

## 高血压病肝阳上亢证患者血清样品的核磁共振谱代谢组学研究

蒋海强<sup>1</sup>, 马斌<sup>2</sup>, 聂磊<sup>2</sup>, 李运伦<sup>3</sup> (1. 山东中医药大学教学实验中心, 山东 济南 250335; 2. 山东大学药学院, 山东 济南 250011; 3. 山东中医药大学附属医院高血压中医临床研究基地, 山东 济南 250011)

**[摘要]** 目的 采用<sup>1</sup>HNMR结合主成分分析(PCA)方法研究高血压病肝阳上亢证患者和健康志愿者的血液成分谱差异, 寻找可能的生物标记物, 揭示高血压病肝阳上亢的证候本质。方法 根据临床高血压病肝阳上亢证的诊断标准, 选择典型病例, 以<sup>1</sup>HNMR分析高血压病肝阳上亢证患者和健康志愿者的血液成分, 使用PCA方法进行模式识别, 寻找标记物并做出相关代谢途径的可能解释。结果 PCA方法处理高血压病肝阳上亢证患者和健康志愿者的血清<sup>1</sup>HNMR谱数据显示, 两组<sup>1</sup>HNMR谱数据可以在得分图实现分类, 与健康志愿者作比较, 患者机体相关代谢发生显著变化, 体内部分氨基酸代谢和葡萄糖代谢明显异于健康志愿者。结论 <sup>1</sup>HNMR结合PCA模式识别的代谢组学方法具有研究复杂条件下机体病理生理变化的优势, 为理解高血压病肝阳上亢证的证候本质和诊断该类病证提供了科学依据。

**[关键词]** 代谢组学; 核磁共振波谱; 主成分分析; 高血压; 肝阳上亢

**[中图分类号]** R963 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)04-0258-04

## A nuclear magnetic resonance spectroscopic metabolomics analysis for serum samples of hypertension patients with hyperactivity of liver-yang

JIANG Haiqiang<sup>1</sup>, MA Bin<sup>2</sup>, NIE Lei<sup>2</sup>, LI Yun-lun<sup>3</sup> (1. Teaching experience center of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250335 China; 2. School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan 250011, China; 3. Traditional Chinese Medicine Clinical Research Base for Hypertension, A affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

**[Abstract]** **Objective** To apply <sup>1</sup>HNMR spectroscopic analysis and principal components analysis(PCA) for investigating the difference of blood composition spectrum between hypertension patients with hyperactivity of liver yang and healthy volunteers to search possible biomarker. Reveal the nature of syndrome of hyperactivity of liver yang. **Methods** Choose typical cases according to the clinical diagnostic criteria for liver yang hyperactivity hypertension, and analysis the components in the blood of hypertension in the patients with syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang and healthy volunteers by <sup>1</sup>HNMR. Track biomarkers and make the possible explanation of the relevant metabolic pathways with pattern recognition by the PCA method. **Results** The data from the analysis by PCA of the serum samples of hypertension in hypertension patients with syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang and healthy volunteers shows that two sets of data can be classified in the score plot. There is significant differences existing between the two groups in terms of relative metabolism of body, especially for some amino acid metabolism and Glucose metabolism. **Conclusion** The metabolomics method <sup>1</sup>HNMR combined with PCA pattern recognition, has advantages in studying pathophysiological changes of the body under the complicated conditions. The study provided evidences for probing the essence of the hypertension of syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang and researching the clinical diagnosis of such diseases.

