

血浆游离脂肪酸代谢轮廓柱前衍生定量方法 在糖尿病患者中医虚证分型中的应用

徐文娟¹, 黄宇虹², 王龙星¹, 杨乾翎¹, 肖红斌^{1*}, 张德芹^{2*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023 ; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要 :以 α -溴代苯乙酮为衍生化试剂,十七酸为内标物,建立了糖尿病患者血浆中游离脂肪酸(FFA)代谢谱分析法,实现了 6 种主要 FFA 及 6 种微量 FFA 的定量分析。用此方法分析了 75 位临床糖尿病患者的血浆 FFA 代谢谱,并通过线性判别分析(LDA)对气虚和气阴两虚两种中医虚证进行了关联分析,正判率为 94.3%。逐步判别分析结果表明,花生四烯酸($C_{20:4}$)和油酸($C_{18:1}$)承载了这两种虚证的重要信息,可作为潜在的标志物。利用代谢组学技术研究血浆 FFA 代谢谱与中医虚证的相关关系对规范证候临床诊断,提高中医药诊疗体系的可信度与可重复性具有重要意义。

关键词 :代谢组学 ;脂肪酸 ;糖尿病 ;中医证候

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)06-0547-04

Classification of diabetes deficiency syndromes based on plasma fatty acid metabolic profilings using pre- column derivatization quantitative method

XU Wenjuan¹, HUANG Yuhong², WANG Longxing¹, YANG Qianxu¹,

XIAO Hongbin^{1*}, ZHANG Deqin^{2*}

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China ;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract : A simple metabolic profiling approach for quantitative analysis of free fatty acids (FFAs) in human plasma by high performance liquid chromatography was described and validated, using α -bromoacetophenone as the derivative reagent and heptadecanoic acid ($C_{17:0}$) as the internal standard. The quantitations of 6 predominant FFAs and 6 trace FFAs were achieved. Plasma fatty acid metabolic profiling of 75 diabetic patients was investigated, and then analyzed by multivariate statistical analysis. The linear discriminant analysis (LDA) model was established and validated for the pattern discrimination between Qi-deficiency and Qi and Yin-deficiency, with the hit ratio 94.3%. Stepwise discriminant analysis (SDA) model indicated that arachidonic acid ($C_{20:4}$) and oleic acid ($C_{18:1}$) contained the important information on the two syndromes above, and can be used as potential biomarkers of traditional Chinese medicine (TCM) syndrome. It is of great significance to systematically study the relationship between fatty acid metabolic profiling and TCM syndrome using metabolomics methods, and to improve the credibility and repeatability of clinical diagnosis and treatment system.

Key words : metabonomics ; free fatty acids (FFAs) ; diabetes ; traditional Chinese medicine (TCM) syndromes

代谢组学是后基因组时代一个最具挑战性的研究领域,涉及分析科学、数学、计算机应用、模型建立

等诸多方面的研究内容,在药物研发及疾病诊断等领域潜力巨大并发挥着越来越重要的作用^[1]。通

* 通讯联系人:肖红斌,博士,研究员,主要研究方向为中药药效物质基础及作用机理。E-mail: hbxiao@dicp.ac.cn.

张德芹,博士,教授,主要研究方向为中药传统理论及临床应用研究。E-mail: deqin123@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 90709014).

收稿日期 2010-01-21

过代谢物谱分析将微观物质变化与宏观病症相联系,寻找相关标志物是疾病分型、诊断、治疗的基础,也是代谢组学要解决的重大问题^[2,3]。采用代谢组学技术,通过对糖尿病病证相关的特定代谢物进行分析、判断,能够帮助人们深入地理解病变过程及机体内物质的代谢途径和代谢状况^[4,5]。

中医辨证施治在疾病预防及治疗上具有一定特色和优势,其中证候学说是中医辨证论治的精髓。中国国家食品药品监督管理局颁布的《中药新药治疗糖尿病的临床研究指导原则》中指出糖尿病中医证候诊断主要分为5种证型:阴虚热盛证、湿热困脾证、气阴两虚证、阴阳两虚、血瘀水停证、血瘀络证^[6],其中气虚、阴虚、阳虚、热盛、血瘀、湿及湿热等基本证候特征是中医诊断及个性化治疗的基础。以证候基本特征为研究对象,通过代谢组学技术获得微观层次上的实验指标,探求其与中医证候的内在联系,对于规范证候临床诊断和疗效评价,提高中医药诊疗体系的可信度与可重复性具有重要意义。

