

代谢标志物在冠心病临床诊断中的价值研究

姜华丽 李伟杰 王金锋*

东莞东华医院 广东东莞 523110

摘要：研究目的 冠心病是目前全球主要死亡原因之一。本研究拟应用临床代谢组学识别血清代谢标志物，筛选冠心病早期诊断相关标志物。研究方法 收集健康对照组（n=86）和冠心病患者（n=166）血清样本，并进行非靶向代谢组学分析和靶向代谢组学分析。随后，检测和筛选潜在的代谢标志物，并建立诊断冠心病的临床模型。研究结果 在人类代谢组数据库中，未发现异十一烯酸，因此我们无法靶向验证其相对丰度水平的差异。此外，与基于 1-十七碳酰-甘油-3-磷酸胆碱（PC（17:0/0:0））、甜菜碱和乙酰肉碱的临床模型相比，结合血清甜菜碱、甘油三酯和体重的临床模型更为灵敏（AUC=0.731 vs.0.579，敏感性=83.0vs.75.5%，特异性=64.0vs.46.5%）。研究结论 我们的研究表明，通过血清代谢组学分析筛选出冠心病与健康对照组之间有四种差异表达的代谢物，分别是PC（17:0/0:0）、甜菜碱、乙酰肉碱、异十一酸，血清甜菜碱、甘油三酯和体重共同构建的模型可以作为冠心病早期诊断的有效工具。

关键词：代谢组学；血清代谢标志物；质谱；冠心病；诊断

心血管疾病是全世界疾病死亡的主要原因。随着人口老龄化，中国冠心病的患病率不断上升^[1]。流行病学调查表明，各种危险因素，包括吸烟、饮酒、糖尿病、高血压、肥胖和家族史，都有可能引起冠心病的发生和发展。这种调查有助于制定冠心病的预防和治疗战略，从而降低死亡率。冠状动脉造影是诊断冠心病的金标准方法；然而，它不仅是侵入性的和昂贵的，而且不适合大规模的早期风险筛查。因此，需要一种无创、安全、有效的临床方法来早期诊断冠心病。

代谢组学是代谢研究的重要组成部分，通过代谢组学检测循环血液代谢产物水平与冠心病的关系，揭示冠心病发展的不同潜在途径。有研究发现心血管疾病发生与柠檬酸循环中的代谢物以及肠道微生物相关的三甲胺 N-氧化物（TMANO）、胆碱和多种脂质相关代谢物有关^[2]。因此，对冠心病代谢组学特征的研究，可能有助于探索与冠心病的代谢途径和机制的分子靶点。在这项基于代谢组学的研究中，我们的目标是确定可用于冠心病早期诊断的血清代谢生物标志物。此外，基于逻辑回归和交叉验证分析，开发并验证了一个临床模型。

1. 资料和方法

1.1 研究对象

在本项研究中，在东莞东华医院招募合格的参与者。诊断标准如下：根据冠脉造影检查，确定至少一条冠状动脉

（包括左主干、左前降支、左回旋支和右冠状动脉）主干动脉狭窄，其狭窄程度 >75%。在入院后用促凝管收集空腹静脉血液 20ml，离心后，取上层血清，集中统一编号后存放于 -70℃ 冰箱待测。所有入选的患者入院后均给予规范的抗血小板、血管紧张素转化酶抑制剂 / 血管紧张素 II 受体拮抗剂（ACEI/ARB）、β 受体阻断剂、他汀类调脂药等药物的应用。排除标准如下：2 个月内患有严重肝肾疾病、骨髓和血液系统疾病、因其他因素（如创伤、恶性肿瘤）引起的胸痛或先前诊断为冠心病和 / 或接受相应治疗的参与者。最后根据临床特征、心电图检查、心肌肌钙蛋白 I 水平和冠状动脉造影诊断为冠心病共 166 例，健康对照组（HCs）为 86 例。本研究由研究者所在医院伦理委员会批准（批准文号：DHLL20161030）。所有受试者均在纳入研究前签署知情同意书。

