

疲劳型亚健康肾阳虚证血浆代谢组学研究

聂晓莉^{1,2} 薛 琪¹ 罗 仁^{1,2*} 赵晓山² 孙晓敏² 余克强³

(1. 南方医科大学南方医院, 广东省广州市广州大道北 1838 号, 510515;

2. 南方医科大学中医药学院; 3. 南方医科大学科技处)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202736, U1132001); 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2008AA02Z409); 广东省自然科学基金博士启动资助项目(S2012040007905); 广东省中医药管理局课题(20122088)

* 通讯作者: luoren41671@yahoo.com.cn, 13503049569

[摘要] 目的 探讨疲劳型亚健康肾阳虚证代谢组学特征表达谱。方法 收集 5 例疲劳型亚健康肾阳虚证患者作为试验组, 6 例同龄健康人作为正常对照组。采用¹H-核磁共振(¹H-NMR)技术, 利用 MestReNova5. 3. 1 软件对两组¹H-NMR 谱进行相位校正和基线校正, 采用 OPLS-DA 进行分类建立模型, 结果以积分矩阵图和载荷矩阵图表示, 分析疲劳型亚健康肾阳虚证血浆代谢组学谱。结果 两组间代谢组学谱存在差异, 31 个内源性代谢产物组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 疲劳型亚健康肾阳虚证关键代谢产物为乳酸、氧化型谷氨酰胺、丙酮酸、醛固酮、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH/NADH)、苯丙氨酸、2-羟丁酸、还原型谷胱甘肽和谷氨酰胺。结论 疲劳型亚健康肾阳虚证存在多个特征性代谢产物, 可能是疲劳型亚健康肾阳虚证发生发展的基础。

[关键词] 疲劳型亚健康; 肾阳虚证; 代谢组学

Plasma Metabonomic Research on Kidney Yang Deficiency in Individuals with Sub-Health Fatigue

NIE Xiaoli^{1,2}, XUE Qi¹, LUO Ren^{1,2}, ZHAO Xiaoshan², SUN Xiaomin², Yu Keqiang²

(1. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangdong Province 510515; 2. Southern Medical University)

ABSTRACT **Objective** To research the metabonomic characteristics of kidney yang deficiency in individuals with sub-health fatigue. **Methods** There were 11 subjects selected from Nanfang Hospital Health Management Center volunteers. Five sub-health fatigue patients with kidney yang deficiency pattern were enrolled as the experimental group and six healthy persons of the same age were chosen as the normal control group. Metabonomic finger printing was acquired and analyzed by using ¹H-NMR, MestReNova5. 3. 1 software. **Results** There was a significant difference between the experimental group and normal control group in 31 endogenous metabolites ($P < 0.05$). The key metabolites of sub-health fatigue patients with kidney yang deficiency were lactate, oxidized glutathione, pyruvate, aldosterone, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NADPH/NADH), phenylalanine, 2-Hydroxybutyric acid, glutathione and L-glutamine. These metabolites were highly correlated with energy metabolism, oxidative stress and hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Conclusion** The sub-health fatigue patients with kidney yang deficiency pattern have many characteristic metabolites. These characteristic metabolites are related to various function changes and may induce sub-health fatigue with kidney yang deficiency pattern.

Keywords sub-health fatigue; kidney yang deficiency; metabolomics

疲劳型亚健康是以疲劳为中心表现的症候群, 介于健康和疾病之间的中间状态, 属于亚健康状态的临床亚型之一, 占亚健康总人数的 50% 以上^[1]。到目前为止, 疲劳型亚健康的具体发生原因及机制尚不清楚, 亦缺乏相应的防治措施。代谢组学是一门在新陈代谢的动态进程中, 系统研究代谢产物的变化规律, 揭示机体生命活动代谢本质的学科^[2]。由于其对全代谢组的高通量及高灵敏性的优势, 已逐渐成为医学领域用于疾病诊断、预后评估及药物治疗评价等方面的新技术^[3-4]。本研究通过研究疲劳型亚健康肾阳虚证与健康人¹H-核磁共振(¹H-

NMR)代谢组差异表达谱, 探讨亚健康状态肾阳虚证特征代谢产物, 为进一步阐释疲劳型亚健康的发生机制奠定基础。

1 临床资料

1.1 一般资料

11 例研究对象均为 2009 年 1—6 月在南方医科大学南方医院健康管理中心体检者, 5 例疲劳型亚健康肾阳虚证患者作为试验组, 6 例健康人作为正常对照组。试验组男 3 例, 女 2 例; 年龄 23~55 岁, 平均年龄(35.1±10.6)岁; 病程 5~12 个月, 平均病程(9.2±3.1)个月。正常对照组男 4 例, 女 2

