

• 专 论 •

多组学技术在中药毒性及解毒研究中的应用

曼琼¹, 马骏¹, 邓毅^{1,2*}, 李鹏杰¹, 杨志军¹, 杨秀娟¹

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要: 系统生物学的飞速发展对中医药深入研究提供了思路 and 手段, 其可以全面系统地分析中药及复方多成分多靶点治疗疾病的分子机制。基于整合多组学策略研究中药毒性和解毒作用已成为中药安全性研究的方向和热点。对基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学和多组学整合技术在中药毒性及解毒作用和机制研究中的思路、方法和进展进行综述, 为多组学技术在中药毒性及解毒作用深入研究中的应用提供参考。

关键词: 多组学; 中药; 毒性; 解毒; 蛋白质组学; 代谢组学

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)12-3117-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.001

Application of multi-omics in toxicity and detoxification of Chinese materia medica

MAN Qiong¹, MA Jun¹, DENG Yi^{1,2}, LI Peng-jie¹, YANG Zhi-jun¹, YANG Xiu-juan¹

1. College of Pharmacy, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Gansu Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: The rapid development of systems biology provides ideas and means for the in-depth study of Chinese materia medica (CMM). It can comprehensively and systematically analyze the molecular mechanism of CMM and Chinese medicine prescription in treating diseases with multi-component and multi-target. It has become the direction and hot spot of the safety research on the toxicity and detoxification of CMM based on the integrated multi-omics strategy. In this paper, the ideas, methods and progress of genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics and multi-omics integration technology in the study of toxicity, detoxification and mechanism of CMM were reviewed, which provides reference for the in-depth study of multi-omics technology in toxicity and detoxification of CMM.

Key words: multi-omics; Chinese materia medica; toxicity; detoxification; proteomics; metabolomics

多组学 (multi-omics) 技术指现代生物科学研究体系中一系列基于高通量分析检测技术的研究方法, 主要包括代谢组学、蛋白质组学、基因组学、转录组学、RNA 组学等^[1]。多组学研究策略可从整体出发, 认识人类组织结构、功能、生物大分子和内源性小分子等之间的内在联系。中药安全性一直备受关注, 因中药成分复杂, 作用靶标多样使中药毒性及解毒机制研究不深入, 利用多组学整合策略获得更为丰富、精确的生物标记物将成为中医药毒性研究的新趋势, 有助于中药和复方与人体生物效

应间复杂系统的研究。

1 组学技术概述及在中医药研究中的应用

在分子术语词后添加“组学 (omics)”意味着对一组分子进行全面或全局的评估 (<http://omics.org/>), 组学技术主要包括基因组学 (genomics)、转录组学 (transcriptomics)、蛋白质组学 (proteomics)、代谢组学 (metabolomics)、免疫组学 (immunomics)、糖组学 (glycomics)、脂类组学 (lipidomics) 等^[2] (表 1)。其中, 基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学被称为四大组学

收稿日期: 2019-10-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81960723); 兰州市科技局资助项目 (2018-4-63); 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放基金资助项目 (ZDSYS-KJ-2018-009)

作者简介: 曼琼 (1990—), 女, 博士研究生, 藏族, 研究方向为中藏药及复方临床应用基础研究。Tel: 18152094636 E-mail: gretam@163.com

***通信作者** 邓毅, 男, 教授, 博士生导师, 从事中藏药及复方临床应用基础研究。E-mail: dengyi@gszy.edu.cn

表 1 各组学技术概况
Table 1 Overview of multi-omics

类型	研究对象	研究内容	主要技术	在中医药领域应用	参考文献
基因组学	生物体内全部基因	结构基因组学：基因定位、基因组作图及核苷酸序列测定 功能基因组学：分析整个基因组基因、非基因序列及功能 比较基因组学：比较不同物种的整个基因组	实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)、微阵列 (microarray)、全基因组测序 (WGS)、外显子测序 (WES)、等三维基因组 (Hi-c、Micro-C) 等	阐述基因多态性与中药之间的关系；建立中医“证候”表达谱；完善中医穴位、经络等治疗理论及作用机制	3-6
转录组学	细胞或生物体某种条件下的所有转录产物	基因转录的区域、转录因子结合位点、染色质修饰点、DNA 甲基化位点等生理或病理状态下所有种类的 mRNA 及其功能	微阵列 (microarray)、基因表达系列分析 (SAGE)、大规模平行信号测序系统 (MPSS)、数字基因表达谱 (DGE) 测序等	鉴别中药材真假；鉴定中药次生代谢产物生物合成功能基因；完善证候诊断标准；寻找中药及复方作用靶点，阐明作用机制	7-8
蛋白质组学	特定的时刻、环境、条件下基因组所表达的全部蛋白质	结构蛋白质组学：蛋白质组表达研究，蛋白质鉴定，翻译后修饰 功能蛋白质组学：蛋白质功能的确定	双向电泳 (2D-PAGE)、荧光差异凝胶电泳 (DIGE)、同位素亲和标记 (ICAT)、同位素标记相对和绝对定量技术 (iTRAQ)、非标记定量技术 (Label-free) 等	解释中药自身遗传分子机制，定向调控中药可利用物质的生物合成；补充中医证候的诊断标准；寻找中药及复方作用靶点，阐明作用机制；阐释复方“君臣佐使”的配伍原则	9-14
代谢组学	生物体参与新陈代谢和正常生长功能的相对分子质量 < 1 000 的内源性小分子化合物	对预先设定的目标代谢物或某一生物、细胞的所有代谢物进行定性和定量分析，研究其动态变化规律	核磁共振技术 (NMR)、液相色谱质谱联用 (LC-MS)、气相色谱质谱联用 (GC-MS)、毛细管电泳质谱联用 (EC-MS)、同位素标记质谱等	评价中药材质量；揭示复方配伍机制和规律；建立中医证候代谢组；寻找疾病代谢生物标志物；发现中药作用物质基础，阐明机制	15-18

