

代谢组学在中医药领域的应用

张建平¹ 朱明丹¹ 张少强² 杜武勋^{1*} 刘长玉¹ 姜 民³

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津市河北区真理道816号, 300151;

2. 天津中医药大学; 3. 天津南开大学药学院博士后)

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划面上项目(90709003)

* 通讯作者: zhmd_2005@163.com

[摘要] 代谢组学是研究机体代谢网络和代谢产物与机体所处环境之间联系的重要方法, 与中医药的基本理论和诊疗思维有异曲同工之处, 为研究复杂的中医理论和中医药的现代化提供了新的思路和研究平台。目前采用代谢组学技术研究中药、中医理论的工作正在开展, 有望在中医药研究领域取得新的突破。

[关键词] 代谢组学; 证候; 中药

代谢组学是后基因时代出现的一门新兴“组学”学科, 该学科能用反映整体的代谢物图, 直接认识生理和生化状态。代谢组学是新药研究开发的重要组成部分, 该学科的应用范围涵盖了新生物标志物的发现、新药筛选、安全性实验等领域。在现代中药研究中, 代谢组学在药物有效性和安全性、中药资源和质量控制研究等方面具有重要的理论意义和应用价值^[1]。代谢产物是反映机体状况的最佳途径, 也是最终效应的表现形式, 这与中医的理论精髓有很多相似之处, 因此, 采用代谢组学技术对中医药基础理论与作用机制进行研究有望突破传统, 加快中医药研究的现代化进程^[2]。

1 代谢组学的基本思想

任何外源物质、病理生理变化或遗传变异的作用都会反映到各种生物学途径上, 对内源性代谢物质的稳态平衡产生干扰, 从而使内源代谢物中的各种物质的浓度和比例发生变化。代谢组学就是关于生物体系代谢物质种类、数量及其变化规律的科学, 是研究生物整体、系统和器官的代谢物质及其与内在或外在因素的相互作用。代谢组学研究步骤包括: 样品制备、代谢产物分离、数据分析和模型建立4个部分。其研究样品主要是尿液、血浆、血清、唾液, 以及细胞和组织的提取液。主要技术手段是核磁共振(NMR)、液-质联用(HPLC-MS)、气-质联用(GS-MS)和色谱(HPLC)等。其通常涵盖以下几个层次: ①代谢靶标分析; ②代谢轮廓分析; ③代谢指纹图谱分析和代谢组学分析^[3]。代谢组学、基因组学和蛋白质组学等同是系统生物学的重要组成部分。外源性物质作用于人体后, 应激性地导致基因转录和翻译,

蛋白质表达和合成, 继而代谢终产物生成等一系列变化。可见代谢物组变化是生物过程的最终结果, 同时代谢组学研究对象的易得性, 大大提升了其研究价值, 所以“基因组学和蛋白质组学告诉你可能发生了什么, 而代谢组学则告诉你发生了什么”^[4]。说明代谢组学处于系统生物学与其他组学相联系的枢纽位置。

2 代谢组学对中医药研究的适用性及其重要意义

2.1 代谢组学对中医药研究的适用性

代谢组学技术, 尤其是其越来越被广泛使用的NMR技术, 由于它能够对活体内外的非损伤组织与器官进行无损伤性、几乎接近生理条件的动态研究, 使得“司外揣内”的中医发现了一种崭新的适合自己理论体系的观察方法。同时代谢组学研究的思想, 不仅仅把人作为一个孤立的体系, 而是把人与环境(地理的、社会的)、人与肠道菌群之间的相互作用加以综合考虑^[5]。这种思想与传统中医药强调人与社会环境的整体观, 四时和饮食对人的影响, 辨证施治等思想是十分契合的。

