

中药质量生物标志物研究进展

李寒冰¹, 吴宿慧^{1*}, 唐进法¹, 王伽伯², 肖小河², 刘昌孝³

1. 河南中医药大学, 河南省仲景方药健康衰老产业工程研究中心, 河南 郑州 450046

2. 解放军总医院第五医学中心, 全军中医药研究所, 北京 100039

3. 天津药物研究院 新药评价研究中心, 现代中药研究中心, 天津 300193

摘要: 中药质量标志物(Q-marker)是中药质量控制研究的新方向之一。Q-marker 既可以是质量化学标志物(Q-chemomarker), 也可以是质量生物标志物(Q-biomarker)。研究建立良好的 Q-biomarker, 可以提高中药质量控制方法和标准与临床安全性和有效性的关联度, 同时兼顾质量控制的可操作性。当前, 我国和美国药品管理部门已将生物评价方法作为中药和植物药质量控制的重要内容。相关企业和研究者也正在积极探索和发展中药质量生物评价方法。在此背景下, 从 Q-biomarker 的角度, 进一步丰富和拓展中药质量生物评价的方法和指标, 并对相关研究实例进行综述和解析, 以期为促进中药 Q-marker 理论和方法体系的丰富与发展, 解决中药质量评控研究中的实际问题提供参考。

关键词: 中药质量标志物; 质量生物标志物; 生物效价; 效应成分指数; 生物效应表达谱

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)19-4556-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.005

Research progress on Q-biomarker of Chinese materia medica

LI Han-bing¹, WU Su-hui¹, TANG Jin-fa¹, WANG Jia-bo², XIAO Xiao-he², LIU Chang-xiao³

1. Henan Zhongjing Recipe Health and Aging Industry Engineering Research Center, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. China Military Institute of Chinese Medicine, Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100039, China

3. Research Center for New Drug Evaluation, Research Center for Modern Chinese Medicines, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Quality marker (Q-marker) is one of the new directions in the research of quality control of Chinese materia medica. The Q-marker can be either quality chemomarker (Q-chemomarker) or quality biomarker (Q-biomarker). The establishment of a good Q-biomarker can improve the linkage of Chinese medicine quality control methods and standards with clinical safety and effectiveness, at the same time considering the operability of quality control. At present, the FDA of China and the United States have adopted biological evaluation methods as an important part of quality control of Chinese medicines and botanicals medicines. Many companies and researchers are also actively exploring and developing methods for the evaluation of quality of Chinese materia medica. This paper further enlarges and expands the methods and indicators of biological evaluation of Chinese materia medica, and summarizes and analyzes relevant research examples from the perspective of Q-biomarker. We hope that it would promote the richness and development of the theoretical system of Chinese medicine quality markers, so as to provide a reference to solve the practical problems for the quality control and evaluation of Chinese materia medica.

Key words: quality marker of Chinese materia medica; quality biomarker; biological potency; effect component index; biological effect fingerprint

中药质量研究和应用关系到中医药科学和产业的发展, 中药质量标志物 (quality marker, Q-marker)^[1]新概念的提出为中药质量研究指明了新的发展方向, 具有非常重要的学术意义和应用价

收稿日期: 2019-09-07

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-BJ-07); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-TJ-43); 国家重点研发计划 (2018YFC1707000); 国家公益性行业专项课题 (201507002); 河南省科技攻关计划 (182102310305)

作者简介: 李寒冰, 男, 教授, 主要从事中药质量生物评价研究。Tel: 13703920231 E-mail: lhb8899@163.com

*通信作者 吴宿慧, 女, 副教授, 主要从事动物生理及生物活性检测研究。E-mail: 15890107010@163.com

值。从广义上来看, Q-marker 既包括中药质量化学标志物 (Q-chemomarker), 也包括中药质量生物标志物 (Q-biomarker)。由于中药成分组成的复杂性, 相当多中药药效物质基础尚未得到充分阐明, 以个别指标性化学成分控制中药质量的模式还存在与临床有效性、安全性关联不紧密等问题。而生物活性检测方法与中药临床疗效和安全性的关联性较为紧密, 且可以反映中药整体的活性和质量。因此, 研究建立良好的 Q-biomarker, 可以提高中药质量控制方法和标准与临床安全性和有效性的关联度, 同时兼顾质量控制的可操作性。

