

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110407. 1321. 002

高血压病肝阳上亢证尿液代谢组学气相色谱-质谱联用研究

蒋海强¹, 聂磊², 李运伦^{3*}, 李珩³

(1. 山东中医药大学教学实验中心, 济南 250355; 2. 山东大学药学院, 济南 250011;
3. 山东中医药大学附属医院高血压中医临床研究基地, 济南 250011)

[摘要] 目的:分析尿液代谢物变化,寻找高血压病肝阳上亢证的特征代谢物,揭示高血压病肝阳上亢的证候本质。方法:根据临床高血压病肝阳上亢证的诊断标准,选择典型病例 9 例,健康志愿者 11 例,取其尿液经衍生化,以 GC-MS 采集高血压病肝阳上亢证患者和健康志愿者的尿液代谢物谱,数据经匹配、对齐、共有特征选择,利用 Simca-P 软件进行主成分分析(PCA, principal component analysis)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA, partial least squares discriminant analysis),寻找可能的生物代谢物,并做出相关代谢途径的可能解释。结果:PCA 及 PLS-DA 方法处理高血压病肝阳上亢证患者和健康志愿者的尿液代谢物谱数据显示,两组 GC-MS 谱数据可以明显分开,与健康志愿者作比较,患者机体相关代谢发生显著变化,体内硬脂酸、肌醇、D-果糖、邻苯二甲酸代谢明显异于健康志愿者。结论:GC-MS 结合模式识别的代谢组学方法具有研究复杂条件下机体病理生理变化的优势,为理解高血压病肝阳上亢证的证候本质和诊断该类病证提供了科学依据。

[关键词] 代谢组学;气相色谱-质谱;高血压病;肝阳上亢证

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0138-05

Study of Hypertension Patients with Syndrome of Ascendant Hyperactivity of Liver Yang on Urine Metabonomics

JIANG Hai-qiang¹, NIE Lei², LI Yun-lun^{3*}, LI Heng³

(1. Teaching Experience Center of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;
2. School of Pharmaceutical Sciences Shan Dong University, Ji'nan 250011, China;
3. Traditional Chinese Medicine Clinical Research Base for Hypertension of Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** Analysis the difference of urine metabolites between hypertension patients with the syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang and healthy volunteers, search the possible biomarker, reveal the nature of the syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang. **Method:** According to the clinical diagnostic criteria of the syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang, select typical cases, select nine typical cases and eleven healthy volunteers, analysis the components in the urine derivatives of hypertension patients with the syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang and healthy volunteers by gas chromatography mass spectrometry, match and align the data, select the same features, make the PCA and PLS-DA by the software Simca-P, track biomarkers and

[收稿日期] 20110121(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772865);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-07-0522);山东省优秀中青年科学家奖励基金(2008BS03029);山东省 2009-2010 中医药科技发展计划项目(2009-018);山东省“泰山学者”专项基金

[第一作者] 蒋海强, 硕士, 讲师, 研究方向:天然药物化学成分的提取分离、分析, E-mail: hq12723@163.com

[通讯作者] *李运伦, 博士, 教授, 研究方向:高血压血管重塑的病理机制和中医证候的客观化, E-mail: liyunlun@yahoo.com.cn

[网络出版时间] 2011-04-07 13:21

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110407.1321.002.html>

explain the possible relevant metabolic pathways. **Result:** The data from the analysis by PCA and PLS-DA of the urine samples shows that; two sets of data from GC-MS can be classified in the score plot. Some significantly changed metabolites like stearic acid, inositol, *D*-fructose, phthalic acid have been identified between the two groups in terms of relative metabolism of body. **Conclusion:** The metabonomics method, gas chromatography-mass spectrometry combined with pattern recognition, has advantages in studying pathophysiological changes of the body under the complicated conditions. The study provided a scientific basis for the the essence of traditional chinese medicine syndrome theory and clinical diagnosis of the syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang.

