

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.04.12

代谢组学在中兽药领域的发展解析

董玲玲, 范 强, 于晓辉, 杨秀玉, 汪 霞*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-02-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 04-0073-05 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 代谢组学作为系统生物学的一部分, 其整体性的研究思路与中医药整体观念相一致。介绍了代谢组学的概念和研究方法, 根据其在中药领域的应用现状预测其在中兽药作用机制研究、毒理及安全评价研究、质量控制方面具有良好的应用前景, 同时对其在未来发展中面临的挑战进行了探讨。

[关键词] 代谢组学; 中兽药; 作用机制; 毒理; 安全评价; 质量控制

Metabonomics and Its Application Prospect in Traditional Chinese Veterinary Medicine

DONG Ling-ling, FAN Qiang, YU Xiao-hui, YANG Xiu-yu, WANG Xia*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: WANG Xia, E-mail: wangxia@ivdc.org.cn

Abstract: Metabonomics is consistent with the idea of holistic function of Chinese medicine, and it is part of system biology. This paper briefly introduces the concept of metabonomics and its research methods firstly, then predicts the application in traditional Chinese veterinary medicine in the field of mechanism, toxicology, safety evaluation and quality control, according to its current application in traditional Chinese medicine, and discusses its challenges in the future.

Key words: metabonomics; traditional Chinese veterinary medicine; mechanism; toxicology; safety evaluation; quality control

代谢组学是研究生物体系受外部刺激所产生的所有代谢产物变化的科学, 主要研究小分子代谢物(分子量 1000 以下), 与蛋白组学, 转录组学相互补充, 和基因组学一起构成系统生物学, 成为研究生命现象的重要手段^[1]。与其它组学比较, 代谢组学是对生物体产生变化的最终反映, 检测相对容

易; 因为基因和蛋白表达的有效的微小变化会在代谢物上得到放大; 代谢物种类远小于基因和蛋白的数目; 代谢组学技术不需建立全基因组测序及大量表达序列标签(EST)的数据库^[2]; 同时, 各生物体系中的代谢产物是类似的, 因此代谢组学研究所采用的技术手段通用性更强。目前, 代谢组学已经广

作者简介: 董玲玲, 硕士研究生, 从事兽药检验方面工作。

通讯作者: 汪 霞。E-mail: wangxia@ivdc.org.cn

泛应用于药物研究^[3]、疾病诊断^[4]、植物鉴定^[5]、营养学^[6]、微生物代谢^[7]、食品安全^[8]等领域的研究。随着代谢组学技术的不断发展与完善,其在中药研究的各领域也逐渐兴起并占有一席之地。文章介绍了代谢组学的研究方法,根据其在中药领域的应用现状预测其在中兽药作用机制研究、毒理及安全评价研究、质量控制方面具有良好的应用前景,同时对其在未来发展中面临的挑战进行了探讨。

1 代谢组学研究方法

代谢组学研究流程包括样品采集和前处理、样品分析以及数据处理等,样品采集和前处理与样品分析紧密相关:只有经过适当的前处理,才能保证对样品所做的分析结果具有可信度,同时不同的仪器分析技术对于样品的前处理有不同的要求。代谢组学产生海量数据,数据处理是代谢组学研究的重要环节,正确的数据处理和分析是获得具有统计意义和生物学意义结果的前提。

1.1 样品采集和前处理 代谢组学研究的对象为广泛存在于细胞、血液、尿液、组织中的小分子代谢物。为了保证样品分析的顺利进行和分析结果的准确可靠,样品采集与前处理的关键就在于 1) 提取出尽可能多的代谢物;2) 经过前处理,降低样品对分析仪器的不利影响,同时提高检出率。例如尿液样品中主要为小分子极性代谢物,包括羧酸类、有机胺类、氨基酸类。在使用 NMR 测定时,不同 pH 值尿液中这些代谢物由于氨基或羧基的解离程度不同,化学位移将发生显著的变化,因此,选择合适的 pH 值显得尤为重要^[9]。在样品分析前利用适当的方法对样品进行前处理不仅能使分析过程顺遂,也为后续的多变量数据分析、标记物识别和代谢途径分析等奠定良好的基础。

