

• 北药研究专栏 •

基于中医方证代谢组学的中药质量标志物发现研究

闫广利, 孙 晖, 张爱华, 韩 莹, 王喜军*

黑龙江中医药大学 国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心/国家中医药管理局中药血清药物化学重点实验室/中美中医方证代谢组学技术合作中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 中药质量是影响中医药传承和发展的重要因素, 然而由于中药成分的复杂性和复方应用的特殊性, 现今的中药质量标准存在难以保障临床疗效的问题。刘昌孝院士提出中药质量标志物的概念和基本属性, 为中药质量标准研究指明了方向。中医方证代谢组学是整合了中药血清药物化学与代谢组学技术, 在方证对应并显效的情况下, 发现与临床疗效相关、体现方剂配伍、可追溯体内代谢和制备过程的中药药效物质基础的研究策略, 是发现中药质量标志物的有效方法。利用中医方证代谢组学方法已经对茵陈蒿汤、六味地黄丸等方剂及男仕胶囊、AS1350 等中药保健品质量标志物的发现研究进行了探索。

关键词: 中药质量标志物; 中医方证代谢组学; 中药方剂; 中药复方保健品; 药效物质基础

中图分类号: R285; R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)16-3729-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.001

Discovery of quality markers of Chinese materia medica based on Chinmedomics

YAN Guang-li, SUN Hui, ZHANG Ai-hua, HAN Ying, WANG Xi-jun

Sino-US Chinmedomics Technology Cooperation Center, Key Laboratory of Serum Pharmacochimistry of TCM, Research Center of Chinmedomics, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: The quality of Chinese materia medica (CMM) has become an important factor affecting the inheritance and development of traditional Chinese medicine. However, due to the complexity of CMM ingredients and the specificity of prescription application, the current quality standards of CMM are difficult to guarantee clinical efficacy. Academician Changxiao Liu proposed the concept of the quality marker (Q-marker) of CMM and its basic attributes, which provided a direction for the study of CMM quality standards. Chinmedomics, integrating serum pharmacochimistry and metabolomics technology, under the conditions of correspondence of prescription-syndrome with therapeutic effect, can be used to find the Q-markers of CMM which are related to the clinical efficacy, and reflect the compatibility of prescriptions, and trace the *in vivo* metabolism and preparation process. The research strategy based on Chinmedomics is an effective method for discovering the Q-markers of CMM, it has been applied to discovery Q-markers of Yinchenhao Decoction, Liuwei Dihuang Pill, NanShi Capsule, AS1350, and other CMM formula as well as the health products.

Key words: quality marker (Q-marker) of Chinese materia medica; Chinmedomics; Chinese materia medica formula; Chinese materia medica health products; pharmacodynamic material basis

中药质量是关系到中医生死存亡的关键问题。“中医亡于中药”的说法不是空穴来风, 更不是耸人听闻, 而是一种实实在在的危机意识。目前中药质量问题严重制约其发展, 特别是中药材质量问题严重。这种状况严重地影响了中医临床疗效, 是当前及长远须解决及持续加以解决的问题。

中药质量标准是衡量、控制及保证中药质量的

依据或技术手段。然而, 由于中药材多基原、多产地, 以及加工炮制方法各异, 制剂组方及工艺各具特色, 导致中药质量标准的建立成为国际性难题; 特别是中药药效物质基础研究薄弱, 致使作为国家药品标准的《中国药典》的中药质量标准存在很多难以逾越的障碍: ①质量控制指标成分与中药有效性关联性不强, 如山楂药材以熊果酸为定性指标,

收稿日期: 2018-04-17

作者简介: 闫广利, 副研究员, 主要从事中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究。E-mail: gancaosuan@163.com

*通信作者 王喜军, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究。E-mail: xijunw@sina.com

