

基于血液代谢组学分析缺血性心脏病患者 疾病进程的代谢紊乱特征

杨柱林¹, 田林云², 吴昊^{2,3}, 李慧敏¹, 顾颖¹, 任达兵¹,
壮可², 赵燕², 张宏^{2,4}, 易伦朝^{1,3}

(1. 昆明理工大学食品科学与工程学院, 云南 昆明 650500;

2. 昆明理工大学附属医院, 云南省第一人民医院心血管内科, 云南 昆明 650032;

3. 昆明理工大学化学工程学院, 云南 昆明 650500; 4. 昆明理工大学生命科学学院, 云南 昆明 650500)

摘要:本研究以 47 例心绞痛患者、51 例心肌梗死患者和 80 例心力衰竭患者的血浆作为样本, 结合超高效液相色谱-高分辨质谱(UPLC-HRMS)技术和化学计量学方法, 分析缺血性心脏病患者疾病进程的代谢紊乱特征。实验共定性、定量鉴定 97 种内源性代谢物, 基于 *t* 检验、主成分分析、偏最小二乘-判别分析、变量重要性投影等方法, 分别筛选出 28 种和 32 种可区分心绞痛与心肌梗死患者, 心肌梗死与心力衰竭患者的差异性特征代谢物。代谢通路分析结果表明, 从心绞痛到心肌梗死, 以及从心肌梗死到心力衰竭的疾病进程中, 氨基酸代谢和三羧酸循环等能量代谢均发生了紊乱; 从心肌梗死到心力衰竭的疾病进程中, 以甘油磷脂代谢和脂肪酸生物合成为代表的脂质代谢显著紊乱; 通过分析受试者工作曲线(ROC), 糖胆酸、富马酸、棕榈酸、肌钙蛋白、高密度脂蛋白、谷丙转氨酶和谷草转氨酶等联合指标可提高心肌梗死诊断精度, ROC 曲线下面积(AUC)值达到1.000 0; 瓜氨酸、柠檬酸、硬脂酸、甘油磷酸胆碱和 NT-proBNP 联合指标可提高心力衰竭诊断精度, AUC 值达到0.957 0。本研究可为缺血性心脏病患者的精准诊断和疾病发展过程中的药物、营养干预提供重要的代谢靶标。

关键词:超高效液相色谱-高分辨质谱(UPLC-HRMS); 代谢组学; 心绞痛; 心肌梗死; 心力衰竭; 化学计量学
中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2024)02-0256-13

doi: 10.7538/zpxb.2023.0068

Blood Metabolomics Reveals the Metabolic Disorder in Disease Progression for Patients with Ischemic Heart Disease

YANG Zhu-lin¹, TIAN Lin-yun², WU Hao^{2,3}, LI Hui-min¹, GU Ying¹, REN Da-bing¹,
ZHUANG Ke², ZHAO Yan², ZHANG Hong^{2,4}, YI Lun-zhao^{1,3}

(1. Faculty of Food Science and Engineering,

Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2. Department of Cardiovascular Medicine, The First People's Hospital of Yunnan Province,
Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, China;

3. Faculty of Chemical Engineering, Kunming University
of Science and Technology, Kunming 650500, China;

4. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University
of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Ischemic heart disease is one of the main causes of death worldwide. In this study, the plasma samples of 47 patients with angina, 51 patients with myocardial infarction, and 80 patients with heart failure were collected. Ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) and chemometrics were used to analyze the plasma metabolic disorder in disease progression for patients with ischemic heart disease. Chromatographic separation was performed on an ACE3 C18 column (150 mm×3.0 mm×3 μm), and MS analysis was carried out by electrospray ionization (ESI) source at positive and negative modes combined with full scanning. In total, 97 endogenous metabolites were identified and quantitative analyzed. Principal component analysis and partial least square-discriminant analysis were applied in combination with variable importance projection (VIP) and *t*-test to screen differentially characteristic metabolites. Metabolite concentration was analyzed using SPSS and the metabolites with significant differences ($P < 0.05$) were found between different processes of diseases. Discriminant analysis using partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was conducted on various disease processes. Classification models were established for angina, myocardial infarction, and heart failure patients. The variables with $VIP > 1$ were selected using Variable Importance in Projection screening. Finally, disease-specific metabolites were identified using $VIP > 1$ and *t*-test $P < 0.05$. Accordingly, 28 and 32 characteristic metabolites were selected to distinguish between patients with angina and myocardial infarction, and with myocardial infarction and heart failure, respectively. The metabolic pathway analysis revealed disorders in both amino acid metabolism and the tricarboxylic acid cycle during the progression from angina to myocardial infarction, and from myocardial infarction to heart failure. In the progression from myocardial infarction to heart failure, there is a significant disturbance in lipid metabolism, including glycerophospholipid metabolism and fatty acid biosynthesis. Based on the results of 1 receiver operating character (ROC) analysis, several indicators including glycocholic acid, fumaric acid, palmitic acid, troponin, high-density lipoprotein, alanine aminotransferase, and aspartate aminotransferase, were found to have diagnostic significance for distinguishing between angina and myocardial infarction, with respective area under curve (AUC) values of 0.737 6, 0.831 9, 0.827 7, 0.938 7, 0.646 0, 0.704 5 and 0.758 9. When these indicators were combined, the AUC was increased to 1.000 0. Similarly, citrulline, citric acid, stearic acid, glycerophospholine, and NT-proBNP were found to have diagnostic significance for distinguishing between myocardial infarction and heart failure, with respective AUC values of 0.619 4, 0.748 7, 0.878 4, 0.636 0 and 0.812 1. When these indicators were combined, the AUC was increased to 0.957 0. At present, there have been some advances in understanding the metabolic characteristics of patients with angina or heart failure based on metabolomics, but there is limited research on the metabolic characteristics of patients with ischemic heart disease. The findings of this study can provide important metabolic targets for precise diagnosis of ischemic heart disease and drug and nutritional interven-

tions during disease development.

Key words: ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS); metabolomics; angina; myocardial infarction; heart failure; chemometrics

缺血性心脏病是目前临床医学中常见且较严重的心血管系统疾病,是以心脏冠状动脉缺血和继发心肌损害为特征的慢性疾病^[1]。缺血性心脏病因发病率、死亡率逐年升高,已成为全球死亡和疾病负担的主要原因之一,是重要的公共卫生问题^[2-3]。我国每年约 105 万人死于缺血性心脏病,占心血管疾病死亡人数的 30% 以上^[4]。因此,揭示缺血性心脏病患者从心绞痛到心肌梗死直至心力衰竭的疾病进程中的代谢特征变化,对研究该疾病的治疗与干预具有重要意义。

代谢组学是通过高通量检测生物体液及其组织中所有小分子代谢物,分析代谢产物种类和数量的动态变化及规律,研究其与生理或病理改变之间的关系^[5-6]。代谢紊乱是心脑血管疾病的重要生理病理特征^[7]。研究发现,心绞痛的发生与多个代谢途径的改变有关,包括精氨酸和脯氨酸代谢、甘油磷脂代谢和嘌呤代谢^[8]等。心力衰竭时,心脏的能量代谢发生改变,脂肪酸的消耗减少,酮和乳酸的消耗增加^[9];嘌呤、酰基肉碱、支链氨基酸、鞘脂、心磷脂等代谢物的变化与心力衰竭的发生密切相关^[10-11]。目前,基于代谢组学的心绞痛或心力衰竭患者的代谢特征研究已取得了一些进展^[12-13],但对缺血性心脏病患者疾病进程的代谢特征研究鲜有报道。

