

基于质谱技术的乳腺癌代谢组学研究进展

Advances in the study of breast cancer metabolomics based on mass spectrometry

王映芬^{1,2}, 付翔杰², 张巍², 谭潭^{2*}

WANG Yingfen¹, FU Xiangjie, ZHANG Wei, TAN Tan^{*}

(1. 南华大学, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学附属郴州医院转化医学研究所, 湖南 郴州 423000)

摘要: 乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤,是女性死亡的主要原因。鉴于乳腺癌的高发病率和死亡率,迫切需要寻找生物标志物来识别高危人群,监测疾病进展,以及评估治疗反应。近年来,基于质谱技术的代谢组学快速发展,其能动态监测遗传信息的变化、生物的刺激或者病理生理的影响导致生物体系内的总体动态改变,基于该特征,给开发并实施更有效的乳腺癌预防、早期发现、诊断和治疗提供了新的可能。本文通过对质谱检测技术在乳腺癌代谢组学方面的应用研究进展进行了详尽归纳,希望为相关研究提供参考。

关键词: 乳腺癌; 代谢组学; 质谱技术

Key words: breast cancer; metabolomics; mass spectrometry

中图分类号:R730

文献标识码:A

乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤和癌症死亡原因,是一个世界性的女性健康问题,占有女性癌症病例的 1/4^[1]。在我国,随着环境改变以及工作压力增加,乳腺癌患病率逐年上升且呈年轻化。乳腺癌的发生和发展是一个多因素过程,除遗传因素外,年龄、生育与否、饮食和环境、外源性雌激素都能影响乳腺癌发生发展^[2]。早期乳腺癌治愈率可达 90%,然而大多数乳腺癌在发现之时已到中晚期,因此,建立早期诊断和有效筛查方法能改善乳腺癌患者生存率。目前推荐的乳腺导管原位癌(DCIS)检查和分期方法包括病史和体格检查,双侧乳腺 X 线检查,病理学评估,肿瘤雌激素受体(ER)状态的确定以及 MRI 表现^[3],现有检测技术成熟、临床应用广泛,但其敏感性及特异性较差。鉴于乳腺癌的高发病率和高死亡率,迫切需要开发出方便、快速、高敏感性和特异性的新技术来寻找诊断、预后、分期、治疗反应和治疗靶点的生物标志物,以便有效提高乳腺癌的临床治愈率。

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后的系统生物学的一个新分支,它通过研究受刺激或受干扰的生物体(如基因突变或病理生理状

态)的代谢产物谱及其动态变化来揭示机体的代谢网络^[4]。代谢组学的研究过程包括生物样本采集、代谢产物的检测与鉴定、数据分析以及生物学信息的挖掘及阐释。其研究对象为复杂的生物体系,常见的生物样本包括生物体液(尿液、血液、唾液、胆汁等)、动物或人体组织(肿瘤、肝脏、脂肪组织等)以及细胞。代谢组学以其高灵敏度、高分辨率、高通量的技术特点以及无创、利于实施等优点在癌症研究领域得到了广泛应用,展现出了巨大的发展潜力。肿瘤生物标志物能够反映肿瘤发生、发展、复发与预后的情况,对肿瘤的早期诊断、疗效评价、预后监控等方面具有重要价值^[5]。

肿瘤的发生和进展与代谢物的改变密切相关,在乳腺癌恶性转化过程中,乳腺癌细胞的代谢组发生了一系列深刻的重组,这种代谢改变是由基因组计划调控的,并受到肿瘤微环境的影响,代谢改变在肿瘤发生发展过程中起关键作用,表现出对特定代谢途径的依赖,主要是在能量代谢和生物合成过程中发生的代谢网络变化^[6],因此,代谢组学可以在乳腺癌的早期筛查、转移与复发、疗效评价等方面发挥重要作用,并且已取得一定的进展,有望为乳腺癌的诊断治疗提供新的思路。

收稿日期:2019-03-06;修回日期:2019-05-27

基金项目:湖南省科技创新计划项目(编号:S2017SFYJJS0085)。

* 通信作者, E-mail: tantan1413@126.com.

