原创精选 Selected article

煤工尘肺患者肺灌洗回收液差异代谢物研究

马超逸^{la,2},李宝平^{2,3},沈福海^{la,1b},孙治平²,陈刚⁴,马国宣⁴,赵永梅⁵,侯博文²,高丽 w^2 ,李倩倩²,刘晓璐^{la,2},李欣宇^{la,2}

1. 华北理工大学 a. 公共卫生学院 b. 河北省煤矿卫生与安全重点实验室, 河北 唐山 063210

- 2. 应急总医院职业病科,北京 100028
- 3. 山西医科大学第一医院国家卫生健康委员会尘肺病重点实验室,山西太原 030001
- 4. 应急管理部北戴河康复院呼吸科,河北秦皇岛 066199
- 5. 北京市朝阳区疾病预防控制中心职业卫生科,北京 100021

摘要:

[背景] 通过代谢组学技术研究煤工尘肺发生发展过程中代谢物和代谢通路的变化,探索其 发病机制是目前的研究热点。

[目的]研究煤工尘肺患者肺灌洗回收液中代谢物的变化,探究煤工尘肺疾病的代谢调节机制。

[方法] 以符合 GBZ 70-2015《职业性尘肺病的诊断》中煤工尘肺诊断标准,进行大容量肺灌洗 手术治疗的煤工尘肺患者作为病例组,以进行气管镜检查的气道狭窄患者为对照组。采集病例 组肺灌洗回收液样本及对照组正常肺组织的肺灌洗回收液样本,过滤掉大颗粒杂质与黏液后 留取上清液于-80 °C 冰箱冷冻保存备用。经过添加提取液、冷浴超声、高速离心等处理后,运 用液相色谱质谱检测技术检测分析病例组与对照组的样本,得到煤工尘肺患者的代谢谱图及 相关数据。通过多元统计分析方法筛选出与煤工尘肺疾病发生发展相关的差异代谢产物,并进 一步根据差异代谢物信息于京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)中寻找其可能参与的 代谢通路。

[结果] 研究对象的一般情况如体重、身高、年龄、工龄等因素在尘肺壹期、贰期、叁期和对 照组 4 组间,差异均无统计学意义(P>0.05)。煤工尘肺壹期患者与对照组之间共筛选出 48 种差异代谢物,其中,上调差异代谢物 14 种,下调差异代谢物 34 种;煤工尘肺贰期患者与对 照组之间共筛选出 66 种差异代谢物,上调差异代谢物 14 种,下调差异代谢物有 52 种;煤工 尘肺叁期患者与对照组之间共筛选出 63 种差异代谢物,上调差异代谢物 11 种,下调差异代 谢物有 52 种。经汇总分析,在上述比较组中均表达差异的代谢物,即可能与煤工尘肺疾病发 生有关的差异代谢物有 36 种,其中,上调差异代谢物 11 种,下调差异代谢物有 25 种。通过 查询 KEGG 数据库共找到 4 条有意义的差异代谢通路,为亚油酸代谢通路、丙氨酸代谢通路、 鞘脂代谢通路及甘油磷脂代谢通路。

[结论] 肺灌洗回收液代谢组学研究结果显示,煤工尘肺疾病发生发展过程中可能有 36 种差 异代谢物,主要涉及亚油酸代谢、丙氨酸代谢、鞘脂代谢、甘油磷脂代谢通路。

关键词:煤工尘肺;非靶向代谢组学;超高效液相色谱-质谱;肺泡灌洗液;生物标志物

Differential metabolites of bronchoalveolar lavage fluid from coal worker's pneumoconiosis patients MA Chaoyi^{1a,2}, LI Baoping^{2,3}, SHEN Fuhai^{1a,1b}, SUN Zhiping², CHEN Gang⁴, MA Guoxuan⁴, ZHAO Yongmei⁵, HOU Bowen², GAO Lini², LI Qianqian², LIU Xiaolu^{1a,2}, LI Xinyu^{1a,2} (1.a. School of Public Health b. Hebei Key Laboratory of Occupational Health and Safety for Coal Industry, North China University of Technology, Tangshan, Hebei 063210, China; 2. Occupational Disease Department, Emergency General Hospital, Beijing 100028, China; 3. Key Laboratory of Pneumoconiosis of National Health Commission, The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 4. Respiratory Department, Beidaihe Rehabilitation Institute of Ministry of Emergency Management, Qinghuangdao, Hebei 066199, China; 5. Department of Occupational Health, Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China) Abstract:

[Background] It is a research hotspot to study the changes of metabolites and metabolic pathways in the process of coal worker's pneumoconiosis (CWP) by metabonomics and to explore its pathogenesis.

[Objective] To study the change of metabolites in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients



DOI 10.11836/JEOM24007

基金项目

国家卫生健康委员会尘肺病重点实验室开 放课题基金项目(NHC202305)

作者简介 马超逸(1998—),女,硕士生; E-mail: Macy980110@163.com

通信作者 李宝平, E-mail: lbp00@sohu.com

作者中包含编委会成员 无 伦理审批 已获取 利益冲突 无申报 收稿日期 2024-01-08 录用日期 2024-04-15

文章编号 2095-9982(2024)06-0617-08 中图分类号 R135.2 文献标志码 A

补充材料

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM24007

▶引用

马超逸,李宝平,沈福海,等.煤工尘肺患者 肺灌洗回收液差异代谢物研究[J].环境与职 业医学,2024,41(6):617-624.