1.2 样品分析 代谢组学研究离不开对复杂样品的仪器分析,经典的分析方法有核磁共振波谱分析(NMR)和色谱质谱联用技术,包括气相色谱-质谱联用(GC-MS),液相色谱-质谱联用(LC-MS),以及多级质谱联用的分析技术等。NMR 能够实现对样品的非破坏性、非选择性分析,检测尽可能多的化合物,但存在灵敏度低、分辨率不高的缺点,常常

导致高丰度分析物掩盖低丰度分析物的情况^[10]。GC/MS 技术因其分辨率高、灵敏度好,且有标准谱库供比对,方便对代谢物进行定性的特点,在代谢组学分析技术中占有一席之地,尤其是微生物代谢组学和植物代谢组学。但 GC/MS 技术也有其局限性,主要是气相色谱分析对象是挥发性代谢物,而难挥发的大部分代谢物信息不能直接获得,需要借助复杂的衍生化处理手段^[11]。随着分析技术的不断发展,LC/MS 技术因其具有前处理简单,适用于大部分代谢物的优势而逐渐被广泛地用于代谢组学研究中^[12]。代谢组学研究对象具有种类繁多,理化性质差异大,浓度范围分布广的特点,要对它们进行无偏向的全面分析,单一的分离分析手段难以胜任,因此联合使用多种分析方法也成为新的趋势^[13]。

1.3 数据处理 代谢组学在样品分析过程中产生海量的多维原始数据,处理、分析和管理这些数据需要专门的数学、统计和信息学知识和工具。经过多年的发展,代谢组学的技术标准及数据库技术、统计分析方法也日趋成熟和完善^[14]。首先需要对各分析方法所得的原始数据进行处理,主要是提取、峰对齐、去噪等处理之后得到可用于代谢组学研究的数据格式。之后为了挖掘代谢物信息,需要借助统计分析手段对两类或多类变量进行判别分类,最经典的统计分析方法为模式识别技术。常用的模式识别技术包括无监督(unsupervised)学习方法和有监督(supervised)学习方法两类。无监督的模式识别方法直接将具有相似特征的样本进行分类,找出分类信息与原始信息的差别,主要包括主成分分析(PCA)、簇类分析(HCA)等;有监督模式识别方法利用多参数模型对未知数据进行辨识、归类和预测,建立模型时有可供学习的样本,主要包括偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)、人工神经网络(ANNs)。代谢组学数据处理的意义在于将庞大的数据转化成有意义的生物学结果,实现对样品的分类或者寻找生物标志物。

2 代谢组学在中兽药领域的应用前景分析

代谢组学研究系统生化谱和功能调节的整体

效果,这与中药作用的整体观念一致,适于解决中药难以认识的整体效应和作用机理等多方面的问题^[15]。同样的道理,也可以借助代谢组学的整体性研究思路和技术手段来研究兽用中药,尤其是某些作用机制仍不明确,毒理研究仍不透彻,质量控制还不到位的中兽药。

2.1 代谢组学在阐明中兽药作用机制中的应用前景分析 中兽药大部分是复方制剂,通过多组分发挥多途径、多靶点的协同作用,最终达到整体调节动物机体的目的,因此对其作用机制的阐述存在一定的难度。而代谢组学是研究药物引起机体内源性代谢物的全局和系统性变化,直接反映体内生化过程和状态的整体变化,采用代谢组学的技术和研究思路可系统的解释和评价多组分中兽药复方的作用机制和疗效。

