

呼出气体活体质谱分析揭示中医推拿引起的代谢反应

朱腾高¹ 韩京² 舒俊文³ 柯牡芳² 王丹¹
刘文杰² 林年香³ 陈焕文^{* 1}

¹(东华理工大学, 江西省质谱科学与仪器重点实验室, 南昌 330013)

²(吉林大学化学学院, 无机合成与制备化学国家重点实验室, 长春 130012)

³(德一天合健康维护中心, 北京 100089)

摘 要 采用电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS) 技术, 在正离子检测模式下, 对经过临床中医诊断为肝胆火旺、心脾阳虚和寒湿厚重等不同健康状态的 4 名志愿者接受推拿前后的呼出气体样品在 m/z 50~1000 质量范围内的指纹谱图进行了直接分析。通过高分辨质谱确认了接受推拿前后发生显著变化的代谢物(如肾上腺素(m/z 184.0889)、3-(3-羟基苯基) 丙酸(m/z 167.0615) 和 L-色氨酸(m/z 205.0933) 等) 的结构。此外, 结合偏最小二乘法判别分析(PLS-DA) 使健康状态不同的志愿者接受中医推拿前后呼出气体的指纹谱图得到明显区分, 说明中医推拿能显著地改变志愿者的新陈代谢过程。呼出气体的直接质谱分析将是实时跟踪中医推拿引起的代谢变化的有效途径。

关键词 呼出气体; 质谱分析; 偏最小二乘法判别分析; 中医推拿

1 引言

以中医的脏腑、经络学说为理论基础发展起来的中医推拿兼具防病治病的功效。根据中医理论, 经络是人体气血运行的通路, 它们在人体内彼此紧密相连, 内通五脏六腑, 外络肢体皮毛, 从而构成一个完整的循环系统, 起着兴气血、通阴阳、养脏腑、利关节的作用。然而, 现代解剖学很难发现与中医理论中相对应的经络系统。因此, 寻求经络系统的功能及其物质基础一直是研究者感兴趣的课题。

呼出气体是人体血液的一部分, 携带了大量能反映生理/病理状态的人体代谢产物^[1-3]。闻识呼出气体的味道而进行某些疾病的辨证施治是中医闻诊的重要内容, 被确立为仅次于望诊的中医四诊之一。此外, 在《难经》、《金匱要略·肺痿肺痛咳嗽上气》中依据气味与五脏的相应关系, 通过闻识气味辨别病变部位^[4]。近年来, 无需样品预处理的呼出气体直接质谱分析在临床诊断和代谢组学研究领域日益受到关注^[5-8], 使呼出气体成为一类取样方便、实时可得、具有重要诊断价值的生物样品。以屠呦呦先生获得诺贝尔奖为里程碑^[9], 国际上越来越重视中医药研究的开发, 俄罗斯等国已设立专门的体验机构和研究小组^[10]。然而, 受到研究手段等限制, 目前对中医基础理论的研究仍然鲜见报道。Hu 课题组^[11-13]采用电针刺法研究了经络的传导功能, 德国学者 Schroeder 等^[14]从中国时钟的角度研究了部分腧穴的功能。这些研究对相关工作起到了重要参考作用。

与前人研究不同, 本研究拟从分子层面出发, 探寻伴随中医推拿出现的感官疗效带来的代谢产物的变化, 旨在获取中医推拿疗效的物质基础和分子学证据。因此, 本研究以志愿者接受中医推拿术前后的呼出气体为样品, 采用可直接分析呼出气体样品的电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS) 为分析平台, 在分子层次考察中医推拿对新陈代谢的影响。在无需样品预处理条件下, EESI-MS 可对液体^[15-18]、气体^[19, 20]、气溶胶^[18-20]和黏性样品^[22, 23]等各种形态的生物样品进行在线分析, 能够直接、快速地获得呼出气体中丰富的组分信息。在此基础上, 采用偏最小二乘法判别分析(PLS-DA) 处理代谢组学大量多变量数据, 通过对比不同志愿者呼出气体数据的 PLS-DA 分析结果验证中医推拿前后呼吸气体中代谢产物的变化, 并对部分具有显著变化的代谢产物进行高分辨质谱分析。

2017-10-20 收稿; 2017-11-28 接受

本文系高等学校学科创新引智计划(111 计划) (No. D17006)、国家自然科学基金项目(No.21520102007) 和江西省质谱科学与仪器重点实验室开放基金项目(No.JXMS201518) 资助

