

慢性乙型肝炎舌红苔黄和舌淡苔白不同舌象的尿代谢组研究

赵瑜¹ 苟小军¹ 戴建业² 徐琳¹ 彭景华¹ 冯琴¹ 张永煜² 胡义扬^{1,3,4}

(1 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海, 201203; 2 上海中医药大学, 上海, 201203; 3 上海高校中医内科学 E-研究院, 上海, 201203; 4 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海, 201203)

摘要 目的:探索慢性乙型肝炎舌红苔黄和舌淡苔白不同舌象者的尿代谢差异指标,为中医舌象生物学物质基础微观辨证提供证据。方法:采用气相色谱/质谱联用(GC/MS)技术方法获取慢性乙型肝炎舌红苔黄和舌淡苔白不同舌象者的尿液样本代谢指纹谱,用无监督的学习模式进行多变量统计分析,观察不同组别的人群之间是否存在“自然”的分类结构。利用有监督的学习模式进行数据分类模型的建立和检验,寻找造成样本聚集和离散的主要差异变量。利用商业化的代谢物谱库以及标准品数据库,进行物质鉴定。结果:慢性乙型肝炎舌红苔黄和舌淡苔白者在有监督的学习模式下具有良好的分开趋势,慢乙肝不同舌象者较健康者的差异代谢物谱主要与能量代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢以及肠道菌群代谢相关。结论:舌象是机体变化的重要窗口,不同舌象的外在表现潜在体内的代谢差异。

关键词 舌象;慢性乙型肝炎;代谢组;物质基础

Urinary metabolic signatures of chronic hepatitis B patients with different tongue manifestations

Zhao Yu¹, Gou Xiaojun¹, Dai Jianye², Xu Lin¹, Peng Jinghua¹, Feng Qin¹, Zhang Yongyu², Hu Yiyang^{1,3,4}

(1 Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3 E-institute of Shanghai Municipal Education Committee, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

4 Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Shanghai University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: Exploring the urinary metabolic profiling of chronic hepatitis b (CHB) patients with different tongue manifestations, the red tongue with yellow tongue coating and the pale tongue with white tongue coating, to demonstrate the potential objective material basis. **Methods:** The urinary metabolic profiling was detected based on gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), multivariate data was analyzed, the unsupervised segregation and supervised segregation analysis were checked, and the potential markers of interest were extracted and confirmed. **Results:** Distinct clustering in metabolic profiles were observed by supervised segregation analysis in different tongue groups, based on the variable of importance (VIP) in the project values, significantly changed metabolites were identified. These changes were related to the disturbance in energy metabolism, amino acid metabolism, nucleotide metabolism, and gut microflora metabolism. **Conclusion:** This study demonstrated that tongue manifestation may have objective material basis, and closely related to the condition of the body organs function.

Key Words Tongue manifestation; Chronic hepatitis b; Metabolome; Material basis

中图分类号:R241.25 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.008

舌象是机体变化的重要窗口,是中医核心证素之一。舌诊是通过观察舌以达到诊察疾病的目的,其历史悠久早在《黄帝内经》中就有望舌诊病的记载。望舌可以察疾病的性质、病邪的浅深,邪正的消长,有谓“审苔垢即知邪之寒热浅深”《医门棒喝》。由于舌象的直观性、客观性,其中医临床辨证的实用价值越来越受到推崇。研究证实正确的舌诊可指导临床决策并提高临床疗效,这一点也逐步被一些西

方学者接受和共识,并应用在一些疾病的早期诊断中^[1-3]。

中医学舌诊不同舌象的生物学基础如何是一重要的科学问题。近年来,利用现代科学技术手段,从形态学、微生态学、分子生物学等不同角度着手探讨舌苔形成和变化的机制,取得了一定的成果^[4-7]。随着系统生物学和信息分析技术的发展以及在中医领域的研究不断深入,目前,已有部分学者采用代谢

基金项目:国家十二五重大科技专项(编号:2012ZX10005001-004);国家自然科学基金项目(编号:81373857,81403298);上海市自然科学基金项目(编号:14ZR1442000)

通信作者:胡义扬,男,博士,研究员、教授,研究方向:中医药防治慢性肝病,E-mail:yyhuliver@163.com;张永煜,男,博士,研究员,研究方向:中医药代谢组学研究,E-mail:dryyz@sina.com

