

# Metabonomics Analysis of Myocardial Injury Induced by Selenium Deficiency in Chicken

Wei Liu<sup>1,2</sup>, Haidong Yao<sup>1</sup>, Wenchao Zhao<sup>1</sup>, Meng Sun<sup>2</sup>, Shiwen Xu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin Heilongjiang

<sup>2</sup>The Key Laboratory of Myocardial Ischemia, Ministry of Education, Harbin Medical University, Harbin Heilongjiang

Email: \*shiwenzu@neau.edu.cn

Received: Apr. 28<sup>th</sup>, 2017; accepted: May 12<sup>th</sup>, 2017; published: May 22<sup>nd</sup>, 2017

## Abstract

**Research purposes:** Study on the changes of myocardial injury induced by selenium deficiency in chicken. **Methods:** 1-day old chicks with low selenium feed were chosen to build the chicken selenium deficient myocardial injury model. Plasma metabonomics analysis was applied to detect the differential metabolites. **Results:** There were 16 differential metabolites in selenium deficient plasma in positive and negative ion state. Among them, the abundance of choline, phosphatidyl glycerol and leucine were up-regulated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Abnormal metabolism of glycerol and phospholipids, leucine, steroids and other biochemical substances were found in selenium deficiency group. These potential biomarkers are associated with inflammation, apoptosis, and platelet aggregation. It can provide new information for understanding the metabolic mechanism of selenium deficiency in chicken.

## Keywords

Chicken Myocardial Cell, Selenium Deficiency, Metabonomics

## 鸡缺硒心肌损伤代谢组学分析

刘 伟<sup>1,2</sup>, 姚海东<sup>1</sup>, 赵文超<sup>1</sup>, 孙 萌<sup>2</sup>, 徐世文<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>东北农业大学动物医学学院内科教研室, 黑龙江 哈尔滨

<sup>2</sup>哈尔滨医科大学附属第二医院心肌缺血教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨

Email: \*shiwenzu@neau.edu.cn

收稿日期: 2017年4月28日; 录用日期: 2017年5月12日; 发布日期: 2017年5月22日

## 摘 要

**目的:** 探讨缺硒致鸡心肌损伤的代谢组学变化。**方法:** 选用1日龄雏鸡, 采用低硒饲料喂养建立鸡缺硒  
\*通讯作者。

心肌损伤模型；通过血浆代谢组学方法检测差异代谢物质。结果：发现正负离子状态下，缺硒组血浆均有显著差异代谢物质，共计16种。其中显著上调表达的有胆碱、磷脂酰甘油、和亮氨酸( $P < 0.01$ )。结论：在缺硒组中观察到甘油、磷脂、亮氨酸、类固醇等生物物质的异常代谢。这些潜在的生物标志物与炎症、凋亡、和血小板聚集有关。可初步为深入理解鸡缺硒心肌损伤代谢机制提供新的信息。

## 关键词

鸡心肌细胞, 缺硒, 代谢组

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

硒(Selenium, Se)是人和动物必需微量元素, 在禽类的生长发育、繁殖、免疫功能及抵抗疾病等方面发挥着重要生物学功能[1] [2] [3]。缺硒可以引起动物的出生率下降、健康受损、以及基于心肌退行性病变导致的出生病死率的提高。缺硒引发 GSH-Px 活性下降, 过氧化物堆积, 从而直接损伤细胞膜, 尤其是线粒体膜。缺硒导致红细胞脆性增加表现出贫血以及内皮细胞膜受损出现肿胀等。研究发现, 硒与心血管系统的结构、功能及其疾病的发生关系密切[4]。已知缺硒与克山病、动脉粥样硬化、冠心病等疾病的发生发展有明显相关性。因此, 本文通过代谢组学技术分析讨论缺硒对雏鸡发育过程中心肌组织损伤前后的代谢物的变化, 这些结果将对揭示在缺硒状态下鸡心肌发育损伤中的生物学功能及缺硒鸡心肌组织病变的可能机制具有重要意义。

## 2. 材料方法

### 2.1. 实验动物

取 1 日龄雏鸡, 雌雄各半(购于哈尔滨市先锋孵化场), 随机分为 2 组。缺硒组标记为 L-Se 组, 饲喂来自于黑龙江省严重缺硒地区龙江县的缺硒日粮(日粮总含硒量为 33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); 硒正常组标记为 C-Se 组, 饲喂全价日粮, 将缺硒组日粮添加  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 使日粮总含硒量为 0.15  $\text{mg}/\text{kg}$ ; 各组雏鸡常规喂养, 自由采食和饮水, 饲喂 35 天。

### 2.2. 血浆样本的采集

正常组和缺硒组各取 6 只雏鸡, 禁食过夜, 次日清晨颈静脉采血 5 mL, 转移至含抗凝剂(EDTA-K3)的采血管中, 3000 rpm 室温离心 10 min, 保留上清液并分装, 每份 250  $\mu\text{L}$ , 共 8 份, 于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

### 2.3. 血浆样品预处理

血浆样品分析前, 需对其进行预处理, 步骤如下[5]: (1) 取一份冻存血浆于冰上解冻, 待完全解冻后, 涡旋 30 s; (2) 取 200  $\mu\text{L}$  血浆于 2 ml 离心管中, 加入 5 倍体积的有机溶剂(甲醇), 涡旋振荡 2 min 后静置, 14000 rpm 离心 10 min, 以除去蛋白质; (3) 取上清液于 2 mL 离心管中,  $37^\circ\text{C}$ 下氮气吹干; (4) 向吹干的离心管内加入乙腈/水溶液(3:1, v/v)重新定容, 涡旋振荡 1 min 后静置; (5) 将液体全部注入进样

