

• 中药安全性评价与风险防控专栏 •

功能代谢组学在中药毒性评价中的研究策略及其应用

王曼姝, 孙思彤[#], 袁 宇, 王 硕, 赫俊杰, 徐晟源, 范思邈*, 李遇伯*

天津中医药大学中药学院, 天津 301617

摘要: 传统中药因其具有整体观念、药效明确、辨证论治等特点而历史悠久。然而, 当今中药毒性与安全用药问题引起研究者的广泛关注, 中药毒性机制尚不明确, 因此, 迫切需要提出新的研究策略。功能代谢组学作为代谢组学的延伸, 通过超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight-mass spectrum, UPLC/Q-TOF-MS) 技术检测机体受到中药干扰后产生的内源性代谢物, 获得代谢标志物并结合其他技术手段筛选出代谢酶, 随后, 利用分子生物学实验验证代谢标志物及其关联酶之间的关系, 阐释代谢物关联的下游毒性机制, 形成一套“毒性成分-内源性代谢物-直接靶标-毒性机制”的新策略。近年来, 大量功能代谢组学应用于探索中药的毒性机制, 如肝、心脏、肾、肺等毒性。综述了功能代谢组学在中药提取物、中药单体毒性评价中的研究策略、毒性靶点及作用机制, 为功能代谢组学在毒理学研究中的应用前景提供新方向。

关键词: 中药; 功能代谢组学; 生物标志物; 毒性成分; 内源性代谢物; 直接靶标; 毒性机制

中图分类号: R285.62 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)02-0349-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.001

Research strategy and application of functional metabolomics in toxicity evaluation of traditional Chinese medicine

WANG Man-shu, SUN Si-tong, YUAN Yu, WANG Shuo, HE Jun-jie, XU Sheng-yuan, FAN Si-miao, LI Yu-bo

School of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Traditional Chinese medicine has a long history because of its holistic concept, clear medicinal effects and evidence-based treatment. However, the issue of toxicity and safe use of traditional Chinese medicines have attracted extensive attention from researchers, and the toxicity mechanism of traditional Chinese medicines is still unclear. Therefore, it is urgent to propose new research strategies. As an extension of metabolomics, functional metabolomics use ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight-mass (UPLC-Q-TOF/MS) technology to detect endogenous metabolites produced by the body after being interfered by traditional Chinese medicines, obtain metabolic markers, and screen out metabolic enzymes in combination with other technical means. Subsequently, molecular biology experiments were used to verify the relationship between metabolic markers and their associated enzymes, to explain the downstream toxicity mechanisms associated with metabolites, and to form a new strategy of “toxic ingredients-endogenous metabolites-direct targets-toxicity mechanisms”. In recent years, a large number of functional metabolomics have been devoted to exploring the toxicity mechanism of traditional Chinese medicine, such as liver, heart, kidney, lung and other toxicity. In this paper, the research strategies, toxicity targets and action mechanisms of functional metabolomics in the toxicity evaluation of Chinese medicine extracts and Chinese medicine monomers were reviewed, in order to provide a new direction for the application prospect of functional metabolomics in toxicology research.

Key words: traditional Chinese medicine; functional metabolomics; biomarker; toxic ingredient; endogenous metabolite; direct target; toxicity mechanism

收稿日期: 2022-08-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873194); 国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目

作者简介: 王曼姝 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学及毒性评价。E-mail: a19931841443@163.com

*通信作者: 范思邈, 男, 讲师, 研究方向为药理学。E-mail: fansimiao@aliyun.com

李遇伯, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为代谢组学及毒性评价。E-mail: yuboli1@163.com

#共同第一作者: 孙思彤 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学及毒性评价。E-mail: sst199845@163.com

作为中华民族的精髓和宝藏, 中药几千年来一直承担着预防和治疗人类疾病的责任, 长期的临床实践证明了中药的显著治疗效果^[1]。然而, 中药引起的不良反应事件时有发生, 使中药安全性问题成为了国内外公众关注的焦点, 阻碍了中医药的现代化和国际化。中药是一个多成分、多靶点、多途径协同的复杂系统, 各组分之间相互作用以及作用靶标的多样性使得中药毒性机制尚不明确。因此, 迫切需要探索一种新的研究策略, 对中药毒性进行深入挖掘。功能代谢组学作为近年发展起来的新兴学科, 被广泛应用于中药毒性研究, 在阐明中药毒性机制的复杂性方面具有重要价值, 已成为研究生命活动发生发展机制的有效手段。

代谢是发生在不同生物体中以维持关键生命活动的一系列生化反应^[2]。在该过程中, 代谢产物作为生物体表型的同时, 也调控生物体的一切生命活动^[3], 可促进不同生理过程的物质交换并在各种生物体内合成能量, 可作为机体代谢反应的关键前体、底物和产物^[4]。代谢产物的水平取决于代谢途径中所有酶的活性以及作用于这些酶的效应物^[5]。因此, 代谢组学所涉及的代谢物变化与机体的生理、病理、毒理直接相关。代谢组学作为一种快速发展的“组学”策略, 主要检测外界干扰后内源性代谢产物的变化, 从中找出与干扰相关的差异代谢物, 同时结合生物信息学分析阐释代谢通路, 解析生物代谢机制^[6]。虽然代谢组学技术能够得到大量与药物毒性或疾病相关的代谢物数据, 但由于现有技术手段和生化认知的局限性^[7], 组学研究仍处于表型代谢组学研究水平, 仅能够实现对表型数据的高通量采集和初步分析, 而未能反映整个毒性过程中生理或病理动态变化^[8], 亦未揭示其与相关代谢物的生化功能和相关机制, 这种限制极大地削弱了代谢组学数据在生命科学广泛领域中的核心价值^[4]。因此如何快速准确地海量的代谢组学数据中筛选出有用的信息, 并发现和验证生物标记物, 进一步揭示药物毒性作用或疾病发生发展的机制, 成为对代谢组学策略优化的重点, 从而推动了功能代谢组学的形成和发展。

