

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.24.009

基于微量元素组学的风湿性疾病 湿热证共性特征研究

赵 铁, 张英泽, 王晓雪, 陆 进, 王国春, 李 平, 祖 宁, 阎小萍, 张相林*

(中日友好医院, 北京市朝阳区樱花东街 2 号, 100029)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001488)

摘要 目的 探讨风湿性疾病湿热证的共性特征。方法 采用电感耦合等离子体质谱技术, 对强直性脊柱炎 (AS) 湿热证患者、痛风性关节炎 (GA) 湿热证患者及健康志愿者的血清样本进行微量元素组学研究, 比较 AS 湿热证患者、GA 湿热证患者相对于健康志愿者血清中与湿热证相关的共性差异微量元素。结果 模式识别分析显示, AS 湿热证组与 GA 湿热证组分别与其对照组之间均表现出明显的分离趋势。与健康对照组比较, GA 湿热证组和 AS 湿热证组均表现为血清铜、铷和铯水平的显著升高 ($P < 0.01$)。结论 血清铜、铷和铯水平升高可能为风湿性疾病湿热证的共性元素特征。

关键词 强直性脊柱炎; 痛风性关节炎; 湿热证; 微量元素组学; 电感耦合等离子体质谱

湿热证作为中医临床常见的一种证候, 与多种风湿性疾病的发生、发展及转归都有密切的关系, 但对于其证候学的物质基础研究多集中于消化、泌尿、生殖系统疾病^[1-2]。已有研究提示, 湿热证实质可能与微量元素有关, 但都集中在最常见的锌 (Zn)、铜 (Cu)、铁 (Fe)、硒 (Se) 等少数几种微量元素上^[3-4], 系统的整体微量元素谱与湿热证的相关性研究则未见报道。本研究以风湿性疾病的两种病理机制区别较大的典型疾病, 即强直性脊柱炎 (AS) 和痛风性关节炎 (GA) 湿热证患者为研究对象, 利用微量元素组学技术, 探讨风湿性疾病湿热证的共性实质。

1 资料

1.1 诊断及辨证标准

AS 诊断标准^[5]: ①临床标准: a) 腰痛、僵 3 个月以上, 活动改善, 休息无改善; b) 腰椎额状面和矢状面活动受限; c) 胸廓活动度低于相应年龄、性别的正常人。②放射学标准: 双侧骶髂关节炎 ≥ 2 级或单侧骶髂关节炎 3~4 级。③诊断分级: a) 肯定 AS: 符合放射学标准和 1 项以上临床标准; b) 可能 AS: 符合 3 项临床标准, 或符合放射学标准而不具备任何临床标准应除外其他原因所致

的骶髂关节炎。④骶髂关节炎 X 线分级: 0 级, 正常; I 级, 可疑变化; II 级, 轻度异常, 可见局限性侵蚀、硬化、但无关节间隙的改变; III 级, 明显异常, 为中度或进展性骶髂关节炎, 伴有以下 1 项或 1 项以上改变 (侵蚀、硬化、关节间隙增宽或狭窄, 或部分强直); IV 级, 严重异常, 完全性关节强直。

GA 诊断标准^[6]: 滑囊液中查见特异性尿酸结晶, 或痛风石经化学方法或偏振光显微镜检, 证实含尿酸钠结晶或具备下列 12 项中的 6 项者: ① 1 次以上的急性关节炎发作; ②炎症反应在 1 天内达到高峰; ③单关节炎发作; ④患病关节皮肤暗红色; ⑤第一跖趾关节疼痛肿胀; ⑥单侧发作累及第一跖趾关节; ⑦单侧发作累及跗骨关节; ⑧有可疑痛风石; ⑨高尿酸血症; ⑩X 线示关节非对称性肿胀; ⑪X 线示骨皮质下囊肿不伴骨质侵蚀; ⑫关节炎发作期间关节液微生物培养阴性。

湿热证辨证标准^[7]: 主症: 腰骶疼痛, 脊背僵硬, 活动受限, 晨僵, 身热不扬, 或四肢关节红肿灼热疼痛; 次症: 口渴或口干不欲饮, 肢体困重, 大便溏软或黏滞不爽, 小便黄赤; 舌脉: 舌质偏红, 苔黄厚或黄腻, 脉滑数或濡数。

