

基于 UHPLC/MS 的冠心病心绞痛血瘀证患者血清代谢组学研究

周耀中¹ 杨涛² 季雪峰¹ 蔡文娟¹ 邵燕¹ 沈秋生¹

(1.南京中医药大学附属常熟市中医院,江苏常熟215500; 2.上海中医药大学附属曙光医院,上海200120)

摘要 目的:寻找冠心病心绞痛血瘀证内源性代谢标志物,探讨冠心病心绞痛血瘀证形成的生物学基础。方法:收集冠心病心绞痛患者及健康人的血液样品,通过超高效液相色谱/质谱(UHPLC/MS)联用及模式识别的代谢组学方法进行比较分析。结果:冠心病心绞痛血瘀证组、冠心病心绞痛非血瘀证组、健康组能够在正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)模式识别图上被明显区分,且模型可靠性高。冠心病心绞痛血瘀证患者的柠檬酸含量减少,肉毒碱、组氨酸、黄嘌呤含量增多(VIP>1且P<0.01)。结论:找到4种冠心病心绞痛血瘀证内源性代谢标志物,依次为柠檬酸、肉毒碱、组氨酸、黄嘌呤。能量代谢、脂代谢、氨基酸代谢、嘌呤分解代谢的改变构成了其代谢特征,为冠心病心绞痛血瘀证的诊断和治疗提供了新的思路与方法。

关键词 冠心病 心绞痛 血瘀 UHPLC/MS 代谢组学 代谢标志物

中图分类号 R541.404 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)06-0025-04

基金项目 常熟市科技发展计划(CSWS201615)

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后发展起来的一门新兴学科,主要通过核磁共振氢谱、气相色谱质谱联用、液相色谱质谱联用等技术手段获取代谢物的原始数据,以模式识别计算分析系统研究小分子物质,帮助我们从小分子的代谢产物数据中“跳”出来,一目了然地发现差异性代谢物,然后通过已知的代谢通路逆推出调节酶,最终完成疾病发病机制、药物治疗机制等研究,目前已应用于肿瘤、肝病、心血管等疾病的诊断和疗效评价。近年来,代谢组学在中医药领域的研究也越来越广泛^[1]。

研究发现“血瘀”常贯穿冠心病(CHD)心绞痛发病始终,“血瘀证”是冠心病心绞痛最主要的证型^[2]。辨证论治是中医理论体系的核心,中医“证”的精准判识是提高中医药临床疗效的核心环节,而传统的四诊辨证受患者和临床医生主观因素影响较大,缺乏客观标准。因此,利用代谢组学技术开展冠心病心绞痛血瘀证的客观化研究有积极的临床意义。

目前有学者开展了有关冠心病血瘀证代谢组学的研究,但鉴于各个研究采用的技术方法、研究对象或者控制条件不同,鉴定出来的代谢产物也不尽相同^[3-4]。且冠心病心绞痛血瘀证的发病是一个多因素、多层次的复杂过程,现有的标记物难以从全面总

体的角度对冠心病心绞痛血瘀证机制进行阐释。本研究采用最新的超高效液相色谱-质谱(HPLC/MS)技术,以其强大的定性、定量分析能力对冠心病心绞痛血瘀证患者行非靶向血清代谢组学检测,寻找其潜在的内源性代谢标志物,为冠心病心绞痛血瘀证客观化研究提供新的思路和方法。

1 临床资料

1.1 一般资料 选取2015年5月至2016年5月上海曙光医院确诊为冠心病心绞痛的患者76例(已通过上海曙光医院伦理委员会伦理审批,伦理审查批件号:2015-396-24-02)。其中冠心病心绞痛血瘀证组(以下简称CHD血瘀证组)38例:男26例,女12例;平均年龄(65.89±1.79)岁;平均病程(8.26±0.78)年。冠心病心绞痛非血瘀证组(以下简称CHD非血瘀证组)38例:男21例,女17例;平均年龄(64.74±1.52)岁;平均病程(6.39±0.64)年。另收集健康人38例作为健康对照组:男19例,女19例;平均年龄(62.13±1.52)岁。3组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性。

1.2 诊断标准 参照《慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南》^[5]及《不稳定性心绞痛和非ST段抬高心肌梗死诊断与治疗指南》^[6];血瘀证诊断标准参照《冠心病血瘀证诊断标准》^[7]。

