

动脉粥样硬化患者尿液的代谢组学研究

庞博¹ 越皓² 王恩鹏² 尉海涛¹ 戴雨霖² 刘淑莹² 吴绥生^{* 1}

¹(吉林大学第一医院, 长春 130023) ²(长春中医药大学, 长春 130117)

摘要 利用基于液相色谱-质谱联用的方法对动脉粥样硬化(atherosclerosis , AS) 患者和正常对照(Control) 人群的尿液进行分析, 寻找动脉粥样硬化患者尿液中的差异代谢物, 为其发病机制及早期筛查提供科学依据。使用 VaSera VS-4000 无创动脉血管弹性测定仪筛选 15 名动脉粥样硬化患者(46.84 ± 2.41) 及 15 名健康者(45.72 ± 1.93) , 采用高分离度快速液相色谱与四极杆-飞行时间串联质谱(RRLC-QTOF/MS) 技术对其尿液代谢物进行分析, 采用主成分分析(Principal component analysis , PCA) 对两组代谢物进行分类, 并寻找潜在生物标记物。RRLC-QTOF/MS 检测结果表明, 动脉粥样硬化组和对照组尿液代谢物谱能得到很好的区分, 发现并鉴定了 2 种生物标记物尿酸及胍基乙酸, 从而提示嘌呤代谢、氨基酸代谢及氧化应激可能在动脉粥样硬化发生发展中有重要作用。

关键词 动脉粥样硬化; 快速高分辨液相色谱/质谱; 尿酸; 胍基乙酸; 代谢组学

1 引言

动脉粥样硬化(Atherosclerosis , AS) 是一种多器官受累的常见血管疾病, 是许多心血管疾病的病理基础, 其发病率在我国乃至全世界呈逐年递增趋势^[1]。动脉粥样硬化主要累及大型及中型肌弹力型动脉, 以主动脉、冠状动脉及脑动脉为多见, 多伴有结构和功能上的改变, 包括管壁结构改变及血管舒缩功能障碍^[2]。因此, 其临床诊断和治疗一直备受关注, 基础与临床工作者开展了大量实验来寻求其早期诊断的指标。目前临床上最常用的是动脉波传导速度(Pulse wave velocity , PWV) , 用于反映动脉粥样硬化程度及早期诊断^[3], 但尚缺乏临床实验室检验方面的相关研究及生化指标。

代谢组学(Metabonomics) ^[4, 5]是研究生物体系受刺激或扰动后其代谢产物-内源性代谢物质种类、数量及其变化规律的科学, 它研究的是生物整体、系统或器官的内源性代谢物质的代谢途径及其这些代谢物质受到内在或外在因素影响时所产生变化的规律, 这种代谢变化可以通过先进的分析技术(质谱、核磁共振技术、色谱-质谱联用技术等) 进行数据采集, 表达成为特定的代谢指纹图谱, 并利用化学计量学的手段对这些信息进行提取, 挖掘其中有用的信息。代谢组学强调将人体作为一个完整的系统来研究, 其研究对象主要是各种生物体液, 如尿液、血液、胆汁、唾液等^[6]。通过测定人体各种体液内代谢物的组成变化来认识和反映人体代谢网络在疾病或药物作用下的变化规律。

本研究利用高分离度快速液相色谱与四极杆-飞行时间串联质谱(Rapid resolution liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry , RRLC-QTOF/MS) 检测经使用 VaSera VS-4000 无创动脉血管弹性测定仪筛选的动脉粥样硬化患者尿液中代谢物的变化, 通过主成分分析寻找潜在生物标记物, 结合血液生化指标变化研究动脉粥样硬化的发生发展机制, 为早期筛查和早期临床治疗提供依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent1200 快速分离液相色谱系统(美国 Agilent Technologies 公司) , 配备高压二元泵, 控温自动进样器; Agilent 6520 Q-TOF 质谱仪(美国 Agilent Technologies 公司) , 配有 ESI 离子源; Eppendorf 5804R 高速离心机(德国 Eppendorf 公司) 。

