



中医方证代谢组学 研究进展

(2018年卷)

王喜军 主编

兼外借



科学出版社

中医方证代谢组学研究进展

(2018年卷)

王喜军 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书系统介绍了2017年中医方证代谢组学的研究成果,并以中医方证代谢组学研究内容为主线,系统介绍了代谢组学技术在中医证候生物学本质、针灸穴位生物学、方剂有效性、肠道微生态及中药调控作用、中药效应成分作用机制、中药毒性、中药质量等研究领域中的年度研究进展。书中例证翔实,图表充分,能够带领读者快速、全面地了解中医方证代谢组学及其研究领域的最新进展。

本书收集作者科研团队完成的中医方证代谢组学研究成果及国内外同行的相关研究工作,力图为从事中医药现代研究的科学家、研究人员及学生提供参考,期望搭建中西医学沟通的生物学语言,促进中医药现代化和国际化发展。

图书在版编目(CIP)数据

中医方证代谢组学研究进展. 2018年卷 / 王喜军主编. — 北京: 科学出版社, 2018.12

ISBN 978-7-03-060152-0

I. ①中… II. ①王… III. ①中药学—药物代谢动力学—研究进展
IV. ①R28

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第283494号

责任编辑: 鲍 燕 / 责任校对: 王晓茜
责任印制: 肖 兴 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

三河市春园印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年12月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2018年12月第一次印刷 印张: 29

字数: 688 000

定价: 288.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

本书编委会

主 编 王喜军

副主编 韩 莹 孙 晖 闫广利

编 委 (按姓氏笔画排序)

- | | |
|----------------|-----------------|
| 王喜军 (黑龙江中医药大学) | 方 衡 (黑龙江中医药大学) |
| 孔 玲 (黑龙江中医药大学) | 卢盛文 (黑龙江中医药大学) |
| 任俊玲 (黑龙江中医药大学) | 刘月涛 (山西大学) |
| 闫 艳 (山西大学) | 闫广利 (黑龙江中医药大学) |
| 关 瑜 (黑龙江中医药大学) | 孙 晖 (黑龙江中医药大学) |
| 杜晨晖 (山西中医药大学) | 李松林 (江苏省中医药研究院) |
| 李爱平 (山西大学) | 李震宇 (山西大学) |
| 杨 乐 (黑龙江中医药大学) | 张宏莲 (齐齐哈尔医学院) |
| 张爱华 (黑龙江中医药大学) | 周小航 (黑龙江中医药大学) |
| 周玉枝 (山西大学) | 赵琦琦 (黑龙江中医药大学) |
| 秦雪梅 (山西大学) | 徐金娣 (江苏省中医药研究院) |
| 高 丽 (山西大学) | 董 辉 (黑龙江中医药大学) |
| 韩 莹 (黑龙江中医药大学) | 谢 静 (黑龙江中医药大学) |
| 熊 辉 (黑龙江中医药大学) | |

Chinmedomics Builds a Bridge from Traditional to Modern Research of Traditional Chinese Medicine

(代序)

Liu ChangXiao (刘昌孝院士)

“Omics” is a new research field of integrative systems biology and bioinformatics. In the post genomic era, the core scientific problem is to study the relationship between different “omics” and functions based on bioinformatics. How to apply the omics method and technology to understand the complexity of traditional Chinese medicines (TCM) is one of the hot spots in the recent decade in China. Here, first of all, we congratulate to Prof. Xi-jun Wang’s research to get gratifying progress which is a bridge linking the traditional theory and modern research for study of TCM, and also congratulate to the publication of *Chinmedomics* by Academic Press in 2015.

Prof. Wang’s *Chinmedomics* is one of the outstanding achievements in the field of research. After reading the article titled “*Chinmedomics: Newer Theory and Application*” (CHM, 2016, 8 (4): 299-307), I delighted to recommend this text to the readers.

Chinmedomics is an integral part of top-down systems biology, which aims to improve understanding of TCM formulations and seeks to elucidate the therapeutic and synergistic properties and metabolism of the formulations using modern analytical techniques for leading to a revolution of TCM therapy in future perspectives of Chinese medicinal formulations. The integrated Chinmedomics is also a powerful challenge and strategy for new drug discovery process from traditional medicines. Prof. Wang’s term introduced an innovative concept on Chinmedomics in a lot of modern researches of traditional medicines. The researchers have a value contribution to development innovative strategy with integrative traditional and modern biological techniques.

