

● 临床论著 ●

引用:李婧,陈梓焜,马燕渝,吴多,胡跃强,黎军宏. 基于 GC-TOF-MS 结合代谢组学分析阳虚证缺血性脑卒中生物标志物的研究[J]. 湖南中医杂志,2022,38(1):6-10.

基于 GC-TOF-MS 结合代谢组学 分析阳虚证缺血性脑卒中生物标志物的研究

李婧¹,陈梓焜¹,马燕渝¹,吴多¹,胡跃强²,黎军宏²

(1. 广西中医药大学,广西 南宁,530001;

2. 广西中医药大学第一附属医院,广西 南宁,530001)

[摘要] 目的:运用气相色谱-飞行时间质谱联用技术(GC-TOF-MS)结合代谢组学方法探究缺血性脑卒中阳虚证患者与健康平和质人群血清中的代谢产物差异,总结缺血性卒中阳虚证相关生物标志物特点,从而进一步揭示疾病的发生机制。方法:将 10 例缺血性脑卒中阳虚证患者作为观察组,10 例中医体质为平和质的健康者作为对照组。应用 GC-TOF-MS 结合代谢组学方法进行血清成分分析。结果:缺血性脑卒中阳虚证患者的差异代谢物包括甘氨酸、富马酸、天冬氨酸等 27 种代谢标记物。结论:临床上可应用以上代谢差异物作为诊断和治疗缺血性脑卒中的潜在生物标志物,有利于疾病早期诊断及治疗,从而降低病死率、致残率,值得临床推广及应用。

[关键词] 缺血性脑卒中;阳虚证;GC-TOF-MS;代谢组学;生物标志物

[中图分类号] R277. 733 **[文献标识码]** A DOI:10. 16808/j. cnki. issn1003-7705. 2022. 01. 002

An analysis of biomarkers for ischemic stroke with syndrome of Yang deficiency based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry combined with metabolomics

LI Jing¹, CHEN Zikun¹, MA Yanyu¹, WU Duo¹, HU Yueqiang², LI Junhong²

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China)

[Abstract] Objective: To investigate the difference in serum metabolites between patients with ischemic stroke with syndrome of Yang deficiency and healthy individuals with normal constitution based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS) combined with metabolomics, the features of biomarkers associated with ischemic stroke with syndrome of Yang deficiency, and the pathogenesis of the disease. Methods: A total of 10 patients with ischemic stroke with syndrome of Yang deficiency were enrolled as observation group, and 10 healthy individuals with normal constitution were enrolled as control group. GC-TOF-MS combined with metabolomics was used for serum component analysis. Results: There were 27 differentially expressed metabolites between the patients with ischemic stroke with syndrome of Yang deficiency and the healthy individuals with normal constitution,

基金项目:国家自然科学基金项目(81874453);广西壮族自治区科技厅重点研发计划项目(桂科 AB18221020);广西壮族自治区自然科学基金青年项目(2019JJB140151);广西中医药大学 2019—2021 年一流学科建设开放项目(2019XK025);广西中医药大学校级一般硕士研究生科研创新项目(YCSY20039)

第一作者:李婧,女,2018 级硕士研究生,研究方向:中医药防治老年病

通讯作者:黎军宏,男,副主任医师,研究方向:中医药防治老年病,E-mail:lijh080@163.com

including glycine, fumaric acid, and aspartic acid. Conclusion: In clinical practice, differentially expressed metabolites can be used as potential biomarkers for the diagnosis and treatment of ischemic stroke and are beneficial for early diagnosis and treatment, thereby reducing mortality rate and disability rate, and therefore, it holds promise for clinical application.

