

基于代谢组学的前列腺癌肿瘤标志物研究进展

赵友, 周焯, 崔笠, 施倩倩, 徐仁芳
(苏州大学附属第三医院, 江苏 常州 213003)

摘要: 前列腺癌是老年男性人群中的一种常见恶性肿瘤, 严重影响男性健康, 其早期诊治至关重要。代谢组学作为系统生物学的新分支, 能够识别肿瘤转化过程中小分子代谢物的细微改变, 为前列腺癌的早期诊治及预后判断提供新的方法。全文对近年来基于代谢组学的前列腺癌肿瘤标志物的研究进展进行综述, 以期前列腺癌代谢组学的相关研究提供科学依据。

关键词: 前列腺癌; 代谢组学; 早期诊治; 肿瘤标志物

中图分类号: R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)02-0154-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.02.B015

Research Progress on Tumor Markers of Prostate Cancer based on Metabolomics

ZHAO You, ZHOU Ye, CUI Li, SHI Qian-qian, XU Ren-fang

(The Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, China)

Abstract: Prostate cancer is a common malignant tumor in the elderly male population, which seriously affects men's health, and its early diagnosis and treatment is essential. Metabolomics, as a new branch of systemic biology, can recognize the subtle changes of small molecule metabolites in the process of tumor transformation and provide a new method for the early diagnosis, treatment and prognosis of prostate cancer. This article reviews the recent progress in tumor markers of prostate cancer based on the metabolomics.

Subject words: prostate cancer; metabolomics; early diagnosis; tumor markers

前列腺癌是老年男性人群中的一种常见恶性肿瘤^[1], 据最新统计, 2018 年全球有近 130 万新发病例和 35.9 万死亡病例, 其发病率占男性恶性肿瘤的 13.5%, 仅次于肺癌, 高居第 2 位, 死亡率占男性恶性肿瘤的 6.7%, 高居第 5 位^[2]。近年来随着人口老龄化加剧、诊断技术不断提高、环境及饮食结构改变等^[3,4], 我国前列腺癌的发病率和死亡率呈明显上升趋势^[5], 前列腺癌正成为严重影响我国老年男性健康的恶性肿瘤。有文献报道, 前列腺癌的早期诊断及筛查能够显著降低其死亡率^[6], 可见前列腺癌早期诊断及筛查至关重要。然而目前的方法如 PSA 检测、直肠指检和前列腺穿刺活检等均存在缺陷^[7-10],

因此寻找一种无创且灵敏度高、特异性高的新型肿瘤标志物成为研究热点。代谢组学作为一种新兴组学技术, 在探索恶性肿瘤生物标志物方面已表现出独特的优势^[11]。本文对近年来应用代谢组学的前列腺癌肿瘤标志物的研究进行总结, 以期为进一步寻找新的肿瘤标志物提供参考。

1 代谢组学概述

代谢组学(metabolomics)^[12]作为基因组学、转录组学和蛋白质组学的补充, 是以组群指标分析为基础, 以高通量检测和数据处理为手段, 以信息建模与系统整合为目标的系统生物学的一个重要分支。代谢组学位于基因和蛋白质的下游, 因可能具有定义表型的优势, 故代谢组学图谱代表了基因调控、酶活

通信作者: 徐仁芳, 主任, 主任医师, 本科; 苏州大学附属第三医院泌尿外科, 江苏省常州市局前街 185 号(213003); E-mail: czyyxf@163.com
收稿日期: 2019-02-22

性和代谢反应在生物组织动态图谱的整合^[13]。生物体内各种代谢途径的紊乱可以放大代谢中间体或产物的浓度变化,而代谢组学的目标就是识别分子量小于 1000D 的代谢物的细微变化,判断生物体某一时期的病理生理状态,使小分子代谢物成为非常有吸引力的疾病生物标志物,为疾病早期诊断及筛查提供更有利手段。

