

• 临床研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.19.009

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240909.1622.006\(2024-09-09\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240909.1622.006(2024-09-09))

基于液相色谱-质谱联用技术的慢性肾脏病骨质疏松症血清代谢组学研究*

李雨静,李瑾,周慧娜,闫桐,秦吉林,郭明好[△]
(新乡医学院第一附属医院肾脏内科,河南新乡 453100)

[摘要] **目的** 研究慢性肾脏病骨质疏松症(CKD-OP)患者的血清代谢产物变化,为 CKD-OP 的早期诊断提供新的生物标志物。**方法** 选取 2023 年 4—11 月在该院就诊并确诊为 CKD 的患者 22 例作为研究对象,另纳入同时期体检者 22 例进行对照研究。以腰椎 T 值 ≤ -2.5 为标准将研究对象分为 CKD-OP 组($n=11$)、慢性肾脏病非骨质疏松症组(CKD-NOP 组, $n=11$)、单纯骨质疏松症组(OP 组, $n=11$)和健康对照组(NC 组, $n=11$)。采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术分析 4 组受试者血清代谢产物差异,筛选 CKD-OP 的潜在生物标志物,并研究潜在生物标志物与腰椎骨密度(BMD)、血清骨源性碱性磷酸酶(BALP)、血清抗酒石酸酸性磷酸酶-5b(TRACP-5b)之间的相关性。**结果** 以受试者工作特征(ROC)曲线的曲线下面积(AUC) >0.9 为条件,筛选出 CKD-OP 的 4 种潜在生物标志物,分别为磷酸胆碱、溶血磷脂酰胆碱(18:2/0:0)、癸酸、尿囊素。血清磷酸胆碱与腰椎 BMD 呈正相关($r=0.601, P<0.05$),与血清 BALP、TRACP-5b 呈负相关($r=-0.729, -0.623, P<0.05$);血清尿囊素与腰椎 BMD 呈正相关($r=0.483, P<0.05$),与血清 BALP 呈负相关($r=-0.494, P<0.05$);血清溶血磷脂酰胆碱(18:2/0:0)与腰椎 BMD 呈正相关($r=0.640, P<0.05$),与血清 BALP、TRACP-5b 呈负相关($r=-0.628, -0.548, P<0.05$);血清癸酸与腰椎 BMD 呈负相关($r=-0.444, P<0.05$),与血清 BALP 呈正相关($r=0.587, P<0.05$)。**结论** 筛选出的 4 种内源性潜在生物标志物为 CKD-OP 的早期诊断及疗效监测提供了新的研究思路。

[关键词] 代谢组学;骨质疏松;慢性肾脏病;液相色谱;生物标志物

[中图分类号] R692.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)19-2930-07

Serum metabolomics study of chronic kidney disease osteoporosis based on liquid chromatography-mass spectrometry coupling technique*

LI Yujing, LI Jin, ZHOU Huina, YAN Tong, QIN Jilin, GUO Minghao[△]
(Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China)

[Abstract] **Objective** To study the changes of serum metabolites in the patients with chronic kidney disease osteoporosis (CKD-OP) to provide the new biomarkers for the early diagnosis of CKD-OP. **Methods** A total of 22 patients with definitely diagnosed CKD visiting in this hospital from April to November 2023 were selected as the study subjects, and 22 subjects with physical examination in this hospital at the same period were included for conducting the control study. With the lumbar vertebral T value ≤ -2.5 as the standard, the subjects were divided into the CKD-OP group ($n=11$), CKD non-OP group (CKD-NOP group, $n=11$), simple osteoporosis group (OP group, $n=11$) and healthy control group (NC group, $n=11$). The liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) coupling technique was used to analyze the differences in serum metabolites among the four groups, the potential biomarkers of CKD-OP was screened, and the correlation between the potential biomarkers with lumbar vertebra bone mineral density (BMD), serum bone-derived alkaline phosphatase (BALP) and serum tartrate-resistant acid phosphatase-5b (TRACP-5b) was studied. **Results** With the receiver's operating characteristic (ROC) curve's area under curve (AUC) >0.9 as the condition, and four potential biomarkers of CKD-OP were screened, which were phosphorylcholine, lysophosphatidylcholine (18:2/0:0), capric acid, and allantoin respectively. Serum phosphorylcholine was positively corre-

