

代谢组学在慢性心力衰竭中医证候研究中的应用及展望

张蕾¹ 张玉慧² 李小茜¹ 何建成¹

¹上海中医药大学, 201203; ²上海市儿童医院, 200062

通信作者: 何建成, Email: hejc8163@163.com

【摘要】 慢性心力衰竭 (CHF) 具有病死率高的特点, 早期防治有重要的临床意义。中医药对于 CHF 的治疗独具特色, 辨证证候是发挥其疗效的关键, 而证候的生物学基础亟待深入探讨。整体性、动态性、即时性是代谢组学的特点, 其与中医学的整体观、恒动观和“司外揣内”“见微知著”的思维模式相一致。在中医证候的研究中引入代谢组学, 将为揭示中医证候生物学基础及客观化、标准化提供依据。现就代谢组学在 CHF 证候研究中的文献进行总结分析, 旨在明确现阶段的研究成果, 并分析其不足, 为以后进一步的研究提供参考依据。

【关键词】 慢性心力衰竭; 证候; 代谢组学; 研究进展

基金项目: 国家自然科学基金 (81803996)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.02.034

Application and prospect of metabolomics in traditional Chinese medicine syndrome research of chronic heart failure Zhang Lei¹, Zhang Yuhui², Li Xiaoqian¹, He Jiancheng¹

¹Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; ²Children's Hospital of Shanghai, Shanghai 200062, China

Corresponding author: He Jiancheng, Email: hejc8163@163.com

【Abstract】 Chronic heart failure (CHF) is characterized by high fatality rate, and early prevention and treatment have major clinical significance. Traditional Chinese medicine (TCM) is unique in the treatment of this disease, the differentiation of syndrome is the key to exert its curative effect, and the biological basis of syndrome needs to be revealed in depth. Metabolomics has the characteristics of holism, dynamics and immediacy, which is consistent with the holistic view, constant movement view of TCM, and the thinking mode of "taking care of the outside and the inside" and "seeing the small and knowing the profound". The application of metabolomics in the study of TCM syndrome will provide a basis for revealing the biological basis, objectification and standardization of TCM syndrome. This paper summarizes and analyzes the existing literatures on metabolomics in CHF syndrome study, aiming to clarify the current research achievements and analyze their deficiencies, so as to provide reference basis for the future research.

【Key words】 Chronic heart failure; Syndrome; Metabolomics; Research progress

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81803996)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.02.034

慢性心力衰竭 (CHF) 是一种复杂的临床综合征, 常见于多种心脏疾病的终末阶段, 其临床发病率与致死率逐年增加, 对患者的生活质量和健康造成了极大影响。如何有效防治 CHF 已成为医药领域研究的热点与难点。中医药治疗 CHF 独具特色, 而辨证证候是发挥其疗效的关键。代谢组学是系统生物学的重要组成部分, 具有整体性、动态性、即时性的特点, 与中医学整体观、恒动观和“司外揣内”“见微知著”的思维模式相一致。近年来, 基于代谢组学的原理、方法和技术, 开展了诸多关于中医证候的研究, 取得了丰硕的成果, 对进一步揭示证候的内在物质基础起到了推动作用, 对证候的客观化、标准化发展提供了依据。现就代谢组学在 CHF 证候研究中的文献进行总结分析, 旨在明确现阶段的研究成果, 并分析其不足, 为进一步研究提供参考依据。

1 代谢组学与中医证候

代谢组学这一概念由英国皇家理工大学 Nicholson 教授^[1]于 1999 年首次提出, 需要通过检测生物体受刺激或干扰后 (如基因变异或环境变化) 的代谢产物变化或随时间的变化趋势, 以此来研究生物体系的代谢途径。代谢组学可用于临床疾病的早期诊断、药物作用机制的研究、筛选和开发新药、进行药物安全性评价、鉴别和确证动物模型等多个领

