



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

약학석사학위논문

소변에서 metabolomics를 이용한
방광암 진단법
및 암 특이적 생존예측

A urinary metabolomic approach
can differentiate patients with bladder cancer
from normal hematuric controls, and predict
cancer-specific survival

2014년 2월

서울대학교 대학원
약학과 천연물과학전공
Jin Xing

소변에서 metabolomics를 이용한
방광암 진단법
및 암 특이적 생존예측

A urinary metabolomic approach
can differentiate patients with bladder cancer
from normal hematuric controls, and predict
cancer-specific survival

지도교수 박 성 혁

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함
2014년 2월

서울대학교 대학원
약학과 천연물과학전공
Jin Xing

Jin Xing의 석사학위논문을 인준함
2013년 12월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

소변에서 metabolomics를 이용한 방광암 진단법 및 암 특이적 생존예측

Xing Jin

서울대학교 대학원
약학과 천연물과학전공

방광암(bladder cancer, BC)은 전세계적으로 흔한 암종에 하나이다. 하지만 현재 BC 진단에 사용되는 방광경 검사법(cystoscopy)과 요세포 검사법(urinary cytology)은 그 진단에서의 한계가 있다. 본 연구에서는 고성능 액체 크로마토그래피-4중극 이동시보 질량 분광계(HPLC-QTOFMS)를 이용하여 138명의 BC 그룹과 121명의 control 그룹을 비교하여 소변 metabolomics 분석을 진행하였다. 여기에서 사용되는 샘플개수는 기존 BC metabolomics 연구에서 사용된 샘플개수보다 훨씬 많다. 다변량 통계분석 결과, BC 그룹과 control 그룹은 metabolomic profile에 의해 혈뇨증 샘플이 포함되어 있음에도 불구하고 뚜렷하게

구별할 수 있었다. 이뿐만 아니라 BC 종류중의 하나인 근육 침입성 방광암(Muscle-Invasive Bladder Cancer, MIBC)도 비 근육 침입성 방광암(Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer, NMIBC)과 구별할 수 있었다. 이런 BC 그룹과 control 그룹을 구별할 수 있는 12개의 대사산물이 동정되었고 이들 중 대부분은 해당과정 경로와 베타산화과정에 연관되어 있다는 것을 알아냈다. 이런 대사산물과 BC의 관계는 또한 microarray 분석법으로 그 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, carnitine transferase와 pyruvate dehydrogenase complex의 발현이 BC 그룹에서 상당히 변화 되었음이 관찰되었다. 임상 적용 가능성 측면에서는 구별모델이 BC를 진단하는데 있어서 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)가 각각 91.3%와 92.5%였고, 이와 비슷한 결과는 수신기 운용 곡선 분석(receiver operating curves analysis, ROC analysis)에서도 보여졌다(AUC=0.937). 다변량 회귀분석법을 통하여 또한 metabolic profile은 암 특이적 생존기간과 연관성이 있음을 보였다. 이런 탁월한 성능, 편리함을 갖춘 metabolomics 접근법은 기존의 BC 진단법을 발전시키거나 대체할 수 있을 것으로 여겨진다.

주요어: bladder cancer, metabolomics, LC-MS, diagnosis

학번: 2012-22661

목 차

국문초록	i
목차	iii
List of Figures	v
List of Tables	vi
I. 서론	1
II. 실험 및 방법	4
1. 시약 및 시료	4
1-1. 시약	4
1-2. 시료	4
2. 기기분석 및 통계분석	5
2-1. 기기분석	5
2-2. 통계분석	6
III. 결과	8
1. 연구 대상 환자의 임상적 및 병리학적 특징	8
2. 소변 metabolomic profile 에 의한 BC 그룹과 control 그룹, NMIBC 그룹과 MIBC 그룹 간의 구별	10
3. 암 특이적 대사산물의 동정	14
4. Metabolomics-based 모델의 진단성능	17

5. BC 환자의 생존예측.....	22
IV. 고찰.....	24
참고문헌.....	32
Abstract	38

List of Figures

Figure 1. Representative HPLC-QTOFMS base peak chromatograms of human urine samples.....	12
Figure 2. OPLS-DA score plots and 3D scatter pots	13
Figure 3. Box plots of the levels of potential markers that could be used to distinguish BC patients from control subjects	16
Figure 4. Cross-validation with an OPLS-DA model and multivariate ROC analysis	19
Figure 5. Cross-validation of the differentiation between NMIBC and MIBC	21
Figure 6. Prediction of cancer-specific survival time	23
Figure 7. Box plots of the related mRNA levels.....	30
Figure 8. Pathway that may be altered in patients with BC compared to control subjects	31

List of Tables

Table 1. Baseline clinical and pathological features of the patients with bladder cancer.....	9
Table 2. Potential urine biomarkers of bladder cancer and the mRNA expression of related genes in BCs relative to control tissue.....	15

I. 서 론

방광암(bladder cancer, BC)은 세계적으로 남성에서는 7번째, 여성에서는 17번째로 흔한 암이다.¹ 현재 BC환자 중 70-80%는 비근육 침입성(Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer, NMIBC), 20-30%는 근육 침입성(Muscle-Invasive Bladder Cancer, MIBC)으로 진단된다. 이 두 종류의 BC는 모두 방광요로상피에서 유래되기는 하지만 임상적 특성은 서로 다르다. NMIBC는 다른 악성 종양보다는 높은 생존률을 가지고 있지만 30-50%의 환자는 경노도적 절제술(transurethral resection, TUR)을 거친 후에도 재발하고 10-20%는 MIBC로 진행된다.² MIBC 일 경우 근치성 방광절제술(radical cystectomy), 방사선 치료(radiation therapy), 화학 요법(chemotherapy)와 같은 효과적이고 체계적인 치료를 받는다고 하여도 예후가 좋지 않았다.³ 그러므로 BC를 정확하게 판단할 수 있는 초기진단법이 요구된다.

현재까지 BC 진단방법으로 방광경 검사법(cystoscopy)과 요세포 검사법(urinary cytology)이 많이 쓰여졌다. 하지만 방광경 검사법은 비용이 비싸고 침습성으로 불편하다. 요세포 검사법도 BC 진단에 자주 쓰이는 간편한 방법이지만 민감성이 낮아서 신뢰도가 떨어진다. 그러므로 BC를 진단할 수 있고 그 BC 종류를 분별할 수 있는 새롭고 간편한 진단접근법이 필요하다.

Metabolomics는 대사산물이 포함되어 있는 생화학적 과정을 연구하는 새로운 연구분야이다. 생체액에서 대사물질을 분석하는

metabolomics는 난소암,⁴ 췌장암,^{5,6} 백혈병⁷과 같은 여러 가지 암 진단에 많이 사용되고 있다. 최근에는 전처리 과정을 거치지 않고 고분해능 매직각 스피닝 NMR(high-resolution magic angle spinning NMR)을 사용하여 직접적으로 조직샘플을 대사산물분석에 적용하는 연구방법이 보고되었다.^{8,9} Local metabolite pattern을 토대로 하는 tissue imaging에 metabolomics를 적용하려는 연구도 보고되었다.^{10,11} 많은 임상 진단 방법은 작은 분자 물질을 근거로 하기에 임상응용에 있어서 metabolomics가 많이 발전될 것으로 예상된다.¹²

다양한 암들 중에서, BC는 소변이 암 조직부분에 직접적으로 닿아 있기 때문에, urinary metabolomics-based diagnosis에 적합하다고 볼 수 있다. 뿐만 아니라, 소변 샘플은 비 침습성으로 채취와 수집이 용이하다. 이러한 이유로 여러 가지 platform을 이용하는 metabolomics를 BC진단에 적용한 논문들이 보고되었고, metabolomics 접근법이 BC를 정확하게 초기진단 할 수 있는 가능성을 가지고 있음을 LC-MS, GC-MS, NMR metabolomics를 사용하여 제안하였다.¹³⁻¹⁶ 하지만 대부분의 연구에서는 적은 양의 샘플 수와 양성 혈뇨샘플이 줄 수 있는 혼란변수 영향을 고려하지 않았다. 게다가 이런 연구들에서는 최종 대사 표시물을 다른 실험접근법으로 확인하지 못했다. 뿐만 아니라 BC환자의 생존예측을 할 수 있는 metabolomic profile의 능력은 다른 연구에서 평가된 적이 없다.

