心、肺、泌尿疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000971

急性 ST 段抬高型心肌梗死患者的血清代谢组学研究

吴倩怡[1]，阎江洪[2]，梁小雪[1]，胡舒鹏[1]，罗素新[1]，夏　勇[3]

（1. 重庆医科大学附属第一医院心血管内科，重庆 400016；2. 重庆医科大学生命科学院，重庆 400016；
3. 美国俄亥俄州立大学心肺研究所，俄亥俄州 43210）

[摘　要]目的：分析急性 ST 段抬高型心肌梗死（acute ST-segment elevation myocardial infarction，ASTEMI）患者的血清，找出特异性的代谢产物。方法：运用超高效液相色谱与四级杆飞行时间串联质谱仪联用技术（ultraperformance liquid chromatography/electrospray ionization quadruple time-of-flight mass spectrometry，UPLC-Q-TOF-MS/MS）和多维统计分析结合单维统计分析的方法，比较 ASTEMI 患者组（n=15）和健康对照组（n=10）的血清。同时采用化学发光法检测 ASTEMI 患者组（n=15）和健康对照组（n=10）血清中的硫酸脱氢表雄酮（dehydroepiandrosterone sulfate，DHEAS）含量，进一步证实 ASTEMI 患者的部分代谢组学研究结果。结果：经 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析后发现 ASTEMI 患者组和健康对照组具有不同的代谢特征。在多维统计分析中，主成分分析（principal component analysis，PCA）和偏最小二乘判别分析（partial least squares discriminant analysis，PLS-DA）结果显示 ASTEMI 患者组和健康对照组分布在不同区域。结合多维统计分析和单维统计分析方法，发现 ASTEMI 患者组血清中至少有 9 个代谢产物明显不同于健康对照组。经过代谢组学研究发现的部分差异（ASTEMI 患者组血清中的 DHEAS 含量明显低于健康对照组），进一步采用化学发光法检测证实（P=0.000）。结论：通过代谢组学分析发现 ASTEMI 患者血清代谢水平明显不同于健康对照者。在 ASTEMI 患者血清中至少有 9 个代谢产物与该疾病相关。这些发现可能提供关于 ASTEMI 患者代谢改变的新见解。

[关键词]急性 ST 段抬高型心肌梗死；代谢组学；超高效液相色谱与四级杆飞行时间串联质谱仪联用技术；硫酸脱氢表雄酮

[中国分类号]R542.2+2　　[文献标志码]A　　[收稿日期]2015-03-29

Serum metabolomics in patients suffered from acute ST segment elevation myocardial infarction

Wu Qianyi[1], *Yan Jianghong*[2], *Liang Xiaoxue*[1], *Hu Shupeng*[1], *Luo Suxin*[1], *Xia Yong*[3]

(*1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;*
2. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University;
3. Davis Heart and Lung Research Institute, The Ohio State University College of Medicine)

[Abstract] ***Objective***: To identify the specific metabolic changes by performing the metabolomics analyses on the serum of patients suffered from acute ST-segment elevation myocardial infarction (ASTEMI). ***Methods***: Ultraperformance liquid chromatography/electrospray ionization quadruple time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) and multivariate statistical analysis combined with statistical analysis unit were used to analyze the serum of ASTEMI patients group (n=15) in comparison with the healthy control group (n=10). Further chemiluminescence detection of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) was carried out to verify some of the metabolomics findings from the ASTEMI patients. ***Results***: UPLC-Q-TOF-MS/MS revealed that ASTEMI patients and healthy control individuals exhibited distinct metabolomics profiles. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) demonstrated that ASTEMI patients and healthy control groups were resided in different regions. By using multivariate statistical analysis and statistical analysis, at least nine metabolites were found to markedly differ in the serum of ASTEMI group from those in the healthy individuals. Some differences revealed by the metabolomics study, such as the significant reduction of DHEAS in the serum of ASTEMI patients, were further confirmed by independent chemiluminescence measurements (P=0.000). ***Conclusion***: The unbiased metabolomics analyses reveal that there are significant differences between ASTEMI patients and healthy controls at serum metabolite lev-

作者介绍：吴倩怡，Email：wuqianyi1987@126.com，研究方向：冠心病的基础与临床。

通信作者：罗素新，Email：luosuxin0204@163.com。

基金项目：国家重点基础研究发展计划资助项目（编号：2014CB542400）；国家自然科学基金资助项目（编号：81170112、81270210）；国家临床重点专科建设经费资助项目（编号：财社〔2011〕170 号）；重庆市科委资助项目（编号：cstc2012jjA10143）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1617.088.html（2016-05-13）

els. At last nine metabolites in the serum are found to be associated with ASTEMI. These findings may provide new insights regarding the metabolism alterations in ASTEMI patients.

[Key words] acute ST-segment elevation myocardial infarction; metabolomics; ultraperformance liquid chromatography/electrospray ionization quadruple time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS); dehydroepiandrosterone sulfate

心血管疾病（cardiovascular disease，CVD）是目前全球主要致死的疾病之一，而其中冠心病和高血压导致的心肌梗死是心血管疾病致死的最主要原因[1]。心肌梗死相关的研究在各方面取得了快速进展，但是急性 ST 段抬高型心肌梗死（acute ST-segment elevation myocardial infarction，ASTEMI）在代谢组学方面的研究仍然是一个空白。因此找出 ASTEMI 发生时代谢产物的变化，进一步探索 ASTEMI 相关的代谢通路显得尤为重要。代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门新兴的学科，是对某一生物或细胞在一特定生理时期内所有低分子量代谢产物同时进行定性和定量分析的一门新学科，具有高敏高效高通量的特点。随着代谢组学快速的发展，检测仪器和分析方法得到了提高，越来越多的差异代谢产物在生物样本中被检测出来，这为了解代谢通路与疾病之间的关系提供了一个更有利的途径[2-3]。同时，疾病的代谢组学研究也为疾病的个体治疗提供更多有效的信息[4]，有助于患者治疗更加个体化。

急性心肌梗死（acute myocardial infarction，AMI）是由于冠状动脉粥样硬化斑块破裂或血管痉挛，而侧支循环未充分建立，造成 1 支或多支血管供应的心肌血供急剧减少或中断，心肌严重而持久地急性缺血达 20~30 min 以上造成的。在心肌缺血过程中机体代谢产物发生变化，改变的代谢产物常常是一些小分子化合物（分子量<1 000），但是目前许多检测手段的筛选范围不包括这些小分子化合物。因此，急切地需要一种能够筛选出特异性的小分子化合物的检测手段，进一步通过这些小分子化合物阐释代谢通路与 AMI 之间的关系。

