

## · 综 述 ·

## 系统生物学在中医“证”本质研究中的应用

王世东<sup>1</sup> 赵国屏<sup>2,3</sup> 张庆华<sup>1,3</sup>

在中医学的发展中,辨证论治一直是中医临床诊治的精髓所在,而“证”的确立则是辨证论治的核心,是承接理法方药的桥梁。“证”是机体在疾病发展过程中某一阶段的病理概括,它包括了病位、病因、病性以及正邪关系,反映的是该阶段病理变化的本质。中医正是通过对人体外在“证”的准确把握而达到对其内在根本病理变化本质的总体了解,正所谓“司外揣内”。但是,通过“望、闻、问、切”四诊所获得的信息很难量化,导致对“证”的判断很大程度上依赖于医生的诊疗水平与经验,这在一定意义上客观地制约了中医学理论的发展和中医现代化的进程。

“证”作为一种规律性的病理表现,必然有其内在的特定物质基础,中医认为“有诸内,必形诸外”也从另一角度说明了外在功能表现是内在物质基础的外延<sup>[1]</sup>。因此,探寻“证”的物质基础,揭示“证”的本质,对实现中医现代化具有十分重要的意义。然而,基于中医“证”的整体性、动态性、时相性、复杂性等特点,简单的采用单一指标来阐释“证”本质的分析方法和思路,容易陷入捉襟见肘的窘境。

“系统生物学”概念的提出,为中医“证”本质的研究提供了一种新的思路。正如陈竺院士指出的:系统生物学作为 21 世纪医学和生物学发展的核心驱动力……为中西医找到了共同语言<sup>[2]</sup>。“系统生物学”是以计算生物学为基础,以高通量技术平台为手段,从系统层面上去综合研究生物体内 DNA、mRNA、蛋白质、代谢物之间复杂的生物学过程的新兴学科<sup>[3]</sup>,它的研究理念与中医“证”的特质有着完美的契合。目前,系统生物学在“证”本质研究领域中也正承担着重要角色。

### 1 转录组学在“证”本质研究中的应用

转录组学通过高通量的基因组学技术平台,对生

物体全基因组表达的质和量进行实时监测,并运用生物信息学的方法构建网络联系,进而从基因转录组水平对“证”的本质作出全面解释。

#### 1.1 实验研究

王肃等<sup>[4]</sup>通过利血平注射液进行大鼠背部皮下注射,建立了脾虚证模型,并运用基因表达谱芯片对比研究了脾虚证大鼠与正常大鼠大脑皮层的基因表达差异。他们发现 145 条基因在脾虚证大鼠大脑皮层发生了明显改变,其功能涉及免疫、细胞骨架运动、能量代谢、蛋白合成和细胞内信号转导等多个方面,从而从基因层面诠释了脾虚证的内在变化。同时,他们也为脾虚证的神疲症状,如《脾胃论》记载的:“食入则困,精神昏冒而欲睡者,脾亏弱也。”提供了新的证据。潘志强等<sup>[5]</sup>对 H22 肝癌荷瘤小鼠早、中、中晚三期,四个证型进行辨证,并运用外显子芯片重点研究早期邪毒壅盛证和气虚证小鼠肾上腺基因表达谱的差异。研究发现 27 条基因在邪毒壅盛证中发生显著调变,与免疫、代谢密切相关。然而,气虚证则仅有 11 条基因发生调变,且下调者多为健康组及邪毒壅盛证组表达活跃的基因。通过实证与虚证的对比研究,从转录组层面上解释了该疾病不同证型间的预后差异,同时也为以肾上腺为介质研究中医实证与虚证提供了新的思路。

