

## • 学术探讨 •

## 再论代谢组学与证候的相关性研究

简维雄 袁肇凯\*

(湖南中医药大学中医诊断教研室、国家中医药管理局病理生理学实验室,湖南省长沙市韶山中路 113 号,410007)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973717);湖南中医药大学青年教师项目(48010101-1)

\*通讯作者:daxiong20001977@163.com,13808425427

[摘要] 通过对代谢组学与中医证候整体性关系、时空性关系,以及结果分析时降维的关系比较,认为代谢组学与中医证候在分析问题及解决问题方面具有相同的思维。

[关键词] 证候;代谢组学;相关性研究

证候是中医学的核心内容,只有彻底揭示其生物学本质才能够突破中医学现代研究的瓶颈。从中西医结合医学的角度来看,中医证本质的含义是指引起“证”发生、发展的物质基础,这些物质决定着证候发生发展的动态变化过程,是在证的发生发展过程中产生的特殊物质群<sup>[1]</sup>。代谢组学(metabonomics/matabonomics)是 20 世纪 90 年代中期发展起来的一门对某一生物或细胞所有低分子量代谢产物进行定性和定量分析的新学科。它是通过考察生物体系受刺激或扰动(如将某个特定的基因变异或环境变化)后其代谢产物的变化或其随时间的变化,来研究生物体系的代谢途径的一种技术<sup>[2-4]</sup>。中医证候代谢组学的实质性研究开展已逾 5 年,从生物代谢角度为多个中医证候内涵研究做出了贡献。本文在课题组 3 年来心血瘀阻证代谢组学研究工作的基础上,进一步探讨两者的相关性,深化代谢组学与证候研究的理论基础。

### 1 整体观

中医学认为,人体由五脏六腑、四肢百骸、五官九窍、皮肉筋骨等组成,通过经络的联系作用,脏腑各器官相互配合、相互协调,从而使人体形成一个有机的整体,是一门整体医学<sup>[5]</sup>。人体机体的功能状态不仅仅是单一脏腑的功能的外现,更是各个组织器官、气血等子系统在相辅相成的协同作用和相反相成的制约作用下运行的结果。人体局部的病理变化,往往与全身的脏腑、气血、阴阳的盛衰有关。反之任何一种疾病又都是整个机能失调变化在某一病变局部的表现。证候的“候”是疾病的外在表现,包括症状和体征两大类,通过对“候”的认识、归纳和总

结,医者确定患者的“证”。这种“证”的结论是以机体整体水平所表现出的“候”为基础的,其实是对机体在某一时间和空间环境中具体状态的认识和把握,与西医学疾病的定位是完全不同的。中医学“把机体看作一个整体,从人体这一大系统出发,强调机体的总体平衡”,而不是某一组织、器官、分子等的病理改变<sup>[6]</sup>。因此,证候的定位是整体性或亚整体性的,即证候是对机体功能反应状态的一种整体性的认识<sup>[7]</sup>。而这种辨证的过程也突出体现着机体内部的联系性和整体性<sup>[8]</sup>。

系统生物学认为,生命是由基因、蛋白质、细胞、组织、器官这些组分按照某种方式整合成的一个系统。生物系统的功能即生命的体现是基因乃至器官网络互动联系下的综合外现,并非这些组分的简单叠加。单个组分无法解释生物的所有属性和行为,因为在一个整体内,各种组分间的相互作用会涌现出组分本身所不具有的新的属性和功能,出现了整体本身所独有的运动规律。整体虽然是由各个组成部分构成的,但各个组成部分只有在作为整体的一部分时才有意义。因此,对生命现象的研究必须从系统整体的水平展开<sup>[9]</sup>。据此分析,疾病就是受到干扰的各组分在结构、功能上的紊乱,而这种紊乱又相互影响,相互作用,形成网络扰动,最终导致整体机能运动失衡。这种失衡的结果,其外表现为症状、体征,其内即内源性的代谢产物。代谢组学是对一个生物系统或细胞在特定时间和条件下所有小分子代谢物质( $M_w < 1\text{KD}$ )的定量、定性分析,从而描述特定条件下代谢物质的整体及其对条件变化应答规律的科学<sup>[10]</sup>。代谢组学采用的是自上而下式的研