In 2015, *Nature* elaborated that Chinmedomics integrates metabolomics with serum pharmacology to mine the chemical and biological characteristics of TCM syndromes and to evaluate the efficacy of TCM formulae (Wang, 2015). Chinmedomics provides a powerful approach to evaluate the efficacy of TCM formulae; Following the principles of systems biology, which has highlighted a paradigm shift in Western medicine, the Chinmedomics approach will contribute to finding a common language to bridge TCM and Western medicines. Using the scientific, effective, and reliable Chinmedomics method for screening lead compounds in drug discovery, the usage of TCM was expanded worldwide (Xu et al, 2016). Prof. Wang’s group focused on the newer theory and application of Chinmedomics, and had carried out

systematic research and achieved the important discoveries. Their work has been widely cited by the international journals, such as *Lancet* (Devuyst et al, 2014) and *Nature Reviews. Drug Discovery* (Wishart, 2016). More than 20 articles, such as *Hepatology*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, and *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (Wang et al, 2013; 2014; 2016), highly evaluated that the authors introduced a serum pharmacochemistry analyzing method called Chinmedomics, which is used for new drug discovery from traditional medicine. Obviously, the author's group have achieved serial development based on this method. Devuyst et al (2014) elaborated in *Lancet*: The study of the urine metabolome is another emerging technology that can generate molecular fingerprints of diagnostic or prognostic value. Armitage et al (2013) reviewed that considering the fingerprint as a unique pattern characterizing a snapshot of the metabolism in a particular cell line or tissue is most useful in biomarker discovery and diagnostics.

Prof. Wang's team used high-throughput, high-resolution, high-sensitivity analytical instruments, combined with bioinformatics and pattern recognition technology, to establish the characteristic metabolic patterns of jaundice syndrome and sub-types, to interpret the scientific connotation at the metabolite level. In the aspect of the analysis, serum pharmacochemistry of TCM is critical to identify these potential bioactive constituents responsible for bioactivities of TCM formulations. The method is used widely for the clarification of the possible therapeutic basis and action mechanism of TCM, through the comparison of the chemical profile of a TCM and its metabolites profile. Simultaneous quantification has demonstrated that the multiple components and drug-drug interaction by pharmacokinetics combining multiple compounds could amplify, rather than reduce, the effects of each agent. Therefore, we suggest that the establishment and implementation of Chinmedomics had made the innovative achievements in solving key scientific problems. Innovative drug design based on clinical experience, enhances the academic level and clinical efficacy and safety of Chinese medicines.

References

- Armitage E G, Rupérez F J, Barbas C, 2013. Metabolomics of diet-related diseases using mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem*, 52: 61-73.
- Devuyst O, Knoers N V A M, Remuzzi G, Schaefer F, 2014. Rare inherited kidney diseases: Challenges, opportunities, and perspectives. *Lancet*, 383 (9931): 1844-1859.
- Wang X, 2015. Inside view. *Nature*, 528 (7582): 12-17.
- Wang X, Zhang A, Sun H, 2013. Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 57 (5): 2072-2077.
- Wang X, Zhang A, Yan G, Han Y, Sun H, 2014. UHPLC-MS for the analytical characterization of traditional Chinese medicines. *TrAC Trends Anal Chem*, 63: 180-187.
- Wang X, Zhang A, Sun H, Han Y, Yan G, 2016. Discovery and development of innovative drug from traditional medicine by integrated chinmedomics strategies in the post-genomic era. *TrAC Trends Anal Chem*, 76: 86-94.
- Wishart DS, 2016. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*, 15 (7): 473-484.
- Xu H, Niu H, He B, Cui C, Li Q, Bi K, 2016. Comprehensive qualitative ingredient profiling of Chinese herbal formula Wu-Zhu-Yu Decoction via a mass defect and fragment filtering approach using high resolution mass spectrometry. *Molecules*, 21 (5): E664.

前 言

中医方证代谢组学（Chinmedomics）整合了系统生物学与中药血清药物化学的理论及技术，通过基于证候生物标记物的方剂整体效应精准评价及方证对应有效状态下的方剂体内显效成分分析的一体化研究设计，发现方剂表达临床疗效的药效物质基础，解决方剂是否有效、有效机制及药效物质的有效性科学问题，实现中医学与现代医学科学有效沟通，使现代医学科学家能够理解及接受中医理论的学术价值及临床经验的实用价值。

