

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002633

基于高效液相色谱-质谱联用技术的 HBV 相关性
肝纤维化血清代谢标志物筛选

张 丹, 赵梓君, 樊 佳, 姚 娟, 魏 聪, 郭永灿

(西南医科大学附属中医医院检验科, 泸州 646000)

【摘要】目的:探讨乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)相关肝纤维化和慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者血清代谢谱差异, 寻找与 HBV 相关肝纤维化的潜在标志物。**方法:**采用高效液相色谱-质谱联用技术分析 16 名 HBV 相关肝纤维化和 16 名 CHB 患者血清代谢谱;应用统计分析及数据库检索, 鉴定出 2 组间差异代谢物;利用 MetaboAnalyst 4.0 软件对差异代谢物进行代谢通路分析和富集分析, 筛选出富集的主要代谢通路及通路上差异代谢物;最后, 利用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评价主要差异代谢物的诊断性能。**结果:**2 组共筛选并鉴定出 54 种差异代谢产物。代谢通路和富集分析发现, 鞘脂代谢通路 $[-\log(P)=9.75, \text{impact}=0.42]$ 和甘油磷脂代谢通路 $[-\log(P)=10.90, \text{impact}=0.06]$ 是 HBV 相关肝纤维化的主要富集代谢通路, 其中神经鞘磷脂、1-磷酸-鞘氨醇、(神经)鞘氨醇、神经酰胺 4 种差异代谢物富集于鞘脂代谢通路, 而磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰甘油 5 种差异代谢物富集于甘油磷脂代谢通路;ROC 分析显示, 9 种差异代谢物 ROC 曲线下面积均大于 0.700, 均具有良好诊断性能。**结论:**鞘脂、1-磷酸-鞘氨醇、(神经)鞘氨醇、神经酰胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸和磷脂酰甘油诊断 HBV 相关肝纤维化均具有较高的诊断准确性, 可能是 HBV 相关肝纤维化的潜在代谢标志物。

【关键词】乙肝相关性肝纤维化; 高效液相色谱-质谱; 代谢组学; 代谢通路分析; 诊断性能

【中图分类号】R446.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-03-27

Screening of serum metabolic biomarkers for HBV-related liver fibrosis based
on high-performance liquid chromatography-mass spectrometry technology

Zhang Dan, Zhao Zijun, Fan Jia, Yao Juan, Wei Cong, Guo Yongcan

(Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Southwest Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the differences in serum metabolic profiles of patients with hepatitis B virus (HBV)-related liver fibrosis and chronic hepatitis B (CHB), and to search for potential biomarkers of HBV-related liver fibrosis. **Methods:** High-performance liquid chromatography-mass spectrometry was used to analyze the serum metabolic profiles of 16 HBV-related liver fibrosis and 16 CHB patients. By using statistical analysis and database search, the differential metabolites between the two groups were identified. Metabolic pathway analysis and enrichment analysis of differential metabolites using MetaboAnalyst 4.0 software screened out the primary metabolic pathways and differential metabolites on pathways. Finally, the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic performance of major differential metabolites. **Results:** A total of 54 different metabolites were identified in the two groups. Metabolic pathways and enrichment analysis found that sphingolipid metabolism pathway $[-\log(P)=9.75, \text{impact}=0.42]$ and glycerophospholipid metabolism pathway $[-\log(P)=10.90, \text{impact}=0.06]$ were related to HBV-related liver fibrosis mainly enriched in metabolic pathways, including sphingomyelin, 1-phosphate-sphingosine, sphingosine, ceramide and other four different metabolites enriched in sphingolipid metabolism pathways, while phosphatidylcholine, phosphatidyl serine, phosphatidylinositol, phosphatidic acid, phosphatidylglycerol and other five different metabolites were enriched in the glycerophospholipid metabolism pathway. ROC analysis showed that the areas under the ROC curve of the nine different metabolites were all greater than 0.700, and all had a good diagnostic performance. **Conclusion:** Sphingomyelin, 1-phospho-sphingosine, sphingosine, ceramide, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidic acid, and phosphatidyl all have a high diagnostic accuracy of HBV-related liver fibrosis, which may be a poten-

作者介绍: 张 丹, Email: 397910725@qq.com,
研究方向: 临床检验及检验诊断标志物研究。

通信作者: 郭永灿, Email: 394447956@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81902169); 四川省教育厅重点资助项目 (编号: 16ZA0181); 西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合课题资助项目 (编号: 2016-JYT009)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200826.1132.002.html>
(2020-08-27)

tial metabolic biomarker for HBV-related liver fibrosis.

