

基于代谢网络变化的 中药整体效应评价方法研究^{*}

□周明眉 刘平 贾伟^{**} (上海中医药大学 上海 201203)
赵爱华 邱明丰 邱云平 苏明明 (上海交通大学药学院 上海 200030)

摘 要:由于中医的“整体观”和中药复方的复杂非线性特征,采用常规药理指标对中药复方的效应进行评价存在着局限性,而现代医学越来越多地采用系统生物学方法对疾病和药物效应进行研究,使得两个医学体系在整体观和方法学上逐渐走向沟通、互补和融合,为中药复方整体效应评价方法的创新提供了契机。通过研究本文提出了采用系统生物学的策略和方法,基于疾病和药物干预下的系统代谢网络的整体性和动态性的变化评价中药整体效应,从而揭示中医“证”的内涵,解释中药复方对疾病的治疗作用,以及指导中药的安全用药。

关键词:中药整体效应评价 代谢网络 系统生物学 代谢组学

具有悠久历史的祖国传统医学蕴藏着许多朴素的辩证分析思想及系统论的观念,强调从整体的角度认识和调节人体生命活动规律,在几千年的实践中积累了大量的有效治疗手段和药物,但因受研究方法和技术手段的限制,中医药的疗效评价和作用机制研究一直没能形成现代科学公认的方法和体系。在中药物质基础的研究中,采用常规药理学(Conventional Pharmacology),即对中药复方、单味药或活性组分和单体进行药理评价,其结果并不令人满意;将中药进行化学成分的提取分离和结构鉴定后,进行效应评价,追求单一

化合物的获得和分子细胞水平新指标的应用,甚至在此基础上进行中药复方的再优化,也(因为丢失了中药组方配伍上的优势而)没有获得较大的成功。这些方法学上的局限性直接导致了国内外对中医药学的科学性的怀疑,甚至在最近一段时间出现了一股要“废除”中医药的思潮。因此如何将习用的、零散的、以“四诊”为核心的疗效评价方法转化为统一的、规范的、能被现代科学界广为接受的有效证据(Evidence or Proof)已成为目前中医药必须应对的一种挑战^[1-5]。

中药复方是中医临床用药的主要形式,是中医辨证论治的具体表现。在中药复方的制备过程中伴随着复杂的物理和化学变化,其体内作用过程中包含着更

收稿日期:2006-12-15

修回日期:2006-12-19

^{*} 上海重点学科建设资助项目(T0301):中医系统实验方剂学研究,负责人:贾伟。

^{**} 联系人:贾伟,教授,上海交通大学药学院副院长,研究方向:中药制剂学与代谢组学研究, Tel/Fax: 021-62932292. E-mail: weijia@sjtu.edu.cn.

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 113

为复杂的物理、化学以及生物作用,因此中药复方本身就是一个复杂的分子系统,其对复杂性疾病(这一个更为复杂的系统)的治疗和调节的复杂程度,远超出以线性的量效、构效、时效为基础的常规药理学的能力范围。近年来我国对中药复方的现代化研究虽然取得了长足的进步,但尚未在如何体现中医药特点和优势的研究方法上取得实质性的突破。最近罗国安等人提出了“化学物质组学(Chemomics)”的概念^[6-7],其研究思路是在中药配伍理论指导下采取自上而下、逐层递进的策略,通过不同层次化学物质组的化学信息流与多参数生物(功能)信息流的相关分析,从复方的整体化学物质组中逐步发现和确定有效化学物质组和有效成分并优化其最佳配伍。这个全新的概念为中药方剂的研究提供了一种新的思路。在药理评价方面不少学者也开展了探索性研究,如王本祥^[8]提出中药药效的关键药效指标和次要药效指标;王智民^[9]提出评价中药多靶点作用特点可采取评价整体疗效的“水闸门法”;以及结合数学模型进行药效评价^[10-14]。但从总体上看,中药复方的疗效和安全性的评价以及作用机理的研究还面临许多困难,对于药物进入人体以后对人体整体生理代谢的影响,也就是疗效的评价和机理的研究,需要从思路到策略上进行进一步的创新,还需要发展和融合新的研究技术。

