

# 全谱二维液相-QTOF 系统用于前列腺癌生物标志物筛选

## LCMS-QTOF-052

**摘要：** 本文利用全谱二维液相系统结合四极杆-飞行时间质谱对前列腺癌患者和正常人的尿液外泌体样本进行了非靶向代谢组学分析。基于全谱二维液相系统,正和负模式下共得到 6840 个特征峰。偏最小二乘判断分析(PLS-DA)表明正常组与模型组有显著差异,共找到 451 种变量投影重要性(VIP)大于 1 的候选差异性代谢物,经数据库比对鉴定出 12 种差异性代谢物,主要影响的通路包括鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等。

**关键词：** 全谱二维液相 四极杆-飞行时间质谱 外泌体

### 技术特点：

- ❖ 采用全谱二维液相结合 Q-TOF, 可进行宽极性目标物的非靶向代谢组学分析。
- ❖ 结合 Signpost MS 等多种数据处理软件进行差异性代谢物筛查与鉴定。

前列腺癌 (prostatecancer, PCa) 是一种较普遍的泌尿系统肿瘤,其发病率在世界范围内不断增加。PCa 的早期筛查主要依赖直肠指诊和血清前列腺特异性抗原 (PSA) 检测,然而直肠指诊只能初步评估前列腺的基本情况,如大小、质地等,缺乏准确性。PSA 也受良性前列腺增生及尿路感染等影响,对 PCa 诊断的特异性较差。因此,PCa 的诊断和治疗急需准确、特异且无创的生物标志物。

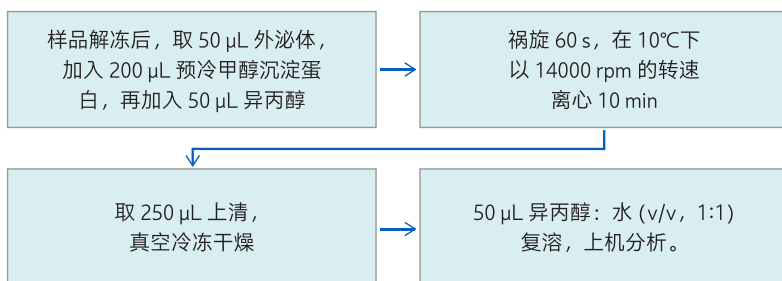
外泌体是细胞自发分泌的一种胞外囊泡,广泛存在于各类细胞,如尿液、血液、腹水及精液等,具有良好的稳定性及低毒性等特点,在肿瘤的发生、发展及血管生成和免疫调控中发挥着重要作用。因其具有独特囊泡结构及双层脂质膜,使其囊泡内核酸和肿瘤相关蛋白免遭外部酶的降解,故不少学者认为外泌体有可能成为 PCa 的非侵入性生物标志物。

代谢组学是研究特定生物体系中整体代谢物水平及其变化规律的独立学科,是疾病研究的重要手段之一。代谢组学研究中的一大困难是代谢物极性跨度大,难以用一种方法完成分析。本研究利用全谱二维液相系统,可以同时完成高极性和低极性的代谢物分析,大大节省了实验工作量和分析时间。该系统与岛津四极杆-飞行时间质谱 LCMS-9030 结合,可以进行宽极性目标物的非靶向代谢组学全组分研究。

本研究利用全谱二维液相-QTOF 系统,以非靶向代谢组学的工作流程分析了前列腺癌患者与正常人的尿液外泌体样本,发现 12 种差异性代谢物,主要为脂质,此外还有有机酸、核苷酸等代谢产物,主要影响鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成。

## 实验部分

### 1.1 样品采集及处理



正常组与模型组各取 7 份样品进行分析，每份样品各取 5  $\mu$ L，均匀混合，制成质量控制 (QC) 样品。QC 样品在样品分析前连续进样 6 针，之后每分析 6 个样品插入 2 针 QC，通过 QC 样全程监测数据质量。

### 1.2 仪器

仪器装置由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用，其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱、一个定量环、一个高压十通阀构成，检测器为 LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪。具体配置为：

系统控制器：SCL-40  
 脱气机：DGU-405  
 输液泵：LC-40B XR  $\times$  2; LC-40B X3  $\times$  2  
 自动进样器：SIL-40C X3  
 定量环：500  $\mu$ L  
 柱温箱：CTO-40C  
 十通阀：FCV-36AH  
 质谱仪：LCMS-9030  
 色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

