

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

马俊旗¹, 阿仙姑·哈斯木², 巴吐尔·买买提明³, 阿布力孜·阿布杜拉², 丁岩¹

1. 新疆医科大学第一附属医院妇科, 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011

3. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

摘要 探讨宫颈上皮内瘤样变(CIN)和健康人血浆差异性代谢成分,分析利用基于核磁共振(NMR)代谢组学技术诊断宫颈癌的可行性。收集新疆医科大学第一附属医院病理确诊的36例CIN患者及36名健康人血液标本,应用NMR技术结合正交偏最小二乘判别分析法(OPLS-DA)对NMR谱数据进行模式识别分析,其结果与液基薄层细胞学(TCT)检测结果比较。结果表明,与健康人相比,CIN患者血浆中极低密度脂蛋白、不饱和脂肪酸和丙酮含量增加,与健康人血浆代谢物比较,差异有统计学意义($r < -0.349$, $P < 0.05$)。乳酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、肌酸、异亮氨酸和1-甲基组氨酸等多种氨基酸含量减少,与健康人血浆代谢物比较,差异具有统计学意义($r > +0.349$, $P < 0.05$)。基于NMR代谢组学技术结合OPLS-DA可以将CIN患者与健康人鉴别开来,其诊断灵敏度为91.7%,假阳性率为8.3%,优于TCT检测。由此得出结论,基于NMR代谢组学技术结合OPLS-DA能有效区分CIN和健康人的血浆代谢物。该技术有望成为早期诊断宫颈癌的一个新手段。

关键词 宫颈上皮内瘤样变;血浆;代谢组;核磁共振

中图分类号 R445.2

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)12-0036-05

¹H-NMR-based Metabonomics Analysis of Plasma Samples with Cervical Intraepithelial Neoplasia

MA Junqi¹, HASIMU Ayshamgul², MAMTIMIN Batur³, ABUDULA Abuliz², DING Yan¹

1. Department of Gynecology in the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract To investigate the metabolites in plasma samples from patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) and analyze their metabonome variation, then explore the potential applications of ¹H-NMR-based metabonomics in diagnosing precancerous diseases, 36 plasma samples of CIN patients and 36 healthy volunteers were studied with the method of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, and the Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) was employed to perform the pattern recognition analysis of NMR spectra. Patients of CIN were characterized by increased levels of lipids, such as very low-density lipoprotein, unsaturated lipid and acetone with statistical significance ($r < -0.349$, $P < 0.05$), and by decreased levels of lactate, alanine, valine, creatine, isoleucine and 1-methylhistidine with statistical significance ($r > +0.349$, $P < 0.05$). The results of OPLS-DA show that CIN patients could be discriminated from healthy volunteers with diagnostic sensitivity of 91.7%, false positive rate of 8.3%. These were better than the results of Thinprep Cytological Test (TCT). These findings indicate that combining NMR measurements with OPLS-DA analysis, ¹H-NMR based

收稿日期: 2010-03-18

基金项目: 新疆医科大学基金项目(YKD2007-10);新疆维吾尔自治区高等学校科研计划项目(XJEDU2008S38)

作者简介: 马俊旗, 副主任医师, 研究方向为妇科肿瘤, 电子信箱: xjmjq@163.com; 阿仙姑·哈斯木(通信作者), 讲师, 研究方向为肿瘤诊断学基础研究, 电子信箱: ayshamgul75@sina.com

metabonomics through plasma metabolites can discriminate patients with CIN from healthy volunteers effectively, and provide a novel method for early diagnosis of cervical cancer.

