

缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证的代谢组学研究

王鹏军¹ 孙明谦² 苗阳² 刘玲玲²

(1 天津中医药大学第一附属医院老年病科,天津,300193; 2 中国中医科学院西苑医院心血管病中心,北京,100091)

摘要 目的:研究缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证的血浆代谢组学特征,探索代谢组学在缺血性心力衰竭中医证候中的应用。方法:收集缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证患者各 18 例,利用液相色谱质谱(LC/MS)联用技术对样本进行检测,用主成分分析(PCA)及偏最小二乘分析判别法(PLS-DA)处理图谱数据,研究两组血浆代谢物图谱的差异。结果:两组患者血浆 LC-MS 图谱的 PCA 及 PLS-DA 分析显示,气虚血瘀证和阳虚水停证能够被明显区分,两组血浆代谢物含量存在明显差异。缺血性心力衰竭阳虚水停证较气虚血瘀证,3 种溶血磷脂酰胆碱类物质含量降低,3 种肉碱类物质含量升高,2 中脂肪酸类物质含量升高,肌酐含量升高。结论:缺血性心力衰竭阳虚水停证和气虚血瘀证具有不同的代谢模式,两组能量代谢及磷脂代谢存在差异。以 LC-MS 为技术特点的代谢组学研究方法能够将两者区分,为中医证候的客观诊断提供了新的检测方法。
关键词 缺血性心力衰竭;气虚血瘀证;阳虚水停证;代谢组学

Metabolomics-Based Study on Ischemia Heart Failure With Syndrome Of Blood Stasis Caused By Qi Deficiency And Syndrome Of Fluid Accumulation Caused By Yang Deficiency

Pengjun Wang, Mingqian Sun, Yang Miao, Lingling Liu

(1 Tianjin University of Chinese medicine, Tianjin 300193, China; 2 Cardiovascular Department, Xi Yuan Hospital, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To investigate metabolomics characteristics of serum samples in ischemia heart failure with syndrome of blood stasis caused by qi deficiency (QDBS) and syndrome of fluid accumulation caused by Yang Deficiency (YDFA) and explore the application of metabolomics in study of TCM syndrome of ischemia heart failure. **Methods:** The serum samples of ischemia heart failure with QDBS (n = 18) and YDFA (n = 18) were detected by Liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS) and analyzed based on Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). **Results:** Ischemia heart failure with QDBS and YDFA can be distinguished clearly by PLS-DA. There was significant difference in metabolic characteristic between the two groups. Compared with QDBS, 3 metabolites belonged to Lysophosphatidylcholines decreased in YDFA; 3 metabolites belonged to carnitines and 2 metabolites belonged to fatty and creatinine increased in YDFA. **Conclusion:** Energy metabolism and phospholipid metabolism were different between ischemia heart failure with QDBS and YDFA. Metabolomics analysis based on LC/MS can distinguish the two groups and provide new detective method for TCM syndromes differentiation objective.

Key Words Ischemia heart failure; Syndrome of blood stasis caused by qi deficiency; Syndrome of fluid accumulation caused by Yang Deficiency; Metabolomics

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.004

中医证候具有明显的整体性,每个证候涉及多个器官或多个系统的病理改变,因此必然涉及多层次和多方面的物质基础。而某种客观指标具有明显的专一性与客观性,体现不出证的整体性和系统性,不能反应中医证候的本质^[1]。代谢组学作为系统生物学研究中一种重要的技术手段,与中医辨证方法有一个共同点—强调整体观,即挖掘机体内在的整体代谢规律,故可以把代谢组的理论、方法和技术作为研究中医证本质的出发点和切入点^[2]。本研究以缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证为研究对象,研究两证型的代谢组学特征,比较两证型代谢模式及代谢物质群的差异,探索代谢组学在研究缺血性心力衰竭中医证候中的应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例来源于 2011 年 10 月至 2012 年

12 月因缺血性心力衰竭于中国中医科学院西苑医院心血管科住院的患者,所有患者经 3 名主治医师辨证为气虚血瘀证和阳虚水停证。本试验共收集病例 36 例,其中气虚血瘀证 18 例,阳虚水停证 18 例。两组患者在年龄、性别、合并疾病等方面没有统计学意义(表 1, $P > 0.05$)。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准

1.2.1.1 心力衰竭诊断标准 参照美国心力衰竭协会 2010 年《心力衰竭治疗指南》^[3]、中华医学会心血管病学分会 2010 年《急性心力衰竭诊断与治疗指南》^[4]及 2007 年《慢性心力衰竭诊断与治疗指南》^[5]标准进行。

