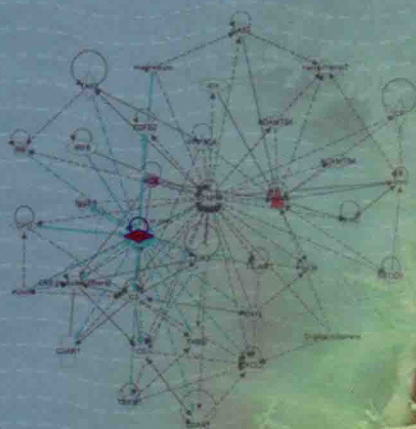




中医方证代谢组学 研究进展

(2016年卷)

王喜军 主编



科学出版社

中医方证代谢组学研究进展

(2016 年卷)

王喜军 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书系统介绍了代谢组学技术在中医药领域的应用及发展情况。深入阐述作者科研团队的中医方证代谢组学理论与实践,同时详细介绍了代谢组学在中医证候生物学本质、针灸穴位生物学、证候动物模型制备、方剂药效评价及作用机制、中药安全性评价、中药品种及质量评价的最新进展,并辅以实例说明。

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,力图为国际上从事中药及天然药物或传统医药研究的科学家、研究人员及学生提供参考,期望促进传统医学研究手段的技术进步,尤其是中医学的学术进步及中药的国际发展。

图书在版编目(CIP)数据

中医方证代谢组学研究进展(2016年卷)/王喜军主编. —北京:科学出版社, 2016. 8

ISBN 978-7-03-049372-9

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

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第160975号

责任编辑:鲍 燕 曹丽英/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>

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2016年8月第一次印刷 印张:22

字数:521 000

定价:198.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

作者简介



王喜军，男，1961年是12月生，日本北海道药科大学药学博士。现任黑龙江中医药大学教授，中药学博士生导师，副校长，国家重点学科及博士授权学科学科带头人，国家中医方证代谢组学研究中心及中药血清药物化学重点实验室主任，国家精品课程中药鉴定学课程负责人，国家级教学团队首席专家，国家规划教材《中药鉴定学》主编，《中华医学百科全书·中药鉴定学》主编。国家百千万人才工程第一、二层次人选，卫生部有突出贡献中青年专家、中央直接联系专家等。

兼任世界中医药学会联合会中药鉴定专业委员会会长、国家药典委员会委员、世界中医药联合会中药药理分会副主席、中华中医药学会中药鉴定分会副主任委员、海峡两岸中医药专家委员会副主任委员、国家药学教学指导委员会副主任委员。

此外还兼任《Evid Based Complement Alternat Med》、《Current Traditional Medicine》、《中国天然药物》、《中国中药杂志》、《中医杂志》、《中国实验方剂学杂志》、《中国药理学通报》、《中医药现代化》、《中药新药与临床药理》、《中国现代中药》及《生物医学》等

20 多家杂志的编委，TrAC、Anal Chem、Sci Rep 及 J Proteome Res 等 30 多个国际著名杂志的审稿专家。

曾获全国优秀教师，全国中青年医学科技之星，中国中医药十大杰出青年，卫生部有突出贡献中青年专家，国家百千万人才工程第一二层次人选，黑龙江省改革开放三十年十大杰出青年，国家十一五科技计划执行突出贡献奖，第十六届吴阶平—保罗·杨森医学药学奖等荣誉称号。

王喜军教授长期从事中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究，在中药有效性评价及药效物质基础研究领域取得了突出成绩。2015 年底，英国《自然》详细介绍其开展的中医方证代谢组学 (Chinmedomics) 研究工作，认为其研究策略对于深入认识中医药的有效性及推动中医药学术进步具有重要意义。主持国家 973 计划及自然科学基金重点项目、国家重大新药创制专项等国家级项目 19 项，发表学术论文 300 余篇，其中在 *Hepatology*、*Mol Cell Proteomics*、*TrAC*、*Anal Chem*、*Sci Rep*、*J Proteome Res* 等国际权威期刊发表 160 余篇 SCI 论文，被 *Lancet*、*Nat Rev Drug Discov*、*Chem Soc Rev* 等国际著名刊物正面引用 5000 余次 (H 指数 45)；以第一完成人获国家科技进步二等奖及国家技术发明二等奖各 1 项，部 (省) 级科学技术奖一等奖 6 项，获发明专利 22 项。

