

• 综述 •

代谢组学与冠心病

李晓英 综述 赵玉生 审校

冠心病是目前世界范围内危害最大的心脏病^[1],也是中国成年人心脏病住院和死亡的第一位原因,其发病率和死亡率依然呈上升趋势^[2]。几十年来,冠心病的许多易患因素已经明确,但动脉粥样硬化的分子机制还不完全清楚。

代谢是生命活动的基本形式,代谢组学技术是运用系统研究的手段,分析生物体受到干扰刺激后,其全部的代谢变化^[3]。例如在疾病状态下,代谢产物的组成和浓度等都会产生相应变化。采用代谢组学技术,考察疾病状态下体内代谢规律,对由其诱导的内源性物质代谢变化进行研究,可以帮助人们更好地理解发病机制,发现疾病的生物标志物并进一步指导治疗。目前代谢组学技术已应用在药物研发、植物学等众多领域,在临床医学包括心血管疾病研究方面亦显示了应用前景。本文就近年来代谢组学与冠心病的相关研究综述如下。

1 代谢组学技术平台

完整的代谢组学分析过程包括样品的采集和处理、数据的分析及解释。根据实际研究对象不同,采用的方法也不同。

代谢组学测定的是生物体液(如血液、尿液)、细胞提取物和组织提取液中所有小分子代谢产物。常用的检测技术是冰冻/液氮降温法及冷冻、干燥的保存技术。

在完成对样品的初步处理后,代谢产物需要通过合适的方法进行测定。高分辨核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、色谱、质谱(mass spectrometer, MS)等分析手段都应用在代谢组学中。由于液态色谱-质谱联用法和气相色谱-质谱联用能

分析范围很广的代谢组分,因此也成为代谢组学研究的重要工具。

核磁共振技术是当前代谢组学应用的主要技术,可在一定的温度和缓冲范围内进行生理条件或接近生理条件的实验,对样品进行无破坏、非选择性的分析,方法简单快速而又能进行动态研究。常用的有¹H、¹³C、³¹P NMR等方法。以¹H NMR为例^[4],将准备好的标本直接上样检测,所得的¹H NMR谱峰与样品中各化合物的氢原子对应,根据一定的规则或与标准氢谱比照可以直接鉴定出代谢物的化学成分,信号的相对强弱反映了各成分的相对含量。随着核磁共振技术的发展,以前用于固体的魔角旋转(magic angle spinning, MAS)技术被应用到液体领域,使得人们可以研究以前难以用液体核磁共振技术研究的样品,如器官组织样品。魔角旋转技术使人们可以得到样品完整的高分辨谱图^[5],扩展了代谢组学的研究范围。除了用于体液或组织外,核磁共振技术还能够对活体内外的非损伤组织、器官进行研究。以心脏的磷谱研究为例^[6],将预处理的体外灌流心脏直接置于检测区,持续观察低氧干预下³¹P核磁共振谱峰的改变情况,发现低氧状况下,^{P³⁺}和^{Mg²⁺}的含量增加,并随低氧的延长而加深、加重。

质谱技术是将预处理的标本加至质谱仪,经历汽化、离子化及加速分离,再将离子化的原子、分子或是分子碎片按质量或质荷比(m/e)大小顺序排列成图谱,图谱中每个峰值对应着相应的分子量^[7],在此基础上,进行各种无机物、有机物的定性或定量分析。质谱技术具有普适性、高灵敏度和特异性,广泛应用于代谢组学研究。新的离子化技术使质谱技术的灵敏度和准确度均有很大程度的提高,如电喷雾离子化质谱、毛细管电泳质谱、经傅立叶转换离子回旋加速器共振质谱和串联质谱技术等^[8]。

此外,根据代谢组学的研究需要,还有其他的一些常用分析技术,如高效液相色谱仪,它们往往与核磁共振技术或质谱技术联用,进一步增加其灵敏性。

在得到上述图谱后,就可以利用主成分分析

收稿日期:2006-08-03

作者单位:100853 北京市,中国人民解放军总医院老年心血管病研究所

作者简介:李晓英,女,1974年6月生,山东省单县人,在读博士研究生,主治医师。E-mail:lxxy9202@sohu.com。现工作单位:宁夏医学院附属医院综合内科

通讯作者:赵玉生, Tel:010-66936293

法^[9]、偏最小二乘法 (partial least squares, PLS)^[10]、人工神经网络^[11]方法来处理和分析这些数据,得出有价值的生物学信息。

