

· 综述 ·

代谢组学在中药及其复方领域中的研究进展

毛庆草^{1,3}, 单进军^{2*}, 吴皓¹, 谢彤²

(1.南京中医药大学药学院,江苏 南京 210023;2.南京中医药大学中医儿科学研究所,江苏 南京 210023;3.南京化工职业技术学院,江苏 南京 210048)

摘要:21 世纪以来,国内外学者运用代谢组学技术在中药及其复方的领域做了很多深入的研究,包括单味中药及其有效成分在治疗疾病机理的研究、中药治疗中医证候动物模型建立的评价、中药复方治疗疾病机理的研究和中药资源和质量控制以及中药有效成分体内过程的研究。本文就近年来在此方面的研究进展进行评述。

关键词:代谢组学;中药;复方;研究进展

中图分类号: 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2014)02-0197-04

Research progress on the Metabolomics in the Traditional Chinese medicine (TCM) and its compound

MAO Yan-cao^{1,3}, SHAN Jin-jun^{2*}, WU Hao¹, XIE Tong²

(1.School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2.Institute of Paediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 3.Nanjing College of Chemical Technology, Nanjing, 210048, China)

KEY WORDS:Metabolomics; Traditional Chinese medicine; Chinese medicine compound; Research progress

代谢组学是上世纪 90 年代末继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后发展起来的一门全新全科,着重解释机体在外界刺激和影响的条件下“已经发生了什么”,由于该学科的研究指导思想、研究内容与研究预期与中药及其复方的研究方法有相似之处,随着代谢组学技术的不断延伸,尝试利用代谢组学技术客观、直观评价中药及其复方的作用机理、综合疗效以及质量评价的研究越来越深入,本文就近十年来,运用代谢组学研究中药及其复方的作用机理、质量控制以及配伍规律方面进行表述。

1 代谢组学相关定义及与中药及其复方研究的相关性

1.1 代谢组学相关定义

代谢组学是系统生物学的一个新兴的研究领域,它是在基因组学、转录组学和蛋白质组学之后发展的学科,Nicholson 教授和他的同事们在 1999 年提出了代谢组学的概念,将代谢组学(metabonomics)定义为:是生物体在病理生理刺激和遗传因素改变的条件下,在不同时间、多方位定量检测其代谢变化,通过测定整个机体的系统代谢图谱来探讨基因功能调控机制的学科^[1]。

根据代谢组学研究对象和目的的不同,可以将其研究目的分为 4 个层次:①代谢物靶标分析(metabolite target anal-

ysis);针对某个或某几个特定组分的分析,如蛋白的底物或者产物,通过检查其因受干扰后目标代谢产物的变化,判断干扰因素的敏感度。②代谢物谱分析(metabolite profiling analysis):采用针对性的分析技术,对特定代谢路径和网络的的标志性或预见性代谢产物进行分析鉴别。③代谢指纹分析(metabolite fingerprint analysis):用于描述某种生理状态细胞内外所有代谢产物的代谢类型的集合。通过高通量的定性和半定量分析实现表型的快速鉴定。④代谢组学分析(metabonomics/metabolomics):一般是对限定条件下的某个生物系统或细胞所有低分子量代谢产物进行完整的定性和定量分析,目前尚难实现^[2]。

作为应用驱动的新兴科学,代谢组学已在药物毒性和机理研究、微生物和植物研究、疾病诊断和动物模型、基因功能的阐明等领域获得了较广泛地应用。近来,代谢组学又在中药成分的安全性评价、药物代谢的分析、毒性基因组学、营养基因组、药理代谢组学、整合药物代谢和系统毒理学等研究方面取得了新的突破和进展^[3-5]。

1.2 代谢组学与中药及其复方研究的相关性

1.2.1 研究思路的相关性 代谢组学主要是通过分析机体受到外界干扰后所分泌的各种体液内的代谢产物的变化趋

收稿日期:2013-08-13;修稿日期:2013-11-10

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81001499,81303295);江苏省自然科学基金(BK2010560);江苏省高校自然科学基金项目(13KJB360005)

