

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.07.008

肝炎及肝硬化患者血代谱及生物标记物相关性研究

徐茜¹, 张晨²

(陕西省西安市第九医院:1. 检验科;2. 感染性疾病科 710054)

摘要:目的 探讨自身免疫性肝炎及原发性胆汁性肝硬化患者与健康人群血液代谢谱差异及生物标记物的相关性。方法 选取 2014 年 5 月到 2015 年 6 月该院确诊为自身免疫性肝炎(AIH)患者 42 例作为 AIH 组,原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者 45 例作为 PBC 组,选取 50 例健康体检者作为对照组。采用线性梯度超高效质谱分析法对研究对象血清中的代谢物进行检测。并对检测所得到的数据进行多个变量的分析,从而建立 AIH 以及 PBC 的临床诊断模型,并对该模型的临床效果进行探究,筛选出合适的生物标记物,并对各组血清之中的生物标记物的活动情况进行分析。结果 通过 PBC 组与 AIH 组患者代谢图谱的差异,构建出诊断两种疾病的模型。AIH 组和 PBC 组胆汁酸水平高于对照组,溶血卵磷脂、卵磷脂、鞘磷脂、脂肪酸在 AIH 组和 PBC 组中较低,苯丙氨酸在 AIH 组中水平高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 血清代谢谱分析技术在诊断 AIH 以及 PBC 方面有重要意义,有望推广到临床。

关键词:自身免疫性肝炎; 代谢组学; 多变量分析; 原发性胆汁肝硬化

中图分类号:R575

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)07-0918-03

Study on the correlation between hematologic genes and hematology in hepatitis and cirrhosis patients

XU Qian¹, ZHANG Chen²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Infectious Disease, the Ninth Hospital in Xi'an, Xi'an, Shanxi 710054, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between blood metabolites and biomarkers in patients with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis and healthy people. **Methods** A total of 42 patients with autoimmune hepatitis(AIH group) and 45 patients with primary biliary cirrhosis(PBC group) in the hospital from May 2014 to June 2015 were enrolled in this study, and 50 healthy subjects were selected as control group. The metabolites in serum were tested by linear gradient ultra-high performance mass spectrometry. On the basis of analysis of multi-variables, the clinical diagnostic model for autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis had established and tested, appropriate biomarkers were screened out, and activities of the biomarkers in the serum were analyzed. **Results** Through the differences of the metabolic profiles of patients with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis, a model for the diagnosis of both diseases was constructed. Serum levels of bile acids in AIH group and PBC group were significantly higher than those in control group($P < 0.05$). Serum levels of AI, PGF, and the level of phenylalanine in AIH group and PBC group were higher than that in control group, the difference were statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** Serum metabolites plays an important role in diagnosis of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis, it is expected to be applied in clinical practice.

Key words: autoimmune hepatitis; metabolomics; multivariate analysis; primary biliary cirrhosis

肝脏是人体内重要的代谢器官,具有解毒以及吞噬等重要功能^[1-2]。人体胆汁的合成主要也是由肝脏细胞完成的,肝脏通过促进胆汁的合成与分泌进而促进人体对脂类的吸收。同时,肝脏与人体激素的分泌息息相关,人体内的多种激素在肝脏中分解或转化;当肝脏发生病变时,激素便失去活性,从而导致人体出现多种病症,人体的代谢过程也受到影响。代谢组学在临床医学方面的应用主要集中于疾病的发病机

制、预后评估以及疾病的诊断治疗方面。由于原发性胆汁性肝硬化(PBC)与自身免疫性肝炎(AIH)在临床治疗方面都没有特定的典型性关系,因此,两种疾病经常会同时发生,对临床上的治疗造成了极大的困扰。本试验在正离子模式之下应用线性梯度超高效液相色谱飞行时间质谱对两种疾病患者的血清进行分析,寻找用于诊断 AIH 以及 PBC 的血清标志物,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 5 月到 2015 年 6 月在本院治疗的确诊为 AIH 的患者 42 例作为 AIH 组, 45 例 PBC 患者作为 PBC 组, 并选取 50 例健康体检者作为对照组。本试验所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 纳入及排除标准

1.2.1 纳入标准^[3] AIH 诊断标准: 2015 年国际 AIH 小组制定的诊断评分标准^[4]。PBC 诊断标准: 2015 年美国肝病协会制定的关于诊断 PBC 的相关准则^[5]。所有纳入研究的患者均已确诊为该病患者。

1.2.2 排除标准 (1) 药物性肝炎、病毒性肝炎或酒精性肝患者; (2) 艾滋病感染者; (3) 同时患有原发性肝癌的患者; (4) 患有甲状腺功能亢进或糖尿病等代谢疾病的患者。

