

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.17.018

基于脂质组学技术研究急性缺血性脑卒中临床诊断标志物*

齐 彪¹ 杨 晨¹ 吴 剑¹ 费国强^{1,2} 李秋平^{1,3Δ}

(1 复旦大学附属中山医院厦门医院神经外科 福建 厦门 361015; 2 复旦大学附属中山医院神经内科 上海 200032;

3 复旦大学附属中山医院神经外科 上海 200032)

摘要 目的:急性缺血性脑卒中(Acute ischemic stroke, AIS)是由于血流减少导致的脑功能突然丧失。由于 AIS 发病机制是异质性和多因素的,我们建立全面的脂质组学方法来阐明 AIS 进程相关的脂质变化和复杂的脂质代谢网络。**方法:**选取 26 例 AIS 患者血液标本和 27 例健康志愿者血清作为研究对象,进行总脂抽提,通过基于 LC-MS 策略的非靶向脂质组学方法进行规模性、整体性的脂质组学分析。**结果:**对 AIS 患者和健康志愿者血浆进行大规模脂质定性定量分析,通过 Progenesis® QI 软件分析 Xevo® G2-XS QTOF 质谱系统 MS^E 采集的子离子数据,精确定量到 1054 个脂质特征差异,准确定性得到 368 个脂质分子,多变量统计分析中差异脂质组成能将 AIS 患者和健康志愿者区分开来,通路富集分析图显示差异脂质主要参与甘油磷脂代谢的紊乱。**结论:** AIS 患者血浆脂质组成与健康志愿者存在显著差异,差异表达的脂质可能与 AIS 发生有关。这些发现有助于开发新的诊断标志物和 AIS 治疗靶点。

关键词:急性缺血性脑卒中;非靶向脂质组学;多元变量统计分析;通路富集分析;甘油磷脂代谢

中图分类号:R743.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)17-3289-04

Diagnostic Biomarker Study on Early Detection of Acute Ischemic Stroke Via Lipidomics Technology*

QI Biao¹, YANG Chen¹, WU Jian¹, FEI Guo-qiang^{1,2}, LI Qiu-ping^{1,3Δ}

(1 Neurosurgery Department, Xiamen Branch, Zhongshan Hospital, Fudan University, Xiamen, Fujian, 361015, China;

2 Neurology Department, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China;

3 Neurosurgery Department, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China)

ABSTRACT Objective: Acute ischemic stroke is a sudden loss of brain function due to the reduction of blood flow. The pathogenesis of AIS is heterogeneous and multifactorial, hence we establish comprehensive lipidomic approach to explore altered lipid composition and complex metabolic networks associated with acute ischemic stroke. **Methods:** Serum samples containing 26 AIS patients and 27 healthy volunteers were collected as subjects. Total lipid extraction was performed, and large-scale lipid species were analyzed via non-targeted lipidomics based on LC-MS strategy. **Results:** Large-scale lipidomic qualitative and quantitative analysis of plasma, comparing AIS patients with healthy controls, via MSE scan by Xevo® G2-XS QTOF mass spectrometry system and peak alignment and deconvolution by Progenesis® QI software. A total of 1054 lipid characteristics were accurately quantified and 368 lipid molecules were precisely identified. Multivariate statistical analyses unraveled that altered lipid composition distinguished AIS patients from healthy controls. The pathway enrichment analysis showed that the significantly changed lipids were mainly involved in glycerophospholipid metabolism disorders. **Conclusions:** Our lipidomic data showed a strikingly consistent separation between AIS patients and healthy donors. Decipherment of lipid compositions distinguishing AIS from control can lead to identify critical diagnostic biomarkers as well as develop therapeutic targets for AIS progression.