究方法,是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<sup>[11]</sup>。其特点在于从系统整体效应的角度去看待研究对象,而非从某一个具体的化合物变化入手,这种从宏观的、整体的、系统的研究角度出发的思路,已被认为符合中医从普遍联系的变化中去分析、把握疾病发生、发展、变化的客观规律的认识<sup>[12]</sup>。正如本课题组前期在心血瘀阻证的研究中发现,心血瘀阻证与血浆代谢产物花生四烯酸、硬脂酸、乳酸、尿素、柠檬酸、 $\beta$ -羟基丁酸、油酸、葡萄糖、丙氨酸等代谢产物含量的改变密切相关;与尿液代谢产物葡萄糖、甘油、木糖醇、马尿酸、油酸酰胺、丙酮等代谢产物含量的改变密切相关<sup>[13-14]</sup>。心肌缺血心血瘀阻证大鼠血浆代谢产物谱是琥珀酸、乳酸、丙氨酸、花生四烯酸、缬氨酸、硬脂酸、苹果酸、果糖、尿素<sup>[15]</sup>。以上结果的综合分析表明,心血瘀阻证生物学内涵涉及葡萄糖、氨基酸、脂质三大物质整体代谢失衡。

可见将研究的事物认为是整体的,从整体出发进行分析,是代谢组学与辨证论治看待事物的基本观念。

## 2 动态观

辨证论治是中医诊疗疾病的特点,其动态演化性是核心问题,证候范畴中的所有因素随着时间的推移,在方式、程度、速度等方面都会发生无穷多样的变化,是一个不断变化的矛盾过程,具有动态时空的特征<sup>[16]</sup>。《灵枢·营卫生会》谈到“卫气行于阴二十五度,行于阳二十五度,分为昼夜,故气至阳而起,至阴而止”。《素问·四气调神大论》所总结的“春三月养生”、“夏三月养长”、“秋三月养收”、“冬三月养藏”的道理,深刻地揭示了疾病不仅受自身气血运行的影响,也受自然环境、四时季节的干预,其表现出的证候是一定时间与一定状态的产物。时间在推移,状态在变化,证候也有可能发生改变。例如伤寒的六经传变,温病的卫气营血传变。“伤寒一日,太阳受之,脉若静者,为不传,颇欲吐,若躁烦,脉数急者,为传也。伤寒二三日,阳明少阳证不见者,为不传也。伤寒六七日,无大热,其人躁烦者,此为阳去入阴故也”。正是因为疾病的过程是不断发展变化的,因此,反映疾病阶段本质的证候就必然存在连续性发展和动态变化<sup>[17]</sup>。疾病自身规律的变化影响病情的进退,使证候的部位、性质、状态时刻运动着

变化着,显示出发展的连续性和相对的阶段性。

因此,需要一种能够从整体上动态反映证候形成过程的技术与方法来揭示这一演变过程,而代谢组学具有这样的功能。人体并非一个静态的结构,疾病过程是体内各类物质生化反应的过程,代谢组学不是针对细胞、组织、体液在某一时间点的状态,而是针对一个完整的生物体系随时间而发生代谢变化的过程进行检测、鉴别、定量和分类,用这样一个多维代谢轨迹可以反映某种生理病理过程中所发生的一系列生物事件<sup>[18]</sup>。Nicholson等<sup>[19]</sup>在药物毒理学研究中发现,利用机体不同时间点代谢组学的变化轨迹可以描述毒性发生和发展的全过程。国内外学者利用代谢组学技术,在异烟肼肝毒性时效关系研究中监测到肝引发损伤的起始、进展、反应最大的时间点及恢复过程,并预测出肝毒性作用的靶器官<sup>[20-21]</sup>。同样在药物毒理学研究中,有学者分析了被测试动物体内的肝脏组织、肝脏组织提取液和血液样本的代谢组分变化,综合这些动态演变信息揭示了给药动物体内的生理生化变化,进一步探讨肝损伤的代谢物变化规律<sup>[22-23]</sup>。