#### 1.2 临床研究

Ma T 等<sup>[6,7]</sup>通过对 4575 个寒证患者进行调查研究,发现了一个具有 16 个成员的中医寒证典型家系。进而对家系中 9 位寒证病人及 5 位正常人的外周血白细胞表达谱进行对比研究,发现 25 条基因在寒证中发生特异调变,且主要集中在能量代谢的功能域中。此结果与他们之前通过文献挖掘和生物信息学方法发现的寒热证与神经—内分泌—免疫(NEI)系统相关的理论相一致<sup>[8]</sup>,从而为通过 NEI 系统来探寻中医“寒热证”本质找到一个新的研究突破口。Cheng L 等<sup>[9]</sup>研究了寒证与热证类风湿关节炎各 10 例患者的静脉血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 细胞表达谱。发现在寒证中特异调变的基因主要与 Toll 样受体(TLRs)信号通路相关,提示寒证患者的炎症反应较热证更明显,而热证中调变的基因则跟 T 淋巴细胞间的相互作用关系更密切。同时,他

基金项目:国家科技重大专项资助项目(No. 2009ZX10004-601)

作者单位:1. 上海中医药大学中医方证与系统生物学研究中心(上海 201203); 2. 中国科学院上海生命科学研究院合成生物学重点实验室(上海 200031); 3. 生物芯片上海国家工程研究中心(上海 201203)

通讯作者:张庆华, Tel: 021-33938791, E-mail: qhzhang@way-en.com

们新发现过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路也参与到中医热证的发病,从而为中医临床的选方用药提供了新的参考。马晓娟等<sup>[10]</sup>通过对比冠心病血瘀证和非血瘀证患者的静脉血白细胞表达谱,发现血瘀证中以炎症、免疫相关的基因发生调变为主,从基因层面上为血瘀证的诊断提供了生物学依据。

## 2 蛋白质组学在“证”本质研究中的应用

蛋白质组学<sup>[11]</sup>通过双向电泳 (2-DE)、质谱 (MS) 及蛋白芯片等方法从整体角度对细胞内部的全套蛋白的表达、分布、相互作用等进行全方位研究,从而达到对中医“证”本质的系统阐释。

### 2.1 实验研究

刘丽丽等<sup>[12]</sup>对由环磷酰胺腹腔注射诱导的血虚证小鼠的骨髓蛋白质组进行研究,发现有 15 个蛋白质在模型组中表达发生特异改变。进一步,通过运用四物汤治疗,发现 CA I, cofilin, ANXA1 及 Prx-V 等蛋白质的调变趋势被四物汤所抑制,从而找到了血虚证发生中可能的关键蛋白。同时,也为四物汤的临床疗效提供了新的生物学依据。刘建勋等<sup>[13]</sup>运用高脂饲料喂养结合冠脉球囊拉伤造成血管内皮损伤的方法建立小型猪痰瘀互结证冠心病模型,并通过双向电泳结合基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 对血清蛋白组进行分析。该研究发现 17 个蛋白的调变与痰瘀互结证密切相关,其功能涉及脂类代谢、免疫、炎症等方面,并指出蛋白 C4BP 的下调及 ApoE 的上调在冠心病痰瘀互结证的形成中可能起着主要作用。

### 2.2 临床研究

曾年菊等<sup>[14]</sup>运用双向电泳结合质谱技术对比研究肝阳化风证 60 例、血虚生风证 45 例及阴虚生风证 30 例患者的外周血淋巴细胞总蛋白,发现硫氧环蛋白过氧化物酶 (TPx) 在肝阳化风证和血虚生风证中较健康人明显下调,而在阴虚生风证中则无明显改变。进一步与疾病发展规律关联分析,他们发现 TPx 可能是中医肝风内动证发生的特异性标志蛋白。褚瑜光等<sup>[15]</sup>利用弱阳离子纳米磁性微球技术结合蛋白芯片平台,研究高血压患者肝胆湿热证与血清蛋白调变的关系。通过与健康人及非肝胆湿热证高血压患者对比研究,共鉴定出 182 和 132 个差异表达并具有统计学意义的蛋白质峰,进而筛选出 5 个特异性蛋白质峰进行建模。经盲法检验,证实所建立的证候决策模型对肝胆湿热证判别特异性达到 89.66%,从而为高血压肝胆湿热证的临床诊断提供了有效参考。

