

文章编号:1003-2754(2023)12-1108-06

doi:10.19845/j.cnki.zfysjzbzz.2023.0238

性别差异与颈动脉粥样硬化斑块:基于UPLC-MS技术的代谢组学研究

喻恬¹, 张秋娟¹, 鲁鹤臻², 王优³, 徐保锋³, 刘锐¹

摘要: **目的** 本研究探讨不同性别颈动脉粥样硬化斑块患者尿液代谢产物差异,探索颈动脉粥样硬化斑块在男女患者中的不同发病机制,尝试解释性别导致的生物学差异。**方法** 收集患有颈动脉粥样硬化斑块的28例男性、14例女性患者的尿液,通过(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)技术进行代谢组学分析。对获取到的代谢组学数据进行基于Metaboanalyst网站的数据分析,从而鉴定男性和女性患者之间的差异代谢物。为了进一步了解代谢物的功能,对代谢物进行生物学功能和通路富集分析。**结果** 颈动脉粥样硬化斑块不同性别的患者的尿液中,34个代谢物显著差异表达。这些代谢物的功能主要富集在组氨酸代谢、 β -丙氨酸代谢、精氨酸生物合成、泛酸和辅酶A生物合成、谷胱甘肽代谢通路上。**结论** 男性和女性组颈动脉粥样硬化斑块的尿液代谢谱存在显著差异。

关键词: 颈动脉粥样硬化斑块; 代谢组学; 男性; 女性

中图分类号:R543.4 **文献标识码:**A

Gender differences with carotid atherosclerotic plaque: a metabolomic study based on UPLC-MS. YU Tian, ZHANG Qiujuan, LU Hezhen, et al. (Department of Very Important People (VIP) Unit, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, China)

Abstract: **Objective** The purpose of this study is to explore the differences of urine metabolites in carotid atherosclerotic plaque patients of different sexes, explore the different pathogenesis of carotid atherosclerotic plaque in men and women, and try to explain the biological differences caused by gender. **Methods** Urine of 28 men and 14 women with carotid atherosclerotic plaque were collected and analyzed by ultraperformance liquid chromatography mass spectrometry (UPLC-MS). Perform metabolomics data analysis based on the Metaboanalysis website to identify differential metabolites between male and female patients. In order to further understand the function of metabolites, biological function and pathway enrichment analysis were conducted on metabolites. **Results** There were significant differences in the expression of 34 metabolites in the urine of patients with carotid atherosclerotic plaque of different sexes. The functions of these metabolites are mainly enriched in histidine metabolism, β -Alanine metabolism, arginine biosynthesis, pantothenate and coenzyme A biosynthesis, and glutathione metabolism pathways. **Conclusion** There are significant differences in urine metabolic profiles between male and female patients with carotid atherosclerotic plaque.

Key words: Carotid atherosclerotic plaque; Metabolomics; Male; Female

颈动脉粥样硬化斑块是血管疾病的常见表现方式,也是卒中的主要病因。研究表明颈动脉粥样硬化斑块及卒中均存在性别异质性^[1]。男性卒中的发病率高于女性,但男性因卒中而死亡的比率较低^[1-3]。女性的卒中症状相较于男性更偏向于不典型(精神状态改变、疼痛、全身无力或疲劳、头痛和其他不可分类的症状)^[4]。一项荟萃分析发现,女性卒中幸存者的功能与男性相比恢复更差^[5]。在斑块形态上,高风险斑块特征,比如薄或破裂的纤维帽、富含脂质或坏死的核心,在男性中比女性更常见^[6,7]。因此非常有必要进一步探究颈动脉粥样硬化疾病背后的性别之间的生物学差异。

目前已经有研究通过手术获取颈动脉粥样硬化斑块进行不同性别的蛋白质组学研究试图阐明这种生物学差异^[8-10]。但尚未有研究者利用尿液标本从

代谢组学的层面上解释背后的生物学问题。代谢组面对人体微环境的变化会做出快速反应,而代谢组学通过检测代谢物种类和数量的改变,可以灵敏地反映出人体的生理病理学变化。本研究利用代谢组学技术对获取到的患有颈动脉粥样硬化斑块的男性和女性患者的尿液进行检测。试图通过对比男、女性不同的代谢物差异,阐明临床上在动脉粥样硬化的发展和进展中观察到的差异。这将对卒中患者进一步的治疗以及结局带来精细化的调整。

