

## 血浆代谢组学研究用于肝移植功能变化的评估

张 琪<sup>1</sup>, 高 静<sup>2</sup>, 李 伶<sup>1</sup>, 陈合兵<sup>1</sup>, 李昕权<sup>2</sup>, 颜贤忠<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国家生物医学分析中心, 北京 100850    <sup>2</sup>武警总医院血液科, 北京 100039

通信作者: 颜贤忠 电话: 010-66930305, 传真: 010-68186281, 电子邮件: yanxz@proteomics.cn;

李昕权 电话: 010-88276562, 电子邮件: lixinquan@yahoo.com

**摘要:** **目的** 探讨基于核磁共振波谱技术的代谢组学方法在肝移植患者围手术期肝功能评价中的应用。**方法** 肝移植患者 15 例, 分别于术前 1 d、术后 1 d 及 1 周, 空腹收集其血液, 对丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、白蛋白、总胆红素、葡萄糖、甘油三酯、胆固醇以及乳酸等血浆生化指标进行检查, 同时测定其核磁共振氢谱, 进行代谢组学分析。**结果** 代谢组学分析显示, 与术前相比, 术后 1 d 患者血浆中的血糖和乳酸水平显著升高, 缬氨酸、丙氨酸、丙酮、琥珀酸、谷氨酰胺、胆碱含量亦显著升高; 至术后 1 周, 血脂和胆碱水平显著升高, 血糖和氨基酸类代谢物含量显著降低。主成分分析显示, 肝移植围手术期各时段血样的代谢谱图之间差异显著, 并能够互相区分开来。造成组间差异的主要影响因素是血糖、血脂、胆碱、乳酸等物质含量的变化。其中血糖、血脂 (包括甘油三酯和胆固醇) 以及乳酸的变化规律与临床检测血浆生化的改变一致, 但血液中胆碱的含量随着治疗进程出现显著的变化。**结论** 代谢组学分析方法能较清晰地反映肝移植患者围手术期各时间段血浆样本间的代谢差异和变化, 作为一种辅助手段, 其在肝移植患者术后诊断中可能有良好的研究和应用前景。

**关键词:** 肝脏移植; 代谢组学; 核磁共振; 模式识别

**中图分类号:** R657.3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-503X(2007)06-0725-05

## Metabonomic Study of Blood Plasma in the Assessment of Liver Graft Function

ZHANG Qi<sup>1</sup>, GAO Jing<sup>2</sup>, LI Ling<sup>1</sup>, CHEN He-bing<sup>1</sup>, LI Xin-quan<sup>2</sup>, YAN Xian-zhong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China

<sup>2</sup>Department of Hematology, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039, China

Corresponding author: YAN Xian-zhong Tel: 010-66930305, Fax: 010-68186281, E-mail: yanxz@proteomics.cn;

LI Xin-quan Tel: 010-88276562, E-mail: lixinquan@yahoo.com

**ABSTRACT: Objective** To access the capability of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabonomics in the evaluation of graft function in the perioperation period of liver transplantation. **Methods** Plasma samples of 15 male primary hepatic carcinoma patients were collected for clinical biochemical analysis and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy 1 day before operation, 1 day and 1 week after the operation. The NMR data were analyzed using principal component analysis. **Results** Metabonomic analysis indicated that, compared with those before operation, blood concentrations of valine, alanine, acetone, succinic acid, glutamine, choline, lactate, and glucose increased significantly 1 day after transplantation. One week later, the levels of lipids and choline increased notably, while those of glucose and amino acids decreased. Principal component analysis showed significant difference between metabolic profiles of plasma samples of variant periods of liver transplantation, due to the variation of the levels of glucose, lipids, lactate, and choline. A good agreement was observed between clinical chemistry and

metabonomic data. **Conclusions** Metabonomic analysis can clearly identify the difference between the plasma samples of primary hepatic carcinoma patients at different time during the perioperation period of liver transplantation. It therefore may be a promising new technology in predicting the outcomes of liver transplantation.

