

吴学海, 杨一言, 王晓堂, 等. 过表达 miR-181a-5p 的口腔癌皮下移植瘤小鼠模型的小肠代谢组学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 8-17.

Wu XH, Yang YY, Wang XT, et al. A subcutaneous transplanted tumor mouse model of oral cancer overexpressing miR-181a-5p study of small intestine metabolomics [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 8-17.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.002

过表达 miR-181a-5p 的口腔癌皮下移植瘤小鼠模型 的小肠代谢组学研究

吴学海^{1#}, 杨一言^{2#}, 王晓堂², 陈文璐², 宋晓娜², 王 恬¹, 宋国华^{1,2,3*}

(1. 山西医科大学口腔医学院, 口腔疾病防治与新材料山西省重点实验室, 太原 030001;

2. 山西医科大学基础医学院, 太原 030001; 3. 山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型
山西省重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 目的 通过检测口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠中代谢物和代谢通路的变化, 分析过表达 miR-181a-5p 对皮下移植瘤小鼠小肠中代谢物和代谢物组的影响。**方法** 实验分为 3 组, 空白对照 (Control) 组、阴性对照 (negative control, NC) 组以及实验 (over expression of miR-181a-5p, OE) 组。将不同组别处理后的细胞混悬液, 通过皮下注射到 M-NSG 重度免疫缺陷雌性小鼠右侧腹股沟中上部, 构建成功腔癌皮下移植瘤小鼠模型。按时记录小鼠体重变化, 对小鼠小肠组织进行 HE 染色, 观察各组病理变化。采用超高效液相色谱-串联飞行时间质谱联用仪和串联 Orbitrap 质谱联用仪检测 NC 组、OE 组和 Control 组小鼠小肠中的代谢物, 使用 XCMS 预分析原始数据, 质量评价样本数据, 鉴定 Control 组与 NC 组、NC 组与 OE 组的差异代谢物, 进行 KEGG 富集分析获取差异代谢通路。**结果** Control 组和 NC 组小肠组织中共鉴定出 170 种差异代谢物。代谢物富集的显著性信号通路包括胆碱代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、 γ -氨基丁酸 (GABA) 神经突触代谢、甘油磷脂代谢、环磷酸腺苷 (cAMP) 信号通路代谢、癌症中心碳代谢以及烟酸和烟碱胺代谢通路。NC 组和 OE 组相比, 小鼠小肠中检测到 VIP (variable importance in the projection) > 2 的差异代谢物有 16 种, 显著性差异代谢物包括甘油磷酸胆碱、棕榈酸、3-羟基丁酰肉碱、 β -羟丁酸等。代谢物富集到的显著性差异通路为胆碱代谢通路。**结论** 口腔癌皮下移植瘤可引起小鼠小肠的代谢物发生变化, 主要改变了小肠中与能量代谢相关的代谢物。过表达 miR-181a-5p 影响口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠代谢物, 代谢物富集通路为胆碱代谢通路。

【关键词】 口腔癌; 皮下移植瘤; 小肠; 代谢组学; miR-181a-5p

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0008-10

A subcutaneous transplanted tumor mouse model of oral cancer overexpressing miR-181a-5p study of small intestine metabolomics

WU Xuehai^{1#}, YANG Yiyang^{2#}, WANG Xiaotang², CHEN Wenlu², SONG Xiaona², WANG Tian¹, SONG Guohua^{1,2,3*}

(1. Shanxi Medical University School of Stomatology, Shanxi Provincial Key Laboratory of Oral Disease Prevention and New Materials, Taiyuan 030001, China. 2. Shanxi Medical University School of Basic Medicine, Taiyuan 030001.

3. Shanxi Medical University Experimental Animal Center, Experimental Animals and Animal Models of Human Disease Key Laboratory of Shanxi Province, Taiyuan 030001)

【基金项目】 国家自然科学基金 (31772551); 中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2022A060); 山西省回国留学人员科研项目 (2021-086); 山西省科技创新人才团队项目 (202204051002032); 山西省自然科学基金 (20210302124093)。

【作者简介】 吴学海 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 口腔肿瘤疾病机制研究。E-mail: 1936910400@qq.com

杨一言 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: winnter9841@163.com

[#]共同第一作者

【通信作者】 宋国华 (1973—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

[Abstract] Objective To analyze the effects of miR-181a-5p overexpression on metabolites in the small intestines of mice with subcutaneous oral cancer by detecting changes in metabolites and metabolic pathways. **Methods** Three groups were included in study: Control group, negative control and miR-181a-5p overexpression group. To establish a subcutaneous oral cancer model in mice, variously treated cell suspensions were subcutaneously injected into the upper right of the groin in female M-NSG severely immunodeficient mice. Changes in pathology and small intestinal tissues were assessed by HE staining. Changes in mouse body weight were also assessed. Tandem orbitrap mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography-tandem time-of-flight mass spectrometry, were used to examine metabolites in the small intestines. By pre-analyzing the original data and quality rating sample data, XCMS was able to assess which metabolites were different among the groups. To identify unique metabolic pathways, KEGG enrichment analysis was used. **Results** A total of 170 distinct metabolites were found in the small intestinal tissues of Control and NC groups. Choline metabolism, alanine, aspartate, and glutamate metabolism, GABA synaptic metabolism, glycerophospholipid metabolism, cAMP signaling route, cancer center carbon metabolism, and niacin and niacin amine metabolic pathways were important signaling pathways for metabolite enrichment. In the NC group, 16 distinct metabolites with VIP values larger than 2 were found in the small intestines compared with the OE group overexpressing miR-181a-5p. Glycerin phosphorylcholine, palmitic acid, 3-hydroxybutyl carnitine, and β -hydroxybutyric acid were among the metabolites that significantly varied. The primary enhanced metabolic pathway was the choline pathway. **Conclusions** Mouse small intestines underwent slight changes from subcutaneous oral cancer with the greatest effect on metabolites critical for energy metabolism. The choline metabolic pathway was the pathway that selected absolutely metabolites in mouse small intestines with subcutaneous grafts of oral cancer.