[Key words] hepatitis B virus-associated liver fibrosis; high-performance liquid chromatography-mass spectrometry; metabolomics; metabolic pathway analysis; diagnostic performance

肝纤维化是指各种慢性肝病引起的细胞外基质在肝脏过度沉积,是肝内细胞之间及其与细胞外基质相互作用的结果^[1]。我国是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染大国,携带者近 1 亿,慢性乙型肝炎感染是引起肝纤维化的主要原因。肝纤维化是进一步向肝硬化发展的中间环节,属可逆性病变。目前对肝硬化仍缺乏有效治疗手段。因此,探索 HBV 相关性肝纤维化的标志物,对阻止肝纤维化向肝硬化转变、减轻社会负担有非常重要的理论和现实意义。近 30 年来,肝纤维化研究一直是医学研究的热点。然而,至今仍没有单个生物标志物或评分系统对肝纤维化检测有理想的敏感度和特异性^[2]。肝穿刺活检组织检查是肝纤维化分期诊断的金标准,但存在有创性、样本误差等局限性。肝纤维化的非侵袭性诊断进展较快,瞬时弹性成像近年在临床上广泛应用,但肝脏炎症、胆汁淤积等均有一定的影响^[3-4]。代谢组学是对生物体内所有代谢物进行定量分析,并寻找代谢物与生理病理变化相对关系的研究方式,其研究对象大都是相对分子质量 1 000 以内的小分子物质。由于与疾病表型更为接近,代谢组学更适用于疾病分型和标志物发现的研究。本文主要运用高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)联用技术分析 HBV 相关性肝纤维化与慢性乙肝患者的血清代谢谱差异,通过对鉴定出的差异代谢物进行代谢物富集和代谢途径分析,筛选出主要差异代谢物,并评价其诊断性能,为 HBV 相关性肝纤维化寻找潜在的标志物。

1 资料和方法

1.1 病例资料

招募 2018 年 2 月至 2018 年 10 月来西南医科大学附属医院就诊的慢性乙型肝炎和乙肝肝纤维化患者,16 例无纤维化的慢性乙肝病例作为对照组(A 组),男性占 56.25%,年龄(39.880 ± 10.475)岁;16 例诊断为乙肝肝纤维化的病例为实验组(B 组),男性占 81.250%,年龄(49.630 ± 7.639)岁。2 组患者年龄及性别无统计学差异($P > 0.05$)。

纳入标准:按照我国中华医学会的《慢性乙型肝炎防治指南》(2015 版),选择有乙型肝炎病史或 HBsAg 阳性史 ≥ 6 个

月,现 HBsAg 和(或)HBV DNA 仍为阳性,经肝穿刺活检组织病理学检查确诊为肝纤维化(S1~S3 期)的患者纳入 B 组;乙型肝炎病史或 HBsAg 阳性史 ≥ 6 个月,现 HBsAg 和(或)HBV DNA 仍为阳性,经 B 超及瞬时弹性成像检查肝脏无纤维化病变(肝脏硬度指数 < 3.5 kPa)的患者纳入 A 组。

排除标准:合并丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒感染,酒精性肝病、自身免疫性肝病、胆汁淤积性肝病、脂肪肝等其他慢性肝病及肝脏肿瘤者;已接受抗病毒治疗者。

1.2 材料与方法

1.2.1 材料试剂 LC/MS 级乙腈购自 Merck 公司(Merck KgaA,德国),HPLC 级甲醇购自 Merck 公司(Dannstadt,德国),甲酸购自 CNW 公司(CNW Technologies GmbH,德国)。实验用水为双蒸馏水。

1.2.2 仪器分析平台 LC-Q/TOF-MS (Agilent, 1290 Infinity LC, 6530 UHD and Accurate-Mass Q-TOF/MS),分离色谱柱为 C18 色谱柱(Agilent, 100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m)。

1.2.3 样本收集 所有受检对象在采血前一天均正常规律饮食作息,以清淡素食为主,于次日清晨(8:00 至 9:00)空腹采集静脉血,4℃、4 000 r/min 离心取血清 500 μ L,置-80℃保存备用。

1.2.4 LC-MS 分析 样本处理:-80℃保存血清于室温解冻后,取 100 μ L 加入 300 μ L 甲醇中涡旋 3 min,静置 5 min 后 12 000 r/min(4℃)离心 10 min,取上清 100 μ L 装瓶进样。质控分析:所有样本混合成一个质控样本作为质量控制,分析 6 次质控样品,样本分析前、中、后各随机检测 2 次质控样品。对质控样品的总离子流色谱图进行重叠,并进行总主成分分析,质控样本结果接近,表明检测重复性好。色谱与质谱联合分析:基于 HPLC-MS 提取离子流图,①色谱洗脱梯度:起始梯度为 5% B 液(乙腈+0.1%甲酸),95% A 液(水+0.1%甲酸),并维持 2 min,10 min 内,B 液线性增加至 95%,并维持 5 min,然后降回 5%。进样量为 4 μ L,自动进样器温度 4℃。②质谱扫描模式:质谱采用正离子、负离子进行检测,离子扫描时间 0.03 s、扫描时间间隔 0.02 s、数据采集范围:50~1 000 m/z 。