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20220591, LHGJ20230502);新乡医学院第一附属医院青年培育基金项目 A 类(QN-2022-A19)。[△] 通信作者, E-mail: guomh@163.com。

lated with lumbar vertebra BMD ($r=0.601, P<0.05$) and negatively correlated with serum BALP and TRACP-5b ($r=-0.729, -0.623, P<0.05$). Serum allantoin was positively correlated with lumbar vertebra BMD ($r=0.483, P<0.05$) and negatively correlated with serum BALB ($r=-0.494, P<0.05$). Serum lyso-phosphatidylcholine (18 : 2/0 : 0) was positively correlated with lumbar vertebra BMD ($r=0.640, P<0.05$), and negatively correlated with serum BALP and TRACP-5b ($r=-0.628, -0.548, P<0.05$). Serum capric acid was negatively correlated with lumbar vertebra BMD ($r=-0.444, P<0.05$) and positively correlated with serum BALB ($r=0.587, P<0.05$). **Conclusion** The screened four endogenous potential biomarkers provide the new research ideas for the early diagnosis and treatment efficacy monitoring of CKD-OP.

[Key words] metabolomics; osteoporosis; chronic kidney disease; liquid chromatography; biomarkers

慢性肾脏病矿物质和骨异常(chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD)是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)导致的矿物质及骨代谢异常综合征,临床上主要表现为矿物质代谢紊乱、骨重塑异常、骨质疏松及心血管或其他软组织钙化等^[1]。CKD 患者早期就会出现矿物质代谢紊乱,导致骨骼形成、重塑和生长改变,引起慢性肾脏病骨质疏松症(chronic kidney disease-osteoporosis, CKD-OP)^[2-3]。多项研究显示,CKD 患者骨质疏松和骨折发生的风险明显高于健康人群,严重影响患者的生活质量,增加患者死亡率^[4-5]。但目前 CKD-OP 的发病机制尚未完全明确。代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门新兴学科,通过效仿基因组学和蛋白质组学思路,代谢组对生物体内所有小分子代谢产物进行分析,可全方位、系统性表征细胞或有机体在受到刺激后(如基因突变、环境改变等)的代谢水平改变。通过研究代谢物的变化规律和病理生理变化,从而找到生物体系代谢途径^[6]。本研究拟采用液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)技术研究 CKD-OP 患者血清代谢组学变化,探索 CKD-OP 的潜在生物标志物,并评估其与腰椎骨密度(bone mineral density, BMD)、骨代谢标志物之间的关系,为 CKD-OP 的早期诊断提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2023 年 4—11 月在本院就诊并确诊为 CKD 的患者 22 例作为研究对象。纳入标准:(1)诊断标准符合《慢性肾脏病早期筛查、诊断及防治指南(2022 版)》^[7];(2)临床资料、生化指标和 BMD 资料完整;(3)年龄 ≥ 18 岁。排除标准:(1)合并肝功能异常、急性炎症性疾病或传染性疾病;(2)患有可能会影响体内骨代谢的免疫性疾病、恶性肿瘤;(3)1 年内使用可能影响骨代谢的药物时间 > 3 个月(包括任何类型的双膦酸盐药物、雌激素受体调节剂、雌激素、活性维生素 D 制剂、糖皮质激素等)。另纳入同时期体检者 22 例进行对照研究。根据《原发性骨质疏松症诊疗指南(2022 版)》定义骨质疏松为腰椎 T 值 ≤ -2.5 ^[8]。根

据以上标准将研究对象分为 CKD-OP 组($n=11$)、慢性肾脏病非骨质疏松症组(CKD-NOP 组, $n=11$)、单纯骨质疏松症组(OP 组, $n=11$)和健康对照组(NC 组, $n=11$)。本研究经本院伦理委员会批准(审批号: EC-022-158),所有受试者知情并自愿参加本研究。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集

收集所有受试者一般资料(性别、年龄、BMI)和实验室检查(肾功能),同时收集影像学检查(BMD、腰椎 T 值等)。应用 CKD 流行病学合作研究公式计算肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)。

1.2.2 仪器与试剂

主要试剂:甲醇、乙腈(德国 CNW Technologies 公司),乙酸铵、乙酸(美国 SIGMA-ALDRICH 公司),氨水(美国 Fisher Chemical 公司),超纯水(广州屈臣氏有限公司),人骨源性碱性磷酸酶(bone-specific alkaline phosphatase, BALP)ELISA 试剂盒(中国江苏酶免实业有限公司),人抗酒石酸酸性磷酸酶-5b(tartrate resistant acid phosphatase-5b, TRACP-5b)ELISA 试剂盒(中国江苏酶免实业有限公司)。实验仪器:Vanquish 超高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Cientific 公司),Orbitrap Exploris 120 质谱仪(美国 Thermo Fisher Cientific 公司),离心机(美国 Thermo Fisher Cientific 公司),全自动生化分析仪 AU5800(美国 Beckman Coulter 公司),uCT550 CT 机(上海联影医疗科技股份有限公司)。