1.3 方法 参与研究的研究对象需晨起空腹采集血清标本, 在 4℃ 下离心 6 min 左右, 放在 -80℃ 的恒温冰箱中保存。在正式试验的前 1 天将样品置于 4℃ 下解冻, 将血清标本与乙腈按照 1:3 的比例均匀混合。在 4℃ 下离心 20 min, 取 450 L 上层清液进行超高效液相色谱梯度分析^[6]。液相色谱的柱温为 35℃, 色谱柱为 ACQUITRC18 柱, 见表 1。

表 1 超高效液相色谱梯度洗脱程序

时间(min)	流速(mL/min)	A%	B%	弧线
0.0	0.3	96	2	0
0.6	0.3	96	2	7
9.0	0.3	21	81	7
15.0	0.3	3	97	7
22.0	0.3	3	97	7
22.5	0.3	0	100	7
15.0	0.3	0	100	7
25.5	0.3	96	2	1
31.0	0.3	96	2	7

注: 正离子模式下 A 为水+0.1% 甲酸, B 为乙腈+20% 异丙醇+0.1% 甲酸; 负离子模式下 A 为水+0.1% 甲酸, B 为甲醇+0.1% 甲酸

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行处理分析, 对研究对象进行均衡性检验, 组间比较采用单因素方差分析或独立 *t* 检验。采用有监督和无监督两种模式对数据进行分析, 无监督模式是用线性投影法把多成新的主成分, 有监督模式则是在已有分组中进行识别与归类通过载荷图以及得分图可以直观地观察分析结果。

2 结果

2.1 AIH 组与 PBC 组患者正负离子模式下变量书及谱峰比较 所有的血清标本在经过超高效液相色谱-质谱分析之后, 得出 AIH 组与 PBC 组患者在正负离子模式下谱峰差异有统计学意义 ($t=4.104, P<0.05$), 见表 2。

表 2 AIH 组与 PBC 组患者正负离子模式下变量数及谱峰比较

组别	正离子模式下变量数		负离子模式下变量数	
	变量数(个)	谱峰(%)	变量数(个)	谱峰(%)
AIH 组	1 232	8.9	1 325	9.1
PBC 组	1 789	8.8	1 810	8.1

2.2 两种疾病诊断模型的建立 对 AIH 组与 PBC 组的血清标本色谱-质谱数据进行分析, 发现这两组正离子模式下与负离子模式下与对照组血清标本都可以明显分开。除此之外, 在正离子模式下 AIH 组与 PBC 组患者数据的区分不明显, 但在负离子模式下两组患者区分明显。为了更好地找到并鉴定潜在的生物标记物, 又采用了有监督的模式识别方法对标本数据进行了分析比较。结果发现在负离子模式下两组得到了很好的区分。负离子模式下模型的解释率和预测率为 $R^2 Y=0.991, Q^2 Y=0.943$ 。对该模型进行交叉验证。

2.3 生物标记物的鉴定 保留时间、质量数与串联质谱数据是鉴定生物标志物的 3 条准则。首先, 根据生物标志物的精确质荷比到数据库中对比查找可能物质, 并购买可能性大的物质的标准品分析, 在相同的色谱条件之下物质的保留时间相同, 之后进行串联质谱分析, 并将获得的生物标志物的二级质谱图与标准品的二级谱图比较, 二者谱图如果完全匹配就能鉴定二者是同一物质。如标本血清中物质的谱图与溶血卵磷脂的图谱谱图完全匹配, 则鉴定为溶血卵磷脂。本试验便是按照这 3 条准则对脂肪酸、胆汁酸、溶血卵磷脂、卵磷脂、鞘磷脂 5 类 20 种生物标记物进行了鉴定分析。分析结果显示, AIH 组与 PBC 组患者体内胆汁酸的水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($t=5.102, P<0.05$), 其他 4 种酯类物质水平较低。同时还发现 PBC 患者血清代谢产物改变程度比 AIH 患者更重。除此之外, 在正离子模式之下发现血清代谢物中苯丙氨酸在 AIH 组中水平高于对照组, 但与 PBC 组患者相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

代谢组学是一门新兴的生物学技术, 它主要是对人体细胞内代谢层面的若干生命活动进行探索^[7]。并且代谢组学的优越之处在于它位于人体代谢活动的最末端, 更接近于机体的表面。除此之外, 代谢组学还可以放大蛋白质或者基因的微小变化, 并且代谢产物的数量和种类也远远小于之前的蛋白质组与基因组^[8-9]。由于人体各个组织中的代谢产物都基本相同, 故代谢组学的应用也更加广泛。因此, 本试验便应用代谢组学的方法来对 AIH 与 PBC 的发病机制以及诊断方法进行进一步研究。