技术，用于人体生理、病理机制研究。

基于系统生物学的多组学研究的出现为系统生物学的发展提供了一个有力工具，研究涉及整合不同类型的组学数据，这些数据既可以作为疾病发生或治疗过程的标志物，也可以体现疾病发生和治疗过程中生物学途径的具体改变。现代医学利用组学技术完成人体和疾病的组学化，使疾病的发生和药物的治疗机制分析网络化，为中医药现代化研究提供了新的思路^[19]。组学技术的发展可一定程度解决中医药作用靶标不清，作用机制不明的问题。多组学整合策略帮助中药及复方更加系统、全面、精准地筛选治疗生物标志物，阐明作用机制，科学地评估中药及复方的临床价值。

2 各组学技术在中药毒性和解毒中的应用

2.1 基因组学

基因组学是第一个出现的组学，也是目前最成

熟的组学技术，其不再关注单个基因的“遗传学”特征，而是重点研究整个基因组的多样性和基因的表达、调控及功能等。在医学研究中，基因组主要用于识别与疾病和治疗反应相关的基因变异，为绘制和研究人体复杂疾病的特定基因变异提供一个有利的框架^[20]。人体大约有 2 万个基因，其中，不同种族和个体之间的基因组差异不到 0.1%，但这些微小的差异决定着人类个体间的差异性，并可能就是毒性物质的易感性基因^[21]。利用基因组学研究药物毒性及中药解毒作用可从全基因角度观察机体与药物发生毒性反应后的整体变化，发现药物毒性或解毒作用的易感基因，阐述药物毒性及解毒机制。采用基因组学技术可快速建立中药毒性评价办法，为中药安全性研究提供思路及手段。雷公藤内酯醇 (TP) 是雷公藤的主要肝毒性成分，Wang 等^[22]采用全基因组微阵列技术分析 TP 诱导肝毒性大鼠的肝

脏基因表达谱, 阐明其肝毒性潜在机制, 基因组数据得到大鼠肝脏差异表达基因 3 329 个, 与胰岛素信号通路、葡萄糖代谢、细胞周期和氧化应激等功能相关。并首次观察到糖皮质激素和胰岛素样生长因子 1 (IGF1) 可能参与 TP 诱导的大鼠肝毒性, 说明 TP 引起大鼠肝毒性可能与其改变肝脏的氧化还原状态, 降低血清葡萄糖并诱导肝细胞凋亡相关。

除了上述雷公藤等有毒性中药引起的固有性人体损伤外, 某些中药本身也可以对人体造成直接损害, 为特异性反应^[23]。这种不良反应发生在极少数易感人群中, 与药物剂量无关, 潜伏期较长, 难以预测, 临床表现差异大。中药特异性反应最常见的为特异质药源性肝损伤 (idiosyncratic drug-induced liver injury, IDILI)^[24]。现已报道何首乌、雷公藤、麻黄、淫羊藿等均可引起 IDILI^[25-27]。IDILI 的发生与遗传或特异质密切相关, 特异质主要包含多态性的酶和蛋白质, 如 I 和 II 相代谢酶、抗氧化酶、药物转运蛋白、炎症和人类白细胞抗原等^[28]。中药 IDILI 与人体易感基因密切相关, 因此目前应用基因组学、蛋白质组学等技术寻找与其直接相关的生物标志物, 并利用基因组学研究基因多态性关系逐渐成为特异质损伤研究的主要方式之一^[29-30]。何首乌为中药养血、养发佳品, 因严重肝毒性报道引起国内外关注。Ma 等^[31]基于 43 位何首乌引起的肝损伤 (PM-DILI) 患者和 43 名对照受试志愿者, 观察其 CYP1A2 的基因型和等位基因频率, 检验基因多态性是否与 PM-DILI 相关。从基因组 DNA 中扩增了 CYP1A2 的 1C、1F、2、7、9 和 11 等位基因并进行测序, PM-DILI 患者 CYP1A2 1C 等位基因的频率为 46.5%, 健康受试者为 27.9%, 说明 CYP1A2 1C 突变在中国 PM-DILI 患者中的发生频率与健康人不同。肖小河研究员和周宏灏院士等^[32]合作首创的药源性肝损伤因果关系评价“整合证据链法”对 11 名 PM-DILI 患者的主要组织相容性复合体 (MHC) 区域进行测序, 并将所有人类白细胞抗原 (HLA) 型频率与 Han-MHC 数据库进行比较, 进一步将 15 名 PM-DILI 患者、33 名其他 DILI 患者和 99 位健康受试者对照进行独立的复制研究, 基于 HLA-B PCR 序列的分型验证候选等位基因。PM-DILI 患者的 HLA-B*35:01 发生率为 45.4%, 汉族人群为 2.7%。逻辑回归模型证实 HLA-B*35:01 是高风险等位基因, 说明 HLA-B*35:01 等位基因是 PM-DILI 的遗传危险因素, 也是预测人类 PM-DILI

的潜在生物标志物。该研究首次发现了何首乌诱发特异质肝损伤的易感基因 HLA-B*35:01, 在中药肝损伤易感人群遗传背景研究方面取得重要突破。

基因芯片又称 DNA 微阵列技术, 可通过挖掘基因表达谱数据库中的差异表达基因, 将药物解毒的作用与基因表达特征结合, 针对性分析与毒性相关的基因, 深入研究解毒作用机制。姜黄素是姜黄的主要有效成分, 对药物、毒物及重金属引起的肝损伤有良好的保护作用^[33]。Wu 等^[34]基于 CCl₄ 致小鼠肝和肝星形细胞 HSC-T6 损伤模型, 采用甲基化芯片 (MeDIP) 分析基因组 DNA 甲基化, 并通过 qRT-PCR、蛋白免疫印迹 (Western blotting)、甲基化特异性定量 PCR (qMSP) 技术验证富含 MeDIP 的 DNA 甲基化转移酶 1 (DNMT1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原 $\alpha 1$ (Coll $\alpha 1$) 等的 mRNA 和蛋白表达及基因甲基化状态, 最终发现姜黄素可以通过下调 DNMT1、 α -SMA 和 Coll $\alpha 1$ 以及关键基因的去甲基化实现体内外肝损伤逆转。