[Keywords] oral cancer; subcutaneously transplanted tumor; small intestines; metabolomics; miR-181a-5p

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

口腔癌常发生于患者口腔的舌部、颊部、唇部和腭部,是一种危害性极大的恶性肿瘤^[1]。2022 年中国和美国共报道新发口腔癌病例 56 943 例,在 2020 年的统计中显示其总患病数在恶性肿瘤中位于第 16 位^[2-3]。恶病质是晚期恶性肿瘤进展进程中同时诱发的一种机体的不良状态,致使患者生活质量明显降低,机体健康状况出现急剧恶化^[4]。小鼠模型常常被用于研究各类肿瘤状态下不同组织和器官的病理变化,可作为研究不同器官代谢功能改变的工具^[5-6]。小肠代谢组的变化在口腔癌恶病质状态下具有重要的研究意义,基于此本研究拟利用代谢组学探究皮下移植瘤小鼠模型中小肠的代谢变化。代谢组学能系统全面的分析目标检测物中代谢物组的差异,在医学相关实验中,代谢组学作为挖掘生物各组织样本的代谢差异有重要的作用^[7-8]。微小 RNA (microRNA) 是一类非编码并且起到多种调控功能的小分子,大量研究表明 miR-181a-5p 参与到多种疾病的发生发展,且在口腔癌中参与调控^[9]。为了进一步筛选在口腔癌皮下移植瘤小鼠模型中与小肠代谢相关的差异代谢物,同时分析过表达 miR-181a-5p 对该状态下小肠代谢物和代谢物组的影响,本研究将采用非靶向代谢组学方法,筛选空白对照组与阴性对照组小鼠模型肠道中的差异代谢物与代谢通路,对比阴性对照组和实

验组,探究过表达 miR-181a-5p 对口腔癌皮下移植瘤小鼠模型肠道代谢的影响,阐明口腔癌状态下及 miR-181a-5p 过表达后的小肠代谢物组和代谢标志物的变化,以期患者的营养支持和全身健康的恢复提供帮助。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20 只 SPF 级 M-NSG 雌性小鼠,体重(20 $\pm$ 2)g,4~6 周龄,购自上海南模生物科技股份有限公司[SCXK(沪)2019-0002]。动物饲养于山西省人民医院实验动物中心屏障环境动物实验设施中心[SYXK(晋)2019-0003]。环境温度(24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,环境湿度(40 $\pm$ 10)%,设施内光暗循环昼夜各半。本研究中所有涉及的动物实验均已得到山西医科大学实验动物伦理委员会的批准(2021013),动物实验中的各项操作均符合 3R 原则以遵循实验动物福利伦理。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖液体培养基(批号:PYG0073,武汉博士德公司);胎牛血清(批号:FS301-02,北京塞澳美细胞技术有限公司);双抗(批号:PYG0016,大连美仑生物技术有限公司);甲醇(批号:A456-4,美国 Fisher 公司);乙腈(批号:1499230-935,美国 Merck

公司);乙酸铵(批号:73594,美国 Sigma 公司)。

干燥烘箱(华北实验仪器有限公司);倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);轮转切片机(德国 Leica 公司);高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);超低温冰箱(日本三洋电器株式会社公司);AB Triple TOF 6600 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(美国 Agilent 公司);色谱柱(2.1 mm×100 mm column, 1.7 μm , Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞悬液制备

培养 CAL-27 细胞以及前期实验构建的过表达 miR-181a-5p 的 CAL-27 细胞,每类各 8 瓶制取细胞悬液。每瓶添加 1 mL 胰酶,然后移置细胞培养箱,时间分别为 NC 组消化 2~3 min,OE 组消化 70 s。培养瓶置于倒置显微镜下观察,待见到胞质回缩,各组细胞悬浮后,在各个培养瓶中加入 1 mL 完全培养基以停止消化。悬浮液是通过对培养瓶中贴壁细胞的充分吹打混合后,置于离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液后重悬的细胞。细胞计数所得细胞悬液的浓度,目标浓度为 $5\times 10^6/\text{mL}$ 。各组小鼠皮下注射细胞数目设置为 5×10^5 个,接种体积为 0.1 mL。

1.3.2 肿瘤接种分组及体重记录

重度免疫缺陷小鼠(NOD-PrkdcscidIl2rgem1/Smoc, M-NSG)适应设施环境 1 周后,对每只小鼠进行消毒处理,注射提前配备的细胞悬液于小鼠右侧腹股沟中上部。各组小鼠接种分组如下:不进行任何处理的空白对照(Control)组($n=6$)、注射口腔癌 CAL-27 细胞的阴性对照(negative control, NC)组($n=7$)和注射过表达 miR-181a-5p 的 CAL-27 细胞的实验(over expression of miR-181a-5p, OE)组($n=7$)。注射细胞混悬液后,各组小鼠饲养于 IVC 笼具中,记录小鼠活动状态及注射后成瘤进展。注射后的 1 周为成瘤缓冲期,固定每周两次观察记录小鼠成瘤情况,发现瘤体后开始每天称取观察记录小鼠的体重变化。

1.3.3 样本的取材和固定

终止实验使用麻醉试剂安乐死处理 M-NSG 小鼠,迅速取出小肠组织,用 0.9% 生理盐水冲洗干净。小肠样本分为两份,一份用于病理组织染色观察,一份置于液氮中冷冻储存 30 min 后,移置-80℃ 冰箱中存储,后续进行组学分析。

1.3.4 小肠组织苏木素-伊红染色

石蜡包埋小肠组织,并通过石蜡切片机对小肠组织进行切片,切片厚度为 4 μm 。小肠切片经过脱蜡和脱水后,使用苏木素染液和伊红染液对小肠组织进行染色,封片,显微镜下观察组织形态变化。

1.3.5 代谢组学样本制备

所得样本均放置在 4℃ 恒温环境下,缓慢解冻,取合适体积的样本加入已预冷过并按照(2:2:1, v/v/v)配备的甲醇:乙腈:水溶液中,涡旋旋转充分混合,低温超声溶解 30 min,并于-20℃ 的恒温环境中放置 10 min,4℃ 14 000 r/min 离心 20 min,离心完毕后,提取所得上清液,真空下干燥处理。质谱分析时,先添加 100 μL 乙腈水溶液(乙腈:水=1:1, v/v),复溶干燥后的样本,涡旋,14 000 r/min,4℃ 离心 15 min,后续样本分析使用的即为所得上清液。

