doi:10.11659/jjssx.05E024081

·临床研究·

代谢组学结合机器学习算法探究心脏瓣膜置换术后早期认知功能障碍生物标志物

陈 薇[1],佘 汉[1,2],唐小嗙[1],陈 伟[1],刘良明[2],李 涛[2],胡 弋[1] (1.陆军特色医学中心麻醉科,重庆 400042;2.野战外科研究部战伤休克与输血研究室/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 通过代谢组学结合机器学习算法对心脏瓣膜置换术后早期认知功能障碍(POCD)的患者术前血清代谢物进行系统研究,筛选可预测心脏瓣膜置换术后早期POCD的生物标志物,并探讨相应的代谢调控机制。**方法** 选择接受体外循环下心脏瓣膜置换术的患者60例,根据是否发生POCD将其分为早期POCD组(P组)和非POCD组(N组)。对P组和N组患者术前血清进行代谢组学分析,筛选差异代谢物及代谢通路。采用随机森林算法鉴定早期POCD的相关生物标志物。**结果** 经代谢组学分析,共检测出532种差异代谢物,采用随机森林算法筛选出5种生物标志物,分别为喹啉、3′-唾液酸乳糖、鞘磷脂(d18:1/20:0)、溶血磷脂酰胆碱[P-18:1(9Z)]和25-羟基胆固醇,其中富集到的主要代谢途径是苯丙氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成、抗坏血酸和醛酸盐代谢、戊糖和葡萄糖酸盐的相互转化、色氨酸代谢、药物代谢-细胞色素P450、卟啉与叶绿素代谢。**结论** 体外循环下心脏瓣膜置换术后发生早期POCD的患者术前多条代谢途径发生了变化,可能导致早期POCD的发生。喹啉、3′-唾液酸乳糖、鞘磷脂(d18:1/20:0)、溶血磷脂酰胆碱[P-18:1(9Z)]和25-羟基胆固醇可能成为预测早期POCD的生物标志物。

[关键词] 代谢组学;随机森林算法;心脏手术;早期术后认知功能障碍;生物标志物

[中图分类号] R614 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-06-16

Metabolomics combined with machine learning algorithms in exploring biomarkers of early postoperative cognitive dysfunction after heart valve replacement

CHEN Wei[1], SHE Han[1,2], TANG Xiao-feng[1], CHEN Wei[1], LIU Liang-ming[2], LI Tao[2], HU Yi[1] (1.Department of Anesthesiology, Army Specialty Medical Center, Chongqing 400042, China; 2.Laboratory of War Injury Shock and Blood Transfusion, Field Surgery Research Department/State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective Metabolomics combined with machine learning algorithms was used to systematically study the preoperative serum metabolites of patients with early postoperative cognitive dysfunction (POCD) after heart valve replacement, so as to screen biomarkers that may predict early POCD after heart valve replacement and explore the corresponding metabolic regulatory mechanisms. **Methods** A total of 60 patients underwent heart valve replacement under extracorporeal circulation were selected and divided into early-POCD group (group P) and non-POCD group (group N) according to whether POCD occurred or not. Metabolomic analysis was performed on preoperative serum samples of patients in group P and group N to screen the differential metabolites and metabolic pathways. The biomarkers related to early POCD were identified by random forest algorithm. **Results** A total of 532 differential metabolites were detected by metabonomics analysis, and 5 biomarkers were screened by random forest algorithm, namely quinoline, 3′-sialyllactose, sphingomyelin (d18: 1/20: 0), lysophosphatidylcholine [P-18:1(9Z)] and 25-hydroxycholesterol. Among them, the main metabolic pathways were phenylalanine metabolism, primary bile acid biosynthesis, ascorbic acid and aldonate metabolism, pentose and glucuronate interconversion, tryptophan metabolism, drug metabolism-cytochrome P450, porphyrin and chlorophyll metabolism. **Conclusion** Many metabolic pathways in patients with early POCD after heart valve replacement under extracorporeal circulation have changed before operation, which may lead to the occurrence of early POCD. Quinoline, 3′-sialyllactose, sphingomyelin (d18:1/20:0), lysophosphatidylcholine [P-18:1(9Z)] and 25-hydroxycholesterol may be biomarkers for predicting early POCD.

