

· 药学前沿 ·

## 临床代谢组学及其在冠心病诊疗中的研究进展

殷鲲鹏, 郑 好, 谢滨新, 李 萍, 张 蕾, 范 勇, 朱 伟, 齐炼文\*

(中国药科大学临床代谢组学中心, 南京 211198)

**摘 要** 代谢组学是近年来生命科学的热门研究领域, 它通过分析生物样品中的代谢物, 从机体水平上揭示疾病代谢紊乱特征。越来越多的研究证实将代谢组学运用于临床诊疗的可行性, 检测生物体液的“代谢指纹”可以为疾病预防、早期诊断、精准治疗、预后评估和新药发现等提供重要支撑。由此, 临床代谢组学 (clinical metabolomics) 应运而生。临床代谢组学是指结合临床大样本, 采用代谢组学和生物信息学等手段, 从整体上描绘内源性代谢小分子集合在疾病扰动下的稳态失衡及药物干预下的转归机制, 揭示疾病潜在的诊疗生物标志物和可干预靶标的一门学科。本文从临床代谢组学发展历程切入, 简述了其分析技术手段和研究内容, 并以冠心病为例, 总结了临床代谢组学在疾病诊疗中的研究进展。

**关键词** 临床代谢组学; 冠心病; 代谢标志物; 进展

**中图分类号** R363 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)06-0629-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170601

**引用本文** 殷鲲鹏, 郑好, 谢滨新, 等. 临床代谢组学及其在冠心病诊疗中的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6): 629-634.  
**Cite this article as:** YIN Kunpeng, ZHENG Hao, XIE Binxin, et al. Clinical metabolomics in diagnosis and therapy of coronary artery disease[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(6): 629-634.

## Clinical metabolomics in diagnosis and therapy of coronary artery disease

YIN Kunpeng, ZHENG Hao, XIE Binxin, LI Ping, ZHANG Lei, FAN Yong, ZHU Wei, QI Lianwen\*

*Clinical Metabolomics Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China*

**Abstract** Metabolomics, a hot field of research of life science in recent years, is to analyze endogenous small-molecule metabolites in biological samples for an overall understanding of the characteristics of metabolic disorders. A growing number of studies have confirmed the application of metabolomics for clinical diagnosis and treatment of diseases. “Metabolic fingerprint” of biological fluids can be employed for disease prevention, timely diagnosis, accurate treatment, prognostic assessment and drug discovery. Clinical metabolomics is to measure low-molecule-weight metabolites’ alterations of individuals in response to physiological stressors, disease processes, or drug therapy, aiming to discover potential biomarkers and drug targets. Coronary artery disease (CAD) is characterized as complex molecular events. Metabolic disturbances are involved in CAD progression. The application of metabolomics to CAD is an emerging field. Advances in metabolomics improve our knowledge on CAD in early diagnosis, prognostic prediction, and personalized therapy.

**Key words** clinical metabolomics; coronary artery disease; metabolic biomarkers; advances

This study was supported by the Natural Science Foundation of China (No. 91639115)

“上古天真论”作为《黄帝内经》开篇要义, 强调人类生命周期的代谢规律。生命体需要不断地与环境发生能量转换, 进行新陈代谢, 这是生命的基本存在方式。春发陈、夏蕃秀、秋容平、冬闭藏,

可谓体外环境之代谢, “饮食有节、起居有常”以及“法于阴阳、和于术数”意在阐述遵从体内外代谢循环的规律, 才能形与神俱, 而尽终其天年<sup>[1]</sup>。

代谢, 是生物体内化学反应的总称, 主要包括

合成代谢和分解代谢。代谢紊乱是心脑血管疾病、恶性肿瘤等代谢性疾病的共同生理病理特征。而代谢紊乱最直接的表现就是体内代谢物的变化。通常把人体代谢物的检测图谱称作代谢组学特征谱,而人体内代谢物的种类和数量因人而异,因而也将之称作“代谢指纹”。通常,人体内代谢物在一定范围内波动。当波动超过某一范围时,就意味着“代谢指纹”稳态的失衡,这一现象预示着疾病发生风险的增加。

