

• 理论探讨 •

中医证候生物分子网络标志的构想与研究

李 梢

(清华大学自动化系清华信息国家实验室生物信息学研究所, 北京市海淀区清华园1号, 100084)

[摘 要] 从网络的角度展开对证候生物学基础的探索, 建立了从“表型网络- 生物分子网络- 药物网络”理解病证方关系的研究框架, 由此进一步提出证候生物分子网络标志的构想, 并进行了寒证与热证的案例研究。进而分析了证候生物分子网络标志应用于证候客观化与个体化诊疗、中医药临床效应评价、方剂与中药药性等研究领域的可能性。

[关键词] 证候; 生物分子网络标志; 系统生物学; 生物信息学

中医学的基本特点在于整体观和辨证论治, 以病证结合、方证相应, 即“病证方”结合的诊疗模式为特色。证(证候)的生物学基础则是中医药现代化的关键, 目前研究较多的有血瘀证、肾阳虚证、寒证、热证、脾虚证等, 并形成了证本质研究、证实质研究、证候客观化、微观辨证等多个学术生长点。数十年来, 证候生物学基础研究不断取得进展, 同时也凸现出了两个关键难点: 一是宏观的证候表型与微观的生物学指标之间的关系十分复杂; 二是缺乏阐释证候内在整体性的研究方法。这两个难点的制约使得证候的生物学基础成为中医药现代化的瓶颈问题。自1999年以来^[1], 我们从生物分子网络角度针对上述难点问题开展研究。通过多年的探索, 形成了适用于阐释病证方系统内涵的“表型网络- 生物分子网络- 药物网络”研究构架。本文进一步提出“证候生物分子网络标志”的构想, 以期对证候生物学基础研究提供一种新的思路与途径。

1 从生物分子网络角度研究证候生物学基础

1.1 相互作用 网络 功能

证候生物学基础的研究进程与现代医学生命科学的发展密切相关。随着高通量生物学技术的进步及生物信息学、系统生物学等新兴交叉学科快速发展, 当前医学生命科学的研究思维正发生从还原论向系统论的转型, 其中一个重要标志就是从生物分子网络的结构和功能来认识生命活动。研究者认识到, 机体的功能并不能还原为个别生物分子的行为, 而是由生物分子的相互作用及其与外界环境之间物质、能量与信息的交换而产生, 即基因、RNA、蛋白质等生物分子通过多层次复杂的相互作用而实现特定生物功能。以生物分

子网络来刻画这些复杂的相互作用及其系统行为, 则是21世纪生命科学的关键突破之一。“相互作用 网络

功能”的研究思维, 相继带动了网络医学^[2]、系统医学^[3], 以及网络药理学^[4]等新进展, 也为建立预测、预防、个体化的医学诊疗模式提供了可能。以上趋势与中医学注重整体功能、强调个体化与系统诊疗的特色具有共通之处, 从而既为中医药研究提出了严峻的挑战, 又为理解证候宏观与微观之间的复杂关系, 探索证候生物学基础研究的新途径, 提供了前所未有的契机。

