

· 药物代谢 ·

基于 UPLC-Q/TOF-MS 分析痰瘀互结型冠心病患者的 血浆脂质组学

朱黎霞¹, 韦园诗², 黄星星², 张英丰^{2*}

(1. 南方医科大学珠江医院, 广州 510282; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 研究痰瘀互结型冠心病患者的血浆脂质组学特征, 寻找其与健康志愿者之间的差异脂质代谢物。**方法:** 采集痰瘀互结型冠心病患者及同年龄段健康志愿者血浆, 采用 UPLC-Q/TOF-MS 进行血浆脂质组学研究。血浆样本在正、负离子模式下分别进行检测, 同时采集一级和二级质谱 (m/z 检测范围分别为 100 ~ 2 000, 50 ~ 2 000), 采用正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 建立脂质组学模型, 基于多元统计发现并鉴定差异脂质代谢物。**结果:** OPLS-DA 模型可明显区分痰瘀互结型冠心病患者及健康志愿者, 发现并鉴定了 15 个差异脂质代谢物, 分别为 C16 sphinganine, 植物鞘氨醇, *N,N*-dimethyl-safingol, 2-hydroxyphytanic acid, orotinichalcone, PC[18:2(2E, 4E)/0:0], PC(0:0/16:0), epitestosterone sulfate, etiocholanolone sulfate, PS[22:1(11Z)/0:0], PC[16:0/20:4(5E, 8E, 11E, 14E)], PC[19:1(9Z)/17:2(9Z, 12Z)], PC(16:0/0:0), PC(18:0/0:0), PS[15:1(9Z)/22:1(11Z)]。**结论:** 痰瘀互结型冠心病患者及健康志愿者的血浆脂质组学特征存在显著差异, 血浆差异脂质代谢物有助于痰瘀互结型冠心病的准确辨证。

[关键词] 痰瘀互结证; 冠心病; 血浆; 脂质组学; 差异脂质代谢物; 磷脂酰丝氨酸; 磷脂酰胆碱

[中图分类号] R22; R24; R28; C37; R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0110-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192046

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190702.0900.003.html>

[网络出版时间] 2019-07-03 15:59

Plasma Lipidomics of Coronary Heart Disease Patient with Syndrome of Intermingling of Phlegm and Static Blood Based on UPLC-Q/TOF-MS

ZHU Li-xia¹, WEI Yuan-shi², HUANG Xing-xing², ZHANG Ying-feng^{2*}

(1. Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China;

2. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the plasma lipidomics characteristics of coronary heart disease (CHD) patients with syndrome of of intermingling of phlegm and static blood, and to find differential lipid metabolites between them and healthy volunteers. **Method:** The plasma samples from CHD patients with syndrome of intermingling of phlegm and static blood and healthy volunteers of the same age were collected. The plasma lipidomics was carried out by UPLC-Q/TOF-MS. The plasma samples were detected under positive and negative ion modes, and the primary and secondary mass spectrometry datas were collected simultaneously, and the m/z ranges were 100-2 000 and 50-2 000, respectively. The lipidomics model was established by orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). Differential lipid metabolites were identified based on multivariate statistics. **Result:** OPLS-DA model could obviously distinguish CHD patients with syndrome of intermingling of phlegm and static blood and healthy volunteers. A total of 15 plasma differential lipid metabolites were identified,

[收稿日期] 20190422(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81302882); 广东省科技计划项目(2014A020221118)

[第一作者] 朱黎霞, 硕士, 副主任医师, 从事心脑血管疾病的基础研究, Tel:020-61643456, E-mail: zhulx2007@163.com

[通信作者] *张英丰, 博士, 副教授, 从事生物药剂学及代谢组学研究, Tel:020-39358043, E-mail: zyfeng-2006@163.com

such as C16 sphinganine, phytosphingosine, *N*, *N*-dimethyl-safingol, 2-hydroxyphytanic acid, orotinalcone, PC [18:2 (2*E*, 4*E*) /0:0], PC (0:0/16:0), epitestosterone sulfate, etiocholanolone sulfate, PS [22:1 (11*Z*) /0:0], PC [16:0/20:4 (5*E*, 8*E*, 11*E*, 14*E*)], PC [19:1 (9*Z*) /17:2 (9*Z*, 12*Z*)], PC (16:0/0:0), PC (18:0/0:0), PS [15:1 (9*Z*) /22:1 (11*Z*)]. **Conclusion:** There are significant differences in plasma lipid characteristics between CHD patients with syndrome of intermingling of phlegm and static blood and healthy volunteers. The plasma differential lipid metabolites are helpful for the accurate differentiation of CHD patients with syndrome of intermingling of phlegm and static blood.

