

· 中药现代化论坛 ·

中药成分组合效应假说及实验研究

朱心红, 沈 群, 高天明*

(第一军医大学 生理学教研室, 广东 广州 510515)

摘 要: 提出“中药成分组合效应”假说, 即: 不管是单味中药还是中药复方, 针对其主治证, 均有与之对应的功效, 其药效物质基础则是其中所含部分有效成分的最佳比例组合; 并在脑缺血动物模型上进行初步验证。在毓神口服液的制剂工艺实验过程中用高效液相色谱与药理学实验相结合的方法, 选择毓神口服液对脑缺血大鼠海马 CA1 区的神经保护作用作为药效学评价指标, 考察各样品的色谱图与药效学结果的相互关系, 寻找能够体现药效的色谱峰。R1, R2, R3 分别是与毓神口服液神经保护作用的药效密切相关的 3 个峰, 这 3 个峰的相对比例而不是其绝对量对毓神口服液产生神经保护作用是非常关键的。该研究结果支持“中药成分组合效应”假说。

关键词: 脑缺血; 高效液相色谱; 毓神口服液

中图分类号: R28

文献标识码: A

文章编号: 0253 2670(2004)02 0122 03

Verification on hypothesis for optimum ratio in various active constituents of Chinese materia medica with desired effects

ZHU Xin-hong, SHEN Qun, GAO Tian-ming

(Department of Physiology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: To propose the hypothesis of the requirement for optimum ratio of various active constituents of Chinese materia medica with desired effects, which suggests that both single drug and compound drug prescriptions have their own target effects corresponding to their main indications and their active constituents must be in optimum ratio. This hypothesis was initially tested in an ischemic animal model. The neuroprotection of Yushen Oral Liqueur (YSOL, an oral liqueur made of Chinese materia medica) on neuronal injury in CA1 region of rat hippocampus following transient forebrain ischemia was used as an index to evaluate the drug's effect. By combination of HPLC and pharmacological method, the relationship of HPLC and pharmacodynamical results of each sample made of YSOL was studied to observe the chromatogram peaks representing the drug's neuroprotective effects. There are three peaks named as R1, R2, and R3 for YSOL, which closely correlate to the drug's neuronal protective effects and the relative weight but not the absolute quantity of those peaks plays a critical role in producing neuronal protective effects of YSOL on ischemia-induced neuronal damage. The results provide experimental data supporting our proposed hypothesis.

Key words: cerebral ischemia; HPLC; Yushen Oral Liqueur (YSOL)

中药方剂(尤其是经典名方)集几千年临床经验, 可谓疗效确实, 然其药效物质基础是什么? 至今不得而知。探求复方药效物质基础是中医药现代化发展的必然要求, 已经引起中医药界乃至整个药学界的广泛关注。但目前中药复方物质基础研究还过多地集中在寻找与单一药效作用相关的单体成分或所谓的“有效成分”上, 对复方多成分共存状态下的

化学-药效相关性的系统研究并未得到足够的重视, 中药质量标准的控制上也多采用测定其中某一单一成分。鉴于此, 我们提出了中药成分组合效应假说并进行了初步的实验论证。

1 假说的提出

一个中药复方的物质基础可以划分为逐步升高的以下几个层次: 有效药材—有效浸出物—有效部

* 收稿日期: 2003-05-22

基金项目: 国家杰出青年基金(30125013); 军队杰出青年基金(01J009); 教育部“长江学者”奖励计划

作者简介: 朱心红(1968-), 男, 河南上蔡人, 第一军医大学生理学教研室讲师, 博士, 主要从事缺血性脑损伤的修复及机制研究。

* 通讯作者 Tel: (020)61648216 Fax: (020)61648216 E-mail: tgao@fimmu.com

位(群)一有效成分。有效药材是指符合传统中医用药习惯的道地药材。低层次物质基础往往包含多个高层次物质基础,反过来,高层次物质基础总也不能代表低层次物质基础。如水浸出物中有多个有效部位(群),但任何一个有效部位均不能代表水浸出物,更不能代表药材或复方。不管如何,这几个层次的层层推进研究都有助于我们发现有效的化学成分,如青蒿素、黄连素等,但中药及方剂的内涵远不止于此。