2.2 转录组学

转录组测序得到的是经基因组转录的 RNA 的总和, 相较基因组, 转录组以少量基因组的 DNA 为模板, 将合成的 RNA 作为来源, 受生长周期、生理条件和外界环境调控, 信息量较基因组缩小^[35]。基于转录组研究中药毒性及解毒作用可揭示基因表达与生命现象之间更深层次的内在联系, 更直接得到毒相关功能基因信息, 获得药物毒性或解毒作用的更具体通路信息。通过转录组可评价中药毒性。槲皮素是桑叶、柴胡、旋覆花等中药及复方的主要成分之一, 可能产生遗传毒性^[36], 但有报道小鼠口服槲皮素后未显示出遗传毒性^[37]。鉴于此, 有学者^[38]基于微阵列转录组学方法评价槲皮素在小鼠小肠和肝脏中潜在的遗传毒性, 微阵列通路显示基因毒性相关通路不受槲皮素调控。DNA 损伤相关基因也没有遗传毒性体现, 说明该实验剂量下槲皮素对小鼠无遗传毒性。此外, 转录组得到的基因信息对寻找早期中毒及解毒生物标志物, 阐释中毒及解毒作用机制有重要价值^[39]。Li 等^[40]采用转录组测序技术 (RNA-Seq) 探讨以肝转录反应为特征的何首乌致大鼠胆汁淤积性肝损伤的分子机制。胆固醇生物合成途径有 14 种编码酶转录产物的表达呈剂量依赖性增加, Western blotting 验证 Cyp7a1 和 Hmgcr 是何首乌致胆固醇和胆汁酸合成的关键酶, 预测其致肝损伤的分子机制与对胆汁酸生物合成的干扰有关。

基因芯片技术也可用于转录组学研究, 基因芯片技术基于碱基互补杂交原理可以定量检测转录本, 实现不同细胞内多种 RNA (mRNA、lncRNA、circRNA) 全基因组测序。现代研究常通过基因芯片和测序技术量化比较特定解毒基因的表达调控规律, 构建基因调控网络, 从而发现解毒生物标志物, 阐述中药解毒机制。Li 等^[41]基于基因芯片技术探讨黄秦艽 (WVBF) 在转录水平对雪上一枝蒿 (CFA) 致小鼠肝毒性的解毒作用。结果表明, 与 CFA 治疗组相比, WVBF 治疗组有 67 个基因下调, 74 个基因上调, 可通过调节氧化应激、炎症损伤和细胞凋亡/坏死途径减轻 CFA 诱导的小鼠肝损伤。除此之外, WVBF 和 CFA 对炎症、癌症和糖尿病等疾病可能具有潜在的协同作用。

2.3 蛋白质组学

并不是所有疾病发生和药物影响的生命体机制变化都可以在基因表达水平上进行测量, 蛋白质的修饰或亚细胞再分配为机体提供了快速应答机制^[42]。作为基因表达的最终产物, 蛋白质组学研究能更好地阐明机体效应活动或功能的过程。随即衍生出毒理蛋白质组学, 研究鉴定生物体系中正常组织和有害物质的关键蛋白质表达和修饰的变化及其信号通路, 有助于通过蛋白质变化对有毒物质的毒性效应进行定量和定性的评估^[43]。蛋白质组研究药物毒性和解毒的最大优势就是可以迅速、全面、详尽地通过分析中毒细胞、组织、器官的蛋白表达变化, 鉴定特异性表达差异蛋白, 确定中毒或解毒标志物, 解释生物过程, 阐明分子机制。

肝脏作为人体药物代谢的最主要器官, 药物的潜在毒性代谢物常会对其产生直接或间接的损伤。我国因中药引起的肝损伤病例已超过 45.43%^[44], 其中主要原因是中药某些特定成分经生物转化变成潜在毒性化合物与大分子蛋白结合, 引起蛋白质变性、DNA 交联等毒性反应。基于蛋白质组学的中药毒性, 尤其是肝毒性的研究可快速、准确、高效地确定中药毒性特异性生物标志物, 便于临床监测。梔子主要成分京尼平苷可诱导肝毒性, Wei 等^[45]基于非标定量技术检测过量京尼平苷诱导的肝损伤大鼠肝脏蛋白表达, 并采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对候选生物标志物进行验证, 最终确定甘氨酸-N-甲基转移酶 (GNMT) 和糖原磷酸化酶 (PYGL) 2 种生物标志物显示肝损伤明显早于丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 等金标准的生物

