

## 应用新技术研究方剂药效物质基础的思路和方法\*

□ 陆茵\*\* 段金廛\*\* 丁安伟 陈建伟

(南京中医药大学/江苏省方剂研究重点实验室 南京 210029)

朱 荃 (南京中医药大学/国家规范化中药药理实验室 南京 210029)

**摘要:**由于在方剂现代化的研究过程中,传统的研究方法很难适应方剂复杂的化学成分与效应多样性,使得方剂物质基础及生物效应的研究成为中医药现代化科学研究的关键。本文就方剂物质基础与生物效应研究方面的一些共性问题,结合研究工作的实践与结果,提出应用生物技术领域的若干新技术开展方剂相关研究的一些思路和方法。

**关键词:**方剂 物质基础 生物效应 生物技术

成功的疾病治疗模式必须使机体代谢网络中的异常或缺陷部分正常化,同时又不得干扰其他维系健康所必须的代谢途径调控。中医药学正具有这样的特点和优势显示其理论体系的科学性与合理性。中医从整体出发,辨证施治,调和阴阳,维持机体内外环境的协调统一。方剂是实施对疾病调控的主要形式,并强调随病情发展变化而随证加减的动态调控,这是当代医学所追求的目标。

方剂研究的关键科学问题是方剂的药效物质基础及作用机理的研究,是中医药现代化研究的重要组成部分,对于继承和发展方剂配伍理论,更有效地指导临床和研创具有自主知识产权的中医药新产品,揭示方剂配伍的内在规律,实现从饮片配伍过渡

到药效成分配伍,从而改变中药的内在质量并走向国际具有重要意义。1999年以来,国家科技部及国家自然科学基金将方剂药效的物质基础研究列为重大攻关项目。然而,方剂药效物质基础研究也是中医药现代研究的难点,其研究思路与方法尚在探索之中。

方剂是以中药饮片为组成单位,在中医理法方药的理论指导下,经配伍组成的治疗系统。方剂的效应物质是由活性物质群构成的;方剂中每味中药所含成分往往多达几十种、上百种,起疗效的物质基础可以包括小分子化合物(挥发油、生物碱、黄酮类、皂苷类)及生物大分子(肽、蛋白、糖肽及多糖等)。活性物质群通过多靶点、多途径经整合发挥作用。而西药多为单一化合物,有特定的作用靶点,作用具有专一性。兴奋机体功能或抑制机体功能是其作用方式。但中医药缺乏对药效物质的微观分析和作

收稿日期:2005-07-25

修回日期:2005-08-01

\* 国家自然科学基金项目(30371727):活血化癥治则影响肿瘤转移的机理研究,负责人:陆茵;国家863计划“创新药物和中药现代化”重大专项项目(2003AA223247):通塞脉微丸的研究与开发,负责人:狄留庆。

\*\* 联系人:陆茵,教授,博士生导师,研究方向:生物技术在方剂研究中的应用,活血化癥方药对肿瘤血管生成及肿瘤转移的影响,Tel:025-86798154,Email:luyingreen@tom.com;段金廛,本刊编委,教授,南京中医药大学副校长,主要研究方向:中药资源的保护与利用。

用规律的科学阐释, 缺乏规范评价方法和量化的指标, 表现在内在质量的不可控及作用机理的不明确。

方剂作用物质的多样性及复杂性, 为研究带来了难以想象的工作量与难度。其治疗作用的物质基础的多样性可能鉴于:

①方药经口服吸收入血, 并以原型作用于机体器官和病灶部位的效应物质群及其化学成分;

②经体内代谢产生的具有生物效应的修饰物和代谢产物;

③生物体受到药物作用后或机体的内部环境的变化、基因的功能改变以及生物体自身分泌的生化产物。

针对如此浩繁的方剂中医理论、作用物质基础和生物效应复杂体系, 如何应用生物技术等现代科技手段简捷明了地研究、分析、评价并揭示中医方剂配伍的科学性和合理性, 为中医药现代化、国际化做出应有的贡献。我们依据自身的工作和积累提出一些思路供同道们参考。