作者简介:毛庆草(1983—),男,江苏南京人,南京中医药大学 2012 级博士研究生。*通信作者:dfsjj@163.com

势来反映人体代谢网络的变化趋势,它具有整体、动态、综合与分析的特点,强调用动态观^[6]。中药及中药复方其所包含的成分十分复杂,想要完全阐明中药及其复方内在成分与治疗疾病的具体药效关系基本不可能,一般认为中药及其复方其内在复杂的多成分通过多途径、多靶点的协同作用,从整体上来调节人体的机能水平,达到治疗的效果。

1.2.2 研究方法的相关性 代谢组学也是研究某种因素引起机体内源性代谢产物的变化,通过判断代谢途径和代谢网络的整体变化来反映机体内生化和机能变化的过程。在研究中药及其复方治疗中医某些证候的疾病的机理中可以利用代谢组学技术找出特异的生物标志物,用生物信息学方法分析这些标志物代谢产物的功能,从而反映中药及其复方的治疗机制,进而可以确定中药及其复方治疗中医证候疾病的相关代谢谱^[7]。

1.2.3 研究预期的相关性 代谢组学通过“生化表型”的清晰表达,代谢组学完全可以用微观、可系统解释的语言来阐明中药及其复方治疗疾病的机理和内在逻辑,进而以代谢组学为主体的系统生物学研究方法可以认识中医药抽象整体观思想的中药途径。基因组学和蛋白质组学告诉你可能发生了什么,而代谢组学告诉你已经发生了什么,这与中医药治疗思想相契合^[8]。

21 世纪以来,国内外学者运用代谢组学技术在中药及其复方的领域做了很多深入的研究,包括单味中药及其有效成分在治疗疾病机理的研究、中药治疗中医证候动物模型建立的评价、中药复方治疗疾病机理的研究和中药资源和质量控制以及中药有效成分体内过程的研究。本文就近年来在此方面的研究进展进行评述。

2 代谢组学的研究方法

核磁共振技术(NMR)、色谱质谱联用(GC/MS、LC/MS)技术是代谢组学应用研究普遍的方法^[7]。NMR 技术可对样品进行无保留的在一定实验条件下进行实时和动态的检测,样品处理简单,但灵敏度低,对高通量差异较大的样品同时检测难度较大。色谱质谱联用技术是目前代谢组学研究中应用最广泛的办法,色谱质谱联用技术具有灵敏度高、分离效率高、分析时间短、处理样品简便等特点,可以对样品进行高通量分析。色谱质谱联用技术在样品不需要过多处理以及色谱条件不需要特定设定的条件下,分析时间在 5 分钟之内,每周可以分析 1000 组以上的样品。而 MS/MS 的串联,可以使一些产物的结构信息得以获得^[8]。GC/MS 分离样品较高且成本较低,但其只能对挥发性和热稳定性好的组分进行分析,对于难挥发或热不稳定的样品要进行衍生化处理。LC/MS 适用样品范围较广,现在大多数药物和外源性代谢产物的研究都用此技术。总之以上研究代谢组学的技术目的是要尽可能精确分析生物体系中尽量多的代谢组分,使得整个分析过程能保留最大限度的代谢物的完整信息。

在代谢组学分析和模式比较识别中,涉及建模、计算机

应用、数学分析和仿真等学科的研究内容^[9]。主成分分析法(Principal component analysis, PCA)是代谢组学中最常用的模式识别方法,PCA 通过主成分对数据集内部结构的解释描述,对数据集的生物化学变化作出判断,进而能直观描述药物或者外界因素到达生物机体、器官、细胞及基因之后,生物体内代谢模式的变化。通过对主成分图上某些成分位置的寻找及判断,可以寻找到生物标志物和确定药物作用的机理。通过代谢产物相关性的比较,可以判断药物影响代谢途径及代谢网络的方式,进而确定更多药物作用机制。一些环境因素和其他干扰因素会影响分析结果,需采用滤噪技术,如加正交信号校正(Orthogonal signal correction),同时采用更为复杂的分析方法,如运用偏最小二乘法分析(PLS-DA)和人工神经网络建立复杂的数学模型对未知样本进行预测分析。