본 연구에서는 고성능 액체 크로마토그래피-4중극 이동시보 질량 분광계(HPLC-QTOFMS)를 이용한 metabolomics 접근법을 수행하였다. 이번 연구에 사용된 환자 샘플의 수는 모든 metabolomics진단법을

다른 BC 연구중에서 가장 많은 것이다(138명의 BC 그룹과 121명의 control 그룹). 게다가 control 그룹 샘플의 상당부분은 양성 혈뇨샘플(n=52)이다. 엄격한 통계학적 교차검증과 미세 배열 유전자 발현(microarray gene expression)데이터와의 비교결과가 metabolomics진단접근법이 뛰어난 효능을 보여줄 뿐만 아니라 정상과 암을 구별할 수 있는 표시물이 해당과정과 베타산화과정에 관련이 있다는 것을 보여주었다. Metabolomics는 또한 BC의 종류인 NMIBC와 MIBC를 구별할 수 있고 이런 환자들의 생존예측도 가능하였다.

II. 실험 및 방법

1. 시약 및 시료

1-1. 시약

Acetonitrile (ACN)은 Honeywell Burdick & Jackson (Morristown, NJ)에서 구매하였고, formic acid는 Fluka (St. Louis, MO)에서 구매하였다. 기타 모든 용매는 HPLC 등급으로 준비하였다.

1-2. 시료

총 259개의 대상샘플을 사용하였는데, 그 중 138개는 방광 요로상피성 암환자의 소변샘플이고 121개는 control 그룹 샘플이었다. control 그룹은 건강검진을 받았던 69명 건강한 사람의 샘플과 비악성조건(non-malignant conditions)에 의해 미세한 혈뇨가 있었던 52명 환자의 샘플로 구성되었다. 나이에 의한 영향을 줄이기 위하여 control 그룹은 BC 그룹과 비슷한 나이의 사람으로 수집하였다. 이 모든 샘플의 수집과 분석은 충북대학교 기관감사위원회의 승인을 받았으며 사전 서면 동의서는 모든 대상자로부터 얻었다(IRB 승인번호 2006-01-001). 소변샘플은 아침소변을 선택하였고 25,000 rpm에서 15분동안 원심 분리하였다. 상층액은 침전물과 분리하여 새로운 Eppendorf 튜브에 넣어서 -20°C 에 저장하였다. 모든 주요한 종양샘플은 TUR 혹은 근처 방광 절제술을 받은 환자로부터 얻었다. 이 환자들은 모두 요로 상피 세포 암종을 가지고 있다는 것이 조직학적으로

확인 되었다. 종양의 단계와 등급은 각각 2002 TNM 분류법과 1973 WHO 등급시스템 규정에 따라 분류되었다. 이 연구에서 사용된 바이오샘플은 보건복지부의 지원을 받는, 인체자원중앙은행(National Biobank of Korea) 구성원중의 하나인 충북대학교병원으로부터 제공받았다.

2. 기기분석 및 통계분석

2-1. 기기분석

냉동 보관된 소변샘플을 녹인 후 15,000 g로 4 °C에서 10분동안 원심분리하여 입자상 물질을 제거하였다. Chromatographic separation는 Kinetex C18 칼럼(2.6 μ m, 100 x 4.6 mm, Phenomenex, USA)을 Agilent 1200 Infinity Series liquid chromatography system과 연결하여 진행하였다. 분석 시 칼럼온도는 35 °C로 유지하였고 유속은 0.35 mL/분, autosampler의 온도는 4 °C, 샘플주입볼륨은 5 μ L로 설정하였다. 분석물은 0.1% formic acid가 포함된 3차 증류수(A)와 0.1% formic acid가 포함된 acetonitrile(B)로 구성된 mobile phase에 의해 용출되었다. Gradient는 다음과 같다. 0-14 분 gradient 5-25% B, 14-19분 gradient 25-40% B, 19-23분 gradient 40-95% B. 이후 용액은 95%의 B로 6분간 유지되고 또다시 출발상태이자 칼럼의 평형상태인 5% B로 6분간 흘려주었다. 질량분석실험은 ESI source가 달려있는 Q-TOF(6530 Accurate-Mass, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 로 진행하였다. MS

데이터는 positive mode로 얻었다. 측정상태는 다음과 같다. ESI source 전압: 4 kV, 가스온도: 350 °C, sheath gas 유속: 12 L/분, nebulizer gas 압력: 30 psi, scan range: 85–1000 m/z.

2-2. 통계분석

LC-MS의 기초 데이터는 지난번 연구에서 사용되었던 방법처럼 MZmine 2.10(mzmine.sourceforge.net)에 맞는 데이터형식으로 바꾸고 프로세싱을 진행하였다.¹⁷ 크로마토그램과 피크들은 local minimum search function을 사용하여 확인하였고, 이온강도, 매칭 m/z, 머무른 시간(RT)은 모두 피크리스트로 정리하였다. 피크들은 나란히 정렬하여 검출된 모든 피크의 합으로 표준화를 하였다. 이 데이터를 다변량 통계분석을 위해 다시 SIMCA-P(Umetrics, Umea, Sweden) 프로그램에 대입하였다. 모든 그룹(control, NMIBC, MIBC)을 서로 구별하기 위하여 partial least square-discriminant analysis(PLS-DA)을 진행하였다. Orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis(OPLS-DA)도 서로 다른 2개 그룹을 구별하고 표시물을 검출하기 위해 사용되었다.^{18, 19} 생존예측분석은 metabolite profile을 독립변수로 사용한 partial least square regression으로 진행되었다. control 그룹과 BC 그룹을 구별하는데 사용되는 이 방법의 민감도와 특이도는 전체 샘플수의 1/3을 test set으로 지정하여 계산하였다. 그 다음 나머지 2/3의 샘플로 만든 다변량 모델을 가지고 샘플의 암 발생 유무를 예측하는데 사용하였다. 모든 다변량 모델은 예측성 값(Q^2)이 더는 증가되지 않을 때까지 반복적인 절차를 통하여

구축되었다.

III. 결 과

1. 연구 대상 환자의 임상적 및 병리학적 특징

Table 1 에서는 본 연구에 등록된 BC 그룹과 control 그룹의 임상적 및 병리학적 특징들이 열거되어 있다. BC 그룹은 평균 65.64 ± 12.65 세 이고 112 명의 남성과 26 명의 여성으로 구성되었다. control 그룹은 평균 64.31 ± 9.18 세 이고 77 명의 남성과 44 명의 여성으로 구성되었다. 31 명, 63 명, 44 명 환자는 각각 G1, G2, G3 등급의 암을 가지고 있으며, 48 명, 35 명, 25 명, 10 명, 20 명 환자는 각각 Ta, T1, T2, T3, T4 단계의 암으로 진단되었다. 17 명(12.3%)의 환자는 하나 혹은 그 이상의 림프절 전이가 있었고 9 명(6.5%) 환자는 먼 거리 전이가 있었다. Follow-up 기간의 중간 값은 37.1 개월이다. 138 명의 BC 환자 중 83 명(60.1%)는 NMIBC 이고 55 명(39.9%)는 MIBC 환자이다.

Table 1. Baseline clinical and pathological features of the patients with bladder cancer

Variables (%)	BC cases	Controls	Healthy controls	Benign hematuria controls
Number	138	121	69	52
Mean age \pm SD	65.64 \pm 12.65	64.31 \pm 9.18	64.28 \pm 7.82	64.37 \pm 10.81
Gender				
Male	112 (81.2)	77 (63.6)	41 (59.4)	36 (69.2)
Female	26 (18.8)	44 (36.4)	28 (40.6)	16 (30.8)
Grade				
G1	31 (22.5)			
G2	63 (45.7)			
G3	44 (31.9)			
T stage				
Ta	48 (34.8)			
T1	35 (25.4)			
T2	25 (18.1)			
T3	10 (7.2)			
T4	20 (14.5)			
N stage				
N0	121 (87.7)			
N(1–3)	17 (12.3)			
M stage				
M0	129 (93.5)			
M1	9 (6.5)			
Median follow-up period (months)	37.1 \pm 17.5			

