

化学物质组学与中药方剂研究*

——兼析清开灵复方物质基础研究

□罗国安** 梁琼麟

(清华大学化学系生命有机磷与化学生物学教育部重点实验室 北京 100084)

张荣利 王义明 刘清飞

(清华大学生命科学与医学研究院中药现代化研究中心 北京 100084)

胡 坪 (华东理工大学化学与制药学院中药现代化工程中心 上海 200237)

摘 要:本文在总结中药复方化学研究体系的基础上借鉴系统生物学,提出了一种新的组学研究方法—化学物质组学。化学物质组是指一定条件下输入生物体系的所有化学物质(化学成分)组成的复杂化学体系,而化学物质组学就是研究化学物质组的组成及其相互关系的一种方法。作为新学科萌芽的探讨,作者提出了层次化的化学物质组学的研究策略和相应的技术,应用于中药方剂的研究,并以清开灵为例从三个层次阐述了化学物质组研究方法,介绍了中药方剂化学物质组学研究的过程。作者认为:化学物质组学为复杂化学体系的研究提供了方法支持,是现有系统生物学的发展和补充,为研究生物复杂系统与外部的化学复杂系统的相互作用提供了必要条件;中药方剂作用于人体的过程正是最典型的两个复杂系统的相互作用,因此,化学物质组学的应用对于中药方剂研究将起到重要的推动作用。

关键词:化学物质组学 化学物质组 中药方剂 系统生物学 清开灵注射液

一、引 言

中药在我国有着几千年的临床应用历史,长期实践经验的总结形成了独特的中医药理论和数以万计的中药方剂。很多中药方剂都具有可靠的临床应用纪录,现代药理学研究也为证实中药方剂的整体疗效提

供了越来越科学和令人信服的实验方法,因此中药方剂作为一种确有疗效的治疗手段正在得到包括国际社会在内的越来越广泛的关注。但是我们也清醒地认识到,要使中药方剂的疗效和安全性得到更加可靠的保证,推动中药作为一种治疗药物更加合理、广泛的应用,还需要更加深入地开展中药方剂的基础研究,加速中药的现代化进程。所谓中药现代化,即指在中医药理论指导下,运用现代科学技术,研制、开发现

收稿日期:2005-11-30

修回日期:2006-01-04

* 科学技术部“十五”攻关项目(2004BA721AB):中成药安全性评价示范研究,负责人:罗国安

** 联系人:罗国安,本刊编委,教授,博士生导师,研究方向:中药方剂化学,现代中药质量标准体系研究,Tel:010-62781688, 010-62772263, E-mail: luoga@mail.tsinghua.edu.cn

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

代中药,实现能用现代科学技术阐明其药效物质和作用机理(现代化),能进行大规模工业生产(产业化),并能为国际市场接受、有国际竞争力的中药制剂(国际化)。我国从 90 年代中期开始实施中药现代化行动纲要,“九五”、“十五”期间通过“攀登计划”、国家“973”计划、国家自然科学基金重大研究计划等对中医药现代化研究大力度的支持,使得我国中医药事业得到长足的发展。尤为可喜的一个现象是中药现代化的研究氛围越来越活跃,许多中医药专家积极欢迎和支持其它各个相关学科的专家加入中药现代化的研究队伍,在中医药理论的指导下引入各种现代科学技术,充分发挥多学科交叉和优势互补的作用。这也是近年来我国中药现代化研究取得较大进展的一条宝贵经验。中药现代化作为我国科技发展战略的一部分已经列入国家“十一五”规划和中长期发展规划,在“九五”、“十五”期间已经打下良好基础的情况下,我国的中药现代化事业必将迎来一个更加快速发展的时期,当然这个过程中与国际同行的竞争也会加剧。目前美洲、欧洲、亚太地区已经有很多的大医药公司和著名科学家纷纷涉足传统医药研究领域,这既是挑战,我们面临的是不进则退从而被人甩在后头的危险;同时也是机遇,国际社会的广泛参与使中医药更容易得到理解和接受,也能够让我们吸收更多新技术和新方法融入到中药研究。因此,为了应对国际竞争,加快我国“十一五”期间中药现代化的步伐,认真总结近年来的经验,推动中药现代研究的新思路和新方法的探讨是具有积极意义的。

中药方剂是中药研究的主流,但是 20 世纪 90 年代中期以前,中药方剂研究主要还是两条途径:一种是借鉴先导化合物的思路,从中药中发现和分离单一有效成分开发成植物药;另一种是在传统中医药理论指导下进行复方的优化配伍,但是还停留在药材配伍的层次上。这些研究可以说是分别在两个不同的化学层次进行研究的,也有把这两个层次结合起来的,但是复方整体(或药材)的层次过于模糊和复杂,研究因素难以控制,由于缺乏一个合适的中间层次或过渡层次,从复方或药材直接跳到“化学成分”层次则很容易割裂中药有效物质之间的内在联

