

• 证候诊断 •

不同证型冠心病患者的血浆代谢组学研究

朱明丹¹ 杜武勋^{1*} 魏聪聪¹ 姜 民² 刘长玉¹ 张建平¹
冯利民¹ 张红霞¹ 刘 岩¹ 袁宏伟¹ 曹旭焱¹ 张少强¹ 许艳玲¹

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津市河北区真理道 816 号, 300150; 2. 南开大学药学院)
基金项目: 国家自然科学基金重点项目(90709003); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81001512);
国家自然科学基金面上项目(81173159)

* 通讯作者: zhmd_2005@163.com, 13011321094

[摘要] 目的 运用代谢组学方法研究冠心病不同证型的代谢差异。方法 收集痰阻心脉证、气阴两虚证、气滞血瘀证冠心病患者各 10 例, 另收集健康人 10 例(正常组), 各组受试者早上空腹采集血浆标本, 应用超高效液相色谱/串联四级杆—飞行时间质谱技术, 分析冠心病不同证候及正常组血浆中的内源性小分子代谢物, 从质谱中可以得到潜在生物标记物的精确分子量, 并对潜在的生物标记物进行鉴定, 探索冠心病不同证候的潜在代谢组学标志物。结果 与正常组相比, 冠心病组磷脂代谢、脂肪酸代谢、氨基酸代谢紊乱以及其导致的小血小板聚集明显。葡萄糖、花生四烯酸、亚油酸在气滞血瘀证组中显著增高; 气阴两虚证组苯丙氨酸、甘氨酸、高丝氨酸、葡萄糖、磷酸肌酸含量较低; 痰阻心脉证组的葡萄糖含量比气滞血瘀证组高。结论 葡萄糖、花生四烯酸、亚油酸、苯丙氨酸、甘氨酸、高丝氨酸、葡萄糖、磷酸肌酸等代谢产物与能量代谢、脂质代谢、糖代谢、氨基酸代谢紊乱密切相关, 有望成为冠心病中医辨证分型的基础物质。

[关键词] 冠心病; 中医证候; 代谢组学

Metabolomic Study on Coronary Heart Disease Patients with Different Chinese Medicine Pattern

ZHU Mingdan¹, DU Wuxun¹, WEI Congcong¹, JIANG Min², LIU Changyu¹, ZHANG Jianping¹, FENG Limin¹, ZHANG Hongxia¹, LIU Yan¹, YUAN Hongwei¹, CAO Xuyan¹, ZHANG Shaoqiang¹, XU Yanling¹

(1. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300150; 2. College of Pharmacy, Nankai University)

ABSTRACT Objective To research the metabolic differences between different patterns of coronary heart disease (CHD) by metabolomics method. **Methods** Ten CHD patients with phlegm obstructing the heart vessels pattern, qi-yin deficiency pattern and qi stagnation blood stasis pattern were collected respectively and 10 healthy persons were collected as the normal group. The fasting plasma samples of subjects were collected in the morning. The ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole-time of flight tandem mass spectrometer was used to analyze the endogenous small molecule metabolites in plasma samples of CHD patients with different patterns and healthy persons. The precise molecular weight of potential biomarkers could be obtained from the mass spectrum. The potential biomarkers were identified to explore the potential metabolomics markers of CHD patients with different patterns. **Results** Comparing with the normal group, a disorder of phospholipid metabolism, fatty acid metabolism and amino acid metabolism occurred in the CHD group and led to platelet aggregation significantly. The contents of glucose, arachidonic acid and linoleic acid were significantly increased in the qi stagnation blood stasis pattern group. The contents of phenylalanine, glycine, homoserine, glucose and phosphocreatine were low in the qi-yin deficiency pattern group. The glucose content in the phlegm obstructing the heart vessels pattern group was higher than that in the qi stagnation blood stasis pattern group. **Conclusion** The metabolites such as glucose, arachidonic acid, linoleic acid, phenylalanine, glycine, homoserine and creatine phosphate are closely related to the energy metabolism, lipid metabolism, glucose metabolism and amino acid metabolism. It is expected to become the material basis for TCM pattern identification of CHD.

