

代谢组学在心血管流行病学研究中的应用

廖春晓 高文静 李立明

【关键词】 代谢组学; 心血管疾病; 生物标志物

Application of metabolomics in research on cardiovascular disease Liao Chunxiao, Gao Wenjing, Li Liming. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China

Corresponding authors: Li Liming, Email: lmllee@vip.163.com; Gao Wenjing, Email: gaowenjing1979@gmail.com

This work was supported by a grant from the research special fund for public welfare industry of health (No. 201002007).

【Key words】 Metabolomics; Cardiovascular diseases; Biomarkers

代谢组学是通过考察生物体系在受到外界刺激后代代谢产物的组成变化或其随时间的变化研究代谢途径的一种技术。它能够从结构、功能表达、效应机制等微观角度探讨生命现象^[1],系统研究代谢产物的变化规律^[2]。心血管疾病的发病率逐年升高,居各种死因的首位^[3,4]。因此对心血管疾病进行及时、准确的诊断十分必要。代谢组学通过先进的仪器检测、数据分析和化学计量方法,对于了解心血管疾病发病机制、临床风险评估、诊断、预后和疗效评估十分重要^[5]。

1999年英国学者Nicholson等^[6]在核磁共振(NMR)分析的基础上,首次提出代谢组学的概念:对生物系统因病理生理或基因改变等刺激所致动态多参数代谢应答的定量测定。代谢组学是关于生物体内源性代谢物质的整体及其变化规律的科学^[7],其中心任务包括检测、量化和编录生物体内源性代谢物质的整体及其变化规律,联系该变化规律与所发生的生物学事件或过程的本质。

机体大多数代谢路径不是孤立存在的,而是与其他代谢通路交互影响,因此疾病的发生会导致机体多种代谢产物的改变,代谢组学能够反映机体整体的代谢状态^[7],可对代谢物全面、实时、系统的轮廓分析,也可对这些代谢物因遗传易感性、环境因素、饮食、生活方式或外源性化学物质等影响而发生的暂时变化进行描述和评价^[8]。

完整的代谢谱分析流程包括样品的采集、预处理、数据采集和分析及解释。代谢谱分析力求尽可能地精确完整地分析生物体系中的代谢组分,分析过程应尽可能保留样品中代谢物的整体信息^[9],近年NMR和质谱(MS)技术已用于分析代谢产物^[10]。代谢谱分析产生的巨大信息需要通过一定

的分析手段,如运用偏最小二乘法,判别分析法(PLS-DA)^[11]或人工神经网络^[12]等。

1. 在流行病学研究中的应用:传统的流行病学研究只关注暴露和结局之间的关系,例如研究生活方式和环境因素对于慢性病发病的影响,很难揭示复杂的生物学机制,因此称为“黑匣子”研究。随着人类基因组和国际人类基因组单体型图计划的完成,基因组学、转录组学、蛋白质组学以及代谢组学等学科领域不断出现新的研究进展^[1],流行病学家也将其运用到人群流行病学研究,有助于将流行病学研究从传统的黑匣子研究模式转移到系统流行病学研究^[13]。例如Wang等^[14]的一项巢式病例对照研究中,对2 422人随访12年,得到201例新发糖尿病病例,利用液相色谱质谱联合技术(LC/MS)分析其基线血浆中的代谢产物,发现5-支链和芳香族氨基酸能够预测正常人群发生2型糖尿病的风险。Wang等^[15]分析了1 011份择期进行心导管检查患者的血浆代谢产物,对其心血管事件发生情况进行3年随访,验证了已知的生物标志物精氨酸甲基化水平增加心血管事件的风险,并得出非对称二甲基精氨酸(ADMA)、对称二甲基精氨酸(SDMA)可以预测不良心血管事件,包括心肌梗死、中风和死亡等。通过运用代谢组学高通量的技术手段进行流行病学研究,能够发现疾病相关生物标志物,有助于揭示和解析暴露与慢性病之间的“黑匣子”之谜,帮助人们了解疾病的病理进程,拓宽对慢性病的认识。同时通过与大型流行病学队列研究相结合,还能发现代谢物在疾病诊断之前的动态变化,从而对疾病进行预测和早期诊断。

