



自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎及其重叠综合征的临床代谢组学表征及区分

周明曦^{1,2,3}, 程诚^{2,3}, 韩延忠^{1,2,3}, 牛明², 黄迎^{2,3}, 何嫻^{2,3}, 刘尧^{2,3}, 肖小河^{2,3}, 王伽伯^{4*}, 马志涛^{4*}

1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137;

2. 解放军总医院第五医学中心肝病医学部, 北京 100039;

3. 解放军总医院第五医学全军中医药研究所, 北京 100039;

4. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

* 联系人, E-mail: jiabo_wang@ccmu.edu.cn; mzht86@ccmu.edu.cn

2022-01-29 收稿, 2022-03-30 修回, 2022-03-31 接受, 2022-03-31 网络版发表

国家自然科学基金(81721002)资助

摘要 自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)及其重叠综合征(overlap syndrome, OS)是临床常见的3种自身免疫性肝病, 由于其发病机制的复杂性和混杂性, 给临床准确区分诊断带来了挑战. 本研究采用非靶向代谢组学方法, 尝试对42例AIH、103例PBC和57例AIH-PBC OS患者血清筛选可辅助区分诊断3种肝病的代谢组学特征标志物. 结果表明, 在与AIH和PBC相关的所有变量中共鉴定出101个特征代谢物, 并进一步筛选出富集于胆汁、磷脂和氨基酸代谢途径的29个代谢物, 作为对AIH和PBC区分能力最强的指纹性代谢物. 从指纹性代谢物中压缩降维得到的特征代谢物向量, 显示出良好的区分诊断AIH与PBC的能力, 受试者工作特征曲线下面积达到0.797($P < 0.0001$). 基于指纹性代谢物主成分分析的可视化分布图, PBC和AIH样本呈现出3个区域: 单纯PBC样本区、单纯AIH样本区和混合区. 而将AIH-PBC OS样本放入该模型后发现, AIH-PBC OS样本在上述3个区域均有分布, 提示目前诊断标准下的AIH-PBC OS患者实际上具有不同的代谢特征和病因倾向, 需要更为精确的区分诊断. 基于指纹性代谢物构建的区分诊断模型, 可以辅助用于自身免疫性肝病患者的精确诊断和管理.

关键词 自身免疫性肝病, 代谢组学, 生物标志物, 胆汁酸, 脂质

自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases, AILD)是一种由自身免疫紊乱引起的且病因不明的慢性肝病, 表现为免疫系统异常攻击肝脏, 患者血清伴有自身抗体升高^[1], 包括自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)和原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)^[2]. 其中, AIH和PBC是临床常见的两种自身免疫性肝病. AIH表现为自身免疫系统攻击肝细胞引起界面型肝炎, 而PBC表现为非化脓性、破坏性

的胆汁淤积, 由免疫影响小叶间胆管引发^[1,3].

在诊断方面, PBC患者反应胆汁淤积的项目(碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和谷氨酰基转移酶(gamma-glutamyl transferase, GGT))异常升高^[4]. 抗线粒体抗体(anti-mitochondrial antibody, AMA)是对PBC具有高特异性的自身抗体, 但据文献^[5]报道, AMA阴性的PBC患者仍占15%~40%, 使诊断陷入困境. 对于AIH, 虽然已发现多种与之相关的自身抗体, 但不能仅靠自身抗体进行诊断^[6,7]. 目前, 诊断AIH需要采用系统

引用格式: 周明曦, 程诚, 韩延忠, 等. 自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎及其重叠综合征的临床代谢组学表征及区分. 科学通报, 2022, 67: 2553–2564

Zhou M X, Cheng C, Han Y Z, et al. Metabolomic profiling and discrimination of autoimmune hepatitis, primary biliary cholangitis, and overlap syndrome (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 2553–2564, doi: [10.1360/TB-2022-0147](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0147)

评分法. 国际自身免疫性肝炎小组(International Auto-immune Hepatitis Group, IAIHG)于1993年提出了AIH描述性诊断标准和诊断积分系统, 该系统主要适用于具有复杂表现患者的诊断, 常用于临床研究. 然而, 由于评分过程的复杂性, 使诊断积分系统在临床推广中具有一定的挑战性. 组织学检查对诊断有重要价值^[3,4,8], 但肝活检存在禁忌症、患者依从性差、组织学病变特异性低等问题, 在临床上常难以实现^[8]. 因此, 寻找更特异、低创的血清生物标志物对于提高AILD的诊断水平具有重要价值.

值得指出的是, 一些同时具有PBC和AIH临床特征的患者目前被定义为患有“AIH和PBC重叠综合征”(AIH and PBC overlap syndrome, AIH-PBC OS)^[3,6], 诊断方法参考Chazouillères等人^[9]于1998年提出的巴黎标准. AIH-PBC OS占PBC患者的2.1%~19%^[8]. 由于AIH-PBC OS的临床特点复杂, 目前仍没有标准的治疗方案, 用药多依赖临床医生经验. 比较常见的方案是先后或联合使用治疗PBC和AIH的药物^[8]. 熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)是目前唯一被推荐用于PBC治疗的一线药物^[4,10], 其安全性良好, 不良反应相对较轻, 但也存在部分患者对UDCA生化应答不佳导致不良预后和低生存率. 用于AIH治疗的免疫抑制剂泼尼松(龙)和硫唑嘌呤存在明显的不良反应, 如Cushing体征(满月脸、痤疮、水牛背、向心性肥胖等)^[3,8,11]. 然而, 联合用药存在争议. 例如, 表型同时符合PBC和AIH的AIH-PBC OS患者可能具有PBC倾向(对UDCA应答良好), 通过免疫抑制治疗可能使患者暴露于不必要的用药风险^[3,8].

代谢组学通过分析机体内的代谢产物, 来反映机体整体病理生理变化方面具有独特的优势^[12,13]. 非靶向代谢组学已广泛应用于肝脏相关疾病的研究, 对临床诊断具有良好的应用价值^[14]. 为此, 本研究选择确诊为AIH、PBC的患者, 通过高分辨率质谱进行非靶向代谢组学研究, 筛选指纹代谢物用于区分AIH和PBC, 建立辅助诊断模型. 进一步, 利用诊断模型研究AIH-PBC OS患者的代谢倾向, 为诊断和治疗重叠综合征提供新的视角. 此外, 还对PBC与AIH不同代谢水平进行了分析和讨论.

1 材料与方法

1.1 病例样本来源

以“自身免疫性肝炎”“原发性胆汁性肝硬化”“原发

性胆汁性胆管炎”“重叠综合征”“AIH/PBC重叠综合征”为关键词, 通过中国人民解放军总医院第五医学中心生物样本库数据库检索2015年10月~2017年5月于肝病医学部住院治疗且留存有标本的病例信息. 在排除诊断不明确、竞争性疾病并存的患者后, 筛选得到符合纳排标准的AILD病例共202例, 其中包含AIH患者42例、PBC患者103例、AIH-PBC OS患者57例. 根据《赫尔辛基宣言》的伦理原则, 研究方案得到医院伦理委员会批准, 不涉及获取任何与患者隐私有关的信息.

(i) 纳入标准. AIH诊断标准: 参照IAIHG于1999年修订的AIH诊断评分系统; PBC诊断标准: 参照美国肝脏病协会于2014年发布的诊断标准; AIH-PBC OS诊断标准: 参照Chazouillères等人^[9]于1998年提出的巴黎诊断标准. 此外, 所有患者在血清采集前未经特异性治疗, 且签署知情同意书, 表明自愿参与本研究.

