

# 甲状腺乳头状癌患者血清样本代谢组学分析

赵阳<sup>1</sup>, 赵明<sup>2</sup>, 王睿<sup>2</sup>, 张方华<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>青岛大学医学部, 山东 青岛

<sup>2</sup>青岛大学附属青岛市中心医院甲状腺外科, 山东 青岛

<sup>3</sup>青岛大学附属青岛市中心医院内分泌与代谢性疾病科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年10月6日; 录用日期: 2023年11月1日; 发布日期: 2023年11月6日

## 摘要

目的: 分析对比甲状腺乳头状癌(PTC)及健康成人血清样本筛选差异代谢物和异常代谢通路, 为PTC的早期诊疗提供新的思路。方法: 选取2022年3月至2022年12月就诊于山东省青岛大学附属中心医院经病理确诊的PTC患者的血清样本30例, 并收集健康成人血清样本36例, 利用超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用技术, 采用主成分分析和偏最小二乘判别分析等方法进行数据处理, 筛选差异相关的生物标志物和代谢通路。结果: 通过分析筛选获得41种可信差异代谢物, 其中22种下调, 19种上调, 在PTC中,  $\alpha$ -溶血磷脂酸、花生四烯酸等呈下降趋势; 顺乌头酸、 $\alpha$ -亚麻酸等呈上升趋势。筛选出20条代谢通路, 分别为氮代谢、赖氨酸降解通路、花生四烯酸代谢通路等。结论: PTC和健康成人组代谢轮廓存在显著差异; 糖酵解、氨基酸代谢、脂代谢参与了PTC的病理过程。

## 关键词

甲状腺乳头状癌, 代谢组学, 代谢通路, 生物标志物

# Metabolomics Analysis of Serum Samples from Patients with Papillary Thyroid Cancer

Yang Zhao<sup>1</sup>, Ming Zhao<sup>2</sup>, Rui Wang<sup>2</sup>, Fanghua Zhang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao Shandong

<sup>2</sup>Thyroid Surgery Department, Qingdao Cancer Hospital, Affiliated Qingdao Central Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

<sup>3</sup>Endocrinology Department, Qingdao Cancer Hospital, Affiliated Qingdao Central Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Oct. 6<sup>th</sup>, 2023; accepted: Nov. 1<sup>st</sup>, 2023; published: Nov. 6<sup>th</sup>, 2023

\*通讯作者。

文章引用: 赵阳, 赵明, 王睿, 张方华. 甲状腺乳头状癌患者血清样本代谢组学分析[J]. 临床医学进展, 2023, 13(11): 17230-17244. DOI: 10.12677/acm.2023.13112415

## Abstract

**Objective:** To analyze and compare the differential metabolites and abnormal metabolic pathways in serum samples of papillary thyroid carcinoma (PTC) and healthy adults, and provide new ideas for the early diagnosis and treatment of PTC. **Method:** Thirty serum samples of PTC patients diagnosed with pathology at the Affiliated Central Hospital of Qingdao University in Shandong Province from March 2022 to December 2022 were selected, and 36 healthy adult serum samples were collected. The data were processed using ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC), principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLSA), and differentially correlated biomarkers and metabolic pathways were screened. **Result:** 41 credible differential metabolites were obtained through analysis and screening, of which 22 were down regulated and 19 were up regulated. In PTC,  $\alpha$ -Lysophosphatidic acid and arachidonic acid showed a downward trend; *Shunaconitic acid*  $\alpha$ -Linolenic acid and other substances are showing an upward trend. 20 metabolic pathways were screened, including nitrogen metabolism, lysine degradation pathway, arachidonic acid metabolism pathway, etc. **Conclusion:** There is a significant difference in metabolic profile between PTC and healthy adult groups; glycolysis, amino acid metabolism, and lipid metabolism are involved in the pathological process of PTC.

## Keywords

Thyroid Papillary Carcinoma, Metabolomics, Metabolic Pathways, Biomarkers

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

甲状腺癌(Thyroid Cancer, TC)是内分泌系统中发病率最高的恶性肿瘤, 甲状腺乳头状癌(Papillary Thyroid Carcinoma, PTC)是分化型甲状腺癌中最常见的类型[1]。近年来, 随着诊断及生活水平的不断提高, TC 的发病率越来越高, 根据 2020 年世界卫生组织国际癌症研究中心发布的癌症发病率和死亡率数据显示全球 TC 发病率居于第 9 位[2]。美国流行病学调查研究显示, TC 已成为女性最常见的癌症[1] [3] [4]。国内相关研究也表明, TC 的发病率逐渐增加, 并逐渐趋于年轻化, 在 30 岁以下的女性 TC 发病率成为女性癌症发病率第一位。目前 TC 的发病机制尚不清楚, 尽管大部分 TC 患者经治疗后预后良好, 但仍有少部分患者存在远处转移及复发情况, 为进一步明确 TC 发病机制、改善患者预后, 需更进一步完善更深入的研究。

近年来, 代谢组学(Metabolomics, Metabonomics)研究应用于识别生物标志物以进行癌症早期诊断, 这有利于进一步了解癌症发生发展的潜在机制[5]。代谢组学是指生物体系因生物刺激、病理生理扰动或遗传信息改变等引起的总体、动态的代谢变化, 是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后检测并分析小分子代谢物的学科, 通过整合不同的“组学”数据集, 了解生物体中发生的复杂过程[6]。基因组学代表能够发生、转录组学代表可能发生、蛋白质组学代表即将发生、代谢组学提示已经或正在发生的生物学过程[7]。现在这项技术已受到科学界的广泛关注, 应用代谢组学对癌症进行探索的同时, 也有研究应用代谢组学来确定疾病治疗方法的有效性及其药物作用机理, 这也为明确癌症发病机制及提供治疗新靶点

的发现提供了更多的机会。

本研究主要采用超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用技术(UHPLC-QTOF-MS)代谢组学方法对 PTC 及健康人群血清样本进行检测,通过筛选差异代谢物,寻找异常代谢通路,探索 TC 的潜在生物标记物,为 TC 的早期诊断、早期治疗提供依据。

## 2. 资料与方法

### 2.1. 研究对象

选取 2022 年 3 月至 2022 年 12 月就诊于山东省青岛大学附属中心医院经病理确诊的 PTC 患者的血清样本 30 例,并收集健康成人血清样本 36 例。最终利用 UHPLC-QTOF-MS 平台分析 PTC 血清样本与健康成人血清样本共 66 例。本研究已经通过青岛大学附属中心医院伦理学委员会审核,所有入组人员均已签署知情同意书。本研究所有过程遵守世界医学伦理协会关于人体标本作为实验样本的声明(赫尔辛基宣言)。

### 2.2. 纳入及排除标准

纳入: 1) 年龄 18~65 岁; 2) 既往无恶性肿瘤病史; 3) 术前未曾服用甲状腺激素相关药物; 4) 术后均病理确诊; 5) 无代谢性、免疫性疾病。

排除: 1) 确诊甲状腺癌时,患者已合并其他致命性疾病; 2) 妊娠期和哺乳期的女性; 3) 缺失完整的临床资料。

### 2.3. 样本前处理

PTC 患者手术前于早晨 6 点至 7 点间采集空腹静脉血 2 ml,健康成人于门诊早晨 8 点至 9 点间采集空腹静脉血 2 ml,分别 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后取血清样本,置于-80℃冰箱冻存待用。用时取出血清标本在 4℃解冻,约 2 小时,移液枪取血清样本 40 μL,置 1.5 mL 离心管中,加入乙腈 160 μL,涡旋 5 min,高速离心(4℃, 14000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min)后,上清液移至 1.5 mL 离心管中,再次高速离心(4℃, 14000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min)后所得的上清液供 LC-QTOF-MS 分析。