例;年龄 22~48 岁,平均年龄(33.8±9.2)岁。两组间年龄、性别比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 诊断及辨证标准

疲劳型亚健康诊断标准参照中华中医药学会《亚健康中医临床指南》^[5]:①持续 3 个月以上反复出现的不适状态或适应能力显著减退,但能维持正常工作;②尽管具有明确的疾病诊断,但与目前不适状态或适应能力的减退无因果联系;③《个人疲劳强度问卷》^[6](Checklist Individual Strength, CIS)疲劳评分 ≥ 60 分。具备 3 项标准可确诊。

肾虚证中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[7]。主症:腰膝酸软,性欲减退,畏寒肢冷。次症:精神萎靡,夜尿频多,下肢浮肿,动则气促,发搞齿摇,舌质淡、苔白,脉沉迟,尺无力。诊断:具备主症 2 项、次症 2 项即可确诊。

1.3 纳入标准

年龄 18~55 岁;符合诊断标准及中医肾虚证辨证标准;签署知情同意书。

1.4 排除标准

患者处于心脑血管疾病、糖尿病、肿瘤等重大疾病治疗用药期;患非重大疾病但需用药维持者;合并感染、外伤者;妊娠及哺乳期妇女;有精神疾病史或精神疾病家族史。

2 方法

2.1 试剂与主要仪器

重水(D_2O ,北京京巨化工科贸有限责任公司,批号:20090210);3-三甲基硅烷基-2,2,3,3-四氘代丙酸钠(TSP,美国 Sigma 公司,批号:081108),用作化学位移的参考内标(δ)。Beckman AllegraTM 64R Centrifuge 低温高速离心机(美国 Beckman 公司),Bruker UltraShieldTM 600 MHz 核磁共振仪(NMR,瑞士 Bruker 公司)。

2.2 样本采集及处理

所有研究对象样本收集前 1 天要求清淡饮食,避免海鲜以及辛辣食物,并禁止饮酒与吸烟。早餐前空腹抽血,血液收集于肝素钠溶液抗凝预处理后的离心管中,混匀,4℃,1000 r/min 离心 10 min,吸取上层血浆,置-80℃保存,用于¹H-NMR 检测。

2.3 ¹H-NMR 实验及数据处理

将血浆取出室温下解冻,向编号后离心管中依次加入 300 μ l 血浆、300 μ l 重水配置的 TSP(2 mg/

ml),充分震荡混匀后 4℃,14000 r/min 离心 10 min,取 500 μ l 上清液加入核磁共振管($\phi=5$ mm)中待用。所有¹H-NMR 谱都在 Bruker UltraShieldTM 600 MHz NMR 用 5 mm 反向 TXT 探头检测,对应的质子共振频率 599.90 MHz,采用弛豫编辑实验(Carr-Purcell-Meiboom-Gill,CPMG)脉冲序列(RD-90°- τ -180°-2 τ -180°-2 τ -180°-...-ACQ)观察小分子信号,CPMG 参数如下:谱宽 8000 Hz,累积扫描 64 次,采样点 64 k,采样时间 5 s,弛豫延迟 6 s,自旋回波时间 0.32 s,线增宽因子 1,实验温度 298 K。在弛豫延迟期间采用预饱和照射压制水峰。自由感应衰减信号(FID)经过傅立叶转换后为一维 NMR 谱图,利用 MestReNova 5.3.1 软件(MestreLab Research SL, Spain)对所有¹H-NMR 谱进行相位校正和基线校正,以 TSP 为化学位移参考峰的位置,设为 0 ppm,对 $\delta 0\sim 7.95$ 进行分段积分,积分间距 $\Delta\delta 0.01$ ppm,每组数据都以总和为 1 进行归一化处理。将归一化后的积分数据以 Excel 文件保存,为消除水峰影响,去除 $\delta 4.5\sim 5.25$ 段的积分值,然后将剩余数据导入到 SIMCA-P⁺ 12.0 软件包(Umetrics, Sweden)进行分析。数据采用 OPLS-DA 进行分类建立模型,结果以积分矩阵图和载荷矩阵图表示。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件处理数据,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,组间代谢物相对含量比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验。

3 结果

3.1 两组代谢组学波谱图比较

两组波谱图在 $\delta 0.8\sim 1.2$ 、 $2.0\sim 2.6$ 、 $3.1\sim 4.3$ 波峰水平有明显差异,提示疲劳型亚健康组血清中多个内源性代谢物水平发生了变化,而这些节段所对应的代谢物与能量代谢、脂代谢、糖代谢、氨基酸代谢、氧化应激、核苷酸代谢等多个代谢通路相关。

