

中药成分在方剂中的作用及其研究思路

徐 强*

南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093

【摘要】 中药成分在方剂中的作用及成分间相互作用的研究, 目前尚缺少理想的研究方法。本文通过对传统名方四逆散的系统研究, 从整体到细胞和分子水平, 从全方到药对配伍, 从单体成分的配伍到成分的特异性剔除等多个角度叙述了四逆散的作用, 在此基础上提出并总结了一些研究思路, 包括方剂效应的多指标评价; 主要成分的含量、分工及与活性的关系; 药对配伍与成分配伍相结合, 成分配伍与剔除相结合等。特别是中药成分的特异性剔除系首次尝试, 我们成功地从四逆散中分别特异性地剔除了柴胡皂苷、芍药苷、柚皮苷和甘草酸, 通过观察剔除后活性的改变, 了解成分在方中承担的角色, 为配伍规律和成分间相互作用的研究打下基础, 对于其他中药和方剂研究亦具有指导意义。

【关键词】 四逆散; 药对; 成分特异性剔除; 成分相互作用

【中图分类号】 R289 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-3651(2006)05-0327-05

1 关于中药化学成分在方剂中作用的一些思考

中药方剂是中医辨证论治、理法方药的重要手段之一, 其君臣佐使配伍等独特规律及效用已为长年累月的临床实践所证实。多年来的研究已在一定程度上阐明了许多方剂作用的机理和物质基础, 这些物质基础包括黄酮类、皂苷类、生物碱类、萜类、内酯类等成分, 不仅赋予了中药方剂作用的科学性, 而且已成为新型中药新药研究的主要参考依据之一。如将某些成分作为新药的指标成分或有效成分用于质量监测, 在五类中药新药中, 更直接以某一类或几类成分作为有效部位, 这些标准的建立通常有赖于中药化学和分析方法手段的建立与成熟。在活性评价方面, 通常采用拆方、单方及提取分离化学成分直接进行, 但对于方剂中某一成分在全方作用中的地位及其与其他成分的相互作用, 如协同、拮抗等, 尚缺少理想的手段。众所周知, 中药方剂是一个十分庞大的化学成分大复方, 除前述的各类化学物质外, 还包括一

些通常被认为是无效或未被认定为有效的物质成分, 如鞣质、黏液、色素、无机离子等。如何评价成分是否具有活性, 除了直接获取成分进行试验外, 似乎没有更好的办法。其中一些成分的分离纯化和活性证明均十分困难, 即使是常见的成分也受到含量多少、分离纯化方法等因素的制约。因此, 要阐明所有成分的活性似乎是不可能的, 更何况成分之间本应该存在各种相互作用, 后者正是中药方剂整合作用的根本。鉴于中药方剂整合调节的作用特点, 我们认为, 方剂的研究应兼顾物质基础的阐明及物质基础间的相互作用。前者比较容易进行且已取得很大的进展, 后者的证明则十分困难。这不仅因为物质基础众多, 还由于对主要物质基础与次要物质基础甚至无关物质基础的界定十分困难, 而物质基础间的相互作用则使情况更加复杂。

因此, 目前对于中药成分在方剂中的作用尚缺少理想的评价方法, 虽有拆方的方法, 但无拆成分的方法; 虽有使用成分进行直接评价活性的方法, 但欠缺成分与全方整合作用关系的评价方法。这些欠缺在一定程度上制约了对中药方剂的深入评价。基于这些考虑, 我们数年来作了一些探索, 取得了一些经验, 可为方剂中成分间的相互作用提供参考。下面以疏肝解郁的基本方四逆散的研究为例, 浅谈一些思路。

【收稿日期】 2006-09-04

【基金项目】 国家自然科学基金及其重大研究计划 (No. 39970887; No. 90209040; No. 30472174) 以及江苏省博士后科研资助计划 B 类资助

【*通讯作者】 徐强: 教授, 博导, 长江学者, Tel(Fax): 025-83597620, E-mail: molpham@163.com

复方的多成分、多作用环节和多靶点等特点已为人们所接受, 这些成分是如何作用的? 有无主次之分? 互相之间有无影响? 等等, 这些问题是阐明方剂作用的重要组成部分。我们从整体作用到细胞和分子水平的活性, 从全方的作用到药对、从单体成分的配伍到成分的特异性剔除等多个角度探讨了四逆散的作用。