**[Key words]** metabolomics; nuclear magnetic resonance spectroscopy; principal components analysis; hypertension; syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang

代谢组学主要研究生物体对外源性物质所引起的病理生理反应, 通过对生物体液和组织中代谢物的检测和分类, 与生物信息进行关联分析, 可监测细

胞的化学变化, 从而反映生物体的病理生理变化。代谢组学的原理和相关技术是研究中医证候本质的重要技术平台<sup>[1]</sup>, 能够从代谢网络终端表象的整体角度反映生物体的功能水平<sup>[2]</sup>, 揭示生物体的病理生理变化实质和机制<sup>[3,4]</sup>。核磁共振(NMR)分析方法是代谢组学研究中的主要技术之一, 适合分离代谢产物中的复杂成分。本研究采用<sup>1</sup>HNMR结合主成分分析(PCA)方法分析、比较高血压病肝阳上亢证患者和健康志愿者的血液成分谱差异, 寻找高血

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助课题(30772865), 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-07-0522), 山东省优秀中青年科学家奖励基金(2008BS03029), 山东省2009-2010中医药科技发展计划项目(2009-018)。

**[作者简介]** 蒋海强(1982-), 男, 硕士, 讲师。E-mail: jhq12723@163.com。

**[通讯作者]** 李运伦。E-mail: liyunlun@yahoo.com.cn。

压病肝阳上亢证特征性的代谢组分模式和可能的生物标记物,揭示高血压病肝阳上亢的证候本质。

### 1 材料和方法

**1.1 实验对象** 根据《1999WHO/ISH 高血压治疗指南》的高血压诊断标准<sup>[5]</sup>和中医肝阳上亢证的辨证标准<sup>[6]</sup>,选择知情同意、志愿受试,经过 2 周“洗脱期”后舒张压在 90~109 mmHg 的 2 级高血压病肝阳上亢证患者 17 例作为试验组,同时选择无症状高血压病的健康志愿者 8 例,作为对照组,两组在年龄、性别分布方面无差异 ( $P < 0.05$ )。

**1.2 试剂和仪器** 重水 (D<sub>2</sub>O) 为美国 CIL 公司产品, 2,2,3,3-三甲基甲硅烷基丙酸 (3-trimethylsilyl [2,2,3,3-D<sub>4</sub>] -propionate, TSP) 为美国 Aldrich 公司产品。AVANCE II 600MHz 型超导傅立叶变换 NMR 谱仪,为瑞士 BRUKER 公司产品。

**1.3 血清样品预处理** 清晨取空腹静脉血,不抗凝,取血清置 -80℃ 冰箱保存,精密移取血清 400 μl 加入 600 μl 的甲醇,涡旋混匀 10 min, 4℃, 12 000 r/min, 高速离心 2 min 取上清液,以氮吹仪吹干,加重水 500 μl 溶解,加入适量 TSP 作为内标,取上层清液 550 μl 置于 5 mm 核磁管中,使用 AVANCE II 600MHz 型超导傅立叶变换 NMR 谱仪进行测量<sup>[7]</sup>。

**1.4 NMR 数据采集和处理** 在超导傅立叶变换 NMR 谱仪上调用 cpmgpr1d 脉冲序列,该序列可以较好地去除血液中大分子的干扰。相关参数如下:预饱和时间 2 s,谱宽 7 288.63 Hz,采样点数 64 k,采样时间 2.6 s,叠加次数 128 次,循环次数 128 次,并控制温度在 298.2 K,自由感应衰减 (free induction decay, FID) 信号经过 32 k 傅立叶变换转为 NMR 谱图。以 TSP 为化学位移参考峰位置,设为 0 校正化学位移,对图谱进行相位校正和基线校正,将 <sup>1</sup>H 谱按默认值,从 10.0 到 0.2 以每段为 0.04 进行分段并积分,扣除 4.5~5 处重水中残余 H<sub>2</sub>O 的影响,共获得 235 个化学位移小段和各化学位移对应的积分值,将积分值进行比例换算后,以 Excel 文件贮存,将这些数据文件采用 Matlab 软件进行主成分分析 (principal components analysis, PCA)。

**1.5 数据分析** 将存储的数据文件导入 Matlab 软件,经主成分分析,得到得分图 (score plot) 和对应的载荷图 (loading plot),根据得分图和载荷图的结果对血清样品的分类;根据相应的载荷图寻找对分类贡献较大的变量 (化学位移),确定两组的共性代谢物和差异的生物标记物,将代谢组学技术和中医药学的研究相结合,尝试阐释中医证候高血压病肝阳