标记物, 更方便对肝毒性的有效监测。除此之外, 对正常肝脏和中药损伤肝脏有明显差异的蛋白进行深入生物信息分析, 寻找差异蛋白互相作用关系, 富集相关蛋白功能和通路, 进行实验验证, 以深入探讨中药毒性机制。吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 是一类毒性生物碱, 广泛分布于千里光、款冬花、佩兰、紫草等中药及成方中, 因明显的肝毒性、肺毒性、遗传毒性等, 被广泛关注^[46-47]。Li 等^[48]采用 2D 凝胶电泳结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 蛋白质组学技术探讨 PAs 中毒大鼠肝脏差异蛋白表达变化和肝毒性机制, 得到氨甲酰磷酸合成酶 1 (Cps1)、骨骼肌肌动蛋白 $\alpha 1$ (Act $\alpha 1$)、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶 (Hpd) 等 21 种差异表达蛋白, 其中 PAs 毒性特异改变蛋白可作为诊断 PAs 中毒的重要生物标志物, 推测内皮型一氧化氮合成酶 (eNOS) 信号、尿素循环和血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路的改变可能是其肝毒性的原因之一, Ingenuity pathway analysis (IPA) 数据库结果进一步显示随着肝毒性的发展, 损伤可能扩展到其他器官的血管相关组织, 如通过引起肺泡毛细血管内皮细胞损伤诱发, 引起高血压, 拓宽目前对吡咯里西啶生物碱毒性分子机制的认识。目前, 蛋白组学现已广泛应用于雷公藤^[49]、黄芩^[50]、柯子^[51]等中药及其成分肝毒性研究。

在解毒过程中, 蛋白质组学技术用于不同时期各种毒理、病理、生理过程中肝脏蛋白质丰度变化的检测, 解析差异蛋白质在毒性发生和中药解毒每一个过程中发挥的作用, 帮助发现与验证解毒生物标志物, 解释中药解毒机制。Miao 等^[52]尝试通过 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 分析黄芩、黄连配伍后大鼠肝脏毒性差异蛋白, 得到二者配伍的差异蛋白主要为 I 期、II 期药物代谢酶和其他主要参与能量代谢、信号转导等的蛋白质, 其中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、和甜菜碱同型半胱氨酸 S-甲基转移酶 (BHMT) 可能是黄芩黄连配伍“增效解毒”的生物标志物。徐建亚^[53]和 Zampieri 等^[54]基于蛋白质组技术策略探讨“干姜人参半夏丸”中干姜人参配伍对生半夏解毒作用的机制。结果鉴定出生半夏组小鼠原肠胚和复方干预组小鼠原肠胚差异表达蛋白 197 个, 散在分布于呼吸、心、神经等系统发育过程, 富集于 Wnt、Hippo 发育相关通路, 进一步含药血清干预前后小鼠胚胎干

细胞的生信结果与体内一致,显示干姜、人参、半夏配伍可调控上述通路对生半夏胚胎毒性起到解毒作用,为临床合理应用半夏及其复方提供理论依据。

2.4 代谢组学

代谢组学通过信息建模、系统整合进行组群指标分析,研究生物体代谢物动态变化的规律^[55]。代谢组学可通过快速分析多条代谢通路,高效率实现对中药毒性程度及解毒作用的研究。代谢组学对中药毒性的研究主要通过连续取样,观察毒性的发生、发展的过程,从而可明确中药毒性作用的靶器官,阐明作用机制。为探讨半夏炮制前后的毒性和潜在中毒机制, Su 等^[56]基于液相色谱-飞行时间-质谱联用(LC-TOF-MS)在半夏炮制前后大鼠血清中检测到 10 种差异代谢产物,涉及雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号转导抑制和转化生长因子- β (TGF- β)途径激活等途径,显示生半夏有心脏毒性,中毒机制涉及自由基清除过程,炮制后毒性减轻。目前,有较多研究利用代谢组学确定中药毒性的生物代谢标志物。Lu 等^[57]基于超高液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱(UPLC-QTOF-MS)研究苍耳子中毒大鼠尿液代谢物水平,最终发现 5-羟基-6-甲氧基吲哚-葡萄糖苷酸、L-苯丙氨酰-L-脯氨酸等 10 种代谢物可以作为苍耳子潜在毒性生物标志物,毒性机制可能与脂质过氧化损伤和脂肪酸氧化代谢紊乱有关。

基于代谢组学对中药解毒作用的研究主要检测毒性的发生、发展、解毒作用的过程,寻找解毒差异代谢产物,阐明解毒作用机制。Su 等^[58]对大鼠的血清和尿液进行核磁共振($^1\text{H-NMR}$)分析,阐明黄芩苷对朱砂肝肾毒性的缓解作用机制,结果发现黄芩苷组大鼠代谢特征与朱砂组明显不同,存在 17 种差异代谢产物,涉及牛磺酸和亚牛磺酸代谢、苯丙氨酸代谢、缬氨酸等,说明黄芩苷通过调节与能量代谢、胆碱代谢、氨基酸代谢等有关的内源性代谢物起到对朱砂肝肾毒性的解毒作用。目前,临床常将中药或复方与化学药物联合使用,降低其脏器毒性。伊立替康(CPT-11)为常用抗癌药,具有严重肠毒性,黄芩汤、生姜泻心汤^[59]、葛根苓连汤^[60]对伊立替康肠毒性具有缓解作用。徐风国教授团队^[61-63]采用 GC/MS、LC/MS 非靶向代谢组研究黄芩汤(HQD)、其主要组成和成分对 CPT-11 致胃肠道毒性大鼠血清代谢的影响。发现黄芩总苷为解肠毒关键成分, HQD 通过逆转谷氨酰胺、色氨酸、胆汁酸和脂质代谢,调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸途径缓

解 CPT-11 胃肠毒性。基于此,进一步采用 LC-MS/MS 的靶向代谢组学分析了 17 个胆汁酸(BAs)的血清和组织代谢谱, HQD 可显著减弱 CPT-11 诱导的肠毒性并逆转疏水 BA 的改变。HQD 处理后 BA 的平衡发生了变化,导致毒性降低,首次证明了 HQD 和 CPT-11 诱导的肠毒性与 BAs 稳态之间的精确相互作用。