超高效液相色谱-高分辨质谱(ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, UPLC-HRMS)具有灵敏度高、分辨率高、分析速度快等特点,可为代谢物的定性、定量分析提供丰富的信息,已成为代谢组学研究中最常用的分析技术^[14-16]。

本研究拟采用 UPLC-HRMS 技术对心绞痛、心肌梗死和心力衰竭患者的血浆代谢物进行高通量定性、定量分析,并结合主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)等化学计量学方法筛选缺血性心脏病不同进程患者的特征差异性代

谢物,探讨各病程的血浆代谢紊乱特征。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UltiMate 3000 超高效液相色谱仪、Q-Exactive Focus 轨道离子阱高分辨质谱仪:美国赛默飞世尔科技公司产品;高速离心机:上海卢湘仪离心机仪器有限公司产品;电子分析天平:上海梅特勒-托利多仪器有限公司产品;超纯水机:德国 Merck 公司产品。

1.2 样品与试剂

甲醇、乙腈、甲酸:均为质谱纯,德国 Merck 公司产品。27 种内源性代谢物标准品,其详细信息列于附表 1(请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载,以下同)。

1.3 实验方法

1.3.1 血浆样本采集 收集 47 例心绞痛、51 例心肌梗死和 80 例心力衰竭患者的血浆样本,详细信息列于表 1。其中,心绞痛患者的入选标准为:出现胸痛症状、无明显心电图变化、血清心肌损伤标记物正常;心肌梗死患者的入选标准为:出现无明显诱因胸痛、心电图提示 ST 段抬高或压低、心肌酶(肌红蛋白、肌钙蛋白、肌酸激酶、肌酸激酶同工酶等)血清心肌损伤标记物发生变化;心力衰竭患者的入选标准为:出现心衰的症状和体征、冠状动脉造影显示冠状动脉严重狭窄、心肌梗死既往史、心功能分级 II-IV 级^[17]、血浆 N-末端前体 B 型钠尿肽水平 >135 ng/L^[18]。本研究排除了既往存在风湿性心脏病、重度肺动脉高压及先天性心脏病、狭窄性心包炎、严重肾功能不全、合并恶性肿瘤、存在严重的创伤性疾病及严重血液系统疾病的患者,以及处于妊娠期及哺乳期的妇女。清晨空腹 8 h 的志愿者肘静脉采血,经肝素锂抗凝,4 °C 静置 3 h 后,以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,置于 -80 °C 冷冻保存。本研究通过了云南省第一人民医院伦理审查委员会的批准,获得了所有参与者的知情同意。

表1 血浆样本患者信息
Table 1 Information of plasma samples

参数 Parameter	心绞痛患者 Angina	心肌梗死患者 Myocardial infarction (MI)	心力衰竭患者 Heart failure (HF)
年龄/岁	64.64±12.19	61.84±11.15	69.84±13.15 ^b
BMI	24.68±2.92	24.22±2.39	22.85±2.91 ^b
性别(男/女)*	25/22	37/14	53/27
高血压(是/否)*	38/9	31/20	53/27
糖尿病(是/否)*	12/35	11/40	31/49
血红蛋白数/(g/L)	141.74±20.27	143.08±18.22	131.56±19.99 ^b
谷丙转氨酶(ALT)/(U/L)	22.16±12.32	28.32±18.02	95.01±559.21
谷草转氨酶(AST)/(U/L)	20.66±10.04	64.65±79.78 ^a	127.57±828.45
AST:ALT	1.00(0.47,1.79)	1.66(0.41,14.52)	1.31(0.52,7.95)
肌酐/(mg/dL)	74.89±23.75	84.55±70.71	105.27±59.31
尿酸/(μmol/L)	362.26±102.47	364.43±85.63	432.89±123.79 ^b
肾小球滤过率/(mL/(min·1.73 ²))	86.68±22.76	89.92±23.52	68.34±27.91 ^b
空腹血糖/(mmol/L)	5.87±2.24	6.55±2.37	6.24±2.64
总胆固醇(TC)/(mmol/L)	4.11±1.16	4.55±1.00 ^a	3.79±1.11 ^b
甘油三酯(TG)/(mmol/L)	1.74±1.73	1.94±1.69	1.47±1.31
高密度脂蛋白(HDL-C)/(mmol/L)	1.10±0.27	0.97±0.21 ^a	0.96±0.27
低密度脂蛋白(LDL-C)/(mmol/L)	2.21±0.83	2.80±0.89 ^a	2.14±0.88 ^b
N-末端前体B型钠尿肽/(ng/L)	511.24±1463.54	1164.52±1830.95 ^a	4983.37±5205.66 ^b
肌钙蛋白T/(ng/L)	5.10±14.51	762.34±1182.69 ^a	20.91±50.34 ^b
游离三碘甲状腺原氨酸/(pmol/L)	16.12±2.14	14.92±4.37	9.31±6.36 ^b
游离甲状腺素/(pmol/L)	4.27±0.67	3.80±1.01 ^a	11.77±10.11 ^b
促甲状腺激素(mIU/L)	2.71±1.85	2.84±3.33	3.15±2.53
三碘甲状腺原氨酸/(μg/L)	94.43±16.89	87.66±23.04	38.35±39.92 ^b
四碘甲状腺原氨酸/(μg/dL)	1.61±0.30	1.53±0.38	49.64±43.86 ^b
室间隔厚度/cm	1.00±0.14	1.03±0.16	10.18±2.30 ^b
左心房内径/cm	3.48±0.45	3.53±0.46	41.26±6.97 ^b
左室舒张末期内径/cm	4.72±0.52	4.88±0.62	54.77±8.82 ^b
肺动脉收缩压/mmHg	30.02±10.45	28.32±8.23	40.09±16.26 ^b
射血分数/%	61.85±9.65	57.32±8.54 ^a	43.29±15.27 ^b

注:a. 心梗组与心绞痛组的比较 P 值 <0.05 ;b. 心衰组与心梗组的比较 P 值 <0.05 ; * 表示人数分布

1.3.2 血浆样本前处理 将血浆样本缓慢解冻后涡旋 1 min,准确吸取 20 μL,加入 20 μL 1 g/L *L*-苯丙氨酸-3,3- d_2 和 *L*-亮氨酸-5,5,5- d_3 内标溶液,500 μL 冷甲醇,涡旋 1 min,室温静置 10 min,在 4 °C 下以 13 000 r/min 离心 10 min;收集上清液,室温下用氮气吹干,250 μL 冷甲醇复溶,涡旋 1 min,过 0.22 μm 滤膜,转移至进样瓶,待测。

同时制备质量控制(QC)样本,用于评价实验过程中仪器的精密度和样本的稳定性。各取

2 μL 所有样本,混匀,加入 1 000 μL 冷甲醇,其余操作步骤与上述样本相同。进样过程中,每隔 6 个血浆样本插入 1 个 QC 样本,共采集 30 个 QC 样本数据。

1.3.3 色谱条件 Thermo Scientific Hypersil ACE3 C18 色谱柱(150 mm×3.0 mm×3 μm);流动相:A 为乙腈,B 为 0.1% 甲酸水溶液;梯度洗脱程序:2~9 min(5%~38% A),9~14 min(38%~68% A),14~22 min(68%~100% A),22~30 min(100%~5% A);每次进样的分析

