

糖尿病肾病患者血浆硫醇氨基酸 与中医辨证分型的相关性研究*

□江芝婷** 王 勇 (华东理工大学药学院 上海 200237)

梁琼麟 (清华大学中药现代化研究中心 北京 100084)

李 平 (中日友好医院临床研究所 北京 100092)

王义明 罗国安** (清华大学中药现代化研究中心 北京 100084)

摘要:目的:探讨与糖尿病肾病中医诊断相关的潜在生物标志物对于中医药现代化、客观化具有重要意义。方法:应用高效液相色谱-三重四极杆质谱联用测定各证型 DN 患者和健康志愿者的血浆中 8 种硫醇氨基酸的含量,通过对照比较病例之间的差异。结果:DN 患者体内 Cys-gly 和 GSH 的含量与健康人相比,显著降低;而 SAH、SAM、Hcy、Cysta 和 Cys 含量随着病情的加重有逐渐增高的趋势。根据 SAH 和 Hcy 能明显区分气阴两虚偏阴虚与阴阳两虚组。另外,气阴两虚偏气虚组患者体内的 SAH 含量与阴阳两虚组相比也有显著性差异。结论:体内 Cys-gly、GSH 含量可辅助 DN 的早期中医诊断,体内 SAH 和 Hcy 的含量与 DN 各证型具有一定的相关性。

关键词:硫醇氨基酸 糖尿病肾病 中医辨证分型

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.03.006

一、前 言

近年来,糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy)的发病率有逐渐上升的趋势。在糖尿病患者中, DN 的发病率高达 47.66%, 由其造成的慢性肾功能衰竭是患者致死的常见病因,占糖尿病患者死亡率的 60%。糖尿病肾病属中医“消渴”、“水肿”范畴,虽然各医家对

于 DN 诊治的方法各有千秋,但公认的基本病机还是本虚标实,本虚为气阴两虚,标实为痰浊、水湿、淤血等^①。目前,中医药对糖尿病肾病的治疗显示了较好的疗效。它不仅能有效控制病情的发展,改善临床症状,而且中药多靶点的治疗弥补了西药的不足,副作用相对较小,适宜长期服用。但是中医治疗 DN 的研究还存在诸多不足,由于医家受各自的知识领域和经验影响,对该病的分期和中医证型分布缺乏参考的标准,制约了 DN 临床研究水平和疗效的进一步

收稿日期: 2009-10-09

修回日期: 2010-05-11

* 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2005CB523503): 中医防治慢性肾功能衰竭临床方法的系统生物学研究,负责人:李平。

** 联系人:江芝婷,博士研究生,主要研究方向:系统生物学,代谢组学研究,Tel: 010-62772265, E-mail: jiangzt@mail.ecust.edu.cn; 罗国安,本刊编委,教授,博士研究生导师,主要研究方向:中药方剂化学,现代中药质量标准体系研究,Tel: 010-62781688, E-mail: luoga@tsinghua.edu.cn。

提高。因此,探寻与糖尿病肾病中医诊断相关的生物标志物,以便为中医诊断提供参考。

糖尿病肾病的发生发展是血流动力学改变、代谢异常以及环境因素共同作用的结果。而同型半胱氨酸(Hcy)代谢循环是影响体内血流动力学和机体平衡的重要代谢循环,血浆中Hcy升高被认为与肾病的病程发展密切相关^[2]。中医认为先天禀赋不足、后天精微物质的缺乏是体内高Hcy浓度的主要病机^[3]。其中先天禀赋与肾脏的关系最为密切,肾为先天之本,主持着全身的水液代谢。同型半胱氨酸的升高,会导致肾功能失调,以至于引起全身的水液代谢紊乱^[4]。根据Hcy代谢网络可知,Hcy主要有两种代谢过程:转甲基化过程和转硫过程,如图1所示^[5],体内Hcy含量的变化必然会引起Hcy代谢循环的紊乱。另外,Hcy代谢循环中其它的硫醇氨基酸在许多生理学和病理学过程中也起了很重要的作用。因此,研究Hcy代谢循环中的中间产物,试图寻找糖尿病肾病中医辨证分型密切相互的生物标志物具有重要意义。