游离脂肪酸(FFA)是生物体内重要的营养和代谢产物,对调节生物体内各项生理和生物功能起重要作用,近年来国内外针对FFA在糖尿病发生发展中的代谢异常及其与胰岛素抵抗相关关系开展了部分工作^[7-9],但结合中医证候学的研究较少。我们利用代谢组学技术探讨FFA与中医虚型的关系,为中医辨证科学化和定量化提供一些依据。本文采用柱前衍生化的高效液相色谱法(HPLC)^[10]测定了75位临床糖尿病患者(气虚28例,阴虚22例,气阴两虚25例)血浆FFA代谢谱,结合多变量统计分析方法,从中医证候的虚证入手进行关联分析,找到了与气虚、气阴两虚两种证型相关的标志物。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200型高效液相色谱系统,配备G1365C MWD可变波长紫外检测器;Milli-Q制水系统购自美国Millipore公司,SPSS16.0软件。

FFA标准品:棕榈酸($C_{16:0}$)、肉豆蔻酸($C_{14:0}$)、十七酸($C_{17:0}$)、硬脂酸($C_{18:0}$)、油酸($C_{18:1}$)、亚油酸($C_{18:2}$)、 α -亚麻酸(α - $C_{18:3}$)、 γ -亚麻酸(γ - $C_{18:3}$)、二十二碳六烯酸($C_{22:6}$)、11,14-二十碳二烯酸($C_{20:2}$)、花生四烯酸($C_{20:4}$)、二十碳五烯酸($C_{20:5}$)购自美国Sigma公司; α -溴代苯乙酮、三乙胺、冰醋酸、三氯乙酸、石油醚(60~90℃)、丙酮等试剂为分析纯,乙腈为色谱纯,均购自天津科密欧化学试剂有限公司;

Milli-Q超纯水。

1.2 实验过程

1.2.1 色谱条件

Waters Symmetry C_{18} 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);柱温55℃;流动相:A相为乙腈,B相为纯水;梯度条件:A相起始为74%,40 min升至84%,50 min升至95%,保持6 min;流速为1.0 mL/min;进样量20 μ L;检测波长242 nm。十七酸作为内标物,配制成2 g/L丙酮溶液;12种待测FFA混合标准溶液中 α - $C_{18:3}$ 、 γ - $C_{18:3}$ 、 $C_{22:6}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{20:2}$ 、 $C_{18:0}$ 质量浓度为0.04 g/L, $C_{20:5}$ 、 $C_{20:4}$ 质量浓度为0.024 g/L。

1.2.2 样品采集与处理

75份血浆样本来自天津中医药大学附属医院,按中医虚证分为气虚28例、阴虚22例、气阴两虚25例。样本在使用前置于-70℃冰箱冷冻保存。将血浆样本室温解冻,精密量取0.5 mL血浆于10 mL离心管中,加入内标十七酸溶液50 μ L,三氯乙酸100 μ L,混合液中加入石油醚2 mL,涡旋振荡5 min,在12 000 r/min速率下离心10 min,小心取出上清液。重复提取3次,合并上清液,将提取液用高纯氮气吹干,加入 α -溴代苯乙酮(20 g/L)100 μ L和三乙胺(25 g/L)50 μ L,试管加塞密封,混合摇匀,于85℃水浴加热45 min,冷却至室温,加入乙酸溶液(10 g/L)100 μ L,于85℃水浴加热5 min,氮气吹干,用1 mL石油醚溶解,0.22 μ m滤膜过滤后立即进行测定。实验所用玻璃器皿均事先用丙酮漂洗并烘干,以防止有外来的FFA(如肥皂中的FFA)等干扰。

