

· 临床研究 ·

# 关节液代谢组学在类风湿关节炎诊断及寒热证候分型中的应用

胡钢锋<sup>1</sup>, 肖鲁伟<sup>2</sup>, 童培建<sup>3</sup>

(1. 浙江省杭州市萧山区第一人民医院, 浙江 杭州 311201;

2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 3. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

**摘要 目的:**探讨关节液代谢组学在类风湿关节炎诊断及寒热证候分型中的价值。**方法:**采集 12 例类风湿关节炎患者(寒湿阻络证 6 例, 湿热阻络证 6 例)和 7 名健康志愿者的膝关节液, 对其进行气相色谱-质谱分析, 并对选定的主要色谱峰的气相色谱-质谱分析数据进行主成分分析。**结果:**共选定 23 个主要色谱峰为共有峰描述关节液化学组成特征, 健康志愿者和类风湿关节炎患者的气相色谱-质谱分析总流离子图总体特征基本相同。经主成分分析将 23 个描述关节液化学组成特征的色谱峰综合成 4 个主成分。对所有被测试者的关节液样品进行主成分分析, 在第 3 和第 4 主成分得分图中类风湿关节炎患者的关节液样品得分分布集中, 健康志愿者关节液样品得分分布较为分散。单独对类风湿关节炎患者的关节液样品进行主成分分析, 在第 3 和第 4 主成分得分图中湿热阻络证患者和寒湿阻络证患者的关节液样品得分分布均较为集中。**结论:**膝关节液的代谢组数据能准确区分类风湿关节炎患者和健康志愿者, 以及类风湿关节炎湿热阻络证和寒湿阻络证患者, 为类风湿关节炎的诊断及其中医证候量化分型提供了一种思路。

**关键词** 关节炎; 类风湿; 诊断; 证候; 湿热; 寒湿; 代谢组学; 主成分分析

## Application of joint fluid metabolomics to diagnosis and COLD-HEAT SYMPTOM COMPLEX typing in patients with rheumatoid arthritis

HU Gangfeng<sup>1</sup>, XIAO Luwei<sup>2</sup>, TONG Peijian<sup>3</sup>

1. The First People's Hospital of Xiaoshan district in Hangzhou, Hangzhou 311201, Zhejiang, China.

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China.

3. Zhejiang Provincial hospital of TCM, Hangzhou 310006, Zhejiang, China.

**ABSTRACT Objective:** To explore the value of joint fluid metabolomics in diagnosis and COLD-HEAT SYMPTOM COMPLEX typing of rheumatoid arthritis(RA). **Methods:** The knee joint fluid of 12 patients with RA( COLD-DAMPNESS BLOCK COLLATERALS(寒湿阻络) in 6 patients and DAMPNESS-HEAT BLOCK COLLATERALS(湿热阻络) in 6 patients) and 7 healthy volunteers were collected respectively and gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) was performed on the samples. The principal component analysis(PCA) was performed on GC-MS data of selected main chromatographic peak. **Results:** Twenty-three main chromatographic peaks were selected as common peaks for describing the chemical composition characteristics of joint fluid. The general characteristics of GC-MS total ion chromatogram of healthy volunteers was basically the same as that of RA patients. Twenty-three chromatographic peaks for describing the chemical composition characteristics of joint fluid were integrated into four principal components by using PCA. The PCA were performed on joint fluid samples of all the subjects. The scores of joint fluid samples of RA patients were characterized by concentrated distribution in the third and fourth principal component score plots, while those of healthy volunteers were characterized by relative dispersion. The PCA were performed only on joint fluid samples of RA patients, and the results showed that the scores of joint fluid samples were characterized by relative dispersion distribution in both patients with DAMPNESS-HEAT BLOCK COLLATERALS and patients with COLD-DAMPNESS BLOCK COLLATERALS in the third and fourth principal component score plots. **Conclusion:** The metabolome data of knee joint fluid can be used to accurately distinguish RA patients from healthy volunteers and distinguish DAMPNESS-HEAT BLOCK COLLATERALS from COLD-DAMPNESS BLOCK COLLATERALS, therefore it provides a new way for diagnosis and TCM symptom complex quantitative classification of RA.