1.2.3 标本采集与处理

所有受试者均采集空腹静脉血 5 mL;20~25 ℃ 静置 30 min;3 000 r/min 离心处理 10 min,取血清置于液氮冻存 10 min,转移至 -80 ℃ 保存备用。ELISA 试剂盒检测血清 BALP、TRACP-5b 表达水平。余移取 100 μ L 血清标本,加入 400 μ L 提取液[甲醇:乙腈=1:1(V/V)],提取液含同位素标记内标;涡旋混匀 30 s;冰水浴中超声 10 min;-40 ℃ 静置 1 h;12 000 r/min 离心 15 min(4 ℃),取上清液,进行 LC-MS 分析。

1.2.4 质量控制验证

所有血清标本另取等量上清液混合成质量控制样品,共 7 管,按照 1.2.3 标本采集与处理方法进行处理。对质量控制样品进行验证,7 份质量控制样品的偏差均在上下 2 个标准差范围内,相关性均接近于 1,说明仪器稳定性和试验重复性均较好,试验数据稳定可靠且能反映不同组别之间代谢组学上的差异。

1.2.5 上机检测

使用 Vanquish 超高效液相色谱仪,通过 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 mm × 50.0 mm,1.7 μm)液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相,含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水,B 相为乙腈。标本盘温度 4℃,进样体积 2 μL。Orbitrap Exploris 120 质谱仪能够在 Xcalibur4.4 控制软件(美国 Thermo Fisher Cientific 公司)控制下进行一级、二级质谱数据采集。

1.2.6 数据处理

采用 R 包(Ropls 1.16.0)进行主成分分析(principal component analysis,PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis,OPLS-DA),以获取变量投影重要度(variable important for the projection,VIP)。通过 *t* 检验获得 *P* 值,并基于 *P*<0.05 及 VIP>2 的标准,筛选对比组之间差异有统计学意义的代谢物。

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件进行数据分析。满足正态分布和方差齐性检验的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。不符合正态分布和方差齐性的计量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,组间比较采用秩和检验。计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。数据之间具有相关性且满足正态分布,采用 Pearson 相关分析,否则采用 Spearman 相关分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组临床资料比较

NC 组患者年龄低于 OP 组及 CKD-OP 组,差异有统计学意义(*P*<0.05);NC 组及 OP 组患者 eGFR 均高于 CKD-NOP 组及 CKD-OP 组,差异有统计学意义(*P*<0.05);4 组间在性别、BMI 上比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

2.2 4 组血清 BALP、TRACP-5b 水平比较

4 组受试者血清 BALP、TRACP-5b 表达水平比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。与 CKD-OP 组对比,NC 组、OP 组、CKD-NOP 组血清 BALP、TRACP-5b 水平均更低,差异有统计学意义(*P*<0.05);与 OP 组对比,NC 组血清 BALP、TRACP-5b 水平更低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与 CKD-NOP 组对比,NC 组血清 TRACP-5b 水平更低,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。

表 1 4 组临床资料比较

项目	NC 组 (<i>n</i> =11)	OP 组 (<i>n</i> =11)	CKD-NOP 组 (<i>n</i> =11)	CKD-OP 组 (<i>n</i> =11)	χ^2/Z	<i>P</i>
男/女(<i>n</i> / <i>n</i>)	4/7	3/8	5/6	3/8	2.288	0.649
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	56.45±4.06 ^{ac}	68.91±5.17	63.91±10.09	69.00±4.92	17.014	0.001
BMI($\bar{x} \pm s$,kg/m ²)	24.97±3.83	24.86±2.76	24.00±1.76	26.24±2.69	1.150	0.341
eGFR($\bar{x} \pm s$,mL·min ⁻¹ ·(1.73 m ²) ⁻¹)	101.59±8.27 ^{bc}	96.66±6.67 ^{bc}	20.87±15.24	30.62±14.29	33.620	<0.001
腰椎 BMD($\bar{x} \pm s$,mg/cm ³)	139.31±21.46 ^{ac}	69.29±20.70 ^b	129.45±24.22 ^c	69.64±21.20	32.482	<0.001

