

生物方剂分析药理策略阐明当归补血汤心脏保护药效学物质基础的设想^{*}

闫奎坡^{1,2}, 朱翠玲^{1,2,*}, 孙彦琴^{1,2}, 朱明军^{1,2}, 刘新灿^{1,2}

(1. 河南中医学院第一附属医院 郑州 450008; 2. 河南中医学院第一临床医学院 郑州 450046)

摘要: 生物方剂分析药理(BAP)研究策略”是指在方剂吸收入生物体内成分分析的指导下,进行方剂的在体/离体药效、药动、质量控制、植物化学等方面的研究,并采用吸收成分与母方疗效比较的研究模式,同时遵循剂量等于母方含量或者血药浓度的原则。该文提出假说,拟在BAP策略指导下阐明当归补血汤对心肌缺血的多方面防治和机理研究的思路、设想及预期结果,从而指导方剂研究相关实验的进一步开展,以期对中药复方研究提供新思路。

关键词: 生物方剂分析药理 当归补血汤 活性成分 假说

doi:10.11842/wst.2016.07.006 中图分类号:R29 文献标识码:A

中药复方的疗效究竟由什么成分发挥作用一直是中医药学术界长期存在的问题^[1],药效物质基础是中药复方研究的核心之一^[2]。在循证医学时代,中药复方在临床的广泛应用,也对中药复方研究提出新的挑战:即如何进一步开展中药复方的研究和开发,以提供充足的疗效证据。生物方剂分析药理(Bioethnopharmaceutical Analytical Pharmacology, BAP)研究策略在此背景下产生了。本课题组应用BAP策略初步明确了冠心病的体内药效物质^[3]。本文拟采用BAP策略对当归补血汤(Dangui-Buxue Tang, DBT)进行分析,并详细介绍BAP明确该方的可吸收生物活性成分及药效学物质基础的过程,为该策略在复方研究的推广与应用奠定基础。

1 DBT及其在冠心病方面的治疗作用

DBT出自《内外伤辨惑论》由李东垣(金元时代)创制,黄芪和当归两味药以5:1组成的,具有益气生血、活血的功效^[4-5]。冠心病属于中医“血瘀证”范畴,气虚血瘀是其基本的病理改变,益气活血法是治疗冠心病的指导原则。DBT能加强心肌收缩力,降低心肌耗氧量,防止或减轻心肌损伤^[6]。抑制血小板的聚集可预防血栓形成;降低血液黏度、加快血流,可改善血液对全身组织器官的供应。DBT还具有降脂、抗氧化应激和抗动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)的作用^[7]。

2 DBT的化学成分组成

基础研究^[6,8-10]表明DBT主要由DBT多糖组分、DBT非多糖组分、黄芪多糖、黄芪甲苷、黄芪异黄酮、

收稿日期 2015-06-05

修回日期 2015-12-07

^{*} 国家自然科学基金委青年科学基金项目(81303073)“基于入血吸收成分谱研究当归补血汤通过MAPK通路的心脏保护作用”,负责人:闫奎坡;河南中医学院省属科研业务专项(2014KYYWF-YQ12)“当归补血汤活性成分预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究”,负责人:闫奎坡;河南中医学院一附院院内博士项目(2012KJ32)“定量君、臣、佐、使药对冠心病号降低大鼠心肌梗面积的贡献度”,负责人:闫奎坡;河南省科技厅科技攻关重点项目(142102310289)“补肾化浊法对高血脂大鼠的降脂作用及其对LDL受体功能的调控和影响”,负责人:朱翠玲;河南省教育厅高校科技创新团队支持计划(13IRTSTHN012)“中西医结合防治心血管疾病”,负责人:朱明军;2013年河南省科技厅创新型科技团队支持计划(C20130050)“河南省中医药防治心血管疾病创新型科技团队”,负责人:朱明军。

