

急性冠状动脉综合征患者血清非靶向代谢组学研究*

闫奎坡¹ 冯娟² 朱翠玲¹ 孙彦琴¹ 郭雨晴² 曹园圆² 刘刚¹ 段飞³

[摘要] 目的:寻找急性冠状动脉(冠脉)综合征相关的潜在生物标志物,为探讨其病理生理机制提供参考依据。方法:利用高效液相色谱-质谱联用技术对急性冠脉综合征患者和冠脉正常者血清样本进行非靶向代谢组学分析,筛选出两组间差异代谢物,采用受试者工作特征曲线评价差异代谢物的诊断价值,进行差异代谢物通路分析。结果:急性冠脉综合征人群与冠脉正常人群代谢谱存在显著差异,通过受试者工作特征曲线筛选出 20 个差异代谢物。差异代谢物通路分析发现,急性冠脉综合征患者受干扰的代谢途径包括非酒精性脂肪肝、烟酸和烟酰胺代谢、胰岛素信号通路、FoxO 信号通路、2 型糖尿病、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、胆固醇代谢、心肌细胞的肾上腺素能信号传导、氧化磷酸化。结论:筛选得到急性冠脉综合征的潜在生物标志物 20 个,涉及非酒精性脂肪肝、烟酸和烟酰胺代谢等 13 条代谢途径。

[关键词] 急性冠状动脉综合征;非靶向代谢组学;高效液相色谱-质谱联用技术;生物标志物

DOI:10.13201/j.issn.1001-1439.2022.07.007

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A

*基金项目:河南省首批青苗人才培养项目[No:豫中医科教(2018)16号];河南省科技攻关项目(No:192102310161、182102310291);河南省中医药科学研究专项课题(No:2017ZY2017);河南省中医药科学研究专项课题(No:2016ZY3003、2016ZY2051、2017ZY2017);河南省中医药科学研究专项(No:20-21ZY1015、20-21ZY2004);河南省重点研发与推广专项(No:192102310167)

¹河南中医药大学第一附属医院心脏中心(郑州,450000)

²河南中医药大学

³河南中医药大学第一附属医院

通信作者:段飞,E-mail:kybduanfei@126.com

引用本文:闫奎坡,冯娟,朱翠玲,等.急性冠状动脉综合征患者血清非靶向代谢组学研究[J].临床心血管病杂志,2022,38(7):548-556. DOI:10.13201/j.issn.1001-1439.2022.07.007.

[12] 雷梅先,蔡霜婷.围绝经期女性性激素与血管内皮功能及冠心病的相关性研究[J].临床内科杂志,2021,38(9):594-597.

[13] 叶青.老年绝经女性冠心病相关的危险因素及其与冠状动脉病变严重程度的相关性研究[D].安徽医科大学,2020.

[14] 李玲慧,李娜.2018~2019年3月天津市部分体检老年人群睡眠时长与冠心病的相关性研究[J].预防医学论坛,2019,25(9):678-682.

[15] Weber C,Fangauf SV,Michal M,et al. Cortisol awakening reaction and anxiety in depressed coronary artery disease patients[J].J Clin Med,2022,11(2):100.

[16] 李菁,郑金刚.女性冠心病危险因素分析[J].心血管病学进展,2012,33(1):31-35.

[17] Kloster S,Tolstrup JS,Nielsen DG,et al. Long-term cardiovascular health after pregnancy in danish women with congenital heart disease. a register-based cohort study between 1993 and 2016[J].J Am Heart Assoc,2022,11(5):e023588.

[18] 陆士娟,钟江华,吴森,等.血浆网膜素-1及超敏C反应蛋白水平与冠心病发生与发展的关系[J].医疗装备,2021,34(15):3-5.

[19] Jiang J,Zhao L,Lin L,et al. Postprandial blood glucose outweighs fasting blood glucose and HbA1c in screening coronary heart disease[J].Sci Rep,2017,7(1):14212.

[20] 花宇,郭潇繁.血糖控制水平对冠心病合并糖尿病患者经皮冠状动脉介入治疗预后的影响[J].中国卫生工程学,2020,19(6):926-927+932.

[21] Dong Y,Que L,Jia Q,et al. Predicting reintervention after thoracic endovascular aortic repair of Stanford type B aortic dissection using machine learning[J].Eur Radiol,2022,32(1):355-367.

[22] Kong S,Chen C,Zheng G,et al. A prognostic nomogram for long-term major adverse cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome after percutaneous coronary intervention[J].BMC Cardiovasc Disord,2021,21(1):253.

[23] Zhang Q,Zhang J,Lei L,et al. Nomogram to predict risk of incident chronic kidney disease in high-risk population of cardiovascular disease in China:community-based cohort study[J].BMJ Open,2021,11(11):e047774.

[24] 周晓娟,马礼坤,魏艳,等.急性心肌梗死患者院内源性休克风险列线图预测模型的构建[J].临床心血管病杂志,2021,37(5):421-427.

[25] 白扬,李晓红,任素剑,等.冠心病、抑郁症与慢性应激[J].湖北中医药大学学报,2019,21(2):54-57.

[26] 霍翾,吕茂玲,刘莎莎,等.新疆地区 LIPG 和 GUCY1A3 基因多态性与冠心病的相关性研究[J].临床心血管病杂志,2021,37(6):576-580.

