



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

巴吐尔·买买提明^{1,2}, 哈木拉提·吾甫尔¹, 豪富华³

1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054

2. 中南大学药学院, 长沙 410007

3. 中国科学院武汉物理与数学研究所; 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉 430071

摘要 探讨异常黑胆质型与非异常黑胆质型肿瘤患者血浆差异性代谢成分, 描述两种肿瘤患者血浆代谢组学差异。对 80 例异常黑胆质型肿瘤患者和 160 例非异常黑胆质型肿瘤患者血浆进行核磁共振氢谱检测, 对结果进行正交偏最小二乘判别 (OPLS-DA) 分析。结果表明, 异常黑胆质型肿瘤患者血浆葡萄糖、极低密度脂蛋白、不饱和脂类、丙氨酸含量比非异常黑胆质型肿瘤患者低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时, 脂肪酸氧化产物乙酰乙酸、 β -羟丁酸、丙酮、异丁酸, 糖酵解产物乳酸、丙酮酸, 以及亮氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、乙酰半胱氨酸、糖蛋白、肌醇等代谢物在血浆中的含量比非异常黑胆质型肿瘤患者高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此得出结论: 异常黑胆质型肿瘤患者体内的脂肪动员和糖酵解水平比非异常黑胆质型肿瘤患者高, 免疫功能的损毁可能比后者严重, 预后可能比后者差。

关键词 异常黑胆质; 非异常黑胆质; 维吾尔医学; 肿瘤; 代谢组学

中图分类号 R291.5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)20-0039-05

Metabonomic Differences of Plasma Between Abnormal Savda and Unsavda Syndrome Neoplasm Patients

MAMTIMIN Batur^{1,2}, UPUR Halmurat¹, HAO Fuhua³

1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

2. College of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410007, China

3. State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics; Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

Abstract The metabonomic differences of plasma between abnormal savda and unsavda syndrome neoplasm are studied in

light of the traditional Uighur medicine. Plasma samples were obtained from 80 cases of abnormal savda syndrome neoplasm patients and 160 cases of abnormal unsavda syndrome neoplasm patients. For each sample, the 1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) based metabonomic analysis was performed and the obtained data was analyzed by the Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). The results show that the abnormal savda syndrome neoplasm patients have a lower degree of glucose, Very Low Density Lipoprotein (VLDL), unsaturated lipids, alanine and a higher degree of fatty acid metabolites like acetone, acetoacetate, β -hydroxy butyrate, isobutyrate; product of glycolysis like lactate, pyruvate; amino acids like leucine, tyrosine, isoleucine, valine, acetylcysteine; another metabolites like myo-inositol, glycoprotein in plasma than the unsavda syndrome neoplasm patients ($P < 0.05$). These findings indicate that the abnormal savda syndrome neoplasm patients have a higher degree of fat mobilization and glycolysis level, their immune function is more seriously damaged and their prognosis may be worse than that of abnormal unsavda syndrome neoplasm patients.

Keywords abnormal savda; abnormal unsavda; traditional Uighur medicine; neoplasm; metabonomics

收稿日期: 2009-09-12

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目 (90709004)

作者简介: 巴吐尔·买买提明, 讲师, 研究方向为维吾尔药与代谢组学, 电子信箱: mtbatu@yahoo.com.cn; 哈木拉提·吾甫尔 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S253002398M), 教授, 研究方向为维吾尔药的现代研究, 电子信箱: halmurat@263.net



0 引言

维吾尔医学理论体系中疾病的异常体液分型是维吾尔医学治疗疾病的主要特色,在疾病的诊治过程中起不可替代的作用^[1-2]。根据维吾尔医学体液质理论,不同体液质的异常虽然有可能导致相同类型的疾病,但其诊断方法和治疗原则不一样。致病因素进入体内后,首先黏液质被损耗、蒸发或浓缩,导致其他体液质的变化并出现异常体液质。尤其异常黑胆质的出现是导致疾病的主要原因之一^[3-4],是肿瘤、高血压、哮喘、糖尿病等复杂性疾病发生发展过程中的共同病理生理学基础。异常黑胆质作为体内各种体液即黑胆质、黏液质、血液质和血液质等发生异常变化的最终产物,其造成的后果往往比较严重^[5]。维吾尔医学临床研究发现 80% 以上的肿瘤是由异常黑胆质性体液产生的,可见异常黑胆质性体液与肿瘤是密切相关的。与其他异常体液质比较,它的致病性、危险性、恶性程度最高,在难治性疾病的发生、发展过程中起主导作用。本研究组在先前的报道中阐述了异常黑胆质型肿瘤患者体内代谢变化特点^[6],本文将主要分析异常黑胆质型和非异常黑胆质型肿瘤患者血浆差异性代谢成分,探讨两种肿瘤患者代谢过程的不同点。

