

代谢组学技术在证候研究中的应用进展

贾 敏¹ 苗 阳² 高铸烨²

(1 中国中医科学院研究生院,北京,100700; 2 中国中医科学院西苑医院,北京,100091)

摘要 目的:了解代谢组学技术在中医证候研究中的进展。方法:按照系统评价方法,以代谢组学和证候为主题词检索国内外数据库,提取符合入选标准的文献,从代谢组学概念、中医证候、代谢组学与中医证候的关系等五方面介绍代谢组学技术的优势及其在中医证候研究中的最新研究进展。结果:代谢组学技术可以发现同一疾病不同证型的代谢产物,并最终确认其所在的代谢生化通路。结论:代谢组学技术在证候研究中得到了广泛应用,代谢组学技术有望为证候本质研究提供可靠的分析方法。

关键词 代谢组学;中医证候;应用进展;综述

Application Progress of Metabonomics on the Study of TCM Syndrome

Jia Min¹, Miao Yang², Gao Zhuye²

(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To learn the recent progress of metabonomics technology applied on the study of TCM syndrome. **Methods:** We searched on domestic and oversea database using metabonomics and syndrome as subject terms and selected articles which meet inclusion criteria. Based on the method of system evaluation, the advantage of metabonomics technology and its recent development of application on the study of TCM syndrome were introduced in terms of concept of metabonomics, TCM syndrome, relation between metabonomics and TCM syndrome. **Results:** By using the metabonomics technology, we could find out metabolites of different syndrome types of the same disease, and finally confirm its biochemical pathways. **Conclusion:** Metabonomics technology is widely applied in the study of TCM syndrome and it is expected to provide a credible analysis method for the study of syndrome essence.

Key Words Metabonomics; TCM syndrome; Application progress; Review

中图分类号:R2-03 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.09.044

证是对机体所处一定阶段的病机概括,候是这种病机或状态的可被观察到的外在表现。唐农基于此提出了证候的经典定义或时相定义,明确指出对证候的认识应该从证与候 2 个方面出发,缺一不可,即在考察人体的临床表现时要结合当时的气候变化,证候就是人这一整体在某一时序气化相变过程中表现出来的异常变化,并可以在中医学阴阳五行等哲学思想的指导下,通过四诊法搜集患者临床资料,运用司外揣内、有诸内必形诸外等理论,判断病位与病机,最终得出具体的证型。此定义同时考虑到了中医整体观念的 2 个层次,因而具有较好的完备性^[1]。

辨证论治是中医学这一独特理论的基本特点之一,但由于证候概念缺乏客观化的标准,使中医证候本质的研究难以进行,很多学者以不同的思路方法,对证候的内涵和本质进行了多方面的探讨^[2]。1986 年,沈自尹首先提出“微观辨证”及“辨证微观化”。

微观辨证即引入现代科学的先进技术,微观地认识机体的结构、代谢和功能特点,从而更加本质地阐明证的物质基础。辨证微观化从微观层面建立辨证的标准,从而有利于辨证客观化,该思想的提出为中医证候本质的研究提供了新的思路与方法化^[3-4]。此后,各种先进科学技术如代谢组学、蛋白质组等技术运用于中医证候研究中,在中医证候本质研究中取得了丰硕的成果,使人们对中医证候的本质有了新的认识。为了解代谢组学技术在中医证候本质研究中的应用现状,本文按照系统评价的方法,以代谢组学和证候为主题词检索国内外数据库,提取符合入选标准的文献,从代谢组学概念、中医证候、代谢组学与中医证候关系等 5 个方面介绍代谢组学技术的优势及其在中医证候研究中的最新进展。