^{**} 通讯作者 朱翠玲,主任医师,教授,主要研究方向:中医药防治心血管疾病的医疗和科研工作。

黄芪异黄酮、黄芪皂苷、当归多糖、阿魏酸组成。还有更详细的研究显示 DBT 所含化学成分有：黄酮苷类,包括:毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、刺芒柄花素苷、9,10-二甲氧基紫檀烷 3-O-B-葡萄糖苷、5,7-二羟基-4-甲氧基异黄酮；氨基酸类,包括:苯丙氨酸和色氨酸；有机酸类,包括:绿原酸、异绿原酸、香草酸、阿魏酸和壬二酸。现研究^[6,8-10]认为黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、阿魏酸、藜芦内酯是 DBT 的主要活性成分,也是目前 DBT 的主要质量控制指标。

DBT 属于经典中药复方,从古文文献和现代药理学研究均证明其在胸痹方面体现出较好的疗效。目前 DBT 的化学成分研究比较清楚,主要活性物质成分明确,课题组拟设想采用 BAP 策略研究 DBT 的心脏保护药效学基础。

3 DBT 汤剂的质量控制

中药汤剂的应用延续千年,本课题研究中以汤剂作为质量控制的标准。在药物选择方面,经药品专家鉴定,药物按照经典方剂的比例进行搭配,DBT 药物煎煮之前的处理、浸泡、煎煮时间等可依据文献^[3]进行,最终得到汤剂制备冻干粉。在此之后需对药物进一步处理,并对其质控成分进行定性和定量检测。中医药质量控制保证了中药的质量,可达到预期的疗效,确保了药效,在重复性及安全性方面发挥了关键作用。在丹参饮(汤剂制备)^[11]和冠心病^[3]的研究中,两种汤剂的煎煮均在时间上严格控制。此外,冠心病还采用了冻干粉制备和高效液相色谱法进行了有效质控,还对入血吸收成分谱进行了分析。

4 活性成分吸收的检测

人或实验动物口服中药后取血,进一步处理得到含药血浆,对其可吸收生物活性成分进行检测,定性定量分析可吸收生物活性成分,即计算可吸收生物活性成分在体的成分及血药浓度。此过程在血液的后续处理过程中比较关键,由于可吸收生物活性成分的物理性质各异,采用萃取的有机试剂也不同。

血药浓度法定性与定量测定体液中复方化学成分的具体方法有:酶标免疫法、荧光、紫外分光光度计法、HPLC 荧光检测法、单纯 HPLC 紫外检测法、胶束荧光法。综合方法包括 GC-MS 法、联合 GC-MS

和 3D-HPLC 法、3D-HPLC 结合 MS 和切换技术使血清样品直接进样法、液相色谱-质谱联用技术(LC-MS 法、2D-HPLC/3D-HPLC 结合四谱(VU、IR、Ms 和)NMR)方法。20 世纪 80 年代已发展到高效毛细管电泳和超临界流体萃取技术。LC-MS 融合了色谱技术的高分离能力与质谱技术的高灵敏和结构解析能力,具有高灵敏度、高选择性的特点,并能提供相对分子质量和丰富结构信息。因此,随着科学技术的发展,LC-MS 的应用日益广泛,目前已成为中药成分分析中最常用的技术之一。

5 BAP 策略目前的研究成果

BAP 研究策略是指在方剂吸收入生物体内成分分析的指导下,进行方剂的在体和离体药效、药动、质量控制、植物化学等方面的研究,研究采用吸收成分与母方疗效比较的研究模式,同时必须遵循剂量等于母方含量或者血药浓度的原则。本研究团队已在该策略指导下已完成了部分研究,BAP 策略基本流程图如图 1 所示。在若干研究中,BAP 策略指导下的冠心病研究^[12]采用 HPLC-MS/MS 测定了健康人与大鼠口服冠心病后吸收入血的 5 个成分:丹参素(T)、阿魏酸(F)、羟基红花黄色素 A(A)、原儿茶醛(P)和芍药苷(E),阐明了冠心病与阿魏酸(F)、羟基红花黄色素 A(A)、丹参素(T)(FAT,剂量等于其在母方中含量)在减小大鼠心肌梗死面积、抑制凋亡/caspase-3 活性与增加心肌血流量的疗效一致,其深入抗凋亡机制还涉及细胞色素 c 的释放与 Bax/Bcl-2 比值等抗氧化应激途径的参与。

