

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001701

基于高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱的股骨头缺血性坏死患者尿液的代谢轮廓分析

高四川¹, 周爱国¹, 白浩波¹, 陈婷梅², 丁世家³, 郭延磊¹, 张健¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院关节外科, 重庆 400016; 重庆医科大学检验医学院 2. 诊断医学实验室教育部重点实验室; 3. 中国教育部临床实验室诊断重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:运用代谢组学的分析研究方法,对股骨头缺血性坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)患者尿液进行代谢轮廓分析,从而探索 ONFH 的分子机制及诊断性生物标志物。**方法:**运用高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱技术对 26 例 ONFH 患者的尿液(实验组)和 26 例正常人的尿液(对照组)进行检测,结合主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA)对差异代谢物进行模式识别分析并观察组间差异。**结果:**实验组和对照组的代谢谱得到明显区分,发现并鉴定出 28 种与 ONFH 相关的差异代谢物,差异具有统计学意义($P < 0.05$),其中筛选出二丙基二硫化物、三甲基硒和氨基甲酸作为 ONFH 潜在的诊断性生物标志物;此外,嘌呤代谢、酪氨酸代谢、果糖和甘露糖代谢的紊乱可能与 ONFH 发生发展密切相关。生物信息学分析结果显示 ONFH 患者的骨骼发育、能量代谢、骨代谢、矿物质代谢、脂质代谢、脂质氧化、血管通透性和氧化应激均受到干扰。**结论:**基于高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱联合多变量数据统计分析成功运用于 ONFH 尿液的代谢轮廓分析。

【关键词】代谢组学;高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱;股骨头缺血性坏死;尿液;生物标志物

【中图分类号】R681.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-05

Urinary metabolomics for the osteonecrosis of the femoral head patients based on HPLC-QTOF/MS

Gao Sichuan¹, Zhou Aiguo¹, Bai Haobo¹, Chen Tingmei², Ding Shijia³, Guo Yanlei¹, Zhang Jian¹

(1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;
2. Key Laboratory of Diagnostic Medicine Designated by the Ministry of Education College of Laboratory Medicine; 3. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics (Ministry of Education of China),
College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: Osteonecrosis of the femoral head (ONFH), one of the widespread orthopaedic diseases with a decrease in bloodstream to the femoral head, is frequently accompanied by cellular death, trabecula fracture, and collapse of the articular surface. The exactly pathological mechanism of ONFH is unknown. The early and rapid diagnosis biomarkers for this disease remain to explore and further identify. **Methods:** High performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry (HPLC-Q-TOF/MS) in combination with multivariate statistical analysis was developed and performed to identify the metabolic profiling of urine from 26 ONFH patients and 26 healthy people. **Results:** Twenty-eight distinctly differential metabolites were detected between the ONFH patients and healthy people. Dipropyl disulfide, trimethylselenonium and carbamic acid were expected to be the potential biomarkers of ONFH. In addition, the up/down-regulation of purine metabolism, tyrosine metabolism, fructose and mannose metabolism were clearly be associated with the ONFH pathogenic progress. The results of bioinformatics analysis suggested a disturbance in energy metabolism, skeletal development, bone metabolism, mineral metabolism, lipid metabolism, lipid oxidation, vascular permeability and oxidative stress of the ONFH patients. **Conclusion:** Metabolomics could serve as a promising approach for identifying the diagnostic biomarkers and elucidating the pathological mechanism of ONFH.

【Key words】metabolomics; High performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry; osteonecrosis of the femoral head; urine; biomarkers

作者介绍: 高四川, Email: 471855658@qq.com,

研究方向: 关节外科运动医学方向。

通信作者: 张健, Email: zhangjianqmu@sohu.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180517.1157.008.html>

(2018-05-19)

