

· 临床论著 ·

参元益气活血胶囊对不稳定型心绞痛患者代谢组学的影响

仇盛蕾¹ 孙博² 颜贤忠² 韩焱¹ 尚菊菊¹ 刘红旭¹

摘要 目的 观察参元益气活血胶囊对不稳定型心绞痛患者代谢组学的影响。**方法** 采用随机对照的研究方法,将 100 例不稳定型心绞痛患者随机分为对照组和治疗组,每组 50 例。对照组采用西医常规治疗,治疗组在西医常规治疗基础上联合参元益气活血胶囊,疗程均为 4 周。观察两组中医症状量化积分、心绞痛发作次数和持续时间,评价临床疗效。对各组患者血清进行弛豫编辑实验和扩散编辑实验,分析各组代谢组学特点。**结果** 与本组治疗前比较,治疗后两组患者中医症状积分降低,心绞痛发作次数和持续时间降低($P < 0.05$);与对照组比较,治疗组中医症状积分、心绞痛发作次数和持续时间降低更明显($P < 0.05$)。代谢组学研究显示:治疗后治疗组患者代谢产物更接近健康人群。其中弛豫编辑实验筛选出标志性的代谢产物有:不同化学位移的脂蛋白、乳酸、丙氨酸和糖类;扩散编辑实验筛选出标志性的代谢产物有:不同化学位移的极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白、多不饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸及脂质。**结论** 西医治疗基础上联合参元益气活血胶囊治疗不稳定型心绞痛,其代谢产物更接近健康人群。

关键词 代谢组学;参元益气活血胶囊;不稳定型心绞痛

Effects of Shenyuan Yiqi Huoxue Capsule On Metabolomics of Patients with Unstable Angina QIU Sheng-lei¹, SUN Bo², YAN Xian-zhong², HAN Yao¹, SHANG Ju-ju¹, and LIU Hong-xu¹ 1 Department of Cardiology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing (100010); 2 Biomedical Analysis Center, Chinese People's Liberation Army Academy of Military Medical Sciences, Beijing (100850)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Shenyuan Yiqi Huoxue Capsule (SYHC) on metabolomics of patients with unstable angina. **Methods** Totally 100 patients with unstable angina were randomly assigned to treatment group and control group, 50 in each group. Patients in the control group received routine therapy of Western medicine, patients in the treatment group received SYHC combined with the routine therapy of Western medicine. After 4 weeks treatment, the quantified scores of traditional Chinese medicine (TCM) symptoms, the frequency and duration of angina attacks were observed. Carr-purcell-meiboom-gill (CPMG) test and longitudinal eddy-delay (LED) test were carried out to analyze the metabolomic characteristics of each group. **Results** Compared with before treatment, the scores of TCM symptoms, the frequency and duration of angina attacks in the two groups were significantly reduced after treatment ($P < 0.05$). Compared with the control group, the scores of TCM symptoms, the frequency and duration of angina attacks were decreased more significantly ($P < 0.05$). Metabolomics studies showed that metabolites of patients in the treatment group were closer to the healthy people after treatment. The metabolomic markers identified by CPMG test are some lipoprotein, lactate, alanine and sugars. Some very low-density lipoprotein (VLDL), low-density lipoprotein (LDL), polyunsaturated fatty acids (PUFA), unsaturated fatty acids (UFA) and lipid are the metabolomic markers identified by LED

基金项目:北京市自然科学基金青年基金项目(No. 7154207)

作者单位:1. 首都医科大学附属北京中医医院心血管科(北京 100010); 2. 中国人民解放军军事医学科学院生物医学分析中心(北京 100850)

通讯作者:刘红旭, Tel: 010-52176633, E-mail: lhx_@263.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190712.215

test. Conclusion SYHC combined with Western medicine in the treatment of unstable angina has a better effect, and the metabolites are closer to healthy people.