1.2 样本收集

按照 Luan 等人先前报告的方法并进行了一些修改^[3]，分离低分子量代谢物（<1500Da）。血清样本解冻并进行质量检测。所有的样品都在冷藏于 -70° C，直到需要。

1.3 非靶向代谢检测

病人倾向评分匹配（PSM）进行筛查后，对 HCs（n=33）和 CHD（n=65）患者的血清样本进行非靶向代谢分析。我们按照先前 Chen 及 Shivanna 等方法^[4]，并对处理时间进行

了轻微修改。

1.4 靶向代谢检测

病人倾向匹配评分 (PSM) 进行筛查后, 对 HCs (n=53) 和 CHD (n=101) 患者的血清样本进行靶向代谢分析。

1.5 代谢产物的鉴定

通过将代谢物的精确分子质量 (m/z) 与人类代谢组数据库 (HMDB1; <http://www.hmdb.ca>) 和 METLIN (<https://metlin.scripps.edu>) 中的精确分子质量 (m/z) 相匹配来鉴定代谢物。在观察值和数据库值之间的质量差 <0.025Da 的条件下, 可以识别代谢物。

1.6 代谢产物通路分析

首先根据错误发现率和 Foldchange 筛选差异代谢物, 并使用 ingenuity pathway analysis 3 方法进行生物途径分析。根据京都基因和基因组百科全书 (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg/>) 数据库确定了冠心病相关的生物学通路。

1.7 统计分析

倾向评分匹配 (PSM) 用于筛选具有相似基线特征的患者队列。通过多维统计分析筛选差异代谢物 [多因素的可变重要性 (VIP) 大于 1 和 P 的值 <0.05]。受试者操作曲线 (ROC) 分析用于评价模型敏感性和特异性。数值表示为平均值 ± 标准偏差 (SD)。使用 SPSS21.0 (Chicago, IL, United States) 和 Student t 检验进行连续变量分析。分类变量采用卡方检验, *P<0.05 被认为具有统计学意义。

2. 研究结果

2.1 入组患者的临床特征

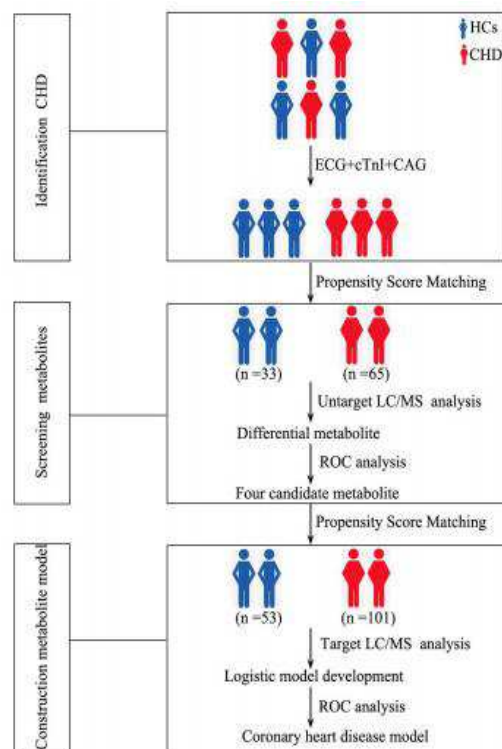
我们的研究设计如图 1 所示。为了确定 CHD 患者代谢物的差异, 对 HCs (n=33) 和 CHD 患者 (n=65) 的血清样本进行 UM 分析。表 1 显示了研究参与者的临床特征。HCs 组和 CHD 组的这些 CHD 相关临床指标无明显差异。

表 1 非靶向代谢组学分析中的患者基本特征

Characteristics	HCs (n=33)	CHD (n=65)	P
Age,y	60.48(10.64)	58.38(10.50)	0.647
MaleSex,n(%)	20(60.6)	45(69.2)	0.498
Height,cm	162.42(8.08)	162.29(7.60)	0.938
Weight,kg	66.39(12.22)	65.65(10.86)	0.761
Smoking,n(%)	12(36.4)	22(34.0)	0.825
Drinking,n(%)	3(9.1)	6(9.2)	1.000
Hypertension,n(%)	22(66.7)	44(67.7)	1.000
Diabetes,n(%)	8(24.2)	17(26.2)	1.000