时间 30 min, 流速 0.20 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 1 μ L。

1.3.4 质谱条件 电喷雾电离源(ESI); 喷雾电压 4 000 V(ESI⁺)、3 500 V(ESI⁻); 雾化温度 300 °C; 鞘气压强 4.5 MPa(ESI⁺)、4.0 MPa(ESI⁻); 辅助气压强 1.5 MPa(ESI⁺)、1.0 MPa(ESI⁻); 传输毛细管温度 350 °C(ESI⁺)、320 °C(ESI⁻); 全扫描(full MS)模式分辨率 35 000; 源内诱导裂解电压 0 eV; 数据依赖二级扫描(ddMS²)分辨率 17 500; 高能碰撞诱导电压分别为 15、25、35 eV。

1.3.5 数据处理 1) 代谢物的定性定量分析。首先, 将测定出的代谢物与 27 种代谢物标准品的保留时间以及一级、二级质谱信息进行对比; 结合 HMDB、Massbank 等数据库以及参考文献对其他无标准品的代谢物进行定性分析。根据定性结果, 采用 Xcalibur 软件提取各代谢物的峰面积, 并用内标法进行定量分析。最后, 使用 SPSS 软件对代谢物进行 *t* 检验分析, 筛选疾病不同进程中含量有显著性差异 ($P < 0.05$) 的代谢物。

2) 聚类模型、分类模型的建立与特征代谢物筛选。首先, 采用 MetaboAnalyst 软件中的 PCA 程序分析 QC 样本在 PCA 投影图中的分布情况, 评估仪器和样本的稳定性。同时, 分别对心绞痛患者与心肌梗死患者、心肌梗死患者与心力衰竭患者进行聚类分析。在此基础上进行疾病不同进程的 PLS-DA 判别分析, 分别建立心绞痛患者与心肌梗死患者、心肌梗死患者与心力衰竭患者的分类模型, 筛选变量重要性投影值 $VIP > 1$ 的变量。最后, 结合 $VIP > 1$ 与 *t* 检验 $P < 0.05$, 筛选疾病不同进程的特征代谢物。

3) 代谢通路分析。为进一步研究患者血浆中内源性代谢物之间的关系, 将筛选出的疾病不同进程特征代谢物的人类代谢组学数据库中的代谢物编号(HMDB-ID)导入 MetaboAnalyst 软件进行代谢通路分析。在代谢通路图中, 横坐标表示代谢通路的影响值(pathway impact), 纵坐标表示富集分析(enrichment analysis)的 *P* 值。基于 $P < 0.1$ 和影响值 > 0.1 筛选差异代谢通路, 并结合筛选出的含量具有显著变化的特征代谢物进行代谢通路分析。

4) 受试者工作曲线(ROC)分析。使用

SPSS 软件, 采用 Logistic 回归分析及 ROC 评估临床生化指标和所筛选代谢指标对缺血性心脏病患者的精准诊断能力。首先, 以单个指标为变量进行 ROC 分析, 评估单个指标的诊断能力; 再联合临床生化指标和代谢指标, 以 Logistic 回归分析所构建的联合变量进行多变量 ROC 分析。 $P < 0.05$ 表明具有统计学意义。

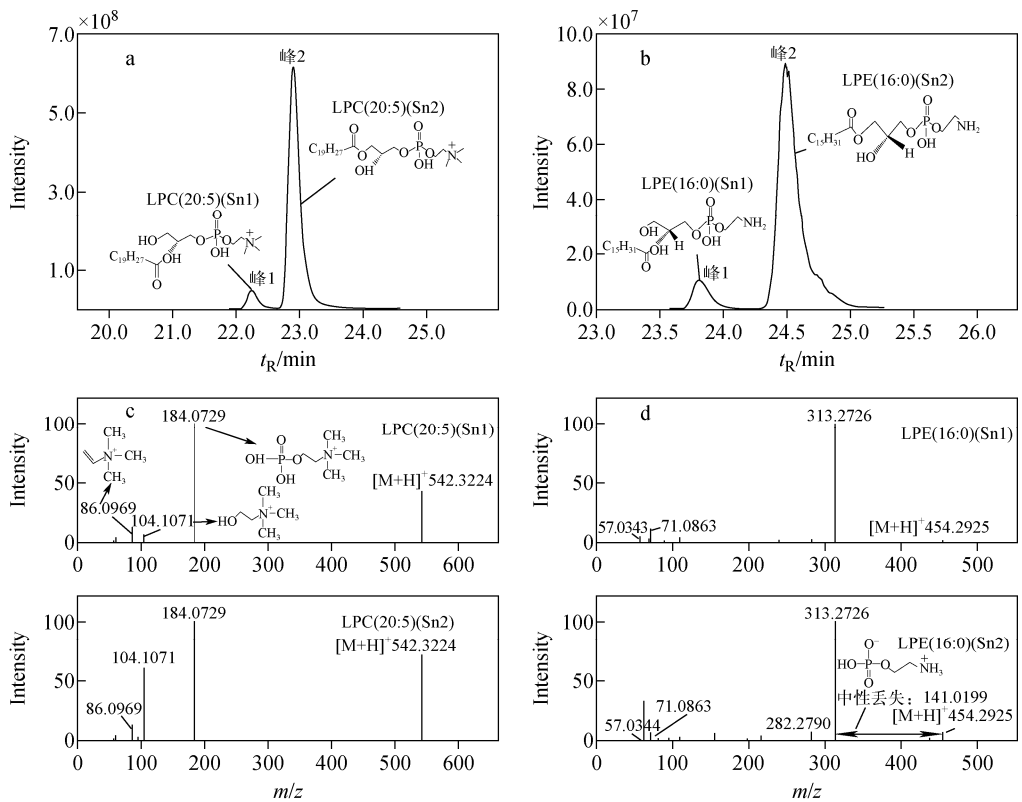
2 结果与讨论

2.1 代谢物定性定量分析

本研究共定性鉴定 97 个代谢物, 其中, 与标准品比对定性 27 个代谢物, 与 HMDB、Massbank 数据库以及参考文献比对定性 70 个代谢物。提取代谢物峰面积, 以 *L*-苯丙氨酸-3,3-d₂和 *L*-亮氨酸-5,5,5-d₃ 为内标物进行定量分析。以溶血磷脂酰胆碱(LPC)LPC(20:5)和溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)LPE(16:0)的同分异构体定性分析为例, 说明代谢物定性过程, 结果示于图 1。由图 1a 和 1b 可见, LPC(20:5)和 LPE(16:0)的提取离子流图中均有 2 个色谱峰。由图 1c 和 1d 可见, LPC(20:5)的 2 个色谱峰的二级质谱均含有溶血磷脂酰胆碱类的特征碎片离子 m/z 184.073 3、104.107 0 和 86.096 4; LPE(16:0)的 2 个色谱峰的二级质谱均含有溶血磷脂酰乙醇胺类的特征中性丢失 m/z 141.019 9。因此, 推断图 1c、1d 中的 2 个峰分别为 LPC(20:5)、LPE(16:0)的同分异构体。有文献^[19]报道, 在反相色谱洗脱脂类代谢物时, 碳链位于 Sn1 的 LPCs 和 LPEs 的代谢物比碳链位于 Sn2 的 LPCs 和 LPEs 更早洗脱。此外, 碳链位于 Sn2 的代谢物响应强度高于碳链位于 Sn1 的代谢物^[20]。因此, 将图 1a 中的峰 1 和峰 2 分别定性为 LPC(20:5)(Sn1)和 LPC(20:5)(Sn2), 图 1b 中的峰 1 和峰 2 分别定性为 LPE(16:0)(Sn1)和 LPE(16:0)(Sn2)。

2.2 分类模型建立及特征代谢物筛选

使用 SPSS 软件对心绞痛、心肌梗死和心力衰竭患者中 97 个代谢物的含量差异进行 *t* 检验分析, 从心绞痛到心肌梗死的疾病进程中共筛选出 37 个含量有显著性差异的代谢物, 从心肌梗死到心力衰竭的疾病进程中共筛选出 41 个含量有显著性差异的代谢物, 结果列于表 2。