▶本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM24007

Funding This study was funded.

Correspondence to LI Baoping, E-mail: lbp00@sohu.com

Editorial Board Members' authorship No Ethics approval Obtained Competing interests None declared Received 2024-01-08 Accepted 2024-04-15

Supplemental material www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM24007

To cite

MA Chaoyi, LI Baoping, SHEN Fuhai, et al. Differential metabolites of bronchoalveolar lavage fluid from coal worker's pneumoconiosis patients[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(6): 617-624.

Link to this article www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM24007 617

with CWP and explore the metabolic regulation mechanism of the disease.

[Methods] Patients with CWP who met the national diagnostic criteria according to *Diagnosis of occupational pneumoconiosis* (GBZ 70-2015) and underwent massive whole lung lavage were selected as the case group, and patients with tracheostenosis who underwent bronchoscopy were selected as the control group. BALF samples were collected from the cases and the controls. After filtering out large particles and mucus, the supernatant was stored in a -80 °C refrigerator. The samples were detected and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry after adding extraction solution, cold bath ultrasonication, and high-speed centrifugation, and the metabolic profiles and related data of CWP patients were obtained. The differential metabolites related to the occurrence and development of CWP were screened by multiple statistical analysis; furthermore, we searched the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database for potential metabolic pathways involved in the progression.

[Results] There was no significant difference in the general conditions of the subjects, such as weight, height, age, and length of service among the stage I group, the stage II group, the stage III group, and the control group (*P*>0.05). When comparing the CWP stage I group with the control group, 48 differential metabolites were screened out, among which 14 were up-regulated and 34 were down-regulated. A total of 66 differential metabolites were screened out between the patients with CWP stage II and the controls, 14 up-regulated and 52 down-regulated differential metabolites. Compared with the control group, 63 differential metabolites were screened out in the patients with CWP stage III, including 11 up-regulated and 52 down-regulated differential metabolites. There were 36 differential metabolites that may be related to the occurrence of CWP, among which 11 differential metabolites were up-regulated, and 25 were down-regulated. Four significant differential metabolic pathways were identified through KEGG database query: linoleic acid metabolic pathway, alanine metabolic pathway, sphingolipid metabolic pathway, and glycerophospholipid metabolic pathway.

[Conclusion] The metabolomic study of BALF show that there are 36 different metabolites in the occurrence and development of CWP, mainly associating with linoleic acid metabolism, alanine metabolism, sphingolipid metabolism, and glycerophospholipid metabolism pathways.

Keywords: coal worker's pneumoconiosis; non-targeted metabolomics; ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry; bronchoalveolar lavage fluid; biomarker

煤工尘肺是由于劳动者在工作场所长期吸入煤 尘引起的最严重的职业病之一,主要临床表现为咳嗽、 咳痰、呼吸困难等以呼吸系统为主的症状,并伴有肺 炎、肺结核、急性呼吸窘迫综合征和肺癌等并发症^[1]。 煤工尘肺的发生发展过程非常复杂,涉及多种细胞和 生物活性物质,由多种因素相互作用制约^[2],其发病机 制目前尚未有明确阐述。

煤工尘肺尚无有效的治疗方法,目前主要通过药物治疗及肺灌洗手术减缓疾病发展。因此,有研究者提出,可以采用系统生物学的观点,从整体层面全面了解疾病发生发展的潜在机制,及时发现前瞻性的生物标志物,以便尽早采取干预措施减缓疾病进展,减轻临床症状³。

代谢组学是系统生物学的重要组成部分,细胞中 的许多生命活动都发生在代谢物的水平上,例如细胞 间通讯、能量转移和细胞信号释放,这些都受到代谢 物的调节^[4]。因此,通过代谢组学技术对不同疾病的代 谢水平进行动态监测,从而确定疾病的特定代谢变化; 由代谢组学技术检测出的代谢物可作为临床疾病诊 断的生物标志物,用于疾病的特异性诊断和疾病机制 的探索^[5]。在哮喘、急性呼吸窘迫综合征、肺结核、慢 性阻塞性肺疾病等肺部疾病中发现磷酸胆碱、谷氨酰 胺、白三烯、花生四烯酸等主要代谢产物发生显著变 化,涉及脂质代谢、氨基酸代谢等多条代谢通路,磷酸 胆碱、谷氨酰胺等代谢物可作为生物标志物辅助诊断 和治疗呼吸系统疾病^[6-7]。文献报道,对矽肺患者的血 浆、尿液等生物样本进行代谢组学分析发现,鞘氨醇、 溶血磷脂、羟基苯甲酸内脂、二酰甘油酯、9-葡萄糖苷 等差异代谢物均可作为矽肺早期生物标志物辅助诊 断^[8]。骨桥蛋白、涎液化糖链抗原-6、多配体蛋白聚糖-4、谷胱甘肽等多种潜在的生物标志物均具有辅助诊 断煤工尘肺的价值^[9-10]。

肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)直 接与肺组织进行物质交换,与血液、尿液等生物样本 相比,BALF直接与肺组织进行接触,其回收液中具有 许多直接来自肺组织的细胞及非细胞成分,能够较好 地提供早期肺部代谢物的变化数据及趋势,直观体现 患者的气道分泌物,具有更高的灵敏性和准确性^[11-12], 其检测结果更具有诊断价值。因此,本研究通过检测 不同期别煤工尘肺患者的肺灌洗回收液,分析其中代 谢物的变化情况,并探索差异代谢物参与的代谢通路, 找到煤工尘肺的潜在生物标志物,为煤工尘肺的治疗 研究提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 一般资料 选取 2023 年 5—7 月在应急管理部 北戴河康复院进行大容量肺灌洗手术治疗的 66 例男 性煤工尘肺患者为病例组,其中壹期患者 40 例,贰期 患者 20 例, 叁期患者 6 例; 各期别均由专家依据 GBZ 70-2015《职业性尘肺病的诊断》中的煤工尘肺诊断 标准诊断确认。

选取 2023 年 7-9 月于北京市朝阳区应急总医 院进行气管镜检查的 15 例男性气道狭窄患者为对 照组。

本研究经过华北理工大学医学伦理委员会的批 准(审批号: 2023027)。所有患者均自愿同意参加本研 究的样本采集,并签署知情同意书。

1.1.2 纳入排除标准 病例组纳入标准: ①符合壹期、 贰期、叁期煤工尘肺诊断标准;②年龄在 25~65 周岁 之间的男性;③接受大容量肺灌洗手术治疗;④无乙 型肝炎等传染性疾病及其他肺纤维化疾病; ⑤临床病 例资料完整。

对照组纳入标准: ①根据煤工尘肺诊断标准排除 尘肺病的患者;②年龄在 25~65 周岁之间的男性; ③进行气管镜手术治疗;④临床病例资料完整。

排除标准:患有活动性肺结核、肺部感染、肺大 疱、重度肺功能低下和严重的心肝肾等重要脏器功能 障碍等并发症,经研究者判断不适合参与本研究的 患者。

1.2 研究方法

1.2.1 试验设计 采用横断面调查研究设计,以平均 每年于北戴河康复院进行大容量肺灌洗手术的煤工 尘肺患者人数和平均每年因气道狭窄于应急总医院 行气管镜检查的患者人数,作为本试验样本量的计算 依据, 规定 α 水平为 0.05, β 水平为 10%, 把握度为 90%,收治北戴河康复院呼吸科的病例组 66 例,收治 应急总医院呼吸科的对照组 15 例, 对其 BALF 进行非 靶向代谢组学分析研究。

1.2.2 样本收集 收集病例组患者 BALF 的第 2 瓶(即 第 500~1000 mL 部分)为样品,用四层 100 目纱布过 滤,在4°C、转速1500 r·min⁻¹、离心半径8 cm 的条件 下,离心 15 min,留取上清液 100 mL,编号,-80 ℃冰 箱保存备用。

收集对照组患者健康肺段的 BALF 10 mL, 在 4 ℃、 转速 1500 r·min⁻¹、离心半径 8 cm 的条件下,离心 5 min, 留取上清液 10 mL,编号,-80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 样本处理 将样本从-80 ℃ 冰箱取出,冰水浴 解冻,取病例组上清液 50 mL,对照组上清液 10 mL, 将甲醇(CNW Technologies,中国)、乙腈(CNW Technologies,中国)、纯水(屈臣氏,中国)按照 2:2:1 的

比例混合制成提取液,以 50 mL 加入 1500 uL 提取液 为基准,按照体积比例加入不同体积的提取液干所 有样本中,通过涡旋混合器充分混匀后,在冰水浴中 使用超声仪(PS-60AL,中国)超声处理 10 min,并在 -40 ℃的条件下静置 1 h, 在 4 ℃、12 000 r·min⁻¹、离 心半径 8.6 cm 的条件下离心 15 min, 从中移取 200 μL 上清液,加入离心管中,编号备用。另从81例样本中 抽取等量上清液混合制成 9 例质控(quality control, QC) 样本, 同样进行上述处理, 在样本上机检测过程 中,每检测9例样本穿插1例QC样本,对实验过程 进行质控。此外,用超纯水配成5例空白样本,同样 每9例样本中穿插1例空白样本,监控仪器样本残 留情况。

1.2.4 色谱质谱条件 色谱条件:使用高效液相色谱 仪(Vanquish,美国),色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相 A 相为 25 mmol·L⁻¹ 乙酸铵+25 mmol·L⁻¹ 氨水, 流动相 B 相为 乙腈; 柱温 25 ℃, 样本恒温 4 ℃ 下进样量 2 µL, 流速 0.5 mL·min⁻¹。洗脱梯度为: 第 0-0.25 分钟, 95% B; 第0.25-3.5分钟,65%B;第3.50-4.00分钟,40%B; 第4.00-4.50分钟,40%B;第4.50-4.55分钟,95%B; 第4.55-6.00分钟,95%B。

质谱条件: 仪器使用高分辨质谱仪(Orbitrap Exploris 120,美国),正负离子电离模式。具体参数为鞘 气流量=50 Arb,辅助气体流量=15 Arb,喷雾电压=3.8 kV 或-3.4 kV, 毛细管温度=320 ℃, 全质谱(mass spectrometry, MS)分辨率=60000, MS/MS分辨率=15000, 碰撞能量=正离子模式 30 V, 负离子模式-30 V。