^a:*P*<0.05,与 OP 组比较;^b:*P*<0.05,与 CKD-NOP 组比较;^c:*P*<0.05,与 CKD-OP 组比较。

表 2 4 组血清 BALP、TRACP-5b 水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	NC 组(<i>n</i> =11)	OP 组(<i>n</i> =11)	CKD-NOP 组(<i>n</i> =11)	CKD-OP 组(<i>n</i> =11)	<i>H</i>	<i>P</i>
BALP(μg/L)	6.25±1.16 ^{ac}	7.46±1.06 ^c	6.84±1.50 ^c	13.18±4.61	22.426	<0.001
TRACP-5b(ng/L)	95.54±24.94 ^{abc}	125.05±31.57 ^c	134.77±39.73 ^c	207.31±83.71	18.731	<0.001

^a:*P*<0.05,与 OP 组比较;^b:*P*<0.05,与 CKD-NOP 组比较;^c:*P*<0.05,与 CKD-OP 组比较。

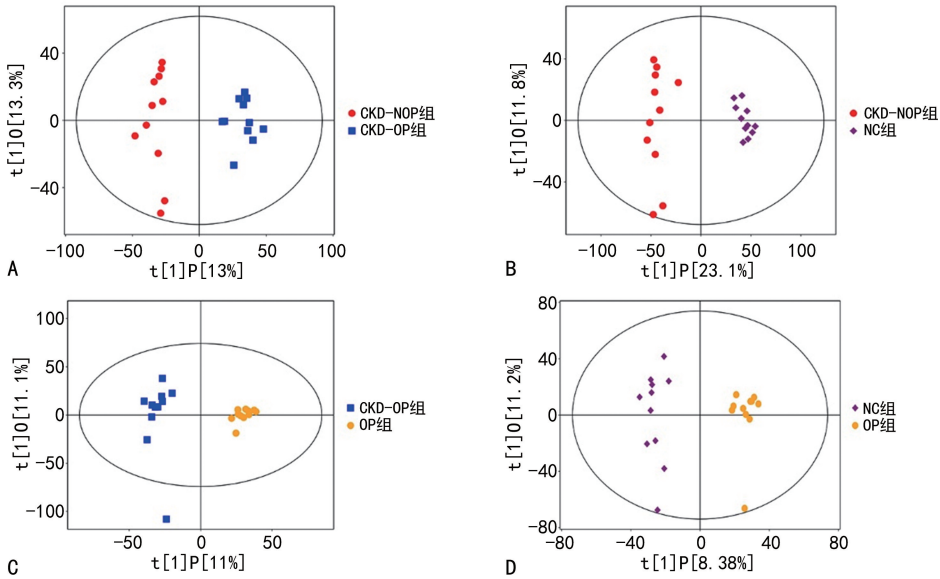
2.3 OPLS-DA 分析结果

4 组间出现分离趋势,血清样本代谢产物存在差异,见图 1。对 OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验,以判断模型是否存在过拟合。结果显示,左侧的 Q^2 值均低于右侧原始点,或者 Q^2 的回归线与纵轴相交数值<0,表明模型拟合度良好。

2.4 4 组血清代谢产物比较

以 VIP>2、*P*<0.05 为条件,对各组间差异代谢物进行筛选。经过筛选标准排出后确定 CKD-NOP 组与 CKD-OP 组有 21 个差异代谢产物,其中二级质谱匹配值>3 分并排除外源性 & 药物相关性代谢产物有 5 种,磷酸胆碱、溶血磷脂酰胆碱(18:2/0:0)、尿囊素、3-氨基-2-哌啶酮在 CKD-OP 组中较 CKD-NOP 组表达下调,而癸酸在 CKD-OP 组中较 CKD-NOP 组

表达上调,见表3。



A:CKD-NOP 组与 CKD-OP 组比较;B:CKD-NOP 组与 NC 组比较;C:CKD-OP 组与 OP 组比较;D:NC 组与 OP 组比较。

图 1 4 组样本 OPLS-DA 分析结果

表 3 CKD-OP 组与 CKD-NOP 组间的血清差异代谢物比较				
指标	rt	VIP	P	CKD-NOP 组/ CKD-OP 组
磷酸胆碱	286.6	2.003	0.009	↓
尿囊素	98.5	2.078	0.002	↓
溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)	130.0	2.237	<0.001	↓
癸酸	26.2	2.087	<0.001	↑
3-氨基-2-哌啶酮	122.7	2.005	0.003	↓

