

基于非靶向脂质组学对卵巢子宫内膜异位症及合并卵巢癌脂质代谢的探索

段雨含¹, 王鹤霖², 张琨^{3*}

1. 吉林大学第二医院输血科, 长春 130041

2. 吉林大学第二医院检验科, 长春 130041

3. 吉林大学第二医院医学研究中心, 长春 130041

*联系人, zk303@jlu.edu.cn

收稿日期: 2024-12-15; 接收日期: 2025-9-9

基金项目: 吉林省卫生健康科技能力提升项目 (2023LC016)

【摘要】卵巢子宫内膜异位症 (ovarian endometriosis, OEMs) 病因复杂, 近几年发病率显著上升。本文选择 10 名患有 OEMs、10 名患有卵巢良性肿瘤 (benign ovarian tumor, BOT) 和 10 名患有 OEMs 合并卵巢癌 (Ovarian cancer, OC) 的育龄期妇女的血清及尿液样本, 采用非靶向超高效液相色谱-质谱 (UPLC-LC-MS) 分析方法, 通过多变量偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 模型分析比较 OEMs 与 BOT 和 OEMs 合并 OC 患者血清及尿液中脂质代谢产物的差异, 进一步通过 KEGG 注释筛选相关代谢途径, 初步探究与 OEMs 发生及其恶化相关的脂质成分, 进一步深入了解 OEMs 的发生发展机制。结果显示, BOT 组与对照组血清及尿液脂质代谢物均存在显著差异, 其中血清中有 13 种显著不同的脂质代谢物, 尿液中有 9 种。KEGG 结果注释分析显示花生四烯酸代谢途径在血清及尿液中均富集, 自噬途径在血清样本中富集。恶性组与对照组血清及尿液脂质代谢物均存在显著差异, 其中血清中有 81 种显著不同的脂质代谢物, 尿液中有 6 种, 血清和尿液样本均存在显著差异的脂质代谢物为主要有甘油磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 和磷脂酰胆碱 (Phosphatidyl cholines, PC)。KEGG 结果注释分析显示亚油酸代谢途径在血清及尿液中均富集, 而血清样本中还揭示了鞘脂信号通路、花生四烯酸代谢途径的富集。本次 OEMs 合并卵巢癌患者及 BOT 患者相比单纯 OEMs 患者血清及尿液脂质代谢物表达均存在差异, 提示了 OEMs 的发生及合并卵巢癌与脂质代谢可能有关。

【关键词】卵巢子宫内膜异位症；脂质组学；卵巢癌；血清；尿液；脂质代谢

Alterations in lipid metabolism in ovarian endometriosis and combined ovarian cancer revealed by untargeted lipidomics

DUAN Yu-han¹, WANG He-lin², ZHANG Kun^{3*}

¹Department of Transfusion Medicine, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China

²Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China

³Medical Research Center, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China

* Correspondence: zk303@jlu.edu.cn

ABSTRACT

Ovarian endometriosis (OEMs) is a complex condition with a rising rate of incidence. This study aimed to investigate the lipid components associated with the development and progression of OEMs, and to clarify the mechanisms underlying the development of EMs. For this, serum and urine samples were selected from ten women of childbearing age with OEMs (control group), ten with BOT (BOT group), and ten with OEMs + ovarian cancer (malignant group). These samples were analyzed using untargeted Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. The lipid metabolism products were compared using a multivariate partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to identify differences among the three groups. Further KEGG annotation was used to screen the relevant metabolic pathways. Differences in the lipid metabolite contents of the serum and urine samples from the BOT and control groups were identified, with 13 in the serum and 9 in the urine varying markedly. KEGG annotation results revealed that the arachidonic acid substitution pathway was enriched in both serum and urine, and the autophagy pathway only in the serum. There were significant differences in lipid metabolites in both the serum and urine samples of the malignant and control groups, with 81 varying significantly in serum and 6 in urine. The lipid metabolites that differed conspicuously in both serum and urine samples were phosphatidic acid and phosphatidylcholines (PC). KEGG annotation results showed that the linoleic acid pathway was enriched in both serum and urine, while the sphingolipid signaling and arachidonic acid pathways were enriched only in the serum samples. There were differences in the levels of serum and urinary lipid metabolites in the malignant and BOT group patients compared to the OEM group. These results suggest that the occurrence of OEMs in combination with ovarian cancer may be related to lipid metabolism.

Keywords: Ovarian endometriosis, lipidomics, ovarian cancer, serum, urine, lipid metabolism

子宫内膜异位症是一种慢性妇科疾病,其特征是子宫内膜腺和子宫外间质的

异常存在,并伴有慢性炎症。最常见的是盆腔器官是卵^[1],可引起慢性盆腔疼痛、痛经和不孕等症状^[2]。随着近年来对 EMs 更深入的认识,它不仅仅是一种局限于盆腔的疾病,而是一种全身性、系统性的疾病^[3],可能影响着外周血,甚至尿液中的代谢物的变化。根据世界卫生组织的数据,全球约有 10%的育龄妇女(1.9 亿)被诊断为患有这种疾病^[4]。目前 EMs 的发病机制尚不明确,异质性使其早期诊断较为困难。据报道,EMs 从出现症状到明确诊断平均需要 8-11 年,且妇科检查和超声检查等无创检查十分依赖医生的临床经验,现以血清 CA125 为代表的大多数生物学指标的敏感性和特异性均欠佳^[5]。早在 1925 年, Sampson 就提出了子宫内膜异位症与恶性转化之间的潜在相关性,子宫内膜异位症与 15%-50%的透明细胞和子宫内膜样卵巢肿瘤相关,子宫内膜异位症患者的卵巢癌发病率增加 2-3 倍^[6]。迄今为止,也有许多研究表明,子宫内膜异位症女性患 OC 的风险可能增加^[7-9]。研究发现^[10], EMs 患者血清脂代谢相关指标总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、载脂蛋白 A1(ApoA1)、Lp(a)水平升高,证明了脂代谢可能与 EMs 有密切关系。而卵巢癌细胞为了满足生长和能量需求,需要不断摄入脂质。因此,EMs 患者合并卵巢癌后,可能存在进一步的脂质代谢紊乱。

