

基于GC/MS的皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)异种移植小鼠血浆和皮肤组织的代谢组学分析

曹宜青¹ 沈小雁² 曹涵¹ 康宏艳³ 乐云辰² 梁栋¹ 郁韵秋^{1△}

(¹复旦大学药学院药物分析教研室 上海 201203; ²上海交通大学医学院瑞金医院皮肤科 上海 200025;

³无锡生物制剂(上海)有限公司 上海 201203)

【摘要】 目的 探讨皮肤T细胞淋巴瘤(cutaneous T-cell lymphoma, CTCL)异种移植小鼠血浆和皮肤组织代谢组的变化,寻找与其相关的差异代谢物。**方法** 将21只Balb/c雌性裸鼠分为实验组和对照组,利用HH细胞(T细胞淋巴瘤ATCC CRL-2105)造模,基于GC/MS对CTCL荷瘤鼠的血浆和肿瘤组织样品进行代谢组学分析。**结果** 共有62种差异代谢物,其中13种在血浆和组织样品中均有出现,结合课题组之前基于LC/MS的CTCL荷瘤鼠血浆和肿瘤组织的代谢组学的研究结果,有9种差异代谢物在GC/MS和LC/MS分析方法中同时出现。血浆中支链氨基酸和葡萄糖升高,血浆和肿瘤组织中3-磷酸甘油升高,血浆中鞘氨醇-1-磷酸盐降解的o-磷酸乙醇胺升高。**结论** 62种差异代谢物可以提高对CTCL代谢物及其相关通路的认识,有助于CTCL的临床诊断。

【关键词】 皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL); GC/MS; 哺乳动物雷帕霉素复合物1; 代谢组学; 小鼠

【中图分类号】 R917 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2020.03.001

Metabolomic analysis of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) xenograft mice plasma and skin tissue based on GC/MS

CAO Yi-qing¹, SHEN Xiao-yan², CAO Han¹, KANG Hong-yan³, LE Yun-chen²,
LIANG Dong¹, YU Yun-qiu^{1△}

(¹Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China;

²Department of Dermatology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025,

China; ³Wuxi Biologics (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To investigate the changes in plasma and skin tissue metabolomes in mice after cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), and to find differential metabolites associated with them. **Methods** A total of 21 Balb/c female nude mice were randomly divided into control group and experimental group. CTCL model was induced by HH cell (T cell Lymphoma ATCC CRL-2105). Plasma and tumor tissue samples of cutaneous T-cell lymphoma mice were analyzed by untargeted metabolomics method based on GC/MS and principal component analysis was performed. **Results** A total of 62 differential metabolites were identified, 13 of which were found in both plasma and tissue samples. Combined with our previous metabolomics studies on LC/MS-based CTCL tumor-bearing mice plasma and tumor tissue, 9 identical differential metabolisms were identified by GC/MS and LC/MS platforms. The branched-chain amino acids and glucose were increased in plasma, glycerol-3-phosphate was increased in plasma and tumor tissues, and o-phosphoethanolamine degraded by sphingosine-1-phosphate was

国家自然科学基金(81773325, 81673056, 81272988)

[△]Corresponding author E-mail: yqyu@shmu.edu.cn

网络首发时间: 2020-05-27 16:00:09 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/31.1885.R.20200526.1607.002.html>

increased in plasma. **Conclusion** Sixty-two differential metabolites have improved the understanding of CTCL metabolites and related pathways, which is helpful for the clinical diagnosis of CTCL.

【Key words】 cutaneous T-cell lymphoma (CTCL); GC/MS; mammalian target of rapamycin complex 1; metabolomics; mouse

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81773325, 81673056, 81272988).

皮肤T细胞淋巴瘤(cutaneous T-cell lymphoma, CTCL)是一种由T淋巴细胞克隆浸润引起,以皮肤病变为主要表现的非霍奇金淋巴瘤。临床上CTCL常见的亚型有蕁样肉芽肿、Sezdry综合征和原发性皮肤外周T细胞淋巴瘤^[1]。CTCL的发病机制尚不明确,其临床表型与炎症性皮肤病相似,早期诊断困难^[2]。目前CTCL的主要诊断方式是组织病理学活检、分子分析和外周血染色体检查,缺少非侵入性检查手段^[3]。

代谢组学是“组学领域”的重要组成部分,通过对生物体内代谢物的定性和定量分析来寻找代谢物与生理病理变化的相关关系^[4]。近年来,多组学技术已被用于CTCL的诊断,比如利用基因组学分析诊断CTCL^[5-6]。LC/MS和GC/MS是代谢组学分析中应用最广泛的两种分析方法,两者识别出的差异代谢物既有区别又有联系。我们基于GC/MS和LC/MS对CTCL人血样进行研究,结果显示CTCL的发病机制与磷脂异常有关^[7],进一步考虑进行皮肤组织样本的分析,但由于人病变组织不易获得,因此本研究采用CTCL荷瘤鼠的血浆和肿瘤组织分别进行GC/MS的代谢组学分析,并对LC/MS^[8]和GC/MS找出的差异代谢物进行对比、分析和关联,从而为进一步研究CTCL提供依据。

材 料 和 方 法

试剂和细胞 甲醇、乙腈(HPLC级)、肝素钠购自上海国药控股化学试剂有限公司;正庚烷购自阿拉丁生化科技有限公司(上海);十三酸、吡啶(HPLC级)、甲氧基胺盐酸盐、N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(MSTFA)、三甲基氯硅烷(TMCS)、RPMI 1640培养基(ATCC 302001)、HH细胞(T cell Lymphoma ATCC CRL-2105)、青霉素-链霉素溶液(SV30010, 10 000 U/mL 青霉素:10 000 U/mL链霉素)、胎牛血清(F2442-500 mL)和二甲亚砜(色谱纯)购自美国SigmaAldrich公司。

CTCL异种移植小鼠 HH细胞培养和CTCL异种移植小鼠模型与本课题组前期研究^[8]相同。动物实验均符合复旦大学动物实验伦理标准要求。实验动物合格证号:伦药批第(2018-12-YF-YYQ-01)号。对照组:健康小鼠($n=5$);实验组:CTCL荷瘤鼠($n=16$)。取小鼠眼眶血,加肝素钠抗凝,1 600× g 离心10 min,留取血浆。