当前, 我国和美国药品管理部门已将生物评价方法作为中药和植物药质量控制的重要内容。如《中国药典》2015 年版发布了《中药生物活性测定指导原则》^[2]; 美国 FDA 发布的《植物药研发行业指南》也明确指出生物评价是植物药在美国新药注册评审的重要内容^[3]; 国家药品监督管理局正在组织研制和起草《中药质量生物评价技术指导原则》。相关企业和研究者也正在积极探索和发展中药质量生物评价方法, 如正在申报美国 FDA 植物药新药的 10 余种中成药, 建立质量生物评价方法是《植物药研发行业指南》的重要内容之一。

在中药质量生物评价发展趋势的背景下, 本文从 Q-biomarker 的角度, 进一步丰富和拓展中药质量生物评价的方法和指标, 并对相关研究实例进行综述和解析, 以期为促进中药 Q-marker 理论和方法体系的丰富与发展, 解决中药质量评控研究中的实际问题提供参考。

1 中药 Q-marker 概念的内涵与外延

生物标志物 (biomarker) 是一种反映生物体生理、病理过程或治疗药物对生物体系干预效果的指标, 既可反映药效也可反映毒性, 涉及到细胞分子结构和功能的变化、生化代谢过程的变化、生理活动的异常表现以及个体、群体或整个生态系统的异常变化等。从生物标志物的基本概念可知其涵盖的范围广泛, 而且随着新技术、新方法的应用, 更多可检测到的特异性结果亦可作为反映药物活性或毒性的指标进行研究和应用。目前生物标志物已被用于药物的药效学等方面的评价^[4]。

用于中药质量控制的生物标志物是能够反映中药质量的单个生物标志物或其集合, 是能够关联中药临床有效性、安全性和一致性的关键质量信息。从定义来看, Q-marker 既可以是单一的指标, 也可

以是多个指标的综合。因此, Q-biomarker 的评价方法既包括生物活性值、生物效价 (biopotency)、生物毒价 (toxicpotency) 这样的单一的生物指标, 也可以是效应成分指数 (effect-constituent index, ECI)、生物效应表达谱 (biological fingerprint) 等包括多个或一系列生物指标的综合指标。生物效价可以较好地反映中药产品的整体活性或功效, 适用于化学物质基础不清楚, 常规理化方法难以评价其质量的中药产品。生物毒价则直接反映中药产品的毒性, 可用于中药的安全性评价。ECI 是基于有效成分和生物效价检测共同加权的评控指标, 具有既能关联中药功效, 又具备快速、准确、简便可行的特点, 主要针对药效作用比较明确、活性成分相对清楚的中药来开展^[5]。生物效应表达谱具有指纹性或特征性, 不仅可以评价中药质量优劣, 也可以用于中药质量真伪鉴别或质量波动监测^[6]。

2 中药 Q-biomarker 的评价方法与适用范围

Q-biomarker 用于中药质量控制不应局限于单一指标或个别指标, 应建立多层次、多指标的整合评价体系。按照评价目的该体系可分为两大类: 一是关联功效或毒性的生物活性检测 (包括效价、生物活性限值和毒价测定等), 主要用于中药质量的优劣、毒性大小等的评价, 属于定量或半定量检测的范畴; 二是基于遗传信息的中药基原 DNA 分子鉴定, 如随机扩增多态性 DNA (RAPD)、DNA 条形码等, 主要用于中药基原鉴定, 属于定性鉴别的范畴。近年来, 又发展了生物效应表达谱检测, 包括热活性指纹图谱 (thermal activity fingerprint)、细胞指纹图谱 (cell fingerprint)、生物自显影薄层色谱 (bioautography TLC)、高内涵分析 (high content analysis)、生物芯片 (biochip) 等, 既能够定性鉴别、又能定量评价。还应包括 ECI 以及效应当量 (efficacy equivalent, EE)、道地指数 (Daodi index, DDI) 等^[6-7]。中药 Q-biomarker 的评价方法与适用范围见表 1。