本文通过检测不同中医辨证分型的糖尿病肾病患者以及健康人血浆中半胱氨酸(Cys)、同型半胱氨酸(Hcy)、酰基甲硫氨酸(SAM)、酰基同型半胱氨酸(SAH)、胱硫醚(Cysta)、甲硫氨酸(Met)、谷胱甘肽(GSH)和半胱氨基甘氨酸(Cys-gly),8种硫醇氨基酸

的含量,探讨它们与中医辨证分型的相关性,并阐述了疾病发展的可能机理。

二、实验

1. 临床资料

资料均来源于北京中日友好医院,共计60例DN患者,男34例,女26例,年龄为40~75岁,平均(56.4±8.3)岁。48例健康志愿者中男性28例,女性20例,年龄为40~68岁,平均(50.3±8.7)岁。

2. 诊断标准

中医辨证标准参照1992年山东明水中华中医药学会糖尿病专业委员会第三次大会通过的《消渴病中医分期辨证与疗效评定标准——消渴病辨证诊断参考标准》和1987年天津中华中医药学会内科肾病专业委员会慢性肾衰中医辨证分型诊断专题讨论会通过的标准进行,以及《中药新药临床研究指导原则》进行辨证并对症状进行量化记分。本文中DN患者按标准被分为气阴两虚偏阴虚、气阴两虚偏气虚和阴阳两虚3大证型。

3. 纳入与排除的病例标准

纳入病例标准:曾经在1~6个月内收集的3次,24小时尿标本中有2次或者3次以上尿白蛋白分泌率(UAER)平均值在20~200(或30~300)及以上,可以确定有持续性白蛋白尿。蛋白量>0.5g/24h,表明已经进入临床糖尿病肾病期。

排除病例标准:①癌症、妊娠或哺乳妇女;②有严重的心、肝、脑等并发症,或合并其它严重原发性疾病,精神病患者;③有糖尿病酮症,酮症酸中毒以及感染、各种原因引起的应激反应状态者。

4. 样品处理及检测方法

就诊的各证型病人及健康人的全血得到后立即加入抗凝剂EDTA,随后以4000rpm的转速,在4℃下离心15min。取上清液放置于-80℃保存,备用。

检测前,精确量取200μL的血浆,加入50μL的内标(25μg·mL⁻¹MPG),涡旋使之充分混合。随后加入100μL DTT(15mg·mL⁻¹)和600μL的甲醇,涡旋3min,以13000rpm的转速,在4℃离

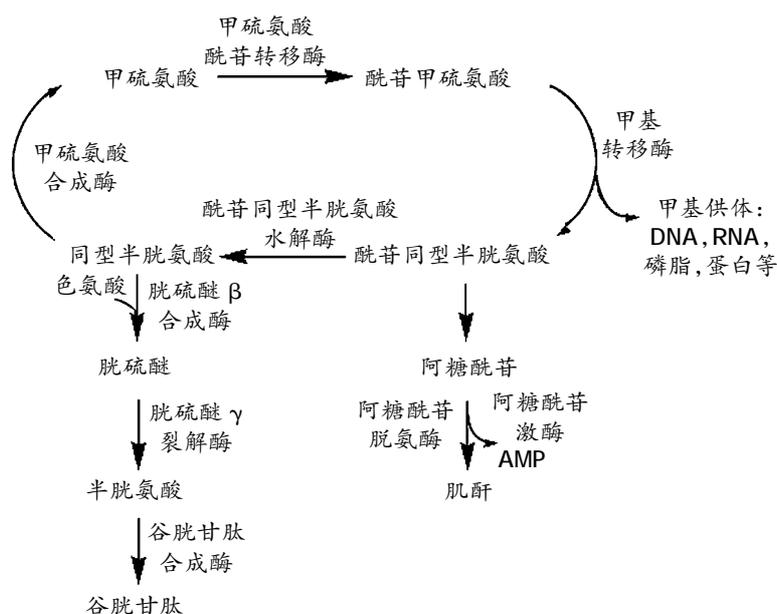


图1 同型半胱氨酸代谢循环简图

心 15min。上清液转移至 1.5mL 的塑料管,在室温下氮气吹干。检测前用流动相复溶后即可。使用已建立的同时测定人血浆中 8 种硫醇氨基酸的方法^[5],应用高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术,对各证型的糖尿病肾病患者和健康人的血浆进行检测。该方法简单、精确,重复性、稳定性、精密度、回收率等指标均达到要求。

