

· 综 述 ·

中医湿证的代谢组学研究述评

杨德才 徐玮斐 顾巍杰 刘国萍

证候是中医学特有的概念,是中医诊断和治疗的核心。湿证是临床常见的中医证候,中医学认为“有诸内者形诸外^[1]”,那么湿证的病理表现,必然有一定的物质结构来支撑^[2],用现代医学理论来揭示中医学湿证理论中蕴藏的科学内涵,找到中医湿证产生的物质基础,将会有助于临床湿证的诊断和治疗。

代谢组学是用整体性分析技术来研究生机体所有代谢物种类、数量,以及其在受内源性或外源性刺激后的变化规律的学科^[3]。以一组代谢物群体作为标记物来进行湿证的研究,有利于对湿证的微观辨证提供依据,是中医药发展现代化的重要出路^[4]。笔者通过对 2006—2016 年运用代谢组学技术研究中医湿证的文献进行总结,以阐释湿证代谢组学研究的最新进展。

1 不同疾病湿证的代谢组学研究

1.1 脾胃病湿证的代谢组学研究 代谢组学用于中医脾胃病湿证的研究,主要是在慢性胃炎湿热证方面,采集的样本主要是血液、尿液及唾液,研究的证型主要是湿热证,及湿热证与其他脾胃病证型的比较,发现湿热证与其他证型的代谢谱存在差异,并且相应的某些差异代谢产物可以作为区分湿热证的潜在生物学标志物。王亮^[3]对 28 例慢性萎缩性胃炎脾胃湿热证患者血液和尿液进行代谢组学研究,发现脾胃湿热证的潜在生物学标志物为缬氨酸、乳果糖、异丁酸、甲酸、肌肽等。施旭光等^[5]应用核磁共振氢谱方法(¹H-NMR)研究 10 例慢性浅表性胃炎脾胃湿热证患者尿液中代谢产物,发现脾胃湿热证组尿液中存在的差异代谢产物为马尿酸、牛磺酸、2-羟基丁酸、岩藻糖、葡萄糖、琥珀酸、乳酸、肌酐等。颜凤蛟^[6]研究慢性胃炎和消化性溃疡患者的血液,发现湿热证的代谢谱与其他证型有明显差异。沈华娟^[7]对 30 例消化性溃疡患者血液进行代谢谱的研究,发现消化性溃疡湿热证与其他证型的代谢谱有差异,并且湿热证与气滞证组的总

胆红素、直接胆红素、间接胆红素含量存在明显差异。童宁宁^[8]对 22 例慢性胃炎湿热蕴脾证患者的唾液进行代谢组学分析,发现湿热蕴脾证组的唾液代谢产物白氨酸、苯丙氨酸、丙酸盐、异丁酸、正丁酸等 10 组指标与健康人比较,有明显的差异性。

1.2 肝脏疾病湿证的代谢组学研究 许多学者应用代谢组学进行肝脏疾病湿证研究,包括的疾病主要有肝衰竭、乙肝及肝癌等;证型主要是寒湿证、湿热证及痰湿证之间及与其他证型的鉴别,通过对不同肝病湿证类型或同一肝病湿证与其他证型的患者血清代谢组学进行比较,研究发现可作为区别肝脏疾病湿证的某些内源性代谢产物^[9-12]。朱洁^[9]对 18 例肝衰竭患者分湿热证组和寒湿证组进行血液代谢组学的研究,发现寒湿证和湿热证患者血清代谢轮廓明显分离,两者内源性代谢产物具有显著差异,并且湿热证组小分子代谢产物中卵磷脂、溶血卵磷脂、肉毒碱类、甘氨酸、脱氧胆酸、次黄嘌呤及 N-癸酰甘氨酸含量显著上调。黄蕾^[10]应用基于超高效液相色谱联合四级杆飞行时间质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS)的代谢组学方法对慢加急(亚急)性乙肝肝衰竭湿热证、慢性乙型肝炎病毒性肝炎湿热证患者进行研究,结果发现两者血清中有 4 类共有标志物为氨基酸类、胆汁酸类、肉毒碱类和溶血卵磷脂类;其中血清中的 L-2-氨基-3-亚甲基-己酸、泮托拉唑、月桂酸二乙醇酰胺、溶血卵磷脂(18:1)是肝衰竭湿热证特异性表征标志物;吡啶丙烯酸、牛磺胆酸钠、溶血卵磷脂(16:1)是慢乙肝湿热证特异性表征标志物。杨秋水^[11]运用代谢组学技术检测 300 例肝豆状核变性患者尿液,结果发现 4-羟基苯乙酸和顺式乌头酸可作为湿证的标志性代谢产物之一。刘雅荣^[12]采集 60 例肝癌患者的血液进行 ¹H-NMR 代谢组学检测,发现脾虚痰湿证肝癌患者与健康人比较,血浆中差异代谢物为多种氨基酸、肌酸、肌酸酐、极低密度脂蛋白等;而非脾虚痰湿证肝癌患者相比,血浆中肌酸、肌酸酐、乳酸、丙酮、 β -葡萄糖、 α -葡萄糖、不饱和脂类等代谢物含量具有差异性。

