

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.11.009

## 基于HPLC/Q-TOF-MS的甲状腺乳头状癌组织代谢组学研究

杜洋<sup>a</sup>, 邹联洪<sup>b</sup>, 范培芝<sup>a</sup>(湖南师范大学附属第一医院暨湖南省人民医院 a. 乳甲外科; b. 急危重症代谢组学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410002)

**[摘要]** **目的:** 用组织代谢组学方法, 探讨甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)组织及癌旁组织的代谢差异, 寻找PTC的潜在生物标志物, 探索PTC的发病机制与治疗策略。**方法:** 收集2018年10月至2020年2月期间湖南省人民医院乳甲外科手术切除的40例PTC患者的癌组织及癌旁组织标本。利用HPLC-MS技术平台对PTC组织及癌旁组织样本的差异性代谢物进行多维统计分析, 寻找与PTC相关的异常代谢通路。**结果:** 经PCA、PLS-DA、OPLS-DA分析得知癌组织和癌旁组织的代谢轮廓具有显著性差异。经OPLS>Loading plot分析, 结合VIP>1、FC>2, 且P<0.05, 筛选出76个潜在差异性代谢物。其中亮氨酸、2-褪黑素、香草酸等33种代谢物在PTC组织中表达上调; 3-葡萄糖苷、甘油磷脂、磷脂酰胆碱、乳糖等43种代谢物在PTC癌组织中表达下调。寻找与差异性代谢物相关的13条异常代谢通路, 如半胱氨酸与蛋氨酸代谢、与甘油磷脂代谢、嘧啶代谢、半乳糖代谢以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、柠檬酸循环等, 这些代谢通路可能参与PTC代谢的病理生理过程。ROC曲线下面积大于0.9的差异性代谢物有5种, 分别是庚二酸、糖醇、辛酸、乳糖和L-丝氨酸。**结论:** PTC组织中半乳糖代谢和氨基酸代谢发生改变, PTC组织细胞中存在沃伯格效应(Warburg effect)。庚二酸、糖醇、辛酸、乳糖、L-丝氨酸五种差异性代谢物可以用来区分PTC患者与正常人。

**[关键词]** HPLC/Q-TOF-MS; 甲状腺乳头状癌; 代谢组学; 代谢通路

**[中图分类号]** R736.1; R730.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)11-1264-08

## Research of tissue metabolomics in papillary thyroid carcinoma based on HPLC/Q-TOF-MS

DU Yang<sup>a</sup>, ZOU Lianhong<sup>b</sup>, FAN Peizhi<sup>a</sup> (a. Department of Breast and Thyroid Surgery; b. Hunan Provincial Key Laboratory of Acute and Critical Metabolomics, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University & Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410002, Hunan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the metabolic differences between papillary thyroid carcinoma (PTC) tissues and adjacent tissues using tissue metabolomics methods, and to search for potential biomarkers of PTC as well as to explore the pathogenesis and treatment strategies for PTC. **Methods:** Collected cancer and para-cancerous tissue specimens from 40 patients with PTC who had undergone breast surgery at Department of Breast and Thyroid Surgery of Hunan Provincial People's Hospital from October 2018 to February 2020. Using the HPLC-MS technology platform, multi-dimensional statistical analysis of differential metabolites in PTC tissues and adjacent tissues was performed to find abnormal metabolic pathways related to PTC. **Results:** PCA, PLS-DA, OPLS-DA analyses showed that the metabolic profiles of cancer tissues and adjacent tissues were significantly different. OPLS>Loading plot analysis screened 76 potential differential metabolites (VIP>1, FC>2, and P<0.05). Among them, 33 metabolites such as Leucyl-phenylalanine, 2-Oxomelatonin and Vanillic acid were up-regulated in PTC tissues; 43 metabolites such as 3-glucoside, glycerophospholipid, phosphatidylcholine and lactose were down-regulated in PTC tissues. 13 abnormal metabolic pathways related to differential metabolites that may be involved in the pathophysiological process of PTC metabolism were found, such as: cysteine and methionine metabolism, glycerophospholipid metabolism, pyrimidine metabolism, galactose metabolism and alanine, aspartic acid and glutamic acid metabolism, citric acid cycle and so on. There were five types of differential metabolites with an area under the ROC curve greater than 0.9, namely pimelic acid, solerol, suberic acid, Alpha-Lactose and L-Serine. **Conclusion:** The galactose metabolism and amino acid metabolism in PTC tissues have changed, and Warburg effect exists in cells of PTC tissues. Pimelic acid, solerol, suberic acid,

**[基金项目]** 湖南省临床医疗技术创新引导项目资助(No. 2018SK50720); 湖南省自然科学基金资助项目(No. 2017JJ3171); 湖南省卫健委重点项目(No. A2017003); 长沙市科技计划项目资助(No. kq1701045)。Project supported by the Clinical Medical Technology Innovation and Guidance of Hunan Province (No. 2018SK50720), the Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 2017JJ3171), the Key Project of Health Commission of Hunan Province (A2017003), and the Science and Technology Project of Changsha City (No. kq1701045)

**[作者简介]** 杜洋(1993-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事甲状腺疾病的临床与基础研究, E-mail: 469414710@qq.com

**[通信作者]** 邹联洪(ZOU Lianhong, corresponding author), 助理研究员, 硕士生导师, 主要从事甲状腺疾病的基础研究, E-mail: zoulh1986@hunnu.edu.cn

Alpha-Lactose and L-Serine can be used to distinguish PTC from normal people.

