

## 小续命汤有效成分组的高通量筛选研究

王月华<sup>1</sup>, 张海霞<sup>1</sup>, 李 奇<sup>2</sup>, 丁 怡<sup>3</sup>, 胡娟娟<sup>1</sup>, 杜冠华<sup>1</sup>

(1. 中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所筛选室, 北京 100050; 2. 北京林业大学生物系, 北京 100083; 3. 清华大学药学院, 北京 100084)

[摘要] 目的:应用高通量筛选技术,建立新型的中药复方活性成分和作用机制研究模式,探讨中药复方小续命汤发挥药理作用的物质基础。方法:观察中药复方小续命汤 240 个连续组分的抗氧化、抗过氧化氢损伤、抗谷氨酸损伤活性以及对神经细胞内钙离子的影响。结果:中药复方小续命汤多模型筛选结果显示,连续组分 L1~L40 和 A100~A120 的综合作用效果较好。因此,可将这两部分的连续组分重新组合,作为小续命汤抗脑缺血损伤的有效成分组。结论:中药复方小续命汤可通过多组分、多靶点途径发挥其药理作用。

[关键词] 高通量筛选; 小命汤; 脑缺血

[中图分类号] R285; R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2006)01-0064-04

## High-throughput screening assay for groups of effective components extracted from Xiaoxuming Recipe

Yue-Hua WANG<sup>1</sup>, Hai-Xia ZHANG<sup>1</sup>, Qi LI<sup>2</sup>, Yi DING<sup>3</sup>, Juan-Juan HU<sup>1</sup>, Guan-Hua DU<sup>1</sup>

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Department of Biology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Department of Pharmacy, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**ABSTRACT** Objective: To present a new approach for the research of effective components extracted from compounds of traditional Chinese medicine and their action mechanisms by high-throughput screening assay. Methods: We observed the anti-oxidation activities of 240 sequential components (L1-L120 and A1-A120) extracted from Xiaoxuming Recipe, the effects of these components on SH-SY5Y cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced and L-glutamic acid-induced damages and the levels of resting calcium ion in neurocytes of rats. Results: Some components (L1-L40, A100-A120) extracted from Xiaoxuming Recipe had the corresponding effects listed above. The combination of these components was regarded as the groups of effective components of Xiaoxuming Recipe in treating sequelae resulting from brain ischemia. Conclusion: Xiaoxuming Recipe has protective effect on brain-ischemia-induced damages through the actions of multiple components with multiple targets.

**KEY WORDS** high-throughput screening; Xiaoxuming Decoction; brain ischemia

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao/ J Chin Integr Med, 2006, 4(1):64-67 www.jcimjournal.com

高通量筛选 (high-throughput screening, HTS) 是 20 世纪后期发展起来的新技术。HTS 改变了传统的新药筛选过程, 采用体外方法寻找对特定靶点具有生物活性的化合物, 它以高效、快速、大规模为主要特点。由于中药复方成分复杂, 具有多

途径、多靶点发挥药物作用的特点, 因此必须将其作为一个有机整体进行研究, 采用多种活性筛选指标进行综合评估, 否则很难综合反映中药复方的药效。应用高通量药物筛选技术研究中药复方, 可以克服传统复方研究中的主要技术障碍, 使中药复方研究

实现自动化和规模化<sup>[1,2]</sup>。

中药复方“小续命汤”首载于唐代孙思邈《千金要方》，是中医常用治疗中风的有效方剂<sup>[3-8]</sup>，由 12 味中药组成：麻黄 3 g、桂枝 3 g、川芎 3 g、红参 3 g、甘草 3 g、附子 3 g、芍药 9 g、杏仁 9 g、生姜 9 g、黄芩 6 g、防己 6 g、防风 6 g。为了获得复方中的全部成分，在样品制备过程中采用了分步提取的方法，分别获得石油醚提取物、乙醇提取物和水提取物。经分析和初步检测证明，水提取物中主要为多糖、淀粉等物质，未发现明显的活性成分。因此，研究目标主要集中于石油醚提取物和乙醇提取物。将上述提取物通过柱层析的方法进行分离，共获得 240 份连续组分样品(L1 ~ L120、A1 ~ A120)，供体外高通量药物筛选使用。