KEYWORDS metabolomics; Shenyuan Yiqi Huoxue Capsule; unstable angina

不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)常常为急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)的前驱表现,近年来 AMI 的病死率不断上升^[1]。首都医科大学附属北京中医医院心血管科研制的参元益气活血胶囊是治疗心绞痛的中药制剂,具有益气扶正、破血逐瘀之功效,在 UA 治疗中有一定优势和特色^[2-4]。本研究观察参元益气活血胶囊对 UA 患者代谢组学的影响。

资料与方法

1 诊断标准及中医辨证分型标准 西医诊断标准:参照中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会 2012 年制定的《非 ST 段抬高急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南》^[5]。UA 的分级标准参照加拿大心脏病学心绞痛分级(CCS)^[6]。中医证候诊断标准:胸痹病参照卫生部 2002 年版《中药新药临床研究指导原则》^[7];气虚血瘀证参照 1994 年国家中医药管理局制定的《中医病证诊断疗效标准》^[8]中有关胸痹心痛的心血瘀阻证和心气虚弱证结合确定。主症:胸痛,胸闷。次症:气短乏力,心悸,眩晕,憋气,水肿,自汗。舌、脉象:舌质黯淡,舌苔薄白,脉细涩无力。具备全部主症,2 项以上次症,舌、脉具备其中 1 项者,可诊断。

2 纳入及排除标准 纳入标准:同时符合以下 5 项方可入选,(1)符合 UA 诊断标准,心功能 CCS I ~ III 级患者;(2)符合中医胸痹气虚血瘀证的诊断标准;(3)年龄 35 ~ 80 岁;(4)经冠状动脉造影或冠脉 CT 检查确诊冠心病,但未行介入治疗的患者(无需介入治疗或患者拒绝介入治疗);(5)签署知情同意书。排除标准:具有以下任意一项排除入选:(1)妊娠或哺乳期女性;(2)过敏体质者;(3)合并急性脑卒中者,有脑出血史者,有肝肾及造血系统等严重原发性疾病者,有精神病患者;(4)伴有血流动力学不稳定的心律失常、心源性休克者;(5)正在参加其他临床试验者。

3 剔除及脱落标准 剔除标准:未按规定治疗,无法判断疗效或资料不全等影响疗效或安全性判断者。脱落标准:所有填写了知情同意书并筛选合格进入随机化试验的受试者,无论何时因退出,只要没有完成方案所规定的观察周期的受试者,均为脱落病例。

4 样本量计算 由于代谢组学检测的代谢物数目远大于样品个数,不适合使用传统的统计学方法进

行分析,多变量分析容易出现过拟合和位数灾难问题^[9]。本研究为参元益气活血胶囊对 UA 患者代谢组学影响的探索性研究,至少需 60 例患者作为临床观察对象,为将脱落率控制在 20% 以内,拟定本研究治疗组、对照组样本量各 50 例,健康对照组样本量 20 名。

5 一般资料 100 例均为于 2014 年 1 月—2017 年 1 月在首都医科大学附属北京中医医院心血管科住院的 UA 患者。采用 SPSS 15.0 统计软件生成随机分配序列号,分为对照组和治疗组,每组 50 例。两组患者治疗过程中依从性良好,均无脱落及剔除病例。另选取 20 名健康志愿者作为代谢组学研究的参照组(健康组),其中男性 12 例,女性 8 例,平均年龄(63.75 ± 5.65)岁。三组患者性别、年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其中,治疗组与对照组患者的心功能、合并症比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。本研究经首都医科大学附属北京中医医院医学伦理委员会批准实施(No. 2015BL-050-02)。

表 1 两组一般资料比较

项目	治疗组(50 例)	对照组(50 例)
性别(例,男/女)	29/21	28/22
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	63.36 ± 7.23	64.92 ± 7.36
心功能(CCS 分级,例)		
I 级	7	8
II 级	32	31
III 级	11	11
IV 级	0	0
合并症(例)		
高血压病	43	41
糖尿病	28	27
高脂血症	39	38
陈旧脑梗死	11	13

