Research
Traditional Chinese Medicine—Article

血浆代谢组学结合超微弱发光表征早期 2 型糖尿病的中医证型

何敏^{a, b, c}, 孙濛濛^{a, b, c}, Slavik Koval^b, Roeland Van Wijk^e, Thomas Hankemeier^b,
Jan Van der Greef^b, Eduard P.A. Van Wijk^{d, e, *}, 王梅^{a, f, g, *}^a Leiden University–European Center for Chinese Medicine and Natural Compounds, Institute of Biology, Leiden University, Leiden 2333 BE, the Netherlands^b Analytical BioSciences, Leiden Academic Center for Drug Research (LACDR), Leiden University, Leiden 2333 CC, the Netherlands^c Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China^d Sino-Dutch Center for Preventive and Personalized Medicine, Tiel 4002 AG, the Netherlands^e Meluna Research, Geldermalsen 4191 LC, the Netherlands^f SU Biomedicine, Leiden 2300 AM, the Netherlands^g Shenzhen Huakai Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Research Center, Shenzhen 518114, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 July 2018

Revised 30 September 2018

Accepted 5 March 2019

Available online 19 June 2019

关键词

2型糖尿病
血浆代谢物
疾病亚型
超微弱发光
相关性网络

摘要

2型糖尿病 (T2DM) 的患病率在全球范围内呈迅速上升趋势。因通用干预措施收效甚微, 所以疾病研究的重点已经转向个性化策略, 特别是疾病的早期阶段的个性化策略。中医基于系统观建立并结合了个性化策略, 提高了我们对个性化诊断的认识。从系统生物学的角度, 例如将代谢组学与其他系统性诊断方法 (如超微弱发光) 相结合, 可提高对个性化诊断的理解, 同时为此类个性化诊疗策略提供生化相关物质基础。在本研究中, 我们研究了44名处于2型糖尿病前期的受试者的血浆代谢组学, 探讨了基于以下中医亚型进行疾病早期分型的可行性: 气阴两虚、气阴两虚挟痰湿、气阴两虚挟血瘀。此外, 通过血浆代谢组学和超微弱发光在中医亚分型方面的关系, 获得体内生化参数与体外表征参数的关联性信息, 从而尝试对疾病亚型分类及判断有更深一步的阐释。结果表明, 血浆代谢物的主成分分析揭示了从中医角度划分的2型糖尿病前期不同亚型之间的差异性。对于3种2型糖尿病前期亚型, 相对含量较高的脂质 (如胆固醇酯和甘油三酯) 是鉴别其中之二的重要元素, 并且可能与较高的心血管疾病风险相关。血浆代谢组学数据表明, 血脂谱是超微弱发光在2型糖尿病亚型分型中收集的重要组成部分。结果表明, 2型糖尿病前期的不同中医亚型之间存在代谢差异, 可通过血浆代谢物分析来区分这些亚型, 血浆代谢组学为系统性超微弱发光体表测量提供了生化参数相关依据。

© 2019 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

2型糖尿病 (T2DM) 是一种具有慢性、破坏性和复杂性的疾病。2型糖尿病的主要特点为由胰岛素分泌不足、胰岛素敏感性降低, 以及胰岛β细胞功能受损导致的空腹血糖水平升高、餐后高血糖[1]。此外, 2型糖

尿病患者体内的炎症因子 (如TNFα、IL-6、IL-8) 以及氧化应激相关活性物质含量较高[2,3]; 激素类、肽类、蛋白质类和酶活力水平均有变化, 伴随其他代谢紊乱现象[4]。值得关注的是, 上述代谢波动趋势可能在患者的临床症状被诊断为2型糖尿病之前数年就已显现[5,6]。

流行病学研究结果显示, 全球受糖尿病影响的人数

* Corresponding author.

E-mail address: eduard.vanwijk@sinodutchcentre.nl (E.P.A. Van Wijk), m.wang@biology.leidenuniv.nl (M. Wang).

目前约为 2.85×10^8 人，并且这个数字逐年增长[7]。此外，由于患者本人对早期症状与潜在疾病以及晚期并发症之间的关联缺乏了解，导致许多人未能获得尽早诊断和及时就医，这可能导致此受糖尿病影响的统计人数很可能被低估[8,9]。而不及时的诊断，如糖尿病发展至晚期，表现出与疾病进展相关的严重并发症时才进行诊断就医，则治疗效果有限且会产生较高的治疗成本[10]。例如，长期血糖代谢障碍会增加产生严重并发症的风险，如高血压、失明、肾衰竭和心血管疾病[11,12]。这些并发症不仅降低生活质量，也是导致糖尿病患者发病、住院和死亡的主要原因。目前的诊断检测主要基于单一的筛查手段或指标，如口服葡萄糖耐量试验或测量空腹血糖。系统性地了解和研究疾病的早期症状，并据此找寻与疾病发展相关的指标将有助于改善疾病的预防和治疗策略，包括变更生活方式的策略。此外，基于常规观察结果采取的治疗措施极其有限（尤其是在疾病的早期阶段），这类治疗措施仅涉及某一种药物、单一靶标以及一种疾病（或适用于所有疾病）的概念。因此，需要通过系统性方法来实现个性化方法。

中医药基于综合性整体观概念从系统宏观层面提供了对疾病综合征和亚型的描述参考（如可用于诊断慢性疾病早期症状的描述）。中医辨证理论关于2型糖尿病前期的描述中认为“气阴两虚”（QYD）为糖尿病早期较常见的中医证型之一。气阴两虚的症状与湿邪或气滞等其他病理因素可相互作用影响，进而可导致疾病向不同的方向或状态发展。从中医与西方代谢及病理学关联性角度来看，气阴两虚某种程度上可反映由代谢亢进引起的轻度炎症反应状态和慢性疲劳症状。湿邪和气郁气滞与现代社会不健康的生活方式和不良饮食习惯密切相关：湿邪可引起糖尿病晚期相关的并发症，如代谢综合征、高血压和绞痛病等；而气郁气滞可能与情志、压力和紧张调节相关，因而气郁气滞可能导致情绪问题（如抑郁）、血液循环障碍和糖尿病性周围神经病变等，即中医概念下的“瘀”。此类中医理论对于糖尿病证型的相关描述可为实施疾病早期及个性化诊疗提供指导或参考。为此，基于中医概念对2型糖尿病前期证型进行研究，将展示中医基础理论在协助开发个性化医疗方面的可能性及其潜在重要的巨大作用，从而在中西医之间搭建桥梁，提供在生化层面可循证的科学数据[13,14]。据此，基于中医理论辨证论治，整合现代系统生物学（包

