

基于代谢组学的强直性脊柱炎和痛风性关节炎 湿热证共性特征研究

赵 铁¹ 殷婷婷² 张英泽¹ 陆 进¹ 李 平¹ 王国春¹ 祖 宁¹ 阎小萍¹ 张相林^{1*}

(1. 卫生部中日友好医院药学部, 北京市朝阳区樱花东街 2 号, 100029; 2. 郑州大学附属郑州市中心医院)

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81001488)

* 通讯作者: xianglin63@yahoo.com, (010)84205563

[摘要] 目的 探讨风湿性疾病湿热证的共性代谢物组特征。方法 采用气相色谱-飞行时间质谱联用技术, 对强直性脊柱炎(AS)湿热证患者 30 例、痛风性关节炎(GA)湿热证患者 29 例及健康志愿者 44 例的血清样本进行代谢组学研究, 比较 AS 湿热证患者、GA 湿热证患者相对于健康志愿者(正常组)血清中与湿热证相关的共性差异代谢物组。结果 与正常组相比, α -羟基丁酸、磷酸和甘露糖在 GA 和 AS 湿热证组血清中均明显升高, 而乙醇胺则明显下降。结论 血清 α -羟基丁酸、磷酸、甘露糖和乙醇胺可能为风湿性疾病湿热证的共性代谢物组特征。

[关键词] 强直性脊柱炎; 痛风性关节炎; 湿热证; 代谢组学

Study on Common Features of Damp-Heat Syndrome in Rheumatism Based on Metabolomics

ZHAO Tie¹, YIN Tingting², ZHANG Yingze¹, LU Jin¹, LI Ping¹, WANG Guochun¹, ZU Ning¹, YAN Xiaoping¹, ZHANG Xianglin¹

(1. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029; 2. Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University)

ABSTRACT **Objective** To research the common metabolomic feature of rheumatism with damp-heat syndrome. **Methods** A metabolomic study of serum samples was conducted in 30 ankylosing spondylitis (AS) patients with damp-heat syndrome, 29 gouty arthritis (GA) patients with damp-heat syndrome and 44 healthy volunteers by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOFMS). The Common difference metabolomics associated with damp-heat syndrome in AS patients with damp-heat syndrome and GA patients with damp-heat syndrome were compared with the healthy volunteers. **Results** Comparing with the healthy volunteers, α -hydroxy acid, phosphoric acid and mannose was significantly increased but ethanolamine was significantly decreased in AS patients with damp-heat syndrome and GA patients with damp-heat syndrome. **Conclusion** The common metabolomic feature of rheumatism with damp-heat syndrome may be α -hydroxy acid, phosphoric acid, mannose and ethanolamine.

Keywords ankylosing spondylitis; gouty arthritis; damp-heat syndrome; metabolomics

风湿性疾病包括类风湿性关节炎、强直性脊柱炎(AS)、痛风性关节炎(GA)、骨关节炎、系统性红斑狼疮等等, 往往具有较高的发病率、致残率、严重的并发症。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、发展及转归都有着密切的关系^[1]。目前对风湿性疾病湿热证特征的研究较少, 湿热证作为中医证型的一种, 有着一组特定的外候信息与之相对应, 而作为承载人体生命活动终端信息、与外候联系最紧密的小分子代谢物, 亦必然与湿热证候存在联系。本研究以风湿性疾病的两种典型疾病即 AS 和 GA 湿热证患者为研究对象, 利用代谢组学技术, 探讨风湿性疾病湿热证的共性特征, 为风湿性疾病湿热证基础理论及其临床诊断的规范化、标准化、定量化提供现代科学依据。

1 资料

1.1 诊断及辨证标准

AS 诊断标准^[2]: 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^[3]: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临床实验室和 X 线征象 12 项中的 6 项者:①1 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。

湿热痹阻证辨证标准^[4]: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 AS 及 GA 诊断标准及中医湿热证者;年龄 18~70 岁;患者同意签署中日友好医院伦理委员会审核同意的知情同意书。

