

基于代谢组学技术的中药效应物质基础及作用机制研究

李春雨^{1,2}, 王 张¹, 王 平¹, 孟宪丽^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

2. 天津药物研究院 天津市新药安全评价, 天津 300193

摘要: 代谢组学技术是 20 世纪 90 年代中期继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后的又一门新兴组学技术, 在方法学上具有整体性、系统性及综合性的特点, 与中医药理论的整体观、动态观、辩证观相吻合。主要综述了近年来代谢组学技术的发展及其在中药效应物质基础及作用机制研究中的应用, 并对代谢组学技术在中药现代化研究中的应用和发展进行了展望。

关键词: 代谢组学; 中药; 效应物质基础; 整体性; 作用机制

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)07-0918-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.027

Therapeutic material basis and action mechanism of Chinese materia medica based on metabonomic technology

LI Chun-yu^{1,2}, WANG Zhang¹, WANG Ping¹, MENG Xian-li¹

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2. Tianjin Centre for Drug Safety Assessment and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Key words: metabonomics; Chinese materia medica; therapeutic material basis; integrity; action mechanism

中药效应物质基础是中药现代研究的核心之一, 也是中药研究的热点和难点, 中药效应物质基础是指中药及其复方发挥药效或毒性作用的化学成分, 是阐明中药作用机制的关键, 是中药质量控制和评价的核心, 是中药临床应用安全、有效、质量可控的保障^[1-2]。但由于中药作用的整体性, 成分、作用机制和靶点的复杂性, 加上研究技术条件、研究思路和方法的局限性, 使得中药现代研究从本质上偏离了中医药的整体观和辨证论治的本质。因此, 建立一种能反映中医药整体观, 阐明中药效应物质基础及其作用机制的研究方法势在必行。

代谢组学 (metabonomics) 是 20 世纪 90 年代中期发展起来的一门新兴组学技术, 是通过考察生物体系 (细胞、组织或生物体) 受刺激或扰动后, 其代谢产物的变化或随时间的变化, 来研究生物体系的一门新兴学科^[3-4]。基于代谢组学技术的中药现代化研究有利于尽快阐明中药“多组分”通过多器官、

多系统、多靶点, 整体作用的科学内涵, 是系统生物学时代给中医药发展提供的一个良好机遇^[5]。

1 代谢组学技术概述

代谢组学研究的对象是基因组的下游产物也是最终产物, 是一些参与生物体系新陈代谢、维持生物体正常功能和生长发育的小分子化合物的集合, 主要是相对分子质量小于 1 000 的内源性小分子^[6]。研究的基本步骤包括: 样品采集、样品预处理、数据采集、数据分析及解析。精确、灵敏、高通量的分析方法为代谢物分析提供检测手段, 是代谢组学研究的基础, 各种模式识别等计算技术从大量的分析信号中发现有用的特征模式, 是代谢组学研究的重要工具^[7-9]。

中药“多组分、多靶点、整体调节”的特点及中医药理论的“整体观”、“辨证论治”与代谢组学的全景式、整体互动性、综合性不谋而合, 是中医药现代化的最佳切入点。代谢组学创始人、英国帝

收稿日期: 2012-11-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001689); 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项 (06-07JP38); 人事部第 51 批中国博士后科学基金面上资助项目 (2012M511916); 四川省中医药管理局中医药科学技术研究专项 (2012-E-040)

