

# 代谢组学在动脉粥样硬化和心血管疾病流行病学研究中的应用

原田美穗, 竹林诚, 饭田彻  
心脏病学系, 大学医学中心, 东京

**摘要:** 代谢组学已发展成为研究动脉粥样硬化和心血管疾病的复杂病理生理学的有力工具。许多流行病学研究已经应用这种技术来准确和全面地评估环境因素对健康结果的影响, 这曾经是一个永恒的挑战。代谢物被定义为小分子, 它们是由细胞内发生的多种酶催化的代谢反应的中间产物。由于遗传变异和环境, 它们使我们能够探索基因-环境的相互作用, 并更好地了解心血管疾病等多因素疾病。这篇综述文章重点介绍了世界各地著名的前瞻性队列研究的结果, 这些研究已将代谢组学用于广泛的目的, 包括发现生物标志物、改善心血管风险预测和早期疾病诊断, 以及探索疾病发作和进展的详细机制。然而, 在临床应用中仍然存在技术挑战。一个限制是由于基于每项研究的判断而使用的各种分析平台; 需要在不同平台之间进行比较评估, 以便在外部正确解释和验证每个数据。其次, 在大多数高通量代谢组学分析研究中获得代谢物水平通常是半定量而不是完全定量的浓度, 这使得难以比较和组合不同研究之间的结果并确定实际使用的水平。2014年, 代谢组学研究联盟成立, 有望率先攻克这些问题。

**关键词:** 代谢组学; 流行病学; 心血管疾病; 动脉粥样硬化

## Application of Metabolomics to Epidemiological Studies of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease

Miho Harada, Sei Takebayashi, and Toru Iida  
Department of cardiology, University Medical Center, Tokyo

**Abstract:** Metabolomics has developed as a powerful tool for investigating the complex pathophysiology underlying atherosclerosis and cardiovascular disease. Many epidemiological studies have applied this technique to accurately and comprehensively assess the effects of environmental factors on health outcomes, which used to be a perpetual challenge. Metabolites are defined as small molecules which are intermediate products of metabolic reactions catalyzed by numerous enzymes occurring within cells. Consequent to both genetic variation and environment, they allow us to explore the gene-environment interactions and to gain a better understanding of multifactorial diseases like cardiovascular disease. This review article highlights the findings of well-known prospective cohort studies around the world that have utilized metabolomics for a wide range of purposes, including biomarker discovery, improving cardiovascular risk prediction and early disease diagnosis, and exploring detailed mechanisms of disease onset and progression. However, technical challenges still exist in applying them clinically. One limitation is due to various analytical platforms that are used based on the judgment of each study; comparative assessments among different platforms need to be conducted in order to correctly interpret and validate each data externally. Secondly, metabolite levels obtained in most high-throughput metabolomics profiling studies are often semiquantitative rather than fully quantitative concentrations, which makes it difficult to compare and combine results among different studies and to determine the levels for practical use. In 2014, the Consortium of Metabolomics Studies was developed, which is expected to take the lead in overcoming these issues.

**Keywords:** Metabolomics, Epidemiology, Cardiovascular disease, Atherosclerosis

## 引言:

小型生物物质是细胞、组织或有机体中存在的所有调控复杂性的最终结果,包括转录调控、翻译调控和翻译后修饰。因此,代谢变化是身体响应疾病过程或药物治疗变化的最接近的报告者。1971年,Arthur Robinson和Linus Pauling构想了核心思想,即反映复杂生物系统功能状态的信息丰富的数据存在于体液中代谢物的定量和定性模式中。同年,霍宁和霍宁首次使用代谢分析这一术语来描述来自患者样本的气相色谱图的输出。这种对生物流体中大量小分子进行定量代谢分析的新兴方法最终被Nicholson等人称为“代谢组学”,而其他人则将其称为“代谢组学”。最近,对特定代谢物家族或亚群的更集中分析甚至产生了新术语,例如“脂质组学”。虽然大多数生物标志物已经作为“靶向”生理研究的延伸出现,但很明显,即使成分或其与疾病的关系最初是未知的,以公正的方式得出的代谢物谱也可能提供信息。

迄今为止,大多数代谢组学研究都是在模式生物中进行的。研究阐明了植物中代谢物的遗传控制,例如拟南芥,并确定了转基因酵母(*S. cerevisiae*)的“代谢足迹”。在后一份报告中,条件培养基的代谢分析被用来“诊断”其他沉默的突变表型。Tandem MS还被用于分析过表达肝脏丙二酰辅酶A脱羧酶的小鼠中的36种酰基肉碱种类,从而产生有关肌肉 $\beta$ -羟基丁酸水平和胰岛素敏感性的新信息。