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;有心、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、残障的患者。

1.4 一般资料

本研究共纳入 2010 年 6—12 月中日友好医院门诊的 AS 湿热证患者(AS 湿热证组)30 例,平均年龄(29.6 ± 9.9)岁和 GA 湿热证患者(GA 湿热证组)29 例,平均年龄(45.6 ± 13.0)岁,并招募 AS 湿热证健康对照组(AS 正常对照组)22 例,平均年龄(29.3 ± 9.2)岁,GA 湿热证健康对照组(GA 正常对照组)22 例,平均年龄(45.7 ± 12.2)岁。患者及健康自愿者均为男性。AS 湿热证组和 AS 对照组之间,GA 湿热证组和 GA 对照组之间一般资料差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

2 方法

2.1 仪器与耗材

氯苯丙氨酸(批号 ACD23033)、十七酸(批号 CF23871)、甲氧铵(批号 BCBB2520)均为美国 Sigma 公司产品;N,O-双(三甲基硅烷)三氟乙酰胺

(BSTFA,含 1% 三甲基氯硅烷,美国 Sigma 公司,批号 LB70202)吡啶溶液;无添加剂真空采血管(北京积水创格医疗科技有限公司)。离心浓缩仪(太仓市科教器材厂);气相色谱-飞行时间质谱联用仪(GC-TOFMS,PegasusHT,美国 Leco 公司);DB-5MS 气相毛细管色谱柱(美国安捷伦科技有限公司)

2.2 血样采集与保存

用无添加剂的真空采血管与空腹状态经外周静脉采全血 3 ml 和 5 ml,3 ml 全血送至中日友好医院检验科进行血常规、肝肾功能等生化指标检查,5 ml 全血在实验室于 4℃、3 000 r/min 离心 10 min,取血清,保存于 -80℃ 待用。

2.3 代谢组学分析

将 100 μ l 上清液转移到带有内插管的样品瓶中,在真空离心浓缩干燥仪上浓缩至干,然后进行三甲基硅烷(TMS)衍生化。衍生化步骤与文献^[5]类似。将 50 μ l 甲氧铵(15 mg/ml 溶解在吡啶中)溶液加入干燥的样品中,涡旋振荡 30 s,然后置于摇床中恒温 30℃,肟化羰基,90 min 后取出,加入 50 μ l BSTFA,涡旋振荡 30 s,静置于 70℃ 鼓风干燥箱中硅烷化反应 1 h。

衍生化后的样品以不分流模式注入到 GC-TOFMS 中进行分析,进样量为 1 μ l,色谱柱为 DB-5 毛细管柱(30 m $\times$ 250 μ m,0.25 μ m),载气为氦气,流速为 1.0 ml/min。进样温度设定为 270℃。柱温梯度为 80℃ 维持 2 min,然后以 10℃/min 程序升温至 180℃,5℃/min 升至 240℃,25℃/min 至 290℃,维持 9 min,然后回到起始温度。传递线(Transfer-line)温度和离子源温度分别为 260℃ 和 200℃。质谱采用电子轰击源(70 eV)及全扫描模式,扫描范围为 m/z 30—600。

2.4 数据处理及统计学方法

将 GC-TOFMS 分析所得的质谱数据由 ChromaTOF 工作站软件以 NetCDF 格式导出。这些 CDF 文件用 Matlab 7.0 工具箱中 hierarchical multivariate curve resolution(H-MCR)修改的用户自定义程序^[6-7],进行数据前处理提取特征变量,包括基线校正、去噪、平滑、对齐、时间-窗口分裂,多元曲线分离(基于多元曲线分离算法)等。所得三维数据集包括样品信息、峰保留时间和峰强度。数据集中内标和由噪音、柱流失及 BSTFA 衍生化引起的人造峰须先被除去。葡萄糖的相关峰在数据归一化前也要去掉。归一化是将每个峰的强度除以一个样品全部峰强度的总和。