**Key words** : liver transplantation ; metabonomic ; nuclear magnetic resonance ; pattern recognition

*Acta Acad Med Sin* , 2007 29( 6 ) : 725 - 729

肝移植作为一种治疗肝癌效果明显的临床手段日渐得到广泛的应用。但由于可能残留微小肿瘤病灶或发生病灶转移以及移植后发生免疫排斥, 从而影响到治疗效果和预后, 因此对肝移植患者进行密切观察尤为重要<sup>[1]</sup>。目前临床上对肝移植患者的病情监测以及术后诊断, 主要依靠影像学和传统的体液生化分析。而代谢组学方法主要通过测定生物体液中内源性小分子代谢产物的指纹图谱, 经过多元统计分析确定代谢物成分受到病理生理刺激后的变化模式, 从而反映出细胞或脏器的功能异常及其随时间的变化过程<sup>[2]</sup>。代谢组学因其能较全面的对样本中各类代谢物种类及含量的变化进行动态监测, 已开始探索其在器官移植领域的应用<sup>[3-6]</sup>。亦有报道将代谢组学手段用于肝脏疾病的研究<sup>[7-9]</sup>。本研究应用基于核磁共振 ( nuclear magnetic resonance, NMR ) 的代谢组学方法, 观察患者在肝移植术后血液中代谢物随时间的变化, 探讨正常人与患者血液代谢谱的差异。

## 对象和方法

**对象** 选取武警总医院男性异体原位肝移植患者 15 例, 年龄 37 ~ 59 岁, 中位年龄 48 岁, 均为肝炎后肝硬化合并原发性肝癌, 均无高血压、糖尿病及冠心病等疾病。对所有患者在术前 1 d、术后 1 d 及 1 周, 清晨空腹抽取 2 ml 静脉血, 乙二胺四乙酸二钾盐 ( EDTA-K<sub>2</sub> ) 抗凝。

**血液生化分析** 2 ml EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血液, 室温下以离心力 3 000 × g 离心 15 min, EP 管收集上层 1 ml 血浆, 置入 Olympus 1 000 全自动生化分析仪 ( 日本 Olympus 公司生产 ), 测定丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、血清白蛋白、血糖、总胆红素、乳酸、胆固醇及甘油三酯。英国 RAN-DOX 定值质控血清进行质量控制。

**代谢组学分析样本处理** 2 ml EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血液, 室温下以离心力 3 000 × g 离心 15 min, EP 管收集上层 1 ml 血浆, 按 300 μl 血浆加入 50 μl 重水、100 μl 的 1% 的氘代 3-甲基硅烷基丙酸钠 ( TSP ) 水溶液

( 用于化学位移定标 )、150 μl 蒸馏水的配比, 配成待测溶液。然后 13 000 × g 离心 15 min, 取上清。取 500 μl 上清样品转入 5 mm 样品管中进行测试。

**NMR 数据采集与分析** 数据在 UNITY INOVA 600 型超导脉冲傅里叶变换 NMR 谱仪 ( 美国瓦里安公司生产 ) 上采集。采用 CPMG ( Carr-Purcell-Mainboom-Gill ) 自旋回波脉冲序列 ( 弛豫时间编辑实验, 以观测血液中小分子物质信号为主 ), 分别取如下参数: 谱宽 8 000 Hz、弛豫延迟时间 2 s、总自旋回波时间 0.32 s、采样点数 64 K、累加次数 64 次, 在弛豫延迟期间采用预饱和方式抑制水峰, 谱仪偏置设置在水峰的位置。

所有自由感应衰减信号经过傅里叶变换 ( Fourier transform, FT ) 转换为 NMR 图谱, 线增宽因子为 0.5 Hz。利用瓦里安公司提供的 VNMR 软件的宏指令将同一组样本的 1D NMR 数据变成数组型的 1D 数据 ( arrayed 1D ), 然后进行 FT 相位校正、基线校正。化学位移用 δ 表示。将 δ 0.4 ~ 4.6 范围内的谱图按每段 0.04 ppm 的宽度进行分段并积分, 将所产生的所有积分数据按每一张谱的积分总强度归一化, 并以文本文件格式输出保存。

**统计学处理** 血液生化分析所有数据均采用 SAS 1.0 软件包处理, 组间比较采用单因素方差分析及 Bonferroni 多重配对 *t* 检验, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。 *P* < 0.05 表示差异具有显著性。代谢组学分析数据采用多元统计分析软件 SIMCA-P10.0 + ( 瑞典, Umetrics AB, Umea ), 采用主成分分析方法 ( principal component analysis, PCA ) 对数据进行分析处理。PCA 分析前先对数据进行平均中心化 ( mean centering ) 处理和 Pareto 标度 ( Pareto scaling ) 处理。为了消除其他非实验因素的影响, 本研究对数据进行了正交信号校正处理 ( orthogonal signal correction, OSC )。之后采用偏最小二乘法 ( partial least square, PLS ) 进行分析。分析结果以前两个主成分 ( principal component, PC ) [ 1 ]/[ 2 ] 进行作图 ( 即得分图, scores plot ), 显示样本间因代谢差异导致的分布和差异状况, 与之相应的载荷图 ( loading plot ) 显示导致这些