1.3.6 小肠非靶向代谢组学分析

(1) 样本准备

小肠组织样品通过 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统(UHPLC)中的 HILIC 色谱柱分离;柱温 25℃,总流速 0.5 mL/min,进样量 2 μL ;两种电离模式流动相成分的构成为 A(水,25 mmol/L 氨水和 25 mmol/L 乙酸铵)和 B(乙腈),色谱系统设置梯度洗脱条件。系统梯度洗脱的步骤:先 0~0.5 min,95%的 B→0.5~7 min 后,使得 B 从 95%线性下调到 65%→7~8 min 之后,将 B 从 65%线性下调到 40%→8~9 min 之后,将已得 B 维持在 40%;9~9.1 min 之后,B 从 40%线性调整至 95%;9.1~12 min 后,使 B 稳定维持在 95%;整个液相色谱分析和操作的过程中小肠样本均放置在温度为 4℃ 的自动进样器中。为使仪器检测信号稳定减少干扰,随机选择分析后续样本。样品整个操作中通过使用添加使用质量控制(QC)样品的方式,该样品可用于监测系统和评价实验数据是否可靠。

(2) 小肠非靶向代谢组学分析

在 Q Exactive 质谱的条件下,使用 AB Triple TOF 6600 质谱仪收集样本的一级和二级谱图,使用 Agilent 1290 Infinity LC - 超高效液相色谱仪(UHPLC)获取结果。对已有小肠组织样本充分分离处理后,质谱系统使用 Triple TOF 6600-质谱仪(AB SCIEX)、电喷雾电离(ESI)检验样本正离子和负离子模式。ESI 源采用以下设置参数值:辅助加热雾化气体 1(Gas1): 60,辅助加热 2(Gas2): 60,幕气参数(CUR): 30 psi,离子源温度 600℃,喷雾电压(ISVF) ± 5500 V(正负的两种不同模式)。60~1000

Da 作为一阶质荷比所检测时的具体范围,25~1000 Da 作为二阶质荷比所检测时的范围。一次质谱扫描时的所累积的时间具体设置为每谱 0.20 s,二次质谱扫描时的所累积的时间具体设置为每谱 0.05 s。对于二次不同的质谱捕获,采用数据依赖采集型方法(IDA),通过将同位素离子所去除的范围调整为 4 Da 并对每回扫描捕捉的 10 个有关联碎片图来筛选处理峰值强度值。参数设置:去簇电压(DP)为 60 V(+)和-60 V(-);碰撞能量(CE)固定在(35±15) eV。

(3) 小肠非靶向代谢组学数据处理

ProteoWizard MSConvert 系统将初始的 MS 数据再更改转化为 MzXML 类型的文件后,通过 XCMS 程序对已有数据进行分析。在拾取峰值时,各参数分别设置为:厘米波(m/z)10 ppm,峰宽 $c(10,60)$,以及预滤器 $c(10,100)$ 。对于峰值分组, $bw=5$, $mzwid=0.025$, $minfrac=0.5$ 。CAMERA (MEtabolite pRofile 注释的算法集合)被用于同位素和加合物的注释。提取离子特征后变量存在有超过 50% 为非零测量值时对其储存保留至少 1 组。代谢物的化合物鉴定是通过比较准确度 m/z 值(<10 ppm)和 MS/MS 谱与可用的真实标准建立的内部数据库进行的。

整理后的数据再进行求和以及标准化后,通过 R 程序包(ropls)进行多元数据整理,主成分分析(PCA)使用帕累托尺度,并分析正交偏最小二乘判别式(OPLS-DA)。为了对模型稳健性进行综合的评价,通过置换检验对其整理分析。计算 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 VIP 值,以表示其对分类的贡献。在对两组独立的样本间进行差异的显著性分析时,采用的是 Student's t 检验的方式进行判别。为了筛选发现样本代谢物之间是否存在较为显著的变化时设置样本的筛选条件为 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 。两个独立变量之间判定是否存在相关性时使用的分析方法为 Pearson 相关分析。

1.4 统计学方法

统计学方法使用 SPSS 23.0 软件分析,数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。单因素方差分析组间数据。独立样本 t 检验进行组内的比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 口腔癌皮下移植瘤小鼠模型小肠组织的病理改变及体重变化

小鼠小肠组织病理切片结果显示,Control 组小鼠小肠绒毛排列规则有序,相邻绒毛间形成界限清

晰的隐窝,并且显示出大量横截的肠绒毛;NC 组小鼠小肠绒毛发生较多脱落,排列疏松无规则,部分上皮层和固有层存在间隙;OE 组小鼠肠绒毛部分连续规则,同时可见较深的肠隐窝(图 1A)。各组小鼠体重有很大变化,Control 组小鼠平均体重在肿瘤成模前后没有显著性差异,NC 组小鼠肿瘤成模后体重明显下降,下降率为 10.27%。OE 组小鼠平均体重在实验开始和结束时没有显著差异(图 1B)。

2.2 代谢组学的多元统计分析

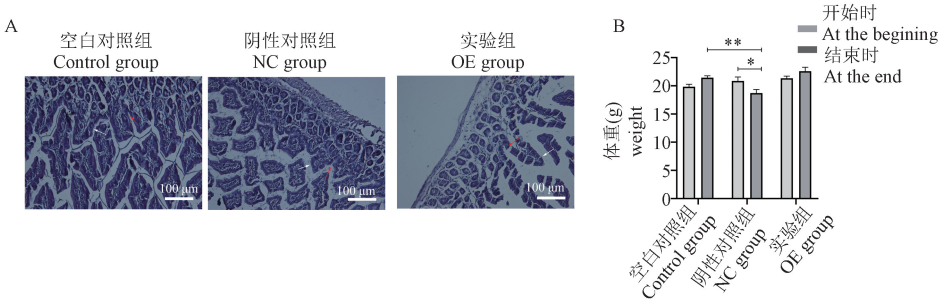
在 PCA 评分图中,Control 组和 NC 组、OE 组和 NC 组之间的代谢轨迹有明显的分离,Control 组和 OE 组的各个检测样本偏离不明显(图 2A~2D)。口腔癌皮下成瘤后使 M-NSG 的代谢网络改变,轨迹发生变化,将 Control 组、NC 组和 OE 组之间的 RT、 m/z 和 ProgenesisQI 预处理峰高强度的广泛多维矩阵导出到 EZinfo 插件中进行模式识别分析。从正离子模式和负离子模式(图 2E~2H)来看,不同组的 OPLS-DA 评分图很好地分离,这表明在 CAL-27 皮下成瘤后和过表达 miR-181a-5p 后,小肠的代谢水平都发生了显著变化。对各组模型使用置换检验检测模型拟合,结果显示模型稳健(图 2I~2L)。