(ii) 排除标准. 患者符合以下任何一条即予排除: 合并甲肝、乙肝、药物性肝损伤、酒精性肝病等竞争性疾病患者; 合并其他器官严重性疾病患者; 意识不清, 不能明确表达主观不适症状患者; 孕妇及哺乳期妇女.

1.2 样品制备

使用采血管收集患者静脉血, 血液样本在4℃冰箱静置过夜, 再以3500 r/min离心10 min分离获得血清, 并保存于-80℃血清生物库中等待分析. 使用前, 将血清置于4℃复融, 准确吸取200 μL置于塑料离心管, 用3倍预冷甲醇稀释后涡流混匀, 静置于4℃冰箱20 min沉淀蛋白及其他固形物. 沉淀后, 将样品置于4℃离心机, 12000 r/min离心10 min, 吸取上清液通过0.22 μm微孔膜过滤, 最后吹干1 h挥干甲醇, 在进样前加入流动相溶液混匀得到样品. 由每个样品吸取10 μL进行混合, 以制备质量控制(quality control, QC)样品.

1.3 实验仪器、试剂和设备参数

(i) 仪器和试剂. 包括6550 iFunnel Q-TOF LC/MS四极杆飞行时间液质联用仪(Agilent, 美国)、ZORBOX RRHD C18色谱柱(2.1 mm i.d.×100 mm, 1.8 μm i.d., Agilent Technologies, 美国)、Agilent Masshunter工作站、Vortex Genius-3涡旋振荡仪(IKA, 德国)、低温离心机(Sigma, 德国)、甲醇(色谱级, Merck, 德国)、乙腈(色谱级, Merck, 德国)等.

(ii) 色谱条件. Q-TOF正离子模式下, 流动相A为

0.1%甲酸水, 流动相B为乙腈; 负离子模式下, 流动相为纯水, 流动相B为乙腈. 柱温设定为30°C, 进样温度设定为4°C, 流速设定在0.30 mL/min, 每次的进样量为4 μ L. 色谱梯度洗脱条件: 0~1 min, 100%(A); 1~9 min, 100%~60%(A); 9~19 min, 60%~10%(A); 19~21 min, 10%~0(A); 21~25 min, 100%(B).

(iii) 质谱条件. 使用带有正、负离子模式的电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI)的Q-TOF LC/MS 仪器进行检测. 非靶向一级质谱检测范围设定在50~1200 m/z , 雾化器20 pSg(负)和20 pSg(正)雾化气体温度设定为225°C, 以13 L/h的速度释放; 鞘气温度设定为275°C, 以12 L/min的速度流动; 电喷雾毛细管电压在负离子模式下为3500 V, 正离子模式下为4000 V; 正负离子模式下喷嘴电压为2000 V; 采用亮氨酸脑啡肽下进行质量数校正, 流速为10 mL/min, 采样频率为10 s/次, 正离子模式下使用121.0509和922.0098的质荷比, 负离子模式下使用112.9856和1033.9881的质荷比.

1.4 数据处理和统计分析

所有的代谢组学变量均在Masshunter Profinder软件中标准化处理. 使用SIMCA-P 14.1软件的主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares-discriminant analysis, OPLS-DA)方法, 对标准化后的原始数据进行了方法学考察, 并评估获取患者的血清代谢轮廓, 同时记录变量投影重要性值(variable importance in projection, VIP). 利用MetaboAnalyst 4.0网站(<https://www.metaboanalyst.ca>)对数据进行过滤、统计分析, 获取 P 值和倍数变化值(fold change, FC). 将差异显著的变量($FC>1.5$ 或 <0.67 , $P<0.05$)通过HMDB(Human Metabolome Database)数据库(<http://www.hmdb.ca>)和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库(<http://www.genome.jp/kegg/ligand.html>)进行生物标志物的鉴定和通路分析.

利用受试者特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)的曲线下面积(area under curve, AUC)、二元logistic回归模型、VIP值和层次聚类分析方法, 从代谢标志物中进一步提取区分能力最强的代谢指纹, 并用雷达图描述指纹性代谢物相对强度值. 最后, 使用代谢指纹构建的PCA模型, 探究AIH-PBC OS组患者中存在的“类AIH”或“类PBC”病因倾向.

所有临床数据采用IBM SPSS Statistics26.0软件进

行统计分析. 数据中的连续变量以中位数(上四分位、下四分位)表示, 分类变量以数字和百分比表示. 组间比较采用Kruskal-Wallis H检验和Mann-Whitney U检验.

2 结果

2.1 入组患者的临床特征

临床信息和实验室数据均来自医院病例数据库, 见表1. 病例分析显示, 3组在性别和年龄无差异, 女性患者均占绝大多数, 且年龄集中于55岁. 各组的疾病特征性抗体阳性率均较高. AIH组和AIH-PBC OS组抗核抗体(anti-nuclear antibody, ANA)阳性率分别为90.5%和100%, PBC组AMA抗体全阳性. PBC组和AIH-PBC OS组的ALP、GGT和免疫球蛋白M(immunoglobulin M, IgM)水平更高($P<0.05$), PBC组的免疫球蛋白G(immunoglobulin, IgG)和 γ -球蛋白水平则显著低于AIH和AIH-PBC OS组($P<0.05$). 指标水平符合均疾病的临床特征.

2.2 LC-MS数据的多元分析

仪器在正负离子模式下分别捕获了14104和13357个变量. 对数据对齐和筛选后, 接着进行PCA和OPLS-DA分析探索血清代谢轮廓. PCA分析(图1(a), (b))显示了QC样本均在得分矩阵的中部, 说明LC-MS系统在分析过程中稳定, 且测试方法可重复. 然而使用PCA方法分离AIH和PBC样本的效果较差, 故更换OPLS-DA方法区分AIH和PBC(图1(c), (d)), 得分图显示分离效果良好. 结合条件($FC>1.5$ 或 <0.67 和 $P<0.05$)筛选所有变量, 获得了差异变量数据共742个(图1(e)). 根据变量的质荷比在HMDB数据库中进行鉴定匹配, 其中有101个变量在数据库中有对应化合物(补充材料). 将这101个代谢物作为AIH和PBC相关的特征代谢物.

如图2(a), 通过分层聚类方法进一步得到区分AIH和PBC的代谢指纹, 相关性最高的6个代谢物的AUC值范围在0.688~0.728. 此外, 采用二元logistic回归分析特征代谢物, 最终选择了步骤17中的15个代谢物, 其区分AIH和PBC的总体准确率高达93.79%(图2(b)). 将以上多变量分析方法得到的代谢物与VIP>1的特征代谢物(图2(c))取并集, 得到共29个代谢物的代谢指纹(图2(d)). 通过主成分分析方法提取指纹代谢物所得到的特征向量, 反映了AIH和PBC间的显著差异($P<0.0001$, 图2(e)). 如图2(f)所示, 特征向量的AUC=0.797可有效区

表 1 AIH、PBC、AIH-PBC OS患者的临床生化指标^{a)}

Table 1 Comparison of characteristics among patients with AIH, PBC, and AIH-PBC OS

