

冠心病心血瘀阻证尿液代谢组学的检测分析

简维雄 袁肇凯 黄献平 陈清华 郑景辉 李勇华 王丽萍

(湖南中医药大学中医诊断研究所, 湖南省长沙市韶山路113号, 410007)

[摘要] **目的** 寻找冠心病(CHD)心血瘀阻证尿液代谢产物谱, 综合分析CHD心血瘀阻证的代谢途径。**方法** ①运用GC-MS鉴定心血瘀阻证组和非心血瘀阻证组、健康组3组尿液代谢产物, 通过对不同组之间代谢产物含量的变化进行主成分分析、偏最小二乘法分析。②综合分析CHD心血瘀阻证代谢途径。**结果** ①主成分分析: 3组样本主成分得分显示分聚于椭圆形得分图的3个区域。尿液19种代谢产物中甘油、油酸酰胺、葡萄糖、丙酮等物质含量升高, 而马尿酸、木糖醇降低。②偏最小二乘法分析: 显示健康组远离心血瘀阻证组与非心血瘀阻证组, 心血瘀阻证组与非心血瘀阻证组位置比较靠近可以判别他们同属一类; 从标准化偏最小二乘系数图可见心血瘀阻证组与甘油、油酸酰胺高度正相关, 与马尿酸、木糖醇高度负相关。按照VIP值依次排列各变量依次是葡萄糖、甘油、木糖醇、马尿酸、油酸酰胺和丙酮。③差异性分析: 有明显变化的代谢产物中, 葡萄糖、甘油、油酸酰胺、丙酮在冠心病中均有不同程度升高, 以心血瘀阻证中增高最为明显($P < 0.01$); 其中甘油、油酸酰胺、丙酮在非心血瘀阻证组与健康组比较也具有统计学差异($P < 0.01$); 核糖醇、马尿酸在心血瘀阻证组和心血瘀阻证组中均降低($P < 0.01$), 而以心血瘀阻证组降低最为明显($P < 0.01$)。**结论** ①葡萄糖、甘油、木糖醇、马尿酸、油酸酰胺、丙酮为CHD心血瘀阻证尿液生物代谢产物谱。②CHD心血瘀阻证代谢途径涉及脂质代谢紊乱以及应激因素, 同时也与肝肾有一定相关性。

[关键词] 代谢组学; 冠心病; 心血瘀阻证; 尿液

Analysis on Urine Metabolomics of Coronary Heart Disease Patients with the Heart Blood Stasis Syndrome

JIAN Weixiong, YUAN Zhaokai, HUANG Xianping, CHEN Qinghua, ZHENG Jinghui, LI Yonghua, WANG Liping

(Diagnostic Institute of Traditional Chinese Medical, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007)

ABSTRACT **Objective** To study on the uric metabolites of coronary heart disease (CHD) patients with heart blood stasis syndrome in TCM and analyze comprehensively the metabolic pathway of heart blood stasis syndrome. **Methods** ①GC-MS was adopted to detect the uric metabolites of CHD patients with heart blood stasis syndrome, CHD patients without heart blood stasis syndrome, and healthy people. The principal component analysis (PCA) and partial least squares (PLS) analysis were done to study the changes of uric metabolites of different groups. ②The metabolic pathway of heart blood stasis syndrome of CHD was analyzed comprehensively. **Results** ①PCA: The principal component scores of the three groups were distributed in three regions in the oval score graph respectively. Of the 19 uric metabolites, the contents of glycerol, oleamide, glucose, and acetone were increased and those of hippuric acid and xylitol were decreased. ②PLS: The result of healthy people was far from those of CHD patients with and without heart blood stasis syndrome, the latter two groups tended to be of a same category. It could be seen from the standardized PLS coefficient graph that there was a positive correlation between heart blood stasis syndrome and the level of glycerol and oleamide and a negative correlation with the level of hippuric acid and xylitol. According to VIP value, all variables were arranged in an order of glucose, glycerol, xylitol, hippuric acid, oleamide, and acetone. ③Variability: In the uric metabolites of CHD patients, the content of glucose, glycerol, oleamide, and acetone was increased, especially in those with heart blood stasis ($P < 0.01$). Of them, there also existed a significant different in glycerol, oleamide and acetone of those CHD patients without heart blood stasis and healthy people ($P < 0.01$). Adonitol and hippuric acid in the CHD patients with and without blood stasis syndrome were both decreased, especially in those with blood stasis syndrome ($P < 0.01$). **Conclusion** ①The uric metabolites of CHD patients with heart blood stasis are glucose, glycerol, xylitol, hippuric acid, oleamide, and acetone. ②From the uric metabolites, it is reflected that the metabolic pathway of heart blood stasis syndrome is related with the disorders of lipid metabolism and the stress, as well as the dysfunctions of kidney and liver.

