

· 临床论著 ·

基于代谢组学中医湿证不同分期糖尿病 肾病患者生物标志物研究

张燕媚^{1, 2, 3} 蔡 寸^{1, 2, 3} 刘嘉玲⁴ 盛泓沁^{1, 2, 3} 刘旭生^{1, 2, 3} 张 蕾^{1, 2, 3}

摘要 **目的** 基于代谢组学技术探讨糖尿病肾病 (DKD) 湿证患者血清差异代谢谱, 寻找与 DKD 患者不同分期相关的潜在生物标志物。**方法** 采用高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 技术, 分析广东省中医院生物资源标本库诊断为 DKD 的患者血清代谢谱, 应用代谢组学处理软件 ProgenesisQ1 和 KEGG、HMDB 数据库统计分析, 筛选湿证与非湿证间、以及不同分期 DKD 患者间的差异代谢物。采用 ROC 分析对上述差异代谢物的诊断性能进行分析, 并取二者 ROC 分析交集的差异代谢物进行通路富集分析, 筛选出同时与湿证和 DKD 不同分期相关的主要代谢通路。**结果** 研究共纳入 63 例 DKD 患者的血清标本, 其中非湿证患者 16 例, 湿证患者 47 例。同时以 7 名健康人群为对照。代谢组学结果显示, DKD 不同湿证亚型与非湿证患者的血清代谢谱之间存在显著差异 (水湿证/湿浊证/湿热证与非湿证间分别有 167、65、28 种差异代谢物, $P < 0.05$)。通路富集分析显示, 水湿证、湿热证和非湿证间的差异代谢物主要富集于苯丙氨酸代谢和胆汁分泌代谢, 湿浊证和非湿证间的差异代谢物主要富集于甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、脂代谢、癌症的胆碱代谢途径。在证候差异代谢物中, 与 DKD 不同分期相关的差异代谢物 ($AUC > 0.7$, 水湿证和非湿证间 116 种, 湿浊证和非湿证间 29 种, 湿热证和非湿证间 10 种), 主要富集在苯丙氨酸代谢、胆汁分泌、脂肪酸生物合成、癌症的胆碱代谢、亚油酸代谢和赖氨酸生物合成。关联分析结果提示, 证候差异代谢物在湿证和非湿证的变化趋势与 DKD 患者临床生化指标随疾病分期进展的变化趋势一致。**结论** DKD 中医湿证与 DKD 的不同分期相关, DKD 湿证患者血清代谢物特征的变化可能与苯丙氨酸代谢、胆汁分泌、脂肪酸生物合成、癌症的胆碱代谢、亚油酸代谢和赖氨酸生物合成通路紊乱相关。

关键词 糖尿病肾病; 代谢组学; 湿证; 疾病分期; 生物标志物; 中医

Study on Biomarkers of Patients with Dampness Syndrome and Diabetic Kidney Disease in Different Clinical Stages Based on Metabonomics ZHANG Yan-mei^{1, 2, 3}, CAI Cun^{1, 2, 3}, LIU Jia-ling⁴, SHENG Hong-qin^{1, 2, 3}, LIU Xu-sheng^{1, 2, 3}, and ZHANG Lei^{1, 2, 3} 1 State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510120); 2 The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou (510405); 4 School of Medicine, Southern University of Science and Technology, Guangdong (518055)

ABSTRACT Objective To explore the differences in serum metabolic profiles of patients with dampness syndrome and diabetic kidney disease (DKD), and to find the potential biomarkers related to the clinical stages of DKD. **Methods** High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to analyze the serum metabolic profiles of patients diagnosed with DKD recruited by the Biological Resources

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81603717; No.81873261); 省部共建中医湿证国家重点实验室专项 (No.SZ2020ZZ22, No.SZ2021ZZ16, No.SZ2021ZZ43); 广东省中医证候临床研究重点实验室专项 (No.ZH2020KF02)

作者单位: 1. 省部共建中医湿证国家重点实验室, 广州中医药大学第二附属医院 (广州 510120); 2. 广州中医药大学第二临床医学院 (广州 510405); 3. 广东省中医证候临床研究重点实验室 (广州 510120); 4. 南方科技大学医学院 (广东 518005)

通讯作者: 张 蕾, Tel: 020-81887233, E-mail: zhanglei@gzucm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20221128.247

Collection of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese medicine. The metabonomics software Progenesis Q1, KEGG and HMDB database were used for statistical analysis to screen out the different metabolites between dampness and non-dampness syndromes, as well as patients in different clinical stages. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was used to analyze the diagnostic performance of the above-mentioned differential metabolites, and the pathway enrichment analysis was carried out to select the major pathways that simultaneously affect the development of dampness syndrome and DKD clinical stages. **Results** A total of 63 DKD patients were recruited in the study, including 16 patients without dampness syndrome and 47 patients with dampness syndrome. Meanwhile, 7 healthy people were recruited as control. There were significant different metabolites between DKD patients with different dampness syndrome subtypes (water-dampness / dampness-turbid / dampness-heat) and non-dampness syndrome (167, 65 and 28 kinds, respectively, $P < 0.05$). Pathway enrichment analysis showed that the differential metabolites between water-dampness, dampness-heat syndromes and non-dampness syndrome were mainly enriched in phenylalanine metabolism and bile secretion metabolism, while the differential metabolites between dampness-turbid syndrome and non-dampness syndrome were mainly enriched in glycine, serine, threonine metabolism, lipid metabolism and cancer choline metabolism. Among the differential metabolites of syndromes, the differential metabolites associated with different stages of DKD (AUC > 0.7, 116 kinds between water-dampness and non-dampness syndromes, 29 kinds between dampness-turbid and non-dampness syndromes, and 10 kinds between dampness-heat and non-dampness syndromes) were mainly enriched in phenylalanine metabolism, bile secretion, fatty acid biosynthesis, cancer choline metabolism, linoleic acid metabolism and lysine biosynthesis pathways. The results of correlation analysis suggested that the expression trends of differential metabolites between dampness syndrome and non-dampness syndrome were consistent with that of clinical biochemical markers changing as clinical stages. **Conclusions** The dampness syndrome of DKD patients is related to the clinical stages of DKD. The changes of serum metabolites in patients with DKD and dampness syndrome may be associated with the disorders of phenylalanine metabolism, bile secretion, fatty acid biosynthesis, cancer choline metabolism, linoleic acid metabolism and lysine biosynthesis pathways.

KEYWORDS diabetic kidney disease; metabonomics; dampness syndrome; clinical stages; biomarkers; Chinese medicine

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是由糖尿病引起的最常见的微血管并发症之一, 目前已成为全球范围内导致终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD) 的主要原因^[1]。而在我国, DKD 患病率也呈快速增长趋势^[2], 给社会带来沉重的经济负担。

中医学认为, DKD 的基本病机为本虚标实, 因脾肾亏虚, 升清降浊无权, 分清别浊失司, 从而湿邪内生, 久之损伤肾络, 发展为 DKD^[3]。广东有着岭南气候文化中独有的“湿盛”特色。岭南之地六淫以湿邪为主, 岭南人群致病, 湿邪为首^[4]。本研究团队前期关于岭南地区 DKD 人群的回顾性研究工作发现, 湿证是 DKD 发生发展的主要标实证, 是其进展的主要病理因素^[5]。研究表明, 在 DKD 不同阶段, 湿证侧重表现出不同亚型^[6, 7]。但对于湿证或不同湿证亚型与 DKD 不同分期相关的生物标志物的探讨, 目前仍缺乏相关研究。

代谢组学可对生物体内代谢物进行定量, 从而寻找代谢物与生理病理变化的相关关系。因此, 本研

究通过非靶向代谢组学 (liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS) 分析方法, 探讨 DKD 湿证患者的血清代谢图谱, 寻找不同湿证亚型相对于非湿证 DKD 患者的差异血清代谢物, 筛选出同时与湿证和 DKD 不同分期相关的生物标志物, 为 DKD 临床诊治的潜在靶点研究提供新思路。

资料与方法

1 诊断标准 患者进入生物资源标本库时的 DKD 诊断及分期表中参照中华中医药学会肾病分会制定的《糖尿病肾脏疾病临床诊疗中国指南》中有关标准^[8]。中医辨证分型诊断参照《糖尿病肾脏病分期辨证规范与疗效评定方案及其研究》中的有关标准^[9]。

2 纳入标准 (1) 符合诊断标准及中医辨证分型标准; (2) 年龄 18~80 岁; (3) 签署知情同意书; (4) 健康人群是体检中包括血液 (血常规、肝功能、肾功能、离子)、尿液 (尿常规、尿白蛋白肌酐比)、肾脏 B 超、心脏彩超和心电图在内的检查均未见异常的成年人群。

3 排除标准 (1) 进入生物资源标本库留血液标本时已行透析等肾脏替代治疗;(2) 进入生物资源标本库时或入库后患者肾活检提示非糖尿病肾病;(3) 肝脏疾病患者或肝功能异常患者;(4) 严重心脑血管疾病患者或高血压不能有效控制患者。

