

• 论 著 •

基于 GC-MS 的脑出血代谢标志物研究*

冉 丽¹, 彭 形², 吴玉洪³, 熊 昕^{1△}

(1. 重庆市中医院神经内科, 重庆 400011; 2. 重庆市中医院神经外科, 重庆 400011;

3. 重庆市中医院, 重庆 400011)

[摘要] **目的** 探索脑出血与血浆代谢标志物之间的关系及可能的机制。**方法** 收集 2020 年 3—12 月就诊于重庆市中医院神经内科、神经外科的住院患者, 发病 24 h 内就诊并完成头颅 CT 平扫确诊为脑出血, 同期健康体检者为对照组。采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析两组间血浆代谢物含量的变化, 应用正交偏最小二乘法(OPLS-DA)、ROC 曲线筛选出两组中的差异性代谢物。**结果** 该研究共纳入脑出血组 24 例, 对照组 30 例, 两组的人口学特征无显著差异, 共筛选出 24 个差异性标志物, 进行 ROC 曲线分析, 最终筛选出 AUC>0.85 的代谢物有 4 个: 3-羟基丙酸、2-羟基丁酸、7-脱氢胆固醇、柠檬酸。**结论** 3-羟基丙酸、2-羟基丁酸、7-脱氢胆固醇、柠檬酸等血浆代谢物可能与脑出血的发病相关, 其中 2-羟基丁酸、7-脱氢胆固醇可能与脑卒中后抑郁的发生有关。

[关键词] 脑出血; 中风; 代谢组学; 生物标志物; 气相色谱-质谱联用技术

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.05.002 **中图法分类号:**R741;R743

文章编号:1009-5519(2023)05-0725-05

文献标识码:A

Study on metabolic markers of intracerebral hemorrhage based on GC-MS*

RAN Li¹, PENG Xing², WU Yuhong³, XIONG Xin^{1△}

(1. Department of Neurology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing

400011, China; 2. Department of Neurosurgery, Chongqing Hospital of Traditional Chinese

Medicine, Chongqing 400011, China; 3. Chongqing Hospital of Traditional Chinese

Medicine, Chongqing 400011, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship and potential mechanism between intracerebral hemorrhage (ICH) and plasma metabolomic biomarker and its possible mechanism. **Methods** The inpatients were enrolled in the study who underwent computed tomography (CT) scans within 24 hours of onset and were diagnosed as ICH from Department of Neurology and Neurosurgery, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, from March to December 2020. The healthy persons in the same period were taken as the control group. The changes of the plasma metabolite content between the two groups were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The differential metabolites in two groups were screened by partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA) and ROC curve. **Results** A total of 24 ICH patients and 30 cases of the control group were enrolled in the study, and their clinical characteristics were no significant difference. A total of 24 important metabolites were identified and analyzed by ROC curve. Finally, four differential metabolites were screened for predicting ICH by applying the area under curve (AUC) greater than 0.85, including 3-hydroxypropionic acid, 2-hydroxybutanoic acid, 7-dehydrocholesterol and citric acid. **Conclusion** 3-hydroxypropionic acid, 2-hydroxybutanoic acid, 7-dehydrocholesterol and citric acid may be related to the pathogenesis of ICH, among which 2-hydroxybutanoic acid and 7-dehydrocholesterol may be related to the occurrence of the post-stroke depression.

[Key words] Intracerebral hemorrhage; Stroke; Metabonomic; Biomarker; Gas chromatography-mass spectrometry

* 基金项目: 重庆市科学技术局科研机构绩效激励引导专项项目(jxyn2019-2-1); 国家中医药管理局中医药循证能力建设项目(2019XZZX-NB014)。

