

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.15.012

反复上呼吸道感染肺卫气虚证的血浆代谢组学特征及玉屏风颗粒干预的临床疗效

林 燕¹, 王亚利^{*}, 王鑫国², 张明泉², 王文智², 耿立梅³, 孙玉凤⁴, 曹文利², 师旭亮²

(1. 河北医科大学研究生学院, 河北省石家庄市中山路 361 号; 050017; 2. 河北中医学院; 3. 河北省中医院; 4. 河北医科大学第二医院)

摘要 目的 运用代谢组学方法研究反复上呼吸道感染肺卫气虚证潜在的证候标记物, 同时观察玉屏风颗粒干预的临床疗效及可能作用机制。方法 选择反复上呼吸道感染肺卫气虚证患者 15 例 (疾病组), 给予玉屏风颗粒治疗, 每次 5 g, 每日 3 次, 共治疗 60 天。同时收集健康体检者 18 例设为健康组。采集健康组及疾病组治疗前后血液, 采用高效液相色谱-质谱联用仪 (HPLC-MS) 检测血浆代谢物, 利用主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法 (PLS) 对数据进行统计分析, 比较健康组和疾病组治疗前后的血浆代谢组学原始谱图和数据。结果 治疗后疾病组患者易感性、畏寒、自汗等临床症状较治疗前有明显改善 ($P < 0.01$)。疾病组中医证候疗效临床痊愈 4 例, 显效 7 例, 有效 3 例, 总有效率为 93.34%。疾病组在治疗前的代谢谱和健康组存在明显不同, 经玉屏风颗粒干预后其代谢谱有显著改变, 向健康组回归; 半胱氨酸、L-蛋氨酸、苏氨酸、焦谷氨酸 4 种物质为反复上呼吸道感染肺卫气虚证的潜在证候标志物。结论 反复上呼吸道感染肺卫气虚证患者存在氨基酸代谢紊乱, 纠正氨基酸代谢紊乱可能是玉屏风颗粒治疗肺卫气虚证的作用机制之一。

关键词 反复上呼吸道感染; 肺卫气虚证; 玉屏风颗粒; 代谢组学

肺卫气虚证是反复上呼吸道感染的基础证型。已有学者从内分泌^[1]、基因^[2]等角度对其进行了探讨, 新兴的代谢组学通过研究体内代谢网络的相应变化及代谢物的差异, 发现疾病的代谢标记物, 为中医“证候”本质的研究拓展了新思路^[3], 是中医证候研究的重要方法。为此我们采用代谢组学技术, 将反复上呼吸道感染肺卫气虚证患者与健康人群对比, 寻找肺卫气虚证的潜在证候标志物, 并观察患者经玉屏风颗粒治疗后潜在证候标志物出现的变化, 以反证其可靠性。

1 临床资料

1.1 诊断标准

西医诊断标准参照《中医呼吸病学》^[4]的有关标准: 反复上呼吸道感染病程在 1 年以上, 反复出现上感症状, 间隙时间一般不少于 7 天, 每年上呼吸道感染 ≥ 5 次。

中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导

原则》^[5]及文献^[6]制定, 肺卫气虚证: 主症: 易患外感性疾病、畏风寒、自汗、舌淡苔白、脉浮弱; 次症: 反复咳嗽或咳喘、流涕、咽痛、乏力、不耐寒热。具备主症 2 项、次症 2 项或主症 1 项、次症 3 项即可诊断。

1.2 纳入标准

符合西医诊断标准及中医辨证标准; 年龄 18 ~ 60 岁; 经检查血、尿常规, 肝、肾功能, 血糖及血脂正常, 心电图无明显异常; 签署知情同意书。

1.3 排除标准

原发性免疫缺陷病患者; 先天性呼吸道畸形患者; 合并心、肝、肾和造血系统严重原发性疾病者; 妊娠或哺乳期妇女。

1.4 一般资料

收集 2012 年 8—11 月在河北省中医院呼吸科、中医内科门诊就诊的患者及本院健康体检者。反复上呼吸道感染肺卫气虚证患者 (疾病组) 15 例, 其中男 7 例, 女 8 例; 年龄 23 ~ 59 岁, 平均 (32.13 ± 11.45) 岁; 病程 1 ~ 5 年, 平均病程 (2.67 ± 1.23) 年。健康体检者 (健康组) 18 名,