1.3 纳入标准 (1) 年龄大于18周岁且小于等于85周岁, 性别不限; (2) 符合冠心病心绞痛诊断标准 (3) 自愿参加, 签署知情同意书者。

1.4 排除标准 (1) 伴急性心肌梗死者; (2) 伴恶性肿瘤、血液系统疾病或服用华法林者; (3) 妊娠及哺乳期妇女; (4) 无法判断中医证型或临床资料不全者。

1.5 主要仪器与试剂 仪器: UHPLC-Q/Exactive 液质联用系统 (Thermo, San Jose, CA, USA); 色谱柱 ACQUITY UPLC® HSS T3 (2.1×100mm, 1.8 μm) (Waters, USA); Avanti J-25I 离心机 (Beckman Coulter, USA); VORTEX-GENIE 2 涡旋混合器 (Scientific Industries, USA) 等。试剂: 甲醇、甲酸、乙腈 (均为色谱纯, Thermo FISH USA)。

2 研究方法

2.1 样品采集 患者入组后第2日清晨空腹抽取肘静脉血5mL, 4℃ 3000r/min离心15min, 取上清后-80℃冰箱冻存备测。

2.2 样品预处理 血清样品-80℃低温冰箱取出后常温下解冻融解, 取100 μL置入离心管, 加入400 μL乙腈以除蛋白, 涡旋1min, 离心(12000r/min 4℃) 10min, 取上清液550 μL置入离心管, 真空挥干。加入100 μL 20%甲醇复溶, 待测。

2.3 HPLC/MS检测条件 色谱条件: 流动相组成, A相为0.1%甲酸水溶液, B相为乙腈。梯度洗脱, 0~1min, 10%B; 1~2min, 10%~20%B; 2~5min, 20%~50%B; 5~10min, 50%~85%B; 10~19min, 85%~95%B; 19.1~21.0min, 100%B。柱温40℃, 流速0.3mL/min, 进样量5.0 μL。质谱参数: 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用仪进行分析, 采用电喷雾离子源; 离子源电喷雾电压为+3.2KV/-2.8KV; 毛细管温度为320℃; 毛细管电压为75.0V; 鞘气流速为32.0a.u.; 辅助气流速为10.0a.u。

2.4 代谢组学数据处理 经UHPLC/MS检测得到的原始数据, 首先利用SIEVE软件对数据进行平滑、去噪, 峰基线校正, 再通过MetaboAnalyst 3.0完成数据预处理, 随后将数据导入Simca 14.1进行建模判别分析。模式识别采用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA), 并行置换检验, 检测OPLS-DA模型的稳健性, 避免相应模式的过度拟合。

根据OPLS-DA模型中变量的VIP值对差异变量进行筛选和可靠性验证(VIP值指变量投影重要性指标, 用来测度每一个自变量对解释因变量的作用大小, 若VIP值大于1, 则表示该自变量因素对解释因变量具有重要作用), 再通过2组t检验筛选组间显著性差异大的化合物(P<0.05), 利用HMDB数据库检索数据, 对照相应的标准品, 对差异变量进行鉴定, 并且借助KEGG数据库中查询相关的代谢通路。

3 研究结果

3.1 总离子流图 生物样本中众多代谢物得到了很好的分离, 保留时间在21min以内。详见图1。

3.2 主成分分析 3组样品分布见初步分离趋势, CHD非血瘀证组和健康组样品分布有部分重叠。详见图2。

3.3 正交偏最小二乘法-判别分析 由于主成分的局限性, 同时为了获得各组间显著差异的代谢物信息, 我们进一步采用具有监督性的多维统计方法即OPLS-DA。同时, 对每一个OPLS-DA得分图行置换检验, 防止模型过度拟合。