HH细胞皮下注射于雌性裸鼠的右侧腋下,小鼠皮肤组织分别取自对照组小鼠的右腋下皮肤,实验组小鼠皮肤肿瘤组织近端(荷瘤鼠右腋下)、肿瘤组织远端(荷瘤鼠左腋下)和肿瘤组织。

血浆处理 取血浆50 μ L至离心管,室温下解冻15 min,加200 μ L的-20 $^{\circ}$ C甲醇(含40 μ g/mL十三烷酸),涡旋5 min,静置10 min,12 000× g 下离心15 min,取上清液40 $^{\circ}$ C下氮气吹干,残余物衍生化,12 000× g 下离心5 min,上清液转至GC/MS进行分析。

组织处理 向EP管加入-20 $^{\circ}$ C甲醇和小鼠组织(1 mg:50 μ L),涡旋5 min,超声10 min,电子组织匀浆器(60 Hz, 300 s)中匀浆,12 000× g 下离心15 min,取600 μ L上清,加入400 μ L甲醇(40 μ g/mL十三烷酸),涡旋5 min,静置10 min,12 000× g 下离心15 min,取900 μ L上清液40 $^{\circ}$ C下氮气吹干,衍生化3 h,12 000× g 下离心5 min,上清液转至GC/MS进行分析。

GC/MS分析 Agilent 7890B气相色谱仪(含7693自动进样器)和5977A四极质量分析仪。色谱柱:DB-5 MS熔融石英毛细管柱(30 m×250 μ m×0.25 μ m,美国Agilent公司)。程序升温:初始70 $^{\circ}$ C保持3 min,之后5 $^{\circ}$ C/min升至300 $^{\circ}$ C保持5 min。氮气载气流量:1.2 mL/min;进样体积:1 μ L;分流比:2:1;入口温度:300 $^{\circ}$ C;界面温度:280 $^{\circ}$ C;离子源温度:230 $^{\circ}$ C。

数据采集及处理 通过MassHunter定性分析软件(B.06.00)将原始数据转换为mzData格式,转换后的数据上传到XCMS-Online(<https://xcmsonline>).

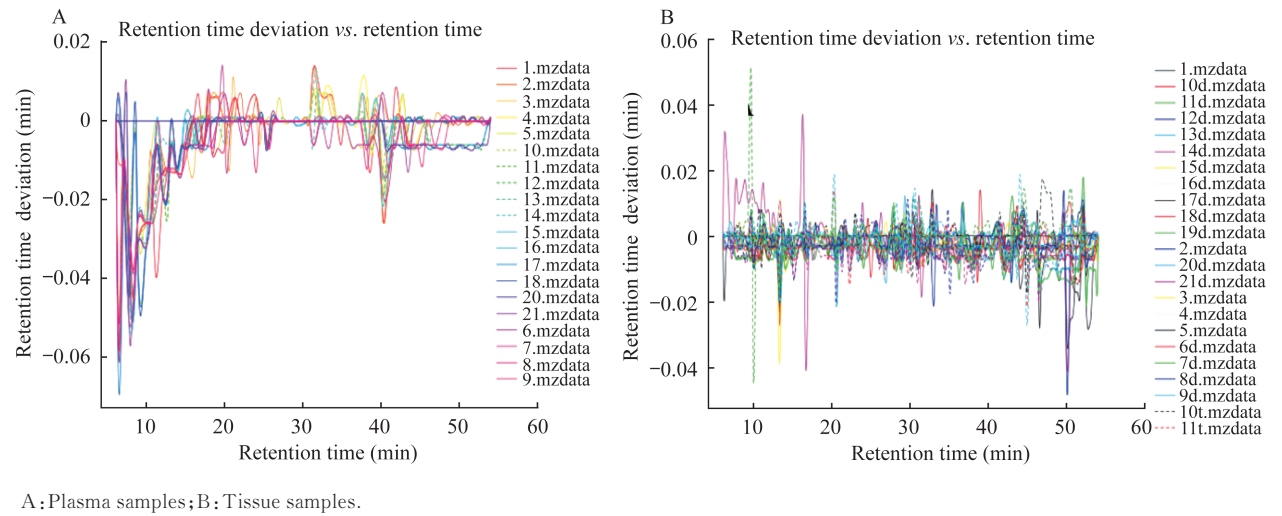
scripps.edu)进行数据过滤,峰对齐和保留时间校正。峰强度校正后,使用“80%规则”筛选数据。数据预处理后用SIMCA 13(Umetrics, Sweden)进行统计分析。

将筛选出的代谢物上传至NIST数据库和人类代谢组数据库(HMDB, <http://www.hmdb.ca>)进行比对,部分采用标准品进行结构验证。使用热图(GraphPad)分析以观察不同组之间差异代谢物的变化。通过Medcalc软件构建接受者操作特征曲线(ROC)以评估差异代谢物的灵敏度和特异性。采用MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst>。

ca/)进行差异代谢物的代谢通路分析。

结 果

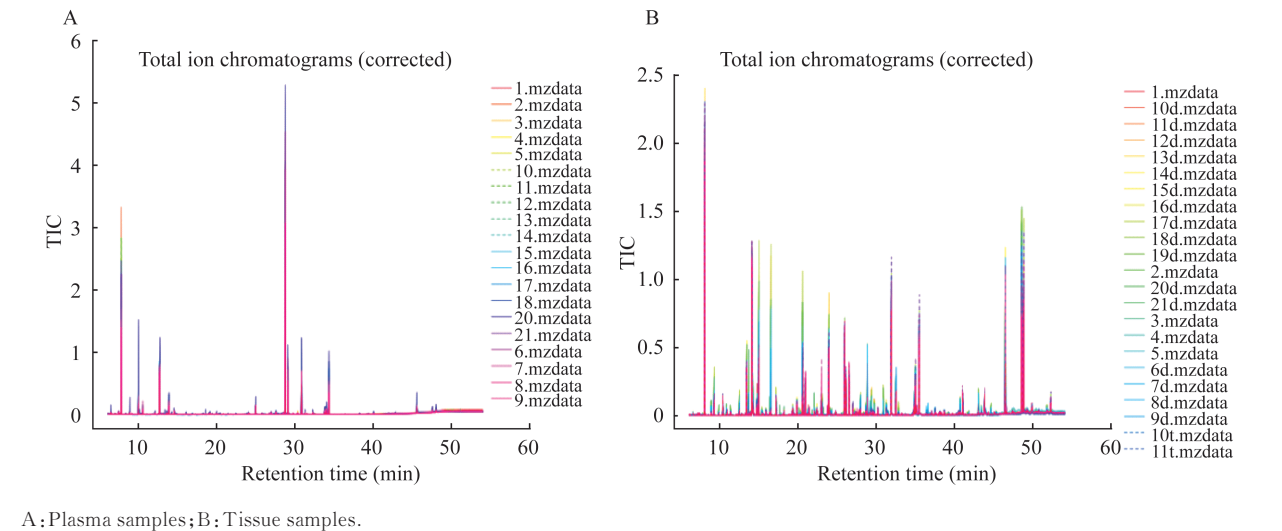
原始数据的质量控制和TIC图 所有血浆样品和组织样品的保留时间偏差分别为4 s和1.2 s,说明所采用的分析方法(包括色谱条件)具有良好的重现性(图1、2)。原始数据包括含有1 704个特征离子的21个血浆样本,含有1 016个特征离子的50个组织样本,数据过滤后,得到1 047个和653个特征离子。