基金项目: 国家自然科学基金 (81150030)

* 通讯作者: wang1955@163.com, (0311) 86261276

其中男 10 例, 女 8 例; 年龄 18 ~ 60 岁, 平均 (34.26 ± 9.54) 岁。两组受试者性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 方法

2.1 治疗方法

疾病组给予玉屏风颗粒。主要成分: 黄芪、白术 (炒)、防风, 广州环球制药有限公司, 批号: Z10930036, 每袋 5 g。每次 1 袋, 每日 3 次, 口服。60 天为 1 个疗程。必要时给予化痰止咳 (羧甲司坦口服溶液, 北京诚济制药有限公司, 批号 H20044967, 每支 10 ml, 每次 1 支, 每日 3 次, 口服) 等对症处理。

健康组不予任何干预, 正常生活。

2.2 观察指标和方法

2.2.1 中医证候积分 参照《中药新药临床研究指导原则》^[9] 中感冒及肺卫气虚证有关症状分级量化标准, 记录治疗前后的症状积分。其中主症 (易感性、畏寒、自汗) 按 4 分制: 正常计 0 分, 轻症计 1 分, 中症计 2 分, 重症计 3 分; 次症 (反复咳嗽或咳喘、流涕、乏力) 具备计 1 分, 不具备计 0 分; 舌脉不计分只做描述, 统计治疗前后症状积分。证候积分减少 (尼莫地平法) = (治疗前积分 - 治疗后积分) / 治疗前积分 × 100%。

2.2.2 实验室标本制备 健康组空腹抽取静脉血 2 ml (EDTA 抗凝, 以下同); 疾病组分别在治疗前后各空腹抽取静脉血 2 ml。血样常温静置 2 h, 3000 r/min 离心 10 min, 取血浆 0.5 ml, 置于冻存管中液氮罐中保存备用。检测前将血浆样本放置 4℃ 解冻复溶, 乙腈、蒸馏水 4℃ 过夜预冷。乙腈与血浆样本 3: 1 混合涡旋, 离心机 14000 r/min、10 min 沉淀蛋白后, 与乙腈、蒸馏水按照 2: 2: 6 稀释, 涡旋移入液相小瓶, 备用。

质量控制样本 (QC) 制备方法: 所有健康组样本室温解冻复融, 涡旋振荡, 分别吸取 10 μl 血清, 再次涡旋振荡充分混匀后分装于 EP 管中, 每管为 100 μl, 即为 QC, 其余处理同样本处理方法。

2.2.3 主要仪器与试剂 高效液相色谱-质谱联用仪 (HPLC-MS): 美国 Applied Biosystems (AB) 公司; 液相系统: ekspertTM ultraLC100; 质谱系统:

AB Sciex QTRAP 4500, 配有 EI、离子阱。高速台式冷冻离心机: TGL-16M, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; 涡旋振荡器: QL-901, Vortex, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 液氮罐: YDS-40, 河南新乡市新亚低温容器有限责任公司。乙腈、甲醇: 色谱级, 美国 Fisher 公司; 蒸馏水: 屈臣氏; 色谱柱: 美国 Thermo 公司。

2.2.4 HPLC-MS 检测 在河北中医学院中药药理实验室, 采用 HPLC-MS 对供试血浆样品进行分离、检测、分析。

色谱条件: 色谱柱为 AAA C₁₈, 3 μm; 100 mm × 2.1 mm; 流动相: A 溶剂 (0.1% 甲酸水溶液); B 溶剂 (0.1% 甲酸乙腈溶液); 流速: 0.3 ml/min; 柱温: 40℃, 进样量: 5 μl。

质谱条件: 正离子 (ESI⁺) 模式下进行检测, 质谱检测数据采集范围: 质荷比 (m/z) 100 - 1000 Da; Curtain Gas: 30 psi, Gas1: 60 psi, Gas2: 60 psi; DP: 90 V; EP: 10; CE: 10; CUR: 30; ISP: 5500 V; Tem: 550℃。

2.2.5 代谢数据处理 经 HPLC-MS 得到的代谢谱数据, 采用 SIMCA-P 软件处理。数据处理采用多种方式: 包括主成分分析 (PCA)^[10]、偏最小二乘法 (PLS)^[11] 分析。