1.2 纳入标准

符合上述诊断标准及中医辨证标准者; 年龄

* 通讯作者: zryhyzx1@sina.com, (010) 84205370

18~70 岁; 患者签署知情同意书。

1.3 排除标准

合并有类风湿关节炎、银屑病性关节炎等其他风湿病以及其他血清阴性脊柱关节病患者; 精神病患者, 不能正确理解和填写问卷调查表者; 合并心、脑血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病; 晚期严重关节畸形、残废的患者。

1.4 一般资料

收集 2010 年 6-12 月中日友好医院门诊的 AS 湿热证患者 30 例 (AS 湿热组), GA 湿热证患者 29 例 (GA 湿热组)。AS 湿热证组平均年龄 (29.6 ± 9.9) 岁, 平均病程 (5.6 ± 2.8) 年; GA 湿热证组平均年龄 (45.6 ± 13.0) 岁, 平均病程 (8.9 ± 4.2) 年; 另于 2011 年 1-3 月收集健康志愿者 44 例, 均来自我院职工, 再将健康志愿者根据年龄匹配分为 AS 湿热证对照组和 GA 湿热证对照组各 22 例, AS 湿热证对照组平均年龄 (29.3 ± 9.18) 岁, GA 湿热证对照组平均年龄 (45.7 ± 12.2) 岁。各组受试者均为男性。AS 湿热证组和 AS 湿热证对照组、GA 湿热证组和 GA 湿热证对照组年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

2 方法

2.1 血样采集与保存

各组受试者空腹状态经外周静脉采全血 5 ml, 于 4℃、3000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 保存于 -80℃ 冰箱中待用。

2.2 微量元素检测

精密称取 0.1 g 血清样品, 置于全氟烷氧基 (PFA) 材料的 10 ml 消解罐中, 然后向其中加入浓硝酸和双氧水各 150 μl, 旋紧盖子, 放入微波消解仪中进行消解。每个循环 40 罐, 消解功率设定为 1600 W, 消解过程共 33 min, 开始 10 min 程序升温至 115℃, 维持 5 min 后, 加热 4 min 至 150℃, 停留 5 min 后, 继续升温 4 min 至 185℃ 并保持到程序结束。所得消解溶液用去离子水转移至棕色 PET 瓶中并继续稀释定量至 1.2 g, 即制得待测样品溶液。该溶液于 4℃ 保存并于测定前转移至离心管中, 准备进样。

电感耦合等离子体质谱 (ICPMS, 7500ce 型, 美国 Agilent 科技有限公司) 以氦气 (纯度 99.99%) 作为载气、等离子体气和辅助气, 以蠕动泵同时提升样品和含有 Sc、铟 (In) 和铼 (Re) 混合液 25 μg/L 的标溶液进样, 样品和内标经同心

雾化器结合的双通道斯科特型雾化室喷雾及电感耦合等离子体离子源电离后, 产生的离子经四级杆质量分析器进入检测系统记录信号强度。用于减少多原子离子干扰的八级杆碰撞池系统被关闭。仪器经调谐达到最佳状态, 最终的操作参数如下: 等离子体工作线圈射频功率为 1500 W, 载气流速 0.93 L/min, 采样深度 8.0 mm, 补偿气流速 0.19 L/min, 样品提升速度 0.1 r/s, 提取锥孔 1 和 2 电压分别为 4.7 V 和 -145.0 V, 雾化室温度 2℃。

ICPMS 数据采集是在半定量模式下进行的。选择监测的各元素同位素质荷比 m/z 根据本课题组已报道的研究结果设定^[8-9]。在每批样品分析前, 利用调谐液, 在无内标的情况下, 进行全部质量数范围上的半定量因子的校正, 以纠正仪器波动偏差, 提高分析准确度。In 和铅 (Pb) 分别通过校正方程 $I(^{115}\text{In}^+) = I(^{115}\text{In}^+) - 0.016 I(^{118}\text{In}^+)$ 和 $I(^{208}\text{Pb}^+) = I(^{208}\text{Pb}^+) + I(^{206}\text{Pb}^+) + I(^{207}\text{Pb}^+)$ 进行进一步的校正。然后, 在有内标的情况下, 检测并记录一个去离子水样品, 作为半定量分析的内标校正文件, 以校正仪器波动偏差, 提高结果的精密度。

