

空间代谢组学在经脉脏腑相关研究中应用思考

吴昊晟¹, 苏航¹, 朱超¹, 王文慧¹, 崔帅², 王堃², 周美启³

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230012; 3. 安徽省中医药科学院亳州中医药研究所, 安徽 亳州 236800)

[摘要]空间代谢组学在生物医学领域中可对代谢物表型进行定性、定量、定位的全面分析研究, 具有操作简单、适用广泛、空间识别功能等特点, 能够有效解决空间分布差异或结构差异的问题, 其应用特点有很大可能适用于经脉脏腑相关研究的需求。将其运用到经脉脏腑相关研究中是构建脑区代谢图谱, 验证代谢过程, 确定量效关系的重要手段, 为深入研究经脉脏腑相关提供了一种新方法和新思路。

[关键词]空间代谢组学; 经脉脏腑相关; 研究策略

[中图分类号]R224 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2022.05.020

经脉脏腑相关理论是中医针灸理论体系的核心, 而经脉脏腑与神经系统之间的联系与研究可能是该理论研究的核心和重要突破口^[1-2]。利用组学方法, 发现研究过程中相关分子和路径的改变, 是研究生理和病理状态下经脉脏腑相关理论的重要切入点。

空间代谢组学是一种能直接从生物组织或器官中获取代谢物分子的结构、含量及其空间分布的信息, 描绘代谢网络图的研究方法。该方法具有灵敏度高、分辨率高、覆盖率高的特点, 将成为生物医学领域研究的有力工具。

从目前已有的研究看, 空间代谢组学在疾病分子机制、生物标志物筛查以及中药成分靶向性研究等方面已取得了一定的成果。现对空间代谢组学的前沿技术及其在生物医学领域研究中的应用进行分析, 以探讨该方法运用于经脉脏腑相关研究中的思路。

1 空间代谢组学及其优势

空间代谢组学是近年来兴起的一种研究方法, 由质谱成像联合代谢组学组成。该方法利用一种新型的分子影像技术——空气动力辅助离子化解吸电喷雾电离质谱成像技术 (air flow-assisted desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging, AFAI-MSI), 弥补了传统液相色谱-质谱联

用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 中组织空间分布信息丢失的局限性, 充分解决了微区异质性的问题。

以绘制大鼠脑内的微区分布代谢网络图为例^[3]。实验研究步骤依次为: 将完整脑组织取出, 经冰冻切片后, 贴于正电荷载玻片上; 利用 AFAI-MSI 技术将喷出的高速带电液滴逐点轰击待测切片, 使代谢物进行解吸和电离, 离子化的代谢物被吸入质谱分析器进行检测, 固定在承载平面的切片连续移动, 不断进行二维扫描, 记录每个位置点上的质谱信号强度, 可以获得样本表面的分子及其含量, 并通过软件重构, 将质谱峰的信号强度按位置进行关联还原, 最后对大脑中的复杂代谢网络进行可视化处理。

传统代谢组学由于技术方法等层面的原因, 在经脉脏腑与脑相关的研究中有不同程度的局限性^[4], 与传统代谢组学相比较, 空间代谢组学的优势主要体现在 3 个方面。第一, 空间代谢组学操作简单。传统代谢组学要进行组织匀浆、代谢物提取等预处理, 以及固相微萃取、固相萃取等复杂的纯化和富集操作^[5]。预处理的差异可能会导致检测结果不准确, 而空间代谢组学在检测前不需要对样本进行特异性标记及复杂的预处理, 取材后即包埋。第二, 空间代谢组学适用广泛。传统代谢组学常运用的核磁共振技术检测灵敏度较低, 检测动态范围窄, 很难同时检测到生物系统中高通量差异较大的代谢产物。气相色谱-质谱联用技术只适用于易挥发且稳定性差的样本^[6]。空间代谢组学能及时发现某些代谢途径中明显变化的

基金项目:国家自然科学基金 (81273858, 81674058); 安徽省中医药领军人才建设项目 (ZYYLJRC201911)

作者简介:吴昊晟 (1997-), 男, 硕士研究生

通信作者:周美启 (1963-), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, meiqizhou@163.com

代谢物,检测范围广泛,灵敏度高,能够检测出上千种代谢物。第三,空间代谢组学具有空间识别功能。传统代谢组学常用的 LC-MS 仅能对代谢物进行质和量的检测,预处理过程容易导致代谢物在组织器官中的空间分布信息缺失,而这种空间信息对于针灸作用的整体效应研究十分重要。空间代谢组学能够描绘出与研究目标直接相关微区中发生变化的具体位置,将代谢组学信息从二维层面上升到三维层面,提供分子空间分布信息,为针灸研究提供了可视化的数据信息。