## 一、方剂药效物质与作用机理研究的思路和方法

### 1. 利用细胞生物色谱分析方剂血清中的活性成分

色谱、光谱技术在中药成份分析中的应用, 极大地推动了中药及其复方成份的研究。然而, 效应与成分关系的研究难度在于难以得到一定量的可供效应分析化合物, 微量及纳克级的化合物效应分析技术不容易建立。细胞膜固相色谱技术就是在这一背景诞生的。我室从 1999 年开始, 对细胞膜固相色谱技术进行探索。细胞膜固相色谱技术与一般生物色谱技术的不同之处在于, 90% 以上生物靶点存在于细胞膜, 比应用单一受体、离子通道更能体现方剂的效应及方剂化学成分复杂性。

细胞膜固相色谱技术的基本原理是: 药物效应的产生是由于药物分子与细胞上的生物大分子 (如受体) 结合, 激活了生物信号放大系统。因此, 能与细胞靶点结合的化学成分才有可能产生生物效应。本实验室首先采用红细胞膜固相色谱分析当归提取液的成分, 得到了洋川芎内酯等化合物, 用血小板固相色谱法分析丹参注射液和脉络宁注射液的成分,

得到了丹参素、原儿茶醛、绿原酸类等一群化合物。研究提示细胞膜固相色谱是一个快速、简便、高效的效应-物质基础的研究方法, 适合方剂这一复杂体系的效应-化学群的研究。方剂的效应是由成分群实现的, 作用环节不仅包括已知的效应靶点, 还包括有待探索的效应靶点或信号通路, 这正是中医方剂学需要解决的方法学问题。

本实验室建立的细胞膜固相色谱优点在于可以将生物学部分与 DAD、NMR、MS 结合、联动, 直接获取效应成分 (群), 并验证该成分 (群) 的效应特征。

以玉屏风散为例, 应用淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞膜研究黄芪、白术、防风的地位, 及其效应-化学关系配伍的变化; 应用淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞膜固相色谱法分析给予方剂提取物后的血清、脑脊液、淋巴液等, 分析其体内代谢后效应-物质基础、细胞因子、信号转导等变化, 试图阐明方剂学配伍规律及其配伍规律的当代生物学基础。

以二陈汤为例, 用肺上皮细胞、肺杯状细胞、肺腺细胞固相化分析应用二陈汤后血清、脑脊液、淋巴液、肺灌流液的化学成分, 并分析成分与信号转导及细胞因子各效应之间的关系, 阐明这二味药物的配伍规律 (图 1)。

### 2. 利用人肠上皮细胞系 (Caco-2 细胞) 分析方剂有效组份在肠道中吸收的过程的改变

进入血清之前, 方剂的有效成分可能有 3 种来源: 药材固有的化学成分; 加工炮制和煎煮过程的产物; 肠内菌代谢产物。

Caco-2 细胞来源于人体结肠腺癌细胞。由于 Caco-2 细胞在培养条件下可自发进行上皮样分化并可形成紧密联结, 其形态学、标志酶的功能表达及渗透特征与小肠相似。

在分析血清中方剂配伍有效成分的改变与效应关系研究之前, 可以对方剂中各种配伍关系进行测试成分组渗透 Caco-2 细胞 (人肠上皮细胞系) 或 MDCK (Madin-Darby canine Kidney) 细胞膜的能力来简单模拟:

(1) 预测方剂中成分组在体内的吸收过程。

(2) 研究各成分组合 (方剂配伍后) 对吸收的影

响作用。

(3) 小肠内各代谢酶对方剂中各组分间的影响。

### 3. 利用报告基因的方法分析血清中效应成分的改变

基本思路是方剂配伍的变化而导致血清中化学成分的改变, 因而其效应也发生改变, 效应的变化可以通过细胞中的报告基因表达出来。该思路的提出可能简化方剂作用物质基础的研究, 从而检测出方剂血清中的效应成分改变与效应之间的关系。其基本步骤为:

(1) 动物经多次给药后, 体内达到稳态的血药浓度(结合血清指纹图谱的研究)。采集血液、分离血清, 以含此药物成分的血清进行含报告基因的细胞体外实验的方法。

(2) 构建带有基因效应元件与荧光素酶基因(报告基因)质粒, 转染细胞筛选稳定表达的细胞系, 通过荧光素酶量的变化从而可知方剂中的活性成分调控下游基因的表达。

该方法客观地模拟了药物与机体相互作用过程, 比较符合体内环境中产生药理效应的真实过程。其血清所含的药物成分也是经过体内一系列生物转化后真正发挥作用的有效成分及药物作用下机体所产生的内源性有效成分, 并且通过测定血清的药物成分, 有利于寻找到机体内真正发挥作用的有效物质基础。此法依然还有诸多问题值得探讨。

