

高效液相色谱法分析宫颈癌及宫颈上皮内瘤变患者的血浆氨基酸变化

阿仙姑·哈斯木¹, 艾尼·赛买提², 沙吉代·库尔班¹, 郑健贺¹, 马俊旗³

1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
2. 乌鲁木齐市水磨沟区人民医院感染科, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学第一附属医院妇科, 乌鲁木齐 830011

摘要 利用高效液相色谱(HPLC)代谢组学技术检测宫颈癌、宫颈上皮内瘤变及健康人血浆游离氨基酸含量,探讨宫颈癌及宫颈上皮内瘤变患者血浆游离氨基酸含量的改变及其临床意义。收集新疆医科大学第一附属医院病理确诊的26例宫颈上皮内瘤变(CIN)患者、22例宫颈癌(CSCC)患者及35例健康人血液标本,应用偏最小二乘判别分析法(PLS-DA)对HPLC谱数据进行模式识别分析,将其结果与健康人血浆游离氨基酸进行比较。结果表明,与健康人相比,CIN和宫颈癌患者血浆存在明显的氨基酸代谢异常。天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸含量自健康人、宫颈上皮内瘤变到宫颈癌呈下降趋势,且以宫颈癌血浆氨基酸含量下降最为显著,差异具有统计学意义($P<0.05$);而精氨酸和苏氨酸在宫颈上皮内瘤变血浆中较健康人明显增高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。由此得出,肿瘤细胞可能选择性地从血浆中摄取特定氨基酸来满足自身不同阶段的生长需求。

关键词 宫颈癌;宫颈上皮内瘤变;氨基酸代谢

中图分类号 R445.2

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.06.013

Analysis of the Blood Amino Acid Metabonomics of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer by High-performance Liquid Chromatography

HASIM Ayshamgul¹, SAIMAITI Aini², KUERBAN Shajidai¹, ZHENG Jianhe¹, MA Junqi³

1. College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Department of Infection, Shuimogou Area Hospital, Urumqi 830011, China
3. Department of Gynecology, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract To investigate the amino acids in plasma samples from patients with the cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and the cervical cancer and from healthy volunteers, to assess their clinical significance and to have insights into the cervical cancer amino acid metabolism and the systemic effects, 26 plasma samples from the CIN patients, 22 plasma samples from the CSCC patients and 35 samples from healthy volunteers are analyzed by the HPLC, and the partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) is employed to perform the pattern recognition analysis of the HPLC spectra. It is shown that there is a significant difference in plasma amino acids between those from patients with the CIN and cervical cancers and from healthy subjects. Compared to the healthy controls, the plasma aspartate, the glutamate, the asparagine, the serine, the glycine, the histidine, the taurine, the alanine, the proline, the tyrosine, the valine, the methionine, the lysine, the isoleucine, the leucine, and the phenylalanine decrease gradually from the CIN

收稿日期:2013-10-23;修回日期:2013-12-18

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2012211A043)

作者简介:阿仙姑·哈斯木,副教授,研究方向为肿瘤诊断学,电子信箱:axiangu75@126.com;马俊旗(通信作者),副主任医师,研究方向为妇科肿瘤,电子信箱:xjmjq@163.com

引用格式:阿仙姑·哈斯木,艾尼·赛买提,沙吉代·库尔班,等.高效液相色谱法分析宫颈癌及宫颈上皮内瘤变患者的血浆氨基酸变化[J].科技导报,2014,32(6):80-83.

to cervical cancers with statistical significance ($P < 0.05$), however the arginine and the threonine decrease dominantly in the CIN plasma than those in the CSCC. These findings indicate that the tumor cells may uptake a specific amino acid selectively from the plasma to meet their needs at different stages of growth.