幸运的是，代谢组学技术的快速发展已经能够找出疾病特异性变化的代谢产物，为探索疾病发生和发展的代谢通路提供有利的线索[5-6]。本文通过运用超高效液相色谱与四级杆飞行时间串联质谱仪联用技术（ultraperformance liquid chromatography/electrospray ionization quadruple time-of-flight mass spectrometry，UPLC-Q-TOF-MS/MS）结合多维统计分析和单维统计分析的方法，旨在探索 ASTEMI 患者全面的代谢产物变化，以期查找出 ASTEMI 的差异代谢产物，为进一步了解心肌梗死代谢通路提供可能性。

1 材料与方法

1.1 样本来源

随机收集来自重庆医科大学附属第一医院住院的 ASTEMI 患者血清。所有患者都符合以下标准：1）胸痛≤12 h；2）心电图 ST 段抬高和/或病理 Q 波；3）冠状动脉造影显示血管完全闭塞；4）心肌酶学标志物出现 ASTEMI 相应动态改变。排除标准：1）心绞痛、急性心包炎、急性肺栓塞、主动脉夹层、心肌炎和心肌病；2）冠状动脉异常和其他相关疾病等；3）无严重感染、肾脏疾病、严重的神经系统疾病及血液系统疾病。

AMI 患者（n=15）收集，包括 10 男 5 女，年龄平均（70.5±2.8）岁，体质量平均（62.3±7.8）kg。健康对照组（n=10）是在同一时间随机收集的健康人血清，包括 5 男 5 女，年龄平均（66.2±2.7）岁，体质量平均（60.7±2.4）kg（表 1）。

1.2 样品处理和准备

将血液收集到 5 ml 容量的 EDTA 采血管，上下颠倒混合，在 3 000 r/min 条件下离心 10 min。离心后上清液转移到 EP 管中放入-80 ℃冰箱进行储存。在处理前一天晚上所有血清样品从-80 ℃放到-20 ℃解冻。处理时样品放入 37 ℃水浴解冻，涡旋 5 min，每 100 μl 血清样本中加入 300 μl 乙腈，涡旋 3 min，在 12 000 r/min 条件下离心 10 min，取上清 300 μl，40 ℃氮气吹干后加入乙腈∶水（3∶1）复溶，超声 3 min，在 12 000 r/min 条件下离心 10 min，取 5 μl 进样。

1.3 色谱分离

样本用 UPLC-C18 柱（Phenomenex Kinetex XB C18 50 cm×2.1 cm，1.7 μm）进行反相色谱分离。色谱柱温度维持在 40 ℃。流动相由溶剂 A（2 mmol/L 醋酸铵+0.05%甲酸）和溶剂 B[丙烯腈∶甲醇（1∶1）]组成，以 0.35 ml/min 的流量进行。采用梯度洗脱如下：0~0.5 min B 液 0~2%；0.5~2.5 min B 液 2%~30%；2.5~6.0 min B 液 30%~100%；6~11 min B 液维持 100%；11~15 min B 液降至 2%，15 min 流动相回到了起始条件。加样体积是 3 μl。

1.4 质谱分析

质谱分析用 AB Sciex 公司的混合型四级飞行时间质谱仪（AB Triple-TOF 5600）完成，涡旋 V 离子源，正、负离子两

种模式下采集数据。具体参数如下:离子喷雾电压(ion spray voltage,ISVF)5.5 kV;涡轮喷射温度(TEM)600 ℃;去聚能(declustering potential,DP)60 v 和碰撞能(collision energy,CE)10 eV。氮气作为喷雾器和辅助气体。喷雾器气体(gas1),加热气体(gas2)和帘气(curtain gas),分别被设置为 60、60 和 15 psi。在正负离子模式下进行完整的扫描,其数据采集范围为 m/z50 至 1 000 amu,持续运行 250 ms。在 IDA 标准中,每个分析物的 8 个最强烈的碎片离子即超过 50 cps 被选做产品扫描,其离子扫描范围从 50 到 1 000 amu 持续时间 50 ms。碰撞能量范围(collision energys pread,CES)是定性分析中一个重要的参数,它可以提高灵敏度和减少碎片信息的遗漏。在此运行中,CES 是设定在 15 eV,在 CE 为 35、45 至 60 eV时能够获得平均 EPI 扫描光谱。多重质量亏损过滤(multiple mass defect filtering,MMDF)和动态背景扣除(dynamic background subtraction,DBS)是由 AB SCIEX 软件所提供的新技术,它可以筛选信息,并执行一个生产扫描,以避免遗漏次要代谢产物,所以 MMDF 和 DBS 被用于触发在实验中信息依赖性获取模式(information dependent acquisition mode,IDA)的功能。此外,一个自动校准输送系统(automated calibration delivery system,CDS)可以自动调节质谱和串联质谱。数据是使用 Analyst® TF 1.6 软件(AB Sciex)分析。

1.5 代谢标志物筛选和鉴别

所有数据采用 MarkerView 1.2.1 软件分析进行 UPLC/MS 数据的提取和去噪。峰值的强度(色谱峰域)被检测出来。数据以保留时间_质荷比配对(Rt-m/z)来表示。最后的数据导入 SIMCA-P 11.5 软件中进行分析。导入的数据采用 UV 格式化和中心化处理数据。处理后的数据进行多维统计分析,多维统计分析包括无监督方法和监督方法。无监督模式采用主成分分析(principal component analysis,PCA)方法。运用软件 PCA 模型绘制得分图和载荷图。在 PCA 得分图中,每个点代表 1 个独立的样品。在 PCA 载荷图中,每 1 个点代表了 1 个对应的 m/z-Rt。监督模型选取偏最小二乘判别分析(partialeast squares discriminant analysis,PLS-DA)。在进行 PLS-DA 之前,运用正交信号校正(orthogonal signal correction,OSC)方法处理数据。根据变量投影重要性指标值(variable important in the projection,VIP>1.0),S-plot 和 P 值($P<0.05$)找出可能的差异代谢产物。2 个模型都进行 7 次交叉验证,防止模型过拟合。筛查出来的差异代谢产物在 HMDB(http://www.hmdb.ca)和 METLIN(http://metlin.scripps.edu)数据库中找到最可能的化合物。与此同时,可能的化合物采用 MS/MS 进行分析,分析后差异代谢产物在 HMDB 和 METLIN 数据库进行二级质谱筛查,最终确定差异代谢产物最可能是哪种化合物。