作者简介: 冉丽(1986—), 硕士研究生, 主治医师, 主要从事脑血管疾病研究工作。△ 通信作者, E-mail: 1276072745@qq.com。

脑卒中是严重威胁人类健康和生命的脑血管疾病,已被排名为我国致残率第一和致死率第二的疾病。在我国每年新发脑卒中患者约为 200 万例,且以每年 8.7% 的速度迅速增长^[1]。有研究表明,中国人脑卒中终生风险为全球之最^[2]。脑出血(ICH)占脑卒中的 15%~30%,其发病凶险,病情变化迅速,治疗手段有限,死亡率及致残率均极高。据报道,脑出血 3 个月死亡率高达 20%~30%^[3]。脑出血的诊断和治疗极其依赖影像学,但在临床工作中存在转运患者、辐射等弊端,但能及时诊断脑出血和评价疾病演变的生物标志物,具有非常重大的临床意义。

代谢组学是以生物光谱数据为基础的多元统计分析,定量测量整个生物体对病理生理刺激或基因修饰的动态多参数代谢反应。代谢组学已广泛用于心血管疾病^[4]、糖尿病^[5]、肾病^[6]及肿瘤^[7]等疾病的研究中。本研究采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)方法对脑出血患者血液标本进行非靶向代谢组学分析,以寻找脑出血潜在的血清生物学标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 3—12 月就诊于重庆市中医院神经内科和神经外科的住院患者,发病 24 h 内就诊并完成头颅 CT 平扫确诊为脑出血纳入脑出血组,同期健康体检者为对照组。纳入标准:(1)符合《中国脑出血诊治指南(2019)》;(2)发病年龄大于 18 岁;(3)发病 24 h 内就诊并完成首次头颅 CT 平扫检查明确诊断。排除标准:(1)外伤性脑出血;(2)原发性脑室出血;(3)动脉瘤,动、静脉畸形,颅内静脉窦血栓,烟雾病等所致的脑出血;(4)患者明确诊断或高度怀疑患有血液系统疾病,如血小板减少性紫癜、白血病、血友病等;(5)抗凝药物相关脑出血;(6)原发性或转移性肿瘤等所致的出血;(7)出血性脑梗死。对照组入选标准:(1)同期同年龄段健康体检者;(2)无脑出血及其他严重疾病史。本研究取得重庆市中医院伦理委员会审查和批准,所有受试者均为自愿参与本研究,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 Agilent 公司 7890A 气相色谱和 DB-5MS(30 m×250 μm×0.25 μm)色谱柱,LECO 公司 PEGASUS HT 质谱仪。

1.2.2 血浆代谢物检测 取样本 100 μL 于 1.5 mL EP 管中,加入 300 μL 提取液(甲醇),加入 10 μL L-2-氯苯丙氨酸,涡旋 30 s;超声 10 min(冰水浴);在 4 °C 和 12 000 r/min 下离心样品 15 min;取 300 μL 上清液于 1.5 mL EP 管中,每个样本各取 60 μL 混合成 QC 样本;干燥萃取物于真空浓缩中;取 60 μL 甲氧胺

盐试剂(甲氧胺盐酸盐,溶于吡啶 20 mg/mL)加入干燥后的代谢物中,缓慢搅拌均匀后,置于 80 °C 的烘箱中孵育 30 min;分别取 80 μL 衍生化试剂(BSTFA)[含有 1% 氯三甲基硅烷(TMCS),体积比(V/V)]加入每个样品中,然后将混合物置于 70 °C 的烘箱孵育 1.5 h;冷却至室温,再加入 5 μL FAMES(溶于氯仿)至混合的样本中;实验样本随机上机检测。进样量:1 μL;分流模式:不分流模式;隔垫吹扫流速:3 mL/min;载气:氦气(Helium);色谱柱:DB-5MS(30 μm×250 μm×0.25 μm);柱流速:1 mL/min;柱箱升温程序:50 °C 保持 1 min,升至 310 °C 以 20 °C/min 速度,保持 6 min;前进样口温度:280 °C;传输线温度:280 °C;离子源温度:250 °C;电离电压:-70 eV;质量范围:50~500 m/z;扫描速率:12.5 光谱/秒;溶剂延迟:4.78 min。