2.3 中医证候疗效标准

参照《中药新药临床研究指导原则》^[9] 有关标准, 临床痊愈: 临床症状、体征消失或基本消失, 证候积分减少 ≥ 95%; 显效: 临床症状、体征明显改善, 证候积分减少 ≥ 70% 但 < 95%; 有效: 临床症状、体征均有好转, 证候积分减少 ≥ 30% 但 < 70%; 无效: 临床症状、体征均无明显改善, 甚或加重, 证候积分减少 < 30%。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行统计处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用配对 t 检验。

3 结果

3.1 疾病组患者治疗前后临床症状积分比较

表 1 示, 治疗后疾病组患者各项临床症状积分均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 反复上呼吸道感染肺卫气虚证患者治疗前后临床症状积分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

症状	例数	易感性	畏寒	自汗	反复咳嗽	流涕	乏力
治疗前	15	2.33 ± 0.62	1.40 ± 0.99	1.13 ± 0.83	0.80 ± 0.41	0.67 ± 0.49	0.73 ± 0.46
治疗后	15	0.53 ± 0.52*	0.47 ± 0.52*	0.20 ± 0.41*	0.07 ± 0.26*	0.07 ± 0.26*	0.67 ± 0.26*

注: 与治疗前比较, * $P < 0.01$

3.2 疾病组患者中医证候疗效

临床痊愈 4 例 (26.67%)，显效 7 例 (46.67%)，有效 3 例 (20.00%)，无效 1 例 (6.66%)，总有效率为 93.34%。

3.3 疾病组治疗前后和健康组的 PCA 图

PCA 能从总体上反应各组样本之间的总体代谢差异和组内样本之间的变异度大小，反映不同组之间的最真实差异。本分析在正离子模式下共获得 6 个主成分，累积 $R^2X = 0.813$ (R^2X 为判别模型质量好坏的主要参数，其值代表模型的解释率，一般来说该值大于 0.4 就表示该模型可靠)。因此，当前模型适合于解释疾病组治疗前、治疗后和健康组间的代谢差异。

图 1 示，疾病组治疗前游离于治疗后、健康组之外，可以与它们明显分类，说明其代谢成分与另两组有显著差异。而疾病组在治疗后和健康组处于相近的区域，且部分融合交织，说明疾病组经过治疗后向健康组回归，两者的代谢成分相似，说明玉屏风颗粒治疗反复上呼吸道感染肺卫气虚证有良好的疗效。

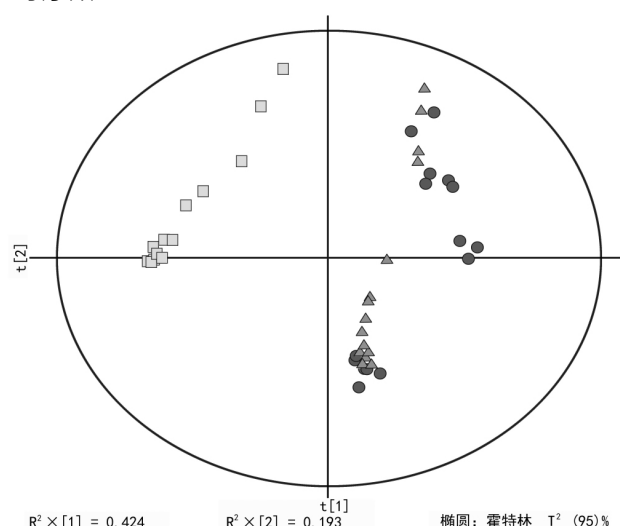


图 1 疾病组治疗前、治疗后和健康组的 PCA 图

注：图中■表示疾病组治疗前；●表示疾病组治疗后；▲表示健康组

3.4 疾病组治疗前和健康组的 PLS 分析图

为了获得导致显著差异的代谢物信息，我们进一步采用监督性的多维统计方法即 PLS 对两组样本进行分析。其模型质量参数为：在正模式下，具有 2 个主成分， $R^2X = 0.143$ ， $R^2Y = 0.994$ ， $Q^2 = 0.698$ 。模型参数 (R^2Y 和 Q^2) 表明当前模型很可靠，适合于解释两组之间的代谢差异和发现两组之间的差异性表达代谢物。图 2 示，疾病组治疗前和健康组具有显著差异，说明两组的代谢成分有明显