1 功能代谢组学

基于质谱的靶向代谢组学与尖端生化方法的结合旨在阐明不同生物背景下代谢产物的生化功能, 被定义为功能代谢组学^[9]。功能代谢组学是以代谢组学发现差异代谢产物和预测差异代谢途径为基础, 结合同位素标记、分子生物学、细胞实验、基

因组学和蛋白质组学等技术手段, 研究差异代谢产物的生物学功能和相关生理学意义^[10], 并自下而上系统分析生物学病理生理现象的全新途径^[11]。与传统代谢组学不同的是, 功能代谢组学作为一种有前途的研究方法, 具有优先识别因疾病发生而改变的功能代谢物和相关功能代谢途径的能力, 并能够找到明确改变的代谢物和代谢途径相关的功能代谢基因或酶。随着疾病的进展以及系统代谢靶点的确定, 功能代谢组学能够阐明中药衍生物功能性化合物对特定疾病的药理学效率和相关治疗机制^[12]。

2 中药毒性分类

中药毒性研究有利于建立科学的评价体系, 保障临床中药用药的安全性。近年来人们对药物毒性的认知发生了重要变化, 机体、环境等因素在部分药物毒性过程中发挥了关键的决定性作用。因此, 根据其成因机制和作用特点, 将药物毒性分成 3 大类, 即药物固有毒性、药物特异质毒性和间接毒性^[10-13]。长期以来, 人们对中药安全性的认识和研究主要局限于药物本身的固有毒性。然而, 近年来陆续报道的传统无毒中药安全事件表明, 仅依靠对其固有性的评价, 往往难以做出科学的解释和制定有效的防控措施。随着国际上对药物毒性分类和表型认识的巨大变化, 提出了普遍但很少关注的毒性类型即间接毒性^[11]。中药到达作用部位不能立刻产生效应, 药物效应有明显的滞后, 这种滞后是由于中药通过改变体内某些内源性物质而发挥药效, 被称为间接毒性。一般是由成分自身的生物活性与机体病症因素的叠加造成的。它通常与机体免疫及代谢途径等的叠加和过程激活有关, 常发生在基础疾病或易感性疾病中。内源性代谢物作为机体各种生理病理过程的最终产物^[14], 在生物系统中具有多种功能, 如产生能量、激素等, 其变化能够反映机体功能和疾病的本质变化, 可为病理机制的研究提供重要线索。中药主要通过多样性的功能化合物调节疾病发病机制下的失调代谢提供治疗作用来共同对抗不同疾病^[15]。

3 功能代谢组学在中药毒性评价中的研究策略

在中药毒性研究中, 生化指标检测、组织病理学观测等传统毒性评价方法主要侧重于研究机体毒性作用的现象和特点, 无法阐明中药毒性作用的物质基础、作用机制和变化规律的复杂性以及多种功能化合物赋予的中药治疗潜力, 这使得中药衍生物功能性化合物的现代探索受到严重阻碍^[16]。目前功能

代谢组学成为了研究中药来源的功能性化合物对抗不同疾病药理作用的最佳选择,能够对不同病理及生理状态下内源性代谢物进行精准表征,通过破译代谢物与分子的相互作用,准确地识别和阐明功能性化合物对疾病的治疗价值^[17-18],其研究特点与中医整体观、系统观、辨证论治思想相一致。借助现代研究方法,功能代谢组学被广泛应用于中药毒性研究,已涉及肝、心脏、肾、肺等靶器官。目前有研究表明,氨基酸、嘌呤等代谢途径紊乱导致的亮氨酸、次黄嘌呤等代谢物水平异常可造成肝损伤^[19-20];花生四烯酸、能量等代谢途径紊乱导致棕榈酸、3-吡啶丙酸等代谢物水平异常可造成心脏损伤^[21-22];鞘脂、嘌呤等代谢途径紊乱导致鞘磷脂、黄嘌呤等关键代谢产物水平异常而造成肾损伤^[23-24];脂质代谢等代谢途径紊乱导致辛酸肉碱等关键代谢产物水平异常可造成神经损伤^[25-26];三羧酸循环、谷氨酰胺等代谢途径紊乱导致肌酸、谷氨酰胺等关键代谢产物水平异常可造成肺损伤^[27-28]。通过分析内源性代谢产物,能够更快地找到中药毒性靶器官并对相关毒性损伤机制取得进一步认识,为中药现代化研究提供新的思路和契机。

功能代谢组学研究策略分为基于代谢物功能的研究和基于相关代谢物所在途径的研究^[9]。基于代

谢物功能的研究策略为通过代谢组学获得差异代谢物后,筛选出差异较大的关键代谢物,对体内动物或体外细胞模型进行干预。同时结合分子生物学技术对其生物功能进行验证,从而揭示关键代谢物在病理及生理状态下的深刻意义和作用。差异代谢物所在的代谢通路病理及生理状态密切相关。代谢通路中与其关联的关键酶、基因等也至关重要。基于相关代谢物所在途径的研究策略为通过体内外实验使用关键代谢酶的激动剂和抑制剂处理动物或细胞,或将代谢物关联的酶、蛋白和基因敲除(沉默)过表达后,观察体内外模型的代谢表型变化。同时采用分子生物学技术检测其功能进一步佐证,为中药毒性相关代谢物的功能信息以及疾病诊断治疗提供充足的分子生物学依据。

内源性功能代谢物与有毒中药研究策略技术路线见图 1。

4 功能代谢组学在中药毒性评价中的应用

中药中有毒成分摄入人体后,将影响机体代谢途径中内源性代谢物的稳态平衡,引发肝、心、肾、脑等靶器官功能失调,破坏细胞生命活动过程,造成消化、循环、泌尿、神经等系统毒性^[29]。功能代谢组学是一种有效评价中药毒性的分析方法,通过研究小分子内源性代谢物在机体整体水平的生理与