注:a. LPC(20:5)的提取离子流图;b. LPE(16:0)的提取离子流图;

c. LPC(20:5)峰1和峰2的二级质谱图;d. LPE(16:0)峰1和峰2的二级质谱图

图1 代谢物 LPC(20:5)和 LPE(16:0)的定性分析

Fig. 1 Qualitative analysis of LPC(20:5) and LPE(16:0)

表2 不同疾病进程 t 检验具有显著性差异的代谢物 (P<0.05)

Table 2 Metabolites with significant differences in t-tests for angina, MI and HF (P<0.05)

序号 No.	代谢物 Metabolite	浓度 Concentration/(mg/L)			t 检验 t-test		HMDB 编号 Number of HMDB
		心绞痛 Angina (n=40)	心肌梗死 MI (n=51)	心力衰竭 HF (n=80)	Angina vs MI	MI vs HF	
1	胱氨酸 ^a	3.47±0.81	4.26±1.93	4.70±2.33	1	0	0000192
2	L-谷氨酰胺 ^a	20.26±3.78	24.19±8.11	24.00±7.74	1	0	0000641
3	L-天冬氨酸 ^b	5.50±2.64	3.34±2.71	7.65±5.30	0	1	0000191
4	瓜氨酸 ^b	0.72±0.35	0.72±0.37	0.93±0.53	0	1	0000904
5	L-苯丙氨酸 ^a	17.50±2.77	19.87±7.57	18.72±6.28	1	0	0000159
6	番茄枝内酰胺 ^b	1.91±1.07	2.25±1.66	3.05±1.85	0	1	0029874
7	脯氨酸甜菜碱 ^a	1.46±1.15	0.81±0.54	1.39±1.21	1	0	0004827
8	苯甲酸	3.24±0.59	2.67±1.30	2.78±1.40	1	0	0001870
9	L-亮氨酸 ^b	14.95±3.12	16.19±7.02	13.38±5.69	0	1	0000687
10	油酸 ^b	88.79±46.81	101.02±25.65	181.98±67.46	0	1	0000207
11	邻苯二甲酸 ^a	14.47±3.17	1.49±1.08	1.73±1.46	1	0	0002107
12	3,4,5-三甲氧基肉桂酸 ^b	0.26±0.24	0.23±0.25	0.12±0.14	0	1	0040891
13	姜酚	30.65±10.75	37.41±9.45	47.34±36.07	1	0	0005783

续表 2

序号 No.	代谢物 Metabolite	浓度 Concentration/(mg/L)			<i>t</i> 检验 <i>t</i> -test		HMDB 编号 Number of HMDB
		心绞痛 Angina (<i>n</i> =40)	心肌梗死 MI (<i>n</i> =51)	心力衰竭 HF (<i>n</i> =80)	Angina <i>vs</i> MI	MI <i>vs</i> HF	
14	糖胆酸 ^a	3.31±2.75	2.40±2.11	2.16±1.95	1	0	0000138
15	尼泊金丙酯	1.55±1.84	1.34±1.31	0.84±0.93	0	1	0032574
16	溶血磷脂酰胆碱(20:5)(Sn1) ^b	0.07±0.07	0.04±0.03	0.02±0.02	0	1	0010397
17	溶血磷脂酰乙醇胺(22:6)(Sn1) ^b	0.45±0.16	0.51±0.30	0.33±0.12	0	1	0011526
18	犬尿酸 ^a	10.37±5.48	50.75±22.42	40.42±23.12	1	0	0000715
19	5-羟基吡啶 ^a	0.81±0.45	3.52±1.44	2.60±1.45	1	0	0059805
20	溶血磷脂酰乙醇胺(22:6)(Sn2) ^b	1.05±0.43	1.22±0.75	0.78±0.31	0	1	0011526
21	溶血磷脂酰乙醇胺(18:2)(Sn1) ^b	0.68±0.25	0.70±0.54	0.41±0.19	0	1	0011507
22	溶血磷脂酰乙醇胺(20:4)(Sn2) ^b	1.88±0.72	2.14±1.47	1.38±0.44	0	1	0011517
23	溶血磷脂酰乙醇胺(18:2)(Sn2)	2.33±1.08	2.58±1.90	1.71±0.86	0	1	0011507
24	棕榈烯酸	2.62±3.03	4.31±2.29	5.76±3.19	1	0	0003229
25	2-氮己环酮 ^a	3.04±1.99	0.84±0.59	1.23±1.19	1	0	0011749
26	富马酸 ^a	0.32±0.30	1.14±0.88	1.21±0.79	1	0	0000134
27	花生四烯酸	8.43±4.54	7.23±2.03	9.22±3.26	0	1	0001043
28	甲基组氨酸 ^b	1.10±0.73	1.00±0.86	1.67±1.41	0	1	0000001
29	氧化三甲胺	0.36±0.31	0.46±0.38	0.32±0.26	0	1	0000925
30	羟脯氨酸 ^b	1.14±0.42	0.89±0.71	1.41±0.85	1	1	0000725
31	氨基丁酸 ^a	0.50±0.17	0.83±0.65	0.62±0.33	1	1	0000452
32	柠檬酸 ^{a,b}	8.30±4.87	3.45±1.89	16.79±14.65	1	1	0000094
33	棕榈酸 ^{a,b}	85.66±21.53	126.24±44.49	104.18±31.21	1	1	0000220
34	桂皮酸 ^{a,b}	1.81±2.20	4.78±4.22	1.81±2.20	1	1	0000567
35	吡哺半乳糖 ^b	11.67±11.06	10.74±6.12	5.78±4.39	1	1	0062170
36	对甲酚硫酸盐 ^{a,b}	150.75±142.78	135.85±104.81	196.52±181.88	1	1	0011635
37	香草酸 ^{a,b}	0.74±0.76	1.35±1.21	0.43±0.46	1	1	0000484
38	N6-乙酰-L-赖氨酸 ^{a,b}	1.58±0.70	2.25±0.96	1.84±0.92	1	1	0000206
39	N,2,3-三甲基-2-异丙基丁酰胺 ^{a,b}	2.59±1.35	8.76±4.33	4.24±2.27	1	1	0036195
40	紫罗兰酮 ^{a,b}	4.23±1.86	6.05±4.37	4.31±1.65	1	1	0036565
41	佛手柑内酯 ^{a,b}	0.19±0.10	0.27±0.12	0.13±0.06	1	1	0030637
42	1-磷酸鞘氨醇 ^{a,b}	0.07±0.04	0.55±0.23	0.23±0.08	1	1	0000277
43	溶血磷脂酰乙醇胺(20:4)(Sn1) ^{a,b}	1.10±0.35	1.32±0.71	0.89±0.32	1	1	0011517
44	溶血磷脂酰胆碱(20:5)(Sn2) ^a	0.21±0.24	0.05±0.03	0.06±0.05	1	1	0010397
45	α-亚麻酰乙醇酰胺 ^{a,b}	2.19±1.07	3.11±1.70	1.90±1.01	1	1	0013624
46	硬脂酸 ^b	143.48±60.13	135.26±29.12	104.21±20.27	0	1	0000827
47	肉豆蔻酸 ^b	5.12±2.22	14.82±2.24	7.40±2.05	1	1	0000806
48	溶血磷脂酰胆碱(20:4) ^{a,b}	0.48±0.54	1.14±0.74	3.08±1.81	1	1	0010395
49	L-天冬酰胺 ^a	2.87±0.85	2.07±1.60	4.18±4.77	1	1	0000168
50	甘磷酸胆碱 ^{a,b}	1.67±0.78	1.14±0.82	1.71±1.30	1	1	0000086
51	丙酰肉碱 ^b	0.55±0.35	0.24±0.24	0.46±0.33	1	1	0000824
52	2-甲基-3-羟基丁酸	21.09±13.62	12.96±12.19	24.21±27.26	1	1	0000354
53	溶血磷脂酰胆碱(16:0) ^a	13.41±7.84	3.74±2.62	6.21±3.96	1	1	0010382
54	溶血磷脂酰乙醇胺(16:0)(Sn1) ^b	0.14±0.12	0.06±0.03	0.13±0.08	1	1	0011503