↓ :代谢物水平与前组比较降低;↑ :代谢物水平与前组比较升高。

2.5 CKD-OP 的潜在生物标志物

以受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线的曲线下面积(area under the curve,AUC)>0.9 为条件,筛选出 CKD-OP 的 4 种潜在生物标志物,分别为磷酸胆碱、溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)、癸酸、尿囊素,见表 4。

2.6 潜在生物标志物与腰椎 BMD、BALP、TRACP-5b 的相关性分析

将 CKD 患者血清中磷酸胆碱、尿囊素、溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)、癸酸表达水平与腰椎 BMD、BALP、TRACP-5b 进行相关性分析,结果表明,血清磷酸胆碱与腰椎 BMD 呈正相关($P<0.05$),与血清 BALP、TRACP-5b 呈负相关($P<0.05$);血清尿囊素与腰椎 BMD 呈正相关($P<0.05$),与血清 BALP 呈负相关($P<0.05$),与血清 TRACP-5b 无明显相关性($P>0.05$);血清溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)与腰椎 BMD 呈正相关($P<0.05$),与血清 BALP、TRACP-5b 呈负相关($P<0.05$);血清癸酸与腰椎 BMD 呈负相关($P<0.05$),与血清 BALP 呈正相关($P<0.05$),与血清 TRACP-5b 无明显相关性($P>0.05$),见表 5。

表 4 血清差异代谢物预测 CKD-OP 的价值			
名称	AUC	95%CI	P
磷酸胆碱	0.917	0.782~1.000	0.009
尿囊素	0.909	0.791~1.000	0.002
溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)	0.934	0.831~1.000	<0.001
癸酸	0.909	0.787~1.000	<0.001

表 5 潜在生物标志物与腰椎 BMD、BALP、TRACP-5b 的相关性分析

项目	腰椎 BMD		BALP		TRACP-5b	
	r	P	r	P	r	P
磷酸胆碱	0.601	0.003	-0.729	<0.001	-0.623	0.002
尿囊素	0.483	0.023	-0.494	0.019	-0.393	0.071
溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)	0.640	0.001	-0.628	0.002	-0.548	0.008
癸酸	-0.444	0.039	0.587	0.004	0.296	0.225

3 讨 论

CKD-OP 的发病机制与 CKD 患者内环境代谢紊乱密切相关。在 CKD 的病理条件下,患者体内代谢环境逐渐失衡,矿物质内稳态逐渐恶化,骨形成及矿化发生障碍,导致 CKD-OP 发生,并增加患者骨折风险。目前,对于 CKD-OP 的临床诊断及疗效评价主要是依据血钙、甲状旁腺激素、骨转化标志物及影像学检查等方法进行评估,而 CKD-OP 发病机制复杂,这些指标的灵敏度和特异度都不够高。

骨转换标志物是成骨细胞或破骨细胞分泌的酶和激素,以及骨基质的胶原蛋白或非胶原蛋白的代谢产物。通过检测骨代谢生化指标表达水平变化,可以在一定程度上了解骨组织新陈代谢的情况。BALP 是由成骨细胞分泌的一种细胞外酶,与骨形成、骨转换具有密切联系。在碱性环境中骨矿化活跃,成骨细胞释放的 BALP 可水解无机磷酸盐,进而降低焦磷酸盐浓度,有利于骨的矿化^[9]。TRACP-5b 主要由破骨细胞的囊泡产生,能使胞吞后的胶原降解产物进一步降解破坏,反映破骨细胞的分化程度与成熟破骨细胞数量^[10-11]。张薇等^[12]的研究表明,所有骨密度参数均与 2 年内再发髋部骨折风险相关。本研究结果显示,CKD-OP 组患者血清 BALP、TRACP-5b 表达水平较 NC 组、OP 组、CKD-NOP 组患者明显升高,表明 BALP、TRACP-5b 水平的变化可在一定程度上反映 CKD 患者骨组织代谢情况。但骨转换标志物表达水平的变化尚不能解释 CKD-OP 的发病机制,且在改善 CKD 患者骨折等相关结局的效用尚未得到证实,仍需进行更深入的研究。