上亢证的生物本质。

### 2 结果

**2.1 高血压病肝阳上亢证患者的血清样品 <sup>1</sup>H-NMR 谱** 高血压病肝阳上亢证病人组血清样品的典型 <sup>1</sup>H-NMR 谱及其中的部分内源性成分如图 1 所示,由图可见血清中代谢成分主要是葡萄糖、有机酸、氨基酸和脂类等化合物。

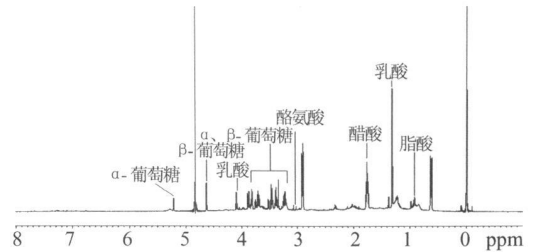


图 1 高血压病肝阳上亢证病人组血清样品的典型 <sup>1</sup>H-NMR 谱

**2.2 PCA 分析** 对 25 例血清样本的 <sup>1</sup>H-NMR 谱分段积分值的 PCA 结果见图 2。由图 2 可知,高血压病肝阳上亢证组和健康志愿者之间基本无交叉和重叠,明显分成两类,除 7 号样品处于二类的分界线上外,其余的样本均能够明显分开,前 2 个主成分对数据信息的贡献率分别是 38.8% (PC1) 和 22.0% (PC2)。

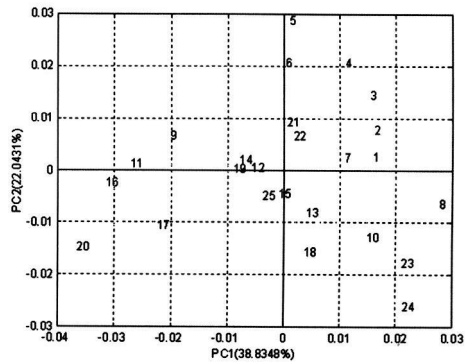


图 2 高血压病肝阳上亢证组和健康志愿者组血清样品散点分布图

通过 PCA 的载荷图 (图 3), 高血压病肝阳上亢证组中脂类化合物 (1.204 & 1.245 Q 1.285 1) 以及化学位移在 3.0~3.5 左右的葡萄糖和氨基酸的含量较高,对分类贡献较大。变量分别对应的化学位移为 3.333 3 1.285 1, 3.205 1, 2.891 5, 1.726 9, 1.204 & 1.245 Q 3.694 & 3.453 & 3.373 5 的化合

物,根据<sup>1</sup>HNMR数据,检索代谢组学<sup>1</sup>HNMR化学位移谱库(HMDB),归属化学位移,确定相应的代谢物,分别为脂类、葡萄糖、酪氨酸等。对于高血压病肝阳上亢组、健康志愿组血清样品<sup>1</sup>HNMR数据中发生变化的成分,将其化学位移和对应的化合物列于表1。

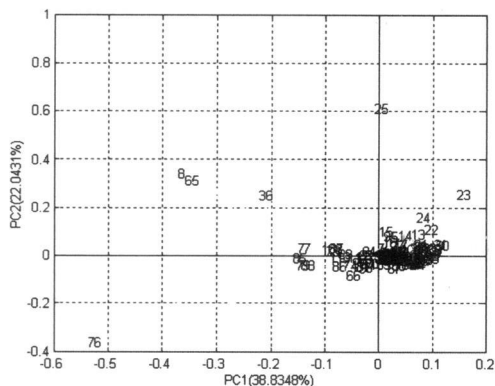


图3 主成分分析高血压病肝阳上亢组、健康志愿组血清样品载荷图

表1 高血压病肝阳上亢证代谢标记物

可能化合物	δH
脂类	1 204 8
脂类	1 245 0
脂类	1 285 1
醋酸	1 726 9
酪氨酸	3 205 1
未知	2 891 5
葡萄糖	3 333 3
葡萄糖	3 373 5
葡萄糖	3 453 8
亮氨酸	3 694 8