### 1.3 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱：第一维：Shim-pack GIST NH2, 100 mm $\times$ 2.1mm I.D., 3  $\mu$ m  
 第二维：Phenomenex Kinetex C8, 150 mm $\times$ 2.1 mm I.D., 2.6  $\mu$ m  
 流动相：第一维：A 相 - 25mM 乙酸铵 +25mM 氨水 / 水, B 相 - 乙腈  
 第二维：A 相 - 水, B 相 - 5mM 乙酸铵 / 乙腈：异丙醇 (v/v, 6:4) +

进样体积：2  $\mu$ L  
 流速：0.4 mL/min  
 柱温：45 $^{\circ}$ C  
 洗脱方式：梯度洗脱 (表 1)

#### 质谱条件

离子源：ESI  
 接口电压：+4.5 kV/ -3.5 kV  
 雾化气：氮气 3.0 L/min  
 干燥气：氮气 10.0 L/min  
 加热气：空气 10.0 L/min  
 接口温度：300  $^{\circ}$ C  
 DL 温度：250  $^{\circ}$ C  
 加热块温度：400  $^{\circ}$ C  
 扫描模式：MS1 SCAN (m/z 50-1000)  
 MS2 DDA (m/z 50-1000)

表 1 液相梯度时间程序

| 时间 (min) | 单元  | 命令           | 值   |
|----------|-----|--------------|-----|
| 0.00     | 泵   | B.Conc       | 95  |
| 0.00     | 泵   | B.Conc3      | 20  |
| 0.00     | 柱温箱 | Oven Valve 2 | 0   |
| 1.90     | 柱温箱 | Oven Valve 2 | 1   |
| 2.90     | 泵   | B.Conc       | 95  |
| 15.90    | 泵   | B.Conc       | 65  |
| 17.90    | 泵   | B.Conc       | 40  |
| 19.90    | 泵   | B.Conc       | 40  |
| 20.00    | 泵   | B.Conc       | 95  |
| 20.00    | 泵   | B.Conc3      | 20  |
| 20.30    | 柱温箱 | Oven Valve 2 | 0   |
| 37.00    | 泵   | B.Conc3      | 100 |

|       |     |         |     |
|-------|-----|---------|-----|
| 41.50 | 泵   | B.Conc3 | 100 |
| 41.60 | 泵   | B.Conc3 | 20  |
| 42.00 | 泵   | B.Conc3 | 20  |
| 42.00 | 控制器 | Stop    |     |

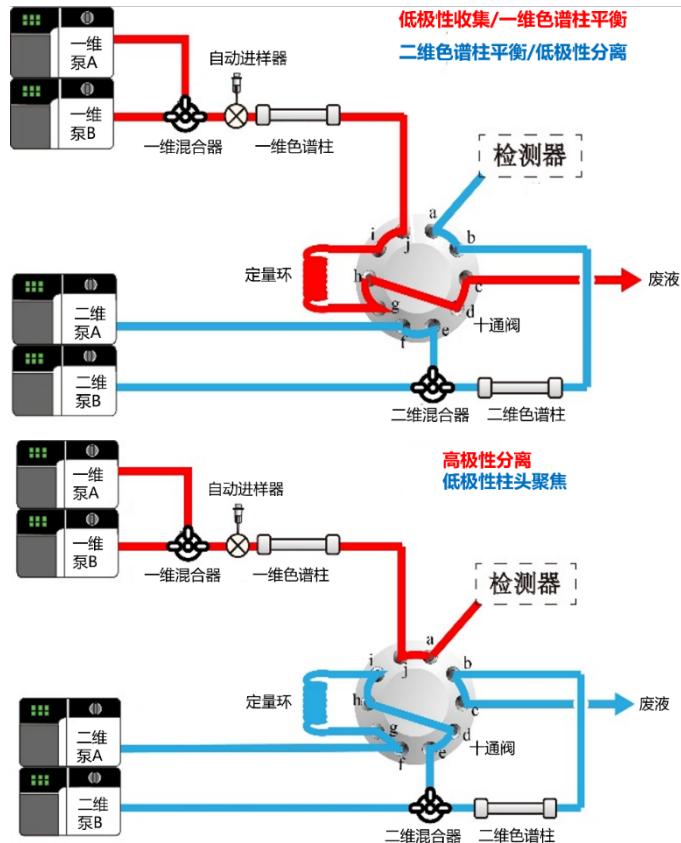


图 1 全谱二维系统流路图（上图：初始状态；下图：切阀后）

#### 1.4 数据处理

采用 Signpost MS 软件对谱图数据处理如离子提取、峰对齐等后，将数据导入 MetaboAnalyst 和 SIMCA 软件进行统计分析，找出差异性代谢物，依据精确  $m/z$  及  $MS^2$  谱图在 MS DIAL 及 HMDB 等平台搜索确认代谢物种类，然后在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 色谱图与特征色谱峰