4 一般资料 广东省中医院生物资源标本库 2017 年 10 月 1 日—2019 年 12 月 31 日诊断 DKD 并留取血清标本的患者,符合纳入排除标准的共 63 例,其中非湿证患者 16 例,湿证患者 47 例。同时以 7 名同一时期在广东省中医院体检均未见异常的成年人作为对照,基线情况见表 1。本研究已通过广东省中医院伦理委员会审批 (No. ZE2020-193-01)。

5 分组情况

5.1 DKD 中医湿证患者分组 将已纳入 DKD 患者按照其进入生物资源标本库时的中医证型分为“湿证”组和非“湿证”组,同时根据《糖尿病肾脏病分期辨证规范与疗效评定方案及其研究》^[9],进一步将“湿证”患者分为湿浊、水湿、湿热 3 个亚组。

5.2 DKD 患者疾病分期分组 (根据患者入库时尿蛋白及肾功能结果分组)

5.2.1 DKD 早期 24 h 尿白蛋白 ≤ 300 mg/24 h 或尿白蛋白 / 肌酐 ≤ 300 mg/g, 和 (或) 肾小球滤过率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) ≥

90 mL/min · 1.73m²。

5.2.2 DKD 中期组 24 h 尿白蛋白 >300 mg/24 h 或尿白蛋白 / 肌酐 >300 mg/g, 且 15 ≤ eGFR < 90 mL/min · 1.73 m²。

5.2.3 DKD 晚期组 24 h 尿白蛋白 >300 mg/24 h 或尿白蛋白 / 肌酐 >300 mg/g, 且 eGFR < 15 mL/min · 1.73 m²;

6 非靶向代谢组学检测方法

6.1 样本采集 生物资源标本库血清留取:受试者空腹 8 h 后抽取肘静脉血置于真空采血管中,在 4 ℃, 3 000 r/min 条件下离心 10 min 后取上层血清,每 1 mL 分装至离心管中,并置于生物资源标本库 -80 ℃ 冰箱保存备用。

6.2 样品处理 每 100 μL 样品加入 400 μL 提取液 [甲醇:乙腈 = 1:1 (v:v)], 含 0.02 mg/mL 的内标 (L-2- 氯苯丙氨酸); 涡旋混匀 30 s 后, 低温超声 (5 ℃, 40 KHz) 30 min 提取; 静置 30 min (-20 ℃) 后离心 (13 000 × g, 4 ℃, 15 min), 移取上清液, 氮气吹干; 加入 120 μL 复溶液 (乙腈:水 = 1:1), 涡旋混匀 30 s, 低温超声 (5 ℃, 40 KHz) 萃取 5 min, 离心 (13 000 × g, 4 ℃, 10 min) 后移取上清液至带内插管的进样小瓶中上机分析。

6.3 液相色谱 - 质谱检测

表 1 健康人、非湿证和湿证患者基线情况 ($\bar{x} \pm s$)

项目	健康人 (7 名)	非湿证 (16 例)	湿证 (47 例)
年龄 (岁)	42.71 ± 11.53	58.94 ± 5.32*	61.50 ± 9.03*
BMI (kg/m ²)	21.42 ± 4.21	22.24 ± 2.52	23.71 ± 2.22
SBP (mmHg)	106.57 ± 8.98	155.50 ± 18.70*	152.80 ± 29.01*
DBP (mmHg)	62.86 ± 5.67	97.25 ± 19.10*	81.07 ± 11.42* [△]
FPG (mmol/L)	4.97 ± 0.29	8.07 ± 3.22	8.49 ± 3.49*
HbA1c (%)	5.35 ± 0.26	7.88 ± 2.47	7.48 ± 1.84
TG (mmol/L)	1.27 ± 0.47	1.68 ± 0.85	1.94 ± 1.45
TC (mmol/L)	5.43 ± 1.40	5.44 ± 1.24	5.15 ± 1.40
HDL-C (mmol/L)	1.36 ± 0.45	1.26 ± 0.07	1.30 ± 0.48
LDL-C (mmol/L)	3.48 ± 1.22	4.30 ± 1.26	3.73 ± 1.26
ALB (g/L)	48.57 ± 2.66	43.90 ± 0.00	36.01 ± 6.30
ALT (U/L)	16.29 ± 12.28	21.06 ± 11.70	17.15 ± 9.08
AST (U/L)	17.71 ± 2.69	20.25 ± 5.54	18.85 ± 7.68
UA (μmol/L)	405.90 ± 103.80	466.33 ± 30.83	436.25 ± 88.22
BUN (mmol/L)	5.00 ± 1.45	9.42 ± 7.90	12.29 ± 6.88*
eGFR [mL / (min · 1.73 m ²)]	102.10 ± 16.67	62.89 ± 30.99*	43.40 ± 33.13* [△]
SCR (μmol/L)	71.57 ± 15.87	129.50 ± 98.40*	223.76 ± 178.35* [△]
UAL (mg/24 h)	13.57 ± 3.51	1 286.14 ± 1841.92*	2 236.65 ± 2046.14* [△]
UACR (mg/g)	13.86 ± 2.00	1 377.61 ± 1720.88*	2 580.71 ± 2258.37* [△]

注:与健康人比较, *P<0.05; 与非湿证比较, [△] P<0.05

6.3.1 仪器 LC-MS 分析的仪器平台为 AB SCIEX 公司的超高效液相色谱串联飞行时间质谱 UHPLC-Triple TOF 系统。

6.3.2 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm i.d, 1.8 μm; Waters, Milford, USA); 流动相 A 为 95% 水 + 5% 乙腈 (含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为 47.5% 乙腈 + 47.5% 异丙醇 + 5% 水 (含 0.1% 甲酸); 流速为 0.40 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温为 40 °C。

6.3.3 质谱条件 样品经电喷雾电离, 分别采用正、负离子扫描模式采集质谱信号。

6.4 质控 质控样本 (quality control, QC) 由所有样本的提取液等体积 (20 μL) 混合制备而成, 每个 QC 的体积与样本相同, 用与分析样本相同的方法处理和检测, 在仪器分析的过程中, 每 5~15 个分析样本中插入一个 QC 样本, 以考察整个检测过程的稳定性。

7 数据处理方法

7.1 代谢组学统计分析方法 将原始数据导入代谢组学处理软件 ProgenesisQ1 (Waters Corporation, Milford, USA) 进行分析得到数据矩阵, 同时将特征峰信息与 <http://www.hmdb.ca/>、<https://metlin.scripps.edu/> 等主流公共代谢物数据库进行匹配, 建立本研究的代谢物信息库。采用正交偏小二乘法 - 判别分析法 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 建模从整体上对样本进行分析, 通过 200 次置换检验对 OPLS-DA 模型进行检验, 确保未发生过拟合, 进而筛选出 VIP > 1 且 P < 0.05 的差异代谢物。利用 KEGG 数据库、HMDB 数据库进行标志物鉴定。通过 T 检验对每个变量进行计算求出 P 值, P < 0.05 为差异有统计学意义。

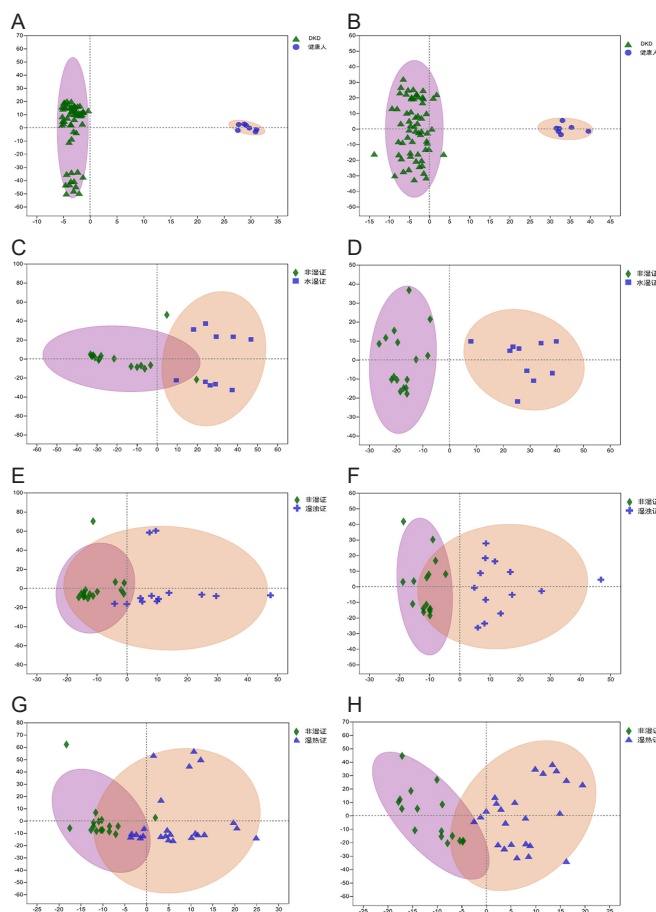
7.2 统计学方法 采用 SPSS13.0 进行统计分析, 计量资料并且服从正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不符合正态分布用中位数和四分位数间距表示, 组间比较采用方差分析或秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同湿证亚型与非湿证的血清差异代谢物分析

