



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2021.190172

http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/202106591.pdf

基于¹H-NMR的冠心病血瘀证、痰浊证的代谢组学研究

易敏¹, 戴幸平², 李秋霞², 赵玉航², 聂闪闪², 王东生^{1,2}

(1. 中南大学湘雅二医院中西医结合科, 长沙 410011; 2. 中南大学湘雅医院中西医结合科, 长沙 410008)

[摘要] **目的:** 冠心病以其极高的发病率严重威胁着人类的健康, 对冠心病药物治疗及作用靶点的研究仍非常迫切。本研究旨在运用核磁共振氢谱(¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹H-NMR)代谢组学技术建立冠心病血瘀证及痰浊证的指纹代谢图谱, 寻找这2种证型的血浆标志性代谢物, 并揭示血府逐瘀汤治疗冠心病血瘀证的机制。**方法:** 采集符合纳入标准的69例冠心病血瘀证患者、60例冠心病痰浊证患者及40例健康对照受试者的清晨空腹血浆, 基于¹H-NMR构建冠心病血瘀证及痰浊证的¹H-NMR指纹代谢图谱。使用多元统计分析方法主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交化偏小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)寻找冠心病血瘀证及冠心病痰浊证的标志性代谢物。随机抽取冠心病血瘀证患者30例, 予血府逐瘀汤治疗30 d, 对治疗前后的清晨空腹血浆进行¹H-NMR检测, 分析冠心病血瘀证患者服药前后标志性代谢物的变化。**结果:** 冠心病血瘀证组与对照组存在显著性差异的代谢物有以下15种: 3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丙酮酸、磷脂酰胆碱、甘油磷脂酰胆碱、甘氨酸、葡萄糖、苯丙氨酸、柠檬酸、酪氨酸、甲酸盐、极低密度脂蛋白, 除葡萄糖、3-羟基丁酸、极低密度脂蛋白水平升高外, 其他12种代谢物水平均下降。冠心病痰浊证组与对照组存在显著性差异的代谢物有以下16种: 缬氨酸、乳酸、丙氨酸、N-乙酰-β-葡萄糖苷酶、谷氨酸、谷氨酰胺、丙酮酸、肌酸、胆碱、甘氨酸、葡萄糖、苯丙氨酸、柠檬酸、组氨酸、酪氨酸、甲酸盐, 除葡萄糖和胆碱2种水平升高外, 其他14种代谢物水平均下降。冠心病血瘀证患者服用血府逐瘀汤治疗后胆碱、磷脂/甘油磷脂类、肌酸、脂质、柠檬酸水平升高, 乳酸水平下降。**结论:** ¹H-NMR结合多元统计学方法能够建立诊断冠心病血瘀证和痰浊证证型的有效模型, 找到证型相关标志性代谢物; 血府逐瘀汤可通过调节脂质代谢、能量代谢治疗冠心病血瘀证。

[关键词] 冠心病血瘀证; 冠心病痰浊证; 代谢组学; 核磁共振氢谱; 血府逐瘀汤

¹H-NMR-based metabolomics study on coronary heart disease with blood-stasis syndrome and phlegm syndrome

YI Min¹, DAI Xingping², LI Qiuxia², ZHAO Yuhang², NIE Shanshan², WANG Dongsheng^{1,2}

(1. Department of Integrated Traditional Chinese & Western Medicine, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 2. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

收稿日期(Date of reception): 2019-05-17

第一作者(First author): 易敏, Email: yimin66@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-8752-0054

通信作者(Corresponding author): 王东生, Email: WDsh666@126.com, ORCID: 0000-0003-0229-4471

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(81800043)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81800043).

ABSTRACT

Objective: Coronary heart disease (CHD) is a serious threat to human health because of its high morbidity. It is very urgent to study the pathogenesis of CHD and the effective drug target. The purpose of this paper is using the ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H -NMR) metabolomics technology to establish the metabolic fingerprint and find the potential biomarker metabolites of CHD with blood-stasis syndrome and phlegm syndrome, and to reveal the metabolic mechanism of Xuefu Zhuyu Decoction for the treatment of CHD with blood stasis syndrome.

Methods: The plasma samples of 69 patients with CHD blood-stasis syndrome, 60 patients with CHD phlegm syndrome, and 40 healthy volunteers were collected in this study. Based on the ^1H -NMR metabolomics technology, the metabolic fingerprint of CHD with blood-stasis syndrome and phlegm syndrome was established. Multivariate statistical analysis methods including principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to find the potential biomarker metabolites of CHD with blood-stasis syndrome and phlegm syndrome. Xuefu Zhuyu Decoction was used to randomly selected blood-stasis syndrome patient. The plasma samples of pre-treatment and post-treatment were collected. ^1H -NMR and multivariate statistical analysis were used to analyze the changes of metabolites in patients with CHD blood-stasis syndrome before and after Xuefu Zhuyu Decoction treatment.

Results: A total of 15 potential biomarkers were identified in the plasma of patients with CHD blood-stasis syndrome, including 3-hydroxybutyrate (3-HB), lactate, alanine, glutamate, glutamine, pyruvate, phosphatidylcholine (PC), glycerylphosphorylcholine (GPC), glycine, glucose, phenylalanine, citrate, tyrosine, formate, very low density lipoprotein (VLDL). The levels of glucose, 3-HB, and VLDL increased, while the levels of other 12 metabolites decreased. A total of 16 potential biomarkers were identified in the plasma of patients with CHD phlegm syndrome, including valine, lactate, alanine, N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG), glutamate, glutamine, pyruvate, creatine, choline, glycine, glucose, phenylalanine, citrate, histidine, tyrosine, and formate. The levels of glucose and choline increased, while the levels of other 12 metabolites decreased. After treatment with Xuefu Zhuyu Decoction, the levels of choline, phospholipids/glycerolipids, creatine, lipids, and citrate increased, while the level of lactate decreased in patients with CHD blood-stasis syndrome.