A: Plasma samples; B: Tissue samples.

图1 对照组与CTCL组小鼠血浆样品和组织样品的保留时间偏差

Fig 1 Retention time deviation plots of plasma and tissue samples of mice in control group and CTCL group



A: Plasma samples; B: Tissue samples.

图2 CTCL组小鼠血浆和组织样品的重叠TIC

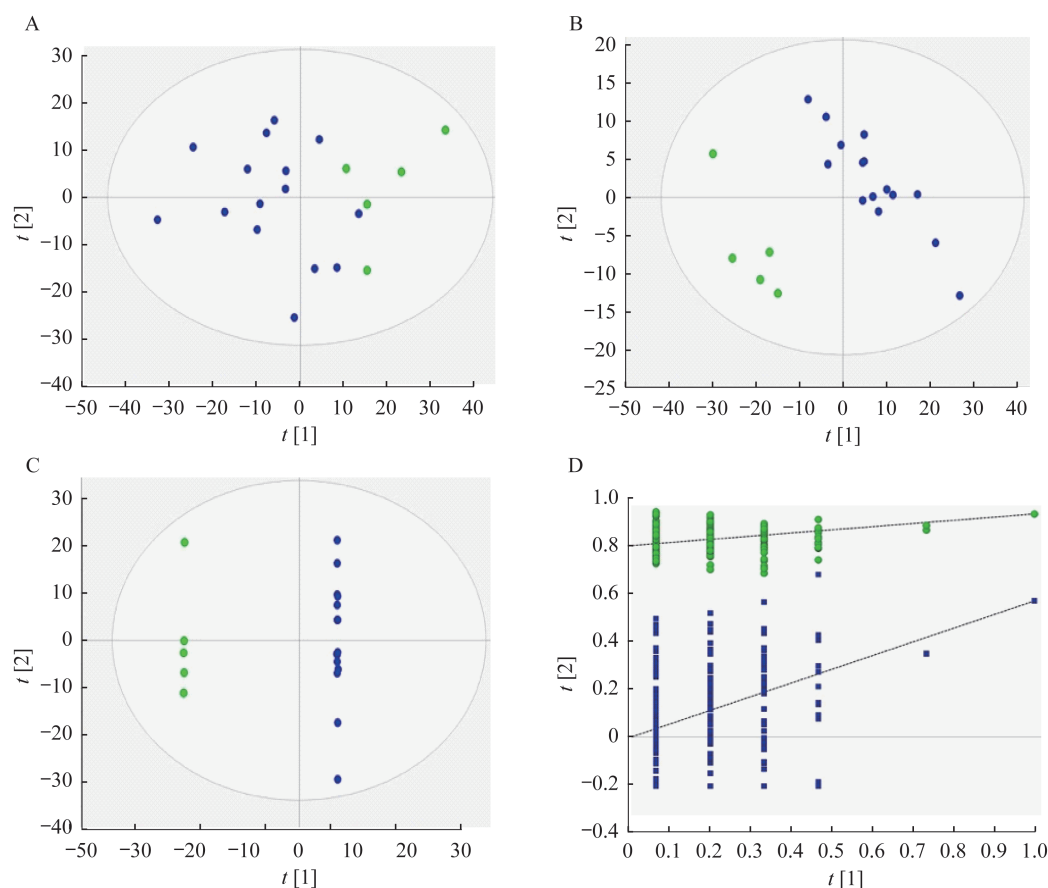
Fig 2 The overlapping TICs of plasma and tissue samples in mice of CTCL group

数据的多变量统计分析 在血浆样品的CTCL组和对照组间,PCA分离不明显,其 $R^2X=0.474$, $Q^2=$

0.204 (图3A); PLS-DA分离明显,其 $R^2X=0.314$, $R^2Y=0.944$, $Q^2=0.576$ (图3B); OPLS-DA分离明

显,其 $R^2X=0.630$, $R^2Y=1.000$, $Q^2=0.672$ (图 3C)。200 次交叉排列验证结果表明,PLS-DA 分析模型具

有可靠的预测能力($R^2: 0, 0.809$; $Q^2: 0, -0.003\ 73$)(图 3D)。



Control group was labeled by green circle, CTCL group was labeled by blue circle. A: Scores plot of PCA; B: Scores plot of PLS-DA; C: Scores plot of OPLS-DA; D: Permutation validation plots of PLS-DA; R^2 labeled by green triangles and Q^2 labeled by blue boxes.

图3 对照组与CTCL组小鼠血浆PCA、PLS-DA及OPLS-DA分析

Fig 3 PCA, PLS-DA and OPLS-DA analysis of plasma of mice in control group and CTCL group

