

# 慢性肾脏疾病晚期患者的尿代谢组学特征分析\*

冯 琴<sup>1</sup>, 尚小玲<sup>1</sup>, 李 智<sup>2</sup>, 胡 芳<sup>1</sup>

(1. 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)医学检验科, 湖北黄石 435000;

2. 澳门大学健康科学学院, 澳门 999078)

**摘要:**目的 研究尿代谢物在慢性肾脏疾病(CKD)晚期患者中的变化及与肾脏疾病发展的相关性。方法 通过 NMR 分析 15 例患者和 15 例健康人的尿代谢组分, 进行主成分分析(PCA)检验, 并进一步运用液相色谱-三重四极杆质谱法分析另外 16 例 CKD 患者和 15 例对照的尿液样本进行验证, 并鉴定 CKD 和非 CKD 尿样之间的尿代谢物。结果 发现 CKD 和非 CKD 尿样之间有七种尿代谢物显著不同( $P < 0.05$ ), 其中枸橼酸盐、牛磺酸、5-羟脯氨酸在 CKD 患者中显著降低( $P < 0.05$ ), 而谷氨酸、鸟苷酸乙酸酯、 $\alpha$ -苯乙酰谷氨酰胺和 N-氧化三甲胺显著上升( $P < 0.05$ )。根据这些代谢物的变化趋势, 5 例 CKD 患者中有 4 例被鉴定为 CKD 患者(80% 准确性), 7 例健康人中有 6 例被划分到对照区(86% 准确性)。结论 该方法特异度高, 可以用来预测 CKD, 其临床引用前景良好。

**关键词:**慢性肾病; 质谱; 代谢组学

中图分类号: R692; R446.112 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)01-093-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.01.024

## Feature Analysis of Urinary Metabolism in Advanced Chronic Kidney Disease

FENG Qin<sup>1</sup>, SHANG Xiao-ling<sup>1</sup>, LI Zhi<sup>2</sup>, HU Fang<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Huangshi Central Hospital(Affiliated Hospital  
of Hubei Polytechnic University), Edong Healthcare Group, Hubei Huangshi 435000, China;

2. Faculty of Health and Science, University of Macau, Macau 999078, China)

**Abstract: Objective** To study the changes of urinary metabolites in patients with advanced chronic renal disease and their correlation with the development of renal diseases. **Methods** In order to identify such markers as a proof of principle and determine if a metabolite signature corresponding to CKD can be found in urine. In the discovery stage, NMR was applied to determine the urine metabolome of 15 patients with CKD and compared that with the metabolome of 15 healthy individuals and found a classification pattern clearly indicative of CKD. A validation cohort of urine samples from an additional 16 patients with CKD and 15 controls was then analyzed by (Selected Reaction Monitoring) liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry between CKD and non-CKD urine samples. **Results** The results indicated a group of seven urinary metabolites differed between CKD and non-CKD urine samples ( $P < 0.05$ ). Among which, citrate, taurine and 5-oxoproline ( $P < 0.05$ ) were significantly decreased, while glutamate, guanidoacetate,  $\alpha$ -phenylacetylglutamine and trimethylamine N-oxide ( $P < 0.05$ ) were significantly increased. According to the change trend of these metabolites, four of five in patients with chronic kidney disease (CKD) had been identified as CKD (80% accuracy), six of the seven health people were divided into the control area (86% accuracy). **Conclusion** This method has high specificity, and can be used to predict chronic kidney disease (CKD), which has good prospects for clinical reference.