Key Words Metabolomics; Coronary heart disease; Heart blood stasis syndrome; Urine

尿液是人体代谢终产物, 在现代医学常规检查中小便被列为三大常规之一。在中医学中小便诊法占有重要的地位, 因小便的形成是多个脏腑综合作用的结

果, 通过对小便的望、闻、问诊可以了解体内脏腑的病理变化、人体津液的盛衰以及病性的寒、热、虚、实。为此, 本课题组基于气相色谱-质谱联用仪研究了冠心病(CHD)心血瘀阻证患者尿液代谢产物, 以期发现心血瘀阻证在尿液层面的生物学途径, 为阐明中医证候的生物学本质奠定基础。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772696); 湖南省科技厅资

助项目(2007CB934904); 湖南省研究生创新基金项目(J10010001)

68)

通讯作者: 袁肇凯, yuank1520@yahoo.com.cn, (0731) 85381147

1 临床资料

1.1 诊断标准

西医诊断标准:按照1979年WHO制定的缺血性心脏病诊断标准进行诊断^[1]。中医辨证标准:按照《中医病证诊断疗效标准》^[2]制定的辨证标准进行诊断。

1.2 纳入标准

受试患者须符合上述诊断及辨证标准,并具备:①年龄40~75岁;②健康对照者均经临床体格检查和生化检查证明无疾病者。

1.3 排除标准

①严重高血压、糖尿病、恶性肿瘤、肝肾疾病、甲状腺疾病患者;②糖尿病性心肌病、甲状腺功能亢进性心脏病、高血压性心脏病、肺原性心脏病、贫血性心脏病、系统性硬皮病性心脏病、风湿性心脏病等各种心脏病;③肝炎、结核等传染病;④精神系统疾病。

1.4 一般资料

病例主要来自湖南中医药大学第二附属医院心血管内科住院CHD患者,健康对照者主要为体检人员。CHD患者分为心血瘀阻证组和非心血瘀阻证组,心血瘀阻证组6例,男性3例,女性3例,年龄(60.60±13.77)岁。非心血瘀阻证组16例,男性9例,女性7例,年龄(59.83±12.68)岁。健康对照组10例,男性5例,女性5例,年龄(57.43±10.28)岁。3组间无统计学差异($P>0.05$),具有可比性。

2 方法

2.1 研究方法

2.1.1 试剂 ①乙腈(500ml色谱级,湖南化工研究院);②吡啶(500ml色谱级,天津定光精细化工研究所);③三氯甲烷(500ml色谱级,长沙湘科精细化工厂);④17碳脂肪酸、甲氧胺、N-甲基-N-三甲硅基三氟乙酰胺、三甲基氯硅烷(均为美国Sigma试剂公司提供)。

2.1.2 器材 QP2010气相色谱-质谱联用仪(GC-MS,日本岛津公司)。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 GC-MS 样本预处理 600μl尿液,加入10μl内标(17碳脂肪酸6mg/ml),加入400μl乙腈,涡旋混合1min,冰浴超声10min,18000r/min,4℃离心5min。取上清干净试管中,氮气吹干。加入50μl甲氧胺吡啶溶液(15mg/ml),混匀,30℃脗化2h。加衍生化试剂(MST-FA 10μl, MCS=100μl, v/v) 50μl,混匀静置。1h后移取上清液到微量进样管,供GC-MS分析。

2.2.2 GC-MS 分析条件 气相条件:分流比,1:1。进样量0.5μl。进样口温度:280℃;接口温度:250℃。升温

程序:80℃;保持2min,以每分钟10℃升至140℃,以每分钟4℃升至240℃,再以每分钟10℃升至280℃,保持3min。离子源温度:200℃。载气:高纯度氦气。质谱条件:载气流速,1.0ml/min;电离方式EI;电子能量70eV。扫描范围:50~800m/z。

2.2.3 总离子流图分析 物质鉴定采用质谱自带软件;GC-MS总离子流图中各峰的保留时间挑选共有峰,获取各峰与内标峰的峰面积数据,用相对峰面积(与内标峰的比值)表示代谢物的含量。