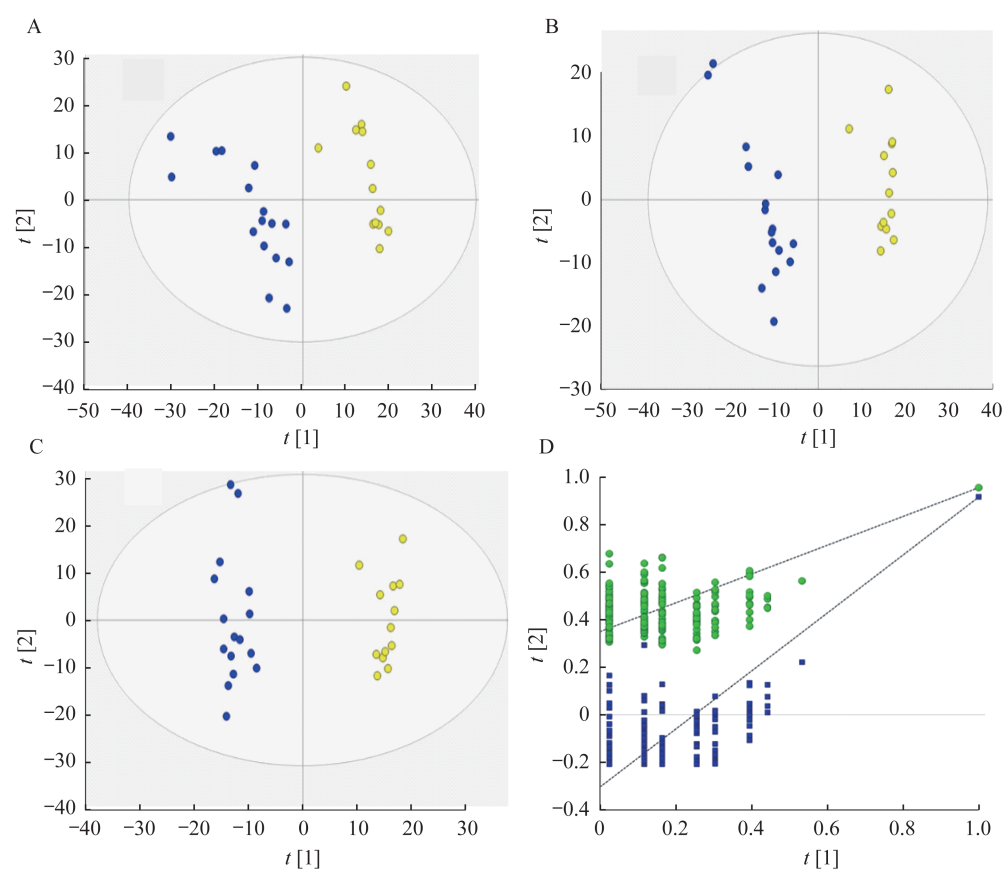
在组织样品中,PCA显示肿瘤组和其他3组间有显著差异($R^2X=0.868$, $Q^2=0.721$),但是对照组与肿瘤组织远端(荷瘤鼠左腋下)间差异不大。为消除小鼠的个体差异,进一步观察CTCL小鼠自身的肿瘤组织和肿瘤组织远端(荷瘤鼠左腋下)。PCA($R^2X=0.748$, $Q^2=0.618$)、PLS-DA($R^2X=0.531$, $R^2Y=0.955$, $Q^2=0.916$)和OPLS-DA($R^2X=0.613$, $R^2Y=0.977$, $Q^2=0.939$)的得分图和拟合参数均显示出肿瘤组织远端组和肿瘤组有明显分离(图4)。对PLS-DA进行200次交叉检验验证, $R^2(0, 0.350)$ 和 $Q^2(0, -0.304)$ 表明该模型无过度拟合(图4)。

血浆和组织样品中差异代谢物的筛选与结构验证 根据OPLS-DA模型中的VIP值, t 检验的 P 值和 FC 值($VIP \geq 1$, $P \leq 0.05$ 和 $FC \geq 1.5$)选择差异

代谢物(表1、2)。在血浆样品中共有29种差异代谢物(其中两种在HMDB中不存在),21种经标准品得以验证,在组织样品中共有33种差异代谢物(其中一种在HMDB中不存在),25种经标准品得以验证。其中13种差异代谢物(L-缬氨酸,L-丝氨酸,L-亮氨酸,甘油,L-异亮氨酸,L-苯丙氨酸,3-磷酸甘油,D-葡萄糖,阿拉伯糖,肌醇,亚油酸,硬脂酸,胆固醇)同时存在于血浆和组织样品中(图5)。

在血浆样品中CTCL组的乳酸和大部分氨基酸增加;油酸、硬脂酸、1-十六烷酸酯甘油和胆固醇明显减少(图6)。在组织样品中肿瘤组的3-磷酸甘油,邻磷酸乙醇胺和L-天冬氨酸显著增加;大部分氨基酸含量减少(图7)。

血浆和组织样品中差异代谢物的ROC分析 对62种差异代谢物作ROC分析(表3、4):在血浆样



Tumor tissue group was labeled by yellow circle, and tumor tissue distal end group was labeled by blue circles. A: Scores plot of PCA; B: Scores plots of PLS-DA; C: Scores plot of OPLS-DA; D: Permutation validation plots of PLS-DA; R2 labeled by green triangles and Q2 labeled by blue boxes.

图4 CTCL小鼠自身的肿瘤组织和肿瘤组织远端的PCA、PLS-DA及OPLS-DA分析

Fig 4 PCA, PLS-DA and OPLS-DA analysis of tumor tissue and tumor tissue distal end in CTCL mice

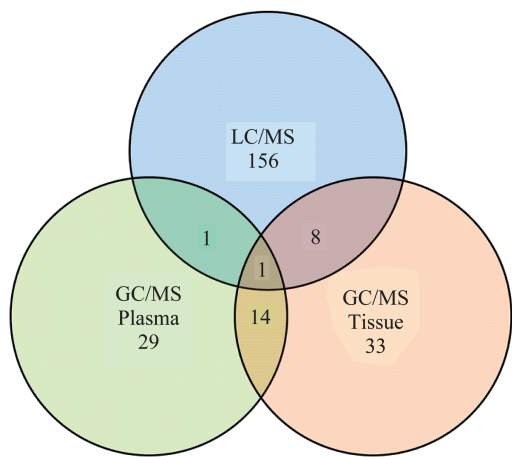


图5 CTCL小鼠血浆样品和肿瘤组织样品中检测到的差异代谢物数据的Venn图

Fig 5 Venn diagrams presenting data for differential metabolites detected in plasma samples and tumor tissue samples of CTCL mice detected by GC/MS and LC/MS respectively

品中,肉豆蔻酸的AUC值为1,表明肉豆蔻酸具有最高的特异性和灵敏度(图8);在组织样品中,多种差异代谢物的AUC值为1(图9)。

血浆和组织样品中差异代谢物的Pathway分析 支链氨基酸(BCAA)和甘油磷脂代谢被认为是血浆和组织样品中最相关的代谢途径(图10)。

讨论

多平台多样本数据相互补充和印证 GC/MS和LC/MS是目前代谢组学分析的主流技术平台。本研究采用GC/MS分析平台,对CTCL荷瘤鼠的血浆和肿瘤组织样品进行代谢组学分析,并将研究结果和课题组之前的研究结果^[8]进行比较(图5),结果表明:血浆中的胆固醇同时在LC/MS和GC/MS中出现,肿瘤组织中黄嘌呤和7种氨基酸(L-天冬酰胺、L-赖氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、L-色氨酸、L-