**Keywords:** chronic kidney disease; mass spectrometry; metabolomics

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的发病率显著上升已成为我国和其他国家一个严重的公共卫生问题<sup>[1,2]</sup>。根据肾小球滤过率(eGFR)的变化可以将 CKD 分为五个阶段, 最近的研究表明, 同时监测 eGFR 和蛋白尿能够准确地反映 CKD 的病情进展<sup>[3]</sup>。一般来说, 临床医生基于血

清肌酐中 eGFR 的值来判断是否为 CKD。血清肌酐受肌肉质量、年龄、种族和早期评估的影响, 另外当 eGFR 的值超过 60 ml/min 时再用这种方法评估并不准确<sup>[4]</sup>。一些新的分析物如中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(NGAL)和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 也发现与 CKD 进展有关, 但是以往的研究

\* 作者简介: 冯 琴(1971—), 女, 本科, 副主任技师, 从事临床化学检验, E-mail: 769221632@qq.com。

通讯作者: 胡 芳(1979—), 女, 硕士, 副主任技师, 从事临床化学检验及实验室管理, E-mail: funci20002000@163.com。

多是建立在有限的研究对象基础上,而且各研究中采用的诊断标准及方法的不同造成了诊断效能评估等结果的差异<sup>[5]</sup>。因此需要发掘新的生物标志来识别 CKD 患者甚至识别早期 CKD 阶段,并最终被用来监测疾病的进展。

实验中运用 NMR 和 MS 的方法对 CKD 患者和健康人尿液进行非靶向分析,检测结果发现一些潜在的重要代谢物,具体研究如下。

## 1 材料和方法

**1.1 研究对象** CKD 患者的尿样收集来自鄂东医疗集团黄石市中心医院。收集 31 例(15 例对照组和 16 例患者)的尿液用于探索阶段,另收集 30 例(15 例对照组和 15 例患者)用于验证阶段。招募 5 例 CKD(3~5 期)的患者和 7 例新的健康受试者用于双盲实验。CKD 阶段(3~5 期)被定义为 GFR 值高于 30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>。验证阶段对照组无糖尿病史、高血压、肾脏或炎症性疾病,没有接受任何已知的药物来干扰研究的变量,并根据性别和年龄与患者组相匹配。

**1.2 主要仪器和试剂** NMR 检测在华中科技大学进行,仪器型号为 AVANCE400MHZ。液相色谱-三重四极杆质谱仪,型号为安捷伦 6460 QQQ MS(6460 Triple Quadrupole Mass Spectrometer),液相色谱系统由一个脱气装置,两个二元泵和恒温自动进样器组成(1200 系列,安捷伦科技,帕洛阿尔托)。实验由上海爱博才思分析仪器贸易有限公司完成。恒温反相色谱柱型号为 Atlantis T3(3 mm, 2.1×100 mm<sup>2</sup>),购自 Waters 公司。冷冻离心机(75002430)购自 ThermoFisher。本实验中所用试剂,甲酸、乙腈、乙酸等均购自美国 Sigma 公司。

**1.3 标本采集** 收集所有患者的晨尿,并于 13 000 r/min,4℃下离心 15 min,去除细胞碎片,保存上清,并保存于-80℃直到分析。液相色谱实验:将 10 μl 样品注射进样于 40℃恒温的反相色谱柱中。使用乙腈溶液进行梯度洗脱,洗脱速率为 0.4 ml/min:0% 的 B 液 5 min,0~10% 的 B 液 2 min,10% 的 B 液 3 min,10%~80% 的 B 液 20 min 左右,80%~100% 的 B 液 0.5 min,最后使用 100% B 液洗脱 5 min(B 液为 0.1 ml/dl 甲酸的乙腈溶液)。质谱仪在正离子模式下运行,气源温度为 325℃,源气流量为 11 L/min。每种代谢物的裂解电压在 130~175 V 范围内,保留时间固定为 50 ms,电子倍增器电压为 400 V。

**1.4 统计学分析** 运用 SPSS11.0 统计软件对数据进行分析。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。健康人群按年龄和性别分组,分别计算各组代谢物的

均值与标准差,应用方差分析比较不同年龄段对数据的影响。相关分析采用 Pearson 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。主成分分析(PCA)和 PLS 使用 AMIX 软件。非参数 Mann-Whitney 检验和 Kruskal-Wallis 检验使用 Dunn 的多重比较测试应用于数据。