* E-mail: chw8868@gmail.com

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高分辨率静电场轨道阱质谱仪(LTQ Orbitrap XL, 美国 ThermoFisher Scientific 公司), 配有 Xcalibur 2.2 数据处理系统; EESI 离子源(江西省质谱科学与仪器重点实验室自制); Matlab 数据分析软件(Version 7.8.0, Mathworks, Inc., Natick, MA); Simca 数据分析软件(Version 13.0, Umetrics, Sweden)。甲醇(色谱纯, 美国 ROE 公司)。

2.2 研究对象

选择年龄为 28~60 岁、不同健康状态的男女志愿者进行实验。在实验前对研究对象作了临床医学统计调查问卷, 包含了年龄、饮食、睡眠、情绪、病史、运动习惯等项目。为了最大程度地排除其它因素干扰机体的激素释放, 在多名志愿者中考虑了饮食、睡眠、病史、精神状态、情绪等情况, 经综合考量, 最后优选了 4 名志愿者作为本研究的对象。其中, 志愿者 1, 男性, 年龄 60 岁, 身体情况接近理想健康状态, 无任何不适症状, 采用轻柔温补手法推拿心经和肺经; 志愿者 2, 女性, 年龄 28 岁, 主要为肝胆火旺, 推拿肝经和胆经; 志愿者 3, 女性, 年龄 35 岁, 主要为心脾阳虚, 自感肩膀僵痛, 胸闷气短, 久坐腰疼, 推拿脾经和心经; 志愿者 4, 女性, 年龄 28 岁, 主要为心脾阳虚, 寒湿厚重, 推拿心经、脾经和胃经。中医诊断志愿者的病症状态由 3 位中医医生做出。

志愿者经过西医体检后发现身体各项指标正常, 属于健康志愿者。推拿前, 志愿者维持正常作息、饮食及工作量, 没有经过特殊护理。实验前 3 h 内不进饮食, 以免因食物不同而干扰呼出气体检测。实验前 1 h 结束工作, 充分休息后记录志愿者的呼出气体质谱指纹谱图。接受 30 min 专业中医推拿治疗, 再采集中医推拿治疗后志愿者的呼出气体指纹谱图, 直接进行 EESI-MS 分析。

2.3 EESI-MS 分析

2.3.1 分析步骤 中医推拿医生首先对志愿者进行中医诊断(望、闻、问、切), 详细了解志愿者的身体状况, 根据诊断结果, 针对性地对志愿者进行穴位或经络方面的中医推拿调理。设置仪器参数, 由志愿者口含一根特氟龙管直接吹气, 引入 EESI 离子源进入质谱仪检测, 吹气流速通过玻璃转子流量计控制在 800 mL/min, 吹气时间保持 30 s。每测完一个志愿者, 更换新的特氟龙管路, 并用高纯氮气进行冲洗。最后, 利用 Simca 软件对获得的 EESI-Orbitrap-MS 质谱数据进行 PLS-DA 分析。

2.3.2 质谱条件 正离子检测模式, 质量扫描范围 m/z 50~1000, 喷雾电压 4.0 kV, 离子传输管温度 200°C, 毛细管电压 35 V, 透镜电压 110 V。EESI 离子源: 2 个喷头毛细管喷雾尖端距离 1~2 mm; 夹角 120°; 质谱进样锥口的距离 0.5 cm; 如图 1 所示, 详细参见文献 [24, 25]。萃取剂: 甲醇, 萃取剂流速: 8 μ L/min; 鞘气流速: 5 arb; 呼出气体流速: 800 mL/min。其它条件由 LTQ Orbitrap XL 系统自动优化。

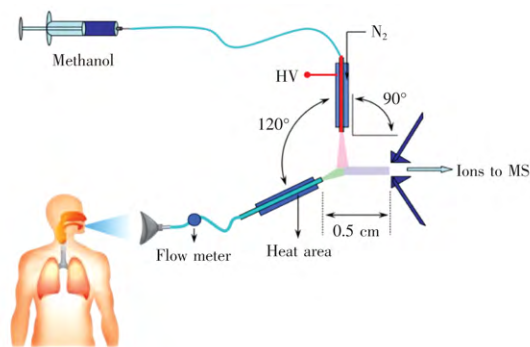


图1 电喷雾萃取电离质谱分析呼出气体实验示意图
Fig.1 Schematic diagram of extractive electrospray ionization-mass spectrometry (EESI-MS) for exhaled breath analysis

