

冠心病痰浊证与气虚证的代谢组学研究

程 鹏 陈泽奇 王东生

摘要 目的 运用代谢组学研究方法探讨冠心病痰浊证与气虚证的中医分型与其代谢产物之间的关系。**方法** 选取冠心病患者 65 例,其中痰凝心脉证组 37 例,心气虚弱证组 28 例。应用气相色谱-质谱联用仪 GC/MS (gas chromatograph-mass spectrometer-computer, GC/MS) 测定两种中医证型的冠心病患者血清内源性代谢物,并分析其代谢谱之间的差异。**结果** 共扫描 100 多个色谱峰,将得到的色谱图与质谱库进行匹配鉴定,最终得到准确定性的化合物 46 个。MCTree 分析结果显示,痰浊证及气虚证患者可被有效区分开,鉴别这两种证型贡献值最大的化合物为丝氨酸,其次为缬氨酸、2-羟基丙酸等。对两种证型代谢物量进行比较,发现痰浊证丝氨酸、2-羟基丙酸显著高于气虚证组($P < 0.05$)。**结论** 冠心病中医证型在代谢组学方面的差异,为冠心病的中医证候研究提供了基础,提示代谢组学技术可能成为中医辨证分型的新研究手段。

关键词 代谢组学;冠心病;痰浊证;气虚证

Metabonomics Research on Coronary Heart Disease Patients of Phlegm Turbidity Syndrome and Qi Deficiency Syndrome CHENG Peng, CHEN Ze-qi, and WANG Dong-sheng *Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha (410008), China*

ABSTRACT Objective To study the correlation between Chinese medical types of coronary heart disease (CHD) [i.e. phlegm turbidity syndrome (PTS) and qi deficiency syndrome (QDS)] and their metabolites. **Methods** Recruited were 65 CHD patients including 37 cases of PTS and 28 cases of QDS. Serum endogenous metabolites in the two syndrome types were determined by gas chromatograph-mass spectrometer-computer (GC/MS), and their differences between their metabolic profiles analyzed. **Results** More than 100 chromatographic peaks were totally scanned. Chromatograms obtained was matched with mass spectrum bank, and finally we got the category contribution value of 46 kinds of substances. Results of MCTree analysis showed patients of PTS and patients of QDS could be effectively distinguished. Compounds contributing to identify the two syndromes were sequenced as serine, valine, 2-hydroxy propionic acid. Comparison of metabolites showed contents of serine and 2-hydroxy propionic acid were higher in patients of PTS than in patients of QDS ($P < 0.05$). **Conclusion** The differences in the metabonomics of CHD TCM syndrome types could provide material bases for TCM syndrome differentiation of CHD, indicating that metabonomics technologies might become a new research method for TCM syndrome typing.

KEYWORDS metabonomics; coronary heart disease; phlegm turbidity syndrome; qi deficiency syndrome

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary athero-

sclerotic disease, CAD) 是一组由遗传和环境等多种因素相互作用所致的慢性心血管疾病,简称冠心病(coronary heart disease, CHD), 在我国的发生率和病死率呈逐年攀升,且呈年轻化趋势,是严重危害人类生命健康的常见病。代谢组学(metabonomics)是后基因时代兴起的一门新的学科,它主要是通过运用系统研究手段,分析生物体在受到刺激干扰后,对其代谢物进行定性定量的研究^[1]。本研究采用基于气

基金项目: 国家科技部国际合作项目(No. 2010DFA32370); 科技部科技支撑计划(No. 2009BAI80B04); 国家自然科学基金资助项目(No. 81173198); 湖南省科技厅国际合作重点项目(No. 2008WK3002)

作者单位: 中南大学湘雅医院中西医结合科(长沙 410008)

通讯作者: 王东生, Tel: 0731 - 84323532, E-mail: wdsh66@aliyun.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 02. 0193