Key words: Acute ischemic stroke; Nontargeted lipidomics; Multivariate statistical analysis; Pathway enrichment analysis; Glycerophospholipid metabolism

Chinese Library Classification(CLC): R743.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)17-3289-04

前言

脑卒中是导致人类致残和致死的主要病因之一,我国每年

约有 200 万新发脑卒中的患者,且卒中发病年龄越来越趋于年轻化^[1,2]。急性缺血性脑卒中(Acute ischemic stroke, AIS)约占全部脑卒中的 80%,由于供给大脑营养的血管闭塞,导致该血管

* 基金项目:厦门市科技惠民计划项目(3502Z20184006);福建省卫生健康青年科研课题(2019-2-62)

作者简介:齐彪(1985-),男,硕士,住院医师,主要研究方向:脑血管病, E-mail: qi.biao@zsxmhospital.com

Δ 通讯作者:李秋平(1968-),男,副主任医师,主要研究方向:神经系统疾病的诊断和治疗,

E-mail: li.qiuping@zs-hospital.sh.cn, 电话:0592-3568013

(收稿日期:2019-04-20 接受日期:2019-05-15)

供应的大脑区域缺血缺氧坏死,从而出现这部分大脑区域支配的身体功能障碍^[3]。AIS 具有高发病率、高死亡率、高致残率、高复发率等特点,治疗的关键在于尽早开通闭塞血管、恢复血流以挽救缺血半暗带组织^[4,5]。

目前,AIS 确诊主要通过临床症状结合辅助检查,包括 CT、CTA(CT 血管成像)、CTP(CT 组织灌注)、MR、MRA(磁共振血管成像)等。这些技术均需要依赖大型仪器,价格昂贵,且患者需多次进行转运搬动^[6]。因此,发现能够预警 AIS 的早期诊断标志物,帮助医生对患者进行及时准确的诊断,筛选个性化治疗靶点并转化为临床应用,是生命科学和临床医学迫切需要解决的问题。

基于质谱分析的脂质组学技术能够对复杂样品中脂质化合物进行快速扫描及定量分析,具有灵敏度高、分辨率好等优点,能进行高通量检测,是临床生化检测的最先进技术之一^[7,8]。本项目拟采用 AIS 患者和健康志愿者的血浆标本,系统挖掘 AIS 进程中脂质组成的改变,试图从脂质代谢角度探索差异脂质对 AIS 发生发展的影响,为临床寻找兼具高特异性和高灵敏度的脂质代谢预测指标。

1 材料与方法

1.1 标本收集

收集 2017 年 8 月-2018 年 12 月间就诊于我院的福建省汉族急性缺血性卒中患者的血液标本,签署相关知情同意书。通过问卷调查以及门诊咨询,收集研究对象的人口学资料及卒中中发病高危因素信息(包括年龄、身高、体重、受教育程度、血压、血糖、是否抽烟酗酒、脑血管病史等);通过查阅住院记录及相关影像学报告,收集研究对象的临床诊疗参数(包括 NIHSS 评分、GCS 评分、脑梗部位及范围、是否大血管闭塞等),治疗方案(药物治疗、是否静脉溶栓、是否机械取栓等),将相关资料录入。

收集同时时间段于我院进行体检的健康人群外周静脉血标本作为对照,根据病例组性别、年龄(± 3 岁)进行频数匹配,对照组健康人群需既往无任何脑血管病史,同样签署相关知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 血浆样本脂质提取 收集 26 例 AIS 患者血液标本和 27 例健康志愿者血清作为研究对象,使用 800 μ L 氯仿/甲醇(2:1, v/v)作为 200 μ L 血浆样品脂质混合物提取的溶剂,样品振荡 1 min,13,000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,上层水相(代谢物)转移至 1.5 mL EP 管中,下层有机相(脂质)转移至干净玻璃离心管中,氮气吹干样品。脂质物质用 100 μ L 乙腈/异丙醇/水(2:2:1, v/v/v)重溶,加入 SPLASHTM LipidoMix[®] Mass Spec Standard 混合标准品作为参照,12,000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,取上清液 80 μ L 行质谱检测。

1.2.2 LC-MS 策略鉴定血浆样本脂质组成 基于 LC-MS 策略的非靶向脂质组学方法,通过 ACQUITY UPLC[®] 色谱平台进行样本分离,联合 Xevo[®] G2-XS QTOF 质谱系统,对血浆样本进行大规模脂质定性定量研究。

色谱条件如下:ACQUITY UPLC CSH C18 色谱柱(130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm),柱温 55 $^{\circ}$ C,样品温度 10 $^{\circ}$ C,上样体