Keywords cervical intraepithelial neoplasia; plasma; metabonome; nuclear magnetic resonance

0 引言

宫颈癌 (Cervical Carcinoma, CC) 是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 临床上近 80% 的宫颈癌由宫颈上皮内瘤样变 (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) 演变而来, 因此 CIN 是与宫颈浸润癌密切相关的一组癌前病变, 反应了宫颈癌发生发展的一个连续性过程。目前, 临床上诊断 CIN 的主要方法为组织病理学和细胞学检查。病理检查虽然对 CIN 诊断的准确度最高, 但是必须首先通过手术或体外刮取病灶组织, 对患者造成创伤大, 因此不是理想的诊断宫颈癌的常规手段。液基薄层细胞学 (Thinprep Cytologic Test, TCT) 技术极大地提高了宫颈细胞学涂片的敏感性与准确性, 降低了传统巴氏涂片检查法的假阴性率, 但诊断低度不典型增生时其假阳性率和假阴性率仍较高^[1-2]。而代谢组学是近年发展起来的一门新学科, 不仅应用于重要疾病的发病机制研究, 而且在肿瘤诊断、肿瘤分级、肿瘤治疗评估、肿瘤复发诊断等方面均有所应用^[3-9]。本研究采用核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 法检测 CIN 患者和健康人血浆代谢物, 同时利用正交偏最小二乘判别分析法 (Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA) 方法对核磁共振谱数据进行模式识别分析, 确定两组标本血浆差异性代谢物组分, 探寻宫颈癌早期诊断的一个新途径。

1 材料与方法

1.1 病例选择

以新疆医科大学第一附属医院妇科自 2008 年 6 月至 2009 年 2 月诊治的 36 例 CIN 患者为病例组 (其中 10 例 CIN I, 12 例 CIN II 和 14 例 CIN III), 均由病理医师确诊。通过体检确定无相关病史的健康志愿者 36 名作为对照组。采集早餐前空腹血液并离心、分离血浆, 保存在 -80℃ 低温冰箱中待测。标本采集经新疆医科大学伦理委员会通过, 研究对象均已填写知情同意书。

1.2 仪器与方法

1.2.1 核磁共振氢谱 ¹H-NMR 的测定

Varian Unity Inova 600MHz 超导核磁共振谱仪 (美国 Varian 公司); Sigma 2-16K 低温离心机 (德国 Sartorius 公司)。重水 (D₂O, 99.9% in D) 和 TSP (3-甲基硅烷-2,2',3,3'-d4 丙酸钠) 购于德国 Sigma 公司。

样品从低温冰箱中取出并在室温中解冻, 取 200μL 血浆加 400μL 磷酸缓冲液生理盐水 (0.045mol/L K₂HPO₄ 和 0.045mol/L NaH₂PO₄, 按 4:1 (V/V) 混合), 并用此缓冲液配置生理盐水, 室温放置 10min, 以 4℃, 10000r/min 离心 10min, 取上

清液 550μL 加到 5mm 的核磁管内。¹H-NMR 谱图的测定均在核磁共振谱仪上采用 CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 脉冲序列 (RD-90°-τ-180°, -2τ-180°, -2τ-180°-..., -ACQ) 进行。记录血清样本 ¹H-NMR 谱, 测试温度为 25℃。预饱和和压制水峰, ¹H-NMR 频率为 599.95MHz, 扫描累积 64 次, 采样数据点为 32768, 谱宽 10000Hz, 采样延迟 2s, 采样时间均为 1.64s。

1.2.2 二维 ¹H-¹H 同核相关谱 (¹H-¹H Homonuclear

Correlation Spectroscopy, ¹H-¹H COSY) 的测定

采用 DQF-COSY (Double-Quantum Filter COSY, DQF-COSY) 脉冲序列进行测定。DQF-COSY 谱是双量子滤波 COSY 谱, 其脉冲序列为: (RD)-90°-t₁-90°-Δ-90°-t₂-ACQ。¹H-NMR 频率为 599.95MHz, 扫描累积 64 次, 采样时间: F1 为 0.015s, F2 为 0.195s, 采样延迟 6.0s。

1.2.3 数据处理与分析

本研究氢谱以 δ5.233 的 α-葡萄糖质子信号为标准进行定标, 用 Topspin 2.0 软件进行谱图的基线校正和相位校正, 并在 δ(0.5~9.0) 范围内把图谱以每段为 δ0.003 分成 2668 段自动积分。为了减少不同样品浓度差异而带来的误差, 在进行模式识别前对各分段积分值进行归一化处理。归一化后的积分数据转化为 Excel 数据格式, 采用 SIMCA-P⁺ 11.0 软件包进行 OPLS-DA 模式识别方法处理和 NMR 数据分析。根据所得的代谢物相关系数确定对照组与病例组的差异性代谢成分, 检验标准为 α=0.05, R²X 和 Q² 为所建立的模型的质量评价指标。通过 Pearson 相关系数显著性差异检测的 r 与 R 的临界值, 确定相关系数的绝对值 |r| > 0.349 所代表的代谢物是统计学上有显著性差异 (P<0.05) 的代谢物临界值。