相色谱-质谱联用仪(gas chromatograph-mass spectrometer-computer, GC/MS)技术的代谢组学方法分析冠心病痰浊证及气虚证辨证分型的物质基础,为冠心病的中医辨证分型提供客观依据。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 西医诊断标准 冠心病的诊断标准:以 Judkin's 法^[2]经桡动脉或股动脉行冠状动脉造影,多角度、多体位投照。根据美国心脏病学会 1975 年分段分类标准,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 $\geq 50\%$,具有诊断意义^[3]。

1.2 中医诊断标准 参照《中华人民共和国中医药行业标准中医病证诊断疗效标准》^[4],选取其中 2 型,痰凝心脉证:胸闷或如物压;心胸作痛,脘痞,心悸,恶心欲呕,口黏,纳少或咳嗽吐痰,体胖,肢体沉重,倦怠乏力,喘促,唇色淡,苔白腻,脉沉滑或弦滑;心气虚弱证:心胸隐痛,反复发作,胸闷气短,活动后加重,心悸易汗,倦怠乏力,神疲懒言,面色皤白,舌暗淡或有齿痕,苔薄白,脉弱或结代。

2 纳入及排除标准 纳入标准:年龄 30~80 岁;符合上述冠心病西医诊断及中医诊断标准。排除标准:经证实由其他疾病引起的心绞痛,如先天性心脏病、心肌病、梅毒、风湿热等;有疑似冠心病症状及心电图表现,但冠脉造影检查示冠脉狭窄 $< 50\%$ 者;食管、胃疾病所致胸痛者;合并肝、肾、造血系统等严重疾病;合并甲亢、重度神经官能症、更年期症候群者;妊娠期及哺乳期妇女;过敏体质患者;中医其他证型及资料不全者。

3 一般资料 选取 2010 年 1—7 月在湘雅医院心内科住院治疗并接受冠状动脉造影检查确诊冠心病的患者,经中医辨证为痰凝心脉证及心气虚弱证。中医辨证分型由 2 名主治以上职称的医师判定入组。冠脉造影由导管室专业医师完成,常规选择途径为经桡动脉或股动脉,左冠状动脉投照不少于 4 个体位,右冠状动脉投照不少于 2 个体位,如有必要需加做其他体位。冠状动脉狭窄程度及病变支数由湘雅医院心血管介入科两名以上高级职称医生共同判定,出具报告单。共收集患者 65 例,其中痰凝心脉证组 37 例,心气虚弱证组 28 例。

4 研究方法

4.1 标本收集 采取患者空腹肘静脉血 4~5 mL,抗凝,置于高速离心机内 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

4.2 试验方法

4.2.1 样品预处理 人体血浆样品从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱取出后常温下解冻融解,取 100 μL 置入离心管,加入 50 μL 十七酸甲醇溶液(内标,1 mg/mL),再加入 350 μL 甲醇以除蛋白,涡旋 1 min,离心(16 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)10 min,取上清液 400 μL 置入进样瓶,真空挥干。加入 20 mg/mL 甲氧胺吡啶溶液 50 μL 混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 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 加 1% TMCS) 100 μL 混匀,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1 h 后涡旋混匀,取 1 μL 进样。

4.2.2 GC/MS 检测条件 气相色谱条件:Agilent DB-5MS 熔融石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$;载气为 He;柱流速 1.00 mL/min;分流比 10:1;进样量 1 mL。气相色谱柱升温程序见表 1。质谱条件:电离方式为标准 EI 源;电子能量 70 eV;离子源温度 200 $^{\circ}\text{C}$;接口温度 250 $^{\circ}\text{C}$;质量范围(m/z) 35~800 amu;扫描间隔 0.2 s/scan,电子倍增器电压 0.90 kV。

表 1 气相色谱柱升温程序

开始时间 (min)	升温速率 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	结束时间 (min)	最终温度 ($^{\circ}\text{C}$)	保持时间 (min)
0.00	0	4.00	70	4
4.00	8	32.75	300	0
32.75	0	35.75	300	3

