

高效液相色谱-质谱联用技术在口腔癌代谢组学分析中的应用

黄 康¹ 覃利梅²

(1. 广西医科大学附属口腔医院; 2. 广西壮族自治区工人医院, 广西南宁 530021)

摘 要 目的: 探讨超高效液相色谱-四级杆飞行时间高分辨质谱联用技术 (UPLC/Q-TOF-MS) 在口腔癌代谢组学分析的应用效果, 并分析其优势特点。方法: 选择我院 2020 年 1 月至 2020 年 12 月口腔癌患者 21 例为观察组, 同期体检人群 21 例为对照组, 利用 UPLC/Q-TOF-MS 技术对两组的血浆、尿液和唾液进行代谢组学分析, 然后采用多元统计分析, 筛选出显著性差异的代谢物并进行鉴定。结果: 检测得出有 18 种显著差异性表达的代谢性物质。相比对照组, 观察组的血浆中有 4 种溶血磷脂酰胆碱和 2 种酰基肉碱, 尿液中有 3 种氨基酸和 2 种有机酸, 唾液中有 5 种有机酸, 1 种肌醇和葡萄糖的代谢表现明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 UPLC/Q-TOF-MS 技术可以精准分析口腔癌的代谢组学差异性小分子物质的分布情况, 可以指导诊断和治疗, 具有较高的学术研究和临床价值。

关键词 UPLC/Q-TOF-MS; 口腔癌; 代谢组学

Application of high performance liquid chromatography – mass spectrometry in metabonomics analysis of oral cancer

Huang Kang¹; Qin Limei²(corresponding author)

(1. Stomatological Hospital Affiliated to Guangxi Medical University; 2. workers' Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region Nanning 530021, Guangxi)

Abstract Objective: To explore the application effect of ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometric method (UPLC/Q-TOF-MS) in metabonomics analysis of oral cancer, and analyze its advantages and characteristics. Methods: 21 cases of oral cancer patients in our hospital from January 2020 to December 2020 were selected as the observation group, and 21 cases of physical examination population in the same period were selected as the control group. The metabolic spectrum of plasma, urine and saliva in the two groups were detected by UPLC/Q-TOF-MS and then multivariate statistical analysis of the metabolomics data resulted in the identification of biomarkers. Results: 18 kinds of metabolic substances were detected. Compared with the control group, there were four kinds of Lysophosphatidylcholine and two kinds of Acylcarnitines in the plasma, three kinds of amino acids and two kinds of organic acids in the urine and five kinds of organic acids in the saliva of the observation group, and the metabolism of inositol and glucose increased significantly ($P < 0.05$). Conclusion: UPLC/Q-TOF-MS can accurately analyze the distribution of metabonomic small molecular substances in oral cancer, guide the diagnosis and treatment, and has high academic research and clinical value.

口腔癌(Oral cancer)是发生在口腔的恶性肿瘤的总称, 90%以上的口腔癌是由于鳞状上皮细胞癌变引

收稿日期: 2021-03-22

作者简介: 黄康, 广西百色, 男, 壮族, 197409, 大学本科, 广西医科大学附属口腔医院, 临床检验专业, 530021, 34019335@qq.com,

现有职称: 主管技师。

通讯作者: 覃利梅。

起的。流行病学统计表明,口腔癌的发生率在所有恶性肿瘤中占第九位,约占 2.8%^[1]。中国是口腔癌发病率相对较高的地区。并且我国口腔癌的发病率和死亡率逐年增加,预计未来中国口腔癌的发病率会越来越高。口腔癌会导致患者的言语功能,饮食和呼吸功能障碍严重影响患者的生活水平。饮酒被认为与口腔癌的发生呈正相关,此外咀嚼槟榔和人类乳头瘤病毒(HPV)感染也是导致患者罹患口腔癌的重要因素^[2]。多个研究表明,罹患口腔癌后死亡的人数高达 1/3,且即使进行手术治疗,也有 1/2 的患者会在术后复发。

