DOI:10.16016/j.1000-5404.202011212

急性心肌梗死患者血浆的脂质代谢特征与潜在生物标志物研究

茹文鑫,胡 汉,周 婷,韩 颖,杨 清,高玉霞 300052 天津,天津医科大学总医院心血管内科

[**摘要**] **目的** 比较急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)患者与冠脉正常者的血浆脂质代谢物差异,深入了解 AMI 的病生理机制;寻找 AMI 可能的新型生物标志物。**方法** 纳入于 2019 年 9 月 20 日至 2020 年 1 月 20 日在天津医科大学总医院心血管内科行冠状动脉造影检查的受试者,根据冠脉造影结果分为心梗组(32 例),同时设置年龄、性别与之匹配的对照组(32 例)。利用代谢组学对心梗组血样进行非靶向脂质组学分析,了解 AMI 患者脂质代谢的变化,比较两组之间脂质代谢物的差异,使用单变量和多变量统计分析寻找有意义的差异代谢物,并采用受试者工作曲线评价差异代谢物的诊断效能,探讨 AMI 患者受干扰的代谢途径。**结果** ①正交偏最小二乘法模型及聚类热图表明心梗组与对照组之间存在明显的分离趋势,多变量统计分析共鉴定出 28 个差异血浆脂质代谢物,在心梗组 16 个脂质分子的浓度显著升高,而 12 个浓度显著降低;②包括甘油二酯(diglyceride,DG)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine,PS)在内的 10 个脂质代谢分子与 AMI 的风险增加相关;包括磷脂酰肌醇、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、溶血磷脂酰胆碱、甘油三酯在内的 13 个阴性预测因子与 AMI 的风险降低相关。③采用受试者工作曲线鉴定出 2 个 AMI 可能的生物标志物 PS(27:0)和 DG(16:0/18:1),其曲线下面积(area under the curve,AUC)分别为 0.976 和 0.807;④AMI 患者受干扰的代谢途径,包括甘油磷脂代谢、鞘脂、嘌呤和嘧啶代谢,其中以甘油磷脂代谢紊乱最明显。**结论** AMI 患者的脂质代谢特征显著改变,共鉴定出 28 个差异性脂质代谢分子,其中甘油磷脂代谢途径紊乱最显著;确定 PS(27:0)和 DG(16:0/18:1)为诊断 AMI 潜在的生物标志物。

[**关键词**] 急性心肌梗死;脂质组学;脂质代谢物质;生物标志物
[**中图法分类号**] Q591.5; R446.112; R542.22 [**文献标志码**] A

Characteristics of plasma lipid metabolism and potential biomarkers in patients with acute myocardial infarction

RU Wenxin, HU Han, ZHOU Ting, HAN Ying, YANG Qing, GAO Yuxia Department of Cardiovascular Diseases, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin, 300052, China

[**Abstract**] **Objective** To compare the differences in plasma lipid metabolites between the patients with acute myocardial infarction (AMI) and those with normal coronary artery in order to explore the pathophysiologic mechanism and search for possible new biomarkers of AMI. **Methods** The patients undergoing coronary angiography in our hospital from September 20, 2019 to January 20, 2020 were enrolled in this study. According to the results, they were divided into myocardial infarction group (AMI group, $n=32$) and control group (age- and sex-matched with the AMI group, $n=32$). Non-targeted lipidomics analysis was performed on the blood samples to find the differences of lipid metabolites between the 2 groups. Univariate and multivariate statistical analyses were applied to explore the meaningful differential metabolites, and receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic efficiency of the selected differential metabolites. Finally, how to disturb metabolic pathways was investigated in the AMI patients. **Results** ①The orthogonal projection to latent structure discriminant analysis (OPLS-DA) and cluster heat

[**通信作者**] 高玉霞,E-mail: tjgaoyuxia@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

map showed that there was a significant trend of separation between AMI group and the control group. Multivariate statistical analysis identified totally 28 differential plasma lipid metabolites, including 16 of them significantly increased and 12 decreased in the AMI group. ②There were 10 lipid metabolites such as diglyceride (DG) and phosphatidyl serine (PS) associated with an increased risk of AMI, while 13 negative predictors, including phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), lytic phosphatidylcholine (LPC) and triglyceride (TG), were associated with a reduced risk of AMI. ③ROC curve identified 2 possible biomarkers of AMI, namely, PS (27:0) (AUC=0.976) and DG(16:0/18:1) (AUC=0.807); ④The disturbed metabolic pathways included metabolism of glycerol phospholipid, sphingomyelin, purine and pyrimidine in the AMI patients, among which the disorder of glycerophospholipid metabolism was the most signficant. **Conclusion** The characteristics of lipid metabolism are significantly changed in AMI patients; a total of 28 differential lipid metabolites are identified, among which the disorder of glycerol phospholipid metabolism pathway indicates the most significant. PS and DG may act as the potential biomarkers for the diagnosis of AMI.

[**Key words**] acute myocardial infarction; lipidomics; lipid metabolites; biomarkers

Corresponding author: GAO Yuxia, E-mail: tjgaoyuxia@126.com

心血管疾病及其主要并发症是全球范围内死亡和残疾的主要原因,每年造成1 780万人死亡[1],其中冠状动脉性心脏病(coronary artery disease,CAD)占35岁以上人群死亡总数的三分之一[2-3]。目前我国心血管病患病率仍处于持续上升时期,估算的现患心血管人数约为3.30亿,其中冠心病占1 100万[4]。急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)是冠心病中较严重、危害大的病症之一,具有起病急骤、发展迅速、复杂多变、并发症多、病死率高等特点。CAD的一大特征是新陈代谢异常,心脏中的代谢变化导致生物流体的代谢组发生变化[5]。近几十年来,越来越多的代谢组学技术用于动脉粥样硬化[6]、心肌缺血[7]、心力衰竭[8]和高血压[9]等疾病的研究,为研究疾病机理和鉴定生物标志物提供了一种新颖的方法。脂质组学是代谢组学的一个分支,是以系统为基础研究所有脂质及其与之相互作用的分子以及它们在细胞内的功能。芬兰的一项队列显示,两种神经酰胺的比率Cer(d18:1/16:0)/Cer(d18:1/24:0)使冠心病的预测率提高了9%[10]。这一比率已经应用于梅奥医学中心的临床实践,成为第一个用于心血管疾病的脂质体生物标记物,并展示了利用脂质体组学识别新的脂类生物标记物的潜力[11]。大量队列研究发现,血浆长链多不饱和脂肪酸与心血管疾病的高风险相关[12],而血浆omega-3和omega-6多不饱和脂肪酸水平与心血管疾病的低风险相关[13-14]。迄今为止,关于急性心肌梗死患者脂质组学的研究较少,本研究将代谢谱分析技术与液相色谱、高灵敏度电喷雾质谱技术相结合,应用于从急性心肌梗死患者以及年龄、性别与之匹配的冠脉正常的对照者获得的血液样本进行非靶向脂质组学分析,以观察AMI患者的脂质代谢特征发生的改变,鉴定可能支持AMI临床诊断的生物标志物以及特定的脂质代谢产物信息。

1 资料与方法

1.1 对象与分组

本研究获得天津医科大学总医院伦理委员会的批准(IRB2021-WZ-008),纳入2019年9月20日至2020年1月20日在本院心血管内科因胸痛、心电图缺血性改变、心肌标志物升高而接受冠状动脉造影检查并诊断为急性心肌梗死的患者。急性心肌梗死的诊断依据2018年欧洲心脏病学会发布的心肌梗死全球统一定义(第四版),具体为心肌坏死生物标记物的典型升高和(或)降低(优选肌钙蛋白),至少有一次超过健康人群的第99百分位值,并有以下至少1项心肌缺血的证据:①心肌缺血临床症状;②心电图出现新的心肌缺血变化(ST段抬高或下降);③心电图出现病理性Q波;④影像学证据显示新的心肌活力丧失或区域性室壁运动异常[15]。对照组纳入的是同期行冠状动脉造影检查,检查结果显示冠状动脉正常的受试者。排除标准:陈旧性心肌梗死;NYHA Ⅲ~Ⅳ级的心力衰竭;糖尿病病史;恶性肿瘤病史;慢性阻塞性肺疾病;心律失常(高度房室传导阻滞、室颤等);先天性心脏病、心肌病、风湿性心脏病;肝肾功能异常;血液系统疾病;甲状腺功能异常;妊娠或哺乳期妇女;有明确细菌、病毒感染、急慢性炎症和免疫性疾病者。所有受试者均签署了知情同意书。