CREA μ mol/L	81.57(24.07)	84.77(25.12)	0.547
URIC μ mol/L	374.42(85.5)	395.59(112.98)	0.346
TCHOm mol/L	4.23(0.99)	4.40(1.0)	0.427
TGmmol/L	1.51(1.02)	1.81(1.22)	0.228
HDLcmmol/L	1.17(0.37)	1.13(0.30)	0.566
LDLcmmol/L	2.84(0.94)	3.03(1.19)	0.426
EF(%)	65.52(6.34)	63.97(7.20)	0.298
Lesion(%)			
0	0(0.0)	8(12.3)	
1	0(0.0)	41(63.1)	
2	0(0.0)	9(13.9)	
3	0(0.0)	7(10.7)	
NA	33(100.0)	0(0.0)	

缩写: HCs, 健康对照; CHD, 冠心病; CREA, 肌酐; URIC, 尿酸; TCHO, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; HDLC, 高密度脂蛋白胆固醇; LDLc, 低密度脂蛋白胆固醇; EF, 射血分数。连续变量表示为平均值 (SD), 分类变量表示为 n (%)。0 代表左主干病变、1 代表前降支病变、2 代表左回旋支病变和 3 代表右冠状动脉病变。



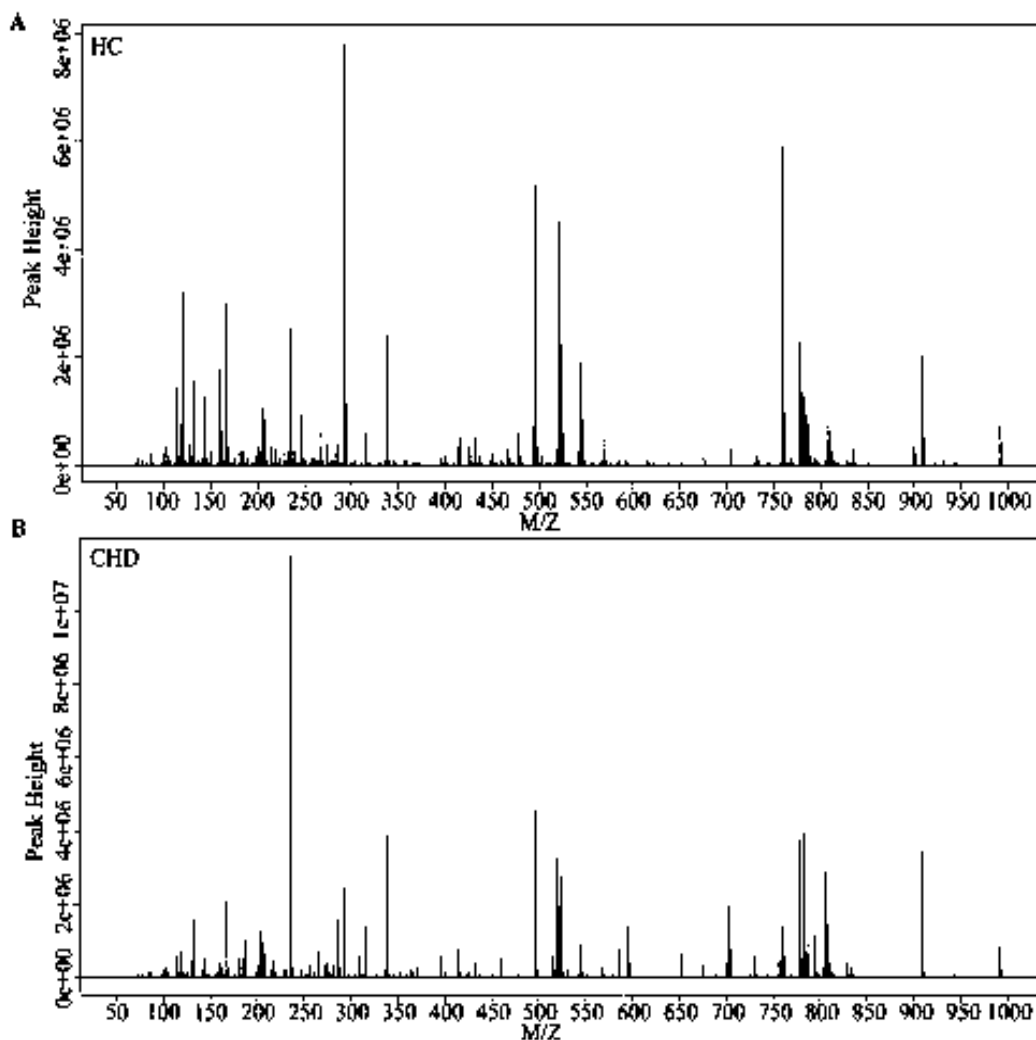
ECG, 心电图; cTnI, 肌钙蛋白 I; CAG, 冠状动脉造影; LC/MS, 液相色谱-串联质谱法; ROC, 受试者特征曲线。

