋白质上的代谢物和结合代谢物的蛋白质或有助于发现代谢途径改变的信号通路。此外, 各种技术平台样品前处理方法比较研究较少, Masson 等<sup>[20]</sup>曾发现不同的肝组织提取策略对 UPLC-MS 分析信号的变异系数有较大差异, 表明为使肝脏疾病代谢组学研究结果具有可比性, 肝脏疾病代谢组学研究样品前处理应逐渐规范化、标准化。

## 2 肝脏疾病代谢物数据多变量统计分析方法

基于 MS 的技术平台和 HNMR 技术平台产生的具有显著性差异的谱学数据是庞大而复杂的, 代谢组学数据分析通常首先采用  $t$  检验、 $\chi^2$  检验、单向方差分析、秩和检验等常规统计分析方法考察不同肝脏疾病组或疾病组与健康组之间差异谱学数据的显著性, 具有显著性差异的谱学数据变量与组间或样品之间产生的多维数学模型无法直观地发现组间或样品之间的差异, 而多变量统计分析方法可以对多维数学模型进行降维处理, 从而易于发现不同疾病组之间或疾病组与健康组之间的差异(模式识别)和导致上述差异的变量(代谢物)<sup>[21]</sup>。肝脏疾病代谢组学研究常用多变量统计分析方法有偏最小二乘-判别式分析法(partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)<sup>[9,15]</sup>、多元线性回归(multiple logistic regression)<sup>[18]</sup>、主成分分析法(principal component analysis, PCA)<sup>[22-23]</sup>、正交投影潜结构分析(orthogonal projection to latent structure, OPLS)<sup>[24]</sup>、逐步判别分析(stepwise discriminant analysis, SDA)<sup>[25]</sup>等。无监督主成分分析法是最常用的代谢组学多变量统计分析方法, 它直接对原始数据进行分析, 但当组内差异较大时, 很难发现组间差异, 而整合应用无监督和有监督多变量数据分析法却能有效弥补这个缺陷而常见于肝脏疾病代谢组学研究数据分析中。在轻微肝性脑病肝硬化血清代谢组学研究中, Jiménez 等<sup>[26]</sup>首先应用无监督的主成分分析法处理经常规统计学分析后有显著差异的 NMR 原始数据对健康控制组与肝硬化患者组进行模式识别, PCA 得分图明显可见部分肝硬化患者与健康人群血清样品 NMR 代谢谱点重叠; 进一步正交信号校正后应用 PLS-DA 进行模式识别, PLS-DA 得分图肝硬化患者与健康人群血清样品 NMR 代谢谱点几乎没有重叠, 模式识别灵敏度和准确度为 98%、特异度为 97%; PLS-DA 得分贡献图揭示相对于健康控制组, 肝硬化患者组血清葡萄糖和乳酸上调而脂类和胆碱下调。同样的方法对有无轻度肝性脑病肝硬化组进行模式识别, 揭示轻度肝性脑病患者组中血清葡萄糖、乳酸、三甲胺氮氧化物上调幅度较大, 甘油和蛋氨酸上调幅度较小; 而在无轻度肝性脑病患者血清中低密度脂蛋白、胆碱、丙氨酸、 $\alpha$ -酸性糖蛋白、血管紧张素 II、乙酸酯、异亮氨酸、亮氨酸、甘氨酸浓度则显著高于有轻度肝性脑病肝硬化患者。显然, 整合应用不同的多变量数据统计分析方法, 特别是整合应用无监督和 supervised 多变量数据统计分析方法更易于不同肝脏疾病组之间、肝脏疾病组与健康组之间差异、潜在代谢标志物的发现和代谢途径的探索<sup>[6-8,17,19]</sup>, 而探索可以适用多谱学数据、整合多种多变量统计分析方法于一体的简单化、规范化肝脏疾病代谢组学数据分析平台还未见报道。

