DOI:10.16016/j.2097-0927.202311001

UHPLC-MS/MS 非靶向代谢组学在移居高原人群高原性高血压血浆代谢研究中的应用

王超臣[1,2],唐才智[1],冉庄[1],罗勇军[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)陆军卫勤训练基地军事医学地理学教研室[1];430070 武汉,中部战区总医院干部病房三科[2]

[摘要] **目的** 研究高原性高血压(altitude-related hypertension, ARH)患者和健康个体之间血浆代谢产物的差异,并分析 ARH 的潜在发病机制。**方法** 选取 2020 年 7 月在进驻海拔 4 200 m 处的健康平原成年男性官兵中按简单随机抽样法选取 20 名 ARH 患者为 ARH 组,30 名血压正常者为对照(Control)组。在测量血压、体质指数(body mass index, BMI)、血氧饱和度和心率后,采集研究对象空腹静脉血样本。基于超高效液相色谱-质谱联用(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)技术,对研究对象血浆中的代谢产物进行筛选和鉴定。使用无监督主成分分析(principal component analysis, PCA)和有监督的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)模型对代谢产物进行指纹图谱分析,以辅助生物标志物的筛选,并对 OPLS-DA 模型进行质量考查和验证,以确保模型的稳定性和可靠性。使用独立样本 t 检验和差异倍数(fold change, FC)分析,绘制火山图,筛选有差异的血浆代谢物。使用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集通路分析对筛选出的差异性代谢物进行功能途径的富集分析和拓扑学分析。**结果** 与 Control 组比较,ARH 组的收缩压、舒张压和心率显著升高,动脉血氧饱和度显著降低($P<0.05$)。PCA 分析显示,正离子模式下,解释了 81.96%的变异;负离子模式下,解释了 79.25%的变异,表明 2 组之间存在显著的代谢差异。OPLS-DA 模型分析显示,正离子模式下,PC1 解释了 77.36%的变异,PC2 解释了 12.25%的变异,$R^2Y=0.96$,$Q^2Y=0.91$;负离子模式下,PC1 解释了 84.15%的变异,PC2 解释了 17.24%的变异,$R^2Y=0.99$,$Q^2Y=0.86$。组间差异均超过 75%,组内差异均小于 20%。正离子模式下,R^2 拟合直线的 Y 轴截距为 0.58,Q^2 拟合直线的 Y 轴截距为-0.48;负离子模式下,R^2 拟合直线的 Y 轴截距为 0.93,Q^2 拟合直线的 Y 轴截距为-0.41。共筛选出 32 种具有显著差异的代谢产物,包括氨基酸、核苷、脂肪酸和有机生物碱。KEGG 分析显示,10 条代谢通路中有 4 条为氨基酸代谢通路,氨酰-tRNA 生物合成途径富集的代谢产物最多。**结论** 基于 UHPLC-MS/MS 技术,运用非靶向代谢组学筛选出的 32 种具有明显差异的代谢产物可能作为 ARH 的特征性生物标志物,而氨酰-tRNA 生物合成途径可能与 ARH 的发病机制相关。

[关键词] 非靶向代谢组学;高原性高血压;代谢通路
[中图法分类号] R331.1; R394.2; R544.1 [文献标志码] A

Application of UHPLC-MS/MS-based nontargeted metabolomics in plasma metabolism in altitude-related hypertension among high-altitude migrants

WANG Chaocheng[1,2], TANG Caizhi[1], RAN Zhuang[1], LUO Yongjun[1] [1]Department of Military Medical Geography, Army Health Service Training Base, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Third Department of Cadre Ward, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan, Hubei Province, 430070, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the differences in plasma metabolites between patients with altitude-related hypertension (ARH) and healthy individuals, and analyze the potential pathogenesis of ARH.

[基金项目] 国家自然基金面上项目(42377466);国家科技部第二次青藏高原综合科学考察研究专题(2019QZKK0607)
[通信作者] 罗勇军, E-mail: luoyj@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

Methods Convenient sampling was conducted on a unit of male healthy officers and soldiers who resident at altitude of <500 m and migrated to an altitude of 4 200 m in July 2020. Twenty of them diagnosed with ARH were assigned into the ARH group, and another 30 non-ARH individuals served as the control group. Their blood pressure, body mass index (BMI), blood oxygen saturation, and heart rate were measured and recorded, and fasting venous blood samples were harvested to screen and identify plasma metabolites with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Metabolite fingerprinting was performed using unsupervised Principal Component Analysis (PCA) and supervised Orthogonal Partial Least Squares Discrimination Analysis (OPLS-DA) models in order to assist in biomarker screening. The quality of the OPLS-DA model was assessed and validated to guarantee the stability and reliability of the model. Differential plasma metabolites were screened using independent sample t test and fold change (FC) analysis, and volcano plots were drawn. Finally, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment pathway analysis was used to perform functional pathway enrichment and topological analysis on the screened differential metabolites. **Results** Compared to the control group, the ARH group showed significantly higher systolic and diastolic blood pressure and heart rate, and lower arterial oxygen saturation ($P<0.05$). PCA analysis showed that 81.96% of the variance was explained in the positive ion mode and 79.25% in the negative ion mode, indicating significant metabolic differences between the 2 groups. OPLS-DA model analysis indicated that in the positive ion mode, PC1 explained 77.36% of the variance and PC2 explained 12.25% of the variance, with $R^2Y=0.96$ and $Q^2Y=0.91$; in the negative ion mode, PC1 explained 84.15% of the variance and PC2 explained 17.24% of the variance, with $R^2Y=0.99$ and $Q^2Y=0.86$. Inter-group difference exceeded 75%, and intra-group difference was less than 20%. The 7-fold cross-validation and 200 permutation test confirmed that the model was stable and reliable. In the positive ion mode, the Y-axis intercepts of the R^2 and Q^2 fitted lines were 0.58 and −0.48, respectively; in the negative ion mode, the Y-axis intercepts were 0.93 and −0.41, respectively. A total of 32 significantly different metabolites were screened out, including amino acids, nucleosides, fatty acids, and organic alkaloids. KEGG analysis revealed that among the 10 metabolic pathways, 4 were amino acid metabolic pathways, with the aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway having the most enriched metabolites. **Conclusion** Based on UHPLC-MS/MS technology, untargeted metabolomics analysis identifies 32 significantly different metabolites, which may serve as characteristic biomarkers for ARH, and the aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway may be associated with the pathogenesis of ARH.