3.3.1 CHD血瘀证组与健康组比较 CHD血瘀证组和健康组也可以被区分, CHD血瘀证组出现部分样

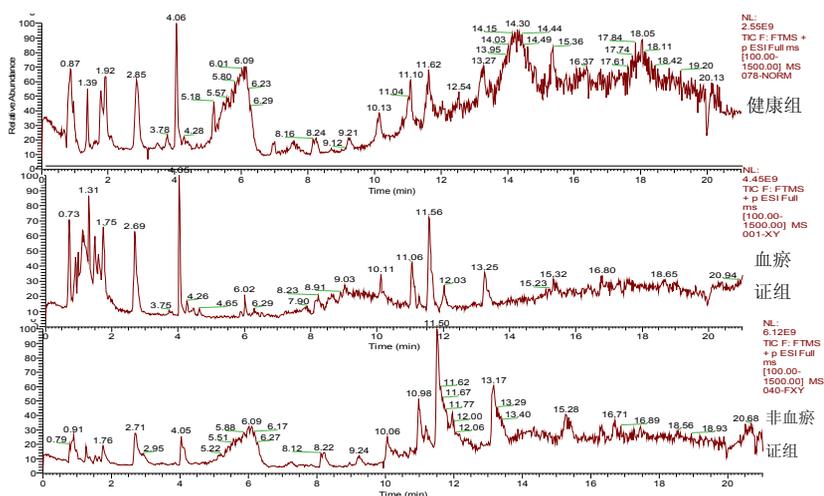


图1 CHD血瘀证组、CHD非血瘀证组、健康组血清样品总离子流图

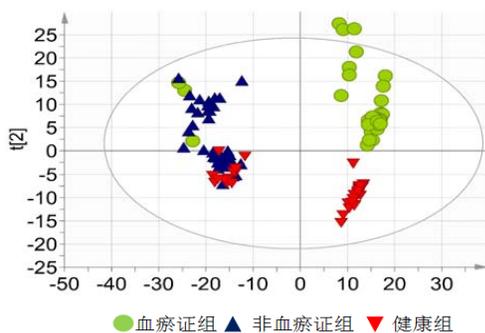


图2 CHD血瘀证组、CHD非血瘀证组、健康组主成分分析得分图

品的集中分离,置换检验结果示模型可靠,不存在过度拟合。详见图3。

3.3.2 CHD非血瘀证组与健康组比较 CHD非血瘀证组和健康组可以被区分,CHD非血瘀证组也出现部分数据的集中分离,置换检验结果示模型可靠。详见图4。

3.3.3 CHD血瘀证组与CHD非血瘀证组比较 CHD血瘀证组 and CHD非血瘀证组可以被区分,且置换检验结果示模型可靠。详见图5。

3.4 生物标志物的筛选及鉴定 结合OPLS-DA模型中变量的VIP值(设置VIP值>1),删除2组间没有显著性差异($P>0.05$)的变量,共找到12种代谢物在各组间有明显变化,结果见表1。找到4种代谢物在CHD血瘀证组 and CHD非血瘀证组之间具有显著差异($VIP>1$ 且 $P<0.05$),结果见表2。

4 讨论

从代谢组学的观点而言,“证”是人体代谢网络功能发生变化后的一种特异性状态。通过分析代谢模式形成的机制和过程,可找出冠心病心绞痛血瘀证发生发展的潜在原因,并可能揭示其生物学本质。本研究找到4种冠心病心绞痛血瘀证的潜在代谢标志物,按VIP值大小依次为柠檬酸、肉毒碱、组氨酸、黄嘌呤。正是这些标志物区分了冠心病心绞痛血瘀证患者与非血瘀患者及健康人不同的代谢模式,同时也反映其病理生理相对应的代谢网络发生异常后代谢物质和功能的改变。

柠檬酸是三羧酸循环的中间产物,冠心病心绞痛血瘀证患者因血脉瘀滞常存在严重的冠脉病变,心肌持续缺血缺氧,能量代谢障碍造成了柠檬酸生成不足^[8]。肉毒碱主要生理作用是转运脂酰

