

中药有效成分辨识的研究进展

陈晓萌^{1,2}, 陈畅², 李德凤², 杨洪军², 许海玉^{2*}

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 为有效地从繁多的中药复方化合物中发现和辨识出其作用成分, 明确中药作用功效提供参考和依据, 通过对中国知网和国外相关杂志的文献进行检索和总结, 从 26 篇近期报道的文献中提炼出有效成分辨识相关思路, 对以药理活性为导向的有效成分辨识和基于体内过程的有效成分辨识这 2 个主要研究方法分别进行归纳, 并着重对基于体内过程有效成分辨识的常用技术如外翻肠囊法、Caco-2 细胞模型、血清药物化学法进行了总结。传统的以药理活性为导向的中药有效成分辨识和近期发展的基于体内过程进行中药活性物质筛选均有各自的优势和不完善之处, 综合应用可以达到良好的互补。同时, 多成分综合作用是中药发挥效果的基本模式, 因此, 进行有效成分辨识时, 在多成分综合效应中辨识出主要的有效成分, 是符合中药特点的有效成分辨识方法。

[关键词] 中药物质基础; 有效成分辨识; 体内过程; 药理活性; 肠吸收模型; 血清药物化学

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0249-04

Research Advances in Discovery for Effective Constituents of Chinese Materia Medica

CHEN Xiao-meng^{1,2}, CHEN Chang², LI De-feng², YANG Hong-jun², XU Hai-yu^{2*}

(1. College of life science and engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] In order to discover and identify effective compositions from various compounds of Chinese medicine, and provide the basis for clearing its efficacy, based on the cnki and foreign related magazines, this article extracts related ideas from 26 recent reports of the literature, and has reviewed discovery technical means for effective constituents of Chinese materia medica with pharmacological activities for guides and discovery technical means for effective constituents of Chinese materia medica based on the processes of metabolism and disposition the two main research methods. And the review introduces discovery strategies for effective constituents of Chinese materia medica, especially focus on the discovery technical means (such as in vitro everted intestinal sac, Caco-2 cell model and serum medicinal chemistry) for effective constituents of Chinese material medica based on the processes of metabolism and disposition. Traditional discovery means for effective constituents of Chinese material medica with pharmacological activities for guides and recent developed discovery technical means for effective constituents of Chinese material medica based on the processes of metabolism and disposition both have their advantages and shortcomings, comprehensive application can achieve good complementary. Meanwhile, effect come

[收稿日期] 2011-02-16

[基金项目] 中国中医科学院基本科研业务费自主选题(Z02063); 综合性中药新药研究开发技术大平台(2009ZX09301-005-002); 中医药行业科研专项(200907001-5)

[第一作者] 陈晓萌, 西南交大在读硕士, 从事药代动力学及其有效成分辨识, Tel: 15210059383, E-mail: juying169@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 许海玉, 助理研究员, 博士, 从事中药药代动力学及其中药组效关系研究, Tel: 010-64014411-2948, E-mail: hy_xu627@163.com

from integrated various components is the basic approach of action for Chinese medicine. Therefore, in the process of the effective components discovery, to find out the main effective components from traditional Chinese medicine with complex composition is a better way agreeable with the characteristics of Chinese medicine.

[Key words] Chinese material medica; discovery for effective constituents; processes of metabolism and disposition; chemical activity; intestinal absorption model; serum medicinal chemistry

中药“多成分,多靶点”的作用特点,得到学术界普遍认可。如何从中药复杂化学体系中辨识出有效成分(群),并弄清其在中药复方药效中所起的作用,是中药现代研究的关键问题之一。本文就中药有效成分(群)辨识的研究进展,综述如下。

1 中药有效成分(群)概述

普遍认为,中药有效成分是指中药材、饮片或者中成药中,具有生物活性的单体化学物质,将多种化学物质的集合,称为有效成分群。由于单一有效成分难以全面反映中药功效,不同功效对应不同成分群,也就是说,中药有效成分种类多、不同有效成分群对应不同功效,这些是导致中药有效成分复杂性的根本原因。