2. 소변 metabolomic profile에 의한 BC 그룹과 control 그룹, NMIBC 그룹과 MIBC 그룹 간의 구별

control 그룹과 NMIBC 그룹, MIBC 그룹 소변 샘플의 대표적인 HPLC-MS 크로마토그램은 Fig. 1 에 표시되어 있다. 피크들은 모두 잘 표시 되었으며 전체 RT 영역에서 균일하게 잘 분포되었다. 게다가 세 개 그룹의 전반적인 피크 profile 이 상당한 차이가 나타났는데 이는 이런 profile 을 가지고 그룹간을 구별하는 데에 사용할 수 있다는 것을 말해준다. 이런 데이터에 대한 전반적인 처리에 있어서 다변량 분석은 그룹간의 metabolomic 차이점을 동정하는데 사용되었다. OPLS-DA 모델은 하나의 예측 값과 두 개의 직교 성분으로부터 얻어졌고 또한 이 모델은 control 그룹과 BC 그룹(NMIBC 와 MIBC 모두 포함)을 잘 분리하였다(Fig. 2A & B)($R^2=0.878$, $Q^2=0.662$). 특히 주목할 만한 점은 control 그룹의 43%는 암이 아닌 양성 혈뇨를 가지고 있는 환자($n=52$)라는 사실이다(open black boxes in Fig. 2A 와 B). 혈뇨가 BC 환자에 보편적으로 존재하는 상황에서 정상환자에 존재하는 양성 혈뇨가 암 진단에 있어서 혼란인자가 될 수 있기 때문에 이런 양성 혈뇨 샘플은 중요한 control 그룹이다. 이 결과는 소변 metabolomics 접근법이 BC 그룹과 혈뇨를 가지는 control 그룹을 구별할 수 있다는 것을 보여주었다. 그리고 BC 의 두 개 하위 집단인 NMIBC 와 MIBC 도 구별하였으며(Fig. 2C 와 D), 한 개의 예측 값과 두 개의 직교 성분을 가진 OPLS-DA 모델은 암 그룹들을 잘 분리하였다($R^2=0.875$, $Q^2=0.355$). 이런 연구결과는 BC 진단과 그것의

하위 집단간 구별하는데 있어서 소변의 LC-MS 분석이 유용하다는 것을 나타냈다.

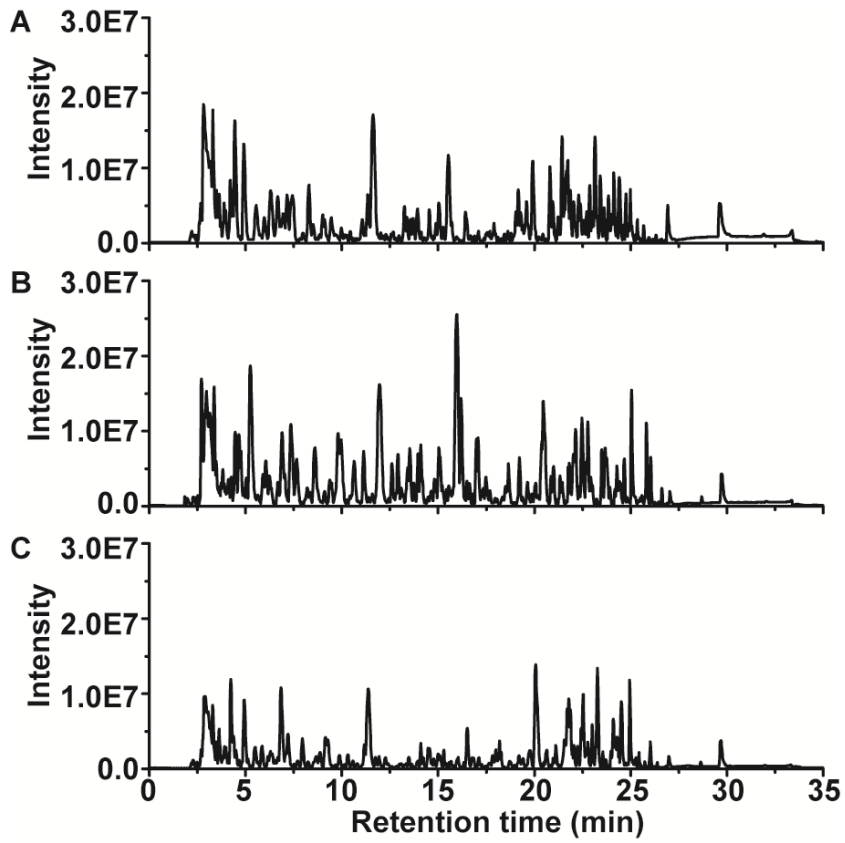


Figure 1. Representative HPLC-QTOFMS base peak chromatograms of human urine samples. (A) A healthy individual. (B) A patient with NMIBC. (C) A patient with MIBC

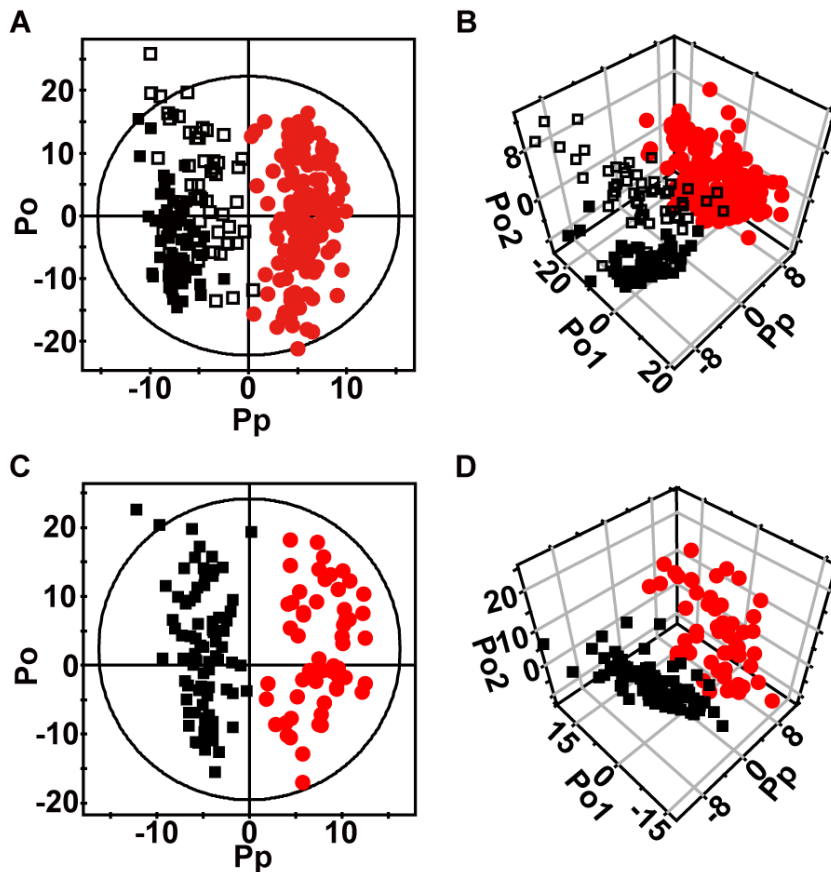


Figure 2. OPLS-DA score plots (A & C) and 3D scatter pots (B & D). Each symbol represents the metabolic profile of an individual sample. (A & B) Comparison of normal controls (black) and patients with bladder cancer (red). The open black boxes represent the control patients with benign hematuria. (C & D) Comparison of the two types of bladder cancer. NMIBCs are represented by black boxes while MIBCs are represented by red dots

3. 암 특이적 대사산물의 동정

Control 그룹과 BC 그룹을 성공적으로 구별할 수 있음을 확인하고서 이 그룹을 구별하는데 공헌하는 특정 metabolomic를 찾기로 하였다. 위에서 제기된 OPLS-DA 모델에 근거하여 높은 연관성과 신호대잡음비율(signal-to-noise)을 가지는 신호들을 우선 선택하였다. 이런 신호들은 119.03, 130.05, 147.03, 162.11, 169.01, 189.16, 233.11, 246.17, 276.14, 286.20, 316.25, 810.13 m/z이다(Table 2). 이런 신호들을 반영하는 분자들은 MS/MS 실험과 이미 알려져 있는 표준물 스펙트럼과 비교하여 동정하였다(Table 2). 그 중 몇 개는 carnitine과 acylcarnitine (carnitine, isovalerylcarnitine, glutarylcarnitine, octenoylcarnitine, decanoylcarnitine)이고 다른 것들은 glycolysis의 마지막 단계와 연관이 있거나 (phosphoenolpyruvate, pyruvate) 또는 TCA cycle에 포함되어 있는 물질들이다(acetyl-CoA, succinate, oxoglutarate). 소변에 있는 이런 물질들의 control 그룹과 BC 그룹에서의 수준차이를 확인하기 위하여, Student's t-test을 진행하였다(Fig. 3). 그 결과 이런 물질들이 두 그룹에서 확연한 차이를 보였다.

