

阳虚体质的血浆 1H-NMR 代谢组学研究*

刘飞, 张鹏[△], 吴淡娟, 赵明海, 纪婷婷

(南方医科大学南方医院检验科, 广州 510515)

[摘要] **目的** 应用核磁共振(NMR)波谱学的代谢组学方法,检测中医体质分类中阳虚体质与平和体质的血浆代谢物,研究阳虚体质中特征代谢物的特点。**方法** 收集阳虚体质与平和体质各 8 例的血液样品,采用横向豫驰时间的分布曲线磁共振脉冲序列(CPMG)采集血液样品数据,观测血浆中的小分子代谢物。用多元统计分析方法比较阳虚体质组与平和体质组血浆内源性差异代谢产物。**结果** 血浆中的代谢产物,与平和体质组相比,在阳虚体质组中乳酸(shift 1.33; $t=-3.018$)、低密度胆固醇脂蛋白(shift 1.26; $t=-2.849$)、脂肪酸(shift 2.25; $t=-3.325$)、氧化三甲胺(shift 3.26; $t=-5.217$)、N-乙酰糖蛋白(shift 2.03; $t=-4.684$)水平都有不同程度下降;而磷脂酰胆碱(shift 3.22; $t=3.901$)、葡萄糖(shift 3.42; $t=3.390$)与谷氨酰胺(shift 2.12; $t=5.177$)水平都有不同程度升高。**结论** 阳虚、平和体质不仅存在体内生物合成与分解中能量代谢、糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢等的差异,也存在神经递质、脏腑功能的改变。

[关键词] 阳虚;能量代谢;体质学说;平和体质;代谢组学

[中图分类号] R446.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)34-4775-04

Plasma 1H-NMR metabonomics research of Yang-deficiency constitution*

Liu Fei, Zhang Peng[△], Wu Danjuan, Zhao Minghai, Ji Tingting

(Department of Laboratory Medicine, NanFang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[Abstract] **Objective** Plasma etabonomics was used to study yang-deficiency constitution, for analyzing the characteristic metabolites. **Methods** Plasma samples from 8 participants with yang-deficiency constitution and 8 participants with balanced constitution were collected. Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG) pulse sequence was used to collect plasma data, and to observe small molecule metabolites in plasma. Differences in endogenous metabolites were detected by multivariate statistical analysis. **Results** Compared with balanced constitution, lactic acid($t=3.018$), low density lipoprotein cholesterol($t=-2.849$), fatty acids($t=-3.325$), trimethylamine oxide($t=-5.217$), N - acetyl glycoproteinare($t=-4.684$) lower in plasma of yang-deficiency constitution, while glucose($t=3.390$), phosphatidyl choline($t=3.901$) and glutamine($t=5.177$) are higher. **Conclusion** The biomarkers supply new ways for the individual differences from the point of view of metabonomics. Yang-deficiency constitution has some metabolism disorder of energy, sugar, lipid, and amino acid metabolism, the neurotransmitter, and viscera function.

[Key words] yang deficiency; energy metabolism; physical constitution theory; balanced constitution; metabonomics

在当代,“中医体质学说”的概念被明确提出,中医体质是个体生命过程中,在先天禀赋基础上、随年龄、性别、生活条件、地理环境及社会因素等的发展变化形成的具有差异性的,但又相对稳定的固有特质^[1]。《中医体质分类与判定标准》在 2009 年由中华中医药学会制定发布。“标准”确定了中医体质 9 种基本类型,平和体质为正常体质,其他 8 种体质类型气虚质、阳虚质、阴虚质、痰湿质、湿热质、血瘀质、气郁质、特禀质属于偏颇体质^[2]。阳虚体质是对个体在未病或已病状态下所表现的阳气亏虚状态的表述。“阳气素虚”“阳虚之质”“中焦阳气素虚之人”等皆为古代中医学对阳虚体质的描述。《中医体质分类与判定》标准指出阳虚体质阳气不足,以手脚发凉、腹部背部怕冷等虚寒表现为主要特征;以体倦嗜卧精神不振,饮食畏凉舌淡胖嫩有齿痕,脉沉迟等为日常表现。近年来,许多学者都对阳虚体质的机制进行了研究,为阳虚体质的诊断提供了一定的客观数据^[3],研究主要包括基因组拷贝数变异、生理生化指标、