括代谢组学）的研究方法，将有望成为探索基于生化反应过程的疾病亚型的有效研究方法。

通常情况下，患者在疾病被临床正式确诊前就已存在数年的代谢紊乱状况，而近年来代谢组学技术这种基于体内代谢轮廓分析的技术正被广泛用于预测和诊断疾病相关研究[15]。代谢组学提供了小分子代谢物在生物系统中的综合概况，可用作表示生物机体生理、病理状态的示值[16]。从理论上讲，这种方法具有适用于研究基于中医理论的疾病诊断研究的可能性。代谢组学通常用于研究血液、尿液和脑脊液等体液。尿液不但易获取，而且包含了与产物排泄相关的信息，并能反映代谢过程随疾病过程的变化，所以代谢组学往往采用尿液进行研究。目前已有研究通过尿液代谢组学探索了基于中医理论的疾病诊断和2型糖尿病综合征亚型[17,18]。然而，血液与尿液具有一定相似性，其同样包含了大量关于身体调节变化状态的动态信息，但二者提供的体内代谢物信息量及信息种类具有显著差异性。通过代谢组学研究不同的体液，提供整体信息间的相互验证和补充差异，可深化对2型糖尿病的系统整体性认识。在一项探索性研究中，荷兰应用科学研究组织[†]（TNO；位于荷兰泽斯特）设计由3名受专业中医培训的医师组成的小组对44名处于2型糖尿病前期的受试者进行了诊断[17]。本文中，我们将通过血浆代谢组学分析来展示这些受试者从中医角度划分的疾病前期亚型的可能性。

最近，有人提出了通过一种非介入性技术的应用来研究基于中医理论的疾病诊断[19]。这项被称为超微弱发光（UPE）的技术通常被用于测量皮肤表面自发的光子辐射[20]。由于UPE可从系统整体水平反映身体的生理和病理变化状态，所以它被认为具有无损临床疾病诊断的应用潜能[21–23]。UPE的发光过程被认为与生命体新陈代谢过程中的生化反应，尤其是与代谢过程中的氧化还原反应产生的活性氧簇相关[24–27]。尽管近年来有研究者总结了基于中医理论应用UPE进行疾病诊断的潜能[19,20,28]，但是对UPE的分子阐释相关机制及理论基础仍需进一步了解。将基于中医理论下的疾病诊断与代谢组学技术相结合也有利于更好地理解UPE技术背后的生物学意义，并探索代谢组学及UPE技术在诊断应用上相关的附加价值。需注意的是，UPE已经被成功用于区别本研究中所用的同批次44名2型糖尿病前期的受试者的亚型[28]，这便于我们可同时研究2型糖尿

[†] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00469287>.

病前期的受试者UPE和血浆代谢组学之间的关联。

2. 材料和方法

2.1. 2型糖尿病前期受试者的入选标准和中医综合征亚型诊断标准

前期研究及发表文章曾报道过招募受试者经正规培训并具有中医认证临床资质的中医师诊断并确诊为2型糖尿病前期不同中医亚型的具体方案[17]。简言之，主要临床参数来自符合以下入组标准的44名荷兰男性受试者：年龄30~70岁，体重指数为26~35 kg·m⁻²，空腹血糖水平为6.1~6.9 mmol·L⁻¹，未发现其他临床异常或糖尿病并发症证据。3名至少接受了5年中医学培训且拥有至少10年临床经验的中医认证医师经盲法分别先后对入组的受试者进行诊断。3名中医医师基于26项中医诊断相关指标将受试者划分归属3种疾病亚型，3名医生对此诊断结果达成了85%的共识。这3类亚型定义如下：气阴两虚（*n*=15例）、气阴两虚挟痰湿（QYD_Damp, *n*=20例）、气阴两虚挟血瘀（QYD_Stag, *n*=9例）。空腹隔夜后采集晨血用于代谢组学研究。此外，UPE数值从双手的手掌和手背表面分别测得。

2.2. 伦理声明

本次探索性研究由TNO设计并执行，并通过蒂尔堡医学伦理委员会（METOPP）审批。

2.3. 数据收集

2.3.1. 血浆代谢组分析

代谢轮廓分析由TNO研究采集。收集的血液经肝素化、离心处理（4℃下以4000 r·min⁻¹速度离心15 min）得到血浆。经分装后的血浆样品储存在-20℃下以备后续提取代谢物和进行质谱分析。

多种类别代谢物，包括胺代谢物、有机酸、糖和溶血磷脂酸（LPA）衍生的代谢物，经气相色谱-质谱（GC-MS）平台进行检测分析。具体萃取和气相色谱-质谱分析方案详见之前已发表文章[29]。简言之，分装后的血浆（每份100 μL）加入内标混合物经甲醇去蛋白。离心后，将上清液转移至新的样品瓶中进行氮吹干和两步衍生化反应。经安捷伦5973液相色谱仪联合6890气相色谱仪（Agilent Technologies, Inc., 美国），使用J&W BD-5 ms毛细管色谱柱（内径：30 m ×

250 μm，膜厚：0.25 μm；Agilent Technologies, Inc., 美国）对所得衍生提取物进行分离及结构鉴定；以流速为1.7 mL·min⁻¹的氦气作为载气，进行程序升温梯度色谱分离。使用Chem Station G1701CA软件（D.01.02版，Agilent Technologies, Inc., 美国）预处理并输出原始数据，为每种代谢物提供相应的其与内标响应比；这些响应比用于进一步统计分析。

此外，根据Van Wietmarschen等[30]和Draisma等[31]使用的方法，我们同时使用液相色谱-串联质谱（LC-MS）靶向检测并分析研究了7大类脂质，包括极性脂质（如磷脂酰胆碱、磷酸乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酸乙醇胺和鞘磷脂）和非极性脂质[如胆固醇酯（ChE）和甘油三酯（TG）]。主要方法步骤简单概括如下：向已含有内标混合物的分装血浆（每份10 μL）加入异丙醇除蛋白后，使用三重四极杆液质联用系统（UHPLC Ultimate 3000+TSQ Endura; Thermo Fisher Scientific Inc., 美国）经Alltech Prosphere C4 300 Å色谱柱（150 mm × 3.2 mm，粒度：5 μm；美国Alltech Associates公司）与Symmetry 300 C4保护柱（2.1 mm × 10 mm，粒度：3.5 μm；Waters, 美国）以正电离模式分离和分析脂质类化合物。得到的原始数据经LCQUAN软件（第2版；Thermo Fisher Scientific Inc., 美国）整合目标脂质的峰面积后输出，生成各种代谢物对相应内标的响应比，用于进一步的统计分析。