Conclusion: ^1H -NMR combined with multivariate statistical method could effectively establish the diagnostic model for CHD blood-stasis syndrome and CHD phlegm syndrome, and find the metabolites related to the syndrome type. The metabolic mechanism of Xuefu Zhuyu Decoction on CHD blood-stasis syndrome may be associated with regulation of lipid metabolism and energy metabolism.

KEY WORDS

coronary heart disease blood-stasis syndrome; coronary heart disease phlegm syndrome; metabolomics; ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy; Xuefu Zhuyu Decoction

冠心病是以动脉粥样硬化为主要病理改变的缺血性心脏疾病, 临床以胸闷、胸痛为主要特征, 严重威胁着人类健康, 也是现阶段全球范围造成死亡

的最主要原因^[1-2]。冠心病属于中医的“胸痹”的范畴, 关键的病理为痰凝血瘀, 基本的病机是心脉瘀阻, 最常见的证型为血瘀证和痰浊证。血府逐瘀汤

是中医治疗“胸痹”的经典方,具有活血化瘀、行气止痛之效,现代医家用血府逐瘀汤治疗冠心病取得了显著的临床疗效^[3-4]。

中医证候是疾病发生和演变过程中特定阶段以及患者个体当时所处特定内外环境的本质反映,能够不同程度地揭示病因、病位、病性、邪正盛衰、病势等病机整体内容,是对致病因素与机体反应性两方面情况的综合反应。非靶向代谢组学以整体研究为其特征,通过全面分析疾病证候的代谢指纹谱,结合生物信息学方法,找出特征代谢物,以确定“证相关代谢谱群”,为中医证型的研究提供了重要手段。核磁共振氢谱(¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹H-NMR)作为代谢组学的检测手段之一,具有快速、准确、专属性高的特点,它不破坏样品的结构和性质,混合物中不同代谢物的¹H-NMR响应系数一致,属于无偏向检测技术;且¹H-NMR中信号强度与样品浓度成正比,可对代谢物进行定量分析^[5]。因此,本研究采用¹H-NMR代谢组学检测技术分析冠心病血瘀证、冠心病痰浊证患者血浆的代谢组学变化,以期寻找揭示其证候本质的标志性代谢物,并探讨血府逐瘀汤治疗冠心病血瘀证的代谢机制。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2016年1至5月于中南大学湘雅医院确诊为冠心病的患者129例。冠心病的诊断参照2002年美国心血管学会和美国心脏病协会制订的标准:冠状动脉造影结果显示主要冠状动脉(左前降支、左回旋支、右冠状动脉)中至少有1支内径狭窄≥50%。根据国家中医药管理局发布的《中医病症诊断疗效标准》^[6],将患者分为血瘀证组和痰浊证组。冠心病痰浊证:“心胸窒闷或如物压,气短喘促,多形体肥胖,肢体沉重,脘痞,痰多口粘,舌苔浊腻,脉滑”;冠心病血瘀证:“心胸阵痛,如刺如绞,固定不移,入夜为甚,伴有胸闷心悸,面色晦暗。舌质紫暗,或有瘀斑,舌下络脉青紫,脉沉涩或结代”。由3名中医师确诊,诊断一致者方可纳入相应组别。

另设年龄、性别与血瘀证组和痰浊证组匹配的对照组。对照组纳入标准为无任何冠心病证据。无血管造影指征的对照组受试者不进行血管造影检查。对照组排除标准:1)白细胞减少、血小板减少、有严重感染史者;2)有高血压心脏病、慢性肺源性心脏病、贫血性心脏病、脑血管病、糖尿病性心肌病或其他恶性肿瘤者;3)肝肾功能不全者;4)孕妇、哺乳

期妇女。

血瘀证组69例,其中男36例、女33例,年龄54~75(64.7±9.3)岁;痰浊证组60例,其中男34例、女26例,年龄45~78(61.1±16.0)岁;对照组40例,其中男23例、女17例,年龄48~74(61.0±12.8)岁。3组性别组成、年龄的差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。进一步在冠心病血瘀证患者中随机抽取30例使用血府逐瘀汤治疗。本研究经中南大学湘雅医院伦理委员会批准(批准号:201303094),所有受试者及其家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血府逐瘀汤的治疗

30例冠心病血瘀证患者使用的血府逐瘀汤为原方现代制剂(国药准字Z12020223,天津宏仁堂药业有限公司生产),药物组成是当归、生地、川芎、桃仁、红花、赤芍、枳壳、柴胡、牛膝、桔梗、甘草。治疗方案为每次6粒,每日2次,每疗程30d。

1.2.2 样本的收集和制备

使用含有肝素钠抗凝剂的试管采集受试者晨起空腹静脉血3mL,静置30min后离心(4℃,3000r/min,15min),取上清血浆,置于-80℃冰箱保存备用。

检测前将血浆样本在室温下解冻,在1.5mLEP管中加入200μL的血浆样本,400μL的缓冲液(0.045mmol/L NaH₂PO₄/K₂HPO₄,pH值为7.4,100%D₂O),震荡混匀后离心(4℃,12000r/min,10min),取550μL上清液至5mm样品管中待检。

1.2.3 检测方法

采用超导傅里叶核磁共振谱仪(瑞士Bruker公司,型号Bruker AVIII 600MHz)进行检测,质子的共振频率为600.13MHz。采用有预饱和压水的1D CPMG脉冲序列,检测各个样本的小分子代谢物成分。基本参数如下:90°脉宽为10s,采样点数为32K,谱宽20ppm,采样时间为1.36s,扫描次数为64,空扫次数为8,采样温度为298K。

对采集的所有一维¹H-NMR谱图的自由感应衰减(free induction decay, FID)谱图信号加上增宽因子为1Hz的指数窗函数后进行傅立叶变换,以提高信噪比;使用Mestrenova软件9.0.1校正谱图的相位和基线;使用α-葡萄糖低场的信号(δ 5.23)进行化学位移定标。使用AMIX软件(V3.9.2)对定标后的谱图在0.6~9.0ppm区域分段积分,积分区间宽为0.002ppm,去除水峰(4.14~5.20ppm)和尿素峰(5.50~6.60ppm)。