1.3 高血压病湿证的代谢组学研究 在对高血压病中医湿证的研究中,采集样本主要是空腹静脉血,研究的证型主要是痰湿壅盛证与其他证型血清代谢产

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81270050, No. 30901897);上海市健康辨识与评估重点实验室(No. 13DZ2261000)

作者单位:上海中医药大学基础医学院(上海 201203)

通讯作者:刘国萍, Tel: 021-51323042, E-mail: 13564133728@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171110.368

物的差异性,所使用的代谢组学技术为气相色谱-质谱连用(GC/MS)和H-NMR技术,研究发现某些有差异性的代谢产物可能会成为区别高血压病湿证类型的生物标志物。董海琪^[13]抽取15例高血压病痰湿壅盛证男性患者的空腹静脉血进行GC/MS代谢组学技术的研究,发现痰湿壅盛组的TC、TG、LDL-C、HDL-C有显著差异,并发现谷氨酸、 γ -生育酚、单十六醛丙三醇、肌酐、尿酸、尿素氮等具有显著性差异的8种化合物。朱海鹏^[14]对12例高血压病痰湿壅盛证患者的空腹静脉血进行GC/MS代谢组学技术的研究,发现痰湿壅盛组代谢产物中果糖、柠檬酸盐、乳酸盐、乙醇胺、尿酸等存在显著差异。高晓丽^[15]对14例高血压病患者的空腹静脉血进行H-NMR技术的代谢组学研究,结果发现高血压病痰湿壅盛组与其他组比较,血清中柠檬酸、丙氨酸、脂类、葡萄糖、肌酐等代谢产物具有明显差异性。

1.4 肺癌与大肠癌湿证的代谢组学研究 在肺癌湿证的研究中,采集的样本为呼出气冷凝液,使用的技术为GC/MS代谢组学技术,而大肠癌病采集的样本为血清和尿液,均发现某些差异性的代谢产物。尤寅骏^[16]应用GC/MS代谢组学技术的方法分析21例肺癌痰湿蕴肺证患者呼出气冷凝液代谢产物,发现痰湿蕴肺组代谢产物中柏木脑、1-丙烯、3-(2-环戊烯基)-2-甲基-1,1-联二苯、2,3-二氢-1,1,3-三甲基-3-苯基-1H-茛等化合物存在显著性差异。蒋鑫超^[17]用GC/MS代谢组学技术研究大肠癌患者的血液和尿液,结果发现脾虚湿郁证患者血浆中甘氨酸、L-丝氨酸、胆碱、精氨酸、柠檬酸及尿液中丙氨酸、柠檬酸、苯乙酰基谷氨酰胺与其他两组比较有显著差异。

1.5 代谢类疾病湿证的代谢组学研究 在代谢综合征湿证及糖尿病湿证的研究中,涉及到了对实验动物模型的研究,采集样本有血浆和尿液,观察到某些内源性差异代谢产物可以作为中医湿证的标志物。冯伟峰^[18]应用H-NMR代谢组学技术研究39例代谢综合征患者,发现各证型代谢轮廓图存在差别,痰湿内蕴证组血浆中的乙醇、乙酸、胆碱、柠檬酸等升高较为明显。杨宇峰等^[19]对6只成功造模的气滞湿阻证代谢综合征大鼠运用代谢组学技术检测血浆样本中的小分子代谢产物,发现气滞湿阻证大鼠血浆中的 β -羟丁酸、乙酰乙酸、丙酮酸等代谢物具有明显的差异。潘秋^[20]采用代谢组学技术研究89只成功造模的2型糖尿病大鼠尿液的代谢产物,发现属于痰湿证组的大鼠尿液中二羟基苯甲酸、戊二酸、L-抗坏血酸、D-葡萄糖酸、十八烷酸的含量较造模前明显增高,差异有统计学意义。