[**Key words**] metabonomics; gas chromatography-mass spectrometry; hypertension; syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang

证候本质研究中、西两种医学体系沟通的必由途径^[1], 本实验采用基于气质联用的代谢组学研究方法来研究人体尿液的代谢物轮廓的改变, 利用 PCA 算法和 PLS-DA 算法区分高血压病肝阳上亢证患者和健康志愿者。实验中检测到一系列内源物质, 经统计分析得到代谢标记物 4 个, 分析其相关代谢途径 7 条。通过对中医证候引起的代谢物分析和生物标记物的发现, 寻找中医证候的生物学信息, 将代谢组学技术和中医药学的研究结合起来, 探索出中医药复杂理论体系研究的新方法与新途径。

1 材料

1.1 诊断标准 ①高血压病的诊断标准参照《2005 WHO/ISH 高血压治疗指南》中的高血压诊断标准^[2]。②高血压病肝阳上亢证的诊断标准参照中华人民共和国卫生部制定的《中药新药临床研究指导原则》中的相关内容^[3]。

1.2 纳入和排除标准 纳入标准: ①同时符合高血压诊断标准和中医肝阳上亢之辨证标准; ②属于 I 级和 II 级原发性高血压的患者, 血压必须符合: $180 \text{ mmHg} (1 \text{ mgHg} = 0.133 \text{ kPa}) \leq \text{收缩压} \leq 140 \text{ mmHg}$ 且 $110 \text{ mmHg} \leq \text{舒张压} \leq 90 \text{ mmHg}$; ③未用药或已服用降血压药物但经 2 周洗脱期后血压达到上述标准; ④年龄在 18 ~ 75 岁; ⑤ I 级高血压病程必须大于 3 个月; ⑥签署知情同意书。排除标准: ①不符合上述纳入标准; ②属于 III 级原发性高血压和各种继发性高血压; ③年龄在 18 岁以下或 75 岁以上; ④合并有精神病或中重度的糖尿病患者; ⑤半年内有心肌梗死或明显脑卒中史; ⑥过敏体质或多种药物过敏者; ⑦近 3 个月内接受过其他新药临床试验者; ⑧合并以下脏器损害的临床表现, 如: 心绞痛、心肌梗死、心力衰竭、短暂脑缺血发作 (TIA)、脑卒中、高血压脑病、视网膜出血、渗出物伴或不伴视乳头水肿、

血肌酐大于 $177 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肾功能衰竭、动脉夹层、动脉闭塞性疾病者。

1.3 一般资料 全部临床病例均为山东省中医医院神经内科 2008 年 7 月至 2009 年 10 月间的门诊和住院患者, 共 9 例, 其中男性 3 例, 女性 6 例; 年龄最小 34 岁, 最大 71 岁, 平均年龄 (57.22 ± 8.76) 岁; 健康志愿者组共 11 例, 男性 5 例, 女性 6 例, 年龄最大 69 岁, 最小 36 岁, 平均年龄 (56.41 ± 7.85) 岁, 各组间年龄、性别基线资料比较, 差异无统计学意义, 具有可比性。

1.4 试剂和仪器 Agilent 5975B 型质谱, Agilent 6890 型气相色谱 (美国, 安捷伦公司), 色谱柱: HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (美国, 安捷伦公司), *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA), trimethyl-chlorosilane (TMCS), 甲氧胺·吡啶 (美国 Sigma 公司), 色谱甲醇。

2 方法

2.1 尿液样品衍生化处理 精密移取病人与健康志愿者中段尿液 200 μL , 加入甲醇 400 μL , 涡旋 3 min, 混匀, 冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 3 h, 离心, 取上清液 400 μL , 氮气吹干, 加入 50 μL 甲氧胺吡啶溶液, 室温反应 24 h, 反应结束后, 向样品溶液中加入 75 μL 的衍生化试剂 (MSTFA 比 TMCS = 100:1) 于室温下反应 1 h 后, 向体系中加入 150 μL 正庚烷终止衍生化反应, 吸取上清液置微量进样杯中进行气质分析。

2.2 气相色谱质谱条件 进样口温度 270 $^{\circ}\text{C}$, 载气氮气, 载气流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样方式不分流, 程序升温条件 85 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min, 以 $8 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升到 125 $^{\circ}\text{C}$, 保持 7 min, 以 $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升到 190 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min, 以 $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升到 300 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。

2.3 数据分析 根据 GC-MS 总离子流图各峰的保留时间挑选共有峰, 采用自动积分, 得到 75 个色谱

峰, 获取其峰面积, 采用 anova 数据预处理, 得到其共有特征 12 个, 导入到 SIMCA-P (version 11.5, Umetrics AB, Umea, Sweden) 软件, 对数据进行自动归一化处理, 以消除样品制备和进样过程产生的误差, 采用主成分分析 (PCA, principal component analysis) 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA, partial least squares discriminant analysis) 2 种模式识别方法分别分析数据。

