

肠外营养中添加多种微量元素对于患者营养代谢的影响 研究方案

一、研究背景

肠外营养中是否应常规添加复合微量元素, 多年以来一直缺乏明确的科学依据。在临床实践中, 添加与否也往往缺乏规范^[1]。已有的肠外营养微量元素相关研究, 并进行国际指南的推荐, 但多数样本含量较小, 且多存在设计问题, 论证强度有限^[2]。

因此, 从促进临床规范应用和保障肠外营养有效性的角度, 明确是否应该常规添加复合微量元素及在应激期的推荐剂量, 是一个重要问题。

参考文献

[1] M. Braga, O. Ljungqvist, P. Soeters, et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: Surgery. *Clinical Nutrition*, 2009 (28), 378–386.

[2] Emma J Osland MPhil, AdvAPD. Australasian Society for Parenteral and Enteral Nutrition guidelines for supplementation of trace elements during parenteral nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 2014;23(4):545-554

二、研究目标

明确注射复合微量元素对使用肠外营养患者(29天- <18岁)营养代谢的影响。

三、研究内容

本研究为一项随机、对照、双盲临床研究。

在2017年07月到2018年06月期间, 以北京协和医院作为牵头单位, 联合四川省人民医院, 成都市妇女儿童中心医院进行试验。成都市妇女儿童中心医院选取因胃肠衰竭、消化道先天畸形术后、其他先天畸形术后、消化道出血需要接受PN的患者40例, 按年龄分为两组(29天-3岁, 3岁- <18岁), 再分别随机分成干预组和对照组, 其中干预组常规添加1倍剂量复合微量元素, 对照组为空白对照。分别比较两组在术前、术后第一天、第三天、第五天等时间点的常规安全性指标、微量元素水平变化、代谢指纹图谱变化、抗氧化指标及免疫指标、以及患者住院时间和住院费用的变化, 来明确注射复合微量元素对使用肠外营养患者(29天- <18岁)营养代谢的影响。

(一) 纳入标准

1. 因胃肠衰竭、消化道先天畸形术后、其他先天畸形术后、消化道出血需要接受PN的患

者, 且预期使用PN在五天以上

2. 分两组, 年龄分别为 29 天-3 岁, 3 岁- <18 岁
3. 无严重心、肝(肝功能指标超过 2 倍正常上限)、肾 (CKDIV 期以下)、肺功能障碍
4. 建立中心静脉途径 (锁骨下、颈内静脉、股静脉或 PICC)
5. 已签署知情同意书

(二) 排除标准

1. 对肠外营养液成分有过敏的患者
2. 糖尿病患者
3. 对已知微量元素过敏或不良反应的患者
4. 已存在明显微量元素缺乏症者(铁、锌、铜等)
5. 先天性代谢异常
6. 缺铁性贫血

(三) 设计方案

1. 随机双盲方案

单纯随机抽样, 采用计算机随机生成随机数, 每位患者给以一个随机号及一个相应密封信封。由一位独立的控制员按随机表为临床配制干预组或标对照组的肠外营养液, 医生和患者均不知所接受的营养液属于哪一组。

2. 营养输入设计

● 干预组:

	葡萄糖	氨基酸	脂肪乳	电解质				维生素	微量元素	总肠外能量
				Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺			
1d	12g/(kg*d)	1g/kg	0.5g/kg	3mmol/(kg*d)	2mmol/(kg*d)	0.5mmol/(kg*d)	0.2mmol/(kg*d)	水溶性维生素 1ml/(kg*d); 脂溶性维生素 1ml/(kg*d), 每天不超过10ml	1ml/(kg*d), 每日最大剂量不超过15ml	第一个10kg (100kal*Wt); 第二个10kg (50kal*Wt); >20kg部分 (20kal*Wt)
2d		2g/kg	1g/kg							
3d		3g/kg	2g/kg							
4d		3g/kg	3g/kg							
5d		3g/kg	3g/kg							

● 对照组:

	葡萄糖	氨基酸	脂肪乳	电解质				维生素	总肠外能量
				Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺		
1d	12g/(kg*d)	1g/kg	0.5g/kg	3mmol/(kg*d)	2mmol/(kg*d)	0.5mmol/(kg*d)	0.2mmol/(kg*d)	水溶性维生素 1ml/(kg*d); 脂溶性维生素 1ml/(kg*d), 每天不超过10ml	第一个10kg (100kal*Wt) ; 第二个10kg (50kal*Wt) ; >20kg部分 (20kal*Wt)
2d		2g/kg	1g/kg						
3d		3g/kg	2g/kg						
4d		3g/kg	3g/kg						
5d		3g/kg	3g/kg						

