

代谢物组学研究进展及其在中医药研究中的应用展望^{*}

□ 吴泽明 孙 晖 吕海涛 孙文军 王喜军^{**}

(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘 要:自 1999 年代谢组学的概念提出以来,它在药物毒理研究、疾病诊断、系统生物学研究等诸多领域里的应用日益深入。代谢组学由于其从代谢网络终端表象的整体角度反映生物体的功能水平,恰与中医的整体思想吻合。它的研究思路和方法,对阐明中医的证候本质及药物的作用机制具有积极的意义,本文综述了近年来代谢物组学研究现状,并对该领域在中医药研究中的应用和发展进行了展望。

关键词:代谢物组学 中医证候 中药现代化

代谢组学 (Metabonomics/Metabolomics) 是后基因组时代出现的一门新的“-omics”组学学科。它的研究中心在于定量地测定由病理生理刺激或基因变异诱导的与时间相关的多参数生物体代谢应答,并利用模式识别 (Pattern Recognition) 将这种应答与体内生物学事件关联,定位事件发生的靶器官和位点,确定生物标记物^[2]。自 1999 年代谢组学的概念提出以来,它在药物毒理研究、疾病诊断、系统生物学研究等诸多领域里的应用日益深入^[2,3,4]。在代谢组学的溯源中常依据研究对象和主要技术手段的不同将代谢组学区分为 Metabolomics 和 Metabonomics,二者分别由 Metabolome^[5]、Metabome^[6]演化而来,前者是由 Fiehn 等在以拟南芥为模型植物,研究植物生理代谢网络时提出

的^[7],它的技术手段主要是 GC-MS,同时兼用 NMR;后者由 Nicholson 在长期研究生物体液的基础上率先提出,主要基于 NMR 方法分析动物体的代谢过程^[1],但随着 LC-MS 技术的长足进步, HPLC-MS/MS (或者 UPLC-MS/MS) 技术在 Metabonomics 研究中的作用逐渐增强^[8,9]。

生物体受外源性物质刺激或基因变异所导致的病理变化过程中,必然影响生物代谢网络,使得细胞产生的内源性物质的种类、浓度或相对比例发生改变,这种改变最终体现在血浆、尿液等生物体液中分子集合轮廓的改变上,利用多种谱学技术建立代谢物指纹图谱来表征这种改变,并利用化学计量学的方法挖掘这些谱图间隐含的信息,从而确定生物标记物,揭示外源性物质所诱导的生物学事件发生的靶器官、位点和强弱程度^[1,10]。基于此,代谢组学的研究通常涵盖以下

收稿日期: 2006-10-10

修回日期: 2006-11-28

* 科技部重大基础研究 (973) 计划项目 (2005CB523406): 基于体内直接作用物质的类方配伍研究,负责人:王喜军。

** 联系人:王喜军,教授,本刊编委,博士生导师,从事中药及复方的血清药物化学研究, Tel: 0451-82110818, Email: wxj@hljucm.net

几个层次: (1)代谢靶标分析 (Metabolic Target Analysis), 有目的地选择某一组具有相似化学属性的小分子类群, 研究其在代谢应答中的变化, 并与既知的生物途径关联, 研究得出外源性物质或病理状态对这一生物途径的效应; (2)代谢轮廓分析 (Metabolic Profiling Analysis), 与靶点分析比较, 它的研究对象更加广泛, 着眼于整个代谢网络中的一些关键信息节点; (3)代谢指纹图谱分析 (Metabolic Fingerprint Analysis), 比轮廓分析更趋于复杂, 不关注于特殊组分, 而对样品进行快速筛选分类; (4)代谢组学分析 (Metabonomic Analysis), 在前三者的基础上, 更进一步系统化、整合化, 研究所有代谢产物的变化情况^[11, 12]。

作为生命学科领域中的一门新兴组学技术, 代谢组学与基因组学、转录组学、蛋白组学等共同构成了“系统生物学”(Systems Biology)^[2, 13]。外源性物质作用于生物体后, 应激性地导致基因转录、翻译, 蛋白质表达、合成, 继而代谢终产物生成等一系列变化, 从DNA, mRNA到蛋白质组, 再到代谢物组, 生命信息在渐次的传递中逐步扩增, 最终整合放大到代谢物组的变化上, 同时由于代谢组学研究对象的易得性, 这就大大提升了它的研究价值, 为新药筛选, 毒理阐释, 疾病诊断等提供了新的视角和手段^[14, 15]。

