基于液质联用及数据分析的血尿代谢组学在胆汁淤积症中的临床应用

何 惠[1] 丁向春[2 通信作者] 雒 夏[2]
1. 宁夏医科大学第一临床医学院 宁夏 银川 750004；
2. 宁夏医科大学总医院 宁夏 银川 750004

摘 要 目的：基于超高效液相色谱-串联质谱技术联合生物信息学分析，分析胆汁淤积症患者血尿代谢物特征的差异性。方法：选取2024年1月至2025年12月于宁夏医科大学总医院收治的40例胆汁淤积症患者作为观察组，同时选择同期的40例健康体检者作为对照组。采用液质联用技术检测代谢谱，结合多种生物信息学方法筛选组间差异代谢物，并分析其关键代谢通路。结果：两组样本通过液质联用共检出有效代谢物627种；共筛选出显著差异代谢物78种，其中上调45种、下调33种；筛选出10个核心潜在生物标志物。结论：基于液质联用的血尿代谢组学能够对胆汁淤积症特征性的代谢紊乱情况进行精准识别，但其临床泛化能力尚需独立外部验证队列进一步评估。

关键词 胆汁淤积症；液质联用；代谢组学；血尿样本；生物标志物

Clinical Application of Blood and Urine Metabolomics Based on LC-MS and Data Analysis in Cholestasis

He Hui[1], Ding Xiangchun[2 Corresponding Author], Luo Xia[2]
1. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China;
2. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Abstract Objective: To analyze the differences in blood and urine metabolite characteristics of patients with cholestasis based on ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) combined with bioinformatics analysis. Methods: A total of 40 patients with cholestasis admitted to the General Hospital of Ningxia Medical University from January 2024 to December 2025 were selected as the observation group, and 40 healthy physical examinees during the same period were selected as the control group. Metabolomic profiles were detected by LC-MS, and differentially expressed metabolites between the two groups were screened by multiple bioinformatics methods, followed by analysis of their key metabolic pathways. Results: A total of 627 valid metabolites were detected by LC-MS in the two groups; 78 significantly differential metabolites were screened out, including 45 upregulated and 33 downregulated; and 10 core potential biomarkers were identified. Conclusion: Blood and urine metabolomics based on LC-MS can accurately identify the characteristic metabolic disorders of cholestasis, but its clinical generalizability still needs to be further evaluated in an independent external validation cohort.

Key words Cholestasis; LC-MS; Metabolomics; Blood and urine samples; Biomarkers

胆汁淤积症指的是因为肝细胞对胆汁的分泌存在障碍、胆管排泄受到阻滞，致使胆汁成分发生反流进入血液，导致其出现全身代谢功能紊乱、肝功能损伤以及多个系统受到累及的临床综合征[1]。通过传统肝功能指标的筛查，能够提示存在胆汁淤积，但特异性相对较低，导致干预时机有所延误[2]，因此，急需采用新型的、无创的、精准的分子检测技术应用于临床诊疗中。代谢组学是一种新型的系统性生物学技术，该技术能够定性且定量地对生物样本中的所有小分子代谢物进行检测。血尿样本更加容易获取、具有无创性以及可重复性；超高效液相色谱—串联质谱能精准地检测出复杂性生物样本中的大量代谢物[3]。本研究尝试在初步探索性分析的基础上，建立血尿联合的代谢标志物组合，并对其诊断潜力和局限性进行系统评估。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2024年1月至2025年12月于宁夏医科大学总医院肝病科收治的40例胆汁淤积症患者设为观察组，同期选择年龄和性别与观察组相匹配的40例健康体检者作为对照组，共80例。本研究通过院内伦理委员会的批准，所有研究对象均在知情同意

书上签字。

纳入标准：观察组：①确诊为胆汁淤积症，即其碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）＞1.5倍正常值上限（upper limit of normal，ULN），γ-谷氨酰转移酶（γ-glutamyl transpeptidase，GGT）＞3倍ULN；②年龄范围为18～75岁；③首次确诊，既往无利胆、保肝等针对性治疗史；④临床资料无缺失。对照组：①健康体检者，其肝功能以及腹部超声结果为正常；②年龄以及性别和观察组相匹配；③近3个月并无肝胆疾病、感染以及代谢性相关疾病。