2.3 代谢物成分的进一步分析 在无症状高血压病健康志愿者血清样品的<sup>1</sup>HNMR谱中也可以发现很多内源性的代谢产物,如氨基酸和脂肪酸。这些化学成分在两个组的血清样品中含量存在较大差别,根据其含量差异可对两组进行区分。这些化学成分存在于人体的多个生化过程中,比如能量代谢、脂类代谢和氨基酸代谢,所以其代谢组氢谱图可以作为化学指纹谱用来描述高血压病肝阳上亢证内源代谢产物的变化。对于未能指认化学位移所对应的化合物,尚需要其他手段进一步鉴别。

### 3 讨论

本研究运用代谢组学技术,血清样品的<sup>1</sup>HNMR谱PCA结果发现:①高血压病肝阳上亢证组和健康志愿者组在积分值散点图中呈聚类分布,两组基本

分开,对PC1和PC2进一步分析发现,与空白组相比,高血压病肝阳上亢证患者体内代谢物存在明显差异,说明血清代谢组学分析能够反映证候之间的差异,代谢组学技术是开展中医证候研究的重要平台。②从两组血清样品的<sup>1</sup>HNMR谱中发现氨基酸有明显差异,推测高血压病的发生可能与氨基酸代谢异常相关,初步推断具有差异的几种氨基酸可能为高血压病肝阳上亢证的疾病标记物,高血压病肝阳上亢证生理学基础为外周交感-肾上腺髓质功能亢进,主要病理环节是外周血浆去甲肾上腺素(NE)和肾上腺素(E)含量显著增高,NE、E是酪氨酸在酪氨酸羟化酶(TH)的作用下合成<sup>[8]</sup>,酪氨酸代谢异常,可能成为高血压病肝阳上亢证的表现。这些发生变化的代谢物可作为高血压肝阳上亢证大的生物标记物进行深入研究。③高血压病伴发糖尿病,这在临床上非常常见,本实验通过发现高血压病肝阳上亢证患者存在葡萄糖代谢的异常,也证明了高血压病伴发糖代谢异常,这对临床诊断高血压病肝阳上亢证以及预防高血压伴发糖尿病均具有重要的意义<sup>[9]</sup>。氨基酸、葡萄糖及脂类化合物参与体内重要的代谢,与三羧酸循环能量代谢、糖降解及脂肪代谢算什么密切相关,这些内源性成分的改变提示人体内相关代谢功能的异常,这与已知的生物病征是一致的。分析这些内源性代谢物及其含量的变化,可揭示中医病证的生物学本质。④本研究应用NMR和主成分分析的方法研究高血压病肝阳上亢证,通过对高血压病肝阳上亢病人和健康志愿者血清样品的分析和模式识别,显示该方法能够区分高血压病肝阳上亢病人和健康志愿者血清样品。尽管在高血压病肝阳上亢病人和健康志愿者各自组内,血清成分存在个体差异,在一定程度上造成了两组样本的交叉,但从PCA的得分图可以看出,两组样本基本能够分开,且类别清晰、明确。这也体现模式识别在代谢组学研究中的重要意义。

本工作有利于深入认识和理解高血压病肝阳上亢证的本质,同时为该类疾病的临床诊断和治疗研究提供依据,血清代谢组学分析能够较好地反映高血压病肝阳上亢证的代谢特征,基于NMR结合模式识别的代谢组学方法是一个可用于研究复杂条件下机体病理生理状态变化,揭示中医证候本质的强有力工具。

### 【参考文献】

[1] 李运伦. 代谢组学是研究证候实质和方剂原理的重要技术平台[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(3): 187  
 [2] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': under

standing the metabolic responses of living systems to Pathophysiological stimulation multivariate statistical Analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica 1999, 29: 1181.

[3] 周明眉, 刘平, 贾伟, 等. 基于代谢网络变化的中药整体效应评价方法研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2006, 8: 113.

