

药对配伍效应与功效物质现代研究方法与策略

唐于平^{1*}, 尚尔鑫², 陈艳琰¹, 乐世俊¹, 史旭芹², 董婷霞³, 詹华强³, 段金厥²

(1. 陕西中医药大学, 陕西省中医药管理局中药配伍重点研究室/秦药特色资源研究与开发国家重点实验室(培育)/陕西省中药基础与新药研究重点实验室/陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 西安 712046; 2. 南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210023; 3. 香港科技大学, 生命科学部暨中药研发中心, 中国 香港 999077)

摘要: 药对是历代中医药学家在长期遣方用药过程中积累起来的简约而精妙的经验总结, 其尽管只是两药相合, 却搭配巧妙、比例得当, 能很好地诠释中药“合群妙用”的特点; 药对是单味中药与若干方剂之间的桥梁, 是许多方剂隐含的规律性特征与辨证施治内涵体现。本研究团队长期以来围绕药物相互作用的复杂性与中药组成成分的多样性, 采用现代科学技术知识与方法开展了药对的系统研究, 形成了药对配伍效应与功效物质现代研究的一系列方法与策略, 本文通过重点阐述这些方法的原理与应用特点, 为阐明药对配伍规律的科学内涵及优化组方的应用提供重要支撑, 也为其他药对的现代研究提供探索性思路与方法。

关键词: 药对; 配伍效应; 功效物质; 药物相互作用; 现代研究

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)09-1564-10

Modern research approaches and strategies for compatibility effects and efficacy components of herbal pairs

TANG Yu-ping^{1*}, SHANG Er-xin², CHEN Yan-yan¹, YUE Shi-jun¹, SHI Xu-qin²,
DONG T.X. Tina³, TSIM W.K. Karl³, DUAN Jin-ao²

(1. Key Laboratory of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine for TCM Compatibility, and State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), and Shaanxi Key Laboratory of Chinese Medicine Fundamentals and New Drugs Research, and Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine/Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Division of Life Science and Centre for Chinese Medicine, the Hongkong University of Science and Technology, Hongkong 999077, China)

Abstract: The herb pair is the simple and exquisite experience summary accumulated by generations of traditional Chinese medicine (TCM) experts in the process of long-term herbal prescription for curing diseases. Although it is only a combination of two herbs, it is cleverly matched and properly proportioned, which can well interpret TCM characteristics of "great combination and artful application". Moreover, the herb pair is an intermediate point between single herb and several TCM formulae, which implicates certain regularity and some connotation of many TCM formulae for diagnosis and treatment based on an overall analysis of the illness and the patient's condi-

收稿日期: 2019-05-28; 修回日期: 2019-06-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773882, 81573714, 81603257); 陕西省重点研发计划项目 (2019ZDLSF04-05, 2019SF-300); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-YL10).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-29-38184350, E-mail: yupingtang@sntcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0413

tion. Our team has long been focusing on the complexity of drug interactions and the diversity of TCM components to carry out systematic research on herb pair by using modern scientific and technological knowledge and approaches. As results, a series of modern research approaches and strategies formed for the compatibility effect and bio-active components of the herb pair. By representing the principles and application characteristics of these approaches, this paper provides important support for elucidating scientific connotation of compatibility regularity of herb pairs and application of formulae optimization, as well as explorative ideas and approaches for modern research on other herb pairs.

Key words: herb pair; compatibility effect; efficacy component; drug interaction; modern research

中药配伍是中医临床治疗疾病遣方用药的主要形式,它不仅以其极为丰富多彩的、经过反复验证的有效组方成为辨证论治中不可缺少的主要工具,而且其理论知识至今有效地指导着临床实践。在中医临床遣药组方中,常常发现两味药物一起应用,有些源自经方,有些出乎时方,这两味药物之所以在处方中习用,是由于通过如此配伍之后,有良好的协调作用或较好的制约作用,这种在临床最常习用的两味药就是药对。因此,药对是中医临床遣药组方常用的配伍形式,是历代医药学家长期医疗实践的经验总结,组成简单却具备中药配伍的基本特征,经过临床应用并被证明行之有效、有一定理论依据和一定组合法度的两味相对固定药物的配对,通过这样的配伍组合,从而发挥协同增效(功效拓展或增强)或配伍减毒(减轻或消除不良反应)作用。药对体现了中医遣方用药的特色优势,具有内在的组合变化规律,既是方剂配伍的精华与核心所在,也是辨证施治针对性与治疗性的明确体现。它不同于单味中药,却是中药应用的升华;它不同于方剂,又是方剂的基础,是许多方剂的母方。因此,药对是单味中药与若干方剂之间的桥梁,是许多方剂隐含的规律性特征与辨证施治内涵的体现^[1,2]。研究药对的配伍特点和临床应用规律,对于解析方剂的组成结构,掌握遣药组方规律,提高临床治疗水平,发展中医药配伍理论和创制现代中药都具有十分重要的理论意义与实践价值。

近年来,有关药对的研究越来越多,广大中医药学者也越来越重视药对的现代研究,在理论总结、功效物质分析、配伍效应评价与作用机制研究、临床应用与产品开发等方面已取得了明显进展。药对作为中医药发展的一个重要研究方向,已被大家所认识并不断得到发展^[2]。本研究团队选择当归养血/活血系列药对等为主要研究对象,建立了适宜于药对配伍效应与功效物质现代研究的一系列方法与策略,为阐明药对配伍规律的科学内涵及优化组方的应用提供了重要支撑,也为其他药对的现代研究提供了思路与方法学参考。

1 方药关联的药对数据挖掘方法

建立方药关联的集成数据平台和适宜于药对配伍比例、疾病科属、功效分布及其网络关系的数据挖掘方法。广义理论上主要论述“药对”组成及其配伍理论的资料和著作比较分散,药对更多是在临床实践过程中逐步形成的相对固定的配伍组成,与药对相关的数据也多散落在大量的中药、方剂论述与中医临床处方中,这就使得数据挖掘技术在药对研究中可能发挥越来越大的作用。数据挖掘技术可在分散的大量数据中找出频繁出现的、有价值的药物、药对和药物组合,以及具有配伍意义的药物组合模式,为研究药对配伍规律提供指引和可靠的数据基础^[3]。目前比较经典和常用的药对数据挖掘方法包括分类、聚类、关联规则、互信息和孤立点分析等。