3 多组学整合策略方法及应用

基因组学、转录组学、代谢组学和蛋白质组学等组学检测技术可基于不同层次描述细胞内的生命活动。基因组可获取所有功能基因的序列和表达信息,转录组可检测所有正在表达的基因的动态变化,蛋白质组反映基因表达调控机制,代谢组反映机体代谢物。基因组的基因通过转录和转录后加工为 mRNA 实现对转录组的调控, mRNA 通过翻译和翻译后修饰实现转录组对蛋白质组的影响。基于复杂的通路和网络关联,可以对不同组学的数据进行整合,通过整理、统计和计算展示数据间的调控关系,揭示药物对生命系统的影响,研究疾病本身发病和药物治疗的机制^[64]。理想的多组学整合是将上述各不同层面组学数据全方位整合,实现疾病或药物对基因、蛋白、转录因子、代谢物的全谱分析,阐述分子调控-表型间的关联,全面解析机制。然而目前常见的多组学整合策略是结合基因组与转录组寻找新的关键基因,或结合基因组/转录组和蛋白质组确定生物标志物,或选以上三者结合代谢组发现基因功能等。目前多见的多组学整合策略是将多类型组学数据进行关联性或因果分析,建立线性模型、树模型或网络模型,并基于统计学、生物学、文献报告、全部纳入等变量纳入方法,统计数据,预测结果,发现生物学调控关系,最终找到与研究目的相关的影响因素^[65]。见图 1。

就中药毒性或解毒而言,目前常用病理、临床化学和血液学指标等参数定义某中药或成分的毒性,这些研究可显示体质量和脏器质量变化、组织显微状态、中毒程度等,多是细胞过程异常和毒性后期效应的结果,不是毒性机制的体现。单一组学数据体现的是毒性反应的过程而不是毒性反应因果关系。而整合不同的组学数据可阐明毒性发生或解毒的潜在原因^[66]。多组学技术的应用可以测定特定的成分组成、特定的基因或蛋白表达,相较传统手段,可以在毒物含量较低和毒性较早期检测特定标记分子,对毒性机制进行全面而详细的分析^[67]。整

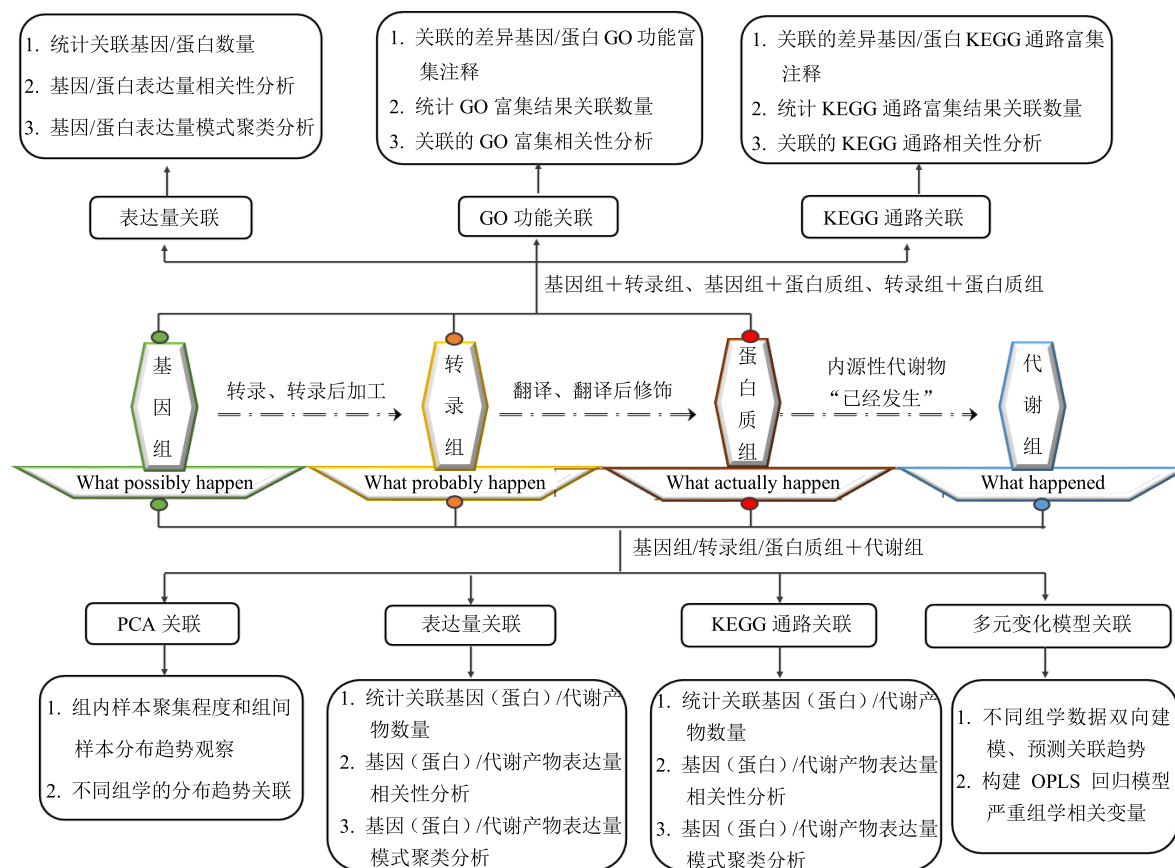


图 1 目前常见的多组学整合策略研究思路

Fig. 1 Current common research design for integration strategy of multi-omics

合各类型组学结果,结合系统生物学、生物信息学、功能基因组学进行生物解释与假设,可帮助研究者评价中药毒性,筛选毒性生物标志物。黄药子清热、凉血、解毒、消癭,临床可诱发肝毒性,Zhao等^[68]基于 iTRAQ 蛋白质组学及 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 代谢组学方法研究黄药子对大鼠的肝脏毒性。整合组学数据显示 1 366 种蛋白和 58 种代谢物呈剂量依赖性改变,肝毒性途径包括嘌呤代谢、嘧啶代谢、氨基酸代谢等,苯胺代谢可能是黄药子毒性的潜在特异性途径,嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、二氢嘧啶脱氢酶(Dpyd)、尿嘧啶核苷磷酸化酶 1(Upp1)、腺嘌呤、腺苷、尿苷等为潜在生物标志物。大黄素存在于何首乌、大黄等中药,具有明显的肝、肾毒性。Wu等^[69]收集 55 份人类肝脏和肾脏样本,整合代谢组学和转录组学数据得到 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 2B7(UGT2B7)是大黄素葡萄糖醛酸化的主要酶,全基因组关联研究(GWAS)发现位于 UGT2B 转录物约 50 kb 内的 rs11726899 显著影响大黄素的代谢,进一步的研究表明,长期使用大黄素会降低 UGT2B7 的活性,导致大黄素的积累。而男性大黄

