

基于代谢组学分析肾虚督寒型强直性脊柱炎代谢网络特点

梁伟东, 彭剑虹, 尹晓霞, 叶雪英, 陈少敬

(东莞市中医院风湿科, 广东东莞 523200)

摘要:【目的】通过检测肾虚督寒型强直性脊柱炎(AS)患者血清代谢谱, 结合证候研究及炎症指标, 探讨肾虚督寒型是否与患者内在代谢网络变化存在联系, 为中医证候现代化研究提供科学依据和物质基础。【方法】选取25例肾虚督寒型AS患者作为AS组, 另选取25例健康受试者作为对照组(健康组)。运用核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)技术, 结合模式识别、多元统计等方法, 分析AS组与健康组血浆中代谢物差异, 配合分析2组受试者的中医证候分布情况及血沉(ESR)、C反应蛋白(CRP)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等各项炎症指标的不同, 阐述肾虚督寒型AS的代谢特征和病理机制。【结果】(1)中医证候分布方面, AS组的腰痛、晨僵等主症及恶寒怕冷、四肢不温、梦中流涎、大便不调等次症的分布频率均明显高于健康组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(2)炎症指标方面, AS组的CRP、ESR、IL-6和TNF- α 水平均明显高于健康组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(3)基于代谢组学技术, 共筛选出19个代谢产物, 涉及酪氨酸通路、甘氨酸-苏氨酸代谢通路、苯丙氨酸通路、酮体通路、 β -丙氨酸通路、丙酮酸通路、氨酰tRNA生物合成、乙醛酸和二元酸通路等8条代谢通路。【结论】肾虚督寒型AS的病理机制可能与患者的能量代谢、氨基酸代谢、脂类代谢以及胃肠道菌群和免疫紊乱等代谢异常有关, 其从多方面影响脾-肾功能轴而发为本病。

关键词: 强直性脊柱炎; 肾虚督寒型; 核磁图谱($^1\text{H-NMR}$); 病理机制; 脾-肾功能轴

中图分类号: R259.932

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)06-1124-09

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.06.009

Analysis of the Characteristics of the Metabolic Network in Ankylosing Spondylitis Patients with the Syndrome of Deficiency of Kidney and Cold of Governor Vessel by Metabolomics Methods

LIANG Wei-Dong, PENG Jian-Hong, YIN Xiao-Xia,
YE Xue-Ying, CHEN Shao-Jing

(Dept. of Rheumatology, Dongguan Traditional Chinese Medicine Hospital, Dongguan 523200 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the possible relationship of syndrome of deficiency of kidney and cold of governor vessel with the changes of internal metabolic network of ankylosing spondylitis (AS) patients by examining the serum metabolic profile, exploring the distribution of syndrome manifestations, and detecting the inflammatory indicator levels, so as to supply scientific evidence and material basis for the research of modernization of traditional Chinese medicine (TCM) syndromes. **Methods** Twenty-five AS patients with the syndrome of deficiency of kidney and cold of governor vessel served as the AS group, and 25 healthy volunteers served as the control group. By using ^1H nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) technique and by combining with the methods of pattern recognition and multivariate statistical analysis, we analyzed the differences of plasma metabolites in AS group and control group, investigated the distribution of TCM syndrome manifestations in the two groups, and detected the levels of inflammatory indicators of erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), so as to clarify the metabolic characteristics and pathogenesis of AS patients with the syndrome of deficiency of kidney and cold of governor vessel. **Results** (1) In respect of TCM syndrome manifestations in AS patients with the syndrome of

收稿日期: 2020-08-05

作者简介: 梁伟东(1987-), 男, 硕士, 主治中医师; E-mail: 283905214@qq.com

基金项目: 广东省中医药局科技专项资金资助项目(编号: 20194013)

deficiency of kidney and cold of governor vessel, AS group had higher occurrence rates of the primary symptoms of lumbago and morning stiffness, and higher occurrence rates of the secondary symptoms such as aversion to cold, cold limbs, slobbering at the night and abnormal stool than the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). (2) In respect of the inflammatory indicators, AS group had higher levels of CRP, ESR, IL-6 and TNF- α than the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). (3) Based on metabolomics analysis, we screened out 19 metabolites, which involved 8 metabolic pathways of tyrosine pathway, glycine - threonine metabolic pathway, phenylalanine pathway, ketone body pathway, β -alanine pathway, pyruvate pathway, aminoacyl tRNA biosynthesis, glyoxylic acid and dibasic acid pathways. **Conclusion** The pathogenesis of AS with the syndrome of deficiency of kidney and cold of governor vessel may be related to the metabolic disturbances such as energy metabolism disorder, amino acid metabolism disorder, lipid metabolism disorder and gastrointestinal flora disorder and immune disorders, which affect the spleen-kidney functional axis in many ways and lead to the occurrence of the disease.