Keywords cervical cancer; cervical intraepithelial neoplasia; amino acid metabolism

氨基酸是生命活动中的一类重要物质,既是构成蛋白质的基本单位,又是合成核酸的重要氮源并能提供能量。氨基酸具有许多重要的生物功能,但又是肿瘤组织赖以生存的条件之一。肿瘤患者多数为高代谢状态,体内蛋白质合成及分解代谢均增高,产生的代谢产物及血液中各种物质成分也随之改变。而作为蛋白质合成的原料及分解代谢产物,氨基酸成分及浓度改变也往往反应了肿瘤患者的不同状态。观察恶性肿瘤患者血浆中氨基酸含量的改变对了解恶性肿瘤的代谢变化具有重要意义。

代谢组学是对体液或细胞所有低分子量代谢产物进行定性和定量分析的学科^[1]。研究者利用代谢组学分析方法检测了不同肿瘤患者血液氨基酸水平,发现肿瘤氨基酸代谢具有其特异性,在食管癌、骨肉瘤、淋巴瘤、软组织肉瘤以及转移性肿瘤患者血液中呈现不一致性^[2]。这对营养治疗中如何纠正肿瘤患者氨基酸代谢异常、以及与化疗药物联合应用抑制肿瘤生长的方面具有指导作用。前期研究中,我们基于核磁共振代谢技术发现宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌(CSCC)患者血浆差异性代谢物^[3-4],为了进一步确定患者的血浆游离氨基酸含量,利用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)定量测定宫颈癌及宫颈上皮内瘤变患者的血浆游离氨基酸,并与健康人测定值进行比较,以探讨宫颈癌及宫颈上皮内瘤变患者血浆游离氨基酸含量的改变及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例选择

收集2010年6月至2012年3月在新疆医科大学第一附属医院和自治区人民医院妇科门诊就诊及住院治疗的宫颈鳞癌患者22例(宫颈癌组),患者平均年龄52.7岁(42~67岁),CIN II患者26例(CIN组),患者平均年龄46.3岁(29~56岁),均经组织病理诊断证实。通过体检确定健康志愿者35名作为对照组。对照组平均年龄为47.7岁(29~60岁),所有研究对象为维吾尔族妇女。

1.2 样品制备

采集病例组患者治疗前的早晨空腹静脉血和对照组健康人的早晨空腹静脉血,离心分离血浆,-80℃保存待测。检测时,取出样本后使用微量移液器将每份样品取出200 μL,加入400 μL乙腈萃取,涡旋30 s,静置10 min,12000 r/min,4℃离心15 min,取上清液置EP管中,40℃氮气吹干,加水200 μL复溶后,涡旋30 s,使用一次性滤膜滤过,取出10 μL按衍生反应要求进行衍生后进样。

1.3 仪器与方法

血浆游离氨基酸含量采用HPLC色谱仪检测(Waters

e2695型高效液相色谱仪,美国Waters公司,包括2475荧光检测器及软件工作站,自动进样器);含有19种氨基酸的混合标准品(美国Waters公司),AccQ-Flour™试剂盒(美国Waters公司),包括AQC粉末2A、2B(Reagent Diluent Flammable)和硼酸盐缓冲液;甲醇和乙腈(色谱纯,Sigma-Aldrich试剂公司);水为Milli-Q超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.4 数据处理与分析

利用HPLC自动进样系统进行数据采集,所采用的数据在工作站进行自动积分获得峰面积,并对数据进行线性分析和根据标准曲线进行样本含量的回归计算。应用SIMCA™P-11软件(Version 11.0, Umetrics Inc., Sweden)对各组样本的血浆氨基酸含量进行偏最小二乘判别分析(partial least-squares discriminant analysis, PLS-DA)以便观察不同组别之间的差异性。所有数据采用SPSS 16.0软件进行统计学处理,血浆氨基酸浓度全部以均数±标准差表示,均数的比较采用两独立样本 t 检验, P 值双侧,以0.05为临界值。

2 结果

2.1 患者血浆氨基酸的色谱分离

结果表明,各氨基酸之间和氨基酸与血浆中的其他内源性代谢物都没有相互干扰,各峰的分离良好,说明色谱条件可行(图1)。19种氨基酸均在30 min内有效地分离,各氨基酸的保留时间分别是5.283、6.524、11.137、11.536、12.548、13.277、14.813、15.094、15.543、16.018、19.942、22.03、23.238、24.137、24.912、26.986、27.415、27.781和8.554 min。