2015-05-25 收稿; 2015-07-12 接受

本文系吉林省科技发展计划(No.20130101127JC) 、公益性行业(农业) 专项(No.20130311106) 资助项目

* E-mail: suishengwu@gmail.com

乙腈、甲酸(色谱纯,美国 TEDIA 试剂公司);超纯水(18.2 MΩ·cm),由本实验 Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)制备。

2.2 样本来源

动脉粥样硬化患者尿样和健康者尿样均由吉林大学附属第一医院提供。通过使用 VaSera VS-1000 无创动脉血管弹性测定仪^[7]以颈-股动脉脉搏传导速度(Carotid-femoral pulse wave velocity, C-F PWV)为主要指标筛选 15 名动脉粥样硬化患者及 15 名健康者,具体情况见表 1。所有人均清晨空腹采取尿样,尿样采集后在 3000 r/min 离心 10 min,以除去杂质,样本于-80℃储存备用。

表 1 样本具体情况

Table 1 Characteristics of two groups($n=15$)

组别(男/女) Group(male/female)	年龄 Age(year)	血压 BP(mmHg)	总胆固醇 TC(mmol/L)	低密度脂蛋白 LDL(mmol/L)	动脉波传导速度 C-FPWV(m/s)
对照组(Control) (9/6)	45.72±1.93	125.72±8.15	5.21±0.63	2.89±0.38	8.67±1.04
动脉硬化组(AS) (10/5)	46.84±2.41	128.68±7.36	5.27±0.49	2.94±0.43	9.53±1.05*

* 与对照组比较 $p<0.05$ (AS vs Con $p<0.05$); BP, blood pressure; TC, total cholesterol; LDL, low density lipoprotein; C-F PWV, carotid-femoral pulse wave velocity; AS: atherosclerosis.

2.3 样本处理

采用离心沉降后四倍稀释法^[8]将样本从-80℃取出,室温下溶解,离心(12000 r/min, 4℃, 5 min),取 50 μL 上清液,用水稀释至 200 μL,涡旋,以 0.45 μm 滤膜过滤,作为待测样品供 LC-MS 分析。

2.4 分析条件

2.4.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm, 美国 Agilent 公司);柱温: 30℃;流动相 A: 超纯水(0.1% 甲酸);流动相 B: 乙腈;流动相梯: 0~5 min, 10%~30% B; 5~10 min, 30%~80% B; 10~12 min, 80%~85% B; 12~15 min, 85%~95% B; 15~20 min, 95% B; 20~21 min, 95%~100% B。流速: 0.4 mL/min。

2.4.2 质谱条件 分别采用电喷雾正离子模式(ESI+)和负离子模式(ESI-)对样品进行检测;质量扫描范围 m/z 100~1200;干燥气流量(N_2)为 9 L/min;干燥气温度为 250℃;雾化电压为 0.276 MPa;毛细管电压为 3.5 kV;碎裂电压为 150 V;锥孔电压为 65 V。在样品测试之前,使用调谐液校正质量轴。

2.5 数据处理:

尿液样品用 RRLC/MS 进行检测,得到样品的总离子流色谱图,在 Mass Hunter 软件的分子特征识别模式下,进行峰校准、背景扣除、面积归一化和数据简化处理,将结果转化为包含化合物的保留时间和质荷比信息的 CEF 格式文件。将 CEF 格式文件导入 Mass Profiler Professional (MPP, Agilent Technologies, USA) 软件,统计软件进行滤噪和归一化,并进行主成分分析(Principal component analysis, PCA),其目的在于对原始数据进行数据压缩,将多维的数据压缩成几个主要的主成分(PCs)来描述数据内部的特征。本实验对数据进行 PCA,通过 PCA 得分图(Score plot)获得样本分类信息,通过 PCA 载荷图(Loading plot)发现可作为生物标记物的化合物,最终找出潜在的生物标记物并进行鉴定。

3 结果与讨论

3.1 动脉粥样硬化患者和健康者尿液 LC-MS 总离子流图

尿液样品经 RRLC-QTOF/MS 分别在正离子模式和负离子模式下进行检测分析。随机选取一个动脉粥样硬化患者和健康者的尿液经过 LC-MS 分析得到总离子流图(Total ion current, TIC)如图 1 所示。从总离子流图中直观观察,可以发现在正负离子模式下,有一些峰在二者之间存在着明显差异,这些观测结果是否具有统计学意义还需要进行进一步的分析验证。

