

投送学科
一级学科： 药学
二级学科： 药物分析学
如是学科交叉研究，所涉及的
一级学科： 化学
二级学科： 分析化学

是否涉密：

是

否

中国博士后科学基金 面上资助申请书 (第 42 批)

申请者：	彭金咏	博士后全国统一编号：	59155
设站单位：	中国科学院大连化学物理所		
项目名称：	黄连-吴茱萸配伍抗肿瘤增效减毒的蛋白组机理		
研究方向：	药学		
通讯地址：	大连市中山路 457 号		
邮政编码：	116023	E-mail：	jinyongpeng2005@163.com
固定电话：	84720076	移动电话：	13840814277
申请日期：	2007 年 9 月 17 日		

中国博士后科学基金

填 报 须 知

1. 申请者应认真阅读《中国博士后科学基金资助规定》和《中国博士后科学基金面上资助实施办法》，按有关要求逐项填写《中国博士后科学基金面上资助申请书》（以下简称《申请书》）。

2. 申请者首先在中国博士后网上 (www.chinapostdoctor.org.cn) 填写《申请书》，并在网上提交到设站单位，然后下载打印一式 3 份（A4 纸双面打印，左侧装订），报送到设站单位进行审核。

如申请项目涉密，不得在网上填报。需下载空白《申请书》后填写纸质一式 8 份，与电子版同时报送到设站单位进行审核。

3. 设站单位在规定的时间内，将审核后的《申请书》统一从网上提交到中国博士后科学基金会，纸质材料加盖设站单位博士后管理部门公章后一并报送。

4. 本《申请书》封面上的“投送学科”系指申请者所报项目所属的学科，若是学科交叉研究项目，则应填写所涉及的学科名称。学科名称须按照一九九七年国务院学位委员会公布的《〈授予博士、硕士学位和培养研究生的学科、专业目录〉修订前后对照表》的标准名称填写。“研究方向”系指申请者所报项目的研究方向。

5. 填表必须实事求是，认真翔实，不得弄虚作假。

一、个人 信 息

姓 名	彭金咏	性 别	男	出 生 日 期	1973.10.17
身份证号	420106197310170835	国 籍	中国	民 族	汉族
进站时间	2007-07-01		预计出站时间	2009-07-01	
博士后 招收类型	流动站 <input checked="" type="checkbox"/> 设站单位名称: 中国科学院大连化学物理所 工作站 <input type="checkbox"/> 设站单位名称: 联合招收单位名称:				
学 位 情 况	学位	获得年月	授予学位单位	专 业	导 师
	学士	1996-06	同济医科大学	药 学	林 宁
	硕士	2003-07	浙江大学	药物分析学	曾 苏
	博士	2006-06	第二军医大学	药物分析学	吴玉田
主 要 研 究 工 作 经 历	起 止 年 月	单 位	研 究 内 容	项 目 分 工	
	2001-04	浙江大学	国家重大基础研究计划“973”项目-气血并治方剂的研究(G1999054405)	活性组分的发现、制备工艺及质量标准	
	2004-04	第二军医大学	国家重大科技专项“创新药物和中药现代化”所属专题新药博士基金项目“薏苡附子败酱散的药效物质基础、作用机制和体内过程分析”(2003AA2Z3524)	主要完成人-物质基础、制备工艺、体内过程分析	
	2004.07	第二军医大学	国家创新药物-乳癖消软胶囊的二次开发研究	主要完成人-活性组分的筛选、制备工艺、质量标准、药理和毒理	
	2006-11	大连医科大学	基于生物质谱技术的左金丸逆转肿瘤细胞多药耐药的分子机制-大连市科技局优秀青年人才基金项目	项目负责人	
	2007-07	中科院大连化物所	基于蛋白质组学的鹿茸活性成分筛选	博士后科研课题,正在进行中	

内容包括:

曾参加过何种重要科学研究活动, 有哪些发明和创造, 曾获得何种专利, 曾获得何种科技奖励及在获奖人中的排名, 已在国内外核心刊物上的发表论文等等。

近年来, 本人共申请国家发明专利 6 项; 主编和参编学术专著 3 部; 作为第一作者或通讯作者在国内外刊物上发表科研论文 30 多篇, 其中 26 篇被 SCI 收录, 累计影响因子近 50 分, 总被引用近 100 次, 并先后荣获 5 项省部级奖项。

近期主要代表性论文:

1) Jinyong Peng, Guorong Fan, Zhanying Hong, Yifeng Chai, Yutian Wu. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1074 (1-2): 111-115.

2) Jinyong Peng, Guorong Fan, Yutian Wu. Supercritical fluid extraction of aurenitiamide acetate from *Patrinia villosa* Juss and subsequent isolation by silica gel and high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1083 (1-2): 52-57.

3) Jinyong Peng, Guorong Fan, Liping Qu, Xin Zhou, Yutian Wu. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for isolation and separation of schizandrin and gomisin A from *Schisandra chinensis*. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1082 (2): 203-207.

4) Jinyong Peng, Guorong Fan, Yutian Wu. Isolation and purification of clemastanin B and indigocticoside A from *Radix Isatidis* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1091 (1-2): 89-93.

5) Jinyong Peng, Genjing Yang, Guorong Fan, Yutian Wu. Preparative isolation and separation of a novel and two known flavonoids from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092 (2): 235-240.

6) Jinyong Peng, Guorong Fan, Yifeng Chai, Yutian Wu. Efficient new method for extraction and isolation of three flavonoids from *Patrinia villosa* Juss. by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1102 (1-2): 44-50.

