

## · 学术论坛 ·

# 鳖甲抗肝纤维化药效物质基础及质量控制研究思路

靳士晓 李仙义 付珊珊 靳世英 韩晋 袁海龙 肖小河

**【摘要】** 鳖甲作为防治肝纤维化的常用中药,备受人们关注,近年来对其进行了广泛深入的研究,明晰了一些化学成分及其抗肝纤维化的可能机制,但其质量标准研究相对薄弱,目前尚未有统一认可的质控手段。本文对鳖甲的化学成分及抗肝纤维化的可能机制进行了整理和归纳,提出了基于“敲出敲入”的鳖甲抗肝纤维化药效物质基础及质量控制研究思路。

**【关键词】** 鳖甲; 肝纤维化; 敲出敲入; 质量控制

**【中图分类号】** R285 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.06.009

鳖甲为鳖科的动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲,又名上甲,团鱼甲,性味咸、微寒,归肝、肾经,具有滋阴潜阳、软坚散结、退蒸除热之功<sup>[1]</sup>。现代研究发现,鳖甲及其复方制剂广泛应用于治疗慢性肝病、预防肝硬化<sup>[2-4]</sup>,是治疗肝纤维化疾病的首选中药,但其质量标准研究相对薄弱,目前鳖甲的活性成分尚未明确,可控指标难以统一,针对这一问题,本文将对鳖甲的化学成分及抗肝纤维化的可能机制作一阐述并提出了基于鳖甲抗肝纤维化目标成分敲出/敲入(knock-out and knock-in)的谱效关系及量效关系研究模式,为鳖甲的标准研究提供参考和借鉴。

## 1 鳖甲化学成分

从生鳖甲和醋制鳖甲提取物中测得的氨基酸有 16 种:苏氨酸、门冬氨酸、丝氨酸、脯氨酸、谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸和精氨酸<sup>[5]</sup>。缪华蓉等<sup>[6]</sup>用 PICO·TAC™ 方法分析了鳖甲内的氨基酸成分,在所有的氨基酸中,高浓度的脯氨酸(27%)和甘氨酸(17%)是其主要特征。文献报道,从鳖甲超微细粉中测出了存在于胶原蛋白中的羟脯氨酸<sup>[7]</sup>,并测得了 18 种氨基酸的总量为 452.86 mg/g。

刑延一<sup>[8]</sup>对醋鳖甲的化学成分进行了研究,运用化学方法、波谱学方法和氨基酸测序方法鉴定了 1 个寡肽类化合物为 AAHGPeG,这是截至目前为止首次从鳖甲中分离并鉴定

定的肽类化合物。高建荣等<sup>[9]</sup>在活性筛选的跟踪指导下,通过 Sephadex G-25 将鳖甲活性部位分离出 8 种分子量小于 6000 的肽类物质。

鳖甲中含有多种微量元素,包括钙、磷、镁、钠、钾、铁、锌、锰、铝、钴、铜、砷、铬、铅、硒、镉等,其中钙、磷、镁含量最高<sup>[6]</sup>。鳖甲超微细粉中钙含量极丰富(231.4 mg/g),镁含量达到 7.128 mg/g<sup>[7]</sup>。利用原子吸收光谱、等离子发射光谱等现代波谱技术从鳖甲中测定出铬、锰、锌、铜、铁、镁、铝、钙、磷、钠、钾、砷、铍、镉、铅和汞 16 种元素,结果表明微量元素、常量元素含量较为丰富,且这些微量元素与鳖甲的滋补作用密切相关<sup>[10]</sup>。

有研究报道,鳖甲中构成多糖的单糖以半乳糖和葡萄糖醛酸为主,这些多糖都具有较好的药理活性。其中半乳糖的含量最高,在生鳖甲中为 2.76 mg/g,醋鳖甲中为 3.06 mg/g<sup>[5]</sup>。

鳖甲中还含有角质、蛋白、动物胶、碘质、维生素 D 等<sup>[11]</sup>。

近年来鳖甲的研究已深入到许多方面,但仍存在着较大的缺憾。由于鳖甲的主要成分为氨基酸类成分,利用现代仪器检测单一成分并没有统一的标准。大量的文献表明,对鳖甲的质量控制多采用高效毛细管电泳(HPCE)、UV、氨基酸分析仪等方法,且多采用提取物中某些化学成分(如氨基酸、蛋白质等)含量为指标。这些指标并不能反映鳖甲的整体质量,且选择不同的质控指标,得出的结论也不同。“找成分,测含量”是目前中药质量控制的主流,但是含量标准与安全性有效性之间很难建立直接或必然的联系<sup>[19]</sup>。对于鳖甲,其活性成分尚无定论,因此,究竟测什么成分来控制鳖甲质量? 含量的高低如何确定? 如何使鳖甲含量标准能够直接关联安全性和有效性是其质量难控难评的主要症结。

