

复方丹参方的药效 物质及作用机理研究*

□张伯礼 高秀梅 商洪才** (天津中医学院 天津 300193)
赵宜军 王永炎 (中国中医研究院 北京 100070)

摘 要: 中医药治病的原则是“调整阴阳,以平为期”。以方剂为载体,注重整体,采用辨证论治的方法,进行综合治疗的思想符合现代治疗学的发展趋势。然而传统中医药缺乏对药效物质的微观分析和作用机理的科学阐释,成为影响中医药迅速发展的瓶颈。因此,以复方丹参方为范例,从方剂的配伍配比、作用机理、药效物质等方面进行系统的研究,不仅证实了复方丹参方多组分、多靶点治疗心血管病假说的科学性,而且为经典处方的二次开发提供了一种模式。本项工作将丰富现代药物治疗学,促进方剂配伍的科学诠释,开拓中药新药创制新思路,构建创新中药的理论基础。

关键词: 复方丹参方 药效物质 作用机理 配伍配比

方剂是一个复杂体系,方剂作用的人体也是一个复杂系统。要认识双重复杂系统,须将复杂系统中非线性规律部分降解为线性规律去研究,多个线性规律的综合有助于复杂系统的认识,因此研究方剂应遵循“复杂——简单——复杂”的原则,发挥其自身的综合优势,保持中药原方的配伍特点,同时借鉴西药的“分析”方法,通过有效组

分的配伍配比规律研究,最终构建药效组分基本清楚、作用靶点及原理基本清楚、高效低毒的现代中药。

作为药典方,复方丹参的生产厂家较多,且未形成合理的质控标准,制剂呈现多样性。同时各种剂型使用丹参和三七不同的有效组分,导致了临床疗效差异;而且丹参、三七、冰片不同组分在心肌缺血病理环节中各自的作用亦不明确,影响了复方丹参方的作用发挥。因

此我们以复方丹参为基础方,主要进行了以下研究:

一、探索丹参、三七在全成分、有效组分层次的配伍配比规律

配伍配比是方剂的核心与灵魂,体现中医药的特色和优势,它既不是简单的药物作用在数量上的相加,也不是机械的毒副反应的抵消,而是在辨证立法基础上,以法统方,立方遣药,有序组合而成的

收稿日期:2003-05-06

修回日期:2003-07-15

* 科技部国家重点基础研究发展规划项目(973项目G1999054403):方剂关键科学问题基础研究,课题负责人:张伯礼。

** 联系人:商洪才,主治医师,在读医学博士,主要从事心脑血管疾病及中药复方研究。Tel: 022-23051120, Fax: 022-27493265, E-mail: shanghongcai@sohu.com。

有制之师。

1. 丹参、三七全成分的配伍 配比规律研究^[1,2]

优选丹参/三七最佳配比是本研究的主要内容。在进行饮片(全成分)层次配伍研究的同时,为组分配伍研究提供技术平台和方法学基础,为效应明确的小复方的二次开发提供一种模式,同时为研制现代中药提供科学依据。

(1) 在整体水平上。应用犬冠状动脉左前降支结扎法造成急性心肌缺血模型,并与血流动力学模型有机结合,着眼于全成分、整体动物、多效应指标动态观察,建立了基线等比增减设计方法,对丹参/三七的不同比例: 10/0、10/1、10/3、10/6、10/10、1/10、0/10进行了多效应比较药理学研究。效应评价指标涉及到心外膜心电图(Σ -ST、N-ST)、心肌组织缺血区范围、心肌生化标志物(cTnI、CK-MB)、冠脉血流量、心肌耗氧量、血流动力学、一氧化氮、内皮素、自由基等。

结果表明:①以丹参为主的药对比例组,即10/6、10/3、10/1、10/0,有明显改善犬心肌缺血的作用,减轻由心外膜心电图所标测的心肌缺血程度,减少通过TTC染色所显示的缺血区。②以丹参为主的药对比例组对心肌钙蛋白的增高有明显的抑制作用,反映了丹参对心血管的直接作用强于三七。这与心外膜心电图、心肌染色所反映的结果基本一致。③在对冠脉血流量有效增加的各组中,以丹参为主的药组(10/0、10/3、10/6)作用较