5 数据处理及统计学方法 采集各个样品的图谱信息,应用岛津 GCMS-QP2010 自带 GC-MS Post-run Analysis 软件进行处理,得到各峰的峰面积,所得质谱图与 NIST05 质谱库进行匹配鉴定,定性物质并得出定量值,采用 matlab 7.5 软件编写的 Monte Carlo tree approach(MCTree)程序进行模式识别分析,得到分类图和变量贡献值。根据各个变量贡献值的高低,确定可能的生物标志物。两种证型代谢物量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 痰浊证、气虚证的总离子流图(图 1、2) 图 1 为痰浊证组 GC/MS 总离子流色谱图,图 2 为气虚证组 GC/MS 总离子流色谱图。扫描范围为 35~800 m/z,纵轴为相对峰强度,横轴为保留时间,共扫描 100 多个色谱峰,同一色谱峰下可包含多个化合物。从图 1、2 的总离子流图可以看出组间内源性代谢物的差异。

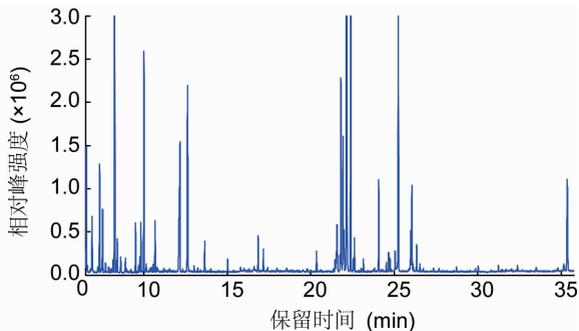


图 1 痰浊证总离子流色谱图

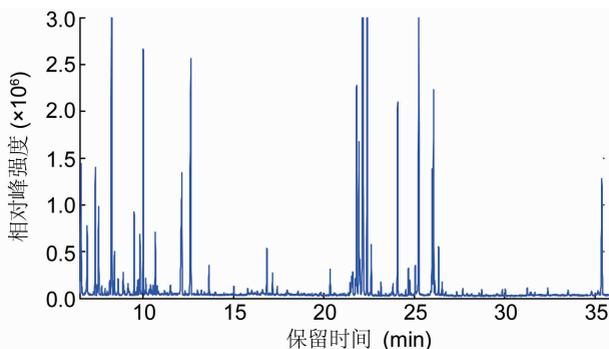


图 2 气虚证总离子流色谱图

2 血浆代谢物的定性、定量分析(表 2、3) 共扫描 100 多个色谱峰,将图信息处理后得到各峰峰面积,将所得的质谱图与质谱库进行匹配鉴定,对血浆中的小分子物质进行定性及定量分析,最终得到能准确定性的化合物 46 个,包括了脂类、糖类和氨基酸类等,并得出这 46 种物质的定量数值。对两种证型代谢物量进行比较,发现痰浊证丝氨酸、2-羟基丙酸明显高于气虚证组($P < 0.05$)。

3 两组样品分布散点图(图 3) 应用 MCTree 对两组样本数据进行分析处理,得到样本分布散点图(score plot),三维数据轴 NLM1、NLM2、NLM3 代表 3 种主成分。图 3 样品分布散点图显示,说明二者之间的代谢组存在显著差异,可明显地将痰浊证和气虚证区分开。

4 血浆代谢物对鉴别两种证型的分类贡献值图(图 4) 有 46 种血浆代谢物对鉴别痰浊证和气虚证有贡献,其贡献值如图 4。7 种代谢物峰值最高的是丝氨酸,其他依次为缬氨酸、2-羟基丙酸、花生四烯酸甲酯、果糖、胆固醇、乳酸。

