

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.03.011

大黄煎剂保留灌肠对轻微型肝性脑病患者血清代谢物谱的影响

黄国初¹, 王萌¹, 杨小微², 姚凡¹, 钟宇², 姚春^{2*}

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市东葛路 89-9 号, 530023; 2. 广西中医药大学)

摘要 目的 探讨大黄煎剂治疗轻微型肝性脑病(MHE)患者的可能作用机制。方法 将 29 例 MHE 患者随机分为大黄煎剂组 15 例和安慰剂组 14 例。大黄煎剂组给予大黄煎剂 200 ml 保留灌肠, 安慰剂组给予无菌注射用水 200 ml 保留灌肠。两组均每天 1 次, 7 天为 1 个疗程。治疗前后检测血清样本中的代谢物, 用主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)分析两组患者治疗前后血清样本中的代谢物变化情况。结果 PCA 分析显示, 大黄煎剂组及安慰剂组治疗前后血清代谢物轮廓的分组趋势不明显, 有较多重叠, 模型参数 R^2X 分别为 0.393 和 0.509, 模型的解释能力欠佳; OPLS-DA 分析显示, 大黄煎剂组模型参数 $R^2X=0.280$, $R^2Y=0.954$, $Q^2Y=-0.097$; 安慰剂组模型参数 $R^2X=0.397$, $R^2Y=0.941$, $Q^2Y=-0.605$, 模型建立失败。两组治疗前后 MHE 患者的代谢物谱均无明显差异。结论 大黄煎剂对 MHE 患者的血清代谢物谱无明显影响。

关键词 轻微型肝性脑病; 大黄煎剂; 代谢组学

轻微型肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE)是肝性脑病(HE)的一个特殊类型, 该病通常没有典型的肝性脑病的表现, 但采用精细的神经生理和心理检查方法如数字连接实验、数字符号实验、事件相关电位 P300 等可检测出异常结果。MHE 患者的操作能力及反应能力受到不同程度的损害, 使得患者在从事高空作业或驾驶时的意外风险大大增加, 如不能及时处理则会进展为临床型肝性脑病, 从而增加患者的死亡率^[1-3]。本课题组前期研究发现, 大黄煎剂保留灌肠对 MHE 大鼠认知功能、血生化指标、肝脏病理改变等均有显著的改善作用^[4]; 可明显改善 MHE 患者认知功能, 提高其生存质量, 阻断或延缓其向临床型肝性脑病进展^[5-6]。本研究运用气相色谱-飞行时间质谱仪(GC-TOFMS)和超高压液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪(UPLC-QTOFMS)代谢组学分析平台分析观察大黄煎剂对 MHE 患者血清中代谢物谱的影响, 以寻找大黄煎剂治疗 MHE 的可能机制。

1 临床资料

1.1 一般资料

29 例 MHE 患者均来源于广西中医药大学第一附属医院肝病科 2013 年 10 月至 2014 年 10 月住院患者。采用中心区组随机化方法, 通过 SPSS 15.0 软件产生随机号将上述患者分为大黄煎剂组 15 例和安慰剂组 14 例。大黄煎剂组中男 9 例, 女 6 例, 平均年龄(44.33 ± 7.05)岁, 乙型肝炎肝硬化平均病程(4.15 ± 1.52)年; 安慰剂组中男 10 例, 女 4 例, 平均年龄(45.20 ± 8.19)岁, 乙型肝炎肝硬化平均病程(4.25 ± 2.21)年。两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 诊断标准

参照《慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)》^[7]、《肝硬化中西医结合诊疗共识》^[8]及《中国肝性脑病诊治共识意见(2013 年, 重庆)》^[9]中有关 MHE 诊断标准拟定, 1) 符合乙型肝炎肝硬化的诊断标准; 2) 数字连接实验-A 及数字符号试验两项测试结果均阳性, 并排除其他精神心理或神经方面疾病。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81160439)

* 通讯作者: 1197840425@qq.com

1.3 纳入标准

- 1) 符合上述 MHE 诊断标准; 2) 年龄 18 ~ 64 岁; 3) 近 3 个月内未参加过其他新药临床试验;
- 4) 签署知情同意书。

1.4 排除标准

- 1) 近 4 周内服用镇静剂或中枢神经系统抑制剂;
- 2) 合并酒精性肝硬化仍继续酗酒者;
- 3) 近 2 周内消化道出血者;
- 4) 体温在 37.5℃ 以上者;
- 5) 伴随严重心、肺、脑、肾等器官受损者;
- 6) 文盲、半文盲者和不合作者;
- 7) 妊娠期、月经期女性。