## 3 展 望

根据数据分析发现的差异代谢物在肝脏疾病期水平上调

或下调情况, 结合代谢物正常的生物化学途径和生物学功能发现肝脏疾病代谢途径改变主要来自于能量代谢、脂类代谢、氧化应激等, 初步揭示肝脏疾病发生、发展机制<sup>[6-13,17-19,22-27,15]</sup>。然而, 代谢组学在肝脏疾病应用研究中, 在生物样本前处理方面亟待规范化、标准化; 代谢物分析与鉴定技术平台、数据分析方法、生物样本等内部整合应用尚处于发展阶段; 外部整合基因组学、蛋白质组学、转录组学和代谢组学技术系统研究肝脏疾病鲜有报道。随着整合代谢组学研究方法发展<sup>[28]</sup>及在肝脏疾病研究中的应用, 可以预见全面揭示肝脏疾病发生、发展机制将为期不远。

## 参考文献:

- [1] Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention[J]. J Clin Virol, 2005, 34(Suppl 1): S1-S3.
- [2] Sherman M, Shafran S, Burak K, et al. Management of chronic hepatitis C: consensus guidelines[J]. Can J Gastroenterol, 2007, 21(Suppl C): 25C-34C.
- [3] Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis[J]. Semin Liver Dis, 2004, 24: 3-20.
- [4] El-Serag HB, Rudolph L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557-2576.
- [5] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E, et al. Metabonomics: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimulate via multivariate statistical analysis of biological NMR data[J]. Xenobiotica, 1999, 29: 1181-1189.
- [6] Godoy MM, Lopes EP, Silva RO, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics[J]. J Viral Hepat, 2010, 17(12): 854-858.
- [7] Amathieu R, Nahon P, Triba M, et al. Metabolomic approach by (1)H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis[J]. J Proteome Res, 2011, 10(7): 3239-3245.
- [8] Wang J, Zhang S, Li ZF, et al. (1)H-NMR-based metabolomics of tumor tissue for the metabolic characterization of rat hepatocellular carcinoma formation and metastasis[J]. Tumour Biol, 2011, 32(1): 223-231.
- [9] Martínez-Granados B, Morales JM, Rodrigo JM, et al. Metabolic profile of chronic liver disease by NMR spectroscopy of human biopsies[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(1): 111-117.
- [10] Martínez-Granados B, Monleon D, Martínez-Bisbal MC, et al. Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy[J]. NMR Biomed, 2006, 19(1): 90-100.
- [11] Hong YS, Coen M, Rhode CM, et al. Chemical shift calibration of 1H MAS NMR liver tissue spectra exemplified using a study of glycine protection of galactosamine toxicity[J]. Magn Reson Chem, 2009, 47(Suppl 1): S47-S53.
- [12] Duarte IF, Stanley EG, Holmes E, et al. Metabolic assessment of human liver transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using high-resolution magic