注:a. PLS-DA 模型 *VIP*>1 结合 *t* 检验 *P*<0.05 筛选的心绞痛患者与心肌梗死患者特征差异代谢物;b. PLS-DA 模型 *VIP*>1 结合 *t* 检验 *P*<0.05 筛选的心肌梗死患者与心力衰竭患者特征差异代谢物;*t* 检验中 0 表示无显著性差异,1 表示具有显著性差异

心绞痛、心肌梗死、心力衰竭与 QC 的 PCA 得分图于附图 1a, QC 在 3 类样本之间的聚集性良好,表明仪器稳定^[21],但 3 类样本均未明显分开,示于附图 1b、1c。为区分疾病进程中的不同类样本,分别建立了心绞痛与心肌梗死患者(正确率 = 0.938, $R^2 = 0.815$, $Q^2 = 0.761$)、心肌梗死与心衰患者(正确率 = 0.961, $R^2 = 0.884$, $Q^2 = 0.809$)的 PLS-DA 模型。10-折交互检验和置换检验($n = 100$)均验证了模型的预测能力和有效性,示于图 2c、2f。利用 PLS-DA 分类模型筛选 $VIP > 1$ 的变量,示于图 2b、2e,并结合 t 检验分析筛选含量有显著性差异($P < 0.05$)的代谢物,最终在心绞痛到

心肌梗死的进程中筛选出 28 种特征代谢物,在心肌梗死到心力衰竭的进程中筛选出 32 种特征代谢物。上述代谢物的具体信息列于表 2。

2.3 代谢通路分析

代谢通路分析结果表明,在心绞痛到心肌梗死的进程中,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成代谢,苯丙氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,三羧酸循环代谢发生了显著改变,示于图 3a;在心肌梗死到心力衰竭的进程中,精氨酸的生物合成,甘油磷脂代谢,脂肪酸生物合成,三羧酸循环发生了显著改变,示于图 3b。

在心绞痛向心肌梗死的进程中,苯丙氨酸和谷氨酰胺含量显著升高。苯丙氨酸是一种必

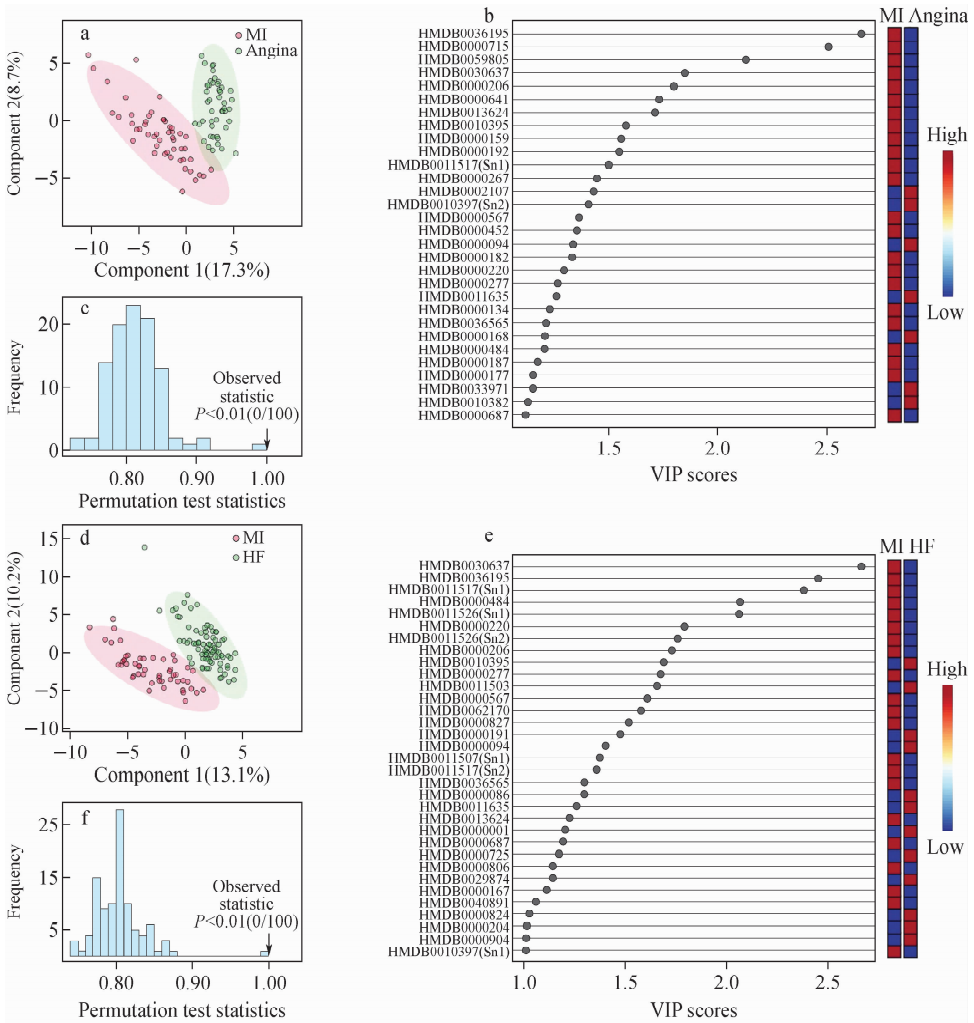


图 2 心绞痛与心肌梗死患者的 PLS-DA 投影图(a)、VIP 值(b)以及置换检验直方图(c), 心肌梗死与心力衰竭患者的 PLS-DA 投影图(d)、VIP 值(e)以及置换检验直方图(f)

Fig. 2 PLS-DA scores plot (a), VIP scores (b) and permutation test histogram (c) of angina and MI, PLS-DA scores plot (d), VIP scores (e) and permutation test histogram (f) of MI and HF

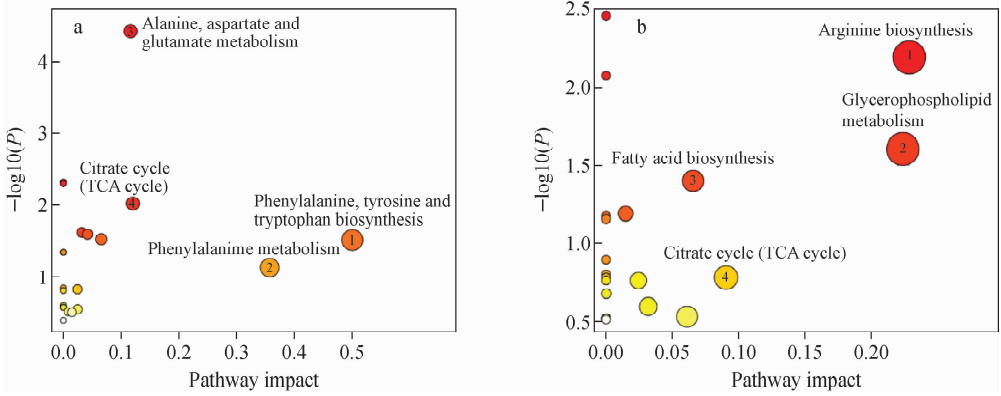


图3 心绞痛与心肌梗死(a)、心肌梗死与心力衰竭(b)组别血浆内源性代谢物的代谢通路分析结果

Fig. 3 Metabolic pathway analysis results of plasma endogenous metabolites in angina and MI (a), MI and HF (b) groups