[Key words] syndrome of intermingling of phlegm and static blood; coronary heart disease; plasma; lipidomics; differential lipid metabolites; phosphorylserine (PS); phosphatidylcholine (PC)

冠心病是严重威胁中老年人身心健康的常见病,高发病率给社会带来了较大负担,中医药在冠心病防治上具有一定优势,通过辨证论治以及中西医结合治疗可取得较为满意的效果。冠心病的中医分型较多,随着生活方式的转变、生活水平的提升以及膳食结构的改变,痰瘀互结型冠心病在冠心病证型所有分类中占据了较大比例^[1-2],积极开展该类型冠心病的研究对其准确的辨证论治具有重要意义。代谢组学是冠心病研究的有力手段之一,国内已开展了冠心病代谢组学的相关研究,但由于人体代谢物来源、组成的高度复杂性,涵盖了种类、性质各异的多类物质,致使这些代谢物与冠心病的关联性不如脂质与冠心病的关联性密切。

冠心病的发生、发展往往伴随着脂质代谢紊乱,冠心病不同的中医证型辨证要素存在较大差异,脂质可能会成为冠心病不同证型构成的物质基础和证型特征性标志物,进而为冠心病的证型区分提供客观依据。随着对脂质研究的日益深入,以脂质全面检测、系统分析为主要内容的学科——脂质组学^[3]已经成为生物医学领域的研究前沿,但目前鲜有冠心病的脂质组学研究。

脂质组学是脂代谢疾病生物标志物发现的新方法^[4-5]。本研究通过引入脂质组学技术,以超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q/TOF-MS)为研究手段,进行痰瘀互结型冠心病患者的血浆脂质组学研究,并与健康志愿者进行比对,以揭示痰瘀互结型冠心病的脂质代谢特征,有利于临床辨证施治,提高辨证的准确性和治疗的针对性,进而提高该疾病的临床疗效。

1 材料

超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱联用仪(包括日本岛津公司的 LC-30AD 型超高效液相色谱仪,含 SIL-30AC 型自动进样器,CTO-20AC 型柱温箱;美国 AB SCIEX 公司的 Triple™ TOF 5600+

型飞行时间质谱仪,含 Analyst TF 1.7, PeakView 2.0.0.7849 及 MarkerView 1.2.1.1 工作站), E3116R 型台式高速低温离心机和 V8 型涡漩混合器(美国 Essenscien 公司),DCY-24S 型 24 孔水浴加热氮吹仪(青岛海科生物科技有限公司),MDFC8V 型 -80 °C 超低温冰箱(日本 Panasonic 公司),Milli-Q 型超纯水系统(美国密理博公司)。

2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚[BHT,阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号 E1429057,纯度 >99.7%],水为自制超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 痰瘀互结型冠心病患者及健康志愿者血浆样本的采集 痰瘀互结型冠心病患者及健康志愿者的血浆样本均来自于南方医科大学珠江医院。痰瘀互结型冠心病患者组(简称 BLZ)21 例,男 11 例,女 10 例,平均年龄(61.2 ± 8.4)岁,平均体质量(61.8 ± 15.3) kg。所有病例均符合《缺血性心脏病的命名及诊断标准》,经冠脉造影确诊为冠心病,证候符合国家中医药管理局《中医病证诊断疗效标准》冠心病痰瘀互结型。主证为胸闷痞塞,时有心前区刺痛,痛有定处,或放射左肩臂,舌质紫暗边有瘀点或瘀斑,舌苔黄腻或白厚腻,舌下脉络青,脉沉滑或结代。次证为口干,烦躁,气粗痰稠。兼证为大便不通,发热。在进行证候诊断时,凡具 2 项主证,1 项及 1 项以上次证即可辨证分型。排除冠心病急性心肌梗死及其他心脏疾病、重度神经官能症、更年期症候群、甲亢、颈椎病、胆心病、胃及食管反流等所致胸痛等,排除合并重度高血压、重度心肺功能不全、重度心律失常,肝、肾、造血系统等严重原发性疾病、精神病患者,排除过敏体质及对多种药物过敏者。健康志愿者组(简称 ZCZ)20 例,为同期医院体检的健康人群。其中男 10 例,女 10 例,平均年龄(60.4 ± 9.9)岁,平均体质量(62.9 ± 15.4) kg,无临床

症状。两组年龄、体质相匹配,差异无统计学意义。两组研究对象均签署了知情同意书。

两组受试对象均晨起空腹采集血样 2 mL,肝素钠抗凝,1 h 内于 4 °C,3 500 r·min⁻¹离心 15 min,取出上层清液,不可混有一丝下层红色,分装于 2 mL 冻存管中,-80 °C 保存备用。

2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 30 °C,样品室温度 4 °C。流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 85% A; 8 ~ 9.5 min, 85% ~ 70% A; 9.5 ~ 10 min, 70% A; 10 ~ 10.5 min, 70% ~ 85% A; 10.5 ~ 15 min, 85% A),流速 0.3 mL·min⁻¹。

2.2.2 质谱条件 在全扫描获得一级谱图的同时进行数据相关采集模式(IDA)获得二级谱图。正离子模式下一级质谱 m/z 100 ~ 2 000,质量偏差 50 mDa,碰撞能量 45 eV;二级质谱采用 high-sensitivity 模式, m/z 50 ~ 2 000,碰撞能量 10 eV;离子源雾化气和辅助气压力均为 55 Pa,气帘气压力 35 Pa,离子源温度 500 °C,喷雾电压 5.5 kV,去簇电压 80 V。负离子模式下一级质谱 m/z 100 ~ 2 000,质量偏差 50 mDa,碰撞能量 45 eV;二级质谱采用 high-sensitivity 模式, m/z 50 ~ 2 000,碰撞能量 10 eV;离子源雾化气和辅助气压力均为 55 Pa,气帘气压力设定 35 Pa,离子源温度设定 500 °C,喷雾电压 -4.5 kV,去簇电压 -100 V。

