

理论探讨

代谢组学与中医药现代研究

王桐生* 谢 鸣*

摘要 从代谢组学的技术特征出发,分析了代谢组学在中医证候模型复制、方药作用机制及中药安全性评价等领域应用的价值及可能性,认为代谢组学将成为中医药现代研究的重要技术方法。

主题词 代谢 @ 代谢组学

Metabonomics and Modern Study of Traditional Chinese Medicine

Wang Tongsheng, Xie Ming

(Department of Formulæology, Beijing University of TCM, Beijing 100029)

Abstract In this paper, from the technique characteristics of metabonomics, the author analyzed application value and possibility of metabonomics in replication of TCM syndrome models, mechanisms of formulae and evaluation of safety of Chinese medicine. It is believed that the metabonomics will become one of important techniques in modern researches of TCM.

Key Words Metabolism: @ metabonomics

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后,系统生物学的重要组成部分,是系统研究代谢产物的变化规律,揭示机体生命活动代谢本质的科学,具有整体动态、综合与分析等方法学特点,与中医的系统整体观相近。基因组学研究生物体在一定的病理生理条件下,基因表达谱的改变。但“沉默基因”及基因之间的互相调控,使得基因的“开”“关”与生物效应之间无直接联系,而且不能与生物体作用的靶点直接联系。蛋白质组学主要是针对细胞蛋白质的变化,进行半定量测定。但蛋白质组学也存在信号通路蛋白相互影响,靶位点难以确定等缺点。代谢组学则是一门在新陈代谢的动态过程中,系统研究代谢产物的变化规律,揭示机体生命活动代谢本质的科学^[1,2]。简而言之,基因组学和蛋白质组学告诉我们可能发生什么,而代谢组学则告诉我们已经发生了什么。细胞内的生命活动离不开物质代谢,而基因、蛋白质的生命调控效应最终也需落在代谢层面上,因此,代谢组学被认为是“组学”研究的最终方向。随着当代生物科学技术的飞速发展,中医药现代化研究正面临借鉴新观念和新技术,寻找合适的切入点,来促进自身发展的机遇。代谢组学将为中医药现代化研究提供一种非常有用的技术手段。

1 代谢组学与现代中医药研究结合的可能性

中医学重视诊疗中的整体观,强调辨证论治,在对

生命和疾病等问题的认识方面与西医学有着根本的区别。西医学在结构理论、理化性质、效用机制等方面强调原理清晰,对疾病的治疗针对性强,有着一定的优势;而中医药的成分多样性、治疗多靶点、多途径却正好与疾病的复杂性相一致。多年来,中医药现代研究,多遵循的是西医学理论框架,如选择单一的病理、生理、生化指标进行研究,忽略了中医药和西医学对疾病认识的不同;在中药方剂学研究方面,由于方剂配伍复杂、中药成分复杂,加之现有方法技术的局限,多沿袭化学药的研究模式,着重有效成分的分离提纯和结构的测定,忽略了方剂是一个非线性复杂体系,尤其是忽视了方药与病证二者之间的相互作用关系。许多中医药研究因缺乏中医理论的指导,难以取得突破性的进展^[3]。因此,中医药研究在理论和技术等方面迫切需要建立符合自身特点的研究方法。代谢组是反应机体状况的分子集合,所有对机体影响的因素如基因、环境、药物、营养、时间等均可反映在代谢组中,而且最终通过代谢组对表达施加影响。作为一种新发展的技术,代谢组学是通过考察生物体系受刺激或扰动后其代谢产物的变化,来研究生物体系代谢途径的一门科学。中医认为,“有诸内必形诸外”,传统上通过利用四诊方法获取患者信息,以揣推体内的变化,获得所谓病证本质的认识。代谢组学研究则是通过对体内、外的血液、尿液等成分的测定,通过与正常或比照的差异分析来了解体内的异常代谢状态。代谢组学在方法学上具有无创、在体、动态等特点,与中医学诊治中整体动态性原则具有很大的趋同性。其在思路,通过获取体内动态代谢