1999 年, Nicholson 首次提出了基于磁共振分析的代谢组学研究模型,并与国际制药公司发起了一项针对药物安全性的创新评估和预测的研究计划,极大地推动了医疗领域代谢组学的研究和发展。以高效液相色谱-质谱联用技术为主要代表的代谢组学是一种新型、现代、高性能、分辨率高、灵敏度高的代谢组学分析方法,通过定性和定量研究生物样本的代谢特征,并结合先进的化学信息技术(例如模式识别)分析处于不同状态(例如生理和病理状态)的各种生物的代谢指纹,给药前后细胞活动的状态,并获得一个相应的生物标记。通过对代谢指纹的分析,揭示了一个生物体在某一特定时间阶段和某一特定环境条件中的一般功能、组成与状态,通常可用于识别样本种类,疾病状况,候选药物药效,毒性反应等^[3]。

在高效液相色谱-质谱(UPLC/Q-TOF-MS)联用技术出现之前,分析唾液的代谢特征需要首先将唾液转化为其他物质才能进行检测,不仅使检测时间延长,而且操作更加复杂,还有可能造成结果误差。UPLC/Q-TOF-MS 技术应用于唾液分析后,可用于发现和区分口腔鳞状细胞癌(OSCC),口腔白斑(OLK)与正常人之间的代谢差异^[4]。毛细管电泳-四级杆飞行时间质谱法也可通过分析唾液中的代谢产物的差异,预测口腔癌,胰腺癌和乳腺癌。然而目前 UPLC/Q-TOF-MS 联用技术还较少用于口腔癌患者中的代谢组学分析,其关于口腔癌的联用代谢组学研究知识局限于一个单一的血浆或唾液样本,尚未进行关于血浆,尿液和唾液三类样本联合的复合代谢组学综合研究。在广泛应用于生理和化学研究的各种生物样本中,血浆是代谢组学研究中的重要生物样本,尿液,

唾液都易于获取且不会引起患者紧张或痛苦。本研究将血浆、尿液以及唾液用于口腔癌的代谢组学研究,健康人和口腔癌症患者中采用到样本后,采用 UPLC/Q-TOF-MS 进行分析,通过多变量统计分析对代谢物进行模式识别,筛选和鉴定出显著变化的生物标志物,并探讨它们之间的相关性,为口腔癌的研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择我院 2020 年 1 月至 2020 年 12 月接受治疗的 21 例口腔癌患者为观察组,同期体检人群 21 例为对照组,比较两组的性别,年龄和 BMI 间无明显差异($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 两组基本情况信息

组别	性别		年龄(岁)	BMI(kg/m ²)
	男(n)	女(n)		
对照组	15	6	49.37±1.31	23.54±0.25
观察组	16	5	50.36±1.23	23.27±0.36
<i>t/F</i>	11.124	10.574	8.551	9.808
<i>P</i>	0.886	0.822	0.779	0.626

1.2 纳入标准

所有患者均符合《口腔科学》中口腔癌的诊断标准^[5],且经本院病理组织学确诊生存期为 6 个月以上,且无远距离转移,年龄范围 18 岁-75 岁,所有试验参与者都充分意识到与所有临床试验相关的风险,并签署了书面知情同意协议,且均由医院伦理委员会审查、同意、跟踪和批准。

1.3 排除标准

排除严重心肺肝疾病,严重的基础代谢性疾病;接受过放疗及免疫治疗患者;患者有影响医患沟通的认知功能障碍;病理数据不完整,临床试验中途终止。

1.4 试剂与仪器

乙腈(HPLC 纯,瑞典 Oceanpak 公司);甲酸(HPLC 纯,美国 ROE 公司);纯净水净化系统(密立波公司,美国)。

KQ-300DV 型数控超声波清洗器(江苏省昆山市

超声仪器有限公司), ALLLEGRATM-64R 高速离心机(美国 Beckman), XK96-A 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司), Waters Acquity UPLC 液相色谱仪, Waters Xevo G2 Q-ToF/MS 质谱仪(美国 Waters 公司), UPLC HSS C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司)。