1.2.5 差异代谢物的筛选及鉴定 将获取的 A 组和 B 组数据进行总主成分分析(principal component analysis, PCA),然后采用偏最小二乘方判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA),最后采用有监督式方法的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)进行建模分析。用 OPLS-DA 模型的变量投影重要性分析(variable importance in the projection, VIP)值(阈值 > 1),并结合 t 检验的 P 值($P < 0.05$)来寻找差异性表达代谢物。通过搜索在线数据库(<http://metlin.scripps>).

edu/), 比较质谱的质荷比 m/z 或分子质量对差异性代谢物进行鉴定。

1.2.6 差异代谢物富集分析和代谢通路分析 使用 MetaboAnalyst 在线分析软件 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 对鉴定的差异代谢物进行代谢通路分析与富集分析, 以确定差异代谢物涉及的代谢途径, 并对富集在通路上的代谢差异物进行诊断性能评价。

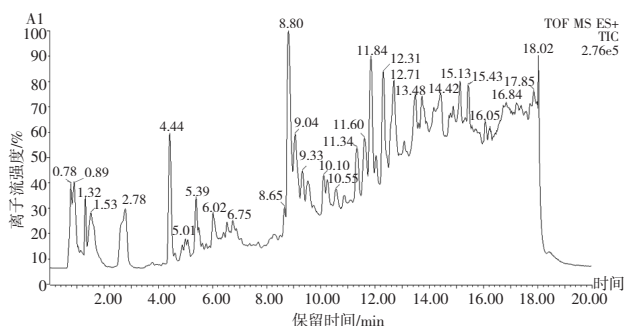
1.3 统计学处理

应用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析。对于 A 组和 B 组符合正态分布的计量资料比较采用 t 检验, 计数资料比较采用卡方检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用 Masslynks 软件 (Waters 公司) 对 HPLC-MS 数据进行预处理。将编辑后的数据导入 Simca-P 软件 (版本 13.0) 进行主成分分析。VIP>1, $P<0.05$ 具有统计学差异。所有鉴定出的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 4.0 进行代谢物富集和途径分析, 代谢通路的 $-\log(P) \geq 2$ 且 $\text{impact} \geq 0.05$ 认为是差异代谢物相关代谢通路。对富集于差异代谢通路上的各差异代谢物绘制受试者工作特征曲线, 计算各个曲线所对应的曲线下面积、敏感性、特异度、阳性预测值、阴性预测值, 评估 HBV 相关肝纤维化的诊断准确性。

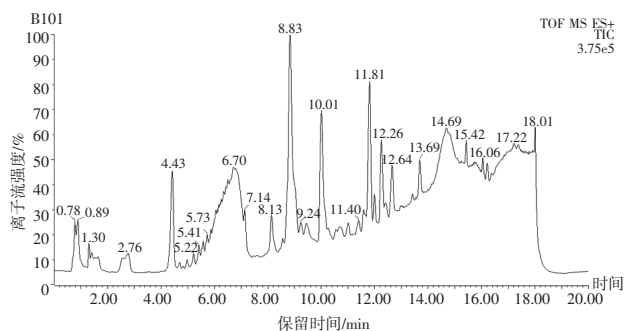
2 结果

2.1 2 组 LC-MS 图谱比较

各组样品所对应的总离子流图如图 1 所示。横坐标表示保留时间 (retention time, RT), 纵坐标表示离子流强度。在 RT=15 min 左右, 各组检测到的代谢离子在种类或含量上存在差异, 色谱峰间分离度良好。