积 1 μ L,流速 0.40 mL/min,流动相 A 为 ACN/H₂O (60:40, v/v) + 10 mM 甲酸铵 + 0.1%甲酸,流动相 B 为 IPA/ACN (90:10, v/v) + 10 mM 甲酸铵 + 0.1%甲酸。

质谱条件如下:离子化模式为 ESI+/ESI-,毛细管电压为 2.0/1.0 KV,锥电压为 30.0 V,锥形气体 50 L/h,源温度 120 $^{\circ}$ C,去溶剂化温度 550 $^{\circ}$ C,去溶剂气流 900 L/h,采集模式为 MSE,低碰撞能量 6 eV,高碰撞能量 30-50 eV,质荷比扫描范围 100-2000 Da。

1.3 脂质组学数据处理及统计分析

MassLynx Acquisition 软件进行一级、二级质谱数据采集和分析。脂质有效峰的标准:质谱峰信号强度大于最高峰的 2%,绝对强度 >1000 以及信噪比 >5,被认为是有效信号峰予以分析。Progenesis[®] QI 软件导入 MSE 采集的子离子数据,并自动和批量进行碎片的结构确认,准确定量和定性样品中发生显著变化的脂质化合物^[9]。样品中各个扫描的信号强度经过手工验证,用内标强度做归一化处理,结果以 "平均数 $\pm$ 标准偏差" 表示。差异脂质的卡值标准需要同时满足两个条件:不同组别脂质分子信号强度倍数变化 >1.5 或 <0.67;变量组间差异采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 。多变量统计分析和通路富集分析由 MetaboAnalyst 4.0 完成^[10,11]。

2 结果

2.1 LC-MS 策略定性定量研究 AIS 患者血清特征脂质代谢谱

本研究选取 26 例 AIS 患者血浆标本和 27 例健康志愿者血浆,通过 LC-MS 脂质组学策略全面解析临床血浆标本脂质代谢物组成,定性定量 AIS 血浆样本中具有显著变化的脂质分子和脂质代谢通路。通过 Xevo[®] G2-XS QTOF 质谱系统共定量到 1054 个脂质特征差异,通过 Progenesis[®] QI 软件匹配得到 368 个脂质分子,图 1 示质谱峰对齐和峰值检测流程。

2.2 定量比较 AIS 患者和健康志愿者血浆脂质代谢差异

我们对血浆样本脂质组学数据进行质控,血浆样本抽提得到的总脂各取 2 μ L 混合得到 QC 样本,正离子模式下总离子流(TIC)图如图 2 所示,实验全程中 QC 样本 TIC 图聚集度极高,提示本实验色谱质谱联用系统具有出色保留时间、峰面积的重现性和质量数稳定性。

我们进一步用正交最小偏二乘判别分析(OPLS-DA)模型对 AIS 血浆样本中具有显著变化的脂质分子做多变量统计学分析,正、负离子模式下 OPLS-DA 得分图均显示差异脂质组成能将 AIS 患者和健康志愿者区分开来(图 3A&3C),图中黑色方块示健康志愿者脂质数据分布,红色方块示 AIS 病人脂质数据分布。正离子模式与负离子模式下差异脂质火山图分别如图 3B 和图 3D 所示,脂质分子信号强度倍数变化 >1.5 或 <0.67,同时 $P < 0.05$ 即满足差异脂质标准,在火山图中以红色方框着重展示,表明 AIS 患者脂质组成发生显著变化。

2.3 通路富集分析 AIS 患者血浆脂质变化

我们用 MetaboAnalyst 4.0 软件对差异脂质行通路富集分析,分析结果如图 4A 所示,通路富集图中圈越大,代表 impact value 越大;圆圈颜色深浅代表 p 值权重, p 越小,颜色越红。得分最高的 10 条富集通路见图 4B($P < 0.01$)。