Keywords: ankylosing spondylitis; syndrome of deficiency of kidney and cold of governor vessel; ^1H nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$); pathogenesis; spleen-kidney functional axis

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种以累及中轴关节为主,以骶髂关节和脊柱附着点炎症为主要症状的疾病,表现为脊柱疼痛、僵直等不适,并逐渐出现脊柱畸形,最终可导致残疾,使人失去生活自理能力,从而给家庭和社会带来沉重的负担^[1-2]。AS的发病人群多以青少年男性为主,发病原因尚未明确,可能与人类白细胞表面抗原B27(HLA-B27)及遗传相关,并受后天环境影响^[3]。临床发现,本病往往伴随怕冷、四肢冰冷、梦中流涎等一系列肾虚表现,西医难以解释其伴随症状的产生机制且对其处理效果欠佳。本病属于祖国医学“大偻”范畴,目前多数学者认为其病机为肾虚督寒,并且证实在此病机认识的基础上采用中医药治疗具有明显优势。但由于认识上存在一定的主观性,以及辨证分型的不统一,从而影响了其在临床的有效推广应用。

代谢组学是一门对生物体内所有代谢物进行定量分析,研究生物体在不同状态下机体内代谢物变化的学科,通过结合证候研究,以寻找该变化与证候特征的内在联系,从而揭示机体生命活动的代谢本质^[4]。基于此,本研究创新性收集肾虚督寒型AS患者证候样本并结合现代技术进行代谢产物谱分析,从代谢网络水平揭示AS与证候变化的内在联系,为下一步研究和寻找中药的作用靶点提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集2019年1月至2019年10月在东莞市中医院门诊或住院部接受治疗的25例肾虚督寒型AS患者作为AS组;另外,收集同期来自东莞市中医院体检中心的健康受试者25例作为对照组(健康组)。本研究已通过东莞市中医院伦理委员会的审查,并且所有受试者均签署了知情同意书。

1.2 病例选择标准

1.2.1 诊断标准 西医诊断标准:强直性脊柱炎的诊断参照1984年美国风湿病学会修订的纽约标准。中医辨证标准:参照国家中医药管理“十一五”重点专科协作组制定的《大偻(强直性脊柱炎)诊疗方案》中关于肾虚督寒型的中医辨证标准。

1.2.2 纳入标准 ①符合强直性脊柱炎的诊断标准;②符合肾虚督寒型的中医辨证标准;③年龄介于16~60岁的患者。

1.2.3 排除标准 ①妊娠期或哺乳期妇女;②年龄小于16岁或大于60岁者;③合并有糖尿病、冠心病、肾功能不全等基础疾病的患者;④同时患有其他风湿免疫性关节炎如白塞氏病、银屑病性关节炎的患者;⑤合并有感染等急性并发症的患者。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 试剂 无水磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)来自广州广试仪器有限公司,二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

来自粤侨有限公司,重水(D₂O)来自杭普实验器材有限公司。

1.3.2 实验仪器 超导核磁共振波谱仪(Varian NMR System 500MHz,美国瓦里安有限公司);全自动生化分析仪BS-220(迈瑞,武汉盛世达医疗设备有限公司);微孔板振荡器(无锡杰瑞安仪器设备有限公司);核磁管(宁杭普实验器材有限公司);TGL-20M台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。

1.4 研究内容 分析AS组与健康组血浆中代谢物差异,并配合分析2组受试者的中医证候分布情况(主证包括腰痛、晨僵,次证包括恶寒怕冷、四肢不温、梦中流涎、大便不调)及血沉(ESR)、C反应蛋白(CRP)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)等各项炎症指标的不同,以阐述肾虚督寒型AS的代谢特征和病理机制。

1.5 研究方法

1.5.1 样品预处理 分别抽取AS患者及健康受试者血样6 mL,在4℃、频率为10 000 Hz下离心10 min,吸取上层血清300 μL至核磁管中,加入0.2 mol/L磷酸平衡液(pH = 7.4) 200 μL和重水50 μL,振荡混匀。

1.5.2 核磁共振氢谱(1H-NMR)的测定分析 在25℃条件下,设置脉冲序列为Carr-Purcell-Meiboom-Gill,谱宽为10 000 Hz,回波时间为1 ms,进行64 k采样点数,64次循环次数,128次叠加次数核磁扫描。核磁信号经过傅立叶变换转为图谱。

1.5.3 图谱处理 使用专业软件MestReNova(version 8.0.1)进行图谱分析,把乳酸峰(δ 1.33)作为化学位移参考峰,对所得图谱进行相位、基线调整并自动积分,其区域规定为δ 0.5~9.0,以0.005 ppm为积分间隔。消除δ 4.7~5.1区域水峰(积分值设为零),将所得积分数据归一化处理,以Excel形式保存,进行下一步多元化统计。

1.6 数据处理和统计分析 把上述积分数据导入

SIMCA-P14.0软件(Umetrics,瑞典)进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)。作为评估模型验证参数的R²和Q²,大于50%提示模型统计有效。OPLS-DA结果使用得分图(score plot)和载荷图(loading plot)的形式表示。通过分析得分图中组间积分差异化学位移,在载荷图找出对这种差异的贡献值,并结合一维NMR谱图峰值变化,寻找相对应的代谢产物。其他实验数据使用SPSS 21.0统计软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用*t*检验;计数资料用率或构成比表示,组间比较采用χ²检验。以*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组受试者基线资料比较 AS组25例受试者中,男14例(占56.0%),女11例(占44.0%);平均年龄(31.64 ± 4.23)岁。健康组25例受试者中,男14例(占56.0%),女11例(占44.0%);平均年龄(30.91 ± 3.87)岁。2组受试者的性别、年龄等基线资料比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05),具有可比性。

2.2 2组受试者证候分布情况比较 表1结果显示:AS组的腰痛、晨僵等主症及恶寒怕冷、四肢不温、梦中流涎、大便不调等次症的分布频率均明显高于健康组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05或*P* < 0.01)。