系,两个层次的研究很难统一起来,因此,我们在 1997 年曾提出在中药复方研究中应该引入一个中间层次即有效部分的概念^[1]。所谓有效部分(组分)是指中药复方的药物中具有相似化学性质的一大类化合物(性质相似的化合物群),这样一个复杂的中药复方(可能有数百种化学成分)往往就可以分为几种或 10 来种有效部分,如和药效学相结合就有可能阐明中药复方协同配伍的化学物质基础。为此,我们提出了包括现代分离方法提取有效部分、指纹图谱定性、指标成分定量、有效部分和药效学研究相结合的整体研究思路。中药复方有效部分理论的提出,推动了中药方剂的研究从两个化学层次向 3 个化学层次的发展,并且中药方剂有效部分的研究很快成为中药方剂研究的一个重要方向。在有效部分理论研究的基础上,我们提出了中药复方的化学研究体系^[2]以及中药复方物质基础和药效相关性研究的方法^[3],通过化学与药效学研究相结合(一个“结合”),基本讲清中药复方的药效物质,基本讲清中药复方的作用机理(两个“基本讲清”),从君臣佐使药材、有效部分、有效成分(三个“化学层次”)阐述中药复方的药效物质,从整体动物、器官组织、细胞亚细胞和分子生物学(四个“药理水平”)来研究中药复方的作用机理(简称“一二三四”体系)。对于中药复方整体的化学表征我们提出了指纹图谱方法^[4],进而在有效部分理论指导下,通过将中药复方的各个有效部分的化学信息与药效学的活性信息的相关分析,就可能辨识复方中起主要药效作用的组分即有效部分(有效组分),因此最早提出了多维多息化学指纹图谱即通过有效组分指纹图谱表征中药复方中的有效组分的化学特征^[5]。2000 年,在王永炎院士牵头下我国启动了第一个中药“973”项目:中药方剂的关键科学问题基础研究,中药有效部分的概念和中药复方的化学研究体系(“一二三四”体系)也被吸收作为项目整体研究思路中化学研究的主要方法体系。国内 20 余家单位参与了该“973”项目的研究,极大地推动了中药方剂理论和实验研究的进展,其中最突出的成果之一就是推动了中药复方从药材配伍到有效部分(有效组分)配伍的理论发展,为从传统的中药复方中开发

现代复方中药(组分中药)进行了成功的探索。有效组分配伍理论和组分中药的研究是中药复方有效部分(有效组分)理论的进一步发展,也证明了我们前面所提出的有效部分理论在实践中是可行的。

本文在总结中药复方有效部分和“一二三四”体系的基础上,充分吸收现代生命科学特别是系统生物学的先进成果,提出了一种新的方法体系即化学物质组学(Chemomics),并在复方中药的研究领域进行了初步的应用尝试。

二、化学物质组学的定义

同生命科学中其它组学方法类似,化学物质组学(Chemomics)就是研究化学物质组(Chemome)的组成及其相互关系的一种方法。虽然生命科学是研究生物系统与外界环境相互作用过程中的生命活动规律,但是现有的生命科学研究体系,如系统生物学方法,主要关注的还是一个系统,即生物复杂系统,对外部输入(环境)的表征进而研究两个复杂系统的相互作用关系尚缺乏可行的方法。因此化学物质组学的提出主要是对与生物系统产生作用的外部化学复杂系统(化学物质组)的研究。化学物质组是指一定条件下输入生物体系的所有化学物质(化学成分)组成的复杂化学体系,例如药物、食物、以及从外部环境摄入的其它化学物质等。对于中药方剂研究来说,在我们前面所提3个化学层次基础上,将所研究的中药复方凝炼提升为一个整体的化学物质组。

化学物质组学的研究是在复杂性科学理论的指导下,采用层次化、系统化及逐步优化的研究策略,而且首先要强调整体(整体化学物质组)有效(所谓有效或功效就是指能够产生预期的生物学响应,例如对疾病的治疗作用,包括西医的病和中医的证,下同),然后从整体到部分(子化学物质组),弄清楚各部分之间的相互关系,在确认了有效部分(有效化学物质组)之后,再考虑进一步研究有效化学物质组中各成分的相互关系,发现和确定有效成分群。由于化学物质组的研究分为了不同的层次,因此也可以采用不同的方法对它们的化学特征分别进行表征:

1. 整体化学物质组(Global chemome)

整体化学物质组是所研究的外部化学体系的最复杂表现形式,即输入到生物体系的所有化学物质和化学成分的集合。一个整体化学物质组可以分为多个子化学物质组(Subchemome)。子化学物质组的划分一般考虑到化学性质、结构或功能的相似性或可区分性。例如一个中药复方可能由多味药材组成,共同构成整体化学物质组。每味药材所包含的化学成分对于整个复方来说构成一个子化学物质组;或者一个复方整体按照一定的方法分成多个性质或功能不同的组分,则每个组分也可以看作整体化学物质组的子化学物质组。整体化学物质组是一个非常复杂的系统,就像蛋白质组学^[6]还解决不了全部蛋白质组的表征,代谢物组学^[7]还不能对全部代谢物进行定性定量,现阶段对于复杂的化学物质组也无法做到明确所有的成分。但是就像代谢指纹谱^[7]一样,现有的化学指纹图谱^[8-9]技术可以为化学物质组的表征提供一种有用的方法。通过多种方法和多种指纹图谱可以较全面地表达化学物质组中丰富的化学信息。也可以借鉴差异蛋白质组学,在一定条件下,采用化学指纹图谱来研究不同设计得到的化学物质组的变化规律。

2. 有效化学物质组(Effective chemome)