2. 在心血管生物标志物中的应用:心血管生物标志物对于心血管疾病的发生发展、诊断、预后有着十分重要的作用,并且已经成功地应用于心血管疾病的诊断(如心肌酶谱和肌钙蛋白用于心肌梗死的诊断)及不良心血管事件(如脂蛋白用于冠心病)的预测。随着系统生物学的迅猛发展,新的生物标志物层出不穷,如C反应蛋白(CRP)、同型半胱氨酸用于冠心病的预测,心房利钠肽用于可疑心衰患者的诊断等(表1),但是一些新的生物标志物由于缺乏特异性,在临床研究中仍有争议,并且标志物在血清水平的变动受很多混杂因素(如饮食、用药、并发症等)的影响,难以辨别其是始动因素还是继发因素。

代谢组学结合临床试验研究已发现很多代谢产物可用于心血管疾病诊断,如Sabatine等^[20]利用18例可诱导性心肌缺血患者作为试验组,18例正常者为对照组,用LC/MS技术分析运动负荷试验前后血液中的代谢产物,极大地控制了混杂因素,结果显示以柠檬酸循环中的6个代谢产物为指标对心肌缺血进行诊断,交叉验证诊断准确率达到83%。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.032

基金项目:卫生行业科研专项项目(201002007)

作者单位:100191 北京大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

通信作者:李立明, Email: lmllee@vip.163.com; 高文静, Email: gaowenjing1979@gmail.com

表 1 心血管相关标志物研究进展

分类	研究状态	应用	进一步研究方向
心肌损伤标志物			
心肌肌钙蛋白 cTns(cTnI, cTnT)	已证实	心肌坏死特异性标志物, 可用于 ACS 危险分层	
肌酸激酶同工酶(ck-MB)	已证实	使用 cTns 前是诊断急性心肌梗死的金标准	
缺血修饰蛋白(IMA) ^[16]	新研究	新的缺血标志物, 对 ACS 预后评价有意义	特异性有待临床研究证实
动脉粥样硬化标志物			
CRP	新研究	心血管危险性强烈预测因子	需解决检测方法、参考值标准化问题以及评价其在临床实践中的应用
过氧化物酶(MPO)	新研究	斑块不稳定标志物, 可疑 ACS 的诊断具有一定前景	缺乏心脏特异性, 需进一步评估其作用
氧化 LDL-C	已证实	炎症前期, 氧化应激标志物, 冠心病的重要预测因素	
apoB/apoA1 ^[17]	已证实	脂蛋白相关的血管疾病风险最准确的预测指标	
白细胞介素	新研究	预测冠心病发病	
同型半胱氨酸	存在争议	升高与冠心病事件增加有关	
半乳糖凝集素-3 ^[18]	新研究	预测心力衰竭患者预后	进一步探讨其在心衰中的发生发展作用
心脏功能标志物			
B 型脑钠肽(BNP)和 NT-proBNP	新研究	用于可疑心衰患者诊断	NT-proBNP 对心力衰竭的动态监测仍需评价
肾上腺髓质素	新研究	帮助区分那些需要强化治疗的极高危心力衰竭患者	
生长分化因子-15 ^[19]	新研究	可能提供心力衰竭独立的危险分层和预后信息	仅发现其与心血管事件的相关, 需进一步评价并了解其作用机制