区别。

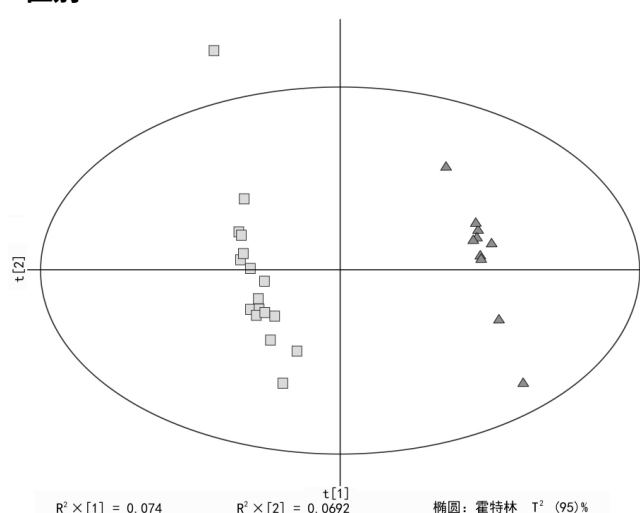


图 2 疾病组治疗前和健康组的 PLS 分析图

注：图中■表示疾病组治疗前；▲表示健康组

3.5 潜在证候标记物

根据疾病组和健康组的载荷图，对分组贡献较大的重要变量因子值进行提取，依据同一分子量出现的频率，经 t 检验筛选出差异变量，再根据变量的精确质量数、保留时间、二级质谱图，利用人类代谢组学数据库 (www.hmdb.ca/metabolites) 进行检索。结果在正离子模式下初步比对并推测出半胱氨酸、L-亮氨酸、L-蛋氨酸、苏氨酸、焦谷氨酸等 5 种物质为反复上呼吸道感染肺卫气虚证的潜在证候标志物，其中苏氨酸在疾病组中呈上升趋势，其余 4 种呈下降趋势。见表 2。

表 2 反复上呼吸道感染肺卫气虚证潜在证候标志物及变化趋势

重要变量因子	t 检验	质荷比	保留时间	物质名称	变化趋势
1. 46730	2.18E-05	122.04	23.14	半胱氨酸	↓
1. 15818	0.002103	132.00	2.03	L-亮氨酸	↓
1. 27969	1.58E-08	150.12	23.46	L-蛋氨酸	↓
1. 22398	0.004898	120.00	4.02	苏氨酸	↑
1. 54937	0.002639	130.08	11.90	焦谷氨酸	↓

3.6 潜在证候标志物的反证

倍性变化是一种用于描述两个相比的对象数量差异的方法。通过比对潜在证候标志物在疾病组治疗前/健康组和疾病组治疗后/健康组的倍性变化值，即可说明该物质在治疗前后的差异。表 3 示，半胱氨酸、L-蛋氨酸、焦谷氨酸、苏氨酸 4 种物质疾病组治疗后/健康组的倍性变化值较疾病组治疗前/健康组出现回调，说明随着玉屏风颗粒的干预、患者疾病的恢复，反证了其作为潜在证候标志物的

可靠性; 而 L-亮氨酸进一步下降, 更加偏离健康水平, 其异常变化否定了它的可靠性。推测玉屏风颗粒回调紊乱的半胱氨酸、L-蛋氨酸、谷氨酸、苏氨酸的代谢是治疗反复上呼吸道感染肺卫气虚证的作用机制之一。

表 3 潜在证候标志物在疾病组治疗前/健康组和疾病组治疗后/健康组倍性变化值比较

潜在证候标志物	疾病组治疗前/健康组	疾病组治疗后/健康组	变化趋势
半胱氨酸	0.8187	1.0530	↑
L-亮氨酸	0.9879	0.9768	↓
L-蛋氨酸	0.7961	0.9480	↑
苏氨酸	1.0590	0.9970	↓
焦谷氨酸	0.9623	0.9777	↑

4 讨论

反复上呼吸道感染属于中医学“虚体感冒”“易感症”的范畴, 基本病机为肺卫气虚, 因此, 根本治则为扶正祛邪。临床上常用玉屏风散予补益肺卫, 防治复发。现代药理研究发现, 玉屏风散可以促进小鼠脾淋巴细胞增殖, 提高 T 淋巴细胞水平、T 细胞的免疫能力^[8], 降低免疫复合物花环形成率^[9]。本研究显示, 疾病组患者治疗后的各项临床症状积分较治疗前明显降低 ($P < 0.01$), 说明玉屏风颗粒可有效改善反复上呼吸道感染肺卫气虚证患者临床症状。