证候本质是中医方证代谢组学研究的起点，利用代谢组学等系统生物学技术发现证候的生物标记物，阐述证候的生物学本质，有助于实现证候的精准诊断，并且建立基于证候生物标记物的疗效评价体系，实现方剂疗效的客观评价，及诠释方剂通过多成分、多靶点调节机体的整体功能治疗多基因复杂性疾病的优势，避免传统西医病理学方法对中医方剂疗效评价的偏颇。针灸也是中医临床有效实践的重要手段，中医方证代谢组学为中医穴位特异性物质基础和针灸的疗效评价及作用机理研究提供了科学方法。肠道微生态是人的重要组成部分，肠道菌群与宿主共同代谢组成了人的整体代谢，现代研究已经表明肠道菌群紊乱与很多中医证候的相关，利用代谢组学等系统生物学方法揭示肠道菌群结构及代谢变化，有助于全面揭示证候本质和阐述相应方剂的作用机制。在证候本质及方剂疗效精准评价基础上，发现了潜在的药效物质，最后仍需要进行生物学验证，代谢组学技术在代谢网络的整体调控水平上无歧视地表征中药药效物质的作用靶点，全面反映该成分对中药及方剂临床疗效的贡献，能够最终确定中药药效物质基础；同时，有利于中药多成分、多靶点的协同作用及其机制的阐述，并且可避免由单靶点效应评价产生的假阴性结果。中药毒性日益受到国际社会的关注，有毒中药由于炮制和配伍不当易于产生毒性，由于方证不对应亦会产生一定毒性；利用中医方证代谢组学方法，进行有毒中药的炮制、配伍及方证对应的安全性评价，能够有效诠释中药毒性机理及中医临床使用安全性的科学内涵。中药质量是中医临床有效实践和安全性的保障，利用代谢组学方法对中药化学成分组进行高通量、无偏差的全面分析，从整体上揭示基源、产地、采收、炮制、制剂等因素对中药成分的影响，有助于发现影响中药质量的关键质量属性，建立全过程的质量控制方法，保障中药临床应用的有效性和安全性。

《中医方证代谢组学研究进展》围绕上述中医方证代谢组学涉及的研究内容,梳理了本年度的研究文献,力图使读者快速、系统、全面地了解中医方证代谢组学理论体系及其相关应用的最新发展,目前已出版了2016年卷和2017年卷。2018年卷继续梳理了本年度的中医方证代谢组学研究实践及其在中医证候本质、方剂有效性、针灸作用机理与经穴特异性、肠道微生态与中药调控作用、中药成分生物效应与机制、有毒中药毒性、中药质量等中医药关键科学问题中的应用,展示了2018年的代表性研究成果,能够使读者一览中医药代谢组学研究的前沿进展,以收高屋建瓴之效。

我们力求本年卷中所有数据翔实、客观,但鉴于所载内容涉及面广,数据量浩大,且专业性强,书中难免出现遗漏及一些翻译不妥之处,敬请读者及业内人士谅解,并提出宝贵意见,以便在今后编写下一卷《中医方证代谢组学研究进展》时予以修正。

黑龙江中医药大学

2018年5月

目 录

Chinmedomics Builds a Bridge from Traditional to Modern Research of Traditional Chinese Medicine (代序)

前言

第一章 中医方证代谢组学研究.....	1
第一节 基于中医方证代谢组学的中医证候精准诊断及方剂疗效精准评价.....	1
第二节 基于中医方证代谢组学的开心散干预阿尔茨海默病小鼠的药效物质基础研究.....	4
第三节 基于中医方证代谢组学的生脉散干预 AD 转基因小鼠的药效物质基础研究.....	16
第四节 基于方证代谢组学的茵陈蒿汤治疗阳黄证相关小鼠模型的药效物质基础研究.....	23
参考文献.....	34
第二章 中医证候生物标记物研究.....	38
第一节 艾滋病感染者肺脾气虚证的生物标记物研究.....	38
第二节 痰瘀互结证代谢综合征的生物标记物研究.....	41
第三节 结直肠癌气虚证和阴虚证的生物标记物研究.....	43
第四节 冠心病心绞痛气虚血瘀证和气虚血瘀痰浊证的生物标记物研究.....	52
第五节 小儿支气管哮喘发作期痰热阻肺证的生物标记物研究.....	57
第六节 冠心病湿证及慢性肾功能衰竭湿证生物标记物研究.....	62
第七节 急性血瘀证的生物标记物研究.....	68
参考文献.....	71
第三章 基于代谢组学的方剂药效评价.....	72
第一节 清热剂药效评价及作用机制研究.....	73
第二节 温里剂药效评价及作用机制研究.....	99
第三节 补益剂药效评价及作用机制研究.....	107
第四节 理气剂药效评价及作用机制研究.....	122
第五节 理血剂药效评价及作用机制研究.....	128
第六节 祛湿剂药效评价及作用机制研究.....	150
第七节 驱虫剂药效评价及作用机制研究.....	163
参考文献.....	172
第四章 基于代谢组学的针灸作用机制及经穴特异性研究.....	174
第一节 针刺治疗大鼠原发性高血压的尿液代谢组学研究.....	175