本试验采用了超高效液相色谱-质谱研究的方法

对 AIH 组、PBC 组与对照组的血清标本进行代谢组学分析,分别将 AIH 组和 PBC 组患者的血清标本与对照组进行对比分析,结果显示,在负离子条件下的区别较为明显,差异有统计学意义($t = 4.104, P < 0.05$)。由此可见,这两种疾病的代谢产物有所差别,产生这种差别的原因可能是两种疾病的发病机制存在差异^[10-11]。胆汁酸是在肝脏中合成的合成并在人体肠道之中发挥作用的物质。健康人体内的胆汁酸基本不会出现在血液循环中,但绝大多数肝胆疾病患者体内胆汁酸水平明显上升^[12]。本试验发现,AIH 组与 PBC 组患者血清中胆汁酸水平明显高于对照组,差异有统计学意义($t = 5.102, P < 0.05$),其他 4 种脂类物质水平较低。除此之外,在正离子模式下发现,血清代谢物中苯丙氨酸在 AIH 组水平高于对照组,但与 PBC 组患者体内代谢该物质比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

综上所述,本试验对 PBC 及 AIH 患者血清进行代谢组学分析发现其重要临床意义,并确定了 5 类生物标记物,血清代谢谱分析技术可以为临床提供一个新的思路。但由于本试验取用的标本例数比较少,研究也不够深入,故需进行更深一步的探讨。

参考文献

- [1] 高莉,章丽娜,何彩琴,等. 232 例自身免疫性肝病患者合并其他自身免疫病情况及预后分析[J]. 中华消化杂志, 2015, 35(2): 90-94.
- [2] 中华医学会肝病学会. 自身免疫性肝炎诊断和治疗共识(2015)[J]. 国际消化病杂志, 2016, 21(1): 165-178.
- [3] IBÁÑEZ-SAMANIEGO L, SALCEDO M, VAQUERO J, et al. De Novo Autoimmune Hepatitis After Liver Transplanta-

tion; A Focus On Gsst1[J]. Liver Transpl, 2017, 23(1): 75-85.

- [4] LOHSE A W, CHAZOILLERES O, DALEKOS G, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis[J]. J Hepatol, 2015, 63(6): 1543-1544.
- [5] 辜雪琴, 范国荣, 陆峰, 等. 气相色谱-质谱代谢组学研究关键技术及典型应用[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(1): 68-73.
- [6] YAMAMOTO M, NOJIMA M, TAKAHASHI H, et al. Identification of relapse predictors in IgG4-related disease using multivariate analysis of clinical data at the first visit and initial treatment[J]. Rheumatol, 2015, 54(1): 45-49.
- [7] 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, 86(9): 1408-1414.
- [8] 王黎洲, 李兴, 宋杰, 等. 肝硬化合并顽固性腹水患者 TIPS 术后腹水改善的相关因素分析[J]. 实用放射学杂志, 2015, 16(5): 777-781.
- [9] 中华医学会肝病学会. 原发性胆汁性肝硬化(又名原发性胆汁性胆管炎)诊断和治疗共识(2015)[J]. 中华传染病杂志, 2016, 20(7): 960-968.
- [10] 梁艳, 杨再兴, 仲人前, 等. 原发性胆汁性肝硬化预后与治疗监测[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(2): 82-84.
- [11] 张学秀, 王立峰, 金磊, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者发生肝癌危险因素的研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(2): 147-149.
- [12] 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: 2017-08-26 修回日期: 2017-11-19)

(上接第 917 页)

参考文献

- [1] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1): 1-10.
- [2] 周总光, 杨烈, 李园. 我国结直肠癌 30 年变迁与应对策略[J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32(9): 693-696.
- [3] TÁRRAGA LÓPEZ P J, ALBERO J S, RODRÍGUEZ-MONTES J A. Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer[J]. Clin Med Insights Gastroenterol, 2014, 7(2): 33-46.
- [4] 冯斐, 燕锦, 袁萍, 等. 饮食习惯、生活方式与结直肠癌关系的配对病例对照研究[J]. 山东大学学报(医学版), 2013, 51(7): 107-112.
- [5] OTANI T, IWASAKI M, YAMAMOTO S, et al. Alcohol consumption, smoking, and subsequent risk of colorectal cancer in middle-aged and elderly Japanese men and women: Japan Public Health Center-based prospective study[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003, 12

(12): 1492-1500.

- [6] 邵红梅, 冯瑞, 朱红, 等. 中国人群结直肠癌危险因素 Meta 分析[J]. 中国慢性病预防与控制, 2014, 22(2): 174-177.
- [7] 校新华, 齐翠娟. 糖尿病治疗与肿瘤风险的关系[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(8): 1-3.
- [8] LEE M S, HSU C C, WAHLQVIST M L, et al. Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 20-25.
- [9] 杨志刚. 糖尿病患者合并结直肠癌的危险性分析[J]. 糖尿病新世界, 2015, 27(10): 224-225.
- [10] 李晓岚, 陈卫昌. 糖尿病与胰腺癌发生发展的关系[J]. 医学综述, 2011, 17(11): 1652-1654.

(收稿日期: 2017-09-15 修回日期: 2017-11-13)