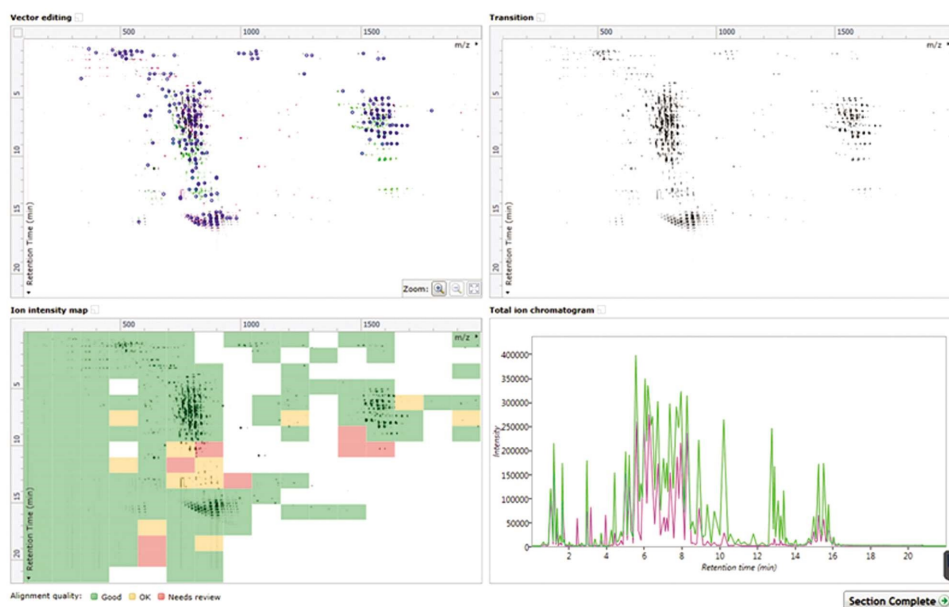


图1 Progenesis QI 软件对质谱数据进行峰对齐和峰值检测

Fig.1 Mass spectrometry data peak alignment and peak detection using Progenesis QI software

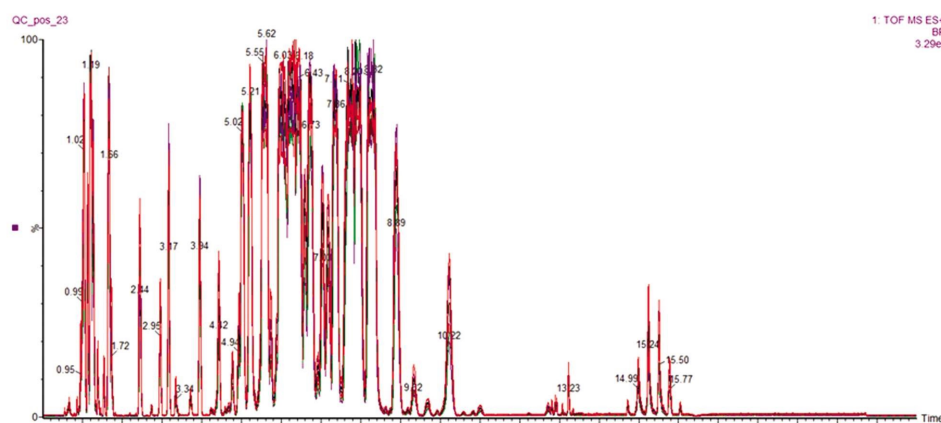


图2 QC 样本正离子模式 TIC 图

Fig.2 Total ion chromatography (TIC) of QC samples in positive mode

3 讨论

脂质是生物膜的重要成分,是生物体储能的主要场所,也是重要的信号分子,多种脂质分子及其代谢中间产物参与血管炎症、细胞增殖、细胞黏附和运动等生理和病理过程^[12,13]。脂质组学(Lipidomics)着眼于全面系统地分析生命体脂质组成,寻找疾病相关的脂质标志物,研究脂质代谢网络和动态调控在各种生命现象中的作用规律^[14,15]。Stegemann 等^[16]使用 shotgun 脂质组学方法,从 685 个临床血浆样品中鉴定到 135 种脂质分子,并明确了 CVD 风险预测的脂质分布特征。齐炼文课题组^[17]基于 2324 例冠心病血浆样本,采用非靶向及靶向代谢组学手段,鉴定与冠心病发生发展密切相关的差异代谢物 36 个,其中 N-乙酰神经氨酸可作为冠心病防治的潜在靶标。许国旺课题组^[18]纳入 1448 例受试者,包括健康对照、慢性乙肝患者、肝硬化患者和肝癌患者,基于 LC-MS 脂质组学方法筛选肝癌生物标志物。AIS 发病机制是多因素的^[19],建立系统性脂质组学方法用以发现能够预警 AIS 的早期诊断标志物,及时启动相应治疗,尽可能挽救 AIS 患者大脑的功能,获得治疗的最佳效果,具