在整体化学物质组中,有的子化学物质组的保留与否对整体化学物质组所研究的功效影响不大,有的子化学物质组的存在对整体的功效反而具有抵消作用,但是有的子化学物质组的去除则会使得整体的功效显著受到降低。针对一定的功效进行系统的研究设计,并始终以整体化学物质组为对照,对各类子化学物质组进行筛选和取舍,最后仅保留必要的子化学物质组组成新的集合并不降低其整体的功效,因此称为有效化学物质组或功能化学物质组。有效化学物质组可以采用有效组分指纹图谱结合多组分分析方法来表征^[11-5]。

3. 有效化学成分群(Effective constituents group)

有效化学物质组虽然还存在一定的不必要的化学成分,相对整体化学物质组来说,在不降低整体活性的前提下已经去除了大部分的非必要的化学组分,大大简化了化学组成,为深入开展功效成分的研究

究提供了基础和条件。通过进一步的分离以及成分活性相关性分析,有可能辨识其中关键的有效成分或有效化学成分群,即按照一定的功效要求进一步筛选得到的化学成分的最小集合。有效化学成分群一般可以采用多组分定量分析来表征。在特殊情况下,最简化的形式就是一个化学成分(化合物)。

化学物质组学研究的基本任务就是首先从整体化学物质组中找出有效化学物质组,进而确定有效化学成分群并揭示其相互关系。

三、化学物质组学和系统生物学的关系

系统生物学是描述在一定条件下某一体系中所有的元素,并确定体系中各元素之间相互关联的生物学网络,以及表征与特定生理刺激相关的元素或网络之间的信息流^[10]。简而言之,系统生物学就是研究生物体系中各种元素之间的相互关系^[11]。现有的技术,例如基因组学、蛋白质组学、代谢物组学分析等可以大规模获取生物体系各元素的数据信息,这些各种类型的数据信息通过生物信息学技术集成起来成为一个网络模型,揭示特定生物体系运作过程。但是现有的系统生物学关注的仅仅是生物复杂系统,没有反映到外部环境的化学复杂系统及其对生物系统的影响。也就是说现有的系统生物学是从系统的角度(整合多种组学方法)研究生物内部系统响应特

定刺激(例如药物治疗)所产生的生物信息网络,但是目前还没有办法表征该刺激所存在的另一个系统(外部系统),而化学物质组学正是提供了这样一个方法,研究与生物系统发生作用的外部系统(定义为化学物质组),从而可以找出与特定的生物学响应(功效)相关的有效化学物质组(化学信息网络)。因此化学物质组学是对现有系统生物学方法的必要补充和发展,为研究生物体系与外部输入体系(环境)两个复杂体系的相互作用提供了方法和可能性。将现有的系统生物学与化学物质组学集成起来,进一步发展成为整体的系统生物学(Global Systems Biology)如图1所示,不仅可以从基因、蛋白质、代谢等多层次网络调节系统理解生物体系的功能,而且可以表征外部输入系统的化学物质信息,通过研究化学物质信息与生物学功能信息的相关性,进一步可以发现有效化学物质组。随着化学物质组学和系统生物学的不断发展和完善,在研究生物复杂系统与外部复杂系统发生作用时,不仅能够描述生物系统发生了什么响应,而且可能找出导致这种响应的外界刺激对应的化学物质基础,从而可能更完整和深刻地理解这一响应的过程和机理。

四、化学物质组学和报道的其它组学的比较

经过充分的文献调研,我们发现见诸报道的其它组学提法还有中药化学组学^[12]和中药复方有效成分组学^[13],因此将它们分别与我们所提出的化学物质组学进行比较。

中药化学组学定义为“通过现代技术手段结合传统中药理论和现代科学理论,阐明与中药药性、功能及主治有关的物质基础即药效成分的组成、结构、含量、相互作用及性质等”^[12]。中药复方有效成分组定义为“中药复方中所含有的所有与该复方临床应用目的密切相关的药理活性成分”^[13],作者阐述了中药复方有效成分组学的研究思路,但是文中没有直接明确地给出该组学的定义。