6 治疗方法 两组患者均给予西医常规治疗(参照 2012 年中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会制定的《非 ST 段抬高急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南》^[5])。治疗组在西医常规治疗基础上,加用参元益气活血胶囊(北京市药监局批准文号 99 京卫字[056]第 F2037 号,药物组成:黄芪、党参、玄参、丹参、地龙、虻虫、水蛭、延胡索等,0.4 g/粒,批号:201401021401011、201508061508022),每日 3 次,每次 4 粒。两组疗程均为 4 周。两组患者治疗期间使用西药情况比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 两组患者使用西药情况比较 (例)

药物	治疗组(50 例)	对照组(50 例)
拜阿司匹林	50	50
波立维	43	45
立普妥	50	50
倍他乐克	42	42
合心爽	6	4
欣康	24	26
代文	22	20
络活喜	35	37
海捷亚	18	20
格华止	18	19
拜糖苹	16	14
诺和龙	3	3
亚莫利	7	6
优泌乐	5	6

7 观察指标及方法

7.1 中医症状积分 中医症状量化积分、心绞痛疗效评定参考 2002 版《中药新药临床研究指导原则》^[7] 进行,积分越高表示患者症状越重。两组心绞痛疗效评定标准均以显效加有效计算总有效率。心绞痛疗效评定计算公式为:(治疗前积分-治疗后积分)/治疗前积分 × 100%。显效:临床症状、体征明显改善,证候积分减少 ≥ 70%。有效:临床症状、体征均有好转,30% ≤ 证候积分减少 < 70%。无效:临床症状、体征无明显改善,甚或加重,证候积分减少 < 30%。加重:临床症状、体征均有加重,证候积分减少 < 0%。

7.2 代谢组学检测 治疗后对两组患者及健康组血清进行代谢组学分析,检测各组患者的代谢模式及标志代谢群。

仪器:美国 Varian 公司 INOVA 600 MHz 超导核磁共振谱仪,配备脉冲场梯度,带梯度场的三共振探头;离心机:德国 Eppendorf MiniSpin Plus。试剂:重水(D₂O),美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司;3-三甲基硅烷基-2,2,3,3-四氘代丙酸钠(TSP),德国 Merck 公司。

方法样品配制:向编号后的离心管中分别依次加入 100 μL TSP 的重水溶液(1 mg/mL),200 μL 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L 以及 300 μL 血清,充分震荡混匀后,13 000 r/min 离心 10min。取上清加入 5 mm 核磁共振管中待用。

NMR 实验:分别采用驰豫编辑(carr-purcell-meiboom-gill,CPMG)和扩散编辑(longitudinal eddy-delay,LED)采集血清样本的数据,分别观测血清中的小分子代谢物和脂类代谢产物。CPMG 实验的谱宽为 8 000 Hz,采样点数 32 k,采样时间 2 s,累加

次数 64 次,为 400 s,2nt 为 320 ms,弛豫延迟为 2 s,其间采用低功率脉冲对水峰进行预饱和。以乳酸甲基信号双峰的左侧峰定为 1.33。LED 实验的谱宽为 8 000 Hz,采样点数 32 k,采样时间 2 s,累加次数 64 次,扩散时间为 100 ms,为 5 ms,弛豫延迟为 2 s,其间采用低功率脉冲对水峰进行预饱和。在对自由感应衰减(free induction decay,FID)信号数据进行填零,分别加上 0.5 Hz(CPMG 实验)和 3 Hz(LED 实验)的线增宽因子后进行傅立叶变换得到 ¹H NMR 谱图。