1 代谢组学与质谱技术

代谢组学是指由于遗传信息的变化、生物的刺激或者病理生理的影响导致生物体系内的总体动态改变,成为了继基因组学、转录组学和蛋白质组学后系统生物学研究的又一重要领域。通常研究代谢组学有两种方法^[7]:(1)相对较慢的技术,产生结构信息,从而识别代谢产物,如核磁共振(NMR);(2)相对快速识别诊断信号的方法,如质谱法(MS)。

质谱法(MS)又分为液相色谱-质谱(LC-MS)及气相色谱-质谱(GC-MS),其中 LC-MS 是最灵敏的生物分子检测技术,而 GC-MS 技术提供了一个相对更全面的色谱技术和具有更高的分离效率以及可用的参考化合物文库。GC-MS 和 LC-MS 的相互结合应用可以更好地表达不同类别的化合物。

2 质谱技术在乳腺癌代谢组学中的应用

2.1 乳腺癌的筛查

不同的代谢转化对癌细胞维持高增殖率和抵抗细胞死亡信号至关重要。这种代谢转化导致独特的细胞代谢表型,通常由肿瘤中不同的代谢标记物以及循环血液反映。因此,对这些变化的代谢物进行分析和检测,能够有效地鉴别出与疾病状态相关的生物标志物,有助于临床疾病的筛查诊断。基于血清或血浆的代谢组学是一种很有潜力的乳腺癌诊断方法。在乳腺癌患者血液中存在代谢组学标记物,乳腺癌患者代谢谱中描述的变化可能以不同方式影响疾病生物学,可以通过改变肿瘤的分化状态,诱导转移表型或促使肿瘤在氧化应激条件下更有活力,从而促进肿瘤发生^[8]。来自乳腺癌患者血液中的代谢组学研究对乳腺癌的筛查和诊断是具有一定的可行性的。代谢生物标志物被证明可以鉴别乳腺癌和正常样本,并且具有极高的敏感性和特异性,这可能会成为新的筛查和诊断乳腺癌的方法。

Huang 等^[9]使用液相色谱/飞行时间质谱(LC-TOF-MS)和气相色谱/飞行时间质谱(GC-TOF-MS)研究了乳腺癌诊断的关键代谢通路特征,开发了一种新的基于代谢途径的疾病诊断代谢组学模型,所得的全期和早期诊断模型是高度准确的,平均 AUC(曲线下面积,受试者操作特征曲线)为 0.968 和 0.934,灵敏度为 0.946 和 0.954,特异性为 0.934 和 0.918。Wang 等^[10]基于 DBS(Dried Blood Spot)的 MS 代谢组学分析了 258 例新确诊的乳腺癌患者以

及 159 例良性乳腺疾病患者(包括 78 名健康人)的血液代谢物来筛选具有乳腺癌诊断潜力的代谢标志物,建立了一个由 Pip、Asn、Pro、C14:1/C16、Phe/Tyr 和 Gly/Ala 六个血液参数组成的诊断模型,该模型区分乳腺癌和非乳腺癌的灵敏度和特异性分别为 92.2% 和 84.4%。

Takayama 等^[11]通过超高压液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定唾液中的多胺(包括它们的乙酰化形式),发现有八种多胺(如 SPM, CAD, Ac-SPM, N1-Ac-SPD, N8-Ac-SPD)与癌症患者强相关。一个简单的一阶方程($Y = 0.5X_{\text{SPM}} - 3X_{\text{Ac-SPM}} - 0.15X_{\text{SPD}} - 3.5X_{\text{N8-Ac-SPD}} + 0.5X_{\text{N1-Ac-SPD}} + 0.04X_{\text{CAD}}$)被用来区分乳腺癌患者和健康人群,采用 N8-Ac-SPD/(N1-Ac-SPD+N8-Ac-SPD)比值进行 ROC 分析,其敏感性和特异性均接近 80%。Johnson 等^[12]通过 MS 对 MCF-7 乳腺癌异种移植小鼠模型尿液进行代谢组学分析,发现肠内酯葡萄糖醛酸、香豆酸硫酸酯、癸酸葡萄糖苷酸、牛磺酸差异表达显著,揭示了肿瘤生长与脂肪酸合成和肠道微生物代谢产物的潜在抗增殖作用之间存在相关性。表明对于乳腺癌患者的非侵入性体液诊断是有用的,可能成为临床检查的支持方法之一。