指标	AIH组(<i>n</i> =42)	PBC组(<i>n</i> =103)	AIH-PBC OS组(<i>n</i> =57)	<i>P</i>	<i>P^a</i>	<i>P^b</i>	<i>P^c</i>
年龄(岁)	55(50,65)	55(49,62)	54(49,60)	0.460	0.648	0.231	0.330
女性(<i>n</i>)	41	94	55	0.223	0.171	0.746	0.211
Dbil(μmol/L)	9.2(4.5,20.6)	8.4(4.5,27.4)	8.6(4.9,32.5)	0.969	0.944	0.854	0.814
Tbil(μmol/L)	19.5(10.8,32.4)	16.7(11.3,41.7)	17.1(12.1,46.7)	0.998	0.929	0.952	0.991
ALT(U/L)	32.0(18.0,69.5)	32.0(20.0,54.0)	34.0(22.5,58.0)	0.661	0.757	0.726	0.346
AST(U/L)	49.5(32.0,158.3)	45(29.0,77.0)	55.0(33.5,107.0)	0.157	0.228	0.992	0.065
ALP(U/L)	118(84.5,184.8)	216(121.0,314.0)	184.0(134.5,289.5)	<0.001	<0.001	<0.001	0.706
GGT(U/L)	68.5(26.0,117.5)	116.0(54.0,298.0)	131.0(61.0,224.5)	0.006	0.004	0.004	0.899
CHE(U/L)	4136.0(2700.0,5201.3)	4874.0(3302.0,6307.0)	4452.0(2416.0,5922.0)	0.067	0.036	0.625	0.101
IgG(U/L)	20.7(14.4,23.7)	14.8(12.7,17.5)	17.9(13.3,23.8)	<0.001	<0.001	0.416	0.002
IgM(U/L)	1.6(0.9,2.4)	3.1(1.7,4.3)	2.8(1.8,4.7)	<0.001	<0.001	<0.001	0.547
γ-球蛋白(%)	28(24.0,33.9)	22.3(19.1,27.6)	27.8(22.6,34.2)	<0.001	0.001	0.892	<0.001
INR(IU)	1.1(1.0,1.2)	0.9(0.9,1.1)	1.0(0.9,1.1)	<0.001	<0.001	0.004	0.019
TC(mmol/L)	3.5(2.8,4.3)	5.2(3.9,6.6)	4.6(3.5,5.6)	<0.001	<0.001	0.003	0.016
TG(mmol/L)	1.2(0.9,1.6)	1.2(0.9,1.9)	1.1(0.8,1.5)	0.159	0.245	0.640	0.070
ANA阳性率(<i>n</i> , %)	38(90.5%)	76(73.8%)	57(100%)	—	—	—	—
ASMA阳性率(<i>n</i> , %)	9(21.4%)	0(0)	0(0)	—	—	—	—
AMA阳性率(<i>n</i> , %)	1(2.4%)	103(100%)	8(14.0%)	—	—	—	—
AMA-M2阳性率(<i>n</i> , %)	2(4.8%)	80(77.7%)	34(59.6%)	—	—	—	—

a) 数据以中位数(上四分位数、下四分位数)或数字(百分比)提供。P: 3组间的显著性差异分析; *P^a*: AIH和PBC组间显著性差异分析; *P^b*: AIH和AIH-PBC OS组间显著性差异分析; *P^c*: PBC和AIH-PBC OS组间显著性差异分析。“—”表示未作比较。ALP, 碱性磷酸酶; ALT, 丙氨酸转氨酶; AMA, 抗线粒体抗体; AMA-M2, 抗线粒体M2抗体; ANA, 抗核抗体; ASMA, 抗平滑肌抗体; CHE, 胆碱酯酶; DBil, 直接胆红素; GGT, 谷酰转肽酶; IgG, 免疫球蛋白G; IgM, 免疫球蛋白M; INR, 国际标准化比率; Tbil, 总胆红素; TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯

分AIH和PBC。

2.3 指纹性代谢物的综合分析

使用雷达图呈现指纹性代谢物的相对丰度值(图3)。AIH和PBC的代谢差异主要与胆汁酸代谢(glycochenodeoxycholate-3-sulfate, glycochenodeoxycholic acid 3-glucuronide, sulfolithocholylglycine, lithocholic acid glycine conjugate)、脂类代谢(Lysophosphatidylcholine [LysoPC][18:0/0:0], LysoPC[22:0/0:0], LysoPC[22:5/0:0], PC[15:0/24:1], PE[20:3/22:5], PE[22:0/15:0])、氨基酸和蛋白质代谢(L-glutamic acid, methionine, homocysteine, argininosuccinic acid)相关, 详见表2。

2.4 基于指纹性代谢物的AIH-PBC OS诊断模型

如图4(a), 利用指纹性代谢物的峰面积数据建立了PCA诊断模型。该模型中样本分离效果较好, 对AIH和

PBC具有特异性的预测能力。但AIH和PBC之间存在部分样本重叠, 提示了部分AIH和PBC患者体内的代谢水平相似。根据PCA模型中样本的分布特征, 我们将模型手工划分为3个区域(3 Zones), 如图4(a)。其中Zone 1为单纯PBC区, Zone 3为单纯AIH区, Zone 2为PBC和AIH的混合区。PBC样本中, 分布在Zone 1的比例为58.3%, Zone 2的比例为41.7%(图4(b))。在AIH样本中, 71.4%的样本位于Zone 3, 分布在Zone 2的样本占28.6%。

将AIH-PBC OS样本载入建立的模型, 检测AIH-PBC OS患者在代谢特征上是否有PBC或AIH倾向(图4(c))。结果显示, 分别有35.1%、40.4%和24.5%的AIH-PBC OS患者位于Zone1-3(图4(d))。对比3组间的生化指标和自身抗体后, 结果显示, 仅有GGT在组间有统计学差异(图5), 而无论是临床生化指标还是自身抗体指标, 均不能有效地区分3组的AIH-PBC OS样本, 说明当前临床常用的生化指标和自身抗体指标难以有效地区分