2 空间代谢组学在生物医学研究中的运用

空间代谢组学在生物医学领域能够有效解决空间分布差异或结构差异相关的问题,在肿瘤代谢的生物标志物筛查、构建代谢过程分布网络图、阐明药物作用机制等方面已有不少成果。

空间代谢组学在研究中可以直接定位极性代谢物,并构建可视化脑内特定区域代谢改变过程。Pang 等^[7]利用空间代谢组学分析的空间分辨信息,发现了大脑微区代谢环境及其变化过程,并绘制出脑内代谢网络图,简便地显示了极性代谢物的分布信息和大鼠脑切片的图像,发现了乙酰胆碱、 γ -氨基丁酸等代谢物的含量变化及空间定位,以及谷氨酸代谢、嘌呤代谢等多个代谢物的代谢途径,并对东莨菪碱治疗组大鼠的脑矢状面切片进行分析,发现东莨菪碱治疗阿尔茨海默病模型中涉及的代谢紊乱的大脑微区。另外, Huo 等^[8]运用空间代谢组学对糖尿病脑病大鼠大脑中的区域特异性代谢紊乱进行研究,筛选出 19 种与糖酵解和磷酸戊糖途径有关的代谢差异物,首次在糖尿病脑病大鼠脑中同时鉴定和定位胆碱代谢过程,并发现了该病理过程中存在线粒体代谢功能障碍,腺苷能、谷氨酸能、多巴胺能、胆碱能和组胺系统功能失调,抗氧化系统以及脂质代谢紊乱。这些都从一定层面上证明了空间代谢组学在中枢神经系统研究中的应用前景,为其在经脉脏腑相关与脑的研究中提供了技术层面的可行性。

代谢过程是空间代谢组学研究的重要内容。代谢是生物体内进行物质、能量交换以维持生长、发育、繁殖和适应内外环境的一种基本过程。Sun 等^[9]使用空间代谢组学的方法发现了大量肿瘤相关的候选代谢物和代谢酶在分子水平上的变化情况,特别是对含量较小的功能性代谢酶也能够进行有效监测,最终发现吡咯烷-5-羧酸还原酶 2 和

尿苷磷酸化酶 1 在食管癌中发生了改变,有助于发现食管癌治疗的潜在代谢靶点。Guo 等^[10]运用空间代谢组学研究了原癌基因 MYC 促进肿瘤发生的机制,发现 MYC 可以与胆固醇调节元件结合蛋白 1 协同调节脂质生成。

空间代谢组学在药物作用机制或毒理作用、肿瘤病理机制及诊断分子基础、神经系统组织微区代谢物的时空分布特征等研究领域得到了广泛应用,充分说明了其使用的优势和应用前景。

3 经脉脏腑相关的研究现状

经脉脏腑相关理论,是研究经脉腧穴与脏腑之间的双向联系的理论。该理论发展经历了 3 个阶段^[11],不断更新的理论观点使经脉脏腑相关研究方向更加清晰。直至今日,经脉脏腑相关研究普遍被认为是基于神经系统作用而展开的,包括躯体神经系统、自主神经系统、神经内分泌系统等方面,特别是从脑神经科学入手研究针刺经脉腧穴的作用机制是目前的主要方向^[12]。

以针刺心经治疗急性心肌缺血的机制研究为例,目前常用的方法有 3 个方面。①从神经化学角度,多种化学物质将针刺信息转化为神经冲动,并在中枢神经系统内进行传递。通过检测针刺前后中枢特定核团中神经递质的含量变化,以揭示针刺通过神经系统发挥调控的实质。急性心肌缺血可引起海马激活,海马 CA1 区和齿状回(dentate gyrus, DG)释放大量去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)引起交感神经过度兴奋, DG 区抑制多巴胺(dopamine, DA)和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的分泌,造成心功能紊乱,而通过针刺可以降低海马中 NE 含量,升高 DA 和 5-HT 含量来拮抗交感神经过度兴奋,从而保护心肌组织^[13]。②从神经生理角度,针刺可以激活中枢神经传导整合针刺信号以发挥不同层面的调控作用。研究者通过电生理和病毒示踪的方法证实了以海马为中心的“海马-室旁核-交感神经”“海马-孤束核-迷走神经”上行通路^[14-15]以及“蓝斑核-海马”“内侧隔核-海马”的下行神经通路^[15],从结构和功能上证实了这些通路在心肌缺血的经脉脏腑相关研究中具有不可或缺的作用。③从分子生物学角度,针刺可减少病变区域炎症病变和细胞凋亡。心肌缺血常伴有海马区炎症反应和神经细胞凋亡,进而导致交感神经兴奋性增强,加重心肌损害,针刺能够有效降低 CA1 区白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子等炎症