3 结果与讨论

3.1 EESI-MS 分析中医推拿前志愿者呼出气体

呼出气体可能具有复杂的分子组成, 而各分子种类与含量的差异构成了该样品的分子指纹。本研究对 4 位志愿者接受中医推拿前呼出气体进行 EESI-MS 分析, 获得具有丰富的质谱信号的一级指纹谱图(图 2A、C、E、G)。通过对比图 2 中 A、C、E、G 发现, 不同志愿者呼出气体的指纹谱图存在差别, 这可能与志愿者不同的身体状态和健康状态有关。采用偏最小二乘法判别分析(PLS-DA) 进行数据处理, 发现志愿者 1 明显区别于其他 3 名志愿者(图 3)。实际上, 志愿者 1 经过中医诊断为接近理想的健康状

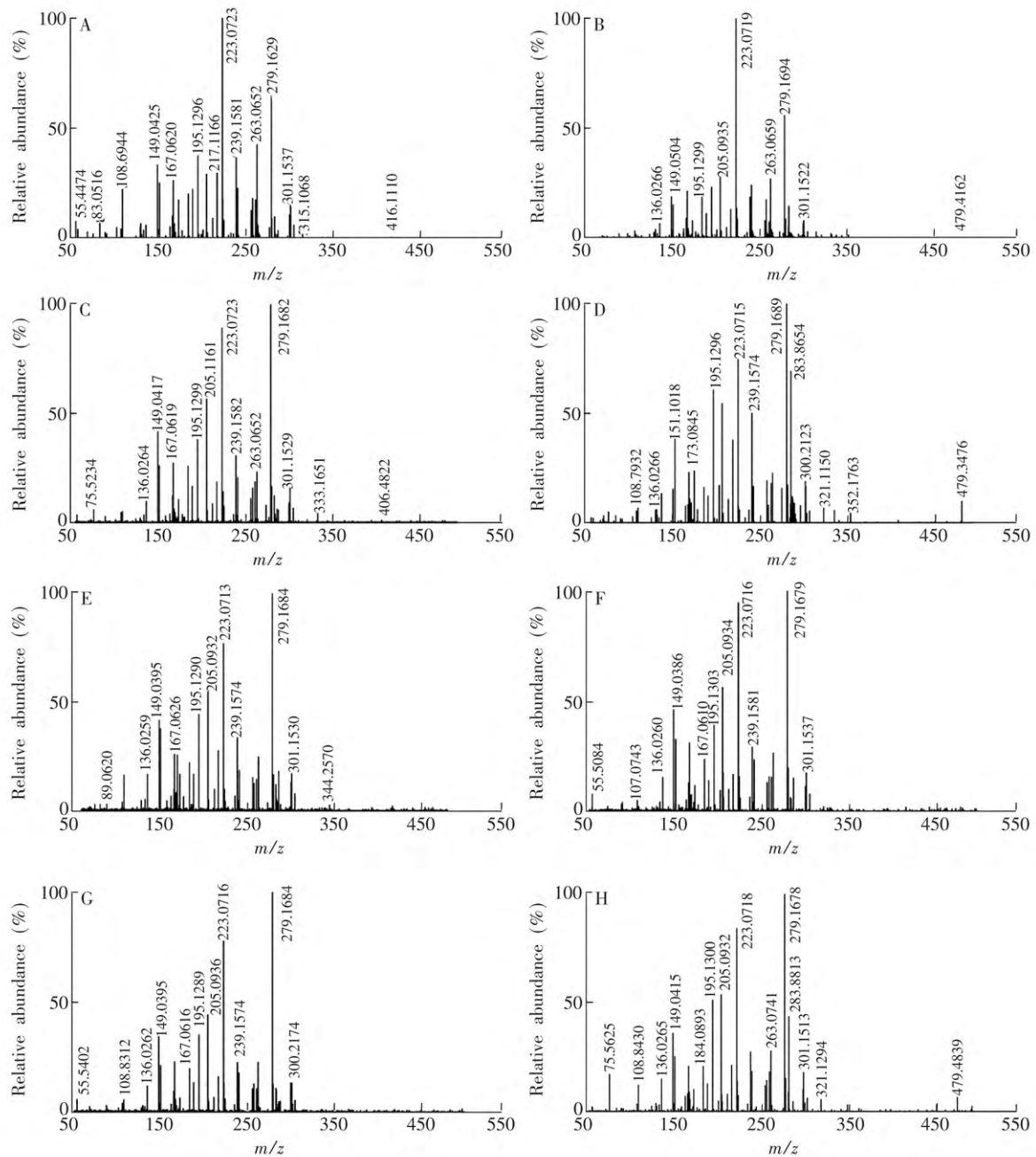


图2 EESI-MS 分析中医推拿前、后志愿者呼出气体指纹谱图: A 志愿者 1 前; B 志愿者 1 后; C 志愿者 2 前; D 志愿者 2 后; E 志愿者 3 前; F 志愿者 3 后; G 志愿者 4 前; H 志愿者 4 后

Fig.2 EESI-MS spectra of exhaled breath of volunteers before and after receiving Traditional Chinese Medicine massage: (A) volunteer 1 before; (B) volunteer 1 after; (C) volunteer 2 before; (D) volunteer 2 after; (E) volunteer 3 before; (F) volunteer 3 after; (G) volunteer 4 before; (H) volunteer 4 after

态,没有气滞血瘀或阴阳失衡方面的问题。这与图 3 反映的数据分析结果一致。志愿者 2、3 和 4 的 PLS-DA 分析结果有部分重叠,这主要因为其在中医诊断中均存在不同程度的病症,而且志愿者 3 和 4 同时表现心脾阳虚,故其呼出气体的谱图重叠更加明显。这些结果表明,EESI-MS 分析结合 PLS-DA 处理数据可以获得呼出气体中多种组分信息,并且根据这些信息可进行生理/病理状态归类。

3.2 EESI-MS 分析中医推拿后志愿者呼出气体