NMR 数据处理:对所得 NMR 数据经傅立叶变换得到谱图,然后调整相位并进行基线校正。对 CPMG 数据,将 0.4 ~ 4.4 范围内的谱按照每段 0.01 ppm 进行分段积分;对 LED 数据,将 0 ~ 6.0 范围内的谱按照每段 0.04 ppm 进行分段积分,并将 4.6 ~ 5.0 之间的谱排除。将积分按每张谱的总积分强度归一化。所得数据输出并转换到 Excel 文件保存。

通过对数据分析,建立数学模型,得到用于评价模型质量的指标:R²X(cum)、R²Y(cum)和 Q²(cum)。R²X(cum)表示模型中隐性变量反映自变量 X 的变异百分比;R²Y(cum)表示模型中隐性变量反映因变量 Y 的变异百分比;Q²(cum)表示模型通过交叉验证后所得到的隐性变量能用于预测 X 和 Y 的百分比。

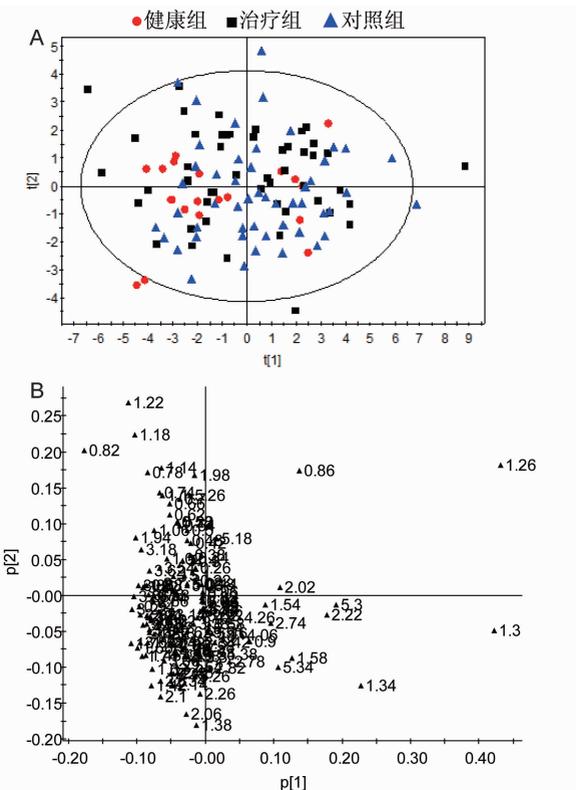
8 统计学方法 应用 SPSS 15.0 统计分析软件处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内治疗前后比较采用配对样本 t 检验,组间比较采用独立样本 t 检验,计数资料用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。将保存的 Excel 格式数据输入到 SIMCA-P + 软件(Umetrics, Umeå, Sweden)进行多元统计。数据采用平均中心化(mean centering)或 Pareto 标度化(Pareto scaling)进行预处理之后采用主成分分析(principal component analysis,PCA)。为强化组间差异,进一步采用偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminate analysis,PLS-DA)。分析结果以得分图(scores plot)和载荷图(loadings plot)的形式表示。

结 果

1 两组治疗前后中医症状积分比较(表 3) 两组患者治疗前中医症状积分比较,差异无统计学意义(P > 0.05);与本组治疗前比较,治疗后两组患者中医症状积分降低(P < 0.05),且治疗组积分降低更明显(P < 0.05)。