2.3 数据处理

Agilent ICPMS 工作站生成的半定量结果报告由本课题组基于 MATLAB 7.0 软件平台自行编写的代码程序读取, 该程序执行内标扣除和浓度单位统一 (统一成 ppt 或 ppb) 等任务, 并最终在 Excel 表格中将结果表示成包括元素名称、样品名称和元素浓度或信号强度 (CPS) 值的三维数据矩阵。

生成的数据矩阵可直接导入 SIMCA-P 11.0 软件包进行多维统计分析。但在统计分析前, 为了减少由元素浓度分布 (相差 1 到多个数量级) 差异产生的异方差对多元统计模型的影响, 我们将数据进行了对数转换和标准化处理。利用有监督的偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 模型来捕捉组间微量元素组的差异, 并找出贡献此差异的主要元素。模型经过 7 轮交互验证 (CV) 过程以防止其过度拟合。为了确保差异元素的可靠性, 全部元素还必须经过经典独立 T 检验的验证。单维统计分析用 SPSS 15.0 进行统计分析。

3 结果

3.1 微量元素组 ICPMS 分析质谱图比较

利用基于 ICPMS 技术的微量元素轮廓分析方法对 AS 湿热证组和 GA 湿热证组及各自对应的正

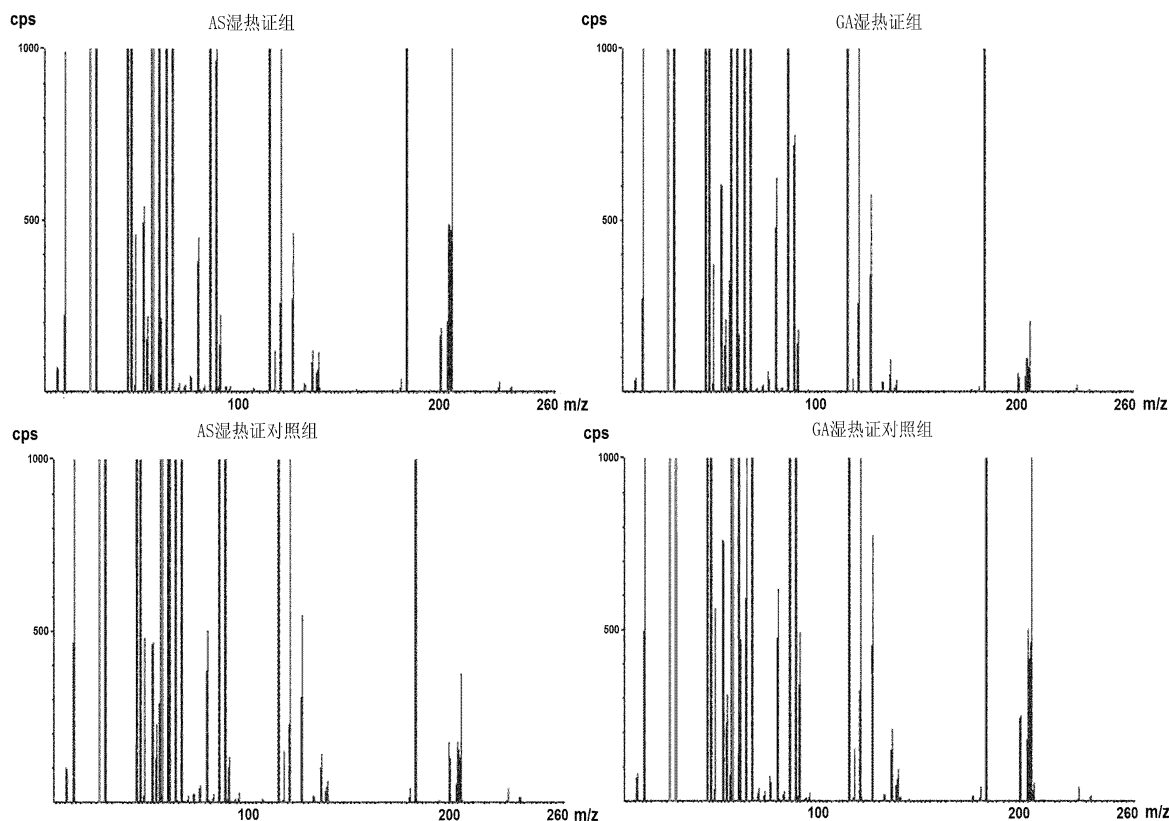


图 1 AS、GA 湿热证组及对照组代表性 ICPMS 质谱图

常对照组样本进行分析, 所得的各组代表性样本 MS 谱如图 1 所示。从 ICPMS 质谱图中不易直观地识别出 AS 湿热证和 GA 湿热证与各自正常对照之间的差异, 因此, 需进一步借助特征提取和统计学的方法来进行比较分析。