1 代谢组学基本概念

代谢组学属物理学、分析化学、生物学的交叉研究领域,与基因组学、转录组学、蛋白质组学同属系

统生物学不可缺少的部分。1999 年英国皇家理工大学 Nicholson 教授首次提出了代谢组学的概念^[5]。它是通过考察生物体系(细胞、组织或生物体)受刺激或扰动后(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,来研究生物体系的一门学科。该学科测定的代谢产物为一些参与生物体新陈代谢、维持生命物体正常生长功能和生长发育的小分子化合物,研究中可供检测标本有尿液、血浆或血清、唾液、脑脊液等生物体液以及细胞提取物、细胞培养液和组织等^[6],这些代谢产物可以反映人体健康状态或疾病状态下的重要信息^[7]。高效、高灵敏度的检测技术结合模式识别和专家系统等计算机分析方法是代谢组学研究的基本方法。其主要关注的是从整体层面上探索生命体代谢方面的特点及规律,通过检测代谢产物含量的变化,来发现特异性生物标志物,并推测可能有关的代谢途径,从而揭示疾病发生发展的代谢机制,为临床用药及新药研发提供指导^[8-10]。

分析技术方面由早期的使用单一仪器转向多种联用、多种组合仪器的方法,可以全面对代谢产物进行无偏向的分析。目前典型的分析手段为核磁共振技术(NMR)、质谱(MS)、色谱、及其联用技术^[11]。NMR 是代谢组学研究中应用最早的分析技术,同时为目前研究中主要的分析技术,特别是¹H-NMR,能完成代谢产物中大多数化合物的检测,满足了代谢组学对更多化合物检测的目标,同时具有对样品无损伤、预处理简单及可进行代谢产物定量分析等优点^[12];相对于 NMR 灵敏度低、检测动态范围窄等弱点,MS 具有较高的灵敏度和专属性,可以实现对多个化合物的同时快速分析与鉴定;色谱可以从多种复杂的混合物中将各个组分分离,并同时具有分离效率高及应用范围广等优点,但定性能力较差^[13];色谱-质谱联用技术兼备色谱的高分离度、高通量及质谱的普适性、高灵敏度和特异性,被越来越多的研究工作用于代谢组学研究^[14]。

2 证候与代谢组学关系

证候是中医学对于人体疾病状况下总体状态的反映,是对人体在疾病发生、发展过程中某一阶段生理、病理状态的概括,是中医学辨证论治的基础^[15-16]。故证候是对人体整体状态的反映。

由于证候的复杂性和整体性,决定了某一证候都不可能是单一物质量变的结果,可能是多项指标异常改变的综合作用,片面地追求单一指标的改变来探寻证候特异性,必然丢失了一些相关指标,远离

证候的本质;而且不同的证候可能在某个指标的改变上出现重合^[17],如 20 世纪 70 年代,曾把 17-OHCS 降低作为诊断肾虚的特异性指标,但后来在脾阳虚证、脾阴虚证研究证发现该项指标亦有降低的趋势,故仅靠单一指标的变化来判定证候类型是无法做到的。

代谢组学将人体看作一个有机的整体,主要研究人体等生物体的代谢产物及代谢网络在疾病状态及医疗干预下的变化规律。与西医学还原论的思想不同,代谢组学从整体层面上考察生物体的变化,这样就可以克服单一指标或少数几个指标的不足^[18]。代谢组学与中医证型在整体观念这一层面达到高度统一,均体现的是致病因素作用于人体时内环境的反应与变化^[19],均是对整体中某一阶段病理变化的本质和发展趋势的反映。代谢组学以其整体、动态、综合分析的特点与中医证候的整体观、恒动观、辨证思维模式不谋而合^[20],因此,在中医证候本质研究中引入代谢组学技术必将加快中医客观化及现代化的步伐,加快中医走向世界、服务全人类的进程。

3 代谢组学与临床证型研究

中医证候本质研究开始于上世纪 50 年代末,但总结半个世纪的研究成果却发现并未找到证候本质的特异项指标,运用客观检测指标进行辨证这一总体目标始终未实现^[21]。近年来,在众多疾病的临床证型研究中应用代谢组学技术取得了重要进展,诸如心力衰竭、不稳定性心绞痛、高血压等。这些疾病在发生过程中机体的基础生化代谢均发生了明显变化,通过收集患者代谢产物,借助代谢组学技术可以发现特异的生物标志物,并推测出与之有关的代谢途径,从而为中医证候的区分提供客观依据。现将临床研究中应用代谢组已取得的成果概述如下。

