

· 临床论著 ·

婴儿巨细胞病毒肝炎不同中医证型的尿液代谢组学研究

李维薇^{1,2} 贺丽丽³ 单进军² 谢 彤² 杜丽娜⁴ 杨 燕⁴ 汪受传¹

摘要 目的 探讨婴儿巨细胞病毒肝炎不同证型的尿液代谢组学特征。**方法** 筛选 84 例婴儿巨细胞病毒肝炎患儿分为湿热内蕴证(39 例)、脾虚湿困证(28 例)、气滞血瘀证(17 例),另选健康对照组 39 名。采用气相色谱及质谱联用(GC-MS)技术对尿液样本进行代谢组学检测,经主成分分析寻找各证型的差异性代谢物。**结果** 生化指标分析显示:湿热内蕴证与脾虚湿困证的总胆红素、结合胆红素及碱性磷酸酶水平存在差异($P < 0.05$);湿热内蕴证与气滞血瘀证的天门冬氨酸氨基转移酶、总胆红素、结合胆红素、总胆汁酸水平及凝血酶原时间存在差异($P < 0.05$);脾虚湿困证与气滞血瘀证的天门冬氨酸氨基转移酶、总胆红素、结合胆红素、总胆汁酸、碱性磷酸酶水平及凝血酶原时间存在差异($P < 0.05$)。代谢组学研究显示:各证型在 OPLS-DA 图上区分明显,各证型间差异性代谢物涉及多种氨基酸代谢、能量代谢及肠道菌群相关代谢物紊乱。**结论** 婴儿巨细胞病毒肝炎湿热内蕴证、脾虚湿困证及气滞血瘀证存在各自的尿液代谢组学特征。

关键词 婴儿巨细胞病毒肝炎;中医证候;代谢组学;湿热内蕴证;脾虚湿困证;气滞血瘀证

Urinary Metabolomics Study on Infantile Human Cytomegalovirus Hepatitis of Different Chinese Medicine Syndromes LI Wei-wei^{1,2}, HE Li-li³, SHAN Jin-jun², XIE Tong², DU Li-na⁴, YANG Yan⁴, and WANG Shou-chuan¹ 1 Department of Pediatric, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing(210023); 2 Institute of Pediatrics, Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing(210023); 3 Department of Pediatric, Jiangsu Province Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing (210028); 4 Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing (100045)

ABSTRACT Objective To investigate the urinary metabolomic characteristics of different Chinese medicine (CM) syndromes in infantile human cytomegalovirus hepatitis. **Methods** Totally 84 infantile human cytomegalovirus hepatitis patients were screened and assigned to damp-heat syndrome (39 cases), Pi-deficiency with dampness encumbrance syndrome (28 cases), Qi stagnation and blood stasis syndrome (17 cases). Another 39 cases of normal control were collected at the same time. A non-targeted gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) metabolomics method was used in conjunction with orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to explore the differential metabolites and pathways of the three CM syndromes. **Results** In clinical index analysis, damp-heat syndrome and Pi-deficiency with dampness encumbrance syndrome differ in total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL) and alkaline phosphatase (ALP, $P < 0.05$). Damp-heat syndrome and Qi stagnation and blood stasis syndrome differ in aspartate aminotransferase (AST), TBIL, DBIL, total bile acid (TBA) and prothrombin time (PT, $P < 0.05$). Pi-deficiency with dampness encumbrance syndrome and Qi stagnation and blood stasis syndrome differ in AST, TBIL, DBIL, TBA, ALP and PT ($P < 0.05$). In metabolomic study, the OPLS-DA score plots revealed clear differentiation among the three CM syndromes. The

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81473725);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(No.KYCX18_1550)

作者单位:1.南京中医药大学附属医院儿科(南京 210023);2.南京中医药大学中医科学研究所(南京 210023);3.江苏省中西医结合医院儿科(南京 210023);4.首都医科大学附属北京儿童医院中医科(北京 100045)

通讯作者:杨 燕, Tel:010-59616161, E-mail: yy2303@sina.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20181226. 238

differential metabolites between the three CM syndromes involve a variety of amino acid metabolism, energy metabolism and intestinal bacterial metabolism disorders. Conclusion Three CM syndromes of infantile human cytomegalovirus hepatitis have specific urinary metabolomic profiles, which indicated that different CM syndromes have their specific biological basis.