## 2 实验结果

**2.1 质谱分析** 本研究分为两部分,质谱分析和预测准确率。所有尿液样品来自不同的病人和对照组。主要是通过 NMR 分析了来自 15 例患者和 15 例健康人的尿代谢组,并进行了主成分分析(PCA)检验,继续运用液相色谱-三重四极杆质谱法分析来自另外 16 例 CKD 患者和 15 例对照的尿液样本进行验证。来自 CKD 患者的 31 例尿样和健康受试者通过<sup>1</sup>H NMR 分析。根据图谱的峰值对每个样品进行 PCA 和偏最小二乘分析,结果显示各组患者代谢物的差异与年龄、药物、性别或样本无关,而主要是与 CKD 有关。因此,在探索阶段运用 NMR 技术鉴定了 29 种代谢物可以作为鉴定 CKD 的潜在生物标志,并且每种代谢物在所有募集者中全部被检测到。为了进一步评估 29 种代谢物在评价和预测 CKD 的有效性,实验采用了更高分辨率的技术,即选择反应监测(selected reaction monitoring,SRM)技术,对得到的结果进行定量分析见表 1。表 1 显示这七种尿代谢物在 CKD 患者和正常人中存在显著的差异,其中明显与 CKD 相关性的是谷氨酸、肌基乙酸酯、α-苯乙酰谷氨酰胺和 N-氧化三甲胺(在 CKD 中均增加),以及 5-羟脯氨酸、牛磺酸和枸橼酸盐(在 CKD 中均降低)。

表 1 在 CKD 和非 CKD 患者中有显著差异变化的数据

代谢物	CKD+ vs 对照		CKD- vs 对照	
	变化值	P 值	变化值	P 值
枸橼酸盐	0.025 8	0.000 2	0.093	0.000 9
鸟苷酸乙酸酯	7.549	0.000 6	6.002 5	0.000 1
牛磺酸	0.436	0.024	0.593	0.034 3
N-氧化三甲胺	4.24	0.000 4	3.423	0.000 2
谷氨酸	2.453	0.000 5	2.11	0.000 1
α-苯乙酰谷氨酰胺	1.734	0.000 6	1.836	0.007 1
5-羟脯氨酸	0.144	0.000 2	0.166	0.000 1

**2.2 预测准确率** 本研究中利用质谱分析结合选择反应监测技术,鉴定了 CKD 患者正常人尿液中有七种代谢物具有显著性差异,根据检测这些代谢物的变化趋势能够判断是否患有 CKD。为了验证这些代谢物在鉴定 CKD 患者中的作用,本研究进

行了盲性实验。通过募集 CKD 患者和正常人,检测他们尿液中这七种代谢物的含量,预测他们是否为 CKD 患者或者正常人。实验结果显示,根据对所收集样本的代谢物分析发现,5 例 CKD 患者中有 4 例被鉴定为 CKD 患者(80%准确性),7 例健康人中有 6 例被划分到对照区(86%准确性)。这些结果说明本研究中鉴定的七种代谢物谷氨酸、肌基乙酸酯、 $\alpha$ -苯乙酰谷氨酰胺、N-氧化三甲胺、枸橼酸盐、5-羟脯氨酸和牛磺酸作为鉴定 CKD 的生物标志物具有较高的可靠性。

3 讨论 目前,我国 CKD 发病率呈升高趋势,其原因是缺乏特异度高的早期诊断方法。过去用来检测 CKD 患者主要是通过检测 eGFR 和蛋白尿的含量。但是 eGFR 受肌肉质量、年龄、种族和早期评估的影响,并不能十分准确地反映出 CKD 患者进展阶段。尽管后来的研究鉴定了如中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(NGAL)和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 也与 CKD 进展有关,但是这些研究仅仅建立在非常有限的研究对象基础上,而且不同的研究中采用的诊断标准及方法也会造成诊断效能评估等结果的差异。质谱检测技术可以大规模高通量筛选代谢物,具有高特异度和灵敏度,且可将传统方法检测不到的化合物检出。然后,再用 LC-MS 技术将患者和正常人的质谱图进行定量分析,以鉴定尽可能多的具有差异的代谢物信息和鉴定新的生物标志物。其优势在于:能够直接检测分析患者的原始样品,灵敏度高,特异度好,所需样品数量少;分析简便,高通量大规模筛选;结果可靠,重复性好。在本研究中,通过质谱检测对比 CKD 晚期阶段(3~5 期)患者和健康志愿者的尿液代谢物,发现了 CKD 患者尿代谢物中有七种代谢物可以明显表征 CKD。