3.2 数据分析结果

3.2.1 主成分分析(PCA) 采用主成分分析考察动脉粥样硬化患者和健康者尿样代谢物变化。如图 2 所示,正离子模式和负离子模式下的 PCA 得分图能够很好地区分二者。图中每个点代表一个样

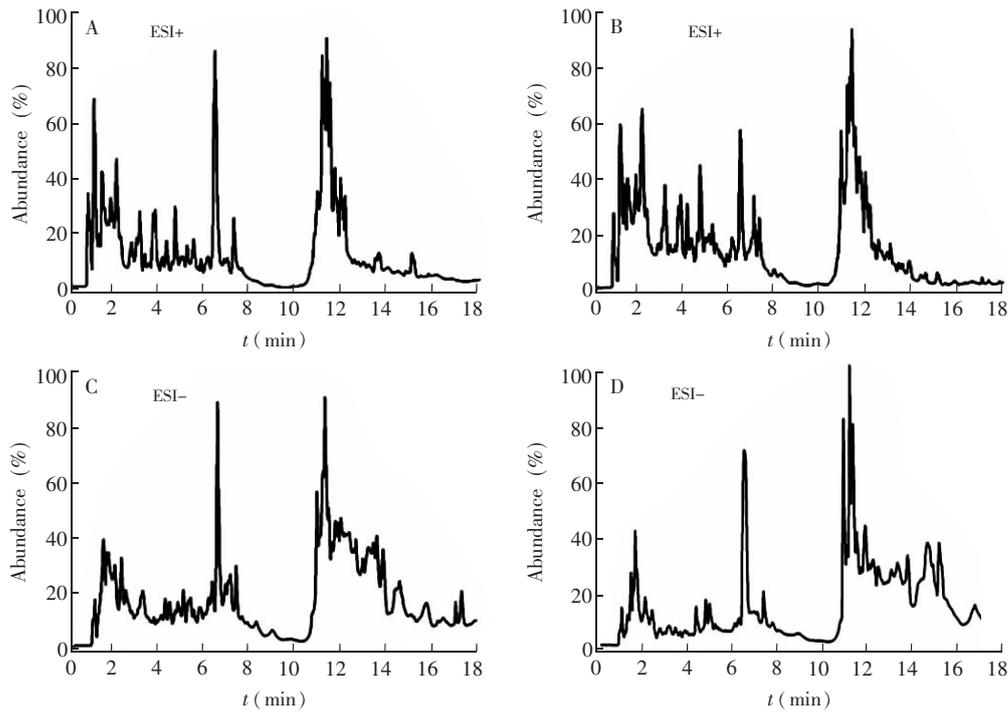


图 1 动脉粥样硬化患者和健康者的 LC-MS 总离子流

Fig.1 LC-MS total ion current chromatograms of urine samples deriving from atherosclerosis (AS) patients and healthy persons

正离子模式下: A 健康者尿样, B 动脉硬化患者尿样; 负离子模式下: C 健康者尿样; D 动脉硬化患者尿样。

ESI+: healthy person (A), AS patient (B); ESI-: healthy person (C), AS patient (D).

本, 每个样本的位置由其自身的代谢决定, 处于相同生理病理状态的样本通常具有相似的代谢物组成, 因此在得分图上也处于相似的位置, 彼此之间距离越远, 表示其生理病理状态相差越大。在正离子模式下, 前 2 个主成分可以解释 86% 的变量, 前 3 个主成分可以解释 95% 的变量; 在负离子模式下, 前 2 个主成分可以解释 84% 的变量, 前 3 个主成分可以解释 94% 的变量。