2 结果

2.1 CIN 患者和健康人血浆代谢物组差异分析

CIN 患者和健康人血浆代谢物两组研究对象血清典型的 NMR 谱见图 1, 其中图 1(a) 和图 1(b) 分别是健康人和 CIN 患者。对 ¹H-NMR 谱分段积分以后的积分值进行 OPLS-DA 分析, 得到相应血清标本的 OPLS-DA 得分图, 结果见图 2。从图 2 中可以直观地给出各血清标本在空间上的位置, 其中每一个点代表一个标本, 可以看到两组的分布区域明显不同, 表明两组血浆代谢成分有显著的差异, 其 R²X 和 Q² 值分别为 0.434 和 0.569, 说明分析结果可信度比较高。根据以上信息进一步利用 NMR 二维谱确认两组调查对象血清差异性代谢成分 (表 1)。表 1 显示与健康人比较, CIN 患者血清中代谢物组的改变情况。

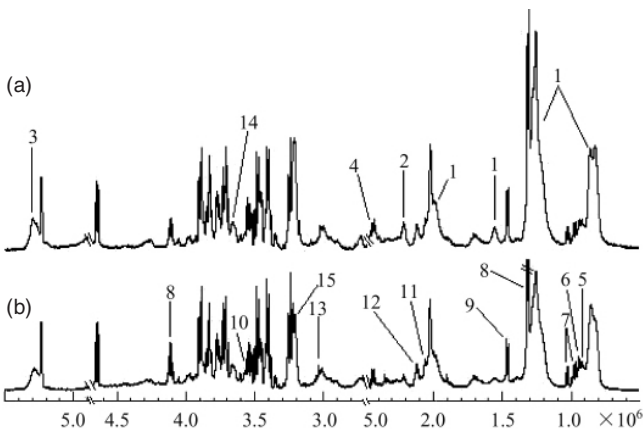


图 1 CIN 患者(a)与健康人(b)血浆的典型
599.95MHz ¹H-NMR 谱

Fig. 1 Typical 599.95 MHz ¹H-NMR spectra of plasma obtained from a patient with CIN (a) and a healthy control (b)

注：对应的代谢物为：1—极低密度脂蛋白；2—丙酮；3—不饱和脂类；4—肉碱；5—异亮氨酸；6—亮氨酸；7—缬氨酸；8—乳酸；9—丙氨酸；10—甘氨酸；11—乙酰半胱氨酸；12—谷氨酰胺；13—肌酸；14—肌醇；15—胆碱。

Notes: 1—VLDL; 2—acetone; 3—unsaturated lipid; 4—carnitine; 5—Isoleucine; 6—Leucine; 7—valine; 8—lactate; 9—alanine 10—glycine; 11—acetylcysteine; 13—creatine; 14—inositei; 15—choline.

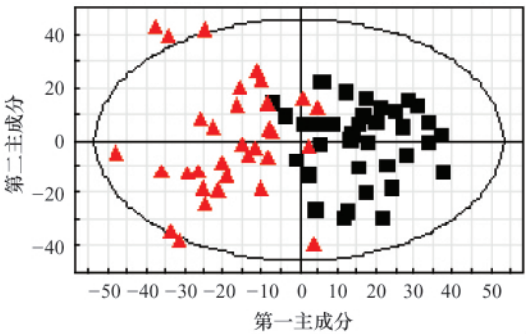


图 2 健康人与 CIN 患者血浆 OPLS-DA 分析得分图
Fig. 2 OPLS-DA score plots for plasma from patients
with CIN and health controls

注：■为健康者；▲为 CIN 患者。CIN 和健康人两组的分布区域明显分开，仅有 3 例 CIN 患者在健康人分布区域，3 名健康人在 CIN 患者分布区域。

Notes: ■, healthy donors; ▲, patients with CIN. Scores plot shows that the data of CIN and health controls scattering into two different regions.

