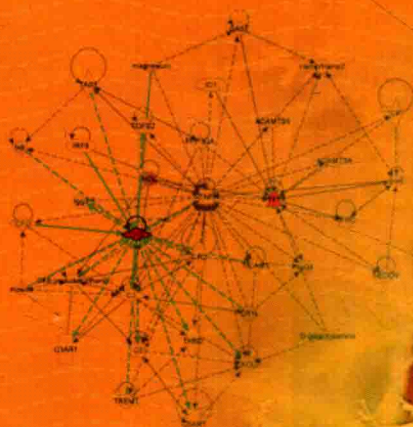




中医方证代谢组学 研究进展

(2017年卷)

王喜军 主编



科学出版社

中医方证代谢组学研究进展

(2017 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2016年以来中医方证代谢组学的研究成果,着重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、中药安全性、中药品种及质量等中医药领域中最新研究进展。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相关应用的最新进展。

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. 2017年卷 / 王喜军主编. —北京: 科学出版社, 2017. 9

ISBN 978-7-03-054491-9

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(2017)第224558号

责任编辑: 鲍 燕 / 责任校对: 王 瑞 彭珍珍

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>

北京利丰雅高长城印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年9月第一版 开本: 787×1092 1/16

2017年9月第一次印刷 印张: 36 1/2

字数: 857 000

定价: 328.0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 闫广利 孙 晖 张爱华

编 委 (按姓氏笔画排序)

- | | |
|------------------------------|--------------------------|
| 王 洋 (上海中医药大学) | 王伽伯 (解放军 302 医院全军中医药研究所) |
| 王喜军 (黑龙江中医药大学) | 牛 明 (解放军 302 医院全军中医药研究所) |
| 方 衡 (黑龙江中医药大学) | 卢盛文 (黑龙江中医药大学) |
| 田俊生 (山西大学) | 邢 婕 (山西大学) |
| 任俊玲 (黑龙江中医药大学) | 刘 畅 (黑龙江中医药大学) |
| 刘月涛 (山西大学) | 刘彩春 (山西大学) |
| 闫广利 (黑龙江中医药大学) | 关冰河 (香港大学) |
| 孙 晖 (黑龙江中医药大学) | 孙淑军 (上海交通大学) |
| 杜巧辉 (香港大学) | 李先娜 (黑龙江中医药大学) |
| 李昆珊 (上海中医药大学) | 肖小河 (解放军 302 医院全军中医药研究所) |
| 吴焕淦 (上海中医药大学) | 沈小丽 (山西大学) |
| 沈剑刚 (香港大学) | 张卫东 (第二军医大学) |
| 张永煜 (上海中医药大学) | 张宏莲 (黑龙江中医药大学) |
| 张爱华 (黑龙江中医药大学) | 陈汉森 (香港大学) |
| 林 璋 (上海交通大学) | 周小航 (黑龙江中医药大学) |
| 庞晶瑶 (解放军 302 医院全军中
医药研究所) | 郑寒丹 (上海中医药大学) |
| 赵 磊 (香港大学) | 柏兆方 (解放军 302 医院全军中医药研究所) |
| 郜 丹 (解放军 302 医院全军中
医药研究所) | 秦雪梅 (山西大学) |
| 夏小涛 (山西大学) | 高 耀 (山西大学) |
| 黄 艳 (上海中医药大学) | 章从恩 (解放军 302 医院全军中医药研究所) |
| 董 辉 (黑龙江中医药大学) | 戴建业 (北京大学) |

研究工作，取得了卓越的成绩，有力地促进了中医方证代谢组学理论体系的完善，并为搭建中医学与现代医学科学沟通的语言桥梁提供了方法。

王教授整理并主编了《中医方证代谢组学研究进展》年度研究成果。学习巨作初稿之后，我欣然写下此序以致祝贺。2016年，王教授在 *Chinese Herbal Medicines (CHM)*，英文学术期刊上较全面地论述了整合系统生物学和生物信息学的方法技术研究中医方证代谢组学，搭建了连接中医药传统和现代研究的桥梁。本人作为 *CHM* 主编，当时特意评述其研究成果，为之也将此述评原文附于本序之后，以感谢作者，以饷读者。