目前代谢组学已被应用于微生物、植物、哺乳动物等的研究<sup>[2-4]</sup>。人体是医学领域所有研究对象中最复杂的,人体内各组成部分和功能网络相互联系、相互影响。利用代谢组学,监测下游“代谢指纹”的变化,逆向追踪上游的调控基因和信号通路,可为疾病的早期诊断和干预提供依据。

临床代谢组学,是指结合临床大样本,采用代谢组学和生物信息学等手段,从整体上描绘内源性代谢小分子集合在疾病扰动下的稳态失衡及药物干预下的转归机制,揭示疾病潜在的诊疗生物标志物和可干预靶标的一门学科。因其具有无创性、高通量、低成本的优势,临床代谢组学已在心脑血管疾病、恶性肿瘤、糖尿病、神经退行性疾病等领域开展了一系列研究<sup>[5-8]</sup>,引起了医药工作者的广泛关注。本文从临床代谢组学发展历程切入,简述了其分析技术手段和研究内容,并以冠心病为例,总结了临床代谢组学在疾病诊疗中的研究进展。

1 临床代谢组学发展史

代谢组学(metabonomics/metabolomics)起源于20世纪末期的欧洲,发展至今仅有二三十年的历史,是组学家族的新成员,系统生物学的重要组成部分<sup>[9]</sup>。

1999年,英国帝国理工大学的Nicholson等<sup>[10]</sup>首次提出“代谢组学”的概念,认为通过高分辨核磁共振技术研究生物体液,可以从整体上绘制其多

维代谢指纹图谱。2002年,Brindle等<sup>[11]</sup>基于核磁共振技术的代谢组学方法分析了66例受试者的血液样本,对冠状动脉狭窄人群与冠脉造影正常人群进行了区分,这一研究表明代谢组学在疾病诊疗方面具有应用潜力。2004年,国际代谢组学协会(Metabolomics Society)成立,其成员来自英国帝国理工大学、瑞典卡洛林斯卡研究院、欧洲分子生物学实验室、美国国家癌症研究所、北卡罗来纳大学教堂山分校等科研机构。2016年,《美国心脏病学会杂志》(JACC)<sup>[12]</sup>报道了冠心病及其不同临床分型的代谢组学特征谱,将代谢变化规律与疾病发生发展过程进行了有机联系,进一步推进了代谢组学的临床转化和应用。

2017年10月,中国首个“临床代谢组学中心”依托中国药科大学成立,该中心是我国第一个官方认可的临床代谢组学机构,“临床代谢组学”正式登上历史舞台。

2 临床代谢组学分析技术

现阶段用于生物样本的分析手段已较为丰富,应用最为广泛的是核磁共振光谱法(NMR)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)等技术<sup>[9]</sup>。

NMR在代谢组学发展初期扮演了重要角色,1983年Nicholson等<sup>[13]</sup>采用核磁共振技术对血浆中的Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>浓度进行定量检测。该技术普适性强,并且由于其无创的特点,是原位检测代谢物的成熟手段<sup>[14]</sup>。随着NMR技术日益成熟,早期仪器灵敏度低等问题也逐渐得到解决,NMR在疾病诊疗方面的应用日渐深入<sup>[15-17]</sup>。

临床代谢组学的研究中,还有较大部分以质谱技术(MS)为研究手段。极高的灵敏度是其优势所在,但增加了图谱解析的难度,因此,目前多采用色谱-质谱联用技术进行临床代谢组学研究,应用最多的是LC-MS和GC-MS<sup>[18-20]</sup>。