强。消心痛组在给药后30min即发挥作用,但很快减弱;而中药组(10/0、10/3、10/6)作用平稳而持久、稳中有升,远后效应明显。④10/6、10/3两组可以明显改善左室收缩及舒张功能,增加心输出量及心脏指数,减少血管总外周阻力,而左室做功没有明显增加,心率、平均动脉压的波动较小。⑤0/10组(单纯三七)既促进NO的释放、保护SOD活性,又降低ET含量、减少MDA的产生,表现出较强的生物效应。

(2) 在细胞水平上。应用心脏微血管内皮细胞(CMEC)模型,对丹参、三七的上述7种比例进行了研究,其指标涉及到MTT、LDH、NO、ET等。

结果表明:①在正常培养条件下,丹参可促进增殖,三七反之,配比随着丹参量的减少和三七量的加大增殖效果减弱;对于NO和ET均有降低趋势,但无统计学意义。②在缺O₂损伤条件下,丹参促进CMEC增殖,三七反之,配比在10/1~10/6范围内,随三七量加大,促进CMEC增殖趋势明显。而在10/10~0/10范围内,随丹参量的减少,三七量的加大,CMEC增殖趋势减弱,各配比组均可显著降低NO释放(除10/6 P>0.05外,均P<0.01),且有降低ET分泌水平的趋势,而尤以10/1和10/6效果最佳。

2. 丹酚酸B、丹参酮ⅡA组分 配伍配比规律研究^[3]

丹参作为复方丹参方中的君药,具有重要的药理作用。丹参的主要水溶性物质丹酚酸B、脂溶性

提取物丹参酮ⅡA有各自的药理活性,两者配伍后有何药效变化;针对不同的体外培养细胞:心脏微血管内皮细胞(CMEC)、心肌细胞(CM)两者又有何不同的作用重点;对于心脏的保护作用,两者配伍后的最佳比例是多少,都是有待回答的问题。

研究以丹酚酸B、丹参酮ⅡA为配伍,以缺氧、肿瘤坏死因子(TNF- α)为刺激因素,CMEC、CM为靶细胞,观察不同配伍后的药效变化并从中寻找二者作用的最佳比例和各自的作用靶点及机制。

结果表明:①CMEC缺氧损伤时,各配比组均可提高CMEC活力,降低LDH释放,丹酚酸B、丹参酮ⅡA配伍后的作用优于单一药物,且以2/8组最显著;各配比组均有降低NO合成、ET释放的趋势。②CMEC被TNF- α 损伤时,各配比组均可提高CMEC活力,降低LDH释放,丹酚酸B与丹参酮ⅡA配伍后的作用强于单一药物,且以5/5组为最佳;各配比组均有增加SOD活性,减少MDA产量的趋势,丹参酮ⅡA抗氧化损伤的能力最强。丹参酮ⅡA提高NO合成、减少ET的释放的作用最显著。③CM缺氧损伤时,各配比组对CM增殖的作用不明显,但丹酚酸B的作用强于丹参酮ⅡA;丹酚酸B、丹参酮ⅡA配伍后减少LDH释放、NO合成的作用强于两者单独使用,且以5/5的比例为最佳。④CM被TNF- α 损伤时,各配比组均能明显减轻细胞的损伤程度,表现在细胞活力增强,LDH释放的减少,保护作用以8/2组最

佳, 5/5组次之; 各配比组均有升高SOD, 减少MDA的作用, 丹参酮II A减少MDA的作用最强。

二、明确丹参、三七、冰片全成分、有效组分治疗心肌缺血的途径、靶点及整合调节作用规律

复方丹参治疗心肌缺血的机制, 一般认为其有扩冠、降低心肌耗氧量、抗血小板聚集等作用, 但目前的研究还不足以揭示临床治疗机制, 其深层次的机理研究更少。已知其抗心肌缺血的机理不同于硝酸酯类化合物的释放外源性一氧化氮使冠脉扩张, 但其通过何种途径发挥对缺血心肌的保护作用, 其整合调节如何体现, 值得深入探讨。

1. 复方丹参方预处理加强缺血预适应心肌保护作用及机制研究^[4]

1986年Murry提出心肌缺血预适应(Ischemic Preconditioning, IPC)现象为心肌细胞保护及机理探讨开辟了新领域, 20世纪90年代受到广泛重视, 并开展了药物预适应研究。

多数中药发挥作用的途径不同于西药的直接对抗和补充, 而在于整合调节。复方丹参方治疗心肌缺血是否因其激活内源性保护物质而发挥作用, 尚不知晓。采用大鼠在体预适应模型, 观察了复方丹参方模拟和加强缺血预适应心肌保护作用及机制。