Table 2. Potential urine biomarkers of bladder cancer (1–12) and the mRNA expression of related genes in BCs relative to control tissue (13–15)^a.

NO.	m/z	Adduct	Metabolite/gene	Element composition/symbol	p-value ^b	Trend ^c
1	119.0362	[M+H] ⁺	Succinate	C ₄ H ₆ O ₄	2.0E-2	↑
2	130.0491	[M+ACN+H] ⁺	Pyruvate ^d	C ₃ H ₄ O ₃	1.2E-2	↑
3	147.0285	[M+H] ⁺	Oxoglutarate ^d	C ₅ H ₆ O ₅	5.9E-3	↑
4	162.1109	[M+H] ⁺	Carnitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	5.1E-3	↑
5	169.0083	[M+H] ⁺	Phosphoenolpyruvate	C ₃ H ₅ O ₆ P	1.1E-2	↑
6	189.1602	[M+H] ⁺	Trimethyllysine	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	3.1E-3	↑
7	233.1104	[M+H] ⁺	Melatonin	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	6.7E-4	↓
8	246.1695	[M+H] ⁺	Isovalerylcarnitine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	6.0E-4	↑
9	276.1441	[M+H] ⁺	Glutaryl carnitine	C ₁₂ H ₂₁ NO ₆	2.2E-9	↓
10	286.2010	[M+H] ⁺	Octenoyl carnitine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	2.4E-4	↑
11	316.2465	[M+H] ⁺	Decanoyl carnitine	C ₁₇ H ₃₃ NO ₄	7.9E-5	↓
12	810.1328	[M+H] ⁺	Acetyl-CoA	C ₂₃ H ₃₈ N ₇ O ₁₇ P ₃ S	4.1E-2	↑
13	-	-	Carnitine palmitoyltransferase	CPT1A	8.4E-3	↑
14	-	-	Carnitine acylcarnitine translocase-like protein (CACL)	SLC25A29	3.9E-3	↑
15	-	-	Dihydrolipoyl dehydrogenase (Pyruvate dehydrogenase complex)	DLD	1.0E-7	↓

^a The mRNA expression levels are from our microarray experiment, which was reported previously.²⁰

^b The *p*-values are from Student's *t*-tests.

^c The trend of the marker levels in the BC group. ↑ and ↓ indicate increased and decreased levels, respectively in the cancer group.

^d Tentative identification.

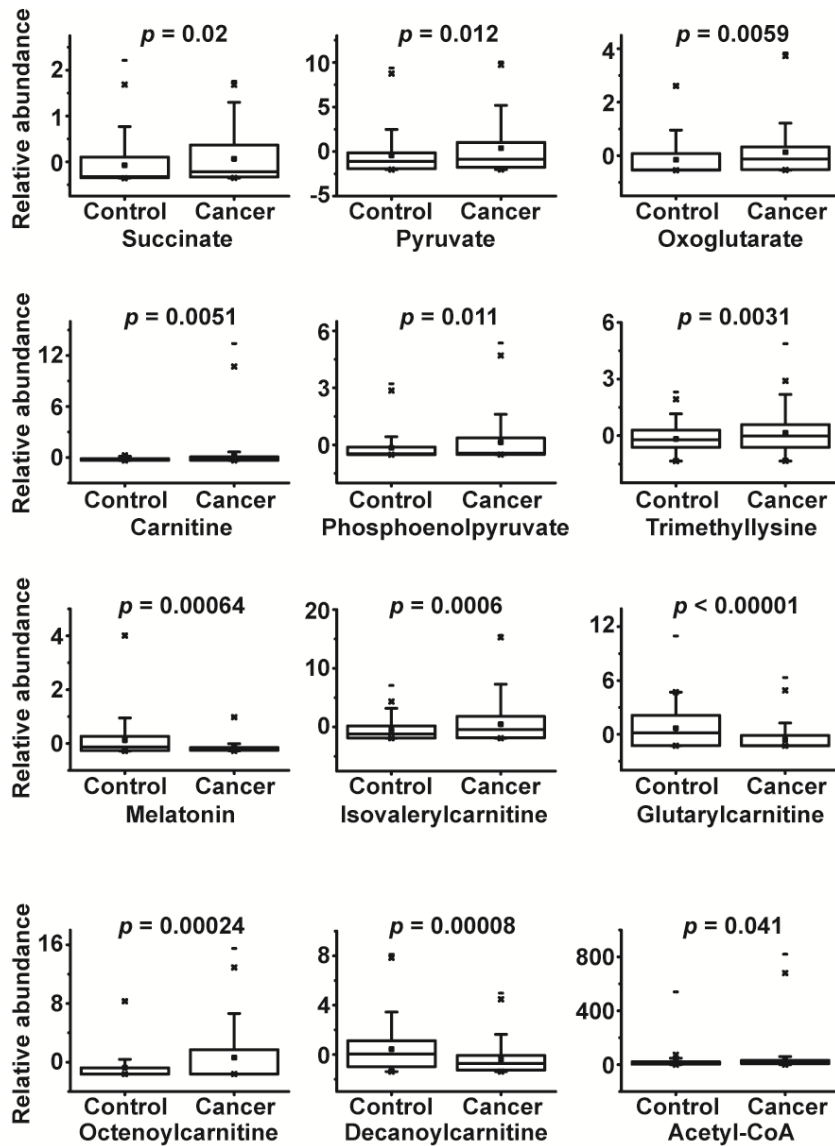


Figure 3. Box plots of the levels of potential markers that could be used to distinguish BC patients from control subjects. The p -values of Student's t -tests are indicated.

4. Metabolomics-based 모델의 진단성능

BC 진단에 있어서 이 다변량 모델의 성능을 평가하기 위하여 교차검증(cross-validation)을 진행하였다. 전체 샘플의 1/3 에 해당하는 임의의 샘플(40 개 control 그룹 샘플, 46 개 BC 그룹 샘플)을 취하여 test set 으로 지정하고 나머지 2/3 의 샘플을 training set 으로 지정하여 예측모델을 만들었다(Fig. 4A). 그 다음 이 모델은 test set 을 진단 예측하는데 사용하였고 이로부터 얻어진 결과를 실제로 임상에서 진단된 결과와 비교하여 모델의 민감도와 특이도를 측정하였다. 이런 교차검증은 metabolomics-based 진단방법의 현실적인 적용 가능성을 결정하는데 있어서 중요하다. 하지만 이 과정은 기타 다른 BC metabolomics 연구에서 항상 진행되어온 것은 아니다. OPLS-DA 모델로 예측한 결과, BC 그룹 46 개 샘플에서 42 개를 BC 그룹으로 예측하였고, control 그룹 40 개에서 37 개를 control 그룹으로 예측하였다. 그러므로 이 예측모델은 91.3%의 민감도와 92.5%의 특이도를 가진다(Fig. 4B). 동일한 training set 과 test set 을 가지고 PLS-DA-based 다변량 수용자 작용 특징 곡선(receiver operating characteristic curve, ROC curve)분석을 진행하였다(Fig. 4A). ROC 를 하게 된 이유는 임상연구에서 진단방법의 성능을 평가하는데 자주 사용되기 때문이다. 그 결과 곡선하면적(area under curve, AUC)은 0.937 이었고 민감도와 특이도는 각각 85%씩을 나타냈다(Fig. 4C). 그러므로 이 두 개 교차검증으로 암을 진단할 때 비슷한 민감도와

특이도를 가진다(85-92.5%). OPLS-DA 모델을 가지고 NMIBC 와 MIBC 를 구별한 방법과 비슷하게 평가되었으며, NMIBC 28 개 샘플 중 24 개를 정확히 예측하였고(85.7% 정확도), MIBC 18 개 샘플 중 9 개를 정확히 예측하였으며(50% 정확도) 종합적인 정확도는 71.7% 이다(Fig. 5).