2.2 证的概述

2.2.1 证的相关概念 证是机体在疾病发展过程中的某一阶段的病理概括。它包括了病位、病因、病性以及正邪关系, 反映的是疾病发展过程中某一阶段的病理变化的本质, 因而它比症状更全面、更深刻、更正确地揭示了疾病的本质^[6]。辨证就是采用望、闻、问、切四诊方法, 来收集患者病因、病状、病性等信息, 结合地理环境、季节气候及患者的年龄、性别、职业、饮食、禀赋等情况, 依据不同的辨证纲领(八纲、六经、三焦、卫气营血、脏腑、气血、津液辨

证),判断之为某种证^[7]。证实际上是外在疾病征象的某种排列组合,是症状和体征的集合。

2.2.2 证的现代科学内涵认识 证的物质基础应是一组相关物质,而非单一特异性物质^[8]。这些物质决定着证的发生发展之动态变化过程,是在证的发生发展过程中产生的特殊物质群^[9]。根据推断证的物质基础不会集中在某一脏器,更不会是单一的特异性物质。所以证本质的研究归根结底也就是探寻证物质基础的研究。从代谢组学的观点而言,证很可能是人体代谢网络功能发生变化后的一种特异生理病理状态,或者两者有某种对应关系。

2.3 代谢组学与中医证的相通之处

2.3.1 操作对象 两者均以有机的整体为操作对象,而非某个独立的系统或脏器。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机体、组织、细胞在内在或外在因素影响下代谢应答的变化,从而准确反映机体的状态。而中医证表现的是致病因素及机体反应的综合情况,两者皆从机体整体变化的角度进行分析。代谢组学更是与中医学的整体观念、系统观念甚至辨证论治思维非常吻合,也与中医重视从人与自然、人与社会和人体内在的普遍联系和动态变化去分析、认识、把握疾病发生、发展、变化的客观规律的认识相一致。

2.3.2 分析方法 代谢组学与中医证均是对多因素进行整体分析。代谢组学研究的是生命个体对外源性物质(药物或毒物)的刺激、环境变化或遗传修饰所做出的所有代谢应答的全貌和动态变化过程,真实地反映人体内网络交叉的生理、生化调节和影响过程,并非仅仅指某一代谢产物。而中医的证是致病因素作用机体后的综合表现,包括了病因、病性、病势、病位、病理等多个内容,与生物体对各种内、外因反应后产生的多项代谢物有相似性。

2.3.3 自身特征即时性、差异性^[8] 证的本质是对疾病过程中所处一定阶段的病位、病因、性质以及病势等所作的病理性概括,是对致病因素与机体反应性两方面情况的综合,是对疾病当前本质的结论。不难看出,证有着即时性,代谢组学得出的生物学信息同样具有即时性。证不仅对疾病中致病因素这一共性有深刻的认识,更注重不同机体的反应性,相对现代医学同一疾病、同一病程,中医学会有不同的辨证。代谢组学也认识到这种个体差异,这种差异反映在不同个体之间及相同个体的不同时段,在寻找共

性的同时,又重视这些差异,为治疗的个体化提供线索。

2.3.4 思维模式为黑箱理论 代谢组学倾向于生物体一系列事件的最终结果,而不关注机体受到各种外界因素影响后遗传物质、蛋白质发生变化的细节及对机体代谢网络的调控。中医证中反映的正是经典的藏象学说,“藏”是藏于体内的脏腑,居于体内,外不可见;“象”是形见于外的生理病理现象,流露于外,是可见的表现、可预测的征兆。它研究的是内在的生命本质与外在现象的关系,揭示脏腑与形体诸窍、自然环境的关系^[10]。综上所述,中医是通过望、闻、问、切四诊方法,形成对疾病本质的认识,而对证作出判断,依据的是“有诸于内,必形诸外”的思想。而代谢组学通过代谢组取生物体整体功能状态的生化表型,来对当下所处的病理状态进行认识,代谢组具有内的特性。因此,中医证对疾病的描述与代谢组学对疾病的认识具有内在本质的相通性。