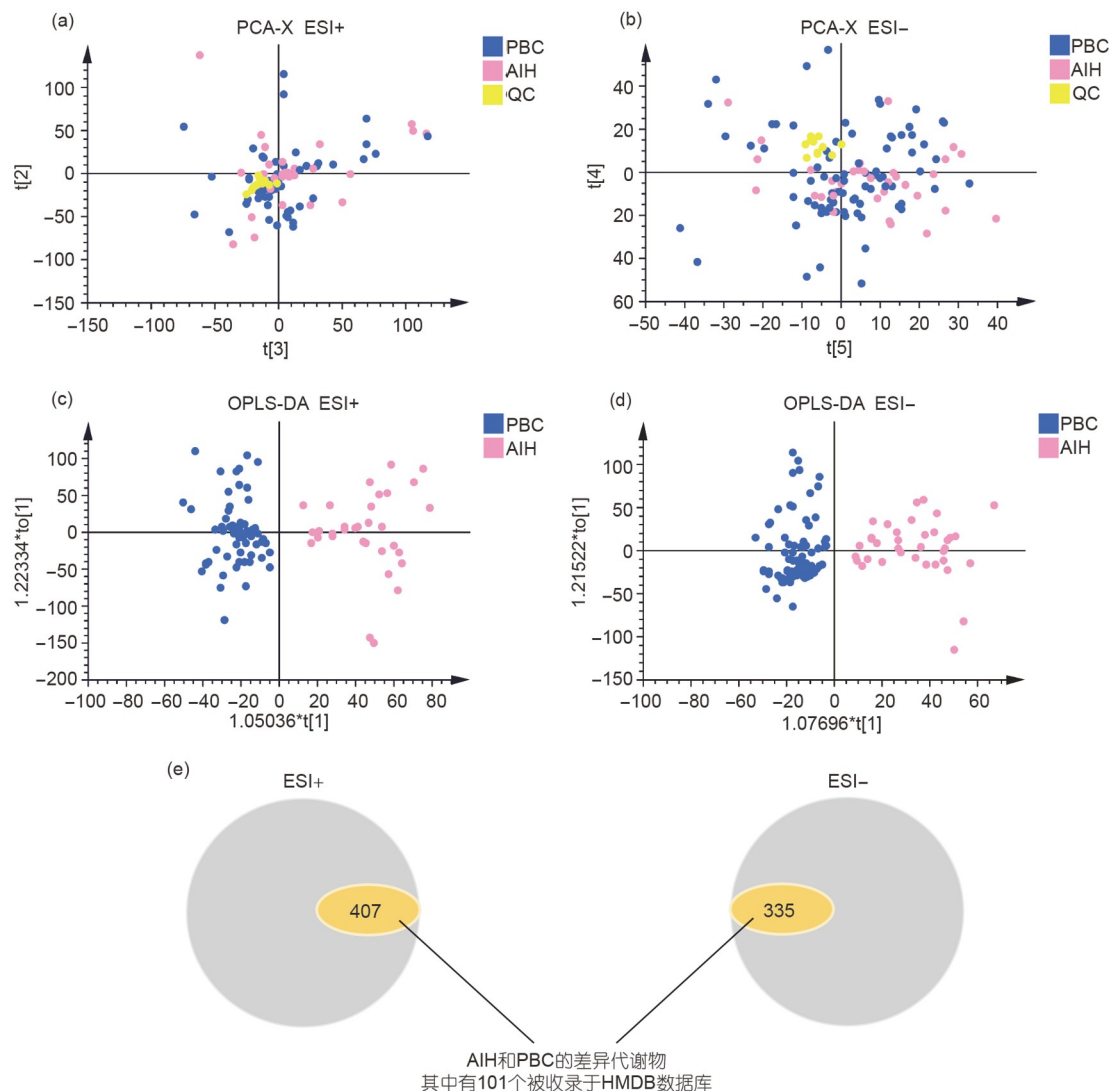


图 1 AIH与PBC组间代谢组学分析. (a) 正离子模式($R^2X(\text{cum})=0.125$, $Q^2(\text{cum})=0.056$)的PCA图; (b) 负离子模式($R^2X(\text{cum})=0.33$, $Q^2(\text{cum})=0.154$)的PCA图; (c) 正离子模式($R^2X(\text{cum})=0.0519$, $R^2Y(\text{cum})=0.861$, $Q^2(\text{cum})=0.283$)的OPLS-DA图; (d) 负离子模式($R^2X(\text{cum})=0.0531$, $R^2Y(\text{cum})=0.835$, $Q^2(\text{cum})=0.278$)的OPLS-DA图; (e) 维恩图的内部部分是指AIH与PBC组间的差异代谢物, 其中有101个变量被收录在数据库中

Figure 1 Metabolomics analysis between AIH and PBC groups. PCA-X (a), (b) and OPLS-DA (c), (d) with all metabolic variables among AIH and PBC groups under the positive and negative models of mass spectrometry. (a) ($R^2X(\text{cum})=0.125$, $Q^2(\text{cum})=0.056$); (b) ($R^2X(\text{cum})=0.33$, $Q^2(\text{cum})=0.154$); (c) ($R^2X(\text{cum})=0.0519$, $R^2Y(\text{cum})=0.861$, $Q^2(\text{cum})=0.283$); (d) ($R^2X(\text{cum})=0.0531$, $R^2Y(\text{cum})=0.835$, $Q^2(\text{cum})=0.278$); (e) the inner parts of the Venn diagram mean the set of differential variables of AIH vs. PBC, 101 of which are annotated in the database

AIH-PBC OS患者的内部差异.

3 讨论

AILD的诊断方法尚不完善, 又由于非特异性的血清学抗体, 常使临床发生误诊和漏诊^[1]. 组织学证据对于诊断AILD至关重要, 但活检结果可能显示出非典型的病理改变, 如, 确诊AIH的病人出现胆道病变(包括胆管炎和胆管消失)^[3], 使诊断陷入困境. 这些案例也提示

了AILD的发病机制中还存在未知因素, 有待进一步挖掘^[2,15,16]. 为此, 本文使用非靶向代谢组学来获得新的血清学生物标志物, 以期更明确地区分AILD. 基于指纹性代谢物建立PCA模型, 并利用AIH和PBC样本在模型可视图的分布特征, 将模型区域分别划分为单纯PBC区(Zone 1)、单纯AIH区(Zone 3)以及PBC和AIH的混合区(Zone 2). 此外, PBC和AIH的混合区Zone 2还提示了部分PBC和AIH患者的代谢轮廓相似.