然而,通过代谢分析来诊断人类疾病的愿景源自对婴儿先天性代谢错误的开创性研究。Millington及其同事率先使用基于串联质谱的方法来监测脂肪酸氧化,以及有机和选定的氨基酸。他们的工作最终促成了北卡罗来纳州对新陈代谢疾病的普遍新生儿筛查。预计对更常见疾病的全球代谢组学分析可能会确定新的生物标志物或聚焦饮食或药物调节的途径。然而,将代谢组学应用于复杂的心血管疾病可能比应用于遗传性先天性代谢错误更困难。

代谢组学分析最常使用核磁共振(NMR)或质谱(MS)进行。样品中的各个分析物分别通过它们的磁共振位移或质荷比进行分离,从而产生分离的光谱分布。在处理生物流体时,NMR通常不需要对样品进行化学操作,而MS通常需要衍生代谢物以产生更容易通过质荷比分离的离子物质。与NMR相比,MS在灵敏度方面具有很强的优势,并且通过应用色谱方法和质量/电荷分离技术的不同组合,提供了测量更广泛的小分子代谢物的能力。

组学方法有望揭示动脉粥样硬化(AS)和相关非传染性疾病及其表型的“黑匣子”机制。其中,代谢组学是对小分子代谢物(如氨基酸、有机酸、核酸和脂质)的综合表征,可以概述与细胞或生物系统相关的代谢状态和整体病理生理变化。将这种高通量技术引入流行病学研究对于了解基因-环境相互作用的后果和发现用于早期预防和检测AS和心血管疾病(CVD)的新生物标志物具有价值。事实上,美国心脏协会在2017年发表了一份声明,阐述了代谢组学对心血管健康和疾病的潜在影响及其临床应用的当前挑战。

在这篇综述中,我们总结了与AS和CVD相关的代谢分析研究的流行病学发现。还显示了与主要动脉粥样硬化危险因素相关的代谢分析结果。最后,提到了流行病学中代谢组学的方法学挑战。

## 一、动脉粥样硬化和心血管疾病的代谢组学分析和预测

Wurtz等人对三个基于人群的队列进行了核磁共振(NMR)代谢组学,以确定事件CVD的生物标志物。芬兰国家FINRISK研究( $n = 7, 256; 800$ 个事件)被用作发现队列, Southall和Brent REvisited(SABRE)研究( $n = 2, 622; 573$ 个事件)和英国妇女健康与心脏研究( $n = 3, 563; 368$ 个事件)被用作复制队列。在FINRISK研究的15年随访期间,在调整了年龄、性别、血压、吸烟、糖尿病和药物以及多重调整后,68种脂质和代谢物中的33种与心血管事件显著相关。统计比较( $P < 0.0007$ )。在所有三个队列的荟萃分析中,4种代谢物,即苯丙氨酸、单不饱和脂肪酸(MUFA)、omega-6脂肪酸和二十二碳六烯酸(DHA),与未来的心血管事件相关。他们指出,通过将这4种代谢物与已确定的风险因素结合起来,心血管风险预测得到了改善。

Vaarhorst等人对79例在随访期间(中位8.1年)发展为冠心病(CHD;心肌梗死、不稳定型心绞痛(UA)心绞痛、冠状动脉旁路移植术或经皮冠状动脉腔内成形术)的病例进行了病例队列分析和1993年至1997年慢性病风险因素监测项目中随机选择的亚组中的565名个体。代谢物评分来自基于NMR的血浆分析,包括脂质组分、葡萄糖、缬氨酸、鸟氨酸、谷氨酸、肌酐、糖蛋白、柠檬酸盐和1,5-脱水山梨糖醇与CHD的发病率相关,与传统的危险因素无关。

虽然NMR快速且廉价,但质谱(MS)已被用作测量平台,以深入研究各种代谢物。与三个瑞典老年人群(ULSAM、TwinGene和PIVUS)一起,对发现队列中的

1, 028 名参与者进行了为期 10 年的随访, 以检查突发冠心病与使用超高性能液体进行基线代谢组学分析之间的关联基于色谱 (UPLC) /MS 的非靶向代谢组学, 具有两个复制队列 ( $n = 1, 670$  和  $970$ , 分别)。四种血浆或血清脂质代谢物, 溶血磷脂酰胆碱 18: 1 (LPC 18: 1)、LPC 18: 2、甘油单酯 18: 2 (MG 18: 2) 和鞘磷脂 28: 1 (SM 28: 1), 与事件相关 CHD 独立于主要心血管危险因素。他们不仅发现这些代谢物适度改善了传统风险因素之外的风险重新分类, 而且还表明 CHD 相关 SNP 和一些 LPC 之间存在关联。