有重大意义。

由于脂质分子结构的复杂多样、脂质分析手段及数据库建立的滞后,导致 AIS 发生发展过程中复杂的脂质代谢网络和功能调控仍未被阐明。本研究基于 LC-MS 策略进行血浆样本大规模脂质定性定量研究,通过反相 LC 基于脂肪酸碳链长度和双键的数量实现脂质的分离;联合不同能级的质谱碰撞诱导碎裂,结合 ESI 正负离子扫描模式的切换,进一步达到离子化过程中分离不同脂质的目的。然后通过串联质谱,充分利用各类脂质的特征裂解碎片对相应脂质进行定性定量分析,精确定量到 1054 个脂质特征差异,准确定性得到 368 个脂质分子,多变量统计分析中差异脂质组成能将 AIS 患者和健康志愿者区分开来。差异脂质富集得到的代谢通路得分最高的前 3 条通路均涉及甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)。基于不同的极性头部基团,常见的甘油磷脂有 6 类:磷脂酰胆碱(PC),磷脂酰乙醇胺(PE),磷脂酰甘油(PG),磷脂酰肌醇(PI),磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酸(PA)^[7]。其中,PC 和 PE 是细胞膜中最丰富的脂质,占总磷脂种类的 50%以上,在维持细胞膜结构和功能过程中发挥着重要作用。PS 在调控细胞周期,尤其是

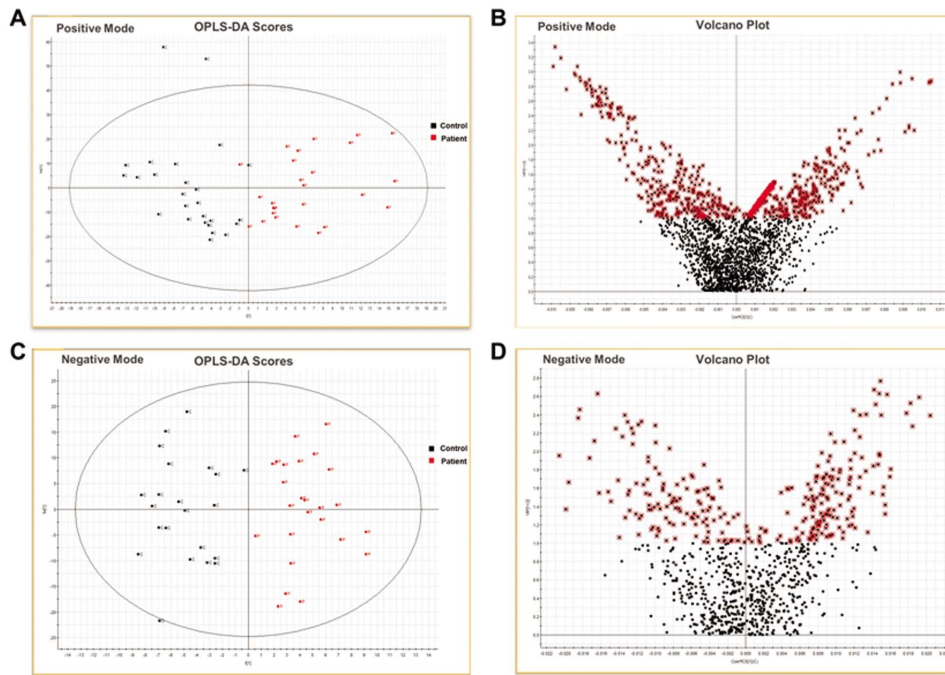


图3 AIS患者和健康志愿者血浆脂质组成差异分析。(A, B)正离子模式下,差异脂质 OPLS-DA 得分图及火山图;(C, D)负离子模式下,差异脂质 OPLS-DA 得分图及火山图。

Fig.3 Analysis of plasma lipid composition differences between AIS patients and healthy donors. (A, B) In positive ion mode, OPLS-DA score plot and volcano plot of significantly changed lipids; (C, D) In negative ion mode, OPLS-DA score plot and volcano plot of differential lipids.