在气相色谱-质谱和液相色谱-质谱实验分析时，需从每份血浆样品中取出等量的样品充分混合后分成数份来制备额外的质控（QC）样品，以用于检查液相色谱-质谱平台的性能，并确定采集数据的时间趋势。QC样品的各目标峰的相对标准偏差用于确认和校正从每个分析平台获取的数据的质量。

2.3.2. UPE 测量

通过光电倍增系统（荷兰Meluna Research BV提供）使得测量同一批44名受试者UPE信号的实验得以实现。该系统的暗室顶部设置了两个探测头，分别包含一个光谱灵敏度范围为160~630 nm的9235QA光电倍增管（Electron Tubes Enterprises Ltd., 英国）和一个电控快门。暗室温度控制需保持在（20±1.0）℃。用于测量UPE的具体参数设置详见课题组前期实验发表文章[32,33]。所有测量均通过计算机驱动软件自动控制UPE信号在手部以下4处表面测得：左手手背、右手手背、左手手掌

和右手手掌。

2.4. 数据预处理和统计分析

2.4.1. 代谢组学数据处理和分析

代谢组学原始数据的统计分析可使用在线软件包MetaboAnalyst 3.0通过各种缩放选项（即自动缩放、范围缩放和帕累托缩放）处理得到对数变换数据集[†][34]。由于在本实验前期探索时发现帕累托缩放法（以平均值为中心并按每个变量的标准偏差的平方根进行缩放）可提供最佳的数据正态分布，体现最佳的数据聚类分组优化性能，故本研究中选用此法进行数据转换以及后续主成分分析研究[35–37]。在进行多变量分析前，我们得到的LC-MS和GC-MS转换后的数据集首先经过变量预筛选，以便达到以下目的：①限制变量数据集，以便可靠地、更好地分离受试者亚型组别；②去除无关和（或）混杂变量；③决定保留哪些变量可供进一步多变量分析。但此预筛选的目的并非为了直接识别潜在的生物标志物，这种通过预筛选除扰、限定多变量分析所用变量数目的方法[通过使用从气相色谱-质谱和液相色谱-质谱的单向方差分析（ANOVA）中获得的 p 值（ $p < 0.1$ ）]已应用于一些代谢谱分析研究[38]。本研究中使用MetaboAnalyst 3.0进行多变量分析，包括主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA），此在线软件可同时提供标准的模型验证信息，包括交叉验证和置换检验，以防模型与数据发生过拟合[34]。

2.4.2. UPE 数据和推导参数的获取

根据在50 ms内对4处手部表面的测量统计数据，可计算出以下10种UPE相关特性参数：强度、FF0、FF1、FF2、 α 、 γ 、 θ 、 φ 、SSI和SSR [32,33,39]。因此，本研究从每位受试者处采集的40个UPE参数与体内内源性代谢物的相关性。

2.4.3. 相关性分析

使用统计软件包R(3.0.3版)计算斯皮尔曼(spearman)等级相关系数，以检查代谢物和UPE参数之间的关系。使用带MetScape插件的CytoScape(3.3.0版)[‡]创建相关性网络的概述图[40,41]。正负相关性分别由 r 的正值和负值表示。

3. 结果和讨论

3.1. 基于血浆代谢组学的疾病亚分型

中医理论指导的疾病诊断是基于从整体宏观角度整合患者症状体现的重要信息来对疾病做出个性化分类的（即所谓的疾病的“证型”）。因此，证型的判断是中医理论体系为个性化干预诊疗提供的最重要的理论概念和前提。探索基于中医理论指导下的疾病诊断与分型可以从新的不同的角度认识个性化医疗保健和管理策略。然而，中医理论指导下的疾病诊断是基于数个中医诊断标准步骤（包括望、闻、问、切）而分别得到的对不同表象症状描述的总结，继而创建可用于个性化诊疗的个人档案。因此，对于中医概念下这种描述性、表象性的疾病诊断及分型，客观循证的数据是非常有必要的。在这项探索性研究中，我们使用了26个中医诊断标准条目，据此对44名处于糖尿病前期的受试者进行不同中医证型的归属分类[17]，并通过血浆样本进行代谢组学分析，以帮助所划分归属的2型糖尿病前期的受试者的不同证型进行科学循证。

首先，我们同时使用了两种分别基于气相色谱-质谱和液相色谱-质谱并已通过方法验证的代谢组学方法来检测不同的内源性代谢物轮廓。气相色谱-质谱检测并鉴定出了147种靶外代谢物，而通过液相色谱-质谱最终确定的代谢物轮廓包含了110种脂质靶向代谢物成分，所有这些代谢物均包含在总代谢谱中以供后续分析。气相色谱-质谱检测到的代谢物包括多种不同种类代谢物，主要为胺代谢物、有机酸、糖和脂肪酸（如溶血磷脂酸和溶血磷脂酸衍生物）。液相色谱-质谱检测到的代谢物可分为7类脂质，包括极性脂质（如磷脂酰胆碱、磷酸乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷酸乙醇胺和鞘磷脂）和非极性脂质（如胆固醇酯和甘油三酯）。考虑到与总变量数（257）相比，作为样本量的受试者数量（44）相对较少，所以在进行多变量分析之前，我们首先进行了限制性筛选可用变量。这一步允许我们优化变量/样本量比值以便更好地应用于下一步的多变量组间分布判别分析，同时便于消除潜在的无关和（或）混淆变量[38]。基于ANOVA方差分析，根据其 $p < 0.1$ 初步筛选出32个潜在重要变量；这些变量包括由气相色谱-质谱鉴定的15种血浆代谢物和由液相色谱-质谱鉴定的17种血浆脂质。随后用所筛选出的潜在重要变量进行多变量分析，包括

[†] <http://www.metaboanalyst.ca/>.

[‡] <http://www.cytoscape.org>.

