

文章编号: 1004-0374(2010)08-0761-11

代谢组学在临床研究中的应用及进展

曹 蓓, 阿基业*, 王广基*, 郑 天, 刘林生, 李梦婕, 石 建, 王新文, 赵春艳
(中国药科大学药代动力学重点实验室, 南京 210009)

摘 要: 代谢组学是“后基因组学”时期新兴的一门学科, 也是系统生物学的重要组成部分。代谢组学通过全面、定量检测生物样本中多种类型小分子化合物, 来了解在内在和外界因素作用下生物体内源性物质的变化及规律, 特别适合于临床上研究机体因受到遗传、生长、生理、环境因素和异物、病源等刺激的影响而产生的变化。借助于代谢组学技术不仅能够描述疾病发生、发展以及治疗过程中机体代谢机能的状态和变化, 为临床疾病的诊断、病理机制的探索、新治疗靶点的发现等提供新的途径和思路, 还可以揭示外界干扰因素(药物/毒物、环境、饮食、生活方式等)对机体的影响, 为药效评价和疾病病因的筛查提供基础数据。近年来, 代谢组学在临床研究方面得到了广泛的应用, 取得了巨大的进展并展现了鼓舞人心的应用前景。该文分别就代谢组学在描述疾病发展状态、研究疾病诊断方法、探索疾病发病原因和发病机理、药效学评价等几个方面的应用及进展进行回顾和综述。

关键词: 代谢组学; 心血管疾病; 癌症; 代谢综合征; 生物标记物

中图分类号: Q591; R969.1 **文献标识码:** A

The application of metabonomics to clinical research and the progress

CAO Bei, A Ji-ye*, WANG Guang-ji*, ZHENG Tian, LIU Lin-sheng,

LI Meng-jie, SHI Jian, WANG Xin-wen, ZHAO Chun-yan

(Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Metabonomics, a newly emerging “omics” science in postgenomics era, is an important part of system biology. By means of non-targeting quantitative determination of various low-molecular-weight metabolites in bio-specimen, it enables a better understanding of the metabolic variation in organisms when subject to internal and external stimuli. As the result, it is particularly suitable for characterizing the metabonomic alternation associated with various factors, such as genetics, growth, physiology, environment and stimuli of xenobiotics and pathogeny. Not only can metabonomics describe the state and alteration of organism's metabolic function during the development and treatment of diseases, providing a novel approach to diagnosing diseases, exploring into the pathologic mechanism, and even offering new therapeutic targets, but can also reveal metabonomic effect of outside factors such as drugs/toxins, environment, diets and lifestyles, and thus facilitates therapeutic evaluation of medicines and identifying etiology of diseases. In general, recently metabonomics has been widely employed in clinical research, achieves fruitful results and shows exciting perspective. This article reviews the progress of metabonomics applying to clinic research, including the description of disease state, development of diagnostic methods, exploration of etiology, pathogeny and pathology as well as assessment of pharmacodynamics.

Key words: metabonomics; cardiovascular disease; cancer; metabolic syndrome; biomarkers

收稿日期: 2009-11-26; 修回日期: 2010-04-09

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项“十一五”计划(2009ZX09304-001, 2009ZX09502-004); 国家自然科学基金项目(30630076); 江苏省科技支撑计划-社会发展项目(BE2008673); 国家科技支撑计划项目(2006BAI08B04)

*通讯作者: 王广基, E-mail: guangjiwang@hotmail.com; 阿基业, E-mail: jiyea@cpu.edu.cn

代谢组学是“后基因组学”时期一门新兴的学科,它同基因组学、转录组学、蛋白质组学共同构成了系统生物学的核心内容,是当今世界上生命科学研究最为活跃的领域之一。代谢组学与基因组学、转录组学、蛋白质组学之间有着紧密的联系:基因组学研究和描绘生物体的基因谱图;转录组学从RNA水平研究基因的表达情况;蛋白组学研究生物体在基因调控和环境双重作用下所表达的蛋白质种类和数量多少;而代谢组学研究生物体在基因调控、蛋白质影响和系统代谢综合作用下代谢组(即小分子化合物代谢物群)随生物体的生长、发育和对外界刺激(药物、病原、毒物、环境)等产生反应而导致的在数量或浓度水平上的变化。相比于其他组学技术(如基因组学与蛋白组学),代谢组学研究具有明显的研究优势:(1)生物体中的小分子化合物的组成比基因组、蛋白组相对简单,一般估计内源性小分子化合物数量大约数千种,而基因和蛋白数十至数百万种;(2)很多内源性小分子化合物的生化代谢网络已经弄清,而目前对基因、蛋白质功能的认识十分有限;(3)代谢组学反映的是各因素综合作用下的终末效应,是各个因素效应的综合体现,具有很强的综合信息优势。代谢组学可以作为其他组学研究(基因组学、蛋白组学)的有力补充;同时其自身独特的优势也奠定了它在整个生命科学研究中的重要地位,因而被广泛应用于多个领域。受益于现代分析技术的迅猛发展和生物信息学平台的不断完善,代谢组学在临床研究中得到了广泛应用并取得了令人瞩目的成果。例如,可以寻找与疾病密切相关的生物标记物(群)用于疾病的诊断,探索病因病机、研究药物作用机制以及寻找新药作用靶点等;可以从整体上把握内源性物质基础的调整或变化以对药效或临床治疗效果进行评价或对药物的安全性或毒性进行评价。近来,陆续有研究表明,代谢组学在个体化用药和公众医疗保健、疾病预测和防控等方面也有着重要的指导作用。

1 代谢组学简介

代谢组学是一门借助于现代生物分析方法(如NMR和MS)和生物信息分析策略(模式识别技术,如PCA和PLS-DA)系统研究生物样本(体液和组织提取液等)中代谢产物在不同生物状态下的变化规律,揭示机体生命活动代谢本质的科学。代谢组学与基因组学和蛋白组学之间紧密联系、相互补充,为揭示生命科学的奥秘提供了一个新的平台^[1-4]。