在意大利基于人群的 Bruneck 研究中进行了另一项脂质组学分析研究, 以更好地预测 CVD 的未来发展 (即, 致命和非致命性心肌梗死、缺血性中风和心源性猝死), 其中包含来自 8 个脂质类别的 135 种脂质, 磷脂酰胆碱 (PC)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC)、胆固醇酯 (CE)、鞘磷脂 (SM)、磷脂酰丝氨酸 (PS)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE) 和三酰基甘油 (TAG), 由基于 MS 的鸟枪法脂质组学测定 9)。对 702 名参与者进行了为期 10 年的随访, 其中 28 种脂质与心血管疾病事件显著相关。有趣的是, 作者将这些脂质种类与之前发现的与晚期动脉粥样硬化斑块相关的脂质进行了比较 10), 并指出观察到了广泛的重叠, 例如 PC (38: 3)。然后, 使用 Cox 比例风险模型确定三种脂质 TAG (54: 2)、CE (16: 1) 和 PE (36: 5) 与 CVD 事件显著相关。进一步分析表明, 将这 3 种脂质添加到常规风险因素 (年龄、性别、糖尿病、吸烟、收缩压、总胆固醇和高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇) 可以显著改善风险预测中的风险辨别和分类模型。

这里还进行了一些基于患者的研究。Shah 等人报告了在测量以了解 Cabarrus 和 Kannapolis 心血管疾病重新分类 (MURDOCK CV) 研究中接受导管插入术的 CHD 患者的心血管事件基线代谢组学分析的预测结果。他们打算评估“临床”概况, 即分子概况与临床数据的整合, 以更好地分类研究中临床心血管事件的风险。结合常规分析 (低密度脂蛋白 (LDL) 和 HDL 胆固醇、甘油三酯、葡萄糖、总酮、 $\beta$ -羟基丁酸和总游离脂肪酸), 使用基于 MS 的靶向方法测量了 45 种酰基肉碱和 15 种氨基酸串联质谱。共有 2, 023 名患者参与了这项分析, 13 种代谢物因素中有 5 种与死亡率独立相关: 中链酰基肉碱、短链二羧酰基肉碱、长链二羧酰基肉碱、支链氨基酸 (BCAA) 和脂肪酸。其中, 三种脂质谱, 即短链二羧酰基肉碱、长链二羧酰基肉碱和脂肪酸, 显著预测了独立于

标准预测因子的致命事件。

血浆代谢组学分析应用于 45 名 UA 和 43 名 AS 患者的空腹血浆样本, 以确定代谢组学分析是否可以区分 UA 和 AS, 并发现 UA12 的潜在生物标志物。UA 患者通过血管造影在至少一根主要冠状动脉中诊断出新发的心绞痛症状恶化或发生最小活动和  $\geq 50\%$  的器质性狭窄, 而心电图没有 ST 段抬高的变化。AS 被定义为血管造影在任何主要冠状动脉中无病变狭窄  $> 20\%$  的管腔不规则。使用快速分离液相色谱四极杆飞行时间质谱 (RRLC-QTOF/MS)、三种 MG、三种磷脂 (植物鞘氨醇、PC 和磷脂酰甘油)、3 种氨基酸和相关代谢物 (犬尿氨酸、硫酸吡啶酚和 p-甲酚硫酸盐) 和其他七种代谢物 (包括血浆中的 18-羟基皮质酮和 7, 8-二氢蝶酸) 在两组之间存在显著差异, 这被认为是诊断 UA 的病理生理生物标志物。为了评估代谢特征是否可以改善临床前阶段的 AS 预测, 将 NMR 光谱法应用于来自芬兰青年心血管风险研究的 1, 595 名 24-39 岁健康成年人的血清样本。作为亚临床 AS 的标志物, 在 2001 年和 2007 年两次测量左颈总动脉后壁的内膜中层厚度 (IMT)。在开发了高通量 NMR 测量平台后, 作者在 2001 年测量了 7 个脂蛋白主要脂质组分、14 个脂蛋白亚类和 18 个小分子 (包括酪氨酸、组氨酸和谷氨酰胺) 的血清浓度作为基线曲线。脂蛋白脂质组分包括总胆固醇、中密度脂蛋白 (IDL) 胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、总甘油三酯、极低密度脂蛋白 (VLDL) 甘油三酯和 IDL 甘油三酯; 脂蛋白亚类包括小到极大的 VLDL、IDL、小到大的 LDL, 以及小到非常大的 HDL。研究表明, 结合 Framingham 风险评分和 NMR 确定的代谢物 (LDL 胆固醇、中等 HDL、DHA 和酪氨酸) 的风险因素, 可以更好地预测 6 年内高 IMT ( $\geq 90\%$ ) 或斑块的发生率。模型仅包含来自弗雷明汉风险评分的因素 (年龄、性别、收缩压、吸烟状况、葡萄糖、总胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇)。对于氨基酸, 酪氨酸和谷氨酰胺水平与 6 年事件高 IMT 相关, 与基线血脂测量无关。