天津药物研究院研究员

中国工程院院士

刘昌孝

2017年9月2日于天津

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

“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 pharmacology 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 subtypes, 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, Knoppers 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

中医药是中华民族在与疾病长期斗争的过程中积累的宝贵财富，其有效的临床经验和丰富的理论知识中蕴含着深厚的科学内涵，需要利用科学语言进行诠释，以促进中医药的继承和现代化发展。中药的有效性是中医发挥临床特色与优势的的决定性基础；没有有效性，中医学就没有生存的基础。因此，如何诠释中药有效性的科学内涵是中医药发展的根本问题，是横在中医学和现代医学之间的鸿沟。

中医理法方药的整体性是中药有效性的前提，其中证候和方剂是与有效性直接关联的核心因素；辨证论治、方证相应，中药才能发挥良好的临床疗效。证候是中医临床治疗的对象，方剂是中医临床应用的药物形式；只有实现中医证候（病）的精准诊断，才能精准地评价方剂疗效，任何脱离了中医证候（病）及方剂而研究有效性的方法都将与中医临床疗效失之交臂。然而，经典的病理生理学及临床化学检验难以客观评价证候的变化，造成中药有效性在一定程度上被方法学局限所折扣。代谢组学以基因表达的最终产物——小分子代谢物为研究对象，通过整体代谢组轮廓变化的分析，表征机体的功能状态和发现机体新陈代谢特征的生物标记物，与中医临床通过望、闻、问、切四诊获得疾病过程中表现在整体层次上的机体反应状态的思维模式不谋而合，已被公认为是探索中医证候生物学本质的科学方法，并有望通过代谢生物标记物的精准分析，实现中医证候（病）的精准诊断和方剂疗效的精准评价。同时，中药作为复杂的化学巨系统，其有效性必有其物质基础，而且必存在于方剂对证治疗表达临床疗效的体内显效成分中，只有同时准确揭示中药表达临床疗效的物质基础，才能真正搭建中西医学沟通的桥梁，促进中医药的继承与现代化发展。

中医方证代谢组学是整合中药血清药物化学和代谢组学方法，解决中医证候本质和方剂疗效评价，发现中药药效物质基础，系统诠释中药有效性科学内涵的理论体系，即：利用代谢组学技术发现并鉴定证候生物标记物，以证候生物标记物为参数评价方剂整体疗效；在有效状态下，利用中药血清药物化学鉴定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，阐明中药有效性机制。世界顶级学术刊物《自然》杂志称该理论“建立了一种沟通现代医学与中医药的语言”。

《中医方证代谢组学研究进展》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，2016年出版了首卷。2017年卷梳理了2016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、肠道微生物与中药调控作用、中药成分生物效应与机制、有毒中药毒性与解毒机理、中药质量等中医药关键科学问题中的应用，展示了本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