在疾病治疗过程中,方剂中各味中药发挥的作用并不完全一样,有的对主病或主证发挥主要治疗作用;有的对兼病或兼证发挥主要治疗作用;有的发挥引经药或者调和药的作用。我们认为中药有效成分具有不确定性的特点,也就是说,在不同的复方、不同的主治症中,即使是同一味中药,有效成分的种类有所不同,所发挥的药效活性也不一样。例如丹参中,有脂溶性和水溶性两类成分,水溶性成分主要作用于心血管系统,而脂溶性成分主要起到抗菌作用^[1]。

中药有效成分体内过程研究中发现,中药中的有些化学物质对于机体来说直接发挥生物学作用;而另一些间接发挥生物学作用,包括大多数原生苷是前药(prodrug),如灯盏乙素聚乙二醇^[2],其在人体内的生物转化产物或代谢产物发挥生物学作用。然而有些成分没有被吸收入血,却能在胃肠道直接发挥作用或者能对胃肠道菌群发挥作用,如大承气汤中的芒硝,其硫酸钠的硫酸根离子不易被肠黏膜吸收,在肠道内形成高渗盐溶液,然而其使肠道扩张,引起机械刺激,促进肠蠕动,从而发生排便效应^[3]。番泻苷和芦荟苷都是泻下剂的前体药物^[4],中药大黄和番泻中都含有番泻苷(sennoside)属于蒽醌类化合物,本身无泻下作用,口服之后小肠吸收率很低,在大肠经肠道菌群作用后生成苷元后才出现泻下作用。

还有一些成分起到促进或抑制其他成分吸收的作用,从而起到增加药效或降低毒性的作用。如对痹祺胶囊进行拆方配伍的药代动力学研究中^[5],按照中药复方配伍的君臣佐使原则,对痹祺胶囊研究结果表明臣药组和佐药组均能显著降低并延长土的宁和马钱子碱的达峰时间,延缓吸收,降低君药中主要药效成分的血药浓度,避免过快产生毒副作用;有的成分能促进其他药效成分的吸收,如藜本内酯是川芎挥

发油中的主要活性成分,在药代动力学研究时,发现在胸舒片复方中能促进其他各有效成分的吸收^[6]。

由此可见,中药有效成分治疗疾病时发挥的作用并不尽相同,那么凡是参与疾病治疗的,能提高疗效的或者降低毒副作用的化学成分都是中药的有效成分。

2 以药理活性为导向的中药有效成分辨识

以活性导向的中药活性物质辨识是研究中药物质基础的传统方法和最基本的模式,在活性物质辨识的其他思路中,都渗透着这种思路。该研究方法为以药理活性为导向(体内实验、组织器官、细胞和分子等)的化学研究(中药复方、有效部位、有效成分 3 个层次上步步深入)来开展研究工作。研究主要有 2 种思路:①先化学后药效。把中药复方作为一个整体,对其进行系统分离,对分离所得的化合物逐一进行药效学研究,药理筛选出有效的化学成分即认为是该复方的药效物质基础。②先药效后化学。把中药复方作为一个整体,根据该复方中主要的化学成分类型和君、臣、佐、使的配伍,有目的地将该复方划分为若干个部位,将所得的各个部位和该复方进行相对应的药效学研究,确定其有效的部位,再将有效部位进行分离,得到有效部位中的各个化学成分,把有效部位中的化学成分认定为该复方的药效物质基础。

中药复方多数是口服,口服后被肠内菌转化或被机体肝药酶代谢,以转化物或代谢产物的形式发挥作用,也有些成分根本不被人体吸收,因此复方的药效成分与成药中的化学成分不等同,很可能有重大差别^[7];其次,中药具有多靶点,多重药效的特点,在试验研究时,尤其是在离体组织器官、细胞、靶点研究时,往往选用的药效模型有限,不能全面、有效的筛选中药有效成分。可见,传统的以药理活性为导向的中药活性物质筛选模式难以有效辨识中药药效成分。