### 2.4. 样本分析

以 UHPLC-QTOF-MS 作为代谢物分离检测平台,研究 PTC 与健康人群血清的代谢差异,在质谱正及负离子模式下采集数据。

色谱条件: 使用 ACQUITY-UHPLC 超高效液相色谱仪和 Q-Exactive 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪型超快速高效液相色谱仪,色谱柱为(100\*2.1 mm),柱温 40℃,进样器温度为 4℃。流动相: 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。梯度洗脱: 0~1 min, 90%→70%A; 1~19 min, 70%→5%A; 19~20 min, 5%A。流速: 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,进样量: 3 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源(electrospray ion source, ESI±),采用正负离子模式检测,使用高纯 N<sub>2</sub> 辅助喷雾电离与脱溶剂,流速为 1.2 L/min 质量扫描范围 20~1000 m/z,干燥气温度 200℃。

质量控制样品: 用于测定进样前仪器及色谱质谱系统和评价试验过程的系统稳定,即 66 个样品各吸取 10 μl 至 EP 管,涡旋混匀,分装成每管 200 μl,余步骤同样本预处理。

### 2.5. 数据统计

在进行原始数据分析之前,需要采用 Metaboscape 3.0 软件对原始数据进行峰提取、降噪、标准化、导出等预处理,处理后采用单维和多维统计方法相结合的方式对数据进行多角度分析。将数据导入

Simca-P14.1 软件进行模式多元分析, 包括主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。采用模型参数变量权重值(variable importance in the projection, VIP)对变量进行筛选, VIP > 1 的变量被认为对模型有显著贡献。采用参数 R2 和 Q2 分别用于评估模型的可解释性和可预测性。利用 MetaboAnalyst 4.0 数据库对差异代谢物进行代谢通路分析。

数据使用的软件主要有: SPSS 27.0 (SPSS, Chicago, IL)、SIMCA-P 14.1 (Umetrics, Umeå, Sweden)以及 Excel (Microsoft, USA)等。

### 3. 结果

#### 3.1. 患者基本特征

共收集就诊于山东省青岛大学附属中心医院的 PTC 患者血清样本 30 例, 健康成人血清样本 36 例, 两组基本指标见表 1。

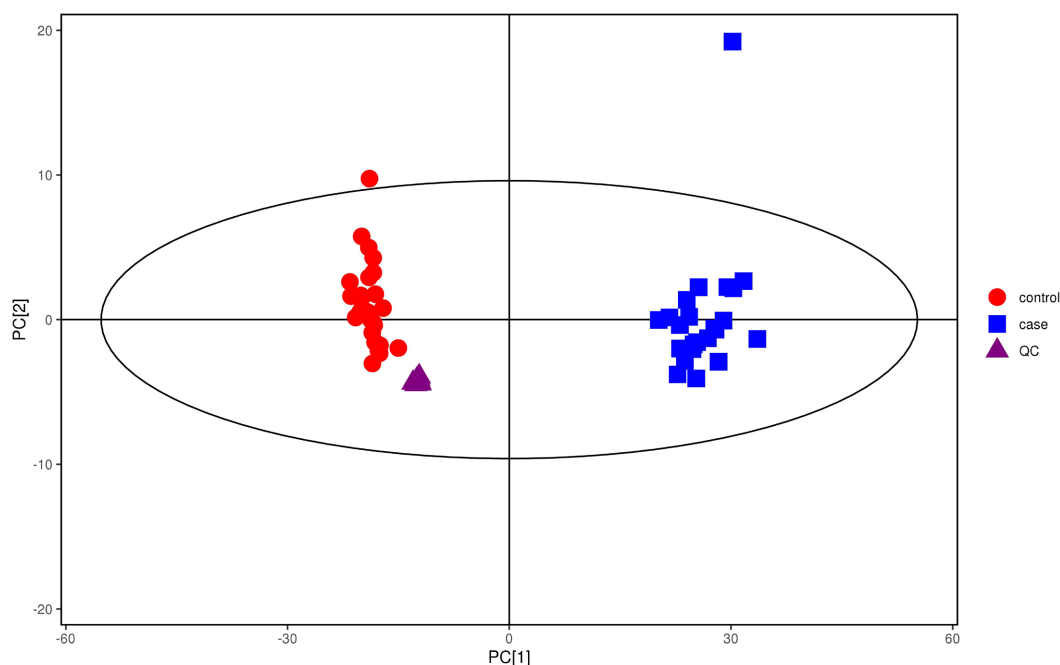
**Table 1.** Basic information of papillary thyroid cancer group and healthy adult group

**表 1.** 甲状腺乳头状癌组及健康成人组基本资料

|                               | 健康成人组              | 甲状腺乳头状癌组           |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| 例数(n)                         | 36                 | 30                 |
| 年龄( $\bar{x} \pm s$ )         | 49 $\pm$ 8.59      | 50.61 $\pm$ 13.22  |
| 性别(女/男)                       | 22/14              | 20/10              |
| 谷草转氨酶(U/L)                    | 18.30 $\pm$ 6.30   | 17.85 $\pm$ 4.64   |
| 谷丙转氨酶(U/L)                    | 18.22 $\pm$ 11.51  | 16.25 $\pm$ 6.26   |
| 肌酐( $\mu\text{mol/L}$ )       | 57.05 $\pm$ 16.56  | 61.55 $\pm$ 16.82  |
| 尿酸( $\mu\text{mol/L}$ )       | 304.91 $\pm$ 80.55 | 307.35 $\pm$ 58.39 |
| 总胆固醇(mmol/L)                  | 4.82 $\pm$ 0.75    | 5.11 $\pm$ 1.23    |
| 甘油三酯(mmol/L)                  | 1.13 $\pm$ 0.78    | 1.39 $\pm$ 0.91    |
| 低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)             | 2.10 $\pm$ 0.60    | 3.25 $\pm$ 1.06    |
| 游离三碘甲状腺原氨酸(pmol/ml)           | N/A                | 4.45 $\pm$ 0.82    |
| 游离四碘甲状腺原氨酸(pmol/ml)           | N/A                | 16.15 $\pm$ 2.92   |
| 促甲状腺激素( $\mu\text{IU/ml}$ )   | N/A                | 1.86 $\pm$ 0.79    |
| 甲状腺球蛋白( $\mu\text{g/L}$ )     | N/A                | 114.3 $\pm$ 175.2  |
| 甲状腺球蛋白抗体( $\mu\text{g/L}$ )   | N/A                | 67.98 $\pm$ 93.32  |
| 促甲状腺素受体抗体( $\mu\text{g/L}$ )  | N/A                | 32.3 $\pm$ 63.37   |
| 甲状腺过氧化物酶抗体( $\mu\text{g/L}$ ) | N/A                | 59.84 $\pm$ 136.27 |

#### 3.2. QC 验证

为了评估实验的可重复性和实验仪器的稳定性, 我们对本次实验在正负离子模式下做了 8 个样本的质量控制样品(quality control, QC) (如图 1), 即为 8 份 QC 样本进行 PCA 分析后, 各个样本在第一主成分的投影结果图, 该图提示了 8 份 QC 样品的偏差范围均在 2SD 范围内, 说明了整个仪器的稳定性较好, 误差小, 实验的数据是稳定可靠的, 该实验数据能反应不同组别之间生物学上的差异。



**Figure 1.** PCA analysis of quality control samples  
**图 1.** 质量控制样品 PCA 分析

### 3.3. 数据归一化处理

对单个 Peak 进行过滤以去除噪音, 基于相对标准偏差(relative standard deviation, RSD, 即变异系数 coefficient of variation, CV)对偏离值进行过滤, 只保留单组空值不多于 50%或所有组中空值不多于 50%的峰面积数据, 对原始数据中的缺失值进行模拟, 数值模拟方法为最小值二分之一法进行填补, 数据标准化处理, 利用内标(internal standard, IS)进行归一化。