收稿日期:2023-08-28;修订日期:2023-10-25

基金项目:吉林大学研究生创新基金(202209)

作者单位:(1. 吉林大学中日联谊医院VIP科,吉林 长春 130033;

2. 吉林大学中日联谊医院检验科,吉林 长春 130033;3. 吉林大学白

求恩第一医院卒中中心,吉林 长春 130021)

通信作者:刘锐, E-mail:liur@jlu.edu.cn

1 材料与方祛

1.1 研究对象 就诊于吉林大学白求恩第一医院接受颈动脉内膜剥脱术的患者,对年龄、高血压病史、糖尿病病史、吸烟史、饮酒史等进行匹配,得到28例男性患者及14例女性患者。本研究经吉林大学白求恩第一医院医学伦理委员会批准,批准号:22K047-002。

1.2 实验仪器 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪、超速离心机、超低温冰箱、涡振荡仪、可调量程移液器、真空离心浓缩仪(美国 Thermo Fisher Scientific);高效液相色谱仪(美国 Waters ACQUITY H-class);旋转真空干燥仪(AES1010);乙腈(美国 Fisher Scientific);质谱级水(美国 Waters);甲醇(美国 Merk);甲酸(美国 Merk);标准品(美国 Waters);1.5 ml 离心管(美国 BioRad);10 kD 滤过管(美国 PALL Life Sciences);高效液相色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm, C18)(美国 Waters)。

1.3 方祛

1.3.1 样本收集及代谢物提取 在手术室中患者空腹状态下麻醉后使用无菌导尿管采集尿液,取10 ml 清洁中段尿,保存-80 °C 冰箱中备用。取样时避免月经血或阴道分泌物、粪便等各种物质的污染,另外取一部分样品做尿常规检测,确认没有尿路感染和血液污染。

取200 μl 尿液上清,添加200 μl 乙腈涡旋30 s 后于-20 °C 冰箱放置30 min。离心后取上清置于旋转真空干燥仪中真空抽干,之后用乙腈水复溶。离心后再次取上清。将上清上到乙腈水润洗3次膜后的10 kD 超滤管,之后离心至膜上干净无液体,离心下的液体待用。

1.3.2 质量控制 在尿液样本上样之前,每份样本中取1 μl 作为质量控制(quality control, QC)样本。QC 样本可以评估整个质谱系统平台的稳定性和可重复性。

1.3.3 测序方祛 使用 Waters ACQUITY H-Class 型号超高效液相色谱系统对样品进行分离。使用 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪对洗脱的代谢物进行分析,数据模式为 DDA 模式。

1.3.4 数据预处理 原始质谱数据通过超高通量液相色谱-质谱联用技术(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)采集^[11]。通过 Progenesis Q1 软件进行数据的峰对齐、峰识别和峰校正等程序前处理。代谢物名称的鉴定根据一级二级质谱信息、公共数据库和商业标准品的比对完成。

两组数据缺失均大于50%、变异系数(coefficient

of variation, CV)大于0.5的代谢物会被删除。两组数据缺失小于50%的代谢物采取 K-临近算法(K-nearest neighbor, KNN)填充,单组数据缺失大于50%的代谢物采用最小值法进行填充。

1.3.5 差异代谢物筛选及富集分析 将代谢物质谱数据导入 Metaboanalyst 5.0(<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行单变量分析、多变量分析^[12]。单变量分析包括倍数变化法及 *t* 检验法。多变量分析包括主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal projections to Latent Structures-discriminant analysis, OPLS-DA)。PCA 分析通过几个主成分来体现代谢组学多维数据下的特征,因此通过 PCA 图我们可以观察到不同组间的差异。OPLS-DA 是一种具有监督模式识别的多元统计方法,能够有效剔除与研究无关的影响从而筛选差异代谢物^[13]。本研究进一步利用变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP)值、*P* 值、log₂(FC)值来筛选差异代谢物。筛选阈值为 VIP>1, *P* 值<0.05 以及 log₂(FC)绝对值>1。对筛选得到的差异代谢物 metaboanalyst 网站中进行生物学功能及通路富集分析(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)^[14]。