代谢组学研究过程由样品制备、代谢物检测分析、数据处理三部分组成。样本通常使用容易获得的生物体液、细胞或组织^[14],其中尿液、血液、唾液等是由非侵入性途径获得的常用样本。其分析技术主要有核磁共振(nuclear magnetic resonance,NMR)技术和质谱(mass spectrum,MS)技术。NMR 一般用来分析生物体液和组织样本,对样本制备的要求低,能够明确提供小分子的信息,阐明化学结构并为分子的鉴定提供证据^[15]。其中质子核磁共振谱(¹H-NMR)技术、高分辨率魔角旋转核磁共振谱(high resolution magic angle spinning,HR-MAS NMR)技术近年来显示出较好的应用前景。MS 一般需要化学衍生化后的气相色谱(gas chromatography,GC)或液相色谱(liquid chromatography,LC)对代谢组分进行预分离,气相色谱-质谱(GC-MS)、液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术可提高分辨率、灵敏度和选择性^[16],在分析生物体液样本时得到广泛应用。目前,超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography,UPLC)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)和毛细管电泳(capillary electrophoresis,CE)与 MS 联用技术正得到越来越多的使用。代谢组学研究产生的是多维度、庞大且复杂的数据集。多变量统计分析方法是对这些复杂数据进行分析 and 建模的有效方法^[17],主要分为无监督和有监督方法两大类。无监督方法可确定在复杂数据池中没有样本类的先验知识的情况下是否存在任何内部聚类,主要包括主成分分析(principal component analysis,PCA)和层次聚类分析(hierarchical cluster analysis,HCA)等。有监督方法可发现引起类别区分的变量或代谢物,主要包括显著性分析(discriminant analysis,DA)、偏最小二乘法(partial least squares,PLS)和正交偏最小二乘法(orthogonal partial least squares,OPLS)等。以上分析方法不仅通过减少维度来简化数据,还提供数据的可视化表示。

2 基于代谢组学的前列腺癌尿液样本中肿瘤标志物的探索

自 Sreekumar 等^[18]应用代谢组学技术在前列腺癌患者尿液样本中发现并证实肌氨酸是前列腺癌细胞进展和侵袭的潜在生物标志物及肌氨酸通路的组成部分可能为治疗干预的新途径以来,利用代谢组学技术对尿液的分析成为基础研究的热点。Khalid 等^[19]应用 GC-MS 技术对 59 例前列腺癌患者和 43 例正常对照者的碱化尿液上空由固相微萃取法提取的挥发性有机物进行分析,结果显示:与正常对照者相比,前列腺癌患者尿液挥发性有机物中 2,6-二甲基-7-辛烯-2-醇、3-辛酮和 2-辛酮含量降低,戊醛含量升高。进一步基于随机森林和线性判别分析模型分析,显示联合上述四种物质对前列腺癌的诊断能力与 PSA 相当,表明上述四种代谢物有助于提高前列腺癌风险的分层。Derezinski 等^[20]应用高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)技术分别对 49 例前列腺癌患者和 40 例健康男性的尿液、血清样本中的 42 种蛋白原性和非蛋白原性氨基酸进行了综合分析,结果显示:与健康男性相比,前列腺癌患者两种体液中乙醇胺、精氨酸和支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)浓度均显著降低,表明乙醇胺、精氨酸和支链氨基酸代谢途径可能是前列腺癌生物标志物的来源。Liang 等^[21]使用快速超高效液相色谱-串联质谱(FPLC-MS)技术对 236 例前列腺癌患者和 233 例健康人的尿液样本进行分析,利用 OPLS-DA 模型对数据进行处理,发现与健康人相比,前列腺癌患者尿液中的甘氨酸、鹅去氧胆酸、马尿酸浓度显著升高,而 5-羟基-L-色氨酸和牛磺胆酸浓度显著降低。ROC 曲线分析显示联合甘氨酸、马尿酸、5-羟基-L-色氨酸可作为前列腺癌的诊断物质(AUC>0.95)。MacLennan 等^[22]利用毛细管电泳-电喷雾电离-质谱(CE-ESI-MS)技术对 3 例前列腺癌患者术中收集的尿液及 20 例健康人的尿液样本中分子量低于 5000D 的代谢物进行检测分析,发现内源性肌氨酸、脯氨酸、胱氨酸、亮氨酸、谷氨酸、犬尿氨酸的代谢水平与前列腺癌的进展有关。Clos-Garcia 等^[23]应用超高效液相色谱-质谱(UHPLC-MS)技术研究 31 例前列腺癌患者(其中Ⅱ期 16 例、Ⅲ期 15 例)和 14 例良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia,BPH)