股骨头缺血性坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是一种常见的骨科疾病,常伴随股骨头内血流减少所致的细胞坏死、骨小梁骨折以及关节面塌陷^[1]。ONFH 主要发病于相对年轻患者,并伴随着不可逆转的髋关节功能丧失。全髋关节置换术(total hip arthroplasty, THA)成为 ONFH 患者的唯一明确治疗手段^[2]。研究表明,缺血、直接细胞毒性和间充质干细胞分化改变是其可能发病机制^[3-5],过度饮酒、创伤、皮质类固醇使用、自身免疫性疾病等疾病是其可能高危因素^[6-7]。目前 ONFH 的病理学、影像学以及侵入性组织病理学检查较为成熟^[8-9],但 ONFH 患者的早期诊断仍是一个世界性难题,尤其是对伴有易感因素患者的诊断更为不易。

由于代谢组学的敏感性及定量重现性,其在生物医学研究中成功应用于生理学、诊断学、功能基因组学等研究^[10-12]。Liu 等^[13]研究发现 ONFH 患者血浆中存在 123 种差异性代谢物;Zhu 等^[14]研究发现 ONFH 患者股骨头骨组织中存在 67 种差异性代谢物,其中 L-脯氨酸、D-精氨酸、肌苷和 L-肉碱被推荐为 ONFH 的诊断性生物标志物。

本研究运用高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱技术对 26 例 ONFH 患者和 26 例正常人的尿液进行检测,并联合多变量数据统计分析对差异代谢物进行模式识别分析并观察组间的差异,目的在于探索 ONFH 的代谢紊乱及潜在的诊断性生物标志物。

1 材料和方法

1.1 实验对象

本实验研究涉及尿液的 26 名股骨头坏死患者及 26 名健康受试者均来自重庆医科大学附属第一医院自 2016 年 2 月至 2017 年 2 月的住院病人和体检者。本试验通过当地的伦理委员会并取得所有受试者的知情同意书。实验组参与者的纳入标准为:①在 Ficat 分期中,通过磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)和 X 线检查确定为 3 期或 4 期的 ONFH 患者;②髋关节内外旋功能严重受限,并需要行全髋关节置换术(THA)的患者。实验组参与者的排除标准为:①既往有代谢性骨疾病的患者,如严重骨质疏松症、佩吉特病、甲状旁腺功能亢进或甲状旁腺功能减退症、肾性骨营养不良、骨肿瘤及骨转移性肿瘤等;②近期服用药物及饮食不健康的患者。最终,ONFH 组纳入 26 名 ONFH 受试者(8 名女性,18 名男性),对照组招募了 26 名健康受试者(10 名女性,16 名男性),见表 1。

表 1 受试者的人口统计学特征和临床特征

	ONFH组 (n=26)	对照组 (n=26)	P 值
男/女比例 (n)	18/8	16/10	
年龄(岁)	53.4 ± 11.1	54.3 ± 10.5	0.078
体质指数(kg/m ²)	23.9 ± 1.8	23.1 ± 1.9	0.110
Ficat 分期	三期或四期	正常	
髋关节功能	严重受限	正常	
代谢性疾病史	无	无	

1.2 样本收集和处理的

收集 ONFH 患者和对照受试者的晨空腹尿液样本 5 mL,并加入 200 μL 叠氮化钠(0.05% wt/v)以抑制样本中的微生物降解作用。所有尿液样本均储存于-80 °C 冰箱中以避免代谢物降解。为了避免代谢物溶剂提取前尿液中代谢物组分的潜在改变,所有尿液样本均在冰上解冻 25 min(室温下)。取 100 μL 尿进行代谢物提取;加入 100 μL 乙腈沉淀小分子蛋白质及其他高分子量化合物,12 000 r/min 离心 10 min 去除沉淀物(4 °C),提取 40 μL 上清液并加入 60 μL 蒸馏水稀释至 100 μL,取 60 μL 于自动采样瓶用于样本分析,取 10 μL 用于仪器稳定性和重复性评估。

1.3 分析方法的验证

由于仪器分析效率的波动性,质量控制样本(quality control, QC)被用于监测仪器的稳定性和重复性。在每批样本进针之前,各进 10 针 QC 样本用于评估仪器的稳定性;在每 5 个样本间进一针 QC 样本用于评估仪器的重复性;在每个 QC 样本后再进一针空白针用于色谱柱的冲洗。最后对所有 QC 样本产生的数据进行主成分分析(principal components analysis, PCA)及 QC 样本中随机离子的相对标准偏差分析(relative standard deviations, RSD%)来评估仪器的稳定性和重复性。