近年来的研究表明，脑卒中发作时，继发性引起的氧自由基增加，是造成神经元损伤的重要因素。同时，脑内兴奋性氨基酸如谷氨酸的释放大量增加，而产生神经毒性作用<sup>[9]</sup>。兴奋性氨基酸激活其受体，引起受体门控通道的离子通道开放，细胞内游离钙大量增加，造成迟发性神经元死亡<sup>[10]</sup>。基于脑卒中的发病机制，我们建立了相关的药物筛选模型，如氧化、过氧化氢损伤、谷氨酸损伤以及神经细胞内静息钙离子浓度的测定模型等。

中药复方的有效成分组是指中药复方中所有与该复方临床应用目的密切相关的药理活性成分。本实验室对中药复方有效成分组进行了尝试性的研究，根据复方适应症——脑缺血的发病机制建立了相关体外筛选模型；采用高通量药物筛选技术对连续样品进行多靶点筛选；通过综合分析多模型筛选结果，找出共同的高活性组分，重新组合得到中药复方“小续命汤”抗脑卒中的有效成分组；最后在脑卒中动物模型上进一步评价有效成分组的药效。

## 1 材料与方方法

1.1 实验材料 (1)SH-SY5Y 细胞，中国医学科学院中国协和医科大学基础研究所提供；(2)溴化二甲噻唑二苯四氮唑 [3-(4, 5) dimethylthiazol-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、胰蛋白酶、多聚赖氨酸和 Fura-2/AM 均为 Sigma 公司产品；(3)标准胎牛血清为 HyClone 公司产品；(4)1640 培养基为 Gibco 公司产品；(5) L-谷氨酸、过氧化氢、核黄素、四氮唑蓝 (nitroblue tetrazolium, NBT)，均为北京化学试剂公司产品；(6)Bechman 2000 测定仪。

## 1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 取 10 剂“小续命汤”药材(购自北京同仁堂药店)，依次用石油醚、95% 乙醇和水分别提取 3 遍，得到低极性成分、中极性成分和高极性成分 3 部分。将低极性和中极性成分经高效液相色谱

分离。低极性部分流动相为石油醚 丙酮(8 2, v v)，中极性部分流动相为氯仿 甲醇 水(9 1 0.1)。室温条件下梯度洗脱，1 ml min 等时连续收集样品，供筛选使用。

1.2.2 中药复方连续组分抗氧化作用 将含有核黄素、蛋氨酸和 NBT 的反应混合物进行光照，核黄素通过氧这一间接途径，将电子传递给 NBT，从而发生光还原反应，导致 formazan 的线性累积。该产物在 560 nm 处有吸收峰，可以测知药物的抗氧化活性<sup>[11]</sup>。取样品按 20 μl 孔加至 96 孔板中，加入 Met-NBT 反应混合液 160 μl 孔，再加入核黄素 20 μl 孔，自然光照射 40 min 后测定吸光度值。

1.2.3 中药复方连续组分对过氧化氢损伤的影响 SH-SY5Y 细胞用 0.125% 胰酶消化后，按  $1 \times 10^5$  个/ml 种植到 96 孔板上，铺成单层后，吸除原培养基，分别加入终浓度为 100 μg/ml 的中药复方 240 个连续组分，1 h 后加入 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μl，24 h 后进行细胞活力测定<sup>[12]</sup>。细胞处理后，弃去培养液，每孔加入 100 μl 终浓度为 0.5 mg/ml 的 MTT，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 继续培养 4 h，弃去上清，每孔加入 100 μl 二甲基亚砷，振荡后于 540 nm 处测定吸光度值。不加样品和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为正常对照组，只加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 而不加样品为损伤模型组。样品组与损伤模型组的吸光度值与正常对照组吸光度值的比值为细胞存活率，样品组细胞存活率减去损伤模型组细胞存活率后得到的数值，表明了样品对损伤的保护作用，数值越大则保护作用越强。