## 3 代谢组学在“证”本质研究中的应用

代谢组学以高通量核磁共振谱 (NMR) 和质谱 (MS) 为核心技术<sup>[16]</sup>,对尿液、血清、唾液、脑脊液等机体代谢产物中的小分子 ( $Mr \leq 1000$ ) 进行定性和定量分析,从生物体系系列事件的总体结果出发来揭示“证”的本质。

### 3.1 实验研究

Chen M 等<sup>[17]</sup>应用氢化可的松诱导大鼠肾阳虚模型,并通过尿代谢组学研究指出氢化可的松诱导儿茶酚胺的代谢增强进而导致免疫功能的过度消耗可能是引起大鼠肾阳虚的主要原因。而肉苁蓉可以通过增强免疫功能来拮抗氢化可的松的作用,从而治疗肾阳虚证。在后续工作中通过气相色谱-质谱 (GC/MS) 技术进一步研究发现 117 种代谢物在肾阳虚证大鼠尿液中明显改变,并鉴定出其中的 23 种代谢物<sup>[18]</sup>。通过主成分分析发现肉苁蓉可以以一种时间依赖的方式使这些改变的代谢物回归到正常大鼠水平。Lu X 等<sup>[19]</sup>通过超高压液相色谱-质谱 (UPLC/MS) 技术同样对氢化可的松诱导大鼠肾阳虚模型的尿代谢组进行研究,找到一系列与能量代谢、脂肪酸代谢及肠道菌群相关的尿代谢产物,同时发现骨碎补对这些代谢物的调节存在着时间依赖效应,进而为肾阳虚证的治疗提供了有利的参考。

### 3.2 临床研究

范群丽等<sup>[20]</sup>运用气相色谱-飞行时间-质谱 (GC-TOF/MS) 研究了阴虚阳亢证、肝火亢盛证与痰湿壅盛证高血压患者的血清小分子代谢物,发现代谢组学方法可以明显区分各中医证型。而且,对中医文献中的经典术语:“肝肾同源”与“上实下虚”作出了新的解释,即色谱峰分析发现高血压病阴虚阳亢证病人体内绝大部分小分子物质水平显著低于健康组,而尿酸、尿素和肌酐却较高。他们认为,肝阴虚则肝的合成与分泌功能降低,导致大多数代谢物浓度降低;肾阴虚则肾的排毒功能下降,故代谢产物增多;而肝阳亢则体内分解代谢率偏高,则导致了尿酸、尿素和肌酐的增多。华何与等<sup>[21]</sup>利用氢核磁共振 (<sup>1</sup>H-NMR) 对冠心病心绞痛血瘀证 (气滞血瘀证、心血瘀阻证、气虚血瘀证) 进行研究,发现心绞痛血瘀证患者血浆代谢物在能量代谢、糖代谢、脂质代谢及氨基酸代谢方面都发生了明显改变。值得注意的是,气虚血瘀证较其他两种血瘀证的代谢紊乱更加严重,并且伴有肾功能下降。自此,通过血浆代谢组学研究,该课题组为冠心病心绞痛的中医学临床分型及诊治提供了新思路。

## 4 宏基因组学在“证”本质研究中的应用

宏基因组学又称元基因组学,是一种以环境样品

中的微生物群体基因组为研究对象,以功能基因筛选和测序分析为研究手段,考察微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系的新的微生物研究方法<sup>[22]</sup>。由于宏基因组学是以整个微生物群落的基因为研究对象。因此,其能够最大限度地检测、了解人体共生菌群与人体之间的相互关系,充分体现了“微观整体性”的特点。相比较于自然环境的微生态研究,关于宏基因组学方法在中医“证”本质研究中的应用还鲜有报道。但是,基于肠道、口腔菌群等微生物群体在人体疾病发生发展中的重要作用及宏基因组学在微生物群落基因研究中的独特优势,未来其在中医“证”本质研究中的良好应用前景是可以预见的。

## 5 问题与展望

系统生物学以其整体性、时效性的特点在中医“证”本质的研究中逐渐发挥着不可替代的作用。通过近十年的探索,以系统生物学研究方法为手段在中医“证”本质的研究中已经取得了诸多可喜的成绩。然而,由此产生的新的现实问题也值得研究者深入思考并亟待解决。