1.2.3 数据处理和分析 采用 Chroma TOF 软件(V 4.3x, LECO)对质谱数据进行分析,具体包括:矫正基线、峰提取、解卷积、峰积分、峰对齐等。结合质谱匹配度、保留时间指数匹配,采用 LECO-Fiehn Rtx5 数据库对所得代谢物进行定性鉴定。采用正交偏最小二乘法(OPLS-DA)对各组指标差异进行显著性分析,并使用 Permutation 试验验证 OPLS-DA 模型的有效性。使用偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)第一主成分的变量投影重要度(VIP)值,VIP 值即不同组间代谢物差异的贡献率;差异倍数(FC)为每个代谢物在比较组中所有生物重复定量值的均值的比值;并结合 *t* 检验的 *P* 值找出差异表达的代谢物,以阈值 VIP>1.0,FC>1.2 或 FC<0.833 且 *P*<0.05,筛选出差异表达的代谢物。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。对筛选出的差异代谢物进行 ROC 曲线分析,以评估潜在生物学标志物的预测能力。

2 结果

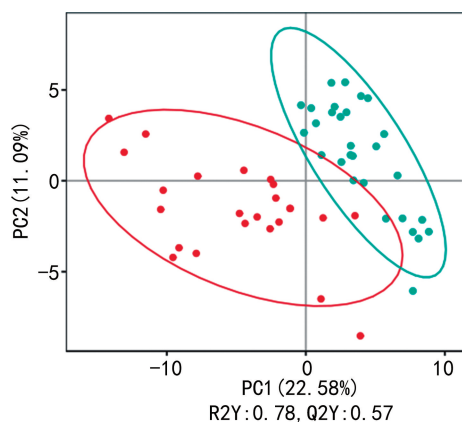
2.1 临床特征 本研究共纳入 54 例患者,脑出血组 24 例,对照组 30 例,其中脑叶出血 4 例,丘脑出血 6 例,基底节出血 11 例,脑干出血 3 例。两组年龄、吸烟、饮酒、高血压及糖尿病史比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。见表 1。

2.2 OPLS-DA 模型 OPLS-DA 回归分析是有监督的判别分析统计方法。采用此分析方法,筛选两组之间存在显著差异的代谢物,得到相应的散点分布图(图 1)。由图可知,脑出血组和对照组可以明显分开

(R2Y=0.78、Q2Y=0.57),说明其预测能力和解释能力较强。Permutation 实验累计的 R2 和 Q2(左下部)显著低于原始的 R2 和 Q2 值(右下部),充分说明 OPLS-DA 模型是稳定的、有效的[截距: R2(0.0, 0.39), Q2(0.0, -0.47)]。见图 2。

表 1 脑出血组和对照组一般资料比较

项目	脑出血组(n=24)	对照组(n=30)	P
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	64.25±15.81	61.00±5.38	0.344
男性[n(%)]	16(66.7)	11(36.7)	0.055
高血压[n(%)]	19(79.2)	17(56.7)	0.146
糖尿病[n(%)]	10(41.7)	9(30.0)	0.372
吸烟[n(%)]	6(25.0)	8(26.7)	0.890
饮酒[n(%)]	8(33.3)	13(43.3)	0.454



注:红色表示脑出血组,蓝色表示对照组。

图 1 OPLS-DA 散点图

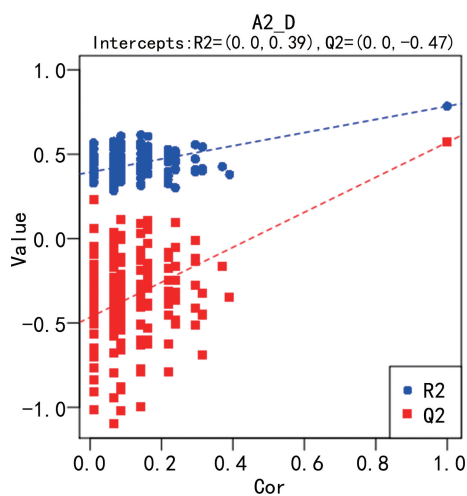


图 2 Permutation 实验

2.3 ROC 曲线结果 本研究共筛选出 24 个差异性标志物,进行 ROC 曲线分析,通过 ROC 曲线下面积(AUC)的大小评价其预测能力,AUC 约接近 1,代表预测脑出血的能力越大,最终筛选出 AUC>0.85 的代谢物有 4 个,分别为 3-羟基丙酸、2-羟基丁酸、7-脱氢胆固醇、柠檬酸。其中 3-羟基丙酸、2-羟基丁酸在