讨 论

CHD 是临床的常见病、多发病。科学工作者们一直致力于发现一种既客观简便又经济无创的诊断冠心病的方法。Nicholson JK 工作组于 1999 年率先提

出代谢组学概念^[5],并提出运用代谢组学技术建立无创诊断冠心病方法^[6],为冠心病的诊断指明了新的方向。代谢组学作为一门新的技术,是研究随时间的变化,生物体系的代谢途径改变的一种技术,或通过考察生物体系受扰动或刺激后(如将环境变化、药物干预或某个特定的基因变异)其代谢产物发生的变化^[1]。

表 2 两组代谢物鉴定结果

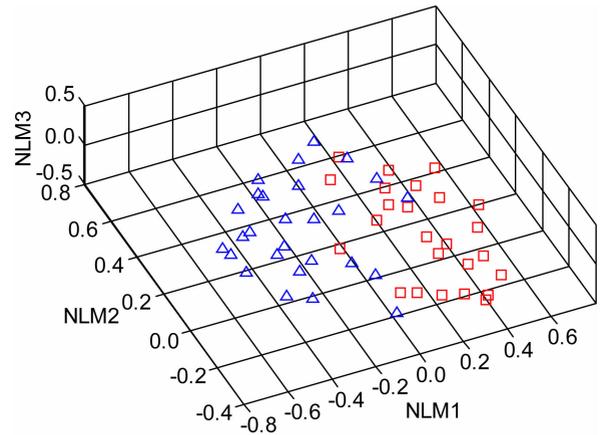
编号	代谢物	保留时间(min)
1	乳酸	8.283
2	羟基乙酸	8.626
3	缬氨酸	8.904
4	丙氨酸	9.178
5	甘氨酸	9.609
6	2-羟基丁酸	9.702
7	甲基丙二酸	9.767
8	草酸	10.014
9	2-羟基丙酸	10.148
10	亮氨酸	10.348
11	3-羟基丁酸	10.422
12	异亮氨酸	10.780
13	尿素	12.196
14	丝氨酸	12.324
15	磷酸	12.636
16	甘油	12.653
17	苏氨酸	13.010
18	甘油酸	13.649
19	苹果酸	16.322
20	焦谷氨酸	16.847
21	2,3,4-三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

表 3 两组代谢物定量比较 ($\bar{x} \pm s$)

代谢物质	痰浊证	气虚证
乳酸	2.039 ± 1.478	1.945 ± 0.927
羟基乙酸	0.007 ± 0.014	0.007 ± 0.010
缬氨酸	0.072 ± 0.027	0.062 ± 0.034
丙氨酸	0.021 ± 0.032	0.024 ± 0.029
甘氨酸	0.003 ± 0.009	0.002 ± 0.005
2-羟基丁酸	0.027 ± 0.016	0.025 ± 0.018
甲基丙二酸	0.019 ± 0.016	0.026 ± 0.024
草酸	0.491 ± 0.206	0.443 ± 0.189
2-羟基丙酸	0.010 ± 0.017*	0.002 ± 0.006
亮氨酸	0.021 ± 0.012	0.024 ± 0.012
3-羟基丁酸	0.065 ± 0.108	0.041 ± 0.051
异亮氨酸	0.019 ± 0.014	0.024 ± 0.012
尿素	0.233 ± 0.367	0.240 ± 0.263
丝氨酸	0.010 ± 0.012*	0.018 ± 0.011
磷酸	0.441 ± 0.208	0.405 ± 0.265
甘油	0.497 ± 0.283	0.408 ± 0.324
苏氨酸	0.023 ± 0.015	0.029 ± 0.017
甘油酸	0.013 ± 0.017	0.012 ± 0.009
苹果酸	0.000 ± 0.002	0.004 ± 0.014
焦谷氨酸	0.087 ± 0.045	0.111 ± 0.057
2,3,4-三羟基丁酸	0.015 ± 0.019	0.014 ± 0.015
木糖醇	0.005 ± 0.013	0.002 ± 0.006
甘油磷酸酯	0.028 ± 0.025	0.032 ± 0.023
柠檬酸	0.011 ± 0.011	0.012 ± 0.014
甘露糖	0.031 ± 0.012	0.034 ± 0.018
肉豆蔻酸	0.164 ± 0.069	0.174 ± 0.081
果糖	0.267 ± 0.228	0.306 ± 0.229
半乳糖	0.083 ± 0.039	0.103 ± 0.065
葡萄糖	4.352 ± 1.706	4.673 ± 2.406
棕榈酸甲酯	0.125 ± 0.595	0.119 ± 0.048
吡喃葡萄糖	0.005 ± 0.009	0.003 ± 0.009
(9E)-9-十六烯酸	0.023 ± 0.022	0.025 ± 0.027
棕榈酸	0.499 ± 0.276	0.403 ± 0.254
肌醇	0.019 ± 0.012	0.019 ± 0.014
亚油酸甲酯	0.075 ± 0.043	0.068 ± 0.035
油酸甲酯	0.039 ± 0.019	0.038 ± 0.018
硬脂酸甲酯	0.059 ± 0.027	0.054 ± 0.023
亚油酸	0.321 ± 0.237	0.253 ± 0.203
油酸	0.573 ± 0.374	0.450 ± 0.283
异油酸	0.046 ± 0.063	0.030 ± 0.020
硬脂酸	0.108 ± 0.056	0.092 ± 0.042
花生四烯酸甲酯	0.029 ± 0.025	0.022 ± 0.011
花生四烯酸	0.005 ± 0.010	0.005 ± 0.007
单软脂酸甘油酯	0.008 ± 0.012	0.004 ± 0.007
单硬脂酸甘油酯	0.002 ± 0.004	0.001 ± 0.004
胆固醇	0.373 ± 0.128	0.319 ± 0.174