1.2 血样及临床资料收集

采集所有受试者的年龄、性别、身高、体质量以及

心脏病相关危险因素等基线资料。受试者在入院后第2天晨起空腹(禁食水至少8 h)状态下接受血液学和生化检查。使用带有新鲜乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝剂的紫帽真空采血管抽取受试者外周静脉血5 mL,将血样以3 000×*g* 离心10 min以分离上清液(血浆),然后将其分装、冷冻并保存在-80 ℃冰箱,直至进一步代谢组学分析。

1.3 质量控制样本的制备

等量取各组样本混合为质控样本,用于测定进样前仪器状态及平衡色谱-质谱系统,每运行8个真实样本后,插入1个质控样本,用于评价整个实验过程中系统稳定性。

1.4 样本制备

在进行液相色谱-质谱分析前,将血浆和质控样本解冻,并使用4 ℃水浴冷冻。取100 μL血浆注入样品瓶中,加入200 μL水和20 μL内标脂质混合物,涡旋混合2 min后加入800 μL甲基叔丁基醚涡旋混合,再加入240 μL预冷甲醇涡旋混合。将混合物低温水浴中超声20 min后,室温放置30 min,然后以10 ℃、14 000×*g* 离心15 min,取上层有机相用氮气吹干。质谱分析时加入200 μL 90%异丙醇/乙腈溶液复溶,充分涡旋,最后取90 μL复溶液,10 ℃、14 000×*g* 离心15 min,取上清液进样分析。

1.5 色谱

使用UHPLC Nexera LC-30A超高效液相色谱仪(SHIMADZU)将2 μL等分试样的预处理样品注入保持在45 ℃的2.1×100 mm(1.7 μm)Waters, ACQUITY UPLC CSH-C18色谱中,流速300 μL/min,将制备好的两组血浆样本进行检测。二元梯度洗脱系统由正离子模式的A =乙腈水溶液($V_{乙腈}$:$V_{水}$=6:4),B =乙腈异丙醇溶液($V_{乙腈}$:$V_{异丙醇}$=1:9)组成,负离子模式由A=乙腈异丙醇溶液和B=乙腈水溶液组成。使用以下线性梯度可实现分离:30%B,维持2 min;2~25 min,增加到100%B;25~35 min,B维持在30%。整个分析过程中样品置于10 ℃自动进样器中。为避免仪器检测信号波动而造成的影响,采用随机顺序进行样本的连续分析。

1.6 质谱

采用配备双电喷雾电离(ESI)源的Q-Exactive Plus质谱仪(Thermo Scientific™)收集质谱数据。电离以正离子(ESI+)或负离子(ESI-)模式运行。加热器温度设置为300 ℃,护套气体流量45 arb,辅气流量15 arb,扫描气体流量1 arb,喷淋电压3.0 kV,毛细管温度350 ℃,S-Lens射频等级50%,MS^1扫描范围:200~1 800。脂质分子和脂质碎片的质量电荷比(M/Z),按照下列方法采集:每次全扫描后采集10个碎片图谱(MS^2 scan,HCD)。MS^1在M/Z为200时分辨率为70 000,MS^2在M/Z为200时分辨率为17 500。

1.7 数据预处理和注释

采用LipidSearch (Thermo Scientific™)软件对脂质分子及内标脂质分子进行峰识别、峰提取、脂质鉴定(二级鉴定)等处理。统计描述时,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布数据采用 $M(P_{25},P_{75})$ 表示。符合正态分布的计数资料组间比较采用Student's t 检验,非正态分布采用Mann-Whitney U检验,$P<0.05$ 表示组间差异具有统计学意义。进行代谢组学分析时,将标准化数据导入SIMCA-P 11.5软件(Umetrics AB, Umeå, Sweden)以进行多变量数据分析。首先使用主成分分析模型(principal component analysis, PCA)观察两组间样本的总体分布趋势和差异度,提供聚类趋势和离群值的全面视图,然后采用偏最小二乘判别分析(partial least-squares discriminant analysis, PLS-DA)模型建立脂质表达量与样品组别之间的关系模型,从数据中集中筛选出与分组相关的差异脂类物质。在此基础上滤除与分类信息无关的噪音,建立正交偏最小二乘判别分析(orthogonal projection to latent structure discriminant analysis, OPLS-DA)模型以进一步提高模型的解析能力和有效性。利用OPLS-DA模型中的变量权重值(variable importance for the projection, VIP)挖掘具有生物学意义的差异脂质分子。本实验以OPLS-DA的VIP>1和P<0.05为显著性差异脂质分子筛选标准。采用7次迭代的置换测试验证有监督的OPLS-DA模型的稳健性并评估过度拟合的程度。

2 结果

2.1 基线资料比较

与对照组相比,心梗组的高血压患者与吸烟人数较多,白细胞计数、低密度脂蛋白胆固醇、纤维蛋白原水平较高,但体质指数、高密度脂蛋白胆固醇、左室射血分数水平较低,这些差异均具有统计学意义($P<0.05$)。尽管两组之间的年龄、性别在统计学上没有显著差异($P>0.05$),但与对照组相比,心梗组患者的平均年龄较大,男性比例较高(表1)。

2.2 基于超高效液相色谱-质谱分析的血浆代谢谱分析

2.2.1 两组脂质代谢物的单变量统计分析 基于超高效液相色谱-质谱分析。从心梗组和对照组中获得了阳和阴性模式的26种脂质亚类,共831个脂质分子,包括阳离子模式下的450个和阴离子模式下的371个脂质分子。差异性脂质分子定义为变异倍数>

1.5 或<0.67,P<0.05。从 831 个脂质分子中共鉴定出 68 个差异性脂质分子(表 2)。火山图结果见图 1,可以明显观察到由急性心肌梗死引起的显著变化的脂质分子。与对照组相比,心梗组图示虚线左边的代谢物(蓝色)表达显著下调,虚线右边的代谢物(红色)表达显著上调(P<0.05)。

表 1 心梗组与对照组基线资料的比较 [n=32,例(%),$\bar{x}\pm s$,$M(P_{25},P_{75})$]

变量	对照组	心梗组	$\chi^2/t/Z$	P
男性	12(37.50)	18.00(56.25)	2.259	0.133
年龄/岁	62.38±4.76	64.34±5.07	−1.602	0.114
BMI	25.72±4.05	23.78±3.48	2.052	0.044
高血压	11(34.38)	20(62.50)	5.067	0.024
吸烟	7(21.88)	17(53.13)	6.667	0.010
家族史				
高血压	4(12.50)	3(9.38)	0.160	0.689
冠心病	7(21.88)	9(28.13)	0.333	0.564
糖尿病	1(3.13)	1(3.13)	0.001	1.000
临床指标				
收缩压/mmHg	130.78±17.05	134.59±20.84	−0.800	0.787
舒张压/mmHg	76.81±9.74	81.03±15.39	−1.310	0.903
心率/min^{-1}	71.91±8.64	75.53±18.02	−1.026	0.309
白细胞计数/$\times10^9\cdot L^{-1}$	6.27±1.62	8.28±1.89	−4.586	0.000
总胆固醇/$mmol\cdot L^{-1}$	4.48±1.14	4.74±0.76	−1.085	0.282
甘油三酯/$mmol\cdot L^{-1}$	1.26(0.99,1.88)	1.54(1.16,1.86)	−0.900	0.368
高密度脂蛋白胆固醇/$mmol\cdot L^{-1}$	1.43(1.14,1.57)	1.14(1.01,1.38)	2.317	0.021
低密度脂蛋白胆固醇/$mmol\cdot L^{-1}$	2.32±0.85	2.87±0.66	−2.896	0.005
葡萄糖/$mmol\cdot L^{-1}$	5.10(4.70,5.50)	5.15(4.70,6.10)	−0.875	0.382
肌酐/$mmol\cdot L^{-1}$	55.50(50.50,62.00)	62.50(53.00,73.00)	−1.922	0.055
尿酸/$mmol\cdot L^{-1}$	304.13±62.72	330.44±66.63	−1.627	0.109
纤维蛋白原/$g\cdot L^{-1}$	2.86(2.60,3.21)	3.12(2.88,3.82)	−2.451	0.014
左室舒张末径/mm	46.19±4.09	48.25±4.55	−1.907	0.061
左室射血分数(%)	64.00(63.00,65.00)	52.00(45.00,57.00)	6.914	0.001

