

代谢组学在肝脏疾病研究中的应用*

罗小芳¹, 茹清静^{2△}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005)

摘要: 代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学等以后新近发展起来的一门新学科, 主要是定性定量分析、研究某一生物或细胞内所有低分子质量的代谢产物。近年来, 代谢组学技术发展迅猛, 其研究领域主要覆盖了药物毒理学研究、临床疾病诊断、微生物与植物学研究、食品营养科学及药物开发等。通过查阅文献资料, 笔者概述了代谢组学技术在肝脏疾病研究中的应用近况。

关键词: 代谢组学; 肝脏疾病研究; 应用进展

中图分类号: Q-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)05-0097-04

代谢组学是一种新型的、整体性的分析技术, 即应用现代分析仪器, 对生物体体液中的内源性代谢产物进行定性与定量的分析研究, 获得特征性的代谢标志物, 从而揭示生物体在某一特定环境下的基因调控功能。肝脏是机体代谢的枢纽, 承担了机体大部分的合成、分解和转化等代谢过程。故从代谢的角度研究肝脏和肝脏疾病很重要。

1 代谢组学的概况

1.1 代谢组学的概念和特点

代谢组学是晚近兴起的后基因组学, 是生命科学最热门的研究领域之一。代谢组学(Metabonomics)的概念, 由英国伦敦大学 Nicholson 博士在 1999 年首次提出, 它被定义为代谢物质动态响应的定量测定和定性分析, 如病理生理、遗传修饰的生物体和外界的刺激导致的改变等^[1]。2000 年, 德国马普所的 Fiehn 教授^[2]等提出了 metabolomics 的概念, 将代谢组学界说为一个静态的过程, 即对生物样品的整体代谢谱研究是在特定条件下进行的。近年来, 随着探究的深入, 科学家们对其概念也进行了完善和增补, 将代谢组学定义为: 通过分析生物体的体液、组织中内源性小分子代谢产物的变化, 获取生物标记物, 从而揭示不同时间与环境下的生物体整体功能状态的差异^[3]。

代谢组学来源于代谢组^[4], 是以组群指标分析

为基础, 以数据处理为手段, 以信息建模整合为目标, 通过对机体代谢产物在时间上的定量和定性分析, 从总体上评价生命体的功能状况及其改变^[5]。与其他组学相比较, 基因和蛋白质表达的有效微细变化会在代谢产物上得到放大, 便于检测, 代谢物含量的微细变化与生物表型的大改变是可以有直接相关性的^[6], 如 Billy David 曾言: “基因组学和蛋白质组学告诉你可能发生什么, 而代谢组学则告诉你已经发生了什么。”^[7]

1.2 代谢组学的研究方法

代谢组学的研究程序一般包括生物样本的采集, 样品预处理, 数据的收集、剖析与诠释, 符号识别和路径分析等环节^[8]。关键的环节是数据的分析和处理^[9], 常用的方法是核磁共振(NMR), 质谱(MS)及其联用技术: ①NMR 技术, 作为结构分析的有力工具, 它可以快速无创、无偏向性地对生物体液等复杂混合物进行检测, 样品不需要繁琐处理, 多种成分测定可同步进行^[10]。NMR 的局限性在于其灵敏度相对较低, 检测动态范围有限, 故不适合用于分析数量较大的低浓度代谢物。②MS 技术^[11], 单独运用时速度较快, 与其他技术联合使用则具有高灵敏度、高选择性、可定性定量分析多种代谢物等性质, 现已经成为代谢组学研究中的首选技术。气相色谱-质谱(GC-MS)^[12], 能同时测定上千种不同

* 基金项目: 浙江省自然科学基金(LY13H270006)

收稿日期: 2015-05-23

作者简介: 罗小芳(1987-), 女, 湖北襄阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医内科肝病方向。

△通信作者: 茹清静, E-mail: 13605810269@163.com

化合物的化学性质,具有较高的检测灵敏度,我们还能参考其提供的质谱库来确定待分析样品的代谢成分。最大的好处是,不需要那些非挥发性代谢产物的化学衍生化过程尤其适用于那些物质热稳定性差,难挥发和相对分子质量较大的物质;毛细管电泳-质谱(CE-MS)^[13],这是一个相对较新且具有发展前景的技术,其优势在于高分离效率和微量样本量,故可以同时得到不同类代谢物的不同的代谢组学特征。

2 代谢组学在肝脏疾病研究中的应用

作为机体代谢的重要器官,肝脏承担了大部分的合成、分解和转化等过程,一些酶和功能是肝脏所特有的;肝脏一旦受损,将影响全身各个系统器官的功能,因此从代谢的角度研究肝脏疾病,有其物质基础^[14]。故在肝脏疾病研究中具有不可或缺的作用。

