

# 乙型肝炎失代偿期肝硬化及慢性肝衰竭患者的呼出气代谢组学差异性分析\*

王仲霞, 桑秀秀, 余思邈, 许文涛, 苏鹏宇, 牛明\*\*, 王睿林\*\*

(解放军总医院第五医学中心/中西医结合诊疗与研究中心 北京 100039)

**摘要:**目的 研究乙型肝炎失代偿期肝硬化与慢性肝衰竭患者的呼出气代谢组学差异,以探索潜在的能预测严重肝病进展的无创生物标志物。方法 采用全二维气相色谱-飞行时间质谱(comprehensive two-dimensional gas chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry, GC×GC-TOF-MS)研究乙型肝炎失代偿期肝硬化及慢性肝衰竭两组患者的呼出气代谢产物,以主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别法(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA)比较挥发性有机化合物(volatile organic compound, VOC)的性质及含量,曲线下面积(area under the curve, AUC)和受试者工作特性(receiver operating characteristic, ROC)曲线建立预测模型。结果 与失代偿期肝硬化组相比,慢性肝衰竭组的1-dodecanol、1-1-cyclohexen-1-yl-ethanone、1-1-methylethoxy-2-propanone、o-cymene及carbon dioxide含量明显降低。ROC曲线分析显示,十二烷醇(1-dodecanol)可鉴别失代偿期肝硬化与慢性肝衰竭(ROC曲线下面积=0.825),且敏感性77.8%,特异性99.23%。结论 十二烷醇可作为一种潜在的生物标志物,预测乙肝失代偿期肝硬化进展为慢性肝衰竭的风险,同时为无创检测方法评估、预测慢性肝病的预后提供物质基础。

**关键词:**呼出气 代谢组学 失代偿期肝硬化 慢性肝衰竭

doi: 10.11842/wst.20190726003 中图分类号: R2-031 文献标识码: A

对呼吸“气味”的辨识作为一种关键的疾病诊断方法——“闻诊”,已在中医诊疗中应用了一千多年,同时西方学者如希波克拉底对此也有类似的认知<sup>[1]</sup>。现代医学研究发现,某些病患的典型气味可能与其呼吸中特定的挥发性有机化合物(VOC)有关,例如糖尿病患者散发的腐烂苹果的气味被确认为丙酮,肾衰竭患者的鱼味由氨过量所引起的<sup>[2,3]</sup>。近代呼出气分析开始于1970年代,Pauling等利用气相色谱技术分离检测到呼出气中约200种挥发性有机化合物(VOCs)<sup>[4]</sup>。随着分析技术的不断进步,呼出气中更多的VOCs被进一步发现和确认<sup>[5]</sup>。目前用于呼出气分析的技术包

括:气相色谱(gas chromatography, GC),气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS),离子迁移谱(ion mobility spectroscopy, IMS),选择性离子流管质谱(selected-ion flow-tube mass spectrometry, SIFT-MS),在线挥发性有机化合物监测检测分析质谱仪(proton transfer reaction mass spectrometry, PTR-MS),传感器和激光光谱等<sup>[6]</sup>。其中GC-MS是目前寻找呼出气生物标志物最基本的方法之一<sup>[7]</sup>。随着分析技术的进步,越来越多的呼出气化合物被发现可作为潜在的疾病特异性生物标志物,目前这一方法已逐步应用于肿瘤早期诊断的探索性研究,成为国际研究的

收稿日期:2019-07-18

修回日期:2019-08-14

\* 国家自然科学基金委员会面上项目(81673806):基于呼出气代谢组学的肝衰竭“肝臭”中医嗅诊辨证客观化研究,负责人:王睿林;军委后勤保障部卫生局保健专项科研课题面上项目(17BJZ53):基于代谢组学分析的酒精性肝病体质差异研究,负责人:王睿林;中央军委联勤保障部全军医学科技青年培育项目(16QNPI51):参附汤对海水浸泡性低体温症干预作用及其栓剂开发,负责人:牛明。

\*\* 王睿林,硕士生导师,副主任医师,主要研究方向:中西医结合肝病临床;牛明,助理研究员,主要研究方向:肝病基础研究。

热点<sup>[8-10]</sup>。比如氧化应激增加产生的烷烃和甲基烷烃是乳腺癌妇女的潜在生物标志物,2-丁烷酮和1-丙醇被认为是最有前景的肺癌检测呼吸生物标志物<sup>[11-12]</sup>。英国一项最新研究表明,帕金森病临床症状出现之前能够闻到相应气味,并由此研发了基于VOC的帕金森病无创呼出气诊断测试方法,该测试可以识别该病早期阶段的患者<sup>[13]</sup>。上述这些研究表明,无创呼出气检测可以为临床实践和诊断提供有价值的信息。

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是当今世界重要的公共卫生问题,乙肝患者高达2.57亿人,每年约有78.6万人死于HBV相关疾病<sup>[14]</sup>。尤其慢性HBV感染可导致肝硬化、肝衰竭或肝细胞癌,而肝硬化进展为肝衰竭和肝癌是导致HBV感染患者死亡的重要原因之一<sup>[15-17]</sup>。肝臭是严重肝病的一个典型临床症状,且与疾病的进展密切相关,如肝衰竭<sup>[18]</sup>。肝衰竭是多种因素引起的肝脏合成、解毒、排泄和生物转化等功能发生严重障碍或失代偿,临床可出现肝臭、出血、肝性脑病等症候<sup>[19]</sup>。其中“肝臭”的形成,是因为肝脏不能将含硫氨基酸等代谢的中间产物清除而进入血液中,通过肺部呼出体外,就会产生特殊的气味。目前已发现肝臭与肝病的严重程度存在关联<sup>[20]</sup>。