4 位志愿者分别接受 30 min 中医推拿治疗后,采用 EESI-MS 直接对其呼出气体进行质谱分析,获得的指纹谱图如图 2B、D、F、H 所示。对比经过中医推拿前(图 2A、C、E、G)后(图 2B、D、F、H)志愿

者呼出气体指纹谱图发现,所有志愿者呼出气体的质谱指纹谱图在推拿前后均发生了变化。如,经过轻柔温补手法推拿心经和肺经后,志愿者1自我感觉更加轻松有活力,而呼出气体指纹谱图(图2B)较治疗前(图2A)具有显著差异,如推拿后 m/z 108.6944 和 m/z 83.0516 谱峰强度较推拿前显著降低;其它信号峰,如 m/z 149.0504、 m/z 184.0889、 m/z 167.0620、 m/z 173.0845、 m/z 205.0935、 m/z 217.1166、 m/z 241.0834、 m/z 261.1417、 m/z 189.0406 等质谱峰的信号强度也发生了变化。志愿者2主要为肝胆火旺,自感平时多口干舌燥,经过中医推拿后感觉良好,口干舌燥情况立即得到显著缓解;志愿者3经过推拿脾经和心经后,无肩膀僵痛和胸闷气短症状。志愿者4通过推拿心经、脾经和胃经后,自感神清气爽,浑身轻松,状态良好。对比发现志愿者2、志愿者3和志愿者4经过中医推拿前后呼出气体中的质谱信号峰强度也存在变化。在 EESI-MS 呼出气体的质谱指纹谱图中可以反映出这些变化,但是经过统计学处理后,变得更加清晰(图3)。

3.3 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)

本研究采用偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)处理数据,对比不同志愿者呼出气体中医推拿前后呼吸气体中代谢产物的变化。分别选取志愿者20次中医推拿前后的呼出气体质谱数据进行 PLS-DA 分析,结果表明,PLS-DA 方法可以有效区分4名志愿者中医推拿前后的呼出气体(图4)。在图4A中,志

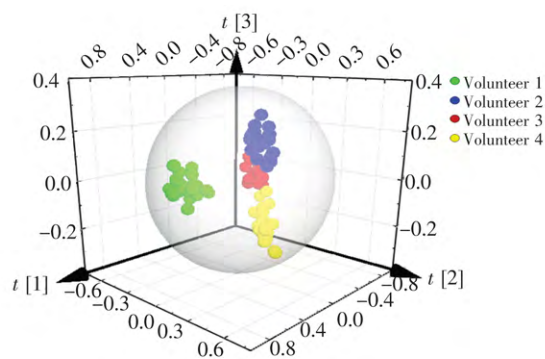


图3 中医推拿前4位志愿者呼出气体 PLS-DA 分析三维得分图

Fig. 3 Partial least squares discrimination analysis (PLS-DA) score plots for 4 volunteers before receiving Traditional Chinese Medicine massage