分别采用标准关联规则发现 Apriori 算法及改进多数据库计算方法,对从历代药对文献中收集整理得到的 625 个药对 347 味药中包括性味、归经、功效等共 49 个属性形成的数据库进行挖掘研究,并对两种方法得到的结果进行比较。结果发现,提出的新方法更适用于分析药物间的关联规则,集中度更好,更易于发现有价值的规律^[4]。从中医方剂数据库中检索出含当归的方剂 16 529 首,应用计算机编程将这些方剂信息读取为便于数据分析的形式,基于病证的药对配伍特点,统计与当归配伍较多的中药,对当归与这些中药的配比、所治疾病科属,功效分布及配比与科属、功效间的网络关系进行挖掘分析。结果发现,在方剂中与当归配伍频率高于 200 次的药物有 170 味,高于 1 500 次的药物有 22 味。对这 22 个常用当归系列药对的进一步分析发现在方剂中都是以 1:1 配伍最为常见,其次是 1:2、2:1 和 3:2;并且这些药对相关方剂所治疾病主要集中在内科与妇科^[5-8]。

应用计算机编程及关键词映射法对大黄和甘草在中医方剂中的配伍应用信息进行统计,采用频数统计、网络图及关联规则对大黄和甘草的应用信息进行数据挖掘,结果发现甘草在方剂中应用广泛,占有方剂的 27.1%。甘草与其他中药在方剂中配伍使用时,其用

量一般等于或小于另一味中药的用量,常用来治疗内科疾病,主要功效为止痛、清热、补虚、祛风化和化痰止咳平喘等。大黄在方剂中常与黄芩、芍药、当归、栀子和甘草等配伍使用,大黄-甘草配伍时其常用配伍比例多为1:1,占方剂总数的37.85%。大黄-甘草配伍比例不同时,方剂功效顺序也有所差别,但主要功效均为止痛、清热、解毒、化痰止咳和泻下等^[9]。

2 药对配伍效应研究方法策略

2.1 基于多指标综合指数法的药对配伍效应整合策略

建立多指标综合指数法的效应整合策略,以准确评价并比较药对配伍效应的综合水平。为了综合评价药对的整体药效,往往需要将多个不同性质、不同类别、不同水平和不同计量单位的效应指标转化为一个无量纲单位但能反映药效相对水平和整体变化的综合指标。依据多指标综合指数法,分别对药对效应测试结果相关指标进行单一化处理即标化,采用专家评分法结合文献分析统计,综合给出各个指标的权重系数。整合效应值即为各药效指标的标化值乘以权重系数后的加和值,然后基于整合效应值的大小方便进行排序与比较分析。

作者比较评价了当归-红花不同配比对急性血瘀大鼠血液流变学和凝血功能的影响,依据多指标综合指数法对全血黏度(WBV)、血浆黏度(PV)、全血高切相对指数(HSWBRI)、全血低切相对指数(LSWBRI)、红细胞聚集指数(EAI)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、血浆纤维蛋白原(FIB)含量和血小板最大聚集率(ADP)多个指标进行单一化处理,计算出各给药组的总活血效应值。首先对各指标数据进行标化,当模型组的相应指标数值(value)高于正常组时, $V_{\text{标化}} = (V_{\text{模型}} - V_{\text{给药}}) / V_{\text{模型}}$;低于正常组时, $V_{\text{标化}} = (V_{\text{给药}} - V_{\text{模型}}) / V_{\text{模型}}$ 。标化指标的权重首先依据这些指标在临床中的重要性,结合同

行专家对各指标在活血化瘀效应整体评价中的相对重要程度打分,最后再结合直观的变量重要性投影值(variable importance in the projection, VIP)处理结果,综合给出各指标的权重系数,总效应值即为各指标标化值乘以权重的加和值。各个指标VIP的计算是将各组大鼠的所有指标导入MassLynx v4.1(Waters公司)软件的EZinfo中,采用主成分分析法(principal components analysis, PCA)的得分图和多指标综合指数法中的总活血化瘀效应值来综合评价当归-红花不同配比的活血化瘀功效(图1)^[10]。基于主成分分析、聚类热图分析和多指标综合指数法,评价了丹参-红花药对不同制法(乙醇、50%乙醇和水)对急性血瘀大鼠血液流变学和凝血功能的影响,发现50%乙醇提取丹参-红花药对活血化瘀的作用最优,为临床更有效应用丹参-红花提供了科学依据^[11]。

2.2 基于响应曲面设计的药对定量药理学药物相互作用研究方法

建立基于响应曲面设计的药对定量药理学药物相互作用研究方法,以阐明药对配伍协同增效作用及其量比范围与相互作用强度。药物相互作用是药物产生效应的重要属性,主要分为协同作用、相加作用和拮抗作用。目前,关于药效学相互作用的分析方法有很多种,主要包括等辐射分析法、分数分析法、平行线分析法和响应曲面分析法等,但前三种方法存在一定的局限性,只能定性分析药物之间的相互作用。而药效学的研究对于指导临床用药具有非常重要的作用,只有定量才能更加直观地体现药物之间的相互作用。因此,定量分析药物之间的药效学相互作用比定性分析更加重要。中药配伍相互作用更具有复杂性,表现出不同比例或剂量的差异性,通过定量评价它们的相互作用可对中药配伍原理给予明确的阐释。定量的响应曲面分析法是一种新颖而有效的研究药物相互作用的方法,它不仅可以在定性和定量地研究药物间的

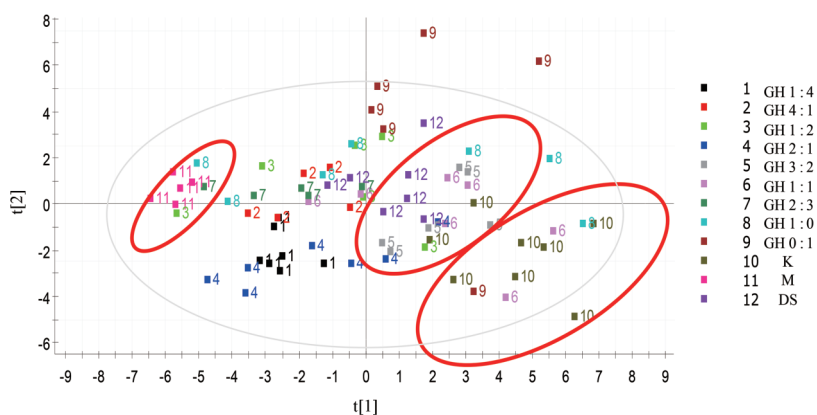


Figure 1 The PCA score plot of blood-stasis indexes after Danggui-Honghua (GH) administration^[10]. K: Normal group; M: Model group; DS: Compound Danshen dropping pill

