

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2015.08.020

综 述

应用代谢组学阐释寒热虚实证的研究概况

郑玲玲¹, 杜武勋^{2*}, 袁宏伟², 朱明丹², 蒋璐¹, 佟颖¹

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津市南开区鞍山西道 312 号, 300193; 2. 天津中医药大学第二附属医院)

摘要 寒热虚实是八纲辨证中最基本、最重要的宏观病性概念。基于寒热虚实指导下的病证结合模式, 提纲挈领地中西医结合诊断、治疗提供了思路。对应用代谢组学技术在中医寒热证、虚实证本质方面的研究进行阐述, 提示中医学整体、宏观的辨证体系与具有系统性、动态性的代谢组学具有内在相通性, 可为病证结合的具体诊疗模式提供可行性依据。

关键词 代谢组学; 八纲辨证; 寒证; 热证; 虚证; 实证

八纲辨证是中医辨证体系中的重要组成部分, 寒热虚实是八纲辨证中宏观病性的总纲, 是对人体整体机能状态的认识和分类。20 世纪以来, 研究者通过借助不同的技术平台, 对八纲辨证内具有寒热虚实对比属性的研究进行了诸多研究。代谢组学是系统生物学中的一个重要分支, 其传递机体生物表型信息, 可用以解读中医寒热虚实证本质。

1 寒热虚实——辨证的病性总纲

《黄帝内经》建立了八纲理论的雏形, 其文曰: “调气之方, 必别阴阳, 定其中外, 各守其乡。内者内治, 外者外治, 微者调之, 其次平之, 盛者夺之, 汗者下之, 寒热温凉, 衰之以属, 随其攸利, 谨道如法, 万举万全, 气血正平, 长有天命。”张景岳提出“二纲六变”说, 即“阴阳为医道之纲领”, “凡诊病施治, 必须先审阴阳”; “六变者, 表、里、寒、热、虚、实也, 是即医中之关键, 明此六者, 万病皆指诸掌矣”。程钟龄《医学心悟》云: “病有总要, 寒、热、虚、实、表、里、阴、阳八字而已。病情既不外此, 则辨证之法亦不出此。”将八纲理论冠之以正名的是祝味菊, 其在《伤寒质难》中说: “夫病变万端, 大致不出八纲范围, 明八纲, 则施治有所遵循, 此亦执简御繁之道也”^[1]。阴阳不仅为八纲中哲学层次的概

念, 且为类证的纲领, 其余六纲则为其衍生。表里是针对病变部位的笼统概括, 其外延尚有争议^[2]。

《素问·调经论》云: “阳虚则外寒, 阴虚则内热”; 《素问·阴阳应象大论》云: “阳胜则热, 阴胜则寒”; 张景岳认为, “寒热者, 阴阳之化也”。可见中医临证须辨寒热, 而寒热乃阴阳之盛衰。《素问·通评虚实论》提出“邪气盛则实, 精气夺则虚”, 说明虚实是从正邪交争看人体正气的虚实与多寡。寒热——阴阳盛衰, 虚实——邪正盛衰, 两者是疾病过程的根本矛盾, 分辨疾病过程中的邪正虚实、阴阳盛衰是辨证的根本要求。后世辨证多是在寒热虚实辨证的基础上, 结合脏腑、气血、六经、三焦等病位诊断, 再组合和发挥, 但无论如何组合, 其分型总不离寒热虚实, 故寒热虚实是中医辨证中最重要、最基本的病性概念。

寒热虚实的产生取决于病邪性质和机体正气阴阳盛衰。然而古人没有关于正气的微观概念和病理解剖认识, 只能从整体或局部的宏观功能状态判断。现代医学的代谢低下必然属虚, 但亢进未必属实, 因为实不是对正气的判断。另外, 寒证、热证的指标是同类指标的两极值, 虚实、寒热虽是内含和外延都对等的二分法, 但寒热虚实处在相互联系的矛盾、变动之中, 彼此之间尚有过渡的中间阶段, 表现为寒热错杂、虚实夹杂等, 实际上对于证的确立是多极的, 主要矛盾仍是辨证的主要突破口, 对寒热虚实病性的判断是决定中医治疗大法的准则。