表 2 心梗组与对照组单变量差异性脂质分子

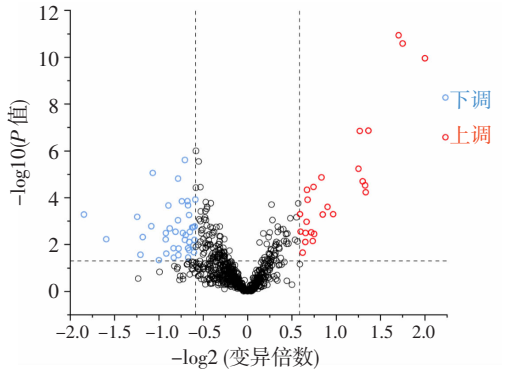
脂质分子	类别	保留时间/min	理论质荷比	变异倍数	P
PS(26:1)-H	PS	2.93	648.39	3.259	0.001
PS(28:2)-H	PS	3.11	674.40	3.362	0.001
PS(27:0)-H	PS	3.08	664.42	4.002	0.001
PS(30:1)-H	PS	8.75	704.45	2.572	0.001
PS(27:0)-H	PS	8.88	664.42	2.406	0.001
LPC(18:0p)+H	LPC	3.33	508.38	0.669	0.001
So(d18:1)+H	So	2.47	300.29	0.613	0.001
SM(d36:2+hO)+H	SM	8.03	745.59	2.381	0.001
PS(18:0/18:1)-H	PS	11.31	788.54	0.477	0.001
DG(16:0/18:1)+NH4	DG	13.34	612.56	1.783	0.001
LPC(18:3)+HCOO	LPC	1.95	562.32	0.581	0.001
SM(d30:2+pO)+H	SM	3.38	661.49	2.458	0.001
PC(29:6p)+H	PC	3.53	664.43	2.509	0.001
DG(16:0/18:2)+NH4	DG	12.48	610.54	1.676	0.001
PI(18:1/20:4)-H	PI	9.27	883.53	0.668	0.001
DG(18:1/18:1)+NH4	DG	13.40	638.57	1.591	0.001

表 2 续下页

续表 2

脂质分子	类别	保留时间/min	理论质荷比	变异倍数	*P*
SM(d33:2+hO)+H	SM	4.96	703.54	2.521	0.001
LPC(18:1p)+H	LPC	3.20	506.36	0.665	0.001
DG(18:1/20:4)+NH4	DG	12.29	660.56	1.600	0.001
LPC(18:4)+H	LPC	2.17	516.31	0.625	0.001
PI(18:1/18:2)-H	PI	9.45	859.53	0.599	0.001
PC(38:7)+H	PC	8.81	804.55	0.628	0.001
PS(18:0/20:4)-H	PS	10.37	810.53	0.539	0.001
DG(16:0/20:4)+NH4	DG	12.20	634.54	1.870	0.001
SM(d38:3+pO)+H	SM	8.02	771.60	1.953	0.001
DG(18:1/18:2)+NH4	DG	12.55	636.56	1.507	0.001
PC(21:4)+H	PC	2.19	572.33	1.800	0.001
TG(20:5/18:2/20:5)+NH4	TG	16.42	940.74	0.278	0.001
PE(20:0/20:4)-H	PE	12.53	794.57	0.633	0.001
TG(18:3/18:2/22:6)+NH4	TG	17.17	942.75	0.422	0.001
PC(34:5)+H	PC	8.41	752.52	0.581	0.001
DG(16:1/18:2)+NH4	DG	11.59	608.52	1.586	0.001
TG(18:3/18:2/20:5)+NH4	TG	16.82	916.74	0.472	0.002
PS(41:6)-H	PS	8.73	848.54	0.662	0.002
LPC(20:5)+H	LPC	2.29	542.32	0.654	0.002
PI(18:1/20:4)-H	PI	9.53	883.53	0.649	0.002
PC(18:3/18:2)+HCOO	PC	8.92	824.54	0.545	0.002
DG(18:0/18:1)+NH4	DG	14.47	640.59	1.514	0.003
TG(18:2/18:2/22:6)+NH4	TG	18.11	944.77	0.570	0.003
LPC(20:5)+HCOO	LPC	1.88	586.32	0.637	0.003
DG(18:2/20:4)+NH4	DG	11.52	658.54	1.645	0.003
LPE(18:3)-H	LPE	2.03	474.26	0.603	0.003
PC(21:3)+H	PC	2.49	574.35	1.573	0.003
TG(18:3/18:2/22:5)+NH4	TG	17.64	944.77	0.528	0.003
DG(18:1/22:6)+NH4	DG	11.98	684.56	1.684	0.004
LPE(20:1)-H	LPE	4.20	506.33	0.617	0.004
TG(18:3/18:2/18:3)+NH4	TG	17.18	892.74	0.441	0.005
TG(20:5/18:2/22:6)+NH4	TG	16.82	966.75	0.332	0.006
LPC(17:0)+H	LPC	3.06	510.36	0.528	0.006
TG(18:3/18:2/20:4)+NH4	TG	17.70	918.75	0.613	0.006
PC(16:1/20:5)+HCOO	PC	8.49	822.53	0.661	0.006
PC(21:0)+H	PC	3.28	580.40	1.665	0.007
TG(12:0/18:2/18:2)+NH4	TG	17.52	816.71	0.634	0.008
PC(19:1)+H	PC	2.83	550.35	1.571	0.008
LPC(19:1)+HCOO	LPC	3.31	580.36	0.655	0.011
PC(14:0/18:3)+HCOO	PC	8.52	772.51	0.668	0.013
TG(18:2/20:4/22:6)+NH4	TG	17.72	968.77	0.561	0.014
TG(18:0/20:4/20:5)+NH4	TG	19.64	946.79	0.628	0.014
LPE(20:5)-H	LPE	1.94	498.26	0.583	0.015
TG(16:1/18:3/18:3)+NH4	TG	17.44	866.72	0.634	0.018
TG(18:3/18:2/18:3)+NH4	TG	17.52	892.74	0.658	0.022
PC(19:2)+H	PC	2.27	548.33	1.539	0.022
TG(16:1/18:3/22:6)+NH4	TG	17.47	916.74	0.530	0.024
TG(18:2/22:6/22:6)+NH4	TG	17.23	992.77	0.433	0.027
TG(12:0/18:2/18:3)+NH4	TG	16.69	814.69	0.582	0.028
TG(16:1/18:2/22:6)+NH4	TG	18.02	918.75	0.629	0.036
TG(18:3/18:2/18:2)+NH4	TG	18.04	894.75	0.562	0.036
LPC(22:1)+H	LPC	5.66	578.42	0.500	0.046

PS:磷脂酰丝氨酸;LPC:溶血磷脂酰胆碱;So:鞘氨醇;SM:鞘磷脂;DG:甘油二酯;PI:磷脂酰肌醇;TG:甘油三酯;PE:磷脂酰乙醇胺;LPE:溶血磷脂酰乙醇胺