域。代谢组学常用的研究方法包括核磁共振 (NMR) 技术、质谱 (MS) 技术、液相色谱 - 质谱联用 (LC-MS) 技术、气相色谱 - 质谱联用 (GC-MS) 技术、高效液相色谱法 (HPLC) 等。NMR 具有高选择性、样本量小及对样品无破坏性等优点, 应用较为广泛, 但其敏感度较弱, 不适用于检测低浓度代谢物。LC-MS 具有普适性、高灵敏度和特异度的特点, 可实现对多个化合物的同时快速分析与鉴定, 是首选的代谢组学研究技术。迄今为止, 代谢组学已广泛应用于 CHF 病理生理学机制的解释及诊疗中。Zheng 等^[2]联合应用 GC-MS 和 LC-MS 发现了 16 种血清代谢物与 CHF 相关。Kang 等^[3]采集 CHF 患者的尿液, 应用核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 技术分析其代谢产物, 并与健康人尿液进行对比, 结果表明, CHF 患者尿液中醋酸盐、丙酮、甲基丙二酸、胞嘧啶、苯乙尿酸含量升高, 而甲基烟酰胺含量下降。研究表明, 中医药在治疗 CHF 中取得了满意疗效, 在缓解临床症状、降低西药毒性及改善患者生活质量等方面显示出积极作用^[4-8]。辨证论治是中医药取得良好疗效的关键, 证候内在物质基础为中医证候客观化研究的重点^[9]。但由于证候具有复杂性的特征, 影响因素较多, 目前的研究尚不能完全揭示其内在物质。“证”是对机体在疾病发展过程中某一阶段的病理概括, 包括病

位、病因、病性及邪正关系等,反映出病变发展过程中某一阶段病理变化的本质,即所谓“视其外应,以知其内脏,则知所病矣”“有诸内必形诸外”。机体受内外因素的影响,不同观察时间、角度、方法、环境有不同的证候表现。证候随时空的变迁而演化,具有多因素、多层次、整体性、动态性的特点。基于代谢组学可对人体进行系统研究,关注人体代谢产物在受到外源性因素影响后的变化规律和特征,进行代谢产物谱分析,找出特异的标志性代谢产物,从而进一步阐释人体生命活动的本质。经代谢组学观察机体中产生代谢物的变化发现疾病诊断的相关生物标志物。因此,代谢组学能客观反映机体的整体变化,与中医学的整体观不谋而合。在中医证候的研究中引入代谢组学,可为证候客观化、标准化提供参考依据。

2 代谢组学在 CHF 中医证候研究中的应用

2.1 代谢组学与 CHF 中医证候临床研究:张少强等^[10]收集 CHF 患者急性期 10 例(寒瘀水结证 5 例,热瘀水结证 5 例)、缓解期 10 例(气阴两虚、瘀血内阻证 5 例,气阴两虚、瘀血内阻证 5 例),10 例健康人作为健康对照,结果显示,与健康对照组比较,CHF 患者丙氨酸和组胺代谢水平明显升高,而 2-羟基丙三羧酸的代谢水平明显降低。王娟等^[11]对 CHF 血瘀证患者进行研究发现,血瘀证患者血浆中甘氨酸、缬氨酸和组氨酸等水平下降,乳酸、丙氨酸等代谢产物升高。王鹏军等^[12]研究发现,与气虚血瘀证相比,CHF 阳虚水停证患者 3 种肉碱类和 2 种脂肪酸类物质含量升高,3 种溶血磷脂酰胆碱类物质含量降低。表明 CHF 不同证型具有不同的代谢模式。吴晓新等^[13]运用反相 HPLC(RP-HPLC)的方法对 CHF 心阳虚证进行研究发现,患者血浆中苯丙氨酸水平与心阳虚证候积分呈正相关。郑海生等^[14]应用 GC-MS 研究发现,CHF 肾阳虚证、非肾阳虚证患者与健康人的尿液具有不同的代谢模式。郑海生等^[15]进一步的研究显示,CHF 肾阳虚证、气阴两虚证患者有 21 种内源性化合物含量与健康人明显不同;CHF 肾阳虚证有 16 种内源性化合物含量与气阴两虚证明显不同。刘玲玲等^[16]应用 LC-MS 分别对 CHF 患者(气虚血瘀证、阳虚水停证)和健康人尿液中的成分进行代谢组学分析,用主成分分析(PCA)及偏最小二乘判别分析法(PLS-DA)进行对比鉴别发现,CHF 患者与健康人之间存在 12 个不同的潜在生物标志物;气虚血瘀证和阳虚水停证相比有 6 个不同的潜在标志物。

2.2 代谢组学与 CHF 中医证候实验研究:钟森杰等^[17]运用 GC-MS 及多元统计分析对 CHF 大鼠模型组(心气阴两虚证)和正常大鼠血浆样本进行模式识别和差异代谢物的筛选,通过 PCA 及 PLS-DA 分析发现,两组大鼠代谢产物明显不同。李琪琳等^[18]利用 ¹H-NMR 检测 CHF 大鼠模型组(心气虚证)与假手术组的尿液,通过 PCA 及 PLS-DA 分析发现,与假手术比较,模型组丙酮、乙酸、3-羟基丁酸等物质含量增多,谷氨酰胺、牛磺酸、肌肝等含量减少。

