

网络出版时间: 2020-5-8 15:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.032.html>

## 胃癌患者唾液中筛选嘌呤代谢相关的诊断标志物

包楚阳<sup>1</sup>, 向丽娟<sup>1</sup>, 刘虎<sup>2</sup>, 汪圣毅<sup>3</sup>, 王亚雷<sup>4</sup>

**摘要** 采用描述性队列研究方式对 178 例胃癌与胃良性疾病患者的唾液样本进行嘌呤代谢分析。经过超高效液相色谱质谱分析后得出 167 个差异代谢物。使用学生 *t* 检验和正交偏最小二乘法分析筛选出黄嘌呤核苷、环鸟苷酸、尿酸以及脱氧核苷一磷酸 4 个诊断标志物。受试者工作曲线 (ROC) 用来评估诊断标志物的组间区分效果。用 Fisher 判别分析建立诊断函数模型, 并通过留一法交叉验证评估检验诊断模型的灵敏度和特异度, 分别为 83.1%、63.3%。唾液中的嘌呤代谢物筛选对于鉴别早期胃癌与胃炎以及筛查早期胃癌有巨大的价值。

**关键词** 胃癌; 嘌呤代谢; 癌症诊断; 唾液

**中图分类号** R 735.2

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2020)05-0811-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.032

癌细胞的增殖不仅需要大量能量, 对增殖合成的底物也有大量需求。而嘌呤是所有生物体最丰富的代谢底物, 它不仅是 RNA 和 DNA 的核心构建模块之一, 嘌呤代谢还提供了大量重要生物合成所需的能量和辅助因子<sup>[1-2]</sup>。现通过收集 178 例胃癌和良性胃病患者的唾液样本, 针对胃癌的嘌呤代谢进行分析, 试图寻找有价值的诊断标志物。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集安徽医科大学第一附属医院 2017 年 3 月~2018 年 1 月外科术后 148 例胃癌患者和消化内科胃镜室 30 例胃炎患者。所有入组患者均有明确组织病理学诊断。本研究经安徽医科大学伦理委员会批准(批准号: 20140141)。已获得所有患者和唾液供体志愿者的书面知情同意书, 该研究严格遵守赫尔辛基宣言。

2020-02-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472750)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院<sup>1</sup> 肿瘤内科、<sup>3</sup> 外科、<sup>4</sup> 消化内科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 中国科学技术大学附属第一医院西区, 安徽省肿瘤医院肿瘤化疗科, 合肥 230031

作者简介: 包楚阳, 男, 硕士研究生;

刘虎, 男, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: drliuhu@yahoo.com

**纳入标准:** ① 所有胃癌和良性疾病组患者均有明确的病理诊断; ② 所有入组患者均可以收集到完整的病案资料和辅助检查资料; ③ 年龄  $\leq 80$  岁。  
**排除标准:** ① 存在其他严重的心、肺、肝、肾功能异常病史及糖尿病等异常代谢疾病; ② 近期有过上呼吸道感染; ③ 存在其他的口腔疾病。

**1.2 标本收集** 所有唾液标本提供者者在收集前 1 d 晚上 10:00 之后不允许进食任何食物。所有标本在收集当天清晨使用 2 ml 冻存管收集, 并且收集前 1 h 不得进行饮水、吸烟、刷牙和剧烈运动。所有的唾液样本在收集后封存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 使用装有干冰的泡沫箱封装运输。

**1.3 仪器与试剂** Agilent 1290 UHPLC 超高效液相色谱仪; AB Sciex & Agilent Triple TOF 6600/6550 高分辨质谱仪(美国 Agilent); Thermo Fisher Scientific Heraeus Fresco17 离心机(日本 Thermo); 深圳市雷德邦电子有限公司 PS-60AL 超声仪; Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱( $1.7\ \mu\text{m}$ ;  $2.1 \times 100\ \text{mm}$ )(美国 Waters); CNW Technologies 公司纯度 LC-MS 级的甲醇、乙腈、醋酸铵、氨水(德国杜塞尔多夫); 上海恒柏生物科技有限公司纯度  $\geq 98\%$  的 L-2-氯苯丙氨酸。