Keywords: metabolomics; random forest algorithm; heart surgery; early postoperative cognitive dysfunction; biomarker

体外循环下心脏瓣膜置换术是治疗心脏瓣膜病的重要手术方式,属于有创术式,患者应激反应较强烈,容易发生术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction,POCD),并且早期POCD发生率为53%~80%,导致患者学习记忆、计算速度、执行能力等认知功能受损[1-3]。因此,确定可靠的生物标志物对于诊断和治疗早期POCD至关重要。

[基金项目] 国家自然科学基金(82300561);重庆市自然科学基金(CSTB2023NSCQ-MSX0713)

[通信作者] 胡 弋,E-mail:huyi921@sina.com

代谢组学作为生物分析化学的一个分支,可以检测到能够穿过血脑屏障的低分子量代谢物,使其成为识别中枢神经功能相关生物标志物的有力工具[4]。Luo等[5]发现脂质代谢异常在2型糖尿病轻度认知功能障碍中起着重要作用,溶血磷脂酰胆碱(18:0)可以作为2型糖尿病轻度认知功能障碍的生物标志物。随机森林算法可以区分不同组别之间的差异[6],根据各代谢物对分类的贡献程度,筛选潜在的标志物。但目前能否利用代谢组学结合随机森林算法筛选可预测早期POCD的相关生物标志物,尚无明确结论。

因此,本研究以体外循环下心脏瓣膜置换术患者为研究对象,运用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight -mass spectrometry,UPLC-Q-TOF-MS)与随机森林算法,从代谢变化角度探索可预测早期POCD的相关生物标志物,为心脏手术患者早期POCD的诊断和治疗提供潜在有利靶点。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择2021年11月至2023年1月陆军特色医学中心心脏血管外科接受体外循环下心脏瓣膜置换术的患者60例,其中男32例、女28例,年龄30~65岁,美国麻醉师协会(American Society of Anesthesiologist,ASA)评级Ⅱ~Ⅲ级。排除标准:①有认知功能障碍;②中枢神经系统病史;③无法配合认知功能评估;④酒精依赖史或者药物依赖史。2组患者的年龄、性别、学历、ASA分级、术前简易智力状态检查量表(mini-mental state examination,MMSE)评分、手术时间、体外循环时间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究经我院伦理委员会批准[伦理批号:(2021)第119号],经中国临床试验注册中心审核(注册号:ChiCTR2200061798),患者或家属签署对本研究的知情同意书。

1.2 认知功能评估

于术前1 d、术后3 d对60例患者进行MMSE评分。术后MMSE评分较术前降低≥2分则判定为发生早期POCD。根据是否发生POCD,将60例患者分为早期POCD组(P组)15例和非POCD组(N组)45例。

1.3 血液样本采集和代谢物提取

在术晨采集患者静脉血5 mL,于离心管内室温静置1 h。以3 000 r/min(离心力13 800 g,半径8.6 cm)离心10 min,取上清液,每管0.2 mL,于-80 ℃冻存。取50 μL样品,加入提取液200 μL,涡旋搅拌30 s;超声处理10 min;于-40 ℃静置后,将样品在4 ℃下以12 000 r/min(离心力13 800 g,半径8.6 cm)离心15 min;取上清液上机检测。

1.4 数据分析和处理

采用Vanquish超高效液相色谱仪,通过Waters ACQUITY UPLC BEH Amide液相色谱柱分离目标化合物。利用自主开发的R程序包(内核为XCMS)实现峰识别、峰提取、峰对齐及积分等,然后在BiotreeDB(V2.1)自建二级质谱数据库中进行物质注释匹配,将算法打分的Cutoff值设置为0.3。进行正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis,OPLS-DA),选择满足变量的重要位置信息(variable importance in projection,VIP)>1.0、$P<0.05$的化合物作为差异代谢物。使用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)路径数据库(http://www.genome.jp/kegg/)、MetaboAnalyst 5.0(http://metpa.metabolomics.ca)进行分析,研究差异代谢物的代谢富集途径。

1.5 基于随机森林Boruta算法筛选关键差异代谢物及受试者工作特征(*receiver operating characteristic*,*ROC*)曲线分析

采用随机森林算法对血清样本的数据进行分析处理,用于筛选关键差异代谢物。然后进行受试者工作特征*ROC*曲线分析,并计算曲线下面积(*area under the curve*,*AUC*)来评估差异代谢物的预测性能。