因子水平,发挥改善心肌缺血作用^[17]。

4 空间代谢组学在经脉脏腑相关研究中应用的思路探讨

经脉脏腑与脑相关是经络理论和针灸基础研究的重要方向之一,运用先进的科学技术是进行经脉脏腑与脑相关研究的重要手段^[18-19]。空间代谢组学在针灸研究方面有着巨大优势,能够从代谢功能、立体结构两个层面为经脉脏腑相关研究提供新思路,很有可能像免疫荧光染色、透射电子显微镜或者激光共聚焦成像等技术一样运用于经脉脏腑相关研究,极大地丰富经脉脏腑相关研究的方法和手段,使经脉脏腑与脑相关的研究更全面、更直观、更立体。

4.1 通过筛选目标核团构建脑区图谱 在以往经脉脏腑相关的研究过程中,筛选目标核团的第一种思路是针对与疾病或其病理机制相关的核团进行筛选,通过观察模型组与针刺组的相关核团 *c-fos* 表达情况,并调控该核团以验证其是否参与针刺过程。第二种思路是以已研究核团为中心,通过病毒示踪技术发散性构建一个相互投射、连接的中枢神经网络。第三种思路是利用功能磁共振成像筛选目标核团^[20-21],采集针刺治疗的任务态与静息态的信息,进行对比分析,找到针刺有效调节脑功能活动的位置。

在神经细胞信号传递的过程中,不仅有神经细胞自身的电信号发挥作用,还需要依靠神经细胞间的化学信号,当一个神经细胞受到信号刺激时,产生动作电位向突触传递,储存在突触前囊泡中的神经递质释放到突触间隙,作用于下一神经细胞突触后膜相应的受体,将信号传递下去。可见,神经递质的释放在信息传递过程中有着不可或缺的作用。将空间代谢组学的方法运用于经脉脏腑相关的研究中,通过比较模型组与治疗组动物脑组织的代谢变化,发现神经递质显著改变之处,结合脑切片 *c-fos* 表达情况加以验证,确定针刺刺激以后明显激活的脑区位置,最终从结构和功能两个层面说明针刺激活的核团及神经通路,以揭示针刺介导的中枢调控实质及神经递质的代谢过程。这种方法能够全面筛选目标核团,构建脑微区图谱,尤其是能够准确判断极小的核团不同亚功能分区中的微量变化,有利于精准定位,筛选目标核团的通道路径,进而探讨相关经脉穴位的中枢作用机制与特异性,为进一步研究提供理论依据。

4.2 从分子层面验证分析代谢过程 经脉脏腑相关理论认为,针刺通过调节中枢神经系统中的内源性小分子代谢物发挥影响,而这些小分子代谢

物则是疾病发生发展过程中必不可少的靶点或标志物。在此过程中,针刺能够调节相关核团中神经递质和生物活性物质,使能量和神经细胞活性恢复正常。目前,常使用酶联免疫法^[22-23]测定待测核团内的神经递质,该方法操作简单,但需要精准定位目标核团,将待测核团分离出来,对操作者的要求较高。另一种是运用微透析^[24-26]方法进行测定,通过在目标核团埋置探针套管,灌流人工脑脊液,采集透析液来检测分析神经递质的含量,但同一只动物检测位点有限,不能同时大范围检测。此外,微透析样品是小分子的亲水性代谢物,标志物是相对较大分子或相对疏水性物质时,在采样过程中可能被排除。空间代谢组学法操作更简单,不需要复杂的埋管、灌流采集等程序,检测范围也更宽阔,不仅可以非靶向性地检测代谢紊乱过程,还能够明确显示具体神经递质和生物活性物质定性和定量的变化过程以及空间定位信息,并能利用京都基因和基因组数据库对代谢通路进行富集分析,显示差异代谢通路,有助于从分子层面全面分析脑区代谢过程,从结构到功能进行深入研究。

