

稳定同位素 iTRAQ 标记联合液相色谱-串联质谱法定量分析药物性肝损伤患者血清氨基酸的变化*

史 忱, 安卓玲, 李鹏飞, 刘丽宏[△] (首都医科大学附属北京朝阳医院药事部 100020)

【摘要】 目的 探索药物性肝损伤(DILI)患者治疗的不同阶段血清氨基酸水平的变化差异, 探讨其临床意义及可用于 DILI 早期诊断及疗效评价的氨基酸类生物标志物。**方法** 收集 21 例健康志愿者(健康组)及 24 例 DILI 患者不同阶段(初诊、治疗、转归)的血清标本, 采用稳定同位素 iTRAQ 标记方法联合液相色谱串联质谱技术检测血清氨基酸进行定量并分析其差异。**结果** 在血清中共定量氨基酸 28 种, 与健康组比较, DILI 患者共有 14 种氨基酸浓度在诊疗不同阶段发生显著性改变; 其中异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸及丝氨酸的浓度在初诊时显著升高, 随治疗进程降低, 逐渐接近于正常水平。**结论** 4 种氨基酸中, 苯丙氨酸与 DILI 的相关性更高, 可能为 DILI 早期诊断及治疗效果评价的潜在生物标志物。

【关键词】 液相色谱-串联质谱; 氨基酸; 药物性肝损伤; 稳定同位素标记

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 08. 001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)08-1009-03

Quantitative analysis of serum amino acids changes in patients with drug-induced liver injury by stable isotope iTRAQ labeling combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry* SHI Chen, AN Zhuo-ling, LI Peng-fei, LIU Li-hong[△] (Department of Pharmacy, Affiliated Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China)

【Abstract】 Objective To explore the changes of serum amino acid levels in the patients with drug-induced liver injury(DILI) at different stages, and then to investigate their clinical significance and the biomarkers available for early diagnosis and curative evaluation of DILI. **Methods** Serum samples from 21 healthy volunteers and 24 patients with different stages(first visiting, treatment, outcome) of DILI were collected. The stable isotope iTRAQ labeling combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry was adopted to quantitatively detect the serum amino acids and analyzes their differences. **Results** There were quantified 28 amino acids in serum. Compared with the control group, 14 kinds of amino acids had significant changes in concentrations during the different diagnosis and treatment periods; among them, the concentrations of isoleucine, leucine, phenylalanine and serine were significantly increased at first visiting, decreased with the treatment process and gradually close to the normal level. **Conclusion** Among 4 kinds of amino acids, The correlation between phenylalanine and DILI is higher, which might be a potential biomarker for early diagnosis and therapeutic effect evaluation of DILI.

【Key words】 liquid chromatography-tandem mass spectrometry; amino acid; drug-induced liver injury; stable isotope iTRAQ labeling

氨基酸是构成人体蛋白质分子的最基本物质, 不仅提供了合成蛋白质的重要原料, 而且对于促进生长, 进行正常代谢、维持生命提供了物质基础, 是物质代谢中的重要组成部分。肝脏是氨基酸代谢的核心器官, 氨基酸的多种转化反应均在肝内活跃进行, 并在体内处于动态平衡状态。而这一平衡状态的打破则是众多疾病的诱因与表现形式^[1]。目前已有研究表明^[2-3], 当肝脏发生损伤时, 体内氨基酸代谢常常出现紊乱, 氨基酸代谢库与血清氨基酸谱随之发生改变。

药物性肝损伤(DILI)是药物治疗过程中出现的一种常见疾病, 包括药物本身或/及其代谢产物, 或由于特殊体质对药物的敏感性升高或耐受性降低所导致的肝脏损害。目前, 只有少部分与药物剂量相关的肝损伤是可预测的; 大部分 DILI 的发生是无法预知的, 其早期临床症状缺乏特异性(如疲劳、恶心、腹痛等), 与其他肝脏疾病难以区分, 对诊断造成困难^[4]。DILI 进展迅速, 并可能出现黄疸、腹水、肝性脑病、肝衰竭等严重症状^[5], 加重患者机体及经济双负担。然而现有肝功能评价指标