2 代谢组学与冠心病的相关研究

2.1 动脉粥样硬化发病机制 KC δ 敲除 (PKC δ -/-)小鼠模型是目前在心血管病研究中应用最广泛的鼠类模型,在揭示动脉粥样硬化形成中显示了重要作用^[12]。以前的研究显示 PKC δ -/-小鼠在转录组学中的变化^[13],然而仅分析 mRNA 如何转录为蛋白质是不够的,因为它没有提供转录后蛋白质的修饰及其功能,而后者参与了许多疾病的发生。目前已知动脉粥样硬化管壁中存在大量由巨噬细胞转变而来的泡沫细胞,蛋白组学技术只能发现两种巨噬细胞蛋白质 CapG 和 MAC-2 在血管病变进展阶段升高,其它由巨噬细胞来源的蛋白质由于浓度过低以致 2D 凝胶电泳无法测量出。因此,2005 年 Mayr 等^[12]联合应用蛋白质组学和代谢组学技术研究小鼠动脉平滑肌,通过两种技术手段将细胞蛋白质变化和其功能改变联系起来,多角度揭示动脉粥样硬化的形成机制。

研究者发现代谢异常在 PKC δ -/-小鼠动脉粥样硬化形成的启动和进展中都可能是关键因素。PKC δ -/-小鼠会产生高脂血症,而代谢组学技术发现 PKC δ -/-小鼠血管的脂酰辅酶 A 脱氢酶上调(参与脂肪酸的 β -氧化),丙氨酸降低(参与丙氨酸-葡萄糖循环)和细胞浆苹果酸脱氢酶的下调(与线粒体生成三磷酸腺苷有关),提示在高脂血症的状态下,血管细胞脂肪代谢取代了糖代谢,因为当增加脂肪酸氧化时可以负反馈抑制丙酮酸脱氢酶复合体的活性,进而减少糖代谢,而后者是血管的主要能源物质;过量的脂肪酸进入线粒体时,还会出现氧化磷酸化解偶联的危险,最终导致能量代谢产物耗竭。此外,腺苷分解代谢产物是黄嘌呤和次黄嘌呤,二者都是黄嘌呤氧化酶的底物,后者在活性氧簇生成中发挥重要作用。能量储备的耗竭和过氧化产物的增多可以导致线粒体功能失调和促进动脉粥样硬化的发生^[14]。因此,上述证据表明葡萄糖减少、能量代谢改变以及氧化应激可能在 PKC δ -/-小鼠血管病变中发挥了作用。

2.2 冠心病诊断

2002 年 Brindle 等^[15]通过冠脉造影将受试者分为两组:三支冠脉病变组和正常组。应用 ^1H NMR 检测两组受试者血清样本,运用正交分析法、主成分分析法和偏最小二乘法方法分析 ^1H

NMR 光谱,通过该实验建立起偏最小二乘法数学模型。实验发现该模型对于预测三支冠脉病变灵敏度可达到 92%,特异性可达到 93%。此外,Brindle 等为明确 ^1H NMR 技术能否识别冠脉病变程度,将另一批经造影证实的冠心病受试者按狭窄程度分为轻、中、重三组。运用同样技术建立的模型能够判断出冠状动脉病变的严重程度。这一研究表明与冠脉造影相比 ^1H NMR 可以运用简单快速的方法诊断冠心病,在人群中进行冠心病患者的筛查。

2005 年 Sabatine 等^[16]将进行运动负荷试验的受试者分为两组:运动诱发可逆性心肌缺血组和无心肌缺血组,运用代谢组学技术来研究急性心肌缺血患者代谢产物变化。在试验中采用蛋白组学技术和核磁共振、液相色谱、质谱技术,利用途径分析技术^[17]分析数据。实验发现两组间与柠檬酸代谢相关的代谢产物改变最明显: γ -氨基丁酸、MET288、草酰乙酸、瓜氨酸、精氨酸琥珀酸盐明显降低, γ -氨基丁酸在运动后 4h 恢复至正常水平,草酰乙酸和瓜氨酸还显示与运动负荷实验中发生的心肌灌注缺损的范围中等强度相关。实验组中的 14 位受试者术后进行了冠状动脉造影,都有不同程度的冠状动脉病变,与代谢组学的结果一致。研究者分析柠檬酸代谢在心肌的氧化磷酸化过程中起核心作用,它提供的还原当量参与心肌三磷酸腺苷生成。在急性心肌缺血时,柠檬酸循环的中间代谢物生成减少,因此血中浓度降低。由此研究者得出结论:通过研究急性心肌缺血时代谢产物的变化和它们的代谢途径,可能会增加诊断冠心病的新方法及新的治疗靶点。