人尿液外泌体 QC 样品的基峰 (BPC) 色谱图如图 2 所示。与普通一维方法相比较，全谱二维在 MS Dial 软件中检出亲水性小分子代谢物和亲脂性物质的数量有显著提升 (如图 3 所示)，也证实了全谱二维具有同时分离宽极性、多目标物的特点。

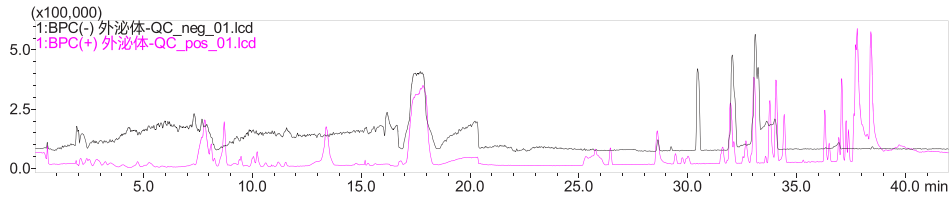


图2 QC样品BPC图(红色:正模式;黑色:负模式)

在正和负模式下,将全谱二维采集的各数据导入 Signpost MS 软件,提取峰表并对齐色谱峰后,共得到 6840 个特征峰。随后对缺失值进行过滤,利用“80%规则”(去除任何一组中出现频率都小于 80% 的离子)筛选特征峰,且剔除在 QC 样品中峰面积 RSD > 30% 的特征峰,最后,将剩余特征峰导入 SIMCA 软件用于下一步统计分析(如图 4 所示)。

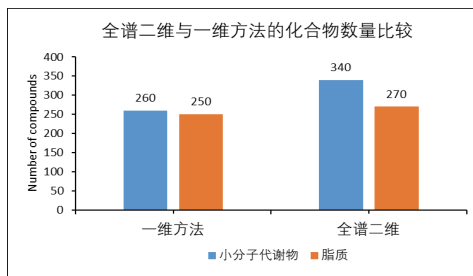


图3 全谱二维与一维方法化合物数量比较



图4 数据预处理流程

## 2.2 差异性代谢物查找

将正常组、模型组与质控组数据导入 SIMCA 软件进行偏最小二乘判断分析 (PLS-DA), 结果显示, 质控组 (QC) 数据聚集性良好, 表明仪器状态稳定, 正常组与模型组可以明显地区分, 表明前列腺癌患者与正常人的尿液外泌体代谢产物有显著差异(图 5)。

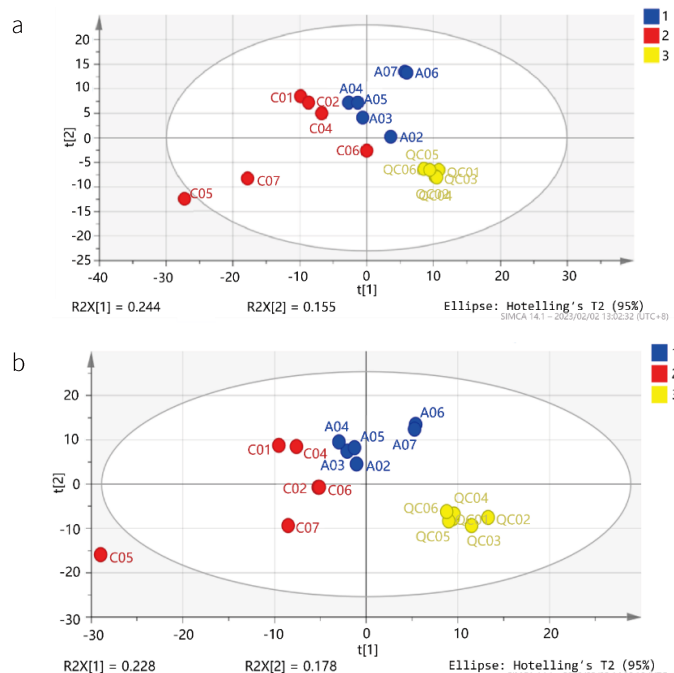


图5 偏最小二乘判断分析 (PLS-DA) 散点图  
(图 a: 正模式; 图 b: 负模式; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 质控组)