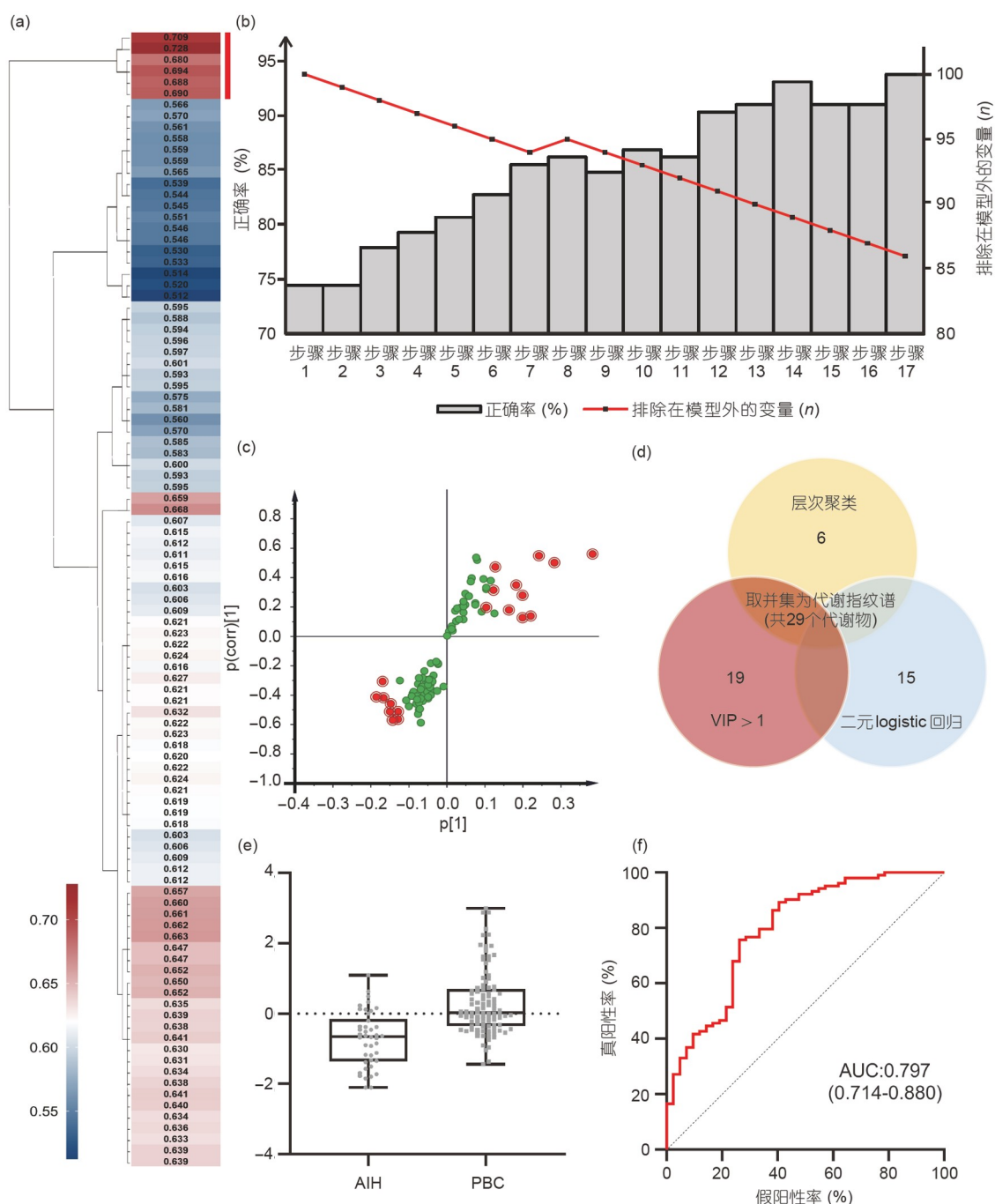


图2 AIH和PBC相关指纹性代谢物的提取。(a) AIH与PBC的101个差异代谢物的层次聚类分析, 红色竖条表示相关性最高的6个代谢物。(b) 二元逻辑回归结果的直方图。步骤17被选中为回归模型, 共包含15个变量, 其他86个变量则被剔除。(c) 101个变量的S-plot图, 19个红点代表VIP>1的变量。(d) 将层次聚类结果和二元逻辑回归结果, 以及VIP>1的变量取交集, 作为区分AIH和PBC的潜在标志物, 即代谢指纹, 共29个代谢物。(e) 代谢指纹在AIH与PBC的含量柱状图。(f) ROC曲线显示特征代谢物具有很好的识别能力(AUC=0.797)

Figure 2 Extraction of AIH vs. PBC related metabolic fingerprints. (a) Hierarchical cluster analysis for the significantly changed 101 metabolites among AIH vs. PBC. The red vertical bar identified the 6-metabolite cluster with the highest correlation. (b) A histogram for the results of binary logistic regression. We chose step 17 as the regression model containing 15 variables, and the other 86 variables were excluded from the model. (c) S-plot of 101 metabolites. The 19 red points represented metabolites with VIP>1. (d) The results of hierarchical clustering and binary logistic regression were combined with the variables with VIP>1 as potential marker to distinguish AIH from PBC, namely metabolic fingerprints, and a total of 29 metabolites were identified. (e) Histogram of metabolic fingerprint content in AIH and PBC. (f) ROC curve demonstrated that the eigenmetabolite revealed better capability for identifying (AUC=0.797)

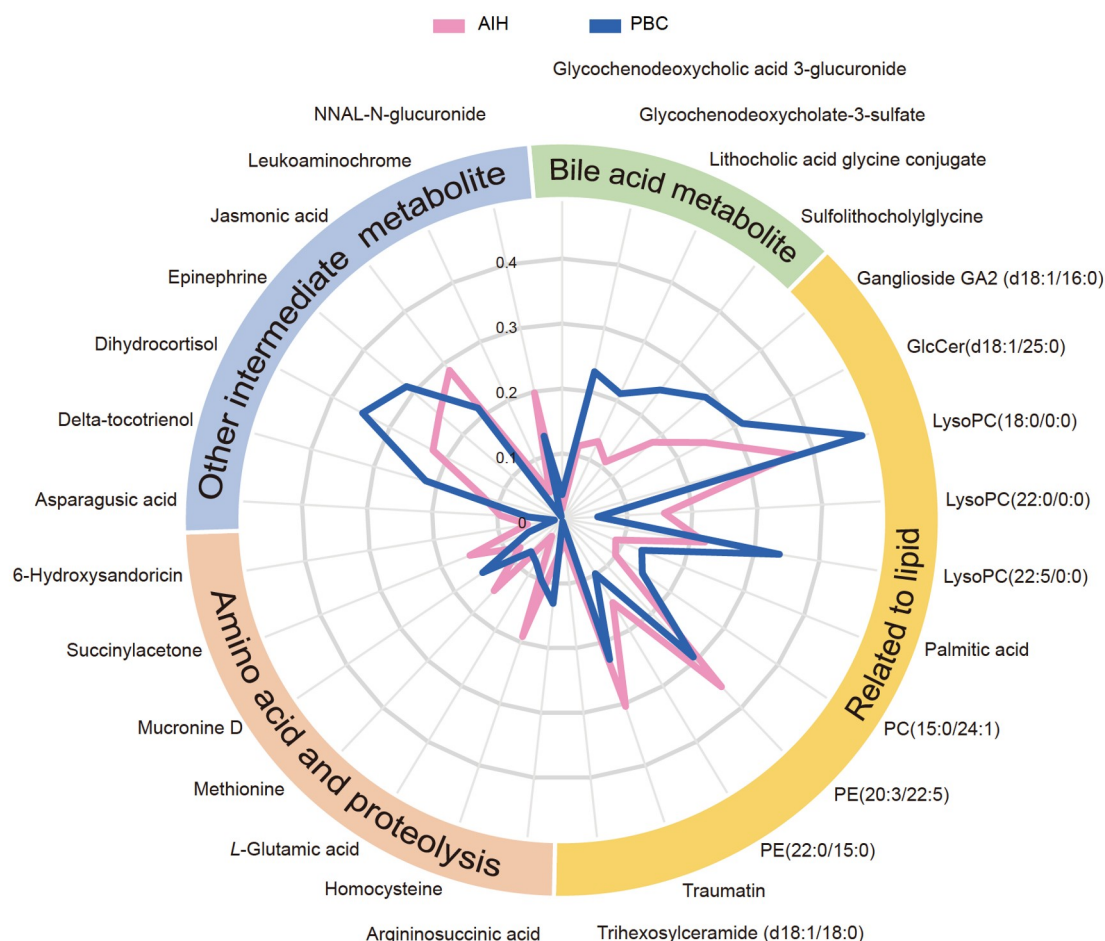


图3 指纹性代谢物的雷达图，对比了代谢产物在AIH和PBC之间相对强度值。根据雷达图中的代谢途径对指纹性代谢物进行分类，包括胆汁代谢、脂质代谢、氨基酸代谢和蛋白质水解物、其他中间代谢物。AMP，腺苷酸；GlcCer，鞘糖脂葡萄糖神经酰胺；LysoPC，溶血磷脂酰胆碱；PC，磷脂酰胆碱；PE，磷脂酰乙醇胺

Figure 3 A radar map for the fingerprint associated with disorders. The relative strength values of metabolites were compared in the two groups. The fingerprint metabolites were classified according to metabolic pathways in the radar map, including bile metabolism, lipids, amino acids and proteolysis, and other intermediate metabolites. AMP, adenosine monophosphate; GlcCer, glucosylceramide; LysoPC, lysophosphatidylcholine; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine

AIH-PBC OS样本在诊断模型的加载结果显示，AIH-PBC OS样本不仅集中在混合区Zone 2(40.4%)，而且还分布在Zone 1(35.1%)和Zone 3(24.5%)。AIH-PBC OS样本在3个区域的分布特征反映了重叠综合征患者体内的代谢水平不完全相同，部分AIH-PBC OS患者的代谢特征与PBC/AIH患者更相似，提示AIH-PBC OS患者具有不同的主要病因或病因倾向，同时也从侧面印证了重叠综合征是一种“经典”自身免疫性肝病的变异型，而非单独的诊断实体。值得关注的是，在对比了3个区域AIH-PBC OS患者的生化指标和自身抗体指标后，发现仅GGT在3组间存在显著差异。GGT是一个非特异性的指标，在大多数肝脏疾病中均可见升高^[17]，

目前不能用于确认AIH-PBC OS患者的主要病因。总的来说，当前临床上常用的生化指标和自身抗体指标均不能有效地区分AIH-PBC OS患者的内部差异，而本文基于代谢指纹构建的PCA模型可以成为一种补充诊断重要的手段，并可用于制定重叠综合征患者的治疗方案，例如，可将诊断为AIH-PBC OS的患者进一步分类为“类PBC”、“类AIH”或两者并存的重叠患者。而对于“类PBC”的AIH-PBC OS患者，可考虑优先使用UDCA治疗，而对于“类AIH”的AIH-PBC OS患者可考虑直接使用免疫抑制剂。基于代谢指纹可为临床更为精准地区分诊断AIH-PBC OS患者和指导临床合理用药提供辅助参考，具有重要的潜在应用价值。