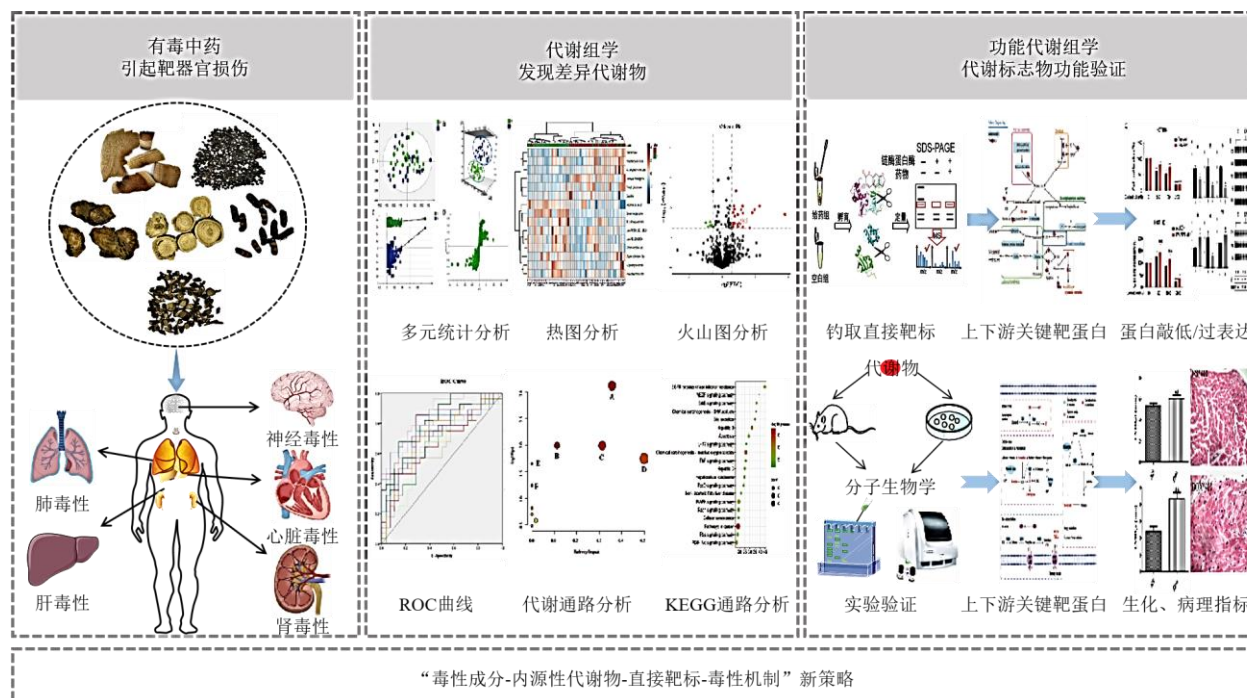


图 1 内源性功能代谢物与有毒中药研究策略技术路线

Fig. 1 Technical roadmap for study strategy of endogenous functional metabolites and toxic traditional Chinese medicine

代谢状况来探索其诱导的毒性机制^[30]。利用功能代谢组学来克服传统的表型代谢组学的局限性,识别关键代谢物,确定关键调控酶,进一步研究不同生物系统中代谢失调的毒性机制,为中药精准用药减毒及安全风险防控提供重要参考。

4.1 肝毒性评价

肝脏是人体的主要代谢器官,是内源性和外源性物质最重要的代谢中心。不仅是脂肪合成和胆固醇代谢的中枢,也对糖、蛋白质、脂肪 3 大营养物质等代谢都有重要的调节作用^[31]。当肝脏处于病理状态时,肝脏新陈代谢的稳态被破坏,进一步加重肝脏的正常代谢负担^[32]。功能代谢组学已被应用于补骨脂等肝毒性研究中。补骨脂及其制剂如仙灵骨葆胶囊在治疗骨折疾病的同时会引起严重肝毒性^[33-34],采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight-mass spectrum, UPLC/Q-TOF-MS)的代谢组学结合串联质量标签(tandem mass tag, TMT)定量蛋白质组学策略筛选出谷胱甘肽、左旋肉碱、琥珀酸等差异代谢物,发现补骨脂提取物的肝毒性与甘油谷胱甘肽等代谢途径密切相关^[20]。补骨脂素是补骨脂的主要肝毒性成分^[35]。采用基于药物亲和反应靶标稳定技术(drug affinity responsive target stability, DARTS)的蛋白质组学、网络药理学、流式细胞术及蛋白质免疫印迹(Western blotting)等策略筛选并验证了非受体酪氨酸蛋白激酶 ABL1 是补骨脂素肝毒性的直接靶标,发现补骨脂素作用于直接靶标 ABL1,导致核因子 E2 相关因子 2 信号通路异常与谷胱甘肽水平相关^[36]。此外,补骨脂提取物引起谷胱甘肽等代谢物水平紊乱对胃、小肠、胰腺等消化器官也会产生毒性作用^[37-38]。功能代谢组学在中药肝毒性评价中的应用见表 1。

4.2 心脏毒性评价

心脏是一个高度代谢活跃的器官,具有产生能量和稳定的代谢能力^[50]。心脏毒性可能诱发心功能不全和心肌损伤^[51]。功能代谢组学与多组学技术相联系,解释了代谢物水平紊乱如何引起心脏毒性,为毒性机制提供了重要的理论依据。功能代谢组学已应用于乌头等心脏毒性研究中。乌头具有镇痛、抗炎等作用^[52],然而对心脏具有较强毒性,可引起多种心律失常而导致死亡。基于 UPLC/Q-TOF-MS 代谢组学技术、TMT 定量蛋白质组学和 Western blotting、基因敲除等策略筛选出棕榈酸、硬脂酸、

核苷酸等差异代谢物。发现棕榈酸可激活 NOD 样受体相关蛋白 2(receptor associated protein 2, RIP2)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3),促进炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-18、IL-1 β 的释放,造成心肌炎症损伤^[22]。此外,乌头引起棕榈酸等代谢物水平紊乱对血管、血液等循环器官也会产生毒性作用^[53-54]。功能代谢组学在中药心脏毒性评价中的应用见表 2。