一、中医方药药理评价必须从辨证论治出发,把握整体性和动态性的特点

中医治疗的复杂性和难点之一是体现在对疾病和治疗方法的整体性和动态性的把握上。同种疾病要进行辨证施治,治疗方案因人(证)而异;对同一病人在疾病不同阶段出现的证候变化予以捕捉、并适时调整治疗方案,提高治疗质量。这样的辨证论治比西医的临床治疗更具有个性化和科学性。而中药复方对机体的治疗作用,是两个复杂系统的相互作用并形成一个更高级的系统整体,其中既有对某些系统的直接作用,也有因系统间的作用而使中药呈现级联网络特点。一个复方的功效可能由多个化学成分实现,一个化学成分也可能具有多种功效,由于药物作用靶点的广谱性,生物多系统之间复杂的相互作用,中药复方对机体的

作用还具有多环节的特点,其作用过程可能包括多种微量单体对众多环节进行微调而使机体复归平衡,其多矢量作用合力的微效积累既是其治疗作用强度温和缓慢的原因,也是中药副作用较轻较少的原因,此所谓“药有个性之特长,方有合群之妙用”。因此中药药理评价不能停留在特异性的药理指标、生物标志物(Biomarkers)或局部功能的改变上,应强调人或实验动物对于药物干预体系的整体反应。

复方研究的关键是“方证对应”,它是中药复方药理学评价系统建立的依据。中医理论强调“辨证论治”,“证”是连接药效实验研究和中药临床研究的桥梁和纽带。中药复方的功能主治都是源于中医的辨证论治,脱离了“证”去评价中药复方的有效性和安全性,是不符合临床实际的。选用中医理论指导下建立的中医证候模型,如:脾虚证模型、肾虚证模型和血虚证模型等,能够更好地反映中医病因、病机变化,更符合临床实际。在此基础上进行的连续、动态的药理学评价,能够在中医药擅长的老年病、慢性病发生发展的渐进过程中,捕捉住中药对其温和缓慢的干预治疗作用证据。值得一提的是,目前中医仍缺乏规范的“证”的模型,往往仍是以单一环节或单一化合物来复制,如何建立反映全身状态的证的模型,并使之与临床实验达到药理学意义上的统一,需要大量临床基础研究工作。

二、基于代谢网络变化的中药复方整体效应评价方法是适应中医方药特点的有效方法之一

中药复方的研究方法学随着认识和技术进步大致以“简单-复杂-系统”的趋势在不断地发展,目前进入了系统生物学研究阶段。植物化学和先导化合物高通量筛选技术的应用,曾经出现过采用单靶点单成分模式从中药中筛选先导化合物的研究热潮,后来随着人们逐渐认识到中药特别是复方作为整体作用的必要性,出现了一些“多对一”或“一对多”的研究模式,后来越来越多的人认识到并试图从“多成分、多靶点、整合调节作用”的模式阐释中药复方的作用机理。这一研究模式带来了海量的单一指标数据结果,对于这些结果信息的整合和归纳成为中药复方药理整体评价

的关键任务。而系统生物学本身的产生也是来自于西方生命科学家对于复杂性疾病必须依靠分子生物学、数学、计算机科学和工程学等多种研究工具整合的认识,它需要生命科学、信息科学、数学、计算机科学等各种学科的共同参与。一般说来,生物信息以这样的“自下而上”式方向进行流动和整合:DNA→mRNA→蛋白质→蛋白质相互作用网络→细胞→器官→个体→群体,系统生物学的重要任务就是尽可能地获得每个层次的信息并将它们进行整合^[15]。