如桂枝(君)配伍不同的药物(臣、佐、使), 在血清中的化学成分不同, 则表现出不同的生物效应。桂枝茯苓丸是治疗子宫肌瘤的有效方药。现代医学认为子宫肌瘤是一种依赖于雌激素生长的肿瘤。过多雌激素可导致子宫肌瘤。传统药理学的方法是给大鼠皮下注射雌激素诱发大鼠的乳腺增生, 导致血清中雌激素的水平升高, 由于造模周期较长, 存在较大的个体差异, 并与人类乳腺增生的病理生理过程不一致等缺点。难以用上述模型筛选或评价方剂不同配伍关系与疗效关系。我们和南京师范大学分子医学研究所合作构建带有雌激素受体效应元件与荧光素酶基因(报告基因)的质粒, 转染细胞筛选稳定表达细胞系, 因为雌激素能够进入细胞核, 与核内受体

作用, 使受体结合到雌激素反应元件(ERE, estrogen response element)上, 从而调控下游基因的表达。可以微量、高效地从桂枝茯苓方剂中筛选出可以调节雌激素基因表达的活性成分群, 方便地检测血清中桂枝茯苓方药成分及方药配伍后成分的变化对细胞中雌激素基因的表达水平的影响(图2)。

### 4. 建立模式生物细胞中基因表达模型, 体现中药方药作用的多靶点、多途径

(1) 建立模式生物细胞中基因表达模型。

采用模式生物细胞进行实验, 条件容易控制, 目前已有多种模式生物的基因组计划已经完成。如酵母菌是真核生物而且基因组已全部测序, 细胞繁殖快, 易于培养, 与哺乳动物细胞有许多共同的生化机制, 存在许多与人类疾病相关的基因。根据公布的酵母基因组序列, 用 PCR 方法扩增了酵母 6000 多个

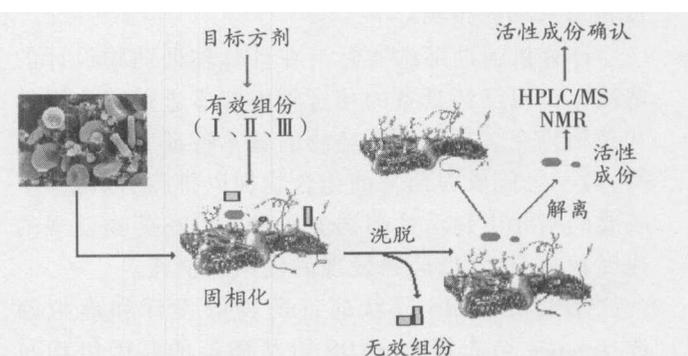


图1 细胞生物色谱在方剂效应物质基础研究的基本原理

目标方(基本方 +a1, +a2, -b1, -b2)

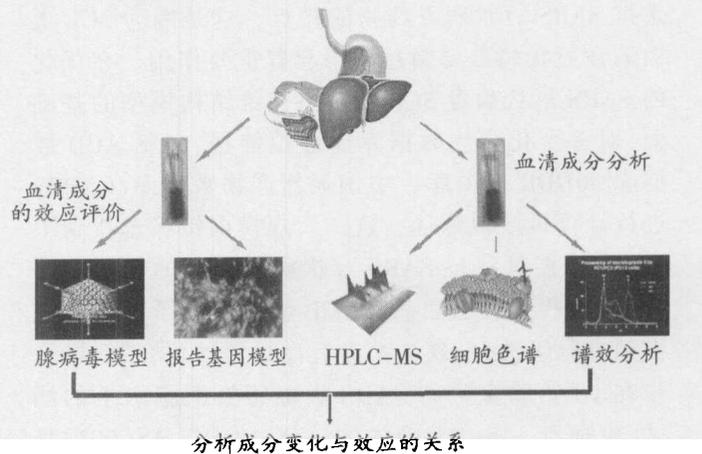


图2 利用生物技术分析血清效应成份的基本原理

开放阅读框片段,制成 DNA 芯片。①解决中药方药作用的多靶点和多途径的问题。②通过不同配伍形成的方剂干扰模式生物,用上述芯片检测基因表达谱的改变,可以在基因水平探讨方剂的内在配伍规律及产生效应的物质基础。