代谢组学的研究对象是“代谢组”(metabolome),即某一生物、系统或细胞中所有代谢产物的集合,可分为基础代谢组(受宿主基因组调控)和共代谢组(取决于体内共生的微生物)^[2]。构成代谢组的小分子化合物的种类和数量繁多、理化性质悬殊、浓度差异巨大,还存在时空分布的差异性和复杂的相互作用,因此对检测技术提出了极高的要求。目前用于代谢组学分析的工具主要分为磁共振仪(NMR)和质谱(MS)检测系统,两者各有所长。NMR是最经典的代谢组学研究工具,其突出优点是样品前处理步骤简单、测定重复性好,但早期的方法灵敏度不够高,如今采用高强磁场、低温探头、二维核磁(2D-NMR)等技术不仅能增强灵敏度,还可减少复杂生物样品中分子的信号干扰,提高对小分子物质的检测和鉴别能力。另外,新发展的高分辨魔角旋转(HR-MAS)、活体磁共振波谱(MRS)和磁共振成像(MRI)技术能够无创、整体、快速地获得机体某指定活体部位的NMR谱,直接鉴别和解析其中的化学成分^[5]。随着质谱和联用技术的发展,气相色谱质谱(GC/MS)、液相色谱质谱(LC/MS)、毛细管电泳质谱(CE/MS)等测定方法在不断提高和完善,成为代谢组学研究的重要工具,如气相飞行时间质谱仪(GC-TOF/MS)在扫描模式下不但具备了广谱测定、强大的分离和分析复杂混合物的能力,还拥有很高的灵敏度、良好的重现性和线性响应^[6,7],其庞大的化合物谱图库也极大的方便了未知化合物的鉴定,因而在代谢组学研究中显示出越来越突出的优势。近年来,其他一些先进的高技术分析平台也在不断地完善,如超高效液相色谱-四极杆/飞行时间串联质谱仪(UPLC-Q TOF/MS)^[8]、超高效液相色谱-线性离子阱静电轨道阱组合式高分辨傅里叶转换质谱仪(UPLC-LTQ-Orbitrap/MS)^[9]以其优越的定性和定量性能逐步受到代谢组学研究工作者的重视。

应用代谢组学技术能测定到的内源性化合物峰数量相当多,产生了信息丰富的多维数据。利用常规统计分析手段逐个峰解析不但耗时漫长,还不能反映代谢组数据全貌,难以显示其整体特点。代谢组学数据分析的基本策略是运用化学计量学理论和多元统计分析新方法,对采集的多维海量原始信息进行降维和归类分析,从中充分挖掘出有效信息。目前常用的方法一般可分为监督(supervised)和非监督(unsupervised)两类,非监督方法不需要有关样品分类的任何背景信息,分析结果只基于所测定数据,如主成分分析(PCA)、非线性映射(nonlinear mapping),

NLM)、层次聚类分析(HCA)等,但在样品内部随机误差较大,当样品之间真实差异不很明显时则无法有效找出真实差异;而监督分析则把样品按照组别进行分类分析,可以滤除随机差异,找出每组样品的特点和区分各组之间的差异,常用的有偏小二乘法-判别分析(PLS-DA)、神经网络(NN)分析等^[10]。利用此方法可由已知数据建立一个基本模型,输入未知样品数据后就可以预测未知样品的类别,这在临床疾病诊断和发现生物标志物方面具有较高的应用价值。通过数据处理软件(如SIMCA),可以得到样品分布图(scores plot)和对应的变量分布图(loadings plot)^[11]。各样品在scores plot中的分布位置综合反映了该样品所检测的信息。scores plot能描述并判断样品之间的相似/差异程度,差异小/图谱相似的样品在散点图中的位置越靠近;反之,距离远的样品内在差异大。而从loadings plot中可以了解到各个/组样品的差异表现在哪些变量/化合物上,这为生物标志物的发现奠定了基础。

2 代谢组学与疾病诊断

疾病的病理变化往往造成机体基础代谢产生相应改变,进而引起小分子代谢物种类或浓度发生对应的变化,最终造成与正常个体之间代谢谱的差异。利用代谢组学技术对患者和健康志愿者的生物样品进行分析,可以检测出代谢谱差异,并鉴定与疾病密切相关的潜在生物标志物(群)。近年来,很多研究者们致力于将这一新兴技术应用于多种疾病的临床患者研究并尝试寻找可用于临床诊断的生物标志物(群)。

2.1 心血管系统疾病

早在2002年,Brindle等^[12]与帝国理工大学代谢组学研究所利用磁共振仪对冠心病患者血样的研究报告引起了医学界的轰动。研究表明,代谢组学方法不但能利用内源性代谢组数据所建立的模型诊断冠心病发生(灵敏度和特异性分别高达92%和93%),还能通过代谢谱对冠心病所处的不同时期进行分类,而采用传统指标,如血压、脂质纤维蛋白原、白细胞数量等冠心病危险因素(risk factor),甚至血管造影的方法也无法区分出疾病的不同严重程度。可见,代谢组学方法可以检测疾病早期机体的生化改变,为冠心病的早期发现和临床诊断提供可能,而且与传统的血管造影方法相比,代谢组学方法具有准确可靠、简便快速、创伤小、经济等优点。另外,Sabatine等^[13]利用HPLC-MS技术对

心肌缺血患者和健康志愿者在运动前后的血浆中内源性小分子化合物进行了代谢组学研究,发现运动前后有少量化合物在两组之间出现显著差异。例如,氨基丁酸、尿酸等化合物在心肌缺血患者运动后血浆中浓度大大降低,而在健康志愿者血浆中保持稳定,甚至有所升高。对发生显著性变化的代谢物进行分级量化计分所求出的缺血风险性得分与心肌缺血的可能性显著相关,预示着利用代谢谱进行心肌缺血诊断的可行性。

2.2 肿瘤

目前认为肿瘤是环境与宿主内外因素交互作用的结果,据估计80%以上的恶性肿瘤与环境因素相关。而这些环境因素所导致的肿瘤相关基因和蛋白的变化,最终会反映在肿瘤组织的代谢和代谢组变化上,因为代谢组反映了基因组和蛋白质组变化所引起的共同“终点”代谢型小分子的变化^[14]。近来研究还表明,大量遗传改变引起的肿瘤也直接影响了肿瘤细胞的糖酵解过程^[15]。因此,可以说肿瘤发生和发展过程都与其代谢组的变化密切相关。另一方面,与正常细胞相比,肿瘤细胞增殖迅速、代谢旺盛,即使在氧气供应充足的情况下也进行无氧糖酵解而不是通过三磷酸腺苷氧化的方式以供应能量,这种代谢差异必然导致肿瘤组织以及细胞中的代谢物的异常,那么通过检测代谢谱差异辅助,甚至替代传统指标诊断癌症有望解决传统方法的阳性率偏低、特异性差等问题。相对于其他疾病,肿瘤患者预后差,难治愈且易复发的治疗特点决定了其治疗更有赖于早期的诊断和治疗。从理论上说肿瘤组织细胞生长和增殖所导致的代谢异常变化可能比形态学检查和传统检测指标要更先出现,这为代谢组学应用于肿瘤早期诊断打下了基础。