3 代谢组学技术在中药及其复方研究中的应用

3.1 单味中药及其中药有效成分治疗疾病机理的研究

有学者将单味中药治疗中医疾病的机理研究做为研究中药药性、机理的突破口,通过单味中药及其有效成分对特定中医证候疾病的代谢组学研究,试图寻找出代谢组学技术在分析、阐述单味中药及其有效成分治疗中医证候疾病机理的有效方法和路径。

Lu 等^[10]运用 uplc/ms 分析了肾阳虚大鼠尿液的代谢产物,确定了苯基丙酰胺、苯乙酰甘氨酸、肌酐、柠檬酸盐等 8 个代谢标志物,通过 PCA 分析,发现治疗组、空白组与给药组在这些代谢标志物的水平有较大差异,最后确定骨碎补药材通过改变其能量代谢、氨基酸代谢和肠道菌群的代谢水平达到治疗肾阳虚症状的效果,并且骨碎补对治疗肾阳虚症状的恢复呈明显的时间依赖性。

Qiu 等^[5]运用 GC-MS 对肉苁蓉治疗氢化可的松致肾虚的动物模型的尿液进行分析,检测出 117 个代谢物,其中鉴别出 23 个代谢物,主要是氨基酸、多胺、脂肪酸、嘌呤、肾上腺激素等,这些代谢物主要干预能量代谢、脂肪代谢和氨基酸代谢。通过分析,在给药十天后,模型组尿液中的络氨酸、多巴胺和去甲肾上腺素的水平是对照组的 1.7~3.0 倍,而治疗组只有 1.1~1.5 倍。作者分析肉苁蓉通过儿茶酚胺代谢水平的调节,提高动物机体免疫力,对抗抵消氢化可的松导致肾虚症状,从而逐步恢复动物正常的相关代谢水平,最终达到系统性恢复氢化可的松导致肾虚大鼠的代谢紊乱。

Jiang 等^[11]运用 GC/MS、LC/MS 和 ¹H NMR 考察了黄连素对大鼠降血脂、血糖的肝脏与尿液的代谢组学,发现通过给药后,代谢物脂肪酸、胆固醇、葡萄糖在肝脏中的水平降低,而尿液中丙氨酸、精氨酸等 7 种物质的水平发生改变,作者通过分析大鼠尿液的代谢物质水平发现,在大鼠给药后发生胆固醇水平下降之前,大鼠体内的碳水化合物就高度地消耗,这提示动物可以利用其他的能量代谢途径来改变氨基酸和脂肪代谢。黄连素通过改变脂肪酸的 β 氧化和葡萄糖氨基酸的生成来改变能量代谢和脂肪代谢。

3.2 中药及其复方治疗中医证候动物模型的建立与评价

运用代谢组学技术,可以有效评估中医证候动物模型建立的科学性和有效性,这为进一步阐明中药及其复方治疗中医证候疾病的机理打下了良好的基础。

Qiu等^[5]通过UPLC/MS对肾阳虚大鼠尿液代谢产物的鉴别以及PCA的分析,观察“模型组”大鼠给药氢化可的松后15天的代谢产物水平,确定大鼠仍处于“肾虚”状态,验证了氢化可的松致“肾虚”模型的有效性。

佟欣等^[12]通过UPLC/TOF-MS,观察大鼠尿液代谢产物的变化,来评价三因素(大黄、乙醇和 α -萘异硫氰酸酯)致大鼠“阴黄”模型的建立。鉴别出19个与阴黄症状起因和发展进程相关联的代谢产物,通过PCA分析,发现三因素可以影响模型大鼠的糖代谢、氨基酸代谢、核苷、脂肪代谢和肠道菌群代谢。其中在大黄的干预下,尿液中发现3,5-二羟基苯乙酸、N-甲基-1-甲基萘胺等在能量代谢水平低下由肠道菌群代谢的产物从而导致非酒精性脂肪肝,而 α -萘异硫氰酸酯通过嗜中性粒细胞释放炎性物质和蛋白酶导致胆管上皮细胞坏死,加剧肝损伤。乙醇通过干扰糖的正常代谢,加剧能量代谢障碍,活化CYP₂E₁酶活性,提高羟自由基水平,加剧肝细胞损伤。