(收稿日期:2022-04-26)

Non-targeted serum metabolomics study in patients with acute coronary syndrome

YAN Kuipo¹ FENG Juan² ZHU Cuiling¹ SUN Yanqin¹ GUO Yuqing²
CAO Yuanyuan² LIU Gang¹ DUAN Fei³

(¹Heart Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450000, China; ²Henan University of Chinese Medicine; ³The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine)

Corresponding author: DUAN Fei, E-mail: kybduanfei@126.com

Abstract Objective: To search for potential biomarkers related to ACS, and to provide reference basis for exploring its pathophysiological mechanism. **Methods:** This study performed non-targeted serum metabolomics analysis in patients with acute coronary syndrome and normal coronary artery by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. The differential metabolites between the two groups were screened, and the diagnostic value of differential metabolites was evaluated by receiver operating characteristic curve. Differential metabolite pathway analysis was carried out. **Results:** There was significant difference in metabolic spectrum between acute coronary syndrome and normal coronary artery, and 20 differential metabolites were screened out by receiver operating characteristic curve. Differential metabolite pathway analysis showed that the disturbed metabolic pathways in patients with acute coronary syndrome included non-alcoholic fatty liver disease, nicotinate and nicotinamide metabolism, insulin signaling pathway, FoxO signaling pathway, type II diabetes mellitus, AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, Cholesterol metabolism, adrenergic signaling in cardiomyocytes, oxidative phosphorylation. **Conclusion:** The 20 potential biomarkers of ACS were screened, involving 13 metabolic pathways such as non-alcoholic fatty liver disease, nicotinate and nicotinamide metabolism.

Key words acute coronary syndrome; non-targeted metabolomics; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; biomarkers

《中国心血管健康与疾病报告 2020》^[1]显示,我国心血管疾病患病人数已达到 3.3 亿,冠心病占 1139 万,心血管死亡率持续上升,占全因死亡率的 40% 以上。急性冠状动脉(冠脉)综合征是心血管疾病中常见的急危重症,发病急、病情重,病死率高。如果能找到与急性冠脉综合征发生、发展相关的生物标志物,及时发现疾病发生信号并采取正确治疗手段,能很大程度上降低患者病死率,改善预后。代谢组学技术利用高通量分析对生物体代谢产物进行鉴定,通过机体代谢轮廓的动态演变观察研究对象在生理病理状态下发生的一系列生物过程。近年来,代谢组学在高血压^[2]、冠心病^[3]、心力衰竭^[4]等心血管疾病中应用越来越广泛,给疾病诊断、药物疗效等研究领域带来巨大的应用前景。本研究利用高效液相色谱-质谱联用技术(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)对急性冠脉综合征患者和冠脉正常者血清样本进行非靶向代谢组学检查,结合多元统计分析对数据进行模式识别,构建数据模型,观察生物系统代谢谱差异,寻找与急性冠脉综合征相关的差异代谢物,进行差异代谢物通路分析,从代谢终端产物层面探讨急性冠脉综合征病生理机制,为疾病的早期诊断、预防和治疗提供一定的参考依据。

1 对象与方法

1.1 仪器与试剂

液相色谱仪(Thermo, UltiMate 3000),质谱仪

(Thermo, Q Exactive Plus),混匀仪(Vortex Mixer, QL-866),冷冻离心机(湘仪, H1850-R),滤膜(Jin Teng, 0.22 μm PTFE),真空浓缩仪(eppendorf, 5305);甲醇、甲酸、乙腈、甲酸铵、2-氯苯丙氨酸。

1.2 研究对象的来源与分组

选取 2020 年 11 月—2021 年 1 月在河南中医药大学第一附属医院心内科住院治疗的 13 例急性冠脉综合征患者为实验组,同时期就诊于我院行冠脉双源 CT 或冠脉造影术显示冠脉正常的 4 例受试者为对照组。

1.3 诊断标准

急性冠脉综合征参照中华医学会心血管病学分会 2015 年制定的《急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南》^[5]和中国医师协会急诊医师分会 2019 年发布的《急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南》^[6]。

1.4 纳入与排除标准

纳入标准:①18~75 岁患者;②自愿签署知情同意书患者。排除标准:①严重心肺功能不全、恶性心律失常、心脏瓣膜病、主动脉夹层、肺动脉栓塞等;②严重肝肾功能不全、严重电解质紊乱、血液系统疾病、恶性肿瘤、自身免疫性疾病等;③意识障碍、精神疾病、妊娠或哺乳期。

1.5 血清样本的采集

所有入组受试者入院后次日晨起于空腹状态

下抽取肘静脉血 3 mL 于真空采血管中,置于 4℃ 环境下自然凝固分层半小时,然后在 4℃, 3000 r/min 条件下离心 10 min,迅速提取上层血清,取 2 mL 分装至冷藏管中,置于 -80℃ 冰箱备存,直至上机分析。

1.6 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC® HSS T3 1.8 μm (2.1×150 mm) 色谱柱;柱温:40℃;进样量:2 μL,流速:0.25 mL/min;流动相:正离子 0.1% 甲酸水(C)-0.1% 甲酸乙腈(D),负离子 5 mM 甲酸铵水(A)-乙腈(B);梯度洗脱程序中流动相时间和浓度设置:0~1 min,2% B/D;1~9 min,2%~50% B/D;9~12 min,50%~98% B/D;12~13.5 min,98% B/D;13.5~14 min,98%~2% B/D;14~20 min,2% D-正模式(14~17 min,2% B-负模式)。

1.7 质谱条件

电离方式:ESI 正负离子模式分别监测;喷雾电压:+3.50 kV,-2.50 kV;鞘气:30 arb;辅助气:10 arb;毛细管温度:325℃;分辨率:70 000;扫描范围:81~1000;采用 HCD 进行二级裂解,碰撞电压为 30 eV。

