

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.08.007

思路与方法

基于比较脂质组学探讨冠心病中医证候的研究思路

朱黎霞

(南方医科大学珠江医院, 广东省广州市工业大道中 253 号, 510282)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302882, 81072935)

摘要 借鉴系统生物学研究模式, 探索以“脂质组学”为评测尺度的冠心病中医证候研究新方法, 通过对不同证型冠心病患者生物样本的比较进行脂质组学研究, 阐明冠心病中医证候脂质代谢轮廓的异同, 寻找不同证型的物质基础, 为冠心病的证候客观化、量化、证本质研究提供依据。

关键词 冠心病; 中医证候; 比较脂质组学

冠心病指冠状动脉粥样硬化或冠状动脉功能性改变导致心肌缺血、缺氧或坏死而引起的心脏病。近年来, 随着人民生活水平的提高和人口老龄化趋势, 其发病率明显增加, 成为中老年人的常见病、多发病。冠心病属于中医学“胸痹”、“厥心痛”、“真心痛”等范畴。《灵枢·五邪》指出“邪在心, 则病心痛。”《素问·藏气法时论》记载“心病者, 胸中痛, 胁支满, 胁下痛, 膺背肩胛间痛, 两臂内痛。”《素问·厥论》曰“真心痛, 手足青至节, 心痛甚, 旦发夕死, 夕发旦死。”目前冠心病中医分型尚无统一标准, 中国中西医结合学会心血管学会修订的《冠心病中医辨证标准》^[1]分为标实和本虚两类共 8 型, 《中医内科学》^[2]将其分为心脉瘀阻、气滞心胸等 7 型, 《中药新药临床研究指导原则 (试行)》^[3]分为心血瘀阻证、气虚血瘀证等 8 型。中医多从患者主诉的症状和体征进行辨证分型, 但临床证候表现极其复杂多变, 要在众多临床表现和体征中抓住疾病的本质非常困难。囿于诊治医生的临床经验、患者主诉等因素, 中医分型主观性强, 缺乏量化标准。

1 冠心病中医证候研究现状

近年来, 众多学者开展了冠心病中医证候客观化研究, 包括中医证与西医病的关系研究, 以及证与特定客观指标如心电图、冠状动脉造影、血脂 (脂蛋白、载脂蛋白)、血液流变学、血管内皮功

能等的关系, 取得了一定成果, 证实冠心病气虚型与心功能变化密切相关^[4], 血瘀型与血液流变学变化密切相关^[5], 痰浊闭阻型与脂质代谢紊乱具有高度相关性等^[6]。这些研究丰富、深化了对中医证本质的认识, 促进了中医“证”研究与西医“病”研究的结合, 但这些生化指标缺乏证候特异性和专属性, 如血瘀型也伴有血脂紊乱和心功能的降低等, 对传统的证候客观化研究提出了挑战。

2 脂质代谢紊乱与冠心病密切相关

关于冠心病的病理学基础——动脉粥样硬化的发病机制, 目前公认的有脂质浸润学说和炎症学说。脂质浸润学说认为, 血浆中高含量的脂质沉积在动脉内膜并刺激结缔组织增生, 细胞合成间质增多, 血管内膜增厚, 导致粥样斑块的形成。炎症学说认为, 动脉粥样硬化的发生是血管壁细胞与血液细胞在多种炎症性细胞因子和增殖因子作用下, 发生相互作用所产生的一种动脉壁对血管损伤的炎症反应过程。正常状态下脂质通过对炎症反应、炎症介质的影响具有抵抗炎症反应的作用。脂质代谢或脂质结构的异常可诱导炎症介质的产生和分泌异常, 反而产生致炎作用, 炎症介质又可加重脂质氧化而导致炎症相关疾病, 如动脉粥样硬化等^[7]。一系列长期、大样本、多中心临床观察也证实了脂质代谢异常与冠心病的关系: 高胆固醇及高甘油三酯是动脉粥样硬化的病理学基础之一, 是冠心病最主要的独立危险因素之一, 特别在低密度脂蛋白低

* 通讯方式: zhulx2007@163.com, (020) 61643456

水平时更是如此;冠心病患者多伴有脂质紊乱,脂蛋白颗粒合成、转运及分解代谢异常等^[8-10]。但目前实验室常规的血脂检查难以发现冠心病不同证型间的差异。

3 脂质组学是脂代谢疾病的新型研究方法

代谢组学是解决中医证候客观化的有力手段。王广基等^[11]用代谢组学的手段研究了冠心病证候的物质基础。由于代谢物的复杂性,很难用一种手段将所有的代谢物一次检测清楚。鉴于脂质在动脉粥样硬化、冠心病发生发展过程中的核心作用和维持机体生命活动、参与能量代谢、信号传导的重要性,以脂质代谢物为目标的代谢组学—脂质组学无疑针对性更强。脂质组学是脂代谢相关疾病的新型研究方法。