以枸橼酸为定量指标,但二者与其行气化痰功能无相关性;②以同一指标成分评价多个药材的质量,指标专属性差,难以反映不同药材的质量特质,如小檗碱是三颗针、功劳木、黄柏、黄连的定量指标成分,熊果酸是马鞭草、木瓜、枇杷叶、翼首草的定量指标成分,芦丁是一枝黄花、木芙蓉叶、桑叶、槐花的定量指标成分;③以单一微量成分标定药材整体质量属性,如熟地黄以毛蕊花糖苷为定量指标,定量下限仅为 0.02%;④药材指标成分与制剂质量指标成分倒挂,如五味子药材定量指标成分为五味子醇甲,而含有五味子的护肝片的定量指标成分除了五味子醇甲,还有五味子甲素和五味子乙素;⑤同名品种指标成分不同,如生脉饮含量测定指标成分为五味子醇甲,而生脉胶囊的含量测定指标成分为人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re。由此可见,目前的质量标准对控制中药质量略显乏力。

基于中药质量的复杂性及质量标准的片面性,刘昌孝院士针对中药生物属性、制造过程及配伍理论等自身医药体系的特点,于 2016 年提出中药质量标志物(Q-marker)的新概念^[1-3]。中药质量标志物是存在于中药材和中药产品(如中药饮片、中药煎剂、中药提取物、中成药制剂)中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质。中药质量标志物的提出进一步密切了中药有效性-物质基础-质量控制标志成分的关联度。中药质量标志物是中药质量标准中的核心要素,是质量标准能否控制中药材、饮片、提取物及制剂内在质量的关键。中药质量标志物的基本条件:①存在于中药材和中药产品中固有的次生代谢物,或加工制备过程中形成的化学物质;②来源某药材(饮片)特有的而不是来源于其他药材的化学物质;③有明确的化学结构和生物活性;④可以进行定性鉴别和定量测定的物质;⑤按中医配伍组成的方剂“君”药首选原则,兼顾“臣、佐、使”药的代表性物质。因此,中药质量标志物最重要的条件应该是与临床有效性及安全性相关联,并体现方剂配伍。换言之,中药的质量内涵就是有效性及安全性,而质量标准是保障和实现临床有效及安全的依据。中药的有效性及安全性在临床上是通过方剂表达的,只有在方剂配伍的环境下,发现其有效状态下组成药材饮片的显效成分,以此作为质量标志物所建立的质量标准才能达到保障和实现临床的有效性、安全性(图 1)。

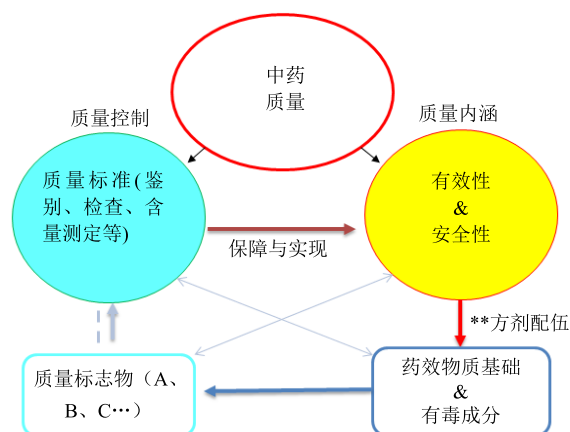


图 1 中药质量标志物与有效性及方剂配伍的关系

Fig. 1 Relationship between quality marker of CMM and efficacy and compatibility of prescription

1 中医方证代谢组学是发现中药质量标志物的有效途径

如何发现质量标志物成为发挥其功能的瓶颈。按上述理论,中药质量标志物应基于有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍的“五原则”^[4-5],既与有效性和安全性相关联,又满足中药成分的专属性、差异性特征的要求,尤其是基于方-证对应的配伍环境,体现针对疾病的显效方式及其物质基础的客观存在。按照中药质量标志物的概念和中药临床运用形式,方剂更能反映质量标志物的有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍的所有要素要求,也更具有临床价值和建立全程质量控制体系的可行性。由此,本团队建立的中医方证代谢组学将是发现中药质量标志物的有效途径^[6]。