差异的主要代谢物。

## 结 果

临床生化分析结果 术后 1 d 肝移植患者的丙氨

酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、血糖及乳酸较术前分别升高了 287.7%、254.9%、41.0%、58.1%，而碱性磷酸酶、甘油三酯和胆固醇分别下降了 187.23%、28.57% 和 36.31%。术后 1 周，上述各指标大部分逐渐恢复正常（表 1）。

表 1 肝移植患者不同时期的血液生化指标检测结果

Table 1 Clinical biochemical indicators of liver transplant recipients during perioperation period (n = 15)

项目 Item	术前 1 d 1 day before operation	术后 1 d 1 day after operation	术后 1 周 1 week after operation
ALT ( IU/L )	163.0 ± 44.0	632.0 ± 460.0	195.0 ± 81.0
AST ( IU/L )	177.1 ± 56.9	628.0 ± 455.0	73.0 ± 22.0
ALP ( IU/L )	135.0 ± 10.0	47.0 ± 34.2	80.0 ± 47.2
ALB ( g/L )	28.6 ± 5.1	41.0 ± 4.2*	40.2 ± 4.3*
TBIL ( μmol/L )	89.2 ± 27.0	91.0 ± 63.6	115.0 ± 69.2
Glu ( mmol/L )	7.16 ± 4.30	10.0 ± 3.80	8.42 ± 4.20
TG ( mmol/L )	0.84 ± 0.23	0.60 ± 0.41	1.37 ± 0.86
CH ( mmol/L )	2.12 ± 0.23	1.35 ± 0.55	2.78 ± 0.61
LAC ( mmol/L )	2.9 ± 0.9	4.6 ± 2.3	2.1 ± 0.5

ALT：丙氨酸氨基转移酶；AST：天冬氨酸氨基转移酶；ALP：碱性磷酸酶；ALB：白蛋白；TBIL：总胆红素；Glu：葡萄糖；TG：甘油三酯；CH：胆固醇；LAC：乳酸；与术前 1 d 相比，\*P < 0.05

ALT：alanine aminotransferase；AST：aspartate aminotransferase；ALP：alkaline phosphatase；ALB：albumin；TBIL：total bilirubin；Glu：glucose；TG：triglyceride；CH：cholesterol；LAC：lactate；\*P < 0.05 compared with 1 day before operation

**NMR 谱图及模式识别分析** 血浆的 NMR 谱图显示患者血样中的内源性代谢物谱在肝移植术后不同时间发生了显著变化，其中术后 1 d 的变化最大。乳酸 (δ1.33) 术后 1 d 时升至最高水平，其后随着

患者供体肝功能部分恢复而降低；血糖 (δ3.24 ~ δ3.93, 多组谱峰) 的含量在术后 1 d 升高；胆碱 (δ3.22)、N-乙酰糖蛋白 (δ2.04) 及一些氨基酸的谱峰强度均随时间而变化(图 1)。PCA 分析显示不