* 北京中医药大学方剂学学科,北京市朝阳区北三环东路 11 号 (100029)

收稿日期: 2006-03-28

变化的综合信息来了解其可能受影响的部位和环节,这与中医“据外揣内”有着很大的内在同一性。而且代谢组学所提供的新技术可以克服中医传统“四诊”方法的局限,为从生物代谢的视角认识中医药的现代内涵提供可靠依据。

近年来,生物科学技术以及相关学科的飞速发展正在为中医药现代研究提供技术平台,如生物芯片、蛋白组学、高通量筛选、血清药理等技术。但基因组学、蛋白组学存在上述的缺陷,血清药理学在方法学上还有待进一步论证。代谢组学作为一门科学新技术,则越来越受到重视。由于代谢组学关注的是各种代谢路径底物和产物的小分子代谢物($MW < 1kD$),反应细胞或组织在外界刺激或是遗传修饰下代谢应答的变化,包括糖、脂类、氨基酸、维生素等。特别是基于NMR技术的研究方法,并不需要进行样品的提纯,可以无损伤地监测组织代谢表达谱的改变,动态评估代谢信息,并在此基础上定位相应的靶组织、作用过程以及生物学标志^[4]。代谢组学无疑将成为适合现代中医药研究的重要技术手段之一。

2 代谢组学在中医药现代研究中的应用

2.1 代谢组学在中医证候模型复制中的应用:建立中医各种病症动物模型,是实现中医药客观化、规范化和科学化的重要环节。中医动物模型建立应在中医理论指导下,应用现代动物实验方法,模拟中医病因或发病学原理来实现,能否用科学、准确、量化的客观指标来表示中医证的内涵,是模型成立与否的关键之一。由于病因和病机复杂多样,选择某个或某几个相关性高、特异性强的实验室“金指标”目前仍很困难,而且有限的指标也不能真实表征动物模型的实质,从而限制了中医证动物模型的建立。代谢组学作为一种系统方法,能在模型复制方面发挥重要作用。首先通过NMR或GC-MS技术建立起生理状态下动物体液(尿液或血清)的“代谢指纹图谱”,通过主成分分析法(PCA)等识别模式,将分散在一组变量上的信息集中到几个主成分上,以主成分来描述数据集内部结构,并以主成分作图直观反应动物的代谢模式^[5]。在此基础上通过比较模型状态下动物体液代谢图谱,分析代谢模式差异性,有可能寻找到代谢网络缺陷的重要生物标志,作为该模型的评价标准,使动物模型的评价趋于全面客观。

2.2 代谢组学在方药作用机制研究中的应用:方剂是在辨证立法的基础上选药配伍组成的,是中医临床用药的主要形式和手段。方药作用机制的研究是阐明中医辨证论治原理和推进中医药现代化的重要部分,方剂配伍原理的揭示不仅为中医临床合理使用方药提供

理论支撑,而且为新药研发提供标准依据^[6]。方剂是多成分的复杂体系,人体是复杂的生命系统,这就决定了方剂的药效和作用机制具有复杂的非线性特征,表现出多成分、多层次、多靶点、多代谢途径的特点。因此,采用经典的药理学方法去研究方剂的作用机制,存在着一定的理论差距和现实的技术瓶颈,即使得出结论,其可信性也值得商榷。目前以方药的药效为线索,在有限器官、组织、细胞及分子不同水平上的个别指标的探测是难以阐明方药的复杂作用机制的。疾病总会在代谢、机能及形态方面出现异常改变,其中代谢作为机能和形态的基础,是多种疾病发生的重要环节,而中医方药疗效原理也必然会涉及到对代谢网络中的缺陷部分的调节或纠正。代谢组学作为一种系统方法,不仅研究药物本身的代谢变化,而且主要研究药物引起的内源性代谢物的变化,而内源性代谢物变化能直接反映体内生化过程和状态变化,通过检测获得体液的“代谢指纹图谱”和分析引起代谢谱变化的原因,可以探明药物作用的靶点。利用代谢组学的整体综合信息表征和分析探原的技术特点来研究方药的作用机制,即探察方药在代谢调控中所起的作用和如何起作用,并有可能阐明复方的多靶点、多层次的作用特点。在找到方剂的多靶点和多途径后,可结合基因组学和蛋白质组学等方法,探明其确切的作用机制,并在复方药味、部位以及成分群等不同层面上,研究其配伍与效用机制之间的关系,甚至有可能真正得到方药配伍与相关靶点相互作用的量效关系。