1.2.4 中药复方连续组分对 L-谷氨酸损伤的作用<sup>[13]</sup> SH-SY5Y 细胞用 0.125% 胰酶消化后，按  $1 \times 10^5$  个/ml 种植到 96 孔板上，铺成单层后，吸除原培养基，分别加入终浓度为 100 μg/ml 的中药复方 240 个连续组分，1 h 后加入 10 mmol/L 的 L-谷氨酸 10 μl，作用 24 h 后进行细胞活力测定。不加样品和 L-谷氨酸为正常对照组，只加 L-谷氨酸而不加样品为损伤模型组。样品组与损伤模型组的吸光度值与正常对照组吸光度值的比值为细胞存活率，样品组细胞存活率减去损伤模型组细胞存活率后得到的数值，表明了样品对损伤的保护作用，数值越大则保护作用越强。

1.2.5 大鼠神经细胞内静息钙离子浓度的测定 取新生 1~2 d 的 Wistar 大鼠全脑<sup>[14,15]</sup>，用 0.125% 胰酶于 37 °C 消化后，过 200 目筛网，离心收集细胞，用含 10% 小牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基调至一定浓度。随后以台盼蓝拒染法计算细胞成活率(细胞成活率 > 95%)。神经细胞与 100 μl 终浓度为 5 μmol/L 的 Fura-2/AM 于 37 °C 恒温孵育 35 min。负载结束后，洗去多余荧光染料，调节细胞浓度为  $2 \times 10^6$  个/ml。在荧光测定配套 96 孔板中

每孔加入样品 10  $\mu$ l、细胞悬液 90  $\mu$ l。激发波长 380 nm、340 nm, 发射波长 510 nm 处测定荧光强度。加入 Triton X-100 破碎细胞膜, 震荡混匀后测定的荧光值为  $Ca^{2+}$  饱和时的荧光值, 计为  $R_{max}$ ; 加入乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙酸络合细胞内钙, 震荡混匀后测定的荧光值为零  $Ca^{2+}$  时的荧光值, 计为  $R_{min}$ 。按下式计算  $Ca^{2+}$  浓度:  $[Ca^{2+}] = KDa \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times (Ff2 / Fb2)$ 。其中  $KDa$  是 Fura-2 与  $Ca^{2+}$  的解离常数, 为 224 nmol/L;  $R = F_{340} / F_{380}$  ( $F_{340}$  为 340 nm 处的荧光值,  $F_{380}$  为 380 nm 处的荧光值);  $Ff2$ 、 $Fb2$  分别是零  $Ca^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  饱和时 380 nm 处的荧光值。

## 2 结果

2.1 中药复方小续命汤连续组分抗氧化活性 小续命汤脂溶成分中, 有些组分的抗氧化活性大于 50%, 而且多集中于 L1 ~ L70 部分; 醇溶成分中有些组分的抗氧化活性大于 50%, 多分布在 A100 ~ A120 部分。见图 1。

2.2 中药复方小续命汤连续组分对  $H_2O_2$  损伤的作用 部分组分对过氧化氢损伤有较好的保护作用(如 L1 ~ L65、L110 ~ A60); 有些组分则不具备保护作用(如 L70 ~ L110); 有些甚至具有相反的作用(如 A70-A110)。见图 2。

2.3 中药复方活性成分对 L-谷氨酸损伤的作用 连续组分中含有多个组分(如 L1 ~ L40、A10 ~ A60、A90 ~ A120), 对 L-谷氨酸损伤有较好的保护作用; 同时, 也有一些没有作用或少量呈相反作用的组分(如 L41 ~ L120)。见图 3。