主成分分析 (PCA)、偏最小二乘判别分析 (PLSDA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) (见补充材料中的表S1和Fig. S1)。

我们在分析中首先聚焦在研究血浆代谢组学能否区分2型糖尿病前期的3种中医亚型 (即气阴两虚对比气阴两虚挟痰湿, 气阴两虚对比气阴两虚挟血瘀, 气阴两虚挟痰湿对比气阴两虚挟血瘀) 这个问题上。3D主成分分析图用于直观展示这3组亚型在3D空间中的自然分布趋势[38,42]。前3项主成分因子PC1、PC2、PC3的综合计算主成分值可代表66.5%的血浆代谢组总分布信息 (图1)。从自然分布的主成分分析结果, 我们发现3种亚型组别之间并没有产生较大的分布距离, 这个结果并不令人意外, 因为3种亚型在中医诊断条目中经常产生共性以及相互联系 (相互关联), 并且这些中医亚型的疾病发展并非线性阶段性相互独立, 而是相互扰动后朝不同方向动态发展变化[13,14]。但我们的确观察到亚型间出现了聚集的趋势, 尽管主成分分析中存在轻微样本组别重叠。

接下来, 我们使用了监督模型如线性判别分析 (LDA)、偏最小二乘判别分析和正交偏最小二乘判别分析, 用以鉴别相关的对分组贡献较大的血浆代谢标志物 (补充材料中的Fig. S2)。正交偏最小二乘判别分析模型展示了最高的 R^2 和 Q^2 值, 因此最终决定基于此模型所得到的得分图来确定最具相关性的重要变量[43,44]。此外, 1000次迭代置换检验 ($p < 0.05$) 显示该模型拥有良好稳定性。图2显示了基于正交偏最小二乘判别分析得分图前两项主成分因子的组别分离情况 (细节参见补充材料中的Fig. S3)。

表1总结了每两亚型组比较时对分组贡献度较大

的相关代谢物 (定义为协方差 $|p[1]| > 0.7$ 和相关系数 $|p(\text{corr})| > 0.3$ 的组合[44]), 以及它们在每对亚型组比较中上调/下调情况 (气阴两虚对比气阴两虚挟痰湿, 气阴两虚对比气阴两虚挟血瘀; 气阴两虚挟痰湿对比气阴两虚挟血瘀)。如表1所示, 在区别气阴两虚与气阴两虚挟痰湿的18种代谢物中, 有14种是长链非极性脂质 (10种甘油三酯和4种胆固醇酯); 这些代谢物在气阴两虚挟痰湿组中的含量高于气阴两虚组。气阴两虚挟血瘀组的甘油三酯和胆固醇酯 (10种甘油三酯和4种胆固醇酯) 也高于气阴两虚组, 尽管其中两种 (C58_10_TG和

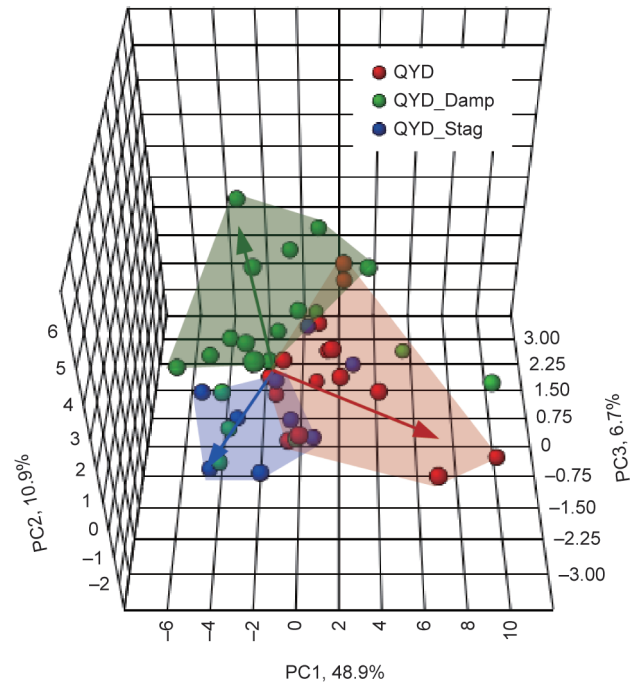


图1. 2型糖尿病前期亚型患者经对数变换和帕累托缩放后血液代谢组数据的3D主成分分析得分图。PC: 主成分。

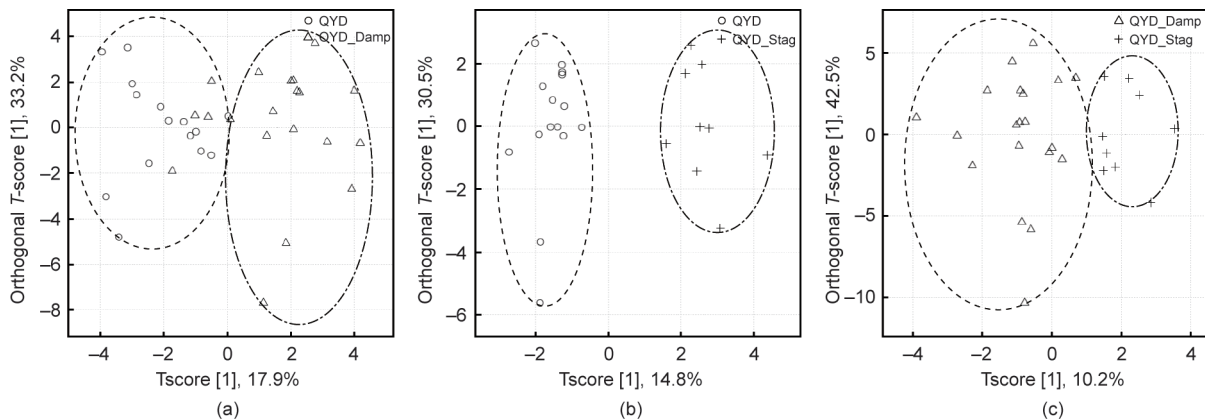


图2. 基于正交偏最小二乘判别分析得分图前两项主要成分因子的亚型两两分组。(a) 气阴两虚与气阴两虚挟痰湿: $R^2Y = 0.61$, $Q^2 = 0.36$, 迭代置换检验 $p = 0.001$; (b) 气阴两虚与气阴两虚挟血瘀: $R^2Y = 0.93$, $Q^2 = 0.62$, 迭代置换检验 $p < 0.001$; (c) 气阴两虚挟痰湿与气阴两虚挟血瘀: $R^2Y = 0.69$, $Q^2 = 0.48$, 迭代置换检验 $p < 0.001$ 。