消化道肿瘤的代谢组学研究取得了很大的进展。Denkert等^[16]利用GC-TOF/MS技术检测了一系列结肠癌组织和正常组织样本,发现两者有极显著差异,鉴定出的206个代谢物有82个存在显著性差异($p < 0.01$)。Hirayama等^[17]通过CE-TOF/MS技术对结肠癌和胃癌肿瘤组织能量代谢过程中的代谢物进行全分析,结果显示该方法很好地区分了结肠癌的正常组织与肿瘤组织,对胃癌的识别能力不如结肠癌。基于HR-MAS NMR和GC/MS技术,Chan等^[18]的研究表明,结直肠癌(CRC)患者和配对正常人的黏膜组织样本在代谢组学方法下也得到了很好的区分,并鉴定出31种代谢物,其中大多数都与结直肠癌中预期的代谢紊乱相关,包括组织缺氧增强、

糖酵解、核苷酸的生物合成、脂质代谢、炎症及类固醇代谢,而且HR-MAS NMR获得的代谢谱还能进一步区分出结肠癌和直肠癌,这些数据显示该方法可能为CRC提供新的表型标记物。

在肝癌研究方面, Yang等^[19]以HPLC-MS检测技术为基础平台研究了原发性肝癌与肝炎、肝硬化鉴别诊断的代谢组学方法。对尿中选取的113种代谢物的数据进行全面分析结果表明:该方法的诊断准确率为肝癌83%、肝硬化88.9%,而肝硬化误诊为肝癌的发生率仅为7.4%,准确度明显优于甲胎蛋白(58.7%)、癌胚抗原(6.1%)、CA199(38.5%)、CA125(52.0%)等传统生物标志物。进一步筛选和鉴定发现8种成分在3种不同肝病间存在较大差异,这为肝癌与肝炎、肝硬化鉴别诊断等后续研究提供了重要线索。

Odunsi等^[20]将基于¹H-NMR技术的血清代谢物检测方法应用于卵巢癌鉴别诊断并获得了满意结果(诊断的正确率 $\geq 97.0\%$),其中2例I期患者也被正确诊断,提示代谢组学技术有望用于卵巢癌早期诊断和高危人群筛查。通过比较还鉴定出了卵巢癌的生物标志物为3-羟基丁酸盐,它在半数以上卵巢癌血清中可测到,而在健康人和良性卵巢肿瘤患者血清中不存在。Denkert等^[21]用GC/TOF-MS检测到有51个代谢物在侵袭性卵巢癌(66例)和卵巢交界性肿瘤患者(9例)的肿瘤样本中呈现显著性变化,提示代谢组学方法在肿瘤鉴别诊断方面的应用潜力。

Sreekumar等^[22]利用LC-GC-MS联用技术检测到尿和血浆的代谢谱能够区分出良性前列腺、前列腺原位癌和转移癌,其中代谢物肌氨酸、尿嘧啶和脯氨酸在前列腺原位癌向转移癌进展过程中含量显著地提高。进一步的细胞试验证实相对于良性前列腺上皮细胞,肌氨酸的水平在非侵袭性前列腺癌细胞中也提高了。敲除甘氨酸N-甲基转移酶(将甘氨酸转化为肌氨酸)能减弱前列腺癌的侵袭性,加入外源性的肌氨酸或敲除导致肌氨酸降解的酶——肌氨酸脱氢酶则会诱导前列腺良性上皮细胞的恶性表型转化。雄激素受体和ERG基因融合产物可调整肌氨酸通路中的各成分。这些结果充分揭示了肌氨酸是肿瘤细胞侵袭和攻击的潜在代谢中间体,为研究肿瘤的生长和转移提供了有益的信息。

应用代谢组学技术在乳腺癌研究方面也取得一些新的成果:先后根据HPLC^[23]和LC-IT/MS^[24]方法检测的乳腺癌患者尿液中核苷类代谢物浓度建立数学模型预测乳腺癌的发生,诊断的灵敏度和特异性

均较理想。Chen等^[25]通过基于RRLC-MS/MS的代谢组学方法鉴定出了包括核苷类及某些氨基酸和有机酸等12种代谢物可能成为乳腺癌潜在的生物标记物,为乳腺癌的诊断与研究提供了进一步的信息。此外, Giskeødegård等^[26]的研究表明,利用乳腺癌活组织的HR-MAS NMR谱可以成功预测雌激素与黄体酮的状态,而且代谢谱与淋巴结状态之间也存在相关性,从而为预测乳腺癌的预兆因素及其诊断与治疗方案的设计提供有利依据。

另外,代谢组学方法在其他一些肿瘤,如口腔癌^[27,28]、肾细胞癌^[29,30]、脑膜瘤^[31]、膀胱癌^[32]等的临床诊断与研究中也显示出了重要作用和意义。

2.3 神经精神性疾病

大多数神经病、精神病及其他中枢神经系统紊乱的诊断和随访都是基于系列症状进行分级计分,在多数情况下,这种方法往往无法鉴定出具有潜在疾病风险的人群或诊断的正确率较低。利用代谢组学技术对局部体液(脑脊液)进行监测,可以较为准确地把握神经系统中细胞或组织的代谢异常,为这类疾病的诊断、监测及治疗带来了更全面的信息和希望^[33]。Underwood等^[34]采用代谢组学方法观察到了亨廷顿舞蹈病(huntington disease, HD)患者与健康人之间的明显差异,潜在的生物标记物涉及脂肪酸的分解(包括甘油和丙二酸)及某些脂肪族的氨基酸,并且在转基因小鼠体内发现了一致的代谢标记。Tsang等^[35]在HD动物模型(R6/2小鼠)上的研究也表明了尿液和血浆的代谢谱在转基因小鼠和野生型小鼠中差异显著,有望被用于监测人类HD。渗透剂、肌酸、谷氨酰胺及乳酸的脑部相对浓度全局性地升高了,乙酸和N-乙酰天冬氨酸则发生了下降并且 γ -氨基丁酸(GABA)与胆碱在纹状体部位呈特异性的低水平状态。而在3-硝基丙酸诱导的大鼠HD模型中鉴定出的代谢异常进一步印证和补充了先前的研究报道^[36]。研究发现在模型动物的大部分脑区牛磺酸与GABA水平全局性的降低了,而仅在苍白球与背部纹状体部位观察到了脂质谱的改变,此外在额皮质发现了磷脂酰胆碱的减少及甘油含量的升高。可见,代谢组学方法应用于HD诊断的巨大潜力,甚至还可能为揭示疾病发生的机制及治疗策略提供有利的线索。Bogdanov等^[37]对25个健康人和66个帕金森病患者(Parkinson's disease, PD)的血浆代谢组学研究结果显示对照组、服药患者和未服药患者的代谢谱能被区分开。氧化损伤的标记物(8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG)和抗氧化剂谷胱甘肽的含