[Keywords] ischemic stroke; syndrome of Yang deficiency; gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry; metabolomics; biomarker

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是临床常见的脑卒中类型,占全球卒中的87%^[1]。该病具有高发病率、高病死率、高致残率和高复发率等特点,是脑血管疾病领域的研究热点^[2]。缺血性脑卒中是指各种原因形成的脑血栓或者脑栓塞使脑供血动脉严重狭窄或闭塞,导致脑供血不足、脑组织缺血的一种疾病。然而其发病机制复杂,早期预防及诊断不足,致残率高,康复治疗花费高,因此,通过开发有价值的生物标志物来预测风险,准确诊断,评估病情,协助治疗,具有重要意义。

代谢组学、基因组学、表观基因组学、转录组学以及蛋白质组学是当下使用较多的系统生物学平台,其具有高通量、高灵敏度、高精确度等特征,为疾病的早期诊断和标志物的发现提供了研究方法,从而有望为脑血管疾病提供新颖的、早期的、具有临床诊断和治疗意义的标志物^[3-4]。因此,本文以气相色谱-飞行时间质谱联用技术(GC-TOF-MS)结合代谢组学分析IS阳虚证患者的整体代谢物谱,寻找药物作用靶点和受体,进而寻求安全有效的治疗方案。

1 资料与方法

1.1 研究对象 将2019年6月至2020年6月于广西中医药大学第一附属医院脑病科诊断为IS阳虚证患者10例设为观察组,另将体检正常、中医体质为平和质的健康者10例设为对照组。本研究经广西中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(批号:2019-003-02)。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 参照《中国脑梗死中西医结合诊治指南(2017)》^[5]、《中国各类主要脑血管病诊断要点2019》^[6]拟定。具备以下主症即可诊断为IS: 1)起病1~6个月; 2)区域性神经功能缺如,少数为全面神经功能受损; 3)症状和体征持续24 h以上。

1.2.2 中医诊断标准 1)中风病的诊断标准:参照《中国脑梗死中西医结合诊治指南(2017)》^[5]、

《中风病诊断与疗效评定标准(试行)》^[7]拟定。主症:偏身不遂,口舌歪斜,神识不清,舌强言謇或不语,偏身麻痹;诱因发病,多见先兆症状。具有主症2个以上,起病急,结合体征、舌脉象、诱因、前兆症状、基础疾病、年龄等,即可明确诊断。2)阳虚证的辨证标准:参照《中药新药临床研究指导原则》^[8]制定。主症:周身或身体局部畏寒,或四肢不温,面目及下肢虚浮,舌淡胖、苔滑润,脉沉紧或微迟。次症:精神萎靡,腰膝酸软,夜尿频繁,大便溏,小便清长。通过主任医师判定具备主症3项(其中第1项为必备),即可明确辨证。

1.3 纳入标准 1)符合上述所有诊断与辨证标准; 2)年龄18~80岁; 3)发病时间>4周; 4)同意接受该研究,并签署知情同意书。

1.4 排除标准 1)腔隙性梗死、进展性卒中、短暂性脑缺血发作、脑梗死后脑出血以及脑动脉炎; 2)有出血倾向或3个月内发生过严重出血; 3)非血管性脑部病变; 4)脑部CT或MRI显示脑出血和其他病变,有明确缺血病灶。

1.5 血液样本采集及处理

1.5.1 样本采集 纳入样本时严格按照纳入标准执行,观察组于入院当天禁食8~12 h后,于清晨静息30 min后抽取空腹静脉血,离心分离血清,置-80℃冰箱保存。

1.5.2 代谢物提取 移取50 μl样品至EP管中,加入200 μl预冷提取液(甲醇),加入5 μl核糖醇,涡旋30s;超声10 min(冰水浴);将样品置于4℃、12000 rpm离心15 min;小心移取180 μl上清液于1.5 ml EP管中,每个样本各取35 μl混合成QC样本;在真空浓缩器中干燥提取物;向干燥后的代谢物加入30 μl甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐,溶于吡啶20 mg/ml),轻轻混匀后,放入烘箱中80℃孵育30 min;向每个样品中加入40 μl BSTFA(含有1% TMCS, v/v),将混合物于70℃孵育1.5 h;冷却至室温,向混合的样本中加入5 μl FAMES(溶于氯仿);