2.2 基于 ¹H-NMR 代谢组学技术与细胞 TCT 检查诊断灵敏度比较

由 OPLS-DA 得分图(图 2)可以看出,CIN 患者和健康人血浆代谢物分布在两个不同区域,其中 3 例 CIN 患者的血浆

表 1 对照组与病例组血浆主要差异性代谢物及其相关系数

Table 1 Differential metabolites of CIN patients and health controls and their correlation coefficients

代谢物	化学位移(×10 ⁻⁶)	归属	相关系数 <i>r</i>
极低密度脂蛋白	0.86(m), 0.88(m), 1.26(m), 1.27(m), 1.57(m), 2.00(m)	CH ₃ (CH ₂) _n , CH ₃ CH ₂ CH ₂ C=CH ₃ CH ₂ (CH ₂) _n , CH ₂ , CH ₂ CH ₂ CO, CH ₂ C=C	-0.47
丙酮	2.22(s)	CH ₃	-0.45
不饱和脂类	5.26(m), 5.28(m), 5.30(m), 5.32(m)	CHCH ₂ CH=, =CHCH ₂ CH ₂ =, =CHCH ₂ CH ₂ =, =CHCH ₂ CH ₂ =	-0.46
肉碱	2.46(dd)	CH ₂ (COO)	-0.44
异亮氨酸	0.93(t), 1.00(d)	δ-CH ₃ , β-CH ₃	0.79
亮氨酸	0.95(d), 0.97(d)	δ-CH ₃ , δ-CH ₃	0.74
缬氨酸	0.98(d), 1.04(d)	CH ₃ , CH ₃ , β-CH ₂	0.58
乳酸	1.33(d), 4.11(q)	CH ₃ , CH	0.83
丙氨酸	1.47(d), 3.76(q)	CH ₃ , α-CH	0.52
甘氨酸	3.55(s)	CH ₂	0.57
乙酰半胱氨酸	2.07(s)	CH ₂	0.77
谷氨酰胺	2.10(m), 2.13(m)	Half β-CH ₂ Half β-CH ₂	0.80
肌酸	3.03(s), 3.92(s)	CH ₂	0.80
肌醇	3.65(dd) H ₄ /H ₆	OCH ₂	0.55
1-甲基组氨酸	7.06(s)	H ₄	0.41
胆碱	3.21(s)	N(CH ₃)	0.35

注：s—单峰；d—双重峰；t—三重峰；q—四重峰；m—多重峰；dd—双重双重峰；ddd—双重双重双重峰。差异性代谢物中相关系数为正值代谢物是在 CIN 患者血浆中降低的代谢物，相关系数为负值的代谢物是在 CIN 患者血浆中增加的代谢物。

Notes: s—singlet; d—doublet; t—triplet; q—quartet; m—multiple; dd—doublet of doublets; ddd—doublet of doublets doublet. Correlation coefficient with a positive or negative value representing a relatively lower or higher concentration of a given metabolite (positive increase in metabolite levels; negative decrease in metabolite levels).

- metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabolomics[J]. *Anal Biochem*, 2006, 352: 274-280.
- [7] Hu C, van der Heijden R, Wang M, *et al.* Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery [J]. *Journal of Chromatography B*, 2009, 26(15): 2836-2846.
- [8] Semenova N A, Dederer L, Gorbacheva L B, *et al.* The use of ¹H NMR spectroscopy for the prognosis of overall survival of breast cancer patients [J]. *Vopr Onkol*, 2005, 51: 581-582.
- [9] Brindle J T, Antti H, Holmes E, *et al.* Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics[J]. *Nat Med*, 2002(8): 1439-1444.
- [10] Suna T, Salminen A, Soininen P, *et al.* ¹H NMR metabolomics of plasma lipoprote in subclasses: Elucidation of metabolic clustering by self-organising maps[J]. *NMR Biomed*, 2007, 20(7): 658-672.
- [11] Sitter B, Bathen T, Hagen B, *et al.* Cervical cancer tissue characterized by high-resolution magicangle spinning MR spectroscopy [J]. *MAGMA*, 2004, 16: 174-181.
- [12] Fossel E T, Carr J M, Mc Donagh J. Detection of malignant tumors water-suppressed proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma[J]. *N Engl J Med*, 1986, 315(22): 1369-1376.