第二节	基于核磁共振技术的电针刺激代谢反应研究	182
第三节	基于MRM-MS技术评价针刺疗效的靶向代谢组学研究	192
第四节	电针和艾灸治疗大鼠慢性萎缩性胃炎机制的代谢组学对比研究	198
	参考文献	206
第五章	基于代谢组学的中医药对肠道微生态研究	208
第一节	基于代谢组学研究柴胡疏肝散对抗生素诱导肠道菌群失调大鼠保护作用	208
第二节	寒凝血瘀证大鼠的肠道菌群变化与粪便代谢特征分析	218
第三节	小檗碱治疗高脂血症大鼠的代谢组学和肠道菌群分析	224
	参考文献	237
第六章	中药体内成分的生物效应及机制研究	239
第一节	基于多组学技术的京尼平苷保肝作用机制的研究	240
第二节	基于代谢组学的小檗碱对前列腺癌的治疗作用研究	252
第三节	基于代谢组学的甘草黄酮治疗乙酸诱导的胃溃疡的机制研究	270
第四节	基于代谢组学的姜黄素缓解N-亚硝基二乙胺诱发的小鼠肝损伤机制研究	276
第五节	黄芩素通过减轻炎症和改善代谢功能在D-半乳糖诱导的衰老大鼠中发挥有益的作用	281
第六节	基于 ¹ H-NMR代谢组学的黄芩素干预D-半乳糖致衰老大鼠作用研究	291
第七节	苦参碱抗肝癌细胞增殖的 ¹ H-NMR代谢组学研究	298
第八节	基于核磁代谢组学研究款冬花对OVA-哮喘模型的保护作用	306
	参考文献	320
第七章	有毒中药毒性的代谢组学研究	323
第一节	补骨脂毒性作用的代谢组学研究	324
第二节	黄药子肝毒性代谢组学研究	329
第三节	何首乌诱导肝毒性的代谢组学研究	334
第四节	银杏酚酸肝毒性和肾毒性的代谢组学研究	341
第五节	草乌毒性及配伍减毒的代谢组学研究	345
第六节	草乌毒性及炮制减毒的代谢组学研究	350
第七节	甘草次酸降低雄黄诱导的亚慢性肝毒性的代谢组学研究	356
第八节	黄芩苷对朱砂减毒作用的代谢组学研究	362
	参考文献	368
第八章	基于代谢组学的中药质量评价研究	370
第一节	青翘和老翘化学成分及抗癌药效差异的比较研究	371
第二节	基于UPLC-QTOF-MS代谢组学技术及HPLC定量分析煮沸时间对白芍炮制过程整体质量影响的研究	378
第三节	基于 ¹ H-NMR代谢组学技术的沙棘物种鉴别研究	384

第四节	基于 UHPLC-QTOF-MS 代谢组学技术的山参叶栽培年限研究	390
第五节	基于 UPLC-QTOF-MS ^E 代谢组学的三七皂苷提取物及注射液的化学组分研究	402
第六节	基于非靶向代谢组学及定量分析评价地理环境影响泽泻质量的研究	407
第七节	基于整合多组学策略的地黄炮制化学转化机制的研究	412
第八节	基于 UHPLC-MS/MS 代谢组学技术的不同采收期黄芩质量比较研究	424
第九节	基于核磁代谢组学技术的不同产地、不同基原、不同栽培方式黄芪比较研究	429
第十节	山西恒山地区蒙古传统(黄)芪和移栽(黄)芪的质量差异研究	444
	参考文献	451

第一章

中医方证代谢组学研究

第一节 基于中医方证代谢组学的中医证候精准诊断及方剂疗效精准评价

中医方证代谢组学（Chinmedomics）是近年来兴起的新兴学科，是整合了系统生物学与中药血清药物化学的理论及技术，形成了鉴定证候生物标记物，建立方剂有效性评价体系，并发现药效物质基础的应用科学^[1]。中医方证代谢组学是以证候为切入点，以方剂为研究对象，利用代谢组学技术发现并鉴定证候的生物标记物，以证候生物标记物为参数评价方剂的整体疗效；在有效的状态下，利用中药血清药物化学分析鉴定有效状态下方剂体内直接作用物质的显效形式；进而将证候生物标记物与方剂体内显效成分相关联，发现与生物标记物轨迹变化高度关联的体内成分，从而鉴定表达方剂临床疗效的药效物质基础，进而阐明中药有效性及其作用机制等科学问题^[2]。目前，“中医方证代谢组学”被国内外生命科学领域广泛接受。该理论和方法的出现，搭建了中医学与现代医学科学沟通的语言桥梁，尤其是证候生物标记物的发现，为证候的精准诊断及方剂有效性的精准评价开辟了有效途径。