[4] 贾伟, 蒋健, 刘平, 等. 代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31: 621.

[5] 林金秀, 吴可贵. 1999年 WHO /ISH 关于高血压治疗指南 [J]. 高血压杂志, 1999, 7(2): 97.

[6] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [S].

第一辑. 1993: 29-32, 47.

[7] 艾斯克儿, 吐拉洪, 哈木拉提·吾甫儿, 豪富华, 等. 基于 NMR 的维吾尔医异常黑胆汁型肿瘤患者血浆代谢组学分析 [J]. 科技导报, 2009, 27(13): 27.

[8] 谌兵来, 唐发清, 金益强, 等. 高血压病肝阳上亢证酪氨酸羟化酶及单胺氧化酶微卫星多态性分析 [J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(3): 37.

[9] 杜建军, 胡守琪, 张建纲. 高血压病患者糖代谢异常的临床分析 [J]. 宁夏医学杂志, 2008, 30(3): 257.

[收稿日期] 2009-12-03  
[修回日期] 2010-03-15

## 碘海醇注射液致视力模糊并过敏性休克 1例

陈红鸽, 吴荣荣 (解放军第 302 医院, 北京 100039)

[关键词] 碘海醇注射液; 视力模糊; 过敏性休克

[中图分类号] R981 [文献标志码] D [文章编号] 1006-0111(2010)04-0261-01

### 1 病历

患者, 男, 44岁, 因肝炎肝硬化于 2009-9-25 日来我院就诊, 肝脏 B 超显示低密度病灶建议肝脏 CT 增强扫描, 当日 9:03 在我院放射科行 CT 增强扫描, 以 3 ml/s 的速度静脉推注碘海醇注射液 100 ml (通用电气药业有限公司, 规格: 35 mg/100 ml 批号: 10961189), 注射完毕后约 1 min 出现眼睛红肿, 视力模糊, 胸闷, 恶心呕吐, 呼吸困难, 随后出现肢端和口唇紫绀。考虑为过敏性休克, 立即肌肉注射盐酸肾上腺素 1 mg, 地塞米松 5 mg, 吸氧 4 L/min, 并紧急送抢救室, 建立两条静脉通路, 给予心电监护, 静滴氢化可的松注射液、羟乙基淀粉 40 氯化钠注射液、盐酸多巴胺注射液控制休克、应用甘露醇注射液预防脑水肿, 2 h 后患者神志清醒, 生命体征基本正常, 病情基本康复。

### 2 讨论

本例患者既往曾多次在我院行肝脏 CT 增强扫描, 用药后无任何不适反映, 此次用药后出现视力模糊和过敏性休克, 考虑为碘海醇所致的严重不良反应。

碘海醇为一种非离子型水溶性造影剂, 常用于各类临床造影检查。其常见不良反应为轻度的感觉异常如热感或暂时性的金属味觉; 胃肠道和过敏样反应少见, 重度不良反应和致死性反应非常罕见<sup>[1-3]</sup>。由于碘过敏试验的预试验对其所引起的过敏反应预测准确性极低, 以及预试验本身也可能导致严重的过敏反应, 因此不建议用预试验来检测碘过敏试验反应<sup>[2]</sup>。本例患者既往用此药无任何不适反应, 而这次却出现了严重不良反应。这提示我们在使用碘海醇时, 不能以往因曾用此药安全而掉以轻心, 同样要密切观察患者的反应。造影剂过敏反应一般在用药后立即发生, 但也存在延迟发生的过敏反应, 因此对病人在造影后 24 h 内应重点监护, 做好急救准备。

### 【参考文献】

- [1] 中华人民共和国药典临床用药须知 2005 年版 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 890.
- [2] 通用电气药业 (上海) 有限公司. 碘海醇注射液说明书 (2006 年 10 月核准) [S].
- [3] 贾公孚, 谢惠民. 药物临床防治大全 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1552.

[收稿日期] 2009-12-24  
[修回日期] 2009-12-24