KEYWORDS infantile human cytomegalovirus hepatitis; Chinese medicine syndromes; metabolomics; damp-heat syndrome; Pi-deficiency with dampness encumbrance syndrome; Qi stagnation and blood stasis syndrome

代谢组学技术作为系统生物学技术的一个重要组成部分,可以定量描述生物内源性代谢物的整体及其对内外因素的应答规律^[1,2]。中医学认为,证候是对机体在疾病发展过程中的某阶段病因、病理、病机、病位的概括,是机体内因和环境外因综合作用下的整体状态。代谢组学技术可通过检测人体体液如血液、尿液、唾液等,从代谢终产物水平上反映生命活动的整体状态,以多维图谱的形式客观反映中医证候的物质基础,已成为中医证候标准化研究的有力工具^[3]。

婴儿巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)肝炎是我国婴儿期常见的肝脏疾病,临床表现为患儿生后黄疸消退延迟或退后复现,伴见肝功能异常及肝脾肿大,严重者可见肝脏纤维化、胆道狭窄梗阻甚至闭锁^[4-6]。常用抗 HCMV 药如更昔洛韦、膦甲酸钠及西多福韦等,由于存在肾脏及骨髓毒性,限制了这些药物在婴儿 HCMV 肝炎中的应用^[7,8]。中医药治疗该病在抗病毒、保肝退黄、减缓肝纤维化及减轻西药不良反应等方面均有一定优势^[9,10]。能否准确辨证分型对于该病的中医药治疗起到重要的先导作用,但目前该病的中医药研究尚存在观测指标不够客观、辨证分型不规范统一的问题。

本研究以婴儿 HCMV 肝炎这一疾病为切入点,采用气相色谱与质谱联用(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)技术,检测该病患儿湿热内蕴证、脾虚湿困证及气滞血瘀证尿液中代谢物的改变,通过主成分分析技术寻找各证型潜在的差异性代谢物,并进一步探讨该病不同中医证型的物质内涵,为阐述中医证候的生物学本质提供依据。

资料与方法

1 诊断标准 参照《诸福棠实用儿科学》^[11]制定诊断标准。

1.1 西医婴儿 HCMV 肝炎诊断标准 (1)月龄 1~12 个月的婴儿;(2)具有黄疸、肝功能损害、肝肿大或脾肿大等肝炎临床表现;(3)活动性 HCMV 感染证据:血清 HCMV IgM 抗体、HCMV pp65 抗原及

HCMV 核酸检测阳性;(4)丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)升高,总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)和/或间接胆红素升高(TBIL),总胆汁酸(TBA)升高。

1.2 中医辨证分型标准 参照《中医儿科常见病诊疗指南》^[12]“胎黄”相关章节制定婴儿 HCMV 肝炎中医辨证分型诊断标准。(1)湿热内蕴证:面目皮肤发黄,色泽鲜明如橘,小便黄赤,不欲吮乳,哭闹不安,哭声响亮,口渴唇干,或有发热,腹胀,大便秘结,舌质红,苔黄腻,指纹紫。(2)脾虚湿困证:面目皮肤发黄,色泽晦暗,日久难退,四肢欠温,大便溏薄,色灰白,精神萎靡,不思进食,小便短少,舌质淡,苔白腻。(3)气滞血瘀证:面目皮肤发黄,颜色逐渐加深,晦暗无华,右胁下痞块质硬,肚腹膨胀,青筋显露,舌质紫,或见瘀斑,苔黄。由北京儿童医院中医科两名副主任医师以上职称的专家辨证诊断。

2 纳入及排除标准 纳入标准 (1)符合西医婴儿 HCMV 肝炎诊断标准及中医辨证分型标准;(2)年龄 1~12 个月的住院患儿;(3)所有患儿监护人均签署知情同意书。排除标准 (1)合并有心、肾、脑或造血系统障碍的患儿;(2)高半乳糖血症、酪氨酸血症、希特林蛋白缺乏症等先天性代谢疾病引起的胆汁淤积;(3)Alagille 综合征、进行性家族性肝内胆胆汁淤积症及胆总管囊肿患儿。

3 一般资料 84 例均来源于 2015 年 6 月—2017 年 6 月在首都医科大学附属北京儿童医院就诊的婴儿 HCMV 肝炎患儿,男性患儿 44 例,女性患儿 40 例,其中湿热内蕴证 39 例、脾虚湿困证 28 例、气滞血瘀证 17 例。另同期收集 39 名北京儿童医院儿童保健中心体检的健康婴儿为健康对照组,其中男性婴儿 20 名,女性婴儿 19 名,年龄 3.8~9.5 个月,身高 52~75 cm,体重 1.5~6.0 kg。四证患儿在性别、年龄、身高及体重方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经过北京儿童医院机构伦理委员会批准(No. 2014-49)。

