

# 基于<sup>1</sup>H-NMR 的代谢组学在心血管疾病中的应用

阳玉中<sup>1</sup>, 李佳<sup>2</sup> 综述, 韦星<sup>1</sup> 审校

(1. 南华大学心血管疾病研究所 湖南省动脉粥样硬化化学重点实验室, 2. 南华大学, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 代谢组学; <sup>1</sup>H-NMR; 心血管疾病

[摘要] 代谢组学是继基因组学、蛋白质组学后系统生物学中新的、重要的方法, 近年来逐步成为了疾病研究领域的热点。核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)是代谢组学的重要方法, 它具有高灵敏度与特异度、样品无损性及稳定性好等优点, 应用广泛。心血管疾病是人类疾病的重要组成部分, 本文就其在心血管疾病研究与应用的现状做一综述。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

## Application of <sup>1</sup>H-NMR-based Metabolomics in Cardiovascular Disease Research

YANG Yu-Zhong<sup>1</sup>, LI Jia<sup>2</sup>, and WEI Xin<sup>1</sup>

(1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province; 2. University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Metabolomics; <sup>1</sup>H-NMR; Cardiovascular Disease

[ABSTRACT] Metabolomics is an emerging system biology following the genomics and proteomics, which has attracted extensive interest in the field of disease study. <sup>1</sup>H-NMR as an important technology of metabolomics, is widely used because of its high speciality and sensitivity, simple procedure and lossless to the samples. Cardiovascular disease is an important part of human disease, and this article reviewed the status quo of its advances in cardiovascular diseases.

代谢组学是通过考察生物体系受刺激或者扰动后代产物的变化或随时间的变化, 来研究生物体系的代谢途径的一种研究方法, 是由英国皇家理工大学 Nicholson 教授及其同事于 1999 年在利用 NMR 技术研究生物体液、细胞和组织中多种代谢产物时首次提出<sup>[1]</sup>。目前, 代谢组学的研究已经广泛应用于生物工程、农业、药物开发、营养学、食品安全与质量以及环境化学与毒理学等领域<sup>[1-4]</sup>。随着代谢组学的进一步发展, 其在疾病的病理生理学机制、诊断及治疗方面的应用越来越受关注, 尤其是中医, 有学者认为代谢组学将是中医走向国际的途径。

随着人们生活水平的提高及老年人口的增加, 心血管疾病的患病率逐年增加且有低龄化的趋势。在国内 40 岁以上人群的死因中, 心血管疾病居首要位置。心血管疾病的起病较隐蔽, 早期诊断困难, 病理生理机制尚不明确, 临床疗效较差。代谢组学可以监测机体代谢水平的变化, 可以从代谢物水平

揭露疾病发生发展过程、找到无创的诊断方法, 甚至可以评估不同治疗方式的疗效。随着代谢组学技术的发展, 其依赖的检测方法也层出不穷。本文就基于<sup>1</sup>H-NMR 的代谢组学在心血管疾病中的应用做一综述。

## 1 代谢组学的基本概况

代谢组学 (metabonomics/metabolomics) 是利用高通量分析仪器对生物体在特定情况下整个代谢产物谱的变化进行定量分析, 结合有效的模式识别方法进行确定、定量和分类, 并寻找代谢物与生理病理变化的相对关系的研究方式。代谢组学完整研究流程主要包括生物样本的采集与保存、样本波谱分析、数据的预处理、模式识别分析、特征代谢物的识别和受干扰代谢途径的分析。其研究的对象是生物体内的小分子代谢产物, 包括肽类、脂类、氨基酸、碳水化合物、有机酸、维生素、矿物质以及食

[收稿日期] 2015-12-03

[修回日期] 2016-04-11

[作者简介] 阳玉中, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病病因、发病机制及防治, E-mail 为 406293814@qq.com。通讯作者 韦星, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病病因、发病机制及防治。

品添加剂、药物、毒素等分子量 < 1000 Da 的物质。检测的标本主要为组织、细胞、生物体液(血浆、尿液、唾液等)、培养基等<sup>[5]</sup>。代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学后系统生物学中的重要方法。