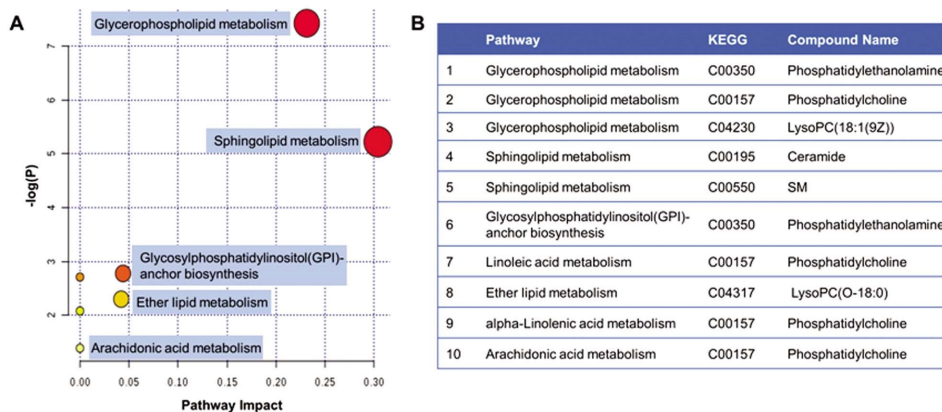


图4 差异脂质通路分析。(A)差异脂质通路富集图,圆圈大小表示 pathway impact value,颜色深浅代表 p 值权重。(B)得分最高的 10 条差异脂质通路。

Fig.4 Pathway analysis of changed lipids. (A) Altered lipid metabolic pathway between AIS group and health control, pathways are represented as circles according to their scores from enrichment (vertical axis) and topology analyses (pathway impact, horizontal axis). (B) List of top ten enriched lipid pathways.

凋亡过程中发挥重要的作用^[20]。PtdIns, 4- 磷酸磷脂酰肌醇(PtdIns4P)和 4, 5- 二磷酸磷脂酰肌醇(PtdIns(4,5)P₂)可以被磷脂酰肌醇-3- 激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)磷酸化,是第二信使的重要前体,参与调控一系列重要的细胞活动^[21]。通路富集分析图显示 AIS 患者的甘油磷脂代谢存在严重的紊乱,为个性化治疗靶点的开发提供了重要方向。

综上,本研究发展不依赖抗体的质谱定量技术,将差异脂质用于监测 AIS 的发生发展,给临床医生和科研工作者提供了一个新的选择。

参考文献(References)

[1] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, Incidence, and Mortality

of Stroke in China: Results from a Nationwide Population-Based Survey of 480 687 Adults[J]. Circulation, 2017, 135(8): 759-771

[2] Chen Z, Jiang B, Ru X, et al. Mortality of Stroke and Its Subtypes in China: Results from a Nationwide Population-Based Survey [J]. Neuroepidemiology, 2017, 48(3-4): 95-102

[3] Adams HP Jr, Biller J. Classification of subtypes of ischemic stroke: history of the trial of org 10172 in acute stroke treatment classification[J]. Stroke, 2015, 46(5): e114-117

[4] Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association[J]. Stroke, 2018, 49(3): e46-e110

(下转第 3296 页)