量在PD患者体内显著增加, 而尿酸水平显著降低。另外, 相比于正常对照, 在抑郁患者血浆内检测到 γ -氨基丁酸(GABA)、甘油、脂肪酸等数百种代谢物水平发生了明显改变。抑郁患者与抑郁症康复者两组间的比较也有类似的代谢改变, 与患者相比, 疾病康复者的差异在于3-羟基丁酸的升高^[38]。尽管这一结果需要更大规模实验的确证, 但它提示了抑郁状态可能与脂质和神经递质的代谢有关, 抗抑郁药的治疗可以调节某些异常的代谢通路, 从而导致康复者的代谢谱更接近于正常对照。认知功能受损可能是阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)的先兆之一, 轻度认知障碍(mild cognitive impairment, MCI)患者也是发展成为阿尔兹海默症的高危人群。Metastasio等^[39]通过¹H-MRS技术检测到脑内N-乙酰天冬氨酸/肌酸比值在进展型MCI(1.48±0.08)和稳定型MCI(1.65±0.12)患者间、进展型MCI与健康人(1.63±0.16)间差异显著, 表明这种代谢改变在痴呆表现出临床症状之前可被检测到, 为监测AD的进展以及研究阻止或减缓MCI发展为AD奠定了一定的基础。Greenberg等^[40]利用UPLC-MS测定技术对血浆代谢谱进行分析, 较清楚区分了健康人与MCI患者及AD患者, 并发现胆酸和脂类在AD疾病进展过程中可能发挥了重要作用。而提取其中三种胆酸数据所建立的模型表明, MCI并不能被认为是一种独立于AD的疾病, 提示进一步研究代谢组中的脂类成分有可能发现该疾病更可靠的生物标记物。类似的研究还在运动神经元疾病^[41]、神经紊乱^[42]、精神分裂症^[43, 44]等神经精神性疾病中得到了应用。

2.4 胎儿遗传缺陷的早期诊断

人体羊水(HAF)的组成可能反映出母体的健康情况及胎儿的状态和发育情况, 当意识到这一问题后, 研究者们运用NMR技术对人羊水成分进行代谢组学分析, 初步确立了HAF与胎儿发育^[45]之间的关系。Graca等^[46]又通过高磁场的¹H NMR和LC-NMR/MS的联用, 鉴定出羊水的化合物达75种, 畸形胎儿与正常胎儿的羊水代谢谱能被清楚区分, 其中有差异的化合物涉及了葡萄糖、琥珀酸、尿酸、8种氨基酸以及糖蛋白等。结合NMR和酶法的测定结果, 该研究进一步提示了畸胎中糖酵解和糖异生出现异常, 并且肾脏发育不全, 这为后续研究工作的深入打下了有力的基础。

2.5 中医辨证和分型

中医辨证分型是我国传统中医学诊断疾病和实

施“辨证施治”的重要基础, 辨证施治的实质就是根据个体特点及机体的疾病状态有针对性地进行个体化的治疗和预防, 从而达到最佳治疗效果^[47]。“辨证”就是确定患者的特点, 是论治的起点和核心, 但临床上通常是根据患者的症状和体征群来辨别证型, 缺乏客观指标, 导致了诊断结果过分依赖于医生经验。中医辨证分型的科学性也一直缺乏有力的直接证据。代谢组学通过检测机体内源性小分子化合物, 可以反映机体的内在物质基础, 在研究临床高血压患者中医辨证分型的过程中, 发现肝阳上亢、痰湿壅盛、阴虚阳亢三种类型的患者代谢组学数据有明显差异, 利用马氏距离可以准确区分这三类患者^[48], 为中医辨证分型的科学性提供了直接证据。另外, 中医证痰阻心脉型及气阴两虚型冠心病患者和健康人的血浆代谢谱之间均得到很好的区分^[49], 并且琥珀酸、3-羟基丁酸、硬脂酸、色氨酸等化合物的水平在两种证型间有显著差异, 其水平高低与患者表现出来的症状有良好的相关性, 有可能成为两种证型客观量化的诊断指标。

2.6 其他疾病

Marchesi等^[50]利用粪便的代谢谱区分了Crohn's病(CD)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和健康对照, 发现CD和UC患者粪提取物中丁酸、乙酸、甲胺和三甲胺的水平低于正常人, 提示肠道菌群的变化; 而氨基酸含量的升高则提示炎症可能造成了吸收不良或肠部蛋白丢失。且上述的代谢差异在CD患者中更为显著, 提示与UC相比CD造成的炎症更加广泛。另发现CD患者粪代谢谱中一个显著的标记特点是甘油含量较高, 而在UC和对照组均较低。此研究结果为胃肠疾病提供了一个新的无痛苦、低创伤性、更经济(采集粪便检测-肠镜检查)的诊断方法, 也有助于深入了解疾病的机制。Jansson等^[51]通过检测17对双胞胎的粪便样本, 发现在CD患者与健康对照间存在显著性差异的代谢物涉及了氨基酸、脂肪酸、胆酸及花生四烯酸的代谢与合成, 其中某些代谢物与疾病表型及样本中的特定细菌呈良好的相关性, 可能为CD的诊断揭示了新的标记物(群)。

Yang等^[52]借助于代谢组学方法在糖尿病的诊断与研究方面开展了大量的工作。结果显示在正常人与2型糖尿病患者间血清脂肪酸类代谢谱^[52]和血浆磷脂类代谢谱^[53]都存在显著差异, 证实了代谢组学方法可能成为糖尿病诊断的有效方法。随后研究还发现尿液的有机酸代谢物谱与2型糖尿病之间也有

相关性,同样可以区分出患者和正常人群。鉴定出的潜在的有机酸类生物标记物有顺丁烯二酸、4-氨基苯甲酸、2,5-二羟基苯乙酸等^[54]。

代谢组学还被应用于间质性膀胱炎^[55]、肝病^[56]等方面的研究,还发现了不少潜在的生物标记物(群),这些结果不仅对疾病研究有一定意义,还可能进一步应用于相关疾病的诊断,为临床提供替代的诊断方法。事实上,最近已出现了多个利用代谢组学方法进行临床疾病诊断的专利方法^[57-59],为临床上一些缺乏明确诊断指标的疾病提供了一个新的方法,必将有利于代谢组学在疾病诊断方面的广泛应用。

3 代谢组学在病因和病理机制等方面的探索和研究

由于代谢组学所检测的许多内源性小分子化合物直接参与了体内各种代谢/循环,其水平高低在一定程度上反映了机体生化代谢的机能和状态,通过代谢网络分析还能了解体内生化代谢状态,沟通生化代谢与疾病关系,从相关的代谢异常处入手探索和揭示疾病病因、病理机制,也有助于发现新的药物作用靶点。