1.2.5 数据处理 采用 Proteo Wizard(3.0, 24117)软 件对原始数据进行 mzXML 格式化处理, 使用内核为 XCMS 的 R 程序包进行峰识别、峰提取等处理,并在 BiotreeDB(V2.1)数据库中进行匹配和物质注释。在 Simca 14.1 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 筛选差异具有统计学意义的生物标志 物。具体为针对第一主成分,去除与分类变量无关的 正交变量,建立正交偏最小二乘判别分析模型,以该 模型的第一主成分的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP) > 1,结合单变量统计方法 的 t 检验的 P<0.05 为筛选标准,并根据代谢物比较 的两组倍数关系(fold change, FC) > 1.5 或 < 0.667 的标 准,筛选出在两组之间具变化趋势的差异代谢物。

在筛选出差异代谢物后再结合京都基因与基因 组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,

619

KEGG)数据库进行相关代谢通路富集分析。以代谢通路富集分析 *P* < 0.05,代谢通路拓扑分析的 Impact≥ 0.1 为标准,筛选关键代谢通路。

1.2.6 质量控制 将 9 例 QC 样本上机检测,得到 QC 样本的 PCA 得分图,见补充材料图 S1,结果显示,QC 样本集中在右下象限,散点高度重合,表示 QC 样本检 测结果聚集性好。说明本次实验代谢物提取方法稳定 有效,仪器信号采集质量和性能在整个实验过程中有 较高的稳定性。

将加入内标的 9 例 QC 样本和 5 例空白样本穿插 在整个实验中,发现 QC 样本内标的出峰时间与响应 的峰高差基本吻合,检测仪器具有良好的稳定性;空 白样本无明显峰被检出,在检测过程中物质残留情况 控制良好,几乎不存在样本间的交叉污染,结果见补 充材料图 S2、图 S3。之后对 QC 样本进行相关分析, 得到 9 个 QC 样品的相关性均位于 0.90~0.97 之间,相 关性较好,说明本次实验数据质量很高,结果见补充 材料图 S4。

1.2.7 统计学分析 实验数据采用 SPSS 23.0 软件进 行统计分析,对正态分布且方差齐的计量资料采用 单因素方差分析,并在事后做两两比较,对符合正态 分布但方差不齐的计量资料采用 Welch 检验,并进 行全部成对的多重两两比较。对计数资料采用 Fish-

2 结果

2.1 患者基本信息

各组患者的身高、体重数据为正态分布且方差齐 的数据资料,采用方差分析进行统计分析。年龄、工龄 数据为正态分布但方差不齐的数据资料,采用 Welch 检验进行统计分析。4 组间身高、体重、年龄、工龄 4 种可能影响煤工尘肺进展的危险因素的分布差异无 统计学意义(*P*>0.05)。结果见表 1。

采用 Fisher 确切概率法对各组患者的吸烟、饮 酒、高血压、脂肪肝、糖尿病情况进行统计学检验, 结果见表 2,不同组间患者的吸烟、饮酒、高血压、 脂肪肝、糖尿病这 5 种因素的分布差异无统计学意 义(*P* > 0.05)。

2.2 各比较组主成分分析结果

如图 1 所示,壹期/对照组、贰期/对照组、叁期/ 对照组,均不存在交叉现象,组间存在分离趋势,显示 在三个比较组中 BALF 代谢网络存在差异。壹期/贰期、 壹期/叁期、贰期/叁期,样本间分离程度不明显,交叉 现象严重,显示在这三个比较组中 BALF 代谢网络无 明显变化。

Table 1 Comparison or basic conditions of patients with coal worker's pheumoconiosis $(x \pm s)$						
分组(Group)	人数(Number)	身高(Height)/cm	体重(Weight)/kg	年龄/岁(Age/years)	工龄/年(Length of service/years)	
壹期(Stage丨)	40	171±4.7	72±9.2	51±5.5	20±6.9	
贰期(Stage II)	20	169±4.2	71±9.5	52±7.2	22±9.4	
叁期(StageIII)	6	174±5.2	72±7.3	50±8.9	14±3.8	
对照(Control group)	15	172±3.0	74±5.9	52±12.9	0	
合计(Total)	81	171±4.4	72±8.5	52±7.9	20±7.8	
F	_	2.214	0.249	0.153	2.233	
Р	_	0.093	0.862	0.927	0.116	

表1 煤工尘肺患者基本情况比较 (x ± s)

表 2 煤工尘肺患者混杂因素比较

Table 2 Comparison of confounding factors in patients with coal worker's pneumoconiosis

分组(Group)	人数 (Number)	吸烟(Smoking)		饮酒(Drinking)		高血压(High blood pressure)		脂肪肝(Fatty liver)		糖尿病(Diabetes)	
		例数 (Number)	率/% (Rate)/%	例数 (Number)	率/% (Rate)/%	例数 (Number)	率/% (Rate)/%	例数 (Number)	率/% (Rate)/%	例数 (Number)	率/% (Rate)/%
壹期(Stage丨)	40	32	80.0	24	60.0	16	40.0	9	22.5	1	2.5
贰期(Stage II)	20	17	85.0	13	65.0	7	35.0	6	30.0	1	5.0
叁期(StageIII)	6	5	83.3	5	83.3	0	0.0	1	16.6	0	0.0
对照(Control group)	15	8	53.3	8	53.3	5	33.3	0	0.0	14	93.3
合计(Total)	81	62	76.5	50	61.7	28	34.6	16	19.8	16	19.8
P(Fisher test)	-		0.152		0.669		0.245		0.106		0.820

移境与职业医学 | Journal of Environmental and Occupational Medicine | 2024, 41(6)



[Note] A: Stage I vs control group, B: Stage II vs control group, C: Stage III vs control group, D: Stage I vs Stage II , E: Stage I vs stage III , F: Stage II vs stage III .