1.6 统计分析

采用SPSS 25.0统计学软件对数据进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用t检验;计数资料以率(%)表示,组间比较采用χ^2检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。组间差异性采用OPLS-DA进行分析。

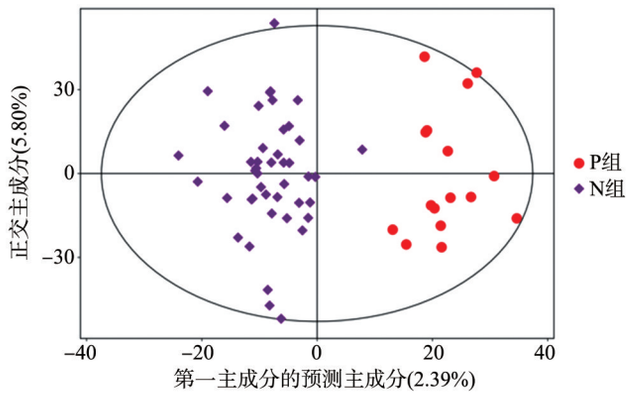
2 结果

2.1 P组与N组术前样本差异性和有效性分析

OPLS-DA模型得分散点图显示P组与N组术前样本组间的差异性良好,见图1。

2.2 P组和N组差异性内源性代谢物的发现和鉴定

P组和N组比较,正、负离子模式共检测出532种差异代谢物,其中40种代谢物与早期POCD相关(图2)。与N组相比,P组下调的代谢物主要有:25-羟基胆固醇、鞘磷脂(d18:1/24:1,d18:1/20:0)、磷脂酰胆碱(22:4/14:0,20:4/20:3,22:6/16:0)、3′-唾液酸乳糖、甘露醇、N4-乙酰胞苷、D-木糖等;上调的代谢物主要



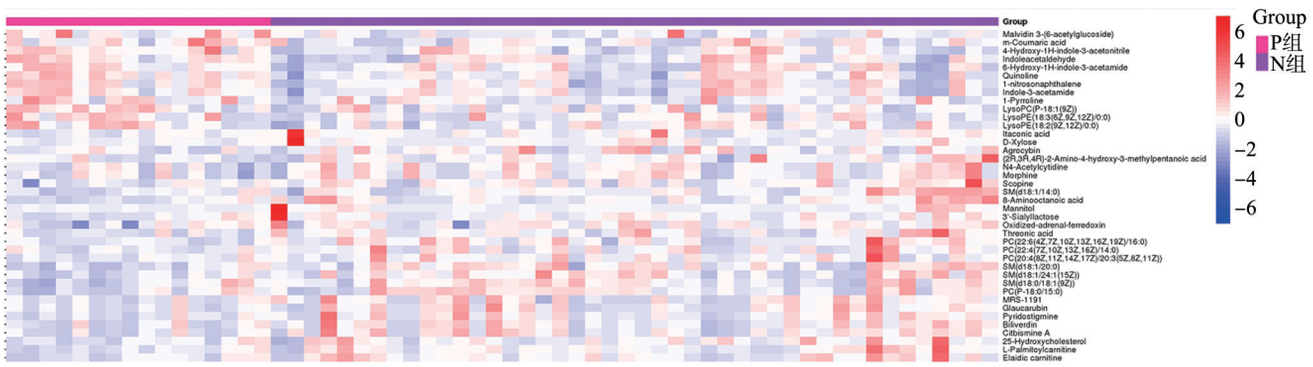
注:每个散点代表一个样本,散点形状和颜色表示不同的实验分组,样本间横向距离越远说明组间差异越大,纵向距离越近说明组内重复性越高

图1 P组对N组的OPLS-DA模型得分散点图

有吲哚-3-乙醛、喹啉、溶血磷脂酰胆碱[P-18:1(9Z)]、溶血磷脂乙醇胺类、1-吡咯啉、间香豆酸等。

2.3 识别POCD关键差异代谢物的发现和鉴定

为进一步评估P组和N组之间代谢物的差异,构建一个随机森林模型,使用最小误差回归树筛选差异代谢物(图3)。根据"平均精确度减少(mean decrease accuracy, MDA)值越大,重要性越大"的原则对MDA值排前10位的差异代谢物进行分析,其中喹啉、3′-唾液酸乳糖、鞘磷脂(d18:1/20:0)、溶血磷脂酰胆碱[P-18:1(9Z)]、25-羟基胆固醇等5种代谢物与认知功能密切相关,可能作为预测早期POCD的关键差异代谢物。



