

学校编码: 10384  
学号: 33120131152850

分类号\_密级\_  
UDC\_

中晚期胰腺癌裸鼠模型的代谢组学研究

李志水

指导教师  
冯江华  
教授

厦门大学

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

中晚期胰腺癌裸鼠模型的代谢组学研究

Metabolomic Study on the Advanced Pancreatic Cancer Model  
in Nude Mouse

李志水

指导教师姓名: 冯江华 教授  
专 业 名 称: 电子与通信工程  
论文提交日期: 2016 年 04 月  
论文答辩时间: 2016 年 05 月  
学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 04 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于     年     月     日解密，解密后适用上述授权。

（  ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年   月   日

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
<b>第一章 绪论</b> .....	1
<b>1.1 胰腺癌背景和研究现状</b> .....	1
1.1.1 胰腺癌简介.....	1
1.1.2 胰腺癌的常见诊断方法.....	1
1.1.3 胰腺癌的研究现状及发展动态.....	2
<b>1.2 基于核磁共振的代谢组学简介</b> .....	3
<b>1.3 本论文研究内容和方法</b> .....	4
<b>第二章 利用代谢组学方法研究动物和人的代谢关系</b> .....	11
<b>2.1 前言</b> .....	11
<b>2.2 实验方案与分析方法</b> .....	11
2.2.1 实验动物选择与生物体液样本收集.....	11
2.2.2 生物体液样品配制.....	12
2.2.3 生物体液样本的核磁共振检测.....	12
2.2.4 核磁共振谱图处理及多元统计分析.....	13
<b>2.3 实验结果和分析</b> .....	15
2.3.1 人与不同种实验动物的血样和尿样的代谢轮廓比较.....	15
2.3.2 不同动物物种间的代谢差异分析.....	17
2.3.3 物种间代谢差异涉及的代谢通路.....	30
<b>2.4 本章小结</b> .....	34
<b>第三章 利用基于 NMR 的代谢组学研究动物中晚期胰腺癌模型</b> .....	39
<b>3.1 引言</b> .....	39
<b>3.2 实验材料与方法</b> .....	39
3.2.1 中晚期胰腺癌动物模型建立.....	39
3.2.2 生物样本配制.....	41

3.2.3 生物样本的一维 $^1\text{H}$ NMR 谱采集	41
3.2.4 数据处理与分析	41
<b>3.3 结果与讨论</b>	<b>42</b>
3.3.1 胰腺癌模型成功建立	42
3.3.2 血样一维 $^1\text{H}$ NMR 谱	44
3.3.3 血样多元统计建模与分析	45
3.3.4 组织一维 $^1\text{H}$ NMR 谱	53
3.3.5 组织多元统计建模与分析	54
3.3.6 血样与组织相关的代谢通道分析	62
<b>3.4 本章小结</b>	<b>69</b>
<b>第四章 总结与展望</b>	<b>75</b>
4.1 论文总结	75
4.2 研究展望	77
<b>附 录</b>	<b>79</b>
<b>攻读硕士期间发表的论文</b>	<b>83</b>
<b>致 谢</b>	<b>84</b>

# CONTENTS

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	III
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Background and research status of pancreatic cancer</b> .....	1
1.1.1 Introduction of pancreatic cancer .....	1
1.1.2 Common diagnostic methods for pancreatic cancer .....	1
1.1.3 Research status and development trend of pancreatic cancer .....	2
<b>1.2 A brief introduction to NMR-based metabolomics</b> .....	3
<b>1.3 Research contents and methods in this thesis</b> .....	4
<b>Chapter 2 Metabolic relations between human and different animal species by metabonomic techniques</b> .....	11
<b>2.1 Introduction</b> .....	11
<b>2.2 Materials and methods</b> .....	11
2.2.1 Animal selection and sample collection of biological fluid .....	11
2.2.2 Preparation of biological fluid samples .....	12
2.2.3 NMR detection of biological fluid samples .....	12
2.2.4 Spectral processing and multivariate statistical analysis .....	13
<b>2.3 Results and analysis</b> .....	15
2.3.1 Comparison of serum and urine metabolic profiles between experimental animals and human .....	15
2.3.2 Metabolic variations between human and different animal species .....	17
2.3.3 Metabolic pathways involved in species variations .....	30
<b>2.4 Summary</b> .....	34
<b>Chapter 3 Metabonomic study on advanced pancreatic cancer in animal model</b> .....	39

