

• 综述 •

中药血清药理学实验方法研究进展

彭智聪¹, 黄静宁¹, 郭宝丽², 张红玲²

(1 湖北省武汉市儿童医院, 武汉 430016; 2 湖北中医学院药理学系, 武汉 430061)

中图分类号: R285 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)02-0057-03

中药血清药理学是研究和探索中药药效作用的一种体外实验方法,对成分复杂的中药及粗提物制剂的药理实验提供了正确性、真实性和可靠性的保证,引起了医药界人士的广泛关注。由于含药血清与机体内环境相一致,从而排除了体内各种因素对中药及其制剂有效成分的影响,其科学性、可行性使中药药理研究易于深入到细胞分子水平,可对成分不明或复方中药制剂进行药效学和药动学研究。目前血清药理研究的成果及水平呈直线上升的趋势,实验报道越来越多。血清药理学实验的步骤很多,在许多重要环节上如处理不当,可使实验结果表现出假阳性或假阴性,故近年来对血清药理实验方法进行了系统的研究,现总结如下。

1 动物给药方法研究

血清药理实验方法首先要给动物服药,然后取其血清作为药物源进行药理学观察,用什么给药方法(剂量、给药次数等)使血清药理效应更好,是实验方法研究的第一步。如在桂枝汤的研究中,以体外抗病毒实验为手段,在制备家兔含药血清时,对不同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1、2、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;每日一次口饲给药,连续3d,末次给药后2h采集的血清,有明显抑制副流感病毒致细胞病变的作用^[1]。用头风饮为药物源,以抗血小板释放5-HT作用(¹⁴C-5HT释放法)和阻滞血管内皮细胞钙通道(⁴⁵Ca掺入法)为指标,比较了每日给药1次、2次和3次,及给1d、2d和3d(1次/d)6种给药方案,根据含药血清的药理作用强度,探讨不同给药方案对中药血清药理学方法的影响。结果表明,在给药总量一致的前提下,连续给药3d所取含药血清的抗5-HT作用比给药1d好。一天内一次给予11.67g/kg较分次给药作用好。以阻滞血管内皮细胞钙通道为指标,实验结果也是如此^[2]。用扶正化瘀复方(虫草菌丝、桃仁、丹参等)血清对大鼠肝贮脂细胞功能的观察发现,该复方能抑制细胞增殖及胶原合成,而且该作用与药物体内给药方式、给药剂量有一定的关系^[3]。补阳还五汤保护自由基损伤血管内皮细胞的血清药理实验结果证明,多次给药的药血清药效优于单次给药的药血清^[4]。用动物大白兔对桂枝汤在给药总量一致的情况下,采用单次给药(1次/d)和连续3d给药两

种给药方式,给药后1、2、3h采集血清进行对比研究,结果:两种给药方式1、2、3h采集的同份血清和病毒感染组、正常血清组比较,二种方式口饲桂枝汤所制备的含药血清对药效无任何影响^[5]。以上研究表明,动物给药方式以连续多日,每天给药一至二次为好。在给药剂量的研究中,用当归补血汤水煎剂(当归、黄芪)6.3、13.2、19.8g/kg,小鼠口服1次,1h后采集腹主动脉的血清0.4ml,加入小鼠造血祖细胞(CFU-GM)体外培养体系中培养6d,观察对CFU-GM的影响。结果:随给药剂量的增加CFU-GM集落数增多,其量效方程为 $Y = -98.93 + 159.66 \log X$,最低起效量为4.17g饮片/kg^[6]。在研究黄芪血清对淋巴细胞增殖及IL-2产生的影响时,也表现出剂量依赖性^[7]。用血清药理学方法观察金荞麦片抗过敏作用的量-效关系时,发现等效剂量的金荞麦片给予豚鼠40min出现效应,80min到达峰值,160min效应开始衰减,效应至少可以维持160min。临床等效剂量的金荞麦片口服有效,3倍与6倍临床等效剂量效应呈比例增加,有明显的量效关系^[8]。给予大鼠不同剂量的苦参、仙鹤草观察含药血清对肝癌腹水癌细胞体外生长的影响,探索该方法制备含药血清过程的给药剂量。结果发现,以参考公式(给药剂量=临床用量×动物等效面积系数×培养基内血清稀释度)计算给药剂量得到的含药血清,对癌细胞生长有明显的影响作用($P < 0.05$)。提示用上述参考公式计算给药剂量来制备含药血清具有一定的合理性和可行性^[9]。