A. A 组离子流强度图谱

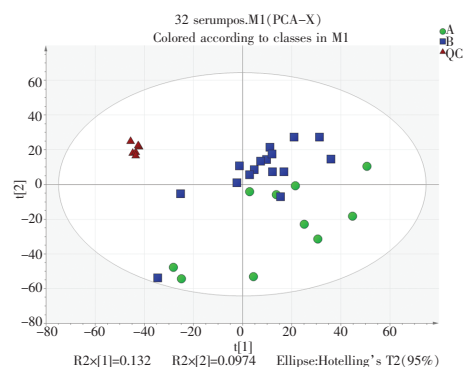


B. B 组离子流强度图谱

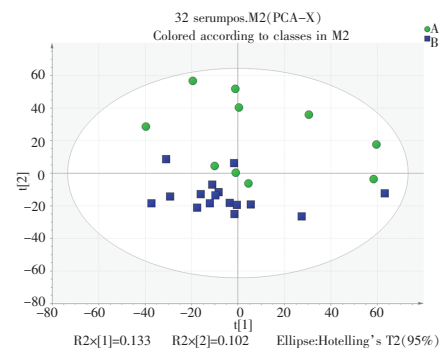
图 1 2 组总离子流图谱

2.2 2 组 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 分析

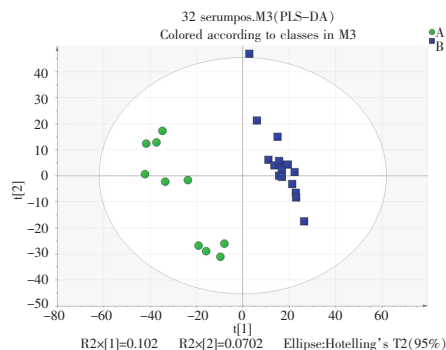
对所得数据进行前处理后进行总 PCA、两组 PCA 及 PLS-DA 分析, 进一步采用有监督式方法 OPLS-DA 进行建模分析, 得到 1 个主成分和 1 个正交成分, 其模式为: $R^2_X=0.172$, $R^2_Y=0.968$, $Q^2=0.608$ 。 $R^2_Y=0.968$, 表示该模型的区分力很好; $Q^2=0.608$, 表示该模型有较好的预测率。如图 2 所示。



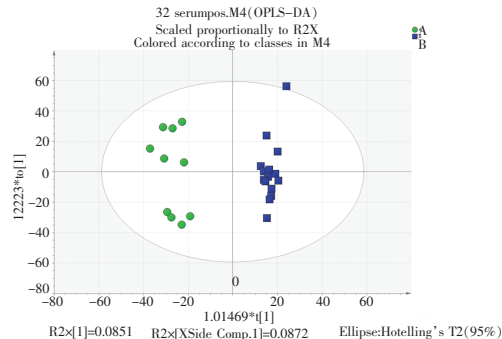
A. 总 PCA 得分图



B. 2 组的 PCA 得分图



C. 2 组的 PLS-DA 得分图



D. OPLS-DA 得分图

注: ● 慢性乙肝对照组; ■ 为肝纤维化组, ▲ 为质控组

图 2 2 组 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 得分图

2.3 2 组间差异代谢物的鉴定

本实验最终共筛选出 54 种内源性差异代谢产物, 其中 38 种代谢物在乙肝肝纤维化组表达上调, 16 种代谢物表达下调(表 1)。

2.4 代谢通路和富集分析

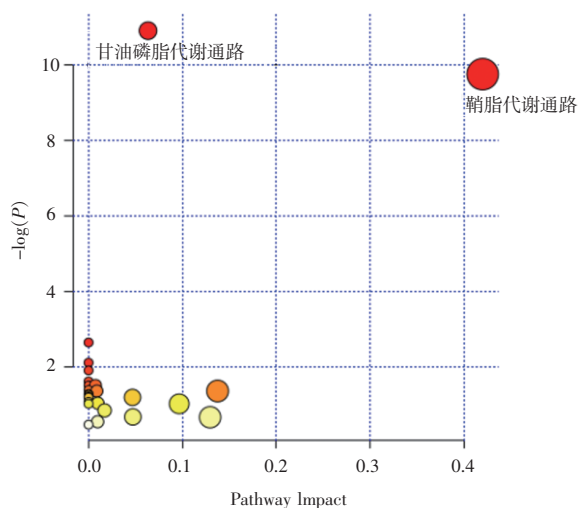
从图 3 看出, 差异代谢物主要富集的代谢途径包括鞘脂代谢通路 $[-\log(P)=9.75, \text{impact}=0.42]$ 、甘油磷脂代谢通路 $[-\log(P)=10.90, \text{impact}=0.06]$ 。其中, 神经鞘磷脂(sphingomyelin,