所得数据集导入 SIMCA-p 11.5 软件进行多元统计分析。数据首先经过中心化和 Pardo 处理, 然后进行主成分分析 (PCA) 或偏最小二乘判别分析 (PLSDA)。PCA 是一种非监督的模式识别方法, 可以用来判断多维数据集的一般聚类情况。PLSDA 是一种有监督的模式识别方法, 一般用来建立组间的预测模型, 判别多维变量在组间是否存在明显的差异。在本研究中, 我们应用软件中默认的 7 轮交互验证方法以防止模式的过度拟合。我们应用独立 t 检验来比较组间均值是否存在显著差异, 计算每个差异变量相应的倍数变化, 以显示它们在模型组以及治疗前后的变化程度。

通过 NIST MS search 2.0 软件比较质谱碎片与 NIST 08 标准质谱库 (相似度超过 70%) 并最终用标准品验证进行代谢物鉴定。

3 结果

3.1 代谢物组 GC-TOFMS 分析总离子流色谱图比较

使用 GC-TOFMS 为基础的代谢指纹谱的分析方法对 AS 湿热证组和 GA 湿热证组及其各自相应的正常对照组样本进行分析, 所得的各组代表性样本总离子流色谱图如图 1 所示。从 GC-TOFMS 总离子流色谱图不易直观地识别出 AS 湿热证组和 GA 湿热证组与各自正常对照组之间的差异, 因此,

需进一步借助特征提取和统计学的方法来鉴别。

3.2 模式识别分析

将采集的 GC-TOFMS 数据导入 MATLAB 7.0 软件, 利用自建的程序, 经过去噪、反卷积、峰重排等过程, 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 进行 PLSDA 建模分析, 初步判断 AS 湿热证组及 GA 湿热证组与其各自正常对照组的聚类关系。图 2、图 3 示, AS 湿热证组和 AS 正常对照组、GA 湿热证组和 GA 对照组均表现出明显的分离趋势, 这提示组间的代谢谱存在显著差异。

3.3 AS 湿热证组与 GA 湿热证组中医辨证的共性代谢物组特征

将 AS 湿热证组和 GA 湿热证组样本的混合组 (湿热证组) 与相应的正常对照组样本混合组 (正常组) 的代谢物水平进行独立 t 检验, 此外, GA 湿热证组以及 AS 湿热证组也与各自对照组分别进行独立 t 检验, 所得的 P 值同时满足 $P < 0.05$ 的代谢物确定为风湿性疾病湿热证的共性代谢物。表 1 示, α -羟基丁酸、磷酸和甘露糖在湿热证组血清中均明显升高, 而乙醇胺在湿热证组血清中明显下降, α -羟基丁酸、磷酸、甘露糖和乙醇胺均为风湿性疾病湿热证的共性代谢物。