素处理肝脏中多药耐药蛋白-2(MRP2)表达的增加又可以减轻大黄素的肝毒性,推测 UGT2B7 和 MRP2 是大黄素潜在的性别差异肝毒性的关键蛋白。

目前,整合多组学技术逐渐应用于筛选中药解毒关键靶标,确定生物标志物,解释中药解毒具体机制,有效解决了中药及复方机制不明等问题,已成为中药安全性研究的热点。CCl₄是一种无色有毒液体,可引起肝损害和肝纤维化。Dong等^[70-71]基于微阵列转录组和 iTRAQ 蛋白质组结合生物网络技术,预测 CCl₄在肝纤维化中的毒理学靶点和复方扶正化癥方抗 CCl₄肝毒性的分子机制及调控网络。整合复方多组学数据显示差异表达基因 255 个,蛋白 499 个,富集到花生四烯酸代谢、视黄醇代谢、细胞色素 P450 异物代谢等通路,10 个核心基因或蛋白重叠,复方治疗大鼠肝脏中 Ugt2a3、Cyp2b1 和 Cyp3a18 的 mRNA 和蛋白表达均高于模型组,表明扶正化癥方可调节 Ugt2a3、Cyp2b1 和 Cyp3a18 等视黄醇代谢和细胞色素 P450 的异生物代谢等途径对抗 CCl₄肝毒性。Song等^[72]整合 iTRAQ 蛋白质组和 GC-MS 代谢组数据,分析绞股蓝皂苷对 CCl₄肝

毒性的作用机制,发现绞股蓝皂苷组有上调蛋白301种,上调代谢物9种;下调蛋白296种,下调代谢物8种。验证得到绞股蓝可能通过上调ALDH改变糖酵解代谢并保护醛和脂质过氧化,抑制CCl₄诱导的肝毒性。

4 结语与展望

中药及复方成分复杂,为多靶点调控,药理机制多不明确,因此,评估其临床价值与安全性具有一定挑战。目前常用的毒性评价方法无法全面分析具体分子机制,欠缺准确性和客观性。中药的安全性是中药走向国际过程中的一个严重瓶颈。组学技术的出现有可能为中药毒性及解毒作用提供更有效的研究模式。观察毒物或解毒相关蛋白的基因类型(基因组)、基因表达(转录组学)、蛋白质水平(蛋白质组学)或代谢物含量(代谢组学)等,并基于上述结果提出合理假设,利用分子生物学手段验证假设,寻找毒性或解毒生物标志物,最终解释中药毒性或解毒的作用机制。

多组学技术的研究为宏观分析,具有整体性和全局性的特点,这与中药多组分、多途径、多靶点治疗疾病的思路相契合。然而,多组学技术在中药研究中的应用还有很多难点需要突破。如何对高通量数据进行高效、快速的收集、管理和分析成为主要挑战之一。大规模组学实验中原始数据的处理需要强大的数据处理设备和精准的算法,原始数据处理后,如何经过数据集的转化,使数据标准化、规范化或规模化等问题,对中医药学研究者来说仍具有较大难度。将整合多组学策略应用于中药研究,进行中药作用靶标的识别,用现代科学依据表征中医药认识疾病的方法和理论,有利于中药作用机制的更深入探索。

参考文献

- [1] Moni M A, Liò P. How to build personalized multi-omics comorbidity profiles. [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, doi: 10.3389/fcell.2015.00028.
- [2] Hasin Y, Seldin M, Lusis A. Multi-omics approaches to disease [J]. *Genome Biol*, 2017, doi: 10.1186/s13059-017-1215-1.
- [3] Ling C, Wang L, Wang Y, *et al.* The roles of traditional Chinese medicine in gene therapy [J]. *J Integr Med*, 2014, 12(2): 67-75.
- [4] Wang P, Chen Z. Traditional Chinese medicine ZHENG and Omics convergence: A systems approach to post-genomics medicine in a global world [J]. *Omics*, 2013, 17(9): 451-459.
- [5] 秦田雨,董笑克,孙文,等.基因组学技术推动中医药精准医学研究现状分析与展望[J].*现代生物医学进展*, 2018, 18(13): 2597-2600.
- [6] 曾召琼,易帆,李萍,等.基因组学技术在中医药研究中的应用[J].*国际检验医学杂志*, 2018, 39(24): 3089-3092.
- [7] Liu Y, Ai N, Liao J, *et al.* Transcriptomics: A sword to cut the Gordian knot of traditional Chinese medicine [J]. *Biomark Med*, 2015, 9(11): 1201-1213.
- [8] Xin J, Zhang R, Wang L, *et al.* Researches on transcriptome sequencing in the study of traditional Chinese medicine [J]. *Evid-Based Compl Alter Med*, 2017, doi: 10.1155/2017/7521363.
- [9] 乐亮,姜保平,徐江,等.中药蛋白质组学研究策略[J].*中国中药杂志*, 2016, 41(22): 4096-4102.
- [10] Iwamoto N, Shimada T. Recent advances in mass spectrometry-based approaches for proteomics and biologics: Great contribution for developing therapeutic antibodies [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 185: 147-154.
- [11] Dove A. Proteomics: Translating genomics into products [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(3): 233-246.
- [12] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, *et al.* Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13(1): 19-50.
- [13] Suo T, Wang H, Li Z. Application of proteomics in research on traditional Chinese medicine [J]. *Expert Rev Proteomic*, 2016, 3(9): 873-881.
- [14] 朱宇伟,于庆云,刘培,等.蛋白质组学在中医药科学研究中的应用进展[J].*中国现代中药*, 2016, 18(5): 661-665.
- [15] Chen C, Gonzalez F J, Idle J R. LC-MS-based metabolomics in drug metabolism [J]. *Drug Metab Rev*, 2007, 39(2): 581-597.
- [16] Freund D M, Hegeman A D. Recent advances in stable isotope-enabled mass spectrometry-based plant metabolomics [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, doi: 10.1016/j.copbio.2016.08.002.
- [17] Markley J L, Brüschweiler R, Edison A S, *et al.* The future of NMR-based metabolomics [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, doi: 10.1016/j.copbio.2016.08.001.
- [18] Sud M, Fahy E, Cotter D, *et al.* Metabolomics Workbench: An international repository for metabolomics data and metadata, metabolite standards, protocols, tutorials and training, and analysis tools [J]. *Nucl Acid Res*, 2016, 44(D1): D463-D470.
- [19] 李兵,韩飞,王忠,等.多组学网络背景下方剂临床价值的考量[J].*中国中药杂志*, 2017, 42(5): 848-851.