《中医方证代谢组学研究进展》编委会

主 编 王喜军

副主编 闫广利 张爱华 孙 晖

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 萍 卢盛文 刘 琦 张天雷 初 航

孟祥才 周小航 韩 莹 董 辉

前 言

中医药是中华民族在与疾病长期斗争的过程中形成的生命科学与中国传统文化有机结合的医学科学，其有效的实践和丰富的知识中蕴含着深厚的科学内涵，然而这种用传统概念表达的中医药理论的科学内涵难以被现代社会普遍理解和接受。中医以整体、动态和辩证的思维方式认识生命与疾病的复杂现象，而套用西医的还原论和分解分析为主的研究方法，已经不能体现中医药在治疗复杂性疾病中的优势，需要建立符合中医药自身特点的创新方法学体系，在系统论指导下从整体、动态、功能上诠释中医药理论的科学内涵，搭建沟通中西医学的桥梁，促进中医药的现代化和国际化。

代谢组学是研究生物体系受刺激或扰动后其内源代谢物质种类、数量及其变化规律的 응용科学，通过对内源性小分子代谢产物的无歧视分析，以代谢轮廓、代谢指纹及代谢靶标等途径反映系统生化谱和功能调节的整体效果，与强调系统效应的中医药学具有天然的趋同性，从而为用生物学语言表述中医药理论的科学内涵提供了合适的方法。经过十余年的发展，中医药代谢组学研究取得了卓越的成就，从中医病/证演变过程的代谢轮廓表征及中药/方剂整体效应评价，到代谢生物标记物发现与代谢网络构建诠释中医病/证生物学本质及中药/方剂作用机制，再到发现与代谢生物标记物相关联的中药药效物质基础，以及深层次的阐明生物标记物功能及中药有效成分靶向调控的生物学机制，使得沟通中西医桥梁的轮廓渐渐清晰，从而形成了中医方证代谢组学（Chinmedomics）理论及方法体系。

为全面系统地展示中医方证代谢组学研究的最新进展，本书围绕中医方证代谢组学在证候生物学本质、证候相关动物模型、中药/方剂有效性及作用机制、中药药效物质基础、中药安全性和中医穴位生物学功能及针刺效应的机理等六个中医药关键科学问题中的应用进行了论述和代表性研究成果的介绍，并详细介绍了中医方证代谢组学理论及方法体系，从而促进符合中医药理论特点的创新理论及方法学体系建设。

本书图文并茂，例证详实，使读者能够全面了解中医方证代谢组学研究的最新成果，系统掌握其学术思想和研究方法，提高读者利用代谢组学技术解决中医药具体问题的能力。限于编者的水平和时间关系，本书难免存在不妥及错误之处，敬请同行专家、使用本书的读者批评指正。

黑龙江中医药大学



2016年5月

目 录

前言	
第一章 中医方证代谢组学理论与实践	1
第一节 中医方证代谢组学理论体系	1
第二节 基于方证代谢组学的茵陈蒿汤物质基础及作用机制研究	9
参考文献	22
第二章 中医证候生物学本质的代谢组学研究	27
第一节 概述	27
第二节 中医黄疸证的代谢组学及生物标记物研究	28
第三节 冠心病心气虚证的代谢组学及生物标记物研究	30
第四节 心血瘀阻证的代谢组学及生物标记物研究	32
第五节 肾虚证的代谢组学及生物标记物研究	37
第六节 消渴证的代谢组学及生物标记物研究	41
第七节 虚实证的代谢组学及生物标记物研究	45
第八节 寒热证的代谢组学及生物标记物研究	48
参考文献	49
第三章 中医穴位生物学功能及针刺治疗疾病机理的代谢组学研究	52
第一节 “足三里”穴生物学功能的代谢组学研究	52
第二节 针灸疗法治疗功能性消化不良的代谢组学研究	69
第三节 电针疗法治疗大鼠胃黏膜损伤的代谢组学研究	74
第四节 针灸干预运动疲劳的代谢组学研究	81
第五节 针灸替代疗法对围绝经期综合征调理作用的代谢组学研究	84
参考文献	87
第四章 中医证候动物模型的代谢组学研究进展	89
第一节 研究概述	89