治疗疾病的物质基础是组成方剂的所有化学成分的总和,药效物质基础则是指方剂中针对药效的化学成分的最佳比例组合,这是两个不同概念。物质基础是个统称,药效物质基础则是特指,是物质基础中的一部分,且成分之间针对具体的药效有最佳的比例组合。以药材丹参为例:其物质基础包括水溶性丹酚酸类成分、脂溶性丹参酮类成分以及其他化学成分,而实际上,用以治疗心血管疾病时,其药效物质基础是丹酚酸类成分,且丹酚酸B、迷迭香酸、儿茶醛等均有一定的比例组成^[1]。鉴于此,我们提出“中药成分组合效应”假说,即不管是单味中药还是中药复方,针对其主治证,均有与之对应的功效,其药效物质基础则是其中所含部分有效成分的最佳比例组合。这里要明确以下几点。

1.1 有效成分的界定:中药及复方中的化学成分有成百上千种,是所有效应的基本物质基础,但是否为有效成分得看是否针对具体的药效,而不可笼统的称之为有效成分,这在选择质量控制指标方面相当重要。仍以丹参为例,用以治疗心血管疾病时,考虑到丹酚酸B的药理作用与丹参的作用几乎相当,因此,应以丹酚酸为质量控制指标,此时丹酚酸即为丹参治疗心血管疾病的主要有效成分,而丹参酮II_A等则可能不是活血化淤的有效成分,但属于抗菌消炎之有效成分,如果开发丹参为治疗痤疮类的药物,则丹参酮类成分为其有效成分^[1]。此外,还有一种假设情况,若丹参酮II_A可以增强丹酚酸的活血化淤作用,我们可以称丹参酮II_A为丹参中活血化淤的有效成分。因此有效成分的界定,关键是看对疾病是否起到了治疗作用,而不管是直接的还是间接的作用。

1.2 有效成分与质量控制指标的关系:对于中药而言,选择单个有效成分作为质量控制指标是显然不够的,因为中药的药效物质基础首先是针对具体效应的有效成分的组合,而这些有效成分单独存在或比例不恰当时则可能是无效的。我们的研究证明了这一点。另外,还有一个反证例子:水杨梅(茜草科)

治疗菌痢很有效,虽然已从中分离出多种化合物,但仍未找到水杨梅的有效化学成分。实验发现分离提纯的化合物纯度越高,药理活性越差^[2]。这其实反过来可能恰好说明了水杨梅治疗菌痢是多个有效化学成分的组合疗效,而非某一化学成分的效应。因此中药复方的质量控制必须从有效成分的最佳组合比例上去控制,而不能控制单一的有效成分含量。

1.3 有效成分组合包括质的组合和量的组合两种:单纯的质的组合即是成分的堆砌,不是有机的组合,仍然起不到应有的疗效。成分的组合则非常复杂,方药配伍组方能引起成分组合质与量的变化,制药工艺的不同也能引起成分组合比例的变化,而成分组合比例的变化可以导致药效的显著变化,只有成分组合达到最佳比例才能有合适的药效。中药成分组合效应假说,在强调有效成分质的组合的基础上,更强调量的有机组合,从而有可能更为深刻地揭示中药复方的药效物质基础。

我们在做毓神口服液的工艺过程中,采用了高效液相色谱分析与药理学实验相结合的方法,结果发现,至少有3个色谱峰与毓神口服液的神经保护作用药效密切相关,且只有当这3个峰处于一个合适的关系时才体现最佳药效;也即是说明了这3个色谱峰所代表的物质及其合适的比例与毓神口服液的神经保护作用药效密切相关。这一结果初步验证了以上假说。

2 实验验证

毓神口服液是治疗中风的经验方,组成为防风、黄芩、生姜、白芍、川芎等。我们以前的研究显示该方具有良好的神经保护作用^[3]。本研究选用不同的工艺条件制备了毓神口服液的不同制剂,分别记为样品1~6。然后,在大鼠前脑缺血-再灌注模型上观察了各个样品对前脑缺血-再灌注7d后海马CA1区神经元的保护作用。