1 材料与方法

1.1 病例选择

新疆医科大学肿瘤医院收治的 240 例肿瘤患者,男性 70 例、女性 170 例,平均年龄 47 ± 13 岁,其中异常黑胆质型肿瘤患者 80 例、非异常黑胆质型肿瘤患者 160 例。病例根据维吾尔医学体液分型的分类标准^[2-3],分成异常黑胆质型肿瘤患者和非异常黑胆质型肿瘤患者两类。异常胆液质、异常黏液质、异常血液质等 3 种异常体液质型肿瘤患者被纳入到非异常黑胆质型肿瘤患者组中,而异常黑胆质和其他体液质混合而成的混合型体液质肿瘤患者不在本次分析当中。

1.2 仪器与方法

1.2.1 核磁共振氢谱 (¹H-NMR 谱) 测定

收集空腹血液并离心分离血浆,保存在 -80°C 低温冰箱中待测。

取 200 μL 血浆加 400 μL 用重水配制的 0.9% NaCl 溶液,在室温放置 10 min,以 10 000 r/min 速度离心 10 min,取上清液 550 μL 加到 5 mm 的核磁管内。所有 ¹H-NMR 谱的测试均在 25°C 条件下用布鲁克 500 MHz 核磁共振波谱仪 (德国) 进行,¹H 核磁共振频率为 500.13 MHz。调用标准 CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), $\text{RD}-90^{\circ}-\tau-180^{\circ}-2\tau-180^{\circ}-2\tau-180^{\circ}-\dots-\text{ACQ}$ 脉冲序列并用预饱和方法压制水峰。每一个样品的谱宽均设置为 10 kHz、采样数据点 32 768、FID 累加 64 次、采样延迟 2 s、每次扫描时间均为 1.64 s。为有利于解谱工作,部分样品测试了 ¹H-¹H 同核相关谱 (COSY 谱)、质子全相关谱 (TOCSY 谱)、J-分解谱 (J-Resolved 谱) 等核磁共振二位谱。所有 ¹H-NMR 谱手动进行相位和基线校正,并在傅里叶变换前乘以增宽因子为 1.0 Hz 的指数窗函数进行处理。

1.2.2 数据处理与分析

¹H-NMR 谱以 α -葡萄糖化学位移 $\delta 5.233$ 的质子信号为标准进行定标,用 AMIX (德国) 软件对每一个 ¹H-NMR 谱的 $\delta 8.5 \sim 0.5$ 范围以每段为 80.003 进行分段积分并进行归一化处理 (每段积分面积除以所有积分面积之和)。 $\delta 5.20 \sim 4.66$ 和 $\delta 2.72 \sim 2.47$ 两段信号分别是水和抗凝剂 (枸橼酸钠) 的信号范围,所以去掉这部分数据。剩余数据用 SIMCA-P+11 软件采用 UV 标准化处理方式 (Unit Variance) 进行标准化处理后进行正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA)。

OPLS-DA 是一种基于偏最小二乘法的线性回归统计分析方法——偏最小二乘判别分析 (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) 方法的改进方法,也就是对 PLS 模型进行了正交信号校正 (Orthogonal Signal Correction, OSC),提高了分析结果的可信度。OPLS-DA 分析方法用 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 等参数评价分析结果的准确性,其中 Q^2 表示统计结果的真实性。本研究把 OPLS-DA 分析的结果用空间分布图 (3D plot) 和相关系数 r 用 Matlab 软件处理后的相关系数图 (coefficient plot) 表示。本研究采用代谢物相关系数确定异常黑胆质型与非异常黑胆质型肿瘤患者的差异性代谢成分,相关系数的临界值相当于显著性差异水平 $P=0.05$ 。通过皮尔森相关系数显著性差异检测 (Pearson's product moment correlation coefficient) 确定 0.217 作为代谢物含量变化是否具有显著性的阈值 ($n=80$), $|r| > 0.217$ 所代表的代谢物是统计学上有显著性差异 ($P < 0.05$) 的代谢物。