## 2 抗肝纤维化研究及其可能机制

肝纤维化(hepatic fibrosis)是各种肝损伤因素致肝内弥漫性细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分过度沉积的病理过程,若肝纤维化逐渐加重,引起肝小叶及血管等改建,

基金项目:国家自然科学基金(81073069);国家新药创制重大专项(2011ZX09201-201-14)

作者单位:100039 北京,中国人民解放军第三〇二医院药学部[靳士晓(硕士研究生)、付珊珊、靳世英、韩晋、袁海龙],全军中药研究所(肖小河);中国人民解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所(李仙义)

作者简介:靳士晓(1988-),女,2010 级在读硕士研究生。研究方向:中药新制剂、新剂型的研究。E-mail:jinshixiao\_1988@126.com

通讯作者:袁海龙(1970-),博士,博士后,副研究员,硕士生导师。中华中医药学会中成药分会秘书长,世界中联中药制剂专业委员会常务理事。研究方向:中药制剂分析。E-mail: yhlpharm@

建议参考文献标引格式:

靳士晓,李仙义,付珊珊,等. 鳖甲抗肝纤维化药效物质基础及质量控制研究思路[J]. 环球中医药, 2012, 5(6):433-435.

假小叶和结节形成,即发展为肝硬化<sup>[12]</sup>。慢性肝炎肝纤维化、肝硬化严重威胁着人类的健康和生命,已成为国内外医学界研究的热点。鳖甲作为防治肝纤维化的常用中药,备受人们关注。

文献报道,以鳖甲为君药的复方鳖甲软肝片对动物肝纤维化早期有明显阻断作用<sup>[13]</sup>。分析其作用机制可能为以下几点:(1)抑制贮脂细胞增殖;(2)减少胶原蛋白合成及其在Disse腔内过量沉积;(3)溶解和吸收已形成的肝纤维化组织,并抑制肝纤维化 $\alpha 2(I)$ mRNA的高水平表达。有学者探讨了复方鳖甲软肝片(FBP)抗人体肝纤维化的作用机制,结果显示,与治疗前穿刺肝组织比较,FBP治疗后的肝纤维化程度均有显著改善( $P<0.01$ ),肝组织内活化肝星状细胞(HSC)数量显著减少,而凋亡的活化HSC数量则明显增加( $P<0.01$ ),提示抑制HSC活化、促进活化HSC凋亡可能为FBP抗肝纤维化的作用机制之一<sup>[14]</sup>。另有学者则认为,FBP可能通过多靶点影响肝纤维化逆转及形成环节产生抗肝纤维化的效果<sup>[15]</sup>。

有研究表明,鳖甲煎煮液能有效地预防和治疗大鼠肝纤维化,其作用机制可能是通过抗脂质过氧化、改善肝组织病理、改善肝功能、调控细胞因子水平等而发挥抑制HSC激活增殖及ECM合成分泌、促进ECM降解吸收等综合作用,阻断和治疗肝纤维化<sup>[16]</sup>。研究发现,鳖甲煎丸能减轻模型大鼠的肝纤维化程度,降低血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶水平,并有效抑制肝纤维组织TGF- $\beta 1$ 的表达。该方抗肝纤维化的机制可能是通过抑制TGF- $\beta 1$ 的表达,进而抑制静止的肝脏星状细胞转变为活化的肌成纤维细胞,抑制细胞外基质的合成,最终阻断肝纤维化的进程<sup>[17]</sup>。

### 3 鳖甲质量控制研究思路

为了解决鳖甲质量控制的突出问题,本课题组以中药谱效关系为切入点,借鉴基因诊断治疗策略,以基于目标成分敲出/敲入(knock-out and knock-in)的研究模式,以期明确鳖甲质量控制的关键组分及其质量控制上下限量<sup>[20]</sup>,为实现面向临床的中药(鳖甲)质(品质含量)一量(临床用量)一体化提供方法学支撑。技术路线见图1。