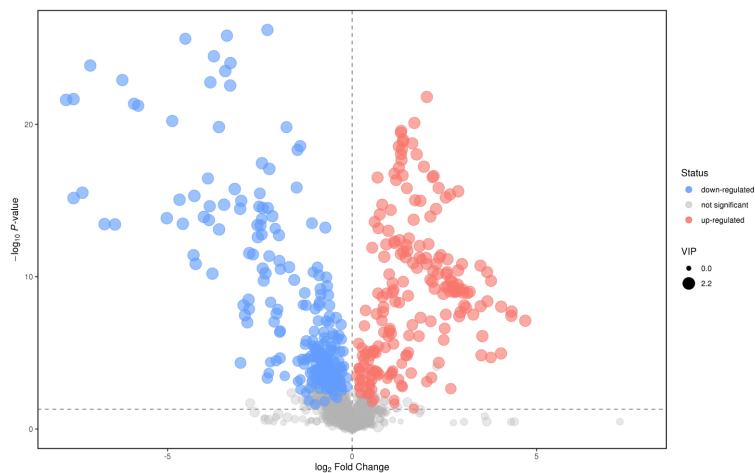
### 3.4. 多元变量统计分析

#### 3.4.1. 火山分析图

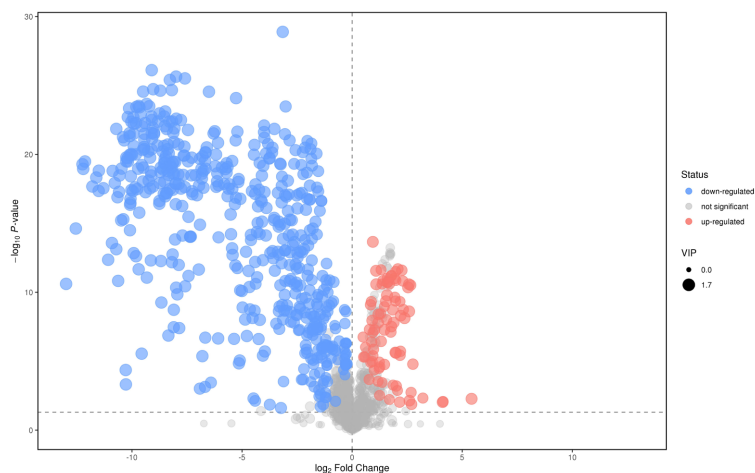
分析两组样本间的差异性代谢物时, 常用的单变量统计学方法 t 检验方法分析, 火山图中每个点代表一个代谢物, 横坐标代表该组对比各物质的倍数变化(取以 2 为底的对数), 纵坐标表示学生 t 检验的 P-value (取以 10 为底对数的负数), 散点大小代表 OPLS-DA 模型的 VIP 值, 散点越大 VIP 值越大。散点颜色代表最终的筛选结果, 显著上调的代谢物以红色表示, 显著下调的代谢物以蓝色表示, 非显著差异的代谢物为灰色。以  $p < 0.05$ ,  $FC > 2$  (FC 是代谢物相对量在两组间的差异倍数)为标准筛选差异性代谢物。负离子模式下(NEG)共筛选出 88 种差异代谢物, 其中 54 种下调, 34 种上调。正离子模式下(POS)共有 90 种差异代谢物, 其中上调 20 种, 下调 70 种(如图 2)。

#### 3.4.2. 正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)

从 OPLS-DA 得分图的结果可以看出, 两组样本区分非常显著, 样本基本处于 95%置信区间内。通过 OPLS-DA 分析我们可以筛选出差异代谢物, 筛选的标准是 VIP 值大于 1 同时满足 t 检验小于 0.05 (如图 3)。置换检验随机模型的  $Q^2$  值均小于原模型的  $Q^2$  值;  $Q^2$  的回归线与纵轴的截距小于零; 同时随着置换保留度逐渐降低, 置换的 Y 变量比例增大, 随机模型的  $Q^2$  逐渐下降。说明原模型具有良好的稳健性, 不存在过拟合现象(如图 4)。



Negative 模式下的火山分析图



Positive 模式下的火山分析图

Figure 2. Volcano analysis in positive and negative ion mode  
图 2. 正负离子模式下火山分析图

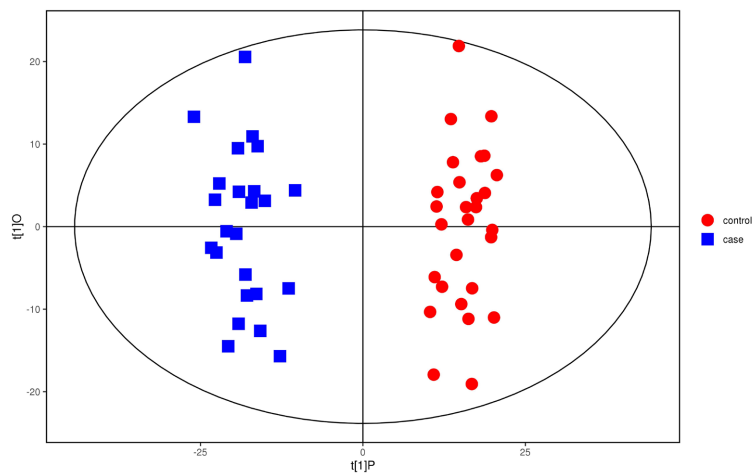
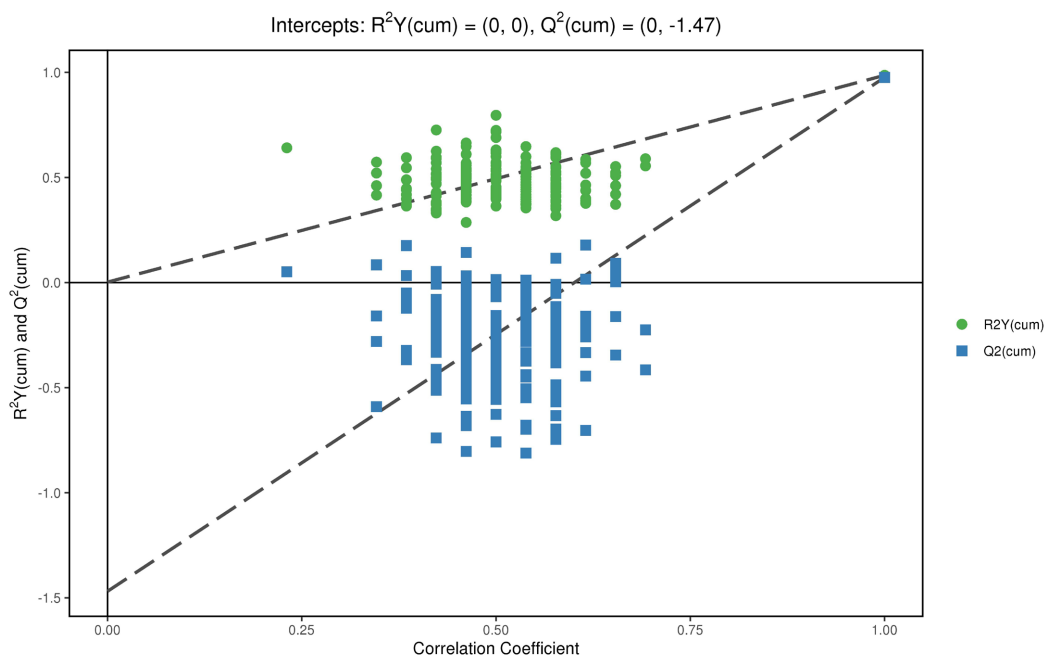


Figure 3. Orthogonal partial least squares method-discriminant analysis  
图 3. 正交偏最小二乘法 - 判别分析



**Figure 4.** Orthogonal partial least squares-discriminant permutation analysis  
**图 4.** 正交偏最小二乘法 - 判别置换分析

### 3.4.3. 层次聚类分析

本研究将正负离子模式下 PTC 和健康成人血清样本中差异代谢物的定量值进行计算欧式距离矩阵,以完全连锁方法对差异代谢物进行聚类,并以热力图进行展示。正离子模式下(如图 5),PTC 和健康成人样品的代谢物数据呈现出较为明显的聚类,在负离子模式下(如图 6)样品的代谢物数据聚类情况基本上可以将两组区分,但情况不如正离子模式下理想,主要原因可能是负离子模式下检测出的 PTC 和健康成人样品差异代谢物较少。

### 3.4.4. 主成分分析(PCA)

利用主成分分析(PCA)方法对 PTC 及健康成人血清样本的代谢物轮廓进行分析。结果所示,两组组间差异较为显著,能够根据两组代谢物信息特征可明显区分,两组间存在明显差异(如图 7)。