1.6 其他疾病湿证的代谢组学研究 在中医学其他疾病湿证中也有所研究,如李修阳^[21]应用H-NMR代谢组学方法研究多囊卵巢综合征痰湿证患者的血清代谢物的差异,发现痰湿证患者与健康人比较,血清中1-甲基组氨酸、柠檬酸、乙醇、甘油磷酸胆碱、乳酸等物质含量具有差异性;与非痰湿证患者比较,乙醇、甘油磷酸胆碱、低密度脂蛋白L1、 α -葡萄糖、乙酰乙酸等存在差异性。赵铁等^[22]对30例强直性脊柱炎(AS)湿热证、29例痛风性关节炎(GA)湿热证患者进行的代谢组学研究发现:血清中 α -羟基丁酸、磷酸和甘露糖、乙醇胺是风湿性疾病湿热证的共性代谢物。钱鹏^[23]应用GC/MS代谢组学技术研究慢性肾功能衰竭患者的尿液样本,发现湿证组与非湿证组有2个差异性峰,差异性代谢产物为3,4-二羟基丁酸和4-甲基-4-羟基-2-戊酮等。

2 差异代谢物比较

对于中医学而言,湿证是中医学所特有的名词。湿是自然界六气风、寒、暑、湿、燥、火中的一类,它是自然界的正常的六气之一,不可或缺^[24];但当湿气过盛,它就变成了致病之邪气,而湿邪所导致的人体产生的一系列症状就称之为湿证。湿性重浊而黏滞,这决定了湿证病程缓慢、顽固,不易治愈。中医学的湿无外乎内湿和外湿,外湿多因外界之湿邪从肌表而入所致,陆渊雷就认为外湿是空气中水蒸气饱和,以至于汗液不能蒸发而致;而内湿则由于脾失健运,水湿停聚所形成的病理状态^[25]。病机十九条中又有:“诸湿肿满皆属于脾”,脾是运化水湿的主要脏腑,喜燥而恶湿,而湿邪外感,常先困脾,可见湿与脾胃息息相关^[26];要深入的研究湿证,应该以整体论为中心,弄清“湿”的本质,应综合运用系统生物学技术等多种技术方法对湿证进行深入探讨^[27]。

纵观以上文献,可以看出代谢组学在中医湿证研究中,对脾胃病、肝病及高血压病的研究较多,还涉及到肝癌、肺癌及大肠癌,对其他疾病的研究较少;研究的样本主要是血液和尿液;研究方法有GC/MS、液相色谱-质谱联用(LC/MS)、核磁共振;主要中医湿证类型为寒湿证、痰湿证及湿热证,研究所观察到的差异性代谢物可以为中医湿证的微观辨证提供一定的客观指标及实验依据。笔者对文献中的差异代谢物进行比较和分析,具体如下。

2.1 异病同证

2.1.1 湿热证 在脾胃病(慢性胃炎、消化性溃疡)、肝病(肝衰竭、肝炎、肝豆状核变性)、风湿性疾病(强直性脊柱炎、痛风性关节炎)湿热证的研究中,未

找到共有的差异性代谢产物;虽然没有所有疾病共有的差异代谢物,但个别疾病间存在相同的血液差异代谢物,不存在相同的尿液差异代谢物。血液代谢组学:(1)黄蕾^[10]发现氨基酸类、胆汁酸类、肉毒碱类、溶血卵磷脂类是肝衰竭和乙型肝炎湿热证患者血液中共有差异代谢物;(2)赵铁等^[22]发现 α -羟基丁酸、磷酸、甘露糖、乙醇胺是强直性脊柱炎和痛风性关节炎湿热证患者血液中共有差异性代谢物;Gall WE 等^[28]称引起血清 α -羟基丁酸升高的原因主要是氧化应激导致肝谷胱甘肽合成增加,进而引起代谢通路上 α -酮丁酸产物升高以及脂质氧化导致的 α -酮丁酸向 α -羟基丁酸转化增加。