患者的尿液样本中的细胞外囊泡,共检测出 248 种不同类别的代谢物,主要属于氨基酸和各种脂类,其中有 78 种代谢物在前列腺癌和 BPH 之间有明显差异,同时发现前列腺癌患者尿液细胞外囊泡中类固醇激素(硫酸脱氢表雄酮)水平升高,与前列腺癌中雄激素合成的潜在升高相一致。该研究表明尿液细胞外囊泡可作为推断前列腺癌代谢变化的非侵入性来源。

3 基于代谢组学的前列腺癌血液样本中肿瘤标志物的探索

Mondul 等^[24]通过 LC-MS 和 GC-MS 技术对来自 α -生育酚、 β -胡萝卜素癌症预防队列研究中采血后 1~23 年内确诊的 74 例前列腺癌患者和 74 例正常人的血清样本中 1-硬脂酰甘油进行检测分析,发现 1-硬脂酰甘油与前列腺癌发病风险呈负相关,支持前列腺癌发生过程中脂质代谢失调的作用。Huang 等^[25]在该队列中使用相同的方法对前瞻性采血后平均 10 年确诊的 137 例前列腺癌患者(其中 T₂ 期 71 例、T₃ 期 51 例、T₄ 期 15 例)和 200 例正常人的血清样本进行分析发现,与对照组相比,T₂ 期前列腺癌血清中 N-乙酰基-3-甲基组氨酸、3-甲基组氨酸和 2'-脱氧尿苷浓度升高;油酰亚油酰甘油磷酸肌醇(GPI)、棕榈酰亚油酰 GPI、胆酸盐和 1-磷酸肌醇这四种脂类代谢物与 T₃ 期呈负相关;T₄ 期血清中次级胆汁酸、性类固醇和咖啡因相关的黄嘌呤升高,参与三羧酸循环的延胡索酸和柠檬酸浓度降低。该研究结果表明在前列腺癌诊断前数年血清代谢谱已存在明显变化,为前列腺癌早期筛查提供新的方向。Giskeodegard 等^[26]使用 NMR、MS 和 GC 技术研究 29 例前列腺癌患者和 21 例 BPH 患者的血液样本,结果显示:与 BPH 相比,前列腺癌血浆中 4 种酰基肉碱水平升高、8 种甘油磷脂水平降低、8 种氨基酸含量增加,其中苯丙氨酸代谢、赖氨酸降解、精氨酸和脯氨酸代谢均显著改变。统计分析显示精氨酸在区分前列腺癌和前列腺增生时,敏感度和特异性分别为 81.5% 和 75.2%。该研究指出脂肪酸(酰基肉碱)、胆碱(甘油磷脂)和氨基酸(精氨酸)代谢的变化可能是区分前列腺癌和前列腺增生的生物标志物。Kumar 等^[27]应用质子核磁共振谱技术基于线性多元

判别函数分析研究 75 例前列腺癌患者、70 例 BPH 患者和 65 例健康人的过滤血清样本,结果显示相比于 BPH 患者和健康人,前列腺癌患者血清中丙氨酸、肌氨酸水平高,而甘氨酸、柠檬酸水平低,结合回归分析表明丙酮酸、柠檬酸、甘氨酸和肌氨酸是前列腺癌潜在的生物标志物。Li 等^[28]应用 FPLC-MS 技术基于 OPLS-DA 模型研究 560 例前列腺癌患者和 500 例健康人的血浆样本,发现前列腺癌患者血浆中的 2-异丙基柠檬酸盐、胞苷、D-天冬酰胺、N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸盐、5-羟基-N-甲酰基犬尿氨酸和 D-4-O-甲基-肌-肌醇与健康人间存在显著差异,在独立患者队列中验证显示联合 2-异丙基柠檬酸盐、胞苷和 D-天冬酰胺作为潜在生物标志物(AUC>0.95)敏感性较高。Zhao 等^[29]通过高分辨率 UPLC-MS 技术基于 PCA 和 OPLS-DA 模型研究 32 例前列腺癌患者和 32 例健康人的血浆样本,共检测出 19 种差异代谢物,发现 11 条代谢途径受影响,ROC 曲线分析显示 7 种差异代谢物的 AUC>0.70,其中利用肌氨酸(AUC=0.917)、乙酰甘氨酸(AUC=0.787)、环丙亚胺(AUC=0.79),这三种代谢物构建联合模型的 AUC 高达 0.941。该研究指出代谢组学技术是发现新的疾病生物标志物的有用工具,并且表明发现的差异代谢物作为临床诊断指标可能是有价值的。