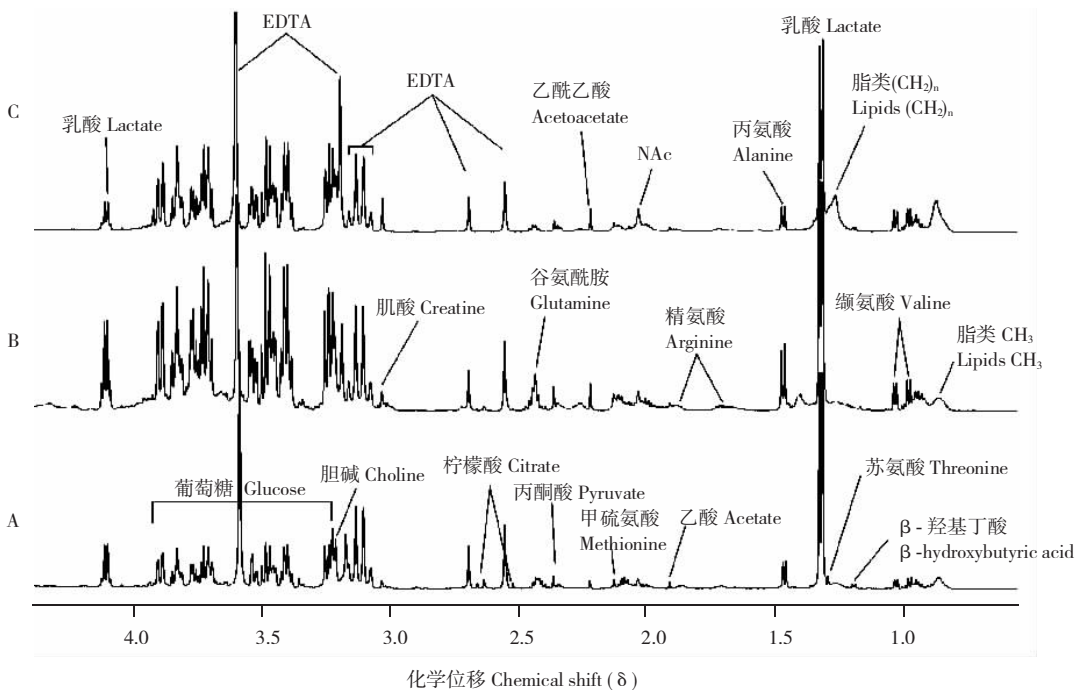


图 1 肝移植患者术前 1 d (A)、术后 1 d (B) 及术后 1 周 (C) 血样的核磁共振氢谱

Fig 1 Proton NMR spectra of a liver transplant recipient 1 day before operation (A), 1 day after operation (B), and 1 week after operation (C)

EDTA：乙二胺四乙酸；NAc：N-乙酰糖蛋白

EDTA：ethylenediamine tetraacetic acid；NAc：N-acetylglycoprotein

同时间点的样本可以在得分图中较好地区分开。术前与术后 1 d 的 PCA 得分图显示, 两组数据间的差异与两个主成分都相关 (图 2A)。与术前相比, 术后 1 d 的血样中乳酸 ( $\delta$  1.34、 $\delta$  4.10) 和葡萄糖含量显著上升, 乙酰乙酸 ( $\delta$  2.22) 也略有上升, 而胆碱 ( $\delta$  3.22)、脂蛋白 ( $\delta$  0.86、 $\delta$  1.22)、缬氨酸 ( $\delta$  0.98、 $\delta$  1.02)、甲硫氨酸 ( $\delta$  2.14)、N-乙酰糖

蛋白 ( $\delta$  2.06) 和谷氨酸 ( $\delta$  2.02、 $\delta$  2.10、 $\delta$  2.34) 减少 (图 2A)。术后 1 周的血样与术后 1 d 相比, 乳酸和葡萄糖的含量显著下降, 而脂蛋白、胆碱、N-乙酰糖蛋白和缬氨酸含量上升 (图 2B)。将术后 1 周的血样与术前的样本相比, 脂蛋白、胆碱、血糖和缬氨酸显著增加, 而乳酸、丙氨酸、谷氨酰胺和 N-乙酰糖蛋白下降 (图 2C)。