4 观察指标及方法 (1)一般资料(月龄、性别、

身高、体重);(2)实验室检查[肝功能:ALT、AST、TBIL、DBIL、TBA、谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)等];凝血五项[凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)、D-二聚体(D-Dimer)]、腹部B超、肝胆核磁等。

5 尿液样本采集及前处理 采集患儿及健康对照晨起晨尿尿液样本 2 mL。尿液样本收集后于 4 ℃, 3 000 r/min 离心 10 min 去除杂质,取上清置于 -80 ℃ 保存,待代谢组学检测。实验前将尿液样本置于冰上解冻,取 90 μL 尿液样本,加入含 30 U 尿素酶的水溶液 10 μL,置于 37 ℃ 孵育 60 min,然后加入 400 μL 冰甲醇(含内标 5 mg),涡旋 10 min。于 4 ℃, 12 000 r/min 离心 10 min,吸取 200 μL 上清液,置于离心浓缩仪中挥干(45 ℃, 14 Vac, 2 h)。每个样本加入 15 mg/mL 的甲氧胺吡啶溶液 30 μL,涡旋 1 min 后振荡 1.5 h (30 ℃, 600 r/min),每个样本加入 30 μL BSTFA(含 1% TMCS)溶液后,涡旋 1 min 后振荡 0.5 h (37 ℃, 600 r/min),取上清液 50 μL 于玻璃内插管内,供 GC-MS 进样。本实验采用质量控制(Quality control, QC)样品检验仪器的稳定性和方法的重现性, QC 样品由所有样本均匀混合而成。样品检测过程中,每 10 个样品完成检测后运行 1 次 QC 样品。

6 GC-MS 分析条件

6.1 气相色谱条件 石英毛细管色谱柱初始柱温 30 ℃,保持 1 min,以 20 ℃/min 升至 320 ℃后,保持 5 min。载气为高纯氦气,流量 1.2 mL/min,采用分流模式,分流比为 20:1。进样口温度 250 ℃,每次进样量 1 μL。

6.2 质谱条件 EI 源,离子源温度 280 ℃,离子传输线温度 250 ℃,碰撞能量 70 eV,采集范围为 50 ~ 500 m/z,采集时间为 3.5 ~ 19 min。

7 数据处理 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析,数据均采用中位数(最小值,最大值)表示。各组月龄、身高、体重及生化指标采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。代谢组学数据部分,原始数据导入 MS-DIAL 软件,经基线校正、峰识别、峰对齐等数据预处理,得到包含变量名、样品名及峰面积的三维数据矩阵,导入 MetaboAnalyst 3.0 数据处理平台(<http://www.metaboanalyst.ca/>)进行数据归一化处理。经归一化处理后的数据经 SIMCA-P 13.0 (瑞典, Umetrics)进行正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),筛选变量权重系数(VIP) > 1 的物质,对这些物质的峰面积采用非参数检验,筛选 $P < 0.05$ 的代谢物为潜在的差异性代谢物,利用 NIST 2014 标准谱图库和已有的标准品加以验证。再经 MetaboAnalyst 3.0 数据处理平台进行富集分析,寻找相关代谢通路。

结 果

1 各证型一般资料比较(表 1) 三证型的 AST、TBIL、DBIL、TBA 及 ALP 水平存在明显差异($P < 0.05$);其中湿热内蕴证与脾虚湿困证患儿在 TBIL、DBIL 及 ALP 含量上存在明显差异($P < 0.05$);湿热内蕴证患儿与气滞血瘀证患儿在 AST、TBIL、DBIL、TBA 及 PT 存在明显差异($P < 0.05$);脾虚湿困证患儿与气滞血瘀证患儿的 AST、TBIL、DBIL、TBA、ALP 及 PT 存在差异($P < 0.05$)。

表 1 各证型一般资料比较 [中位数(最小值,最大值)]