7) Jinyong Peng, Guorong Fan, Yutian Wu. Preparative isolation of four new and two known flavonoids from the leaf of *Patrinia villosa* Juss. by counter-current chromatography and evaluation their anticancer activities in vitro. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1115 (1-2): 103-111.

8) Jinyong Peng, Yunyun Jiang, Guorong Fan, Bin Chen, Qiaoyan Zhang, Yifeng Chai, Yutian Wu. Optimization suitable conditions for preparative isolation and separation of curculigoside and curculigoside B from *Curculigo orchoides* by high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, 2006, 52 (1): 22-28.

曾获得的
研究成果

- 9) Jinyong Peng, Guorong Fan, Yutian Wu. Preparative Isolation and Separation of Three Flavonoids and Three Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum japonicum* Thumb. Using High-Speed Counter-current Chromatography by Stepwise Increasing the Flow Rate of the Mobile Phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2006, 29 (11): 1619-1632.
- 10) Liping Qu, Jinyong Peng*. Single-step Preparative Isolation and Separation of Three Flavonones from *Sophore flavescens* using High-speed Countercurrent Chromatography with Stepwise Increase in the Mobile Phase Flow Rate. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2006, 29 (6): 913-924.
- 11) Jinyong Peng, Guorong Fan, Yutian Wu. Two new dihydroflavonoids from *Patrinia villosa* Juss. *Chinese Chemical Letters*, 2006, 17 (2): 218 - 220.
- 12) Jinyong Peng, Guorong Fan, Yutian Wu. Two new dihydroflavonoids from *Patrinia villosa* Juss (II). *Chinese Chemical Letters*, 2006, 17 (4): 485-488.
- 13) Jinyong Peng, Fuqiu Dong , Qiwei Xu , Youwei Xu , Yan Qi , Xu Han , Lina Xu, Guorong Fan, Kexin Liu. Orthogonal test design for optimization of supercritical fluid extraction of daphnoretin, 7-methoxy-daphnoretin and 1,5-diphenyl-1-pentanone from *Stellera chamaejasme* L. and subsequent isolation by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1135 (2): 151-157.
- 14) Xin Zhou, Jinyong Peng, Guorong Fan, Yutian Wu. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092 (2): 216-221.
- 15) C.H. Ma W. Ke, Z.L. Sun, J.Y. Peng, Z.X. Li, X. Zhou, G.R. Fan, C.G. Huyang. Large-scale isolation and purification of scoparone from *Herba artemisiae Scopariae* by high-speed counter-current chromatography. *Chromatographia*, 2006, 64 (1-2): 83-87.
- 16) Li-ping Qu, Guo-rong Fan, Jin-yong Peng, He-ming Mi. Isolation of six isoflavones from *Semen sojae preparatum* by preparative HPLC. *Fitoterapia*, 78 (2007): 200-204.
- 17) 彭金咏, 范国荣, 吴玉田, 陈洪渊. 白花败酱草中异苈草苷和异牡荆苷的高速逆流色谱分离和制备. *分析化学*, 2005, 33 (10): 1389-1392.
- 18) 彭金咏, 范国荣, 吴玉田, 陈洪渊. 反相制备液相色谱分离纯化白花败酱草异戊烯基黄酮. *分析化学*, 2006, 34 (7): 983-987.
- 19) 彭金咏, 范国荣, 吴玉田. 白花败酱草化学成分的分离与鉴定. *药学学报*, 2006, 41 (3): 236-240.
- 20) 彭金咏, 范国荣, 吴玉田. 白花败酱草化学成分研究(II). *中国中药杂志*, 2006, 31 (2): 128-130.
- 21) 彭金咏, 范国荣, 吴玉田. 白花败酱草化学成分研究. *中药材*, 2005, 10: 883-884.