2.1.2 痰湿证 所有疾病痰湿证无共有的差异代谢物,个别疾病痰湿证间存在相同血液差异代谢物,不存在相同的尿液差异代谢物。血液代谢组学:(1)高晓丽^[15]研究高血压痰湿证血液代谢组学、蒋鑫超^[17]研究大肠癌痰湿证血液代谢组学、冯伟峰^[18]研究代谢综合征痰湿证血液代谢组学、李修阳^[21]研究多囊卵巢综合征痰湿证血液代谢组学的结果中找到 1 个共有差异代谢物为柠檬酸;此外,在冯伟峰^[18]与李修阳^[21]的研究结果中还存在 2 个相同的差异代谢物为柠檬酸、乙醇。柠檬酸是三羧酸循环的中间代谢物,而三羧酸循环又是糖类、脂类、氨基酸类有氧代谢的主要途径,血液中柠檬酸含量的升高表明三羧酸代谢的增强^[29]。(2)董海琪^[13]研究高血压痰湿证患者血液代谢组学与冯伟峰^[18]研究代谢综合征痰湿证患者血液代谢组学共有 1 个相同差异代谢物为低密度脂蛋白。(3)刘雅荣^[12]研究肝癌脾虚痰湿证患者血液代谢组学与蒋鑫超^[17]研究大肠癌脾虚痰湿证患者血液代谢组学共有 3 个相同的差异代谢物,分别为甘氨酸、胆碱、缬氨酸;有资料表明胆碱是机体必需的营养物质,是细胞膜卵磷脂和鞘磷脂的重要组成部分,是体内合成乙酰胆碱的前体物质和重要的甲基来源^[30]。

2.2 同病同证 关于同一疾病的相同证候研究,主要集中在肝衰竭的湿热证及高血压痰湿壅盛证,均找到相同的血液代谢差异物,唯有在慢性胃炎湿热证中找到共同的尿液代谢差异物。(1)肝衰竭湿热证血液代谢组学:朱洁^[9]与黄蕾^[10]关于肝衰竭湿热证患者血液代谢组学研究中存在 2 个相同差异代谢物,分别为溶血卵磷脂类和肉毒碱类。(2)慢性胃炎脾胃湿热证尿液代谢组学:王亮^[3]与施旭光等^[5]关于慢性胃炎脾胃湿热证患者尿液代谢组学的研究中存在 3 个相同的差异代谢物,分别为肌酐、马尿酸、柠檬酸。(3)高血压痰湿壅盛证血液代谢组学:①在高血压痰湿壅

盛证患者血液代谢组学的研究中,高晓丽^[15]与董海琪^[13]发现的结果中存在 3 个相同的差异代谢物,分别为葡萄糖、谷氨酸、肌酐;②高晓丽^[15]与朱海鹏^[14]关于高血压痰湿壅盛证患者血液代谢组学研究存在 1 个相同差异代谢物为尿酸。其中葡萄糖、乳酸与糖代谢相关,丙氨酸与谷氨酸与蛋白质代谢有关^[5],肌酐是肌酸代谢的最终产物,能反映肾小球滤过功能及肾功能^[31]。

3 展望 虽然代谢组学在中医学湿证的研究中已经取得了某些进展,但仍然存在几个关键的问题:(1)目前湿证的代谢组学研究尚处于基础阶段,研究得到的结果大多还是“可能”与湿证的形成有关,并不十分明确,尚不能全面、客观、真实地反应湿证的生物学基础;(2)文献报道中使用的分析技术单一,高岗^[32]在进行肾虚证代谢组学研究中,分别利用 NMR、LC-MS、LC-TOF/MS 和 GC-MS 分析技术研究大鼠尿液和血浆,发现不同分析方法找到的标记物不同,单一分析技术研究只能找到部分化学和生物信息,而复杂的生物体液需要多种分析技术相结合来进行研究;(3)代谢组学研究易受饮食、环境、体质、年龄、某些能够影响代谢物的疾病等因素的影响,难以保证结果的可重复性,并且湿证的轻重程度不同,某些可能的差异性代谢产物就不明显;(4)在同一疾病同一湿证的代谢组学研究中,得到的差异代谢产物不尽相同,并且得到的差异性代谢产物未进行验证,不能明确是湿证发生的诱因还是结果;(5)研究样本偏少,样本越多研究得到的结果会越准确可信。

为了更好克服以上问题,笔者认为可以采取以下对策^[4,32-34]:(1)可以采取 NMR、LC-MS、GC-MS 多个分析技术相结合来进行单一疾病湿证的代谢组学研究,把研究得到的重要差异代谢物进行反复验证,将“可能”逐渐转化为“确定”;(2)处于大数据时代的今天,在对中医学湿证的代谢组学研究,更需要重视多样本的积累和分析,得出的结论才会更加具有可信度;(3)进行“接力”研究,对在湿证代谢组学研究中取得的有重大意义的公关内容不断进行深入探讨,必将取得新层次的进展;(4)进行追踪分析,把湿证分为轻、中、重度进行分别研究,并且把饮食、体质等可能受影响因素纳入考虑范围。

中医学湿证的生物学基础研究是一项艰巨而又十分有意义的工作,需要广泛吸取多学科知识并采用先进的实验技术手段,对其进行多视角、全方位的综合研究,唯有如此才有可能对中医湿证的内涵和外延做出科学界定,相信未来这两个复杂系统的相互交叉融合