脂质组学是基于分析化学原理和技术手段,特别是质谱技术,通过定性定量分析生物样本中的脂质,挖掘与其他脂质、蛋白质之间关系,进而阐明相关的生物机制^[11],为理解许多小分子内源性脂质代谢物及其相关的代谢途径提供线索^[12],已被证明可为复杂疾病领域提供进一步的见解。液相色谱-质谱联用技术

(LC-MS) 脂质组学是色谱分离与质谱检测的耦合,增加了额外的选择性,引入保留时间作为鉴定的手段,从而降低了质谱分析的复杂性,并增加了每个样品的峰容量,可以进行定性和定量分析^[13]。对 EMs 患者血清及尿液的检测可能会获得不同的脂质代谢标志物和脂质代谢谱,这些定量参数反映 EMs 病理状态。到目前为止,EMs 及合并卵巢癌脂质代谢紊乱的详细机制尚未完全阐明。本研究的目的是通过比较单纯 OEMs 与卵巢良性肿瘤和 OEMs 合并卵巢癌患者的血清及尿液不同的脂质代谢产物和分析相关的代谢途径,获得差异脂质代谢谱,从脂质代谢的角度探讨血清和尿液之间的联系,同时为进一步探索 EMs 的发生及 OEMs 合并卵巢癌的可能机制提供理论依据,也为后续筛选潜在的有价值的鉴别诊断标志物提供思路。

1 资料与方法:

1.1 样本收集与制备

所有受试者均招募自 2022 年 3 月至 2022 年 10 月在吉林大学第二医院首诊且术后经病理证实为 OEMs (对照组)、BOT (BOT 组, 包括成熟畸胎瘤、卵巢浆液性囊腺瘤、卵巢粘液性囊腺瘤等)、OMEs 同时合并卵巢癌 (恶性组, 卵巢癌病理类型包括卵巢子宫内膜样癌、卵巢透明细胞癌等) 的妇女。其中 BOT 组 10 例, 恶性组 10 例, 对照组 10 例。所有受试者采集入院当日经检验后剩余的外周静脉血清样本及次日清晨中段尿。纳入标准: (1) 病例组患者符合入组的病理诊断、首诊; (2) 年龄处于 20-40 岁之间的育龄期女性; (3) 非妊娠期; (4) 术前 3 个月内未使用任何激素治疗; (5) 不合并严重内外科疾病 (心、肝、脑、肾等系统病变或恶性肿瘤等); (6) 无免疫系统等内科合并症。排除标准: (1) 近期出现严重急性感染或炎症反应、有活动性出血者; (2) 合并内分泌、免疫系统疾病或其他恶性肿瘤; (3) 临床资料不完整者; (4) 标本不合格者。本研究经吉林大学第二医院医学伦理委员会审核批准。

血清标本用高速离心机 3000r/min 进行离心 10min, 尿液标本在室温条件下用高速离心机 3000r/min 进行离心 15min 后, 分别取其上清液密封置于 EP 管中, 于 -80°C 冰箱中进行保存。

1.2 仪器和试剂

质谱: TripleTOF5600 (SCIEX)、液相色谱: ExionUPLC (SCIEX)、甲醇、96 孔板、氮吹、乙腈、振荡器。

1.3 代谢产物提取

从 -80°C 冰箱取出样本, 4°C 度缓慢解冻。将样本用电子天平称重, 加入 10 倍质量的 50% 甲醇 (比如 25mg 组织加入 250 μ l buffer), 充分匀浆。吸取匀浆液 200 μ l 转 EP 管, 加入 1ml 乙腈混匀, -20 度放置 2 小时沉淀蛋白。15000g 离心取上清, 真空浓缩抽干。20 μ l 50% 甲醇复溶。每个样本取 5 μ l 混匀制成 QC 样本。

1.4 代谢物检测

所有样品均通过 LC-MS 系统按照机器指令获得。首先采用超高效液相色谱 (UPLC) 系统 (SCIEX) 进行分离, 反相分离采用 XBridge BEH C18 柱 (3.5 μ m,

2.1mm × 100 mm, 沃茨, UK)。柱温箱保持在 50 °C。流速为 0.3 ml/min, 移动的相由溶剂 A (水+0.1%甲酸) 和溶剂 B (乙腈+0.1%甲酸) 组成。梯度洗脱条件为: 0~0.5 min, B 相 5%; 0.5~5 min, B 相 5%~80%; 5~7 min, B 相 80%~100%; 7~8 min, B 相 100%; 8~8.1 min, B 相 100%~5%; 8.1~10 min, B 相 5%。