寻找生物标志物是对疾病进行代谢组学研究的目标。聂莉等^[11]认为, 生物标志物可以为我们深入了解疾病的病理生理过程提供依据, 为早期诊断、病情监测及评价药物疗效提供可能。基于代谢组学的中医证候研究虽然处于初级阶段, 但是已有学者在此领域中取得一定的成果, 如谢世平等^[12]将艾滋病病毒携带者、艾滋病患者脾肺气虚证患者与健康人的尿液进行代谢组学研究, 发现两组存在着显著的差异物质或物质群。简维维等^[13]研究发现, 葡萄糖、甘油、木糖醇、马尿酸、油酸酰胺等为冠心病心血瘀阻证尿液生物代谢产物谱。以上研究结果也进一步提示, 代谢组学技术与中医学理论相结合有广阔的前景。

差异代谢物是机体代谢途径中反映整体代谢信息的关键点, 可反映病理所对应的代谢网络发生后物质和功能的改变, 并能确定其所在的代谢通路的异常。本研究显示, 反复上呼吸道感染肺卫气虚证的潜在标志物均属于氨基酸类, 表明体内氨基酸代谢出现紊乱, 具体的代谢网络途径为半胱氨

酸、苏氨酸、蛋氨酸、谷氨酸代谢途径。这些物质发生变化不仅可以区分疾病组与健康组不同的代谢模式, 也反映了该证候对应的代谢网络发生异常后机体出现免疫力的下降。

本研究仅研究了反复上呼吸道感染肺卫气虚证患者的血浆变化, 临床观察例数也偏少, 存在一定的不足。下一步我们还要观察其他相关疾病的肺卫气虚证患者、人体其他代谢物 (如尿液、唾液等) 的对比研究, 并扩大样本量, 以期从全方位、多角度、多层次阐明肺卫证候的本质。

参考文献

- [1] 李泽庚, 张杰根. 肺气虚证的神经内分泌免疫网络研究现状及探讨 [J]. 中医药学刊, 2005, 23(9): 1602-1604.
- [2] 李泽庚, 王国俊, 彭波, 等. 肺气虚证和肺阴虚证蛋白芯片研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(4): 705-707.
- [3] 王伟明, 黄育华, 盛国光, 等. 基于代谢组学的中医证本质研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(10): 1686-1688.
- [4] 欧阳忠兴, 柯新桥. 中医呼吸病学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 439.
- [5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 390-392.
- [6] 王洪琦, 李建国. 卫气虚弱与人类白细胞抗原相关性研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(3): 32-33.
- [7] Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes [J]. Plant Mol Biol, 2002, 48(1-2): 155-171.
- [8] Wagner S, Scholz K, Sieer M, et al. Tools in metabolomics an integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in human urine [J]. Anal Chem, 2007, 79(7): 2918-2926.
- [9] 张磊, 李东晓, 吴瑕. 玉屏风散总多糖 (YTP) 影响肠道黏膜损伤小鼠肠-呼吸道 IgA 分泌研究 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 43-45.
- [10] 张红军, 张晓莉, 宋宝辉. 玉屏风散对小鼠红细胞免疫黏附功能及腹腔巨噬细胞吞噬活性的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(6): 619.
- [11] 聂莉, 黄平. 慢性阻塞性肺证候呼出气冷凝液中的生物标志物及其意义 [J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29(19): 1186-1190.
- [12] 谢世平, 马素娜, 刘伟, 等. 基于液质联用技术艾滋病病毒携带者、艾滋病患者脾肺气虚证者尿液的代谢组学研究 [J]. 环球中医药, 2011, 4(6): 429-433.
- [13] 简维维, 袁肇凯, 黄献平, 等. 冠心病心血瘀阻证尿液代谢组学的检测分析 [J]. 中医杂志, 2010, 51(8): 729-732.

