

## · 中药现代化论坛 ·

## 基于复杂体系原理的中药复方药效物质“组合筛选”思路与方法

郭立玮, 朱华旭, 潘林梅\*

(南京中医药大学 中药复方分离工程重点实验室, 江苏 南京 210029)

**摘要:**依据“中医药研究所面临的是一个复杂巨系统”与“中药复方是天然组合化学库”两种学说,指出中药药效物质化学组成多元化,而又具有多靶点作用机制,是一个具有大量非线性、多变量、变量相关数据特征的复杂体系。提出中药复方药效物质“组合筛选”研究的新思路与新方法:把组合化学“以分子最大的多样性模拟生物多样性”原理及数据挖掘技术引入到中药复方复杂体系研究领域。以中药复方组方药味的重组组合分组及多种分离技术代替组合化学合成路线,以多种工业化分离技术的产物为“基本构造单元”,创造“化学多样性”的中药复方药效物质组合库,并通过数据挖掘和知识发现,寻找中药复方“多成分、多靶点”的化学组成与作用机制的内在关联;探索针对中药药效物质复杂体系的“高通量药物筛选”新技术,为建立“最优分离”概念,以及开展相关精制技术应用系统优化设计提供依据。

**关键词:**中药复方;药效物质;复杂体系;组合;筛选

**中图分类号:**R28;284

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2009)04-0505-04

### Thinking and method of “Combinatorial Screening” based on complex systems principle for active components of Chinese materia medica compound

GUO Li-wei, ZHU Hua-xu, PAN Lin-mei

(Key Laboratory of Separation Engineering of Chinese Materia Medica Compound, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** According to two theories, which are “traditional Chinese medicine researching is in the face of a complex opening gigantic system” and “Chinese materia medica compound (CMMC) is the natural combinatorial chemical libraries”, the study on active fractions of CMMC has been facing to a complex system with a large number of data that is non-linear, multi-variable, and varieties related to each other. The thinking and method of “combinatorial screening” has been put forward based on these two theories, that is the principle “using the diverse structures of molecules to simulate the diverse organism” used in combinatorial chemistry and the data mining technique was taken into the study on complex system of CMMC. In order to create combinatorial libraries, the two methods were used to obtain the fractions of CMMC. Re-combination group of the CMMC was used, and various industrial separation techniques, such as resin, membrane, were used to replace the diversity of chemosynthesis routes to create “Building Block”. Through data mining and knowledge discovery, the intrinsic correlation of CMMC “multi-components and multi-targets” between the chemical composition and the mechanism was carried out. The new technologies which aim at high-throughput screening of CMMC were explored, in order to provide the evidence for setting up an idea with “optimal separation” and optimization design about application system of refining technology.

**Key words:** Chinese materia medica compound (CMMC); active components; complex system; combination; screening

中药复方物质基础研究是目前中药研究的难点 和热点之一,有关的研究理论、研究思路和研究方法

\* 收稿日期:2008-07-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572374,30873450);江苏省教育厅自然科学基金项目(07KJB360087);江苏省中医药管理局科技项目(H05164);江苏省中医药管理局科技项目(HL07088);江苏省教育厅“青蓝工程”资助

作者简介:郭立玮(1948—),男,福建上杭人,教授,博士生导师,主要研究方向为中药制备高新技术、中药生物药剂学。

Tel:(025)86798066 E-mail:guoliwei815@yahoo.com.cn

已有较多的报道<sup>[1,2]</sup>。本文提出的“组合筛选研究”是借鉴组合化学(combinatorial chemistry)理论及相关研究方法。现阶段以国内外报道对老年痴呆症具有确切疗效的黄连解毒汤<sup>[3~6]</sup>等为研究体系,应用目前已用于工业生产的多种现代分离技术及其集成,通过客观反映复方临床药效的微量生物活性筛选模型和多变量数据挖掘系统的实验研究,建立构效关系数据库<sup>[7,8]</sup>,在中医药理论指导下,从分子水平阐明中药复方治疗作用的物质基础和作用机制,寻找中药复方物质基础研究的新思路、新方法,为建立具有工业化开发前景的中药复方药效物质分离理论与技术体系进行探索。