3.2 CPMG ¹H-NMR 模式识别

采用 OPLS-DA 方法对两组样本建模,以“肾虚证”为因变量(Y),积分值为自变量(X),将 Y 值设定为 0/1 的矩阵(正常对照设为 0,肾阴虚证设为 1),模型参数 $R^2X=0.787$, $R^2Y=0.628$, $Q^2=-0.328$,对应积分矩阵图显示样品集中分布于 95% 可信区间,模型拟合及分类效果好,且两组之间

明显区分开来,提示两组间代谢物相对水平存在显著性差异,结果与临床辨证分组相符合,为进一步应用于临床诊断奠定基础。进一步寻找造成这种区分的差异代谢产物,根据载荷矩阵图和 S 图提取出对分类贡献最大的前 40 个 VIP 值变量。

3.3 试验组患者特征性代谢产物

将对分类贡献较大、最大的前 40 个变量进行组间两独立样本非参数 Mann-Whitney U 检验,结果 31 个位点的变量组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其中相对水平上调的有 13 个,下调的有 18 个。通过人类代谢组学数据库(HMDB)及文献报道^[8-10]等方式,得到 10 种关键代谢产物的名称及变化趋势,具体见表 1。这些代谢物与能量代谢、氧化应激、下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA)相关,可能是疲劳型亚健康肾阳虚证的特征代谢产物。

表 1 疲劳型亚健康肾阳虚证关键代谢产物及变化趋势

编号	内源性代谢产物	变化趋势	编号	内源性代谢产物	变化趋势
1	乳酸	↑	6	苯丙氨酸	↓
2	氧化型谷氨酰胺	↑	7	天冬氨酸	↓
3	丙酮酸	↑	8	2-羟丁酸	↑
4	醛固酮	↓	9	还原型谷胱甘肽	↓
5	NADPH/NADH	↓	10	谷氨酰胺	↓

注:“↑”表示上调趋势,“↓”表示下调趋势

4 讨论

CMPG ¹H-NMR 模式识别中,积分矩阵图可见样品集中分布于 95%可信区间,模型拟合及分类效果好,提示两组代谢谱有差异。载荷矩阵图提示两组间代谢物相对水平存在差异。正常状态下细胞能量代谢以有氧呼吸为主。本研究发现,与正常对照组比较,试验组血浆中还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADH)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)、天冬氨酸水平下降,乳酸、丙酮酸及 2-羟丁酸水平明显升高。NADH、NADPH、天冬氨酸是三羧酸循环的关键酶和中间产物,它们的减少表明疲劳型亚健康人群细胞有氧代谢减少,酸性代谢产物在体内累积,对细胞有直接的损伤作用^[11]。有氧代谢过程主要在线粒体中进行,这提示疲劳型亚健康存在线粒体功能障碍^[12-13]。

既往研究结果表明,力竭性运动时组织相对缺氧,组织器官氧化代谢增强,体内产生大量活性氧自由基,引发脂质过氧化(LOP)反应,破坏组织、器官的正常结构和功能,造成机体的代谢紊乱,进而导致

疲劳^[14]。本研究发现,试验组血浆氧化型谷氨酰胺水平升高,还原型谷胱甘肽水平降低,与既往研究结果^[15]相符,这提示疲劳型亚健康肾阳虚证存在氧化应激反应增强,氧自由基破坏线粒体结构及功能,促进细胞凋亡。

与正常对照组比较,试验组血浆醛固酮水平下降,提示肾阳虚证与 HPA 功能密切相关,HPA 功能减退可导致促甲状腺素、促肾上腺皮质激素、促性腺素、抗利尿素等相关激素水平低下,因此肾阳虚证患者常伴有腰膝酸软、性欲减退、夜尿频多、下肢浮肿等临床症状。这也与肾阳虚证患者与 HPA 的状态有关的现代研究成果相符合^[16]。而苯丙氨酸减少将导致甲状腺素、儿茶酚胺、5-羟色胺等神经递质合成减少,神经突触兴奋性降低,这可能与肾阳虚证表现出的精神萎靡不振、体温感觉异常(畏寒肢冷)等症状有关。

本研究从代谢组学小分子水平反映出疲劳型亚健康肾阳虚证存在多个特征性代谢产物,这些特征代谢产物与能量代谢、氧化应激、HPA 等多方面功能改变相关,这可能是疲劳型亚健康肾阳虚证发生发展的基础。

由于本研究是对疲劳型亚健康肾阳虚证代谢组学实验的初步研究,存在样本数偏小的不足,且¹H-NMR 技术检测结果也常有假阳性,因此今后尚须在扩大样本量、完善实验质量控制等方面进一步完善以提高重复性。