通过比较我们可以看出它们与我们所提出的化学物质组学在适用范围、定义以及研究思路的系统性上看都有明显的区别。

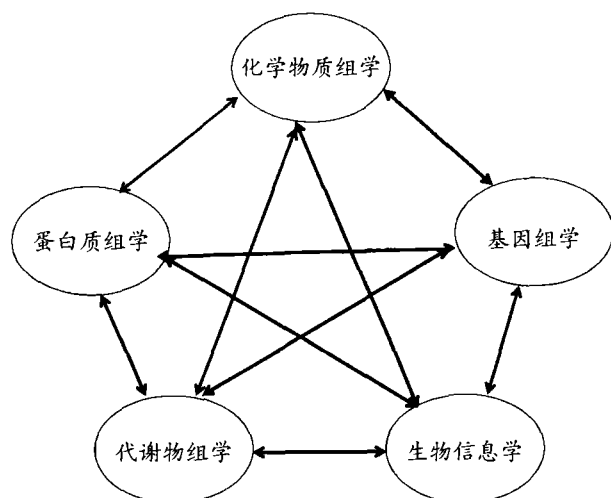


图1 整合化学物质组学构成整体系统生物学 (Global Systems Biology)示意图

适用范围:文献报道这两种组学方法的定义都仅仅局限于中药,我们所提出的化学物质组学不仅包括中药在内,也同样适用于其它化学物质体系,例如食品、环境等复杂体系。

定义:从目前比较公认的组学方法的定义看,例如基因组学(Genomics)、蛋白质组学(Proteomics)、代谢物组学(Metabonomics)等,无一例外的都是定义为“研究XX组的组成和相互关系(的一种方法)”,即研究基因组(Genome)或蛋白质组(Proteome)或代谢物组(Metabonome)的组成和相互关系的一种方法,而且这些组学方法所研究的对象(即XX组)都能给出一个明确的定义,而且有一个共同的特点都是定义为某一范围、阶段或者界定条件下系统中的所有(全部)物质,这是词尾后缀-ome的基本含义。从我们所提出的化学物质组学(Chemomics)和化学物质组(Chemome)的定义来看是完全符合国际惯例的。而文献提出的“中药化学组学”从形式上看不符合一般组学方法的定义模式,因为中药化学组不能作为研究的对象,文中也没有给出对研究对象的正式定义;中药复方有效成分组学没有正式的定义,其英语翻译为Effective compounds group,意思为有效成分群或组,可以看作是其研究对象,作为组学(应该代表一种方法)的定义不够准确。另外从两种组学方法实际界定的研究内容来看,也不太符合“组学”定义要求的范围。根据组(-ome)的一般定义,既然以中药作为对象,则研究对象应该界定的是中药中的所有(全部)成分。而“中药化学组学”和“中药复方有效成分组学”所界定的范围显然不是中药中的所有成分,因此不同于我们所定义的化学物质组。两文献所提出的研究思路有一定的理论价值。如果我们的化学物质组学应用于中药的话,“中药化学组学”和“中药复方有效成分组学”实质上与我们提出的有效化学物质组是有所类似的,相当于我们所研究的第2个层次-有效化学物质组。

研究思路系统性:我们不仅给出化学物质组学规范的定义,而且指出了3个不同的研究层次,提出了一套层次化、系统化及逐步优化的研究策略,下文还会专门结合中药化学物质组学的研究阐述较具体

的研究方案,并通过研究实例证实方法的可行性。“中药化学组学”和“中药复方有效成分组学”两文的主要内容是论证了从整体的角度来开展“中药复方有效成分组”(对应于本文的“中药复方有效化学物质组”层次)研究工作的必要性和意义。

五、化学物质组学与中药方剂研究

中药作为一种治疗药物,首要的要求是安全和有效,其次要保证质量稳定可控,在此基础上,适应现代药物的要求,在考虑技术可行性和经济性的情况下,应该力求药物组成的简单和明确。完全按照西药的要求追求药物成分的纯度对复方中药的开发来说无异于舍本逐末,这一点国内基本已经达成共识,国际上近年来对于多组分药物间的相互作用也有了较多的认识,越来越多的科学家对复方药物的协同配伍作用也逐步认同^[14-15]。但是另一方面,我们也认识到对于一个中药复方,其含有的众多化学成分并不都是有用或必须的,可能有些还是有害的或者是需要严格控制的。传统复方中大量非必要的成分的存在增加了药物的复杂性和不确定性,这不仅增加了药效物质和药理研究以及药物质量控制的难度,而且药物成分的复杂性和大量未知成分的存在也增大了潜在副作用的风险,影响到复方药物疗效和安全性,这也是我们不得不承认的一个事实。因此有必要通过对传统中药复方的系统研究达到基本明确其药效成分和作用机理的要求,在保持疗效或者说增效减毒的前提下开发现代复方药物,但是目前要解决的关键问题是建立一套有效的方法体系。

最近在抗疟疾的多组分药物开发领域取得了重大进展^[16]:即根据公认的多个药物靶点,采用现代药理手段从传统的抗疟疾植物药中快速筛选先导化合物,然后根据这些先导化合物或现有的抗疟疾药物的相互作用筛选出最佳组合。这种多组分药物为解决抗疟疾药物普遍存在的药物抵抗性问题提供了最好的解决方案,并可能进一步提高疗效。这也让我们感到鼓舞,说明国际社会充分看到了复方配伍的优势。但是这种基于单体药物或先导化合物的排列组合进行筛选的模式应用于中药复方的研究时还存在

很大的局限性。这种模式的实质是首先从整体分离到单体成分,再反过来通过研究单体成分的组合回复到复方有效组成。既然我们认识到中药复方起作用的是一群具有协同配伍作用的有效组分(成分)群,这个物质群必定存在于中药复方所包含的整体化学物质组之中,因此通过整体系统的研究这些化学成分群的相互关系是有可能发现这一物质群的,显然这是一种快捷的方式。我们所提出的化学物质组学为解决这一问题提供了一种可行的方案。

化学物质组学应用于中药方剂的研究需要在中医药理论和复杂性科学理论的指导下,确定一定的适应症或证(功能主治)并建立可行的评价模型和参数,按照我们前面所提出的层次化、系统化及逐步优化的研究策略,首先要保证全方确有疗效,然后按照药材或者按照化学性质的不同分成若干个组分(子化学物质组),通过适当的数学设计,研究不同子化学物质组的各种配伍化学信息与药效信息的相关性,弄清楚各组分之间的相互关系,在保效的原则下去除非必需的组分,保留必不可少的组分重新配伍构成有效化学物质组。在此基础上根据需要考虑进一步研究有效化学物质组中各成分的相互关系(组效关系),发现和确定有效成分群见图2。其中中药复方组效关系的辨识需要采用中药组效学的研究方法见图3,借助生物信息学和化学信息学技术从两个矩阵的非线性交叠作用关系中辨识药效组分或药效组分群。