根据文献报道几型肾脏损伤中转录组数据显示 5-羟脯氨酸酶上升 22%,而  $\gamma$ -谷氨酰转移酶的表达降低<sup>[7]</sup>,这些数据变化与本研究中的数据一致,在 CKD 患者尿液中 5-羟基脯氨酸降低而谷氨酸升高。苯乙酰谷氨酰胺在肝脏和肾脏中由苯乙酸酯和谷氨酰胺合成并通过尿液排泄体外。苯基丁酸酯和苯乙酸酯在患有尿素循环障碍的患者被用作氮循环的替代途径,因此苯乙酰谷氨酰胺作为有效的替代载体可以降低这些患者的氮水平<sup>[8]</sup>。在 CKD 患者中,由于肾脏功能下降导致尿素积累,这可以解释在 CKD 患者中苯乙酰谷氨酰胺的增加,作为氮排泄的补偿机制。牛磺酸能偶促进一些离子的转运如钠离子、钾离子、钙离子和镁离子,有研究表明在高血压和肾衰竭患者血浆中的牛磺酸降低,这也与本实验发现 CKD 患者中低牛磺酸

相一致<sup>[9]</sup>。N-氧化三甲胺在肾衰竭患者中上升,在本研究中同样发现在 CKD 患者中 N-氧化三甲胺上升<sup>[10]</sup>。由于肾功能下降导致尿素和肌酐增加,而 N-氧化三甲胺是机体用来抵消这些物质。实验中发现 CKD 患者中枸橼酸盐水平降低<sup>[11]</sup>。与前人的发现一致。此外,几种代谢紊乱与低枸橼酸盐相关,包括肾小管 pH 或细胞内 pH 降低,例如 CKD 患者特别是晚期阶段存在的代谢性酸中毒<sup>[12]</sup>。

此外,利用本研究中鉴定的其中代谢物预测 CKD 患者和正常人,其中 CKD 患者准确性达到 80%,正常人的准确性高达 86%,仅仅只有两例预测错误。表明这 7 种生物标志物不仅仅可以用于正常人 CKD 的诊断,更具有意义的是可准确判断 CKD。因此,我们认为本研究中鉴定的 7 种代谢物可以作为判定 CKD 的标志物,有助于识别和监测 CKD 的进展阶段。

#### 参考文献:

- [1] DRAWZ P, AHMAN M. Chronic kidney disease[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2015, 162(11): ITC1.
- [2] 文集,谢席胜,张明华,等. 基于创新中医理论辨证施治慢性肾脏疾病的临床研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(1): 34-38.  
WEN Ji, XIE Xisheng, ZHANG Minghua, et al. Management of chronic kidney disease guided by the theory of traditional Chinese Medicine: an experimental study[J]. *Journal of Sichuan University(Medical Edition)*, 2014, 45(1): 34-38.
- [3] 张晓敏,刘宏,刘必成. 高尿酸血症与慢性肾脏病发生发展关系的研究进展[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2013, 32(1): 114-117.  
ZHANG Xiaomin, LIU Hong, LIU Bicheng. Progress in the relationship between hyperuricemia and the development of chronic kidney disease[J]. *Journal of Southeast University(Medical Edition)*, 2013, 32(1): 114-117.
- [4] 阙凤连,肖文霞,吴一行. 2 型糖尿病患者内生肌酐清除率与慢性并发症的关系[J]. *广东医学*, 2014, 35(13): 2022-2024.  
QUE Fenglian, XIAO Wenxia, WU Yixing. Relationship between creatinine clearance and chronic complications in patients with type 2 diabetes[J]. *Guangdong Medicine*, 2014, 35(13): 2022-2024.
- [5] PERALYA C A, SHLIPAK M G, JUDD S, et al. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and