2.4 中药复方小续命汤连续组分对神经细胞内静息  $Ca^{2+}$  的影响 静息期细胞内  $Ca^{2+}$  浓度一般在 200 nmol/L 左右。小续命汤的脂溶成分大多对神经细胞内静息  $Ca^{2+}$  浓度无影响; 而有些醇溶组分可使神经细胞内静息  $Ca^{2+}$  浓度升高, 幅度在 35% ~ 84%。见图 4。

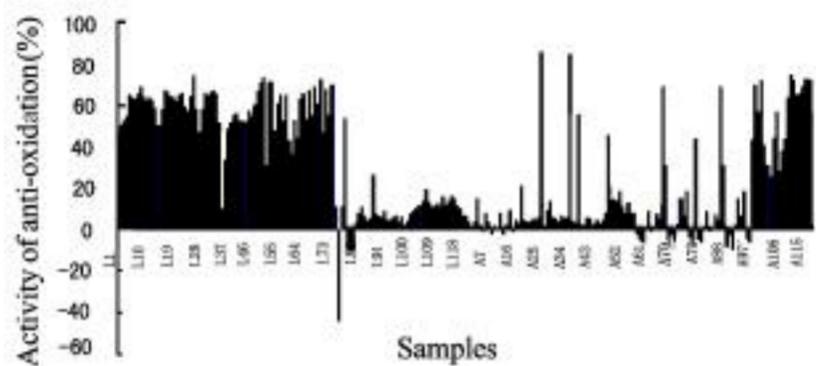


图 1 小续命汤 240 个连续组分抗氧化活性  
Fig 1 Anti-oxidation activities of 240 sequential components extracted from Xiaoxuming Recipe  
Values represent means of three independent experiments .

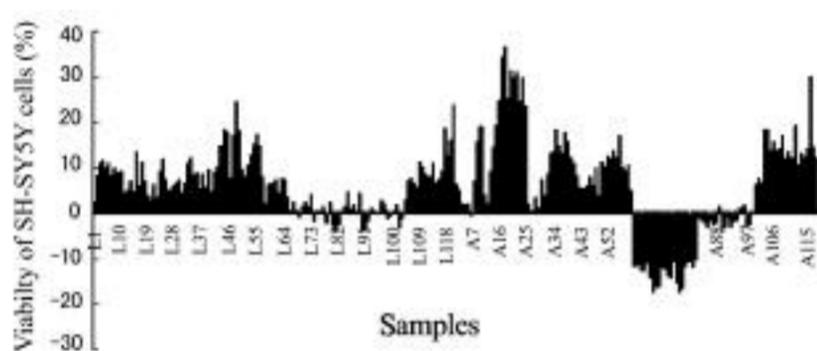


图 2 小续命汤 240 个连续组分对 SH-SY5Y 细胞过氧化氢损伤的作用  
Fig 2 Effects of 240 sequential components extracted from Xiaoxuming Recipe on viability of SH-SY5Y cells with  $H_2O_2$ -induced damage  
Values represent means of three independent experiments .

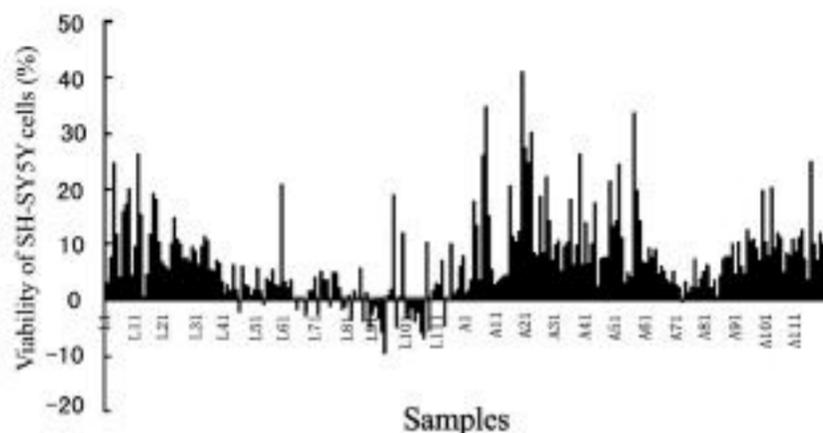


图 3 小续命汤 240 个连续组分对 SH-SY5Y 细胞 L-谷氨酸损伤的作用  
Fig 3 Effects of 240 sequential components extracted from Xiaoxuming Recipe on viability of SH-SY5Y cells with L-glutamic acid-induced damage  
Values represent means of three independent experiments .