[Key words] HPLC/Q-TOF-MS; papillary thyroid carcinoma (PTC); metabolomics; metabolic pathway

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(11): 1264-1271. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.11.009]

甲状腺癌是临床上最常见的内分泌肿瘤,占全部恶性肿瘤的1.1%<sup>[1]</sup>。其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺癌中最常见的类型,约占所有甲状腺癌的90%,多见于30~45岁女性,具有分化程度好,恶性程度低,但早期易出现淋巴结转移等特点,因此,早期诊断、及时治疗对提高PTC患者长期生存具有重要意义。超声引导下细针穿刺细胞学检查(fine needle aspiration cytology, FNAC)是甲状腺癌诊断中常用的辅助检查。虽然影像学检查对于甲状腺癌的诊断灵敏度较高,但特异度却较差<sup>[2]</sup>。FNAC是目前最准确、最具成本效益的评估甲状腺结节良、恶性的方法,但仍有20%~30%不能经FNAC确定良、恶性。由于某些甲状腺微小乳头状癌的异常细胞较少,所以会出现漏诊甚至误诊的情况<sup>[3]</sup>。因此,寻找一种稳定可靠的生物标志物来辅助甲状腺癌的诊断是很有必要的。

代谢组学被简单地定义为在特定条件下对生物系统代谢组的全面分析,它是高通量组学技术之一,在系统生物学中也起着重要作用。代谢组由数千种复杂的小分子代谢物组成,其相对分子质量通常在 $1 \times 10^3$ 以下。本研究主要采用高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱技术(HPLC-Q-TOF-MS/MS)代谢组学方法对PTC及癌旁组织样本进行检测,通过筛选差异代谢物,寻找异常代谢通路,探索PTC的潜在生物标志物,为PTC的早期诊断、早期治疗提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 主要仪器与材料

甲醇(赛默飞世尔科技中国有限公司);乙腈(赛默飞世尔科技中国有限公司);液相色谱质谱联用仪(美国Thermo scientific公司);液相质谱分析仪(美国Bruker公司);G-560E型漩涡振荡器(美国Thermo Scientific公司);研磨仪(上海净信实业发展有限公司);MetaboScape 3.0(美国Bruker公司);Origin 9.1软件(美国OriginLab);SIMCA-P 14.1软件(瑞典Umetrics公司);MetaboAnalyst 4.0(美国Bruker公司)

### 1.2 研究对象

本课题实验使用的所有样本均取自于2018年10月至2020年02月期间湖南省人民医院乳甲外科患者,样本均为经病理确诊的PTC患者的癌组织和癌旁组织,共计80例(癌和癌旁组织各40例)。本实验纳入标准:(1)术后均病理确诊为PTC;(2)术前甲状腺功能在正常范围内,包括甲状腺激素(T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>)和促

甲状腺激素;(3)术前未曾服用甲状腺激素相关药物;(4)无代谢性、免疫性疾病(如糖尿病、高血压等);(5)既往无恶性肿瘤病史。本实验排除标准:(1)确诊甲状腺癌时,患者已合并其他致命性疾病;(2)缺失完整的临床资料。

本课题所使用的甲状腺癌患者组织样本的病理分型均为PTC(不包括甲状腺微小乳头状癌)。其中,PTC组共40例,其中男9例、女31例,发病年龄范围20~54岁,平均发病年龄37.8岁,中位发病年龄38岁;其中0例有甲状腺癌家族史、远处转移,40例PTC均为原发肿瘤,27例有周围淋巴结转移,10例肿块位于甲状腺左侧叶,20例肿块位于甲状腺右侧叶,7例肿块位于甲状腺双侧叶,3例肿块位于甲状腺峡部。临床分期为I期的有13例,II期的有20例,III期的有5例,IV期的有2例。PTC的分期(tumor node metastasis, TNM)根据美国肿瘤联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)发布的甲状腺癌指南2018年第8版。

### 1.3 标本采集与处理

1.3.1 标本采集 实验样品均为手术中采集样本的PTC标本(包括术前穿刺确诊以及术中快速冰冻切片确诊的PTC标本);标本在离体15 min内用生理盐水冲洗并冻存在实验室-80℃超低温冰箱内,以便研究中使用;癌旁组织取距离病灶组织3 cm内的甲状腺组织,尽量避免电刀灼烧部分;运输过程中以碎冰做冷链。

1.3.2 标本的预处理 首先从-80℃超低温冰箱内取出冻存的标本组织,再将冰冻组织标本置于4℃冰箱解冻30 min;精确称取30 mg组织样本到1.5 ml EP管中,加入20 μl内标(L-2-氯-苯丙氨酸,0.3 mg/ml,甲醇配置),加入400 μl甲醇水溶液(CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O v:v=4:1);加入两个小钢珠,在-80℃冰箱中放置5 min后,放入研磨机中研磨(60 Hz, 2 min);超声提取10 min, -20℃静置30 min;4℃低温离心10 min,取200 μl的上清液,装入带内衬管的LC-MS进样小瓶中。