表1

Pair of subtypes	Metabolite	Change	
QYD_Damp. vs. QYD	C52_5_TG	↑	
	C54_6_TG	↑	
	C54_5_TG	↑	
	C54_7_TG	↑	
	C56_8_TG	↑	
	C56_7_TG	↑	
	C56_8_TG	↑	
	C58_9_TG	↑	
	1-Methylhistidine % 10227\01.03 uk × 45*	↑	
	C58_9_TG	↑	
	C52_6_TG	↑	
	C18_3_ChE	↑	
	C16_0_ChE	↑	
	C22_6_ChE	↑	
	C20_3_ChE	↑	
	Creatinine	↑	
	1-Palmitoyl-L-alpha-lysophosphatidic acid	↓	
	1-Stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	↓	
	QYD_Stag. vs. QYD	C22_5_ChE	↑
		C54_7_TG	↑
C54_6_TG		↑	
C58_10_TG		↑	
C52_6_TG		↑	
C56_8_TG		↑	
C18_3_ChE		↑	
C52_5_TG		↑	
C22_6_ChE		↑	
C56_7_TG		↑	
C56_9_TG		↑	
C20_3_ChE		↑	
C54_5_TG		↑	
C58_9_TG		↑	
31944 uk 05		↓	
QYD_Stag. vs. QYD_Damp	Beta-Alanine	↓	
	6926 uk × 10*	↓	
	1-Methylhistidine % 10227\01.03 uk × 45*	↓	
	31944 uk 05*	↓	

The sequence of the metabolites indicates their importance for the contribution to the group separations.

↑: increase; ↓: decrease.

*: Structural unidentified metabolites in GC-MS untargeted measurement.

C22_5_ChE) 与出现在气阴两虚对比气阴两虚挟痰湿组的甘油三酯和胆固醇酯不同。因此, 我们可以得出结论, 长链非极性脂质的增加与气阴两虚挟痰湿组和气阴两虚挟血瘀组有关。

2型糖尿病早期的病理机制与不合理的生活方式有

关, 如摄入高脂肪高热量饮食[45-48]; 在这方面, 2型糖尿病早期类似于慢性疲劳综合征和(或)伴随轻度炎症反应的亚健康状态[17]。甘油三酯是磷脂的前体, 而磷脂是细胞膜的基本构成成分, 同时在维持体内能量平衡中发挥着重要作用。胆固醇酯是胆固醇的一种储存形式, 通常情况下胆固醇可以高密度脂蛋白(HDL)形式输出并返回肝脏。高胆固醇和高甘油三酯水平(高胆固醇血症和高甘油三酯血症)分别与脂肪堆积的产生、动脉粥样硬化和心血管疾病有着密切的关系[49,50]。因此, 2型糖尿病前期子组患者(气阴两虚挟痰湿和气阴两虚挟血瘀)在疾病发展后期更有可能发展为动脉粥样硬化和(或)心血管相关疾病。

气阴两虚挟痰湿组和气阴两虚挟血瘀组的共性为这两组志愿者均表现出高于气阴两虚组的甘油三酯和胆固醇酯含量, 但实际上气阴两虚挟痰湿组和气阴两虚挟血瘀组之间也同样存在数种代谢差异(表1)。比如, 气阴两虚挟血瘀组的氨基酸类代谢物含量相对较低[和(或)气阴两虚挟痰湿组的氨基酸类代谢物含量相对较高], 表明气阴两虚挟血瘀和气阴两虚挟痰湿亚型之间的差异可能主要在于两组亚型在三羧酸(TCA)循环和(或)肌纤维降解代谢过程上存在差异[51]。总之, 上述研究鉴定并筛选出23种重要代谢物作为划分2型糖尿病前期亚型的依据。因此, 此研究表明可根据血浆代谢组学的差异, 尤其是血浆脂质和氨基酸类代谢物来区分2型糖尿病前期不同的亚型。

此前, Wei等[17]报道尿液代谢组学可反映气阴两虚挟血瘀型患者的碳水化合物代谢和肾功能的变化; 特别是3种中医亚型中的两种可以由尿液代谢组学来鉴别。相比之下, 血浆代谢组学可将3个亚型分离区别开来; 特别值得强调的是, 可以使用血浆代谢组学技术将气阴两虚和其他组别顺利区分, 这可能归因于血液代谢成分中含有大量尿液代谢组学平台很难检测到的脂类成分。这一发现表明, 测量脂质代谢组学对于准确判断2型糖尿病前期亚型具有重要意义。在之前的研究[17]中, 尿液代谢组学已证明能提供额外的生物标志物, 以区分气阴两虚挟痰湿和气阴两虚挟血瘀; 而本实验的脂质组学结果发现表明, 通过多种代谢组学平台研究不同的体液可以为中医诊断学研究提供更全面的信息。

3.2. 代谢组学与 UPE 的相关性

现存对代谢物的分析只能基于当前已稳定建立的可行的分析平台来实施, 这意味着我们的分析并不一定能

检测并涵盖理想目标下的所有代谢轮廓图谱。辅助其他技术仍然是必要的，以便更加系统、动态地整合、表征基于中医理论的疾病诊断这一探索性研究。UPE已展现出作为非介入性检测生命体整体生理病理状态的指标，因此测量UPE可能更接近中医理论从整体组织水平对疾病诊断的理念[19]。UPE测量已经发展为快速和高灵敏度的成熟技术，有证据表明，测量人手的UPE足以反映身体状态[19]。作为一种极具潜力的工具，UPE已被推荐用于临床研究[21]。据此，我们对处于2型糖尿病前期的受试者进行了UPE测量。实验组前期研究已经报道了关于使用16个UPE参数来划分这3种中医证型的研究成果[28]。然而，UPE参数的分子水平阐释仍需深入研究。可行的策略之一是代谢组学与UPE相结合[23,52]。鉴于血浆代谢组学和UPE都能有效地将同批2型糖尿病前期受试人群进行证型分组，因此，血浆代谢组学数据可为UPE的生理解释提供有效信息[53-55]。为了探索这两种技术之间的关系，我们使用斯皮尔曼等级相关系数建立了基于相关性的代谢物-UPE网络。这种相关性网络可能为进一步区分疾病亚型提供额外的信息，同时为UPE参数提供生化阐释。