瓶, 用于 RRLC-QTOF/MS 检测。

## 2.4. 血浆 RRLC-QTOF/MS 检测

使用 RRLC (Reversed phase liquid chromatography)液相自动进样系统(Agilent 公司), 自动上样 10  $\mu$ L, 分析柱为 3.0  $\times$  100 mm (1.8  $\mu$ m) ZORBAX SB-C18 色谱柱(Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 柱温设为 40 $^{\circ}$ C。色谱流动相采用含 0.1% 甲酸的水溶液(A)和乙腈溶液(B)。洗脱梯度条件为 5%~95% 的乙腈溶液, 分析时间为 38 min。样品检测温度为 4 $^{\circ}$ C。

质谱检测使用 Agilent 四级杆时间飞行色谱仪 Q-TOF(Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 并采用电喷雾离子源的正离子模式(ESI+)和负离子模式(ESI-)。通过对影响样品离子化较大的参数脱溶剂气温度和流速、毛细管电压、fragment 等优化, 最终确定出本次实验样品离子化的最佳条件为: 脱溶剂气温, 350 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气流量, 10 L/h; 毛细管电压在正离子和负离子模式下分别设定为 4.0 kV 和 3.5 kV。图谱数据采集的质荷比范围为 50~1000 m/z, 采集扫描频率为 0.5 s。

## 2.5. 样品数据采集的质控

本研究设立空白样品(blanks)和质量控制样品(quality control samples, QC) [5], 并且进样时采取正常组和缺硒组样品合并质量控制样品(QC)交叉、随机进样。同时采用 PCA 方法分析血浆质控样品数据, 观察血浆质控样是否出现集中趋势, 以此验证本研究采用 RRLC-QTOF/MS 检测样品数据的可靠性。

## 2.6. 数据预处理

使用 Agilent 公司的定性软件将结果转化为 mzdata 文件, 生成的数据文件导入 R 软件包, 使用 XCMS [6] [7] [8] [9] [10] 和 CAMERA [11] [12] 进行数据预处理, 其中, XCMS 预处理的相关参数(如峰半峰宽、保留时间窗等)采用默认值[13], 并对样本数据进行归一化(normalized)和标准化(standardization)处理[14]。

## 2.7. 数据分析和模式识别

采用 SIMCA-p 11.5 (Umetrics AB, Umea, Sweden)软件进行 PCA [15]和 PLS-DA 统计分析[16]。并采用 PLS-DA 模型置换检验验证建立的 PLS-DA 模型是否稳健有效, 判定标准为: 所有置换后的 R2 和 Q2 值均低于原始的 R2 和 Q2 值。借助于 PLS-DA 建模的 VIP 值和单变量的假设检验(the Welch's t test)的 P 值得到生物标志物。生物标志物筛选标准为: VIP > 1.2 并且 P 值小于 0.05。

## 2.8. 物标志物解析

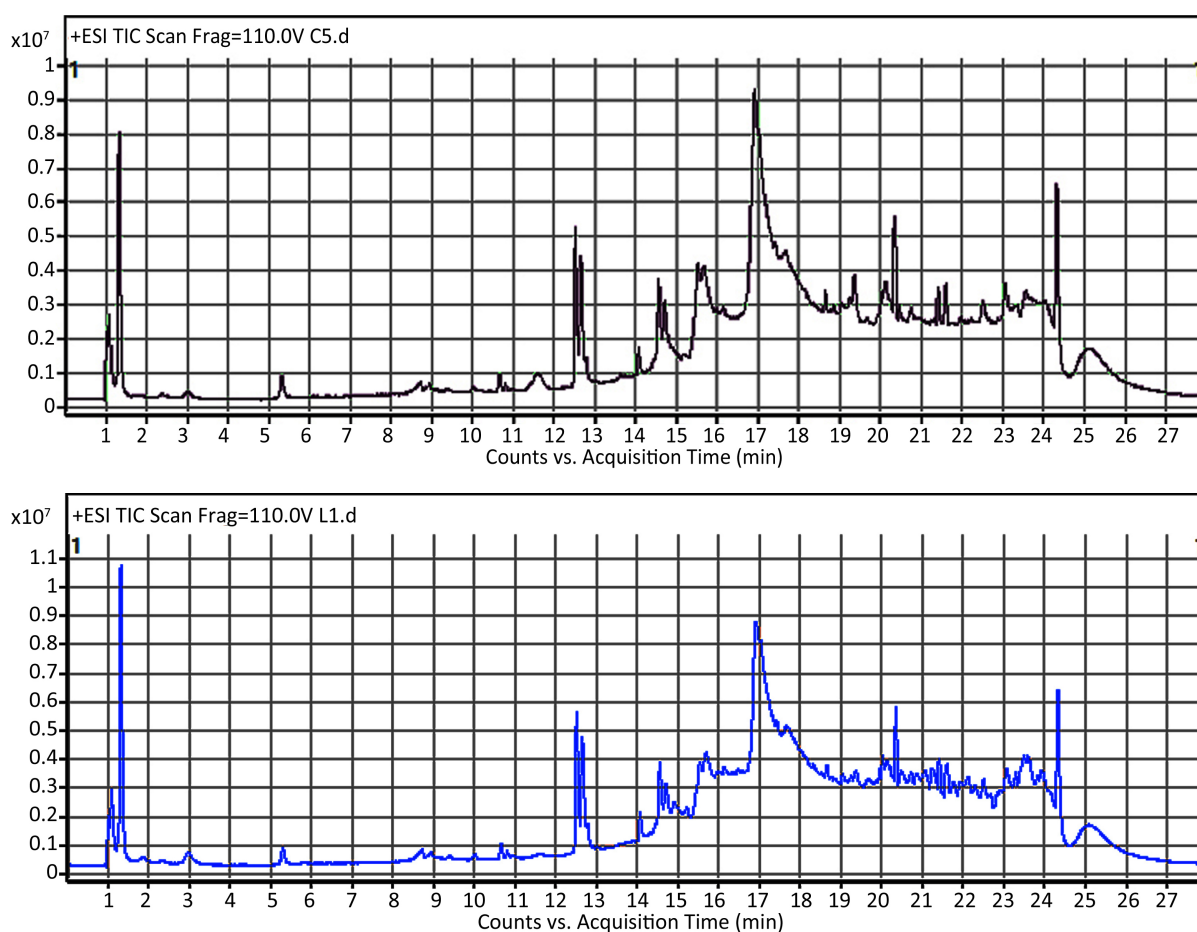
以保留时间和质荷比作为基本定性信息, 并根据 CAMERA 的化学标识信息排除了相同代谢物的同位素、碎片离子和加合物。然后根据保留时间、一级质谱及二级质谱获得的碎片离子信息确定代谢物的分子量和分子式; 检索人类代谢组学数据库(HMDB)、Chemspider 或 Metlin 等数据库得到具有相同质荷比物质的结构信息; 再利用碎片识别软件将数据库中得到的化合物结构信息同该生物标志物的二级离子碎片信息进行匹配。针对找到生物标志物为切入点, 检索国内外相关代谢组学数据库或有关的文献, 逆向探索该生物标志物的代谢途径或生物学意义。