注:红色表示该物质在所在组含量表达较高,蓝色表示该物质在所在组含量表达较低

图2 P组对N组的层次聚类分析热力图

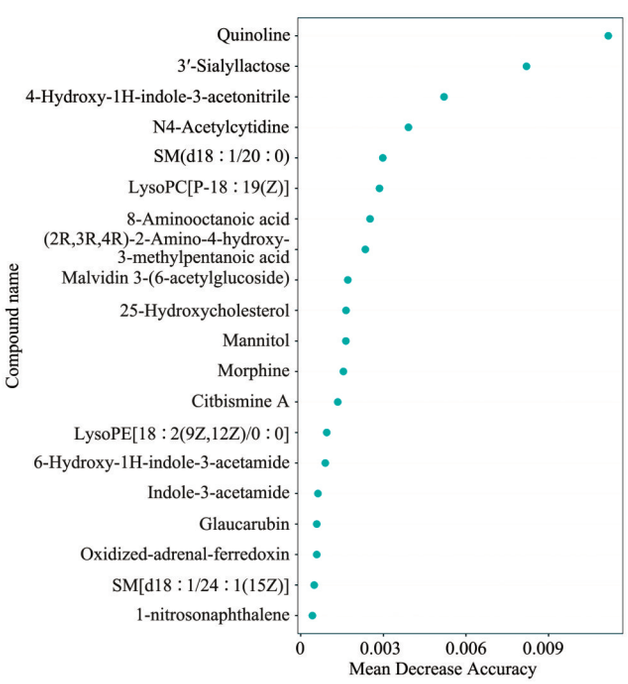


图3 随机森林MDA

2.4 评估筛选代谢物性能

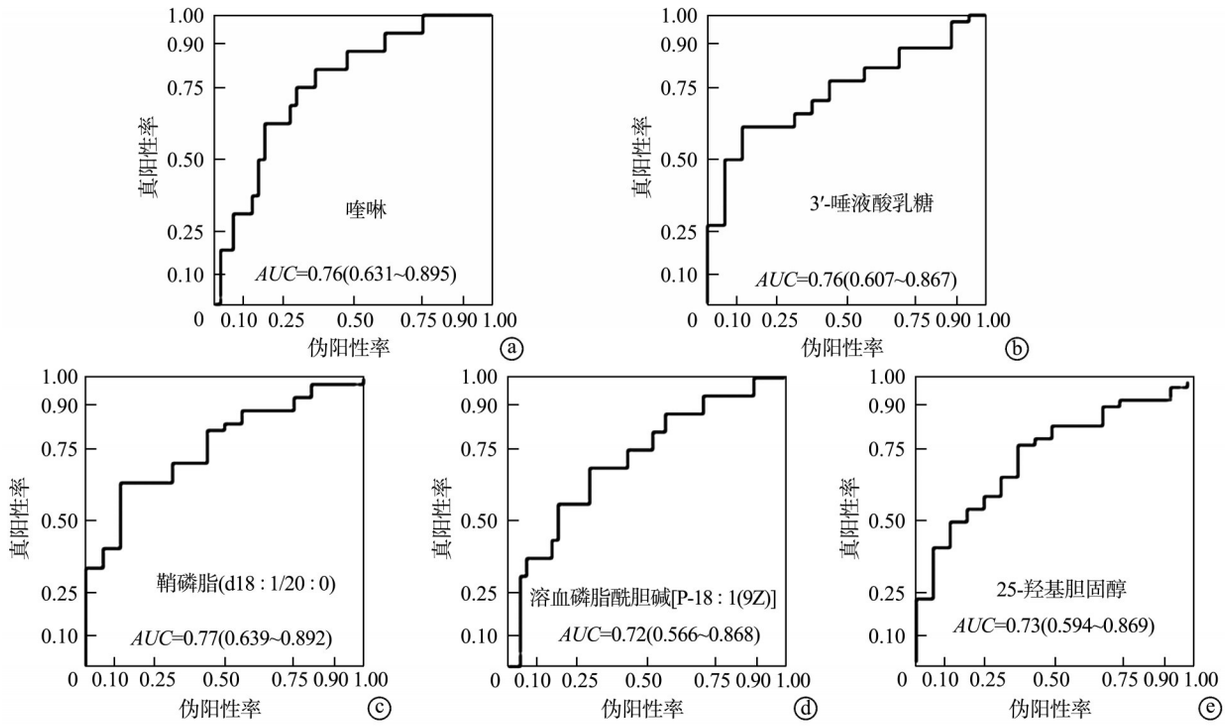
进一步构建*ROC*曲线,通过*ROC*曲线分析筛选差异代谢物,并计算*AUC*。结果显示,5种关键差异代谢物喹啉、3′-唾液酸乳糖、鞘磷脂(d18:1/20:0)、溶血磷脂酰胆碱[P-18:1(9Z)]、25-羟基胆固醇的*AUC*分别为0.76、0.74、0.77、0.72、0.73,均大于0.7,提示随机森林模型识别的这5种差异代谢物对早期POCD具有良好的预测能力(图4)。