我们在最后选定的23种对疾病分型具有重要作用的代谢标志物和16种UPE重要参数之间建立了相关性网络，以便直观展示与3种亚型分组最密切的相关性（图3）。这些网络清楚揭示了3种亚型之间UPE与代谢物的相关性的不同分布情况。具体而言，与气阴两虚组相比，气阴两虚挟痰湿亚型包含的相关性信息相对较少，而气阴两虚挟血瘀亚型包含的正负相关性信息相对较多。首先，基于中医理论，这3种亚型具有基于共同、基本的生物背景的证型（即气阴两虚），同时又各自包含额外的病理因素（湿邪或气滞）来反映不同的证型表象，应据此采用相应的干预措施进行治疗[28]。因此，UPE与代谢物的相关性在气阴两虚挟痰湿和气阴两虚挟血瘀中的不同分布可能表明了二证型与气阴两虚型相比其疾病向不同方向上发展的不同动态变化。此外，UPE的主要来源与代谢过程中活性氧的产生密切相关[19]。活性氧造成的细胞损伤与多种疾病相关；特别是，过量产生活性氧将导致糖尿病发病已被报道[4]；活性氧的主要来源是由磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶家族产生。脂质衍生信号分子的激增可能导致磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADPH）氧化酶被激活，从而产生活性氧与细胞氧化损伤[56]。本研究恰恰发现并证实了，2型糖尿病前期气阴两虚挟痰湿亚型组和气阴两虚挟

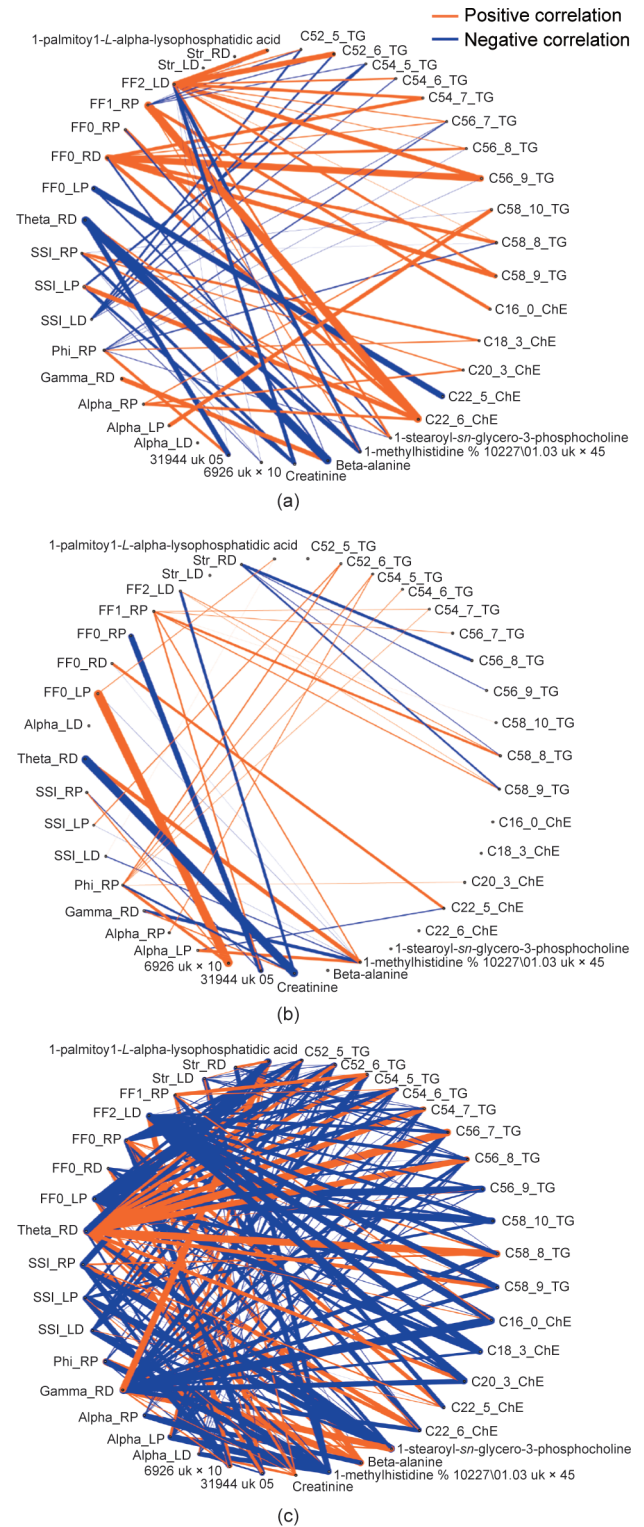


图3. 2型糖尿病前期亚型的代谢变量和UPE参数之间的相关性网络。(a) 气阴两虚；(b) 气阴两虚挟痰湿；(c) 气阴两虚挟血瘀。图中仅绘制了代谢物和UPE参数之间相对较强的相关性 ($|r| > 0.3$)。

血瘀亚型组中的血浆脂质代谢物含量高于气阴两虚组。这一发现可能潜在解释了气阴两虚挟痰湿组和气阴两虚挟血瘀组不同于气阴两虚组的UPE与代谢物的相关

性分布情况。

另一方面，我们发现气阴两虚挟痰湿组和气阴两虚挟血瘀组的血浆代谢物的主要差异在于氨基酸及其衍生代谢物；此外，以前的尿代谢物显示，气阴两虚挟血瘀组的糖含量高于气阴两虚挟痰湿组[17]。还原糖可以与游离氨基反应生成席夫碱，这会一步导致Amadori产物的积累。相对而言，Amadori糖基化产物倾向于蛋白质积累，导致晚期糖基化从而生成活性氧[4]。这些信息可有助于我们理解UPE与代谢物的相关性在气阴两虚挟痰湿组的分布有别于气阴两虚挟血瘀组的原因。

再次，16个UPE参数不仅包含了光子强度（Str）信息，还囊括了光子计数的统计特性（FF、SSI、 α 等）[32,33]。这些光子计数统计特性描述了一定测量时间内的光子发射的分布规律。这意味着这些特性都依赖于光子信号的累积及时序性。这对于从系统的角度理解UPE和代谢过程之间的关系具有重要意义。尽管与气阴两虚相比，气阴两虚挟痰湿和气阴两虚挟血瘀组显示了较高的长链非极性脂质含量，但根据图3，气阴两虚挟血瘀组显示这些脂质与UPE参数之间存在多种强相关性，而气阴两虚挟痰湿组却没有显示出这些相关性。这一发现可能表明，UPE参数可能不仅仅取决于与脂质产生过程相关的活性氧产生分子数量。此外，气阴两虚挟痰湿组和气阴两虚挟血瘀组的区别在于它们的氨基酸代谢物和糖含量，而糖和氨基酸代谢均属于在细胞内紧密相关的代谢网络系统。单一代谢通路相关的代谢不足可能影响整个代谢网络的工作，并进一步改变UPE在强度（活性氧的数量）和UPE时序性（生成活性氧的时间）方面的变化。