注: ACS: 急性冠脉综合征; apoB/apoA1: 载脂蛋白 B/载脂蛋白 A1

Lewis 等^[21]用 MS 方法分析 36 例接受乙醇室间隔消融治疗肥厚梗阻型心肌病的患者治疗前后不同时点的血液样本, 以接受常规心导管检测的患者为阴性对照, 自发性心肌梗死患者(SMI)作为阳性对照, 发现参与嘧啶代谢、三羧酸循环代谢和磷酸戊糖途径的代谢产物在治疗 10 min 后即可检测到变化, 并且在 SMI 组得到验证。

除了小型临床试验研究, 代谢组学在大型人群队列研究中的应用也同样可以控制混杂因素, 发现可用于疾病预测的代谢物, Zheng 等^[22]对 896 名黑人进行了 10 年的随访, 应用代谢组学分析方法发现基线血液中 4-羟基马尿酸乙酯(肠道菌群发酵的产物)浓度与随后的高血压风险呈正相关, Shah 等^[23]对 600 多人进行 3 年的随访研究, 发现支链氨基酸的水平可以预测冠状动脉患者不良心血管事件的发生。

流行病学人群研究结合高通量的代谢组学可以有效控制混杂因素, 发现与心血管疾病相关的潜在生物标志物(表 2)。

3. 在药物疗效评价中的应用: 代谢组学技术可以实现对代谢物轮廓监测和靶向分析, 能够从多种代谢通路出发, 构

建药物与机体代谢路径及病理生理变化之间的联系, 可用于评价药物对心血管疾病的作用, 包括药物治疗效果、时间和剂量效应。降低心血管疾病风险最普遍的是他汀类药物。Kaddurah-Daouk 等^[28]为评价他汀类药物疗效在个体间的差异, 应用靶标代谢组学分析血浆中的脂质代谢, 发现响应者代谢产物的改变比无响应者更复杂, 基线胆固醇脂和磷脂代谢产物与治疗后 LDL-C 水平相关。

4. 与其他组学方法的整合应用: 心血管疾病研究中新的代谢通路和生物标志物的发现依赖于基因组学、转录组学、蛋白组学和代谢组学的结合。

(1) 代谢组学与基因组学的整合: 全基因组关联研究(GWAS)已发现大量与临床相关代谢物的基因位点, Meta 分析已经证实, 与个体血清代谢物浓度如葡萄糖、胰岛素、血脂和尿酸等相关的位点高达 100 多个^[5]。将代谢组学与基因组学结合有助于更好地了解代谢物与疾病之间的关联。研究发现调节血浆 LDL-C 的单核苷酸多态性位点与心血管疾病的发生独立相关, 证实 LDL-C 水平与动脉粥样硬化形成相

表 2 代谢组学在心血管潜在生物标志物中的研究发现

分类	研究设计	研究人群	代谢物	体液/组织	分析技术
高血压	横断面	英国、美国、中国、日本(4 630)	3-羟基丁酸、 α -酮戊二酸、马尿酸以及二甲甘氨酸(肠道菌群发酵产物)	尿液	NMR ^[20]
心肌梗死	临床试验	诱导性心肌缺血(18), 对照(18)	柠檬酸途径	血浆	LC/MS ^[20]
	临床试验	PMI(20), 对照(16), SMI(12), 对照(9)	乌头酸、次黄嘌呤、三甲胺 N-氧化物、苏氨酸	血浆	LC/MS ^[21]
心脏衰竭	临床试验	缺血性心衰(15), 健康(20)	柠檬酸循环和脂肪酸代谢途径	尿液	NMR ^[24]
		缺血性心衰(52), 健康(57)	2-酮戊二酸(2-OG)、假尿苷	血浆	气相色谱(GC)/飞行时间(TOF)/MS ^[25]
动脉粥样硬化	临床试验	非 ST 段抬高急性冠脉综合征(9), 稳定性动脉粥样硬化(10), 健康(10)	4-羟基脯氨酸	血浆	GC/MS ^[26]
	临床试验	动脉粥样硬化(9), 健康(10)	24 个代谢产物变化(胰岛素抵抗)	血浆	NMR/GC/MS ^[27]
高血压	人群队列	正常血压黑人(896)	4-羟基马尿酸乙酯	血浆	NMR ^[22]
心肌梗死	人群队列	冠心病患者(314), 对照(314)	支链氨基酸	血浆	MS ^[23]