#### 3.1 基于抗肝纤维化成分敲出的鳖甲谱效关系与药效关键组分辨识

鳖甲中抗肝纤维化目标组分初步确定:在“系统分层筛选”的基础上,根据有效提取部位化学指纹图谱和体外抗肝纤维化作用,运用典型相关分析和主成分分析方法分析各个色谱峰与药效作用的相关性,根据各成分因子载荷选取与肝纤维化指标显著相关的色谱峰作为目标成分。

样品的制备:首先通过粗提得到鳖甲的总提取物,然后经柱层析及制备液相等分离纯化手段获得目标成分,同时收集敲出该目标成分后的剩余萃提物,即目标成分阴性样品。

生物等效性试验:采用目标成分与阴性样品对肝星状细胞增殖的影响来对比考察目标成分、目标成分阴性样品与鳖甲总提物的抗肝纤维化作用的客观差异。

药效关键组分的确定:根据生物等效性试验结果,确定主要药效成分和/或药效相关成分。目标成分与阴性样品、鳖甲总提物的药效作用比较,可以确定主要药效成分、药效相关成分。循环筛查过程,最终从目标成分中筛选出鳖甲的药学关键组分。

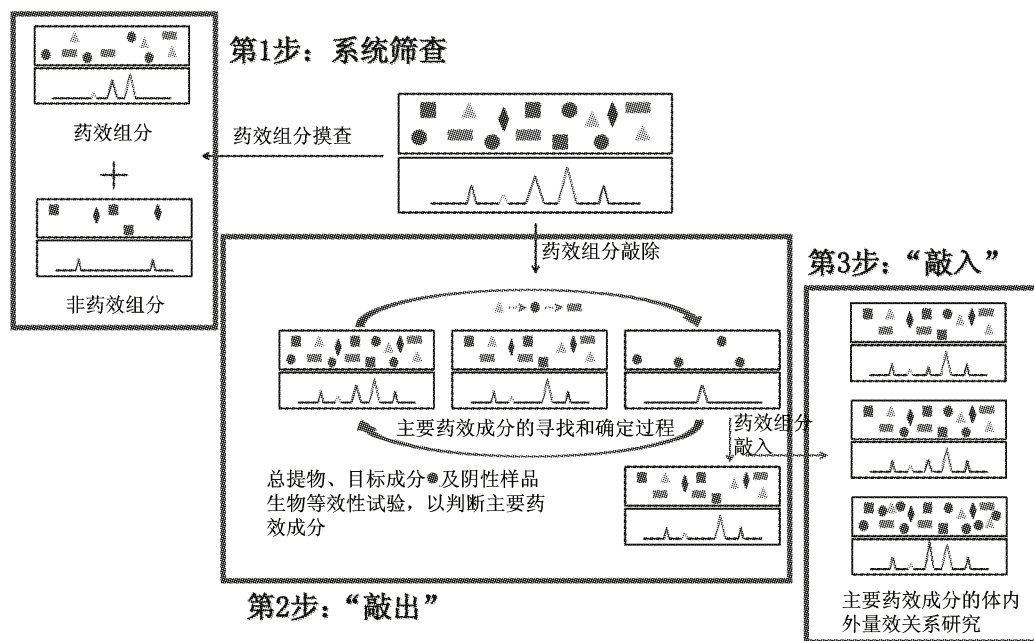


图1 基于“敲出/敲入”的鳖甲质量控制技术路线图

相互作用关系研究:鳖甲是多成分组成的复杂体系,成分之间可能存在一定的协同/拮抗关系。采用“柱形图叠加法”及 FICI 法分析各敲出成分之间的相互作用关系。

### 3.2 基于目标成分敲入的鳖甲量效关系与质量控制标准研究

体外量效关系的表达:同样采用对肝星状细胞增殖的影响,对比考察在目标组分阴性样品中,依次加入递比稀释的目标组分后,建立体外量(毒)效关系。

体内量效关系的表达:采用大鼠肝纤维化模型,对比考察在目标组分阴性样品中,依次加入递比稀释的目标组分后,并以此与鳖甲总提物的药效作用和毒性进行比较,建立体内量(毒)效关系。

鳖甲质量标准上下限的确定:(1)为获得与鳖甲总提物相同或相似的药效作用,目标组分阴性样品中所需要加入的目标组分的最小用量即最小起效用量,这一阈值可作为鳖甲质量控制的下限;(2)在获得与鳖甲总提物相同或相似的药效作用的基础上,逐次增加目标组分的用量,当样品的药效随目标成分的增加达到峰值甚至出现明显毒副作用时,这一阈值可作为鳖甲质量控制的上线。

