

〔文章编号〕 1007-0893(2021)05-0001-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.05.001

结核性胸腔积液和恶性胸腔积液代谢组学的比较分析

冶学燕^{1,2} 仝雪薇^{1,2} 刘春燕¹ 张新^{1*}

(1. 石河子大学医学院第二附属医院 新疆生产建设兵团医院, 新疆 乌鲁木齐 830002; 2. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000)

〔摘要〕 **目的:** 应用非靶向超高效液相色谱-质谱联用 (UHPLC-MS) 技术分析结核性胸腔积液 (TPE) 和恶性胸腔积液 (MPE) 代谢组学的变化特征, 筛选出两者间鉴别诊断的潜在代谢标志物。 **方法:** 收集 2019 年 10 月至 2020 年 8 月于新疆生产建设兵团医院住院的胸腔积液患者 15 例, 其中 TPE 组 8 例, MPE 组 7 例。应用非靶向 UHPLC-MS 技术对两组胸腔积液样本进行正、负离子两种模式的代谢组学分析, 并进行受试者操作特征曲线 (ROC) 分析。 **结果:** TPE 组与 MPE 组比较, 筛选出 17 种差异代谢物, 其中脂质及类脂分子代谢物 11 种 (占 64.7%), 有机杂环化合物 2 种 (占 11.7%), 苯类化合物、有机含氧化合物、有机酸及其衍生物和未鉴定物质均为 1 种 (各占 5.9%)。在 11 种脂质及类脂分子差异代谢物中, TPE 组中有 5 种上调, 其中亚油酸甲酯和替普瑞酮上调倍数高达 62.25 倍和 19.35 倍; MPE 组中有 6 种上调, 上调倍数最高为 2.5 倍。1-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、替普瑞酮、亚油酸甲酯和 1-十七烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱这 4 种代谢物诊断 TPE 的曲线下面积 (AUC) 均大于 0.8。 **结论:** 1-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、替普瑞酮、亚油酸甲酯和 1-十七烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱在 TPE 组中上调, 并初步显示对 TPE 具有较好的诊断效能, 提示这类代谢物有望成为 TPE 和 MPE 鉴别诊断的潜在标志物。

〔关键词〕 结核性胸腔积液; 恶性胸腔积液; 超高效液相色谱-质谱联用技术; 代谢组学

〔中图分类号〕 R 521.7 〔文献标识码〕 A

Comparative Analysis of Metabonomics between Tuberculous Pleural Effusion and Malignant Pleural Effusion

YE Xue-yan^{1,2}, TONG Xue-wei^{1,2}, LIU Chun-yan¹, ZHANG Xin^{1*}

(1. The Second Affiliated Hospital of Shihezi University School of Medicine/Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Xinjiang Urumqi 830002; 2. Shihezi University School of Medicine, Xinjiang Shihezi 832000)

〔Abstract〕 **Objective** To analyze the metabolic characteristics of tuberculous pleural effusion (TPE) and malignant pleural effusion (MPE) by non-targeted ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS), and to screen out potential metabolic markers for differential diagnosis between them. **Methods** Fifteen patients with pleural effusion in Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps from October 2019 to August 2020 were collected, including TPE group ($n = 8$) and MPE group ($n = 7$). Non-targeted UHPLC-MS technique was used to analyze the metabonomics of two groups of pleural effusion samples in both positive and negative ion modes, and the receiver operating characteristic curve (ROC) analysis was carried out. **Results** TPE group compared with MPE group, 17 kinds of differential metabolites were screened, including 11 kinds of lipids and lipid-like molecules metabolites (64.7%), 2 kinds of organoheterocyclic compounds (11.7%), 1 kind of benzenoids, organic oxygen compounds, organic acids and derivatives and undefined substances (5.9% each). Among the 11 Lipids and lipid-like molecules differential metabolites, 5 were up-regulated in TPE group, in which linoleic acid methyl ester and teprenone were up-regulated by 62.25 and 19.35 times, and 6 were up-regulated in MPE group, with the highest up-regulation of 2.5 times. The area under curve (AUC) of 1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, teprenone, linoleic acid methyl ester and 1-heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine was more than 0.8. **Conclusion** 1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, teprenone, linoleic acid methyl ester and 1-heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine are up-regulated in TPE group, and preliminarily show good diagnostic efficacy