每个圆圈代表某一种脂质代谢分子心梗组/对照组比值,红蓝色代表变化有差异的脂质分子,蓝色代表该种脂质分子在心梗组浓度降低,红色代表升高

图 1　心梗组与对照组差异性脂质分子火山图分析

2.2.2　两组脂质代谢物的多维统计分析　　采用 PCA 以非监督的数据分析方法检查分组趋势和离群值。尽管在 PCA 得分图中未观察到心梗组和对照组之间明确的分离趋势(图 2),但没有极端异常需要排除。PCA 模型的得分图还显示了质控样品的紧密聚集,表明整个分析期间仪器的可重复性良好。

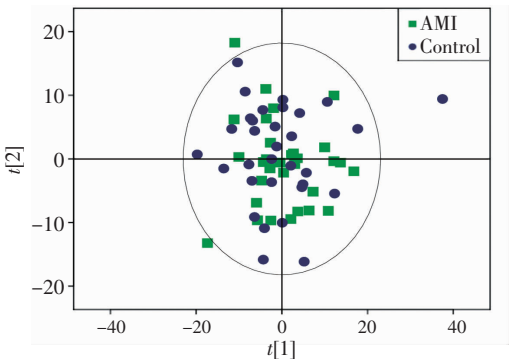
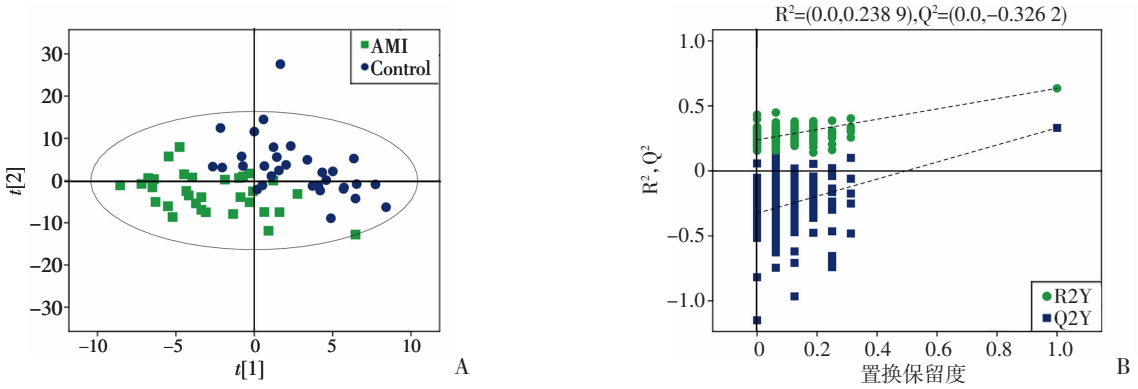


图 2　心梗组(绿色)和对照组(蓝色)以及质控样本(粉色)的 PCA 得分图

初步概述后,对数据进行 PLS-DA 分析,心梗组和对照组样本分布在两个相对独立的区域中,表明在总体水平上两组之间的脂质代谢物差异显著(图 3A)。经 7 次循环交互验证得到 PCA 模型参数用于评价模型质量,包括参数 R^2X,R^2Y 和 Q^2,其中 R^2 代表模型的有效性,并表示拟合的优度,而 Q^2 代表模型预测的准确性。排列后的数据计算的所有拟合优度值(R^2 和 Q^2)都低于右侧相应的原始点,并且 Q^2 回归线具有负截距(图 3B),表明分离模型具有统计意义,其高预测性不是随机的,也不是过度拟合引起的。结果显示,$Q^2=0.327$,证明该模型稳定性较好。

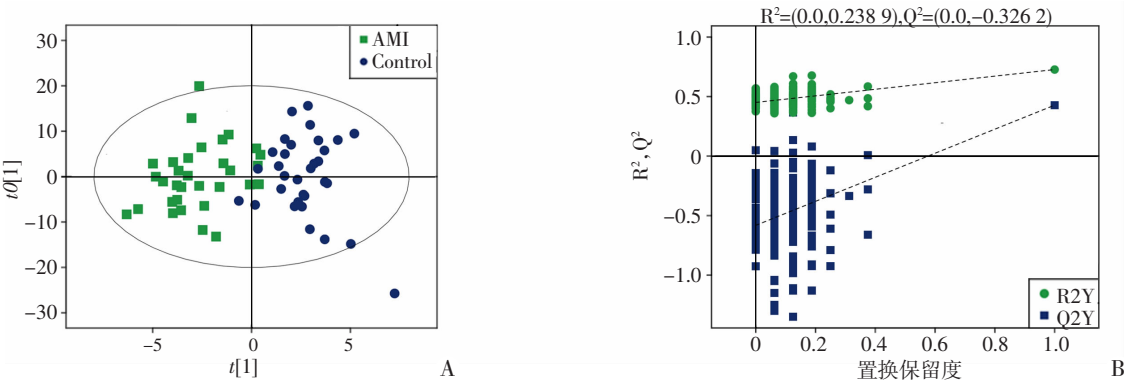
为提高模型的解析能力和有效性,滤除与分类信息无关的噪音,进一步采用 OPLS-DA 分析,结果显示两组间清晰的分离趋势(图 4A)。OPLS-DA 置换试验结果表明,OPLS-DA 模型随着置换保留度逐渐降低,随机模型的 R^2 和 Q^2 均逐渐下降,原模型不存在过拟合现象,模型稳健性良好(图 4B)。

由 OPLS-DA 模型得到的 VIP 能够用于衡量各脂质分子的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力,挖掘具有生物学意义的差异脂质分子。以 OPLS-DA 的 VIP>1 和 $P<0.05$ 为显著性差异脂质分子筛选标准,最终鉴定出 28 个显著性差异性脂质分子(表 3)。这些脂质分子所属的脂质亚类绝对定量之间的差异显示,两组间总甘油三酯(triglyceride,TG)、鞘磷脂(sphingomyelin,SM)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamines,PE)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine,PC)未见明显差异。心梗组总磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol,PI)、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine,LPC)明显低于对照组,而总甘油二酯(diglyceride,DG)明显高于对照组($P<0.01$,图 5)。