### 3.4.5. 和弦分析

通过对差异代谢物进行物质分类来源归属,以斯皮尔曼方法对差异代谢物进行相关计算,最终以和弦图进行可视化展示。图中点大小代表 LOG\_FOLDCHANGE 值大小,点越大,其对应的 LOG\_FOLDCHANGE 值也就越大;点的颜色代表该组对比的差异代谢物来源分类,连线代表对应位置代谢物的相关系数值大小(如图 8)。

## 3.5. 差异代谢物信息

利用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,并且确定了两组血清代谢轮廓之间存在的显著性代谢差异。根据差异权重贡献值(VIP)来筛选潜在的差异性代谢物,一般认为 VIP > 1.0 的变量在模型中区分度较大,可将其对应的代谢物作为潜在得生物标志物。结合 VIP > 1.0、曲线下面积 AUC > 0.95,且 p < 0.05 条件获得 41 种可信差异代谢物,其中 22 种下调,19 种上调,在 PTC 中, $\alpha$ -溶血磷脂酸、花生四烯酸、粪卟啉 III、血栓素 b2、棕榈酰-甘油-3-磷酸胆碱、亚甲基-四氢

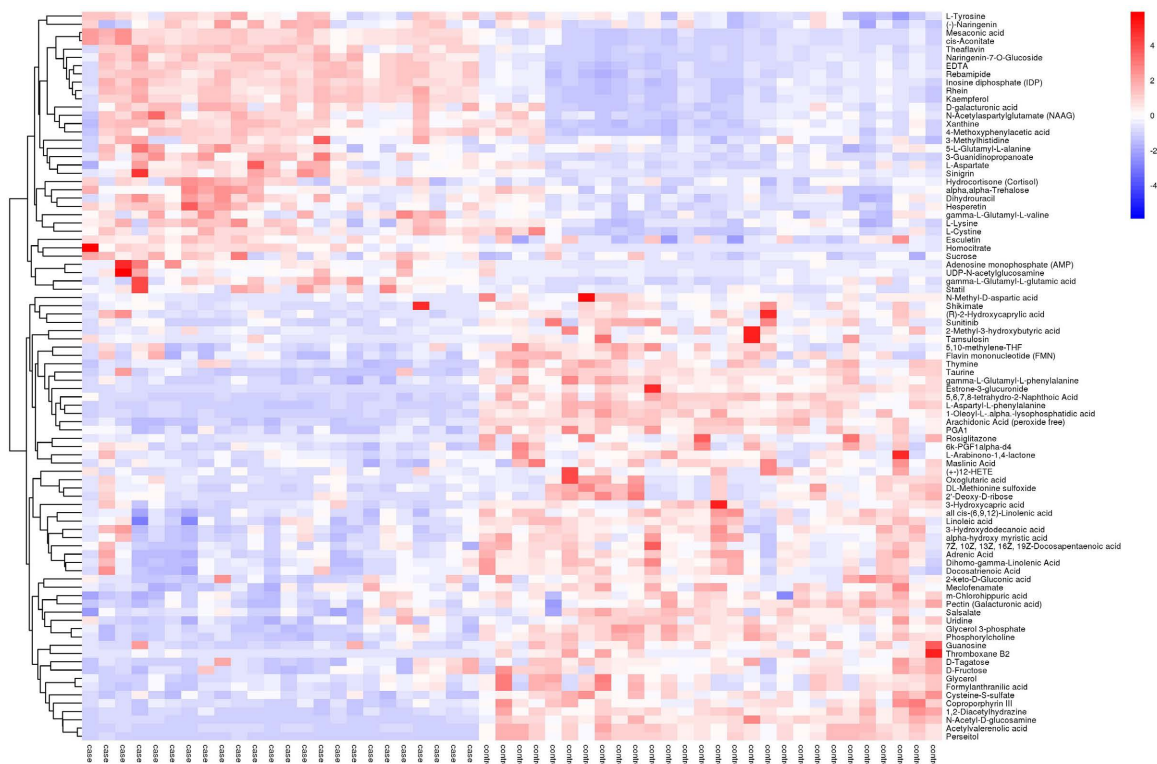


Figure 5. Under negative ion mode (NEG)

图 5. 负离子模式下(NEG)

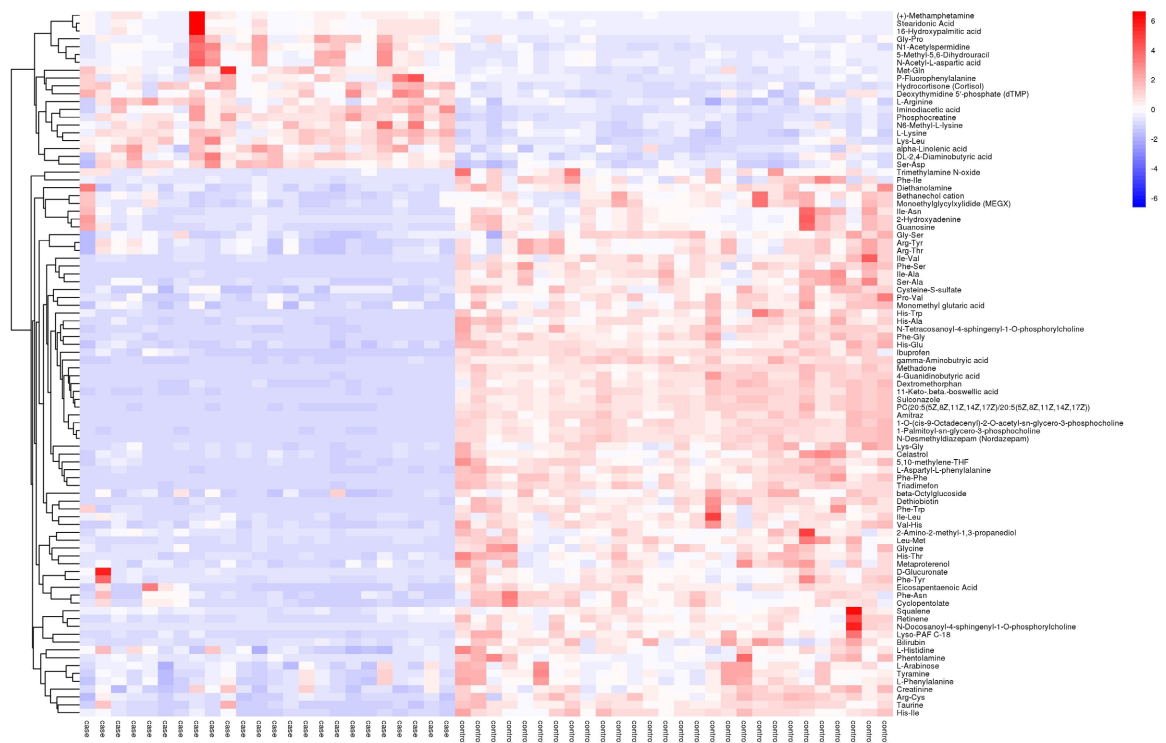
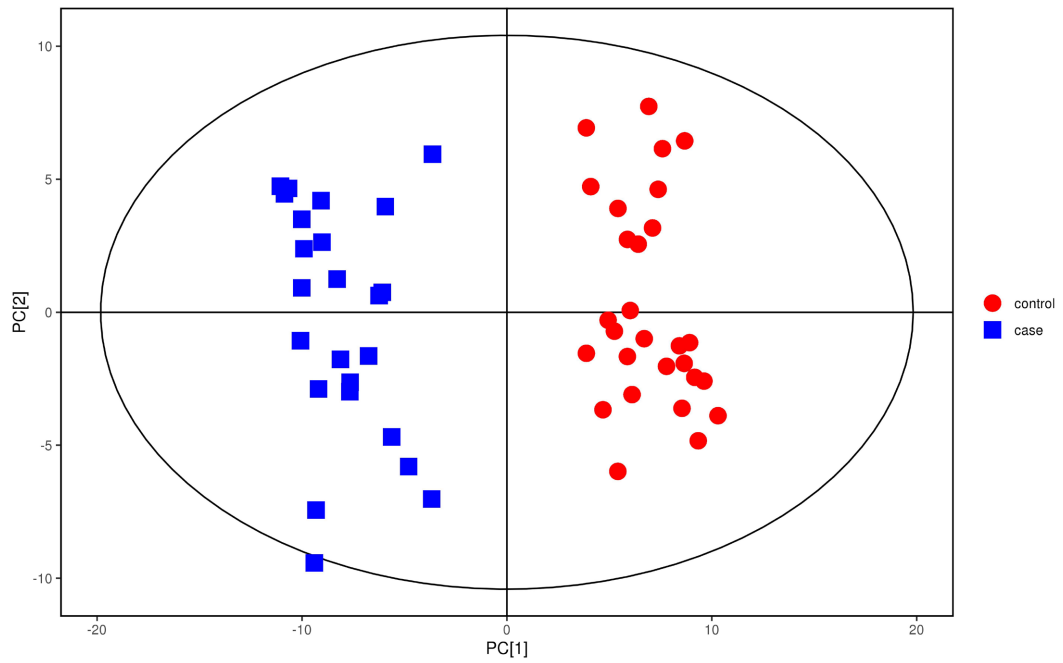