代谢组学是研究细胞代谢活动产物的一个科学分支,是继蛋白质组学、转录物组学和基因组学之后的最新组学技术之一,用于分析整个生物系统内代谢的最终产物^[13]。代谢组学可对机体内所有小分子代谢产物进行分析,包括氨基酸、激素、碳水化合物、核苷酸和脂类^[14]。通过将生物过程与代谢组学相关联,可揭示机体内代谢谱变化,精确、灵敏地反映疾病的病理生理状态。因此,本研究基于 LC-MS 技术对 CKD-OP 组、CKD-NOP 组、OP 组、NC 组患者的血清标本进行非靶向代谢组学分析,确定磷酰胆碱、尿囊素、溶血磷脂酰胆碱(18:2/0:0)、癸酸等 4 种内源性代谢产物可作为 CKD-OP 的潜在生物标志物,并研究了其与 CKD 患者腰椎 BMD、血清 BALP 和血清 TRACP-5b 的相关性。

磷酰胆碱是由带负电荷的磷酸盐与带正电荷的胆碱基团结合而成的小分子,是真核生物膜主要磷脂(卵磷脂)的前体和降解产物^[15]。磷酰胆碱为损伤相关的分子模式和病原体相关分子模式,具有促炎和免疫调节特征。RICHTER 等^[16]研究表明,游离磷酰胆碱和磷酰胆碱修饰的大分子可通过含有 $\alpha 9$ 和 $\alpha 10$ 亚单位的烟碱型乙酰胆碱受体呈剂量依赖性地抑制人

单核细胞释放依赖于三磷酸腺苷的白细胞介素(interleukin,IL)- 1β 。IL- 1β 可通过上调胰岛素样生长因子 2 和趋化因子在非骨吸收破骨细胞中的表达来促进破骨细胞的形成。此外,磷酰胆碱可作为一种脂质相关的小抗原,可诱发机体产生免疫反应。机体内循环免疫球蛋白 M 抗体中 5%~10% 为抗磷酰胆碱抗体^[17]。抗磷酰胆碱抗体(尤其是免疫球蛋白 M 和免疫球蛋白 G1 抗体)已被证实在动脉粥样硬化、糖尿病、骨性关节炎、风湿性疾病等慢性炎症状态下具有保护作用,其潜在的机制包括抗炎、免疫调节、清除死亡细胞和抵御感染性病原体等^[18]。已有研究表明,进行血液透析治疗的 CKD 患者死亡率与抗磷酰胆碱抗体水平呈负相关^[19]。本研究结果显示,CKD-OP 组患者血清中磷酰胆碱水平较 CKD-NOP 组患者降低,磷酰胆碱水平与腰椎 BMD 呈正相关,与血清 BALP、TRACP-5b 水平呈负相关,提示 CKD-OP 的发病机制可能与微炎症状态和免疫系统相关,后续可进一步探究其作用机制。

尿囊素作为尿酸氧化反应的主要产物,可反映全身的活性氧水平,具有抗氧化和抗炎活性^[20]。尿囊素被认为是氧化应激的生物标志物,可以参与机体对氧化应激的保护。已有多项研究表明尿囊素在慢性肾脏病、糖尿病肾病、多囊肾病、炎症性自身免疫性疾病和肾移植等疾病中的表达水平发生变化^[21-23]。MARZOOK 等^[24]以 6 Gy 辐射作为氧化应激模拟剂对雄性 SD 老龄大鼠进行照射,发现尿囊素在改善和保护健康方面具有重要作用,并推测尿囊素可能是通过介导游离铁螯合作用来抑制羟自由基和尿酸来改善细胞的完整性和功能。李凯伦等^[25]在 fms^{j4e1} 骨折缺陷模型斑马鱼的研究中发现,尿囊素可能通过调节核因子受体激活因子- κB 配体(receptor activator of nuclear factor- κB ligand,RANKL)/骨保护素(osteoprotegerin,OPG)通路促进破骨细胞成熟,促进骨折修复过程。OPG 已被证实可通过抑制 RANKL 与位于破骨细胞及其前体细胞表面的核因子 κB 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κB ,RANK)结合来抑制破骨细胞分化^[26]。此外,RANKL/RANK/OPG 通路同样可影响成骨细胞的形成。PONTES 等^[27]针对绝经后妇女血清磁共振代谢组学的研究表明,骨质疏松症组患者血清中尿囊素水平较骨质减少组降低。本研究结果显示,CKD-OP 组患者血清尿囊素水平较 CKD-NOP 组降低,尿囊素与腰椎 BMD 呈正相关,与血清 BLAP 呈负相关,提示尿囊素可能通过调节成骨细胞与破骨细胞的分化与成熟,而促进 CKD 患者发生骨质疏松。

溶血磷脂酰胆碱(18:2/0:0)是磷脂分解代谢的产物之一。溶血磷脂酰胆碱源自磷脂酶 A2 对磷脂酰胆碱的裂解,是氧化修饰低密度脂蛋白的主要成分^[28]。在正常生理条件下,血清中的溶血磷脂酰胆碱

