

• 证候诊断 •

冠心病血瘀证血浆代谢组学研究

魏 星¹ 万 玲¹ 刘石蜜¹ 夏季东² 易伦朝² 王东生^{1*}

(1. 中南大学湘雅医院中西医结合科, 湖南省长沙市开福区湘雅路 87 号, 410008; 2. 中南大学化工化学院)

基金项目: 科技部国际科技合作与交流专项资助项目(2010DFA32370); “十一五”国家科技支撑计划项目(2009BAI80B04);

国家自然科学基金资助项目(81173198); 湖南省科学技术厅国际科技合作计划资助项目(2008WK3002);

湖南省科学技术厅科技计划一般项目(2009JT4012); 中南大学贵重仪器设备开放共享基金资助项目(CSUZC2012013)

* 通讯作者: wdsh66@yahoo.com.cn, (0731)84327369

[摘要] 目的 采用气相色谱(GC)-质谱(MS)联用技术, 寻找冠心病(CHD)血瘀证患者内源性代谢分子标记物。方法 收集 CHD 血瘀证患者 48 例、CHD 非血瘀证患者 52 例及健康对照组 40 例, 运用 GC-MS 联用技术检测各组受试者血浆代谢产物, 对代谢物定性分析后, 分别采用单变量 t 检验和多变量蒙特卡罗树法(MCTree)对各组代谢物含量进行比较。结果 各组受试者血浆内源性代谢物种类无差别, 总计 46 种。定量单变量 t 检验结果显示, CHD 患者与健康对照组比较, 有 32 种代谢物含量差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); CHD 血瘀证组与 CHD 非血瘀证组比较, 胆固醇含量升高, 木糖醇含量降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。MCTree 结果显示, 健康对照组与 CHD 患者血浆代谢物完全分离, 对二者分离贡献最大是 L-缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、L-丝氨酸, 且含量较健康对照组明显降低; 血瘀证与非血瘀证之间有明显分离趋势, 44 种物质对分类有显著影响。结论 血浆 GS-MS 代谢图谱能有效的从健康人中区分出冠心病患者、从冠心病患者中区分出血瘀证患者, 这些含量存在差异和对分类有贡献的物质可能是 CHD 血瘀证诊断和辨证的潜在代谢标记物和客观指标。

[关键词] 冠心病; 血瘀证; 代谢组学; 气相色谱-质谱联用技术

Plasma Metabolomics Study on Blood Stasis Syndrome of Coronary Heart Disease

WEI Xing¹, WAN Ling¹, LIU Shim¹, XIA Jidong², YI Lunzhao², WANG Dongsheng¹

(1. Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Province 410008; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University)

ABSTRACT Objective To search the endogenous metabolites molecular makers in plasma of coronary heart disease (CHD) patients with blood stasis syndrome by gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS) technique. **Methods** Forty-eight CHD patients with blood stasis syndrome, 52 CHD patients without blood stasis syndrome and 40 healthy persons were involved in the research. The plasma metabolites were detected by GC-MS technique. The metabolite contents were compared with t -test and Monte-Carlo tree method. **Results** There were 46 types of metabolites without difference among the subjects. There were significant differences between CHD patients and healthy persons in the contents of 32 types of metabolites ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with CHD patients without blood stasis syndrome, the cholesterol content was significantly increased but the xylitol content was significantly decreased in CHD patients with blood stasis syndrome ($P < 0.05$). The plasma metabolites were completely separated in healthy persons and CHD patients. L-valine, glycine, alanine and L-serine were the greatest contribution to the separation and their contents in CHD patients were significantly decreased as compared with those in the healthy persons. There was a significant separation trend between blood stasis syndrome and non-blood stasis syndrome and 44 types of metabolites had a significant effect on the classification. **Conclusion** The plasma GS-MS metabolite profiles can effectively distinguish CHD patients from healthy persons and distinguish blood stasis syndrome in CHD patients. The substances of different content and contributing to classification may be the potential metabolic marker and objective indicators for diagnosing as CHD with blood stasis syndrome.