第二节	肾阴虚证动物模型的代谢组学研究	93
第三节	糖尿病肾阴虚证动物模型的代谢组学研究	96
第四节	氢化可的松诱导的肾阳虚证动物模型的代谢组学研究	97
第五节	腺嘌呤诱导的肾阳虚证动物模型的代谢组学研究	99
第六节	皮质酮诱导的肾阳虚证动物模型的代谢组学研究	100
第七节	脾虚证动物模型的代谢组学研究	104
第八节	脾阳虚证动物模型的代谢组学研究	105
第九节	脾气虚证动物模型的代谢组学研究	107
第十节	脾气虚证、脾阳虚证动物模型的代谢组学研究	109
第十一节	心气虚证动物模型的代谢组学研究	112
第十二节	心气虚证心力衰竭模型的代谢组学研究	116
第十三节	肺气虚证心力衰竭模型的代谢组学研究	117
第十四节	脾肾气虚证模型的代谢组学研究	121
第十五节	综合放血法制备血虚证模型的代谢组学研究	123
第十六节	腹腔注射环磷酰胺诱导的血虚证模型的代谢组学研究	125
第十七节	冠心病心肌缺血血瘀证模型的代谢组学研究	127
第十八节	慢性束缚法诱导肝郁证模型的代谢组学研究	128
第十九节	情志刺激法诱导肝郁证模型的代谢组学研究	130
第二十节	气阴两虚证心肌缺血模型的代谢组学研究	131
第二十一节	气虚血瘀证心肌缺血模型的代谢组学研究	132
第二十二节	应激刺激法诱导肝郁脾虚证心肌缺血模型的代谢组学研究	134
第二十三节	慢性束缚法诱导肝郁脾虚证心肌缺血模型的代谢组学研究	135
	参考文献	136
第五章 中药方剂药效评价及作用机制的代谢组学研究		140
第一节	研究概述	140
第二节	基于代谢组学的补益剂药效评价及作用机制研究	148
第三节	基于代谢组学的和解剂药效评价及作用机制研究	167
第四节	基于代谢组学的解表剂药效评价及作用机制研究	177
第五节	基于代谢组学的清热剂药效评价及作用机制研究	182
第六节	基于代谢组学的温里剂药效评价及作用机制研究	190
第七节	基于代谢组学的理血剂药效评价及作用机制研究	194
	参考文献	200

第六章 有毒中药毒性的代谢组学研究	204
第一节 研究概述	204
第二节 基于代谢组学方法的川乌毒性研究	206
第三节 基于代谢组学的白附片毒性生物标记物的研究	221
第四节 基于代谢组学的黄连毒性研究	229
第五节 基于代谢组学的苍耳子毒性研究	237
第六节 基于代谢组学方法的甘遂急性毒性研究	242
第七节 基于代谢组学的马兜铃酸肾毒性研究	249
第八节 基于代谢组学方法的苦参碱毒性研究	258
第九节 基于代谢组学的有毒中药毒性的解毒方法研究	266
参考文献	291
第七章 基于代谢组学的中药药效物质基础研究	293
第一节 研究概述	293
第二节 关黄柏预防非细菌性前列腺炎药效物质基础研究	297
第三节 复方丹参片抗心肌缺血药效物质基础研究	304
第四节 四逆汤抗心肌梗死的药效物质基础研究	310
第五节 麝香保心丸治疗心肌梗死的药效物质基础研究	318
第六节 柴胡舒肝散抗抑郁药效物质基础研究	327
第七节 肾气丸补肾阳药效物质基础研究	333
参考文献	338

第一章

中医方证代谢组学理论与实践

第一节 中医方证代谢组学理论体系

辨证论治、方证相应是中医临床诊疗疾病的基本原则,证候和方剂是中医临床诊疗疾病的核心要素,对其科学内涵的系统诠释是中医药学的关键科学问题^[1]。方剂最大的特点是多种药物按照“君臣佐使”的关系相互配伍,发挥整合调节作用,其整体效应通常取决于方剂中多种活性物质的协同作用^[2]。方剂作为临床应用的药物,其有效性的显示必有其物质基础。因此,众多科研人员对方剂药效物质多成分、多途径、多靶点的作用特点,努力寻求合适的现代科学表达体系来全面深入阐释方剂药效物质及作用机制。中药血清药物化学经过近 20 年的发展,形成了系统的理论和方法,有效地解决了方剂体内直接作用物质确认及其体内过程等相关问题,在中药药效物质基础鉴定、中医方剂多成分药代动力学标记物确认、方剂配伍规律研究及创新药物设计等方面起到了积极的促进作用^[3]。然而,由于证候缺乏客观的诊断标准,证候生物学实质未被有效揭示,致使方剂疗效难以正确评价,从而极大地限制了研究过程中方剂体内成分与临床疗效关系的发现,使药效物质基础的研究与中药临床有效性脱节。鉴于此,王喜军等将中药血清药物化学与代谢组学有机整合,在大量研究实践基础上,提出并建立了中医方证代谢组学(chinmedomics)研究策略^[4]。利用代谢组学技术揭示证候的生物学本质,发现证候的生物标记物;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;将内源性证候的生物标记物与体内的外源性方剂成分相关联,阐明方剂药效物质基础及有效性机制,阐明了方剂配伍规律及其科学内涵。