表 1 2 组间差异的代谢物

esi	RT	m/z	name	VIP	P	B/A
H	7.61	169.05	Uric acid	1.52	1.72E-02	2.85
H	6.02	120.06	Threonine	1.90	2.93E-04	2.32
H	13.08	428.37	Stearoylcarnitine	1.28	1.08E-02	1.76
H	9.78	300.29	Sphingosine	1.89	7.88E-04	0.22
H	16.83	705.60	SM (d18:0/16:0)	1.82	3.26E-03	3.94
H	10.00	467.35	SM (d18:0/0:0)	1.36	1.86E-02	0.21
Na	10.00	473.31	SM (d17:1/0:0)	2.01	5.18E-04	0.20
H	6.85	740.50	PS (P-16:0/18:4 (6Z, 9Z, 12Z, 15Z))	1.32	5.00E-04	2.07
H	16.11	666.49	PS (O-16:0/12:0)	1.73	7.43E-05	2.47
H	6.36	534.25	PS (8:0/8:0)	1.44	3.41E-04	1.94
Na	5.67	560.30	PS (19:1 (9Z)/0:0)	1.24	9.59E-04	1.74
Na	6.36	562.30	PS (19:0/0:0)	1.45	3.57E-04	1.91
Na	6.35	532.28	PS (17:1 (9Z)/0:0)	1.51	2.61E-04	1.95
Na	5.82	534.29	PS (17:0/0:0)	1.86	4.27E-05	3.06
Na	16.39	520.25	PS (16:0/0:0)	1.20	1.47E-03	2.32
H	6.83	739.49	PI (P-16:0/12:0)	1.06	1.24E-03	1.80
Na	8.83	579.29	PI (P-16:0/0:0)	1.94	2.49E-03	0.78
Na	6.59	621.32	PI (18:1 (9Z)/0:0)	1.15	2.22E-03	2.23
H	8.72	585.31	PI (17:1 (10Z)/0:0)	1.47	1.36E-02	0.52
Na	6.38	567.60	PI (14:0/0:0)	1.32	6.28E-04	1.84
H	6.83	730.45	PI (12:0/13:0)	1.14	9.27E-04	1.91
H	12.28	497.33	PG (P-18:0/0:0)	1.09	1.17E-02	1.16
Na	5.73	521.31	PG (O-18:0/0:0)	1.97	8.20E-05	1.92
Na	16.39	521.25	PG (8:0/8:0)	1.10	2.64E-03	2.30
H	5.66	561.31	PG (22:4 (7Z, 10Z, 13Z, 16Z)/0:0)	1.17	1.11E-03	1.76
H	5.87	565.34	PG (22:2 (13Z, 16Z)/0:0)	2.02	7.75E-05	1.86
Na	5.87	547.31	PG (19:1 (9Z)/0:0)	1.83	1.19E-04	1.96
H	12.20	454.29	PC (6:0/6:0)	1.49	1.62E-02	1.24
H	16.38	608.48	PC (24:0/0:0)	1.24	2.54E-03	2.15
H	12.99	532.34	PC (19:3 (10Z, 13Z, 16Z)/0:0)	1.66	4.22E-03	1.45
H	11.60	482.32	PC (15:0/0:0)	1.43	6.50E-03	1.44
H	15.72	769.60	PA (P-20:0/22:2 (13Z, 16Z))	1.71	4.34E-03	3.62
H	1.31	133.09	Ornithine	1.25	4.38E-02	0.52
H	18.03	130.16	Octylamine	1.06	3.66E-02	0.54
H	0.77	91.04	Lactic acid	1.72	3.56E-03	1.08
Na	16.41	415.34	Hexacosadienoic acid	1.45	3.37E-04	2.26
Na	7.09	587.08	dTDP-D-glucose	1.01	2.98E-02	3.96
H	10.78	393.29	Deoxycholic acid	2.42	2.11E-02	0.91
H	4.37	201.11	Decenedioic acid	1.75	7.45E-03	1.77
H	6.40	404.03	Cytidine diphosphate (CDP)	1.31	8.74E-04	1.77
H	2.52	149.06	Cinnamic acid	1.57	2.99E-02	0.23
Na	16.29	696.53	CerP (d18:1/20:0)	1.37	4.53E-04	2.15
H	0.87	162.13	Carnitine	2.08	3.84E-03	3.08
H	12.41	426.36	C-8 Ceramide	1.87	3.99E-03	0.65
H	10.78	394.29	C19 Sphingosine-1-phosphate	2.51	1.37E-02	0.89
H	1.41	180.13	Tyrosine	1.89	8.08E-03	0.39
H	9.08	498.26	Taurochenodeoxycholic acid	1.45	3.06E-02	0.17
H	11.30	463.30	SM (d18:1/0:0)	1.94	6.55E-03	0.20
H	12.68	524.34	PS (18:0/0:0)	1.75	1.22E-02	1.86
H	8.64	368.16	PC (3:0/3:0)	2.51	2.17E-04	2.71
H	8.64	367.15	PA (6:0/6:0)	2.69	5.76E-05	2.77
H	0.75	181.06	Mannitol	2.28	4.13E-03	1.12
H	1.30	191.10	Dodecatetraenoic acid	2.59	4.68E-04	0.74
H	8.65	976.44	CDP-DG (16:0/18:2 (9Z, 12Z))	1.35	4.40E-02	2.82

注: B/A 为 fold-change (FC) 值, 表示某差异代谢物在 B 组相对 A 组的表达倍数变化, FC > 1, 表示代谢物上调; FC < 1, 表示代谢物下调。esi 代表电喷雾电离, H 表示加和离子氢, Na 表示加和离子钠

SM)、1-磷酸-鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate,S1P)、(神经)鞘氨醇(sphingosine)、神经酰胺(ceramide)富集在鞘脂代谢通路;而磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine,PC)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol,PI)、磷脂酸(phosphatidic acid,PA)、磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol,PG)富集在甘油磷脂代谢通路(图4)。



注:Y轴基于P值(来自通路富集分析),X轴基于 pathway impact value(来自通路拓扑分析)。节点颜色基于P值,由浅到深,P值由大到小,节点半径基于其 pathway impact value,由小到大,impact 值由小到大