2.3 血浆样品前处理及测定 测试前将待测样品从 -80 °C 冰箱中取出,于 4 °C 下解冻,精密吸取血浆 0.1 mL,加入 4 °C 甲醇 0.24 mL,涡旋混匀 1 min,加入 4 °C 甲基叔丁基醚 0.8 mL,涡旋 2 min,超声 3 min(功率密度 1.5 W·cm⁻²,频率 30 kHz),加入 4 °C 水 0.2 mL 涡旋 2 min 后相分离。于 4 °C,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上层有机相 0.9 mL,40 °C 氮气吹干,加乙腈-水(90:10)混合液 100 μL 复溶,-20 °C 冷冻过夜,于 4 °C,13 000 r·min⁻¹离心 2 次,每次 10 min,吸取上清液于装有内衬管的样品瓶中进样。正、负离子模式下各进样 4 μL,获得了正、负离子模式下的脂质组学研究数据。

分别取 2 组血浆所有样品各 5 μL 混合,经前处理后作为质控样品。正式进样前连续进样 6 次使系统预适应和平衡。分析过程按照 ZCZ-BLZ 的顺序交叉进样,每进 8 份样品进样 1 次质控样品,用于评价整个实验过程中系统稳定性。UPLC-Q/TOF-MS

总离子流(TIC)图见图 1,2。结果发现代谢产物得到了良好分离,且组间存在差异。正离子模式下所得到的峰信息量多于负离子模式,正、负离子模式 TIC 图特征存在差异。

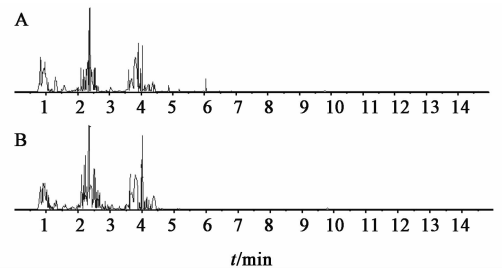


图 1 正离子模式下人血浆的 TIC
A. 健康志愿者组(ZCZ); B. 痰瘀互结型冠心病患者组(BLZ)(图 2 同)

图 1 正离子模式下人血浆的 TIC

Fig. 1 TIC of human plasma under positive ion mode

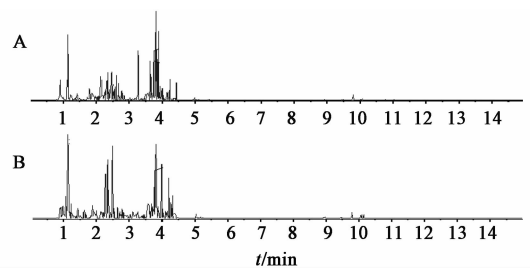


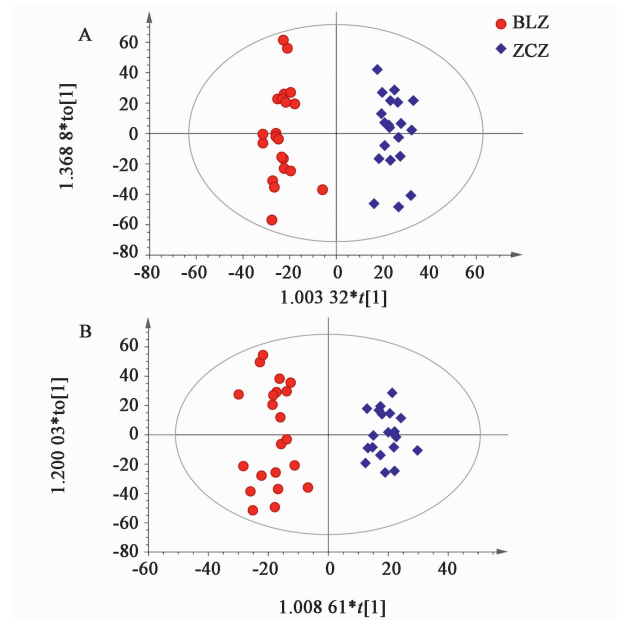
图 2 负离子模式下人血浆的 TIC

Fig. 2 TIC of human plasma under negative ion mode

2.4 脂质组学数据分析

2.4.1 建立脂质组学 OPLS-DA 模型 采用 PeakView 2.0.0.7849 及 MarkerView 1.2.1.1 工作站进行峰校准、背景扣除、滤噪、峰面积归一化处理,生成正、负离子模式下的样品名-(质荷比-保留时间数据对)-离子强度的三维矩阵,导入 SIMCA-P 14.1 软件。采用 Pareto 标度法对两组样本进行 OPLS-DA 处理,自动拟合并提取主成分。从得分图可以看出 BLZ 及 ZCZ 位于得分图两侧,且组内样本相对集中,见图 3。层次聚类分析图表明总体上可分为 2 组,组内样本距离较近,组间距离较远,表明 BLZ 及 ZCZ 血浆脂质组学特征存在显著差异,所建立的脂质组学模型可显著区分两组样本,见图 4。