3 中药 Q-biomarker 的应用情况

在中药整合质量观指导下, 对于中药 Q-biomarker 评价方法的建立, 研究较为深入的有生物效价、生物毒价、ECI、生物效应响应谱等系列方法^[6-7]。

3.1 生物效价

生物效价不用过分关注化学成分, 关联中药功效, 采用定量或半定量的方法表征中药产生的生物效应, 从而控制其内在质量。本法适用于功效突出、

表 1 Q-biomarker 评价方法与适用范围

Table 1 Evaluation methods and application scope of Q-biomarker

方法名称	概 念	特 点	适用范围
生物活性检测	以中药功效为基础,采用定量药理学和药物分析方法定性、定量表征中药产生的生物效应,从而控制或评价中药内在质量及方法	不用过分关注化学成分,关联功效或毒性,实验方法兼具药理活性测定与药物分析的特点,可做到定量或半定量	功效较突出、成分复杂或缺乏理化检定方法的中药,包括以安全性和一致性为导向的中药质量评价
热活性指纹图谱	仪器连续记录的生物体新陈代谢过程中能量转移和热变化的参数及谱图,可用以定性、定量地测定药物与机体间的相互作用	可以实时、在线、无损、连续地监测生物体正常的生长代谢状况以及药物作用下变化情况,从而确定不同药物的药效作用及大小,阐明中药药性差异	以安全性为导向的中药质量生物评价;以一致性为导向的中药质量生物评价
自显影生物薄层	一种将薄层色谱分离和生物活性测定相结合的活性筛选方法	无须特殊的仪器设备,操作简单、实验耗费低、灵敏度和专属性高、生物活性的测定速度快,是一种集分离、鉴定和活性测定于一体的药物筛选方法	以一致性为导向的中药质量生物评价
高内涵分析	是一种以细胞为检测对象,通过显微成像法记录多孔板内细胞的图像,并通过分析图像中的信息来解析细胞内物质活动的技术	充分整合样品制备技术、自动化设备、数据管理系统、检测试剂、生物信息等资源,在细胞或分子水平上实现对候选药物的多元化、快速化和规模化筛选或分析	以优质性为导向的中药质量生物评价;以安全性为导向的中药质量生物评价
生物芯片	通过微加工工艺将大量生物识别分子按照预先设置的排列方式固定在厘米见方的芯片片基上,利用生物分子间的特异性亲和反应,实现对配体如基因、抗原等生物活性物质的分析	具有快速、高效、并行处理及分析自动化的特点	以优质性为导向的中药质量生物评价;以安全性为导向的中药质量生物评价
ECI	是基于多组分化学表征和生物效应检测共同加权的评控指标	作为中药质量综合评控的新方法,既能关联药材的临床功效,又具有快速、准确、普适性广、简便可行特点的质量评价模式	以优质性为导向的中药质量生物评价;以安全性为导向的中药质量生物评价;以一致性为导向的中药质量生物评价
EE	指中药能产生特定生物效应强度的量	以生物效应或化学成分和生物效应检测共同加权的效应成分指数为核心,以有效物质发挥的生物效应总量为评价指标的中药质量综合评控的新模式	以优质性为导向的中药质量生物评价;以安全性为导向的中药质量生物评价;以一致性为导向的中药质量生物评价
生物活性标志物	是一种能客观测量并评价正常生物过程、病理过程或对药物干预反应的指示物	可用于疾病诊断、判断疾病分期或者用来评价新药或新疗法在目标人群中的安全性及有效性	以优质性为导向的中药质量生物评价;以安全性为导向的中药质量生物评价;以一致性为导向的中药质量生物评价
DNA 分子鉴定	通过测定目的基因片段的核苷酸序列,并比较序列间的差异来确定各类群间有鉴别意义的特异性位点,从而达到鉴定的目的	具有快速、微量、特异性强的特点,且不受生长发育阶段、供试部位、环境条件的影响	中药真伪鉴别;药材溯源、分类

成分复杂或缺乏理化检定方法的中药、中成药及复方制剂等。

板蓝根具有清热解毒功效,但化学成分复杂,尚未找到直接关联功效的化学检测指标,研究者^[8-9]以板蓝根“清热解毒”功效为基础,通过对流感病毒神经氨酸酶(NA)的体外活性检测,得到板蓝根的抗病毒生物效价,该方法有效提高了该药材的质量控制水平。对于角甲类动物药的生物活性测定,王玄等^[6,10]以抗凝血、抗血栓活性直接反映其活血通络之功效,在此基础上建立了体外抗凝血、抗血栓活性检测的角甲类动物药质量评价方法,构建了新型的角甲类动物药质量控制管理体系。类似的还有,采用体外免疫活性测定能够直接关联冬虫夏草的补益功效机制,建立了基于体外淋巴细胞增殖活性检测的冬虫夏草生物检测方法,有效提高和完善冬虫夏草的质量控制水平;建立了能反映麝香消肿止痛功效的,以检测抗炎活性的质量评价方法^[6]。在中药复方制剂的质量生物测定方面,沙孟晨等^[11]通过微量量热法测定不同质量浓度连花清瘟胶囊对绿脓杆菌的生长代谢的影响,建立了连花清瘟胶囊质量一致性评价方法。