2 方法

2.1 治疗方法

大黄煎剂组给予大黄煎剂 (由大黄 30 g、乌梅 30 g 组成) 保留灌肠, 由广西中医药大学第一附属医院制剂室统一制成 200 ml/袋的灌肠液, 每天 1 次, 共治疗 7 天。安慰剂组给予无菌注射用水 200 ml 保留灌肠 (批号: ZA13100308, 购自山东齐都药业有限公司)。每天 1 次, 共治疗 7 天。

保留灌肠规范化操作流程: 所用灌肠液应用前均加温至 40℃ 左右, 用 50 ml 甘油注射器抽取, 连接 14 号肛管, 患者取左侧卧位, 将肛管轻柔插入直肠 30 cm 以上, 缓慢注入药液。拔管后用手掐住臀部向肛门挤压, 压迫肛门括约肌 5 min, 在操作完毕后, 患者转为右侧卧位, 使药物在肠内尽量保持 120 min 以上。

2.2 观察指标和方法

采用 GC-TOFMS (购自美国 Pegasus HTLECO 公司) 和 UPLC-QTOFMS (购自美国 Waters 公司) 仪器观察两组患者治疗前后血清代谢谱的变化。

2.2.1 采样情况 两组患者治疗前后于早晨空腹抽血, 室温下静置至其自然凝结后进行离心, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于 -80℃ 冰箱冻存储用。

2.2.2 样本制备 UPLC-QTOFMS 样本制备: 取解冻后的样本, 混旋均匀, 精密吸取 40 μl 于 1.5 ml 的离心管中, 加入 0.3 mg/ml 的氯苯丙氨酸 (批号: 31096CK, 购自美国 Sigma 公司) 水溶液 20 μl, 再加入 60 μl 水后, 加入于 4℃ 放置过 30 min 的萃取溶剂甲醇: 乙腈 (1:9) 500 μl (甲醇批号: I667707251, 购自德国 Merck 公司; 乙腈批号: 145760, 购自美国 Fisher 公司), 混旋 2 min, 超声 1 min。于 -20℃ 放置 10 min 后, 于

4℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液各 150 μl 于玻璃进样瓶中的内插管, -80℃ 冻存。

GC-TOFMS 样本制备: 血清溶解, 涡旋混匀后移取 100 μl, 加入甲醇溶解的 1 mg/ml 十七酸 (批号: 026K1543, 购自美国 Sigma 公司) 10 μl 和水溶解的 0.3 mg/ml 氯苯丙氨酸 10 μl, 混匀后加入混合溶剂 300 μl (氯仿: 甲醇 1:3) (氯仿批号: K31N56, 购自美国 J. T. BAKER 公司) 涡旋混匀, -20℃ 静置 10 min, 4℃ 离心 10 min (10 000 r/min)。取 300 μl 上清液于 1.5 ml 高回收进样瓶中, 室温下真空干燥。抽干后用氮气对样品再次干燥, 以保证样品中无水并排除空气中湿气对衍生的影响 (衍生时, 空气湿度 35%)。氮气吹干后加入 15 mg/ml 吡啶 (批号: SZABD148SV, 购自美国 Sigma 公司) 溶解的甲氧胺 (批号: BCBN2932V, 购自美国 Sigma 公司) 80 μl, 密封后振荡 30 s, 30℃ 摇床 (220 r/min) 反应 90 min; 反应结束后, 在反应瓶中加入 80 μl 的 BSFTA (含 1% TMCS, 批号: LC08598V, 购自美国 Sigma 公司), 密封后振荡 30 s, 70℃ 反应 60 min。反应结束后, 振荡 10 s, 室温下放置 1 h 后进样分析。

2.3 统计学分析

所有样本均采用 GC-TOFMS 和 UPLC-QTOFMS 两个互补平台进行检测, 分别采用混合样本本质控进行原始数据校正, 校正后的数据合并后进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 等多维统计分析, 组间差异的显著性分析采用 *t* 检验, 显著性程度指标 *P* 值控制在 0.05 之内。数据处理及分析过程中用到的软件主要有: SPSS 15.0、SIMCA-P + 12.0.1 (Umetrics, Umeå, Sweden)、Excel 2007 (Microsoft, USA) 等。

3 结果

通过分析 GC-TOFMS 和 UPLC-QTOFMS 平台所得到数据, 在血清中鉴定了 246 个物质, 所有多维统计均采用这些物质进行分析。对大黄煎剂组和安慰剂组进行 PCA 和 OPLS-DA 建模分析。

PCA 分析结果: 图 1 可以看出, MHE 患者使用大黄煎剂治疗前后血清代谢轮廓的分组趋势不明显, 有较多重叠, 表明 MHE 患者在大黄煎剂治疗前后其内源性代谢产物变化不明显。图 1 大黄煎剂组对应的模型参数 $R^2X = 0.393$, 表示该模型能解释因变量 39.3% 的变异信息 (见表 1)。MHE 患者使用安慰剂前后血清代谢轮廓的分组趋势亦不明显, 其模型参数 $R^2X = 0.509$, 表示该模型能解释