脑出血组中较对照组升高,脱氢胆固醇、柠檬酸较对照组下降。见表 2、图 3。

表 2 筛选出的差异性标志物

项目	AUC	敏感度	特异度	约登指数 最大值
3-羟基丙酸	0.93	87.50	93.10	0.806 0
2-羟基丁酸	0.92	83.33	93.10	0.764 4
7-脱氢胆固醇	0.87	79.17	82.76	0.619 3
柠檬酸	0.87	91.67	79.31	0.709 8
氢化肉桂酸	0.84	83.33	79.31	0.626 4
果糖	0.83	66.67	86.21	0.528 7
异柠檬酸	0.82	79.17	86.21	0.653 7
半乳糖醇	0.80	58.33	93.10	0.514 4
1-甲基海因	0.80	75.00	75.86	0.508 6
小尿苷	0.78	70.83	79.31	0.501 4
麦芽糖	0.78	70.83	89.66	0.604 9
异庚烷酸	0.78	75.00	82.76	0.577 6
半乳糖	0.77	70.83	82.76	0.535 9
葡萄糖	0.77	66.67	93.10	0.597 7
己糖醇	0.77	70.83	89.66	0.604 9
N-乙酰鸟氨酸	0.77	62.50	82.76	0.452 6
葡萄糖	0.77	70.83	86.21	0.570 4
山梨醇	0.76	58.33	82.76	0.410 9
核糖	0.76	87.50	55.17	0.426 7
酪胺	0.70	45.83	93.10	0.389 4
次黄嘌呤	0.70	37.50	100.00	0.375 0
2-脱氧电子酸	0.69	70.83	65.52	0.363 5
1,5-脱水葡萄糖醇	0.68	87.50	48.28	0.357 8
十六烷基甘油	0.68	62.50	68.97	0.314 7

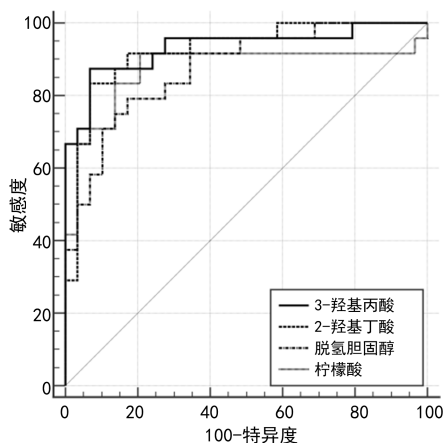


图 3 ROC 曲线

3 讨论

脑出血发病凶险,病情进展快,致死率及致残率高,预后差,可用于早期诊断脑出血的血液学生物标

志物。代谢组学是新近发展起来的一门学科,效仿了基因组学和蛋白质组学的研究思想,可以有效地研究整个生物体的代谢状态,并对低相对分子质量代谢产物进行定性和定量分析^[8]。本研究以 GC-MS 方法,对发病 24 h 内脑出血患者的血液,与对照组进行比较,发现了 24 个差异代谢标志物。进一步 ROC 曲线分析,以 AUC > 0.85 为分界点,本研究筛选了可用于预测脑出血的标志物有 4 个,分别为 3-羟基丙酸、2-羟基丁酸、7-脱氢胆固醇、柠檬酸。

3-羟基丙酸是一种羧酸,其是从肠道分解支链氨基酸和丙酸的中间产物,通常来源于丙酰辅酶 a 和丙酰羧化酶的缺陷。在患有自闭症的儿童尿液样本中 3-羟基丙酸水平更高,经口服万古霉素治疗后精神症状缓解,伴有 3-羟基丙酸水平显著下降^[9]。本研究发现脑出血患者 3-羟基丙酸较对照组升高,说明脑出血导致丙酰辅酶 a 代谢通路障碍。3-羟基丙酸异常增多可对脑细胞产生毒性作用,进而加重脑损伤。