表 1 临床代谢组学研究常用分析技术对比

分析技术	优 点	缺 点
NMR	非破坏性检测;唯一可用于活体检测 and 原位检测;可用于未知化合物的结构鉴定,给出分子信息多,样品前处理简单,不需进行衍生化、分离等操作	灵敏度低
GC-MS	灵敏度高,选择性好;气体、液体均可测定;需要样品量少;技术成熟,自动化程度高	破坏性检测;有时需要衍生化处理;不可用于活体检测和原位检测
LC-MS	灵敏度高、分辨率高;应用广泛,可检测代谢物组中绝大部分物质;需要样品量更少;拥有大型数据库;自动化程度高	破坏性检测;不可用于活体检测和原位检测

### 3 临床代谢组学研究内容

临床代谢组学主要围绕代谢物组的“五定”(即定性、定量、定位、定因、定果)展开研究:定性,从生物体液(血液、尿液、唾液、汗液等)上万个代谢产物中发现与疾病发生发展密切相关的代谢标志物;定量,精确测量人群队列中代谢物的含量变化程度;定位,针对从生物体液中发现的代谢标志物,追踪发生病理变化的器官或组织;定因,结合生物学手段,探索引起代谢物变化的上游大分子(核酸、蛋白质)的功能性变化;定果,验证代谢物(或上游生物大分子)变化的致病机制。

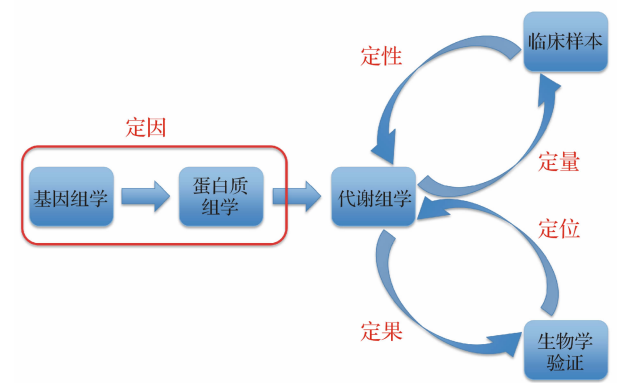


图1 临床代谢组学的研究内容

生物体内有数万个小分子代谢物,常规分析仪器可以检测到其中含量较高的近3千个物质。在临床代谢组学研究中,先通过代谢组学技术检测临床样本,再利用大数据分析方法,筛选出特异性强和灵敏度高的代谢物群作为疾病的潜在诊疗标志物,进一步通过基因组学和蛋白质组学探索引起代谢标志物变化的分子基础,最后通过生物学手段,揭示疾病的发病机制。在整个过程中,以临床样本为基础的代谢组学是研究的纽带,既联系了上游的基因组学、蛋白质组学,又结合了下流的生物学功能研究。

### 4 冠心病的临床代谢组学研究

冠心病已成为威胁人类健康最严重的疾病之一,据世界卫生组织统计<sup>[21]</sup>,仅在2012年,全球约有1750万人死于心血管疾病,占有疾病致死人数的31%,居人类致死性疾病首位。流行病学调查表明,近年来冠心病在我国的发病率和致死率呈上升趋势,预计到2030年,中国每年因心血管疾病

死亡的人数有可能达到770万<sup>[22]</sup>。

心血管事件常在临床诊断之前或无特殊症状的情况下突然发生,这是造成该疾病高致残率和高致死率的重要原因,因此,早期干预是降低冠心病发生的重要策略。此外,冠心病机制复杂,仅动脉粥样硬化的形成机制就包含脂质浸润学说、平滑肌细胞克隆学说、血栓形成学说等<sup>[23-25]</sup>,其中涉及近百个基因和20余条调控通路<sup>[26]</sup>。因此,运用临床代谢组学手段深入挖掘冠心病的动态调控网络,探索关键信号通路基础,寻找分子标志和干预靶点,建立冠心病的早期诊疗方法,对于降低冠心病的发生率和病死率具有重要意义。

2002年,Brindle等<sup>[11]</sup>发现了一种利用<sup>1</sup>H NMR鉴别冠心病及其严重程度的诊断技术,该技术与传统的冠脉造影相比具有快捷、成本低等优势,且专一性与灵敏度均较高(>90%)。尽管后来证实该结果会受药物服用影响,但Barba等<sup>[27]</sup>的研究成果仍表明<sup>1</sup>H NMR研究冠心病代谢具有可行性。