2 结果与讨论

2.1 血浆FFA的HPLC分析

空腹血浆FFA浓度升高与糖尿病患者胰岛素抵抗(IR)有着重要关系,高浓度FFA可能通过影响胰岛素信号传导通路,导致胰岛素抵抗^[11],因此对临床糖尿病患者血浆样本FFA进行分析是脂质组学的一项重要内容。由于FFA的紫外吸收区一般在195~206 nm,对其直接测定给溶剂选择带来较大的局限性。参考文献[10]的方法,我们以 α -溴代苯乙酮为衍生化试剂,十七酸为内标物,建立了糖尿病患者血浆FFA代谢谱分析法。图1为血浆FFA的HPLC谱图,根据标准品对色谱峰进行鉴定。从图1中可见糖尿病患者血浆中 $C_{20:4}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:0}$ 等FFA的含量较高,此外还含有其他一些微量FFA。结果表明,上述6种主要

FFA 及 6 种微量 FFA 在 56 min 达到基线分离。其中分离难点主要集中在 α -C_{18:3} 与 γ -C_{18:3} 这对异构体,以及 C_{16:0} 和 C_{18:1} 上。实验表明,低于 15 000 塔板/m 的柱效很难使其达到基线分离。

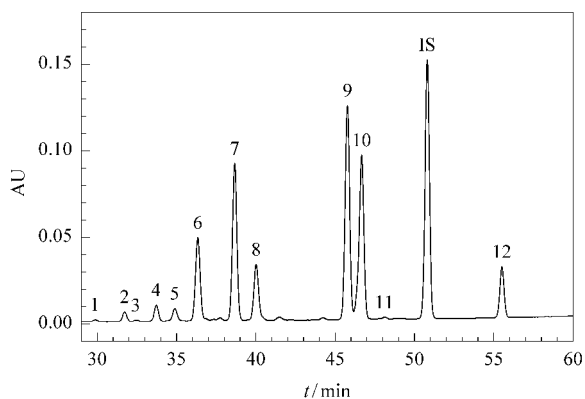


图 1 糖尿病患者血浆 FFA 的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of plasma FFAs from diabetic patients

Peaks : 1. C_{20:5} ; 2. α -C_{18:3} ; 3. γ -C_{18:3} ; 4. C_{22:6} ; 5. C_{14:0} ; 6. C_{20:4} ; 7. C_{18:2} ; 8. C_{16:1} ; 9. C_{16:0} ; 10. C_{18:1} ; 11. C_{20:2} ; IS. C_{17:0} ; 12. C_{18:0}.

2.2 方法学考察

精密度实验是将同一样本的衍生产物连续进样 5 次,FFA 峰面积的相对标准偏差 (RSD) 的范围为 0.97% ~ 2.52% (见表 1)。

方法的重复性是将同一样本按照 1.2.2 节所述方法平行处理 5 份,分别测定,计算其峰面积的 RSD。结果发现除了 C_{16:1} 外其他 FFA 的重复性均在可接受范围内(见表 1)。C_{16:1} 重复性不好可能是由于衍生化反应过程中各种 FFA 存在竞争反应。对 C_{16:1} 单独进行衍生,重复性为 5.94%。

回收率考察是在 0.5 mL 空白样本中加入 8 μ g

表 1 12 种 FFA 方法学的考察 (n = 5)

Table 1 Method validation for 12 free fatty acids (n = 5)

FFA	Precision (RSD)/%	Repeatability (RSD)/%	Recovery/%	Regression equation
C _{20:5}	1.23	6.19	102.0	$Y = 31.52X - 0.006$
α -C _{18:3}	1.18	6.91	98.4	$Y = 8.05X - 0.002$
γ -C _{18:3}	1.36	7.16	95.2	$Y = 10.86X - 0.004$
C _{22:6}	1.38	7.89	94.6	$Y = 5.09X - 0.011$
C _{14:0}	1.31	5.64	96.1	$Y = 10.77X - 0.004$
C _{20:4}	1.07	5.12	100.1	$Y = 25.50X - 0.005$
C _{18:2}	2.52	3.75	97.8	$Y = 7.55X - 0.001$
C _{16:1}	1.16	24.79	93.2	$Y = 8.39X + 0.009$
C _{16:0}	1.08	10.14	102.8	$Y = 17.79X - 0.009$
C _{18:1}	0.97	5.93	102.5	$Y = 6.42X - 0.001$
C _{20:2}	1.13	3.50	98.8	$Y = 7.28X - 0.003$
C _{18:0}	1.90	12.34	95.8	$Y = 4.89X - 0.001$

X : the mass concentration of FFAs (g/L) ; Y : the peak area ratio of FFAs and C_{17:0}.