表1 通过GC/MS筛选出对照组与CTCL组小鼠血浆样品中的差异代谢物

Tab 1 Identification of differential metabolites among the plasma samples of mice in control group and CTCL group by GC/MS

NO.	HMDB ID	RT	Metabolites ^a	Matching score	Validated by standard samples
1	HMDB00190	7.79	L-Lactic acid	960	Y
2	HMDB00161	8.91	L-alanine	812	Y
3	HMDB00357	10.54	3-Hydroxybutyric acid	943	N
4	HMDB00162	10.73	L-Proline1	719	Y
5	HMDB00883	12.10	L-Valine	919	Y
6	HMDB00294	12.68	Urea	930	Y
7	HMDB00187	13.13	L-Serine	879	Y
8	HMDB00687	13.67	L-Leucine	930	Y
9	HMDB02142	13.72	Phosphoric acid	910	Y
10	HMDB00131	13.88	Glycerol	936	Y
11	HMDB00162	14.24	L-Proline2	698	Y
12	HMDB00172	14.25	L-Isoleucine	894	Y
13	HMDB00167	16.87	L-Threonine	919	Y
14	HMDB00159	22.44	L-Phenylalanine	860	Y
15	HMDB00666	23.99	Heptanoic acid	443	N
16	HMDB00126	25.82	Glycerol 3-phosphate	666	N
17	HMDB29942	26.19	Arabinose	766	N
18	HMDB00806	27.01	Myristic acid	817	Y
19	HMDB00122	28.76	D-Glucose	925	Y
20	HMDB00625	30.30	Gluconic acid	622	N
21	HMDB00220	30.83	Palmitic acid	952	Y
22	HMDB29942	31.29	Arabinose	676	N
23	HMDB00211	32.27	Myo-inositol	881	Y
24	HMDB00673	33.78	Linoleic acid	745	N
25	HMDB00207	33.87	Oleic acid	800	N
26	HMDB00929	34.19	L-Tryptophan	869	Y
27	HMDB00827	34.34	Stearic acid	947	Y
28	HMDB31074	40.06	Glycerol 1-hexadecanoate	874	Y
29	HMDB00067	47.56	Cholesterol	727	Y

^aThere was more than 1 derivatized product from amino acids and saccharides. The products derived from the same metabolites were distinguished with number. Y: Validated by standard; N: standard samples were not available.

亮氨酸、L-谷氨酸)同时在LC/MS和GC/MS分析平台中出现。LC/MS和GC/MS两种分析平台对该类差异代谢物的分析均能达到较高的灵敏度,表明这两种分析方法不仅可以互补,还可以进行有效的相互验证。此外,由于代谢组学涉及的化合物性质差异较大,不同的分析平台检出的种类不同,如GC/MS可检出乳酸和葡萄糖,LC/MS可检出PC类和MG类,采用多平台技术可以增加差异代谢物

的覆盖面,因此在以后的研究中可以考虑将两种分析方法结合以获得更多的信息。

由于代谢途径不同,在血浆和肿瘤组织中会出现不同的差异代谢物,我们又将血浆和肿瘤组织样品的分析结果进行了比较,共同差异代谢物有13种,分别占血浆差异代谢物和肿瘤组织差异代谢物的48.3%和42.3%;涉及的共同通路有BCAA代谢、半乳糖代谢、亚油酸通路和甘油磷脂代谢。说

表 2 通过 GC/MS 筛选出 CTCL 小鼠自身的肿瘤组织和肿瘤组织远端样品中的差异代谢物

Tab 2 Identification of differential metabolites among tumor tissue samples and tumor tissue distal end samples in CTCL mice by GC/MS

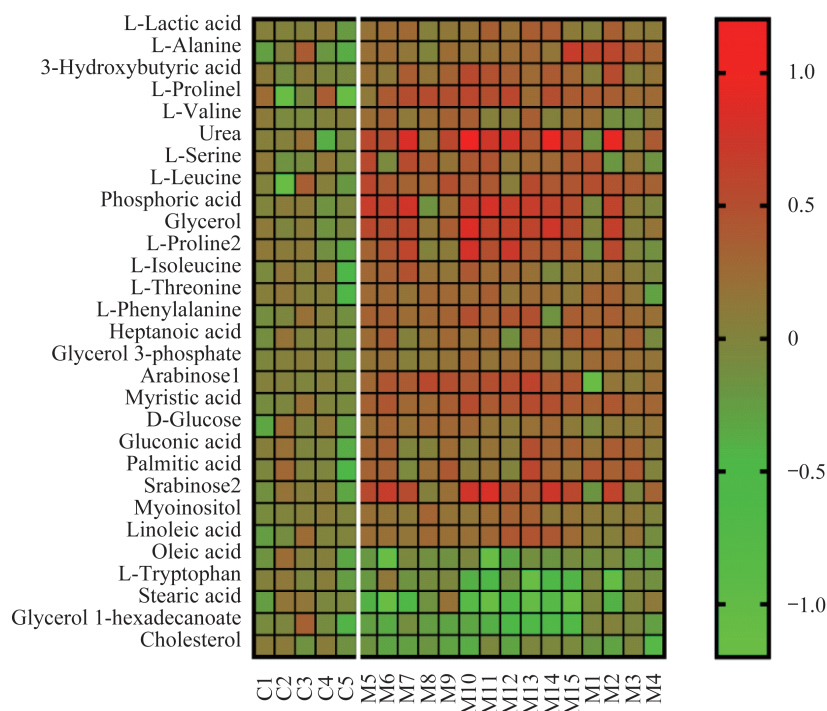
NO.	HMDB ID	RT	Metabolites ^a	Matching score	Validated by standard samples
1	HMDB00123	6.55	Glycine	607	Y
2	HMDB00883	8.87	L-Valine1	946	Y
3	HMDB00161	9.26	L-Alanine	920	Y
4	HMDB00687	10.82	L-Leucine	872	Y
5	HMDB00883	12.48	L-Valine2	909	Y
6	HMDB00187	13.67	L-Serine	925	Y
7	HMDB00687	14.08	L-Leucine	731	Y
8	HMDB00131	14.17	Glycerol	930	Y
9	HMDB00172	14.66	L-Isoleucine	760	Y
10	HMDB00123	14.97	Glycine	934	Y
11	HMDB00187	16.50	L-Serine	946	Y
12	HMDB00696	20.51	L-Methionine	765	Y
13	HMDB00267	20.53	Pyroglutamic acid	930	Y
14	HMDB00191	20.59	L-Aspartic acid	936	Y
15	HMDB00168	22.41	L-Asparagine	804	Y
16	HMDB00148	22.96	L-Glutamic acid	899	Y
17	HMDB00159	23.00	L-Phenylalanine	898	Y
18	HMDB00126	26.08	Glycerol 3-phosphate	927	N
19	HMDB00224	26.46	O-Phosphoethanolamine	890	Y
20	HMDB00094	27.28	Citric acid	735	Y
21	HMDB00446	27.94	N-Alpha-acetyllysine	740	N
22	HMDB00122	28.80	D-Glucose	843	Y
23	HMDB00182	29.36	L-Lysine	840	Y
24	HMDB00158	29.68	L-Tyrosine	908	Y
25	HMDB00289	30.84	Uric acid	912	N
26	HMDB00292	31.23	Xanthine	680	N
27	HMDB00211	32.47	Myo-inositol	927	Y
28	HMDB00673	34.82	Linoleic acid	904	N
29	HMDB00827	35.42	Stearic acid	936	Y
30	HMDB01043	37.45	Arachidonic acid	843	N
31	HMDB00944	41.76	Behenic acid	879	N
32	HMDB02003	44.60	Tetracosanoic acid	622	N
33	HMDB00067	48.50	Cholesterol	931	Y