脂质组学是对血浆、组织等生物样本中的脂质及其代谢物进行全面系统分析的一门新兴学科,通过研究体液、细胞、组织等脂质提取物,可以获得脂质组的信息,反映生理/病理状态下脂质的整体变化。自 2003 年 Han X 等^[12]首次提出脂质组学概念以来,其发展非常迅速。Stock J^[13]阐述了脂质在动脉粥样硬化疾病中的特殊角色,指出脂质组学是研究不稳定型动脉粥样硬化斑块的有力手段,可以区分稳定和型冠状动脉疾病,实现血脂异常患者的个性化治疗等。Rabiei Z 等^[14]采用大鼠脑中风模型研究了橄榄叶提取物的脑卒中保护作用。Ekroos K 等^[15]从脂质组学与分子脂质、“shot-gun 与靶向脂质组学”、生物信息学、诊断生物标记物等角度论证脂质组学在研究动脉粥样硬化疾病中的重要作用。在我国脂质组学研究尚处于起步阶段,天津大学元英进课题组进行了以红豆杉、紫杉醇为对象的脂质组学系列研究^[16-19]。赵铁等^[20]的研究表明,柴黄益肾颗粒通过对脂质尤其是鞘脂代谢异常的调节可延缓大鼠糖尿病肾病的进展。

4 基于比较脂质组学的冠心病中医证候的研究思路

中医证候是对病理状态下机体整体状态的抽象概括和高度凝练,现代医学诊断指标为不同视角和切入点获得的疾病微观特征,二者之间为整体与局部、宏观与微观的关系。故离散、精确、特异性较差的微观指标尚难以全面、客观、真实、深刻地反映立体的、多维的、不断变化、相对粗放、抽象的证本质。系统的宏观证型与离散的微观指标缺乏专属性、排他性的内在联系,需要在更高视野下探究证本质,避免“盲人摸象式”的认识误区和“一

叶障目、不见泰山”的方法学陷阱。

脂质组学属于系统生物学的新型分支学科。在对脂质组(生物体内源性脂质小分子的集合体)全面分析的基础上,能够定性、定量表征生物体整体功能状态,在脂代谢疾病中医分型中有特殊意义。通过对脂质组学数据降维,将零乱、分散的数据整合为数个主成分,从内涵上类似于中医理论体系的“证”。获得脂质生物标记物是脂质组学研究的终极目的之一,其在揭示脂代谢疾病中医证候本质方面具有独特优势。随着生物质谱技术的进步,脂质组学在中医证本质研究、证候脂生物标记物的识别、证候诊断等方面已展现出广阔的应用前景。殷婷婷等^[21]对风湿性疾病湿热证进行脂质组学研究,发现部分甘油磷脂酰胆碱类和甘油三酯类代谢物可能为强直性脊柱炎湿热证脂质代谢的特异性物质,为风湿性疾病湿热证研究提供了新的依据。

由于冠心病患者在年龄、性别、文化背景、气候、性格、饮食起居习惯、遗传特性等方面的差异性,故有共同病理生理学基础的冠心病中医证候表现各异,体现了疾病发生过程中人与自然、内因与外因的共同作用,在同一疾病的本质特征上具有了“证”的外在分化,各证型间既有联系又有区别,既有共性又有个性。鉴于脂质代谢紊乱在冠心病发生、发展中的基础性作用,不同证型必然有不同的脂质代谢轮廓和特征性脂质标记物,故基于比较脂质组学的冠心病中医分型具有合理性、可行性、可操作性。

脂质组学为特殊的系统生物学。基于比较脂质组学进行冠心病中医分型的研究需要从 4 个方面着手:①采集生物样本。从研究结果的可靠性、说服力来看,动物模型难以代替患者。从获取标本的便利性和伦理学角度考虑,生物样本应首选血液、尿液。②生物样本的前处理,获得脂质组。不同的检测仪器对前处理的要求不同,为富集脂质和保持脂质稳定性,可考虑液液萃取获取脂质组和冷冻干燥法除基质相结合。③生物样本的高通量分析。组学研究具有大样本量的特点,必须建立高效、灵敏、快速、稳健的脂质组分析方法。④脂质组学数据的解析。