2.2 乳腺癌的分型

根据基因改变可将乳腺癌分为五个分子亚型:Luminal A、Luminal B、Luminal B HER2 阳性(人类表皮生长因子受体 2)富集、HER2 过表达和三阴性乳腺癌^[13]。由于乳腺癌的高度异质性,对代谢途径的理解仍然不够充分。针对不同的乳腺癌亚型患者经常会采用不同的治疗方案,然而,即使针对同一亚型的乳腺癌患者也常会出现预后效果存在较大差异的情况。同时,虽然致癌基因和抑癌基因的突变被认为是恶性增长的最终原因,但细胞代谢变化是其对遗传变化与细胞生理学功能改变的应答,目前,临床试验正在研究靶向糖酵解,谷氨酸分解,脂肪酸合成,缺氧诱导因子(HIF)信号传导和其他途径的代谢药物。因此,为了确定从代谢药物中获益最多的患者群体,分析乳腺癌不同亚型的代谢变化谱非常重要。

为分析乳腺癌细胞系亚型之间的中心代谢差异,Willmann 等^[14]用气相色谱-电子轰击离子源-质谱(GC-EI-MS)对乳腺癌与乳腺上皮细胞系进行代谢组学比较,发现在氨基酸代谢、三羧酸循环和糖酵解中存在显著差异。所得数据可用于研究细胞系的 PCA 分类和乳腺癌与乳腺上皮细胞系的 PLS-

DA 鉴别。Budczies 等^[15]用 GC-TOF-MS 研究了 ER⁺ 和 ER-乳腺癌患者组织的代谢组学。发现在 ER⁺ 亚型中 β -丙氨酸, 2-羟基戊二酸, 谷氨酸, 黄嘌呤增加, 谷氨酰胺减少。其中 β -丙氨酸和谷氨酰胺变化最显著, β -丙氨酸和 4-氨基丁酸转氨酶 (ABAT) 表达之间存在负相关关系。

Fan 等^[16]通过 LC-MS 和 GC-MS 测定乳腺癌患者和正常人的血浆代谢谱, 鉴定了包括肉碱、溶血磷脂酰胆碱 (20 : 4)、脯氨酸、丙氨酸、溶血磷脂酰胆碱 (16 : 1)、糖原脱氧胆酸、缬氨酸和 2-辛烯二酸等 8 种差异代谢物用于乳腺癌亚型的诊断。表明乳腺癌亚型的特征可能与其个体代谢特征相关, 代谢物浓度的差异可能有助于乳腺癌的诊断以及乳腺癌亚型的确定。

2.3 乳腺癌的治疗靶点研究

肿瘤细胞代谢重编程能平衡细胞能量需求和合成代谢, 有助于疾病的进展。与非转化细胞相比, 快速增殖的恶性细胞的代谢需求差异表明靶向代谢可能是开发新型癌症治疗的潜在策略。癌细胞可以表现出对特定代谢途径的依赖, 以这些代谢途径为靶点是一个很有前途的治疗策略。开发利用代谢缺陷的新治疗方法的关键步骤是识别与特定恶性肿瘤相关的代谢改变。代谢组学领域的进步使得测量广谱细胞代谢物成为可能, 并提供了一种鉴定与癌症相关的特定代谢改变的方法。

Beatty 等^[17]应用 GC-MS 与 LC-MS 对三阴性乳腺癌 (TNBC) 和对照细胞进行了代谢组学研究。代谢图谱揭示了两种主要的 TNBC 代谢亚型, 其中非基底细胞样 TNBC 细胞系表现出对谷胱甘肽生物合成的相对较强的依赖性, 以维持足够的抗氧化能力从而支持肿瘤发生。表明谷胱甘肽生物合成途径是 TNBC 的治疗靶点, 并以此为基础确定了谷胱甘肽抑制剂 (BSO) 和柳氮磺胺吡啶 (SASP) 联合治疗的合理性——通过减少谷胱甘肽的合成, 从而抑制肿瘤的生长。非靶向代谢组分析可以识别差异表达的代谢产物, 这些代谢通路的依赖性可以指向新的治疗策略。

大多数癌细胞对甲硫氨酸具有独特的代谢需求, 当甲硫氨酸被其代谢前体同型半胱氨酸替代时, 癌细胞无法增殖。Borrego 等^[18]通过气相色谱/飞行时间质谱法 (GC-TOFMS) 对同型半胱氨酸培养基中培养的三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 及其甲硫氨酸不敏感衍生细胞系 MDA-MB-468res-R8 进行非靶向代谢组学研究其对甲硫氨酸应激的代谢反应。确定了两种细胞系之间独特的代谢反应,

