

代谢组学在心血管疾病方面的研究进展

于 正, 梁繁荣

成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075

通信作者: 梁繁荣 电话: 028-66875812, 电子邮件: lfr@cdutcm.edu.cn

摘要: 代谢组学是研究生物体被扰动后内源性代谢物变化规律的系统科学, 其在心血管疾病中的应用研究成为热点, 有望通过对心血管病患者的代谢轮廓分析找到有意义的生物标记物并探索疾病的发病机制。本文就研究现状做一综述, 并对其发展前景进行展望。

关键词: 代谢组学; 心血管疾病

中图分类号: R54 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2012)04-0413-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2012.04.020

Research Advance in Application of Metabonomics in Cardiovascular Diseases

YU Zheng, LIANG Fan-rong

College of Acu-Moxibustion and Tuina of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Corresponding author: LIANG Fan-rong Tel: 028-66875812, E-mail: lfr@cdutcm.edu.cn

ABSTRACT: Metabonomics is a systematic science that mainly studies the dynamic changes of endogenous metabolites after a biological system is stimulated or disturbed. Its application in cardiovascular diseases has increasingly been explored, with an attempt to find valuable biomarkers and explore the underlying pathogenesis of cardiovascular diseases by profiling the metabolism in these patients. This article summarized recent advances in this topic and outlines prospects for future developments.

Key words: metabonomics; cardiovascular disease

Acta Acad Med Sin, 2012, 34(4):413-417

代谢组学是研究生物体被扰动后(如基因的改变或环境变化后)代谢产物(内源性代谢物质)种类、数量及变化规律的科学, 其对生物体液中的小分子代谢物进行高通量的检测和数据处理, 寻找代谢物与生理病理变化的相对关系, 研究生物整体或组织细胞系统的动态代谢变化, 是系统生物学的重要组成部分。

近年来, 心血管疾病的发病率逐年增高, 而年

龄却趋向于低龄化, 在中国 40 岁以上人群的死亡原因中, 心、脑血管疾病是主要因素。心血管疾病大多发病隐蔽, 发病机制尚不清楚, 代谢组学可以研究生物体内的代谢变化, 也许通过对内生性代谢物变化的分析, 可以明确心血管疾病的发病机制, 甚至寻找到简单、无创的疾病检测及预测方法。本文就代谢组学近年来在心血管疾病的诊断及病理生理探寻中所取得的进展做一综述。

高血压

原发性高血压是多基因、多因素影响的疾病,其发病机制至今未能完全阐明, Bridle 等^[1]采用建立在氢谱核磁共振 (¹H-Nuclear Magnetic Resonance, ¹H-NMR) 基础上的代谢组学方法对不同血压水平人群进行血清代谢组学检测后发现,正常人与血压偏高和高血压患者之间存在代谢组学差异。

Akira 等^[2]选用自发性高血压脑卒中大鼠 (stroke-prone spontaneously hypertensive rats, SHRSP) 为模型, 以与模型组年龄相仿的正常血压大鼠为对照组, 使用基于¹H-NMR 的代谢组学方法分析两组大鼠的尿液代谢物, 得到尿样代谢轮廓, 通过主成分分析法 (principal component analysis, PCA) 分析复杂的 NMR 数据, 结果发现实验组大鼠尿液中牛磺酸、肌酸水平高于对照组, 但还有一些未知的代谢物浓度低于对照组, 而这种未知的代谢物在区分 SHRSP 与正常血压大鼠中有着重要意义, 之后 Akira 等^[3]针对这些未知的化合物又做了进一步研究, 使用配备有高保留极性化合物反相柱的液相色谱与核磁共振联用技术 (liquid chromatography-nuclear magnetic resonance, LC-NMR) 系统分析了 28 周龄正常血压大鼠的尿液, 发现这种未知的代谢物为丁二酰牛磺酸, 是正常血压大鼠的特征, 值得注意的一点是, 遗传性高血压大鼠比正常血压大鼠分泌更多的牛磺酸, 但是在遗传性高血压大鼠的身上却未检测到丁二酰牛磺酸的存在^[3]。对于这种新型代谢物的生物性及病理生理的进一步研究也许会有助于原发性高血压发病机制的探索。Akira 等^[4]还通过基于¹H-NMR 的代谢组学分析了年轻的自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 和正常血压大鼠的尿液代谢轮廓, 将 NMR 光谱数据使用总积分和肌酸酐积分标准化后, 采用 PCA 法分析得到的加载图可明确区分二者。肌酸酐积分标准化数据后可知尿液中的很多代谢物, 如柠檬酸盐、 α -酮戊二酸和苯酰氨基醋酸都低于正常血压对照组的大鼠, 可以作为区分 SHR 与正常血压大鼠的标记物, 这些代谢的改变可能与 SHR 的血压调节有关, 但是与大鼠品系差异的关系暂时还不能排除。