^aThere was more than 1 derivatized product from amino acids and saccharides. The products derived from the same metabolites were distinguished with number. Y: Validated by standard; N: Standard samples were not available.

明血浆和肿瘤组织样品不仅可以单独反映 CTCL 的局部代谢,两种样品之间的差异代谢物还较为相关。不同样本得到的差异代谢物在种类和数量上不完全相同,如在 GC/MS 平台中单甘脂和棕榈酸等 15 种差异代谢物只在血浆样本中出现,尿酸和磷酸乙醇胺等 19 种差异代谢物只在肿瘤组织样本中

出现。

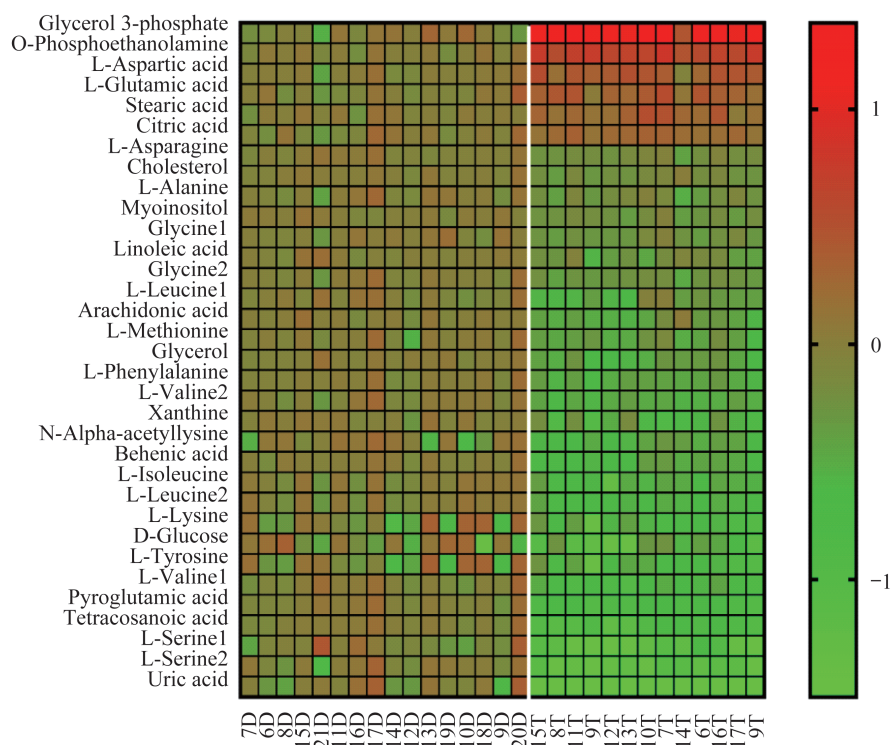
CTCL 小鼠血浆和肿瘤组织中 BCAA 异常 BCAA(包括缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸)在血浆中上调并在肿瘤组织中下调,这表明 BCAA 在 CTCL 的恶性 T 细胞增殖过程中被转运和消耗,以适应更高的蛋白质合成速率。异常 BCAA 是 CTCL 小鼠



C: Control group; M: CTCL group.

图6 对照组与CTCL组小鼠血浆样品中代谢物的热图分析

Fig 6 Heatmap of metabolites in plasma samples of mice in control group and CTCL group



D: Tumor tissue distal end group; T: Tumor group.

图7 CTCL小鼠自身的肿瘤组织和肿瘤组织远端组中代谢物的热图

Fig 7 Heatmap of metabolites in tumor tissue group and tumor tissue distal end group in CTCL mice

表 3 对照组和 CTCL 组小鼠血浆样品中差异代谢物的 ROC 数据

Tab 3 ROC results for differential metabolites in plasma samples of mice in control group and CTCL group