**Key words** arthritis, rheumatoid; diagnosis; symptom complex; dampness-heat; cold-dampness; metabolomics; principal component analysis

基金项目: 浙江省中医药管理局项目(2007GA002)

通讯作者: 童培建 E-mail: 1375819112@163.com

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病, 属中医学痹症范畴, 依据不同的证候群可划分为热证和寒证。代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后新近发展起来的一门学科, 是系统生物学的重要组成部分, 主要利用气相色谱-质谱分析 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 等技术结合模式识别, 来判断生物体的病理生理状态。代谢组学与中医学在许多方面有相近的属性, 因此本研究拟通过对膝关节液组学的研究, 探讨关节液代谢组学在 RA 诊断及寒热证候分型中的价值。

## 1 临床资料

**1.1 一般资料** RA 患者 12 例, 男 5 例, 女 7 例; 年龄 36 ~ 64 岁, 中位数 42.5 岁; 病程 3 个月至 8 年, 中位数 4.5 年; 寒湿阻络证 6 例, 湿热阻络证 6 例; 28 个关节疾病活动度评分<sup>[1]</sup> 2.02 ~ 7.04 分, 中位数 3.8 分。健康志愿者 7 名, 男 3 名, 女 4 名。年龄 23 ~ 64 岁, 中位数 43 岁。所有受试者均进行关节穿刺, 抽取关节液于 -80 ℃ 保存备用。试验方案经医院伦理委员会审核通过。

**1.2 诊断标准** 采用 1987 年美国风湿病学会 RA 的诊断标准<sup>[2]</sup>。

**1.3 纳入标准** ① RA 患者符合上述诊断; ② RA 患者和健康志愿者均同意参与本研究, 并签署知情同意书。

**1.4 排除标准** ① 近 3 个月内应用过糖皮质激素、消炎止痛及抗风湿药者; ② 近 6 个月内进行过膝关节腔穿刺或膝关节腔药物注射者。

## 2 方法

**2.1 GC-MS 分析** 采用 Agilent 6890N-5973N 型 GC-MS 联用仪对所取得的膝关节液进行 GC-MS 分

析。操作参数: 进样口温度 270 ℃、离子源温度 230 ℃、四极杆温度 150 ℃、电离电压 70 eV, 载气为高纯氦气 ( $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 质谱扫描范围  $60 \sim 600 \text{ m} \cdot \text{z}^{-1}$ ; 进样方式为不分流模式, 进样量  $2 \mu\text{L}$ 。谱峰检测和重叠峰分辨采用 AMDIS 软件; 化合物检索采用 NIST 质谱数据库。升温程序: 起始温度 70 ℃, 保持 5 min 后以  $8 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度升至 300 ℃, 并保持 8 min。

**2.2 数据处理与模式识别** 谱峰检测以 3 倍信噪比为限, 除去杂质峰、溶剂峰、过载峰和一些不稳定的小峰。谱峰校准和共有峰提取由自编的 MATLAB 程序自动完成, 模式识别借助化学计量学软件 Unscrambler 8.0 完成, 色谱分析采用主成分分析法。