图 1 6 个两两比较组间肺灌洗回收液样本的 PCA 得分散点图 Figure 1 PCA score scatter plots of six pairwise comparison groups

2.3 差异代谢物筛选

差异代谢物筛选结果得出,在壹期煤工尘肺组与 对照组中,有48种差异代谢物,上调差异代谢物有 14种,下调差异代谢物有34种;在贰期煤工尘肺组 与对照组中,有66种差异代谢物,上调差异代谢物有 14种,下调差异代谢物有52种;在叁期煤工尘肺组 与对照组中,有63种差异代谢物,上调差异代谢物有 11种,下调差异代谢物有52种。壹期煤工尘肺组与 贰期煤工尘肺组、壹期煤工尘肺组与叁期煤工尘肺组、 贰期煤工尘肺组与叁期煤工尘肺组之间未发现具有 统计学意义的差异代谢物。

通过汇总各组的差异代谢物,研究发现参与疾病

发生发展的代谢物共 36 种,即在壹期/对照、贰期/对 照、叁期/对照组中均表达差异的代谢物,其中,上调 代谢物有 11 种,下调代谢物有 25 种,详见表 3。

2.4 代谢通路筛选与分析

总体差异代谢物 KEGG 通路富集分析提示与煤工 尘肺相关的通路包括核苷酸代谢、丁酸代谢、亚油酸 代谢等共 42 条代谢通路,以代谢通路富集分析 P<0.05, 代谢通路拓扑分析的 Impact 值≥0.1 为标准,筛选出 4 条涉及的关键代谢通路,分别为:亚油酸代谢通路、 鞘脂代谢通路、丙氨酸代谢通路和甘油磷脂代谢通路。 结合差异代谢物在差异代谢通路中的富集情况,得到 表 4。

	Table 3 Differential meta	abolites involved in the progressio	on of coal wo	rker's pheum	oconiosis	
序号 (No.)	差异代谢物名称 (Name of differential metabolite)	第一主成分的变量投影重要度 (VIP for principal component 1)	Р	Q#	倍数关系 (FC)	上调/下调* (Up/down)
1	马来酸(Maleic acid)	1.400 41	0.00104	0.008 07	5.51828	\uparrow
2	甲基去甲福林(Methyl normethazine)	1.75688	0.00042	0.002 30	3.61244	\uparrow
3	精氨酸(Arginine)	1.35166	0.000 02	0.00016	6.26919	\uparrow
4	丁二酸酐(Succinic anhydride)	1.25968	0.00192	0.01255	2.48222	\uparrow
5	天竺葵酸(Geranium acid)	1.460 27	0.000 09	0.001 53	1.85953	\uparrow
6	庚酸(Heptanoic acid)	1.81152	0.000 03	0.000 29	2.50075	\uparrow
7	丙酸(Propionic acid)	1.267 50	0.000 57	0.005 32	2.44861	\uparrow
8	谷氨酰胺(L-glutamine)	1.604 79	0.00021	0.001 32	7.78634	\uparrow
9	次黄嘌呤(Hypoxanthine)	1.58614	0.000 25	0.001 50	9.37344	\uparrow
10	月桂酸(正十二烷酸,N-dodecanoic acid)	1.13086	0.00012	0.000 85	2.87480	\uparrow