Metabolites	RT	AUC	Standard error	95% CI	Sensitivity	Specificity
L-Lactic acid ^a	7.79	0.907	0.069	0.692–0.990	73.33	100.00
L-Alanine	8.91	0.840	0.147	0.609–0.963	93.33	80.00
3-Hydroxybutyric ^a acid	10.54	0.947	0.049	0.746–0.998	86.67	100.00
L-Valine	12.10	0.800	0.103	0.563–0.943	80.00	80.00
Urea ^a	12.68	0.920	0.064	0.709–0.993	80.00	100.00
L-Serine	13.13	0.800	0.100	0.563–0.943	66.67	100.00
L-Leucine ^a	13.67	0.947	0.058	0.746–0.998	100.00	80.00
Phosphoric acid	13.72	0.853	0.088	0.625–0.969	80.00	100.00
Glycerol ^a	13.88	0.947	0.049	0.746–0.998	86.67	100.00
L-Proline	14.24	0.800	0.105	0.563–0.943	66.67	100.00
L-Isoleucine	14.25	0.827	0.103	0.594–0.957	60.00	100.00
L-Threonine ^a	16.87	0.933	0.058	0.728–0.996	86.67	100.00
L-Phenylalanine ^a	22.44	0.933	0.067	0.728–0.996	93.33	100.00
Heptanoic acid	23.99	0.867	0.083	0.641–0.975	73.33	100.00
Glycerol 3-phosphate ^a	25.82	0.947	0.048	0.746–0.998	86.67	100.00
Myristic acid ^a	27.01	1.000	0.000	0.832–1.000	100.00	100.00
D-Glucose	28.76	0.787	0.138	0.549–0.935	93.33	60.00
Gluconic acid	30.30	0.867	0.101	0.641–0.975	80.00	80.00
Palmitic acid	30.83	0.867	0.100	0.641–0.975	93.33	80.00
Myo-inositol ^a	32.27	0.960	0.039	0.766–1.000	86.67	100.00
Linoleic acid	33.78	0.853	0.122	0.625–0.969	93.33	80.00
Oleic acid	33.87	0.720	0.183	0.478–0.894	100.00	60.00
L-Tryptophan	34.19	0.827	0.125	0.594–0.957	93.33	80.00
Stearic acid	34.34	0.813	0.098	0.578–0.950	66.67	100.00
Cholesterol	47.56	0.867	0.096	0.641–0.975	66.67	100.00

^aAUC>0.9.

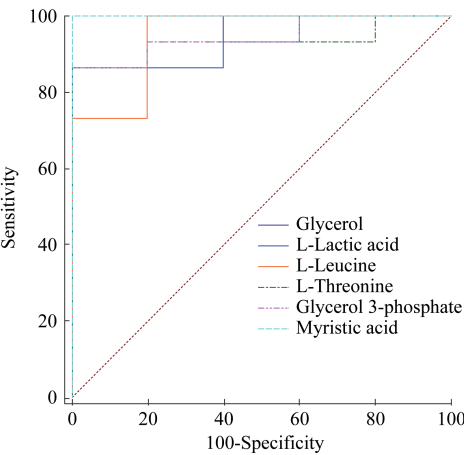


图 8 对照组与 CTCL 组小鼠血浆样品中部分 AUC > 0.9 的差异代谢物的 ROC

Fig 8 The ROC of differential metabolites with AUC > 0.9 in plasma samples of mice in control group and CTCL group

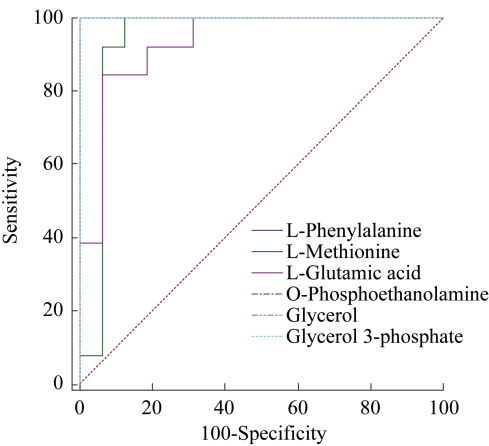


图 9 CTCL 小鼠自身的肿瘤组织和肿瘤组织远端样品中部分 AUC>0.9 的差异代谢物的 ROC

Fig 9 The ROC of differential metabolites with AUC >0.9 in CTCL mice of tumor tissue and tumor tissue distal end

表4 CTCL小鼠自身的肿瘤组织和肿瘤组织远端样品中差异代谢物的ROC数据

Tab 4 ROC results for potential biomarkers of tumor tissue group and tumor tissue distal end group in CTCL mice

Metabolites	RT	AUC	Standard error	95% CI	Sensitivity	Specificity
L-Valine ^a	8.87	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
L-Alanine	9.26	0.861	0.072	0.682-0.960	92.31	75.00
L-Leucine ^a	10.82	0.913	0.062	0.749-0.985	84.62	100.00
L-Serine ^a	13.67	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
Glycerol ^a	14.17	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
L-Isoleucine ^a	14.66	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
Glycine	14.97	0.938	0.043	0.781-0.993	92.31	87.5
L-Methionine ^a	20.51	0.938	0.058	0.781-0.993	100.00	87.50
Pyroglutamic acid ^a	20.53	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
L-Aspartic acid ^a	20.59	0.928	0.063	0.768-0.991	84.62	100.00
L-Asparagine ^a	22.41	0.928	0.049	0.768-0.991	76.92	100.00
L-Glutamic acid ^a	22.96	0.933	0.046	0.775-0.992	84.62	93.75
L-Phenylalanine ^a	23.00	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
Glycerol 3-phosphate ^a	26.08	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
O-Phosphoethanolamine ^a	26.46	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
Citric acid ^a	27.28	0.918	0.056	0.755-0.987	100.00	81.25
N-Alpha-acetyllysine	27.94	0.870	0.072	0.693-0.965	100.00	75.00
D-Glucose	28.80	0.851	0.076	0.670-0.955	100.00	68.75
L-Lysine	29.36	0.856	0.072	0.676-0.958	92.31	75.00
L-Tyrosine	29.68	0.856	0.072	0.676-0.958	92.31	75.00
Uric acid ^a	30.84	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
Xanthine ^a	31.23	0.981	0.021	0.847-1.000	100.00	93.75
Myo-inositol ^a	32.47	0.976	0.023	0.839-1.000	92.31	93.75
Linoleic acid ^a	34.82	0.962	0.031	0.816-0.999	84.62	100.00
Stearic acid ^a	35.42	0.966	0.028	0.824-0.999	92.31	93.75
Arachidonic acid ^a	37.45	0.933	0.068	0.775-0.992	92.31	100.00
Behenic acid ^a	41.76	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
Tetracosanoic acid ^a	44.60	1.000	0.000	0.881-1.000	100.00	100.00
Cholesterol ^a	48.50	0.938	0.054	0.781-0.993	92.31	93.75

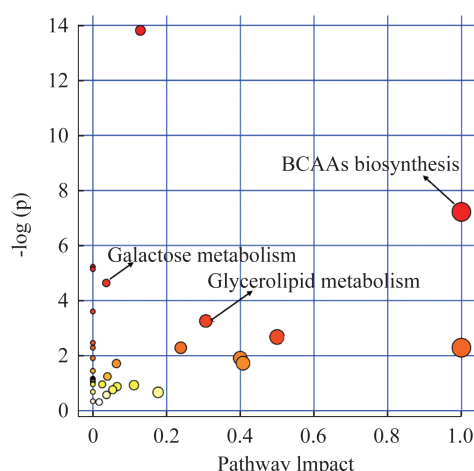
^aAUC>0.9.