随机顺序上机检测。

1.5.3 上机检测 Agilent7890 气相色谱-飞行时间质谱联用仪配有 Agilent DB-5MS 毛细管柱 (30 m×250 μm×0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)。

1.6 数据分析

1.6.1 数据处理 使用 ChromaTOF 软件 (V4.3x, LECO) 对质谱数据进行峰提取、矫正基线、解卷积、峰积分、峰对齐等处理。物质定性工作中, 运用 LECO-Fiehn Rtx5 数据库, 其中质谱匹配及保存时间指数匹配。最后, 将 QC 样本中检出率<50% 或 RSD>30% 的峰撤除。

1.6.2 主成分分析 主成分分析 (PCA) 运用 SIMCA 软件 (V16.0.2, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Sweden), 利用对数 (LOG) 更换加中心化 (CTR) 对数据进行格式化处置, 再进行主动建模剖析。

1.6.3 正交偏最小二乘法-判别分析 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 运用 SIMCA 软件对数据进行对数转换加 UV 格式化校正, 第一步对第一主成分进行 OPLS-DA 建模处理, 用 7 折交叉验证 (7-fold cross validation) 进行模型的质量检验; 对用交叉验证后得到的 R^2Y (模型对分类变量 Y 的可解释性) 和 Q^2 (模型的可预测度) 评价模型的有效性; 再利用置换检测 (permutation test), 随机数次转换分类变量 Y 的排列次序获得差异的随机 Q^2 值, 最终检测模型的有效度。

2 结 果

2.1 生物代谢产物 PCA 分析结果 2 组的 PCA 得分散点图表明, 样本基本处于 95% 置信区间内, 2 组样本的区别显著。(见图 1)

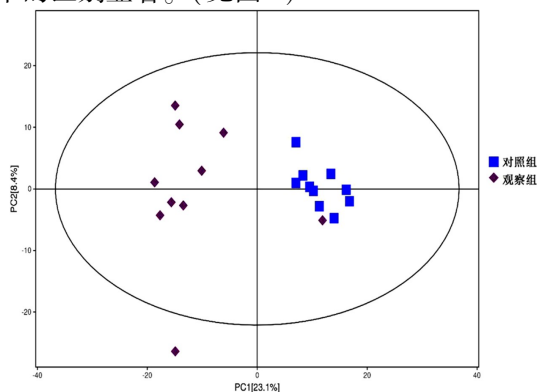


图 1 2 组 PCA 模型得分散点图

2.2 生物代谢产物 OPLS-DA 分析结果 2 组的 OPLS-DA 模型得分散点图表明, 样本全部位于 95% 置信区间内, 2 组样本区分非常显著。(见图 2)

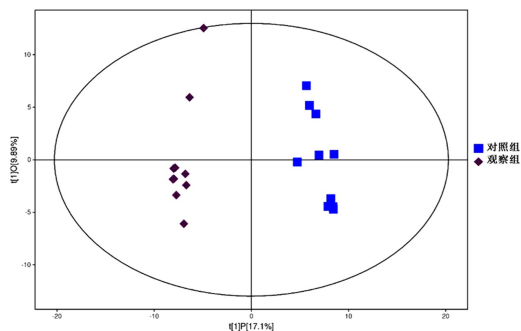
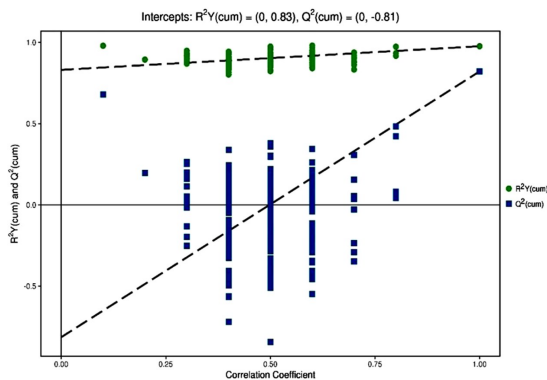