1.8 数据分析

本研究使用 R 语言 ropls 包对数据多元统计分析,采用正交-偏最小二乘判别分析(orthogonal projections to latent structures discriminant analysis, OPLS-DA)模型数据对组间代谢物进行筛选,主要筛选标准参照 $P < 0.05$ 且 $VIP > 1$ 。将二级质谱分析获得的碎片信息与 HumanMetabolome Database (<http://www.hmdb.ca>), Metlin (<http://metlin.scripps.edu>), massbank (<http://www.massbank.jp/>), LipidM-aps (<http://www.lipidmaps.org>), mzcloud (<https://www.mzcloud.org>) 数据库中已知物质进行匹配和注释,以获得差异代谢物信息。采用受试者工作特征曲线(ROC),以灵敏度和特异度来评价鉴定结果的准确性。图中横坐标代表假阳性率/特异度,纵坐标代表真阳性率/灵敏度,曲线下面积(AUC)代表鉴定结果的准确性。采用凝聚层次聚类(agglomerate hierarchical clustering)对样本进行聚类分析,结果以热图表示。最后,将鉴定的差异代谢物信息输入到 Metaboanalyst 数据库(<https://www.metaboanalyst.ca/>),联合 KEGG 数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)对差异代谢物进行通路富集分析。将相关代谢通路以代谢通路影响因子图进行可视化,图中横坐标为通路影响因子(impact),纵坐标为 $-\log(P)$,impact 与 $-\log(P)$ 值越大,通路影响越大。本研究选择 $impact > 0.05$ 的通路作为潜在通路。

1.9 统计学处理

本研究采用 SPSS 21.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示,符合正态分布,组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布,采用秩和检验;计数资料以例(%)表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

共纳入 17 例受试者,实验组 13 例,对照组 4 例。两组患者年龄、性别、高血压、糖尿病、高脂血症、脑血管疾病、吸烟等一般情况比较无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

2.2 基峰色谱图

本研究采用典型样本基峰色谱图来反映样本整体信息,从图中可以看出各样本出峰情况较好,见图 1、图 2。

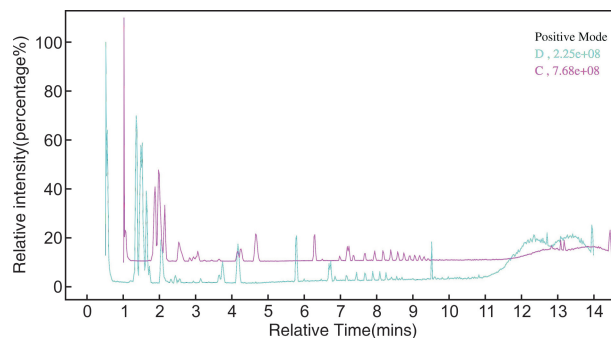


图 1 典型样本基峰色谱图(正离子模式)

Figure 1 Typical sample base peak chromatogram (positive ion mode)

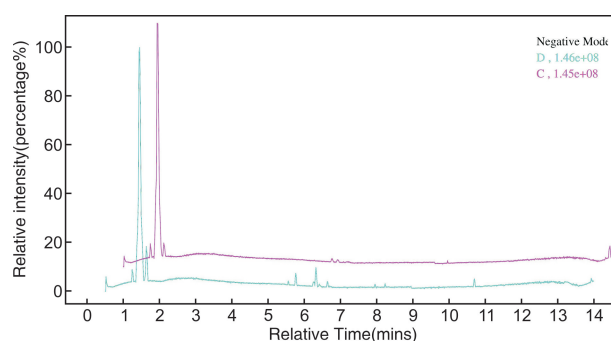


图 2 典型样本基峰色谱图(负离子模式)

Figure 2 Typical sample base peak chromatogram (negative ion mode)

2.3 质量控制和质量保证

图中红色代表 QC 样本,绿色代表实验样本。正负离子模式下,QC 样本分布相对聚集,RSD < 30% 的特征峰比例分别为 71.4% 和 72.9%,说明样本质量较好,实验条件相对稳定,见图 3、4。

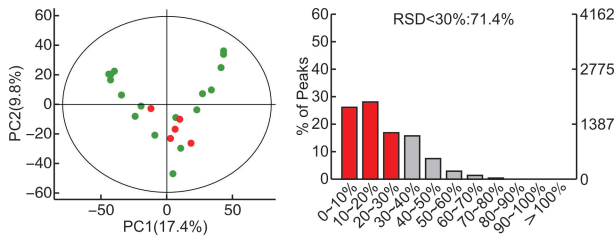


图3 实验样本与QC样本的PCA图(正离子模式)
Figure 3 PCA plots of experimental samples and QC samples(positive ion mode)

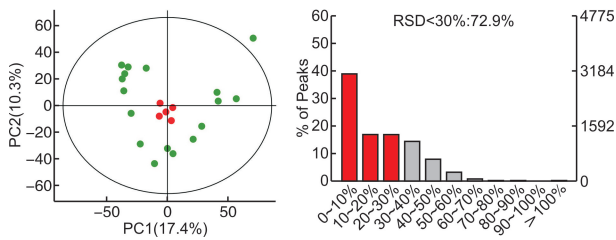


图4 实验样本与QC样本的PCA图(负离子模式)
Figure 4 PCA diagram of experimental samples and QC samples(negative ion mode)

2.4 正交-偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)

正负离子模式下,组间样本点分离明显,分布趋势可以明显区分开,组间分类较好,组内样本分布相对聚集,提示各组间样本代谢物表达存在显著差异,组内样本重复性较好,说明急性冠脉综合征

患者与冠脉正常者具有特异的代谢谱,两组代谢轮廓存在显著差异,见图5。模型参数 $R^2 X$ 、 $R^2 Y$ 、 Q^2 值见表1。

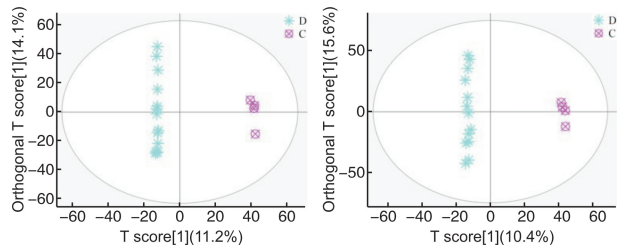


图5 血清样本的OPLS-DA得分图(左边为正离子模式,右边为负离子模式)
Figure 5 OPLS-DA score of serum samples(positive ion mode on the left, negative ion mode on the right)