2.3 2组受试者各项炎症指标比较 表2结果显示:AS组的CRP、ESR、IL-6和TNF-α水平均明显高于健康组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),提示AS患者处于炎症活动期。

2.4 2组受试者血浆中代谢物差异分析

2.4.1 2组受试者血浆中代谢物的1H-NMR分析 结果见图1。通过观察健康组和AS组血浆中代谢物的1H-NMR分析图谱(化学位移区间δ 0.5~

表1 2组受试者的证候分布情况比较

Table 1 Distribution of the syndrome manifestations in the two groups

[例(%)]

组别	例数(例)	主症		次症			
		腰痛	晨僵	怕冷恶寒	四肢不温	梦中流涎	大便不调
强直性脊柱炎(AS)组	25	25(100.0) ^②	25(100.0) ^②	18(72.0) ^①	16(64.0) ^①	12(64.0) ^①	13(52.0) ^①
健康组	25	0(0.0)	1(4.0)	8(32.0)	8(32.0)	5(20.0)	6(24.0)
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

①*P* < 0.05, ②*P* < 0.01, 与健康组比较

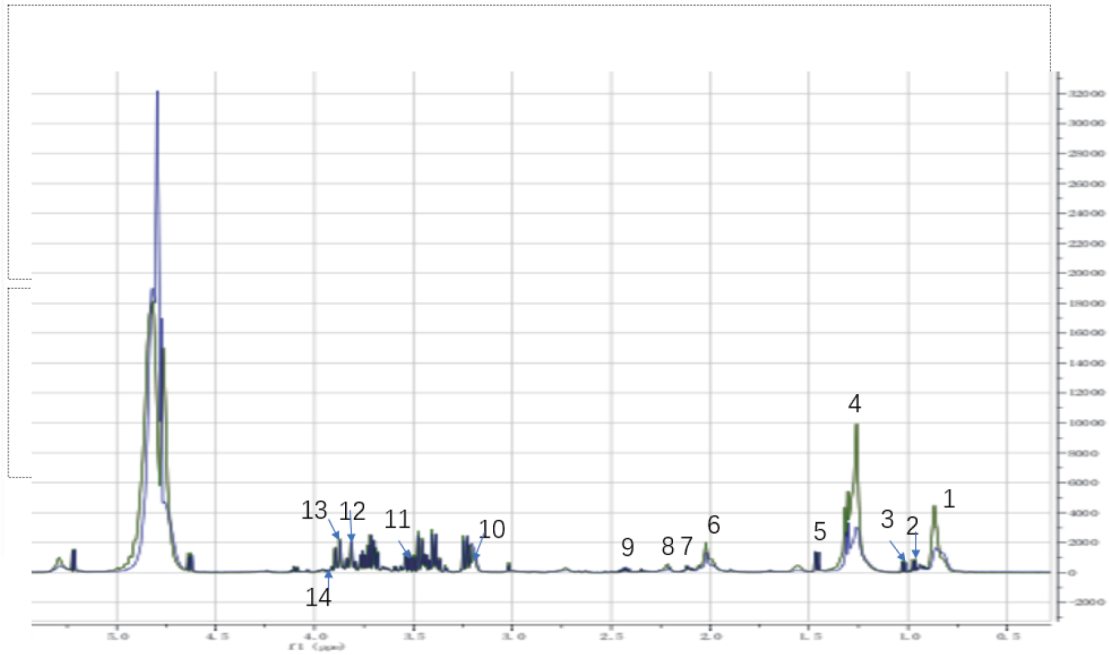
表2 2组受试者各项炎症指标比较

Table 2 Comparison of the levels of inflammatory indicators in the two groups

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	CRP(mg·L ⁻¹)	ESR(mm·h ⁻¹)	IL-6(ng·L ⁻¹)	TNF-α(ng·L ⁻¹)
强直性脊柱炎(AS)组	25	22.56 ± 3.74 ^①	35.00 ± 6.41 ^①	45.50 ± 7.12 ^①	13.80 ± 3.15 ^①
健康组	25	7.89 ± 2.69	14.00 ± 3.93	22.10 ± 6.43	9.10 ± 4.01
P值		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

①P < 0.05, 与健康组比较



红线: AS组; 绿线: 健康组。其中: 1. 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C); 2. 亮氨酸; 3. 缬氨酸; 4. 乳酸; 5. 苯丙氨酸; 6. 脂类化合物; 7. 谷氨酸盐; 8. N-乙酰糖蛋白; 9. α-酮戊二酸; 10. 甘氨酸; 11. 脯氨酸; 12. 脯氨酸; 13. 马尿酸盐; 14. 甜菜碱

图1 强直性脊柱炎(AS)组和健康组血浆中代谢物的1H-NMR分析结果

Figure 1 1H-NMR analysis results for the plasma metabolites in the AS group and healthy control group

9,放大8倍)的差异,并结合COSY、TOCSY、HSQC等数据库^[5-8],对2组受试者存在差异的代谢物进行峰值归属,并查找其对应的代谢产物。结果发现,14种代谢产物可在肉眼被区分,对于差异较少的代谢物,需要进行多元统计,以进一步挖掘存在差异的代谢产物。

2.4.2 2组受试者血浆中代谢物的非监督PCA分析 对健康组与AS组的代谢物进行非监督PCA分析。由图2可见,由于健康志愿者处于相对稳定代谢状态,故分布相对集中,在组间差异中,2组基本能区分开,但仍有部分重叠(PC1 vs. PC2, R2=88.8%, Q2 = 71.1%),提示模式良好。为取得更有意义统计结果,故进一步行PLS-DA和OPLS-DA分析。