2 结果

通过 ¹H-NMR 谱图和 COSY、TOCSY、J-Resolved 等二维谱对异常黑胆质型和非异常黑胆质型肿瘤患者血浆差异性代谢成分进行了信号归属。图 1 显示了异常黑胆质型和非异常黑胆质型肿瘤患者血浆 ¹H-NMR 谱图。对 ¹H-NMR 谱图进行 OPLS-DA 分析的结果用空间分布图和相关系数图表示,如图 2 所示。图 2(a) 中的每个点代表一个样品,图 2(b) 中颜

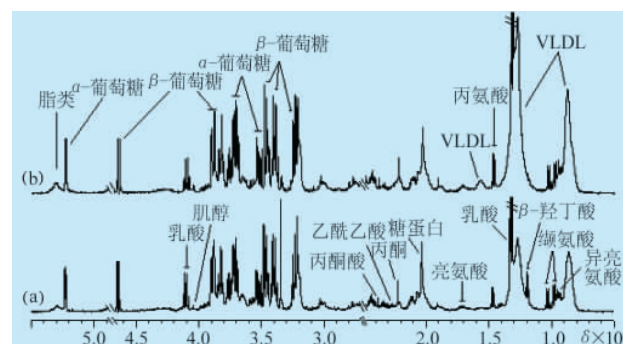


图 1 异常黑胆质型肿瘤患者 (a) 和非异常黑胆质型肿瘤患者 (b) 血浆 ¹H-NMR 谱图

Fig. 1 ¹H-NMR spectra of plasma samples from abnormal savda syndrome neoplasm patients (a) and abnormal unsavda syndrome neoplasm patients (b)

有关差异性代谢物的化学位移及其归属已在表 1 中描述,其中相关系数为正值代谢物是在异常黑胆质型肿瘤患者血浆中含量高的代谢物,相关系数为负值的代谢物是在异常黑胆质型肿瘤患者血浆中含量低的代谢物,与非异常黑胆质型肿瘤患者比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果显示,异常黑胆质型肿瘤患者与非异常黑胆质型肿瘤患者比较,前者血浆中多种氨基酸和酸性代谢物的含量较高,但是丙氨酸的含量较低。同时,VLDL、不饱和脂类、葡萄糖含量在异常黑胆质型肿瘤患者血浆中较低。

3 讨论

肿瘤的早诊断和早治疗是延长病人生命、提高生命质量的关键,所以寻找一种灵敏、可信的诊断指标仍然是肿瘤研究工作的重点。根据研究异常黑胆质型体液导致肿瘤等难治性疾病的危险性比其他体液质都高^[7],所以研究与异常黑胆质型体液有关的疾病体液代谢组学特点,将有助于阐明肿瘤等难治性疾病发生、发展过程中的体液变化过程,有助于发现与疾病有关的特异性代谢标志物。体液中的代谢物质与细胞、组织和整体水平的生物化学状态密切相关,内环境的任何变化会导致体液中代谢物质发生显著变化,也就是代谢的紊乱性变化会在血液等体液的代谢组中得到表现^[8-9]。异常体液质的出现过程也与体内代谢紊乱性变化密切相关。