参考文献

- [1] 谢雁鸣,胡镜清,何丽云,等.亚健康中医基本证候临床流行病学现场调查及其质量控制[J].中国中医基础医学杂志,2006,12(8):632-634.
- [2] 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.
- [3] Fan X, Bai J, Shen P. Diagnosis of breast cancer using HPLC metabonomics fingerprints coupled with computational methods [C]. Shanghai: Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2005: 6081-6084.
- [4] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia [J]. Circulation, 2005, 112 (25): 3868-3875.
- [5] 中华中医药学会. 亚健康中医临床指南[M]. 北京: 中国

- 中医药出版社,2006:1.
- [6]van der Werf SP, van den Broek HL, Anten HW, et al. Experience of severe fatigue long after stroke and its relation to depressive symptoms and disease characteristics [J]. Eur Neurol, 2001,45(1):28-33.
- [7]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,2002:386.
- [8]Le Tallec N, Lacroix P, de Certaines JD, et al. Effects of dimethylformamide on in vivo fatigue and metabolism in rat skeletal muscle measured by ³¹P-NMR[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1996,35(3):139-143.
- [9]Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, et al. Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ¹H-NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition[J]. NMR Biomed, 1998,11(4-5):235-244.
- [10]Anthony ML, Sweatman BC, Beddell CR, et al. Pattern recognition classification of the site of nephrotoxicity based on metabolic data derived from proton nuclear magnetic resonance spectra of urine[J]. Mol Pharmacol, 1994,46(1):199-211.
- [11]Schurr A, Payne RS, Miller JJ, et al. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2001,895(1-2):268-272.
- [12]李保良,赵晓山,罗仁,等. 亚健康疲劳状态时血清对骨骼肌细胞线粒体膜细胞色素C氧化酶活性和线粒体能量负荷的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(37):7258-7262.
- [13]曹兆丰,程德基,林克椿,等. 运动性内源性自由基对大鼠肝脏线粒体的影响[J]. 中国应用生理学杂志,1993,9(1):25-27.
- [14]Konig D, Wagner KH, Elmadfa I, et al. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress[J]. Exerc Immunol, 2001, 7:108-133.
- [15]聂晓莉,李晓勇,靳文,等. 慢性疲劳大鼠模型的建立及其对肝功能的影响[J]. 热带医学杂志,2007,7(4):323-325,344.
- [16]沈自尹. 从肾本质研究到证本质研究的思考与实践——中西医结合研究推动了更高层次的中医与西医互补[J]. 上海中医药杂志,2000,34(4):4-7.

(收稿日期:2012-10-26;修回日期:2012-11-27)

[编辑:王利芬]

欢迎邮购《一选方治验实录》

在浩瀚的中医典籍中,有方名的古方数以十万计。为了汰芜存菁,借鉴古今医家的经验,为现代临床服务,作者在长期从事中医方药文献研究和临床诊疗工作的基础上,在完成“中医古方筛选方案和利用研究”课题研究的基础上,经过深入发掘,编纂完成《一选方治验实录》(上下册)。本书以有验案资证作为筛选古方的重要条件,结合古方其他价值特征,从近10万首方剂中,筛选出583首古方及其相关验案5500余则。这些优选出的古方,既不乏传世名方,也有相当一部分以往未被方剂学教材或方剂选本收录过的“新面孔”。从10万首方中最终优选出500余首方,其比例约为200选1;又鉴于治验记录是本书的主要内容,故名为《一选方治验实录》。

全书分上、下两册,上册收录汉唐方(张仲景方、晋唐方),下册收录宋元明清方(宋元方、明清方),编次以方为纲,医案为目,每一方剂又分方源记载和治验实录(分为中医病证医案、西医病症医案)两部分。书末附有方名索引、中医病证索引、西医病症索引和引用书目,方便读者检索。

本书汇集古今文献,资料丰富,拥有本书,就如同跟随古今名医侍诊,通过品读古方所附的具体病例,领悟出该方的适应证和用法秘诀,可大大提高中医治疗的疗效。本书是中医各科临床医生提高临床疗效必备的案头书,又可为各中药生产厂家研发新药提供借鉴。

《一选方治验实录》(上下册),为16开精装本,1584页,已由人民卫生出版社于2011年1月出版。上册定价99元,下册定价108元,全套207元。邮购汇款地址:北京市东直门南小街16号中医杂志社医海林音像书店;邮政编码:100700;联系电话:(010)64013162、(010)64014431;转3053。请在汇款附言中注明所购书名、上下册或全套及数量,邮购单册需加邮费10元,全套及2册以上免邮费。欢迎邮购。