www.jeom.org

622

续表 3						
序号 (No.)	差异代谢物名称 (Name of differential metabolite)	第一主成分的变量投影重要度 (VIP for principal component 1)	Р	Q [#]	倍数关系 (FC)	上调/下调* (Up/down)
11	乳酸(Lactic acid)	1.42624	0.012 30	0.03927	3.307 20	\uparrow
12	N-乙酰-β-丙氨酸(N-acetyl-beta-alanine)	1.32984	0.015 00	0.04646	0.19801	\checkmark
13	肌醇(Inositol)	1.81792	0.000 12	0.00085	0.112 14	\checkmark
14	焦酒石酸(Tartaric acid)	1.63250	0.005 72	0.02034	0.08076	\checkmark
15	琥珀半醛(Amber semialdehyde)	1.66273	0.00378	0.01442	0.200 03	\checkmark
16	奥昔嘌醇(Oxypurinol)	1.82793	0.01615	0.04952	0.025 14	\checkmark
17	N-乙酰葡糖胺-1-磷酸(N-acetylglucosamine-1-phosphate)	1.406 50	0.000 00	0.00000	0.08104	\checkmark
18	5'-胞苷酸(5'-cytidine)	1.24679	0.000 05	0.00037	0.11998	\checkmark
19	2-呋喃酰甘氨酸(2-furanoyl glycine)	1.972 47	0.00001	0.00010	0.066 33	\checkmark
20	麦芽三糖(Maltotriose)	1.19447	0.02422	0.04962	0.34647	\checkmark
21	尿苷5'-单磷酸(Uridine 5'-monophosphate)	1.64157	0.000 08	0.00055	0.11600	\checkmark
22	麦芽五糖(Maltopentaose)	1.66759	0.004 54	0.01677	0.02841	\checkmark
23	地诺前列素(Dinoprost)	1.725 22	0.015 85	0.04866	0.006 66	\checkmark
24	γ-亚麻酸(γ-linolenic acid)	1.27925	0.00478	0.01751	0.21718	\checkmark
25	4-异丙基苯甲酸(4-isopropylbenzoic acid)	1.78694	0.000 00	0.00001	0.231 25	\checkmark
26	尿囊素(Allantoin)	1.76667	0.01954	0.04812	0.045 50	\checkmark
27	麦芽四糖(Maltotetraose)	1.67001	0.00187	0.00807	0.02125	\checkmark
28	3'-甲氧基鸟苷(3'-methoxyguanosine)	1.64786	0.02005	0.04939	0.12004	\checkmark
29	脱甲氧姜黄(Demethoxyturmeric)	1.53832	0.000 02	0.00017	0.22426	\checkmark
30	麦芽六糖(Maltohexaose)	1.54048	0.00413	0.01553	0.08016	\checkmark
31	乙醇胺磷酸酯(Ethanolamine phosphate)	1.86761	0.01828	0.04643	0.10649	\checkmark
32	硬脂酸(反式十八烷酸, <i>Trans</i> -octadecanoic acid)	1.43154	0.000 04	0.00032	0.25630	\checkmark
33	二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid)	1.10933	0.005 79	0.02571	0.27682	\checkmark
34	蔗糖(Sucrose)	1.19697	0.01462	0.045 44	0.07678	\checkmark
35	苷酸(Nucleotide)	1.35448	0.000 27	0.00163	0.068 68	\checkmark
36	苯甲酸(Benzoic acid)	1.77132	0.00001	0.00011	0.246 21	\downarrow

[注]#:Q为假阳性结果个数/推测为阳性结果的个数。*:个表示上调,↓表示下调。

[Note] #: Q is number of false positive results/number of presumed positive results. *: \uparrow means up, and \downarrow means down.

表 4 差异代谢通路富集到的差异代谢物

Table 4 Differential metabolites enriched by differential metabolic pathways

代谢通路	富集分析P值(P value of	拓扑分析Impact值	富集差异代谢物
(Metabolic pathway)	enrichment analysis)	(Impact value of topology analysis) (Enrichment of differential metabolites)
 鞘脂代谢(Sphingolipid metabolism)	0.015644	0.153 08	鞘氨醇、植物鞘氨醇、O-磷酸乙醇胺(Sphingosine, sphingosine, O-ethanolamine phosphate)
亚油酸代谢(Linoleic acid metabolism)	0.001685	0.65625	亚油酸、二十二碳六烯酸、γ-亚麻酸(Linoleic acid, docosahexaenoic acid acid, γ-linolenic acid)
甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)	0.040 343	0.15685	磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱、乙醇胺磷酸酯(Phosphatidylcholine, glycerin phosphatidylcholine, Ethanolamine phosphate)
丙氨酸代谢(Alanine metabolism)	0.013977	0.440 65	琥珀酸半醛、谷氨酰胺、L-谷氨酸(Succinic acid, L-glutamine acid, L-glutamic acid)

3 讨论

本研究中,共筛选出 36 种参与煤工尘肺疾病发 生发展全过程的差异代谢物,其中,11 种为上调差异 代谢物,25 种为下调差异代谢物,筛选出 4 条差异代 谢通路,包括亚油酸代谢、鞘脂代谢、丙氨酸代谢和甘 油磷脂代谢途径。富集于差异代谢通路的差异代谢物 有:γ-亚麻酸、乙醇胺磷酸酯、谷氨酰胺、二十二碳六 烯酸。其中,谷氨酰胺在煤工尘肺患者中呈高表达状态,而γ-亚麻酸、二十二碳六烯酸和乙醇胺磷酸酯呈 低表达状态。

谷氨酰胺具有多种细胞保护功能,能够抑制细胞 凋亡并促进细胞迁移^[13]。在本研究中,煤工尘肺患者 体内谷氨酰胺含量相较于对照组而言是升高的。Ge 等^[14]通过靶向代谢技术分析肺纤维化模型和正常人 体的肺成纤维细胞发现,在纤维化模型的成纤维细胞 中,谷氨酰胺及其代谢活动增强,其代谢产生的 α-酮 戊二酸(α-ketoglutarate, α-KG)能够激活雷帕霉素机械 作用靶点复合物 1(sirolimus target complex 1, mTORC1), 促进胶原的表达,抑制成纤维细胞中胶原蛋白的降解, 在人肺成纤维细胞胶原蛋白的表达中起着关键作用。 纤维组织的主要结构蛋白是胶原蛋白,过量胶原蛋白 在组织中沉积是纤维化发病机制的主要因素, Hamanaka 等^[15]对未经谷氨酰胺培养的肺成纤维细胞 与经谷氨酰胺培养的肺成纤维细胞进行代谢分析比 较,结论证实谷氨酰胺是转化生长因子-B(transforming growth factor-β, TGF-β)诱导机体肺成纤维细胞产 生胶原蛋白的重要因子,导致胶原蛋白过度沉积从而 引起肺组织纤维化。此外,谷氨酰胺在胞质中可以与 吡咯啉-5 羧酸盐结合生成胶原蛋白中主要的胶原氨 基酸残基脯氨酸和甘氨酸[15-16],为胶原的合成提供原 材料。