1.2 系统生物学研究策略与模式的变革

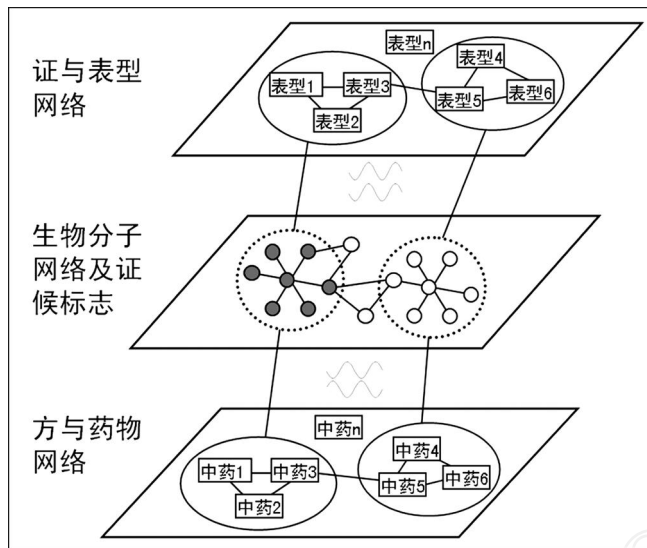
系统生物学这一名词虽新, 但系统和整体的理念却由来已久, 例如中医的整体观、亚里士多德“整体大于局部之和”之说, 乃至Besedovsky 1977年提出的神经内分泌免疫(NED)学说等。然而既往系统和整体的理念在长时期内主要停留在哲学思辨和经验的层面, 未能自上而下, 而还原论指导下的医学生命科学研究则往往是局部和分离的, 难以获取整体信息。直到20世纪末系统生物学等交叉学科领域兴起之后, 随着研究策略、模式与方法的革新, 这种两难的局面始有改观, 并迎来了理解各种生物系统的系统行为及其本质原则的黄金时期。系统生物学整合了数据驱动(data-driven)的自下而上式、模型驱动(model-driven)的自上而下式研究策略, 融合了计算与实验的研究手段, 即通过计算模型产生可供实验验证的假设, 通过实验检验假设, 从而获得系统与整体相关的规律性认识。值得注意的是, 高通量的组学(基因组、蛋白质组、代谢组等)技术本身可能只是大规模的还原分析^[5], 需要依赖计算、建模等方法去推测其内在的系统。因此, 生物系统的复杂性、生物学数据的快速增长突出了生物信息学计算方法的重要性, 并使之成为当前最具活力的前沿学科之一。目前研究表明, 生物分子网络是复杂生物系统的构建基础和重要表现方式^[2], 网络的复杂性本质

基金项目: 国家自然科学基金项目(30873464, 90709013), 国家科技支撑计划课题(2006BA108B05-05)

联系方式: shao1@mail.tsinghua.edu.cn



上就是“关系”的复杂性。正是系统生物学以上研究模式与策略的变革与进步,使从生物分子网络角度探索证候的生物学基础具备了现实可行性。我们通过多年研究,提出了“表型网络-生物分子网络-药物网络”的框架^[6],对病证方关系取得了较好的理解,并为进一步提出证候生物分子网络标志提供了基础(附图)。



附图 用于理解病证方关系的表型网络-生物分子网络-药物网络的研究框架,以及证候生物分子网络标志的示意图

2 表型网络-生物分子网络-药物网络的研究

2.1 以表型组合为基础研究证候

“表型”在医学上指症状、体征等临床表现,是机体受基因表达和环境因素影响而表现出来的特征。西医“病”、中医“证”均来自于对表型的观察。我们通过调查病变部位、量化诊断、症状描述、普遍状况、环境因素5类,共85项类风湿关节炎(RA)常见的临床表型信息,对中西医诊断同一疾病(RA)的特点进行比较。结果发现中、西医学对RA的诊断方式差异具有显著性。与西医观察相比,中医学侧重于疾病过程中环境因素的考察,以及症状信息的全面采集与提炼,因此,有助于疾病复杂临床信息的归类,以及寒、热等不同证候的判别^[7]。同时,中医“证”更侧重于观察表型之间的关联,即通过特定的表型组合(四诊信息组合)来界定证候概念。我们依据慢性胃炎、SARS等疾病的临床调查资料,分析并发现了与患者诊断(如慢性胃炎幽门螺杆菌感染)^[8]、客观指标(如SARS患者的SaO₂)、预后(如SARS患者死亡率)密切相关的特异表型组合^[9],从而给出了辨证论治一定的科学依据,并提示以表型组合为基础,可望进一步探索证候的生物学机制及其个体化诊疗内涵^[10]。