1.3 统计学处理

将¹H-NMR谱图的数据进行初步处理后导入

SIMCA-P 软件包(V14, Umetrics, Sweden), 采用主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交化偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)进行多元统计分析。数据采用自适换算标准化方式进行处理。采用7倍交叉验证、200次重复排列置换检验评价OPLS-DA模型的准确性。采用OPLS-DA分析中的相关系数(r)来确定2组间血浆的差异代谢物。在对数据进行回溯转换后, 采用Matlab软件(V7.0.4, Mathworks Inc., USA)绘制针对每个变量的皮尔森相关系数负载图, 找出组间有显著性差异的化学成分, 并进行颜色编码, 颜色反映代谢物变化的显著性, 从冷色(蓝色)到暖色(红色)表示显著性逐渐升高。通过查阅相关系数表, 确定相关系数 $|r| > 0.301$ 作为临界值($P < 0.05$), 来判别组间差异代谢物, $r > 1$ 说明差异

物质上调, $r < 1$ 说明差异物质下调。

对使用血府逐瘀汤治疗的冠心病血瘀证患者治疗前、后的血浆代谢物的峰面积进行手动积分, 将峰面积表导入SIMCA-P软件包再次进行PCA和OPLS-DA多变量统计分析。使用OPLS-DA模型的变量重要性投影(variable importance projection, VIP)值对差异性代谢物进行预选($VIP > 1$ 说明对分类有贡献)。

2 结果

2.1 $^1\text{H-NMR}$ 谱图

选择3组的代表性 $^1\text{H-NMR}$ 谱图, 根据一维谱图谱峰的化学位移, 并对照相关研究^[7-8]和共享数据库对核磁共振信号进行代谢物归属(图1)。

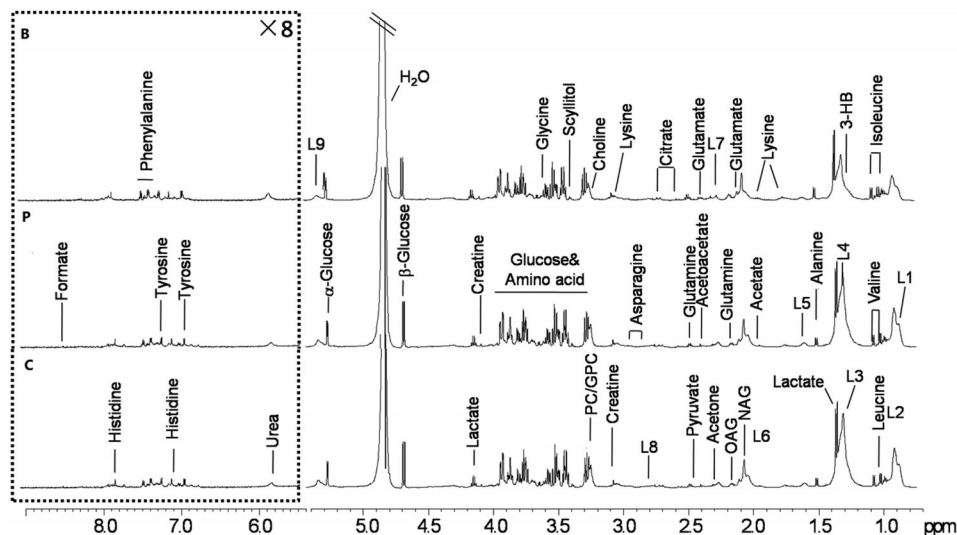


图1 冠心病血瘀证组、冠心病痰浊证组及对照组的代表性 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Figure 1 Typical spectra of plasma samples in the group of coronary heart disease blood-stasis syndrome, the group of coronary heart disease phlegm syndrome, and the group of control

B: Coronary heart disease with blood-stasis syndrome; P: Coronary heart disease with phlegm syndrome; C: Control; 3-HB: 3-hydroxybutyrate; NAG: N-acetyl-glycoprotein; OAG: O-acetyl-glycoprotein; PC: Phosphorycholine; GPC: Glycerophosphorycholine; L1: LDL, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$; L2: VLDL, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$; L3: LDL, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$; L4: VLDL, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$; L5: VLDL, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$; L6: Lipids, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$; L7: Lipids, $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$; L8: Lipids, $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=-$; L9: Lipids, $-\text{CH}=\text{CH}-$.

2.2 冠心病痰浊证、血瘀证的模式识别及差异代谢物鉴定

2.2.1 PCA 模式识别

3组的PCA三维散点得分图(图2)可完全分开, PCA模型获得2个主成分, 模型可解释的变量 R^2X 为87.2%, 模型的可预测度 Q^2 为74.4%, 均较高, 说明模型可靠。

2.2.2 OPLS-DA 模式识别

冠心病血瘀证组与对照组的OPLS-DA得分图(3A)示OPLS-DA模型的 R^2X 为85.5%, Q^2 为82%。使用200次重复排列置换检验, 得到 R^2 为0.264, Q^2 为-0.329, 表明模型不存在过拟合。在冠心病血瘀证组与对照组的相关系数负载图(3B)中, 颜色代表代谢物变化的显著性, 从冷色(蓝色)到暖色(红色)显著性

逐渐升高。冠心病血瘀证组与对照组存在显著性差异的代谢物有以下 15 种：3-羟基丁酸(3-hydroxybutyrate, 3-HB)、乳酸、丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丙酮酸、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、甘油磷脂酰胆碱(glycerolphosphorylcholine, GPC)、甘氨酸、葡萄糖、苯丙氨酸、柠檬酸、酪氨酸、甲酸盐、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL), 除葡萄糖、3-HB及VLDL水平升高外, 其他12种代谢物水平均下降(表1)。

