

中药复方血清药理研究方法学探讨- I ^{*}

崔晓兰 贺玉琢 高英杰 李晓芹 周爱香 田甲丽 郭淑英 富杭育 姜廷良

(中国中医研究院中药所 北京 100700)

摘 要 以桂枝汤的体外抗病毒实验为手段,对家兔含药血清制备时不同的给药次数和采血时间进行了探讨。结果显示:家兔单次口饲给药后 1h、2h、3h 所采集的含药血清无抑制副流感病毒致细胞病变的作用;

* 国家自然科学基金资助项目(No:39630360)

每日 1 次口服给药,连续 3d,末次给药后 2h 的血清,有明显抑制副流感病毒致细胞病变的作用。

关键词 血清药理学方法学 桂枝汤 抗病毒作用

Study on a Serum-pharmacology Method of a Chinese Medical Formula- I

Cui Xiaolan, He Yuzhuo, Gao Yingjie, Li Xiaoqin, Zhou Aixian,

Tian Jiali, Guo Shuying, Fu Hangyu, Jiang Tingliang

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing, 100700)

Abstract: Antiviral effect of the serum from the rabbits dosed with GZD (Guizhi decoction) was observed in vitro. The result showed that the first, second or third hour's serum of the rabbits treated with GZD once a day had no antiviral effect, while the second hour's serum of the rabbits with GZD once a day for three days had significantly antiviral effect.

Key words: Serum-pharmacology, Guizhi decoction, antiviral effect

中药复方的体外实验通常是中药粗提物直接加入反应体系中进行药理学观察,这种方法存在许多弊端,以致使许多实验结果不能与体内实验结果和临床疗效相吻合。口服给药后采集的血清作为被研究的对象,由于客观地模拟了药物与机体相互作用的过程,在一定程度上克服了原体外实验方法中所存在的诸多不足之处,使所得结果更具科学性和可信性。在中药复方血清药理学的实验研究中,含药血清制备技术的规范化研究是一切研究的基础。本实验就单次口服给药、1 日 1 次连续 3d 给药以及末次给药后 1h、2h、3h 采血的方法进行了探讨,旨在为中药血清药理学的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 动物:大耳白兔、雄性,体重 2.5~3.0kg,由中国药品生物制品检定所提供。细胞:人喉癌细胞 Hep-2 株,购自中国药品生物制品检定所。病毒:副流感病毒 I 型,购自中国医学科学院病毒所。药品:桂枝汤由赤芍 10g,炙甘草 7g,大枣 10g,生姜 10g,桂枝 10g 组成,各药经鉴定后常规煎煮,浓缩至相当于 0.94g(生药)/ml 水煎剂,备用。

1.2 方法

1.2.1 正常家兔血清对 Hep-2 细胞的毒性界线 取家兔 8 只,耳中央动脉采血后分离血清,用 2%小牛血清的 Engle's 液做 1:2

~1:64 倍比稀释,加至已长成单层的 Hep-2 细胞板上,每个稀释度做 4 个复孔,置 37℃,5%的 CO₂ 培养箱中培养。每日倒置显微镜下观察细胞生长情况,连续 5d,以不出现细胞退变的最小稀释度为无毒界线。经观察正常家兔血清 1:4 稀释时对细胞生长无明显影响。

1.2.2 桂枝汤水煎液对 Hep-2 细胞的毒性界线 桂枝汤水煎液煮沸消毒后做 1:2~1:128 倍比稀释。具体过程同 1.2.1。经观察桂枝汤水煎液 1:32 倍稀释后对细胞生长无明显影响。

1.2.3 含药血清制备 大耳白家兔 8 只,每只每次按 2.2g 生药/kg 体重灌胃(相当于人临床等效剂量)。每日 1 次或每日 1 次连续 3 日,于末次给药后 1h、2h、3h 耳中央动脉采血,分离血清。正常血清于给药前采集。