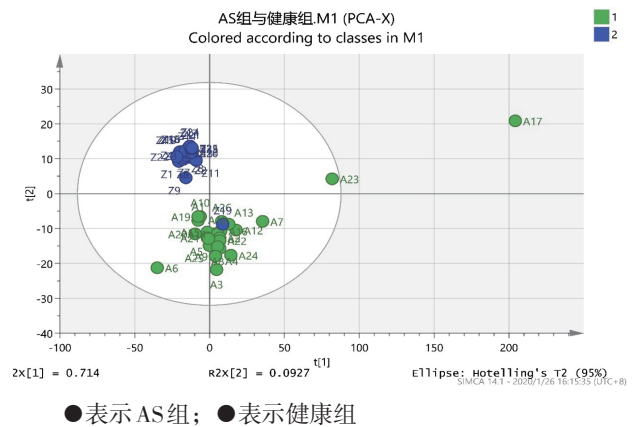
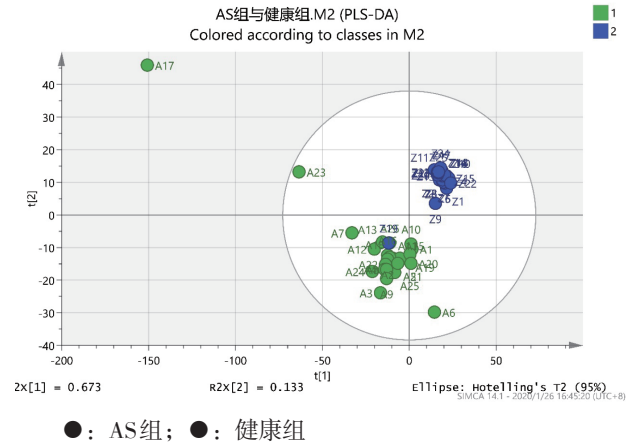


图2 强直性脊柱炎(AS)组和健康组血浆中代谢物的PCA分析图

Figure 2 PCA analysis results for the plasma metabolites in the AS group and healthy control group

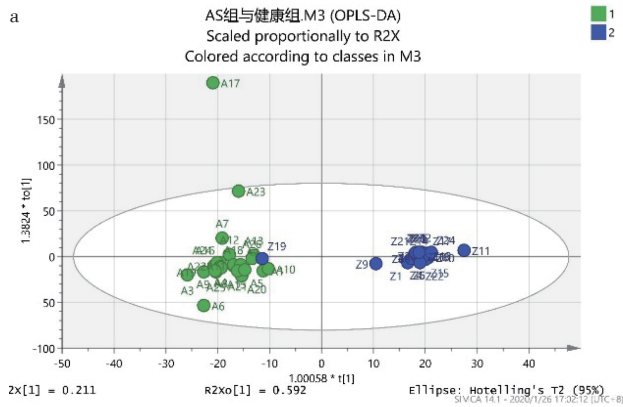
2.4.3 2组受试者血浆中代谢物 1H-NMR 的 PLS-DA 和 OPLS-DA 分析 进一步行 PLS-DA 分析, 结果如图 3 [R_{2x}=80.6%, R_{2y}=90.1%, Q₂(cum)=82.7%]。由得分图可以看出, 2 组的组间分布得到完全分开, 但组内存在个别样本分布相对分散。为寻找与发病机制及证型相关的代谢物, 再次进行 OPLS-DA 分析, 以提高模式识别方法的判定能力, 得到结果如图 4-a [R_{2x}=83.9%, R_{2y}=91.9%, Q₂(cum)=88.4%]。从图中可以看出, 组间无交叉和重叠, 且 2 组各自集中分布, 表明其模式是有效的。进一步行组间 OPLS-DA 结果的载荷图分析 (图 4-b), 取权重系数 (VIP) > 1, 发现 94 个差异变量, 结合实际图谱, 筛选出其中的 19 个代谢物, 分别为 HDL-C、异白氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脂类化合物、N-乙酰天冬酰胺、谷氨酸盐、α-酮戊二酸、甘氨酸、马尿酸盐、酪氨酸、苯丙氨酸、甜菜碱、谷氨酰胺、脯氨酸、缬氨酸、胆



●: AS组; ●: 健康组
图3 强直性脊柱炎(AS)组和健康组血浆中代谢物 1H-NMR 的 PLS-DA 分析图

Figure 3 PLS-DA graph of 1H-NMR analysis results for the plasma metabolites in the AS group and healthy control group

碱、精氨酸、苏氨酸。

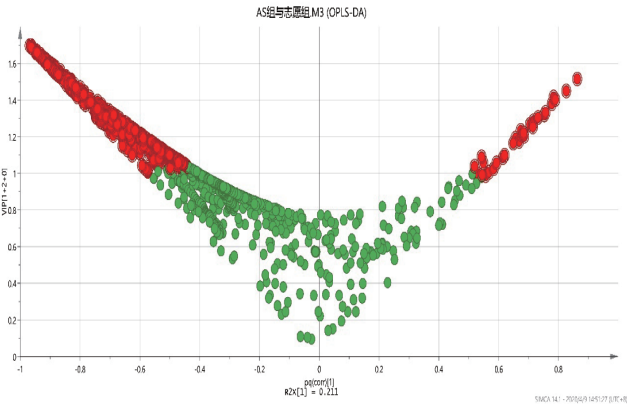


●表示 AS 组; ●表示健康组

图4 强直性脊柱炎(AS)组和健康组血浆中代谢物 1H-NMR 的 OPLS-DA 分析得分图(a)与载荷图(b)