可见具有动态分析技术特点的代谢组学无疑是证候演变规律最佳的分析工具。

## 3 “司外揣内”是两者分析问题的基本原理

“司外揣内”为中医诊断的基本原理之一,“视其外应,以知其内脏,则知所病矣”,通过观察患者外在的临床表现,认识内在的病理本质,即外候内证。这一诊断原理,与控制论的“黑箱”理论很相似<sup>[24]</sup>。中医采用司外揣内、见微知著和知常达变的方法论观点,正是把人体看作是一个黑箱,采用不打开人体黑箱的方法来研究疾病变化规律。如外感六淫、内伤、七情等致病因素作用于人体,人体通过阴阳化生、五行生克、脏腑协调反映于外,表现为特异的症状、体征,故《灵枢·外揣》说:“五音不彰,五色不明,五脏波荡”。

生命是一个完整的系统,在复杂的生物体中,视其外部是无法了解内在基因、蛋白质、细胞、组织、器官的改变。代谢物组是基因——蛋白质——新陈代谢产物这样一个生命活动链的终点集合体,生命活动的任何变化都可以引起生物代谢物的变化<sup>[25]</sup>。生物体液中的代谢物与细胞和组织中的代谢物处于动态平衡,生物体中细胞功能异常一定会反映在生物体成分的变化中<sup>[26]</sup>。所以当在疾病状态时,所有的由于病理生理紊乱引起的直接化学反应,通过与

控制代谢的酶核酸相结合而引起的内源生化物质在比例、浓度及代谢通量等方面的失调都会在代谢物成分中得到反映。而代谢组学就是从尿液、血浆、血清、唾液和胆汁等生物体终端样本中检测代谢物。所以有学者认为,“基因组学和蛋白质组学告诉我们生命体可能发生什么,而代谢组学则是告诉我们已经发生了什么”。这也是目前代谢组学开展较多的研究的原因,通过特异性的标志物,诊断疾病、确定病因或通过代谢产物谱推测体内物质变化过程,也是以逆向思维为主<sup>[27-30]</sup>。

可见两者分析问题的原理有相似之处,内在的“证”,形成了外在的“候”,内在基因、蛋白质的改变,形成了代谢产物,所以代谢产物恰恰就是内在证的生物学本质。

#### 4 对繁杂信息的“降维”法

证候是机体内因和环境外因综合作用的机体整体的反应状态,是疾病的病因、病位、病性、病势及正邪双方的力量对比,也是人体受外环境影响与外环境能量交换的结果。具体包含了内在因素如机体内气、血、阴、阳关系的失调,脏腑间的乘侮、母子传变、相互调控作用失衡,以及年龄、性别、性情、嗜好、体质、遗传因素等复杂的病理关系;外在因素又由于病邪性质、入侵途径、侵犯部位、邪正双方力量对比状况的不同而使证候呈现复杂多变的信息。医生面对患者时的经验、直觉、感悟、情绪也会对证候产生影响。证候与这些海量构成要素是非线性的关系。李梢从证候诊断资料、证候构成要素、证候诊断方法等方面出发,认为证候具有多维的特性<sup>[31]</sup>。