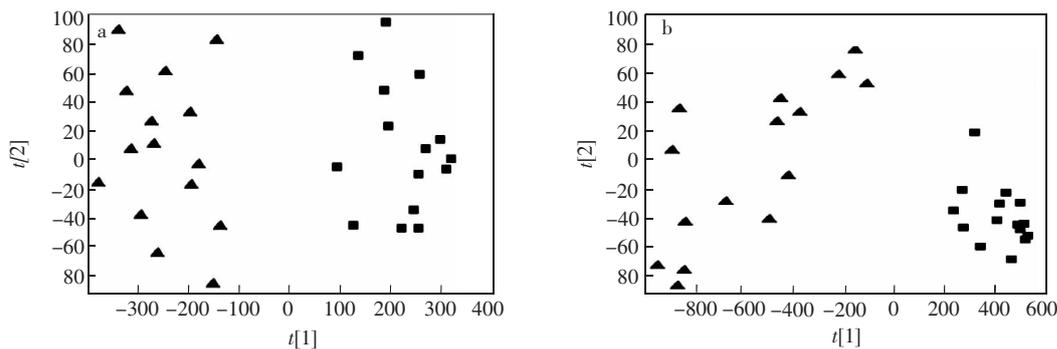


图 2 区分 AS 组和 Control 组的 PCA 得分图

Fig.2 PCA Scores plot of urine sample

(a) 正离子模式; (b) 负离子模式。(▲ 对照组; ■ 动脉粥样硬化组)。

(a) ESI+; (b) ESI-。(▲ Healthy person, ■ AS patient)。

3.2.2 差异变异研究 基于动脉粥样硬化患者和健康者的 PCA 分析结果, 确定两组之间存在代谢差异, 这些变量的 PCA 载荷图如图 3 所示, 图中每个点代表样本中检测到的代谢物相关信息, 距离原点越远, 表明该代谢物对两组间分类的贡献越大。根据载荷图的结果, 选取其中距离远点比较远, 即对分组贡献较大的代谢物作为潜在生物标记物。根据独立 t 检验的 p 值, 7 种化合物被认为动脉粥样硬化人群发病的潜在标记物。

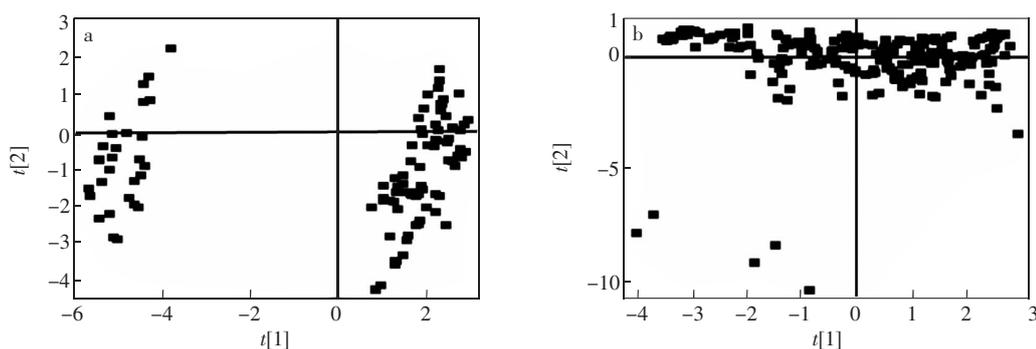


图 3 区分 AS 组和 Control 组的 PCA 载荷图。(a) 正离子模式; (b) 负离子模式。

Fig.3 Loadings plot from PCA for the common components. (a) ESI+; (b) ESI-

3.2.3 潜在标志物鉴定 潜在标记物的鉴定是根据它们的精确分子量和串联质谱结果以及与数据库或标准品的比较进行的。以负离子模式下的离子 m/z 167.0184 为例,说明生物标记物的鉴定过程。正离子模式下,该离子的提取离子色谱图及在保留时间 1.648 min 时的质谱图如图 4a 和图 4b 所示。将计算结果与数据库中化合物进行比对,初步鉴定该化合物为尿酸。串联质谱的结果确认了这个结论(图 4c) 与购买的标准品的串联结果比对,两者完全一致。根据以上信息,这个生物标记物被鉴定为尿酸。其它化合物的鉴定同上所述,但是一些化合物未能定性。