无法在肝实质损伤发生前进行及时预警且无特异诊断 DILI 的生物标志物。本研究将结合稳定同位素相对与绝对定量(iTRAQ)标记与液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)对 DILI 患者不同阶段血清氨基酸水平进行定量, 探索氨基酸浓度变化与 DILI 诊断及治疗的相关性, 寻找可用 DILI 早期发现及疗效评价的生物标志物, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以临床医生诊断以及肝脏酶学指标为依据^[6], 排除肝胆相关疾病(包括肝炎病毒、巨细胞病毒、EB 病毒感染, 胆道病变、酒精性肝损伤、休克、心力衰竭、自身免疫性疾病、遗传或代谢性肝病病变等)^[7], 纳入本院 2014 年 8~12 月住院的 24 例 DILI 患者, 包括 6 例抗肿瘤药物引起的 DILI、4 例中药引起的 DILI、13 例降脂药引起的 DILI 及 1 例抗菌药物引起的 DILI。其中男 14 例, 女 10 例, 年龄 24~71 岁, 平均年龄 55 岁, 平均体质量 68 kg。收集患者血清标本, 并根据其治疗的不同阶段将血清标本分为初诊组、治疗组和转归组。同时

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81341015); 北京市自然科学基金资助项目(7142065)。

作者简介: 史忱, 女, 在读硕士, 主要从事临床药理学研究。 △ 通讯作者, E-mail: hongllh@126.com。

纳入于本院体检的健康志愿者 21 例作为健康组,其中男 15 例,女 6 例,年龄 24~33 岁,平均年龄 27 岁,平均体质量 62 kg。本研究经首都医科大学附属北京朝阳医院伦理委员会审批,符合医学伦理学标准。

1.2 仪器与试剂 API 3200 型液相色谱-串联质谱仪(美国 Applied Biosystem 公司),配有电喷雾离子源(ESI)及 Analyst1.5.1 数据处理软件;LC-20A 型液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),包括自动进样器、柱温箱、脱气机等;ABBOTT 高速离心机(德国 ABBOTT 公司)。iTRAQ™ 试剂盒(批号 A1116)由美国 Applied Biosystem 公司提供,其中包括:10%磺基水杨酸溶液(含 400 μmol/L 正异亮氨酸)、标记缓冲液(0.45 mol/L 硼酸盐缓冲液,pH8.5,含 20 μmol/L 正缬氨酸),115-iTRAQ 衍生化试剂(15 人份/瓶,每瓶用 70 μL 异丙醇稀释后使用)、1.2%羟胺水溶液、iTRAQ-114 同位素标记的 44 种氨基酸内标(0.5%甲酸标准稀释液溶解后使用)。色谱纯乙腈与甲酸(德国 Merck 公司);七氟丁酸(美国 Sigma 公司);实验用纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.3 方法 本实验检测方法采用李鹏飞等^[8]建立的稳定同位素 iTRAQ 技术联合 LC-MS/MS 法对血清中氨基酸进行准确定量。

1.3.1 色谱条件 采用 XBridge Shield RP18 色谱柱(5 μm, 150 mm×4.6 mm,美国 Waters 公司)。流动相 A:水(含有 0.01%七氟丁酸、0.1%甲酸);流动相 B:乙腈(含有 0.01%七氟丁酸、0.1%甲酸)。梯度洗脱条件见表 1,柱温 50 ℃,进样量 3 μL。

表 1 梯度洗脱条件			
时间(min)	流速(μL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.3	800	100	0
11.0	800	80	20
11.5	800	0	100
14.0	800	0	100
14.1	800	100	0
21.0	800	100	0

1.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源正离子化模式,扫描方式为多种反应监测(MRM),离子喷射电压 3 000 V,离子源温度 540 ℃,源内气体 1(GS1,N₂)压力 345 kPa,气体 2(GS2,N₂)压力 414 kPa,气帘气(CUR,N₂)压力 138 kPa,接触电压为 30 V,碰撞能量为 10 eV。