A:心梗组(绿色)与对照组(蓝色)PLS-DA 得分图;B:PLS-DA 置换试验验证图

图 3　心梗组与对照组 PLS-DA 分析图



A:心梗组(绿色)和对照组(蓝色)OPLS-DA 得分图;B:OPLS-DA 置换试验验证图

图 4 心梗组与对照组 OPLS-DA 分析图

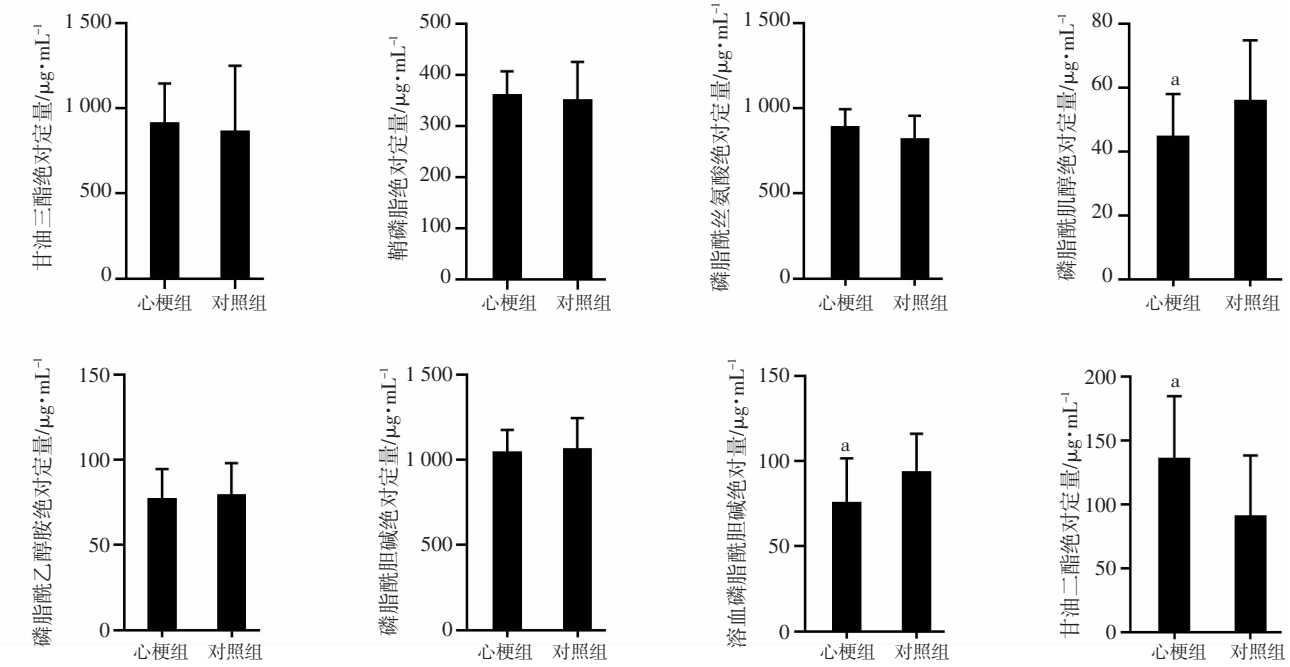
表 3 心梗组/对照组显著差异性脂质分子的受试者工作曲线参数

脂质分子	类别	VIP 值	变异倍数	*P*	AUC	约登指数	特异度(%)	敏感度(%)
PS(27:0)-H	PS	1.172	4.002	0.000	0.976	0.88	96.88	90.63
DG(16:0/18:1)+NH4	DG	1.559	1.783	0.000	0.807	0.53	84.38	68.75
DG(16:0/18:2)+NH4	DG	2.845	1.676	0.000	0.794	0.47	65.63	81.25
DG(18:1/18:1)+NH4	DG	3.041	1.591	0.000	0.783	0.50	65.63	84.38
LPC(16:0)+HCOO	LPC	2.982	0.869	0.018	0.776	0.56	87.50	68.75
DG(18:1/20:4)+NH4	DG	1.743	1.600	0.000	0.769	0.47	90.63	56.25
DG(16:0/20:4)+NH4	DG	1.019	1.870	0.000	0.765	0.47	68.75	78.13
LPC(18:0)+HCOO	LPC	2.789	0.805	0.007	0.764	0.50	71.88	78.13
LPC(18:1)+HCOO	LPC	1.783	0.799	0.026	0.761	0.53	75.00	78.13
DG(18:1/18:2)+NH4	DG	5.499	1.507	0.001	0.758	0.50	59.38	90.63
PS(37:0)-H	PS	6.027	1.207	0.000	0.754	0.41	90.63	50.00
DG(18:1/22:6)+NH4	DG	1.261	1.684	0.004	0.746	0.47	75.00	71.88
LPC(18:2)+HCOO	LPC	2.783	0.736	0.010	0.737	0.44	78.13	65.63
DG(16:1/18:2)+NH4	DG	1.261	1.586	0.001	0.733	0.34	84.38	50.00
DG(18:2/20:4)+NH4	DG	1.896	1.645	0.003	0.731	0.41	84.38	56.25
LPC(20:5)+H	LPC	1.403	0.654	0.002	0.731	0.38	75.00	62.50
PS(37:1)-H	PS	7.515	1.131	0.003	0.726	0.44	53.13	90.63
PC(34:2e)+H	PC	1.451	0.749	0.002	0.726	0.38	84.38	53.13
PC(38:6)+H	PC	1.357	0.762	0.002	0.714	0.41	75.00	65.63
PI(18:0/20:4)-H	PI	2.548	0.802	0.010	0.710	0.44	75.00	68.75
PC(36:4)+H	PC	2.910	0.680	0.010	0.687	0.41	59.38	81.25
TG(16:0/18:1/18:2)+NH4	TG	6.860	1.201	0.015	0.672	0.31	65.63	65.63
TG(18:3/18:2/18:2)+NH4	TG	1.506	0.562	0.036	0.662	0.34	65.63	68.75
PC(16:1p/18:0)+HCOO	PC	1.085	0.821	0.024	0.662	0.28	34.38	93.75
SM(d42:1)+HCOO	SM	1.812	1.143	0.036	0.639	0.31	43.75	87.50
PE(16:0/22:6)-H	PE	1.287	1.227	0.047	0.636	0.28	75.00	53.13
SM(d22:1/18:0)+HCOO	SM	2.102	1.123	0.046	0.630	0.31	34.38	96.88
PS(39:3)-H	PS	2.619	0.802	0.044	0.609	0.22	50.00	71.88

PS:磷脂酰丝氨酸;DG:甘油二酯;LPC:溶血磷脂酰胆碱;PI:磷脂酰肌醇;SM:鞘磷脂;TG:甘油三酯;PE:磷脂酰乙醇胺

2.2.3 聚类分析 为了评价差异脂质的合理性,全面直观地显示样本之间的关系以及脂质在不同样本中的表达模式差异,利用显著性差异脂质的表达量对各组样本进行层次聚类。结果见图 6,每行代表一个差异脂质分子(即纵坐标为显著性差异表达的脂质分子),每列代表一组样本(即横坐标为样本信息)。红色代表显著性上调脂质分子,绿色代表显著性下调脂质分子,颜色深浅表示上下调的程度,表达模式接近的

脂质分子聚在左侧同一簇下。与对照组相比,包括 PS(37:0)、PS(37:1)、SM(d22:1/18:0)、SM(d:42:1)、DG(16:0、20:4)等 16 个脂质分子在心梗组的表达显著性上调,而包括 PI(18:0/20:4)、LPC(18:1)、LPC(18:2)、TG(18:3/18:3/18:2)等 12 个脂质分子在心梗组的表达显著性下调。