药效学相互作用规律, 而且还可以寻找到效果满意、不良反应最小的药物间的最佳阈值反应范围^[12]。将响应曲面分析法应用于药对相互作用研究, 以阐明药对配伍协同增效作用及其量比范围与作用强度, 为中药配伍相互作用研究提供了新的思路与方法^[13-18]。

基于血虚模型的定量药理学方法, 建立了三维响应曲面相互作用模型, 阐明了当归-川芎药对配伍剂量范围大部分表现出协同作用, 其次是相加作用, 未见明显的拮抗作用区域。当归与川芎的比例从4:1到2:1, 从小剂量到大剂量, 均表现为相加作用。而其他比例, 则表现出小剂量为相加作用, 大剂量表现为协同作用^[13]。而基于血瘀模型的相互作用研究结果发现, 当归与川芎药对配比在2:1~1.3:1, 表现出明显的协同作用(协同作用强度为:-0.9); 当归剂量在2~3.5 g、川芎剂量在7~9 g区域内, 表现出拮抗作用(拮抗作用强度为:0.2); 而其他比例并未表现出明显的协同或拮抗作用^[14]。通过比较发现, 当归-川芎药对养血补血功效与活血化瘀功效在一定量比均有不同的协同增效作用, 其配比为3:2协同作用都较强, 但配伍后养血补血功效的协同作用范围明显大于活血化瘀功效(图2), 说明当归-川芎配伍后整体功效常常偏重于养血补血。但对当归-红花药对配伍效应研究后发现药对配伍后活血化瘀的协同作用明显大于养血补血功效^[15,16]。当归-黄芪药对配伍养血补血相互作用研究结果显示, 当归-黄芪配伍总体表现为高剂量组的协同作用强于低剂量组, 尤其是当归剂量在10~40 g、黄芪剂量在90~180 g区间及当归剂量在50~100 g、黄芪剂量在20~100 g区间表现出很强的协同效应^[17]。

2.3 基于比较代谢组的药对配伍优效研究方法 代谢组学作为系统生物学的一个重要组成部分, 可以综合评价并同时分析整个生物系统的内源性代谢变化。许多学者采用具有分辨率高、分析速度快和灵敏度高的超高压液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱(UPLC-

QTOF/MS) 技术来研究模型动物血浆和尿液样品的代谢指纹图谱, 观察药对配伍前后对模型动物代谢组生物信息表达干预变化情况; 质谱数据采用MarkerLynx软件处理, 然后采用模式判别法分析组间的代谢物差异, 结合质谱信息和数据库检索对潜在的生物标志物进行鉴定, 将鉴定的生物标志物输入MetPA数据库中构建代谢通路, 比较分析药对配伍前后模型动物体内的异常代谢紊乱向正常状态转归的程度, 从而揭示药对配伍优效性科学内涵, 为代谢组学应用于药对与方剂配伍相互作用机制研究提供了思路与方法^[19-24]。

作者基于比较代谢组学对当归-川芎药对及其组成药味对血虚大鼠的养血补血作用进行研究^[21]。首先, 将灌胃给予当归-川芎药对及其组成药味后对血虚大鼠的养血补血药效学进行评价, 检测指标主要包括体重、外周血常规及脏器指数(脾脏和胸腺); 然后, 采用代谢组学策略对血虚大鼠的血浆及尿液内源性生物标志物进行分析。在血浆和尿液中分别初步鉴定得到10和5个潜在的生物标志物, 主要为溶血磷脂酰胆碱类、鞘氨醇、油酸、8,11,14-二十碳三烯酸、神经酰胺、烟酸、焦磷酸硫胺素、植物鞘氨醇、羟孕烯醇酮和甘油磷酸胆碱。由于鞘氨醇和神经酰胺在血浆和尿液中均存在, 故在血浆和尿液中共鉴定到13个潜在生物标志物。与正常组比较, 血虚组大鼠的溶血性磷脂酰胆碱类、鞘氨醇、烟酸、焦磷酸硫胺素、植物鞘氨醇和甘油磷酸胆碱上调; 而油酸、8,11,14-二十碳三烯酸、神经酰胺和羟孕烯醇酮下调。13个生物标志物主要参与的代谢通路有12条, 其中以硫胺代谢和鞘脂代谢通路最为主要。将血虚的特征效应指标外周血常规与内源性生物标志物进行相关性分析发现, 白细胞、红细胞、血红蛋白、红细胞压积、单核细胞和中性粒细胞主要与鞘氨醇、植物鞘氨醇、溶血性磷脂酰胆碱类和甘油磷酸胆碱的相对丰度呈较强负相关, 与油酸、8,11,14-二十碳三烯酸和羟孕烯醇酮的相对丰度呈较强正相关; 生物标

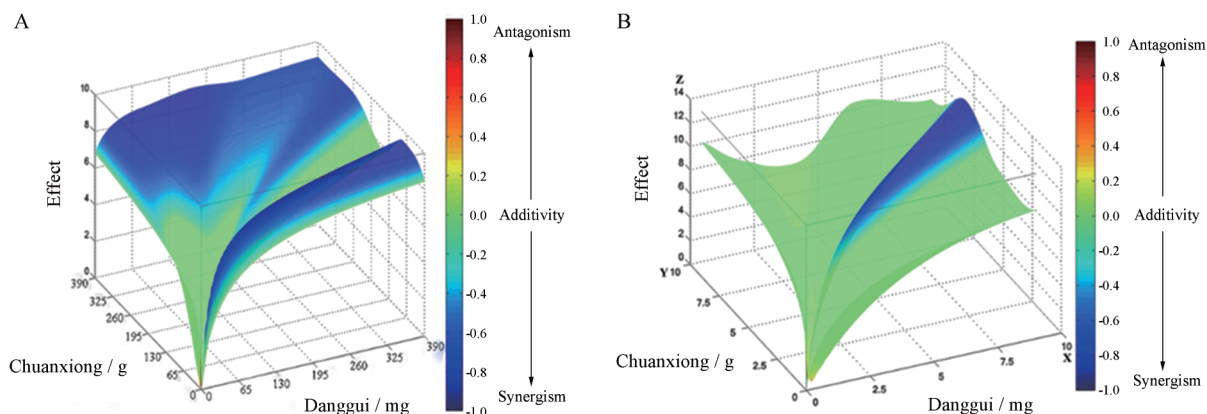


Figure 2 The response surface of Danggui-Chuanxiong for nourishing and tonifying blood effects (A) or activating blood effects (B)^[13,14]