项目	湿热内蕴证(39 例)	脾虚湿困证(28 例)	气滞血瘀证(17 例)
月龄	2.0[1.0,4.5]	2.0[1.5,5]	2.5[1.0,9.0]
身高(cm)	58.0[51.0,75.0]	57.0[50.0,72.0]	56.0[50.0,73.0]
体重(kg)	5.0[3.3,7.0]	5.0[4.0,8.5]	5.0[3.3,9.5]
ALT(U/L)	130.3[24.6,625.8]	98.9[17.1,437.7]	190.6[68.0,393.0]
AST(U/L)	165.4[61.0,844.8]	90.4[41.6,527.1]	243.5[97.5,533.5]**△△
TBIL(μmol/L)	103.1[19.9,273.6]	21.1[3.1,189.2]**	168.1[112.5,150.5]**△△
DBIL(μmol/L)	57.2[6.9,203.8]	6.1[1.0,124.8]**	111.4[72.1,191.8]**△△
TBA(μmol/L)	92.0[17.3,207.0]	44.4[4.6,160.0]	111.6[69.1,223.2]**△△
GGT(U/L)	155.9[60.5,465.9]	91.3[24.8,358.8]	214.9[24.5,1074.7]
ALP(U/L)	450.0[253.0,1580.0]	357.0[177.0,704.0]**	485.5[334.0,1047.0]△△
LDH(U/L)	384.0[233.0,777.0]	334.5[191.0,841.0]	398.5[222.0,639.0]
PT(U/L)	10.4[8.9,15.7]	10.5[9.4,14.3]	10.9[9.6,21.6]**△
PLT($10^9/L$)	273.0[80.0,930.0]	351.5[57.0,463.0]	281.5[87.0,504.0]

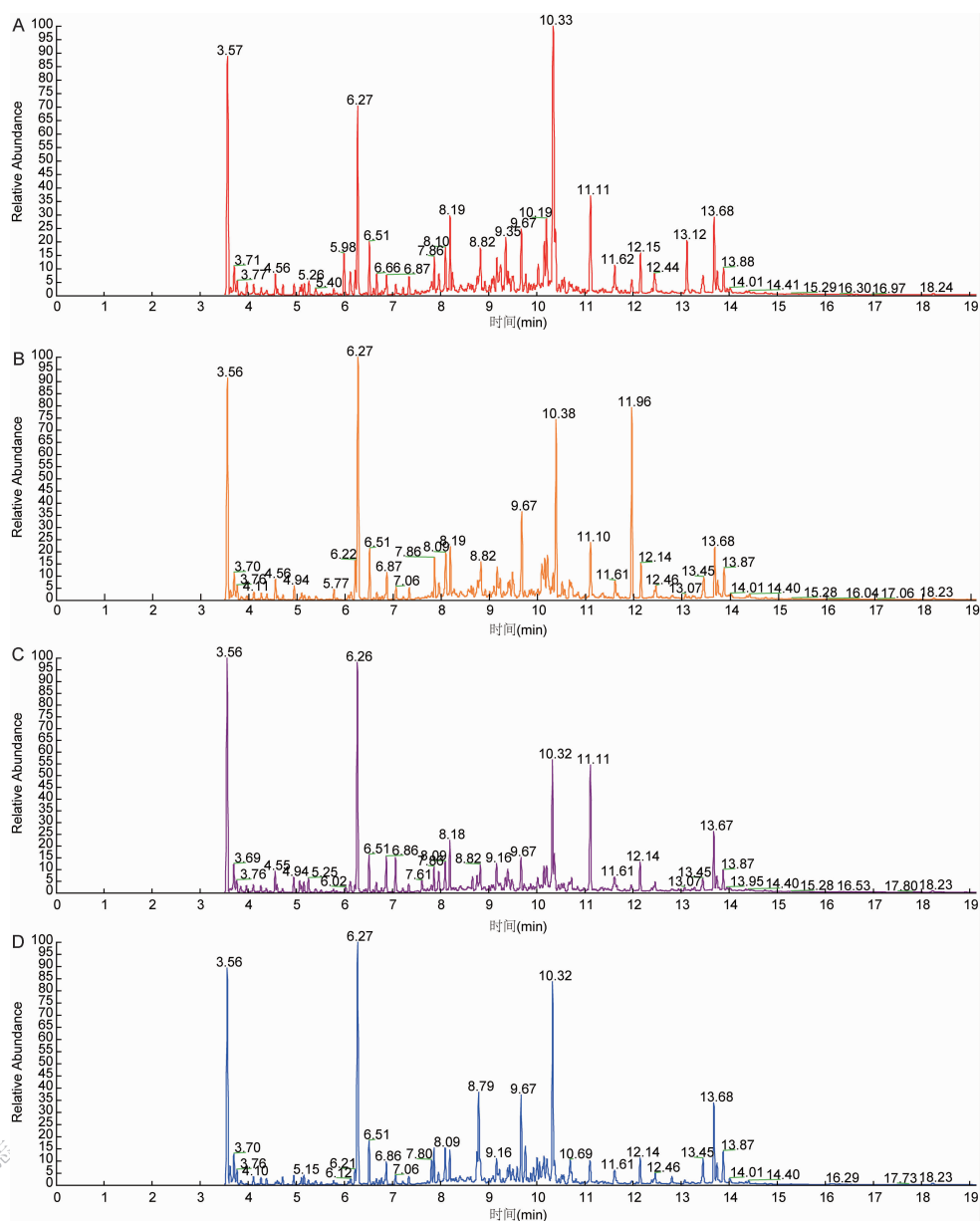
注:与湿热内蕴证比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与脾虚湿困证比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