一、提出背景

中药药效物质基础是指中药中含有的能够表达药物临床疗效的化学成分的总称。中药的药效物质基础是关系到中药的有效性、安全性等质量问题的关键因素,其研究和确认的技术与方法制约中药现代化及国际化进程的关键科学问题。然而,由于中药复方给药形式的特殊性、方证对应疗效的专属性,决定了中药药效物质基础研究和确定方法的复杂性,只有依据中医临床给药方式及有效性的评价方法,建立系统的关联“证候诊断—方剂效应评价—体内直接作用物质分析”的系统方法学才能发现或找到与临床疗效相关联的药效物质基础。由此可见,中药的药效物质基础研究是一个系统的方法学工程,任何超越于证候、方剂的单一研究过程,都将与中药的临床有效性失之交臂。

以往关于中药药效物质基础研究方法已取得了可喜的进展,形成了很多行之有效的研究

方法,如生物活性导向分离^[5,6]、生物转化分析^[7,8]、成分敲出方法^[9]、中药血清药物化学方法^[10,11]等,在解决中药活性成分(尚不能称为药效物质基础)确认,中药质量评价等相关的科学问题方面起到了积极的促进作用。然而由于思路、方法及应用技术的局限,都在某些方面存在不可逾越的弊端,并不能使发现的所谓活性成分与中药的临床有效性直接相关联,致使实质性的中药药效物质基础研究寥寥无几,中药药效物质基础研究方法进展缓慢,尚未形成系统的方法学或共性关键技术。

首先,从总体上看,以往的研究方法多是以单味中药饮片为起点进行药效物质基础研究。此为经典的研究思路和方法,对充分认识中药的化学成分,发现中药或天然药物的活性成分,推动中药质量评价、中药创新药物设计、中成药制备工艺提升,以及为推进复方的化学成分研究均起到了不可或缺的作用。然而,从中药药效物质基础研究层面考虑,该研究思路和方法存在“起步错误”。既然是“药效物质基础”就应该从“药物”入手,从中医理论及中医临床实践角度,中医使用的药物是“方剂”,单味中药饮片只是原料(单方除外),方剂才是药物。以往的研究已经证实,单味中药作为原料,其本身含有的只是化学成分或活性成分,在不同方剂配伍环境下相同中药在体内表达不同化学成分而实现方剂配伍的临床疗效取向。相同中药在不同方剂及不同的病理状态下药效取向不同,表达的药效物质不同。例如,中药关黄柏,其功效概括为三点:清热燥湿、泻火解毒、退虚热。但是它与知母相须配伍,在方剂中仅发挥清相火、退虚热的功效,如滋肾丸、大补阴丸、知柏地黄丸等。本课题组研究了不同配伍环境下关黄柏的体内成分,关黄柏在单独给药及在知柏地黄丸等方剂配伍环境下其体内成分差异较大,在方剂配伍条件下关黄柏体内以黄柏内酯、黄柏酮、木兰碱及相关的代谢产物为主,而非目前作为关黄柏质量检测成分的小檗碱及巴马汀。从方剂作为药物角度,黄柏内酯、黄柏酮及木兰碱作为主要体内成分,其表达药效作为药效物质基础的可能性更大^[12]。在茵陈蒿汤研究中,分析鉴定血清中成分21个,其中8个利胆保肝成分只有在全方配伍条件下才能被选择性吸收并表达良好的体内动态^[13,14]。

众多的研究结果提示我们,中药的药效物质基础是通过具体的临床有效方剂表达的,中药的药效物质基础应该从方剂入手,才能反映中医临床辨证施治原则和方剂配伍中药物成分之间在吸收、分布、代谢和排泄(ADME)过程中的相互作用,由此在针对证候的前提下及方剂配伍的环境下揭示的某一中药的体内药效物质基础才能反映中医临床疗效,更符合中医药理论。可以说,从常用有效方剂研究入手,以有效方剂为研究对象,进行中药的药效物质基础研究是中医理论及临床实践的必然要求。