因变量 50.9% 的变异信息 (见表 1)。两个模型的解释能力均欠佳, 需要进行有监督的模式识别方法 (OPLS-DA 分析) 进一步分析。

OPLS-DA 分析结果: 大黄煎剂组, $Q^2Y = -0.097$ 所对应的模型参数 $R^2X = 0.280$, $R^2Y = 0.954$ (见表 1), 表明该模型概括了第一主成分 (t_1) 和第二主成分 (t_2) 两种整体信息的 28%, 能解释因变量 95.4% 的变异信息; 安慰剂组所对应的模型参数 $R^2X = 0.397$, $R^2Y = 0.941$, $Q^2Y = -0.605$ 。 Q^2Y 均为负值, 表明两个模型无可预测准确度, 模型建立失败, 提示 MHE 患者在接受大黄煎剂和安慰剂治疗前后其代谢物谱均无明显差异。

表 1 两组轻微型肝性脑病患者主要模型参数

组别	例数	模型	成分	R^2X	R^2Y	Q^2Y
大黄煎剂	15	PCA	3	0.393	/	/
	15	OPLS-DA	1+2	0.280	0.954	-0.097
安慰剂组	14	PCA	3	0.509	/	/
	14	OPLS-DA	1+2	0.397	0.941	-0.605

注: R^2X , 模型在 X 矩阵的累积建模变化; R^2Y , 在 Y 矩阵的累积建模变化; Q^2Y , 在 Y 变量或矩阵的累积预测变化

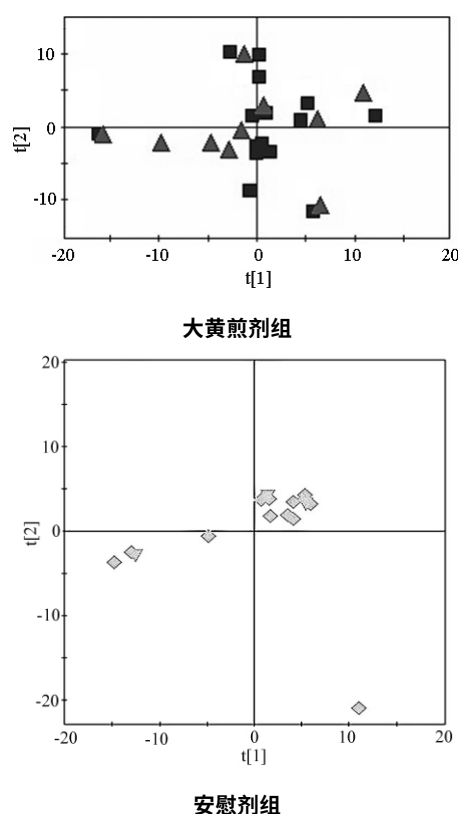


图 1 两组 MHE 患者治疗前后二维 PCA 得分图

■为用大黄煎剂组治疗前, ▲为用大黄煎剂组治疗后, ◆为安慰剂组治疗前, ▼为安慰剂组治疗后; t_1 第一主成分; t_2 第二主成分

4 讨论

MHE 没有明确对应的中医病名, 根据其临床表现大致可归于“鼓胀”“郁证”“癥积”“不寐”“黄疸”等范畴, 其病机多为肝气失畅, 气滞血瘀; 日久不化, 蕴热化火生痰; 毒邪内蕴, 腑气不通, 蒙蔽脑窍。其中“毒”“痰”“瘀”是导致 MHE 发生的关键性病理产物。因此, 通过通腑醒神、泄毒降浊化痰之法, 将肠道内“毒”“痰”“瘀”之邪排出体外, 以达开窍醒神之效。本课题组前期研究表明, 大黄煎剂连续灌肠 7 天, 可明显改善 MHE 患者神经生理及智力检测结果, 疗效较好^[10-13]。然而大黄煎剂治疗 MHE 的确切作用机制仍未被完全阐明, 其对 MHE 认知功能的影响是否通过影响患者内源性代谢物而发挥作用? 因此, 本研究采用 GC-TOFMS 和 UPLC-QTOFMS 联合检测的方法来探讨大黄煎剂治疗 MHE 的可能作用机理。