4.3 肾毒性评价

肾脏是保证人体内环境稳态、排泄人体代谢废物及内分泌功能的重要器官。因受到生物体内外各种复杂因素的影响,代谢物紊乱可导致肾脏结构和功能异常^[58-59]。目前,中药代谢物深层次的相关毒性机制仍未确定,因此,功能代谢组学与多组学联系起来,在找到生物标志物的基础上,解释代谢物是如何调节代谢酶,最终影响生物体内代谢物的生理特征。功能代谢组学已应用于马兜铃等肾毒性研究中。马兜铃来源于草本马兜铃和细辛属植物,可引起严重的肾毒性^[60]。基于 UPLC/Q-TOF-MS 的代谢组学和活性蛋白质组学、细胞热位移分析策略筛选出肌酐、尿酸、甲基琥珀酸等为大鼠服用马兜铃酸的差异代谢物。马兜铃酸会导致甲基琥珀酸降低,腺苷三磷酸合成异常,苹果酸脱氢酶 2 降低,三羧酸循环损害线粒体功能障碍,诱导肾脏细胞凋亡,导致肾脏损伤^[61]。此外,马兜铃酸引起甲基琥珀酸等代谢物水平紊乱也会对尿道、膀胱等泌尿器官产生毒性作用^[62]。功能代谢组学在中药肾毒性评价中的应用见表 3。

4.4 其他

神经是机体主要的功能调节中枢,可控制和调节其他系统的活动,来维持机体内环境的平衡和适应外环境的变化,保证生命活动的正常进行。神经传递所需的递质及其受体是各种治疗药物的针对性目标,更是中药及其复方制剂引起神经毒性的靶部位。中药使用不当易发生神经毒性反应,因此,功能代谢组学与其他分子生物方法联合起来,找到毒性靶点及其代谢途径和相应功能变化的信号通路,有助于用药效果的最大化和用药不良反应的最小化,进而为明确中药在机体内的毒性机制提供新途径。如表 4 所示,功能代谢组学已应用于紫杉醇的神经毒性研究。紫杉醇可用于治疗乳腺癌等晚期或难

表 1 功能代谢组学在中药肝毒性评价中的应用

Table 1 Application of functional metabolomics in evaluation of traditional Chinese medicine hepatotoxicity

毒性 中药	毒性成分	检测策略	关键代谢物	肝毒性机制	文 献
雷公藤	雷公藤多苷	基于代谢组学、转录组学、分子生物学方法策略	<i>D</i> -谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸等	通过调控氨基酸代谢通路进而导致吡啶甲酸、溶血磷脂酰胆碱等代谢物下调,造成肝毒性	19
补骨脂	补骨脂水提物	基于 TMT 定量蛋白质组学、代谢组学、分子生物学方法策略	琥珀酸、次黄嘌呤、左旋肉碱、苯丙氨酸等	重组人中性胆固醇酯水解酶 1、细胞色素 7A1 胆汁酸蛋白表达增加,胆汁酸盐输出泵的表达下降调节胆汁酸代谢及转运的蛋白,造成肝毒性	20
苦参	苦参酮	基于代谢组学、分子生物学方法策略	左旋肉碱、 <i>L</i> -肉碱和 <i>L</i> -乙酰肉碱、甘油磷脂等	通过调控脂肪酸代谢通路进而导致甘油磷脂等功能代谢物的代谢紊乱,造成肝毒性	39
何首乌	—	基于 NMR 代谢组学、分子生物学方法策略	苯丙氨酸、黄嘌呤、尿苷等	通过氧化应激,损害线粒体功能并导致能量、嘧啶和氨基酸等代谢紊乱,造成肝毒性	40
大戟	大戟提取物	基于 GC-MS 代谢组学、分子生物学方法策略	<i>L</i> -谷氨酸、富马酸、肌氨酸等	富马酸含量降低和丙酮酸增加表明三羧酸循环和糖酵解的进程减弱,导致丙酮酸向线粒体的转运受损,活性氧增加,引起肝毒性	41
大黄	大黄提取物	基于代谢组学、分子生物学方法策略	多巴胺、胆碱、乙醇酰胺等	作为多巴胺激动剂的多巴胺分泌减少,会引起肝毒性的发生,同时环磷酸腺苷信号通路会使多巴胺受体 1、2 等关键靶蛋白减少,促进免疫炎症致肝毒性	42
黄药子	—	基于代谢组学、蛋白质组学方法策略	尿嘧啶、胞嘧啶、腺苷等	通过嘧啶代谢途径会导致尿苷减少,嘌呤核苷酸磷酸化酶和胸腺嘧啶核苷磷酸化酶蛋白表达下降,诱发肝毒性	43
—	七叶树苷 A	基于非靶向代谢组学、分子生物学方法策略	5-羟基尿胺、 <i>N</i> -乙酰基-5-羟色胺、棕榈酸等	通过激活氧化应激和能量代谢紊乱、引发炎症和细胞凋亡来诱导肝损伤	44
细辛	—	基于代谢组学、转录组学方法整合策略	亚精氨酸、牛磺酸、磷酸乙醇等	牛磺酸水平显著增加,磺基转移酶 2A1 显著下调,其毒性与脂质过氧化和谷胱甘肽消耗,诱导肝毒性	45
商陆	—	基于代谢组学、网络毒理学、分子生物学方法策略	花生四烯酸、尿素、鸟氨酸等	通过氨基酸代谢途径上调花生四烯酸等关键代谢物,激活 p53 信号通路,上调半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 的蛋白质表达,诱导细胞凋亡引起肝毒性	46
白鲜皮	白鲜皮碱	基于代谢组学转录组学、蛋白质组学、分子生物学方法策略	鹅去氧胆酸盐、牛磺胆酸盐等	酯酰辅酶 A 长链家族成员 4 和胆固醇酰基转移酶 1 蛋白上调和重组人脂肪酸结合蛋白-1 下调,导致脂质代谢紊乱,激活氧化应激诱导肝毒性	47
川楝子	川楝子素	基于代谢组学、蛋白质组学、分子生物学方法策略	天冬酰胺、赖氨酸、赖氨酸、谷胱甘肽等	通过激活丝裂原活化蛋白激酶来诱导谷胱甘肽耗竭、肝细胞线粒体功能和脂质代谢障碍,活性氧水平升高,诱导肝毒性	48
八角莲	—	基于化学代谢组学、网络毒理学、分子生物学方法策略	5-羟基异磺酸酯、苯丙氨酸等	通过调节靶点苯丙氨酸羟化酶及超氧化歧化酶 1、2 等,影响苯丙氨酸代谢、甘油磷脂代谢、能量代谢等相关通路,进而诱导氧化应激、细胞凋亡、炎症反应和能量消耗,诱发肝毒性	49