# 3. 结果

## 3.1. RRLC-QTOF/MS 正离子模式下的血浆分析结果

### 3.1.1. 正常组和缺硒组的典型 RRLC-QTOF/MS 图谱

图 1 为正常组和缺硒组的血浆总离子流图。其中, 上面代表的是正常组的色谱图, 下面的图谱属于



**Figure 1.** Typical RRLC-QTOF/MS chromatograms of plasma samples for normal and Se deficiency acquired in positive mode

**图 1.** 正常和缺硒 35d 血浆正离子模式下的 RRLC-QTOF/MS 图谱

缺硒组，图谱中包括成千个血浆中的代谢物质。由图可见，二者的总离子流图中的谱峰大体上是一致的，我们无法直接从谱图上观察出两组的差异，说明两组间的差异可能是复杂、微弱的改变，因此需要采用统计分析和模式识别方法进一步挖掘出组间的差别和其中潜在的生物标志物。

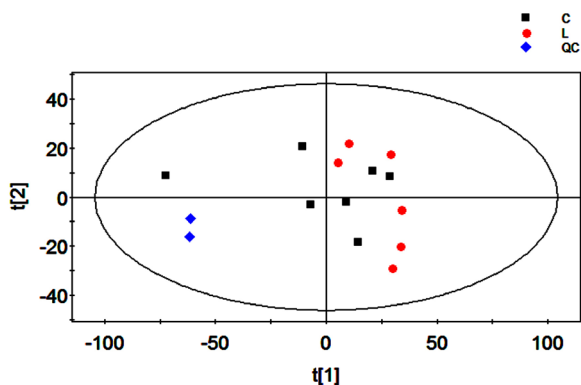
### 3.1.2. 正常组和缺硒组的代谢组模式识别分析结果

经 XCMS 软件对图谱进行预处理，结果显示(见图 2)，从 PCA 得分图可以看到，QC 样品聚集在一起，说明代谢组学检测平台的稳定性和可靠性；同时，整体上没有观测到异常离群样本，C 组与 L 组之间也具有一定的分离趋势。

从 PLS-DA 得分图可以看出，预筛选的离子峰变量都能将 C 组和 L 组明显分离开(图 3(a))。PLS-DA 模型置换检验验证图也显示，所建立的 PLS-DA 模型是稳健有效的(图 3(b))。

### 3.1.3. 差异代谢物的筛选和物质鉴定

为了在近千个代谢物中寻找到区分两者的差异物质，基于所建立的 PLS-DA 模型并根据 CAMERA 分析得到的同位素、加合物和碎片离子信息，在排除上述离子后，最终共筛选出差异变量 9 个，详见表 1。我们进一步对这些差异代谢物做化学结构鉴定和生物功能解析，以此来确定潜在的生物标志物。

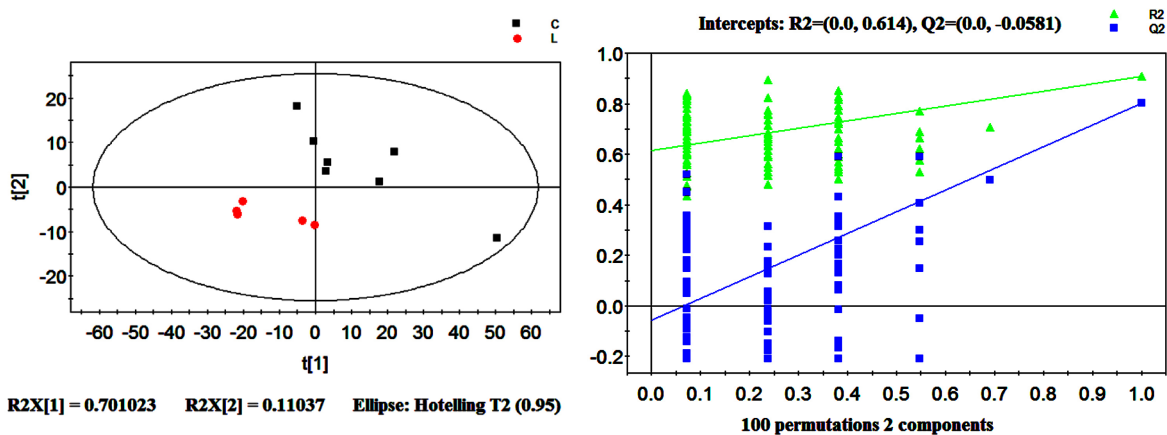


R2X[1] = 0.482016 R2X[2] = 0.0944517 Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