### 1.4 HPLC-MS分析

以HPLC-MS作为代谢物分离检测平台,研究PTC与癌旁组织的代谢差异,在质谱正及负离子模式下采集数据;超高效液相色谱条件:Acclaim TMRSLC120-C18色谱柱(100 mm×2.1 mm),柱温保持在40℃,进样量3 μl。流动相A为0.1%(体积分数)甲酸/水(含2 mmol/L甲酸铵),流动相B为0.1%(体积分数)乙腈/水,梯度设置:2% B持续0~2 min, 50% B持续2~12 min, 90% B持续10~30 min, 98% B

继续持续作用 30~60 min;流速维持在 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;质谱条件为:电喷雾离子源(electrospray ion source, ESI $\pm$ ),采用正负离子模式检测,使用高纯 $\text{N}_2$ 辅助喷雾电离与脱溶剂,流速为 1.2 L/min 质量扫描范围 20~1 000  $m/z$ ,干燥气温度 200  $^\circ\text{C}$ 。

### 1.5 数据处理与模式识别

**1.5.1 数据预处理** 在进行原始数据分析之前,利用 Metaboscape 3.0 软件对这些原始数据进行峰提取、降噪、标准化、导出等预处理。再将原始数据上传至 HMDB 数据库(Human Metabolome Database; <https://www.hmdb.ca>)、Annotate with Smartformula 在线网站数据库进行匹配,最后输出质荷比、保留时间、代谢物信息等。

**1.5.2 多维数据统计学分析** 预处理后的数据导入 Simca-P14.1 软件进行模式多元分析识别,包括主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)。首先执行 PCA 以进行数据概述和离群值检测。然后执行 PLS-DA 进行分类。通过 200 次置换检验验证模型是否过拟合,以此来了解模型的可靠性。参数  $R^2$  和  $Q^2$  分别用于评估模型的可解释性和可预测性。进一步进行 OPLS-DA,以使比较组之间的分离最大化。通过分析投影上的变量重要性来发现 OPLS 模型中的变量权重值(variable important in projection, VIP)。

**1.5.3 差异表达代谢物的鉴别** 成功构建模型后,通过组间差异性分析,选择已鉴定的  $\text{VIP}>1$ 、 $P<0.05$  且差异性倍数( $\text{FC}$ ) $>2$  的代谢物作为比较组之间的差异性代谢物,通过模式识别,得出这些差异代谢物。

**1.5.4 代谢通路分析** 在 MetaboAnalyst 4.0(<https://www.metaboanalyst.ca/>)网站中,利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行代谢通路分析。

## 2 结果

### 2.1 PTC 患者癌组织与癌旁组织之间代谢模式的比较

利用 PCA 方法对 PTC 组织与癌旁组织样本的代谢物轮廓进行分析,结果(图 1A、B)显示,在正负离子模式下,癌组织样本和癌旁组织样本的组间差异较为显著,两组间的代谢轮廓存在明显差异。图中所示的绿色圆点代表癌旁组织(PTC adjacent),蓝色方块代表 PTC 组织(PTC)。

利用 PLS-DA 方法对癌组织与癌旁组织样本的代谢物轮廓进行分析,结果(图 1C、E)显示,正离子模式下,癌和癌旁组织样品的代谢组学的组间存在显

著差异 [ $R^2X(\text{cum})=0.289$ ,  $R^2Y(\text{cum})=0.897$ ,  $Q^2(\text{cum})=0.772$ ];对其 PLS-DA 进行 200 次置换检验,  $R^2Y=0.71$ ,  $Q^2Y=-0.101$ ,提示不存在过拟合现象,结果如图 1D,说明该 PLS-DA 模型结构可靠。在负离子模式下,癌和癌旁组织样品的代谢组学数据同样存在明显的组间差异 [ $R^2X(\text{cum})=0.893$ ,  $R^2Y(\text{cum})=0.624$ ,  $Q^2(\text{cum})=0.532$ ],进行 200 次置换检验发现,  $R^2Y=0.118$ ,  $Q^2Y=-0.0458$ ,提示没有出现“过拟合”现象,结果如图 1F,说明负离子模式下 PLS-DA 模型有效,癌和癌旁组织代谢特征存在差异。

同时,还利用 OPLS-DA 对癌组织与癌旁组织样本的代谢物轮廓进行分析,结果(图 1G、I)显示,在正负两种离子模式下,癌和癌旁组织组间分离较好,两组之间代谢产物轮廓存在明显区别,同时,两组内样本聚类较为集中,聚集程度高,不存在明显的组内差异。在 OPLS-DA 模型中,经 200 次置换检验,结果在正离子模式下置换检验的  $R^2$  截距为 0.819,  $Q^2$  的截距为 -0.423,如图 1H;在负离子模式下置换检验的  $R^2$  截距为 0.12,  $Q^2$  的截距为 -0.0507,如图 1J。这说明了 OPLS-DA 模型没有出现“过拟合”,模型可靠,说明 OPLS-DA 模型可以用来区分癌和癌旁组织,且该模型具有较高的区分度和预测率。

### 2.2 PTC 组织与癌旁组织之间差异性代谢物

通过上述多变量统计分析方法成功构建了用于组间区分的 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 模型,并且确定了 PTC 和癌旁组织之间存在的显著性代谢差异。通过 200 次置换检验过的 OPLS-DA 模型根据 VIP 来进一步筛选潜在的差异性代谢物。采用  $t$  检验等单变量分析方法,认为  $P<0.05$  具有统计学差异。

