

• 综 述 •

中药成分的生物学活性评价及筛选

李建锋¹, 荀丽英², 李 航¹, 赵启韬^{2*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学基础医学院, 山东 济南 250355

摘 要: 中药成分的生物学活性评价是探索中药药效物质基础的主要手段。分别从整体动物、细胞、分子3个层面, 系统论述了10年来该领域的技术进展, 以及依托新技术筛选出的新中药活性组分及单体化合物。同时分析了不同技术的长处及不足, 以期能为中药新药研发提供资料及思路。

关键词: 中药活性成分; 生物学活性评价; 膜亲和色谱; 生物大分子亲和色谱; 高效液相色谱-柱后生物活性联机检测

中图分类号: R285; R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)04-0588-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.025

Evaluation and screening for biological activity of components in Chinese materia medica

LI Jian-feng¹, XUN Li-ying², LI Hang¹, ZHAO Qi-tao²

1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. College of Basic Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Biological activity evaluation of Chinese materia medica (CMM) composition is one of the main means to explore the active components of CMM. This paper, from the three aspects of whole animal, cellular, and molecular, discusses systematically the technical progress in this area over the past 10 years and the screening of new active ingredients from CMM and monomer compounds based on new technology. At the same time, the different technical strengths and weaknesses have been analyzed in the hope of providing the information and ideas for the research on the new drugs of CMM.

Key words: bioactive components in Chinese materia medica; biological activity evaluation; membrane affinity chromatography; biomacromolecular affinity chromatography; high performance liquid chromatography-biological activity after column on-line detection

中药对人类健康的贡献日益受到国际社会的关注, 然而多数中药药效物质基础不清已成为制约中药发展的瓶颈。在“回归自然”浪潮及中医药产业化的大环境下, 运用现代科技手段阐明中药的物质基础, 是中药现代化的重要内容, 也是提高中药疗效、稳定中药质量的重要手段。众所周知, 中药化学成分复杂, 除极少数矿物药以外, 每一个单味中药所含的成分就相当于一个化合物库。这些众多类型的化合物并非均是活性分子。中药特定的药理活性往往与某些具有一定结构特征的分子群直接相

关。中药活性成分筛选的目的是寻找中药中发挥治疗作用的化学成分群或明确中药药效的物质基础。近年来, 随着现代生物技术、化学分离技术的发展, 中药成分生物学活性评价及筛选研究日趋繁荣。本文系统总结了10年来该领域的研究进展, 以及依托这些技术所获得的所有中药活性成分, 以期能为中药新药研发提供资料及思路。

1 整体药效评估筛选法

神农尝百草是最原始的以人为试验对象的整体药效评估法, 也是鉴定药物、食物与毒物, 寻找中

收稿日期: 2014-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173164)

作者简介: 李建锋(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治心脑血管疾病的机制研究。

*通信作者 赵启韬, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师。Tel: (0531)89628501 E-mail: qita Zhao@163.com

药资源最有效、最直接,当然也是最危险的方法。因而以动物(包括正常、疾病动物模型)进行药效评估的要求自然产生。动物层次药效评估能够从整体水平检测药物的疗效、毒副作用,其结果最接近人体试验。目前,利用疾病动物模型进行药效评估是中药新药研发过程中必不可少的环节,多种疾病的动物模型,如高血压、高脂血症、糖尿病等,也日趋成熟。