2.2 表型与基因的全局关联

病、证的概念均不是从分子机理上去界定的。探索

证候的生物学基础首先需要建立宏观病证表型与微观生物分子之间的联系,这也是当前医学生命科学研究中的本质问题之一。以往研究表型与基因的关系往往采用“点对点”的方式。中医学则注重四诊合参、辨证论治,即综合考察表型之间的关系。借鉴中医学这一整体思维方式,我们从表型的整体联系出发,建立一种CIPHER计算模型^[11]实现了人类全部表型与基因的关联。该模型有效地利用生物分子网络中的相互作用信息来解释表型之间的相关性,据此寻找新的致病基因,并实现了目前最高的致病基因预测精度。运用该模型对5000多种人类已知表型进行全基因组范围的致病基因预测,结果进一步发现表型与基因关系中的模块性特征,即一组相关的表型,其对应的基因在生物分子网络中也具有较为紧密的连接^[11]。这一发现佐证了中医辨证理论的合理性,并为进一步提出证候生物分子网络标志的构想提供了原理上的支持,即表型的适当组合,能够体现生物分子网络特定的网络结构与功能。研究建立的人类表型与生物分子网络的关联,也有助于从复杂生物系统的角度重新理解病证,乃至沟通病证、结合病证。

2.3 表型-NEI-药物多层次网络

NEI是维持机体稳态、调节机体与环境相互作用的枢纽,NEI学说的提出是现代医学研究从局部转向整体的一个重要体现。上世纪80年代以来,从NEI入手研究证候的生物学基础成为热点。然而既往研究对NEI生物分子之间的复杂关系以及NEI与病证、药物的关联往往局限于描述性分析,缺少整体水平的研究方法。为突破这一局限,我们2006年提出了将“概念性NEI”转变为“系统性NEI”的新构想,通过分析、整合NEI的典型调控环节,以及激素、细胞因子、神经递质的相互作用,建立了国际首个NEI专题数据库db-NEI^[12]。此后,我们利用CIPHER方法发现,NEI表型的相关基因在生物分子网络上连接最为紧密,即模块性最为显著^[11]。并进一步参照病证方相结合的中医理论,在拓展NEI生物分子的多种相互作用、转录因子与microRNA的调控作用的基础上,融合NEI相关疾病、药物信息,综合构建了疾病表型-NEI-药物多层次网络^[13],通过多层次网络分析发现了药物与疾病之间“同病异治”、“异病同治”等特点。这一研究结果为从分子水平和系统层次理解病证方关系提供了例证,并提示病证方之间的关系可抽象为“表型网络-生物分子网络-药物网络”之间的内在关联。

3 证候生物分子网络标志的构想

既往研究表明,证是由许多因素组成的复杂系统,

难以用单一的生理、生化指标来表达^[14]。如附图所示,我们在表型网络-生物分子网络-药物网络研究框架的基础上,从证候概念中的表型组合信息、方剂的复合干预效应出发,针对特定证候的生物学基础进一步提出“证候生物分子网络标志”的构想:证候的形成与特定的生物分子网络密切相关,证候生物分子网络具有结构与功能两方面性质,在结构上体现为一定的网络拓扑,即网络系统的连接形式;在功能上具有模块性特点,即通过一组具有密切相互作用的生物分子集合实现功能。我们把符合下列条件的、体现网络重要结构与功能的关键模块,称为“证候生物分子网络标志”。与特定证候的表型组合密切相关;能够有效区分其他证候,即具有证候鉴别意义;能够受到对证方剂的调控。比单一的生物分子更能鉴别不同证候特点,反映方证关系。同时,证候生物分子网络及其标志在病理生理过程中,环境因素的影响下能够发生一定的动态变化,并可以具有不同的兼夹形式,从而体现出证候的个体化、系统诊疗意义。

4 证候生物分子网络标志的案例研究

4.1 寒证、热证的生物分子网络标志

寒、热是中医的基本证候以及其他复合证候形成的基础,反映了机体阴阳偏盛偏衰、病邪属阴属阳的基本性质。我们从复杂生物网络的角度切入探索寒证、热证的生物学基础,首先从寒证、热证表型组合出发,构建了基于NEI的寒证、热证生物分子网络。通过网络功能分析,发现寒证生物分子网络以激素的功能模块为主,热证的生物分子网络以细胞因子的功能模块为主,神经递质功能模块共同分布于两个网络。进而从“异病同证”的角度验证了寒、热证的两种功能特性:通过分析比较21种寒证相关疾病、38种热证相关疾病的致病基因分布,发现热证疾病的致病基因显著分布于细胞因子通路,两组疾病共同的致病基因显著分布于神经递质通路。同时,通过网络拓扑结构分析,发现寒热证生物分子网络具有无标度(Scale-free)性质,即网络的功能实现主要依赖于一些关键节点。因此,从“方证相关”的角度,将寒热证网络的多个关键节点作为靶点,以此观测寒、热方剂干预炎症大鼠的生物效应,结果发现热性方剂主要作用于寒证的网络关键节点,寒性方剂主要作用于热证的网络关键节点,与“疗寒以热药,疗热以寒药”的辨证治疗原则一致^[15]。综合上述网络结构与功能特点,寒证、热证网络关键节点所组成的功能模块分别符合以下条件:以寒、热表型组合为基础;具有寒、热鉴别意义;能够有效区分寒、热方剂的不同作用特点,因此,可视作寒证、热证的生物分子