SIMCAP 11.5 - 2015-12-25 16:50:03

Figure 2. PCA scores plot for the top two components discriminates L (SeD group) from C(Control group) based on the data from positive mode

图 2. 正离子模式下的血浆代谢组 PCA 得分图



R2X[1] = 0.701023 R2X[2] = 0.11037 Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

SIMCAP 11.5 - 2015-12-24 21:28:31

(a)

(b)

SIMCAP 11.5 - 2015-12-25 17:28:21

Figure 3. (a) PLS-DA scores plot for C (■) from L (●) based on the data from positive mode; (B) Validation plot obtained from 100 permutation tests based on the data from positive mode

图 3. (a) PLS-DA 模型得分图, 正常组(■)缺硒组(●); (b)100 次随机置换的验证图

Table 1. Nine biochemical properties of a potential biomarker

表 1. 9 个潜在生物标志物的生物化学特性

ID	代谢物	m/z	RT(min)	FC <sup>a</sup>	ppm	P	VIP	代谢通路
Positive-ion electrospray ionization mode (ESI+)								
1	Decenedioic acid	201.1102	8.94	0.96	9.45	3.13E-03	2.12	Fatty acid oxidation
2	LysoPC(15:0) <sup>b</sup>	504.3028	17.98	-0.64	6.54	3.86E-02	1.89	Glycerophospholipid metabolism
3	Choline	104.1063	15.69	-0.66	6.72	2.81E-02	1.54	Glycerophospholipid metabolism
4	LysoPE(0:0/22:6)	526.2912	14.70	-0.89	3.04	4.37E-02	1.37	Lysophospholipid metabolism
5	Retinol <sup>c</sup>	269.2247	20.35	-1.03	8.17	1.87E-02	1.37	Retinol metabolism
6	GlutaminyL-Leucine	260.1582	14.18	1.25	8.84	4.93E-04	1.97	Protein catabolism
7	Isoprene	69.0697	25.83	0.12	2.90	1.26E-03	1.60	Terpenoid backbone biosynthesis
8	Tylophorine	343.1884	24.31	0.26	5.83	1.70E-03	1.41	Others
9	S-Prenyl-L-cysteine	187.0660	1.21	-0.42	1.07	3.27E-02	1.02	Others

## 3.2. RRLC-QTOF/MS 负离子模式下的血浆分析结果

### 3.2.1. 正常组和缺硒组的典型 RRLC-QTOF/MS 图谱

图 4 为负离子模式下检测到的正常组和缺硒组典型的血浆总离子流图，图谱中包括了近千个代谢物质。如图所示，二者的总离子色谱图中的谱峰大体上是一致的，无法从图谱上直观地察看出组间的差别，因此需要采用统计分析方法进一步寻找组间的差别以及其中潜在的生物标志物。

### 3.2.2. 正常组和缺硒组的代谢组模式识别分析结果

采用 XCMS 软件对负离子模式获得的数据预处理后共得到 316 个代谢物，将各血浆样品投射到 PCA 模型的前两个主成分构建的得分图中可知(见图 5)，PCA 分析方法无法正确显示两组样本的分类情况，组间具有较大的重叠部分。

采用 PLS-DA 模型的前三个主成分构建得分图，如图 6(a)，结果显示，正常组和缺硒组间存在着明显的差异，两组间无交叉和重叠，表明两组动物体内的代谢模式明显不同。

经过 100 次建模得到的 PLS-DA 模型验证图。图 6(b)显示，经 100 次置换获得的  $Q^2_{cum}$  在 0 以下，表明本研究构建的 PLS-DA 模型较为稳健，没有过拟合危险，经过此 PLS-DA 模型分析得到的结果可靠。