苗阳课题组^[22]分别收集 18 例缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证患者,利用液相色谱质谱(LC/MS)联用技术对血浆样本进行检测,研究 2 组代谢物图谱的差异。研究发现阳虚水停证较气虚血瘀证,与能量代谢相关的肉碱类物质及脂肪酸升高,与磷脂代谢有关的溶血磷脂酰胆碱物质含量降低。在尿液样本方面,2 种证型间 6 个潜在的生物标志物被鉴定出来,如精氨酸、泛酸等,主要表现在精氨酸代谢、磷脂代谢及能量代谢通路的变化。这说明引入代谢组学技术确实有利于中医证候本质的研究,从而加快证候本质研究的步伐。

程鹏^[23]等分别纳入痰凝心脉证及心气虚弱证的冠心病患者,运用气相色谱-质谱连用技术分析两

种证型患者血浆中内源性代谢产物及代谢谱的差异。通过将所得的色谱图与质谱库进行匹配及模式识别分析等发现了 46 种能将 2 种证型鉴别的代谢产物,贡献值较大的物质为丝氨酸、缬氨酸、2-羟基丙酸等,从而得出代谢组技术分析检测的小分子物质可能为区别中医证型的物质基础的结论。何华与^[24]等运用氢核磁共振(¹H NMR)技术分别对 12 例不稳定型心绞痛痰浊痹阻证和气虚血瘀证患者的血浆样本进行检测,旨在发现标志性的代谢产物谱。研究结果显示,两证型间的代谢物存在显著差异。不稳定型心绞痛痰浊痹阻证组较气虚血瘀证,乳酸、葡萄糖、半乳糖、低密度脂蛋白、脂类化合物、天门冬氨酸、酪氨酸等物质含量升高,而柠檬酸、高密度脂蛋白、不饱和脂肪酸、氧化三甲胺的含量降低。这些物质均与能量代谢、糖代谢、脂质代谢及氨基酸代谢有关。这说明运用代谢组中的核磁共振技术能够将两种证型区分,可以为中医证候提供客观的诊断依据。

陈艺等^[25]按照中医诊断标准收集肝火亢盛证和阴虚阳亢证的原发性高血压患者,运用气相色谱飞行时间质谱 GCTOF-MS 技术对患者血清进行分析。发现了显著差异的代谢产物,并推测可能与三羧酸循环、糖、脂肪等代谢途径有关。朱嘉等^[26]分别纳入阴虚阳亢证高血压患者和健康志愿者,通过色谱技术及主成分分析方法等寻找和发现 2 组间代谢产物的差异。结果发现了显著差异的代谢产物,缬氨酸、苏氨酸等游离脂肪酸增加,肌酐及尿素等反应机体代谢增强的物质增多等,说明运用代谢组学技术能将两者区分,确实存在标志性代谢产物。

因此,在寻求中医证候物质基础以探索证候本质的研究中,代谢组学技术起着至关重要的作用,可以为中医辨证客观化提供依据。

4 代谢组学与证候动物模型研究

中医证候动物模型就是基于对疾病病因及病机认识的基础上,在动物体上模拟和制作人类的各种证候^[27]。动物模型的建立,改变了单一的临床观察研究模式,是中医临床研究过度到基础研究的桥梁^[28],同时研究所取得的成果可能弥补中医临床客观化指标的不足,为临床实践提供客观依据^[29]。目前,国内已将代谢组学技术应用于中医证候动物模型研究中,通过分析生物样品,寻找中医证候的生物标记物。在中医理论指导下建立的动物模型可以真实反映中医证候的本质。

盖江华等^[30]将雄性大鼠随机分为空白对照组、外寒内饮(小青龙汤)模型组和小青龙汤治疗组,运

用核磁共振技术对 3 组大鼠的尿液、血液和肺组织进行检测,发现了小青龙汤证的特异性代谢产物,并得出与之相关的代谢途径及通道主要为能量代谢、炎症反应和免疫功能这 3 个方面。从而为中医证候诊断和治疗效果的评估提供了客观化依据。

李琪琳等^[31]通过左冠状动脉前降支结扎建立了心梗后心气虚证心力衰竭大鼠模型,利用核磁共振氢谱技术检测模型组与假手术组尿液代谢物的差异。结果发现 2 组的代谢物质能明显区分,与假手术组相比,与能量代谢、糖代谢、脂代谢等相关的物质含量存在统计学意义。