必将成为可能,代谢组学的发展将会更好的推动中医湿证本质的客观化研究。

参 考 文 献

- [1] 任健主编. 濒湖脉学白话解[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 149.
- [2] 杜武勋, 朱明丹, 姜民, 等. 中医证候及证候物质基础研究的思考[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(8): 1497-1499.
- [3] 王亮. 基于代谢组学“慢性萎缩性胃炎脾胃湿热证”生物学基础的临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [4] 熊绍权, 林丽珠, 龙奇达. 中医药系统生物学研究现状评析[J]. 中医杂志, 2010, 51(5): 392-394.
- [5] 施旭光, 皱忠杰, 吴美音. 慢性浅表性胃炎脾虚与脾胃湿热证患者尿液 H-NMR 的代谢组学研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(12): 1427-1432.
- [6] 颜凤蛟. 慢性胃病气虚血瘀证、气滞证、湿热证的代谢组学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [7] 沈华娟. 消化性溃疡气虚血瘀证与气滞证及湿热证代谢组学的差异性研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [8] 童宁宁. 慢性胃炎湿热蕴脾证代谢组学的初步研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
- [9] 朱洁. 基于代谢组学的慢加急(亚急)性乙肝肝衰竭湿热证的证候研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2013.
- [10] 黄蕾. 慢加急(亚急)性乙型肝炎肝衰竭湿热证与慢性乙型肝炎湿热证代谢组学比较研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014.
- [11] 杨秋水. 肝豆状核变性的中医辨证分型及其代谢组学研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.
- [12] 刘雅荣. 基于核磁共振的脾虚湿盛证肝癌患者血浆代谢组学研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(2): 296-301.
- [13] 董海琪. 高血压病痰湿壅盛证现代科学内涵的代谢组学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [14] 朱海鹏. 高血压病阴虚阳亢证与痰湿壅盛证代谢组学内涵比较研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [15] 高晓丽. 中青年高血压病痰湿壅盛证患者血清样品的核磁共振谱代谢组学研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2015.
- [16] 尤寅骏. 肺癌痰湿蕴肺证、气阴两虚证患者呼出气冷凝液的代谢组学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2011.
- [17] 蒋鑫超. 基于代谢组学的方法对脾虚湿郁证大肠癌生物标志物的探讨[D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [18] 冯伟峰. 基于代谢组学对代谢综合征特征代谢物及其中医证型的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- [19] 杨宇峰, 腾飞. 气滞湿阻证代谢综合征大鼠血液代谢组学研究[J]. 时珍国医药, 2014, 25(12): 3075-3076.
- [20] 潘秋. 从表征和尿液代谢组学角度判别 2 型糖尿病大鼠中医证候属性的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [21] 李修阳. 基于代谢组学的多囊卵巢综合征痰湿证生物标志物筛选[D]. 山东: 山东中医药大学, 2014.
- [22] 赵铁, 殷婷婷, 张英泽, 等. 基于代谢组学的强直性脊柱炎和痛风性关节炎湿热证共性特征研究[J]. 中医杂志, 2013, 54(7): 592-596.
- [23] 钱鹏. 慢性肾功能衰竭中医湿证代谢组学研究[A]. 全国第十一届中医诊断学术年会论文集[C]. 北京: 中华中医药学会, 2010: 254-268.
- [24] 印会河. 中医基础理论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 93-96.
- [25] 陆渊雷主编. 金匮要略今释[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 23.
- [26] 王庆其. 内经选读[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 112.
- [27] 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, 31(2): 252-255.
- [28] Gall WE, Beebe K, Lawton KA, et al. Alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population [J]. PLoS One, 2010, 5(5): 10883.
- [29] 李英帅, 王琦, 袁卓珺. 阳虚体质者血清和尿液的核磁共振代谢组学[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(11): 2521-2527.
- [30] 潘志远. 胆碱和阿司匹林协同抗炎作用及其药理学机制的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
- [31] 罗敏琪, 吴帆, 黄建林, 等. 中国南方地区正常人群血清肌酐水平的变化其临床意义[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(9): 1843-1844, 1847.
- [32] 高岗. 肾虚证代谢组学及六味地黄汤的干预研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [33] 洪静, 李福凤, 王忆勤. 代谢组学在中医证候本质研究中的应用概况[J]. 中华中医药学刊, 2012, 33(1): 149-151.
- [34] 高扬, 张安晶, 胡元会. 代谢组学在中医证候研究中的应用进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(6): 710-712, 716.

(收稿: 2016-09-26 在线: 2017-12-22)

责任编辑: 白霞