Figure 6. Under positive ion mode (POS)

图 6. 正离子模式下(POS)





红点：健康成人组，蓝点：PTC 组

Figure 7. Principal component analysis

图 7. 主成分分析

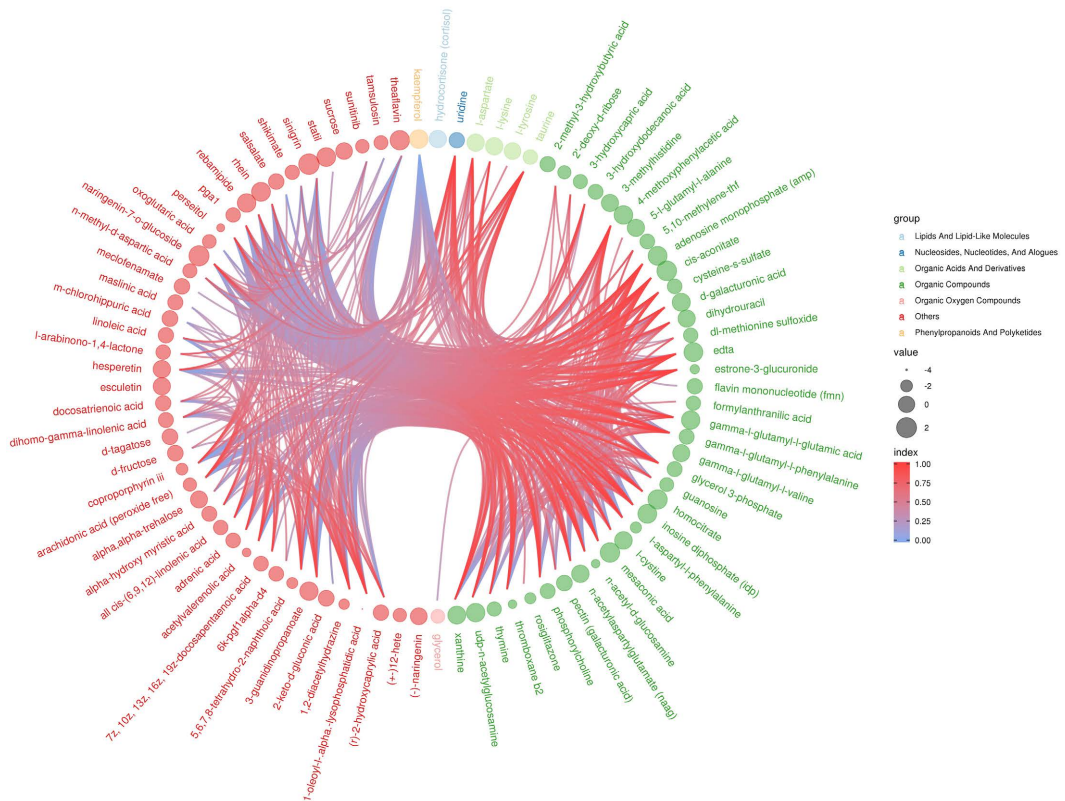


Figure 8. Chord analysis

图 8. 和弦分析

叶酸、半胱氨酸-s-硫酸盐、 $\gamma$ -氨基丁二酸、甘氨酸、谷氨酸、组氨酸-苏氨酸、色氨酸、亮氨酸、天冬氨酸-苯丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸、肾上腺素酸、磷酸胆碱、大黄酸、血小板活化因子、N-去甲基地西洋、维甲酸呈下降趋势；顺乌头酸、 $\alpha$ -亚麻酸、二磷酸肌苷、山奈酚、氨基甲酸、柚皮素 7-葡萄糖苷、内源性前列腺素诱导剂、茶黄素、皮质醇、甲基-赖氨酸、磷酸肌酸、天冬氨酸、牛磺酸、酪胺、肌酐、L-精氨酸、半乳糖醛酸、胸腺嘧啶、乳糖呈上升趋势(如表 2)。

**Table 2.** Differential metabolites between PTC and healthy adult groups under positive and negative ion modes  
**表 2.** 正负离子模式下 PTC 与健康成人组差异性代谢物

|    | 代谢物             | 差异权重贡献值(VIP) | 保留时间(RT) | 质荷比(m/z) | p 值  | PTC. VS. 健康成人 |
|----|-----------------|--------------|----------|----------|------|---------------|
| 1  | $\alpha$ -溶血磷脂酸 | 2.03         | 306.66   | 175.07   | 0.00 | ↓             |
| 2  | 花生四烯酸           | 1.96         | 41.92    | 303.23   | 0.00 | ↓             |
| 3  | 粪卟啉 III         | 1.53         | 436.74   | 653.27   | 0.00 | ↓             |
| 4  | 血栓素 b2          | 1.82         | 162.92   | 369.23   | 0.03 | ↓             |
| 5  | 顺乌头酸            | 2.04         | 413.45   | 173.01   | 0.00 | ↑             |
| 6  | $\alpha$ -亚麻酸   | 2.03         | 391.24   | 291.08   | 0.00 | ↑             |
| 7  | 二磷酸肌苷           | 2.02         | 419.64   | 427.00   | 0.00 | ↑             |
| 8  | 山奈酚             | 2.04         | 419.60   | 285.04   | 0.00 | ↑             |
| 9  | 氨基甲酸            | 2.04         | 413.52   | 129.02   | 0.00 | ↑             |
| 10 | 柚皮素 7-葡萄糖苷      | 2.03         | 391.22   | 471.08   | 0.00 | ↑             |
| 11 | 内源性前列腺素诱导剂      | 1.96         | 391.36   | 351.05   | 0.00 | ↑             |
| 12 | 大黄酸             | 2.06         | 419.62   | 283.02   | 0.00 | ↓             |
| 13 | 茶黄素             | 2.03         | 419.88   | 563.11   | 0.00 | ↑             |
| 14 | 棕榈酰-甘油-3-磷酸胆碱   | 1.32         | 112.84   | 365.27   | 0.00 | ↓             |
| 15 | 亚甲基-四氢叶酸        | 1.13         | 33.53    | 456.14   | 0.00 | ↓             |
| 16 | 半胱氨酸-s-硫酸盐      | 1.66         | 282.92   | 199.97   | 0.00 | ↓             |
| 17 | $\gamma$ -氨基丁二酸 | 2.07         | 346.9    | 202.09   | 0.00 | ↓             |
| 18 | 甘氨酸             | 3.56         | 235.2    | 218.5    | 0.00 | ↓             |
| 19 | 谷氨酸             | 2.87         | 320.3    | 189.3    | 0.00 | ↓             |
| 20 | 组氨酸-苏氨酸         | 1.89         | 243.09   | 191.2    | 0.00 | ↓             |
| 21 | 色氨酸             | 2.89         | 259.76   | 143.45   | 0.00 | ↓             |
| 22 | 亮氨酸             | 2.43         | 312.78   | 174.02   | 0.00 | ↓             |
| 23 | 天冬氨酸-苯丙氨酸       | 3.05         | 237.56   | 143.51   | 0.00 | ↓             |
| 24 | 丝氨酸             | 2.98         | 326.15   | 154.9    | 0.00 | ↓             |
| 25 | 脯氨酸             | 2.12         | 451.32   | 261.1    | 0.00 | ↓             |
| 26 | 肾上腺素酸           | 1.36         | 321.8    | 211.45   | 0.00 | ↓             |
| 27 | 磷酸胆碱            | 1.98         | 256.31   | 142.3    | 0.00 | ↓             |
| 28 | 血小板活化因子         | 2.32         | 490.34   | 153.5    | 0.00 | ↓             |