志物与血小板和淋巴细胞相关较弱,但均有统计学意义。外周血常规的药效学指标结果和代谢组学结果显示,当归-川芎药对及其组成药味对乙酰苯肼和环磷酸腺苷诱导的血虚大鼠有养血补血作用,可调节紊乱的代谢通路向正常状态转归;当归-川芎药对的养血补血整体作用优于单味药,且当归的补血作用较川芎强(图3)。同时作者采用比较代谢组学方法也对当归-红花药对养血活血作用进行了研究,也发现药对的整体作用优于单味药^[22,23]。

3 药对功效物质研究技术与方法

3.1 基于人工神经网络的药对功效物质取效辨识技术

建立基于人工神经网络 (artificial neural network, ANN) 的中药有效成分群辨识技术,以揭示药对不同功效的共有物质基础及其功效取向特征。人工神经网络是一种非线性映射系统,不要求变量满足正态性及独立性等条件,是一种不同于常规统计方法的信息处理系统,它的这些特征非常符合中药复杂作用体系的规律性探究。基于人工神经网络的中药有效成分群辨识技术是将多指标综合指数法和人工神经网络综合应用于中药效应与有效成分群关联分析的一种技术。首先,将各效应指标进行整合,得到总效应值;然后,运用人工神经网络将各样品的总效应与其对应样品中各成分的含量测定结果分别进行拟合分析,便可得到中药效应与其有效成分群的关联图。该法较适用于样品量大、效应成分较多的研究对象,与方药多组分、多靶点

协同整合作用机制一致。

通过多指标综合指数法对当归-川芎药对功效各测定指标进行整合,采用人工神经网络将药对成分含量与其整合效应分别进行拟合性相关分析,从而阐释其不同功效的效应物质及其对整体功效的贡献大小。结果发现,当归-川芎药对中芳香酸尤其是绿原酸和咖啡酸对养血补血效应贡献较大;绿原酸、洋川芎内酯I和H对活血化瘀效果贡献较大;藁本内酯、咖啡酸、阿魏酸和洋川芎内酯I对调经止痛效应贡献较大。说明芳香酸偏重于补血活血,苯酞内酯更偏重于活血止痛^[25]。该方法成功应用于药对的功效物质基础研究,不仅可以发现药对不同功效的共有物质基础,还能阐释不同成分的功效偏性,为方药复杂效应物质基础研究提供了新的思路与方法。

3.2 基于选择性成分敲除策略的药对功效成分量化辨识与验证技术

基于中药化学物质的复杂性和治疗作用的整体性特点,借鉴生物学领域的基因敲除策略,采用制备液相色谱技术将中药目标成分选择性敲除,进而对其进行效应比较评价,根据目标成分敲除前后活性的变化及其变化程度,通过计算热图与三维主成分分析 (three-dimensional principal components analysis, 3D PCA) 得出所敲除成分在中药效应表达中的贡献,进而对该中药中不同效应成分进行主次区分与排序。运用该方法和策略,作者成功应用于药对功效物质基础研究,使药对复杂效应与化学物质的关联关系得到

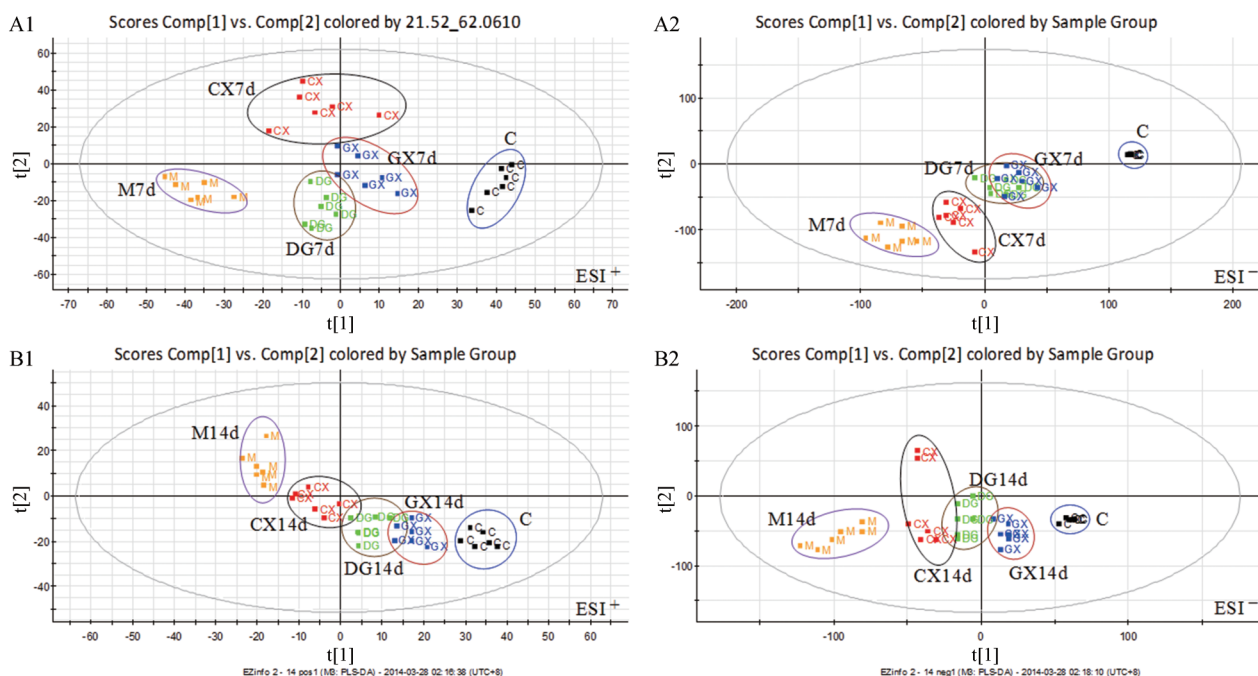


Figure 3 The plasma partial least squares discrimination analysis (PLS-DA) score plots classifying the control (C), model (M), Danggui (DG), Chuanxiong (CX) and Danggui-Chuanxiong (GX) groups on 7 days (A1 and A2) and 14 days (B1 and B2) both in positive (A1 and B1) and negative (A2 and B2) modes^[21]