(2)构建致病基因腺病毒表达载体,转染靶细胞、器官,建立体内外疾病模型。

到目前为止,已经发现的药物靶点约有 500 个,而根据人类基因组研究结果预测的药物靶点可有 5000~10000 个。通过构建致病基因腺病毒表达载体,转染靶细胞、器官,建立体内外疾病模型,可以在整体、器官、细胞、分子生物学 4 个水平开展方剂效应物质基础的研究,模拟人类疾病的发生过程。该模型一致性好,个体差异小,便于平行观察。

(3)充分利用生物信息学及计算机辅助方药活性物质基础的预测。

计算机辅助筛选实际上在计算辅助药物设计的基础上,对已经具备的化合物虚拟库进行药物活性和药物特点(是否具有药物的基本特征)的虚拟预测,对不可能成为药物的化合物加以排除,以减少不必要的实际生物活性筛选工作量,提高药物发现的速度和效率,降低药物发现的成本和消耗。

①如抗 SARS 冠状病毒药物的设计和虚拟筛选:science 杂志报道 SARS 冠状病毒的基因组均与已知典型的冠状病毒类似,含有感染宿主细胞时起重要作用的结构蛋白,如 3CL 蛋白酶就可能作为筛选抗 SARS 冠状病毒药物的靶点,这是因为 3CL 蛋白酶在冠状病毒复制过程中起着重要作用。在优化的 SARS 冠状病毒 3CL 蛋白酶三维结构模型的基础上,对多个化合物数据库作虚拟筛选,包括 ACD 数据库、MDDR 数据库、中国天然产物数据库(CNPD)进行计算机虚拟筛选,这一大规模虚拟筛选找到了 300 个可能具有抗 SARS 冠状病毒潜力的候选化合物,将这些化合物用病毒 3CL 蛋白酶分子水平筛选模型进行筛选,发现 7 个具有高活性的化合物,进一步在 P3 实验室进行 SARS 病毒感染细胞水平的测试,发现有一 5-HT 受体拮抗剂(DDDC-AS-001)具有明显的抗 SARS 病毒感染和保护细胞的作用,其

EC<sub>50</sub> 小于 10mg/L,此成果已申请专利。

②在 internet 网上运行的包含结构信息和活性信息的中药数据库有 10000 余种,从数百种(最多数千种)中药药用植物出发来发现新药,比从几十万中植物出发的命中率要高,风险要小,希望要大。因为这数百种中药药用植物都是经过几千年来中华民族的“临床”实验证实,疗效肯定,而且大多是低毒,低副作用的。到目前为止,已经发现的药物靶点约 500 个,而根据人类基因组研究结果预测的药物靶点可有 5000~10000 个。通过靶点建立筛选模型的同时,并于生物信息技术和计算机辅助筛选相结合,探讨方剂物质基础研究的新思路。

③根据靶点结合计算机程序预测类方剂 1 和 2 中可能通过血脑屏障的化学成分(从 internet 网中天然化合物库中寻找)。血-脑间有一种选择性阻止各种物质由血入脑的屏障,称为血脑屏障(BBS blood-brain barrier)。对于治疗缺血性脑中风的靶向药物,必须通过 BBS,才能产生治疗和预防缺血性脑中风的作。根据 Clark 的简单方程  $LgBB = -0.10488 \times PSA + 0.152 \times CLgP + 0.139$ ,方程中 PSA 表示化合物的极性表面积,CLgP 表示化合物的疏水性。利用上述方程可以说明方 2 中由于挥发性成分的含量增加,可以通过血脑屏障发挥作用的成分增加。进一步可以说明在方 1 和方 2 之间物质基础与生物效应之间的关系。