- angle spinning 1H NMR spectroscopy [J]. *Anal Chem* 2005, 77(17):5570-5578.
- [13] Cox IJ, Sharif A, Cobbold JF, et al. Current and future applications of in vitro magnetic resonance spectroscopy in hepatobiliary disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(30):4773-4783.
- [14] Fiehn O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(1):155-171.
- [15] Li ZF, Wang J, Huang C, et al. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabonomics of hepatocarcinoma in rats with lung metastasis: elucidation of the metabolic characteristics of hepatocarcinoma at formation and metastasis [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(18):2765-2775.
- [16] Zhang Q, Wang G, Du Y, et al. GC/MS analysis of the rat urine for metabonomic research [J]. *J Chromatography B*, 2007, 854(1-2):20-25.
- [17] Chen J, Wang W, Lv S, et al. Metabonomics study of liver cancer based on ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 650(1):3-9.
- [18] Soga T, Sugimoto M, Honma M, et al. Serum metabolomics reveals  $\gamma$ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(4):896-905.
- [19] Chen T, Xie G, Wang X, et al. Serum and urine metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(7):1-13.
- [20] Masson P, Alves AC, Ebbels TM, et al. Optimization and evaluation of metabolite extraction protocols for untargeted metabolic profiling of liver samples by UPLC-MS [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(18):7779-7786.
- [21] 阿基业. 代谢组学数据处理方法-主成分分析法 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2010, 15(5):481-489.
- [22] Wu H, Xue R, Dong L, et al. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 648(1):98-104.
- [23] Zhang L, Jia X, Peng X, et al. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry metabonomic platform in human plasma of liver failure caused by hepatitis B virus [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(10):688-698.
- [24] Yin P, Wan D, Zhao C, et al. Mol biosyst. a metabonomic study of hepatitis B-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by using RP-LC and HILIC coupled with mass spectrometry [J]. *Mol Biosyst*, 2009, 5(8):868-876.
- [25] Xue R, Dong L, Wu H, et al. Gas chromatography/mass spectrometry screening of serum metabolomic biomarkers in hepatitis B virus infected cirrhosis patients [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(3):305-310.
- [26] Jiménez B, Montoliu C, MacIntyre DA, et al. Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by (1)H-nuclear magnetic resonance [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(10):5180-5187.
- [27] Gao H, Lu Q, Liu X, et al. Application of 1H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(4):782-785.
- [28] 朱超, 梁琼麟, 王义明, 等. 代谢组学的整合化发展及其新进展 [J]. *分析化学*, 2010, 38(7):1060-1068.

(收稿日期:2011-11-15 修回日期:2012-02-16)

· 综 述 ·

## 烟雾病的直接血管重建术治疗进展

曹 芳 综述, 孙晓川 审校

(重庆医科大学附属第一医院神经外科 400016)

**关键词:** 烟雾病; 直接血管重建术; 颞浅动脉-大脑中动脉吻合术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.23.036

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)23-2426-04

烟雾病(moyamoya disease, MMD)又称脑底异常血管网症,以颈内动脉及其大分支末端进行性狭窄甚至闭塞为特征的脑血管疾病。目前, MMD的病因尚不清楚, 诊断金标准是脑血管造影, 没有药物能逆转或稳定 MMD的病变进程, 及时、恰当的手术干预是主要的治疗方式<sup>[1]</sup>。手术治疗的血管造影标准包括: (1)颈内动脉颅内段狭窄或闭塞; (2)动脉造影时, 在狭窄或闭塞的动脉周围看见异常血管网; (3)双侧病变<sup>[1]</sup>。对于无症状, 脑血管造影也不严重但当 SPECT 等检查发现脑血流动力学改变时也可作为手术治疗另一条标准<sup>[2-3]</sup>。手术的目的是增加脑皮质缺血区的血流, 阻止后期缺血性脑损害。应用最多的供血动脉是颈外动脉系统。由于缺少前瞻性随机对照临床研究, 目前没有一种手术成为治疗 MMD 的标准。手术方式

分为直接、间接和联合血管重建术。本文就直接血管重建术的治疗进展作一综述。

### 1 直接血管重建术的局限性

直接血管重建术包括颞浅动脉-大脑中动脉(STA-MCA)吻合术、颞浅动脉-大脑前动脉(STA-ACA)吻合术、颞浅动脉-大脑后动脉(STA-PCA)吻合术和枕动脉-大脑中动脉(OA-MCA)吻合术等。直接血管重建术能立即改变脑缺血区血供及脑血流动力学, 脑缺血症状得到很快改善<sup>[4-5]</sup>。但直接血管重建术也不完全安全, 术后脑血流量的立即增高及脑血流动力学的改变, 17.0%~27.5%的患者可出现短暂的神经功能障碍<sup>[6-7]</sup>。术后可能形成新的动脉瘤, 甚至导致动脉瘤破裂出血<sup>[8]</sup>, 还可能加快颈内动脉狭窄的进程<sup>[9]</sup>。直接血管重建术也