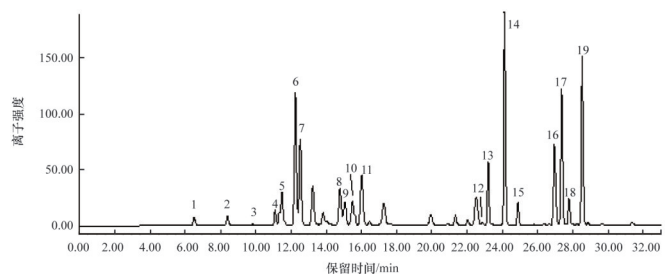


图1 血浆氨基酸典型HPLC图谱

Fig. 1 Chromatogram of 19 amino acids

注:1~19氨基酸分别为天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、天冬酰胺(Asn)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、牛磺酸(Tau)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ilu)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、苯丙氨酸(Phe)

2.2 宫颈癌、宫颈上皮内瘤变患者及健康人血浆氨基酸含量的模式识别分析

对两组患者及健康人血浆氨基酸含量采用SIMCA™P-11

进行PLS-DA分析,结果见图2。

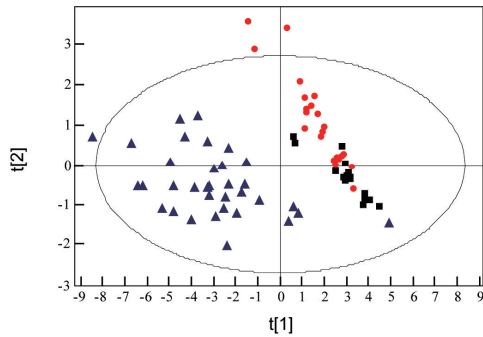


图2 对照组与宫颈癌、宫颈上皮内瘤变组血浆的得分图
Fig. 2 Score plots of plasma amino acid for CSCC, CIN patients and healthy subjects

注:从得分图中可以看到3组的分布区域是分开的,说明3组血浆氨基酸含量有明显差异。●表示宫颈癌组,■表示宫颈上皮内瘤变组,▲为健康对照组

图2中每个点表示1个对应样本,能够看出两组患者及健康人在空间的分布是分开的,说明3组参试人员体内氨基酸代谢有差异,尤其宫颈癌、宫颈上皮内瘤变患者与健康人有明显的差异。

2.3 宫颈癌、宫颈上皮内瘤变患者及健康人血浆氨基酸含量分析

宫颈癌和宫颈上皮内瘤变患者血浆氨基酸含量分别与健康人血浆氨基酸含量进行比较,结果如表1。结果显示,健康人、宫颈上皮内瘤变和宫颈癌患者血浆氨基酸含量呈现逐渐降低的趋势。宫颈上皮内瘤变与宫颈癌患者比较,宫颈癌患者血浆氨基酸含量降低更加明显。宫颈上皮内瘤变患者血浆氨基酸含量与健康人血浆氨基酸含量比较,除胱氨酸外,其他氨基酸的含量均有统计学差异($P < 0.05$)。宫颈癌患者血浆氨基酸含量与健康人血浆氨基酸含量比较,除了丙氨酸、脯氨酸和胱氨酸以外,其他氨基酸的含量均有统计学差异($P < 0.05$)。

表1 健康组与宫颈癌、宫颈上皮内瘤变患者血浆氨基酸浓度($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Plasma amino acid profiles of healthy, CIN, and cervical cancer groups ($\bar{x} \pm s$)