单维统计分析使用 SPSS 19.0 软件进行。对所有数据采用 Wilcoxon-Mann-Whitney 检测方法,选取 $P<0.05$ 的化合物结合多维统计分析的结果,筛选差异代谢产物。

1.6 统计分析

多维统计运用 SIMCA-P 11.5 软件进行无监督模式中的 PCA 分析和监督模式中的 PLS-DA 分析,数据以保留时间_质荷比配对(Rt-m/z)来表示。单维统计分析运用 SPSS 19.0 软件进行 Wilcoxon-Mann-Whitney 检测,数据以保留时间_质荷比配对(Rt-m/z)来表示。研究对象一般信息中计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表达,两组间比较采用两独立样本 t 检验;计数资料采用率表示,组间比较采用卡方检验和 Fisher 确切概率法;DHEAS 含量信息运用两独立样本秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

本研究符合重庆医科大学人体试验伦理委员会所制定的伦理学标准,并取得病人的知情同意。

2 结 果

2.1 研究对象基本资料

ASTEMI 患者组与健康对照组具体信息见表 1,计数、计量资料均无统计学差异。

表 1 研究对象基本资料

Tab.1 Information in the study

基本资料	健康组(n=10)	ASTEMI 组(n=15)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	66.2±2.7	70.5±2.8	1.201	0.242
体质量(kg)	60.7±2.4	62.3±7.8	0.645	0.525
BMI(kg/m²)	22.8±2.1	24.8±2.8	2.024	0.068
收缩压(mm/Hg)	118±18.3	136.5±27.0	2.015	0.056
舒张压(mm/Hg)	76.0±11.1	78.1±12.5	0.448	0.659
HDL-C(mmol/L)	1.169±0.282	1.172±0.276	0.026	0.979
LDL-C(mmol/L)	2.686±0.412	2.519±0.762	0.709	0.486
糖尿病史例数(%)	0.0%	26.7%	-	0.345
吸烟史例数(%)	10.0%	33.3%	-	0.125

注:-,采用 Fisher 确切概率法

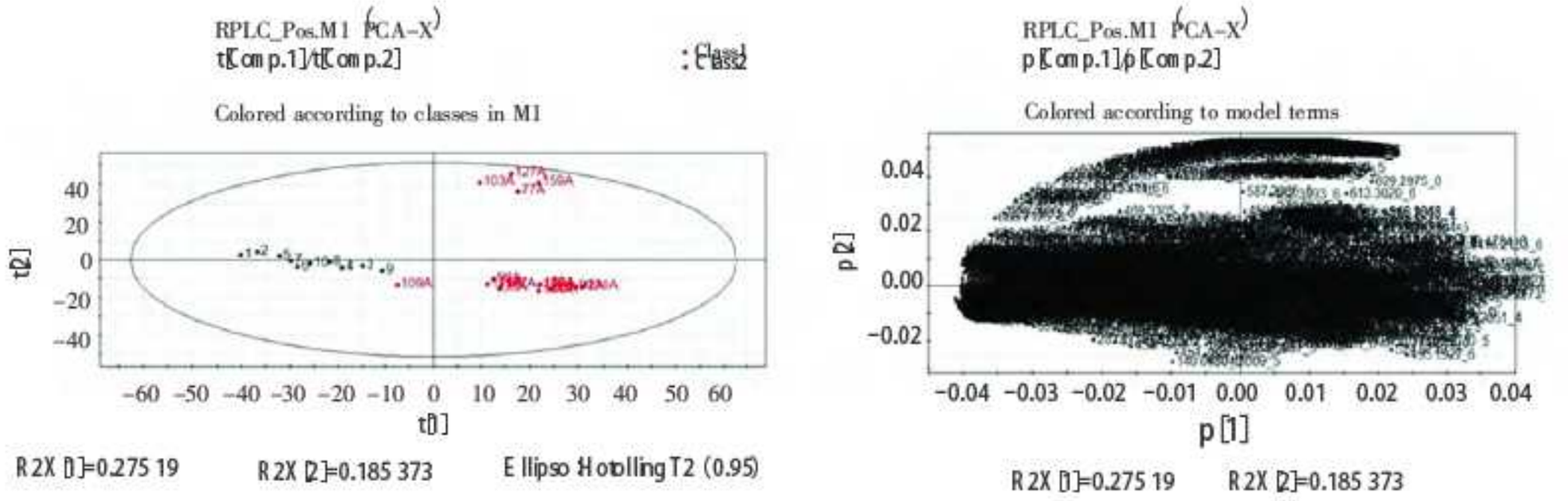
2.2 特异性代谢产物的筛选

在正负离子模式下,对 15 个 ASTEMI 患者和 10 个健康对照组血清样本进行液相色谱质谱联用分析。ASTEMI 发生时伴随代谢水平的改变,采集的血清包含改变的代谢产物。对血清样本进行液相色谱质谱联用分析后,得到的数据进行 PCA 分析和 PLS-DA 分析。无监督的 PCA 方法中得分图显示 ASTEMI 组和健康对照组在正离子模式(图 1A)和负离子模式(图 2A)下分布在不同区域,彼此之间是分离的。在 PCA 载荷图中,ASTEMI 组和健康对照组在正离子模式(图 1B)和负离子模式(图 2B)下能看到有明显特异性的 Rt-m/z 点。但是整个模型的解释率和预测性较低(正离子模型:$R^2X=0.80$,$Q^2=0.518$;负离子模型:$R^2X=0.80$,$Q^2=0.26$)。此后,对 ASTEMI 组和健康对照组使用 PLS-DA 监督方法,该模型的解释率、稳定性和预测性较高(正离子模型:$R^2X=0.93$,$R^2Y=0.98$,$Q^2=0.97$;负离子模型:$R^2X=0.75$,$R^2Y=0.98$,$Q^2=0.96$)。进行 PLS-DA 分析之前,数据通过 OSC 方法进行校正。在 PLS-DA 分析得分图中,正离子模式(图 3A)和负离子模式(图 4A)下 ASTEMI 组和健康对照组能够更明显的分离,ASTEMI 组与健康对照