2.1 代谢组学在乙型肝炎中的应用

全球人口中约有 20 亿人感染乙型肝炎病毒,其中 20%~35% 的患者最终将死于肝硬化或肝癌^[15]。杨永霞等^[16]利用超导核磁共振谱仪分别检测 8 例正常人血清和 11 例重型乙型肝炎患者血清,发现重症肝患者的蛋氨酸、三甲胺和葡萄糖含量升高,而乳酸、胆碱和脂质的含量降低。这些血清代谢物的差异可以帮助我们对重症乙肝患者的早期识别、诊断及治疗,提高预后生存率。侯丽娟等^[17]采用 NMR 技术检测慢性乙肝合并抑郁患者的尿液中的代谢物质,发现慢乙肝合并抑郁的患者尿液中乙酸盐、马尿酸盐和二甲基甘氨酸的含量显著升高,本研究结果有助于未来解决临床实践中抑郁症诊断不确定的困境。

2.2 代谢组学在脂肪肝中的应用

非酒精性脂肪肝是一种与肥胖、胰岛素抵抗及遗传因素有关的代谢性疾病^[18],是隐源性肝硬化的最主要病因^[19],70% 隐源性肝硬化由非酒精性肝炎导致^[20],肝活检是其临床诊断的金标准,但由于是一种有创技术,故临床推广受限。刘晓琳等^[21]通过液相色谱-四级杆飞行时间质谱技术在大鼠的肝脏和血清中检测差异表达的代谢物,结果发现 40 只大鼠都出现了代谢紊乱,且硬脂酰肉毒碱在非酒精性脂肪肝的不同表型中都稳定升高,为临床提供了一个敏感且无创的诊断脂肪肝的方法。酒精性肝病^[22](Alcoholic liver disease, ALD)是由于酒精直接对肝

脏细胞造成损害,引起肝细胞发生脂肪变性、坏死,孙长海等^[23]用 GC-MS 梁琦等^[25]结合代谢组学结果检测:确定了肌酐、氨基酸和谷胱甘肽等 7 种可早期诊断酒精性肝病患者的尿液中生物标记物。

2.3 代谢组学在肝损伤中的应用

肝损药物及其代谢产物的毒性作用、化学品及过敏反应等非病毒性因素是造成肝损伤的主要原因^[24],而临床上对肝损伤的诊断目前主要依靠排除法。广防己、汉防己的使用会影响涉及葡萄糖和脂质代谢的肝毒性和肝线粒体功能的影响;且涉及到能量代谢紊乱。Schoonen W^[26]等发现用溴苯诱导肝坏死的小鼠模型,其肝坏死的程度与溴苯的剂量成正相关,处理组小鼠的血清及尿液中的乳酸盐、酪氨酸等代谢产物的含量与对照组小鼠不同,提示我们可以通过检测代谢产物的改变来发现具有特异性生物学标记物的肝损伤。

2.4 代谢组学在肝硬化中的应用

肝硬化是由一个或多个病因长期或反复作用形成的弥漫性肝损害,目前代谢组学技术广泛应用于肝硬化的诊断^[27]。杨永霞等^[28]等用核磁共振氢谱(1H NMR)技术研究乙肝后肝硬化患者血清的代谢组学变化,发现磷酸胆碱/脂和胆碱含量降低,而乳酸、甲硫氨酸及葡萄糖的含量升高,这些代谢产物的差异提供了肝硬化在可靠的分子水平上的诊断依据,可尽早区分出乙肝和乙肝后肝硬化患者,便于及时进行治疗。

2.5 代谢组学在肝衰竭中的应用

肝衰竭^[29]是由多种因素引起的严重肝脏损害,导致其合成、解毒和排泄等功能发生严重障碍甚至失代偿,病死率极高。Yang 等^[30]研究肝功能衰竭鼠模型的代谢组学特征,发现肝功能衰竭组与对照组之间的血清胆汁酸峰值有明显差异,提示血清胆汁酸水平可以为肝衰竭的病因分析及进一步研究提供依据。Feng 等^[31]应用 CG-MS 研究了急性肝功能衰竭大鼠的血清代谢产物,发现血清中 β -羟丁酸盐、5-羟吲哚乙酸和磷酸盐含量水平均增高,提示代谢产物的变化能帮助急性肝功能衰竭的诊断。

2.6 代谢组学在原发性肝癌中的应用

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)目前发病率位居恶性肿瘤第 5 位,病死率居第 3 位^[32],同时它的 5 年生存率还不到 7%^[33]。甲胎蛋白(AFP)不是原发性肝癌独有的客观辅助指标,鉴于 AFP 的非特异