一、代谢组学的实施

代谢组学关注的核心在于比较研究外源物刺激或基因变异后体液中中小分子代谢产物集合的变化, 但目前还没有一种技术平台能做到全成分分析。从研究阶段上讲, 代谢组学研究可以划分为两大方面的内容^[16]:

1. 数据采集

即以生物体液中的代谢产物为研究对象, 利用NMR、LC-MS等各种谱学技术对其进行分析。代谢组学是基于NMR技术发展起来的, 它对生物样品的选择宽泛, 灵敏度高, 非侵袭性实验提供的微量样品就足以供多次分析用, 且不需要复杂的样品前处理; 同时新兴的魔角旋转技术已大大提高了NMR技术对复杂基质(如组织等)的分辨能力^[17, 18], 使得NMR技术继续在代谢组学研究中保持主流地位; 色谱-质谱联用

技术整合了色谱的高分离度和质谱高灵敏度、普适性的长处, 在代谢组学研究中获得的越来越广泛的应用^[19, 20]。

2. 数据处理与分析

利用模式识别对获得的谱图信息进行化学计量学处理, 可采取监督型(Supervised)或非监督型(Unsupervised)方法分析数学算法前处理后得到的数据矩阵来发掘蕴涵着的有效信息, 前者有主成分分析分析(PCA), 聚类分析(CA)等; 后者包括人工神经网络(ANN), 偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)等^[16, 21, 22], 随着研究的深入, 对数据的分析正趋于智能专家系统化, 如COMET初步建立的“CLOUDS”系统, 采用了非神经网络形式的概率k-NN分类方法, 利用重叠强度对未知化合物进行毒理分类^[23]。

目前, 人们已经认识到代谢组学研究的关键问题并不在于数据的获取, 而在于有效的实验设计和对数据信息的充分解读。随着既往研究的积累, 代谢组学在药物毒理研究、作用机理阐释和疾病诊断中的应用越来越广泛深入。下面从上述三种应用领域入手, 选择有代表性的个案扼要地概述代谢组学的研究进展及在中医药研究中的应用设想。

二、代谢组学在医药研究中的应用概况

1. 药物毒理代谢组学研究

代谢组学的概念是Nicholson等人在以NMR技术为基础的药物毒性评价体系建立的系统工作中提出的, 因此药物毒理研究是代谢组学研究的初衷, 也是目前研究最为活跃的领域之一。通过研究药物作用后体液中代谢物组的扰动, 将这种扰动与既知的生物代谢途径关联, 就能获得关于外源物作用于生物体位点、途径和强弱等相关信息, 且随着药物毒理数据库的建立、专家系统的完善, 代谢物组在未知化合物的毒性预测中的应用具有广阔的前景^[23], 这将大大降低新药的创新成本和研发周期。Gartland等人研究发现由BEA、环氧丙烷和N-苯基邻氨基苯甲酸诱导的乳突淋巴瘤样毒性表现为早期尿样中三甲胺-N-氧化物, 二甲胺, 甲胺和甜菜碱的升高, 同时二甲基甘氨酸, 柠檬酸盐, 2-酮戊二酸降低^[24, 25]; 在服用环孢霉素、HgCl₂和d-

丝氨酸后的大鼠尿液中,Williams等使用 LC-MS发现了一系列新的表征肾小管损伤的生物标记物,它们在色氨酸代谢的过程产生^[19,26];Homes等利用代谢组学研究肾小管 S3 段损伤性化合物 HgCl₂和六氯对二甲苯,结果随肾小管 S3段损伤的加剧,尿中乳酸、羟丁酸盐、马尿酸盐、Cr和酮戊二酸显著升高,提示这些成分可以作为肾小管 S3段损伤的生物标记物^[27]。国内王全军等对抗肿瘤药物 Z24进行毒理代谢组学研究,结果 PCA分析得分图中高中低剂量呈现聚类分布,这种分布与毒性反应相对应,高中剂量的代谢表型是 Z24肝脏毒性的典型表现,顺乌头酸、己二酸、乳酸等被证实为生物标记物^[28]。