组聚类性更加明显。在 PLS-DA 载荷图中，离原点越远的点被视为特异性越强的点（图 3B 和 4B）。这些特异性的 Rt-m/z 点结合 VIP-plots 和 S-plots（图 5 和图 6），筛选出数十个特异性化合物。同时对这些物质在进行 Wilcoxon-Mann-Whitney 检验，选取 $P<0.05$ 的化合物。结合多维统计分析（VIP>1）和单维统计分析（$P<0.05$）的结果，筛选出 ASTEMI 组和健康对照组之间具有特异性的化合物。

2.3　特异性代谢产物的鉴定

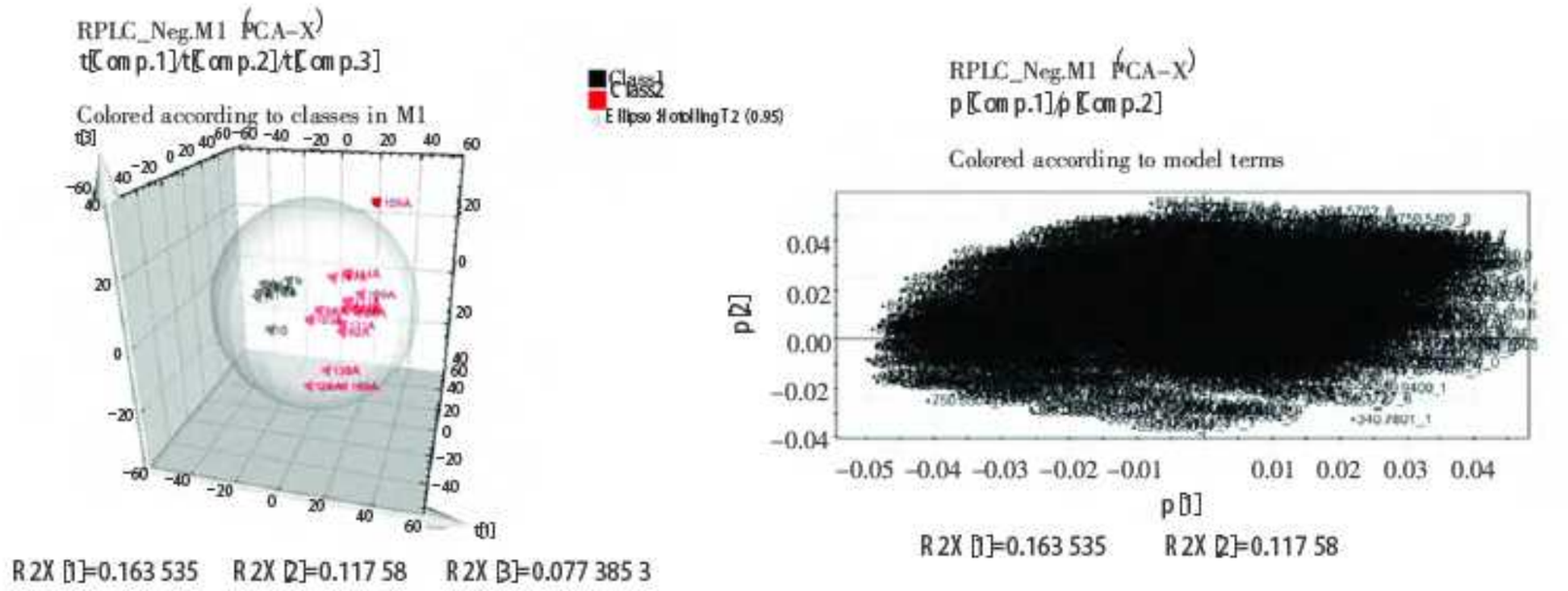
为了鉴定筛选出来的的化合物，运用 METLIN 和 HMDB 数据库对这些物质进行鉴定。在数据库中，每个标志物是以 Rt-m/z 的形式进行解释的。在 2 个数据库中都能发现的代谢产物，将被作为与 ASTEMI 相关的特异性代谢产物。经过筛



A. 得分图　　B. 载荷图

图 1　ASTEMI 组和健康对照组在正离子模式下 PCA 图

Fig. 1　PCA in the positive ion mode of ASTEMI group and the healthy control group