2017年5月

目 录

序 前言

第一章 中医方证代谢组学研究	1
第一节 中医方证代谢组学研究体系的历史发展.....	1
第二节 基于中医方证代谢组学的六味地黄丸干预大鼠脑瘫模型的药效物质基础与作用机制研究.....	3
第三节 基于中医方证代谢组学的生脉散干预老年痴呆症大鼠的药效物质基础研究 ...	11
第四节 基于中医方证代谢组学的开心散干预老年痴呆症大鼠的药效物质基础研究 ...	19
第五节 基于中医方证代谢组学的中药复方制剂 AS1350 补肾阳药效物质基础及作用机制研究	32
第六节 基于中医方证代谢组学的中药复方制剂男仕口服液补肾阳药效物质基础及作用机制研究	50
第七节 基于中医方证代谢组学的中药复方制剂男仕胶囊治疗肾阳虚证的药效物质基础及作用机制研究	59
参考文献	70
第二章 中医证候组学的理论与实践	72
第一节 “证候组学”理论	72
第二节 基于同病异证与异病同证的慢性乙型病毒肝炎组学研究	75
第三节 基于异病同证的黄芩柴胡药对治疗湿热证的药效评价	84
第四节 血瘀证的代谢组学及生物标记物研究	92
第五节 痰热及痰湿证的代谢组学及生物标记物研究	98
第六节 虚实证的代谢组学及生物标记物研究.....	101
第七节 脾胃湿热及脾胃不和证的代谢组学及生物标记物研究.....	107
第八节 代谢组学在消渴证风险预测的研究.....	113
参考文献.....	114
第三章 基于方证代谢组学方剂有效性评价	118
第一节 研究概述.....	118
第二节 清热剂药效评价及作用机制研究.....	119
第三节 理血剂药效评价及作用机制研究.....	170

第四节	补益剂药效评价及作用机制研究	218
第五节	祛湿剂药效评价及作用机制研究	256
第六节	祛痰剂药效评价及作用机制研究	278
第七节	理气剂药效评价及作用机制研究	282
第八节	补肾益气活血方对脑卒中和骨质疏松症异病同治的 药效观察及共同信号通路 的网络药理学探索	287
	参考文献	306
第四章	基于代谢组学的针灸作用机制及经穴特异性研究	311
第一节	艾灸生成物干预大鼠尿液代谢组学的研究	311
第二节	针灸对溃疡性结肠炎代谢组学的研究	316
第三节	艾灸疗法对“脾虚型”肠易激综合征代谢组学研究	319
第四节	足阳明经穴特异性的代谢组学研究	324
第五节	针灸治疗原发性痛经的代谢组学研究	328
第六节	艾灸与针刺对血清代谢物调节作用的研究	334
	参考文献	341
第五章	肠道微生态及中药方剂调控作用的代谢组学研究	343
第一节	中医证候与肠道微生态的关系与研究进展	343
第二节	麦冬多糖 MDG-1 影响高脂饮食诱导肥胖小鼠肠道菌群的代谢组学研究	355
第三节	麦冬多糖 MDG-1 影响 2 型糖尿病模型小鼠肠道菌群的代谢组研究	362
第四节	西洋参减弱结肠炎小鼠相关的结直肠癌变作用及其肠道菌群的代谢组学研究	367
	参考文献	376
第六章	基于代谢组学的中药成分生物效应及机制研究	381
第一节	研究概述	381
第二节	小檗碱对 2 型糖尿病的治疗作用研究	382
第三节	灯盏乙素和灯盏乙素苷元对缺血性脑损伤神经保护作用研究	386
第四节	6,7-二甲氧基香豆素对阳黄证的治疗作用研究	391
第五节	6,7-二甲氧基香豆素对乙醇诱导的原代肝细胞损伤的保护作用研究	397
第六节	京尼平对糖尿病的治疗作用研究	402
第七节	穗花杉双黄酮对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用研究	411
第八节	芍药苷抗 ANIT 诱导的胆汁淤积性肝损伤的保护作用研究	414
	参考文献	419
第七章	有毒中药毒性及其解毒机制的代谢组学研究	423
第一节	研究进展	423
第二节	番荔枝毒性作用的代谢组学研究	425