3 代谢组学在中医药领域的应用前景

3.1 评价中药药效

代谢组学已经被应用于评价实验动物或临床患者对外源性刺激(药物)所产生的一系列代谢过程、作用机制和靶器官效应等方面。将代谢组学技术应用到中药的整体药效评价、作用机制及药物在体内的代谢指纹图谱研究,不仅可监测药物本身在体内的代谢变化过程,更重要的是可以通过观察药物所引起的内源性代谢物的变化,推测体内生化过程和状态的变化,进而推断中药的作用机制,利用代谢物的终端性信息,寻找或阐明药物作用的靶点或受体。王喜军等^[11]研究了茵陈蒿汤干预 CCl₄ 诱导肝损伤大鼠的尿液代谢表型变化,观察其代谢组的回调趋势,借助超高压液相色谱串联飞行时间质谱仪分析系统和主成分分析方法,明晰表征大鼠肝损伤的5个内源性生物标记物,并结合系统生物学的理论还原肝损伤的机制和实质,以及茵陈蒿汤对肝损伤的防治机理,从代谢组学角度对经典方剂防治肝损伤给出全新解释。Li 等^[12]采用 UPLC/MS 结合多元统计分析方法对补肾中药淫羊藿的药效物质组学及其对氢化可的松诱导的肾虚证大鼠代谢物谱的影响进行了初步研究。通过比较正常组、模型组及淫羊藿醇提取物给药组大鼠的血清及尿样的代谢谱,发现淫羊藿苷和朝藿定 C 可能为淫羊藿的主要药效物质基础。进而对大鼠体内基础代谢物谱、肾阳虚大鼠代谢物谱及给淫羊藿后大鼠体内代谢物谱进行比较研

究,寻找与肾虚大鼠相关的生物标记物,发现淫羊藿可使肾虚大鼠代谢网络得以修复,由此探讨了淫羊藿补肾作用的机制及药效物质。

3.2 筛选中药种质资源

生物的个体特征除取决于先天遗传因素外,还受其生存环境的诸多影响,这些内外因素决定了生物个体的总体特征——代谢表型。应用代谢组学技术研究中草药种质资源代谢表型,将为中药资源的可持续发展和利用提供科学根据和保障。齐炼文等^[4]把植物不同生长期含有的不同化学物质作为一个整体,应用代谢组学技术对药材的整体代谢物组进行考查,用于评价药材的质量,因此,代谢组学技术在药用植物(中药)研究中有巨大的潜在应用价值。对有重要药用价值的植物,如人参、红豆杉、长春花等进行代谢组学研究,将4种组学相互结合,将基因蛋白代谢物联系成为一个有机体,相信会将药用植物研究提升到一个前所未有的深度,也为真正深入研究植物代谢途径和关键调控位点,进一步开发利用药用植物提供了一种全新的宏观研究方法。Murch 等^[13]采用 HPLC-MS 对黄芩代谢成分进行研究,发现了2000个成分,对其中的781个成分进行鉴定,从而为筛选、评价优良品种建立了筛选模型。Kim 等^[14]对3种不同种属麻黄植物进行了核磁氢谱指纹图谱分析,通过主成分分析找到了其间的代谢物差异,证明指纹图谱分析是植物化学分类学的一个有力工具,并为其全面质量控制带来了可能。

3.3 中药安全性在代谢组学中的评价

1993年 Vanherweghem 等报道^[15],一些年轻妇女服用了含广防己、厚朴、关木通等中草药成分的减肥药后出现慢性肾功能衰竭,组织形态学主要表现为“进展性间质纤维化”,并称之为“中草药肾病”(Chinese herb nephropathy, CHN),随后国内外学者开始关注 CHN。后有学者提出 CHN 的主要成因是患者服用了含有马兜铃酸(aristolochic acid)成分的中草药,因此,冠名为“马兜铃酸肾病”(aristolochic acid nephropathy, AAN)。国内外有关中草药不良反应的报道,使中药安全性问题在国际上引起了重视。中药成分复杂,具有多靶点交叉作用的特点,在毒性的发生上有时难以用单一器官或组织的毒性反应来评价。应用代谢组学的方法研究不同时间点生物体液,在毒性的“终点”位置分析代谢谱的改变,可动态无伤害地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。樊夏雷