2.4.2 脂质组学模型评价 以 $R^2(\text{cum})$ (表示所解释的模型差异)和 $Q^2(\text{cum})$ (表示所预测的模型差异)作为脂质组学模型优劣的标准。正、负离子模式 $R^2Y(\text{cum})$ 和 $Q^2(\text{cum})$ 均 >0.5 ,表明所建立的 OPLS-DA 模型对痰瘀互结型冠心病患者与健康志愿者的区分有较好的解释和预测,模型参数见表 1。通过七重循环交叉验证单因素方差分析(CV-



A. 正离子模式; B. 负离子模式(图 3~6 同)

图 3 人血浆脂质组学 OPLS-DA 模型的得分

Fig. 3 Scores plots of OPLS-DA models for human plasma lipidomics

ANOVA) 评价模型的质量。结果 P 均 < 0.05 , 表明 OPLS-DA 模型所识别的差异脂质代谢物可靠性高, 见表 2。

表 2 人血浆脂质组学 OPLS-DA 模型的 CV-ANOVA 参数

Table 2 CV-ANOVA parameters of OPLS-DA models for human plasma lipidomics

模式	方差来源	SS	f	MS	F	P	标准差
正离子	总和	40.000	40	1.000			1.000
	回归	23.645	4	5.911	13.011	1.188×10^{-6}	2.431
	残差	16.355	36	0.454			0.674
负离子	总和	40.000	40	1.000			1.000
	回归	26.560	4	6.640	17.786	3.859×10^{-8}	2.577
	残差	13.440	36	0.373			0.611

2.4.3 脂质组学模型过拟合评价 采用 200 次迭代置换验证试验进行模型过拟合评价, 见图 5, 图中每个点代表了 1 次迭代置换验证过程。结果正离子模式的 $R^2 > Q^2$, R^2 截距 0.524, Q^2 截距 -0.519; 负离子模式的 $R^2 > Q^2$, R^2 截距 0.584, Q^2 截距 -0.473。 Q^2 均在 R^2 之下, 且 Q^2 的回归直线与 Y 轴的交点在负半轴, 说明该模型未过度拟合。

2.5 血浆差异脂质代谢物的鉴定 通过脂质组学 OPLS-DA 模型 S 型图 (S-plot), 结合变量重要性投影 (VIP) 值 > 1 , Jack-knife 不确定区间不跨越零点

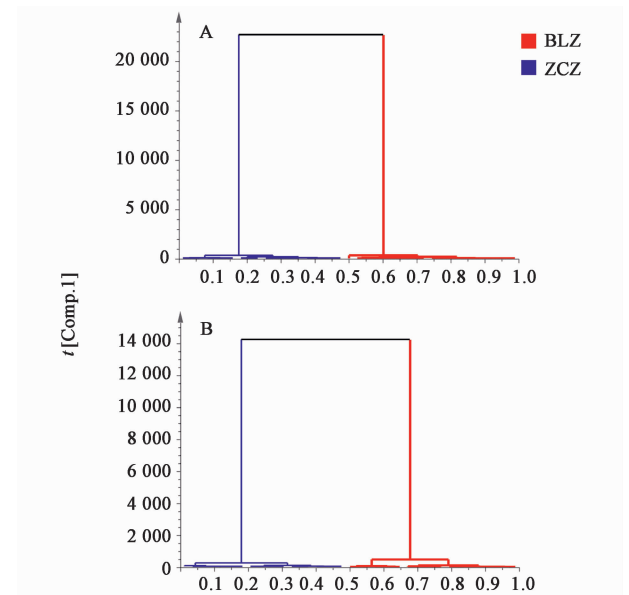


图 4 人血浆脂质组学的层次聚类分析

Fig. 4 Hierarchical clustering analysis plots of human plasma lipidomics

表 1 人血浆脂质组学 OPLS-DA 模型的拟合参数

Table 1 Fitting parameters of OPLS-DA models for human plasma lipidomics

模式	主成分数/个	$R^2 X(\text{cum})$	$R^2 Y(\text{cum})$	$Q^2(\text{cum})$
正离子	4	0.436	0.957	0.716
负离子	3	0.371	0.935	0.762

为差异脂质代谢物入选标准。采用 SPSS 24 软件 (美国 IBM 公司) 进行组间差异脂质代谢物 Student's t -test 等单维统计分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, 并计算变异倍数 (FC)。S-plot 见图 6。

在进行差异脂质代谢物准分子离子峰的归纳后, 除依据偶氮原则和 UPLC-Q/TOF-MS 提供的精确 m/z 匹配外, 还结合二级质谱等信息鉴定脂质, 并对照 HMDB (人类代谢组数据库), Metlin, Lipid Maps 等数据库进行检索与判断, 共鉴定了 15 种

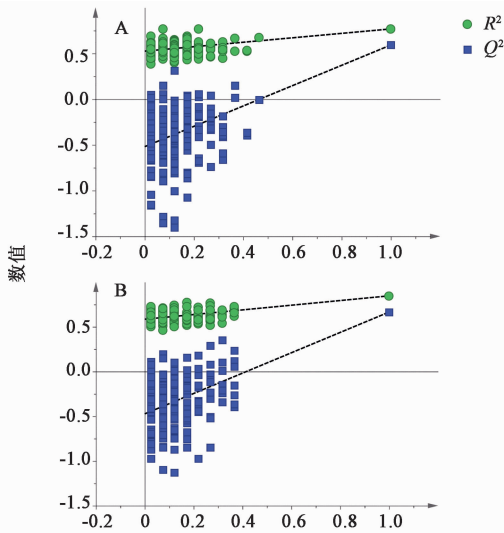


图 5 人血浆脂质组学模型的 200 次迭代置换检验
Fig. 5 Two hundred times iterations permutations test plots of human plasma lipidomics models