排除标准：①伴发肝硬化、肝癌、重症肝炎或者处于自身免疫性肝病晚期；②重要脏器存在重度功能障碍；③伴发糖尿病以及高脂血症等代谢性相关疾病。

1.2 方法

仪器：超高效液相色谱仪（Waters ACQUITY UPLC），串联质谱仪（Thermo Q-Exactive HF），高速冷冻离心机（Eppendorf 5810R），超纯水仪，－80 ℃超低温冰箱，涡旋振荡器。试剂：甲醇、乙腈（色谱纯，Merck），甲酸、乙酸铵（质谱级），标准品内标物2-氯苯丙氨酸，质控样本（quality control sample，QC），代谢物数据库：人类代谢组数据库（human metabolome database，HMDB）、Metlin、京都基因与基因组百科全书（kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）。

所有研究对象均需保持持续空腹8～12 h，清晨采集研究对象外周静脉血共5 mL，将其放置在乙二胺四乙酸（依地酸）（ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）抗凝管中，以3 000 r/min的速度持续离心15 min，分离上层血浆；采集研究对象晨尿共10 mL，尿液经离心以后获取上清。

样本预处理：取出血浆/尿液样本100 μL，向其中加入400 μL含有内标的甲醇—乙腈提取液，经过涡旋振荡共3 min，于－20 ℃的环境下保持静置30 min，以12 000 r/min的速度在4 ℃环境下离心15 min，获取上清，使用氮气进行吹干，复溶以后进样，设置QC样本用于对其检测稳定性进行验证。

色谱条件：色谱柱C18反相柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）；流动相A：0.1%甲酸—水相，流动相B：0.1%甲酸—乙腈；梯度洗脱：0～2 min，5% B；2～14 min，5%～95% B；14～16 min，95% B；16～18 min，5% B；流速为0.3 mL/min，柱温40 ℃，进样量共5 μL。

质谱条件：电喷雾电离源（electrospray ionization，ESI），在正、负离子模式同时开展对应的检测；喷雾电压设置为3.8 kV；离子源温度设置为350 ℃；扫描范围设置为m/z 70～1 000；分辨率70 000；使用一级扫描联合二级碎片扫描模式，获取代谢物的精确分子量以及相关碎片信息。

原始数据通过Progenesis QI软件进行峰对齐、保留时间的校正、峰提取以及归一化处理，剔除缺失值超过20%的代谢产物，获取代谢物的定量矩阵。使用R语言开展统计学分析：①主成分分析（principal component analysis，PCA）观察组间的整体代谢相关差异；②正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）通过建立判别模型，对组间区分度进行验证；③差异代谢物筛选标准：VIP＞1，P＜0.05，|FC|＞1.2；④通过KEGG通路富集分析差异代谢物，对关键性的病理通路进行分析。

代谢物鉴定标准：代谢物的初步鉴定依据为与HMDB、Metlin、KEGG数据库中精确母离子质量数（误差＜5 ppm）及二级质谱碎片谱的匹配结果。对于筛选出的10个核心潜在生物标志物，进一步采用与化学标准品在相同液相色谱—质谱条件下进行保留时间、母离子及二级碎片离子的比对，实现一级鉴定（Level 1）。其余差异代谢物为推定鉴定（Level 2）。

1.3 观察指标

采集两组患者的常规肝功能指标，包括：血清总胆红素（total bilirubin，TBIL）、直接胆红素（direct bilirubin，DBIL）、ALP、GGT、总胆汁酸（total bile acids，TBA）、丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）等，上述指标需要使用全自动生化分析仪进行检测。

1.4 统计学处理

应用SPSS 25.0软件进行统计数据处理，符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，行t检验；计数资料以百分数（%）表示。开展χ^2检验，P＜0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝功能指标对比

肝功能指标见表1。

2.2 液质联用整体代谢组学分析

两组血浆以及尿液样本中一共检出有效代谢物627种。PCA结果发现：观察组和对照组的代谢谱具有明显的分离趋势，说明胆汁淤积症患者的机体整体代谢模式发生明显的改变；OPLS-DA模型发现两组具有完全区分性，R^2=0.924，Q^2=0.871。

2.3 差异代谢物筛选

将VIP＞1、P＜0.05、|FC|＞1.2作为筛选标准，一共获取78种具有明显差异的代谢物，其中血浆差异代谢物共有46种，尿

液差异代谢物共有32种；上调代谢物共有45种，下调代谢物共有33种。

表1 肝功能指标对比（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	TBIL（μmol/L）	DBIL（μmol/L）	ALP（U/L）	GGT（U/L）	TBA（μmol/L）	ALT（U/L）	AST（U/L）
观察组	40	78.45 ± 12.36	45.12 ± 10.03	276.83 ± 48.42	312.54 ± 75.68	42.68 ± 6.35	116.37 ± 24.25	108.42 ± 21.66
对照组	40	13.28 ± 2.15	4.37 ± 1.22	72.15 ± 6.34	25.36 ± 3.12	5.21 ± 1.46	24.18 ± 5.33	22.45 ± 4.81
t		32.854	25.507	26.509	23.979	36.371	23.483	24.506
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