基金项目: 2012 年度高等学校博士学科点专项科研基金 (20121210110009)

* 通讯作者: enduwux@163.com

2 病证结合——中西医结合诊疗模式

“证”是判断疾病性质的各种证据,即非单一证据,应为证据集合体,是对疾病发展到某一阶段的病因、病位、病性、正邪关系及病势等的高度概括,其病理具有多维特性,反映疾病本质的阶段性诊断。“病”则是对疾病全过程的特点与规律所作的概括。古人尚不能全面地认识疾病的病因,故中医轻病因、重辨证。中医对病因重视不足,并常将其与病机、病性等混淆,在一定程度上影响了对病因的理解与运用,故中医的辨证尚需包含审因、辨证和辨病,辨病是深层次辨别症、证的特异性,且能明确治疗靶点,使治疗更具有针对性^[3]。“辨病而不辨证”或“辨证忽视辨病”都不能更好地诠释疾病。这是中西医理论思维反差的结果所在:西医学单纯还原分析,不适合解读中医药复杂的理论体系;同时中医药认识疾病的方法、理论均缺乏合适的现代科学表达体系,目前仍是一种不能与现代医学相通的“语言”。利用现代医学诊病与中医辨证相结合的病证结合诊病模式已得到认可,已成为临床实践中中西医结合医学的主要模式^[4-5]。

3 代谢组学——复杂体系整体的认识手段

代谢组学是指在新陈代谢的动态进程中,系统研究代谢产物的变化规律,揭示机体生命活动的代谢本质。代谢组学强调把人体作为一个完整的系统来研究,通过测定人体各种体液内代谢物的组成变化来认识和反映人体代谢网络在疾病和药物影响下的代谢模式^[6]。其研究任务是通过检测并量化生物体内代谢物在外界环境影响(疾病、药物治疗)下的变化,并确定此种变化的机制(发病机制、药物治疗机制)。目前代谢组学研究的高通量技术主要有气相色谱-质谱联用技术(GC/MS)、液相色谱-质谱联用技术(LC/MS)和核磁共振技术(¹H-NMR)。代谢组学主要通过尿液、血清、唾液及细胞提取物、培养液等研究代谢路径的底物和产物的小分子代谢物,其代谢物的检测、分析和鉴定是代谢组学技术的核心部分。代谢组学采用的是“自上而下”式的研究方法,对代谢的终端产物进行多元化综合分析,从整体上展示生物体内在的变化状态,避免了以往采用单一指标或少数几个指标研究某种病理和生理变化的弊端^[7]。

代谢组反映的是人体生化网络对所有扰动因素进行应答和变化的终端信息,可能更接近于中医“证”的信息。通过化学计量学方法可以挖掘出某

一病证相关的特定共性组分(群),对证加以量化,做到宏观(证)与微观(生物标记物群)的结合,从而提高辨证论治的科学化、定量化和客观化。较之通过流行病学方法及专家的经验打分等半定量的“辨证”,代谢组学具备的高分辨率和重现性,可为稳定和可信的辨证提供依据。所以代谢组学成为沟通还原论为主的西医与整体论为主的中医两者之间的共同语言。

宏观证的研究从寒热证候、虚实证候等简单、相反的基本证候入手,由浅入深可逐步推进^[8]。在寒热虚实的宏观中医理论指导下,从病证结合为观察点的狭义病理学概念出发,运用代谢组学探究疾病状态下的寒热虚实证候群与病理及代谢的联系,以期对临床的疾病寒热虚实证做进一步的验证。