使用高分辨率串联质谱仪 TripleTOF5600 (SCIEX) 检测色谱柱洗脱的代谢物。Q-TOF 在正离子模式, 毛细管电压设置为 5 kV。在负离子模式下, 毛细管电压设定为 -4.5 kV。质谱数据在 IDA 模式下获得。TOF 质量范围为 50 至 1200 Da。在 MS/MS 检测中, 前 8 个前体被破碎。此外, 为了评估 LC-MS 在整个采集过程中的稳定性, 还采集了一个质量控制样品 (所有样品的集合)。

1.5 数据收集、处理和统计分析

1.5.1 峰提取及鉴定

峰提取使用软件为 XCMS, 其处理包括峰对齐、峰提取、归一化、去卷积等步骤。然后保留 QC 样本中变异系数 (Coefficient of Variance, CV) 小于 30% 的代谢物作为最终的结果用于后续定量 (差异分析) 及鉴定。本研究基于 HMDB 数据库进行加合离子的鉴定。

1.5.2 多变量分析和单变量统计分析

典型的基于 KL 散度或互信息的方法依赖于较多样本, 为了在小样本条件有效分析代谢物对不同对照组的影响, 本研究选择适于小样本的 PLS-DA 模型前两个主成分的 VIP (Variable Important for the Projection, VIP) 值, 结合单变量分析变异倍数分析 (Fold change) 和 T 检验 (p-value) 值来筛选差异表达的代谢物。筛选条件^[12]: 1、VIP ≥ 1; 2、fold-change ≥ 1.5 或者 ≤ 0.66; 3、p-value < 0.05, 三个条件都满足后的离子即差异离子, 最终结果以火山图 (Volcano plot) 形式呈现 Fold change 和 p-value 两个指标。

1.5.3 代谢通路富集

通过差异代谢物的 KEGG 注释整理映射到相应物种 (人) 的所有途径。通过富集分析对差异代谢产物所在的代谢途径进行综合分析, 进一步筛选出主要代谢途径。用 MetaboAnalyst 6.0 进行可视化分析各组间的差异代谢物主要富集的通路。为了使歪斜分布归一化, 对数据进行了非线性转换, 使用了对数变换。

1.5.4 一般统计分析

测量数据以平均值±标准差表示。 $P < 0.05$ 为显著性水平。

2 结果

2.1 各组样本一般情况的比较分析

经统计学分析，各组患者年龄及 BMI 无显著差异 ($P > 0.05$)，见表 1。

表 1 各组样本的年龄和 BMI 分析

Table 1 Analysis of age and BMI for each group of samples

组别	年龄 (岁)	BMI (kg/m^2)
BOT 组	32(24,39)	22.43±3.14
OEMs 组	35(28,41)	23.21±4.32
恶性组	38(32,43)	22.73±4.54

2.2 质量控制分析

检测开始时，先使 3-10 个连续的 QC 样本对“液相-质谱”系统进行平衡和检测，而后进行实验样本的检测。每 10 个检测样本会穿插一个 QC 样本，用以监测样本检测过程中的仪器状态，以保证足够的质控数据量。如附图 1 所示，QC 样本聚类良好，表明本次实验具有良好的准确性及可重复性，仪器检测稳定，满足定量分析要求。

2.3 BOT 患者与 OEMs 患者血清及尿液差异代谢产物的筛选及数据分析

PCA 模型负、正离子模式下均显示恶性 BOT 组与对照组患者血清及尿液之间均无明显的分离趋势，如附图 2。为了更好的获取组间差异信息，我们进行 PLS-DA 分析，该模型显示 BOT 组和对照组血清和尿液之间均存在明显的分离趋势，如附图 3，二者之间的脂质相关的代谢产物存在显著差异。在 PLS-DA 模型中，用参数 R^2 (R^2Y) 表示模型的解释率， Q^2 (Q^2Y) 表示模型的预测率。模型 $Q^2 > 0.5$ ，可靠； $0.3 < Q^2 \leq 0.5$ ，较好；若 $Q^2 < 0.3$ ，可靠性较低。血清样本模型评价参数结果显示：负离子模式 $R^2Y = 0.977$ ， $Q^2 = 0.394$ ，稳定性较好。尿液样本模型评价参数结果显示：负离子模式 $R^2Y = 0.915$ ， $Q^2 = 0.73$ ，稳定性可靠。差异代谢物筛选的结果分别由火山图表示，如附图 4。在 BOT 组与对照组患者的血清中鉴定出 13 显著差异脂质代谢物，且能在 HMDB 库中鉴定到：胆固醇戊酸酯、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、氧化磷脂酰丝氨酸、氧化磷脂酰甘油、N-十二烷酰-鞘氨醇-4-烯-1-磷酸酯、氧化磷酸甘油磷酸盐等，如附表 1。尿液中

鉴定出 9 种显著差异脂质代谢物，且能在 HMDB 库中鉴定到：胆固醇酯、氧化鞘脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酸，如附表 2。