冠心病痰浊证组与对照组的OPLS-DA得分图(4A)示OPLS-DA模型的R²X为85.3%, Q²为81.5%。使用200次重复排列置换检验, 得到R²为0.247, Q²为-0.331, 表明模型不存在过拟合。冠心病痰浊证组与对照组的相关系数负载图(4B)显示: 冠心病痰浊证组与对照组存在显著性差异的代谢物有缬氨酸、乳酸、丙氨酸、N-乙酰-β-葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-glucosaminidase, NAG)、谷氨酸、谷氨酰胺、丙酮酸、肌酸、胆碱、甘氨酸、葡萄糖、苯丙氨酸、柠檬酸、组氨酸、酪氨酸、甲酸盐共16种, 除葡萄糖和胆碱2种水平升高外, 其他14种水平均下降(表1)。

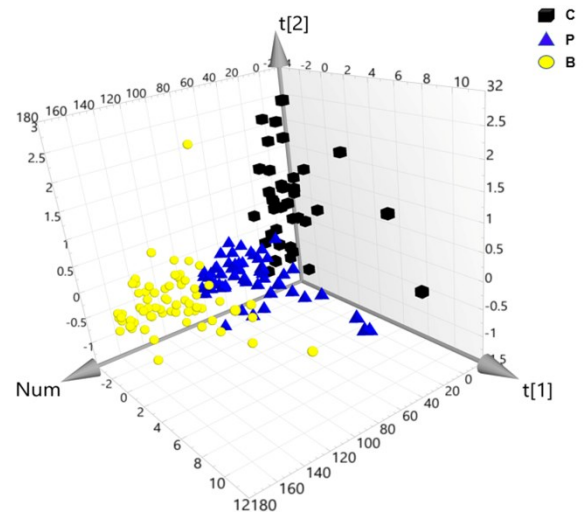


图2 冠心病血瘀证组、冠心病痰浊证组及对照组的PCA三维散点得分图

Figure 2 Three-dimensional scatter score map of PCA in the group of coronary heart disease blood-stasis syndrome, the group of coronary heart disease phlegm syndrome, and the group of control

B: Coronary heart disease with blood-stasis syndrome; P: Coronary heart disease with phlegm syndrome; C: Control

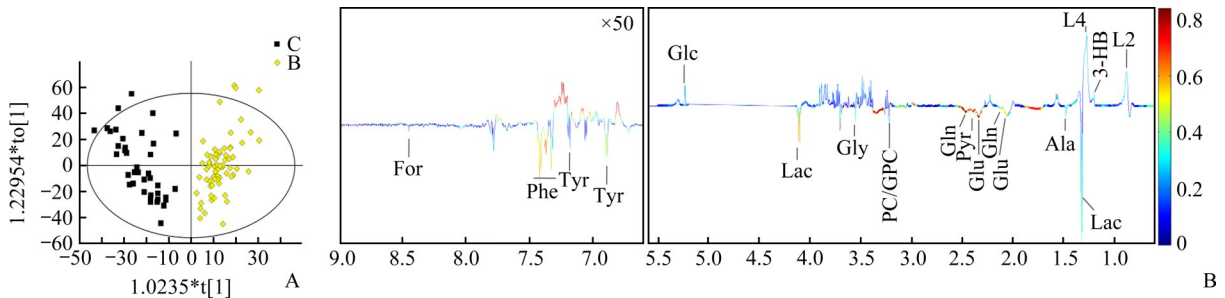


图3 冠心病血瘀证组和对照组的OPLS-DA得分图(A)和相关系数负载图(B)

Figure 3 OPLS-DA score plots (A) and correlation coefficient load diagram (B) of the group of coronary heart disease blood-stasis syndrome and the group of control

C: Control; B: Coronary heart disease with blood-stasis syndrome.

表1 组间差异代谢物及其相关系数

Table 1 Differential metabolites and correlation coefficients between groups

Metabolic substance	Chemical shift	<i>r</i>	
		P vs C	B vs C
Valine	0.99(d), 1.04(d)	-0.554	
3-HB	1.20(d)		0.395
Lactate	1.32(d), 4.11(q)	-0.600	-0.649
Alanine	1.48(d)	-0.544	-0.389
NAG	2.03(s)	-0.376	
Glutamate	2.06(m), 2.35(m)	-0.727	-0.779
Glutamine	2.13(m), 2.46(m)	-0.794	-0.779

表 1(续)

Metabolic substance	Chemical shift	<i>r</i>	
		P vs C	B vs C
Pyruvate	2.37(s)	-0.492	-0.440
Creatine	3.03(s), 3.94(s)	-0.523	
Choline	3.20(s)	0.410	
PC	3.22(s)		-0.339
GPC	3.22(s)		-0.339
Glycine	3.56(s)	-0.580	-0.650
Glucose	3.42(t), 3.54(dd), 3.71(t), 3.73(m), 3.84(m), 3.25(dd), 3.41(t), 3.46(m), 3.49(t), 3.90(dd), 4.65(d), 5.23(d)	0.327	0.327
Phenylalanine	7.32(d), 7.37(t), 7.42(dd)	-0.818	-0.627
Citrate	2.53(d), 2.64(d)	-0.933	-0.920
Histidine	7.06(s), 7.78(s)	-0.358	
Tyrosine	6.90(d), 7.19(d)	-0.707	-0.505
Formate	8.45(s)	-0.431	-0.345
L2: VLDL, CH ₃ -(CH ₂) _n -	0.88(m)		0.373

P: 冠心病痰浊证组; B: 冠心病血瘀证组; C: 对照组。

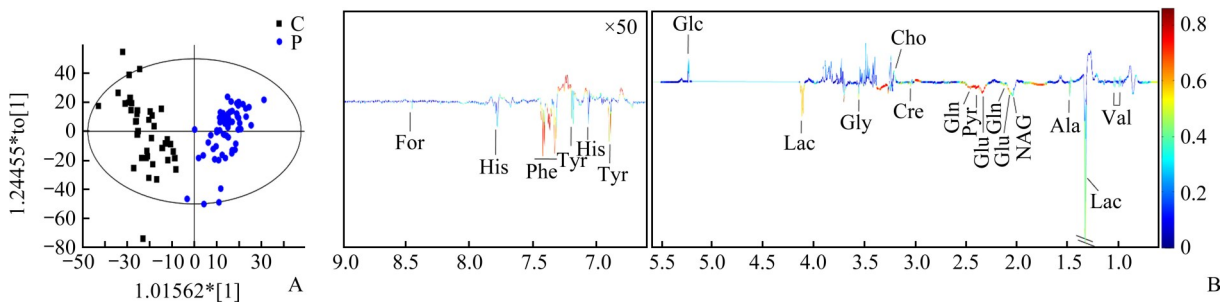


图4 冠心病痰浊证和对照组的OPLS-DA得分图(A)和相关系数负载图(B)

Figure 4 OPLS-DA score plots (A) and correlation coefficient load diagram (B) of the group of coronary heart disease phlegm syndrome and the group of control

C: Control; P: Coronary heart disease with phlegm syndrome.