活性成分吸收的检测和 BAP 策略研究成果是 BAP 策略阐明 DBT 药效学物质基础的关键步骤。在可吸收生物活性成分测定的基础上,这两方面结果互相验证,可对在体和离体研究起到指导作用。

6 BAP 指导 DBT 的在体研究策略

DBT 的心脏保护作用研究按照图 1 的设计思路(包括 DBT 的质量控制部分)进行。BAP 应用方面的 3 个要点为:方剂成分在血中的测量、吸收成分与母方疗效的比较、吸收成分剂量等于母方中的量^[1]。在方剂可吸收生物活性成分在血中的定量研究方面,一般在研究方剂整体药效,同时利用 UPLC、LC-MS-MS 等仪器测定口服方剂后血中吸收的化学成分。明确方剂体内吸收成分是 BAP 研究的前提与指

导思想。研究吸收成分剂量等于母方中的量 BAP 指导 DBT 在体研究的关键 ,由图 1 可见 ,DBT 质量控制的 5 种成分对急性缺血大鼠的剂量等于 DBT 母方的含量 ,只有这样才能充分体现剂量和母方含量的关系。在吸收成分的疗效最终和母方疗效进行比较上 ,只有通过比较才能发现吸收成分疗效是否可以代表母方的疗效。

在 DBT 及其可吸收生物活性成分心脏保护作用的在体研究方面 ,本课题组采用了经典的冠脉结扎所致的急性心肌梗死模型 ,同时选用公认的整体和组织水平疗效评估(如大鼠状态、TTC 标记心梗面积等)分子层面的疗效评估(如炎症因子、凋亡指标、mRNA 等) ,做到多层面验证可吸收生物活性成分和母方的疗效。

中药复方心脏保护作用疗效及机制研究较多 ,但至今仍未充分揭示某个复方的疗效物质基础。目前在中药复方研究方面 ,BAP 策略认为其疗效和部分活性成分相关研究将可能揭开复方有效活性成分

的“面纱” 。也有很多研究策略认为复方成分十分复杂 ,其疗效是多种成分、多种微量元素共同发挥作用的结果 ,其具体活性成分难以阐明。

目前研究认为复方疗效活性不明 ,只有充分揭示复方疗效的活性物质 ,中医药现代化才能进一步发展。BAP 策略正是在这种背景下产生并成功揭示出冠心 号等部分复方的疗效活性物质 ,本课题组将继续采用该策略进一步研究 DBT 的心脏保护作用 ,揭示其疗效活性物质。目前较多研究仅采用复方中的个别单体成分或组合进行疗效对比的研究 ,这样的研究单体成分能否吸收还不明确 ,剂量的设置没有充分的依据。BAP 策略可摒弃上述研究的不足 ,从而更科学的解决了复方研究的局限性。