利用 ip 四氧嘧啶所致的糖尿病小鼠模型,金清等^[1]系统评估了木香 *Aucklandiae lappa* Decne. 的乙醇提取物,乙醇提取物醋酸乙酯部位、正丁醇部位和水提取部位降血糖效果;发现其中乙醇提取物醋酸乙酯部位降血糖活性较强;并对该部位用柱色谱法继续分离、精制,同时进行降血糖活性检测。最后筛选出了2种新的天然降血糖活性成分,木香炔内酯(costunolide)、去氢木香内酯(dehydrocostus lactone)。谭斌等^[2]利用大孔树脂吸附瓜蒌皮 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 水煎液,然后分别用95%、70%、40%的乙醇及双蒸水洗脱,去除乙醇得到瓜蒌皮的4个提取物。采用舌下注射低密度脂蛋白(LDL)的方法制备大鼠血管内皮损伤模型。利用该模型评价上述4种提取物的血管保护活性,发现其中水、70%乙醇提取物对大鼠血管内皮损伤保护作用显著。高文义等^[3]以正常大鼠在给药前后血压变化情况,观察茺蔚子 *Leonuri Fructus* 醇提液的乙醚、醋酸乙酯、正丁醇和水萃取物的降血压活性;发现茺蔚子水溶性成分对正常大鼠降血压作用明显,水层中主要含生物碱类成分,因而生物碱可能是茺蔚子降血压作用的主要活性成分。

尽管利用动物模型进行新复方中药活性评价的研究资料不胜枚举,但通过该方法进行中药活性成分筛选的资料却很少。主要原因是需要的受试样品量大,而多种中药单体极难大量制备,不能满足实验要求;另外该方法实验周期长,工作量大,无法实现大规模、高通量筛选。因而,用于活性成分筛选的各种细胞模型应运而生。

2 细胞层次的活性评估法

细胞是生命最基本的结构与功能单位。对于一个完整而有活性的细胞来说,生存环境中各种因素的变化,均会引起其内部的代谢变化;因而能够为中药活性成分筛选提供一个最小而又相对完整的生物体系。同时使用培养的细胞筛选活性成分成本低、周期短,因此细胞药物筛选模型得到了迅速发展^[4]。

2.1 抗肿瘤药物筛选细胞模型

目前各种癌细胞株不仅容易获得、易于培养,而且实验操作简单。因而,检测某中药成分是否可体外诱导肿瘤细胞坏死、凋亡或抑制增殖已经成为抗肿瘤中药活性成分筛选第一步。以这种方法配合动物体内抑瘤实验,已成功从中药中发现了众多抗肿瘤的候选药物^[4]。

常中飞等^[5]利用人肝癌 HepG-2 细胞株、大鼠胶质瘤 C6 细胞株为实验材料,MTT 法检测魔芋 *Amorphophallus rivieri* Durieu 的水提物、醇提物、醋酸乙酯萃取物及石油醚萃取物对肿瘤细胞的增殖抑制作用,发现其中醋酸乙酯萃取物及石油醚萃取物可显著抑制肿瘤细胞增殖。采用沉淀反应或颜色反应对这2种萃取物进行化学成分分析,结果显示其主要成分为有机酸、生物碱、黄酮类、挥发油、香豆素等。刘春宇等^[6]培养了人早幼粒白血病细胞、人肝癌细胞、人低分化胃肠癌细胞、人肺癌细胞和人宫颈癌细胞等多种细胞株,利用 MTT 法对沙苑子 *Astragali Complanatii Semen* 不同成分群体外抑制癌细胞增殖的效果进行评估,同时采用 S₁₈₀ 小鼠肉瘤模型进行体内抑瘤效果检验,从而明确沙苑子总黄酮为其抗肿瘤的主要活性成分。

2.2 细胞保护的药评价筛选模型

张子理等^[7]通过在培养液中添加党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 系列提取物处理小肠隐窝细胞株(IEC-6),检测不同成分对细胞生存、增殖的作用效果,以及对该细胞分泌功能的影响,从而建立了胃肠黏膜损伤修复药物筛选的细胞模型,并筛选了党参中具有调节细胞增殖作用防治胃溃疡的活性成分。原江锋等^[8]体外建立人血管内皮细胞 ECV304/大脑皮层细胞株 C6 细胞共培养系统,作为血脑屏障(BBB)药物筛选模型,从丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 提取液中筛选可能作用于中枢神经系统的活性成分,并结合液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)分析,发现丹参提取液中至少有16种成分能够透过BBB,其中4种成分为隐丹参酮(cryptotanshinone)、丹参酮I(tanshinone I)、丹参素(tanshinol)和原儿茶酸(protocatechuic acid)。