a:$P<0.01$,与对照组比较

图 5　组间差异性脂质分子涉及的脂质亚类绝对定量量比较（$n=32, \bar{x}\pm s$）

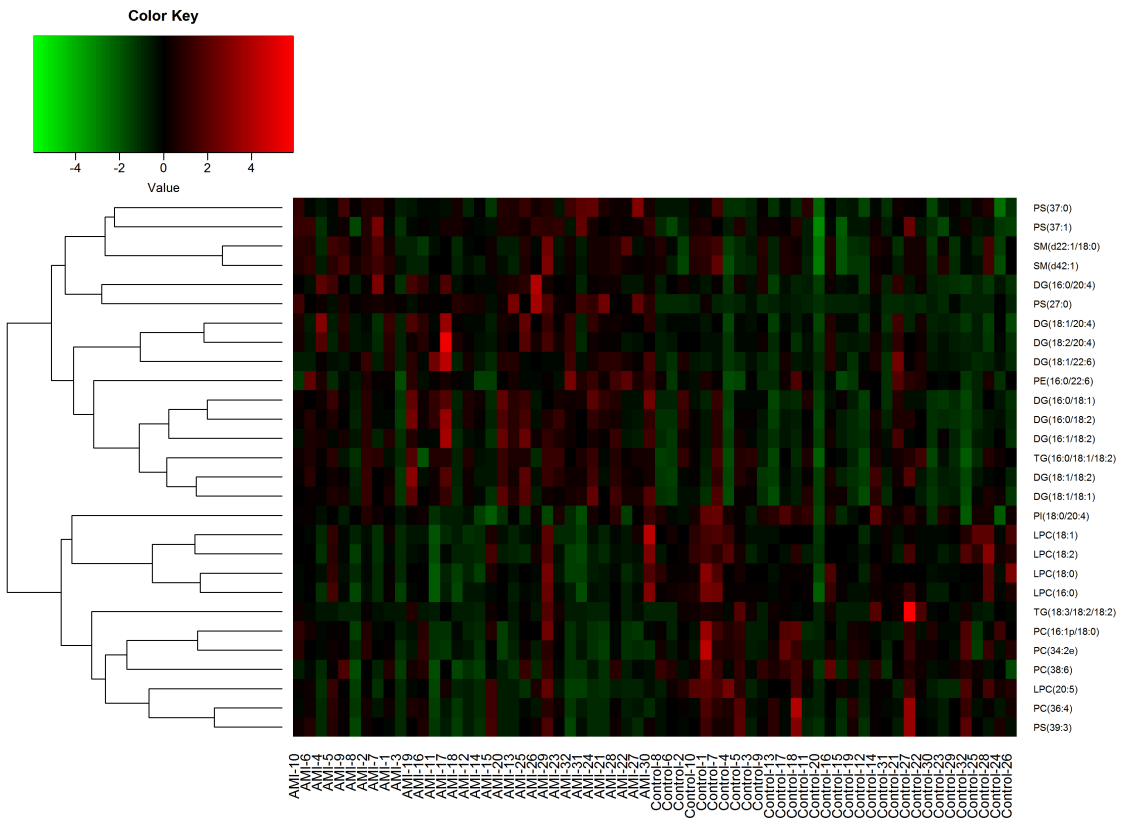
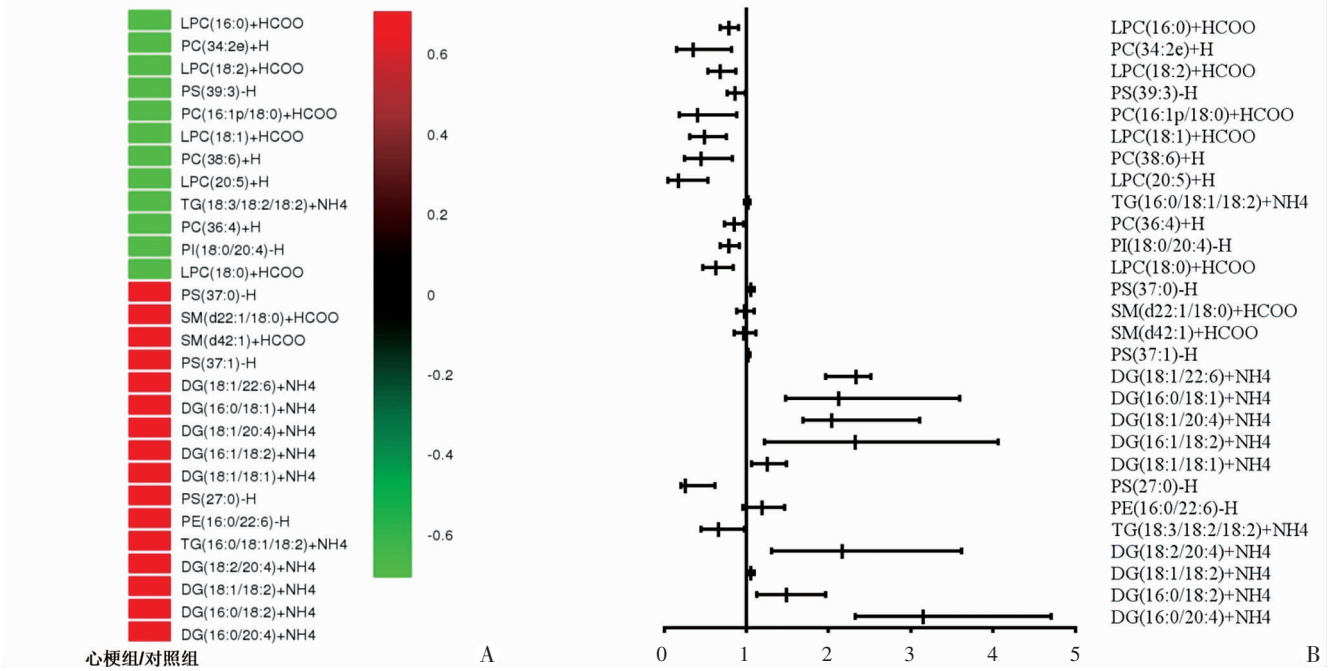


图 6　显著差异性脂质分子聚类热图

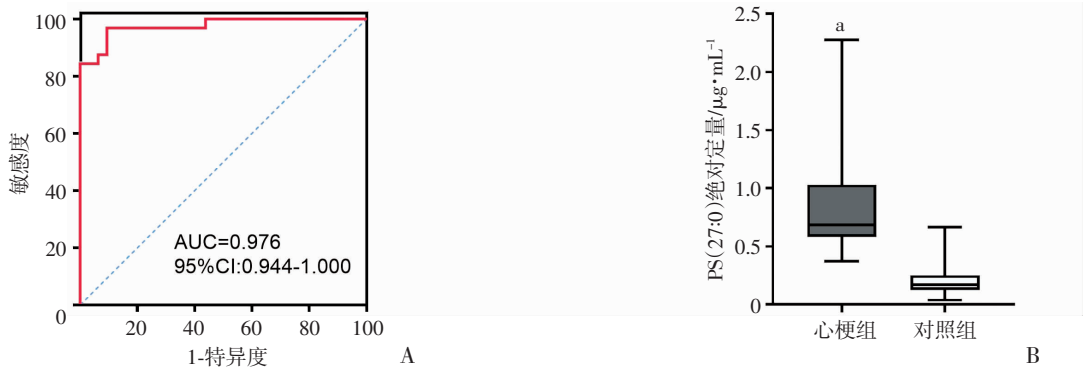
2.2.4　急性心肌梗死发病风险　差异性脂质代谢分子的平均标准化量热图可以更加清楚地比较两组之间脂质代谢分子的变化,其中红色代表与对照组相比,心梗组对应脂质分子的浓度升高,绿色代表降低(图7A),颜色越深代表变化越大。为了验证差异性脂质代谢分子与AMI相关,在调整年龄、性别、BMI、吸烟、高血压、LDL-C后,使用Logistic回归模型评估急性心肌梗死的风险。对于28个脂质代谢分子,包括DG和PS在内的10个脂质代谢分子与AMI的风险增加1.01~4.71倍相关;包括PI、PC、PS、LPC、TG在内的13个阴性预测因子与AMI的风险降低5%~99%相关(图7B)。

2.2.5　评估生物标志物的诊断潜力　为了评价这些差异性脂质分子的诊断价值,构建了28个差异代谢物的受试者工作曲线(receiver operating characteristic, ROC),其中有2个脂质分子的曲线下面积(area under curve, AUC)值大于0.8,即PS(27:0, AUC=0.976)和DG(16:0/18:1, AUC=0.807),表明其具有良好的诊断价值(图8A,图9A),并且与对照组相比,这两种代谢物在心梗组的浓度是升高的,差异具有统计学意义($P<0.05$,图8B、图9B),这表示血浆中脂质分子PS(27:0)和DG(16:0/18:1)可能作为区分AMI患者和冠脉正常的受试者的潜在的生物标志物。



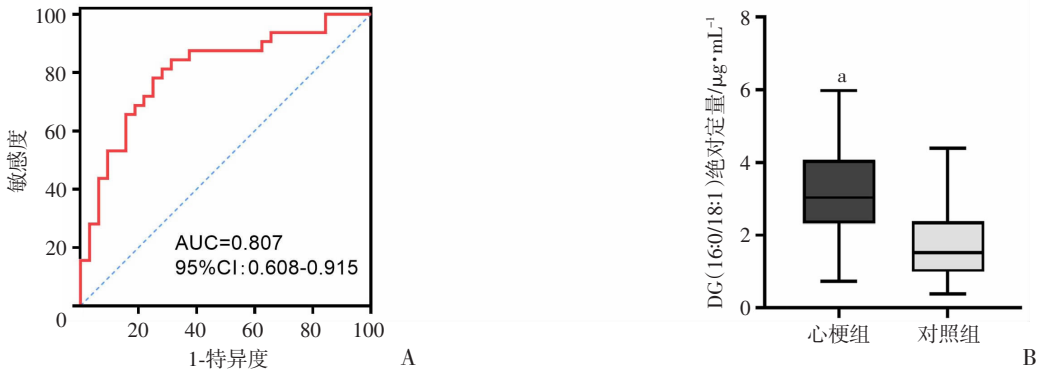
A:心梗组/对照组显著差异性脂质分子平均标准化量热图;B:心梗组/对照组发病风险森林图