1.4 HPLC/Q-TOF-MS 分析

反相色谱柱 Kinetex XB-C18 column(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm, Phenomenex), 正相色谱柱 Luna-Silica column(100 mm × 2.1, 3 μm, Phenomenex), 流速 0.35 mL/min。反相色谱法:流动相由溶剂 A(0.1%甲酸水溶液, v/v)和溶剂 B(0.1%甲酸乙腈溶液, v/v)组成,梯度洗脱:0.0~1.0 min, 1%B; 1.0~8.0 min, 5%~85%B; 8.0~12.0 min, 85%B; 12.0~12.1 min, 85%~5%B。正相色谱法:流动相由溶剂 C[95:5 水/乙腈(v/v)与 0.1%甲酸]和溶剂 D[5:95 水/乙腈(v/v)与 0.1%甲酸]组成,梯度洗脱:0.0~1.0 min, 95%D; 1.0~8.0 min, 95%~50%D; 8.0~12.0 min, 50%D; 12.0~12.1 min, 50%~95%D。质谱:AB-Sciex 4600 四级杆-飞行时间质谱仪,分别采用电喷雾正离子和负离子电离模式。碰撞能量:40 ± 15(+ESI), -40 ± 15(-ESI)离子喷雾电压:阳离子模式+5 500 V, 阴离子模式-4 500 V;热箱温度:600 °C;雾化气压力:55 Psi;涡轮增压气压力:55 Psi;气帘气压力:25 Psi;全扫描分析;质量扫描范围:50~1000 D;一级质谱采集频率为 0.25 s, 二级质谱采集频率为 0.1 s, 每次采集 8 个数据。进样量为 10 μL;随机进针;分析过程中所有样品保

存于 4 ℃。

1.5 数据处理和代谢物的鉴定

采用 PeakView 软件对采集到的谱图进行数据提取,得到一个三维矩阵的原始数据,包括化合物荷比、保留时间和离子丰度。用 MakerView 软件对原始数据进行预处理,包括基线校正、去噪、去卷积、峰对齐、标准化等。再用 80%规则对数据进行处理。经过上述处理得到的数据集再导入 SIMCA 13.0 软件中进行主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析,筛选出差异代谢物,在 HMDB 数据库中根据质荷比找出相应的物质并以内源性物质为标准进行初筛,再执行 MS/MS 实验(碰撞能量为 20~40 eV)进行下一步筛选,最后用差异代谢物的二级质谱图与标准品和数据库(human metabolomic database, HMDB)中的二级质谱图进行比对而最终确认差异代谢物,通过 MetPA 3.0 找出与 ONFH 相关的代谢通路,并通过受试者工作特征曲线分析(receiver operating characteristic, ROC)方法对所有差异性代谢物的临床诊断性能进行分析。

2 结果

2.1 临床特征和人口统计学分析

ONFH 组和对照组的临床特征及人口统计学分析见表 1。ONFH 受试者和对照组之间的年龄、性别和体质指数(body mass index, BMI)无统计学差异。在 ONFH 受试者中:12 例患者有饮酒史,6 例患者有股骨粗隆间或股骨颈骨折疾病史,5 例患者有皮质类固醇治疗史,其余 3 例患者无明确原因。根据 Ficat 分类系统,ONFH 患者 ONFH 全部处于 III 或 IV 期,且需行全髋关节置换术。ONFH 组患者均通过手术切除的股骨头标本的组织病理学分析确诊。

