

本文引用:苏炳焯,简功辉,谢青玲,唐晓璐,杨卓,向黎黎,陆小龙,熊辉.膝骨关节炎肝肾亏虚证与寒湿痹阻证的血浆代谢组学差异研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(6):749-753.

膝骨关节炎肝肾亏虚证与寒湿痹阻证的 血浆代谢组学差异研究

苏炳焯^{1,2},简功辉¹,谢青玲¹,唐晓璐¹,杨卓¹,向黎黎³,陆小龙³,熊辉^{1*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.鞍山市第三医院,辽宁鞍山114031;

3.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙410005)

〔摘要〕目的 研究膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)肝肾亏虚证与寒湿痹阻证的差异代谢物,探讨KOA肝肾亏虚证与寒湿痹阻证辨证差异的物质代谢轮廓。**方法** 选取KOA肝肾亏虚证和寒湿痹阻证患者各30例,采用核磁共振氢谱(¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹H-NMR)技术测定血浆中的小分子代谢物,采用主成分分析法和正交偏最小二乘法-判别分析,进行多元统计分析。**结果** 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组血浆样本有5个差异代谢物有统计学意义($P<0.05$),其中高密度脂蛋白、柠檬酸、低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白在肝肾亏虚组患者中含量明显高于寒湿痹阻组患者,而醋酸、组氨酸含量明显低于寒湿痹阻组患者。依富集程度($P<0.05$)判别代谢通路为乙醛酸和二羧酸代谢、组氨酸代谢、柠檬酸循环、 β -丙氨酸代谢、丙酮酸代谢、糖酵解和糖异生。**结论** KOA肝肾亏虚证和寒湿痹阻证患者存在差异代谢物,分型的差异代谢物基础可能是柠檬酸盐、组氨酸和醋酸。其中醋酸、组氨酸可能为寒湿痹阻证的标志性代谢产物。

〔关键词〕 膝骨关节炎;肝肾亏虚;寒湿痹阻;核磁共振氢谱;代谢组学

〔中图分类号〕 R274.9;R684.3

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.06.021

Study on the Difference of Plasma Metabolomics Between Liver and Kidney Deficiency Syndrome and Cold-Dampness Bi Syndrome in Knee Osteoarthritis

SU Bingzhu^{1,2}, JIAN Gonghui¹, XIE Qingling¹, TANG Xiaolu¹, YANG Zhuo¹, XIANG Lili³, LU Xiaolong³, XIONG Hui^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Third Hospital of Anshan, Anshan, Liaoning 114031, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

〔Abstract〕 Objective To study the difference of metabolites between liver-kidney deficiency syndrome and cold-dampness Bi syndrome in knee osteoarthritis (KOA), and to explore the material metabolism profile of the difference between liver-kidney deficiency syndrome and cold-dampness Bi syndrome in KOA. **Methods** The plasma of 30 KOA patients with liver and kidney deficiency syndrome and cold-dampness Bi syndrome were collected. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) technology was applied to determine small molecule metabolites in plasma. Principal component analysis and partial least squares discrimination analysis were performed to conduct multivariate statistical analysis. **Results** There were 5 different metabolites in the plasma samples of liver and kidney deficiency group and cold-dampness Bi group, with statistical significance ($P<0.05$). The contents of high density lipoprotein (HDL), citrate and low density lipoprotein (LDL)/very low density lipoprotein (VLDL) in patients with liver-kidney deficiency group were significantly higher than those in patients with cold-dampness Bi group, while the contents of acetate and histidine were significantly lower than those in patients with cold-dampness Bi group. According to the

〔收稿日期〕 2020-05-20

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2019JJ40224)。

〔作者简介〕 苏炳焯,男,在读博士研究生,研究方向:中医骨科临床与实验研究。

〔通讯作者〕 *熊辉,男,教授,主任医师,博士研究生导师, E-mail: xh_hn@sina.com。

enrichment degree ($P < 0.05$), the metabolic pathway was identified as glyoxylate and dicarboxylate metabolism, histidine metabolism, citrate cycle, β -alanine, pyruvate metabolism, glycolysis/gluconeogenesis. **Conclusion** There are different metabolites in KOA patients with liver and kidney deficiency syndrome and cold-dampness Bi syndrome. Citrate, histidine and acetate may be the different metabolites of syndrome type. Acetate and histidine may be the iconic metabolites of cold-dampness Bi syndrome.