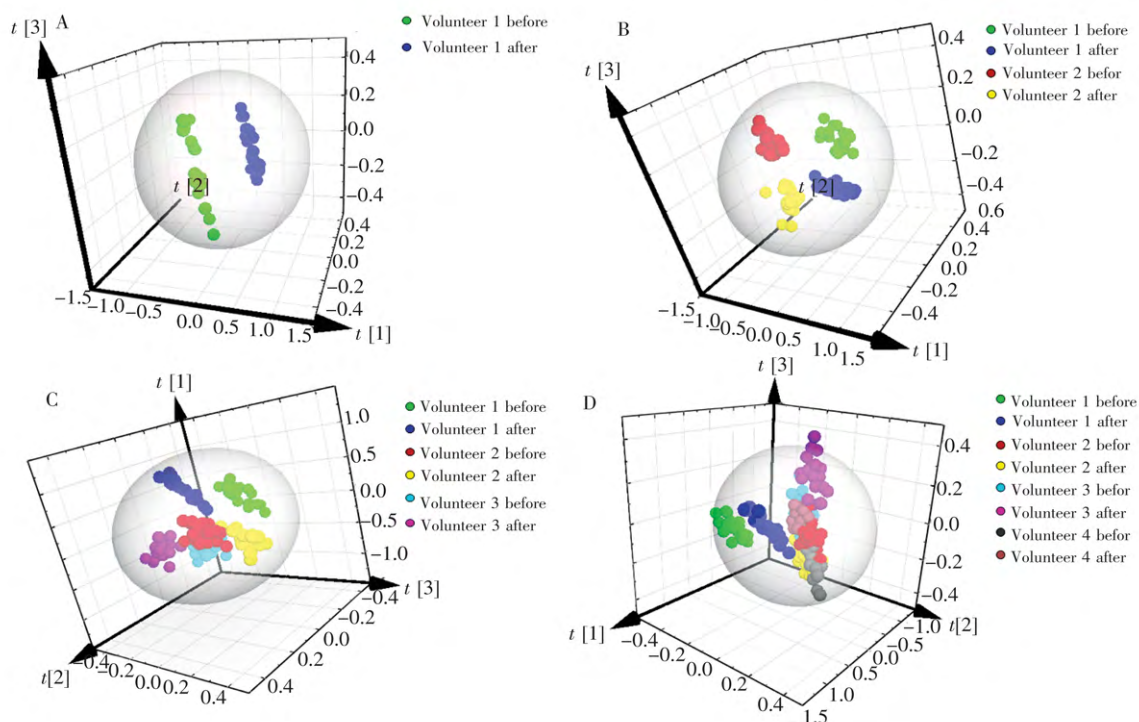


图4 中医推拿前后4位志愿者呼出气体 PLS-DA 分析三维得分图。A 志愿者1; B 志愿者1和2; C 志愿者1、2和3; D 所有志愿者。

Fig. 4 Three dimensional PLS-DA score plots for 4 volunteers before and after receiving Traditional Chinese Medicine massage. (A) Volunteer 1; (B) Volunteer 1, 2; (C) Volunteer 1, 2, and 3; (D) All the four volunteers.

愿者 1 在中医推拿前、后呼出气体的指纹谱图发生了显著的变化,其中 m/z 184.0889、 m/z 108.6944、 m/z 83.0516、 m/z 149.0504、 m/z 167.0620、 m/z 205.0935 等差异显著。在 PLS-DA 分析结果中, VIP 值反映了各个质荷比对样品区分的贡献, VIP 值 >1.0 的物质对区分贡献较大。经过精确质量分析发现, m/z 184.0889 对应的物质可能是肾上腺素(偏差 ≤ 20 ppm)。肾上腺素是一种具有重要生理功能的激素,能够直接作用于肾上腺素能 α 、 β 受体,产生强烈快速而短暂的兴奋 α 和 β 型效应,对心脏 β_1 -受体的兴奋,可使心肌收缩力增强,心率加快,心肌耗氧量增加;同时作用于血管平滑肌 β_2 -受体,使血管扩张,松弛支气管平滑肌,扩张支气管,解除支气管痉挛,降低周围血管阻力而减低舒张压。这些效应与志愿者 1 自感评价一致。类似地,质谱峰 m/z 184.0889 在其他志愿者推拿后的呼出气体中都有检出,虽然浓度差异较大,可能与志愿者各自的身体健康差异与中医推拿的穴位或经络部位不同有关。目前的初步结果预示肾上腺素可作为评价推拿疗效的重要物质之一。