图 1 冠心病代谢物临床模型建立的流程图。HCs, 健康对照组; CHD, 冠心病;

2.2 非靶向代谢组学分析检测异常表达代谢产物

对 33 例 HC 和 65 例 CHD 患者血清中的非靶向代谢物进行了比较分析，共获得 3069 个分子特征并进行进一步分

析。如图 2A、B 所示，HC 组和 CHD 患者的质谱图显示了不同的代谢峰。

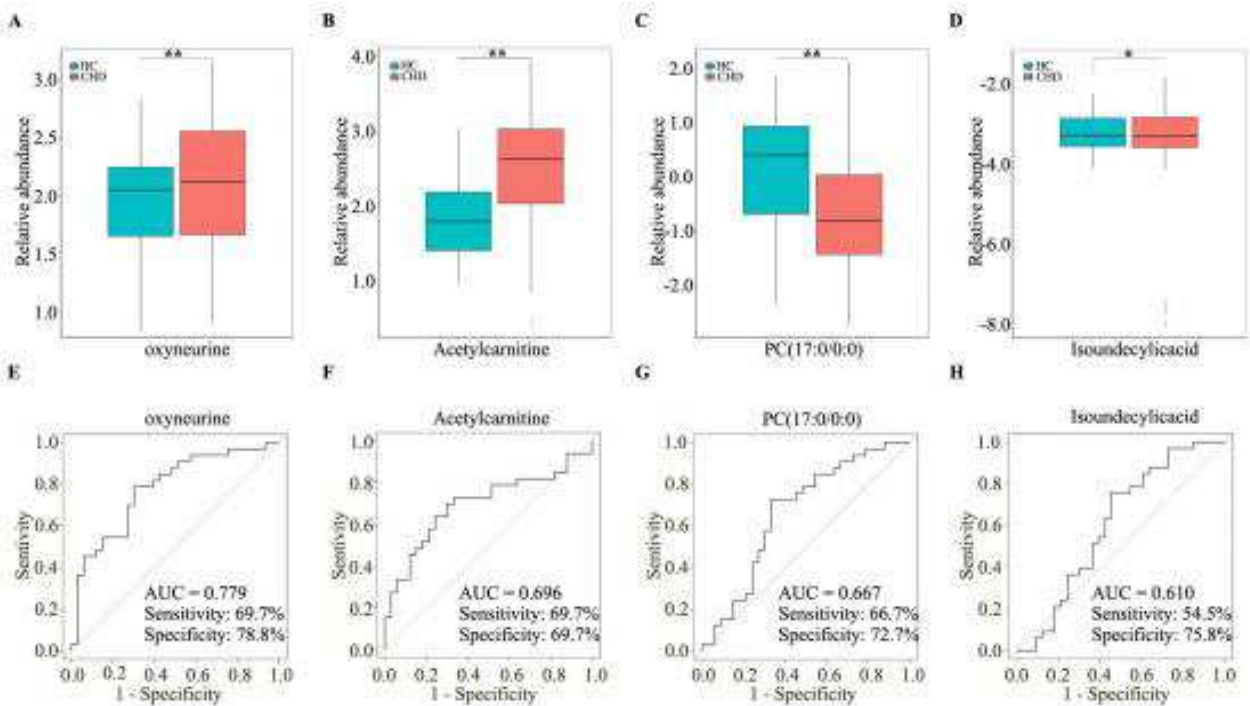


(A) HC 和 (B) CHD 患者组的代谢预测分析。HC，健康对照组；CHD，冠心病。

图 2 质谱图

为评估异常表达代谢物的诊断潜力，通过 ROC 曲线下面积 >0.6 筛选 HC 组和 CHD 患者的差异代谢物。如图 3A-D 所示，四种失调的代谢物（甜菜碱、乙酰肉碱、PC (17:0/0:0) 和异十一烯酸) 在各组间的丰度水平上存在显著差异。HC 组和 CHD 患者的甜菜碱、乙酰肉碱、PC (17:0/0:0)

和异十一烯酸的 AUC 值分别为 0.779、0.696、0.667 和 0.610；敏感性分别为 69.7%、69.7%、66.7% 和 54.5%，特异性分别为 78.8%、69.7%、72.7% 和 75.8%（图 5E-H）。总之，我们的数据表明，甜菜碱、乙酰肉碱、PC (17:0/0:0) 和异十一烯酸可能参与 CHD 期间发生的代谢组学变化。



血清样本中甜菜碱 (A)、乙酰肉碱 (B)、PC (17:0/0:0) (C) 和异十一酸 (D) 的相对丰度。HC 和 CHD 患者组中甜菜碱 (E)、乙酰肉碱 (F)、PC (17:0/0:0) (G) 和异十一酸 (H) 的 AUC 值。HC, 健康对照组; CHD, 冠心病。

图 3 通过 UM 分析筛选四种异常表达代谢物。