2.3 特定靶受体筛选的细胞模型

随着细胞信号转导理论不断丰富,学者们逐渐认识到某些关键受体是多种药物的作用靶点。因而从中药中筛选某种功能细胞内关键受体的激活剂或抑制剂成为中药药理学界的研究热点。这种方法的

成功建立依赖于稳定表达特定关键受体的细胞。多种细胞稳定表达组织细胞特异性受体,这给受体激活或抑制剂筛选细胞模型的建立提供了方便。

巨噬细胞表达丰富的甘露糖受体(MR)。MR可与甘露糖末端的配体结合。田维毅等^[9]利用这一特点,建立巨噬细胞甘露糖受体(MMR)结合物筛选模型。大致过程是体外培养小鼠腹腔巨噬细胞→将该细胞分别与不同浓度的D-甘露糖、D-半乳糖共同孵育→除去未结合D-甘露糖、D-半乳糖→细胞与异硫氰酸荧光素标记的甘露糖化牛血清白蛋白(M-FITC-BSA)共同孵育→流式细胞仪、荧光显微镜检测巨噬细胞与M-FITC-BSA的结合率,检测模型的有效性。通过优化各种实验条件,建立有效的MMR筛选模型;并用于筛选四物汤等6个复方多糖中的MR结合成分。结果发现在一定浓度下,四君子汤、六味地黄汤和玉屏风散多糖组分能明显拮抗巨噬细胞与M-FITC-BSA的结合。因而,这3种复方多糖可能通过与MR结合发挥药理活性。

另一种方法是通过基因转染的方法,使特定细胞株内稳定、大量表达某种特异性受体,从而得到建立模型所需要的细胞株。这种方法有很多成功的例子。为筛选能激活D5受体的天然活性成分,邓小红等^[10]以人多巴胺受体D5R基因转染人胚肾细胞株HEK293,以稳定转染抗性筛选剂G418筛选后,获得了多株D5受体单克隆细胞。随后采用cAMP响应阳性(CRE)药forskolin和D5受体特异性激动剂SKF38393进行刺激,摸索出D5受体激动剂高通量筛选的最佳条件。利用该细胞筛选模型,该课题组对200余种中药水提物进行了初步筛选,从中选出了3种可明显激活D5受体的中药水提物,为D5受体激动剂的筛选打下基础。

3 生物大分子层次的活性评估法

细胞信号转导理论的发展同时催生了生物大分子层次的中药成分活性评价及筛选方法。该方法属于靶受体或酶的体外筛选模式,其思路是如果已证实某关键的信号通路与某生理、病理环节密切相关,那么以该信号通路上的关键受体、酶为探针,从众多中药成分中筛选靶受体的激活剂、抑制剂,或靶酶的催化剂、抑制剂、底物;从而发现候选药物。核心技术是把关键的受体、酶从组织细胞内分离纯化出来,选择合适的对照品,在合适的反应体系中与各种中药提取物、部位、组分等成分共同孵育,利用灵敏的检测器通过光吸收等原理检测是否发生

免疫结合或酶促反应。在分子层次对中药成分进行生物学活性评估,不依赖动物模型与细胞、受试样品需要量少、实验周期短、费用低、操作过程可实现自动化,因而极大提高了筛选的通量与规模。目前,中药学、天然药物学界的许多学者将摸索成熟的活性检测技术与各种色谱、质谱技术等联合应用,建立了多种中药活性成分高通量筛选技术模式,发现了多种新的天然活性成分,或多种中药成分的新的生物学活性。