- [20] Li R, Kim D, Ritchie M D. Methods to analyze big data in pharmacogenomics research [J]. *Pharmacogenomics*, 2017, 18(8): 807-820.
- [21] 练雪萍, 艾妮, 陆晓燕, 等. 毒理基因组学及其在中药安全性研究中的应用进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(14): 2690-2695.
- [22] Wang J, Jiang Z, Ji J, *et al.* Gene expression profiling and pathway analysis of hepatotoxicity induced by triptolide in Wistar rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, doi: 10.1016/j.fct.2013.04.039.
- [23] Mosedale M, Watkins P B. Drug-induced liver injury: advances in mechanistic understanding that will inform risk management [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 101(4): 469-480.
- [24] Yu Y, Mao Y, Chen C, *et al.* CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury [J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(3): 221-241.
- [25] Xi C, Peng S, Wu Z, *et al.* Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90(1): 531-541.
- [26] Jing J, Teschke R. Traditional Chinese medicine and herb-induced liver injury: Comparison with drug-induced liver injury [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2018, 6(1): 57-69.
- [27] Gao Y, Wang Z, Tang J, *et al.* New incompatible pair of TCM: *Epimedium Folium* combined with *Psoraleae Fructus* induces idiosyncratic hepatotoxicity under immunological stress conditions [J]. *Front Med*, 2019, 13(2): 1-13.
- [28] Roth A D, Lee M Y. Idiosyncratic drug-induced liver injury (IDILI): Potential mechanisms and predictive assays [J]. *Biomed Res Int*, 2017, doi: 10.1155/2017/9176937.
- [29] Petros Z, Makonnen E, Aklilu E. Genome-wide association studies for idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity: Looking back-looking forward to next-generation innovation [J]. *Omics*, 2017, 21(3): 123-131.
- [30] McGill M R, Jaeschke H. Biomarkers of drug-induced liver injury: Progress and utility in research, medicine, and regulation [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(9): 797-807.
- [31] Ma K F, Zhang X G, Jia H Y. CYP1A2 polymorphism in Chinese patients with acute liver injury induced by *Polygonum multiflorum* [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 5637-5643.
- [32] Li C, Rao T, Chen X, *et al.* HLA-B* 35: 01 Allele is a potential biomarker for predicting *Polygonum multiflorum*-induced liver injury in humans [J]. *Hepatology*, 2019, 70(1): 346-357.
- [33] Afrin R, Arumugam S, Rahman A, *et al.* Curcumin ameliorates liver damage and progression of NASH in NASH-HCC mouse model possibly by modulating HMGB1-NF- κ B translocation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.intimp.2017.01.016.
- [34] Peng W, Huang R, Xiong Y L, *et al.* Protective effects of curcumin against liver fibrosis through modulating DNA methylation [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(4): 255-264.
- [35] Shinde V, Stöber R, Nemade H, *et al.* Transcriptomics of hepatocytes treated with toxicants for investigating molecular mechanisms underlying hepatotoxicity [J]. *Method Mol Biol*, 2015, 1250(4): 225-240.
- [36] Resende F A, Vilegas W, Dos Santos L C, *et al.* Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test [J]. *Molecules*, 2012, 17(5): 5255-5268.
- [37] Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, *et al.* Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin [J]. *Mutat Res*, 2008, 654(1): 38-44.
- [38] Hoek-van den Hil E F, van Schothorst E M, van der Stelt I, *et al.* Quercetin tests negative for genotoxicity in transcriptome analyses of liver and small intestine of mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, doi: 10.1016/j.fct.2015.04.005.
- [39] Joseph P. Transcriptomics in toxicology [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, doi: 10.1016/j.fct.2017.07.031.
- [40] Jiang L L, Zhao D S, Fan Y X, *et al.* Transcriptome analysis to assess the cholestatic hepatotoxicity induced by *Polygoni Multiflori Radix*: Up-regulation of key enzymes of cholesterol and bile acid biosynthesis [J]. *J Proteomics*, 2018, 177(7): 40-47.
- [41] Li J, Liu G, Awais I, *et al.* Effects of *Veratilla baillonii* extract on hepatic gene expression profiles in response to aconitum brachypodium-induced liver toxicity in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00568.
- [42] Wang K, Huang C, Nice E. Recent advances in proteomics: Towards the human proteome [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(6): 848-857.
- [43] Suman S, Mishra S, Shukla Y. Toxicoproteomics in human health and disease: An update [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13(12): 1073-1089.
- [44] 孙润菲, 孙明瑜. 中草药诱导肝损伤的研究进展 [J]. *中国医刊*, 2017, 52(3): 13-17.
- [45] Wei J, Zhang F, Zhang Y, *et al.* Proteomic investigation of signatures for geniposide-induced hepatotoxicity [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(12): 5724-5733.
- [46] Letsyo E, Jerz G, Winterhalter P, *et al.* Toxic pyrrolizidine alkaloids in herbal medicines commonly used in Ghana [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.jep.2017.03.008.
- [47] Merz K H, Schrenk D. Interim relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicines [J]. *Toxicol Lett*,