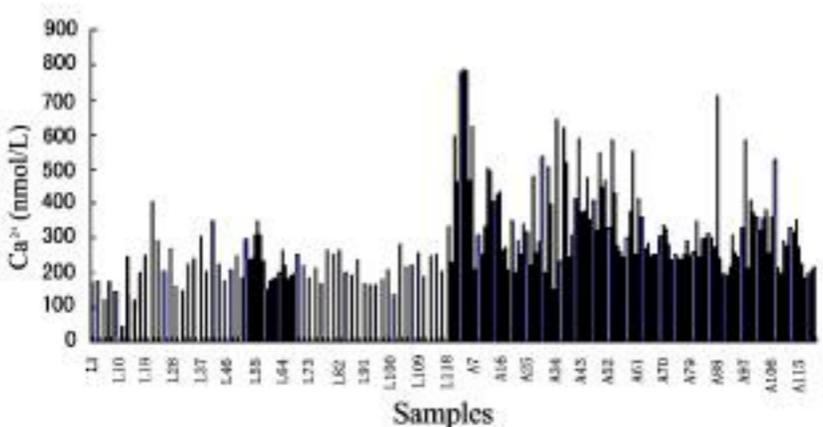


图 4 小续命汤 240 个连续组分对大鼠神经细胞内静息钙的影响  
Fig 4 Effects of 240 sequential components extracted from Xiaoxuming Recipe on levels of resting calcium ion in neurocytes of rats  
Values represent means of three independent experiments .

## 3 讨论

中药复方的有效成分组是指中药复方中含有的所有与该复方临床应用目的相关的药理活性成分<sup>[16]</sup>。在中药复方研究中引入有效成分组的概念, 有利于全面认识中药理论和中药复方多成分、多靶点作用的治疗模式, 摆脱目前简单化的中药复方研究方式, 使中药复方的研究更符合中药组方的理论。

同时,也可应用现代医学的理论解释复方的作用及其机制,以促进传统中药理论的发展。

自由基是机体内正常的代谢产物。当脑缺血时,细胞内钙离子浓度增加,激活了磷脂酶 A2 和核酸酶,使自由基生成增加而消除减慢。大量的自由基攻击膜结构和 DNA,使细胞和组织的结构和功能都遭到破坏。适度增高的细胞内钙可以启动钙依赖的细胞反应,提高神经传导性及神经突触的可塑性。一般来说,钙离子浓度升高一个数量级,即可导致生化反应的启动,而钙超载则导致细胞能量的耗竭。自由基释放增加,使脂质双层膜受到损伤,最终导致细胞的死亡。因此,适度增高的细胞内钙是细胞维持正常生理反应所必须的;而中度增高的细胞内钙启动机体的内在保护机制,可能是中药复方小续命汤发挥神经保护作用的机制。

实验表明,中药复方小续命汤 240 个连续组分分别在多个筛选模型上发挥作用,有些组分活性较高,有些组分活性较低甚至具有相反的作用。A70 ~ A100 在多种模型中表现相反或有害的作用,因此可以认为是复方中影响疗效或产生不良反应的组分;而其他组分则作用强弱各有不同,说明发挥作用的途径各有差异。其中连续组分 L1 ~ L40 和 A100 ~ A120 的综合活性较好,可把这部分重新组合为中药复方小续命汤抗脑卒中的有效成分组。将此有效成分组在动物模型上进行了评价,结果表明其疗效优于原方(结果见其他报道)。因此,由分析结果可得出以下结论:中药复方中含有大量的化合物,其中含有具有治疗作用的有效成分,但这些成分在药理作用方面既有交叉又有不同;同一成分可能发挥多方面的作用,而有些成分只发挥一方面的作用;在中药复方中还有一部分成分不仅没有治疗作用,甚至表现出相反的作用,可能是产生药物不良反应的主要原因之一。综合评价多个模型的筛选结果,找出综合活性较好的部分,对于提高治疗效果具有重要的意义。