〔收稿日期〕 2020-12-18

〔基金项目〕 国家临床重点专科建设项目资助课题 (兵卫发 [2011]24 号); 新疆生产建设兵团临床重点专科建设项目资助课题 (兵卫发电 [2013]24 号); 兵团科技攻关项目资助课题 (2018AB024); 新疆生产建设兵团医院院级科技计划项目资助课题 (2018010)

〔作者简介〕 冶学燕, 女, 在读医学硕士, 研究方向为结核性胸腔积液潜在生物标志物的研究。

〔*通信作者〕 张新 (E-mail: xjzhangxin108@126.com)

in TPE, suggesting that these metabolites are expected to be potential markers for differential diagnosis of TPE and MPE.

(Key Words) Tuberculous pleural effusion; Malignant pleural effusion; UHPLC-MS; Metabonomics

结核性胸腔积液 (tuberculous pleural effusion, TPE) 与恶性胸腔积液 (malignant pleural effusion, MPE) 在渗出性胸腔积液中较为常见, 两者之间的鉴别诊断一直是倍受关注的临床问题^[1]。目前, 临床上往往采用多种技术联合或多种诊断要素联合对渗出性胸腔积液的性质进行综合诊断, 但 TPE 和 MPE 之间的鉴别诊断依然比较困难^[2]。因此, 寻找新的、更为特异性的生物标志物用于 TPE 和 MPE 之间的鉴别诊断是研究的热点问题。

近年来, 代谢组学的新技术得到了快速发展, 通过代谢组学的研究方法能够探索生命体在不同生理病理状态下所产生的内源性代谢物变化规律, 为研究疾病的特异性代谢生物标志物提供了强大的技术支持^[3-4]。但是, 目前针对胸腔积液的代谢组学研究报道较少。本研究采用非靶向超高效液相色谱-质谱联用技术 (ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC-MS) 对 TPE 和 MPE 进行代谢组学的比较分析, 旨在发现用于两者之间鉴别诊断的潜在生物标志物。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2019 年 10 月至 2020 年 8 月于新疆生产建设兵团医院住院患者的胸腔积液样本 15 例, 其中 TPE 组 8 例 (男性 5 例, 女性 3 例), MPE 组 7 例 (男性 4 例, 女性 3 例)。TPE 病例诊断参照《肺结核诊断》(WS/T 288-2017)^[5], MPE 的诊断: 胸腔积液中找到恶性肿瘤细胞或胸膜活检组织病理学确诊为肺腺癌或鳞癌。排除标准: 合并有细菌感染等其他原因所致胸腔积液, 或合并糖尿病、甲状腺功能紊乱等其他基础代谢性疾病。本研究通过新疆生产建设兵团医院伦理委员会审批, 患者均知情同意本研究。

1.2 样本采集与制备

所有患者入院后, 在无菌条件下, 采用胸腔穿刺的方法收集患者胸腔积液 5~10 mL, 4 °C 下 2200 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取适量样本加入预冷甲醇/乙腈/水涡旋混合, 低温超声 30 min, -20 °C 静置 10 min, 4 °C 下 30200 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取 100 μL 上清液待进样分析。质量控制 (quality control, QC) 样本是从 15 份胸腔积液样本中各取相等体积混合得到, 制备方法与实验样本相同。本实验采用 3 个 QC 样本平衡柱条件, 在实验样本进样前、进样中和进样后间隔插入 QC 样本用于监测整个液-质系统的稳定性和重复性。

1.3 液相色谱-质谱检测

采用非靶向 UHPLC-MS (AB SCIEX, 美国) 进行样本一级、二级谱图的采集, 分离色谱柱为超高效液相色谱系统色谱柱 (ACQUITY UPLC BEH Amide, 1.7 μm; 2.1 mm

×100 mm, 美国)。样本置于 4 °C 自动进样器中, 采用随机顺序进行样本的连续分析^[6]。质谱采集正、负两种离子模式下谱图, 离子扫描时间为 0.20 s, 扫描时间间隔为 0.05 s, 质谱数据采集范围为 25~1000 质荷比 (mass-to-charge ratio, m/z)^[6]。