在正负离子模式下,结合  $\text{VIP}>1.0$ 、 $\text{FC}>2.0$  且  $P<0.05$  的条件,通过 MetaboAnalyst 4.0 网站进行非参数检验,最终得出癌和癌旁组织差异性代谢物共 76 种,按  $\text{FC}$  值排序的前 10 种差异性代谢物详情列于表 1。

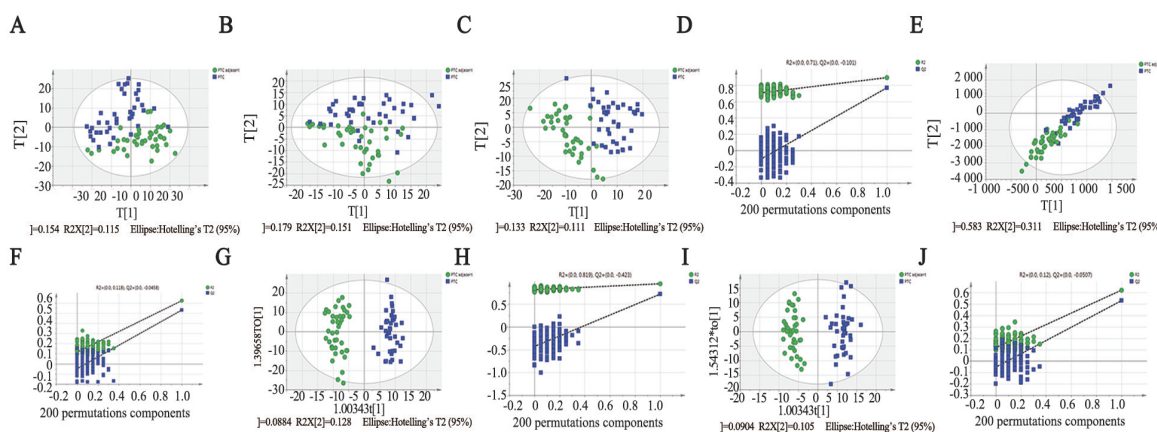
### 2.3 PTC 组织与癌旁组织之间差异性代谢通路分析

利用 MetaboAnalyst 4.0 对 PTC 与癌旁组织的差异性代谢物进行代谢通路分析。在 KEGG 数据库中,根据  $-\log(P)>0.5$  且 Pathway impact 值大于 0.05 筛选出 13 条代谢通路(图 2),分别为硫代谢(sulfur metabolism)、牛磺酸和次牛磺酸代谢(taurine and hypotaurine metabolism)、氨酰 tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)、视黄醇代谢通路(retinol metabolism)、半胱氨酸与蛋氨酸代谢通路(cysteine and methionine metabolism)与甘油磷脂代谢通路(glycerophospholipid metabolism)、嘧啶代谢通路(pyrimidine metabolism)以及半乳糖代谢通路(galactose metabolism)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代



谢通路(alanine, aspartate and glutamate metabolism)、二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、精氨酸生物合成(arginine biosynthesis)、柠檬酸循环(citrate cycle)、丙酮酸盐代谢通路(pyruvate metabolism)。圆圈的大小(横坐标)代表通路影响

值,反映代谢产物在该通路中的重要程度。圆圈颜色深浅(纵坐标)代表P值的大小,反映代谢物在整个代谢通路中的是否具有显著性差异。圆圈越靠近右上角,表示代谢物对途径的影响越大。用数字1~13将有意义的代谢通路依次排序。



A, B: The scatter plots analyzed by PCA; C, E, G, I: PLS-DA (Figure 1C, E) and OPLS-DA (Figure 1G, I) showed that the metabolism of PTC tissues was different from that of adjacent tissues; D, F, H, G: The scatter plots of OPLS-DA analysis of PTC adjacent (green dots) and cancer tissues (blue squares) groups more clearly showed the metabolic differences between the two groups. Use permutation test to test the reliability of the model

图1 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 分析方法进行多元分析识别

Fig.1 PCA, PLS-DA and OPLS-DA analysis methods were used for multivariate analysis and identification

表1 正负离子模式下PTC组织和癌旁组织差异性代谢物(前10)

Tab.1 Differential metabolites in PTC tissues and adjacent tissues in positive and negative ion mode (Top10)

No.	Name	FC	log <sub>2</sub> (FC)	P	VIP	HMDB ID	ESI±
1	Leucyl-phenylalanine	8.2149	3.0382	8.84E-07	1.73439	HMDB0013243	M + H
2	2-Oxomelatonin	7.5819	2.9226	1.10E-05	1.6916	HMDB0060721	M + H
3	Vanillic acid	7.4366	2.8947	2.39E-07	1.65857	HMDB0000913	M + H
4	Aspartylphenylalanine	7.0347	2.8145	2.95E-08	1.72915	HMDB0000706	M + H
5	2-Methylcitric acid	6.0081	2.5869	1.18E-07	1.47845	HMDB0000379	M - H
6	Undecanedioic acid	4.8098	2.266	1.18E-06	1.78611	HMDB0000888	M + H
7	Homo-L-arginine	4.3018	2.1049	0.0057553	1.52689	HMDB0000670	M + H
8	Tetrahydroaldosterone-3-glucuronide	4.093	2.0332	2.06E-08	1.68811	HMDB0010357	M + H
9	Glycylproline	3.914	1.9687	6.83E-06	1.28339	HMDB0000721	M + H
10	5,6-Dihydrouridine	3.4822	1.8	0.0033371	1.3649	HMDB0000497	M + H