第三节	狼毒大戟血中毒性生物标记物研究·····	430
第四节	雄黄诱导亚慢性肝脏毒性的代谢组学研究·····	437
第五节	马兜铃酸诱导急性肾毒性的细胞代谢组学研究·····	445
第六节	京大戟中 pекinenal 诱导人体 LO2 肝细胞毒性的生物标记物研究 ·····	451
第七节	生何首乌诱导大鼠肝毒性及炮制减毒的代谢组学研究·····	458
第八节	茯苓对制何首乌诱导大鼠特异性肝损伤减毒作用的代谢组学研究·····	463
第九节	半夏诱导心脏毒性及炮制减毒作用的代谢组学研究·····	472
第十节	三七对雷公藤诱导大鼠肝毒性减毒作用的代谢组学研究·····	480
第十一节	附子配伍甘草减毒作用的代谢组学研究·····	484
	参考文献·····	492
第八章	基于代谢组学的中药质量评价研究 ·····	494
第一节	研究概述·····	494
第二节	柴胡药材质量评价研究——从药材资源到方剂药理·····	495
第三节	不同栽培地及种质太子参根的差异化学成分研究·····	509
第四节	郁金物种鉴别化学标记物研究·····	516
第五节	三种人参属植物挥发性化学标记物研究·····	521
第六节	人参五个不同部位化学标记物及验证研究·····	526
第七节	药用麻黄物种鉴别研究·····	541
第八节	麻黄茎及根挥发油成分的分析与比较研究·····	546
第九节	蔷薇红景天样品的真实性和质量研究·····	550
第十节	蟾酥干燥过程中蟾酥毒素的变化分析·····	553
第十一节	当归和欧当归补血药效差异的比较研究·····	558
	参考文献·····	567

第一章

中医方证代谢组学研究

第一节 中医方证代谢组学研究体系的历史发展

中药药效物质基础是揭示中药有效性的关键,是中药安全性和质量控制的核心问题^[1],而中药方剂多组分、多靶点、整体调节的作用特点,致使药效物质基础研究成为中医药现代化进程中的瓶颈之一。中药有效性评价是挖掘和揭示中医药治疗优势的前提,证候和方剂是与中药有效性直接相关的关键科学问题^[2]。证候的模糊性及方剂的复杂性极大地限制了证候的精准诊断和方剂有效性评价,以及药效物质基础的确认。由此,揭示证候生物标记物,建立方剂的药效生物评价体系,是研究中药的有效性及发现药效物质基础的必然要求,也是目前国际关注的热点问题^[3]。而阐明中药药效物质基础,建立适于中药复杂体系的研究方法,一直是中药及中药方剂研究的难点。由于绝大多数药物只有通过血液循环才能发挥作用,因此研究其血中移行成分就显得尤为重要。基于上述思考,20世纪90年代初开始进行了一系列相关的理论及方法研究。王喜军教授首次提出了从口服中药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。将该理论定义为:以经典的药物化学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中药后血清中移行成分,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科学。该理论设计超越了体外生物活性导向分离不能反映药物体内生物转化及方剂中药物成分在吸收过程中的相互作用的方法学障碍,重视了中药与机体间的相互作用关系,体现了中药的整体性,实现了中药有效成分研究方法学的进步,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,被国内外广泛应用^[4]。

中药药效物质基础是关系到中药有效性及安全性等质量问题的关键因素^[5],因此,揭示中药药效物质基础成为中药迈向国际市场至关重要的一步。而由于中药组方成分的复杂性、多样性,药理作用的多靶点、多途径、多效应等,致使中药组方物质基础研究困难重重。目前中药物质基础研究多集中在单味药研究上,并取得了一些成果,如青蒿素、石杉碱甲、五味子素、川芎嗪、银杏内酯、联苯双酯等。因此探索适合于中医药体系的药效物质基础研究方法,阐明药效物质基础及发挥其药效作用的本质,是当前中医药研究的关键问题。以往关于中药药效物质基础研究方法(如传统的植物化学模式、生物活性导向分离、成分敲出/敲入方法、中药血清药物化学方法等)尽管已取得了可喜的进步,但不能使发现的所谓活性成分与临床疗效的有效性直接相关联,致使难以全面揭示中药整体药效的物质基础及作用机制。因此原有研究模式已不能满足深入地挖掘中医药精髓的需求,必须将研究方法与临床疗效评价紧密结合