其次,就具体方法而言,经典的植物化学分步提取药效追踪分离的方法,从中药中成功获得了一批活性成分,如抗疟新药青蒿素^[15]、治疗阿尔茨海默病的石杉碱甲^[16]、治疗心脑血管病的川芎嗪等^[17]。然而,受收率及活性测试方法的限制,许多成分停留在结构鉴定水平。此后的生物活性导向分离方法,加速了活性成分的发现^[18,19],但是此方法是一个以发现新化合物和活性成分为主要目的的研究模式,在中药药效物质基础的最初层面(活性成分)上进行研究,一味地去研究中药中到底含有什么成分,什么成分能在体外药理实验中显示活性,往往使研究走入唯单一成分论的误区。此方法不仅费时费力,而且不能反映成分的体内生物转化(机体对药物的作用),更不能反映方剂中药物之间在吸收、分布等方面的相互作用。伴随着研究的深入及技术的进步,众多学者已认识到“采用上述方法”所确定的活性成分不能称其为中药的药效物质基础,达成了从方剂体内成分分析入手研究中药药物物质基础的思路和方法

的共识。

从20世纪90年代开始,黄熙等首先提出证治药动学假说^[20],并进一步提出了方剂血清成分谱与靶成分概念^[21],经过不断完善,形成了生物方剂分析药理的研究策略^[22];邱峰提出研究中药化学成分的体内代谢过程,从活性代谢物中筛选中药药效物质基础的思路^[23,24];杨秀伟提出通过体内过程分析和将中药原形化学成分与生物转化和(或)代谢产物进行生物学活性比较研究,确定中药的有效化学成分和效应物质的思路和方法^[25,26];许海玉等一批学者在此方面也进行了相关的探索^[27-34]。

在此研究方面,王喜军于20世纪90年代初开展了从口服方剂后的含药血清中分析鉴定方剂体内直接作用物质的系统研究工作,完成了茵陈蒿汤、六味地黄丸等11个方剂的体内成分的系统研究^[35-47],提出并建立了中药血清药物化学的理论及研究方法,并将其内涵定义为“以经典的药物化学的研究手段和方法为基础,运用现代分离技术及多维联用技术,分析鉴定或表征口服方剂后人或动物血清中移行成分,并阐明其活性与中药传统药效相关性,确定中药药效物质基础并研究其体内过程的应用学科”^[48]。以此为标志,中药药效物质基础的研究进入到以方剂为切入点,既能体现方剂中药物的相互作用又能体现人体对药物的作用,从体内直接作用物质基础与中药传统药效相关性角度研究中药药效物质基础的阶段。

然而,上述从体内成分分析入手的研究方法,也仅仅是解决了中药药效物质基础研究的表现层面的方法问题,与体现临床疗效的中药药效物质基础研究尚有相当大的距离,还没有真正体现“针对证候、方剂配伍环境及有效性的前提下揭示中药的体内药效物质基础”的中医理论及临床实践的必然要求。由于证候是中医对疾病的基本描述,而方剂是对证候实施治疗的药物。正是由于证候缺乏客观的诊断标准,从而难以正确评价方剂疗效,导致难以有效揭示血清药物化学所揭示的方剂体内成分与疗效关系。由此,证候的生物学本质成为方剂疗效评价的前提,更是制约中药血清药物化学方法有效实践的关键环节。因此,必须在整合上述方法并引进新技术的基础上,建立在方剂对应证候治疗有效性评价的前提下,分析鉴定中药的体内药效物质基础的系统方法学^[49]。

事实上,中药与临床之间关系是:“中药—方剂—证候”,方剂是核心。而中药药效物质基础研究设计应该采取逆向研究的思路及方式,按照“证候生物学标记物—方剂效应评价—中药体内药效物质基础”研究路径,以证候为切入点,以方剂为研究对象,在有效状态下发现方剂成分的体内显效形式,从而揭示中药的药效物质基础。基于此思路,王喜军提出整合代谢组学技术与中药血清药物化学理论及方法,解决证候生物学本质、方剂有效性评价及中药药效物质基础的系统方法学——中医方证代谢组学,并将其英文定义为 *Chinmedomics*^[50]。通过总结前期的大量研究成果^[51-57],将中医方证代谢组学理论体系的总体学术设计确定为:先从中医证候或病入手,利用代谢组学技术解决证候或病的生物学实质,建立证候或病的生物标记物群及其代谢网络,从而客观地认识和评价证候或疾病;在此基础上,以证候或疾病的生物标记物群桥接证候的动物模型,建立方剂效应的生物评价体系,从而规范地评价方剂治疗效应;在有效性的前提下,通过一体化研究,利用中药血清药物化学方法确定方剂的体内直接作用物质的显效形式,并将体内的外源性药物成分与内源性证候或病标记物相关联,从而在血清药物组分和代谢标记物量变的相关性上发现中药的体内药效物质基础,阐明多成分、多靶点的协同作用机制^[58,59]。中医方证代谢组学理论体系的基本研究框架见图1-1。