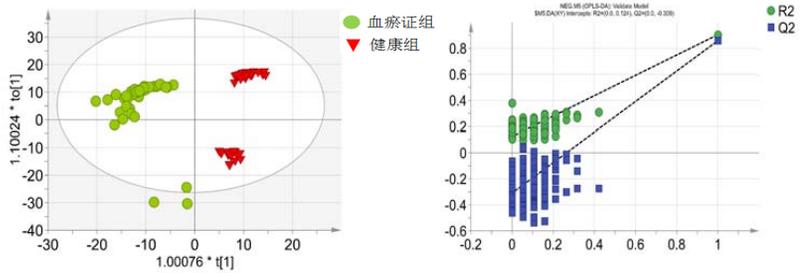


图3 CHD血瘀证组和健康组 OPLS-DA 得分图及置换检验图

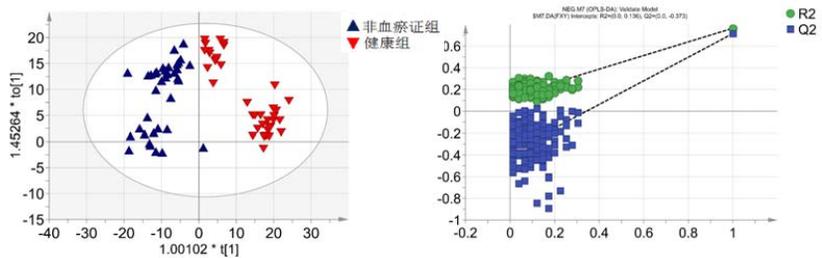


图4 CHD非血瘀证组和健康组 OPLS-DA 得分图及置换检验图

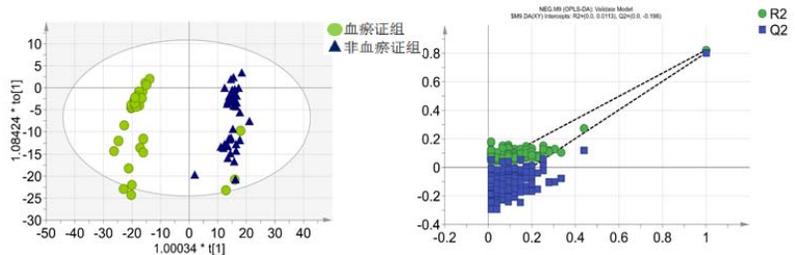


图5 CHD血瘀证组和CHD非血瘀证组 OPLS-DA 得分图及置换检验图

表1 各组血清代谢物质含量比较($\bar{x} \pm s$)

代谢产物	CHD 血瘀证组	CHD 非血瘀证组	健康组
组氨酸	1.047 ± 0.541 \blacktriangle	0.799 ± 0.368	0.816 ± 0.274
丝氨酸	0.018 ± 0.014 \blacklozenge	0.023 ± 0.031 \blacklozenge	0.056 ± 0.046
谷氨酸	0.187 ± 0.145 \blacklozenge	0.180 ± 0.116 \blacklozenge	0.388 ± 0.128
尿酸	0.213 ± 0.090 \blacklozenge	0.162 ± 0.091 \blacklozenge	0.110 ± 0.059
蛋氨酸	0.183 ± 0.071 \blacklozenge	0.182 ± 0.105 \blacklozenge	0.124 ± 0.039
柠檬酸	1.400 ± 0.256 \blacktriangle	2.681 ± 1.080 \blacklozenge	3.158 ± 0.697
肉毒碱	0.595 ± 0.539 \blacktriangle	0.329 ± 0.381 \blacklozenge	0.172 ± 0.080
β -羟丁酸	0.227 ± 0.096 \blacklozenge	0.240 ± 0.108 \blacklozenge	0.421 ± 0.124
苯丙酮酸	0.120 ± 0.076 \blacklozenge	0.126 ± 0.085 \blacklozenge	0.261 ± 0.094
黄嘌呤	0.260 ± 0.127 \blacktriangle	0.186 ± 0.079	0.177 ± 0.051
赖氨酸	0.198 ± 0.077 \blacklozenge	0.229 ± 0.107 \blacklozenge	0.359 ± 0.109
木糖醇	0.052 ± 0.033 \blacklozenge	0.053 ± 0.037 \blacklozenge	0.122 ± 0.037

注: \blacklozenge 与健康组比较, $P<0.05$; \blacktriangle 与CHD非血瘀证组比较, $P<0.05$ 。

表2 CHD血瘀证组和CHD非血瘀证组差异性代谢产物比较

代谢产物	R.T.	VIP	FC	上调/下调	KEGG 代谢通路
柠檬酸	1.04	2.97	1.91	↓	糖代谢
肉毒碱	0.89	2.70	0.55	↑	脂代谢
组氨酸	0.77	2.23	0.77	↑	氨基酸代谢
黄嘌呤	1.68	1.69	0.71	↑	嘌呤分解代谢