2.4 生物标志物

在PTC与癌旁组织的76种差异性代谢物中,其中有5种差异性代谢产物(庚二酸、糖醇、辛二酸、α-乳糖、L-丝氨酸)的ROC曲线下面积(area under ROC curve, AUC) > 0.9,因此庚二酸、糖醇、辛二酸、α-乳糖、L-丝氨酸等五种差异性代谢物可以来区分PTC组织与癌旁组织,如图3所示,庚二酸、糖醇、辛二酸、α-乳糖在PTC组织中的浓度明显低于癌旁组织,L-丝氨酸在PTC组织中的浓度明显高于癌旁组织。对该

5种差异性代谢物进行通路分析得到代谢通路图,如图4所示。表2为图4代通路图的信息列表。

3 讨论

本文采用HPLC-MS技术对40例PTC患者的癌组织和癌旁组织的代谢轮廓进行了分析,PCA、OPLS-DA分析结果均表明,癌组织和癌旁组织的代谢轮廓具有显著性差异,经OPLS—Loading plot分析寻找到76个差异性代谢产物以及代谢通路13条相

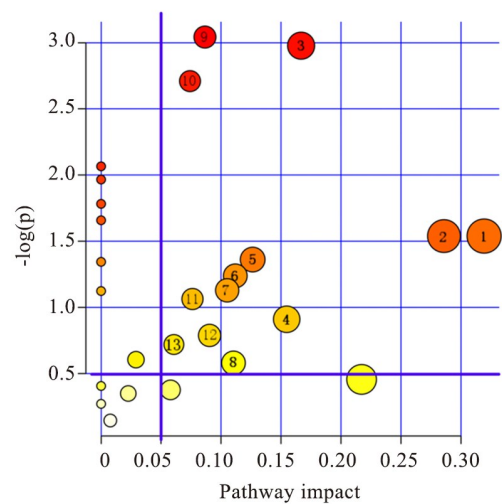
关异常代谢通路,其中大多属于糖代谢、氨基酸代谢、脂类代谢。将以上76个差异物进行ROC分析,发现ROC曲线下面积不小于0.9的差异物有5个,经分析可得出:该5个差异性代谢物与半乳糖代谢和甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢有关。

OTTO WARBURG<sup>[4]</sup>发现,癌细胞生长过程中通过糖酵解产生大量能量,这与正常细胞的氧化磷酸化的能量代谢方式大相径庭。这也表明癌细胞生长方式的不同主要是因为涉及到的能量产生途径的方式不同<sup>[5]</sup>。健康细胞中的能量来源于线粒体氧化糖类分子,而肿瘤细胞主要依赖糖酵解为自身供能,这种作用机制既不需要氧原子参与也不需要线粒体参与。

通过HPLC-TOF-MS的代谢组学分析结果表明, $\alpha$ -乳糖参与了半乳糖代谢通路途径,且可以作为区分PTC与癌旁组织的差异性代谢物,乳糖在PTC组织中的含量较癌旁组织含量明显下降。如ROC曲线分析图所示,乳糖ROC曲线下面积大于0.932,在PTC癌组织中的含量为癌旁组织含量的0.015倍。说明乳糖可以用来区分PTC组织及正常组织。基于这个发现,可以推测PTC发生发展能涉及到半乳糖代谢,这势必与肿瘤的能量代谢有关。虽然癌细胞的能量来源主要依赖糖酵解过程,而不是正常的氧化磷酸化过程,但糖酵解过程的ATP产生效率远远低于氧化磷酸化过程,因此在癌细胞需要大量的葡萄糖(glucose)作为能量来源。在肠道内乳糖(lactase)通过 $\alpha$ -半乳糖苷酶(Lac Z)和乳糖水解酶化(LCT)分别分解为半乳糖和葡萄糖,然后它们利用同一肠道上皮细胞进入血液,参与全身的代谢反应,所以半乳糖(galactose)和葡萄糖之间对同一转运体存在竞争性作用。在糖酵解供能过程中,鉴于癌细胞对于葡萄糖的需求量比正常细胞要高,因此推测半乳糖的吸收被竞争性的抑制,这就导致半乳糖的浓度降低,从而相应得引起半乳糖降解产物在癌组织中的浓度也

有所下降。据SHANG<sup>[6]</sup>代谢物富集分析结果,半乳糖代谢途径影响了能量代谢,被认为是影响PTC发展的重要因素,半乳糖苷酶被认为是PTC治疗的潜在靶点,因此进一步研究乳糖代谢在甲状腺癌的作用是有必要的。

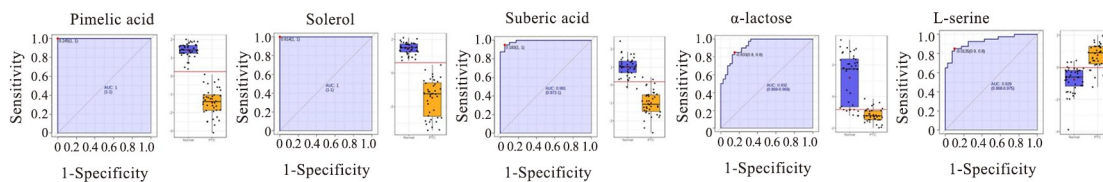
本研究通过对PTC与癌旁组织进行差异性代谢物检测,发现PTC中的磷脂酰胆碱、1-酰基-甘油-3-磷酸胆碱等等多种脂肪酸含量较癌旁组织下降。磷脂酰胆碱、1-酰基-甘油-3-磷酸胆碱所在的甘油磷脂代谢通路的影响值大于0.11(大于0.1),说明甘油磷脂代谢通路与PTC的发生发展相关。