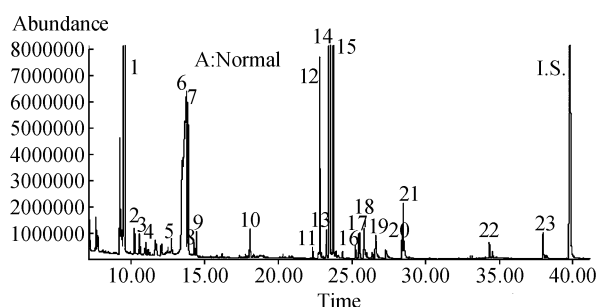
## 3 结果

**3.1 GC-MS 分析结果** 除去杂质峰、溶剂峰和一些不稳定小峰, 最终共选定 23 个主要色谱峰为共有峰描述关节液化学组成特征, 健康志愿者和 RA 患者的 GC-MS 色谱图总体特征基本相同 (图 1)。

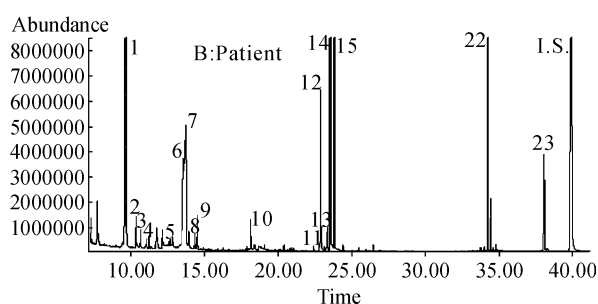
**3.2 主成分分析结果** 经主成分分析将 23 个描述关节液化学组成特征的色谱峰综合成 4 个主成分。对所有被测试者的关节液样品进行主成分分析, 在第 3 和第 4 主成分得分图 (图 2) 中 RA 患者的关节液样品得分分布集中。单独对 RA 患者的关节液样品进行主成分分析, 在第 3 和第 4 主成分得分图 (图 3) 中湿热阻络证患者和寒湿阻络证患者患者的关节液样品得分分布均较为集中。

## 4 讨论

代谢组学是系统生物学的重要组成部分, 是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门学科, 以代谢组 (在某一时刻细胞内所有代谢物的集合) 为研究对象。后两者分别从基因和蛋白质层面探寻生命的活动, 但实际上细胞内很多生命活动发生在代谢物层



(1) 健康志愿者膝关节液 GC-MS 分析总离子流图



(2) RA 患者膝关节液 GC-MS 分析总离子流图

图 1 健康志愿者和 RA 患者膝关节液 GC-MS 分析总离子流图

1 ~ 23 为共有峰编号; I. S. 为内标物 (去氧胆酸钠)