包括甲硫氨酸补救, 嘌呤/嘧啶合成和三羧酸循环。MDAMB-468res-R8 细胞比 MDA-MB468 细胞更早地响应这种细胞应激, 更好地满足代谢需求。揭示了与乳腺癌甲硫氨酸依赖性有关的代谢表型的动态变化, 并进一步强调了 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 作为肿瘤发生的主要调节因子的重要性可能成为治疗干预的新靶点。

2.4 乳腺癌的治疗反应监测

由于乳腺癌是一种临床异质性疾病, 在进行临床治疗时常导致不同的预后。识别对化疗有反应者并因此提高病人长期生存率对治疗方案有重要意义, 而识别对化疗无反应者则可及时改用其它可能的有效治疗手段。乳腺癌代谢组学研究可以揭示乳腺癌代谢特征, 鉴定乳腺癌新辅助化疗反应的潜在生物标志物, 为乳腺癌治疗反应的监测提供重要依据。

牛磺酸是最丰富的游离氨基酸, 参与人体许多重要的生物过程, 并已被证明具有抗乳腺癌和其他肿瘤的活性。He 等^[19]用高通量气相色谱-飞行时间质谱法 (HT GC-TOFMS) 研究牛磺酸在乳腺癌中的作用机制, 鉴定出 23 种差异代谢物, 分别参与能量、葡萄糖、氨基酸和核酸代谢, 表明牛磺酸的抗肿瘤活性是通过改变乳腺癌细胞代谢的调节的。这些差异代谢物可能是监测癌症治疗和临床预后的潜在生物标志物, 为进一步研究牛磺酸的抗肿瘤机制及开发治疗乳腺癌的新策略提供了科学依据。

内源性雌酮水平与绝经后乳腺癌的发病率显著相关。Kim 等^[20]应用高灵敏度的质量辅助激光解吸/电离质谱 (MALDI-MS) 定量平台检测内源性雌激素, 成功地监测了由芳香酶抑制剂处理导致的 MCF-7 细胞中雌酮的代谢表达水平的变化。结果表明 MALDI-MS 定量方法可能是含酮代谢物的靶向代谢组学的一般方法, 可以反映临床条件和致病机理, 用于临床上疾病的治疗反应监测。

3 结语与展望

综上所述, 基于质谱技术的代谢组学在乳腺癌的早期筛查、临床分型、潜在治疗靶点研究、疗效评价及预后监测等相关的代谢性生物标志物研究方面已经取得了不错的成果, 但也面临着不少挑战, 例如 (1) 应与基因组学、蛋白质组学整合, 建立从基因水平、蛋白功能水平到终端代谢产物水平的系统模型, 从系统生物学角度对乳腺癌有更深入全面的认识, 筛选特异性的生物标志物; (2) 与临床转化紧

密结合,乳腺癌的候选特异代谢性生物标志物报道已有不少,但真正运用到临床诊治上还有待进一步探索和开发,并且代谢组学对许多内外因素非常敏感,微小的差异可能影响代谢谱,迫切需要规范实验方法和数据分析技术;(3)代谢物的浓度动态变化跨度大,代谢物的组成非常复杂,且容易受到干扰,目前靠单一分析方法无法准确测量整个代谢组群,因此检测技术仍需不断突破;(4)代谢组学分析产生大量的数据,利用现有的代谢物数据库对所有变化的代谢物进行全面识别是困难的,已鉴定的代谢物的变化机制也难以解释;(5)乳腺癌并非一个孤立的肿瘤,其代谢过程还受所处内环境的影响,目前研究中所利用的组织样本一般都独立于肿瘤微环境体系,因此这也是进一步研究中值得探索的问题。

由于高发病率和死亡率,乳腺癌成为全球女性死亡的第二大原因。为了更好的了解乳腺癌发生发展过程,通过结合不同的代谢分析技术,可以将人类乳腺癌组织的代谢组覆盖最大化。肿瘤的病理生理过程涉及非常复杂的机制,其在不同发生阶段会产生不同代谢产物,并且这些产物可能存在时空特异性,通过结合目前比较先进的质谱学分析技术,能够更好地展示肿瘤不同发生过程的代谢产物。质谱学的代谢组学目前已经发展比较成熟,已经可以通过高通量的方式分析数百个生物样本,并可以此为基础建立相关数据库,通过对数据的分析、挖掘与阐释,能够更好地认识肿瘤发生发展机制。代谢组学产生了许多新的生物学上的见解,可用于在肿瘤生物学基础上对乳腺癌进行筛查与分型,以确定新的预后和预测标记,并发现未来治疗干预的新靶点,随着精准医疗时代的到来,其进步的范围将继续扩大,为许多等待更有效治疗方案的癌症患者带来新的希望。