Pathway analysis based on “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG).The color and size of each circle is based on p-values (yellow: higher P-values and red: lower P-values) and pathway impact values (the larger the circle the higher the impact score)calculated from the topological analysis, respectively. Pathways were considered significantly enriched if  $P < 0.05$ , impact 0.1 and number of metabolite hits in the pathway  $> 1$

图2 代谢通路分析结果

Fig.2 Results of pathway analysis of metabolomics data



ROC curve of pimelic acid, Solerol, suberic acid,  $\alpha$ -lactose, L-serine. The ROC curve on the left is based on non-target metabolomics data. The abscissa in the ROC curve graph represents specificity, and the ordinate represents sensitivity. The histogram on the right reflects the statistically significant changes in the concentration of biomarkers and metabolites between PTC cancer tissue and adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). The yellow histogram in the figure represents the concentration of PTC cancer tissue, the blue histogram represents the concentration of adjacent tissues

图3 ROC曲线分析5种代谢物诊断PTC癌组织与癌旁组织的能力

Fig.3 ROC curve analysis of the ability of five metabolites to diagnose PTC cancer tissues and adjacent tissues

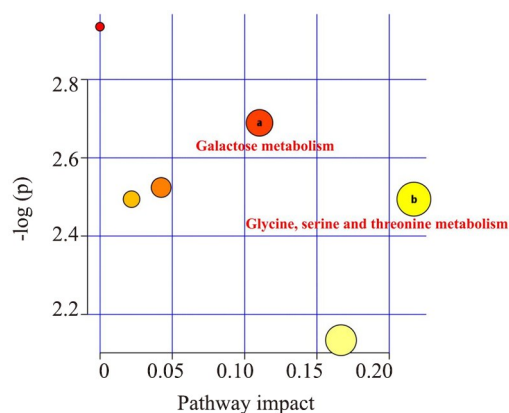
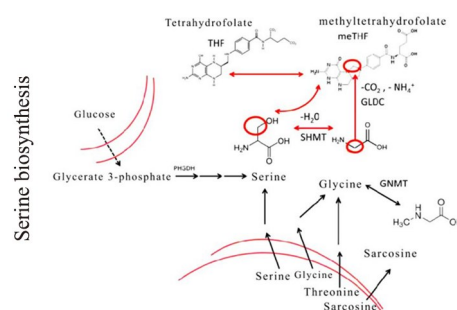


图4 庚二酸、糖醇、辛二酸、乳糖、L-丝氨酸5种差异性代谢物涉及的半乳糖代谢及甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路图

Fig.4 Diagram of galactose metabolism and glycine, serine, and threonine metabolism pathways involved in five different metabolites of pimelic acid, solerol, suberic acid,  $\alpha$ -lactose, L-serine



The metabolism of serine and glycine is de novo produced by glycolysis through oxidation of the intermediate product 3-phosphoglycerate. Serine and glycine are also transported into the cell, and sarcosine and threonine can also enter the cell to be converted into glycine. The dashed arrows indicate multiple biochemical steps. The double arrow indicates a reversible step. Abbreviations: PHGDH: phosphate dehydrogenase, GLDC: glycine decarboxylase, SHMT: serine hydroxymethyltransferase, GNMT: glycine-N-methyltransferase, THF: tetrahydrofolate, Me-THF: methyltetrahydrofolate

图5 丝氨酸生物合成  
Fig.5 Serine biosynthesis

表2 相关代谢通路的信息列表

Tab.2 A list of information about the relevant generation pathways

No.	Metabolic pathway	Total	Expected	Hits	Raw P	Impact	Hm adjus	FDR	Database
1	Galactose metabolism	27	0.07	1	2.15E-01	0.32	1.00E+00	1.00E+00	KEGG
2	Glycine, serine and threonine metabolism	33	0.07	1	2.15E-01	0.29	1.00E+00	1.00E+00	KEGG

甘油磷脂类是真核细胞膜中最为常见的磷脂类成分,其中磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)共同约占细胞膜磷脂类成分的50%,除构成细胞膜外,甘油磷脂类还参与细胞膜对蛋白质的识别和信号传导等活动。甘油磷脂类的合成及代谢途径在PTC发生发展中显得尤为突出和重要。通常情况下,在恶性肿瘤组织中,由于甘油磷脂类合成大于分解,所以胆碱类物质呈高水平表达<sup>[7-8]</sup>。恶性肿瘤发生发展过程中伴随着膜类结构的大量破坏,胆碱在恶性肿瘤机体内水平也会升高。其次,据WOJAKOWSKA等<sup>[9]</sup>报道,磷脂酰胆碱(PC)及甘油磷酸胆碱(glycerophosphocholine)在PTC组织中呈显著性的高水平表达,且代谢终产物胆碱可再次进入从头合成途径中生成新的PC类,表明了PTC的癌细胞在源源不断地合成与分解生成新的磷脂类成分,以满足癌细胞不断增殖与更新的需求。