- 22) 彭金咏, 范国荣, 吴玉田. 白花败酱草中黄酮类成分的高速逆流色谱法快速制备. 中国药学杂志, 2006, 41 (13): 977-979.
- 23) 彭金咏, 栾连军, 程翼宇. 精制血府逐瘀方不同配伍情况下芍药苷的溶出量. 中国中药杂志, 2003, 28 (6): 516-518.
- 24) 彭金咏, 栾连军. 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶的研究进展. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19 (5): 373-376.
- 25) Jin Yong Peng, Haiyan Liu, Yan Qi, Xu Han, Youwei Xu, Lina Xu, Qiwei Xu. A new bioactive dihydroflavanoid from *Dolichos tenuicaulis* (Baker) Craib. Chinese Chemical Letters, 2007, 18 (3): 293-296.
- 26) JIN-YONG PENG, FU-QIU DONG, KE-XIN LIU, XU HAN, YOU-WEI XU, YAN QI, QI-WEI XU and LI-NA XU. Two new bioactive prenylated dihydroflavanoids from the medicinal plant *Dolichos tenuicaulis* (Baker) Craib. Journal of Asian Natural Products Research, 2007, in press.
- 27) Tingting Zhou, Zhenyu Zhu, Chen Wang, Guorong Fan, Jinyong Peng, Yifeng Chai, Yutian Wu. On-line purity monitoring in high-speed counter-current chromatography: Application of HSCCC-HPLC-DAD for the preparation of 5-HMF, neomangiferin and mangiferin from *Anemarrhena asphodeloides*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44 (2007) 96-100.
- 28) JIN-YONG PENG, XU HAN, LI-NA XU, YOU-WEI XU, YAN QI and QI-WEI XU. Two new prenylated coumarins from *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl. Journal of Asian Natural Products Research, 2007, in press.
- 29) Jinyong Peng, Xu Han, Yan Qi, Youwei Xu, Lina Xu, Qiwei Xu. A new prenylated coumarin from *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl. Fitoterapia (Accpeted).
- 30) Jinyong Peng, Libin Zhan, Fuqiu Dong, Youwei Xu, Xu Han, Yan Qi, Lina Xu, Qiwei Xu, and Kexin Liu. A comparative study of chromatographic methods for separating chemical compounds from *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl roots. Separation and Purification Technology, in press.
- 31) Jinyong Peng, Qiwei Xu, Youwei Xu, Yan Qi, Xu Han, Lina Xu. A new anticancer dihydroflavanoid from the root of *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl. Natural Product Research, 2007, 21 (7): 641-645.
- 32) Jinyong Peng, Fuqiu Dong, Yan Qi, Xu Han, Youwei Xu, Lina Xu, Qiwei Xu, Kexin Liu, Zhenyu Zhu. Preparative separation of four triterpene saponins from *Radix astragali* by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection. Phytochemical Analysis, 2007, 2007, 18 (6): 页码待定.
- 33) Jinyong Peng, Xu Han, Youwei Xu, Yan Qi, Lina Xu and Qiwei Xu. New approach of application High Speed Countercurrent Chromatography Coupled with Direct Injection the powders of a Raw Materials without any Preparation, for Isolation and Separation of Four Alkaloids with High Recoveries from *Coptis chinensis* Franch. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2007, 30 (19): 2929-2940.
- 34) 彭金咏, 许丽娜, 韩旭, 许有威, 齐艳, 徐奇玮. 大麻药中两个新异戊烯

基黄酮的高速逆流色谱分离制备. 分析化学, 出版中.

35) 王晓娜, 许丽娜, 彭金咏*, 刘克辛. 现代生物质谱技术在生物大分子分析研究中的应用. 中国现代应用药学杂志, 出版中.

36) 许有威, 齐艳, 韩旭, 许丽娜, 徐奇玮, 彭金咏*. 高速逆流色谱结合大孔树脂从龙胆中快速分离高纯度龙胆苦苷. 中国中药杂志, 出版中.

37) 许有威, 许丽娜, 尹连红, 齐艳, 韩旭, 徐奇玮, 彭金咏*. 采用高速逆流色谱结合粉末直接进样分离槐花中的芦丁. 大连医科大学学报, 出版中.

38) 许丽娜, 蔡博能, 尹连红, 王晓娜, 彭金咏*. 紫外分光光度法测定大麻药及其提取物中总皂苷的含量. 大连医科大学学报, 出版中.

39) Yan Qi, Xu Han, Youwei Xu, Lina Xu, Xiaona Wang, Lianhong Yin, Qiwei Xu, Jinyong Peng*. Efficient continuous-flow ultrasound-assisted extraction (CF-UAE) of curcumin from *Curcuma longa* L, *Curcuma aromatica* Salisb and *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc using non-ionic surfactant containing extraction solvent system. *Journal of Chromatography A*, Accepted.

申请专利情况:

1) 柚皮甙、柚皮芸香甙、橙皮甙和新橙皮甙高纯度分离纯化方法. 申请号: 200410053284.7; 公开号: CN1587272A.

2) 白花败酱草中几种高纯度药用物质的快速制备方法. 申请号: 200410068016.2; 公开号: CN1634875A.

3) 短瓣金莲花总黄酮和几种高纯度药用物质的制备工艺. 申请号: 200410093126.4; 公开号: CN1660864.

4) 中药复方薏苡附子败酱散抗肿瘤活性组分的制备工艺. 申请号: 200610023375.5; 公开号: CN1840114A.

5) 化合物(2S)-5,7,2',6'-四羟基-6,8-二异戊烯基-二氢黄酮的提取工艺及其应用. 申请号: 200610026825.6. 公开号: CN1850816.

6) 大麻药中抗肿瘤活性组分大麻药黄酮 A 的提取方法. 申请号: 200610134431.2. 公开号: CN1962665.

参编著作及教材:

1、《手性药物与手性药理学》参编, 浙江大学出版社, 2002.

2、《现代色谱分析》参编, 第二军医大学出版社, 2004.

3、2007年执业药师资格考试(中药学类) - 《中药学专业知识(二)/考题分级解析》主编, 人民军医出版社, 2007.

获奖情况:

1、2000.01 荣获湖北省卫生系统先进工作者荣誉称号

2、2006.12 荣获李瑞麟教育医学奖

3、2006.07 荣获上海市药学优秀论文二等奖

4、2007.06 荣获大连医科大学优秀共产党员荣誉称号

5、2007.05 荣获辽宁省自然科学优秀论文二等奖

二、申报项目审核与评审结果

名称	中文	黄连-吴茱萸配伍抗肿瘤增效减毒的蛋白组机理
	英文	Proteomics mechanism of toxicity-reducing and efficacy-enhancing anticancer actions induced by the interaction of Coptis chinensis Franch and Evodia rutaecarpa (Juss.) Benth
研究类别	基础研究 <input checked="" type="checkbox"/> 应用基础 <input type="checkbox"/> 技术开发 <input type="checkbox"/>	
项目来源	自选项目 <input checked="" type="checkbox"/> 国家自然科学基金项目 <input type="checkbox"/> 863高技术研究项目 <input type="checkbox"/> 973计划项目 <input type="checkbox"/> 国家社科基金项目 <input type="checkbox"/> 其它国家级重点项目 <input type="checkbox"/> 省市或部门重大项目 <input type="checkbox"/> 其它项目 <input checked="" type="checkbox"/>	
研究经费来源及数额	50000	
申请者承诺	我保证填报内容真实、准确。如果获得资助，我将严格遵守中国博士后科学基金资助的有关规定，按计划认真开展研究工作，切实保证完成研究工作任务。 <p style="text-align: center;">申请者（签章）：</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;">年 月 日</p>	
申报单位审核意见	我单位已对申请人的资格和《申请书》内容进行了认真审核，本表各项内容属实，符合申请条件。 <p style="text-align: center;">负责人（签章）：</p> <p style="text-align: center; margin-left: 150px;">单位（盖章）：</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;">年 月 日</p>	

评定结果	<p>经专家评审， 决定： 给予 _____ 博士后中国博士后科学基金面上资助 _____ 等资助， 金额为人民币 _____ 万元。</p> <p>中国博士后科学基金会（盖章）</p> <p>年 月 日</p>
------	--

三、专家推荐意见

合作导师对申报人和申报项目的评价	<p>内容包括： 对申报项目内容的真实性和知识产权问题等提出审核意见，并对申请者的研究方法和创新能力，对申报项目的科学价值和应用价值以及预期成果提出评价意见。</p> <p>基于蛋白质组学技术开展中药机理研究对于揭示中药复杂体系各成分与生物靶点间分子网络调控及配伍协同机制具有重要意义。本项目选择在临床具有显著治疗效果的黄连-吴茱萸配伍中药为研究对象，拟采用蛋白质组学技术开展黄连吴茱萸配伍作用机制和化学成分谱-药效谱-生物信息谱三元谱间关联性分析的研究。研究成果不仅有望揭示黄连吴茱萸在抗肿瘤上的增效减毒作用机理，而且可以建立新型的中药复方研究技术平台。</p> <p>彭金咏博士在中药化学成分及活性研究方面具有很好的研究基础，取得了一系列创新性成果，发表了一些高水平的文章。具有很好的知识积累和科研能力。</p> <p>本项目选题具有很好的创新性，研究目标明确，技术路线合理。建议对本项目优先资助。</p> <p>推荐人姓名：张玉奎 职称：研究员、中科院院士 专业：分析化学 推荐人单位：中国科学院大连化学物理研究所</p> <p style="text-align: right;">2007年9月20日</p>
推荐意见	<p>本人同意推荐该博士后申请中国博士后科学基金资助。</p> <p>推荐人姓名： 职称： 专业：</p> <p>推荐人单位： 专家（签章）：</p> <p style="text-align: right;">年 月 日</p>

<p>同行专家对申报人和申报项目的评价</p>	<p>内容包括： 对申报项目内容的真实性和知识产权问题等提出审核意见，并对申请者的研究方法和创新能力，对申报项目的科学价值和应用价值以及预期成果提出评价意见。</p> <p>本课题选择经典药对黄连 - 吴茱萸维研究对象，运用蛋白质组学技术来开展中药复杂体系各成分与生物靶点间分子网络调控及配伍协同机制的研究，具有重要意义。本项目选题新颖、设计合理、研究手段先进，采用蛋白质组学技术进行黄连吴茱萸化学成分谱 - 药效谱 - 生物信息谱三元谱间关联性分析，不仅可以揭示黄连吴茱萸在抗肿瘤上的增效减毒作用机制，而且为中药复方的配伍研究提供新的思路和方法。</p> <p>彭金咏博士在中药及中药复方的化学成分、活性、分离分析新技术与新方法等研究方面具有很好的研究基础，发表了多篇高水平的科研论文，取得了一系列创新性成果，具有很强的科研能力和创造能力。</p> <p>因此，建议对本项目优先资助。</p> <p>推荐人姓名：刘克辛 职称：教授 专业：药理学 推荐人单位：大连医科大学药学院</p> <p style="text-align: right;">2007年9月22日</p>
<p>推荐意见</p>	<p style="text-align: center;">本人同意推荐该博士后申请中国博士后科学基金资助。</p> <p>推荐人姓名： 职称： 专业：</p> <p>推荐人单位： 专家（签章）：</p> <p style="text-align: right;">年 月 日</p>

四、申报项目简介

内容包括:

概括项目主要内容、项目的预期目标、科学意义、应用前景、创新与发展。

中医学是中华民族几千来防病治病丰富实践经验的结晶，中医能辨西医不明之症，中药能治西药难治和不治之症。因此，对中医药尤其是对具有君、臣、佐、使配伍理论体系中中药复方的研究，从分子水平上阐明其作用机理、药效物质基础和配伍机制，这不仅对我国的中药现代化研究，也对中医药走出国门等具有重要意义。

黄连和吴茱萸是两种常用的名贵中药，二者以 6:1 配伍组成的中药复方即是出自《丹溪心法·六火》的经典名方 - 左金丸，亦被中国药典所收载，具有泻火、疏肝、和胃、止痛等功效，临床主要用来治疗胃溃疡、胃酸过多和脘肋疼痛等症，主要活性成分为生物碱、内酯和多糖等，其中来自黄连的生物碱和吴茱萸多糖等均具有抗肿瘤活性。