既然构成证候要素是多维的,辨证时采用的方法也是多维的。所以辨证论治是一项复杂浩大的工程,但在处理问题时可以抓住其主要矛盾,采用“降维”的方法,化繁杂为简单。“降维”时依据中医常见证候,辨别主要因素、伴随因素,提取公认的特征性证候因素,然后梳理四诊信息,依据临床经验对复杂的辨证方法排列组合,确定有效方剂。《素问·阴阳应象大论》强调,“善诊者,察色按脉,先别阴阳。”林珮琴在《类证治裁》中提出,“识其为阴为阳,为虚为实,为六淫,为七情,而不同揣合也;辨其在经在络,在腑在脏,在营卫,在筋骨,而非关臆度也。”提示辨证之着手处,不外辨病性虚实阴阳、明病位脏腑经络,如此则可提纲挈领,故在众多繁杂的信息中,“降维”为病位、病性<sup>[32]</sup>。

代谢组学模式分析的处理对象主要为 GC-MS

LC-MS 以及 NMR 等仪器设备获取的波谱/图谱数据转换而成的数据矩阵,通常为几十至几百维的大量信息,单凭眼睛的观察很容易漏掉一些细微的变化,必须应用模式识别的手段对这些信息进行提取,得到有用的信息<sup>[33]</sup>。代谢组学技术检出物通常是  $n$  个样品,色谱峰/或变量数  $m$ ,代表  $m$  维空间中分布着  $n$  个点。因代谢组学技术检出数目通常很大,由此原始数据产生的数学模型无法直观地发现样品或组别之间的差异,这时就可以考虑用投影的方法对上述(多维空间)模型进行降维处理以化繁为简<sup>[34]</sup>。比如,PLS 和 PCA 是代谢组学数据处理常用的多元统计方法,其在最大程度利用样本有用信息的同时,用其强大的空间压缩能力,能够将代谢组学高维空间样本压缩至人类视觉能够接受的二维或三维空间,在知识表达(可视化)方面有着不可替代的优势,且具有结构简单、对样本集容量不敏感及快速并行计算等优势<sup>[35-36]</sup>。更为重要的是,这些模式识别算法的线性本质使其所建立的模型具有很强的解释性,可以有效地帮助寻找“生物标记物”<sup>[37]</sup>。故代谢组学对生物体的海量信息采用降维分析。可见对于复杂事物繁杂信息的处理两者具有共同之处,采用“降维”的方法,化繁为简,提取反映事物信息的主要方面。

综上所述,中医的辨证论治思维方式与代谢组学对疾病的研究方法具有相似之处。两者都遵从人体是一个有机整体,通过整合已经发生结果的生物体系输出的多维信息,逆向分析其内在的动态联系。

#### 参考文献

- [1] 沈自尹. 有关证与神经内分泌免疫网络的研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21(1): 10-11.
- [2] Oliver SG. Yeast as a navigational aid in genome analysis. 1996 Kathleen Barton-Wright Memorial Lecture[J]. Microbiology, 1997, 143(Pt 5): 1483-1487.
- [3] Tweeddale L, Notley-McRobb L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool(“metabolome”) analysis[J]. J Bacteriol, 1998, 180(19): 5109-5116.
- [4] Nicholson JK, Connolly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2): 153-161.
- [5] 刘家强, 王大鹏, 王米渠, 等. 论整体医学对中医未来发展的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 8(5): 1251-1252.
- [6] 陈竺. 系统生物学——21 世纪医学和生物学发展的核心驱动力[J]. 世界科学, 2005, (3): 2-6.