[Keywords] knee osteoarthritis; deficiency of liver and kidney; cold-dampness Bi syndrome; ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy; metabolomics

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是发生在膝关节的髌股关节或内外侧间室的骨性关节炎,由于膝关节软骨退行性改变,导致软骨磨损、破坏,伴有关节周围骨质增生,是一种以软骨损伤为主的慢性、退行性关节炎^[1-2]。KOA在中老年人中的发病率较高^[3],中医学将其归属于“痹证”范畴^[4]。“证”是中医辨证论治的起点与核心,证本质研究具有实际的临床价值^[5]。代谢组学可作为中医证候研究的一种技术手段^[6]。本研究采用核磁共振氢谱(^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy, $^1\text{H-NMR}$)检测技术分析 KOA 肝肾亏虚证和寒湿痹阻证患者血浆的代谢产物,寻找 KOA 肝肾亏虚证和寒湿痹阻证的代谢差异物,为“证”的本质差异研究提供物质基础。

1 对象

1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2019 年 12 月就诊于湖南中医药大学第二附属医院的 KOA 患者,年龄在 50~74 岁的 KOA 肝肾亏虚证和寒湿痹阻证患者各 30 例,其中每组男 15 例,女 15 例;肝肾亏虚组,年龄(62.3 ± 8.6)岁,病程(3.4 ± 2.9)年。寒湿痹阻组,年龄(62.2 ± 7.5)岁,病程(3.6 ± 3.3)年。两组患者性别、年龄、病程比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经湖南中医药大学第二附属医院伦理委员会批准。

1.2 诊断标准

参照膝骨关节炎中西医结合诊疗指南中的诊断标准^[7]:(1)近 1 个月内反复膝关节疼痛;(2)晨僵 ≤ 30 min;(3)活动时有关节摩擦音(感);(4)中老年患者(≥ 50 岁);(5)X 线检查(站立或负重位)示关节间隙变窄、软骨下骨硬化和(或)囊性变、关节缘骨赘形成;(6)MRI 示软骨损伤、骨赘形成、软骨下骨髓水肿和(或)囊性变、半月板退行性撕裂、软骨部分或全层缺失。满足诊断标准(1)+(2)+(3)+(4)或(1)+(5)或(1)+(6)条,诊断为 KOA。

1.3 中医证候诊断

参照《膝骨关节炎中医诊疗专家共识(2015 年版)》^[8]《膝骨关节炎中西医结合诊疗指南》^[7]中的证候诊断。(1)寒湿痹阻证 ①主症:关节疼痛重着、遇冷

加剧、得温则减。②次症:腰身重痛。③舌象与脉象:舌质淡,苔白腻,脉沉。(2)肝肾亏虚证 ①主症:关节隐隐作痛。②次症:腰膝酸软无力,酸困疼痛,遇劳更甚。③舌象与脉象:舌质红,少苔,脉沉细无力。

1.4 纳入标准

(1)符合上述诊断标准;(2)符合依据“探脉哥智能中医辅助诊疗系统(登记号:2020SR0117189)”和上述诊疗方案的诊疗标准进行计算机评判后确定的中医证型标准;(3)近 1 个月内未曾服用过非甾体抗炎药、激素等药物或接受其他治疗者;(4)受试者自愿加入本研究方案,并签署知情同意书。