表 2 AIH与PBC相关代谢指纹的代谢物详细信息

Table 2 The detailed information of metabolites in metabolomic fingerprint associated with AIH vs. PBC

序号	模式	分子量(ppm, parts per million)	保留时间 (min)	代谢物	分子式	相差分子量 (ppm)	AUC	AIH/PBC	
								FC	P
1	ESI+	184.0941	1.1	Epinephrine	C ₉ H ₁₃ NO ₃	15	0.632784	0.7938	0.013994
2	ESI+	148.0583	1.22	L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	14	0.709478	0.43161	0.012728
3	ESI+	136.0436	1.37	Homocysteine	C ₄ H ₉ NO ₂ S	7	0.59478	1.8089	0.005488
4	ESI+	365.2255	7.96	Dihydrocortisol	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	18	0.679945	0.64725	0.001031
5	ESI+	213.1472	7.97	Traumatoin	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	6	0.59707	1.5413	0.023113
6	ESI+	152.0698	8.06	Leukoaminochrome	C ₈ H ₉ NO ₂	5	0.56456	11.997	0.029187
7	ESI+	434.3164	8.27	Lithocholic acid glycine conjugate	C ₂₆ H ₄₃ NO ₄	23	0.633929	0.61068	0.018492
8	ESI+	211.1331	8.35	Jasmonic acid	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	1	0.634844	1.5022	0.029548
9	ESI+	626.3515	8.52	Glycochenodeoxycholic acid 3-glucuronide	C ₃₂ H ₅₁ NO ₁₁	3	0.662775	0.49234	0.004875
10	ESI+	605.2746	8.72	6-Hydroxysandoricin	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₂	25	0.511905	4.1279	0.033191
11	ESI+	397.3088	10.7	Delta-tocotrienol	C ₂₇ H ₄₀ O ₂	3	0.62065	0.59311	0.005661
12	ESI+	514.2905	12.63	Sulfolithocholylglycine	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	14	0.72848	0.45961	0.000122
13	ESI+	662.3928	13.02	Mucronine D	C ₃₇ H ₅₁ N ₅ O ₆	2	0.608745	0.53486	0.039701
14	ESI+	570.3476	14.12	LysoPC(22:5/0:0)	C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P	14	0.693681	0.66825	0.001465
15	ESI+	524.3633	15.51	LysoPC(18:0/0:0)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	15	0.690247	0.5799	0.001505
16	ESI+	1065.681	15.52	Ganglioside GA2 (d18:1/ 16:0)	C ₅₄ H ₁₀₀ N ₂ O ₁₈	22	0.688187	0.63345	0.002308
17	ESI+	580.4237	23.32	LysoPC(22:0/0:0)	C ₃₀ H ₆₂ NO ₇ P	17	0.583333	2.8837	0.000516
18	ESI+	1052.679	24.17	Trihexosylceramide (d18:1/18:0)	C ₅₄ H ₁₀₁ NO ₁₈	29	0.559982	7.065	0.046106
19	ESI+	830.6465	24.27	PC(15:0/24:1)	C ₄₇ H ₉₂ NO ₈ P	20	0.624313	0.63516	0.018098
20	ESI-	824.697	1.05	GlcCer(d18:1/25:0)	C ₄₉ H ₉₅ NO ₈	2	0.614743	0.64595	0.021437
21	ESI-	814.5206	1.09	PE(20:3/22:5)	C ₄₇ H ₇₈ NO ₈ P	4	0.593243	1.5966	0.029693
22	ESI-	148.0444	1.18	Methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	4	0.599824	1.8426	0.001074
23	ESI-	760.5769	1.89	PE(22:0/15:0)	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	12	0.631417	1.4043	0.027104
24	ESI-	157.0536	3.95	Succinylacetone	C ₇ H ₁₀ O ₄	19	0.661913	2.5694	0.000668
25	ESI-	528.2623	4.82	Glycochenodeoxycho- late-3-sulfate	C ₂₆ H ₄₃ NO ₈ S	3	0.658622	0.52163	0.047259
26	ESI-	384.1539	5.17	NNAL-N-glucuronide	C ₁₆ H ₂₄ N ₃ O ₈	32	0.574594	1.4715	0.028845
27	ESI-	148.9712	5.22	Asparagusic acid	C ₄ H ₆ O ₂ S ₂	16	0.649846	2.0807	0.032161
28	ESI-	289.1208	5.3	Argininosuccinic acid	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₆	19	0.638219	0.34457	0.016183
29	ESI-	255.2315	15.27	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6	0.621106	0.59288	0.038277

本研究提取的指纹性代谢物主要包括胆汁酸、脂类、氨基酸以及蛋白水解物等。在PBC组,胆汁酸和脂类代谢物相对强度更高,或与胆汁淤积有关:胆汁淤积发生后,机体的代谢功能紊乱,胆盐、脂质和胆固醇等胆汁组分易在血液中积累^[18,19]。此外,还有学者在早期

PBC患者的肝脏组织中发现胆固醇摄取基因被抑制,而分泌/排泄基因被激活,导致了血清胆固醇浓度升高。同时,患者合成和转运磷脂酰胆碱的基因也被上调,从而帮助排泄胆汁中的胆固醇^[18]。

关于脂质相关代谢物,本研究发现,AIH和PBC患

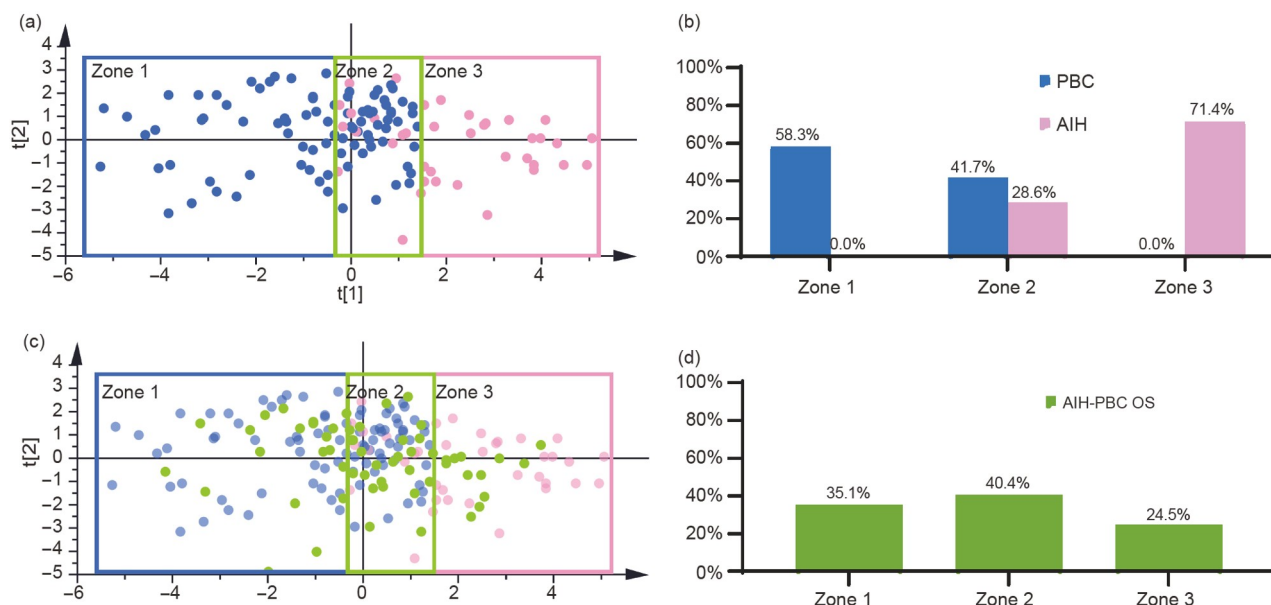


图 4 使用PCA模型评估样本. (a) AIH与PBC样本在代谢指纹构建的PCA模型下的散点图. 根据AIH和PBC样本的分布情况, 将模型区域划分为1~3区(Zone 1~3). (b) AIH与PBC患者在Zone 1~3的分布比例用直方图表示. (c) 载入AIH-PBC OS组后的PCA模型散点图. (d) AIH-PBC OS患者在Zone 1~3分布比例用直方图表示