外周血基因表达等方面^[4-8]。代谢组学能准确地反映生物体系状态,揭示机体代谢的本质。代谢组学越来越广泛应用于中医药学领域^[9-11]。其通过分析生物体液中的代谢产物的变化来确定代谢过程与参与的生物标志物,是生物体综合状态的直接体现^[12],但关于阳虚体质的代谢组学方面研究较少。其中核磁共振(NMR)技术是代谢组学中比较常用的处理方法,其检测手段快速,准确性高,而且不会破坏组织样品。故本研究采用基于 NMR 技术的代谢组学方法来研究阳虚体质与湿热体质的血浆代谢产物,进一步探究二者代谢产物的变化,为寻找阳虚体质的差异代谢产物提供方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2015 年 3~4 月在广州市某社区招募志愿者,同时进行中医体质问卷调查。根据中医体质得分对志愿者体质进行判定^[2]。筛选出符合阳虚体质与平和体质的研究对象共 16 例,每组体质各 8 例。研究对象年龄 18~48 岁,平均

* 基金项目:广东省中医药局基金项目资助(20132184)。 作者简介:刘飞(1974-),主管技师,硕士,主要从事临床试验诊断学的研究。

△ 通讯作者, E-mail: nfyzyz@126.com。

(33.50±10.99)岁。身体健康,近 1 个月内未服用任何药物,经本人知情同意后纳入研究。两组人群性别($P=1.000$)、年龄($P=0.869$)、BMI($P=0.966$)比较,差异均无统计学意义。

1.2 仪器与试剂 瑞士 Bruker 公司 Bruker-500 AVANCE III 核磁共振谱仪、ZH-2 型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂)、微量高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)、含氘代三甲基硅基丙酸钠(TSP)(Sigma 公司)、重水(D_2O)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、氯化钠($NaCl$)。

1.3 血液标本的采集、预处理 志愿者在采样前 24 h 禁酒、避免劳累、暴饮暴食,饮食清淡,心情平和。早上 8:00 空腹,由医院专职医务人员用肝素抗凝管抽取静脉血 3 mL。将所得血液样品,14 000×g 离心 4 min,取血浆 300 μ L,加入 100 μ L 的重水与 200 μ L PBS 缓冲液,充分振荡混匀,再加入 5 mm 核磁共振管中待用。

1.4 数据的采集和处理 应用核磁共振波谱仪,采用横向豫弛时间的分布曲线磁共振脉冲序列(carr purcell meiboom gill, CPMG)检测血浆中的小分子代谢物。相关参数如下:频率为 600 MHz,采样点数为 64 k,累加扫描次数为 128 次,谱宽为 20×10^{-6} Hz,豫弛延迟(relaxation delay) 2 s,扫描时间 1.638 s,采样范围-5~15,温度为 25 $^{\circ}C$ 。应用 Mestrenova6.1 软件对实验数据进行分析,将获得的血液 1H-NMR 数据经傅里叶变换得到图像梯度分布频谱图,然后进行统一的定标、基线、相位调整以及积分处理。本实验以乳酸双峰峰(1.33)为标准化学位移进行定标,删除 4.6~6.0 ppm 的水峰,将积分区间 δ 0.5~9.0 ppm 以每段为 δ 0.01 进行分段积分,对所有积分数据进行归一化处理。为消除残留的水信号影响实验结果,在积分值表中将 4.6~6.0 ppm 区间的积分值删除,然后将所得数据输出并转换到 Excel 2007 文件保存。

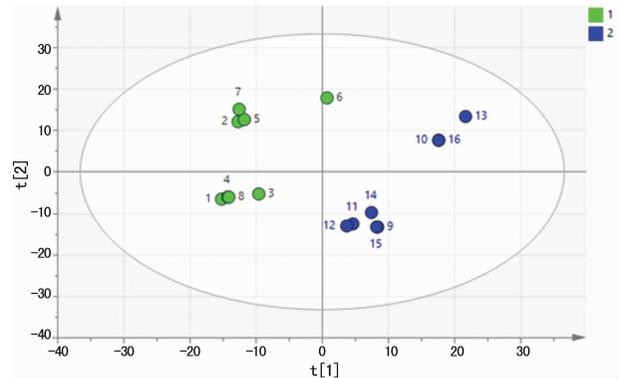
1.5 NMR 数据分析 本实验采用 SIMCA-P 软件(V13.00, Umetrics, Sweden)对获得的 NMR 数据进行多元统计分析。首先将录入的 Excel 格式数据保存为 CSV 格式的文件,然后导入到 SIMCA-P 软件,选择进行主成分(PCA)分析,以及根据正交偏最小二乘(PLS-DA)法返回的回归因子做类别判断进行建模。通过 PLS-DA 模型获得的得分图与变量权重值(variable importance for the projection, VIP)分辨出对分类影响较大的变量,确定阳虚、平和二体质组间的差异代谢产物,据此确定出阳虚体质的差异性代谢产物。