Figure 4 OPLS-DA graph score plot(a) and loading plot(b) of 1H-NMR analysis results for the plasma metabolites in the AS group and healthy control group

为了更直观地表示代谢物变化趋势及其贡献, 采用建立 coefficient-loading 相关图的形式来表现代谢物的变化, 运用 back-scaling 的数据处理模式, 得到的图谱为 NMR 图谱的形状^[9]。结果见图 5 和表 3。由于把健康组作为参考组进行对比, 故图中向上的代谢峰说明 AS 患者的代谢物水平下降, 而向下的代谢峰则说明 AS 患者的代谢物水平上升。从图中的颜色分布可知, 颜色越红表示贡献率越大, 即相应的代谢物在 2 组之间的差异越显著; 颜色越蓝表示贡献率越小, 即相应的代谢物



在 2 组之间的差异越不显著。由于本研究的研究人数为 50 例, 查阅相关系界值数表, 可以得出其相关系数临界值 |r| 为 0.556, 表示如果代谢物的相关系数的绝对值大于 0.556, 即可说明该代谢物的变化具有显著性差异。从表 3 结果可以看出, 与健康组相比, AS 组中的 HDL-C、异白氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、N-乙酰天冬酰胺、脂类化合物、谷氨酸盐、α-酮戊二酸、甘氨酸、肌醇、马尿酸盐及酪氨酸水平上升, 而胆碱、丙氨酸、甜菜碱、谷氨酰胺、脯氨酸、缬氨酸、二甲胺、精氨

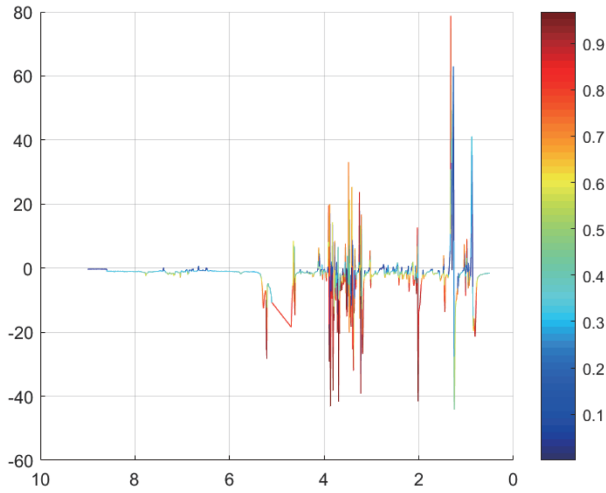


图5 强直性脊柱炎(AS)组和健康组代谢产物差异对比图
Figure 5 Differences in the plasma metabolites in the AS group and healthy control group

表3 2组受试者差异代谢产物的名称及变化趋势
Table 3 The differential metabolites and their variation trend in the AS group and healthy control group

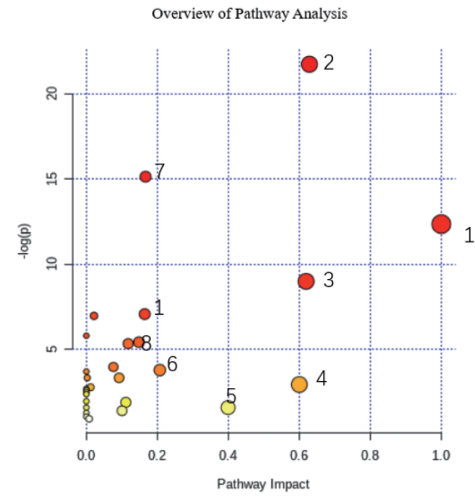
化学位移	代谢物	相关系数 r	变化趋势
0.82	HDL-C	0.885	↑
1.01	异白氨酸	0.860	↑
0.97、3.65	亮氨酸	0.923	↑
1.02	异亮氨酸	0.903	↑
1.04	缬氨酸	0.637	↓
1.47、3.77	丙氨酸	0.704	↓
	N-乙酰天冬酰胺	0.847	↑
2.02	脂类化合物	0.964	↑
2.05	谷氨酸	0.928	↑
2.45、3.02	α-酮戊二酸	0.877	↑
3.18	甘氨酸	0.946	↑
3.22	胆碱	0.752	↓
3.24	精氨酸	0.565	↓
3.26	氧化三甲胺	0.862	↓
3.27、3.91	甜菜碱	0.760	↓
3.35	脯氨酸	0.656	↓
3.68	马尿酸盐	0.947	↑
3.48	苏氨酸	0.714	↓
3.78	谷氨酰胺	0.648	↓
	三甲胺	0.731	↓
7.17	酪氨酸	0.617	↑

↑: 上升; ↓: 下降

酸、苏氨酸的水平下降。

2.5 潜在代谢通路分析 通过分析代谢物的变化能够更好地体现人体代谢信息网络, 寻找异常代

谢通路。把筛选出来的19种代谢输入MetaboAnalyst 4.0进行分析, 综合Holm P值、FDR(false discovery rate)值和Impact值, 共发现多条重要的代谢通路, 其中前8条Pathway Impact > 0.1, 被列为最主要的代谢途径(图6), 它们分别为酪氨酸通路、甘氨酸-苏氨酸代谢通路、苯丙氨酸通路、酮体通路、β-丙氨酸通路、丙酮酸通路、氨酰tRNA生物合成、乙醛酸和二元酸通路。根据实验结果, 结合KEGG数据库, 涉及到的代谢通路包括能量代谢、葡萄糖代谢、氨基酸代谢、脂类代谢以及胃肠道菌群及免疫紊乱, 其从多方面影响脾-肾轴功能, 从而形成肾虚督寒基本病机(图7)。