网络标志。此后,我们又建立了中医“气”及寒热机体动态演化的熵模型^[16],为进一步理解寒热证候生物分子网络标志的动力学变化,以及寒热证与其他证候的兼夹形式提供了基础。

4.2 证候生物分子网络标志与个体化诊疗

“同病异证、异病同证”反映了疾病之间的内在联系,也体现了个体化诊疗的一种准则。我们尝试将病与证的关系置于生物分子网络的背景下进行比较分析,并为此提出了融合文献挖掘与基因表达谱分析、构建特定病证生物分子网络的LMMA方法^[17],该方法也是用于分析同病异证、异病同证分子基础的前提条件。以血管新生相关疾病的寒热辨治为例,血管新生是炎症、肿瘤、心血管病等重大疾病的共性病理过程,我们从中医络脉理论出发,对血管新生提出了“络道亢变”这一观点^[18],并采用LMMA方法构建了血管新生生物分子网络。结合清代叶天士《临证指南医案·诸痛》“络中气血,虚实寒热,稍有留邪,皆能致痛”之理论,我们的研究发现,寒热证生物分子网络与血管新生生物分子网络之间存在共同的信号通路,即病与证在网络层面存在结合点。同时寒热证候的网络标志还可有效区分血管新生的不同分子机制,例如,TNF- α 是寒热证网络共同的关键节点,TNF- α 在不同水平下与寒、热证不同分子发生相互作用,并分别与血管新生过度、不足两种状态有关。上述结果提示,寒热证候可能反映了血管新生发生、发展过程中不同的内在环境,适合于采用寒热不同性质的药物进行针对性干预^[15]。由于血管内皮细胞的变化也被认为是血瘀证病理变化的中心环节^[19],因此,一方面,我们的研究提示,在分子生物网络基础上可望进一步理解寒热、血瘀等不同证候之间的关系;另一方面,证候生物分子网络标志可望成为一种从分子层面对疾病进行“辨证论治”的新途径。

5 证候生物分子网络标志的应用

证候客观化与个体化诊疗:证候生物分子网络标志在宏观的证候表型与微观的生物学指标之间建立了有机的联系,并可从中阐发证候的内在整体特性,从而为证候生物学基础研究提供了一种可行的思路与方法,对于证候客观化、微观辨证以及个体化诊疗,具有重要推动作用。同时也有助于对病证关系、方证关系、方剂作用机理等中医药研究的共性问题,给予新的理解。

中医药临床效应评价:利用证候生物分子网络标志,在中医药临床效应评价中可望起到扩大证据来源、增加传统证据可信度的作用。以证候生物分子网络标志为基础,还能够预测中医药的临床效应指标,分析中



医药临床效应指标之间的关联及其整体性能,理解疾病客观指标与中医证候指标间的关系,从而区分疾病效应与证候效应。

方剂配伍规律与综合作用机理:证候生物分子网络的无标度性质表明,网络对单因素干预具有强耐受性,而受多因素协同作用时则变得脆弱,这为方剂配伍的合理性给出了一种解释^[15]。协同作用是方剂通过配伍而形成综合效应的基础。从证候生物分子网络标志出发,可认为方剂协同作用的“涌现”来自于方剂成分在作用靶点上的网络联系。而通过分析靶点的网络联系,可望逆向推导方中成分的有效组合。我们按此思路初步建立了基于生物分子网络推断药物组合协同作用的方法,从传统方剂中发现并验证了3种具有协同作用的有效成分组合^[20]。