1.4 质谱数据分析

采用 XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积。处理后的数据采用 SIMCA 软件进行有监督的正交偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)。采用 OPLS 模型的变量重要性投影值 (variable importance in the projection, VIP) (> 1) 与 t 检验的 P 值 (< 0.05) 寻找差异表达代谢物。通过在线数据库 HMDB 对差异代谢物进行定性分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理。正态计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态计数资料以四分位数间距表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。对 TPE 中脂质及类脂分子代谢物校正质谱峰面积进行受试者操作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 分析, 计算代谢物在 TPE 诊断中的曲线下面积 (area under curve, AUC)。

2 结果

2.1 一般资料

在 TPE 组中胸水腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, ADA) 阳性者 6 例 (占 75.0%), 癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 均为阴性; 在 MPE 组中 CEA 阳性者 5 例 (占 71.4%), ADA 均为阴性, 两组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组患者的年龄、性别及体质量指数 (body mass index, BMI) 比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 两组患者的一般资料比较

组别	n	男: 女	年龄 / $M(P_{25}, P_{75})$, 岁	BMI/ $\bar{x} \pm s$, $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$	胸水 ADA	胸水 CEA
					阳性 /n (%)	阳性 /n (%)
TPE 组	8	5:3	57(56,87)	23.03 ± 3.03	6(75.0)	0(0.0)
MPE 组	7	4:3	67(62,84)	22.17 ± 3.08	0(0.0) ^a	5(71.4) ^a

与 TPE 组比较, ^a $P < 0.05$

注: TPE 一结核性胸腔积液; MPE 一恶性胸腔积液; BMI 一体质量指数; ADA 一腺苷脱氨酶; CEA 一癌胚抗原

2.2 系统质量控制

3 个 QC 样本在正、负离子模式下色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠, 整个实验过程中仪器误差引起的变异较小, 见封三图 1。

2.3 差异代谢产物的筛选

正、负离子模式下共获得 17 种显著差异代谢物，在 TPE 组中 5 种上调，12 种下调。在 17 种差异代谢物中，脂质及类脂分子代谢物 11 种（占 64.7%），有机杂环化合物 2 种（占 11.7%），苯类化合物、有机含氧化合物、有机酸及其衍生物和未鉴定物质均为 1 种（各占 5.9%），见封三图 2。

2.4 脂质及类脂分子差异代谢物分析

TPE 组中有 11 种脂质及类脂分子代谢物与 MPE 组比较显示存在差异，其中，5 种脂质及类脂分子代谢物在 TPE 组中上调，亚油酸甲酯和替普瑞酮在 TPE 中上调倍数最高，分别上调 62.25 倍和 19.35 倍，而在 MPE 组中下调；6 种脂质及类脂分子代谢物在 MPE 组中上调，上调倍数最高为 2.5 倍，而在 TPE 组中下调，见表 2。

表 2 正、负离子模式下 11 种脂质及类脂分子差异代谢物

中文名称 / 类	Name	m/z	VIP	FC	P	离子模式
亚油酸甲酯	Linoleic acid methyl ester	295.26	1.454	62.25	0.034	正
替普瑞酮	Teprenone	313.27	2.167	19.35	0.033	正
7.α-羟基-3-氧基-4-胆固醇酸	7.alpha.-hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid	431.31	1.795	2.30	0.029	正
1-十七烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	1-heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	510.35	1.142	2.05	0.037	正
1-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	522.35	2.693	1.42	0.033	正
β-隐黄素	beta.-cryptoxanthin	552.43	1.681	0.40	0.009	正
亚麻酸	Linolenic acid	277.22	3.292	0.36	0.015	负
甘油磷脂类	(2-aminoethoxy)[2-[docosa-4.7.10.13.16.19-hexaenoyloxy]-3-[hexadec-1-en-1-yloxy]propoxy]phosphinic acid	746.51	1.696	0.42	0.011	负
维生素 E	alpha-Tocopherol (Vitamin E)	429.37	1.491	0.48	0.013	负
亚油酸	Linoleic acid	279.23	15.844	0.50	0.024	负
甘油磷脂类	Pc(16:1e/9-hode)	816.57	4.151	0.69	0.039	负