3.2 模式识别分析 (PLSDA)

利用 Agilent 工作站从采集的 ICPMS 图谱中提取原始数据, 然后导入 MATLAB 7.0 软件, 利用自建的程序, 将原始数据整理成一个三维矩阵, 将处理后的数据导入 SIMCA-P 11.0 进行 PLSDA 建模分析 (图 2 - 图 5), 初步判断 AS 湿热证组及 GA 湿热证组与其各自对照组的聚类关系, 以及与聚类相关的潜在贡献变量。如图 2 和图 3 所示, AS 湿热

证组与其对照组, GA 湿热证组与其对照组之间均表现出明显的分离趋势, 这提示组间的微量元素谱存在显著差异。又如图 4 和图 5 所示, 铜 (Cu)、铷 (Rb) 和铯 (Cs) 等元素对各模型的构建起到了明显贡献。

3.3 AS 湿热证与 GA 湿热证中医辨证的共性元素组特征

将 AS 湿热证和 GA 湿热证样本的混合组与相应的正常样本混合组的元素水平进行独立 *T* 检验; 此外, GA 湿热证组与其对照组以及 AS 湿热证组与其对照组也分别进行独立 *T* 检验, 所得的 *P* 值同时满足 *P* < 0.05 的元素确定为风湿性疾病湿热证的共性元素。表 2 示, 微量元素 Cu 和碱金属元

表 2 AS 湿热证和 GA 湿热证的共性元素组特征

元素	湿热证组 vs 正常对照组	GA 湿热证组 vs GA 湿热证对照组			AS 湿热证组 vs AS 湿热证对照组		
	<i>P</i> 值	<i>P</i> 值	变化倍数	趋势	<i>P</i> 值	变化倍数	趋势
Cu	3×10^{-9}	1×10^{-5}	1.2282	↑	1×10^{-7}	1.4713	↑
Rb	6×10^{-5}	0.0007	1.1634	↑	0.0124	1.1631	↑
Cs	5×10^{-5}	0.0002	1.3515	↑	0.0022	1.5347	↑
Ba	0.5142	0.0163	0.7410	↓	0.2189	1.2075	-
Tm	0.2822	0.0004	0.1661	↓	0.7063	1.2780	-
Ir	0.4950	0.0478	0.3377	↓	0.8828	1.0737	-

注: 湿热证组, 即 AS 湿热证组与 GA 湿热证组之合; 正常对照组, 即 AS 湿热证对照组与 GA 湿热证对照组之合; 变化倍数是两组某微量元素平均相对强度的比值