由于中药方剂化学物质组学研究是在坚持保效的前提下从全方一步一步地找出有效化学物质组,进而确定中药方剂有效化学成分群。就所研究的功能主治来说,最后确定的有效化学成分群必须能够代表有效化学物质组,而有效化学物质组又要求能够代表整体化学物质组。也就是说,对于一个中药方剂,体现某一特定功能主治的化学物质基础可以有多个层次的表达形式,整体

化学物质组,有效化学物质组,有效化学成分群对于特定功能主治的效果是相当的,但是研究层次是逐步深入的。整体化学物质组是最初的层次,因此是一种最复杂的表现形式;有效化学成分群是研究的第3个层次,也是所研究的功能主治对应的物质基础的最简单表达形式,也就是意味着其中任何成分的缺失都会对该功效指标具有显著影响。一般情况下有效化学成分群是具有相互作用的一群化合物,有时候从有效化学物质组中也可能找到单个的有效成分(即先导化合物)就能达到整体化学物质组的功效水平,因此化学物质组学也能筛选到先导化合物(如果原方中确实存在的话),相当于有效化学成分群的特例。化学物质组学研究策略的应用较之常规的筛选过程减小了一定的盲目性和工作量,因此可能具有更高的成功率和效率。不过应当指出的是,无论是有效化学物质组还是有效化学成分群,都是对应着特定的功能主治(或某种疾病)的,对于整体化学物质组所具有的其它功能主治来说,它们可能就变成“无效”或者“低

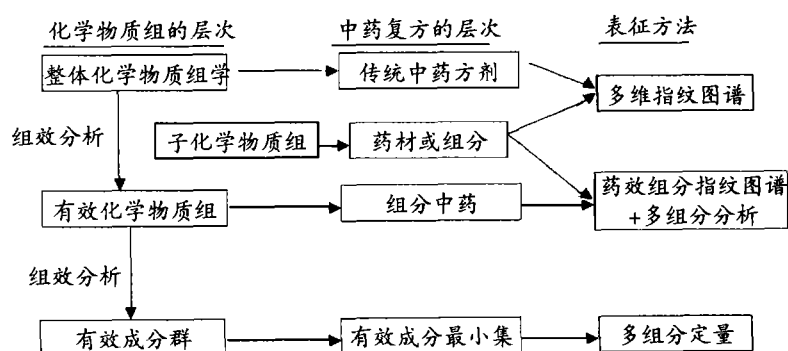


图2 中药方剂化学物质组研究示意图

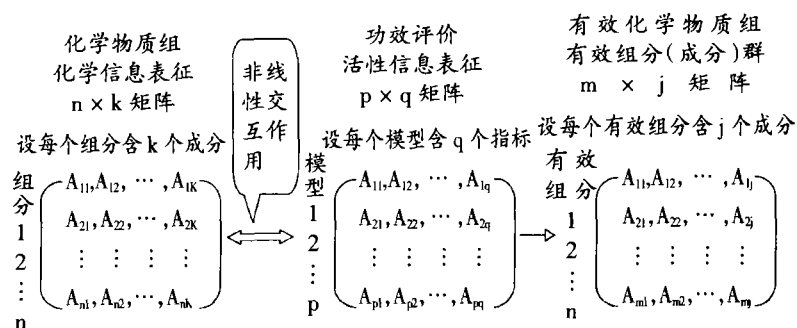


图3 组效学研究示意图

效”了,因此并不是说组分配伍甚至有效成分配伍可以完全等同于全方,而是应该针对所研究的功能主治(或特定疾病)。

对于中药复方的研究,考虑中药的复杂性,可以根据研究的需要和技术条件的发展,按照多个层次的化学物质组的研究逐步深入。整体化学物质组(Global Chemome)的研究相当于复方整体层次的研究,通过药材配伍即子化学物质组的优化组合开发新的复方药物,这是长期以来中药研究的一种方式。整体化学物质组虽然太复杂,药效成分和作用机理的研究都不容易讲得清楚明确,但是就像蛋白质组、代谢物组在目前阶段大部分处于模糊状态的情况仍然不妨碍它们作为一种研究方法的应用,第一个层次上的化学物质组学研究同样也能应用于传统中药方剂的配伍研究。我们认为,在现阶段必须保持整体化学物质组的研究来体现传统中药方剂的特色,这有利于原质原味保护传统中药方剂。即使现在有些问题讲不清楚,但它的功效是确实的,保留原质原味有利于将来进一步的继承和扬弃。第二个层次有效化学物质组的筛选和确认则是中药有效组分配伍、开发组分中药,并能做到基本明确药物组成和作用机理,这可能会成为当前和今后一段时期中药复方研究的重点。随着对中药复方药物要求的提高和现代科学技术的进步,也有可能向第三个层次的推进,逐步进入有效成分群的层次,包括开发出单体成分的植物药。目前国际上按西药的通用标准(要求讲清所有成分)来要求中药,这本身是不合理的。因此我们提出的化学物质组学方法提供了这样一种多层次的、可持续发展的研究策略和方法是有可能体现中药方剂的安全、有效、稳定和可控。

