

## • 综述 •

## 代谢组学研究现状与展望

徐 旻<sup>1</sup>, 林东海<sup>1\*</sup>, 刘昌孝<sup>2\*\*</sup>

(1. 中国科学院 上海药物研究所, 上海 201203;

2. 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

关键词: NMR; GC-MS; 代谢组学; 模式识别; 药物评价

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)09 - 0769 - 06

## Current status and prospect of metabonomics

XU Min<sup>1</sup>, LIN Dong-hai<sup>1\*</sup>, LIU Chang-xiao<sup>2\*\*</sup>

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 2. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

**Key words:** NMR; GC-MS; metabonomics; pattern recognition; drug evaluation

人类基因组测序工作的完成,迎来了后基因时代。人们对生命过程的理解有了很大的提高,研究的热点转移到基因的功能和几个“组学”研究,包括研究核糖核酸(RNA)转录过程的转录组学、研究某个过程中所有蛋白及其功能的蛋白质组学、研究代谢产物的变化及代谢途径的代谢组学。

基因组学、转录组学、蛋白质组学与代谢组学之间存在十分密切的联系。众所周知,生物信息从DNA、mRNA、蛋白质、代谢产物、细胞、组织、器官、个体、群体的方向进行流动,形成了DNA、mRNA、蛋白质、代谢产物、细胞、组织、器官、个体到群体这几个研究层次。生命现象是基因、mRNA、蛋白质、代谢产物、细胞、组织、器官、个体和群体等层次有机整合的结果。以基因、mRNA、蛋白质、代谢产物为研究对象的基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢

组学自然也是一个有机的整体,它们都是系统生物学特别是分子系统生物学研究的重要组成部分。系统生物学是后基因组研究最具挑战性的一个研究领域。它包括转录组、蛋白质组、代谢组学分析等分子生物学研究,涉及数学分析、计算机应用、模型建立和仿真等诸多方面的研究内容<sup>[1,2]</sup>。

代谢组学相对于其他组学而言是一门较新的组学,不过已经显示了其在药物发现过程中的巨大潜力,它可以在药物发现过程的前期就能识别药物的毒性,避免了药物发现过程中的损耗。代谢组学研究有望成为新药发现与研发过程的一个必需部分<sup>[3]</sup>。

## 1 代谢组学的历史回顾

代谢组学作为一门新发展的技术,它是通过考察生物体系受刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)其代谢产物的变化或其随时间的变化,研究生物体系的代谢途径的一种技术<sup>[4]</sup>。

最初人们提出了代谢物组(metabolome)的概念。严格地说,代谢物组应该是指某一生物或细胞所有的代谢产物(metabolite)。在实际工作中,由于分析手段的局限性,更多人倾向于把代谢物组局限于某一生物或细胞中所有的低相对分子质量代谢产

收稿日期: 2005-02-23.

基金项目: 中科院“百人计划”研究基金国家 973 计划资助项目(2004CB518902); 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2003AA2Z347D).

通讯作者 \* Tel: 86 - 21 - 50806036,

E-mail: dhlin@mail.shnc.ac.cn

\*\* Tel: 86 - 22 - 23006863, Fax: 86 - 22 - 23006860,

E-mail: liuchangxiao@vip.163.com

物。与基因组学、转录组学和蛋白质组学相对应,代谢物组学是一门对某一生物或细胞所有低相对分子质量代谢产物进行定性和定量分析,以监测活细胞中化学变化的科学。

在人们逐步的研究过程中,提出了一些相关概念,如代谢物靶目标分析 (metabolite target analysis)、代谢轮廓(谱)分析 (metabolic profiling analysis)、代谢组学 (metabonomics 或 metabolomics) 和代谢指纹分析 (metabolic fingerprinting analysis)。其中, metabolomics 和 metabonomics 分别从 metabolome 和 metanome 演化而来。Metabolomics 最早出现在 Fiehn 小组的工作中, Fiehn<sup>[5-8]</sup> 研究小组主要研究植物生理代谢网络,其分析技术主要以 GC-MS 为主,也利用 NMR 和 MS 技术;而 metabonomics 由 Nicholson<sup>[4,9]</sup> 率先提出,主要利用核磁共振手段分析动物体的代谢过程。因此有人提出以分析手段来区分 metabolomics 和 metabonomics,目前国内的代谢组学研究小组基本达成共识,即用 metabonomics 一词来表示“代谢组学”。