## 二、AS 主要危险因素代谢组学分析

AS 的主要危险因素, 如血压升高、饮食摄入、肥胖和胰岛素抵抗/糖尿病, 也是代谢组学研究的主题。尽管预防动脉粥样硬化性 CVD 的管理指南和风险评估工具不断改进 14), 但需要新的策略在当前风险因素出现之前识别风险。通过将代谢组学应用于大规模流行病学研究, 正在迅速发现关键的生物标志物和新途径。生活方式因素的影响, 例如体育活动和饮酒, 这些因素对人类代谢

组的 AS 的一级预防, 也正在研究中。

### 1) 血压升高的代谢分析

Holmes 等人的早期工作表明, 尿代谢物与血压水平有关。他们将核磁共振波谱法应用于来自宏观/微量营养素和血压国际研究 (INTERMAP) 研究 ( $n = 4, 630$ ) 的 24 小时尿液样本, 并表明 24 小时尿中丙氨酸和马尿酸盐的排泄量可能与饮食和肠道微生物有关活动, 与血压水平有关。尿甲酸盐也与血压水平显著相关。有趣的是, 本研究人群中四个种族的尿液代谢物排泄模式存在差异。从 7, 100 个光谱数据中鉴定出的 25 种有区别的代谢物在来自日本、中国、英国和美国的人群样本中得到了很好的区分。首先将东亚和西方人群分为两个不同的集群, 然后根据性别和居住区域确定子集群, 这可能反映了饮食和饮食相关主要危险因素的差异。另一项著名的队列研究, 社区中的 AS 风险 (ARIC) 研究, 采用代谢组学来识别个体代谢物及其与黑人人群中高血压事件相关的模式。在为期 10 年的随访中, 896 名 45-64 岁的正常血压黑人中有 344 名男性和女性出现高血压, 并通过非靶向代谢组学方法结合 LC-MS 和气相色谱 (GC) 测量了基线时的 204 种血清代谢物-多发性硬化症。在对各种风险因素进行多次调整后, 基线 4-羟基马尿酸盐 (一种源自肠道微生物群发酵多酚的微生物最终产物) 与高血压风险增加 18% 相关。本研究还指出了肠道微生物组与血压之间的相互作用。在主成分分析后, 由 16 种代谢物 (包括性类固醇) 组成的代谢物模式也与高血压风险显著相关。

### 2) 膳食摄入通过肠道微生物组对代谢组和健康结果的影响

食物消费及其对健康结果的影响是一个重要课题 (18), 但大型流行病学研究中的膳食评估仍然是一个挑战。存在各种方法, 例如饮食回忆或记录, 以及食物频率问卷, 但每种方法都有其局限性, 代谢组学有望全面了解个人的消费情况。上一段提到的两项研究的结果表明, 代谢组学还可以阐明饮食与健康之间的复杂关系, 因为人体代谢组包括来自食物的营养物质及其经肠道微生物群修饰的相关代谢物。INTERMAP 研究小组广泛研究了这方面。在一项比较 369 名非洲裔美国人 (AA) 和 1, 190 名 40-59 岁的非西班牙裔美国白人 (NHWA) 的研究中, 男性 AA 的收缩压和舒张压水平显著更高 (分别为 4.7 和 3.4 mmHg) 和女性 (分别为 9.0 和 4.8 mmHg)。作者进行了基于 NMR 的尿液代谢组分析, 结果显示 9 种代谢物 (肌酐、3-羟基异戊酸、糖