组学或蛋白质组学或元基因组学方法探索舌苔的生物学基础^[8-9],提示运用系统生物学方法,可以揭示舌象变化的内涵,为舌象研究探索了良好的技术途径。

中医学认为舌象变化离不开身体的内环境,舌象是机体变化的重要窗口,所谓“有诸于内,必形诸于外”。舌与脏腑、经络、气血、津液具有密切联系,《形色简摩·舌质舌苔辨》曰:“苔乃胃气之所熏蒸,五脏皆禀气于胃,故可借以诊五脏之寒热虚实也。”除舌的自体物质基础研究之外,舌象与整体内环境的关系有待探讨。因此,本研究从慢性乙型肝炎患者最常见的舌红苔黄和舌淡苔白两种舌象着手,检测上述舌象者的尿液代谢物谱,探讨不同的舌象表现是否存在机体内在的代谢差异。

1 材料方法

1.1 临床病例纳入及排除标准 纳入标准:1)符合慢性乙型肝炎疾病诊断标准者;2)舌象辨证为舌红苔黄或舌淡苔白者;3)年龄 18~65 周岁;4)签署知情同意书。

排除标准:1)年龄 <18 岁或 >65 岁;2)合并其他嗜肝病毒感染、自身免疫性疾病等其他肝脏疾病;3)慢性重型肝炎;4)伴有心、肾、肺、内分泌、血液、代谢及胃肠道严重原发病者;5)或精神病患者、孕妇或哺乳期妇女。

慢性乙型肝炎诊断标准参考“2005 年中华医学会肝病学分会、感染病学分会制定的慢性乙型肝炎诊断标准”^[10]。舌象诊断标准:参照全国高等中医药院校规划教材《中医诊断学》^[11]。

1.2 舌象信息采集 根据《中医诊断学》中舌诊的内容制定舌象观察表,包括记录舌色、舌形、苔质、苔色、舌下脉络等内容。慢乙肝患者温水漱口 10 min 后,先肉眼观察记录患者舌象,然后采用舌像仪(DAOSH,ZBOX)拍摄志愿者舌象,将图象输入计算机,同时记录患者临床病情,辨证结果由 3 名主治医师共同确认。

1.3 代谢组样本检测及信息分析

1.3.1 尿样的收集及处理 在样本收集前一天叮嘱患者清淡饮食,禁止吸烟、喝酒,减少食物对代谢造成的波动。留取晨尿约 5 mL 置 10 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 10 min,取上层液置于 -70 ℃ 冰箱保存。

实验前 2 h 将尿液样品取出,室温下解冻摇匀,取 1.0 mL 尿液样品于离心管中,12 000 r/min 离心 10 min;取上清液 200 μ L 于 1.5 mL 离心管中,振荡

30 s,在 37 ℃ 反应 15 min 去除尿素;加入 800 μ L 的 A 和 10 μ L 的 B,振荡 1 min;13 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μ L 于 GC 瓶中,在室温氮气流吹干;加入 50 μ L 的 C,封盖,振荡 1 min,在 30 ℃ 的摇床(200 r/min)下反应 90 min 进行甲氧氨对羰基的封闭反应,启盖;加入 50 μ L 的 D,封盖,振荡 30 s;在 70 ℃ 的烘箱中反应 60 min,振荡 30 s,启盖,加入 40 μ L 的庚烷,封盖,振荡 30 s 即可。

1.3.2 代谢组学检测及数据分析 采用 GC/MS 技术方法获取尿液样本代谢指纹谱。将每个样本的原始数据通过 DataBridge(PerkinElmer Inc, USA)软件转换为 NetCDF 格式,导入到 XCMS toolbox 程序包中,自动执行基线校正,峰辨识,峰对齐及中心化等过程,最终得到一个三维矩阵表,将该文件导入 SIMCA-P11.0 软件中进行模式识别和多维统计分析。用无监督的学习模式,如主成分分析(Principal Component Analysis, PCA),进行多变量统计分析,观察不同组别间是否存在“自然”的分类结构。在此基础上,利用有监督的学习模式包括偏最小二乘法(Partial least squares, PLS)、正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)等,进行数据分类模型的建立和检验。依据 P 值小于 0.05, VIP > 1.0(重要变量投影系数)的原则,寻找造成样本聚集和离散的主要差异变量。经商业化的代谢物谱库以及标准品数据库匹配鉴定相对应的化合物,结合 HMDB 以及 KEGG 数据库搜索结果,得到各组间相互比较的慢性乙型肝炎舌红苔黄、舌淡苔白者特征性尿代谢物谱。