2-羟基丁酸又称为 α -羟基丁酸,是由 α -酮丁酸衍生而来的一种有机酸,2-羟基丁酸是由乳酸脱氢酶或 α -羟基丁酸脱氢酶催化生成 α -酮丁酸生成的副产物。2-羟基丁酸是胰岛素抵抗和葡萄糖调节受损的早期标志,这似乎是由于脂质氧化和氧化应激的增加而引起的^[10]。通常出现在与能量代谢不足有关的情况下,有研究表明,NADH₂/NAD 比值的增加是 2-羟基丁酸生成的最重要因素^[11]。脑出血血肿周围脑组织缺血缺氧、乳酸堆积、线粒体功能障碍,均可能导致 NADH₂/NAD 比值增加,进而引起 2-羟基丁酸水平升高。PU 等^[12]研究发现,2-羟基丁酸水平在抑郁症患者中明显升高,这提示其可能与脑卒中后抑郁发生相关。

7-脱氢胆固醇为胆固醇在体内可被脱氢氧化生成,7-脱氢胆固醇随血运至人皮下组织,随日光中紫外线照射转变为维生素 D₃,调节机体钙磷代谢,以及调节免疫、细胞生长、分化等功能。因此,维生素 D₃ 是 7-脱氢胆固醇的活性形式。维生素 D₃ 是维生素 D 的一种类型,有研究报道,维生素 D 可以降低脑出血发生率及改善脑出血结局,其机制包括抑制活性氧自由基产生,从而减轻血脑屏障损伤,减少促炎性因子水平以抑制炎症反应,以及预防脑血管痉挛及延迟性脑损伤发生^[13]。此外,有研究报道,维生素 D 可促进修复性巨噬细胞分化,进而促进血肿清除及改善神经行为等^[14]。本研究发现,脑出血患者血浆中 7-脱氢胆固醇水平明显降低,可能与脑出血所致胆固醇代谢障碍或为机体保护性机制需消耗更多的维生素 D,以降低脑损伤发生有关。CENIK 等^[15]研究发现,高浓度的 7-脱氢胆固醇是中至重度抑郁症状的预测指标,说明 7-脱氢胆固醇可能参与脑卒中后抑郁的发生。

柠檬酸是三羧酸循环的中间代谢物,柠檬酸是三羧酸循环中第一个产物,它是通过草酰乙酸和乙酰辅酶 A 的乙酰基间缩合反应生成的。已有研究证实脑出血血肿周围组织线粒体功能障碍^[16],从而导致三羧酸循环受阻,使柠檬酸合成减少。本研究发现,脑出血组柠檬酸较对照组明显下降,这与以往研究报道一致。

综上所述,本研究发现,3-羟基丙酸、2-羟基丁酸、7-脱氢胆固醇、柠檬酸这 4 个血浆代谢物对脑出血有较高的预测价值,2-羟基丁酸、7-脱氢胆固醇可能与脑卒中后抑郁的发生有关,但仍需进行更深入的研究,以探讨其在脑出血发生发展过程中的机制,从而更好地指导临床。

参考文献

- [1] YANG G, WANG Y, ZENG Y, et al. Rapid health transition in China, 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013, 381(9882):1987-2015.
- [2] FEIGIN V L, NGUYEN G, CERCY K, et al. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016 [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(25):2429-2437.
- [3] MAYER S A, RINCON F. Treatment of intracerebral haemorrhage [J]. *Lancet Neurol*, 2005, 4(10):662-72.
- [4] ZHANG F, JIA Z, PENG G, 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.
- [5] GU Y, ZHANG Y, SHI X, et al. Effect of traditional Chinese medicine berberine on type 2 diabetes based on comprehensive metabonomics [J]. *Talanta*, 2010, 81(3):766-772.
- [6] LU X, XIONG Z, LI J, et al. Metabonomic study on 'Kidney-Yang Deficiency syndrome' and intervention effects of *Rhizoma Drynariae* extracts in rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2011, 83(3):708.
- [7] JIYE A, QIAN S, WANG G, et al. Chronic myeloid leukemia patients sensitive and resistant to imatinib treatment show different metabolic responses [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13186.
- [8] 董敏健, 李晨, 赵良才, 等. 代谢组学在转化医学

中的应用[J]. 生物产业技术, 2018, 67(5): 93-97.