3.1 代谢性疾病

很多代谢性疾病的病因和发病机制被认为与体内小分子代谢物水平的失衡或功能的紊乱密切相关,因此将代谢组学方法应用于此类疾病的研究可能揭示出与疾病相关的代谢和分子信息。

Newgard等^[60]通过基于LC-MS的代谢组学研究发现支链氨基酸(branched chain amino acids, BCAAs)、芳香族氨基酸和短链乙酰肉毒碱是造成肥胖人群与偏瘦人群代谢谱差异的主要因素。进一步动物实验设计考察是否这些代谢物直接造成了胰岛素抵抗,结果显示饮食中高含量的BCAAs可造成胰岛素抵抗的表型,并且是通过作用于雷帕霉素靶蛋白mTOR(已知的胰岛素抵抗的调节子)信号通路来调节胰岛素敏感性的。

高血压病与代谢综合征密切相关,高血压患者往往伴随着代谢紊乱,而高血压与代谢紊乱之间的关系一直不明。最近利用转基因自发性高血压模型大鼠(SHR)研究发现,SHR体内存在明显的代谢异常,如血浆中游离脂肪酸的水平显著高于正常对照组,且与血压具有较好的相关性^[61]。利用人参皂苷治疗8周后,其代谢紊乱的状况有明显改善,血压也明显降低;而几种常用的降压药物虽然能起到有

效降压作用,但对代谢紊乱几乎没有调节作用,此结果提示降低血压并不能改善异常的代谢,相反改善代谢紊乱可能具有缓解血压作用^[62],即从因果关系看,代谢异常尤其是脂代谢紊乱可能是高血压的致病因素之一。此结果也被另外一系列研究所支持:Brindle等^[63]发现临界高血压患者和高血压患者的血清代谢谱没有明显差异,但两者与正常组血清代谢谱有明显差异,即临界高血压患者与高血压患者一样出现了明显的代谢异常。从高血压和代谢紊乱发生的时间先后次序看,显然代谢异常发生于血压出现明显异常之前。此外,有研究显示动物和人体输入较高浓度的游离脂肪酸后体内血压明显上升^[64,67],而一项大规模临床研究也发现人群中游离脂肪酸水平高的个体出现高血压的风险明显高于其他个体^[68],这些结果进一步提示游离脂肪酸水平以及体内脂代谢的异常可能是导致高血压发生的重要因素之一。

3.2 肿瘤

在对肿瘤的认识方面,虽然我们熟知肿瘤细胞生长代谢旺盛,但一直不清楚肿瘤细胞内部代谢的具体特征。Denkert等^[16]对结肠癌病变组织的代谢网络分析研究时发现癌症患者体内三羧酸循环的中间代谢产物发生下调,而尿素循环的代谢产物,如嘌呤、嘧啶以及氨基酸的水平与正常的组织相比要高。这些结果意味着GC-TOF/MS的代谢组学可以作为分子病理研究的一种新方法。相类似的,Hirayama等^[17]报道了在结肠癌和胃癌的肿瘤组织中都存在葡萄糖浓度很低而乳酸和糖酵解中间产物浓度很高的现象,表明肿瘤组织的细胞糖酵解旺盛,说明糖酵解是肿瘤组织能量供应的主要方式,而肿瘤细胞处于能量匮乏状态。除了谷氨酰胺外,其他所有氨基酸在肿瘤组织的积聚意味着蛋白质的自噬降解和谷氨酰胺分解的活跃。另外,还发现三羧酸循环的中间产物存在器官特异性的差异,反映出了根据供氧多少,不同组织对有氧呼吸的依赖性。此研究表明从能量代谢角度来看,肿瘤微环境远不是肿瘤细胞生长的理想环境,提示糖酵解途径可能是开发新型抗癌药物的潜在靶点。Catchpole等^[30]运用代谢组学方法描述了肾细胞癌的代谢特征: α -生育酚、马尿酸、肌醇、1-磷酸果糖、1-磷酸葡萄糖在肾细胞癌组织中发生了显著的变化;而花生四烯酸、脂肪酸类、脯氨酸、尿嘧啶以及三羧酸循环通路在原位癌向转移癌进展中可能扮演着重要的角色,从而为进一步揭示肾细胞癌的发生及转移机制提供了有

利信息。

3.3 精神-神经性疾病

迄今, 大多精神心理性疾病的分子生理病理过程一直未能弄清, 其主导治疗药物的作用机理也不明确, 代谢组学方法为解决这些难题提供了新的思路。Lan 等^[69]首次利用¹H-NMR 技术研究了有双相精神障碍史的患者死后脑组织中的分子变化, 并与经长期口服情绪稳定剂(锂和丙戊酸)后大鼠脑组织中鉴定出的代谢改变进行比较, 发现某些代谢物在人和大鼠脑组织中出现了一致的变化, 且兴奋性/抑制性神经递质的平衡对精神紊乱极其重要, 如谷氨酸水平在病变脑组织中增高了, 而谷氨酸/谷氨酰胺的水平在经丙戊酸治疗后发生了下调, 锂治疗则使 γ -氨基丁酸的含量增多了。此外, 死后脑组织中高水平的肌酸和肌醇经药物治疗后均发生了降低, 但临床上神经元活力的重要代谢标记物——*N*-乙酰天冬氨酸在给予长期情绪稳定剂治疗后的水平未发生改变。这些发现为了解和深入研究精神类疾病和评价治疗方法、揭示双相精神障碍的病理病机提示了重要信息, 同时对研究和制定新的治疗策略具有一定的指导作用。

4 代谢组学与临床疗效评价

在疾病状态下生物样品中的代谢组可能明显有别于正常状态, 但经过治疗康复后代谢组极有可能向正常状态恢复。因此, 通过比较治疗前后的代谢组学差异并与健康机体进行对比分析, 可以对各种治疗手段的临床有效性进行综合评价。也就是说对疾病进行治疗/干预后考察系统代谢网络的整体性变化, 从而判断治疗/干预是否能够使疾病状态发生逆转并使机体代谢组向正常恢复, 直至最终康复。

4.1 药效评价

到目前为止, 代谢组学应用于药效评价的研究报道很少。Kaddurah-Daouk 等^[70]通过比较精神分裂症患者治疗前后的代谢谱评价了三种抗精神分裂药物奥氮平、利哌利酮和阿立哌唑对脂类生化代谢的调节作用。结果发现这三种药物除了具有共同的脂质代谢调节作用外, 各自还有特有的效应。在精神分裂症患者体内较低水平的磷脂酰乙醇胺(PE)经三种药物治疗后浓度明显升高, 但与奥氮平和利哌利酮相比, 阿立哌唑对脂质组的改变最小, 这与其较小的代谢副作用相一致。奥氮平和利哌利酮治疗后出现甘油三酯的升高和游离脂肪酸减少的现象, 阿立哌唑治疗却无此作用。这些变化表明外周效应可能