1.3.3 血清标本前处理 精密吸取血清标本 40 μL 置于 1.5 mL 的 EP 管中,加入含 400 μmol/L 正异亮氨酸的磺基水杨酸 10 μL 以沉淀蛋白,涡旋 30 s 后以 10 000 r/min 离心 2 min。

移取上清液 10 μL 于 1.5 mL 的 EP 管中,加入含 20 μmol/L 正缬氨酸的 40 μL 标记缓冲液,涡旋 30 s 后瞬时离心。移取上层液体 10 μL 于 1.5 mL 的 EP 管中,加入 5 μL iTRAQ-115 衍生化试剂,涡旋 30 s 后瞬时离心,置于室温下反应 30 min 后,加入 5 μL 羟胺终止衍生化反应,涡旋 30 s 后瞬时离心。最后加入 32 μL 含 iTRAQ-114 同位素标记的内标溶液,涡旋混匀后瞬时离心,待进行 LC-MS/MS 分析^[8]。

1.3.4 定量分析与数据处理 标本经过 LC-MS/MS 特定采集方法,提取 44 种氨基酸对应的 iTRAQ-115 和 iTRAQ-114 的 MRM 离子流图,进行积分处理。在每 3 μL 进样中,含有 10 pmol 从内标溶液中带入的每种 iTRAQ-114 试剂标记的氨基酸,根据特定的校正系数可计算标本中氨基酸浓度。正异亮氨酸和正缬氨酸属于非人体内氨基酸,在样品预处理步骤引入的正异亮氨酸用于检验经过沉淀后氨基酸的回收率,通过正异亮氨酸回收率校准每种氨基酸的测定结果。在 iTRAQ-115 衍生化标记步骤引入正缬氨酸,用于检验标记反应的效率,反应效率在 80%~120%为合格^[8]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间生化结果及氨基酸浓度比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 DILI 患者与健康志愿者的酶学指标比较 24 例 DILI 患者的血清标本按诊断及治疗不同阶段分为初诊组、治疗组与转归组。3 组 DILI 患者的血清酶学指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)与谷氨酸氨基转移酶(AST)均具有异常增高,与健康组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$);且伴随治疗的进程,AST 与 ALT 逐渐降低,接近正常值范围,具体可见表 2。

表 2 DILI 患者及健康志愿者肝酶指标(U/L, $\bar{x} \pm s$)				
指标	健康组	初诊组	治疗组	转归组
AST	20±7	170±148**	59±23**	32±14**
ALT	19±7	241±187**	132±56**	43±28**

注:与健康组比较,** $P < 0.01$ 。

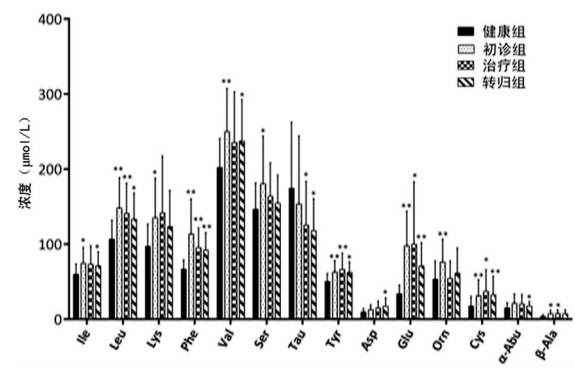
2.2 DILI 患者血清氨基酸浓度变化 对 DILI 患者与健康志愿者血清中的 28 种氨基酸的浓度进行准确定量。与健康组比较,共有 14 个氨基酸的浓度在诊断和治疗不同阶段发生显著性变化。其中,异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸及丝氨酸的浓度在初诊组显著升高,随着治疗进程,逐渐降低并接近健康组水平;氨基酸浓度的变化与肝酶指标的变化相符,提示这 4 种氨基酸的变化可能与 DILI 患者诊断及治疗过程相关联,见表 3、图 1~2。