2005年,Sabatine等<sup>[28]</sup>通过对比运动前后代谢物含量的变化,发现心肌缺血的受试者在运动后尿酸、柠檬酸、 $\gamma$ -氨基丁酸等与对照组比较,产生了显著的变化。2009年,Metabolon公司展示UHPLC/MS/MS<sup>2</sup>高通量技术可在短时间内完成血液中339个小分子代谢物的定量分析<sup>[29]</sup>。2013年以来,高场傅里叶变换离子回旋加速度共振质谱仪(FT-ICR/MS)串联UHPLC已被逐步应用于临床代谢组学<sup>[30]</sup>。质谱分析在冠心病的临床应用逐渐走向成熟。

冠心病的发生和发展会引起三羧酸循环(TCA)及其上游成分的变化<sup>[31]</sup>。有研究发现,心肌缺血患者血浆中TCA循环的部分代谢物的减少与心肌缺血诱导的氧化代谢减弱一致<sup>[28]</sup>。李佳等<sup>[32]</sup>发现冠心病病人血液中琥珀酸水平异常升高,缺血/缺氧能引起心肌细胞内、外琥珀酸堆积,细胞内堆积的琥珀酸以HIF-1 $\alpha$ 依赖性途径抑制丙酮酸脱氢酶(PDH)活性;细胞外堆积的琥珀酸激活其特异性受体GPR91,促进下游PKC $\delta$ 活化并转移至线粒体,损伤PDH活力。琥珀酸介导的葡萄糖氧化受阻加重了心肌细胞缺血再灌注损伤。人参皂苷可以减少琥珀酸堆积,抑制细胞内琥珀酸/HIF-1 $\alpha$ 的活化及细胞外GPR91/PKC $\delta$ 信号通路,恢复PDH活力,改善心肌细胞缺血再灌注损伤。

冠心病患者体内的葡萄糖代谢也有所变化<sup>[27]</sup>。心肌缺血时,葡萄糖的有氧代谢下降,而无氧糖酵解相应地上升<sup>[33]</sup>。在对 36 例接受酒精间隔消融治疗的肥厚性梗阻性心肌病患者的代谢组学研究中,发现患者的乳酸水平明显增加,反映了心肌内糖代谢的变化<sup>[31]</sup>。

冠心病还会影响人体内氨基酸的水平。正常心脏以氨基酸作为 ATP 来源的依赖性较小<sup>[34]</sup>,但在心肌缺血期间,氨基酸可作为重要的能量来源。比如,在缺氧条件下可以由谷氨酸和谷酰胺经底物水平磷酸化生成三磷酸鸟苷<sup>[35]</sup>。Yang 等<sup>[36]</sup>对 472 位受试者的血清进行分析,证实支链氨基酸(BACCs)与颈动脉内膜中层的增厚独立相关,这有可能成为预测冠心病风险的标志之一。Yang 等<sup>[37]</sup>继续比较了 143 例冠心病患者与 286 例正常人之间的 BCAAs 含量,发现 BCAAs 浓度每上升一个标准偏差都会造成罹患冠心病风险增加约两倍。Bernini 等<sup>[38]</sup>在对 864 个正常志愿者的血浆研究中发现较低浓度的苏氨酸、肌氨酸酐意味着罹患冠心病的风险更低。