2.5 差异代谢物基本信息

得到46个组间差异代谢物,代谢物上调15个,下调31个。采用ROC曲线对46个鉴定结果的准确性进行评价,46个代谢物的AUC均大于0.7,说明46个代谢物在急性冠脉综合征的诊断中具有一定参考价值。20个代谢物 $AUC > 0.9$,说明这20个物质作为急性冠脉综合征诊断标志物价值较高,可能作为区分ACS患者和冠脉正常者的潜在生物标志物,见表2。

表1 正负离子模式下模型参数 $R^2 X$ 、 $R^2 Y$ 、 Q^2 值

Table 1 Model parameters $R^2 X$, $R^2 Y$, Q^2 values in positive and negative ion mode

比对照组	正离子模式				负离子模式			
	pre	$R^2 X$ (cum)	$R^2 Y$ (cum)	Q^2 (cum)	pre	$R^2 X$ (cum)	$R^2 Y$ (cum)	Q^2 (cum)
D vs C	3	0.343	0.999	0.512	3	0.352	0.998	0.562

注:pre:主成分数; $R^2 X$:模型对X变量数据集可解释度; $R^2 Y$:模型对Y变量数据集的可解释度; Q^2 :模型可预测度;D:实验组;C:对照组。

表2 差异代谢物基本信息

Table 2 Basic information of differential metabolites

鉴定物质	中文名称	VIP	P 值	AUC	特异度	灵敏度	FC(D/C)	log2(FC)	Up/Down
Methyl jasmonate	茉莉酸甲酯	2.613661375	0.0000212	1	1	1	1.1838	0.24347	↑
1-Pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylate	1-吡咯啉基-4-羟基-2-甲酸乙酯	2.553357458	0.0000135	1	1	1	0.20546	-2.2831	↓
Geranial	香叶醛	2.471406282	0.0000447	1	1	1	0.37048	-1.4325	↓
Myristic acid	肉豆蔻酸	2.288558754	0.00035126	1	0.923	1	0.85213	-0.23085	↓
Heptanoic acid	庚酸	1.973785906	0.005974332	1	0.923	1	1.1764	0.23443	↑
Glutaric acid	戊二酸	1.888055466	0.00663257	1	0.923	1	3.8199	1.9335	↑
Methyl dopa	甲基多巴	1.782584297	0.015714848	1	0.923	1	7.1221	2.8323	↑
Ergocalciferol	钙化醇	2.50780231	0.0000836	0.981	0.923	1	0.55905	-0.83895	↓
Ursodeoxycholic acid	熊去氧胆酸	2.431963998	0.0000741	0.981	0.846	1	0.21266	-2.2334	↓
2-Methylbutanal	2-甲基丁醛	2.394841431	0.00011526	0.971	0.923	1	0.29557	-1.7584	↓

续表 2

鉴定物质	中文名称	VIP	P 值	AUC	特异度	灵敏度	FC(D/C)	log ₂ (FC)	Up/Down
L-Tryptophan	L-色氨酸	1.814754381	0.01352811	0.962	0.923	1	1.5099	0.59448	↑
Beta-Leucine	β-亮氨酸	2.262807849	0.000876087	0.942	0.769	1	0.36188	-1.4664	↓
Aminocaproic acid	氨基己酸	2.026705449	0.002831395	0.942	0.769	1	0.75535	-0.40478	↓
Norepinephrine	去甲肾上腺素	2.022780712	0.002906188	0.942	0.923	1	1.1223	0.16648	↑
Pelargonic acid	壬酸	2.006880444	0.003225859	0.923	0.846	1	1.1801	0.23894	↑
3,3-Dimethoxybenzidine	3',3-二甲氧基联苯胺	1.722964627	0.015617621	0.923	0.846	1	0.81238	-0.29978	↓
Suberic acid	辛二酸	1.680850163	0.018998759	0.923	0.923	1	3.7433	1.9043	↑
9,10-DHOME	9, 10-二羟基-12(Z)-十八碳烯酸	1.67909049	0.024683863	0.923	0.769	1	0.67184	-0.57382	↓
L-2-Hydroxyglutaric acid	L-2-羟基戊二酸	1.453893739	0.048090985	0.923	0.769	1	4.8314	2.2724	↑
Glycocholic acid	甘氨酸胆酸	1.664600861	0.02620388	0.913	0.846	0.75	0.32061	-1.6411	↓
4-Quinolinecarboxylic acid	4-喹啉羧酸	1.660727769	0.020803943	0.894	0.846	0.75	4.0207	2.0074	↑
Succinic acid	琥珀酸	1.538375284	0.034828958	0.885	0.769	1	2.4312	1.2817	↑
12-Hydroxydodecanoic acid	12-羟基十二酸	2.031058316	0.004294962	0.875	1	0.75	0.23991	-2.0595	↓
DL-Glycerol 1-phosphate	DL-甘油 1-磷酸	1.909775673	0.008438434	0.875	0.923	0.75	0.58075	-0.78401	↓
Uridine	尿苷	1.691841244	0.018065851	0.875	0.692	1	0.34062	-1.5538	↓
Pyroglutamic acid	焦谷氨酸	1.607054931	0.026276433	0.865	0.769	1	0.54557	-0.87415	↓
Sarcosine	肌氨酸	2.0448578	0.00250559	0.846	1	0.75	0.090852	-3.4603	↓
Imidazole-4-acetaldehyde	咪唑-4-乙醛	2.009610412	0.003169029	0.846	1	0.75	0.22524	-2.1505	↓
D-Glucose	D-葡萄糖	1.776976883	0.016122915	0.846	0.846	0.75	0.33039	-1.5977	↓
Creatine	肌酸	1.706128383	0.016907231	0.846	0.923	0.75	0.37158	-1.4283	↓
Ribitol	戊五醇核糖醇	1.695095446	0.023085247	0.846	0.769	1	0.53381	-0.90561	↓
Biotin	生物素	1.616842764	0.025203641	0.846	0.769	1	0.57732	-0.79255	↓
Benzamide	苯甲酰胺	1.608918913	0.02606946	0.846	0.923	0.75	0.25422	-1.9759	↓
Sphinganine	鞘氨醇	1.457431025	0.047469279	0.846	0.769	1	0.93425	-0.098117	↓
Nicotinic acid	烟酸	1.447890041	0.049160166	0.846	0.692	1	5.8827	2.5565	↑
Ketoleucine	酮亮氨酸	1.529183197	0.044152111	0.837	1	0.75	1.3366	0.41853	↑
Adipate semialdehyde	己二酸半醛	1.729157647	0.015163222	0.827	1	0.75	0.17645	-2.5027	↓
1, 2-Epoxy-p-menth-8-ene	柠檬烯-1,2-环氧化物	1.605616471	0.026437023	0.827	0.846	0.75	0.23377	-2.0968	↓
5-Hydroxypyrazinamide	5-羟基吡嗪酰胺	1.511633383	0.038680014	0.827	0.923	0.75	2.2601	1.1764	↑
Pyrrolidonecarboxylic acid	吡咯烷酮羧酸	1.567836926	0.038289473	0.808	0.923	0.75	0.41675	-1.2627	↓
Withaferin A	醉茄素 A	1.70531079	0.016971919	0.788	0.846	0.75	0.46977	-1.09	↓
Guanidinosuccinic acid	胍基琥珀酸	1.60642627	0.033046828	0.788	0.923	0.75	0.49889	-1.0032	↓
Niacinamide	烟酰胺	1.548295864	0.04117419	0.779	0.769	1	1.2493	0.32114	↑
Maslinic acid	马斯里酸	1.566941246	0.038418236	0.76	0.846	0.75	0.10312	-3.2776	↓
Methionine sulfoximine	蛋氨酸磺酸盐	1.467500228	0.045732623	0.75	1	0.5	0.10929	-3.1937	↓
Carnosine	肌肽	1.675920044	0.019429262	0.74	1	0.5	0.30913	-1.6937	↓