[**Key words**] nontargeted metabolomics; altitude-related hypertension; metabolic pathways

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (42377466) and the Second Tibetan Plateau Scientific Expedition and Research Programme of Ministry of Science and Technology (2019QZKK0607). Corresponding author: LUO Yongjun, E-mail: luoyj@tmmu.edu.cn

高原低压性低氧环境对机体血压有显著影响[1],大量研究表明,暴露于高原环境数小时后,由于对高原缺氧环境适应不良,可能对血压产生明显影响,多数表现为收缩压和舒张压升高,严重的可能诱发高原性高血压(altitude-related hypertension, ARH)[2]。ARH 是指平原居民在进入高原后,血压显著升高[收缩压≥140 mmHg 和(或)舒张压≥90 mmHg],当返回平原环境后,血压会恢复至正常范围的现象[3]。

长时间暴露于低压、低氧环境下会对血压产生影响。血压过高或过低都可能损伤人体的心脏、肾脏、大脑等靶器官,甚至导致残疾或死亡[4]。全球不仅有约 8 160 万人永久居住在海拔 2 500 m 以上的高原地区,每年还有数千万人从平原进入高原[5]。研究显示,海拔高度与高血压患病率呈正相关[6]。在海拔 3 000 m 以上的地区,每升高 100 m,高血压患病率增加 2%[7]。与平原地区相比,高原地区的高血压患病率显著增加,严重影响高原人群的健康。但是,目前高原低氧环境诱发 ARH 导致血压升高的具体机制仍不清楚[8]。

在临床研究中,代谢组学的主要应用是发现与疾病相关的生物标志物。代谢组学分为非靶向代谢组学和靶向代谢组学,是一种生物体内小分子代谢产物进行定性定量分析,研究其种类、数量及变化规律,并探索其与生理病理变化相对关系的科学。非靶向代谢组学的主要优势在于其广泛的代谢物覆盖范围。与靶向代谢组学不同,非靶向代谢组学不需要预先选择特定的代谢物或通路进行分析,而是通过同时检测和分析

生物体内的大量代谢物,提供全面的代谢信息。ARH作为一种多基因、多因素的复杂疾病,其发病机制尚未完全明确,因此更适合采用非靶向代谢组学的方法进行研究[9]。因此,本研究通过非靶向代谢组学检测ARH人群的血浆代谢物,以深入探讨ARH的发病机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取2020年7月前往海拔4 200 m某地进行高原驻训的504名健康成年男性官兵为研究对象,进行急性高原病(acute mountain sickness, AMS)相关问卷调查。进驻前1周,部队统一配发并服用红景天胶囊(2粒/次,1次/d)用于预防AMS。部队7月初从驻地出发,按照阶梯习服原则到达海拔4 200 m的高原驻训地。进入高原后,依据《中国高血压防治指南(2018年修订版)》,以收缩压≥140 mmHg和(或)舒张压≥90 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)诊断为ARH,按照简单随机抽样的方式从504名官兵中分别抽取20名ARH患者和30名血压正常者纳入ARH组和对照(Control)组。

试验对象纳入标准:①居住地在海拔500 m以下平原地区的男性官兵(年龄≥18岁);②既往无高血压病史及降压药物治疗史;③非同日测量3次血压,平均收缩压<140 mmHg且平均舒张压<90 mmHg。

试验对象排除标准:①肝肾功能不全者;②有严重心脑血管病、过量饮酒史、风湿性疾病、炎症性肠病、慢性阻塞性肺疾病及近期有手术或创伤史者;③近期服用激素类药物或其他可能影响血压的药源性疾病患者;④各种急慢性感染和传染疾病、慢性高原病(如高原红细胞增多症)、血管与全身炎症、免疫系统疾病及脏器功能衰竭者;⑤临床资料不全者。在采集空腹静脉血样前,2组受试者均未接受医学干预。本研究获得陆军军医大学伦理委员会批准(2020第001-02),所有参与者签署知情同意书。

1.2 样品制备

静脉血使用EDTA作为抗凝剂,3 000×*g* 4 ℃离心10 min后,分离血浆,并置于-80 ℃冰箱冷冻保存备用。检测时,将血浆样品在4 ℃环境下缓慢解冻,解冻后血浆中加入配制好的预冷甲醇/乙腈/水溶液(体积分数为2∶2∶1)1 mL;涡旋混匀30 s,低温超声30 min,-20 ℃静置10 min后,离心14 000×*g* 4 ℃ 20 min,取400 μL上清于EP管中进行真空干燥。质谱分析前加入50 %乙腈/水溶液(乙腈∶水=1∶1)200 μL进行涡旋复溶,14 000×*g* 4 ℃离心15 min;取上清液进样分析;最后从每个试验样本中取10 μL上清混合成质控样品上机检测,在整个运行过程中充分分布质控样品,以确保其有效性。将制备好的样品保存于样品瓶中,待测。

1.3 仪器分析

待测样品采用Agilent 1290 Infinity LC系统(德国安捷伦公司),超高效液相色谱系统(ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC)进行分离,色谱柱规格为4.6 mm×150 mm,粒径为5 μm。柱温25 ℃,流速0.3 mL/min,进样量为2 μL。流动相A:水+25 mmol/L乙酸铵+25 mmol/L氨水;流动相B:乙腈,使用梯度洗脱(表1)。样品置于4 ℃自动进样器中。为避免仪器检测信号波动而造成的影响,采用随机顺序对样本进行连续分析,同时样本队列中插入质控样品,用于监测和评价系统的稳定性及实验数据的可靠性。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相A/%	流动相B/%
0	0.3	95	5
1.0	0.3	5	95
14.0	0.3	35	65
16.0~18.0	0.3	60	40
18.1	0.3	5	95
23.0	0.3	5	95

采用电喷雾电离(electrospray ionizotion,ESI)正离子和负离子两种模式进行检测。UHPLC色谱柱分离后的ESI源条件如下:采集离子质荷比范围为50~1 000 Da,离子源加热温度600 ℃,源喷雾电压±5 500 V(正负两种模式)。喷雾气344.74 kPa,辅助加热气551.58 kPa,气帘气206.84 kPa,TOF MS扫描积累时间0.20 s/谱,产物离子扫描积累时间0.05 s/谱,二级质谱采用信息依赖采集(information dependent acquisition, IDA)获得,并且采用高灵敏度模式,去簇电压60 V,碰撞能量(35±15) eV,在IDA设置中,首先排除分子量<4 Da的同位素,然后对候选离子进行6个周期的监测。