现今对冠心病的早期诊断主要依赖典型症状再结合心电图、正电子发射计算机断层扫描技术(PET)、冠状动脉造影等手段发现心肌缺血或冠脉阻塞的证据。心电图经济便捷但缺乏特异性,对隐匿型冠心病识别差;PET 是目前临床较为先进的技术,对疾病的早期诊断具有高灵敏度和高特异性,但成本高,不易推广;冠脉造影是目前冠心病诊断的“金标准”,可以明确冠状动脉狭窄的部位、程度和范围等,然而,冠脉造影因其有创性,病人依从性不高,难以用于大规模人群的早期诊断和安全预警<sup>[39]</sup>。研究表明,冠心病患者伴有心肌代谢紊乱,因此通过临床代谢组学研究确定冠心病的生物标志物具有广阔前景。目前,世界上对氧化三甲胺(TMAO)的研究较多,其被认为是预测早期冠心病和动脉粥样硬化的重要标志物<sup>[40–41]</sup>。卵磷脂、胆碱和肉碱通过宿主肠道微生物生成三甲胺(TMA),随后 TMA 释放到体液循环中被肝脏氧化成 TMAO。而 TMAO 可能通过干扰胆固醇的逆向转运,促进动脉粥样硬化的进程,增加心血管事件的风险。因此,肠道微生物被认为是调节这一过程的关键因素<sup>[42]</sup>。3,3-二甲基-1-丁醇通过干扰肠道微生物中 TMA 的生成,降低体液循环中 TMAO 的

浓度,可以有效预防动脉粥样硬化病变的发生<sup>[43]</sup>。

随着计算机技术的发展,利用大数据手段分析临床样本引起了越来越多的关注。运用大数据方法处理临床代谢组学分析结果,筛选出最具特征的生物标志物将会是未来研究冠心病的重要突破口。2013 年,Suhre 等<sup>[44]</sup>对 2 820 个受试者的血清进行了超高效液相-多级质谱分析,最后获得了 60 个生化途径中的 295 个代谢物和 37 个相关的基因轨迹,该报道对研究心血管疾病、肾脏疾病、糖尿病、肿瘤等提供了新的视角。随后,范勇等<sup>[12]</sup>基于我国多中心的 2 324 个临床样本(均经冠脉造影验证),采用高通量、高覆盖代谢组学和生物信息学等检查手段,首次绘制了冠心病及其不同临床分型的血浆代谢组学特征谱。该研究从近 2 000 个代谢物中发现、鉴定了与冠心病发生发展表型特征密切相关的代谢差异物 129 个,其中新型代谢物 20 个,代谢通路紊乱特征主要包括磷脂代谢降低、多不饱和游离脂肪酸升高、氨基酸(二甲基化和乙酰化)代谢升高、肉碱代谢降低、胆汁酸代谢减弱等,从代谢物库中筛选出 12 组灵敏度高(>90%)、专属性强(90%)的代谢标志物组,用于临床冠心病的快速诊断及不同亚型的区分诊断,其内部诊断准确率高(AUC > 0.95),外部双盲预测准确率大于 90%,多中心预测准确率大于 90%;发现并初步验证了花生四烯酸、溶血磷脂酰胆碱、柠檬酸、苯丙氨酸、BH<sub>4</sub>、乙酰肉毒碱失调的机制和生物学功能。大数据筛选临床生物标志物将成为可能。

## 5 展 望

临床代谢组学研究方兴未艾,人群队列在中国还处在发展阶段,结合队列开展临床代谢组学研究具有广阔的发展空间。未来,临床代谢组学将以临床样本为基石、以组学分析为工具、以药物干预为核心、以生物功能为导向,目标是建立中国人群的代谢组学特征谱和数据库,提高对重大疾病的预警能力和诊疗水平。医药学工作者还能以临床代谢组学为工具,深入探索代谢紊乱的生理病理过程和基本规律,发现疾病诊疗和可干预靶标,设计和研发创新药物,为疾病预防、早期诊断、精准治疗、预后评估和新药发现等提供重要支撑。

临床代谢组学在临床领域的影响逐步扩大,今后还需要多学科的努力。临床代谢组学方法

需要更加简化,质谱等组学仪器需要更加普及。同时,临床代谢组学研究者需要与临床医生、药物化学家、药理学家开展更加紧密的合作<sup>[45]</sup>,共同推动药物的开发和临床试验。最重要的是,已发现的生物标志物与疾病的关联需要逐步阐明。“合抱之木,生于毫末,九层之台,起于累土。”从1999年7月Nicholson等<sup>[10]</sup>的第1篇代谢组学研究论文到2017年10月中国药科大学成立中国首个临床代谢组学中心,仅仅过去了18年。尽管这门学科目前面临着许多亟待解决的难题,但鉴于临床代谢组学领域已经获得的成果,可以预见这门学科的发展迈向成熟并不会太远。