图 2 2 组 OPLS-DA 得分散点图

2.3 生物代谢产物 OPLS-DA 置换检验 原模型 R^2Y 值非常靠近 1, 表明建立的模型吻合样本数据的真实情况; 原模型 Q^2 值非常靠近 0.5, 表示如果加入新样本模型, 会得到近似分布。说明原模型能够较好地描述 2 组样本之间的差异。(见图 3)



注: 横坐标代表置换检测的置换保留率 (与原模型 Y 变量顺序一致的比例, 置换保留率等于 1 处的点即为原模型的 R^2Y 和 Q^2 值), 纵坐标代表 R^2Y 或 Q^2 的值, 绿色圆点代表置换检测得到的 R^2Y 值, 蓝色方点代表置换检测得到的 Q^2 值, 两条虚线分别代表 R^2Y 和 Q^2 的回归线。

图 3 2 组 OPLS-DA 模型的置换检验结果

2.4 差异代谢物筛选 基于 GC-TOFMS 的代谢组数据的固有特征要求运用多元变量统计学分析方式对数据进行检验 [t 检验中 $P < 0.05$, OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度 (VIP) > 1]。差异代谢物筛选表的主要内容包括: similarity、VIP 值、P-VALUE。similarity: 该物质与质谱检测峰的匹配度打分; VIP: 来自 OPLS-DA 模型的 VIP 值; P-VALUE: 来自 t -test 的 P 值。表中 similarity 打分的

取值范围为[0,1000],分数越高匹配度越好。结果显示,筛选出的差异代谢物包括:甘氨酸、富马酸、天冬氨酸、花生酸、胱氨酸、柠檬酸、马来酸盐、4-羟基苯乙酸、亚油酸、羧脯氨酸、4-羟基苯甲酸、花生四烯酸、乳糖、甘露糖、3,6-脱水-D-半乳糖、6-脱氧-D-葡萄糖、槐糖、d-葡庚糖、1,5-脱水葡萄糖醇、磷酸盐、胆甾烷-3,5,6-三醇、亚油酸甲酯、谷氨酰胺、烟酰胺、茉莉酸甲酯、2-脱氧尿苷、肉豆蔻酸、乳酰胺。(见表1)

表 1 观察组差异代谢物筛选结果

差异代谢物	similarity	VIP	P-VALUE
1,5-脱水葡萄糖醇	962	1.487	0.001
羧脯氨酸	947	1.244	0.009
柠檬酸	931	1.816	0.001
磷酸盐	920	2.040	0.000
甘露糖	890	1.874	0.001
甘氨酸	881	1.924	0.000
肉豆蔻酸	819	1.267	0.016
亚油酸	817	1.054	0.015
富马酸	751	2.037	0.000
胱氨酸	749	1.002	0.002
花生四烯酸	688	2.096	0.000
天冬氨酸	678	1.697	0.001
谷氨酰胺	626	1.245	0.000
6-脱氧-D-葡萄糖	503	1.021	0.036
槐糖	463	1.398	0.006
乳酰胺	455	1.136	0.026
3,6-脱水-D-半乳糖	441	1.710	0.011
亚油酸甲酯	430	1.652	0.000
乳糖	403	1.097	0.008
d-葡庚糖	389	2.221	0.000
马来酸盐	310	2.253	0.000
4-羟基苯乙酸	310	1.708	0.001
花生酸	308	1.849	0.002
茉莉酸甲酯	260	1.308	0.011
烟酰胺	254	1.204	0.006
2-脱氧尿苷	249	1.383	0.015
4-羟基苯甲酸	196	1.175	0.025

3 讨 论

以上结果表明,表1中的27种代谢产物可能为IS阳虚证患者潜在的生物标志。差异代谢产物大部分来自于氨基酸代谢,氨基酸不仅是蛋白质的组成部分,而且还是促进多种生物合成途径的中间代谢产物^[9]。血液氨基酸是体内各组织之间氨基酸转运的关键模式,即使人血浆氨基酸浓度不高,但