注:VIP:OPLS-DA 第一主成分变量权重值;FC(fold change):倍性变化;log₂(FC):倍性变化的 log₂ 值;Up:代谢物高表达(上调);Down:代谢物低表达(下调)。

2.6 差异代谢物层次聚类分析

热图显示,46个差异代谢物在组间分类较好,组内分布聚集,提示组间样本代谢物差异较大,组内样本代谢物相似。说明急性冠脉综合征患者和冠脉正常者代谢谱存在显著差异,见图6。

2.7 差异代谢物通路分析

得到36条可能受差异代谢物扰动的代谢通路,其中13条通路 $\text{Impact} \geq 0.1$,说明这13条通路受差异代谢物扰动较大,在疾病干预机体代谢轮廓波动中的作用越大,可作为急性冠脉综合征病理机制的潜在通路,分别为非酒精性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver disease)、烟酸和烟酰胺代谢(Nicotinate and nicotinamide metabolism)、胰岛素信号通路(Insulin signaling pathway)、FoxO信号通路(FoxO signaling pathway)、2型糖尿病(Type II diabetes mellitus)、催乳素信号通路(Prolactin signaling pathway)、胰岛素分泌(Insulin secretion)、生物素代谢(Biotin metabolism)、血管平滑肌收缩(Vascular smooth muscle contraction)、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、胆固醇代谢(Cholesterol metabolism)、心肌细胞的肾上腺素能信号传导(Adrenergic signaling in cardiomyo-