Keywords coronary heart disease; blood stasis syndrome; metabolomics; gas chromatography-mass spectrometry

代谢组学是系统生物学的重要组成领域之一, 在揭示中医传统理论本质上有着巨大优势^[1-3], 在冠心病(coronary heart disease, CHD)的检测中显

示出了广阔前景^[4-6]。本研究旨在采用气相色谱(GC)-质谱(MS)联用技术, 寻找 CHD 血瘀证患者内源性代谢分子标记物, 探讨 CHD 血瘀证的证候

本质及代谢特征。

1 临床资料

1.1 诊断及辨证标准

CHD 诊断标准采用世界卫生组织(WHO)制定的《缺血性心脏病的命名及诊断标准》^[7]并经冠状动脉造影证实至少 1 支冠脉狭窄 $\geq 50\%$ 。血瘀证中医辨证标准参照《中医病证诊断疗效标准》^[8]制定。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准:符合以上诊断标准及血瘀证辨证标准;年龄 40~75 岁。

排除标准:合并严重高血压、糖尿病、恶性肿瘤、肝肾疾病、甲状腺疾病、造血系统疾病者;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、肺源性心脏病、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患者;肝炎、结核等传染病患者;精神系统疾病者;妊娠及哺乳期妇女;过敏体质及重要资料不全者。

1.3 一般资料

选取 2009 年 12 月至 2011 年 7 月在中南大学湘雅医院内科住院治疗并首次通过冠状动脉造影确诊为 CHD 的患者 100 例,将辨证属 CHD 血瘀证的患者作为 CHD 心血瘀阻证组(血瘀证组),共 48 例,其中男 32 例,女 16 例,平均年龄(62.80 ± 11.03)岁;其余证型 CHD 患者作为 CHD 非血瘀证组,共 52 例,其中男 34 例,女 18 例,平均年龄(62.58 ± 10.23)岁;另将同时期在中南大学湘雅医院体检中心体检且结果正常的成年人作为健康对照组,共 40 例,其中男 29 例,女 11 例,平均年龄(60.83 ± 12.68)岁。各组受试者一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.4 主要试剂及仪器

甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺和三甲基氯硅烷(BSTFA+1% TMCS)、甲氧胺盐酸盐、吡啶、十七烷酸(分析纯,购自美国 Sigma 公司)。气相色谱质谱联用仪(GC/MS-QP2010,日本岛津公司)。

2 方法

2.1 样本的采集及预处理

各组受试者均于造影确诊或确认体检结果无异常后第 2 天早晨空腹肘静脉采血 4 ml,EDTA 抗凝,离心($10\,000\text{ r/min}$, 4°C)10 min 后取上清液, -80°C 保存。实验时常温解冻,取 $100\,\mu\text{l}$ 置入离心管,加入 $50\,\mu\text{l}$ 十七酸甲醇溶液(内标, 1 mg/ml),再加入

$350\,\mu\text{l}$ 甲醇以除蛋白,涡旋 1 min,离心($16\,000\text{ r/min}$, 4°C)10 min,取上清液 $400\,\mu\text{l}$ 置入进样瓶,真空挥干。加入 20 mg/ml 甲氧胺吡啶溶液 $50\,\mu\text{l}$ 混匀, 70°C 下脗化 1 h 后加衍生试剂 N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺和三甲基氯硅烷(BSTFA+1% TMCS) $100\,\mu\text{l}$ 混匀, 70°C 水浴反应 1 h 后涡旋混匀,取 $1\,\mu\text{l}$ 进样。

2.2 GC/MS 检测条件

采用气相色谱-质谱联用仪检测 GC/MS,检测条件:色谱柱程序升温(70°C , 4 min, 8°C/min 升至 300°C 后保持 3 min);分流比 10:1;进样口温度 280°C ,接口温度 250°C ,离子源温度 200°C ;载气为高纯度氦气,流速 1.00 ml/min ;电离方式为标准 EI 源,电子能量 70 eV;扫描范围(m/z)35~800 amu,扫描间隔 0.2 s/scan。

2.3 统计学方法

根据 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。多变量分析应用 matlab 7.5 编写 Monte Carlo Tree approach 程序,采用化学计量学模式识别方法蒙特卡罗树法(MCTree)进行统计分析。结果应用 SPSS 15.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用单变量 t 检验。

3 结果

3.1 各组受试者代谢物总离子图分析

在优化的 GC-MS 检测条件下,建立了稳定的血浆小分子物质代谢图谱(图略),所得图谱中色谱峰分离情况理想,几乎都达到基线分离,保留时间及主要峰的分布均具有较好的重现性,不同组别的血浆代谢图谱具有明显的差别。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,各组受试者血浆各峰的 RSD 为 $2.05\% \sim 6.75\%$ 。