可以与 G 蛋白耦联受体和 Toll 样受体相结合执行各种细胞功能。在较高浓度下,溶血磷脂酰胆碱通过刺激核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 4(NOD-like receptor family, pyrin domain-containing protein 4, NLRC4)和核苷酸结合寡聚化结构域样受体含 pyrin 结构域蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3, NLRP3)炎症小体,导致单核细胞和神经元细胞依赖半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白水解酶-1(caspase-1)释放 IL-1 β 。暴露于内源性和外源性溶血磷脂酰胆碱已成为细胞和组织生物学的关键因素,如慢性疾病状态(糖尿病、癌症、心血管疾病或神经变性)中的炎症级联反应、促凋亡和抗凋亡级联反应、氧化应激反应等^[29-33]。本研究结果显示,CKD-OP 组患者血清中溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)水平较 CKD-NOP 组患者降低,溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)水平与腰椎 BMD 呈正相关,与血清 BALP、TRACP-5b 水平呈负相关,提示其与 CKD-OP 的发生、发展密切相关,但其作用机制尚不明确。

癸酸是一种中链脂肪酸。多项研究表明,部分脂肪酸通路参与骨代谢的调节,脂肪酸的组成变化可能影响骨吸收、骨形成和骨量^[34]。PARK 等^[35]通过研究脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化过程,证实癸酸在脂多糖处理的 RAW264.7 细胞中通过抑制诱导型一氧化氮合酶表达和激活 STAT3 基因(Ser727),从而抑制脂多糖诱导的 TRACP 阳性破骨细胞形成。本研究结果显示,CKD-OP 组患者血清癸酸水平较 CKD-NOP 组增多,癸酸水平与腰椎 BMD 呈负相关,与血清 BALP 水平呈正相关,推测癸酸可能通过抑制破骨细胞的分化而导致 CKD-OP 发生。

本研究存在局限性,研究对象来自同一家医院,且各组样本量偏少,可能导致部分数据只表现出变化趋势。今后应进一步开展大样本量、多中心的临床研究,以提供更多的科学依据。

综上所述,CKD-NOP 组与 CKD-OP 组患者间存在多个差异性代谢产物,最终筛选出磷酰胆碱、尿囊素、溶血磷脂酰胆碱(18 : 2/0 : 0)、癸酸 4 种内源性潜在生物标志物,为 CKD-OP 的早期诊断及疗效监测提供了新的研究思路。

参考文献

[1] LIU Z H, LI G, ZHANG L, et al. Executive summary: clinical practice guideline of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) in China[J]. *Kidney Dis*, 2019, 5 (4):197-203.

[2] 程海涛, 张晓暄, 李银辉. 肾性骨病发病机制研究及进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(10):

1550-1554.

[3] KLAWANSKY S, KOMAROFF E, CAVANAUGH P J, et al. Relationship between age, renal function and bone mineral density in the US population[J]. *Osteoporos Int*, 2003, 14 (7): 570-576.

[4] 何舒宁, 郝丽, 张森. 慢性肾脏病患者骨密度与骨代谢生化指标的相关性分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(12):1755-1759.

[5] AGGARWAL H K, JAIN D, YADAV S, et al. Bone mineral density in patients with predialysis chronic kidney disease[J]. *Ren Fail*, 2013, 35 (8):1105-1111.

[6] ZAGULSKI M, HERBERT C J, RYTKA J. Sequencing and functional analysis of the yeast genome[J]. *Acta Biochim Pol*, 1998, 45(3):627-643.

[7] 上海市肾内科临床质量控制中心专家组. 慢性肾脏病早期筛查、诊断及防治指南(2022 年版)[J]. *中华肾脏病杂志*, 2022, 38(5):453-464.

[8] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会, 章振林, 夏维波, 等. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J]. *中国全科医学*, 2023, 26(14):1671-1691.

[9] 中国骨质疏松杂志骨代谢专家组, 张萌萌, 马倩倩, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识(2023 修订版)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(4): 469-476.

[10] SCHINI M, VILACA T, GOSSIEL F, et al. Bone turnover markers: basic biology to clinical applications[J]. *Endocr Rev*, 2023, 44 (3): 417-473.

[11] KASAI H, MORI Y, OSE A, et al. Prediction of fracture risk from early-stage bone markers in patients with osteoporosis treated with once-yearly administered zoledronic acid[J]. *J Clin Pharmacol*, 2021, 61(5):606-613.