一、中医方证代谢组学理论形成的科学背景及发展

健康模式及疾病谱的变化给现代医学研究提出众多新的命题，单靶点单一药物的简单治疗模式难以解决多靶点复杂性疾病的治疗问题，个体化的精准诊断及治疗又对现代医学提出了新的挑战。中医辨证施治是建立在对证候特征认知基础上的个体化诊疗过程，蕴含着精准医学的原始思维，体现了精准治疗医学的理念^[3, 4]。辨证论治以动态、个体化诊疗方式治疗疾病，正是精准医学个体化治疗的杰出典范。中医方剂配伍的协同增效联合干预措施，以及中医学辨证论治个体化治疗的精准潜力等在解决多基因复杂性疾病治疗问题方面积累了大量有价值的临床经验，具有鲜明的特色和优势。而中药的有效性是中医治疗优势的根本体现，也是横在中医学与现代医学科学家之间难以逾越的鸿沟，致使中医学的优势及其临床经验的价值难以被充分接受及发挥更有效的作用。如何建立一种能够科学阐释中药有效性的生物学语言，是建立起中医学与现代医学科学沟通的桥梁，是发挥中医药在治疗复杂性疾病及个体化精准治疗方面优势的前提。

有效性是中医药生存发展的关键，方剂有效性精准评价是挖掘和揭示中医药治疗优势的前提，而有效性精准评价是与证候和方剂两大中医学关键科学问题直接相关的^[5]。然而，

中医证候的模糊性及中药方剂的复杂性极大地限制了方剂的有效性评价及药效物质基础的确认; 现行有限的病理及临床化学指标难以体现方剂治疗复杂性疾病的整体作用特点。只有对中医证候状态的“精准”辨识, 对中药方剂的“精准”认识, 以及基于有效状态“精准”地评价疗效, 才能实现中医方剂的精准治疗。由此, 在揭示证候生物标记物的前提下, 建立方剂疗效精准评价体系, 是评价中药的有效性 & 发现方剂药效物质基础的必然要求^[6]。基于上述思考, 20 世纪 90 年代初笔者开始进行了一系列相关的理论及方法研究, 并率先提出了从口服方剂后的含药血清中分离鉴定中药药效物质基础的思路和研究设计, 建立了中药血清药物化学的理论及方法体系^[7], 为发现中药药效物质基础, 解决中药有效性及安全性等质量问题提供了方法学支撑。21 世纪初又将代谢组学技术引入证候生物学实质研究^[8], 并将其与中药血清药物化学有机整合, 利用代谢组学技术揭示证候的精确生物标记物, 利用血清药物化学方法发现有效状态下方剂的体内直接作用物质的显效形式; 在方剂疗效精准评价的基础上将内源性证候的生物标记物与外源性方剂显效成分相关联, 挖掘与证候标记物轨迹变化高度关联的药物成分, 发现并确定中药药效物质基础及有效性机制的科学内涵; 在大量研究实践基础上, 形成了阐释中药有效性的理论及方法体系——中医方证代谢组学^[2]。

中医方证代谢组学的英文定义为 Chinmedomics, Chinmedomics 的学术思想、策略内涵及研究方法于 2011 年底在 *Omics* 杂志发表^[9]; 英文版专著 *Chinmedomics* 已由 Elsevier 出版^[10]。近 5 年相继在 *Hepatology*、*Mol Cell Proteomics*、*Mass Spectrom Rev* 等国际知名刊物发表 200 余篇 SCI 收录论文, 被 *Lancet*、*Nat Rev Drug Discov*、*Chem Soc Rev* 等国际著名期刊正面引用 10000 余次; 其中 28 篇被 Thomson Reuters 评选为“ESI 全球高被引论文”; 38 篇被美国 BioMedLib 评选为相关研究领域最佳论文; 1 篇被英国皇家化学学会 RSC 评为领域前“Top1%”高被引论文; “茵陈蒿汤体内直接作用物质与代谢轮廓及生物标记物的关联性研究”发表后被国际千名医学家 (Faculty of 1000 Medicine) 特别推荐为“F1000 论文”, 认为在本领域具有特殊重要意义 (Special significance in its field)^[11]。目前, 中医方证代谢组学被国内外广泛接受并引用, 2015 年底, *Nature* 杂志评论认为该理论搭建了中医学与现代医学科学沟通的语言桥梁^[12], 对于深入认识中医药的有效性及其作用机制, 提升中医临床经验的社会价值, 推动中医药学术进步及新医学理论形成具有重要意义。

二、中医方证代谢组学与证候的精准诊断

精准诊断是提高中医临床疗效的关键。临床上中医证候诊断均以症状、体征、舌象、脉象等一系列证候要素为依据, 但是缺乏客观规范的标准, 或常因个人经验水平不同而使辨证结果不一致, 对病的证候分型也缺乏统一规范, 导致了证候诊断的模糊性及难重复的属性。目前生命科学研究已进入了组学时代, 生物标记物已成为精准诊断的主要依据, 是连接精准医学基础研究与临床诊疗的桥梁^[13~16]。应用中医证候/病的精确生物标记物可以实现证候精准诊断与精准用药, 并实现中药疗效的客观化的评价。应用证候/病生物标记物可以评价中医证候发生、发展、分型、治法、方药, 把精准医学的理念渗透到传统中医诊疗全过程, 也可实现从被动治疗到主动精准预防。中医方证代谢组学的研究核心是以典型证候/病患者群或相关模型动物的体液 (尿液、血液、唾液等) 为样本, 以液质联用技术对血清及尿液样品的小分子代谢产物进行无歧视分析, 建立各证候/病患者群的代谢轮廓、代谢指纹, 并鉴