2.3 血府逐瘀汤对冠心病血瘀证患者血浆代谢物质的调节

2.3.1 治疗前后PCA模式识别

血府逐瘀汤治疗冠心病血瘀证前后PCA三维散点得分图(图5)分离趋势明显,表明患者血浆中代谢物质治疗前后差异明显,PCA模型获得2个主成分,模型可解释的变量 R^2X 为63.5%,模型的可预测度 Q^2 为53.6%。

2.3.2 血府逐瘀汤临床疗效的血液流变学评价

采用血府逐瘀汤治疗后,患者的全血黏度(高剪切和低剪切)、血浆黏度、红细胞聚集指数均明显低于治疗前(均 $P < 0.05$,表2)。

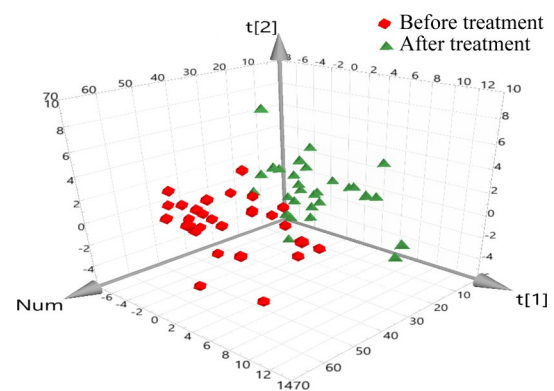


图5 血府逐瘀汤治疗冠心病血瘀证前后的PCA三维散点得分图

Figure 5 Three-dimensional scatter score map of PCA before and after Xuefu Zhuyu Decoction treatment for coronary heart disease blood-stasis syndrome

2.3.3 治疗前后 OPLS-DA 模式

血府逐瘀汤治疗冠心病血瘀证前后的 OPLS-DA 得分图(图 6A)显示: 两组分离趋势明显, 且 OPLS-DA 模型的 R²Y 为 68.7%, Q² 为 65.2%。使用 200 次重复排列置换检验, 得到 R² 值与 Y 轴交点为 0.392, Q²

与 Y 轴交点为 -0.0584, 说明模型不存在过拟合情况。血府逐瘀汤治疗冠心病血瘀证前后的相关系数负载图(图 6B)显示: 治疗后胆碱、磷脂/甘油磷脂类、肌酸、脂质、柠檬酸水平升高, 乳酸水平下降(表 3)。

表 2 血府逐瘀汤对冠心病血瘀证患者临床疗效的血液流变学评价

Table 2 Hemorheological evaluation of clinical effect of Xuefu Zhuyu Decoction on coronary heart disease blood-stasis syndrome

Group	Whole blood viscosity/(m·Pa ⁻¹ ·S ⁻¹)		Plasma viscosity/(m·Pa ⁻¹ ·S ⁻¹)	Erythrocyte aggregation index
	High shear	Low shear		
Before treatment	4.11±0.38	7.78±0.39	2.34±0.78	4.63±0.70
After treatment	3.34±0.45*	6.38±0.20*	1.51±0.24*	4.17±0.67*

*P<0.05。

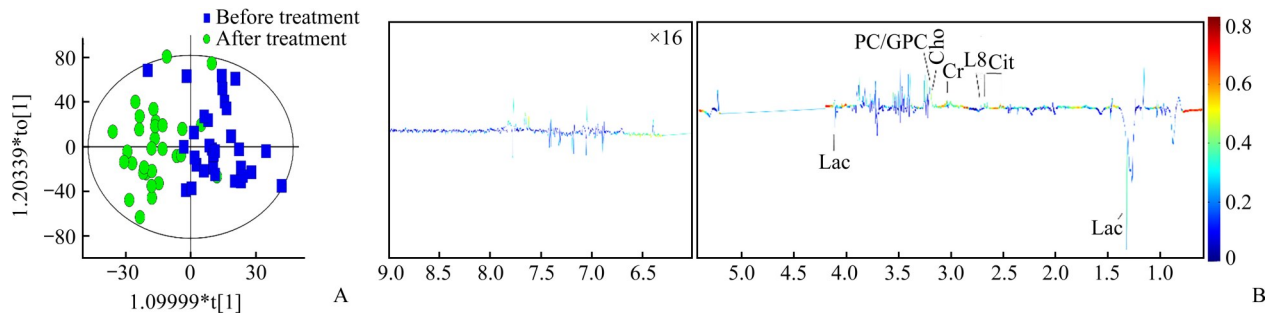


图 6 血府逐瘀汤治疗冠心病血瘀证前后的 OPLS-DA 得分图(A)和相关系数负载图(B)

Figure 6 OPLS-DA score plots (A) and correlation coefficient load diagram (B) before and after Xuefu Zhuyu Decoction treatment of coronary heart disease blood-stasis syndrome

表 3 血府逐瘀汤治疗前后差异代谢物及其相关系数

Table 3 Differential metabolites and correlation coefficients before and after Xuefu Zhuyu Decoction treatment

Metabolic substance	Chemical shift	r
Lactate	1.33(d), 4.12(q)	-0.429
Citrate	2.52(d), 2.64(d)	0.664
Lipids(=CH-CH ₂ -CH=)	2.74(s)	0.391
Creatine	3.03(s)	0.467
Choline	3.18(s)	0.461
PC/GPC	3.20(s)	0.348