表 2 功能代谢组学在中药心脏毒性评价中的应用

Table 2 Application of functional metabolomics in evaluation of traditional Chinese medicine cardiotoxicity

毒性 中药	毒性成分	检测策略	关键代谢物	心脏毒性机制	文献
雷公藤	雷公藤 红素	基于 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学、网络毒理学、分子生物学方法策略	3-吲哚丙酸、棕榈酸等	高水平的棕榈酸导致体内氧化应激升高, 过量的活性氧激活肿瘤坏死因子信号通路, 影响下游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族引发细胞凋亡, 诱导心脏毒性	21
乌头	乌头碱	基于 UPLC/Q-TOF-MS 代谢组学技术、TMT 定量蛋白质组学、基因敲除、分子生物学方法策略	棕榈酸、硬脂酸、核苷酸等	棕榈酸可激活 RIP2、NF- κ B、NLRP3, 促进炎症因子 IL-18、IL-1 β 的释放, 造成心肌炎症损伤	22
		基于 DARTS 的蛋白质组学、分子生物学方法策略	花生四烯酸	乌头碱作用于直接靶点胞质型磷脂酶 A ₂ , 介导花生四烯酸释放, 经前列腺素 E ₂ /环氧合酶-2 途径, 释放炎症因子, 造成心脏毒性	55
		基于蛋白质组学、脂质组学、代谢组学技术的策略	谷氨酸、柠檬酸合酶、次黄嘌呤等	通过能量代谢和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶途径紊乱, 腺苷三磷酸降低和活性氧升高, 通过氧化应激, 引起心脏毒性	56
半夏	—	基于 UPLC/Q-TOF-MS 代谢组学技术、分子生物学方法策略	亮氨酸、血清素、脯氨酸等	高水平的血清素会激活转化生长因子- β 信号通路诱导心肌 H9C2 细胞凋亡, 导致心脏毒性	57

表 3 功能代谢组学在中药肾毒性评价中的应用

Table 3 Application of functional metabolomics in evaluation of traditional Chinese medicine nephrotoxicity

毒性中药	毒性成分	检测策略	关键代谢物	肾毒性机制	文献
雷公藤	雷公藤 甲素	基于靶向代谢组学、分子生物学方法策略	胸腺嘧啶、尿酸、腺苷等	尿酸和黄嘌呤过度消耗, 激活 Toll 样受体信号通路, 促进下游蛋白 NF- κ B 的磷酸化, 并引起炎症反应, 最终导致肾毒性	23
		基于代谢组学、TMT 定量蛋白质组学、分子生物学方法策略	次黄嘌呤、鞘氨醇、苯丙氨酸等	鞘氨醇含量显著降低, 鞘氨醇抑制剂蛋白激酶 C 活性增加, 诱导肾细胞损伤和凋亡, 导致肾损伤	63
斑蝥	斑蝥素	基于 UPLC/Q-TOF-MS 的非靶向代谢组学、分子生物学方法策略	磷脂酰胆碱、鞘磷脂、琥珀酸等	聚碳酸酯、聚乙烯类含量降低, 通过鞘脂代谢通路引起磷脂酶 D ₂ 蛋白表达激活, 诱导人肾小管上皮 HK-2 细胞凋亡、引发肾毒性	24
马兜铃	马兜铃酸	基于代谢组学和活性蛋白质表达谱、细胞热转变分析、分子生物学方法策略	丙酮酸、肌酐、尿酸、甲基琥珀酸等	甲基琥珀酸降低, 腺苷三磷酸异常, 苹果酸脱氢酶 2 降低, 三羧酸循环损害, 线粒体功能障碍, 诱导肾细胞凋亡, 导致肾毒性	61
		基于代谢组学、转录组学、蛋白质组学技术等策略	头孢匹林、柠檬酸等	通过氨基酸代谢、谷胱甘肽代谢途径进而影响头孢匹林、柠檬酸等功能代谢物, 增加谷胱甘肽合成酶表达水平, 造成肾毒性	64

表 4 功能代谢组学在中药其他毒性评价中的应用

Table 4 Application of functional metabolomics in evaluation of other toxicity of traditional Chinese medicine

毒性 中药	毒性 成分	检测策略	关键代谢物	其他毒性机制	文献
—	紫杉醇	基于质谱的细胞代谢组学技术、分子生物学方法策略	辛酰肉碱、乙酰左旋肉碱	辛酰肉碱显著增加，链酰基辅酶 A 脱氢酶显著降低，导致线粒体功能障碍、脂质代谢紊乱，引起神经毒性	25
雄黄	—	基于非靶向脂质组学、分子生物学方法策略	鞘磷脂 (d36:2)、溶血磷脂酰乙醇胺 (18:2、22:6) 和溶血磷脂酰胆碱 (16:0)	溶血磷脂酰胆碱 (16:0) 水平增加可直接增加 Ca^{2+} 浓度，使合成酶细胞质磷脂酶 A ₂ 和脂蛋白相关磷脂酶 A ₂ 水平显著增加，诱导活性氧产生，最终导致细胞氧化损伤，引起神经毒性	26
山豆根	—	基于蛋白质组学、代谢组学技术策略	肌酸、左旋肉碱、谷氨酰胺等	谷氨酰胺被谷氨酰胺酶-1 代谢形成氨，氨增多会刺激线粒体活性氧产生，通过氧化应激引起细胞过度增殖，引起肺毒性	27
山药	—	基于代谢组学、分子生物学方法策略	花生四烯酸、左旋肉碱、棕榈酸等	脂肪酸 β -氧化、糖酵解和三羧酸循环的抑制，孕烷 X 受体和细胞色素酶 3A13 激活，胆汁淤积造成肺毒性	28