2 代谢指纹图谱宏观分析(图 1) 各组的色谱峰数量及峰高存在一定差异,推测各组的尿液代谢产物存在一定差异,各证候组及健康对照组的总离子流图(total ion current, TIC)在色谱峰数量及峰高存在差异,详细信息进一步采用多元统计进行分析。

3 多元统计分析(图 2) 采用 OPLS-DA 模型来观察婴儿 HCMV 肝炎不同证候总体代谢分布。湿热内蕴证、脾虚湿困证及气滞血瘀证这三种不同的证候沿第一主成分及第二主成分轴均呈明显的分离趋势;随后继续采用 OPLS-DA 模型两两对比,上排为三个证候组与健康对照组的两两对比,均沿第二主成分轴完全区分;下排为三个证候组间的两两对比,同样沿

第二主成分轴完全区分,提示 HCMV 肝炎各证候有各自的代谢特征。

4 各证型与健康组差异性代谢物比较(表 2 ~ 4) 通过上述 OPLS-DA 模型发现:湿热内蕴证与健康对照组有 10 个差异性代谢物,主要涉及苯丙氨酸代谢,柠檬酸循环代谢紊乱;脾虚湿困证与健康对照组比较,有 12 个差异代谢物,涉及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,赖氨酸的降解及生物合成,组氨酸代谢,氨酰 tRNA 生物合成等代谢通路的紊乱;气滞血瘀证与健康对照组比较,有 13 个差异代谢物,与赖氨酸的降解及生物合成,乙醛酸和二羧酸代谢,柠檬酸循环及氨酰 tRNA 生物合成有关。



注:A 为湿热内蕴证;B 为脾虚湿困证;C 为气滞血瘀证;D 为健康对照组

图 1 婴儿 HCMV 肝炎各证型组及健康婴儿尿液的 GC-MS 总离子流图

表 2 湿热内蕴证患儿与健康对照组的差异性代谢物比较

编号	代谢物	保留时间 (min)	Log ² (Fold Change)	变量权重系数 (VIP)	P value Mann-Whitney	FDR
1	D-葡萄糖(D-Glucose)	16.04	-4.7651	2.11720	2.67×10^{-15}	4.13×10^{-14}
2	1,3-丙二醇(1,3-Propanediol)	4.55	4.4506	4.46987	1.92×10^{-18}	5.95×10^{-17}
3	柠檬酸(Citric acid)	9.67	-2.5928	1.65761	2.83×10^{-11}	2.92×10^{-10}
4	D-麦芽糖(D-Maltose)	14.21	-2.5610	1.11554	0.000000151	0.000000667
5	乙酰-L-赖氨酸(Acetyl-L-Lysine)	9.82	2.2294	2.14655	0.000004440	0.000012500
6	L-胱氨酸(L-Cystine)	11.97	2.2072	2.64591	1.83×10^{-9}	1.42×10^{-8}
7	3-氨基异丁酸(3-Aminoisobutyric acid)	7.47	2.1192	1.75515	0.000022800	0.000058800
8	D-甘露醇(D-Mannitol)	10.32	2.0685	2.34209	2.97×10^{-8}	0.000000184
9	苯丙氨酸(Phenylalanine)	8.60	1.8616	1.71612	0.000161150	0.000356830
10	L-酒石酸[L-(+)-Tartaric acid]	8.66	1.2681	1.83178	0.002362400	0.004882300