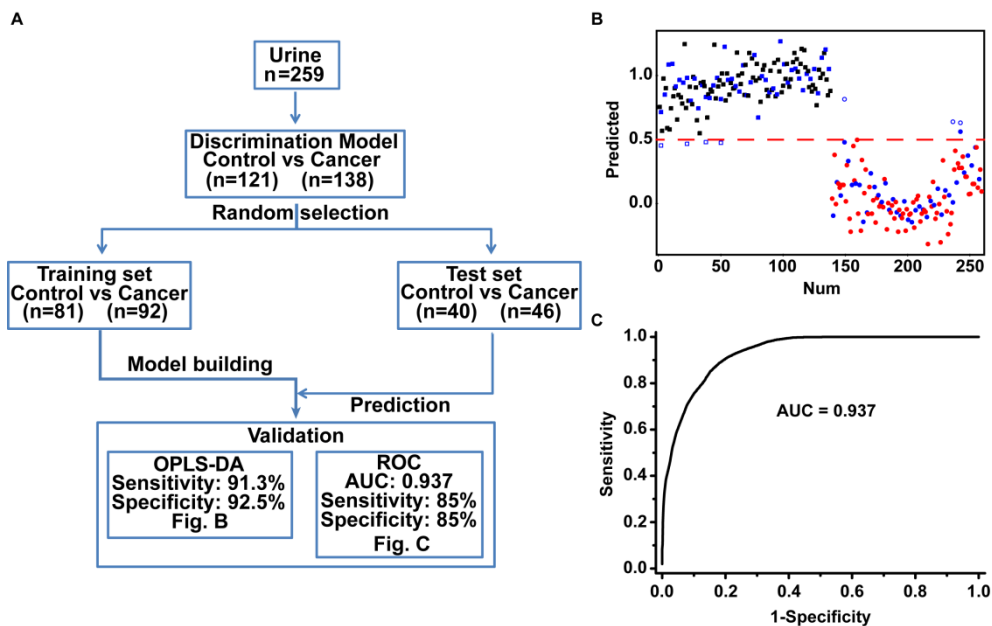


Figure 4. Cross-validation with an OPLS-DA model and multivariate ROC analysis. (A) Schematic depiction of the overall procedure of cross-validation analysis. The test set was created by randomly selecting one third of the entire sample. A prediction model was built with the rest of the samples (training set), after which the models were used to predict the cancer status of the test set. Diagnostic performance was assessed by either OPLS-DA or PLS-DA based ROC curve analysis. (B) Prediction of the cancer status using the OPLS-DA model. The boxes represent BC patients while the dots represent control subjects. The green samples represent the test set. The samples represented by open green symbols are mis-predicted samples. The dichotomic decision of prediction was made by using the a priori value of 0.5 for the Y variable from the OPLS-DA model. Of the 46

cancer samples, 42 were predicted to be from cancer patients (91.3% sensitivity) while 37 of the 40 control samples were predicted to be from control subjects (92.5% specificity). (C) PLS-DA-based ROC curve analysis using the same test set revealed a sensitivity of 85% and specificity of 85%. The area under the curve (AUC) value was 0.937.

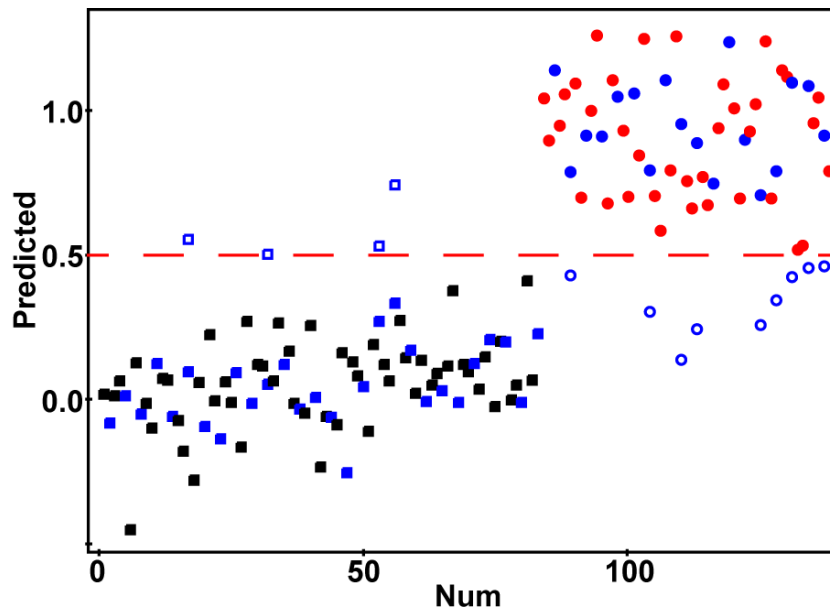


Figure 5. Cross-validation of the differentiation between NMIBC and MIBC.

The test set was created by randomly selecting one third of the each group. A prediction model was built by using the rest of the samples (training set), after which the NMIBC/MIBC status of the test set was predicted. The diagnostic performance was assessed by using the OPLS-DA model. Boxes represent NMIBC patients while the dots represent MIBC patients. The samples in green represent the test set. The samples in open green symbols are mis-predicted samples. The dichotomic decision of prediction was made by using the a priori value of 0.5 for the Y variable from the OPLS-DA model.

5. BC환자의 생존예측

임상학적 상황에서는 암환자의 진단 후 생존을 예측하는 것이 매우 중요하다. 하지만 전에 진행되었던 많은 metabolomics를 이용한 BC 연구에서는 metabolomics가 생존시간을 예측할 수 있는지에 대한 의문을 갖지 않았다. 이것은 아마도 각 연구의 샘플집단 이질성, 여러 가지 치료방법이 사용된 사실, 그리고 진단 후 전반적인 생존기간에 대한 추적 관찰에 대한 어려움 등을 반영하기 때문일 것이다. 본 연구에서의 55명의 MIBC환자 중 34명(61.8%)은 근치 방광 절제술을 받았고 26명(47.3%)은 전신 화학요법을 받았다. 지금까지 30명(54.5%) 환자는 생존해 있고, 23명(41.8%)환자는 사망하였으며, 2명(3.6%)은 추적 관찰기록에서 제외되었다. 23명의 사망 환자 중 17명은 암과 연관되어 사망하였다. Metabolomic접근법으로 진단 후 생존기간을 예측 가능한지 그 여부를 밝히기 위하여 17명 사망환자를 대상으로 하여 다변량 PLS 회귀분석을 진행하였다. PLS 예측 모델은 의존적인 변수로써 암-특이적 생존기간을 사용하고 독립적인 변수로 metabolic profile을 사용하여 3개의 성분을 구성하였다($R^2=0.991$, $Q^2=0.404$). 이런 각각의 암 특이적 생존기간은 leave-one-out 분석을 통하여 예측한 다음 그 예측 값을 실제 생존기간과 비교하였다. 그 결과 예측 값과 실제 값 사이 0.405의 R^2 값 뿐만 아니라 $p=4.6E-3$ 이라는 값을 보였다(Fig. 6). 이는 metabolomic profile이 BC 환자의 암 특이적 생존기간을 예측하는데 있어서 유용하다는 것을 나타낸다.

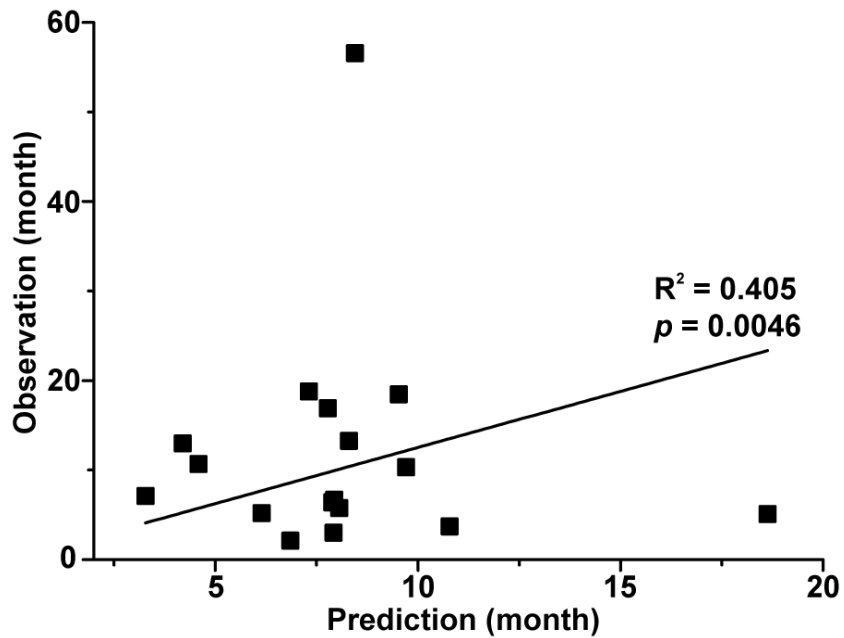


Figure 6. Prediction of cancer-specific survival time. The PLS prediction model was obtained with three components ($R^2 = 0.991$, $Q^2 = 0.404$). The X-axis corresponds to the predicted values that were calculated by using the PLS regression followed by the leave-one-out prediction. The Y-axis corresponds to the actual cancer-specific survival time. The R-squared value of the linear regression is 0.405 and the p -value is 0.0046.