2. 诊断代谢组学研究

病理过程中代谢网络的某些环节出现紊乱,这最终体现在体液代谢组成和相对量的变化上。因此比较研究正常组与病理组的代谢物组,利用 Supervised 类型分析方法就能寻找到特定的表征病理状态的生物标记物。许国旺等人基于 LC-MS/MS 技术对肝脏疾病的诊断进行代谢靶标研究,以尿液中核苷酸类代谢终产物为分析对象,PCA 分析并经组织病理学证实,可将肝炎、肝硬化误诊为肝癌的几率下降到 7.4%,目前这一研究成果正接受多方资金资助进行产业化开发^[29]。Brindle 等应用 NMR 技术,以严重心血管疾病患者和心血管动脉硬化患者的血清和血浆为研究对象,进行了代谢组学分析,结合 PCA, SMCA, PLS-DA 等模式识别技术建立了判别心血管疾病及其严重程度的新诊断方法,优于传统的血管造影术^[30]。

随着人类基因组草图计划的完成,后基因组时代里多种“omics”技术涌现,大量关于生命体基因、蛋白质、代谢物组间相互作用联系的信息被发现,这反馈性地刺激了检验医学从单一项目检测向整体分析过渡,从辅助疾病诊断向健康早期预警过渡,为代谢组学在检验医学领域中的应用开拓了更为广阔的前景。

3. 药物代谢组学研究

药物作用于机体后一方面自身会被肠道菌群或肝药酶代谢,产生活化或灭活的代谢产物,另一方面药物/药物代谢产物会导致机体内源性物质应答的变化,这最终还会体现在体液中代谢物组的成分构成或相对

浓度的变化上,因此药物代谢组学的研究目的在于从药物诱导的内源物的时空变化切入,通过与相关生物途径的关联,探讨药物的作用靶点和机制。目前,代谢组学研究大多集中在药物毒理研究上,涉足药物作用机制解析的研究-药物代谢组学研究还处于初级阶段,这主要表现在进行药物代谢组学研究的技术平台还正在构建,方法学体系正在探讨,这当中 Plumb R. S 研究小组进行了许多有益的开拓性研究^[8,14]。他们用 LC/MS 对鼠尿中 3 种候选药物的代谢情况进行了检测,通过将空白尿液与给药尿液 LC/MS 谱图的比较分析,成功的将 3 种药物的代谢差异在质谱中区分出来,共找出了 10 个化合物。此外,他们还利用 LC/TOFMS 联用技术在事先不清楚受试药物结构的情况下对体液中的药物代谢产物进行了检测,结合化学计量学方法对给药样本与空白样本的谱图进行对比分析,在复杂谱峰中分析出了代谢产物的质谱峰,避开了大量内基质峰的干扰^[31,32]。黄玉荣等用代谢组学方法研究钩藤多动合剂的药效机制,采用攀爬实验和自发行实验研究多动合剂对去水吗啡小鼠模型的药效作用,同时用 HPLC-ECD 方法研究其生化机制,观察到多动合剂可抑制去水吗啡引起的小鼠的攀爬行为,并减弱自发活动的增强。对去水吗啡引起的血浆中 DA 和 NE 含量的改变及脑组织中 DA 含量的改变,多动合剂均能予以校正,表明多动合剂能调整单胺类神经递质的失衡以达到治疗多动综合征的目的^[33]。

除了上述列举的 3 种主要应用领域外,代谢组学尚还有植物代谢组学、营养代谢组学研究等分支。

三、在中医药研究中应用展望

自 1999 年有英国皇家理工学院的 Nicholson 提出代谢组学 (Metabonomics) 的概念以来,它以其在生命科学领域巨大的学术价值和应用潜力吸引了许多世界一流的实验室参与到相关研究中。2001 年 Pfizer, Eli Lilly, Novartis 等六家世界制药巨头与英国 London Imperial College 合作成立了毒理代谢物组学国际研究协作组 (Consortium for Metabonomic Toxicology, 简称 COMET), 致力于开发适于在新药研发中进行毒理筛选的数据库;创制用于毒性预测的软件专家系统。由