## 1 中药复方药效物质体系的基本特征与组合化学

1.1 中药复方药效物质是复杂体系的组合:中药(含复方,下同)由植物、动物和矿物等构成,其药效物质的获取,不可避免的需要“去伪存真,去粗取精”,因而“分离”是中医药领域的共性关键技术<sup>[9]</sup>。

中医治疗的一个重要特点是将各单味药组成复方使用,这一特征既体现了中医辨证论治,依时、依地、依人而定的个体化给药方案特色,又反映了其药效物质基础的复杂性及其作用机制的综合性。中药药效物质整体性是目前研究中药分离问题时必须时时记住的一条原则。依据现代天然产物化学的研究,哪怕是一个仅由四五味中药组成的复方也可能含有 300~500 种化学成分。如何从中筛选出有效成分,又如何将它们进行有效分离,其被分离产物能否代表中药的功效,能否在中医理论指导下,在临床取得原有汤剂应有的疗效并有所提高,这实质上就是中药分离所面临的科学问题<sup>[10]</sup>。迄今为止,回答这一问题较好的学说是中国科学院院士周俊教授提出的“天然组合化学库”与“多靶作用机制”<sup>[11]</sup>。鉴于中药药效物质的复杂性与不确定性(至少就目前而言,由药理模型来筛选可代表中药复方整体作用的化学成分几乎是不可能的),为从中药及其复方中获取尽可能完整的“天然组合化学库”,科学的中药分离目标应是具有各种活性成分的化学组合体。

与化学药物不同,中药中的药效物质是以十分复杂的形态存在及变化着的,尤其是在复方中。尽管这些药效物质的某些存在形态可用化学、药理学或生物药剂学的实验数据加以表征,还可以血清药理学的手段加以确认,但物理化学及数学的因素对其存在形态的影响(如成分间相对数量的变化可使其功用主治改变),以及在不同生物学环境下它们的表现(如一些中药及复方的双向调节作用),却难以

阐释清楚。

因此,尽管多年来国内外学者们一直致力于阐明中药复方的作用机制和物质基础,但由于中药复方的博大精深和复杂性,迄今仍难以为其疗效提供科学依据。其关键问题之一,正如王永炎院士指出:“中医药研究所面临的是一个复杂巨系统,其主要特征是表征被研究对象的各个指标不是成比例的变化,各指标之间呈非线性关系,不遵循线性系统的运动规律叠加原理,即如果把整个系统分解成数个较小的系统,并获取各子系统的运动规律,则这些子系统运动规律的叠加不是整个系统的运动规律”。

中药药效物质化学组成多元化,而又具有多靶点作用机制,是一个具有大量非线性、多变量、变量相关数据特征的复杂体系,如何将其化学组成与活性作用耦合,以阐明中药复方的作用机制和物质基础,从而建立具有产业化前景的“中药复方药效物质分离与生物活性评价技术体系”。中医药体系的上述本质特征与由此而产生的技术特点与难点,决定了中药药效物质研究必须引进独特的思维模式及以数据挖掘技术为代表的现代医药信息科学技术。

1.2 组合化学及其基本思想:组合化学为现代科技领域的重大成果之一<sup>[12]</sup>,是根据组合论的思想,将各种化学构建单元——构件(building block),以系统平行的方式进行反应,可在极短的时间内迅速获得大量的化合物。在技术上,组合化学将有限的几种化学试剂以不同的组合方式,通过多样性的化学合成路线进行有机合成反应,以获得尽可能多的产物。该法的高效率是单种产物的合成方法无法比拟的,它的特色就在于“组合”,故称“组合合成方法”<sup>[13]</sup>。

组合化学研究的基本思想是合成分子多样性化学库。每一个化学库都具有分子的复杂性和多样性。复杂性代表了所有可变的位置;多样性则反映了给定化学库内分子生物化学性质和化学结构上非类似性,分子间没有简单的定量关系<sup>[2]</sup>。组合库设计的目的之一正是以分子最大的多样性模拟生物多样性,因此组合化学也是代表 21 世纪发展趋势的仿生化学的研究范畴之一。