1.4 代谢产物指纹图谱分析

通过Proteo Wizard软件将所有原始数据格式转化为mz XML格式,消除同位素干扰,然后采用XCMS程序进行峰对齐、保留时间校正、提取峰面积和离子碎片等重要信息,得到化合物的峰值列表。应用SIMCA-P14.1进行模式识别,数据经帕累托缩放预处理后,进行多维统计分析。使用无监督主成分分析(principal component analysis, PCA)对2组血浆中代谢产物指纹

差异进行组间和组内变异度分析,评估组间和组内的变异度,以揭示代谢特征的差异。采用有监督的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)模型进行分析,区分2组样本代谢产物离子峰之间的差异,并通过7折交叉验证和200次响应排序检验对OPLS-DA模型进行质量考查和验证,以确保模型的稳定性和可靠性。

1.5 代谢产物的KEGG富集通路分析

通过Metabo Analyst软件对筛选出的差异性代谢物进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析和拓扑学分析。根据代谢途径中鉴定代谢物的相对响应值以及降维算法计算代谢途径的相对响应值,进一步计算代谢途径之间的关联系数,并绘制代谢途径关联网络图。通过KEGG Mapper可视化工具展示富集后的途径及其差异代谢物。

1.6 统计学分析

数据分析采用SPSS 26.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用独立样本t检验,相关性分析用Pearson法,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者基础信息及生理指标分析

ARH组和Control组受试者在年龄、体质指数(body mass index,BMI)和民族等方面的差异均无统计学意义(表2)。与Control组比较,ARH患者的收缩压、舒张压和心率显著升高,而动脉血氧饱和度显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

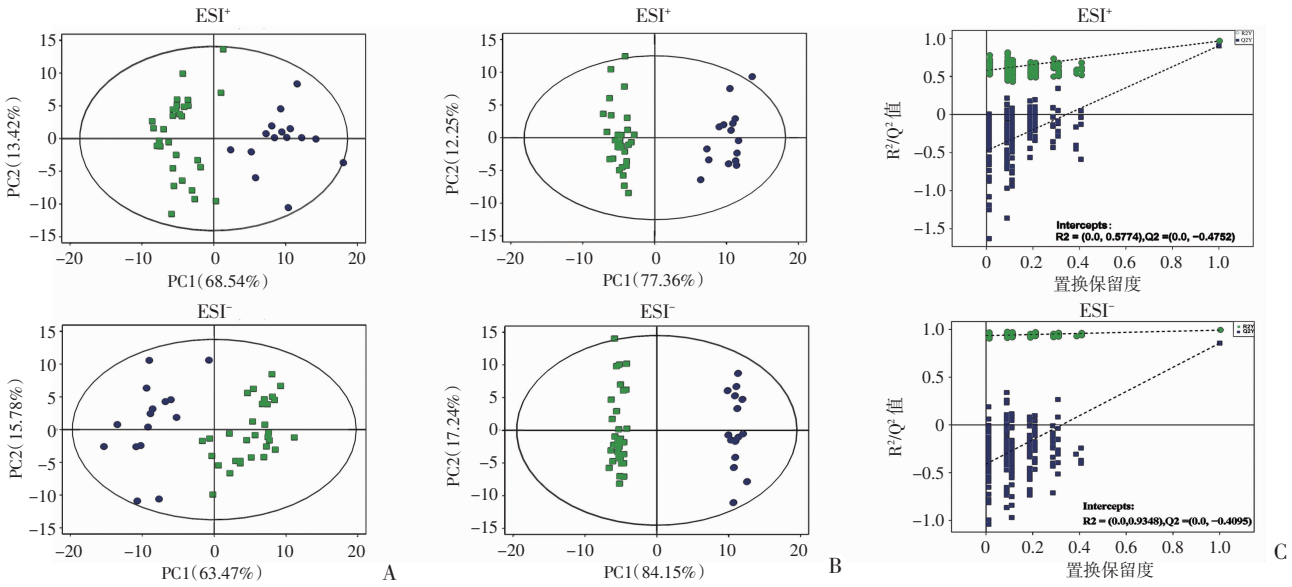
表2 受试者基础信息及生理指标[$\bar{x}\pm s$,例(%)]

指标	Control组($n=30$)	ARH组($n=20$)	P
年龄/岁	22.37±2.29	23.90±4.14	0.099
BMI/(kg/m^2)	21.94±1.54	22.87±2.12	0.079
汉族	26(86.70)	19(95.00)	0.350
收缩压/mmHg	122.00±12.96	147.56±8.28	<0.001
舒张压/mmHg	77.33±8.21	94.34±6.87	<0.001
动脉氧饱和度/%	84.70±4.23	82.29±4.32	0.016
心率/bpm	85.17±11.69	89.01±12.69	0.017

收缩压、舒张压、动脉氧饱和度和心率取3次平均值

2.2 ARH血浆代谢产物指纹图谱分析

待测样本通过正离子和负离子两种模式进行检测后,使用无监督PCA分析对2组血浆中代谢产物指纹差异进行组间和组内变异度分析。在正离子模式下,PC1解释了68.54%的变异,PC2解释了13.42%的变异,PCA图可以解释81.96%的总变异;在负离子模式下,PC1解释了63.47%的变异,PC2解释了15.78%的变异,PCA图可以解释79.25%的总变异(图1A)。使用有监督OPLS-DA模型分析后,正离子模式下:PC1=77.36%,PC2=12.25%,$R^2Y=0.96$,$Q^2Y=0.91$;负离子模式下:PC1=84.15%,PC2=17.24%,$R^2Y=0.99$,$Q^2Y=0.86$,组间差异均超过75%,组内差异均小于20%,同时R^2和Q^2均超过0.5并接近于1(图1B)。为防止模型过拟合,通过7折交叉验证和200次响应排序检验对OPLS-DA模型进行质量考查和验证。正离子模式下R^2拟合直线Y轴截距为0.58,Q^2拟合直线Y轴截距为−0.48;负离子模式下R^2拟合直线Y轴截距为0.93,Q^2拟合直线Y轴截距为−0.41(图1C)。



A:正负离子模式下的PCA分析图;B:正负离子模式下的OPLS-DA分析图;C:正负离子模式下的OPLS-DA排列试验图

图1 正负离子模式下血浆代谢产物PCA和OPLS-DA分析图

2.3 ARH 血浆代谢产物差异性分析

用独立样本 t 检验和差异倍数(fold change, FC)分析比较 2 组之间的血浆代谢产物差异,并绘制火山图。以 $P<0.05$,|Log2 FC|>1 为标准,筛选有差异的血浆代谢产物。ESI^+模式下 ARH 组与 Control 组样本间有显著性差异的代谢产物有 741 个,其中代谢下调的有 647 个,上调的有 94 个;在 ESI^-模式下有 767 种,其中上调的有 121 种,下调的有 646 种(图 2)。