才能发现表达中药治疗效应的物质基础。中药血清药物化学经过 20 余年的发展,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。然而,由于中医证候缺乏客观的诊断标准,致使方剂疗效难以正确评价,最终造成方剂体内成分与疗效关系难以有效揭示^[6]。由于证候是一个非线性的复杂巨系统,只有采用与证候相适应的复杂性科学理论及思维方法对其进行研究,才能揭示其科学内涵^[7,8]。由于机体需通过不断调整复杂的代谢网络来维持自身与外界的互动平衡,代谢组学技术是对生物体内所有代谢物进行定量分析,并寻找代谢物与生理病理变化的相对关系的研究方式,与中医学系统观和整体观念的核心思想不谋而合^[9]。中医辨证论治的关键是对证候本质的认识,代谢组学既能够以代谢轮廓宏观诊断证候,以代谢指纹准确把握证候变化,又能以生物标记物的含量变化微观精准地表征证候各阶段的生物学特征,并以此反映证候实质及方剂的治疗效应^[10-13]。在此方面,王喜军教授利用代谢组学阐释了黄疸证、肝郁脾虚证、肾阳虚证及相关动物模型的代谢生物标记物^[14-16]。为建立一种能够科学阐释中药有效性及其作用机制的生物学语言,将研究方法 with 临床疗效评价紧密结合而发现表达方剂治疗效应的物质基础,发挥中医药在治疗复杂性疾病中的优势,21 世纪初将代谢组学技术引入中药研究,并将研究工作中与中医临床研究、中医方剂研究相结合,在中医证候临床体征要素研究的基础上,将中药血清药物化学与代谢组学有机整合,利用代谢组学技术揭示证候的生物标记物,利用中药血清药物化学方法发现方剂的体内直接作用物质;在有效状态下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,挖掘与证候标记物轨迹变化高度关联的药物成分,阐明了方剂药效物质基础及有效性机制、方剂配伍规律及其科学内涵^[17,18]。由此,在大量研究实践基础上,形成了中医方证代谢组学理论及方法创新体系,既能克服中医证候的模糊性和经验性的不足,又进一步探索了机体物质组学的整体变化,为中药有效性的阐明,临床证候的精准诊断及精准治疗,以及基于经方的创新药物设计提供有效的研究方法。

中医方证代谢组学创新体系其核心工作是从临床阳黄证患者切入,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路径及相关蛋白;在此基础上,构建阳黄证相关动物模型,建立了治疗阳黄证方剂的药效生物评价体系;在阐明治疗阳黄证代表方剂茵陈蒿汤有效性的前提下,分析鉴定显效状态下茵陈蒿汤体内成分 21 个;并将 21 个成分与 40 个黄疸证生物标记物相关联,发现能够调整标记物生物轨迹的蒿属香豆素等成分,并利用阳黄证动物模型及细胞模型,阐明相关体内成分与茵陈蒿汤临床疗效的相关性及生物学机制^[19-21]。该项工作首次系统阐释了中医证候的生物标记物及经方的有效性、有效成分及作用机制。相继通过心阳虚证等 8 个中医证候标记物及温心方等 13 个方剂有效性研究,提出了基于代谢调控的‘中药体内显效成分—生物标记物—药物靶标’发现的整合研究策略,使中医方证代谢组学理论和方法体系得到完善,为临床疗效的提升及创新药物的发现提供更有效方法。依据其研究策略融合了多项核心内容:基于代谢组学的证候生物标记物的发现、基于证候生物标记物的证候模型制备、基于中药血清药物化学的方剂体内显效形式的发现及鉴定、方剂体内成分与证候生物标记物关联度分析、以生物标记物为靶标的中药创新药物(先导结构)的发现、基于代谢调控(机制信号通路)的中药药靶筛选及功能研究等,形成了中医方证代谢组学核心理论及技术体系。其中,证候生物标记物发现及方剂体内显效成分与证候生物标记物关联度分析方法具有原创性^[22,23]。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 年年底在 *Omic*s 杂志发表^[24];英文版专著 *Chinmedomics* 已由