<b>3.1 Introduction</b> .....	39
<b>3.2 Materials and methods</b> .....	39
3.2.1 Establishment of animal model with advanced pancreatic cancer .....	39
3.2.2 Biological sample preparation .....	41
3.2.3 1D <sup>1</sup> H NMR spectrum acquisition .....	41
3.2.4 Data processing and analysis .....	41
<b>3.3 Results and discussion</b> .....	42
3.3.1 Successful establishment of animal model with pancreatic cancer .....	42
3.3.2 <sup>1</sup> H NMR metabolic profiles of serum samples .....	44
3.3.3 Multivariate statistical modeling and analysis of serum samples .....	45
3.3.4 <sup>1</sup> H NMR metabolic profiles of tissue samples .....	53
3.3.5 Multivariate statistical modeling and analysis of tissue samples .....	54
3.3.6 Metabolic pathway analysis of serum and tissue samples .....	62
<b>3.4 Summary</b> .....	69
<b>Chapter 4 Summary and Prospect</b> .....	75
<b>4.1 Thesis summary</b> .....	75
<b>4.2 Research prospects</b> .....	77
<b>Appendix</b> .....	79
<b>Publications</b> .....	83
<b>Acknowledgements</b> .....	84



表 1. 中英文缩略词对照

英文全称	英文缩写	中文全称
Nuclear Magnetic Resonance	NMR	核磁共振
Magnetic Resonance Imaging	MRI	磁共振成像
Magnetic resonance Spectrum	MRS	磁共振波谱
3- (trimethylsilyl)[2,2,3,3- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-propionate	TSP	2, 2, 3, 3-氘代三甲基硅烷丙酸钠
Mean center scaling	Ctr	中心化换算
Principal components analysis	PCA	主成分分析
Partial least squares-discriminant analysis	PLS-DA	偏最小二乘判别分析
Response permutation testing	RPT	响应排序试验
Orthogonal signal correction	OSC	正交信号矫正
Orthogonal partial least squares discriminant analysis	OPLS-DA	正交偏最小二乘判别分析
Multislice Computed Tomography	MSCT	多层螺旋计算机断层摄影
Variable importance in projection	VIP	变量权重重要性
Subcutaneous xenograft	SX	皮下植瘤
Orthotopic xenograft	OX	原位植瘤

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘 要

胰腺癌是一种恶性程度极高的消化道类恶性肿瘤，早期无显著病征，病人在确诊时病情基本已处于中晚期，而研究显示，直径小于 2 cm 和 1 cm 的胰腺癌术后 5 年生存率分别可达 30%-60% 和超过 75%，远高于中晚期术后 5 年生存率。

本文为课题“基于核磁共振的代谢组学技术发现胰腺癌的生物标志物及早期诊断应用”的一部分。整个课题目的在于通过系统分析动物和人类胰腺癌中晚期模型代谢通道的异同点，然后通过构建动物早期胰腺癌模型，并结合中晚期动物与人类胰腺癌代谢通路的共同点，进而把动物的早期胰腺癌分析结果适当推广到人类早期胰腺癌诊断分析上，最后通过临床研究对得到的胰腺癌早期生物标志物进行长期追踪与验证。

本文工作主要分为两部分。

第一部分利用基于核磁共振的代谢组学技术分析了人类与不同种常见实验动物血样和尿样代谢组的代谢特征异同点，结果表明奶牛和猪是研究药物在体内运输和生物分布的较优选择，而昆明小鼠在研究药物代谢方面可能与人类更接近，而从各方面总体考虑，SD 大鼠则更适合用于常规实验动物模型。结果为针对不同研究目的例如疾病诊断、药物代谢和毒理研究的动物模型选择确定了基本原则。

第二部分利用代谢组学技术分析裸鼠皮下植癌和原位植癌两种模式下的中晚期胰腺癌模型的代谢特征，进而寻找中晚期胰腺癌的特征代谢物。实验结果显示：两种模式的癌症组与对照组在血样和胰腺组织的代谢轮廓上均存在显著差异，癌症组血样和胰腺中的乳酸、支链氨基酸、芳香族氨基酸均呈现显著升高的趋势；同时，发现胰腺癌体内存在三羧酸循环、脂代谢、糖代谢以及氧化应激等紊乱现象。而皮下植癌和原位植癌的血样代谢轮廓不存在显著性差异，原因可能在于血样代谢组受全身器官的共同影响；然而，两者的组织代谢组的明显差异却提示植癌方式的组织特异性，故虽然皮下植癌具有简单、廉价等优点，但因其不符合人体胰腺癌发病过程，若在条件允许的情况下最好选择原位植癌的模式。