## 2 代谢组学的研究手段

Fiehn 研究小组的一系列有关植物代谢网络的研究比较有代表性,他们用 GC/MS 方法对模板植物拟南芥的叶子提取物进行了研究,定量分析了 326 个化合物,并确定了其中部分化合物的结构<sup>[7]</sup>。

Nicholson 等在长期研究生物体液的基础上提出的基于核磁共振 (NMR) 方法的 metabonomics,是定量研究有机体对由病理生理刺激或遗传变异引起的、与时间相关的多参数代谢应答,它主要利用核磁共振技术和模式识别方法对生物体液和组织进行系统测量和分析,对完整的生物体 (而不是单个细胞) 中随时间改变的代谢物进行动态跟踪检测、定量和分类,然后将这些代谢信息与病理生理过程中的生物学事件关联起来,从而确定发生这些变化的靶器官和作用位点,进而确定相关的生物标志物。除了 GC-MS 和核磁共振之外, HPLC 和 LC/TOF-MS 也被用于这方面的研究<sup>[10]</sup>。

## 3 基于 NMR 的代谢组学研究

与 MS 和 HPLC 相比, NMR 的缺点是灵敏度较低,但其优点也是非常明显的。NMR 方法具有无损伤性,不会破坏样品的结构和性质,可在接近生理条件下进行实验,可在一定的温度和缓冲液范围内选择实验条件;可以进行实时和动态的检测;可设计多种编辑手段,实验方法灵活多样。NMR 还有一个重要的特点,就是没有偏向性,对所有化合物的灵敏度

是一样的,而 MS 则存在离子化程度和基质干扰等问题。NMR 氢谱的谱峰与样品中各化合物的氢原子是一一对应的,所测样品中的每一个氢原子在图谱中都有其相关的谱峰,图谱中信号的相对强弱反映样品中各组分的相对含量。因此, NMR 方法很适合研究代谢产物中的复杂成分。实际上, NMR 氢谱很早就被用于研究生物体液,从一维高分辨<sup>1</sup>H 谱图可得到代谢物成分图谱,即代谢指纹图谱<sup>[11]</sup>。

NMR 样品只需要简单的预处理。尿液和血清是代谢组学研究中的主要样品<sup>[12]</sup>。对于尿样,需要通过离心除去固体悬浮物质,然后加入磷酸盐缓冲液,保证所有样品的 pH 值都在一个很小的范围内,这样才能保证所得到的谱图中相同化合物的谱峰在相同的位置。对于尿样,常用的实验方法是 1D<sup>1</sup>H 谱,通常采用加预饱和的 1D NOESY 脉冲序列,这样可以得到较好的水峰抑制效果和较平直的基线。同时采用较高的数字分辨率和较长的弛豫延迟,以保证能够区分化学位移相近的谱峰,且能够得到准确的积分。而对于血清样品,则需要采用弛豫编辑<sup>[13]</sup>或扩散编辑<sup>[14]</sup>的方法来分别观测小分子和大分子的谱峰。随着 NMR 技术的发展,以前用于固体的魔角旋转 (MAS) 技术被移植到液体领域,使得人们可以研究以前难以用液体 NMR 研究的样品,如器官组织样品。利用 MAS 技术,人们可以得到完整的组织样品高分辨谱图<sup>[15]</sup>,扩展了代谢组学研究的样品范围,同时可以更全面地对一个系统进行深入的研究。

在得到<sup>1</sup>H NMR 谱图之后,通常以  $\delta 0.04$  为单位,将谱图划分成若干区域,并对所有区域进行积分,然后将积分值归一化后输出。在得到了这些数据之后,就可以利用模式识别 (pattern recognition, PR) 方法来处理和分析这些数据<sup>[16]</sup>,得出有价值的生物学信息 (图 1)。在代谢组学的研究中,最简单常用也是比较有效的模式识别方法是主成分分析法 (principal component analysis, PCA)。PCA 的特点是将分散在一组变量上的信息集中到某几个综合指标即主成分 (principal component, PC) 上,利用这些主成分来描述数据集内部结构,实际上也起着数据降维的作用。主成分是由原始变量按一定的权重经线性组合而成的新变量,这些变量具有以下性质: (1) 任意两个主成分之间都是正交的; (2) 第 1 个主成分包含了数据集的绝大部分方差,第 2 个主成分则次之,依次类推。这样,由前 2 个或 3 个主成分作图,就能够很好地反映数据集所包含的生物化学变