需氨基酸,是酪氨酸的前体^[22]。Murr等^[23]研究表明,心肌梗死患者血液中苯丙氨酸和酪氨酸水平变化可能与免疫激活和炎症反应有关。心肌梗死引起的心肌组织坏死会导致肌钙蛋白I进入血液循环^[24]。谷氨酰胺可通过向心肌细胞提供细胞内能量供应来减少缺血引起的肌钙蛋白I的损失,谷氨酰胺还可以提高心肌三磷酸腺苷/二磷酸腺苷比值,降低心肌乳酸积累^[25],从而减少缺血期间的心肌损伤。此外,犬尿酸的含量显著升高,其是色氨酸分解代谢为犬尿酸途径中的代谢产物,犬尿酸通过激活心肌缺血损伤后的Sirt3-acSOD2/IL-1 β 途径来诱导巨噬细胞炎症和氧化应激,从而加快心肌梗死的进程^[26]。心肌梗死的发病机制与心肌细胞凋亡和纤维化、炎症细胞浸润等多种因素有关^[27-28],同时还会诱导坏死组织释放和水解蛋白质,因此,在心肌梗死发生前、后观察到氨基酸代谢差异^[29]。

在心肌梗死到心力衰竭的过程中,瓜氨酸含量升高,其是精氨酸的天然前体^[30],精氨酸在细胞质中通过一氧化氮合酶(NOS)代谢为一氧化氮(NO)和瓜氨酸。NO是一种重要的活性氧自由基,低水平的NO可能导致动脉粥样硬化和心力衰竭。精氨酸可以通过恢复NO合成和减少产生与NO相互作用的活性氧来预防心血管功能障碍^[31]。甘油磷酸胆碱和LPC(20:4)的含量呈上调趋势,甘油磷脂参与膜蛋白的分泌和代谢,以及内质网、线粒体的功能等^[32],其代谢紊乱会引起内质网应激、胰岛素抵

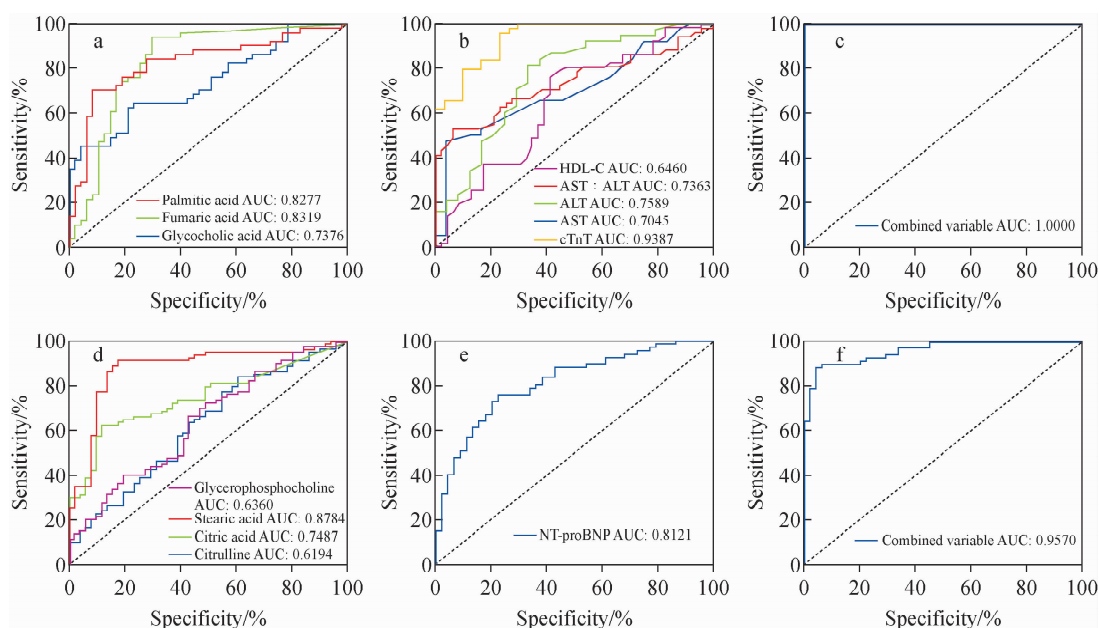
抗、血脂异常等代谢异常^[33-34]。内质网应激会诱导GRP78促使IRE1-XBP1、CHOP、Caspase-12等通路活化^[35],最终导致心肌肥大凋亡而发生心力衰竭;胰岛素抵抗可引起心肌能量代谢能力降低和底物代谢紊乱、钙信号通路异常、心肌细胞-内皮细胞NO信号通路受损,导致心力衰竭的发生发展^[36]。此外,棕榈酸和硬脂酸的含量发生显著变化,脂肪酸的生物合成原料为乙酰CoA,是人体能源物质代谢的重要中间代谢产物,脂肪酸生物合成代谢紊乱会影响糖酵解、三羧酸循环等能量代谢^[37]。本研究中,脂肪酸的生物合成紊乱导致心力衰竭患者血浆脂肪酸总量上升,心脏中脂质的过度积累会导致细胞凋亡、心脏肥大和心功能障碍,从而导致心力衰竭^[38]。

在心绞痛到心肌梗死和心肌梗死到心力衰竭的疾病进程中,柠檬酸和富马酸的含量均发生显著变化,三羧酸循环代谢紊乱。研究表明^[39-40],三羧酸循环的中间代谢物与心肌梗死、心力衰竭的患病率有关。在发生心肌缺血和心脏损伤时,缺氧会导致三羧酸循环紊乱,减少ATP的产生,使中间代谢物在细胞内积累^[41]。三羧酸循环是主要的供能代谢途径,是葡萄糖和脂质代谢的最终途径,当其发生异常代谢时,将造成心肌细胞能量不足,导致心力衰竭。有研究表明^[42],缺血后左冠状动脉中琥珀酸盐、富马酸盐、苹果酸盐、柠檬酸盐和乳酸的水平显著升高,与心肌梗死的发生显著相关。

结合临床生化指标和筛选出的特征代谢物

进行 ROC 分析。结果表明,在心绞痛和心肌梗死之间,糖胆酸、富马酸和棕榈酸对心肌梗死具有诊断意义($P < 0.05$),AUC 值分别为0.737 6、0.831 9、0.827 7,示于图 4a;临床指标中肌钙蛋白、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、AST:ALT、HDL-C 对心肌梗死具有诊断意义($P < 0.05$),AUC 值分别为0.938 7、0.704 5、0.758 9、0.736 3、0.646 0,示于图 4b;将这些指标进行联合诊断分析后,AUC 值提升至1.000 0,示于图 4c。在心肌梗死和心力衰竭之间,32 种代谢物中的瓜氨酸、柠檬酸、硬脂酸和甘油磷酸