非常明确而直观的科学表达; 该技术方法能广泛运用于中药多种类型有效成分研究, 重要的是能将起辅助作用的中药成分得到有效辨识与验证^[26-29]。

通过对当归-川芎药对及其单味药敲除阿魏酸前后体外抗氧化活性比较评价, 发现敲除阿魏酸后, 当归-川芎药对及其单味药的抗氧化活性均有明显下降, 说明阿魏酸应为当归-川芎药对及其单味药抗氧化活性主要效应物质, 其作用大小为: 当归 > 川芎 > 当归-川芎药对。对阿魏酸在当归、川芎和当归-川芎药对中的抗氧化活性作用进一步比较, 在敲除溶液的基础上研究了不同浓度阿魏酸在当归-川芎药对及其单味药中的抗氧化活性。结果发现, 阿魏酸在当归-川芎药对及其单味药中抗氧化作用方面与剂量相关, 在测定浓度下, 剂量效应曲线作用趋势一致, 说明阿魏酸在当归、川芎和当归-川芎药对中的抗氧化活性方面起到重要作用, 其作用大小: 当归 > 川芎 ≈ 当归-川芎药对, 这也进一步证实了阿魏酸在当归中的作用比在川芎和归芎中的作用大^[27]。从红花中分别敲除了 11 个主要成分, 通过计算分析进一步阐明了这些成分对红花活血化瘀总效应的贡献大小 (脱水红花黄色素 B > 6-羟基山柰酚-3-氧芸香糖-6-氧葡萄糖苷 > 羟基红花黄色素 A > 山柰酚-3-氧芸香糖苷 > 6-羟基山柰酚-3-氧芸香糖苷 > 6-羟基山柰酚-3,6-二氧葡萄糖基-7-氧葡萄糖醛酸 > 6-羟基芹菜素-6-氧葡萄糖基-7-氧葡萄糖醛酸 > 胞苷 > 6-羟基山柰酚-3,6-二氧葡萄糖苷 > 6-羟基山柰酚-3,6,7-三氧葡萄糖苷 > 腺苷) (图 4), 说明红花活血化瘀作用的主要功效物质是醌式查尔酮碳苷和含 7-羟基的黄酮醇苷类成分^[28]。

3.3 基于化学模糊识别策略的药对配伍功效物质相互作用研究方法 建立化学模糊识别策略, 用于药对配伍复杂效应物质相互作用研究 (图 5)。化学成分相互作用是揭示药对配伍机制的重要内容, 配伍前后化学成分变化的定性定量分析是药对物质基础研究的首

要任务。该方法首先建立了药对化学物质库, 包括各药味主要化学成分的名称、结构、分子量、分子式、质谱和紫外信息; 基于此, 通过超高效液相色谱串联光电二极管矩阵检测器与三重四极杆高分辨质谱 (UPLC-PDA-TQ-MS) 获得各色谱峰的质谱和紫外分析信息进行结构归类。这种成分归类鉴别的化学模糊识别策略避免了中药复杂成分鉴定中步骤复杂、对照品稀缺、难以全面而准确鉴定结构等缺点, 同时又能满足中药复杂成分配伍相互作用变化规律研究的要求, 体现了中医药的模糊与整体观。化学模糊识别后, 采用对称配比设计制备配伍样品, 通过 UPLC-PDA-TQ-MS 串联技术进行样品分析, 从而获得药对配伍效应物质相互作用规律。该研究策略与方法被应用于中药“十八反”中甘遂-甘草反药组合相互作用研究^[30]。结果发现, 甘遂中 26 个成分及甘草中 45 个成分都得到了化学模糊鉴定并分别归类, 进而通过半对称配比设计对这些化合物进一步定量研究, 发现甘遂能促进甘草中大多数三萜皂苷、苯丙素苷及苷元类化合物的溶出; 甘草也能促进甘遂中大多数具有毒性作用的二萜和三萜类成分的溶出, 这可能是中药“十八反”甘遂与甘草配伍禁忌的物质基础。

作者采用高效液相色谱串联光电二极管矩阵检测器 (HPLC-PDA) 技术和化学模糊识别策略对丹参-红花药对不同配比的活性物质变化规律进行了系统研究^[31]。通过建立丹参与红花的化学物质库, 并经过对照品峰的紫外信息, 建立了 4 类活性物质 (丹酚酸类、丹参酮类、醌式查尔酮类和黄酮类) 的紫外信号网络, 并通过网络将丹参-红花中的成分进行快速鉴别与归类, 进而采用对称配比设计对这些化合物进行定量分析。在丹参-红花配伍的水煎液中, 通过化学模糊识别策略分别鉴定出 47 个成分, 其中丹酚酸类成分 15 个、醌式查尔酮类成分 20 个和黄酮类成分 12 个。不同配比中, 在 5:1~5:2 内所测成分总的相对溶出度较高,

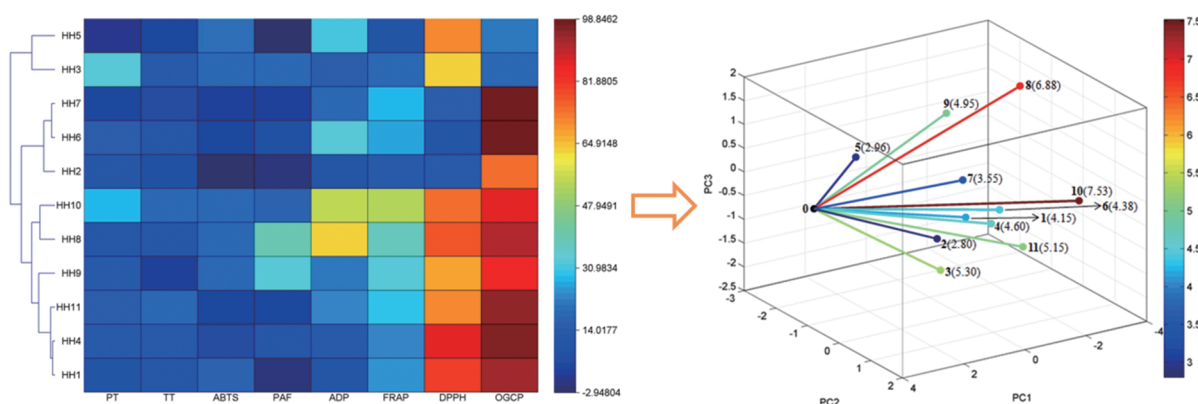


Figure 4 The heat map and 3D score plot for total contribution of every target component on integration effect of honghua^[28]