从研究现状上讲,目前系统生物学在“证”本质研究中的应用仍处于起步阶段。基础实验方面,疾病、证型的种类和动物模型的建立都需要进一步丰富和规范;临床实验方面,研究样本的多样性及其与中医证候形成的相关性需要进一步提升和加强;平台建设方面,各种中医药组学实验方法及样本信息数据库的建立还有待提高;数据处理方面,关联多种组学数据信息的生物信息学分析方法还需进一步开发。此外,各组学和组学间的常规实验技术和研究侧重点需要进行有机的结合和拓展,通过不同研究方法和研究层面间的优势互补来克服单一平台或单一技术可能造成的实验结果的片面性,实现组学数据信息获得的最优化。

从研究思路讲,以某一种疾病的确定证型为切入点来研究该疾病中证型的形成规律,进而以中医“异病同证”的概念为基础来进行多病种扩大验证,从而找到“证”的真实的具有普遍意义的物质基础,可能会得到更好的结果<sup>[23]</sup>。同时,“证”的规范化则是“证”本质的研究前提<sup>[24]</sup>,即要以典型病例的典型证候为研究出发点。再者,“证”的出现可通过血液和尿液等中的内源性成分的改变而反映出来,而这一改变则常以组、群、谱的特征出现。反映中医“证”本质的物质基础不仅是一些特征性物质,而且多是组、群、谱集成的形式<sup>[25]</sup>。因此,联合多种组学,以多系统为研究媒介,以“信息整合”为基础,综合探索“证”的本质

可能会成为今后“证”的研究中的重要思路。

总之,以整体思维为研究出发点的系统生物学必定会在中医“证”本质的研究中发挥其独特的优势,为推动中医现代化进程作出贡献。

## 参 考 文 献

- [1] 胡学军,蔡光先,刘柏炎,等. 蛋白质组学在中医“证”实质研究中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(2): 87-91.
- [2] 陈竺. 系统生物学——21世纪医学和生物学发展的核心驱动力[J]. 世界科学, 2005, 28(3): 2-6.
- [3] Kitano H. Foundations of systems biology [M]. London: MIT Press Cambridge, MA, 2001: 10-11.
- [4] 王肃,陈小野,邹世洁,等. 利血平脾虚证模型大脑皮层基因表达谱变化的初步研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21(9): 1512-1515.
- [5] 潘志强,方肇勤,卢文丽,等. 邪毒壅盛和气虚证 H22 肝癌荷瘤小鼠肾上腺基因转录的差异[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(2): 118-122.
- [6] Ma T, Tan C, Zhang H, et al. Bridging the gap between traditional Chinese medicine and systems biology: the connection of cold syndrome and NEI network[J]. Mol Biosyst, 2010, 6(4): 613-619.
- [7] Yang L, Wang M, Wu W, et al. Transcriptome analysis of cold syndrome using microarray [J]. Am J Chin Med, 2007, 35(4): 609-620.
- [8] Li S, Zhang ZQ, Wu LJ, et al. Understanding Zheng in traditional Chinese medicine in the context of neuro-endocrine-immune network [J]. IET Syst Biol, 2007, 1(1): 51-60.
- [9] Cheng L, Cheng X, Gao C, et al. Cold and heat pattern of rheumatoid arthritis in traditional Chinese medicine: distinct molecular signatures identified by microarray expression profiles in CD4-positive T cell [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(1): 61-68.
- [10] 马晓娟,殷惠军,陈可冀. 血瘀证患者差异基因表达谱研究[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(4): 355-360.
- [11] Swinbanks D. Government backs proteome proposal [J]. Nature, 1995, 378(6558): 653.
- [12] 刘丽丽,马增春,王宇光,等. 四物汤对环磷酸胺致阴虚证小鼠骨髓蛋白质组的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1172-1175.
- [13] 刘建勋,苗兰,李欣志,等. 中国小型猪痰瘀互结证冠心病模型的血清蛋白质组学研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1): 73-76.
- [14] 曾年菊,梁清华,陈疆,等. 蛋白质组学方法研究 TPx

在肝风内动证中的表达及关系[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 750-752.