2.4 潜在生物标记物的结构鉴定及相关代谢途径分析 通过 PLS-DA 分析, 变量对分类的重要程度可以由 VIP 值的大小来衡量。VIP 值越大, 对应变量对分类的贡献就越大。选择 VIP 值大于 1 变量对应的成分可能是潜在的生物标记物。通过 NIST05 数据库及参照相关文献进行相应标记物的鉴定, 确定结构后, 导入到 KEGG 数据库, 分析其代谢通路。

3 结果

3.1 GC-MS 分析 健康志愿组、高血压病肝阳上亢组的 GC-MS 的总离子流图如图 1 所示, 从总离子流图未能看出具体的区别, 故需要数据分析方法进一步进行模式识别。

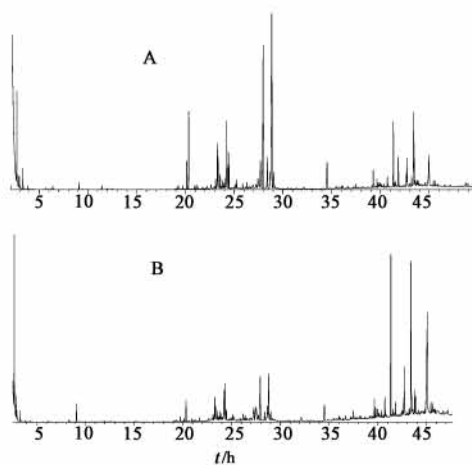


图 1 2 组受试者的总离子流

A. 高血压病肝阳上亢组; B. 健康志愿组

3.2 模式识别 将 anova 预处理的数据导入 Simca-P 软件, PCA 结果见图 2, 高血压病肝阳上亢证组和健康志愿组之间基本无交叉和重叠, 说明二者之间存在较明显的代谢异常, 故采取偏最小二乘判别分析对数据进行进一步分析, PLS-DA 如图 3, 分类结果较 PCA 得到明显改善。这是因为 PLS-DA 能够提取数据中与样本类别的相关信息, 并使它们的相关程度达到最大, 因此分类能力较强。R² = 0.872, 说明本模型主成分可以解释总变量的 93.4%, Q²

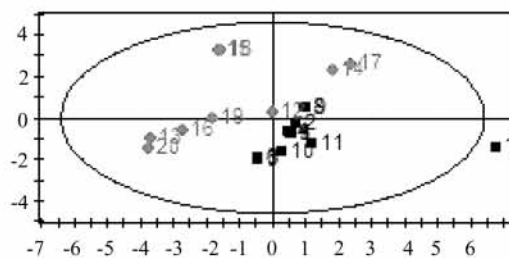


图 2 基于 anova 预处理高血压病肝阳上亢证组和健康志愿组主成分分析散点

1~11. 健康志愿者; 12~20. 高血压病肝阳上亢证患者

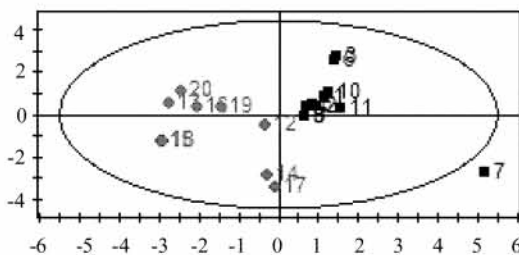


图 3 基于 anova 预处理高血压病肝阳上亢证组和健康志愿组偏最小二乘判别分析散点

1~11. 健康志愿者; 12~20. 高血压病肝阳上亢证患者

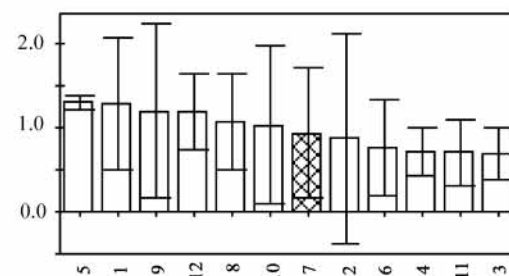


图 4 基于 anova 预处理高血压病肝阳上亢证组和健康志愿 VIP

(cum) = 0.73, 说明本模型的预测能力为 85.44%, 可见本模型的拟合能力和预测能力较好。通过 PLS-DA 分析, 变量对分类的重要程度可以由 VIP 值的大小来衡量, 如图 4 所示, VIP 值越大, 对应变量对分类的贡献就越大。