蛋白片段的 N-乙酰、二甲基甘氨酸、赖氨酸、N-乙酰神经氨酸、亮氨酸、二甲胺和 2-羟基异丁酸) 在 AA 和四种代谢物 (三甲胺、N-甲基烟酸、马尿酸盐和琥珀酸盐) 在 NHWA 中升高, 其中一些被称为肠道微生物组的代谢物。AA 和 NHWA 之间有多种食物的摄入量存在显著差异, 例如, 总蔬菜和生蔬菜、新鲜水果、加工肉类和鸡蛋。然后进行多元线性回归分析, 以评估将这些食物及其营养成分 (如植物蛋白、尿钾镁、尿钠/钾比) 作为解释变量添加到尿代谢物中对 AA 和 AA 之间的血压差异有何影响。NHWA。结果, 在回归模型中包含 11 种营养素和 10 种非营养素因素导致血压差异显著降低了 21% - 52%。这项研究的结果可能显示了饮食摄入与肠道微生物群改变之间复杂的相互作用及其对血压水平的影响的一部分。

目前在 CVD 领域感兴趣的另一种代谢物是三甲胺 N-氧化物 (TMAO)。据报道, 一种源自饮食的肠道微生物宿主代谢物及其前体代谢物是胆碱、甜菜碱和肉毒碱, TMAO 与广泛人群的心血管和死亡风险增加有关。上海女性健康研究和上海男性健康研究中的一项嵌套病例对照研究 ( $n = 275$  例冠心病事件,  $n = 275$  名个体匹配对照) 表明, 尿液中的 TMAO (而非其前体) 与发生冠心病的风险呈正相关在人群中, 在调整传统冠心病危险因素后, TMAO 最高四分位数与最低四分位数的比值比 (OR) 为 1.91。作者还补充说, 这种关联在糖尿病患者 (OR = 6.21) 中比在非糖尿病患者 (OR = 1.56) 中更为明显。TMAO 与油炸肉或鱼密切相关。这项研究还不仅强调了饮食摄入的影响, 还强调了饮食、肠道微生物群和宿主之间相互作用对心血管健康的重要性。

### 3) 肥胖和代谢综合征的代谢特征

越来越多的证据表明代谢组学特征与肥胖之间存在密切关系。Elliott 等人在 INTERMAP 的西方队列成员中通过 24 小时尿液代谢分析探索了肥胖的代谢特征, 并确定 29 和 25 种尿液代谢物与美国人群的体重指数 (BMI) 相关 ( $n = 1, 880$ ) 作为一个发现集和英国 (UK) 人口 ( $n = 444$ ), 分别。其中, 反映 5 种肠道微生物共代谢途径的 9 种代谢物与 BMI 相关; 三甲胺、二甲胺和二甲基甘氨酸与胆碱代谢有关, 4-甲酚硫酸盐、酪氨酸和 4-羟基扁桃酸与酪氨酸代谢有关, 苯乙酰谷氨酰胺与苯丙氨酸代谢有关, 马尿酸与苯甲酸产生有关, 2-羟基异丁酸与 N-*Faecalibacterium prausnitzii* 产生丁酸盐。还发现反映柠檬酸循环中间体、骨骼肌周转、线粒体代谢和 BCAA 代谢的各种代谢物与 BMI 显著相关。Ho 等人还发

现, BMI 与使用 LC-MS/MS 分析的 217 种代谢物中的 69 种相关, 包括 Framingham 心脏研究的 2, 383 名参与者中的芳香族氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸)和支链氨基酸(缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸)。FHS) 通过横断面评估的后代队列以及对其心脏代谢特征纵向变化的评估。

肥胖和代谢疾病特征通常同时出现在代谢综合征(MetS) 患者身上。在上述 FHS 后代研究中, 在与 BMI 和其他代谢特征(包括腹部肥胖、胰岛素抵抗和血脂异常) 相关的代谢物谱中观察到相当大的重叠。然而, 空腹血糖和血压特征的特征相对不同, 表明各种心脏代谢表型之间的代谢特征存在差异。他们的研究结果还证明了肥胖状态和胰岛素抵抗之间的重要相互作用。胆汁酸代谢物与肥胖但不瘦个体的胰岛素抵抗密切相关, 而异亮氨酸与瘦个体的胰岛素抵抗密切相关。Iida 等人的代谢分析还表明, 异亮氨酸和包括 BCAA 在内的其他极性代谢物与日本绝经后妇女的 MetS 相关, 该群体的 BMI 相对正常, 具有胰岛素抵抗背景。