但在本研究中发现磷脂酰胆碱、溶血磷脂等胆碱类物质在PTC患者体内含量相对较低,与既往其他实验结果相矛盾。分析其中原因:(1)本实验纳入研究的病例均为I、II期的甲状腺癌患者,未发生局部或远处转移,因此未表现为胆碱升高。这恰好与

YANG<sup>[10]</sup>在研究乳腺癌中胆碱变化结果一致,这也意味着胆碱的变化可能与癌细胞是否发生转移密切相关。这些I期、II期PTC的患者中,脂类物质快速合成,消耗大量胆碱,因此胆碱降低。据相关报道,胆碱代谢与机体甲基化状态有关,这与甲状腺癌发病机制有关<sup>[11-12]</sup>;(2)本实验仅纳入40例癌组织病例,可能存在一定的误差,有待进一步研究论证。

癌细胞会通过特定的代谢途径以维持细胞的不断生长与增殖。在此期间癌细胞会有大量的能量需求。同时,新生的癌细胞也需要大量的生物分子构件,包括蛋白质、核酸、脂质以及维持细胞氧化还原状态的重要辅助因子。氨基酸在肿瘤的发展进程中充当了十分重要的营养源头的的作用,它可以作为新生癌细胞的主要碳源。丝氨酸是哺乳动物细胞中产生1-碳(1C)单位的主要代谢来源,丝氨酸代谢提供了氨基酸和核苷酸等必需的前体,丝氨酸代谢控制细胞的抗氧化和甲基化能力,促进癌细胞的生长<sup>[13]</sup>。SHMT1和SHMT2两种丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, SHMT)分别在细胞质和线粒体中将丝氨酸分解为甘氨酸和甲基四氢叶酸(THF),见图5。SHMT在许多快速生长的癌细胞中高度活跃,是癌症干预的重要分子靶点。在本研究



中,丝氨酸(AUC>0.929)可以被用来区分PTC与正常人,因此,有待进一步深入研究SHMT,以便进一步明确PTC的治疗靶点。牛磺酸作为在氨基酸衍生物在PTC中的含量增加。牛磺酸被认为是浸润性膀胱癌的一种可能的指纹生物标志物<sup>[14]</sup>。它参与了氨酰-tRNA生物合成的KEGG途径的显著改变,表明PTC中蛋白质生物合成的异常。亮氨酸作为氮供体和支链氨基酸之一,被用于蛋白质和核苷酸合成,同时参与蛋白质局部结构的构成,它们在癌症的发展中起着重要的作用<sup>[15-16]</sup>。研究<sup>[17]</sup>表明,亮氨酸在胃癌组织和淋巴结转移阳性胃癌组织中均增加,亮氨酸被认为是胃癌淋巴结转移过程中的预测因子。本研究中筛选出的众多差异性代谢物中,亮氨酸是PTC组和癌旁组间差异最明显的代谢物,这可能与PTC细胞内的染色体等物质合成相关。丙氨酸是一种糖原氨基酸,可以先被转化为三羧酸循环中间体,然后在糖异生过程中转化为葡萄糖。因此,丙氨酸也可以被认为是甲状腺癌细胞快速增殖的能量<sup>[18-19]</sup>。

除此之外,据XU等<sup>[20]</sup>报告了PTC中的乳酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸和谷氨酰胺的水平比非肿瘤组织高得多,这与本研究结果一致。因此,可以得出结论,PTC组织中的氨基酸可归因于膜生物合成和快速肿瘤细胞增殖的能量需求增加。在差异最明显的代谢物中,除了氨基酸水平改变外,还观察到其他类型的物质,如褪黑素。褪黑素是在松果体中合成的吲哚胺,它在癌症中的作用日益受到关注。它作为一种抗氧化剂和自由基清除剂,可能通过控制广泛的氧化损伤在PTC中发挥保护作用<sup>[21]</sup>。褪黑素介导的抑制内皮素-1(ET-1)的合成和释放,是癌细胞存活的保护因子<sup>[22]</sup>。褪黑素通过降低血管内皮生长因子(VEGF)水平抑制肝癌细胞HepG2的血管生成,并在动物模型<sup>[23-24]</sup>中验证了这一结果。最近研究发现褪黑素联合抗肿瘤药物如全反式视黄酸和生长抑素的治疗作用恶性肿瘤<sup>[25]</sup>。2-氧褪黑素(2-oxomelatonin)是一种褪黑素的代谢产物,在PTC中明显升高,说明褪黑素被大量分解用于合成了2-氧褪黑素,褪黑素在PTC中的浓度的降低。

总之,本研究中利用代谢组学分析与多变量分析相结合的方法来区分PTC组织与正常甲状腺组织,确定了PTC的代谢特征,而PTC的发生、发展及预后相关的全程机制,还有待进一步研究。后续研究中,将补充PTC血液、淋巴液标本,结合基因组学、蛋白组学的方法进行更深入地筛查及研究,寻找PTC诊治的新靶标。