的 FFA 混合溶液,重复测定 5 次,回收率范围为 93.2% ~ 102.8% (见表 1)。

在 FFA 的定量线性范围(1 ~ 10 mg/L)内具有良好的线性关系,平均线性相关系数 $r^2 > 0.994$ 。

该方法各项参数均满足生物样本的测定要求。

2.3 病例分析及数据处理

75 份血浆样本按中医虚证分为气虚 28 例、阴虚 22 例、气阴两虚 25 例,其中气虚是糖尿病虚证初期,而气阴两虚是较重阶段,阴虚处于两者之间^[12]。实际血浆样品经过前处理、衍生化及色谱测定,对 12 种 FFA 与十七酸峰面积的比值进行数据分析。本文在数据处理过程中综合考察了代谢组学常用的数据处理模式^[13,14],利用 SPSS 软件,通过线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)和逐步判别分析(stepwise discriminant analysis, SDA)函数模块对得到的 FFA 原始数据进行处理。

首先从差异性较大的气虚和气阴两虚两种情况入手通过 LDA 模块对整体 FFA 数据进行分析,结果见表 2,正判率为 94.3%。图 2 是运用 LDA 模块对上述两种中医证型中 12 种 FFA 进行分析所得到的散点图,可以看出两种中医证型样本具有明显的分类结果。通过数据分析可以看出血浆中 FFA 含量在糖尿病代谢异常的发生和发展过程中产生了明显的变化,与中医证候之间有着紧密的相关性。通过 SDA 模块对原始数据进行处理,结果表明 C_{20:4} 和 C_{18:1} 对中医证型的分类影响较大,用 LDA 模块对这两个变量分析所得结果见表 3,总体正判率达到 90.6%,具有统计学意义($p < 0.05$)。比较两种判别结果可看出,C_{20:4} 和 C_{18:1} 与全体 FFA 的判别结果相差不大,说明这两种 FFA 承载了两种中医证候的重要信息。实验结果与 C_{20:4} 具有刺激人体胰岛分泌

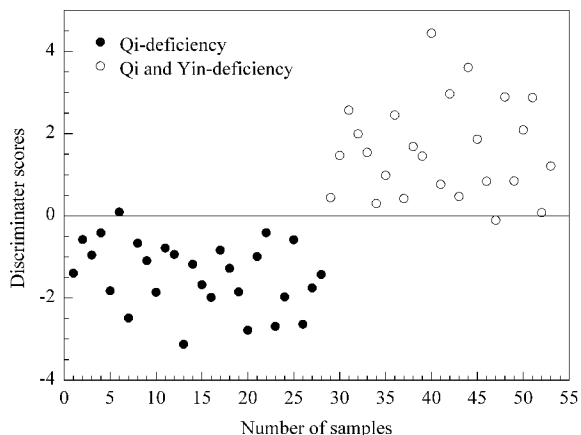


图 2 12 种 FFA 在中医气虚和气阴两虚判别分析中的散点图
Fig. 2 Scatter plots of 12 FFAs from Qi-deficiency and Qi and Yin-deficiency patients

胰岛素,调节胰岛分泌物对葡萄糖的响应以及影响胰岛的功能等生理作用存在一致性^[15]。利用不同中医证型患者的 $C_{20:4}$ 和 $C_{18:1}$ 的相对浓度绘图,通过判别函数画线将两种中医证候区分开,结果见图 3。从图 3 中可看出,气虚和气阴两虚这两种中医证型分布在判别函数的两侧,表明这两种 FFA 对于糖尿病中医证候诊断具有重要意义,可作为潜在的标志物辅助中医诊断的规范化和标准化。与此同时,我们也尝试了对 3 种虚证同时进行分型,其总体正判率为 69.3%,3 种证型之间存在交叉,不能很好区分。这也提示我们对于中医证候的复杂体系仅凭一类化合物很难将所有证型进行区分,需要多类指标的综合评价。