以肝炎为例, 肝内免疫反应已被公认为造成肝损伤的重要机制之一, 对于肝炎的治疗来说, 不仅需要抗病毒药, 还需要保肝药物以及能抑制肝内免疫应答的药物。这说明复杂的病情要求有多种治疗方案, 从研究角度, 就需要有多种的评价体系相对应。我们发现, 四逆散对四氯化碳、卡介苗加脂多糖以及三硝基氯苯导致迟发型变态反应(PCI-DTH)等不同机理所致的肝损伤均有显著的改善作用, 其中 PCI-DTH 肝损伤系我们研究室首创, 通过对该模型的研究及比较四逆散对其他模型的作用, 我们认为, 肝炎中肝细胞的损伤至少包括效应细胞/分子和靶肝细胞两方面的因素, 药物改善肝损伤既可通过被动地保护肝细胞来实现, 也可通过主动地消除引起肝细胞损伤的因素, 包括消除肝浸润淋巴细胞的功能等。四逆散改善肝损伤的作用机理正是包含了保护肝细胞膜和抑制肝浸润淋巴细胞两个方面。这种集被动和主动效应于一体的活性使四逆散对于肝损伤的综合疗效得以发挥, 亦提示方剂研究应根据疾病的性质而选择相应的复数评价指标, 甚至建立新的评价体系。在这些作用中, 四逆散全方用药作用明显优于各单味中药; 各单味药中, 肝细胞膜保护作用以柴胡较强, 甘草次之, 白芍与枳实较弱; 对免疫细胞功能的影响以白芍较强, 甘草次之, 柴胡与枳实较弱。提示方中各组成中药分别作用于肝损伤过程的不同环节, 全方作用优于各单味中药系其对疾病过程中不同靶点综合效应的结果。

四逆散的其他药效学试验(如对接触性皮炎的抑制作用)及其机理亦体现出类似的特点, 即不同成分具有不同的作用, 因篇幅所限, 这里不作详细阐述。这些结果表明, 方剂中的不同药物具有不同的功能, 绝非某些单一指标所能囊括, 需要多指标的评价体系。这些功能的主要承担者显然与其所含化学成分有关, 如何进一步探讨众多成分

的作用应是方剂研究的重点之一。

3 四逆散主要成分的含量、药理活性及主要分工

为探讨四逆散中成分在其中的作用, 我们选择四逆散 4 个组成中药的 4 个代表性成分柴胡皂苷 a、芍药苷、柚皮苷、甘草酸, 分别探讨了这些成分的效应, 并检测了其在四逆散中的含量, 分别为四逆散水提取物重量的 1.2%、1.4%、7.9% 和 2.1%。柴胡皂苷 a、柚皮苷、甘草酸均可显著抑制耳肿胀, 其中以柴胡皂苷 a 的作用最强, 甘草酸次之, 而芍药苷基本无影响。从抑制耳肿胀程度来看, 各单体成分的作用弱于全方。四逆散及各主要单体成分对 Con A 所致脾淋巴细胞增殖有明显的抑制作用, 其中以柴胡皂苷 a 和甘草酸作用较显著, 芍药苷次之, 柚皮苷无明显影响。对于接触性皮炎模型的活化 T 淋巴细胞, 四逆散、柴胡皂苷 a、芍药苷、甘草酸均能显著抑制其移动能力及 MMP-2 和 MMP-9 的分泌; 四逆散、柴胡皂苷 a 还能显著抑制其粘附能力, 芍药苷、甘草酸仅有抑制的趋势, 而柚皮苷则无明显影响。这些结果提示, 对于上述 T 淋巴细胞活化过程的各个指标, 柴胡皂苷 a 作为君药柴胡的主要成分作用最为显著, 芍药苷次之。

上述 4 个成分分别在不同的指标上显示了它们的活性, 一方面证实了它们本身的作用, 另一方面也说明这些成分在一定程度上分别代表了柴胡、芍药、枳实、甘草的某些作用甚至是主要作用, 可以说它们是这些药物的主要效应成分。然而, 我们在研究中也发现了这样一个问题, 四逆散中的柴胡皂苷 a 与柴胡皂苷 a 单独使用时对淋巴细胞粘附作用及增殖反应的半数抑制浓度(IC_{50}) 存在较大的差异, 即柴胡皂苷 a 单独使用要达到与所含同等量柴胡皂苷 a 的四逆散同样的抑制效果, 其浓度要大得多, 这表明四逆散中的其它成分协同了柴胡皂苷作用的发挥。这一现象的发现对于阐明方剂的作用十分重要, 提示方剂中成分间存在着相互作用, 这种作用既有协同的, 也有拮抗的, 既有通常认为的有效成分间的作用, 也存在有效成分与“无效”成分间的相互作用。这些现象也迫使我们不得不考虑这样的问题: 除现有的拆方、分离有效成分等的研究模式外, 方剂研究还应该采用什么样的方法研究成分的作用? 能否进行拆