2.3 靶向代谢组学分析检测异常表达代谢产物

为了进一步研究上述失调代谢物的潜在作用, 对 HC(n=53) 和 CHD(n=101) 患者患者的血清样本进行筛选并进行靶向代谢分析。临床特征如表 2 所示。

表 2 靶向代谢组学分析中的患者基本特征

Characteristics	HC (n=53)	CHD (n=101)	P
Age,y	59.60(10.41)	58.28(11.52)	0.486
MaleSex,n(%)	33(62.3)	70(69.3)	0.471
Height,cm	162.98(7.32)	162.73(7.91)	0.849
Weight,kg	67.05(11.39)	66.40(11.40)	0.737
Smoking,n(%)	18(34.0)	36(35.6)	0.861
Drinking,n(%)	6(11.3)	10(9.9)	0.206
Hypertension,n(%)	32(60.4)	59(58.4)	0.864
Diabetes,n(%)	16(30.2)	27(26.7)	0.707
CREA μ mol/L	83.51(23.22)	85.47(29.90)	0.678
URIC μ mol/L	379.23(91.29)	389.36(113.77)	0.576
TCHOmml/L	4.26(0.93)	4.38(1.09)	0.497
TGmml/L	1.54(0.93)	1.86(1.53)	0.166
HDLcmml/L	1.13(0.35)	1.16(0.40)	0.645
LDLcmml/L	2.81(0.94)	2.99(1.17)	0.335
EF(%)	64.47(7.61)	64.24(7.18)	0.854
Lesion(%)			