### 3.2.3. 差异代谢物的筛选和物质鉴定

差异代谢物的筛选是代谢组学研究中最重要的一步。本研究利用 PLS-DA 模型算得的 VIP 值结

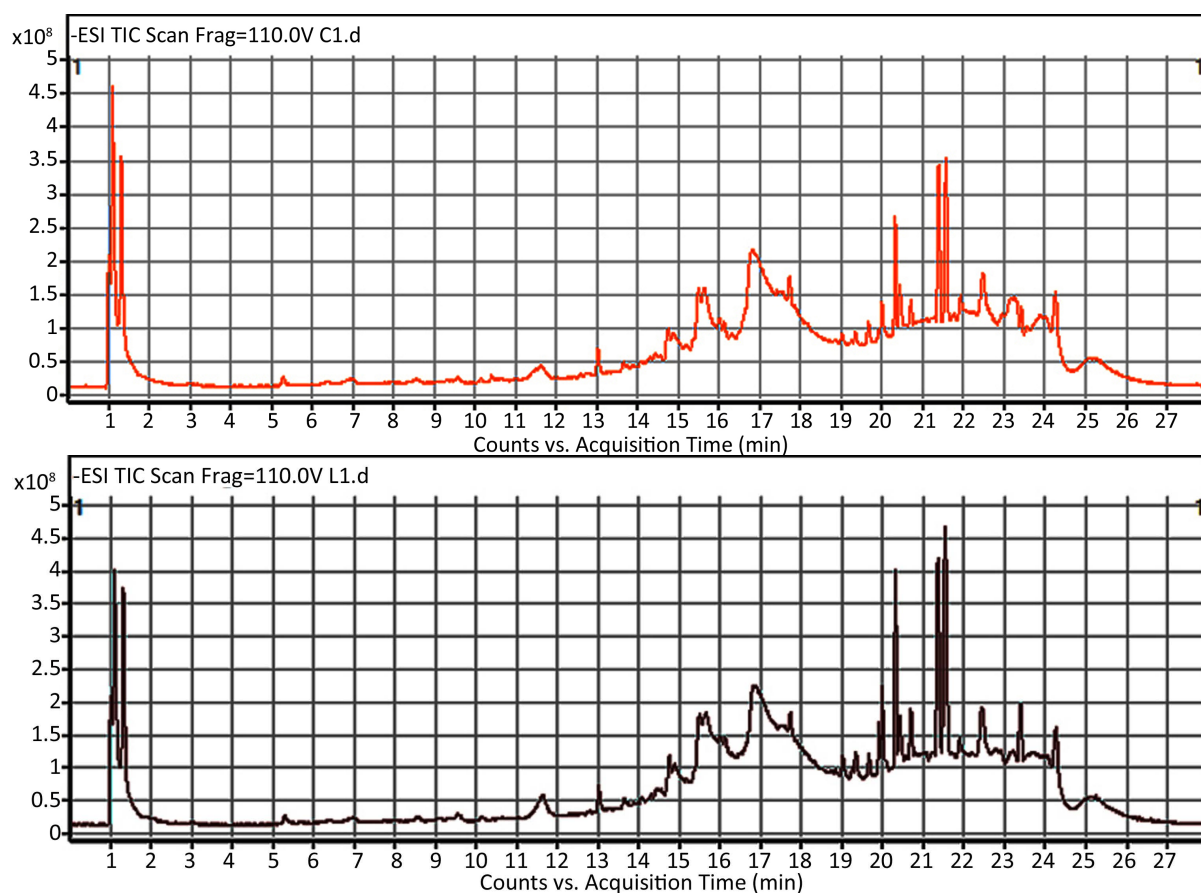


Figure 4. Typical RRLC-QTOF/MS chromatograms of plasma samples for normal and Se deficiency acquired in negative mode

图 4. 正常和缺硒 35d 血浆负离子模式下的 RRLC-QTOF/MS 图谱

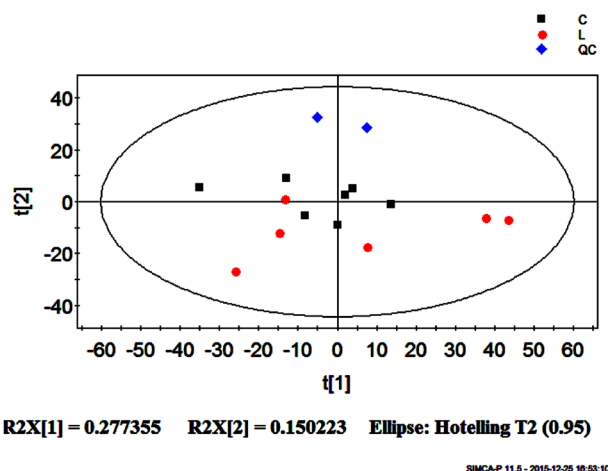


Figure 5. PCA scores plot for the top two components discriminates L (SeD group) from C(Control group) based on the data from negative mode

图 5. 负离子模式下的血浆代谢组 PCA 得分图

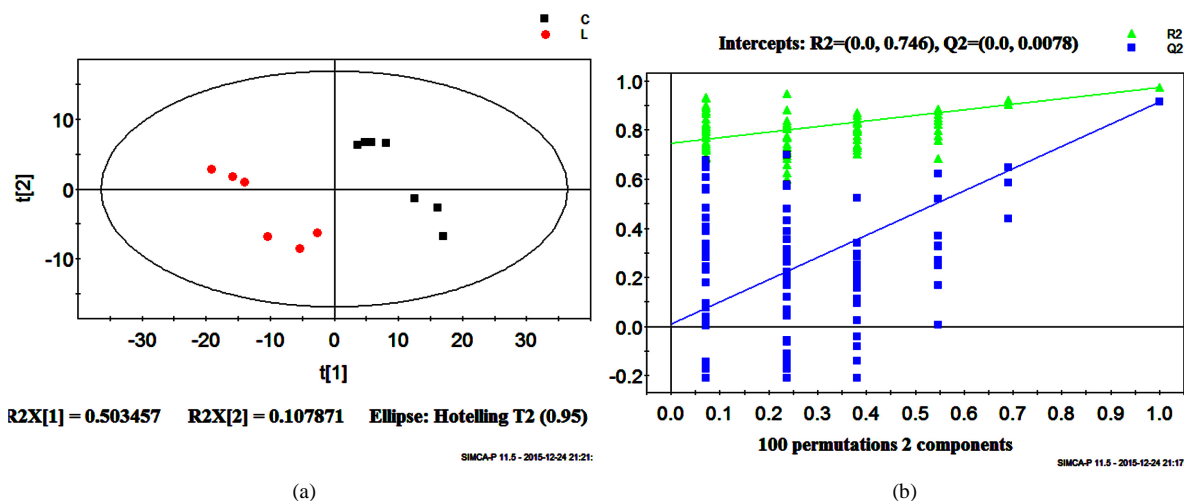


Figure 6. (a) PLS-DA scores plot for C (■) from L (●) based on the data from negative mode; (b) Validation plot obtained from 100 permutation tests based on the data from negative mode

图 6. (a) PLS-DA 模型得分图，正常组(■) 缺硒组(●)；(b)100 次随机置换的验证图

合单变量检验方法(the Welch's t test)算得的  $P$  值筛选出对样品分类有贡献的差异变量。然后根据 CAMERA 分析结果，删除多余的同位素离子、加合物和碎片离子，最终共筛选出对分组有贡献的变量 7 个，详见表 2。