2.2 质量控制

在样品分析过程中一共得到 60 个质量控制样品的数据,对这 60 个 QC 样品采用 SIMCA 13.0 软件进行主成分分析法(principal component analysis, PCA)分析,模型的相关参数为: $R^2=0.625$; $Q^2=0.579$,PCA 分析得到的得分图显示 QC 样品按照 4 种不同的检测模式分别聚集在 4 个空间内,因为 R^2 和 Q^2 都大于 0.5,说明在数据采集过程中,HPLC/Q-TOF-MS 系统稳定,采集的数据可靠。此外,在 5 个 QC 样品中随机挑选 8 个峰的相对标准偏差(RSD%)用于评估离子的再现性。在 RPLC-Neg, RPLC-Pos, HILIC-Neg, HILIC-Pos 模式中,RSD% 的波动范围分别为:3.1%~11.7%、6.2%~11.8%、1.3%~4.9%、0.5%~4.5%,结果表明 HPLC/Q-TOF-MS 分析系统的稳定性适用于代谢组学的代谢谱分析。

2.3 模式识别和潜在差异代谢物的鉴定

PCA 是在代谢组学研究中最常用的无监督分析方法,因此 PCA 被用于本研究以获得数据的初始概述。在 PCA 分析中,实验组和对照组在 HPLC/Q-TOF-MS 的正负离子模式分析中被明显分开,说明 2 组间存在明显的差异。在监督多元统计分析中,正交偏最小二乘法分析(orthogonal partial least-

squares discrimination analysis, OPLS-DA)被用于确定引起 2 组差异的代谢物,OPLS-DA 分析得到的得分图(图 1)显示,实验组和对照组得到更明显的区分。根据(variable importance in projection, VIP)值的大小选取对区分实验组和对照组起重要作用的成分,并对这些成分在 2 组之间的差异进行非参数检验,根据上述方法初步筛出 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 的 599 个差异代谢物。在 HMDB 数据库中找出对应的可能的内源性物质,再在 PeakView 软件中对这些可能的物质执行 MS/MS 实验得到相应的一级或二级质谱图,将样本中检测到的差异代谢物的一级或二级质谱图与上述执行 MS/MS 实验得到的质谱图进行比对,最终确认 28 个差异代谢物见表 2。差异代谢物的丰度与尿液样本间的相关性分析通过热谱图呈现在图 2 中。

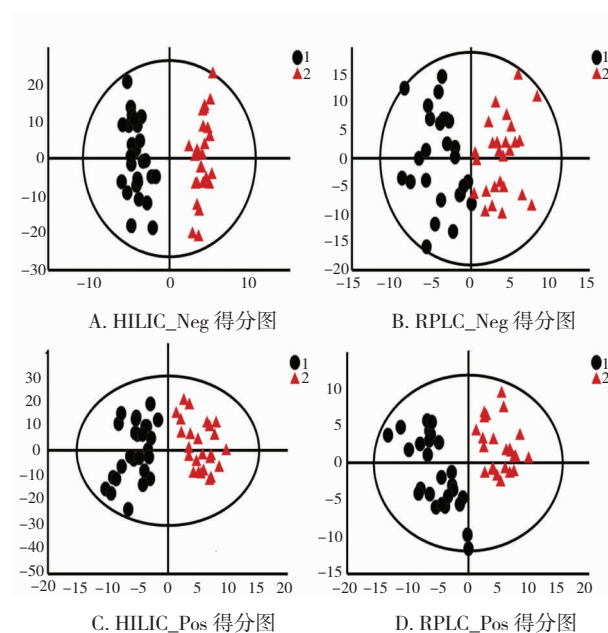


图 1 ONFH 组(圆形)和对照组(三角形)的尿液在 4 种模式下代谢轮廓分析的 OPLS-DA 得分图

2.4 代谢通路分析

为了阐明 28 种差异代谢物与 ONFH 间的潜在相关性,代谢通路分析被用于寻找最为相关的代谢通路。代谢通路分析表明,氮代谢、果糖和甘露糖代谢、赖氨酸代谢、嘌呤代谢、酪氨酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢与 ONFH 密切相关,具体的分子机制尚待进一步研究。