结果表明: 再灌组、早晚期假性预适应组坏死重量占缺血重量(IS/AAR)分别高达45%、47%、45%; 心律失常发生率也分别高达76.46%、55.56%、73.33%; 血清

中LDH含量也显著高于对照组, $P < 0.01$ 。缺血预处理后, IPC早期组IS/AAR与早期假性预适应组相比降低了17%, 晚期IPC组IS/AAR与晚期假性预适应组相比仅降低4%; 早期IPC和晚期IPC组心律失常发生率分别为11.76%、43.75%, 显著低于再灌和早晚期假性预适应组, $p < 0.01$; IPC后LDH释放也减少。说明缺血预适应可缩小缺血范围, 减少心律失常的发生率。复方丹参方预处理后, 在再灌、IPC基础上IS/AAR进一步缩小约10%~17%, LDH释放也减少, LDH含量以药物+晚期IPC组最低, 与晚期假性预适应组相比, $P < 0.05$, 但复方丹参方对心律失常的影响不明显。另外复方丹参方预处理后, 还可使血清中MDA下降, SOD活性增强。

通过免疫组化和RT-PCR方法研究发现, 复方丹参预处理后可以使早、晚期IPC组和再灌组的心肌细胞iNOS、PKC mRNA和蛋白表达明显加强, $p < 0.05$, 对再灌HSP70表达也有增加趋势。

2. 丹酚酸B预处理的心脏细胞保护作用及机制研究^[5,6]

丹参水溶性成分系统研究表明: 丹参含多种酚酸类化合物, 其中丹酚酸B的含量最高, 因此, 我们在CMEC和CM培养成功的基础上, 基于缺氧预适应(HPC)机制, 建立缺氧/复氧损伤的细胞模型, 以细胞活力(MTT)、乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、内皮素(ET)等生化指标及超微结构变化为评价标准, 观察了丹酚酸B预适应的细胞保护

效应; 并采用以蛋白激酶C(PKC)抑制剂chelery-thrine、 K_{ATP} 通道阻滞剂优降糖为工具药的方式, 在对内源性保护物质PKC、热休克蛋白70(HSP70)的mRNA表达影响上, 探讨了丹酚酸B预处理细胞保护的分子生物学机制。

结果表明: ①在正常培养条件下, 丹酚酸B可明显提高CMEC和心肌细胞的细胞存活率和SOD活性、降低LDH活性、维持正常的形态超微结构, 有降低CMEC的ET分泌和NO释放趋势。②缺氧预适应可增强细胞对随后较长时间缺氧/复氧损伤的耐受性, 表现为可提高细胞存活率和SOD活性, 降低LDH活性, 而且能明显降低CMEC因缺氧/复氧导致的ET和NO水平升高, 同时明显改善其形态超微结构变化。③丹酚酸B预适应具有与缺氧预适应相似的细胞保护效应, 对于CMEC表现为早期保护和延迟保护两个时相。④ K_{ATP} 通道阻滞剂优降糖不能消除HPC的CMEC保护作用, 选择性PKC抑制剂chelery-thrine消除了HPC的CMEC保护效应, 丹酚酸B预适应可以使CMEC被PKC抑制剂阻断的HPC效应重现。⑤在早期预适应中, 丹酚酸B预适应可促进缺氧/复氧损伤CMEC的HSP70 mRNA、PKC mRNA表达增强, 且明显优于HPC; 在晚期预适应中, 丹酚酸B预适应同样促使HSP70 mRNA表达增强, 且与HPC具有叠加效应。

三、明确复方丹参方药效物质基础、化学成分指纹谱及质控标准, 为中药质量提高和知识产权保护提供技术壁垒

方剂的药效物质基础不是单一成分,而是复杂的混合物,因此必须结合药理学对方剂药效物质降解分析,进行有效组分和有效成分的化学筛选,建立规范的提取方法,进行有效成分的指纹图谱识别和指标成分的定量分析,在主要药效学导向下,制定药材和方剂的质控标准。

选择复方丹参方中的10个成分作为指标^[7,8]:丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮IIA、三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Re、人参皂苷Rb1,采用高效液相色谱法对给药前后复方丹参方中丹参水溶性成分、脂溶性成分及三七皂苷类成分进行含量测定。根据这些成分理化性质间的差异,建立了色谱条件。对丹参、三七各配比(生药量之比:10/0、10/1、10/3、10/6、10/10、1/10、0/10)组方中主要成分的含量及稳定性进行测定和考察。在此基础上还对大鼠灌服复方丹参方后血清中的丹参素、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1进行检测和药物动力学研究。主要结论:

1. 复方丹参方不仅具有抗心肌缺血的作用,而且有增强缺血预适应效果 作用机制可能是扩冠和激活内源性保护物质的释放。

2. 丹参的作用靶点侧重于血管,其扩张冠脉的效应强于三七三七的作用靶点侧重于心肌,其对缺氧心肌的保护作用强于丹参;

3. 结合化学结果分析得出:二者配伍后存在协同互补效应,三七皂苷类成分可使丹参水溶、脂溶成分的含量稳定 丹参水溶性成分吸收入血较快(给药后30min),扩冠效应强,更适于速效;而丹参脂溶性成分和三七皂苷类成分吸收入血较慢(给药后60min),远后效应明显,更适宜长效。

4. 丹酚酸B与丹参酮IIA均有抗心肌缺血的作用,但各有侧重

5. 复方丹参方中丹参的水溶性成分 以丹酚酸B含量为最高,其次是丹参素、原儿茶醛;丹参脂溶性成分的含量高低依次为隐丹参酮、丹参酮IIA、丹参酮I;三七皂苷类成分则以人参皂苷Rg1含量为最高,其次是人参皂苷Rb1、三七皂苷R1,再次为人参皂苷Re。

6. 复方丹参方中各类成分的稳定性是三七皂苷类成分强于丹参水溶性成分,而水溶性成分的稳定性又优于脂溶性成分 复方丹参方配比不同时,同类成分间的稳定性有所差异,其稳定性随着三七在处方中所占比例的增大而呈增强的趋势,说明复方丹参方中各主要成分的含量及稳定性与配伍配比存在一定的相关性。

7. 建立的药物分析方法可作为复方丹参方各主要成分的质量控制标准,复方丹参方中的丹酚酸B、丹参素、人参皂苷Rg1和人参皂苷Rb1可经胃肠道吸收入血,提示可能为主要药效成分。

四、展 望

方剂的现代化研究是一项复杂而艰巨的系统工程。要完成表征现代化(工艺、质控、包装)相对容易,而内涵现代化(从饮片配伍到组分配伍)的实现要付出几代人的努力。方剂关键科学问题(两个基本清楚、三个化学层次、四个药理水平基础上的配伍配比)的解决,是今后方剂研究的重点。

参考文献

- 1 商洪才,张伯礼,高秀梅等.丹参三七药对不同配比药效学比较研究.辽宁中医杂志,2002,29(5):297.
- 2 商洪才,张伯礼,高秀梅等.丹参三七不同配比对急性心肌梗死犬心肌生化标志物的影响.天津中医,2002,19(2):43.
- 3 张萌.丹酚酸B/丹参酮IIA不同配比对心脏细胞的影响.天津中医学院学位论文,2002.
- 4 高秀梅,张伯礼,商洪才等.复方丹参方预处理加强缺血预适应心肌保护作用及机制研究.中国医学论坛报,818,819,820,821期.
- 5 郭利平,高秀梅,张萌等.丹酚酸B缺血预适应对心肌细胞的延迟保护作用研究.天津中医,2002,19(2):46.
- 6 张萌,杜嵘,郭利平.丹酚酸B对TNF- α 损伤大鼠微血管内皮细胞的影响.天津中医,2002,19(6):38.
- 7 潘桂湘,张伯礼,高秀梅等.复方丹参方中丹参三七主要化学成分的研究概述.天津中医,2002,19(5):75.
- 8 潘桂湘,张伯礼,乔延江.HPLC测定复方丹参中三种水溶性成分含量.中草药,2002,33(10):901.

(责任编辑:柳 莎 侯西娟)

欢迎订阅本刊,欢迎投稿。电话:010-62616352,传真:62652762, E-mail:wst@mail.casipm.ac.cn

Present Situation of Study on Quantized Diagnosis of Syndromes in TCM and Consideration Caused Thereby

Wang Jie and Yao Kuiwu

(Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091)

This article briefly analyzes the history and the status quo of the quantized diagnosis of syndromes in TCM, introduces and describes in detail several methods of quantized diagnosis of TCM syndromes, such as multivariate statistics and analysis, computer pattern recognition and DME/epidemiology, and puts forward some views about the status quo of the study in syndromes. It holds that firstly, in the study of quantized diagnosis of syndromes importance should be attached to the theory of TCM, and based on clinical practice collaboration should be carried out in multidisciplines, at various levels and through different approaches in order to ensure researchers' high level in mathematics and better mathematic methods they would use. As the result exact guarantee would be provided for the study on syndromes in methodology and problems in TCM be dealt with mathematic methods as a whole and secondly, attention should be paid to the scientificity, reliability and accuracy of background data which are used to set up mathematic models, seeking to set up an operational platform for quantized diagnosis of syndromes from the beginning of the study.