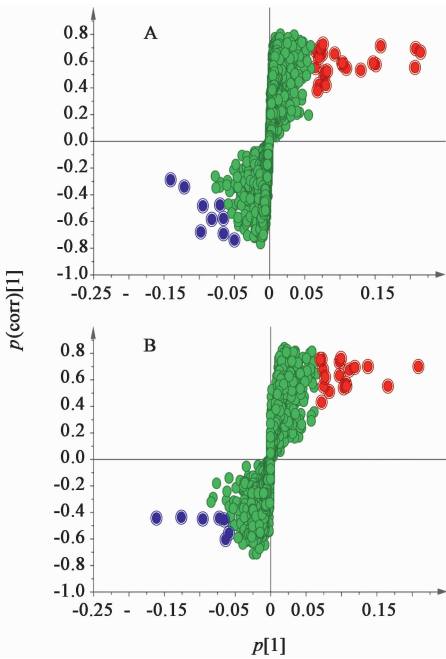


图 6 人血浆脂质组学的 S-plot 分析
Fig. 6 S-plot of human plasma lipidomics

差异脂质代谢物。

正离子模式下, m/z 274.273 0 为准分子离子 $[M + H]^+$, 二级质谱具有 m/z 256.263 2, 230.247 5 等主要二级碎片离子, 鉴定为 C16 sphinganine; m/z 318.299 9 为准分子离子 $[M + H]^+$, 具有 m/z 256.263 4, 102.092 2 等主要二级碎片离子, 鉴定为植物鞘氨醇 (phytosphingosine); m/z 330.336 2 为加合离子 $[M + H]^+$, 具有 m/z 312.326 0, 286.310 4 等主要二级碎片离子, 鉴定为 N, N -dimethyl-

safingol; m/z 346.331 3 为准分子离子 $[M + NH_4]^+$, 具有 m/z 328.321 8, 284.295 5 等主要二级碎片离子, 鉴定为 2-hydroxyphytanic acid; m/z 437.195 3 为准分子离子 $[M + H]^+$, 具有 m/z 303.120 2 等主要二级碎片离子, 鉴定为 orotinichalcone; m/z 520.338 7 为准分子离子 $[M + H]^+$, 具有 m/z 502.327 8, 184.072 9 等主要二级碎片离子, 鉴定为 磷脂酰胆碱 (PC) $[18:2(2E,4E)/0:0]$; m/z 496.337 6 为准分子离子 $[M + H]^+$, 具有 m/z 478.330 0, 184.073 4 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC(0:0/16:0)。

负离子模式下, m/z 367.156 8 为准分子离子 $[M - H]^-$, 二级质谱具有 m/z 96.961 5 等主要二级碎片离子, 鉴定为 epitestosterone sulfate; m/z 369.174 5 为准分子离子 $[M - H]^-$, 二级质谱具有 m/z 96.960 7 等主要二级碎片离子, 鉴定为 etiocholanolone sulfate; m/z 564.332 2 为准分子离子 $[M - CH_3]^-$, 二级质谱具有 m/z 504.311 7, 279.232 8 等主要二级碎片离子, 鉴定为 磷酸酰丝氨酸 (PS) $[22:1(11Z)/0:0]$; m/z 816.533 9 为准分子离子 $[M + Cl]^-$, 二级质谱具有 m/z 766.545 8, 303.233 2 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC $[16:0/20:4(5E,8E,11E,14E)]$; m/z 818.546 9 为准分子离子 $[M + Cl]^-$, 二级质谱具有 m/z 758.538 1, 295.227 9 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC $[19:1(9Z)/17:2(9Z,12Z)]$; m/z 540.330 3 为准分子离子 $[M + HCOO]^-$, 二级质谱具有 m/z 480.309 2, 255.232 7 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC(16:0/0:0); m/z 568.362 2 为准分子离子 $[M + HCOO]^-$, 二级质谱具有 m/z 508.340 8, 283.264 2 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PC(18:0/0:0); m/z 860.569 3 为准分子离子 $[M + OAc]^-$, 二级质谱具有 m/z 800.548 0, 337.239 7 等主要二级碎片离子, 鉴定为 PS $[15:1(9Z)/22:1(11Z)]$ 。

2.6 差异脂质代谢物的诊断能力分析 采用 MedCalc 18.2.1 软件绘制受试者操作特征曲线 (ROC) 并提取相关参数, 评价其区分痰瘀互结型冠心病患者和健康志愿者的能力。结果表明 OPLS-DA 模型筛选的差异脂质代谢物对痰瘀互结型冠心病患者具有良好的诊断能力。差异脂质代谢物见表 3, ROC 见图 7, 8。