单位: $\mu\text{mol/L}$

氨基酸	健康组	CIN组	CSCC组	P^1	P^2
天冬氨酸	0.0621±0.0279	0.0156±0.00189	0.0103±0.0109	0.000	0.000
谷氨酸	0.5659±0.2333	0.0813±0.07485	0.0582±0.0533	0.000	0.007
天冬酰胺	0.0838±0.0189	0.0508±0.01936	0.0429±0.0291	0.000	0.041
丝氨酸	0.3977±0.6232	0.1060±0.04794	0.0858±0.0453	0.041	0.001
甘氨酸	0.3917±0.1338	0.1954±0.09794	0.1628±0.0893	0.000	0.007
组氨酸	0.2018±0.0575	0.0693±0.01953	0.0581±0.0231	0.000	0.000
精氨酸	0.1198±0.0374	0.1288±0.05859	0.0949±0.0649	0.000	0.000
苏氨酸	0.3133±0.2104	0.3328±0.15494	0.2790±0.1475	0.038	0.007
牛磺酸	0.3631±0.2514	0.0972±0.04182	0.0856±0.0423	0.000	0.047
丙氨酸	1.5821±1.0121	0.1395±0.08783	0.1190±0.0807	0.000	0.066
脯氨酸	0.094±0.0754	0.0561±0.04236	0.0469±0.0343	0.003	0.052
胱氨酸	0.0152±0.0187	0.0136±0.00586	0.0144±0.0688	0.950	0.396
酪氨酸	0.1016±0.0543	0.0579±0.01736	0.0517±0.0205	0.000	0.027
缬氨酸	0.3270±0.1666	0.1910±0.04680	0.1632±0.0649	0.000	0.001
蛋氨酸	0.2001±0.2071	0.0249±0.00730	0.0217±0.0085	0.000	0.005
赖氨酸	0.1172±0.0522	0.0942±0.03533	0.0808±0.03878	0.001	0.008
异亮氨酸	0.4206±0.3848	0.1248±0.04481	0.1068±0.0471	0.001	0.004
亮氨酸	0.3226±0.1108	0.1231±0.03451	0.1026±0.0426	0.000	0.003
苯丙氨酸	0.1631±0.0491	0.0717±0.02950	0.0601±0.0279	0.000	0.002

注: P^1 为健康组与CIN组比较, P^2 为CIN组与CSCC组比较。

3 讨论

氨基酸是生命活动中最基本的物质,是生命代谢的物质基础。在肿瘤组织的恶性转化过程中,由于肿瘤细胞动力学的改变,导致机体明显的代谢异常状况,主要表现在肿瘤组织蛋白质合成增强和氨基酸分解减弱,这与肿瘤细胞旺盛生长相适应。肿瘤组织为了满足自身的快速生长和细胞的无限增殖需要从血浆中摄取某些特定氨基酸,引起这些氨基

酸在血浆中的含量降低,导致机体氨基酸代谢缺陷^[5]。

本结果表明,宫颈癌、宫颈上皮内瘤变血浆与健康对照组相比,存在明显的氨基酸代谢异常。但癌前病变和宫颈癌患者血浆氨基酸含量呈现两种改变,大部分氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸)含量在宫颈癌患者血浆中低于宫颈上皮内瘤

变患者,而宫颈上皮内瘤变血浆氨基酸总量又低于健康人血浆氨基酸总量。也就是说自健康人至宫颈癌,其血浆氨基酸总含量呈下降趋势,且以宫颈癌血浆氨基酸总量下降最为显著;含量下降的氨基酸中有统计学意义的多为人体必需氨基酸、支链氨基酸及生糖氨基酸。而精氨酸和苏氨酸在宫颈上皮内瘤变血浆降低较宫颈癌明显,提示肿瘤的进展、转移等可能依赖不同的氨基酸,这与某些研究报道一致^[6]。

支链氨基酸(branched chain acids,BCAA)包括亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸,其作为氮的载体不仅在机体蛋白质合成和分解中发挥着重要的调节作用,同时具有供能底物和其他氨基酸(如谷氨酰胺)合成底物及肌蛋白调节剂的功能,是维持机体氮平衡的关键因素,而谷氨酰胺是机体储藏最丰富的必需氨基酸,是各组织重要氮源和能量的来源,其代谢不仅可提供能量而且为核酸和类脂等合成提供前体^[7]。缬氨酸高摄取是肿瘤细胞氨基酸代谢特征之一,实验证明,肿瘤组织和细胞中缬氨酸代谢旺盛,肿瘤患者血浆中BCAA浓度低于健康对照组,因此在肿瘤生长过程中,可利用这些氨基酸作为能源,在三羧酸循环中获得更多能量^[8,9]。