中药复方发生作用往往是多成分、多靶点和多途径的综合过程，不同类型的成分间又存在配伍协同效应，其结果的外在表现为药理活性的增强和毒性的减低，内在原因是一系列生物大分子结构、功能和量的改变，调节这些结构和功能的直接作用者是蛋白质。如何体现中药小分子群及其相互作用与生物功能分子间的关系和网络调控是摆在药学、中药学和生物学家面前亟待探索的问题，也是中医药研究中的热点和瓶颈问题。

然而，目前对中药复方配伍的研究，大多只停留在简单的药效、配伍化学成分的变化和整体动物模型上的初步机理等研究，未能从分子水平和微观上对配伍所产生的增效减毒现象作深入的机制探讨，导致了中医药在很大程度上不能被西方接受和认可。

传统的对单一蛋白质的分析和研究难以满足现代中药复杂体系的系统探索 and 现代系统生物学的发展要求。蛋白质组学 (proteomics) 的发展为中医药学的深入研究提供了新的技术平台，它是以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象。因此，可以利用该技术来研究和比较中药复方不同配伍给药后细胞或组织内的差异蛋白质，通过蛋白质表达谱和表达产物的差比性分析，来揭示中药成分的多靶点、多环节的作用过程，进而探索中药复方中成分间的相互关系。

本项目中选择经典药对黄连 - 吴茱萸为实验材料，进行相关抗肿瘤活性实验。在建立各样品化学成分谱和药效谱的基础上，借助于蛋白质组学研究技术，以生物样本

中的蛋白质为研究对象，进行现代生物质谱、多维凝胶电泳和多维色谱的分析研究，建立不同配伍给药后各样本的质量肽谱（MS charting）和质量指纹谱（peptide mass fingerprinting, PMF）等生物信息指纹谱，通过对比分析、因子分析和神经网络等化学模式识别技术对化学成分谱 - 药效谱 - 生物信息谱三元指纹谱间的关联性进行分析，来揭示黄连和吴茱萸药对抗肿瘤多成分、多靶点和多途径的作用机理和成分间的配伍协同机制。

项目的预期目标:

- 1、解释黄连吴茱萸药对抗肿瘤的分子作用机理及配伍协同机制，并证实古方左金丸组方的合理性。
- 2、将蛋白质组学相关技术应用于中药复方的研究当中来，探讨可供中医药研究借鉴的技术平台。
- 3、首次在中医药研究中提出了化学成分谱 - 药效谱 - 生物信息谱三元指纹谱的概念，并探讨了其关联性。
- 4、在国内外核心期刊上发表科研论文 2~3 篇，其中至少一篇为 SCI 收录。
- 5、培养硕士研究生 1~2 名。

本项目的创新点及应用:

目前有关黄连和吴茱萸配伍的研究报道较多，但只涉及到药理、成分变化和定量、简单的作用机制等方面，有关蛋白质组学及现代生物质谱等技术用于黄连吴茱萸配伍作用机制和化学成分谱 - 药效谱 - 生物信息谱三元谱间关联性分析的研究均未见报道，也未见黄连吴茱萸配伍在抗肿瘤活性上的增效减毒作用的研究报道，创新点和应用具体体现在：

- 1、本项目从整体高度和生物信息学的角度出发，将蛋白组学相关技术应用到中药复方配伍机制的研究当中来，揭示中药复杂体系各成分与生物靶点间分子网络调控及配伍协同机制。
- 2、在中药复方研究中，首次提出了“化学成分谱 - 药效谱 - 生物信息谱三元指纹谱的关联性分析”这一概念，旨在探索新的和可供中药复方研究借鉴的技术平台。
- 3、揭示了左金丸组方的合理性及其在抗肿瘤方面的应用，拓宽了其应用范围。

五、申报项目的内容

(注：可自行加页。)

该项目的主要内容有：

- 1、黄连和吴茱萸及不同组合配伍样品活性部位的制备：黄连和吴茱萸及其不同比例配伍（6:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:4、1:6）样品先用水加热回流提取一次，过滤后的药渣再用75%的乙醇回流提取一次，合并滤液，减压浓缩后真空干燥，即得。
- 2、优化色谱质谱分析条件，建立各样品的化学成分谱。
- 3、肿瘤细胞和动物模型：选择H22小鼠肝癌移植性肉瘤和腹水肿瘤模型进行药理活性实验，测定抑瘤率、肿瘤抑制生长因子、细胞凋亡等指标，并进行肿瘤细胞的显微照相、肉瘤和脾脏的病理切片，建立相关的药效谱。
- 4、制备不同配伍给药后肉瘤和腹水总蛋白：依据相关文献和蛋白组研究技术，采用超声对腹水瘤和肉瘤细胞破碎后，用去垢剂对膜蛋白融解后用水溶液提取，再用凝胶过滤法和亲和层析法对蛋白质和非蛋白进行分离。用胰蛋白酶对所得蛋白质进行酶解，并用冰冻的方法终止反应。
- 5、生物信息指纹谱的建立：采用多位凝胶电泳和现代生物质谱技术MALDI-TOF-MS/MS、2DHPLC-ESI-MS/MS和PAGE-LC-ESI-MS/MS建立黄连和吴茱萸及不同组合配伍给药后的质量肽谱和质量指纹谱等生物信息指纹谱。
- 6、生物信息的获取和相互关系的辨识：采用对比分析、因子分析和神经网络等化学模式识别技术对各组实验样品化学成分谱-药效谱-生物信息谱进行关联性分析，找出其相关性及指标性生物信息，阐明黄连吴茱萸抗肿瘤的分子机理及成分间的配伍协同机制。
- 7、研究成果及相关材料的整理：专利申报、科研论文的撰写和结题材料的整理。