2.4 KEGG通路富集分析

对78种差异代谢物作对应的KEGG通路富集，一共富集到21条显著通路（$P < 0.05$），显著程度为前5位的通路分别包括：胆汁酸分泌通路、初级胆汁酸生物合成通路、甘油磷脂代谢通路、色氨酸代谢通路以及三羧酸循环通路。

3 讨论

胆汁淤积症的发病机制相对复杂，该疾病的核心就是胆汁排泄受到阻碍，胆汁酸的蓄积会对肝细胞造成损伤，进而导致其全身代谢功能发生紊乱，常规肝功能指标的应用，只能够对其胆汁淤积结果进行反映，无法对早期微观代谢改变进行揭示。代谢组学的应用，能够捕捉疾病早期小分子代谢物的变化情况，血尿样本具有无创性以及易获取性[4]；液质联用技术的应用，可充分利用高通量以及高精准度的优势，能够全面检测胆汁酸、脂质、氨基酸等复杂性代谢物，能够适用于胆汁淤积症代谢组学的研究中。

本研究一共筛选出78种差异代谢物，主要包括：胆汁酸类、脂质类、氨基酸类、有机酸以及肠道菌群代谢物。胆汁酸是胆汁发生淤积的重要标志物，本研究中的牛磺鹅去氧胆酸、甘氨胆酸明显上调，原因是胆管的排泄受到阻碍，结合型胆汁酸随胆汁的排出难度相对较高，反流入血，经肾脏部分排泄进入尿液，是胆汁淤积发生后最直接的一种代谢改变情况。甘油磷脂的代谢异常主要在于：溶血磷脂酰胆碱功能发生紊乱；胆汁酸发生蓄积可破坏肝细胞膜磷脂结构，导致脂质过氧化损伤，使患者的肝细胞炎症坏死程度加重[5]。

KEGG通路富集结果发现：胆汁酸的分泌、初级胆汁酸的合成、甘油磷脂的代谢、色氨酸的代谢、三羧酸循环是关键性通路。胆汁酸的合成以及分泌通路的异常是胆汁淤积的主要启动因素；肝细胞中的胆固醇对于胆汁酸的合成产生亢进作用，排泄途径受阻，致使胆汁酸蓄积；色氨酸代谢功能发生紊乱后，可能通过肠—肝轴影响肝损伤程度。色氨酸相关代谢物的变化可能与肠道菌群代谢相关，但其与肠道菌群结构及功能的直接因果关系，尚需粪便宏基因组学等研究进一步验证；三羧酸循环障碍提示肝细胞能量代谢功能受损，线粒体功能发生异常可引起胆汁排泄功能障碍，使患者形成恶性循环[6]。

4 结论

综上，基于液质联用的血尿联合代谢组学能够识别胆汁淤积症患者的特征性代谢紊乱，核心代谢标志物组合可早期筛查胆汁淤积症。

参考文献

[1]雒夏,李淑霞,海龙,等.基于液质联用代谢组学技术探索肝内胆汁淤积症的潜在血清代谢标志物[J].中华肝脏病杂志,2024,32(8):753-760.

[2]罗欣,成鹏,陆茵,等.丁香酸调控胆汁酸代谢和肠道屏障改善胆汁淤积肝病的研究[J].南京中医药大学学报,2024,40(4):350-358.

[3]邓昕雨,吴和霏,李煜兵,等.基于胆汁酸代谢组学探讨芍药苷改善α-萘异硫氰酸酯诱导胆汁淤积的作用机制[J].中草药,2024,55(1):148-158.

[4]刘佳琪,邓文龙,张鹏飞,等.基于代谢组学探讨香附对大鼠胆汁酸代谢的影响[J].中国食品添加剂,2026,37(3):1-12.

[5]张灵雁,于东升,李晓萍.基于“肠道菌群–胆汁酸代谢”探讨茵栀黄颗粒对胆汁淤积症小鼠的改善作用及其机制[J].现代药物与临床,2023,38(11):2660-2671.

[6]陈思敏,黄锦豪,王德勤,等.基于代谢组学及分子对接技术揭示消炎利胆方干预慢性肝内胆汁淤积的作用机制[J].药学学报,2023,58(11):3408-3420.

（本文编辑 王 冬）