简言之，尽管UPE参数和特定代谢物类（如甘油三酯和胆固醇酯）之间有明显的联系，但亚型之间仍存在不同的UPE-代谢网络相关性。3种网络为明确区别疾病亚型提供了差异依据，并可能作为一种额外的诊断方法。然而，我们还须在更大的糖尿病前期和糖尿病受试者群体中开展进一步的临床研究，以便更好地探寻更详细的与UPE和基于中医理论的疾病诊断相关的生物学机制。这不仅可为UPE的临床应用潜能提供新的生理解释信息支持，也可为基于中医理念的疾病诊断提供更多的循证依据。

4. 结论与展望

血浆代谢组学可用于对早期2型糖尿病的3种中医

亚型进行分型，并提供了比尿液代谢组学更完善的分型统计结果。具体而言，甘油三酯和胆固醇酯等血浆脂质水平的升高，可能指示着特定亚型患者罹患心血管疾病的风险增加。此外，我们以非介入性的UPE对2型糖尿病前期进行亚分型，UPE参数与特定的血浆代谢物相关（主要是脂质代谢物），这类相关性在3种亚型之间有所区别。因此，将UPE与血浆代谢组学相结合，可从系统生物学角度加深对疾病诊断和UPE生化基础的认识。

通过参考中医理论下的疾病诊断与分型来鉴别2型糖尿病前期亚型从而达到未来实施个性化治疗的目的，这种研究是非常必要的，因为早期诊断、分型可以大大提高患者的治疗效果。本研究为整合代谢组学与UPE来实现个性化医疗、提高对疾病的早期诊断水平提供了可能性。但当下代谢组学平台不一定也没有必要来检测到并完全涵盖理想目标下的所有代谢轮廓图谱，实验中往往需要根据现有代谢组学平台进行选择使用。由于难以仅仅通过代谢组学获得反映复杂动态变化的综合信息，我们将基于中医理论指导下的疾病诊断方式与代谢组学和UPE相结合，对于促进2型糖尿病的早期诊断具有特别的贡献。为了扩展代谢物和UPE参数之间的相关性网络，还需采取进一步深入研究。此外，现有的各种对2型糖尿病亚型分类方法基于不同表型症状及诊断标准的实施，这些标准亟需依赖客观参数统一，以便进一步实施临床诊断标准化。因此，需要进行更多研究，以便更好地理解中医理论概念，如疾病的证候和证型。

致谢

作者何敏在荷兰莱顿大学（20108220166）攻读博士学位从事此科学研究期间获得了中国国家留学基金管理委员会的《国家建设高水平大学公派研究生项目》海外留学项目提供的资助，以及中国国家重点基础研究项目（2014CB543100）的支持，特此感谢。此外，作者感谢Herman van Wietmarschen对本文稿的审读。

作者贡献

何敏、Eduard Van Wijk、王梅、Slavik Koval、Thomas Hankemeier和Jan Van der Greef对研究工作的设计做出了重大贡献。何敏、孙濛濛、Eduard Van Wijk、

Roeland Van Wijk and Jan Van der Greef合作完成本文稿撰写工作。全体作者对本文稿进行了审读，并同意出版。

Compliance with ethics guidelines

Min He, Mengmeng Sun, Slavik Koval, Roeland Van Wijk, Thomas Hankemeier, Jan van der Greef, Eduard P. A. Van Wijk, and Mei Wang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online.