Keywords coronary heart disease; TCM pattern; metabolomics

代谢组学为后基因时代一种全新的组学技术, 是系统生物学的一个重要分支。中医证候代谢组学研究技术是通过采集证候样本或模型动物的血浆、尿样等进行代谢产物谱分析, 得到各自的代谢产物谱, 找出特异的标志性代谢产物, 用生物信息学方法

分析生物标志物的功能, 以确定“证相关代谢谱群”^[1]。本研究利用代谢组学技术对冠心病痰阻心脉证、气阴两虚证、气滞血瘀证进行了初步研究, 试图通过患者血浆的代谢物质变化探索病证模式背后的生物标志物。

1 资料

1.1 冠心病诊断标准及中医辨证标准

冠心病西医诊断采用 Judkin's 方法行冠状动脉造影检查,冠状动脉病变至少在两个 X 线投影位置上均能看到冠状动脉分支、段狭窄 $\geq 50\%$,即可确诊^[2]。

中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[3]。痰阻心脉证:胸闷如窒而痛,或痛引肩背,气短喘促,体胖多痰,身体困重,舌苔浊腻或滑,脉滑。气阴两虚证:胸闷隐痛,时作时止,心悸气短,倦怠懒言,头晕,失眠多梦,舌红少苔,脉弱而细数。气滞血瘀证:胸痛胸闷,胸胁胀满,心悸,唇舌紫暗,脉涩。

1.2 纳入标准

符合冠心病诊断标准及中医辨证标准者;年龄 40~70 岁;签署知情同意书。

1.3 排除标准

合并严重高血压、重度肺功能不全、重度心律失常和肝、肾、造血系统等严重原发性疾病、精神病患者;妊娠或哺乳期妇女。

1.4 一般资料

收集 2011 年 1 月至 2012 年 1 月在天津中医药大学第二附属医院心血管科住院的冠心病患者,中医辨证分为痰阻心脉证组 10 例,气阴两虚证组 10 例,气滞血瘀证组 10 例。各组均为男 5 例,女 5 例;平均年龄 55 岁;病程 3~10 年,平均病程 5 年。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。另收集健康人 10 例(正常组),均为 2011 年在天津中医药大学第二附属医院体检中心体检者,经详细询问病史、体格检查及胸透、血尿便常规、血糖、肝肾功能等理化检查,评定无心、脑、肝、肾、肺等主要器官系统的实质性病变。

2 方法

2.1 样品的采集与制备

受试者血浆标本都在早上空腹采集后立即在 4℃ 条件下 3000 r/min 离心 10 min,将血浆放到 EP 管-80℃ 保存。样品处理时,精密量取血浆样品 300 μ l,加入甲醇 1200 μ l,涡旋 2 min,在 4℃ 条件下 13000 r/min 离心 15 min;取上清液 1200 μ l 经氮气吹干后,加入 50% 甲醇 150 μ l 复溶,涡旋 2 min 后,4℃ 条件下 13000 r/min 离心 15 min,取上清液进行分析。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件 色谱分离采用 Acquity BEH C₁₈ 分析柱(100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, Waters, MA, USA),柱温 30℃,流速 0.4 ml/min。自动进样器温

度设定 20℃,进样 5.0 μ l,每个样品重复进样 3 次。流动相组成为:A 相为乙腈;B 相为 0.1% 甲酸水溶液,采用梯度方式洗脱样品。梯度设置如表 1。

表 1 液相色谱流动相梯度条件

序号	时间	流速(ml/min)	A/%	B/%
1	初始	0.400	2.0	98.0
2	4.00	0.400	30.0	70.0
3	5.00	0.400	40.0	60.0
4	8.00	0.400	40.0	60.0
5	14.00	0.400	50.0	50.0
6	18.00	0.400	55.0	45.0
7	22.00	0.400	90.0	10.0
8	24.00	0.400	90.0	10.0
9	26.00	0.400	2.0	98.0
10	28.00	0.400	2.0	98.0

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源;V 模式;毛细管电压 3.0 kV;锥孔电压 30 V;离子源温度 100℃;脱溶剂气温度 300℃;脱溶剂氮气流量 600 L/h;锥孔气流量 50 L/h;检测器电压 1800 V;采样频率 0.1 s,采样间隔 0.02 s;记录范围 50—1000 Da;Lockmass 采用 LEA($[M+H]^+ = 555.2931$)。

2.3 代谢组学数据分析

借助化学计量学的手段对于代谢组学所获数据中的信息进行提取。本研究主要采用了主成分分析法(Principle component analysis,PCA,一种无监督的模式识别方法)对所获得的代谢组学数据进行分析。质谱数据处理采用 Waters 公司 Markerlynx 软件(Waters, MA, USA)进行色谱峰自动识别和峰匹配,数据导入后采用 PCA 对不同组间的数据进行模式识别。

