

基于 NMR 的维吾尔医异常黑胆质型肿瘤患者血浆代谢组学分析

艾斯克尔·吐拉洪¹, 哈木拉提·吾甫尔², 豪富华³, 巴吐尔·买买提明^{2,4}

1. 新疆医科大学第五附属医院, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054
3. 中国科学院武汉物理与数学研究所; 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉 430071
4. 中南大学药学院, 长沙 410007

摘要 探讨了异常黑胆质型体液引起肿瘤过程中体内代谢变化的机理。对 223 例异常黑胆质型肿瘤患者和 50 例健康人血浆进行核磁共振氢谱检测, 分段积分后采用正交偏最小二乘判别 (OPLS-DA) 分析。结果表明, 异常黑胆质型肿瘤患者血浆中多种氨基酸显著下降, 包括亮氨酸、丙氨酸、瓜氨酸、酪氨酸、组氨酸、甘氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等, 与健康人比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。此外, 糖蛋白、谷氨酰胺、肌醇、乳酸、胆碱、肌酸也显著下降, 与健康人比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。同时, 异常黑胆质型肿瘤患者血浆中甲酸、丙酮、乙酸、乙酰乙酸、丙酮酸、 β -羟丁酸、肉碱、丙二酸, 以及脂肪分解产物多不饱和脂肪酸、极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白等显著增加, 与健康人比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。由此表明, 异常黑胆质型肿瘤患者体内脂肪动员加强, 同时氨基酸代谢出现异常, 细胞膜的完整性降低, 机体抗氧化能力下降, 使氧化损伤加剧。机体形成异常黑胆质时, 很可能出现机体内分泌功能紊乱, 免疫功能低下, 膜蛋白和受体变性, 从而引起肿瘤等各种疾病。

关键词 异常黑胆质; 代谢组学; 肿瘤; 维吾尔医学

中图分类号 R291.5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)13-0027-05

Metabonomic Studies on Abnormal Savda Syndrome Patients with Neoplasm Using NMR Spectroscopy

TURAHUN Askar¹, UPUR Halmurat², HAO Fuhua³, MAMTIMIN Batur^{2,4}

1. The Fifth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China
3. State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Molecular and Atomic Physics; Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China
4. College of Pharmacy, Zhongnan University, Changsha 410007, China

Abstract This paper studies metabonomic changes in plasma of Abnormal Savda syndrome patients with neoplasm based on the theory of Traditional Uighur Medicine. A ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) based metabonomic analysis was performed on plasma samples obtained from 223 cases of Abnormal Savda syndrome patients with neoplasm and 50 healthy volunteers, and the data were analyzed using Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). The results show that in plasma of Abnormal Savda syndrome patients with neoplasm, a wide range of amino acids including Leucine, Alanin, Citruline, Tyrosine, Histidine, Glycine, Methionine, Isoleucine, Valine, Acetylcysteine see a significant decrease ($P<0.05$) and Glycoprotein, Glutamine, Myo-inositol, Lactic acid, Choline Creatine are also decreased ($P<0.05$). Formic acid, Acetone, Acetic acid, Acetoacetate, Pyruvate, β -Hydroxy butyrate, Carnitine, Malonic acid are increased as compared with healthy plasma metabolites ($P<0.05$). It is concluded that in Abnormal Savda syndrome patients with neoplasm, lipid metabolism-related metabolites are increased, with abnormal amino acid metabolism, cytoplasm membrane defects, oxidative damage due to abnormal antioxidation ability. These findings indicate that

收稿日期: 2009-04-20

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目 (90709004)

作者简介: 艾斯克尔·吐拉洪, 医师, 研究方向为维医维药与代谢组学, 电子信箱: aisiker2000@yahoo.com.cn; 巴吐尔·买买提明 (通信作者), 讲师, 研究方向为维医维药与代谢组学, 电子信箱: mtbatu@yahoo.com.cn

the Abnormal Savda syndrome may be accompanied with imbalance of endocrine dysfunction of the body, low immune function, structural changes of protein, carbohydrates, nucleic acid, biological macromolecules, membrane lipid peroxidation, membrane protein and receptor variability, which will be followed by various diseases such as neoplasm.