2.5 P组和N组差异代谢物的通路分析

通过对差异代谢物进行富集分析,差异表达代谢物途径主要涉及苯丙氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成、抗坏血酸和醛酸盐代谢、戊糖和葡萄糖酸盐的相互转化、色氨酸代谢、药物代谢-细胞色素P450、卟啉与叶绿素代谢,见图5。

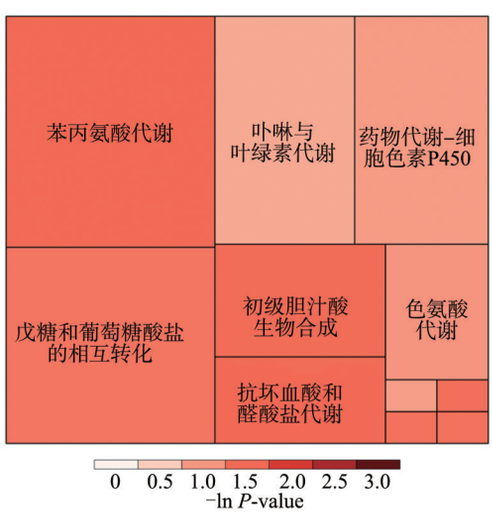
3 讨论

在本研究中,代谢组学分析共鉴定出532种差异代谢物。利用随机森林算法识别早期POCD诊断相关的5种代谢生物标志物:喹啉、3′-唾液酸乳糖、鞘磷脂(d18:1/20:0)、溶血磷脂酰胆碱[P-18:1(9Z)]、25-羟基胆固醇。*ROC*曲线结果显示,5种差异代谢物可作为预测体外循环下心脏瓣膜置换术早期POCD的生物标志物。



a:喹啉;b:3′-唾液酸乳糖;c:鞘磷脂(d18:1/20:0);d:溶血磷脂酰胆碱[P-18:1(9Z)];e:25-羟基胆固醇

图4 差异代谢物*AUC*(括号内为95%*CI*)



注:方块颜色表示富集分析的*P*值[取负自然对数,即-ln(*P*)],颜色越深,*P*值越小,富集程度越显著

图5 P组对N组的代谢通路矩形树分析图

喹啉是喹啉酸的代谢产物,喹啉酸是色氨酸代谢产生的一种神经毒性物质[7]。喹啉酸结合N-甲基-D-天冬氨酸受体产生神经毒性作用,并通过炎症反应、诱导神经元和星形细胞凋亡等途径参与多种神经退行性疾病的发生发展[8]。喹啉酸还与学习记忆能力相关,研究发现在脑室内注入喹啉酸后,大鼠的记忆能力和空间学习能力明显受损[9]。色氨酸代谢在微脑血管中的产物主要靶点为芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AhR)。AhR信号激活一方面会影响一氧化氮的产生和血管舒张,另一方面还可引发氧化应激、刺激炎症反应、加速细胞衰老,并促进血管壁钙化,最终导致血脑屏障的完整性受损,破坏脑血管稳态[10]。本研究结果也显示,P组患者色氨酸代谢通路富集程度明显,提示该通路异常可能导致早期POCD的发生。