以交叉验证的方式对上述 PLS-DA 模型进行验证，结果表明：正模式下截距  $R^2=0.816$ ， $Q^2=-0.366$ ，负模式下截距  $R^2=0.369$ ， $Q^2=-0.264$ ，模型可靠，没有过拟合（图 6）。

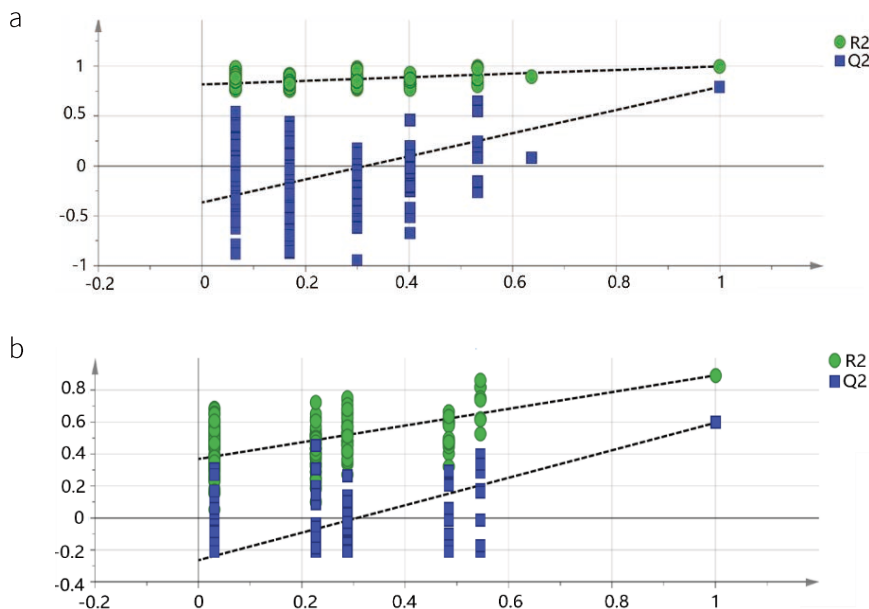


图 6 PLS-DA 200 次交叉验证结果（图 a：正模式；图 b：负模式）

通过变量投影重要性 (variable importance of projection, VIP) 筛选差异性代谢物。选取  $VIP > 1$  的特征峰，认为对组间差异贡献较大，是潜在的差异性代谢物。二维色谱正模式下候选差异性代谢物共 220 个，负模式下候选差异性代谢物共 231 个（图 7）。

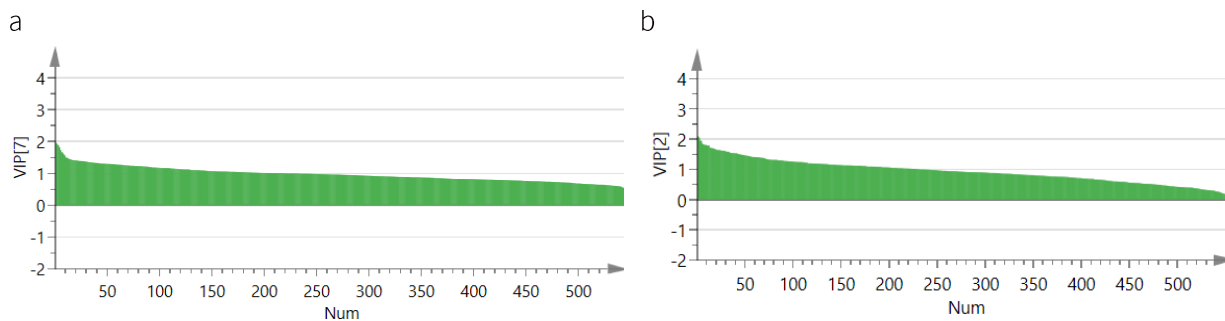


图 7 PLS-DA 各物质 VIP 值计算（图 a：正模式；图 b：负模式）

### 2.3 差异性代谢物鉴定

将所有  $VIP > 1$  的候选差异性代谢物进行 t 检验，将  $p < 0.05$  的物质谱图导入 MS-DIAL 软件，通过精确  $m/z$  和  $MS^2$  谱图匹配进行鉴定（图 8）。将所得结果与 HMDB 平台比对，共鉴定出 12 种差异性代谢物；所有物质质量测定误差  $< 4$  ppm；11 种物质浓度水平上调，另外 1 个浓度下调（表 2）。