2.1 各样品指纹图谱分析

2.1.1 材料与方法:安捷伦1100HPLC,DAD紫外检测器(美国)。甲醇(色谱纯,Merck公司),水(双蒸水)。色谱条件:Kromasil 100-5C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm),柱温20℃,流速0.5 mL/min,波长254 nm,进样量10 μL,梯度洗脱程序见表1。

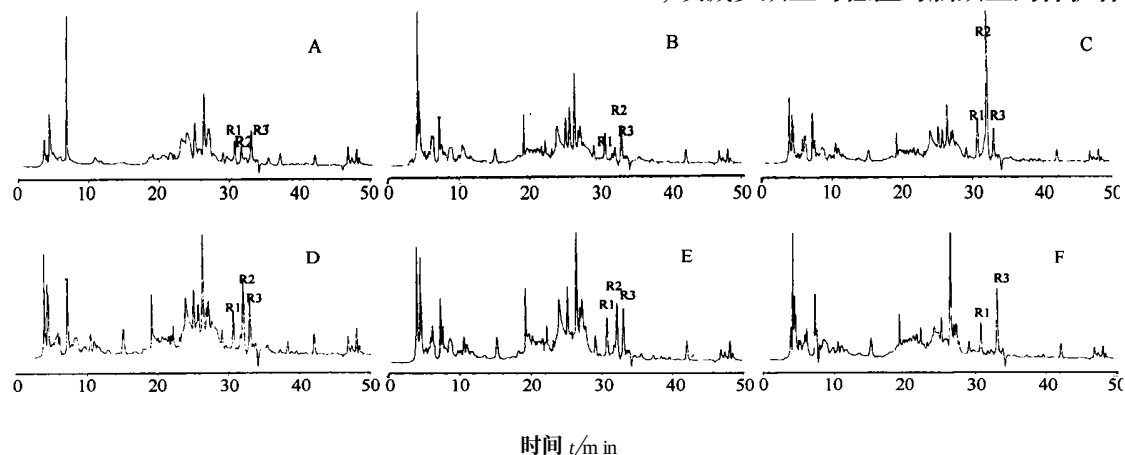
2.1.2 样品溶液制备:选用不同的工艺条件制备毓神口服液的不同制剂,制成每毫升含原药材1g的样品溶液,记为样品1~6,分别用0.45 μm微孔滤膜滤过后进样分析。

2.1.3 结果:样品1~6的色谱指纹图谱见图1。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Procedures of gradient elution

时间/m in	甲醇/%	水/%
0	15	85
10	15	85
15	45	55
40	70	30
41	100	0
60	100	0



A~F: 样品1~6

A-F: samples 1-6

R1, R2, R3 分别指与毓神口服液药效密切相关的3个峰

R1, R2, and R3 refer to three chromatogram peaks which closely correlate to drugs in YSOL

图1 各样品的高效液相色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of each sample of YSOL

2.2.2 实验分组: 生理盐水组、样品1组、样品2组、样品3组、样品4组、样品5组、样品6组($n=6$); 各实验组均于缺血前3 d ig 给予生理盐水或药物4 mL (相当于生药4 g)/次, 3次/日。

2.2.3 组织病理学观察: 取大鼠, 用缓冲福尔马林灌注液(0.1 M PB, 4% HCHO 的混合液, pH 7.2), 经主动脉灌注固定后取脑, 制作脑部冠状石蜡切片(6 μ m), 尼氏染色, 光镜下观察海马CA1区组织病理学变化, 并计存活锥体细胞密度。

2.2.4 数据统计: 检验方差齐性后, One-way ANOVA 检验。

2.2.5 实验结果: 各组对前脑缺血-再灌注海马CA1区神经元的保护作用见图2。

2.3 讨论: Pulisinelli 建立的大鼠短暂性前脑缺血模型是目前国际上研究缺血性脑损伤后继发性神经元死亡普遍采用的模型之一。短暂性前脑缺血后, 实验动物海马的CA1区锥体细胞发生迟发性神经元死亡(delayed neuronal death, DND), 即脑缺血再灌注2~3 d后, 光镜下才见到CA1区锥体细胞的死亡, 而同一区的中间神经元及CA3区的锥体细胞