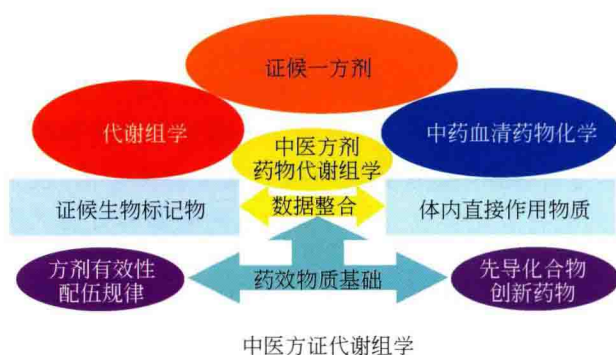


图 1-1 中医方证代谢组学理论体系基本框架

二、研究内容

中医方证代谢组学是以证候生物学本质研究为起点,以方剂为研究对象,在方剂有效性评价前提下分析方剂体内成分的显效形式,最后通过方剂体内成分与证/病生物标记物的关联分析和生物学验证,确定中药药效物质基础和阐明作用机制的系统研究体系,融中医“理、法、方、药”于一体,因此,研究内容包括中医药的多个科学问题。

(一) 中医证候生物学本质研究

从现代系统医学角度,中医证/病是机体对体内外各种环境变化和致病因素作出反应的一种功能状态,其本质是机体失衡而致的代谢或其网络的改变,机体内源性代谢成分的变化通过生物表型的变化而反映出来。而代谢组学技术通过对内源性小分子代谢产物的无歧视分析,通过代谢轮廓、代谢指纹及代谢靶标等途径反映机体受干扰后的代谢网络的变化,反映机体的功能状态。运用代谢组学的手段,表征证候及其演变过程中机体代谢轮廓变化,鉴定证候的生物标记物,构建证候的生物网络,阐释证候的生物学实质。

通过高通量、高灵敏度与高精确度的分析技术,结合模式识别、专家系统等分析方法从整体上来探讨生命活动在代谢层面的特征和规律,使代谢物含量变化与生物表型的改变建立直接关联,揭示疾病发生发展的代谢机制,发现和筛选生物标志物,为进一步探索治疗靶点提供重要信息;结合模式识别等生物信息学技术,以生物标记物为节点,利用 MetPA 代谢途径分析工具,映射机体证候代谢途径,建立中医证的特征性代谢网络。在此基础上,从整体层面阐释中医证候的内源性代谢物的变化。重点研究代谢物动态变化与生物表型的改变直接关联,实现对传统经典中医证候进行再评价与确证,全面的阐释中医证候的内涵,从而进一步揭示中医证的本质特征。

(二) 方剂药效生物学评价体系研究

基于辨证施治、方证相应的中医临床治疗疾病原则,建立符合中医药自身作用特点的方剂药效评价方法是发现表达临床疗效的药效物质基础的前提。因此,在证候生物学本质研究基础上,以证或病的生物标记物为桥接复制与证或病相关的动物模型,构建以传统的生理生化、

病理生理研究为基础,整体代谢轮廓和生物标志物动态轨迹变化为指标体系的方剂整体效应评价的方法及技术,建立整合生物标记物的方剂整体效应的生物评价体系(bioevaluation system for the efficacy of TCMs, BES),阐述方剂有效性和作用机制,并为方剂有效状态下体内直接作用物质的研究奠定基础。

(三) 方剂有效状态下体内直接作用物质分析

方剂有效状态下的体内直接作用物质是反映其临床疗效的药效物质基础。将研究体内直接作用物质的中药血清药物化学方法和评价临床疗效的代谢组学方法相整合,设计一体化的研究方案,在方剂有效性评价前提下,利用现代多维联用色谱技术,鉴定或表征口服方剂后的体内直接作用物质,并研究不同配伍条件下方剂体内多成分的动态变化规律,阐明体内直接作用物质的吸收、分布、代谢和排泄特点,阐明方剂体内代表性成分的量-时-效相互关系,充分认识方剂对证治疗有效状态下的体内显效形式。

液相色谱-质谱联用技术为方剂血中移行成分的定性定量分析提供了有效的研究手段,同时借助质量短缺过滤技术、背景扣除技术、多变量统计分析技术和药物代谢分析软件,能够更全面地获得方剂有效剂量下的体内直接作用物质;另外,多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)、连续窗口全碎片离子采集模式(sequential window acquisition of all theoretical fragment ions, SWATH)等高灵敏度的质谱采集模式,也为方剂血中移行成分的定量提供了方法。