2.4 冠心病不同证型生物标记物分析

生物标记物的发现与确证是代谢组学研究的目标和重要突破口之一。通过上述分析所获得的代谢指纹图谱,经图谱预处理并积分后,对积分值进行多元统计分析,根据各样本的主成分得分作图(Scores 图),可判别组间差异并对组别进行分类;进一步用 PCA 分析进行主成分因子负荷矩阵分析,并作变量散点图>Loading 图),从图中可发现显著升高或降低的变量,这些变量即为“生物标志物”,这些变量的组合即为表征病变的“生物标记物群”,此时获得的仅为相关峰信息,如相应的保留指数和荷质比等,根据所得信息进一步进行结构推测,查询相关数据库以及实验室自建的化合物信息库,进行生物标记物的获得及确证。

3 结果

3.1 各组血浆样本典型的物质准分子离子峰(BPI)图谱

通过对冠心病痰阻心脉证、气阴两虚证、气滞血瘀证和健康人血浆生物标记物进行 PCA 聚类计算分析,得到典型的 BPI 图,如图 1。从总离子流图谱直观比较可以发现,有一些谱峰在四组之间存在着明显的差异。

3.2 各组血浆样本代谢产物差异的图谱模式识别

通过分析主要得到 Score 图和 Loading 图。Score 图能够显示样品在坐标图中的关联性,相似的样本会聚在一起,有差异的样本会分开分布在不同的区域,即 Score 图能够将存在代谢差异的实验组样本进行分类。Loading 图可以找出对分类贡献的成分,离原点越远的成分对分类贡献越大,这些成分可被认为是干扰正常生理代谢的潜在生物标志物。从图 2 可以很直观地看出,两组间明显的分为

两个的部分,同一组间很好聚集在一起。通过对 Loading 图(图 3)的分析,找到了对分型贡献较为显著的 12 个物质,依次为 m/z 520.34, 496.34, 524.37, 212.02, 522.36, 544.34, 120.08, 76.07, 991.68, 166.08, 303.23, 279.23。

3.3 潜在生物标志物的鉴定和代谢途径研究

在代谢组学分析过程中,对潜在生物标志物的鉴定分析是一个至关重要的步骤,潜在生物标志物对于作用机制和代谢途径的研究意义重大,这也是代谢组学研究中的难点。对 PCA 聚类 Loading 图中找到的 12 个贡献显著的潜在生物标志物,依次采用 TOF-MS 精确分子量测定、匹配分子式、数据库检索、文献对照和标准品确证的方式进行鉴定,结果见表 2。葡萄糖、花生四烯酸、亚油酸在气滞血瘀证组中显著增高;气阴两虚证组苯丙氨酸、甘氨酸、高丝氨酸、葡萄糖、磷酸肌酸含量较低;痰阻心脉证组的葡萄糖含量比气滞血瘀证组高。

