

肝硬化正虚血瘀证候与血清蛋白质组学所见

周焯威¹ 徐品初^{1,3} 成扬¹⁻⁵ 徐列明¹⁻⁵

摘要 目的 从肝硬化患者证候和血清蛋白质组学两方面,探讨肝硬化中医正虚血瘀的病机。
方法 采集到肝硬化男性患者 44 例和健康男性志愿者 17 名的四诊信息和血清标本。对肝硬化患者的四诊信息进行辨证和证候频率分析,归纳为不同证候群。运用 Cu 整合磁珠与基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术检测患者和健康者血清蛋白质组,运用 Bruker 公司统计学分析软件分析,找出不同证候患者之间及与健康对照组之间有显著差异的蛋白质峰,运用 QC 算法建立肝硬化不同证候的分类预测模型。**结果** 肝硬化证候出现频率超过 30%、由高到低依次排列的是:乏力、精神萎靡、蜘蛛痣、肝掌、纳差、齿龈鼻肌衄、腕腹胀满、动则气促、面晦黯、胁肋刺痛、腰膝痠软、胁肋隐痛、五心烦热或低热、潮热盗汗。脾气虚弱证候组 17 例,其中属 Child-Pugh A 级的例数占 64.7%;肝肾阴虚证候组 12 例,其中属 Child-Pugh C 级的例数占 66.7%;血瘀证候组 15 例,在 Child-Pugh A 级和 C 级中所占比例相似,均 >40%。在 Child-Pugh A 级出现的蜘蛛痣、肝掌、动则气促、五心烦热或低热、潮热盗汗、腹壁脉络曲张、下肢水肿等证候,在 Child-Pugh C 级出现的频率增加,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。选择峰值明显质荷比为 4 642.81、4 963.91、5 247.8、5 805.95、6 305.27 和 12 447.7 的蛋白质峰构成脾气虚弱证候诊断模型中的特征蛋白质峰,前 5 个峰在 Child-Pugh A 级和 C 级的蛋白质峰谱中都能找到;9 290.3 蛋白质峰为肝肾阴虚证候诊断模型的特征蛋白质峰,该峰与 7 768.29 蛋白质峰为肝肾阴虚证候组与其他 2 证候组比较均下调的蛋白质峰,均包括在乙型肝炎肝硬化的诊断模型中,但未出现在 Child-Pugh A 级的蛋白质峰谱中,而在 Child-Pugh B 级和 C 级的蛋白质峰谱中表达逐级下调。另外 17 个在肝肾阴虚证候患者表达有明显变化的蛋白质峰中,8 个在 Child-Pugh A 级中均有表达;在 Child-Pugh A 级和 C 级中均表达的 4 964.55 和 5 806.83 蛋白质峰构成乙型肝炎肝硬化血瘀证候诊断模型中的特征性蛋白质峰。建立的乙型肝炎肝硬化脾气虚弱证候诊断模型,敏感度为 100%,特异度为 82.35%;建立的肝肾阴虚证候诊断模型,敏感度为 100%,特异度为 94.12%;建立的血瘀证候诊断模型,敏感度为 100%,特异度为 100%。**结论** 正虚血瘀是肝硬化全程均有的基本病机,“正虚”包括了脾气虚弱和肝肾阴虚。肝肾阴虚虽在肝硬化失代偿期明显,但在代偿期已有表现,需尽早顾护。

关键词 肝硬化;血清蛋白质组学;中医病机;正虚;血瘀

Basic Pathogenesis of Asthenia of Healthy Energy and Blood Stasis in Liver Cirrhosis Studied by Serum Proteomics ZHOU Ye-wei, XU Pin-chu, CHENG Yang, et al *Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203)*

ABSTRACT Objective To study the basic pathogenesis of "asthenia of healthy energy and blood stasis" in liver cirrhosis studied by Chinese syndromes and serum proteomics. **Methods** The information of four methods of examinations and serum samples were collected from 44 cases of male cirrhotic patients and 17 cases of healthy male volunteers. The different syndrome groups were summarized according to syndrome differentiation and frequency analysis using the patient's information of four methods of examinations. The serum proteins were isolated by magnetic beads and detected by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The proteins expressed differently between cirrhotic patients of different syndrome

基金项目:国家重点基础研究发展计划 973 资助项目(No. 2006CB504800);上海市重点学科建设项目资助(Y0302);上海市教育委员会重点学科(第五期)建设项目(No. J50307);上海市高校 E-研究院项目(No. E03008);上海市高校创新团队建设(第一期)

作者单位:1. 上海中医药大学附属曙光医院(上海 201203); 2. 上海中医药大学肝病研究所(上海 201203); 3. 肝肾疾病病证教育部重点实验室(上海中医药大学)(上海 201203); 4. 上海市中医临床重点实验室(上海 201203); 5. 国家中医药管理局重点研究室(慢性肝病虚损)(上海 201203)