2.4 OEMs 合并 OC 患者与 OEMs 患者血清差异代谢产物的筛选及数据分析

PCA 模型负、正离子模式下均显示恶性组与对照组患者血清及尿液之间均无明显的分离趋势，如附图 5。而 PLS-DA 模型显示恶性组和对照组血清及尿液之间存在明显的分离趋势，如附图 6，二者之间的脂质相关的代谢产物存在显著差异。血清样本模型评价参数结果显示：负离子模式 $R^2 Y=0.964$ ， $Q^2=0.831$ ，稳定性可靠。尿液样本模型评价参数结果显示：负离子模式 $R^2 Y=0.849$ ， $Q^2=0.399$ ，稳定性较好；而正离子模式 $R^2 Y=0.835$ ， $Q^2=0.694$ ，稳定性可靠。血尿样本差异代谢物筛选的结果分别由火山图表示，如附图 7。在恶性组和对照组患者的血清中鉴定出 81 种显著差异脂质代谢物，且均能在 HMDB 库中鉴定到，如附表 3，其中上调的有 15 种，下调的有 66 种。尿液中鉴定出 6 种显著差异脂质代谢物，且均能在 HMDB 库中鉴定到，如附表 4，其中上调的有 3 种，下调的有 3 种。

2.5 OEMs 合并 OC 患者与 BOT 患者血清差异代谢产物的筛选及数据分析

PCA 模型负、正离子模式下均显示良性组与恶性组患者血清及尿液之间均无明显的分离趋势，如附图 8。而 PLS-DA 模型显示恶性组和良性组血清及尿液之间存在明显的分离趋势，如附图 9，二者之间的脂质相关的代谢产物存在显著差异。血清样本模型评价参数结果显示：负离子模式 $R^2 Y=0.953$ ， $Q^2=0.742$ ，稳定性可靠；正离子模式 $R^2 Y=0.928$ ， $Q^2=0.592$ ，稳定性可靠。尿液样本模型评价参数结果显示：正离子模式 $R^2 Y=0.747$ ， $Q^2=0.468$ ，稳定性较好。血尿样本差异代谢物筛选的结果分别由火山图表示，如附图 10。在恶性组和良性组患者的血清中鉴定出 12 种显著差异脂质代谢物，如附表 5，且全部处于上调趋势。尿液中鉴定出 7 种显著差异脂质，如附表 6，其中上调的有 6 种，下调的有 1 种。

2.6 差异代谢物相关代谢途径

本实验基于 HMDB 数据库对差异代谢产物进行加合离子的鉴定，同时基于 KEGG 数据库进行代谢通路的注释，有助于了解代谢物所参与的主要生化代谢途径和信号转导通路。对所有鉴定的各组间血液及尿液差异代谢物合并后使用

Metaboanalyst 6.0 进行分析，如图 1 所示。BOT 组与对照组血清及尿液差异脂质代谢物同时主要富集在花生四烯酸代谢通路中，血清样本差异代谢物还富集在自噬相关通路中。恶性组与对照组血清及尿液差异脂质代谢物同时主要富集在亚油酸代谢通路中，血清样本差异代谢物还富集在鞘脂信号通路和花生四烯酸代谢途径中。

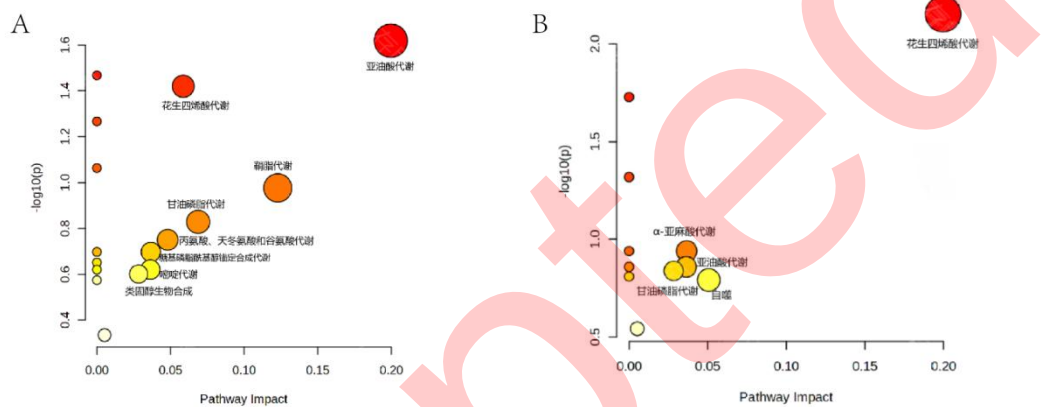


图 1 恶性组和对照组差异脂质代谢物主要富集通路（A），BOT 组和对照组差异脂质代谢物主要富集通路（B）

Figure 1 Main enriched pathways of lipid metabolites differing between the malignant group and the control group (A); main enriched pathways of lipid metabolites differing between the BOT group and the control group (B)

3. 讨论

3.1 主要发现

本研究通过鉴定 10 例 OEMs 患者分别与 10 例 BOT 和 OEMs 合并卵巢癌患者的血清及尿液样本中代谢物的结构，经 PLS-DA 模型分析前两个主成分的 VIP 值，结合单变量分析 Fold change 和 T 检验 P 值来筛选差异表达的代谢物。在 BOT 组与对照组患者的血清中鉴定出 13 显著差异脂质代谢物，在尿液中鉴定出 9 种显著差异脂质代谢物，详细结果见附表 1、附表 2。KEGG 通路富集结果显示两组差异脂质代谢物主要富集在花生四烯酸代谢通路、自噬相关通路中。恶性组与对照组的血清中鉴定出 81 种显著差异脂质代谢物，在尿液中鉴定出 6 种显著差异脂质代谢物，详细结果见附表 3、附表 4。KEGG 通路富集结果显示两组差异脂质代谢物主要富集在亚油酸代谢通路、鞘脂信号通路和花生四烯酸代谢途径中。恶性组与 BOT 组的血清中鉴定出 12 种显著差异脂质代谢物，在尿液中鉴