注: FC表示变化倍数, $FC>1$ 表示降低, $FC<1$ 表示升高。

辅酶A通过线粒体内膜进入线粒体基质进行β氧化提供能量,具有促进缺血心肌脂肪代谢,改善机体能量供应的作用^[9],本次研究中CHD血瘀证组肉毒碱含量的升高可能是血瘀证患者为对抗脂肪代谢异常,启动的保护机制。组氨酸可以在组氨酸脱羧酶的催化下生成组胺,在应激条件下,组胺的过度激活可诱发冠脉收缩,冠脉血流减少,而且可以通过扰乱心肌线粒体和内皮功能加重心肌缺血,其释放水平与心肌缺血程度呈正相关^[10],提示CHD血瘀证组的心肌缺血程度更加严重。黄嘌呤是嘌呤分解代谢的中间产物,在黄嘌呤氧化酶作用下生成尿酸,血尿酸水平升高是心血管疾病的独立危险因素,也是反应冠心病严重程度的重要指标。本研究中CHD血瘀证组黄嘌呤含量更高,提示CHD血瘀证组出现嘌呤分解代谢紊乱更加敏感,缺血的心肌核苷酸代谢被激活,嘌呤分解代谢失常,引起中间代谢产物蓄积。

本次研究主要是利用代谢组学技术探索冠心病血瘀证辨证的生物学基础,找到了冠心病心绞痛血瘀证潜在的内源性标志物,这些有特异性的物质有望成为活血化瘀中药的干预靶点,为下一步开展中医药治疗冠心病心绞痛的研究提供理论和实验基础。在后续的研究中,可以扩大代谢组学研究的样本量,利用不同的检测方法,进行相互验证,提高结果的准确性、客观性。同时,如条件允许,可以进行多个组学技术平台的综合研究,更好地解释彼此之间的相关性。

参考文献

[1] 贾伟,蒋健,刘平,等.代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用[J].中国中药杂志,2006,31(8):623.

[2] 陈可冀.血瘀证与活血化瘀治疗的研究[J].中国中医药现代远程教育,2005,3(11):10.

[3] 魏星,万玲,刘石蜜,等.冠心病血瘀证血浆代谢组学研究[J].中医杂志,2013,54(7):587.

[4] 王勇,李中峰,陈建新,等.基于冠心病心肌缺血血瘀证小型猪血清核磁共振代谢组学的研究[J].分析化学,2011,39(8):1274.

[5] 中华医学会心血管病学分会.慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南[J].中华心血管病杂志,2007,35(3):195.

[6] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会.不稳定性心绞痛和非ST段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J].中华心血管病杂志,2007,35(4):295.

[7] 中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会,陈可冀,史大卓,等.冠心病血瘀证诊断标准[J].中国中西医结合杂志,2016,36(10):1162.

[8] 简维雄,袁肇凯,黄献平,等.冠心病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):582.

[9] PEPINE C J, WELSCH M A. Therapeutic potential of L-carnitine in patients with angina pectoris[J].The Carnitine System, 1995: 225.

[10] HATTORI Y, HATTORI K, MATSUDA N, et al. Regulation of Cardiovascular System by Histamine[J].Handb Exp Pharmacol, 2016, 11(13): 236.

第一作者:周耀中(1990—),男,医学硕士,住院医师,主要从事中医药防治心血管病的临床与基础研究。

通讯作者:沈秋生,医学硕士,主任医师。
13915601051@163.com

收稿日期:2017-12-16

编辑:强雨叶

文末参考文献著录规则之页码的标注

根据国家标准GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》的规定,本刊关于参考文献页码的著录做重要修订如下:(1)专著或期刊中析出文献的页码或引文页码,应采用阿拉伯数字著录,引自序言或扉页题词的页码,可按实际情况著录(例:钱学森.创建系统学[M].2版.太原:山西科学技术出版社,2001:序2.);(2)阅读型参考文献的页码著录文章的起始页,引文参考文献的页码著录引用信息所在页。阅读型参考文献指著者为撰写或编辑论著而阅读过的信息资源;引文参考文献指著者为撰写或编辑论著而引用的信息资源。例如:将谈勇等发表在本刊2015年第1期第1—4页的文章《夏桂成国医大师调治复发性流产经验探赜》作为阅读型参考文献引用时,页码著录为“1”;作为引文文献引用“夏老提出心-肾-子宫轴功能失常是流产病机关键”这一观点或原文时,著录这些引用信息的所在页“3”。更多有关本刊参考文献著录规则见本刊网站(www.jstem.cn)首页下载专区。