中医根据望、闻、问、切四诊收集的诊察资料对肝衰竭进行辨证论治,提高了肝衰竭的治疗效果。在肝病中医诊疗过程中,“肝臭”是中医嗅诊的必须诊察要素,对其进行中医嗅诊辨证,有利于病位、病性的判断,是肝病中医辨证论治不可或缺的组成部分。而已有报道也证实,呼吸气中VOCs的浓度也与某些肝病(如酒精性肝炎<sup>[21,22]</sup>)的严重程度有关。由此可见,检测患者呼出气的VOCs对于了解肝病(尤其是严重肝病)的进程具有较好的应用前景。因此,本研究采用GC×GC-TOF-MS技术对呼出气冷凝液进行分析,通过测定呼出气中明显与特定疾病相关的挥发物,鉴别呼出气VOC在HBV相关失代偿性肝硬化和慢性肝衰竭中的差异,展示中医肝病嗅诊辨证的客观内涵,为无创技术评估、预测慢性严重肝病的进展及预后,进而进行中西医结合早期干预治疗,提供了理论支持和物质基础。

## 1 研究对象和方法

### 1.1 研究对象和临床数据

研究方案经解放军总医院第五医学中心(原解放

军302医院)伦理委员会批准,并在中国临床试验注册处注册,注册号为CHICTR-ROC-17010345。

2017年4月至2017年10月,解放军总医院第五医学中心(原解放军302医院)招募了18至80岁的健康对照14人(C组),以及乙型肝炎失代偿性肝硬化患者18人(HLC组)、乙型肝炎所致慢性肝衰竭患者13人(HLF组),诊断依据为《慢性乙型肝炎防治指南》(2015更新版)<sup>[23]</sup>及肝衰竭诊治指南(2012年版)<sup>[24]</sup>。排除其他慢性肝病患者,如原发性肝癌、自身免疫性肝病、丙型肝炎病毒合并感染以及其他严重并发疾病(如酗酒、未控制的糖尿病或癌症),或不愿签署知情同意的患者。在收集呼出的空气之前,进行了实验室检验,并记录总胆红素(TBIL)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)等临床资料。

### 1.2 呼出气冷凝液样品采集与分析

要求所有受试者禁食至少2 h,并8 h内未使用任何药物,且采样前2 h内不刷牙,24 h不要饮酒、吸烟。在采集呼出气冷凝液(exhaled breath condensate, EBC)样本之前,用纯净水漱口2次。

在带有冷却套的RTube呼气冷凝液收集器(美国Respiratory Research, Inc., RRI)中收集EBC样品,然后冷冻在-20°C实验室冷冻室中。受试者被要求至少呼吸2 min正常呼吸,为测试提供足够的液体量。

### 1.3 实验方法

使用安捷伦7890气相色谱系统(安捷伦技术公司,美国加利福尼亚州圣克拉拉市),在DB-5ms柱(30 m×250 μm×0.25 μm, USA)上分离所收集样品中的所有检测分析物。培养时间和温度分别为15 min及50°C。搅拌器转速为500 rpm,萃取时搅拌器转速为100 rpm。样品提取时间为30 min,解吸时间为10 min,以氦气为载气,前入口吹扫流速为3 ml·min<sup>-1</sup>。通过柱的气体流速为1 ml·min<sup>-1</sup>。初始温度保持在50°C下1 min,然后以4°C·min<sup>-1</sup>的速率增加到150°C,随后以8°C·min<sup>-1</sup>的速率增加到210°C,并在210°C下保持5.5 min。注射、传输线和离子源温度分别为240、280和220°C。在电子碰撞模式下,能量为70 eV。在溶剂延迟0.3 min后,以每秒50个光谱的速率以33-500 m/z范围的全扫描模式获取质谱数据。将所有样品各取10 μl进行混合作为QC样品,且每检测10个样品,增加一个QC样本检测。