IV. 고 찰

BC 은 실제 임상에서 요세포 분석법과 방광내시경법으로 진단한다. 비록 요세포 분석법은 간편하고 BC 를 진단하는데 있어서 높은 특이도를 가지고 있지만 진단능력은 낮은 민감도(40-76%)를 가지기 때문에 비효율적이다.²¹ 게다가 방광내시경법은 침습성이고 상대적으로 비용이 비싸기 때문에 대다수의 환자가 고통스러워 한다. 그러므로 control 그룹과 BC 그룹을 보다 나은 민감도와 특이도로 구별할 수 있는 새로운 진단방법이 필요하다. 이를 위하여 소변을 기반으로 하는 몇몇의 테스트가 개발되었다. 이 테스트에는 BC 항원(bladder tumor antigen, BTA), 핵기질 단백질 22(nuclear matrix protein 22, NMP22), 소변 피브리노겐-피브린 분해산물(urine fibrin and fibrinogen degradation products, FDP), 이뮤노사이트(ImmunoCyt), FISH(UroVysion)가 포함된다.^{22, 23} 하지만 이 모든 테스트는 그 진단능력이 불충분하고 그 무엇보다 방광내시경법이나 요세포 검사법을 대체할 수가 없었다.²⁴ 본 연구에 사용한 소변 metabolomics-based 진단접근법은 임상 관련성과 좋은 효과, 그리고 간편함 때문에 훌륭한 진단법이 될 것으로 생각된다. 소변은 방광에 저장되어 있고 또한 방광조직과 직접적으로 접촉하고 있기때문에 소변을 이용한 이 접근법은 임상적으로 적절하다고 생각된다. 그러므로 소변의 metabolomic profile 은 방광조직의 상태를 반영하기에 적합하고 이는 BC 진단에 있어서 여러 연구에 사용되었던 혈액 샘플보다는 임상적 적절성을 더

가지게 된다.^{25, 26} 본 연구에서는 많은 환자 수를 사용하여 (> 250) 두 그룹을 구별함에 있어 높은 민감도와 특이도를 보여 신뢰할 수 있는 진단성능을 제공하였다. 특히 85% 이상의 높은 민감도는 낮은 민감도를 보이는 요세포 검사법과 대조된다. 진단 테스트는 그 종류를 막론하고 간편하면서 빠른 실제적용과 진단결정이 상대적으로 쉽게 되어야 하는 것이 중요하다. 이 metabolomics 접근법에 사용된 소변샘플은 original test 기존 테스트에 영향을 주지 않으면서도 일반 건강검진관정에서 쉽게 얻을 수 있으며 오직 5 μ L 볼륨만이(1/5000 부피의 전형적인 소변샘플) 필요하다. 게다가 부분 마취와 통증이 있는 방광내시경법과 비교했을 때 소변 metabolomics 진단 접근법은 또한 비침습성이라는 장점을 가지고 있다. 샘플은 35 분만에 분석이 끝나고 노련한 병리학자의 전문 지식이 없어서도 상대적으로 빠르고 객관적인 결정을 내릴 수 있다. 이런 장점 때문에 소변 metabolomics 진단 접근법은 현재 임상에서 사용되고 있는 방광내시경법이나 요세포 검사법을 발전시키거나 심지어 대체 할 수 있는 잠재력을 가질 것이다.

본 연구에서는 소변의 acetyl-CoA 가 증가되는 것이 BC 그룹에서 관찰되었고 또한 carnitine, 몇몇의 acylcarnitine 도 control 그룹과 BC 그룹을 구별하는데 기여한다는 사실을 알아냈다. 알려진 바와 같이 carnitine 은 지방산이 미토콘드리아로 들어가는데 있어서 꼭 필요한 물질이고 또한 acetyl-CoA 는 이 산화과정의 마지막 산물이라는 사실로부터 지방산 산화과정이 암 상태를 결정하는데 있어서 중요한

인자로 작용할 것으로 생각된다. 이미 발표된 BC 환자의 microarray 분석에 의하면,²⁰ 지방산 산화과정에 참여하는 효소들의 유전자 발현 수준을 검사하였는데 BC 그룹에서 carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A)의 발현 수준이 control 그룹보다 높았다($p=0.0084$; Table 2). CPT1A 는 carnitine 을 사용하여 산화용 지방산을 미토콘드리아 내부로 수송하여 주는 중요한 효소중의 하나이다. 게다가 CPT1A 는 NMIBC ($p=0.089$) 보다는 MIBC ($p=0.0003$)에서 현저히 증가하였으며 이 두 가지 암 종류 사이에서도 발현 수준의 현저한 차이가 있었다($p=0.028$, Fig. 7A). 그러므로 CPT1A 의 발현은 MIBC 와 연관성이 있을 것으로 판단이 되며 새로운 연구의 흥미로운 주제가 될 것으로 생각된다. 그 이유는 CPT1A 의 발현이 세포의 운동성과 관련이 있다는 연구가 highly metastatic alveolar rhabdomyosarcoma 암세포에서 진행되었다는 보고가 있었기 때문이다.²⁷ 흥미로운 것은 CPT 의 억제제를 항암제로 개발하려는 노력들도 많이 보여졌다는 사실이다.^{28, 29} 본 연구에서 관측된 결과로부터 이런 억제제들이 BC 치료에 유용하다는 것을 추측할 수 있었다. Microarray 데이터에서는 또한 지방산을 미토콘드리아에 수송하는 다른 효소인 carnitine acylcarnitine translocase-like protein(CACL, 유전자부호: SLC25A29)^{30, 31} 이 control 그룹보다 BC 그룹에서 높은 수준으로 발현된다는 것을 알 수 있었다($p=0.0039$; Table 2). CACL 의 발현이 NMIBC 와 MIBC 두 그룹에서 모두 control 그룹보다 높은 수준으로

나타났지만(vs NMIBC: $p=0.016$; vs MIBC: $p=0.0016$) NMIBC 와 MIBC 사이에서는 큰 변화가 없었다($p=0.647$, Fig. 7B). 비록 CACL 에 관한 연구가 CPT1A 처럼 많이 보고되지는 않았지만 CACL 을 표적물질로 삼는 것도 BC 의 두 개 하위집단인 NMIBC 와 MIBC 모두를 치료할 수 있는 잠재력을 가진다. 그러므로 암 유발과정에서 지방산 산화과정을 암시한 기타 여러 논문과 ³²⁻³⁴ 함께 본 metabolomics 연구와 microarray 분석은 BC 종양 형성과 침습과정에서 지방산의 베타산화과정이 아마도 중요한 역할을 할 것이라는 사실을 제기하였다. 다른 베타산화과정의 분자인 acetyl-CoA 의 수준이 pyruvate 의 투입으로부터 pyruvate dehydrogenase complex (PDC)를 통하여 영향을 받는다. 그래서 본 연구에서는 PDC 성분의 발현정도를 측정하였고 그 결과 세 번째 성분인 dihydrolipoyl dehydrogenase(DLD)이 BC 그룹에서 현저히 감소됨이 관찰되었다 ($p<10^{-7}$; Table2). NMIBC 와 MIBC 사이는 큰 변화가 없었지만 이것들과 control 를 비교 했을 때 현저히 차이가 나타났다(vs NMIBC: $p<0.001$; vs MIBC: $p<0.001$, Fig. 7C). 이는 높은 수준의 acetyl-CoA 의 발현은 pyruvate 로부터 전환되어서 얻어진 것보다는 베타산화과정이 높아져서 나타났다는 것을 설명하고 있다. 이런 제안은 대부분의 암세포에 제기되는 Warburg 효과와 일치하며 pyruvate 는 acetyl-CoA 보다는 lactate 로 변환된다.³⁵ BC 에 의해 영향을 받는 전반적인 pathway 는 Figure 8 에 요약되어 있다.