简维雄等^[32]通过结扎大鼠冠状动脉左前降支制作急性心肌梗死(AMI)心血瘀阻证模型,并将其随机分为模型组及养心通脉治疗组,同时设立手术组及空白对照组。选取大鼠的心肌组织,运用 GC-MS 技术检测代谢产物含量的变化。发现模型组中能加快能量代谢、清除氧自由基作用的甘氨酸、谷氨酸、酪氨酸等代谢产物下降,药物治疗组中此类物质明显升高。这说明心梗心血瘀阻证代谢途径与缺氧后能量代谢紊乱相关,养心通脉方可以明显干预这一过程。王勇等^[33]通过左冠状动脉前降支放置 Ameriod 环制备冠心病心肌缺血血瘀证小型猪模型,并设立假手术组,留取血清样本。采用核磁共振 NMR 和模式识别技术,寻找 2 组间标志性代谢产物及相关的代谢途径。研究发现模型组与假手术组相比,与糖代谢紊乱相关的肌酸、乳酸等物质含量升高,与脂肪代谢加速相关的肉碱含量上升及相应的 VLDL、LDL 含量的降低,糖类及脂代谢的紊乱导致柠檬酸循环中柠檬酸等物质含量的升高。从而得出代谢组技术有利于中医证型规范化研究的结论。

高岗^[34]等运用核磁共振技术及模式识别的方法寻找氢化可的松诱导的肾虚证大鼠和空白对照大鼠的尿液成分谱差异,结果发现模型组与对照组比较,代谢发生显著变化,乳酸代谢堆积,琥珀酸及柠檬酸等与三羧酸循环能量代谢及糖酵解相关的物质含量降低。这为肾虚证的临床辨证提供了依据。

5 问题与展望

目前,大量的证据表明代谢组学已广泛应用在中医证候研究中,用以发现潜在的代谢标志物及其代谢通路^[35],并取得了一定的成果,但仍存在一些不足。代谢组学作为一门新兴的学科,现有的分析技术手段主要针对相对分子量较小的内源性小分子,尚不能全面准确的筛选出所有有意义的标志性代谢产物;其次对于代谢组学所检测到的海量数据,

正确的解读及分析是一大难题^[36];再者代谢组学样品的收集、制备、预处理及仪器分析过程中干扰因素较多,这些因素对于代谢组学的分析意义重大。此外,中医证候欠规范,辨证标准不统一,虽然在中医理论和中医病因学指导下建立的动物模型能模拟中医证候,但动物的代谢模式是否与人类完全一致,通过动物试验发现的标志性代谢产物及其代谢通路与临床上同一证型的患者是否相同。仍值得深入研究。还应注意的是,目前证候本质研究中药物干预措施的应用尚不广泛,在今后的研究中可以运用中药进行辨证治疗,在患者症状明显改善时行代谢组学检测,观察已被发现的特异生物标志物含量是否发生改变,从而更有力证实该生物标志物的特异性。今后的证候研究,应加强代谢组学技术与其他技术方法的联合,提高对证候本质的认识,促进证候本质研究的发展^[7]。