Elsevier 出版^[25]。该研究模式可以促进中药物质基础的阐明、基于中药活性成分的新药发现、完善质控标准等方面的研究工作。将其应用到药物研发和生产实际中,可有效提高新药创制水平,为我国中药行业提供强有力的技术支撑。例如,男仕胶囊、男仕口服液、AS1350 是无限极(中国)有限公司开发的具有抗疲劳、耐缺氧和调节免疫功能的保健食品,其中 AS1350 主打国外市场,目前还没有上市销售,为促进 AS1350 在国外上市后能够顺利打开市场以及从补肾阳方面扩大宣传,应用中医方证代谢组学研究策略对 AS1350 的补肾阳作用进行整体效应评价,并与已上市品种男仕胶囊、男仕口服液及中药经典名方金匱肾气丸进行比较,明确了 AS1350 的物质基础和作用机制及其治疗优势,发现了关键有效成分及效应生物标记物,提升了其质量标准。

第二节 基于中医方证代谢组学的六味地黄丸干预大鼠脑瘫模型的药效物质基础与作用机制研究

六味地黄丸首创于宋代钱乙所著的《小儿药证直诀》,用于治疗小儿先天肾阴不足所致的“五迟、五软”证,是滋补肾阴的经典名方。五迟、五软证表现为立迟、行迟、语迟、齿迟、发迟以及手软、足软、肌肉软、口软、头项软。小儿脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)是出生前到生后1个月内由各种原因所引起的脑损伤或发育缺陷所致的运动障碍及姿势异常,同时伴有智力低下、癫痫、惊厥、语言和视觉、听觉障碍等并发症。中医将小儿脑瘫归属于“五迟、五软”证的范畴。本研究基于中医方证代谢组学的研究体系和方法,首先针对缺血缺氧脑瘫大鼠模型进行代谢组学分析,鉴定潜在生物标记物,然后进行六味地黄丸干预作用的代谢组学研究及有效状态下六味地黄丸的血清药物化学研究,分析六味地黄丸干预缺血缺氧模型大鼠的效应生物标记物与其体内显效成分的相关性,从而确定六味地黄丸干预缺血缺氧脑瘫大鼠模型的潜在药效物质基础^[26]。

一、缺血缺氧诱导脑瘫大鼠模型的代谢组学研究

新生儿期脑组织缺氧缺血(即血氧量和血流量减少)是小儿脑性瘫痪症发生的重要原因。延迟剖宫产手术法能够高度模拟人类新生儿因宫内窘迫而致缺氧缺血的病理进程,符合“五迟、五软”证因先天胎禀不足的中医病机。采用延迟剖宫产手术法复制先天性缺血缺氧脑瘫大鼠模型,利用基于液-质联用技术的代谢组学方法,结合大鼠行为学、临床化学和组织病理学等检验,分析缺血缺氧脑瘫大鼠(HICP)模型尿液代谢轮廓的变化,挖掘和鉴定潜在生物标记物,建立药效生物学评价体系,用于六味地黄丸有效性评价。

(一) 实验分组与数据采集

取临产大鼠打开腹腔后用4个止血钳分别夹闭双侧子宫角血管,夹闭10 min时,立即从子宫取出新生大鼠,用棉签对新生大鼠进行术后抢救,成活的新生大鼠作为模型组和六味地黄丸给药组(备用)。取临产的大鼠仅进行剖宫产手术,不用止血钳夹闭子宫角血管进行延迟,成活的作为假手术对照组。另取临产大鼠,于上述剖腹产实验室前至少1天自然分娩,母鼠作

为代乳鼠用于饲养剖腹产新生大鼠。

每组新生大鼠 20 只,待 21 日龄离乳后,采集 21 日龄到 49 日龄的尿液,每隔 7 天收集一次尿液,利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术(Waters SYNAPT HDMS)采集代谢轮廓数据,用于代谢组学分析。49 日龄时采集肝门静脉血,离心取血清;采血后的大鼠,打开颅骨,剥离大脑,前脑制成组织匀浆液,测定生化指标及进行蛋白质印迹分析,后脑进行组织病理及免疫组织化学分析(以下简称免疫组化分析)。