表1 HLC和HLF两组患者的临床及生物学特征

|                               | HLC( <i>n</i> = 18)       | HLF( <i>n</i> = 13)       | <i>P</i> value |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| 年龄/年                          | 54.39 ± 8.66              | 46.08 ± 11.29             | 0.030          |
| 性别(男/女)                       | 17/1                      | 11/1                      | 0.811          |
| 吸烟/人                          | 3                         | 6                         | 0.074          |
| 腹水/人                          | 17                        | 12                        | 0.811          |
| TP/(g/L)                      | 59.00(57.75, 68.00)       | 53.00(50.5, 61.00)        | 0.025          |
| ALB/(g/L)                     | 33.50(29.50, 38.25)       | 28.20(24.50, 31.00)       | 0.011          |
| TBIL/(μmol·L <sup>-1</sup> )  | 16.50(12.43, 24.23)       | 131.80(60.50, 331.35)     | 0.000          |
| DBIL/(μmol·L <sup>-1</sup> )  | 7.150(5.05, 10.55)        | 93.30(27.00, 241.55)      | 0.000          |
| ALT/(U·L <sup>-1</sup> )      | 24.00(19.74, 28.25)       | 61.00(28.50, 430.00)      | 0.004          |
| AST/(U·L <sup>-1</sup> )      | 34.00(29.00, 38.25)       | 99.00(46.50, 330.50)      | 0.000          |
| γ-GGT/(U·L <sup>-1</sup> )    | 25.00(17.75, 38.75)       | 53.00(19.75, 90.50)       | 0.075          |
| CHE/(g/L)                     | 4246.00(2804.00, 5707.25) | 2529.00(1309.50, 3240.50) | 0.003          |
| ALP/(IU·L <sup>-1</sup> )     | 98.50(80.25, 114.00)      | 167.00(93.00, 194.00)     | 0.025          |
| TBA/(μmol·L <sup>-1</sup> )   | 27.50(10.75, 67.25)       | 192.00(80.50, 250.50)     | 0.001          |
| LDH/(U·L <sup>-1</sup> )      | 162.00(156.50, 193.75)    | 214.00(173.00, 269.50)    | 0.002          |
| BUN/(mmol·L <sup>-1</sup> )   | 5.60(4.70, 7.03)          | 3.80(2.67, 5.10)          | 0.003          |
| PT/s                          | 13.75(11.88, 14.48)       | 19.30(18.40, 20.25)       | 0.000          |
| PTA/%                         | 60.25(54.20, 82.73)       | 37.30(34.20, 38.10)       | 0.000          |
| INR                           | 1.21(1.04, 1.27)          | 1.65(1.60, 1.73)          | 0.000          |
| FIB/(g·L <sup>-1</sup> )      | 1.59(1.30, 1.94)          | 0.97(0.74, 1.37)          | 0.002          |
| TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )    | 3.28(2.48, 4.19)          | 0.97(0.74, 1.37)          | 0.000          |
| HDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> ) | 1.15(0.88, 1.39)          | 0.47(0.36, 0.71)          | 0.000          |
| LDL-C/(mmol·L <sup>-1</sup> ) | 2.15(1.46, 2.69)          | 1.66(1.31, 1.92)          | 0.089          |
| AFP/(ng·ml <sup>-1</sup> )    | 3.44(2.22, 8.11)          | 52.32(13.00, 115.20)      | 0.002          |

#### 1.4 质谱数据分析

使用ChromaTOF软件(V 4.3x, LECO)对质谱数据进行了峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分、峰对齐等分析,最后将QC样本中检出率50%以下或RSD > 30%的峰去除。采用代谢组学分析在线工具Metaboanlyst对数据进行分析,筛选变化倍数(fold change, FC) > 2, *P* < 0.05的差异化化合物。采用Simca 13.0对归一化的数据进行PCA和OPLS-DA分析,并根据OPLS-DA分析中VIP value > 1, |*p*(corr) ≥ 0.5对上述差异化化合物进行筛选,筛选结果作为潜在生物标记物,并通过与NIST数据库中的已知化合物谱图进行比对鉴定。

#### 1.5 统计方法

使用IBM SPSS statistics 21.0软件进行统计分析和ROC曲线分析。计量资料以中位数±四分位间距表示。定性资料和分类参数分析采用Fisher's检验或Mann-Whitney检验。*P* < 0.05差异有统计学意义, *P* < 0.01时差异有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床特征

本研究共招募了45名受试者,包括14名健康受试者、18名失代偿性肝硬化(HLC组)和13名慢性肝衰竭(HLF组)患者。统计了HLC、HLF两组患者的临床特征包括血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、TBIL、直接胆红素(DBIL)、ALT、AST、γ-谷氨酰转移酶(γ-GGT)、胆碱酯酶(CHE)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、尿素氮(BUN)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶原时间活性(PTA)、国际标准化比率(INR)、纤维蛋白原(FIB)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)和甲胎蛋白(AFP)。患者信息和临床数据见表1。结果显示为中位数±四分位间距。

### 2.2 呼出挥发性有机化合物的多变量分析及差异

针对45例受试者的呼出气冷凝物进行GC × GC-TOF-MS检测,根据谱库比对结果共鉴定出668种化

合物,化合物经峰提取、归一化等预处理后,采用simca13.0进行多元统计分析。PCA分析结果如图1所示,质控组(QC)样本聚集度较好,表明检测方法较为稳定;C、HLC和HLF三组具有一定的区分能力,表明组间存在明显的代谢差异。图2聚类分析图也验证了C、HLC和HLF三组间的代谢差异。为了进一步筛选与HLC进展到HLF相关的差异代谢标志物,采用OPLS-DA对HLC与HLF组间差异代谢物进行分析。图3A的HLC与HLF组间OPLS-DA分析得分图,以及图3B的HLC与HLF组间OPLS-DA分析S-plot图,均表明差异代谢标志物可很好的区分两组患者。我们筛选VIP value > 1, |p(corr)| ≥ 0.5、P < 0.05的化合物作