3.2 各组受试者血浆代谢物定性结果

各组受试者血浆内源性代谢物种类无差别,具体物质名称见表 1(内标十七酸保留时间为 25.244 min)。

3.3 各组受试者血浆代谢物定量比较

定性完成后,结合保留时间、保留指数等信息,对定性所得 46 种内源性代谢物在不同组中的含量进行了计算。

运用单变量的 t 检验对相同物质在不同组别间

表 1 各组受试者血浆内源性代谢物种类

编号	保留时间 (min)	物质名称	编号	保留时间 (min)	物质名称
1	8.283	乳酸	24	21.128	柠檬酸
2	8.626	羟基乙酸	25	21.454	甘露糖
3	8.904	L-缬氨酸	26	21.573	肉豆蔻酸
4	9.178	丙氨酸	27	21.807	果糖
5	9.609	甘氨酸	28	21.993	半乳糖
6	9.702	2-羟基丁酸	29	22.178	葡萄糖
7	9.767	甲基丙二酸	30	22.619	棕榈酸甲酯
8	10.014	草酸	31	23.150	吡喃葡萄糖
9	10.148	2-羟基丙酸	32	23.819	(9E)-9-十六烯酸
10	10.348	亮氨酸	33	24.081	棕榈酸
11	10.422	3-羟基丁酸	34	24.530	肌醇
12	10.780	异亮氨酸	35	24.669	亚油酸甲酯
13	12.196	尿素	36	24.749	油酸甲酯
14	12.324	L-丝氨酸	37	25.049	硬脂酸甲酯
15	12.636	磷酸	38	25.996	亚油酸
16	12.653	甘油	39	26.072	油酸
17	13.010	L-苏氨酸	40	26.134	异油酸
18	13.649	甘油酸	41	26.348	硬脂酸
19	16.322	苹果酸	42	26.538	花生四烯酸甲酯
20	16.847	L-焦谷氨酸	43	27.681	花生四烯酸
21	17.161	2,3,4-三羟基丁酸	44	29.862	单软脂酸甘油酯
22	19.829	木糖醇	45	31.661	单硬脂酸甘油酯
23	20.344	甘油磷酸酯	46	35.372	胆固醇

的含量进行比较分析发现：①与健康对照组比较，CHD 患者血浆内有 32 种代谢物在含量上存在差异，包括 8 种氨基酸：L-缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、L-丝氨酸、亮氨酸、L-苏氨酸、L-焦谷氨酸含量均降低；6 种脂肪酸：花生四烯酸含量降低，棕榈酸、亚油酸、油酸、异油酸、(9E)-9-十六烯酸含量均升高；5 种有机酸类：草酸、2-羟基丁酸、甲基丙二酸、羟基乙酸含量升高，柠檬酸含量降低；5 种糖类：

甘露糖、果糖、半乳糖、葡萄糖含量升高，吡喃葡萄糖含量降低；2 种醇类：甘油含量升高，木糖醇含量降低；3 种酯类：甘油磷酸酯、单软脂酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯含量均降低；3 种其他类：磷酸(酸类)、尿素(胺类)、胆固醇，含量均降低。上述物质中，胆固醇和羟基乙酸差异的统计学意义为 $P<0.05$ ，其余物质差异的统计学意义均为 $P<0.01$ 。这些物质可能就是 CHD 患者的血浆代谢标记物。②与 CHD 非血瘀证组比较，CHD 血瘀证组有 2 种物质含量存在差异，胆固醇含量升高($P<0.05$)，木糖醇含量降低($P<0.05$)。这两种物质可能就是 CHD 血瘀证的代谢标记物。

将定性所得的 46 种物质作为变量，采用 MC-Tree 法对 CHD 患者与健康对照组、CHD 血瘀证组与 CHD 非血瘀证组进行聚类分析，结果显示：①健康对照组与 CHD 患者血浆代谢物完全分离，而且各组中样本簇居紧密，提示健康人与 CHD 患者之间代谢模式有显著差异(图 1-a)；对二者分离有贡献是 L-缬氨酸、甘氨酸、亮氨酸、L-丝氨酸(图 1-b)，结合定量结果可知，在 CHD 患者血浆中，以上 4 种物质含量较健康人明显降低，这些对分类有贡献的物质可能也是 CHD 患者的代谢诊断标记物。②CHD 血瘀证与非血瘀证之间尽管有一部分样本混合在一起，但都具有明显的分离趋势(图 2-a)；定性所得 46 种物质中，除吡喃葡萄糖(糖类)、单软脂酸甘油酯(酯类)外的其余 44 种血浆内源性代谢物均对 CHD 血瘀证与非血瘀证有不同程度的贡献(图 2-b)，这 44 种对分类有贡献的物质可能是 CHD 血瘀证分型的判别代谢标记物。