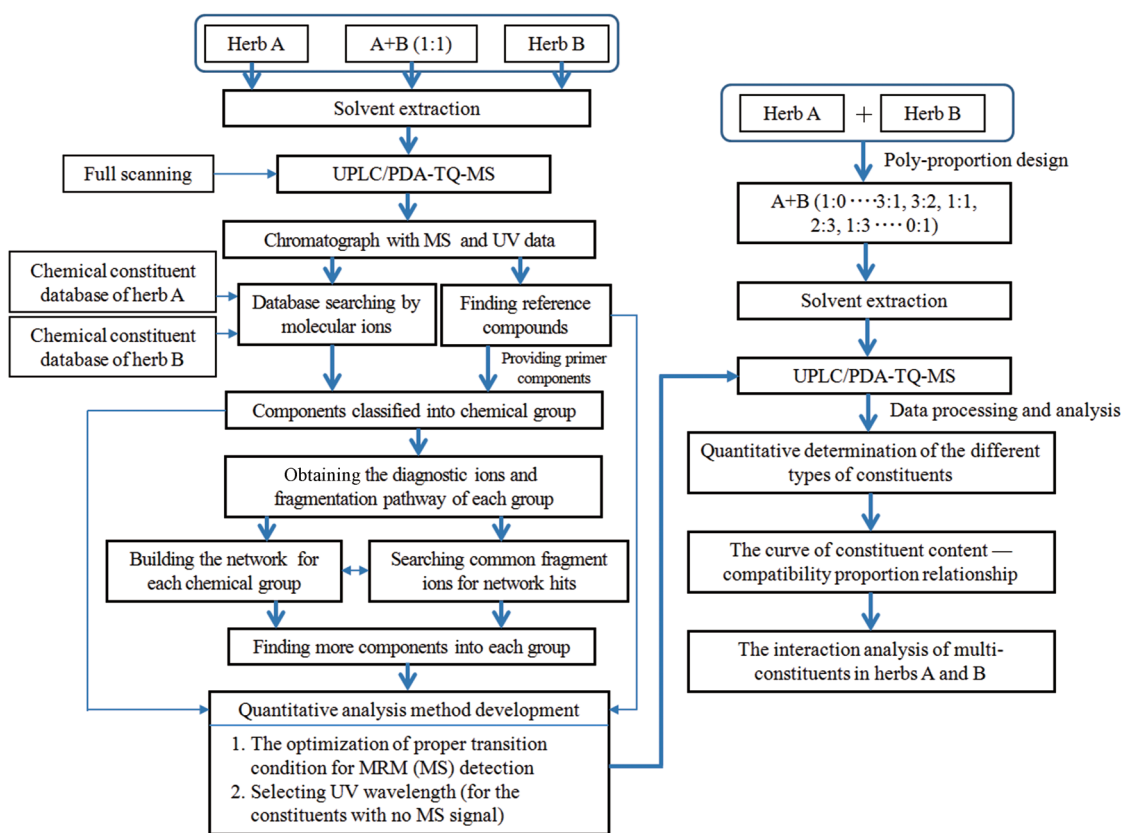


Figure 5 The summary diagram of fuzzy chemical identification strategy with poly-proportion design for analysis of herb-herb interaction^[30]

最高时丹参-红花配比为 5:2, 表明不同配伍比例的丹参-红花中不同化学成分的配伍变化规律有所不同, 且存在较优配比。这为丹参-红花药对临床配伍合理应用提供了参考。

3.4 药对质量标志物的分层三维整合辨识技术 通过建立分层三维整合技术, 对药对质量标志物进行量化辨识与传递变化规律研究。中药质量标志物是近年来中药质量评价与控制的核心概念, 基于作者对中药质量研究的认识与长期实践, 提出“以有效性为核心, 以可测性和特有性为条件, 复方中药结合配伍关系, 遴选确认中药质量标志物 (TCM Q-marker), 进而考察其传递与溯源的功能属性”的研究思路。选择临床常用代表性中药为研究对象, 根据所含成分有效性、可测性与特有性评分, 采用分层三维整合技术进行综合量化评价与分级辨识, 从而遴选确认质量标志物; 进而从植物次生代谢产物形成到产生药效的药物形成与作用表达全过程进行质量标志物的传递变化规律研究^[32]。基于中药化学与生物学属性和有效性表达特点, 整合多学科技术方法, 重点开展其质量标志物的系统辨识与确认的创新方法研究, 以形成代表性和示范性推广应

用, 为有力提升中药质量控制水平提供重要的理论与方法支撑。

针对药对中各有效成分, 分别采用不同指标体系从有效性、可测性和特有性三个维度进行评价, 在每个维度上应用专属性指标整合方法将各指标体系数值整合作为各成分在该维度上的得分; 同时, 为了便于进行质量标志物的最终辨识, 在更高层次上将三维得分进一步整合成综合得分, 作为辨识依据 (图 6)。根据三维得分和综合得分将各成分绘制在同一分布图中, 具有信息量大、直观可视和便于筛选等优点。从各维度所属的指标体系整合成为有效性、可测性和特有性三个维度的得分, 作为第一层次, 可采用多指标整合方法; 第二层次则进一步从三个维度得分整合成为单一得分, 作为质量标志物最终遴选与确认的直接参考。在此过程中, 需要根据药物及药物组合相关属性及其影响因素, 综合考虑各维度的权重比例, 以确定最终得分^[32]。参考 Delphi 方法^[33], 邀请多领域内专家, 针对药物数据, 各自独立评分, 最终确定各维度权重。图 6a 和 b 是两单味中药的质量标志物分布示意图。每个圆点代表 1 个潜在质量标志物, 红色表示该成分来源于