**1.4 唾液样本的处理** 将唾液样本在  $4^{\circ}\text{C}$  下冰上解冻, 于 EP 管中以 100/400  $\mu\text{l}$  (样本/提取液) 涡旋混匀; 在  $-20^{\circ}\text{C}$  孵育以沉淀蛋白质, 离心; 取新鲜上清液, 在不加热的真空浓缩器中干燥提取物, 加入提取液重构; 再次涡旋超声水浴并离心后, 将上清液转移到新鲜的 LC/MS 采样瓶中, 每个样品取 10  $\mu\text{l}$ , 合并为质控 (quality control, QC) 样品。之后对样品进行 UHPLC-QTOF-MS 分析。

**1.5 LC-MS 参数和数据预处理** LC-MS 所用色谱柱为 UPLC BEH Amide 色谱柱( $1.7\ \mu\text{m}$ ;  $2.1 \times 100\ \text{mm}$ )。进样体积为 pos: 2  $\mu\text{l}$ , neg: 3  $\mu\text{l}$ 。在每个数据采集循环中, 筛选出强度最强且大于 100 的分子离子谱峰进行采集对应的二级质谱数据。轰击能量: 30 eV, 每 50 ms 产生 15 张二级谱图。ESI 离子源参数设置如下: 雾化气压: 60 Psi, 辅助气压: 60 Psi, 气帘气压: 35 Psi, 温度:  $650^{\circ}\text{C}$ , 喷雾电压: 5 000

V(正离子模式)。再使用 XCMS 软件做保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐。使用自撰写 R 程序包和自建二级质谱数据库对峰进行物质鉴定。(唾液样本液相色谱-质谱分析由 Shanghai Biotree Biotechnology 公司完成)

**1.6 数据处理与统计分析** 使用多元统计分析中的正交偏最小二乘法分析(orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis, OPLS-DA) 第一变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP) 以及单变量统计分析的学生  $t$  检验来筛选差异代谢物, 差异代谢物的筛选标准以 VIP 值大于 1  $t$  检验以及秩和检验的  $P < 0.1$  为有统计学意义。将差异代谢物与嘌呤代谢通路映射匹配分析进行代谢通路分析(差异代谢通路分析和差异代谢物分析由 Shanghai Biotree Biotechnology 公司定制 R Package 分析完成)。使用 SPSS16.0 来进行差异受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC curve) 分析, 评估差异代谢物以及差异代谢物的组合对样本进行区分的效果, 使用 Fisher 判别分析计算差异代谢物的诊断函数。

## 2 结果

**2.1 患者的流行病学资料** 本次研究征募唾液样本志愿者共 178 例, 年龄为 25 ~ 78 ( $59.84 \pm 11.57$ ,  $P < 0.001$ ) 岁。在 148 例胃癌患者中男性 119 例, 女性 29 例; 30 例良性胃病患者中, 男性 21 例, 女性 9 例。按 TNM 分期来观察, 胃癌组患者中, T1 患者 18 例; T2 患者 42 例; T3 患者 76 例; T4 患者 8 例, 分期不明的患者 4 例。

**2.2 LC-MS 数据处理和差异代谢物的筛选** 在 178 例受试者的唾液中共鉴定出 3 638 个峰, 经过对原始数据进行数值标准化处理后 3 637 个峰被保留, 通过二级质谱匹配分析得到 374 个常规代谢物或二级碎片, 根据峰面积的强度值来评估代谢物的水平, 经过经过两组间的信号强度比值和 OPLS-DA 分析的 VIP 值以及组间单变量学生  $t$  检验分析后得出 164 个代谢物用于后续分析。见表 1。

**2.3 嘌呤代谢物分析** 对嘌呤代谢通路内 92 个代谢物或二级碎片, 在经过两组间的定量比值和 OPLS-DA 分析的 VIP 值以及组间单变量学生  $t$  检验分析后得出 4 个符合筛选卡值标准的代谢物。在代谢组学数据分析中, 通常使用 ROC 曲线来评估差异代谢物或其组合对组间样本的区分的效果, 即通过 ROC 曲线评估差异代谢物的组间判别能力。在对

以上 4 种差异代谢物进行 ROC 曲线分析, 结果显示在胃癌患者中唾液样本中嘌呤代谢通路内的黄嘌呤核苷、环鸟苷酸和脱氧核苷一磷酸相较于胃良性病患者出现了下调, 而尿酸则呈现上调。见图 1。