作者简介: 李春雨 (1985—), 男, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及毒理学。

Tel: (022)84845247 Fax: (022)84845246 E-mail: licy@tjipr.com

*通信作者 孟宪丽 Tel: (028)87714869 E-mail: wd2526@163.com

国理工大学的 Jeremy Nicholson 教授认为：代谢组学与有着几千年历史的中医学在许多方面有相近的属性，它们的有机结合将有力地推动中医药的现代化进程^[10]。中药（尤其是复方）进入机体后，起效的是中药中的原形成分或代谢产物或与机体作用形成的新成分，三者构成体内中药成分的代谢物组。中药代谢物组通过多器官、多系统、多靶点，协调干预人体内源性代谢物组来治疗疾病。中药代谢物组的作用都会反映到各种生物化学途径上，使内源性代谢物组中某种或多种物质的浓度和比例发生变化。而内源性代谢物组变化特征模式提供了药物作用机制和作用靶点的信息。通过追踪中药影响体内内源性代谢物组的组成和变化，可以整体评价中药的疗效和安全性，阐明中药效应物质基础及作用机制，解决中药现代化的瓶颈问题^[11]。

2 代谢组学技术在中药效应物质基础研究中的应用

中药及其复方物质基础的研究可以从本质上阐明其临床应用及复方配伍的科学内涵，使中药及其复方向标准化和规范化发展。由于中药及其复方是通过多组分发挥多途径、多靶点的协同作用，整体调节人体的阴阳平衡。用传统的方法研究起来费时、费力，且无法体现其整体性。借助代谢组学先进的研究方法和技术平台，在中医药理论的指导下从不同角度、不同层次上系统的研究中药及其复方，可以快速筛选出多种活性组分，有助于揭示中药及其复方产生药效的物质基础，为中药现代研究提供了崭新的思路。

Liang 等^[12-13]采用代谢组学技术，对中药彭县雪胆和尖萼楼斗菜的抗菌物质基础及作用机制进行了相关研究。通过对彭县雪胆乙醇提取物、雪胆甲素及已知作用模式的 9 种常用抗菌素处理的金黄色葡萄球菌培养液进行 HPLC-DAD-ESI-MS 代谢谱研究和主成分分析(PCA)，发现彭县雪胆乙醇提取物、雪胆甲素与万古霉素的投影点聚集在一起，表明彭县雪胆的作用模式与万古霉素的作用模式类似，都是通过抑制细胞壁的合成发挥抗菌作用，说明雪胆甲素是彭县雪胆抗菌的主要物质基础。通过对尖萼楼斗菜及其相关组分和已知作用机制的 9 种常用抗菌素处理的金黄色葡萄球菌培养液的代谢物谱进行对比分析，结果显示尖萼楼斗菜的投影点与氯霉素、琥乙红霉素、林可霉素、链霉素和四环素的投影点聚集在一起，表明尖萼楼斗菜的作用模式与这些抗菌素的作用机制相似，都是作用在蛋白质的合成方

面，并发现木兰花碱是尖萼楼斗菜中抗菌的主要物质基础。在 9 种已知作用机制的抗菌素的基础上，用代谢谱结合 PCA 分析探究中药可能的作用机制及物质基础，是一种探寻中药的抗菌作用机制和阐明药效物质基础的快速方法。

王雪洁等^[14]运用基于 ¹H-NMR 和 UPLC 的代谢组学技术对生远志、蜜远志及甘草制远志的药效物质基础进行了研究，结果显示生远志、蜜远志、甘草制远志化学成分明显不同；与蜜远志相比，生远志与甘草制远志化学成分更加接近；三者中部分氨基酸、有机酸及糖类含量的变化较大；与生远志相比，蜜远志中总皂苷量几乎不变，甘草制远志则有所上升；糖酯类化合物 3, 6'-二芥子酰基糖酯在甘草制远志中量有所降低，蜜远志中最低，从代谢组学整体角度来看，生远志及其蜜制、甘草制品化学成分差异明显，提示炮制可改变其物质基础，导致其功效不同。

3 代谢组学技术在中药及其复方作用机制研究中的应用

3.1 代谢组学技术在中药作用机制研究中的应用

目前对中药疗效的评价及作用机制的研究基本上是沿用化学药物的方法，虽然采用了现代分子生物学技术，但中药研究并没有显示出优于化学药物的特点，这与忽视中医药“君、臣、佐、使”，“升、降、沉、浮”，“寒、热、温、凉”等理论及中药整体综合作用很难在单一机制的药理模型和分子水平加以诠释有关，亟需建立适用于中药整体综合作用的药效评价体系，代谢组学技术可能成为未来系统生物学研究中中药整体疗效及作用机制的重要手段^[15]。