2.3 统计学方法

应用SPSS 13.0软件,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,主成分分析(PCA)、偏最小二乘法(PLS)应用SIMCA-2P11.5软件。组间代谢产物含量差异性采用方差分析。

3 结果

3.1 精密度实验

取同一样品连续进样6次,计算各相对峰面积的相对标准偏差(RSD)。结果发现,血浆各峰的RSD为3.75%~9.07%。

3.2 代谢物鉴定

共有峰挑选后发现尿液中中共有内源性代谢物19种。利用NIST质谱数据库对共有的内源性代谢物作鉴定,按通常匹配度大于80%的鉴定结果作为可信度较大的物质。按保留时间分别为:石炭酸、丙二酸、甘油、磷酸、尿囊酸、吡啶、马尿酸、苯丙酸、丙酮、阿拉伯树胶酸、木糖醇、核糖醇、二甲基扁桃酸、半乳糖、棕榈酸甲酯、葡萄糖、肌醇、油酸酰胺、己二酸。

3.4 主成分分析

将尿液内19种代谢物质通过主成分分析(PCA),进行健康组、心血瘀阻证组、非心血瘀阻证组3组第一主成分和第二主成分得分研究(见图1)。结果显示,主成分积分值集中分布于椭圆形得分图的三个区域,健康组在右边、非心血瘀阻证在中间,心血瘀阻证组在左边。

血浆25种代谢产物因子载荷图(见图2)。结合得分图分析心血瘀阻证组3、18、16、9物质明显升高,7、11显著降低。经对比上调的分别是甘油、油酸酰胺、葡萄糖、丙酮,下调的是马尿酸、木糖醇。

3.5 PLS 分析

建立判别模型,模型显示健康组远离心血瘀阻证组与非心血瘀阻证组,心血瘀阻证组与非心血瘀阻证组位置比较靠近可以判别他们同属一类,证明模型建立是合理的,同时第一个PLS成分有效性是0.4294,第二个PLS有效性是0.1960,累积解释为0.6255是

表1 3组人尿液发生改变的代谢产物含量比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	葡萄糖	甘油	核糖醇	马尿酸	油酸酰胺	丙酮
心血瘀阻证组	6	0.159±0.010 *	0.056±0.002 *▲	0.074±0.007 *▲	0.026±0.003 *▲	0.032±0.003 *	0.051±0.006 *▲
非心血瘀阻证组	16	0.140±0.006	0.045±0.004 *	0.085±0.008 *	0.030±0.004 *	0.029±0.003 *	0.045±0.005 *
健康组	10	0.134±0.007	0.023±0.003	0.110±0.013	0.037±0.003	0.025±0.002	0.039±0.006

注:与健康组比较,* $P<0.01$;与非心血瘀阻证组,▲ $P<0.01$

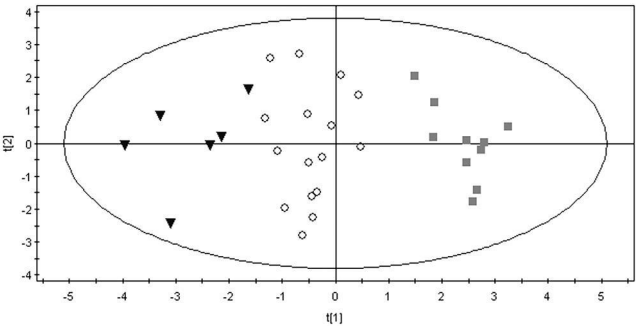


图1 人尿液3组样本得分图

(▼心血瘀阻证组 ○非心血瘀阻证组 ■健康组)