与代谢异常的副作用相关。

代谢组学研究在药效评价方面的优势对于中药来说可能具有更重要的意义。中药是一个多组分的复杂体系, 可能具有多靶点作用效应, 其作用机制很难用单一的模型和分子水平加以诠释, 采用常规药理指标对中药复方的效应进行评价往往也存在着局限性, 而代谢组学反映的是药物作用的最终效应——体内物质基础, 可能是反映中药的整体性作用效果的较佳方法。例如利用基于GC-TOF/MS 的代谢组学技术对人参总皂苷降压作用进行整体评价时发现, 它不但显示出明显的降压作用, 而且将高血压模型动物体内异常的代谢状态调节为趋于正常, 尤其是显著调节了与血压呈现显著正相关的游离脂肪酸类化合物^[62]。这种将多组分中药药效评价集中在整体内源性物质基础的方法避免了对单个成分进行单独药效研究问题, 使得药效评价的方式得到简化, 评价指标也由传统的临床生化指标改变为体现内源性物质基础的体内小分子化合物。最近, 上海交通大学张卫东教授领导的研究组利用代谢组学技术对淫羊藿抗衰老作用进行了研究, 发现大鼠在生长和衰老过程中血清中的游离脂肪酸、氨基酸等水平有明显改变, 与正常大鼠相比服用淫羊藿后大鼠体内一些与衰老呈现密切正相关的小分子水平被调整到较年轻水平^[71]。虽然目前的研究结果是建立在动物实验基础上, 但借助于代谢组学技术从内源性物质基础的角度评价中药疗效, 为全面认识中药的治疗特点提供了一个新的思路和方法。

4.2 手术方案及预后评价

与评价药物疗效相似, 代谢组学有望用于手术方案以及治疗效果的监测评估。以器官移植为例, 探索和研究器官功能和排斥反应的快速、低损害性的检测方法是研究者们一直关注的问题。而通过监测液体中(尿液或血浆)内源性小分子化合物作为代谢标记物以监测器官活力和排斥情况具有很强的实用性和经济性。迄今为止, 报道了不少与供体肾脏损伤、移植后的肾功能以及急性和亚临床排斥反应相关的潜在生物标记物, 较有意义地发现尿(或血清)中氧化三甲胺(TMAO, 由肾脏髓质产生, 与维持机体内环境稳态相关)的浓度比正常增高了3~4倍, 提示移植的功能障碍最初显示在肾脏髓质细胞损伤, 虽然目前无法确定直接的原因(排斥或感染), 但仍然使得鉴定组织损伤或功能不全的原因成为可能^[72]。在肝移植方面, 发现许多重要的生物标记物都与尿素代谢循环相关, 如捐赠者肝中甲基

化精氨酸衍生物的浓度可以强烈的预兆最终的器官排斥^[73]，同样，细胞外精氨酸的含量和恢复速度可较好指示肝脏移植24 h后的器官功能^[74]，而血清和尿中异常的尿素(下降)和谷氨酰胺(增加)水平可以作为急性器官排斥潜在的非侵袭性诊断指标^[75]。

5 代谢组学与疾病治疗的新模式

5.1 药物个体化治疗

由于个体间的差异，不同人对于治疗干预的反应性并不一致。因此，根据患者的个体特征选择治疗方案，实行个体化治疗是医药学科学家孜孜以求的目标，有利于提高用药安全性和有效性。虽然很多研究表明，个体药物反应性的差异与药物基因型的多态性相关，但仅依靠基因组学知识实施个体化给药方案尚嫌不足。Clayton等^[76]提出“药物代谢组学”作为一种可替代的方法来制定个体化给药方案，可以弥补基因组学的不足，能反映环境因素，如营养状态、肠道菌群、年龄、疾病等造成的机体药物反应性的差异。初步的动物实验结果显示，大鼠给予扑热息痛前尿的生化代谢谱与给药后的组织学检测结果(肝损伤的程度)有显著的统计相关性。这有力支持了所提出的假说——机体对外源性物质反应的信息可能包含在给药前生物体液的代谢模式中。由此我们认为“药物代谢组学”为群体筛选提供了一个基础，可以根据个体的特殊情况预测药物的干预结果，有针对性地选择某类药物或改变给药剂量进行治疗。

5.2 饮食或肠道菌落结构干预治疗

代谢组学研究为寻求治疗靶标创造了新的契机和一个潜在的有效途径，也进一步为治疗模式和理念的创新提供了可能。Holmes等^[77]利用¹H-NMR方法研究了四个种族(中国、英国、日本、美国)间代谢表型的差异，对4 630名受试者(40~59岁的17个群体样本)的24 h尿液样本进行分析，结果显示不仅东西方人群尿液代谢物的排泄模式显著不同，而且同样是东方人种，中国和日本群体间的差异也存在显著性，另外，以饮食中蔬菜/动物蛋白和血压差异描述的各个亚群间的代谢表型也有显著差异。这一研究提示了改变饮食结构对预防和治疗疾病的可能性。

代谢组学还可以反映与疾病相关的一些未曾揭示的重要信息，如最近Li等^[78]的研究发现与人体共生的菌群对宿主代谢的影响，指出整个代谢谱的变化有相当一部分是由肠道菌群结构变化造成的，而

肠道菌群不但受到药物的影响，更与人类疾病，如肥胖、糖尿病等代谢性疾病^[79, 81]密切相关。此项研究提示了一种新的疾病治疗靶点和模式——通过改变人体内的共生菌群来治疗相关疾病^[82, 83]。