3 讨论与总结

3.1 差异脂质代谢物的临床诊断应用潜力分析 本文采用 UPLC-Q/TOF-MS 技术进行了健康志愿者

表 3 基于 UPLC-Q/TOF-MS 鉴定的差异脂质代谢物

Table 3 Differential lipid metabolites identified by UPLC-Q/TOF-MS

模式	t_R /min	m/z		δ /ppm	加合离子	差异脂质代谢物	AUC	VIP 值	约登指数	FC ¹⁾	$P^{1)}$	趋势 ¹⁾	代谢通路
		实测值	理论值										
正离子	0.92	274.273 0	274.274 0	-3.64	[M+H] ⁺	C16 sphinganine	0.864	4.57	0.705	0.24	5.32×10^{-5}	↑	SP
	0.96	318.299 9	318.300 3	-1.25	[M+H] ⁺	phytosphingosine	0.752	5.76	0.467	0.42	8.40×10^{-3}	↑	SP
	0.85	330.336 2	330.336 6	-1.21	[M+H] ⁺	<i>N,N</i> -dimethyl-safingol	0.800	5.45	0.471	0.35	9.22×10^{-4}	↓	FA
	0.93	346.331 3	346.331 6	-0.86	[M+NH ₄] ⁺	2-hydroxyphytanic acid	0.831	4.64	0.607	0.41	9.32×10^{-5}	↓	FA
	1.02	437.195 3	437.195 9	-1.37	[M+H] ⁺	orotinalcone	0.710	6.24	0.457	0.37	0.027 5	↓	PK
	3.80	520.338 7	520.339 8	2.11	[M+H] ⁺	PC[18:2(2E,4E)/0:0]	0.705	5.25	0.381	0.38	0.001 2	↓	GP
	4.04	496.337 6	496.339 8	-4.43	[M+H] ⁺	PC(0:0/16:0)	0.700	4.33	0.469	1.82	0.003 9	↑	GP
负离子	1.18	367.156 8	367.158 5	-4.63	[M-H] ⁻	epitestosterone sulfate	0.869	3.85	0.705	0.43	8.35×10^{-5}	↓	ST
	1.20	369.174 5	369.174 1	1.08	[M-H] ⁻	etiocolanolone sulfate	0.776	4.41	0.510	0.39	0.004 1	↓	ST
	4.01	564.332 2	564.330 7	2.65	[M-CH ₃] ⁻	PS[22:1(11Z)/0:0]	0.838	3.91	0.614	0.33	8.06×10^{-5}	↓	GP
	2.25	816.5339	816.531 6	2.81	[M+Cl] ⁻	PC[16:0/20:4(5E,8E,11E,14E)]	0.886	4.13	0.660	0.41	3.01×10^{-6}	↓	GP
	2.30	818.546 9	818.547 2	0.36	[M+Cl] ⁻	PC[19:1(9Z)/17:2(9Z,12Z)]	0.800	3.27	0.605	0.31	6.18×10^{-4}	↓	GP
	4.04	540.330 3	540.330 7	-0.74	[M+HCOO] ⁻	PC(16:0/0:0)	0.698	4.19	0.326	2.28	0.001 1	↓	GP
	3.86	568.362 2	568.362 0	0.35	[M+HCOO] ⁻	PC(18:0/0:0)	0.729	5.27	0.469	2.17	0.005 0	↑	GP
2.69	860.569 3	860.565 8	4.06	[M+OAc] ⁻	PS[15:1(9Z)/22:1(11Z)]	0.698	5.35	0.381	2.37	0.001 2	↑	GP	

注: ¹⁾ BLZvsZCZ; ↑ 和 ↓ 分别代表该脂质物在 BLZ 中升高和降低; AUC. ROC 曲线下面积; 约登指数. ROC 曲线 sensitivity + specificity-1 的值, 代表了该差异脂质代谢物区分痰瘀互结型冠心病患者和健康志愿者的能力; SP. 鞘脂; GP. 甘油磷脂; ST. 甾醇酯; FA. 脂肪酸; PK. 多聚乙烯。

与痰瘀互结型冠心病患者的血浆非靶向脂质组学研究, 揭示了其血浆脂质代谢轮廓的差异性, 发现了具有若干临床诊断潜力的差异脂质代谢物, 为痰瘀互结型冠心病患者的精准证型判断奠定了基础。本文进行的小样本脂质组学研究发现的差异脂质代谢物经 ROC 曲线诊断, 其可显著区分两组血浆脂质轮廓, 具有临床诊断的潜力。但由于临床患者来源的复杂性, 如年龄、性别、基础病、合并症、精神及机能状态、药物食物环境的干预等, 如果要拓展到临床应用, 必须进一步放大样本, 以更严苛的标准来审视差异脂质代谢物, 将其开发成具有明确临床诊断价值的生物标志物。在更大样本、多中心参与的基础上, 采用靶向脂质组学研究手段, 定量检测差异脂质代谢物在健康志愿者和痰瘀互结型冠心病患者的血浆浓度差异。遵循差异发现、初步验证、最终确认的流程, 确定入选的差异脂质代谢物的种类及诊断标准, 评价其进行未知样本诊断的适用性。由于差异代谢物靶向脂质组学的方法学开发及更大样本的搜集、检测是一项浩大工程, 需要深入研究, 建立差异脂质代谢物快速、灵敏、专属性检测方法, 将其提升到诊