中药药性的生物学基础:中药药性理论是联系辨证与论治的桥梁。从生物学角度来看,中药具有何种药性与中药相关于何种证候状态密不可分,因此,中药药性的生物学基础可以通过中药相关的证候生物分子网络标志来界定。我们关于寒热药性的前期研究^[15]也提示了这一点。而以中药药性、方剂配伍的生物学内涵为依据,中药的特色理论也可用于指导西药的性质、西药的组合等研究。

6 结语与展望

证候生物分子网络标志的构想,从复杂生物系统层面,将宏观的证候表型与微观的生物学指标进行了有机结合,并初步形成从描述性转为预测性、从实体转向关系的证候生物学基础研究模式与方法,对于深入认识证候的生物学内涵具有积极意义,也为系统生物学、生物信息学的理念与方法与中医药的结合提供了一条可行的途径。我们的初步研究表明,证候生物分子网络标志不仅可应用于证候客观化、中医药临床效应评价、方剂配伍与综合作用机理、中药药性的生物学基础等多个领域,也有助于从宏观水平和微观层面加深对机体系统及其诊疗方式的认识。

参考文献

[1]李梢 中医证候与分子网络调节机制的可能关联 周光召主编 面向21世纪科技进步与社会经济发展[M] 北京:中国科学技术出版社 1999: 442

[2]Barabási AL. Network medicine—from obesity to the “diseaseome”[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(4): 404- 407.

[3]Auffray C, Chen Z, Hood L. Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare[J]. *Genome Med*, 2009, 1(1): 2

[4]Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682- 690

[5]Hiesinger PR, Hassan BA. Genetics in the age of systems biology. *Cell*, 2005, 123(7): 1173- 1174

[6]Li S. Network systems underlying traditional Chinese medicine syndrome and herb formula[J]. *Current Bioinformatics*, 2009, 4(3): 188- 196

[7]李艳,李梢,吕爱平. 类风湿性关节炎中西医结合临床诊察的数据挖掘分析[J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(11): 988- 991.

[8]Li S, Lu AP, Zhang L, et al. Anti-Helicobacter pylori immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of H. pylori infection in patients with precancerous lesions[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(4): 755- 758

[9]Li S, Wang R, Zhang Y, et al. Symptom combinations associated with outcome and therapeutic effects in a cohort of cases with SARS[J]. *Am J Chin Med*, 2006, 34(6): 937- 947.

[10]李梢 从维度与阶度探讨中医证候的特征及标准化方法[J]. *北京中医药大学学报*, 2003, 26(3): 1- 4

[11]Wu XB, Jiang R, Zhang MQ, et al. Network-based global inference of human disease genes[J]. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 189, E1- E11.

[12]Zhuang YL, Li S, Li YD. dbNEI: a specific database for neuro-endocrine-immune interactions[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2006, 27(1- 2): 53- 59

[13]Zhang J, Ma T, Li YD, et al. dbNEI 0: building multi-layer network for drug-NEI-disease [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(20): 2409- 2411.

[14]张伯礼,王晓晖. 证候及其现代研究[J]. *继续医学教育*. 2006, 20: 1- 4

[15]Li S, Zhang ZQ, Wu LJ, et al. Understanding ZHENG in traditional Chinese medicine in the context of neuro-endocrine-immune network[J]. *NET Syst Biol*, 2007, 1(1): 51 - 60

[16]Kang GL, Li S, Zhang JF. Entropy-based model for interpreting life systems in traditional Chinese medicine[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2008, 5(3): 273- 279

[17]Li S, Wu LJ, Zhang ZQ. Constructing biological networks through combined literature mining and microarray analysis: a LMMA approach[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(17): 2143- 2150

[18]李梢,王永炎. 类风湿性关节炎从“络”辨治的理论体系初探[J]. *中医杂志* 2002, 43(2): 85- 88

[19]王阶,姚魁武. 血瘀证证候实质研究进展与思考[J]. *中国医药学报*, 2003, 18(8): 490- 493

[20]李梢,张宁波,张博. 基于基因网络的药物组合协同作用确定方法 2008年申请中国发明专利 申请号: 200810239284 4

(收稿日期: 2009- 05- 08; 修回日期: 2009- 07- 07)

[编辑: 黄 健]