1.1 不同湿证亚型与非湿证的血清差异代谢物 OPLS-DA 分析 (图 1) 通过 LC-MS 分析, 正负离子模式检测条件下, 得到 692 个可识别差异代谢物 (阳离子 + 阴离子)。建立 OPLS-DA 模型分析不同湿

1.2 不同湿证亚型与非湿证的血清差异代谢物概览 (表 2~4) OPLS-DA 建模分析后, 进一步对不同湿证亚组和非湿证和差异代谢物进行分析筛选, 选择 VIP 值 > 1 且 P < 0.05 的代谢物为差异代谢物, 结果提示水湿证和非湿证间存在 167 种差异代谢物, 湿浊证和非湿证间存在 65 种差异代谢物, 湿热证和非湿证间存在 28 种差异代谢物 (表中为 VIP 值排名前



注: (A-B) 健康人与非湿证 DKD 患者阳、阴离子 OPLS-DA 模型分析, 阳、阴离子模式分别为: R2X=0.590, R2Y=0.985, Q2=0.629; R2X=0.381, R2Y=0.938, Q2=0.519; R2Y>0.5; (C-D) 水湿证与非湿证 DKD 患者阳、阴离子 OPLS-DA 模型分析, 阳、阴离子模式分别为: R2X=0.553, R2Y=0.729, Q2=0.388; R2X=0.333, R2Y=0.916, Q2=0.401; R2Y>0.5; (E-F) 湿浊证与非湿证 DKD 患者阳、阴离子 OPLS-DA 模型分析, 阳、阴离子模式分别为: R2X=0.418, R2Y=0.589, Q2=0.0723; R2X=0.299, R2Y=0.726, Q2=0.0897; R2Y>0.5; (G-H) 湿热证与非湿证 DKD 患者阳、阴离子 OPLS-DA 模型分析, 阳、阴离子模式分别为: R2X=0.426, R2Y=0.628, Q2= -0.23; R2X=0.321, R2Y=0.739, Q2=-0.147; R2Y>0.5)

图 1 不同湿证亚型与非湿证 DKD 患者差异代谢谱的 OPLS-DA 分析

证亚型与非湿证 DKD 患者间的代谢物差异。结果提示水湿证、湿浊证和湿热证的代谢谱均分别与非湿证之间存在差异。

20 的差异代谢物及其相对于非湿证组在湿证亚组的表达趋势)。

1.3 不同湿证亚型与非湿证的血清差异代谢物通路富集(图 2~4) 对不同湿证亚组和非湿证的差异代谢物通过 KEGG 数据库进行通路富集分析, 结果提示水湿证和非湿证组间差异代谢物主要富集于苯丙氨酸代谢途径和胆汁分泌代谢途径(图 2, $P<0.05$); 湿浊证和非湿证组间差异代谢物主要富集于甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、脂代谢、癌症的胆碱代谢等代谢途径(图 3, $P<0.05$); 湿热证和非湿证组间差异代谢物主要富集于苯丙氨酸代谢、胆汁分泌等代谢途径(图 4, $P<0.05$)。

2 与 DKD 疾病不同分期相关的湿证差异代谢物探索及通路富集

2.1 与 DKD 疾病不同分期相关的湿证差异代谢物及其诊断性能探索

根据 DKD 患者不同疾病分期, 通过 OPLS-DA 模型建模分析 DKD 不同分期中 P 值 <0.05 的差异代谢物, 对其进行 ROC 分析, 结果提示有 274 种差异代谢物曲线下面积 (area under the curve, AUC) >0.7 , 提示这 274 种差异代谢物对 DKD 分期的诊断性能良好。同时对不同湿证亚型的差异代谢物进行 ROC 分析, 取 AUC >0.7 且与 DKD 疾病分期 ROC

分析中重合的差异代谢物作为二者交集。

2.1.1 与 DKD 疾病不同分期相关的水湿证差异代谢物(表 5) 水湿证与非湿证差异代谢物中有 159 种差异代谢物 AUC >0.7 , 其中有 116 种与 DKD 不同分期中 AUC >0.7 的差异代谢物重合, 表明这 116 种差异代谢物同时与水湿证及 DKD 疾病分期相关(47 种在水湿证和 DKD 分期进展中表达均上升, 68 种在水湿证和 DKD 分期进展中表达均下降, 1 种在水湿证候表达下降, 而在 DKD 分期进展中表达上升)。表中选取其中 ROC 值前 20 的差异代谢物。

2.1.2 与 DKD 疾病不同分期相关的湿浊证差异代谢物(表 6) 湿浊证与非湿证差异代谢物中有 55 种差异代谢物 AUC >0.7 , 其中有 29 种与 DKD 不同分期中 AUC >0.7 的差异代谢物重合, 表明这 29 种差异代谢物同时与湿浊证及 DKD 疾病分期相关(5 种在湿浊证和 DKD 分期进展中表达均上升, 20 种在湿浊证和 DKD 分期进展中表达均下降, 4 种在湿浊证表达下降, 在 DKD 分期进展中表达上升), 表中选取其中 ROC 值前 20 的差异代谢物。

2.1.3 与 DKD 疾病不同分期相关的湿热证差异代谢物(表 7) 湿热证与非湿证差异代谢物中有 14 种差异代谢物 AUC >0.7 , 其中有 10 种与 DKD 不

表 2 水湿证与非湿证差异血清代谢物

化合物名称	分子式	P
顺式苦杏仁苷 A (Cis-Mulberroside A) ↑	$C_{26}H_{32}O_{14}$	<0.001
大黄酸 (Emodic acid) ↑	$C_{15}H_8O_7$	<0.001
L-冬胺基乙酸-L-苯丙胺基乙酸 (Asp-Phe) ↑	$C_{13}H_{16}N_2O_5$	<0.001
L- α -天冬氨酰羟脯氨酸 (L-alpha-Aspartyl-L-hydroxyproline) ↓	$C_9H_{14}N_2O_6$	0.006
(Cadiamine) ↑	$C_{15}H_{26}N_2O_3$	0.005
2-羟基-24-酮-二十八烷内酯 (2-Hydroxy-24-keto-octacosanolide) ↓	$C_{28}H_{52}O_4$	0.010
香紫苏内酯 (Sclareolide) ↓	$C_{16}H_{26}O_2$	0.004
6-羟基山柰酚-7-葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 7-glucoside) ↓	$C_{21}H_{20}O_{12}$	0.001
5-(2-羟基亚乙基)-4-(羟基甲基)-2(5H)-呋喃酮 (Ascladiol) ↑	$C_7H_8O_4$	<0.001
油菜素内酯 (Brassinolide) ↓	$C_{28}H_{48}O_6$	<0.001
二十二碳六烯酸乙酯 (PI (22: 6 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z) / 22: 2 (13Z, 16Z))) ↑	$C_{53}H_{87}O_{13}P$	0.011
艾纳香内酯 A (Blumealactone A) ↓	$C_{20}H_{28}O_6$	<0.001
16, 16-二甲基-前列腺素 A1 (16, 16-dimethyl-PGA1) ↓	$C_{22}H_{36}O_4$	<0.001
二羟基-1H-吲哚葡萄糖苷 I (Dihydroxy-1H-indole glucuronide I) ↑	$C_{14}H_{15}NO_8$	0.004
2-甲基-4-(磺氧基)丁酸 (2-methyl-4-(sulfooxy) butanoic acid) ↓	$C_5H_{10}O_6S$	0.010
马拉硫磷单羧酸 (Malathion monocarboxylic acid) ↓	$C_8H_{15}O_6PS_2$	0.002
(12S-HHTrE) ↑	$C_{17}H_{28}O_3$	0.002
苏氨酸-蛋氨酸 (Threoninyl-Methionine) ↑	$C_9H_{18}N_2O_4S$	0.005
赤芝酸 F (Lucidenic acid J) ↑	$C_{27}H_{38}O_8$	0.002
(9S)-氢过氧化-(9Z, 11E)-十八碳二烯酸 ((±) 9-HpODE) ↓	$C_{18}H_{32}O_4$	0.001