乙醇胺磷酸酯又名磷脂酰乙醇胺,是肺泡表面活 性物质中磷脂的组成成分,是一种非磷脂酰胆碱的良 性磷脂离子。Chen等^[17]对煤工尘肺患者血清脂质代 谢组学的研究发现,与正常人群相比,煤工尘肺患者 乙醇胺磷酸酯的相对丰度显著下降,是煤工尘肺的一 种潜在生物标志物。在煤工尘肺疾病发生发展过程中, 乙醇胺磷酸酯主要通过降低肺成纤维细胞中胶原 mRNA 及胶原蛋白的表达,诱导肺成纤维细胞中 Ca²⁺信号表 达,通过 U73122 或 2-APB 抑制 PLC/InsP3 信号通路, 促进人体肺成纤维细胞凋亡,抑制肺纤维化的发展^[18]。

二十二碳六烯酸产生的 10S,17S-二羟基二十二碳 素-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-己烯酸能够减轻尘肺患者的 炎症反应和细胞外基质沉积症状,调节与肺纤维化有 关的肿瘤坏死因子-α、白细胞介素-1β和 TGF-β1 等细 胞因子水平,改善血气交换和肺功能,纠正尘肺的低 氧血症并发症,逆转上皮-间质表型转化,抑制肺纤维 化进程^[19]。

本研究筛选出的差异代谢通路中,甘油磷脂代谢 途径参与煤工尘肺疾病的发生发展,此检验结果与 Li 等^[4]学者研究的尘肺患者血浆代谢组学特征结果一致。 甘油磷脂代谢途径涉及肺表面活性剂磷脂的合成与 代谢,影响 II 型肺泡上皮细胞的稳态调节机制^[20],进 而影响患者肺功能,导致疾病发生发展。

本研究还发现肌醇在煤工尘肺中表达降低而乳

酸的表达水平升高,Kottmann 等^[21]通过分析肺纤维化 患者肺组织中的代谢变化,发现乳酸浓度显著升高, 可能作用机制是促使成纤维细胞 TGF-β 激活,血小板 衍生生长因子 β/过氧化物酶体增殖物活化受体-γ 传 导通路诱导肌成纤维细胞增殖,也可诱导肺胶原纤维 的合成、沉积,加剧患者肺部纤维化的病变进程。此外, 乳酸的增多可能与有氧糖酵解途径被激活有关,该途 径为患者机体成纤维细胞分化为肌成纤维细胞提供 能量,促进形成细胞外基质,抑制该过程可能有助于 减轻肺纤维化进程^[22]。肌醇可通过抑制由肌醇驱动的 信号传导诱导的肺部纤维化过程,抑制细胞侵袭,减 缓肺纤维化进程,表现出抗纤维化特性,同时,下调白 细胞介素-6 的水平可改善煤工尘肺患者的气道炎症 反应^[23-24]。如果增加患者体内肌醇的含量,可能达到 延缓疾病进展的目的。

本研究中还发现了一些其他研究未发现的γ-亚 麻酸、琥珀半醛、N-乙酰-β-丙氨酸、丁二酸酐等差异 代谢物以及鞘脂代谢、亚油酸代谢等代谢通路,可能 是因为这些代谢物在进入血液、尿液等组织中时发生 了其他生物代谢反应,从而未能在其他生物样本中检 测到差异。但有研究证实其可能参与了煤工尘肺的发 生发展。鞘脂代谢中的鞘氨醇激酶-1 能够抑制肺组织 纤维化进程,1-磷酸鞘氨醇和溶血磷脂酸参与肺组织 纤维化的发病机制,但具体作用尚未明确,需进一步 验证^[25]。其他代谢物和代谢通路在煤工尘肺疾病发病 机制中的作用尚未有研究证实,需要后续进行靶向代 谢组学进一步分析研究。

综上所述,本研究发现煤工尘肺患者中,谷氨酰胺、 乳酸呈高表达状态,二十二碳六烯酸、乙醇胺磷酸酯、 肌醇呈低表达状态,可能参与疾病发生发展过程的代 谢通路有甘油磷脂代谢通路、亚油酸代谢通路、鞘脂代 谢通路和丙氨酸代谢通路。其他如次黄嘌呤、琥珀半醛、 焦酒石酸等差异代谢物在煤工尘肺发生发展过程中的 作用机制有待进一步验证。但由于如今进行大容量肺灌 洗手术治疗的尘肺患者较少,且叁期患者病情严重,肺 功能较差,无法耐受大容量肺灌洗手术治疗,未能检测 出不同期别煤工尘肺患者肺灌洗回收液中代谢物的差 异。本项研究得到的差异代谢物和代谢通路可能作为 潜在生物标志物,辅助诊断煤工尘肺疾病,为探索煤工 尘肺发病机制和治疗煤工尘肺新研究提供参考和思路。

参考文献

[1]王珺,周海,李朝晖,等.福建省某煤矿尘肺病死亡病例分析[J].海峡预

防医学杂志, 2019, 25(3): 108-110. WANG J, ZHOU H, LI Z H, et al. Analysis of death cases of pneumoconiosis in a coal mine in Fujian province[J]. Strait J Prev Med, 2019, 25(3): 108-110.