3.1 普通体外筛选模式

这种筛选方式中,中药成分的活性检测与不同成分的分离分析、结构鉴定分别进行。其基本思路是利用纯化的特定酶、受体,先检测中药粗提物或部位的活性,选择其中活性显著部位,利用色谱、质谱技术进行精细的成分分离、鉴定。 α -葡萄糖苷酶抑制剂类成分可抑制小肠内 α -葡萄糖苷酶的活性,延缓或抑制葡萄糖在肠道的吸收,从而有效降低餐后高血糖。许芹永等^[11]利用体外抑制模型,从肉桂*Cinnamomum cassia* Presl.的石油醚提取物中筛选出了 α -葡萄糖苷酶抑制剂桂皮醛(cinnamaldehyde)、肉桂酸(cinnamic acid)。酪氨酸酶是皮肤黑色素形成过程中的关键酶,该酶的抑制剂可能具有美白护肤的功效。通过检测丹参不同极性溶剂提取部位对酪氨酸酶活性的抑制作用,发现丹参氯仿萃取层具有较强的酪氨酸酶抑制活性,其中起主要作用的是丹参素(tanshinol)、原儿茶醛(proto catechuicaldehyde)^[12]。朴香兰等^[13]利用相似的方法从连翘*Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl筛选到了酪氨酸酶抑制成分白桦脂酸(betulinic acid)。

3.2 生物色谱技术

生物色谱技术是一种新兴的亲色谱技术,以有活性的细胞膜、生物大分子作为靶标固着在色谱填料上形成固定相,以各种缓冲溶液为流动相。中药提取物作为溶质添加在流动相中。中药提取物经过色谱柱时,其中不同成分与靶标作用程度、结合性能不同,从而在固定相上表现出不同的保留行为。根据保留行为的差别,结合使用高分离效能的HPLC、高分辨率的质谱检测技术,具有不同生物学活性的成分即被筛选、分离出来。根据不同的固定相,生物色谱技术分为细胞膜色谱技术和大分子亲和色谱技术^[14]。

3.2.1 细胞膜色谱技术 细胞膜上存在多种受体,一般单个细胞的受体密度可达 $10^3 \sim 10^4$ 数量级,是

筛选多靶标中药活性成分的理想材料^[15]。血管内皮生长因子受体2(VEGFR 2)在血管内皮细胞(VEC)中表达丰富,该受体的激活对VEC发挥正常功能必不可少。李义平等^[16]以硅胶为载体制备ECV304细胞膜固定相,建立了VEC膜色谱模型,并利用该模型筛选红毛三七中的活性成分,并进行初步药理学验证,发现塔斯品碱(taspine)能够选择性地作用于VEGFR 2,并显著抑制血管内皮生长因子(VEGF)诱导的血管管腔形成。利用相同的ECV304细胞膜色谱模型,蒙麦侠等^[17]以抗VEGF抗体为对照,发现竹根七的醋酸乙酯萃取部位中的ZGQ-C成分群和EVC细胞膜高度亲和,MTT法检测证实该成分显著抑制EVC的增殖。

表皮生长因子受体(EGFR)在多种恶性肿瘤中过度表达,被激活后促进肿瘤细胞增殖、加速肿瘤转移和抑制肿瘤细胞凋亡。从中药中寻找EGFR拮抗剂或抑制剂是目前的研究热点。王嗣岑等^[18]采用高表达EGFR的HEK293细胞系制备细胞膜色谱固定相,将该色谱模型与高效液相色谱/质谱(HPLC/MS)联用,从独活*Angelica pubescens* Maxim. f. 中筛选出与EGFR高度亲和的成分蛇床子素(osthole)。MTT及ELISA检测证实蛇床子素显著抑制EGFR/HEK293细胞增殖,并可与EGFR结合。采用相似的方法,张宇洁等^[19]研究发现,蛇床子素也是长春七*Libanotis buethorimensis* (Fisch.) DC. 中与红细胞膜高度亲和,并对红细胞有细胞毒性的活性成分。Wang等^[20]采用A431细胞膜色谱和高效液相色谱/质谱从中药中筛选EGFR拮抗剂,发现苦参*Sophora flavescens* Ait. 中的氧化苦参碱(oxymatrine)和苦参碱(matrine)能够作用于EGFR。