References

- [1] Virally M, Blicklé JF, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutic perspectives. *Diabetes Metab* 2007;33(4):231–44.
- [2] Wright E Jr, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract* 2006;60(3):308–14.
- [3] Ahmad SI, editor. *Diabetes: an old disease, a new insight*. Nottingham: Springer Science & Business Media; 2013.
- [4] Alba-Loureiro TC, Munhoz CD, Martins JO, Cerchiaro GA, Scavone C, Curi R, et al. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz Med Biol Res* 2007;40(8):1037–44.
- [5] Gonzalez-Franquesa A, Burkart AM, Isganaitis E, Patti ME. What have metabolomics approaches taught us about type 2 diabetes? *Curr Diab Rep* 2016;16(8):74.
- [6] Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet* 2009;373(9682):2215–21.
- [7] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87(1):4–14.
- [8] Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8(4):228–36.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes statistics report: estimates of diabetes and its burden in the United States. Report. Atlanta: US Department of Health and Human Services; 2014.
- [10] American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the US in 2012. *Diabetes Care* 2013;36(4):1033–46.
- [11] McCarthy MI. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med* 2010;363(24):2339–50.
- [12] Harris MI, Eastman RC. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16(4):230–6.
- [13] Jiang M, Lu C, Zhang C, Yang J, Tan Y, Lu A, et al. Syndrome differentiation in modern research of traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol* 2012;140(3):634–42.
- [14] Guo J, Chen H, Song J, Wang J, Zhao L, Tong X. Syndrome differentiation of diabetes by the traditional Chinese medicine according to evidence-based medicine and expert consensus opinion. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:492193.
- [15] Zhang AH, Sun H, Qiu S, Wang XJ. Recent highlights of metabolomics in Chinese medicine syndrome research. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:402159.
- [16] Ramautar R, Berger R, Van der Greef J, Hankemeier T. Human metabolomics: strategies to understand biology. *Curr Opin Chem Biol* 2013;17(5):841–6.
- [17] Wei H, Pasman W, Rubingh C, Wopereis S, Tienstra M, Schroen J, et al. Urine metabolomics combined with the personalized diagnosis guided by Chinese medicine reveals subtypes of pre-diabetes. *Mol Biosyst* 2012;8(5):1482–91.
- [18] Wu T, Yang M, Wei HF, He SH, Wang SC, Ji G. Application of metabolomics in traditional Chinese medicine differentiation of deficiency and excess syndromes in patients with diabetes mellitus. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:968083.
- [19] He M, Sun M, Van Wijk E, Van Wietmarschen H, Van Wijk R, Wang Z, et al. A Chinese literature overview on ultra-weak photon emission as promising technology for studying system-based diagnostics. *Complement Ther Med* 2016;25:20–6.
- [20] Van Wijk R, Van der Greef J, Van Wijk E. Human ultraweak photon emission and the yin yang concept of Chinese medicine. *J Acupunct Meridian Stud* 2010;3(4):221–31.
- [21] Ives JA, Van Wijk EP, Bat N, Crawford C, Walter A, Jonas WB, et al. Ultraweak photon emission as a non-invasive health assessment: a systematic review. *PLoS One* 2014;9(2):e87401.
- [22] Van Wijk R, Van Wijk EP, Van Wietmarschen HA, Van der Greef J. Towards whole-body ultra-weak photon counting and imaging with a focus on human beings: a review. *J Photochem Photobiol B* 2014;139:39–46.
- [23] Burgos RCR, Van Wijk EPA, Van Wijk R, He M, Van der Greef J. Crossing the boundaries of our current healthcare system by integrating ultra-weak photon emissions with metabolomics. *Front Physiol* 2016;7:611.
- [24] Van Wijk R, Van Wijk EP, Wiegant FA, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. *Indian J Exp Biol* 2008;46(5):273–309.
- [25] Cifra M, Pospíšil P. Ultra-weak photon emission from biological samples: definition, mechanisms, properties, detection and applications. *J Photochem Photobiol B* 2014;139:2–10.
- [26] Prasad A, Pospíšil P. Linoleic acid-induced ultra-weak photon emission from *Chlamydomonas reinhardtii* as a tool for monitoring of lipid peroxidation in the cell membranes. *PLoS One* 2011;6(7):e22345.
- [27] Kobayashi M, Takeda M, Sato T, Yamazaki Y, Kaneko K, Ito K, et al. In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress. *Neurosci Res* 1999;34(2):103–13.
- [28] Sun M, Van Wijk E, Koval S, Van Wijk R, He M, Wang M, et al. Measuring ultraweak photon emission as a non-invasive diagnostic tool for detecting earlystage type 2 diabetes: a step toward personalized medicine. *J Photochem Photobiol B* 2017;166:86–93.
- [29] Koek MM, Muilwijk B, Van der Werf MJ, Hankemeier T. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78(4):1272–81.
- [30] Van Wietmarschen HA, Van der Greef J, Schroën Y, Wang M. Evaluation of symptom, clinical chemistry and metabolomics profiles during Rehmannia six formula (R6) treatment: an integrated and personalized data analysis approach. *J Ethnopharmacol* 2013;150(3):851–9.
- [31] Draisma HHM, Reijmers TH, Bobeldijk-Pastorova I, Meulman JJ, Estourgie-Van Burk GF, Bartels M, et al. Similarities and differences in lipidomics profiles among healthy monozygotic twin pairs. *OMICS* 2008;12(1):17–31.
- [32] Van Wijk EPA, Van Wijk R, Bajpai RP, Van der Greef J. Statistical analysis of the spontaneously emitted photon signals from palm and dorsal sides of both hands in human subjects. *J Photochem Photobiol B* 2010;99(3):133–43.
- [33] Bajpai RP, Van Wijk EPA, Van Wijk R, Van der Greef J. Attributes characterizing spontaneous ultra-weak photon signals of human subjects. *J Photochem Photobiol B* 2013;129:6–16.
- [34] Xia J, Sinel'nikov IV, Han B, Wishart DS. *MetaboAnalyst 3.0*—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 2015;43(W1):W251–7.
- [35] Worley B, Powers R. Multivariate analysis in metabolomics. *Curr Metabolomics* 2013;1(1):92–107.
- [36] Van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, Van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 2006;7(1):142.
- [37] Benkali K, Marquet P, Rérolle JP, Le Meur Y, Gastinel L. A new strategy for faster urinary biomarkers identification by Nano-LC-MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *BMC Genomics* 2008;9(1):541.
- [38] Petersen IL, Tomasi G, Sørensen H, Boll ES, Hansen HC, Christensen JH. The use of environmental metabolomics to determine glyphosate level of exposure in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *Environ Pollut* 2011;159(10):3071–7.
- [39] Van Wijk R, Van Wijk EPA, Bajpai RP. Photocount distribution of photons emitted from three sites of a human body. *J Photochem Photobiol B* 2006;84(1):46–55.
- [40] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;13(11):2498–504.
- [41] Gao J, Tarcea VG, Karnovsky A, Mirel BR, Weymouth TE, Beecher CW, et al. Metscape: a Cytoscape plug-in for visualizing and interpreting metabolomic data in the context of human metabolic networks. *Bioinformatics* 2010;26(7):971–3.
- [42] Yin P, Peter A, Franken H, Zhao X, Neukamm SS, Rosenbaum L, et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem* 2013;59(5):833–45.
- [43] Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemom* 2006;20(8–10):341–51.
- [44] Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem* 2008;80(1):115–22.
- [45] Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;105(2):141–50.
- [46] Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite

- profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 2011;17(4): 448–53.
- [47] Salek RM, Maguire ML, Bentley E, Rubtsov DV, Hough T, Cheeseman M, et al. A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol Genomics* 2007;29(2):99–108.
- [48] Wang-Sattler R, Yu Z, Herder C, Messias AC, Floegel A, He Y, et al. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Mol Syst Biol* 2012;8(1):615.
- [49] Bagdade JD, Ritter MC, Subbaiah PV. Accelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1991;21(2):161–7.
- [50] Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res* 2005;36(3):232–40.
- [51] Sjölin J, Hjort G, Friman G, Hambraeus L. Urinary excretion of 1-methylhistidine: a qualitative indicator of exogenous 3-methylhistidine and intake of meats from various sources. *Metabolism* 1987;36(12):1175–84.
- [52] He M, Van Wijk E, Van Wietmarschen H, Wang M, Sun M, Koval S, et al. Spontaneous ultra-weak photon emission in correlation to inflammatory metabolism and oxidative stress in a mouse model of collagen-induced arthritis. *J Photochem Photobiol B* 2005;36(3):232–40.
- [53] Chuang H, Lee E, Liu Y, Lee D, Ideker T. Network-based classification of breast cancer metastasis. *Mol Syst Biol* 2007;3(1):140.
- [54] Barabási AL, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12(1):56–68.
- [55] Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 2005;437(7061):1032–7.
- [56] Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, et al. palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia* 2007;50(2):359–69.