通讯作者:徐列明, Tel: 021-20256520, E-mail: xulieming@126.com

types and healthy volunteers were analyzed by statistical analysis software (product of Bruker Corporation Clin-ProTools 2.1 software). The diagnosis model was established by QC algorithm. **Results** The liver cirrhosis syndrome with the appearance frequency of more than 30% was sequenced from high to low as fatigue, listlessness, spider telangiectasia, liver palms, anorexia, bleeding from the nose, the gum or the subcutaneous tissue, the abdominal distention, shortness of breath while moving, dim facial complexion, pricking pain of the flank, weak waist and knees, dull pain in the flank, burning sensation of five centers, or low fever, hectic fever, and night sweat. The cases belonging to Child-Pugh A in the seventeen patients of the Pi-qi asthenia syndrome group accounted for 64.7%. The cases belonging to Child-Pugh C in the twelve patients of the Gan-Shen yin deficiency syndrome group accounted for 66.7%. The cases belonging to Child-Pugh A were similar to the cases belonging to Child-Pugh C in the fifteen patients of the blood stasis syndrome group, being more than 40%. Such syndromes as spider telangiectasia, liver palms, shortness of breath while moving, burning sensation of five centers, or low fever, hectic fever, and night sweat, varicose vein of the abdominal wall, and edema of lower extremities appeared more frequently in Child-Pugh C than in Child-Pugh A (all $P < 0.05$). The characteristic protein expression peak with mass-to-charge ratio of 4 642.81, 4 963.91, 5 247.8, 5 805.95, 6 305.27, and 12 447.7 in the Pi-qi asthenia syndrome diagnosis model were chosen. The former five peaks could be found in Child-Pugh A and Child-Pugh C. The protein expression peak with mass-to-charge ratio of 9 290.3 was the characteristic protein expression peak in the Gan-Shen yin deficiency syndrome diagnosis model. The protein expression peak with mass-to-charge ratio of 9 290.06 and 7 768.29 were down-regulated in the Gan-Shen yin deficiency syndrome group compared with the other two syndromes groups. The protein expression peaks 9 290.3 and 7 768.29 were included in the diagnosis model of hepatitis B cirrhosis. They did not appear in Child-Pugh A, while they were gradually down-regulated in Child-Pugh B and Child-Pugh C. Of the other seventeen protein expression peaks in patients of the Gan-Shen yin deficiency syndrome, eight expressed in Child-Pugh A. The protein expression peaks 4 964.55 and 5 806.83 that expressed both in Child-Pugh A and Child-Pugh C constituted the characteristic protein peaks of the hepatitis B cirrhosis blood stasis diagnosis model. The diagnosis model of the Pi-qi asthenia syndrome was established with the sensitivity of 100% and the specificity of 82.35%. The diagnosis model of the Gan-Shen yin deficiency syndrome was established with the sensitivity of 100% and the specificity of 94.12%. The diagnosis model of the blood stasis syndrome was established with the sensitivity of 100% and the specificity of 100%. **Conclusions** Asthenia of healthy energy and blood stasis was the basic pathogenesis during the whole process of liver cirrhosis. Asthenia of healthy energy covers Pi-qi asthenia and Gan-Shen yin deficiency. Gan-Shen yin deficiency was obvious in the compensation stage of liver cirrhosis, but it has manifested in this stage. So early treatment was necessary.

KEYWORDS liver cirrhosis; serum proteomics; Chinese medicine pathogenesis; asthenia of healthy energy; blood stasis

肝硬化是各种慢性肝脏疾病发展的最终共同途径^[1,2]。肝硬化的病理基础是肝纤维化。笔者基于“正虚血瘀”基本病机的假说确立“扶正化瘀”治则,用中药抗肝纤维化治疗肝硬化已取得可喜疗效^[3]。然而肝纤维化和肝硬化“正虚血瘀”基本病机的假说阐述尚不充分,具体何种正虚不甚清楚,需要进一步研究诠释。

本文拟收集肝硬化患者的四诊信息,通过检测血清蛋白质组,研究典型证候与血清蛋白质组的关系,探讨蛋白质多态性与肝硬化病机之间的有机联系。研究将有助于对肝硬化“正虚血瘀”病机的认识,对于更好地针对病机施治,提高临床疗效有积极的意义。

资料与方法

1 诊断标准 参照中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会制定的肝硬化临床诊断、中医辨证和疗效评定标准(试行方案)^[4],确定肝硬化诊断标准和肝硬化证候组的划分,肝功能分级评价按 Child-Pugh 分级(Child-Pugh classification)评分分级^[5]。

1.1 脾气虚弱证候 主症:(1)纳差或食后脘腹胀满;(2)便溏或黏滞不畅;(3)腹胀;(4)乏力或动则气促;(5)精神萎靡;(6)舌淡或边有齿印。次症:(1)恶心或呕吐;(2)自汗;(3)口淡不欲饮;(4)面色萎黄;(5)畏寒肢冷;(6)下肢水肿。凡具备主症 3 项,或主

症 2 项加次症 2 项,可定为本证候。

1.2 肝肾阴虚证候 主症:(1)腰痛或腰酸腿软;(2)眼干涩;(3)五心烦热或低热;(4)舌红少苔。次症:(1)耳鸣、耳聋;(2)头晕、眼花;(3)大便干结;(4)小便短赤;(5)肋肋隐痛,劳累加重;(6)口干咽燥;(7)潮热盗汗。凡具备主症 3 项,或主症 2 项加次症 2 项,脉象基本符合,可定为本证候。

1.3 血瘀证候 主症:(1)肋肋如刺,痛处不移;(2)肝掌,或蜘蛛痣,或红纹赤缕,或腹壁脉络曲张;(3)肋下积块(肝或脾肿大);(4)舌质紫黯,或瘀斑瘀点。次症:(1)肋肋久痛;(2)脸色晦黯;(3)齿衄、鼻、肌衄。凡具备主症中 1 项或次症 2 项,可定为本证候。