华永丽博士^[16]采用代谢组学研究策略,以当归挥发油为研究对象,建立大鼠炎症模型,进行了当归挥发油的抗炎机制研究,从机体整体水平揭示其抗炎的机理,分析了当归挥发油抗炎相关的代谢物、代谢通路以及与当归挥发油抗炎作用相关的细胞因子之间的关系;采用 GC-MS 测定空白对照组(KB)、LPS 炎症模型组、不同浓度当归挥发油干预组的血浆、肝组织、肺组织、尿液中代谢物;应用 PCA、PLS-DA 对各组不同组织的 GC-MS 数据进行分析,不同模型组得到完全分离;通过重要变量投影因子(VIP)及非参数检验筛选出各组织中的差异代谢物;运用代谢组学途径分析(MetPA)数据库对差异代谢物的代谢途径进行分析;采用 MetPA 数据库构建各组不同组织筛选出的所有差异代谢物的相关代谢通路,找出与 LPS 致炎及当归挥发油干预作用有密切相关性的代谢通路;采用 Matlab 软件对所有差异代谢物及其 KB、LPS 炎症模型组、不同浓度当归挥发油干预组进行热点聚类分析,所筛选的差异代谢可以表征各组;采用 Spss 软件对所检测到的差异代谢物与检测的炎性因子、炎性介质指标进行相关性分析,筛选出琥珀酸、丙酮酸等七种可作为 LPS 致炎及当归挥发油抗炎的生物标志物。

2.2 代谢组学在中兽药毒理和安全性评价研究方面的应用前景分析 随着对用药安全的重视程度越来越高,人们对中药毒理与安全性评价的关注度也日益提高。中药毒性成分复杂,致毒机制不明确,中药安全性已是涉及中医药现代化和国际化的重大科学问题^[15]。谢燮等^[17]以实验大鼠为对象,分析其尿液代谢物组成的动态变化,考察人参的主要有效成分--人参总皂苷对大鼠机体尿液代谢谱的影响。结果显示短期和长期服用人参皂苷均不会对正常大鼠尿液的代谢组造成非常显著的影响。梁晓萍博士^[18]采用 UPLC/TOF-MS 代谢组学方法研究了蟾酥对大鼠潜在的肝脏急性毒性。结果表明蟾酥毒性对体内代谢的干扰主要集中于脂质代谢的相关途径,从代谢层面上反映了蟾酥导致的肝脏损伤,以及该损伤对机体代谢的影响。代谢组学在中药毒理与安全性评价中的应用主要集中在单味中药,对中药方剂的研究较少,胡中慧博士^[19]利用 ¹H-NMR 的代谢组学技术对莲必治注射液毒性作用机制进行了推测。目前,针对中兽药的毒理及安全性评价的代谢组学的相关研究鲜有报道,但中兽药的安全性问题是涉及兽药残留和动物源性食品安全的重大问题,基于代谢组学已在中药毒理及安全性评价研究中的良好基础,其在中兽药毒理及安全性评价中必将发挥重要作用,具有良好的研究前景。

2.3 代谢组学在中兽药质量控制方面的应用前景分析 中药的质量控制研究一直是中药现代化、产业化、国际化进程的重要保障,中药质量控制的基础与核心是中药效应物质,即中药及其复方中发挥作用的化学成分^[20]。传统的质量控制手段包括指纹图谱方法和主成分(或活性成分)定性定量方法,但这两种方法均不能从整体上反映中药的质量,制约了质量标准的合理性。中药发挥作用靠的是多组分、多靶点协同作用,不仅是单一活性成分的作用,也不是多种活性成分的简单相加,尤其中药复方更是如此,因此,不能以化学药品的量效关系模式来简单控制中药的质量,而代谢组学的整体性研究思路与中药质量控制的整体性要求不谋而合,因