1.5 样本采集

血浆样本采集:患者在禁食状态下进行采集,样本采集到含促凝剂的真空采血管后,静置半小时,4℃ 下以 3500rpm 离心 10min 分离血浆,置-80℃ 冰箱中储存。尿液样本采集:采集受试者晨尿中段尿,离心保存方法同血浆。唾液样本采集:收集唾液前 1h 内禁食、禁水、禁烟。采集者清水漱口,等待 1min 后采用自然留取法,使采集者头稍向前倾,收集 3mL 唾液,离心保存方法同血浆。

1.6 样本处理

血浆样品预处理方法:将 100μL 血浆中混合 300 μL 乙腈进行沉淀蛋白操作,冰水浴超声 10 min,涡旋混匀 1 min,以 13000 rpm 的转速 4℃ 离心 15 min,移取上清液, UPLC/Q-TOF-MS 进样分析。

尿液样品预处理方法:将 100μL 尿液样品中添加 300μL 乙腈进行稀释,超声、涡旋以及离心方法同血浆。

唾液样品预处理方法:唾液解冻后,将 100μL 样品加入 300μL 乙腈溶液,超声、涡旋以及离心方法同血浆。

样品制备的质量控制(QC):将所有待测血浆样品提取并均匀混合,将血浆进行预处理,吸取上清液,以获得血浆质控样品,尿液和唾液质控样品也同样获得。

1.6 代谢组学分析条件

色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1×100mm, 1.7μm),流速:0.3mL/min,柱温:40℃,进样量:5μL,采用梯度洗脱,流动相为 0.1%甲酸水溶液和 0.1%乙腈溶液,色谱梯度为:0-0.5min, 1%乙腈;0.5-2min, 1%-50%乙腈, 2-10 min, 50%-99%乙腈;10-12 min, 99%-1%乙腈。

质谱条件:采用电喷雾电离源(ESI 源),在正离

子电离模式下进行质谱检测分析。使用高纯 N₂ 作为辅助喷雾电离与脱溶剂气体,干燥气流速:10mL/min, N₂ 温度:350 °C,雾化气气压:310 kPa,脱溶剂氮气流速:600L/h,锥孔反吹氮气:50 L/h。毛细管电离电压:2.1 kV,四极杆扫描范围:m/z 50-1000。

方法学考察:样品检测过程中每 6 个样本插入 1 个 QC 样本,用于系统稳定性监测。

1.7 代谢组学数据处理

本实验中,采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术处理患者的血浆、尿液和唾液,并进行了代谢组学分析。再通过多元统计分析筛选出显著变化的生物标记物。数据分析过程如下:原始数据经过 MarkerLynx applications manager Version 4.1 (Waters Corp., Manchester, UK)数据处理系统进行峰发现、峰对齐和原始数据的峰值滤过,以找出潜在的判别变量。采用 SIMCA-P⁺12.0 软件 (Umetrics AB, Umea, Sweden)进行多元数据分析,主成分分析法(PCA)和偏最小二乘-判别分析(PLS-DA),筛选出 VIP 大于 1.5 的碎片信息。与此同时,使用 SPSS 17.0 software 进行独立样本 T 检验以确定代谢物从统计学的角度观察是否具有显著改变。将这些物质作为潜在生物标记物,随后对这些生物标记物进行物质识别和鉴定,通过与标准品比较、MS/MS 分析以及搜索代谢物数据库,如:HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 匹配获得代谢物。