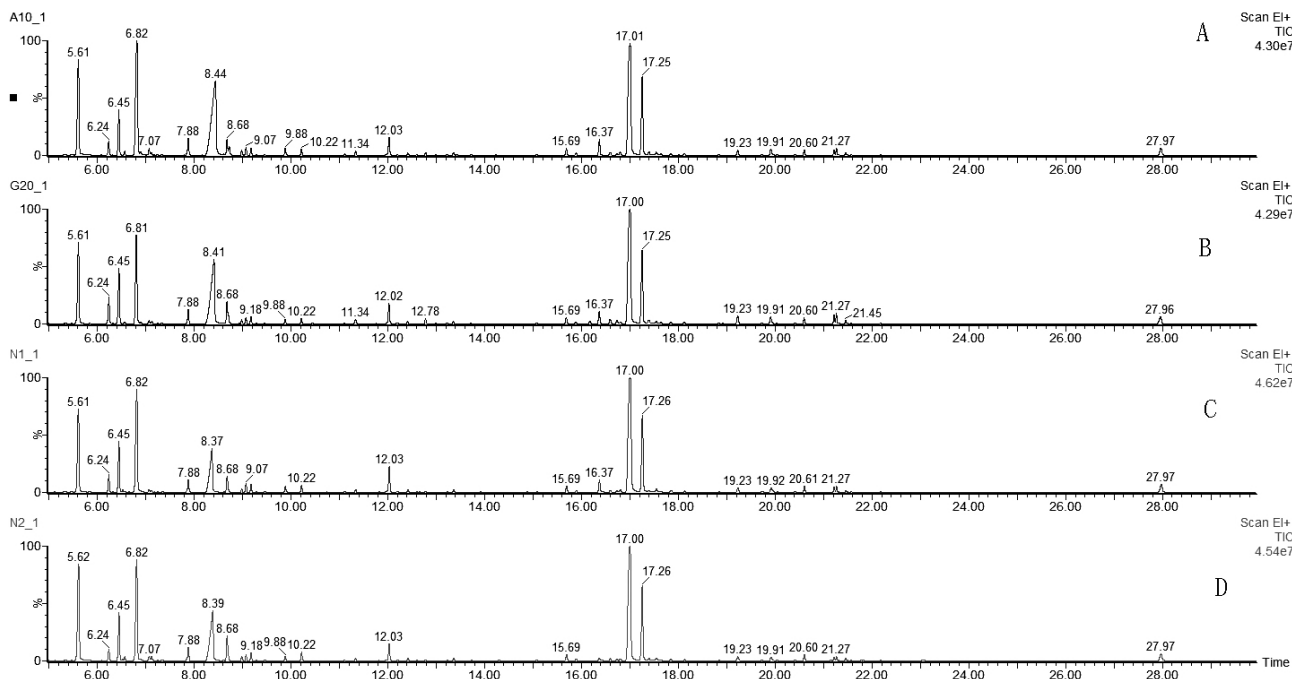


图 1 各组代表性 GC-TOFMS 总离子流色谱图
A: AS 湿热证组; B: GA 湿热证组; C: AS 正常对照组; D: GA 正常对照组

表 1 AS 湿热证和 GA 湿热证的共性代谢组特征

保留时间(min)	共性代谢物	湿热证组和正常组 进行比较 P 值	GA 湿热证组与 GA 正常对照组比较			AS 湿热证组和 AS 正常对照组进行比较		
			P 值	变化倍数	趋势	P 值	变化倍数	趋势
6.15	未能鉴别	0.0000	0.0002	2.21	↑	0.0129	1.66	↑
6.56	α-羟基丁酸	0.0004	0.0362	1.36	↑	0.0002	1.74	↑
8.61	乙醇胺	0.0031	0.0309	0.88	↓	0.0242	0.80	↓
8.71	磷酸	0.0000	0.0000	1.20	↑	0.0116	1.14	↑
16.80	甘露糖	0.0000	0.0006	1.40	↑	0.0000	1.45	↑

