

基于 GC-TOFMS 的虚寒证原发性痛经患者尿液代谢组学

徐丁洁¹, 徐洪², 赵舒¹, 曹颖¹, 董玉山¹, 成秀梅³, 杜惠兰^{3*}

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000;

2. 河北联合大学医学实验研究中心, 河北 唐山 063000;

3. 河北医科大学中西医结合妇科教研室, 石家庄 050091)

[摘要] **目的:**比较虚寒证原发性痛经患者与正常组尿液内源性代谢物的差异,从整体角度阐释其病理生理学机制,深化中医整体观在现代实验研究中的应用。**方法:**采用病证结合模式,基于气相色谱-飞行时间质谱(GC-TOFMS)技术,以 *N*-甲基-*N*-三甲基-硅基三氟乙酰胺(MSTFA)作为衍生化试剂,检测虚寒证原发性痛经患者及正常组月经周期第 2 天(MC₂)尿液代谢产物,得出两组总离子流色谱图(TIC),结合非监督的主成分分析(PCA)进行多维统计分析,寻找两组的差异性代谢产物。**结果:**虚寒组与正常组比较,差异代谢产物有果糖、麦芽糖、阿拉伯呋喃糖、异柠檬酸、乳酸、马尿酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、软脂酸、硬脂酸、原藻醇 12 种。与正常组比较,虚寒组升高的有乳糖,降低的有果糖、麦芽糖、阿拉伯呋喃糖、异柠檬酸、马尿酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、软脂酸、硬脂酸、原藻醇。**结论:**虚寒证原发性痛经组与正常组尿液的差异代谢物涉及糖、氨基酸、脂酸代谢及肠道微生物菌群。

[关键词] 虚寒证; 原发性痛经; 代谢组学; 尿液

[中图分类号] R284.1, R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0182-03

[doi] 10.11653/syfj2013130182

Asthenia-cold Syndrome in Patients with Primary Dysmenorrhea Based on Urine Metabolomics

XU Ding-jie¹, XU Hong², ZHAO Shu¹, CAO Ying¹, DONG Yu-shan¹, CHENG Xiu-mei³, DU Hui-lan^{3*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine of Hebei United University, Tangshan 063000, China;

2. Medical Research Center of Hebei United University, Tangshan 063000, China;

3. Institute of Integrated Chinese and Western Medicine of Gynecology of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the differences between the asthenia-cold syndrome in patients with primary dysmenorrhea and normal group in urinary endogenous metabolites, and elaborate the path physiological mechanisms of the asthenia-cold syndrome in patients with primary dysmenorrheal. **Method:** *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) tri-fluoroacetamide (MSTFA) was selected as derivatization reagent to detect urine metabolites at the second day in menstrual cycle (MC₂) of the two groups using gas chromatography-time of flight mass spectrometer (GC-TOFMS), drawn the total ion chromatogram (TIC) of each group, combination with unsupervised principal component analysis (PCA) for the multi-dimensional statistical analysis to look for variability material between the two groups. **Result:** Compared with the normal group, twelve variability materials in asthenia-cold group were detected. They were fructose, maltose, arbinofuranose, isocitric acid, lactic acid, hippuric acid, glycine, serine, threonine, palmitic acid, octadecanoic acid, and erythritol. Among the total materials only lactic acid in asthenia-cold group was higher than in the normal group; the rest materials in asthenia-

[收稿日期] 20121225(001)

[基金项目] 河北联合大学博士科研启动基金项目

[第一作者] 徐丁洁, 博士研究生, 讲师, 从事月经病寒证的生物学机制研究, Tel: 15833529879, E-mail: xudingjie@163.com

[通讯作者] * 杜惠兰, 教授, 博士生导师, 从事生殖内分泌研究, Tel: 0311-86265042

cold group were all lower than in the normal group. **Conclusion:** Asthenia-cold syndrome of the primary dysmenorrheal patients and the normal group suggested significant difference in urine metabolites. These variability materials are related to several metabolic pathways such as glycolmetabolism, amino acid metabolism, fatty acid metabolism and disturbance of enterobacteria.

[**Key words**] asthenia-cold syndrome; primary dysmenorrhea; metabolism; urine

痛经是妇科临床常见病,感受寒邪是中重度原发性痛经的首要致病因素^[1],《伤寒论汇注精华》指出:“寒邪伤阳”,寒为阴邪,易伤阳气,导致阳气不足,虚寒内生,脏腑失于温养,生化失期,气虚血少,冲任失养,“不荣则痛”,遂致虚寒证痛经^[2]。目前,对虚寒证的研究以免疫低下为主^[3];痛经则侧重于前列腺素、炎症因子的变化^[4];虚寒证痛经的研究则是以上指标的相加^[5],缺乏整体角度的对本病病症结合的研究。借助代谢组学技术,本实验采用气相色谱-飞行时间质谱(GC-TOFMS)技术寻找虚寒证原发性痛经患者与正常组尿液中小分子代谢物的异同,从整体角度阐释虚寒证原发性痛经的病理生理学机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 根据实验目的和设计、参考预实验结果,按照统计学公式计算样本含量共 17 例,即虚寒证原发性痛经组(简称“虚寒组”)7 例、正常对照组(简称“正常组”)10 例。均来自在校大学生,取样前 3 d 统一饮食。