Figure 4 Evaluating samples by PCA model. (a) Scatter plot of AIH vs. PBC-related metabolic fingerprint in PCA model. According to the distribution of AIH and PBC scatter points, the model region was divided into Zone 1~3. Zone 1 as the “pure zone” of PBC, Zone 3 as the “pure zone” of AIH, and Zone 2 as the mixture zone of PBC and AIH. (b) The distribution ratio of AIH and PBC patients in Zone 1~3 is presented with histograms. (c) Scatter plot of the PCA model after loading the AIH-PBC OS group. (d) The distribution ratio of AIH-PBC OS patients in Zone 1~3 is presented with histograms

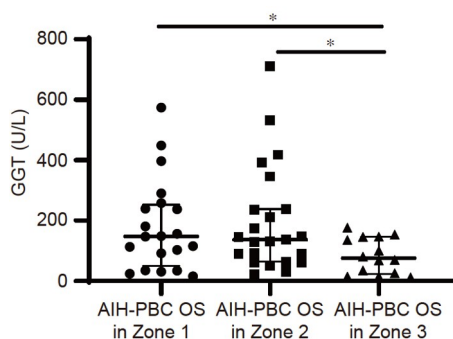


图 5 Zone 1~3三个区域AIH-PBC OS患者间的GGT指标具有显著性差异. *: $P < 0.05$

Figure 5 Comparison of clinical indices among AIH-PBC OS samples in Zone 1~3. There were significant differences in GGT index among AIH-PBC OS patients in Zone 1~3 groups. *: $P < 0.05$

者体内的溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholines, LysoPCs)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholines, PCs)和磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamines, PEs)等磷脂类存在差异: PBC组中LysoPC(22:5/0:0)、LysoPC(18:0/0:0)和PC(15:0/24:1)更高, AIH组中LysoPC(22:0/0:0)、PE(20:3/22:5)和PE(22:0/15:0)更高. 肝病的代谢核心表型, 是肝脏疾病破坏脂质循环, 导致胆汁酸和磷脂的异

常浓度^[3,12,20,21]. 肝病发生后, 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等促炎因子刺激肝细胞, 并上调溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶基因(lysophosphatidylcholine acyltransferase gene, Lpcat), 加速LysoPCs向PCs转化. 一项基于小鼠的非酒精性脂肪性肝病的研究发现, 胆汁酸排泄基因表达被上调, 而负责输送胆汁酸到肝细胞的溶质载体表达受到抑制^[21]. 这一机制或许能解释其他炎症性肝病的脂质代谢循环失衡现象^[12]. 由于PCs在清除多余胆盐和胆固醇上发挥着重要作用, 胆汁淤积后PC需求量的增加可能进一步激活Lpcat1基因^[21], 可能解释了PBC和AIH组间LysoPCs和PCs的差异. 此外, PCs和PEs还是构成细胞膜的主要成分, PCs/PEs比值降低可引起肝细胞炎症导致细胞凋亡^[22,23], 本研究结果中AIH组中PCs/PEs比值下降或也提示了肝细胞为主要受损靶点. 另一方面, 胆汁淤积还导致有毒胆汁酸在肝内积聚, 使PBC的脂质代谢紊乱情况比AIH更为严重^[24]. 石胆酸作为一种疏水的毒性胆汁酸, 常在胆汁淤积患者肝脏中表现出浓度升高^[24,25], 还能诱发动物出现胆汁淤积^[25], 其可能的机制为通过TGF- β 通路

增加胆汁酸代谢产物,并上调*Lpcat2*、*Lpcat4*和鞘磷脂磷酸二酯酶3(sphingomyelin phosphodiesterase, *Smpd3*)基因,从而破坏脂质循环,引起磷脂和鞘脂的比例失调^[20,25]。为了更全面地了解PBC和AIH病程中磷脂的变化,可以采用脂质组学进行进一步的研究。

PBC和AIH患者在氨基酸代谢上同样存在差异,例如,本研究发现,谷氨酸(glutamic acid)浓度在PBC患者体内更高。有报道称,外源增加谷氨酸可促进白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、TNF- α 表达,引发肝脏炎症^[26,27]。蛋氨酸(methionine)及其代谢衍生物同型半胱氨酸(homocysteine)在AIH患者的血清中浓度更高。蛋氨酸通路代谢异常在许多疾病中都有表现,如高浓度的同型半胱氨酸已被证实与酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝有关^[28-30]。同型半胱氨酸还可引发氧化应激,加速肝炎进程和肝细胞凋亡^[31]。蛋氨酸代谢紊乱可能通过促炎和诱导氧化应激,影响AIH的发病,该发现或能成为AIH治疗的关键点。

综上,本研究通过血清非靶向代谢组学方法,对AIH和PBC的患者体内的代谢水平进行了表征,获得了29个富集于胆汁、磷脂和氨基酸代谢途径的指纹性代谢物,可用于辅助临床区分诊断AIH和PBC,同时也为梳理AIH和PBC的发病机制上提供了帮助。基于指纹性代谢物建立的PCA模型,还能为明确AIH-PBC重叠综合征患者的病因倾向提供方法,也为指导重叠综合征的临床合理用药提供新视野。但由于缺乏定性定量的数据,对于结果中胆汁酸盐、磷脂类代谢物、氨基酸等的含量差异如何影响AIH和PBC的发病或进展,还需进一步采用靶向方法定量检测,同时构建体内外模型验证代谢物功能。此外,面对表现出混杂疾病特征的患者时,代谢组学方法可能出现难以判断组别的情况,故在临床使用时需结合已成熟的生物学指标和疾病标志物进行综合判定。为此,后续将扩大样本量,建立前瞻性的大队列研究进一步验证生物标志物的区分力,并逐步优化检测方法。