表 1 差异代谢物和差异代谢通路的筛选

差异代谢物名称	RT	MC	MB	FC	P 值	VIP 值
肌苷	202.857	0.291	0.308	0.95	0.883	0.745
次黄嘌呤核苷	202.472	1.126	1.196	0.94	0.885	0.845
腺苷一磷酸	414.215	0.023	0.020	1.10	0.835	0.919
黄嘌呤	302.879	0.0013	0.0011	1.25	0.566	0.16
鸟苷	300.152	0.0076	0.0077	0.98	0.974	0.69
黄嘌呤核苷	172.911	0.141	0.225	0.62	0.089	1.16
环鸟苷酸	313.0495	0.006	0.015	0.44	0.016	1.52
尿酸	311.225	0.023	0.011	2.08	0.003	2.15
脱氧腺苷一磷酸	426.1735	0.052	0.154	0.36	0.025	1.38

RT: 该物质的色谱中的保留时间; MC: 该物质在该组对比内的癌症组的相对定量均值; MB: 该物质在该组对比内的良性组的相对定量均值; FC: Fold-Change 特定代谢物在胃癌组与胃良性病组定量的比值。该表列举几个嘌呤代谢的中间产物作为示例, 部分产物因其统计分析的差异值不明显且判别分析贡献值较小没有纳入下述的诊断模型; 筛选卡值标准: VIP 值  $> 1$   $P < 0.1$

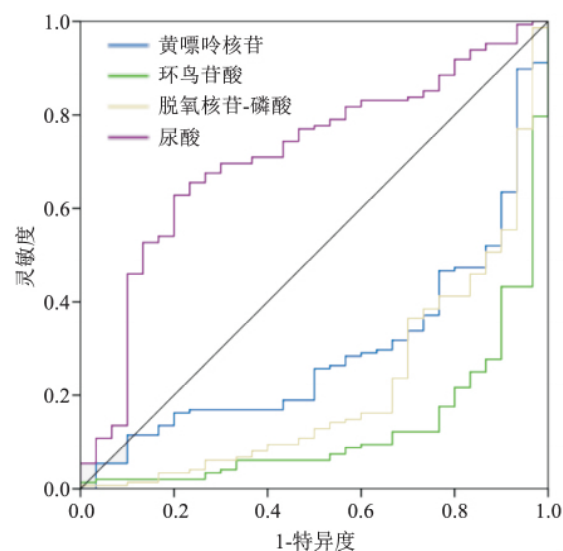


图 1 嘌呤代谢通路中 4 个差异代谢物的 ROC 曲线

脱氧核苷一磷酸曲线下面积(area under curve, AUC) = 0.38 (95% CI = 0.27 ~ 0.49); 黄嘌呤核苷 AUC = 0.294 (95% CI = 0.20 ~ 0.39); 环鸟苷酸 AUC = 0.13 (95% CI = 0.06 ~ 0.19); 尿酸 AUC = 0.711 (95% CI = 0.61 ~ 0.81)

**2.4 嘌呤代谢物的诊断函数模型** 针对上述分析结果中的 4 种差异代谢物使用 Fisher 判别分析建立差异代谢物的诊断函数模型。

$$\begin{aligned} \text{诊断函数: } y_1 &= 65.973 x_1 + 24.766 x_2 - 22.641 x_3 - \\ &\quad 0.2 x_4 - 1.489 \\ y_2 &= 32.690 x_1 - 22.685 x_2 + 29.897 x_3 + \\ &\quad 13242 x_4 - 1.137 \end{aligned}$$

上述函数中  $x_1$  为唾液中的黄嘌呤核苷,  $x_2$  为环

鸟苷酸  $x_3$  为脱氧核苷一磷酸,  $x_4$  为尿酸。若单个样本的  $y_1$  值大于  $y_2$  则视为良性胃病, 若  $y_1$  小于  $y_2$  则将其视为胃癌,  $P = 0.013$ 。使用留一法交叉验证分析得出该模型的灵敏度为 83.1%, 特异度为 63.3%。