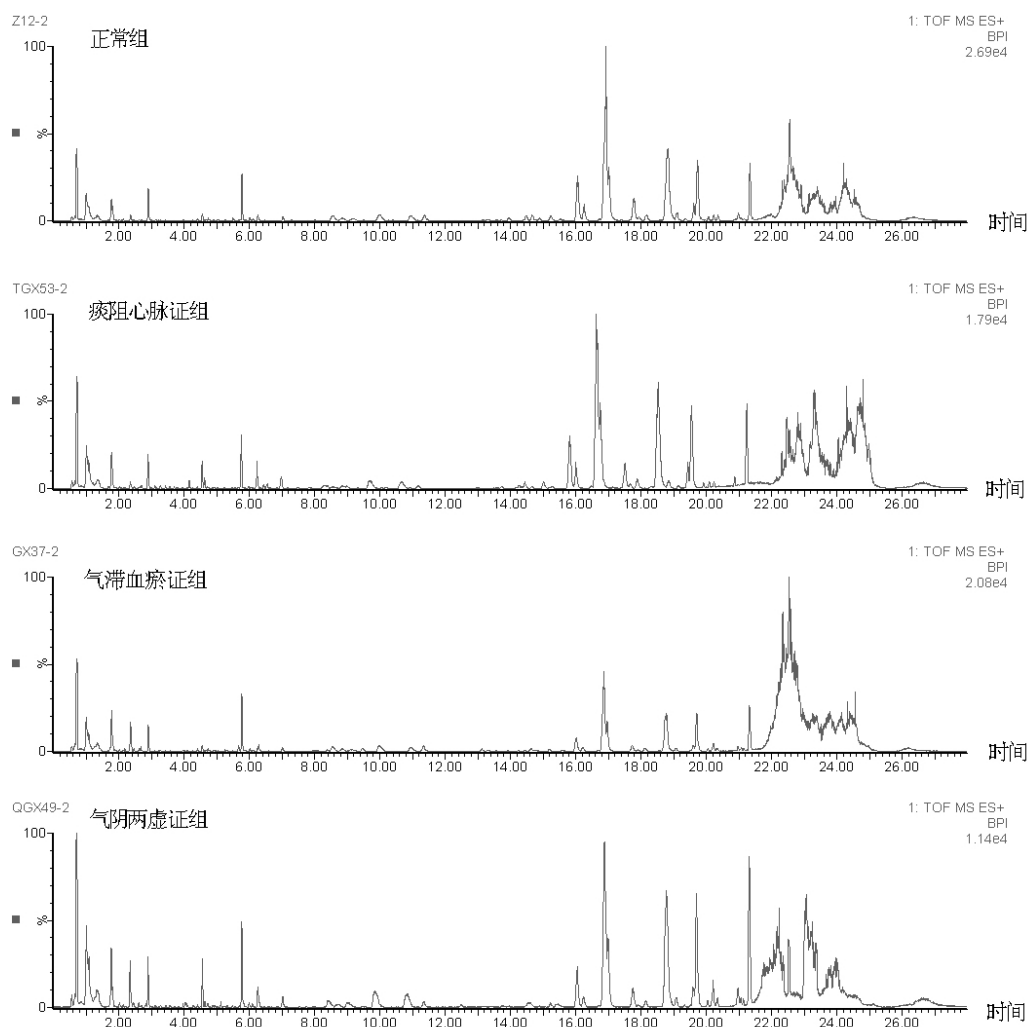


图 1 各组血浆样品典型的超高效液相色谱质谱四级杆飞行时间质谱

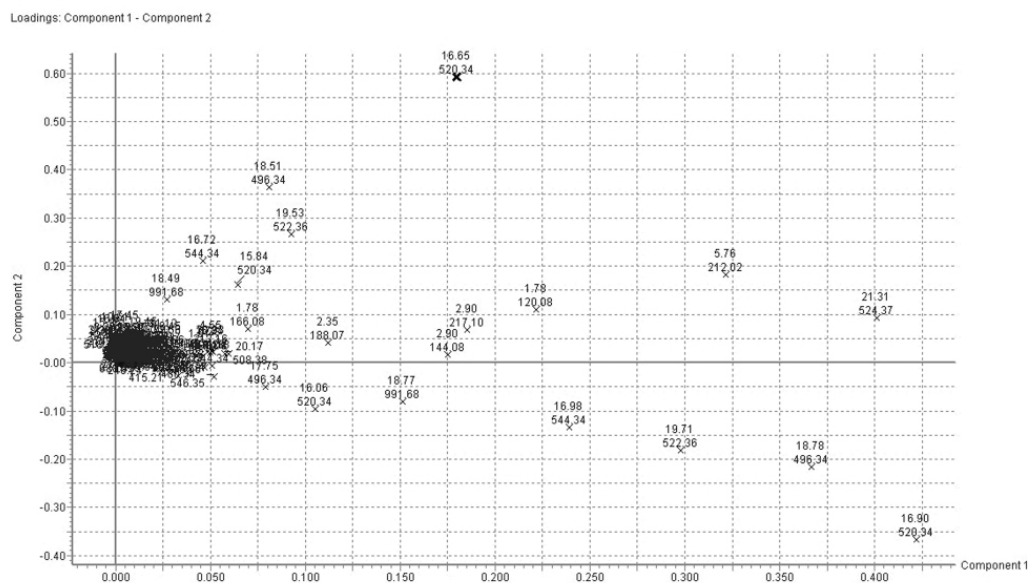
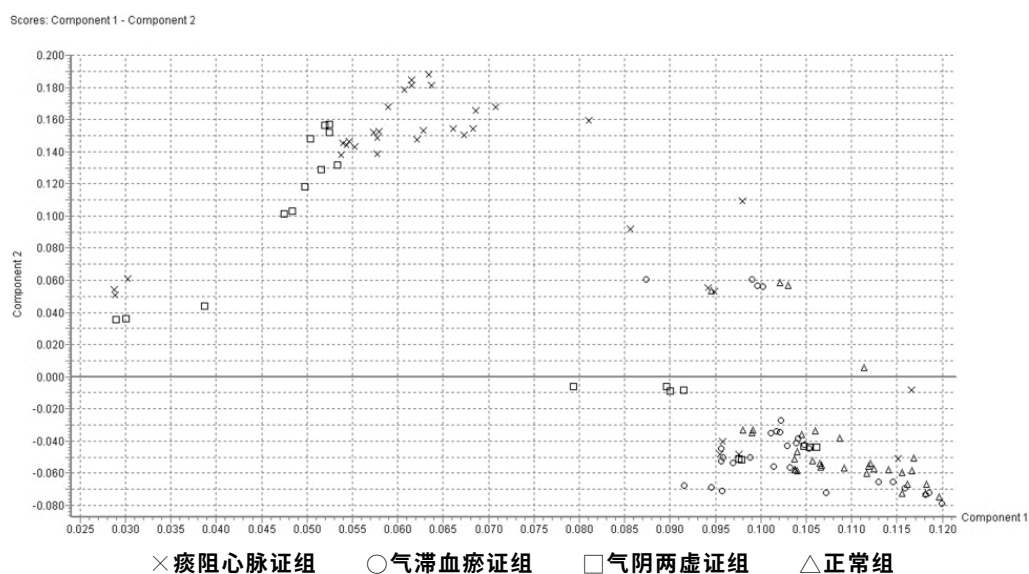