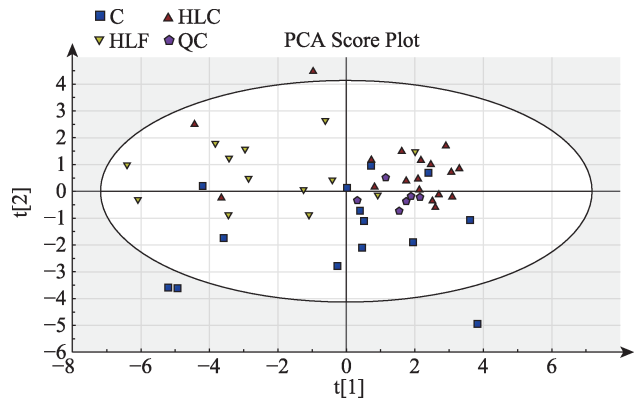


图1 C、HLC、HLF和QC组的PCA评分图

注:C:健康对照组;HLC:HBV导致的失代偿期肝硬化组;HLF:HBV所致慢性肝衰竭组;QC:质控组。

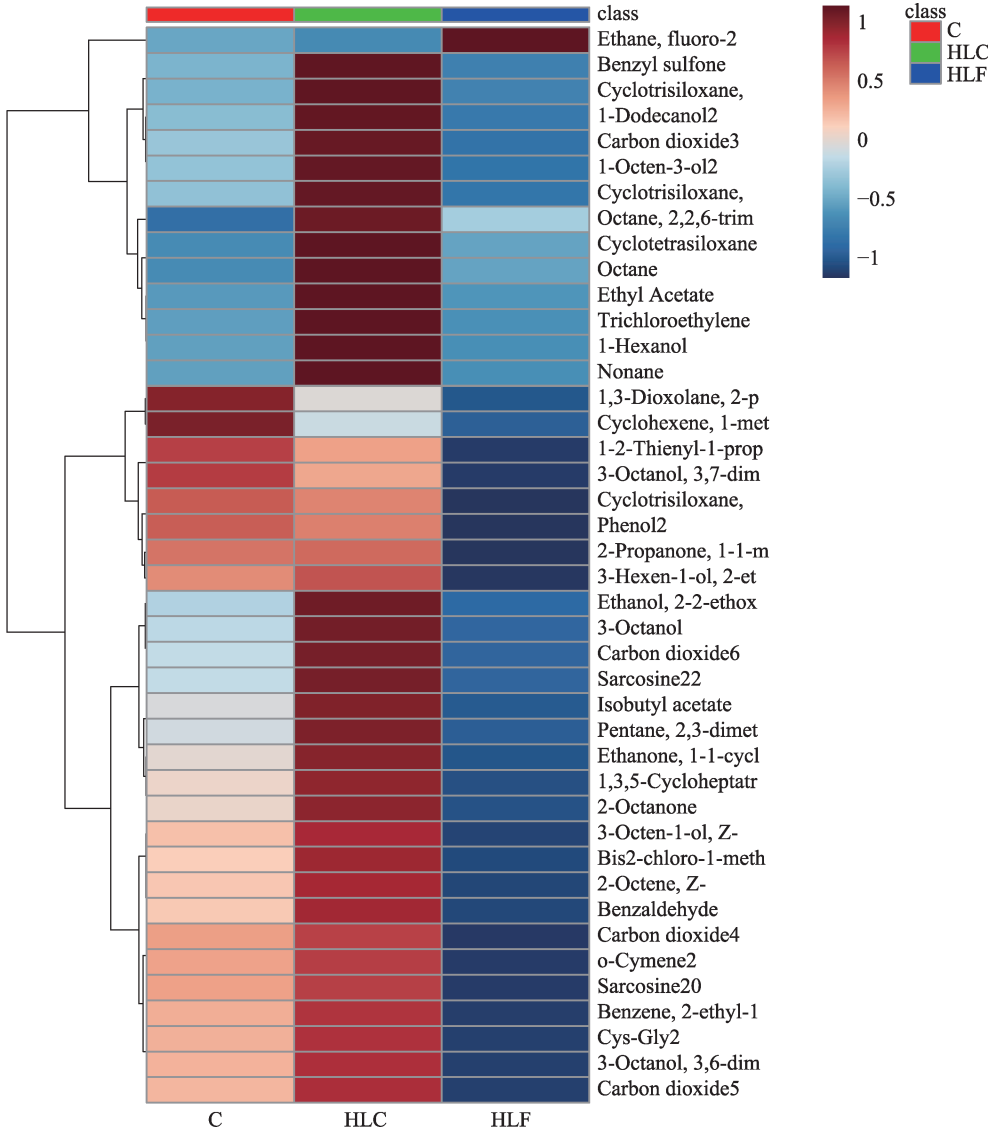


图2 C、HLC、HLF和QC组的聚类分析图

注:C:健康对照组;HLC:HBV导致的失代偿期肝硬化组;HLF:HBV所致慢性肝衰竭组;QC:质控组。



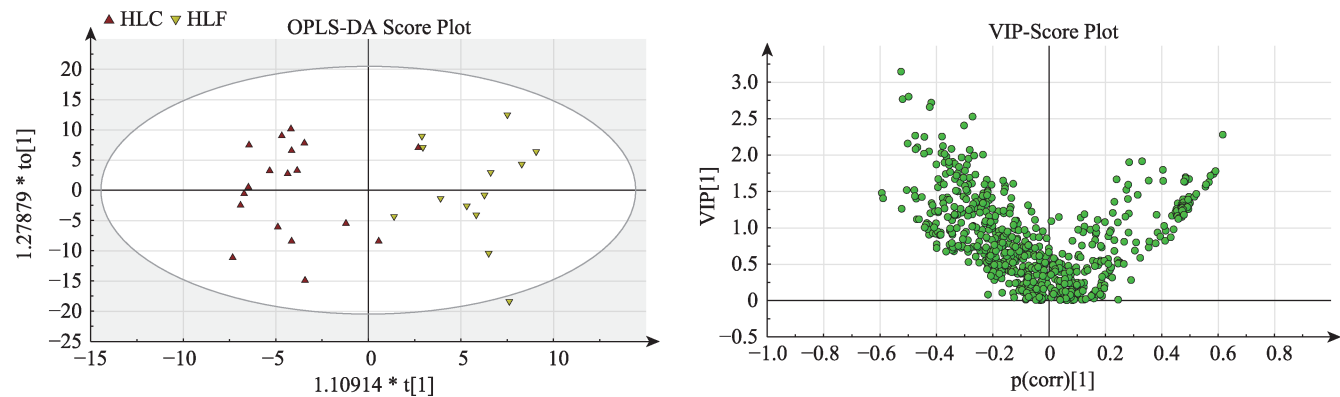


图3 基于OPLS-DA分析的HLC与HLF组间差异VOCs筛选

注:A:HLC与HLF组间OPLS-DA分析得分图;B:HLC与HLF组间OPLS-DA分析S-plot图

表2 HLC与HLF组的差异代谢产物

|    | 代谢产物                                    | VIP  | <i>P</i> (corr) | FC   | <i>P</i> value |
|----|-----------------------------------------|------|-----------------|------|----------------|
| 1  | 1-Dodecanol                             | 1.09 | -0.67           | 3.01 | 0.00           |
| 2  | 1-1-cyclohexen-1-yl- Ethanone           | 1.33 | -0.78           | 2.41 | 0.00           |
| 3  | o-Cymene                                | 1.91 | -0.63           | 2.70 | 0.00           |
| 4  | Carbon dioxide                          | 2.11 | -0.57           | 2.78 | 0.00           |
| 5  | 1-1-methylethoxy-2-Propanone,           | 1.12 | -0.77           | 2.31 | 0.00           |
| 6  | 2-2-ethoxyethoxy-Ethanol,               | 1.91 | -0.62           | 6.59 | 0.01           |
| 7  | hexamethyl-Cyclotrisiloxane,            | 1.63 | -0.51           | 2.15 | 0.01           |
| 8  | Octen                                   | 1.33 | -0.69           | 2.90 | 0.01           |
| 9  | 3,7,7-trimethyl-1,3,5-Cycloheptatriene, | 1.73 | -0.57           | 3.04 | 0.01           |
| 10 | Octane                                  | 2.79 | -0.71           | 3.17 | 0.01           |