## [参考文献]

- [1] FERLAY J, STELLAROVA-FOUCHER E, LORTET-TIEULENT J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(6): 1374-1403. DOI:10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- [2] REMONTI L R, KRAMER C K, LEITÃO C B, et al. Thyroid ultrasound features and risk of carcinoma: a systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Thyroid*, 2015, 25(5): 538-550. DOI:10.1089/thy.2014.0353.
- [3] KIM T, OH Y L, KIM K M, et al. Diagnostic dilemmas of hyalinizing trabecular tumours on fine needle aspiration cytology: a study of seven cases with BRAF mutation analysis[J]. *Cytopathology*, 2011, 22(6): 407-413. DOI:10.1111/j.1365-2303.2011.00886.x.
- [4] UNTERLASS J E, CURTIN N J. Warburg and Krebs and related effects in cancer[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2019, 21: e4. DOI: 10.1017/erm.2019.4.
- [5] SUN L C, SUO C X, LI S T, et al. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect[J]. *Biochim et Biophys Acta BBA-Rev Cancer*, 2018, 1870(1): 51-66. DOI:10.1016/j.bbcan.2018.06.005.
- [6] SHANG X C, ZHONG X, TIAN X S. Metabolomics of papillary thyroid carcinoma tissues: potential biomarkers for diagnosis and promising targets for therapy[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(8): 11163-11175. DOI:10.1007/s13277-016-4996-z.
- [7] WEN S, HE Y, WANG L, et al. Aberrant activation of super enhancer and choline metabolism drive antiandrogen therapy resistance in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2020, 39(42): 6556-6571. DOI:10.1038/s41388-020-01456-z.
- [8] WU X, CAO H, ZHAO L F, et al. Metabolomic analysis of glycerophospholipid signatures of inflammation treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs-induced-RAW<sub>264.7</sub> cells using 1H NMR and U-HPLC/Q-TOF-MS[J/OL]. *J Chromatogr B*, 2016, 1028: 199-215 [2020-01-11]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1570023216304214?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.06.032.
- [9] WOJAKOWSKA A, COLE L M, CHEKAN M, et al. Discrimination of papillary thyroid cancer from non-cancerous thyroid tissue based on lipid profiling by mass spectrometry imaging[J]. *Endokrynol Pol*, 2018, 69(1): 2-8. DOI:10.5603/ep.a2018.0003.
- [10] KATZ-BRULL 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. DOI: 10.1097/00002820-200204000-00013.
- [11] VENKATARAMAN G M, YATIN M, MARCINEK R, et al. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-symporter gene methylation status[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(7): 2449-2457. DOI: 10.1210/jcem.84.7.5815.
- [12] CHEN J, HU Q, HOU H, et al. Metabolite analysis-aided diagnosis of papillary thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2019, 26(12): 829-841. DOI:10.1530/erc-19-0344.
- [13] PAONE A, MARANI M, FIASCARELLI A, et al. SHMT1 knockdown induces apoptosis in lung cancer cells by causing uracil

- misincorporation[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(11): e1525 [2020-01-10]. <https://www.nature.com/articles/cddis2014482>. DOI: 10.1038/cddis.2014.482.
- [14] SRIVASTAVA S, ROY R, SINGH S, et al. Taurine-a possible fingerprint biomarker in non-muscle invasive bladder cancer: a pilot study by 1H NMR spectroscopy[J]. *Cancer Biomark*, 2010, 6(1): 11-20. DOI:10.3233/cbm-2009-0115.
- [15] MAYERS J R, TORRENCE M E, DANAI L V, et al. Tissue of origin dictates branched-chain amino acid metabolism in mutant Kras-driven cancers[J]. *Science*, 2016, 353(6304): 1161-1165. DOI: 10.1126/science.aaf5171.
- [16] MAYERS J R, WU C, CLISH C B, et al. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development[J]. *Nat Med*, 2014, 20(10): 1193-1198. DOI:10.1038/nm.3686.
- [17] ZHANG H L, CUI L Z, LIU W, et al. <sup>1</sup>H NMR metabolic profiling of gastric cancer patients with lymph node metastasis[J]. *Metabolomics*, 2018, 14(4): 1-13. DOI:10.1007/s11306-018-1344-x.
- [18] RYOO I, KWON H, KIM S C, et al. Metabolomic analysis of percutaneous fine-needle aspiration specimens of thyroid nodules: Potential application for the preoperative diagnosis of thyroid cancer [J]. *Sci Rep*, 6(1): 30075. DOI:10.1038/srep30075.
- [19] TIAN Y, NIE X, XU S, et al. Integrative metabolomics as potential method for diagnosis of thyroid malignancy[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14869 [2020-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26486570/>. DOI:10.1038/srep14869.
- [20] XU Y N, ZHENG X J, QIU Y P, et al. Distinct metabolomic profiles of papillary thyroid carcinoma and benign thyroid adenoma[J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(8): 3315-3321. DOI:10.1021/acs.jproteome.5b00351.
- [21] KARBOWNIK M, LEWINSKI A. The role of oxidative stress in physiological and pathological processes in the thyroid gland; possible involvement in pineal-thyroid interactions[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2003, 24(5): 293-303.
- [22] TALIB W H. Melatonin and cancer hallmarks[J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 518. DOI:10.3390/molecules23030518.
- [23] JARDIM-PERASSI B V, ARBAB A S, FERREIRA L C, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85311 [2020-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24416386/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0085311.
- [24] CARBAJO-PESCADOR S, ORDOÑEZ R, BENET M, et al. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(1): 83-91. DOI:10.1038/bjc.2013.285.
- [25] KRESTININA O, FADEEV R, LOMOVSKY A, et al. Melatonin can strengthen the effect of retinoic acid in HL-60 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 2873. DOI:10.3390/ijms19102873.

[收稿日期] 2020-04-07

[修回日期] 2020-09-28

[本文编辑] 黄静怡