2 研究对象 研究对象为 2009 年 8 月—2010 年 5 月上海中医药大学附属曙光医院肝硬化科住院及门诊男性肝硬化患者。同时选择健康男性志愿者作为对照,对照组无明显证候和肝脏疾病史,肝脏 B 超、肝功能及其他实验室检查均未见异常。共有 44 例乙肝肝硬化患者,年龄 28~72 岁,平均 51 岁,其中脾气虚弱证候者 17 例,年龄 28~72 岁,平均 53 岁;肝肾阴虚证候者 12 例,年龄 32~68 岁,平均 50 岁;血瘀证候者 15 例,年龄 32~65 岁,平均 51 岁。健康对照组 17 名,年龄 20~45 岁,平均 30 岁。

3 试剂和仪器 α -氰-4-羟基苯丙烯酸(HCCA)、Cu 螯合磁珠(MB-IMAC Cu),结合缓冲液(binding solution),清洗缓冲液(washing solution),洗脱缓冲液(eluting solution)均为 Bruker Daltonics 公司产品。乙腈(ACN)、三氟乙酸(TFA)均为 Sigma 公司产品。基质辅助激光解吸离子飞行时间质谱仪 MALDI-TOF-MS(Autoflex TOF III)、磁珠分离器(magnetic bead separator, MBS)均为 Bruker Daltonics 公司产品。

4 样品收集与预处理 真空采血管采集静脉血 5 mL,在室温下静置 30 min,在离心机中 3 000 r/min,离心 5 min,收集上层血清(不能溶血),将血清分装成 100 μ L/管,置于 EP 管中,立即 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

5 纳米磁珠预处理、上样和洗脱 完全混匀磁珠悬浮液,取出 5 μ L 磁珠加入 200 μ L 样品管,再加入 50 μ L 铜螯合磁珠结合缓冲液(BS),将样品管放入磁珠分离器,在前后相邻两孔间反复移动样品管 10 次,样品管在磁珠分离器上停留 20 s,使磁珠富集于管壁,用移液器小心吸去样品管中的溶液,重复上述步骤 1 次,向样品管中加入 20 μ L 铜螯合结合缓冲液使磁珠重新悬浮,再加 5 μ L 血清,混匀,室温放置 5 min,将样品管再

放入磁珠分离器静置 20 s,用移液器吸去悬浮的液体,再向样品管中加入 100 μ L 铜螯合磁珠清洗缓冲液(WS),在磁珠分离器前后相邻两孔间反复移动样品管 10 次,使样品管在磁珠分离器上静置 20 s,用移液器吸去悬浮的液体,重复上述步骤 1 次,向样品管中加入 10 μ L 铜螯合磁珠洗脱缓冲液(ES),混匀,室温静置 5 min,样品管放入磁珠分离器,磁珠贴壁 20 s,用移液器小心将洗脱下来的多肽样品溶液移入干净的样品管,取 1 μ L 样品与 2 μ L 基质充分混匀,点样到点样板上,待干后放入仪器读取。基质:250 mL ACN、2% TFA 250 mL 和 15 mg HCCA,经超声波溶解后形成基质饱和溶液。

6 点靶检测与分析 将 1 μ L 从磁珠上洗脱下来的纯化样品与 2 μ L 基质于点样板板上混匀,在室温下自然干燥后待检测。用标准蛋白质校正仪器,使质荷比误差范围至 0.1% 内,每个样品手工点设激光射击 18 个点、每次射击 200 次,优化相对分子质荷比范围 4 000~20 000,质谱检测使用 MALDI-TOF-MS(Autoflex TOF III)仪器运用 FlexControl 2.2 软件收集数据,运用 Bruker 公司统计学分析软件 ClinProTools 2.1 软件分析所获得的蛋白图谱找出有显著差异的质荷比峰(需 $P < 0.05$),建立诊断模型,同时验证模型的有效性(灵敏性、特异性)。

7 统计学方法 将证候出现的概率用频率表示。频率 = 频数/样本量,其中频数即出现证候的例数,样本量即观察的总例数。两组计量资料采用 t 检验,多组计量资料先作方差齐性检验,如方差不齐,作方差分析。对不呈正态分布的资料进行非参数检验 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-wallis 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 乙肝后肝硬化患者的证候分布 从肝硬化证候出现频率来看,肝硬化组患者具有正虚、血瘀证候的特点,按证候频率由高到低依次排列,且出现频率超过 30% 的症状:乏力、精神萎靡、蜘蛛痣、肝掌、纳差、齿衄鼻肌衄、腕腹胀满、动则气促、面晦黯、肋肋刺痛、腰膝痠软、肋肋隐痛、五心烦热或低热、潮热盗汗(图 1)。

2 乙肝后肝硬化脾气虚弱证、肝肾阴虚证和血瘀证证候频数、频率比较(表 1) 从肝硬化证候出现频率来看,以乏力、精神萎靡、蜘蛛痣最为多见,这 3 种证候在脾气虚弱证候组、肝肾阴虚证候组、血瘀证候组 3 组中均有,组间差异无统计学意义。除此以外,肝硬化