表 3 健康志愿者及 DILI 患者血清氨基酸浓度变化(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)				
氨基酸	健康组($n=21$)	初诊组($n=24$)	治疗组($n=18$)	转归组($n=23$)
精氨酸(Arg)	99.59±40.98	100.59±34.72	95.9±33.36	112.42±33.22
组氨酸(His)	55.70±28.03	58.84±21.01	64.84±28.13	54.14±20.42
异亮氨酸(Ile)	59.82±13.92	74.55±21.12*	73.13±24.68*	71.04±18.77
亮氨酸(Leu)	106.60±25.35	148.17±40.24**	140.57±40.39**	133.33±34.83*
赖氨酸(Lys)	96.91±29.51	135.25±52.59*	141.56±75.60	123.31±48.01
甲硫氨酸(Met)	34.53±7.39	37.91±8.91	37.55±9.01	32.94±9.99
苯丙氨酸(Phe)	66.80±12.22	113.47±46.74**	95.16±26.49**	91.98±23.42**

续表 3 健康志愿者及 DILI 患者血清氨基酸浓度变化(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

氨基酸	健康组(n=21)	初诊组(n=24)	治疗组(n=18)	转归组(n=23)
苏氨酸(Thr)	108.14±30.51	134.90±59.66	126.07±58.43	113.02±41.79
色氨酸(Trp)	39.05±6.52	37.58±7.45	37.58±9.76	36.17±5.66
缬氨酸(Val)	201.97±38.74	249.88±57.29**	235.29±67.19	237.07±55.00*
甘氨酸(Gly)	416.62±189.70	409.65±245.32	392.42±204.25	363.19±173.63
丝氨酸(Ser)	146.47±34.87	180.31±63.63*	163.63±44.45	154.22±37.63
牛磺酸(Tau)	174.22±88.09	153.49±90.31	125.39±58.23*	117.74±42.80*
酪氨酸(Tyr)	50.34±10.38	62.69±15.53**	66.22±22.15**	62.49±14.09*
天门冬酰胺(Asn)	50.42±11.61	60.65±19.46	61.03±19.39	53.31±18.24
天门冬氨酸(Asp)	9.38±4.69	12.97±6.22	15.16±8.98	17.31±11.36*
瓜氨酸(Cit)	29.14±10.17	26.82±16.02	26.59±10.17	32.30±15.91
谷氨酸(Glu)	33.76±12.08	97.78±46.37**	100.03±82.58*	70.62±31.49**
谷氨酰胺(Gln)	668.36±177.12	603.24±152.72	570.54±181.47	570.38±151.28
鸟氨酸(Orn)	53.24±24.18	76.19±30.98**	54.19±23.22	61.28±33.74
半胱氨酸(Cys)	17.51±12.79	31.14±21.68**	37.20±28.61*	32.45±25.13**
α-氨基正丁酸(α-Abu)	15.10±6.86	21.25±12.44	20.37±12.38	17.83±5.89*
丙氨酸(Ala)	349.89±114.05	387.76±85.12	391.22±143.68	419.17±145.97
β-丙氨酸(β-Ala)	3.86±2.43	7.19±4.73*	7.62±4.82*	7.15±5.44
β-氨基异丁酸(β-Aib)	1.83±1.72	2.96±2.35	3.29±3.81	2.94±2.55
乙醇胺(EtN)	20.44±6.76	21.61±10.35	19.42±10.73	21.93±11.59
羟基脯氨酸(Hyp)	7.32±4.89	7.08±5.44	9.12±6.63	10.43±14.41
脯氨酸(Pro)	130.19±92.55	126.62±50.90	131.60±50.24	139.12±73.78

注:与健康组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。



注:与健康组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 1 DILI 患者诊断与治疗过程中血清中浓度发生显著变化的 14 种氨基酸