2 结果

2.1 方法学考察

QC 样品在不同时间进样后,在得到的色谱峰中,随机选取 20 个色谱峰,计算其峰面积和保留时间的 RSD 值。血浆 QC 样品色谱峰峰面积 RSD<13.26%,保留时间 RSD<0.87%,尿液 QC 样品色谱峰峰面积 RSD<13.11%,保留时间 RSD<0.79%唾液 QC 样品色谱峰峰面积 RSD<11.21%,保留时间 RSD<0.84%。说明检测过程中系统是稳定的。

2.2 代谢组学数据处理

利用 UPLC/Q-TOF-MS 技术,分析血浆、尿液以及唾液的代谢物,其 QC 样品正离子模式下的 BPI 图如图 1 所示。

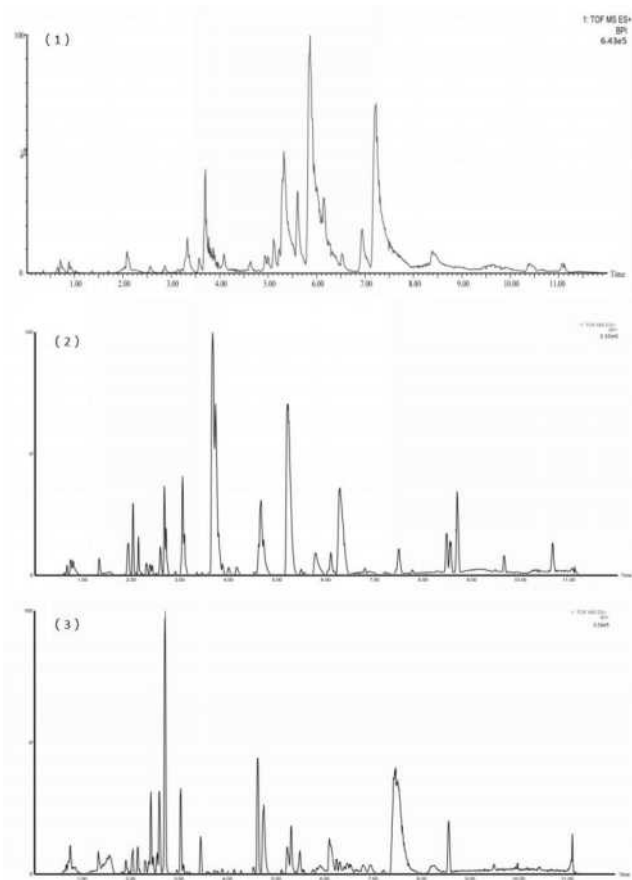


图 1 QC 样本 BPI 图 (1: 血浆; 2: 尿液; 3: 唾液)

采用 Makerlynx software 软件将 UPLC/Q-TOF-MS 采集得到的原始数据进行导出, 经过离子对的提取, 得到的血浆、尿液以及唾液样品代谢组学数据。我们使用多元统计对数据进行分析, 采用 PCA 进行无监督的数据分析, 可以真实的反映出各组的差异。从图 2 中可以观察到, 各组间差异明显, 模型良好。在此基础上, 采用偏最小二乘模式识别分析法 (Partial least squares-discriminate analysis, PLS-DA) 进行有监督的数据分析, 基于 PLS-DA 模型, 我们进一步筛选显著性变化的差异性代谢物, 一般将 $VIP > 1.5$ 的变量认为是潜在标记物, 继而将这些生物标志物进行学生 T-test 检验, 得到显著性变化的生物标志物。

其中, 在血浆组、尿液组以及唾液组分别筛选到 102、98 和 76 个显著变化的离子信息。继而我们进一步对具有生物学信息的潜在生物标志物进行鉴定, 最终确认了共同的肝毒性生物标志物 18 个, 具体离子信息见表 2。