中药及其复方的整体药理评价最终要在中医理论指导下,积极利用现代科学技术,以多学科交叉融合的方式进行。在东西方医学都注重整体研究和数据整合的今天,系统生物学研究方法为这一问题的解决提供了契机。代谢组(Metabonome)指生物体内的所有小分子代谢物,是生物体内经基因组表达和新陈代谢产生的中介物及终产物^[16]。代谢组学是后基因组时代出现的一门新兴“组学”学科。包括中药复方在内的药物治疗系统对处于疾病状态的人体系统进行干预,重建人体系统的平衡(Homeostasis)。我们可以通过测定内源性代谢物组的变化来绘制一条疾病状态下以及药物干预下的病理变化过程的系统运行轨迹(Time-space trajectory),它能用反映整体的代谢物图直接刻画出动态情况下的生理和生化状态及变化过程,因此能提供区别于其他“组学”而来的终端性(End-point)信息(见图1虚拟的系统病理变化过程)^[17]。代谢组学已经用于评价实验动物模型在外源性刺激下产生的一系列代谢过程和作用机制、靶器官的效应和组织损伤。代谢组学已逐渐成为新药研究开发的必要部分,其应用涵盖新生物标志物的发现、新药筛选、安全性评价和作用机制研究,因此在模型识别和确证、药物筛选、作用机制研究等方面具有极其重要的应用价值。将研究代谢调控网络变化应用于中药及复方的整体效应评价中也符合中医药的整体观以及辨证论治的特点。

如图示,系统受到外界或内部扰动(致病)因素作用下,其代谢调控网络的运行状态将逐步偏离平衡状态(淡蓝色区域),一直到达疾病状态(黑色区域);而药物干预后的调控网络受到修复,通过一系列变化逐步重建平衡,回到或接近平衡状态。

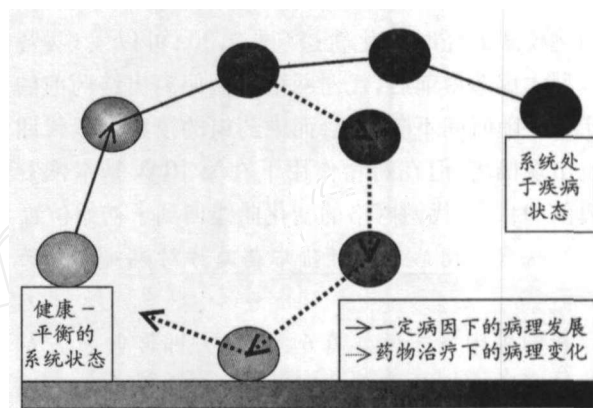


图1 (虚拟的)疾病状态下以及药物干预下的病理变化过程的系统运行轨迹

1. 从代谢网络变化评价“证”的动物模型以及药物干预

中医的“证”是机体在疾病发展过程中某一阶段的病理概括,它很可能是人体调控网络功能发生变化后的一种特异性并具有相对稳定性的状态。从代谢组学的观点而言,人体处于不同的生理病理状态时必然存在特定的代谢组分模式。代谢产物的变化与脏腑生理、病理密切相关,与以往任何单一指标不同,理应更能反映中医“证”的概念。从津液代谢的过程看,依靠肾阳的温煦气化,输送到全身,经过代谢后则化为尿液排出体外。因此,尿液中代谢产物应能全面地反应肾阳虚证的本质。因此尿液代谢组学指标具有科学性和系统性,而且其非介入性采样方法比其他检测方法更具备实用性。文献报道肾阳虚证患者代谢物水平有特征性变化,如24小时尿17-羟皮类固醇(17-OHCS)含量明显降低等^[18],表明患者代谢网络可能发生了特征性的变化。采用氢化可的松造大鼠肾阳虚证模型是进行肾阳虚证基础研究的经典方法,我们通过代谢组学对模型动物的代谢网络变化进行了研究,同时观察了补肾阳中药肉苁蓉对模型动物的代谢网络的影响^[19]。我们采用了GC/MS和模式识别技术对模型大鼠的尿液进行内源性代谢物分析,发现在氢化可的松诱导下动物初期的代谢活动尤其是能量相关代谢明显增强,儿茶酚胺生物合成通路在药物诱导下加速;进一步以多因素分析技术获得模型大鼠及中药干预大鼠的