图 8 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

表 2 差异性代谢物鉴定结果表

| 编号 | 物质                                 | 模式 | R.T. (min) | 实测 m/z   | 理论 m/z   | 误差 (ppm) | 上 / 下调 * |
|----|------------------------------------|----|------------|----------|----------|----------|----------|
| 1  | C17-sphinganine                    | +  | 5.08       | 288.2892 | 288.2900 | 2.77     | ↑        |
| 2  | Pantothenic acid                   | +  | 16.41      | 220.1084 | 220.1080 | 1.82     | ↓        |
| 3  | Lauryldiethanolamine               | +  | 34.46      | 274.2740 | 274.2740 | 0.00     | ↑        |
| 4  | D-ribo-Phytosphingosine            | +  | 5.86       | 318.3026 | 318.3030 | 1.26     | ↑        |
| 5  | Boldenone                          | +  | 32.52      | 453.3293 | 453.3310 | 3.75     | ↑        |
| 6  | NAE 20:2                           | +  | 31.53      | 352.3204 | 352.3210 | 1.70     | ↑        |
| 7  | NAE 20:1                           | +  | 32.24      | 354.3358 | 354.3367 | 2.54     | ↑        |
| 8  | Octadecanoic acid                  | -  | 38.72      | 283.2632 | 283.2640 | 2.82     | ↑        |
| 9  | Pseudouridine                      | -  | 8.54       | 243.0618 | 243.0620 | 0.82     | ↑        |
| 10 | C10-LAS                            | -  | 27.39      | 297.1518 | 297.1520 | 0.67     | ↑        |
| 11 | Lignoceric acid                    | -  | 35.60      | 367.3593 | 367.3590 | 0.82     | ↑        |
| 12 | 2-acetoxy-6-pentadecylbenzoic acid | -  | 37.69      | 389.2691 | 389.2680 | 2.83     | ↑        |

\*: ↑ 上调, ↓ 下调

## 2.4 通路分析

将表 2 中鉴定出的 12 个物质导入 MetaboAnalyst 平台进行通路分析, 发现前列腺癌患者尿液外泌体主要受影响的代谢通路有鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等 (图 9)。

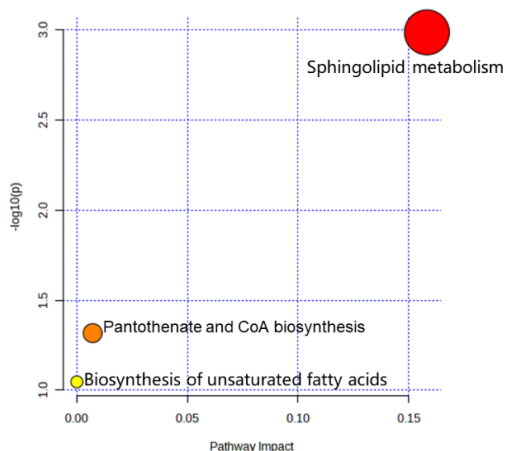


图 9 前列腺癌患者尿液外泌体受影响的主要代谢通路

## ■ 结论

本文利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用，对前列腺癌患者和正常人尿液外泌体样本进行了非靶向代谢组学研究。全谱二维液相系统扩大了代谢物分析的极性范围，加上 Q-TOF 的高分辨定性能力，正和负模式共得到 6840 个特征峰。PLS-DA 分析表明，正常组与模型组尿液外泌体成分有显著区别，利用 VIP 值 >1 筛查到 451 种差异性代谢物，通过准确 m/z 及 MS<sup>2</sup> 库搜索鉴定出 12 种差异性代谢物。这些差异性代谢物主要影响鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等。本研究增进了对前列腺癌生物标志物筛选的认识，同时表明全谱二维液相系统作为一种有力的工具可帮助研究者一次性分析极性跨度更大的代谢物。

岛津应用云