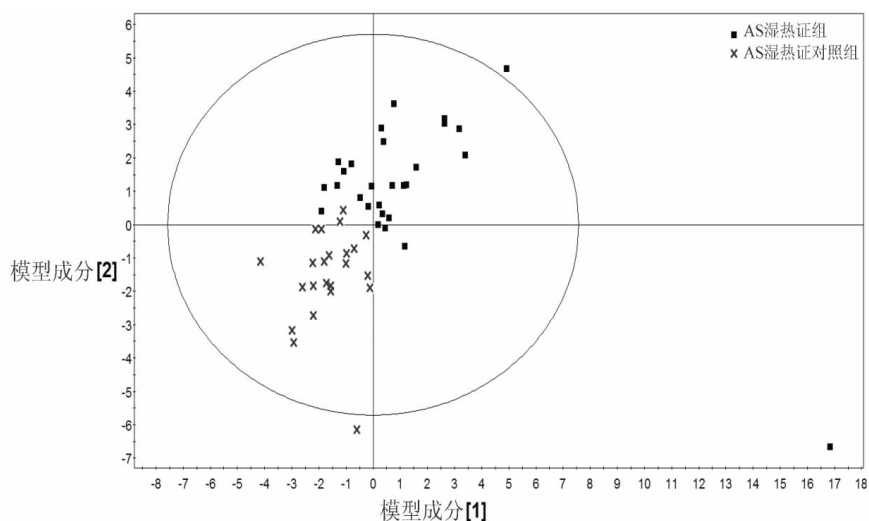


图2 AS 湿热证组与 AS 湿热证对照组 PLSDA 得分图

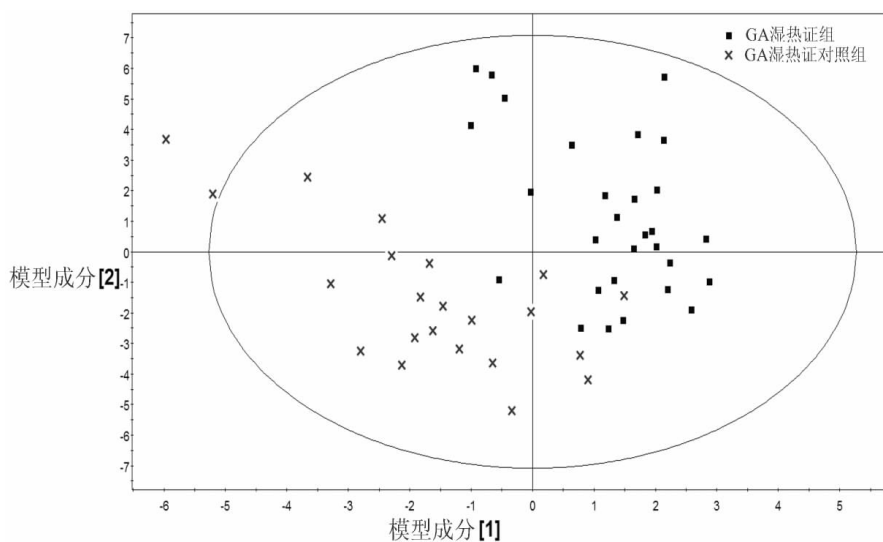


图3 GA 湿热证组与 GA 湿热证对照组 PLSDA 得分图

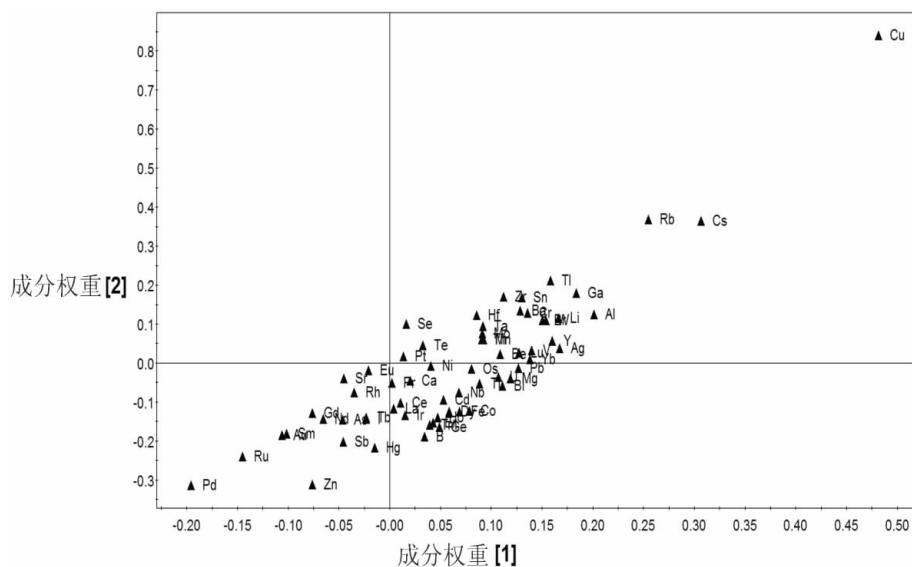


图4 AS 湿热证组与 AS 湿热证对照组 PLSDA 载荷图

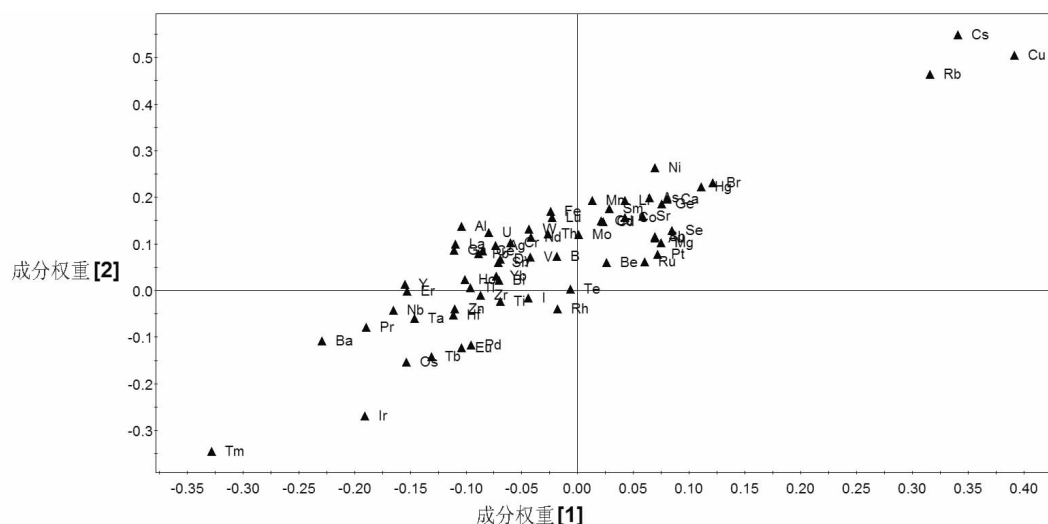


图5 基于元素组的 GA 湿热证组与 GA 湿热证对照组 PLSDA 载荷图

素 Rb 和 Cs 在湿热证组血清中均明显升高,提示 Cu、Rb、Cs 为风湿性疾病 AS 和 GA 湿热证的共性元素标记物。

4 讨论

近年来研究显示,湿热证本质可能与炎症、免疫功能异常、微量元素水平变化、氧化与抗氧化异常、致炎细胞因子表达亢进、细胞代谢实质等有关^[10-12]。本研究以 AS 和 GA 两种风湿性疾病湿热证为切入点,采用先进的微量元素组学技术,从系统微量元素组学水平揭示风湿性疾病湿热证的共性本质。微量元素组学是本课题组针对微量元素分析领域的现状,将“组学”研究策略与无机元素分析相结合,经过严谨的方法学考察,提出的一种新的微量元素研究方法——微量元素组学^[8]。它是对无机元素水平进行整体分析,并结合多元统计思想,对临床疾病状态进行区分及潜在生物元素标记物寻找的一种新思路和新方法。相对于传统的微量元素分析方法,微量元素组学不再孤立地测定一个或少数几个元素,而是充分发挥现代分析仪器的优势,对自然界存在的全部微量元素及痕量元素等进行同时测定,极大地提高了微量元素分析的效率,降低了分析的成本。