1.4 统计学方祛 计量资料如果符合正态分布以($\bar{x}\pm s$)表示,不符合正态分布则以中位数描述。计数资料以例数和百分率进行描述。正态分布的连续变量用 *t* 检验比较,否则应用 Wilcoxon 秩和检验。所有数据使用 R 软件(4.2.1 版本)及 MetaboAnalyst 网站进行统计学分析。

2 结果

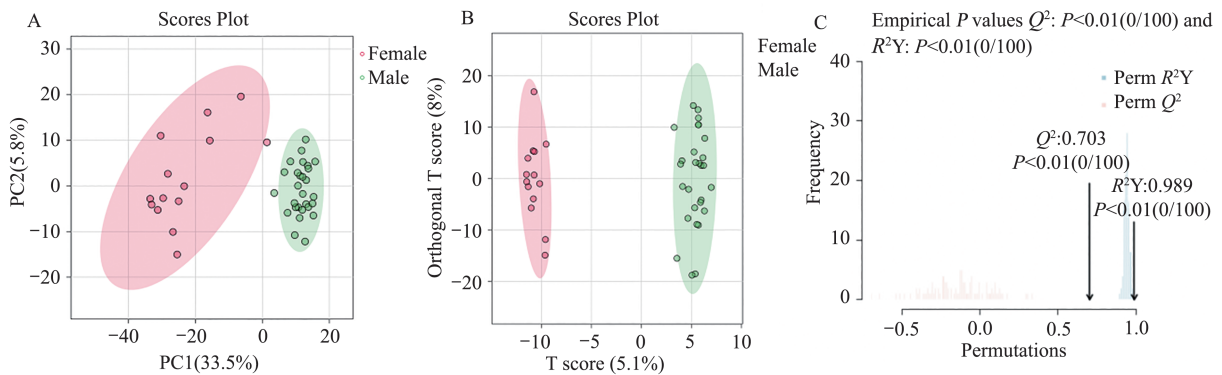
2.1 临床基线资料 本研究包括28例男性患者与14例女性颈动脉粥样硬化斑块患者。两组的基本临床基线资料(见表1)。可以看到男性组和女性组的临床基线水平基本一致。

2.2 尿液差异代谢物鉴定和筛选 在代谢物质谱数据中去除 CV 值>0.5 以及缺失值超过50%的代谢物后,在男性组和女性组的颈动脉粥样硬化斑块患者中鉴定得到1154个代谢物。

2.2.1 PCA 及 OPLS-DA 分析 使用 PCA 模型及 OPLS-DA 模型绘制监督聚类分析,对男性组和女性组之间代谢物进行差异分析(见图1A, B)。PCA 和 OPLS-DA 结果中男性组和女性组分离明显,表明男性组和女性组的代谢物有明显变化。图1C 表明经过100次置换检验后, OPLS-DA 模型不存在过拟合。并且模型的预测能力($Q^2=0.703$)对数据的解释率($R^2=0.989$)都较好。