여러 metabolomics profile 을 이용한 BC 연구들이 진행되어 왔지만 대부분은 BC 그룹이 45 명보다 적었고^{13-16, 25, 26} 오직 하나의 연구만이 83 명의 BC 그룹과 51 명의 control 그룹을 가지고 있다.³⁶ 게다가 많은 연구는 test set 을 포함한 교차검증의 부족으로 인하여 그 연구를 실제 임상에 적용하는데 있어서 제한이 있었다. 그에 비해, 본 연구에서는 훨씬 많은 수의 BC 그룹(n=138)과 control 그룹(n=121)을 사용하였으므로 더 믿음직한 통계결과를 제시할 수 있었다. 게다가 본 연구에서는 총 샘플 수의 1/3 을 가지고 test set 으로 지정하여 OPLS-DA 교차검증을 진행하였다. 실제로 이 연구에서 사용된 test set(control 그룹: n=40; BC 그룹: n=46)은 위에서 언급한 대부분의 연구에서 사용한 수와 비슷하거나 훨씬 많았다. 이와 관련하여 한 개의 연구만이 독립적인 test set 을 가지고 그들이 분석 platform 의 예측 값에 대해서 객관적으로 평가한 바가 있었다.²⁶ 그들은 OPLS-DA 모델이 100%의 민감도와 특이도를 가지는 것으로 보고하였다. 하지만 이 연구에서 사용한 BC 그룹은 총 20 명의 환자만으로 구성되어 있었다. 이러한 점은 비슷한 연구를 진행할 때 주의해야 함을 나타낸다. 본 연구와 기타 여러 metabolomics 연구를 고려해 보면,^{13-15, 37} 현실적인 민감도와 특이도는 약 85-90%로 추정되어 진다. 더불어 중요한 것은 본 연구에 양성 혈뇨환자가 control 그룹에 포함되어 있다는 사실이고 또한 이는 본 연구에서 제기된 모델은 혈뇨가 존재하더라도 control 그룹과 BC 그룹을 구별할 수 있다는 것이다. 그

이유는 BC 환자에 보편적으로 혈뇨가 존재하지만 암이 아닌 환자에서도 나타날 수 있어 혈뇨가 심각한 혼란변수로 작용하기 때문이다. 실제로 양성 혈뇨 control 그룹이 BC 그룹과 control 그룹 사이에 존재하였다(Figure 2A 와 2B, 부호: □). 많은 양성 혈뇨를 포함한 환자가 존재함에도 불구하고 본 연구에서 제기한 모델은 control 그룹과 BC 그룹을 탁월한 민감도와 특이도로 구별할 수 있었다. 전에 혈뇨환자를 사용하였던 연구들에서는 이들을 control 그룹에 포함시키지 않았거나²⁵ 소변 분석에서처럼 혈뇨가 혼란인자가 될 수 없는 혈청 샘플을 분석하였다.²⁶ 그러므로 양성 혈뇨 환자를 포함시킨 본 연구는 제시한 모델이 실제 임상에서도 훌륭하게 적용될 수 있음을 제안한다.

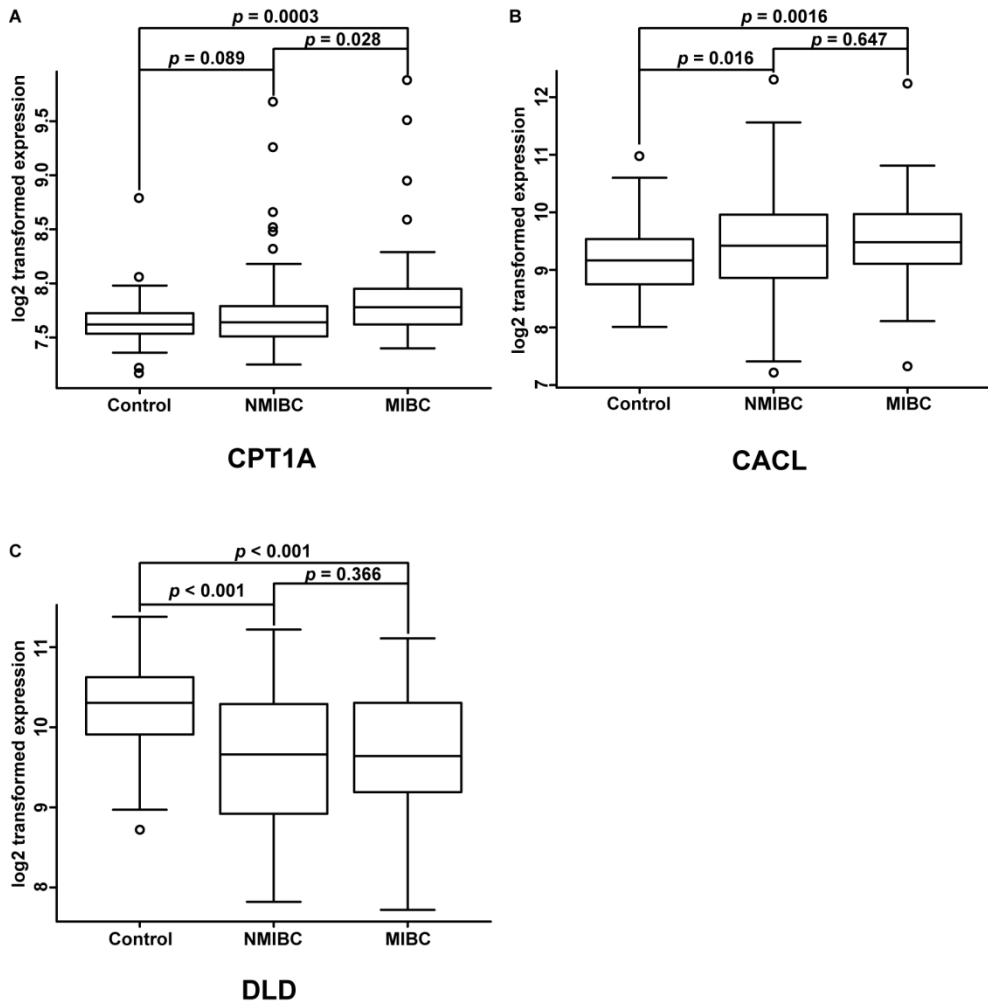


Figure 7. Box plots of the related mRNA levels. The *p*-values of Student's *t*-tests are indicated.

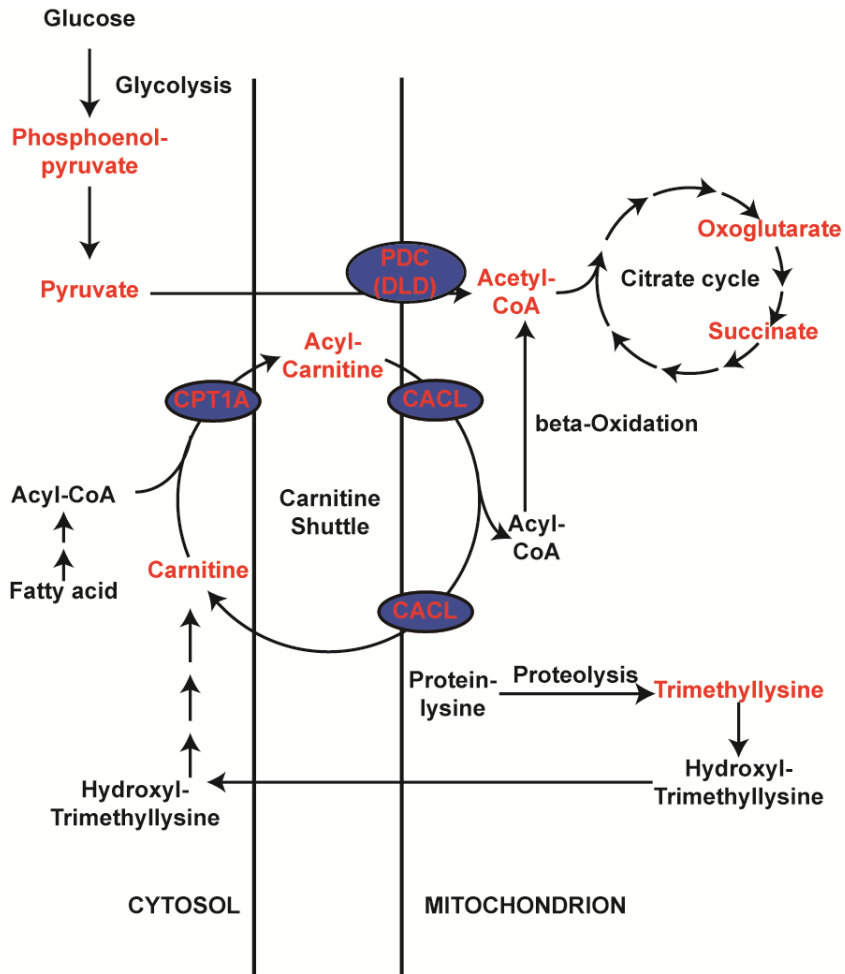


Figure 8. Pathway that may be altered in patients with BC compared to control subjects. The metabolites detected in this study are indicated in red. The genes whose levels are modulated in our microarray analysis are indicated in blue ellipses