佛手*Citrus medica* L. 是常用的抗血压中药,但有效成分尚不清楚。为从佛手中筛选舒张血管的有效成分,王艳微等^[21]采用血管平滑肌细胞膜色谱(VSM/CMC)模型,结合HPLC/MS分析,并经离体动脉舒张实验验证,确定了佛手柑内酯(bergapten)是该药的主要活性成分。与此类似,赵惠茹等^[22]用家兔胸主动脉血管细胞膜为固定相,从当归*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 挥发油中分离出对主动脉血管有舒张作用的2种有效成分。Yang等^[23]建立了大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞膜色谱,并结合液-质联用(LC-MS)分析技术,从五味子

Schisandra sphenanthera Rehd. et Wils. 中筛选出了具有血管扩张活性的成分去氧五味子素(deoxyschisandrin)和五味子酯甲(schisantherin A)。采用大鼠心肌细胞膜色谱柱,结合高效液相-飞行时间质谱(TOF/MS)分析,曹岩等^[24]从附子*Aconitum carmichaeli* Debx. 中初步筛选、鉴定出8个与心肌细胞膜高亲和性的成分,主要有单酯型的苯甲酰乌头胺(benzoylaconine)、苯甲酰新乌头胺(benzoylmesaconine)和苯甲酰次乌头胺(benzoylhypaconine)。Hou等^[25]以硅胶为载体制备MDA-MB-231细胞膜固定相,结合2D LC-MS分析技术,筛选厚朴*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 中具有抗乳腺癌活性的成分,结果发现和厚朴酚(honokiol)和木兰醇(magnol)为其主要抗乳腺癌活性成分。

固定相采用动物细胞膜,细胞膜色谱技术能够较好地模拟活性成分与细胞膜及膜蛋白的相互作用,但由于离体细胞膜容易失活,使得色谱柱的寿命较短。

3.2.2 生物大分子亲和色谱技术 与细胞膜色谱技术不同,大分子亲和色谱技术是将有活性酶、受体、DNA、抗体、血浆中的运输蛋白或具有其他重要生理功能的生物大分子预先分离、纯化出来,然后直接与色谱填料相偶联,并制备成色谱柱。色谱柱上的成分单一,能排除非目的分子的干扰。

郑晓晖等^[26]从家兔肺组织中纯化得到 β_2 -肾上腺素受体(β_2 -AR),以大孔硅胶为载体,建立了 β_2 -AR亲和色谱方法,从苦杏仁*Armeniacae Amarum Semen* 中筛选出了可与 β_2 -AR相结合的活性成分苦杏仁苷(amygdalin)。王芳焕等^[27]采用羰基咪唑法合成人血清白蛋白(HAS)与大孔硅胶相结合的生物色谱填料,并使用该色谱柱从铁棒锤*Aconitum pendulum* Busch 中筛选出了与HAS相结合的4种活性物质脱乙酰去氧乌头碱(deacetylated deoxyaconitine)、苯甲酰脱氧乌头碱(benzoldeoxyaconitine)、乌头原碱(aconine)、苯甲酰新乌头原碱(benzoylmesaconine)。

生物色谱技术实现了中药活性成分筛选和分离的一体化,也提高了从复杂体系中识别目标成分的特异性、敏感性和选择性,目前在其推广和应用方面却存在一些困难^[28]。其一,由于各种中药活性成分在生物体内的作用靶点不同,所以色谱柱制备时选用的生物活性物质、固定相材料也不同,使得生

物色谱固定相的制备困难。其二, 色谱分离的条件和保持固定相生物活性的条件不能同时兼顾。其三, 由于固定相含有蛋白质或其他生物大分子, 大分子亲和色谱的分离能力与常规的高效液相色谱(HPLC)相比较低。其四, 生物色谱柱特异性保留的中药活性成分的量一般都较少, 也难以收集到足够的量供分子结构鉴定使用^[29]。

3.3 HPLC 柱后生物活性联机检测技术

HPLC 柱后生物活性联机检测技术是将分离功能强大的 HPLC 技术、成熟的生物活性体外生化检测技术联合使用, 实现了化学分离与活性检测的同步进行, 克服了传统药物筛选方法存在的操作繁琐、成本高等缺点, 已被广泛地应用于中药或天然产物中抗氧化剂、乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂、磷酸二酯酶(PDE)抑制剂、血管紧张素转移酶(ACE)抑制剂、细胞色素 P450 抑制剂等的筛选^[30]。