1.6 统计学处理 应用软件 SPSS 18.0 统计软件进行分析。对研究对象信息资料进行平衡分析;两独立样本 t 检验方法用于计量资料比较;计数资料采用 χ^2 检验进行比较。对血浆中的几种代谢产物的归一化积分值($\bar{x} \pm s$)用两独立样本 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阳虚体质与平和体质血浆的 1H NMR 谱主成分分析(PCA) 采用 PCA 方法对阳虚体质和平和体质两组血浆样品的 1H NMR 谱进行分析,建模后累计计算出 8 个主成分,模型参数 $R^2X=0.963$, $Q^2=0.505$,对应积分矩阵见图 1。 R^2X 、 Q^2 均大于 0.5,说明该模型稳定可靠,该模型分析了 96.3% 的原始数据。图中每个点代表 1 个样本,绿色点为阳虚体质组,蓝色点为平和体质组。从图 1 可以看出,所有样本集中分布于

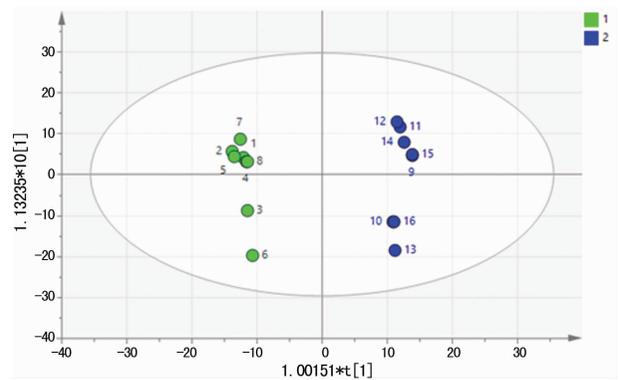
散点图的椭圆内,证明模型拟合效果较好,阳虚体质、平和体质两组可被明显区分开来,可进一步应用多种方法如 OPLS-DA 来分析代谢指纹。



1: 阳虚体质组; 2: 平和体质组。

图 1 阳虚体质组与平和体质组的主成分分析模型矩阵图

2.2 阳虚体质与平和体质血浆的 1H NMR 谱正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA) 阳虚体质与平和体质的血浆代谢组 OPLS-DA 模型见图 2。建模后计算出 2 个主成分,模型参数 $R^2X=0.497$, $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.954$,对应积分矩阵图, R^2Y 越接近于 1,代表该模型建立越好。该模型解释了 49.7% 的原始数据,并拥有 95.4% 的预测能力。图中每个点代表 1 个样本,绿色点为阳虚体质组,蓝色点为平和体质组。结果,所有样品集中分布于散点图的椭圆内,模型拟合效果好,两组之间完全分离,提示阳虚体质与平和体质血浆代谢产物差异有统计学意义($P > 0.05$)。



1: 阳虚体质组; 2: 平和体质组。

图 2 阳虚体质组与平和体质组正交偏最小二乘法分析模型矩阵图

2.3 归一化积分值得统计分析 根据 PLS-DA 模型的 VIP 大于 1 的化学位移值,找出其相对应的归一化积分值,做统计分析,以 $P < 0.05$ 的原则,共找出 16 个差异化学位移值(表 1),将差异性值通过人类代谢组数据库(<http://www.hmdb.ca>)查找其所代表的代谢物。最后鉴定出对分类影响较大的差异性代谢物 8 个(表 2)。与平和体质组相比,阳虚体质组血浆代谢产物中乳酸($P=0.015, 0.009, 0.034$)、极低密度脂蛋白/低密度脂蛋白($P=0.013, 0.011$)、脂肪酸($P=0.005$)、氧化三甲胺($P=0.000$)、N-乙酰糖蛋白($P=0.001$)水平下降;而葡萄糖($P=0.010$)、磷脂酰胆碱($P=0.002$)与谷氨酰胺($P=0.000$)水平升高。