3 基于体内过程进行中药活性物质筛选

口服给药是最常见的临床给药途径,药物的吸收是产生体内活性的先决条件(在胃肠道直接发挥作用的药物除外),是整个体内过程的源头和起点。在多数情况下,中药有效成分需要被吸收入血、到达靶器官并作用于相应靶点后才能发挥药效作用。

该研究方法是现代仪器,如高效液相-质谱的联用法(HPLC-MS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、核磁共振法(NMR)等,系统的分析生物体中血液、组织器官、尿液、粪便等中随时间和空间(各个组织)的药物(包括原型药物、转化产物和代谢产物等)动态变化情况,并对药物及其代谢物进

行定性、定量分析,获得药物各种代谢途径、方式的信息和药代动力学的各种参数。王喜军^[8-9]对六味地黄丸及口服六味地黄丸后大鼠血清药物化学进行研究,从血中发现了11个人血成分,其中4个为新产生的代谢产物,7个成分为六味地黄丸所含成分的原型成分。将血中移行成分以适当浓度添加到大鼠成骨细胞培养液中,用噻唑蓝(MTT)法测定细胞的增殖速度,结果表明六味地黄丸主要血中移行成分莫诺苷、獐牙菜苷、马钱子苷的混合物各剂量组均表现出对大鼠成骨细胞的促增殖作用,从而初步确定六味地黄丸主要血中移行成分是其治疗骨质疏松的药效物质基础。

目前,细胞吸收模型、离体器官吸收模型、在体吸收模型等体外吸收模型常用于中药有效成分的筛选及其成分吸收机制的研究,同样,血清药物化学、药物代谢物组学等新的概念和方法应用到了中药的研究开发,提高了中药药效物质的研究水平。目前研究药物在肠内吸收的实验方法主要有体外法(*in vitro*)、在体法(*in situ*)、体内法(*in vivo*)。体外吸收模型的建立,使原本复杂的动物实验相对简单化,不受一些生理因素例如胃肠道的排空、小肠表面积等因素的影响,相比整体动物而言有一定优势,而且方法简单,对研究药物跨膜吸收、被动吸收和主动转运过程的机制有一定价值,并可单独用于研究影响吸收的因素。本法包括分离肠黏膜法(isolated gut mucosa),外翻肠囊法(everted gut sacs),Caco-2细胞模型法(Caco-2 cell line),MDCK(madin-darby犬肾细胞系)细胞模型法^[10],平行人造膜通透性测定法(PAMPA)^[10],以及其他研究方法^[10],如研究小肠吸收的其他方法还有固定化人工膜技术(IAM)、固定化脂质体色谱(ILC)、胶束电动色谱(MEKC)、生物分配胶束色谱(BMC)、脂质体分配系统、生物传感器法、空壳红细胞法等,另外,还有一些细胞株如2/4/A1,It29,T84,IEC-18等,但运用并不广泛。其中,外翻肠囊法和Caco-2细胞模型法相对来说最为完善,运用最为广泛体外肠吸收模型。

3.1 外翻肠囊法 外翻肠囊法又称肠外翻法,它是由Wilson和Wiseman于1954年创建,最早用于研究葡萄糖和氨基酸在肠道的代谢、转运^[11],后经不断改进,成为目前最常用的体外肠道吸收生物模型。冯亮等^[12]研究了三七皂苷R1和人参皂苷Rg1在大鼠胃肠道的吸收动力学,并考察不同的药物浓度和常用吸收促进剂对其吸收的影响。本法是一种广泛用以研究肠吸收的方法,可用于研究生物膜的转运机制。该方法的优点在于操作简便,试验条件易控制,重复性好,经济适用,被广泛用来研究药物动力学和养分的吸收机制。然而由于组织的功能或形态易发生改变,该法只适于研究快速转运。

3.2 Caco-2细胞模型 Caco-2细胞(the human colon adenocarcinoma cells)模型是最近十几年来国外广泛采用的一种研究药物吸收的体外模型,在吸收过程研究中,比较简单,重复性好,应用范围较广。Caco-2细胞即可形成与小肠上皮细胞相同的细胞极性和致密的单细胞层组织,其形态和