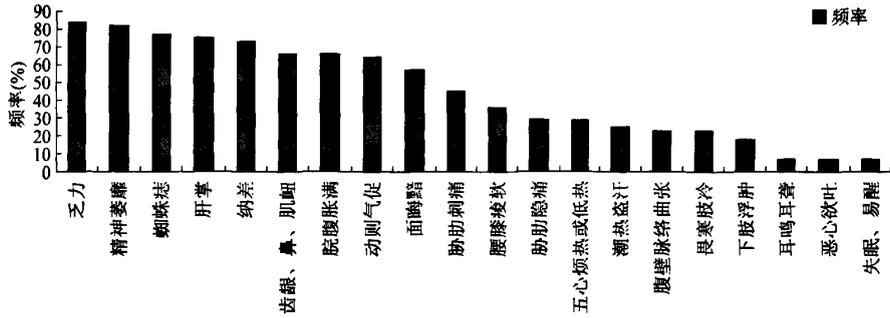


图1 肝硬化患者症状及体征出现频率

脾气虚弱证候组中,以纳差、脘腹胀满为主要证候,与其他2组中的证候表现比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。肝硬化肝肾阴虚证候组中,以腰膝痿软、胁肋隐痛、五心烦热或低热、潮热盗汗为主要证候,与其余2组的相同证候表现比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。肝硬化血瘀证候组中,以齿龈鼻肌衄、面晦黯、胁肋刺痛为主要证候,与其余2组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 乙肝后肝硬化脾气虚弱、肝肾阴虚、血瘀证证候出现频率比较

证候	脾气虚弱证候组 (17例)		肝肾阴虚证候组 (12例)		血瘀证候组 (15例)	
	频数	频率 (%)	频数	频率 (%)	频数	频率 (%)
乏力	15	88.2	11	91.7	11	73.3
精神萎靡	16	94.1	10	83.3	10	66.7
蜘蛛痣	11	64.7	10	83.3	13	86.7
肝掌	9	52.9	9	75.0	15	100.0**
纳差	17	100.0	6	50.0**	9	60.0**
齿龈鼻肌衄	8	47.1	6	50.0 ^{△△}	15	100.0**
脘腹胀满	17	100.0	6	50.0** ^{△△}	6	40.0
动则气促	12	70.6	8	66.7	8	53.3
面晦黯	5	29.4	6	50.0 [△]	14	93.3**
胁肋刺痛	4	23.5	1	8.3**	15	100.0
腰膝痿软	0	0.0	12	100.0** ^{△△}	4	26.7
胁肋隐痛	1	5.9	10	83.3** ^{△△}	2	13.3
五心烦热或低热	0	0.0	11	91.7** ^{△△}	2	13.3
潮热盗汗	0	0.0	9	75.0** ^{△△}	2	13.3
腹壁脉络曲张	1	5.9	5	41.7*	4	26.7
畏寒肢冷	4	23.5	3	25.0	2	13.3
下肢水肿	3	17.6	3	25.0	2	13.3
耳鸣耳聋	0	0.0	3	25.0*	0	0.0 [△]
恶心想吐	0	0.0	1	8.3	2	13.3
失眠、易醒	2	11.8	0	0.0	1	6.7

注:与脾气虚弱证候组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与血瘀证候组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;3组证候按肝硬化患者(总体)证候出现频率频率,从高到低顺序排列,仅列出症状出现频率超过5%的项目;表4同

3 乙肝后肝硬化 Child-Pugh 分级不同阶段的证候比较(表2) 在肝硬化不同阶段的证候中,乏力、精神萎靡、纳差、齿龈鼻肌衄、脘腹胀满、胁肋刺痛、腰膝痿软、胁肋隐痛等在肝硬化 Child-Pugh A 级、Child-Pugh B 级、Child-Pugh C 级中的表现频率类似,差异无统计学意义。在肝硬化 Child-Pugh A 级出现的证候:蜘蛛痣、肝掌、动则气促、五心烦热或低热、潮热盗汗、腹壁脉络曲张、下肢水肿等,在 Child-Pugh C 级出现的频次增加,级间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 乙肝后肝硬化 Child-Pugh 分级不同阶段证候出现频率比较

证候	Child-Pugh A 级 (18例)		Child-Pugh B 级 (7例)		Child-Pugh C 级 (19例)	
	频数	频率 (%)	频数	频率 (%)	频数	频率 (%)
乏力	13	72.2	6	85.7	18	94.7
精神萎靡	15	83.3	5	71.4	18	94.7
蜘蛛痣	10	55.6**	6	85.7	18	94.7
肝掌	9	50.0**	6	85.7	18	94.7
纳差	13	72.2	4	57.1	15	78.9
齿龈、鼻、肌衄	13	72.2	2	28.6	14	73.7
脘腹胀满	13	72.2	3	42.9	13	68.4
动则气促	8	44.4*	5	71.4	15	78.9
面晦黯	8	44.4*	4	57.1	2	10.5
胁肋刺痛	8	44.4	3	42.9	9	47.4
腰膝痿软	4	22.2	3	42.9	9	47.4
胁肋隐痛	3	16.7	3	42.9	7	36.8
五心烦热或低热	2	11.1*	3	42.9	8	42.1
潮热盗汗	2	11.1*	1	14.3	8	42.1
腹壁脉络曲张	0	0.0**	1	14.3	9	47.4
畏寒肢冷	4	22.2	2	28.6	4	21.1
下肢水肿	0	0.0**	1	14.3	7	36.8
耳鸣耳聋	0	0.0	1	14.3	2	10.5
恶心想吐	0	0.0*	0	0.0*	3	15.8
失眠、易醒	1	5.6	1	14.3	1	5.3

注:与 Child-Pugh C 级比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

4 乙肝后肝硬化中医证候类型与 Child-Pugh 分级的关系(表 3) 3 种证候在各 Child-Pugh 分级中均有表现,但是脾气虚弱证候以 Child-Pugh A 级为主;肝肾阴虚证候以 Child-Pugh C 级为主;血瘀证候在 Child-Pugh A 级和 C 级中的出现频率相似,均在 40% 以上。

表 3 中医证候类型与 Child-Pugh 分级比较 [例(%)]