化。这样的主成分图能够直观地描述药物作用到器官之后,或者基因改变之后生物体内的代谢模式的变化。每一个样本在主成分图上的位置纯粹由它的代谢反应所决定。在这种比较简单的方法中,将从受试动物得到的样本与 NMR 产生的代谢组数据库进行比较,就可以确定它的主成分图上的位置,从而确定其机制,并有可能找到生物标志物。处于相似病理生理状态的动物得到的样本通常具有相似的组分,因此主成分图中也处于相似的位置,许多代谢物之间的相关性很令人满意,因此需要发展或采用更复杂的分析方法。另外,一些环境因素和性别、饮食等因素都会影响分析结果,因此,需要采用滤噪技术,如正交信号校正(orthogonal signal correction)<sup>[17]</sup>,同时采用更为复杂的分析方法,如偏最小二乘法、判别分析(PLS-DA)<sup>[18]</sup>和人工神经网络<sup>[19]</sup>。用这类方法可以建立复杂的数学模型,对未知样本进行预测分析<sup>[4,9]</sup>。

#### 4 代谢组学的应用

4.1 药物作用(药效和毒性)模型的鉴别和确证  
新药发现和开发领域中基因组学和蛋白质组学等新技术的应用,发展并推进了药物作用靶位或受体的发现和鉴别。组合化学提供的大量化合物以及从天然产物(包括中草药)提取的大量样品,为建立高通

量筛选提供了在细胞和分子水平进行评价筛选化合物,以发现新的生物活性物质。但从整体观念来看,新药的发现最终必须在整体动物的药理和疾病模型上予以证实,才能将生物活性化合物转化为候选化合物进入开发研究。在此过程中,上述新技术还存在较多的缺陷。代谢组学作为一种系统方法,能在鉴别和确证药理和疾病模型上发挥作用。成功的疾病治疗必须使代谢网络中的缺陷部分正常化,同时又不得干扰其他维持健康所必须的代谢途径的调控。代谢组图谱能同时反映代谢网络中多个生物化学途径的成百上千个化合物。新药发现和开发的目的是要从中获得能使代谢平衡由疾病状态恢复到正常状态(即药效研究的目的),而不是出现病理状态(即应该降低或消除的不良反应或毒性)。代谢组学研究可以区别不同种属、不同品系动物模型的代谢状态,鉴别与人体疾病状态的差异,寻找人类疾病、药效和毒性的适宜动物模型。在用动物实验的结果或细胞水平的实验结果预测人的实验结果,生物标志物起着桥梁的作用。Aardema等<sup>[20]</sup>认为具有以下关系(图2)。对于实验动物模型所得到的反映毒性的关键基因表达指纹如与人有高度的相似性,表明发生在动物模型的分子损伤和效应与人相似。