- [9] SHAW W. Increased urinary excretion of a 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid (HPHPA), an abnormal phenylalanine metabolite of Clostridia spp. in the gastrointestinal tract, in urine samples from patients with autism and schizophrenia [J]. *Nutr Neurosci*, 2010, 13(3): 135-143.
- [10] GALL W E, BEEBE K, LAWTON K A, et al. alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10883.
- [11] LANDAAS S, PETTERSEN J E. Clinical conditions associated with urinary excretion of 2-hydroxybutyric acid [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 1975, 35(3): 259-266.
- [12] PU J, LIU Y, ZHANG H, et al. An integrated meta-analysis of peripheral blood metabolites and biological functions in major depressive disorder [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(8): 4265-

4276.

- [13] ASHOURI R, FANGMAN M, BRIELMAIER J, et al. Nutritional supplementation of naturally occurring vitamin D to improve hemorrhagic stroke outcomes [J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 670245.
- [14] LIU J, LI N, ZHU Z, et al. Vitamin D enhances hematoma clearance and neurologic recovery in intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2022, 6: 101161.
- [15] CENIK B, PALKA J M, THOMPSON B M, et al. Desmosterol and 7-dehydrocholesterol concentrations in post mortem brains of depressed people: The role of trazodone [J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 139.
- [16] KIM-HAN J S, KOPP S J, DUGAN L L, et al. Perihematomal mitochondrial dysfunction after intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2006, 37: 2457-2462.

(收稿日期: 2022-05-23 修回日期: 2022-11-18)

(上接第 724 页)

- [4] 陈滑维, 张圣福, 何海涛. 不同辐照仪对大鼠下颌骨放射性颌骨坏死模型建立的影响 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2021, 39(5): 524-530.
- [5] 李洁, 吴轶群, 陈富民, 等. 基于 RS2000 辐照仪建立大鼠放射性口腔黏膜炎模型的实验研究 [J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2021, 19(6): 500-505.
- [6] 于亚婷, 段斯亮, 马新博, 等. 辐照剂量对肿瘤细胞活性及肿瘤融合细胞疫苗效果的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(4): 527-530.
- [7] 申晓康, 俞成山, 张子民, 等. 新型高剂量 X 射线管研究 [J]. *原子能科学技术*, 2015, 49(4): 755-758.
- [8] MURPHY M K, KAMEN J. Deciding between an X-ray and ¹³⁷Cs irradiator-it's not just about energy spectra [J]. *Rad Res*, 2019, 192(5): 493-506.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 电离辐射防护与辐射源安全基本标准: GB 18871-2002 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 放射工作人员健康要求 GBZ 98-2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

- [11] 侯细荣. 血液辐照仪周围环境辐射水平测量结果分析与建议 [J]. *化学工程与装备*, 2021(5): 252-253.
- [12] ICRP. Recommendations of the international commission on radiological protection [M]. ICRP Publication 26. Oxford: Pergamon Press, 1977: 112-119.
- [13] 倪波, 朱方炜, 孟中华, 等. 血液辐照仪的辐射剂量检测 [J]. *环境与职业医学*, 2013, 16(4): 290-294.
- [14] 王宏芳, 马永忠, 万玲, 等. 血液辐照仪的辐射剂量学研究 [J]. *中国医学装备*, 2015, 12(1): 25-27.
- [15] 郑祖安, 刘飞, 钟伟伟, 等. X 射线生物辐照仪剂量学探讨 [J]. *中国辐射卫生*, 2016, 25(4): 401-405.
- [16] 张巍, 于夕荣. 医疗机构辐射安全文化综合评价的实证研究 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2016, 36(2): 133-138.
- [17] 庄文欣, 刘宗昱, 付文玉, 等. 医学院校实验动物伦理学问题的思考 [J]. *西北医学教育*, 2014, 22(2): 329-332.

(收稿日期: 2022-05-24 修回日期: 2022-10-12)