罗和古等^[13]通过NMR分析慢性束缚应激(CIS)模型大鼠血浆内源性代谢产物的变化,发现乙酸、胆碱、N糖蛋白、饱和脂肪酸和血糖的水平较正常大鼠提高,而血浆内低密度脂蛋白(LDL)、超低密度脂蛋白(VLDL)、和不饱和脂肪酸的水平较正常大鼠降低。

Chen等^[14]通过¹H NMR考察了脑动脉结扎致亚急性中风模型大鼠的相关代谢产物水平变化,在20个鉴别出的内源性代谢产物中,其中丙酮、 β -羟基丁酸盐、葡萄糖、乳酸、丙氨酸等5个物质水平提高,而 γ -氨基丁酸、N-乙酰-天门氨酸(NAA)、牛磺酸等14个物质的水平下降。

3.3 中药复方及中药配伍科学性研究

运用代谢组学技术分析、揭示中药复方及中药药对配伍的有效性,已经成为研究中药复方组方规律的一个新的手段。通过分析中药复方及药对对机体代谢产物、路径和网络的影响,可以阐述中药复方组方以及药物配伍的内在逻辑关系。

Keiko等^[15]运用CE-TOFMS对当归芍药散提取物进行高通量的次级代谢产物的筛查,119个代谢产物得到鉴别,通过PCA分析,确定有机胺、氨基酸和莽草酸衍生途径的生物碱为其主要代谢产物。并将这些代谢产物与方中单味中药活性的相关性进行研究。发现茯苓、苍术、共同拥有利尿作用,胍丁胺在茯苓、苍术、泽泻中水平较高。而3-甲基组氨酸、亚精胺、色氨酸等7个代谢产物在当归和石斛中水平较高,这两味中药共同拥有调理气血的作用。通过对中药复方进行高通量的代谢组学分析,可以为传统的中药复方的质量控制提供补充。

罗和古等^[13]运用NMR观察逍遥散对慢性束缚应激

(CIS)大鼠的血浆内源性代谢产物的变化,发现经过逍遥散治疗的CIS模型大鼠,其血浆内超低密度脂蛋白VLDL、低密度脂蛋白LDL、苏氨酸、蛋氨酸和谷氨酸水平提高,通过比较挥发油复方逍遥散和缺挥发油的复方逍遥散对大鼠血浆代谢产物影响的比较发现,丙氨酸、苏氨酸、LDL、VLDL和不饱和脂肪酸的水平在用含挥发油逍遥散治疗的模型大鼠血浆中水平较高,通过分析发现这含挥发油和缺挥发油的逍遥散均可以将CIS大鼠的乙酸、胆碱、乙酰半胱氨酸(NAC)、饱和与不饱和脂肪酸、LDL、VLDL等代谢产物的水平恢复正常。通过这些代谢产物水平的调整,作者得出逍遥散可以防止肝脏细胞氧化同时促进微循环而达到治疗肝气郁滞的效果。

Wang等^[16]运用HPLC/DAD/ESI-MS考察了丹参沉香药对血瘀气滞模型大鼠血浆代谢组学的影响,通过PCA分析,作者发现血瘀气滞与内源性物质4-甲基苯甲酰胺有关,而沉香作为“使”药,通过影响 β -3,4-二羟基- α -羟基苯丙酸异丙酯水平的变化加强君药丹参的治疗气瘀滞的效果。

Chen等^[14]运用¹H NMR考察了补阳还五汤对亚急性中风模型大鼠的代谢组学,其中20个内源性代谢产物得到鉴别,经过给药的中风模型大鼠其N-乙酰-天门氨酸(NAA)、牛磺酸、丙酮酸盐等10个代谢产物的水平提高而葡萄糖和丙氨酸的水平降低。作者认为,补阳还五汤可以使亚急性中风大鼠部分紊乱的代谢产物水平恢复正常。