注:与心气虚弱证比较,*P < 0.05

中医证型的区分主要依据“有诸内,必形诸于外”的思想,通过四诊合参形成对疾病症状和体征的认识。国内学者认识到代谢组学方法在中医药研究中的广泛前景,将代谢组学技术更深入地应用到中医证型的客观化研究中^[7,8]。目前冠心病的分型标准不一,不同时期、不同类型的诊断标准不同,不利于提高冠心病的中医诊疗水平。代谢组学是从整体角度来对待人体复杂的生命现象,这与中医的思维方式相一致,通过将不



注:□为气虚证型;△为痰浊证型

图 3 MCTree 样品分布散点

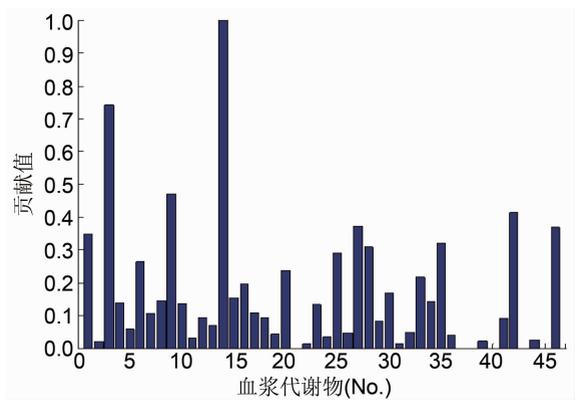


图 4 46 个变量(血浆代谢物)对分类的贡献值

同证型的特定疾病分为不同组进行代谢组学研究,分析其代谢物的不同变化,找出区分不同证型的分子标志物,这将有助于中医辨证分型的客观化研究。因此本研究均采用单证型^[9],与既往研究中的复合证型比较,能在更大程度上将各证型的代谢物区分开,从而找出区分不同证型的分子标志物^[10,11]。