支链氨基酸是一些被反复确定为与肥胖相关的主要代谢物, 但它们作为肥胖生物标志物的使用应谨慎处理, 因为它们也是胰岛素抵抗和糖尿病的指示和可能的生物标志物。Wang 等人(26) 在 FHS 后代研究中进行了一项嵌套病例对照研究, 其中 2, 422 名血糖正常的个体中有 201 名在随访 12 年后发展为糖尿病。他们发现, 在长期随访中, 基线 BCAA 和芳香族氨基酸(苯丙氨酸和酪氨酸) 的空腹浓度可预测糖尿病的发病和进展; 上述五种氨基酸的标准差增加 1 与未来糖尿病发展风险增加 57% - 102% 相关。最近, 各种研究对不同种族的 BCAA 和胰岛素抵抗以及糖尿病风险进行了调查, 可以认为 BCAA 水平及其与胰岛素抵抗的关系是种族依赖性的。在胰岛素抵抗动脉粥样硬化研究中, 一个由高加索人、AA 和西班牙裔组成的多种族队列, 采用 MS 方法测量了 685 名非糖尿病个体的血浆 BCAA 水平, 发现与晚期糖尿病风险的正相关关系在白种人或高加索和西班牙裔联合组, 但在 5 年随访期间未出现在 AA 中(27)。在 Tillin T 等人的另一项前瞻性研究(28) 中, 比较了来自 SABER 研究的南亚和欧洲男性参与者的 9 种血清氨基酸浓度、代谢和肥胖特征之间的横断面关联, 以及与 19 多年的跟踪。结果, 南亚人的血清异亮氨酸浓度较高, 但与肥胖测量的相关性较弱, 纵向分析表明, 与欧洲人(14%) 相比, 南亚人(35%) 受试者患糖尿病的风险更高。尽管亚洲人的 BMI 通常较低, 但研究表明, 与西方人相比, 代谢紊乱的氨基酸谱发生了类似的变化(25),

或者对 BCAA 水平升高和胰岛素抵抗的敏感性更高(29)。BCAA 与胰岛素抵抗之间的机制仍不清楚, 尽管先前的研究表明, 外源性 BCAAs 摄入仅占胰岛素抵抗发作的一小部分, 并且脂肪组织中 BCAAs 分解代谢的遗传变异是重要影响。正在进行的基础科学研究有望揭示 BCAAs 和全身代谢紊乱背后的复杂机制。

#### 4) 生活方式因素的代谢分析

代谢组学对环境因素有反应, 例如身体活动和饮酒习惯。在鹤冈代谢组学队列研究(TMCS) 的 1, 000 多名日本男性参与者中研究了日常体力活动水平与通过毛细管电泳-质谱(CE-MS) 分析的血浆代谢物之间的横截面关系。在调整混杂因素后, 较高水平的体力活动和较短的坐姿与较低浓度的 BCAA 和其他氨基酸显着相关。同一项队列研究通过 CE-MS 方法分析了每日乙醇摄入量与血浆代谢物浓度的关系, 并确定了每日乙醇摄入量的 19 种潜在生物标志物和 4 种(苏氨酸、肌基琥珀酸和谷氨酰胺以及谷氨酸/谷氨酰胺比率) 候选生物标志物酒精引起的肝损伤。使用 CE-MS 测量的 94 种代谢物的偏最小二乘判别分析(PLS-DA) 显示代谢表型与男性每日饮酒量不同水平之间存在相关关联( $R^2: 0.41$   $Q^2: 0.38$ )。女性也获得了类似的结果, 尽管由于大量饮酒者数量有限, 该模型的预测能力很差( $R^2: 0.18$   $Q^2: 0.14$ )。使用投影得分  $> 1.5$  中 PLS-DA 变量重要性的截止值, 14 种代谢物被认为是男性模型的最大贡献变量。热图显示了不饮酒者和重度饮酒者之间 14 种代谢物的不同分布模式; 与重度饮酒者相比, 某些代谢物在非饮酒者中的浓度较低, 而其余代谢物的浓度较高。当比较血浆浓度水平时, 所有 14 种代谢物都显示出根据饮酒类别水平的线性关联。上述和类似研究的结果可以深入了解各种生活方式对人类健康的保护性或致动脉粥样硬化作用的潜在机制。这些证据的积累将有助于更好地理解积极和消极生活方式背后的机制, 最终可能导致开发个性化的疾病预防方法。

### 三、心血管流行病学中代谢组学的方法学问题

流行病学研究中的代谢组学是一种很有前途的方法, 可以识别用于 CVD 和 AS 的预防、诊断和预后的生物标志物。然而, 直到最近, 代谢组学仍不适合大规模流行病学应用, 这主要是由于分析平台的样品通量能力有限以及对所创建的大量数据的处理要求。方法学技术的进步使代谢物分析能够应用于流行病学研究, 从而可以进行大规模的基于人群的投资。