中医方证代谢组学是整合了中药血清药物化学与代谢组学技术,在方-证对应并显效的前提下,发现与临床疗效相关、体现方剂配伍、来源于组成药物药效物质基础的研究策略^[7-8]。该研究策略是在本团队 20 世纪 90 年代初建立的中药血清药物化学理论及方法(2002 年获国家科技进步二等奖)基础上,于 21 世纪初与代谢组学技术整合后所建立的发现药效物质基础的新策略,并成功地在 9 个证候及 12 个相关方剂中应用实践(2012 年中国中西医结合学会科学技术一等奖)^[9-10]。一方面,利用代谢组学技术从内源性小分子代谢层面表征证候代谢轮廓及发现生物标记物,实现证候的精准诊断,并以代谢轮廓和生物标记物为参数精准评价方剂整体效应;另一方面,采用一体化研究,利用血清药物化学方法阐明有效状态下方剂体内显效成分,将内源性证

候的生物标记物与体内的外源性方剂成分相关联,阐明方剂药效物质基础及有效性机制^[11-12]。将上述学术思想定义为中医方证代谢组学,其英文被定义为Chinmedomics^[13],原著Chinmedomics由Elsevier出版;Chinmedomics已被国际学术界接受并引用,Nature杂志认为Chinmedomics“a powerful approach to evaluate the efficacy of TCM”;刘昌孝院士认为“中医方证代谢组学搭建了中医药从传统到现代研究的桥梁”^[14]。该方法不仅是基于方剂配伍及方证对应条件下,评价中药有效性从而发现药效物质基础的有效途径,更是发现中药质量标志物不可或缺的途径之一。

2 中医方证代谢组学在中药质量标志物研究中的应用

2.1 茵陈蒿汤质量标志物研究

茵陈蒿汤出自东汉张仲景《伤寒论》,具有清热利湿退黄的功能,现代临床主要用于治疗肝胆系统疾病引起的湿热黄疸,其病理变化与肝损伤密切相关。首先,制备四氯化碳诱导大鼠肝损伤模型,在肝胆临床生化指标和组织病理学评价基础上,利用代谢组学方法和UPLC-HDMS技术分析肝损伤发生过程中机体代谢轮廓变化,在血液和尿液中共发现了32个肝损伤相关生物标记物,茵陈蒿汤能够有效干预四氯化碳诱导大鼠肝损伤模型代谢轮廓的变化,能够使23个生物标记物显著回调^[15]。在茵陈蒿汤保肝作用评价基础上,在中药血清药物化学理论指导下,利用UPLC-HDMS技术对同时采集的血清样品进行分析,鉴定或表征了21个茵陈蒿汤表达保肝效应的体内显效成分,包括苦藏花苷酸、绿原酸、6-甲氧基香豆素-7-O-硫酸酯、7-甲氧基香豆素-6-O-硫酸酯、京尼平龙胆二糖苷、京尼平苷、红花黄色素、茵陈烯炔、5,6-二甲氧基-7-羟基香豆素、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、6,8-二甲氧基-7-羟基香豆素、6,7-二甲氧基香豆素、2,5-二甲基-7-羟基色原酮、2,7-二甲基-1,4-萘醌、6-甲氧基色原酮、茵陈色原酮、大黄酸、大黄素及3个未鉴定成分^[16]。测定同一只肝损伤大鼠模型在茵陈蒿汤干预过程中体内生物标记物的相对强度及茵陈蒿汤体内显效成分的相对强度,根据其动态变化进行关联度分析,发现茵陈蒿汤6个体内显效成分与生物标记物显著相关,即京尼平苷与多元醇、苯甲酸己氧基酯、2-羟基-十四烷-1-萘酮、甘氨酸、犬尿酸、1-正己烷基-3,9-二烯-2-羟基苯甲酸酯、亮氨酸基脯氨酸、2-羟基-十四烷-1-