3.3 潜在生物标记物寻找及鉴定 通过 PLS-DA 的 VIP 图 (图 4), 可以确定对分类贡献较大的变量。根据变量对应的保留时间, 得到其质谱图, 经 NIST 数据库查询, 确定化合物的结构如表 1 所示。

3.4 代谢途径分析 KEGG 数据库为代谢物从代谢途径的水平理解细胞或组织的生物学意义提供了生物信息资源^[4]。将高血压病肝阳上亢证 4 种已鉴

表1 健康志愿者和高血压病肝阳上亢证潜在生物标记物列表 VIP 值 (>1,共6个)

序号	排序 VIP	排序 VIP 序号	对应 Rt	可能化合物
1	1.287 87	1	37.382	硬脂酸
2	1.197 8	9	26.29	未确定
3	1.180 63	12	32.136	肌醇
4	1.059 53	8	23.566	D-果糖
5	1.031 14	10	26.529	邻苯二甲酸

表2 高血压病肝阳上亢证潜在生物标记物代谢途径分析

KEGG 化合物编号	代谢物	代谢途径	分子式(相对分子质量)
C01530	硬脂酸	脂肪酸合成;不饱和脂肪酸的生物合成	C ₁₈ H ₃₆ O ₂ (284.271 5)
C00173	肌醇	磷酸肌醇代谢;磷脂信号系统	C ₆ H ₁₂ O ₆ (180.063 4)
C00085	D-果糖	戊糖和葡萄糖醛酸相互转换	C ₆ H ₁₃ O ₉ P (260.029 7)
C01606	邻苯二甲酸	在不同环境中的微生物代谢	C ₈ H ₆ O ₄ (166.026 6)

定结构的代标记物输入 KEGG 数据库,可以发现 4 种代谢物涉及到 6 条代谢通路,如表 2 示,这些代谢物主要与氨基酸代谢、脂肪酸代谢和糖代谢相关。

4 讨论

传统中医认为,肝为风木之脏,体阴而用阳,肝阴不足,阴不潜阳,或肾水不足,水不涵木而致风阳上扰多属虚因而肝肾阴虚、阴不制阳,导致肝阳上亢,并以此为基础确定了肝阳上亢证的诊断标准。本研究在中医证型诊断标准的基础上,经模式识别技术,得到具体的检验学指标,如肌醇、硬脂酸、D-果糖等,丰富了中医证候的研究内容,提供了中医证型的科学诊断标准,以利于临床诊断及用药。

肌醇参与磷酸肌醇代谢途径,磷脂酶 C 是肌醇磷脂代谢中的关键酶,肌醇磷脂在磷脂酶 C 的作用下产生相应的磷酸肌醇(IP3)和二酰基甘油(DG)。研究表明高血压患者及 SHR 一些细胞的磷脂酶 C 的活性是升高的。磷脂酶 C 活性升高必将引起肌醇磷脂的转换率增高,进一步导致 DG 和 IP3 增加,结果是 PKC 活性升高及 Ca 动员加强,而细胞内游离

Ca 增高是原发性高血压发病机制的最后共同途径^[5]。同时,在高血压形成过程中,VSMC 的磷脂肌醇系统被过度激活,VSMCs 内 G 蛋白-肌醇磷脂途径状态异常活跃和/或对外源性刺激的反应性增强,PLC 活性升高,IP3 和 DAG 生成增加,Ca²⁺ 浓度增高,而导致了血管平滑肌的过度痉挛和增殖,从而使 SHR 的 VSMC 张力增加,血压升高^[6]。综上所述,调节钙代谢的 IP3 信号传递途径的异常,可能是导致高血压发生的基本原因,而肾素-血管紧张素系统、VSMC 的改变,可能都是反映 IP3 信号传递途径的异常的一种标志或表现^[7]。本实验通过 GC-MS 技术,发现肌醇的可能代谢途径磷酸肌醇代谢异常,推测磷酸肌醇代谢与高血压病肝阳上亢证密切相关。

脂肪酸引起血压升高和促进高血压血管病变与血浆游离脂肪酸组成有关,血浆游离脂肪酸对血管内皮细胞有直接作用,它们可进入细胞内作为第二信使,加入到细胞膜磷脂中改变膜的功能,生成有血管活性的二十烷类来影响细胞功能^[8]。研究证实高血压病患者血浆总饱和脂肪酸与正常对照组相比较是明显增高的,其中主要以豆蔻酸、棕榈酸及硬脂酸为主。饱和脂肪酸有促进血小板凝聚及抑制纤维蛋白酶作用,从而促进血栓形成,同时对血管内皮细胞有损伤作用^[9],进而促进高血压血管病变,引起血压升高。本实验发现高血压病肝阳上亢证患者存在硬脂酸代谢的异常,也证明了高血压病伴发脂肪酸代谢异常。因此,血浆游离脂肪酸各成分的含量高低与血压密切相关,分析这些内源性代谢物及其含量的变化,可揭示高血压病肝阳上亢证的生物学本质。