治性癌症^[65-66]，但长期用药会引起神经毒性^[67]。基于质谱的细胞代谢组学结合分子生物学实验筛选出辛酰肉碱、乙酰左旋肉碱等紫杉醇诱导人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的差异生物标志物。发现辛酰肉碱显著增加，链酰基辅酶 A 脱氢酶显著降低，导致线粒体功能障碍、脂质代谢紊乱，从而引起神经毒性^[25]。此外，紫杉醇引起辛酰肉碱等代谢物水平紊乱也会对脊髓等神经器官产生毒性^[68]。

肺是含氧量最多且最易受损的器官，在毒性中药进入肺部经生物酶进行代谢活化过程，因其与外环境接触面积最大，会引起呼吸损伤。因此，功能代谢组学与其他组学联系起来，以便能更有效评估和鉴定中药差异代谢物及其致毒机制。如表 4 所示，功能代谢组学目前已应用于山豆根的肺毒性研究中。山豆根可用于治疗扁桃体炎、喉咙肿痛等疾病^[69]，但其可导致肺毒性^[70]。基于 UPLC/Q-TOF-MS 的代谢组学和蛋白质组学筛选出肌酸、左旋肉碱、谷氨酰胺等大鼠口服山豆根后产生的差异标志物。谷氨酰胺被谷氨酰胺酶-1 代谢形成氨，氨增多会刺激线粒体活性氧产生，通过氧化应激引起细胞过度增殖，引起肺毒性^[27]。此外，山豆根引起谷氨酰胺等代谢物水平紊乱也会对鼻、咽等呼吸器官产生毒性作用^[71]。

因此，在药物安全性评估、毒性检测和疾病诊断研究中，功能代谢组学通过对毒性进行全面分析，跟踪小分子毒性机制的变化，对毒性进行整体评价，

有利于预测和诊断药物毒性。

5 结语及展望

近年来，随着中药及其制剂在国内外的广泛使用，其安全问题日益突显，并成为影响中药现代化进程的关键因素之一^[72]。目前常用毒性评价的方法因无法全面分析其分子机制，欠缺准确性和客观性，严重阻碍了中药毒理学研究^[73]。国内外已有研究者将代谢组学用于中药毒性机制研究^[74]，如肖小河课题组^[75]通过代谢组学发现关键代谢酶，并确认下游关键致毒机制，将代谢物与下游毒性机制相联系。而功能代谢组学技术作为一种系统研究方法，侧重于分析全局代谢物，并结合生物学技术分析其下游毒性机制。

本文总结了一套“毒性成分-内源性代谢物-直接靶标-毒性机制”的新策略，借助有害结局路径概念，首先基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术发现毒性生物标志物，明确中药致毒的有害结局；经代谢组学和其他技术整合分析，构建调控网络发现代谢物的关键事件；DARTS、细胞热转变分析、蛋白质氧化速率稳定性分析、热蛋白质组分析等非修饰靶点垂钓方法找寻核心靶标（靶蛋白或代谢酶），采用液相色谱-串联质谱联用的蛋白质组学对核心靶标进行鉴定，并结合网络药理学虚拟技术筛选出潜在靶标和毒性机制，明确了毒性进程中的“核心靶标”，将核心靶标与有害结局的毒性机制相关联；随后采用表

面等离子体共振、等温滴定微量热技术和分子对接技术等化学方法模拟毒性成分与核心靶标的作用模式,验证小分子与核心靶标之间的相互作用;利用实时聚合酶链式反应、Western blotting 等生物学方法在细胞或动物层面对“毒性成分-核心靶标”的下游毒性通路进行功能性验证,将核心靶标与代谢物关键事件及有害结局关联起来,明确了代谢物致毒的有害结局路径。目前,虽然功能代谢组学不能完全解决毒性评价的问题,但是,随着各种分析技术的不断发展,功能代谢组学已成为评价中药毒理学和深入阐释毒性机制的潜在工具,可为合理用药及毒性防控提供理论指导,同时为研究中药功能代谢组学提供了新策略和思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yu Y, Yao C L, Guo D A. Insight into chemical basis of traditional Chinese medicine based on the state-of-the-art techniques of liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1469-1492.
- [2] Peng B, Li H, Peng X X. Functional metabolomics: From biomarker discovery to metabolome reprogramming [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(9): 628-637.
- [3] Chouchani E T. Logic and mechanisms of metabolite signalling [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18(2): 71-72.
- [4] Hu L L, Liu J J, Zhang W H, et al. Functional metabolomics decipher biochemical functions and associated mechanisms underlie small-molecule metabolism [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2020, 39(5/6): 417-433.
- [5] Chmielewski F M, Götz K P. Metabolites in cherry buds to detect winter dormancy [J]. *Metabolites*, 2022, 12(3): 247.
- [6] Carlos G, Santos F P, Fröhlich P E. Canine metabolomics advances [J]. *Metabolomics*, 2020, 16(2): 1-19.
- [7] 王明菡, 段志文. 代谢组学在毒理学中的应用现状 [A] // 第十六届沈阳科学学术年会论文集 [C]. 沈阳: 沈阳市科学技术协会, 2019: 1-6.
- [8] 刘璟贤, 张建永, 李晓飞. 功能代谢组学在生物医药领域中的应用 [J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(6): 631-638.
- [9] 李遇伯, 局亮, 邓皓月, 等. 基于毒性整体早期评价的“十八反”中药配伍禁忌毒性表征的研究思路及方法 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(6): 960-966.
- [10] Hoofnagle J H, Björnsson E S. Drug-induced liver injury - types and phenotypes [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(3): 264-273.
- [11] 高云娟, 赵旭, 柏兆方, 等. 基于间接毒性认知的中药安全风险防控 [J]. *中国药物警戒*, 2021, 18(11): 1004-1008.
- [12] 宋海波, 沈传勇. 中药安全用药与风险防控的探索及实践: 以何首乌为例的安全风险管理 [J]. *中国食品药品监管*, 2020(12): 12-18.
- [13] Chen C, Gao J, Wang T S, et al. NMR-based metabolomic techniques identify the toxicity of emodin in HepG2 cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9379.
- [14] Yang Q J, Zhao J R, Hao J, et al. Serum and urine metabolomics study reveals a distinct diagnostic model for cancer cachexia [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9(1): 71-85.
- [15] Wang X J, Zhang A H, 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] Chen D Q, Chen H, Chen L, et al. Metabolomic application in toxicity evaluation and toxicological biomarker identification of natural product [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 252: 114-130.
- [17] Liu J J, Luo X L, Guo R, et al. Cell metabolomics reveals berberine-inhibited pancreatic cancer cell viability and metastasis by regulating citrate metabolism [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(9): 3825-3836.
- [18] Guo R, Luo X L, Liu J J, et al. Omics strategies decipher therapeutic discoveries of traditional Chinese medicine against different diseases at multiple layers molecular-level [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 152: 104627.
- [19] An Z, Sun Y, Shi C, et al. Metabonomic and transcriptomic analyses of *Tripterygium* glycosides tablet-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, doi: 10.1080/01480545.2022.2077360.
- [20] Duan J Y, Dong W Y, Xie L J, et al. Integrative proteomics-metabolomics strategy reveals the mechanism of hepatotoxicity induced by *Fructus Psoraleae* [J]. *J Proteomics*, 2020, 221: 103767.
- [21] Liu C X, Zhang C N, Wang W X, et al. Integrated metabolomics and network toxicology to reveal molecular mechanism of celastrol induced cardiotoxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 383: 114785.
- [22] Bi C H, Zhang T P, Li Y M, et al. A proteomics- and metabolomics-based study revealed that disorder of palmitic acid metabolism by aconitine induces cardiac injury [J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(12): 3031-3040.
- [23] Huang W, Liu C X, Xie L J, et al. Integrated network pharmacology and targeted metabolomics to reveal the mechanism of nephrotoxicity of triptolide [J]. *Toxicol Res*, 2019, 8(6): 850-861.
- [24] He T M, Liu J X, Wang X N, et al. Analysis of cantharidin-induced nephrotoxicity in HK-2 cells using untargeted metabolomics and an integrative network pharmacology analysis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 146: 111845.
- [25] Huang J W, Kuo C H, Kuo H C, et al. Cell metabolomics

