

代谢组学在泌尿系统肿瘤中的应用^{*}

张丽秀,赵金匣 综述,王志平[△]审校(兰州大学第二医院泌尿外科研究所/甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心/甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室,兰州 730030)

【关键词】 代谢组学; 泌尿系统肿瘤; 肿瘤标志物; 代谢通路
DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 03. 045 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)03-0395-03

1999 年英国皇家理工大学 Nicholson 等^[1] 研究中首次提出代谢组学(metabonomics)的概念,它是通过考察生物体系受刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)其代谢产物的变化或其随时间的变化来研究生物体系代谢途径的一种技术。2000 年德国植物学家 Fiehn 和 Dormann^[2] 首次将植物代谢组学与基因功能结合在一起,提出 metabolomics 的概念。自此,形成了代谢组学的两大流派:metabonomics 和 metabolnomics。代谢组学是基因组学和蛋白质组学的补充,近年来广泛应用于肿瘤生物学领域的研究中^[3]。

1 代谢组学研究方法

样品采集与预处理、样品检测与鉴定和数据分析构成了代谢组学研究的基本步骤。

1.1 样品的采集与预处理 代谢组学分析的标本主要是体液(血液、尿液、唾液、腹水、胆汁、前列腺分泌物等)和组织、细胞

及其培养液,目前应用最多的是血液和尿液。采集样品要有严格的实验设计和足够的分析精度,通常还需对采集的样本进行生物灭活。因研究对象、目的和方法的不同,对样本预处理的方法也各异^[3]。

1.2 样品检测及鉴定 常用的代谢组学分析技术有核磁共振(NMR)、质谱(MS)、色谱、质谱色谱联用技术、傅里叶变换红外光谱学(FT-IR)等。其中应用最早、最成熟的是 NMR 和 MS。NMR 是代谢组学之初就普遍采用的方法,MS 是一种相对比较成熟的分析技术,在研究中通常根据需要与气相色谱(GC)、液相色谱(LC)、超高效液相色谱(UPLC)等技术联合应用,以提高灵敏度。由于目前所有的分析技术都有各自的优、缺点和应用范围,实际操作中多采用联合技术和多种方法的综合分析。代谢组学常用分析方法比较见表 1。

表 1 几种代谢组学常用方法的比较

分析技术	优点	不足	主要应用领域
NMR ^[4-6]	可以实现对样品的非破坏性、非选择性分析,检测范围广,技术成熟	灵敏度、分辨率不高,对复杂样品分析时尚有难度	药物研究、基因功能、疾病诊断
MS ^[7]	高选择性、高灵敏度	样品制备复杂,检测过程会造成代谢产物损失	常与色谱技术联合应用,应用范围广
GC-MS ^[8-9]	高分辨率、高灵敏度,已建立标准谱图库	样品必须气化,不宜分析热不稳定物质和大分子	植物代谢组研究优选方法
LC-MS ^[10-11]	最有前途的代谢组研究技术之一,分析范围广,灵敏度高	样本制备时会出现基底效应和保留时间迁移	应用广泛,天然产物分析、疾病诊断、食品药品监测
UPLC ^[9,12-13]	超高分离速度、灵敏度、特异度	样品制备过程复杂	新兴领域,对中药研究领域有较大帮助
FT-IR ^[14-15]	快速、无损害、高通量分析,预处理简单	除血液外,其他样品进样前必须经过脱水处理	广泛用于微生物、植物、临床医学研究等领域

1.3 数据分析 代谢组学数据分析应用的主要手段是模式识别技术,包括非监督学习方法和有监督学习方法。非监督学习方法将得到的分类信息与样本的原始信息进行比较,建立代谢产物与原始信息的关系,包括主成分分析(PCA)、层次聚类分析(HCA)、自组织图(SOMs)等。在这些技术中 PCA 最为简

单,在反映数据的原始情况方面具有优势,可以有效发现并剔除异常样本。监督学习方法通过建立的模型对样本进行分析,有判别分析(DA)、偏最小二乘法(PLS)、偏最小二乘法-判别分析联合法(PLS-DA)、正交偏最小二乘法(OPLS)、人工神经网络(ANN)技术等。由于 OPLS 整合了正交信号校正法的优

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81372733)。
[△] 通讯作者,E-mail:erywzp@lzu.edu.cn。

点并对 PLS 进行了改进,使数据分析更为准确和更具针对性,在代谢组学中的应用越来越广泛^[13]。

2 代谢组学在泌尿系肿瘤中的应用

在肿瘤的发生及进展中,肿瘤细胞中的微小变化都会引起代谢物的“延增效应”,产生大量的异乎寻常的代谢物^[16]。尿液是良好的代谢组学分析样本,且获取方便,尿液和(或)其他体液中代谢物的变化或波动情况对泌尿系肿瘤的診断和药物治疗靶点的发现都具有重要意义。目前已在泌尿系肿瘤中发现多种尿液和血液代谢标志物,其中一些已显现出很好的应用前景。