3 讨论

痰浊证和血瘀证作为中医中冠心病最常见的两个证型, 是冠心病发生和发展病理过程的两个不同阶段。已有大量研究^[9-14]从血脂、血液流变学、炎症

因子、血管内皮的结构和功能、平滑肌细胞的凋亡、基因的表达等多个微观角度来探讨二者的演变及联系, 认为冠心病的中医病理基础多为由痰至瘀, 痰瘀互结, 瘀阻心脉。

本研究使用¹H-NMR 技术结合多元统计分析发现: 与健康对照比较, 冠心病血瘀证和痰浊证患者血浆中乳酸、丙酮酸、柠檬酸水平明显下降。乳酸、丙酮酸、柠檬酸主要涉及三羧酸循环。三羧酸循环是有氧代谢供能的主要途径, 该途径的第一步就是由乙酰辅酶 A 与草酰乙酸形成柠檬酸。在本研究中, 冠心病患者血浆中柠檬酸水平明显下降, 说明冠心病患者存在较严重的三羧酸能量代谢障碍, 与 Sabatine 等^[15]研究的结果相同。丙酮酸作为乳酸被摄取后糖酵解的代谢物, 是糖类代谢和脂类代谢进入三羧酸循环的中间产物, 可以调节三羧酸循环。本研究中冠心病血瘀证和痰浊证患者血浆中乳酸、丙酮酸水平明显下降, 说明冠心病患者有严重能量代谢异常。丙氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、

甘氨酸、酪氨酸均属于氨基酸代谢, 这些代谢物质在冠心病血瘀证和/或痰浊证患者血浆中水平均明显下降。研究^[16]证实: 酪氨酸激酶及其相关受体的上调与冠心病内皮通透性及粥样斑块的形成密切相关, 酪氨酸残基在酪氨酸激酶的作用下磷酸化。

本研究发现3-HB、VLDL、PC、GPC等代谢小分子可作为冠心病血瘀证的标志性代谢物, 其主要涉及脂质代谢。脂质代谢紊乱是引起动脉粥样硬化发生和进展的重要因素。3-HB是在肝脏中合成的一种酮体, 它提供乙酰辅酶并和乙酰辅酶A合成胆固醇、脂肪酸和复合脂质, 是脂质合成的重要原料。本研究发现冠心病血瘀证患者血浆中3-HB水平明显上升, 说明脂质合成原料增加。VLDL是运输内源性胆固醇的主要形式, 一般条件下并没有致动脉粥样硬化的作用, 但当其水平在体内显著升高时, 血浆中的三酰甘油和胆固醇水平也会随之增高, 载脂蛋白B(apolipoprotein B, ApoB)也会相对增加, 随着VLDL水平在体内的升高, 其颗粒会逐渐细小, 密度逐渐增加, 此时具有很强的致动脉粥样硬化的作用。因此, VLDL也被认为是能够导致动脉粥样硬化的因子。冠心病血瘀证患者血浆中的PC和GPC水平明显下降, 而PC和GPC是磷脂的重要组成部分, 主要用来构成细胞膜双层结构, 保证细胞器功能和代谢的稳定。在低密度脂蛋白受体基因敲除(low density lipoprotein receptor gene knockout, LDLR^{-/-})动脉粥样硬化小鼠的血浆中, PC和GPC水平明显下降, 说明在动脉粥样硬化过程中存在较严重的磷脂代谢紊乱^[17]。研究^[18]报道人体血浆中PC和GPC水平降低是冠心病发生的危险因素。本研究发现3-HB、VLDL、PC和GPC在冠心病血瘀证患者血浆中变化明显, 证明冠心病血瘀证患者血浆中存在较严重的脂质代谢紊乱, 这些小分子物质可以作为冠心病血瘀证的潜在生物标志物。

NAG、肌酸、胆碱、组氨酸、缬氨酸可作为冠心病痰浊证的标志性代谢产物。这些小分子代谢产物主要与炎症反应、能量代谢、氨基酸代谢有关。人体内存在 α -胰蛋白酶、转铁蛋白、珠蛋白、免疫球蛋白和纤维蛋白原等多种NAG, 这些NAG多与炎症性疾病的发生相关^[19]。有研究^[20]报道NAG可作为大动脉炎血清潜在的生物标志物, 并且与糖尿病颈动脉粥样硬化密切相关^[20]。在本研究中, 冠心病痰浊证患者血浆中NAG水平明显下降, 提示在冠心病痰浊证患者冠状动脉粥样硬化的发生和发展过程中, 冠状动脉的炎症反应可能与NAG相关。胆碱是甘油磷脂代谢通路的中间产物, 人体内的胆碱可氧化形成甜菜碱, 肠道微生物对甜菜碱和胆碱的分解代谢

生成氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide, TMAO), 而甜菜碱/胆碱比值与心血管疾病呈负相关, 胆碱与三酰甘油之间呈显著正相关^[21], 甜菜碱和TMAO均与AS的发生密切相关^[22-23]。在本研究中, 冠心病痰浊证患者血浆中胆碱水平明显升高, 可能引起TMAO水平升高、甜菜碱/胆碱比值下降, 最终导致动脉粥样硬化, 因此胆碱可作为冠心病痰浊证的代谢小分子标志物。肌酸在人体中主要存在于肌肉组织中, 由甘氨酸、丝氨酸、蛋氨酸在肝中合成, 主要与细胞的能量转移有关, 冠心病痰浊证患者血浆中肌酸水平下降明显, 提示患者存在能量代谢异常。研究^[24]证实组氨酸具有心肌保护作用, 组氨酸可通过降低游离自由基的毒性作用, 阻止活性氧的生成, 保存高能磷酸来减轻心肌缺血再灌注损伤, 维持心肌细胞内pH值的稳定, 从而起到保护心肌正常功能的作用。冠心病痰浊证患者血浆组氨酸水平明显下降, 可能导致上述心肌保护作用减弱。