图3 差异代谢物的代谢通路和富集分析

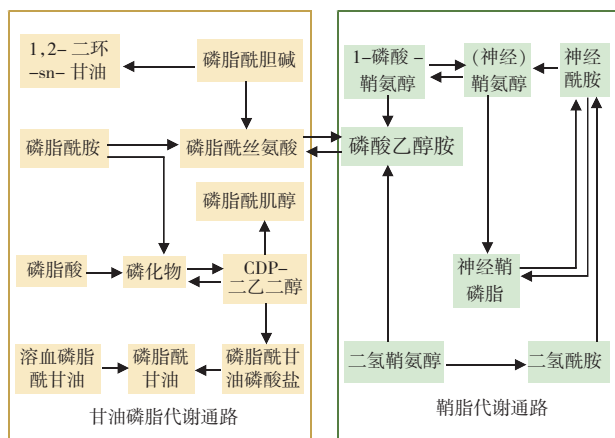


图4 代谢路径示意图

2.5 差异代谢物的诊断性能

富集于鞘脂代谢通路和甘油磷脂代谢通路9种差异代谢物的ROC曲线如图5所示,它们的诊断性能分别见表2。差异代谢物曲线下面积(area under the curve,AUC)>0.7,其中,磷脂酰甘油的AUC最大,为0.914,特异度为93.75%,阳性预测值为93.33%;神经酰胺的AUC为0.820,灵敏度为93.75%,阴性预测值为92.30%。

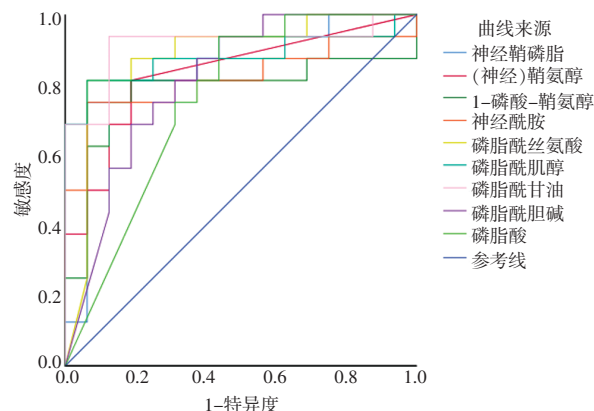


图5 代谢差异物对于乙肝肝纤维化诊断的ROC曲线

表2 9种差异代谢物的诊断性能指标

代谢差异物	灵敏度 I/%	特异度 I/%	阳性预测值 I/%	阴性预测值 I/%	曲线下 面积
神经鞘磷脂	87.50	81.25	82.35	86.67	0.855
1-磷酸-鞘氨醇	75.00	81.25	80.00	76.47	0.781
(神经)鞘氨醇	81.25	81.25	81.25	81.25	0.834
神经酰胺	93.75	75.00	78.95	92.30	0.820
磷脂酰胆碱	81.25	62.50	68.42	76.92	0.813
磷脂酰丝氨酸	81.25	87.50	86.67	82.35	0.883
磷脂酰肌醇	87.50	87.50	87.50	87.50	0.879
磷脂酸	68.75	75.00	73.33	70.59	0.756
磷脂酰甘油	87.50	93.75	93.33	88.24	0.914

3 讨论

肝脏是人体最大的能量代谢器官,HBV所致肝纤维化会导致肝细胞受到严重损伤,很容易引起广泛的代谢异常,而代谢组学揭示了基因和蛋白质表达的下游产物,探讨的是最终结果,代谢产物可反映机体系统的生理和病理状态。因此,基于代谢组学在肝病研究中的优越性,本研究运用LC-MS的定量代谢组学技术,构建乙肝肝纤维化组和慢性乙肝对照组的OPLS-DA模型,筛选和鉴定出2组间54种差异代谢物。为寻找乙肝肝纤维化关键差异代谢物,进一步对这54种差异代谢物进行富集分析和通路分析。分析发现,富集在鞘脂代谢通路的神神经鞘磷脂、1-磷酸-鞘氨醇、(神经)鞘氨醇、神经酰胺4种差异代谢物,富集在甘油磷脂代谢通路的磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰甘油5种差异代谢物,都与肝纤维化的发生发展相关,可能是乙肝肝纤维化的新型生物标志物,为进一步靶向检测奠定基础。