功能上与人体的小肠上皮细胞相似^[13]。杨秀伟建立了Caco-2细胞模型和标准操作规程^[14],在中药成分的转运机制探讨方面,杨秀伟课题组对中药生物碱类化合物^[15-18],香豆素类化合物^[19],萜类化合物^[20],三萜类化合物^[21],和其他物质^[22-23]的转运机制做了系统探讨。尽管Caco-2细胞单层模型在药物肠吸收和转运研究上有诸多优点,但亦存在某些缺陷。已知P-糖蛋白(P-gp)在药物外流上起重要作用。由于Caco-2细胞来源于人结肠腺癌细胞,与正常结肠细胞相比,具有过量表达P-gp的特性,因此,所得到的药物外流性研究结果可能低于实际吸收水平。由于这个缺陷,为了更好地在体外模拟体内生理环境,预测体内肠道药物转运和代谢行为,今后应着重应用细胞培养技术、分子克隆技术和生化诱导技术对Caco-2细胞模型进行优化,改善Caco-2细胞模型的性质,使之更接近人肠药物吸收的实际情况^[14]。

3.3 血清药物化学 血清药物化学主要是研究血清中的化学物质,观测血清中外源性活性物质及其作用和代谢规律,是近年来迅速发展起来的研究中药药效物质基础较为科学的一种方法。血清药物化学在中药复方物质基础方面的研究,已有学者对复方五仁醇胶囊^[24],醒脑滴丸^[25],等中药复方展开过研究。近年来,有更多的人将血清药物化学的方法应用于阐明中药的药效物质基础。中药指纹图谱现已成为中药物质基础研究的一种新模式和研究体系,如果利用指纹图谱的建立与血清药物化学相结合,就能更加清楚地阐述中药的药效物质基础。然而,该法在实际运用中也可能遇到问题。首先,在血清中检测到的“成分”未必就是有效物质或者有效成分代谢产物;其次,某些吸收入血检测到的成分,经过富集和提纯后,未必能发挥出药物初提物的药效,这给有效成分的确定带来困难;此外,不同种属、年龄的动物对药物吸收的差异,不同给药剂量、采血时间造成的血药成分、浓度的差异,加上血清内源性成分的干扰,使血清有效成分的分离鉴定产生了相当大的困难。因此,尽管中药血清药理学和血清药物化学虽是一种很有发展前途的方法,但许多问题尚待今后更加深入的探讨。

在传统的中药活性物质筛选方法遇到瓶颈时,基于体内过程的中药有效成分研究给我们开辟出了另外一个思路。然而有些指标成分在药材中含量较高,但由于生物利用度低、代谢消除迅速等原因难以在体内达到有效浓度。相应的,有些中药的有效成分原型药物没有药理作用或者药理作用不强,但在生物体内被肠道菌群转化或者被肝药酶代谢转化成活性代谢产物而发挥药效作用。同时,有效成分可能刺激机体发生作用形成的新成分。这些都为有效成分的辨识增加了难度。

4 展望

一药多效是中药普遍具有的特点,为此,必须在明确的适应症的基础上,进行有效成分辨识,较笼统进行有效成分辨识更具有实际意义。多成分综合作用是中药发挥效果的基本模式,因此,进行有效成分辨识时,在多成分综合作用中

辨识出主要的有效成分,是符合中药特点的有效成分辨识方法,我们在川芎挥发油舒张血管有效成分的辨识中,采用数据挖掘与实验研究相结合的方法,成功辨识出 13 种具有血管活性的有效成分^[26],探索了有效成分辨识的新方法。此外,结合体内过程,亦可以有效缩小辨识范围,不失为一条有效的研究路径。

[参考文献]

[1] 陈向荣,陆京伯,石汉平. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国医院药学杂志,2001,21(1):44.

[2] 叶海,张灿,沈文斌,等. 灯盏乙素聚乙二醇前药的合成与表征[J]. 中国天然药物,2006,4(4):283.