每日输入营养液的总容积计算如下: 第一个 10kg(100ml/kg*Wt), 第二个 10kg(50ml/kg*Wt), 第三个 10kg (20ml/kg*Wt)。两组使用 PN 的干预时间为至少 5 天。TPN 支持第 4 天, 胃肠功能启动后, 可经胃管或经口给予糖水或米汤 5-100ml。

3. 微量元素营养不良监测与代谢指纹图谱检测设计

- 患者入组后, 手术前 2-3 天采用 MNA-SF 及胃肠道功能评估进行营养评价。
- 术前禁食 8-12h
- 入组后 (手术前 1 天) 第二天晨 8: 00 空腹留基线血样检测微量元素水平。同时留取血样、尿液以备串联质谱及 1H-NMR 代谢组学检测。
- 手术后第二天, 在输注肠外营养前。留取血样、尿液以备串联质谱及 1H-NMR 代谢组学检测。
- 手术后第三天, 晨 8: 00 空腹留基线血样检测 9 种微量元素水平。同时留取血样以备串联质谱及 1H-NMR 代谢组学检测。
- 研究第五天晨 8: 00 留血样检测微量元素水平。
- 研究第一、三、五日晨 8: 00 留血样、尿液以备串联质谱及 1H-NMR 代谢组学检测。
- 标本分离后储存-20—80 冰箱。

4. 血液标本的采取及保存

- 常规项目: 如血常规、肝肾功能、血脂、凝血功能等, 根据临床需要, 按照所在医院检验科要求操作;

● 特殊项目血标本采集流程

□ 每位患者采血约 7.5ml, 分别装入三个非抗凝管 (红头管, 每管可保存 4.5ml):

1) 检测微量元素: 2ml 血液装入非抗凝管, 送解放军总医院检验科检测。

2) 检测 1H-NMR:

3ml 血液装入枸橼酸钠抗凝管, 即刻置于 2000 r/min 离心 10min, 离心后, 取上清液置于-70 度冰箱内保存待用。

3) 检测 IL-1, IL-6, IL-8, MDA

2.5ml 血液装入非抗凝管 (红头管, 每管可保存 4.5ml), 常温静置 2 小时, 以 3000-5000 rpm

离心 30 分钟, 取黄色上清液, 再分装至 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 共 4 管, 清楚的标记好姓名、入组号、采血时间等相关资料, 存入-70 度冰箱。

5. ¹H-NMR 检测流程

1) NMR:600 MHZ NMR, ¹H 谱图, 标准 protocol

- 预处理标本血浆在室温下解冻, 于 16 000 r / min 离心 10 min, 用移液器吸取 450ul 加入核磁管中, 并于核磁管中加入 50uL 重水 (D₂O), 充分振荡约 120S, 静置 10 min 后将标本放于 600MHZNMR 中进行检查。
- 采用 BrukerAvanceDRx600 傅立叶 MNR 变换核磁共振仪检测血浆代谢物。获得原始一维 NMR 谱图。按照如下标准操作流程进行数学建模: 使用 MESTREC 软件将谱图分解成 150-300 个区域进行自动积分; 将积分所得数据用 MATLAB 在 PC 机上进行主成分分析(Principal Components Analysis, PCA)。进而进行数学建模, 采用典型相关分析, 建立 PLS-DA 分析所需要的数据矩阵, 先进行数据中心化和归一化校正, 然后进行正交信号校正 (OSC), 最终建立代谢指纹图谱的回归方程。
- 代谢指纹图谱对手术后病情变化的预测和监测意义: 通过多种数据处理方法的结合, 考察随术后全代谢谱在病情时间变化的差异, 补充 NMR 方法的不足, 能更全面系统地应用疾病的代谢轮廓去有效指导 PN 支持患者的治疗。

2) LC/MS: 标准 protocol-药植所提供 (氨基酸谱图)

● 液相条件:

色谱柱: HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, i.d, 1.8 μm)