组合化学研究可分为 3 个基本阶段<sup>[14,15]</sup>:(1)分子多样性化学库的合成,包括设计模板分子、研究和优化组合合成方法、选择构建单元等。(2)群集筛选。设定液相或固相筛选方法,即合成产物是挂在树脂上还是切落于溶液中进行筛选;选择筛选模型,包括细胞功能性筛选,受体、抗体、基因表达蛋白筛选等。(3)化学库解析、译码,即确认活性分子结构,

有 Houghten 的逐位和二元定位理论、亲合选择法、检索库法、编码化学库等。

目前几乎国际上所有大型制药公司都在采用组合化学技术与高通量筛选相结合的方法进行新药研发<sup>[16]</sup>。与此同时,组合化学从制药领域向其他化学领域渗透,已在新材料开发、催化剂制备、沸石分子筛研究和电化学等领域取得重大进展,把组合化学带入一个新的增长空间<sup>[12]</sup>。

1.3 组合化学思路引入中医药研究领域的主要问题:近年来,中药复方组合化学研究虽有相关文章发表,但具体的实验研究报道仅见杨奎等<sup>[17]</sup>采用二元索引库筛选进行川芎、天麻提取物的复方组合化学研究。该研究对中药复方组合化学研究的方法学进行了有益的探索,但其组合库组成不到 10 个构件,与具有多样性意义的组合化学原理相差甚远。目前,将组合化学理论与技术引入中医药研究领域的主要问题是:(1)寻找“组合化学”理论与中医药体系的结合点困难,“建库”思路与方法学上没有突破。(2)常用植物化学分离技术难以表述中药药效物质的多元性及复杂性,且缺乏产业化前景。(3)缺乏简便、快速的药物筛选手段,难以开展高通量筛选。(4)中药体系实验数据的多变量、非线性、噪声大等特点,对数学建模带来极大困难。

## 2 获取中药药效物质基础的新思维

为构造可体现中医药“整体观念”的中药制剂学理论与技术体系,本实验室近年将“非线性复杂适应系统科学原理及研究思维”与“组合化学”原理相耦合,逐步形成了研究中药药效物质基础的“新思维”:以中药复方组方药味的重组组合分组及多种分离技术代替组合化学合成路线,以多种工业化分离技术的产物为“基本构造单元”,创造“化学多样性”的中药复方药效物质组合库,并通过数据挖掘和知识发现,寻找中药复方“多成分、多靶点”的化学组成与作用机制<sup>[18]</sup>的内在关联,探索针对中药药效物质复杂体系的“高通量药物筛选”新技术,为建立“最优分离”概念,开展相关精制技术应用系统优化设计提供依据。根据这一思维,本实验室在大量文献研究及有关前期工作的基础上,提出了以下中药复方药效物质“组合筛选”的研究思路。

2.1 中药复方是根据中医理论以及单味药功能主治性味,通过人工组合形成的具有疗效的相对安全的天然组合化学库。千百年来以水煎煮为主的中医服药方式体现了中药水提取液的安全性及有效性,也提示中药水提取液体系中存在天然、合理的药效

物质,其中包括最优的化学成分种类与数量的组合比例关系。这种关系既可通过处方“君、臣、佐、使”的配伍原理而实现的治疗效果得到体现,也可通过其化学组成及药理作用的多元化加以表征。

2.2 各种现代分离技术因为其自身的原理与中医药体系不能完全兼容,致使分离产物无法准确、完整体现中药药效物质基础。特别是从天然产物中分离出的化合物,母核结构和活性基团是长期临床和自然筛选的结果,其结构的多样性具有人工合成化合物所不能比拟的优势与复杂性。而通过多种分离技术的“集成”可实现药效成分的“集成”,从而实现分离产物的多元化。因而通过组方药味与分离方法的组合,可将中药复方分解为众多化学组成多元化、靶向作用多样性的“基本构造单元”,作为天然组合化学库的“构件”。