本研究结果显示, 大黄煎剂对 MHE 患者的血清代谢物谱无明显影响。可能有以下几个原因: 1) 大黄煎剂可能是通过影响 MHE 患者体内其他大分子物质而起作用, 而 GC-TOFMS 和 UPLC-QTOFMS 代谢组学检测平台无法检测到这些大分子物质 [代谢组学检测技术通常只能检测到分子量 (MW) <1000 的各种代谢通路的底物和产物的小分子代谢物]; 2) 本研究样本量较小, 不能排除抽样误差的存在; 3) 从血清标本采集到最终检测的过程中, 样本有可能在离体条件下发生代谢活动, 从而影响样品中代谢物的质和量的改变, 可能会对受试者真实的代谢物谱产生干扰。

代谢组学作为一门新兴学科, 在中医药现代化、中药药理学、毒理学等领域中有着极其广泛和重要的应用前景。本研究从代谢组学的角度对大黄煎剂治疗 MHE 的作用机制进行了有益的探索, 初步得出了一些有意义的数据和结果, 为下一步的继续研究打下了基础。

参考文献

- [1] 李瑜元, 聂玉强, 沙卫红. 亚临床型肝性脑病的发病率调查 [J]. 中华内科杂志, 2000, 39(9): 625-627.
- [2] 曾峰, 李瑜元, 聂玉强. 亚临床肝性脑病的流行病学调查 [J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(11): 680-682.
- [3] 姚春, 谢武, 付蕾. 解毒化痰方对轻微型肝性脑病大鼠行为学、学习记忆能力、血浆内毒素、血氨、肝功能及肝脏病理影响随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(5): 7-10.

- [5] 牛登锋. 大黄煎剂对轻微型肝性脑病患者 EEG、BEAM 及疗效影响的临床研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2014.
- [6] 姚春, 姚凡, 谢武, 等. 大黄煎剂保留灌肠治疗轻微型肝性脑病临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(3): 474-476.
- [7] 韦新, 程万里, 张荣臻. 大黄煎剂治疗轻微型肝性脑病的临床研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(1): 26-27.
- [8] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(1): 113-128.
- [9] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 肝硬化中西医结合诊疗共识 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(4): 277-279.
- [10] 中华医学会消化病学分会, 中华医学会肝病学分会. 中国肝性脑病诊治共识意见(2013 年, 重庆) [J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2014, 6(2): 81-93.
- [11] 石清兰, 毛德文, 吕建林, 等. 加用大黄煎剂保留灌肠治疗轻微型肝性脑病疗效观察 [J]. 广西中医药, 2013, 36(3): 15-16.
- [12] 姚春, 牛登锋, 王萌, 等. 大黄煎剂灌肠治疗轻微型肝性脑病的治疗体会 [J]. 医药前沿, 2014(13): 251-252.
- [13] 张玉娥. 大黄煎剂对轻微型肝性脑病患者 P300 及疗效影响的临床研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2014.
- [14] 韦玉仙. 大黄煎剂灌肠治疗轻微型肝性脑病临床研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2013.

Effect of *Dahuang Decoction* (大黄煎剂) Retention Enema on Serum Metabolite Profiling in Patients with Minimal Hepatic Encephalopathy

HUANG Guochu¹, WANG Meng¹, YANG Xiaohui², YAO Fan¹, ZHONG Yu², YAO Chun²

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530023; 2. Guangxi University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore possible mechanism of *Dahuang Decoction* in treating minimal hepatic encephalopathy (MHE). **Methods** Randomly divided 29 cases of patients with MHE into the *Dahuang Decoction* group (15 cases) and the placebo group (14 cases). The *Dahuang Decoction* group was given *Dahuang Decoction* 200 ml for retention enema. The placebo group was given sterile water injection 200ml for retention enema. Both once per day, lasted for 7 days as a course. Examined metabolite in serum samples before and after treatment. Analyzed changes of metabolite in serum samples of patients before and after treatment using principal component analysis (PCA) and partial least square discrimination analysis (OPLS-DA). **Results** PCA indicated that grouping trend of serum metabolite profile of the placebo group and the *Dahuang Decoction* group before and after treatment was not obvious and had much overlap. Model parameter R^2X was respectively 0.393 and 0.509. Model interpretability was not good enough. OPLS-DA showed that model parameter of the *Dahuang Decoction* group $R^2X = 0.280$, $R^2Y = 0.954$, $Q^2Y = -0.097$; Model parameter of the placebo group $R^2X = 0.397$, $R^2Y = 0.941$, $Q^2Y = -0.605$. The model was not established successfully. Serum metabolite profiling of patients with MHE in two groups before and after treatment had no obvious difference. **Conclusion** *Dahuang Decoction* has no obvious effect on serum metabolite profiling of patients with MHE.

Keywords minimal hepatic encephalopathy (MHE); *Dahuang Decoction*; metabonomics

(收稿日期: 2015-03-20; 修回日期: 2015-06-22)

编辑: 王利芬