2.3 口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠中潜在差异代谢物的检测

Control 组和 NC 组中共检测到 170 种差异代谢物,包括胆碱、谷氨酰胺、3-脱氢胆酸、胆酸、磷酸胆碱、磷酸甘油、3-羟基丁酰肉碱、胆红素、鞘磷脂等。差异代谢物层次聚类热图显示 Control 组和 NC 组代谢物在正离子模式和负离子模式下的改变(图 3A、3B)。显著性差异代谢差异倍数变化(正负模式)结果表明,口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠中 3-羟基丁酰肉碱、3-脱氢胆酸、胆酸、磷酸胆碱等代谢改变明显(图 3C、3D)。

2.4 口腔癌皮下移植瘤小鼠模型小肠的差异代谢物通路富集分析

为了了解变化明显的 170 个代谢物在小肠中的代谢途径以及相关网络,将全部生物代谢物导入 Metabo Analyst 4.0 中分析。为了确定显著改变的代谢途径,对差异代谢物进行 KEGG 通路富集分析。分析结果发现主要富集通路为胆碱代谢、丙氨酸代谢、天冬氨酸代谢、谷氨酸代谢、甘油磷脂代谢、GABA 神经突触代谢、cAMP 信号通路代谢、癌症中心碳代谢,其中烟酸和烟碱胺代谢通路是口腔癌皮下移植瘤小鼠模型中筛选到的主要显著性代谢改变通路(图 4)。

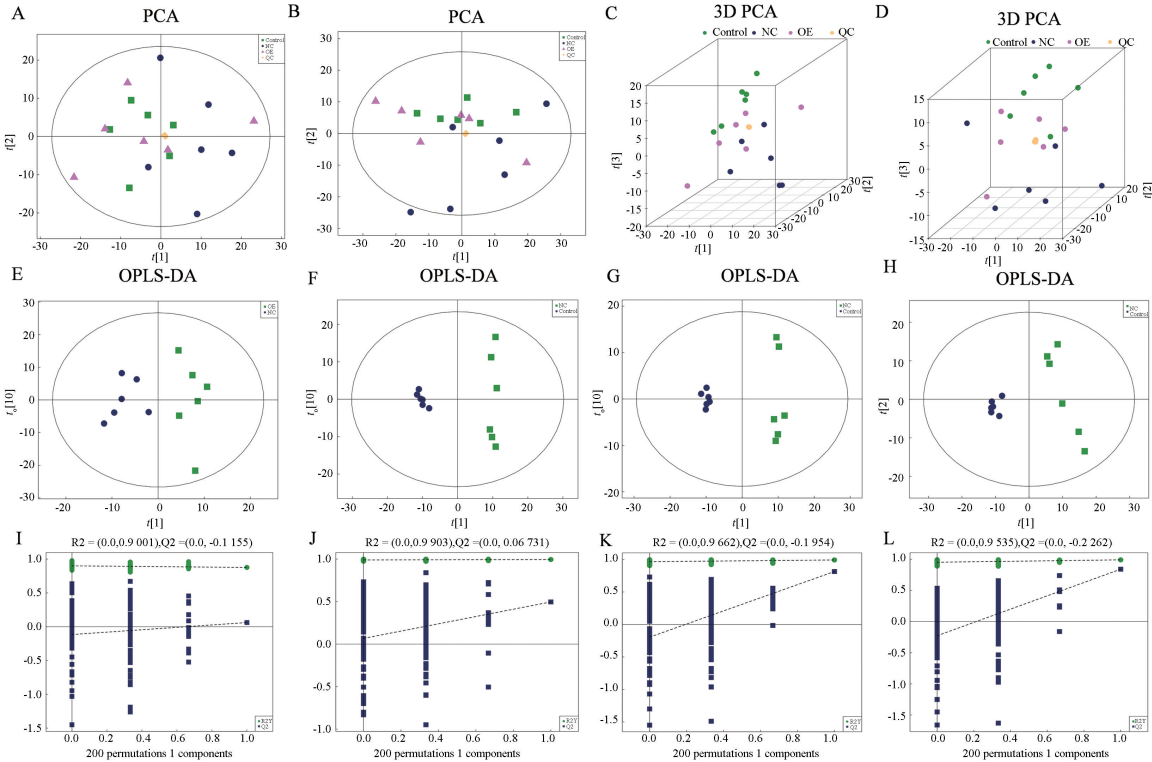


注:白色箭头:肠绒毛;红色箭头:肠隐窝。与不同组别相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 各组小鼠模型小肠组织病理学形态和实验开始时和结束时体重对比

Note. White arrowhead, intestinal villus. Red arrowhead, intestinal crypts. Compared between different groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Comparison of histopathological morphology of small intestine and body weight at the beginning and end of tumorigenesis in mice of each group



注:A:正离子模式总体样本的 PCA 分析;B:负离子模式总体样本的 PCA 分析;C:正离子模式样本的 3D PCA 分析;D:负离子模式样本的 3D PCA 分析;E:OE vs NC 组正离子模式 OPLS-DA 图;F:OE vs NC 组负离子模式 OPLS-DA 图;G:NC vs Control 组正离子模式 OPLS-DA 图;H:NC vs Control 组负离子模式 OPLS-DA 图;I:OE vs NC 组正离子模式 PLS-DA 置换检验;J:OE vs NC 组负离子模式 PLS-DA 置换检验;K:NC vs Control 组正离子模式 PLS-DA 置换检验;L:NC vs Control 组负离子模式 PLS-DA 置换检验。

图 2 各组间的多元统计分析图

Note. A, PCA analysis of total samples in positive mode. B, PCA analysis of total samples in negative mode. C, 3D PCA analysis of total samples in positive mode. D, 3D PCA analysis of total samples in negative mode. E, OE vs NC group positive mode OPLS-DA score plot. F, OE vs NC group negative mode OPLS-DA score plot. G, NC vs Control group positive mode OPLS-DA score plot. H, NC vs Control group negative mode OPLS-DA score plot. I, OE vs NC group positive mode PLS-DA permutation test. J, OE vs NC group negative mode PLS-DA permutation test. K, NC vs Control group positive mode PLS-DA permutation test. L, NC vs Control group negative mode PLS-DA permutation test.