[15] 褚瑜光, 石洁, 胡元会, 等. 高血压病中医肝胆湿热证患者血清蛋白质组学研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(1): 37-41.

[16] Dunn WB, Bailey NJ, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies[J]. Analyst, 2005, 130(5): 606-625.

[17] Chen M, Zhao L, Jia W, et al. Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone-induced animal model [J]. J Proteome Res, 2005, 4(6): 2391-2396.

[18] Qiu Y, Chen M, Su M, et al. Metabolic profiling reveals therapeutic effects of *Herba Cistanches* in an animal model of hydrocortisone-induced kidney-deficiency syndrome[J]. Chin Med, 2008, 3:3.

[19] Lu X, Xiong Z, Li J, et al. Metabonomic study on Kidney-yang deficiency syndrome and intervention effects of *Rhizoma Drynariae* extracts in rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. Talanta,

2011, 83(3): 700-708.

[20] 范群丽, 王广基, 阿基业, 等. 高血压病阴虚阳亢证的代谢组学内涵研究[J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(6): 409-411.

[21] 华何与, 贾钰华, 张红栓, 等. 冠心病心绞痛三种血瘀证的血浆代谢组学研究[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(3): 258-260.

[22] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. Chem Biol, 1998, 5(10): R245-R249.

[23] 祁明浩, 詹臻. 基因芯片技术在中医证研究中的思考与应用[J]. 中医药学刊, 2006, 24(11): 2022-2024.

[24] 陈勇, 韩凤梅, 李瀚. 慢性乙型肝炎中医"证"分型的方法学探讨[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2004, 6(6): 51-54.

[25] 苏式兵, 胡义扬, 赵立平, 等. 慢性乙型病毒性肝炎中医证候生物学基础的研究思路[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 2(31): 222-225.

(收稿:2011-09-14 修回:2012-07-30)

## 《中国中西医结合杂志》第八届编委会名单

总编辑 陈可冀

副总编辑 沈自尹 肖培根 雷燕

顾问 吴咸中 辛育龄 陈凯先 陈维养 邓铁涛 王永炎 侯灿 曹洪欣

编辑委员(以姓氏笔画字母为序)

于德泉	马必生	王一涛	王卫霞	王文健	王宁生	王伟	王阶	王拥军	王昌恩
王学美	王宝恩	王硕仁	王舒	车镇涛	尹光耀	叶文才	史大卓	史载祥	白彦萍
吕志平	吕爱平	吕维柏	朱兵	危北海	庄曾渊	刘干中	刘平	刘良	刘建平
刘建勋	刘猷枋	齐清会	阮新民	孙汉董	孙燕	杨任民	杨宇飞	杨秀伟	李乃卿
李大金	李玉光	李廷谦	李军祥	李连达	李国栋	李国勤	李顺成	李恩	李涛
李焕荣	连方	吴伟康	吴泰相	吴根诚	时毓民	邱峰	张大钊	张永贤	张永祥
张伯礼	张荣华	张亭栋	张家庆	张敏州	陆付耳	陈士奎	陈小野	陈冬燕	陈香美
范维琥	林志彬	林求诚	林瑞超	郁仁存	果德安	周文泉	周俊	周霁祥	赵一鸣
赵伟康	赵健雄	胡义扬	胡镜清	饶向荣	洪传岳	栗原博(日本)	顾振纶	徐治鸿	
徐浩	殷惠军	郭军	郭赛珊	唐由之	唐旭东	凌昌全	黄光英	黄怡超	黄晓愚
黄熙	曹小定	崔红	麻柔	梁晓春	葛秦生	董竞成	董福慧	韩济生	谢竹藩
谢明村	谢恬	蔡定芳	裴正学	廖家楨	廖福龙	衡先培	戴瑞鸿		

Yung-chi CHENG(美国) Sheng-xing MA(美国) Qun-hao ZHANG(美国)