| 11 | 2-ethyl-1,3-dimethyl-Benzene            | 1.73 | -0.58           | 2.85 | 0.01           |
| 12 | Isobutyl acetate                        | 1.85 | -0.56           | 2.38 | 0.02           |
| 13 | (Z)-3-Octen-1-ol                        | 1.16 | -0.62           | 3.21 | 0.02           |
| 14 | 3-Hexen-1-ol, 2-ethyl-2                 | 1.24 | -0.69           | 2.74 | 0.02           |
| 15 | 2,2,6-trimethyl-Octane,                 | 1.49 | -0.51           | 2.09 | 0.02           |
| 16 | Cyclotetrasiloxane, octamethyl-4        | 1.18 | -0.69           | 2.36 | 0.02           |
| 17 | Bis2-chloro-1-methylethyl ether         | 1.03 | -0.58           | 2.30 | 0.02           |
| 18 | Ethyl Acetate                           | 2.19 | -0.56           | 2.73 | 0.02           |
| 19 | Nonane                                  | 2.74 | -0.72           | 2.23 | 0.03           |
| 20 | Benzaldehyde                            | 1.21 | -0.71           | 2.80 | 0.03           |
| 21 | Sarcosine                               | 2.20 | -0.62           | 2.01 | 0.04           |
| 22 | 2-Octene, Z-                            | 2.52 | -0.57           | 2.03 | 0.04           |

注:5种具有显著差异( $p<0.01$ )的VOCs对乙型肝炎失代偿期肝硬化与慢性肝衰竭的鉴别能力较好,包括十二烷醇、1-1-甲基乙氧基-2-丙酮、二氧化碳、1-1-环己烯-1-基乙酮和邻环己烯。

为特异性代谢标志物,结果如表2所示。

### 2.3 ROC分析

将HLC和HLF组代谢产物进行比较,以探索可能作为HBV所致失代偿期肝硬化进展为慢性肝衰竭的风险预测因子的化合物。对5种化合物( $P<0.01$ )的进一步分析显示(图4):当十二烷醇(1-Dodecanol)  $\geq$

0.321可鉴别CLF, AUC为0.825(95%置信区间0.675-0.975),特异性99.23%,敏感性77.8%。1-1-甲基乙氧基-2-丙酮(1-1-methylethoxy-2-propanone)  $\geq$  0.597预测CLF的AUC为0.821(95%置信区间0.6663-0.978),特异性84.6%,敏感性77.8%。二氧化碳(carbon dioxide)、1-1-环己烯-1-基乙酮(1-1-cyclohexen-1-