### 3 讨论

目前已有多项针对膀胱癌、乳腺癌等多个癌种进行了代谢组学相关研究, 发现癌症患者的血液、尿液以及呼气中有多种明显差异的代谢物, 在经转录组学整合分析后发现大多数差异代谢物与嘌呤代谢密切相关<sup>[3-4]</sup>。本次研究收集了 148 例胃癌患者和 30 例胃良性病患者的唾液进行 UHPLC-QTOF-MS 分析, 筛选出 4 个较明显的差异代谢物, 分别为环鸟苷酸、黄嘌呤核苷、腺嘌呤脱氧核苷以及尿酸。相较于良性胃病的患者, 在胃癌患者的唾液中环鸟苷酸、黄嘌呤核苷和腺嘌呤脱氧核苷出现下调, 而尿酸呈上调。

在人体内, 嘌呤核苷酸的合成方式有 2 种, 一种是从头生物合成 (de novo synthesis) 途径, 另一种是互补的补救合成途径。从头合成主要中间产物为肌苷一磷酸 (inosine monophosphate, IMP), IMP 可以继续通过中间产物黄嘌呤一磷酸 (xanthine monophosphate, XMP) 合成为鸟嘌呤一磷酸 (guanosine monophosphate, GMP) 或者直接合成腺嘌呤一磷酸 (adenosine monophosphate, AMP), GMP 和 AMP 继续进入各自的循环并最终合成 DNA 或 RNA, 由于肿瘤细胞不受限制增殖产生了其对 RNA、DNA 大量需求, 这可能导致鸟嘌呤、腺嘌呤代谢循环的改变以及环鸟苷酸和脱氧核苷一磷酸相应的下调。另外的补救合成途径主要存在于缺乏从头合成的细胞或组织中, 通过循环回收碱基来合成嘌呤核苷酸以满足机体平时的代谢需求。在本次研究中几种嘌呤核苷酸的相应衍生物如鸟苷、腺苷、肌苷均出现了不同程度的下调, 其中黄嘌呤核苷最为明显。大致代谢过程见图 2。

对于肿瘤细胞, 由于从头生物合成能够产生巨大能量和各种细胞原材料, 可以满足癌细胞的各种增殖需求。在肿瘤组织中, 由于补救合成途径的中间代谢物被用于细胞增殖而次黄嘌呤的回收途径利用率下降, 导致了嘌呤降解增加从而产生了尿酸的上调, 最近也有研究<sup>[5-6]</sup>显示血清中的尿酸浓度可以作为评估乳腺癌的预后因素。而鸟苷一磷酸、脱氧腺苷一磷酸以及黄嘌呤核苷这 3 种代谢物目前在

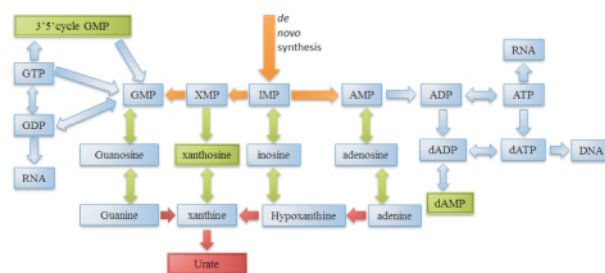


图 2 嘌呤的补救合成途径

橙色箭头: 从头合成方式 (de novo synthesis); 绿色箭头: 嘌呤补救合成途径; 红色箭头: 嘌呤降解, 最终产物为尿酸; 深色标记的 4 个代谢物为本次研究的诊断标记物; 绿色: 下调, 红色: 上调

嘌呤代谢通路内的作用未发现有研究揭示说明。对于本次研究所发现的在胃癌患者唾液样本中这 3 种代谢物出现不同程度下调的原因, 推测可能与肿瘤组织不受限制的增殖需求以及肿瘤环境中嘌呤代谢途径改变有关, 但其具体的分子水平代谢机制仍不清楚, 有待进一步的体外细胞试验来探索和证实<sup>[7-8]</sup>。