2.3 这些“构件”的化学组成及其与“药效作用”之间的复杂关系,从数学的角度看,可视为具有多变量、非线性、变量相关等特征的一组或数组数据集。通过客观反映复方临床药效的微量生物活性筛选模型对不同“构件”的“高通量筛选”反应,可建立相关构效关系数据库。在中医药理论指导下,开展多变量数据挖掘(data mining),进行知识发现(knowledge discovery in database, KDD)<sup>[20,21]</sup>的系统研究,耦合化学组成与活性作用,则可阐明中药复方的作用机理和物质基础,并可从众多的“构件”中筛选出合适的部分,作为该方二次开发的“模块”,开展新药的拟合优化研究。

## 3 主要研究方法

主要研究方法整合了“药理活性指导下的植化分离”、“拆方研究”、“血清药理学”、“现代色谱”、“计算机化学”等中药复方多学科研究的思路和先进技术。在组合化学理论的指导下,参照组合化学研究程序:组合库的建立、库的表征分析及筛选、库的解析“三步曲”开展研究。

3.1 组合库的建立——组合化学库“构件”的制备:采用组合数学方法对处方进行组合分组,并以多种具工业化前景的分离技术对复方进行“分解”,制备中药复方“组合化学库”的“构件”。

3.1.1 数学组合原理:由  $N$  种药味组成的复方可在君、臣、佐、使配伍理论的指导下进行配伍组合,其最大组合数值可达到  $C_N^k = N! / (N-k)! k!$ <sup>[22]</sup>。如由 4 味中药组成的复方可组合为 15 组,若每组分别采用膜分离技术(对水提液的不同相对分子质量部位进行分离,得到  $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $6 \times 10^3$ 、 $1 \times$

10<sup>3</sup> 等不同的相对分子质量部位);树脂吸附技术(以水、一定体积分数乙醇等洗脱)等,各分离技术再选择  $n_i$  个工艺条件,则共可获得  $15 \times (n_i + n_i + \dots)$  个样品,应该说这个数字是可观的。

3.1.2 工业化程度较高的多种高新分离技术:鉴于中药复方化学成分极其复杂,加之许多成分的量甚微,用常规的植物化学方法制备分离,不仅工作量巨大,而且其工业化过程难以表述。故选择膜分离、大孔吸附树脂等现有工业化程度较高的多种高新分离技术作为“构件”制备手段,既可体现分离产物的多元性,又便于将来成果的产业化操作。其中膜分离技术是对传统化学分离方法的一次革命,被国际上公认为是21世纪中期最有发展前途的一项重大生产技术<sup>[22]</sup>。吸附树脂技术在中草药有效成分的提取分离及成分测定方面已显示出其独特的作用<sup>[23]</sup>。

### 3.2 库的表征分析及筛选

3.2.1 组合化学库“构件”的主要化学组成研究:采用 TLC、HPLC 等方法,建立化学多元性的表征技术,对各“构件”开展主要化学组成研究。

3.2.2 以能反映中医主治病证的药理学高通量筛选方法的建立:以血清药理学、分子生物学等技术建立能反映该方主治病证的药理学检测方法,并对各“构件”进行生物活性筛选。如近期将以反映老年性痴呆主治病证的高通量筛选模型为目标,拟采用血清药理学和分子生物学的方法,选择可反映上述病理特征的若干细胞的体外培养实验作为药理活性导向的评价指标,对各“构件”进行活性检测。

3.3 用于组合化学库“构件”主要化学组成与生物活性的相关性研究的数据挖掘技术平台:将所得到的化学和药理学数据,综合运用统计多元分析、主成分分析、偏最小二乘及支持向量机(support vector machine, SVM)<sup>[24~26]</sup>等多种数据挖掘算法,取长补短,相互印证,优化建模,探讨构效关系规律,寻找各“构件”化学性质与生物活性的相关性。并在该关系模型的指导下:(1)根据应用体系的实际情况来选择、设计最优的分离工艺技术。(2)以经优选的“构件”为组方“元素”,进行组成和剂量的拟合优化研究,为高水准开发中药新药奠定基础。

## 4 展望

近年来,在国家自然科学基金、江苏省科技创新团队科研基金、江苏省教育厅、省中医药管理局科技基金等资助下,先后开展了:基于膜与树脂分离技术的黄连解毒汤“组合筛选”研究、药物组合与分离方式对黄连解毒汤药物动力学影响的探讨、治疗类风