(二) 模型评价

行为学结果发现,21~49 日龄内,模型组大鼠的整体行为能力较假手术对照组差,具体表现为在玻璃棒上悬吊的时间较短,在斜坡上完成调转头向上的时间较长,30s 内的活动较少,且很容易被抓取。临床生化指标结果显示,21~49 日龄内,模型组大鼠脑组织中 S100B 蛋白、谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)和血清中神经烯醇化酶(NSE)的含量均较假手术对照组高,说明宫内窘迫能够造成新生大鼠脑组织损伤,血脑屏障被破坏。组织病理学方面,21 日龄时,模型组大鼠脑白质的神经胶质细胞和皮层神经元细胞水肿,同时出现固缩坏死样改变,数量减少,排列紊乱,脑室扩张明显,49 日龄时各方面虽有改善,但病理状态依然存在。免疫组织化学结果显示,21 日龄和 49 日龄时,HICP 模型大鼠脑组织中髓鞘碱性蛋白(MBP)的表达水平较假手术对照组显著降低,提示延迟剖宫产手术可能在一定程度上阻碍或延迟新生大鼠脑组织中髓鞘的形成。蛋白免疫印迹法(Western-blot)结果显示,21~49 日龄内,HICP 模型组大鼠脑组织中 caspase-3 蛋白的表达水平较高,说明延迟剖宫产手术能够促进新生大鼠脑组织释放 caspase-3 蛋白,从而促进细胞凋亡。综合上述指标,说明模型组新生大鼠在 49 日龄内整体表现与人类缺氧缺血性脑瘫的病理特征相似,采用延迟剖宫产手术方法复制的缺血缺氧诱导脑瘫大鼠模型成功。

(三) 生物标记物鉴定与代谢通路分析

将利用 UPLC-Q-TOF-HDMS 技术采集的尿液代谢轮廓数据导入 Waters Progenesis QI 软件,结合 EZinfo 2.0 软件对大鼠尿液代谢轮廓进行分析,再应用 Progenesis QI 软件中 Identify Compounds 鉴定成分模块,对脑瘫大鼠模型尿液潜在生物标记物在 Human Metabolome Database(HMDB)数据库进行相关检索,最终利用 Masslynx 4.1 软件 Massfragment 模块对圈定的生物标记物进行二级结构解析。

新生大鼠在 21 日龄时,对假手术对照组与模型组代谢轮廓进行分析,得到相应的得分图(图 1-1),图中两组数据聚类明显,进一步通过 S-plot 和 VIP-plot 图提取对聚类分离贡献度较大的变量离子,检索数据库和解析二级质谱数据进行鉴定,最终确定了脑瘫大鼠模型尿液中 20 个潜在生物标记物:肌酸酐、1,3-二甲基脲嘧啶、烟酰胺、尿酸、胞嘧啶、ADP-forming、3-甲基尿酸、甲基巴豆酰甘氨酸、N1-(α -D-ribose)-5,6-dimethyl-benzimidazole、5-L-谷酰基-牛磺酸、黄嘌呤核苷、N-乙酰神经氨酸、顺式乌头酸、柠檬酸、3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸酯、5-胸腺嘧啶核苷酸、2,5-二羟基苯乙酸、3-甲氧基吡啶、5-羟基吡啶乙酸、雄甾烯二醇,其中尿酸在正负离子模式下相同保留时间内均可以被检测到。基于 MetaboAnalyst 的 Metabolomics Pathway Analysis(MetPA)分析平台,发现 8 个潜在靶标代谢通路:乙醛酸和二羧酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、柠檬酸循环、嘧啶代谢、酪氨酸代谢、甾类激素生物合成、嘌呤代谢、色氨酸代谢。主要涉