2.3 代谢组学在中药安全性评价中的应用:新药安全性评价的目的是提供新药对机体危害程度的科学依据,预测上市新药对人类的危害程度。传统的新药安全性评价是通过给一定数量的实验动物使用大剂量待测药物,观察其毒性特征,然后将实验结果外推到人群。然而这种方法存在着一定的缺点,如种属差异、实验周期长、费用昂贵等。中药具有有效毒二重性,长期对中药毒效关系的认识主要以经验为依据,近年来,中药的毒副作用开始引起人们的重视。代谢组学通过研究不同时间点的生物机体的体液,在毒性的“终点”位置分析代谢谱的改变,通过模式识别方法,确定毒性靶组织、毒性作用过程、机制以及生物标志物。可动态无伤害检测机体生物体液的代谢图谱的变化,动态评价药物毒性效应,其分析技术简便快捷^[7]。特别值得提出的是,中药的毒性不仅与药物自身性能有关,还涉及到其所作用的对象。应用代谢组学研究方法,探查比较方药对不同病证的作用差异,对于认识中医方药效、毒与病证的关系具有重要价值。

3 结语

进入后基因组时代后,代谢组学作为一门新技术在药物靶点的发现、新药的开发、毒理学研究、疾病的预防和诊断等方面的重要性越来越明显。尽管国内的代谢组学的研究刚刚起步,存在高分辨率仪器紧缺、代谢指纹图谱不完善、识别分析模式软件依赖进口等问题,但它无损害性、动态、高敏感性的分析特点,已显现出强劲的发展势头。同时代谢组学是一种较全面系统的研究技术,在方法学上具有融整体、动态、综合、分析于一体的特点,符合中医整体性原则。利用代谢组学技术,不仅能够对参与机体所有功能活动的成分进行检测,还可以对其作用的结果进行全面的综合分析,获得有关中医药原理或机制的深入理解。可以预见,代谢组

学将成为中医药现代研究的一种重要的技术手段

参考文献

- 1 刘昌孝.代谢组学的发展与药物研究开发.天津药学,2005,17(2): 1~6.
- 2 陈慧梅.代谢组学及其研究方法和应用.肾脏病与透析肾移植杂志,2005,14(1): 59~63.
- 3 何祥久,邱峰,姚新生.中药复方研究现状和思路.化学进展,2001,13(6): 481~485.
- 4 彭双清,廖明阳,颜贤忠.代谢组学方法的建立及其在药物安全评价中的应用.卫生毒理学杂志,2004,18(3): 185~187.
- 5 徐文,林东海,刘昌孝.代谢组学研究现状与展望.药科学报,2005,40(9): 769~774.
- 6 陈西平.复方研究的思路与方法浅析.中医药学刊,2003,21(11): 1850~1851.
- 7 朱勇飞,张天宝.代谢组学在毒理学研究中的应用.国外医学卫生学分册,2005,32(3): 156~159.