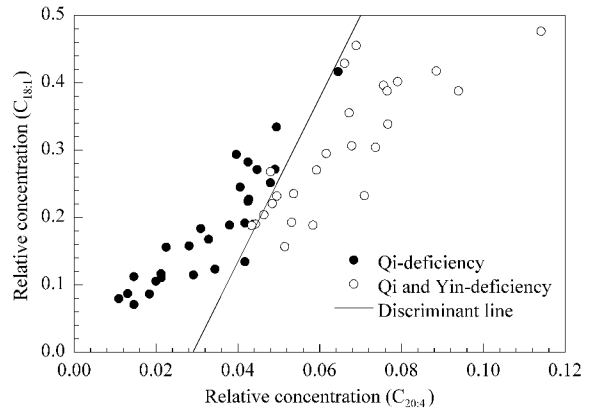


图 3 $C_{20:4}$ 和 $C_{18:1}$ 对中医气虚和气阴两虚判别分析散点图
Fig. 3 Scatter plots of $C_{20:4}$ and $C_{18:1}$ from Qi-deficiency and Qi and Yin-deficiency patients

表 2 12 种 FFA 中医证候线性判别分析结果

Table 2 Classification of TCM syndromes by LDA method using 12 free fatty acids

Pre-grouping	Total sample No.	No. recognized as Qi-deficiency	No. recognized as Qi and Yin-deficiency	Hit ratio
Qi-deficiency	28	27	1	96.4%
Qi and Yin-deficiency	25	2	23	92.0%
Total hit ratio				94.3%

表 3 $C_{20:4}$ 和 $C_{18:1}$ 中医证候线性判别分析

Table 3 Classification of TCM syndromes by LDA method using $C_{20:4}$ and $C_{18:1}$

Pre-grouping	Total sample No.	No. recognized as Qi-deficiency	No. recognized as Qi and Yin-deficiency	Hit ratio
Qi-deficiency	28	26	2	92.9%
Qi and Yin-deficiency	25	3	22	88.0%
Total hit ratio				90.6%

3 结论

将代谢组学与中医证候诊断相结合,以定性定量的方式探索中医“证”的诊断和评价指标,对于促进中医诊疗的客观性及规范化具有重要的现实意义。在今后的工作中,我们将选取更多的化合物作为研究对象,在辨证论治的基础上,从多角度深入系统地研究糖尿病中医证候与代谢物含量的相关关系,为揭示疾病机理以及推动中医辨证规范化提供一条现实可行的途径。

参考文献:

[1] Xu G W. Metabolomics: Method and Application. Beijing: Science Press (许国旺. 代谢组学: 方法与应用. 北京: 科学出版社), 2008

[2] Xu G W, Lu X, Yang S L. Acta Academiae Medicinae Sinicae (许国旺, 路鑫, 杨胜利. 中国医学科学院学报), 2007, 29(6): 701

[3] Xu G W, Yang J. Chinese Journal of Chromatography (许国旺, 杨军. 色谱), 2003, 21(4): 316

[4] Vallejo M, Angulo S, Barbas C, et al. J Chromatogr A, 2008, 1187: 267

[5] Huo T G, Cai S, Li F M, et al. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49: 976

[6] Zheng X Y. Chinese Medicine Clinical Research Guiding Principles. Beijing: China Medical Science and Technology Press (郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则. 北京: 中国医药科技出版社), 2002

[7] Kashyap S, Belfort R, Cusi K, et al. Diabetes, 2003, 52: 2461

[8] Bays H, Mandarino L, Defronzo R A. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(2): 463

[9] Yi L Z, Yuan D L, Liang Y Z, et al. Metabolomics, 2008, 4: 30

[10] Mehta A, Oeser A M, Carlson M G. J Chromatogr B, 1998, 719, 9

[11] Lam T K, Yoshii H, Haber C A, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 283(4): 682

[12] Yang C F, Cao Q, Shen Y M. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (杨彩凤, 曹茜, 沈永明. 天津中医药大学学报), 2008, 27(2): 107

[13] Beckwith-Hall B M, Brindle J T, Barton R H. Analyst, 2002, 127(10): 1283

[14] Lin Y P, Si D Y, Liu C X. Chinese Journal of Analytical Chemistry (林艳萍, 司端运, 刘昌孝. 分析化学), 2007, 35(10): 1535

[15] Persaud S J, Muller D, Belin V D, et al. Diabetes, 2007, 56: 197