[3] 周永学. 芒硝的临床运用与药理研究[J]. 陕西中医学院学报,2007,30(1):54.

[4] Dreessen M, Eyssen H, Lemli J. The metabolism of sennosides A and B by the intestinal microflora: *in vitro* and *in vivo* studies on the rat and the mouse [J]. J Pharm Pharmacol,1981,33(10):679.

[5] 许妍妍. 基于配伍理论的痹祺胶囊药代动力学研究[D]. 天津:天津大学,2010.

[6] 戚建平,平其能,李江然,等. 舒胸片中各活性成分药动学的相互作用以及川芎挥发油的促吸收作用[C]. 南京:江苏省药学会第七届药师周大会、第十一届华东地区药剂学术会议,2006.

[7] 郭立玮. 中药药物动力学方法与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:295.

[8] 王喜军,张宁,孙晖,等. 六味地黄丸的血清药物化学研究[J]. 中国天然药物,2004,2(4):219.

[9] 孙晖,张宁,李丽静,等. 六味地黄丸主要血中移行成分对培养大鼠成骨细胞促增殖作用的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(17):2161.

[10] H van de, H Len, P Art. 药物生物利用度[M]. 何仲贵,钟大放,等,译. 北京:化学工业出版社,2006:8.

[11] Wilson T H, Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface [J]. Physiol, 1954,123(1):116.

[12] 冯亮,蒋学华,周静,等. 三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_g 的大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国药理学杂志,2006,41(14):1097.

[13] 孙海燕,廖晓慧,彭光华. Caco-2 细胞模型及其在食品

营养物质吸收研究中的新进展[J]. 时珍国医国药,2007,18(10):2573.

[14] 杨秀伟,杨晓达,王莹,等. 中药化学成分肠吸收研究中 Caco-2 细胞模型和标准操作规程的建立[J]. 中西医结合学报,2007,5(6):634.

[15] 马莲,王莹,杨秀伟. 利用 Caco-2 细胞模型研究白鲜碱和茵芋碱在人小肠的吸收[J]. 中国新药杂志,2007,18(2):124.

[16] 马莲,杨秀伟. 盐酸黄连碱和小檗红碱在人源 Caco-2 细胞单层模型中的吸收研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(23):2523.

[17] 马莲,杨秀伟. 利用人源 Caco-2 细胞单层模型研究粟碱、N-甲基四氢粟碱和头花千金藤碱在人肠道的吸收[J]. 药学学报,2008,43(2):202.

[18] 马莲,杨秀伟. 利用 Caco-2 细胞单层模型预测柯楠碱、育亨宾、阿马碱、萝芙木碱的人肠吸收[J]. 中国中药杂志,2008,33(20):2373.

[19] 杨秀伟,郭庆梅,王莹. 独活中 6 种香豆素类成分在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收转运研究[J]. 中西医结合学报,2008,6(4):392.

[20] 王莹,杨秀伟. 游离蒽醌在人肠 Caco-2 细胞模型的转运[J]. 中国天然药物,2008,6(2):141.

[21] 郑艳,杨秀伟. 茯苓三萜类化合物在人源 Caco-2 细胞单层模型中的吸收研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(13):1596.

[22] 田莉,杨秀伟,王莹,等. 顺式-和反式-阿霍烯在 Caco-2 细胞模型中的体外摄取、转运和外排特性[J]. 药学学报,2007,42(1):87.

[23] 郑艳,杨秀伟. 茯苓酸在人源肠 Caco-2 细胞单层模型的吸收和转运 [J]. 中西医结合学报,2008,6(7):704.

[24] 窦志华,丁安伟,王陆军,等. 复方五仁醇胶簇血清药化学研究[J]. 中草药,2006,37(8):1137.

[25] 阳长明,陈玉平,李霄,等. 醒脑滴丸中右旋龙脑含量测定及其体内分析方法研究[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(7):489.

[26] 陈畅. 基于数据挖掘的川芎挥发油有效成分辨识研究[D]. 成都:西南交通大学,2010.

[责任编辑 何伟]