2.5 潜在生物标志物的筛选

在此研究中,ONFH 组中以离子丰度 $Fold>2$ 、 $VIP>2$ 且 $AUC(ROC \text{ 曲线下面积})>0.9$ 为标准的差异代谢物被挑选出来作为潜在生物标志物。因此,在二元逻辑回归分析后,二丙基二硫($VIP=2.13, Fold=-3.1, AUC=0.953$)、三甲基硒($VIP=2.9, Fold=-2.4, AUC=0.904$)和氨基甲酸($VIP=2.23, Fold=-2.7, AUC=0.932$)被确定为 ONFH 的潜在生物标志物,3 个潜在生物标志物特异性及敏感性通过受试者工作特征曲线分析(ROC)呈现于图 3 所示。

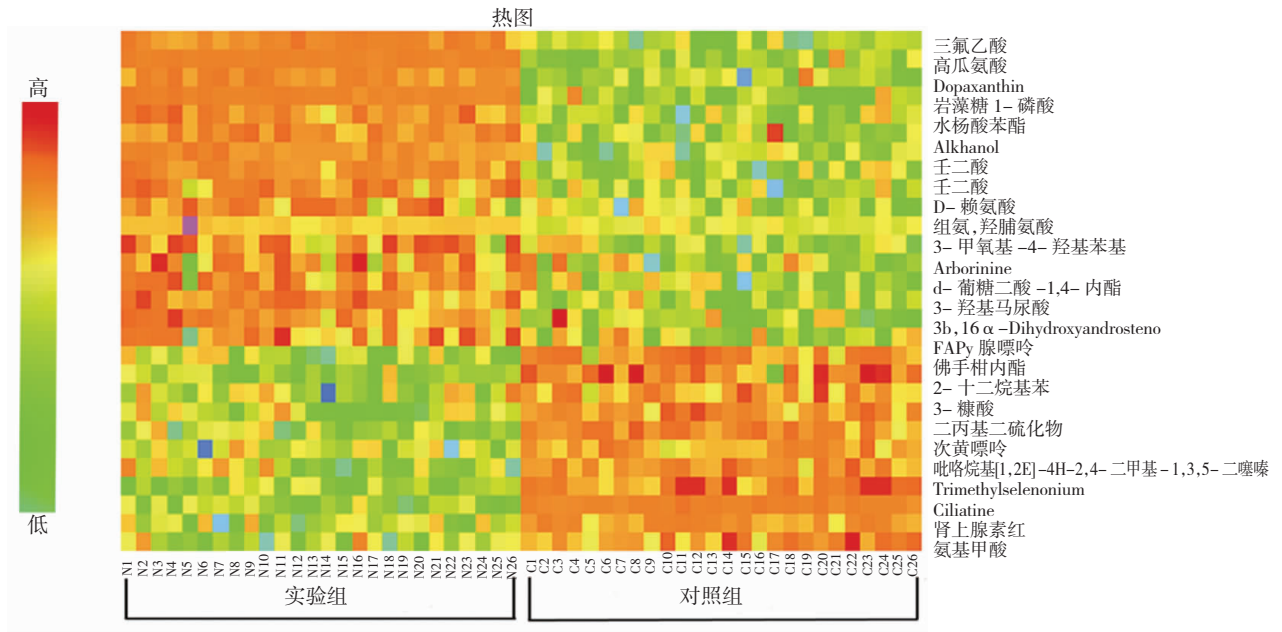


图 2 实验组与对照组样本中差异性代谢物的热谱图

表 2 ONFH 中的差异性代谢物

保留时间	代谢物	变化趋势	离子模式	观测质量	实际质量	P 值
4.38	2-十二烷基苯	↓	H-N	325.1856	326.494	0.000
3.76	3-羟基马尿酸	↑	H-N	194.0467	195.1721	0.000
0.53	3-甲氧基-4-羟基苯基	↑	R-N	221.0289	222.2372	0.000
3.08	Dopaxanthin	↑	R-N	389.0914	390.3441	0.000
4.37	岩藻糖 1-磷酸	↑	H-N	243.0189	244.1364	0.000
3.28	氨基甲酸	↓	H-N	60.0036	61.04	0.000
4.25	三氟乙酸	↑	H-N	112.987	114.0233	0.000
4.37	组氨, 羟脯氨酸	↑	H-N	267.1113	268.2691	0.000
3.41	D-赖氨酸	↑	H-N	145.0988	146.1876	0.000
4.05	高瓜氨酸	↑	R-N	188.1015	189.2123	0.000
3.92	佛手柑内酯	↓	H-N	215.0333	216.192	0.000
3.88	水杨酸苯酯	↑	H-N	213.0508	214.2167	0.000
1.06	FAPy 腺嘌呤	↑	H-P	154.0624	153.142	0.000
0.99	壬二酸	↑	H-N	187.0986	188.2209	0.000
2.19	壬二酸	↑	R-N	187.10	188.2209	0.000
0.55	3-糠酸	↓	R-N	111.0094	112.0835	0.000