(四) 方剂体内成分与效应生物标记物的关联分析

基于代谢组学方法建立的整合证候生物标记物的方剂整体效应生物评价体系,一方面用于方剂有效性评价,诠释方剂整体生物效应和效应生物标记物,另一方面为方剂血中移行成分与其治疗效应相关联提供了效应指标“系统”。中药血中移行成分往往多达数十个甚或上百个,对其逐个进行分离制备用于药效评价是极为困难的,也是不符合中医药整体作用模式的,亟须建立一种符合中药作用模式的提取体内直接作用物质与方剂生物效应关系的分析方法。鉴于此,通过相关分析的数学模型将中药血清药物化学方法分析获得的口服方剂后的中药有效状态下体内直接作用物质及其动态规律的数据,与内源性证或病的生物标记物轨迹变化规律的数据相关联,建立了血清中外源性中药成分与内源性标记物两组变量关联度分析方法(plotting of correlation between marker metabolites and serum constituents, PCMS),提取与内源性标记物高度关联的外源性中药成分作为潜在的中药药效物质基础,进行生物学验证,确定中药药效物质基础。

通过PCMS分析,进一步构建的方剂体内直接作用物质与效应生物标记物的关联网络图,从而利用方剂效应生物标记物对关联的每个中药体内直接作用物质的生物学功能进行注释,诠释方剂体内直接作用物质的生物信息学;根据靶标成分不同时间点的血药浓度与各内源性生物标志物浓度关系建立药代-药效关联模型;构建“证候-血中移行成分-靶标成分-生物标记物”关联网络,阐明方剂多组分、多途径、多靶点、多效应整体调节的作用机制及方剂合理配伍内涵。

(五) 药效物质基础的生物学验证及对生物标记物的调控机制研究

建立及制备与证候病理相关的动物模型或细胞模型,通过对证候生物标记物关联代谢通

路的聚焦,筛选关键代谢酶和信号通路,并结合细胞生物学和分子生物学技术,研究生物标记物的生理功能,验证中药药效物质基础生物学功能-效应生物标记物的“点对点”作用网络,阐明方剂体内直接作用物质多成分单靶点累积效应、多成分多靶点协同效应的机制,从而建立利用中医方证代谢组学系统发现和确认中药药效物质基础及其作用机制的生物学验证方法。

三、中医方证代谢组学研究相关技术

(一) 证候生物标记物的发现技术

证候的物质基础决定着证的发生发展的动态变化过程,所以证的本质研究也就是探寻证的物质基础研究。代谢组学可以通过对活体组织器官的无损伤、几乎接近生理条件的动态研究,来分析由疾病诱导产生的代谢产物的变化,运用多变量数据统计方法对不同证型进行分类,挖掘出与某一证型相关的特征标记物群及相应代谢网络,阐释“证”的生物学本质。应用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术、气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术以及核磁共振(NMR)技术等高通量、高分辨、高灵敏度的现代仪器,定性定量地分析生物体体液中(如血清、血浆、尿液、唾液、脑脊液等)的内源性代谢产物,并结合化学计量学方法分析机体在不同状态下的代谢谱差异,揭示机体在特定时间、环境下的整体功能状态。

在代谢组学研究中以血样为研究对象进行分析十分常见,血样中内源性代谢物种类比较繁多,成分比较稳定,可在预设时间点采集操作,有利于从整体水平上观测并追踪体内的代谢物变化。尿液为研究对象进行分析则有独特的优势,没有侵入性,可实现自身对照,最大限度地降低了个体差异对研究结果的影响,尿样的预处理过程也比较简单,是代谢组学分析中最典型的生物体液。样品制备和预处理以后,需要对代谢物进行分离、分析和鉴定,即数据的采集,这是代谢组学研究中的关键步骤。NMR技术用于代谢组学研究有许多优势。它是一种无损的多参数动态分析技术,具有定性分析和定量分析功能,通过单次检测可以得到含量在检测限内的所有小分子化合物的特征NMR谱。由于NMR谱携带有丰富的分子结构和动力学信息,便于确定未知代谢物的结构和性质。NMR分析具有良好的客观性和重现性,能够实现数据的交换和比较,许多新技术如自动进样技术、流动探头及谱图处理技术的出现和不断完善也使检测速度和准确性不断得到提高。