7 BAP 指导 DBT 的离体研究策略

BAP 指导 DBT 离体研究策略 ,笔者以 DBT 及其活性成分对大鼠正常原代心肌细胞的干预予以说明。由于传统中药复方汤剂中重金属、药物污染、电

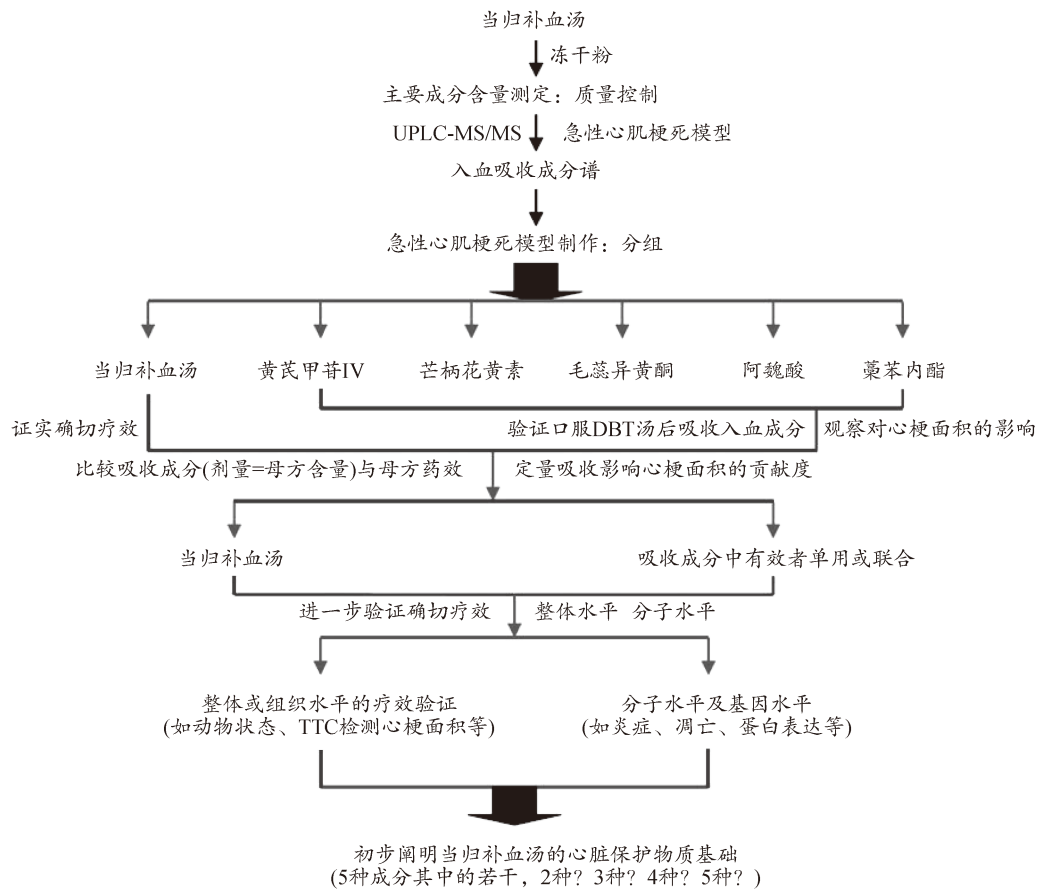


图 1 BAP 指导下 DBT 质量控制及在体研究策略流程图

解质等造成的粗制剂,可直接进行细胞干预;因此,即使杀毒、灭菌后可能导致假阳性或假阴性结果^[1]。药效学物质是吸收入体内的成分(药效成分的直接证据),不存在内源性与外源性干扰。按照BAP策略就能够扬长避短,药效学物质明确后,就可以基本代表母方的疗效;也使离体实验分析的药物成分得到精简。另外还可以参考血药浓度范围进行研究,也可采用可吸收生物活性成分疗效和血清药效学比较的模式研究。类似离体研究模式进行离体细胞研究,本课题组利用DBT含药血清与其可吸收生物活性成分对缺血缺氧模型细胞干预,比较两者的药效学;预期目标是二者具有类似的心肌细胞保护的效应;然后进行机制研究。既有研究发现心肌死亡的方式主要坏死、凋亡、自噬,引起心肌死亡的机制主要有氧化应激、炎症和心肌细胞死亡相关的指标,可对上述经典指标进行检测,验证DBT及其可吸收生物活性成分分离心肌细胞的保护机制。