代谢组学研究主要依赖高通量分析仪器的检测和多元变量统计数据分析。分析仪器主要包括核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、高效液相质谱(high performance liquid chromatography, HPLC)等高通量、高灵敏度和高精度分析技术。在这些分析技术中,色谱-质谱联用的分析方法灵敏度与精确度较高、检测范围广,且检测所需的样本少(组织样本少于 25 mg, 细胞样本少于 100 万, 生物体液少于 50  $\mu$ L), GC-MS 灵敏度很高,可以检测到小于 150 Da 的小分子物质<sup>[6]</sup>,且对于脂肪酸类物质敏感度较高而广泛应用于脂肪酸类物质的分析,但其检测受检测物的挥发难易程度限制。LC-MS 的灵敏度和特异度都很高,且不受检测物的挥发难易程度限制,但不易电离的物质将不易被检测到<sup>[5]</sup>。NMR 是一种基于具有自旋性质的原子核在核外磁场作用下吸收射频辐射而产生能级跃迁的谱学技术,目前应用最广泛的是一维核磁共振(<sup>1</sup>H-NMR)<sup>[6-7]</sup>。与其他方法相比, NMR 具有以下优点:(1)样品预处理简单,操作步骤少,检测过程不易被污染;(2)无损性,检测过程不会破坏样品的组织和性质<sup>[8-9]</sup>;(3)稳定性与可重复性好,数天内检测结果稳定<sup>[10-11]</sup>;(4)无偏向,对所有代谢物的灵敏度一样<sup>[12]</sup>;(5)定性定量;(6)可进行动态检测,研究机体代谢模式的动态变化规律;(7)对脂类物质的分辨率较好。其缺点是检测范围相对较窄,信噪比较低<sup>[10-11]</sup>。因此,基于<sup>1</sup>H-NMR 的代谢组学在疾病的发病机制、诊断、治疗与预后方面的应用越来越多。

## 2 基于<sup>1</sup>H-NMR 的代谢组学在心血管疾病研究中的应用

### 2.1 缺血-再灌注损伤

缺血-再灌注损伤常见于心肌梗死、脑卒中、创伤性休克、器官移植等缺血性疾病抢救与治疗中,其发病机制复杂、临床疗效差,至今是临床治疗的一个难点。Chouchani 等<sup>[13]</sup>利用代谢组学的方法分别检测了 C57BL/6J 小鼠的心、脑、肝、肾的缺血-再

灌注损伤代谢途径的改变,发现缺血期间三羧酸循环中间产物琥珀酸盐的聚集,主要与再灌注期间线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生相关。再灌注时,聚集的琥珀酸盐被琥珀酸脱氢酶再次氧化、线粒体反向电子传递产生大量 ROS。抑制琥珀酸的积累,或许成为一个治疗缺血-再灌注损伤的靶点。Constantinou 等<sup>[14]</sup>将新西兰兔分为模型组、缺血预适应组、抗氧化剂(褪黑激素)组、缺血预适应+抗氧化剂组及吲哚衍生物 C6458 组,用基于<sup>1</sup>H-NMR 的代谢组学方法检测血清代谢产物谱,结合主成分分析法(principal component analysis, PCA)能明显地找到各组间的代谢差异,并发现乳酸盐/葡萄糖、乳酸盐+丙酮酸/乙酸盐或许能反映各种缺血-再灌注损伤的严重程度或疗效。代谢组学的方法为研究缺血-再灌注损伤的机制、诊疗提供了一条新的思路。

### 2.2 缺血性心脏病

据世界卫生组织 2008 年全球死因统计结果,约 34% 的患者死于心血管疾病,而其中约半数死于缺血性心脏病<sup>[15]</sup>。新的诊断、治疗及其疗效评价方法对于缺血性心脏病非常重要。Kirschenlohr 等<sup>[16]</sup>通过利用基于<sup>1</sup>H-NMR 的方法分析患者血清代谢谱来预测是否患有冠心病,发现脂质变化与冠心病的发病显著相关,其预测度达 80.3%。Bernini 等<sup>[17]</sup>利用基于 NMR 的代谢组学方法对 864 例健康志愿者进行了分析,以寻找心血管疾病危险因素与血清代谢物之间的关系,他们发现除了胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)外,3-羟基丁酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、苏氨酸、甘氨酸和丝氨酸等代谢产物也是心血管疾病的重要危险因素,同时也可能是缺血性心脏病潜在的生物标志物<sup>[18]</sup>。张开泰等<sup>[19]</sup>观察了新血府逐瘀汤对冠心病心血瘀阻证病人血浆小分子代谢产物的影响,发现新血府逐瘀汤可能通过调整糖类、脂肪酸和氨基酸等物质的代谢来产生疗效。这些研究提示氨基酸和脂质的代谢在缺血性心脏病的病理生理发展过程及诊疗中尤为重要。