表 1 阳虚体质与平和体质血浆代谢物归一化积分值比较

shift(δ)	VIP	归一化积分值($\bar{x} \pm s$)		阳虚体质组与平和体质组相比	t	P
		平和体质组	阳虚体质组			
0.84	1.321	2.2872 ± 0.2476	2.7348 ± 0.3505	↑	2.950	0.011
1.26	1.292	2.7789 ± 0.1791	2.3741 ± 0.3598	↓	-2.849	0.013
1.31	1.266	5.4669 ± 1.1297	4.1541 ± 0.7333	↓	-2.758	0.015
1.33	1.339	6.0592 ± 0.7726	4.7237 ± 0.9845	↓	-3.018	0.009
1.34	1.311	6.1218 ± 0.8062	4.8271 ± 0.9624	↓	-2.917	0.011
2.03	1.667	1.0595 ± 0.1519	0.7875 ± 0.0624	↓	-4.684	0.001
2.12	1.729	0.4271 ± 0.0182	0.5038 ± 0.0377	↑	5.177	0.000
2.25	1.417	0.2322 ± 0.0435	0.1677 ± 0.0333	↓	-3.325	0.005
3.22	1.539	1.7615 ± 0.3315	2.3821 ± 0.3043	↑	3.901	0.002
3.26	1.733	2.0058 ± 0.2268	1.5139 ± 0.1403	↓	-5.217	0.000
3.42	1.432	1.0985 ± 0.0680	1.4682 ± 0.3009	↑	3.390	0.010
3.45	1.255	0.8043 ± 0.0454	0.9233 ± 0.0476	↑	5.119	0.000
3.57	1.328	0.8262 ± 0.0609	0.8913 ± 0.0400	↑	2.525	0.024
3.85	1.159	1.2011 ± 0.1016	1.3656 ± 0.1314	↑	2.802	0.014
4.11	1.141	0.1406 ± 0.0173	0.1167 ± 0.0227	↓	-2.367	0.034
4.61	1.369	0.0088 ± 0.0004	0.0935 ± 0.0046	↑	52.175	0.000

↑:表示上升;↓:表示下降。

表 2 阳虚体质与平和体质比较的差异常代谢产物

shift(δ)	代谢产物	水平
1.26, 1.34	极低密度脂蛋白/低密度脂蛋白	↓
1.31, 1.33, 4.11	乳酸	↓
2.03	N-乙酰糖蛋白	↓
2.12	谷氨酰胺	↑
2.25	脂肪酸	↓
3.22	磷脂酰胆碱	↑
3.26	氧化三甲胺	↓
3.42	葡萄糖	↑

↑:表示上升;↓:表示下降。

3 讨论

本研究采用 1H NMR 谱对阳虚体质与平和体质的血浆代谢产物进行分析(平和体质作为正常对照),结果表明阳虚体质与平和体质主要存在能量代谢、糖代谢、脂代谢、蛋白质合成等方面的异常。

在这些差异代谢物中,与能量代谢有关的化合物有乳酸。糖酵解是乳酸生成的主要途径,其方式又是生物体在无氧下从碳水化合物(糖类)获得能量的一种主要形式。在体内的生物合成与分解中,葡萄糖经过磷酸化、氧化等反应生成丙酮酸,有氧条件下,丙酮酸可进一步氧化磷酸化生成乙酰 CoA 进入三羧酸循环,释放 ATP 能量,最后生成 CO₂ 和 H₂O;无氧条件下,糖酵解产生的丙酮酸则加氢还原为乳酸,并释放出 ATP 能量^[13]。平和体质组乳酸浓度水平高于阳虚体质组,提示总体能量代谢水平方面阳虚体质组是下降的;同时由于人体主要依赖外周血中的红细胞运送氧分子供给其他细胞和组织进行能量代谢,但红细胞、淋巴细胞中并无线粒体,主要依赖糖酵解的

无氧代谢供给自身能量,乳酸浓度的下降提示这些组织的功能也可能因此受到影响。《素问·调经论》指出阳虚体质的成因,即“阳虚则外寒,阴虚则内热,阳盛则外热,阴盛则内寒。”先天禀赋阳气的不足,或病后阳亏,容易形成阳虚体质。中医认为,阳虚是阴阳平衡失调的状态,阳虚体质总以阳“虚”为主要特征,由“虚”导致机体功能减退,反映在能量代谢上就表现为水平下降。

在上述差异代谢物中,葡萄糖和 N-乙酰糖蛋白与糖代谢相关。葡萄糖是人体内新陈代谢中不可或缺的重要物质之一,为血糖在血液运输中的主要成分,并为体内氧化提供能量。N-乙酰糖蛋白与 N-乙酰氨基半乳糖, N-乙酰葡萄糖胺, N-乙酰神经氨酸均属于同一类可组成糖蛋白糖链的单糖,糖蛋白糖链最独特的生物学作用是参与如淋巴因子、白细胞介素等免疫介质的生物相互识别、结合,完成免疫应答反应过程。相比于平和体质组,阳虚体质组血浆中葡萄糖含量升高,而 N-乙酰糖蛋白合成减少,提示阳虚体质存在一定程度的糖代谢紊乱,以及免疫功能下降。但具体机制仍需要进一步研究。