胆碱对心力衰竭具有诊断意义($P < 0.05$),AUC 值分别为0.619 4、0.748 7、0.878 4、0.636 0,示于图 4d;临床指标中 NT-proBNP 对心力衰竭具有诊断意义($P < 0.05$),AUC 值为0.812 1,示于图 4e;将这些指标进行联合诊断分析后,AUC 值提升至0.957 0,示于图 4f,诊断的灵敏度和特异度均得到提升。临床生化指标与特征代谢物的结合可提高心肌梗死和心力衰竭诊断的准确性,对缺血性心脏病的精准诊断具有重要意义,也可为相关疾病的精准干预提供重要的生物学靶点。



注:a,b,c. 心绞痛与心肌梗死的 ROC 分析结果;d,e,f. 心肌梗死与心力衰竭的 ROC 分析结果

图 4 联合临床生化指标和特征代谢物的 ROC 分析结果

Fig. 4 ROC analysis results of clinical biochemical indicators combined characteristic metabolites

3 结论

本研究采用高灵敏度、高分辨率的 UPLC-HRMS 技术,基于代谢组学分析方法探究缺血性心脏病患者从心绞痛到心肌梗死、心肌梗死到心力衰竭过程的代谢紊乱特征。在定性定量 97 种血浆内源性代谢物的基础上,结合 t 检验、PCA、PLS-DA、变量重要性投影等方法,分别筛选出 28 和 32 种可区分心绞痛与心肌梗死患者,心肌梗死与心力衰竭患者的差异性特征代谢物。代谢通路分析结果表明,从心绞痛到心肌梗死,以及心肌梗死到心力衰竭的疾病进程中,氨基酸代谢和三羧酸循环等能量代谢均

发生紊乱;从心肌梗死到心力衰竭的疾病进程中,以甘油磷脂代谢和脂肪酸生物合成为代表的脂质代谢紊乱显著。ROC 分析结果表明,在心绞痛到心肌梗死过程中,糖胆酸、富马酸、棕榈酸、肌钙蛋白、高密度脂蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶对心肌梗死具有诊断意义,AUC 值分别为0.737 6、0.831 9、0.827 7、0.938 7、0.646 0、0.704 5、0.758 9,联合指标的 AUC 值为1.000 0;在心肌梗死到心力衰竭过程中,瓜氨酸、柠檬酸、硬脂酸、甘油磷酸胆碱、NT-proBNP 对心力衰竭具有诊断意义,AUC 值分别为0.619 4、0.748 7、0.878 4、0.636 0、0.812 1,联合指标的 AUC

值为0.957 0。本研究可为缺血性心脏病患者的精准诊断和疾病发展过程中的药物、营养干预提供重要的代谢靶标。

参考文献:

- [1] HARTLEY A, MARSHALL D C, SALCICCIOLI J D, SIKKEL M B, MARUTHAPPU M, SHALHOUB J. Trends in mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Europe: 1980 to 2009[J]. *Circulation*, 2016, 133(20): 1 916-1 926.
- [2] SACCARO L F, AIMO A, EMDIN M, PICO F. Remote ischemic conditioning in ischemic stroke and myocardial infarction: similarities and differences[J]. *Frontiers in Neurology*, 2021, 12: 716 316.
- [3] ZHOU M, WANG H, ZENG X, YIN P, ZHU J, CHEN W, LI X, WANG L, WANG L, LIU Y, LIU J, ZHANG M, QI J, YU S, AFSHIN A, GAKIDOU E, GLENN S, KRISH V S, MILLER-PETRIE M K, MOUNTJOY-VENNING W C, LIANG X. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *The Lancet*, 2019, 394(10 204): 1 145-1 158.
- [4] KHAN M A, HASHIM M J, MUSTAFA H, BANIYAS M Y, AL SUWAIDI S K B M, ALKATHEERI R, ALBLOOSHI F M K, ALMATROOSHI M E A H, ALZAABI M E H, AL DARMAKI R S, LOOTAH S N A H. Global epidemiology of ischemic heart disease: results from the global burden of disease study[J]. *Cureus*, 2020, 12(7): e9349.
- [5] BUNDY J D, HE J. Hypertension and related cardiovascular disease burden in China[J]. *Annals of Global Health*, 2016, 82(2): 227-233.
- [6] 姜茗宸,汪受传,徐珊,徐秋月,单进军,谢彤,彭琳秀,戴启刚. 小儿哮喘患者呼出气冷凝液代谢组学研究[J]. *分析化学*, 2018, 46(6): 969-974.
JIANG Mingchen, WANG Shouchuan, XU Shan, XU Qiuyue, SHAN Jinjun, XIE Tong, PENG Linxiu, DAI Qigang. Metabolomics study of exhaled breath condensate in childhood asthma by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 46(6): 969-974(in Chinese).
- [7] PEREZ-TEROL I, RIOS-NAVARRO C, DIOS E D, MORALES J M, GAVARA J, PEREZ-SOLE N, DIAZ A, MINANA G, SEGURA-SABATER R, BONANAD C, BAYÈS-GENIS A, HUSSER O, MONMENEU J V, LOPEZ-LEREU M P, NUNEZ J, CHORRO F J, RUIZ-SAURI A, BODI V, MONLEON D. Magnetic resonance microscopy and correlative histopathology of the infarcted heart[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 20 017.
- [8] MCGARRAH R W, CROWN S B, ZHANG G F, SHAH S H, NEWGARD C B. Cardiovascular metabolomics[J]. *Circulation Research*, 2018, 122(9): 1 238-1 258.
- [9] MURASHIGE D, JANG C, NEINAST M, EDWARDS J J, COWAN A, HYMAN M C, RABINOWITZ J D, FRANKEL D S, ARANY Z. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart[J]. *Science*, 2020, 370(6 514): 364-368.
- [10] 庞博,王斌,舒振波,姚小晓,张国栋,扈聪,吴绥生. 慢性心功能衰竭患者尿液的代谢组学研究[J]. *分析化学*, 2017, 45(8): 1 165-1 171.
PANG Bo, WANG Bin, SHU Zhenbo, YAO Xiaoxiao, ZHANG Guodong, HU Cong, WU Suisheng. Metabonomics study of chronic heart failure by rapid resolution liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(8): 1 165-1 171(in Chinese).
- [11] LERMAN J B, GIAMBERARDINO S N, HERMANDEZ A F, FELKER G M, SHAH S H, MCGARRAH R W. Plasma metabolites associated with functional and clinical outcomes in heart failure with reduced ejection fraction with and without type 2 diabetes[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 9 183.
- [12] LI Z, LIU X, WANG J, GAO J, GUO S, GAO K, MAN H, WANG Y, CHEN J, WANG W. Analysis of urinary metabolomic profiling for unstable angina pectoris disease based on nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(12): 3 387-3 396.
- [13] YAO W, GAO Y, WAN Z. Serum metabolomics profiling to identify biomarkers for unstable angina[J]. *BioMed Research International*, 2017: 7657306.