图 3 各组血清样本 PCA 聚类 Loading 图

序号	选择离子	精确质量(Da)	元素组成	鉴定
1	[M+H] ⁺	520.3391	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	L-溶血卵磷脂 LysoPC[18;2(9Z,12Z)]
2	[M+H] ⁺	496.3390	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(16;0)
3	[M+H] ⁺	524.3707	C ₂₆ H ₅₅ NO ₇ P	硬脂酰甘油磷脂酰胆碱
4	[M+H] ⁺	212.0187	C ₄ H ₁₀ N ₃ O ₅ P	磷酸肌酸 Phosphocreatine
5	[M+H] ⁺	522.3552	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	L-溶血卵磷脂 LysoPC[18;1(9Z)]
6	[M-H] ⁻	544.3400	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	花生四烯酰基溶血卵磷脂
7	[M+H] ⁺	120.0797	C ₁₂ H ₁₃ NO ₄	L-高丝氨酸 L-Homoserine
8	[M+H] ⁺	76.0666	C ₂ H ₅ NO ₂	甘氨酸
9	[M+H] ⁺	991.6809	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	葡萄糖 Maltohexaose
10	[M+H] ⁺	166.0841	C ₉ H ₁₁ NO ₂	苯丙氨酸 L-Phenylalanine
11	[M-H] ⁻	303.2293	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	花生四烯酸
12	[M-H] ⁻	279.2293	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	亚油酸

4 讨论

代谢组学通过特异性的标志物,诊断疾病、确定病因或通过代谢产物谱推测体内物质变化过程^[4-7]。其优势在于样品获取方便、检测容易,能够对检测到的小分子化合物进行定性和定量研究,而这些化合物的上调、下调或许将来可以作为鉴别中医证候的客观指标。本研究利用代谢组学方法发现不同证型的冠心病患者的代谢物存在明显差异,这些代谢物有望成为各证型患者生物标志物。

研究结果显示,与正常组相比,冠心病各组磷脂代谢、脂肪酸代谢、氨基酸代谢紊乱以及其导致的血小板聚集明显。在潜在生物标志物中,有众多磷脂类的物质,如溶血磷脂酰胆碱(LPC16:0)、硬脂酰甘油磷脂酰胆碱,这说明磷脂代谢紊乱很可能是造成冠心病代谢异常的主要原因。正常情况下,体内的花生四烯酸主要是以脂肪酰基的形式储存在质膜磷脂中,细胞中游离的花生四烯酸浓度几乎为零;当冠状动脉狭窄造成心肌缺血后,蛋白激酶(PKC)通路被激活,进一步活化了磷脂酶 A_2 (PLA₂),使得质膜磷脂的水解加快,磷脂含量降低,另一方面释放产生的游离花生四烯酸水平升高。花生四烯酸经环加氧酶前列腺素 G_2 (PGG₂)、前列腺素 H_2 (PGH₂)、前列腺素 E_2 (PGE₂)进一步转化为血栓烷 A_2 (TXA₂)、血栓烷 B_2 (TXB₂),PGE₂等能够诱发炎症、促进局部血管扩张,TXA₂及PGE₂能促进血小板凝集、血管收缩,促进凝血和血栓的形成,造成严重的一系列心血管疾病^[8]。花生四烯酸的代谢异常对心脏的正常功能有着极大的影响,可导致心脏的收缩力下降,心输出量减少,甚至可诱发或加重心肌梗死和心绞痛。