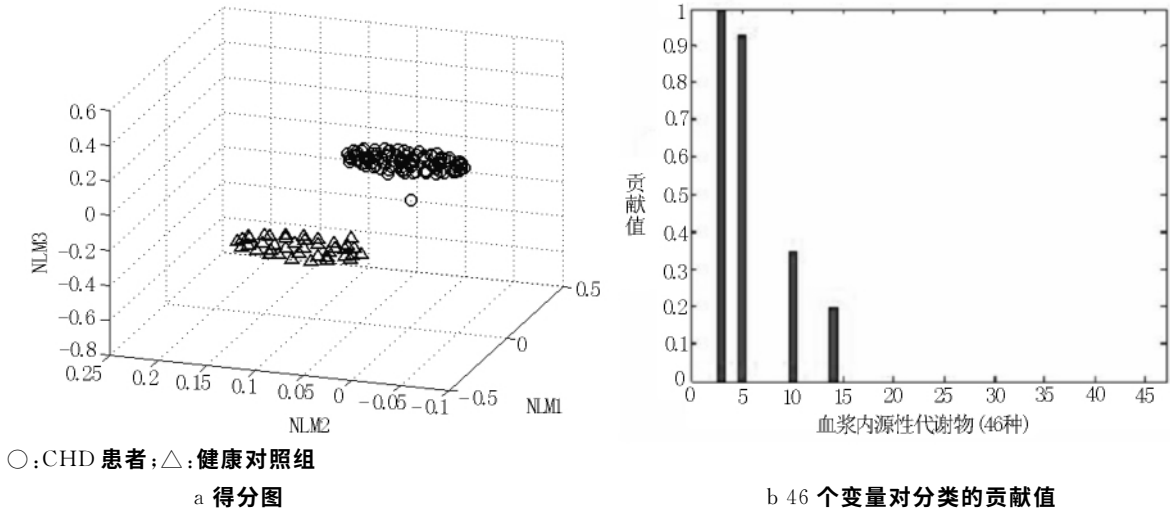


图 1 CHD 患者与健康受试者血浆样本代谢谱的 MCTree 图

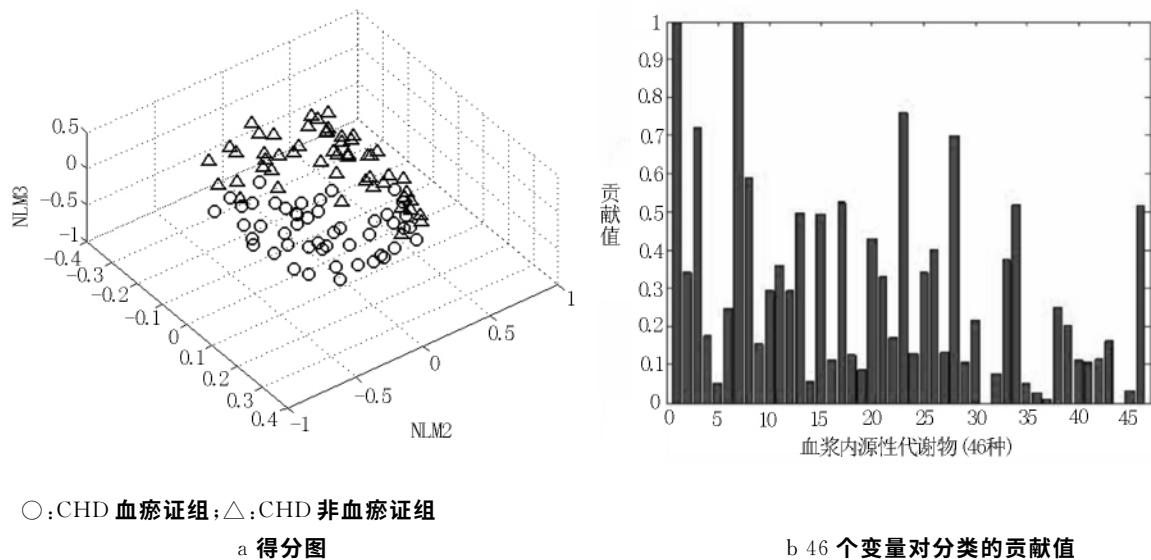


图 2 CHD 患者血浆样本代谢谱的 MCTree 图

4 讨论

GC-MS 联用技术是代谢组学的主要分析技术之一,最早于 20 世纪 70 年代就用于疾病的代谢图谱分析^[9-11],在疾病诊断研究中也运用得越来越多^[12-13],是目前发展最完善、运用最广泛的联用技术,具有灵敏度和分辨率高、适于痕量分析等优点。但其高灵敏度和分辨率的特点也意味着检测条件很小的变化就可能导致同一个样本在不同时候测出的谱图也不一样,因此,我们采用对同一样品连续进样 6 次检测,来考察仪器的重复和稳定性,以保证结果的正确性。另外,GC 分析是具有热稳定性的非极性或极性小的物质,这意味着许多化合物如糖类、核苷、氨基酸等不能被直接分析,而对标本进行提取和处理等中间的处理环节难以避免会引入一些潜在的变异和造成某些物质成分的损失及信息的丢失。血浆中的代谢物一般都是极性大、挥发性低的水溶性物质,虽然我们采用的衍生化方法和升温程序合理,但一些量微的小分子物质仍难以避免丢失。

本研究中,我们最终鉴定出结果较为可靠的化合物 46 个,这些物质包括脂肪酸、酯类、氨基酸、糖类、有机酸、醇类及其他类物质。通过单变量 t 检验发现,与健康人相比,CHD 患者血浆内 6 种脂肪酸类含量异常($P < 0.01$),3 种与脂质代谢有密切关系的酯类物质含量也降低($P < 0.01$),提示 CHD 患者存在严重的脂类代谢异常,而脂质代谢紊乱可以看做是 CHD 血瘀证的主要代谢特征之一。

文献报道^[14-19],血浆脂肪酸(FA)组成与 CHD 有密切关系,饱和脂肪酸升高是 CHD 的高危因素,