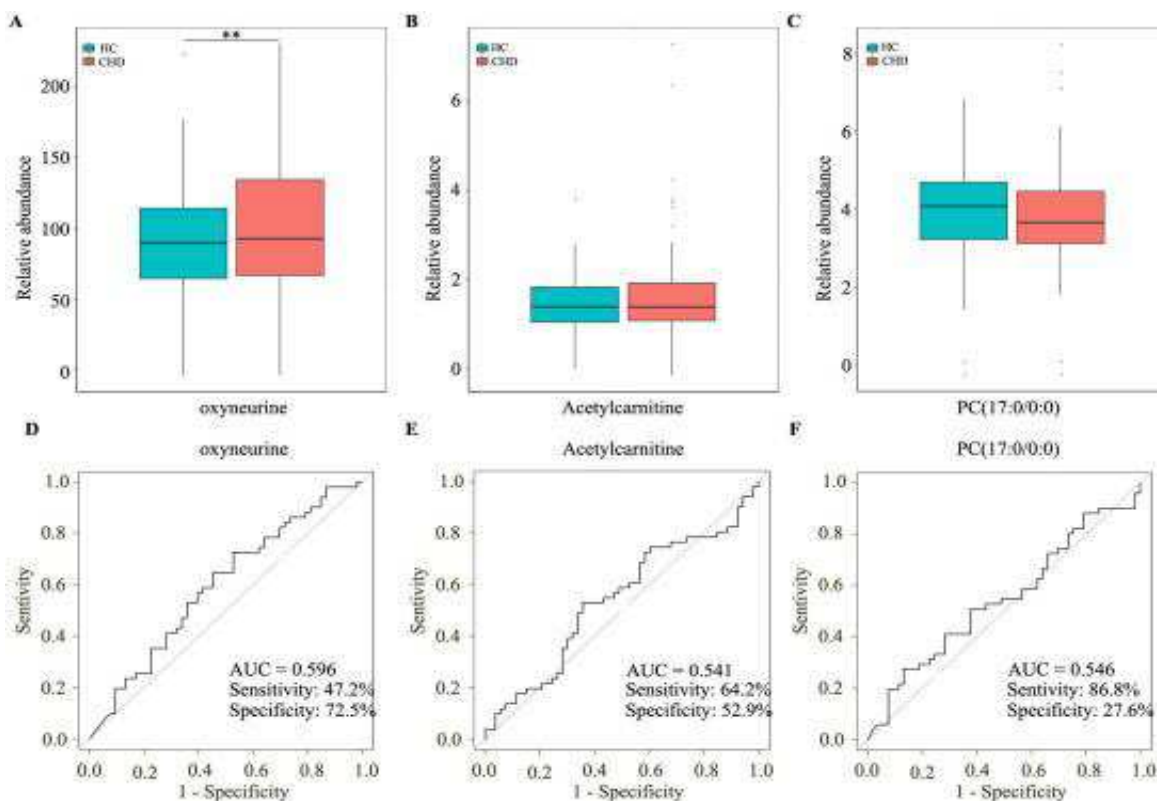
0	0(0.0)	11(10.9)	
1	0(0.0)	58(57.4)	
2	0(0.0)	19(18.8)	
3	0(0.0)	13(2.9)	
NA	33(100.0)	0(0.0)	

缩写: HC, 健康对照; CHD, 冠心病; CREA, 肌酐; URIC, 尿酸; TCHO, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; HDLC, 高密度脂蛋白胆固醇; LDLC, 低密度脂蛋白; EF, 射血分数。连续变量表示为平均值 (SD); 分类变量表示为 n (%)。0 代表左主干病变、1 代表前降支病变、2 代表左回旋支病变和 3 代表右冠状动脉病变。

由于 HMDB 中未发现异十一酸, 我们无法验证其相对丰度水平的差异。对其他三种代谢物 (即甜菜碱、乙酰肉碱和 PC (17:0/0:0)) 进行了系统和全面的分析。CHD 组与 HC 组相比, 甜菜碱的丰度水平有显著差异; 这一发现与 UM 分析结果相似 ($P < 0.05$; 图 4A)。然而, 乙酰肉碱和 PC (17:0/0:0) 的丰度水平在各组之间没有差异 (图 4B-C)。这些结果表明, 甜菜碱可以作为诊断冠心病的血清代谢生物标志物。ROC 分析显示, CHD 患者与 HC 组的甜菜碱、乙

酰肉碱和PC (17:0/0:0) 的 AUC 值分别为 0.596、0.541 和 0.546；敏感性分别为 47.2%、64.2% 和 86.8%，特异性分别为 72.5%、52.9% 和 27.6% (图 4D-F)。总的来说，我们的

数据表明所有这三种失调的代谢物，特别是甜菜碱，都可以用于冠心病的早期诊断。



甜菜碱 (A)、乙酰肉碱 (B) 和 PC (17:0/0:0) (C) 的相对丰度。HC 和 CHD 患者组中甜菜碱 (D)、乙酰肉碱 (E) 和 PC (17:0/0:0) (F) 的 AUC 值。靶向代谢组学；HC，健康对照组；CHD，冠心病。