### 2.3 心力衰竭

心力衰竭的病理生理学机制十分复杂,且其临床疗效差、死亡率很高。杜智勇<sup>[20]</sup>利用 NMR 对 46 例慢性心力衰竭患者的血清进行了代谢组学分析,PCA 分析发现射血分数 < 40% 的患者与正常组有明显的血清代谢组学差异,并进一步通过 PLS 模型筛选出了 3-羟基丁酸、丙酮、琥珀酸、缬氨酸、丙氨酸、

谷氨酰胺、肌酸及甲硫氨酸 8 种代谢特征产物,而丙酮、3-羟基丁酸可能是慢性心力衰竭的小分子血清标志物。李琪琳等<sup>[21]</sup>通过结扎冠状动脉左前降支的方法复制了心肌梗死后心气虚证心力衰竭的大鼠模型,并观察了其尿液代谢组学变化。结果发现模型组羟基丁酸、乙酸、丙酮、磷脂酰胆碱、三甲胺、马尿酸含量升高;谷氨酰胺、肌肝、牛磺酸、柠檬酸、苹果酸、苯基丙氨酸含量下降,而这些代谢产物主要与心肌能量代谢、脂质代谢、氨基酸代谢紊乱及胃肠道、肾功能异常有关。

#### 2.4 高血压

高血压是多基因、多因素影响的疾病,也是心脑血管疾病最重要的危险因素之一,其发生和发展过程的分子机制至今尚未完全阐明。解君等<sup>[22]</sup>采用<sup>1</sup>H-NMR 结合有效的模式识别方法 PCA、偏小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 分析了平肝方药对高血压大鼠大脑额叶皮质区代谢组学的影响。研究发现平肝方药组与卡托普利组代谢组学变化区别明显,尤其是葡萄糖、半乳糖、多巴胺和琥珀酸差异显著,可能是潜在生物标志物,并得出结论:高血压损伤额叶组织可能主要表现在能量代谢和神经损伤方面,而平肝方药在有效降压同时,通过影响其代谢产物来缓解疾病引起的物质代谢异常。代谢组学能够为高血压的研究提供一个代谢谱角度的新思路。

#### 2.5 高脂血症

高脂血症是指血浆中甘油三酯、胆固醇含量异常增高,长期的高脂血症能增加患冠状动脉性心脏病、脂肪肝及肿瘤的风险<sup>[23]</sup>。Jiang 等<sup>[24]</sup>用高脂饮食的金黄地鼠复制了高脂血症的动物模型,在不同时间段提取其血浆、尿液和肝脏组织进行了基于<sup>1</sup>H-NMR 的代谢组学及多元变量统计分析。结果表明高脂血症的发生发展可以分为三个阶段,早期阶段主要是三羧酸循环中间产物、脂肪酸和酮体引起能量代谢紊乱;中期阶段主要与肠道微生物群代谢紊乱引起的 N-乙酰基糖蛋白、氧化三甲胺、牛磺酸、胆碱、二甲胺水平的变化相关;晚期阶段肝脏组织中谷氨酸、谷氨酰胺明显增高提示肝功能的紊乱。高脂饮食不仅扰乱了机体的脂质代谢和能量代谢,同时影响了氨基酸代谢、核苷酸代谢、炎症及氧化应激;这为高脂血症的发生发展过程提供了新的信息和思路。

### 3 展望

代谢组学能动态监测生物体在不同状态下的

代谢状态,发现代谢谱的差异,找出具有特征意义的生物标志物,近年来逐步成为了心血管疾病研究的新兴领域。代谢产物是基因组、蛋白质组的最终表现形式,同时可以无创的、动态的反映生物体的生命状态。通过代谢组学分析可以为疾病的预测、诊断、疗效评估及预后等提供有力的帮助。心血管疾病的发生发展是一个慢性过程,波及的人群广、死亡率高,尽管现代医疗技术迅猛发展,但心血管疾病的发生率与死亡率仍为增长趋势。早期心血管及风险的评估、有效治疗手段的发展是当前心血管疾病研究的重点,而代谢组学将是不可或缺的一种重要研究方法。同时,代谢组学也面临着许多挑战,代谢产物极其丰富与复杂,目前发现与定义的代谢物数量在 6500 到 10000 左右,其分子量通常在 1000 Da 以下,并不包括所有的代谢产物。同时大多数研究更关注生物体本身的代谢物变化而忽略了食物、药物等其它因素对代谢谱的影响。不同数据库对代谢物定义差异也是阻碍新的生物标志物发现的一个因素。代谢产物变化大、寿命短、受影响的因素多,合理的实验设计及高敏感性和特异性的检测仪器对于代谢组学的发展是急需的。<sup>1</sup>H-NMR 是一种高敏感性与特异性、样品预处理简单、样品检测过程简单与无损、稳定性好的高通量仪器,对于代谢组学在疾病研究,尤其是心血管疾病研究的发展中显得尤为重要。在代谢组学自身发展的同时,需要更多的临床研究来证实之前的研究结果或发现新的生物标志物、信号传导通路等,以更好地服务临床。