Figure 2 Multivariate statistical analysis chart between groups

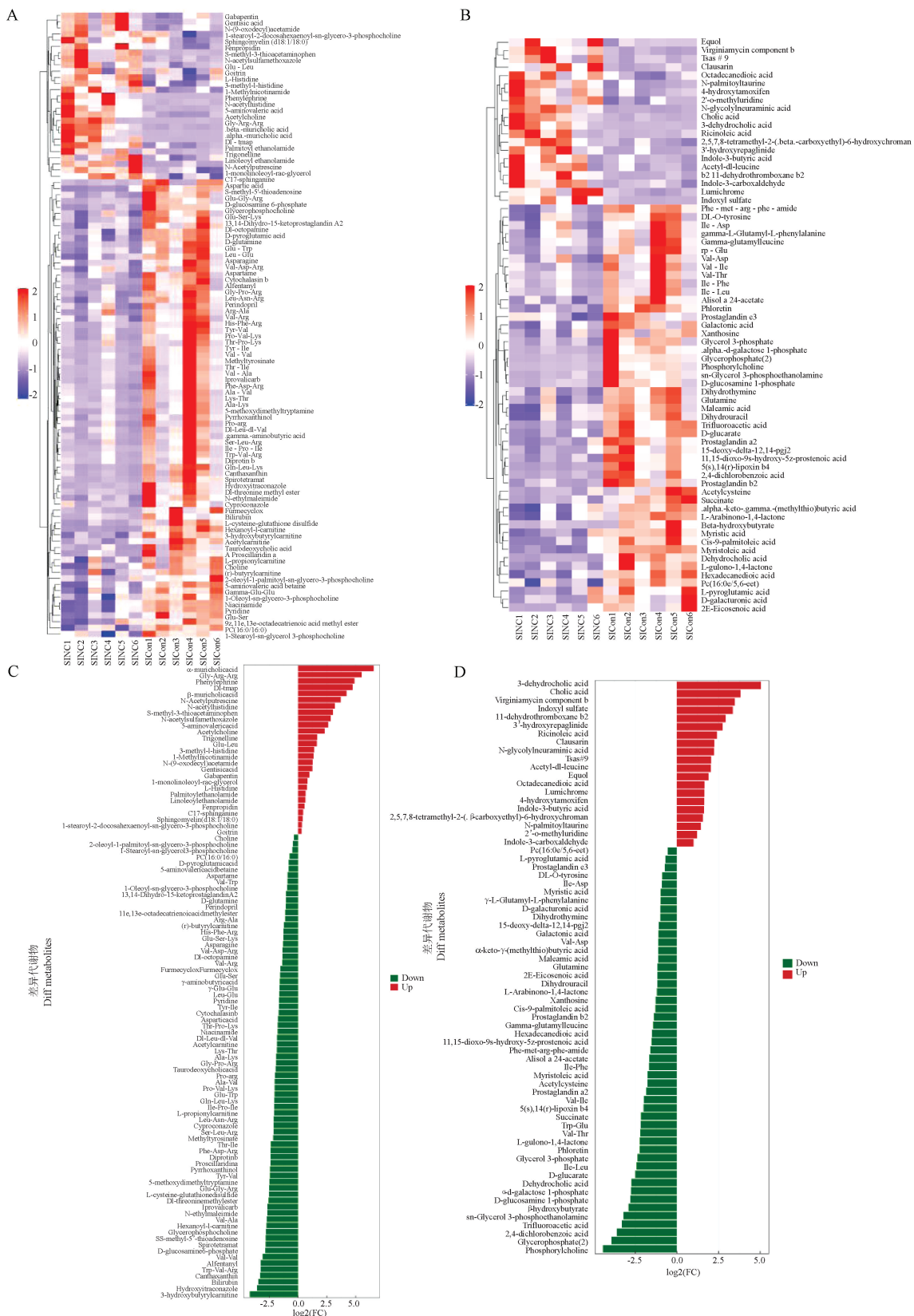


图3 正负离子模式口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠代谢物层次聚类热图和代谢物表达倍数分析图

Figure 3 Mice with subcutaneous implanted oral cancer tumors underwent hierarchical clustering heat map and metabolite expression fold analysis both in positive and negative ion modalities

2.5 过表达 miR-181a-5p 对口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠组织的代谢组学的影响

通过 Student's *t* 检验进行数据分析,代谢物筛选条件为 VIP>2、*P*<0.05,对比分析 NC 组和 OE 组小肠中明显差异代谢物。小肠组织中代谢物的

结构鉴定,以及代谢物的信息是否匹配都通过对现有数据库的数据进行比对后进行。结果鉴定到 OE 组和 NC 组中共有 16 种显著性差异代谢物,代谢物种类详见表 1。当 VIP>1 时,39 种代谢物被检测到。小肠组织中的差异代谢物热图结果表明