萘酮、1-正己烷基-3,9-二烯-2-羟基苯甲酸酯等13个生物标记物高度相关;6,7-二甲氧基香豆素与多元醇、苯甲酸己氧基酯、 α -核糖咪唑、2-羟基-十四烷-1-萘酮、犬尿酸、苯并呋喃二酮等7个生物标记物高度相关;大黄酸与丙氨酸苯丙氨酸、甘氨酸、犬尿酸、10,12-二炔十八酸苯酯、[氨基-(4-吡啶基)甲基]-[2-(2,5-二甲基苯氧基)乙酰基]氧铵、苯并呋喃二酮等8个生物标记物高度相关;6,8-二甲氧基-7-羟基香豆素与 α -核糖咪唑、甘氨酸、1-正己烷基-3-二烯-2-羟基苯甲酸酯、亮氨酸基脯氨酸等6个生物标记物高度相关;5,6-二甲氧基-7-羟基香豆素与2-羟基-十四烷-1-萘酮、甘氨酸、犬尿酸、1-正己烷基-3,9-二烯-2-羟基苯甲酸酯、亮氨酸基脯氨酸5个生物标记物高度相关;槲皮素-3-O-葡萄糖苷与甘氨酸、犬尿酸、10,2-二炔十八酸苯酯、[氨基-(4-吡啶基)甲基]-[2-(2,5-二甲基苯氧基)乙酰基]氧铵等5个生物标记物高度相关^[17]。这6个成分共与20个肝损伤生物标记物相关,基本能够体现茵陈蒿汤抗肝损伤的效应机制,是茵陈蒿汤抗肝损伤的主要效应成分。

5,6-二甲氧基-7-羟基香豆素和6,8-二甲氧基-7-羟基香豆素在茵陈蒿汤体外样品中仅有少量存在,推测并证实二者在体内主要由6,7-二甲氧基香豆素代谢产生^[18],基于质量标记物的“饮片固有成分”原则,这两个代谢物不能作为质量标志物,而将其前体化合物6,7-二甲氧基香豆素作为质量标志物,同时该成分也是茵陈蒿汤的主要效应关联成分。因此,京尼平苷、6,7-二甲氧基香豆素、大黄酸、槲皮素-3-O-葡萄糖苷,这4个成分的整体作用能够反映茵陈蒿汤的整体效应,而且是饮片中的固有成分,结构明确,在饮片中具有较高的含量,能够体现方剂配伍,可作为茵陈蒿汤的质量标志物。

2.2 六味地黄丸质量标志物研究

六味地黄丸出自北宋钱乙《小儿药证直诀》,是据东汉张仲景《金匮要略》所载肾气丸减去桂枝、附子而成,用于治疗小儿“五迟、五软”证。首先,采用延迟刨宫产手术方法制备能够反映“五迟、五软”证病机的缺氧缺血脑瘫大鼠模型,在经典行为学、临床生化指标、组织病理学、免疫组织化学评价基础上,利用代谢组学方法和UPLC-HDMS技术分析脑瘫大鼠模型机体内源性代谢轮廓变化,鉴定了20个生物标记物,包括肌酸酐、1,3-二甲基脲嘧啶、烟酰胺、尿酸、胞嘧啶、apo-[3-methylcrotonoyl-