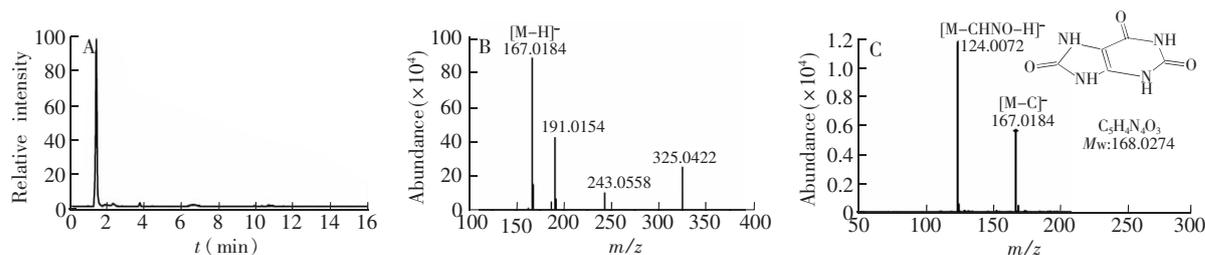


图 4 潜在标志物尿酸的鉴定: (a) 正离子模式下尿酸的提取离子色谱图; (b) 相应的质谱图; (c) 串联质谱图 碰撞能量为 25eV。

Fig.4 Identification of potential marker-uric acid. (a) Extract ion chromatography (EIC), (b) Mass spectrum of ion at m/z 167.0184 (c) MS-MS of the marker (25 eV)

表 2 列出了潜在生物标记物的鉴定结果。ANOVA 分析给出了它们在健康对照组与 AS 组之间的变化趋势。

表 2 AS 组和 Control 组的潜在生物标记物的鉴定结果

Table 2 List of identified differential metabolites between AS patients and controls

离子模式 ESI	保留时间 Retention time (min)	质量 Mass (m/z)	化合物 Compound	质量偏差 Mass deviation ($\times 10^{-6}$)	变化趋势 Change
ESI ⁺	4.809	117.054	胍基乙酸 Guanidinoacetic acid	6.8174	上调 UP
	6.574	247.0811	$C_8H_{13}N_3O_6$	5.2169	上调 UP
	11.137	202.0951	L-Coprine	1.8159	上调 UP
	8.298	136.0873	$C_9H_{12}O$	6.54	上调 UP
ESI ⁻	1.648	168.0274	尿酸 Uric acid	9.3079	上调 UP
	12.156	230.1544	十二双酸 Dodecanedioic acid	8.54	上调 UP
	4.730	280.104	$C_{13}H_{16}N_2O_5$	9.0894	上调 UP

3.3 动脉粥样硬化早期潜在生物标志物分析

本实验通过运用 LS-MS 方法对早期动脉粥样硬化患者和健康人群尿液进行检测,结合统计学处理发现 7 种生物标志物及其变化趋势,并鉴定出其中 4 种,其中尿酸和胍基乙酸可能与动脉粥样硬化的发病机制有关。

在人体内,嘌呤是核酸的代谢产物,尿酸是嘌呤的代谢最终产物,可以说尿酸是细胞分解的终末产物之一。糖代谢、脂代谢紊乱均可导致尿酸增高。近年来,一些大规模前瞻性研究结果表明,尿酸参与动脉粥样硬化发生发展过程,而血尿酸浓度与动脉粥样硬化程度密切相关,是心血管疾病的独立危险因素^[9]。Krishnan 等^[10]报道,动脉粥样硬化的年轻人血管钙化程度与尿酸浓度呈正比,Takayama 等^[11]报道,在无代谢综合征的人群中,颈动脉内膜中层厚度随尿酸浓度增加而增大。尿酸导致动脉粥样硬化的机制有很多,在血液中尿酸的物理溶解度很低,尿酸微结晶容易析出并沉积于血管壁,引起局部炎症,导致血管内膜受损^[12]。尿酸还可诱发氧化应激,Chao 等^[13]发现通过 NADPH 氧化酶系统的氧化作用,尿酸可刺激人主动脉平滑肌细胞内皮素基因-1 的表达,从而参与心血管疾病发生发展;Gersch 等^[14]发现尿酸可直接灭活 NO,从而发挥其促氧化作用,导致动脉粥样硬化。