3.3.1 天然抗氧化剂筛选 利用抗氧化剂的还原性, 从 HPLC 中流出的成分在反应单元中与特定的氧化剂反应, 检测反应前后吸收光谱的变化, 来进行抗氧化活性成分筛选。根据所用氧化剂的不同, 该方法可分为 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二盐(ABTS)法和磷钼络合物法^[31]。DPPH 在溶液中显紫色, 在 517 nm 处有最大吸收; 与抗氧化剂作用, 生成结构稳定的 DPPH-H, 在 517 nm 的吸收峰消失, 在色谱图中形成倒峰^[32]。与此类似, ABTS^{•+}在 743 nm 处有最大吸收。抗氧化剂可使其转变成结构稳定的 ABTS, 在色谱图中 743 nm 处形成倒峰^[33]。而具有抗氧化活性的化合物与 6 价的磷钼试剂进行反应, 生成 5 价的蓝色磷钼络合物, 其倒峰的位置处于 598 nm 处^[34]。10 多年来, 利用该技术筛选出的天然抗氧化剂近 50 种^[30]。

利用 HPLC-ABTS 技术, 耿雪飞等^[35]对细叶杜香 *Ledum palustre* L. 茎部的抗氧化活性成分进行了筛选、分析, 发现该药材甲醇提取物抗氧化活性显著。经核磁共振从该提取物的二氯甲烷萃取层鉴定出一种成分为秦皮素(fraxetin)。He 等^[36]也利用此技术从栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 中检测出了具有清除自由基活性的化学成分, 其中异绿原酸 A(isochlorogenic acid A)为最主要的抗氧化成分。利用 HPLC-DPPH 法, 王小淞等^[37]系统检测了黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 根、茎、叶提取物的抗氧化活性, 发现不同部位提取物抗氧化活性成分差

异显著, 并比较了 10 个不同产地的黄芩根提取物中抗氧化活性成分, 结果显示其都含有黄芩素(baicalein)、黄芩苷(baicalin)、二氢黄芩苷(dihydrobaicalin)、降汉黄芩素(norwogonin)、野黄芩苷(scutellarin)这 5 种抗氧化活性成分。

3.3.2 酶抑制剂筛选 生物体内某些酶的底物和产物光吸收谱差异较大。HPLC 柱后活性联机检测技术正是利用了这种性质, 筛选 AChE、PDE、ACE 及细胞色素 P450 的抑制剂的。AChE 可催化乙酰胆碱生成 5'-硫醇基-2-硝基苯甲酸(5-thio-2-nitrobenzoate, $\lambda_{\max}=405\text{ nm}$)^[38]。PDE 可以和 2'-(N-甲基邻氨基苯甲酰)环磷酸鸟苷、腺苷(mant-cGMP、mant-cAMP)反应, 分别生成 2'-(N-甲基邻氨基苯甲酰)磷酸鸟苷、腺苷(mant-GMP、mant-AMP), 与 mant-cGMP、mant-cAMP 相比, mant-GMP、mant-AMP 的荧光强度明显降低^[39]。而 ACE 催化 abz-FRK(dnp)P-OH 生成荧光物质 abz^[39-40]。细胞色素 P450 催化乙氧基卤试灵生成荧光物质卤试灵^[37]。当上述酶的抑制剂存在时, 反应产物的量显著减少。中药成分经 HPLC 分离后, 柱后进入活性检测单元, 与检测试剂作用, 在适当的波长检测吸光度, 具有抑制活性的成分会呈现倒峰^[38-41]。