1.5	d-葡糖二酸-1,4-内酯	↑	R-N	191.0206	192.1235	0.000
3.36	次黄嘌呤	↓	H-N	135.0315	136.1115	0.000
3.61	5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid	↑	R-N	192.0235	193.1562	0.000
4.86	二丙基二硫化物	↓	H-P	151.0631	150.305	0.000
2.74	Ciliatine	↓	R-N	124.0083	125.0636	0.000
8.97	Trimethylseleniumium	↓	R-P	125.9869	124.06	0.000
4.56	Alkhanol	↑	H-N	265.1491	266.3328	0.000
4.82	(6R)-6-(L-Erythro-1,2-Dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4a-hydroxypterin	↓	H-P	227.1039	226.2325	0.000
4.16	Arborinine	↑	H-P	286.1043	285.2946	0.000
0.4	3b, 16a-Dihydroxyandrostenone sulfate	↑	R-N	383.1542	384.487	0.000
2.07	吡咯烷基[1,2E]-4H-2,4-二甲基-1,3,5-二噻嗪	↓	R-N	188.0575	189.341	0.000
4.61	肾上腺素红	↓	R-N	178.0518	179.1727	0.000

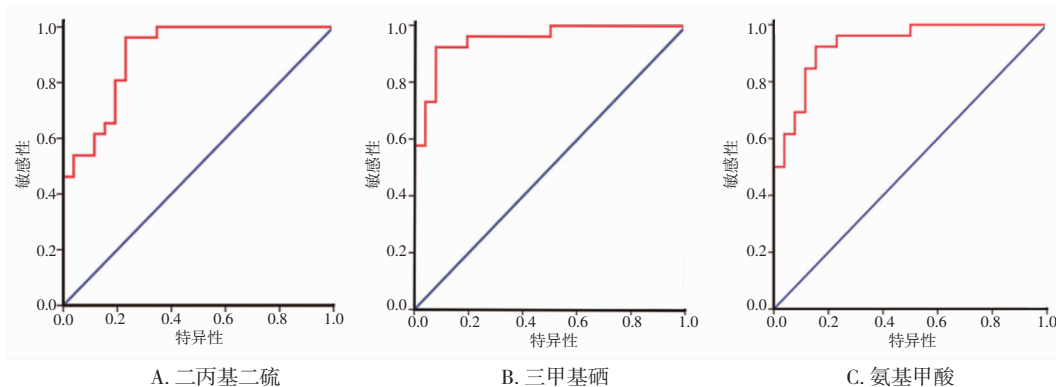


图 3 潜在生物标志物的受试者工作特征 (ROC) 曲线

3 讨论

在本研究中,确立了 28 种 ONFH 相关性差异性代谢物,其中二丙基二硫、三甲基硒和氨基甲酸被筛选出作为 ONFH 的诊断性生物标志物。3 种代谢物均有相关文献报道。大鼠肝细胞中,在细胞色素 P450 酶或含黄素的单加氧酶的作用下,二丙基二硫被微粒体氧化为二丙基硫代亚磺酸酯^[15],而二丙基二硫具有抗癌特性。硒是一种重要的生物元素,具有抗癌特性,三甲基硒是人尿液中常见的硒代谢物^[16]。在可逆反应下,初级和次级胺类可与二氧化碳反应形成氨基甲酸。氨基甲酸也是糖脂化的底物并产生稳定的氨基甲酸酯葡萄糖苷酸代谢物。此外,几种胺的氨基甲酸产物被认有细胞毒性^[17]。