此,代谢组学技术已成为中药质量控制研究的重要手段之一。向铮^[21]采用代谢组学方法研究不同植物来源的莪术的质量控制和评价方法,以我国较常用的中药材莪术(包括温莪术、蓬莪术及广西莪术)为研究对象,研究不同生长时期莪术的代谢物轮廓,结合 PCA 和 PLS-DA 等模式识别方法建立三种不同植物来源的莪术质量控制标准,筛选了 4 个分类化学标志物莪术酮、吉马酮、莪术二酮及表莪术酮,并成功用于商品莪术药材的来源和质量控制。Lee DY 等人^[22]采用基于 LC-QTOF/MS 的代谢组学技术方法快速区分来源于韩中日三国的人参,并采用 PCA 和 PLS-DA 分析方法获得区分不同来源人参的生物标记物,并建立了质量控制方法。除了对中药材的鉴定,代谢组学在中药质量控制中还可与其他技术手段协同作用,实现对中药质量全方位,多角度,点面结合的监控。李萍团队^[23]经过不断地探索和实践,形成了从吸收、分布、靶向结合和代谢 4 个水平上阐明中药效应物质基础,采用代谢指纹图谱、生物指纹图谱与多活性指标成分定量分析相结合的中药质量控制体系。并将这一思路成功的用于包括金银花、黄芪、当归、丹参、三七等中药材、制剂和复方丹参片、当归补血汤、银花甘草汤、丹七方等中药复方制剂的质量控制研究中。

代谢组学技术手段已是国内外进行中药质量控制研究的重要方法之一,将代谢组学技术应用到中兽药质量控制研究中,亦为一种新的选择,打破常规思路,以整体性的思维模式进行中兽药质量控制研究,最终建立更加科学合理的中兽药质量标准。

3 展 望

随着分析技术、仪器工业及数据统计学不断发展,代谢组学的研究不断完善,其在中药研究领域必将发挥更重要的作用。遗憾的是,中兽药研究还未能充分利用代谢组学这个研究利器,根据其在中药领域已经取得的进展,可以预测其在中兽药作用机制研究,毒理及安全评价研究,质量控制方面具有良好的应用前景。

当然,任何分析技术都有缺陷,代谢组学也不例外,未来其在中兽药领域的发展也将面临众多挑战,主要体现在:1)目前还没有一种样品处理技术和分析技术能同时实现对所有代谢物进行全面的定性和定量分析;2)如何将代谢组学获得的海量数据转化成有生物学意义的指标,科学合理的数据处理技术是关键;3)中兽药多组分、多靶点、作用于多种目标动物的复杂特点对代谢组学的发展提出了更高的要求。虽然现阶段挑战多,但机遇与挑战并存,相信随着代谢组学技术的不断完善,必将为中兽药的发展提供更加广阔的研究平台,实现中兽药的安全、有效、质量可控,大力推动中兽药现代化研究的步伐。

参考文献:

- [1] Nicholson J K, Wilson I D. Understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism [J]. *Nat Rev*, 2003, 2: 668-676.
- [2] Taylor J, King R D, Altmann T, *et al.* Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(suppl.2): 241-248.
- [3] Dias D A, Koal T. Progress in metabolomics standardisation and its significance in future clinical laboratory medicine [J]. *EJIFCC*. 2016, 27(4): 331-343.
- [4] Moore R E, Kirwan J, Doherty M K, *et al.* Biomarker discovery in animal health and disease: the application of post-genomic technologies [J]. *Biomark Insights*. 2007, 10(2): 185-196.
- [5] Lee M Y, Moon B C, Kwon Y K, *et al.* Discrimination of polygonatum species and identification of novel markers using H NMR- and UPLC/Q-TOF MS-based metabolite profiling [J]. *J Sci Food Agric*. 2016, 96(11): 3846-3852.
- [6] Tian H, Lam S M, Shui G. Metabolomics, a powerful tool for agricultural research [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11).
- [7] Mashego M R, Rumbold K, De Mey M, *et al.* Microbial metabolomics: past, present and future methodologies [J]. *Biotechnol Lett*. 2007, 29(1): 1-16.
- [8] Senyuva H Z, Gökmen V, Sarikaya E A. Future perspectives in orbitrapTM-high-resolution mass spectrometry in food analysis: a review [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2015, 32(10): 1568-606.
- [9] 邹忠杰,梁生旺,袁经权,等. 中药代谢组学研究中生物样品