#### 1. 代谢组学测量的各种分析平台

代谢组学通常涉及对数百到数千种代谢物的测量, 目前没有一个平台可以全面分析所有代谢物。为了优化各种代谢物的测量, 已经开发了许多分析平台, 以及定制的仪器和样品提取协议, 并用于代谢分析。有两个主要平台: NMR 光谱和 MS, 后者可以与 GC、LC 和 CE 结合使用。每个平台都有其优点和缺点。NMR 可以在不制备样品的情况下分析各种生物流体, 但与 MS 方法相比灵敏度相对较差, 潜在生物标志物的浓度可能低于检测限。使用 GC-MS 的主要优点是其可靠性和相对较低的仪器成本和维护。另一方面, 它需要对样品进行衍生化以产生挥发性化合物, 因此, 在 GC-MS 分析中可能无法观察到不衍生化的非挥发性化合物和大的或热不稳定的化合物。LC-MS 高度适用于分析各种半极性化合物, 包括许多感兴趣的次级代谢物, 使其成为分析亲水和疏水代谢物的最广泛应用的色谱-MS 策略。尽管带电或极性代谢物(例如糖磷酸盐、氨基酸)的分析被认为难以通过 LC-MS 进行分析, 但结合不同色谱柱和应用亲水相互作用色谱(HILIC)等策略来获得极性化合物的良好分离已经使其能够涵盖更广泛的代谢物。CE-MS 在代谢组学中的执行频率低于 GC- 和 LC-MS, 但对于极性代谢物(包括碳水化合物、氨基酸、有机酸和核苷酸)的绝对定量而言, 它是一种强大的工具, 其中一些被称为重要的潜在生物标志物用于心血管疾病。CE-MS 的另一个关键优势是它可以对多个样品的连续进样进行高通量代谢物筛选, 这在进行大规模研究时是一个优势。主要的欧洲队列, 如奥格斯堡地区(KORA)和 TwinsUK 登记处的合作健康研究, 以及包括 FHS 后代队列和 ARIC 研究在内的美国队列, 主要通过 LC-MS 和 GC-MS 进行代谢分析。芬兰队列、爱沙尼亚生物库、COMBIBIO 和 INTERMAP 研究等人群研究已将 NMR 应用于其代谢组学分析。作为亚洲为数不多的应用代谢组学的大规模人群队列研究之一, TMCS 已将 CE-MS 用于极性代谢物, 将 LC-MS 用于脂质代谢物。尽管由于仪器限制, 大多数实验室使用单一的分析方法, 但可能认为并行应用几种技术来研究全局代谢组是可取的。

## 2. 大规模流行病学研究中代谢物测量的可靠性

代谢物不仅对 AS 等病理改变敏感, 而且对不适当的样品处理也很敏感。准确的质量控制和质量保证对于获得可靠的结果至关重要, 尤其是在长期测量数千个样本的大规模流行病学研究中。

限制代谢组学测量误差和偏差的一个方面可以在分析前阶段发现, 例如样品收集、处理、运输和储存。在

大规模流行病学中进行的多中心研究中, 通常很难确保每个机构都严格遵循标准的样本制备协议。测试采血管, 避免溶血, 将全血立即放入冰水中, 使用 EDTA 血浆, 最好使用非再冷冻的生物样本库样本是报告的分析前阶段的一些建议。Hirayama 等人通过 CE-MS 检查了取样程序和储存条件对血浆和血清中代谢组学特征稳定性的影响。他们指出, 血浆中的特征比血清中的特征显示出更好的稳定性。此外, 从储存较短时间的血浆中获得最佳代谢组学特征, 并建议缩短凝血时间用于血清分析。

在分析阶段限制测量误差和偏差对于确保可靠数据也至关重要, 例如在流行病学研究中以高统计能力估计精确的疾病风险。在 Townsend MK 等人报告的一项研究中, 血浆样本由护士健康研究和卫生专业人员随访研究的几十名参与者捐赠, 这是一些关于女性 CVD 危险因素的最大前瞻性队列研究和男性, 研究通过 LC-MS 方法测量的代谢组学特征的重现性。大多数代谢物, 特别是脂质和脂质代谢物、氨基酸和胆汁酸, 都具有可接受的实验室变异性, 并且在处理延迟和 1 至 2 年内可在个体内重现。然而, 他们的结果也表明, 当血液样本在延迟 24 小时或更长处理后, 在流行病学研究中通过 LC-MS 评估某些代谢物存在困难。Harada 等人使用来自 TMCS 亚洲人群的数据在更大范围内检查了 CE-MS 测量的可重复性和有效性。分析了来自 8,000 多名队列参与者的每种阳离子和阴离子代谢物的 800 多个质量控制样本和血浆样本, 数据采集时间为 52 个月。作者得出结论, CE-MS 测量的代谢物的重现性与其他大规模流行病学研究中使用其他平台相当。然而, 由于通过 CE-MS 应用代谢组学的大规模研究仍然有限, 作者已经描述了外部验证的必要性。