证候类型	例数	Child-Pugh 分级		
		A 级	B 级	C 级
脾气虚弱	17	11(64.7)	2(11.8)	4(23.5)
肝肾阴虚	12	1(8.3)	3(25.0)	8(66.7)
血瘀	15	6(40.0)	2(13.3)	7(46.7)
合计	44	18(40.9)	7(15.9)	19(43.2)

5 乙肝肝硬化各中医证候组与健康对照组血清蛋白质峰比较

5.1 乙肝肝硬化脾气虚弱证候组与健康对照组血清蛋白质峰比较 乙肝肝硬化脾气虚弱证与健康对照组有 15 个在 2 组间的差异有统计学意义(表 4)。软件自动区分最佳的血清差异表达蛋白质建立诊断模型,乙肝肝硬化脾气虚弱证候组 17 例样本均区分正确,敏感性为 100%。健康对照组 17 例,14 例区分正确,3 例区分错误,特异性为 82.35%(表 5)。构成诊断模型的峰值明显的特征蛋白质峰(图 2)。

表 4 乙肝肝硬化脾气虚弱证候组与健康对照组比较蛋白质差异峰 ($\bar{x} \pm s$)

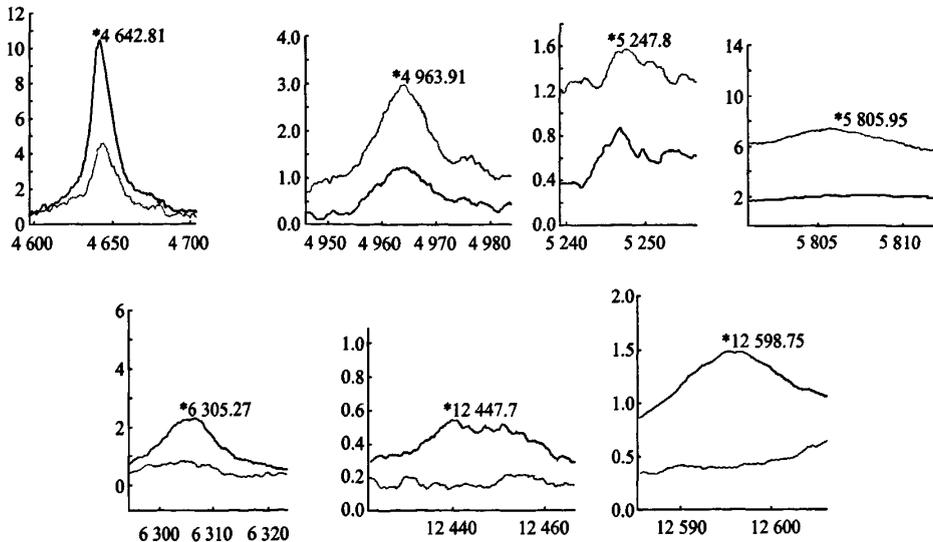
质荷比	脾气虚弱证候组 (17 例)	健康对照组 (17 例)	P 值
4642.81 *	63.04 ± 27.43	29.68 ± 9.62	0.00357
4963.91 *	30.84 ± 11.03	17.37 ± 6.99	0.00415
5247.80 *	35.77 ± 15.75	21.59 ± 10.78	0.02380
5263.98	59.09 ± 31.87	35.18 ± 16.35	0.04370
5294.02	440.23 ± 154.39	298.27 ± 105.19	0.02380
5337.82	126.40 ± 75.12	44.35 ± 14.73	0.00460
5805.95 *	33.39 ± 11.28	22.97 ± 10.81	0.04120
6090.51	158.40 ± 62.76	262.68 ± 106.89	0.01690
6305.27 *	41.92 ± 19.20	63.16 ± 21.23	0.02380
8567.57	27.15 ± 7.16	53.40 ± 24.28	0.00460
9290.19	535.33 ± 326.41	804.21 ± 579.91	0.03500
9495.55	11.52 ± 6.43	23.72 ± 14.41	0.02380
12447.70 *	12.60 ± 3.28	19.58 ± 7.77	0.02010
12598.75 *	46.77 ± 13.00	81.88 ± 27.46	0.00357
16615.75	432.42 ± 223.83	846.81 ± 579.91	0.04450

注*用于建立诊断模型中的蛋白质峰

表 5 乙肝肝硬化脾气虚弱证候诊断模型识别能力 (例)

诊断模型	脾气虚弱证候组	健康对照组	合计
阳性	17(真阳性)	3(假阳性)	20
阴性	0(假阴性)	14(真阴性)	14
合计	17	17	34

注:敏感度:100%(16/16),特异度:82.35%(14/17)



注:灰色:乙肝肝硬化脾气虚弱证患者;黑色:健康对照组

图 2 脾气虚弱证候诊断模型中的特征蛋白质峰

5.2 乙型肝炎肝硬化肝肾阴虚证候组与健康对照组血清蛋白质峰比较 乙型肝炎肝硬化肝肾阴虚证候组与对照组有 19 个在 2 组间差异有统计学意义(表 6)。软件自动区分最佳的血清差异表达蛋白质建立诊断模型,乙型肝炎肝硬化肝肾阴虚证候组 12 例均区分正确,敏感性为 100%。健康对照组 17 例,16 例区分正确,1 例区分错误,特异性为 94.12%(表 7)。构成诊断模型的峰值明显的特征蛋白质峰(图 3)。

表 6 乙型肝炎肝硬化肝肾阴虚证与健康对照组比较
蛋白质差异峰 ($\bar{x} \pm s$)