湿关节炎中药复方——清络通痹汤的药效物质“组合筛选”研究等课题。根据本文提出的思路与方法所开展的部分实验研究论文将陆续发表。可以预见,由上述课题及其后续研究成果所创建与确立的“基于复杂体系原理的中药复方药效物质组合化学理论与技术体系”,必将丰富和完善中药复方药效物质和作用机制研究思路与方法,全面提升中药新药整体研究水平,有力地推进中医药现代化的进程。

### 参考文献:

- [1] 何祥久,邱峰,姚新生. 中药复方研究现状和思路[J]. 化学进展, 2001, 13(6): 481-484.
- [2] 刘刚,恽榴红,王建新. 组合化学分子库与新药研究[J]. 化学进展, 1997, 9(3): 223-228.
- [3] 高荣慧. 黄连解毒汤的临床应用[J]. 国外医学: 中医中药分册, 2002, 24(3): 148-151.
- [4] 吴彦,孙建宁,于绍坤. 黄连解毒汤有效部位对培养大鼠皮层神经元缺氧缺血损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(8): 936-939.
- [5] 徐静华,于庆海,渡边裕司. 黄连解毒汤对脑缺血动物的促智作用及机制探讨[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(12): 705-707.
- [6] 张芝平,韩鹏. 黄连解毒汤治疗脑病的药理与临床研究新进展[J]. 中华实用中西医杂志, 2003, 16(12): 1832-1834.
- [7] 梁逸曾,龚范,俞汝勤,等. 化学计量学用于中医药研究[J]. 化学进展, 1999, 11(2): 208-210.
- [8] 何敏,周家驹. 中药数据库的设计和建立[J]. 计算机与应用化学, 1999, 16(5): 363-365.
- [9] 郭立玮. 现代分离科学与中药分离问题——关于开展“中药分离原理与技术”系统研究的思考[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(4): 61-88.
- [10] 郭立玮. 中药膜分离领域的科学与技术问题[J]. 膜科学与技术, 2003, 23(4): 209-213.
- [11] 周俊. 中药复方-天然组合化学库与多靶作用机理[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, (2): 67-70.
- [12] 廖春阳. 组合化学: 新药创制的高效方法与技术[J]. 重庆大学学报, 2003, 26(4): 80-85.
- [13] 吴增茹,李有勇,徐筱杰. 组合库的筛选及在新药研究中的应用[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2000, 36(2): 275-285.
- [14] 周南. 组合化学概述[J]. 上海化工, 1999, (20): 4-7.
- [15] 杜冠华. 高通量药物筛选技术与新药开发策略[J]. 中国新药开发杂志, 2002, 11(1): 31-36.
- [16] 李松军,刘白玲,胡杰. 高通量筛选技术中数学模型的建立[J]. 中国科学院研究生院学报, 2004, 21(3): 333-339.
- [17] 杨奎,郭力,周明眉,等. 中药复方组合化学研究方法初探[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(3): 42-44.
- [18] 宁黎丽,毕开顺,王瑞,等. 吴茱萸药效物质基础研究的方法与研究[J]. 药理学报, 2000, 35(2): 131-134.
- [19] 郭立玮,樊文玲,董洁,等. 数据挖掘方法用于中药水提液膜过程优化的研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(3): 42-47.
- [20] 乔延江,李澎涛,苏钢强,等. 中药(复方)KDD研究开发的意义[J]. 北京中医药大学学报, 1998, 21(3): 15-18.
- [21] 《数学手册》编写组. 数学手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1979.
- [22] 曹光明. 中药工程学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001.
- [23] 冯孝庭. 吸附分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [24] Vapnik V N. Statistical Learning Theory [M]. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1998.
- [25] 陆文聪,陈念贻,叶晨洲,等. 支持向量机算法和软件 ChemSVM 介绍[J]. 计算机与应用化学, 2002, 19(6): 697.
- [26] 陈念贻,陆文聪,叶晨洲,等. 支持向量机及其它核函数算法在化学计量学中的应用[J]. 计算机与应用化学, 2002, 19(6): 691-693.