2.1 前列腺癌 代谢组学在前列腺癌方面的研究较多,已取得重要的成果。Sreekumar 等^[15]采用 GC-MS 和 LC-MS 相结合的方法分析了 42 例前列腺癌组织标本及相对应 220 例血、尿标本的 1 126 种代谢产物。发现了 60 种前列腺癌组织的代谢产物,其中肌氨酸、尿嘧啶、犬尿氨酸、3-磷酸甘油、亮氨酸、脯氨酸随疾病进展在肿瘤中的水平逐渐增高,并用分子生物学方法证实肌氨酸能调节肿瘤细胞的浸润和迁移,可作为早期诊断前列腺癌的标志物。Roberts 等^[17]发现柠檬酸盐、精胺、肌醇、乳酸盐等成分在健康人群和前列腺癌人群中有差异。代谢组学不仅可以有效诊断前列腺癌,而且可以探测前列腺癌早期的变化,真正做到早发现、早预防。此外,还有研究报道,用 ¹H-NMR 的方法检测前列腺液中的柠檬酸水平对前列腺癌的診断价值优于前列腺特异性抗原(PSA),且与患者年龄无关^[17-18]。

但最近的一项验证前列腺癌患者尿液中代谢标志物的研究却得出了相反的结论:该研究采用经过验证的代谢组学研究方法对 126 例泌尿生殖系统肿瘤患者和健康人的尿液标本进行分析,结果显示尿液中的脯氨酸、犬尿氨酸、尿嘧啶和 3-磷酸甘油并不能区分前列腺癌和健康人及其他类型的肿瘤患者^[19]。此外,这些代谢标志物在 T₁ 期、T₂ 期,以及 Gleason 评分小于 7 和大于或等于 7 的前列腺癌患者之间也没有明显的差异。该研究发现血清 PSA 水平并不影响这些代谢物在尿液中的表达,但肌酐浓度和他们之间存在强烈的相关性,提示这些代谢物的变化主要和肾脏排泄功能的变化有关。

总体来说,大多数研究显示前列腺癌代谢标志物具有较好的研究价值,但此结论并未得到普遍的认可,还需大量高质量、大样本的研究加以证实。目前为止,PSA 仍是临床上应用价值最高的前列腺癌标志物。

2.2 膀胱癌 有很多研究采用尿液代谢组学的方法诊断膀胱癌取得了较好的效果。Issaq 等^[18]用高效液相色谱法(HPLC)结合飞行时间质谱法(TOFMS)对 48 例膀胱移行细胞癌患者和 41 例健康人进行尿液代谢组学分析,并采用两种方法进行判定:用 PCA 法判定膀胱癌和健康人的特异性和敏感度分别为 96%、98%,用 OPLS-DA 法判定膀胱癌的特异性和敏感度可达 100%。类似的研究用 GC-TOFMS 结合 OPLS-DA 法对 24 例 T₁ 期膀胱癌患者和 51 例健康人进行尿液代谢组学分析,发现用这种方法诊断膀胱癌的特异度和敏感度可达 100%^[19]。

代谢组学在发现膀胱肿瘤标志物方面的研究也较为广泛,但目前为止还没有发现一种标志物能优于膀胱镜检查。Al-

berice 等^[20]对不同分级分期的膀胱癌患者尿液代谢标志物进行了检测,并分析了其与膀胱癌进展及复发之间的关系,发现甜菜碱、半胱氨酸、组氨酸、酪氨酸、肌肽、癸酰基肉碱和尿酸 7 种潜在膀胱肿瘤代谢标志物,其中前四者属于高风险标志物。此外还发现了 N-乙酰色氨酸等 5 种与膀胱癌复发有关的代谢标志物,此研究可能对膀胱癌的临床诊断、进展判断和复发预测具有一定的指导意义。

目前发现的膀胱癌尿液标志物已有 30 多种,但特异性大都低于尿脱落细胞学检查,研究尿液中的代谢标志物对膀胱癌的早期诊断、病情监测和术后复发预测具有重要意义。

2.3 肾细胞癌 由于肾脏的特殊结构与生理功能,血液和尿液等生物液体能够与肿瘤组织密切接触,通过对比肾癌患者和健康对照者尿液中代谢物的组成差异,有助于建立有价值的床旁诊断试验,但到目前为止,还没有在体液中发现有价值的肾癌肿瘤标志物。样本的处理和加工对尿液代谢物的检测影响很大,所以建立标准化的样本处理方法显得尤为重要。Kim 等^[21]用代谢组学的方法对肾癌患者和健康人的尿液标本进行分析(尿液标本经过标准化处理),发现羟基喹啉铜、4-羟苯甲酸和龙胆酸在两组标本中的表达存在差异,错误率为 26%。我国学者用 RPLC/MS 结合多变量 OPLS/DA 对 30 例肾癌患者和 30 例健康人的血清进行多肽分析,筛选出 19 个对肾癌具有潜在诊断价值的多肽。基于该 19 种多肽的无导层序聚类分析对肾癌鉴定的灵敏度可以达到 100%,其中 4 种多肽有非常优秀的灵敏度和特异度,提示其在肾癌诊断中巨大的应用潜力。