## Continued

|    |          |      |        |        |      |   |
|----|----------|------|--------|--------|------|---|
| 29 | N-去甲基地西洋 | 1.56 | 327.6  | 310.4  | 0.00 | ↓ |
| 30 | 维甲酸      | 1.86 | 241.5  | 235.4  | 0.00 | ↓ |
| 31 | 皮质醇      | 2.37 | 101.06 | 120.83 |      | ↑ |
| 32 | 甲基-赖氨酸   | 1.71 | 73.09  | 132.03 | 0.00 | ↑ |
| 33 | 磷酸肌酸     | 1.88 | 293.12 | 44.65  | 0.00 | ↑ |
| 34 | 天冬氨酸     | 1.63 | 45.31  | 210.2  | 0.00 | ↑ |
| 35 | 牛磺酸      | 1.45 | 151.87 | 156.37 | 0.00 | ↑ |
| 36 | 酪胺       | 1.76 | 132.1  | 158.12 | 0.00 | ↑ |
| 37 | 肌酐       | 2.31 | 415.00 | 214.32 | 0.00 | ↑ |
| 38 | L-精氨酸    | 1.03 | 331.1  | 215.23 | 0.00 | ↑ |
| 39 | 半乳糖醛酸    | 2.81 | 253.12 | 235.88 | 0.00 | ↑ |
| 40 | 胸腺嘧啶     | 1.08 | 267.9  | 380.2  | 0.00 | ↑ |
| 41 | 乳糖       | 1.16 | 172.65 | 303.23 | 0.00 | ↑ |

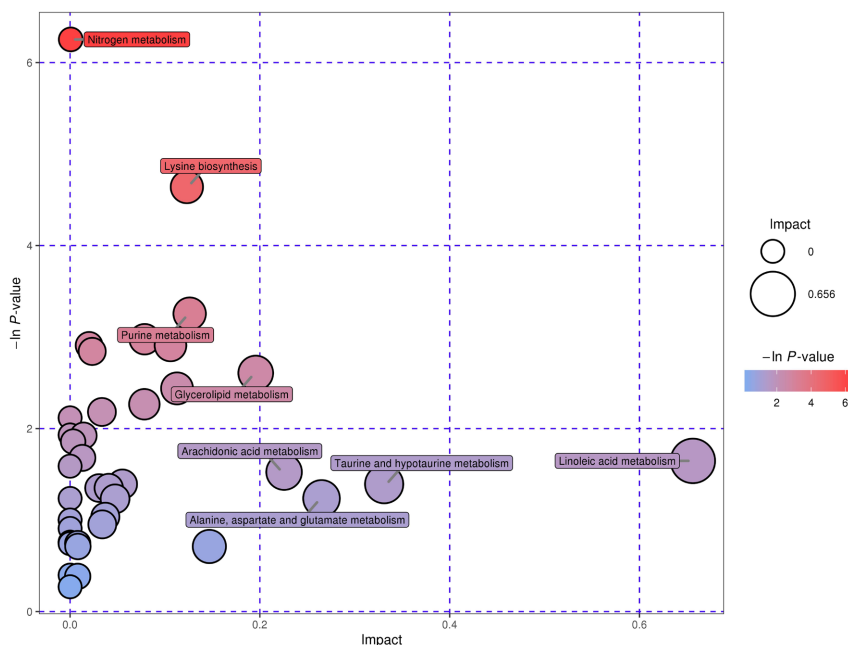
### 3.6. 代谢通路分析

根据 KEGG 数据库, 匹配到 40 条代谢通路, 再根据  $-\log(p)$  值  $> 0.5$  且 Pathway impact 值大于 0.05 筛选出 20 条代谢通路, 分别为氮代谢(Nitrogen metabolism)、赖氨酸降解通路(Lysine degradation)、花生四烯酸代谢通路(Arachidonic acid metabolism)、牛磺酸和亚牛磺酸代谢(Taurine and hypotaurine metabolism)、 $\alpha$ -亚麻酸代谢(Linoleic acid metabolism)、组氨酸代谢(Histidine metabolism)、初级胆汁酸生物合成(Primary bile acid biosynthesis)、甲烷代谢(Methane Metabolism)、精氨酸和脯氨酸代谢(Arginine and Proline Metabolism)、生物素代谢(Biotin metabolism)、甘氨酸代谢(Glycine metabolism)、丝氨酸代谢(Serine metabolism)、苏氨酸代谢(Threonine metabolism)、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化(Mutual conversion of pentose and glucuronic acid)、氨酰-tRNA 生物合成(Aminoacyl tRNA biosynthesis)、视黄醇代谢(Retinol metabolism)、嘌呤代谢(Purine metabolism)、甘油酯代谢(Glycerolipid metabolism)、甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)、柠檬酸循环(Citratecycle)等。代谢通路分析的结果以气泡图进行展示, 在拓扑分析中的影响因子大小, 大小越大影响因子越大; 气泡所在纵坐标和气泡颜色表示富集分析的 P 值(取负自然对数), 颜色越深 P 值越小, 富集程度越显著(如图 9)。以矩形树图进行展示, 矩形树图中每一个方块代表一个代谢通路, 方块大小表示该通路在拓扑分析中的影响因子大小, 大小越大影响因子越大; 方块颜色表示富集分析的 P 值(取负自然对数), 颜色越深 P 值越小, 富集程度越显著(如图 10)。

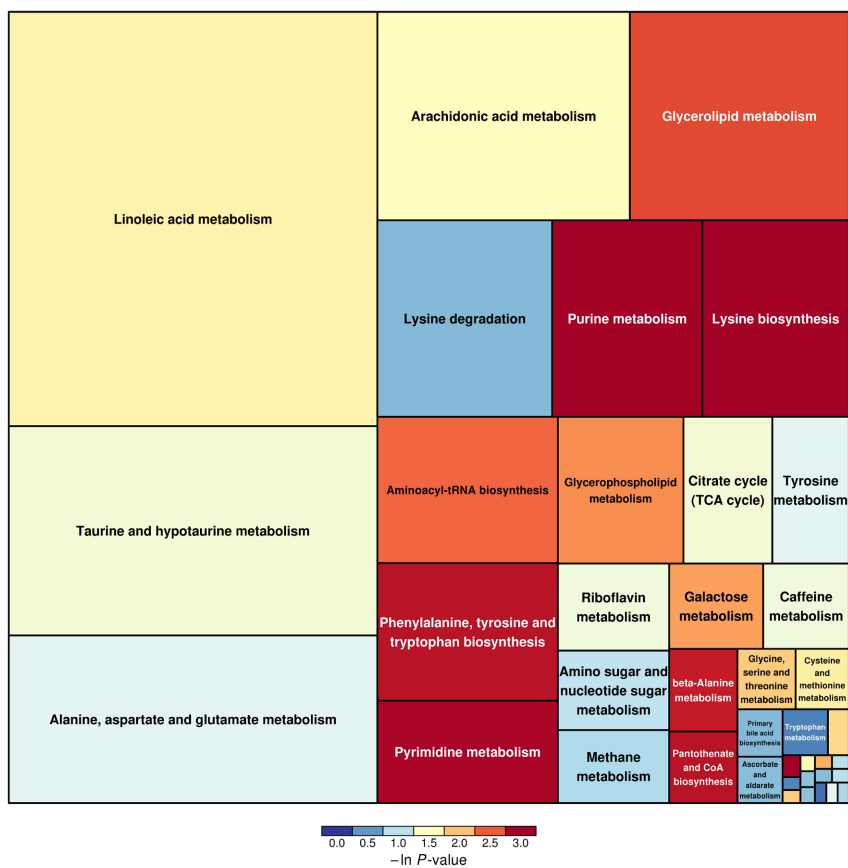
## 4. 讨论

随着人类基因组测序计划的完成, 生命科学研究的重点已转向功能基因组分析。但基因组分析不能随着生物化学状态的变化而提供有价值的终点生物标志物作为诊断信息。代谢组作为转录组和蛋白质组的下游, 被认为是基因组学、转录组学和蛋白质组学的补充。代谢组学研究主要是针对肿瘤组织中代谢物的特异性代谢谱进行深入分析, 通过研究癌组织的代谢状态, 可以产生关于肿瘤组织病理改变的局部信息, 并了解癌症的生物学过程。此研究已经应用于癌症的许多方面(如病理生理、诊断、治疗)。研究表明代谢组学可应用于口腔鳞癌[8]、肝癌[9]、乳腺癌[10]的筛查及早期诊断。