참고문헌

1. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013;63(2): 234-41.
2. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49(3): 466-5; discussion 75-7.
3. Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, et al. Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines. *Eur Urol* 2011;59(6): 1009-18.
4. Garcia E, Andrews C, Hua J, et al. Diagnosis of early stage ovarian cancer by ¹H NMR metabonomics of serum explored by use of a microflow NMR probe. *J Proteome Res* 2011;10(4): 1765-71.
5. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010;6(1): 78-95.
6. OuYang D, Xu J, Huang H, Chen Z. Metabolomic profiling of serum from human pancreatic cancer patients using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Appl Biochem Biotechnol* 2011;165(1): 148-54.
7. MacIntyre DA, Jimenez B, Lewintre EJ, et al. Serum metabolome analysis by ¹H-NMR reveals differences between chronic lymphocytic leukaemia molecular

- subgroups. *Leukemia* 2010;24(4): 788-97.
8. Li M, Song Y, Cho N, et al. An HR-MAS MR metabolomics study on breast tissues obtained with core needle biopsy. *PLoS One* 2011;6(10): e25563.
 9. Jimenez B, Mirnezami R, Kinross J, et al. ¹H HR-MAS NMR spectroscopy of tumor-induced local metabolic "field-effects" enables colorectal cancer staging and prognostication. *J Proteome Res* 2013;12(2): 959-68.
 10. Eberlin LS, Norton I, Dill AL, et al. Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry. *Cancer Res* 2012;72(3): 645-54.
 11. Grobe N, Elased KM, Cool DR, Morris M. Mass spectrometry for the molecular imaging of angiotensin metabolism in kidney. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302(8): E1016-24.
 12. Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, Ahmad N, Fisher J, Prasad KR. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *J Surg Res* 2010;160(1): 122-32.
 13. Issaq HJ, Nativ O, Waybright T, et al. Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Urol* 2008;179(6): 2422-6.
 14. Pasikanti KK, Esuvaranathan K, Ho PC, et al. Noninvasive urinary metabonomic diagnosis of human bladder cancer. *J Proteome Res* 2010;9(6): 2988-95.
 15. Huang Z, Lin L, Gao Y, et al. Bladder cancer determination via two urinary

metabolites: a biomarker pattern approach. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(10): M111 007922.

16. Srivastava S, Roy R, Singh S, et al. Taurine - a possible fingerprint biomarker in non-muscle invasive bladder cancer: A pilot study by ¹H NMR spectroscopy. *Cancer Biomark* 2010;6(1): 11-20.

17. Wen H, Yang HJ, An YJ, et al. Enhanced phase II detoxification contributes to beneficial effects of dietary restriction as revealed by multi-platform metabolomics studies. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(3): 575-86.

18. Bylesjo M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics* 2006;20(8-10): 341-51.

19. Kang J, Choi MY, Kang S, et al. Application of a ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics approach combined with orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis as an efficient tool for discriminating between Korean and Chinese herbal medicines. *J Agric Food Chem* 2008;56(24): 11589-95.

20. Kim WJ, Kim EJ, Kim SK, et al. Predictive value of progression-related gene classifier in primary non-muscle invasive bladder cancer. *Mol Cancer* 2010;9: 3.

21. Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS, Jr., et al. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy--part II: patient evaluation, cytology, voided markers, imaging, cystoscopy, nephrology evaluation, and follow-up. *Urology* 2001;57(4): 604-10.

22. Simon MA, Lokeshwar VB, Soloway MS. Current bladder cancer tests: unnecessary or beneficial? *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;47(2): 91-107.
23. Giannopoulos A, Manousakas T, Gounari A, Constantinides C, Choremi-Papadopoulou H, Dimopoulos C. Comparative evaluation of the diagnostic performance of the BTA stat test, NMP22 and urinary bladder cancer antigen for primary and recurrent bladder tumors. *J Urol* 2001;166(2): 470-5.
24. van der Poel HG, Debruyne FM. Can biological markers replace cystoscopy? An update. *Curr Opin Urol* 2001;11(5): 503-9.
25. Cao M, Zhao L, Chen H, Xue W, Lin D. NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer. *Anal Sci* 2012;28(5): 451-6.
26. Lin L, Huang Z, Gao Y, et al. LC-MS-based serum metabolic profiling for genitourinary cancer classification and cancer type-specific biomarker discovery. *Proteomics* 2012;12(14): 2238-46.
27. Liu L, Wang YD, Wu J, Cui J, Chen T. Carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A): a transcriptional target of PAX3-FKHR and mediates PAX3-FKHR-dependent motility in alveolar rhabdomyosarcoma cells. *BMC Cancer* 2012;12: 154.
28. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* 2010;120(1): 142-56.
29. Beberitz GR, Schuster HF. The impact of fatty acid oxidation on energy

- utilization: targets and therapy. *Curr Pharm Des* 2002;8(14): 1199-227.
30. Sekoguchi E, Sato N, Yasui A, et al. A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting. *J Biol Chem* 2003;278(40): 38796-802.
31. Camacho JA, Rioseco-Camacho N. The human and mouse SLC25A29 mitochondrial transporters rescue the deficient ornithine metabolism in fibroblasts of patients with the hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria (HHH) syndrome. *Pediatr Res* 2009;66(1): 35-41.
32. Liu Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2006;9(3): 230-4.
33. Hirsch HA, Iliopoulos D, Joshi A, et al. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell* 2010;17(4): 348-61.
34. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7(10): 763-77.
35. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123(3191): 309-14.
36. Putluri N, Shojaie A, Vasu VT, et al. Metabolomic profiling reveals potential markers and bioprocesses altered in bladder cancer progression. *Cancer Res* 2011;71(24): 7376-86.
37. Jobu K, Sun C, Yoshioka S, et al. Metabolomics study on the biochemical profiles of odor elements in urine of human with bladder cancer. *Biol Pharm Bull*

2012;35(4): 639-42.

Abstract

A urinary metabolomic approach can differentiate patients with bladder cancer from normal hematuric controls, and predict cancer-specific survival

Xing Jin

Natural Products Science Major

College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Bladder cancer (BC) is a common cancer worldwide but the current diagnostic modalities, such as cystoscopy and urinary cytology, have some limitations. Here, high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-QTOFMS) was used to profile urine metabolites of 138 patients with BC and 121 control subjects (69 healthy people and 52 patients with

hematuria due to non-malignant disease), a patient population much larger than those assessed in other BC metabolomics studies. Multivariate statistical analysis revealed that the cancer group could be clearly distinguished from the control groups on the basis of their metabolomic profiles, even when the hematuric control group was included. Patients with muscle-invasive BC could also be distinguished from patients with non-muscle-invasive BC on the basis of their metabolomic profiles. Successive analyses identified 12 differential metabolites that contributed to the distinction between the BC and control groups, and many of them turned out to be involved in glycolysis and betaoxidation. The association of these metabolites with cancer was corroborated by microarray results showing that carnitine transferase and pyruvate dehydrogenase complex expressions are significantly altered in cancer groups. In terms of clinical applicability, the differentiation model diagnosed BC with a sensitivity and specificity of 91.3% and 92.5%, respectively, and comparable results were obtained by receiver operating characteristic analysis (AUC=0.937). Multivariate regression also suggested that the metabolic profile correlates with cancer-specific survival time. The excellent performance and simplicity of this metabolomics-based approach suggests that it has the potential to augment or even replace the current modalities for BC diagnosis.

Keywords: bladder cancer, metabolomics, LC-MS, diagnosis

Student number: 2012-22661