肌基乙酸是一种甘氨酸的代谢中间产物,是肌酸生物合成的直接前体,在肌基乙酸-甲基转移酶 N 的作用下生成肌酸,但这一反应会造成高半胱氨酸(hcy)水平升高,而后者近年来已被证明是心血管疾病,尤其是动脉粥样硬化发病的独立危险因素^[15]。

动脉粥样硬化有很高的发病率,是各种心脑血管疾病的病理生理基础,对其早期筛查和诊断尤为重要。本实验在排除高血压、血栓性疾病前提下,通过颈-股动脉脉搏传导速度(C-F PWV)这个指标筛选出 15 名动脉粥样硬化患者与健康人,并观察其尿液的代谢组学变化。经过多元统计分析,健康对照组、动脉粥样硬化组获得了很好的区分。本研究发现并鉴定了两种潜在生物标记物:尿酸和肌基乙酸,其变化揭示了核酸代谢、氨基酸代谢在动脉粥样硬化早期发生发展中的作用,可能对于临床上早期诊断、预防及治疗动脉粥样硬化具有重要意义。

References

- 1 LIN Cong, WU Xiao-Qiu, DENG Ke. *Chinese J. Medical Recapitulate.*, **2013**, 19(6): 975-977
林聪,吴晓球,邓可. 医学综述, **2013**, 19(6): 975-977
- 2 PANG Bo, FU Zhao-Jun, TAN Wei-Jie, LIU Chao-Zhong, HUANG Cong-Chun, XU Xian-Rong, LU Cheng-Rong, SUN Jin-Jin, WANG Gang. *Chinese J. Med J. Chin. PLA.*, **2010**, 35(3): 293-296
庞博,付兆君,谈维洁,刘朝中,黄丛春,徐先荣,陆成荣,孙津津,王刚. 解放军医学杂志, **2010**, 35(3): 293-296
- 3 Alkan E, Karakas M S, Yıldırım B. *Turkish J. Gastroenterol.*, **2014**, 25(1): 20-25
- 4 Nicholson J K. *Mol Syst Biol.*, **2006**, 2: article 52
- 5 Holmes E, Tang H, Wang Y, Wang Y, Seger C. *Plant Med.*, **2006**, 72(9): 771-785
- 6 Nicholson J K, Wilson I D. *J. Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, 2(8): 668-676
- 7 XIA Xiao-Qi, YANG Cheng-Ming, ZENG Chun-Yu, WANG Hong-Yong, FANG Yu-Qiang. *Chinese J. Chongqing Medicine.*, **2010**, 39(2): 177-179
夏小琦,杨成明,曾春雨,王红勇,方玉强. 重庆医学, **2010**, 39(2): 177-179
- 8 CHEN Yan-Hua, ZHANG Rui-Ping, SONG Yong-Mei, DONG Li-Jia, ZHAN Qi-Min, ZAI Pa-Er Abulizi. *J. Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(2): 173-177
陈艳华,张瑞萍,宋咏梅,董立佳,詹启敏,再帕尔·阿不力孜. 分析化学, **2011**, 39(2): 173-177
- 9 Viazzi F, Leoncini G, Pontremoli R. *Reumatismo.*, **2011**, 63(4): 253-262
- 10 Krishnan E, Pandya B J, Chung L, Dabbous O. *J. Arthritis Res. Ther.*, **2011**, 13: 1-8
- 11 Takayama S, Kawamoto R, Kusunoki T, Abe M, Onji M. *Cardiovascular Diabetol.*, **2012**, 11: 1-9
- 12 ZHANG Xing-Ping, CHEN Qing-Wei, ZHENG Ling. *Chinese J. Chongqing Medicine*, **2004**, 33(1): 35-36
张兴平,陈庆伟,郑陵. 重庆医学, **2004**, 33(1): 35-36
- 13 Chao H H, Liu J C, Lin J W, Chen C H, Wu C H, Cheng T H. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2008**, 29(11): 1301-1312
- 14 Gersch C, Palii S P, Kim K M, Angerhofer A, Johnson R J, Henderson G N. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids.*, **2008**, 27(8): 967-978
- 15 Handy D E, Scolaro J, Chen J, Huang P, Loscalzo J. *Cell. Mol. Biol.*, **2004**, 50(8): 903-909