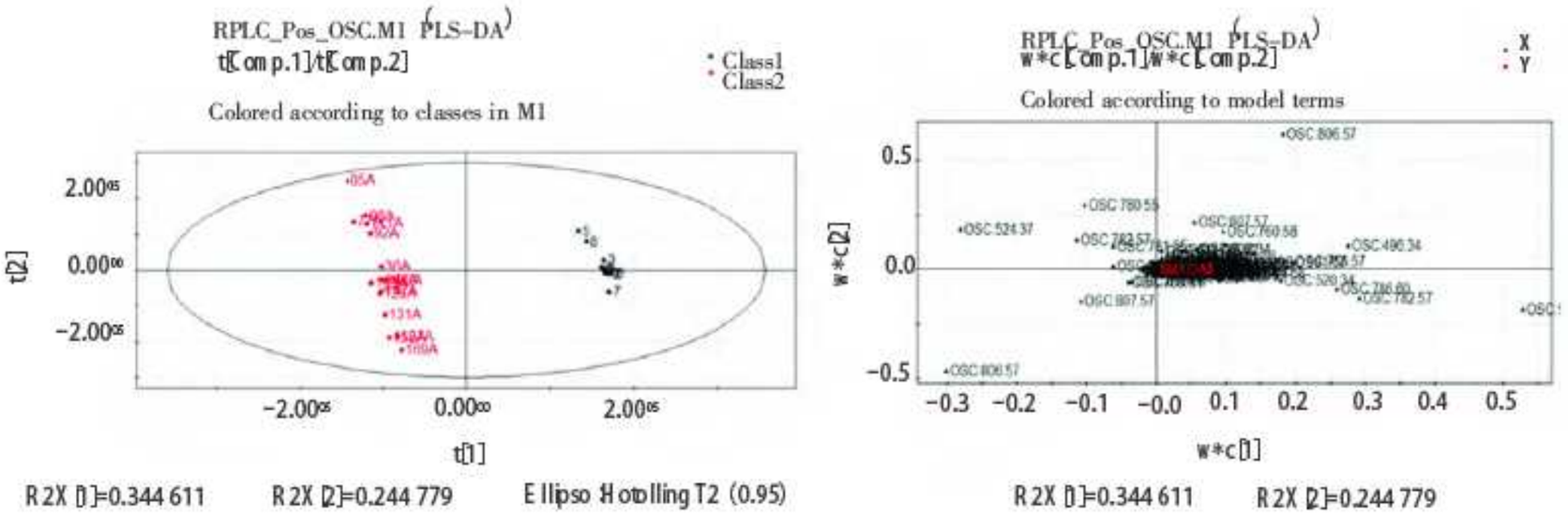


A. 得分图　　B. 载荷图

■ Class 1：ASTEMI 组　　■ Class 2：健康对照组

图 2　ASTEMI 组和健康对照组在负离子模式下 PCA 图

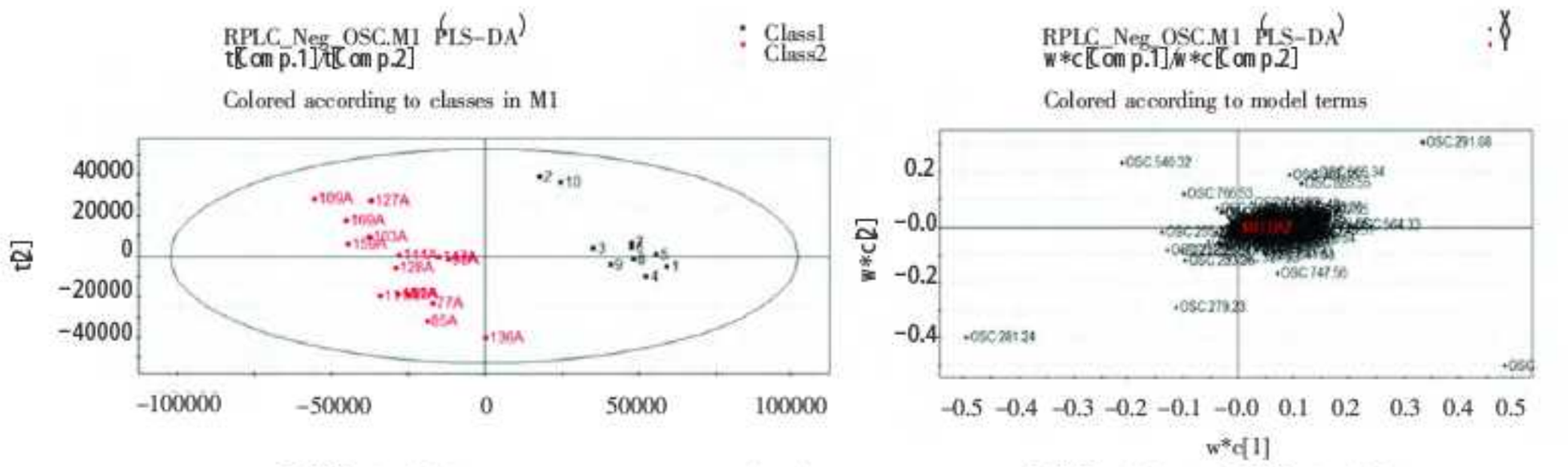
Fig.2　PCA in the negative ion mode of ASTEMI group and the healthy control group



A. 得分图　　B. 载荷图

图 3　ASTEMI 组和健康对照组在正离子模式下 PLS-DA 图

Fig.3　PLS-DA in the positive ion mode of ASTEMI group and the healthy control group