- mortality[J]. the Journal of the American Medical Association, 2011, 305(15): 1545-1552.
- [6] 王小丽, 刘瑞东. 尿 TGF- $\beta$ 1 检测在诊断慢性肾炎中的临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(1): 88-90.
- WANG Xiaoli, LIU Ruidong. Clinical application of urinary transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ 1) measurement in diagnosing chronic nephritis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(1): 88-90.
- [7] POSADA-AYALA M, ZUBIRI I, MARTIN-LORENZO M, et al. Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease[J]. Kidney International, 2014, 85(1): 103-111.
- [8] PHISITKUL S, KHANNA A, SIMONI J, et al. Amelioration of metabolic acidosis in patients with low GFR reduced kidney endothelin production and kidney injury, and better preserved GFR[J]. Kidney International, 2010, 77(7): 617-623.
- [9] GAO X, CHEN W, LI R, et al. Systematic variations associated with renal disease uncovered by parallel metabolomics of urine and serum[J]. BMC Systems Biology, 2012, 6(1): S14.
- [10] QI S, OUYANG X, WANG L, et al. A pilot metabolic profiling study in serum of patients with chronic kidney disease based on  $^1\text{H}$ -NMR-Spectroscopy[J]. Clinical and Translational Science, 2012, 5(5): 379-385.
- [11] 王一多, 金英玉, 关秀茹. 肾脏水通道蛋白-1 (AQP-1) 的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(3): 162-164.
- WANG Yiduo, JIN Yingyu, GUAN Xiuru. Progress in the research of aquaporin-1 (AQP-1) of the kidney [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(3): 162-164.
- [12] 王尉, 高志琪. 慢性肾病贫血患者血清 NGAL 水平与缺铁状态的临床相关研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(3): 119-122.
- WANG Wei, GAO Zhiqi. Clinical study on NGAL and iron status in patients with chronic renal anemia [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(3): 119-122.

收稿日期: 2017-12-08

修回日期: 2018-07-30

(上接 92 页)

- [4] PETRUCCI R, LOMBARDI G, CORSINI, et al. QuantiFERON-TB Gold In-Tube improves tuberculosis diagnosis in children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(1): 44-49.
- [5] WONG K S, HUANG Y C, HU H C, et al. Diagnostic utility of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test in pediatric tuberculosis disease in Taiwanese children[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2017, 50(3): 349-354.
- [6] LODHA R, MUKHERJEE A, SAINI D, et al. Role of the QuantiFERON(R)-TB Gold In-Tube test in the diagnosis of intrathoracic childhood tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2013, 17(11): 1383-1388.
- [7] BAO L, LI T, DIAO N, et al. Fluctuating behavior and influential factors in the performance of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in the diagnosis of tuberculosis[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e103763.
- [8] GAO Y, OU Q F, HUANG L F, et al. Improved diagnostic power by combined interferon-gamma release assay and nested-PCR in tuberculous pleurisy in high tuberculosis prevalence area[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2012, 66(3): 393-398.
- [9] GRARE M, DERELLE J, DAILLOUX M, et al. Difficulties of TB diagnosis in children: QuantiFERON TB Gold In-Tube as useful tool[J]. Arch Pediatr, 2010, 17(1): 77-85.
- [10] LOSI M, BOCCHINO M, MATARESE A, et al. Role of the QuantiFERON-TB test in ruling out pleural tuberculosis: a multi-centre study[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2011, 24(1): 159-165.
- [11] MUKHERJEE A, SAINI S, KABRA S K, et al. Effect of micronutrient deficiency on QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test in diagnosis of childhood intrathoracic tuberculosis[J]. Eur J Clin Nutr, 2014, 68(1): 38-42.
- [12] ROSE M V, KIMARO G, KROIDL I, et al. Evaluation of QuantiFERON microtube, using 0.9 ml blood, for diagnosing tuberculosis infection[J]. The European Respiratory Journal, 2013, 41(4): 909-916.
- [13] METIN T O, TANIR G, OZ F N, et al. Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test with tuberculin skin test in children who had no contact with active tuberculosis case[J]. Tuberk Toraks, 2014, 62(2): 116-121.

收稿日期: 2018-09-04

修回日期: 2018-09-19