冠心病脂质组学研究需要解决 3 个共性和关键问题:①脂质组的提取和定量方法。不同于代谢组生物样本的沉淀蛋白方法,脂质组学需要对脂质进行全面、无偏的定量、定性分析。据此需要优化脂质组的提取方法和萃取溶剂组成。通过内标定量

法,分析内标物及各脂质成分的响应强度进行精确定量。②分析仪器的选择。生物质谱技术具有高灵敏性、高选择性和强大的分析能力,目前发展非常迅速和成熟,应用日益普遍。通过超高效液相(UPLC)预分离和高分辨质谱(MS)结合,可以同时检测大量脂质,获得精确分子量。四级杆串联质谱(ESI-Q-MS/MS)可对脂质进行精确定量,飞行时间质谱(TOF-MS)可获得精确分子量进行定性。通过子离子扫描、母离子扫描、中性碎片丢失扫描等多级质谱模式并结合对照品质谱特征,对脂质标记物进行高效结构鉴定和精准辨识。故四级杆质谱和飞行时间质谱结合成为脂质组学的首选研究手段。③脂质组质谱分析模式的选择。根据极性脂质可分为极性脂质和非极性脂质,极性不同其色谱保留特征各异。反相色谱(RP)和正相色谱(NP)模式均难以同时分离极性和非极性脂质,具有内在缺陷。亲水作用色谱(HILIC)对极性化合物具有分离优势及与质谱具有兼容性,以其做为首选分析模式可在保留脂质化合物完整信息的前提下尽可能多地精确分析生物样本中的脂质化合物。优化色谱/质谱条件,建立脂质组的亲水作用色谱分析模式在脂质组学研究中具有特殊意义。

以超高效液相色谱—四级杆飞行时间串联质谱仪(UPLC-triple quadrupole-Q/TOF-MS)为基本检测手段,依据中医药整体观、系统论的指导思想,借鉴 Han X 等^[1]、Layre E 等^[2]提出的脂质组学分析策略,采集不同证型冠心病患者的生物样本(如血液、尿液、唾液等),经前处理获得脂质组后进行比较脂质组学研究有望成为可行的研究思路。

冠心病脂质组学数据的合理利用。①数据经前处理后进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA),结合得分图(scoring plot)和载荷图(loading plot)数据点的离散度和聚集度,同时采用独立 T 检验和非参数(Mann-Whitney, M-W)检验来考察各证型脂质组间差异的显著性,判别潜在的各证型脂质生物标记物,利用脂质组学开放数据库(<http://lipidsearch.jp/LipidNavigator.html>、<http://lipidbank.jp>、<http://www.caffreylab.ul.ie>)对照品质谱对照等途径鉴定、解析相关生物标记物。从而建立、完善以“比较脂质组学”为评测尺度的冠心病证型新型研究方法。②鉴于冠心病中医分型的主观性和辨证的复杂性,在脂质组学数据基础上,采用聚类分析,分为若干类,凝练基于数据本

质的“证”,并和临床症状的“证”进行比对,修正、完善对冠心病中医证型的认知。

综上,通过对冠心病患者生物样本的脂质组的全面分析,不仅要确定生物样本(血液、尿液、唾液)所有脂质的种类及结构,发现特征性的脂质生物标记物,更要全面了解这些脂质的功能及其调控异常变化与冠心病的发生、发展之间的关系,阐明冠心病中医证型脂质代谢轮廓的异同,寻找不同证型的物质基础,为冠心病的证候客观化、定量化、证本质研究提供依据,从而发挥中西医病证结合治疗冠心病的优势。亦可为脂质紊乱相关疾病,如肥胖、非酒精性脂肪肝、脑卒中、糖尿病肾病、高脂血症等辨证分型提供借鉴。

参考文献

- [1] 中国中西医结合学会心血管学会. 冠心病中医辨证标准 [J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(5): 257.
- [2] 张伯礼, 薛博瑜. 中医内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 83-86.
- [3] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 69-70.
- [4] 陈耀青, 陈可冀, 涂秀华, 等. 冠心病气虚、气阴两虚证的心功能特点及生脉注射液的效应观察 [J]. 中西医结合杂志, 1988, 8(9): 523-526.
- [5] 丘瑞香, 罗致强, 朱稚宜, 等. 冠心病血症血液理化特性与中医证型相关性研究 [J]. 中医杂志, 2002, 43(5): 378-380.
- [6] 辛爱洁. 冠心病痰浊闭阻证与脂质代谢相关性研究概况 [J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(4): 105-106.
- [7] 米宁, 季之欣, 武彩娥. 脂质对炎症的影响 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32(5): 421-426.
- [8] 廖新平, 张才仁. 脂质代谢失常与冠心病的关系 [J]. 湖北医学院学报, 1983, 4(2): 15-18.
- [9] 胡志高, 屈晓冰, 胡敏. 载脂蛋白 M 与冠心病及其危险因素的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(3): 360-361.
- [10] 吴婉清. 载蛋白(Apoproteins): 脂蛋白代谢决定因素和冠心病易患因子 [J]. 国外医学心血管疾病分册, 1985(2): 109-110.
- [11] 王广基, 阿基业, 严蓓, 等. 代谢组学研究冠心病中医分型的体内物质基础 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(1): 127-133.
- [12] Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics [J]. J Lipid Res, 2003, 44(6): 1071-1079.
- [13] Stock J. The emerging role of lipidomics [J]. Atheroscle-