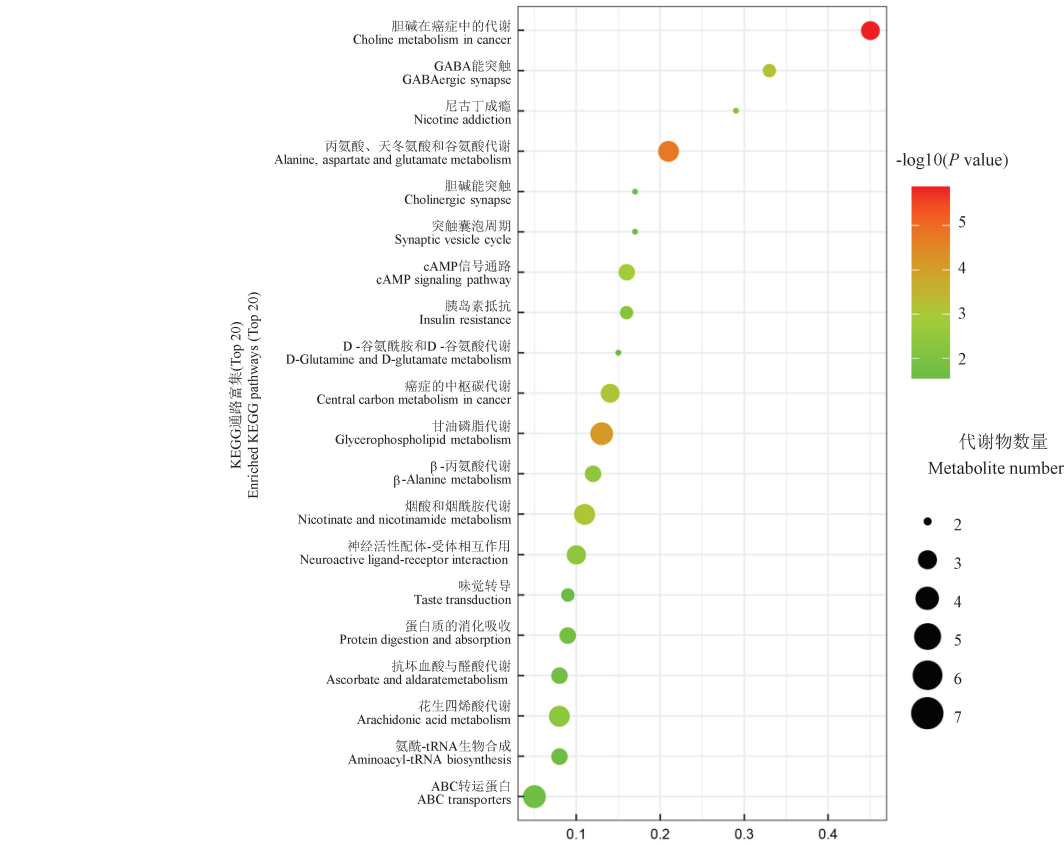


图 4 KEGG 富集通路图(气泡图)

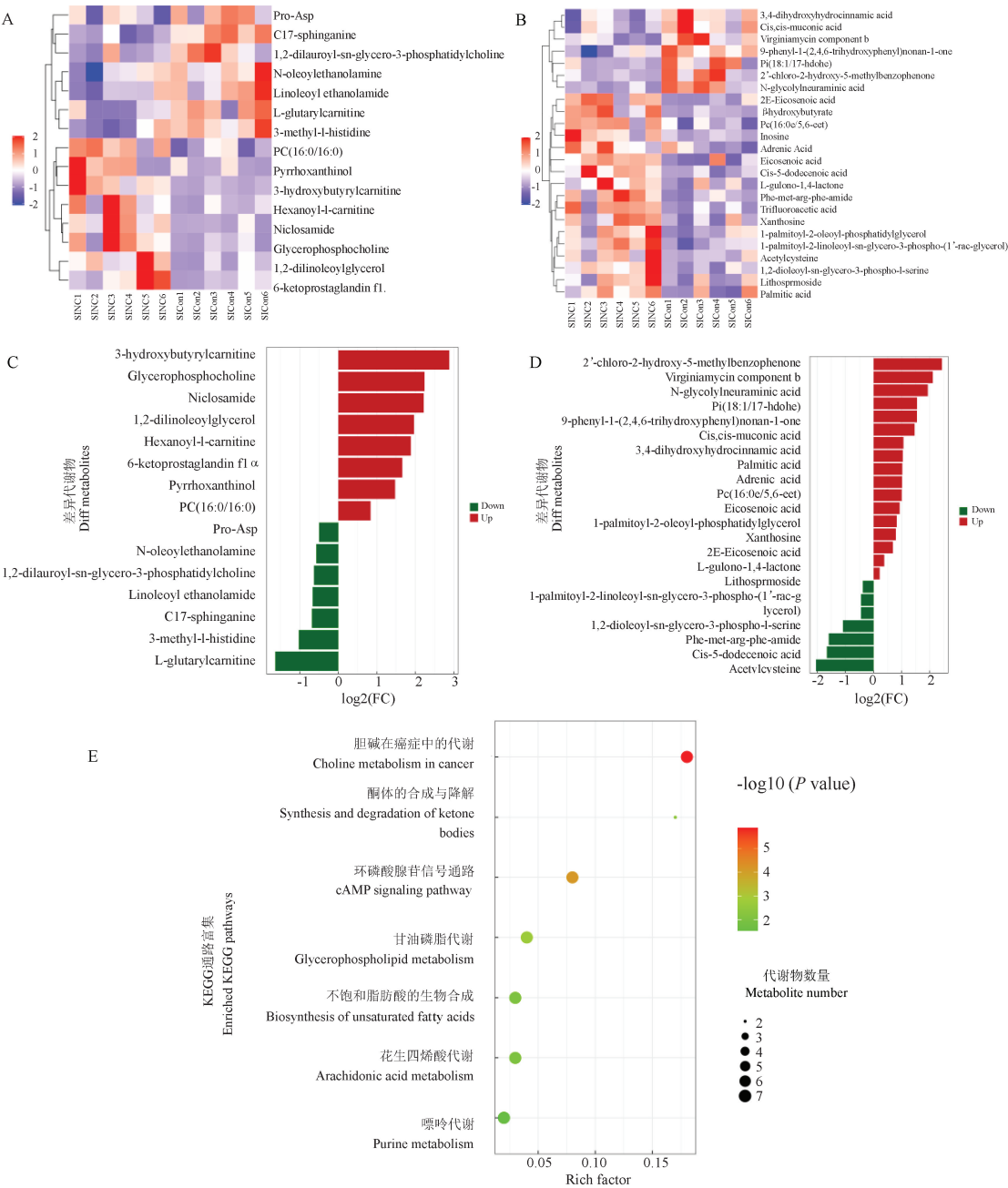
Figure 4 KEGG enrichment pathway diagram (bubble diagram)

表 1 过表达 miR-181a-5p 后口腔癌皮下移植小鼠模型小肠中鉴别到的差异代谢物($\bar{x}\pm s$)