2.2 药效学实验

2.2.1 模型的制备: 参照改良的 Pulsinelli 四血管闭塞法制作前脑缺血模型^[4]。成年Wistar大鼠(200 $\pm$ 20) g, 禁食过夜以恒定血糖水平, 缺血前一天烧灼阻断双侧椎动脉, 第2天夹闭双侧颈总动脉15 min后松开, 恢复脑供血, 再灌注7 d后处死动物进行组织病理学观察。缺血期间控制体温和脑温于37 $^{\circ}$ C, 以减少缺血时低温对脑缺血的保护作用。

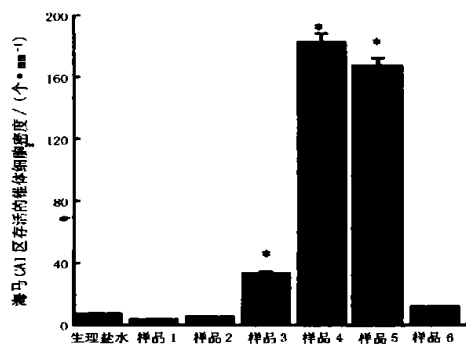
与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs NS group

图2 毓神口服液各样品对前脑缺血后大鼠海马CA1区神经元的保护作用

Fig. 2 Neuroprotective effects of various samples of YSOL on CA1 neuronal injury in rat hippocampus after transient forebrain ischemia

则几乎不受损害。该模型已被广泛用于评价药物的神经保护作用。

由药效学实验结果可以发现, 若以存活锥体细胞密度50个/mm²为是否有效的区分值, 样品4和

(下转附1页)

本身具有丝裂原样作用;红景天苷在体外亦可增强有丝分裂原刺激小鼠脾淋巴细胞的增殖反应,而苷元酪醇对此无影响。

3 展望

我国红景天属药用植物多,研究者们对其种类和分布进行了广泛的实地调查,初步整理鉴定出了22个品种。药源丰富且现已掌握了人工栽培红景天技术。目前国内对红景天的化学成分、药理和临床的研究都较深入。况且红景天应用范围广泛,疗效显著,不良反应少,价格便宜,需求量大。我国已有红景天保健茶、口服液、饮料等进入市场,红景天植物将作为新药品与食品资源开发利用。随着研究的不断深入,红景天的应用对医药学和运动医学将有潜在的重大意义。国内红景天的研究较多,但不如人参、刺五加等研究的深入广泛,研究仅限于少数几种红景天植物。对成分的研究亦较局限,作为应用开发,应从保健、预防和治疗三方面深入研究。