- [14] CAI F, REN F, ZHANG Y, DING X, FU G, REN D, YANG L, CHEN N, SHANG Y, HU Y, YI L, ZHANG H. Screening of lipid metabolism biomarkers in patients with coronary heart disease via ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2021, 1169: 122-603.
- [15] YUAN X, WEN J, JIA H, TONG L, ZHAO J, ZHAO L, XIONG Z. Integrated metabolomic analysis for intervention effects of Gushudan on glucocorticoid-induced osteoporotic rat plasma based on RP/HILIC-UHPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. *Analytical Biochemistry*, 2020, 591: 113-559.
- [16] XU T, ZHOU L, SHI Y, LIU L, ZUO L, JIA Q, DU S, KANG J, ZHANG X, SUN Z. Metabolomics approach in lung tissue of septic rats and the interventional effects of Xuebijing injection using UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2018, 164(6): 427-435.
- [17] 柴珂, 杨杰孚. 心力衰竭诊断和治疗的现状和思考[J]. *心脑血管病防治*, 2020, 20(1): 10-12, 24. CHAI Ke, YANG Jiefu. Current situation and thinking of diagnosis and treatment of heart failure[J]. *Cardio-Cerebrovascular Disease Prevention and Treatment*, 2020, 20(1): 10-12, 24 (in Chinese).
- [18] PENG F, LIU X, WANG X, CHEN J, LIU M, YANG Y, BAI Z. Triple deletion of *clpC*, *porB*, and *mepA* enhances production of small ubiquitin-like modifier-*N*-terminal pro-brain natriuretic peptide in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(1): 67-79.
- [19] JIN S, SONG C, LI S, ZHANG Y, CHEN C, ZHOU X, XU Y, FENG Y, ZHANG Z, JIANG H. Preventive effects of turmeric on the high-fat diet-induced hyperlipidaemia in mice associated with a targeted metabolomic approach for the analysis of serum lysophosphatidylcholine using LC-MS/MS[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 11: 130-141.
- [20] CHEN G, SONG C, JIN S, LI S, ZHANG Y, HUANG R, FENG Y, XU Y, XIANG Y, JIANG H. An integrated strategy for establishment of metabolite profile of endogenous lysoglycerophospholipids by two LC-MS/MS platforms[J]. *Talanta*, 2017, 162: 530-539.
- [21] YUAN X, WEN J, JIA H, TONG L, ZHAO J, ZHAO L, XIONG Z. Integrated metabolomic analysis for intervention effects of Gushudan on glucocorticoid-induced osteoporotic rat plasma based on RP/HILIC-UHPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. *Analytical Biochemistry*, 2020, 591: 113-559.
- [22] FERNSTROM J D, FERNSTROM M H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain[J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(6): 1539-1547.
- [23] MURR C, GRAMMER T B, MEINITZER A, KLEBER M E, MÄRZ W, FUCHS D. Immune activation and inflammation in patients with cardiovascular disease are associated with higher phenylalanine to tyrosine ratios: the ludwigshafen risk and cardiovascular health study[J]. *Journal of Amino Acids*, 2014: 783-730.
- [24] VILELA E M, BETTENCOURT-SILVA R, da COSTA J T, BARBOSA A R, SILVA M P, TEIXEIRA M, PRIMO J, GAMA RIBEIRO V, NUNES J P L. Anti-cardiac troponin antibodies in clinical human disease: a systematic review [J]. *Annals of Translational Medicine*, 2017, 5(15): 307.
- [25] WISCHMEYER P E, JAYAKAR D, WILLIAMS U, SINGLETON K D, RIEHM J, BACHA E A, JEEVANANDAM V, CHRISTIANS U, SERKOVA N. Single dose of glutamine enhances myocardial tissue metabolism, glutathione content, and improves myocardial function after ischemia-reperfusion injury[J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2003, 27(6): 396-403.
- [26] ZHANG X, CAI Y, SU X, JING Q, LIU H, NA K, QIU M, TIAN X, LIU D, WU T, YAN C, HAN Y. Untargeted metabolomics identified kynurenine as a predictive prognostic biomarker in acute myocardial infarction[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 950-441.
- [27] MEIKLE P J, FORMOSA M F, MELLETT N A, JAYAWARDANA K S, GILES C, BERTOVIC D A, JENNINGS G L, CHILDS W, REDDY M, CAREY A L, BARADI A, NANAYAKKARA S, WILSON A M, DUFFY S J,

- KINGWELL B A. HDL phospholipids, but not cholesterol distinguish acute coronary syndrome from stable coronary artery disease[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2019, 8(11): e011792.
- [28] CAIDAHL K, HARTFORD M, RAVN-FISCHER A, LORENTZEN E, YNDESTAD A, KARLSSON T, AUKRUST P, UELAND T. Homeostatic chemokines and prognosis in patients with acute coronary syndromes[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2019, 74(6): 774-782.
- [29] XU G M, CUI S, PU Z. The role of metabolomics in myocardial infarction: a recent mini-review[J]. *Signa Vitae*, 2023, 19(1): 34-42.
- [30] RASHID J, KUMAR S S, JOB K M, LIU X, FIKE C D, SHERWIN C M T. Therapeutic potential of citrulline as an arginine supplement: a clinical pharmacology review[J]. *Pediatric Drugs*, 2020, 22(3): 279-293.
- [31] SALMANI M, ALIPOOR E, NAVID H, FARAHBAKHS P, YASERI M, IMANI H. Effect of l-arginine on cardiac reverse remodeling and quality of life in patients with heart failure [J]. *Clinical Nutrition*, 2021, 40(5): 3 037-3 044.
- [32] WANG R, LI B, LAM S M, SHUI G. Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2020, 47(2): 69-83.
- [33] FU S, YANG L, LI P, HOFMANN O, DICKER L, HIDE W, LIN X, WATKINS S M, IVANOV A R, HOTAMISLIGIL G S. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity[J]. *Nature*, 2011, 473(7 348): 528-531.
- [34] CHEN S, WU Q, ZHU L, ZONG G, LI H, ZHENG H, ZENG R, LIN X, SUN L. Plasma glycerophospholipid profile, erythrocyte n-3 PUFAs, and metabolic syndrome incidence: a prospective study in Chinese men and women[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2021, 114(1): 143-153.
- [35] LEE R, XU B, RAME J E, FELKIN L E, BARTON P, DRIES D L. Regulated inositol-requiring protein 1-dependent decay as a mechanism of corin RNA and protein deficiency in advanced human systolic heart failure[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2014, 3(6): e001104.
- [36] BERTERO E, MAACK C. Metabolic remodeling in heart failure[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2018, 15(8): 457-470.
- [37] LOPASCHUK G D, KARWI Q G, TIAN R, WENDE A R, ABEL E D. Cardiac energy metabolism in heart failure[J]. *Circulation Research*, 2021, 128(10): 1 487-1 513.
- [38] MURASHIGE D, JANG C, NEINAST M, EDWARDS J J, COWAN A, HYMAN M C, RABINOWITZ J D, FRANKEL D S, ARANY Z. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart[J]. *Science*, 2020, 370(6 514): 364-368.
- [39] BULLÓ M, PAPANDREOU C, GARCÍA-GAVILÁN J, RUIZ-CANELA M, LI J, GUASCH-FERRÉ M, TOLEDO E, CLISH C, CORELLA D, ESTRUCH R, ROS E, FITÓ M, LEE C H, PIERCE K, RAZQUIN C, ARÓS F, SERRA-MAJEM L, LIANG L, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ M A, HU F B, SALAS-SALVADÓ J. Tricarboxylic acid cycle related-metabolites and risk of atrial fibrillation and heart failure[J]. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2021, 125: 154 915.
- [40] RUIZ-CANELA M, HRUBY A, CLISH C B, LIANG L, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ M A, HU F B. Comprehensive metabolomic profiling and incident cardiovascular disease: a systematic review[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2017, 6(10): e005705.
- [41] CZIBIK G, STEEPLES V, YAVARI A, ASHRAFIAN H. Citric acid cycle intermediates in cardioprotection[J]. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 2014, 7(5): 711-719.
- [42] CONSEGAL M, NÚÑEZ N, BARBA I, BENITO B, RUIZ-MEANA M, INSERTE J, FERREIRA-GONZÁLEZ I, RODRÍGUEZ-SINOVAS A. Citric acid cycle metabolites predict infarct size in *Pigs* submitted to transient coronary artery occlusion and treated with succinate dehydrogenase inhibitors or remote ischemic preconditioning [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 4 151.