图 4 通过 TM 分析筛选三种异常表达的代谢物。

2.4 临床代谢模型建立

为了评估甜菜碱、乙酰肉碱和PC(17:0/0:0)的临床意义，我们建立一个与冠心病早期诊断相关的临床模型。然而，该联合诊断模型的 AUC 值仅为 0.579，敏感性为 75.5%，特异性为 46.5% (图 5A)。这些结果表明，单靠失调产物不足以诊断冠心病；在构建临床模型时，还应纳入其他与 CHD 相关的生化指标。

为了提高冠心病诊断的准确性，采用逐步后退选择法和交叉验证分析对临床模型进行调整。最佳模型如下： $\text{logit}(P=\text{CHD 患者 vs. HCs 患者}) = 0.020 \times \text{oxynearine} + 0.389 \times \text{TG} - 0.036 \times \text{重量} - 0.393$ (图 5B)。AUC 值为 0.731；敏感性为 83.0%，特异性为 64.0%。研究表明，结合甜菜碱、甘油三酯和体重可显著提高临床模型的准确性，使其适用于冠心病的诊断。

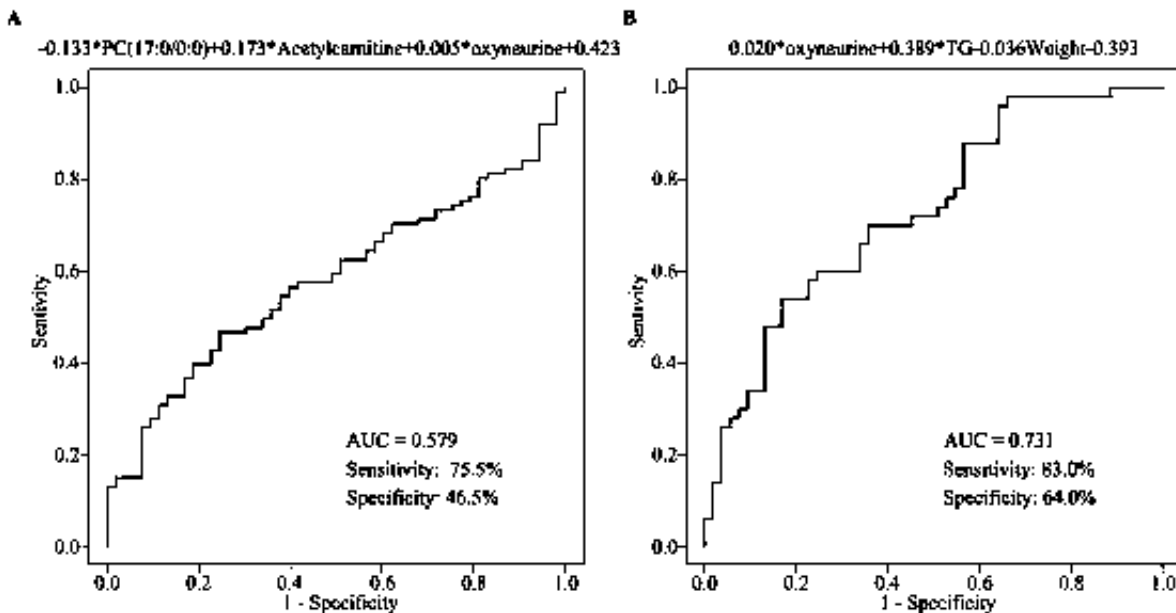
3. 讨论

冠心病是一种与炎症和氧化应激相关的复杂人类疾病，其发病与多种环境和遗传因素有关。其发病率每年都在增加，因此造成了重大的社会经济负担。代谢组学的进展有助于阐明冠心病发展的潜在机制^[5]。在这项研究中，我们进行了非靶向代谢和靶向代谢分析，以检测冠心病和健康者之间的差异代谢物。我们的研究表明，甜菜碱、乙酰肉碱和PC(17:0/0:0)在冠心病患者中明显失调。此外，在我们的临床模型中加入甜菜碱、甘油三酯和体重显著增加了其稳健性 (AUC=0.731)，表明它们可以作为冠心病早期诊断的生物标志物。