6 小结

代谢组学从出现至今只有十多年时间，但已经广泛应用于生命科学的各个领域，特别在临床医学研究中代谢组学显示出了巨大潜力和良好前景。对于与体内代谢密切相关的疾病，如肿瘤、糖尿病、心血管疾病、精神神经类疾病等，由于疾病的发生、发展与代谢状态直接相关，检测有关代谢物浓度水平可以提供机体代谢状态信息，从而把握疾病发展的阶段和状态，这在理论上为临床诊断提供了切实可行的替代方法。另一方面，在采取临床手段(药物或手术等)治疗疾病过程中，检测代谢物水平还可以了解治疗手段对机体代谢的调节程度，进而了解机体的恢复状况和治疗效果，这在实践上为临床疗效评价(药效或手术治疗及其预后评价等)提供了一个值得探索的定量指标。此外，借助代谢组学技术所鉴定出的不同生物状态下(生理、病理、治疗干预等)特定代谢通路或代谢物的变化为病因、病理机制、药物作用机制等研究提供了重要信息，进而促进了新的治疗靶点的发现。值得一提的是迄今已有多项利用代谢组学方法进行疾病诊断、治疗和药物发现的专利被批准，充分显示了代谢组学方法在临床研究中的价值和实用性。尽管目前的NMR和MS技术已具备较佳的检测能力，但随着现代分析技术的进一步提高，尤其是联用技术的发展，将有望实现更便捷的定性鉴别与高效的定量测定，为获得更加丰富的小分子化合物信息提供有利条件，促进全面深入的认识和研究疾病。同时人们对代谢网络、蛋白质和基因功能的认识也不断完善和提高，代谢组学所提供的信息将在疾病认知和治疗中发挥更重要的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature*, 2008, 455: 1054-6
- [2] Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell*, 2008, 134(5): 714-6
- [3] Rochfort S. Metabolomics reviewed: a new "Omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J Nat Prod*, 2005, 68(12): 1813-20
- [4] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research &

- development. *Pharm Res*, 2006, 23(6): 1075-86
- [5] Lindon JC, Nicholson JK. Analytical technologies for metabolomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. *Trends Anal Chem*, 2007(3): 194-204
- [6] Jiye A, Trygg T, Gullberg J, et al. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal Chem*, 2005, 77(24): 8086-94
- [7] Koek MM, Mulwijk B, van der Werf MJ, et al. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006, 78(4): 1272-81
- [8] Yin P, Zhao X, Li Q, et al. Metabolomics study of intestinal fistulas based on ultraperformance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS). *J Proteome Res*, 2006, 5(9): 2135-43
- [9] Dunn WB, Broadhurst D, Brown M, et al. Metabolic profiling of serum using ultraperformance liquid chromatography and the LTQ-Orbitrap mass spectrometry system. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(2): 288-98
- [10] Ebbels TMD. Chapter 7: Nonlinear methods for the Analysis of Metabolic Profiles [M]//Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. *The Handbook of Metabolomics and Metabolomics*. Amsterdam: Elsevier BV, 2007: 201-23
- [11] Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabolomics. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 469-79
- [12] Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat Med*, 2002, 8(12): 1439-44
- [13] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation*, 2005, 112(25): 3868-75
- [14] Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 2002, 48: 155-71
- [15] Costello LC, Franklin RB. ‘Why do tumour cells glycolyse?’: from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem*, 2005, 280(1-2): 1-8
- [16] Denkert C, Budczies J, Weichert W, et al. Metabolite profiling of human colon carcinoma—deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. *Mol Cancer*, 2008, 7: 72
- [17] Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, et al. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res*, 2009, 69(11): 4918-25
- [18] Chan EC, Koh PK, Mal M, et al. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J Proteome Res*, 2009, 8(1): 352-61
- [19] Yang J, Xu G, Zheng Y, et al. Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabolomics avoiding false-positive result from hepatitis and atocirrhosis diseases. *J Chromatogr B*, 2004, 813(1-2): 59-65
- [20] Odunsi K, Wollman RM, Alnbrosone CB, et al. Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabolomics. *Int J Cancer*, 2005, 113(5): 782-8
- [21] Denkert C, Budczies J, Kind T, et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 10795-804
- [22] Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, 2009, 457(7231): 910-4
- [23] Bullinger D, Fröhlich H, Klaus F, et al. Bioinformatical evaluation of modified nucleosides as biomedical markers in diagnosis of breast cancer. *Anal Chim Acta*, 2008, 618(1): 29-34
- [24] Hennes C, Bullinger D, Fux R, et al. Prediction of breast cancer by profiling of urinary RNA metabolites using support vector machine-based feature selection. *BMC Cancer*, 2009, 9: 104
- [25] Chen Y, Zhang R, Song Y, et al. RRLC-MS/MS-based metabolomics combined with in-depth analysis of metabolic correlation network: finding potential biomarkers for breast cancer. *Analyst*, 2009, 134(10): 2003-11
- [26] Giskeødegård GF, Grinde MT, Sitter B, et al. Multivariate modeling and prediction of breast cancer prognostic factors using MR metabolomics. *J Proteome Res*, 2010, 9(2): 972-9
- [27] Tiziani S, Lopes V, Günther UL. Early stage diagnosis of oral cancer using ¹H-NMR-based metabolomics. *Neoplasia*, 2009, 11(3): 269-76
- [28] Zhou J, Xu B, Huang J, et al. ¹H-NMR-based metabolomic and pattern recognition analysis for detection of oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*, 2009, 401(1-2): 8-13
- [29] Kim K, Aronov P, Zakharkin SO, et al. Urine metabolomics analysis for kidney cancer detection and biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(3): 558-70
- [30] Catchpole G, Platzer A, Weikert C, et al. Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma. *J Cell Mol Med*, 2009[Epub ahead of print]
- [31] Monleón D, Morales JM, Gonzalez-Darder J, et al. Benign and atypical meningioma metabolic signatures by high-resolution magic-angle spinning molecular profiling. *J Proteome Res*, 2008, 7(7): 2882-8
- [32] Issaq HJ, Nativ O, Waybright T, et al. Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Urol*, 2008, 179(6): 2422-6
- [33] Quinones MP, Kaddurah-Daouk R. Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis*, 2009, 35(2): 165-76
- [34] Underwood BR, Broadhurst D, Dunn WB, et al. Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain*, 2006, 129(Pt4): 877-86
- [35] Tsang TM, Woodman B, McLoughlin GA, et al. Metabolic characterization of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease by high-resolution MAS ¹H NMR spectroscopy. *J Proteome Res*, 2006, 5(3): 483-92
- [36] Tsang TM, Haselden JN, Holmes E. Metabolomic characterization of the 3-nitropropionic acid rat model of Huntington's disease. *Neurochem Res*, 2009, 34(7): 1261-71