代谢物模式的经时变化轨迹(图 2,3),可以发现,肾阳虚模型大鼠造模前后,代谢网络明显偏离出给药前的平衡状态并随时间不断变化,而中药组的模型大鼠代谢网络也出现偏离,但在药物作用下在第 10 天基本恢复到造模前的状态,代谢网络的变化曲线回到了初始位置。

2. 从代谢网络变化评价中药复方对疾病模型的干预

我们采用黄连吴茱萸 6:1 组方即经典名方左金丸对结肠腺癌前病变模型进行治疗的研究。采用二甲胍(1,2-dimethylhydrazine, DMH)诱发大鼠结肠上皮增殖与凋亡以及结肠腺癌前病变(异变肠腺病

灶),基于组织病理切片的常规药理研究表明黄连吴茱萸水提物对 DMH 诱发大鼠结肠上皮增殖与凋亡和异常肠腺病灶(ACF)形成有明显抑制作用。通过氯甲酸乙酯衍生化对 DMH 诱导模型大鼠尿样进行 GC/MS 分析,结合多变量分析统计对所得谱图进行研究,发现了许多代谢通道的变化,比如三羧酸循环、色氨酸代谢和肠道菌代谢等^[20]。在对模型组和健康对照组大鼠尿样中这些特定代谢物水平进行分析时,发现中药治疗组的代谢谱接近于健康对照组。结合药理学、分子生物学、元基因组研究等结果,推断药对的药效作用机制可能在于影响肠道微生物,以及抑制 COX-2、和细胞