3.2 生物毒价

生物毒价与生物效价检测方法类似,主要用于对“有毒”中药如川乌、附子、雷公藤、何首乌等进行质量评控。

鉴于心脏毒性是附子类中药的主要毒性反应,赵志浩等^[12]以引起室性早搏的药物最小中毒量(MTD)为生物学指标,评价了生附片、黑顺片、白附片、蒸附片、炮天雄、刨附片的毒性,建立了整体表征、关联毒性的附子生物评价方法。赵小梅等^[13]综合采用UPLC-Q-TOF-MS技术及代谢组学方法分析,指认了7个可能的肝毒性生物标志物,基于此以肝脏L02细胞为研究载体,通过测定药物对细胞的抑制率,优化建立了基于肝细胞毒价检测的雷公藤质量评价方法^[14],该方法直接关联雷公藤临床肝脏毒副反应,对从质量控制角度提高雷公藤临床用药的安全有效性具有重要价值。宋婧等^[15]同样通过测定药物对肝脏L02细胞的抑制率,建立了何首乌肝细胞毒性检测方法,并初步指认了何首乌中潜在导致肝细胞损伤的物质,提示了临床应用何首乌应高度重视其肝损伤风险,该研究对于提高何首乌安全用药具有重要指导意义。

3.3 ECI

ECI能够使不同成分所关联的药效大小得到有

效表征,使临床安全性和有效性得到初步关联,使中药质量评价和控制模式与指标更加科学有据、综合全面。依据研究对象的特点及研究的目的不同,可以分为以下几种情况。

3.3.1 对于功效较单一,采用一种活性指标能体现其主要功效的中药来说,可采取单指标研究思路 即先确定该中药的药效活性及主要活性成分,然后对活性成分的生物效应值及含量进行检测,以效应值为指标采用归一化法分配各成分药效权重,最终通过综合指数法建立各成分效应权重。据此,刘振杰等^[16-17]成功建立了基于抗血小板聚集的丹参 ECI,并且所建立的评价方法在复方丹参制剂及其他活血化瘀类中药中得到应用。

3.3.2 对于需多个药效指标才能体现其主要功效的中药来说,采取多指标研究思路 首先是确定各个药效指标及各成分含量,接下来可采取多种评价方法联合应用进行效应指标权重分配,然后拟合出不同浓度单体成分与对应效应的“量-效”关系方程,将各批药材成分的量带入“量-效”方程中得到该批药材的成分效应值,最终以综合指数法建立药效指标权重与成分效应值综合加权的 ECI。Xiong 等^[18]将抗痢疾杆菌效应及抗人肝癌 HepG2 细胞增殖效应为黄连效应指标,以这些效应为黄连中 5 种生物碱进行药效权重分配,应用多指标综合评价法构建了黄连的 ECI。

3.3.3 为使化学指纹谱成为直接关联中药药效的质控标准,在 ECI 基础上发展了效应成分指纹谱(effective components fingerprint, ECF) 该方法将中药化学指纹图谱及各成分信息与生物效价相关联,即用功效校正活性成分的峰面积来建立 ECF。有研究首先检测了黄芩抑菌生物效价,建立了黄芩样品的化学指纹图谱,然后采用灰色关联法(GRA)辨识主要抑菌效应成分,通过抑菌效价校正相应成分的峰面积(绝对峰面积除以相关系数)建立了黄芩的 ECF,与原始化学指纹图谱相比,黄芩的 ECF 能够更清晰、准确地体现各等级样品的差异。

3.3.4 鉴于不同的毒性成分对中药整体安全性的贡献度不同,对有毒中药采用毒性成分指数(TCI)控制其质量,直接关联临床安全性 张定堃等^[19-20]先测定了附子及目标毒性成分对大鼠的最小致死量(MLD),得到了 3 种主要毒性成分新乌头碱、乌头碱及次乌头碱的 MLD 值,采用倒数归一化法计算

三者的毒性校正系数、整合毒性校正系数与实际含量,得到附子的 TCI。

3.4 生物效应表达谱

生物效应表达谱是指在特定的实验条件下,供试药物作用于生物体系所表达出的一组特征生物学信息或图谱,通常具有时间-效应或剂量-效应依赖关系,包括生物热活性指纹图谱、基因表达谱、蛋白质表达谱、代谢物表达谱、细胞表型特征谱、生物自显影薄层色谱等。相对于生物效价检测,生物效应表达谱能反映药物作用于生物的更多指纹信息和/或动态影响,在表征药效相关的中药质量一致性方面具有独特优势,尤其适合于中药注射剂的质量监测。