Lu 等^[5]用气象色谱-飞行时间质谱 (gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry, GC/TOFMS) 代谢组学分析了 SHR 与正常血压小鼠的血浆代谢物,

以及 SHR 与年龄相关的代谢变化, 共 187 个峰值去卷积后被定量, 其中 78 个被识别, 使用 PCA 和偏最小二乘法-判别分析 (projection to latent structure partial least-squares discriminant analysis, PLS-DA) 处理 GC/TOFMS 数据, 结果表明棕榈酸、亚油酸、油酸、硬脂酸、3-羟丁酸、肌酸酐、赤藓糖、肌肉肌醇、维生素 E、谷固醇、非酯化胆固醇等代谢物在模型组和对照组的血浆中含量有着明显的不同, 相对于正常血压小鼠, SHR 血浆中的非饱和脂肪酸含量明显增高, 并且这些代谢物的水平在 10~18 周的 SHR 血浆中亦有增高。这种游离脂肪酸和高血压的相关性提示, 游离脂肪酸是高血压疾病的潜在生物标记物, 而且其在自发性高血压的发展中起着重要的作用。

以上研究表明, 代谢组学是鉴别潜在生物标记物和研究高血压病理过程的有力工具, 而脂肪酸有可能成为识别高血压的生物标记物, 并且通过对脂肪酸代谢途径的进一步研究可以深入了解高血压的发病机制。

高脂血症

脂质在真皮沉积会引起黄色瘤, 长期的血脂增高会引起动脉粥样硬化, 产生冠心病和周围血管病, 但是大多数高脂血症患者并无明显的症状和体征。Zhang 等^[6]采用气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 结合多元统计分析对饮食诱导的高脂血症大鼠代谢物进行分析, 取大鼠高脂饮食前及高脂饮食期间 0、7、14、21、28d 的血浆, 通过工具检验其血脂水平, 利用 GC-MS 代谢组学分析, 使用 PCA 和 PLS-DA 处理数据, 41 种内生代谢物被分离、鉴定及定量, 并认为潜在的生物标记物有: β -羟基丁酸、酪氨酸和肌酸酐。这说明代谢组学可以全面提供动物模型疾病进程的生物化学轮廓, 利用代谢组学去识别病理生理状态有可能建立一个新的早期诊断人类疾病的方法学。

冠心病

心肌缺血的诊断对于冠心病诊断和治疗方法的选择都非常重要, 随着代谢组学技术的发展, 研究人员希望通过代谢组学的方法找到鉴别心肌缺血的生物标记物。Sabatine 等^[7]用液相色谱质谱联用 (LC/MS) 分析了 36 例患者运动负荷试验前后血液

中的代谢产物,将其中 18 例经心肌灌注显像诊断为可诱导性心肌缺血的患者作为试验组,剩余 18 例正常者为对照组,结果发现运动后,乳酸和一些代谢物包括骨骼肌一磷酸腺苷的分解代谢在两组都增加,但是还有多种代谢物在试验组中明显增多或减少,而在对照组中无改变,并发现运动负荷前后两组代谢产物的变化趋势出现不一致,柠檬酸循环的 23 个中间代谢物有 6 种变化显著,其中就包括柠檬酸,其可以准确区分试验组与对照组,这提示心肌缺血可能与能量代谢有关。

Barba 等^[8]利用基于 NMR 的代谢组学方法预测怀疑患有冠心病的患者是否会发生运动诱导的心肌缺血,该研究选取了 31 例怀疑有劳力型心绞痛但是无心肌梗死的患者,其中 22 例经单光子放射计算机断层显像显示有可逆的心肌灌注缺损者作为试验组,无可逆的心肌灌注缺损的 9 例作为对照组,两组患者年龄与临床症状都相似,运动负荷试验后都达到了最大心率,结果显示 84% 的患者可以被 PLS-DA 分析方法正确区分,主要的区分成分是乳酸盐,葡萄糖,一部分甲基、亚甲基脂和长链氨基酸。说明代谢组学分析可以预测怀疑患有冠心病患者的运动可诱导性心肌缺血的发生,从而做到早期预防。

目前冠心病的诊断方法主要是冠状动脉造影术,是冠心病诊断的金标准,确诊率高,但是有创伤性,Brindle 等^[9]通过¹H-NMR 的模式识别方式分析血浆可以正确诊断冠心病,还可以评价其严重程度,其特异性大于 90%。该研究认为代谢组学可以作为一项精确的、非侵袭性的诊断冠心病的技术应用于临床,而且适用于群体筛查以及疗效的评估。