利用代谢组学研究肾细胞癌发生的代谢通路,寻找治疗的药物靶点也是代谢组学研究的一个方面。现有的几个公共通路数据库(KEGG、BioCyc、SMPDB)可进行代谢通路分析。Kim 等^[21]分析了代谢物在肾癌的致病通路中的作用,发现这些代谢物存在于特定的氨基酸和能量代谢的普遍通路中,符合肿瘤组织对蛋白质的高效分解和利用的现象以及“瓦伯格”效应。

总体看来,在发现临床可用的肾癌标志物之前,还需要更多大规模研究对整体代谢物进行深入分析,对现有研究结果进行验证,为肾癌的早期诊断和发现有效的药物治疗靶点提供可靠的试验依据。

3 展 望

代谢组学从生命整体出发,对机体的各种生理和病理现象研究更加全面和具体,在研究泌尿系统肿瘤中具有突出的优势。目前已发现多种有价值的泌尿系统肿瘤的代谢标志物,通过研究肿瘤发生的代谢通路,对肿瘤发生机制的认识及寻找治疗药物靶点都具有重要意义,但现有的研究结果仍需要大样本的基础和临床研究加以证实。从总体来看,代谢组学仍然是一个新兴的学科,在检测方法和应用等方面还需要进一步完善。随着研究手段的发展,相信在不久的将来,代谢组学在肿瘤生物学领域将会发挥更大的作用。

参考文献

[1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to

- pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [2] Fiehn OK, Dormann P. Metabohte profiling for plant functional genomics [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18 (11): 1157-1161.
- [3] 许国旺, 路鑫, 杨胜利. 代谢组学研究进展[J]. *中国医学科学院学报*, 2007, 29(6): 701-711.
- [4] 苗朝霞, 王映红. NMR 技术在天然产物活性物质发现及其药理学研究的应用[J]. *药学报*, 2013, 48(9): 1383-1389.
- [5] Forseth RR, Schroeder FC. NMR-spectroscopic analysis of mixtures; from structure to function [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(1): 38-47.
- [6] Simmler C, Napolitano JG, Mcalpine JB, et al. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25(1): 51-59.
- [7] Saito K, Nomura F. Mass spectrometry application for clinical diagnostics chairmen's introductory remarks[J]. *Rinsho Byori*, 2013, 61(9): 803-804.
- [8] Issaq HJ, Van QN, Waybright TJ, et al. Analytical and statistical approaches to metabolomics research[J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(13): 2183-2199.
- [9] Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2007, 26(1): 51-78.
- [10] Metz TO, Zhang Q, Page JS, et al. The future of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in metabolic profiling and metabolomic studies for biomarker discovery[J]. *Biomark Med*, 2007, 1(1): 159-185.
- [11] Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, et al. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87(1): 12-25.
- [12] Andrés-Iglesias C, Blanco CA, Blanco J, et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach to determine differential metabolites between regular and non-alcohol beers[J]. *Food Chem*, 2014, 157(15): 205-212.
- [13] Goodrich KM, Neilson AP. Simultaneous UPLC-MS/MS analysis of native catechins and procyanidins and their microbial metabolites in intestinal contents and tissues of male Wistar Furth inbred rats[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 958(1): 63-74.
- [14] Allwood JW, Clarke A, Goodacre R, et al. Dual metabolomics: a novel approach to understanding plant-pathogen interactions[J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(5/6): 590-597.
- [15] Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression[J]. *Nature*, 2009, 457(7231): 910-914.
- [16] Schmidt C. Metabolomics takes its place as latest up-and-coming "omic" science[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(10): 732-734.
- [17] Roberts MJ, Schirra HJ, Lavin MF, et al. Metabolomics: a novel approach to early and noninvasive prostate cancer detection[J]. *Korean J Urol*, 2011, 52(2): 79-89.
- [18] Issaq HJ, Nativ O, Waybright T, et al. Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *J Urol*, 2008, 179(6): 2422-2426.
- [19] Pasikanti KK, Esuvaranathan K, Ho PC, et al. Noninvasive urinary metabonomic diagnosis of human bladder cancer[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(6): 2988-2995.
- [20] Alberice JV, Amaral AF, Armitage EG, et al. Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics approach[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1318(4): 163-170.
- [21] Kim K, Taylor SL, Ganti S, et al. Urine metabolomic analysis identifies potential biomarkers and pathogenic pathways in kidney cancer[J]. *OMICS*, 2011, 15(5): 293-303.

(收稿日期: 2014-07-05 修回日期: 2014-10-20)

统计资料类型

统计资料共有三种类型: 计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料, 指通过度量衡的方法, 测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小, 得到的一系列数据资料, 其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到, 如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组, 然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数, 其特点是没有度量衡单位, 多为间断性资料, 如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组, 男性组有 72 例, 女性组有 70 例, 即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料, 可通过半定量的方法测量, 其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值, 各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同, 如根据某种药物的治疗效果, 将患者分为治愈、好转、无效或死亡。