性,张蕾等^[24]选择 27 例肝癌患者、31 例肝硬化患者及 22 例健康志愿者的尿液样本,采用超高效液相色谱与质谱联用技术进行代谢组学的分析研究,结果发现四氢醛固酮 3 葡萄糖苷酸、胆汁甘氨酸等代谢物在肝癌组尿液中含量高于肝硬化组,而鹅脱氧胆酸、乳糖、吡啶酚等代谢物的含量均低于肝硬化组,这些代谢标志物的变化可以为原发性肝癌的发病机理及早期诊断提供重要的分子学依据。

2.7 代谢组学在肝移植中的应用

肝移植是治疗各种终末期肝脏疾病的主要手段。因为肝移植术前、术后患者易发生多器官的生理功能障碍和代谢紊乱,故及时准确地监测病情变化,是患者能否实施肝移植和评估移植肝功能状态的关键。有相关肝移植的研究^[35]表明,许多重要的生物标记物都与尿素代谢循环有关,如供肝者肝中甲基化精氨酸衍生物的浓度可以灵敏地预测移植肝的功能状态,而血清和尿液中的尿素异常降低、谷氨酰胺异常升高的水平平均可以用来判断是否出现肝移植肾功能异常及急性排异反应。

3 小结与展望

代谢组学技术正处于快速发展的阶段,能全面评估细胞在其自身微环境中的状态,具有巨大的应用潜力和科学价值,其在肝脏疾病中的应用范围也越来越广泛。我们有理由相信,随着代谢组学技术的进一步革新及分析技术的不断完善,我们能寻找出更多特征性代谢标志物,从而为其发病机理、诊断治疗提供新的客观依据。

参考文献:

- [1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabolomics: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimulate via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181–1189.
- [2] Fiehn O, Kopka J, Dormann P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1157–1161.
- [3] 王斯婷, 李晓娜, 王皎, 等. 代谢组学及其分析技术[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(9): 1792–1795.
- [4] Sweetlove LJ, Fernie AR. Regulation of metabolic networks: understanding metabolic complexity in the systems biology era[J]. *New Phytol*, 2005, 168(1): 9–21.
- [5] Liu CX, Li C, Lin DH, et al. Significance of Metabolomics in drug discovery and development [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, 4(12): 87.
- [6] Nobeli I, Thornton JM. A bioinformatician's view of the metabolome[J]. *Bioessays*, 2006, 28(5): 534–545.
- [7] German JB, Bauman DE, Burrin DG, et al. Metabolomics in the opening decade of the 21st century: building the roads to individualized health [J]. *Nutr*, 2004, 134(10): 2729–2730.
- [8] 许国旺, 路鑫, 杨胜利, 等. 代谢组学研究进展[J]. *中国医学科学院学报*, 2007, 29(6): 701–702.
- [9] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. Metabolomics: a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153–157.
- [10] Rooney OM, Troke J, Nicholson JK, et al. High-resolution diffusion and relaxation edited magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact liver tissue [J]. *Magn Reson Med*, 2003, 50(7): 925–927.
- [11] 卢红梅, 梁逸曾. 代谢组学分析技术及数据处理技术[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(3): 326–332.
- [12] 李灏, 姜颖, 贺福初, 等. 代谢组学技术及其在临床研究中的应用[J]. *遗传*, 2008, 30(4): 391–392.
- [13] Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, et al. Journal of Proteome Research[J]. *J Proteome Res*. 2003, 2(5): 488–491.
- [14] 刘欢, 韩涛. 代谢组学及其在肝脏疾病研究中的应用进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2008, 11(1): 60–61.
- [15] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1264–1273.
- [16] 杨永霞, 陈书峰, 陈阿丽, 等. 重症乙型肝炎患者血清代谢组研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2011, 36(3): 220–222.
- [17] 侯丽娟, 许清玉, 段树鹏, 等. 尿液代谢组学诊断乙肝患者的抑郁症状 [J]. *上海交通大学学报*, 2014, 34(11): 1647–1651.
- [18] 李萌, 吴涛, 季光, 等. 代谢组学在中医药治疗非酒精性脂肪肝研究中的应用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(7): 1044–1045.
- [19] Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ, et al. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study[J]. *Hepatology*, 2000, 32(5): 689–692.
- [20] Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni J, et al. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease[J]. *Hepatology*, 1999, 29(13): 664–669.
- [21] 刘晓琳, 明雅南, 张静怡, 等. 非酒精性脂肪性肝病不同表型的代谢组学研究[J]. *肝脏*, 2015, 20(2): 95–100.
- [22] 周云飞, 陈伟军. 酒精性脂肪肝流行病学调查[J]. *现代医药卫生*, 2001, 17(9): 732–734.
- [23] 孙长海, 陈百慧, 王蒙, 等. 酒精性肝病患者尿液代谢组学研究[J]. *黑龙江医药科学*, 2013, 36(5): 44–45.
- [24] 孔明, 戴菁, 孙旖, 等. 药物性肝损伤生物标志物研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(3): 290–293.