5. 数据分析

采用 SPSS13.0 统计软件,所有的连续变量均经过 Kolmogorov-Smirnov 检验,呈正态分布。各组间的差异采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为有显著性差异。

三、结果

1. 临床常规检测

糖尿病肾病患者按照中医辨证分型诊断标准被分为气阴两虚偏阴虚、气阴两虚偏气虚和阴阳两虚 3 组,患者的临床常规检测数据统计如表 1 所示。随着病程的发展,患者体内血糖和血红蛋白含量逐渐下降,血清肌酐和尿素氮的含量逐渐升高。阴阳两虚组血清肌酐和尿素氮含量显著增高,收缩压也较气阴两虚偏阴虚、气虚组高。胆固醇、甘油三酯和高、低密度脂蛋白胆固醇含量没有显著性差异。

2. 硫醇氨基酸含量的病例对照检测(见表 2)

Cys-gly 和 GSH 随着病程的加重,含量逐渐降低;而 SAH、SAM、Hcy、Cysta 和 Cys 则有逐渐增高的趋势。气阴两虚偏阴虚组患者体内 Cys-gly、SAH、SAM、Hcy 和 GSH 含量与健康组相比有显著性差异,提示可应用于辅助糖尿病肾病中医辨证的早期诊断。其中 SAM 和 Hcy 能显著区分气阴两虚偏阴虚与阴阳两虚组。另外,气阴两虚偏阴虚组、气虚组患者体内的 SAH 含量与阴阳两虚组相比有显著性差异,说明 SAH 能较好的反映疾病发展的过

程,对糖尿病肾病的中医辨证分型具有重要意义。

四、讨论

DN 的发病机制极为复杂,目前认为 DN 的发展是多因素综合作用的结果,与持续的高血糖代谢状态、肾血流动力学异常、脂质代谢紊乱、多种细胞因子、反应氧簇以及家庭遗传等因素有关。本实验室通过建立定量代谢组学平台^[6],首先应用代谢全谱寻找潜在生物标志物以及相关的代谢循环,随后通过对脂肪酸代谢、磷脂代谢^[7]、嘌呤嘧啶代谢^[8]以及硫醇氨基酸代谢循环^[9]中间代谢产物进行定量,试图解释疾病发生的可能机制以及表征疾病发展的潜在生物标

表 1 各证型糖尿病肾病患者临床常规检测数据

	气阴两虚 偏阴虚(n=20)	气阴两虚 偏气虚(n=20)	阴阳两虚 (n=20)
男性(%)	50	55	65
年龄	55.5(1.5)	55.3(2.0)	58.2(2.7)
空腹血糖(mmol·L ⁻¹)	8.19(1.00)	7.15(0.82)	6.59(0.52)
糖化血红蛋白(%)	8.91(0.75)	9.14(0.64)	8.25(1.03)
血红蛋白(g·L ⁻¹)	120.64(4.71)	117.77(10.69)	100.2(7.59)
血清肌酐(μmol·L ⁻¹)	222.65(71.19)	249.31(89.99)	543.02(88.79)
尿素氮(mmol·L ⁻¹)	9.85(2.15)	10.27(2.02)	21.68(2.99)
胆固醇(mmol·L ⁻¹)	5.35(0.53)	4.78(0.26)	5.57(0.65)
甘油三酯(mmol·L ⁻¹)	2.99(0.94)	1.97(0.33)	2.30(0.48)
高密度脂蛋白胆固醇(mmol·L ⁻¹)	1.30(0.08)	1.22(0.11)	1.26(0.11)
低密度脂蛋白胆固醇(mmol·L ⁻¹)	2.78(0.28)	2.79(0.21)	3.23(0.41)
收缩压(mmHg)	136.9(4.4)	137.5(5.8)	150.0(6.3)
舒张压(mmHg)	81.3(2.5)	79.5(2.8)	80.3(4.1)