- 前处理方法[J]. 广东药学院学报, 2010, (04): 434-437.
- Zhou Z J, Liang S W, Yuan J Q. Pretreatment methods of biological samples in the study of metabolomics of traditional Chinese medicine [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical College, 2010, (04): 434-437.
- [10] Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(2): 525-527.
- [11] Dettmer K, Aronov P A, Hammock B D. Mass spectrometry-based metabolomics[J]. Mass Spectrom. Rev, 2007, 26(1): 51-78.
- [12] Roux A, Lison D, Junot C, *et al.* Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review[J]. Clin Biochem. 2011, 44(1): 119-35.
- [13] L Deng, H Gu, J Zhu, *et al.* Combining NMR and LC/MS using backward variable elimination: metabolomics analysis of colorectal cancer, polyps, and healthy controls[J]. Anal Chem, 2016, 88(16): 7975-7983.
- [14] 卢红梅, 梁逸曾. 代谢组学分析技术及数据处理技术[J]. 分析测试学报, 2008, (03): 325-332.
- Lu H M, Liang Y Z. The Development of Analytical Technologies and Data Mining in Metabolomics[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2008, (3): 325-332.
- [15] 刘昌孝. 代谢组学与中药现代研究[J]. 河南大学学报(医学版), 2006, (04): 1-7.
- Liu C X. Metabolomics and modern research of traditional Chinese medicine [J]. Journal of Henan University (Medical Science), 2006, (4): 1-7.
- [16] 华永丽. 当归挥发油干预大鼠 LPS 炎症模型的相关代谢物及代谢通路分析[D]. 甘肃农业大学, 2014.
- Hua Y L. Analysis of related metabolites and metabolic pathways of volatile oil in *Angelica sinensis* in rats with LPS inflammation model [D]. Gansu Agricultural University, 2014.
- [17] 谢 燮, 陈少秋, 吕颖芳, 等. 长期服用人参皂苷大鼠尿液代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2014, (23): 4675-4679.
- Xie Y, Chen S Q, Lv Y F, *et al.* Urine metabonomic study on long-term use of total ginsenosides in rats [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, (23): 4675-4679.
- [18] 梁晓萍. 基于液质联用的代谢组学在中药复方疗效和安全性评价中的应用[D]. 华东理工大学, 2011.
- Liang X P. Application of metabolomics based on LC/MS in the efficacy and safety evaluation of traditional Chinese medicine compound [D]. East China University of Science and Technology, 2011.
- [19] 胡中慧. 莲必治注射液安全性再评价研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2010.
- HU Z H. Study on safety re-evaluation of Lianbizhi injection [D]. Academy of Military Medical Sciences, Chinese People's Liberation Army, 2010.
- [20] 王智民. 中药药效物质基础的系统研究是中药现代化的关键. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1111-1113.
- Wang Z M. Systematic study of the pharmacological basis of traditional Chinese medicine is the key to the modernization of traditional Chinese medicine [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2003, 28(12): 1111-1113.
- [21] 向 铮. 基于代谢组学的莪术类药材的质量控制[D]. 浙江大学, 2012.
- Xiang Z. Quality control of curcuma zedoaria a based on metabolomics [D]. Zhejiang University, 2012.
- [22] Lee DY, Kim JK, Shrestha S, Seo KH, *et al.* Quality evaluation of Panax ginseng roots using a rapid resolution LC-QTOF/MS-based metabolomics approach [J]. Molecules. 2013, 18(12): 14849-14861.
- [23] 李 萍, 齐炼文, 闻晓东, 等. 中药效应物质基础和质量控制研究的思路与方法[J]. 中国天然药物, 2007, (1): 1-9.
- Li P, Qi L W, Wen X D, *et al.* Chinese medicine effects of material basis and quality control research ideas and methods [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2007, (1): 1-9.

(编辑:陈希)