本课题组应用大鼠急性血瘀证模型，采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术和 PCA、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)等统计学方法对沙棘提取物治疗血瘀证作用机制进行了研究，结果表明沙棘提取物能使急性血瘀证模型大鼠的代谢谱型向正常动物回归，其作用机制可能与苯丙氨酸、色氨酸、琥珀酰鸟氨酸、犬尿喹啉酸、鹅去氧胆酸和胆酸等潜在生物标志物有关^[16]。应用大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型(MCAO)，采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术和 PCA、PLS-DA 等方法对灯盏细辛治疗 MCAO 的作用机制进行了探讨，结果显示灯盏细辛注射液能减弱或取消外界刺激因素“线栓法阻塞大脑中动脉”对机体的作用，使脑缺血大鼠的代谢谱型向正常动物回归，其作用机制可能与犬尿喹啉酸、琥珀酰鸟

氨酸和亮氨酸脯氨酸等潜在生物标志物有关,可能涉及“色氨酸-犬尿喹啉酸”和“琥珀酰鸟氨酸-尿素循环-NO”等代谢途径^[17]。以基于高分离度快速液相-质谱(RRLC-MS)为核心分析技术和PCA分析法为数据解析手段的代谢组学技术,探讨了大黄治疗慢性肾功能衰竭的作用机制。研究表明大黄通过减少慢性肾功能衰竭大鼠血液中儿茶酚胺类物质生成,减少磷酸酯类物质分解,减少炎症介质产生,使体内D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢和蛋氨酸循环恢复正常而发挥治疗作用^[18]。

袁洋等^[19]采用基于NMR技术的代谢组学方法,探讨了荷叶生物碱干预非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的作用机制。研究发现荷叶生物碱主要通过调节机体脂质代谢、能量代谢,缓解氧化应激、脂质过氧化损伤等作用,抑制大鼠肝脏脂肪性病变、炎症反应以及肝脏胶原沉积,对大鼠非酒精性脂肪性肝病发挥治疗作用。

3.2 代谢组学技术在中药复方作用机制研究中的应用

中药复方治疗疾病的作用机制研究一直处于“黑箱”状态,只知其有疗效但是对其疗效产生的机制并不清楚^[20]。中药复方由几味甚至十几味中药组成,其药效物质基础研究就更加困难。中药及其复方成功治疗疾病必须使机体代谢网络中的缺陷部分正常化,同时不得干扰其他维持健康所必须的代谢途径的调控。代谢组学通过研究药物引起机体的内源性代谢物的变化,研究体内生物化学过程和状态的变化。通过分析“代谢指纹图谱”变化的原因,阐明其作用机制^[21]。

谢宝刚等^[22]以HPLC-UV为技术手段,基于代谢组学的技术平台,采用PCA法研究了六味地黄片的抗炎作用机制。研究结果显示,炎症模型组大鼠经六味地黄片干预后,有向正常对照组恢复的趋势,证明六味地黄片可调节由于炎症引起的机体代谢网络的紊乱,有利于生物标记物的发现及其作用机制的阐明。

王喜军等^[23]基于代谢组学理论,以UPLC-ESI-Q-TOF/MS为核心技术,以PCA分析方法为数据解析手段,初步确定4个能够表征酒精性肝损伤发生、发展和恢复状态的内源性生物标记物,且发现茵陈蒿汤对4个内源性生物标记物代谢轨迹的扰动具有明显的回调作用,从生物体内代谢组层面确定茵陈蒿汤具有较好的保肝作用。