1.2 病例选择标准

1.2.1 诊断标准

1.2.1.1 西医原发性痛经诊断标准 参考《妇产科学》拟定^[6]行经前后或经期出现下腹部疼痛、坠胀,伴腰酸或者其他不适,程度严重影响生活和工作质量者。生殖器官无器质性病变,B 超、妇科检查无异常发现。

1.2.1.2 中医虚寒证痛经诊断标准 参考《中医病证治法术语》^[7]和《中医妇科学》^[2]拟定。

主症:经期或经后小腹绵绵而痛,喜暖喜按,得热痛减。

次症:①经血量少,或月经后期;②经色淡,质稀;③面色淡白,畏寒肢冷;④腰骶冷痛,尿清便溏,或尿少浮肿。

舌脉:舌淡胖,苔白,脉沉迟无力。

以上主症必备,次症兼有 2 项或 2 项以上者,结合舌脉即可诊断虚寒证痛经。

1.2.2 纳入标准 符合西医原发性痛经诊断标准;符合中医虚寒证痛经诊断标准;年龄 18 ~ 25 岁;志

愿参加实验者。

1.2.3 排除标准 生理性闭经及月经周期、经期不规律者;生殖器官器质性病变者;3 个月内服用过激素类药物者;神经-精神系统疾病者;心、脑、肝肾等出现功能性或器质性病变者;依从性较差者。

1.3 代谢组学检测 代谢组学研究常用核磁共振或质谱联用技术,本实验采用 GC-TOFMS 检测。流程包括前期样品收集和制备、中期的代谢产物检测、分析鉴定以及后期的数据分析与生化解释^[8]。

1.3.1 仪器及试剂 HP 6890 型气相色谱仪 Agilent; Waters Co. Milford, MA 飞行时间质谱仪; Agilent Technologies, Palo 色谱柱 DB-5MS 型毛细管 Alto, CA;核糖醇、*N*-甲基-*N*-三甲基-硅基三氟乙酰胺(MSTFA)、甲氧胺盐酸盐、吡啶均购自 Sigma. Aldrich Chemical Co. Germany。

1.3.2 尿样收集 受试者于月经周期第 2 天(MC₂)取 5 mL 晨尿中段尿,以 13 200 r·min⁻¹离心 20 min,取上清,-80 °C 保存。

1.3.3 尿样前处理 尿液中含有较多极性强的非挥发性物质,如氨基酸、胺类、糖类等,分析前要进行衍生化处理,降低极性增加挥发性。本实验的衍生化试剂为 MSTFA,过程如下^[9]。

①解冻,取尿液 100 μL,加入甲醇 500 μL,混匀;②加内标液(核糖醇溶液)20 μL,置 70 °C 恒温水浴箱 15 min,以 15 000 r·min⁻¹离心 15 min;③取上清,依次加入纯水 500 μL、氯仿 250 μL,以 4 000 r·min⁻¹离心 20 min;④置 60 °C 恒温水浴箱中分离上层,氮气吹扫至干;⑤加甲氧胺-吡啶溶液 20 μL,30 °C 脛化 90 min;⑥加 MSTFA 40 μL,混匀,置 37 °C 恒温水浴箱衍生 30 min,冷却至室温,静置 120 min。取 0.3 μL λ GC-TOFMS 进样瓶。

1.3.4 GC-TOFMS 检测 色谱条件:DB-5MS 毛细管柱(5% diphenyl cross-linked 95% dimethylpolysiloxane;250 μm × 30 m,0.25 μm),进样 0.3 μL,分流比 25:1,进样口温度 230 °C,离子源温度 220 °C,接口温度 290 °C。载气为氮气,载气流速 1 mL·min⁻¹。程序升温起始温度 70 °C,保持 5 min,以 5 °C·min⁻¹升至 310 °C,保持 5 min。

质谱条件: 电离方式 EI, 电子能量 70 eV, 质谱扫描范围 m/z 30 ~ 550, 全扫描方式。

1.3.5 数据处理及模式识别 采用计算机把采集到的每个质谱的所有离子相加得到总离子强度, 总离子强度随时间变化的曲线称为总离子流色谱图 (TIC)。根据 TIC 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, 用相对峰面积表示代谢物含量。最初的原始数据经过存储、预处理得出一个二维矩阵, 采用非监督的主成分分析, 产生得分图和载荷图^[8]。

1.3.6 代谢物的鉴定 利用质谱谱库和计算机检索, 可以完成谱图的解析。通过统计分析, 根据得分图和载荷图, 检索美国国家科学技术研究院 (NIST) 和标准品验证确定这些主要化合物信息, 根据衍生化规律, 推导出原始代谢物的物质结构, 获得各色谱峰化合物的名称、结构式等信息, 得到差异表达的代谢物^[8]。