类似地,志愿者 2、3 和 4 的呼出气体在接受中医推拿前后均发生了显著变化,他们的得分图即使与志愿者 1 的得分图叠加在一起仍然可清晰地地区分,分别如图 4B、4C 和 4D 所示。在志愿者 2 的呼出气体中, m/z 75.5626、 m/z 184.0896、 m/z 217.1228、 m/z 167.0615 等成分存在显著性差异;在志愿者 3 的呼出气体中, m/z 223.0716、 m/z 163.1406、 m/z 151.1066、 m/z 205.0935 等成分存在显著性差异;在志愿者 4 的呼出气体中, m/z 283.8838、 m/z 217.1228、 m/z 205.0933 等成分存在显著性差异。通过高分辨质谱分析发现,这些物质,如 m/z 167.0615(3-(3-羟基苯基)丙酸)、 m/z 205.0933(L-色氨酸)、 m/z 223.0716(L-胱硫醚)最有可能存在于呼出气体中。中医推拿对志愿者的新陈代谢产生了影响,呼出气体可反映代谢产物的变化,EESI-MS 呼出气体分析平台可从分子层次上揭示这些代谢物的变化。

4 结论

采用电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)直接分析了志愿者推拿治疗前后的呼出气体样品,并对比了不同的志愿者呼出气体指纹谱图。初步研究结果表明,志愿者呼出气体中的肾上腺素、氨基酸等物质有显著变化,意味着中医推拿影响了志愿者新陈代谢过程,从而造成了人体呼出气体代谢产物的变化。呼出气体的 EESI-MS 质谱分析可获得呼吸气体样品物质指纹谱图,并可通过高分辨质谱分析进行结构鉴定,有望作为跟踪中医推拿引起的代谢组学变化的有效工具。

References

- 1 Berchtold C, Meier L, Steinhoff R, Zenobi R. *Metabolomics*, **2014**, 10(2): 291-301
- 2 Haick H, Broza Y Y, Mochalski P, Ruzsanyi V, Amann A. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43(5): 1423-1449
- 3 Broza Y Y, Mochalski P, Ruzsanyi V, Amann A, Haick H. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2015**, 54(38): 11036-11048
- 4 CHEN Chun-Feng, WANG Yi-Qin, YAN Hai-Xia. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, **2014**, 41(1): 63-64
陈春风,王忆勤,燕海霞. *辽宁中医杂志*, **2014**, 41(1): 63-64
- 5 Gaugg M T, Engler A, Nussbaumer-Ochsner Y, Bregy L, Stoberl A S, Gaisl T, Bruderer T, Zenobi R, Kohler M, Sinues P M L. *J. Breath. Res.*, **2017**, 11(4): 046004
- 6 Schwarz E I, Sinues P M L, Bregy L, Gaisl T, Gomez D G, Gaugg M T, Suter Y, Stebler N, Nussbaumer-Ochsner Y, Bloch K E, Stradling J R, Zenobi R, Kohler M. *Thorax*, **2015**, 71(2): 110-117
- 7 Sinues P M L, Zenobi R, Kohler M. *Eur. Respir. J.*, **2013**, 42: P1270
- 8 Sinues P M L, Zenobi R, Kohler M. *Chest*, **2013**, 144(3): 746-749
- 9 Tu Y. *Nat. Med.*, **2011**, 17(10): 1217-1220
- 10 LI Zhong-You, BAO Yu-Qin. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, **2009**, 16(11): 1-2
李宗友,鲍玉琴. *中国中医药信息杂志*, **2009**, 16(11): 1-2
- 11 Guo J J, Liu J H, Fu W B, Ma W T, Yuan M Q, Zhou X D, Hu J M. *J. Physiol. Sci.*, **2008**, 58(5): 309-315
- 12 Guo J, Liu J, Fu W, Ma W, Xu Z, Yuan M, Song J, Hu J. *Brain Res.*, **2008**, 1188(1): 165-172
- 13 Liu J H, Yan J, Yi S X, Chang X R, Lin Y P, Hu J M. *Neurosci. Lett.*, **2004**, 356(2): 99-102