References

- [1] Li J X, Liu J T, Jin Y R, et al. Studies on chemical constituents from stem and leaf of *Sachalin Rhodiola* (*Rhodiola sachalinensis*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(10): 659-661.
- [2] Yang Z Y, Liu Q, Zhang C S, et al. Studies on the chemical constituents of *Rhodiola* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(8): 441-442.
- [3] Bao W F, Wu W C, Zhang W. A study on the water-soluble constituents from the rhizoma of the *Rhodiola rosea* L. grown in China [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2000, 10(3): 209-210.
- [4] Fan W, Tezuka Y, Ni K M, et al. Prolyl endopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sachalinensis* [J]. *Chen Pharm Bull*, 2001, 49(4): 396-401.
- [5] Hao L M, Jiang W H, Meng X T, et al. The effects of salidroside on the somatotropin of the old rats' pituitary [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2000, 20(4): 230-231.
- [6] Li Y, Cui L, Pan L, et al. Experimental study of antiaging effects of rhodoin on myocardium in rats [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2001, 21(1): 55-57.
- [7] Guan G M, Wang Y P, Dong Z, et al. Effects of rhodoin on expression of fibroblast growth factor on olfactory bulb in senile rats and its significance [J]. *Chin J Otorhinolaryngol* (中华耳鼻咽喉科杂志), 1999, 34(4): 227-228.
- [8] Ma Y, Zhang X Z, Chen X S, et al. Effect of *Rhodiola* and acetazolamide in improving hypoxia in high altitude [J]. *Chin Ment Health J* (中国心理卫生杂志), 2001, 15(2): 117-118.
- [9] Chi A Q, Zhang X S, Lu X M. Effect of Sanpu Hongjingtian (*Rhodiola* sp.) Capsule on erythrocyte deformability and oxygen free radical in patients with high altitude polycythemia [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(6): 442-444.
- [10] Darbinyan V, Kteyan A, Panossian A, et al. *Rhodiola rosea* in stress induced fatigue—a double blind cross-over study of a standardized extract SHR-5 with a repeated low-dose regimen on the mental performance of healthy physicians during night duty [J]. *Phytomedicine*, 2000, 7(5): 365-371.
- [11] Zhang Z H, Liu J X, Shang X H, et al. The effect of *Rhodiola* Capsules on oxygen consumption of myocardium and coronary artery blood flow in dogs, [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23(2): 104-106.
- [12] Maimeskulova L A, Maslov N N. Antiarrhythmic effect of phytoadaptogens [J]. *Eksp Klin Farmakol*, 2000, 63(4): 29-31.
- [13] Zhuang J Q, Shi J R, Zeng Z L, et al. Studies of effects of *Rhodiola sachalinensis* complex prescription on exercise capacity and red cell immune function in rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1998, 4(4): 9-12.
- [14] Shi J R, Zhuang J Q, Guo R X, et al. The regulation of *Rhodiola crenulata* compound on immune function of rats trained by heavy exercise [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1999, 15(4): 171-173.
- [15] Seo W G, Pae H O, Oh G S, et al. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 76(1): 119-123.
- [16] Pae H O, Seo W G, Oh G S, et al. *Rhodiola sachalinensis* induces the expression of inducible nitric oxide synthase gene by murine fetal hepatocytes (BNL CL. 2) [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2001, 23(1): 25-33.
- [17] Xu K J, Zhang S F, Lu G Z, et al. Protective therapy of acute lung injury during cardiopulmonary bypass in patients with congenital heart disease associated with pulmonary hypertension [J]. *Med J Natl Defending Forces Northwest Chin* (西北国防医学杂志), 1999, 20(3): 172-174.
- [18] Li Y X, Piao H, Li H H, et al. Effect of extract from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor on splenic lymphocyte transformation in mice [J]. *J Med Sci Yanbian Univ* (延边大学医学学报), 1998, 21(2): 96-98.

(上接第124页)

样品5的疗效与其他几个样品的疗效有明显的差异,可以认为其他几个样品几乎没有疗效,结合高效液相色谱图谱可以发现,色谱图中R₁, R₂, R₃的适当比例与疗效存在极大的相关性,其中R₂峰的存在对药效有显著影响,没有R₂峰不体现药效;但R₂峰并非越大越好,只有在R₁, R₂, R₃有适当的比例的时候,才能体现最好的药效,所以我们可以认定R₂峰是有效成分,但若选择以R₂峰所代表的物质作为该方的质量控制指标,又明显是不合适的,因此该方的质量控制必须选择至少含R₂峰所代表的物质的几个成分的比例组合作为质量控制指标才有实际意义。

3 结语

就毓神口服液在大鼠前脑缺血-再灌注模型上

产生的神经保护作用来说,其作用效应应该是以含有R₂峰所代表物质的多成分组合效应,而并非某一单一成分的效应,因而该研究从实验的角度初步验证了中药成分组合效应假说。

References

- [1] Wang Z M. Some opinions about the apply of TCM fingerprint [J]. *China J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2001, 8(9): 21-24.
- [2] Cao Z Q. New thinking about study of pharmacodynamic material basis and functional mechanism in Chinese materia medica [J]. *Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai* (上海中医药大学学报), 2000, 14(1): 36-40.
- [3] Hao J H, Zhu X H, Gao T M. Protective effects of Yushenkoufuye (YSKFY) on pyramidal cells in CA1 region of the hippocampus after reperfusion following ischemia in rats [J]. *Trace Elements Sci* (广东微量元素科学), 2002, 9(5): 53-55.
- [4] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267.