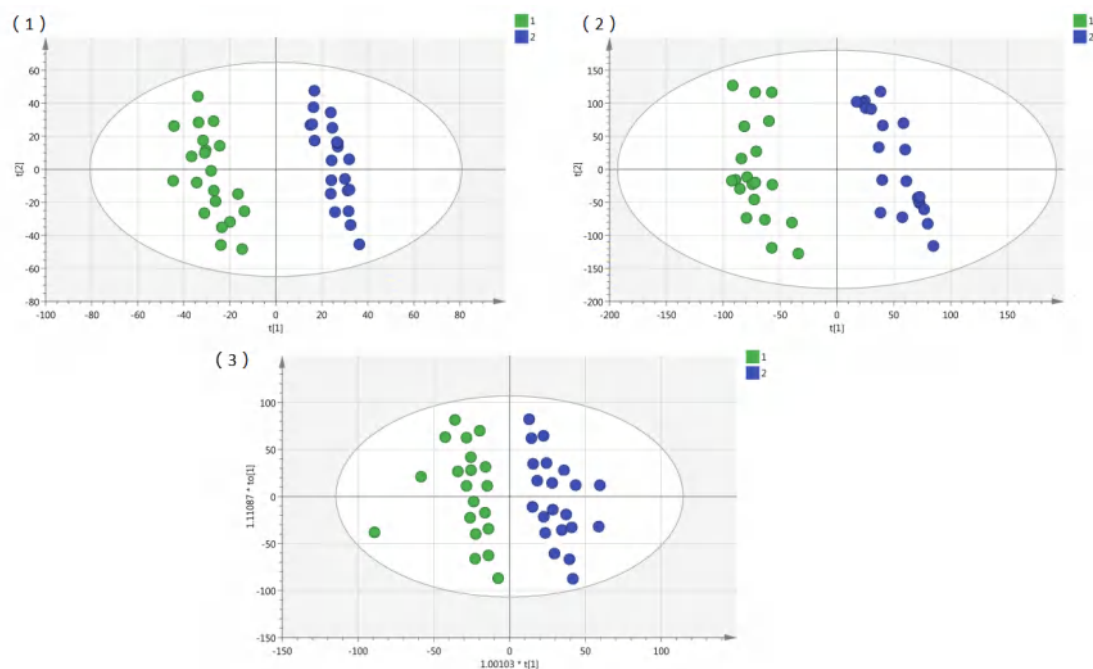


图 2 两组 PCA 得分图 (1: 血浆; 2: 尿液; 3: 唾液。绿色圆点代表: 对照组; 蓝色圆点代表: 观察组)

表 2 血浆、尿液、唾液中的差异代谢物列表

序号	样本类型	鉴定物质	HMDB ID	分子式	分子量	t
1	Plasma(血浆)	LysoPC(16;0/0;0)	HMDB0010382	C24H50NO7P	495.6300	0.79
2	Plasma(血浆)	LysoPC(18;0/0;0)	HMDB0010384	C26H54NO7P	523.6834	0.85
3	Plasma(血浆)	LysoPE(20;0/0;0)	HMDB0011511	C25H52NO7P	509.6568	0.88
4	Plasma(血浆)	PC(16;0/16;0)	HMDB0000564	C40H80NO8P	734.0388	0.57
5	Plasma(血浆)	Oleoylcarnitine	HMDB0005065	C25H48NO4	426.660	0.96
6	Plasma(血浆)	Stearoylcarnitine	HMDB0000848	C25H50NO4	428.675	0.52
7	Urine(尿液)	Proline	HMDB0000162	C5H9NO2	115.1304	1.14
8	Urine(尿液)	Imidazoleacetic acid	HMDB0002024	C5H6N2O2	126.1135	1.61
9	Urine(尿液)	D-Glucuronic acid	HMDB0000127	C6H10O7	194.1396	2.18
10	Urine(尿液)	Phenylalanine	HMDB0000159	C9H11NO2	165.1891	1.36
11	Urine(尿液)	Hippuric acid	HMDB0000714	C9H9NO3	179.1726	1.35
12	Saliva(唾液)	Butyric acid	HMDB0000039	C4H8O2	88.1050	1.39
13	Saliva(唾液)	2,3-butanediol	HMDB0003156	C4H10O2	90.121	2.47
14	Saliva(唾液)	Lactic acid	HMDB0000190	C3H6O3	90.0778	3.72
15	Saliva(唾液)	Succinic acid	HMDB0000254	C4H6O4	118.087	2.37
16	Saliva(唾液)	4-hydroxyphenylacetic acid	HMDB0060390	C8H8O3	152.1471	2.64
17	Saliva(唾液)	Glucose	HMDB0000122	C6H12O6	180.1558	0.51
18	Saliva(唾液)	myo-Inositol	HMDB0000211	C6H12O6	180.1556	2.11