#### 4. 讨论

前面的实验结果显示缺硒诱发鸡心肌损伤过程中发生了 ERS、炎症反应、钙超载等生理事件，从而加速心肌细胞凋亡、组织损伤、器官衰竭。本部分研究以正常饲喂雏鸡作为对照组，使用 RRLC-QTOF/MS 检测血浆中的代谢物，从代谢组学上研究缺硒与对照的差异，并从中找到 16 个与其很可能有关联的生物标志物。

研究结果显示：代谢组学能够明显分开正常组和缺硒组。采用 RF 模式判别方法(1000 种代谢物)，通过交叉验证分析，显示了在正离子模式检测下，两组差别的 AUC 值为 0.9044；在负离子模式检测下，

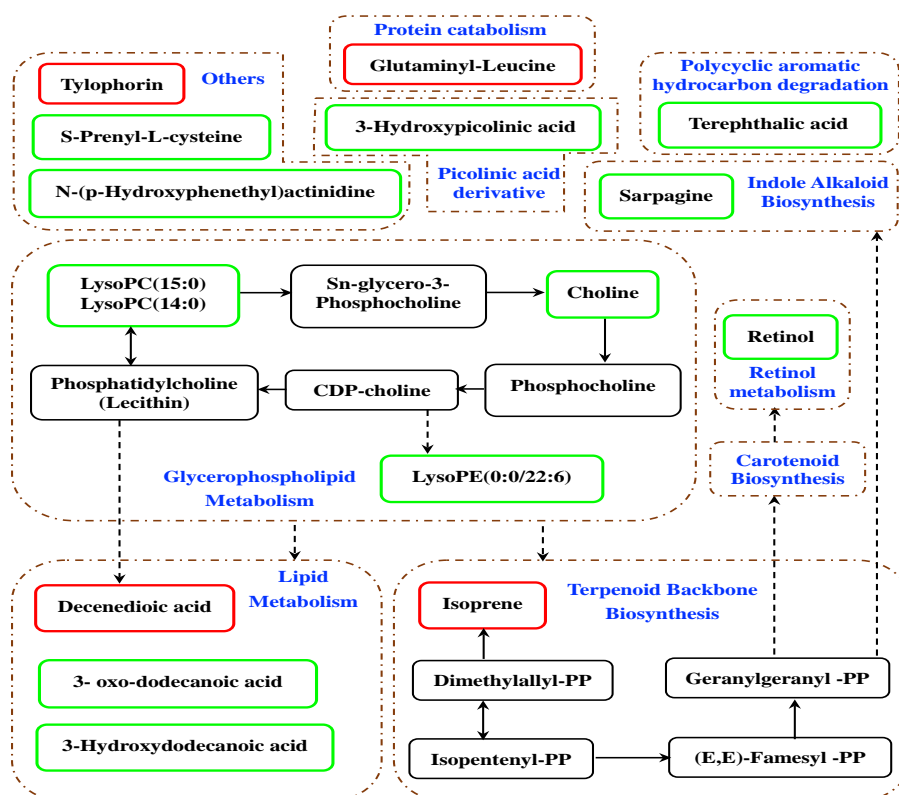
AUC 值为 0.7513。进而，用筛选出并推测出了其化学结构的 16 个内源性物质(包括正离子模式的 9 个标志物和负离子模式的 7 个物质)，区分两组标本的 AUC 值为 0.9143，表明使用这些标志物就能够很好地区分正常组和缺硒组。

根据 KEGG, Wikipedia 等查找发现 16 个代谢标志物分布在 9 个代谢通路中，其中 5 个相互关联而另外 4 个未找到关联，如图 7 所示。5 个相互关联的途径分别是甘油磷脂代谢、脂类代谢、萜类化合物

**Table 2.** 7 biochemical properties of a potential biomarker

**表 2.** 7 个潜在生物标志物的生物化学特性

ID	代谢物	m/z	RT(min)	FC <sup>a</sup>	ppm	P	VIP	代谢通路
Negative-ion electrospray ionization mode (ESI-)								
10	3-Hydroxydodecanoic acid	215.1655	15.13	-0.87	0.93	4.12E-03	1.23	Fatty acid metabolism
11	3-oxo-dodecanoic acid	213.1500	18.20	-1.18	1.88	1.00E-02	1.16	Fatty acid biosynthesis
12	LysoPC(14:0)	466.2971	16.59	-0.94	6.86	2.22E-02	1.29	Glycerophospholipid metabolism
13	Terephthalic acid	165.0206	6.78	-0.20	7.88	5.42E-03	1.22	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation
14	Sarpagine	309.1609	15.64	-0.18	0.00	3.12E-02	1.18	Indole alkaloid biosynthesis
15	3-Hydroxypicolinic acid	138.0195	9.43	-0.33	1.45	3.75E-02	1.02	Picolinic acid derivative
16	N-(p-Hydroxyphenethyl)actinidine	267.1607	12.61	-0.72	1.87	4.67E-02	1.12	Others



**Figure 7.** The network of the potential biomarkers for SeD according to the KEGG PATHWAY database (Blue letters on behalf of metabolic pathways; red frame FC > 0; green frame FC < 0)