Keywords Abnormal Savda; metabonomics; neoplasm; Traditional Uighur Medicine

0 引言

维吾尔医体液学说认为人体有胆液质(Sapra Hilit)、血液质(Kan Hilit)、黏液质(Belghem Hilit)和黑胆质(Savda Hilit)等4种体液,这4种体液在体内相互转换、补充并不断地循环于整个人体,在人体的整个生命活动保持一定比例的平衡状态。如果以上4种体液质的比例发生变化就会产生异常体液(Abnormal Hilit)即对人体无益或有害的体液。维吾尔医学认为体液的异常变化是疾病产生的根本,根据其变化的程度、所起的作用及产生的症状、导致的疾病类型等,将异常体液质分为异常胆液质(Abnormal Sapra)、异常血液质(Abnormal Kan)、异常黏液质(Abnormal Belghem)和异常黑胆质(Abnormal Savda)4种,尤其是异常黑胆质的增加是体液发生异常变化的主要特征^[1],其他异常体液的长期滞留并“燃烧”也会产生异常黑胆质,这也是异常体液导致疾病的主要原因之一^[2-3],其造成的后果往往比较严重,是肿瘤、高血压、哮喘、糖尿病等复杂性疾病发生发展过程中的共同病理生理学基础^[4]。研究发现80%以上的肿瘤是由异常黑胆质性体液产生的^[5]。

代谢活动是生命活动的本质特征和物质基础,代谢组是在代谢活动中产生的内源性代谢物质的动态整体。当体内代谢出现紊乱性变化时,往往会在尿液和血液等体液的代谢组中得到表现,维吾尔医体液学说主张异常体液质的出现过程也与以上代谢理论基本一致。所以,通过测试异常体液质所包含的特异性代谢产物有可能推断出异常体液质发生的机制。代谢组学(Metabonomics)是采用核磁共振、质谱等化学分析技术,分析生物体整体性代谢变化情况的一门新兴学科^[6-7]。机体的病理变化使得机体的代谢产物也产生了某种相应的变化,对这些由疾病引起的代谢产物的变化进行分析有助于发现与疾病相关的生物标志物^[8]。异常体液质的出现过程也与体内代谢变化密切相关,也就是异常体液质的出现是体内代谢发生紊乱的一个标志。因此,对尿液和血液等体液代谢组进行检测和分析,就有可能对异常体液质型疾病发生和发展过程伴随的生物化学变化进行了解和认识,使维吾尔医学关于疾病诊断和治疗的理论体系提高到一个新的高度。因此,本研究以异常黑胆质型肿瘤患者为研究对象,用核磁共振波谱技术测定患者血浆代谢物成分及相对含量,从而阐明异常黑胆质型肿瘤患者体内代谢变化过程。

1 材料与方法

1.1 研究对象

50例通过体检确定其身体健康的志愿者,其中男性26例,女性24例,平均年龄为 58.82 ± 13.04 ,新疆医科大学附属肿瘤医院诊治的223例异常黑胆质型肿瘤患者,其中男性110例、女性113例,平均年龄为 (56.40 ± 14.05) 岁。异常黑胆质型患者的体液分型根据维吾尔医学体液分型的分类标准^[9]确定。收集早餐前空腹血液并离心分离血浆,保存在 -80°C 低温冰箱中待测。

1.2 血浆核磁共振氢谱的测试

样品在室温中解冻,取200 μL 血浆加400 μL 用重水配制的生理盐水,在室温放置10 min,以10 000 r/min的速度离心10 min。取上清液550 μL 加到5 mm的核磁管内。 ^1H -NMR谱的测定在布鲁克500 MHz核磁共振波谱仪(德国)上用BB1探头采用CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill)脉冲序列(RD- 90° - τ - 180° - 2τ - 180° - 2τ - 180° -...-ACQ)进行。对 ^1H 核共振频率为500.13 MHz,累积扫描64次,采样数据点32 768,谱宽20 mg/L,采样延迟2 s,每次扫描时间均为1.64 s,测试温度 25°C ,采用预饱和方法压制水峰。