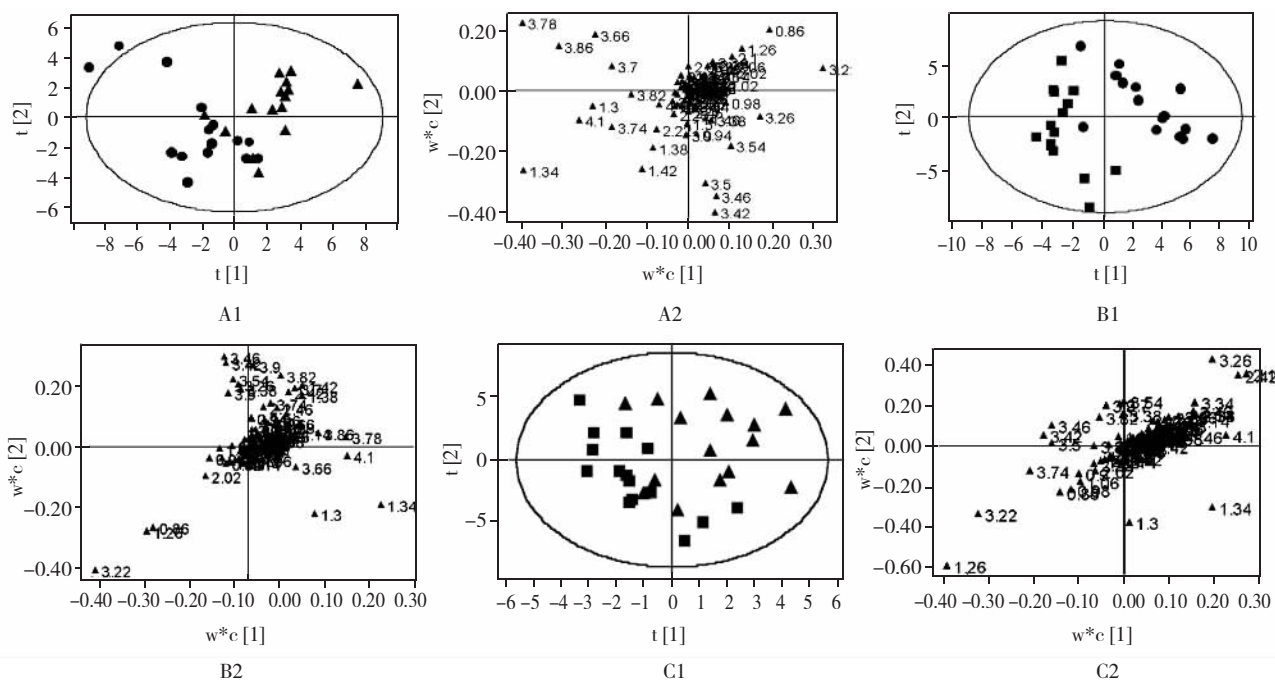


图 2 肝移植患者血样核磁共振氢谱的主成分分析结果

Fig 2 Principal component analysis results of proton NMR spectra of liver transplant recipients

A1. 术前与术后 1 天比较的得分图; A2. 术前与术后 1 天比较的载荷图; B1. 术后 1 天与术后 1 周比较的得分图; B2. 术后 1 天与术后 1 周比较的载荷图

▲、●、■分别为术前、术后 1 天及术后 1 周的样本; t[1]/t[2]分别代表第一和第二主成分; w\*c[1]/w\*c[2]代表与主成分相应的载荷; 得分图中的椭圆形表示 Hotelling  $T^2$  检验的 95% 置信区域

A1. scores plot of 1 day before operation vs. 1 day after operation; A2. loading plot of 1 day before operation vs. 1 day after operation; B1. scores plot of 1 day vs. 1 week after operation; B2. loading plot of 1 day vs. 1 week after operation; C1. scores plot of 1 day before operation vs. 1 week after operation; C2. loading plot of 1 day before operation vs. 1 week after operation

▲, ● and ■ represent samples collected 1 day before operation, 1 day after operation, and 1 week after operation, respectively; t[1] and t[2] represent the first and second principal components; w\*c[1] and w\*c[2] represent the loading corresponding to t[1] and t[2] respectively; The eclipse in the scores plot shows the 95% confidence area of Hotelling  $T^2$  test

## 讨 论

本研究利用常规血生化和核磁共振结合多元统计分析两种手段对 15 例肝移植手术患者手术前后血浆中代谢产物进行检测和分析, 结果表明两种手段对乳酸、血脂和葡萄糖的检测结果是—致的, 后者

还能提供常规生化不能检测的其他代谢物的数据, 其中一些对判断移植物的功能有着重要的作用。两种手段的检测结果都表明在术后 1 d 血浆乳酸和葡萄糖水平显著升高及血脂下降。这一变化表明术后 1 d 时, 患者经过长时间的移植手术, 由于新肝缺血造成的组织缺氧、肝组织低灌注以及血管缝合后肝组织的再灌注损伤, 使肝脏的乳酸代谢转化出现障碍