断脂质生物标志物的层次。

3.2 脂质组学差异脂质代谢物的发现方法 脂质组学是对生物样本中的脂质进行全面系统分析, 检测脂质分子组成及其含量动态变化, 进而揭示脂质在各种生命现象中的重要作用机制。自 2003 年提出以来^[6], 发展极为迅速。脂质是广泛存在于人体内的一类重要物质, 是构成机体的物质基础之一, 近年来发现某些脂质分子还可以参与信号传导, 在人体生理功能的精确调控中发挥极为重要的作用。随着对脂质生理、生化功能研究的不断深入, 新的发现不断更新着人类对于脂质的认识, 研究脂质调控网络及脂质相对变化的脂质组学成为生命科学及医学领域的热点^[7], 在中医药领域也逐渐得到了应用^[8]。

本研究采用 UPLC-Q/TOF-MS 进行了痰瘀互结型冠心病患者与健康志愿者的血浆脂质组学研究, 发现并鉴定了部分差异脂质代谢物, 整体评价了痰瘀互结型冠心病患者与健康志愿者的血浆脂质组学特征的差异性。从得分图可以清晰看出, 两组之间界限清晰、差异明显, 表明两组之间血浆脂质相对

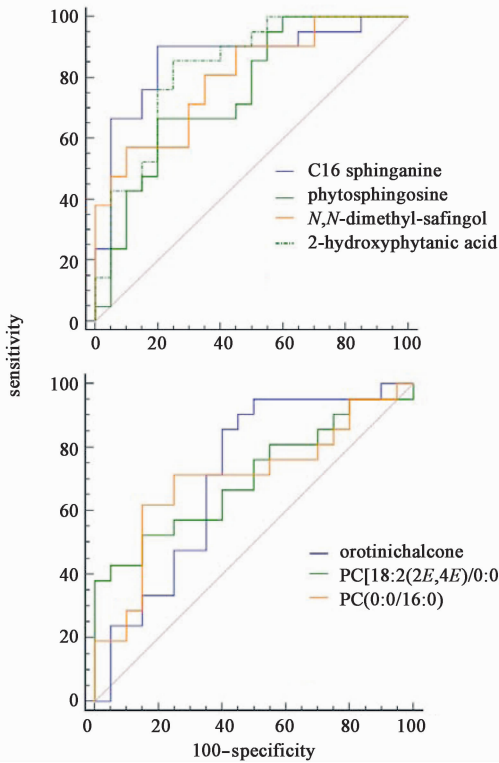


图 7 人血浆正离子模式下差异脂质代谢物的 ROC
Fig. 7 ROC of differential lipid metabolites in human plasma under positive ion mode

组成与含量存在明显差异,脂质能够成为区分两组研究对象的特征性物质。由于两组对象血浆脂质组成绝大部分均无显著性差异,则差异脂质代谢物就成为区分两组的关键脂质,识别差异脂质代谢物极为重要。由于脂质组学数据较为庞大,在检测到的数千脂质中识别差异脂质代谢物存在较大困难,需要结合多元统计方法。OPLS-DA 模型可有效区分两组对象,但存在过度拟合的风险,必须要对模型进行过度拟合评价。模型的显著性及七重循环交叉验证实验是常用的评价方法,只有检验合格的模型,所得出的结论和识别的差异脂质代谢物才具有较高的可信度。基于多元统计的生物信息学分析是常用的差异脂质代谢物识别方法。通过采用 t 检验,FC, P , S-plot, 载荷图及 ROC 等综合分析判断,所发现的 15 个差异脂质代谢物具有良好的诊断能力,即具有良好的组间区分能力,有望成为痰瘀互结型冠心病的诊断脂质生物标志物。

3.3 脂质组学样本的前处理方法 生物样品的前处理对脂质组学研究至关重要,采用适宜的前处理方法可使组织或体液中的脂质尽可能多的转移到萃取溶剂中。脂质具有极性头部和疏水性尾部,三氯甲烷-甲醇(2:1 或 1:2)混合体系能有效溶出体液

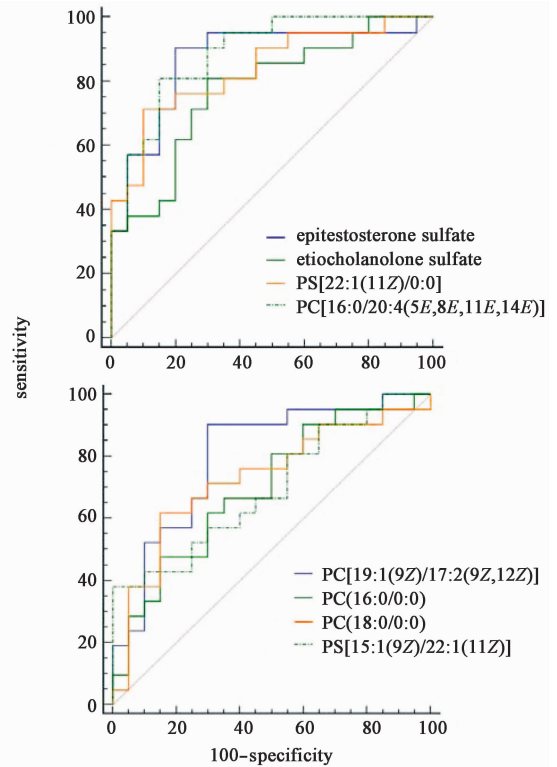


图 8 人血浆负离子模式下差异脂质代谢物的 ROC
Fig. 8 ROC of differential lipid metabolites in human plasma under negative ion mode