**关键词：** NMR 代谢组学；胰腺癌；生物标志物

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## ABSTRACT

Pancreatic cancer is a highly malignant tumor of digestive tract. In the United States, the mortality of pancreatic cancer ranks the fourth among cancers, and the 5-year survival rate is under 6% after surgery. And in China, the mortality and confirmed pancreatic cancer patients are higher than in USA. Because there is no significant symptom at the early stage of the pancreatic cancer, patients often have been at the advanced stage when diagnosed. Previous study shows that patients with a pancreatic tumor diameter less than 2 cm could have a 5-year survival rate up to 30% - 60%, while those less than 1 cm could have a 5-year survival rate more than 75%, which indicated the therapeutic effect of patients with early pancreatic cancer is far more better than ones with advanced tumors.

This thesis is a part of the project “NMR-based metabonomic analysis of pancreatic cancer facilitates identification of biomarkers for its early diagnosis”. The project aims to use NMR-based metabonomic techniques to identify potential early biological markers for pancreatic cancer. Firstly, the metabolic similarities and differences were analyzed between animals and human pancreatic cancer in advanced stages, following by construction of animal modeling with an early pancreatic cancer, and try to link the results from the animal modeling to the patients and serve to the early diagnosis of human pancreatic cancer. Finally the potential biomarkers of early pancreatic cancer will be validated by the long-term tracking and verification clinical work.

This thesis mainly consists of two parts.

In the first part, NMR-based metabonomic technique was applied to identify the interspecies metabolic differences and similarities between humans and various experimental animals at a baseline physiological status by analyzing their serum and urine metabonomes. The results highlight that dairy cow and pig may be an optimal choice for transportation and biodistribution studies of drugs and that Kunming mouse

model may be the most effective for excretion studies of drugs, whereas Sprague-Dawley rat could be the most suitable candidate for animal modeling under overall considerations. Knowledge of the metabolic effects from species difference will enable the construction of better models for disease diagnosis, drug metabolism, and toxicology research.

In the second part, NMR-based metabonomic technique combined with multivariate statistical analysis was applied to characterize the metabolic profiles of the advanced pancreatic cancer in nude mice by the subcutaneous transplantation and the orthotopic implantation, respectively, and further to identify the potential biological markers for pancreatic cancer. The results show that the significantly different metabolic profiles were demonstrated between the control and the two pancreatic cancer groups in both blood and tissue samples, where lactate, branched chain amino acid and aromatic amino acids showed a significant increase in the cancer groups compared with the control group, which keeps consistent with previous related researches on pancreatic cancer; at the same time, the disordered Krebs cycle, lipid metabolism, glucose metabolism and oxidative stress were also observed in pancreatic cancer groups. The blood metabolic profile does not display significant differences between subcutaneous transplantation and orthotopic implantation pancreatic groups, which may be due to the fact that blood metabolites are affected by multiple organs not only including the pancreas, which confirmed the similarity between two kinds of tumor transplantation. However, their obvious differences in tissue metabolic profiles indicated the specificity of tumor transplantation. Therefore, although subcutaneous transplantation offers a simple, inexpensive, reproducible and quantifiable advantage, it displays its inherent limitations; i. e. it does not accord with human pancreatic cancer pathogenesis.

**Keywords:** NMR-based metabonomics; Pancreatic cancer; Biological markers

# 第一章 绪论

## 1.1 胰腺癌背景和研究现状

### 1.1.1 胰腺癌简介

胰腺癌是一种恶性程度很高的消化道肿瘤疾病，在美国，胰腺癌病死率并列癌症死亡第4位，且术后5年的生存率不足6%<sup>[1]</sup>，是现代医学急需攻克的难题之一。近几年，胰腺癌发病率在全球呈上升趋势，仅在美国，根据癌症协会统计，2012年至少有43920例新发病例，有37390人死亡<sup>[2]</sup>，数据同时显示，从2004年开始，胰腺癌的发病率以每年1.5%的速度进行增长；在中国，胰腺癌的年死亡率和新增病例速度数值相近，并且呈现出乡村形势较城市更为严峻的特点。中国和美国相比，中国每年确诊和死亡的胰腺癌患者数量均高于美国同期水平，根据GLOBOCAN组织估计，2012年中国分别占全球新增胰腺癌病例和胰腺癌死亡总数的19.45%和19.27%，这表明我国正面临胰腺癌病情扩散的严峻挑战<sup>[3]</sup>。