在差异代谢物代谢通路富集分析中,鞘脂代谢通路具有较高的可信度及影响力,在乙肝相关性肝纤维化形成过程中可能有着重要作用。本研究中,鞘脂代谢在肝纤维化的作用同样被其他研究所证实。文献表明,肝纤维化组中各鞘脂成分组成明显不同于对照组,且血清鞘脂水平与肝纤维化的进展和病毒应答率之间有密切关系^[5-6]。本研究的鞘脂代谢通路显示,神经鞘磷脂可由神经酰胺在鞘磷脂合成酶的催化下生成。神经鞘磷脂和鞘磷脂合成酶均是信号传导分子,参与细胞凋亡,而肝细胞死亡激活库普弗细胞,释放出促炎性细胞因子,从而激活肝星状细胞,并分泌细胞外基质,进一步促进肝纤维化形成^[7]。这表明神经鞘磷脂与肝纤维化的发生发展有关,本研究报道一致。神经鞘磷脂在鞘磷脂磷酸二酯酶(1,2,3,4)的作用下,生成神经酰胺。神经酰胺可通过腺苷蛋氨酸转移酶的下调,使细胞内还原型谷胱甘肽耗竭及线粒体的膜电位丧失从而使肝细胞受到氧自由基损伤,这可能是其参与肝脏炎症反应、进一步形成肝纤维化的机制。神经酰胺可在 N-酰基鞘氨醇酰胺水解酶(1,2)的作用下被脱乙酰化形成鞘氨醇,然后在鞘氨醇激酶 1(sphingosine kinase-1, SphK1)和鞘氨醇激酶 2(sphingosine kinase-2, SphK2)作用下磷酸化形成 1-磷酸-鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)。有研究结果表明, SphK1 的活性和表达在人肝纤维化中得到增强。最重要的是,其证明了转化生长因子- β 1 在人骨髓来源的间充质干细胞和肝源性促纤维化细胞中以 SphK1/S1P 依赖性但不依赖 S1P 受体(sphingosine 1-phosphate receptor, S1PR)的方式诱导胶原蛋白产生,而纤维生成细胞的活化及其胶原蛋白表达是肝纤维化进展中的关键事件。且表明 S1P 以 S1PR 独立方式参与胶原蛋白生成^[8]。SPHK-S1P 轴与肝脏炎症和纤维化有关^[9-10]。本研究表明, S1P 在乙肝肝纤维化中异常表达,是参与人类肝脏疾病期间纤维化进展的重要介质。鞘氨醇可增强溶酶体膜通透性,促进水解酶释放,最终引起细胞程序性死亡^[11]。本研究中,鞘氨醇在慢性乙肝组和乙肝肝纤维化组具有差异表达,富集在鞘脂代谢通路中,因此,鞘氨醇或许也可诱导肝细胞凋亡,参与乙肝肝纤维化形成。由此看出,鞘脂代谢通路可能是肝纤维化的关键代谢通路,通路中的 S1P 等差异代谢物是参与人类肝脏

疾病期间纤维化进展的重要介质,可作为潜在的诊断标志物。

甘油磷脂代谢通路是本研究证实的另一条重要通路。已有研究表明,HBV 诱导的肝病,如乙肝肝纤维化、乙肝肝硬化等对脂质代谢具有较深远的影响^[12]。本研究中,磷脂酰胆碱可由胆碱磷酸化而生成。也可由磷酸乙醇胺经过一系列酶促反应生成磷脂酰胆碱,肝脏中合成的磷脂酰胆碱是血浆中最丰富的脂质成分(摩尔比高达 70%),磷脂酰胆碱通过 1 个 FA 基团的部分水解而产生溶血磷脂酰胆碱。溶血磷脂酰胆碱通过 G 蛋白偶联受体信号传导,对各种细胞具有有害作用,包括增强炎症反应、破坏线粒体完整性和诱导细胞凋亡^[13]。因此,磷脂酰胆碱在乙肝肝纤维化患者中高度升高,表明广泛的细胞死亡,是肝细胞凋亡的有毒代谢标志。磷脂酰丝氨酸可由磷脂酰胆碱在磷脂酰丝氨酸合成酶 1 的催化下合成。近年来, Gas6/TAM(Tyro3、Axl 和 MERTK)相互作用已被描述与肝脏的炎症和愈合过程有关。高 Axl 表达及高 sAxl 水平独立地与纤维化/肝硬化相关^[14]。有文献表明,磷脂酰丝氨酸是激活 TAM 的辅助因子,且以浓度依赖的方式增强 MERTK 和 TYRO3 配体的活化,这表明局部磷脂酰丝氨酸的浓度可以微调 TAM 信号传导和功能^[15]。因此,磷脂酰丝氨酸或许以调节 TAM 信号的方式参与肝纤维化的形成。而在本研究中,磷脂酰丝氨酸在乙肝肝纤维化组表达升高,可作为乙肝肝纤维化的潜在标志物。磷脂酸是一种很常见的磷酸酯类,是磷脂酰肌醇循环中的另一个中间体,是形成大多数磷脂的前体^[16]。已有研究表明,磷脂酸与人类肺和肾纤维化密切相关^[17]。而在本研究中,在肝纤维化患者中也有显著表达。由于肝脏是一个较大的代谢器官,当肝脏发生纤维化时,可引起肝脏对脂质代谢的异常,而脂质的代谢异常进一步引起肝脏的脂毒性,加重对肝脏的损害。因此,在本研究甘油磷脂代谢通路中,富集的 5 种脂质在乙肝肝纤维化表达上调,可作为乙肝肝纤维化潜在的标志物。