**图 7.** 根据 KEGG 路径数据库构建的缺硒潜在生物标志物网落图(蓝色字体代表代谢通路; 红色框 FC > 0, 绿色框 FC < 0)

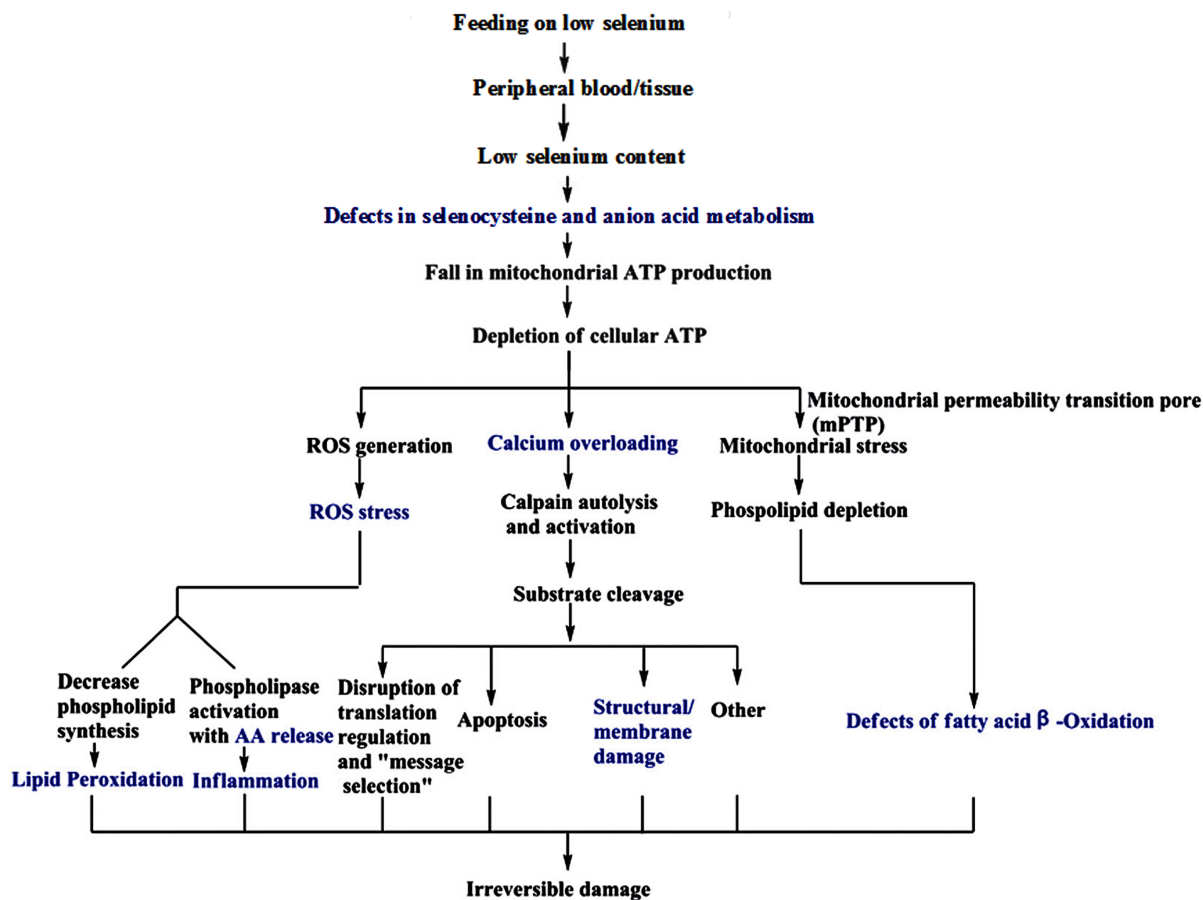


的生物合成、视黄醇代谢以及吡啶生物碱生物合成；4 个未找到关联的途径分别是蛋白质分解代谢、多环芳烃降解、吡啶羧酸衍生物及其他。

在确定的 16 个代谢标志物中，有 4 个物质是上调的，其他 12 个物质都是下调。其中有三个物质是在先前的文献中有过报道与 MI 和氧化应激有关，分别是 choline, Decenedioic acid and Leucine。在这三个物质中，Choline 明确与冠心病的发生有关，其机制是胆碱参与炎症反应、斑块破裂和血小板聚集的细胞信号介导通路[17] [18]。Decenedioic acid 是一种磷脂酰甘油(decenedioic acid) PG(16:0/16:0)作为合成心磷脂的前体，发现在缺硒组中下调，下调的甘油磷脂有可能通过心磷脂介导的凋亡诱导发生心肌损伤[19] 代谢组学分析发现 Leucine 在缺硒组升高。Perez de Obanos 等[20]提供了在一个细胞系统内由 Leucine 诱导 ROS 的证据。他们还报道了 Leucine 通过 NADPH 氧化酶和线粒体 ROS 的产生显示了前氧化物的作用。

我们研究发现：PC(15:0/14:0)是一种磷脂酰胆碱，在缺硒组的浓度降低。有研究报道升高的磷脂胆碱能够与血小板活化因子相互作用刺激血小板、中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞，产生炎症反应和血小板聚集[21]。但缺硒 35 天，可能处于损伤早期机体防御阶段而有所降低。据此，我们推测缺硒诱导的鸡心肌损伤机制，如图 8 所示。

根据统计分析结果，本研究在分析的第一阶段一共筛选出近千个物质。但本研究两组入选标准除饲料中硒含量不同外，使用饲喂方法基本上相同，具有一定的可比性。我们选择内源性的 16 个物质作为潜在的生物标志物，并对其中的 13 个标志物做了生物学途径的归类 and 解释，而其他 4 个标志物有待于进一



**Figure 8.** Pathogenesis of myocardial injury in chickens with SeD (The pathological changes in blue were related to the results of the metabolomic study)

**图 8.** 缺硒诱导鸡心肌损伤的发病机制(蓝色代表病理相关的代谢途径)

步研究。

总之, 我们的研究显示用代谢组学方法可用来找出缺硒诱导鸡心肌损伤的生物标志物。在缺硒组中观察到甘油、磷脂、亮氨酸、类固醇等生物物质的异常代谢。这些潜在的生物标志物与炎症、凋亡、和血小板聚集有关。本研究筛选出的生物标志物可初步为深入地理解鸡缺硒心肌损伤代谢机制提供新的信息。在此基础上进一步针对靶向途径做定向检测及筛选, 同时采取更大样本的多重对照研究以及其生物学实验有待后续工作继续进行。