注: 括号内数据为人数; PMI: planned myocardial infarction

关。Kettunen等^[5]在大样本人群中利用GWAS和代谢组学计算血浆代谢产物的遗传度,发现11个新的与血浆脂质代谢产物相关的基因位点。

(2)代谢组学与蛋白质组学的整合:通过代谢组学和蛋白质组学的结合,可以更好地评估体内参与代谢的酶及其相应代谢产物的状态,从而更好地了解发病机制^[29],动脉粥样硬化一直以来被认为与血管内脂质沉积导致的慢性炎症反应相关,Mayr等^[30]利用代谢组学和蛋白质组学分析了载脂蛋白E缺陷的动脉粥样硬化小鼠模型的主动脉组织,发现在动脉粥样硬化中代谢物和蛋白质变化的相互关联,并且证实了氧化应激、能量代谢和炎症反应之间潜在的联系。在人群研究中,分析了手术中发生房颤者的右心房组织,蛋白质提取物使用双向凝胶电泳分析,发现蛋白质结构广泛发生变化,酮化过程产生能量的关键酶3-氧化酸CoA-转移酶异常表达。心脏的代谢物由高分辨率的NMR分析,早期代谢表达的变化表明房颤诱导 β -羟基丁酸盐、生酮氨基酸和甘氨酸的增加,这些都与酮化过程相关,验证了蛋白质组学的发现,提示房颤发生与能量代谢受损高度相关^[31]。为深入研究心衰与房颤的共同发病机制提供了线索。