2.3 冠心病治疗

医生和患者都希望能够选择应用最适合自己的治疗方案,然而个体化治疗方案的前提是能够预测不同个体对特定药物或药物剂量不同反应。药物基因组学的局限性在于没有考虑到环境因素对药物的吸收、分布、代谢和排泄的影响,例如个体间营养状态、肠道微生物群、年龄、疾病、用药前以及用药中所联用的其它药物的差异,因此单纯应用药物基因组学不能完成个体化治疗的目标。由此,有研究者提出药物代谢组学技术,该技术将用药前后机体的代谢产物图谱和化学计量学联起来建立起数学模型,由此来预测每个个体对药物的不同反应。

2006 年 4 月 Clayton 等^[18]在 Nature 杂志发表文章,利用药物代谢组学技术研究扑热息痛在大鼠的应用。 ^1H NMR 先测量出用药前后扑热息痛及其相关代谢产物如扑热息痛硫酸盐(P)、扑热息痛葡

葡萄糖酸酐(G)等所在的光谱区域和浓度,进而将用药前后机体代谢谱进行比较,得出扑热息痛相关代谢产物的总量和相对比例,如G/P比值,再结合主成分分析法建立起PLS模型。该模型通过研究G/P比值与用药前葡萄糖酸酐部分所在的光谱区域得出结论:G/P比值可能用于预测不同大鼠对扑热息痛的反应。

综上所述,研究者提出药物代谢组学可以比较每个人对药物的不同反应,并在人群中进行筛查,决定适合每一个个体的特定药物、药物种类和药物剂量。

3 结束语

目前冠脉造影是诊断冠心病的金标准,作为有创的检查方式,会给患者带来一定的痛苦,同时价格较昂贵,而且造影也不能识别稳定性和不稳定性心绞痛,后者是决定患者将来是否发生心肌梗死的主要因素。代谢组学以检测血液样本为基础,不会给患者造成较大的痛苦,价格便宜,还有利于在人群中筛查冠心病患者,减少严重心血管事件的发生,可以作为冠心病诊治手段的有益补充。此外,虽然目前多种药物可以有效降低心肌梗死的风险,但很难定位哪些患者最适合何种药物治疗,即实现治疗的个体化。代谢组学有可能通过检测患者对药物的代谢途径和反应来实现这一目标。随着代谢组学软硬件技术向进一步自动化及高通量发展,并与基因组学、蛋白质组学不断整合,使人们能够以更快的速度对机体代谢成分进行自动分析,可能为人类诊治冠心病提供新的思路和方法。

参考文献

[1] Gaziano JM. Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine. 6th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2001, 1-18.

[2] 赵冬. 2005 心脏病学实践. 北京:人民卫生出版社, 2005. 3.

[3] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999, 29: 1181-1189.

[4] Cheng LL, Lenan CL, Bogdanova A, et al. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic angle spinning. *Mag Res Med*,

1996, 36: 653-658.

- [5] 刘昌孝. 代谢组学的发展与药物研究开发. *天津药学*, 2005, 17: 1-6.
- [6] 闫永彬, 罗雪春, 张月清. 大鼠离体心脏缺血预处理的核磁共振研究. *清华大学学报*, 2000, 40: 8-11.
- [7] Paul H, Gamache DF, Meyer MC, et al. Metabolomic applications of electrochemistry/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15: 1717-1726.
- [8] Jens N, Stephen O. The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol*, 2005, 23: 544-546.
- [9] Plumb RS, Stumpf CL, Granger J H, et al. Use of liquid chromatography/time of flight mass spectrometry and multivariate statistic analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 2632-2638.
- [10] Gavagh CL, Wilson ID, Nicholson JK. Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies; use of orthogonal signal correction and PLS-DA. *FEBS Lett*, 2002, 530: 191-196.
- [11] 朱元宗, 吴本清, 王自能. 多种羧化酶缺陷尿液标志物 GC MS 分析. *基础医学与临床*, 2004, 24: 213-216.
- [12] Mayr M, Chung Y, Mayr U, et al. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscle Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 2135-2142.
- [13] Wuttge DM, Sirsjo A, Eriksson P, et al. Gene expression in atherosclerotic lesion of apolipoprotein E deficient mice. *Mol Med*, 2001, 7: 383-392.
- [14] Bernal-Mizrachi C, Gates AC, Weng S, et al. Vascular respiratory uncoupling increases blood pressure and atherosclerosis. *Nature*, 2005, 435: 502-506.
- [15] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and non-invasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^1H NMR based metabolomics. *Nat Med*, 2002, 8: 1439-1444.
- [16] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation*, 2005, 112: 3868-3875.
- [17] Berriz GF, King OD, Bryant B, et al. Characterizing gene sets with FuncAssociate. *Bioinformatics*, 2003, 19: 2502-2504.
- [18] Clayton A, Lindon JC, Cloarec O, et al. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature*, 2006, 440: 1073-1077.