- analyses revealed a role of altered fatty acid oxidation in neurotoxicity pattern difference between nab-paclitaxel and solvent-based paclitaxel [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0248942.
- [26] Zhang W W, Huo T G, Li A H, *et al.* Identification of neurotoxicity markers induced by realgar exposure in the mouse cerebral cortex using lipidomics [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 389: 121567.
- [27] Zhang S N, Li X Z, Yang W D, *et al.* *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*-induced pulmonary toxicity: A study on the toxic mechanism and material basis based on integrated omics and bioinformatics analyses [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, 1179: 122868.
- [28] Ji H N, Liu C, Tong N, *et al.* Metabonomic approaches investigate diosbulbin B-induced pulmonary toxicity and elucidate its underlying mechanism in male mice [J]. *Toxicol Res*, 2021, 10(2): 272-276.
- [29] Wang P C, Wang Q H, Yang B Y, *et al.* The progress of metabolomics study in traditional Chinese medicine research [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7): 1281-1310.
- [30] Wu G S, Zhang W D, Li H K. Application of metabolomics for unveiling the therapeutic role of traditional Chinese medicine in metabolic diseases [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242: 112057.
- [31] Chen W Y, Liu Y N, Chen J, *et al.* The Notch signaling pathway regulates macrophage polarization in liver diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107938.
- [32] Ding H R, Wang J L, Ren H Z, *et al.* Lipometabolism and glycometabolism in liver diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1287127.
- [33] Ge F L, Niu M, Han Z X, *et al.* Landscape of hepatobiliary adverse drug reactions related to preparations containing psoraleae fructus and its application in pharmacovigilance [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(11): 832-837.
- [34] Li C Y, Niu M, Liu Y L, *et al.* Screening for susceptibility-related factors and biomarkers of Xianling Gubao Capsule-induced liver injury [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 810.
- [35] Yu Y L, Yu R L, Men W J, *et al.* Psoralen induces hepatic toxicity through PERK and ATF6 related ER stress pathways in HepG2 cells [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2020, 30(1): 39-47.
- [36] Sun S T, Wang M S, Yuan Y, *et al.* A new strategy for the rapid identification and validation of direct toxicity targets of psoralen-induced hepatotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2022, 363: 11-26.
- [37] Gong S H, Lan T, Zeng L Y, *et al.* Gut microbiota mediates diurnal variation of acetaminophen induced acute liver injury in mice [J]. *J Hepatol*, 2018, 69(1): 51-59.
- [38] Yu N Y, Wei S, Li M Y, *et al.* Effects of perfluorooctanoic acid on metabolic profiles in brain and liver of mouse revealed by a high-throughput targeted metabolomics approach [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23963.
- [39] Jiang P, Zhang X W, Huang Y T, *et al.* Hepatotoxicity induced by *Sophora flavescens* and hepatic accumulation of kurarinone, a major hepatotoxic constituent of *Sophora flavescens* in rats [J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1809.
- [40] Ruan L Y, Li M H, Xing Y X, *et al.* Hepatotoxicity and hepatoprotection of *Polygonum multiflorum* Thund. as two sides of the same biological coin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 230: 81-94.
- [41] Zhao C J, Jia Z, Li E W, *et al.* Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2019, 62: 152959.
- [42] Li S Z, Wang Y M, Li C Y, *et al.* Study on hepatotoxicity of rhubarb based on metabolomics and network pharmacology [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 1883-1902.
- [43] Zhao D S, Jiang L L, Fan Y X, *et al.* Investigation of *Dioscorea bulbifera* rhizome-induced hepatotoxicity in rats by a multisample integrated metabolomics approach [J]. *Chem Res Toxicol*, 2017, 30(10): 1865-1873.
- [44] He T, Liu C X, Li M Y, *et al.* Integrating non-targeted metabolomics and toxicology networks to study the mechanism of esculentoside A-induced hepatotoxicity in rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(6): 1-15.
- [45] Cao S, Han L T, Li Y M, *et al.* Integrative transcriptomics and metabolomics analyses provide hepatotoxicity mechanisms of asarum [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1359-1370.
- [46] Cao D, Zhao C J, Li Z Q, *et al.* Combined metabolomics and network toxicology to explore the molecular mechanism of *Phytolacca acinose* Roxb-induced hepatotoxicity in zebrafish larvae *in vivo* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 3303014.
- [47] Tu C, Xu Z Y, Tian L C, *et al.* Multi-omics integration to reveal the mechanism of hepatotoxicity induced by dictamnine [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 700120.
- [48] Yan X J, Zhuo Y, Bian X Q, *et al.* Integrated proteomics, biological functional assessments, and metabolomics reveal toosendanin-induced hepatic energy metabolic disorders [J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32(4): 668-680.
- [49] Liu C X, Zhang C N, He T, *et al.* Study on potential toxic material base and mechanisms of hepatotoxicity induced by *Dysosma versipellis* based on toxicological evidence chain (TEC) concept [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 190: 110073.
- [50] Hausner E A, Elmore S A, Yang X. Overview of the components of cardiac metabolism [J]. *Drug Metab Dispos*, 2019, 47(6): 673-688.
- [51] Cardinale D M, Zaninotto M, Cipolla C M, *et al.*