*数据以平均值(标准误差)的形式表示。

表 2 体内 8 种硫醇氨基酸含量的病例对照结果

化合物	浓度(Mean±ts/√n)			
	对照(n=48)	气阴两虚 偏阴虚(n=20)	气阴两虚 偏气虚(n=20)	阴阳两虚 (n=20)
Cys-gly(μg·mL ⁻¹)	1.49±0.11	1.21±0.21 ^a	1.11±0.14 ^a	1.01±0.17 ^a
SAH(ng·mL ⁻¹)	5.74±1.09	22.86±12.55 ^a	34.41±15.58 ^a	100.11±36.87 ^{abc}
SAM(ng·mL ⁻¹)	13.12±1.02	18.45±5.31 ^a	22.13±7.19 ^a	35.21±7.84 ^{ab}
Hcy(ng·mL ⁻¹)	699.08±71.88	936.84±169.11 ^a	1123.75±230.37 ^a	1696.78±419.76 ^{ab}
Cysta(ng·mL ⁻¹)	5.26±0.63	5.75±1.67	5.92±1.25	7.19±1.26 ^a
Met(μg·mL ⁻¹)	2.73±0.20	2.75±0.47	2.75±0.32	3.39±0.84 ^a
GSH(μg·mL ⁻¹)	910.16±83.62	667.74±91.59 ^a	637.34±110.28 ^a	625.89±98.06 ^a
Cys(μg·mL ⁻¹)	7.98±0.71	9.16±1.91	11.11±2.16	12.91±3.22 ^a

注:a 与对照组相比, $P<0.05$,有显著性差异,b 与气阴两虚偏阴虚组相比有显著差异,c 与气阴两虚偏气虚组相比有显著差异。

志物。本文着重从硫醇氨基酸代谢出发,阐述其中间产物与中医分型之间的相互关系。应用现代分析技术为中医 DN 诊断分型提供量化指标,能够有效辅助中医诊断。

临床常规检测是西医诊断糖尿病肾病分期的主要依据,经典的 Mogensen 分期就是以尿白蛋白分泌率(UAER)和肾小球滤过率(GFR)为标准^[9]。从常规检测结果可以看到,血清肌酐和尿素氮的含量在气阴两虚和阴阳两虚组之间有显著差异,揭示了本病的内在病理变化为“因虚致实”,也即是说实邪的产生往往存在有正气不足。DN 后期,肾小球滤过率下降,体内水液和毒素不能排出体外,患者普遍存在浊毒内停、气血损伤等浊湿证的表现,而浊湿与血清肌酐和尿素氮的变化有很大的相关性^[10]。然而,血清肌酐和尿素氮体内含量剧增在 DN 晚期才会出现,不利于疾病的早期诊断,所以寻找适合于 DN 早期诊断的其他潜在生物标志物具有重要的意义。

体内 Hcy 升高的中医病机可以归于痰浊、血瘀范畴^[11]。而痰浊阻滞血气的运行,从而会引起血瘀;血瘀阻滞则会使津液停蓄化而为痰,痰瘀相互搏结,导致体内 Hcy 的蓄积。血淤是在多种致病因素作用下而产生的一种病理状态,会导致“血行失度”,从而“血脉瘀阻”,与血管内皮细胞损伤密切相关^[12]。肾脏是体内 Hcy 排出体外的重要场所,肾脏内皮细胞的损伤,导致 Hcy 的清除率下降,以至于体内 Hcy 含量升高^[3]。体内 SAH 含量的升高,对肾脏造成损害有两方面的可能。一是从 Hcy 代谢通路来讲,SAH 通过 SAH 水解酶的作用转化为 Hcy,从而 Hcy 的蓄积必定会引起 SAH 体内含量增高;二是 SAH 和 Hcy 对肾脏有一定的毒性,必定会损害肾脏功能。中医认为肾元亏虚,毒损肾络,肾之体用俱病所致糖尿病肾病发生发展,而毒损肾络是糖尿病肾病的核心^[13]。在一定程度上,揭示了 SAH 和 Hcy 体内含量与中医辨证分型具有较好的相关性的原因(见图 2)。