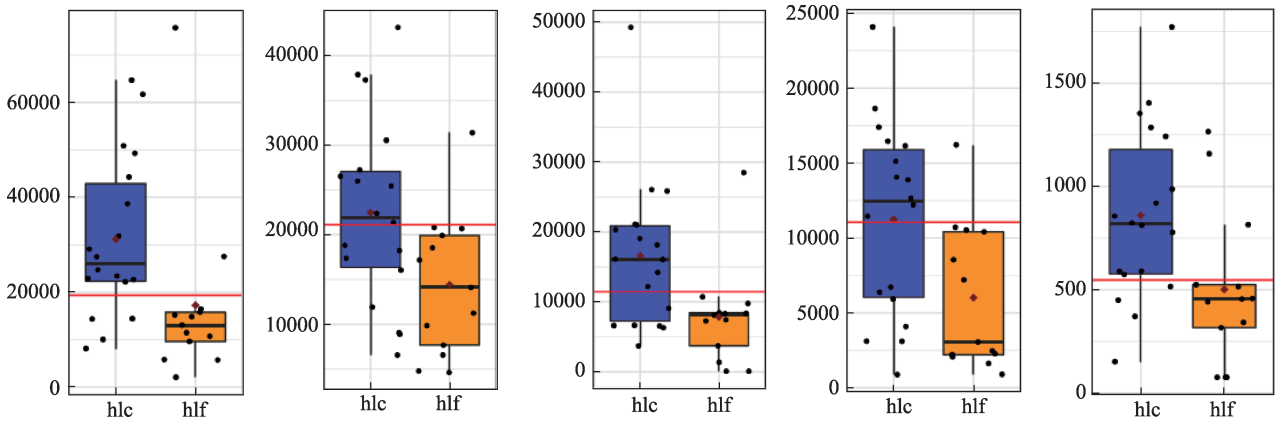


图4 区分HLC和HLF的不同挥发性有机化合物的柱状图

A: 1-Dodecanol; B: 1-1-methylethoxy-2-propanone; C: carbon dioxide; D: 1-1-cyclohexen-1-yl-ethanone; E: o-cymene

表3 区分HLC和HLF的不同挥发性有机化合物 AUC

| VOC                            | AUC(95% CI)         | 最佳分离值 | 敏感性/% | 特异性/% |
|--------------------------------|---------------------|-------|-------|-------|
| 1-Dodecanol                    | 0.825(0.675, 0.975) | 0.32  | 77.8  | 99.23 |
| 2-Propanone, 1-1-methylethoxy- | 0.821(0.663, 0.978) | 0.17  | 77.8  | 84.6  |
| Carbon dioxide                 | 0.850(0.696, 1.000) | 0.97  | 83.3  | 84.6  |
| Ethanone, 1-1-cyclohexen-1-yl- | 0.838(0.695, 0.980) | 0.34  | 72.2  | 76.9  |
| o-Cymene                       | 0.833(0.692, 0.975) | 0.29  | 77.8  | 84.6  |

注:十二烷醇预测效果最好,当其 $\geq 0.321$ 可鉴别失代偿期肝硬化与慢性肝衰竭,AUC为0.825(95%置信区间0.675-0.975),特异性99.23%,敏感性77.8%。

yl-ethanone)和邻环己烯(o-cymene)的AUC分别为0.85、0.838和0.833,灵敏度分别为83.3%、72.2%和77.8%,特异性分别为84.6%、76.9%和84.6%。十二烷醇的ROC曲线表明(图5),HLC组和HLF组样品分离良好,十二烷醇的预测能力最强。

### 3 讨论

“闻诊”是中医临床疾病诊断的重要途径之一,肝臭中医嗅诊辨证是依据机体脏腑、气血、津液受病,会导致气味异常改变,而气味的改变与人体内脏腑生理病理状态存在对应关系。《难经》中明确记载了依据嗅诊进行辨证,如“五脏各有声色臭味,当与寸口尺内相应,其不相应者病也。”(《难经·十三难》);肝“其臭臊”,心“其臭焦”,脾“其臭香”,肺“其臭腥”,肾“其臭腐。”(《难经·三十四难》);“何以知伤暑得之?然,当恶臭。何以言之?心主臭,自入为焦臭,入脾为香臭,入肝为臊臭,入肾为腐臭,入肺为腥臭,故知心病伤暑得之,当恶臭。”(《难经·四十九难》),据此可进行中医嗅诊来判别病位、病性。目前在肝病中医临床辨证过程中,对气味“臊”、“焦”、“香”、“腥”、“腐”的诊察判断过

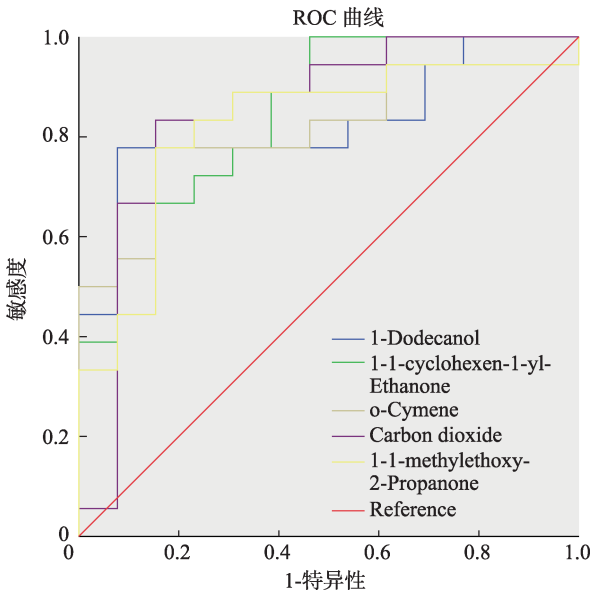


图5 1-dodecanol、1-1-methylethoxy-2-propanone、carbon dioxide、1-1-cyclohexen-1-yl-ethanone和o-cymene的ROC曲线图。