3.4 中药资源及其体内过程研究

随着代谢组学技术在快速有效鉴别中药方面的研究不断发展和成熟,运用代谢组学技术阐释中药体内过程和生物转化方面的研究也开始尝试,随着研究的开展,可以为中药资源的研究提供一个全新的视野和路径。

Guo等^[17]运用UPLC/MS手段去鉴别人参、三七、竹节参三种人参属药物中具有特征的次级代谢产物,一共11种皂苷在这三种药材中得以确认。并通过PCA和PLS-DA发现竹节参皂苷IV A,人参皂苷R₀、R_c、R_{b1}、R_{b2}、R_{g2}在这三种药材中的水平差异明显。人参皂苷R_{b1}在人参中水平最高、在竹节参中水平最低。作者认为通过UPLC/MS与多变量统计分析相结合的方法可以去评价不同中药或同属中药的内在次级代谢产物成分,并通过将其归类和鉴别,从而可以阐明中药内在化学成分资源的多样性的内在机理。

Ha等^[18]通过LC/ESI-MSⁿ,确定了桔梗皂苷D经肠道菌群代谢的11个产物,并确定了这些肠道菌群代谢产物的化学结构,分析发现桔梗皂苷D经肠道菌群代谢后主要通过糖苷键的断裂重排、母环的断裂以及分子重排,进而确定了10条桔梗皂苷D经肠道菌群代谢的途径。尽管一些桔梗代谢产物的结构无法确定或者有些成分含量过低,如乙酰化的位置尚不确定,但这种研究方法仍然提供了一种快速的中药单体成分体内代谢途径的研究方法。

3.5 中药毒性及其机制研究

随着代谢组学在中药质量评价中应用的深入,以及多种

分析平台的应用,代谢组学技术不断发展应用于中药有效性评价研究过程中,对中药细胞毒性以及中药毒性风险评价的研究也逐渐展开^[19]。Chen 等^[20]运用 UPLC-MS 技术,通过代谢组学研究对菊科植物千里光(*Senecio scandens*)和欧洲千里光(*Senecio vulgaris*)的毒性进行了比较研究。2010 年版《中国药典》记载的菊科千里光(*Senecio scandens*),对其副作用和毒性没有提及;而欧洲千里光(*Senecio vulgaris*)则报道其有严重的肝脏毒性;Xiong 等^[21]发现,十种吡咯里西定类生物碱如阿多尼弗林碱、千里光宁碱及其氧化物、倒千里光碱及其氧化物、千里光菲淋被检出。其中阿多尼弗林碱被检定为菊科千里光的特殊标志物,而千里光宁碱及其氧化物则被认为是欧洲千里光的特殊标志物。通过体内和体外的肝脏毒性试验发现,千里光宁碱及其氧化物相比较阿多尼弗林碱具有更严重潜在的肝脏毒性。研究表明通过代谢组学的研究可以有效对具有遗传学相近形态的中药进行毒性评价,提高用药的安全性。

4 展望

虽然代谢组学并不能全面、精确地分析中药及其复方在疾病诊治、资源鉴别、体内过程等研究的系统性和科学性,目前还不能完全替代传统药理、生化、分子生物学的研究手段,但随着研究技术固有缺陷的改善、数据分析模型及技术的扩展以及与其他相关学科的深度交叉,做为与中医药研究整体思想相契合的代谢组学,在中医药研究的领域,在中药及其复方科学性的研究方面完全可以率先将传统的中医药研究思想与这门新兴的学科做到完美结合,为中医药的研究水平与层次的提高做到自身应有的贡献。

参考文献:

- [1] 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):1181-1189.
- [2] Taylor J, King RD, Altmann T, et al. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(Suppl2): 241-248.
- [3] Dong H, Zhang AH, Sun H, et al. Ingenuity pathways analysis of urine metabolomics phenotypes toxicity of Chuanwu in Wistar rats by UPLC-Q-TOF-HDMS coupled with pattern recognition methods[J]. *Molecular Bio Systems*, 2012, 8:1206-1221
- [4] Mlawule RM, Karl R, Marjan DM, et al. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(1): 1-16
- [5] Qiu YP, Chen MJ, Su MM. Metabolic profiling reveals therapeutic effects of Herba Cistanchesin an animal model of hydrocortisone-induced "kidney-deficiency syndrome"[J]. *Chinese Med*, 2008, (10): 1186-1193.
- [6] Tang HR, Wang YL. Metabonomics: a revolution in progress[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2006, 33(5): 401.
- [7] 杨萍,贾钰华,李杰. 代谢组学技术及其在中医药领域中的应用[J]. *辽宁*