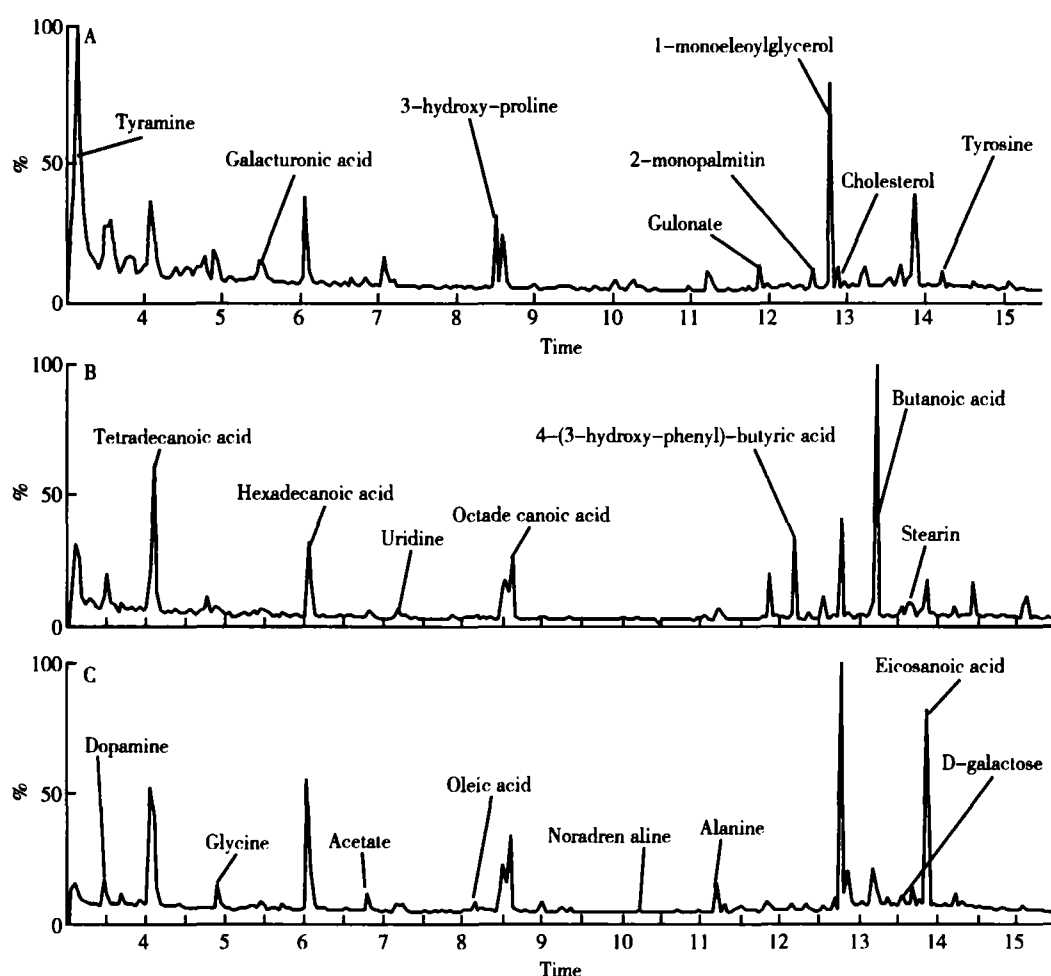


图 2 给药后第 10 天时, (A) 肉苁蓉干预治疗组 (B) 肾阳虚模型组和 (C) 空白对照组的尿样 GC/MS 分析 TIC 色谱图。

色素 P450 活性。通过主成份分析 (PCA), 我们发现中药治疗组模型动物的代谢变化轨迹图谱与模型组动物有明显的差异, 给药组的代谢物轨迹在偏离正常组 5 周后又向正常组方向偏移, 而 DMH 诱导的模型组则远远地偏离正常组所在的平衡状态 (见图 3)。

如图所示, DMH 诱导的结肠腺癌前病变模型组的代谢谱明显偏离 (自左向右) 正常对照组的范围, 而中药治疗后的大鼠在自左向右偏离出一段 (第三周) 后于第 5 周转向另一个代谢状态空间 (上方), 并与第 9 周回到正常对照组的范围位置。

3. 从代谢网络变化评价中药毒性

中药安全性是中药效应的首要因素。含马兜铃酸的中草药由于肾毒性问题已引起国内外学者的广泛关注。我们对马兜铃酸的肾毒性开展了代谢组学研究, 以期获得整体性的药物毒性结果, 并建立整体、动态的药物毒性评价方法。我们采用 LC/MS 和 GC/MS 技术以及多变量统计分析马兜铃酸组和含马兜铃酸的中药关木通组大鼠尿样代谢物^[21], 结合常规药理学对肾功能的检测, 结果显示在马兜铃酸引起的进行性肾功能损伤的同时, 代谢模式也发生了显著改变, 主成分分析 (PCA) 示意图显示出空白对照组和服用马兜铃酸组大鼠有显著差异, 见图 4。这些差异提示同型半胱氨酸形成和叶酸循环加速, 而同型半胱氨酸的再甲基化和花生四烯酸的生物合成减少。通过分析给药后 48 小时的尿液样品, 采用 6 个特异性变量进行数据分析和预测, 在盲法下成功地预测了正常组和马兜铃酸组, 并且成功地预示了某些服用马兜铃酸动物并不会导致肾毒性。这些基于代谢网络的分析方法对药物肾毒性的预测具有高度的精确性, 可以广泛用于中药整体毒性评价和筛选; 同时发现低剂量的马兜铃酸在给药 6