- and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(20): 1557-1565
- [21] Hounslow NWokingham K. Pitavastatin has pleiotropic anti-oxidative and anti-inflammatory benefits in patients with dyslipidaemia: results from aphaseIII study programme [J]. *Atheroscler Suppl*, 2011, 12(1): 55
- [23] Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(5): 2569-2619
- [24] Yuichi Ozaki, Hector M. Garcia-Garcia, Solomon S. Beyene, et al. Effect of Statin Therapy on Fibrous Cap Thickness in Coronary Plaque on Optical Coherence Tomography [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2018, 11(6): 829-838
- [25] Konstantinos C, Koskinas, Serge Zaugg, et al. Changes of coronary plaque composition correlate with C-reactive protein levels in patients with ST-elevation myocardial infarction following high-intensity statin therapy[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 247: 154-160
- [26] Osung Kwon, Soo-Jin Kang, Se Hun Kang, et al. Relationship Between Serum Inflammatory Marker Levels and the Dynamic Changes in Coronary Plaque Characteristics After Statin Therapy[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2017, 10(7): pii: e005934
- [27] Koshiyama H, Taniguchi A, Tanaka K, et al. Effects of Pitavastatin on Lipid Profiles and High-sensitivity CRP in Japanese Subjects with Hypercholesterolemia: Kansai Investigation of statin for Hyperlipidemic Intervention in Metabolism and Endocrinology (KISHIMEN) Investigators[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2008, 15(6): 345-350
- [28] Matsubara T, Nakao M, Marui N, et al. Impact of pitavastatin on high-sensitivity C-reactive protein and adiponectin and adiponectin hypercholesterolemic patients with the metabolic syndrome: The PREMIUM Study[J]. *J Cardiol*, 2012, 60(5): 389-394
- [29] Sattar N, Preiss D, Murray HM. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials [J]. *Lancet*, 2010, 375(9716): 735-742
- [30] Choi JY, Choi CU, Hwang SY, et al. Effect of pitavastatin compared with atorvastatin and rosuvastatin on new-onset diabetes mellitus in patients with acute myocardial infarction[J]. *Am J Cardiol*, 2018, 122(6): 922-928

(上接第 3292 页)

- [5] Harmon TS, Hulsberg PC, McFarland III JR, et al. Time is Brain: The Future for Acute Ischemic Stroke Management is the Utilization of Steerable Microcatheters for Reperfusion [J]. *Cureus*, 2019, 11(1): e3842
- [6] Hasan TF, Rabinstein AA, Middlebrooks EH, et al. Diagnosis and Management of Acute Ischemic Stroke [J]. *Mayo Clin Proc*, 2018, 93(4): 523-538
- [7] Brügger B. Lipidomics: Analysis of the Lipid Composition of Cells and Subcellular Organelles by Electrospray Ionization Mass Spectrometry[J]. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 79-98
- [8] Forest A, Ruiz M, Bouchard B, et al. Comprehensive and Reproducible Untargeted Lipidomic Workflow Using LC-QTOF Validated for Human Plasma Analysis [J]. *J Proteome Res*, 2018, 17(11): 3657-3670
- [9] Paglia G, Astarita G. Metabolomics and lipidomics using traveling-wave ion mobility mass spectrometry[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(4): 797-813
- [10] Xia J, Wishart DS. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(6): 743-760
- [11] 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
- [12] Brown HA, Marnett LJ. Introduction to lipid biochemistry, metabolism, and signaling [J]. *Chemical reviews*, 2011, 111(10): 5817-5820
- [13] Holthuis JC, Menon AK. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis[J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 48-57
- [14] Han X. Lipidomics for Studying Metabolism[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(11): 668-679
- [15] Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(11): 954-969
- [16] Stegmann C, Pechlaner R, Willeit P, et al. Lipidomics Profiling and Risk of Cardiovascular Disease in the Prospective Population-Based Bruneck Study[J]. *Circulation*, 2014, 129(18): 1821-1831
- [17] Zhang L, Wei TT, Li Y, et al. Functional Metabolomics Characterizes a Key Role for N-Acetylneuraminic Acid in Coronary Artery Diseases [J]. *Circulation*, 2018, 137(13): 1374-1390
- [18] Luo P, Yin P, Hua R, et al. A Large-scale, Multicenter Serum Metabolite Biomarker Identification Study for the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma[J]. *Hepatology*, 2018, 67(2): 662-675
- [19] Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2009, 111(6): 483-495
- [20] Fadok V A, Voelker D R, Campbell P A, et al. Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of Apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages [J]. *J Immunol*, 1992, 148(7): 2207-2216
- [21] Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in Cell Regulation and Membrane Dynamics[J]. *Nature*, 2006, 443(7112): 651-657