- 中医杂志, 2009, 36(1): 32-35.
- Yang P, Jia YH, Li J. Metabonomics and its Application to Traditional Chinese Medicine[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2009, 36(1): 32-35.
- [8] 王广基, 查伟斌, 郝海平, 等. 代谢组学技术在中医药关键科学问题研究中的应用前景分析[J]. *中国天然药物*, 2008, 6(2): 89-97.
- Wang GJ, Zha WB, Hao WP, et al. Application Analysis of the Metabonomics in Key Scientific Problems of Traditional Chinese Medicine [J]. *Chin J Nat Med*, 2008, 6(2): 89-97.
- [9] King RD, Whelan KE, Jones FM, et al. Functional genomic hypothesis generation and experimentation by a robot scientist[J]. *Nature*, 2004, 427(2): 247.
- [10] Lu XM, Xiong ZL, Li JJ, et al. Metabonomic study on 'Kidney-Yang Deficiency syndrome' and intervention effects of Rhizoma Drynariae extracts in rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2011(83): 700-708.
- [11] Jiang ZJ, Liu F, Ong ES, et al. Metabolic profile associated with glucose and cholesterol Lowering Effects Of berberine in Sprague-Dawley rats[J]. *Metabolomics*, 2012(8): 1052-1068.
- [12] Tong X, Sun H, Yan GL, et al. Evaluation Study on Urine Metabolomics in Yinhuang Rat Model Induced by Triplet Factors of Rhubarb, Ethanol, and α -Naphthylisothiolanate[J]. *Chin J Integr Med*, 2011(5): 369-375.
- [13] Luo HG, Chen JX, Zhang Q, et al. Comparative Study on Effects of Xi-aoyao Powder and Its Modified Prescription on Plasma Metabolomics of Rats with Chronic Immobilization Stress[J]. *Chin J Integr Med*, 2012(10): 1092-1097.
- [14] Chen HJ, Shen YC, Lin CY. Metabolomics study of Buyang Huanwu Tang Decoction in ischemic stroke mice by ¹H NMR[J]. *Metabolomics*, 2012(8): 974-984.
- [15] Keiko L, Masahiro S, Tomoyoshi S, et al. Profiling of the charged metabolites of traditional herbal medicines using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry[J]. *Metabolomics*, 2011: 290-299.
- [16] Wang SX, Luo K, Liang J. Metabolomics study on the synergistic interaction between *Salvia miltiorrhiza* and *Lignum dalbergiae odoriferae* used as Jun-Shi herbs in a *S. miltiorrhiza* recipe[J]. *Med Chem Res*, 2011(20): 16-22.
- [17] Guo XX, Yan N, Ming M, et al. Application of ultra - performance LC-TOF-MS metabolite profiling techniques to the analysis of medicinal Panax herbs[J]. *Metabolomics*, 2008(4): 248-260.
- [18] Ha YW, Na YC, Ha IJ, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry-based structural analysis of new platycoside metabolites transformed by human intestinal bacteria[J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2010(51): 202-209.
- [19] Aravindaram K, Yang NS. *Metabolomics in Medicinal Plant Research* [M]. New York: Biotechnology for Medicinal Plants, 2013: 275-294.
- [20] Chen T, Mei N. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids[J]. *J Appl Toxicol*, 2010(30): 183-196.
- [21] Xiong AZ, Yang L, Ji LL. UPLC-MS based metabolomic study on *Senecio scandens* and *S. vulgaris*; an approach for the differentiation of two *Senecio* herbs with similar morphology but different toxicity[J]. *Metabolomics*, 2012(8): 614-623.

(编辑:董宇)