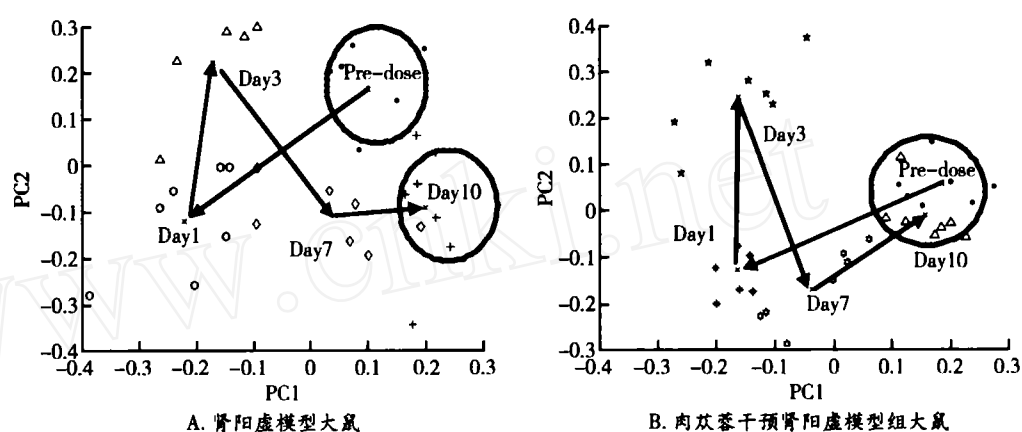


图 3 图 A 模型大鼠及中药干预大鼠的代谢物模式的经时变化轨迹

图 B 中所示代谢网络在中药治疗下在第 10 天恢复到初始状态。

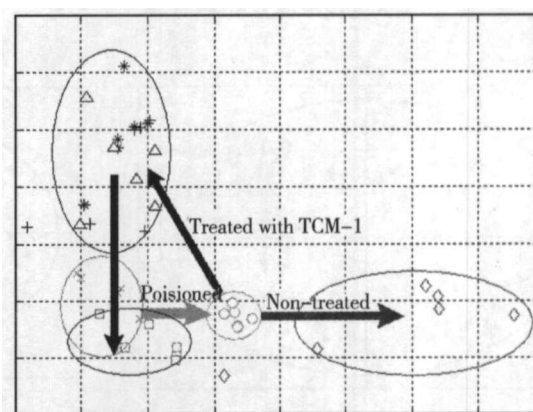


图 4 黄连吴茱萸药对对 DMH 诱发大鼠结肠癌前病变模型的代谢网络影响

天时, 代谢网络恢复为正常, 而高剂量的仍与正常动物有显著差异, 见图 5, 这就解释了中药安全性与剂量之间的密切关系, 表明合理使用有毒中药, 不会带来临床不良后果。

基于代谢网络变化的中药整体效应评价方法针对体内内源性代谢物 (组) 进行时间相关性的定量测定, 研究 (疾病) 系统在中药干预下的整体性和动态性应答。它是一种对人体的整体生理代谢特性进行非破坏性、系统测量的全新的技术体系, 能够有望实现对不同健康状况的人体的分类识别, 以及对同一个生物体在疾病发生发展过程和药物干预前后的整体生理代谢特性