4.2 LED 实验结果(图 3、4,表 7) LED 的

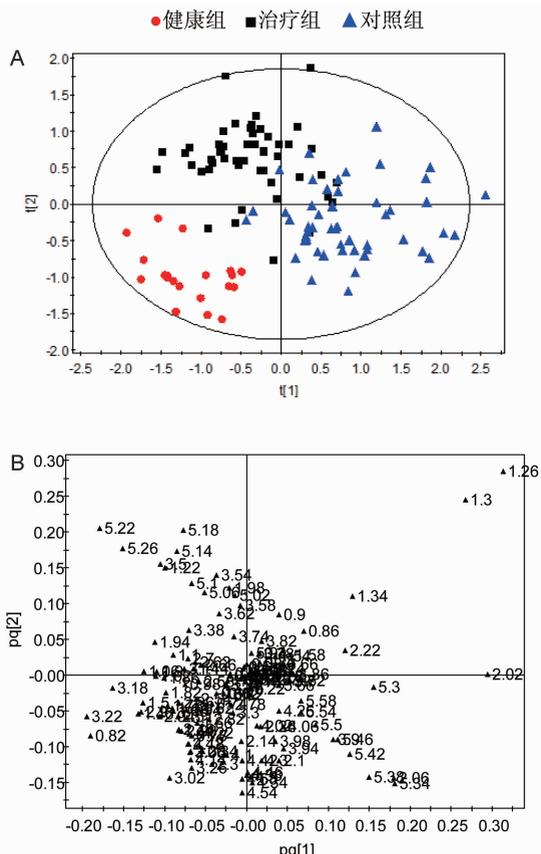
PLS-DA 结果显示:治疗组、对照组、健康组的代谢产物可以显著区分,其中治疗组的代谢产物更接近健康人群。LED 的 PCA 分析结果不能区分三组人群代谢产物。



注:A 为得分图;B 为载荷图;R2X(cum) = 73.2%; Q2(cum) = 68.6%

图 3 健康组、治疗组、对照组 LED 的 PCA 分析结果图

LED 实验提示:三组患者的代谢物极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白、多不饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、脂质的浓度变化可以区分。



注:A 为得分图;B 为载荷图;R2X(cum) = 91.3%; R2Y(cum) = 62.8%; Q2(cum) = 48.8%

图 4 健康组、治疗组、对照组 LED 的 PLS-DA 结果图

讨 论

UA 属于中医学的“胸痹”、“心痛”病范畴,中医学认为其主要病因病机为“血瘀”,“气虚血瘀证”为其临床常见证候。有学者通过对血小板微粒黏附、聚集及促炎症反应的研究,为冠心病 UA 患者血瘀证的形成机制提供理论支持^[10]。临床治疗 UA 多从益气活血立法^[11],扶正祛邪、标本同治。

表 7 相关代谢物浓度变化对照

化学位移(ppm)	化合物名称	治疗组/正常组	对照组/正常组	治疗组/对照组
0.86	低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白	↑	↑	↓
0.90	极低密度脂蛋白	↑	↑	↓
1.22	低密度脂蛋白	↑	↓	↑
1.26	低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白	↑	↑	↓
1.30,1.34	极低密度脂蛋白	↑	↑	↓
1.58	脂质	↑	↑	↓
2.22	脂质	↑	↑	↓
2.74	多不饱和脂肪酸	↑	↑	↓
5.30,5.34	不饱和脂肪酸	↑	↑	↓

注:↑表示含量相对较高;↓表示含量相对较低

通过代谢组学分析研究,有学者认为不同类型冠状动脉疾病患者发生代谢紊乱,小分子代谢产物的变化对冠状动脉疾病的鉴别诊断具有潜在价值^[12]。应用代谢组学技术可以评价 UA 的中医治疗策略,可以区分 UA 患者与健康人、以及使用不同治疗方案后的代谢模式。有研究显示,中药可能对 UA 患者血浆中的某些代谢产物或代谢通路有影响^[13]。

参元益气活血胶囊具有益气扶正、破血逐瘀之效。既往的研究证实,它有助于缓解心绞痛患者的临床症状,改善中医证候,提高患者生活质量^[2-4];改善患者血浆内皮素及一氧化氮水平^[14];同时,研究表明,参元益气活血胶囊可以降低缺血再灌注损伤大鼠的血清 LDH、CK-MB 水平、抗脂质过氧化损伤、抑制炎症反应等^[15,16],可以多靶点地保护心脏。