技术路线:

该模式把鳖甲作为一个整体或系统来考量,抗肝纤维化的药效作用始终与鳖甲总提物进行等效性比较,更加符合中医药的整体观、系统观以及多成分协同或拮抗作用的特点。

## 4 结语

中药现代化的进程中,其多成分整体性的特点要求传统中药的质量控制方法也要更加完善和现代化,2010 版《中华人民共和国药典》也特别注重中药质控模式的多元化和生物评价手段的应用,并在编写大纲中明确指出:中药的质量标准要逐步由单一指标成分定性定量测定,向活性有效成分及生物测定的综合检测过渡。只有这样才能达到“安全、有效、可控”的要求。因此,笔者提出“敲出敲入”的研究模式,在“敲出”阶段,明确鳖甲抗肝纤维化的目标成分,借助化学手段对其进行分离鉴定,并建立目标成分指纹图谱;在“敲入”阶段,制定鳖甲抗肝纤维化有效用量及质控标准上下限。在整个研究过程中,对鳖甲单一目标成分及整体成分进行了系统全面的探索,并紧密结合鳖甲的抗肝纤维化药理活性,该方法可补充和完善目前鳖甲化学药质控模式的不足,使其质量关联药效,量而又准,可控可评,实现面向临床的鳖甲质量标准化研究。

## 参 考 文 献

[1] 肖培根.新编中药志(第四卷)[M].北京:化学工业出版社,2002:273-276.

- [2] 姜宏伟.单味鳖甲治疗肝炎肝硬化 30 例[J].临床医学,2007,8(6):93-94.
- [3] 杨杰,谢春娇.鳖甲汤治疗乙肝肝硬化腹水 38 例[J].实用中医内科杂志,2005,19(4):362.
- [4] 李燕燕.中药醋鳖甲的研究概况[J].环球中医药,2008,1(4):14-16.
- [5] 凌笑梅,张娅婕,张桂英,等.鳖甲提取物中氨基酸、微量元素及多糖含量的测定[J].中国公共卫生,1999,15(10):939.
- [6] 缪华蓉,沈耀明.鳖甲内氨基酸成分的研究[J].中成药,1995,17(12):37-38.
- [7] 邹全明,杨珺,赵先英,等.中华鳖甲超微细粉中氨基酸及钙、镁元素分析[J].中药材,2000,23(1):6-7.
- [8] 刑延一.鳖甲中寡肽类化学成分及炮制原理的研究[D].北京:北京中医药大学,2006.
- [9] Gao JR, Liu YW, Li CY, et al. Identification of the active material of anti-hepatic fibrosis from *Amydae Carapax* [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2010, 18(5): 346-352.
- [10] 刘焱文,刘生友.龟板、鳖甲微量元素测定及其滋补作用探析[J].微量元素与健康研究,1994,11(1):44-45.
- [11] 江苏新医学院.中药大辞典·下册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:2723.
- [12] Benyon RC, Arther MJ. Mechanisms of hepatic fibrosis[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1998, 27(1):75-78.
- [13] 易毛,韩晋.复方鳖甲软肝片[J].中国新药杂志,1999,18(4):631.
- [14] 周光德,李文淑,赵景民,等.复方鳖甲软肝片抗肝纤维化机制的临床病理研究[J].解放军医学杂志,2004,29(7):563-564.
- [15] 赵景民,周光德,李文淑,等.复方鳖甲软肝片抗肝纤维化机制的临床病理研究[J].解放军医学杂志,2004,29(7):560-562.
- [16] 高建蓉.鳖甲防治肝纤维化及其作用机制的实验研究[D].武汉:湖北中医学院,2007.
- [17] 贺松其,文彬,吕志平,等.鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠转化生长因子  $\beta_1$  的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2006,14(1):11-13.
- [18] 谢世平,司富春,赵君玫,等.鳖甲煎丸对免疫性肝纤维化大鼠胶原及相关细胞因子表达的影响[J].中国医药学报,2004,19(7):412-415.
- [19] 肖小河,金城,鄢丹,等.中药大质量观及实践[J].中草药,2010,41(4):505-507.
- [20] 肖小河,鄢丹,袁海龙,等.基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建[J].中草药,2009,40(9):1345-1348.

(收稿日期:2011-12-20)

(本文编辑:刘群)