比较模式用于整体或离体实验的相同点在于两者都强调吸收成分并都进行药效的比较;不同的是,整体比较中,吸收成分的剂量等于母方中的含量,而离体比较时,如果单纯研究机制,药物成分机制作用又没有重复实验,那么母方作用的机制就应该是吸收的药效学物质机制的综合。如需更精确地研究药效学和作用机制,吸收成分剂量需要参考这些成分的药效血药浓度范围,同时需要联合应用进行比较。本课题组拟在明确DBT的药效学物质基础上,采用上述模式进行精细设计,就能解决这一长期困扰方剂离体作用机理的重大关键科学问题。

课题组现开展的DBT研究已经鉴定出汤剂中和入血的5种成分,初步研究显示吸收入血的5种成分在抗心肌缺血的药效方面与母方类似;下一步将深入探讨吸收成分能否在机制方面也发挥类似母方的心脏保护机制。

BAP策略在整体研究上曾解决了部分中药复方的药效物质基础,但在离体研究上尚未全面展开。但从目前的研究进展来看,BAP策略离体研究指导中药复方作用机制及物质基础研究上很快可以取得突破。

8 小结

从中医药学现代化角度来看,仅研究DBT心脏保护作用的机理还远不能阐明其治疗冠心病的作用机理。保持中药特有疗效的同时,研究其吸收入活

性成分的药效学才能丰富、发展和完善中医药学,也是实现中医药现代化过程中不可逾越的难关^[12,13],突破这道难关才能让中医药逐步迈向世界^[14]。

从中药的实质来看,中药是由非常多的化学物质按照特定的相对含量比例组合而成的复方制剂。从化学的角度来看,要实现这一复杂复方制剂的质量控制,首先主成分含量测定十分关键,将其化学物质的结构和相对含量阐明非常重要。BAP研究中药复方的策略正是在多年来复方研究的基础上,汲取中药基本理论、药理学、药物制剂学、化学、分子生物学等研究成果逐步发展起来的;并已经初步解决了部分中药复方的药效学物质基础,对其结构、含量进行了初步测定。但深入研究中药复方可吸收生物活性成分及相关药效研究的文献较少,原因之一在于中药复方可吸收生物活性成分不清楚;紧靠含药血清进行离体的细胞研究,因含药血清的质量控制及所含代表复方功效的物质基础不明确,尚无法揭开中药复方药效物质基础的谜团。而在BAP策略指导下进行研究,不但可以明确复方吸收入血的具体药效物质基础,同时还可以利用目前的技术进行定量测量,这样就可以开展中药复方可吸收生物活性成分干预离体的细胞研究,以便更好地揭示中药复方的可吸收生物活性成分及多方面的药效研究。目前该策略已经完成了对冠心病的研究,初步证明了冠心病与FAT(剂量等于其在母方中含量)在疗效上一致;离体研究也继续采用BAP策略,阐明了冠心病舒张血管的机制。在该策略的指导下,DBT的疗效物质基础也将很快明确。

在上述介绍BAP策略阐明DBT心脏保护药效学物质基础的部分研究进展及进一步研究设想的基础上,本课题组将通过该复方或者药对的研究,把BAP策略延伸到其他学科,从而在更大范围内研究中药复方的疗效及物质学基础。目前该策略已经投入到补阳还五汤、血府逐瘀汤、酸枣仁汤、桃核承气汤等经典方剂的临床药效及其药效物质基础的研究。笔者在BAP策略研究基础上,结合循证医学时代对中药复方研究提出新的挑战,首次提出了中药复方循证生物系统研究策略(Chinese Herbal Compound Formula Evidence-Based Biosystem Research Strategy,CHCF-EB-BRS),拟从从古籍、系统评价和临床研究多层面验证中药复方的临床疗效,再采用质控良好的复方进行实验室及临床研究,