4.3 为针灸量效关系提供客观依据 针灸量效关系是针灸的本质特征,是针灸疗效的关键因素^[27]。代谢是生物体必不可少的过程,在针灸过程中其代谢物的变化是代谢过程的体现,针灸通过“神经-内分泌网络”对机体生理病理过程进行调节,必然伴随着内源性代谢物或生物标志物的变化,通过代谢物变化可以量化评价针灸调节脏腑的疗效。通过对比分析是否使用针灸,或不同针灸穴位,或不同针灸剂量的相应内源性代谢物的时效变化过程,进而确定腧穴、刺激量、疗效三者之间的关系。空间代谢组学通过揭示不同穴位和针灸剂量与神经系统中相应代谢过程和代谢物变化之间的作用,筛选出针灸调节的代谢通路和潜在生物标记物,从分子生物学角度阐释针灸的作用机制,为针灸的标准化提供客观依据。

运用空间代谢组学研究经脉脏腑相关过程中神经系统代谢变化,能够有效研究经脉脏腑与中枢调控机制之间的关联,并能为经脉的特异性治疗作用提供循证依据。

5 结语

尽管空间代谢组学在经脉脏腑相关研究中有较大的优势,但仍面临着许多亟待解决的问题。第一,空间代谢组学技术在国内尚未完全普及,该技术需

要耗费一定的时间和资金,若不能严格把控检测质量,将会浪费大量科研资源。第二,虽然空间代谢组学检测范围涉及1 500多种小分子代谢物,但不能识别标准代谢物以外的新代谢物和检测大分子蛋白,如该方法难以检测经脉脏腑相关实验中的常用指标 c-fos 蛋白,使得筛选核团时需结合脑切片 c-fos 表达情况。第三,样本的个体差异、复制模型的差异以及针灸剂量的差异会引起代谢物定量的失准,故建立完善的模型复制和治疗标准极为重要。第四,取材时代谢过程停止,空间代谢组学只检查该时刻样本代谢物的定位和含量水平,因此,把控两组之间的取材时间非常重要,取材时间不同会导致结果的差异。另外,这一特点也决定了研究者不能够实时动态地监测代谢物变化过程。

目前,空间代谢组学在经脉脏腑相关的研究中应用还较少,随着该技术方法的逐渐成熟,利用空间代谢组学从分子生物学、神经生物学等多角度,腧穴、刺激量、疗效等多层面,建立系统的经脉脏腑相关研究方法,为针灸标准化提供依据。空间代谢组学具有空间定位的特点,可以促进分子生物学和神经生物学之间的立体交叉研究,使二者相互融合印证,从“结构-功能”角度帮助研究核团的电活动及神经递质的变化过程,更深层次地进行经脉脏腑相关研究。

参考文献:

- [1] 周逸平,汪克明,胡玲,等. 经脉脏腑相关研究展望[J]. 安徽中医学院学报, 2009,28(5):1-4.
- [2] 周逸平. 经脉-脏腑相关是经络理论的核心[J]. 针刺研究, 1999,24(3):238-241.
- [3] HE J, SUN C, LI T, et al. A sensitive and wide coverage ambient mass spectrometry imaging method for functional metabolites based molecular histology [J]. *Adv Sci*, 2018,5(11):1800250.
- [4] 李晓璐,黄光瑞,吴小丽,等. 近十年代谢组学技术在针灸调节机体代谢相关研究中的应用概述[J]. 环球中医药, 2021,14(7):1352-1357.
- [5] 汪明明,程海婷,薛明. 基于 LC-MS 的代谢组学分析流程与技术方法[J]. 国际药学研究杂志, 2011,38(2):130-136.
- [6] 刘健,万磊,黄传兵,等. 代谢组学检测方法及其在中医药系统的应用[J]. 中国临床保健杂志, 2013,16(5):449-452.
- [7] PANG X, GAO S, GA M, et al. Mapping metabolic networks in the brain by ambient mass spectrometry imaging and metabolomics [J]. *Anal Chem*, 2021,93(17):6746-6754.
- [8] HUO M, WANG Z, FU W, et al. Spatially resolved metabo-