同时,GSH 是反映体内氧化应激水平的重要物质,Cys-gly 是它的一种代谢产物。GSH 的主要功能是通过其巯基与体内的自由基结合,加速自由基的排泄,具有保护肝细胞膜、促进肝脏酶活性、抗氧化、解毒等作用^[14]。GSH 对降低 2 型糖尿病早期肾病患者尿清蛋白的排出也有很好的作用^[15]。它们在气阴两虚偏阴虚组患者体内含量明显降低,表明阴虚病人抗氧化能力下降,对于周围环境的抵御能力下降,更易

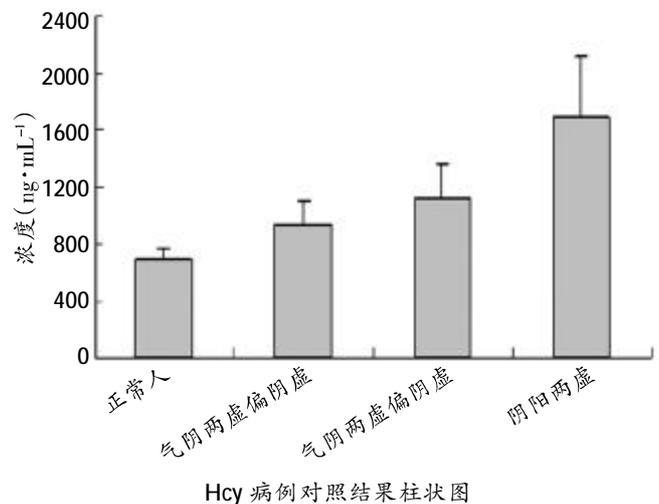
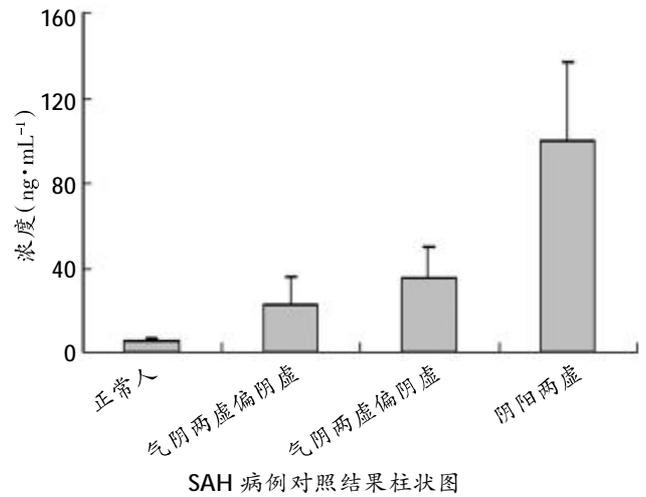


图 2 SAH 和 Hcy 的病例对照结果柱状图

受疾病侵害。鉴于其对疾病发展初期具有很好的灵敏度,适宜作为早期诊断的辅助指标。

中医证型客观化是中医辨证现代研究中的一个重要课题,它为深入研究中医证型的实质,量化辨证指标开辟了道路。血清肌酐和尿素氮的含量是西医公认的表征肾功能的重要指标,从中医辨证分型的临床常规检测数据可知,一定程度上表明了疾病的发展,但灵敏度较低。而 SAH、Hcy 等硫醇氨基酸对于 DN 的病程具有很好的相关性,表征了疾病发展,对于作为适合于中医辨证分型的量化指标具有重要的研究意义。

参考文献

- 1 王志伏,张雅玲.糖尿病肾病的中医辨证论治.辽宁中医杂志,2007,34(6):791-792.