3′-唾液酸乳糖被溶酶体内的唾液酸酶水解,释放游离唾液酸(sialic acid,SA)[11]。SA能抑制Aβ聚集、通过唾液化减少神经炎症反应,是神经元修复重塑的重要调节剂[12-13]。Wang等[14]用添加SA的配方奶喂养仔猪,发现SA可以显著提高猪仔的学习记忆能力。在大脑内,SA是以神经节苷脂的一部分存在的,单唾液酸四己糖神经节苷脂是最重要的神经节苷脂之一。有研究发现,单唾液酸四己糖神经节苷脂可以减轻Aβ诱导的氧化应激,改善阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)大鼠模型中的记忆缺陷[15]。

鞘磷脂是髓鞘中包围神经细胞轴突的必需分子,可形成屏障防止轴突损伤,促进神经冲动的传导[16]。鞘磷脂存在于生物膜中,与胆固醇形成脂筏,在神经传递和突触可塑性中发挥关键作用,脂筏的失调与神经退行性疾病的发病机制有关[17]。在中枢神经系统中,鞘磷脂可能影响淀粉样蛋白前体蛋白加工和神经元兴奋性,从而影响AD的进展[18-19]。Qiang等[20]的研究结果显示,鞘磷脂对痴呆具有预防作用,鞘磷脂水平升高与痴呆风险降低相关,结合机器学习算法发现在

与痴呆相关的代谢产物中,鞘磷脂是重要性最高的代谢物之一。

溶血磷脂酰胆碱是参与细胞信号传导的内源性磷脂,在血管炎症中充当促炎介质[21]。溶血磷脂酰胆碱诱导脊髓白质脱髓鞘,降低细胞内cAMP水平,诱导促凋亡基因表达,进而抑制少突胶质细胞存活[22]。少突胶质细胞是产生髓磷脂的细胞,为神经元提供代谢支持并防止神经退行性变[23]。溶血磷脂酰胆碱诱导的神经炎症可引起免疫细胞浸润和星形胶质细胞活化,活化的星形胶质细胞释放促炎细胞因子和白细胞介素-1β、肿瘤坏死因子-α等趋化因子,导致记忆巩固障碍[24]。Plemel等[25]将溶血磷脂酰胆碱注入小鼠白质束中,小鼠发生快速脱髓鞘和神经退行性变,导致学习和记忆障碍。

25-羟基胆固醇是胆固醇被氧化后的氧甾醇,参与初级胆汁酸生物合成代谢,是神经炎症、突触传递和髓鞘形成的有效调节剂。25-羟基胆固醇的一个靶点是谷氨酸NMDA受体(NMDARs),25-羟基胆固醇能够减弱24(S)-hc诱导的NMDAR过度激活导致的神经细胞损失增加,即兴奋性毒性[26]。初级胆汁酸代谢是由细胞色素P450酶家族促进的,初级胆汁酸包括胆酸和鹅去氧胆酸。有研究连续6周将三氯化铝注射进大鼠的腹腔内,造成神经毒性,导致大鼠AD,随后每天注射鹅去氧胆酸可显著减轻三氯化铝诱导的认知和空间缺陷,并通过降低Aβ42水平减少海马Aβ生成[27]。本研究结果亦显示初级胆汁酸代谢通路富集程度明显,说明该通路对早期POCD影响显著。

综上,体外循环下心脏瓣膜置换术发生早期POCD的患者术前多条代谢途径发生变化,可能导致早期POCD的发生。喹啉、3′-唾液酸乳糖、鞘磷脂(d18:1/20:0)、溶血磷脂酰胆碱[P-18:1(9Z)]和25-羟基胆固醇可能成为预测早期POCD的生物标志物。

[参考文献]

[1] Nemeth E, Vig K, Racz K, et al. Influence of the postoperative inflammatory response on cognitive decline in elderly patients undergoing on-pump cardiac surgery: a controlled, prospective observational study[J]. BMC Anesthesiol, 2017, 17(1): 113. doi: 10.1186/s12871-017-0408-1.

[2] Urcun YS, Altun Y, Pala AA. Early and late predictors of postoperative neurocognitive dysfunction in cardiac surgery[J]. Ideggyogy Sz, 2022, 75(7-08): 231-240. doi: 10.18071/isz.75.0231.