不饱和脂肪酸中的 ω -6 PUFAs 代谢产生促炎介质, ω -3 PUFAs 代谢产生抗炎介质,对心血管有保护作用。本研究中我们找到了 8 种脂肪酸类的物质,其中饱和脂肪酸 3 种(棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻酸),不饱和脂肪酸 5 种[油酸、异油酸、亚油酸、花生四烯酸、(9E)-9-十六烯酸]。CHD 患者血浆内棕榈酸含量较健康人升高;亚油酸、异油酸、亚油酸和花生四烯酸可归为 ω -6 系列,其含量亦较健康人显著升高,提示炎症可能在 CHD 和其他动脉粥样硬化疾病中起着重要作用。可能是因为体内脂肪酸代谢失衡,引起体内非感染性炎症及血小板异常活化,导致冠状动脉病变及血栓形成。此外,与健康人相比,CHD 患者中 8 种氨基酸、4 种有机酸含量降低($P < 0.05$),糖类、醇类及其他类物质物质含量也较健康人有差异($P < 0.01$),糖代谢障碍、低氨基酸代谢水平可能是 CHD 血瘀证的代谢特征。

与 CHD 非血瘀证相比较,CHD 血瘀证中胆固醇含量升高($P < 0.05$),木糖醇含量降低($P < 0.05$),且均较健康人异常。木糖醇是糖代谢的正常中间产物,胆固醇是临床上反应体内脂质代谢情况的一个重要指标,提示 CHD 血瘀证可能较非血瘀证存在更为严重的糖、脂代谢异常。CHD 患者中出现脂肪酸增高、木糖醇等含量降低,可能与其心肌缺血促进脂肪贮存和脂肪氧化代谢、影响细胞代谢、抑制活性氧物质而导致消耗增加有关,且这一情况在 CHD 血瘀证中更为严重,但有待进一步研究证实。

MCTree 是一种极为有效的变量筛选方法^[20],在生物医学、计算物理系、宏观经济学等领域广泛应

用。用该方法模拟某一过程时几乎将所有可能的概率计算在内,所得结果较单纯考虑某一或某几个变量的统计分析方法更为可靠。本研究将分析所得46种物质作为变量运用MCTree方法分析发现:CHD患者与健康人之间可能存在不同的代谢模式, L-缬氨酸、甘氨酸、亮氨酸、L-丝氨酸对二者间的判别有显著作用。这4种物质在CHD患者中含量均较健康人低,说明较健康人而言,CHD患者氨基酸代谢水平偏低。