注:变化倍数为 GA 湿热证组或 AS 湿热证组和各自正常对照组某代谢物平均相对强度的比值

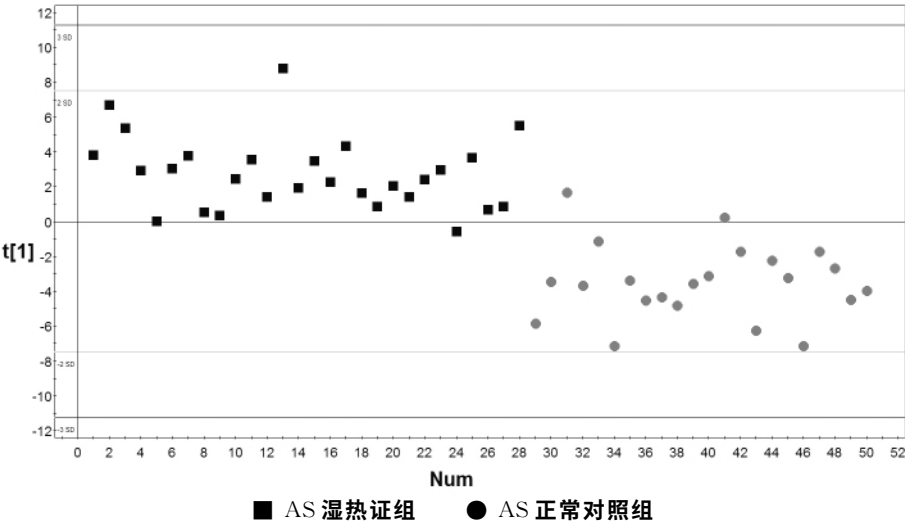


图 2 AS 湿热证组与 AS 正常对照组的 PLSDA 得分图

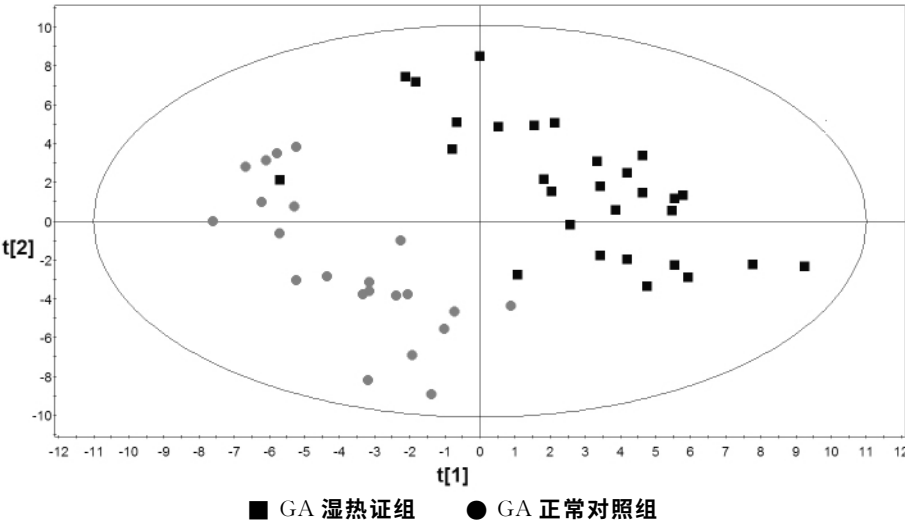


图 3 GA 湿热证组与 GA 正常对照组的 PLSDA 得分图

4 讨论

目前学者研究湿热证的思路大体可以概括为临床和中医动物模型两个层次以及免疫、生化、病理、微量元素等几个方向。近年的研究结果显示,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^[8-10]。湿热证作为中医证型的一种,有着一组特定的外候信息与之相对应,而作为

承载人体生命活动终端信息、与外候联系最紧密的小分子代谢物,亦必然与湿热证候存在联系,但湿热证和诸如氨基酸、有机酸、糖类、有机胺、脂肪酸、嘌呤/嘧啶、脂类(甘油磷脂、鞘脂等)等小分子代谢物群之间的相关性研究至今还未见报道。本研究以临床风湿性疾病 AS 和 GA 为切入点,从代谢物组入手,进一步探讨湿热证共性特征。

本研究发现 α-羟基丁酸在 GA 湿热证和 AS 湿

热证患者血清中均明显升高,可能为风湿性疾病湿热证的共性特征。 α -羟基丁酸是 α -酮丁酸形成过程中的副产物,该形成反应由乳酸脱氢酶或 α -羟基丁酸脱氢酶催化。 α -酮丁酸主要由氨基酸(苏氨酸和甲硫氨酸)分解代谢和谷胱甘肽(半胱氨酸)合成代谢中产生。根据 Gall 的报道^[11],引起 α -羟基丁酸在血清中升高的原因可能至少有以下两方面:①氧化应激导致肝谷胱甘肽合成增加,进而引起代谢通路上 α -酮丁酸产物的增加。②由于脂质氧化引起的 NADH/NAD 比例升高,从而导致 α -酮丁酸在乳酸脱氢酶和 α -羟基酸脱氢酶作用下向 α -羟基丁酸转化增加。本研究受技术条件限制未能检测到 α -酮丁酸,但本课题组的另一项试验研究发现^[12],AS 和 GA 湿热证患者血清中溶血甘油磷脂酰胆碱、甘油磷脂酰胆碱、甘油磷脂酰乙醇胺、甘油三酯等许多脂质组分相对于健康对照组出现了显著的降低,这些结果提示氧化应激及与之直接或间接相关的脂质代谢异常可能与风湿病湿热证实质密切相关。本研究还发现,磷酸、甘露糖和乙醇胺可能为风湿性疾病湿热证的共性特征,这些结果此前均未见报道,有待于进一步的研究。