CoA: carbon-dioxideligase (ADP-forming)], 3-甲基尿酸、甲基巴豆酰甘氨酸、 N_1 -(α -D-ribosyl)-5,6-dimethyl-benzimidazole、5-L-谷酰基-牛磺酸、黄嘌呤核苷酸、 N -乙酰神经氨酸、顺式-乌头酸、柠檬酸、3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸酯、5-胸腺嘧啶核苷酸、2,5-二羟基苯乙酸、3-甲氧基吡啶、5-羟基吡啶乙酸、雄甾烯二醇；涉及糖类代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、甾体激素类生物合成5种代谢途径。六味地黄丸能够干预延迟刨宫产幼鼠代谢轮廓变化，使其代谢轮廓更加接近假手术组，脑瘫模型20个生物标记物中的10个能够被六味地黄丸显著回调($P < 0.05$)，包括柠檬酸、尿酸、5-羟基吡啶乙酸、5-胸腺嘧啶核苷酸、3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸酯、2,5-二羟基苯乙酸、雄甾烯二醇、肌酸酐、 N -乙酰神经氨酸、黄嘌呤核苷。利用UPLC-HDMS技术分析六味地黄丸干预脑瘫大鼠模型有效的体内显效成分，共发现了20个血中移行成分，包括14个原型成分和6个代谢产物，分别为梓醇、6- O -甲基梓醇、莫诺苷、丁香酚甲醚、丹皮酚原苷、毛蕊花糖苷、脱水莫诺苷元、泽泻醇A单乙酸酯、16(R)-贝壳杉烷-2,12-二酮、土莫酸、泽泻醇F、顺式-9-顺式-12-亚油酸、十六(烷)酸、豆甾醇、没食子酸硫酸酯、去氧牡丹酮葡萄糖醛酸苷、脱水1-乙基- β -D-半乳糖苷、脱水獐牙菜苷、二十二烷酸脱甲基硫酸酯和脱水麦角甾醇。将六味地黄丸有效状态下体内显效成分的暴露水平与其干预回调的脑瘫生物标记物表达水平进行关联度分析，发现六味地黄丸5个体内显效成分与脑瘫大鼠模型生物标记物高度相关，即莫诺苷与顺式-乌头酸、3-甲基尿酸、黄嘌呤核苷酸、 N -乙酰神经氨酸高度相关；丹皮酚原苷与柠檬酸、5-胸腺嘧啶核苷酸、甲基巴豆酰甘氨酸、5-羟基吡啶乙酸高度相关；毛蕊花糖苷与顺式-乌头酸、烟酰胺、尿酸、胞嘧啶高度相关；没食子酸硫酸酯与肌酸酐、2,5-二羟基苯乙酸、黄嘌呤核苷酸、 N -乙酰神经氨酸高度相关；脱水獐牙菜苷与顺式-乌头酸、3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸酯、胞嘧啶、3-甲氧基吡啶高度相关。莫诺苷、丹皮酚原苷、毛蕊花糖苷、没食子酸硫酸酯、脱水獐牙菜苷，这5个成分能够调节六味地黄丸10个效应生物标记物中的9个，基本反映了六味地黄丸的效应机制，是主要效应关联成分^[19]。

脱水獐牙菜苷前体化合物獐牙菜苷、没食子酸硫酸酯前体化合物没食子酸、莫诺苷均来自山茱萸，

丹皮酚原苷来自牡丹皮，毛蕊花糖苷来自熟地黄，代表了六味地黄丸“三补”效应成分，可以作为六味地黄丸的质量标志物。

2.3 男仕胶囊的质量标志物研究

男仕胶囊是由黄芪、巴戟天、蒲公英、枸杞子和桂枝组成的补肾阳中药复方制剂，具有温补肾阳的功能。采用sc皮质酮橄榄油溶液的方法复制肾阳虚证大鼠模型，在临床化学、组织病理学和免疫组化检测基础上，利用UPLC-HDMS技术分析肾阳虚大鼠模型内源性代谢轮廓变化，鉴定了52个代谢标记物，涉及到15条代谢通路，包括亚麻酸代谢、色氨酸代谢、甘油磷脂代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、类固醇激素生物合成、酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、甘油酯代谢、赖氨酸降解、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、初级胆汁酸合成、不饱和脂肪酸合成。男仕胶囊能够使肾阳虚大鼠模型偏离的代谢轮廓调节至健康状态，明显回调的代谢标记物所涉及的代谢通路为类固醇激素的生物合成途径、色氨酸代谢通路中神经递质合成途径、酪氨酸代谢通路中的神经递质和激素的合成与分泌途径。利用UPLC-HDMS技术分析男仕胶囊治疗有效状态下的体内显效成分，共鉴定了20个原型成分和5个代谢产物，包括来源于蒲公英的苯丙氨酸、原儿茶酸、咖啡酸、伞形花内酯、2,4-二羟基肉桂酸乙酯、二羟基木犀草苷、木犀草苷、3-(2-羟基苯基)丙酸、5,6,7-trihydroxy-18-methyloxacyclooctadec-3-en-2-one、5,6,7-trihydroxy-18-methyloxacyclooctadecan-2-one、1,5-dioxacycloicosane-6,20-dione、香豆酸、对羟基苯甲酸、2,4-二羟基肉桂酸乙酯、2,5-二羟基肉桂酸、阿魏酸葡萄糖醛酸苷；源于巴戟天的去乙酰基车叶草苷酸、对羟基肉桂酸、水晶兰苷、鸡屎藤次苷、2-羟基-1-甲氧基蒽醌、1-羟基-2-甲氧基蒽醌、2,5-二羟基蒽烷；来源于黄芪的5-羟基-7,8-二甲氧基黄酮葡萄糖醛酸苷；来源于枸杞子的甜菜碱。将男仕胶囊有效状态下的血中移行成分暴露水平与肾阳虚生物标记物动态变化进行关联度分析，男仕胶囊8个体内显效成分与生物标记物高度相关，分别为咖啡酸、2-羟基-1-甲氧基蒽醌、1-羟基-2-甲氧基蒽醌、阿魏酸葡萄糖醛酸苷、木犀草苷、甜菜碱、伞形花内酯和去乙酰基车叶草苷酸，主要来源于男仕胶囊中黄芪、巴戟天、蒲公英和枸杞子4味中药。进一步将这8个化合物输入中药靶点预测数据库(Herbal Ingredients' Target