1.5 排除标准

(1)合并类风湿关节炎、色素沉着绒毛结节性滑膜炎、滑膜结核、滑膜软骨瘤病、痛风性关节炎、创伤性滑膜炎等其他关节疾病患者;(2)合并有严重的肺、肝、肾、心脑血管、血液性、代谢性及精神类疾病患者;(3)病人有关节创伤史;(4)接受过激素治疗或膝关节局部有破溃、感染、化脓者;(5)孕妇或哺乳期妇女。

2 方法

2.1 样本采集与前处理

患者禁食、禁水 12 h 以上,采集静脉血,加入枸橼酸钠抗凝剂,离心分离出血浆,离心后将血液封存于 EP 管中,并标记分组信息及编号。置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。

将预处理后的血浆样本从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出,室温放置,待其融化后,取 200 μL 上层清液于离心管中,加入 400 μL 用重水配制的 0.9% 氯化钠溶液(含 0.3 mg/mL TSP),涡旋混匀,以 13 000 r/min 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的低温离心机中离心 10 min,离心完成后取上层清液 550 μL ,加入编号的 5 mm 核磁管中,并将其放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,于 24 h 内进行 NMR 检测。

2.2 NMR 采集

血浆样本的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图采集在 Bruker AVANCE III 600 MHz 超导核磁共振波谱仪上进行,为了测定血浆中的小分子代谢物,采用弛豫编辑(Carr-Purcell-Meiboom-Gill, CPMG)脉冲序列对样品进行测定,实验参数如下:谱宽 20.0 ppm,采集点数 64 K,

弛豫延迟 2 s, 累加次数 128 次, 90° 脉冲宽度 12 μ s, 采集时间 1.36 s。所有实验均在 5 mm 多核宽带观测(BBO)的探头上进行, 测试温度维持在 298 K。采用 Topspin 3.5 软件对采集的原始谱图进行傅立叶变换以及基线校正、相位调整, 并将 TSP 作为化学位移的参考峰, 定为 0 δ ppm。使用 MestReNova 12.0 软件对核磁谱图进行处理, 将 0.5~9.5 ppm 区域内谱图以 0.004 ppm 为单位进行分段积分, 并去除 4.77~5.20 ppm 区域残余水峰信号。所得积分值按每张图谱的总积分面积进行归一化处理, 数据最终在 Excel 2010 软件上以 CSV 格式保存。

2.3 数据分析

采用 SIMCA-P 141 软件(Umetrics AB, Umea, Sweden)对归一化后的数据进行多元数据分析。为了从总体上反映两组样本之间的代谢差异和组内样本之间的变异度的大小, 对数据采用中心化换算的数据标准化方式预处理之后, 进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。此外, 为了消除个体差异、年龄、性别等相关因素对分组的影响, 强化组间差异, 确定差异代谢物, 对数据进行正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 并将 OPLS-DA 模型中的变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) 值 > 1.0 作为差异代谢物筛选的重要标准之一。

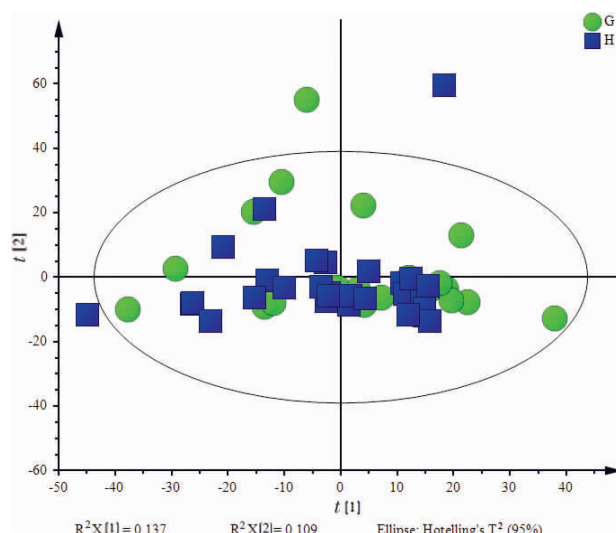
3 结果与分析

3.1 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组 KOA 患者血浆样本的 PCA、OPLS-DA 分析