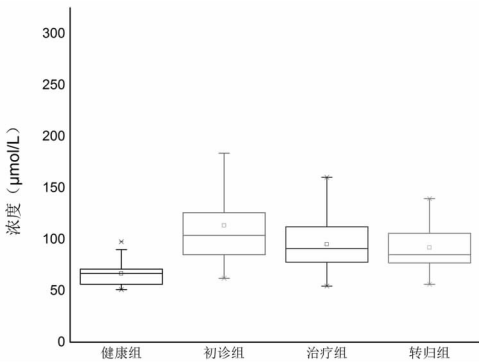


图 2 DILI 患者治疗过程中血清苯丙氨酸浓度变化

3 讨 论

本研究基于 iTRAQ 标记方法,结合 LC-MS/MS 对 DILI

患者初诊、治疗中及转归后的血清中 28 种氨基酸进行定量,分析 DILI 患者诊断与治疗不同阶段的氨基酸浓度变化,并探讨氨基酸类生物标志物浓度与肝损伤过程的相关性。发现与健康组相比,共有 14 种氨基酸在诊疗不同阶段发生显著变化;其中,异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸及丝氨酸的浓度变化可能与 DILI 患者诊断及治疗过程相关联。

血浆中的支链氨基酸(BCAA)与芳香族氨基酸(AAA)的比值曾被用来作为肝病期间蛋白质代谢异常的指标^[9],并主要用于指导肝病的临床治疗。根据氨基酸的化学结构分类,异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸属于 BCAA,苯丙氨酸和酪氨酸属于 AAA。其中异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸均为人体必需氨基酸,自身不能合成,必须从食物中摄取。药物造成的肝损伤多为急性肝损伤,肝细胞功能障碍或发生坏死,使肝脏氨基酸代谢能力下降,坏死细胞内的氨基酸释放入血,因此血浆中浓度增高的氨基酸主要为细胞内浓度高的氨基酸(谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、苏氨酸等)与主要在肝脏代谢的氨基酸(苯丙氨酸、赖氨酸及甲硫氨酸)^[10]。与以上氨基酸相比,BCAA 则主要在肝外组织代谢,肝脏对其影响不大^[9];遂发生肝损伤时,BCAA 在血浆中的浓度升高^[11-12]、不变^[13]或降低^[14]均有相关报道,提示苯丙氨酸的变化与 DILI 进程的相关性可能大于异亮氨酸及亮氨酸。

在前期研究中,本课题组对 DILI 患者及健康志愿者的血清进行了非靶向代谢组学检测分析,目前已鉴定出 2 个可能的生物标志物结构,包括苯丙氨酸和二甲基鸟苷^[15]。本研究中发现苯丙氨酸在 DILI 患者初诊组、治疗组与转归组中其浓度增高,与健康组相比差异均有统计学意义($P<0.05$),且变化规律可与治疗过程相关联,即在疾病组的浓度高于健康组,随着治疗后的转归,其浓度水平接近于健康组(下转第 1015 页)

- 妊娠晚期孕妇 B 族溶血性链球菌的多中心研究[J]. 中华围产医学杂志, 2014, 17(6): 361-364.
- [3] Park KH, Kim KH, Kang JH, et al. Current status and clinical presentations of invasive neonatal Group B streptococcal infections in Korea[J]. *Pediatr Int*, 2011, 53(2): 236-239.
- [4] 许基平. B 群链球菌快速检测方法研究进展[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(19): 2380-2381.
- [5] Park JS, Cho DH, Yang JH, et al. Usefulness of a rapid real time PCR assay in prenatal screening for group B streptococcus colonization[J]. *Ann Lab Med*, 2013, 33(1): 39-44.
- [6] Melin P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(9): 1294-1303.
- [7] 朱敏, 范建霞, 程利南. 围产期 B 族链球菌感染的研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(2): 137-141.
- [8] 严育忠, 华静, 范惠清, 等. 围产期 B 族链球菌感染的研究进展[J]. 中华围产医学杂志, 2011, 14(12): 758-763.
- [9] Hidehito M, Juri K, Masato H, et al. Immunochromatographic detection of the Group B Streptococcus antigen from enrichment cultures [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(9): 1381-1387.
- [10] 赵静, 熊涛, 唐军, 等. 早发型和晚发型新生儿脓毒症的临床特点[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(10): 736-738.
- [11] 罗俊, 马丽亚, 徐芬. 新生儿晚发型 B 族链球菌败血症临床特征及预后分析[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(9): 805-808.
- [12] Lanari M, Cavrini F, Sambri V, et al. Comparison of different methods for detection of Group B Streptococcus vaginal intrapartum colonization [J]. *Early Hum Dev*, 2009, 85(10): 1213-1235.
- [13] 季修庆, 陆根生, 胡平, 等. 荧光定量 PCR 检测南京地区孕晚期妇女生殖道 B 族链球菌的带菌情况[J]. 检验医学, 2014, 29(6): 628-630.
- [14] Honest H, Sharma S, Khan KS, et al. Rapid tests for group B streptococcus colonization in laboring woman: a systematic review [J]. *Pediatrics*, 2006, 117(4): 1055-1066.
- [15] Benson KD, Luchansky JB, Elliott JA, et al. Pulsed-field fingerprinting of vaginal group B streptococcus in pregnancy[J]. *Obstet Gynecol*, 2002, 100(3): 545-551.
- [16] 张立, 臧嘉. 快速检测 B 群链球菌试剂盒的初步应用[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 453-453.