程主观性强,难以客观量化。常根据“气味酸腐臭秽或气味不重、微有腥臭”判定“实热”或“虚寒”,未明确与中医辨证分型进行对应,难以体现肝臭中医嗅诊对

辨证论治的贡献度,也未将其与预后判定、疗效评估关联起来。现有的《病毒性肝炎中医辨证标准(试行)》明确了辨证标准,但未纳入“肝臭”中医嗅诊辨证的内容,限制了肝臭中医嗅诊辨证的临床应用。现代研究也证实,人体呼出气中的挥发性化合物(VOCs)常可反应人体生理过程和新陈代谢的变化,并可作为疾病非侵入性检测的生物标志物<sup>[25,26]</sup>。慢性肝衰竭是临床病死率较高的一种肝病,在我国由乙型肝炎病毒长期感染导致失代偿期肝硬化是该病发生的主要原因之一,且患者常伴有一定的肝臭,因此,通过检测呼出气反映肝臭的发生,具有良好的物质发现潜力,将其与中医嗅诊理论相结合,能够阐释肝臭中医嗅诊的科学内涵,实现肝衰竭肝臭中医嗅诊辨证的客观化,阐释肝臭中医嗅诊的科学内涵,实现肝衰竭肝臭中医嗅诊的客观量化,提高肝衰竭中医辨证论治的精准度,并与临床生化指标相结合,建立肝臭中医嗅诊与病情轻重、疾病进程的关联。有助临床及早诊断慢性肝衰竭的进展,提前采取合理的临床干预措施。

气相色谱(GC)和气相色谱质谱(GC-MS)是目前用于VOCs的分离和鉴定的有效途径,特别是近年来,全二维气相色谱-串联飞行时间质谱(GC×GC-TOF-MS)的应用,对于VOCs中低含量特征化合物的识别发挥了重要作用<sup>[27-30]</sup>。为此,本研究采用GC×GC-TOF-MS技术测定患者呼出气冷凝物,筛选乙型肝炎导致的失代偿期肝硬化和慢性肝衰竭中差异的VOCs,并进行统计学分析。

本研究分析结果表明,5种具有显著差异( $P < 0.01$ )的VOCs对乙型肝炎失代偿期肝硬化与慢性肝衰

竭的鉴别能力较好,包括十二烷醇、1-1-甲基乙氧基-2-丙酮、二氧化碳、1-1-环己烯-1-基乙酮和邻环己烯。其中,十二烷醇预测效果最好,当其 $\geq 0.321$ 可鉴别失代偿期肝硬化与慢性肝衰竭,AUC为0.825(95%置信区间0.675-0.975),特异性99.23%,敏感性77.8%。十二烷醇又名正十二醇、月桂醇,是脂肪醇的一种,具有弱而持久的油脂气味。十二烷醇在人体生理病理中相关作用的研究较少,曾有对蛙肝微粒体的研究表示,CO对十二烷醇羟基化的抑制强烈,且其羟基化过程中涉及了一种以上的细胞色素P-450<sup>[31]</sup>。故慢性肝衰竭患者呼出气代谢产物中十二烷醇的增多,可能与内源性CO及P-450变化有关,继而影响肝脏的血液循环及胆红素代谢。最近的研究表明,十二烷醇可以在大肠杆菌中通过全细胞生物转化产生<sup>[32]</sup>,其在肝病进展中升高,可能与肠道菌群的影响有关。

慢性严重肝病者,尤其进展到失代偿期肝硬化特别是慢性肝衰竭阶段,定期复查以监测病情变化至关重要,而目前监测手段以抽取静脉血为主,增加患者痛苦及往来医院的时间精力消耗,导致患者的依从性较差,因此,患者对于无创检查和监测手段更加渴求。我们的初步研究,不仅表明呼出气中的十二烷醇可以作为区分HBV所致失代偿期肝硬化和慢性肝衰竭患者的潜在生物标志物,同时也证实了呼出气VOC确与肝病进展相关,为日后无创呼出气分析技术用于评估、预测慢性严重肝病的进展提供了理论支持及物质基础,也为进一步揭示疾病进展机制及研发无创、简便、廉价的诊断、监测手段提供理论依据。

## 参考文献

- 1 Adams F. Hippocratic Writings: Aphorism 4,5. New York: Web Atomics, 1994.
- 2 Marco R, Antonio T, Sotiris E P. Si: WO3 sensors for highly selective detection of acetone for easy diagnosis of diabetes by breath analysis. *Anal Chem*, 2010, 82(9): 3581-3587.
- 3 Wang Z, Wang C. Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements. *J Breath Res*, 2013, 7(3): 037109.
- 4 Buszewski B, Keszy M, Ligor T, et al. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr*, 2007, 21(6): 553-566.
- 5 Phillips M, Herrera J, Krishnan S, et al. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 729(1-2): 75-88.
- 6 Miekisch W, Schubert J K. From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: Technical developments in breath analysis. *Trac-Trend Anal Chem*, 2006, 25(7):665-673.
- 7 Fiehn O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Trend Anal Chem*, 2008, 27(3): 261-269.
- 8 van de Goor R, van Hooren M, Dingemans A M, et al. Training and validating a portable electronic nose for lung cancer screening. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(5): 676-681.
- 9 Heers H, Gut J M, Hegele A, et al. Non-invasive detection of bladder tumors through volatile organic compounds: a pilot study with an