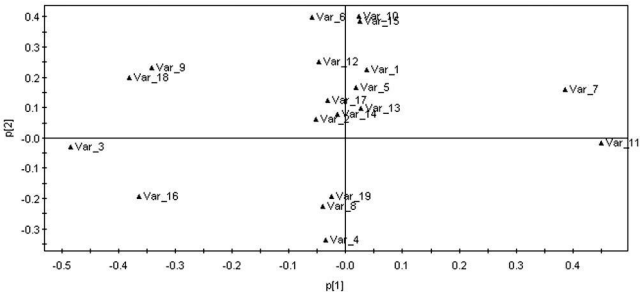


图2 人尿液3组因子载荷图

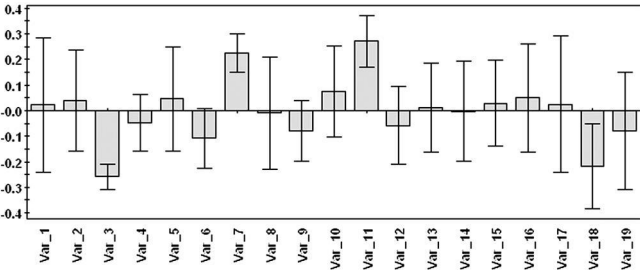


图3 人尿液自变量系数图

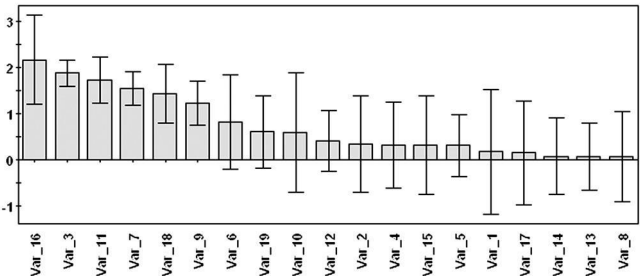


图4 人尿液自变量 VIP 图

一个可以接受的精度。图3为19个自变量标准化偏最小二乘系数图,可以看到心血瘀阻证组与甘油、油酸酰胺高度正相关,与马尿酸、木糖醇高度负相关。按照VIP

值各变量与药物干预的密切度依次是葡萄糖、甘油、木糖醇、马尿酸、油酸酰胺、丙酮(见图4)。

3.6 3组发生改变的代谢产物含量比值比较

对6种有明显变化的代谢产物采用单因素方差分析,确定差异性。表1示,葡萄糖、甘油、油酸酰胺、丙酮在冠心病中均有不同程度升高,以心血瘀阻证组中增高最为明显具有统计学差异($P<0.01$)。其中甘油、油酸酰胺、丙酮在非心血瘀阻证组与健康组比较也具有统计学差异($P<0.01$)。核糖醇、马尿酸在心血瘀阻证组与心血瘀阻证组降低高具有统计学差异($P<0.01$)。而以心血瘀阻证组降低最为明显($P<0.01$)。

4 讨论

在对健康组、非心血瘀阻证组、心血瘀阻证组样本PCA分析时3组分别位于不同的区间,同时找出反应CHD心血瘀阻证特异的代谢产物其中上调的是甘油、油酸酰胺、葡萄糖、丙酮,下调的是马尿酸、木糖醇。为了进一步判别3组间的关系进行PLS模拟,和实际情况一致的疾病组分在一类,健康组在另一类。为了进一步了解6种血浆代谢产物哪些变量属于最为重要的指标,通过变量系数图及系数VIP图,按照系数VIP排列的指标为:葡萄糖、甘油、木糖醇、马尿酸、油酸酰胺、丙酮,经代谢物差异显著性比较符合以上的判断。最后确定葡萄糖、甘油、木糖醇、马尿酸、油酸酰胺、丙酮,为CHD心血瘀阻证尿液生物代谢产物谱。

原尿中的葡萄糖在近曲小管几乎全部被重吸收,一般糖尿病或者肾小管疾病患者可以升高,除此之外情绪激动也可以引起一过性的尿糖增多^[3]。此次实验在非心血瘀阻证中增高不明显,但心血瘀阻证组显著增高,由于CHD心血瘀阻证疼痛较为剧烈引起的应激性一过性尿糖。在体内三酰甘油不断分解产生的甘油与脂肪酸,甘油则在肝脏中经过磷酸化和氧化生成3-磷酸甘油,其排除增多是可能与肝功能下降有关,其次人体在应激条件下脂肪分解加速,甘油的生成也会增多。

尿液中酮体增多,常见于糖尿病加重时^[4]。在应激时脂肪分解加速,脂肪酸在肝脏内经 β 氧化产生的酮体大量增加。而脂肪酸氧化会抑制三羧酸循环,使得酮体聚积。当酮体生成大于组织利用时,由肾脏排出时,尿液中出现丙酮增多。