(收稿日期: 2015-09-21 修回日期: 2015-11-25)

(上接第 1011 页)

的状态(图 2)。结合前期研究与本次氨基酸的定量实验结果, 提示苯丙氨酸可能为 DILI 早期诊断及治疗效果评价的潜在生物标志物。

参考文献

- [1] 陶蓓蓓, 李鹏飞, 张绪得, 等. 液相色谱-串联质谱在全谱氨基酸检测中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(1): 59-61.
- [2] Huo T, Chen X, Lu X, et al. An effective assessment of valproate sodium-induced hepatotoxicity with UPLC-MS and ¹HNMR-based metabonomics approach[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 969: 109-116.
- [3] Kumar BS, Chung BC, Kwon O, et al. Discovery of common urinary biomarkers for hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride, acetaminophen and methotrexate by mass spectrometry-based metabolomics[J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 32(7): 505-520.
- [4] Au JS, Navarro VJ, Rossi S. Review article: drug-induced liver injury-its pathophysiology and evolving diagnostic tools[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(1): 11-20.
- [5] Hayashi PH, Fontana RJ. Clinical features, diagnosis, and natural history of drug-induced liver injury[J]. *Semin Liver Dis*, 2014, 34(2): 134-144.
- [6] 许建明. 急性药物性肝损伤诊治建议(草案)[J]. 中华消化杂志, 2007, 27(11): 765-767.
- [7] 禹铮, 贾继东. 药物性肝损害的危险因素, 诊断规范及停药标准[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(9): 674-677.
- [8] 李鹏飞, 王燕, 陶蓓蓓, 等. 稳定同位素 iTRAQ 标记/高效液相色谱-串联质谱法同时定量分析人体中 42 种氨基酸及典型病例[J]. 分析化学, 2012, 40(5): 762-767.
- [9] 秦环龙. 肝功能不全时氨基酸代谢变化与支链氨基酸的治疗作用[J]. 肠外与肠内营养, 2004, 11(4): 249-252.
- [10] Holecek M. Three targets of branched-chain amino acid supplementation in the treatment of liver disease[J]. *Nutrition*, 2010, 26(5): 482-490.
- [11] Shi ZQ, Chang TM. Amino acid disturbances in experimental hepatic coma rats[J]. *Int J Artif Organs*, 1984, 7(4): 197-202.
- [12] Holecek M, Skalská H, Mráz J. Plasma amino acid levels after carbon tetrachloride induced acute liver damage. A dose-response and time-response study in rats[J]. *Amino Acids*, 1999, 16(1): 1-11.
- [13] Record CO, Buxton B, Chase RA, et al. Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy[J]. *Euro J Clin Invest*, 1976, 6(1): 387-394.
- [14] Rosen HM, Yoshimura N, Hodgman JM, et al. Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology[J]. *Gastroenterology*, 1977, 72(3): 483-487.
- [15] 安卓玲, 史忱, 赵瑞, 等. 基于超高效液相色谱-质谱的药物性肝损伤患者血清代谢组学研究[J]. 分析化学, 2015, 43(9): 1408-1414.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-25)