2.4 ARH 血浆中差异代谢产物的筛选与鉴定

在以上工作的基础上,进一步筛选出血浆中具有显著差异的代谢产物,并进行鉴定。首先按照多维统计分析变量重要性投影(variable importance projection, VIP)值>1.3,单变量统计 $P<0.05$ 和|Log2 FC|>1 的标准对血浆中差异代谢产物进行筛选;然后借助质谱猎手个人化合物数据库与谱库管理器在线数据库中的准确质荷对筛选出的差异代谢产物进行鉴定,结果显示,共筛选得到 32 种具有显著差异的代谢产物(表 3)。

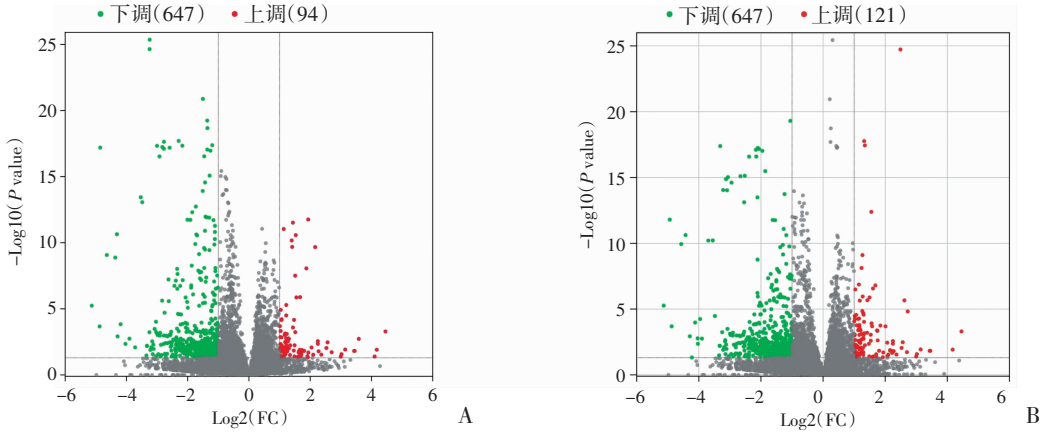


图 2 正离子(A)、负离子(B)模式下血浆代谢产物火山图

表 3 筛选得到的 ARH 血浆中具有显著差异的代谢产物

序号	代谢物	质荷比	KEGG 编号	差异倍数	VIP 值	变化趋势	P
1	Betaine aldehyde	363.58	C00576	0.26	9.46	↓	<0.05
2	D-Proline	307.24	C00763	0.30	4.84	↓	<0.05
3	L-Pyroglutamic acid	450.47	C01879	0.38	2.12	↓	<0.05
4	Maltose	341.10	C00208	0.27	2.09	↓	<0.05
5	Glucosamine	195.10	C00329	0.36	1.68	↓	<0.05
6	L-Arginine	566.63	C00062	0.44	1.62	↓	<0.05
7	Citrate	484.76	C00158	0.43	1.60	↓	<0.05
8	2′-Deoxyguanosine 5′-monophosphate	346.05	C00362	0.48	1.59	↓	<0.05
9	3α-Mannobiose	394.72	C22291	0.47	1.55	↓	<0.05
10	Uracil	111.02	C00106	0.28	1.37	↓	<0.05
11	D-Ornithine	130.05	C00515	0.24	1.37	↓	<0.05
12	Acetylcarnitine	313.04	C02571	0.46	1.36	↓	<0.05
13	Maltotriose	471.73	C01835	0.48	1.35	↓	<0.05
14	L-Glutamate	407.92	C00025	0.34	1.31	↓	<0.05
15	Uridine 5′-monophosphate	323.03	C00105	0.37	1.30	↓	<0.05
16	Hydroxyproline	198.05	C00350	0.41	1.19	↓	<0.05
17	Raffinose	111.02	C00492	0.25	1.18	↓	<0.05
18	Hypoxanthine	156.13	C00262	8.33	30.6	↑	<0.05
19	Taurine	293.13	C00245	3.13	8.00	↑	<0.05
20	Phenol	93.44	C00146	2.07	4.21	↑	<0.05
21	PC (16:0/16:0)	121.32	C00157	2.33	3.76	↑	<0.05

续表 3

序号	代谢物	质荷比	KEGG 编号	差异倍数	VIP 值	变化趋势	*P*
22	Inosine	204.60	C00294	19.20	3.05	↑	<0.05
23	Sphingomyelin (d18:1/18:0)	89.94	C00550	2.17	2.98	↑	<0.05
24	Chenodeoxycholate	74.77	C05466	2.26	2.18	↑	<0.05
25	Allopurinol riboside	203.84	C05325	2.86	2.09	↑	<0.05
26	L-Leucine	265.07	C00123	2.45	2.00	↑	<0.05
27	Phosphorylcholine	556.35	C00588	2.78	1.61	↑	<0.05
28	Cholic acid	407.27	C00695	3.32	1.44	↑	<0.05
29	L-Phenylalanine	261.49	C00079	3.47	1.39	↑	<0.05
30	L-Tryptophan	270.29	C00078	2.46	1.36	↑	<0.05
31	L-Palmitoylcarnitine	174.14	C02990	4.18	1.33	↑	<0.05
32	Adenosine monophosphate	457.79	C00020	2.13	1.25	↑	<0.05

↑:上调;↓:下调

使用层次聚类分析对筛选得到的差异代谢产物进行分类,并使用 Origin 绘图呈现差异代谢产物的相对变化和分布情况。与 Control 组比较,ARH 组血清中 Betaine aldehyde, D-Proline, L-Pyroglutamic acid, Maltose, Glucosamine, L-Arginine, Citrate, 2′-Deoxyguanosine 5′-monophosphate, 3α -Mannobiose, Uracil, D-Ornithine, Acetylcarnitine, Maltotriose, L-Glutamate, Uridine 5′-monophosphate, Hydroxyproline, Raffinose 等 17 种代谢产物含量降低,而 Hypoxanthine, Taurine, Phenol, PC (16:0/16:0), Inosine, Sphingomyelin (d18:1/18:0), Chenodeoxycholate, Allopurinol riboside, L-Leucine, Phosphorylcholine,Cholic acid, L-Phenylalanine,L-Tryptophan, L-Palmitoylcarnitine, Adenosine monophosphate 等 15 种代谢产物含量增加(图 3)。