TC 是最常见的内分泌恶性肿瘤, PTC 是最常见的病理类型, 占 TC 的 85%~90% [11]。近年来, TC



**Figure 9.** Bubble diagram of metabolic pathway differences  
**图 9.** 代谢通路差异气泡图



**Figure 10.** Metabolic pathway differences rectangle tree  
**图 10.** 代谢通路差异矩形树

发病率越来越高, 现成为所有恶性肿瘤发病率增长最快的肿瘤。尽管 TC 的死亡率没有随着发病率的增加而增加, 但其复发率及难治率呈现上升趋势。为提高治疗效率明确 TC 的发病机制已成为临床面临的巨大挑战。随着 TC 分子生物学的发展, 分子诊断逐渐进步, TC 的发生、发展相关异常代谢已被发现, 代谢组学靶向治疗成为研究的热点。

代谢组学的应用分离技术如气相、液相色谱, 物质鉴定技术如质谱、核磁共振, 本研究使用超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用技术(UHPLC-QTOF-MS)将分离技术物质鉴定技术相结合, 各自弥补其缺点, 实现高灵敏度及高特异性的特点。本次实验利用 UHPLC-QTOF-MS 技术研究 PTC 患者与健康成人对照, 分析两组之间的代谢产物之间的变化情况, 在 POS 下二级匹配定性出 470+代谢物, 在 NEG 下二级匹配定性出 340+代谢物。正离子模式结果和负离子模式结果分别进行一次对比分析, 对数据进行预处理, 构建模型, 进行 PCA 分析和 OPLS-DA 得到差异代谢物, 通过 PCA 图可以发现两组无特定的聚集趋势, 分散趋势明显, 证明两组之间存在明显差异, OPLS-DA 模型图证明模型构建良好, 无过拟合情况。分析提示 PTC 和健康对照组人群血浆代谢物精确区分开来, 共筛选出差异代谢物 91 个, 上调 20 个, 下调 71 个。再结合 VIP > 1.0、曲线下面积 AUC > 0.95, 且  $p < 0.05$  条件获得 41 种差异代谢物, 其中 22 种下调, 19 种上调。进行 KEGG 通路分析, 提示 PTC 发生发展机制与糖代谢、脂肪代谢及氨基酸代谢密切相关。

葡萄糖代谢作为生理平衡的基础, 其代谢异常是癌症发生的标志之一[12]。代谢组学提示具有无限增殖能力及恶性表型的肿瘤细胞表现出特有的糖代谢重塑[13]。肿瘤细胞分化周期短、生长速度快的前提是需要更多能量。癌细胞代谢的特点在于糖酵解的增加和三羧酸循环的抑制, 由于肿瘤细胞具有 Warburg 效应, 即癌细胞即使在氧气非常充足的情况下, 通常依靠无氧酵解功能, 在乳酸脱氢酶的作用下转化为乳酸而迅速获能。异常糖酵解通过改变转运体、交换器、质子泵的活性产生大量乳酸维持癌细胞生存环境[14] [15]。本研究结果显示 PTC 组与健康组相比乳酸、半乳糖醛酸、顺乌头酸表达上调。甲状腺癌组织较正常组织光谱中更高含量的乳酸和乙酰胆碱, Paolo 等[16]人研究与本研究结果一致, 甲状腺癌组织较正常组织光谱中更高含量的乳酸。因此进一步研究乳糖代谢在甲状腺癌的作用是必要的。

癌细胞中的脂代谢重新编码刺激癌细胞增殖、迁移可能是通过甘油三酯、胆固醇的合成及分解代谢途径进行的[17], 癌细胞通过脂滴形式储存能量, 过多的脂滴进一步分解为游离脂肪酸[18]。随着年龄的增长, 人体代谢能力降低, 产生的碱性物质能力下降, 大量游离脂肪酸的产生, 未能及时得到中和, 使人体内环境的酸碱平衡得到破坏, 无法恢复到稳定状态, 高 PH 环境适宜癌细胞生存。有研究表明, 黑色素瘤[19]、卵巢癌[20]、前列腺癌[21]和结直肠癌[22]的进展与脂质代谢相关。本研究提示 PTC 组与健康组相比  $\alpha$ -溶血磷脂酸、花生四烯酸、棕榈酰-甘油-3-磷酸胆碱、磷酸胆碱、 $\alpha$ -亚麻酸代谢产物异常, 花生四烯酸及  $\alpha$ -亚麻酸等代谢通路异常, 需大量基础研究进一步验证脂代谢与甲状腺癌发生发展的相关性。在 PTC 组大黄酸明显下调, 大黄酸代谢通路异常, 已研究证明大黄酸对结直肠癌[23]、乳腺癌[24]、口腔癌[25]都有一定的抑制作用, 目前甲状腺癌与大黄酸相关研究暂未报道。

在肿瘤的增殖过程中需要大量的氨基酸作为合成蛋白质的底物。例如, 精氨酸、天冬氨酸和谷氨酰胺的合成代谢已成为许多癌症治疗的研究靶点, 精氨酸琥珀酸合成酶是此代谢途径的关键酶, 研究证明精氨酸琥珀酸合成酶参与黑色素瘤、前列腺癌、肝细胞癌的发生, 通过抑制该酶可作为一种选择性地杀死癌细胞的潜在疗法[26]。L-精氨酸的代谢调节促进了中枢记忆样 T 细胞表型的形成, 体外(人)和体内(小鼠模型)的存活能力和抗肿瘤活性都增强了[27]。牛磺酸, 一种氨基磺酸, 被发现在体外少突胶质细胞分化过程中显著升高, 在 PTC 中的含量增加。牛磺酸被认为是膀胱癌的一种可能的生物标志物[28]。有研究使用四种不同的代谢组学工具与传统的生化技术相结合证明结肠癌的生物标记物 N1, N12-二乙酰精胺, 是多胺代谢的代谢终产物[29], 并且此产物已在证明与肺癌[30]、乳腺癌[31]及膀胱癌[32]的发生息息相关。

也有证据表明,癌症利用细胞外基质衍生的氨基酸来支持新陈代谢,特别是脯氨酸[33]。本研究提示 PTC 组中甘氨酸、谷氨酸、组氨酸-苏氨酸、色氨酸、亮氨酸、天冬氨酸-苯丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸、甲基-赖氨酸、天冬氨酸、酪胺、L-精氨酸、胸腺嘧啶表达异常,氮代谢、赖氨酸降解代谢、组氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路等均异常。

总之代谢组学是不断发展的研究领域,有许多成功的案例表明,它的力量从生物标记物的发现延伸到了解表型背后的机制,代谢组学与基因组学、蛋白质组学等技术相结合,这些技术为微生物区系做出巨大贡献。PTC 发病机制尚未明确,我们通过代谢组学确定了 PTC 的代谢特征,部分糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢及其代谢产物的异常可能为 PTC 发病机制的探索提供新思路,也可能为其治疗提供新的靶点及方向。