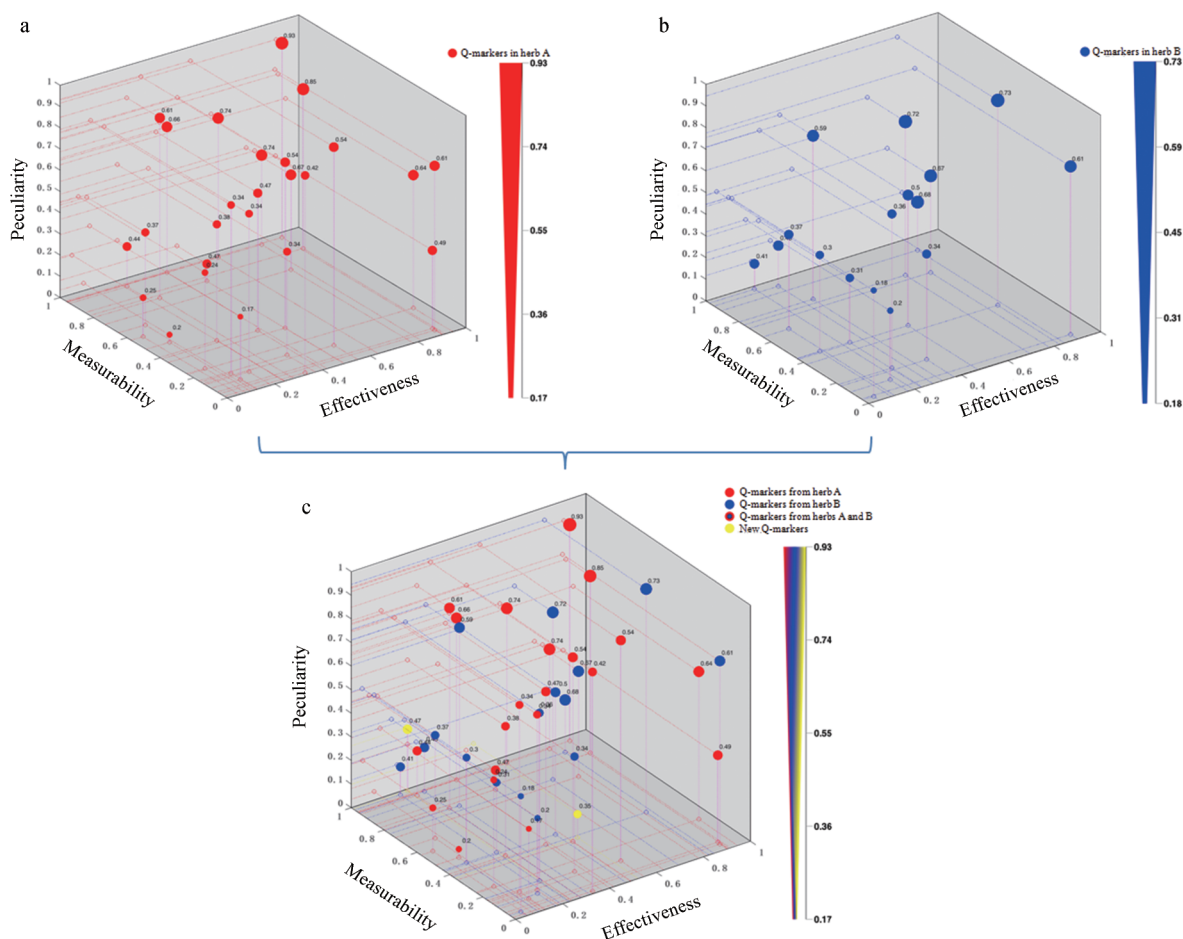


Figure 6 Grading identification of the Q-marker of TCM consisting of herbs A and B. a: Diagram for Q-markers from herb A; b: Diagram for Q-markers from herb B; c: Diagram for Q-markers from herb pair containing A and B. Red point: Q-markers from herb A; Blue point: Q-markers from herb B; Red and blue point: Q-markers from herb pair containing A and B; Yellow point: New Q-markers^[32]

药物 A, 蓝色表示来源于药物 B。圆点在三维空间中的位置则由该成分在有效性、可测性和特有性三个维度上的得分来确定。同时, 圆点的面积大小则表示该成分三个维度的综合得分, 旁边显示的数据即是综合得分数值。右侧是圆点直径与得分的对比标尺。借助该分布图, 可以很方便地观察各成分在三个维度上的表现及综合得分, 适合多种条件下的质量标志物辨识。针对药物 A 和 B 合用的药对, 其质量标志物分布图更为复杂, 如图 6c 所示。与单味药相比, 药对配伍形成的药物潜在质量标志物在图中的表达可能包括 4 个方面: 来源药物 A、药物 B、药物 A 和 B 都含有的有效成分和可能产生新的有效成分。因此, 图中以红、蓝两色圆点表示共有成分, 黄色表示新成分, 同样以圆点面积代表综合得分。通过建立这种方法, 可以对药对质量标志物进行量化评价与直观辨识。

4 结论与展望

我国拥有丰富的中医药资源, 在中医药研究方面具有深厚的文化背景及临床和实验研究积累。作者建

立了方药关联的特征性中医方剂数据库, 应用计算机编程将库中含有目标药味的方剂信息读取为便于数据分析的形式, 基于病证的药对配伍特点, 统计与目标药味配伍较多的中药, 对其与这些中药的配比、所治疾病科属、功效分布及配比与科属、功效间的网络关系进行挖掘分析, 获得了对系列药对的一些规律性认识。但中药配伍规律的经验性和药对配伍特征的隐含性使得对中药药对配伍的系统认识与知识发现还需要长期挖掘与总结提升。

中药的功用各有所长, 只有通过合理的配伍, 调其偏性, 制其毒性, 增强或改变原有功用, 消除或缓解其对人体不利因素, 发挥其相辅相成或相反相成的综合作用, 才能符合辨证论治的要求, 更充分地发挥药物的治疗效果, 适应比较复杂的病证治疗需要。作者通过响应曲面相互作用研究方法、药代动力学与比较代谢组学等揭示了当归系列药对相互作用的性质与作用特点。但中药配伍药物相互作用的多样性与模糊性使得药对配伍相互作用研究一直是药对现代研究的难

点, 需要采用更多现代方法与技术不断尝试和实践。

多成分是中药的最大特点, 即使单味中药也含有多种化学成分, 且多种成分有效, 每个有效成分又具有多方面的生物活性, 它们之间可以相互协同、拮抗或既协同又拮抗, 每味中药相当于一个小复方。由多味中药配伍组成的复方, 其化学成分、生物活性和相互作用更为复杂。作者基于人工神经网络、选择性成分敲除与化学模糊识别策略等中药效应物质研究技术与方法对药对功效物质进行了系统辨识与量化验证。但中药配伍功效物质具有复杂性与难确定性, 还需要进一步创建方法与策略, 以达到药对功效物质的精准辨识, 也为了真正揭示药对配伍的化学本质, 更好地服务于中药质量控制水平的提升, 实现中医药现代化发展。