本研究中异常黑胆质型肿瘤患者与非异常黑胆质型肿

瘤患者比较,前者血浆中除葡萄糖、VLDL、不饱和脂类和丙氨酸含量比后者低以外,其他多种代谢物含量均高于后者。异常黑胆质型肿瘤患者血浆中葡萄糖含量较低,但是乳酸含量却增加,说明异常黑胆质型肿瘤患者体内的糖酵解过程比非异常黑胆质型肿瘤患者强,大量的葡萄糖在糖酵解中被消耗,但是所获得的能量可能不能满足机体需求。组织细胞氧和能量的缺乏可能导致异常黑胆质型肿瘤患者体内脂肪动员的加强,测试结果证明了这一点。异常黑胆质型肿瘤患者血浆中乙酰乙酸、 β -羟丁酸、丙酮含量较高,这是脂肪酸 β -氧化的产物——酮体,酮体含量的增加证明异常黑胆质型肿瘤患者体内的脂肪动员水平比非异常黑胆质型肿瘤患者体内高。脂肪酸通过脂酰 CoA 合成酶的作用下转变成脂酰 CoA,并进入肝细胞线粒体内产生大量的乙酰 CoA 和 $\text{NADH}+\text{H}^+$,乙酰 CoA 在线粒体内进一步氧化形成酮体。如果组织细胞缺氧会引起体内乙酰 CoA 和 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 的堆积,进一步抑制葡萄糖的有氧氧化。可能的机制是:脂肪代谢产生的大量乙酰 CoA 和 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 抑制丙酮酸转变成乙酰 CoA 的过程,同时 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 也抑制乙酰 CoA 进入三羧酸循环,但是, $\text{NADH}+\text{H}^+$ 促进糖酵解过程、促进丙酮酸变成乳酸,使组织器官通过无氧氧化获得能量,所以异常黑胆质型肿瘤患者糖酵解及脂肪酸 β -氧化水平超过非异常黑胆质型肿瘤患者,可能的代谢变化过程见图 3。由以上结果可见,异常黑胆质型肿瘤患者体内的酸性代谢物含量比非异常黑胆质型肿瘤患者高,

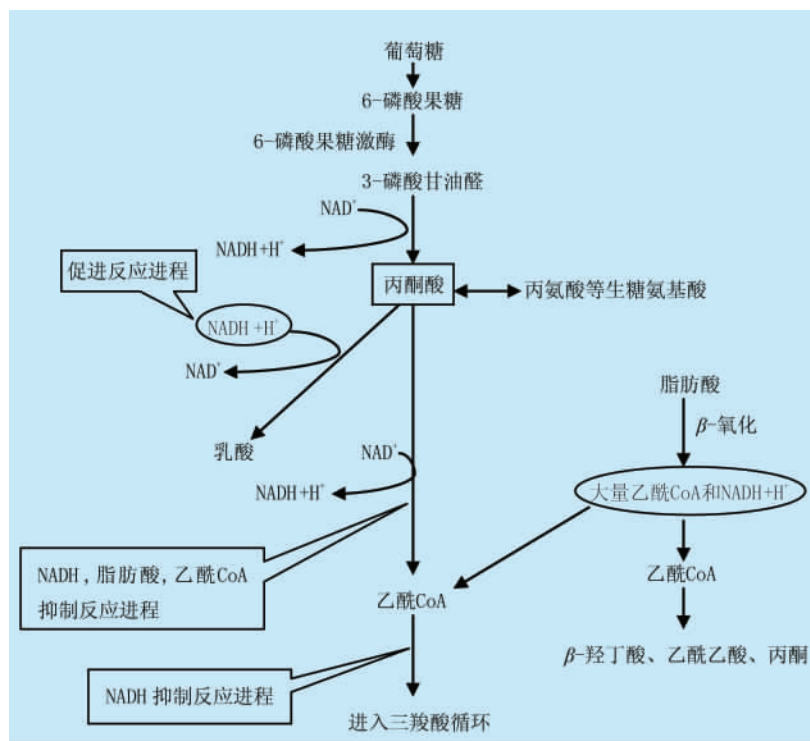


图 3 异常黑胆质型肿瘤患者血浆代谢物可能的代谢过程

Fig. 3 Metabolic pathways of plasma metabolites from abnormal savda syndrome neoplasm patients



这可能说明异常黑胆质型肿瘤患者发生酸中毒的危险性要比非异常黑胆质型肿瘤患者高。

异常黑胆质型肿瘤患者血浆中糖蛋白和肌醇含量高于非异常黑胆质型肿瘤患者。糖蛋白与很多疾病如肿瘤、感染等的发生、发展有关,肿瘤细胞表面的糖蛋白可脱落进入血液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。在对异常黑胆质型恶性肿瘤患者血浆去甲肾上腺素、多巴胺等神经递质的检测发现,其含量比非异常黑胆质型恶性肿瘤患者高^[10],这些神经递质的增加与异常黑胆质型肿瘤患者体内酪氨酸含量的增加有关。酪氨酸也会增加体内黑色素的合成,这可能是异常黑胆质型体液患者皮肤比其他体液质黑^[3]的主要原因。