- [7]郭蕾,王永炎.论中医证候中的复杂现象及相应的研究思路[J].中国中医基础医学杂志,2004,10(2):3-5.
- [8]叶立国.系统生物学范式:中西医结合路径探讨[J].科学技术与辩证法,2009,26(1):37-42.
- [9]刘海龙.系统生物学:走向整体论的生物学[J].系统科学学报,2009,17(1):46-49.
- [10]Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development[J]. Pharm Res, 2006, 23(6): 1075-1088.
- [11]Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC, et al. The challenges of modeling mammalian biocomplexity [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(10): 1268-1274.
- [12]刘萍,程静,陈刚.应用代谢组学研究“肺与大肠相表里”理论的思路和方法[J].辽宁中医杂志,2011,38(3):428-430.
- [13]简维雄,袁肇凯,黄献平.冠心病心血瘀阻证尿液代谢组学的检测分析[J].中医杂志,2010,51(8):729-732.
- [14]简维雄,袁肇凯,黄献平.冠心病心血瘀阻证血浆代谢组学的检测分析[J].中国中西医结合杂志,2010,30(6):579-584.
- [15]简维雄,黄献平,袁肇凯.基于气相色谱-质谱的心血瘀阻证血浆代谢组学研究[J].中华中医药学刊,2009,27(4):796-798.
- [16]郭蕾,王永炎,张志斌,等.证候动态时空特征的复杂性及相应的研究思路[J].中医研究,2006,19(3):1-3.
- [17]孙晓伟,王阶.证候动态变化规律研究[J].山东中医药大学学报,2010,34(2):104-105.
- [18]Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Recent developments and applications of NMR-based metabonomics [J]. Chin J Magn Resonance, 2006, 23(1): 101-127.
- [19]Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [20]Bollard AW, Keun HC, Beckonert O, et al. Comparative metabonomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 204(2): 135-151.
- [21]廖艳,彭双清,颜贤忠.抗结核药物异烟肼肝毒性时效关系的代谢组学[J].中国医学科学院学报,2007,29(6):730-737.
- [22]Coen M, Lenz EM, Nicholson JK, et al. An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy[J]. Chem Res Toxicol, 2003, 16(3): 295-303.
- [23]黄欣,龚益飞,程翼宇.基于气相质谱-质谱的代谢组学方法研究四氯化碳致小鼠急性肝损伤[J].分析化学研究报告,2007,35(12):1736-1740.
- [24]顾萍.黑箱理论在中医学中的应用[J].南京中医药大学学报,2001,2(2):66-68.
- [25]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):79-86.
- [26]林艳萍,司端运,刘昌孝.液相色谱和质谱联用技术结合化学计量学应用于代谢组学的研究进展[J].分析化学,2007,35(10):1535-1540.
- [27]赵春艳,阿基业,曹蓓.代谢组学在代谢性疾病研究中的进展[J].中国临床药理学与治疗学,2011,16(4):439-446.
- [28]高嘉元,严玉澄.代谢组学技术在肾脏病研究中的应用[J].中西医结合肾病杂志,2011,12(5):466-470.
- [29]石洁,胡元会.代谢组学及其在心血管疾病中的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(1):86-88.
- [30]梅亚波,封志纯.代谢组学在儿科危重症领域的研究进展[J].解放军医学杂志,2011,36(6):676-678.
- [31]李梢.从维度与阶度探讨中医证候的特征及标准化方[J].北京中医药大学学报,2003,26(3):1-4.
- [32]万晓刚,蔡文就.中医辨证思路浅议[J].湖北中医杂志,2003,25(10):3-4.
- [33]宋凯,李霞.面向代谢组学的模式识别技术应用与展望[J].生物信息学,2008,6(2):90-92.
- [34]阿基业.代谢组学数据处理方法——主成分分析[J].中国临床与药理治疗学,2010,15(5):481-489.
- [35]Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics[J]. J Proteome Res, 2007, 6(2): 469-479.
- [36]金志超,陆健,吴骋.两种基于偏最小二乘法的分类模型对肿瘤基因表达数据行多分类的比较研究[J].中国卫生统计,2009,26(5):450-454,458.
- [37]宋凯,李霞.面向代谢组学的模式识别技术应用与展望[J].生物信息学,2008,6(7):90-92,96.

(收稿日期:2011-09-22;修回日期:2011-11-17)

[编辑:黄健]

## 欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951—1986年(4张光盘)480元;1987—1994年(1张光盘)260元;1995—2004年(1张光盘)280元。光盘合订本为计算机用数据光盘,收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容,可对所有文章进行任意字检索,方便实用。

汇款地址:北京东直门内南小街16号中医杂志北京医海林音像书店,邮政编码:100700,电话:(010)64035632。网址:<http://www.jtcm.net.cn>。