Database), 对其作用靶标进行预测, 发现 11 个关联蛋白靶点, 包括酪氨酸蛋白激酶 BTK、 α -肾上腺能受体、一氧化氮合酶蛋白、生长激素、激素敏感性脂解酶等, 参与了神经营养蛋白信号通路、鞘脂类信号通路、甾类激素生物合成通路、醛固酮合成和分泌、花生四烯酸代谢等通路^[20]。因此, 咖啡酸、阿魏酸葡萄糖醛酸苷前体化合物阿魏酸、木犀草苷、伞形花内酯来自蒲公英, 2-羟基-1-甲氧基蒽醌、1-羟基-2-甲氧基蒽醌、去乙酰基车叶草苷酸来自巴戟天, 甜菜碱来自枸杞子, 可以作为男仕胶囊的质量标志物。

2.4 中药复方制剂 AS1350 的质量标志物研究

AS1350 是由鹿茸、肉桂、熟地黄、五味子、枸杞子、核桃仁、龙眼肉、大枣制成的中药复方制剂, 具有补肾阳的功能。在利用代谢组学进行皮质酮诱导肾阳虚大鼠模型生物标记物研究基础上, 发现 AS1350 对 1-磷酸-鞘氨醇、表脱氧胆酸、*N*-乙酰神经氨酸、 α -亚麻酸、苯丙酮酸、苯乙酰甘氨酸、黄尿酸、犬尿酸、皮质酮和 11 β ,21-二羟基-5 β 孕烷-3,20-二酮等核心标记物具有显著调节作用, 主要通过干预激素合成途径、色氨酸代谢途径、苯丙氨酸和酪氨酸代谢途径、脂肪酸代谢途径及磷酸甘油酯类代谢途径而调整了核心标记物的代谢轨迹。血清药物化学研究发现 AS1350 干预肾阳虚证有效状态下体内表达 47 个显效成分, 其中木脂素类(五味子醇甲、五味子酯甲、五味子醇乙、戈米辛 S、戈米辛 F、戈米辛 D)、香豆素类(香豆素、滨蒿内酯)、苯丙素类(去甲二氢愈创木酯酸)、环烯醚萜苷类(梓醇)、植物甾醇(环木菠萝烷醇)和生物碱类(巴婆碱、光千金藤碱、甜菜碱、东莨菪素)和环己烯类(努特卡扁柏酮、 β -紫罗兰酮)成分与肾阳虚生物标记物的轨迹变化高度关联, 主要来源于方中五味子、熟地黄、枸杞子和大枣^[21]。这些效应关联成分是 AS1350 的潜在质量标志物群, 可通过进一步的定性定量分析, 确定 AS1350 的质量标志物。

2.5 关黄柏药材质量标志物研究

关黄柏为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮, 为黄柏的经典正品来源, 古称“黄檗”。自《中国药典》2005 年版开始, 关黄柏被从“黄柏”中分出单列, 并规定关黄柏含小檗碱不得少于 0.6%, 含巴马汀不得少于 0.3%; 但关黄柏是常用清热燥湿、滋阴除蒸中药, 其质量标准中指标成分既无特异性和可溯源性, 更没有体