1.3 数据处理与分析

核磁共振氢谱以 α -葡萄糖化学位移5.233 mg/L的质子信号为标准进行定标,用AMIX(德国)软件在8.5~0.5 mg/L范围内把谱图以每段为0.003 mg/L分成2 668段进行自动积分,积分值进行归一化处理。去掉水峰的信号范围5.20~4.66 mg/L和抗凝剂(枸橼酸钠)的信号范围2.72~2.47 mg/L,用SIMCA-P+11软件进行正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA)。

OPLS-DA是新发展起来的数据分析方法,它将正交信号校正方法(Orthogonal Signal Correction, OSC)与偏最小二乘法(Partial Least Squares, PLS)结合并对PLS进行修正,在代谢组学研究中其判别能力优于主成分分析法(Principal Component Analysis, PCA)和简单独立建模级类推法(Simple Independent Modeling of Class Analogy, SIMCA)等方法^[8,10], R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 是所建立模型的质量评价指标。分析模型的优化程度用 R^2X 参数描述、表示 X 的总变异, R^2Y 描述的是反应变量 Y 的变异百分比,用交叉核实参数 Q^2 描述模型的累积预测程度、表示预测结果的真实性。本研究通过代谢物相关系数确定健康人与异常黑胆质型肿瘤患者的差异性代谢成分,检验标准为 $P=0.05$ 。通过皮尔森相关系数显著性差异检测(Pearson's product moment correlation coefficient)确定0.273作为代谢物含量变化是否具有显著性的阈值($n=50$),相关系数 $|r|>0.273$ 所代表的代谢物是统计学上有显著性差异($P<0.05$)的代谢物, $|r|$ 值越大表示差异性越大、反之越小。

2 实验结果

健康人和异常黑胆质型肿瘤患者血浆的 ^1H -NMR谱如图1所示。对 ^1H -NMR谱进行分段积分以后的积分值进行

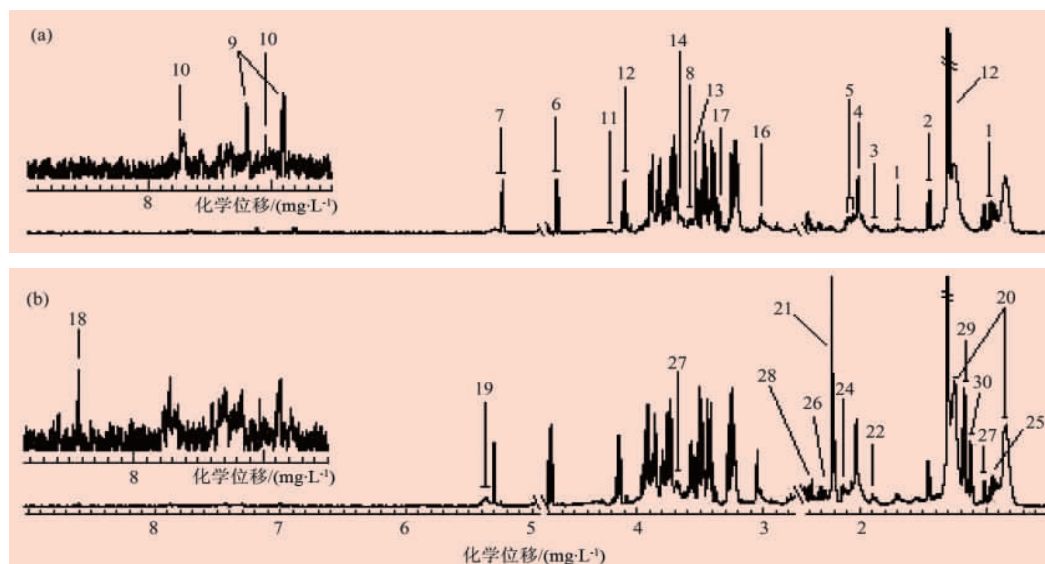


图 1 健康人(a)和异常黑胆质性患者(b)的核磁共振 500 MHz ^1H -NMR 谱

Fig. 1 500 MHz ^1H -NMR spectra (δ 9.0~0.5 mg/L) of plasma samples from healthy volunteers (a) and Abnormal Savda syndrome patients with neoplasm (b)