参考文献:

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] PILEVARZADEH M, AMIRSHAHI M, AFSARCHAREHBAGH R, et al. Global prevalence of depression among breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2019(10): 1007.
- [3] GRADISHAR WJ, ANDERSON BO, BALASSANIAN R, et al. Breast cancer, version 4. 2017, NCCN clinical practice guidelines in Oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2018, 16(3): 310-20.
- [4] GUAN Q, LIANG S, WANG Z, et al. H NMR-based metabonomic analysis of the effect of optimized rhubarb aglycone on the plasma and urine metabolic fingerprints of focal cerebral ischemia-reperfusion rats[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(1): 65-75.
- [5] LOUMAYE A, THISSEN JP. Biomarkers of cancer cachexia[J]. Clin Biochem, 2017, 50(18): 1281-8.
- [6] JAGANNATHAN NR, SHARMA U. Breast tissue metabolism by magnetic resonance spectroscopy[J]. Metabolites, 2017, 7(2): E25.
- [7] WOOD SL, WESTBROOK JA, BROWN JE. Omic-profiling in breast cancer metastasis to bone: implications for mechanisms, biomarkers and treatment[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(1): 139-52.
- [8] WILLMANN L, SCHLIMPERT M, HIRSCHFELD M, et al. Alterations of the exo- and endometabolite profiles in breast cancer cell lines: a mass spectrometry-based metabolomics approach[J]. Anal Chim Acta, 2016, 92(5): 34-42.
- [9] HUANG S, CHONG N, LEWIS NE, et al. Novel personalized pathway-based metabolomics models reveal key metabolic pathways for breast cancer diagnosis[J]. Genome Med, 2016, 8(1): 34-40.
- [10] WANG Q, SUN T, CAO Y, et al. A dried blood spot mass spectrometry metabolomic approach for rapid breast cancer detection[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 1389-98.
- [11] TAKAYAMA T, TSUTSUI H, SHIMIZU I, et al. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Clin Chim Acta, 2016, 45(2): 18-26.
- [12] JOHNSON CH, MANNA SK, KRAUSZ KW, et al. Global metabolomics reveals urinary biomarkers of breast cancer in a mcf-7 xenograft mouse model[J]. Metabolites, 2013, 3(3): 658-72.
- [13] FARSHID G, WALTERS D. Molecular subtypes of screen-detected breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 172(1): 191-9.
- [14] WILLMANN L, SCHLIMPERT M, HALBACH S, et al. Metabolic profiling of breast cancer: differences in central metabolism between subtypes of breast cancer cell lines[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015, 1000: 95-104.
- [15] BUDCZIES J, BROCKMÖLLER SF, MÜLLER BM, et al. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism[J]. J Proteomics, 2013, 9(4): 279-88.
- [16] FAN Y, ZHOU X, XIA TS, et al. Human plasma metabolomics for identifying differential metabolites and predicting molecular subtypes of breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9925-38.
- [17] BEATTY A, FINK LS, SINGH T, et al. Metabolite profiling reveals the glutathione biosynthetic pathway as a therapeutic target in triple negative breast cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2017, 17(1): 104-7.
- [18] BORREGO SL, FAHRMANN J, DATTA R, et al. Metabolic changes associated with methionine stress sensitivity in MDA-MB-468 breast cancer cells[J]. Cancer Metab, 2016, 4(1): 9-15.
- [19] HE YU, LI QQ, GUO SC. Taurine attenuates dimethylbenz[a]anthracene-induced breast tumorigenesis in rats: a plasma metabolomic study[J]. Anticancer Res, 2016, 36(2): 533-43.
- [20] KIM KJ, KIM HJ, PARK HG, et al. A MALDI-MS-based quantitative analytical method for endogenous estrone in human breast cancer cells[J]. Sci Rep, 2016, 6(2): 44-89.

(本文编辑:蒋湘莲)