4.2 药物作用机制的研究 如前所述,代谢组学作为一种系统方法,能在鉴别和确证药理和疾病模型

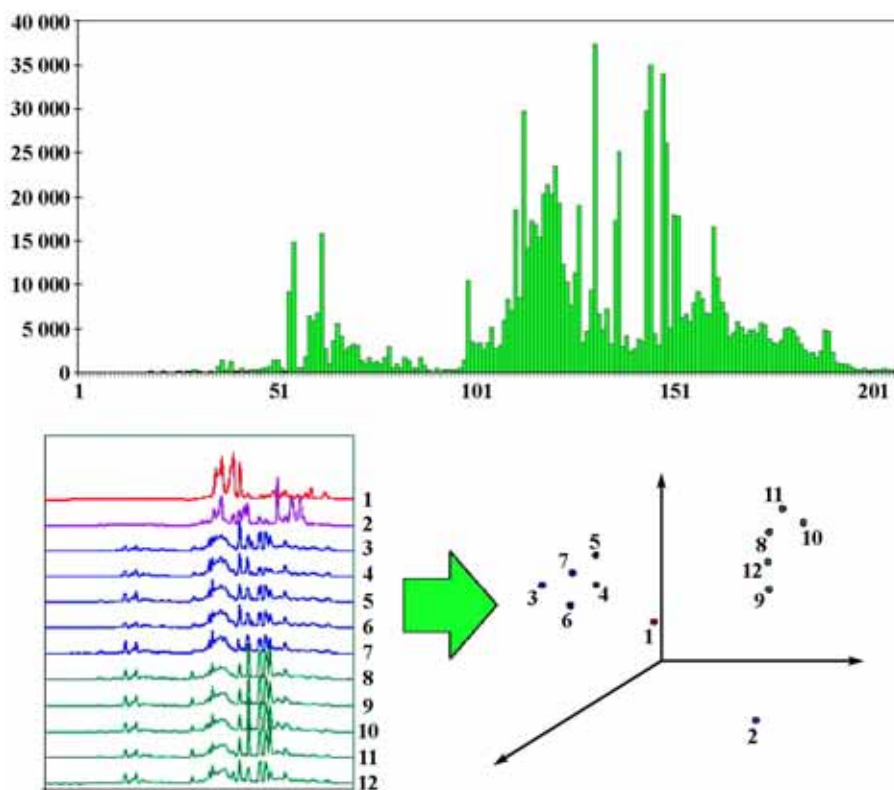
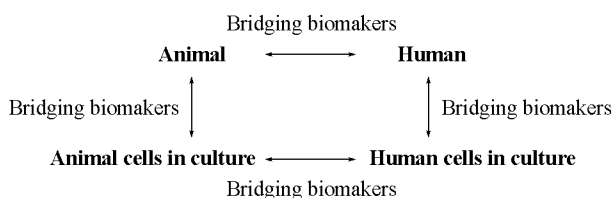


Figure 1 Analysis of main metabolites



**Figure 2** Application of bridging biomarkers to extrapolate from test models to humans

上发挥作用。成功的疾病治疗必须使代谢网络中的缺陷部分正常化,同时又不得干扰其他维持健康所必须代谢途径的调控。药物的作用机制的研究就是研究药物在这种调控作用中所起的作用和如何起作用。代谢组学研究“代谢指纹图谱”,它不仅研究药物本身的代谢变化,而主要是研究药物引起的内源性代谢物的变化,更直接反映体内生物化学过程和状态的变化。通过认识体液“代谢指纹图谱”变化的原因,阐明药物作用靶点或受体。受体学说已经成为现代医学科学的重要理论,它是说明细胞如何识别、接受和传递信息的学说。象人体这样复杂的多细胞系统,有赖于遗传信息和神经及体液因素的正常传递,而这种信息传递在相当程度上依赖于各种受体。从药理学角度看,则依据药物分子与受体分子之间的反应规律,在药物分子结构和效应的关系基础上发现新药并最终使新药具有更好的疗效和更少的毒性和副作用。

根据受体学说,作者<sup>[21-23]</sup>在进行由勾藤等多味中药组成的多动合剂的生物化学机制和比较两种抗抑郁药物(氯氮平和奎的平)的生物化学机制研究中,应用代谢组学方法,采用 HPLC 测定给药动物血清中多种内源性神经递质(Ach, DA, NE, 5-TH 等)的动态变化,而不是测定药物有效成分的变化进行该项目研究。从代谢物组成和含量的经时变化发现具有疗效的生物标志物,认为药物的整体作用产生的生物化学物质(神经递质)是其药效的基础物质,证明这 3 种药物的作用机制与 DA 受体有关。

利用代谢组学研究磷酸二酯酶 IV 抑制剂 CH018 形成的血管损伤与炎症反应的关系,发现该化合物引起的尿代谢物组图谱改变是血管损伤造成的,与炎症反应无关<sup>[24]</sup>。又如抗糖尿病药物罗格列酮对脂质代谢物组的影响的实验中,发现其作用机制是抑制动物肝脏-血液的脂交换<sup>[25]</sup>。从成功的例子不难看出,用代谢组学方法研究所揭示的生物化学变化很容易与传统手段的测定结果联系,更容易评价药效作用和发现药物作用的生物化学物质基础