1.2.1.2 心功能判断标准 参照 1928 年 NYHA 心功

能分级方案,分为4级。

表1 两组患者一般资料比较

分组	样本量 (例)	年龄(岁)	性别		高血压	
			男(例)	女(例)	有(例)	无(例)
气虚血瘀证组	18	68.33 ± 10.97	11	7	11	7
阳虚水停证组	18	73.94 ± 8.37	12	6	12	6

1.2.1.3 心力衰竭分期(分阶段)标准 采用中华医学学会心血管病分会2007年《慢性心力衰竭诊断与治疗指南》^[5],将心力衰竭分为四个阶段。

1.2.1.4 冠心病诊断依据 参照 ACCF/AHA2011年《不稳定性心绞痛/非ST段抬高性心肌梗死患者管理指南》^[6]、欧洲心脏病学会2011《非ST段抬高性急性冠脉综合征处理指南》^[7]及中华医学学会心血管病分会2010年《急性ST段抬高性心肌梗死诊断治疗指南》^[8]制定。

1.2.2 中医诊断标准 中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则》(2002.5试行)^[9]证候诊断标准执行。

1.3 纳入标准 1)年龄40~85岁的缺血性心力衰竭患者;2)心力衰竭的基础病因是冠心病或合并高血压;3)LVEF ≤ 50%;4)NYHA心功能分级为Ⅲ级或Ⅳ级(心力衰竭分期为C期或D期);5)中医辨证为气虚血瘀证和阳虚水停证;6)签署知情同意书。

1.4 排除标准 1)急性冠脉综合征、肺栓塞和急性脑血管病;2)其他心脏病:瓣膜心脏病、扩心病、高心病、肺心病和先心病;3)糖尿病、肝功能不全者(ALT、AST升高超过正常值的3倍)、肾功能不全(血肌酐超过3mg/dL);4)恶性肿瘤终末阶段恶病质状态患者;5)拒绝接受此项研究或近1个月参加其他研究的患者。

1.5 试剂与材料 乙腈为色谱纯购于美国Fisher公司;甲酸为色谱纯购于J.T. BAKER公司;纯净水购于中国娃哈哈有限公司;次黄嘌呤、肌酐、尿酸购于sigma公司。

1.6 样本的采集与保存 受试者入组后次日早餐前抽取肘静脉血约5mL,置于真空采血管(EDTA-K3抗凝管)中,采集样品经4℃,3000 r/min中离心10min后取上清血浆,置于-80℃保存。

1.7 样品处理 血浆样品在室温下溶化后,取50 μL血浆加入200 μL乙腈溶剂沉淀震荡后在室温下静止10min,经12000 r/min,4℃离心10min后,取200 μL上清,过0.22 μm滤膜后,进入LC-MS分析。

1.8 色谱条件 液相色谱为美国Agilent 1200 HPLC系统,液相分离分别采用BEH C₁₈色谱柱(X-bridge, 2.5 μm, 2.1mm × 100mm, waters, IELAND)流动相采用0.1%甲酸水溶液(A)和0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度

如下:35% B;3min,60% B;15min,75% B;18min,95% B;20min,95% B;22min,35% B;28min, stop;2min,平衡,流速为0.25mL/min,柱温35℃。

1.9 质谱条件 质谱采用美国Agilent 6520 series Time of Flight mass spectrometer equipped with an electro-spray ionization (ESI) Interface (LC-TOF-MS)。雾化气和干燥气均为氮气,碰撞气为氦气。采集模式为正离子,毛细管电压为3500eV,雾化温度为350℃,干燥气为10.0L/min,雾化气为30 psi。质谱扫描范围为m/z 80 - 1000,数据储存模式为centroid。离子源采用双ESI喷雾,质谱采集数据通过两个已知的标准品[Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine和7H-purine,对应m/z 922.00980和121.0509]进行实时矫正。参比液通过Agilent isocratic泵以0.01 mL/min的速度喷入质谱。

1.10 数据处理方法 LC-MS所采集数据通过Agilent Mass Hunter (version-2.0)和Mass Professor profiler (MPP)软件进行系统数据分析。首先LC-MS数据通过Agilent Mass Hunter (version-2.0)工作站中的Molecular Feature extraction (MFE)功能对每个样本中的分子进行提取并创建mass features用于以后分析。在MFE分析中m/z的丰度数值大于500的数据才会被采集纳入mass features的计算中。丰度的计算是由Mass Hunter软件对一个分子相应的isotopic和adductive peaks丰度加合后产生。最后,在所采集的mass features中,丰度大于3000的features被纳入和整理成数据以待进一步分析。