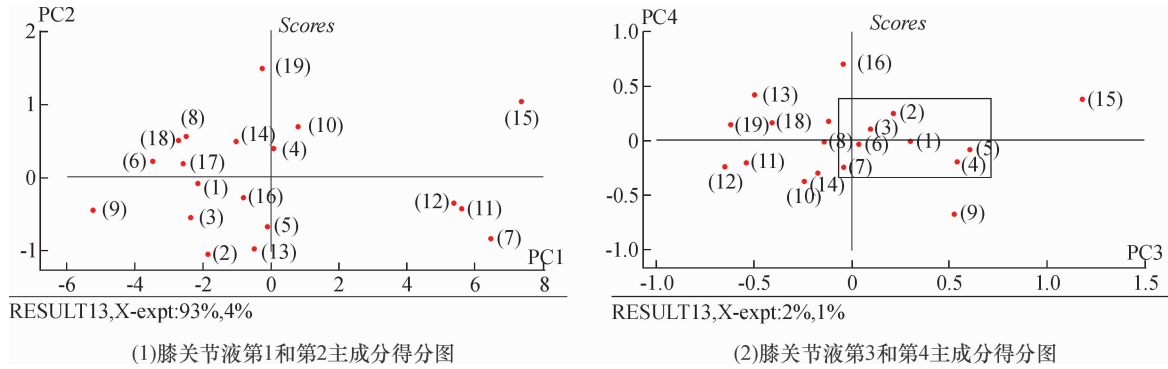


图 2 健康志愿者和 RA 患者膝关节液 GC-MS 主成分分析得分图

(1) ~ (7) 为健康志愿者; (8) ~ (19) 为 RA 患者

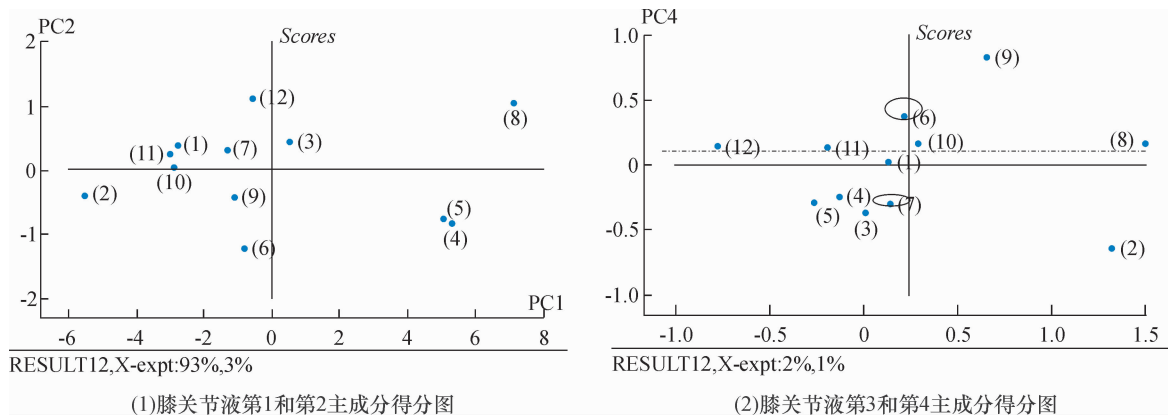


图 3 RA 患者膝关节液 GC-MS 主成分分析得分图

(1) ~ (6) 为 RA 湿热阻络证患者; (7) ~ (12) 为寒湿阻络证 RA 患者

面,如细胞能量传递、细胞信号释放、细胞间通信等都要受代谢物的调控<sup>[3]</sup>。它主要研究的是作为各种代谢路径的底物和产物的小分子代谢物,其样品主要是动植物的细胞和组织的提取液,常用的技术手段包括核磁共振、MS、GC 等<sup>[4]</sup>。滑膜炎是 RA 中非常重要的病理改变,与血液相比,关节液中代谢物的变化可能更能准确、灵敏地反映 RA 的病理改变<sup>[5]</sup>。中医学和代谢组学都是对影响机体整体状况的多种因素进行研究,尽管研究方法不相同,但却体现了相似的思维模式<sup>[6]</sup>。因此,我们对 RA 患者和健康志愿者进行关节液代谢组学研究,探讨其在 RA 诊断及中医证候分型中的价值。

关节液样品经 GC-MS 分析后,输出的总离子流图上的每个色谱峰都包含了该物质的定性信息和定量信息,而每分析一个样品都会出现大量的色谱峰。每个样品的特征就由众多数据所决定,因此各样品之间或者各组样品之间差异的程度也都由这些数据所决。然而,由于数据量非常庞大,常规统计分析方法既难以发现样品之间或各组之间的异同,也难以发现

样品中的哪些变量造成了这些差异<sup>[7]</sup>。主成分分析作为代谢组学数据分析中占主导地位的方法,从多个数值变量之间的相互关系入手,利用降维的思想,可将多个变量转化为少数几个互不相关的综合变量(主成分),它在尽量保证数据信息丢失最少的原则下通过降维处理,使复杂问题简单化,降低了问题分析的难度<sup>[8]</sup>。

样品在每个主成分中的得分也就是其在所计算的数学模型中的空间坐标,反映了它在模型中的位置,因而主成分分析得分图可直观地反映样品在数学模型空间中的分布情况<sup>[7]</sup>。在主成分分析得分图中样品分布点越靠近,说明它们所含分子的组成和浓度越接近,反之则说明差异越大。在健康志愿者和 RA 患者膝关节液第 3 和第 4 主成分得分图中,健康志愿者的关节液样品分布相对集中,而 RA 患者关节液样品分布则较为分散,在主成分分析得分图中可准确地对二者进行区分;在 RA 患者膝关节液第 3 和第 4 主成分得分图中,湿热阻络证患者的关节液样品主要分布在分类线[图 3(2)中的虚线]的下

方,寒湿阻络证患者的关节液样品主要集中在分类线的上方,2 种证型的患者各仅有 1 例被错分,即图 3 中的患者(6)和(7)。

本研究的结果提示,膝关节液的代谢组数据能准确区分 RA 患者和健康志愿者及 RA 湿热阻络证和寒湿阻络证患者,为 RA 的诊断及其中医证候量化分型提供了一种思路。由于定量诊断与证候研究是系统工程,本研究所取关节液样本量有限,证候种类不全,所得结论还有待于进一步的研究来证实和完善。

## 5 参考文献

- [1] Prevoo ML, Van't Hof MA, Kuper HH, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(1): 44-48.
- [2] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American

rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(1): 44-48.