木糖醇是人体糖类代谢的正常中间体,具有减慢血浆中产生脂肪酸的速度,抗酮体的作用,其含量下降于此也不无关系^[5]。油酸酰胺存在与人、猫、大鼠等哺乳动物的中枢和外周组织的不饱和脂肪酸中,在中枢系统具有镇静、催眠的作用^[6]。在血浆中的生理功能尚不十分清楚。但我们考虑冠心病患者尿液中增高,与血浆脂肪酸含量的上升有关。马尿酸主要有肝脏代谢苯甲酸产生,系苯甲酸在肝脏解毒的代谢产物,可以反应肝功能的变化,同时在肾小管血流减少时,尿液中的马尿酸排除也会减少,其降低与肝、肾功能都有一定的相关性^[7]。由此推测心血瘀阻证代谢途径可能涉及糖、脂肪、蛋白质三大物质代谢,以及心、肝、肾等脏器。

GC-MS 的高分辨率,所以可以反应出代谢物痕量的变化,比如在尿检中发现仅有一人尿糖呈(±),但 GC-MS 却检测出心血瘀阻证尿液中葡萄糖含量的变化,但在尿液总粒子流图中却无氨基酸片段。在检索同类研究文献时得知,有学者采用 GC-MS 检测出人尿液中41种有机酸和16种氨基酸^[8-9]。其原因可能是8min和20min附近出现尿素峰干扰。为了排除的尿素的干扰,有学者在使用衍生化试剂 MSTFA、TMCS 时首先脲酶孵育(37℃,2h)尿液,但孵育是否会影响到其他代谢产物的变化(比如此次发现的丙酮就是极易

分解),尚未见文献报道,所以在进行基于 GC-MS 的尿液代谢组学研究时选择合适的衍生化试剂还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 贝政平. 内科疾病诊断标准[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 251.
- [2] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 18.
- [3] 迟惠梅. 浅谈尿糖的形成和检查[J]. 中华中西医杂志, 2008, 6(6): 69.
- [4] 林旭明. 小儿尿酮体阳性72例比较检测报告[J]. 中华现代临床医学杂志, 2005, 3(12): 1196-1197.
- [5] 李香妹, 马少怀. 木糖醇的生理功能及含木糖醇食品的试制[J]. 食品工业科技, 2003, 24(7): 51-52.
- [6] 杨静玉, 吴春福. 顺-9, 10-十八碳烯酰胺的研究进展[J]. 生理科学进展, 1999, 30(4): 81-83.
- [7] 杨军. 马尿酸与尿毒症[J]. 国外医学泌尿系统分册, 1989, 9(4): 145-149.
- [8] 孙咏梅, 张林, 许志勤, 等. 气质联用法分离测定氨基酸[J]. 解放军预防医学杂志, 1996, 14(6): 425-428.
- [9] 郭勃, 余兆楼, 常理文, 等. 尿中有机酸的毛细管气相色谱-质谱轮廓分析——用于苯丙酮尿症的诊断[J]. 分析化学研究简报, 1993, 21(9): 1075-1077.

(收稿日期: 2009-09-02; 修回日期: 2010-02-10)

[编辑: 叶晨]

东华原十功能煎药机全力配合国家中药房建设

十功能煎药机



- 1、自动两煎功能, 充分提高药效;
- 2、电动挤压功能, 实现药渣自动分离;
- 3、自动搅拌功能, 提高煎药效果;
- 4、常压煎煮功能, 保留传统煎药特点;
- 5、药物先煎后下功能, 满足不同处方需求;
- 6、自动加水计量功能, 准确控制加水量;
- 7、自动清洗功能, 更卫生更清洁;
- 8、防高温干烧功能;
- 9、自动加热调节功能, 文火、武火自动控制转换;
- 10、滑动锅盖功能, 操作方便快捷;

国家中医医院煎药室升级改造重点示范医院



东华原生产基地



北京中医医院
安装十功能自动两煎煎药机50台



河南中医学第一附属医院
安装密闭两煎煎药机90台

专业品牌

煎药包装设备行业领军品牌, 拥有实用新型专利ZL2008 2 0122713.5等多项国家专利, 6000多家医院、40000多家终端客户共同见证。

专业品质

9大系列、30多个型号产品, 覆盖了中药煎药包装行业全部领域, 充分满足医院、药店、诊所等不同机构的不同需求。

专业资质

通过ISO9001、ISO13458质量体系认证, 德国CE产品安全质量认证, 产品质量、服务及安全均已达到欧盟标准。

专业服务

全国30多家分公司和办事处, 100多位维修工程师, 450多位服务人员, 为您提供及时周到的“一站式”服务。



北京东华原医疗设备有限公司
地址: 北京市中关村昌平科技园区振超路1号

咨询电话: 400-888-0258 800-810-0359

电话: 010-89718013-892 网址: www.donghuagroup.com