两组血浆样本 PCA 分析共获得个 7 主成分, 累积 $R^2X=0.482$, $Q^2=0.137$, PCA 得分图结果如图 1 所示。结果显示: 模型中的主成分积分值集中分布于散点图(95%的置信区域内)的 4 个区域中, 说明肝肾亏虚组与寒湿痹阻组患者中的代谢物存在差异。两组样本 OPLS-DA 分析模型($R^2X=0.31$, $R^2Y=0.966$, $Q^2=0.197$)得分图如图 2 所示。结果显示: 两组样品在 $t[1]$ 维较好地分开, 说明组间差异有统计学意义。

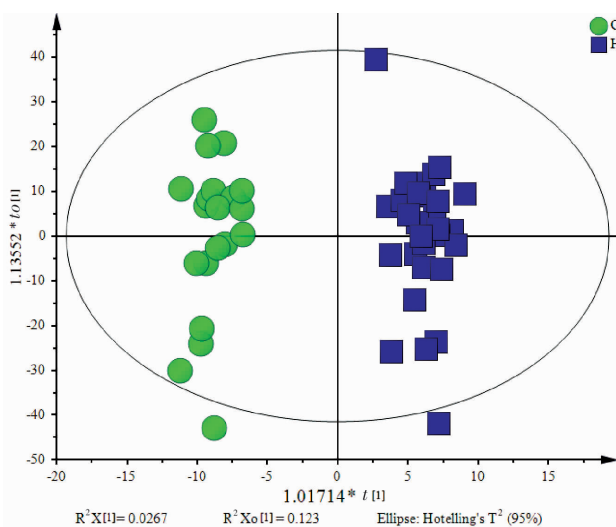
3.2 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组 KOA 患者血浆样本 OPLS-DA 的相关系数负载

肝肾亏虚组与寒湿痹阻组血浆样本 OPLS-DA 的相关系数负载图 3 可以直观看出使得两组样本存在的代谢物。结合 OPLS-DA 模型对潜在生物标志物进行筛选鉴定, 最终得到 5 个差异代谢物($P < 0.05$), 其结果如表 1 所示。结果表明: 高密度脂蛋白、柠檬酸、低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白、组氨酸在肝肾亏虚组患者中含量明显高于寒湿痹阻组患者, 而醋



注: G.肝肾亏虚组; H.寒湿痹阻组

图 1 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组 KOA 患者血浆样本的 PCA 得分图



注: G.肝肾亏虚组; H.寒湿痹阻组

图 2 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组 KOA 患者血浆样本的 OPLS-DA 得分图

酸盐含量明显低于寒湿痹阻组患者。见图 3。

3.3 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组 KOA 患者血浆样本中差异物质通路归属

通路分析采用 MetaboAnalyst v.2.0(www.metaboanalyst.ca)进行, 以富集程度($P < 0.05$, P 值越低表明富集程度越高)判别代谢通路其结果如表 2 所示。最终发现肝肾亏虚组与寒湿痹阻组主要差别($P < 0.05$)在于乙醛酸和二羟酸代谢、组氨酸代谢、柠檬酸循环(TCA 循环)、 β -丙氨酸代谢、丙酮酸代谢、糖酵解和糖异生。