References

- [1] Tang YP, Duan JA. The Modern Research of Herb Pairs (药对现代研究) [M]. Beijing: Science Press, 2014: 6.
- [2] Tang YP, Shu XY, Li WX, et al. Research on Chinese medicine pairs (I) - their formation and development [J]. China J Chin Mat Med (中国中药杂志), 2013, 38: 4185-4190.
- [3] Shang EX, Li WL, Ye L, et al. Research on Chinese medicine pairs (II) - their data mining [J]. China J Chin Mat Med (中国中药杂志), 2013, 38: 4191-4195.
- [4] Shang EX, Ye L, Fan XS, et al. Discovery of association rules between TCM properties in crude drug pairs by mining between datasets and probability test [J]. World Sci Technol Modern Tradit Chin Med Mat Med (世界科学技术—中医药现代化), 2010, 12: 377-382.
- [5] Jin Y, Shang EX, Ye L, et al. Data analysis of herb pairs containing *Angelicae Sinensis Radix* in TCM clinic application [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 194-199.
- [6] Jin Y, Qu C, Tang YP, et al. Herb pairs containing *Angelicae Sinensis Radix* (Danggui): a review of bio-active constituents and compatibility effects [J]. J Ethnopharm, 2016, 181: 158-171.
- [7] Wang H, Tang YP, Ding AW, et al. Data analysis of *Radix Angelicae Sinensis* and *Rhizoma Ligusticum* of different proportions in the TCM clinic application [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2009, 15: 44-47.
- [8] Chen F, Tang YP, Tao J, et al. Data analysis for different proportions in clinic application of *Radix Angelicae sinensis* and *Radix Astragali* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 235-238.
- [9] Cao YJ, Tang YP, Shen J, et al. Analysis on compatibility and application of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its herb pairs based on data mining method [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 4552-4559.
- [10] Li SJ, Li WX, Tang YP, et al. Comparative analysis of the promoting blood effects of the combination of different proportions of Danggui and Honghua by the principal component analysis and multi-attribute comprehensive index methods [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 1304-1309.
- [11] Qu C, Tang YP, Shi XQ, et al. Comparative study on promoting blood effects of Danshen-Honghua herb pair with different preparations based on chemometrics and multi-attribute comprehensive index methods [J]. China J Chin Mat Med (中国中药杂志), 2017, 42: 3017-3025.
- [12] Short TG, Ho TY, Minto CF, et al. Efficient trial design for eliciting a pharmacokinetic-pharmacodynamic model-based response surface describing the interaction between two intravenous anesthetic drugs [J]. Anesthesiology, 2002, 96: 400-408.
- [13] Huang MY, Shang EX, Tang YP, et al. Research on nourishing and tonifying blood effects of the herb pair consisting of *Angelica sinensis* and *Ligusticum chuanxiong* on the basis of drug interaction [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2013, 33: 516-521.
- [14] Huang MY, Tang YP, Shang EX, et al. Study on interaction of activating blood effects of the herb pair constituted by Danggui and Chuanxiong by response surface method [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2012, 28: 1407-1413.
- [15] Jin Y, Pu ZJ, Tang YP, et al. Effect of promoting blood circulation of herb pair containing *Angelicae Sinensis Radix* and *Carthami Flos* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 2087-2092.
- [16] Jin Y, Shang EX, Tang YP, et al. Compatibility law analysis of tonifying blood of couplet medicines of *Angelicae Sinensis Radix* and *Carthami Flos* by three-dimensional response surface model [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 1-6.
- [17] Shi XQ, Shang EX, Tang YP, et al. Interaction of nourishing and tonifying blood effects of the combination of *Angelicae sinensis Radix* and *Astragali Radix* studied by response surface method [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1375-1383.
- [18] Cui X, Shang EX, Jiang S, et al. Interaction of *Scutellaria-Coptis* herb pair in improvement of glucose and lipid metabolism of type 2 diabetes rats based on response surface method [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 630-635.
- [19] Li WX, Huang MY, Tang YP, et al. Metabolomic study of the action mechanism of nourishing blood effect of Fo-Shou-San on blood deficiency mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 1301-1306.
- [20] Huang MY, Tang YP, Li WX, et al. Evaluate activating blood circulation and dissipating blood stasis effect mechanism of Foshousan on acute blood stasis rats on basis of metabolomic approach [J]. China J Chin Mat Med (中国中药杂志), 2013, 38: 3576-3582.
- [21] Li WX, Tang YP, Guo JM, et al. Comparative metabolomics

- analysis on hematopoietic functions of herb pair Gui-Xiong by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition approach [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1346: 49-56.
- [22] Li SJ, Lin H, Qu C, et al. Urine and plasma metabolomics coupled with UHPLC-QTOF/MS and multivariate data analysis on potential biomarkers in anemia and hematinic effects of herb pair Gui-Hong [J]. *J Ethnopharm*, 2015, 170: 175-183.
- [23] Li SJ, Lin H, Tang YP, et al. Comparative metabolomics analysis on invigorating blood circulation for herb pair Gui-Hong by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 107: 456-463.
- [24] Zhu SW, Gong WX, Chen CC, et al. The contribution of Radix Bupleuri-Radix Paeoniae Alba herb pair to Xiaoyaosan based on ¹H NMR metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 720-728.
- [25] Li WX, Tang YP, Shang EX, et al. Analysis on correlation between general efficacy and chemical constituents of Danggui-Chuanxiong herb pair based on artificial neural network [J]. *China J Chin Mat Med (中国中药杂志)*, 2012, 37: 2935-2942.
- [26] Wang LY, Tang YP, Liu X, et al. Study on material base of Carthamus tinctorius with antioxidant effect based on selective knock-out [J]. *China J Chin Mat Med (中国中药杂志)*, 2014, 39: 1285-1289.
- [27] Wang LY, Tang YP, Liu X, et al. Effects of ferulic acid on antioxidant activity in Angelicae Sinensis Radix, Chuanxiong Rhizoma, and their combination [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13: 401-408.
- [28] Qu C, Wang LY, Lin H, et al. Hierarchical identification of bioactive components in a medicinal herb by preparative high-performance liquid chromatography and selective knock-out strategy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 135: 206-216.
- [29] Qu C, Wang LY, Jin WT, et al. Comparative analysis of the effects of hydroxysafflor yellow A and anhydrosafflor yellow B in safflower series of herb pairs using prep-HPLC and a selective knock-out approach [J]. *Molecules*, 2016, 21: 1480.
- [30] Shen J, Mo X, Tang YP, et al. Analysis of herb-herb interaction when decocting together by using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fuzzy chemical identification strategy with poly-proportion design [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1297: 168-178.
- [31] Qu C, Pu ZJ, Zhou GS, et al. Comparative analysis of main bio-active components in the herb pair Danshen-Honghua and its single herbs by ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40: 3392-3401.
- [32] Tang YP, Shang EX, Chen YY, et al. Research thoughts and methods on grading identification and transmission change law of TCM Q-marker [J]. *China J Chin Mat Med (中国中药杂志)*, 2019, 44: 3116-3122.
- [33] Humphrey-Murtoa S, de Wit M. The Delphi method—more research please [J]. *J Clin Epidemiol*, 2019, 106: 136-139.