### 参考文献

- [1] Zhao JX, Tian YX. *Huang Di Nei Jing* (黄帝内经) [M]. Beijing: Jinghua Press, 2013: 314–320.
- [2] Ząbek A, Junka A, Szymczyk P, et al. Metabolomics analysis of fungal biofilm development and of arachidonic acid-based quorum sensing mechanism [J]. *J Basic Microb*, 2017, **57** (5): 428–439.
- [3] Lee YJ, Perdian DC, Song Z, et al. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants [J]. *Plant J*, 2012, **70** (1): 81–85.
- [4] Hong JH, Lee WC, Hsu YM, et al. Characterization of the biochemical effects of naphthalene on the mouse respiratory system using NMR-based metabolomics [J]. *J Appl Toxicol*, 2015, **34** (12): 1379–1388.
- [5] Heather LC, Wang X, West JA, et al. A practical guide to metabolomic profiling as a discovery tool for human heart disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, **55** (2): 2–11.
- [6] Kobayashi T, Nishiumi S, Ikeda A, et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer [J]. *Cancer Epidem Biomar*, 2013, **22** (4): 571–579.
- [7] Floegel A, Stefan N, Yu Z, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach [J]. *Diabetes*, 2013, **62** (2): 639–648.
- [8] Paglia G, Stocchero M, Cacciatore S, et al. An unbiased metabolomic investigation of the Alzheimer's disease brain points to a dysregulation of the mitochondrial aspartate metabolism [J]. *J Proteome Res*, 2015, **15** (2): 1334–1341.
- [9] Tang H, Wang Y. Metabonomics; a revolution in progress [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33** (5): 401–417.
- [10] 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 [J]. *Xenobiotica*, 1999, **29** (11): 1181–1189.
- [11] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics [J]. *Nat Med*, 2002, **8** (12): 1439–1444.
- [12] Fan Y, Li Y, Chen Y, et al. Comprehensive metabolomic characterization of coronary artery diseases [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, **68** (12): 1281–1293.
- [13] Nicholson JK, Buckingham MJ, Sadler PJ. High resolution 1H n. m. r. studies of vertebrate blood and plasma [J]. *Biochem J*, 1983, **211** (3): 605–615.
- [14] Qiu QQ, Yan M, Li C. Advances in analytic technology of metabolomics [J]. *J Diagn Concepts Pract* (诊断学理论与实践), 2011, **10** (1): 82–85.
- [15] Bathen TF, Sitter B, Sjøbakk TE, et al. Magnetic resonance metabolomics of intact tissue: a biotechnological tool in cancer diagnostics and treatment evaluation [J]. *Cancer Res*, 2010, **70** (17): 6692–6696.
- [16] Bernini P, Bertini I, Luchinat C, et al. The cardiovascular risk of healthy individuals studied by NMR metabolomics of plasma samples [J]. *J Proteome Res*, 2011, **10** (11): 4983–4992.
- [17] Soininen P, Kangas AJ, Würtz P, et al. Quantitative serum nuclear magnetic resonance metabolomics in cardiovascular epidemiology and genetics [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2015, **8** (1): 192–206.
- [18] Wang J, Yuan ZM, Kong HW, et al. Exploring the mechanism of Rhizoma coptidis in treating type II diabetes mellitus based on metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2012, **30** (1): 8–13.
- [19] Tachibana C. What's next in 'omics: the metabolome [J]. *Science*, 2014, **345** (6203): 1519–1521.
- [20] Yong F, Xin Z, Xia TS, et al. Human plasma metabolomics for identifying differential metabolites and predicting molecular subtypes of breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, **7** (9): 9925–9938.
- [21] World Health Organization. Cardiovascular disease (CVDs) [EB/OL]. (2017-05-01) [2017-11-13]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en>.
- [22] Moran A, Gu D, Zhao D, et al. Future cardiovascular disease in China Markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-China [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2010, **3** (3): 243–252.
- [23] Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, et al. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice [J]. *Circulation*, 2003, **107** (12): 1640–1646.
- [24] Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi [J]. *Brit Heart J*, 1983, **50** (2): 127–134.
- [25] Schwartz SM. Perspectives series: cell adhesion in vascular biolo-