2 结果

2.1 TIC GC-TOFMS 检测 得出正常组、虚寒组典型 TIC, 发现两组在同一保留时间色谱峰大小、高低存在差异 (图 1)。

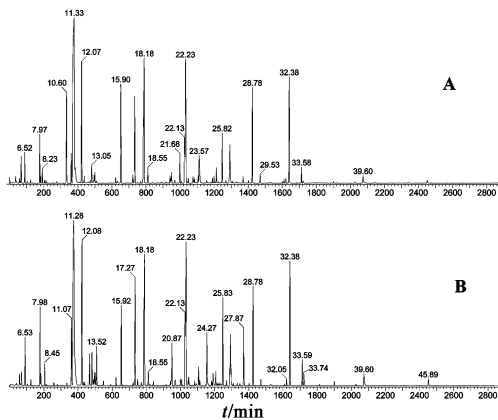


图 1 基于 GC-TOFMS 的正常组 (A) 和虚寒组 (B) 的典型 TIC

根据 TIC 中各峰的保留时间挑选共有峰, 检测到 36 种共有内源性代谢物。查询 NIST 数据库, 鉴定这些代谢物 (按通常匹配度 > 80% 的鉴定结果作为可信度较大的物质)。

2.2 PCA 据预处理后, Excel 储存, 导入 SIMCA-P + 软件包 (Umetrics AB, Umea Sweden), 采用 PCA 进行多维统计分析, 利用得分图获得对样品分类的信息, 通过载荷寻找可以作为生物标记物的变量。

2.2.1 得分图比较 得分矩阵图积分值主要集中在椭圆形散点图 (95% 可信区间) 的区域。正常组出现在右上象限, 虚寒组出现在左下象限, 样本出现明显的分离效果, 无重叠和交叉, 说明正常组、虚寒

组之间有较明显的区别。

2.2.2 载荷图比较 载荷图反映了输出变量对样品分类的影响。对“得分矩阵”影响越大的变量, 其距离载荷矩阵图中心的距离越远, 其代表的化合物是使不同组别样本产生代谢图谱差异的主要原因, 也就是潜在的可作为生物标记物的内源性代谢物质。结合保留时间进行定性及质谱鉴定, 得出两组的差异性代谢产物有果糖、麦芽糖、阿拉伯呋喃糖、异柠檬酸、乳酸、马尿酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、软脂酸、硬脂酸、原藻醇 12 种。与正常组比较, 虚寒组升高的有乳糖, 降低的有果糖、麦芽糖、阿拉伯呋喃糖、异柠檬酸、马尿酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、软脂酸、硬脂酸、原藻醇。

3 讨论

寒证为八纲之一, 妇科寒证是常见病、多发病, 包括“阴胜则寒”的虚寒证和“阳虚则寒”的虚寒证, 临床中则以虚寒证月经病较多见^[10], 主要表现为“周期延后, 经量少, 色黯有块, 带下量多, 质清稀, 婚久不孕, 产后小腹冷痛, 喜按, 舌质淡, 苔薄白, 脉沉迟无力”。“妇人以血为本”, 寒为阴邪, 性主收引、凝滞, 极易与血搏结, 影响气血运行, 损伤阳气, 或素体阳虚, 经期或经后冲任、胞宫失于濡养, “不荣则痛”, 导致虚寒证痛经^[2]。目前, 对于虚寒证痛经多采用病理生理、分子生物学等方法, 研究多集中在免疫、生殖内分泌、能量代谢等方面^[5], 结果众多, 但局限于某一指标, 某一系统难以全面诠释其整体状态, 尚缺乏从整体观念的研究结果。

作为系统生物学的组成部分, 代谢组学通过考察生物体受到刺激或扰动后其内源性代谢产物的应答变化, 从整体角度研究个体的生物学状况^[11], 与中医整体观念, 辨证论治思想相吻合^[12], 亦是中医整体观在现代实验研究中的体现。本实验借用此技术, 寻找到虚寒证原发性虚寒组和正常组差异性代谢物质, 有果糖、麦芽糖、阿拉伯呋喃糖、异柠檬酸、乳酸、马尿酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、软脂酸、硬脂酸、原藻醇 12 种。与正常组比较, 虚寒组升高的有乳糖, 降低的有果糖、麦芽糖、阿拉伯呋喃糖、异柠檬酸、马尿酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、软脂酸、硬脂酸、原藻醇。搜索 Kegg Pathway Database (<http://www.genome.jp/kegg/>), 发现这些内源性差异代谢产物涉及到糖代谢、氨基酸代谢、脂酸代谢及肠道微生物菌群。

糖是一类化学本质为多羟醛或多羟酮及其衍生物的有机化合物, 代谢途径有葡萄糖无氧酵解、有氧