表 3 湿浊证与非湿证差异血清代谢物

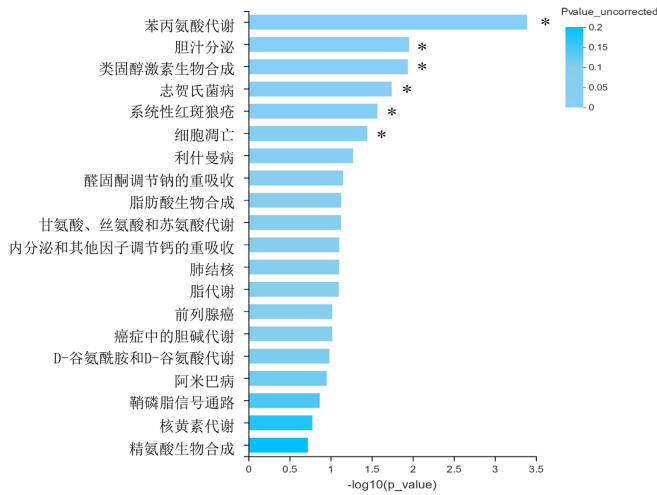
化合物名称	分子式	P
苏氨酸-蛋氨酸 (Threoninyl-Methionine) ↑	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	0.006
阿魏酸樟脑酯 (Campesterol ferulate) ↑	C ₃₈ H ₅₆ O ₄	0.004
苏氨酸异亮氨酸 (Threoninyl-Isoleucine) ↑	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₄	0.027
异亮氨酸 (L-Isoleucine) ↓	C ₆ H ₁₃ NO ₂	0.034
3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪唑丙酸 (CMPF) ↓	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	0.014
尼泊金异戊酯 (Isopeopyl Paraben) ↓	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	0.016
哌啶 (Piperidine) ↓	C ₅ H ₁₁ N	0.044
S-烯丙基-L-半胱氨酸 (S-Allyl-L-cysteine) ↓	C ₆ H ₁₁ NO ₂ S	0.046
水杨醛 (Salicylaldehyde) ↓	C ₇ H ₆ O ₂	0.049
乌头酸 (Aconitic acid) ↓	C ₆ H ₆ O ₆	0.048
8, 11, 14-二十碳三烯酸, 5, 6-二羟基-, (8Z, 11Z, 14Z)((±) 5, 6-DHET) ↓	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	0.002
人参炔 C (Ginsenoyn C) ↓	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	0.004
(R)-8-乙酰氧基丙酮 ((R)-8-Acetoxy-carvotanacetone) ↓	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	0.018
L-反式-5-羟基-2-哌啶羧酸 (L-trans-5-Hydroxy-2-piperidinecarboxylic acid)	C ₆ H ₁₁ NO ₃	0.018
9-酮基-10(E), 12(Z)-十八碳二烯酸 (9-OxoODE) ↓	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	0.014
6-O-乙酰-溴大霉素 (6-O-Acetylaustroinulin) ↓	C ₂₂ H ₃₆ O ₄	0.019
艾纳香内酯 A (Blumealactone A) ↓	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	0.012
8(S)-HETrE ↓	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	0.004
13-羟基-9-甲氧基-10-氧代-11-十八烯酸 (13-Hydroxy-9-methoxy-10-oxo-11-octadecenoic acid) ↓	C ₁₉ H ₃₄ O ₅	0.012
6-羟基山柰酚 7-葡萄糖苷 (6-Hydroxykaempferol 7-glucoside) ↓	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.014

表 4 湿热证与非湿证差异血清代谢物

化合物名称	分子式	P
顺式苦杏仁苷 A (Cis-Mulberroside A) ↑	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	0.024
5-(2-羟基亚乙基)-4-(羟基甲基)-2(5H)-咪唑酮 (Ascladiol) ↑	C ₇ H ₈ O ₄	0.007
丙氨酸 γ-谷氨酸盐 (Prolyl-Gamma-glutamate) ↑	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₄	0.023
水杨酸 (Salicylic acid) ↑	C ₇ H ₆ O ₃	0.014
藻毒素 F (Physagulin F) ↑	C ₃₀ H ₄₀ O ₉	0.025
2-苯乙醇葡萄糖醛酸盐 (2-Phenylethanol glucuronide) ↑	C ₁₄ H ₁₈ O ₇	0.033
反式肉桂酸 (Trans-Cinnamic acid) ↑	C ₉ H ₈ O ₂	0.025
帕拉米松 (Paramethasone) ↑	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	0.008
胆酸 (Cholic acid) ↑	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	0.026
PE (P-18: 1(11Z)/22: 5(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z)) ↑	C ₄₅ H ₇₈ NO ₇ P	0.029
氯乙烯酸 A (Corchorifatty acid A) ↓	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	0.002
Cynaratriol ↓	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	0.029
2-O-阿魏酰酒石酸 (2-O-Feruloyltartronic acid) ↓	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	0.047
人参炔 C (Ginsenoyn C) ↓	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	0.042
(对映-2α-3β-15β)-16-贝壳杉烯-2, 3, 15-三醇 ((ent-2α, 3β, 15β)-16-Kaurene-2, 3, 15-triol) ↓	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	0.002
4-羟基苯甲酸芹糖基葡萄糖酯 (Aposylglucosyl 4-hydroxybenzoate) ↓	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂	0.019
5, 8, 12-三羟基-9-十八烯酸 (5, 8, 12-Trihydroxy-9-octadecenoic acid) ↓	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	0.038
DL-2-氨基辛酸 (DL-2-Amino-octanoic acid) ↓	C ₈ H ₁₇ NO ₂	0.038
(R)-8-乙酰氧基丙酮 ((R)-8-Acetoxy-carvotanacetone) ↓	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	0.032
8(S)-HETrE ↓	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	0.015

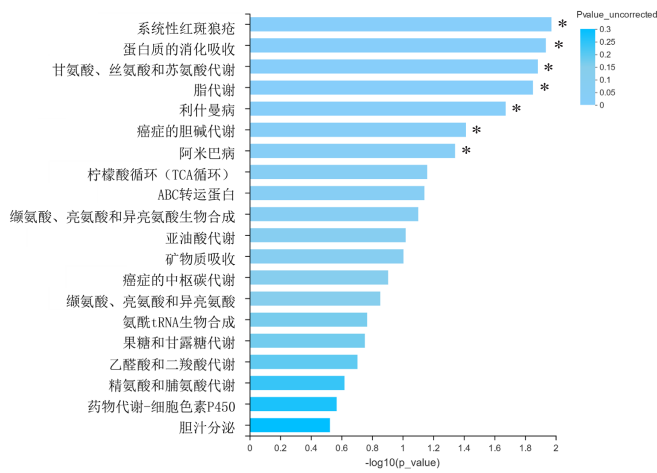
同分期中 AUC>0.7 的差异代谢物重合, 表明这 10 种差异代谢物同时与湿热证及 DKD 疾病分期相关 (4 种在湿热证和 DKD 分期进展中表达均上升, 6 种

在湿热证和 DKD 分期进展中表达均下降)。2.2 与 DKD 疾病不同分期相关的湿证差异代谢物通路富集分析



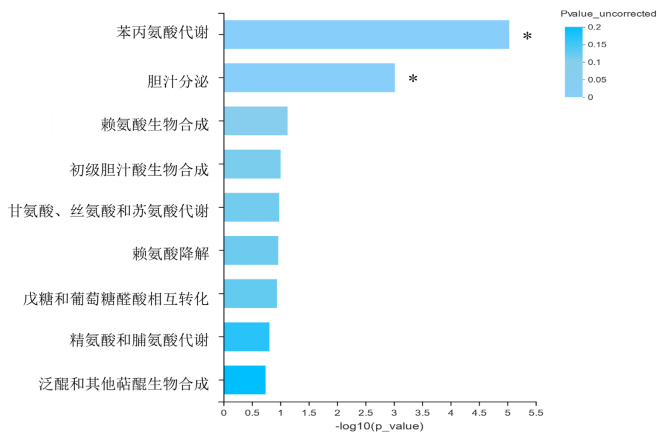
注: *P<0.05

图 2 水湿证与非湿证差异代谢物的 KEGG 通路富集分析



注: *P<0.05

图 3 湿浊证与非湿证差异代谢物的 KEGG 通路富集分析



注: *P<0.05

图 4 湿热证与非湿证差异代谢物的 KEGG 通路富集分析

2.2.1 与 DKD 不同分期相关的水湿证与非湿证差异代谢物通路富集分析 (图 5、6) 与 DKD 不同分期相关的水湿证与非湿证差异代谢物主要富集于苯丙氨酸代谢、胆汁分泌和脂肪酸生物合成 3 条通路

(图 5), 图 6 为包含了水湿证与非湿证差异代谢物在内的与 DKD 分期进展相关的湿证差异代谢物在苯丙氨酸代谢通路上的富集及表达水平变化。

2.2.2 与 DKD 不同分期相关的湿浊证与非湿证差异代谢物通路富集分析 (图 7) 与 DKD 不同分期相关的湿浊证与非湿证差异代谢物主要富集于癌症的胆碱代谢、亚油酸代谢 2 条通路。

2.2.3 与 DKD 不同分期相关的湿热证与非湿证差异代谢物通路富集分析 (图 6、8) 与 DKD 不同分期相关的湿热证与非湿证差异代谢物主要富集于苯丙氨酸代谢、胆汁分泌、赖氨酸生物合成 3 条通路。