Plasma Metabonomics Characteristics of Lung and Defensive Qi Deficiency Syndrome in Repeated Upper Respiratory Infection Patients and Clinical Effects of Yupingfeng Particles (玉屏风颗粒) Intervention

LIN yan¹, WANG Yali¹, WANG Xinguo², ZHANG Mingquan², WANG Wenzhi², GENG Limei³, SUN Yufeng⁴, CAO Wenli², SHI Xuliang²

(1. Graduate College of Hebei Medical University, Hebei, 050017; 2. Hebei University of Chinese Medicine; 3. Chinese Medicine Hospital of Hebei Province; 4. The Second Hospital of Hebei Medical University)

ABSTRACT Objective To use metabonomics method to study the potential syndromes markers about lung and defensive Qi deficiency syndrome of repeated upper respiratory infection (URI) and observe clinical effects and possible mechanism of action of Yupingfeng Particles. **Methods** Fifteen patients with lung and defensive Qi deficiency syndrome of repeated URI (disease group) were given Yupingfeng Particles, 5 g each time, three times a day for a total of 60 days. Eighteen healthy subjects were collected as health group at the same time. Blood samples from the healthy and the disease group were collected before and after treatment. High performance liquid chromatography mass spectrometry instrument (HPLC-MS) was used to detect plasma metabolites, and principal component analysis (PCA) and partial least squares (PLS) was used to make statistical analysis to the data for comparing plasma metabonomics original spectra and data of the healthy group and the disease group before and after treatment. **Results** After treatment, clinical symptoms such as susceptibility, chills, spontaneous perspiration of patients in the disease group improved significantly ($P < 0.01$). Curative effect of traditional Chinese medicine syndrome in the disease group showed that clinical recovery were 4 cases, 7 cases were markedly effective, 3 cases were effective and the total effective rate was 93.34%. Metabolic spectrum of the disease group was significantly different from the health groups before the treatment. The disease group's metabolic spectrum has significant changes after Yupingfeng Particles intervention, regressed to the health group. Four kinds of material including Cysteine, L-methionine, threonine, pyroglutamic acid were potential syndrome markers of lung and defensive Qi deficiency syndrome of repeated URI. **Conclusion** Patients with lung and defensive Qi deficiency syndrome of repeated URI had disorder of amino acid metabolism. Correcting disorder of amino acid metabolism may be one of the mechanisms of action that Yupingfeng Particles in treatment of lung and defensive Qi deficiency syndrome.

Keywords repeated upper respiratory infection; lung and defensive Qi deficiency syndrome; Yupingfeng Particles (玉屏风颗粒); metabonomics

(收稿日期: 2014-11-21; 修回日期: 2015-01-03)

编辑: 叶 晨

信 息 窗

第三届岐黄论坛隆重召开

【本刊讯】2015 年 7 月 18 日,由中华中医药学会主办,北京康仁堂药业有限公司、神威药业集团有限公司、四川好医生药业集团有限公司协办的第三届岐黄论坛在北京隆重召开。论坛以“落实国家战略,发展健康服务”为主题,旨在立足传统,面向未来,促进岐黄之学薪火相传,推动岐黄之术革故鼎新。来自中医药医疗、保健、教育、科研、管理、文化、产业相关专家学者 1200 余人参加了本次论坛。

开幕式上,国家中医药管理局副局长、中华中医药学会副会长马建中对发展中医药健康服务业提出三点意见,一要加快构建中医药健康服务体系、二要积极发展中医药健康服务新业态、三要加快中医药健康服务支撑体系发展。国家科学技术奖励工作办公室主任邹大挺,中国科协党组成员、书记处书记王春法出席会议并讲话。中华中医药学会副会长、北京市中医管理局局长屠志涛宣读了《关于设立中华中医药学会学术委员会的决定》及学术委员会名单。开幕式后,中国中西医结合学会陈香美院士,国家科技部发展战略研究院王宏广副院长,国医大师徐经世教授,中国中医科学院院长张伯礼院士,广州中医药大学第一附属医院冼绍祥院长和中国中医科学院广安门医院肿瘤科林洪生主任分别做大会报告。当日下午,中医养生康复论坛、妇科炎症中医药防治论坛、肿瘤中医药防治论坛、中医经典传承创新论坛、心脑血管疾病中医药防治论坛、中医药标准化工作论坛、中药传承创新应用论坛、眼科疾病中医药防治论坛等 8 个分论坛同期召开,并取得圆满成功。

论坛还得到了中国中医科学院、北京中医药大学、上海中医药大学、广州中医药大学、南京中医药大学、成都中医药大学和天津中医药大学的大力支持。