Key Words: syndrome, quantized diagnosis, traditional Chinese medicine

Study on Pharmaceutical Matters and Functional Mechanisms of Complex Prescriptions of Radix Salviae Milti Orrhizal

Zhang Boli, Gao Xiumei and Shang Hongcai

(Tianjing Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjing 300193)

Zhao Yijun and Wang Yongyan

(China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100070)

The principle for the treatment of diseases in traditional Chinese medicine (TCM) lies in "regulating Yin-Yang to seek equilibrium of all parts of human body". The thinking that with prescriptions as carriers attention is given to the integration and the methodology of treatment based on syndrome differentiation is adopted for integrated treatment, is in accord with the trends of the development of modern therapeutics. In traditional Chinese medicine, however, the deficiency in microscopic analysis of effective matters of drugs and the scientific explanation of their functional mechanisms have become bottle-necks in the development of TCM. Therefore, a systematic study of the compatibility and proportion of drugs in prescriptions and the functional mechanisms and effective matters of drugs has been carried out by taking the complex prescriptions of Radix Salviae Milti orrhizal as examples, which has not only proved that the hypothesis for the treatment of cardiovascular diseases by the multi-constituents and multi-targets of such prescriptions is a scientific one, but also offered a pattern for the second exploitation of classic prescriptions. This study will enrich the modern pharmaco-therapeutics, push forward the scientific explanation of compatibility of medicines in a prescription, create new ideas for the development of new Chinese medicines and build up a theoretical basis for the innovation of Chinese medicines.

Key Words: complex prescription of Radix Salviae miltiorrhizae, effective matters of a medicine, functional mechanism, compatibility and proportion of drugs in a prescription.

A Preliminary Analysis of Development of Chinese Patent Drugs for Diabetes

Zhou Huarong

(Taiji Academy of Medicines, Chongqing Municipality 400015)

Zhong Guoyue

(Academy of Chinese Materia Medica of Chongqing Municipality, Chongqing 400065)

This article analyzes the composition of prescriptions, the determination of indications and the form of drugs and dosages of the existing Chinese patent drugs for diabetes in China in accordance with the understanding of the pathogenic mechanisms of diabetes and from the viewpoint of traditional Chinese medicine, and points out that in the development of Chinese patent drugs for the prevention and control of diabetes the advantages of traditional Chinese medicine should be given full scope and the prevention and control of the development of chronic complications should be stressed in particular.

Key Words: diabetes, Chinese patent drug, research and development

Relationship between Yin–Yang and Organic Elements, Electrophilic Intensity and oxidation potential of Elements in Chinese Medicine

Jin Ri guang, Yang hong and Mu Xueyan

(College of Material Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing sub-cluster Life Power Technology Institute, Beijing 100029)

All kinds of organisms have their own distribution law of life-related elements, including Chinese medicines, and their oxidation potential is different. Generally, when the oxidation potential is higher, the Yang(+) attribute of ions will be stronger; otherwise, the Yin(–) attribute is stronger. It is discovered in the data from the analysis of the elements of Chinese medicines that the so-called Yin and Yang in the traditional Chinese medicine have close relationship with the distribution of oxidation potential of the elements in the fourth period. In the medicines with Yang attribute, elements with high oxidation potential are superior and on the contrary in the medicines with Yin attribute, elements with low oxidation potential are advantageous. Therefore, oxidation potential can be used to distinguish between Yin and Yang and identify the flavor of Chinese medicines. This paper explores the relationship among the electrophilic intensity of the cations of life-related elements, oxidation potential and the organisms of Chinese medicines, pointing out that linear relationship exists between oxidation potential and charge strength of various cations and that the cation has its Yin and Yang attributes in the light of oxidation potential and different cations have their different affinities for negatively charged electrons in microcircumstance as far as charge strength is concerned. It also indicates the intrinsic reasons of the flavors (pungent, sweet, bitter, acidity, salty and so on) of Chinese medicines and their corresponding structural characters of organic components and makes a further suggestion that the general organic components and flavors of Chinese medicines could be predicted through the distribution of the elements of biological power.