本研究结果显示,阳虚体质血浆中低密度胆固醇脂蛋白水平降低,与脂代谢密切相关。脂蛋白是胆固醇及其酯化物、三酰甘油在体内运输的载体。高密度脂蛋白富含胆固醇,介导的胆固醇逆向转运,即从外周组织携带胆固醇到肝脏中,再分泌到胆汁中,进而调节脂代谢、改善血脂异常^[14]。而低密度脂蛋白运载胆固醇进入外周组织细胞,极低密度脂蛋白作用则主要是运输三酰甘油用于能量代谢或储存。脂肪酸也与脂、能量代谢密切相关。磷脂酰胆碱作为磷脂的主要成分之一,也参与了脂代谢。人体脂肪酸主要以机体主要的能量储存形式三酰甘油存在。阳虚体质血浆中脂肪酸水平低于平和体质组,说明其存在脂代谢紊乱的表现,产能不足,皮下脂肪组织储备不足,因而产生怕冷、手足不温等症状。

本研究结果还发现,阳虚体质组的谷氨酰胺水平高于平和质组,而氧化三甲胺水平低于平和质组。其中氧化三甲胺与慢性肾病相关^[15]。而谷氨酰胺作为非必需氨基酸,是人体必不可少的营养物质之一。谷氨酰胺是构成蛋白质分子的基本单位,可以增加蛋白质的合成,与氨基酸代谢、神经递质密切相关^[16]。在兴奋性神经元中,谷氨酰胺被转变为谷氨酸,并在突触小泡中重新组装;在抑制性神经元中,谷氨酰胺转变为谷氨酸后进一步转变为 γ -氨基丁酸,并包装于突触小泡中。

与中医的整体观一致,代谢组学研究从整体角度对阳虚体质的生物特征进行了探索。本研究结果表明阳虚体质不仅存在着能量代谢、糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢的改变,也存在着神经递质、脏腑功能及与免疫功能相关介质的改变。这些代谢特征既与阳虚体质的先天禀赋有关,也受到环境、饮食、气候、心理等后天因素的影响,在先天与后天因素的共同影响下,导致了人体免疫功能、生物功能调节发生紊乱,进而影响代谢产物的变化。

参考文献

[1] 王琦. 中医体质学(2008 版) [M]. 北京:人民卫生出版社,2009.

[2] 中华中医药学会. 中医体质分类与判定[J]. 中华养生保健:上半月,2009,4(9):38-39.

[3] Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease[J]. Circ Res, 2015,116(3):448-455.

[4] 王琦,姚实林,董静,等. 阳虚体质者内分泌及免疫功能变化[J]. 中西医结合学报,2008,6(12):1226-1232.

[5] 姚实林. 阳虚质理论及其外周血基因表达谱研究[D]. 北

京:北京中医药大学,2007.

[6] Wang Q, Yao S. Molecular basis for cold-intolerant yang-deficient constitution of traditional Chinese medicine[J]. Am J Chin Med, 2008,36(5):827-834.

[7] 倪红梅,吴艳萍,何裕民. 用基因芯片技术研究青少年肾阳虚体质差异表达基因[J]. 上海中医药杂志,2004,38(6):3-5.

[8] 姚实林,张祖志,吴君霞,等. 阳虚质者基因组拷贝数变异小样本研究[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(11):4-7,60.

[9] 杨中良,胡庆禧,李剑,等. 代谢组学在中医中药领域的应用进展[J]. 河南中医,2015,35(1):204-206.

[10] 袁博,杜小正,王金海,等. 代谢组学在中医学中的现代研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(12):57-59.

[11] 余王琴,郑小伟. 基于代谢组学的中医证候研究[J]. 中医学报,2014,29(5):673-677.

[12] 郭宾,戴仁科. 代谢组学及其研究策略和分析方法进展[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(3):554-563.

[13] 杨玲. 糖无氧酵解与运动训练[J]. 中国体育教练员,2015(1):14-15.

[14] 苏中军,张肃,姜军. 高密度脂蛋白生物学功能及运动调节的研究与进展[J]. 中国组织工程研究,2015,19(37):6048-6053.

[15] 许瑞旭,窦思东. 中医阳虚型体质现代研究概述[J]. 健康研究,2015,35(5):505-507.

[16] 王晶,左小霞,张晔. 谷氨酰胺临床应用研究进展[J]. 人民军医,2013,56(4):469-470.

(收稿日期:2016-05-17 修回日期:2016-08-05)

《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的计量资料,用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表达呈偏态分布的计量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。
4. 统计学分析方法的选择:对于计量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于计数资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 3 种表达方式,无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间(CI)。