方剂效应物质基础研究是一个巨大的系统工程,需要化学、生物学、生物化学、药理学、病理学、信息科学、医学生物工程等多学科的交叉渗透进行研究,现代生物活性筛选的方法已经深入到靶基因水平上,并且已经将基因组学广泛应用于果蝇及斑马鱼等生物构建生物疾病模型,这是现代生物科技发展的结果。计算机化学现在也是新药研发过程中必不可少的一部分。随着基因组、转录组、蛋白组和代谢组学和后基因组技术的兴起,必然会为中医药研究带来更多的手段和方法。多学科交叉渗透将促进方剂学的发展,并可能产生多个相关学科的新增长点。

应当看到,包括方剂效应物质基础、方剂配伍规律等的许多关键问题,目前尚缺乏简捷有效的方法和系统性,严重制约着方剂研究进展。将中医药学与

现代药理学、药物化学、药剂学、生物信息学、数理统计学、计算机技术等相关学科有机结合,才有可能突破,方剂的现代研究才能发展。因此,方剂配伍规律及其生物效应的研究、方剂活性物质基础研究;新技术在方剂研究中的应用、方剂信息资源挖掘与利用成为我们实验室的研究方向。实验室将瞄准方剂学研究发展前沿,运用现代生物技术等新技术、新方法努力构建方剂基础研究及应用开发研究的技术平台,为中医药现代化做出应有的贡献。

### 参考文献

- 姜廷良.论中药复方药效物质基础和作用机理研究的意义.中国中西医结合杂志,1999,19(4):195~196.
- 于友华,王永炎,赵宜军,等.方剂配伍规律的研究.中国中药杂志,2001,26(4):219~222.
- 徐青,肖红斌,梁鑫淼.中药复方药效物质基础的研究方法与技术.世界科学技术—中药现代化,2001,3(4):25~28.
- 姜廷良,霍海如.重视中药多组分整合作用的研究.世界科学技术—中医药现代化,2003,5(2):1~6.
- 马春涛,雷燕.中药复方效应物质基础的研究进展及展望.中国实验方剂学杂志,2003,9(3):46~49.
- 乔学斌,侯廷军,余慧东,等.基于网络的中医药信息系统的开发和研究.物理化学学报,2002,18(5):394~398.
- 侯廷军,乔学斌,徐筱杰.中药有效成分三维结构数据库的开发和研究.化学学报,2001,59.
- 徐东铭,徐雅红.中药复方药效活性成分研究思路初探.中国医药学报,2001,16(6):51~54.
- 陆茵,等.生物技术在中医药动物模型研究中的应用.世界科学技术—中药现代化,2002,4(6):28.
- 陆茵,等.探讨中药活性成分筛选及中药药理研究的新方法.南京中医药大学学报,2003,19(6):321.
- 樊宏伟,朱荃,等.血小板细胞膜固相相色谱法的建立及其对丹参效应物质的分析.中国药学杂志,2004,39(5):375~378.
- 张伯礼,高秀梅,等.复方丹参方的药效物质及作用机理的研究.世界科学技术—中医药现代化,2003,5(5):14~17.
- 石任兵,刘斌,等.中药复方化学与创新药物的研究.世界科学技术—中医药现代化,2003,5(6):6~11.
- 李澎涛,乔延江,王永炎,等.对中药复方研究的思考.北京中医药大学学报,1999,22(5):15~18.
- 刘喜平,李沛清,李娟.复方配伍研究对中药新药研发的启示.中成药,2005,27(5):589~591.
- 罗佳波,余林中,谭晓梅.方剂配伍规律研究应以物质基础为核心.中国中医基础医学杂志,1999,5(10):18~20.
- 赵建荣,李晓玫.中药复方物质基础研究的现状与展望.中草药,2003,34(11):963~966.
- 丘瑞香,孟君.中药复方物质基础研究的思考.中国中西医结合杂志,2002,22(5):388~389.
- 刘俊,青杰,魏玉平.复方中药物质基础研究.时珍国医国药,2003,11(3):243~244.
- 高月,吕秋军,刘永学,等.中药复方物质基础的研究.中国新药杂志,2000,9(5):307~308.
- 张声鹏,赖天松.中药复方物质基础研究方法浅析.中国中医基础医学杂志,2000,6(6):56~57.
- 严永清.中药复方中物质基础的增效因素.世界科学技术—中药现代化,2001,3(2):18~20.
- Wang J M,Hou T J,Xu X J.Automated docking of peptides and proteins by genetic algorithm.Chemometr.Intell.Lab.,1999,45:281.
- Hou T J,Wang J M,Xu X J. A new molecular simulation software package .J.Mol.Graphics Mol.2001,19:455.
- Rota P A et al. Characterization of a Novel Coronavirus Associated Corovavirus. Science,2003,300:1399.
- Shen X, Xue J H et al. Small Envelope Protein E of SARS: Cloning,Expression, Purification,CD Determination, and Bioinformatics Analysis. Acta Pharmacol Sin.2003,24(6):505.
- Marra M A et al. The Genome Sequence of the SARS-Associated Corovavirus.Science,2003,300:1399.
- Xiong B,Gui C S et al. A3D Model of SARS-CoV3CL P roteinnase and its Inhibitors Design by Virtual Screening. Acta Pharmacol Sin.2003,24(6):497.
- Anand D,Ziebuhr J, Wadhvani P, Mesters J R, Hilgenfeld R. Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) structure: Basis for Design of anti-SARS Drugs. Science (scienceexpress).2003 May 13.
- Fujii S,Naksshima N,Okamura H,et al.Progesterone -induced smooth muscle-like cells in the subperitoneal nodules produced byestrogen. Experimental approach to leiomyomatosis pertonealis disseminata.Am J Obstet gynocol,1981,139(2):164.
- Diel,Tissue-Lamb P,Rosen J,Drug discovery using receptors that modulate gene expression.J Recept SigTrans Res,1997,17 (1~3): 531.
- Schwabe JWR,Chapman L,Rhodes D,T he oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation,Structure,1995(3):201~213.
- Jennifer RW,Varsha SL,Margaret AL,Ann MN,Allosteric Modulation of Estrogen Receptor Conformation by Different Wstrogen Response Elements.Mol Endocrinol ,2001:1114~1126.
- 杨海涛,王广基. Caco-2 单层细胞模型及其在药理学中的应用.药科学报,2000,35(10):797~800.