CHD血瘀证、非血瘀证患者可能存在不同代谢模式或代谢模式中存在不同的部分,46个变量中除吡喃葡萄糖、单软脂酸甘油酯、硬脂酸甲酯外,其余物质均对分类有不同程度的影响,单变量 t 检验中发现的CHD血瘀证的潜在代谢标记物(木糖醇、胆固醇)也对分类有贡献。这些物质包括脂肪酸类(饱和脂肪酸及不饱和脂肪酸)、酯类、氨基酸类、糖类、醇类、醇酸类、有机酸类等多类物质,包括了简维雄等^[12]报道的CHD血瘀证8种代谢产物中的7种。

本研究中单变量 t 检验中含量有差异的物质和MCTree方法中对分类有贡献的物质,均可能是我们要寻找的CHD或CHD血瘀证的代谢标记物,即CHD或CHD血瘀证的诊断、辨证的客观指标。两种分析方法所得结果存在差异,可能是因为有些物质在患者和健康人中绝对的数量值差别可能很小,但在MCTree算法中显示的差异很大;因为人体血浆中各种代谢物浓度差异较大,而含量高的代谢物未必比含量低的代谢物具有更重要的生理作用。下一步,我们将应用液质联用技术、核磁共振技术对本研究的结果进行进一步筛选验证。

参考文献

- [1] 张建平, 张少强, 朱明丹, 等. 代谢组学在中医药领域的应用[J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(2): 31-34.
- [2] Wang M, Larmers RJ, Korthout HA, et al. Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology[J]. Phytother Res, 2005, 19(3): 173-182.
- [3] 林中营, 严诗楷, 戴卫星, 等. 代谢组学技术在临床诊断中的应用[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(6): 811-817.
- [4] Griffin JL. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis[J]. Curr Opin Chem Biol, 2003, 7(5): 648-654.
- [5] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using HNMR-based metabonomics[J]. Nat Med, 2002, 8(12): 1439-1444.
- [6] 许彬, 王海龙, 魏开华, 等. 代谢组学分析技术及其在人类重大疾病研究中的应用[J]. 分析测试学报, 2006, 25(5): 128-132.
- [7] 贝政平. 内科疾病诊断标准[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 251.
- [8] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 18.
- [9] Gates SC, Sweeley CC, Krivit W, et al. Automated metabolic profiling of organic acids in human urine. II. Analysis of urine samples from "healthy" adults, sick children, and children with neuroblastoma[J]. Clin Chem, 1978, 24(10): 1680-1689.
- [10] Gates SC, Sweeley CC. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography[J]. Clin Chem, 1978, 24(10): 1663-1673.
- [11] Gates SC, Dendramis N, Sweeley CC. Automated metabolic profiling of organic acids in human urine. I. Description of methods[J]. Clin Chem, 1978, 24(10): 1674-1679.
- [12] 简维雄, 袁肇凯, 黄献平, 等. 冠心病心血瘀阻证血浆代谢组学的检测分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(6): 579-585.
- [13] 邓嘉辉, 易伦朝, 梁逸曾, 等. 分类特征变量法用于筛选鼻咽癌的代谢标记物[J]. 计算机与运用化学, 2010, 27(4): 421-424.
- [14] 肖辉, 张月明, 张琰, 等. 阿魏蘑菇提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(4): 331-335.
- [15] DAS UN. Tumoricidal and anti-angiogenic actions of gamma-linolenic acid and its derivatives[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2006, 7(6): 457-466.
- [16] 董杰明, 吴瑞华, 袁昌鲁, 等. γ -亚麻酸的保健作用[J]. 卫生研究, 2003, 32(3): 299-301.
- [17] Marik PE, Zaloga GP. Immunonutrition in critically ill patients: a systematic review and analysis of the literature[J]. Intensive Care Med, 2008, 34(11): 1980-1990.
- [18] Wichmann MW, Thul P, CZA Rnetzki HD, et al. Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): data from a prospective, randomized, multicenter trial[J]. Crit Care Med, 2007, 35(3): 700-706.
- [19] 吴远怡, 何振杨, 谢贤和, 等. ω -3 不饱和脂肪酸对脓毒血症患者免疫功能及近期预后的影响[J]. 广东医学, 2011, 32(17): 2332-2335.
- [20] Cao DS, Wang B, Zeng MM, et al. A new strategy of exploring metabolomics data using a Montecarlo tree[J]. Analyst, 2011, 136(5): 947-954.

(收稿日期: 2012-08-31; 修回日期: 2012-11-22)

[编辑: 崔京艳]