3 展望

综上所述,CHF 发病过程伴随着糖、氨基酸、脂质、能量代谢的紊乱,CHF 证候不同,其代谢产物也不同,是研究

CHF 证候客观化的基础。近年来将代谢组学应用于中医证候的研究虽取得了一定成果,但仍存在一些不足,总结如下。

3.1 中医证候名称不规范:基于上述文献发现,不同文献对 CHF 的证候分型不尽相同,尽管为同一证型,其证候名称也未能统一,这就导致其同类或相关研究出现差异,无法进行对比,而单一某项研究又无法说明问题,造成研究的可重复性较差,其结果不具有说服力。建议采用国家通行的规范标准,如《中药新药临床研究指导原则》。

3.2 采集的样本较为单一:上述研究基本都采集一种体液样本,如血液或尿液,未见多种体液的联合应用。目前多用于代谢组学分析的样本有血浆或血清、尿液、唾液等生物体液及组织、细胞提取物等。血液和尿液是最常用于人类代谢组学研究的样本,因为血液和尿液在疾病状态下代谢物浓度的变化要早于基因和蛋白质^[19]。但由于血液样本的采集属于有创操作,具有血源性感染风险,患者配合度较低;尿液的采集虽然十分简便和快速,但其结果易受到多种因素的影响,尤其是在尿液处理过程中,操作不慎会引起测量值偏差。唾液具有易采集且无损伤的特点,其成分复杂,具有多种生物学功能,含有独特、丰富的蛋白质成分及一系列代谢产物,是潜在的心血管疾病理想的生物学标志物。国外诸多研究证实了唾液可用于 CHF 的诊断^[20-22],而我国该领域的研究尚处于初步阶段,仍有很大的发展空间。Foo 等^[23]研究发现,CHF 患者唾液中 N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP)的表达高于健康人;Denver 等^[24]研究发现,CHF 患者唾液中内皮素细胞水平是健康人的 2~6 倍。中医学认为,舌苔是散布在舌体表面的一层苔垢物,可通过观察舌苔辨明病邪性质、病位深浅、邪正盛衰,并指导临证用药。随着现代生物技术的发展,对舌苔的代谢组学研究逐年增多,多涉及慢性肾衰竭、慢性胃炎^[25-26]等疾病,尚未见其应用于 CHF 的研究。中医学认为“心开窍于舌”“舌者心之官,故心气通于舌”,说明舌在一定程度上可反映心的气血阴阳变化。本课题组前期通过对舌苔液的蛋白芯片检测发现,CHF 气虚血瘀证、气阴两虚证与健康人相比有各自差异表达的蛋白种类;且同一证候患者血清与舌苔液中相关蛋白含量的变化趋势基本一致^[27]。我们认为,不同的舌苔液蛋白表达水平变化也可能正是不同中医证候内在生物学信息的反映。后续研究可将舌苔液作为研究 CHF 证候代谢组学的样本,既采集方便且无创,又具中医特色,更能反映证候的内在物质基础。

3.3 转变证候研究的思维方式:上述文献研究均以 CHF 不同证候类型与健康人进行鉴别得出代谢组学特征。但中医的“证”不仅包括一定的生理活动和病理状态,还是疾病过程中某一阶段的病理学概括。同一种疾病在不同阶段可出现不同的证,而同一种证又可见于不同的疾病过程中,即所谓的同病异证与异病同证。因此,对于 CHF 证候的研究,必须关注其证候的动态变化,才能更全面地揭示证候的内在物质基础。建议采集同一患者不同时期的同一体液样本,如采集阳虚水泛证患者 7、14、28 d 的血液标本进行横向的动态观察;同时采集如血液、尿液、舌苔液等多种样本,又可进行纵向的对比。

3.4 改进和联合应用多种代谢组学检测技术和数据分析方法:近年来,由于代谢组学多使用无创方法寻找疾病的生物标志物,对检测技术和方法提出了新的要求。由于代谢产物种类繁多,成分复杂,故需要借助高效、高灵敏度、高精度分析技术和先进的数据分析方法,常用的有偏最小二乘法(PLS)、PLS-DA、正交偏最小二乘法(O-PLS)、人工神经网络(ANN)等。因此,改进和联合应用多种代谢组学检测技术和数据分析方法,才可取得更为全面的研究结果。代谢组学是一种系统性的生物学研究方法,但局限于现今科学技术和手段尚未成熟、相关影响因素繁杂、代谢产物众多,因此实验结果存在一定程度的误差,故当前的问题是保证实验结果的准确和增加实验次数,以筛选出与 CHF 证候相关代谢通路的关键代谢产物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29 (11): 1181-1189. DOI: 10.1080/004982599238047.