注：m/z — 质荷比；VIP — 变量重要性投影值；FC — 差异表达倍数。FC > 1 — TPE 组中上调的代谢物，FC < 1 — MPE 组中上调的代谢物

2.5 脂质及类脂分子差异代谢物 ROC 曲线分析

1-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、替普瑞酮、亚油酸甲酯和 1-十七烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱这 4 种代谢物诊断 TPE 的 AUC 均大于 0.8，见图 3、表 3。

表 3 4 种脂质及类脂分子差异代谢物 ROC 曲线面积

脂质及类脂分子差异代谢物	AUC	P
1-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	0.821	0.037
替普瑞酮	0.911	0.008
亚油酸甲酯	0.875	0.015
1-十七烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	0.821	0.037

注：ROC — 受试者操作特征曲线；AUC — 曲线下面积

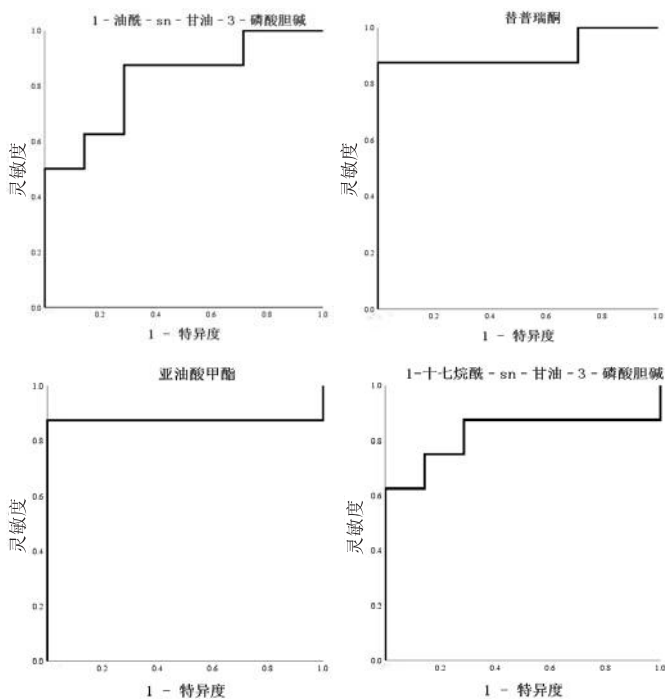


图 3 4 种脂质及类脂分子差异代谢物 ROC 曲线

3 讨论

代谢组学相关研究已经涉及各个领域，其分析技术也在不断升级并逐步完善^[7]。非靶向分析是最经典、应用最广泛的代谢组学分析方法，通过对样本中所有化合物进行综合、全面、无偏性的高覆盖检测，可实现不同样品间代谢特征的比较^[8]。分辨率对于非靶向分析至关重要，结合高扫描速度和高质量精确度的要求，UHPLC-MS 联用技术日渐成熟，并得到了较广泛的应用。刘倩倩等人^[9]采用非靶向超高效液相色谱-四重飞行时间质谱（ultra-high performance liquid chromatography-Q ToF/mass spectrometry, UHPLC-QTOF/MS）技术对严重阻塞性冠心病患者血样的代谢组学进行分析，发现了 6 种代谢物与严重阻塞性冠心病具有强相关性。赵贺如^[10]采用该技术鉴定出 16 种代谢物可作为原发性高血压的潜在生物学标志物。代谢组学的研究样本已经涉及到血液、尿液、痰液及组织样本等，但对胸腔积液的代谢组学研究报道较少。