质荷比	肝肾阴虚证候组 (12 例)	健康对照组 (17 例)	P 值
4642.55	95.57 ± 25.57	247.83 ± 102.65	0.000118
4964.93	70.89 ± 37.96	39.01 ± 13.97	0.0302
5296.24	71.82 ± 15.16	45.09 ± 21.18	0.00175
5337.72	484.90 ± 122.44	306.23 ± 107.71	0.00175
5806.51	226.28 ± 74.18	92.06 ± 29.86	0.000257
5906.13	1747.04 ± 312.22	1242.54 ± 368.94	0.00175
5962.86	189.26 ± 45.85	143.61 ± 47.42	0.0302
6305.03	25.89 ± 8.79	53.56 ± 24.47	0.00168
7768.29	183.20 ± 72.42	484.89 ± 121.74	< 0.000001
8578.77	16.06 ± 6.72	8.42 ± 5.24	0.00891
8603.74	58.60 ± 30.76	30.38 ± 11.82	0.0221
8871.21	41.53 ± 10.24	28.89 ± 10.40	0.00891
8933.67	146.39 ± 74.04	53.04 ± 26.03	0.00331
9181.25	15.68 ± 5.00	28.42 ± 5.97	0.0000163
9290.30*	239.84 ± 85.32	818.18 ± 205.81	< 0.000001
10262.08	42.49 ± 10.16	95.30 ± 49.75	0.00175
12446.68	23.71 ± 5.16	34.53 ± 11.17	0.00526
12599.16	39.32 ± 9.93	77.66 ± 27.31	0.000199
16612.33	426.49 ± 243.20	870.69 ± 589.93	0.023

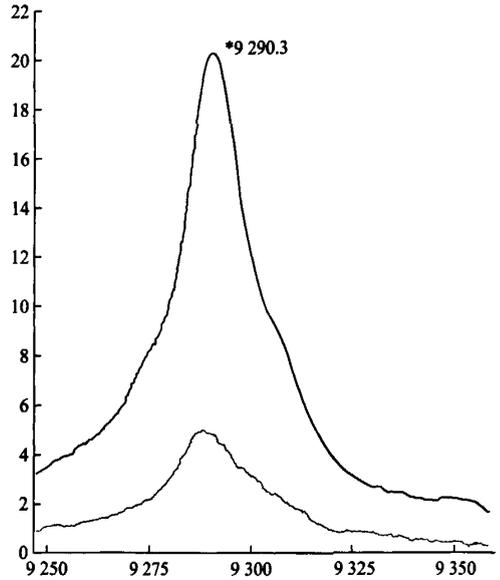
注: * 用于建立诊断模型中的蛋白质峰

表 7 乙型肝炎肝硬化肝肾阴虚证候诊断模型识别能力 (例)

诊断模型	肝肾阴虚证候组	对照组	合计
阳性	12(真阳性)	1(假阳性)	13
阴性	0(假阴性)	16(真阴性)	16
合计	12	17	29

注: 敏感度: 100%(12/12), 特异度: 94.12%(16/17)

5.3 乙型肝炎肝硬化血瘀证候组与健康对照组血清蛋白质峰比较 乙型肝炎肝硬化血瘀证候组与对照组有 13 个在 2 组间差异有统计学意义(表 8)。软件自动区分最佳的血清差异表达蛋白质建立诊断模型,乙型肝炎肝硬化血瘀证候组 15 例,均区分正确,敏感性为 100%。健康对照组 17 例,均区分正确,特异性为 100%(表 9)。构成诊断模型的峰值明显的特征蛋白质峰(图 4)。



注: 灰色: 乙型肝炎肝硬化肝肾阴虚证患者; 黑色: 健康对照组

图 3 肝肾阴虚证候诊断模型中的特征蛋白质峰

表 8 乙型肝炎肝硬化血瘀证候组与健康对照组比较
上调的蛋白差异峰 ($\bar{x} \pm s$)

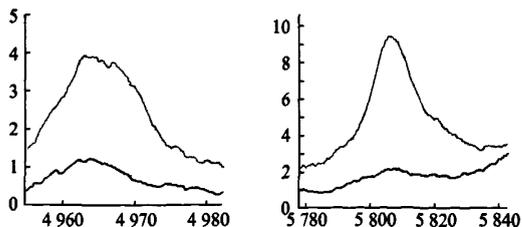
质荷比	血瘀证候组 (15 例)	健康对照组 (17 例)	P 值
4642.40	146.76 ± 36.23	251.66 ± 103.65	0.00564
4964.55*	94.54 ± 52.57	36.63 ± 13.06	0.00564
5249.44	30.12 ± 7.78	19.34 ± 7.70	0.00564
5337.93	504.14 ± 155	310.22 ± 109.66	0.00564
5760.61	47.33 ± 22.14	24.87 ± 10.20	0.00842
5806.83*	280.61 ± 142.24	103.44 ± 32.83	0.00564
6305.20	29.02 ± 11.12	54.38 ± 24.67	0.00564
8567.77	32.23 ± 8.64	20.85 ± 9.53	0.00672
8602.55*	51.71 ± 14.63	34.37 ± 14.15	0.00842
8932.69	79.64 ± 37.92	39.27 ± 17.83	0.00672
9289.60	523.22 ± 179.89	781.60 ± 197.25	0.00564
10261.63	54.32 ± 21.86	91.27 ± 47.59	0.03340
12597.44	48.62 ± 14.00	76.90 ± 26.81	0.00564

注: * 用于建立诊断模型中的蛋白质峰

表 9 乙型肝炎肝硬化血瘀证候诊断模型识别能力 (例)