表 1 男性组和女性组的临床资料

分类	男性组	女性组	P 值
<i>n</i>	28	14	
年龄($\bar{x}\pm s$)	63.643±6.934 7	66.143±8.017 8	0.302
体重指数($\bar{x}\pm s$)	24.304±2.676 6	23.241±2.677 1	0.232
吸烟, <i>n</i> (%)			0.824
是	11(26.2%)	6(14.3%)	
否	17(40.5%)	8(19%)	
饮酒, <i>n</i> (%)			1.000
是	5(11.9%)	2(4.8%)	
否	23(54.8%)	12(28.6%)	
高血压, <i>n</i> (%)			0.495
否	9(21.4%)	6(14.3%)	
是	19(45.2%)	8(19%)	
高血脂, <i>n</i> (%)			1.000
是	3(7.5%)	1(2.5%)	
否	24(60%)	12(30%)	
糖尿病, <i>n</i> (%)			0.890
否	22(52.4%)	12(28.6%)	
是	6(14.3%)	2(4.8%)	
冠心病, <i>n</i> (%)			1.000
否	27(64.3%)	13(31%)	
是	1(2.4%)	1(2.4%)	
抗高血压药, <i>n</i> (%)			1.000
否	18(43.9%)	8(19.5%)	
是	10(24.4%)	5(12.2%)	
降脂药, <i>n</i> (%)			0.072
否	20(47.6%)	6(14.3%)	
是	8(19%)	8(19%)	
斑块分型, <i>n</i> (%)			0.261
稳定斑块	9(21.4%)	7(16.7%)	
不稳定斑块	19(45.2%)	7(16.7%)	