本研究采用非靶向UHPLC-MS技术对8例TPE和7例MPE的代谢组学进行了比较,筛选出17种显著差异的代谢物,其中脂质及类脂分子代谢物为11种(占64.7%),且在TPE组中发生显著改变,而其他类差异代谢物的占比很小。研究表明,结核分枝杆菌细胞壁中存在的复杂脂质可与宿主主动相互作用,调节宿主代谢并刺激宿主机体的免疫应答^[11]。本研究显示,亚油酸甲酯和替普瑞酮在TPE组中上调倍数最高,分别达到62.25倍和19.35倍,可能与结核分支杆菌感染需要足够的营养供应有关,导致TPE中各种脂质相关代谢物的浓度发生改变,与Luo P等人的研究结果一致^[12]。此外,有6种脂质类代谢物浓度在MPE组中上调,但上调倍数不高,最高为2.5倍,可能与恶性肿瘤为消耗性疾病有关,导致患者体内脂质含量改变,但具体机制有待进一步研究。

脂质及类脂分子差异代谢物ROC曲线结果显示:1-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-十七烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、替普瑞酮及亚油酸甲酯这4种代谢物诊断TPE的效能较佳。上述4种筛选出的代谢物属于甘油磷脂类、醇脂类及脂肪酰基类脂质代谢产物,已有代谢组学相关研究显示,甘油磷脂类、醇脂类及脂肪酰基类脂质代谢物在结核病与其他疾病鉴别及结核分枝杆菌耐药性鉴定等方面存在差异^[13-14],本研究显示上述4种代谢物在TPE中上调,并初步显示对TPE具有较好的诊断效能。但是,需要进一步对其在TPE中的诊断价值进行验证。

本研究采用UHPLC-MS技术对TPE及MPE进行了非靶向代谢组学的比较研究,1-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1-十七烷酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱、替普瑞酮及亚油酸甲酯在TPE组中显著改变,提示这类代谢物有望成为TPE与MPE间鉴别诊断的潜在标志物,但仍需要通过靶向代谢组学加以验证。

[参考文献]

- (1) 解春林,黄韬,卜俊晖,等.胸水标志物在诊断恶性与结核性胸水中的研究进展(J).实用医学杂志,2019,35(6):173-175.
- (2) 陈效友.重视结核性胸膜炎的综合诊断(J).中国防痨杂志,2020,42(11):1137-1141.

- (3) 徐天润,刘心昱,许国旺.基于液相色谱-质谱联用技术的代谢组学分析方法研究进展(J).分析测试学报,2020,39(1):10-18.
- (4) 李鳌.代谢组学应用与研究进展(J).医学研究杂志,2020,49(1):168-171.
- (5) 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.肺结核诊断标准(WS 288-2017)(J).新发传染病电子杂志,2018,3(1):59-61.
- (6) Aredo JV, Purington N, Su L, et al. Metabolomic profiling for second primary lung cancer: A pilot case-control study (J). Lung Cancer, 2021, 155(1): 61-67.
- (7) Cui L, Lu HT, Lee YH. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases (J). Mass Spectrom Rev, 2018, 37(6): 772-792.
- (8) Gika H, Virgiliou C, Theodoridis G, et al. Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art (J). J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1117(6): 136-147.
- (9) 刘倩倩,王春玥,宋晨曦,等.基于超高效液相色谱-飞行时间质谱联用的冠心病非靶向代谢组学分析及代谢标记物的探索(J).中国循环杂志,2019,34(8):752-756.
- (10) 赵贺如.基于UHPLC/Q-TOF-MS探讨原发性高血压并发高尿酸血症的血清代谢标志物研究(D).宜春:宜春学院,2019.
- (11) Gago G, Diacovich L, Gramajo H, et al. Lipid metabolism and its implication in mycobacteria-host interaction (J). Curr Opin Microbiol, 2018, 41(2): 36-42.
- (12) Luo P, Mao KM, Xu JJ, et al. Metabolic characteristics of large and small extracellular vesicles from pleural effusion reveal biomarker candidates for the diagnosis of tuberculosis and malignancy (J). J Extracell Vesicles, 2020, 9(1): 179-183.
- (13) López HY, Lara RE, Salgado BM, et al. Glycerophospholipid Metabolism Alterations in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Tuberculosis Comorbidity (J). Arch Med Res, 2019, 50(2): 71-78.
- (14) Pal R, Hameed S, Kumar P, et al. Mycobacterium tuberculosis Comparative lipidomics of drug sensitive and resistant reveals altered lipid imprints (J). 3 Biotech, 2017, 7(5): 325-329.