图7　两组间显著差异性脂质分子与AMI发病风险分析



A:脂质分子PS(27:0)受试者工作曲线;B:两组脂质分子PS(27:0)绝对定量比较　a:$P<0.01$,与对照组比较

图8　脂质分子PS(27:0)受试者工作曲线及组间定量差异比较



A:脂质分子 DG(16:0/18:1)受试者工作曲线;B:两组脂质分子 DG(16:0/18:1)绝对定量 a:$P<0.01$,与对照组比较

图 9 脂质分子 DG(16:0/18:1)受试者工作曲线及组间定量差异比较

2.3 代谢途径改变

在京都基因与基因组百科全书通路数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway, KEGG Pathway)的基础上分析鉴定差异性脂质分子所处的代谢途径,与对照组相比,心梗组受干扰的代谢途径,包括甘油磷脂、鞘脂、嘌呤和嘧啶代谢,其中以甘油磷脂代谢紊乱最明显(图 10)。

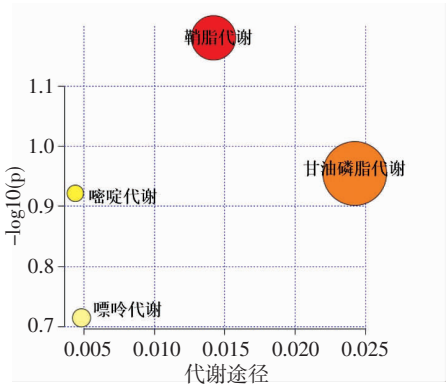


图 10 心梗组受干扰的代谢途径

3 讨论

与炎症和氧化应激相关的脂质代谢改变是与动脉粥样硬化斑块形成相关的病理变化的主要驱动因素之一[16]。本研究表明脂质组学方法能够区分 AMI 患者与对照组之间的差异。此外,通过比较 AMI 患者和冠脉健康对照者,证实了特定差异性脂质代谢产物的存在和受干扰的代谢途径。

本研究发现 AMI 患者总 DG 水平升高。DG 是众所周知的蛋白激酶 C 的变构激活剂,已证明 DAG 可以激活特定的蛋白激酶 C 亚型,其激活与胰岛素抵抗有关[17]。另外,DG 也与高血压有关。含有棕榈酸(16:0)的 DG 已被证明与高血压具有显著统计学上的遗传相关性[18]。高血压、血糖异常和肥胖都与动脉粥样硬化的发病机理密切相关。此外,本研究结果还证明脂质分子 DG(16:0/18:1)+NH4 对 AMI 有着良好的诊断能力,其诊断特异性 84.38%,敏感性 68.75%,有望成为 AMI 可能的生物标志物。

尽管未观察到两组间总 TG 的显著差异,但脂质分子 TG(16:0/18:1/18:2)在 AMI 组显著升高。据报道,含有饱和脂肪酸的链长为 12:0~16:0的 TG 会增加血清总胆固醇和 LDL-C,而血浆总胆固醇和 LDL-C 的升高是动脉粥样硬化的重要致病因素之一[19]。

本研究结果表明甘油磷脂代谢是最显著受干扰的途径。包括 PC、LPC、PE、LPE、PS、PI 等在内的多种亚类都属于甘油磷脂代谢通路,之前的研究[20]也支持本试验的结果。

磷脂参与冠心病的几种病理生理过程,例如细胞凋亡、自噬、增殖和炎症。PC 是真核细胞中最重要的磷脂之一,是哺乳动物心脏中的主要磷脂,人类心肌细胞组成的 PC 约 40%[21]。本研究发现,与对照组相比,AMI 患者 4 种脂质分子 PC(34:2e)、PC(38:6)、PC(38:6)、PC(16:1p/18:0)显著降低。在心脏组织中,已有研究报道在缺氧或局部缺血期间磷脂酰胆碱合成的抑制作用。研究提示灌注缺氧的心脏中磷脂酰胆碱合成受到抑制,缺氧也会损害分离的大鼠心室肌细胞中的磷脂酰胆碱的合成[22],在再灌注的大鼠心脏中显示出缺血后胆碱的净损失[23]。有研究认为 ATP 和 CTP 的耗尽是磷脂酰胆碱合成减少的原因[24]。

溶血磷脂酰胆碱主要来源于 PC,血浆中的一大部分 LPC 是由卵磷脂糖蛋白胆固醇酰基转移酶产生的,另一部分主要在组织中通过分泌型磷脂酶 A2 水解磷脂酰胆碱获得[25]。本研究显示,与对照组相比,AMI 患者总 LPC 降低,脂质分子 LPC(16:0)、LPC(18:0)、LPC(18:1)、LPC(18:2)、LPC(20:5)显著降低。ZHU 等[26]观察到 MI 患者的 LPC(18:2)、LPC (16:0)、LPC (18:1)显著降低。与本研究的差异在于他们的样本

是在急性心肌梗死后的1~6个月内收集的[26]。有趣的是,可以观察到在心肌梗死急性期患者中发现的差异标志物LPC(18∶2)、LPC(16∶0)、LPC(18∶1)也存在于疾病的慢性期。

AMI组总PI显著低于对照组,并且PI(18∶0/20∶4)与AMI发病风险呈负相关(*OR*=0.79,95%*CI*:0.68~0.92)。PI在磷脂酶A2的作用下生成花生四烯酸,花生四烯酸是前列腺素和其他二十碳二烯酸生物合成所必需的。这些花生四烯酸参与单核细胞和巨噬细胞的激活,并与基质金属蛋白酶的产生相关,基质金属蛋白酶的产生是斑块不稳定的标志[27]。与本研究结果类似,之前的研究表明不稳定型冠心病患者的总PI比稳定型冠心病患者低13.6%,且证明包括PI 36∶4、PI 38∶4、PI 40∶4等在内的9种PI与不稳定型冠心病呈负相关[28]。

AMI组PS含量显著增加,并且发现PS(27∶0)的AUC高达97.6%,特异性96.88%,敏感性90.63%,有可能成为潜在的诊断AMI的生物标志物。PS能够在PS-PLA1的作用下水解暴露在凋亡细胞或是活化的血小板等细胞表面的PS,产生LPS[29]。LPS可能具有一些重要的生理作用,尽管来自临床和基础研究的证据仍然不足,但有研究而表明LPS可能与人类受试者中5-羟色胺(血小板活化的生物标记物)显著相关,参与血小板的激活过程,从而参与ACS的发病过程[30]。

本试验还发现AMI患者SM的升高。鞘脂是生物膜结构的重要组成成分,包括SM、脑苷脂和神经节苷脂三类,其信号转导通路受应激(包括氧化应激)的影响而改变,并与细胞的增殖和死亡以及心肌细胞和血管平滑肌细胞的收缩密切相关[31]。SM是巨噬细胞泡沫细胞形成和动脉粥样硬化形成的中心致病环节。以前的研究显示高SM血浆水平与冠状动脉疾病相关。在一项病例对照研究中,冠心病组血浆SM水平高于对照组,血浆SM水平和SM/(SM+PC)比值对冠心病有独立的预测价值,人血浆SM水平与冠心病呈正相关且独立相关[32],与本研究结果一致。

综上所述,本研究提供了原理上的证据,即血浆非靶向脂质代谢组学可以准确区分AMI患者与对照组,具体表现为:①AMI患者的脂质代谢特征发生了显著改变,脂质组学共鉴定出28个差异脂质代谢分子;②脂质亚类的变化与AMI发生风险相关,DG和PS的变化与AMI的风险增加相关;PI、PC、PS、LPC、TG的变化与AMI的风险降低相关;③脂质组学鉴定出两种可能支持AMI临床诊断的生物标志物PS(27∶0)(AUC=0.976)和DG(16∶0/18∶1,AUC=0.807);④AMI患者受干扰的代谢途径包括甘油磷脂代谢、鞘脂、嘌呤和嘧啶代谢,其中以甘油磷脂代谢紊乱最明显。代谢特征和AMI事件之间关联的阐明提供了有关生物学机制的新信息,这可能为AMI更有效的治疗提供线索。

参考文献:

[1] GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2018, 392(10159): 1736-1788. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.