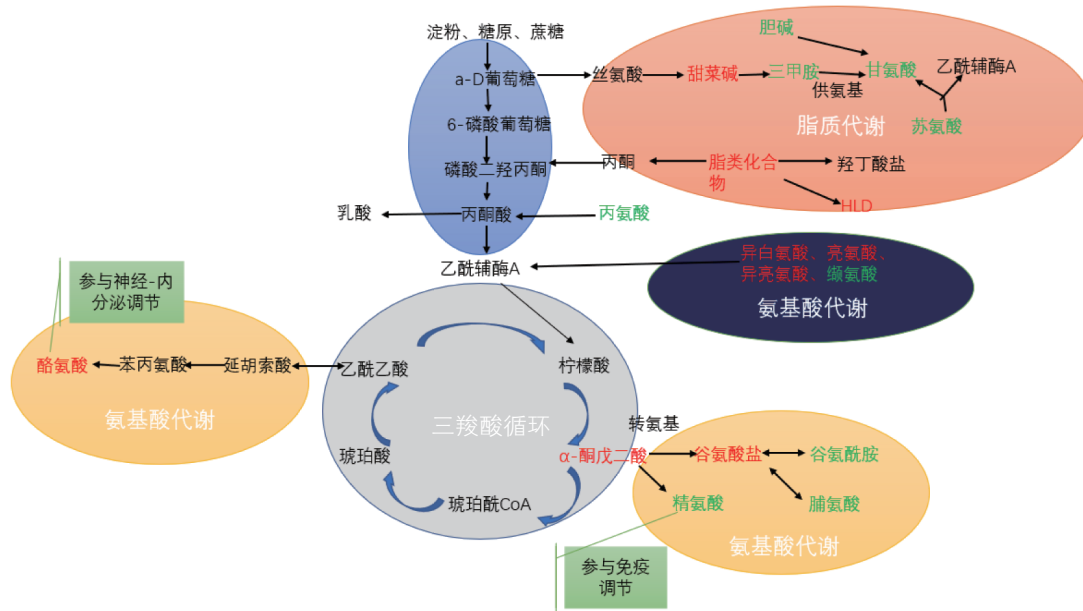
1: 酪氨酸通路; 2: 甘氨酸-苏氨酸代谢通路; 3: 苯丙氨酸通路; 4: 酮体通路; 5: β-苯丙氨酸通路; 6: 丙酮酸通路; 7: 氨酰tRNA生物合成; 8: 乙醛酸和二元酸通路

图6 强直性脊柱炎(AS)患者代谢网络分析图

Figure 6 Metabolic network analysis for the AS patients

3 讨论

强直性脊柱炎(AS)属于中医学“大偻”“腰痛”等范畴, 大多数医家认为本病与肾有关。《脉要精微论》曰:“腰者肾之府, 转摇不能, 肾将惫矣。”《医学衷中参西录》曰:“凡人之腰疼, 皆脊梁处作疼, 此实督脉主之……肾虚者, 其督脉必虚, 是以腰疼。”张锡纯认为, 脊髓袋, 即尾闾关, 其位于督脉, 却源自命门, 连接任脉, 任脉属阴, 督脉属阳, 是孕育精气, 封藏元气的地方。由于本虚邪胜, 元气失于潜藏, 督脉失养而生本病。全国名老中医王庆国教授认为, 本病以肾虚督脉失养为本, 寒湿、热瘀等为标, 邪阻督脉, 气血亏虚, 而发为本病^[10]。我们从证候研究发



注：把治疗前定义为观察对象，红色表示升高，绿色表示降低

图7 强直性脊柱炎(AS)患者肾虚督寒机制代谢通路分析图

Figure 7 Analysis of the pathway of the metabolites in the AS patients with the syndrome of deficiency of kidney and cold of governor vessel

现，AS患者多表现为腰背部或骶髂部疼痛，夜间明显，以及晨僵等，逐渐累积至整条脊柱督脉所过之处，且伴随怕冷、四肢不温等肾虚表现，提示本病发生与先天不足、肾虚督寒有关。我们同时发现，患者出现梦中流涎、大便不调等脾虚湿阻表现，推测后天脾土参与疾病发生的全过程，因脾失运化，痰湿内生，土湿克肾水，阻碍经络，从而加重肾虚督亏的情况。基于代谢组学，结合炎症指标检测结果，我们进一步研究发现，与健康体检者相比，肾虚督寒型AS患者的代谢网络存在异常，以下从不同的代谢途径展开讨论。

3.1 能量代谢异常与AS的关系 丙氨酸是参与葡萄糖代谢的重要产物，作为非必需氨基酸，在肝脏脱去氨基变成丙酮酸，后者再作为载体，经肝的糖异生再次生成葡萄糖，输送到肌肉进行有氧代谢。我们发现AS患者丙氨酸水平升高，提示外周肌肉组织对葡萄糖利用障碍。而中医学认为，脾主四肢，若脾阳虚衰，则四肢不温。因此，本研究中大部分患者具有四肢不温症状，我们推测这可能与外周肌肉对葡萄糖的利用减少有关。