定出 7 种显著差异脂质代谢物，详细结果见附表 5、附表 6。

3.2 优势和局限性

以往的研究表明，EMs 的发生发展与脂质代谢紊乱有关^[14, 15]。机体内外环境发生改变会导致机体的血液、尿液及组织中的相对分子量小于 1 000 的代谢产物发生迅速而显著的变化。非靶向代谢组学是针对生物系统内小分子代谢物（<1 000 Da）全面、系统的定性和定量分析代谢组学研究^[16]，因此，在阐明疾病发病机制和鉴定生物标志物方面具有巨大的应用潜力。我们此次实验结果发现，甘油磷脂等脂质代谢产物可能参与 EMs 的病理生理过程，包括自噬等细胞死亡过程。近年来比较热门的以脂质过氧化物增多为主要特征之一的新型程序性细胞死亡——铁死亡^[17]，也被提出与 EMs 的发生发展相关^[18]，也有研究证实了 PE 等磷脂成分是铁死亡信号传递的最关键磷脂^[19]，未来我们可以进一步从脂质代谢的角度探究铁死亡参与 EMs 的病理机制。以前的研究试图在血清中找到诊断 EMs 的生物标志物，或者在尿液中找到可以反映 EMs 的病理变化的脂质代谢物。但到目前为止，还没有研究将它们结合在一起探索它们之间的代谢联系。子宫内膜异位症相关性卵巢癌（EAOC）得到越来越多研究人员的关注^[20]，但 EAOC 相对罕见，致不同研究间纳入标准不统一且偏倚较大，由于样本量有限，我们的研究以 OEMs 合并卵巢癌作为研究对象，仅对 EAOC 的研究做出了初步探索。在此基础上，未来可以利用脂质组学联合其它个性化诊疗方法识别并确定 EMs 恶变的驱动突变、候选基因，进行 EAOC 发病机制及分子遗传学的研究，明确 EMs 恶变早期诊断的生物学标志物。该实验是一项小样本研究，有待进行大样本、多中心、重复性实验提高结果准确性；另外，本研究缺少对非靶向脂质组学结果的验证实验，未来可以联合靶向分析模式对筛选到的差异代谢物进行验证。

3.3 解释说明

脂质组学作为代谢组学的重要分支，是对生物体内的脂质进行系统地分析^[21]，旨在通过各种方法对生物体液、组织以及细胞中的脂质进行研究，探究不同疾病状态下的机体脂质代谢变化，从脂质代谢网络角度研究疾病的可能发生机制，寻找能够表征疾病的关键脂质生物标志物。本实验结果初步揭示了血清及尿液样本中多种甘油磷脂成分，如磷脂酰胆碱（Phosphatidyl cholines, PC）、磷脂酰乙醇胺（Phosphatidyl ethanolamines, PE）、磷脂酰丝氨酸（Phosphatidyl serines, PS）、

甘油磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 等在 BOT 组与 OEMs 组的显著差异, 且大部分脂质相关代谢物 OEMs 组相比 BOT 组处于下调趋势; PA 和 PC 也在 OEMs 合并卵巢癌与单纯 OEMs 血清和尿液中存在显著差异, 同时我们对 BOT 组和恶性组进行了差异代谢物的鉴定, 发现 PA 等代谢物也有一定的变化, 但由于目前我们的研究还有一定的局限性, 需要进一步的实验证明 PA、PC 等脂质代谢物在 OEMs 疾病进展过程中重要作用甘油磷脂参与机体内细胞传导过程、能量储存等过程, 进而调控脂代谢。一项研究^[22]显示磷脂可以通过减少脂质过氧化和氧化应激缓解酒精性脂肪肝引起的脂肪异常积累。有研究报告^[23], 减少易被过氧化脂质的合成, 特别是 PE 的过氧化, 可以显著抑制细胞死亡。但这类氧化型磷脂导致细胞死亡的根本机制尚不明确, 目前较为广泛接受的推测为: 一是磷脂的过氧化破坏了细胞膜结构的完整性; 二是亲电子产物对细胞生存相关蛋白的抑制。因此 PE 可能参与子宫内膜基质细胞死亡过程从而影响 EMs 的发生发展过程。抑制脂质过氧化脂质 PE 的合成进而抑制细胞死亡, 为临床上治疗相关疾病提供了新的策略。

一项细胞实验研究结果表明, PS 暴露于细胞表面可介导细胞凋亡信号, 其水平下降提示 EMs 患者在位内膜的凋亡受抑制^[24], 而本次 OEMs 患者血清中 PS 相比对照组的结果上调, 考虑可能存在其它途径调控 PS 的水平, 从而影响机体外周血中 PS 的代谢状况, PS 参与 EMs 发生发展的具体机制仍需进一步基础实验证明。PC 具有良好的表面活性作用和乳化特性, 能结合并增加胆固醇及三酰甘油的溶解度, 改善机体的脂质代谢。研究发现, 腹膜型 EMs 患者的腹腔积液及血清中 PC 表达升高, 是新的疾病早期诊断标志物^[25], 这与本实验 OEMs 血尿样本中多种 PC 亚型升高的研究结果一致。分析其机制, PC 结合体内的胆固醇和三酰甘油, 通过抑制脂质代谢信号通路, 抑制细胞凋亡, 进而促进 OEMs 的疾病进展^[26]。也研究发现, PC 的表达上调能够促进巨噬细胞重编程, 促进巨核细胞由 M1 向 M2 型巨噬细胞转化, M2 巨噬细胞分泌产生单核细胞趋化蛋白, 招募单核细胞的同时, 还能够促进子宫内膜组织的异位生长^[27]。PA 作为一种信号分子, 通过其对靶蛋白酶活性和囊泡运输的影响来调节各种细胞过程^[28]。由于与其他磷脂相比, PA 具有独特的物理化学性质, 已成为一类影响膜结构、动力学和蛋白质相互作用的新型脂质介质。由于此特性, PA 与细胞运动有关, 可能