六、中药清开灵的化学物质组学研究

清开灵注射液是具有几十年临床应用历史的著名中成药,由牛黄、水牛角、黄芩、栀子、金银花、板蓝根、珍珠母等七味药材组成,对治疗中风病(脑水肿)、呼吸道感染、肝炎等具有很好的临床疗效。但是清开灵注射液也存在一些迫切需要解决的问题,例如药效物质基础不够清楚,作用机理还有待明确和

证实,制剂的质量也难以控制,严重影响到清开灵临床用药的疗效和安全性保证,临床不良反应报道时有发生。这些问题具有一般性,是制约中药现代化的瓶颈问题。在国家“973”项目的支持下,我们与北京中医药大学李澎涛教授的课题组合作,选择具有代表性的祛邪扶正方清开灵注射液为研究对象,积极探索中药方剂现代研究的理论和方法创新。在王永炎院士的指导下,我们选择清开灵治疗“上焦之火”(中风病)为突破口,将化学研究与药理学研究工作紧密结合起来。

清开灵的药理学研究工作由李澎涛教授领导,在北京中医药大学完成。课题组将中医学关于中风病“毒损脑络”病机学说与西医学关于中风病“炎症级联反应”观点结合起来,设计了局灶性完全脑缺血、全脑不完全脑缺血动物模型以及脑神经元、胶质细胞、微血管内皮细胞等细胞模型,累计研究了51个药理相关指标^[17-20],为清开灵方剂及有效组分的药理学评价提供了有效的保证。

清开灵的化学物质基础研究工作由我们清华大学课题组完成^[20-29]。按照中药方剂化学物质组学的研究策略和方法,我们重点对清开灵的整体化学物质组和有效化学物质组两个层次开展了系统的研究工作,对清开灵的有效组分进行了筛选和配伍优化。主要研究过程和结果如下:

1. 清开灵的整体化学物质组的研究^[21-25]

清开灵全方所构成的整体化学物质组非常复杂,既包括有机小分子化合物群,还包括无机离子和生物大分子等,对应的我们发展了多类化学指纹图谱的方式进行表征:对无机离子类建立 ICP/MS 指纹图谱,多肽蛋白质等生物大分子采用蛋白质指纹谱方法,有机小分子则主要采用 HPLC/DAD/MS/MS 多维联用指纹图谱的方法,见图 4。通过多种分析表征方法,我们共鉴定了清开灵的整体化学物质组中的 40 多种有机成分和 10 余种无机成分,能够基本讲清清开灵的主要化学组成。按照清开灵所含物质成分的性质可以分为 9 大类型的有效部分(组分),即整体化学物质组可以分为 9 个子化学物质组,并分别鉴定了其中的主要成分:

(1)胆汁酸类成分为去氧胆酸、异去氧胆酸和牛胆酸(来自胆酸);

(2)氨基酸类成分为组氨酸、赖氨酸、天门冬氨酸、精氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、亮氨酸等(来自水牛角、珍珠母和板蓝根);

(3)无机元素包括 Ca、Mg、Si、K、Ti、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、Se、Sr 等(主要来自珍珠母),研究发现清开灵中的 Ca 包括无机游离和有机螯合两种形态;

(4)黄酮类成分为黄芩苷、汉黄芩苷等(主要来自黄芩);

(5)有机酸类成分为绿原酸、异绿原酸、奎尼酸以及槲子酸和藏红花酸等(主要来自槲子、金银花等);

(6)核苷类成分为腺苷、尿苷等(主要来自板蓝根);

(7)环烯醚萜苷类成分为槲子苷、异槲子苷、京尼平龙胆二糖苷和槲子酮苷等(主要来自槲子);

(8)色素类成分为藏红花素、槲子素、槲子蓝、槲子黄等(主要来自槲子);

(9)挥发性成分为芳樟醇、棕榈酸和蒎烯等。

2. 清开灵的有效化学物质组的研究^[26-30]

在整体化学物质组研究的基础上,以子化学物质组及其一定的配伍方式构成化学信息矩阵(化学信息由图4所示的指纹图谱方法和指标成分定性定量进行表征),以多参数药理指标构成相关的活性信息矩阵,采用图3所示的组效学研究方法辨识主要的药效组分和关键药效成分。本着保效减毒的原则,最后确定清开灵治疗脑缺血损伤的子化学物质组的最佳配伍为4类有效组分即胆酸类(牛胆酸、猪胆酸和异去氧胆酸等)、黄芩苷类(黄芩苷为主,还有脱氧黄芩苷、汉黄芩苷等)、槲子环烯

醚萜类(槲子苷为主,包括京尼平龙胆二糖苷、去羟槲子苷和槲子酸等)、珍珠母提取物(包含结合态钙和游离态钙及若干种氨基酸)等组成清开灵新方,即清开灵的有效化学物质组。对清开灵有效组分的配伍量采用均匀设计法进行了优化。结果显示清开灵新方较清开灵原方具有减毒优势的同时,增效作用亦比较明显。