A: 男性组和女性组 PCA 模型; B: 男性组和女性组 OPLS-DA 模型; C: OPLS-DA 模型评价。

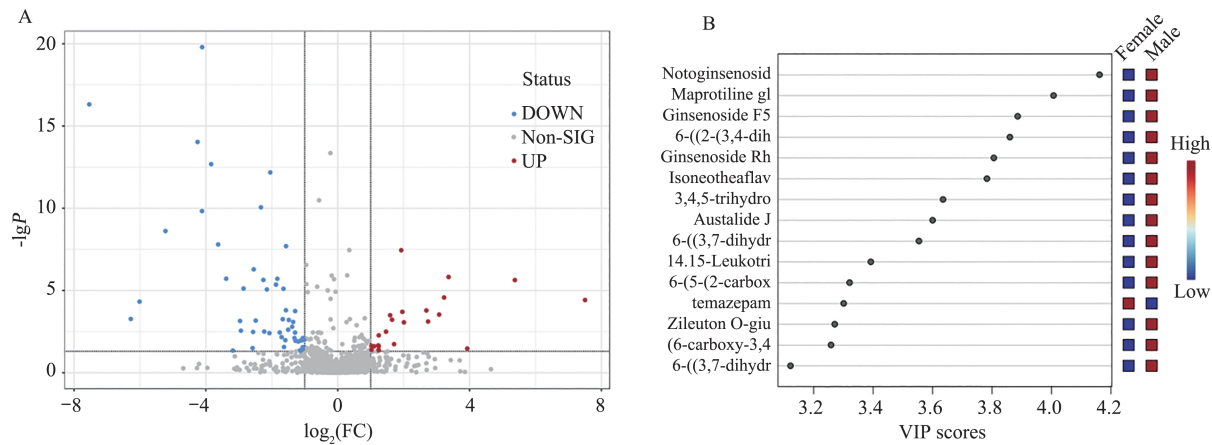
图 1 男性组和女性组样本尿液代谢组学分析

2.2.2 差异代谢物筛选 选取同时满足VIP>1及P<0.05及log₂(FC)绝对值>1的代谢物,最终在男性组和女性组中鉴定出34个代谢物(见表2),其中

9个代谢物在女性组中表达上调,25个代谢物在女性组中表达下调。代谢物在两组间的差异表达情况(见图2A)。VIP评分最高的15个代谢物(见图2B)。

表2 差异代谢物列表

差异代谢物	VIP值	P值	log ₂ (FC)
(3b, 6a, 12b, 20S, 23E)-Dammar-23-ene-3, 6, 12, 20, 25-pentol 6, 20-diglucoside	1. 872 003 722	0. 003 148 5	-2. 230 4
(9Z, 11E, 13E, 15Z)-4-Oxo-9, 11, 13, 15-octadecatetraenoic acid	2. 444 697 084	0. 000 178 73	-1. 293 8
(9Z, 11R, 12S, 13S, 15Z)-12, 13-Epoxy-11-hydroxy-9, 15-octadecadienoic acid	1. 449 221 558	0. 043 796	-1. 147 1
11-Oxo-androsterone glucuronide	1. 476 989 877	0. 023 324	1. 020 8
13-Hydroxy-5'-O-methylmelledonal	1. 547 929 807	0. 021 839	1. 230 6
1-Acetoxy-2-hydroxy-16-heptadecen-4-one	1. 978 245 689	0. 003 917 6	-2. 072 9
1-Methylhistamine	1. 980 742 455	0. 002 418 3	-1. 505 4
25-Hydroxyvitamin D2-25-glucuronide	2. 749 795 457	8. 69E ⁻⁶	-2. 151 8
3, 7-Dimethyl-5-octene-1, 7-diol 1-glucoside	2. 159 782 697	0. 000 711 15	-2. 964 1
6-Hydroxyhexanoic acid	1. 786 403 487	0. 010 037	-1. 021 6
9, 10-DiHODE	2. 316 577 342	0. 000 557 04	-1. 668 8
Acetylsalvipisone	2. 157 333 429	0. 000 772 17	2. 739 4
Arsenocholine	2. 889 821 578	1. 94E ⁻⁶	-1. 832 7
Austalide J	3. 599 997 506	8. 75E ⁻¹¹	-2. 330 6
Austalide L	1. 326 865 706	0. 045 076	-3. 181 8
D-4'-Phosphopantothenate	1. 505 571 035	0. 024 011	1. 244 4
Decanoyl-L-carnitine	2. 311 682 361	0. 000 619 73	-1. 483 9
Dehydroepiandrosterone	2. 880 745 925	2. 28E ⁻⁶	-2. 256 4
Fluticasone propionate	2. 043 812 015	0. 001 602 3	-1. 383 7
Ginsenoside F5	3. 886 101 752	9. 34E ⁻¹⁵	-4. 252 1
Isonoeotheaflavin 3-O-gallate	3. 782 671 039	6. 61E ⁻¹³	-2. 046 3
L-cis-3-Amino-2-pyrrolidinecarboxylic acid	2. 092 618 817	0. 000 866 09	2. 006 5
Methylisopelletierine	1. 945 735 676	0. 003 582 1	-1. 760 8
N-Acetylornithine	1. 624 916 734	0. 018 325	1. 709 2
Prilocaine	2. 694 673 615	7. 62E ⁻⁶	-2. 857 7
Prostaglandin F3a	2. 002 876 967	0. 003 609 1	-1. 296 6
Salsoline-1-carboxylate	2. 836 042 79	1. 51E ⁻⁰⁶	3. 363 3
Spermine	2. 404 649 014	0. 000 537 85	-6. 277 8
Spermine dialdehyde	1. 859 100 035	0. 007 762 9	-1. 313
Sterebin G	1. 755 348 227	0. 012 697	-1. 200 2
Sulfolithocholyglycine	1. 913 238 409	0. 006 853 4	-1. 703 6
temazepam	3. 300 928 332	3. 57E ⁻⁸	1. 926 3
Trigonelline	2. 281 770 524	0. 000 32	1. 589 7
Tyrosyl-Hydroxyproline	1. 524 412 986	0. 046 02	-1. 120 1



A: 男性组和女性组差异代谢物火山图; B: 男性组和女性组差异代谢物 VIP 图。

图2 男性组和女性组样本尿液差异代谢物筛选

2.3 生物学功能及通路富集分析 为进一步探索男性组和女性组在颈动脉粥样硬化斑块疾病中的生物学差异,将筛选出的差异代谢物进行KEGG代谢通路富集分析,结果显示差异代谢物富集的几个重要的代谢通路主要富集在组氨酸代谢、 β -丙氨酸代谢、精氨酸生物合成、泛酸和辅酶A生物合成、谷胱甘肽代谢等与脂代谢、蛋白质代谢和糖代谢有关的通路上(见图3)。