诊断模型	血瘀证候组	健康对照组	合计
阳性	15(真阳性)	0(假阳性)	15
阴性	0(假阴性)	17(真阴性)	17
合计	15	17	32

注: 敏感度: 100%(15/15), 特异度: 100%(17/17)



注:灰色:乙肝肝硬化血瘀证患者;黑色:健康对照组

图 4 乙肝肝硬化血瘀证候诊断模型中的特征蛋白质峰

讨 论

“正虚血瘀”是肝纤维化和肝硬化的基本病机假说,是从临床实践中发现归纳后提出的,有中医理论和历代名医治疗经验的基础,也经过了扶正化瘀方治疗肝纤维化和肝硬化临床和实验研究结果的验证^[6,7]。但是“正虚”病机的确切涵义仍需要阐释。究竟气血津液阴阳中何者偏衰?哪个脏腑的正气不足?虽然不乏应用聚类分析、多元回归等统计学方法分析大样本的证候调查结果,从证型角度解释肝硬化的正虚血瘀病机的研究^[8],但是仍需要开展进一步的研究和获得更多的证据支撑。本文研究正虚和血瘀的关系,故舍去了含有各种实证证候的病例。

1 正虚血瘀是肝硬化的基本病机 本文首先从患者的主要证候研究肝硬化的基本病机。从肝硬化证候出现频率来看,乏力、精神萎靡、蜘蛛痣、肝掌、纳差、齿龈鼻肌衄、脘腹胀满、动则气促、面晦黯、肋肋刺痛、腰膝痠软、肋肋隐痛、五心烦热或低热、潮热盗汗(按频率由高到低依次排列)等证候出现的频率超过 30%。其中尤以乏力、精神萎靡、蜘蛛痣、肝掌、纳差、动则气促等证候最为多见,在脾气虚弱证候组、肝肾阴虚证候组、血瘀证候组 3 组中都有 50% 以上的频率出现,提示在肝硬化患者中,虚(以乏力、精神萎靡、纳差、动则气促为代表)、瘀(以蜘蛛痣、肝掌为代表)普遍存在。肝硬化 Child-Pugh A 级患者多处于代偿期,Child-Pugh B 级和 C 级的患者已在失代偿期,故 ABC 分级代表了病情的严重程度和不同阶段。在分级不同阶段的证候中,乏力、精神萎靡、蜘蛛痣、肝掌、纳差等在肝硬化 Child-Pugh A 级、Child-Pugh B 级、Child-Pugh C 级中的表现频率都在 50% 以上。提示虚(以乏力、精神萎靡、纳差等为代表)、瘀(以蜘蛛痣、肝掌为代表)贯穿在肝硬化发展的不同阶段中。

本文脾气虚弱证候组以 Child-Pugh A 级为主,占 64.7%;肝肾阴虚证候组以 Child-Pugh C 级为主,占 66.7%;血瘀证候组在 Child-Pugh A 级和 C 级中的出

现频率相似,均在 40% 以上。将 Child-Pugh A 级和 C 级 2 个阶段的证候作比较,发现蜘蛛痣、肝掌、动则气促、五心烦热或低热、潮热盗汗、腹壁脉络曲张、下肢水肿等证候 Child-Pugh C 级出现的频率增加,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),提示血瘀伴随肝硬化发展逐渐加重,而虚证在肝硬化代偿期和失代偿期不同阶段,由脾气虚弱为主向肝肾阴虚为主转换。可见,肝硬化“正虚”的病机,包括了脾气虚弱和肝肾阴虚。我们在《岳岳全书·杂证谟·虚损》中找到理论根据。张介宾基于“阳化气,阴成形”的理论,认为“凡虚损…或先伤其气,气伤必及于精;或先伤其精,精伤必及于气。但精气在人,无非谓之阴分。盖阴为天之一根,形质之祖,故凡损在形质者,总曰阴虚,此大目也”。我们以为,气虚反映了机体全身抵御疾病能力的下降,而肝脏形质损伤则直接导致阴虚。由于阴精虚损而不能化气为用以致气虚表征显现突出,但随着肝脏形质损伤逐步加重,阴虚的表征会日益明显。因此肝硬化“正虚血瘀”的病机可作如下诠释:邪致肝脏机体形质损伤,精气虚损,气血不行,凝血蕴里而不散,积乃成焉。

2 血清蛋白质组学支持肝硬化“正虚血瘀”的基本病机假说 “有诸于内,必形于外”,外在的表象必然有其内在的物质变化。研究疾病的病机在宏观层次上的微观辨证,是整体观的重要发展和深化。从整体水平出发的蛋白质组学研究可在更贴近生命本质的层次上去发现和理解生命活动的规律,以及重要生理、病理现象的本质。蛋白质组学技术在肝纤维化/肝硬化研究中的应用,具有潜在价值。本文所用的 MALDI-TOF-MS 技术大大克服了 2 维电泳技术的局限性。其对样品的要求及处理相对简单,可测定的分子质量范围大;MALDI 进样是固相的,不易受溶液性质影响,对杂质的忍耐性较好。而本文提取血清蛋白所采用的球形磁珠,有较大的抓取蛋白的表面积,具有较高灵敏度。磁珠表面的特异基团可与血清中特异低丰度蛋白充分接触,捕获蛋白种类多,从而保证了系统有很好的灵敏度^[9];运用蛋白质组学差异蛋白质峰建立的诊断模型均具有较高的敏感性和特异性^[10,11]。