表 3 脾虚湿困证患儿与健康对照组的差异性代谢物比较

编号	代谢物	保留时间 (min)	Log ² (Fold Change)	变量权重系数 (VIP)	P value Mann-Whitney	FDR
1	1,3-丙二醇(1,3-Propanediol)	4.55	8.2765	4.02419	1.3224×10^{-13}	3.8351×10^{-12}
2	L-酒石酸[L-(+)-Tartaric acid]	8.66	3.5732	3.52648	4.6303×10^{-8}	6.7139×10^{-7}
3	氨基丙二酸(Aminomalonic acid)	7.61	2.2911	1.37298	0.00111400	0.0034838
4	马尿酸(Hippuric acid)	9.76	2.2074	1.39944	0.00538040	0.0097520
5	D-葡萄糖(D-Glucose)	16.04	1.9158	2.08455	0.00030605	0.0012679
6	L-胱氨酸(L-Cystine)	11.97	1.8386	2.02083	9.0466×10^{-7}	8.7451×10^{-6}
7	丝氨酸(Serine)	6.86	1.8203	1.67185	0.00433350	0.0085370
8	3-氨基异丁酸(3-Aminoisobutyric acid)	7.47	1.7503	1.79518	0.01385900	0.0201730
9	L-赖氨酸(L-Lysine)	9.00	1.7438	1.56687	0.01391200	0.0201730
10	N,N-二甲氨甘氨酸(N,N-Dimethylglycine)	3.96	1.6796	1.55794	0.00141450	0.0037292
11	L-组氨酸(L-Histidine)	10.21	1.5862	1.15342	0.00441570	0.0085370
12	丁酸(Butanoic acid)	7.21	1.5146	1.17439	0.00432080	0.0085370

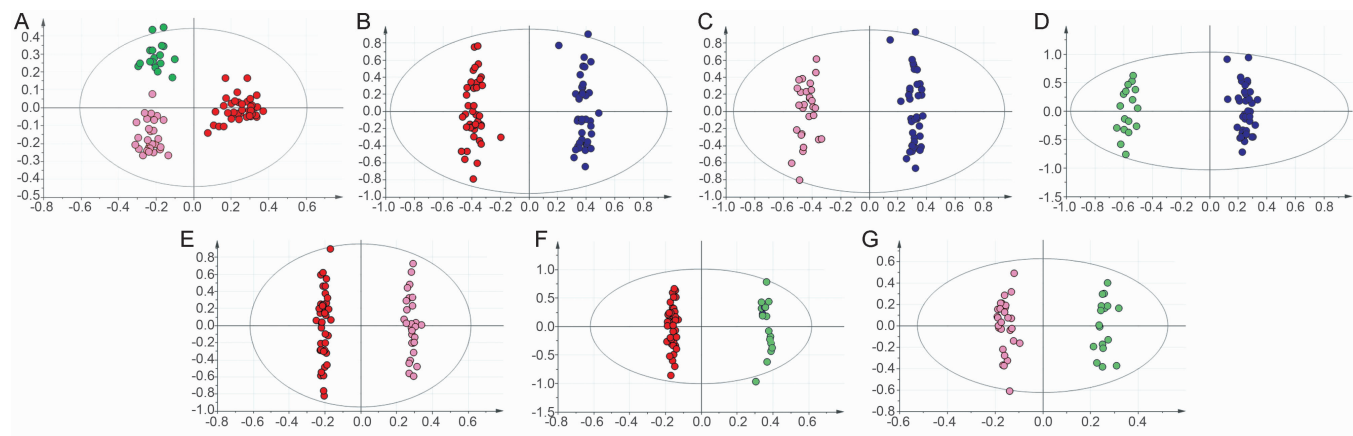
表 4 气滞血瘀证患儿与健康组的差异性代谢物比较

编号	代谢物	保留时间 (min)	Log ² (Fold Change)	变量权重系数 (VIP)	P value Mann-Whitney	FDR
1	D-葡萄糖(D-Glucose)	16.04	-3.6263	2.02477	1.5898×10^{-7}	1.4308×10^{-6}
2	柠檬酸(Citric acid)	9.67	-3.3920	2.06983	3.7856×10^{-9}	5.1106×10^{-8}
3	L-赖氨酸(L-Lysine)	10.19	3.0432	2.11852	0.000030781	0.00010434
4	L-酒石酸[L-(+)-Tartaric acid]	8.66	2.8584	3.32085	2.2035×10^{-7}	1.4873×10^{-6}
5	棕榈酸(Palmitic acid)	10.71	2.7603	1.86318	0.002329800	0.00419360
6	1,3-丙二醇(1,3-Propanediol)	4.55	2.4664	3.94686	1.7416×10^{-9}	4.7024×10^{-8}
7	草酸(Oxalic acid)	5.17	-2.2959	1.03684	0.001662300	0.00329310
8	L-胱氨酸(L-Cystine)	11.97	2.1663	2.34655	0.000030916	0.00010434
9	辛二酸(Suberic acid)	8.92	-1.9572	1.07512	0.000363500	0.00098145
10	尿素(urea)	6.02	-1.8661	1.41263	0.000946120	0.00231340
11	L-胱氨酸(L-Cystine)	11.97	1.6442	1.82724	0.009071100	0.01360700
12	氨基丙二酸(Aminomalonic acid)	7.61	1.2973	1.39497	0.003046600	0.00514110
13	丁酸(Butanoic acid)	7.21	1.1194	1.39619	0.032564000	0.04396100