有研究报道,肿瘤细胞生长不但依赖于总氮水平,而且也依赖于一定量的谷氨酸、门冬氨酸,而且某些肿瘤细胞生长与谷氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸呈正相关;而丝氨酸、谷氨酰胺和甘氨酸肿瘤生长呈负相关^[10,11]。这提示与肿瘤生长呈正相关的氨基酸在高水平下可能刺激肿瘤生长,而与肿瘤生长呈负相关的氨基酸可能为肿瘤细胞所嗜好。在个别不同肿瘤中结论不一致,可能与肿瘤生长部位、肿瘤分级有关。本研究中,胱氨酸在宫颈上皮内瘤变和宫颈癌患者血液中含有量降低,提示肿瘤细胞可能选择性地从血浆中摄取这些特定氨基酸来满足自身快速生长的需求,导致机体氨基酸的含量降低。

4 结论

健康人与宫颈CIN和宫颈癌患者血浆氨基酸含量存在明显差异,这可能与肿瘤生长不同阶段需要的氨基酸不同有关,其可能在不同阶段摄取某些特定氨基酸来满足自身快速生长的需求。

参考文献(References)

- [1] Waters N J, Waterfield C J, Farrant R D, et al. Integrated metabolomic analysis of bromo-benzene-induced novel hepatic 5-oxoprolinosis[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(6): 1448-1459.
- [2] Baracos V E, Mackenzie M L. Investigations of branched-chain amino acids and their metabolites in animal models of cancer[J]. *American Society for Nutrition*, 2006, 136(S1): 237-242.
- [3] 马俊旗,阿仙姑·哈斯木,巴吐尔·买买提明,等.基于核磁共振代谢技术研究宫颈上皮内瘤样变患者血浆代谢物[J]. *科技导报*, 2010, 28(12): 36-40.
Ma Junqi, Hasim Ayshamgul, Mamtimin Batur, et al. ¹H-NMR-based metabolomics analysis of plasma samples with cervical intraepithelial

neoplasia[J]. *Science and Technology Review*, 2010, 28(12): 36-40.

- [4] Hasim A, Ali M, Mamtimin B, et al. Metabonomic signature analysis of cervical carcinoma and precancerous lesions in women by 1H NMR spectroscopy[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2012, 3(6): 945-951.
- [5] Mampassi D M, 顾月清.与肿瘤有关的氨基酸代谢缺陷及其相关药物的应用[J]. *药物生物技术*, 2012, 19(4): 373-376.
Mampassi D M, Gu Yueqing. The applications of amino acids metabolism deflection and its drug in tumor therapy[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2012, 19(4): 373-376.
- [6] Fan J, Hong J, Hu J D, et al. Ion chromatography based urine amino acid profiling applied for diagnosis of gastric cancer[J]. *Gastroenterology research and Practice*, 2012, doi: 10.1155/2012/474907.
- [7] Flåring U B, Rooyackers O E, Wernerman J, et al. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle[J]. *Clinical Science*, 2003, 104(3): 275-282.
- [8] Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, et al. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e24143.
- [9] Hasim A, Ma H, Mamtimin B, et al. Revealing the metabolomic variation of EC using ¹H-NMR spectroscopy and its association with the clinicopathological characteristics[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(9): 8955-8964.
- [10] Le A, Lane A N, Hamaker M, et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells [J]. *Cell Metabolism*, 2012, 15(1): 110-121.
- [11] 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.
Mamtimin Batur, Upur Halmurat, Hao Fuhua, et al. Metabonomic differences of plasma between abnormal savda and unsavda syndrome neoplasm patients[J]. *Science & Technology Review*, 2009, 27(20): 39-43.

(责任编辑 吴晓丽)

《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映中国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域中国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。