等^[16]开展了基于 GC/TOF/MS 的关木通肾毒性代谢组学研究,关木通给药后,利用 GC/TOF/MS 及模式识别技术为核心的代谢组学方法对尿样及血浆样品进行研究。结果表明,给药后2d、4d 大鼠尿液及血浆中代谢组水平与给药前产生明显变化,内源性代谢产物谱随时间动态变化明显,能够区分出各自的变化趋势,表现出毒性发生、发展的动态过程。李建新等^[17]以生物核磁共振结合模式识别技术和主成分分析法探讨雷公藤甲素口服给药对大鼠尿液内源性代谢产物的影响,结果发现,大鼠尿液的代谢物谱与雷公藤甲素对肾脏造成损害作用密切相关。代谢组学已经作为一种独立的技术被广泛地应用于候选药物的毒性评价。美国食品与药品管理局(FDA)已经接受代谢组学研究的结果作为新药申报和注册的重要参考指标。代谢组学可以早期诊断或预测毒性的出现,监测尚未引起组织病理学变化的毒性,减少药物不良反应的发生率,具有临床应用潜力。

4 结语

中医药现代化,一个亟待解决的问题是建立能体现中医药自身特点和优势,同时又能被国际医学界接受的疗效评价和机制研究方法。代谢组学是20世纪90年代中期发展起来的一门新兴学科,与中医学在许多方面有着相近的属性,如果把它们有机结合起来研究将是一件非常有意义的工作。中医药现代化研究与以代谢组学为核心的系统生物学的结合将是一个创造性的、并可能引领中医药走向世界的重要方向。

参考文献

- [1] 刘昌孝. 代谢组学助推中药现代研究[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(6): 1.
- [2] Wang M, Larmers RJ, Korthout HA, et al. Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology[J]. *Phytother Res*, 2005, 19(3): 173-182.
- [3] 吴泽明, 孙晖, 吕海涛, 等. 代谢组学研究进展及其在中医药研究中的应用展望[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2007, 9(2): 99.
- [4] 齐炼文, 李萍, 赵静. 代谢组学与中医药现代化[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(6): 79.
- [5] Nicholson JK, Wilson ID. Opinion: understanding 'Global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(8): 668-678.
- [6] 邓铁涛. 辨证论治[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(9): 1-3.

丘老师喜运用《医宗己任篇》之滋水清肝饮加减治疗,方中生地黄、山药、山茱萸为“三补”,滋补肝肾之阳以滋水涵木;当归、白芍养血柔肝;柴胡疏肝,牡丹皮、栀子清泻肝火,泽泻泻下焦之阴火,养、清、疏并用,兼白芍、酸枣仁之平肝,为疏、清、平、养并用之方。

丘老师在遣方用药上也以“疏、清、平、养”为指导,以柴胡、郁金疏肝;以牡丹皮、栀子、夏枯草、决明子、茵陈、鸡骨草、菊花清肝;以白芍、珍珠母平肝;以滋水涵木法养肝,生地黄、山茱萸、女贞子、墨旱莲为常用药;止血药常选用茜草、仙鹤草、墨旱莲、紫珠、地稔、阿胶、小蓟等。

3 验案举隅

刘某,男,60岁,2006年8月11日初诊。主诉:“全身紫斑3天余”。患者于2006年5月发现下肢、胸腹部、背部多发细小出血点,压不褪色,色紫暗不鲜明,无对称性。伴齿龈红肿,神疲乏力,胸胁苦满,烦躁腰酸,耳鸣目花,瓜甲无华,舌边红、苔黄,脉弦。遂查血小板 $60 \times 10^9/L$,在我院血液科治疗。给予犀角地黄汤为主方,加用强的松治疗。治疗1周后血小板升至 $120 \times 10^9/L$ 。继无明显诱因,血小板进行性下降至 $43 \times 10^9/L$,激素加量及犀角地黄汤治疗1个月余,血小板下降至 $36 \times 10^9/L$,乃自停前服药。患者焦虑不安,烦躁易怒,口苦口干,腰膝酸软,舌红、苔黄,脉弦数,遂请丘老师会诊。丘老师认为,患者初诊为热扰血