### 参考文献

- [1] Li J, Guan L, Zhang H, et al. Endometrium metabolomic profiling reveals potential biomarkers for diagnosis of endometriosis at minimal-mild stages[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 42.
- [2] Yin J, Ren W, Huang X, et al. Potential mechanisms connecting purine metabolism and cancer therapy[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1697.
- [3] Luo X, Yu H, Song Y, et al. Integration of metabolomic and transcriptomic data reveals metabolic pathway alteration in breast cancer and impact of related signature on survival[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 13021-31.
- [4] Jacyna J, Wawrzyniak R, Balayssac S, et al. Urinary metabolomic signature of muscle-invasive bladder cancer: A multiplatform approach[J]. Talanta, 2019, 202: 572-9.
- [5] Yue C F, Feng P N, Yao Z R, et al. High serum uric acid concentration predicts poor survival in patients with breast cancer[J]. Clin Chim Acta, 2017, 473: 160-5.
- [6] Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion[J]. Int J Cardiol, 2016, 213: 8-14.
- [7] Garcia-Gil M, Camici M, Allegrini S, et al. Emerging role of purine metabolizing enzymes in brain function and tumors[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): E3598.
- [8] Okugawa Y, Toiyama Y, Shigeyasu K, et al. Enhanced AZIN1 RNA editing and overexpression of its regulatory enzyme ADAR1 are important prognostic biomarkers in gastric cancer[J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 366.

## Screening of diagnostic markers of gastric cancer in salivary purine metabolites

Bao Chuyang<sup>1</sup>, Xiang Lijuan<sup>1</sup>, Liu Hu<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Oncology, West District of Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Anhui Provincial Cancer Hospital, Hefei 230031)

**Abstract** A descriptive cohort study was conducted to analyze purine metabolism in saliva samples from 178 patients with gastritis and gastric cancer. 167 differential metabolites were identified by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-QTOFMS). Xanthosine, Cyclic GMP, uric acid and 2'-Deoxyadenosine 5'-monophosphate were screened out by Student *t* test and orthogonal partial least square analysis. ROC curve was used to evaluate the inter group discrimination effect of diagnostic markers. Fisher discriminant analysis was used to establish the diagnostic function model, and the sensitivity and specificity of the diagnostic model were obtained as 83.1% and 63.3% respectively by leave-one-out cross validation. The screening of purine metabolites in saliva has great potential in distinguishing early gastric cancer from gastritis and screening early gastric cancer.

**Key words** gastric cancer; purine metabolism; cancer diagnosis; saliva

(上接第 810 页)

- [8] Takahashi K, Taniguchi H, Ando M, et al. Mean pulmonary arterial pressure as a prognostic indicator in connective tissue disease associated with interstitial lung disease: a retrospective cohort study [J]. *BMC Pulm Med* 2016, 16(1): 55.
- [9] Kobak S, Kalkan S, Kirilmaz B, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients with primary Sjögren's syndrome [J]. *Autoimmune Dis*, 2014, 2014: 710401.
- [10] Gao H, Zhang X W, He J, et al. Prevalence, risk factors, and prognosis of interstitial lung disease in a large cohort of Chinese primary Sjögren syndrome patients: a case-control study [J]. *Medicine*, 2018, 97(24): e11003.
- [11] Pérez-Peñate G M, Rúa-Figueroa I, Juliá-Serdá G, et al. Pulmonary arterial hypertension in systemic lupus erythematosus: prevalence and predictors [J]. *J Rheumatol*, 2016, 43(2): 323-9.
- [12] Sato T, Hatano M, Iwasaki Y, et al. Prevalence of primary Sjögren's syndrome in patients undergoing evaluation for pulmonary arterial hypertension [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197297.

## Clinical analysis of 80 cases of primary Sjögren's syndrome with pulmonary arterial hypertension

Xie Maosheng, Jin Yingzhao, Jin Li, et al

(Dept of Rheumatology and Immunology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract** To investigate the risk factors of primary Sjögren's syndrome with pulmonary arterial hypertension (pSS-PAH) for early diagnosis and treatment, a total of 438 patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) were selected. Patients were divided into two groups according to pulmonary arterial pressure detected by cardiac ultrasonography. The clinical and laboratory characteristics between the two groups were compared. Among 438 patients, 80 had PAH, the incidence rate was 18.3%. Age of pSS-PAH was 22 ~ 77 (59.9 ± 13.8) years old, and pulmonary arterial pressure was between 5.33 ~ 15.19 kPa. Multivariate logistic regression analysis suggested that interstitial pneumonia, age, and initial pulmonary symptoms were the risk factors for pSS-PAH. In these cases, cardiac ultrasonography should be performed as soon as possible, early diagnosis and treatment can improve the prognosis of patients.

**Key words** primary Sjögren's syndrome; pulmonary arterial hypertension; risk factors