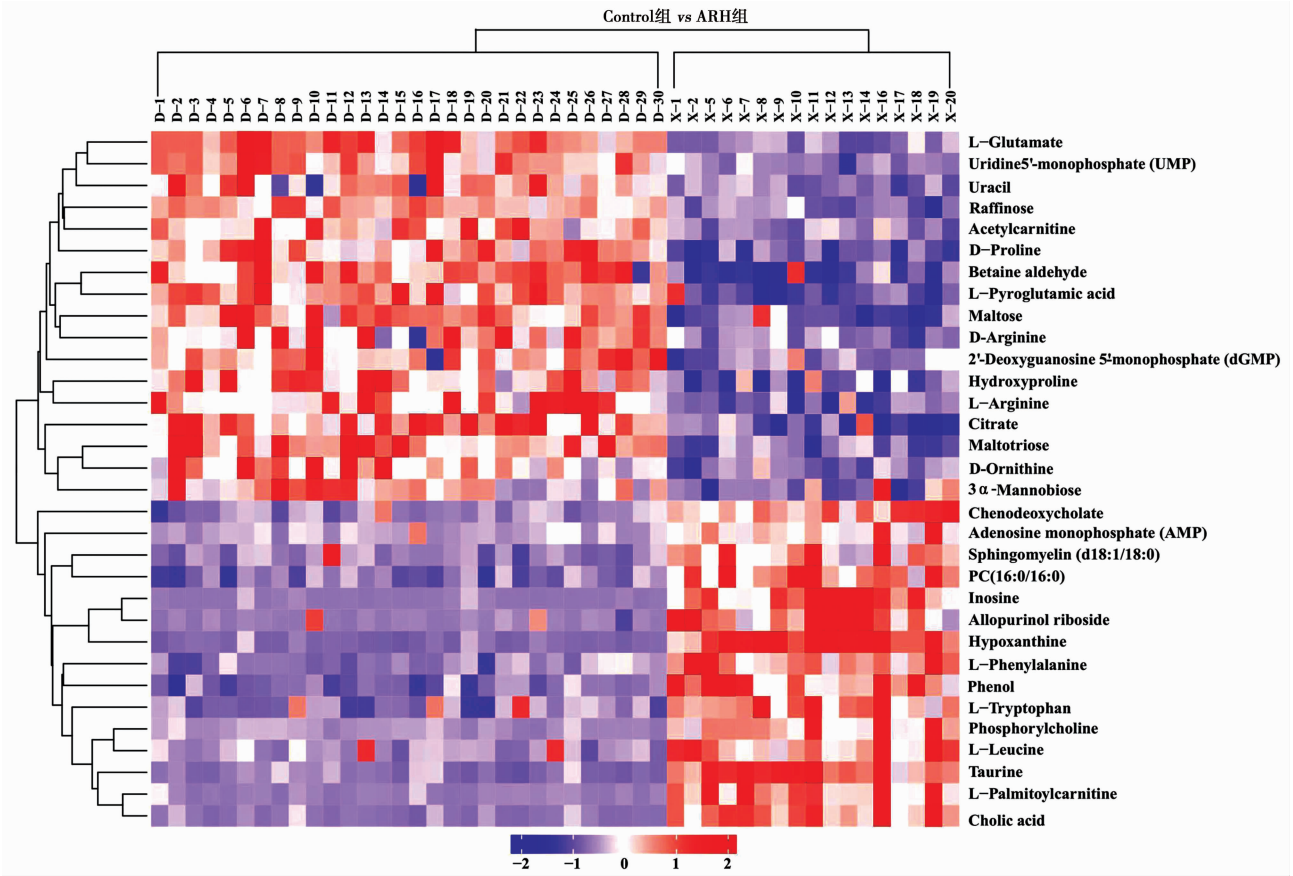


图 3 ARH 血浆中差异代谢产物的层次聚类分析

2.5 ARH 差异代谢产物的 KEGG 富集通路分析

通过对 32 种差异代谢产物进行通路注释分析,发现 10 条显著富集的代谢通路:① Aminoacyl-tRNA biosynthesis;② Purine metabolism;③ Sphingolipid biosynthesis;④mTOR signaling pathway;⑤Taurine and hypotaurine metabolism;⑥Primary bile acid biosynthesis;⑦ D-arginine and D-ornithine metabolism;⑧ Alanine, aspartate and glutamate metabolism;⑨Protein digestion and absorption;⑩Citrate cycle。其中氨酰-tRNA 通路上富集的差异代谢产物最多,通路上囊括了 L-Leucine, L-Phenylalanine, L-Tryptophan, L-Glutamate, D-Proline 等在内的 10 个差异代谢产物。嘌呤代谢通路,鞘脂生物合成通路,mTOR 信号通路,牛磺酸和次牛磺酸代谢通路,初级胆汁酸生物合成通路等也分别富集了 7、3、3、4、6 种差异代谢产物(图 4)。

2.6 差异代谢产物的相关性分析

通过对差异代谢产物的相关性分析,结果发现,Acetylcarnitine、L-Phenylalanine、L-Tryptophan、L-Leucine、D-Proline 之间显著正相关;Allopurinol riboside、Hypoxanthine、Inosine、Phosphorylcholine、Adenosine monophosphate 之间正相关;L-Leucine、L-Tryptophan、L-Phenylalanine 具有相关性(图 5)。

3 讨论

3.1 ARH 差异代谢产物的非靶向代谢组学分析

代谢组学是系统生物学的一个分支,致力于研究与药物毒性、疾病过程和基因表达相关的体内代谢产物变化[10]。非靶向代谢组学是对源自生物体的所有代谢产物进行全面和系统的分析。因非靶向代谢组学可以识别和筛选具有诊断价值的特定生物标志物,在临床研究中具有重要的意义。本研究采用超高效液相色谱-质谱联用(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)非靶向代谢组学技术对 ARH 患者的血浆代谢特征进行分析,通过无监督 PCA 和有监督 OPLS-DA 模型对 ARH 患者血浆中代谢产物的指纹图谱进行分析,通过 7 折交叉验证和 200 次响应排序检验对 OPLS-DA 模型进行质量考查和验证,尽管两种模式下 R^2 拟合直线的 Y 轴截距较大,可能存在假阳性的情况,但 Q^2 拟合直线的斜率均为正值,且 Y 轴截距均小于 0.05,回归线呈向上趋势,未出现过拟合现象,证明模型可靠,可用于后续分析。经过筛选鉴定,共发现 32 种差异代谢产物,主要是氨基酸及其衍生物,其次是核苷酸、脂类、碳水