4 病证结合下寒热证的代谢组学研究

Miao 等^[9]应用气相色谱-飞行时间质谱联用技术(GC-TOF/MS)、超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱技术(UPLC-Q/TOF)检测 4 种关节炎患者的血清,发现一组由 6 种代谢物组成的生物标志物可以作为关节炎性疾病的共同代谢标志,它们共同的代谢缺陷标志分子涉及的通路以丙酮酸-乳酸代谢通路为核心,表明缺氧状态下亢进的能量代谢是关节炎症、关节损害的共同病理基础。同时该研究也找到每种疾病的特异性代谢物谱,应用这些特征性代谢标志物,可以对疾病的早期准确诊断及鉴别诊断提供依据。另有研究者^[10]借助质谱(MS)方法,取类风湿性关节炎寒证与热证患者血清,通过偏最小二乘法显著性分析,确定 7 个能够区分寒热证的潜在生物标记物,即 3-氧-丙酸、L-脯氨酸、5-氧-脯氨酸、尿素、核糖醇、纤维醇、L-亮氨酸,其中前 6 个标记物为热证上调, L-亮氨酸为寒证上调。热证 L-脯氨酸和 5-氧-脯氨酸上调,表明热证与寒证相比有更多的胶原蛋白降解; L-亮氨酸在寒证中上调,说明机体处于寒证时,蛋白质的合成较其分解更甚。可见机体热证与寒证呈现相反的蛋白质代谢过程,类风湿性关节炎的寒热证候代谢谱均具有各自生理特征,利用代谢组学方法可以找到具有寒热差异的潜在生物标记物,为临床分型提供可靠依据。此外,汪江山等^[11]采用正交滤波并结合偏最小二乘判别分析,可以明显区分类风湿关节炎的不同病程(稳定期与活动期)以及寒证与热证。Wu 等^[12]构筑寒证、热证生物分子网络,并通过寒热性方剂治疗,以基于逆转神经内分泌免

疫因子参与的免疫应答网络失衡以及能量代谢紊乱, 阐释寒热证的内在实质。

5 病证结合下虚实证的代谢组学研究

近年多有学者对脾阳虚、肾阳虚证有关的代谢组学进行研究, 如施旭光等^[13-15]在利血平致大鼠脾阳虚证的¹H-NMR 代谢组学研究中, 从血清和尿液中分别鉴定出相关标志物, 发现脾阳虚大鼠机体糖代谢、脂质代谢、氨基酸代谢和氮代谢紊乱; 邹忠杰等^[16]利用¹H-NMR 分析氢化可的松诱导肾阳虚大鼠的尿液, 发现肾阳虚大鼠机体肠道菌群受到扰动、能量代谢紊乱、甲基转移反应被抑制, 且氨转运功能亦受阻; 龚梦鹃等^[17]基于¹H-NMR 血清的研究结果则与上述结果大致吻合。Lu 等^[18]通过超高效液相色谱质谱仪 (UPLC/MS) 检测大鼠尿液, 确立上述相关代谢通路的 8 个标志物; Huang 等^[19]则利用超高压液相色谱质谱仪 (HPLC/MS) 进一步对肾阳虚大鼠血清、尿液进行检测, 两者互相补充, 证实了肾阳虚大鼠血清和尿中的丙氨酸、溶血卵磷脂、色氨酸、胆汁酸等均增高, 尿液中的 α -酮戊二酸、柠檬酸盐和肌酐降低, 提示肾阳虚与能量代谢紊乱密切相关。董飞侠等^[20]采用 GC-MS 分析肾阳虚证与非肾阳虚证患者, 发现了 25 个差异代谢物排序, 经鉴定分别为丙氨酸、脯氨酸、胺基丙二酸二乙酯、马尿酸、柠檬酸和组胺等物质, 明确与能量代谢、脯氨酸、精氨酸等代谢途径有关, 能够很好地区分阳虚和非阳虚的差异性。结合不同学者的研究, 通过对脾阳虚、肾阳虚证大鼠及人的代谢物比较, 可见脾阳虚、肾阳虚证均可影响到能量代谢、糖代谢、脂质代谢、氨基酸代谢等; 肾阳虚证尚与肠道菌群受到扰动、甲基转移反应被抑制以及氨转运功能受阻有关。至于影响程度、区别度尚待考证, 且规范的病证结合动物模型尚未建立, 动物与人的桥接物质等尚不明朗。

研究中不乏病证结合下虚实证的鲜明对照, 如徐丁洁^[21]采用 GC-TOF/MS 结合多维统计方法比较痛经实寒组、虚寒组患者与正常组的尿液代谢物, 发现内源性差异代谢产物涉及到糖代谢、氨基酸代谢、脂酸代谢及肠道微生物菌群, 实寒组与正常组之间差异代谢物有葡萄糖、果糖、木糖醇、半乳糖等共 8 种, 虚寒组只有乳酸升高, 其余则降低, 提示实寒证与虚寒证在代谢组方面的主要差异为糖代谢。此外, 实寒组的线粒体损伤较轻微, 虚寒组的线粒体损伤明显, 两者均存在能量代谢障碍, 且寒