讨 论

中医临床辨证是在中医学理论的指导下,通过望闻问切四诊合参,对症状、体征等病情资料进行综合分

析,明确病位、病性等辨证要素后概括为完整的证候。传统辨证在很大程度上依赖医生的诊疗水平,且主观性较强,缺乏客观指征,阻碍了中医证候的标准化研究。随着代谢组学技术的引入,从机体代谢产物水平对



注:●湿热内蕴证;●脾虚湿困证;●气滞血瘀证;●健康对照组;A 为 HCMV 肝炎三个证型的 OPLS-DA 图;B ~ G 为各证型与健康对照组对比及三个证型两两对比的 OPLS-DA 图

图 2 多元统计分析图

中医证候进行新的诠释,有助于中医证候客观化和中医证本质的探索。

肝脏是人体内体积最大,代谢功能最重要同时也是最复杂的器官。肝脏疾病过程中必然伴随机体代谢状态的紊乱。一系列代谢组学研究已经对肝脏疾病的证本质进行了探究:如 Wang X 等^[13]对病理性黄疸常见的“阳黄”及“阴黄”的代谢组学特征进行研究,发现丙氨酸、天冬氨酸及谷氨酸等氨基酸的合成与降解相关代谢通路在阳黄和阴黄患者存在明显差异;郭孜等^[14]对乙型肝炎后肝硬化患者的尿液进行了研究:发现该疾病的四种证型均有各自的代谢特征,涉及能量代谢以及氨基酸代谢紊乱;马欣等^[15]对非酒精性脂肪肝合并肝损伤患者的证候进行了血清代谢组学分析,发现该疾病湿热内蕴证及肝郁脾虚证的患者在氨基酸、糖类以及脂类代谢均存在不同程度的差异。这些研究均表明同一肝脏疾病的不同证候有各自的生物学物质基础。本课题组在前期研究中也发现,婴儿 HCMV 肝炎、胆汁淤积性肝病及肝外胆道闭锁的患儿均存在不同程度的氨基酸代谢及能量代谢紊乱^[16,17]。在本研究中,HCMV 会造成肝实质的损伤,故三证患儿均见到不同程度的氨基酸代谢紊乱。

本研究收集了 HCMV 肝炎患儿及健康婴儿的晨尿,基于 GC-MS 技术进行代谢组学检测,运用多维数据分析方法对该病不同证型的物质基础进行探究,总结了该病湿热内蕴证、脾虚湿困证及气滞血瘀证的差异性代谢物,同时对各证型的生化指标进行比较。在本研究中,湿热内蕴证患儿的 TBIL 水平及 DBIL 水平较脾虚湿困证患儿高,这与临床辨证时湿热内蕴证黄疸色泽更为鲜明相一致;气滞血瘀证组病程长,病情

重,本研究发现该组患儿的 AST、TBIL、DBIL、TBA、ALP 水平及 PT 较另外两组明显升高,提示该证型肝细胞损伤及胆汁淤积情况最为严重。

湿热内蕴证常见于该疾病早期阶段。本研究发现该证型存在 D-葡萄糖、D-麦芽糖及柠檬酸等能量相关代谢物的下调。曾有研究显示慢性胃炎湿热内蕴证患者同样存在能量代谢障碍^[18]。湿热内蕴证造成的能量消耗必然会影响患儿体内的 ATP 含量,这会进一步造成患儿体液代谢的异常^[19],成为该证型水湿内生,蕴而化热的病理基础;一系列研究已经证实肠道菌群紊乱是脾虚湿困证的病理基础^[20],本研究发现脾虚湿困证患儿存在 3-氨基异丁酸、氨基丙二酸、丁酸、马尿酸这些和肠道菌群相关的代谢物紊乱,从代谢组学角度又一次验证了这一观点;病程迁延,经久不愈或在该病基础上合并胆道闭锁的患儿,易发展成气滞血瘀证。在本研究中,气滞血瘀证患儿存在氨基酸代谢通路的紊乱及乙醛酸和二羧酸代谢,柠檬酸循环等能量相关代谢通路的紊乱。能量代谢障碍可能是该病气血运行不畅,气滞血瘀的病理基础^[21]。