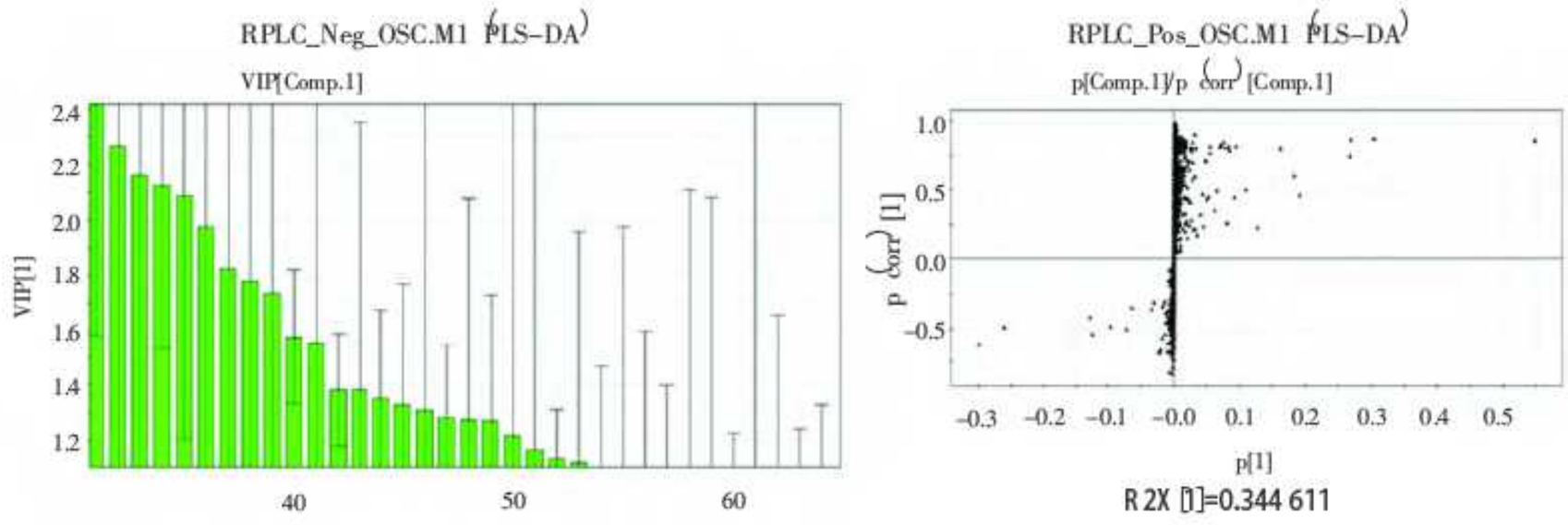


A. 得分图　　B. 载荷图

■ Class 1：ASTEM Ⅰ组　　■ Class 2：健康对照组

图 4　ASTEM Ⅰ组和健康对照组在负离子模式下 PLS-DA 图

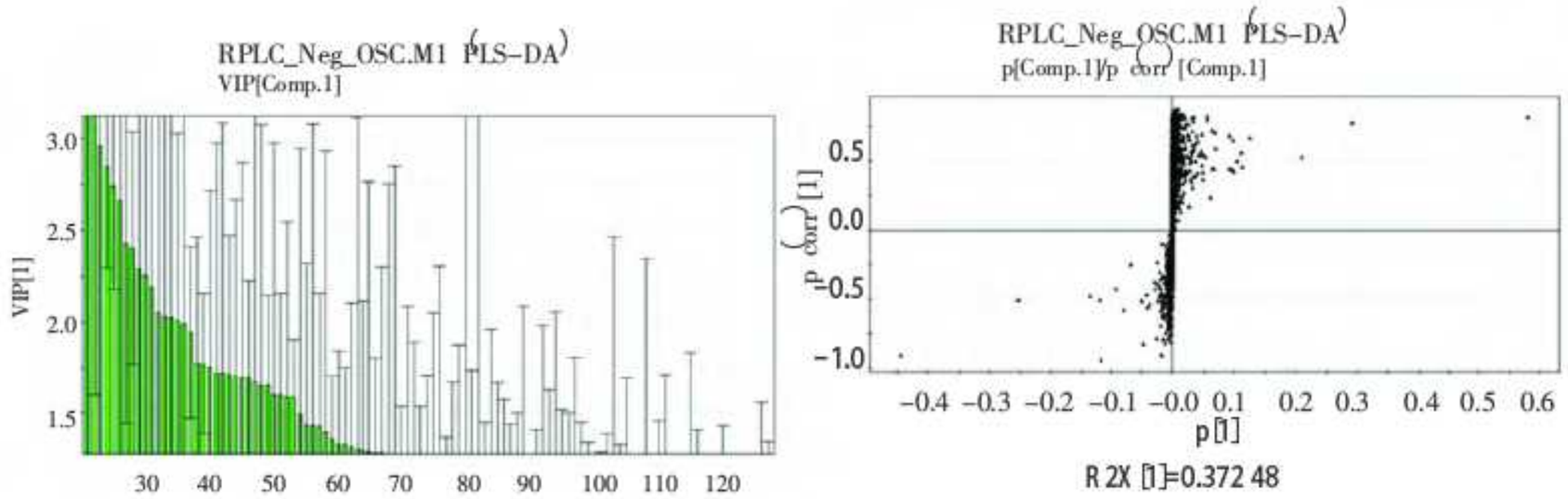
Fig.4　PLS-DA in the negative ion mode of ASTEM Ⅰ group and the healthy control group



A. VIP 图　　B. S 图

图 5　ASTEM Ⅰ组和健康对照组在正离子模式的 VIP 图和 S 图

Fig.5　VIP-plots and S-plots in the positive ion mode of ASTEM Ⅰ group and the healthy control group



A. VIP 图　　B. S 图

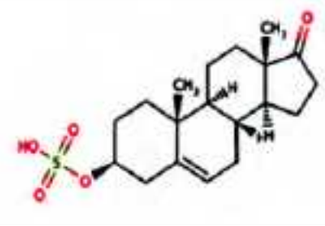
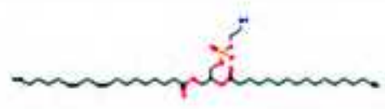
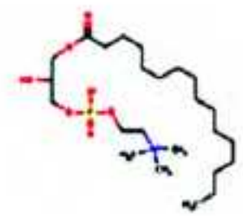
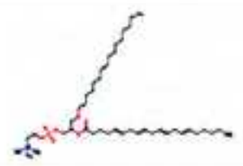
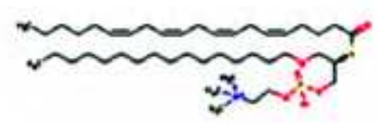
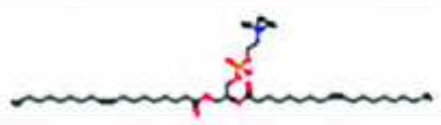
图 6　ASTEM Ⅰ组和健康对照组在负离子模式下的 VIP 图和 S 图

Fig.6　VIP-plots and S-plots in the negative ion mode of ASTEM Ⅰ group and the healthy control group

选后，48 个特异性代谢产物被发现。然后对这 48 个代谢产物进行二级质谱鉴定。鉴定后，再次运用上述 2 个数据库进行二级质谱筛查，最终筛选出 ASTEMI 特异性的 9 个代谢产物，分别是硫酸脱氢表雄酮（dehydroepiandrosterone sulfate，DHEAS）、甘油磷酸_N_花生四烯乙醇胺（Glycerophospho-N-Arachidonoyl Ethanolamine，GP-NArE）、1_棕榈酰_2_亚油磷酯酰乙醇胺（1-Palmitoyl-2-linoleoyl PE，PLPE）、1_棕榈酰_sn_甘油_3_磷酸胆碱（LysoPC（16:0））、1_十七酰_sn_甘油基_3_磷酸胆碱（1-heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）、1-O_十六烷基_2-O_乙酰基_sn_甘油基_3_磷酰胆碱（PAF C-16）、1-O_十六烷基_2_花生四烯酰_sn_甘油_3_磷酸胆碱（Arachidonoyl PAF C-16）、花生四烯酸 硫代卵磷脂（Arachidonoyl thio-PC）、1，2_二油酰基_sn_甘油基_3_磷脂酰胆碱（1，2-Dioleoyl PC）表 2）。

表 2　在正离子和负离子模型 ASTEM I 中的特异性代谢产物

Tab.2　Specific metabolites in the positive and negative ions model in the ASTEM I

代谢产物	分子量（D）	分子式	ESI 模式	变化	可能性结构
DHEAS	368.1657	$C_{19}H_{27}O_5S$	M-H	↓	
GP-NArE	501.2855	$C_{25}H_{44}NO_7P$	M-H	↓	
PLPE	715.5151	$C_{39}H_{74}NO_8P$	M-H	↓	
LysoPC（6:0）	495.3324	$C_{24}H_{50}NO_7P$	M+H	↓	
1-十七酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱	509.3481	$C_{25}H_{52}NO_7P$	M+H	↓	
1-O-十六烷基-2-O-乙酰基-sn-甘油基-3-磷酰胆碱	523.3637	$C_{26}H_{54}NO_7P$	M+H	↓	
1-O-十六烷基-2-花生四烯酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱	767.5828	$C_{44}H_{82}NO_7P$	M+H	↓	
花生四烯酸硫代卵磷脂	783.5600	$C_{44}H_{82}NO_6PS$	M+H	↓	
1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱	785.5934	$C_{44}H_{84}NO_8P$	M+H	↓	