和作用机制。

**4.3 药物的临床前毒性评价** Nicholson 研究小组利用基于 NMR 的代谢组学技术,在药物的毒性评价方面做了大量卓有成效的工作。其工作涵盖分析平台的建立、结果的重现性分析和改进、基因改变及相应代谢响应的特性研究、化学计量学方法等。六家制药公司(Bristol-Meyers-Squibb, Eli Lilly, Hoffmann-La Roche, Novo Nordisk, Pfizer, and Pharmacia)和英国伦敦帝国理工大学联合组成了 COMET (Consortium for Metabonomic Toxicology) 联盟,在 COMET 的研究项目中,主要利用 <sup>1</sup>H NMR 技术、模式识别和专家系统,根据已知毒性物质的病理效应对被检测的生物组织进行分类。该项目的主要目标是:(1) 对实验对象(老鼠的尿液、血清和组织)中代谢物的病理和生化变化进行详细的多维描述;(2) 建立加入“有毒药物”后代产物的 NMR 谱图数据库;(3) 建立毒性预测的专家系统;(4) 寻找各类生物标记物;(5) 通过对有毒和无毒类似物的分类,测试所建立的专家系统<sup>[26]</sup>。现在,COMET 正在建立老鼠尿中和雄性动物血清中代谢物的 NMR 谱图库,研究人员大约要对 150 种典型药物进行研究。由 Nicholson 等建立的 Metabotrix 公司与 Waters 公司于 2002 年 3 月 10 日签署了一个为期 3 年的协议,由 Waters 提供 LC/MS 仪器, Metabotrix 帮助 Waters 开发代谢组学技术,包括基于 LC/MS 和 NMR 的数据处理方法、信息学和化学计量学模型等。双方合作的重点放在疾病诊断和药物毒性的代谢组学研究。

**4.4 药物的临床前安全性评价** 临床前安全性评价的目的是提供新药对人类健康危害程度的科学依据,预测上市新药对人类健康的危害程度。药物毒理学的目的是观察和测定化学物质对机体引起的损害、发病机制以及对机体本身的影响。而在研究中能够提供更多重要信息的是毒性病理学的研究。毒性病理检查能够判定药物造成病理性损伤的部位、程度、性质和预后等基本问题,因而可为药物的安全性提供重要的依据。在毒理学研究中大部分实验要进行动物试验,无论是急性毒性试验、长期毒性试验、致畸试验、致癌试验等病变的发现,部位的确定,病因的探索都离不开毒性病理学的检查和诊断。试验的周期越长,毒性病理学检查的结果就越重要。因此,毒性病理学是毒理学中最为重要的组成部分,也是临床前安全性评价工作中最重要的环节。

用新技术新方法进行毒性机制的研究是国际上

一个重要的发展趋势。安全性评价必须在保证检测数据可靠性的同时,引进先进的分子生物学等新技术和新方法,深入地进行毒性机制的研究,提高安全性评价的技术分析水平。代谢组学已经作为一种独立的技术被广泛地应用于候选药物的毒性评价,还被几家制药公司纳入其药物研发方案中。许多生物化学、毒理学和临床化学的问题都可以用基于高分辨 $^1\text{H}$  NMR的代谢组学来加以阐述。从生物体液的 $^1\text{H}$  NMR谱图可以得到大量的代谢物数据,并由此确定毒性的靶器官,推导出毒性的生化机制,发现损伤的发生、发展和消失过程中的生物标记物<sup>[27,28]</sup>。

**4.5 疾病诊断** 由于机体的病理变化,机体的代谢产物也相应地产生了某种变化。对这些由疾病引起的代谢产物的响应进行代谢组学分析,能够帮助人们更好地理解病变过程及机体内物质的代谢途径,发现疾病的生物标记物,并辅助临床诊断。Brindle等<sup>[29]</sup>应用 $^1\text{H}$  NMR技术,以36例严重心血管病患者(triple vessel disease, TVD)和30例心血管动脉硬化患者(normal coronary arteries, NCA)的血清和血浆为研究对象,进行了代谢组学分析,结合PCA, SIMCA, PLS-DA, OSC-PLS等模式识别技术建立了判别心血管疾病及其严重程度的新诊断方法。该方法的灵敏度及专一性高于90%并且具有最小限度的侵入性,仅需几滴血液,就可利用核磁共振指纹谱和计算机模式识别技术,判断出心脏病的严重程度。它优于传统的血管造影术,用于检测心脏病时具有快速、廉价、安全的优点且副作用少。许国旺<sup>[30-32]</sup>等采用毛细管电泳方法(CE),通过代谢靶标分析,以尿中13~15种核苷浓度为数据矢量,用PCA法处理数据,对分别患有10多种癌症的68位癌症病人和54位正常人进行分类研究,识别率达72%。对用HPLC法测定206位正常人和296位肿瘤患者尿中15种核苷排放水平进行研究,也得到类似的结果。采用人工神经网络软件对数据进行处理,对肿瘤患者的识别率可达83%。该项目已通过中国科学院组织的鉴定,认为达到国际领先水平,目前正在国家科技部和辽宁省重点基金的支持下,对肿瘤诊断专用仪器及相关试剂盒进行研究。