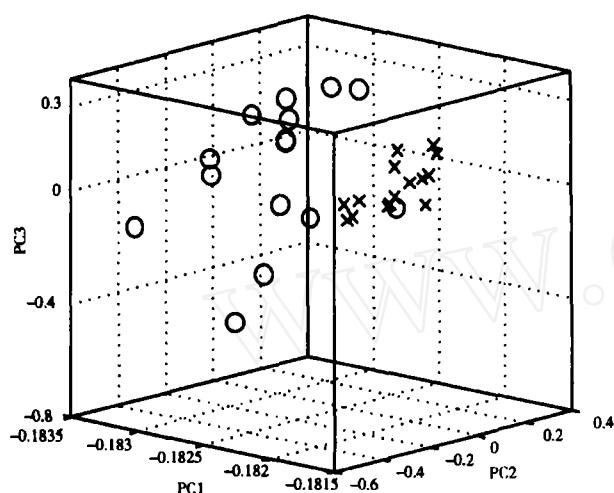


图5 给药48小时后健康组和马兜铃酸大鼠组尿样分析PCA图

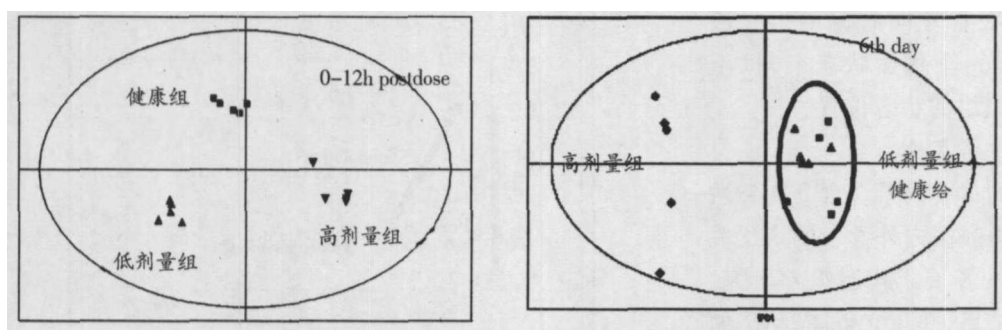


图6 马兜铃酸给药后12h(左)和给药后6天(右),高、低剂量组与正常组代谢网络之间的比较,其中低剂量组的代谢网络在第6天已恢复至健康组区域

的动力学监控,以此作为评价药物疗效的依据。在通过多变量统计和模式识别研究宏观的代谢网络变化的同时,我们还应该结合对微观的细胞模型和基于关键生化指标和单一靶点的药物模型的分子生物学研究、常规的药理学研究和药物代谢动力学研究,从而对中药复方的作用机理获得深入系统的认识,形成整合代谢组学的系统药理学新方法。而这样的中药复方的系统药理学将是实现现代生物医学与中医药学汇通融合的“契合点”。

三、结 语

中医药要走向国际社会,一个急需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

医学界接受的中药复方的疗效评价和机制研究方法。组成中药复方药效物质基础的复杂性和作用机制的多样性决定了中药药理评价方法不能采用单一化合物(化学)药物的评价方法,必须采用传统和现代的技术方法相结合的多学科整合性方法,即在现有的中药药理、临床药理、分子生物学基础上引入代谢组学、基因组学等研究复杂生物体系的技术手段,结合中药的化学成分组研究,对分子水平、细胞水平、整体水平上中药的生物效应和作用机制研究结果进行系统整合。

四、讨 论

人体在生命活动过程中所有的细胞都会向胞外分泌代谢物和蛋白质,形成所谓的生理“足迹(Footprints)”。这些胞外的生物分子最终在血液里汇聚,在尿液中排出。因此,血液、尿液等体液中的大量的代谢物和蛋白质的组

成谱即分泌组和代谢组是人体内所有器官、组织和细胞生理活动的结果和集中反映。当某个器官出现病变时,其向外分泌、排泄的代谢物和蛋白质也会发生变化,用基于NMR、MS等的现代代谢组学和蛋白组学手段对体液内的蛋白质和代谢物进行尽可能全面的测

定,通过多变量统计手段进行数据处理和模式识别,可以在系统水平准确刻画人体的整体的生理代谢特性,观察人体在疾病发生发展过程和药物干预下的整体变化,实现对中医药生物效应的整体性和动态性评价。采用这种研究方法还可以找到对体内特定病理过程具有标识作用的胞外的代谢物和蛋白质组成谱。

参考文献

- 1 Katherine Gunding. The desktop guide to complementary and alternative medicine: an evidence-based approach. JAMA 2001; 286(16):2030.
- 2 Diana Brahm. Standard of care for alternative medicine. Lancet 2000; 356(9239):1422.
- 3 Jin-Ling Tang, Si-Yan Zhan, Ernst E. Review of randomized controlled