Table 1 After overexpression of miR-181a-5p, different metabolites were discovered in the small intestine in a mouse model for subcutaneous grafted oral cancer						
名称 Name	变量投影重要度 VIP	差异倍数 FC	<i>P</i>	质荷比 m/z	保留时间(s) RT	
甘油磷酸胆碱 Glycerophosphocholine	27.31	4.71	0.02	258.11	360.92	
棕榈酸 Palmitic acid	11.93	1.16	0.03	255.23	44.42	
3-羟基丁酰肉碱 3-hydroxybutyrylcarnitine	6.24	7.35	0.02	248.15	290.43	
顺-粘康酸 Cis-muconic acid	5.43	0.73	0.02	141.02	335.45	
3-甲基-L-组氨酸 3-methyl-L-histidine	4.28	0.49	0.00	170.09	367.33	
三氟乙酸 Trifluoroacetic acid	3.74	3.84	0.01	227.00	165.69	
二十碳烯酸 Eicosenoic acid	2.81	1.74	0.03	309.28	39.50	
黄嘌呤核苷 Xanthosine	2.80	1.91	0.05	283.07	217.64	
Pi (18 : 1/17) Pi (18 : 1/17-hdohe)	2.76	0.47	0.04	923.50	197.94	
C17-二氢(神经)鞘氨醇 C17-sphinganine	2.58	0.62	0.00	288.29	36.00	
1,2-二油酰基-sn-丙三基 3-磷酸-L-丝氨酸 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	2.53	2.10	0.03	769.50	37.67	
L-古洛诺-1,4-丁内酯 L-gulono-1,4-lactone	2.40	2.03	0.01	195.05	358.01	
肌苷 Inosine	2.23	4.35	0.04	267.07	214.31	
β -羟丁酸 β -hydroxybutyrate	2.20	5.41	0.02	103.04	234.31	
维吉尼亚霉素组分 b Virginiamycin component b	2.15	0.32	0.01	524.23	38.55	
6-酮前列腺素 f1. α 6-ketoprostaglandin f1. α .	2.06	3.16	0.04	393.22	180.84	

(图 5A、5B), 比较 NC 组小肠组织和 OE 组小肠组织差异代谢物, 在正离子模式中显示 8 种代谢物存在上调, 7 种代谢物存在下调, 在负离子模型中, 有 17 种代谢物存在上调, 7 种代谢物存在下调。正离子、负离子模式下显示代谢物倍数的显著差异分析

显示(图 5C、5D), 在皮下移植瘤中过表达 miR-181a-5p 的小肠中代谢物 3-羟基丁酰肉碱、 β -羟丁酸明显改变。胆碱代谢通路是过表达 miR-181a-5p 后皮下移植瘤小鼠小肠中代谢物富集到的显著性差异通路。



注:A;正离子模式 NC 组和 OE 组层次聚类热图;B:负离子模式 NC 组和 OE 组层次聚类热图;C:正离子模式代谢物表达倍数分析图;D:负离子模式代谢物表达倍数分析图;E:KEGG 富集通路图(气泡图)。

图 5 正负离子模式 OE 组和 NC 组的层次聚类热图和显著差异代谢物倍数分析图

Note. A, Positive ion mode NC group and OE group hierarchical clustering heat map. B, Negative ion mode NC group and OE group hierarchical clustering heat map. C, Positive ion mode metabolite expression multiple analysis diagram. D, Negative ion model metabolite expression multiple analysis diagram. E, KEGG enrichment pathway diagram (bubble diagram).

Figure 5 Hierarchical clustering heat map and significant difference metabolite fold analysis map of positive and negative ion mode OE group and NC group

3 讨论

口腔癌患者晚期较易出现恶病质的不良机体状态,其特征为体重的显著下降和伴发肌肉组织的萎缩,患者极易出现多脏器的能量失衡及细胞组织代谢功能紊乱^[10]。当患者机体体重下降至患病初始状态时的 95% 以下的时候,或者是患者体重指数 (BMI) < 20 kg/m² 并发骨骼肌组织量下降的情况下体重变化达 2% 以上时,该疾病所处状态可被视为存在肿瘤恶病质机体状态^[11]。然而,小肠组织在口腔恶性肿瘤恶病质机体下的代谢物及代谢物组的改变状况尚未可知。

本实验通过皮下注射 CAL-27 细胞和过表达 miR-181a-5p 细胞构建口腔癌皮下移植瘤小鼠,检测到小鼠的体重在第 3 周时下降超过了 20%。小鼠小肠组织样本非靶向代谢组学结果表明,与 Control 组相比,NC 组小鼠小肠组织检测到 170 种显著差异代谢物,如甘油磷酰胆碱、胆酸、谷氨酰胺、谷氨酸和甘油磷脂。差异代谢物显著性富集的通路主要为胆碱、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和甘油磷脂代谢通路。与 NC 组比较,过表达 miR-181a-5p 的 OE 组在 VIP>1 的条件下鉴定到 39 个代谢物,在 VIP>2 的条件下鉴定到 16 个显著性差异代谢物,其中主要差异代谢分子为甘油磷酰胆碱、棕榈酸、3-羟基丁酰肉碱、 β -羟丁酸。此外,小肠的功能被谷氨酰胺等调节,口腔癌皮下移植瘤小鼠模型小肠组织氨基酸的代谢、脂质的代谢及所参与的代谢通路与小肠的代谢功能密切联系。与 NC 组相比,3-羟基丁酰肉碱、 β -羟丁酸等是小肠模型过表达 miR-181a-5p 后变化的首要代谢物质。

谷氨酰胺是一类重要参与细胞能量代谢的物质,在口腔癌皮下移植瘤小鼠模型的小肠组织中发现谷氨酰胺代谢紊乱,本研究的结果与 Walker 氏肝癌恶病质小鼠模型小肠组织中谷氨酰胺代谢紊乱类似,推测小肠组织中的谷氨酰胺代谢会受到肿瘤生长而产生差异^[12]。谷氨酰胺作为参与生命活动的一类重要的游离氨基酸,它能为肠道中细胞提供能量,同时抑制与肠道炎症反应相关的信号通路,抑制肠道细胞凋亡,同时减少氧化应激的发生以达到保护肠道细胞数目及功能的目的;有研究表明,肠道上皮细胞的增殖、屏障功能、紧密连接蛋白表达的水平和小肠的渗透性都受到谷氨酰胺影响^[13-15]。推测恶病质状态导致的小肠功能受损诱