## 3. 克服代谢组学的挑战

为了促进人类代谢组学的大规模合作研究并克服与上述类似的问题, 2014 年成立了一个名为代谢组学研究联盟(COMETS)的联盟。作为世界上最大的代谢组学联盟, 它包括截至 2018 年 4 月来自亚洲、欧洲、北美和南美的 47 项前瞻性研究, 共包括 136,000 多名参与者, 其血液代谢组学数据通过多个平台测量。研究人员之间就不同平台之间的关联进行交流可以提高每个测量数据的质量和一致性, 更不用说拥有大样本量的独特优势, 它可以进行高效的统计分析。比较评估是通过两个领先平台在拆分样品中测量 111 种代谢物水平进行的; 结果表明, 这些值显示出高度的相关性。然而, 由于平台之间的测量单位不同, 因此绝对浓度的一致性仍然存在挑

战。在大多数高通量代谢组学分析研究中获得的代谢物水平通常是半定量的，而不是完全定量的浓度。需要进一步的工作来建立具有临床意义的浓度阈值，即使是先前研究中发现的与 CVD 和 AS 的重要关联也是如此。

代谢组学研究中有两种不同的分析策略；有针对性的和无针对性的。靶向方法涉及使用内标化合物对一组确定的代谢物进行定量。由于该方法具有较高的特异性和准确性，因此被广泛用于分析和比较不同生理状态下的多种代谢物，其中最常见的是 MS 方法。非靶向方法是对样品中所有可测量分析物的综合分析，包括化学未知物。未知代谢物的鉴定非常有限，因此难以有效鉴定重要的生物标志物。尽管如此，非靶向策略提供的广泛覆盖范围具有识别新代谢途径和疾病生物标志物的强大潜力。由于 COMETS 目前仅限于基于已识别代谢物的分析，因此它的目标是在未来整合来自未识别代谢物的数据。

#### 结论

近年来，代谢组学作为揭示心血管健康和疾病的黑匣子机制的其他组学方法中的一种有价值的方法，受到了进一步的关注。在这篇综述中，我们重点介绍了代谢组学在全球范围内应用于心血管流行病学的最新发现，为导致 CVD 复杂性及其潜在过程的因素提供了新的见解，包括饮食摄入对代谢组、肠道微生物组和健康结果的影响，和各种 AS 危险因素代谢特征。本综述还讨论了当前需要克服的分析局限性和挑战，从不同平台的比较评估到确定代谢物绝对浓度以建立临床有意义的阈值，以及使用非靶向方法阐明未鉴定的代谢物。所取得的每一项进展都将使代谢组学研究大大有助于预防 AS 和 CVD。

#### 参考文献:

[1]Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, Atzori L. Metabolomics as a tool for cardiac research. *Nat Rev Cardiol*, 2011; 8: 630-643

[2]Lewis GD, Asnani A, Gerszten RE. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *J Am Coll Cardiol*, 2008; 52: 117-123

[3]Shah SH, Kraus WE, Newgard CB. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. *Circulation*, 2012; 126: 1110-1120

[4]McGarrah RW, Crown SB, Zhang GF, Shah SH, Newgard CB. Cardiovascular Metabolomics. *Circulation research*, 2018; 122:1238-1258

[5]Cheng S, Shah SH, Corwin EJ, Fiehn O, Fitzgerald RL, Gerszten RE, Illig T, Rhee EP, Srinivas PR, Wang TJ, Jain M, American Heart Association Council on Functional Genomics and Translational Biology; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; and Stroke Council. Potential Impact and Study Considerations of Metabolomics in Cardiovascular Health and Disease : A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Cardiovasc Genet*, 2017; 10

[6]Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68:2374 - 6.

[7]Horning EC, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem*. 1971;17:802 - 9.

[8]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 - 9.

[9]Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, et al. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol*. 2001;19:45 - 50.

[10]Allen J, Davey HM, Broadhurst D, et al. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol*. 2003;21:692 - 6.