- rosis, 2012, 221(1): 38-40.
- [4] Rabiei Z, Bigdeli MR, Rasoulzadeh B, et al. The neuro-protection effect of pretreatment with olive leaf extract on brain lipidomics in rat stroke model [J]. Phytomedicine, 2012, 19(10): 940-946.
- [5] Ekroos K, Jänis M, Tarasov K, et al. Lipidomics: a tool for studies of atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2010, 12(4): 273-281.
- [6] 陆姝欢. 脂质组学研究两种红豆杉细胞磷脂代谢的差异 [D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [7] 杨松. 钼诱导子强化红豆杉细胞次生代谢产物生产的信号机制研究 [D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [8] 张祥瑞. 紫杉醇-透明质酸复合制剂的体外活性及

- 脂质组学研究 [D]. 天津: 天津大学, 2008.
- [9] 肖文海. 东北红豆杉细胞培养过程中细胞分化与次生代谢间关系的系统分析 [D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [10] 赵铁, 张浩军, 李平, 等. 柴黄益肾颗粒对糖尿病肾病大鼠保护作用的脂质组学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 155-162.
- [11] 殷婷婷, 李平, 赵铁, 等. 风湿性疾病湿热证实质的脂质组学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 210-213.
- [12] Layre E, Moody DB. Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens [J]. Biochimie, 2013, 95(1): 109-115.

Research Ideas of TCM Syndromes of Coronary Heart Disease Based on Comparative Lipidomics

ZHU Lixia

(Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangdong Province 510282)

ABSTRACT The research ideas for TCM syndromes of coronary heart disease (CHD) were discussed in this article on the basis of comparative lipidomics. The lipid metabolism in different patterns of CHD was clarified, the material basis of different patterns was found, and the basis for research on objectification, quantification and nature of syndromes was provided.

Keywords coronary heart disease; TCM pattern; comparative lipidomics

(收稿日期: 2013-10-21; 修回日期: 2014-01-02)

编辑: 邓 媛

(上接第 649 页)

参考文献

- [1] 孙玉英, 陈少春, 王素霞. 超促排卵对子宫内膜容受性影响的研究进展 [J]. 中国妇幼健康研究, 2006, 17(6): 519-520.
- [2] 王锦德, 门殿霞, 于子芳, 等. 经阴道彩色多普勒超声观察子宫内膜及内膜下血流预测体外受精-胚胎移植中子宫内膜的容受性 [J]. 中国医学影像技术, 2010, 26(10): 1930-1932.
- [3] 黄荷凤. 现代辅助生育技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 111.

- [4] 申舒静. 在长方案 IVF 中不同剂量长效 GnRH-a 调节效果的临床对照研究 [D]. 广东: 中山大学, 2009.
- [5] 马蔚蓉, 谈勇. 2 种治疗方法对排卵障碍性不孕症排卵结局的分析比较 [J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(3): 101-102.
- [6] 周红, 张波, 冯贵雪, 等. 不同促排卵启动时机对 IVF-ET 的影响 [J]. 中国计划生育学杂志, 2009, 16(8): 485-487.
- [7] 高敏芝, 张慧翠, 孙兆贵. 控制性超排卵对子宫内膜容受性的影响 [J]. 复旦学报, 2009, 36(2): 248-251.

YOU Zhaoling's Experience in Treating Low Endometrial Receptivity

PAN Saimei, TAN Zhenyu, LIU Wene

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Province 410007)

ABSTRACT YOU Zhaoling's understanding of low endometrial receptivity after superovulation in an in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) and experiences in improving endometrial receptivity and implantation rate based on TCM was introduced in this article.

Keywords endometrial receptivity; embryo implantation rate; YOU Zhaoling

(收稿日期: 2013-08-15; 修回日期: 2013-09-26)

编辑: 洪 涛