胰腺处于下腹部，位置较深，且胰腺癌早期阶段无明显临床特征，使得患者确诊时病情大多已处于胰腺癌中晚期阶段。虽然胰腺癌在诊断、分级及手术方法上已经取得了显著的进步，但是在就诊的病人中，约有85%为中晚期<sup>[4]</sup>。在中晚期病例中，有些无法实施肿瘤切除手术，故手术不超过20%，术后5年生存率仅为5%<sup>[5]</sup>。Chari等人曾对不同直径大小的胰腺肿瘤术后5年生存率进行过相关研究，研究结果显示直径小于1cm的早期胰腺癌术后5年生存率可超过75%，而直径小于2cm的胰腺癌病例术后5年生存率可达30%-60%<sup>[6]</sup>，这些都远远高于中晚期患者的术后5年生存率。因此，胰腺癌的早期诊断显得意义重大。

### 1.1.2 胰腺癌的常见诊断方法

当前，常见的胰腺癌诊断方法主要有以下几种：

(1) 影像学诊断技术<sup>[7,8]</sup>。该类型技术主要包括超声内镜检查或超声内镜引导下细针穿刺活检术(EUS guided FNA)<sup>[9]</sup>、多层螺旋计算机断层摄影(MSCT)和磁共振成像检查(MRI)等<sup>[10]</sup>。其中，超声内镜检查或超声内镜引导下细针穿刺活检术优势在于可以准确显示肿瘤位置、大小以及其对周围的组织和血管的浸润具有

高敏感性，劣势在于该诊断技术对穿刺的技术要求十分高，在肿瘤较小时容易因为穿刺误入周围组织和血管中使得结果呈现假阴性和组织、血管的损伤，并且该技术价格昂贵，很多病患比较难以接受<sup>[11]</sup>；多层螺旋计算机断层摄影优势在于其无需痛苦的穿刺和对周围组织的损伤，基本满足了对胰腺癌肿瘤的定位、定性诊断的硬性要求，该诊断技术能够对肿瘤的病变范围以及是否伴有周围血管浸润、是否存在肿瘤转移等做出较高准确率的诊断，因此十分高效和精确，但是其劣势在于该技术目前无法区分胰腺癌和慢性胰腺炎，并且其对小直径的肿瘤敏感性不强；MRI 影像诊断技术近几年被广泛应用于临床影像学诊断当中，其具有无创伤、价位适中、分辨率高的优点，但是由于核磁共振技术特点的局限性使得有一部分装备有金属心脏起搏器之类的患者无法使用该技术，同时，该技术对于直径小于 2 cm 的病灶定性较为困难，并且，其对胰腺癌和慢性胰腺炎不易鉴别，这些不足之处使得该技术具有一定的局限性。总而言之，影像学诊断技术在诊断直径小于 2 cm 肿瘤的特异性和敏感性方面存在不足，急需解决。

(2) 血清肿瘤标志物。在过去关于胰腺癌的研究文献中，已经提及一些类似潜在的血清生物标志物，比如 CgA, CEA, CA19-9, POA, CA195 等<sup>[12-14]</sup>，以上这些主要为肿瘤相关抗原类型的生物标志物，其它癌症血清中也存在，故不具有胰腺癌生物标志物的特异性，所以该方法针对胰腺癌诊断的可靠性并不高，存在假阳性的可能。

(3) 癌基因检测<sup>[15, 16]</sup>。自从基因组学在疾病研究中被广泛应用之后，获得了一些与胰腺癌相关的基因片段，比如与胰腺癌发生过程紧密相关的原癌基因和抑癌基因，如 K-ras、P53、Rb 基因、p16 基因、nm23 基因等<sup>[17, 18]</sup>，以上这些基因片段的检测可以用于辅助诊断胰腺癌，其敏感性较高；然而，因为胰腺癌发展过程中伴随着多种基因的变化，这些基因的改变可能发生在其它种类的肿瘤和非肿瘤疾病上，故癌基因检测的技术得到的结果特异性不高；再者，基因的表达存在假阳性和假阴性的可能，所以该方法难以达到准确诊断胰腺癌肿瘤的目的。

### 1.1.3 胰腺癌的研究现状及发展动态

关于胰腺癌的研究由来已久，其中最早的公开文献报告可以追溯到 1932 年



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.