心力衰竭

Kang 等^[10]通过基于核磁共振的代谢组学方法分析了缺血性心力衰竭患者的尿液代谢物,试图了解心力衰竭的代谢途径,找到其特征性标记物,该研究将 15 例原发性缺血性心力衰竭患者作为试验组,20 例健康者作为对照组,分析数据后结果显示,心力衰竭组醋酸盐和丙酮水平较健康组高,并且还伴有甲基丙二酸的代谢紊乱。心力衰竭患者与健康组相比,尿液中还有胞嘧啶和苯乙酰甘氨酸的升高与 1-甲基烟酰胺的降低。心力衰竭患者柠檬酸循环代谢物和脂肪酸代谢的改变提示与能量代谢有关。

充血性心力衰竭可导致心肌重构,增加心房纤

颤的敏感性,但目前对其潜在的机制却了解甚少。De Souza 等^[11]应用高通量的蛋白质组学和代谢组学分析了假手术组的充血性心力衰竭狗的左心室心肌细胞和组织,蛋白质提取物使用双向凝胶电泳分析,心脏的代谢物由高分辨率的 NMR 分析,发现蛋白质结构广泛发生变化,结蛋白和细丝蛋白的碎片提示结构损害,而且电子显微镜也证实了这一点。心脏保护的热休克蛋白也发生了广泛的改变,一些蛋白(HSP27、HSP60、HSP70)快速增加,而另一些蛋白(GRP78、 α -B-crystallin、HSP90)延迟增加,苹果酸脱氢酶(DH)、 α -/β-烯醇酶和丙酮酸脱氢酶(E1 的 α -亚基组成部分)的早期上调和大量酶的推迟下调以及伴随的代谢变化提示针对代谢应激有一个不断变化的适应性反应,早期代谢表达的变化表明充血性心力衰竭的发展诱导葡萄糖和丙氨酸浓度的增加,并得出结论,充血性心力衰竭导致心房蛋白组和代谢组发生事件依赖性变化,这为深入了解导致心律失常的心肌重构的分子机制做出了贡献。

动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是多种原因引起的复杂性疾病,不仅与遗传有关,环境也是很重要的因素之一,研究内生化合物的代谢变化可以深入了解动脉粥样硬化的发展。Zha 等^[12]用 GC/MS 分析高脂饮食喂养的仓鼠血清代谢物,使用 PCA 和 PLS-DA 处理数据,结果显示模型动物从正常发展到高胆固醇血症,进一步发展为早期的动脉粥样硬化,都是具有时间依赖性的,21 种化合物被检测到可以作为动脉粥样硬化发展的生物标记物。这些鉴定的化合物提示,氨基酸新陈代谢和脂肪酸氧化在胆固醇超载后明显被扰乱,这些数据提供了高胆固醇血症和动脉粥样硬化连续性的病理生理过程的新信息。

讨 论

自从 1999 年代谢组学被提出及运用于各个领域后,如每项技术一样,代谢组学在不断地发展和完善,在进行代谢组学研究的过程中,所用的样本基本上都是生物体液,如血液、尿液、泪液、唾液等,标本的易采集性也为代谢组学的发展提供了良好的基础,但是是否体液的代谢物就能充分反映生物体的代谢状态呢?与生物体组织相比,是否会遗漏某

些重要的信息呢? 肝脏对大多数生化反应来说是很重要的组织器官, 其对代谢组学的研究意义引起了很多科学家的关注, 但是将肝组织应用于代谢组学的研究中, 最棘手的问题是选用合理的有机溶剂将其溶解及提取。Gu 等^[13]通过实验得到提取率最高的溶剂为甲醇-水, 然后将高脂血症仓鼠和对照组正常仓鼠身上提取的肝组织使用有机溶剂溶解, 利用 GC/TOF-MS 分析其代谢变化, 使用 PCA 和 PLS-DA 处理数据, 发现相较于对照组, 实验组的代谢物有明显变化。对比同一只动物的肝组织和血清代谢物, 发现有相同的生物标记物, 而肝的代谢物提供了更多的补充信息。研究结果提示, 肝脏的代谢组学是一项很有意义的技术, 其所提供的信息比生物体液更加丰富, 检测组织的代谢组学方法对于代谢组学的研究来说非常重要, 系统的生物流体分析和自身组织分析相结合意义深远。

代谢组学的发展不仅止于此, 还包括技术和数据分析方法的提高, 这些都促进代谢组学更好地运用于其他研究领域。在心血管疾病的研究中, 近年来代谢组学使用无创的方法寻找疾病的生物标记物, 甚至比传统的检测方法更加敏感, 提高了疾病的确诊率, 但是具有挑战性的下一步是: 被检测到的代谢物是生物标记物还是引向了未知的另一个病理过程? 如心血管疾病普遍为大家所接受的指标为总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白等, 针对这些高危因素所采取的措施已经降低了心血管疾病的发病率和死亡率, 但是 Bernini 等^[14]在近期研究中发现, 使用代谢组学的方法, 除了可以通过这些常见的普通标记物将高血压受试者区分为高危组和低危组外, 3-羟基丁酸、 α -酮戊二酸、苏氨酸以及二甲甘氨酸等以往被认为与心血管疾病无关的代谢物也可达到同样的目的。这个结果是否提示心血管疾病还有其他的危险因素没有被发现? 或者还存在某些未知的机制? 都值得进一步研究。