促进子宫内膜细胞的迁移和侵袭,同时负责激活 NADPH 氧化酶产生活性氧,从而参与炎症过程^[29]。这些脂质差异代谢物提示我们 EMs 患者机体存在着脂质代谢的变化,可能成为鉴别 OEMs 及其它卵巢良恶性肿瘤疾病的有效指标。

本实验结果 OEMs 合并卵巢癌、BOT 分别与 OEMs 对比显示 KEGG 通路富集分析血清和尿液两组间花生四烯酸代谢途径都发生了改变。在该通路中,卵巢 EMs 组相比 BOT 组血清及尿液中 PC 上调,PC 的上调促进前列腺素的生成。花生四烯酸(AA)是细胞膜脂质的主要成分,AA 通过三种代谢途径代谢成生物活性促炎介质的前体是核心炎症途径:AA 通过 COX 途径代谢为前列腺素(PGs);通过 LOX 途径转化为白三烯(LTs)和脂氧素(LXs);通过细胞色素 P450(CYP450)途径代谢^[30]。Lai ZZ 等^[31]研究发现 COX-2 参与 EMs 的发病机制,在激素、低氧等调节下,异位病变腺上皮细胞和 ESCs 中 COX-2 增多,导致 EMs 高增殖、低凋亡、高侵袭和血管生成,细胞毒性 NK 细胞分化受损,进一步促进 EMs 的发生发展。因此,我们的研究初步探索了 PC 可能通过花生四烯酸代谢途径促进 EMs 的疾病进展,具体机制有待进一步研究。

另一个值得注意的是自噬途径在 OEMs 患者的血清中富集。自噬是一个保守的细胞内降解系统,在细胞死亡中起着双重作用,可以为细胞在营养缺乏条件下提供一些必要的营养物质促进细胞存活,但是自噬过度发生会导致细胞内一些正常组分被降解从而加速细胞死亡^[32]。研究表明^[33],哺乳动物的肝脏和脂肪组织作为机体能量储备和转换的场所,其代谢状态同样受到细胞自噬的影响,高血脂、糖尿病、肥胖症、脂肪肝等疾病的发生也与自噬密切相关。在自噬过程中,ATG3 基因是自噬体形成不可缺少的基因,ATG3 在 ATG8 接合系统中充当 E2 泛素样接合酶,有助于吞噬细胞延伸,同时在该过程中 ATG3 的 N-末端需与 PE 结合^[34],PE 使得自噬蛋白募集至细胞膜上并增强自噬信号^[35]。Allavena 等^[36]106 通过分析 13 例 III~IV 期卵巢 EMs 组织发现,LC3-II 和 BECN1 的蛋白表达水平增加,自噬起始基因 ATG4、ATG7 的 mRNA 表达水平也升高,而 p62 蛋白的表达降低,证实卵巢 EMs 异位内膜组织中自噬过程是激活的。PE 参与细胞的自噬过程,但具体机制还有待进一步确定,通过研究该通路可能为进一步了解 EMs 异位病灶的迁移机制提供思路。

KEGG 通路富集结果显示 OEMs 合并卵巢癌组与 OEMs 组血清差异脂质代

代谢物还富集在亚油酸代谢通路、鞘脂信号通路中。在鞘脂信号通路中, Cer 是鞘脂代谢的中心, SM 可在多种酶催化下转化生成 Cer、Sph 和 S1P 等其他鞘脂。鞘脂代谢与甘油磷脂代谢紧密相关, SM 可生成多种甘油磷脂, 如 PC、PE 等。SM 是构成血浆脂蛋白的关键脂质, 参与循环中的脂质运输, 有研究表明 Cer/SM 失衡促进脂质代谢紊乱并募集死亡受体 Fas 诱导细胞凋亡, 还可导致肝损伤^[37]。Njoku 等^[38]分析了体质量指数 (body mass index, BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ 、子宫内膜样子宫内膜癌、子宫内膜组织学正常女性的血浆样本, 认为血浆代谢物具有早期检测子宫内膜癌的潜力, SM 与子宫内膜样癌和透明细胞癌的发生风险呈正相关。Vouk 等^[39]实验提出, 高浓度的鞘磷脂及卵磷脂与 EMs 疾病的进展相关, 这可能与抑制细胞凋亡与脂质代谢信号通路有关。Dutta 等^[40]通过动物实验得出结论, EMs 组的小鼠血清中鞘磷脂及卵磷脂表达升高, 而甘油三酯及鞘磷脂表达降低, 认为血清中卵磷脂、鞘磷脂、甘油三酯及卵磷脂与鞘磷脂的比值与 EMs 具有明显相关性, 且均可作为 EMs 特异性表达脂质的相关指标, 并提出 EMs 的发病机制可能与内源性脂质代谢相关。另外, 有研究表明, 鞘脂信号异常可增加 OC 患病风险, 细胞 Cer 和 S1P 之间的平衡在 OC 发生中起关键作用, OC 患者血浆、腹水和肿瘤组织中长链 Cer 水平上调和血清中的各种 SM 水平下降与肿瘤减小相关, 并影响 OC 患者生存期。SM 代谢紊乱、氧化损伤和线粒体功能障碍会导致鞘磷脂合酶 2 (sphingomyelin synthase 2, SMS2) 水平降低, 而 SMS2 降低又可导致 SM 水平显著降低和 Cer 水平显著升高^[41]。我们实验中的恶性组血清样本代谢产物 SM 与对照组相比下调, 与上述结果一致。因此, SM 可能通过鞘脂代谢途径参与 OC 的发病过程, 具体调控通路有待进一步实验证明。