[2] BENJAMIN E J, VIRANI S S, CALLAWAY C W, *et al*. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2018, 137(12): e67-e492. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000053.

[3] FORD E S, AJANI U A, CROFT J B, *et al*. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000[J]. N Engl J Med, 2007, 356(23): 2388-2398. DOI: 10.1056/NEJMsa053935.

[4] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告2019概要[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(9): 833-854. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2020.09.001.
Writing Group for Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2019: an updated summary[J]. Chin Circ J, 2020, 35(9): 833-854. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2020.09.001.

[5] USSHER J R, ELMARIAH S, GERSZTEN R E, *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. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.09.972.

[6] WANG X, WANG D, WU J, *et al*. Metabolic characterization of myocardial infarction using GC-MS-based tissue metabolomics[J]. Int Heart J, 2017, 58(3): 441-446. DOI: 10.1536/ihj.16-432.

[7] 吴炜, 王怡宁, 代静文, 等. 原发性心肌病诊断新路径:从高分辨影像到分子精准医学[J]. 协和医学杂志, 2019, 10(1): 12-16. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.2019.01.002.
WU W, WANG Y N, DAI J W, *et al*. New clinical diagnostic pathway of primary cardiomyopathy: from high-resolution imaging to molecular precision medicine[J]. Med J PUMCH, 2019, 10(1): 6-10. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.2019.01.002.

[8] LANFEAR D E, GIBBS J J, LI J, *et al*. Targeted metabolomic profiling of plasma and survival in heart failure patients[J]. JACC Heart Fail, 2017, 5(11): 823-832. DOI: 10.1016/j.jchf.2017.07.009.

[9] ZHENG Y, YU B, ALEXANDER D, *et al*. Metabolomics and incident hypertension among blacks: the atherosclerosis risk in communities study[J]. Hypertens Dallas Tex, 2013, 62(2): 398-403. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01166.

[10] LAAKSONEN R, EKROOS K, SYSI-AHO M, *et al*. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond

LDL-cholesterol[J]. Eur Heart J, 2016, 37(25): 1967-1976. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw148.

[11] RELTON C L, GAUNT T, MCARDLE W, *et al*. Data resource profile: accessible resource for integrated epigenomic studies (ARIES)[J]. Int J Epidemiol, 2015, 44(4): 1181-1190. DOI: 10.1093/ije/dyv072.

[12] IMAMURA F, LEMAITRE R N, KING I B, *et al*. Long-chain monounsaturated fatty acids and incidence of congestive heart failure in 2 prospective cohorts[J]. Circulation, 2013, 127(14): 1512-1521,1521e1-18. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001197.

[13] DEL GOBBO L C, IMAMURA F, ASLIBEKYAN S, *et al*. Omega-3 polyunsaturated fatty acid biomarkers and coronary heart disease: pooling project of 19 cohort studies[J]. JAMA Intern Med, 2016, 176(8): 1155-1166. DOI: 10.1001/jamainternmed.2016.2925.

[14] MARKLUND M, WU J H Y, IMAMURA F, *et al*. Biomarkers of dietary omega-6 fatty acids and incident cardiovascular disease and mortality: an individual-level pooled analysis of 30 cohort studies[J]. Circulation, 2019, 139(21): 2422-2436. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038908.

[15] AGEWALL S, BELTRAME J F, REYNOLDS H R, *et al*. ESC working group position paper on myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries[J]. Eur Heart J, 2017, 38(3): 143-153. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw149.

[16] QUEHENBERGER O, DENNIS E A. The human plasma lipidome[J]. N Engl J Med, 2011, 365(19): 1812-1823. DOI: 10.1056/NEJMra1104901.

[17] KOLCZYNSKA K, LOZA-VALDES A, HAWRO I, *et al*. Diacylglycerol-evoked activation of PKC and PKD isoforms in regulation of glucose and lipid metabolism: a review[J]. Lipids Health Dis, 2020, 19(1): 113. DOI: 10.1186/s12944-020-01286-8.

[18] EGAN B M. Plasma lipidomic profile signature of hypertension in Mexican American families: specific role of diacylglycerols[J]. Hypertension, 2013, 62(3): 621-626. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01633.

[19] KRIS-ETHERTON P M, YU S. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies[J]. Am J Clin Nutr, 1997, 65: 1628S-1644S. DOI: 10.1016/S0271-5317(97)00070-5.

[20] LU J, CHEN B, CHEN T, *et al*. Comprehensive metabolomics identified lipid peroxidation as a prominent feature in human plasma of patients with coronary heart diseases[J]. Redox Biol, 2017, 12: 899-907. DOI: 10.1016/j.redox.2017.04.032.

[21] FLOEGEL A, KÜHN T, SOOKTHAI D, *et al*. Serum metabolites and risk of myocardial infarction and ischemic stroke: a targeted metabolomic approach in two German prospective cohorts[J]. Eur J Epidemiol, 2018, 33(1): 55-66. DOI: 10.1007/s10654-017-0333-0.

[22] SARRI E, GARCIA-DORADO D, ABELLAN A, *et al*. Effects of hypoxia, glucose deprivation and acidosis on phosphatidylcholine synthesis in HL-1 cardiomyocytes. CTP: phosphocholine cytidylyltransferase activity correlates with sarcolemmal disruption[J]. Biochem J, 2006, 394(Pt 1): 325-334. DOI: 10.1042/BJ20050834.

[23] BRÜHL A, HAFNER G, LÖFFELHOLZ K. Release of choline in the isolated heart, an indicator of ischemic phospholipid degradation and its protection by ischemic preconditioning: no evidence for a role of phospholipase D[J]. Life Sci, 2004, 75(13): 1609-1620. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.03.019.

[24] SUTTER I, KlINGENBERG R, OTHMAN A, *et al*. Decreased phosphatidylcholine plasmalogens—A putative novel lipid signature in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction[J]. Atherosclerosis, 2016, 246: 130-140. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.003.

[25] LAW S H, CHAN M L, MARATHE G K, *et al*. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5). DOI: 10.3390/ijms20051149.

[26] ZHU M, HAN Y, ZHANG Y, *et al*. Metabolomics study of the biochemical changes in the plasma of myocardial infarction patients[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1017. DOI: 10.3389/fphys.2018.01017.

[27] WHITE A J, DUFFY S J, WALTON A S, *et al*. Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodelling: implications for unstable coronary disease[J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(4): 813-820. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.05.003.

[28] MEIKLE P J, WONG G, TSOROTES D, *et al*. Plasma lipidomic analysis of stable and unstable coronary artery disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(11): 2723-2732. DOI: 10.1161/atvbaha.111.234096.

[29] YANG Q, GUO M, ZHOU Y, *et al*. Phosphatidylserine-specific phospholipase A1 is the critical bridge for hepatitis C virus assembly[J]. Virol Sin, 2019, 34(5): 521-537. DOI: 10.1007/s12250-019-00123-2.

[30] KURANO M, DOHI T, NOJIRI T, *et al*. Blood levels of serotonin are specifically correlated with plasma lysophosphatidylserine among the glycero-lysophospholipids[J]. BBA Clin, 2015, 4: 92-98. DOI: 10.1016/j.bbacli.2015.08.003.

[31] YANO M, WATANABE K, YAMAMOTO T, *et al*. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice[J]. J Biol Chem, 2011, 286(5): 3992-4002. DOI: 10.1074/jbc.M110.179176.

[32] JIANG X C, PAULTRE F, PEARSON T A, *et al*. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20: 2614-2618. DOI: 10.1161/01.atv.20.12.2614.

(收稿:2020-11-22;修回:2021-02-06)

(编辑 汪勤俭)