流动相: A: 乙腈 (含 0.1%甲酸)、B: 水 (含 0.1%甲酸)

流动相梯度程序:

	Time(min)	A (%)	B (%)	curve
1	0.00	2.0	98.0	
2	0.50	2.0	98.0	6
3	8.00	70.0	30.0	6
4	10.00	98.0	2.0	6
5	10.10	2.0	98.0	6

柱温: 45°C

样品室温度: 6°C

流速: 0.5 mL/min

进样体积: 5 μL

● 质谱条件

以氮气作为雾化、锥孔气; 电喷雾电离正、负离子模式; 飞行管检测模式 V 型; 毛细管电

版本号: 1.0

版本日期: 2017 年 8 月 3 日

压(capillary voltage) 3.5kv; 锥孔电压(Sampling cone)35v (正离子模式) /40v (负离子模式); 萃取锥孔(Extraction cone)3v; 源温(Source temperature)100°C; 脱溶剂气温度(Desolvation temperature) 400°C; 反向锥孔气流(Cone gas flow)50 l/h; 脱溶剂气 (Desolvation gas flow)600 l/h; 碰撞气流速(Collision gas flow)0.5mL/min; 检测器 (Detector)1700v; 扫描时间(Scan time)1s; 扫描时间间隔(Inter scan time)0.02s; 质荷比范围: 50-1000 m/z; 数据采集形式(Data format) centroid; 灵敏性 (Sensitivity)normal; 动态范围(Dynamic range) extended; 锁定质量数 (Lock mass): 556.2771/554.2615。

3) 数据处理方法:

● 数据的提取

数据的提取方法采用 UPLC/QTOFMS 系统操作软件 MassLynx V4.1 中的 MarkerLynx (MassLynx SCN 803) 软件包, 该软件包能够自动完成谱峰识别、滤噪等前处理程序, 处理参数设置如下: retention time range 1-10 min, mass range 100-1000 amu, mass tolerance 0.01, minimum intensity 1%, mass window 0.05, retention time window 0.20, noise elimination level 6。最后输出三维矩阵, 即由保留时间和精确质核比组成的谱峰索引(变量)、样本名称和峰强度/面积。

● 数据的多元统计分析

多元统计分析采用 SIMCA-P 软件(Umetrics AB, Sweden, 11.0 version), 首先进行主成分分析 (PCA) 对数据进行模式识别, 考察各组数据轮廓的分离情况, 评价所建立模型的解释能力和预测能力。同时, 在 PCA 分析的基础上, 利用最小二乘-判别分析法 (PLS-DA) 对能在 PCA 模型中能有较好分离的两组样品进一步的进行分析, 通过 S-plot 的加载分析和变量重要性分析 (VIP) 从建立的 PLS-DA 模型中找到造成两组之间差异的变量。

● 差异变量的显著性分析

使用双侧 t 检验的方法进行。

6. 观察指标

- 常规安全性指标: 入组当日、干预第一日、干预第三日及第 5 日抽血测肝、肾功、血脂、血常规。并逐日记录体温、脉搏、血压等生命体征。
- 微量元素水平变化。
- 抗氧化指标及免疫指标: MDA, IL-1, 6, 8, Hs-CRP
- 记录患者总住院时间、住院费用等终点指标情况

7. 偏倚控制措施

- 采用双盲设计, 可有效控制各种观察中的偏倚
- 纳入患者围手术期住院病人, 可有效控制失访偏倚

版本号: 1.0

版本日期: 2017年8月3日

-
- 在患者进入试验前做详细说明, 要求每位受试者签署知情同意书

8. 统计分析方法

常规统计在四川省医学科学院·四川省人民医院创伤代谢组多学科实验室计算数学教研组 R 生物计算平台上实现。数据按标准建库, 并进行清理和标化。计量资料先行数据分布状态检验, 正态性数据采用 ANVOVA 行单因素分析, 非正态数据行秩和检验。计数资料行 X² 检验。结局资料与微量元素摄入状态关联先行 Logistic 多元回归, 复以第二代多元统计工具行主成分分析及偏小二乘法建模。

9. 伦理审查

由中国医学科学院北京协和医院伦理委员会、成都市妇女儿童中心医院进行伦理审查。通过后将在美国国立卫生研究院临床试验中心进行注册。

Article information: <https://dx.doi.org/10.21037/tp-21-456>