本次研究显示尿液中差异代谢物数量具有一定变化: BOT 组与对照组相比, 尿液中有 9 种显著差异的脂质代谢物, 而恶性组与对照组相比, 尿液中仅有 6 种差异代谢物。针对这一问题, 可能的原因是由于尿液极性大、水分及电解质含量高、脂质含量较低等因素, 构成了尿液脂质组学的研究屏障, 目前国内较少进行尿液的脂质组学研究。生物样品脂质常规的处理方法是液液萃取法, 但尿液的高极性特点, 使常规的萃取试剂难以有效分层而不能顺利萃取获得脂质。因此, 以后的研究需进一步改进尿液标本的前处理方法, 通过 -80°C 、1 pa 的真空冷冻干燥, 既除去尿液占比极高的水分, 保持脂质的稳定性, 避免脂质的氧化, 同

时又富集脂质，使脂质充分转移到溶剂中，有利于提高脂质回收率。另外，脂质代谢物可能受到环境因素、饮食习惯和用药史等因素的潜在影响，本实验为了尽可能规避这些影响，选择进 3 个月内无用药史的首诊患者作为实验对象，但生活习惯、饮食、肠道菌群等个体差异对脂质仍有一定的影响，因此现有研究所发现的差异脂质多属于探索性工作，需通过前瞻性研究进行大样本临床验证。

4 结论

- 1、BOT 患者相比 OEMs 患者血清及尿液脂质代谢物表达均存在差异。
- 2、OEMs 合并卵巢癌患者相比单纯 OEMs 患者血清及尿液脂质代谢物表达均存在差异。
- 3、不同的代谢物与多种代谢途径有关，其中花生四烯酸代谢通路在 BOT 和 OEMs 两组血清及尿液中均有富集，且在 OEMs 合并卵巢癌和单纯 OEMs 两组血清中富集。

参考文献

- [1] Sauders P T K, Horne A W. Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell*, 2021, 184(11): 2807-2824.
- [2] Ochoa Bernal M A, Fazleabas A T. The Known, the Unknown and the Future of the Pathophysiology of Endometriosis. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5815.
- [3] Jia X M, Liu H Y, Zhong X Y. Research progress on systemic effects of endometriosis (in Chinese). *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2023, 58(9): 712-715. [贾雪敏, 刘海元, 钟晓盈. 子宫内膜异位症全身系统性影响的研究进展. *中华妇产科杂志*, 2023, 58(9): 712-715.]
- [4] Lamceva J, Uljanovs R, Strumfa I. The Main Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4254.
- [5] Lin C C, Chen Z Y, Wang C Y, et al. Research progress on biomarkers for endometriosis based on lipidomics (in Chinese). *Journal of Zhejiang University(Medical Sciences)*, 2020, 49(6):779-784.[林翠翠, 陈正云, 王春艳, 等. 基于脂质组学的子宫内膜异位症生物标志物研究进展. *浙江大学学报*

(医学版), 2020, 49(6):779-784.]

- [6] Herreros-Villanueva M, Chen C C, Tsai E M, et al. Endometriosis-associated ovarian cancer: What have we learned so far?. Clin Chim Acta, 2019, 493: 63-72.
- [7] Chen F, Zhu M, Li W. Advances in research on malignant transformation of endometriosis-associated ovarian cancer. Front Oncol, 2024, 14: 1475231.
- [8] Giannini A, Massimello F, Caretto M, et al. Factors in malignant transformation of ovarian endometriosis: A narrative review. Gynecol Endocrinol, 2024, 40(1): 2409911.
- [9] Ioannidou A, Sakellariou M, Sarli V, et al. New Evidence About Malignant Transformation of Endometriosis-A Systematic Review. J Clin Med, 2025, 14(9): 2975.
- [10] Lin C C. Study on The Mechanism of Resveratrol Regulating Lipid Metabolism and Treating Endometriosis (in Chinese). Zhejiang University, 2020.[林翠翠. 白藜芦醇调节脂代谢及治疗子宫内膜异位症的相关机制研究, 浙江大学, 2020.]
- [11] Di Gioia M, Zanoni I. Dooming Phagocyte Responses: Inflammatory Effects of Endogenous Oxidized Phospholipids. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 626842.
- [12] Guan S Y, Liu Y Y, Guo Y, et al. Potential biomarkers for clinical outcomes of IVF cycles in women with/without PCOS: Searching with metabolomics. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 982200.
- [13] Gonen A, Miller Y I. From Inert Storage to Biological Activity-In Search of Identity for Oxidized Cholesteryl Esters. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 602252.
- [14] Guo P, Gan J, Xu L, et al. Causal links and mediating effects of lipid metabolism, immune cells, and inflammatory proteins in endometriosis: Evidence from Mendelian randomization. Medicine (Baltimore), 2025, 104(28): e43163.
- [15] Ye X, Song X, Zhou S, et al. Integrative bioinformatics analysis of lipid