[2] Zheng Y, Yu B, Alexander D, et al. Associations between metabolomic compounds and incident heart failure among African Americans: the ARIC Study [J]. *Am J Epidemiol*, 2013, 178 (4): 534-542. DOI: 10.1093/aje/kwt004.

[3] Kang SM, Park JC, Shin MJ, et al. ¹H nuclear magnetic resonance based metabolic urinary profiling of patients with ischemic heart failure [J]. *Clin Biochem*, 2011, 44 (4): 293-299. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.11.010.

[4] Li X, Zhang J, Huang J, et al. A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of the effects of qili qiangxin capsules in patients with chronic heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62 (12): 1065-1072. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.05.035.

[5] Xian S, Yang Z, Lee J, et al. A randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled clinical study on the efficacy and safety of Shenmai injection in patients with chronic heart failure [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186: 136-142. DOI: 10.1016/j.jep.2016.03.066.

[6] Fu S, Zhang J, Menniti-Ippolito F, et al. Huangqi injection (a traditional Chinese patent medicine) for chronic heart failure: a systematic review [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (5): e19604. DOI: 10.1371/journal.pone.0019604.

[7] 王永霞,毋领娟,李彬,等. 中医药治疗慢性心力衰竭系统评价现状分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32 (2): 687-689. DOI: CNKI:SUN:BXYY.0.2017-02-077.

Wang YX, Wu LJ, Li B, et al. Current status analysis on systematic review of traditional Chinese medicine in treating chronic heart failure [J]. *CJTCMP*, 2017, 32 (2): 687-689. DOI: CNKI:SUN:BXYY.0.2017-02-077.

[8] 陈婷,祝小芬,常征利,等. 仲景温阳法辨证论治慢性心力衰竭的临床研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2018, 25 (5): 476-479. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.05.007.

Chen T, Zhu XF, Chang ZL, et al. Clinical research of patients with chronic heart failure treated according to syndrome differentiation and Zhongjing's warming yang method [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2018, 25 (5): 476-479. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.05.007.

[9] 贾运滨,魏江磊. 中医证候客观化临床研究进展 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17 (3): 187-189. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.026.

Jia YH, Wei JL. Clinical research progress in objectification of traditional Chinese medicine syndromes [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2010, 17 (3): 187-189. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.026.

[10] 张少强,鞠静,朱明丹,等. 慢性心力衰竭不同证型的代谢组学研究 [J]. *时珍国医国药*, 2019, 30 (2): 507-509. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.02.088.

Zhang SQ, Ju J, Zhu MD, et al. Metabolomics of different syndromes of chronic heart failure [J]. *Lishizhen Med Mater Res*, 2019, 30 (2): 507-509. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.02.088.

[11] 王娟,赵慧辉,陈建新,等. 慢性心力衰竭血瘀证患者血浆代谢物研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39 (2): 101-105. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2016.02.003.

Wang J, Zhao HH, Chen JX, et al. Research on plasma metabolites of chronic heart failure patients with blood stasis pattern [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2016, 39 (2): 101-105. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2016.02.003.

[12] 王鹏军,孙明谦,苗阳,等. 缺血性心力衰竭气虚血瘀证和阳

虚水停证的代谢组学研究 [J]. *世界中医药*, 2013, 8 (12): 1393-1396. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.004.

Wang PJ, Sun MQ, Miao Y, et al. Metabolomics-based study on ischemia heart failure with syndrome of blood stasis caused by qi deficiency and syndrome of fluid accumulation caused by yang deficiency [J]. *World Chin Med*, 2013, 8 (12): 1393-1396. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.004.

[13] 吴晓新,曾瑞峰,梁国荣,等. 基于 28 例心衰心阳虚证患者的证候积分与苯丙氨酸代谢指纹图谱的相关性研究 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25 (3): 762-763. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2014.03.109.

Wu XX, Zeng RF, Liang GR, et al. Based on the syndrome score of 28 patients with heart failure and heart Yang deficiency syndrome Correlation with phenylalanine metabolism fingerprint [J]. *Lishizhen Med Mater Res*, 2014, 25 (3): 762-763. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2014.03.109.