cytes)、氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation),见表3和图7。

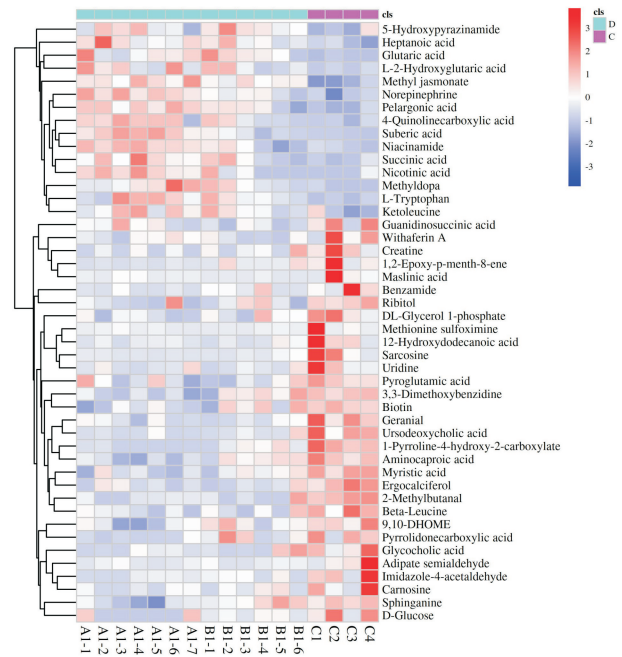


图6 差异代谢物热图

Figure 6 Heatmap of differential metabolites

表3 通路影响因子表

Table 3 Pathway Influencing Factors Table

通路名称	$-\log(P)$	代谢通路影响值	代谢物	代谢通路 KEGG ID
Non-alcoholic fatty liver disease	3.593	0.5	C00031	hsa04932
Nicotinate and nicotinamide metabolism	3.2309	0.25116	C00042;C00153;C00253	hsa00760
Insulin signaling pathway	2.9134	0.25	C00031	hsa04910
FoxO signaling pathway	2.6971	0.2	C00031	hsa04068
Type II diabetes mellitus	2.5215	0.16667	C00031	hsa04930
Prolactin signaling pathway	1.9488	0.15789	C00031	hsa04917
Insulin secretion	1.8685	0.15	C00031	hsa04911
Biotin metabolism	1.1258	0.14062	C00120	hsa00780
Vascular smooth muscle contraction	2.2472	0.125	C00547	hsa04270
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	2.1362	0.11111	C00031	hsa04933
Cholesterol metabolism	2.0375	0.1	C01921	hsa04979
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	2.0375	0.1	C00547	hsa04261
Oxidative phosphorylation	1.6073	0.1	C00042	hsa00190
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	1.7951	0.095238	C02237	hsa00471
Gap junction	1.9488	0.090909	C00547	hsa04540
Synaptic vesicle cycle	1.8685	0.083333	C00547	hsa04721
Insulin resistance	1.4104	0.083333	C00031	hsa04931
Central carbon metabolism in cancer	4.2753	0.075472	C00031;C00042;C00078	hsa05230
cAMP signaling pathway	3.0788	0.074074	C00042;C00547	hsa04024
Histidine metabolism	1.986	0.072	C00386;C05130	hsa00340
Sphingolipid signaling pathway	1.6652	0.068966	C00836	hsa04071

续表 3

通路名称	$-\log(P)$	代谢通路影响值	代谢物	代谢通路 KEGG ID
Carbohydrate digestion and absorption	1.1557	0.068966	C00031	hsa04973
Butanoate metabolism	0.8088	0.066176	C00042	hsa00650
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1.2902	0.064516	C00233	hsa00290
African trypanosomiasis	1.6073	0.0625	C00078	hsa05143
Vitamin digestion and absorption	2.2954	0.061224	C00120;C00153	hsa04977
Valine, leucine and isoleucine degradation	0.8088	0.059289	C00233	hsa00280
GABAergic synapse	2.1362	0.058824	C00042	hsa04727
Pyrimidine metabolism	0.51133	0.057549	C00299	hsa00240
Mineral absorption	2.8109	0.057143	C00031;C00078	hsa04978
Pertussis	2.0375	0.055556	C00253	hsa05133
Galactose metabolism	0.7426	0.055556	C00031	hsa00052
Sphingolipid metabolism	1.2198	0.054795	C00836	hsa00600
Taste transduction	2.6366	0.052632	C00031;C00547	hsa04742
HIF-1 signaling pathway	1.6652	0.052632	C00031	hsa04066
Salivary secretion	1.5533	0.052632	C00547	hsa04970

注: $-\log(p)$: 对 P 值的自然对数取负值。

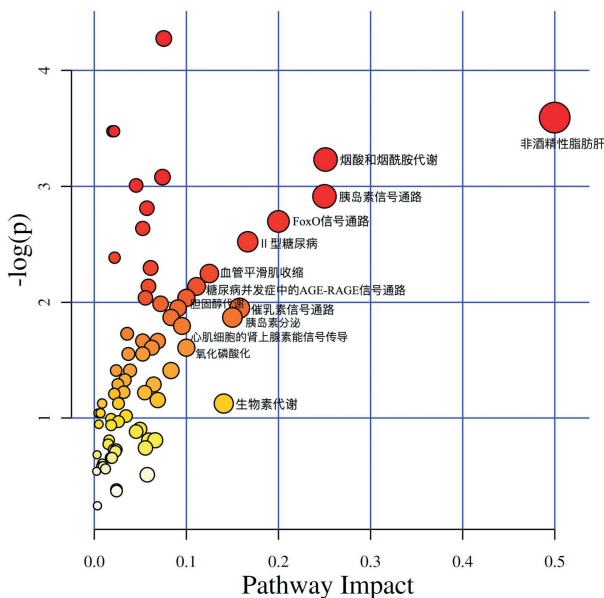


图 7 急性冠脉综合征患者血清生物标志物构建的代谢通路

Figure 7 Metabolic pathways constructed by serum biomarkers in patients with acute coronary syndrome

3 讨论

生物体系对内外界的刺激(如疾病刺激和药物干预)都会反映在代谢产物的变化上。心脏能量代谢紊乱是心血管疾病的主要因素,心肌代谢紊乱会引起生物流体中代谢产物发生改变,对这些代谢产物进行定量分析,建立代谢物与疾病生理病理间关系,能够早期高效、准确指导疾病的诊断和治疗,对疾病风险评估和疾病预后预测具有重大意义^[7]。本研究利用 HPLC-MS 对急性冠脉综合征患者血清和冠脉正常者血清进行非靶向代谢组学检测,寻

找两组间差异代谢物,通过差异代谢物通路分析进一步阐明 ACS 病生理机制。差异代谢物通路分析发现,与对照组相比,13 条代谢途径在急性冠脉综合征人群中发生了明显变化,分别为非酒精性脂肪肝、烟酸和烟酰胺代谢、胰岛素信号通路、FoxO 信号通路、2 型糖尿病、催乳素信号通路、胰岛素分泌、生物素代谢、血管平滑肌收缩、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、胆固醇代谢、心肌细胞的肾上腺素能信号传导、氧化磷酸化。对参与急性冠脉综合征病理机制的重要通路进行以下阐述:

3.1 非酒精性脂肪肝代谢通路

非酒精性脂肪肝是慢性肝病的主要病因,与糖尿病、胰岛素抵抗、肥胖密切相关,这些危险因素都增加了心血管疾病的发生风险。研究表明,NAFLD 与心血管疾病的复杂关系可能与胰岛素抵抗、脂肪组织功能障碍、血脂异常、氧化应激、炎症反应和内皮功能障碍有关^[8]。NAFLD 与动脉粥样硬化和冠心病的发生有关,NAFLD 在严重冠心病患者中更为常见,也是导致 NAFLD 患者死亡的主要原因。在稳定性冠心病患者中,NAFLD 与冠脉病变程度相关,在急性冠脉综合征,尤其是急性心肌梗死患者中,与无 NAFLD 患者相比,NAFLD 患者的预后较差^[9-10]。初步预测急性冠脉综合征患者体内非酒精性脂肪肝代谢途径发生异常,促进炎症反应、内皮损伤、心肌细胞氧化应激等过程,引起心绞痛、心肌梗死。

3.2 烟酸和烟酰胺代谢

研究显示长期摄入烟酸和烟酰胺是增加心血管疾病的危险因素^[11]。过量烟酸和烟酰胺不仅会引起机体代谢紊乱,而且在降解过程中会产生活性氧可诱发氧化应激,引起心肌细胞损伤、坏死,出现

心绞痛、心肌梗死等心血管疾病^[12]。一项糖耐量试验表明,给予烟酰胺会增加糖耐量试验中胰岛素的释放,推测其可能与氧化应激降低糖耐量、产生胰岛素抵抗有关^[13]。本研究发现,急性冠脉综合征患者血清中烟酸、烟酰胺含量明显高于冠心病患者,烟酸和烟酰胺代谢异常引起心肌细胞损伤和坏死,出现心绞痛、心肌梗死等心血管疾病。

3.3 2型糖尿病代谢通路

糖尿病高血糖易致多器官损伤,其中以心脑血管病变最为常见。糖尿病是冠心病重要危险因素,糖尿病高血糖刺激血管平滑肌合成分泌多种细胞因子,增加血管平滑肌在血管内膜沉积,促进动脉粥样斑块发生发展^[14]。糖尿病患者常伴有凝血因子和血小板功能增强,不稳定斑块破裂,易形成血栓引起管腔狭窄和闭塞^[15-16]。糖尿病是急性心肌梗死患者住院病死率的独立危险因素,研究表明,急性心肌梗死合并糖尿病患者住院期间并发症多,病死率高^[17]。此外,糖尿病胰岛素抵抗、高胰岛素血症会影响血脂代谢异常,加重脂质在血管内膜沉积,促进动脉粥样硬化的形成。初步预测急性冠脉综合征患者体内2型糖尿病代谢途径发生变化,引起血糖、血脂代谢异常。

3.4 FoxO 信号通路

FoxO 是叉头蛋白家族的一个亚群,与心肌细胞的凋亡、萎缩、自噬、氧化应激、缺血再灌注损伤等生理过程有关^[18-19]。研究显示,冠心病病情严重程度与叉头转录因子 3a(FoxO3a)表达水平呈正相关^[20],冠心病患者血浆中 FoxO3a 水平明显高于冠心病患者,可作为冠心病临床诊断的新型生物标记物。FoxO3a 可激活过氧化氢酶、细胞凋亡调解子 Bim、FasL 等基因表达来发挥抗氧化的作用,抑制了氧化应激引起的细胞凋亡。但是,持续激活 FoxO3a 可调控 Bcl-2 相互作用细胞死亡介导因子表达来介导心肌细胞凋亡,导致内皮细胞损伤,因此,FoxO 相关信号通路在细胞凋亡上具有重要作用^[21-22]。叉头转录因子 1(FoxO1)磷酸化可上调 Bim 蛋白表达诱导 TNF- α 介导的细胞凋亡^[23],激活 FoxO1 信号通路可抑制胰岛 β 细胞的凋亡发挥治疗 2 型糖尿病作用^[24]。FoxO1 去乙酰化可上调 GTP 结合蛋白-Rab7 的表达,促进细胞自噬的形成^[25-26]。初步预测急性冠脉综合征的病理机制可能与 FoxO 信号通路异常有关,调节 FoxO 相关蛋白活性参与心肌细胞的凋亡、氧化应激、缺血再灌注损伤等病理过程。

3.5 糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路

AGEs 受体(RAGE)参与了多种细胞中 AGE-RAGE 信号传导,特别是在糖尿病和心血管疾病中,可能成为糖尿病和心血管疾病治疗的潜在靶点^[27-28]。AGEs 是一个重要的分子家族,在冠心病

的病理生理中起着关键作用,与动脉粥样硬化和细胞内信号传导有直接关系,对内皮细胞反应、血管平滑肌细胞功能和血小板活性有不利影响。AGE-RAGE 信号还参与支架内再狭窄的发生,可作为心肌代谢的主要危险因素^[29]。AGEs 水平的增加与糖尿病患者心血管事件的发生有关,这些心血管事件包括动脉粥样硬化、心律失常、心脏收缩和舒张功能障碍、充血性心力衰竭、支架内再狭窄^[30-31]。研究表明,与无阻塞性冠脉疾病患者相比,血糖异常和三支血管病变患者血清 AGEs 水平明显升高^[32]。梗阻性冠脉疾病患者中,AGEs 水平的升高与冠脉严重程度相关。初步预测急性冠脉综合征患者体内糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路障碍,引起内皮细胞损伤、血管平滑肌功能障碍和血小板活性异常,增加了心血管事件的发生风险。