注:CPMG 脉冲序列, δ 6.5~9.0 mg/L 比原图(δ 0.5~9.0 mg/L)放大了 16 倍

Notes: The region δ 6.5~9.0 mg/L was expanded 16 times in comparison with the original region δ 0.5~9.0 mg/L

OPLS-DA 分析,得到 3D 空间分布图,结果见图 2。本次分析中, $R^2X=0.32$, $R^2Y=0.94$, $Q^2=0.89$ 。从图 2 可以看到,两组的分布区域完全分开,说明两组血浆在代谢成分上有明显差异,从相关系数中得到两组的差异性代谢组分的化学位移并与相关系数相结合确定差异程度,根据以上信息及用 ^1H - ^1H 同核相关谱(COSY 谱)、质子全相关谱(TOCSY 谱)、J-分解谱(J-Resolved 谱)等核磁共振二位谱技术确定了健康人与异常黑胆质型肿瘤患者血浆差异性代谢成分,详见表 1。

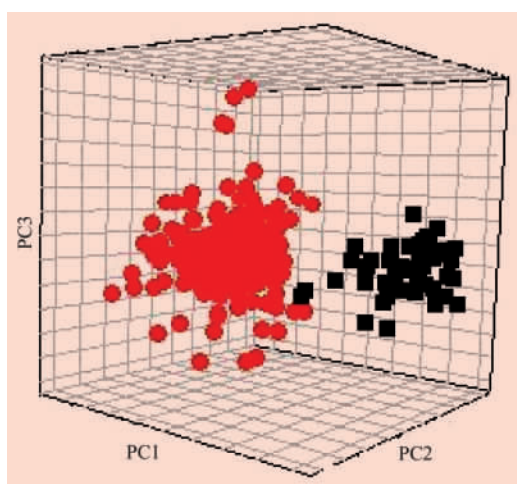


图 2 ^1H -NMR 谱(CPMG 脉冲序列)的 OPLS-DA 分析空间分布

Fig. 2 OPLS-DA 3D plots of ^1H -NMR spectra

注:■为健康人,●为异常黑胆质型肿瘤患者;模型参数分别为

$R^2X=0.32$, $R^2Y=0.94$ 和 $Q^2=0.89$

Notes: ■ is healthy volunteers; ● is Abnormal Savda syndrome patients with neoplasm. The values of model parameters are

$R^2X=0.32$, $R^2Y=0.94$, $Q^2=0.89$

从结果可知两组血浆多种代谢组分有显著性差异,差异性代谢物中相关系数为正值的代谢物是在异常黑胆质型肿瘤患者血浆中降低的代谢物,相关系数为负值的代谢物是在异常黑胆质型肿瘤患者血浆中增加的代谢物。异常黑胆质型肿瘤患者血浆中多种氨基酸显著下降,包括亮氨酸、丙氨酸、瓜氨酸、酪氨酸、组氨酸、甘氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等,与健康人比较差异有统计学意义($P<0.05$)。此外,糖蛋白、谷氨酰胺、肌醇、乳酸、胆碱、肌酸也显著下降,与健康人比较差异有统计学意义($P<0.05$)。同时,异常黑胆质型肿瘤患者血浆中甲酸、丙酮、乙酸、乙酰乙酸、丙酮酸、 β -羟丁酸、肉碱、丙二酸以及脂肪分解产物多不饱和脂肪酸、VLDL、LDL 等明显增加,与健康人比较差异有统计学意义($P<0.05$)。 α -葡萄糖和 β -葡萄糖在两组中没有显著性差异($P>0.05$)。 ^1H -NMR 谱 4.21 mg/L 有双重峰的代谢物在异常黑胆质型肿瘤患者血浆中显著降低,而 2.78 mg/L 有双重峰的代谢物显著增加,均有统计学差异($P<0.05$),但是具体的代谢物种类需进一步探索。