通过代谢组学对心血管病的研究,可以进一步了解心血管病发病机制,从而探索到有效治疗方法和药物,评估相应治疗效果。

参 考 文 献

- [1] Hu YH, Liang ML. Preventive medicine inomics [J]. J Peking University: Health Sci, 2012, 44(3): 327-330. (in Chinese) 胡永华, 梁梦璐. 组学时代的预防医学[J]. 北京大学学报: 医学版, 2012, 44(3): 327-330.
- [2] Schnackenberg LK, Beger RD. Monitoring the health to disease continuum with global metabolic profiling and systems biology [J]. Pharmacogenomics, 2006, 7(7): 1077-1086.
- [3] Cardiovascular disease prevention and treatment research center in China, Ministry of Health. Report on Cardiovascular Diseases in China (2011) [M]. Beijing: Encyclopedia of China Publishing House, 2011. (in Chinese) 卫生部心血管病防治研究中心. 中国心血管病报告(2011) [M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2011.
- [4] Hu DY, Ding RJ. Thoughts on cardiovascular disease prevention and discipline [C]. Tianjin: Fifth Cardiology Meeting of Haihe, 2009. (in Chinese) 胡大一, 丁荣晶. 对心血管疾病预防和学科建设的一些思考 [C]. 天津: 第五届海河之滨心脏病学会议, 2009.
- [5] Kettunen J, Tukiainen T, Sarin A, et al. Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels [J]. Nature genetics, 2012, 44(3): 269-276.
- [6] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [7] Tang H, Wang Y. Metabonomics: a revolution in progress [J]. Progr Biochem Bioph, 2006, 33(5): 401.
- [8] Zhang M. The applications of metabonomics in the study of diabetes mellitus [J]. Med Recapitul, 2013, 19(5): 914-916. (in Chinese) 张敏. 代谢组学在糖尿病中的研究应用 [J]. 医学综述, 2013, 19(5): 914-916.
- [9] Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, et al. Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses [J]. Nature Biotechnol, 2005, 23(7): 833.
- [10] Lewis GD, Asnani A, Gerszten RE. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery [J]. J Amer College Cardiol, 2008, 52(2): 117-123.
- [11] Gavaghan CL, Wilson ID, Nicholson JK. Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA [J]. FEBS Letters, 2002, 530(1): 191-196.
- [12] Fonville JM, Richards SE, Barton RH, et al. The evolution of partial least squares models and related chemometric approaches in metabonomics and metabolic phenotyping [J]. J Chemometr, 2010, 24(11/12): 636-649.
- [13] Hu FB. Metabolic profiling of diabetes: from black-box epidemiology to systems epidemiology [J]. Clin Chem, 2011, 57(9): 1224-1226.
- [14] Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes [J]. Nature Med, 2011, 17(4): 448-453.
- [15] Wang Z, Tang WW, Cho L, et al. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(9): 1383-1391.
- [16] Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction [J]. Clin Chem, 2003, 49(4): 581-585.
- [17] Walldius G, Jungner I, Aastveit AH, et al. The apoB/apoA-I ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk [J]. Clin Chem Lab Med, 2004, 42(12): 1355-1363.
- [18] Zhu XF, Zhao CP. New heart failure biomarker-galectin 3 [J]. Internat J Cardiovascul Dis, 2013, 40(3): 170-172. (in Chinese) 朱雪峰, 赵翠萍. 心衰新标志物——半乳糖凝集素3 [J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(3): 170-172.
- [19] Ding Y. The research progress of the cardiovascular biomarkers [J]. Med Recapitul, 2011, 17(20): 3095-3099. (in Chinese) 丁瑜. 心血管生物标志物的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(20): 3095-3099.
- [20] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia [J]. Circulation, 2005, 112(25): 3868-3875.
- [21] Lewis GD, Wei RU, Liu E, et al. Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury [J]. J Clin Investig, 2008, 118(10): 3503.
- [22] Zheng Y, Yu B, Alexander D, et al. Metabolomics and incident hypertension among blacks. The atherosclerosis risk in communities study [J]. Hypertension, 2013, 62(2): 398-403.
- [23] Shah SH, Bain JR, Muehlbauer MJ, et al. Association of a peripheral blood metabolic profile with coronary artery disease and risk of subsequent cardiovascular events [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2010, 3(2): 207-214.
- [24] Kang S, Park J, Shin M, et al. H nuclear magnetic resonance based metabolic urinary profiling of patients with ischemic heart failure [J]. Clin Biochem, 2011, 44(4): 293-299.
- [25] Dunn WB, Broadhurst DI, Deepak SM, et al. Serum metabolomics reveals many novel metabolic markers of heart failure, including pseudouridine and 2-oxoglutarate [J]. Metabolomics, 2007, 3(4): 413-426.
- [26] Vallejo M, Garcia A, Tuñón J, et al. Plasma fingerprinting with GC-MS in acute coronary syndrome [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 394(6): 1517-1524.
- [27] Teul J, Rupérez FJ, Garcia A, et al. Improving metabolite knowledge in stable atherosclerosis patients by association and correlation of GC-MS and 1H NMR fingerprints [J]. J Proteome Res, 2009, 8(12): 5580-5589.
- [28] Kaddurah-Daouk R, Baillie RA, Zhu H, et al. Lipidomic analysis of variation in response to simvastatin in the cholesterol and pharmacogenetics study [J]. Metabolomics, 2010, 6(2): 191-201.
- [29] Mayr M, Madhu B, Xu Q. Proteomics and metabolomics combined in cardiovascular research [J]. Trends Cardiovasc Med, 2007, 17(2): 43-48.
- [30] Mayr M, Chung Y, Mayr U, et al. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(10): 2135-2142.
- [31] Mayr M, Yusuf S, Weir G, et al. Combined metabolomic and proteomic analysis of human atrial fibrillation [J]. J Am College Cardiol, 2008, 51(5): 585-594.

(收稿日期: 2013-09-18)

(本文编辑: 王玉立)