HPLC 柱后活性联机检测技术虽然操作简便、筛选速度快、专属性高, 但不能阐明活性成分的作用通路, 而且色谱分离得到多种化学成分非常少, 难以产生明显的峰响应。

4 结语

中药成分的复杂性及作用靶点的多样性决定了对其进行生物学活性评估的艰巨性。整体动物层次的药效评估虽然结果最接近人体试验, 也符合中药多靶点作用的特点; 然而需要的受试样品量多、工作量巨大。多数中药成分在药材中量较少, 无法用这种方法进行活性评估。体外细胞、分子层次的活性评价方法提高了从复杂中药成分体系中识别目标成分的特异性、敏感性, 也能实现大规模、高通量筛选; 然而只能验证特定成分在特定细微的生化环节上具有活性, 不能代表该成分在体内有药用效果; 而且也忽略了中药多成分、多靶点、协同作用的特点, 脱离了中医理论的指导, 也无法真正寻找到中药活性成分。因而, 中药成分的生物学活性评价及筛选不存在通用方法。以活性为导向, 体内、体外多种方法相结合, 才能对多种多样的中药成分进行全面、客观的活性评估, 及筛选到确实有效的活性成分。

参考文献

- [1] 金清, 白晓华, 邓亚飞, 等. 木香降血糖有效部位及有效成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1371-1375.
- [2] 谭斌, 刘韵, 谷彬, 等. 瓜蒌皮提取物对大鼠血管内皮损伤的保护作用 [J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12(9): 9-11.
- [3] 高文义, 李银清, 蔡广知, 等. 茺蔚子降血压活性成分筛选的实验研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(2): 142-143.
- [4] 冯雅俊, 李杏花, 田林, 等. 细胞模型在中药研究中的应用 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(9): 203-205.
- [5] 常中飞, 陈培丰, 胡秀敏. 蛇六谷提取物抗肿瘤活性筛选及初步化学成分分析 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 580-581.
- [6] 刘春宇, 顾振纶, 杜崇民, 等. 沙苑子抗肿瘤活性部位体内外筛选 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1052-1054.
- [7] 张子理, 陈蔚文. 小肠隐窝细胞株 (IEC-6): 中药生物活性成分筛选的药理模型 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3-4): 180-182.
- [8] 原江峰, 崔军见, 尚卫, 等. 血脑屏障药物筛选模型的建立及丹参活性成分筛选分析 [J]. 中国科学: 化学, 2010, 40(6): 717-724.
- [9] 田维毅, 董登祥, 杨娟, 等. 巨噬细胞甘露糖受体模型的初步建立及其在中药复方筛选中的应用 [J]. 中成药, 2009, 31(6): 834-838.
- [10] 邓小红, 殷钟意, 郑旭煦, 等. 多巴胺 (D5) 受体激动剂高通量筛选模型的建立和天然活性成分的筛选 [J]. 生物医学工程杂志, 2010, 27(3): 606-611.
- [11] 许芹永, 朱靖博, 王振中, 等. 肉桂抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(9): 1246-1249.
- [12] 李红艳, 刘艳杰, 王倩, 等. 具有酪氨酸酶抑制活性的丹参有效成分筛选研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 85-89.
- [13] 朴香兰, 杨静, 楼彩霞, 等. 连翘对酪氨酸酶的抑制活性 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2012, 21(4): 19-22.
- [14] 方艺霖, 张艺, 肖小河, 等. 细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1119-1121.
- [15] 王丽莉, 张铁军. 细胞膜色谱法及其在中药活性成分研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 110-114.
- [16] 李义平, 贺浪冲. 血管内皮细胞膜色谱模型的建立及初步应用 [J]. 科学通报, 2007, 52(4): 410-415.
- [17] 蒙麦侠, 杨智锋, 贺浪冲. 竹根七中具有血管生成抑制作用有效成分的筛选 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(1): 46-47.
- [18] 王嗣岑, 孙萌, 孙彦民, 等. 用高表达 EGFR 细胞膜色谱-HPLC/MS 联用快速筛选独活中抗 EGFR 活性成分 [J]. 中国科学: 化学, 2010, 40(6): 750-756.
- [19] 张宇洁, 贺浪冲. 用细胞膜色谱模型筛选长春七抑制 HeLa 细胞增殖的活性成分 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(6): 463-465.
- [20] Wang S, Sun M, Zhang Y, et al. A new A431/cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening epidermal growth factor receptor antagonists from *Radix Sophorae Flavescentis* [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(32): 5246-5252.
- [21] 王艳微, 畅瑞苗, 王新, 等. 细胞膜色谱法与液相色谱-质谱联用筛选佛手的活性成分 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(8): 66-68.
- [22] 赵惠茹, 杨广德, 贺浪冲. 生物活性跟踪分离法筛选当归挥发油中的有效成分 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 112-113.
- [23] Yang X X, Wang Y W, Zhang X X, et al. Screening vasoconstriction inhibitors from traditional Chinese medicines using a vascular smooth muscle/cell membrane chromatography-offline-liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(19): 2586.
- [24] 曹岩, 景晶, 吕狄亚, 等. 用细胞膜色谱法和 HPLC-TOF/MS 研究附子中的有效成分 [J]. 药学实践杂志, 2011, 29(5): 339-349.
- [25] Hou X, Yuan X L, Zhang B, et al. Screening active anti-breast cancer compounds from *Cortex Magnolia officinalis* by 2D LC-MS [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(4): 706-712.
- [26] 郑晓晖, 赵新锋, 杨荣, 等. β_2 -肾上腺素受体亲和色谱及其在苦杏仁活性成分筛选中的应用 [J]. 科学通报, 2007, 52(18): 2111-2115.
- [27] 王芳焕, 龚波林. 人血清白蛋白生物色谱柱的性能研究及应用于铁棒锤中活性成分的筛选 [J]. 化学通报, 2010, 73(9): 819-825.
- [28] 胡敏敏. 细胞生物色谱法在中药研究中的应用 [J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(21): 234-235.
- [29] 汪宁, 段金彪, 朱荃, 等. 细胞膜生物色谱法在中药研究中的应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(5): 82-85.
- [30] 王晓飞, 焦海胜, 李玉民. HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在天然活性成分筛选中的应用 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1047-1051.
- [31] 王璐, 孙莉琼, 苏航, 等. 联用技术在自由基清除物筛选中的应用 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 1032-1036.
- [32] Koleva I I, Niederlander H A G, van Beek T A. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures [J]. *Anal Chem*, 2000,