2 结果

2.1 临床信息分析 共收集慢性乙型肝炎典型的舌红苔黄与舌淡苔白舌象者每组各 50 例,另收取淡红舌薄白苔的健康志愿者 25 例为对照,各组临床基础信息及生化指标基线见表 1,慢乙肝舌红苔黄与舌淡苔白组间临床信息无差异。

2.2 慢性乙型肝炎不同舌象组尿代谢分析 对比不同舌象志愿者尿样本的 GC/MS 色谱图,三组间的尿代谢物谱差异明显,经 NIST 谱库和标准品鉴定后确定的内源性代谢物包括:氨基酸类,核苷类,碳水化合物类,不饱和脂肪酸类等。对慢性乙型肝炎舌红苔黄组和舌淡苔白组以及健康志愿者的尿代谢物谱进行 PCA 分析见图 1,在无监督状态下各组尿代谢物谱区分情况不理想。进一步筛选慢性乙型不同舌象组分类的关键变量,对每组数据进行 OPLS 分析,经 7 重交叉验证,模型的 $R^2Y = 0.89$, $Q^2Y =$

0.67。分类结果如图 2 所示,各组具有良好的分开趋势。

表 1 各组临床信息分析 中位数(最小值-最大值)			
指标	舌红苔黄组 (n = 50)	舌淡苔白组 (n = 50)	正常舌象组 (n = 25)
年龄(years)	36.7(22-58)	35.8(17-50)	36.0(20-57)
性别(M/F)	43(7) *	44(6) *	15(10)
TBIL(μmol/L)	14.21(5.2-81.21)	18.19(8.65-245.41)	14.9(6.9-20.5)
DBIL(μmol/L)	5.75(2.5-62.9) *	6.35(2.5-201.4) *	4.2(3-5.3)
ALT(IU/L)	66(23-365) *	67.5(22-584) *	17(10-31)
AST(IU/L)	39.5(25-131) *	37.5(20-286) *	19(14-35)
GGT(IU/L)	39.5(7-436) *	45(5-634) *	19(10-63)
ALP(IU/L)	84(47-211) *	96(39-182) *	53(13-96)
TP(g/L)	73.5(53-86)	74(61-84)	72(62-79)
ALB(g/L)	30(9-48) *	28(19-49) *	44(38-63)
TBA(μmol/L)	16(2-311) *	17.5(2-390) *	8(5-12)
HBsAg(IU/mL)	250(15.25-250) *	250(0.27-250) *	0.01(0-0.02)

注: * 慢乙肝各组 vs 健康组 $P < 0.05$ 。

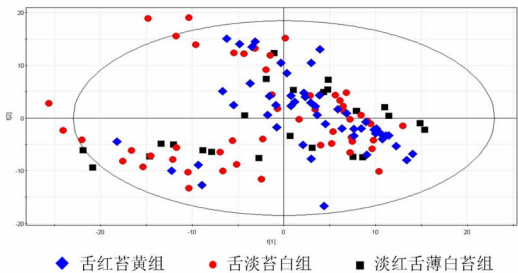


图 1 慢性乙型肝炎舌红苔黄组、舌淡苔白组和健康组尿代谢 PCA 得分图

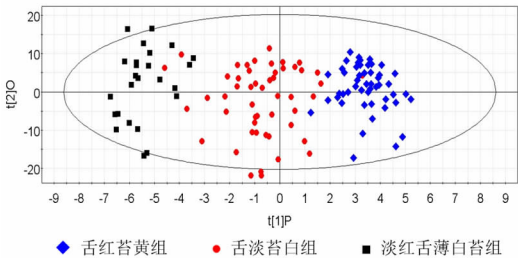


图 2 慢性乙型肝炎舌红苔黄组、舌淡苔白组和健康组尿代谢 OPLS 得分图

2.3 特征性代谢物谱鉴定 基于 OPLS 分析结果,筛选 VIP 值 >1 , $P < 0.05$ 的峰值得到对慢乙肝舌红苔黄和舌淡苔白组分类的关键变量,经 NIST 数据库以及标准品鉴定,得到慢性乙型肝炎舌红苔黄与舌淡苔白不同舌象的特征性尿代谢物谱,详见表 2。

3 讨论

与正常舌象者相比较,慢乙肝舌红苔黄和舌淡苔白患者较健康志愿者的代谢差异主要集中在能量代谢、氨基酸代谢和菌群代谢三大模块。舌红苔黄者的尿样本景天庚酮糖浓度显着增加,丙酸,乙二酸,D-葡萄糖酸和 β -D-吡喃葡萄糖苷浓度显著减少,舌淡苔白者尿液中 D-甘露糖,肌-肌醇及景天庚酮糖