- [25] 梁琦,倪诚,颜贤忠,等. 广防己、粉防己的肝肾毒性及代谢组学比较研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2882–2888.
- [26] Schoonen W, Lioks C, Ploem JP, et al. Sensitivity of ¹H NMR analysis of rat urine in relation to toxico-metabonomics. Part 1: Dose dependent toxic effects of bromobenzene and paracetamol[J]. Toxicol Sci, 2007, 98(3): 272–283.
- [27] 郭孜, 王文玉, 戴建玉, 等. 乙肝后肝硬化证候的尿代谢组学研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2012, 14(1): 1282–1286.
- [28] 杨永霞, 杨生义, 梁敏锋, 等. 乙肝后肝硬化患者血清代谢组的核磁共振[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(1): 99–101.
- [29] XU Bin, WANG Hai long, WEI Kai hua, et al. Metabonomics analytical techniques and their applications in the study of serious and fatal diseases [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2006, 25(5): 128–133.
- [30] Yang L, Xiong A, He Y, et al. Bile acids metabonomic study on the CCl₄-and alpha-naphthylisothiocyanate-induced animal models: quantitative analysis of 22 bile acids by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chem Res Toxicol, 2008, 21(12): 2280–2288.
- [31] Feng B, Wu S, Lv F, et al. Metabolic profiling analysis of a D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced mouse model of fulminant hepatic failure[J]. J Proteome Res, 2007, 6(6): 2161–2168.
- [32] El-Serag HB, Rudolph L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557–2559.
- [33] Kassahun WT, Fangmann J, Harms J, et al. Liver resection and transplantation in the management of hepatocellular carcinoma: a review [J]. Exp Clin Transplant, 2006, 4(2): 549–558.
- [34] 张蕾, 范志娟, 张磊, 等. 肝细胞肝癌患者尿液代谢轮廓分析及潜在生物标志物筛选 [J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4(2): 73–78.
- [35] Martin-Sanz P, Olmedilla L, Dulin E, et al. Presence of methylated arginine derivatives in ortho topic human liver transplantation: relevance for liver function [J]. Liver Transpl, 2003, 9(1): 40–47.
- (编辑: 徐建平)

(上接第 86 页)

- [13] 王家璧. 皮肤性病治疗检测进展和精要[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005: 211–212.
- [14] 何慧英, 曹毅, 马丽俐, 等. 生发 1 号胶囊治疗脱发的临床研究[C]//2005 年全国中西医结合医学美容学术研讨会, 2005.
- [15] 刘光颖, 李峥. 丹参现代药理研究概述[J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(5): 153–156.
- (编辑: 徐建平)

The Clinical Effect of Intralesional Glucocorticoid Injection in the Treatment of Alopecia Areata Patients with Eyebrow Loss Symptom

SUN Dan, YANG Xiaohong, HE Huiying, TAO Maocan, LU Xianchang, CAO Yi[△]
(The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the clinical effect of local injections with glucocorticoid for alopecia areata (AA) patients who with eyebrow loss. **Methods** 60 AA patients with eyebrow loss were divided into three groups in order of been diagnosed initially. 20 cases in the treatment group were treated with diprospan suspension localized injection biweekly and hair-promoting capsules I orally taken five capsules per time and three times per day; 20 cases in the control group I were treated with diprospan suspension localized injection biweekly; 20 cases in the control group II were treated with hair-promoting capsules I orally taken five capsules per time and three times per day; The injection of the glucocorticoid suspension was stopped after 8 weeks, while hair-promoting capsule I was continued to 12 weekends. The observational indicator was evaluated at baseline, 2nd weekends, 4th weekends, 8th weekends and 12th weekends after treatment. **Results** The difference of clinical effects showed significance as time goes on ($F=218.253$, $P<0.01$); Time factors and group factors had interactive effects on clinical effects: the clinical effect of treatment group and control group showed gradual improvement as time goes on ($F=7.709$, $P<0.01$); The clinical effect of treatment groups were more significant than control group ($P<0.01$), the difference between control group I and control group II was not obvious ($P>0.05$). **Conclusion** The glucocorticoid localized injection has many characteristics with simplicity operation, quickly and precisely clinic effect, and its side effect would gradually resolved as time goes on after glucocorticoid withdrawl. Combination of glucocorticoid localized injection and hair-promoting capsules I orally taken is worth to promote to treat AA patients with eyebrow loss symptom.

KEY WORDS: local injection; glucocorticoid; alopecia areata; eyebrows loss