证的发生与神经-内分泌-免疫网络密切相关, 两组前期均以亢进为主, 实寒组逐渐适应建立新平衡, 虚寒组则最终出现衰竭导致机体免疫低下及病理性损伤。Sun 等^[22]以慢性乙型肝炎为切入点, 利用 GC-MS 结合主成分分析法 (PCA) 分析虚实证存在的物质内涵, 结果显示, 实证和虚证患者血清中分别有 22 个、17 个不同的代谢产物, 利用受试者工作特征曲线图 (ROC) 可敏感地检测木吡喃糖苷并可用以特异地诊断虚证, 而实证中核糖酸、尿酸、d-核糖、环己酮升高, 说明虚实证代谢通路有差异和交汇, 两者差异结合临床症状得以区分, 且实证较虚证患者有更强的解毒能力。这一结果对阐述慢性乙型肝炎虚实分类的不同发病机制有重要意义。Wu 等^[23]运用 GC-MS 结合基于核函数的正交投影潜结构方法 (K-OPLS) 对 366 例糖尿病患者尿糖与健康者进行对比, 发现糖尿病患者糖酵解过程中, 包括肌醇 D、C4 糖 2 等四种中间物质较健康者升高, 提示它们可能是糖尿病的生物标志物; 而实证的木糖和 C4 糖 2 高于虚证, 可为糖尿病虚实证型分类的补充。另外, Xu 等^[24]的研究显示, 高效液相色谱法 (HPLC) 结合非相关线性判别分析方法可找寻糖尿病 3 个证型即气虚、气阴两虚和湿热证中的不同生物标志物。

6 讨论

总之, 中医寒热虚实证是对机体宏观病性的综合判断, 与代谢组学的系统论、整体观不谋而合, 两者共同研究病证结合下的寒热虚实证实质有可取之处。结合以上相关病证回归到生化代谢通路, 虚证较实证存在更严重的能量代谢紊乱, 寒证较热证存在较为严重的能量代谢不足。但基于中医宏观辨证思维特色, 寒热虚实证的代谢组学分析尚不够系统, 且大多比较分散。另外, 可能存在的问题是, 得到的生物标志物可能与疾病关系不大, 而是一些其他潜在混杂变量的影响^[25]。因此, 为避免理论研究和临床实践的脱节, 基于中医寒热虚实证候研究下的病证结合需要具有较强的针对性和可重复性, 即针对评价潜在生物标志物的一个重要标准是需要经过多次实验, 才能评价这些生物标志物与疾病结果是否有显著并持续一致的关联。

代谢组学可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寒热虚实证的现代内涵提供可靠的依据。但中医药目前的疾病分型尚未统一, 不仅需要从疾病的病理特征出发, 考虑在寒热虚实对比属性内的证分型, 尚需在临床中找寻与之

相结合的药性寒热属性的“共性”规律^[26-27]，以及药物对机体补虚泻实代谢层面的研究。其次，代谢组学标志物群尚不能全面、精确地就病证结合下的寒热虚实证做一诊断，故需建立一套整合的生物标志物体系，包括中医证候生物标志物群、影像学标志物及临床生化指标系统等宏观、微观层面，通过与各种临床病证的相关性研究，以期全面、准确地应用于多因素、复杂性疾病的寒热虚实证实质研究中。