于得到数家顶级工业实验室的支持,几年来他们成绩斐然,截至目前基于 NMR 技术的 COMET I 已顺利完成,由 Waters 公司进行战略资助的基于 LC/MS 的 COMET II 已实质开展。

代谢组学在广泛应用于药物安全性评价和疾病诊断等研究领域的同时,由于其从代谢网络终端表象的整体角度反映生物体的功能水平,这恰与中医的整体思想吻合。从整体观念来看,证候是由受外源性刺激(外邪)或基因变异(内因)所致的病理变化过程,该过程使生物代谢网络、使细胞产生的内源性产物的种类、浓度、相对比例发生扰动,这种扰动体现在小分子代谢产物集合轮廓的改变。因此利用多种谱学技术建立代谢物指纹图谱来表征这种动态的多元生物整体信息的改变,并利用化学计量学的方法挖掘这些谱间隐含的信息,从而确定证候的生物标记物,可从系统生物学的代谢物组学角度阐明中医证候的微观本质。在此基础上,以有效的方剂进行治疗或干预,研究其对生物标记物的影响,通过以方测证的方法确证生物标记物的意义及方证相应性。

从整体观上看,证候最终必须在动物的药理和病理模型上予以证实。代谢物组学研究可以区别不同种属、不同品系动物模型的代谢状态的差异,寻找人类疾病药效和毒性的适宜动物模型,而生物标志物起着动物模型和证候的桥梁作用。因此,以证候的生物标志物为动物模型的建模和评价体系,可建立起反映证候本质的证候动物模型。深入的研究工作将利用能诱导与证候 Marker 变化轨迹最大叠和的外源性干预方法,指导中医证候动物模型的复制,如此经过“证候人”-有效方剂-模型动物的梯队推进,将在真正意义上阐明中医证候本质和方证相应性,并有助于方剂配伍规律及药效机制的阐明。这种还原论与整体论集成的研究模式用在方剂配伍规律研究中将有效消弭由于“证不对方”而导致的经方无效的尴尬。因此有基于代谢组学在中医药研究中的深层潜在价值,目前我国已有多家院所成立了专门的机构进行中医药代谢组学相关研究,这其中涉及到了附子等中药的毒理研究、六味地黄丸对 SAM 大鼠的抗衰老作用、中医脏象的物质实质研究等多方面。

参考文献

- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., Holmes, E. "Metabonomics" understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181~1189.
- Nicholson, J. K., & Wilson, I. D. Understanding global systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(8): 668~676.
- Brindle, J. T., Antti, H., Holmes, E., et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H NMR - based metabonomics. *Nat Med*, 2002, 8(12): 1439~1444.
- Griffin, J. L., Bonney, S. A., Mann, C., et al. An integrated reverse functional genomic and metabolic approach to understanding oxic acid - induced fatty liver. *Physiol Genomics*, 2004, 17(2): 140~149.
- Oliver, S. G., Wilson, M. K., Kell, D. B. et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(9): 373~378.
- Fiehn, O. Metabonomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(1-2): 155~171.
- Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *dFunct Genom*, 2001, 2(3): 155~166.
- Jan D. Wilsona, Robert Plumbb, et al. HPLC - MS - based methods for the study of metabonomics. *Journal of Chromatography B*, 2005, 817: 67~76.
- Rebecca E. Williams a, Eva M. A., et al. combined 1H NMR and HPLC - MS - based metabonomic study of urine from obese (fa/fa) Zucker and normal Wistar - derived rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38: 465~471.
- Nicholson J. K., Connelly J., Lindon J. C., et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153~161.
- Taylor J., King R. D., Altmann T., et al. Application of metabonomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning. *Bioinform*, 2002, Suppl. 1: S241~S248.
- Vikram A., Shivaji B., Hamzehzarghani H., et al. Volatile metabolite profiling to discriminate diseases of McIntosh apple inoculated with fungal pathogens. *J. Sci. Food Agri*, 2004, 84(11): 1333~1340.
- Hood L., Heath J. R., Phelps M. E., et al. System biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. 2004, *Sci* 306: 640~643.
- 冉小蓉, 梁琼麟, 罗国安. 代谢组学的应用及进展. *中成药*, 2005, 27(4): 381~385.
- 彭双清, 廖明阳, 颜贤忠. 代谢组学方法的建立及其在药物安全评