3 讨论

以往研究中发现异常黑胆质型体液是肿瘤等难治性疾病发生、发展过程中的主要因素。根据维吾尔医学的传统理论,对于不同疾病的诊断和治疗主要是依据不同体液的不同状态来进行的^[2],对体液的代谢组学分析可提供与内环境变化有关的生物标志物及这种变化的机制信息^[11-12]。异常黑胆质型体液作为一种机体在特殊状态下出现的体液,包含着机体出现异常情况的多种信息。在本研究中通过 NMR 手段对异常黑胆质型肿瘤患者血浆进行代谢组学研究发现多种代谢成分的变化。

积。同时,异常黑胆质型肿瘤患者血浆中与脂肪代谢有关的肉碱、乙酸、不饱和脂类、VLDL、LDL 含量也显著增加。异常黑胆质型肿瘤患者血浆 α -葡萄糖和 β -葡萄糖与健康人比较无显著性差异 ($P>0.05$),但乳酸却显著性降低 ($P<0.05$),其可能的机制是:来自脂肪的乙酰 CoA 的增加会抑制丙酮酸脱氢酶复合体从而抑制丙酮酸脱氢、NAD⁺含量增加,NAD⁺会增加乳酸脱氢变成丙酮酸的过程,同时肉碱也有抑制乳酸形成的作用。

除脂肪代谢发生异常外,还发现异常黑胆质型肿瘤患者体内多种氨基酸含量明显减少,包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、瓜氨酸、酪氨酸、组氨酸、甘氨酸、蛋氨酸等,与健康组比较也有显著性差异 ($P<0.05$)。本研究中观察到患者血浆中其他一些代谢物的变化,如糖蛋白、谷氨酰胺、胆碱、肌酸、肌醇等代谢成分在异常黑胆质型肿瘤患者血浆中显著降低,而甲酸和丙二酸含量显著增加。胆碱的主要作用是调控细胞凋亡、构成生物膜的重要组成成分,降低血清胆固醇。胆碱含量的降低可能预示着异常黑胆质型患者体内细胞膜的完整性降低,调控细胞凋亡过程可能出现了失衡。谷氨酰胺和糖蛋白、丙氨酸一起对免疫功能的维持起到很主要的作用,具有改善机体代谢、增加淋巴细胞总数、改善机体免疫状况等效果。血浆中谷氨酰胺水平下降预示机体抗氧化能力下降,使氧化损伤加剧。异常黑胆质型肿瘤患者血浆胆碱、谷氨酰胺、丙氨酸、糖蛋白等含量的下降预示细胞膜受到损伤、免疫力下降、机体受自由基伤害加深。结合以往的研究^[14-15],机体出现异常黑胆质病症时,机体内分泌功能紊乱、免疫功能低下、生物膜脂质过氧化、膜蛋白和受体变性,从而引起肿瘤等各种疑难杂症疾病。

4 结论

异常黑胆质型肿瘤患者脂肪动员增加,肝线粒体脂肪代谢加强。酮体、丙酮酸、甲酸、丙二酸、乙酸、肉碱以及不饱和脂肪酸、VLDL、LDL 等代谢物在血浆的增加可以作为异常黑胆质型肿瘤潜在的代谢标志物。

致谢 本研究的实验数据处理和分析得到中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室唐惠儒研究员的大力支持和无私指导,在此对唐惠儒及其团队表示衷心的感谢。

参考文献 (References)

- [1] 库热西江·托乎提,阿不都热依木·玉素甫,哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医正常体液与异常体液分型比较研究[J]. 中国民族医药杂志, 2004(3): 3-4.
- Tohti Kurax, Yusup Abdurehim, Upur Halmurat. *Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities*, 2004(3): 3-4.
- [2] 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医学气液体论及其现代研究 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2003: 44-52.
- Upur Halmurat. *Therapy of Mizaj and Hilit in Uyghur medicine and modern study* [M]. Urumqi: Science and Technique Publishing Company

in Xinjiang, 2003: 44-45.