或组织匀浆液中的脂质,成为脂质提取的“金标准”^[9]。但也存在如下问题:①三氯甲烷毒性较大,对操作人员的身体健康较为不利;②前处理后脂质位于体系下层,转移过程中会引入上层水系的污染;③三氯甲烷降解后会产生光气、氯化氢气体,易使不稳定的脂质类成分发生化学变化^[10]。新的脂质提取方法不断被开发出来,如甲基叔丁基醚(MTBE)及 MTBE-甲醇^[11-12]。脂质可转移至体系上层的 MTBE 有机相中,简化了提取过程,适用于批量脂质组学样品的前处理,且对脂质的提取效率不低于三氯甲烷-甲醇体系。

3.4 差异脂质代谢物 本文发现多种 PC 在痰瘀互结型冠心病患者与健康志愿者血浆中存在显著差异。ROC 较高的 AUC 及约登指数(Youden index)充分证明了 PC 类具有作为诊断标志物的良好潜力。研究发现磷脂类脂质与冠心病关系密切^[13]。冠心病患者红细胞膜 PC 较正常人群明显降低^[14], PC 的代谢物溶血磷脂酰胆碱(LPC)与冠心病的发生、发展存在直接联系^[15]。鞘脂类物质与冠心病关系密切,鞘氨醇代谢物植物鞘氨醇参与了鞘脂代谢通路,进而影响冠心病的发生、发展进程^[16],在细胞生长、分化、信号传导方面扮演了重要角色,鞘氨醇

的蓄积有可能促进心肌细胞凋亡^[17]。由于脂质组成的复杂性及结构的多样性,差异脂质代谢物参与冠心病进程的机制尚需进一步研究。

3.5 总结 本文通过引入脂质组学研究手段,发现并鉴定了痰瘀互结型冠心病患者与健康志愿者的15个血浆差异脂质代谢物,可为冠心病痰瘀互结证的精准辨证提供依据,有利于提高其临床疗效。目前,涉及到冠心病血浆脂质组学的研究报道还比较少,由于临床样本采集存在较大困难和诸多不可控因素,加之痰瘀互结证的辨证主观性较强,在后期研究中,将会进一步加大样本量,保证样本质量,严格辨证标准,同时尝试采用鸟枪法等其他质谱研究方法,进一步挖掘冠心病痰瘀互结证的脂质物质基础。

[参考文献]

[1] 闫丹丹,边育红,于春泉. 冠心病痰瘀互结病机及生物学基础研究概述[J]. 天津中医药大学学报,2018,37(1):1-5.

[2] 李先涛. 对冠心病痰瘀互结证(胸痹心痛)临床辨证的认识[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(1):10-12.

[3] Shevchenko A, Simons K. Lipidomics; coming to grips with lipid diversity[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2010,11(8):593-598.

[4] HU C, van der Heijden R, WANG M, et al. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2009,877(26):2836-2846.

[5] LIU X, LI J, ZHENG P, et al. Plasma lipidomics reveals potential lipid markers of major depressive disorder[J]. Anal Bioanal Chem,2016,408(23):6497-6507.

[6] HAN X, Gross R W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by electrospray ionization mass spectrometry: a bridge to lipidomics [J]. J Lipid Res, 2003, 44 (6): 1071-1079.

[7] 杜丽娜,单进军,谢彤,等. 呼吸系统疾病相关脂类及脂质组学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):219-223.

[8] 赵铁,张浩军,殷婷婷,等. 柴黄益肾颗粒对糖尿病肾病大鼠保护作用的脂质组学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):155-162.

[9] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959,37(8):911-917.

[10] Nagano K, Kano H, Arito H, et al. Enhancement of renal carcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to chloroform in male rats [J]. J Toxicol Environ Health A,2006,69(20):1827-1842.

[11] Byeon S K, Lee J Y, Moon M H. Optimized extraction of phospholipids and lysophospholipids for nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. Analyst,2012,137(2):451-458.

[12] Myeong H M. Phospholipid analysis by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Mass Spectrom Lett,2014,5(1):1-11.

[13] WANG Z, Klipfell E, Bennett B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. Nature, 2011, 472 (7341): 57-63.

[14] 魏晓东,李莉,白晶. 复方丹参对冠心病患者红细胞膜磷脂成分的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(6):336-338.

[15] Ganna A, Salihovic S, Sundström J, et al. Large-scale metabolomic profiling identifies novel biomarkers for incident coronary heart disease[J]. PLoS Genet,2014,10(12):e1004801.

[16] LIU Y T, JIA H M, CHANG X, et al. Metabolic pathways involved in Xin-Ke-Shu protecting against myocardial infarction in rats using ultra high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal,2014,90:35-44.

[17] Greenberg A J, Hackett S R, Harshman L G, et al. Environmental and genetic perturbations reveal different networks of metabolic regulation [J]. Mol Syst Biol, 2011,7:563.

[责任编辑 刘德文]