生物信息学分析表明果糖和甘露糖代谢在 ONFH 中明显上调。在本研究中,海藻糖-1-磷酸在 ONFH 患者的尿液中含量明显升高。海藻糖-1-磷酸是果糖代谢途径的中间产物,海藻糖-1-磷酸含量的上调预示着果糖的分解代谢。果糖代谢在人体中发挥着重要的作用,高果糖饮食可以增加微架构从而提高骨骼强度^[18]。此外,研究表明高果糖饮食 7 d 后,能量代谢、线粒体功能和脂质氧化相关基因表达下调^[19]。果糖与矿物质代谢密切相关,果糖可以在一定程度上影响铁、锌、铜的生物利用度。Parks 等^[20]报道果糖可以影响脂质代谢。高果糖摄入可引起严重的脂质过氧化损伤,并降低平滑肌谱系的蛋白标记物水平^[21]。这意味着血管渗透性和氧化应激可能与高果糖代谢密切相关。因此,在 ONFH 患者中高果糖代谢与能量代谢、脂质代谢、矿物质代谢、脂质

氧化和血管渗透性等密切相关。

在兔动物模型中,研究发现血管通透性和氧化应激可能参与皮质类固醇诱导的骨坏死^[22]。而本研究表明嘌呤代谢在 ONFH 中表达上调。在嘌呤降解途径中,次黄嘌呤是中间产物,从次黄嘌呤到尿酸的氧化过程伴随着 H_2O_2 的产生^[23]。本研究结果中次黄嘌呤的下调可能预示着 H_2O_2 过量产生,并参与氧化应激反应中。因此,本研究结果表明 ONFH 中嘌呤代谢和氧化应激反应间存在着紧密联系。

生物信息学分析结果表明 ONFH 中酪氨酸代谢受到干扰。在酪氨酸磷酸化依赖的信号级联反应中,蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinases, PTKs) 和蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatases, PTPs) 起着关键作用。在破骨细胞的正常分化过程中,酪氨酸激酶家族受体和肿瘤坏死家族受体起着重要的作用。PTPs 是破骨细胞活性的主要调节者之一。氧化应激可能影响多种细胞信号传导途径,尤其是 PTKs 与 PTPs 之间的平衡,从而导致细胞蛋白处于异常磷酸化状态^[24]。在癌症分子靶向治疗的最前沿,酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKIs) 起着改变骨细胞活性、分化成熟及影响骨量的作用,这可能是由 TKI 对间充质干细胞和造血干细胞的影响所致。因此,本研究结果表明 ONFH 患者中可能存在骨发育、骨代谢和氧化应激紊乱。

由于本研究中的全部受试者均为 Ficat 分期 3/4 晚期 ONFH 患者,不能代表早期 ONFH 患者的代谢谱改变。因此,其在 ONFH 早期诊断中的作用尚待进一步研究。此外,3 种潜在的诊断性生物标志物是在不分析模式下检测到的,这意味着理论上在实际中用相同的方法检测所有 3 种生物标志物存

在一定限制。因此,未来的工作将致力于早期 ONFH 患者的代谢组学研究。此外,本研究中的差异性代谢物需在大量尿样样本中进一步验证,并做定性定量分析,旨在发现最可靠的诊断性生物标志物。