## 参考文献

- [1] Haymart, M.R. (2021) Progress and Challenges in Thyroid Cancer Management. *Endocrine Practice*, **27**, 1260-1263. <https://doi.org/10.1016/j.eprac.2021.09.006>
- [2] Chen, D.W., Lang, B.H.H., Mcleod, D.S.A., Newbold, K. and Haymart, M.R. (2023) Thyroid Cancer. *The Lancet*, **401**, 1531-1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00020-X)
- [3] Haugen, B.R., Alexander, E.K., Bible, K.C., et al. (2016) 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, **26**, 1-133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>
- [4] Pizzato, M., Li, M., Vignat, J., et al. (2022) The Epidemiological Landscape of Thyroid Cancer Worldwide: GLOBOCAN Estimates for Incidence and Mortality Rates in 2020. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, **10**, 264-272. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00035-3)
- [5] Bauermeister, A., Mannocho-Russo, H., Costa-Lotufu, L.V., Jarmusch, A.K. and Dorrestein, P.C. (2022) Mass Spectrometry-Based Metabolomics in Microbiome Investigations. *Nature Reviews Microbiology*, **20**, 143-160. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00621-9>
- [6] Anwardeen, N.R., Diboun, I., Mokrab, Y., Althani, A.A. and Elrayess, M.A. (2023) Statistical Methods and Resources for Biomarker Discovery Using Metabolomics. *BMC Bioinformatics*, **24**, Article No. 250. <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05383-0>
- [7] Chacko, S., Haseeb, Y.B. and Haseeb, S. (2022) Metabolomics Work Flow and Analytics in Systems Biology. *Current Molecular Medicine*, **22**, 870-881. <https://doi.org/10.2174/1566524022666211217102105>
- [8] Chen, X. and Yu, D. (2019) Metabolomics Study of Oral Cancers. *Metabolomics*, **15**, Article No. 22. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1483-8>
- [9] Ganesan, R., Yoon, S.J. and Suk, K.T. (2022) Microbiome and Metabolomics in Liver Cancer: Scientific Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 537. <https://doi.org/10.3390/ijms24010537>
- [10] Xiao, Y., Ma, D., Yang, Y.S., et al. (2022) Comprehensive Metabolomics Expands Precision Medicine for Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Research*, **32**, 477-490. <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00614-0>
- [11] Li, M., Dal Maso, L. and Vaccarella, S. (2020) Global Trends in Thyroid Cancer Incidence and the Impact of Overdiagnosis. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, **8**, 468-470. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30115-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30115-7)
- [12] Kodama, M. and Nakayama, K.I. (2020) A Second Warburg-Like Effect in Cancer Metabolism: The Metabolic Shift of Glutamine-Derived Nitrogen: A Shift in Glutamine-Derived Nitrogen Metabolism from Glutaminolysis to De Novo Nucleotide Biosynthesis Contributes to Malignant Evolution of Cancer. *BioEssays*, **42**, e2000169. <https://doi.org/10.1002/bies.202000169>
- [13] Arguello, R.J., Combes, A.J., Char, R., et al. (2020) SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metabolism*, **32**, 1063-1075. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.11.007>
- [14] Feng, J., Li, J., Wu, L., et al. (2020) Emerging Roles and the Regulation of Aerobic Glycolysis in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **39**, Article No. 126. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01629-4>
- [15] Cao, L., Wu, J., Qu, X., et al. (2020) Glycometabolic Rearrangements—Aerobic Glycolysis in Pancreatic Cancer: Causes, Characteristics and Clinical Applications. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **39**, Article

- No. 267. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01765-x>
- [16] Miccoli, P., Torregrossa, L., Shintu, L., *et al.* (2012) Metabolomics Approach to Thyroid Nodules: A High-Resolution Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance-Based Study. *Surgery*, **152**, 1118-1124. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2012.08.037>
- [17] Bian, X., Liu, R., Meng, Y., *et al.* (2021) Lipid Metabolism and Cancer. *Journal of Experimental Medicine*, **218**, e20201606. <https://doi.org/10.1084/jem.20201606>
- [18] Li, D. and Li, Y. (2020) The Interaction between Ferroptosis and Lipid Metabolism in Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, Article No. 108. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00216-5>
- [19] Arslanbaeva, L., Tosi, G., Ravazzolo, M., *et al.* (2022) UBIAD1 and CoQ10 Protect Melanoma Cells from Lipid Peroxidation-Mediated Cell Death. *Redox Biology*, **51**, Article ID: 102272. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102272>
- [20] Lin, F., Li, X., Wang, X., *et al.* (2022) Stanniocalcin 1 Promotes Metastasis, Lipid Metabolism and Cisplatin Chemoresistance via the FOXC2/ITGB6 Signaling Axis in Ovarian Cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **41**, Article No. 129. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02315-3>
- [21] Ippolito, L., Comito, G., Parri, M., *et al.* (2022) Lactate Rewires Lipid Metabolism and Sustains a Metabolic-Epigenetic Axis in Prostate Cancer. *Cancer Research*, **82**, 1267-1282. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0914>
- [22] Zhu, Y., Gu, L., Lin, X., *et al.* (2020) Dynamic Regulation of ME1 Phosphorylation and Acetylation Affects Lipid Metabolism and Colorectal Tumorigenesis. *Molecular Cell*, **77**, 138-149. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.015>
- [23] Zhang, H., Yi, J.K., Huang, H., *et al.* (2021) Rhein Suppresses Colorectal Cancer Cell Growth by Inhibiting the mTOR Pathway *in vitro* and *in vivo*. *Cancers*, **13**, Article 2176. <https://doi.org/10.3390/cancers13092176>
- [24] Wang, S., Fu, J.L., Hao, H.F., *et al.* (2021) Metabolic Reprogramming by Traditional Chinese Medicine and Its Role in Effective Cancer Therapy. *Pharmacological Research*, **170**, Article ID: 105728. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105728>
- [25] Zhang, H., Ma, L., Kim, E., *et al.* (2023) Rhein Induces Oral Cancer Cell Apoptosis and ROS via Suppresses AKT/mTOR Signaling Pathway *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 8507. <https://doi.org/10.3390/ijms24108507>
- [26] Gupta, S., Sahu, D., Bomalaski, J.S., *et al.* (2018) Argininosuccinate Synthetase-1 (ASS1) Loss in High-Grade Neuroendocrine Carcinomas of the Urinary Bladder: Implications for Targeted Therapy with ADI-PEG 20. *Endocrine Pathology*, **29**, 236-241. <https://doi.org/10.1007/s12022-018-9516-9>
- [27] Matos, A., Carvalho, M., Bicho, M. and Ribeiro, R. (2021) Arginine and Arginases Modulate Metabolism, Tumor Microenvironment and Prostate Cancer Progression. *Nutrients*, **13**, Article 4503. <https://doi.org/10.3390/nu13124503>
- [28] Yuan, J.B., Gu, L., Chen, L., Yin, Y. And Fan, B.Y. (2021) Annexin A8 Regulated by lncRNA-TUG1/miR-140-3p Axis Promotes Bladder Cancer Progression and Metastasis. *Molecular Therapy-Oncolytics*, **22**, 36-51. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.04.008>
- [29] Johnson, C.H., Dejea, C.M., Edler, D., *et al.* (2015) Metabolism Links Bacterial Biofilms and Colon Carcinogenesis. *Cell Metabolism*, **21**, 891-897. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.011>
- [30] Wikoff, W.R., Hanash, S., Defelice, B., *et al.* (2015) Diacetylspermine Is a Novel Prediagnostic Serum Biomarker for Non-Small-Cell Lung Cancer and Has Additive Performance with Pro-Surfactant Protein B. *Journal of Clinical Oncology*, **33**, 3880-3886. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.7779>
- [31] Umemori, Y., Ohe, Y., Kuribayashi, K., *et al.* (2010) Evaluating the Utility of N1, N12-Diacetylspermine and N1, N8-Diacetylspermidine in Urine as Tumor Markers for Breast and Colorectal Cancers. *Clinica Chimica Acta*, **411**, 1894-1899. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.018>
- [32] Zhu, Y., Piao, C., Zhang, Z., *et al.* (2022) The Potential Role of c-MYC and Polyamine Metabolism in Multiple Drug Resistance in Bladder Cancer Investigated by Metabonomics. *Genomics*, **114**, 125-137.
- [33] Geng, P., Qin, W. and Xu, G. (2021) Proline Metabolism in Cancer. *Amino Acids*, **53**, 1769-1777. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03060-1>