4 讨论

“证”是对疾病发展过程中某一阶段病机特点的整体概括, “证”具有“阶段性”和“非特异性”^[8]。代谢

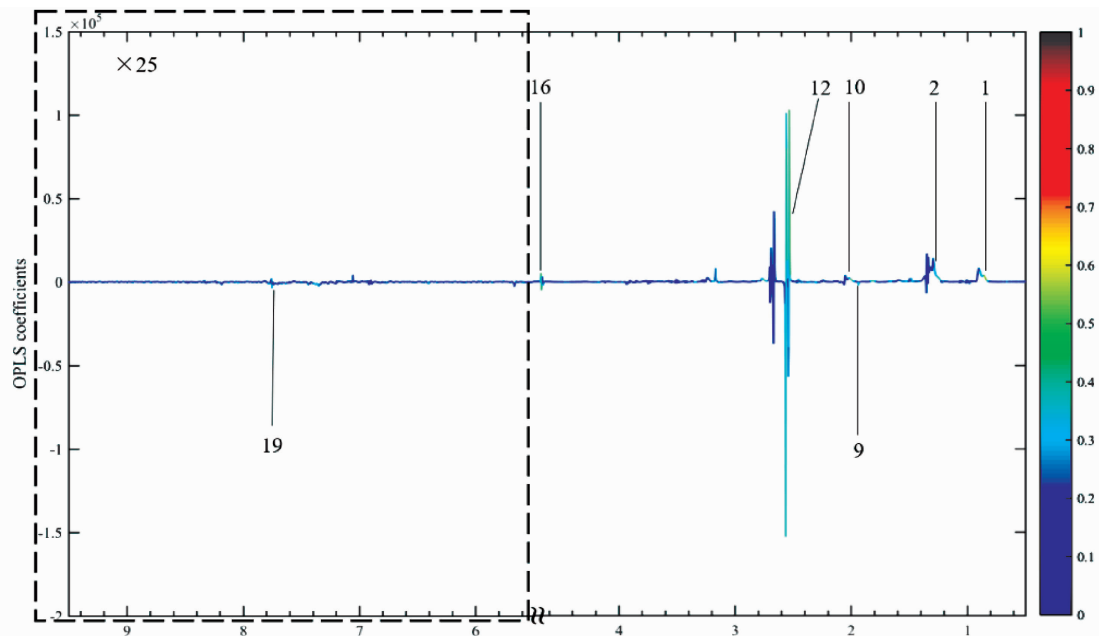


图3 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组 KOA 患者血浆样本 OPLS-DA 的相关系数负载图

表1 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组 KOA 患者血浆差异代谢物

代谢物	化学位移/ppm	VIP 值	相关系数
组氨酸(histidine)	0.86	3.203 77	-0.343 910
柠檬酸(citrate)	1.94	3.123 79	-0.509 992
醋酸(acetate)	2.55	2.581 60	0.421 476
低密度脂蛋白(LDL)/极低密度脂蛋白(VLDL)	1.30	2.218 03	0.362 118
高密度脂蛋白(HDL)	7.76	2.106 51	0.343 910

表2 肝肾亏虚组与寒湿痹阻组 KOA 患者血浆样本差异物质通路归属

代谢通路名称	差异代谢物命中该通路的个数	富集分析得到的 P 值	命中该条通路的差异代谢物的名称及其 KEGG ID
乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)	2	0.001	柠檬酸(citrate) cpd:C00158 醋酸(acetate) cpd:C00033
组氨酸代谢(histidine metabolism)	1	0.031	组氨酸(L-Histidine) cpd:C00135
柠檬酸循环(citrate cycle)	1	0.038	柠檬酸(citrate) cpd:C00158
β-丙氨酸代谢(β-alanine metabolism)	1	0.040	组氨酸(L-Histidine) cpd:C00135
丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)	1	0.042	醋酸(acetate) cpd:C00033
糖酵解和糖异生(glycolysis/gluconeogenesis)	1	0.050	醋酸(acetate) cpd:C00033

组学从微观上,研究机体代谢进程中所有代谢物的变化规律^[9]。二者的思路和方法都是研究机体的特定“状态”,表现为体液中内源性成分的变化,并以组、群、谱的特征出现^[10]。KOA 病理主要与软骨代谢相关,涉及到其他组织如滑膜^[11]、韧带以及软骨下骨的变化^[2]。本研究发现,两组血清样本代谢物存在差异,有统计学意义。