分,灼伤血络,故见出血。因邪热未尽,羁留肝经,肝不藏血,故紫斑反复发作,此时烦躁易怒、口苦为肝火上炎,但腰膝酸软等证为肾水不足之象,故过于寒凉治之不效。丘老师指出:以“疏、清、平、养”为法,选用滋水清肝饮加减,处方:柴胡12g,白芍、酸枣仁、仙鹤草各20g,生地黄、女贞子、山茱萸、茵陈、栀子、连翘各15g,墨旱莲10g,甘草6g。每日1剂,水煎服。治疗2周余,2006年9月2日复诊,血小板回升至 $80 \times 10^9/L$ 。患者情绪转佳,仍有腰酸,失眠,唇甲苍白。处方:熟地黄、山药、山茱萸、夏枯草、菊花、杜仲各15g,白芍、茯苓、桑椹子、茵陈、酸枣仁各20g。每日1剂,水煎服。治疗3周余,2006年10月4日血小板回复至 $102 \times 10^9/L$,患者症状消失,期间间有反复,再服前方获效。

按:丘老师在辨证施治过程中,注重审证求因,见微知著。辨证准确的同时,也重视疾病过程的演变。准确把握“肝体阴用阳”的特点,“肝火—肝血—肝阴”的关系,用药不寒凉,善用柴胡、白芍疏肝坚阴,喜用茵陈、栀子清肝热,注重二至丸滋水涵木,酸枣仁、仙鹤草、桑椹子养肝血。丘和明老师运用“肝藏血”理论治疗ITP为临床开拓了新思路,值得进一步学习和总结。

参考文献

[1] 鲁兆麟,陈大舜.中医各家学说[M].北京:中国协和医科大学出版社,2000:6.

(收稿日期:2010-07-01)

[编辑:洪涛]

(上接第453页)

[7] 薛骞.代谢组学技术:中医药发展的重大契机[J].中华中医药学刊,2008,26(1):176-177.

[8] 张杰.关于中医证候物质基础研究路径的思考[J].中国中医基础医学杂志,2007,13(5):394-395.

[9] 申维玺.论中医“肾本质”的科学内涵[J].中国中医基础医学杂志,2001,7(6):10-13.

[10] 吴巧凤,颜贤忠,唐勇.代谢组学在我国中医药领域的应用[J].四川中医,2008,26(3):7-9.

[11] 王喜军,孙文军,孙晖,等.CCl₄诱导大鼠肝损伤模型的代谢组学及茵陈蒿汤的干预作用研究.世界科学技术—中医药现代化,2006,8(6):101-103.

[12] Li FM, Lu XM, Liu HP, et al. A pharmacometabonomic study on the therapeutic basis and metabolic effects of *Epimedium brevicornum* Maxim¹. On hydrocortisone-induced rat using UPLC-MS [J]. Biomed Chromatogr, 2007, 21(4): 397-401.

[13] Murch SJ, Rupasinghe HP, Goodenowe D, et al. A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin

(*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes: discovery of novel compounds [J]. Plant Cell Rep, 2004, 23(6): 419-425.

[14] Kim HK, Choi YH, Erkelens C, et al. Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using ¹H-NMR spectroscopy and principal component analysis [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53(1): 105-109.

[15] Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young woman: association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. Lancet, 1993, 341(8842): 387-391.

[16] 樊夏雷,刘文英,王广基,等.基于GC/TOF/MS的关木通肾毒性的代谢组学研究[J].毒理学杂志,2007,21(4):323-325.

[17] 李建新,华嘉,何翠翠.中药毒性的代谢组学研究(1):雷公藤甲素的肾脏毒性[J].亚太传统医药,2007,3(7):42-45.

(收稿日期:2010-09-26;修回日期:2010-11-25)

[编辑:黄健]