4 基于代谢组学的前列腺癌组织、细胞样本中肿瘤标志物的探索

Ren 等^[30]通过整合代谢组学和转录组学研究 25 份前列腺癌患者的癌组织和相匹配的 25 份相邻非癌组织,发现半胱氨酸和蛋氨酸代谢、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸代谢和己糖胺生物合成等生化途径异常表达。另在 51 例前列腺癌患者和 16 例 BPH 患者中验证发现代谢物鞘氨醇对于区分前列腺癌和 BPH 具有高度特异性和敏感度,特别是对于 PSA 水平低(0~10ng/ml)的患者。还发现位于鞘氨醇下游的鞘氨醇-1-磷酸受体 2 信号转导受损,代表一种肿瘤抑制基因的缺失,是潜在的关键致癌途径,这一途径可作为关键治疗靶点。Lima 等^[31]应用 GC-MS 技术分析当 pH 分别为 2、7 条件下 4 种前列腺癌细胞系(22RV1、PC3、DU145、LNCaP)和一种正常前列腺上皮细胞系(PNT2)的细胞外基质中挥发性有机化合物

的代谢差异,结合 PCA 和 PLS-DA,发现相比于正常前列腺上皮细胞系,前列腺癌细胞系细胞外基质中酮类、醛类、有机酸类改变最多,其中十五烷-2-酮、癸酸明显升高,环己酮、4-甲基庚烷-2-酮、2-甲基戊烷-1,戊二醇、对甲基苯甲醛、1-(3,5-二甲基呋喃-2-基)乙酮、苯甲酸甲酯和壬酸均显著降低,且不同 pH 下提取的挥发性有机化合物对前列腺癌的鉴别能力相近。该研究表明前列腺细胞外基质中挥发性有机化合物的监测有潜力成为前列腺癌筛选的一种新方法。

5 总结与展望

代谢组学技术以其无创、利于实施等优点在探索前列腺癌肿瘤标志物的研究中迅速开展。研究显示以尿液、血液或组织等为样本的代谢组学研究已经发现了一些具有诊断能力的差异代谢物,如肌氨酸、柠檬酸、丙氨酸和精胺等。而相比于其他组学,代谢组学研究仍处于起步阶段,查读近几年相关的基础研究发现,大多科学学者未考虑患者的基础疾病,如糖尿病、高血脂等对代谢的影响,且样本类型选择多和样本量大小不一及检测技术的差异,导致研究结论纷杂,差异代谢物种类多、数量大及缺乏特异性。Gkotsos 等^[32]研究表明尿液中肌氨酸并不能作为前列腺癌诊断的生物标志物,可见新发现肿瘤标志物需要进一步在基础和临床研究中加以验证。随着代谢组学研究路线的统一、更全面代谢谱数据库的建立、检测分析技术的改进、代谢组学与其他组学联合应用的发展,基于代谢组学的前列腺癌肿瘤标志物研究有一定前景。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1):5-29.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [3] Sim HG, Cheng CW. Changing demography of prostate cancer in Asia[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(6):834-845.
- [4] Tao ZQ, Shi AM, Wang KX, et al. Epidemiology of prostate cancer: current status[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(5):805-812.
- [5] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [6] Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up [J]. Lancet, 2014, 384 (9959): 2027-2035.
- [7] Loeb S, Bjurlin MA, Nicholson J, et al. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer[J]. Eur Urol, 2014, 65(6): 1046-1055.
- [8] Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter[J]. N Engl J Med, 2004, 350(22):2239-2246.
- [9] Schroder FH, van der Maas P, Beemsterboer P, et al. Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(23):1817-1823.
- [10] Loeb S, van den Heuvel S, Zhu X, et al. Infectious complications and hospital admissions after prostate biopsy in a European randomized trial [J]. Eur Urol, 2012, 61 (6): 1110-1114.
- [11] O'Connell TM. Recent advances in metabolomics in oncology[J]. Bioanalysis, 2012, 4(4):431-451.
- [12] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica, 1999, 29(11):1181-1189.
- [13] Trock BJ. Application of metabolomics to prostate cancer [J]. Urol Oncol, 2011, 29(5):572-581.
- [14] Lindon JC, Nicholson JK. Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery [J]. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2008, 27(3):194-204.
- [15] Moco S, Bino RJ, De Vos RCH, et al. Metabolomics technologies and metabolite identification [J]. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26(9):855-866.
- [16] Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, et al. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data[J]. Trends Biotechnol, 2004, 22(5): 245-252.
- [17] Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics[J]. J Proteome Res, 2007, 6(2):469-479.