由于双黄连冻干粉针不良反应的报道以过敏与类过敏反应为主,据此 Ren 等^[21]采用 xCELLigence 实时细胞分析系统检测了肥大细胞在药物作用下的脱颗粒等生理/病理变化,得到相应的细胞响应谱,建立了双黄连冻干粉针的质量一致性检测方法。此外,依据各药物的主要功效或不良反应的生物学机制,以各样品对模式生物作用的热活性指标提取生物热动力学参数,建立了双黄连冻干粉针、清开灵注射液、复方茵陈注射液、注射用益气复脉冻干粉等系列中药注射剂的热活性指纹图谱。所建立的方法不仅能对不同处理样品及污染样品进行有效区分,更能定性定量、实时在线刻画中药注射液合格样品/特殊样品的质量信息,在一定程度上弥补了化学分析检测的不足,为中药注射剂质量波动的早期快速筛查及不良反应预警方法探索具有一定借鉴意义^[6,21]。

4 展望

Q-biomarker 在 Q-marker 理论框架下应运而生。Q-biomarker 与中药临床功效关联紧密,可对药物的安全性及稳定性做出有效评价,可用于中药的质量控制与评价,且特别适合于化学成分及药效作用机制不清楚、缺乏定量评价指标的中药。目前基于生物标志物的中药质量生物评价研究尚处于萌芽阶段,其具体的研究方法有待进一步完善。近年来随着组学技术的不断发展,生物标志物研究得到了极大地推动,可供选择的研究途径包括循证医学/药理学、临床代谢组学、网络药(毒)理学、定量蛋白组学、人源化动物模型、人源化细胞模型等,为基于生物标志物的中药质量生物评价研究奠定了良好的条件,相信生物标志物将很快走进中药质量控制与评价的研究中。

参考文献

- [1] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] US Food and Drug Administration. Botanical Drug Development Guidance for Industry [EB/OL]. [2017-03-01]. [http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance compliance regulatory information/guidances/ucm458484.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance%20compliance%20regulatory%20information/guidances/ucm458484.pdf).
- [4] 闫广利,孙 晖,张爱华,等. 基于中医方证代谢组学的中药质量标志物发现研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3729-3734.
- [5] 熊 吟,肖小河,鄢 丹,等. 综合量化集成的中药品质评控策略: 中药效应成分指数 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 1-7.
- [6] 肖小河,王伽伯,刘昌孝. 中药质量生物评价 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [7] Zhang T, Bai G, Han Y, et al. The method of quality marker research and quality evaluation of traditional Chinese medicine based on drug properties and effect characteristics [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 204-211.
- [8] 李寒冰,鄢 丹,王伽伯,等. 基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质的生物评价 [J]. 药学报, 2009, 44(2): 162-166.
- [9] 马丽娜,章从恩,鄢 丹,等. 超滤质谱技术筛选板蓝根中抗流感病毒的活性成分 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 812-816.
- [10] 王 玄,欧阳罗丹,代春美,等. 动物类中药质量控制的生物评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12): 2228-2235.
- [11] 沙孟晨,张海珠,何 琴,等. 基于微量热法的连花清瘟胶囊质量一致性评价方法的建立 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2202-2206.
- [12] 赵志浩,张定堃,吴明权,等. 基于大鼠室性早搏心脏毒性的附子质量生物评价方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3814-3820.
- [13] 赵小梅,刘歆颖,续 畅,等. 基于 LC-MS 代谢组学的雷公藤多苷致肝毒性生物标志物的初步筛查 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19): 3851-3858.
- [14] 赵庆国,王艳辉,马致洁,等. 基于肝细胞毒价检测的雷公藤质量评价方法研究 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 378-383.
- [15] 宋 婧,马致洁,王伽伯,等. 何首乌及其主要成分对正常人 L02 肝细胞损伤作用的研究 [J]. 北京中医药, 2016, 35(7): 694-697.
- [16] 刘振杰. 基于效应成分指数的丹参质量评价研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.

- [17] Liu Z J, Shi Z L, Tu C, *et al.* An activity-calibrated chemical standardization approach for quality evaluation of *Salvia miltiorrhiza* Bge. [J]. *RSC Adv*, 2017, 7(9): 5331-5339.
- [18] Xiong Y, Hu Y, Li F, *et al.* Promotion of quality standard of Chinese herbal medicine by the integrated and efficacy-oriented quality marker of effect-constituent index [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45: 26-35.
- [19] 张定堃. 中药质量整合评控模式和方法研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [20] Zhang D K, Li R S, Han X, *et al.* Toxic constituents index: A toxicity-calibrated quantitative evaluation approach for the precise toxicity prediction of the hypertoxic phytomedicine — Aconite [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 164-177.
- [21] Ren Y S, Yan D, Zhang P, *et al.* A strategy for quality fluctuation detection of a herbal injection based on combination of chemical fingerprinting and biological fingerprinting [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, doi: 10.1016/j.jpba.2011.05.006.