及糖类代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、甾体激素类生物合成五大代谢途径。缺血缺氧诱导脑瘫大鼠模型尿液潜在生物标记物及其关联代谢通路见表 1-1。

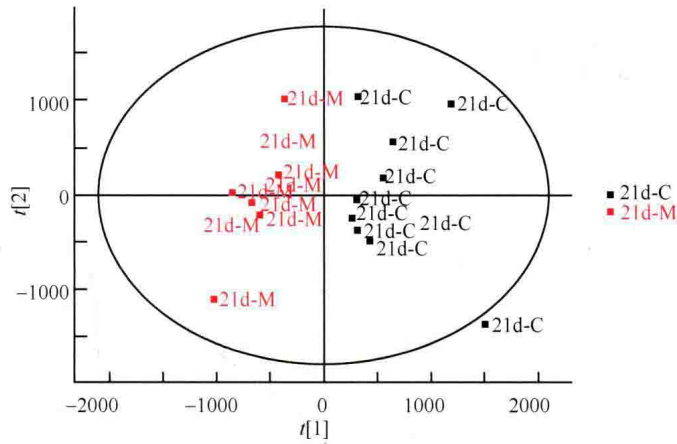


图 1-1 新生大鼠 21 日龄时假手术对照组 (21d-C) 与脑瘫模型组 (21d-M) 大鼠尿液 UPLC-Q-TOF-MS 代谢轮廓主成分分析得分图^[26]

表 1-1 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的缺血缺氧诱导脑瘫大鼠模型尿液生物标记物信息^[26]

序号	保留时间/min	质荷比	分子式	生物标记物	关联代谢通路
1	0.43	114.9886	C ₄ H ₇ N ₃ O	肌酸酐	氨基酸代谢
2	0.83	141.0688	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂	1,3-二甲基脲嘧啶	嘌呤代谢
3	1.00	123.0560	C ₆ H ₆ N ₂ O	烟酰胺	烟碱代谢
4	1.05	169.0364	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	尿酸	嘌呤代谢
5	1.48	112.0508	C ₄ H ₅ N ₃ O	胞嘧啶	嘧啶代谢
6	1.49	174.1255	C ₇ H ₁₅ N ₃ O ₂	ADP-forming	生物素代谢
7	1.82	183.0516	C ₆ H ₆ N ₄ O ₃	3-甲基尿酸	嘌呤代谢
8	2.22	158.0796	C ₇ H ₁₁ NO ₃	甲基巴豆酰甘氨酸	脂肪酸代谢
9	4.15	279.1333	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	<i>N</i> -1-(α -D-ribose)-5,6-dimethyl-benzimidazole	核黄素代谢
10	4.38	255.0670	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₆ S	5-L-谷酰基-牛磺酸	牛磺酸和亚牛磺酸代谢
11	4.44	285.0815	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	黄嘌呤核苷	嘌呤代谢
12	4.67	310.1699	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉	<i>N</i> -乙酰神经氨酸	氨基糖类代谢
13	0.66	173.0085	C ₆ H ₆ O ₆	顺式乌头酸	三羧酸
14	0.67	191.0187	C ₆ H ₈ O ₇	柠檬酸	三羧酸
15	1.37	263.0231	C ₉ H ₁₂ O ₇ S	3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸酯	酪氨酸代谢
16	2.01	321.0478	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₈ P	5-胸腺嘧啶核苷酸	嘧啶代谢
17	2.72	167.0343	C ₈ H ₈ O ₄	2,5-二羟基苯乙酸	酪氨酸代谢
18	3.59	162.0549	C ₉ H ₉ NO ₂	3-甲氧基吡啶	色氨酸代谢
19	4.27	190.0513	C ₁₀ H ₉ NO ₃	5-羟基吡啶乙酸	色氨酸代谢
20	8.00	285.1893	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	雄甾烯二醇	花生烯酸代谢