参考文献

- [1] 祝味菊. 伤寒质难 [M]. 北京:学苑出版社, 2011:126.
- [2] 陈建国, 马家驹, 陶有强. 八纲来源于《黄帝内经》 [J]. 中医杂志, 2011, 52(9):804-806.
- [3] 全小林. 论辨证、辨病、审因与辨证论治在临床中的应用 [J]. 中医杂志, 2013, 54(2):93-95.
- [4] 杜武勋, 朱明丹, 袁宏伟, 等. 构建现代医学疾病诊断中医辨证的病证结合诊治模式的必要性与设想 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(3):387-390.
- [5] 徐璠, 许朝霞, 王又闻, 等. 基于病证结合的中医证候规范化研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1):14-16.
- [6] 黄晓晨, 宿树兰, 郭建明, 等. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考 [J]. 中草药, 2014, 45(2):147-153.
- [7] Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC, et al. The challenges of modeling mammalian biocomplexity [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(10):1268-1274.
- [8] 张静, 刘龙, 颜新, 等. 中医证本质研究与代谢组学技术:现状与思考 [J]. 中西医结合学报, 2012, 10(10):1069-1071.
- [9] Miao J, Tianlu C, Hui F, et al. Serum metabolic signatures of four types of human arthritis [J]. J Proteom Res, 2013, 12(8):3769-3779.
- [10] 吕诚. 类风湿关节炎寒热证候分类的系统生物学基础 [D]. 北京:中国中医科学院, 2010.
- [11] 汪江山, 赵欣捷, 尹沛源, 等. 类风湿性关节炎疾病分型的血浆代谢组学研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2009, 11(1):201-205.
- [12] Wu X, Jiang R, Zhang MQ, et al. Network-based global inference of human disease genes [J]. Mol Syst Biol, 2008, 4:189. doi: 10.1038/msb.2008.27.
- [13] 施旭光, 吴美音, 黄曼婷, 等. 基于代谢组学的补中益气汤“益气升阳”配伍机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1):103-106.
- [14] 邹忠杰, 施旭光, 龚梦鹃, 等. 利血平所致大鼠脾虚证代谢组学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3):291-294.
- [15] Zheng XF, Tian JS, Liu P, et al. Analysis of the restorative effect of Bu-zhong-yi-qi-tang in the spleen-qi deficiency rat model using 1H-NMR-based metabolomics [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(2):912-920.
- [16] 邹忠杰, 龚梦鹃, 谢媛媛, 等. 氢化可的松诱导的肾阳虚大鼠尿液代谢组学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8):135-136.
- [17] 龚梦鹃, 叶文华, 谢媛媛, 等. 巴戟天补肾阳作用的血清代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11):1682-1685.
- [18] Lu XM, Xiong ZL, Li JJ, et al. Metabonomic study on Kidney-Yang Deficiency syndrome and intervention effects of Rhizoma Drynariae extracts in rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. Talanta, 2011, 83(3):700-708.
- [19] Huang D, Yang J, Lu X, et al. An integrated plasma and urinary metabolomic study using UHPLC-MS: Intervention effects of Epimedium koreanum on ‘Kidney-Yang Deficiency syndrome’ rats [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 76:200-206.
- [20] 董飞侠, 黄迪, 何立群, 等. III 期慢性肾病肾阳虚证患者尿液代谢组学特征的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(12):1109-1112.
- [21] 徐丁洁. 妇科实寒症与虚寒证代谢组学及证候形成过程中相关网络调控的比较研究 [D]. 石家庄:河北医科大学, 2012.
- [22] Sun S, Dai J, Fang J, Gou X, et al. Differences of Excess and deficiency zheng in patients with chronic hepatitis B by urinary metabolomics [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013:738245. doi: 10.1155/2013/738245.
- [23] Wu T, Yang M, Wei HF, et al. Application of metabolomics in traditional Chinese medicine differentiation of deficiency and excess syndromes in patients with diabetes mellitus [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012:968083. doi: 10.1155/2012/968083.
- [24] Xu W, Zhang L, Huang Y, et al. Discrimination of type 2 diabetes mellitus corresponding to different traditional Chinese medicine syndromes based on plasma fatty acid profiles and chemometric methods [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(2):463-468.
- [25] 洪静, 李福凤, 王忆勤. 代谢组学在中医证候本质研究中的应用概况 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1):149-151.
- [26] 肖小河, 郭玉明, 王伽伯, 等. 基于传统功效的中药寒热药性研究策略 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(1):9-15.
- [27] 姜森, 吕爱平. 基于药物生物效应的中药寒热属性分类研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11):2149-2152.

(收稿日期:2014-10-16;修回日期:2014-12-19)

编辑:崔京艳