定各证候的代谢生物标记物,对标记物再进行精准定量,确定证候标记物量变区间;分析揭示证候或模型动物的代谢轮廓及代谢标记物;以代谢轮廓宏观表征证候/病/模型动物的整体特征,以代谢标记物的质与量变化微观表达证候/病/模型动物的精细特征,利用标记物定量范围进行证候精准诊断;并通过生物标记物的关键代谢酶/代谢径路阐释证候/病的生物学机制。代表性工作是中医黄疸证(阳黄证)的生物标记物研究,利用代谢组学鉴定阳黄证生物标记物40个,并揭示阳黄证相关的代谢径路及相关蛋白质^[17]。该项工作首次系统阐释了中医证的生物标记物及证候的发病机制。此后,相继完成了肝郁脾虚证、心阳虚证等中医证候^[18, 19],以及高脂血症、肝癌、酒精肝、肥胖等疾病的生物标记物研究^[20~22]。

三、中医方证代谢组学与方剂疗效精准评价

方剂疗效精准评价是挖掘和揭示中医药治疗优势的前提。以证候/病/相关模型动物的代谢轮廓、代谢指纹及生物标记物作为方剂药效评价的依据,在疗效评价上结合症状、体征的变化以及疾病的生物学指标,建立基于代谢标记物的方剂药效临床精准评价体系。在此基础上,以临床证候生物标记物为靶点,通过生物标记物的功能分析,并以代谢径路及相关关键代谢酶为指导,结合功能蛋白分析,整合相关证候的中医学病因病机,以相关的现代疾病模为基础,复制中医证候相关的动物模型,建立方剂药效精准的实验评价体系,并开展经方的有效性及其机制挖掘研究。方剂疗效精准评价是发现药效物质基础的前提。中医方证代谢组学为中药有效性评价提供了有效途径。利用中医方证代谢组学的方法,开展黄疸证、肾阴虚、肾阳虚、心阳虚、实热证、心气虚、失眠症、消渴证、肝郁脾虚、气阴两虚证证候,以及茵陈蒿汤、茵陈四逆汤、六味地黄丸、知柏地黄丸、肾气丸、温心方、黄连解毒汤、酸枣仁汤、生脉饮等方剂治疗上述相关病症的整体疗效及药效物质基础的研究^[23~30],并阐明中药的有效性及其复方配伍的科学意义。

四、证候精准诊断及方剂疗效与药效物质基础发现

20世纪90年代初,笔者提出并建立了从口服方剂后含药血清中发现药物体内直接作用物质的研究设计。然而,由于当时中医证候生物标记物没有得到有效阐释,方剂的疗效精准评价体系尚未建立,只是单纯分析体内成分及其动态,没能实现将体内成分和中药有效性相联系。21世纪初将代谢组学发现证候标记物轨迹分析与血清药物化学体内成分分析同时一体化在方剂显效状态下完成,将方剂体内成分与证候生物标记物相关联,根据关联度确定潜在药效物质基础^[31],由此,建立了“血清中外源性中药成分与内源性生物标记物关联度分析”(plotting of correlation between marker metabolites and serum constituents, PCMS)方法,即将方剂显效状态下体内成分的经时变化规律与证候生物标记物在方剂作用下的动态变化规律相关联,挖掘影响证候标记物轨迹变化的体内直接作用物质,将其作为潜在药效物质基础进行生物学验证,从而确证表达临床疗效的体内药效物质基础,发现与临床疗效相关的药效成分。在此方面,完成了芍药甘草汤等14个方剂的体内有效成分的系统研究^[32]。利用中医方证代谢组学研究方法聚焦发现与伤寒伤阴、肝脾不和证相关的原发性痛经的21个尿液生物标记物,包括肌酸酐、亮氨酸-羟基脯氨酸、N-乙酰-L-丙氨酸、尿酸、N-乙酰乙醇胺、