## 基金项目

国自然课题(31272626)资助。

## 参考文献 (References)

- [1] Köhrl, J., Brigelius-Flohé, R., Böck, A., Gärtner, R., Meyer, O. and Flohé, L. (2000) Selenium in Biology: Facts and Medical Perspectives. *Biological Chemistry*, **381**, 849-864. <https://doi.org/10.1515/bc.2000.107>
- [2] Brown, K.M. and Arthur, J.R. (2001) Selenium, Selenoproteins and Human Health: A Review. *Public Health Nutrition*, **4**, 593-599. <https://doi.org/10.1079/PHN2001143>
- [3] Li, J.G., Zhou, J.C., Zhao, H., Lei, X.G., Xia, X.J., Gao, G. and Wang, K.N. (2011) Enhanced Water-Holding Capacity of Meat Was Associated with Increased Sepw1 Gene Expression in Pigs Fed Selenium-Enriched Yeast. *Meat Science*, **87**, 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.019>
- [4] Wang, X., Zhang, X., Ren, X.P., Chen, J., Liu, H., Yang, J., Medvedovic, M., Hu, Z. and Fan, G.C. (2010) Micro-RNA-494 Targeting Both Proapoptotic and Antiapoptotic Proteins Protects against Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Injury. *Circulation*, **122**, 1308-1318. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.964684>
- [5] Bruce, S.J., Jonsson, P., Antti, H., Cloarecc, O., Trygg, J., Marklund, S.L. and Moritz, T. (2008) Evaluation of a Protocol for Metabolic Profiling Studies on Human Blood Plasma by Combined Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: From Extraction to Data Analysis. *Analytical Biochemistry*, **372**, 237-249. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.09.037>
- [6] Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R. and Siuzdak, G. (2006) XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry*, **78**, 779-787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- [7] Katajamaa, M. and Oresic, M. (2007) Data Processing for Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Journal of Chromatography A*, **1158**, 318-328. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.021>
- [8] Katajamaa, M. and Oresic, M. (2005) Processing Methods for Differential Analysis of LC/MS Profile Data. *BMC Bioinformatics*, **6**, 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-179>
- [9] Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L. and Orešič, M. (2011) Algorithms and Tools for the Preprocessing of LC-MS Metabolomics Data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **108**, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.03.010>
- [10] Hendriks, M.M.W.B., Eeuwijk, F.A., Jellema, R.H., Westerhuis, J.A., Reijmers, T.H., Hoefsloot, H.C.J., Smilde, A.K. (2011) Data-Processing Strategies for Metabolomics Studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **30**, 1685-1698. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.019>
- [11] Ralf Tautenhahn, C.B. and Neumann, S.E. (2007) Annotation of LC/ESI-MS Mass Signals. Springer, Berlin. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-71233-6\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-540-71233-6_29)
- [12] Kuhl, C. (2010) LC-MS Peak Annotation and Identification with CAMERA. 114.
- [13] Smith, C.A. (2005) LC/MS Preprocessing and Analysis with XCMS. *Memory*, 1-13.
- [14] Warrack, B.M., Hnatyshyn, S., Ott, K.H., Reily, M.D., Sanders, M., Zhang, H. and Drexler, D.M. (2009) Normalization Strategies for Metabonomic Analysis of Urine Samples. *Journal of Chromatography B*, **877**, 547-552. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.007>
- [15] Trygg, J., Holmes, E. and Lundstedt, T. (2007) Chemometrics in Metabonomics. *Journal of Proteome Research*, **6**, 469-479. <https://doi.org/10.1021/pr060594g>
- [16] Boulesteix, A.L. and Strimmer, K. (2007) Partial Least Squares: A Versatile Tool for the Analysis of High-Dimensional Genomic Data. *Briefings in Bioinformatics*, **8**, 32-44. <https://doi.org/10.1093/bib/bb1016>
- [17] Park, Y.H., Jeon, Y.H. and Kim, I.Y. (2012) Selenoprotein W Promotes Cell Cycle Recovery from G2 Arrest through

the Activation of CDC25B. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1823**, 2217-2226.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.09.001>

- [18] Wu, A.H.B., Crosby, P. and Fagan, G. (2003) Ischemia-Modified Albumin, Free Fatty Acids, whole Blood Choline, B-Type Natriuretic Peptide, Glycogen Phosphorylase BB, and Cardiac Troponin. In: Wu, A.H.B., Ed., *Cardiac Markers*, 2nd Edition, Humana Press, Totowa, 259-277.
- [19] Belikova, N.A., Vladimirov, Y.A., Osipov, A.N., Kapralov, A.A., Tyurin, V.A., Potapovich, M.V., Basova, L.V., Peterson, J., Kurnikov, I.V. and Kagan, V.E. (2006) Peroxidase Activity and Structural Transitions of Cytochrome C Bound to Cardiolipin-Containing Membranes. *Biochemistry*, **45**, 4998-5009. <https://doi.org/10.1021/bi0525573>
- [20] Danne, O., Möckel, M., Lueders, C., Mügge, C., Zschunke, G.A., Lufft, H., Müller, C. and Frei, U. (2003) Prognostic Implications of Elevated Whole Blood Choline Levels in Acute Coronary Syndromes. *American Journal of Cardiology*, **91**, 1060-1067. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(03\)00149-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(03)00149-8)
- [21] Pérez de Obanos, M.P., López-Zabalza, M.J., Arriazu, E., Modola, T., Prieto, J., Herraizc, M.T. and Iraburu, M.J. (2007) Reactive Oxygen Species (ROS) Mediate the Effects of Leucine on Translation Regulation and Type I Collagen Production in Hepatic Stellate Cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1773**, 1681-1688. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.07.005>

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [ojs@hanspub.org](mailto:ojs@hanspub.org)