六、申报项目的研究方法

内容包括：

研究计划、拟采取的研究方法、实验方案、技术路线、已具备的条件及目前进展的情况、资助金的拟用计划。

申报项目的研究方法：

该项目共分五个阶段进行，如下。

第一阶段：实验用样品的制备及各样品化学成分谱的建立 制备黄连吴茱萸及其不同配比（6:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:4、1:6）各样品，并采用 HPLC-MS/MS 建立各样品的化学成分谱。

第二阶段：样品的抗肿瘤活性实验 采用 H₂₂ 小鼠移植性肉瘤和腹水瘤模型，给药后测定抑瘤率、肿瘤坏死因子 α 、脾指数，并进行肿瘤细胞的形态学以及肉瘤和脾脏的病理切片分析，构建相关药效谱。

第三阶段：生物信息谱的建立 利用蛋白组学等技术对给药组肿瘤细胞总蛋白进行提取、分离纯化和酶解，再采用现代生物质谱，多维凝胶电泳和多维色谱等技术建立不同配伍给药后的质量肽谱和质量指纹谱等生物信息指纹谱。

第四阶段：关联性分析 通过对比分析、因子分析和神经网络等化学模式识别技术对化学成分谱 - 药效谱 - 生物信息谱间三元指纹谱间的关联性进行分析和辨识，找出相关和差异来揭示黄连和吴茱萸药对抗肿瘤作用多成分、多靶点和多途径的作用机理和成分间的配伍协同机制。

第五阶段：课题的收尾阶段 专利申报、科研论文的撰写和结题材料的整理。

具体见下图 1。

已经具备的研究条件：

本项目依托于中国科学院大连化学物理研究所的国家色谱分析中心，申请者所在科室具有 LCQ^{DUO} 质谱仪（Thermo Finnigan）、ESI-TOF（Michrom）质谱仪、JASCO、Shimadzu、大连依利特、上海通微等厂家生产高效液相色谱仪 10 台、Michrom 微流高效液相色谱仪、Shimadzu 制备型高效液相色谱仪、Beckman Coulter 毛细管电泳仪、JASCO 超临界流体色谱仪、微流控芯片检测仪、Invitrogen 蛋白等电分离器、Cole Pamer 细胞超声破碎仪等多种与蛋白分离分析研究的技术平台，还具有标准化的细胞培养室和实验动物室，完全可以满足本申报项目的实验要求。

该项目组成员具有从事中药药理、作用机制、蛋白分离和分析的科研人员、硕士和博

士生组成，知识层析搭配合理，完全有能力顺利完成本项目的研究工作。

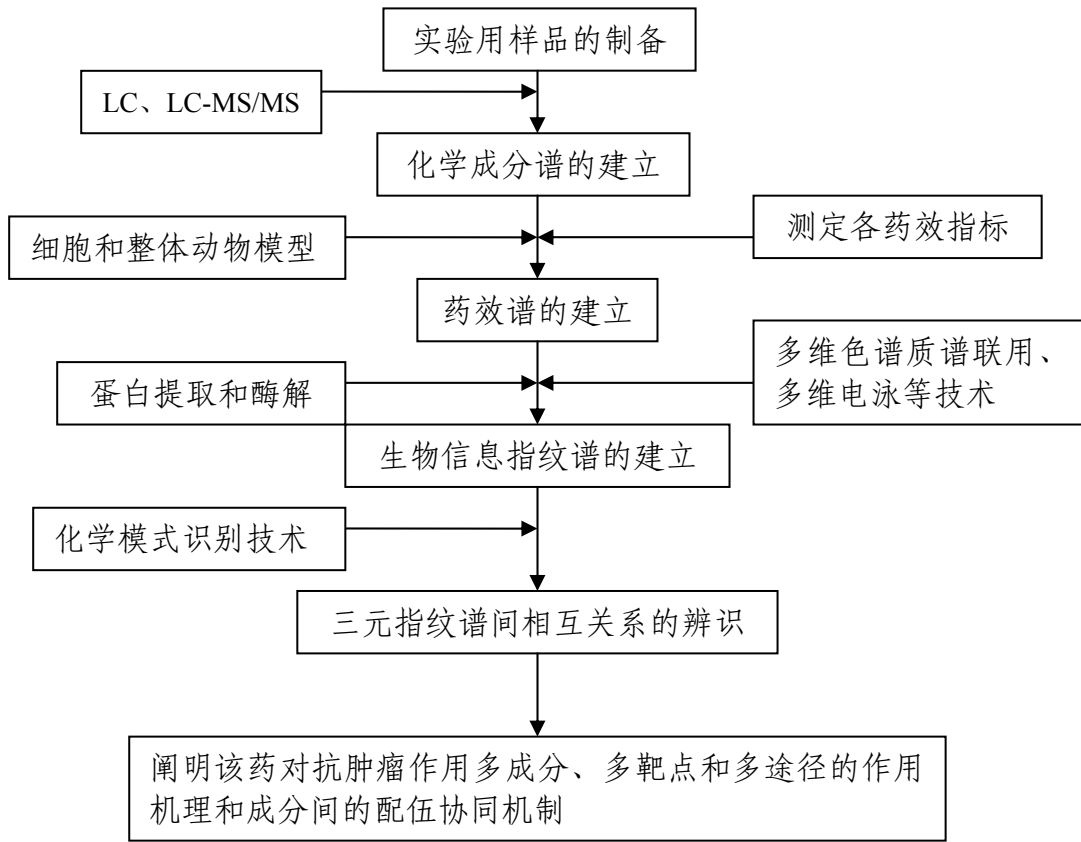


图 1 实验方法流程图

项目的前期研究基础:

- 1、实验用样品的制备 目前已经制备了黄连、吴茱萸及其不同配伍的各组实验用样品。
- 2、初步的药理活性实验 并对所得样品进行了体内抗移植性 H22 小鼠肉瘤的活性试验，相关抑瘤率、脾指数、肿瘤细胞的形态学分析等下见表 1 和图 2。

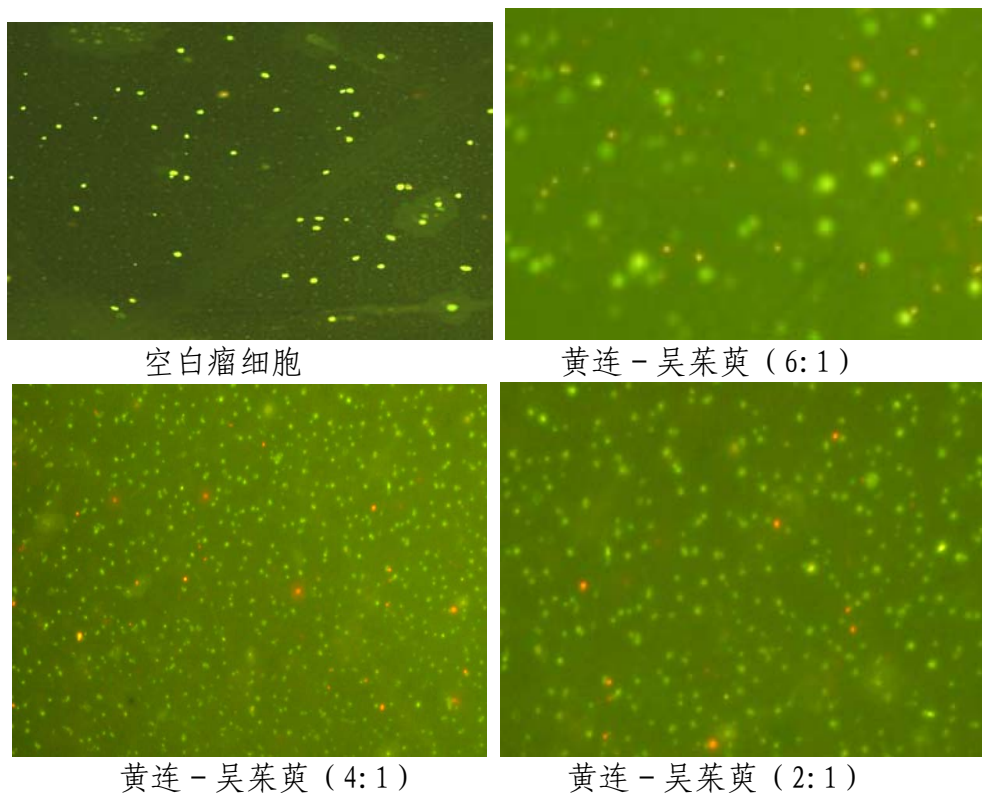
表 1 黄连、吴茱萸及不同配伍对移植性 H22 小鼠肝癌的生长抑瘤率及脾指数

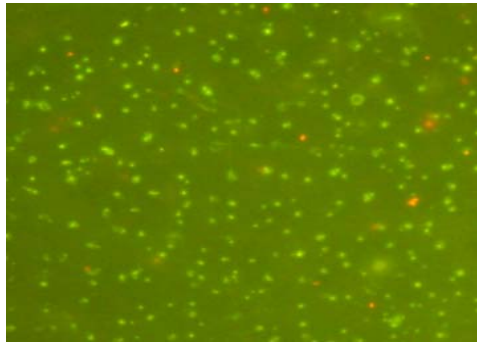
组别	给药剂量 mg/kg	抑瘤率 %	脾重 0.1 mg/10g ($\bar{x} \pm S.D.$)
环磷酰胺	20	35.4	0.1689±0.0403
黄连	200	35.0	0.1748±0.0115
吴茱萸	200	39.3	0.1796±0.0553
黄连：吴茱萸 6:1	200	60.0	0.1944±0.0321
黄连：吴茱萸 4:1	200	44.8	0.2300±0.0412
黄连：吴茱萸 2:1	200	31.9	0.1791±0.0218
黄连：吴茱萸 1:1	200	30.3	0.2230±0.0245
黄连：吴茱萸 1:2	200	28.1	0.1740±0.0233
黄连：吴茱萸 1:4	200	24.0	0.1790±0.0488
黄连：吴茱萸 1:6	200	28.6	0.1745±0.0441