- lomics based on air-flow-assisted desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging reveals region-specific metabolic alterations in diabetic encephalopathy [J]. *J Proteome Res*, 2021,20(7):3567-3579.
- [9] SUN C, LI T, SONG X, et al. Spatially resolved metabolomics to discover tumor-associated metabolic alterations [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2019,116(1):52-57.
- [10] GUO H H, FENG C L, ZHANG W X, et al. Liver-target nanotechnology facilitates berberine to ameliorate cardio-metabolic diseases [J]. *Nat Commun*, 2019,10(1):1981.
- [11] 曾希玲. 周逸平教授学术思想研究[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2015.
- [12] 周逸平. 经络理论研究的重大战略意义和思路[J]. 安徽中医学院学报, 2010,29(5):71-74.
- [13] 许果,吴欣,王堃,等. 电针干预急性心肌缺血大鼠海马齿状回区神经递质影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020,22(1):70-74.
- [14] CUI S, WANG K, WU S B, et al. Electroacupuncture modulates the activity of the hippocampus-nucleus tractus solitarius-vagus nerve pathway to reduce myocardial ischemic injury [J]. *Neural Regen Res*, 2018,13(9):1609-1618.
- [15] CUI S, ZHOU Y P, WU S B, et al. Electroacupuncture improved the function of myocardial ischemia involved in the hippocampus-paraventricular nucleus-sympathetic nerve pathway [J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018:2870676 [2022-04-13]. <https://doi.org/10.1155/2018/2870676>.
- [16] WU X, WANG K, CUI S, et al. Electroacupuncture ameliorates acute myocardial ischemia: a potential role of the locus coeruleus [J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020:4298657 [2022-04-13]. <https://doi.org/10.1155/2020/4298657>.
- [17] 王堃,吴生兵,崔帅,等. 电针心经对急性心肌缺血大鼠海马去甲肾上腺素和白介素 6、白介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 针刺研究, 2018,43(6):365-369.
- [18] 周逸平. 关于经络经脉脏腑相关研究的深入探讨[J]. 针刺研究, 2006,31(6):327-328.
- [19] 周逸平,周美启,汪克明,等. 经脉脏腑与脑相关研究是中西医理论结合的突破口[J]. 安徽中医学院学报, 2008,27(1):1-7.
- [20] 蒋燕,石晓花,王钰凯,等. 针刺干预原发性失眠患者不同脑区的任务态 fMRI 研究[J]. 中国实验诊断学, 2020,24(6):903-906.
- [21] 李晓燕,赵创,刘志丹,等. 针刺治疗面瘫机制的 fMRI 研究概述[J]. 中医学报, 2021,36(10):2122-2127.
- [22] 汪克明,刘婧,吴子建,等. 针刺不同经穴干预心肌缺血模型大鼠下丘脑内单胺类递质的相对特异性[J]. 针刺研究, 2011,36(3):205-208.

[23] 王洁, 吴子建, 蔡荣林, 等. 电针“心俞-神门”对急性心肌缺血模型大鼠心肌与海马组织 Glu、Asp 和 NR1 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(1): 79-84.

[24] 王堃. 针刺心经对心肌缺血模型大鼠海马 CA1 区神经递质含量的影响[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.

[25] 王慧, 王旭, 唐卉凌, 等. 微透析法研究针刺后中缝背核单胺类神经递质含量的动态变化[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(3): 301-303.

[26] 许静. 基于微透析技术探讨针刺不同配穴对急性心肌缺血大鼠下丘脑多巴胺递质含量影响的研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2016.

[27] SHI X M. Study of the relationship between acupuncture dose and effect[J]. *Acupuncture and Herbal Medicine*, 2021, 1(1): 3-9.

(收稿日期: 2022-04-14)

Application of Spatial Metabolomics in the Research on Meridian-Viscera Relationship

WU Hao-sheng¹, SU Hang¹, ZHU Chao¹, WANG Wen-hui¹, CUI Shuai², WANG Kun², ZHOU Mei-qi³

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui Hefei 230012, China; 3. Bozhou Institute of Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui Bozhou 236800, China)

[Abstract] In the field of biomedicine, spatial metabolomics can perform comprehensive qualitative, quantitative, and localization analyses of metabolite phenotypes and has the characteristics of simple operation, wide application, and spatial identification function. It can effectively solve the problem of spatial distribution differences or structural differences, and its application characteristics may help to meet the needs of the research on meridian-viscera relationship. In the research on meridian-viscera relationship, it is an important approach to construct a metabolic map of the brain region, verify the metabolic process, and determine the dose-effect relationship, which provides new methods and ideas for the in-depth research on meridian-viscera relationship.

[Key words] Spatial metabolomics; Meridian-viscera relationship; Research strategy

 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *

欢迎投稿 欢迎订阅
 website: <http://xuebao.ahtcm.edu.cn>
 E-mail: ahxbbjb@163.com