- Cardiotoxic effects and myocardial injury: The search for a more precise definition of drug cardiotoxicity [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, 59(1): 51-57.
- [52] Gao X T, Hu J, Zhang X C, *et al.* Research progress of aconitine toxicity and forensic analysis of aconitine poisoning [J]. *Forensic Sci Res*, 2018, 5(1): 25-31.
- [53] Wei Z W, Dong Z X, Jia J, *et al.* Application of Q-TOF-MS based metabolomics techniques to analyze the plasma metabolic profile changes on rats following death due to acute intoxication of phorate [J]. *Int J Legal Med*, 2021, 135(4): 1437-1447.
- [54] Geng C M, Cui C M, Wang C S, *et al.* Systematic evaluations of doxorubicin-induced toxicity in rats based on metabolomics [J]. *ACS Omega*, 2020, 6(1): 358-366.
- [55] Wei J X, Fan S M, Yu H X, *et al.* A new strategy for the rapid identification and validation of the direct targets of aconitine-induced cardiotoxicity [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4649-4664.
- [56] Xie D Z, Wu J Y, Wu Q, *et al.* Integrating proteomic, lipidomic and metabolomic data to construct a global metabolic network of lethal ventricular tachyarrhythmias (LVTA) induced by aconitine [J]. *J Proteomics*, 2021, 232: 104043.
- [57] 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: 34692.
- [58] Xiong W, Meng X F, Zhang C. NLRP3 inflammasome in metabolic-associated kidney diseases: An update [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 714340.
- [59] Kalim S, Rhee E P. An overview of renal metabolomics [J]. *Kidney Int*, 2017, 91(1): 61-69.
- [60] Anger E E, Yu F, Li J. Aristolochic acid-induced nephrotoxicity: Molecular mechanisms and potential protective approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1157.
- [61] Zhang Q, Luo P, Chen J Y, *et al.* Dissection of targeting molecular mechanisms of aristolochic acid-induced nephrotoxicity via a combined deconvolution strategy of chemoproteomics and metabolomics [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(5): 2003-2017.
- [62] Hu X Q, Shen J Y, Pu X Y, *et al.* Urinary time- or dose-dependent metabolic biomarkers of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rats [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 156(1): 123-132.
- [63] Xie L J, Zhao Y W, Duan J Y, *et al.* Integrated proteomics and metabolomics reveal the mechanism of nephrotoxicity induced by triptolide [J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(7): 1897-1906.
- [64] Li Y, Xu H X, Cai D H, *et al.* Integration of transcriptomic, proteomic and metabolomic data to reveal the biological mechanisms of AAI injury in renal epithelial cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2021, 70: 105054.
- [65] Mandapati A, Lukong K E. Triple negative breast cancer: Approved treatment options and their mechanisms of action [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, doi: 10.1007/s00432-022-04189-6.
- [66] Abu Samaan T M, Samec M, Liskova A, *et al.* Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 789.
- [67] Gornstein E L, Schwarz T L. Neurotoxic mechanisms of paclitaxel are local to the distal axon and independent of transport defects [J]. *Exp Neurol*, 2017, 288: 153-166.
- [68] Sarkar C, Jones J W, Hegdekar N, *et al.* PLA2G4A/cPLA2-mediated lysosomal membrane damage leads to inhibition of autophagy and neurodegeneration after brain trauma [J]. *Autophagy*, 2020, 16(3): 466-485.
- [69] Zhang S N, Li H M, Li X Z, *et al.* Integrated omics and bioinformatics analyses for the toxic mechanism and material basis of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizome*-induced hepatotoxicity [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 198: 113994.
- [70] Yuan W L, Huang Z R, Xiao S J, *et al.* Systematic analysis of chemical profiles of *Sophorae tonkinensis Radix et Rhizoma in vitro and in vivo* using UPLC-Q-TOF-MS E [J]. *Biomed Chromatogr*, 2022, 36(6): e5357.
- [71] Yang L F, Garcia Canaveras J C, Chen Z H, *et al.* Serine catabolism feeds NADH when respiration is impaired [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(4): 809-821.e6.
- [72] 段敬怡, 许妍妍, 王玉明, 等. 基于有害结局路径的中药毒性进程动态机制研究思路 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(1): 58-63.
- [73] Duan L, Guo L, Wang L, *et al.* Application of metabolomics in toxicity evaluation of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 60.
- [74] 陈宵, 孙承业. 代谢组学在天然产物毒性评价和毒理学研究中的应用进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1244-1257.
- [75] 肖小河, 柏兆方, 王伽伯, 等. 中药安全性评价与药物警戒 [J]. *科学通报*, 2021, 66(S1): 407-414.

[责任编辑 崔艳丽]