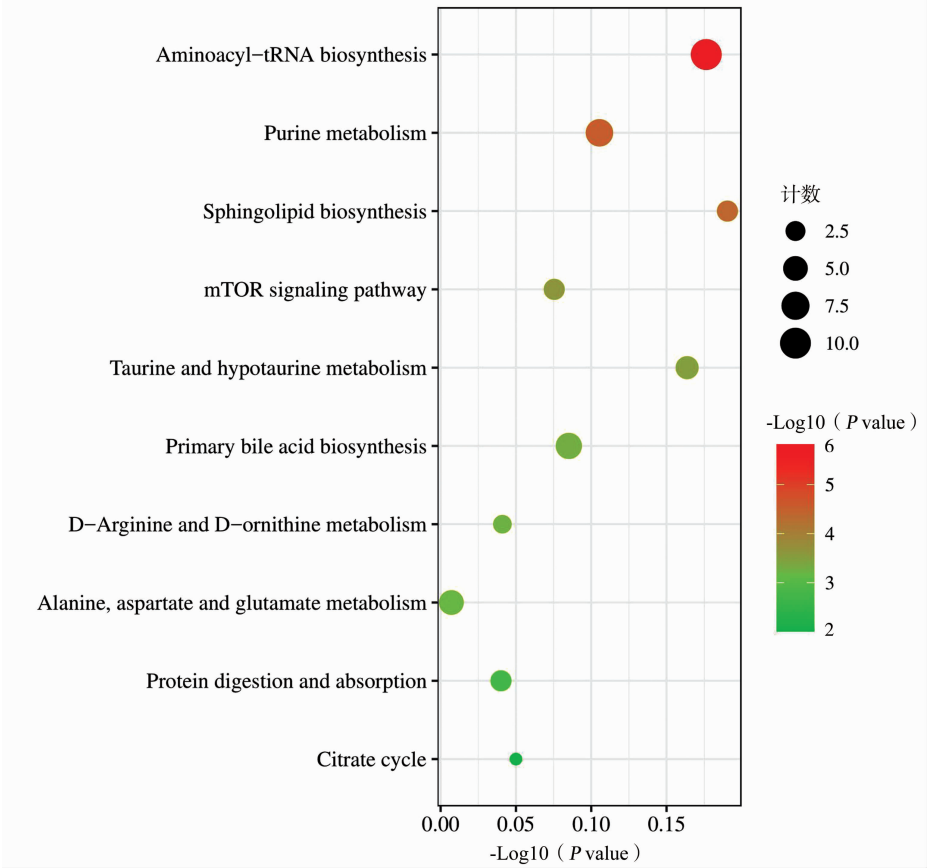
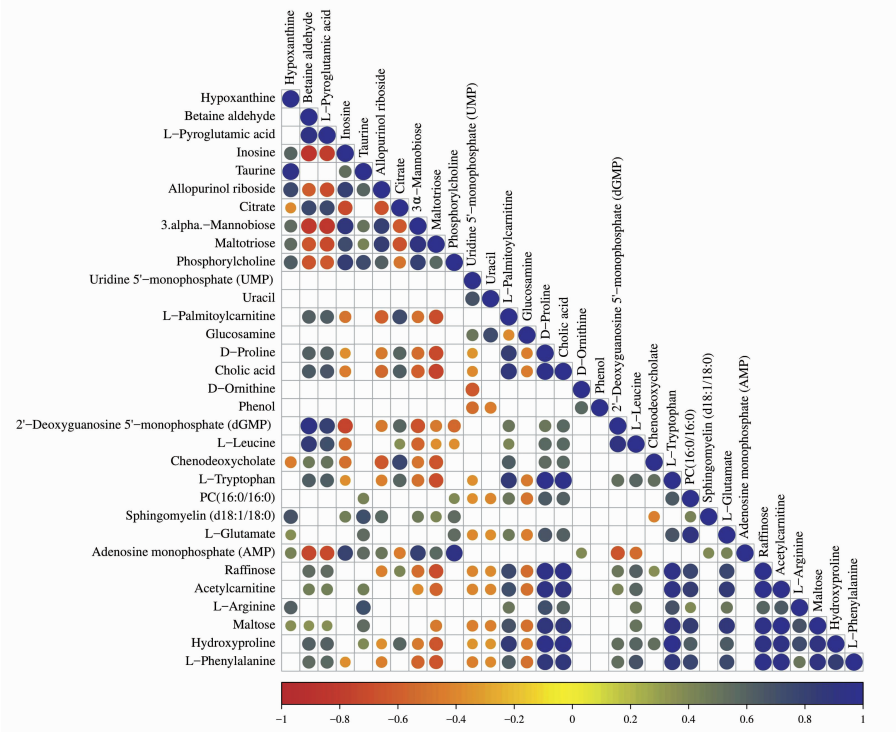


图 4 血浆中差异代谢产物的相关代谢通路 KEGG 富集分析图



圆圈越大代表相关性更强

图 5 血浆中差异代谢产物的相关性分析

化合物、类固醇和磷脂等。差异代谢产物主要富集在氨基酸代谢、脂质代谢、尿酸代谢和胆汁酸代谢等 10 条通路,为进一步筛选 ARH 生物标志物及探索发病机制研究奠定了基础。

3.2 氨基酸在血压调节中的作用

目前,已知的天然氨基酸大约有 500 种,其中许多对血压具有调节作用。研究表明,脯氨酸、精氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺可升高血压,而丝氨酸、丙氨酸、牛磺酸和甘氨酸可以降低血压[11-12]。一氧化氮是调节内皮细胞的关键因素,精氨酸及其相关的氨基酸如瓜氨酸和高精氨酸可能通过一氧化氮调节血压[13-14]。在自发性高血压大鼠模型中,补充瓜氨酸可以增加肾脏一氧化氮的产生并改善高血压[15]。同型半胱氨酸是蛋氨酸的代谢副产物,可通过诱导非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)的产生,损害内皮功能,升高血压。半胱氨酸是硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)的底物,也是抗氧化分子谷胱甘肽的组成部分。谷胱甘肽和 H_2S 信号与血压调节密切相关,因此半胱氨酸可能具有调节血压的作用;牛磺酸作为一种含硫氨基酸也具有舒张血管作用[13]。此外,色氨酸及其代谢产物已被证明可诱导剂量依赖性血管舒张[16]。因此,氨基酸在血压调节中发挥着重要的作用。本研究发现,ARH 患者血清中 L-Leucine、L-Phenylalanine、L-Tryptophan、D-Proline、L-Glutamate 等氨基酸的表达与 Control 组相比差异具有统计学意义。而这些氨基酸大多富集在氨酰-tRNA 通路上,其可能通过该通路发挥血压调节的作用。