本研究基于 GC/MS 技术对冠心病痰浊证及气虚证患者的血浆进行代谢组学分析,得到色谱图与质谱库进行匹配鉴定,准确定性了 46 种化合物,运用 MCTree 模式进行识别分析,发现痰浊证和气虚证患者可以被较好地地区分,并且得到鉴别这两种证型贡献值最大的化合物为丝氨酸,其次为缬氨酸、2-羟基丙酸等;将痰浊证、气虚证 46 种代谢物定量值进行比较,发现痰浊证血浆中的丝氨酸、2-羟基丙酸含量显著高于气虚证,该结果与 MCTree 的分类贡献值比较,结果十分吻合。本研究结果表明,丝氨酸、2-羟基丙酸等差异化合物均可能为鉴定冠心病痰浊证和气虚证两种证型的生物标志物。上述结果说明,利用 MCTree 建立的两种证型的数学模型参数与临床中医症状有显著

相关性,提示代谢组学所检测的体内小分子化合物可能正是潜在的区分中医证型的物质基础。

参 考 文 献

- [1] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153-161.
- [2] 陈在嘉, 徐义枢, 孔华宇主编. 临床冠心病学[M]. 北京:人民军医出版社,1996:193.
- [3] 马长生, 盖鲁粤, 张奎俊主编. 介入心脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:106.
- [4] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 1994: 127-128.
- [5] 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.
- [6] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using $^1\text{H-NMR}$ -based metabonomics [J]. *Nat Med*, 2002, 8(12): 1439-1444.
- [7] 朱明丹, 杜武勋, 姜民, 等. 中医证候与基因、蛋白质、代谢组学研究思路探讨[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(1): 69-71.
- [8] 韩建科, 魏聪, 常丽萍. 证候现代研究概况及代谢组学方法应用[J]. *时针国医国药*, 2011, 22(2): 450-452.
- [9] 张红栓, 贾钰华, 华何与, 等. 冠心病心绞痛痰浊证、血瘀证的尿液代谢组学研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(2): 126-128.
- [10] 王广基, 阿基业, 严蓓, 等. 代谢组学研究冠心病中医分型的体内物质基础[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2009, 11(1): 127-133.
- [11] 朱莹莹, 王广基. 冠心病中医辨证分型的代谢组学研究[J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(6): 1267-1269.

(收稿:2013-08-05 修回:2014-05-16)

“2014 中医药科研设计与 SCI 论文写作培训班(下)”在福州成功举办

2014 年 11 月 9—10 日中国中西医结合杂志社在福州举办了“2014 中医药科研设计与 SCI 论文写作培训班(下)”。本次会议包括科研设计及论文发表经验两部分内容。会议特邀中国科学院院士陈可冀教授、香港浸会大学中医药学院卞兆祥教授、中国中医科学院西苑医院副院长史大卓教授、福建中西医结合研究院副院长彭军教授、中国中医科学院广安门医院李光熙教授、中国中医科学院心血管病研究所副所长徐浩教授、温州医科大学附属第二医院郑国庆教授、广东省中医院吴大嵘教授、长青藤编辑中国区编辑主任张科宏博士、福建医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计系何保昌博士、*Chinese Journal of Integrative Medicine* 副编审郭艳编辑等介绍及分享科研设计及论文发表经验。本次会议设学员提问和专家点评环节,专家就学员临床科研、论文写作及发表过程中常见的问题进行针对性解答,开拓了学员思维,分享实战经验,受到广大中医药、中西医结合科研工作者的一致好评,培训现场气氛热烈,提问踊跃,学员们均反馈收获很大。

Chinese Journal of Integrative Medicine 于 1995 年创刊,由国家中医药管理局主管,中国中西医结合学会及中国中医科学院主办,2014 年最新影响因子为 1.401,在 22 本国际 CAM 领域杂志排名 11 位。2014 年本刊再次入选“2014 年中国最具国际影响力学术期刊”,排名第 56 位,本刊国际影响力指数 CI 指数为 135.359,国际他引总引频次 676 次,国际他引影响因子 1.327,标志着本刊的国际影响力不断提高。中国中西医结合杂志社自 2013 年先后在北京、南京主办中医药科研设计与 SCI 论文写作培训班,以期进一步提高我国中医、中西医结合医疗科研人员的 SCI 论文写作能力。