通过Mass Hunter软件产生的数据,进一步输入到Mass profiler professor(MPP)软件中进行分析。MPP分别采用排列、归一化、修正80%规则、数据集分割和数据缩放等方法对数据集进行预处理,所得数据最后应用SIMICAP+统计软件进行进一步的PCA和PLS-DA的分析。

2 结果

2.1 LC-MS的代谢轮廓图 本实验采用HPLC-TOF-MS技术分别对缺血性心力衰竭不同证候患者血清中的成分进行代谢组学分析。Typical base ion currents(TIC)如图1所示。

2.2 多元数据分析

2.2.1 缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证的OPLS-DA数据分析 如图2所示,阳虚水停证组与气虚血瘀组在OPLS-DA模式识别中呈现了明显的区别。说明两种中医证候的心力衰竭患者体内代谢成分呈现出了一定的差别。

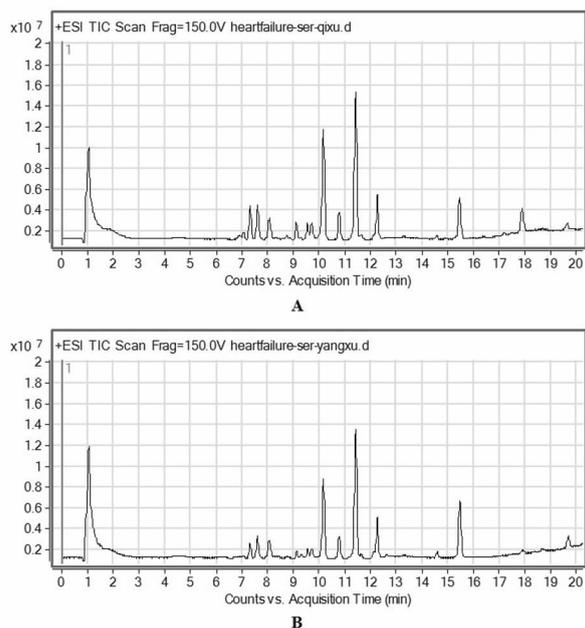


图 1 Typical serum total ion current (TIC) performed on HPLC-MS
A: Serum TIC of Qixu group B: Serum TIC of Yangxu group

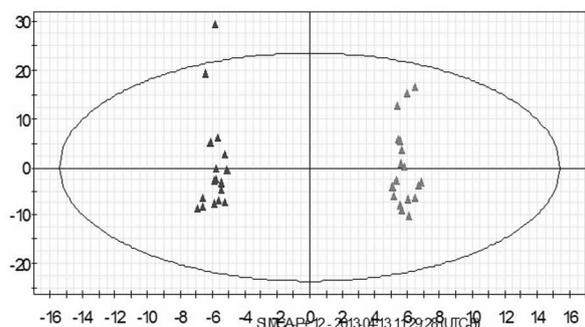


图 2 PLS-DA (A; $R^2 Y = 0.992, Q^2 = 0.637$) and OPLS-DA (B; $R^2 Y = 0.992, Q^2 = 0.287$) score plots of Yangxu and Qixu groups. Red: Qixu group Blue: Yangxu group

2.2.2 缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证的差异性代谢物质 在 PLS-DA 分析中 VIP 数值大于 1, 一般被认为是对模式区分有贡献的主要成分。因此, 认为这些小分子成分在正常组和疾病组之间的区别较大, 在模式识别中发挥重要作用。本实验将 VIP 大于 1 的组分作为潜在的生物标志物进行进一步的分析。内源性代谢产物的结构筛查首先是通过 MPP 软件, 将 LC-MS 数据中每个被是分子的代谢产物视为一个 features 进行数据提取。feature 的精确分子量, 同位素丰度, 输入到 METLIN 数据库进行比对分析。通过 student t-test (Unilateral, Equal Variances) 进行进一步筛选, P 值小于 0.05 的潜在生物标志物, 通过进一步的 MS/MS 实验进行进一步的确认。将这些潜在生物标志物的碎裂方式进行分析与比对, 从而验证这些标志物的结果推断。最后, 通过对一些标准品的比对最终确定生物标志物的结构。

如表 2 所示, 得到 9 种缺血性心力衰竭阳虚水停证和气虚血瘀证的差异性代谢物质, 将各差异性代谢物质与整体代谢网络途径相匹配后, 确认了其所在的代谢生化通道及在各组间变化方向。