葡萄糖进行有氧代谢，生成丙酮酸，随后进入三羧酸循环。后者经异构并氧化脱羧生成 α -酮

戊二酸，再氧化脱氨生产谷氨酸，在此过程中为机体提供能量，维持正常生命活动活力。我们发现AS患者 α -酮戊二酸及谷氨酸水平升高，提示代谢途径受阻，存在能量代谢异常。同时我们发现AS患者多表现为腰痛，夜间尤甚，以及恶寒怕冷、四肢不温等一派虚寒之象，谢国倩等^[14]认为与患者肾-脾轴功能减退相关。由于有氧代谢均在线粒体发生，因此我们推测患者肾-脾轴功能可能与线粒体功能异常相关。

3.2 脂质代谢通路与AS的关系 胆碱是组成卵磷脂的主要成分，在肝脏与肾脏中进一步生产甜菜碱，后者内含三个活性甲基，具有高度化学活性，可分解为三甲胺，提供甲基以合成甘氨酸。甜菜碱及甘氨酸均具有调节炎症反应作用，抑制炎症细胞因子的转录，使炎症因子及氧自由基合成下降，同时改善脂类代谢，降低机体炎症反应^[12-13]。N-乙酰天冬酰胺与胆碱结合，生成磷脂酰胆碱。CUPPEN B V J等^[14]研究发现，磷脂酰胆碱与CRP结合以启动宿主免疫反应，而脂肪酸具有促进炎症效果，能与IL-6、TNF- α 等抗炎分子的前体相结合，释放炎症介质。He Z X等^[15]通过检测AS患者粪便代谢物发现类固醇化合物存在性别差异，但AS发病率是否与性别相关，目前尚未见相

关报道。

本研究发现AS患者的胆碱、甜菜碱、三甲胺水平下降,甘氨酸及脂类化合物水平上升,提示患者甜菜碱-甘氨酸代谢通路、胆碱、脂质代谢通路异常,而且CRP、ESR、IL-6及TNF- α 等炎症指标明显升高,因此我们推测上述通路参与炎症反应激活途径。

3.3 氨基酸代谢通路与AS的关系 本研究发现AS患者的氨基酸水平发生异常。支链氨基酸包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等,经脱氨基生成糖类、酮类,后者形成乙酰辅酶A,进入三羧酸循环。AS患者的上述3种氨基酸含量上升说明氨基酸代谢发生异常改变,使得氨基酸不能正常地进入三羧酸循环,糖酵解增强,从而增加氧化应激及细胞受损^[16]。

人体中有多种神经-内分泌调节活性物质如肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺等,酪氨酸是这些物质合成的基础^[17]。它是由苯丙氨酸羟基化生成,为神经递质合成前体。本研究发现AS患者的酪氨酸水平上升,提示酪氨酸代谢通路受阻,我们推测其可能对神经-内分泌调节产生影响,从而造成患者怕冷、梦中流涎等肾虚表现,这有助于进一步解释AS患者肾虚督寒的形成机制。

3.4 免疫功能紊乱与AS的关系 苏氨酸具有促进磷脂合成及使脂肪酸进一步氧化,作为免疫球蛋白的主要合成原料,参与人体免疫反应,其缺乏时,影响免疫代谢,降低人体抵抗病毒与体内细胞异常增殖的能力下降^[18]。本研究发现患者的苏氨酸水平下降,提示AS患者存在免疫异常。

脯氨酸、精氨酸均参与人体细胞凋亡。郭棚^[19]研究发现,在体外培植时,增加精氨酸可使母猪滋养层细胞增殖增加,细胞凋亡受抑制。而脯氨酸能加速牙釉质修复,在代谢中,生产羟脯氨酸和羟赖氨酸,后者是合成胶原蛋白,促进软骨愈合的原料。AS患者大多表现为骶髂关节软骨破坏,骨质增生融合,同时合并外周关节附着点炎症,这些表现均与软骨及胶原蛋白异常有关。中医认为,肾主骨,藏精而生髓。病理情况下,肾虚元气失藏,不能生髓,“髓”功能异常,临床表现为腰痛、晨僵、脊柱活动指数下降。本研究发现,AS患者的脯氨酸、精氨酸代谢下降,引起免疫功能紊乱,细胞凋亡加快,软骨修复减慢,从

而导致骶髂关节炎症,是“肾主髓”功能下降的表现形式之一。

3.5 肠道功能紊乱与AS的关系 在人体肠道绒毛上部成熟线粒体中,存在谷氨酸-谷氨酰胺循环,谷氨酸与谷氨酰胺互相转换,生产大量三磷酸腺苷(ATP),为肠内营养代谢提供能量,能有效改善脓毒症患者肠黏膜屏障功能^[20-21]。本研究发现AS患者谷氨酰胺水平下降,谷氨酸盐水平上升,比例失调,提示谷氨酸-谷氨酰胺循环障碍,肠道能量利用受阻。中医的脾主运化,应涵盖了现代医学胃肠道功能范畴。脾土久虚(肠道能量不足),气血生化无源,可进一步导致肾虚失养而引发本病,故我们推测谷氨酸-谷氨酰胺循环障碍可能是其发病机制之一。