参 考 文 献

- [1] Microsurgery Department of the Orthopedics Branch of the Chinese Medical Doctor Association, Group from the Osteonecrosis and Bone Defect Branch of the Chinese Association of Reparative and Reconstructive Surgery, Microsurgery and Reconstructive Surgery Group of the Orthopedics Branch of the Chinese Medical Association. Chinese guideline for the diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults[J]. *Orthop Surg*, 2017, 9(1): 3-12.
- [2] Assi C, Kheir N, Samaha C, et al. Early results of total hip arthroplasty using dual-mobility cup in patients with osteonecrosis of the femoral head [J]. *SICOT J*, 2018, 4(4): 1-5.
- [3] Hermigou P, Flouzat-Lachaniette CH, Delambre J, et al. Osteonecrosis repair with bone marrow cell therapies: state of the clinical art[J]. *Bone*, 2015, 1(70): 102-109.
- [4] Shah KN, Racine J, Jones LC, et al. Pathophysiology and risk factors for osteonecrosis[J]. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2015, 8(3): 201-209.
- [5] Chen YX, Zhu DY, Xu ZL, et al. The protective effect of cordycepin on alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2391-2403.
- [6] Liu LH, Zhang QY, Sun W, et al. Corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head: detection, diagnosis, and treatment in earlier stages[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(21): 2601-2607.
- [7] Wang XS, Zhuang QY, Weng XS, et al. Etiological and clinical analysis of osteonecrosis of the femoral head in Chinese patients[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(2): 290-295.
- [8] Li Z, Wang L, Wei J, et al. Bone-strengthening pill (BSP) promotes bone cell and chondrocyte repair, and the clinical and experimental study of BSP in the treatment of osteonecrosis of the femoral head[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(57): 97079-97089.
- [9] Stevens K, Tao C, Lee SU, et al. Subchondral fractures in osteonecrosis of the femoral head: comparison of radiography, CT, and MR imaging[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2003, 180(2): 363-368.
- [10] Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: metabolomics; the apogee of the omics trilogy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4): 263-269.
- [11] Zhang A, Sun H, Wang P, et al. Future perspectives of personalized medicine in traditional Chinese medicine: a systems biology approach[J]. *Complement Ther Med*, 2012, 20(1-2): 93-99.
- [12] Winder CL, Cormell R, Schuler S, et al. Metabolic fingerprinting as a tool to monitor whole-cell biotransformations[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(1): 387-401.
- [13] Liu X, Li Q, Sheng J, et al. Unique plasma metabolomic signature of osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(7): 1158-1167.
- [14] Zhu WW, Chen TM, Ding SJ, et al. Metabolomic study of the bone trabecula of osteonecrosis femoral head patients based on UPLC-MS/MS[J]. *Metabolomics*, 2016, 12(3): 48.
- [15] Teyssier C, Siess MH. Metabolism of dipropyl disulfide by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver[J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(6): 648-654.
- [16] Kuehnelt D, Juresa D, Kienzl N, et al. Marked individual variability in the levels of trimethylselenonium ion in human urine determined by HPLC/ICPMS and HPLC/vapor generation/ICPMS[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(7-8): 2207-2212.
- [17] Schaefer WH. Reaction of primary and secondary amines to form carbamic acid glucuronides[J]. *Curr Drug Metab*, 2006, 7(8): 873-881.
- [18] Bass EF, Baile CA, Lewis RD, et al. Bone quality and strength are greater in growing male fed fructose compared with glucose[J]. *Nutr Res*, 2013, 33(12): 1063-1071.
- [19] Seyssel K, Meugnier E, Lê KA, et al. Fructose overfeeding in first-degree relatives of type 2 diabetic patients impacts energy metabolism and mitochondrial functions in skeletal muscle[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(12): 2691-2699.
- [20] Parks EJ, Skokan LE, Timlin MT, et al. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults[J]. *J Nutr*, 2008, 138(6): 1039-1046.
- [21] Zhou YB, Zhang J, Cai Y. Insulin resistance induces medial artery calcification in fructose-fed rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012, 237(1): 50-57.
- [22] Ichiseki T, Matsumoto T, Nishino M, et al. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model[J]. *J Orthop Sci*, 2004, 9(5): 509-515.
- [23] Gupta RK, Patel AK, Shah N, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(11): 4405-4409.
- [24] Li J, Pang Q. Oxidative stress-associated protein tyrosine kinases and phosphatases in Fanconi anemia[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(14): 2290-2301.

(责任编辑:张辉洁)