- 2 Veldman BA, Vervoort G, Blom H, et al. Reduced plasma total homocysteine concentrations in type 1 diabetes mellitus is determined by increased renal clearance. *Diab Med*, 2005, 22:301-305.
- 3 李卫丽,景光光. 高同型半胱氨酸血症的中医病因病机探讨. *辽宁中医杂志*, 2006, 33 (4):412-413.
- 4 李磊, 刘建勋. 高同型半胱氨酸血症致动脉粥样硬化的生物学基础及中西医治疗. *中药药理与临床*, 2008, 24 (4):73-75.
- 5 Jiang ZT, Liang QL, Luo GA, et al. HPLC electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma aminothiols: Application to studies of diabetic nephropathy. *Talanta*, 2009, 77 (4): 1279-1284.
- 6 Xia JF, Liang QL, Hu P, et al. Recent trends in strategies and methodologies for metabonomics. *Chin J Anal Chem*, 2008, 37 (1):136-143.
- 7 Pang LQ, Liang QL, Wang YM, et al. Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal -phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy. *J Chromatogr B*, 2008, 869:118-125.
- 8 Xia JF, Liang QL, Liang XP, et al. Ultraviolet and tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 21 pivotal metabolites in plasma from patients with diabetic nephropathy. *J Chromatogr B*, 2008, 877:1930-1936.
- 9 Mogensen CE. Natural history of renal functional abnormal in human diabetes mellitus, from normal buminuria to incipient and overt nephropathy. *The Kidney in Diabetes Mellitus*. New York: Livingstone, 1989, 19.
- 10 牟新,周旦阳,赵进喜. 265例糖尿病肾病肾功能不全患者中医证候与实验室指标的典型相关性研究. *中华中医药杂志*, 2008, 23 (12): 1057-1060.
- 11 任燕,麻金木,任瑛. 中西医对慢性肾衰合并高同型半胱氨酸血症的认识. *长春中医药大学学报*, 2008, 24 (10):501-502.
- 12 刘铜华, 郑鸿雁. 糖尿病肾病的中医药诊治述要. *国际中医药杂志*, 2006, 28 (3):187-190.
- 13 王永炎,杨宝琴,黄启福. 络脉病与病络. *北京中医药大学学报*, 2003, 26 (4):1-2.
- 14 Isibashi F, Ishida K, Takashina S. The etiology of microalbuminuria in early NIDDM. *Diabetes*, 1990, 39:92-96.
- 15 高峰. 还原性谷胱甘肽对2型糖尿病早期肾病患者尿清蛋白排泄率的影响. *中国全科医学*, 2007, 10(19):1606-1608.

Relation Between the Plasma Aminothiols Level and TCM Syndrome Differentiation of Patients with Diabetic Nephropathy

Jiang Zhiting¹, Wang Yong¹, Liang Qionglin², Li Ping³, Luo Guoan², Wang Yiming²

(1. School of Pharmacy, East-China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China;

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

3. Clinical Medicinal Research Institute, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100092, China)

Abstract: Investigation of the potential biomarkers associated with the TCM diagnose of diabetic nephropathy is considered a contributing factor in facilitating TCM modernization and objectivity. This study carried out simultaneous quantitation of eight plasma aminothiols by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry, so as to compare the difference between cases and the control. Compared with healthy people, the patients with diabetic nephropathy had dramatically degraded plasma GSH and Cys-gly concentrations, and their plasma SAH, SAM, Hcy, Cysta and Cys level gradually increased with the disease progress. SAH and Hcy indicated the difference between the Yin deficiency and Yin-Yang deficiency groups, especially when significant variance of the SAH concentration existed between Qi deficiency and Yin-yang deficiency. The results showed that plasma GSH and Cys-gly concentration may assist the early TCM diagnose, and the SAH and Hcy levels are associated with the syndrome type.

Keywords: Aminothiols, Diabetic nephropathy, TCM syndrome differentiation

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立崴)