本研究发现: 血府逐瘀汤可调节冠心病血瘀证患者血浆中乳酸、柠檬酸、脂质、肌酸、胆碱、PC/GPC的水平, 其中乳酸、柠檬酸、PC/GPC均为冠心病血瘀证的特征性小分子代谢产物。“以方测证”进一步证实了冠心病血瘀证的代谢轮廓及证型稳定性。在本研究中, 使用血府逐瘀汤后, 冠心病血瘀证患者血浆柠檬酸、肌酸水平较用药前明显升高, 乳酸水平明显降低, 说明血府逐瘀汤能够改善冠心病心脉痹阻缺氧导致的能量代谢异常。冠心病血瘀证患者存在较严重的磷脂代谢紊乱, 在使用血府逐瘀汤后患者血浆中PC/GPC水平显著上调, 说明血府逐瘀汤可纠正机体磷脂代谢的紊乱状态。血府逐瘀汤主要通过调节脂质代谢通路、能量代谢通路治疗冠心病血瘀证。

本研究使用¹H-NMR技术结合多元统计分析建立了冠心病血瘀证和痰浊证的指纹代谢图谱, 找到证型相关代谢产物及相关代谢通路, 说明代谢组学技术可以有效地运用到中医证型相关研究中; 进一步使用血府逐瘀汤治疗冠心病血瘀证患者, “以方测证”证实了血瘀证证型的稳定性, 初步阐释了血府逐瘀汤治疗冠心病的代谢机制。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] Roth GA, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J].

- Lancet, 2018,392(10159):1736-1788.
- [2] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 中国心血管病报告2018概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-219.
HU Shengshou, GAO Runlin, LIU Lisheng, et al. Summary of the 2018 Report on Cardiovascular Diseases in China[J]. Chinese Circulation Journal, 2019, 34(3): 209-219.
- [3] 陈林, 彭维. 血府逐瘀汤加减治疗冠心病心绞痛131例疗效观察[J]. 中医临床研究, 2018, 10(10): 85-87.
CHEN Lin, PENG Wei. Observation on treating angina pectoris from coronary heart disease with the Xuefu Zhuyu decoction[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2018, 10(10): 85-87.
- [4] 蔡孝明. 血府逐瘀汤联合西药治疗冠心病心绞痛心血瘀阻证患者的临床效果分析[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(5): 182-183.
CAI Xiaoming. Clinical effect analysis of Xuefu Zhuyu decoction combined with western medicine in the treatment of coronary heart disease angina pectoris patients with blood stasis syndrome[J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2017, 11(5): 182-183.
- [5] 张芬芬, 蒋孟虹, 沈文斌, 等. 定量核磁共振(QNMR)技术及其在药理学领域的应用进展[J]. 南京师范大学学报, 2014, 14(2): 8-18.
ZHANG Fenfen, JIANG Menghong, SHEN Wenbin, et al. Progress in quantitative nuclear magnetic resonance technology in pharmaceutical applications[J]. Journal of Nanjing Normal University, 2014, 14(2): 8-18.
- [6] 国家中医药管理局政司. 中医病证诊断疗效标准[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020: 29.
Department of Administration, National Administration of Traditional Chinese Medicine. Criteria for diagnosis and curative effect of TCM diseases and syndromes[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2020: 29.
- [7] Savorani F, Kristensen M, Larsen FH, et al. High throughput prediction of chylomicron triglycerides in human plasma by nuclear magnetic resonance and chemometrics[J]. Nutr Metab (Lond). 2010, 7: 43.
- [8] Probert F, Rice P, Scudamore CL, et al. ¹H NMR metabolic profiling of plasma reveals additional phenotypes in knockout mouse models[J]. J Proteome Res, 2015, 14(5): 2036-2045.
- [9] 闻莉, 刘松林, 梅国强. 高脂血症的中医临床证型分布及辨证规律研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(3): 220-221.
WEN Li, LIU Songlin, MEI Guoqiang. Study on the distribution and differentiation of TCM clinical syndromes of hyperlipidemia[J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2008, 14(3): 220-221.
- [10] 贺劲. 血液流变性改变与冠心病中医证型关系研究[J]. 中国中医急症, 2008, 17(10): 1401-1403.
HE Jin. The research on the relationship between hemorheology changes and TCM syndromes of coronary heart disease[J]. Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine, 2008, 17(10): 1401-1403.
- [11] 王东生, 袁肇凯, 陈方平, 等. 动脉粥样硬化大鼠“痰瘀”病理演变与血管平滑肌细胞凋亡的相关性研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(2): 38-40.
WANG Dongsheng, YUAN Zhaokai, CHEN Fangping, et al. Relationship between pathological development of phlegm-stasis and apoptosis in vascular smooth muscle cell in atherosclerotic rats model[J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2005, 12(2): 38-40.
- [12] 袁肇凯, 黄献平, 谭光波, 等. 冠心病血瘀证血管内皮细胞功能的检测分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(5): 407-410.
YUAN Zhaokai, HUANG Xianping, TAN Guangbo, et al. Analysis of the function of vascular endothelial cells in coronary heart disease patients of blood-stasis syndrome[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2006, 26(5): 407-410.
- [13] 王东生, 袁肇凯, 黄献平, 等. 动脉粥样硬化大鼠痰瘀病理演变与相关基因表达的研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5): 650-653.
WANG Dongsheng, YUAN Zhaokai, HUANG Xianping, et al. Study on pathological mechanism of phlegm and blood stasis syndrome and gene expression in atherosclerotic rat[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 24(5): 650-653.
- [14] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 36(2): 141-152.
LIU Juntian. Progress of inflammatory pathogenesis of atherosclerosis[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University. Medical Sciences, 2015, 36(2): 141-152.
- [15] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia[J]. Circulation, 2005, 112(25): 3868-3875.
- [16] Liang K, Ma N, Luo SG, et al. The expression and clinical significance of spleen tyrosine kinase in patients with coronary heart disease[J]. Med Sci Monit, 2019, 22(25): 2112-2121.
- [17] Li D, Zhang L, Dong F, et al. Metabonomic changes associated with atherosclerosis progression for LDLR^{-/-} mice[J]. J Proteome Res, 2015, 14(5): 2237-2254.
- [18] Guasch-Ferre M, Hu FB, Ruiz-Canela M, et al. Plasma metabolites from choline pathway and risk of cardiovascular disease in the PREDIMED (Prevention With Mediterranean Diet) study[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(11): e006524.
- [19] Bell JD, Brown JC, Nicholson JK, et al. Assignment of resonances for “acute phase” glycoproteins in high resolution proton NMR spectra of human blood plasma[J]. FEBS Lett, 1987, 215(2): 311-315.
- [20] Jain A, Kumar D, Guleria A, et al. NMR-based serum metabolomics of patients with Takayasu arteritis: Relationship with disease activity[J]. J Proteome Res, 2018, 17(9): 3317-3324.
- [21] Lee M, Hong N, Lee YH, et al. Elevated N-acetyl-β-D-glucosaminidase, a urinary tubular damage marker, is a significant predictor of carotid artery atherosclerosis in type 1 diabetes, independent of albuminuria: A cross-sectional study[J]. J Diabetes Complications, 2018, 32(8): 777-783.
- [22] Griffin JL, Wang X, Stanley E. Does our gut microbiome predict cardiovascular risk? A review of the evidence from metabolomics[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2015, 8(1): 187-191.