2.4　特异性代谢产物硫酸脱氢表雄酮的鉴定

为了进一步鉴定筛选出来的 ASTEMI 的特异性代谢产物，选取 9 个代谢产物中的硫酸脱氢表雄酮（DHEAS）进行化学发光法分析。检测 ASTEMI 患者组（n=15）和健康对照组（n=10）血清中 DHEAS 的含量（表 3）。经检测后，发现 ASTEMI 患者组 DHEAS 含量明显低于健康对照组（z=-4.160，P<0.05）（图 7）。

表 3　DHEAS 含量

Tab.3　DHEAS content

DHEAS	疾病组	健康组
DHEAS含量	37.2	284.0
	48.2	520.5
	29.4	442.3
	135.2	422.7
	35.1	505.4
	70.0	482.1
	113.4	531.0
	279.1	456.0
	37.5	534.4
	77.4	478.5
	111.3	–
	46.8	–
	84.3	–
	10.0	–
	117.6	–
M（Q_1，Q_3）	70.0（37.2, 113.4）	480.3（437.4, 523.1）

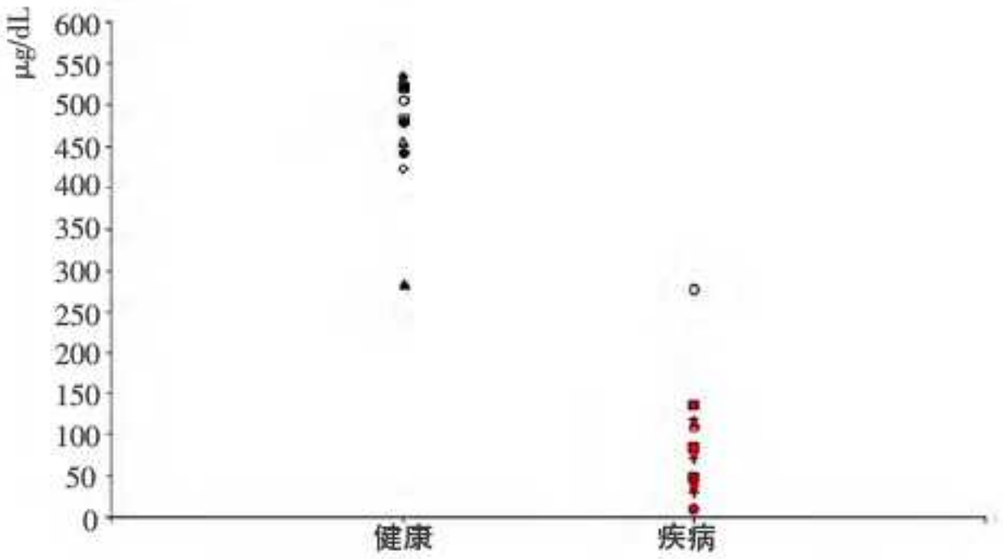


图 7　硫酸脱氢表雄酮在对照组和 ASTEM I 患者组中的表达

Fig.7　Expression of DHEAS in the control group and ASTEM I group

3 讨 论

AMI是一种高发病率及高致死率的疾病。在AMI发生和发展中机体将会发生代谢产物的变化，而这些变化的代谢产物常常是由于疾病相关代谢通路的改变产生的，因此通过变化的代谢产物可以寻找AMI特异性的代谢通路。1997 年 Oliver Fiehn 提出了一门新的组学即代谢组学，它不同于基因组学、转录组和蛋白质组学，是系统生物学的重要组成部分[7]。代谢组学是一种检测在一特定生理状态下的生物标本（包括体液或组织）中的小分子代谢产物（分子量<1 000）方法的新学科，它的目的是检测出一个既定样本中各小分子物质的特点，以及在正常和病理条件下，对代谢分子网络进行定性和定量的描述和解释。在系统生物学中，其被证明为更有效地预测和解释复杂的表型，以建立表型和代谢之间的关系[8]。作为一个新兴的组学平台，代谢组学是通过生物样本检测到代谢产物的变化，并且通过这些代谢产物的变化来反映机体组织的状态，从而有效地理解复杂机体的的生物学和生物化学过程。随着代谢组学的发展，它已被作为一种有前景的预测和解释疾病代谢产物变化的方法。它能够检测到特定状态下的特异性产物，通过这些特异性的产物，寻找疾病特异性的代谢通路变得更容易。目前很少有文献报道ASTEMI特异性的代谢产物，仅有的文献主要集中于动物而非人类本身研究[9-10]。

本研究中，15 例ASTEMI患者血清样本运用代谢组学方法中的UPLC-Q-TOF-MS/MS和多维统计分析与单维统计分析相结合进行分析。最重要的是，在患者入院第一时间收集样本，这样就保证了ASTEMI患者早期的代谢产物的变化得到存储。此外，EDTA采血管用于保存样本，并且收集后迅速-80 ℃保存[11]，进一步保证了样本的可靠性。在对UPLC-Q-TOF-MS/MS分析后，数据进行多维统计分析的结果表明PLS-DA模型明显比PCA模型能够更清晰的表现出疾病组和对照组的聚集性。在进行PCA和PLS-DA之后，筛选出来的代谢产物运用HMDB和METLIN数据库进行参考[12]，保证了所筛选的物质是人类所特有的，同时也减小筛选代谢产物的遗漏。