[3] Qin JH, Ma QG, Ma DM. Low-dose sevoflurane attenuates cardiopulmonary bypass (CPB) -induced postoperative cognitive dysfunction(POCD)by regulating hippocampus apoptosis vi PI3K/AKT pathway[J]. Current Neurovasc Res, 2020, 17(3): 232-240. doi: 10.2174/1567202617666200513085403.

[4] Ke C, Pan CW, Zhang Y, et al. Metabolomics facilitates the discovery of metabolic biomarkers and pathways for ischemic stroke: a systematic review[J]. Metabolomics, 2019, 15(12): 152. doi: 10.1007/s11306-019-1615-1.

[5] Luo T, Jiang X. Risk factors and metabolomics of mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus[J]. Front Mol Biosci, 2024, 11: 1341290. doi: 10.3389/fmolb.2024.1341290.

[6] Breiman L. Random forests[J]. Machine Learning, 2001, 45(1): 5-32. doi: 10.1023/a:1010933404324.

[7] Orhan F, Schwieler L, Engberg G, et al. Kynurenine metabolites in CSF and plasma in healthy males[J]. Int J Tryptophan Res, 2024, 17: 11786469241245323. doi: 10.1177/11786469241245323.

[8] da Silveira TL, Zamberlan DC, Arantes LP, et al. Quinolinic acid and glutamatergic neurodegeneration in caenorhabditis elegans[J]. Neurotoxicology, 2018, 67: 94-101. doi: 10.1016/j.neuro.2018.04.015.

[9] Arora MK, Kisku A, Jangra A. Mangiferin ameliorates intracerebroventricular- quinolinic acid-induced cognitive deficits, oxidative stress, and neuroinflammation in Wistar rats[J]. Indian J Pharmacol, 2020, 52(4): 296-305. doi: 10.4103/ijp.IJP_699_19.

[10] Salminen A. Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in Alzheimer's disease: role of tryptophan metabolites generated by gut host-microbiota[J]. J Mol Med (Berl), 2023, 101(3): 201-222. doi: 10.1007/s00109-023-02289-5.

[11] Sprenger N, Duncan PI. Sialic acid utilization[J]. Adv Nutr, 2012, 3(3): 392S-397S. doi: 10.3945/an.111.001479

[12] Bucciantini M, Nosi D, Forzan M, et al. Toxic effects of amyloid fibrils on cell membranes: the importance of ganglioside GM1[J]. FASEB J, 26(2): 818-831. doi: 10.1096/fj.11-189381.

[13] Sgambati E, Tani A, Leri M, et al. Correlation between sialylation status and cell susceptibility to amyloid toxicity[J]. Cells, 2022, 11(4): 601. doi: 10.3390/cells11040601.

[14] Wang B, Yu B, Karim M, et al. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets[J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(2): 561-569. doi: 10.1093/ajcn/85.2.561.

[15] Wang X, Li B, Yu X, et al. The neuroprotective effect of GM-1 ganglioside on the amyloid-beta-induced oxidative stress in PC-12 cells mediated by Nrf-2/ARE signaling pathway[J]. Neurochem Res, 2022, 47(8): 2405-2415. doi: 10.1007/s11064-022-03635-8.

[16] Schneider N, Hauser J, Oliveira M, et al. Sphingomyelin in brain and cbgnitivedevelopment: preliminary data[J]. eNeuro, 2019, 6(4): ENEURO.0421-18.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0421-18.2019.

[17] Moll T, Marshall JNG, Soni N, et al. Membrane lipid raft homeostasis is directly linked to neurodegeneration[J]. Essays Biochem, 2021, 65(7): 999-1011. doi: 10.1042/ebc20210026.

[18] Fabelo N, Martín V, Marín R, et al. Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions[J]. Neurobiol Aging, 2014, 35: 1801-1812. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.005.

[19] Norman E, Cutler RG, Flannery R, et al. Plasma membrane sphingomyelin hydrolysis increases hippocampal neuron excitability by sphingosine1-phosphate mediated mechanisms[J]. J Neurochem, 2010, 114(2): 430-439. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06779.x.

[20] Qiang YX, You J, He XY, et al. Plasma metabolic profiles predict future dementia and dementia subtypes: a prospective analysis of 274, 160 participants[J]. Alzheimers Res Ther, 2024, 16(1): 16. doi: 10.1186/s13195-023-01379-3.