表 2 缺血性心力衰竭阳虚水停证与气虚血瘀证生物标志物比较及代谢通路

No.	Mass	RT	Change	Identified results	Related pathway
1	517.3166	8.83	down	Linolenoyl lysolecithin ¹	phospholipids metabolism
2	523.3643	14.5	down	1-hexadecyl-2-acetyl-glycero-3-Phosphocholine ¹	Phosphocholine metabolism
3	519.3331	9.69	down	1-Linoleoyl phosphatidyl choline ¹	phospholipids metabolism
4	343.2722	7.64	up	Dodecanoyl carnitine ¹	energy metabolism
5	369.288	8.39	up	cis-5-Tetradecenoyl carnitine ¹	energy metabolism
6	399.3348	12.6	up	Palmitoyl carnitine ¹	energy metabolism
7	228.2082	18.6	up	4,8-dimethyl-dodecanoic acid ¹	fatty acid oxidation
8	328.2387	19.6	up	3,9,15-Docosatriynoic acid ¹	fatty acid oxidation
9	113.059	1.04	up	Creatinine ²	energy metabolism

¹ identified by MS/MS, ² identified by standard

3 讨论

3.1 能量代谢 本研究显示, 缺血性心力衰竭阳虚水停证较气虚血瘀证, 参与能量代谢的肉碱类物质 (Dodecanoyl carnitine、cis-5-Tetradecenoyl carnitine 和 Palmitoyl carnitine)、脂肪酸 (4,8-dimethyl-dodecanoic acid 和 3,9,15-Docosatriynoic acid) 以及肌酐 (Creatinine) 含量升高, 表明两证型在能量代谢方面存在差异。

心肌正常的能量代谢主要包括三个过程。1) 代谢底物的利用。2) 氧化磷酸化——通过线粒体呼吸链产生能量。3) ATP 的转运和利用——ATP 转运至心肌纤维以供应心脏泵血所需要的能量。线粒体肌酸激酶将 ATP 的高能磷酸键转移给肌酸形成磷酸肌酸和 ADP, 磷酸肌酸从线粒体扩散至心肌纤维后, 由心肌纤维内肌酸激酶将其高能磷酸键转移给 ADP 形成 ATP。磷酸肌酸脱掉高能磷酸键以后形成的游离的肌酸很快又扩散至线粒体内^[10-12]。此外, 心肌还可以利用酮体等合成能量。

中医认为, 气虚为阳虚之渐, 阳虚为气虚之甚, 阳虚患者更易疲劳, 活动耐量明显减低。气虚血瘀证多见于缺血性心力衰竭的早期, 阳虚水停证多见于缺血性心力衰竭的晚期。随着心力衰竭的发展, 心力衰竭晚期脂肪酸代谢异常, 氧化减少, 心肌 ATP 合成减少; 肌酸激酶活性降低, 高能磷酸盐生成不足, 心肌能量利用障碍^[13-14]。缺血性心力衰竭阳虚水停证肉碱类及脂肪酸类较气虚血瘀证含量升高, 可能由于肉碱-脂酰肉碱转运机制异常, 脂肪酸以及肉碱不能进入线粒体内而在胞浆聚集, 导致 ATP 合成减少。肌酐为肌酸的代谢产物, 缺血性心力衰竭阳虚水停证肌酐较气虚

血瘀证含量升高,可能由于肌酸激酶活性减低,肌酸不能有效合成磷酸肌酸而在体内聚集,分解代谢增强,导致其含量升高,心肌能量利用障碍。本研究显示,缺血性心力衰竭阳虚水停证较气虚血瘀证,能量合成不足,能量利用障碍,具体机制有待进一步的深入研究。

3.2 磷脂代谢 本研究显示,缺血性心力衰竭阳虚水停证较气虚血瘀证,参与磷脂代谢的 Linolenoyl lysolecithin、1 - hexadecyl - 2 - acetyl - glycerol - 3 - Phosphocholine 以及 1 - Linoleoyl phosphatidyl choline 含量降低,表明两证型在磷脂代谢方面存在差异。