参考文献

- [1]任延明,文绍敦,洒玉萍,等. 痛风中医证型病因病机调查分析[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(7):872-873.
- [2]van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria[J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(4):361-368.

(上接第 586 页)

用中药复方金线莲口服液联合金线莲喷雾剂治疗,临床上取得了很好的疗效,在皮疹和口腔黏膜病变消退时间方面有较强的优势,同时能更有效的缩短总疗程。而利巴韦林联合中药金线莲在治疗手足口病方面并不能起到增强疗效的作用,但能缩短退热时间,其机理有待进一步的药理研究。

综上所述,手足口病普通型中医证型主要为热毒犯肺和肺脾湿热两型,临证时抓住手足口病普通型中医基本病因病机“热毒夹湿”,早期投予清热解毒化湿之品,并依据中医证候特点,进行辨证论治,可彰显中医药在防治手足口病的灵活性、有效性和安全性。

参考文献

- [1]吴疆. 我国手足口病与重症肠道病毒感染的流行病学研究现状[J]. 中国小儿急救医学, 2008, 15(2):100-102.
- [2]张国梁,颜鹏飞,陈必全,等. 837 例手足口病普通型中医

- [3]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.
- [4]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.
- [5]Li H, Xie Z, Lin J, et al. Transcriptomic and metabolomic profiling of obesity-prone and obesity-resistant rats under high fat diet[J]. J Proteome Res, 2008, 7(11):4775-4783.
- [6]Jonsson P, Gullberg J, Nordström A, et al. A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS[J]. Anal chem, 2004, 76(6):1738-1745.
- [7]Jonsson P, Johansson AI, Gullberg J, et al. High-throughput data analysis for detecting and identifying differences between samples in GC/MS-based metabolomic analyses[J]. Anal chem, 2005, 77(17):5635-5642.
- [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]Gall WE, Beebe K, Lawton KA, et al. alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population [J]. PLoS One, 2010, 5(5):10883.
- [12]殷婷婷,赵春杰,张英泽,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.

(收稿日期:2012-11-02;修回日期:2013-01-10)

[编辑:邓媛]

临床流行病学研究分析[J]. 中医药临床杂志, 2011, 23(9):763-766.

- [3]中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 版)[S/OL]. (2010-4-21)[2012-12-03]. <http://www.moh.gov.cn>.
- [4]解放军总后勤部卫生部. 临床疾病诊断依据治愈好转标准[S]. 北京:人民军医出版社, 1987:172.
- [5]胡焕章. 岭南脾胃湿热病机与诊治[J]. 中医杂志, 1986, 27(7):7-9.
- [6]荣莉.《岭南卫生方》治瘴学术思想初探[J]. 中医文献杂志, 2003, 21(4):7-9.
- [7]福建中医药研究所. 福建药物志(第二册)[M]. 福州:福建科学技术出版社, 1982:215.
- [8]王振登,杨春波. 金线莲中微量元素及氨基酸的分析测定[J]. 福建中医学院学报, 1993, 3(2):100-101.
- [9]李希元,秦艳华,郝健. 针药结合治疗抽动-秽语综合征 30 例[J]. 吉林中医药, 2003, 23(4):34.

(收稿日期:2012-12-03;修回日期:2013-01-17)

[编辑:邓媛]