由表 1 可知，黄连和吴茱萸间存在明显的配伍作用，当二者的配伍比例为 4: 1 和 6: 1 时，对肿瘤的生长有着显著的抑制作用，明显高于黄连和吴茱萸及其他配伍比例给药时的抗肿瘤效果；当二者的配伍比例为 2: 1 ~ 1: 6 时，抗肿瘤作用显著低于 4: 1 和 6: 1 比例配伍时的效果，也低于二者单独给药时产生的作用。以上结果表明黄连和吴茱萸按照一定的比例配伍时，可产生协同或抑制作用，并与二者的用药量有关，即与两药材化学成分的种类及含量密切相关。从各给药组小鼠脾脏的重量可以看出，黄连、吴茱萸及其不同配伍时小鼠的脾重均高于阳性对照药环磷酰胺，表明黄连、吴茱萸及其不同配伍各给药组均可不同程度的保护机体的免疫系统。以上结果可从肿瘤细胞的显微照片、肉瘤和脾脏的病理切片中得到证实。

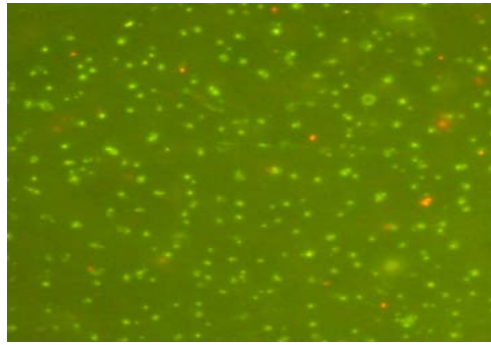
肿瘤细胞的形态学分析可知，空白组肿瘤细胞经 AO: EB 染色细胞多呈黄绿色荧光几乎未见凋亡细胞；在黄连、吴茱萸及不同比例配伍各给药组中，出现凋亡细胞；在黄连、吴茱萸及不同比例配伍各给药组中，出现凋亡细胞，尤其是在黄连 - 吴茱萸 (6: 1) 组中，可明显看到橘红色或强橘红色晚期凋亡或死亡细胞；在其他各组配伍中，也可见部分凋亡或坏死的肿瘤细胞；这与各给药组对肿瘤生长的抑制作用的实验结果一致。

有关肉瘤和脾的病理切片、细胞凋亡的流式细胞分析、肿瘤生长抑制因子、肿瘤细胞蛋白的提取分离和酶解、生物质谱分析等工作正在或即将进行。

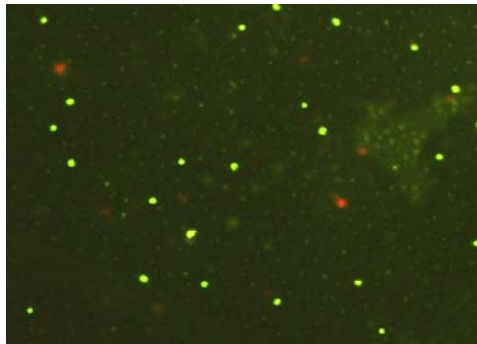




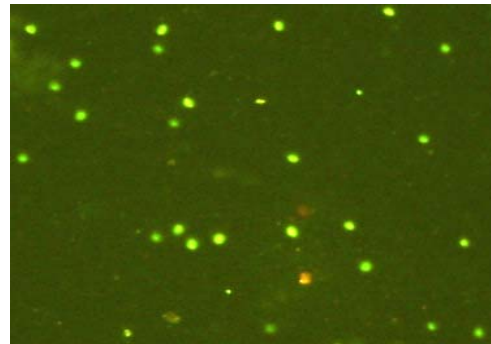
黄连 - 吴茱萸 (1:1)



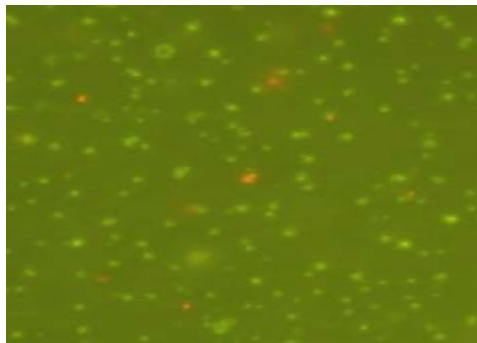
黄连 - 吴茱萸 (1:2)



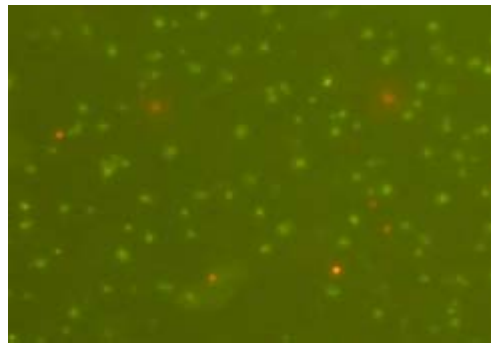
黄连 - 吴茱萸 (1:4)



黄连 - 吴茱萸 (1:6)



黄连



吴茱萸

图 2 不同配伍给药后肿瘤细胞的显微照片

资金的使用计划:

第一阶段: 共需科研经费 1.6 万元, 主要用于进一步的药理活性实验、肿瘤生长抑制因子的测定、流式细胞仪分析及相关病理切片等药效谱和体外化学成分谱的建立等。

第二阶段: 共需科研经费 2.5 万元, 主要用于肿瘤细胞、肉瘤蛋白的提取、分离纯化、酶解、质谱分析鉴定及生物信息指纹谱的建立。

第三阶段: 共需科研经费 0.9 万元, 主要用于化学成分谱 - 药效谱和生物信息指纹谱间相互关系的辨识、黄连 - 吴茱萸配伍增效减毒作用分子网络调控的探讨、论文及专利等相关费用等。