本研究发现 Cu、Rb 和 Cs 在 AS 和 GA 湿热证患者血清中浓度均升高,这些元素的异常变化反映了风湿性疾病湿热证的共性特征,可能为风湿性疾病湿热证潜在的元素指征和辨证标记物,同时提示湿热证证候的内涵和机理。血清 Cu 浓度升高已经在一些湿热证动物模型上发现,有人认为其升高可能引起与某些—SH 基团结合物的增多,降低机体

的抗氧化能力^[9]。而我们分析认为,由于 Cu 在体内既有促氧化的作用(游离 Cu),又有抗氧化的作用(铜蓝蛋白),无论如何,血清 Cu 升高都暗示着湿热证机体处于氧化应激状态。因此,湿热证血清 Cu 浓度升高也有可能是炎症反应的结果。但本研究并未发现 Zn、Se 的显著降低,这与湿热证动物模型研究的结果不一致^[6-7,13],可能反映了实际湿热证与动物造模所致湿热证的区别。

Rb 和 Cs 与锂(Li)、钠(Na)、钾(K)为同族的重稀碱金属元素。研究表明,Rb 和 Cs 与神经系统疾病、心血管系统疾病、恶性肿瘤、泌尿系统疾病、老年白内障和糖尿病等关系密切,并且已应用于神经系统疾病和肿瘤的治疗^[14-15],而 Rb 和 Cs 与 AS 和 GA 的关系未见有过报道。因此,本研究不仅为风湿性疾病中、西医的基础研究提供了新的思路,也为 Rb 和 Cs 与疾病病理关系的研究提供了新的证据和切入点。

本文以 AS 和 GA 湿热证为突破口,在微量元素水平上探索风湿性疾病湿热证的共性本质,发现血清中 Cu、Rb 和 Cs 水平在 AS 和 GA 湿热证患者血清中均升高,提示 Cu、Rb 和 Cs 水平同时升高可能为风湿性疾病湿热证的共性特征元素标记物组,从而为临床风湿性疾病湿热证的辨证论治提供新的实验依据。

参考文献

- [1] 吕文亮. 湿热证本质的研究思路与方法 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(9): 1555-1556.
- [2] 王丽萍, 陈建, 庄永泽, 等. IgA 肾病湿热证与临床病理的相关性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(1): 178-179.