戴云涛等^[24]采用代谢组学的方法,以GC-MS为技术手段,对逍遥散抗抑郁作用机制进行了研究。研究发现,逍遥散与阿米替林干预大鼠抑郁症模型后尿液代谢谱中有9个生物标记物相同,提示一些共同的和特有的代谢途径可能与逍遥散和阿米替林治疗抑郁症的作用机制相关。

梁生旺等^[25]应用基于NMR和PCA分析法的代谢组学技术,研究了脑脉通复方对MCAO的作用机制,以期建立适合中药复方疗效评价及其物质基础的研究方法。结果显示脑脉通复方提取物能够很好地抑制MCAO引起的大鼠血浆中谷氨酰胺、牛磺酸、酪氨酸、乳酸升高;提高脂类、胆固醇、3-羟基丁酸、N-乙酰天门冬氨酸、乙酰乙酸、谷氨酸、胆碱的水平,使之趋向于正常,从而起到抗脑缺血再灌注损伤的作用。

4 代谢组学技术在中药毒性作用机制研究中的应用

中药具有效、毒二重性,长期对中药毒效关系的认识主要以经验为依据。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,还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。此外,应用反映整体思想的代谢组学评价中药的毒性,对中药毒性进行科学地、系统地、综合地评价研究,对于确保中药的合理、安全、有效用药,建立现代中药毒理评价体系,指导临床拟订合理的临床用药方案、剂量和给药间隔均有指导意义。

颜贤忠等^[26]以NMR为技术平台,研究经关木通染毒后大鼠尿液的代谢表型改变及其与组织病理和尿液、血浆生化指标的相关性,探讨了代谢组学在中药毒理学研究中的应用。结果表明,染毒后大鼠肾脏出现不同程度的炎症坏死,尿样中氧化三甲胺、柠檬酸、牛磺酸、肌酐、甜菜碱等代谢物的量均有不同程度的下降,而醋酸、丙氨酸的量则显著上升。PCA分析表明,造成组间差异的主要影响因素是醋酸和氧化三甲胺的变化。不同剂量条件下,各组动物的代谢谱各不相同,与肾脏病理和血浆生化改变相一致,提示代谢组学技术在毒理学研究有着广泛的应用前景。

李建新等^[27]以 NMR 为技术手段, 结合模式识别技术和 PCA 法探讨雷公藤甲素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密切相关。

樊夏雷等^[28]开展了基于 GC-TOF-MS 的关木通肾毒性代谢组学研究, 结果表明, 给药后 2、4 d 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。

5 讨论与展望

中药是多成分的复杂体系, 人体是更复杂的生命系统, 这就决定了中药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研究中药的药效物质基础及作用机制, 存在着一定的理论差距和现实的技术瓶颈, 这也是制约中医药现代化的主要问题之一。反应机体状况的内源性分子集合与机体功能状态之间有着密切的关系, 机体的病理生理变化和中药作用最终通过代谢物组的变化表现出来, 因此, 借助于代谢组学先进的分析技术, 有望在一定程度上阐明中药效应物质基础及其作用机制, 从整体上评价中药的安全性和有效性。

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。系统生物学及相关技术的快速发展, 为从多学科、多视角认识中医药疗效机制提供了重要的方法学基础和技术条件, 将全景式、整体性的代谢组学技术与中医药整体观、辨证论治理论进行有机结合, 必将进一步加快中医药的现代化进程, 推动我国的中药研究、开发与国际双向接轨, 中医药与以代谢组学为核心的系统生物学的结合, 是一个极富创造性并引领中医药现代化的重要之举。

参考文献

[1] 邹忠杰, 袁经权, 龚梦鹃, 等. 代谢组学技术在中药研究中的应用 [J]. 广东药学院学报, 2009, 25(4): 424-428.

[2] 邓海山, 段金庵, 尚尔鑫, 等. 代谢组学的研究现状及其在方剂量效关系中的应用 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(3): 198-199.

[3] Nicholson J K, Lindon J C. Systems biology: Metabonomics [J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1054-1056.