- [3] 徐昊,林东海,刘昌孝. 代谢组学研究现状与展望[J]. 药学报, 2005, 40(9): 769-773.
- [4] 吕诚. 类风湿性关节炎寒热证候分类的系统生物学基础[D]. 北京:中国中医科学院, 2010.
- [5] 肖长虹,吴启富,张丽华,等. 类风湿关节炎关节液抗环瓜氨酸肽抗体的检测及意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2006, 10(3): 184-186.
- [6] 简维雄,袁肇凯. 中医“证候”与代谢组学研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(2): 351-352.
- [7] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 481-489.
- [8] 李琳琳,杨永利,施学忠,等. HIV/AIDS 患者中医四诊信息的主成分分析[J]. 郑州大学学报:医学版, 2007, 42(4): 679-682.

(2013-11-01 收稿 2014-03-12 修回)

## · 作者须知 ·

### 论文中对数据进行统计学处理时需要注意的问题

**1 对基线资料进行统计学分析** 搜集资料应严格遵守随机抽样设计,保证样本从同质的总体中随机抽取,除了对比因素外,其他可能影响结果的因素应尽可能齐同或基本接近,以保证组间的齐同可比性。因此,应对样本的基线资料进行统计学分析,以证明组间的齐同可比性。

**2 选择正确的统计检验方法** 研究目的不同、设计方法不同、资料类型不同,选用的统计检验方法则不同。例如:2 组计量资料的比较应采用  $t$  检验;而多组( $\geq 3$  组)计量资料的比较应采用方差分析(即  $F$  检验),如果组间差异有统计学意义,想了解差异存在于哪两组之间,再进一步做  $q$  检验或 LSD- $t$  检验。许多作者对多组计量资料进行比较时采用两两组间  $t$  检验的方法是错误的。又如:等级资料的比较应采用 Ridit 分析或秩和检验或行平均得分差检验。许多作者对等级资料进行比较时采用卡方检验的方法是错误的。

**3 假设检验的推断结论不能绝对化** 假设检验的结论是一种概率性的推断,无论是拒绝  $H_0$  还是不拒绝  $H_0$ ,都有可能发生错误(I 型错误和 II 型错误)。因此,假设检验的推断结论不能绝对化。

**4  $P$  值的大小并不表示实际差别的大小** 研究结论包括统计结论和专业结论两部分。统计结论只说明有无统计学意义,而不能说明专业上的差异大小。 $P$  值的大小不能说明实际效果的“显著”或“不显著”。统计结果的解释和表达,应说对比组之间的差异有(或无)统计学意义,而不能说对比组之间有(或无)显著的差异。 $P \leq 0.01$  比  $P \leq 0.05$  更有理由拒绝  $H_0$ ,并不表示  $P \leq 0.01$  时比  $P \leq 0.05$  时实际差异更大。只有将统计结论和专业知识有机地结合起来,才能得出恰如其分的研究结论。若统计结论与专业结论一致,则最终结论也一致;若统计结论与专业结论不一致,则最终结论需根据专业知识而定。判断被试因素的有效性时,要求在统计学上和专业上都有意义。

**5 假设检验的结果表达**  $P$  值传统采用 0.05 和 0.01 这 2 个界值,现在提倡给出  $P$  的具体数值和检验统计量的具体数值(小数点后保留 3 位有效数字),主要理由是:①以前未推广统计软件之前,需要通过查表估计  $P$  值,现在使用统计软件会自动给出具体的  $P$  值和检验统计量的具体值( $t$  值、 $F$  值、 $\chi^2$  值等)。②方便根据具体情况判断问题。例如  $P = 0.051$  与  $P = 0.049$  都是小概率,不能简单地断定  $P = 0.051$  无统计学意义而  $P = 0.049$  有统计学意义。③便于对同类研究结果进行综合分析。

**6 统计学符号的使用** 统计学符号的使用应按照 GB3358—82《统计名词及符号》的规定,具体可参阅本刊投稿须知中的有关要求。