3. 从药材配伍的清开灵原方到组分配伍的清开灵新方

通过上述对清开灵化学物质组的研究,在保效减毒的原则下,从原来7味药材配伍的大复方(整体化

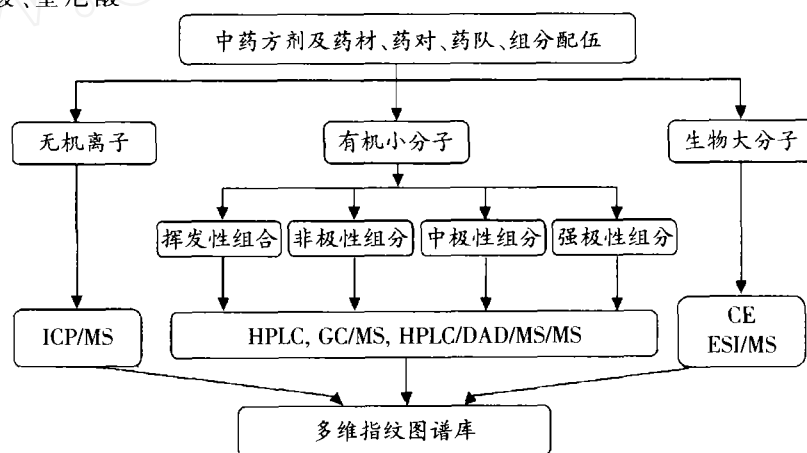


图4 多维指纹图谱应用于清开灵中化学物质组的化学表征

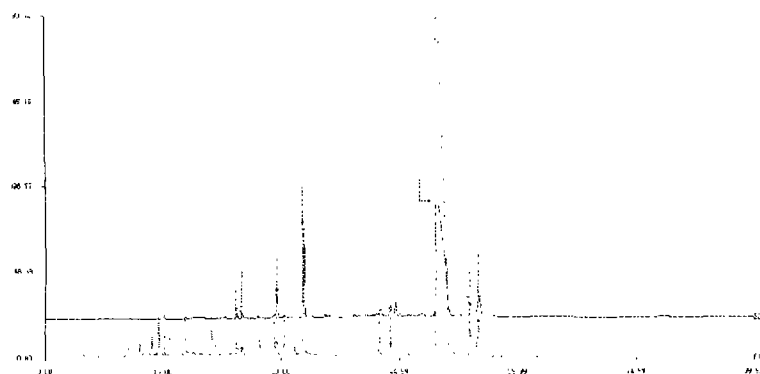


图5 指纹图谱和多指标成分定量应用于新方(S2)和原方(S1)的化学表征

1. 山槲子苷, 2. 异槲子苷, 3. 京尼平龙胆二糖苷, 4. 槲子苷, 5. 黄芩苷, 6. 脱氧黄芩苷, 7. 汉黄芩苷, 8. 异去氧胆酸, 9. 去氧胆酸 10. 胆酸

学物质组包含 9 大类组分) 中发现并确认 4 类有效组分的配伍可以代表清开灵的治疗“上焦之火”(脑水肿) 的功效, 从而成功开发了 1 个治疗脑水肿的组分中药。虽然清开灵的研究还没有达到化学物质组学研究的第 3 个层次及明确所有有效化学成分层次, 但是所得到的该组分中药中主要的药效成分已经基本清楚, 见图 5, 药物质量能够得到稳定的控制, 疗效和安全性可以得到可靠的保证, 药理作用也能够基本清楚^[17-20]。因此我们认为从目前来看并不一定苛求清开灵方的化学物质组学研究达到第 3 个层次, 第 2 层次的研究就已经能够达到开发现代组分中药的要求。当然, 随着现代科学技术的进步, 如果确有需要的, 在组分中药的基础上开展第 3 个层次的研究也是完全可能的。

七、展 望

传统中药成分复杂, 功能主治也非常广泛。采用整体化学物质组学可以表征其功能主治和物质基础的相关性。针对一定的较明确的适应症, 只要具备科学合理的活性评价方法和指标, 就可以对传统中药复方开展系统的化学物质组学研究和筛选, 从而开发出主要药效成分基本明确, 药理作用基本清楚的现代组分中药。本文所提出的化学物质组学作为一种创新的组学研究方法, 为从中药或传统复方药物中开发新药(包括传统复方中药、组分中药或植物药) 提供了一个可行的方法学平台, 在新药研发中有着广泛的应用前景。

化学物质组学作为研究外部环境构成的化学体系的一种普遍性的方法, 除了中药方剂以外, 也还可以研究其它药物, 以及非药物化学物质(如食物、空气污染、农残、水污染等) 对生物体系的影响, 在食品科学、环境科学等领域同样有着潜在的应用。