- [37] Bogdanov M, Matson WR, Wang L, et al. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. *Brain*, 2008, 131 (Pt2): 389-96
- [38] Paige LA, Mitchell MW, Krishnan KR, et al. A preliminary metabolomic analysis of older adults with and without depression. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2007, 22(5): 418-23
- [39] Metastasio A, Rinaldi P, Tarducci R, et al. Conversion of MCI to dementia: role of proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(7): 926-32
- [40] Greenberg N, Grassano A, Thambisetty M, et al. A proposed metabolic strategy for monitoring disease progression in Alzheimer's disease. *Electrophoresis*, 2009, 30(7): 1235-9
- [41] Rozen S, Cudkowicz ME, Bogdanov M, et al. Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metabolomics*, 2005, 1(2): 101-8
- [42] Kaddurah-Daouk R, Soares JC, Quinones MP. Chapter 6: Metabolomics: a Global Biochemical Approach to the Discovery of Biomarkers for Psychiatric Disorders[M]//Turck CW. Biomarkers for Psychiatric Disorders. New York: Springer US, 2009: 129-62
- [43] Holmes E, Tsang TM, Huang JT, et al. Metabolic profiling of CSF: evidence that early intervention may impact on disease progression and outcome in schizophrenia. *PLoS Med*, 2006, 3(8): e327
- [44] Khativich P, Lockstone HE, Wayland MT, et al. Metabolic changes in schizophrenia and human brain evolution. *Genome Biol*, 2008, 9(8): R124
- [45] Bock JL. Metabolic profiling of amniotic fluid by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy: correlation with fetal maturation and other clinical variables. *Clin Chem*. 1994, 40(1): 56-61
- [46] Graca G, Duarte IF, Barros AS, et al. ¹H NMR based metabolomics of human amniotic fluid for the metabolic characterization of fetus malformations. *J Proteome Res*, 8(8): 4144-50
- [47] 周明眉, 刘平, 贾伟, 等. 基于代谢网络变化的中药整体效应评价方法研究. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2006, 8(6): 113-9
- [48] Lu Y, A J, Wang G, et al. Metabolomics approach to the biochemical differentiation of Traditional Chinese Medicine syndrome types of hypertension. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2007, 12(10): 1144-9
- [49] 严蓓, 阿基业, 王广基, 等. 代谢组学研究冠心病中医分型的体内物质基础. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2009, 11(1): 1143-50
- [50] Marchesi JR, Holmes E, Khan F, et al. Rapid and noninvasive metabolomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 546-52
- [51] Jansson J, Willing B, Lucio M, et al. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's Disease. *PLoS ONE*, 2009, 4(7): e6386
- [52] Yang J, Xu G, Hong Q, et al. Discrimination of Type 2 diabetic patients from healthy controls by using metabolomics method based on their serum fatty acid profiles. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 813(1-2): 53-8
- [53] Wang C, Kong H, Guan Y, et al. Plasma phospholipid metabolomic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *Anal Chem*, 2005, 77(13): 4108-16
- [54] Yuan K, Kong H, Guan Y, et al. A GC-based metabolomics investigation of type 2 diabetes by organic acids metabolic profile. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 850(1-2): 236-40
- [55] Fukui Y, Kato M, Inoue Y, et al. A metabolomic approach identifies human urinary phenylacetylglutamine as a novel marker of interstitial cystitis. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(30): 3806-12
- [56] Yang J, Zhao X, Liu X, et al. High performance liquid chromatography-mass spectrometry for metabolomics: Potential biomarkers for acute deterioration of liver function in chronic hepatitis B. *J Proteom Res*, 2006, 5(3): 554-561
- [57] Kaddurah-Daouk, Rima, Kristal, et al. Methods for drug discovery, disease treatment, and diagnosis using metabolomics: US, 7553616[P]. 2009-6-30
- [58] Laaksonen, Reijo, Oresic, et al. Diagnostic method for myopathy: US, 7611902[P]. 2009-11-3
- [59] Kaddurah-Daouk, Rima, Kristal, et al. Methods for drug discovery, disease treatment, and diagnosis using metabolomics: US, 7635556[P]. 2009-12-22
- [60] Newgard CB, An J, Bain JR, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab*, 2009, 9(4): 311-26
- [61] Lu Y, A J, Wang G, et al. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabolomic approach to differentiating hypertension- and age-related metabolic variation in spontaneously hypertensive rats. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(18): 2882-8
- [62] 陆益红, 王广基, 阿基业, 等. 自发性高血压大鼠血浆代谢组学组研究及人参皂苷作用机制初探. *中国天然药物*, 2007, 5(6): 443-7
- [63] Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, et al. Application of chemometrics to ¹H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst*, 2003, 128(1): 32-6
- [64] Grekin RJ, Vollmer AP, Sider RS. Pressor effects of portal venous oleate infusion: A proposed mechanism for obesity hypertension. *Hypertension*, 1995, 26(1): 193-8
- [65] Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, et al. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes*, 2000, 49(7): 1231-8
- [66] Lopes HF, Martin KL, Nashar K, et al. DASH diet lowers blood pressure and lipid-induced oxidative stress in obesity. *Hypertension*, 2003, 41(3): 422-30
- [67] Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest*, 1997, 100(5): 1230-9
- [68] Fagot-Campagna A, Balkau B, Simon D, et al. High free fatty acid concentration: an independent risk factor for hypertension in the Paris Prospective Study. *Int J Epidemiol*, 1998, 27(5): 808-13

- [69] Lan MJ, McLoughlin GA, Griffin JL, et al. Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 2009, 14(3): 269-79
- [70] Kaddurah-Daouk R, McEvoy J, Baillie RA, et al. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 2007, 12(10): 934-45
- [71] Yan S, Wu B, Lin Z, et al. Metabonomic characterization of aging and investigation on the anti-aging effects of total flavonoids of Epimedium. *Mol Biosyst*, 2009, 5(10): 1204-13
- [72] Wishart DS. Metabolomics: The Principles and potential applications to transplantation. *AM J Transplant*, 2005, 5(12): 2814-20
- [73] Martín-Sanz P, Olmedilla L, Dulin E, et al. Presence of methylated arginine derivatives in orthotopic human liver transplantation: relevance for liver function. *Liver Transpl*, 2003, 9(1): 40-8
- [74] Silva MA, Richards DA, Bramhall SR, et al. A study of the metabolites of ischemia-reperfusion injury and selected amino acids in the liver using microdialysis during transplantation. *Transplantation*, 2005, 79(7): 828-35
- [75] Singh HK, Yachha SK, Saxena R, et al. A new dimension of ¹H-NMR spectroscopy in assessment of liver graft dysfunction. *NMR Biomed*, 2003, 16(4): 185-8
- [76] Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, et al. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature*, 2006, 440(7087): 1073-7
- [77] Holmes E, Loo RL, Stamler J, et al. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature*, 2008, 453(7193): 396-400
- [78] Li M, Wang B, Jia W, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2117-22
- [79] DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(4): 460-9
- [80] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1470-81
- [81] Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(13): 1546-58
- [82] Jia W, Li H, Zhao L, et al. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(2): 123-9
- [83] Burcelin R, Luche E, Serino M, et al. The gut microbiota ecology: a new opportunity for the treatment of metabolic diseases? *Front Biosci*, 2009, 14: 5107-17