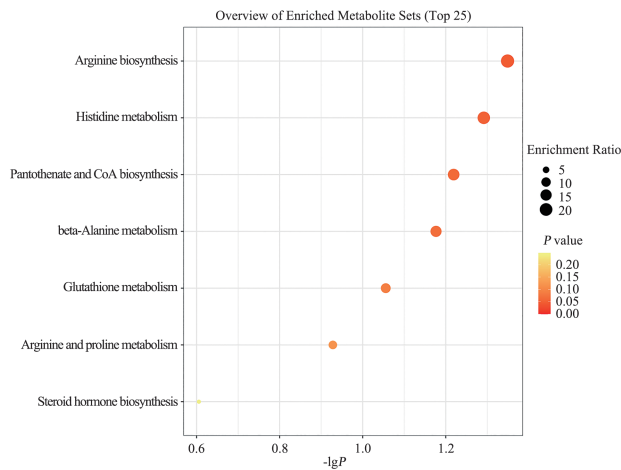


图3 男性组和女性组尿液差异代谢物富集通路分析

3 讨论

颈动脉粥样硬化斑块患病人群背后的性别差异受到研究人员关注。随着组学技术以及生物信息学分析的发展,研究者们不仅仅从临床表现、发病率、死亡率、治疗结局、危险因素、斑块形态等方面,甚至从基因组、蛋白质组、代谢组层面来研究男性和女性

人群的颈动脉粥样硬化斑块差异。本研究首次利用颈动脉粥样硬化斑块患者的尿液进行代谢组学分析来帮助理解该疾病中的性别差异。

颈动脉粥样硬化斑块与人体代谢关系密切,在该疾病的进展过程中往往会伴随糖代谢、脂代谢、蛋白质代谢等代谢途径的异常。本研究发现男性组和女性组的差异代谢物富集在组氨酸代谢、 β -丙氨酸代谢、精氨酸生物合成、泛酸和辅酶A生物合成、谷胱甘肽代谢通路。根据筛选出的差异代谢物及代谢通路进行研究,有利于探索颈动脉粥样硬化斑块疾病在男女组中的不同发病机制,以及解释性别导致的生物学差异。

1-甲基组氨酸是本研究中男性组和女性组的差异代谢物,且该代谢物在女性中表达下调。它参与组氨酸代谢,是大脑中抗氧化分子肌肽及其类似物的代谢副产物^[15]。人体口服补充肌肽或组氨酸可降低血糖、血脂水平以及改善炎症、氧化应激^[16,17]。有研究者利用代谢组学技术在缺血性卒中患者和健康患者的血液代谢物中将1-甲基组氨酸确定为差异代谢物^[18]。精胺是一种天然细胞代谢物,对心血管疾病具有保护作用^[19],它参与谷胱甘肽代谢、 β -丙氨酸代谢通路。它在本研究中是男性组表达上调的差异代谢物。一项对动脉粥样硬化小鼠的代谢组学研究表明精胺在血液中表达下调^[20]。N-乙酰鸟氨酸参与精氨酸生物合成通路,在本研究中是女性组上调表达的差异代谢物。N-乙酰鸟氨酸是从L-谷氨酸到L-精氨酸的酶促生物合成中的中间体,目前尚未有研究报道它与动脉粥样硬化的关系。D-4'-磷酸泛

酸参与泛酸和辅酶 A 生物合成通路,是女性组表达上调的差异代谢物。它是泛酸参与辅酶 A 生物合成的过程中的中间产物,辅酶 A 广泛参与生物体内物质代谢。

通过对本研究中富集到的通路以及涉及的差异代谢物进行系统检索,我们发现 1-甲基组氨酸和精胺这两种代谢物早已在动脉粥样硬化疾病中报道,而 N-乙酰鸟氨酸以及 D-4'-磷酸泛酸尚未有报道。本研究通过 UPLC-MS 技术表明男性和女性之间颈动脉粥样硬化的尿液代谢组存在显著差异,通过分析这些差异代谢物可能有助于阐明临床上在动脉粥样硬化的发展和进展中观察到的差异。