3.3 嘌呤代谢在血压调节中的作用

作为人体嘌呤代谢的最终产物,血尿酸是导致或加重高血压的独立危险因素[17]。尿酸生成过程中诱发的氧化应激,尿酸转运障碍和尿酸钠结晶在血管壁中的沉积等机制,均会对血压产生显著影响[18]。另外,组织缺血缺氧发生时会加剧黄嘌呤转化为尿酸的过程。尿酸生成过程会产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),ROS 不仅刺激血管壁增殖,还与一氧化氮结合抑制其血管舒张功能,加重动脉硬化,诱发高血压[18]。本研究发现,ARH 患者组血清嘌呤代谢相关因子的表达显著上调,且与血压呈正相关。因此,嘌呤代谢途径的激活可能是 ARH 发生的另一机制。

3.4 鞘脂代谢在血压调节中的作用

脂质代谢紊乱是高血压的主要特征之一,鞘脂(神经酰胺)、甘油脂(三酰基甘油)和脂肪酰基(油酸、胆固醇酯)代谢与血压密切相关[19]。在地中海饮食预防心血管疾病试验(Prevención con Dieta Mediterránea)中,较高的神经酰胺浓度与较高的舒张压相关[20]。研究表明,神经酰胺是鞘脂生物合成途径的中心中间体,已被发现通过抑制内皮一氧化氮合酶-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶-热休克蛋白 90 信号复合物来诱导血管功能障碍[21]。此外,神经酰胺还可通过钙非依赖性磷脂酶 A2、环加氧酶-1 和血栓素合成酶依赖途径诱导血栓素

A2 释放,可导致内皮依赖性动脉收缩[22]。氯沙坦降压作用的发挥就是通过抑制神经酰胺介导的内皮依赖性血管收缩,改善血管内皮功能实现的[23]。因此,鞘脂可能通过减少内皮源性松弛因子和增加内皮源性收缩因子,加剧内皮功能障碍,导致了高血压的发生。本研究发现,与血压正常者相比,ARH 患者血清中 PC(16:0/16:0), Sphingomyelin (d18:1/18:0)明显增加,可能是导致 ARH 发生的又一机制。

3.5 胆汁酸代谢在血压调节中的作用

胆汁酸对血压同样具有调节作用。在动物实验中发现,胆管结扎可导致全身血管扩张和低血压[24]。在针对肝硬化大鼠模型的实验中,牛磺酸鹅去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TCDCA)和牛去氧胆酸(taurodeoxycholic acid, TDCA)输注增加了肠系膜血流量,扩张了预收缩的肠系膜血管,降低了全身血压[25]。大鼠和小鼠胸主动脉预收缩实验显示,通过去除内皮细胞抑制一氧化氮生成或去除毒蕈碱 M3 受体几乎阻断 TCDCA 血管扩张作用[26]。因此,一氧化氮和毒蕈碱 M3 受体是胆汁酸发挥作用的关键[27]。然而,在大鼠肠系膜血管中,去氧胆酸甘氨酸偶联物通过减少平滑肌细胞中 RhoA 的膜转运来抑制 RhoA/ rho 激酶途径。这表明,共轭胆汁酸对血管功能的调节作用可能不是通过一氧化氮,而是通过降低钙离子通道的敏感性实现的[28]。本研究发现,ARH 患者的牛磺酸和胆汁酸水平明显高于健康对照组。其原因可能是发挥扩张血管作用的共轭胆汁酸、TDCA、TCDCA 生成减少,血管调节障碍,导致血压升高。此外,与 Control 组比较,ARH 患者的 mTOR 信号通路和蛋白质吸收相关因子也存在差异。因此,ARH 发病的原因可能是体内多个通路共同作用的结果。

由于本研究纳入的检测样本有限,可能会导致检测结果出现偏差,需要在人群中进行检测验证。另外本研究建立的 ESI^+/ESI^- 模型 R^2 拟合直线 Y 轴截距较大,可能会出现假阳性的情况,接下来需要增加检测样本量进一步研究。

综上所述,ARH 是一种高原特发病,对进入高原生活人群的身体健康产生显著的影响。如果不进行早期诊治,可能会对人体造成不可逆损伤[29]。通过非靶向代谢组学研究,发现了一些特异的代谢产物差异和相关通路,这些代谢产物及通路可能在 ARH 的发病和调控中发挥着重要的作用。代谢产物谱的差异为诊断 ARH 提供了生物标志物,而富集的代谢通路则为 ARH 的研究奠定了基础,为准确认识 ARH,开展疾病预防和早期诊治提供了可能。

参考文献:

[1] 冉庄, 陈郁, 谭超, 等. 基于新型住宿方舱的弥散供氧对移居高原人员生理学效应的影响[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(8): 707-714. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202010080.
RAN Z, CHEN Y, TAN C, *et al*. Influence of diffuse oxygen supply on physiological effects in migrants in plateau: a study based on a new accommodation cabin[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(8): 707-714. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202010080.

[2] Cb D, Td S, J S, *et al*. Hypertension and acute mountain sickness in Himalayan Trekkers in Nepal: An observational cohort study[J]. Wild Environ Med Wilderness Environ Med, 2020, 31(2): 157 - 164. DOI: 10.1016/j.wem.2020.01.004

[3] 林莹, 张宇清. 高原性高血压的患病率、发病机制及治疗研究进展[J]. 中华高血压杂志, 2020, 28(1): 82-86. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2020.01.025.
LIN Y, ZHANG Y Q. Research progress on the prevalence, pathogenesis and treatment of high primary hypertension[J]. Chin J Hypertens, 2020, 28(1): 82-86. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2020.01.025.

[4] Riley C J, Gavin M. Physiological changes to the cardiovascular system at high altitude and its effects on cardiovascular disease[J]. High Alti Med Biol, 2017, 18(2): 102 - 113. DOI:10.1089/ham.2016.0112.

[5] 刘鑫源, 罗勇军. 急性高原(山)病诊断标准的演变历程及最新进展[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(10): 188-192. DOI: 10.13704/j.cnki.jyyx.2019.10.070.
LIU X Y, LUO Y J. Evolution and recent progress of diagnostic criteria for acute plateau (mountain) disease[J]. J Prev Med Chin PLA, 2019, 37(10): 188-192. DOI: 10.13704/j.cnki.jyyx.2019.10.070.