成分的研究?为探讨这些相互作用,我们还是先从配伍出发。

4 四逆散的药对配伍、成分配伍与全方效应

我们以三硝基氯苯导致小鼠接触性皮炎模型(PCI-CS)探讨了四逆散对细胞免疫反应不同阶段的影响,并从四逆散所含的药对出发,研究了方中的药对配伍。根据方剂配伍理论,四逆散中至少包含了三个以上配伍特色明显的药对:柴胡-芍药(一散一收)、柴胡-枳实(一升一降)、芍药-甘草(经典镇痛方)。鉴于药对是最小、最简单的复方,一个药对也可存在于多个复方当中,了解它们的作用规律,不仅可以揭示方剂作用的特点及其配伍的科学内涵,而且可为重组复方提供科学依据。与此同时,药对配伍又是探讨方剂中各药味相互作用的重要途径。我们发现,于诱导相给药时,柴胡-芍药、芍药-甘草、四逆散可显著减轻耳肿胀,柴胡-枳实仅有抑制的趋势;体外可抑制 Con A 刺激的 T 淋巴细胞增殖及混合淋巴细胞增殖,减少 IL-2 的产生。这些效应中,以四逆散和柴胡-芍药的作用较强,芍药-甘草次之,柴胡-枳实则无影响;于诱导相给药可显著降低 TNF- α 和 NO 的水平,以四逆散和柴胡-芍药作用最为显著;四逆散、柴胡-芍药还可显著抑制活化的 T 细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9,柴胡-枳实、芍药-甘草无显著影响;对于活化 T 淋巴细胞粘附能力的抑制作用,亦以柴胡-芍药和四逆散的作用较强,柴胡-枳实次之,芍药-甘草较弱。

以上结果表明,对于上述 T 淋巴细胞活化过程的各个指标,各药对的作用表现不一,主要以君臣配伍的柴胡-芍药的作用最为显著,甘草有一定协同作用。这在一定程度上阐明了四逆散疏肝解郁、治疗炎症性疾病的作用机理,更为重要的是,通过药对活性的比较,证实了四逆散组方的合理性,尤其是君臣两药柴胡-芍药的配伍在大多数药效中的作用均较强,这为其配伍规律研究打下了基础。

接着,我们考察了四逆散中主要活性成分的配伍。四逆散各单味药的化学成分及主要有效成分的研究相对明确,为探讨全方物质基础及其相互变化的规律提供了宝贵的信息。根据上述的 4 个代表性成分柴胡皂苷 a、芍药苷、柚皮苷、甘草酸药理研究结果,同时根据 HPLC 测得它们在四逆散

中的含量,按它们在方中所占含量两两配伍,于诱导相联合给药,发现柴胡皂苷 a-芍药苷、柴胡皂苷 a-柚皮苷、芍药苷-甘草酸均可显著减轻小鼠耳肿胀,抑制 picryl chloride 体内活化的 T 淋巴细胞的移动能力,并呈现出明显的药效协同作用,以柴胡皂苷 a-芍药苷配伍协同作用最为显著。进一步将 4 个单体成分按方中比例同时联合给药,发现协同作用更为显著。那么,这一协同作用又是如何实现的呢?是否与这些主要活性成分在体内的相互作用有关?

5 特定成分的剔除及其作用环节

中药及其方剂中活性成分的研究,通常需要分离有效成分或有效部位,其中对于活性成分的认定都是基于单体化合物的药理学研究,这一做法的最大好处是直接反映了该化合物所具有的各种药理活性,易于重复且比起粗制剂容易做出量效关系,因此一直作为中药及方剂物质基础研究的重要内容之一受到重视。但是这种研究模式同样存在着缺陷,比如它不能确切反映该成分在全方背景下的实际作用,更不能了解其在方中与其他成分的相互作用及其结果。在这样的背景下,我们思考能不能建立一种探讨某一成分或某些成分在方剂中作用的新方法?受基因剔除和基因沉默等技术的启发,我们考虑将某一成分从方剂中特异性地除去,而保留其他所有成分(包括通常认为是有效的和无效的成分)不变。先从甘草酸出发,尝试制作了针对甘草酸的免疫亲和柱,从而将甘草酸从四逆散全方中选择性地剔除,来反向研究甘草酸在四逆散全方抑制迟发型免疫反应中的地位和作用,以期为将来更深入的方剂研究打下基础。