4, 8-二羟基喹啉、4, 6-二羟基喹啉、泛醌-1、D-脱硫生物素、异戊酰基葡萄糖苷酸、D-精氨酸、黄嘌呤核苷酸、异戊氨酰-缬氨酸、丁基嘧啶磷、磷酸胆碱、鞘氨醇、17-羟孕酮、雌激素葡萄糖苷酸、18-羟基皮质酮、前列腺素 A1、前列腺素 E2 甲酯、L-尿胆素；主要涉及淀粉和蔗糖代谢、嘌呤代谢、甾类激素的生物合成、花生四烯酸代谢、磷酸戊糖代谢、D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢、鞘脂类代谢、色氨酸代谢等途径。进而，在治疗有效性基础上，表征了芍药甘草汤治疗原发性痛经的血中移行成分，其中包括 13 个原型成分，主要是白芍苷、没食子酸、芹糖甘草苷、甘草素、甘草苷、苯甲酸芍药苷、芒柄花黄素、异甘草素、甘草酸、甘草香豆素、甘草异黄酮、甘草利酮、异甘草黄酮醇，以及 2 个代谢产物（芒柄花黄素葡萄糖苷酸、甘草素-4-O-葡萄糖苷酸）^[33, 34]。利用 PCMS 方法发现芍药甘草汤的主要药效物质基础是白芍苷、没食子酸、苯甲酸芍药苷及甘草酸，其通过调节 *N*-乙酰-L-丙氨酸、肌酸酐、尿酸、亮氨酸-羟基脯氨酸、*N*-乳酰乙醇胺、4, 6-二羟基喹啉等关键代谢标记物，影响磷脂酶 A2、谷氨酰胺合成酶、卵磷脂胆固醇脂酰转移酶，通过解决花生四烯酸代谢、色氨酸代谢、磷酸戊糖代谢、嘌呤代谢障碍，阻止原发性痛经发生和发展的进程^[6]。

五、小 结

21 世纪医学的发展，精准医学必将扮演重要的角色，在世界各国都已给予高度重视的情况下，我国必须抓住机遇，瞄准临床需求，尊重中医思维，以精准医学为理念，整合多学科知识，构建中医学精准诊断及疗效精准评价的平台，提高中医临床疗效，更为中医学与现代医学科学交流和沟通提供有效途径。中医方证代谢组学是大数据时代精准医学的重要组成部分，已在中医证候精准诊断及方剂疗效精准评价等领域展开广泛应用。中医方证代谢组学在证候精准诊断及方剂疗效精准评价基础上，以精确生物标记物为桥梁，以体内显效成分为纽带，建立方剂疗效精准评价体系，揭示经典方剂与证候之间对应关系的生物学实质，实现临床相关证候的精准诊断及方剂精准遣药，有助于实现中国式精准医学模式。大力发展中医方证代谢组学技术平台有望促进中医药基础研究与临床资源优势的深度整合，进一步提升中医药研发的原始创新能力。

第二节 基于中医方证代谢组学的开心散干预阿尔茨海默病小鼠的药效物质基础研究

开心散首载于《备急千金要方》，由远志、人参、茯苓和菖蒲组成，具有益智，安神定志、益气养心的功效，是中医安神定惊、治疗健忘的基本方。现代药理学研究表明，开心散四味中药均能在不同程度上起到益智的作用，具有改善学习认知能力，保护脑组织的作用^[35, 36]。但开心散的药效机制及有效成分尚不明确，对机体代谢的影响尚不清楚。在众多阿尔茨海默病（AD）动物模型中，转基因模型有着较高的认可度，故选择研究较为成熟的 APP/PS1 转基因小鼠模型为研究对象^[37]，进行开心散干预 AD 小鼠的药效物质基础研究。

在中医方证代谢组学理论指导下，首先利用 Morris 水迷宫和新奇物体识别评价开心散对 12 月龄 AD 转基因小鼠模型行为学影响，以及利用苏木精-伊红（HE）脑组织染色和

Ab₁₋₄₂ 脑组织免疫组织化学法评价开心散对 12 月龄 AD 转基因小鼠模型组织病理学影响, 并采用基于超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS) 的代谢组学技术评价开心散对 AD 干预作用的整体疗效及效应生物标记物; 应用中药血清药物化学方法, 对开心散血中移行成分进行表征及鉴定; 通过 PCMS 软件对小鼠模型的血中移行成分和调控的内源性生物标记物进行关联分析, 阐明开心散防治 AD 的药效物质基础。

一、开心散干预 AD 小鼠模型的效应生物标记物研究

通过比较 APP/PS1 转基因小鼠行为学、病理学结果, 评价 AD 小鼠模型疾病变化特征, 并采用基于 UPLC-MS 的代谢组学技术, 对 AD 小鼠模型进行血液代谢轮廓分析寻找生物标记物, 揭示开心散干预 AD 小鼠模型的效应生物标记物。

(一) 实验分组与数据采集

1. 开心散给药样品的制备

按原方比例, 即人参: 茯苓: 远志: 石菖蒲 = 3 : 3 : 2 : 2, 称取人参 150g、茯苓 150g、远志 100g、石菖蒲 100g, 加 70% 乙醇 3000ml, 加热回流两次, 每次 2h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至含生药量 0.065g/ml。