本研究结果显示,葡萄糖、花生四烯酸、亚油酸在心血瘀阻证中显著增高,与文献报道一致^[9]。冠心病气滞血瘀证心肌组织持续缺血、持续疼痛,造成生理应激,刺激肾上腺皮质、激活交感神经系统,使血中糖皮质激素和儿茶酚胺增高,致使机体合成代谢降低,分解代谢亢进,脂肪、糖元分解加快,血糖、脂肪酸(花生四烯酸、硬脂酸)水平增高。气阴两虚证组苯丙氨酸、甘氨酸、高丝氨酸、葡萄糖、磷酸肌酸含量较低,提示氨基酸代谢水平低及能量代谢异常可能是气虚证的生物标志之一。能量代谢障碍可导致气血运行不畅,不通而痛,这与“胸痹而痛”及气阴两虚证气短乏力相一致^[10]。葡萄糖是生物体内新陈代谢不可缺少的重要物质之一,它参与很多代谢过程,包括糖代谢、脂代谢等。磷酸肌酸是人体内源

性活性物质,可为ATP分子补充能量,后者是细胞代谢过程中主要的能量来源。痰阻心脉证组的葡萄糖含量比气滞血瘀证组高,说明痰浊证组比气滞血瘀证组存在更严重的糖代谢紊乱。痰浊证组脂肪酸代谢紊乱更明显,脂肪酸代谢途径属于中医“痰浊”、“湿邪”的范畴,代谢趋势下降引起痰湿之邪蓄积体内,阻遏脾胃,导致脾胃功能受损,而脾胃功能受损又进一步可加剧痰湿之邪的蓄积,形成恶性循环。这些代谢产物与能量代谢、脂质代谢、糖代谢、氨基酸代谢紊乱密切相关,有望成为冠心病中医辨证分型的基础物质。

参考文献

- [1]杜武勋,朱明丹,袁宏伟,等.病证结合,方证相应的系统-系统的方证相应动态研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(6):839-842.
- [2]国际心脏病学会和协会及世界卫生组织临床命名标准化联合专题组.缺血心脏病的命名及诊断标准[J].中华心血管病杂志,1981,9(1):75.
- [3]郑筱萸.中药新药临床研究指导原则(试行)[M].北京:中国医药科技出版社,2002:69.
- [4]赵春艳,阿基业,曹蓓.代谢组学在代谢性疾病研究中的进展[J].中国临床药理学与治疗学,2011,16(4):439-446.
- [5]高嘉元,严玉澄.代谢组学技术在肾脏病研究中的应用中国[J].中西医结合肾病杂志,2011,12(5):466-470.
- [6]石洁,胡元会.代谢组学及其在心血管疾病中的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(1):86-88.
- [7]梅亚波,封志纯.代谢组学在儿科危重症领域的研究进展[J].解放军医学杂志,2011,36(6):676-678.
- [8]Wenk MR. The emerging field of lipidomics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(7):594-610.
- [9]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):579-584.
- [10]严蓓,阿基业,郝海平,等.心血瘀阻组与气阴两虚证心肌缺血大鼠模型的代谢组学表征与辨识[J].中国科学C辑:生命科学,2008,38(12):1143-1151.

(收稿日期:2012-12-18;修回日期:2013-05-27)

[编辑:邓媛]

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951—1986年(4张光盘)480元;1987—1994年(1张光盘)260元;1995—2004年(1张光盘)280元。光盘合订本为计算机用数据光盘,收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容,可对所有文章进行任意字检索,方便实用。

汇款地址:北京东直门内南小街16号中医杂志北京医海林音像书店,邮政编码:100700,电话:(010)64035632。网址:<http://www.jtcm.net.cn>。