参考文献

- [1] 唐农. 中医证候经典定义的探讨与意义[J]. 广西中医药, 1995, 18(3): 35-37.
- [2] 孙喜灵, 姜伟炜, 张晓林, 等. 中医证候的结构化研究[J]. 世界中医药, 2013, 8(2): 146-148.
- [3] 沈自尹. 微观辨证和辨证微观化[J]. 中医杂志, 1986, 59(2): 55-57.
- [4] 白晓晖, 李晓娟, 陈家旭, 等. 微观辨证在现代中医辨证论治体系的发展和应用[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 649-651.
- [5] 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.
- [6] 颜凤蛟, 葛惠男. 代谢组学在中医证型本质研究中的应用进展[J]. 山西中医, 2014, 30(1): 58-59.
- [7] Zhang AH, Sun H, Qiu S, et al. Recent highlights of metabolomics in chinese medicine syndrome research[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013; 40:2159.
- [8] 王芹芹, 张芳梅, 王喜军. 基于代谢组学的中医证候本质研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(3): 541-545.
- [9] Sun H, Zhang A, Yan G, et al. Metabolomic analysis of key regulatory metabolites in hepatitis C virus - infected tree shrews [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(3): 710-719.
- [10] Zhang A, Sun H, Wang X. Power of metabolomics in biomarker discovery and mining mechanisms of obesity [J]. *Obes Rev*, 2013, 14(4): 344-349.
- [11] 雪琴, 范国荣, 陆峰等. 气相色谱-质谱代谢组学研究关键技术及典型应用[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(1): 68-73.
- [12] 江春迎, 王映红. 基于核磁共振技术的定量代谢组学研究[J]. 药科学报, 2014, 49(7): 949-955.
- [13] 夏建飞. 基于液质联用技术的代谢组学新方法的研究与应用[D]. 上海: 华东理工大学, 2010.
- [14] 胡正青, 林夏珍, 郭明. 代谢组学研究技术进展[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(6): 485-490.
- [15] 潘志强, 方肇勤. 中医证候本质研究现状及引入系统生物学技术新趋势[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(1): 104-107.
- [16] 王永炎. 完善中医辨证方法体系的建议[J]. 中医杂志, 2004, 45(10): 729-731.
- [17] 张天奉, 张建军, 吕金阳. 走出中医证候客观化研究的误区[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(11): 21-22.
- [18] Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC, et al. The challenges of modelling mammalian biocomplexity [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(10): 1268-1274.
- [19] 范群丽, 陈晓虎. 代谢组学技术在中医证候研究中的应用概况[J]. 江苏中医药, 2010, 42(7): 79-81.
- [20] 周志刚, 张程, 吴焕淦, 等. 代谢产物相关技术在溃疡性结肠炎中的应用研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(10): 1131-1135.
- [21] 江锋, 王宗殿. 中医证候本质研究的回顾与思考[J]. 中医药学刊, 2005, 23(1): 131-133.
- [22] 王鹏军, 孙明谦, 苗阳, 等. 缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证的代谢组学研究[J]. 世界中医药, 2013, 8(12): 1393-1396.
- [23] 程鹏, 陈泽奇, 王东生. 冠心病痰浊证与气虚证的代谢组学研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(2): 193-197.
- [24] 华何与, 崔凯, 关山越. 不稳定型心绞痛痰浊痹阻证与气虚血瘀证血浆代谢组学研究[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(4): 578-581.
- [25] 陈艺, 方祝元. 高血压病肝火亢盛证与阴虚阳亢证的血清代谢组学比较研究[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(4): 320-323.
- [26] 朱嘉, 董海琪, 方祝元. 高血压病阴虚阳亢证的代谢组学研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23(3): 142-147.
- [27] 陈学习, 彭成. 试论辨证动物模型在中医方药研究中的应用与发展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(1): 29-30.
- [28] 高振, 杨剑, 徐丹, 等. 中西医结合病证动物模型研究概况[J]. 深圳中西医结合杂志, 2010, 20(2): 117-119.
- [29] 时文远, 施斌, 袁朵, 等. 建立中医动物模型的思考[J]. 中医学报, 2015, 30(1): 65-67.
- [30] 盖江华. 基于代谢组学核磁共振技术的小青龙汤证证本质的研究[D]. 太原: 山西中医学院, 2013.
- [31] 李琪琳, 张安晶, 吴华芹, 等. 基于¹H-NMR技术研究心气虚证心力衰竭模型大鼠尿液代谢组学变化[J]. 北京中医药, 2013, 32(12): 939-943.
- [32] 简维雄, 陈清华, 黄献平, 等. 大鼠心血瘀阻证心肌组织代谢组学的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(4): 515-520.
- [33] 王勇, 李中峰, 陈建新, 等. 基于冠心病心肌缺血血瘀证小型猪血清核磁共振代谢组学的研究[J]. 分析化学, 2011, 39(8): 1274-1278.
- [34] 高岗, 杨根金, 姜子洋. 肾虚证大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(5): 565-568.
- [35] Wang X, Wang Q, Zhang A, et al. Metabolomics study of intervention effects of Wen - Xin - Formula using ultra high - performance liquid chromatography/mass spectrometry coupled with pattern recognition approach [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 74: 22-30.
- [36] 谢国祥. 基于几种色谱分析方法的生物样本的代谢组学研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2007.