(责任编辑:刘维杰 王 瑀)

### **Institutional Construction of Sustainable Development of TCM Industry**

—Intellectual Property Right Protection and Standardization of TCM Suitable for “Research of Big Sciences”

*Zhou Feiyue, Tang Wuxiang and Cheng Guizhi*  
(Beijing Institute of Machinery, Beijing 100085)

In order to put forward measures for the sustainable development of TCM industry, this article analyses the technical obstacles which may restrain the sustainable development of TCM industry, and based on the analysis of the characteristics of TCM scientific and technological innovations and aimed at the difficult problems in the protection of TCM intellectual property right it works out the institutional framework of intellectual property right protection and standardization which fits in with the characteristics of “the research of big sciences” in TCM, pointing out that the appropriate combination of protection and standardization can largely encourage scientific and technological innovations in TCM. Finally, it expounds the possible impact that this new framework may bring about on pushing forward the sustainable development of TCM industry and enhancing its competitiveness via institutional construction.

Key words TCM, Sustainable development, intellectual property right, technological standard

### **Ideas and methodology in Studying Material Foundation of Curative Effects of TCM Prescriptions by New Technologies**

*Lu Yin Duan Jin'ao Zhu Quan Ding Anwei and Chen Jianwei*  
(Jiangsu key laboratory for Basic Theory & Application of Prescriptions, Nanjing University of Traditional Chinese  
Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
National Standard Lab. of Pharmacology of Chinese Materia Medica,  
Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029)

The study in the material foundation and biological effects of TCM prescriptions is the key to the modernization of traditional Chinese medicine. In the study of the modernization of TCM prescriptions, it is difficult for traditional methods to deal with the complex chemical components and the diversity of the effects of prescriptions. In combination with some common problems and research practice and results in the study of material foundation and biological effects of TCM prescriptions, this article puts forward the ideas and methodology for relative studies of TCM prescriptions by the application of various new technologies in the area of biological technology.

Key words Prescription, material foundation and bio-effect, application of biotechnology

### **Steps and Methods in Choosing TCM small compound Prescriptions for Treatment of climacteric Syndromes in Perimenopause**

*Li Dong'an, Liang Maoxin, Zhang Huiyin, Zhang Yanling, Ma Jie, Li Zhongping, You Xianmin and Wang Shushi*  
(Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034)

90 [World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]