中药复方的有效成分不单纯是每味中药有效成分的简单相加,因此不能孤立地去研究复方中的每味中药,而应从复方出发进行研究<sup>[17]</sup>。基于此理论,本实验的设计就是把复方作为一个整体进行研究。把中药复方整体分成许多组分,然后分别对这些组分进行研究,找出高活性组分,去除无效组分,去粗取精,逐步优化重组,从而形成精简的方剂。这种方法充分体现了中药复方对人体多途径、多靶点的整合调节作用,符合中药复方的作用特点<sup>[18]</sup>。

[参考文献]

1 杜冠华. 药物筛选技术与中药现代化. 世界科学技术-

中药现代化, 2000, 2(4): 47-52 .

2 杜冠华. 高通量药物筛选与中药现代化研究. 中成药, 1999, 21(5): 268-270 .

3 关建红, 王世民. 小续命汤降脂作用初探. 山西医药杂志, 1996, 25(4): 289-290 .

4 孙思贵. 小续命汤加味致血管神经性水肿一例. 山西中医, 1995, 11(2): 32 .

5 李奎喜, 李 峥, 王洲典. 小续命汤新用. 四川中医, 2001, 19(7): 78 .

6 赵昌蓝, 李培峰. 小续命汤临床应用举隅. 浙江中医杂志, 1992, 27(9): 420 .

7 关建红, 王世民, 杨文珍. 小续命汤对大鼠高血脂症的影响. 中药药理与临床, 1996, 2(3): 7, 13-14 .

8 陈立峰, 刘汉祥, 叶 美, 等. 续命汤颗粒剂治疗中风 31 例临床观察. 湖南中医杂志, 1997, 13(6): 5-6 .

9 Kimelberg HK, Nestor NB, Feustel PJ. Inhibition of release of taurine and excitatory amino acids in ischemia and neuroprotection. Neurochem Res, 2004, 29(1): 267-274 .

10 Feustel PJ, Jin Y, Kimelberg HK. Volume-regulated anion channels are the predominant contributors to release of excitatory amino acids in the ischemic cortical penumbra. Stroke, 2004, 35(5): 1164-1168 .

11 朱庆磊, 何爱霞, 吕欣然. 葛根素对氧自由基的清除和抗氧化损伤作用. 解放军药学学报, 2001, 17(1): 1-4 .

12 Saito T, Kijima H, Kiuchi Y, *et al*. Beta-amyloid induces caspase-dependent early neurotoxic change in PC12 cells: correlation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neurotoxicity. Neurosci Lett, 2001, 305(1): 61-64 .

13 Llado J, Haenggeli C, Maragakis NJ, *et al*. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. Mol Cell Neurosci, 2004, 27(3): 322-331 .

14 李 明, 王峻峰, 韩济生, 等. 应用 Fura-2/ AM 检测分离的神经细胞内游离钙及其变化. 药学学报, 1991, 26(12): 890-894 .

15 朱晓燕, 韩建军, 姜淑杰, 等. 用 Fura-2 测定单个巨噬细胞内游离钙的条件的优化. 第二军医大学学报, 2002, 23(3): 341-343 .

16 杜冠华. 中药复方有效成分组学研究. 中成药, 2002, 24(11): 878-880 .

17 张礼和. 我对中药复方有效成分研究的一些看法. 化学进展, 1999, 11(2): 186-188 .

18 丘瑞香, 孟 君. 中药复方物质基础研究的思考. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(5): 388-389 .