- electronic nose. *Anticancer Res*, 2018, 38(2):833–837.
- 10 Phillips M, Cataneo R N, Cruzramos J A, *et al.* Prediction of breastcancer risk with volatile biomarkersin breath. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 170(2):343–350.
  - 11 Lourenco C, Turner C. Breath analysis in disease diagnosis: methodological considerations and applications. *Metabolites*, 2014, 4 (2): 465–98.
  - 12 Krishnan S T, Devadhasan J P, Kim S. Recent analytical approaches to detect exhaled breath ammonia with special reference to renal patients. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(1): 21–31.
  - 13 Saalberg Y, Wolff M. VOC breath biomarkers in lung cancer. *Clin Chim Acta*, 2016, 459: 5–9.
  - 14 Revill P, Testoni B, Locarnini S, *et al.* Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(4): 239–248.
  - 15 Gustot T, Fernandez J, Garcia E, *et al.* Clinical course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology*, 2015, 62(1): 243–52.
  - 16 Daniel L, Mark K. Global epidemiology of Hepatitis B virus infection. Berlin: Springer International Publishing, 2016:S158–68.
  - 17 Locarnini S, Hatzakis A, Chen D S, *et al.* Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J HEPATOL*, 2015, 62(1): S76–S86.
  - 18 Hanounch I A, Zein N N, Cikach F, *et al.* The breathprints in patients with liver disease identify novel breath biomarkers in alcoholic hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12(3): 516–523.
  - 19 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2018年版). 现代医药卫生, 2018, 34(24):3897–3904.
  - 20 Hanounch I A, Zein N N, Cikach F, *et al.* The breathprints in patients with liver disease identify novel breath biomarkers in alcoholic hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12(3): 516–523.
  - 21 Alkhouri N, Singh T, Alsabbagh E, *et al.* Isoprene in the exhaled breath is a novel biomarker for advanced fibrosis in patients with chronic liver disease: a pilot study. *Clin Transl Gastroen*, 2015, 6 (9): 112.
  - 22 Fernández Del Río R, O'Hara M E, Holt A, *et al.* Volatile biomarkers in breath associated with liver cirrhosis – comparisons of pre- and post-liver transplant breath samples. *Ebiomedicine*, 2015, 2(9): 1243–1250.
  - 23 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会.《慢性乙型肝炎防治指南》(2015 更新版). 传染病信息, 2015, 28(6): 321–336.
  - 24 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012 年版). 中华肝脏病杂志, 2013, 3(21): 177–182.
  - 25 Shin H W, Barletta B, Meinardi S, *et al.* Analysis of exhaled volatile organic compounds (vocs) in cystic fibrosis with pulmonary aspergillosis. *American Thoracic Society International Conference*, 2016.
  - 26 Amann A, Costello Bde L, Miekisch W, *et al.* The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res*, 2014, 8(3): 034001.
  - 27 Hao J J, Hu H W, Liu J, *et al.* Integrated metabolomics and network pharmacology study on immunoregulation mechanisms of panax ginseng through macrophages. *Evid-Based Compl Alt*, 2019.
  - 28 柴焯, 孟雅坤, 柏兆方, 等. 基于生物靶标网络分析的山豆根抗乙肝病毒的作用机制初步研究. 药学报, 2018, 53(3):396–402.
  - 29 Gao Y, Wang Z L, Tang J F, *et al.* New incompatible pair of TCM: Epimedium Folium combined with Psoraleae Fructus induces idiosyncratic hepatotoxicity under immunological stress conditions. *Front Med*, 2019: 1–13.
  - 30 王肖辉, 景婧, 牛明, 等. 酒精性肝病合并药物性肝损伤的代谢组表征和生物标志物研究. 中国科学:生命科学, 2019, 49(6): 749–760.
  - 31 Miura Y. Effect of inhibitors on omega- and (omega-1)-hydroxylation of lauric acid by frog liver microsomes. *Lipids*, 1983, 17: 864–869.
  - 32 Hsieh S C, Wang J H, Lai Y C, *et al.* Production of 1-Dodecanol, 1-Tetradecanol, and 1, 12-Dodecanediol through whole-cell biotransformation in escherichia coli. *Appl Environ Microb*, 2018, 84 (4): e01806–1817.

## Analysis of Exhaled Gas Metabolites in Patients with Decompensated Cirrhosis and Chronic Liver Failure of Hepatitis B

Wang Zhongxia, Sang Xiuxiu, Yu Simiao, Xu Wentao, Su Pengyu, Niu Ming, Wang Ruilin  
(Department of Combined TCM and Western Medicine, the 5th Medical Centre,  
Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Objective To study the difference of exhaled gas metabonomics between patients with decompensated hepatitis B cirrhosis and chronic hepatic failure in order to explore potential non-invasive biomarkers for predicting the progression of severe liver diseases. Methods With the advent of comprehensive two-dimensional gas chromatography



tandem time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOF-MS), we studied the difference of exhaled gas metabonomics between patients with decompensated cirrhosis and chronic hepatic failure of hepatitis B. Principal component analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis (OPLS-DA) were performed to compare the contents of the volatile organic compounds (VOCs). Area under the curve (AUC) and receiver operating characteristic (ROC) curves were used to build a predictive model. Results Compared with decompensated cirrhosis group, the contents of 1-dodecanol, 1-1-cyclohexen-1-yl-ethanone, 1-1-methylethoxy-2-propanone, o-cymene and carbon dioxide in chronic hepatic failure group were significantly lower. ROC curve analysis showed that 1-dodecanol could identify decompensated cirrhosis and chronic hepatic failure patients (area under ROC curve = 0.825), with sensitivity of 77.8% and specificity of 99.23%. Conclusion 1-dodecanol can be used as a potential non-invasive biomarker to predict the risk of hepatitis B decompensated cirrhosis progressing to chronic liver failure, and to provide a foundation for noninvasive detection methods to evaluate and predict the prognosis of chronic liver diseases.

**Keywords:** Exhaled gas, Metabonomics, Decompensated Cirrhosis, Chronic liver failure

(责任编辑: 周阿剑, 责任译审: 邹建华)