综上所述,本研究采用气相色谱及质谱联用技术,以婴儿 HCMV 肝炎为例,在代谢组学层面上探讨了该疾病不同证型的证本质。尿液代谢组学结果显示该疾病湿热内蕴证、脾虚湿困证及气滞血瘀证具有不同的代谢组学特征,各组间的差异性代谢物涉及多种氨基酸代谢、能量代谢及肠道菌群相关代谢物紊乱,为中医证本质的研究提供了科学依据。但本研究仍存在一些不足,仅针对婴儿 HCMV 肝炎这一单一疾病的相关证型进行了研究。在今后研究中,可收集一些其他肝脏疾病如乙型肝炎、EB 病毒肝炎、非酒精性脂肪肝病的

样本,探索不同疾病同一证型的生物学本质,对中医证本质进行更深层次挖掘。

利益冲突:本文所有作者无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Tang H, Wang Y. Metabonomics: a revolution in progress [J]. Prog Biochem Biophys, 2006, 33 (5): 401-417.
- [2] Patti G J, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 13(4): 263.
- [3] 汪受传, 杜丽娜, 单进军, 等. 应用代谢组学探讨小儿病毒性肺炎中医证候标准化的研究思路 [J]. 中医儿科杂志, 2013, 9(1): 1-3.
- [4] Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome [J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(4): 178-181.
- [5] Dreher AM, Arora N, Fowler KB, et al. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection [J]. J Pediatr, 2014, 164(4): 855-859.
- [6] 段泓宇, 喻韬, 万朝敏. 巨细胞病毒感染诊断及治疗进展 [J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2010, 6(1): 68-71.
- [7] Tezer H, Seçmeer G, Kara A, et al. Cytomegalovirus hepatitis and ganciclovir treatment in immunocompetent children [J]. Turk J Pediatr, 2008, 50(3): 228-234.
- [8] Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases [J]. Antiviral Res, 2006, 71(2-3): 154-163.
- [9] 李维薇, 杨燕, 贺丽丽, 等. 婴儿巨细胞病毒肝炎的中医药研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(12): 2458-2461.
- [10] 李维薇, 杨燕, 谢辉辉, 等. 中西医结合治疗婴儿巨细胞病毒肝炎临床疗效及安全性 Meta 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 178-182.
- [11] 胡亚美, 江载芳, 申昆玲, 等主编. 诸福棠实用儿科学 [M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 910-915.
- [12] 中华中医药学会. 中医儿科常见病诊疗指南 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 163-166.
- [13] Wang X, Zhang A, Han Y, et al. Urine metabolomics analysis for biomarker discovery and detection of jaundice syndrome in patients with liver disease [J]. Mol Cell Proteomics, 2012, 11(8): 370-380.
- [14] 郭孜, 王文玉, 戴建业, 等. 乙肝后肝硬化证候的尿代谢组学研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(1): 1282-1287.
- [15] 马欣, 顾宏图, 赵瑜, 等. 不同证候的非酒精性脂肪肝合并肝损伤患者的血清代谢组学分析 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1246-1250.
- [16] Li WW, Shan JJ, Lin LL, et al. Disturbance in plasma metabolic profile in different types of human cytomegalovirus-induced liver injury in infants [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1-10.
- [17] Li WW, Yang Y, Dai QG, et al. Non-invasive urinary metabolomic profiles discriminate biliary atresia from infantile hepatitis syndrome [J]. Metabolomics, 2018, 14(7): 89-90.
- [18] 廖圣银, 曾俊, 王爱瑶, 等. 慢性胃炎脾胃湿热证大鼠胃黏膜蛋白质组与三仁汤治疗的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(1): 76-80.
- [19] Dai J, Sun SJ, Cao JM, et al. Similar connotation in chronic hepatitis B and nonalcoholic fatty liver patients with dampness-heat syndrome [J]. Evid-based Complement Alternat Med, 2013(2): 1-12.
- [20] 邵铁娟, 李海昌, 谢志军, 等. 基于脾主运化理论探讨脾虚湿困与肠道菌群紊乱的关系 [J]. 中华中医药杂志, 2014(12): 3762-3765.
- [21] 朱明丹, 杜武勋, 魏聪聪, 等. 不同证型冠心病患者的血浆代谢组学研究 [J]. 中医杂志, 2013, 54(17): 1489-1493.

(收稿: 2017-10-13 在线: 2018-01-28)

责任编辑: 白 霞