- trials of traditional Chinese medicine. *British Medical Journal* 1999; 319 (7203):160-161.
- 4 Ernst E. Herbal medicines: Where is evidence Growing evidence of effectiveness in counterbalanced by inadequate regulation. *British Medical Journal* 2000;321(7258):395-396.
 - 5 Robert Yuan, Yuan Lin. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacology & Therapeutics* 2000; 86:191-198.
 - 6 叶能胜,梁琼麟,罗国安等. 化学物质组学与蛋白质组学. 亚太传统医药,2006,1:23-27.
 - 7 罗国安,梁琼麟,张荣利等. 化学物质组学与中药方剂研究-兼析清开灵复方物质基础研究. 世界科学技术-中医药现代化,2006,8(1):6-15.
 - 8 王本祥,周秋丽. 关于中药活性成分的认识及其研究方法. 中国中药杂志,2001,26(1):10.
 - 9 王智民,杜力军,毕开顺. 中药药效评价的水闸门法. 世界科学技术-中医药现代化,2000,2(5):34.
 - 10 翟晓翔,国承纲. 建立中药整体功效系统理论. 山东中医药大学学报,1998,22(2):104.
 - 11 赵玉男,邢东明,杜力军等. 以数学模型对中药药效进行综合评价的意义和思考. 世界科学技术-中医药现代化,2002,4(6):24-27.
 - 12 韩京艳,邢东明,卢弘等. 对中药药效评价的方法学探讨. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2001,17(2):4-6.
 - 13 李敏,孙虹,林佳等. 用聚类-矩阵和法评价不同产地丹参提取物相关活性. 世界科学技术-中医药现代化,2002,4(1):33-35.
 - 14 陶佳林,赵玉男,王笑等. 利用“分层法”评价中药复杂体系药效时有关权重设立的讨论. 世界科学技术-中医药现代化,2005,7(1):33-37.
 - 15 胡作为,周燕萍,沈自尹. 从现代生物学的发展谈中医药从整体上调控基因功能的优势. 中医药学刊,2004,22(1):91-93.
 - 16 Raamsdonk L M, Teusink B, Broadhurst D, et al. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotech.* 2001,19(3):45-50.
 - 17 Nicholson JK, Connolly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Feb;1(2):153-161.
 - 18 顾天爵,等. 肾虚病人尿中 17-羟类固醇排出量改变的观察. 中华内科杂志,1964,12(4):307.
 - 19 Chen MJ, Zhao LP, Jia W, et al. Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone induced animal model. *Journal of Proteome Research.* 2005, Vol. 4, (6) 2391-2396.
 - 20 Qiu YP, Su MM, Jia W, et al. Understanding of herb pair treated DMH-induced precancerous colon based on metabonomic profiling.
 - 21 Chen MJ, Su MM, Jia W, et al. Metabonomic study of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Proteome Research.* 2006, 5(4):995-1002.

Evaluation of Therapeutic Effects of TCM Based on Metabolic Variations

Zhou Mingmei¹, Liu Ping¹, Jia Wei¹, Zhao Aihua², Qiu Minghua², Qiu Yunping², Su Mingming²

(1. Shanghai University of TCM, Shanghai 201203;

2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030)

This paper proposes a new methodology to study the response of regulatory network of metabolism, which is helpful for evaluating the basic therapeutic effects of traditional Chinese medicine (TCM), especially in the context of systems biology. Conventional wisdom of pharmacology has proved insufficient in evaluating the therapeutic effects of a multi-herb formula, as TCM formulas are mostly designed in a complicated and non-linear manner, to achieve a coordinated and interactive effect. Western medicine, however, prefers a multi-disciplinary approach to study the mechanism and pathological response of complex diseases to drug therapy. Expecting an enhanced communication, mix, and being complementary to one another in both philosophical thinking and methodology, the two medical systems are facing an unprecedented opportunity for innovation and modernizing TCM. Here one of the systems biology approaches, metabonomics, is employed, to understand the basic dynamic variations of metabolic responses to TCM intervention. This will eventually lead to an improved knowledge of TCM's syndrome theory, therapeutic effects of multi-herb formulas, and the safety of TCM products.

Keywords: Evaluation of therapeutic effects of TCM, metabolic network, systems biology, metabonomics

(责任编辑:王 瑀,责任编辑:张志华,责任译审:邹春申)

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 119