经过鉴定，有多种特异性代谢产物与ASTEMI相关，本研究选取其中最具有代表性的 9 个代谢产物。DHEAS、GP-NArE、PLPE、LysoPC（16:0）是其中特异性最高的 4 个特异性代谢产物。第一个物质是DHEAS，DHEAS是脱氢表雄酮（DHEA）的硫酸盐形式，是一种内源性性类固醇激素，被推测有抗衰老作用[13]。有研究对心血管疾病组和对照组血清中的DHEA或DHEAS水平进行了比较，其中部分研究表明DHEAS与动脉粥样硬化的发展呈负相关，动脉粥样硬化多伴随低水平的DHEAS[14]。另一些研究显示DHEA或DHEAS对机体有保护性效应[15]，高浓度的DHEAS伴随较低水平死亡率[16-17]。本研究中UPLC-Q-TOF-MS/MS分析的结果是ASTEMI患者组中DHEAS的含量低于健康对照组。进一步运用化学发光法发现ASTEMI患者组的DHEAS含量远远低于正常对照组。随着年龄的增长DHEAS降低，基于此结果和本实验中ASTEMI患者组DHEAS含量低于对照组，提出给予患者缺失的DHEAS，有可能减少ASTEMI患者的死亡率。同时，DHEAS水平的降低将来可能成为预测ASTEMI发生的特异性标志物，进一步找到ASTEMI特异性的氨基酸代谢通路。筛选出的第 2 个物质是GP-NArE，实验中ASTEMI患者组血清中的GP-NArE低于健康对照组。GP-NArE是花生四烯酸乙醇胺（AEA）的一个生理相关的前体。通过Abh4合成的double O-deacylation进一步产生GP-NArE，紧随着GDE1-介导的转化为脂质产生AEA[18-19]。本研究结果表示ASTEMI患者组中GP-NArE含量减少，间接表明AEA与AMI相关联，ASTEMI的发生可能伴随GP-NArE和AEA相关的代谢通路。第 3 种物质为PLPE。PLPE是许多磷脂酰乙醇胺的一种脂质，容易发生氧化。在PLPE氧化后，结构发生变化，氧化产物成为一个中间化合物，参与了许多病理生理变化，如动脉粥样硬化[20]。同时，其他研究发现，PLPE出现在糖尿病中，PLPE的氧化应激会导致其他分子的氧化，最后导致糖尿病并发症。但是，在本研究中PLPE在ASTEMI患者组低于健康对照组，这可能提示ASTEMI的发生伴随氧化应激相关通路，但该通路的改变需进一步研究。第 4 个物质是LysoPC（16:0）。lyso-PC是一个主要导致动脉粥样硬化的脂蛋白[21]。在很多研究中，疾病组lyso-PC水平比健康对照组要明显增加。然而，本研究中ASTEMI组的lyso-PC低于健康对照组，这与大部分文献报道相异。是否是收

集样本时间较早，ASTEMI 早期代谢产物的不同改变，这还需要进一步的探索。同时，本研究中部分样本合并糖尿病和/或吸烟史，是否该项因素影响最终代谢组学结果需要进一步实验及验证。

本研究运用 LC-ESI-Q-TOF-MS/MS 方法对 ASTEMI 患者的血清进行代谢组学分析，筛选出 9 个特异性的代谢产物与 ASTEMI 相关，并且运用化学发光法进一步证实了特异性代谢物产之一的 DHEAS，填补了 ASTEM 在代谢组学方面研究的空白。该结果提示代谢组学是一种强大的工具，可以用来筛选疾病特异性的代谢产物。研究中筛选出特异性代谢产物可能为寻找 ASTEMI 相关的代谢通路提供线索，尤其是其中之一的硫酸脱氢表雄酮是否为未来 ASTEMI 的诊断和治疗的新靶标尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Mathers CD，Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. PLoS Med，2006，3（11）：e442.

[2] Gowda GA，Zhang S，Gu H，et al. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics[J]. Expert Rev Mol Diagn，2008，8（5）：617-633.

[3] Lewis GD，Asnani A，Gerszten RE. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery[J]. J Am Coll Cardiol，2008，52（2）：117-123.

[4] German JB，Bauman DE，Burrin DG，et al. Metabolomics in the opening decade of the 21st century：building the roads to individualized health[J]. J Nutr，2004，134（10）：2729-2732.

[5] Heather LC，Wang X，West JA，et al. A practical guide to metabolomic profiling as a discovery tool for human heart disease[J]. J Mol Cell Cardiol，2013，55（6）：2-11.

[6] Senn T，Hazen SL，Tanq WH. Translating metabolomics to cardiovascular biomarkers[J]. Prog Cardiovasc Dis，2012，55（1）：70-76.

[7] Oliver SG. Yeast as a navigational aid in genome analysis[J]. Microbiology，1997，143（Pt 5）：1483-1487.

[8] Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes[J]. Plant Mol Biol，2002，48（1-2）：155-171.

[9] Sansbury BE，DeMartino AM，Xie Z，et al. Metabolomic analysis of pressure-overloaded and infarcted mouse hearts[J]. Circ Heart Fail，2014，7（4）：634-642.

[10] Jiang P，Dai W，Yan S，et al. Biomarkers in the early period of acute myocardial infarction in rat serum and protective effects of Shexiang Baoxin Pill using a metabolomic method[J]. J Ethnopharmacol，2011，138（2）：530-536.

[11] Yin P，Peter A，Franken H，et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood[J]. Clin Chem，2013，59（5）：833-845.

[12] Smith CA，O'Maille G，Want EJ，et al. METLIN：a metabolite mass spectral databas[J]. Ther Drug Monit，2005，27（6）：747-751.

[13] Schloms L，Storbeck KH，Swart P，et al. The influence of Aspalathus linearis（Rooibos）and dihydrochalcones on adrenal steroidogenesis：quantification of steroid intermediates and end products in H295R cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol，2012，128（3-5）：128-138.

[14] Creatsa M，Armeni E，Stamatelopoulos K，et al. Circulating androgen levels are associated with subclinical atherosclerosis and arterial stiffness in healthy recently menopausal women[J]. Metabolism，2012，61（2）：193-201.

[15] Golden SH，Maguire A，Ding J，et al. Endogenous postmenopausal hormones and carotid atherosclerosis：a case-control study of the atherosclerosis risk in communities Cohort[J]. Am J Epidemiol，2002，155（5）：437-445.

[16] Barrett-Connor E，Khaw KT，Yen SS. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate，mortality，and cardiovascular disease[J]. N Engl J Med，1986，315（24）：1519-1524.

[17] Trivedi DP，Khaw KT. Dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in elderly men and women[J]. J Clin Endocrinol Metab，2001，86（9）：4171-4177.

[18] Simon GM，Cravatt BF. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway[J]. J Biol Chem，2006，281（36）：26465-26472.

[19] Simon GM，Cravatt BF. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acylethanolamine precursors in mouse brain[J]. J Biol Chem，2008，283（14）：9341-9349.

[20] Domingues MR，Simões C，Reis A，et al. Identification of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylethanolamine modificationsunder oxidative stress conditionsby LC-MS/MS[J]. Biomed Chromatogr，2009，23（6）：588-601.

[21] Kume N，Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells[J]. J Clin Invest，1994，93（2）：907-911.

（责任编辑：冉明会）