[6] MINGJI C, ONAKPOYA I J, PERERA R, *et al*. Relationship between altitude and the prevalence of hypertension in Tibet: a systematic review[J]. Heart, 2015, 101(13): 1054 - 1060. DOI: 10.1136/heartjnl-2014-307158.

[7] YUE L, FAN Z, SUN L, *et al*. Prevalence of essential hypertension and its complications among Chinese population at high altitude[J]. High Alti Med Biol, 2017, 18(2): 140-144. DOI: 10.1089/ham.2016.0078.

[8] HOU Y P, WU J L, TAN C, *et al*. Sex-based differences in the prevalence of acute mountain sickness: a meta-analysis[J]. Mil Med Res, 2019, 6(1): 38. DOI: 10.1186/s40779-019-0228-3.

[9] 李淑敏, 蒋海强, 齐冬梅, 等. 基于代谢组学技术筛选与血压升高相关的差异性代谢物[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 23-30. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.004.
LI S M, JIANG H Q, QI D M, *et al*. Screening of differential metabolites related to elevated blood pressure according to metabolomics technology[J]. Chin J Comp Med, 2022, 32

(6):23-30. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.004.

[10] LAW W S, HUANG P Y, ONG E S, *et al*. Metabonomics investigation of human urine after ingestion of green tea with gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography/mass spectrometry and (1)H NMR spectroscopy[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(16): 2436-2446. DOI:10.1002/rcm.3629.

[11] MANTZOURANIS E, KAKARGIA E, KAKARGIAS F, *et al*. The impact of high protein diets on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies[J]. Nutrients, 2023, 15(6): 1372. DOI:10.3390/nu15061372.

[12] ZHANG X Y, SERGIN I, EVANS T D, *et al*. High-protein diets increase cardiovascular risk by activating macrophage mTOR to suppress mitophagy[J]. Nat Metab, 2020, 2(1): 110-125. DOI:10.1038/s42255-019-0162-4.

[13] ABEBE W, MOZAFFARI M S. Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies[J]. Am J Cardiovasc Dis, 2011, 1(3): 293-311.

[14] MOALI C, BOUCHER J L, SARI M A, *et al*. Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their N omega-hydroxy derivatives, and N omega-hydroxynor-L-arginine[J]. Biochemistry, 1998, 37(29): 10453-10460. DOI:10.1021/bi980742t.

[15] KOENERS M P, VAN FAASSEN E E, WESSELING S, *et al*. Maternal supplementation with citrulline increases renal nitric oxide in young spontaneously hypertensive rats and has long-term antihypertensive effects[J]. Hypertension, 2007, 50(6): 1077-1084. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.095794.

[16] WANG Y T, LIU H Z, MCKENZIE G, *et al*. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation[J]. Nat Med, 2010, 16(3): 279-285. DOI:10.1038/nm.2092.

[17] 方宁远, 吕力为, 吕晓希, 等. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识(2023年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2023, 43(6): 461-480. DOI:10.19538/j.nk2023060106.
FANG N Y, LYU L W, LYU X X, *et al*. China multi-disciplinary expert consensus on diagnosis and treatment of hyperuricemia and related diseases (2023 Edition)[J]. Chin J Pract Intern Med, 2023, 43(6): 461-480. DOI:10.19538/j.nk2023060106.

[18] KUWABARA M. Hyperuricemia, cardiovascular disease, and hypertension[J]. Pulse (Basel), 2016, 3(3/4): 242-252. DOI:10.1159/000443769.

[19] LIN Y T, SALIHOVIC S, FALL T, *et al*. Global plasma metabolomics to identify potential biomarkers of blood pressure progression[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(8): e227-e237. DOI:10.1161/ATVBAHA.120.314356.

[20] WANG D D, TOLEDO E, HRUBY A, *et al*. Plasma ceramides, Mediterranean diet, and incident cardiovascular disease in the PREDIMED trial (prevención con dieta mediterránea)[J]. Circulation, 2017, 135(21): 2028-2040. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024261.

[21] JIANG X C, GOLDBERG I J, PARK T S. Sphingolipids and cardiovascular diseases: lipoprotein metabolism, atherosclerosis and cardiomyopathy[J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 721: 19-39. DOI:10.1007/978-1-4614-0650-1_2.

[22] SPIJKERS L J A, VAN DEN AKKER R F P, JANSSEN B J A, *et al*. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role for ceramide[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21817. DOI:10.1371/journal.pone.0021817.

[23] SPIJKERS L J, JANSSEN B J, NELISSEN J, *et al*. Antihypertensive treatment differentially affects vascular sphingolipid biology in spontaneously hypertensive rats[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29222. DOI:10.1371/journal.pone.0029222.

[24] HENNENBERG M, TREBICKA J, SAUERBRUCH T, *et al*. Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension[J]. Gut, 2008, 57(9): 1300-1314. DOI:10.1136/gut.2007.144584.

[25] LJUBUNCIC P, SAID O, EHRLICH Y, *et al*. On the *in vitro* vasoactivity of bile acids[J]. Br J Pharmacol, 2000, 131(3): 387-398. DOI:10.1038/sj.bjp.0703554.

[26] KHURANA S, YAMADA M, WESS J, *et al*. Deoxycholyltaurine-induced vasodilation of rodent aorta is nitric oxide- and muscarinic M(3) receptor-dependent[J]. Eur J Pharmacol, 2005, 517(1/2): 103-110. DOI:10.1016/j.ejphar.2005.05.037.

[27] NAKAJIMA T, OKUDA Y, CHISAKI K, *et al*. Bile acids increase intracellular Ca(2+) concentration and nitric oxide production in vascular endothelial cells[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(7): 1457-1467. DOI:10.1038/sj.bjp.0703471.

[28] JADEJA R N, THOUNAOJAM M C, BARTOLI M, *et al*. Deoxycholylglycine, a conjugated secondary bile acid, reduces vascular tone by attenuating Ca^{2+} sensitivity via rho kinase pathway[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 348: 14-21. DOI:10.1016/j.taap.2018.04.012.

[29] 叶梓, 刘鑫源, 陈郁, 等. 基于血液学参数的急性高原反应潜在预测指标的筛查分析[J]. 重庆医学, 2023, 52(23): 3560-3566. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.23.007.
YE Z, LIU X Y, CHEN Y, *et al*. Screening analysis of potential predictors of acute mountain sickness based on hematological parameters[J]. Chongqing Med, 2023, 52(23): 3560-3566. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.23.007.

(**收稿**:2023-11-01;**修回**:2024-05-18)

(编辑 邓强庭)