3 讨论

口腔内出现溃疡、结节、肿块等症状且长期不愈者,即考虑为发生口腔癌的可能。口腔癌是指包括牙龈癌、舌癌、颌骨癌、口底癌、唇癌等发生在眼眶以下,颈部以上发生于颜面部皮肤黏膜的一种癌症,中大多数属于鳞状细胞癌类型,即黏膜变异。2018年,中国口腔癌的死亡率约为 1.38/10 万,且死亡率逐年增加。口腔癌的发生多因患者长期吸烟、饮酒或口腔卫生环境差,给霉菌和细菌创造了有利于亚硝胺及其前体的形成环境,使机体对致癌物更加敏感,易于癌症发生。此外,口腔癌易于转移,难以切除,术后五年内存活率较低,且恶性程度较高的口腔癌预后较差^[6]。口腔癌的治疗技术虽然不断取得成功,但是患者的 5 年生存率仅为 50%左右。与其他的恶性肿瘤类型一样,口腔癌是复杂的多种因素共同作用的结果,环境因素和遗传因素都有可能致肿瘤的发生。其中吸烟会导致烟草中的多环芳烃和亚硝酸铵损伤患者细胞中的 DNA,使 DNA 羟基化,进而引起肿瘤发生;

酒精中的乙醇会导致肝功能损伤,使患者体内的解毒功能下降,导致癌症发生。

代谢组学是使用定量分析研究生物体内的所有代谢物的一种研究方法,并研究其生理学和病理学变化之间的关系。代谢组学被定义为小分子代谢的所有组成部分的集合,在细胞,组织或器官中,例如糖,脂质,氨基酸等分子量小于 1000 的小分子化合物。基因、环境、营养、药物和年龄等信息最终都会通过代谢物组的变化而发生不同的表达和影响。因此小分子代谢物对药物的药效学和毒性研究、疾病的作用机理和治疗药物的合理应用具有重要意义^[7]。

高效液相色谱-质谱联用技术是研究代谢组学的一种重要的技术手段,已被广泛用于生物样品分析、化学计量学、目标成分分析和样品指纹分析等众多领域,具有较强的分离能力和高灵敏度。此技术最终分别从血浆,尿液和唾液中选择了 6、5 和 7 种不同的代谢物,并对这 18 种代谢物进行鉴定,其中有血浆中的两种酰基肉碱和四种溶血磷脂酰胆碱,尿液中的