我们首先制作了抗甘草酸的多克隆抗体,将甘草酸与 BSA 偶联,合成完全抗原,紫外分光光度法证实该人工抗原同时具有载体蛋白和甘草酸的特征吸收峰。经 SDS-PAGE 法鉴定,证实载体蛋白上已连接有一定数目的甘草酸分子,再根据紫外光谱法和考马斯亮蓝法计算抗原中甘草酸与 BSA 的连接数目。用该抗原免疫新西兰兔后得到抗血清,为 Ig G 组分,抗体的效价达 1:30 000。

得到抗甘草酸的抗体后,我们应用其剔除中药中的甘草酸,这是基于抗原-抗体反应的特异性,基于此原理产生的免疫亲和色谱柱既能应用于物

质分离亦能应用于成分分析。对于中药成分的单克隆或多克隆抗体,已有一些实验室制作,以ELISA用于检测中药或方剂中成分的定性定量评价,这对于中药的品种鉴定及质量检测具有重要意义,但将中药成分的特异性抗体用于剔除中药或方剂中的特定成分,从而反向探讨该成分的作用,则系本课题组首次进行。本研究中,我们将纯化抗体与 Sepharose 4B 凝胶偶联,制备抗甘草酸的免疫亲和柱,然后加四逆散提取物过柱,获得的样品中甘草酸含量显著下降,下降率达 95.5%,表明甘草酸已从四逆散全方中选择性地剔除。

接下来我们考察了剔除甘草酸后的四逆散样品对接触性皮炎小鼠脾细胞粘附 IV 型胶原的影响,四逆散和甘草酸均具有显著的抑制作用,而四逆散剔除甘草酸后的样品仅显示出轻微的抑制作用。换言之,甘草酸的剔除降低了四逆散对淋巴细胞粘附的抑制作用,表明甘草酸在四逆散抑制淋巴细胞粘附过程中起着主要作用。此外,剔除甘草酸亦可显著阻断四逆散对抗原致敏小鼠脾淋巴细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 的抑制作用。

除甘草酸外,四逆散中还包括一些其他的活性成分。例如,柴胡中的柴胡皂苷具有抗炎、抗变态反应、影响 T 细胞功能、保肝、抗病毒、抗肿瘤等作用;白芍中芍药苷可调节免疫、镇痛及保肝;枳实中柚皮苷具有抗氧化作用等。如前所述,四逆散的治疗效果体现了许多化学成分的整合效应,尝试从中药方剂中选择性地剔除一个或多个化学成分,将有助于阐明中药方剂的作用机理。我们还用同样方法制作了剔除柴胡皂苷、柚皮苷和芍药苷后的四逆散样品,这些抗体均具有很高的特异性。如抗柚皮苷抗体与芍药苷、柴胡皂苷 a 和甘草酸的交叉反应率均 < 1%,与橙皮苷的交叉反应率 < 2%,成功剔除柚皮苷后的四逆散样品中,未观察到其他峰的明显变化,可以认为免疫亲和柱对柚皮苷的剔除是特异性的,对柚皮苷以外的其他成分基本无影响。

通过这样的方法探讨某个成分被特异性剔除后的效应变化,反过来推测该成分在方中的作用,我们在针对芍药苷的研究中则遇到了挑战,进一步揭示了这种反向研究方式的必要性:在一些指标的检测中,芍药苷的剔除并不影响四逆散的作用,而芍药苷本身单独使用则有这些作用,提示芍药苷并非这些作用的主要担当成分,经过多次探

索,发现芍药苷的剔除在其他一些指标方面使四逆散的作用大大减弱,很显然,芍药苷后者的作用对于四逆散作用的贡献更大,这个认识用以往的方法是很难获取的。这一实践进一步证实了中药方剂成分的多靶点和多环节,为阐明成分在方剂中实际作用的研究提供了新的方法。同时,这种免疫亲和层析特异性地剔除中药中特定成分的方法,对于其他中药或方剂物质基础和作用机理的探讨,亦具有指导意义。