溶血磷脂酰胆碱 (Lysophosphatidylcholine, LPC) 是氧化型低密度脂蛋白 (Oxidized low - density lipoprotein, ox - LDL) 的主要活性成分。研究显示, LPC 在动脉粥样硬化中是一个关键的致炎因子。LPC 可以增加培养的人和兔动脉内皮细胞中的血管细胞黏附分子 - 1 (Vascular cell adhesion molecule - 1, VCAM) 和细胞间黏附分子 - 1 (Intercellular adhesion molecule - 1, ICAM - 1) 的表达,促进单核和单核样细胞的趋化黏附,而黏附在内膜上的单核细胞又可以启动血管壁中强烈的炎症反应,加重脂蛋白的氧化,而氧化的脂蛋白可以进一步损害内膜,导致炎症细胞的浸润的恶性循环。LPC 还可以以剂量依赖方式促进人脐静脉内皮细胞释放 IL - 8 和单核细胞趋化蛋白 - 1 (Monocyte chemoattractant protein, MCP - 1),促进巨噬细胞产生 IL - 1 β 等介导斑块内的炎症反应^[15-16]。李伟军^[17]等的研究显示, LPC 还能够明显增加人脐静脉内皮细胞 IL - 6、TNF - α mRNA 的表达及上清液中的含量。LPC 可以通过多种途径发挥其促炎性作用,如与细胞膜的特定受体相结合、通过非受体途径直接与细胞膜结合等^[18]。

中医认为,气虚为阳虚之渐,阳虚为气虚之甚。气虚血瘀证多见于缺血性心力衰竭的初期,而阳虚水停证多见于缺血性心力衰竭的晚期。现已证实,心力衰竭与炎症反应密切相关,随着心力衰竭的发展及恶化,炎性因子释放增多,炎性反应逐渐增强^[19]。

本研究显示,缺血性心力衰竭阳虚水停证较气虚血瘀证,与炎症反应有关的溶血磷脂酰胆碱类物质 Linolenoyllysolecithin、1 - hexadecyl - 2 - acetyl - glycerol - 3 - Phosphocholine 和 1 - Linoleoyl phosphatidylcholine 含量降低,表明缺血性心力衰竭阳虚水停证较气虚血瘀证,溶血磷脂酰胆碱介导的炎性反应有进一步的紊乱,其机制有待更加深入的研究。

参考文献

[1] 薛飞飞,陈家旭.对“微观辨证”的思考与展望[J].中医杂志,2007,48(2):104-106.

[2] 简伟雄,袁朝凯.中医“证候”与代谢组学研究[J].中华中医药学刊,2009,27(2):351-352.

[3] HEART FAILURE SOCIETY OF AMERICA. Executive Summary: HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline[J]. J Card Fail, 2010,16(6):e1-194.

[4] 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.急性心力衰竭诊断和治疗指南[J].中华心血管病杂志,2010,3(38):195-208.

[5] 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.慢性心力衰竭诊断和治疗指南[J].中华心血管病杂志,2007,12(35):1076-1095.

[6] American Heart Association, American College of Cardiology Foundation. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non - ST - Elevation Myocardial Infarction(Updating the 2007 Guideline) [J]. J Am Coll Cardiol,2011,57(19):1920-59.

[7] Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST - segment elevation [J]. Eur Heart J, 2011, Aug 26. [Epub ahead of print].

[8] 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.急性ST段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J].中华心血管病杂志,2010,38(8):675-676.

[9] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则(试行)[S].北京:中国医药科技出版社,2002:79-80.

[10] Bessman SP, Geiger PJ. Transport of energy in muscle: the phosphoryl Creatine shuttle [J]. Science, 1981, 211:448-52.

[11] Ingwall JS. ATP and the heart. [J] Norwell MA: Kluwer Academic, 2002.

[12] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of sCreatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis' [J]. Biochem J, 1992, 281:21-40.

[13] Osorio JC, Stanley WC, Linke A, et al. Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor - alpha in pacing - induced heart failure [J]. Circulation, 2002, 106:606-12.

[14] Beer M, Seyfarth T, Sandstede J, et al. Absolute concentrations of high - energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with (31)P - SLOOP magnetic resonance spectroscopy [J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 40:1267-74.

[15] Benitez S, Camacho M, Arcelus R, Vila L, Bancell C, Ordonez - Llanos J. Increased lysophosphatidylcholine and non - esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cell: Relationship with electronegative LDL [J]. Atherosclerosis, 2004, 177(2):299-305.

[16] Rong JX, Berman JW, Taubman MB, Fisher EA. Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein - 1 gene expression in rat aortic smooth muscle cell [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22:1617-623.

[17] 李伟军,刘侨侨,姜黄素对溶血磷脂酰胆碱诱导内皮细胞炎症因子产生的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(1):52-56.

[18] 亢爱春,霍勇,齐丽彤.溶血磷脂酰胆碱在动脉粥样硬化中的作用[J].中国动脉硬化杂志,2006,14(12):1083-1086.

[19] 段佳佳,夏大胜.慢性心力衰竭患者炎性细胞因子的变化及作用[J].中国心血管病杂志,2012,17(2):93-95.