2. 实验分组与给药

雄性 2 月龄 APP/PS1 转基因小鼠 24 只, 随机分为 AD 模型组 (模型组) 12 只, 开心散给药组 (开心散组) 12 只; 同月龄相同遗传背景 C57/BL6 小鼠 12 只, 作为空白组。小鼠均购自南京大学模式动物研究所, 许可证号: 201601848。饲养于黑龙江中医药大学药物安全评价中心。适应环境饲养一周, 每笼 2 只饲养至 12 月龄末, 动物自由摄食和饮水。开心散组灌胃给予开心散药液 0.65g/kg, 同时模型组和空白组给予蒸馏水, 连续给药 10 个月。进行行为学测试后小鼠禁食 12h, 采集血液样本。

3. 样品处理与数据采集

小鼠禁食 12h 后, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠氯化钠溶液 (0.2ml/100g) 麻醉。断头取血, 血液静置 30min, 于 4℃、4000r/min 离心 10min, 取上层血清于 -80℃ 冰箱内备用。血清样本于室温解冻, 取血清样品 50μl 加乙腈: 甲醇 (1 : 1) 200μl, 涡旋 10s 后于 4℃ 放置 10min, 于 4℃、13 000r/min 离心 10min, 取上层清液真空干燥, 干燥物用含 0.1% 甲酸的甲醇: 水 (80 : 20) 400μl 复溶, 涡旋 20s, 超声 5min, 于 4℃、13 000r/min 离心 10min, 取上清液过 0.22μm 滤膜, 滤液供 UPLC-MS 分析。

4. 行为学评价

(1) Morris 水迷宫

定位航行实验: 利用软件将迷宫分为四个象限, 池水加奶粉成为白色。每天将小鼠面向池壁分别在四个象限的同一位置放入水中测试 120s, 记录其寻找并爬上站台所需的时间 (逃

避潜伏期)。若小鼠在 120s 内未找到平台,须利用标杆将其引导至平台并停留 15s,此时逃避潜伏期记为 120s。历时 5 天。

空间探索实验:定位航行实验结束后,撤除水下平台,于四个象限内随机选取一个象限,在同一入水点将小鼠放入水中,记录其在 120s 内跨过原平台相应位置的次数。历时 1 天。

(2) 新奇物体识别

各组小鼠于训练阶段开始前 24h,放入空盒内自由探索 5min 以适应环境。训练阶段,盒中距盒壁 8cm 处放置 2 个完全相同的彩色纸盒;小鼠放入盒内,自由探索 10min;等待 30min 后进行测试,其中一个彩色纸盒替换为紫色纸盒,小鼠再次被放入盒内自由探索 10min,小鼠鼻子距离纸盒 2cm 之内视为探索行为;24h 后再测试一次。记录小鼠探索熟悉物体(彩色纸盒)及探索新物体(紫色纸盒)的时间。

5. 病理学评价

末次行为学结束后,小鼠禁食 12h,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液(0.2ml/100g)麻醉。断头取脑,脑组织浸泡在 10% 中性多聚甲醛中固定。

(1) HE 染色法

各组小鼠脑组织经过组织洗涤、脱水、透明、浸蜡和包埋后获得蜡切片,将 4 μ m 厚度石蜡切片脱蜡至水,入苏木素(H)染液 5min,70% 盐酸酒精分化 10s,自来水充分冲洗,使细胞核蓝化,蒸馏水洗,切片入伊红(E)染液 1min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片后于光学显微镜下观察。

(2) A β_{1-42} 免疫组织化学法

各组小鼠脑组织石蜡切片经过脱蜡、水化后按照一抗的需要,采用抗原修复液(pH 值为 6.0)对组织切片进行预处理,3% H₂O₂ 去离子水孵育切片 15min,以阻断内源性过氧化物酶,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗,滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育留宿,PBS 浸洗,滴加 IgG 抗体-Fab 段-HRP 多聚体,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后 PBS 冲洗 5 次,每次 3min,使用二氨基联苯胺(DAB)溶液显色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片后于光学显微镜下观察。

(二) 开心散干预 AD 小鼠的行为学评价

1. Morris 水迷宫

定位航行实验测试小鼠的学习能力。与空白组比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,开心散组小鼠逃避潜伏期明显缩短,差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明开心散能改善模型组小鼠的学习能力[图 1-1(a)];空间探索实验测试小鼠对空间位置记忆能力。与空白组比较,模型组小鼠穿越平台次数减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,开心散组小鼠穿越平台次数增加;差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明开心散可以改善模型组小鼠的空间位置记忆能力[图 1-1(b)]。