参考文献

- Arndtz K, Hirschfield G M. The pathogenesis of autoimmune liver disease. *Dig Dis*, 2016, 34: 327–333
- Carbone M, Neuberger J M. Autoimmune liver disease, autoimmunity and liver transplantation. *J Hepatol*, 2014, 60: 210–223
- Boberg K M, Chapman R W, Hirschfield G M, et al. Overlap syndromes: The International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. *J Hepatol*, 2011, 54: 374–385
- Hirschfield G M, Beuers U, Corpechot C, et al. EASL clinical practice guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol*, 2017, 67: 145–172
- Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association; Chinese Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association; Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. Consensus on the diagnosis and management of primary biliary cirrhosis (cholangitis) (2015) (in Chinese). *J Clin Hepatol*, 2015, 31: 1980–1988 [中华医学会肝病学分会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 原发性胆汁性肝硬化(又名原发性胆汁性胆管炎)诊断和治疗共识(2015). 临床肝胆病杂志, 2015, 31: 1980–1988]
- Czaja A J. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis: Current status and future directions. *Gut Liver*, 2016, 10: 177–203
- Mieli-Vergani G, Vergani D, Czaja A J, et al. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18017
- Vierling J M. Autoimmune hepatitis and overlap syndromes: Diagnosis and management. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2015, 13: 2088–2108
- Chazouillères O, Wendum D, Serfaty L, et al. Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: Clinical features and response to therapy. *Hepatology*, 1998, 28: 296–301
- Carey E J. Progress in primary biliary cholangitis. *N Engl J Med*, 2018, 378: 2234–2235
- Manns M P, Czaja A J, Gorham J D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 2010, 51: 2193–2213
- Beyoğlu D, Idle J R. The metabolomic window into hepatobiliary disease. *J Hepatol*, 2013, 59: 842–858
- Nicholson J K, Wilson I D. Understanding “global” systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2: 668–676
- Yu M, Zhu Y, Cong Q, et al. Metabonomics research progress on liver diseases. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2017: 8467192
- Thomson A W, Knolle P A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 753–766
- Herkel J, Carambia A, Lohse A W. Autoimmune hepatitis: Possible triggers, potential treatments. *J Hepatol*, 2020, 73: 446–448
- Kunutsor S K. Gamma-glutamyltransferase-friend or foe within? *Liver Int*, 2016, 36: 1723–1734
- Kohjima M, Enjoji M, Yada R, et al. Pathophysiological analysis of primary biliary cirrhosis focusing on choline/phospholipid metabolism. *Liver Int*, 2015, 35: 1095–1102

- 19 de Aguiar Vallim T Q, Tarling E J, Edwards P A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. [Cell Metab](#), 2013, 17: 657–669
- 20 Lian J S, Liu W, Hao S R, et al. A serum metabolomic analysis for diagnosis and biomarker discovery of primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. [Hepatob Pancreat Dis Int](#), 2015, 14: 413–421
- 21 Tanaka N, Matsubara T, Krausz K W, et al. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. [Hepatology](#), 2012, 56: 118–129
- 22 Payne F, Lim K, Girousse A, et al. Mutations disrupting the Kennedy phosphatidylcholine pathway in humans with congenital lipodystrophy and fatty liver disease. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 8901–8906
- 23 Li Z, Agellon L B, Allen T M, et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. [Cell Metab](#), 2006, 3: 321–331
- 24 Zhang Y, Hong J Y, Rockwell C E, et al. Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver. [Liver Int](#), 2012, 32: 58–69
- 25 Matsubara T, Tanaka N, Patterson A D, et al. Lithocholic acid disrupts phospholipid and sphingolipid homeostasis leading to cholestasis in mice. [Hepatology](#), 2011, 53: 1282–1293
- 26 Nakanishi Y, Tsuneyama K, Fujimoto M, et al. Monosodium glutamate (MSG): A villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. [J Autoimmun](#), 2008, 30: 42–50
- 27 Roman-Ramos R, Almanza-Perez J C, Garcia-Macedo R, et al. Monosodium glutamate neonatal intoxication associated with obesity in adult stage is characterized by chronic inflammation and increased mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptors in mice. [Basic Clin Pharmacol Toxicol](#), 2011, 108: 406–413
- 28 Glushchenko A V, Jacobsen D W. Molecular targeting of proteins by *L*-homocysteine: Mechanistic implications for vascular disease. [Antioxid Redox Signal](#), 2007, 9: 1883–1898
- 29 Medici V, Peerson J M, Stabler S P, et al. Impaired homocysteine transsulfuration is an indicator of alcoholic liver disease. [J Hepatol](#), 2010, 53: 551–557
- 30 Bhanji R A, Ma M, Bain V G, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with severity of cirrhosis and negative impact after liver transplantation. [Liver Int](#), 2016, 36: 696–704
- 31 Sibrian-Vazquez M, Escobedo J O, Lim S, et al. Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2010, 107: 551–554

补充材料

表S1 AIH与PBC相关的101个特征代谢物详细信息

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎及其重叠综合征的临床代谢组学表征及区分”

Metabolomic profiling and discrimination of autoimmune hepatitis, primary biliary cholangitis, and overlap syndrome

Mingxi Zhou^{1,2,3}, Cheng Cheng^{2,3}, Yanzhong Han^{1,2,3}, Ming Niu^{2,3}, Ying Huang^{2,3}, Xian He^{2,3}, Yao Liu^{2,3}, Xiaohe Xiao^{2,3}, Jiabo Wang^{4*} & Zhitao Ma^{4*}

¹ School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

² Department of Hepatology, Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China;

³ Military Institute of Chinese Materia, Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China;

⁴ School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

* Corresponding authors, E-mail: jiabo_wang@ccmu.edu.cn; mzht86@ccmu.edu.cn

Autoimmune liver disease (AILD) is a kind of liver disease caused by immune dysfunction, including autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cholangitis (PBC), and overlap syndrome (OS). In AILD patients, the immune system attacks the liver, and elevated autoantibodies can be found in serum. AIH and PBC are two kinds of AILD with high incidence, and their pathogenesis is different. AIH is characterized by interfacial hepatitis caused by the autoimmune system attacking hepatocytes. The clinical features of PBC are non-suppurative, destructive cholestasis resulting from immune damage affecting the interlobular bile ducts. Due to the complex and promiscuous pathogenesis of autoimmune diseases and the low specificity of clinical features, challenges remain in the clinical diagnosis of AILD. Liver biopsy results are necessary for the accurate diagnosis of AILD, but biopsy is not conducive to the prognosis of patients, and the pathological changes of patients may be non-specific. Therefore, the need of finding serological metabolites with low high specificity and invasive features becomes urgent. Metabolomics has unique advantages in reflecting the overall pathophysiological changes of the body by analyzing the metabolites. Untargeted metabolomics has been widely used in the study of liver-related diseases and has good application value for clinical diagnosis.

In this study, we attempted to characterize the metabolic signatures of autoimmune liver diseases by serum metabolomics. A mass spectrometry-based untargeted metabolomics study was performed on the serum of AIH ($n=42$), PBC ($n=103$), and AIH-PBC OS ($n=57$) patients. The differentiable metabolites for PBC and AIH samples were obtained by principal component analysis and orthogonal partial least-squares-discriminant analysis, which consisted of the metabolomic signatures. Among the metabolomic signatures, the fingerprint metabolites were further extracted by clustering analysis using the values of area under the curve (AUC) of each differentiable metabolite, binary logistic regression model, and variable importance projection scores. 101 signature metabolites from all metabolite variables were identified, and 29 fingerprint metabolites were further screened out and enriched in bile, phospholipids, and amino acids metabolisms pathway, with most classification ability to distinguish PBC and AIH. The eigenmetabolite compressed from the fingerprint metabolites visualized the significant difference between PBC and AIH ($P<0.0001$) and achieved a good potential for classification (AUC=0.797). Based on fingerprint metabolites, AIH and PBC samples could be separated into three zones, the “pure zone” of PBC, the “pure zone” of AIH, and the mixture zone of PBC and AIH. We put OS samples into the model and found that samples showed different distribution characteristics in three zones, indicating that OS patients according to the current diagnostic criteria have different metabolic characteristics and etiological tendencies, requiring a more accurate diagnosis. This study revealed a metabolic outlook for AIH, PBC, and their overlap syndrome, and the diagnostic model based on fingerprint metabolites with the potential ability to facilitate precise diagnosis and management of patients with autoimmune liver diseases.

autoimmune liver diseases, metabolomics, biomarkers, bile acid, lipid

doi: [10.1360/TB-2022-0147](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0147)