- [2] LIU G, XU Q, ZHAO J, et al. Research status of pathogenesis of pneumoconiosis and dust control technology in mine—a review [J]. Appl Sci, 2021, 11(21): 10313.
- [3] CHOTIRMALL SH, GELLATLY SL, BUDDEN KF, et al. Microbiomes in respiratory health and disease: an Asia-Pacific perspective[J]. Respirology, 2017, 22(2): 240-250.
- [4] LI Y, XIAO K, XIAO S, et al. Difference in intestinal flora and characteristics of plasma metabonomics in pneumoconiosis patients[J]. Metabolites, 2022, 12(10): 917.
- [5] LIU Y, LI Y, LIU K, et al. Exposing to cadmium stress cause profound toxic effect on microbiota of the mice intestinal tract[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e85323.
- [6] CALLEJÓN-LEBLIC B, GARCÍA-BARRERA T, PEREIRA-VEGA A, et al. Metabolomic study of serum, urine and bronchoalveolar lavage fluid based on gas chromatography mass spectrometry to delve into the pathology of lung cancer [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 163: 122-129.
- [7] ESTHER JR C R, COAKLEY R D, HENDERSON A G, et al. Metabolomic evaluation of neutrophilic airway inflammation in cystic fibrosis [J]. Chest, 2015, 148(2): 507-515.
- [8] 韩颖,秦亦如,金佳纯,等. 职业性矽肺患者血浆代谢组学研究[J]. 中国职业医学, 2022, 49(3): 280-286.
 HAN Y, QIN YR, JIN JC, et al. Plasma metabolomics study in patients with occupational silicosis[J]. Chin Occup Med, 2022, 49(3): 280-286.
 [9] ONG S.F. MANNIM A practical regime for stable jectore labeling by amino.
- [9] ONG SE, MANN M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) [J]. Nat Protoc, 2006, 1(6): 2650-2660.
- [10] ADDONA T A, ABBATIELLO S E, SCHILLING B, et al. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma [J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(7): 633-641.
- [11] 吕田田, 余亚辉, 余海艳, 等. 慢性阻塞性肺病稳定期模型大鼠支气管肺 泡灌洗液的代谢组学研究[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(19): 1955-1961.
 LYU TT, YU YH, YU HY, et al. Metabonomic study of alveolar lavage fluid in rats with stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chin J Hosp Pharm, 2021, 41(19): 1955-1961.
- [12] LIANG L, HU M, CHEN Y, et al. Metabolomics of bronchoalveolar lavage in children with persistent wheezing [J]. Respir Res, 2022, 23(1): 161.
- [13] BAI L, BERNARD K, TANG X, et al. Glutaminolysis epigenetically regulates antiapoptotic gene expression in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts

[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 60(1): 49-57.

- [14] GE J, CUI H, XIE N, et al. Glutaminolysis promotes collagen translation and stability via α -ketoglutarate –mediated mTOR activation and proline hydroxylation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 58(3): 378-390.
- [15] HAMANAKA R B, O'LEARY E M, WITT L J, et al. Glutamine metabolism is required for collagen protein synthesis in lung fibroblasts[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 61(5): 597-606.
- [16] LI P, WU G. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth [J]. Amino Acids, 2018, 50(1): 29-38.
- [17] CHEN Z, SHI J, ZHANG Y, et al. Lipidomics profiles and lipid metabolite biomarkers in serum of coal workers'pneumoconiosis[J]. Toxics, 2022, 10(9): 496.
- [18] SUN T, LI H, ZHANG Y, et al. Inhibitory effects of 3-Cyclopropylmethoxy-4-(difluoromethoxy) benzoic acid on TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transformation of in vitro and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in vivo[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6172.
- [19] LI H, HAO Y, ZHANG H, et al. Posttreatment with Protectin DX ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and lung dysfunction in mice[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46754.
- [20] GOSS V, HUNT A N, POSTLE A D. Regulation of lung surfactant phospholipid synthesis and metabolism [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(2): 448-458.
- [21] KOTTMANN R M, KULKARNI A A, SMOLNYCKI K A, et al. Lactic acid is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and induces myofibroblast differentiation via pH-dependent activation of transforming growth factor-β[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(8): 740-751.
- [22] 马瑞敏, 范亚丽, 叶俏. 肺纤维化与代谢物相关的研究趋势: 一项文献计量分析[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(4): 434-438,445.
 MA RM, FAN YL, YE Q. Current trends in research on pulmonary fibrosis and metabolites: a bibliometric analysis[J]. J Environ Occup Med, 2022, 39(4): 434-438,445.
- [23] UNVER N, DELGADO O, ZELEKE K, et al. Reduced IL-6 levels and tumor-associated phospho-STAT3 are associated with reduced tumor development in a mouse model of lung cancer chemoprevention with *myo*-inositol[J]. Int J Cancer, 2018, 142(7): 1405-1417.
- [24] DAWSON R E, JENKINS B J, SAAD M I. IL-6 family cytokines in respiratory health and disease [J]. Cytokine, 2021, 143: 155520.
- [25] ROQUE W, ROMERO F. Cellular metabolomics of pulmonary fibrosis, from amino acids to lipids[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2021, 320(5): C689-C695.

(英文编辑:汪源;责任编辑:丁瑾瑜)