高血压病与糖尿病存在共同的发病基础,二者同为代谢综合征的主要成分。高血压病伴发糖尿病,在临床上十分常见。本实验发现高血压病肝阳上亢证患者存在果糖代谢的异常,果糖实际上比葡萄糖更容易被代谢,因为它可以绕过糖酵解的限速酶,磷酸果糖激酶,可以直接成为 1,6-二磷酸果糖,从而进入糖酵解过程,本实验发现主要是糖酵解、糖异生异常以及磷酸戊糖代谢途径异常,也证明了高血压病伴发糖代谢异常,这对临床诊断高血压病肝阳上亢证以及预防高血压伴发糖尿病均具有重要的意义^[10]。

大鼠不翻转小肠囊模型对三七皂苷 R₁ 吸收的研究

邓震亭^{1,2}, 孟林¹

(1. 天津医科大学基础医学院药理教研室, 天津 300070;
2. 天津中医药大学第一附属医院药剂部, 天津 300193)

[摘要] 目的:通过不翻转小肠囊法研究药物浓度、能量以及小肠上皮组织的 P-蛋白对三七皂苷 R₁ 吸收的影响。方法:在小肠囊中加入不同浓度的三七皂苷 R₁ 溶液,比较不同浓度的三七皂苷 R₁ 的吸收差异;加入代谢抑制剂 2-硝基酚,观察三七皂苷 R₁ 的吸收是否需要能量;观察 P-蛋白抑制剂维拉帕米对三七皂苷 R₁ 吸收的影响。结果:三七皂苷 R₁ 的吸收与浓度呈线性,且需要能量。维拉帕米对三七皂苷 R₁ 的吸收无显著影响。结论:三七皂苷 R₁ 在大鼠肠道内的吸收有被动扩散性,三七皂苷 R₁ 可能不是 P-蛋白的底物。

[关键词] 三七皂苷 R₁; 不翻转小肠囊模型; 吸收; 维拉帕米; 2-硝基酚

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0142-03

Study on Absorption of Notoginsenoside R₁ Using Rat Non-everted Gut Sac

DENG Zhen-ting^{1,2}, MENG Lin¹

(1. Basic Medical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070;
2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Tradition Chinese Medicine, Tianjin 300193)

[Abstract] **Objective:** To study the absorption characteristics of notoginsenoside R₁ influenced by density, energy and p-glycoprotein with rat non-everted gut sac system. **Method:** Different concentration of notoginsenoside

[收稿日期] 20101118(013)

[第一作者] 邓震亭, 硕士生, 研究方向: 药理药剂, Tel: 022-27432634, E-mail: dengzt6@163.com

[参考文献]

- [1] 董飞侠, 黄迪, 何立群, 等. III期慢性肾病肾阳虚证患者尿液代谢组学特征的研究[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(12): 1109.
- [2] 中国高血压防治指南修正委员会. 中国高血压防治指南[M]. 2005年修订版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 20.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 73.
- [4] Okuda S, Yanada T, Hanmajima M, et al. KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: W423.
- [5] 余庆皋. 肌醇磷脂代谢与高血压[J]. 生命的化学, 1991, 11(2): 27.
- [6] 王鹏飞, 凌宗秀. 磷脂肌醇特异的磷脂酶 C 与高血压关系的研究进展[J]. 重庆科大学学报, 2002, 27(3): 364.
- [7] 周建辉, 刘霞, 郝宏. 三磷酸肌醇在高血压发病中的作用[J]. 青岛医药卫生, 2007, 39(1): 54.
- [8] Grimsgaard S, Bonna K H, Jacobsen B K, et al. Plosmu saturated and linoleic fatty acids are independently associated with blood pressure. Hypertension, 1999, 34(3): 478.
- [9] Steinberg H O, Tarshoby M, Monestel R et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependant vasodilation [J]. J Clin Invest, 1997, 100: 1230.
- [10] 王顺, 马爱群. 脂肪酸代谢异常在高血压发病机制中的作用[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2005, 32(3): 80.

[责任编辑 邹晓翠]