2.3 湿证差异代谢物与 DKD 患者临床生化指标的关联性分析 (图 9、10) 湿证与非湿证人群的差异代谢物, 与 eGFR、血肌酐、24 h 尿白蛋白、尿白蛋白肌酐比这 4 个指标的相关性分析结果提示, 与非湿证人群比较, 在湿证人群中高表达的大部分代谢物, 与肾功能进展和尿白蛋白水平成正相关; 在湿证人群中低表达的大部分代谢物, 与肾功能进展和尿白蛋白水平成负相关。

讨论

近年来, 随着糖尿病基础人群的不断扩大, 在此基础上 DKD 的发病率和患病率亦逐年升高^[2]。为实现对 DKD 的多靶点治疗, 中医药的干预在其诊治中也日趋广泛。众多医家在 DKD 诊治过程中的累积经验表明, 湿证是贯穿 DKD 疾病进程中主要的标实证^[10-12], 对 DKD 的预后发展有重要影响。本研究尝试将中医湿证与 DKD 疾病不同分期的血清代谢谱关联, 探索与 DKD 疾病分期相关的湿证的潜在血清生物标志物。研究发现 DKD 不同湿证亚型与非湿证患者的血清代谢谱之间存在显著差异 (水湿证 / 湿浊证 / 湿热证与非湿证间分别有 167、65、28 种差异代谢物)。水湿证和湿热证差异代谢物主要富集于苯丙氨酸代谢途径和胆汁分泌代谢途径, 湿浊证差异代谢物主要富集于甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 脂代谢途径。在证候差异代谢物中, 与 DKD 不同分期相关的差异代谢物 (水湿证与非湿证 116 种, 湿浊证与非湿证 29 种, 湿热证与非湿证 10 种), 主要富集在苯丙氨酸代谢、胆汁分泌、脂肪酸生物合成、亚油酸代谢。证候差异代谢物与 DKD 患者临床生化指标的关联性分析结果提示, “湿” 与 DKD 疾病分期紧密相关。本研究的发现为 DKD 湿证诊断及疾病分期的机制研究提供生物学基础。

本研究结果提示苯丙氨酸代谢途径与 DKD 患者

表 5 与 DKD 不同分期相关的水湿证与非湿证差异代谢物及 ROC 分析

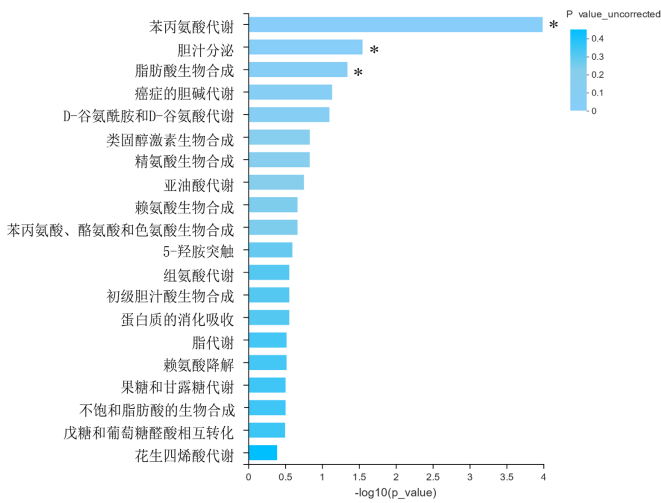
化合物	分子式	水湿证	DKD 进展	AUC	95%CI
(ent-2 α , 3 β , 15 β)-16- 考拉烯-2, 3, 15- 三醇 ((ent-2 α , 3 β , 15 β)-16-Kaurene-2, 3, 15-triol)	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	↓	↓	0.981	[0.9400, 1.000]
海藻糖 (Erythrose)	C ₄ H ₈ O ₄	↑	↑	0.944	[0.8642, 1.0000]
艾纳香内酯 A (Blumealactone A)	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	↓	↓	0.931	[0.8060, 1.0000]
帕拉米松 (Paramethasone)	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	↑	↑	0.925	[0.8269, 1.0000]
前列腺素 B2 (PGB2)	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	↑	↑	0.925	[0.8201, 1.0000]
乙酰-DL- 缬氨酸 (Acetyl-DL-Valine)	C ₇ H ₁₃ NO ₃	↑	↑	0.919	[0.7983, 1.0000]
DL-2- 氨基辛酸 (DL-2-Aminoocanoic acid)	C ₈ H ₁₇ NO ₂	↓	↓	0.919	[0.8161, 1.0000]
藻毒素 F (Physagulin F)	C ₃₀ H ₄₀ O ₉	↑	↑	0.913	[0.8058, 1.0000]
反式肉桂酸 (Trans-Cinnamic acid)	C ₉ H ₈ O ₂	↑	↑	0.906	[0.7861, 1.0000]
5-(2- 羟基亚乙基)-4-(羟基甲基)-2(5H)- 呋喃酮 (Ascladiol)	C ₇ H ₆ O ₄	↑	↑	0.894	[0.7718, 1.0000]
巴比妥酸 (Kynurenic acid)	C ₁₀ H ₇ NO ₃	↑	↑	0.894	[0.7639, 1.0000]
苯乙酰谷氨酰胺 (Phenylacetylglutamine)	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	↑	↑	0.894	[0.7687, 1.0000]
氟伏沙明酸 (Fluvoxamino acid)	C ₁₄ H ₁₇ F ₃ N ₂ O ₃	↓	↓	0.894	[0.7684, 1.0000]
慈姑醇 (Sagittariol)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	↓	↓	0.894	[0.7633, 1.0000]
顺式苦杏仁苷 A (Cis-Mulberroside A)	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	↑	↑	0.888	[0.7323, 1.0000]
(1xi, 4xi, 6xi)- 香芹酮氧化物 ((1xi, 4xi, 6xi)-Carvone oxide)	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	↓	↓	0.888	[0.7620, 1.0000]
烯赖氨酸 (Allysine)	C ₆ H ₁₁ NO ₃	↑	↑	0.881	[0.7506, 1.0000]
(9S)- 氢过氧化-(9Z, 11E)- 十八碳二烯酸 ((±) 9-HpODE)	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	↓	↓	0.881	[0.7506, 1.0000]
(11Z, 13E, 15S)-15- 过氧化氢-11, 13- 二烯酸 (15(S)-HpEDE)	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	↓	↓	0.881	[0.7501, 1.0000]
16, 16- 二甲基- 前列腺素 A1 (16, 16-dimethyl-PGA1)	C ₂₂ H ₃₆ O ₄	↓	↓	0.881	[0.7529, 1.0000]

表 6 与 DKD 不同分期相关的湿浊与非湿证差异代谢物及 ROC 分析

化合物	分子式	湿浊证	DKD 进展	AUC	95%CI
(对映-2 α -3 β -15 β)-16- 贝壳杉烯-2, 3, 15- 三醇 ((ent-2 α , 3 β , 15 β)-16-Kaurene-2, 3, 15-triol)	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	↓	↓	0.837	[0.6678, 1.0000]
4- 羟基苯甲酸苄基葡萄糖苷 (Apiosylglucosyl 4-hydroxybenzoate)	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂	↓	↓	0.827	[0.6652, 0.9886]
6-[(3Z, 6Z, 9Z)-1- 羟基十五碳-3, 6, 9- 三烯基] 恶烷-2- 酮 ((±) 5, 6-DHET)	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	↓	↓	0.817	[0.6619, 0.9727]
(9S, 10S)-10- 羟基-9-(膦酰氧基) 十八酸 ((9S, 10S)-10-hydroxy-9-(phosphonoxy) octadecanoic acid)	C ₁₈ H ₃₇ O ₇ P	↓	↑	0.803	[0.6415, 0.9642]
9- 酮基-10(E), 12(Z)- 十八碳二烯酸 (9-OxoODE)	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	↓	↓	0.803	[0.6317, 0.9741]
(11Z, 13E, 15S)-15- 过氧化氢-11, 13- 二烯酸 (15(S)-HpEDE)	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	↓	↓	0.793	[0.6223, 0.9643]
硫酸脱氢表雄酮 (Dehydroepiandrosterone sulfate)	C ₁₉ H ₂₈ O ₅ S	↓	↓	0.793	[0.6178, 0.9687]
D- 甘露醇 (D-Mannitol)	C ₆ H ₁₄ O ₆	↑	↑	0.793	[0.6192, 0.9674]
15(S)- 羟基二十碳三烯酸 (15(S)-Hydroxyeicosatrienoic acid)	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	↓	↓	0.789	[0.6121, 0.9648]
人参炔 C (Ginsenyne C)	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	↓	↓	0.789	[0.6178, 0.9591]
慈姑醇 (Sagittariol)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	↓	↓	0.784	[0.6107, 0.9566]
5, 8, 12- 三羟基-9- 十八烯酸 (5, 8, 12-Trihydroxy-9-octadecenoic acid)	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	↓	↓	0.784	[0.6101, 0.9572]
5-(3',5')- 二羟基苯基 γ - 戊内酯 (5-(3',5')-Dihydroxyphenyl-gamma-valerolactone)	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	↓	↓	0.779	[0.6048, 0.9529]
氯乙烯酸 A (Corchorifatty acid A)	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	↓	↓	0.779	[0.5965, 0.9612]
艾纳香内酯 A (Blumealactone A)	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	↓	↓	0.774	[0.5992, 0.9489]
13- 羟基-9- 甲氧基-10- 氧代-11- 十八烯酸 (13-Hydroxy-9-methoxy-10-oxo-11-octadecenoic acid)	C ₁₉ H ₃₄ O ₅	↓	↓	0.774	[0.5987, 0.9494]
11'- 羧基 γ - 色甘醇 (11'-Carboxy-gamma-chromanol)	C ₂₅ H ₄₀ O ₄	↓	↓	0.764	[0.5872, 0.9416]
3 β , 6 β - 二羟基胆酸-4- 烯-24- 油酸 (3 β , 6 β -Dihydroxychol-4-en-24-oic Acid)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	↓	↓	0.764	[0.5852, 0.9436]
6-O- 乙酰澳大利亚鱼精蛋白 (6-O-Acetylaustroinulin)	C ₂₂ H ₃₆ O ₄	↓	↓	0.760	[0.5797, 0.9395]
尼泊金异戊酯 (Isopeopyl Paraben)	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	↓	↑	0.760	[0.5737, 0.9455]