#### [参考文献]

- [1] 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[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1 181-189.
- [2] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics: systems biology in pharmaceutical research and development [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, 6(3): 265-272.
- [3] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004, 4(2): 189-199.
- [4] Wishart DS, Jewison T, Guo AC, et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D801-807.
- [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: 2-11.
- [6] Atherton HJ, Bailey NJ, Zhang W, et al. A combined <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy- and mass spectrometry-based metabolomic study of the PPAR-alpha null mutant mouse defines profound systemic changes in metabolism linked to the metabolic syndrome [J]. *Physiol Genomics*, 2006, 27(2): 178-186.
- [7] Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, et al. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(1): 387-426.
- [8] Banoei MM, Donnelly SJ, Mickiewicz B, et al. Metabolomics in critical care medicine: a new approach to biomarker discovery[J]. *Clin Invest Med*, 2014, 37(6): E363-376.
- [9] Chalkias A, Fanos V, Noto A, et al. <sup>1</sup>H NMR-metabolomics: can they be a useful tool in our understanding of cardiac arrest[J]. *Resuscitation*, 2014, 85(5): 595-601.
- [10] Wurtz P, Makinen VP, Soinen P, et al. Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults [J]. *Diabetes*, 2012, 61(6): 1372-380.
- [11] Wurtz P, Soinen P, Kangas AJ, et al. Characterization of systemic metabolic phenotypes associated with subclinical atherosclerosis[J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7(2): 385-393.
- [12] Sobolev AP, Mannina L, Proietti N, et al. Untargeted NMR-based methodology in the study of fruit metabolites [J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 4088-108.
- [13] Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS [J]. *Nature*, 2014, 515(7527): 431-435.
- [14] Constantinou MA, Tsantili-Kakoulidou A, Andreadou I, et al. Application of NMR-based metabolomics in the investigation of myocardial ischemia-reperfusion, ischemic preconditioning and antioxidant intervention in rabbits[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 30(3-4): 303-314.
- [15] Robertson IM, Holmes PC, Li MX, et al. Elucidation of isoform-dependent pH sensitivity of troponin i by NMR spectroscopy[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(7): 4996-5007.
- [16] Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, et al. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease[J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 705-710.
- [17] Bernini P, Bertini I, Luchinat C, et al. The cardiovascular risk of healthy individuals studied by NMR metabolomics of plasma samples [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(11): 4983-992.
- [18] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57-63.
- [19] 张开泰, 吉中强, 纪文岩. 新血府逐瘀汤对冠心病心血瘀阻证病人血浆小分子代谢产物代谢谱的影响[J]. *青岛大学医学院学报*, 2013, 49(3): 237-242.
- [20] 杜智勇. 代谢组学方法评价慢性心力衰竭代谢重构的基础与临床研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012: 10-38.
- [21] 李琪琳, 张安晶, 吴华芹等. 基于<sup>1</sup>H-NMR技术研究心气虚证心力衰竭模型大鼠尿液代谢组学变化[J]. *北京中医药*, 2013, 32(12): 939-943.
- [22] 解君, 蒋海强, 李运伦. 基于<sup>1</sup>H-NMR代谢组学分析研究平肝方药对高血压大鼠大脑额叶皮质区的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2013, 15(5): 936-941.
- [23] Simons LA. Additive effect of plant sterol-ester margarine and cerivastatin in lowering low-density lipoprotein cholesterol in primary hypercholesterolemia [J]. *Am J Cardiol*, 2002, 90(7): 737-740.
- [24] Jiang CY, Yang KM, Yang L, et al. A <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic investigation of time-related metabolic trajectories of the plasma, urine and liver extracts of hyperlipidemic hamsters[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66786.
- (此文编辑 许雪梅)