[12] 张薇, 周风云, 苏永彬, 等. 肌肉参数和骨密度与髌部骨折后 2 年内再发髌部骨折风险的相关性分析[J]. *重庆医学*, 2023, 52(14):2121-2126.

[13] VICTOR O A, ADURAGBEMI N O, LYDIA O A, et al. Metabolomics of male infertility [J]. *Clin Chim Acta*, 2024, 556:117850.

[14] PANNER S M, FINELLI R, AGARWAL A, et al. Proteomics and metabolomics-current and future perspectives in clinical andrology [J]. *Andrologia*, 2021, 53(2):e13711.

[15] LI Z, VANCE D E. Phosphatidylcholine and choline homeostasis[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49

- (6):1187-1194.
- [16] RICHTER K, MATHES V, FRONIUS M, et al. Phosphocholine-an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:28660.
- [17] OTSUKA Y, KONDO T, AOKI H, et al. IL-1beta promotes osteoclastogenesis by increasing the expression of IGF2 and chemokines in non-osteoclastic cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2023, 151(1):1-8.
- [18] FROSTEGARD J. Antibodies against phosphorylcholine-implications for chronic inflammatory diseases[J]. *Metabolites*, 2023, 13(6):720.
- [19] SAMAL S K, QURESHI A R, RAHMAN M, et al. Different subclasses and isotypes of antibodies against phosphorylcholine in haemodialysis patients: association with mortality [J]. *Clin Exp Immunol*, 2020, 201(1):94-104.
- [20] DELIBAS B, KURUOGLU E, BERKET M C, et al. Allantoin, a purine metabolite, enhances peripheral nerve regeneration following sciatic nerve injury in rats: a stereological and immunohistochemical study[J]. *J Chem Neuroanat*, 2021, 117:102002.
- [21] OWEIS A O, AL-QARQAZ F, BODOOR K, et al. Elevated interleukin 31 serum levels in hemodialysis patients are associated with uremic pruritus[J]. *Cytokine*, 2021, 138:155369.
- [22] TOLUN A A, ZHANG H, IL'YASOVA D, et al. Allantoin in human urine quantified by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2010, 402(2):191-193.
- [23] XIE Q, HU N, CHEN Y. Chronic kidney disease-associated pruritus significantly impacts on quality of life of patients on haemodialysis and associates with increased levels of serum calcium and phosphorus[J]. *Postgrad Med J*, 2022, 98(1161):e16.
- [24] MARZOOK F, MARZOOK E, EL-SONBATY S. Allantoin may modulate aging impairments, symptoms and cancers[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2021, 34(4):1377-1384.
- [25] 李凯伦, 卢荆奥, 陈小辉, 等. 尿囊素促进破骨细胞缺陷斑马鱼骨折修复[J]. *遗传*, 2023, 45(4):341-353.
- [26] 王梦蝶, 吴虹, 王荣慧, 等. RANKL 介导的诱导破骨细胞分化的相关经典信号通路研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(7):898-902.
- [27] PONTES T A, BARBOSA A D, SILVA R D, et al. Osteopenia-osteoporosis discrimination in postmenopausal women by 1H NMR-based metabolomics [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5):e0217348.
- [28] LIU P, ZHU W, CHEN C, et al. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases [J]. *Life Sci*, 2020, 247:117443.
- [29] CHIURCHIU V, LEUTI A, MACCARRONE M. Bioactive lipids and chronic inflammation: managing the fire within[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:38.
- [30] NIKOLAOU A, KOKOTOU M G, VASILAKAKI S, et al. Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A(2) [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(6):941-956.
- [31] ZHANG J Y, HUANG Y R, TANG X J, et al. Roles of lipid profiles in human non-small cell lung cancer [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20:2091183936.
- [32] HSU P C, MAITY S, PATEL J, et al. Metabolomics signatures and subsequent maternal health among mothers with a congenital heart defect-affected pregnancy [J]. *Metabolites*, 2022, 12(2):100.
- [33] CHIARINI A, ARMATO U, HU P, et al. Danger-sensing/pattern recognition receptors and neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23):9036.
- [34] GONG R, XIAO H M, ZHANG Y H, et al. Identification and functional characterization of metabolites for bone mass in peri and postmenopausal Chinese women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(8):3159-3177.
- [35] PARK E J, KIM S A, CHOI Y M, et al. Capric acid inhibits NO production and STAT3 activation during LPS-induced osteoclastogenesis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11):e27739.