的水平显着增加,而丁二酸,乙二酸的水平显着下降,上述差异代谢物与能量代谢相关^[12-13]。中医认为正常的舌象提示胃气旺盛,气血津液充盈。脾胃同居中焦,而脾主运化,是人体消化、吸收食物,对精微输布的主要脏器,人体化生和充实精气血液均有赖于脾胃的运化作用。《素问·玉机真藏论》曰:“脾为孤脏,中央土以馆四傍”,故称脾胃为“后天之本”。所谓“见肝之病,则知肝当传之于脾,当先实其脾气”,当肝气横逆犯脾,脾气虚弱导致运化不足成为上述能量代谢紊乱的可能原因。

与健康组相比,舌红苔黄组尿样本中甘氨酸、半胱氨酸、色氨酸水平增加,舌淡苔白组半胱氨酸、色氨酸升高。半胱氨酸和甘氨酸是谷胱甘肽的组成成分,色氨酸是必需氨基酸的一种,维持正常的细胞代谢,并参与蛋白质的合成^[14]。当肝细胞受损,游离色氨酸释放增加,可显着影响肝脏疾病在体内色氨酸代谢状态^[15]。上述代谢物在两舌苔组之间分布无差异,因此,推测该变化一定程度上体现了慢性乙型肝炎的疾病代谢特性。

较健康组,慢乙肝舌红苔黄和舌淡苔白组尿样本苯甲酸含量均升高,而舌淡苔白组较舌红苔黄组丁酸,乙酸,2,3-二羟基丁酸尿代谢量升高。苯甲酸,丁酸,乙酸,2,3-二羟基丁酸的变化与菌群代谢相关。苯甲酸,属于含苯基化合物,是肠道菌群的代谢产物的代谢,来源于从食物中的多酚和蛋白质分解而来的芳香族氨基酸^[16]。丁酸,乙酸和 2,3-二羟基丁酸为短链脂肪酸,主要来源于盲肠或结肠微生物对膳食纤维素,淀粉及其他未消化物质的发酵^[17]。最新研究发现舌苔的形成与疾病状态下的口腔微环境密切相关,舌苔一定程度上是人体在病理状态下,对口腔正常微生物的动态平衡失调的反映^[18-19]。在中医理论中,舌淡苔白多与湿浊痰饮内停,食积胃肠有关,属脾胃运化不利的表现,因此,其菌群相关物代谢谱差异可能与脾胃失调,运化失职密切相关。此外,慢乙肝舌淡苔白组较健康组伪尿苷水平升高,虽然有研究认为尿液中的伪尿苷是恶性肿瘤的早期诊断标志物,但与舌苔生物学内涵的关系仍不清楚,有待于进一步研究。

4 小结

本研究发现慢性乙型肝炎舌红苔黄和舌淡苔白者有明确的特征性尿代谢物谱,提示中医证候具有整体性,舌象的“外在”表现潜在体内的代谢差异,为中医舌象生物学物质基础微观辨证提供了参考依据。

表 2 慢性乙型肝炎舌红苔黄组、舌淡苔白组特征性代谢物谱表

代谢物	舌红苔黄组 Vs 健康组 (Fc)	P 值	舌淡苔白组 Vs 健康组 (Fc)	P 值	舌红苔黄组 Vs 舌淡苔白组 (Fc)	P 值	代谢通路
甘氨酸	1.93 *	0.038	1.55	0.200	1.27	0.297	氨基酸代谢
半胱氨酸	2.12 *	0.016	2.34 *	0.037	0.907	0.675	氨基酸代谢
色氨酸	2.08 *	0.016	2.05 *	0.035	1.01	0.946	氨基酸代谢
伪尿苷	1.43	0.253	1.89 *	0.033	0.76	0.183	核苷酸代谢
乙酸	0.98	0.934	1.65 *	0.040	0.60 ^{##}	0.004	菌群代谢
丁酸	0.85	0.528	1.36	0.255	0.62 [#]	0.020	菌群代谢
2,3-二羟基丁酸	1.23	0.505	2.27 *	0.046	0.54 [#]	0.032	菌群代谢
苯甲酸	5.03 *	0.035	1.80 *	0.029	2.79 [#]	0.018	菌群代谢
丁二酸	1.15	0.676	0.54 *	0.043	2.13 ^{##}	0.008	能量代谢
丙酸	0.45 *	0.029	0.76	0.757	0.51 [#]	0.025	能量代谢
乙二酸	0.45 *	0.014	0.43 **	0.003	1.03	0.887	能量代谢
D-甘露糖	1.11	0.629	1.48 *	0.039	0.75	0.064	能量代谢
景天庚酮糖	1.71 *	0.042	3.30 **	0.006	0.52 [#]	0.011	能量代谢
D-葡萄糖酸	0.54 *	0.016	1.00	0.992	0.54 ^{##}	0.009	能量代谢
肌-肌醇	0.93	0.818	1.79 *	0.042	0.52 ^{##}	0.004	能量代谢
α-D-吡喃葡萄糖苷	0.35 *	0.033	0.62	0.309	0.57	0.245	能量代谢