三种氨基酸和两种有机酸,唾液中的五种有机酸,肌醇和葡萄糖等代谢物。结果表明健康人与口腔癌之间的相关代谢物具有显著的差异,葡萄糖和乳酸是糖酵解的中间代谢产物,是人体葡萄糖异化的共同途径,口腔癌患者体内的葡萄糖和乳酸代谢发生显著的变化,口腔癌患者体内能量代谢显著,发生恶病质,导致能量消耗显著增加^[10]。口腔癌患者唾液中的葡萄糖浓度显著低于对照组,表明口腔癌组织中的糖酵解增加,消耗的葡萄糖的量增多,此现象也与“Warburg效应”相关^[11]。乳酸水平的降低与基于核磁共振的口腔癌血浆代谢组学下降的研究结果相似。作为三羧酸代谢的中间产物,琥珀酸在口腔癌患者中显著增加,这可能是由于三羧酸循环代谢的加速所引起的。口腔癌细胞的周期异常引起葡萄糖代谢和能量代谢异常,这也是口腔肿瘤患者的三个典型特征。溶血磷脂酰胆碱是磷脂酰胆碱的膜代谢产物,口腔癌患者血浆中4种溶血磷脂酰胆碱的类型明显减少,提示口腔癌细胞中的磷脂酶快速转化,可能导致血浆溶血磷脂酰胆碱的消耗增加,这与肿瘤的扩散和转移有关。此外,与健康对照相比,口腔癌患者唾液中的肌醇也明显增加。肌醇作为真核细胞中的第二信使,包括磷酸肌醇,磷酸肌醇和磷酸肌醇,以前的研究表明,在口腔癌的早期阶段,磷脂酰肌醇酶的高表达可以导致肌醇增加^[12]。另外,肌醇还是一种组织渗透剂,通常与细胞内钙浓度的调节,胰岛素信号传递以及脂肪酸氧化相关联,因此肌醇在人体内的增加可能会促进肿瘤细胞的能量代谢和脂质代谢,这些结果表明唾液中的肌醇和琥珀酸被提示有助于鉴别和诊断口腔癌。

综上所述,本研究通过UPLC/Q-TOF-MS技术检测口腔癌的代谢组学特征,可以精准分析口腔癌代谢组学小分子物质的分布情况,有效筛选差异性代谢物质,在临床诊断和治疗方面具有较强的指导意义,具有学术研究意义和临床推广价值。

参考文献

- [1] 任振虎,胡传宇,李媛洁.1990年至2017年口腔癌的全球和区域负担:疾病全球负担研究报告[J].癌症 2020,39(4):159-171.
- [2] 李宏权,宋扬,钱文昊,等.我国口腔癌研究现状与热点的文献计量分析[J].中国中医药图书情报杂志,2020,44(5):14-19.
- [3] 刘怡,管晓燕,王倩,等.代谢组学在口腔癌及口腔潜在恶性病变研究中的应用[J].遵义医学院学报,2017,40(3):339-341,346.
- [4] 于雪迪,孙红英.代谢组学在口腔癌及口腔癌前病变标志物研究中的应用[J].口腔医学,2017,37(4):369-372.
- [5] 庄润涛,周新莹,石彩凤,等.Topical application of garcinol on metabolism of hamsters serum[J].北京口腔医学,2018,26(4):191-195.
- [6] 孙向辉,张磊,韩涛.代谢组学分析技术在口腔软组织疾病诊断及治疗中的应用进展[J].山东医药 2019,59(33):92-96.
- [7] 李婷,邓鹏翅.基于核磁共振技术的代谢组学研究在口腔疾病中的进展[J].化学研究与应用,2020,8(3):329-333.
- [8] A S P, A S E A, C G C B, et al. In-depth cannabis fatty acid profiling by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry[J]. Talanta, 2021: 122249.
- [9] A Y W W, A B N L, A L L L, et al. Research Progress of Analysis of Mineral Oil Hydrocarbons using On-line High Performance Liquid Chromatography Coupled with Gas Chromatography[J]. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, 2021, 49(3): 341-349.
- [10] Liu, Ronk M, Fujimori K, et al. Analysis of Silicone Oil in Prefilled Syringes and Biopharmaceutical Drug Products Using High-Performance Liquid Chromatography[J]. AAPS PharmSciTech, 2021, 22(2): 1-9.
- [11] Ghram H H A, Khan K A, Ahmed Z, et al. Quality evaluation of Saudi honey harvested from the Asir province by using high-performance liquid chromatography (HPLC) [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(8): 14-20.
- [12] Zhu Y Y, Yuan X U, XQ Zou, et al. Determination of 146S Antigen in Inactivated Foot-and-Mouth Disease Vaccine by Size-Exclusion High-performance Liquid Chromatography and Quality Evaluation of Vaccine. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 7(10): 13-18.