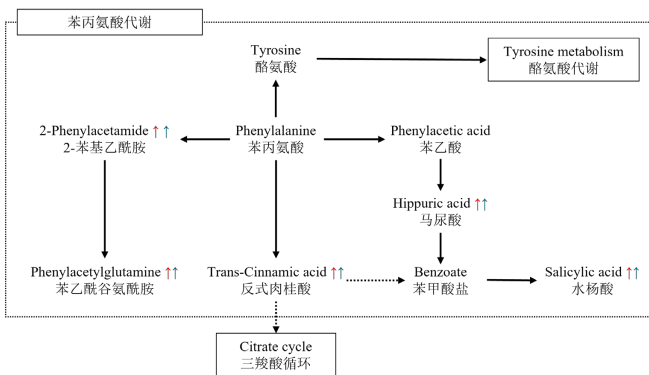
表 7 与 DKD 不同分期相关的湿热与非湿证差异代谢物及 ROC 分析

化合物	分子式	湿热证	DKD 进展	AUC	95%CI
(对映-2 α -3 β -15 β)-16-贝壳杉烯-2, 3, 15-三醇((ent-2 α , 3 β , 15 β)-16-Kaurene-2, 3, 15-triol)	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	↓	↓	0.800	[0.6583, 0.9406]
氯乙酸 A (Corchorifatty acid A)	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	↓	↓	0.766	[0.6183, 0.9130]
藻毒素 F (Physagulin F)	C ₃₀ H ₄₀ O ₉	↑	↑	0.734	[0.5662, 0.9026]
帕拉米松 (Paramethasone)	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	↑	↑	0.721	[0.5591, 0.8837]
2-O-阿魏酰酒石酸 (2-O-Feruloyltartronic acid)	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	↓	↓	0.719	[0.5533, 0.8842]
丙氨酰- γ -谷氨酸盐 (Prolyl-Gamma-glutamate)	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₄	↑	↑	0.714	[0.5512, 0.8759]
4-羟基苯甲酸蔗糖基葡萄糖酯 (Apiosylglucosyl 4-hydroxybenzoate)	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂	↓	↓	0.711	[0.5445, 0.8774]
5-(2-羟基亚乙基)-4-(羟基甲基)-2(5H)-咪喃酮 (Ascladiol)	C ₇ H ₈ O ₄	↑	↑	0.711	[0.5473, 0.8746]
5, 8, 12-三羟基-9-十八烯酸 (5, 8, 12-Trihydroxy-9-octadecenoic acid)	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	↓	↓	0.708	[0.5422, 0.8745]
5-(3',5')-二羟基苯基- γ -戊内酯 (5-(3',5')-Dihydroxyphenyl-gamma-valerolactone)	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	↓	↓	0.708	[0.5397, 0.8770]



注: *P<0.05

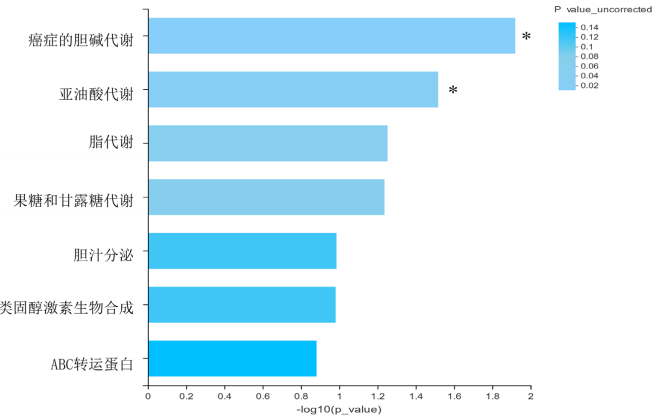
图 5 与 DKD 不同分期相关的水湿证与非湿证差异代谢物通路富集分析



注: 红色箭头为与非湿证 DKD 患者比较, 代谢物表达量在湿证 DKD 患者中升高; 绿色箭头为随着 DKD 疾病分期的进展, 代谢物表达量逐渐升高

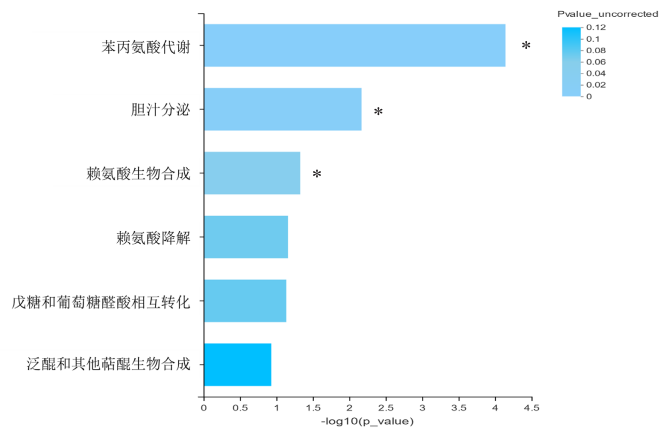
图 6 与 DKD 疾病分期相关的湿证差异代谢物在苯丙氨酸代谢通路上的富集及表达水平变化