图10 BCAAs与甘油磷脂代谢是最相关的代谢途径

Fig 10 BCAAs and glycerolipid metabolism were the most relevant metabolic pathways

血浆和肿瘤组织最重要的代谢特征。

BCAA(尤其是亮氨酸)可通过激活 mTORC1^[9]刺激骨骼肌蛋白形成。同时亮氨酸会降低 AMP 激酶(AMPK)活性,从而引发胰岛素抵抗和癌症^[10]。在本研究中,亮氨酸在血浆中明显升高,在组织中明显减少,表明 BCAA 可能激活 mTORC1 并引发 CTCL(图 11)。

CTCL 小鼠血浆和肿瘤组织中 3-磷酸甘油上调 血浆和肿瘤组织中增加的 3-磷酸甘油可能导致细胞膜降解或恶性 T 细胞形态变化。小鼠血浆中 3-磷酸甘油的升高与课题组之前的研究结果^[8]相一致。

CTCL 小鼠血浆中葡萄糖上调 体内葡萄糖含量也会影响 mTORC1^[10]的活性。血浆中葡萄糖的升高会抑制 AMPK 通路,从而减轻 TCS1/TSC2 复合物的抑制功能并激活 mTORC1^[11]。同样,葡萄糖

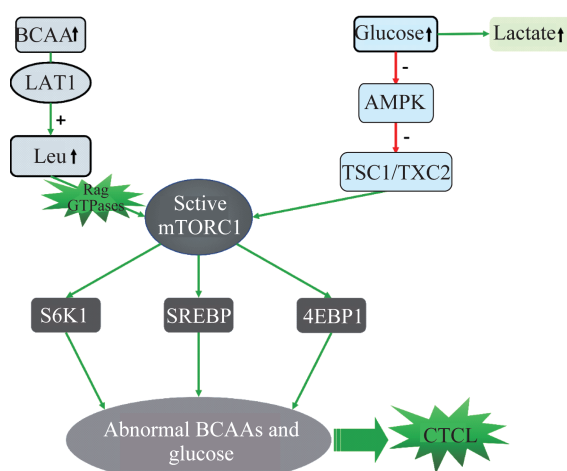


图 11 基于 CTCL 小鼠血浆和肿瘤组织中 BCAA 异常假设的 CTCL 小鼠代谢通路

Fig 11 Hypothetical metabolic pathways based on BCAA abnormalities in plasma and tumor tissues of CTCL mice

也可以通过降低亮氨酸等 AMPK 激酶的活性来激活 mTORC1^[12]。在本研究中,血浆中葡萄糖含量增加,意味着葡萄糖激活 mTORC1,同时参与癌细胞的 Warburg 效应,而血浆中乳酸含量增加也验证了这一点^[13];肿瘤组织中葡萄糖含量降低,可认为葡萄糖通过糖酵解被消耗并转化为乳酸(图 11)。

CTCL 小鼠血浆 o-磷酸乙醇胺被降解 我们之前的研究已显示:组织中鞘氨醇-1-磷酸酯(S1P)增加会促使磷酸戊糖途径与核苷酸代谢相互作用,且与 CTCL 肿瘤组织大小显著相关(Pearson 相关系数 $\rho=0.64$)^[8]。本研究显示,血浆中 S1P 降解的 o-磷酸乙醇胺含量也增加,不同样本(血浆和皮肤)的研究结果表明 S1P 和 o-磷酸乙醇胺的异常可能与 CTCL 关系密切。

参考文献

- [1] VAKEVA L, NIITTYVUOPIO R, LEPPA S, *et al.* Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients with cutaneous T-cell lymphoma[J]. *Acta Derm-Venereol*, 2016, 96(6): 816-817.
- [2] SIDIROPOULOS KG, MARTINEZ-ESCALA ME, YELAMOS O, *et al.* Primary cutaneous T-cell lymphomas: a review [J]. *J Clin Pathol*, 2015, 68 (12):

- 1003-1005.
- [3] BENJAMIN CHASE A, MARKEL K, TAWA MC. Optimizing care and compliance for the treatment of mycosis fungoides cutaneous T-cell lymphoma with mechlorethamine gel[J]. *Clin J Oncol Nurs*, 2015, 19(6): 131-139.
- [4] NICHOLSON JK, TIMBRELL JA, SADLER PJ. Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage. Mercury-induced nephrotoxicity in rats[J]. *Mol Pharmacol*, 1985, 27(6): 644-651.
- [5] LITVINOV IV, NETCHIPOROUK E, CORDEIRO B, *et al.* The use of transcriptional profiling to improve personalized diagnosis and management of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (12): 2820-2829.
- [6] ION A, POPA IM, PAPAGHEORGHE LM, *et al.* Proteomic approaches to biomarker discovery in cutaneous T-cell lymphoma [J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 9602472.
- [7] JIANG G, SHEN X, KANG H, *et al.* Serum metabolite profiling of cutaneous T-cell lymphoma based on a multiplatform approach [J]. *J Chromatography B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1077-1078: 71-76.
- [8] LE Y, SHEN X, KANG H, *et al.* Accelerated, untargeted metabolomics analysis of cutaneous T-cell lymphoma reveals metabolic shifts in plasma and tumor adjacent skins of xenograft mice [J]. *J Mass Spectrom*, 2018, 53 (2): 172-182.
- [9] KIMBALL SR, JEFFERSON LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis [J]. *J Nutr*, 2006, 136(1 Suppl): 227S-231S.
- [10] LONG W, SAFFER L, WEI L, *et al.* Amino acids regulate skeletal muscle PHAS-I and p70 S6-kinase phosphorylation independently of insulin [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 279(2): 301-306.
- [11] INOKI K, ZHU T, GUAN KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival [J]. *Cell*, 2003, 115(5): 577-590.
- [12] GWINN DM, SHACKELFOR DB, EGAN DF, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2): 214-226.
- [13] WARBURG O. On respiratory impairment in cancer cells [J]. *Science*, 1956, 124(3215): 269-270.

(收稿日期: 2019-07-08; 编辑: 王蔚)