- [18] Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression [J]. *Nature*, 2009, 457(7231): 910–914.
- [19] Khalid T, Aggio R, White P, et al. Urinary volatile organic compounds for the detection of prostate cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143283.
- [20] Dereziński P, Klupczynska A, Sawicki W, et al. Amino acid profiles of serum and urine in search for prostate cancer biomarkers: a pilot study [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(1): 1–12.
- [21] Liang Q, Liu H, Xie LX, et al. High-throughput metabolomics enables biomarker discovery in prostate cancer [J]. *Rsc Advances*, 2017, 7(5): 2587–2593.
- [22] MacLennan MS, Kok MGM, Soliman L, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for targeted and untargeted analysis of the sub-5kDa urine metabolome of patients with prostate or bladder cancer: A feasibility study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1074–1075: 79–85.
- [23] Clos-Garcia M, Loizaga-Iriarte A, Zuniga-Garcia P, et al. Metabolic alterations in urine extracellular vesicles are associated to prostate cancer pathogenesis and progression [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1470442.
- [24] Mondul AM, Moore SC, Weinstein SJ, et al. 1-stearoylglycerol is associated with risk of prostate cancer: results from serum metabolomic profiling [J]. *Metabolomics*, 2014, 10(5): 1036–1041.
- [25] Huang J, Mondul AM, Weinstein SJ, et al. Prospective serum metabolomic profile of prostate cancer by size and extent of primary tumor [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 45190–45199.
- [26] Giskeodegard GF, Hansen AF, Bertilsson H, et al. Metabolic markers in blood can separate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(12): 1712–1719.
- [27] Kumar D, Gupta A, Mandhani A, et al. NMR spectroscopy of filtered serum of prostate cancer: A new frontier in metabolomics [J]. *Prostate*, 2016, 76(12): 1106–1119.
- [28] Li YF, Qiu S, Zhang AH. High-throughput metabolomics to identify metabolites to serve as diagnostic biomarkers of prostate cancer [J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(16): 3284–3290.
- [29] Zhao YB, Lv HM, Qiu S, et al. Plasma metabolic profiling and novel metabolite biomarkers for diagnosing prostate cancer [J]. *Rsc Advances*, 2017, 7(48): 30060–30069.
- [30] Ren S, Shao Y, Zhao X, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals major metabolic pathways and potential biomarker involved in prostate cancer [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(1): 154–163.
- [31] Lima AR, Araujo AM, Pinto J, et al. Discrimination between the human prostate normal and cancer cell exometabolome by GC-MS [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5539.
- [32] Gkotsos G, Virgiliou C, Lagoudaki I, et al. The role of sarcosine, uracil, and kynurenic acid metabolism in urine for diagnosis and progression monitoring of prostate cancer [J]. *Metabolites*, 2017, 7(1): E9.