- 14 Schroeder S , Epplee S , Zhang J W , Meyer-Hamme G , Friedemann T , Hu W G. *Evid-Based. Compl. Alt.* , **2012** , 2012(3) : ID 268237
- 15 Chen H W , Venter A , Cooks R G. *Chem. Comm.* , **2006** , (19) : 2042–2044
- 16 Chingin K , Chen H W , Gamez G , Zhu L , Zenobi R. *Anal. Chem.* , **2009** , 81(1) : 123–129
- 17 Law W S , Chen H W , Ding J H , Yang S P , Zhu L , Gamez G , Chingin K , Ren Y L , Zenobi R. *Angew. Chem. Int. Edit.* , **2009** , 48(44) : 8277–8280
- 18 Chagovets V , Kononikhin A , Starodubtseva N , Sysoev A A , Ding J H , Chen H W , Frankevich V. *Eur. J. Mass Spectrom.* , **2015** , 21(6) : 829–832
- 19 Chen H W , Wortmann A , Zhang W H , Zenobi R. *Angew. Chem. Int. Edit.* , **2007** , 46(4) : 580–583
- 20 Chen H , Yang S , Wortmann A , Zenobi R. *Angew. Chem. Int. Edit.* , **2007** , 46(40) : 7591–7594
- 21 Gu H W , Hu B , Li J Q , Yang S P , Han J , Chen H W. *Analyst* , **2010** , 135(6) : 1259–1267
- 22 Ding J H , Gu H W , Yang S P , Li M , Li J Q , Chen H W. *Anal. Chem.* , **2009** , 81(20) : 8632–8638
- 23 Huang X Y , Fang X W , Zhang X , Dai X M , Chen H W , Luo L P. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2014** , 406(29) : 7705–7714
- 24 Moser B , Bodrogi F , Eibl G , Lechner M , Rieder J , Lirk P. *Resp. Physiol. Neurobio.* , **2005** , 145(2–3) : 295–300
- 25 DING Jian-Hua , WANG Xing-Xiang , ZHANG Hui , PAN Su-Su , LUO Ming-Biao , LI Jian-Qiang , CHEN Huan-Wen. *Chem. J. Chinese Universities* , **2011** , 32(8) : 1714–1719
- 丁健桦 , 王兴祥 , 张慧 , 潘素素 , 罗明标 , 李建强 , 陈焕文. 高等学校化学学报 , **2011** , 32(8) : 1714–1719

In vivo Breath Analysis by Extractive Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Investigation of Metabolic Responses to Traditional Chinese Medicine Massages

ZHU Teng-Gao¹ , HAN Jing² , SHU Jun-Wen³ , KE Mu-Fang² , WANG Dan¹ ,
LIU Wen-Jie² , LIN Nian-Xiang³ , CHEN Huan-Wen^{*1}

¹(East China University of Technology , Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation , Nanchang 330013 , China)

²(State Key Laboratory of Inorganic Synthesis and Preparative Chemistry , College of Chemistry , Jilin University , Changchun 130012 , China)

³(De Yi Tian He Health Care Centre , Beijing 100089 , China)

Abstract Traditional Chinese Medicine massage is a kind of physiotherapy which affects on specific parts of the body surface by means of training to regulate the function of the body to achieve the therapeutic effect. In this work , under positive detection model , the chemical fingerprint of exhaled breath from volunteers before and after receiving Traditional Chinese Medicine massage within m/z 50–1000 were detected by extractive electrospray ionization-mass spectrometry (EESI-MS) . And through high resolution mass spectrometry analysis , the metabolites such as epinephrine (m/z 184. 0889) , 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid (m/z 167.0615) and *L*-tryptophan (m/z 205. 0933) were successfully identified. Besides , chemical fingerprints of volunteers before and after receiving Traditional Chinese Medicine massage under different health condition were clearly differentiated via partial least squares discrimination analysis (PLS-DA) . The results showed that Traditional Chinese Medicine massage could significantly change the metabolic process of volunteers. Moreover , it further indicated that the established method could provide a real time fashion to follow metabolic changes caused by Traditional Chinese Medicine massage.

Keywords Exhaled breath; Mass spectrometry; Partial least squares discrimination analysis; Traditional Chinese Medicine massage

(Received 20 October 2017; accepted 28 November 2017)

This work was supported by the 111 Project (No. D17006) , the National Natural Science Foundation of China (No. 21520102007) , and the Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation Open Fund (No. JXMS201518) .