4 结论

异常黑胆质型肿瘤患者体内的脂肪动员和糖酵解水平比非异常黑胆质型肿瘤患者高,免疫功能的损毁可能更严重,其预后可能更差。

致谢 本实验数据的采集和分析得到了中国科学院武汉物理与化学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室唐惠儒研究员及其研究团队的支持,在此表示衷心感谢。

参考文献 (References)

- [1] 易沙克江. 中国医学百科全书: 维吾尔医分卷(维文)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1985: 17-33
Ishakjan. Encyclopedia of Chinese Medicine: Uyghur Medicine [M]. Urumqi: Health Science and Technology Publishing House of Xinjiang, 1985: 17-33
- [2] 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.
Sabir Mamatimin. Diagnostics of Uyghur medicine [M]. Urumqi: Science and Technology Publishing House of Xinjiang, 1993: 135-148.
- [3] 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.

Upur Halmurat. Therapy of Mizaj and Hilit in Uyghur medicine and modern study [M]. Urumqi: Science and Technology Publishing House of Xinjiang, 2003: 44-45.

- [4] 阿不都热依木·玉素甫, 李林, 哈木拉提·吾甫尔, 等. 维医异常体液分型及其与氧化-抗氧化系统关系的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(8): 61-63.

Yusup Abdurehim, Li Lin, Upur Halmurat, et al. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2004, 10(8): 61-63.

- [5] 阿布力米提·玉素甫阿吉. 维吾尔医基础理论(维文)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1988: 32-46.

Ablimit Yusup Haji. Basic Theory of Uyghur medicine [M]. Urumqi: Health Science and Technology Publishing House of Xinjiang, 1988: 32-46.

- [6] 艾斯克·吐拉洪, 哈木拉提·吾甫尔, 豪富华, 等. 基于 NMR 的维吾尔医异常黑胆质型肿瘤患者血浆代谢组学分析 [J]. 科技导报, 2009, 27(13): 27-31.

Turahun Askar, Upur Halmurat, Hao Fuhua, et al. Science and Technology Review, 2009, 27(13): 27-31.

- [7] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉素甫, 阿不都艾尼, 等. 维吾尔医成熟剂和清除剂抗活性氧的作用研究[J]. 中国民族医药杂志, 2000, 6(3): 30-32.

Upur Halmurat, Yusup Abdurehim, Abduheni, et al. Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities, 2000, 6(3): 30-32.

- [8] Xu J, Bjursell M K, Himrod J, et al. A genomic view of the Human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis [J]. Science, 2003, 299 (5615): 2074-2076.

- [9] Nicholson J K, Holmes E, Wilson I D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care [J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(5): 431-438.

- [10] 成庆英. 肿瘤维医分型与血浆单胺类神经递质的相关研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2007.

Cheng Qingying. The relationship between tumor patients' plasma monoamine neurotransmitter changes and their Urgur traditional medicine syndromes[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2007.

(责任编辑 王芷)

·学术动态·

“第 4 届全国地球物理技术学术研讨会”征文

由中国地球物理学会主办的“第 4 届全国地球物理技术学术研讨会”定于 2010 年第 2 季度在北京召开。会议宗旨: 加强地球物理技术领域的相互交流, 促进国内仪器的自主研发和国外技术的合理引进。本次会议主题是: 深部资源探测和各种地球物理场的监测研究。

会议现面向相关科技工作者征稿, 征文内容包括: 资源探测的各种自主研发的地球物理仪器设备, 信号处理技术和探测研究方法; 与环境灾害相关的地球物理监测仪器设备, 数据处理技术及观测研究方法; 地球物理技术范畴的观测、探测、实验仪器、信号及数据分析处理技术, 以及研究方法。

征稿截止日期: 2009 年 11 月 30 日, 收稿信箱: cgtsc@126.com。

通信地址: 中国北京市海淀区民族学院南路 5 号 (100081);

电话: 010-68729347, 82998257; 传真: 010-68460283。