- 2016, 263(30): 44-57.
- [48] Li Y H, Tai W C S, Khan I, *et al.* Toxicoproteomic assessment of liver responses to acute pyrrolizidine alkaloid intoxication in rats [J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2018, 36(2): 65-83.
- [49] Li M, Hu T, Tie C, *et al.* Quantitative proteomics and targeted fatty acids analysis reveal the damage of triptolide in liver and kidney [J]. *Proteomics*, 2017, doi: 10.1002/pmic.201700001.
- [50] Ong E S, Len S M, Lee A C H, *et al.* Proteomic analysis of mouse liver for the evaluation of effects of *Scutellariae Radix* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18(21): 2522-2530.
- [51] 王立娜, 郑虎占, 王志斌, 等. 应用蛋白质组学技术探讨诃子醇提物诱导小鼠肝毒性机制 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1475-1478.
- [52] Miao Q, Zhao Y Y, Miao P P, *et al.* Proteomics approach to analyze protein profiling related with ADME/Tox in rat treated with *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* as well as their compatibility [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, doi: 10.1016/j.jep.2015.07.044.
- [53] Xu J, Dai C, Shan J, *et al.* Determination of the effect of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. on nervous system development by proteomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, doi: 10.1016/j.jep.2017.11.014.
- [54] 徐建亚. 生半夏胚胎发育毒性及其复方配伍减毒作用的蛋白质组学分析 [D]. 南京: 南京师范大学, 2017.
- [55] Zampieri M, Sekar K, Zamboni N, *et al.* Frontiers of high-throughput metabolomics [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, doi: 10.1016/j.cbpa.2016.12.006.
- [56] Su T, Tan Y, Tsui M S, *et al.* Metabolomics reveals the mechanisms for the cardiotoxicity of *Pinelliae Rhizoma* and the toxicity-reducing effect of processing [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 1-23.
- [57] Lu F, Cao M, Wu B, *et al.* Urinary metabolomics study on toxicity biomarker discovery in rats treated with *Xanthii Fructus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(1): 311-320.
- [58] Su G, Chen G, An X, *et al.* Metabolic profiling analysis of the alleviation effect of treatment with baicalin on cinnabar induced toxicity in rats urine and serum [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00271.
- [59] Guan H, Li P, Wang X, *et al.* Shengjiang Xiexin decoction alters pharmacokinetics of irinotecan by regulating metabolic enzymes and transporters: A multi-target therapy for alleviating the gastrointestinal toxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00769.
- [60] Wu Y, Wang D, Yang X, *et al.* Traditional Chinese medicine Gegen Qinlian decoction ameliorates irinotecan chemotherapy-induced gut toxicity in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109(1): 2252-2261.
- [61] Wang J, Fan H, Wang Y, *et al.* Metabolomic study of Chinese medicine Huang Qin decoction as an effective treatment for irinotecan-induced gastrointestinal toxicity [J]. *RSC Advances*, 2015, 5(33): 26420-26429.
- [62] Cui D N, Wang X, Chen J Q, *et al.* Quantitative evaluation of the compatibility effects of huangqin decoction on the treatment of irinotecan-induced gastrointestinal toxicity using untargeted metabolomics [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00211.
- [63] Wang X, Cui D, Dai X, *et al.* HuangQin decoction attenuates CPT-11-induced gastrointestinal toxicity by regulating bile acids metabolism homeostasis [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00156.
- [64] 郭非非. 整合多组学数据的遗传调控研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [65] 沈思鹏, 张汝阳, 魏永越, 等. 多组学数据整合分析的统计方法研究进展 [J]. 中华疾病控制杂志, 2018, 22(8): 763-765.
- [66] Huang S, Chaudhary K, Garmire L X. More is better: Recent progress in multi-omics data integration methods [J]. *Front Genet*, 2017, doi: 10.3389/fgene.2017.00084.
- [67] González-Ruiz V, Schvartz D, Sandström J, *et al.* An integrative multi-omics workflow to address multifactorial toxicology experiments [J]. *Metabolites*, 2019, 9(4): 79-92.
- [68] Zhao D S, Jiang L L, Wang L L, *et al.* Integrated metabolomics and proteomics approach to identify metabolic abnormalities in rats with *Dioscorea Bulbifera Rhizome*-induced hepatotoxicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2018, 31(9): 843-851.
- [69] Wu L, Han W, Chen Y, *et al.* Gender differences in the hepatotoxicity and toxicokinetics of emodin: The potential mechanisms mediated by UGT2B7 and MRP2 [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(9): 3931-3945.
- [70] Dong S, Chen Q L, Song Y N, *et al.* Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis [J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(4): 561-572.
- [71] Dong S, Cai F, Chen Q, *et al.* Chinese herbal formula Fuzheng Huayu alleviates CCl₄-induced liver fibrosis in rats: A transcriptomic and proteomic analysis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(6): 930-945.
- [72] Song Y N, Dong S, Wei B, *et al.* Metabolomic mechanisms of gypenoside against liver fibrosis in rats: An integrative analysis of proteomics and metabolomics data [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173598.