揭示复方的疗效物质基础及相应的机制,以期解决中药复方研究面临的瓶颈,并期望借助 CHCF-EB-

BRS 策略的融合研究,将数十万中药复方的疗效物质基础得以明确,从而促进中医药的现代化进程。

参考文献

- 1 闫奎坡. 冠心 II 号心脏保护作用的物质基础及其舒张大鼠胸主动脉机制的研究. 长沙: 中南大学博士学位论文, 2012: 1-2.
- 2 屠鹏飞, 史社坡, 姜勇. 中药物质基础研究思路与方法. 中草药, 2012, 43(2): 209-215.
- 3 Huang X, Qin F, Zhang H M, *et al.* Cardioprotection by Guanxin II in rats with acute myocardial infarction is related to its three compounds. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121(2): 268-273.
- 4 Zhang Y, Hu G, Lin H C, *et al.* Radix Astragali extract promotes angiogenesis involving vascular endothelial growth factor receptor-related phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-dependent pathway in human endothelial cells. *Phytother Res*, 2009, 23: 1205-1213.
- 5 Yang M, Chan G C, Deng R, *et al.* An herbal decoction of Radix astragali and Radix angelicae sinensis promotes hematopoiesis and thrombopoiesis. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(1): 87-97.
- 6 张三印, 冯蓓, 杨苗. 当归补血汤抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞的增殖及其分子机制. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 163-167.
- 7 马文静, 孙璐, 孙娟, 等. 当归补血汤及当归黄芪提取部位组合物对 P38MAPK 信号转导通路的研究. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(7): 807-808.
- 8 Dong T T, Zhao K J, Gao Q T, *et al.* Chemical and biological assessment of a chinese herbal decoction containing Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis: Determination of drug ratio in having optimized properties. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(7): 2767-2774.
- 9 Song Z H, Ji Z N, Lo C K, *et al.* Chemical and biological assessment of a traditional chinese herbal decoction prepared from Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis: Orthogonal array design to optimize the extraction of chemical constituents. *Planta Med*, 2004, 70(12): 1222-1227.
- 10 Sheng L H, Li S L, Kong L, *et al.* Separation of compounds interacting with liposome membrane in combined prescription of traditional Chinese medicines with immobilized liposome chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(2): 216-224.
- 11 Yan K P, Guo Y, Xing Z, *et al.* Dan-Shen-Yin protects the heart against inflammation and oxidative stress induced by acute ischemic myocardial injury in rats. *Exp Ther Med*, 2012, 3(2): 314-318.
- 12 Yuan R, Lin Y. Traditional Chinese medicine: An approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacol Therapeut*, 2000, 86: 191-198.
- 13 Xie P S, Leung A Y. Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 1933-1940.
- 14 Yan K P, Yong G, Xing Z H, *et al.* Dan-Shen-Yin has integrated protective effects in diabetic atherosclerosis rat models. *J Med Plants Res*, 2011, 5(27): 6336-6343.

The Hypothesis of Elucidating the Cardioprotective Absorbed Bioactive Compounds of *Danggui-Buxue-Tang* with the Method of Bioethnopharmaceutical Analytical Pharmacology

Yan Kuipo^{1,2}, Zhu Cuiling^{1,2}, Sun Yanqin^{1,2}, Zhu Mingjun^{1,2}, Liu Xincan^{1,2}

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;
2. The First Clinic Medical College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Bioethnopharmaceutical analytical pharmacology (BAP) means to study Chinese herbal compound formula (CHCF) from the aspects of *in vivo* and *in vitro* efficacy, pharmacodynamics, quality control and plant chemistry, guided by the CHCF absorbed bioactive compounds (ABC) analyses. The form of BAP is performed by comparing ABC efficacy with mother formula efficacy. Meanwhile, it must follow the principle which the ABC dose should be equal to the mother formula content or the blood drug concentration. In this study, the hypothesis was put forward to clarify the thoughts, assumptions and expected results, which uncovered the multiple cardioprotective mechanism of *Danggui-Buxue Tang* (DBT) for ischemic heart disease. BAP is expected to guide the development of further experiments for providing a better thought for the research over CHCF.

Keywords: Bioethnopharmaceutical analytical pharmacology, *Danggui-Buxue Tang*, absorbed bioactive compounds, hypothesis

(责任编辑:朱黎婷,责任译审:朱黎婷)