4.1 相关代谢物参与的 KOA 发病机制之间的关联性推断

高密度脂蛋白(HDL)升高可见于 KOA 患者,绝经后女性 KOA 骨量^[12]与 HDL 呈正相关,可能是引起软骨下骨改变的原因。罗绪林等^[13]应用针刀结合

手法干预 KOA 病人发现其机制可能是通过干预的脂质和 HDL 代谢来达到治疗作用。

低密度脂蛋白(LDL)是由极低密度脂蛋白转变而来,LDL 被氧化能够促进软骨骨赘形成、促进炎症反应及加速软骨细胞凋亡^[14]。LDL 被氧化修饰而成的脂质过氧化产物,在关节软骨的退变中起到核心的促进作用,是 KOA 病情诊断的标志物之一^[15]。

醋酸,是一种有机一元酸,典型的脂肪酸。有研究表明应用关节腔注射碘乙酸可建立大鼠骨关节炎模型,并且随着剂量的加大关节损伤越严重^[16]。乙酸可致小鼠疼痛出现扭体反应,已成为常规镇痛药物筛选方法。

柠檬酸是脂肪、蛋白质及糖三大能量物质转化的核心环节,是有氧代谢过程的中心代谢途径,是机体获得能量的主要方式,其可能与关节软骨及导致线粒体功能障碍相关^[17]。

组氨酸能在组氨酸脱羧酶的作用下脱羧形成组胺,组胺具有很强的血管舒张作用,并与多种变态反应及炎症有关^[18]。组氨酸与氧化损伤有关,是活性氧自由基的直接清除剂,降低关节内氧自由基的水平,可减轻关节软骨的损伤^[19-20]。

根据差异代谢产物与主要代谢通路间关系,组氨酸主要参与了 β -丙氨酸、组氨酸代谢。醋酸主要参与了丙酮酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、糖酵解和糖异生。柠檬酸主要参与了TCA循环、乙醛酸和二羧酸代谢。6条通路主要与3个代谢产物相关,在机体能量代谢过程中发挥重要作用。

4.2 差异代谢物参与的KOA证型之间的关联性推断

虚实是辨别人体正气强弱和病邪盛衰的两个纲领。实证主要取决于邪盛方面,而虚证主要取决于正虚方面。肝肾亏虚证属虚证,寒湿痹阻证属实证。二者差异代谢物及代谢通路提示能量代谢的差异。肝肾亏虚证处于相对能量不足状态,可导致气血运行不足,这与肝肾亏虚证患者常伴有腰膝酸软乏力等有关。

柠檬酸多与能量相关。在肝肾亏虚证患者中含量明显高于寒湿痹阻证患者,其代谢差异可能是由于不能被中心体充分利用,进而导致代谢物堆积。差异代谢物在肝肾亏虚证患者中明显增多,提示可能由于其证候本身的虚实所导致。

实证疼痛多剧烈,乙酸致小鼠扭体反应模型可以模拟腹腔炎症引起的腹痛症状,其在寒湿痹阻组较高。与寒湿痹阻证和肝肾亏虚的临床疼痛症状差异相符合。应用细辛提取物可显著降低乙酸导致小鼠扭体的扭体次数^[21]。细辛性味辛温,有散寒功效,热药治寒提示醋酸可能为寒湿痹阻证的标志性代谢产物。骨内高压与骨内血流动力学异常有关,可致KOA的发生^[22]。科研中常用结扎供给血管造模^[17]。温热方药能改善因寒邪导致的器官血流动力学异常,增加其血液灌注^[23]。组氨酸与血管收缩相关,本次研究提示其在寒湿痹阻证患者较高,推测其可能为寒湿痹阻证的特异性代谢产物。

参考文献

[1] 邱红福,卢新刚,王欣欣,等.中西医结合治疗膝骨关节病的研究进

展[J].老年医学与保健,2017,23(1):60-62.