参考文献

- 1 罗国安, 王义明. 中药复方有效部分研究方法及其理论初探. 中成药, 1997, 19(8): 44~45.
- 2 罗国安, 王义明. 中药复方的化学研究体系. 世界科学技术-中医药现代化, 1999, 1(1): 16~19.
- 3 罗国安, 王义明. 中药复方物质基础和药效相关性研究. 世界科学技术-中医药现代化, 1999, 1(1): 11~15.
- 4 曹进, 饶毅, 沈群, 等. 中药指纹图谱及其建立原则. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 200~204.
- 5 罗国安, 王义明, 曹进. 多维多息化学特征谱及应用. 中成药, 2000, 22(6): 395.
- 6 Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. NATURE 2000, 405(6788): 837~84.
- 7 Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181~1189.
- 8 罗国安, 王义明, 曹进等. 建立我国现代中药质量标准体系的研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2002, 4(4): 5~12.
- 9 He XG. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. J. Chromatogr. A, 2000, 880 (1-2): 203~232.
- 10 Ideker T, Galitski T, Hood L. A new approach to decoding life: Systems biology. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2001, 2: 343~372.
- 11 Weston, A.D., & Hood, L. J. Proteome Res. 2004, 3, 179~196.
- 12 王升启. 中药基因组学与中药化学组学. 首都医药, 2001, 8(6): 19~20.
- 13 杜冠华. 中药复方有效成分组学研究. 中成药, 2002, 24 (11): 878~880.
- 14 Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. J. Infect. Dis. 1978, 137: 122~130.
- 15 Ohrt C, Willingmyre GD, Lee P, Knirsch C, Milhous W. Assessment of azithromycin in combination with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro. Antimicrob. Agents Chemother., 2002, 46: 2518~2524.
- 16 Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, et al. Antimalarial drug discovery: Efficacy models for compound screening. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3 (6): 509~520.
- 17 钟相根, 李澎涛, 王永炎. 清开灵有效组分对缺血脑组织神经营养因子含量的影响. 北京中医药大学学报, 2004, 27(3): 21~24.
- 18 徐丽荣, 马世彬, 李澎涛, 等. 清开灵有效组份对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞间黏附分子表达的影响. 中药新药杂志, 2004, 35(6): 666~669.
- 19 徐丽荣, 马世彬, 李澎涛, 等. 清开灵有效组分对 MCAO 大鼠脑微血管内皮细胞的影响. 中药材, 2004, 27(5): 348~352.
- 20 钟相根, 李澎涛, 王永炎, 等. 清开灵有效组分对大鼠缺血脑组织星形胶质细胞活化的影响. 中国医药学报, 2004, 19(6): 338~340.
- 21 Yan SK, Xin WF, Luo GA, et al. An Approach to develop Two-Dimensional Fingerprint for the Quality Control of Qingkailing Injection

- from DAD Chromatogram. J. Chromatogr. A, 2005, 1090 (1-2): 90~97.
- 22 Yan SK, Xin WF, Wang YM, Luo GA, Cheng YM. Qingkailing Injection by High-Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. Chem. Pharm. Bull., 2005, 53 (11), in press.
 - 23 曹进,徐燕,张永知,等. 清开灵注射液 HPLC/ELSD 指纹图谱建立及质量相关性研究. 分析化学 2004,32(4):469~473.
 - 24 徐燕,程伟,徐艳华,等. 清开灵注射液和珍珠母水溶液中钙的测定及形态初探. 中成药,2003,25(2):106~107.
 - 25 徐燕,曹进,王义明,等.多波长高效液相色谱法同时测定栀子中的三类成分. 药学报,2003,38(7):543~546.
 - 26 曹进,徐燕,王义明,等. 清开灵注射液中三种胆酸含量测定方法比较. 中成药,2003,25(9):705~708.
 - 27 曹进,徐燕,张永知,等. 清开灵注射液指标成分的体内样品分析. 中医药学刊,2003,21(12):1980~1982.
 - 28 曹进,徐燕,王义明,等. 多波长高效液相色谱法同时测定清开灵注射液中三种有效成分. 药物分析杂志,2004,24(1) 8~11.
 - 29 Yan SK, Luo GA, Wang YM, et al. Simultaneous Determination of Nine Components in Qingkailing Injection by HPLC/ELSD/DAD and Its Application to the Quality Control, J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, in press
 - 30 严诗楷,辛文峰,罗国安,等. 应用 HPLC-DAD-ELSD 联用技术同时测定清开灵注射液中的五类有效成分. 色谱,2005,23(5): 482~486.

Study of Chemical Matteromics and Prescription of Traditional Chinese Medicine

--And An Analysis of Material Foundation of Compound Prescription Qingkailing

Luo Guoan, Liang Qionglin (Department of Chemistry of Tsinghua University and Key Laboratory of Biological Organic Phosphorus and Chemical Biology of the Ministry of Education, Beijing 100084)

Zhang Rongli, Wang Yiming Liu Qingfei (Centre for Study of Modernization of Traditional Chinese Medicine, Institute of Life and Medical Sciences, Beijing 100084)

HuPing (Centre for Modernization Engineering of Traditional Chinese Medicine, school of chemistry and Pharmaceutics, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

This article presents a new methodology, chemical matteromics, for the study of "omics" on the basis of summarizing chemical studies of the compound prescriptions of traditional Chinese medicine (TCM) and making use of systems biology for reference. Chemical matterome means a complex chemical system composed of all the chemical matters (chemical components) which come into biosystems in a given condition while chemical matteromics is a methodology for the study of the components of a chemical matterome and their relationship. To explore this new discipline, the authors of this article propose a strategy of gradational study of chemical matteromics and its corresponding technology and apply it to the study of TCM prescriptions. Taking compound prescription QingKailing for example, they expound the study on the method of chemical matteromes at three levels and describe the study on the process of the chemical matteromics of TCM prescriptions. They hold that chemical matteromics offers methodological support for the study of complex chemical system and constitutes the development and supplement of the present systems biology, thus providing a necessary condition for the study of the interreaction between the biological complex system and the chemical complex system outside. The process that TCM prescriptions function on human body most typically expresses the interreaction of the two complex systems. Therefore, chemical matteromics will play an important role in the promotion of the study of TCM prescriptions.

Key Words: Chemical matteromics, chemical matterome, TCM prescription, systems biology, QingKailing injection

(责任编辑:张志华,英文译审:秦光道)