肠道微生物将饮食中的芳香族化合物分解成苯酸盐,后者在肝肾中与甘氨酸结合,形成马尿酸盐,是肠道菌群代谢产物,参与肠道炎症反应。临床研究^[22-23]发现,AS患者往往伴发腹泻、腹痛等炎症肠病。我们的证候研究结果也提示大部分AS患者伴随大便不调情况,可能与肠道菌群代谢失调相关。脾虚生湿,湿浊内陷,湿土克于肾水,影响脾-肾功能轴而发为本病。因此,我们推测脾虚生“湿”,可能与胃肠道菌群失调有关,需要后续进一步研究。

综上所述,本研究使用¹H-NMR技术的代谢组学方法,探讨了肾虚督寒型AS患者血中代谢产物的变化趋势,初步筛选出亮氨酸、异亮氨酸、脂类化合物、谷氨酸盐、 α -酮戊二酸、甘氨酸、马尿酸盐、酪氨酸、苯丙氨酸、甜菜碱、谷氨酰胺、脯氨酸、缬氨酸、胆碱、三甲胺、精氨酸、苏氨酸等物质作为本病的早期诊断的潜在生物标志物,涉及8条代谢通路。提示肾虚督寒型AS的发病机制可能与患者的能量代谢、氨基酸代谢、脂类代谢以及胃肠道菌群和免疫紊乱等代谢异常有关,从而从多方面影响脾-肾功能轴而形成肾虚督寒病机。但由于我们仅分析血清中的代谢,具有一定局限性,仍需要后期完善免疫复合物检测及病理,来验证本研究结论。

参考文献:

- [1] 刘斌. 强直性脊柱炎免疫遗传学发病机制的研究进展[J]. 中国临床医学, 2019, 26(1): 117-121.
- [2] 张莉, 沈海丽. 老年强直性脊柱炎患者临床治疗及生活质量现

- 况分析[J].中国地方病防治杂志, 2018, 33(2): 177-178.
- [3] TAUROG J D, CHHABRA A, Colbert R A. Ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(13): 1303.
- [4] MENNI C, ZIERER J, VALDES A M, et al. Mixing omics: combining genetics and metabolomics to study rheumatic diseases[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(3): 174-181.
- [5] BOLLARD M E, CONTEL N R, EBBELS T M, et al. NMR-based metabolic profiling identifies biomarkers of liver regeneration following partial hepatectomy in the rat[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(1): 59-69.
- [6] HUO T G, CAI S, LU X M, et al. Metabonomic study of biochemical changes in the serum of type 2 diabetes mellitus patients after the treatment of metformin hydrochloride[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(4): 976-982.
- [7] JANKEVICS A, LIEPINSH E, LIEPINSH E, et al. Metabolomic studies of experimental diabetic urine samples by ¹H NMR spectroscopy and LC/MS method[J]. *Chemometr Intell Lab*, 2009, 97(1): 11-17.
- [8] ZHANG L M, YE Y F, AN Y P, et al. Systems responses of rats to aflatoxin B1 exposure revealed with metabonomic changes in multiple biological matrices[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(2): 614-623.
- [9] NAKANO Y, FORSPRECHER J, KAARTINEN M T. Regulation of ATPase activity of transglutaminase 2 by MT1-MMP: implications for mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(1): 260-269.
- [10] 雷超芳, 翟昌明, 任北大, 等. 王庆国教授从肾督论治强直性脊柱炎经验探析[J]. *环球中医药*, 2019, 12(5): 786-788.
- [11] 谢国情, 何晓瑾, 金实, 等. 从肾-脾轴论治强直性脊柱炎[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(1): 11-13.
- [12] 向家培, 华晓芳. 甜菜碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤炎症及心肌细胞凋亡的影响[J]. *安徽医学*, 2018, 39(11): 2197-2200
- [13] 陈丽虹. 不同刮痧方案治疗腰椎间盘突出症的代谢组学及临床操作流程规范研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [14] CUPPEN B V J, FU J, WIETMARSCHEN H A V, et al. Exploring the inflammatory metabolomic profile to predict response to TNF- α inhibitors in rheumatoid arthritis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163087.
- [15] HE Z X, WANG M Z, LI H C, et al. GC-MS-based fecal metabolomics reveals gender-attributed fecal signatures in ankylosing spondylitis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1476.
- [16] HU NIE Y, CHEN S, et al. Leucine reduces reactive oxygen species levels via an energy metabolism switch by activation of the mTOR-HIF-1 α pathway in porcine intestinal epithelial cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 89: 42-56.
- [17] 孙竺. 血管性认知障碍大鼠神经递质与学习记忆及负性情绪相关性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2019.
- [18] 甄毕贤, 贾连群, 杨关林. 四君子汤治疗脾气虚证大鼠的血清代谢物谱群特征研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(3): 1234-1237.
- [19] 郭棚. 精氨酸对初产母猪繁殖性能及胎盘滋养层细胞增殖的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [20] SZE W H, HANI E N, NAGENDRA P S. Effects of supplementation of citrulline and *Lactobacillus helveticus* ASCC 511 on intestinal epithelial cell integrity[J]. *J Funct Foods*, 2020, 64(10): 103571.
- [21] 黄丹, 王学东, 段钰萍, 等. 谷氨酰胺对脓毒症患者肠粘膜屏障功能和免疫功能的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(14): 2733-2735.
- [22] WEN C, ZHENG Z, SHAO T, et al. Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis[J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 142.
- [23] CICCIA F, RIZZO A, TRIOLO G. Subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2016, 28(1): 89-96.

【责任编辑：陈建宏】