- metabolism-related genes and immune infiltration in endometriosis. *Medicine* (Baltimore), 2025, 104(24): e42816.
- [16] Töpeer N, Kleessen S, Nikoloski Z. Integration of metabolomics data into metabolic networks. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 49.
- [17] Pan Q, Luo Y, Xia Q, et al. Ferroptosis and Liver Fibrosis. *Int J Med Sci*, 2021, 18(15): 3361-3366.
- [18] Nulianti R, Bayuaji H, Ritonga M A, et al. Correlation of ferritin and glutathione peroxidase 4 (GPX4) level as a marker of ferroptosis process in endometrioma. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 4357.
- [19] Kagan V E, Mao G, Qu F, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 81-90.
- [20] Yachida N, Yoshihara K, Yamaguchi M, et al. How Does Endometriosis Lead to Ovarian Cancer? The Molecular Mechanism of Endometriosis-Associated Ovarian Cancer Development. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(6): 1439.
- [21] Reghupaty S C, Dall N R, Svensson K J. Hallmarks of the metabolic secretome. *Trends Endocrinol Metab*, 2024 Jan;35(1):49-61.
- [22] Lin Z D. Effects of phospholipid on lipid metabolism of Chinese mitten crab (in Chinese). East China Normal University, 2021. [林志灯. 磷脂对中华绒螯蟹脂代谢影响的研究; 华东师范大学, 2021.]
- [23] Li Y. Ischemia-induced ACSL4 Activation Contributes to Ferroptosis Mediated Tissue Injury in Intestinal Ischemia/reperfusion (in Chinese). Dalian Medical University, 2019. [李扬. 缺血诱导的 ACSL4 引起铁死亡并导致肠缺血再灌注后组织损伤, 大连医科大学, 2019.]
- [24] Nagata S, Suzuki J, Segawa K, et al. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ*, 2016, 23(6): 952-961.
- [25] Loy S L, Zhou J, Cui L, et al. Discovery and validation of peritoneal endometriosis biomarkers in peritoneal fluid and serum. *Reprod Biomed Online*, 2021, 43(4): 727-737.

- [26] Singh B, Chaudhary R, Katharia R, et al. Prognostic Significance and Prevalence of IgG Subtypes in Rh Haemolytic Disease of Fetus and Newborn. *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2021, 37(3): 442-447.
- [27] Cauvi D M, Hawisher D, Does-Silva P R, et al. Macrophage reprogramming by negatively charged membrane phospholipids controls infection. *Faseb j*, 2019, 33(2): 2995-3009.
- [28] Zhou H, Huo Y, Yang N, et al. Phosphatidic acid: from biophysical properties to diverse functions. *Febs j*, 2024, 291(9): 1870-1885.
- [29] Wang X, Devaiah S P, Zhang W, et al. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 2006, 45(3): 250-278.
- [30] Wang T, Fu X, Chen Q, et al. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3683.
- [31] Lai Z Z, Yang H L, Ha S Y, et al. Cyclooxygenase-2 in Endometriosis *Int J Biol Sci*, 2019, 15(13): 2783-2797.
- [32] Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8: 105-137.
- [33] Tian L, Guo S Y, Wu W M, et al. Autophagy-mediated lipid metabolism in animals and its detection (in Chinese). *Acta Entomologica Sinic*, 2017, 60(03): 347-356. [田铃, 郭三友, 吴文梅, 等. 细胞自噬介导的动物脂代谢及其检测. *昆虫学报*, 2017, 60(03): 347-356.]
- [34] Fang D, Xie H, Hu T, et al. Binding Features and Functions of ATG3. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 685625.
- [35] Calzada E, Onguka O, Claypool S M. Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 321: 29-88.
- [36] Allavena G, Carrarelli P, Del Bello B, et al. Autophagy is upregulated in ovarian endometriosis: a possible interplay with p53 and heme oxygenase-1. *Fertil Steril*, 2015, 103(5): 1244-1251.e1.
- [37] Su D, Liao Z, Feng B, et al. Pulsatilla chinensis saponins cause liver injury

through interfering ceramide/sphingomyelin balance that promotes lipid metabolism dysregulation and apoptosis. *Phytomedicine*, 2020, 76: 153265.

- [38] Njoku K, Campbell A E, Geary B, et al. Metabolomic Biomarkers for the Detection of Obesity-Driven Endometrial Cancer. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(4): 718.
- [39] Vouk K, Hevir N, Ribić-pucelj M, et al. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod*, 2012, 27(10): 2955-2965.
- [40] Dutta M, Anitha M, Smith P B, et al. Metabolomics Reveals Altered Lipid Metabolism in a Mouse Model of Endometriosis. *J Proteome Res*, 2016, 15(8): 2626-2633.
- [41] Li Z Y, Sun X T, Xing G Y, et al. Research Progress on Sphingolipid Metabolism and Benign and Malignant Gynecological Diseases (in Chinese). *J Int Obstet Gynecol*, 2023, 50(06): 649-654.[李振英, 孙晓彤, 邢广阳, 等. 鞘脂代谢与妇科良恶性疾病的研究进展. *国际妇产科学杂志*, 2023, 50(06): 649-654.]