## 5 代谢组学研究的展望

目前代谢组学技术可以从一个生物样品中检测出数百种低相对分子质量的化合物。这些化合物的相互作用可以和细胞的生物化学和生理学相联系。利用代谢组学作为技术手段的研究项目将会越来越

多。代谢组学在药物开发、临床诊断、微生物和植物、营养科学中的重要性已越来越显现。Front Line策略咨询公司在其《代谢产物组:市场与技术的战略评估报告》中预测,代谢组学技术将广泛应用到药物靶点的发现、新药的开发、毒理学研究、疾病的预防和诊断及农业等领域。此外,代谢组学分析系统的硬件、软件技术都将进一步提高,朝着整合化、自动化和高通量的方向发展,使人们能够以更快的速度对代谢组更大的部分实现自动分析和可视化。

国内代谢组学的发展才刚刚起步,还有许多基础工作有待完善。核磁共振实验方法的选择和优化,数据分析所采用的化学计量学方法的发展和选择,这些方面的工作还有很多可以开展。尤其是很多传统医学的瑰宝有待于用代谢组学方法进行研究,以得到更深入的阐述。在分析手段方面,各种技术都各有所长,怎样进行优势互补,使得各种分析技术的数据能统一、交叉验证也是一个亟待解决的问题。

## References

- [1] Kitano H. Systems biology: a brief overview [J]. *Science*, 2002, **295**(5560): 1662 - 1664.
- [2] King RD, Whelan KE, Jones FM, *et al.* Functional genomic hypothesis generation and experimentation by a robot scientist [J]. *Nature*, 2004, **427**(3): 247 - 252.
- [3] Liu CX, Li C, Lin DH, *et al.* Significance of metabolomics in drug discovery and development [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacol*, 2004, **4**(2): 87 - 96.
- [4] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, *et al.* Metabolomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, **1**(2): 153 - 161.
- [5] Fiehn O. Metabolic networks of *Cucurbita maxima* phloem [J]. *Phytochemistry*, 2003, **62**(6): 875 - 886.
- [6] Fiehn O. Link between genotypes and phenotypes [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **48**(2): 155 - 171.
- [7] Taylor J, King RD, Altmann T, *et al.* Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning [J]. *Bioinformatics*, 2002, **18**(3): 241 - 248.
- [8] Hall R, Beale M, Fiehn O, *et al.* Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(7): 1437 - 1440.
- [9] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. "Metabolomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multi-variate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, **29**(11): 1181 - 1189.
- [10] Plumb RS, Stumpf CL, Granger JH, *et al.* Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and

- multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids [ J ]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, **17**( 23 ): 2632 - 2638.
- [ 11 ] Bales JR, Higham DP, Howe I, *et al*. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine [ J ]. *Clin Chem*, 1984, **30**( 3 ): 426 - 432.
- [ 12 ] Nicholson JK, Wilson ID. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids [ J ]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 1989, **21**( 4 ): 449 - 501.
- [ 13 ] Tang H, Wang Y, Nicholson JK, *et al*. Use of relaxation-edited one-dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma [ J ]. *Anal Biochem*, 2004, **325**( 2 ): 260 - 272.
- [ 14 ] Beckwith-Hall BM, Thompson NA, Nicholson JK, *et al*. A metabolomic investigation of hepatotoxicity using diffusion-edited <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of blood serum [ J ]. *Analyst*, 2003, **128**( 7 ): 814 - 818.
- [ 15 ] Griffin JL, Cemal CK, Pook MA. Defining a metabolic phenotype in the brain of a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia 3 [ J ]. *Physiol Genomics*, 2004, **16**( 3 ): 334 - 340.
- [ 16 ] Wang Y, Bollard ME, Keun H, *et al*. Spectral editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues [ J ]. *Anal Biochem*, 2003, **323**( 1 ): 26 - 32.
- [ 17 ] Beckwith-Hall BM, Brindle JT, Barton RH, *et al*. Application of orthogonal signal correction to minimise the effects of physical and biological variation in high resolution <sup>1</sup>H NMR spectra of biofluids [ J ]. *Analyst*, 2002, **127**( 10 ): 1283 - 1288.
- [ 18 ] Gavaghan CL, Wilson ID, Nicholson JK. Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA [ J ]. *FEBS Lett*, 2002, **530**( 2 ): 191 - 196.
- [ 19 ] Holmes E, Antti H. Chemometric contributions to the evolution of metabolomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra [ J ]. *Analyst*, 2002, **127**( 12 ): 1549 - 1557.
- [ 20 ] Aardema MJ, MacacGregor JT. Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies [ J ]. *Mutat Res*, 2002, **499**( 1 ): 13 - 25.
- [ 21 ] Liu CX. Metabolomics in modern research of traditional Chinese medicines [ J ]. *Chin Tmdit Herb Drugs* ( 中草药 ), 2004, **35**( 6 ): 601 - 605.
- [ 22 ] Huang YR, Wei GL, Xiao SH, *et al*. Studies on pharmacodynamics and its biochemical mechanism of Ucnecaristem mixture for treating children’s hyperactivity syndrome by metabolomic method [ J ]. *Chin Tmdit Herb Drugs* ( 中草药 ), 2005, **36**( 3 ): 301 - 305.
- [ 23 ] Zhang ZP, Su Y, Yue N, *et al*. Biochemical mechanism of comparison studies of clozapine and quetiapine by using metabolomic method in rats [ J ]. *Asian J Drug Metab Pharmacok*, 2004, **4**( 4 ): 281 - 284.
- [ 24 ] Slim RM, Robertson DG, Ajbassam M, *et al*. Effect of dexamethasone on the metabolomics profile associated with phosphodiesterase inhibitor-induced vascular lesions in rats [ J ]. *Toxicol Appl Res*, 2003, **183**( 2 ): 108 - 116.
- [ 25 ] Watkins SM, Reifsnnyder PR, Pan HJ, *et al*. Lipid metabolome-wide effects of the PPAR gamma agonist rosiglitazone [ J ]. *Lipid Res*, 2002, **43**( 11 ): 1809 - 1817.
- [ 26 ] Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, *et al*. Contemporary issues in toxicology the role of metabolomics in toxicology and its evaluation by the COMET project [ J ]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, **187**( 3 ): 137 - 146.
- [ 27 ] Robertson DG, Reily MD, *et al*. Metabolomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid *in vivo* screening of liver and kidney toxicants [ J ]. *Toxicol Sci*, 2000, **57**( 2 ): 326 - 337.
- [ 28 ] Shockcor JP, Holmes E. Metabolomic applications in toxicity screening and disease diagnosis [ J ]. *Curr Top Med Chem*, 2002, **2**( 1 ): 35 - 51.
- [ 29 ] Brindle JT, Antti H, Holmes E, *et al*. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics [ J ]. *J Nat Med*, 2002, **8**( 12 ): 1439 - 1444.
- [ 30 ] Xu GW, Liebich H. Normal and modified nucleosides in urine as potential tumor markers analyzed by micellar electrokinetic capillary chromatography and high performance liquid chromatography [ J ]. *Am Clin Lab*, 2001, **20**( 1 ): 22 - 32.
- [ 31 ] Yang J, Xu GW, Kong HW, *et al*. Artificial neural network classification based on high performance liquid chromatography of urinary and serum nucleosides for the clinical diagnosis of cancer [ J ]. *J Chromatogr B*, 2002, **780**( 1 ): 27 - 33.
- [ 32 ] Zheng YF, Xu GW, Liu DY, *et al*. Study of urinary nucleosides as biological marker in cancer patients analyzed by micellar electrokinetic capillary chromatography [ J ]. *Electrophoresis*, 2002, **23**( 24 ): 4104 - 4109.