伦理学声明:本研究方案经由吉林大学白求恩第一医院伦理委员会审批(批号:22K047-002),患者均签署知情同意书。

利益冲突声明:本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明:喻恬负责设计论文框架、起草论文;鲁鹤臻负责实验操作、研究过程的实施;喻恬、张秋娟负责数据收集、统计学分析、绘制图表;徐保锋负责论文修改;刘锐负责拟定写作思路、指导撰写文章并最后定稿。

[参考文献]

- [1] Gasbarrino K, Di Iorio D, Daskalopoulou SS. Importance of sex and gender in ischaemic stroke and carotid atherosclerotic disease [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(6): 460-473.
- [2] Barker-Collo S, Bennett DA, Krishnamurthi RV, et al. Sex differences in stroke incidence, prevalence, mortality and disability-adjusted life years: results from the global burden of disease study 2013 [J]. *Neuroepidemiology*, 2015, 45(3): 203-214.
- [3] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2020, 141(9): e139-e596.
- [4] Jerath NU, Reddy C, Freeman WD, et al. Gender differences in presenting signs and symptoms of acute ischemic stroke: a population-based study [J]. *Gend Med*, 2011, 8(5): 312-319.
- [5] Carcel C, Wang X, Sandset EC, et al. Sex differences in treatment and outcome after stroke: Pooled analysis including 19,000 participants [J]. *Neurology*, 2019, 93(24): e2170-e2180.
- [6] Ota H, Reeves M, Zhu D, et al. Sex differences in patients with asymptomatic carotid atherosclerotic plaque: *in vivo* 3.0-T magnetic resonance study [J]. *Stroke*, 2010, 41: 1630-1635.
- [7] Ota H, Reeves MJ, Zhu DC, Majid A, Collar A, Yuan C, et al. Sex differences of high-risk carotid atherosclerotic plaque with less than 50% stenosis in asymptomatic patients: an *in vivo* 3T MRI study [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2013, 34(5): 1049-1055, S1.
- [8] Liang W, Ward LJ, Karlsson H, et al. Distinctive proteomic profiles among different regions of human carotid plaques in men and women [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26231.
- [9] Yuan XM, Ward LJ, Forssell C, et al. Carotid atheroma from men has significantly higher levels of inflammation and iron metabolism enabled by macrophages [J]. *Stroke*, 2018, 49(2): 419-425.
- [10] Ward LJ, Olausson P, Li W, et al. Proteomics and multivariate modelling reveal sex-specific alterations in distinct regions of human carotid atheroma [J]. *Biol Sex Differ*, 2018, 9(1): 54.
- [11] Zhao YY, Lin RC. UPLC-MS(E) application in disease biomarker discovery: the discoveries in proteomics to metabolomics [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 215: 7-16.
- [12] Chong J, Soufan O, Li C, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W486-W494.
- [13] Boccard J, Rutledge DN. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 769: 30-39.
- [14] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [15] Bellia F, Vecchio G, Cuzzocrea S, et al. Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases [J]. *Mol Aspects Med*, 2011, 32(4-6): 258-266.
- [16] Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health [J]. *Amino Acids*, 2020, 52(3): 329-360.
- [17] Holeček M. Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement [J]. *Nutrients*, 2020, 12(3): 848.
- [18] Wang X, Zhang L, Sun W, et al. Changes of metabolites in acute ischemic stroke and its subtypes [J]. *Front Neurosci*, 2021, 14: 580929.
- [19] Qiu Y, Li L, Guo X, et al. Exogenous spermine inhibits high glucose/oxidized LDL-induced oxidative stress and macrophage pyroptosis by activating the Nrf2 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(4): 310.
- [20] Zhang F, Jia Z, Gao P, et al. Metabonomics study of atherosclerosis rats by ultra fast liquid chromatography coupled with ion trap-time of flight mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2009, 79(3): 836-844.

引证本文:喻恬,张秋娟,鲁鹤臻,等.性别差异与颈动脉粥样硬化斑块:基于 UPLC-MS 技术的代谢组学研究 [J]. *中馈与神经疾病杂志*, 2023, 40(12): 1108-1113.