利用软件计算比对得出的乙肝肝硬化脾气虚弱证候诊断模型由 7 个特征蛋白质峰组成,其中前 6 个蛋白质全部包括在乙肝肝硬化的诊断模型(另文发表)中,而且在 Child-Pugh A 级和 C 级的蛋白质峰谱(数据未提供)中都能找到。因此血清蛋白质组学的研究结果也提示,脾气虚弱证候在乙肝肝硬化是普遍存在的。

9 290.3 蛋白质峰为肝肾阴虚证候诊断模型的特

征蛋白质峰,该峰与 7 768. 29 蛋白质峰是肝肾阴虚证候组与其他 2 证候组比较均下调的蛋白质峰(数据未显示),均包括在乙肝肝硬化的诊断模型中,但未出现在 Child-Pugh A 级的蛋白质峰谱中,而在 Child-Pugh B 级和 C 级的蛋白质峰谱中表达逐级下调,联系到有肝肾阴虚证候群的肝硬化患者以 Child-Pugh C 级为主,提示肝肾阴虚证候反映肝硬化病情的严重。但是仔细分析后我们发现,另外 17 个在肝肾阴虚证候患者表达有明显变化的蛋白质峰中,4 964. 58、5 294. 4、5 337. 93、5 806. 86、4 642. 49、6 305. 14、12 447. 43、12 597. 91 等 8 个蛋白质峰,在 Child-Pugh A 级中都有表达,提示肝肾阴虚在肝硬化进展过程中不是突然出现的,其病机变化可能伴随肝的形质损伤较早出现,因此临床治疗肝硬化顾护正气的同时,尽早补益肝肾可能是非常重要的。

组成乙肝肝硬化血瘀证候诊断模型的 3 个蛋白质峰中,质荷比为 4 964. 55 和 5 806. 83 的 2 个蛋白质在图形上呈“峰”的形式,8 602. 55 在图形上则呈较为平坦的线段。我们确定前 2 种峰值明显的蛋白质构成乙肝肝硬化血瘀证候诊断模型中的特征性蛋白质峰。这 2 个蛋白质峰包括在乙肝肝硬化的诊断模型中,在 Child-Pugh A 级和 C 级中都表达,提示血瘀证候在乙肝肝硬化各阶段都存在的。

综上所述,“正虚血瘀”是肝硬化全程均有的基本病机,“正虚”包括了脾气虚弱和肝肾阴虚。肝肾阴虚虽在肝硬化失代偿期明显,但在代偿期已有表现,需尽早顾护。

参 考 文 献

- [1] Friedman SL. Liver fibrosis from bench to bedside[J]. *J Hepatol*, 2003,38(Suppl 1):S38-S53.
- [2] Bhaskar ME. Management of cirrhosis and ascites[J]. *N Engl J Med*, 2004,351(3):300-301.
- [3] 赵长青,吴艺青,徐列明. 扶正化瘀胶囊抗肝纤维化的临床疗效和作用机制[J]. *中西医结合学报*, 2006,4(5):467-472.
Zhao CQ, Wu YQ, Xu LM. Curative effects of Fuzheng Huayu Capsule on hepatic fibrosis and the functional mechanisms: a review[J]. *J Chin Integr Med*, 2006,4(5):467-472.
- [4] 张育轩,危北海. 肝硬化临床诊断、中医辨证和疗效评定标准(试行方案)[J]. *中国中西医结合杂志*, 1994,14(4):237.
Zhang YX, Wei BH, editor. Clinical diagnosis, Chinese medicine syndrome differentiation, and therapeutic efficacy assessment standard of liver cirrhosis (trial)[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 1994,14(4):237.
- [5] 王吉耀. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:504.
Wang JY, editor. Internal medicine[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 504.
- [6] 刘平,刘成,胡义扬,等. 扶正化瘀方对肝炎后肝硬化的治疗作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 1994,2(2):75-78.
Liu P, Liu C, Hu YY, et al. The therapeutic effect of Fuzheng Huayu Recipe in treating post-hepatitis cirrhosis[J]. *Chin J Hepatol*, 1994,2(2):75-78.
- [7] 徐列明,刘平,刘成,等. 扶正化瘀 319 方治疗慢性乙型肝炎肝纤维化[J]. *中华肝脏病杂志*, 1997,5(4):207-209.
Xu LM, Liu P, Liu C, et al. Treatment of chronic hepatitis B with hepatic fibrosis by Fuzheng Huayu 319 Recipe[J]. *Chin J Hepatol*, 1997,5(4):207-209.
- [8] 张琴,邱宏,王磊,等. 355 例肝炎后肝硬化患者中医证候与生物学指标的关系[J]. *中西医结合学报*, 2007,5(2):130-133.
Zhang Q, Qiu H, Wang L, et al. Correlation between syndromes of post-hepatitic cirrhosis and biological parameters: a report of 355 cases[J]. *J Chin Integr Med*, 2007,5(2): 130-133.
- [9] Poon TC, Hui AY, Chan HL, et al. Prediction of liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B infection by serum proteomic fingerprinting: a pilot study[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(2):328-335.
- [10] Zhu XD, Zhang WH, Li CL, et al. New serum biomarkers for detection of HBV-induced liver cirrhosis using SELDI protein chip technology[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(16):2327-2329.
- [11] Morra R, Munteanu M, Bedossa P, et al. Diagnostic value of serum protein profiling by SELDI-TOF protein chip compared with a biochemical marker, FibroTest, for the diagnosis of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007, 26(6):847-858.
(收稿:2010-06-15 修回:2011-01-09)