现关黄柏在经典方剂中表达的特有疗效。为此, 以中医方证代谢组学为核心技术, 选取关黄柏发挥清热燥湿功效的代表类方二妙丸、三妙丸、四妙丸, 及发挥滋阴除蒸功效的代表类方疗本滋肾丸、滋肾丸、大补阴丸和知柏地黄丸, 分析方剂配伍环境下关黄柏血中移行成分, 并通过进一步的药效关联分析, 发现关黄柏药材的质量标志物。

利用 UPLC-HDMS 技术分析鉴定了方剂配伍环境下关黄柏 30 个血中移行成分, 包括黄柏内酯 A/B、黄柏碱、木兰碱、3-*O*-阿魏酰奎宁酸、牛角花素、蝙蝠葛碱、四氢巴马汀、非洲防己碱、巴马汀、小檗碱、 γ -羟基丁烯酸内酯 II、三棱酸、吴茱萸苦素、黄柏内酯、黄柏酮及生物碱类成分的葡萄糖醛酸结合物等^[22]。基于前列腺癌与肾阴虚相火亢盛的密切关系和关黄柏治疗前列腺癌的临床应用, 制备前列腺癌小鼠模型评价关黄柏的疗效。采用异种移植法制备前列腺癌裸鼠模型, 在组织形态学和免疫组织化学方法评价关黄柏抗前列腺癌作用基础上, 利用 UPLC-HDMS 技术进行血液代谢组学研究, 鉴定了 34 个血液生物标记物, 关黄柏对尿酸、2-糠酸、柠檬酸、前列腺素 A₁、前列腺素 A₂、全反式视黄酸、PGF_{2a} 乙醇酰胺、神经酰胺、5'-脱氧腺苷、磷脂、花生四烯酸、鞘磷脂等 12 个核心生物标记物产生了明显的回调作用, 通过调节亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、鞘脂类代谢、三羧酸循环、视黄醇代谢起到抗前列腺癌作用。将关黄柏有效状态下的血中移行成分与前列腺癌生物标记物进行关联度分析, 确定 9 个关黄柏体内显效成分, 其中黄柏碱与 2-羟基肉桂酸、神经酰胺呈极度相关; 木兰碱与雄酮硫酸盐、血栓素、花生四烯酸代谢物呈极度相关; 小檗碱与 2-羟基肉桂酸、花生四烯酸代谢物呈极度相关; 蝙蝠葛碱和四氢巴马汀与磷脂、尿酸、血栓素、新叶黄素呈极度相关; 药根碱与前列腺素 A₂、神经酰胺、乙醇酰胺呈极度相关; 巴马汀与尿酸、5'-脱氧腺苷呈极度相关; 黄柏酮和黄柏内酯与尿酸、磷脂、新叶黄素呈极度相关^[23]。MTT 法和 Annexin V/PI 双染法分析结果表明, 主要效应关联成分小檗碱、木兰碱、黄柏内酯和黄柏酮具有不同程度的体外抗肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡活性^[24-25]。黄柏碱、木兰碱、小檗碱、蝙蝠葛碱、四氢巴马汀、药根碱、巴马汀、黄柏酮、黄柏内酯作为关黄柏中固有的原型成分, 具有与其功效相关的活性和体内行为, 能够体现方剂配伍的溯源性, 而

且可定性定量测定^[26], 可作为关黄柏质量标志物。

3 结语

中医方证代谢组学以中医病证本质研究为起点, 以方剂为研究对象, 通过方剂体内显效成分与病证生物标记物的关联分析, 发现方剂表达临床疗效的药效物质基础。将该研究策略应用于中药质量标志物研究中, 是解决其有效性、可溯源性和体现复方配伍属性的有效途径。将方证代谢组学策略延伸至药用植物代谢组学研究, 分析药用植物化学分类和次生代谢产物生物合成, 解决中药质量标志物的特有属性。最后以建立指纹图谱定性和多成分定量的分析方法, 从而全面解决中药质量标志物发现和确认的技术问题, 保证中药的有效性和安全性。