- gy. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis [J]. *J Clin Invest*, 1997, **99**(12):2814–2817.
- [26] Jiang P. The Study on Metabolomics and pharmacokinetics of Shexiang Baoxin Pill(麝香保心丸代谢组学和代谢动力学研究) [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2012.
- [27] Barba I, León GD, Martín E, *et al.* Nuclear magnetic resonance-based metabolomics predicts exercise-induced ischemia in patients with suspected coronary artery disease[J]. *Magnet Reson Med*, 2008, **60**(1):27–32.
- [28] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, *et al.* Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2005, **112**(25):3868–3875.
- [29] Evans AM, Dehaven CD, Barrett T, *et al.* Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems[J]. *Anal Chem*, 2009, **81**(16):6656–6667.
- [30] Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling[J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1292**(5):51–65.
- [31] Lewis GD, Wei R, Liu E, *et al.* Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury [J]. *J Clin Invest*, 2008, **118**(10):3503–3512.
- [32] Li J, Yang YL, Li LZ, *et al.* Succinate accumulation impairs cardiac pyruvate dehydrogenase activity through GRP91-dependent and independent signaling pathways; therapeutic effects of ginsenoside Rb1 [J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2017, **1863**(11):2835–2847.
- [33] Vary TC, Reibel DK, Neely JR. Control of energy metabolism of heart muscle[J]. *Annu Rev Physiol*, 1981, **43**(5):419–430.
- [34] Young LH, McNulty PH, Morgan C, *et al.* Myocardial protein turnover in patients with coronary artery disease. Effect of branched chain amino acid infusion[J]. *J Clin Invest*, 1991, **87**(2):554–560.
- [35] Drake KJ, Sidorov VY, McGuinness OP, *et al.* Amino acids as metabolic substrates during cardiac ischemia[J]. *Exp Biol Med*, 2012, **237**(12):1369–1378.
- [36] Yang R, Dong J, Zhao H, *et al.* Association of branched-chain amino acids with carotid intima-media thickness and coronary artery disease risk factors[J]. *PLoS ONE*, 2014, **9**(6):e99598.
- [37] Yang R, Wang S, Sun L, *et al.* Association of branched-chain amino acids with coronary artery disease: a matched-pair case-control study [J]. *Nutr Metab Cardiovas*, 2015, **25**(10):937–942.
- [38] Bernini P, Bertini I, Luchinat C, *et al.* The cardiovascular risk of healthy individuals studied by NMR metabolomics of plasma samples[J]. *J Proteome Res*, 2011, **10**(11):4983–4992.
- [39] Patel MR, Peterson ED, Dai D, *et al.* Low diagnostic yield of elective coronary angiography[J]. *New Engl J Med*, 2010, **362**(10):886–895.
- [40] Wang Z, Elizabeth K, Bennett BJ, *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, **472**(7341):57–63.
- [41] Erdmann CC. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk [J]. *New Engl J Med*, 2013, **368**(17):1575–1584.
- [42] Tang WH, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease[J]. *J Clin Invest*, 2014, **124**(10):4204–4211.
- [43] Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, *et al.* Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis[J]. *Cell*, 2015, **163**(7):1585–1595.
- [44] Suhre K, Shin SY, Petersen AK, *et al.* Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research [J]. *Nature*, 2011, **477**(7362):54–60.
- [45] Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, **15**(7):473–484.