湿证和疾病分期有密切关联, 其中在湿证患者血清中高表达的苯乙酰谷氨酰胺、2-苯基乙酰胺、马尿酸、



注: *P<0.05

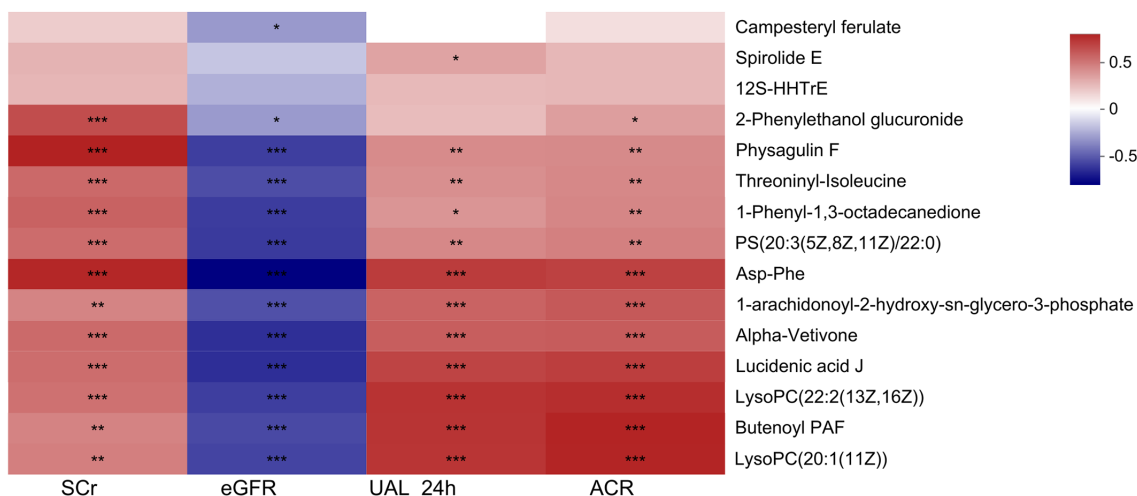
图 7 与 DKD 不同分期相关的湿热证与非湿证差异代谢物通路富集分析



注: *P<0.05

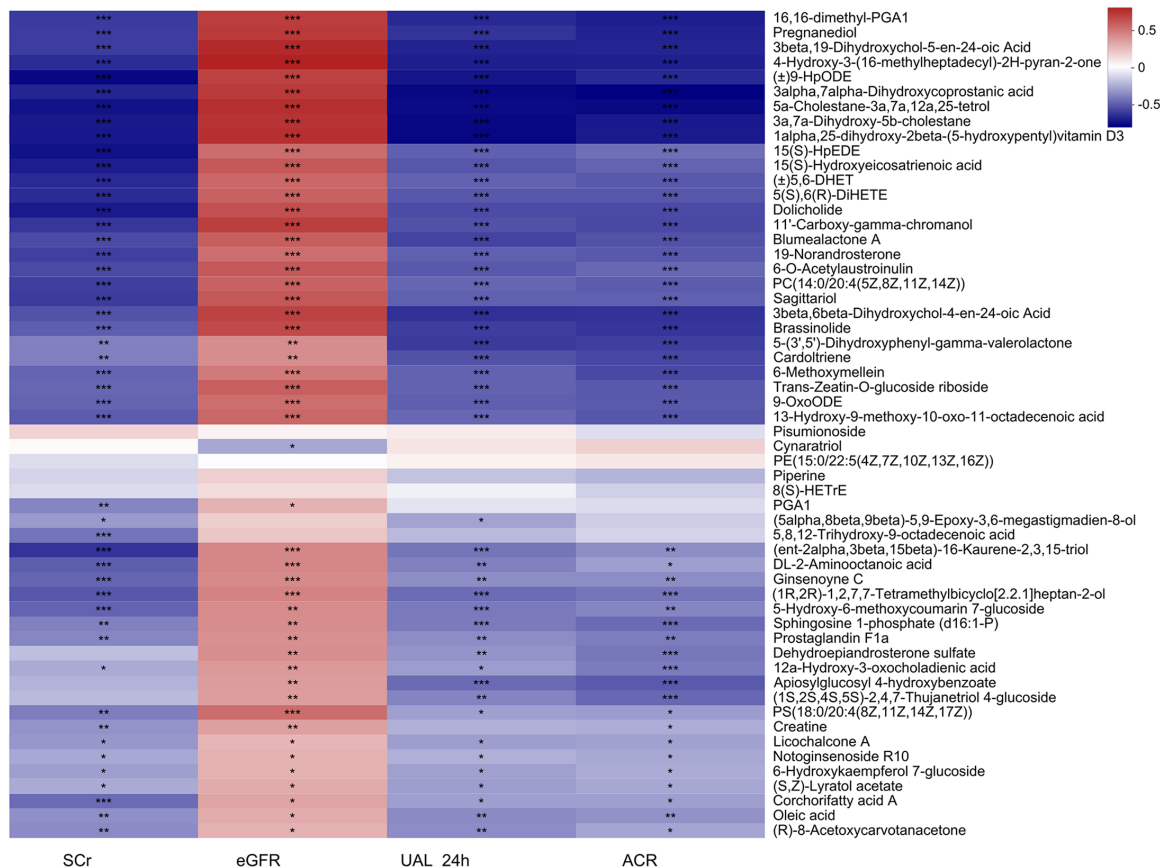
图 8 与 DKD 不同分期相关的湿热证与非湿证差异代谢物通路富集分析

反式肉桂酸、和水杨酸表达量均与 DKD 患者疾病分期的进展呈正相关。研究表明, 在临床糖尿病患者^[13]和 2 型糖尿病动物模型中^[14]均存在苯丙氨酸代谢异常, 且血清中苯丙氨酸水平与胰岛素抵抗和进展至 2 型糖尿病的风险相关^[15, 16]。苯乙酰谷氨酰胺作为苯丙氨酸代谢途径的重要代谢物, 可增强血小板反应性



注：横坐标为临床指标，纵坐标为相对于非湿证患者，在湿证患者表达较高的差异代谢物；每个格子代表代谢物和关联的临床指标的相关性，不同颜色代表相关系数的大小；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

图 9 eGFR、SCr、UAL、ACR 与湿证及非湿证差异代谢物的关联性分析（高表达）



注：横坐标为临床指标，纵坐标为相对于非湿证患者，在湿证患者表达较低的差异代谢物；每个格子代表代谢物和关联的临床指标的相关性，不同颜色代表相关系数的大小；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

图 10 eGFR、SCr、UAL、ACR 与湿证及非湿证差异代谢物的关联性分析（低表达）

以及增强机体血栓形成潜能，与心血管发生风险相关^[17]。由于 DKD 是糖尿病的微血管并发症，结合中医学“湿损肾络”的病机理论，笔者推测在湿证形成和 DKD 进展过程中，苯乙酰谷氨酰胺表达量的升高，

可能会促进微血栓形成，加重肾小球硬化，从而促进 DKD 进展，但仍有待进一步的研究。2-氨基乙酰胺作为苯乙酰谷氨酰胺生成的重要中间产物，关于在 DKD 发展中的作用探讨，目前尚缺乏相关研究，但

从其代谢途径上看,也可能与增加微血栓形成风险相关。马尿酸(Hippuric acid, HA)可由许多饮食成分的代谢产生的,如蔬菜、水果、茶和咖啡中的儿茶素和肉桂酸。这些化合物转化为苯甲酸,然后转化为马尿酸并在尿液中排出^[18]。当肾功能受损时,马尿酸排出受限。因此,马尿酸是终末期肾脏病患者常见的蛋白结合型尿毒症毒素(Protein-bound uremic toxins, PBUT),可通过促进氧化应激可加重肾脏纤维化^[19]。反式肉桂酸是包括儿茶素和芳香化合物在内的多种苯丙酸类化合物的前体,同样存在在水果、蔬菜和其他植物源性食品中^[20, 21]。有研究表明,反式肉桂酸可促进层粘连蛋白和 I 型胶原的增加,从而促进成纤维细胞迁移,调节细胞外基质合成^[22],推测其在 DKD 发展过程中,可通过促进层粘连蛋白和 I 型胶原等加重肾脏纤维化。水杨酸是一种广泛存在于植物中的小分子酚类物质,是苯丙氨酸代谢途径的中间产物,其稳态的正常维持与糖基化和羟基化有密切联系^[23, 24]。有研究表明,植物内水杨酸的积累可促进细胞死亡^[25],但潜在的分子机制还不清楚。本研究结果显示水杨酸表达量的增加与 DKD 分期发展呈正相关,推测有可能为随着疾病进展,晚期糖基化水平增加,水杨酸积累的同时,进一步促进细胞死亡,但其潜在的具体机制,仍需进一步研究。

胆汁分泌是人体生理活动的重要一部分,影响着包括肝脏、胆囊、肠道、肾脏在内等多个器官的正常生理功能。其代谢途径中的 2-苯乙醇葡萄糖醛酸除参与胆汁分泌途径外,还参与戊糖与葡萄糖醛酸的相互转化,是戊糖与葡萄糖醛酸相互转化途径的主要生物标志物之一,在糖尿病的发生发展中起着重要的作用^[26]。本研究中,2-苯乙醇葡萄糖醛酸表达量在 DKD 湿证和疾病分期的进展中均显著升高,提示其有成为预测 DKD 湿证形成和疾病进展的重要潜能。硫酸脱氢表雄酮是脱氢表雄酮由肾上腺产生后经肝脏硫酸化生成的一种代谢物^[27],对预防骨质疏松症,改善性功能和抑郁方面起着重要作用^[27, 28],其表达量升高最能反映促肾上腺皮质激素的分泌情况,其含量高低与肥胖、胰岛素抵抗相关^[29]。本研究中硫酸脱氢表雄酮在 DKD 湿证和疾病分期进展中的表达量均相对较低,有可能因其生成不足从而进一步促进胰岛素抵抗,加重疾病进展。

脂肪酸的生物合成是脂代谢的重要一环。脂代谢紊乱或脂肪酸生物合成异常活跃,使血清中游离脂肪酸堆积过多,可导致胰岛分泌功能障碍,引发胰岛素抵抗^[30],同时,游离脂肪酸堆积过多,可进一步导

致机体氧化应激,从而加重 DKD 疾病进展。既往部分研究表明,血浆中肉豆蔻酸和油酸均与血管损伤相关^[31-33],而本研究中,脂肪酸生物合成的终末期产物肉豆蔻酸(Myristic acid)和油酸(Oleic acid)在湿证证候和 DKD 疾病分期的进展中均呈下降趋势,这可能与 DKD 患者在临床医生干预下或自我管理下的饮食摄入调控相关。在疾病进展中,在包括生活方式管理在内的综合治疗下,患者脂肪酸相关物质摄入减少。