参考文献

- [1] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1456.
- [2] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3149-3154.
- [3] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, et al. A new concept on quality marker for quality assessment and process control of chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [4] 张铁军, 白 钢, 陈常青, 等. 中药质量标志物——基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-marker) 研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [5] 张铁军, 王 杰, 陈常青, 等. 基于中药属性和作用特点的中药质量标志物研究与质量评价途径 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1051-1060.
- [6] 王喜军. 中药药效物质基础研究的系统方法学——中医方证代谢组学 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 13-17.
- [7] Wang X J, Zhang A, Sun H, et al. Discovery and development of innovative drug from traditional medicine by integrated chinmedomics strategies in the post-genomic era [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2016, doi: 10.1016/j.trac.2015.11.010.
- [8] Wang X J, Zhang A, Yan G, et al. UHPLC-MS for the analytical characterization of traditional Chinese medicines [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2014, 63: 180-187.
- [9] Wang X J. *Chinmedomics* [M]. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2015.
- [10] Wang X J. *Serum Pharmacochimistry of Traditional Chinese Medicine* [M]. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2017.
- [11] Wang X, Zhang A, Zhou X, et al. An integrated chinmedomics strategy for discovery of effective constituents from traditional herbal medicine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18997.
- [12] Zhang A, Sun H, Wang X J. Mss spectrometry-driven drug discovery for development of herbal medicine [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2018, 37(3): 307-320.
- [13] Wang X, Zhang A, Sun H. Future perspectives of Chinese medical formulae: Chinmedomics as an effector [J]. *OMICS*, 2012, 16(7/8): 414-421.
- [14] Liu C X. Chinmedomics builds a bridge from traditional to modern research of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 297-298.
- [15] Wang X, Zhang A, Wang P, et al. Metabolomics coupled with proteomics advancing drug discovery toward more agile development of targeted combination therapies [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(5): 1226-1238.
- [16] Wang X, Sun W, Sun H, et al. Analysis of the constituents in the rat plasma after oral administration of Yin Chen Hao Tang by UPLC/Q-TOF-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(3): 477-490.
- [17] 张爱华, 孙 晖, 闫广利, 等. 中医方证代谢组学——中医药研究的新策略 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 569-576.
- [18] Wang X, Lv H, Sun H, et al. Development of a rapid and validated method for investigating the metabolism of scoparone in rat using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadruple time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(23): 3883-3890.
- [19] 李秋菊, 王 萍, 王美佳, 等. 基于中医方证代谢组学技术的六味地黄丸干预脑瘫大鼠模型研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(10): 1684-1696.
- [20] 刘 琦, 赵宏伟, 张爱华, 等. 基于中医方证代谢组学研究男仕胶囊治疗肾阳虚证的药效物质基础及作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2901-2914.
- [21] Liu Q, Zhang A, Wang L, et al. High-throughput chinmedomics-based prediction of effective components and targets from herbal medicine AS1350 [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep38437.
- [22] 李先娜, 邹 迪, 李冰冰, 等. 基于体内过程的关黄柏在知柏地黄丸等类方配伍环境下血中移行成分分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(10): 1730-1739.
- [23] Li X N, Zhang A, Wang M, et al. Screening the active compounds of *Phellodendri Amurensis Cortex* for treating prostate cancer by high-throughput chinmedomics [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/srep46234.
- [24] 张天雷, 邱 时, 李先娜, 等. 基于细胞代谢组学技术的关黄柏潜在有效成分木兰碱对前列腺癌细胞的治疗作用研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(10): 1740-1748.
- [25] Li X, Zhang A, Sun H, et al. Metabolic characterization and pathway analysis of berberine protects against prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(39): 65022-65041.
- [26] Wang L, Yan G, Zhang A, et al. Fingerprinting and simultaneous determination of alkaloids and limonins in *Phellodendri Amurensis Cortex* from different locations by high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(1): 161-166.