四种失调的代谢物甜菜碱、乙酰肉碱、PC(17:0/0:0)和异十一酸在冠心病患者和健康组之间的丰度水平存在显著差异。甜菜碱，据报道可增加血浆谷胱甘肽过氧化物酶水

平并调节胰岛素分泌^[6]。乙酰肉碱是一种有效的抗氧化剂和抗炎标记物。已发现它可以减轻神诱导的氧化应激和海马线粒体功能障碍,调节抗氧化防御能力,保护海马神经元免受氧化损伤^[7]。PC(17:0/0:0)是一种溶血磷脂,参与酰化循环并调节脂质和糖的组成^[8]。据报道,异十一烯酸在体外表

现出5-脂氧合酶抑制活性^[9]。根据以上研究,上述四种失调的代谢物似乎在冠心病患者的脂质氧化应激中起着关键作用。因此,以它们为靶点可能是临床治疗冠心病的一种新方法。然而,需要进一步研究来阐明它们的确切作用和潜在机制。



(A) 三种代谢物(甜菜碱、乙酰肉碱和PC(17:0/0:0))临床模型的AUC值。(B)结合血清甜菜碱、TG和体重的临床模型的AUC值。甘油三酯;HC,健康对照组;CHD,冠心病。

图5 冠心病诊断的临床模型。

在目前的的研究中,我们通过进行非靶向代谢和靶向代谢分析,进一步检测代谢产物的变化。建立了基于代谢物的临床模型;然而,由于在HMDB中未发现异十一酸,因此仅对甜菜碱、乙酰肉碱和PC(17:0/0:0)进行靶向代谢分析。异十一烯酸的作用有待进一步探讨。最后,由于使用小样本验证了临床模型,其敏感性和特异性值得深入研究。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] 国家心血管病中心,中国心血管健康与疾病报告编写组,胡盛寿.中国心血管健康与疾病报告2023概要[J].中国循环杂志,2024,39(7):625-60.

[2] CHENG S, LARSON M G, MCCABE E L, et al. Distinct metabolomics signatures are associated with longevity in humans[J]. Nature communications, 2015, 6: 6791.

[3] LUAN H, MENG N, LIU P, et al. Non-targeted metabolomics and lipidomics LC-MS data from maternal plasma of 180 healthy pregnant

women[J]. GigaScience, 2015, 4: 16.

[4] CHEN H, CAO G, CHEN D Q, et al. Metabolomics insights into activated redox signaling and lipid metabolism dysfunction in chronic kidney disease progression[J]. Redox biology, 2016, 10: 168-78.

[5] 殷鲲鹏,郑好,谢滨新,etal.临床代谢组学及其在冠心病诊疗中的研究进展[J].中国药科大学学报,2017,48(6):629-34.

[6] 李炳龙,齐永秀,刘常丽,etal.甜菜碱药理作用机制及其药效学研究进展[J].中国新药杂志,2008,17(18):1571-4.

[7] FARRELLS, VOGEL J, BIEBER L L. Entry of acetyl-L-carnitine into biosynthetic pathways[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1986, 876(1): 175-7.

[8] LINGWOOD D, SIMONSK. Lipid rafts as a membrane-organizing principle[J]. Science, 2010, 327(5961): 46-50.

[9] OHKUMAH, TOMITAK, HOSHINO Y, et al. 5-Hydroxyanthranilic acid derivatives as potent 5-lipoxygenase inhibitors[J]. The Journal

alofantibiotics,1993,46(5):705-11.

作者简介：

姜华丽（1988—），女，汉，学历：博士，研究方向：
有9年的心血管内科工作经验，6年冠脉介入经验，在冠心病、急慢性心力衰竭、高血压及心律失常等心血管疾病诊疗方面具有丰富的临床经验，主要致力于心血管疾病代谢组学相关研究。

基金项目：

2022年东莞市社会发展科技项目（立项编号：
20221800903182）；
2023年东莞市社会科技发展重点项目（立项编号：
20231800935672）；
东莞市心血管慢性病防治重点实验室。