本研究基于高分辨 NMR 方法的代谢组学技术,研究参元益气活血胶囊联合西医常规治疗的作用下,UA 患者体内代谢水平的变化,通过对代谢产物进行定量、动态和整体分析,获取患者体内能量代谢、合成和分解的信息。通过 CPMG 实验和 LED 实验的 PLS-DA 结果显示,使用参元益气活血胶囊治疗 UA 患者,其代谢产物更接近健康人群,其中 CPMG 实验筛选出的标志性的代谢产物有:不同化学位移的脂蛋白、乳酸、丙氨酸和糖类;LED 实验筛选出的标志性的代谢产物有:不同化学位移的极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白、多不饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸及脂质。本研究结果还显示,使用参元益气活血胶囊治疗 UA,可以改善患者的中医症状积分,改善患者心绞痛发作次数和持续时间。这提示,参元益气活血胶囊治疗 UA 临床有效改善患者的中医症状积分和心绞痛发作次数和持续时间,可能与在参元益气活血胶囊的作用下,机体的代谢产物,尤其是脂质代谢产物更接近健康人群有关。

依据本研究中临床疗效评价结果及代谢组学相关数据分析,提示参元益气活血胶囊可能对 UA 患者的脂类代谢、糖类代谢及蛋白质代谢层面均有作用,从而改善患者的中医症状积分,提高临床疗效。但是尚需进一步研究探索其关键性的作用靶点,为中医药在治疗 UA 的研究领域提供更加令人信服的临床证据。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突关系。

参 考 文 献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J].中国循环杂志,2018,33(1):1-8.
- [2] 刘红旭,金玫,王振裕,等.参元丹煎剂治疗不稳定心绞痛(血瘀证)113例临床观察[J].中医杂志,1999,40(4):219-221.
- [3] 仇盛蕾,韩垚,戴梅,等.参元益气活血胶囊对不稳定型心绞痛患者 GRACE 评分的影响[J].北京中医药,2016,35(4):194-197.
- [4] 仇盛蕾,韩垚,尚菊菊,等.参元益气活血胶囊对不稳定型心绞痛病人生活质量的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(10):1157-1159.
- [5] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会.非 ST 段抬高急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南[J].中华心血管病杂志,2012,40(5):353-367.
- [6] Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris [J]. Circulation, 1976, 54(3): 522-523.
- [7] 郑筱萸主编.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国中医药科技出版社,2002:57-73.
- [8] 国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准[M].南京:南京大学出版社,1994:29.
- [9] Sima C, Dougherty ER. What should be expected from feature selection in small-sample settings [J]. Bioinformatics, 2006, 22(19): 2430-2436.
- [10] 胡元会,贾秋蕾,孟昊,等.冠心病不稳定型心绞痛患者血瘀证与外周血小板微粒膜蛋白表达的相关性[J].中医杂志,2017,58(4):321-324.
- [11] 崔源源,高铸焯,史大卓.冠心病(胸痹)气虚痰瘀互结病机辨析[J].北京中医药,2014,33(2):117-119.
- [12] 赵娟,滕丽新,毛梅.冠状动脉疾病的代谢组学特点及其诊断价值[J].中国循证心血管医学杂志,2017,9(9):1112-1117.
- [13] 于晓红,周亚滨,孙静,等.养心汤对不稳定型心绞痛患者血浆代谢组学的影响[J].中国中西医结合杂志,2013,33(2):191-198.
- [14] 刘红旭,邓新荣,金玫,等.不稳定性心绞痛患者血浆内皮素、一氧化氮水平及中药治疗的影响[J].中国中西医结合杂志,1996,16(10):585-587.
- [15] 解欣然,李爱勇,林燕,等.参元丹后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J].中国病理生理杂志,2010,26(10):1977.
- [16] 尚菊菊,李爱勇,杨洪志,等.参元丹药理预适应对大鼠缺血再灌注心肌梗死面积、蛋白激酶 C 及热休克蛋白 70 的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(8):1730-1733.

(收稿:2018-10-04 在线:2019-08-02)

责任编辑:白 霞