本研究为明确 9 种差异代谢物对乙肝肝纤维的诊断性能,进一步对 9 种差异代谢物进行了 ROC 曲线分析,发现富集于以上 2 条代谢途径中的 9 种差异代谢物对 HBV 相关性肝纤维化具有比较良好的诊断性能。目前,对于乙肝肝纤维化的无创诊断

方法主要有瞬时弹性成像、APRI 指数、Forns 指数等,研究已证实它们在诊断中度肝纤维化的诊断效能。例如,FS、Forns、APRI 的 ROC 曲线下面积分别为 0.807、0.786、0.767,敏感度分别为 83.30%、60.00%、73.30%,特异度分别为 81.60%、92.10%、76.30%^[18]。本研究中,富集在 2 条代谢通路中的 9 种代谢差异物除 S1P、磷脂酸外,其余差异物 AUC 均明显高于 FS、Forns、APRI 的 AUC,且具有足够的敏感度和特异性、阳性预测值、阴性预测值,对区分慢性乙肝和乙肝肝纤维化具有较高的诊断价值。

总之,本文运用 LC-MS 技术从乙肝肝纤维化患者和乙肝患者对照组筛选并鉴定出 54 种内源性差异代谢产物,通过对差异代谢物富集和代谢途径分析发现了鞘脂和甘油磷脂 2 条重要的代谢通路,它们可能参与 HBV 相关性肝纤维化的生物代谢进程。同时,确定了神经鞘磷脂、1-磷酸-鞘氨醇、(神经)鞘氨醇、神经酰胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰甘油 9 种 HBV 相关性肝纤维化潜在的生物代谢标志物。本研究由于患者依从性差、样本量较小,其结果仍需要多中心、大样本甚至多组学的、随机的前瞻性研究来进行靶向验证。

参 考 文 献

- [1] Saxena NK, Anania FA. Adipocytokines and hepatic fibrosis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(3): 153–161.
- [2] Li CX, Li RT, Zhang W. Progress in non-invasive detection of liver fibrosis[J]. Cancer Biol Med, 2018, 15(2): 124–136.
- [3] 杜静华, 南月敏. 肝纤维化新型分子诊断标志物[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(3): 445–450.
- [4] Du JH, Nan YM. Novel molecular diagnostic markers for liver fibrosis[J]. J Clin Hepatol, 2017, 33(3): 445–450.
- [5] Wu L, Shen Y, Li F. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis; a review of current imaging modalities[J]. Gastroenterol Hepatol, 2020, 43(4): 211–221.
- [6] Kong WL, Li WY, Grammatikos G. Relationship between changes of serum sphingolipids and progress of hepatic fibrosis and therapeutic effect[J]. J Clin Hepatol, 2015, 31(4): 610.
- [7] Qu F, Zheng SJ, Liu S, et al. Serum sphingolipids reflect the severity of chronic HBV infection and predict the mortality of HBV-acute-on-chronic liver failure[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104988.
- [8] Simon J, Ouro A, Ala-Ibanibo L, et al. Sphingolipids in non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma; ceramide turnover[J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): E40.
- [9] Xiu L, Chang N, Yang L, et al. Intracellular sphingosine 1-phosphate contributes to collagen expression of hepatic myofibroblasts in human liver fibrosis independent of its receptors[J]. Am J Pathol, 2015, 185(2): 387–398.
- [10] Dandri M. Epigenetic modulation in chronic hepatitis B virus infection[J]. Semin Immunopathol, 2020, 42(2): 173–185.
- [11] Murai K, Shirasaki T, Honda M, et al. Peretinoin, an acyclic retinoid, inhibits hepatitis B virus replication by suppressing sphingosine metabolic pathway *in vitro*[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): E108.
- [12] Iessi E, Marconi M, Manganelli V, et al. On the role of sphingolipids in cell survival and death[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2020, 351: 149–195.
- [13] Wu T, Zheng XJ, Yang M, et al. Serum lipid alterations identified in chronic hepatitis B, hepatitis B virus-associated cirrhosis and carcinoma patients[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42710.
- [14] Law SH, Chan ML, Marathe GK, et al. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5): E1149.
- [15] Stauer K, Dengler M, Huber H, et al. The non-invasive serum biomarker soluble Axl accurately detects advanced liver fibrosis and cirrhosis[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3135.
- [16] Burstyn-Cohen T, Maimon A. TAM receptors, phosphatidylserine, inflammation, and cancer[J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 156.
- [17] Epand RM. Features of the phosphatidylinositol cycle and its role in signal transduction[J]. J Membr Biol, 2017, 250(4): 353–366.
- [18] Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, et al. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions[J]. J Biochem, 2015, 157(2): 81–89.
- [19] 徐燕, 冯艳玲, 施裕新. 瞬时弹性成像在慢性乙型肝炎肝纤维化诊断中的应用[J]. 山东医药, 2014, 54(47): 21–24.
- [20] Xu Y, Feng YL, Shi YX. Application of Fibro Scan in diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B[J]. Shandong Med J, 2014, 54(47): 21–24.

(责任编辑: 周一青)