- [23] Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis[J]. Cell, 2015, 163(7): 1585-1595.
- [24] Farshid AA, Tamaddonfard E, Yahyaee F. Effects of histidine and N-acetylcysteine on diclofenac-induced anti-inflammatory response in acute inflammation in rats[J]. Indian J Exp Biol, 2010, 48(11): 1136-1142.
- (本文编辑 郭征)

本文引用: 易敏, 戴幸平, 李秋霞, 赵玉航, 聂闪闪, 王东生. 基于¹H-NMR的冠心病血瘀证、痰浊证的代谢组学研究[J]. 中南大学学报(医学版), 2021, 46(6): 591-600. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.190172

Cite this article as: YI Min, DAI Xingping, LI Qiuxia, ZHAO Yuhang, NIE Shanshan, WANG Dongsheng. ¹H-NMR-based metabolomics study on coronary heart disease with blood-stasis syndrome and phlegm syndrome[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2021, 46(6): 591-600. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2021.190172

本刊常用词汇英文缩写表(按英文字母排序)

从2012年第1期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

5-FU	5-氟尿嘧啶	FDA	美国食品药品监督管理局	NS	生理氯化钠溶液
5-HT	5-羟色胺	FITC	异硫氰酸荧光素	PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压
ABC法	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	GFP	绿色荧光蛋白	PaO ₂	动脉血氧分压
ACh	乙酰胆碱	GSH	谷胱甘肽	PBS	磷酸盐缓冲液
AIDS	获得性免疫缺陷综合征	HAV	甲型肝炎病毒	PCR	聚合酶链反应
ALT	丙氨酸转氨酶	Hb	血红蛋白	PI3K	磷脂酰肌醇3激酶
AngII	血管紧张素II	HBV	乙型肝炎病毒	PLT	血小板
APTT	活化部分凝血活酶时间	HCG	人绒毛膜促性腺激素	PT	凝血酶原时间
AST	天冬氨酸转氨酶	HCV	丙型肝炎病毒	PVDF	聚偏二氟乙烯膜
ATP	三磷酸腺苷	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇	PET/CT	正电子发射计算机断层显像仪
bFGF	碱性成纤维细胞转化生长因子	HE	苏木精-伊红染色	RBC	红细胞
BMI	体重指数	HGF	肝细胞生长因子	RNA	核糖核酸
BP	血压	HIV	人类免疫缺陷病毒	ROS	活性氧
BSA	牛血清白蛋白	HR	心率	real-time PCR	实时聚合酶链反应
BUN	尿素氮	HRP	辣根过氧化物酶	real-time RT-PCR	实时反转录聚合酶链反应
CCr	内生肌酐清除率	HSP	热休克蛋白	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
CCK-8	细胞计数试剂盒-8	HPF	高倍视野	SABC法	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法
COX-2	环氧化酶-2	IC ₅₀	半数抑制浓度	SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶
Cr	肌酐	ICU	重症监护病房	Scr	血肌酐
CRP	C反应蛋白	IFN	干扰素	SO ₂	血氧饱和度
CT	计算机断层摄影	IL	白细胞介素	SOD	超氧化物歧化酶
CV	变异系数	iNOS	诱导型一氧化氮合酶	SP法	标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法
DAB	二氨基联苯胺	IPG	固相pH梯度	SPF	无特定病原体
ddH ₂ O	双蒸水	JNK	氨基末端激酶	STAT3	信号转导和转录激活因子3
DMEM	杜尔贝科改良伊格培养基	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇	Tbil	总胆红素
DMSO	二甲基亚砜	LPS	内毒素/脂多糖	TBST	Tris-盐酸洗膜缓冲液
DNA	脱氧核糖核酸	MAP	平均动脉压	TC	总胆固醇
ECG	心电图	MAPK	丝裂原活化蛋白激酶	TG	三酰甘油
ECL	增强化学发光法	MDA	丙二醛	TGF	转化生长因子
ECM	细胞外基质	MMP	基质金属蛋白酶	Th	辅助性T细胞
EDTA	乙二胺四乙酸	MRI	磁共振成像	TLRs	Toll样受体
EEG	脑电图	mTOR	雷帕霉素靶蛋白	TNF	肿瘤坏死因子
EGF	表皮生长因子	MTT	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	TUNEL	原位末端标记法
ELISA	酶联免疫吸附测定	NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	VEGF	血管内皮生长因子
eNOS	内皮型一氧化氮合酶	NF-κB	核因子-κB	VLDL-C	极低密度脂蛋白胆固醇
ERK	细胞外调节蛋白激酶	NK细胞	自然杀伤细胞	vWF	血管性血友病因子
ESR	红细胞沉降率	NO	一氧化氮	WBC	白细胞
FBS	胎牛血清	NOS	一氧化氮合酶	WHO	世界卫生组织