- [13] Leray G, Quemener V, Le Rumeur E, *et al.* Proton NMR spectroscopy of plasma lipoproteins in the experiment alLew is lung carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 1992, 12(4): 1227-1231.
- [14] 周爱儒, 查锡良. 生物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004. Zhou Airu, Zha Xiliang. *Biology* [M]. Beijing: People Health Publishing House, 2004.
- [15] Roberts L D, McCombie G, Titman C M, *et al.* A matter of fat: An introduction to lipidomic profiling methods (Review)[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(2): 174-181.
- [16] 阿仙姑·哈斯木, 马红, 伊力亚尔·夏合丁, 等. 新疆不同民族食管癌血浆代谢组学差异分析[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(7): 591-596. Hasim Ayshangul, Ma Hong, Sheyhidin Ilyar, *et al.* *Chin J Prev Med*, 2009, 43(7): 591-596.
- [17] Beckonert O, Monnerjahn J, Bonk U, *et al.* Visualizing metabolic changes in breast-cancer tissue using ¹H-NMR spectroscopy and self-organizing maps[J]. *NMR Biomed*, 2003, 16: 1-11.
- [18] Kunle O, Robert M, Christine B, *et al.* Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabolomics[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113: 782-788.

(责任编辑 李慧政)

·学术动态·



第十二届中国科协年会 第十一分会场 “全球气候变化与气象水文 海洋观测研讨会”征稿

由中国科学技术协会主办、中国仪器仪表学会承办的第十二届中国科协年会第十一分会场“全球气候变化与气象水文海洋观测研讨会”将于2010年11月1—3日在福州市召开。

本届会议主题:全球气候变化与气象水文海洋观测。

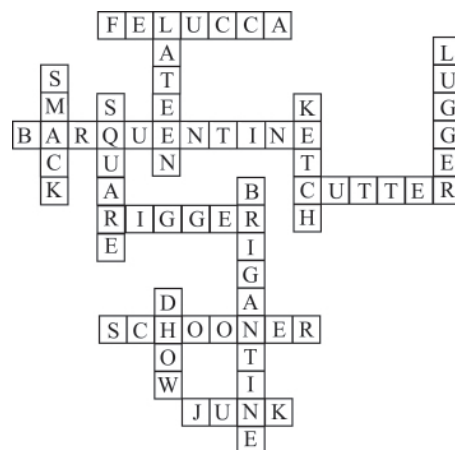
征文内容包括:①气候变化与新型气象水文海洋仪器与观测方法的研究;②气候变化与气象水文海洋仪器的新理论和新理论的研究;③新技术在气象水文海洋仪器的观测、通讯等方面的运用;④新型气象水文海洋仪器的监测网络系统;⑤气象水文海洋仪器的标准、规范和计量检定技术;⑥气象水文海洋仪器实验技术和技术札记等有关文章。

会议网站: http://www.cis.org.cn/templates/news_list_cn/details.aspx?nodeid=15&contentid=1123。

征文截止时间:2010年8月1日。

联系方式:北京市海淀区中关村南大街46号中国气象局气象探测中心(100081)边泽强;电话:010-68406866,电子邮箱:bianzq@cma.gov.cn。

本期填词游戏答案



本期九宫填数答案

九宫 难度系数 ◆◆◆◆◆

4	5	8	6	9	1	2	7	3
9	7	3	8	5	2	4	1	6
2	1	6	3	7	4	9	8	5
5	2	1	9	8	7	6	3	4
7	6	4	2	1	3	5	9	8
8	3	9	5	4	6	1	2	7
6	9	2	7	3	5	8	4	1
3	4	5	1	2	8	7	6	9
1	8	7	4	6	9	3	5	2
2	8	3	7	9	1	4	6	5
6	9	4	3	2	5	1	8	7
1	7	5	4	6	8	9	2	3
4	2	7	8	1	9	5	3	6
9	1	6	5	3	7	2	4	8
5	3	8	6	4	2	7	9	1