6 小 结

通过四逆散的研究,我们可以发现,中药方剂的作用十分广泛,对于这种广泛作用的解释必须要有多指标的评价体系。与此同时,方剂中的药味在作用上有主次之分,这种主次在不同指标上有所不同,取决于该指标在方剂整体作用中的地位,由此提出中药成分的作用及其在全方作用中的地位问题,因为中药化学成分中许多是具有功能的,这种功能应该放到全方整体作用中考虑。基于这种观点,我们一方面探讨药味配伍与成分配伍的作用,以探讨成分间的相互作用,另一方面提出新的研究思路,将成分的活性研究采用反向思维方式进一步拓展,即在中药方剂中缺损某一或某些特定成分,观察其活性的改变,从而确定该成分在方中承担什么角色,具有什么功能,与其他成分的相关关系等。这一做法不仅可进一步确证该成分的作用,同时由于某一或某些成分的剔除而方剂整个作用环境变化不大,对于探讨该成分在方中的作用显然比单独使用该成分更接近实际情况。这是因为直接使用该成分的研究虽能直接验证成分的作用,但不能代表其在某些指标上的“无效”就在全方中未行使功能,芍药苷就是一个很好的例子。因此,成分的特异性剔除这一崭新研究思维是中药方剂研究中的重要创新和补充,尤其是将成分配伍与配伍剔除相结合的做法,可为方剂研究提供新的途径。

致 谢:参加四逆散的主要研究人员包括:陈婷、孙洋、张莉、董懿、蒋洁云、陈亮、周春祥、洪敏等。

参 考 文 献

- [1] Jiang JY, Zhou CX and Xu Q. Alleviating effects of Si-Ni-San, a traditional Chinese prescription, on experimental liver injury and its mechanisms[J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(8): 1089-1094

- [2] 周春祥(Zhou CX), 徐 强(Xu Q), 曹劲松(Cao JS), 等. 四逆散改善细胞免疫性肝损伤作用机理研究[J]. 中国中医基础医学杂志(*China J Basic Med Tradit Chin Med*), 2002, **8**(5): 367-369.
- [3] 孙 洋(Sun Y), 徐 强(Xu Q). 四逆散药对及全方对 Con A 活化的小鼠脾细胞移动和粘附能力的影响[J]. 中国天然药物(*Chin J Nat Med*), 2003, **1**(2): 103-106
- [4] Sun Y, Chen T, Xu Q. Si-Ni-San, a traditional Chinese prescription, and its drug-pairs suppress contact dermatitis in mice via inhibiting activities of metalloproteinases and adhesion of T lymphocytes[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, **55**: 839-846.
- [5] 陈 婷(Chen T), 尹利华(Yin LH), 刘吉华(Liu JH) 等. 四逆散体内过程研究 I: 人工胃液对四逆散组成成分的影响[J]. 亚洲医药(*Asiamed Mag*), 2001, **6**(5): 141-144
- [6] 蒋洁云(Jiang JY), 徐 强(Xu Q). 四逆散及其各组成中药对实验性肝损伤的影响[J]. 中国天然药物(*Chin J Nat Med*), 2004, **2**(1): 45-49.
- [7] Zhang L, Sun Y, Chen T, *et al.* Selective depletion of glycyrrhizin from Si-Ni-San, a traditional Chinese prescription, blocks its effect on contact sensitivity in mice and recovers adhesion and metalloproteinases production of T lymphocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, **5**: 1193-1204.
- [8] Zhang L, Dong Y, Sun Y, *et al.* Role of four major components in Si-Ni-San, a traditional Chinese prescription, against contact sensitivity in mice[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, **58**: in press.
- [9] 陈 亮(Chen L), 陈 婷(Chen T), 徐 强(Xu Q). 免疫亲和色谱特异性剔除中药方剂四逆散中的柚皮苷[J]. 色谱(*Chin J Chromatogr*), 2006; **24**(3): 243-246

Role of Chemical Components in Traditional Chinese Prescription and New Approach to the Research

XU Qiang*

State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093

【ABSTRACT】 There is a lack of an ideal method to study how chemical components play their role in a traditional Chinese prescription and how the components interact each other. This paper summarizes the activities of Si-Ni-San, a famous traditional Chinese prescription, from various aspects such as those in vivo and in vitro, by whole prescription or by drug-pairs, by component combination or by selective depletion of component, etc. Then we suggest some approaches to the research of Chinese prescriptions from the data on Si-Ni-San. For example, the multi-assay may be required for evaluating the activity of prescription and the role of main components contained. The research materials may include whole prescription, drug-pairs, components and their combinations, and component-depleted prescription. Particularly the specific depletion of a component from a prescription was the first attempt, where we have successfully depleted the saikosaponin, paeniflavin, naringin and glycyrrhizin, respectively from Si-Ni-San. By examining the change in activity after depletion, the role of the components could be explained in whole prescription. This attempt will be helpful for the research on the drug combination theory and the interaction between components in traditional Chinese prescription.

【KEY WORDS】 Si-Ni-San; Drug-pair; Specific depletion of component; Interaction between components

【Foundation Item】 This project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39970887; No. 90209040; No. 30472174); the Postdoctoral Foundation B of Jiangsu Province.