1.2.4 血清对病毒致细胞病变的抑制作用 取已长成单层的 Hep-2 细胞板,弃去培养液,每孔接种 100TICD₅₀ 的副流感病毒液 50μl,置 37℃,5%的 CO₂ 培养箱中吸附 1h,弃去病毒液,以 2%小牛血清的 Engle's 液洗细胞面 2 次。依次加入不同时间采集的血清(终浓度为 1:4),每孔 100μl,每份血清平行测定 4 个复孔。置 37℃,5%的 CO₂ 培养箱中培养。每日倒置显微镜下观察细胞病变情况。当病毒感染对照组细胞病变为++++或培养

至 72h 时记录实验结果。细胞病变判定按 6 级分类标准^[1]。结果采用秩和检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 单次给药后 1h、2h、3h 采血结果 表 1 中数据表明:单次给药后 1h、2h、3h 所采集的血清以及正常血清和病毒感染组比较均有显著差异,提示二者均有抑制病毒致细胞病变的作用;各含药血清和正常血清比较无差异;水煎药液组和病毒感染组比较无差异。

表 1 单次给药后血清对病毒致细胞病变的影响

组 别	稀释度	细胞病变(孔数)						
		—	±	+	++	+++	++++	
含药血清 1h	1:4	15	0	10	3	2	2	Δ *
2h	1:4	25	0	5	1	0	1	Δ *
3h	1:4	17	3	6	2	3	1	Δ *
正常血清	1:4	19	0	10	3	0	0	Δ
水煎药液	1:32	0	0	0	11	20	1	
病毒对照		1	0	3	11	14	3	
细胞对照		32						

与病毒组比较 $\Delta P < 0.01$,与正常血清组比较 * $P > 0.05$

2.2 每日 1 次连续 3d 给药后 1h、2h、3h 采血结果 见表 2。统计学处理显示:每日 1 次连续 3d 给药后 1h、2h、3h 所采集的血清以及正常血清和病毒感染组比较有显著差异,提示二者均有抑制病毒致细胞病变的作用;和正常血清组比较,2h 采集的血清有显著差

表 2 每日 1 次连续 3d 给药血清对病毒致细胞病变的影响

组 别	稀释度	细胞病变						
		—	±	+	++	+++	++++	
含药血清 1h	1:4	0	4	2	12	4	10	Δ
2h	1:4	1	4	11	10	5	1	Δ *
3h	1:4	2	0	2	13	6	9	Δ
正常血清	1:4	3	0	1	14	3	11	Δ
水煎药液	1:32	0	0	0	4	7	21	
病毒感染		0	0	0	1	4	27	
细胞对照		32						

与病毒组比较 $\Delta P < 0.01$,与正常血清组比较 * $P < 0.01$

异,而和其它时间血清比较无差异。水煎药液组和病毒感染组比较无差异。

3 讨论

根据以上结果:单次给桂枝汤水煎剂后 1h、2h、3h 采集的血清以及正常血清均有显著的抑制病毒致细胞病变作用,且二者之间比较无差别,说明这种情况下血清所产生的药效不完全是药物作用的结果,主要是正常血清本身含有的抗病毒成分在起作用。可见单次给药后 1h、2h、3h 采血这种方法存在正常血清的抗病毒成分对实验结果的干扰,不能反应药物本身在体内的作用规律,因此需进一步探索。从每日 1 次连续 3d 给药后 1h、2h、3h 采血结果分析:各含药血清组和正常血清组与病毒感染组比较均有显著抑制病毒致细胞病变的作用,且和正常血清组比较,2h 所采集的血清有显著差异,而其它时间的含药血清则无差异。可见,每日 1 次连续 3d 给药后采血这种方法可反映出药效产生的时间点,突出含药血清本身的作用,基本排除正常血清对实验结果的干扰,优于单次给药的方法,但它是否是最佳方法,我们还在进行多方探讨,如 1 日多次给药,多日给药等,结果将会陆续报道。

从 2 次实验结果均可看出:桂枝汤水煎剂本身并无直接抗副流感病毒作用,而口饲桂枝汤后的含药血清则有明显作用,这种现象正是建立中药血清药理学的出发点。

参考文献

1 Moore D. F et al: Virus Inhibition Assay for Measurement of Acyclovir Levels in Human Plasma and Urin Antimicrob. Agenes Chmother, 1981, 20 (6):787~792

(收稿:1997-04-22)