综上,急性冠脉综合征人群与冠脉正常人群代谢谱存在显著差异,鉴定出 20 个差异代谢物。通过 logistic 回归分析发现,茉莉酸甲酯、甲基多巴、L-色氨酸、去甲肾上腺素等 9 个代谢物与急性冠脉综合征的发生风险呈正相关。香叶醛、肉豆蔻酸、熊去氧胆酸、甘氨酸等 11 个代谢物与急性冠脉综合征的发生风险呈负相关。急性冠脉综合征患者受干扰的代谢途径包括非酒精性脂肪肝、烟酸和烟酰胺代谢、胰岛素信号通路、FoxO 信号通路、2 型糖尿病、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、胆固醇代谢、心肌细胞的肾上腺素能信号传导、氧化磷酸化。本研究结果为急性冠脉综合征的临床诊断和治疗提供了一定参考价值,但是,样本量少,仍需要多中心多样本研究进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. 中国循环杂志,2021,36(6):521-545.
- [2] Zhao H, Liu YJ, Li Z, et al. Identification of essential hypertension biomarkers in human urine by non-targeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS[J]. Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry, 2018, 486:192-198.
- [3] Lu XY, Xu Ho, Zhao T, et al. Study of Serum metabolomics and formula-pattern correspondence in coronary heart disease patients diagnosed as phlegm or blood stasis pattern based on ultra performance liquid chromatography mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2018, 24(12):905-911.
- [4] Liu YT, Xu WQ, Xiong YF, et al. Evaluations of the effect of Huang Qi against heart failure based on comprehensive echocardiography index and metabolomics [J]. Phytomedicine, 2018, 50:205-212.
- [5] 中华医学会心血管病学分会. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2015,

- 43(5):380-393.
- [6] 张新超,于学忠,陈凤英,等.急性冠脉综合征急诊快速诊治指南(2019)[J].临床急诊杂志,2019,20(4):253-262.
- [7] Ussher JR, Elmariah S, Gerszten RE, et al. The emerging role of metabolomics in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(25):2850-2870.
- [8] Wright KA, Suarez O, Fabian M, et al. Risk Factor control and cardiovascular event risk in people with type 2 diabetes in primary and secondary prevention settings[J]. Circulation, 2020, 142(20):1925-1936.
- [9] Arslan U, Yenercağ M. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and coronary heart disease [J]. World J Clin Cases, 2020, 8(20):4688-4699.
- [10] Stahl Eric P, Dhindsa Devinder S, Lee Suegene K, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and the heart: JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(8):948-963.
- [11] 周士胜,臧益民. B 族维生素过量与心血管病风险 [J]. 心脏杂志, 2012, 24(1):110-113.
- [12] Zhou SS, Zhou YM, Li D, et al. Dietary methyl-consuming compounds and metabolic syndrome[J]. Hypertens Res, 2011, 34(12):1239-1245.
- [13] Li D, Sun WP, Zhou YM, et al. Chronic niacin overload may be involved in the increased prevalence of obesity in US children [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(19):2378-2387.
- [14] 赵鹏,王倩梅,王彦军,等. 2 型糖尿病合并冠脉病变患者中急性心肌梗死的发生与血清 Adropin 蛋白水平的相关性研究[J]. 临床急诊杂志, 2019, 20(4):268-271+277.
- [15] 于杰滨,邵明举. 冠心病合并 2 型糖尿病患者临床特点及生化指标[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(4):689-691.
- [16] 夏经钢,尹春琳. 冠心病和糖尿病“共病”管理中的干预靶点—代谢性炎症的作用机制探讨[J]. 中国循环杂志, 2021, 36(1):93-96.
- [17] 谷世奎,张梅,黄体钢,等. 糖尿病对急性心肌梗死患者预后的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2010, 20(3):281-284.
- [18] 李春光,江新利,马会杰,等. 叉头蛋白 FoxO 亚群在心血管系统中的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(3):262-265.
- [19] 王路乔,黄波,程晓曙. FoxO 转录因子与心血管生物学效应[J]. 生命的化学, 2013, 33(4):413-417.
- [20] 帕丽达·阿布来提,高颖. 血浆 miR-223 和 FoxO3a 水平与冠心病及其传统危险因素之间的相关性研究 [J]. 中国心血管病研究, 2021, 19(7):661-666.
- [21] 郑星星,王建刚. FoxO3a 转录因子与心血管疾病的研究进展[J]. 心脏杂志, 2014, 26(2):222-224+232.
- [22] Fasano C, Disciglio V, Bertora S, et al. FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response[J]. Cells, 2019, 8(9):1110-1138.
- [23] 刘振华,王珂,王馨佩,等. 转录因子 FoxO1 的修饰调节效应及在心血管疾病中的作用 [J]. 心脏杂志, 2018, 30(2):218-221.
- [24] 杜立娟,孙敏,谈钰濛,等. 半夏泻心汤对过氧化氢叔丁醇诱导的 MIN6 细胞凋亡及 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(1):63-67.
- [25] 李澜,高慧,邢晓雪,等. 心肌自噬及其分子机制研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(24):2479-2482.
- [26] 徐俊,黄秀兰. SIRT1-FoxO-自噬通路研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(7):901-904.
- [27] Yamagishi S, Matsui T. Smooth muscle cell pathophysiology and advanced glycation end products (AGEs) [J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(7):875-881.
- [28] Prasad K, Dhar I, Caspar-BG. Role of advanced glycation end products and its receptors in the pathogenesis of cigarette smoke-induced cardiovascular disease[J]. Int J Angiol, 2015, 24(2):75-80.
- [29] Claudia LC, Armando CO, Maciste Habacuc MC, et al. Dietary advanced glycation end products and cardiometabolic risk[J]. Curr Diab Rep, 2017, 17(8):63.
- [30] Yamagishi S, Matsui T. Role of hyperglycemia-induced advanced glycation end product (AGE) accumulation in atherosclerosis[J]. Ann Vasc Dis, 2018, 11(3):253-258.
- [31] Fishman SL, Sonmez H, Basman C, et al. The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without diabetes mellitus: a review[J]. Mol Med, 2018, 24(1):59.
- [32] Kerkeni M, Weiss IS, Jaisson S, et al. Increased serum concentrations of pentosidine are related to presence and severity of coronary artery disease [J]. Thromb Res, 2014, 134(3):633-638.

(收稿日期:2021-09-21)