质谱技术具有极高灵敏度的特性,使得更多低含量的代谢物可以被检测到。LC-MS技术集液相色谱的高效、快速分离效能与质谱高灵敏度、高专属性等优点于一体,被广泛应用于极性化合物、难挥发性化合物、热不稳定化合物和大分子化合物的定性和定量分析,是目前代谢组学研究中的主流技术。由于GC-MS技术兼具色谱的高分离度、高通量和质谱的高灵敏度及特异性等优点,能够获得更加丰富的代谢物信息,弥补了NMR技术灵敏度低、信号重叠及代谢物谱窄的不足,逐渐成为代谢组学研究中的常用手段。

证候生物标记物研究过程中主要通过模式识别技术来产生直观结果,模式识别技术是建立在传统的统计学方法之上的模型判别技术,主要包括非监督学习方法和有监督学习方法两大类。非监督学习方法主要包括主成分分析(principal components analysis, PCA)、非线性映射(nonlinear mapping)、聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)等。有监督学习方法是在有可供学习利用的训练样本的基础之上建立多参数模型,并同时利用训练样本的信息优化模

型,对样本情况进行归类、识别和预测,进而使各类样本间达到最大分离。“有监督”学习方法主要包括:软独立建模分类法(SIMCA)、偏最小二乘法(partial least squares, PLS)、偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)、人工神经网络(neural network, ANN)等。代谢组学数据通过模式识别判别分析找到差异性变量后,需要对这些差异性代谢物进行鉴定并了解它们所参与的代谢通路,以对其生物学内涵加以解释,这些可以通过各种代谢途径和生物化学数据库来实现,其中最常用的有京都基因与基因组百科全书(KEGG)、人类代谢组数据库(HMDB)等。

(二) 方剂体内直接作用物质分析技术

血中移行成分的检测是中药血清药物化学的关键环节,LC-MS 技术为血中移行成分的检测和鉴定提供了有效的分析手段,能够更全面地获得中药体内直接作用物质的信息。然而,血中内源性成分同时也获得了良好的检测,严重干扰了药物成分的辨识,必须引进 LC-MS 数据的处理方法^[60]。质量短缺过滤技术(mass defect filtering, MDF)主要用于同系物成分的提取,它通过设定适当的质量短缺范围和实施多重过滤对高分辨 LC-MS 图谱进行处理,过滤掉大量内源性干扰物质峰,使具有相近质量短缺值的同系物及其代谢物明显暴露出来而易于识别^[61]。例如,将其应用于茵陈四逆汤中乌头生物碱类成分的提取,鉴定表征了 64 个乌头生物碱成分^[62]。背景扣除(background subtraction)是以空白生物样品为参照,将含药生物样品图谱中与空白生物样品相同的离子过滤掉的一种技术,该方法最为简单,不需要任何设置即可获得主要含有药源性成分的色谱图^[63]。一些药物代谢物分析软件,如 Waters Metabolynx 和 AB Sciex MetabolitePilot,将上述技术融为一体,并结合代谢途径的预测,实现数据自动提取与代谢物辅助鉴定^[64,65]。上述技术用于对单张色谱图进行处理,然而血中移行成分确定要求进行多个动物的重现,这时每个样品都进行处理就显示比较繁琐,主成分分析法、正交偏最小二乘判别分析法等多变量统计分析方法能够提取一组样品中共有的血中移行成分,方便了血中移行成分的确定。为充分利用上述技术的优点,常常将多种数据处理技术综合应用,如先对一组含药血清样品 LC-MS 数据进行质量短缺过滤或背景扣除,再利用多变量统计分析方法提取含药血清中特有(空白血清中没有)的共有离子,并结合软件进行代谢途径预测,有助于全面检测、辨识和鉴定中药血中移行成分^[66,67]。

综合应用上述多种中药体内成分辨识技术可获得比较全面的中药入血成分及代谢轮廓,在此基础上为进行中药体内成分的动态变化规律分析,需要建立定量(对于可获得对照品的中药体内成分)或半定量(对于不可获得对照品的中药体内成分)的监测方法。三重四级杆质谱或串联四级杆/线性离子阱质谱的 MRM 采集模式,具有特异性强、灵敏度高、准确度高、重现性好、线性动态范围宽的突出优点,能够满足血中微量中药入血成分及代谢物的定量监测,用于药代动力学研究,同时也可用于生物样品中内源性小分子代谢物的定量监测,为血清中外源性药物成分与内源性代谢生物标记物的关联分析提供数据。

(三) 血清中外源性药物成分与内源性代谢生物标记物的关联分析技术

血清中外源性中药成分与内源性标记物两组变量关联度分析方法(plotting of correlation between marker metabolites and serum constituents, PCMS),通过提取与内源性标记物高度关联的外源性中药成分作为潜在的中药药效物质基础,并进行生物学验证进而确定中药药效物