缬氨酸和异亮氨酸是涉及到机体压力、能量和肌肉代谢的两种重要支链氨基酸,有研究表明^[30, 34],人体内缬氨酸和异亮氨酸水平和稳态与胰岛素抵抗和糖化血红蛋白水平呈正相关。本研究结果显示,在湿证(水湿和湿浊证)和 DKD 疾病分期进展中,缬氨酸和异亮氨酸均呈上升趋势。考虑到 DKD 患者发病机制复杂,胰岛素抵抗是其发生发展的主要原因之一^[35],因此,推测缬氨酸和异亮氨酸水平的升高也与 DKD 患者胰岛素抵抗相关。同时,本研究中,湿证和 DKD 不同分期差异代谢物的 ROC 分析交集提示缬氨酸和异亮氨酸同时与湿证和 DKD 疾病分期的进展相关,预测性能良好,有望成为诊断湿证和预测 DKD 进展的潜在生物标志物。

本研究中,湿证人群与非湿证人群的基线特征显示,与非湿证人群比较,湿证人群的肾功能相对较差($P < 0.05$),尿白蛋白水平相对较高($P < 0.05$)。这其实符合 DKD 的中医病机认识:“湿”既是 DKD 疾病发展过程中的病理产物,又是促进疾病进展的加重因素。因此,糖尿病肾病 DKD “湿证”人群的代谢组学生物学特征,既有可能是疾病本身进展的反映,也可能有助于寻找到与疾病进展相关的生物标志物。所以,在研究中做了不同证候的组间差异代谢物与糖尿病肾病疾病不同分期差异代谢物的交集分析。这也正是研究目的,寻找与 DKD 不同分期相关的湿证特异生物标志物。此外,本研究中湿证与非湿证人群的差异代谢物,与 eGFR、血肌酐、24 h 尿白蛋白、尿白蛋白肌酐比这 4 个临床指标的相关性分析结果也提示了“湿”与糖尿病肾病疾病分期的紧密相关性。

本研究的局限性主要有两个方面。第一方面,是本研究重点描述了不同湿证亚型与非湿证 DKD 患者之间的差异代谢谱,而未能具体展示总体湿证和非湿证 DKD 患者间的差异代谢物结果,原因是在对总体湿证和非湿证 DKD 患者的差异代谢谱进行建模分析时,OPLS-DA 模型提示过拟合,这可能与本研究样本量有限以及部分患者的代谢物水平差异较大相关。

但是,从研究结果,也看出不同湿证亚型具有各自的代谢特征。分析不同湿证亚型与非湿证的差异代谢物,使研究结果更加细化。第二方面,由于回顾性研究,缺乏患者的药物和饮食摄入记录,因此无法排除药物和饮食习惯对代谢谱的影响。

综上所述,本研究采用代谢组学技术,探索与 DKD 不同分期相关的湿证的潜在血清生物标志物。湿证与非湿证差异代谢物的通路富集和与临床生化指标的相关性分析结果提示,中医湿证与 DKD 的疾病分期密切相关,DKD 湿证患者血清代谢物特征的变化可能与苯丙氨酸代谢、胆汁分泌、脂肪酸生物合成、亚油酸代谢通路紊乱相关。本研究为糖尿病肾病湿证及疾病不同分期的机制研究提供生物学基础,但仍有待前瞻性研究进一步验证。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Ma L, Jiang Y, Kong X, et al. Interaction of MTHFR C677T polymorphism with smoking in susceptibility to diabetic nephropathy in Chinese men with type 2 diabetes[J]. *J Hum Genet*, 2019, 64 (1): 23-28.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38 (4): 292-344.
- [3] 刘玉宁, 陈以平. 糖尿病肾病肾小球硬化症的中医病机探讨 [J]. *新中医*, 2003, 35 (7): 8-9.
- [4] 曾令烽, 杨伟毅, 梁桂洪. 岭南中医湿证与慢性病防治创新模式探讨 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34 (6): 2345-2349.
- [5] 张燕媚. 中医药防治糖尿病肾病非透析患者的回顾性队列研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [6] 刘月. 糖尿病肾病的中医证候学研究 [J]. *当代医学*, 2016, 22 (36): 187-188.
- [7] 宋高峰. 2 型糖尿病肾病患者不同分期中医证候特点分析 [J]. *江西中医药*, 2019, 50 (7): 27-30.
- [8] 中华医学会肾脏病学分会专家组. 糖尿病肾脏疾病临床诊疗中国指南 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2021, 37 (3): 255-304.
- [9] 赵进喜, 王世东, 李靖, 等. 糖尿病肾脏病分期辨证规范与疗效评定方案及其研究 [J]. *世界中医药*, 2017, 12 (1): 1-4.
- [10] 张建伟. 糖尿病肾病中医分期辨证论治体会 [J]. *百家论医*, 2007, 28 (11): 1571-1572.
- [11] 苏红梅, 季章龙, 杨春艳, 等. 宁亚功教授治疗糖尿病肾病的经验 [J]. *西南国防医药*, 2014, 24 (11): 1239-1240.
- [12] 申少珍, 王耀光. 王耀光教授辨治糖尿病肾病的经验总结 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2017, 18 (5): 381-382.
- [13] Liu Y, Chen X, Liu Y, et al. Metabolomic study of the protective effect of Gandi capsule for diabetic nephropathy [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 31: 108815.
- [14] Pan L, Li Z, Wang Y, et al. Network pharmacology and metabolomics study on the intervention of traditional Chinese medicine Huanglian Decoction in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112842.
- [15] Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes [J]. *Nat Med*, 2011, 17 (4): 448-453.
- [16] Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, et al. Metabolomics in prediabetes and diabetes: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39 (5): 833-846.
- [17] Nemet I, Saha PP, Gupta N, et al. A cardiovascular disease-linked gut microbial metabolite acts via adrenergic receptors [J]. *Cell*, 2020, 180 (5): 862-877.
- [18] Lees HJ, Swann JR, Wilson ID, et al. Hippurate: the natural history of a mammalian-microbial cometabolite [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12 (4): 1527-1546.
- [19] Sun B, Wang X, Liu X, et al. Hippuric acid promotes renal fibrosis by disrupting redox homeostasis via facilitation of NRF2-KEAP1-CUL3 interactions in chronic kidney disease [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9 (9): 783.
- [20] Viana RDS, Aquino FLT, Barreto E. Effect of trans-cinnamic acid and p-coumaric acid on fibroblast motility: a pilot comparative study of in silico lipophilicity measure [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 35 (24): 5872-5878.
- [21] Zeng L, Wang X, Tan H, et al. Alternative pathway to the formation of trans-cinnamic acid derived from L-Phenylalanine in tea (*Camellia sinensis*) plants

- and other plants[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68 (11): 3415–3424.
- [22] Aquino FLT, Silva JPD, Ferro JNS, et al. trans-Cinnamic acid, but not p-coumaric acid or methyl cinnamate, induces fibroblast migration through PKA- and p38-MAPK signalling pathways[J]. *J Tissue Viability*, 2021, 30 (3): 363–371.
- [23] Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T. The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures[J]. *Planta*, 2005, 221 (2): 287–296.
- [24] Zhang Z, Li Q, Li Z, et al. Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* interaction[J]. *Plant Physiol*, 2007, 145 (2): 450–464.
- [25] Zeng HY, Yu L, Chen DK, et al. The immune components EDS1 and PAD4 are required for cell death caused by overaccumulation of ceramides in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2021, 107 (5): 1447–1465.
- [26] Sandholm N, Van Zuydam N, Ahlqvist E, et al. The genetic landscape of renal complications in type 1 diabetes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28 (2): 557–574.
- [27] Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, et al. DHEA and DHEA-S: a review[J]. *J Clin Pharmacol*, 1999, 39 (4): 327–348.
- [28] Wronka KM, Wunsch E, Kozłowska-Petriczko K, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate indicates decreased sulfation capacity and impaired quality of life in primary sclerosing cholangitis[J]. *Pol Arch Intern Med*, 2021, 131 (9): 790–796.
- [29] Rosenfield RL. Normal and premature adrenarche[J]. *Endocr Rev*, 2021, 42 (6): 783–817.
- [30] Chen T, Ni Y, Ma X, et al. Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20594.
- [31] Sacks FM, Lichtenstein AH, Wu JHY, et al. dietary fats and cardiovascular disease: a presidential advisory from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2017, 136 (3): e1–e23.
- [32] Olivieri O, Speziali G, Castagna A, et al. The positive association between plasma myristic acid and ApoCIII concentrations in cardiovascular disease patients is supported by the effects of myristic acid in HepG2 cells[J]. *J Nutr*, 2020, 150 (10): 2707–2715.
- [33] Ooi EM, Watts GF, Ng TW, et al. Effect of dietary fatty acids on human lipoprotein metabolism: a comprehensive update[J]. *Nutrients*, 2015, 7 (6): 4416–4425.
- [34] Badoud F, Lam KP, DiBattista A, et al. Serum and adipose tissue amino acid homeostasis in the metabolically healthy obese[J]. *J Proteome Res*, 2014, 13 (7): 3455–3466.
- [35] Karalliedde J, Gnudi L. Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31 (2): 206–213.
- (收稿: 2021-02-24 在线: 2023-01-11)
责任编辑: 汤 静