其更新速度快,浓度相对平稳,因此在脑血管疾病、肿瘤、代谢性疾病发生发展中起着至关重要的作用。氨基酸在神经系统中作为神经递质,在新陈代谢的调节剂和神经调节剂中扮演着不可或缺的角色^[9-10]。因此,缺血性中风中氨基酸的波动可以用作这种病理学的标志物。

人体总氨基酸含量中,甘氨酸占11.5%,人体蛋白质中氨基酸总氮的20%来自甘氨酸。在中枢神经系统中,甘氨酸作为神经递质起着至关重要的作用。甘氨酸存在于脊髓、脑干和小脑中,其作为一种双向神经递质,通过激活甘氨酸受体(GlyRs)和N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDARs)在脑缺血中起关键作用^[11-12]。甘氨酸既可以通过GlyR位点(位点A)诱导糖氨酸抑制,又可以通过NMDAR-甘氨酸共激动剂位点(位点B)诱导NMDAR依赖性神经元兴奋^[13]。甘氨酸是已知具备神经庇护特点的简单非必需氨基酸,可以通过miRNA微小核糖核酸/腺苷酸激活蛋白激酶/糖原合成酶激酶-3/血红素氧合酶1(miR-19a-3p/AMPK/GSK-3β/HO-1)途径改善缺血性中风的细胞凋亡、炎症反应和葡萄糖代谢异常^[14]。甘氨酸通过抑制缺血再灌注损伤后人核转录因子κ(NF-κBp65)的上来抑制缺氧诱导因子-1α(HIF-1α),从而抑制促炎活性^[15]。甘氨酸受体α2(GlyRa2)介导缺血性脑损伤后脑血管重建的保护作用^[16]。IS阳虚证患者甘氨酸相关系数绝对值较大,差异度较高,可能与脑损伤后炎症反应有直接关系。有研究显示脑缺血时人体神经功能异常,可致神经兴奋性氨基酸谷氨酸(Glu)释放增多,脑细胞外的Glu浓度明显增加^[17-18]。通过释放谷氨酸,星形胶质细胞活跃地调节突触传递,并且促进神经系统疾病的兴奋性毒性,进而促使脑组织损伤,导致神经细胞凋亡和死亡^[19]。谷氨酰胺酶抑制剂可减少Glu的释放^[20],所以IS阳虚证患者谷氨酰胺的含量异常很可能激活了中枢神经系统自我保护机制。

综上所述,目前这项研究可以更好地了解氨基酸在脑缺血中的功能。这些代谢标记物有望成为诊断和治疗缺血性脑卒中的潜在生物标志物,为临床上准确及时的诊断提供了实际的理论依据,从而使IS患者得到尽早的诊断和治疗。但是,该研究仍需要进行大样本多中心试验进行验证,并且使用其

他分子生物标记物(例如脂质或蛋白质),这可以提高生物标记物的敏感性和特异性,以提高临床对缺血性脑中风的防治水平。

参考文献

- [1] BARTHELS D, DAS H. Current advances in ischemic stroke research and therapies[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(4): 165260.
- [2] CAMPBELL BCV, KHATRI P. Stroke[J]. Lancet, 2020, 396(10244): 129-142.
- [3] WANG R, LI B, LAM SM, et al. Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression[J]. J Genet Genomics, 2020, 47(2): 69-83.
- [4] 郎金雨, 王耀, 甄百新, 等. 代谢组学在多种神经类疾病诊断研究中的应用[J]. 沈阳医学院学报, 2020, 22(6): 579-582, 586.
- [5] 高长玉, 吴成翰, 赵建国, 等. 中国脑梗死中西医结合诊治指南(2017)[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(2): 136-144.
- [6] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国各类主要脑血管病诊断要点 2019[J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(9): 710-715.
- [7] 李平, 吴钟璇, 张云如, 等. 中风病诊断与疗效评定标准(试行)[J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(1): 2.
- [8] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 99.
- [9] GOULART VAM, SENA MM, MENDES TO, et al. Amino acid bio-signature in plasma among ischemic stroke subtypes[J]. Biomed Res Int, 2019(2019): 8480468.
- [10] SOCHA E, KOBIA M, KOŚLIŃSKI P. Amino acid profiling as a method of discovering biomarkers for diagnosis of neurodegenerative diseases[J]. Amino Acids, 2019, 51(3): 367-371.
- [11] CURTIS DR, WATKINS JC. The excitation and depression of spi-

nal neurones by structurally related amino acids[J]. J Neurochem, 1960(6): 117-141.