导致乳酸水平显著升高,此外手术造成患者机体出现应激反应,也可能使血液中乳酸水平升高,表明新肝脏的代谢功能尚未完全发挥。随着供体肝功能恢复,术后1d~1周,正常肝脏取代病肝后,血液循环恢复,新肝组织缺氧状况改善,其代谢功能逐渐发挥作用,因此乳酸含量显著下降。同时供体肝功能进一步好转,糖异生和糖酵解等代谢功能逐渐恢复正常,具体表现在血糖、乳酸含量显著下降,而且乳酸含量已经低于术前水平,表明新肝的功能好于术前的肝脏功能。谷氨酰胺的水平也低于术前及术后1d时的水平,表明肝脏功能趋于正常<sup>[6]</sup>。术后1d~1周,胆碱含量升高。胆碱在血液中主要以磷脂酰胆碱形式存在,磷脂酰胆碱在磷脂酶的作用下降解生成胆碱,进而生成乙酰胆碱,乙酰胆碱在胆碱酯酶的作用下水解生成乙酸和胆碱。健康人血液中的磷脂酰胆碱、乙酰胆碱、胆碱3种物质处于正常的动态平衡。而肝癌患者肝细胞受损,甚至变性坏死,间质炎症细胞浸润,纤维组织和结缔组织增生,导致肝脏合成表达磷脂酶和胆碱酯酶降低,胆碱酯类物质水解减少,进而血液中游离胆碱含量降低。此外,肿瘤细胞生长速度快,从而需要摄取更多的磷脂酰胆碱以供细胞膜的需要,有报道肿瘤组织中的磷脂酰胆碱含量会异常增高,进而促进肿瘤细胞的有丝分裂<sup>[10~12]</sup>,使血液中胆碱含量降低。当供体肝脏取代病肝后,肝细胞功能逐渐恢复,不再特异性摄取胆碱,且肝脏蛋白酶合成表达回升,因此术后1周时,血液中胆碱含量回升。

综上,与常规的临床生化检验和影像学检查相比,基于NMR技术的代谢组学分析能够更全面地反映生物体液的代谢变化,因此越来越多的研究者尝试将其应用于临床疾病诊断和预后<sup>[13,14]</sup>。同时,代谢组学分析通过定量描述代谢产物的变化,反映体内代谢过程的变化,对了解疾病的发生发展进程,以及临床诊断指标的选择可能会有帮助。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 周福庆,彭贵主. 肝癌肝移植的预后预测[ J ]. 实用临床医学,2007,8(2):136-138.
- [ 2 ] Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, *et al.* Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis[ J ]. *Biomarkers*,2004,9(1):1-31.
- [ 3 ] Wishart DS. Metabolomics : the principles and potential applications to transplantation[ J ]. *Am J Transplant*,2005,5(12):2814-2820.
- [ 4 ] Melendez HV, Rela M, Setchell KDR, *et al.* Bile acids analysis : a tool to assess graft function in human liver transplantation[ J ]. *Transpl Int*,2004,17(6):286-292.
- [ 5 ] Melendez HV, Ahmadi D, Parkes HG, *et al.* Proton nuclear magnetic resonance analysis of hepatic bile from donors and recipients in human liver transplantation[ J ]. *Transplantation*,2001,72(5):855-860.
- [ 6 ] Singh HK, Yachha SK, Saxena R, *et al.* A new dimension of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in assessment of liver graft dysfunction[ J ]. *NMR Biomed*,2003,16(4):185-188.
- [ 7 ] Yang J, Zhao X, Liu X, *et al.* High performance liquid chromatography-mass spectrometry for metabonomics : potential biomarkers for acute deterioration of liver function in chronic hepatitis B[ J ]. *J Proteome Res*,2006,5(3):554-561.
- [ 8 ] Yang J, Xu G, Zheng Y, *et al.* Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases[ J ]. *J Chromatogr B*,2004,813(1-2):59-65.
- [ 9 ] Yang J, Xu G, Hong Q, *et al.* Discrimination of type 2 diabetic patients from healthy controls by using metabonomics method based on their serum fatty acid profiles[ J ]. *J Chromatogr B*,2004,813(1-2):53-58.
- [ 10 ] Katz-Bruhl R, Seger D, Rivenson-Segal D, *et al.* Metabolic markers of breast cancer : enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis[ J ]. *Cancer Res*,2002,62(7):1966-1970.
- [ 11 ] Morvan D, Demidem A, Papon J, *et al.* Melanoma tumors acquire a new phospholipid metabolism phenotype under cyclophosphamide as revealed by high-resolution magic angle spinning proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of intact tumor samples[ J ]. *Cancer Res*,2002,62(6):1890-1897.
- [ 12 ] Herminghaus S, Pilatus U, Moller-Hartmann W, *et al.* Increased choline levels coincide with enhanced proliferative activity of human neuroepithelial brain tumors[ J ]. *NMR Biomed*,2002,15(6):385-392.
- [ 13 ] Holmes E, Nicholson JK, Tranter G. Metabonomic classification of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks[ J ]. *Chem Res Toxicol*,2001,14(2):182-191.
- [ 14 ] Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, *et al.* Chemometric models for toxicity based on NMR spectra of biofluids[ J ]. *Chem Res Toxicol*,2000,13(6):471-478.

(2007-06-19 收稿)