步长倍通丹红注射液对血小板膜糖蛋白的影响

邓 芬* 胡长林* 谢运兰*

血小板活化在脑缺血再灌注损伤越来越受到重视,可以通过检测血小板膜糖蛋白(CD41、CD62P)的表达来了解血小板活化状况。步长倍通丹红注射液为丹参与红花的复方制剂,有活血化瘀作用。我们运用流式细胞术检测 CD41、CD62P,探讨步长倍通丹红注射液对血小板活化的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物:清洁级昆明小鼠,体重 20~30g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物和试剂及仪器:步长倍通丹红注射液由济南步长制药有限公司生产的原液,经重庆中药研究院制备浓缩 10 倍的浓缩液, FITC 标记的 CD41 抗体、CD62P 抗体及阴性对照均为美国 Pharmingen 公司产品, PE 标记的 CD61 抗体购自美国 Ebioscience 公司, Calibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

2 方法

2.1 分组: (1)假手术组; (2)脑缺血再灌注对照组; (3)脑缺血再灌注步长倍通丹红注射液治疗组。

2.2 给药:治疗组按 2ml/kg 步长倍通丹红注射液浓缩液,对照组予等量生理盐水缺血再灌注后从腹腔内注射。

2.3 缺血再灌注模型制备:3%水合氯醛腹腔麻醉,取颈正中切口,分离双侧颈总动脉后,以丝线阻断双侧颈总动脉,确定无血流通,持续 20 分钟后恢复血流,假手术组不阻断血流。

2.4 标本采集:缺血再灌注后 3、6、12、24 小时迅速摘去眼球,采血 0.5ml (枸橼酸钠抗凝),低速离心 500r/min,分离富血小板血浆分别加入 FITC 标记的 CD41 抗体、CD62P 抗体和阴性对照 (FITC 标记的同型对照) 各 2 μ l,再加入 PE 标记的 CD61

抗体 2 μ l, PBS 洗涤 2 次,孵育半小时,上机检测。

3 结果

各组对 CD41 表达的影响:治疗组与对照组缺血再灌注 3~6 小时血小板膜糖蛋白 CD41 表达水平相似,无统计学差异 ($P>0.05$)。治疗组缺血再灌注 12 小时、24 小时 CD41 表达低于对照组,有统计学差异 ($P<0.05$)。相关资料略。

各组对 CD62P 表达的影响:缺血再灌注 3 小时后治疗组与对照组 CD62P 表达水平均高于假手术组,有统计学意义 ($P<0.05$)。12 小时达高峰,再逐渐下降,治疗组缺血再灌注 6~24 小时 CD62P 表达明显低于对照组,有统计学意义 ($P<0.05$)。其余时间点 CD62P 表达两组无统计学差异 ($P>0.05$)。相关资料略。

4 讨论

研究认为,丹参酚酸和红花有抑制血小板黏附、聚集、激活的作用,以及能抗血栓形成、改善微循环等作用。步长倍通丹红注射液为中药丹参、红花提取的复方制剂,其抗血小板作用可能是多途径,抑制 ADP 诱发通路,抑制 TXB₂ 系统,或抑制血小板释放反应等。限于经费,其它的项目未进行研究。本研究主要的目的是探讨步长倍通丹红注射液对血小板膜糖蛋白表达的影响。因此选用 CD41、CD62P 单抗进行全血法流式细胞术,检测治疗前后血小板膜糖蛋白的表达情况。通过对照研究发现,缺血再灌注后 CD41 及 CD62P 表达均升高,引起血小板活化。而步长倍通丹红注射液在治疗后 12 小时开始降低血小板膜糖蛋白 CD41 表达,在 6 小时后开始降低 CD62P 表达。说明该药可以抑制血小板的活化,减少 GPII b/IIIa 受体的激活,从而减少血小板聚集,有效改善脑血流。通过本实验可以看出,步长倍通丹红注射液对血小板膜糖蛋白有影响,但是否存在对血小板膜糖蛋白及 GPII b/IIIa 受体一种反馈性抑制,值得继续深入研究。

* 重庆医科大学附属第二医院神经病学研究室,重庆市渝中区临江路 76 号 (400010)

收稿日期:2006-04-28