- [12] DUTERTRE S, BECKER CM, BETZ H. Inhibitory glycine receptors: An update[J]. J Biol Chem, 2012, 287(48): 40216-40223.
- [13] XU TL, GONG N. Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: Diversity, function and regulation[J]. Prog Neurobiol, 2010, 91(4): 349-361.
- [14] CHEN ZJ, ZHAO XS, FAN TP, et al. Glycine improves ischemic stroke through miR-19a-3p/AMPK/GSK-3 β /HO-1 Pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2020(14): 2021-2031.
- [15] LIU R, LIAO XY, PAN MX, et al. Glycine exhibits neuroprotective effects in ischemic stroke in rats through the inhibition of M1 microglial polarization via the NF- κ B p65/Hif-1 α signaling pathway[J]. J Immunol, 2019, 202(6): 1704-1714.
- [16] CHEN Z, WANG X, LIAO H, et al. Glycine attenuates cerebrovascular remodeling via glycine receptor alpha 2 and vascular endothelial growth factor receptor 2 after stroke[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(10): 6895-6907.
- [17] HELMS HCC, NIELSEN CU, WAAGEPETERSEN HS, et al. Glutamate transporters in the blood-brain barrier[J]. Adv Neurobiol, 2017(16): 297-314.
- [18] MALIK AR, WILLNOW TE. Excitatory amino acid transporters in physiology and disorders of the central nervous system[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5671.
- [19] HELLSTEN SV, HÄGGLUND MG, ERIKSSON MM, et al. The neuronal and astrocytic protein SLC38A10 transports glutamine, glutamate, and aspartate, suggesting a role in neurotransmission[J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(6): 730-746.
- [20] 张伟, 刘鹏, 袁媛, 等. 阻断谷氨酸-谷氨酰胺循环对大鼠脑缺血-再灌注损伤的神经保护作用[J]. 中国脑血管病杂志, 2016, 13(4): 198-203.

(收稿日期: 2021-04-16)

如何“赶走”黄褐斑

黄褐斑, 中医学也称为蝴蝶斑、黧黑斑、肝斑、面尘, 是由多种因素导致的, 需根据类型进行不同的调理。例如随着年龄增长而加重的黄褐斑多由于肝肾亏虚所致, 需滋养肝肾; 有一些黄褐斑与生气、动怒相关, 则需要调理肝气。

桃红四物汤由熟地黄、白芍、当归、川芎、桃仁、红花六味药物组成。方中熟地黄、白芍、当归、川芎乃滋补肝肾之水流, 桃仁、红花是疏通水渠之关键, 女性易气郁, 贪凉饮冷, 遇风感寒, 这些均可导致体内瘀血形成, 所以活血药物是方剂中很重要的部分。

红花味辛、性温, 具有活血通经、祛瘀止痛、化滞消斑之力。《本草汇言》载: “红花, 破血、行血、和血、调血之药也。”该味药可用于闭经、痛经、产后的瘀阻腹痛、结节痛、胸痹痛、头痛、瘀热郁滞的斑疹色暗等问题。红花可回乳, 不适合怀孕和哺乳期妇女, 也不适合有出血倾向的患者。桃仁与红花就像一对很难拆散的组合, 有红花的方剂中, 常会发现桃仁的身影。桃仁性平, 无论是因寒致瘀, 还是因热致瘀, 其均可通过相关配伍而达到活血化瘀的目的, 且具有润肠通便的功效。(罗大伦, <https://www.cntcm.com.cn/news.html?aid=160595>)