展 望

心血管疾病(包括脑血管病)的死亡率已居各种疾病之首, 并且还在逐年上升, 因此势必成为医学领域研究的热点。但是迄今多种心血管疾病的发病机制仍不明确, 缺乏特效的治疗方法和药物, 病死率和病残率高, 预后差^[15], 这种现状迫切需要改变。伴随基因组学、蛋白质组学的研究及发展, 研

究人员在同样的指导思想下提出了代谢组学, 因其主要关注的是代谢物, 而基因和蛋白表达的微小改变都会在代谢物上得到放大, 代谢物的数量级又远远小于基因和蛋白的数目, 从而弥补了基因组学和蛋白质组学等微观研究中的缺点。

代谢组学在医学领域的应用不仅可用于诊断, 还可以评估疾病的临床病程、患者的预后、手术或者药物的疗效等, 而了解代谢的特征模式还可以帮助人们了解疾病的病理进程, 拓宽对特殊疾病的认识, 因此通过代谢组学对心血管疾病的研究, 希望可以更进一步地了解心血管疾病的发病机制, 从而探索到有效的治疗方法和药物, 评估相应治疗的效果。

代谢组学研究起步不久, 还有很多缺点, 如: 不能将生物体内的代谢物全面涵盖, 有可能导致信息的丢失; 代谢物受环境因素影响多, 波动大, 导致数据可信度不高等, 但是随着越来越多的科研人员开始进行深入的研究, 代谢组学必将会有非常广阔的前景, 不仅能帮助人们了解生物体中各种复杂的相互作用和代谢关系, 还能在临床上发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Bridle JT, Nicholson JK, Schofield PM, et al. Application of chemometrics to NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension [J]. *Analyst*, 2003, 128(1):32-36.
- [2] Akira K, Imachi M, Hashimoto T. Investigations into biochemical changes of genetic hypertensive rats using ^1H nuclear magnetic resonance-based metabonomics [J]. *Hypertens Res*, 2005, 28(5):425-430.
- [3] Akira K, Mitome H, Imachi M, et al. LC-NMR identification of a novel taurine-related metabolite observed in (^1H NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5):1091-1096.
- [4] Akira K, Masu S, Imachi M, et al. ^1H NMR-based metabonomic analysis of urine from young spontaneously hypertensive rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(3):550-556.
- [5] Lu Y, A J, Wang G, et al. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabonomic approach to differentiating hypertension- and age-related metabolic variation in spontaneously hypertensive rats [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(18):2882-2888.
- [6] Zhang Q, Wang G, A J, et al. Metabonomic profiling of di-

- et-induced hyperlipidaemia in a rat model [J]. *Biomarkers*, 2010, 15(3):205-216.
- [7] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2005, 112(25):3868-3875.
- [8] Barba I, de León G, Martín E, et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics predicts exercise-induced ischemia in patients with suspected coronary artery disease [J]. *Magn Reson Med*, 2008, 60(1):27-32.
- [9] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using H-NMR-based metabonomics [J]. *Nature Med*, 2002, 8(12):1439-1444.
- [10] Kang SM, Park JC, Shin MJ, et al. ¹H nuclear magnetic resonance based metabolic urinary profiling of patients with ischemic heart failure [J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(4):293-299.
- [11] De Souza AI, Cardin S, Wait R, et al. Proteomic and metabolomic analysis of remodelling in congestive heart failure [J]. *Cell Cardiol*, 2010, 49(5):851-863.
- [12] Zha W, A J, Wang G, et al. Metabonomic characterization of early atherosclerosis in hamsters with induced cholesterol [J]. *Biomarkers*, 2009, 14(6):372-380.
- [13] Gu S, A J, Wang G, et al. Metabonomic profiling of liver metabolites by gas chromatography-mass spectrometry and its application to characterizing hyperlipidemia [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(3):245-252.
- [14] Bernini P, Bertini I, Luchinat C, et al. The cardiovascular risk of healthy individuals studied by NMR metabonomics of plasma samples [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(11):4983-4992.
- [15] 杨惟莎. 我国心血管疾病学文献 (1990~2003) 计量分析 [J]. *国际医药卫生导报*, 2004, 10(14):238-240.

(收稿日期: 2011-08-31)