- [1] 刘立, 杨运高, 吴仕九, 等. 湿热证微量元素变化的实验研究 [J]. 新中医, 2003, 35(2): 77-78.
- [2] 刘德传, 吴仕九, 杨运高, 等. 微量元素、抗氧化剂与湿热证的相关性的研究 [J]. 广东微量元素科学, 2001, 8(2): 30-32.
- [3] van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of New York criteria [J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(4): 361-368.
- [4] Wallace SL, Robinson H, Masi AT, et al. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout [J]. Arthritis Rheum, 1977, 20(3): 895-900.
- [5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 179-183.
- [6] Zhao T, Chen T, Qiu Y, et al. Trace element profiling using inductively coupled plasma mass spectrometry and its application in an osteoarthritis study [J]. Anal Chem, 2009, 81(9): 3683-3692.

- [7] Su M, Zhang T, Zhao T, et al. Human gouty arthritis is associated with a distinct serum trace elemental profile [J]. Metallomics, 2012, 4(3): 244-252.
- [8] 张淑英. 脾胃湿热证的中医研究进展 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(11): 1870-1873.
- [9] 马剑颖. 脾胃湿热证本质的研究进展 [J]. 中国医药学报, 2006, 34(4): 42-44.
- [10] 周燕萍, 胡作为, 吕文亮. 温病湿热证本质研究新进展 [J]. 湖北医学院学报, 2004, 6(1): 49-50.
- [11] 刘立, 杨运高, 吴仕九, 等. 湿热证动物模型微量元素、维生素 E 变化及清香散的调节作用 [J]. 广东微量元素科学, 2002, 9(7): 33-36.
- [12] 秦俊法. 铷的生物必需性及人体健康效应 [J]. 广东微量元素科学, 2000, 7(8): 1-18.
- [13] Melnikov P, Zanon LZ. Clinical effects of cesium intake [J]. Biol Trace Elem Res, 2010, 135(1-3): 1-9.

Study on the Common Features in Damp-Heat Syndrome of Rheumatic Diseases Based on Trace Element Profiling

ZHAO Tie, ZHANG Yingze, WANG Xiaoxue, LU Jin, WANG Guochun, LI Ping, ZU Ning, YAN Xiaoping, ZHANG Xianglin

(China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029)

ABSTRACT Objective To explore the common features of rheumatic diseases with damp-heat syndrome. **Methods** Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was applied to determinate trace element profiles of blood samples from ankylosing spondylitis (AS) patients with damp-heat syndrome, gouty arthritis (GA) patients with damp-heat syndrome, and healthy volunteers. Then the trace element profiles of different patients and healthy subjects were compared, and the common features in the trace element profiles of AS patients and GA patients which were different from those of healthy volunteers were investigated. **Results** Compared with healthy control group, both GA damp-heat group and AS damp-heat group showed significant increase levels of copper, rubidium and cesium in blood serum. **Conclusion** The increased serum levels of copper, rubidium and cesium may be the common elementary features in damp-heat syndrome of rheumatic diseases.

Keywords ankylosing spondylitis; gouty arthritis; damp-heat syndrome; trace element profiling; inductively coupled plasma mass spectrometry

(收稿日期: 2014-04-17; 修回日期: 2014-09-04)

编辑: 邓 媛

欢迎邮购医学光盘

四大经典 VCD 《黄帝内经》《伤寒论》《金匱要略》《温病学》全套 2500 元, 其中《金匱要略》单套 800 元, 其余每套 600 元。四大基础 VCD 《中医基础理论》、《中医诊断学》、《中药学》、《方剂学》全套 2700 元, 单套 700 元。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社; 收款人: 北京医海林音像书店, 邮编: 100700, 联系人: 张伟平, (010) 64014411-3036; 叶晨, (010) 64013162。