注:Fc(fold change):表示代谢物浓度相对增加和减少的倍数;* $P<0.05$,** $P<0.01$;VS 健康人淡红舌薄白苔组;^{##} $P<0.01$,[#] $P<0.05$;慢乙肝舌红苔黄组 VS 舌淡苔白组;NS:差异无统计学意义。

参考文献

[1] M Jiang, Q Zha, C Lu, et al. Association between tongue appearance in Traditional Chinese Medicine and effective response in treatment of rheumatoid arthritis [J]. Complementary Therapies in Medicine, 2011, 19: 115 – 121.

[2] 张军峰, 吴娟, 孙正, 等. 胃癌癌患者舌苔变化及其血清 sE-cad 水平和临床检验指标的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20 (3): 193 – 199.

[3] JK Anastasi, LM Currie, GH Kim. Understanding diagnostic reasoning in TCM practice: tongue diagnosis [J]. Alternative Therapies in Health and Medicine, 2009, 15: 18 – 28.

[4] 邓伟哲, 岳小强, 刘庆, 等. 原发性肝癌患者和健康人“正常舌象”的对比研究[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(1): 13 – 16.

[5] 阙铁生, 卓冬婷, 吕军影, 等. 脾胃湿热证黄腻苔与舌上皮细胞凋亡和细菌总数的关系探讨[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 692 – 693.

[6] WJ Qi, MM Zhang, H Wang, et al. Research on the relationship between thick greasy tongue fur formation and vascular endothelial cell permeability with the protein expression of zonula occludens-1 [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(7): 510 – 516.

[7] 吴正治, 李明, 张永锋, 等. 消化系疾病舌苔变化的凋亡相关基因分子机理研究[J]. 中医杂志, 2006, 47(1): 50 – 52.

[8] 李福凤, 赵洁, 钱鹏, 等. 慢性胃炎患者腻苔的代谢指纹图谱研究 [J]. 中西医结合学报, 2012, 10(7): 757 – 765.

[9] B Jiang, XJ Liang, Y Chen, et al. Integrating next-generation sequencing and traditional tongue diagnosis to determine tongue coating microbiome [J]. Sci Rep, 2012, 2: 936.

[10] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学会. 慢性乙型肝炎防治指南标准[S]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12): 881 – 891.

[11] 朱文峰. 中医诊断学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 84.

[12] SH Lahham, MP Peppelenbosch, H Roelofsen, et al. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(11): 1175 – 1183.

[13] YP Xie. The Sedoheptulose Research Progress [J]. Chinese Journal of Medical Guide, 11(7): 1245 – 1248.

[14] C Bell, J Abrams, D Nutt. Tryptophan depletion and its implications for ppsychiatry [J]. Br J Psychiatry, 2001, 178(5): 399 – 405.

[15] N Miwa, S Hayakawa, S Miyazaki, et al. IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion [J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11(12): 865 – 870.

[16] AR Rechner, MA Smith, G Kuhnle, et al. Colonic metabolism of dietary polyphenols; influence of structure on microbial fermentation products [J]. Free Radic Bio Med, 2004, 36(2): 212 – 225.

[17] S Mao, R Zhang, D Wang, et al. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows [J]. BMC Veterinary Research, 2012, 8(1): 237.

[18] JY Lv, LP Huang, TS Jue, et al. Study on Tongue Coating Microecosystem with Damp-heat Syndrome Patients Liaoning [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2008, 35(4): 487 – 488.

[19] JY Lv. Research Progress of damp-heat syndrome tongue coating [J]. Journal of Liaoning University of TCM, 2008, 10(10): 174 – 177.

(2014 – 12 – 26 收稿 责任编辑: 洪志强)