- 72(10): 2323-2328.
- [33] Koleva I I, Niederlander H A G, van Beek T A. Application of ABTS radical action for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(14): 3373-3381.
- [34] Cardenosa R, Mohamed R, Pineda M, *et al.* On-line HPLC detection of tocopherols and other antioxidants through the formation of a phosphomolybdenum complex [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(12): 3390-3395.
- [35] 耿雪飞, 郑永杰, 赵明, 等. 基于 HPLC-ABTS 体系筛选细叶杜香抗氧化活性成分 [J]. 化学工程师, 2011, 193(10): 70-73.
- [36] He W, Liu X, Xu H, *et al.* On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts [J]. *Food Chem*, 2010, 123(2): 521-528.
- [37] 王小淞, 陈波, 姚守拙. HPLC-DPPH 在线法筛选黄芩提取物中抗氧化活性成分 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 224-227.
- [38] Ingkaninan K, de Best C M, van der Heijden R, *et al.* High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholine sterase inhibitors from natural products [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 872(1/2): 61-73.
- [39] Schenk T, Breel G J, Koevoets P, *et al.* Screening of natural products extracts for the presence of phosphodiesterase inhibitors using liquid chromatography coupled online to parallel biochemical detection and chemical characterization [J]. *J Biomol Screen*, 2003, 8(4): 421-429.
- [40] van Elswijk D A, Diefenbach O, van der Berg S, *et al.* Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1020(1): 45-48.
- [41] Kool J, van Liempd S M, Ramautar R, *et al.* Development of a novel cytochrome P450 bioaffinity detection system coupled online to gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Biomol Screen*, 2005, 10(5): 427-436.