- 价中的应用. 卫生毒理学杂志, 2004, 18 (3) 185~187.
- 16 Hector C. Keun Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, 109 92~106.
 - 17 Garrod, S., Humpfer, E., Spraul, M., et al. High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopic studies on intact rat renal cortex and medulla. *Magn Reson Med*, 1999, 41 (6) 1108~1118.
 - 18 Garrod, S., Humpfer, E., Connor, S. C., et al. High-resolution 1H-NMR and magic angle spinning NMR spectroscopic investigation of the biochemical effects of 2-bromoethanamine in intact renal and hepatic tissue. *Magn Reson Med*, 2001, 45 (5) 781~790.
 - 19 Williams, R. E., Major, H., Lock, E. A., et al. D-Serine-induced nephrotoxicity: a HPLC-TOF/MS-based metabonomics approach. *Toxicology*, 2005, 207 (2) 179~190.
 - 20 Wilson, I. D., Nicholson, J. K., Castro-Perez, et al. High resolution "Ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res*, 2005, 4 (2) 591~598.
 - 21 J. C. Lindon, E. Holmes, J. K. Nicholson. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2001, 39 1~40.
 - 22 李晶, 吴晓健, 刘昌孝, 等. 代谢组学研究中数据处理新方法的应用. *药学报*, 2006, 41 (1) 47~53.
 - 23 Ebbels, T., Keun, H., Beckonert, O., et al. Toxicity classification from metabonomic data using a density superposition approach: "CLOUDS". *Anal Chim Acta*, 2003, 490 (1-2) 109~122.
 - 24 Holmes, E., Bonner, F. W., & Nicholson, J. K. 1H-NMR spectroscopic and histopathological studies on propyleneimine-induced renal papillary necrosis in the rat and the multimammate desert mouse (*Mastomys natalensis*). *Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1997, 116 (2) 125~134.
 - 25 Williams, R. E., Twomey, K., Jacobsen, M., et al. N-phenylanthranilic acid induced nephrotoxicity - a metabonomics approach. *Toxicology*, 2003, 192 (1) 77~78.
 - 26 Lenz, E. M., Bright, J., Knight, R., et al. A metabonomic investigation of the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using 1H NMR and HPLC-TOF/MS: time dependent changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity. *Analyst*, 2004, 129 (6) 535~541.
 - 27 Holmes E., Connor SC, Nicholls AW, et al. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine. *Chemomet Intell Lab Sys*, 1999, 44 245~255.
 - 28 王全军, 颜贤忠, 吴纯启. Z24经口染毒大鼠尿液的核磁共振代谢组学研究. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18 (6) 460~465.
 - 29 Jun Yang, Guowang Xu, Yufang Zheng. Strategy for metabonomics research based on high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 2005, 1084 214~221.
 - 30 Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabonomics. *J Nat Med*, 2002 ed8 (12) 1439~1444.
 - 31 Plumb R S, Stumpf C L, Granger J H, et al. Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometer and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolite in biological fluids. *Rapid Commun in Mass Spectrom*, 2003, 17 (23) 2632~2638.
 - 32 Plumb R S, Stumpf C L, Gorenstein M V, et al. Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometer coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development. *Rapid Commun in Mass Spectrom*, 2002, 16 (20) 1991~96.
 - 33 黄玉荣, 魏广力, 龙红. 钩藤多动合剂的药效作用及用代谢组学方法研究其生化机制. *中草药*, 2005, 36 (3) 398~402.

Metabonomics and Its Application in TCM Study

Zhen g Wu, Hui Sun, Haitao Lu, Wenjun Sun, Xijun Wang

Heilongjiang University of TCM, Harbin, 150040

Metabonomics, since its birth, has found increasing applications in numerous areas, including drug toxicity, disease diagnosis, and system biology. Metabonomics studies biological functions, looking into metabolism as a whole. It shares some similarities with the TCM theory. The roadmap presented by metabonomics makes a good reference for improving the understanding of TCM syndromes and therapeutic mechanisms of herbal medicines. In this paper, authors reviewed the past results of metabonomic studies, and proposed to extend applications of metabonomics to TCM.

Keywords: Metabonomics; TCM syndromes; TCM modernization

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:张志华, 责任译审:邹春申)