- [3] 阿不都热依木·玉素甫, 李琳, 哈木拉提·吾甫尔, 等. 维吾尔医异常体液分型及其与氧化-抗氧化系统关系的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(8): 61-62.
- Yusup Abdurehim, Li Lin, Upur Halmurat, *et al. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2004, 10(8): 61-62.
- [4] 阿布力米提·玉素甫阿吉. 维吾尔医基础理论(维文)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技出版社, 1988: 32-46.
- Yusup Haji Ablimit. *Basic theory of Uyghur medicine*[M]. Urumqi: Science and Technology Publishing Company in Xinjiang, 1988: 32-46.
- [5] 哈木拉提·吾甫尔,阿不都热依木·玉素甫. 维吾尔医异常黑胆质新论 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2005: 11-12.
- Upur Halmurat, Yusup Abdurehim. *The new theory of Abnormal Savda hilit in Uyghur medicine*[M]. Urumqi: Science and Technique Publishing Company in Xinjiang, 2005: 11-12.
- [6] Nicholls A W, Holmes E, Lindon J C, *et al. Metahonomic investigations into hydrazine toxicity in the rat*[J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14(8): 975-987.
- [7] Lindon J C, Holmes E, Nicholson J K. *Metahonomics: Systems biology in pharmaceutical research and development*[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, 6(3): 265-272.
- [8] Peiyuan Yin, Patamu Mohemaiti, Jing Chen, *et al. Serum metabolic profiling of Abnormal Savda by liquid chromatography/mass spectrometry* [J]. *Journal of Chromatography B*, 2008(5): 43.
- [9] 买买提明·沙比尔. 维吾尔医学诊断学 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技出版社, 1993: 135-148.
- Sabir Mamatimin. *Diagnostics of Uyghur medicine* [M]. Urumqi: Science and Technology Publishing Company in Xinjiang, 1993: 135-148.
- [10] 冒海蕾, 徐晏, 王斌, 等. 正交信号校正正常人血清 ¹H-NMR 谱的代谢组分析中的滤噪作用评价[J]. 化学学报, 2007, 65(2): 152-158.
- Mao Hailei, Xu Min, Wang Bin, *et al. Acta Chimica Sinica*, 2007, 65 (2): 152.
- [11] Holmes E, Nicholls A W, Lindon J C, *et al. Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ¹H-NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition*[J]. *NMR Biomed*, 1998, 11(4-5): 235-244.
- [12] Anthony M L, Sweatman B C, Beddell C R, *et al. Pattern recognition of the site of nephrotoxicity based on metabolic data derived from proton nuclear magnetic resonance spectra of urine*[J]. *Mol Pharmacol*, 1994, 46 (1): 199-211.
- [13] 周爱儒, 查锡良. 生物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- Zhou Airu, Zha Xiliang. *Biochemistry* [M]. Beijing: People's Health Publisher, 2004.
- [14] 哈木拉提·吾甫尔, 艾斯卡尔·依米提. 维吾尔医成熟剂及清除剂诱导 T 淋巴瘤细胞凋亡的研究 [J]. 新疆医科大学学报, 1999, 22(3): 231.
- Upur Halmurat, Himat Askar. *Journal of Xinjiang Medical University*, 1999, 22(3): 231.
- [15] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉素甫, 阿不都艾尼, 等. 维吾尔医成熟剂和清除剂抗活性氧的作用研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2000, 6(3): 30-32.
- Upur Halmurat, Yusup Abdurehim, Abduheni, *et al. Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities*, 2000, 6(3): 30-32.

(责任编辑 王芷)