发了谷氨酰胺的过度消耗。小肠的功能受损和能量的过度消耗与小肠组织病理切片中上皮细胞数目减少及小鼠的体重变化相一致,并且谷氨酰胺可能与之相关。

本研究对小肠组织代谢物和代谢物组系统性分析后发现胆酸、牛磺去氧胆酸、 α -鼠胆酸以及 β -鼠胆酸等胆酸相关代谢物存在明显的差异。胆酸是在肝组织中合成的参与组织内分泌的一类重要分子,参与小肠组织中脂溶性相关维生素和脂质物质的吸收及调控。研究发现回肠回收利用了几乎全部的胆酸,和其它小分子营养素一样,胆酸通过肝肠循环抵达肝^[16]。既往研究显示,结肠癌恶病质小鼠模型中,小肠组织中的胆汁酸的重吸收及转运功能下降,肝组织中结合型胆酸含量增加,同时口服牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA) 类药物治疗恶病质存在着一定的疗效^[17]。MiR-181a-5p 是一类小分子的非编码 RNA,显示出了对癌症的抑制效果,在口腔癌已有研究发现其可发挥抑癌作用^[18]。和 NC 组比较,在 OE 组小鼠模型的小肠中,甘油磷酰胆碱发生了明显的变化,其作用为参与合成乙酰胆碱和磷脂酰胆碱及构成细胞膜磷脂的一类必需代谢物^[19-20]。胆碱代谢在癌症中的改变,标志着肿瘤的发生和发展^[21]。本研究发现胆碱代谢的改变是 miR-181a-5p 过表达后小肠中主要的代谢改变。有研究报道当肝细胞出现死亡以及骨骼肌组织发生损伤后,常并发胆碱含量的减少^[22]。胆碱的作用很广泛,酮体和脂肪酸等物质的代谢、细胞核和线粒体膜成分的构成,甚至是脂质的代谢,细胞间信号传输和转导,线粒体能量代谢等都受到胆碱的调节^[23-25]。结果提示患者营养状况的改善以及机体功能的恢复或可通过给予胆碱类物质而得以改善。

本实验通过对口腔癌皮下移植瘤小鼠模型小肠组织的差异代谢物和 KEGG 通路富集分析显示小肠中脂肪代谢和氨基酸代谢的显著变化,提示小肠处于氨基酸过度消耗、脂肪过度消耗的状态。然而小肠组织中氨基酸以及脂肪代谢物过度消耗的具体机制尚待进一步的研究。小肠参与着机体多种物质的代谢。本研究为进一步探索肠道功能受损的原因和机理,研究改善口腔癌状态下肠道细胞功能、改善晚期患者的生活质量和给予患者机体营养供应提供了可能依据。基于此,小肠相关代谢物的研究或可作为一个突破口为后续相关研究给予帮助和支持。

参考文献:

- [1] Zhang ZY. Oral maxillofacial surgery 8th ed. [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2020.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-590.
- [4] Thomson PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction [J]. J Oral Pathol Med, 2018, 47(9): 803-807.
- [5] Cui P, Huang C, Guo J, et al. Metabolic profiling of tumors, sera, and skeletal muscles from an orthotopic murine model of gastric cancer associated-*Cachexia* [J]. J Proteome Res, 2019, 18(4): 1880-1892.
- [6] Knudsen LA, Desdorf R, Möller S, et al. Translational potential of metabolomics on animal models of inflammatory bowel disease-a systematic critical review [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 11.
- [7] Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(7): 451-459.
- [8] 汤喜兰, 徐国良, 董伟, 等. 异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠的血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 486-493.
Tang XL, Xu GL, Dong W, et al. Serum metabolomics study of cardiac hypertrophy in an isoproterenol-induced rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 486-493.
- [9] 杨一言, 高继萍, 续国强, 等. 非编码 RNA 调控口腔鳞状细胞癌葡萄糖代谢重编程的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 91-97.
Yang YY, Gao JP, Xu GQ, et al. Research progress on the regulation of non-coding RNA in glucose metabolism re-editing in oral squamous cell carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 91-97.
- [10] Biswas AK, Acharyya S. Understanding cachexia in the context of metastatic progression [J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(5): 274-284.
- [11] Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(5): 489-495.
- [12] Lima MMR, de Mello MAD, Curi R. Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine [J]. Cell Biochem Funct, 2002, 20(2): 107-113.
- [13] Kim MH, Kim H. The roles of glutamine in the intestine and its implication in intestinal diseases [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1051.
- [14] Wang B, Wu G, Zhou Z, et al. Glutamine and intestinal barrier function [J]. Amino Acids, 2015, 47(10): 2143-2154.
- [15] Kim H. Glutamine as an immunonutrient [J]. Yonsei Med J, 2011, 52(6): 892-897.
- [16] Wang Y, Gao X, Zhang X, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with altered bile acid metabolism in infantile cholestasis [J]. mSystems, 2019, 4(6): e00463-e00419.
- [17] Feng L, Zhang W, Shen Q, et al. Bile acid metabolism dysregulation associates with cancer cachexia: roles of liver and gut microbiome [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021, 12(6): 1553-1569.
- [18] Rezaei T, Amini M, Hashemi ZS, et al. microRNA-181 serves as a dual-role regulator in the development of human cancers [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 432-454.
- [19] Sonkar K, Ayyappan V, Tressler CM, et al. Focus on the glycerophosphocholine pathway in choline phospholipid metabolism of cancer [J]. NMR Biomed, 2019, 32(10): e4112.
- [20] Levillain O, Schmolke M, Guder WG. Influence of dehydration on glycerophosphorylcholine and choline distribution along the rat nephron [J]. Pflugers Arch, 2001, 442(2): 218-222.
- [21] Ridgway ND. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013, 48(1): 20-38.
- [22] da Costa KA, Kozyreva OG, Song J, et al. Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline [J]. FASEB J, 2006, 20(9): 1336-1344.
- [23] Teodoro JS, Rolo AP, Duarte FV, et al. Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression [J]. Mitochondrion, 2008, 8(5-6): 367-376.
- [24] Fujita Y, Nagakura T, Uchino H, et al. Functional expression of choline transporters in human neural stem cells and its link to cell proliferation, cell viability, and neurite outgrowth [J]. Cells, 2021, 10(2): 453.
- [25] Zeisel SH. Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults [J]. Annu Rev Nutr, 2006, 26: 229-250.

[收稿日期] 2023-01-05