- [2] APPLETON C T. Osteoarthritis year in review 2017: biology[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2018, 26(3): 296-303.
- [3] 雷磊,王莉,魏巍,等.两种神经阻滞疗法治疗膝骨关节炎的疗效对比研究[J].中国疼痛医学杂志,2017,23(4):307-309.
- [4] 膝骨关节炎中医诊疗专家共识(2015年版)[J].中医正骨,2015,27(7):4-5.
- [5] 郑海生,蒋健,贾伟.浅谈代谢组学在中医证本质研究中的应用[J].辽宁中医杂志,2008,35(5):693-694.
- [6] 杨秀娟,邓毅,杨延泽,等.代谢组学在血虚证及血瘀证中的应用研究进展[J].中国临床药理学杂志,2017,33(11):1069-1072.
- [7] 中国中西医结合学会骨伤科专业委员会.膝骨关节炎中西医结合诊疗指南[J].中华医学杂志,2018,98(45):3653-3658.
- [8] 董正华.辨病与辨证相结合是《伤寒论》的基本诊断模式[J].陕西中医学院学报,2005,28(6):5-7.
- [9] 陈慧梅,刘志红.代谢组学及其研究方法和应用[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2005,14(1):59-64.
- [10] 邵勤,周小莉,张莹,等.基于核磁共振氢谱的膝关节骨性关节炎肝肾亏虚证血清代谢组学研究[J].中国中医药信息杂志,2017,24(6):27-31.
- [11] LOHMANDER L S. What can we do about osteoarthritis?[J]. Arthritis Research & Therapy, 2000, 2(2): 95-100.
- [12] 张向群,李敏,吴晓惠,等.绝经后女性膝骨关节炎的骨量变化[J].临床荟萃,2012,27(2):118-121.
- [13] 罗绪林,张教明,姚振江,等.针刀结合手法对膝关节骨性关节炎患者血清脂质及高密度脂蛋白亚类的影响[J].湖北中医杂志,2010,32(10):7-8.
- [14] 王丹碧,李雪萍.脂代谢紊乱与骨性关节炎的关系研究进展[J].中华物理医学与康复杂志,2019,41(5):396-400.
- [15] 王华,姜未,周天健,等.膝骨性关节炎患者中低密度脂蛋白与氧化应激的关系及意义[J].广东医学,2018,39(21):3207-3210.
- [16] 周康,叶妙勇,马轲,等.碘乙酸致大鼠膝骨关节炎疼痛模型的实验研究[J].浙江中西医结合杂志,2020,30(3):202-206,263.
- [17] 戴七一,韩杰,滕居赞,等.揉髌手法对兔膝关节骨关节炎模型血清代谢组学影响的实验研究[J].世界最新医学信息文摘(电子版),2016,16(12):1-4.
- [18] ANDERSEN H H, ELBERLING J, ARENDT-NIELSEN L. Human surrogate models of histaminergic and non-histaminergic itch[J]. Acta Dermato Venereologica, 2015, 95(7):771.
- [19] MADSEN R K, LUNDSTEDT T, GABRIELSSON J, et al. Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2011, 13(1):19.
- [20] SPIES CORNELIA M, STRAUB RAINER H, FRANK B. Energy metabolism and rheumatic diseases: from cell to organism[J]. Arthritis Research & Therapy, 2012, 14(3):216.
- [21] 袁晓琴,孙莲芬,郑进.细辛的镇痛作用部位及机制研究[J].上海中医药杂志,2009,43(5):72-75.
- [22] 张学良,宋敏,宋贵杰.骨内高压致骨性关节炎机理的探讨[J].颈腰痛杂志,2006(4):327-329.
- [23] 王晓松,刘小花,路帅,等.温经汤对月经病寒实证患者卵巢及子宫血流动力学的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(2):861-863.