[14] 郑海生,蒋健,贾伟,等. 慢性心力衰竭肾阳虚证患者代谢组学研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25 (2): 198-201.

Zheng HS, Jiang J, Jia W, et al. Research on metabolomics in chronic heart failure with kidney-yang deficiency [J]. *CJTCMP*, 2010, 25 (2): 198-201.

[15] 郑海生,蒋健. 基于代谢组学慢性心力衰竭肾阳虚证代谢模式的研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23 (5): 645-647, 695.

Zheng HS, Jiang J, et al. Kidney-yang deficiency metabolic mode research in chronic heart failure based on metabolomics [J]. *J Basic Chin Med*, 2017, 23 (5): 645-647, 695.

[16] 刘玲玲. 慢性心力衰竭气虚血瘀证和阳虚水停证的尿液代谢组学研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.

Liu LL. The study of urine metabolomics features of ischemic heart failure which divided into syndrome of blood stasis caused by Qi deficiency and syndrome of accumulation of fluid caused by Yang deficiency [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2014.

[17] 钟森杰,李欣春,李杰,等. 心气阴两虚证心力衰竭大鼠血浆代谢组学研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38 (9): 981-985.

Zhong SJ, Li XC, Li J, et al. Plasma metabolomics of rats with heart failure with heart-qi yin deficiency syndrome [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2018, 38 (9): 981-985.

[18] 李琪琳,张安晶,吴华芹,等. 基于 ¹H-NMR 技术研究心气虚证心力衰竭模型大鼠尿液代谢组学变化 [J]. *北京中医药*, 2013, 32 (12): 939-943.

Li QL, Zhang AJ, Wu HQ, et al. Research of urine metabolomics changes in heart failure rats with syndrome of heart-qi deficiency based on ¹H-NMR method [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2013, 32 (12): 939-943.

[19] Emwas AH, Luchinat C, Turano P, et al. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review [J]. *Metabolomics*, 2015, 11 (4): 872-894. DOI: 10.1007/s11306-014-0746-7.

[20] Zhang X, Walsh T, Atherton JJ, et al. Identification and validation of a salivary protein panel to detect heart failure early [J]. *Theranostics*, 2017, 7 (18): 4350-4358. DOI: 10.7150/thno.21727.

[21] Joharimoghadam A, Tajdini M, Bozorgi A. Salivary B-type natriuretic peptide: a new method for heart failure diagnosis and follow-up [J]. *Kardiol Pol*, 2017, 75 (1): 71-77. DOI: 10.5603/KP.a2016.0097.

[22] Zhang X, Schulz BL, Punyadeera C. The current status of heart failure diagnostic biomarkers [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16 (4): 487-500. DOI: 10.1586/14737159.2016.1144474.

[23] Foo JY, Wan Y, Kostner K, et al. NT-ProBNP levels in saliva and its clinical relevance to heart failure [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (10): e48452. DOI: 10.1371/journal.pone.0048452.

[24] Denver R, Tzanidis A, Martin P, et al. Salivary endothelin concentrations in the assessment of chronic heart failure [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9202): 468-469. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)82019-X.

[25] Liu X, Sun ZM, Liu YN, et al. The Metabonomics studies of tongue coating in H pylori positive chronic gastritis patients [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 804085. DOI: 10.1155/2015/804085.

[26] 李福凤,赵洁,钱鹏,等. 慢性胃炎患者腻苔的代谢指纹图谱研究 [J]. *中西医结合学报*, 2012, 10 (7): 765-757. DOI: 10.3736/jcim20120706.

Li FF, Zhao J, Qian P, et al. Metabolite changes in the greasy tongue coating of patients with chronic gastritis [J]. *J Chin Integr Med*, 2012, 10 (7): 765-757. DOI: 10.3736/jcim20120706.

[27] 李小茜,何建成,曹雪滨,等. 充血性心力衰竭常见中医证候物质基础初探 [C]// 中国中西医结合学会. 中国中西医结合学会诊断专业委员会第十次全国学术会议论文集, 秦皇岛, 2016. 北京: 中国中西医结合学会, 2016: 311-321.

Li XQ, He JC, Cao XB, et al. A preliminary study on the material basis of common TCM syndromes in congestive heart failure [C]// Chinese Society of Integrated Traditional and Western Medicine. Proceedings of the 10th national academic conference of diagnostic committee of Chinese society of integrated traditional and western medicine, Qinhuangdao, 2016. Beijing: Chinese Society of Integrated Traditional and Western Medicine, 2016: 311-321.

(收稿日期: 2019-09-27)