[4] Nicholson J K, Connelly J, Lindon J C, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153-161.

[5] Xu E Y, Schaefer W H, Xu Q. Metabolomics in pharmaceutical research and development: metabolites, mechanisms and pathways [J]. *Curr Opin Drug Discov Dev*, 2009, 12(1): 40-52.

[6] 王勇, 郭淑贞, 李春, 等. 慢性心肌缺血模型小型猪血浆代谢组学分析 [J]. 中西医结合学报, 2011, 9(2): 158-164.

[7] Westerhuis J A, Velzen E J, Hoefsloot H C, et al. Multivariate paired data analysis: Multilevel PLS-DA versus OPLS-DA [J]. *Metabolomics*, 2010, 6(1): 119-128.

[8] 许广艳, 葛卫红. 代谢组学的数据分析技术及其应用 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1755-1758.

[9] Dai L P, Gu Y, Yin R J, et al. Quantitative metabolomics: analysis on active components in extracts from *Kaki Folium* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(4): 276-281.

[10] 罗国安, 梁琼麟, 王义明. 中医药系统生物学发展及展望 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(4): 242-248.

[11] 张敏. 传统文化对中医“证”理论形成的影响 [J]. 河南中医, 2011, 31(8): 839-840.

[12] Yan Y, Yi Z B, Liang Y Z. Validate antibacterial mode and find main bioactive components of traditional Chinese medicine *Aquilegia oxysepala* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(7): 1855-1857.

[13] Yi Z B, Yan Y, Liang Y Z. Investigation of antimicrobial model of *Hemsleya pengxianensis* W. J. Chang and its main active component by metabolomics technique [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 116(1): 89-90.

[14] 王雪洁, 李震宇, 薛水玉, 等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1727-1737.

[15] 王建农, 顾士萍, 谭仁祥, 等. 基于植物代谢组学混合物氢谱测定概念快速发现先导化合物的方法学研究 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 812-814.

[16] Zhao X J, Zhang Y, Meng X L, et al. Effect of a traditional Chinese medicine preparation Xindi soft capsule on rat model of acute blood stasis: A urinary metabonomics study based on liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 873(2): 151-158.

[17] 王张. 基于代谢组学的民族药灯盏细辛、沙棘有效性评价及作用机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.

[18] 李春雨, 王平, 王张. 基于代谢组学技术的大黄治疗慢性肾功能衰竭的作用机制研究 [J]. 中草药, 2012,

- 43(2): 312-315.
- [19] 袁 洋. 非酒精性脂肪性肝病的代谢组学及荷叶生物碱干预机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2008.
- [20] 唐文富, 陈光远, 黄 熙. 方剂代谢组学新假说 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 801-503.
- [21] 王战国, 胡慧玲, 兰 轲, 等. 试论基于代谢组学与方证理论的药效学-药动学方法研究中药复方配伍规律 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 169-172.
- [22] Xie B G, Gong T, Gao R, *et al.* Development of rat urinary HPLC-UV profiling for metabonomic study on Liuwei Dihuang pills [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(2): 492-493.
- [23] 王喜军, 刘 莲, 孙 晖, 等. 乙醇诱导大鼠肝损伤的代谢组学和茵陈蒿汤的干预研究 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 453-457.
- [24] Dai Y T, Li Z Y, Xue L M, *et al.* Metabolomics study on the anti-depression effect of xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 482-483.
- [25] 陈 曦, 杨永霞, 王淑美, 等. 基于 NMR 代谢组学研究脑脉通复方提取物对大鼠脑缺血再灌注模型的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 97-102.
- [26] 赵剑宇, 颜贤忠, 彭双清. 关木通肾毒性的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 725-729.
- [27] 李建新, 华 嘉, 何翠翠. 中药毒性的代谢组学研究 (I): 雷公藤甲素的肾脏毒性 [J]. 亚太传统医药, 2007, 3(7): 42-43.
- [28] 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.