2 动物采血时间及血清处理的研究

动物选择一定的给药方法后,就要对动物进行采血,采血除要求操作者技术熟练外,采血时间也要选择好,理想的采血时间应落在血药浓度的高峰期。影响血药浓度高峰期的因素很多,不同药物达峰期不一样,同一种药物观察指标不同,也有其不同的最佳采血时间。含药血清采集后是否进行血清灭活,怎样处理血清,也是方法学研究的项目之一。空白血清往往干扰实验结果,因为空白血清含有许多体内固有的活性物质,不能把空白血清作为没有活性的生理溶液。研究桂枝汤的体外抗病毒实验时,对采血时间进行了探讨,结果表明给药后30min采血为好^[1],将所采集的含药血清分为2份,其中1份经56℃30min灭活,对比灭活前后血清对病毒致细胞病变作用的影响,结果:正常血清灭活后相对作用强度平均降低50%左右,抑制病毒致细胞病变的作用基本消

失;1次给药采集的含药血清灭活后相对作用强度平均降低50%左右,2次给药采集的含药血清灭活后相对作用强度平均降低35%左右,但两者灭活前所表现的有效时间点均仍然存在^[10]。用¹⁴C-5HT释放法和⁴⁵Ca²⁺掺入法,探讨影响中药复方头风饮血清药理学方法的重要因素——制备含药血清的采血时间时,进行了时效关系的研究,结果显示:给药后30min采血所得血清作用最佳^[11],同时对血清的灭活也进行了研究,结果表明血清灭活后使其药效作用有所提高,但无明显差异^[12]。用动物大白兔对桂枝汤单次给药,1次/d,连续3d给药后123h采集血清和正常血清组比较,同份血清灭活前后自身比较以及灭活前后血清所表现出的作用峰点比较,均无差异^[5]。补阳还五汤保护自由基损伤血管内皮细胞的血清药理实验结果证明,空白对照组大鼠血清无论灭活与否均可维持细胞正常生长,细胞无明显形态改变和活力减少^[4]。在血清处理研究中,为了消除正常血清活性对实验的影响,周芝兰等人以豚鼠离体气管螺旋条抗乙酰胆碱(Ach)及组织胺活性差异为指标,对几种血清预处理方法进行了比较,研究结果显示,经乙醇、丙酮、甲壳素预处理的血清均可非常明显地降低血清的抗Ach作用,丙酮预处理亦能明显降低血清的抗组胺作用,而56℃灭活血清不能降低其抗Ach和抗组胺的作用^[13]。当空白血清出现显著阳性反应,严重干扰实验进行时,要对血清进行预处理减少空白血清的干扰,突出药物作用。另外,在浴槽内的离体器官实验,特别是当浴槽中加入血清量较多,通氧时形成大量泡沫,严重妨碍实验进行时,也要对血清进行预处理,处理后的血清不仅在浴槽中通气时泡沫明显减少,空白血清的活性也明显降低。但预处理血清也可能将血清中的药物成分除掉,故要进行一些对照实验,确定血清预处理方法。在研究口服小青龙汤煎剂的豚鼠血清对离体豚鼠气管平滑肌收缩作用时,提出一种简便易行的血清预处理方法以消除血清蛋白对实验的干扰^[14]。

3 含药血清的保存及血清加入量的研究

含药血清进行处理后,保存时间的长短、科学的保存方法也是方法学研究的内容之一,从而保证含药血清的有效性。在实验操作中,血清加入量也不能多多益善,这样形成较多的假阳性结果,那么血清加入量也需要进行摸索。在血清保存方法研究中,对桂枝汤的药效作用进行了血清保存时间对其影响的研究,结果表明,低温保存3d对药效无影响^[5]。以含头风饮血清抗血小板释放5-HT和阻滞内皮细胞钙通道作用为指标,探讨了含药血清低温保存对药效的影响。结果显示:含药血清经长时间低温保存后药效均显著降低($P < 0.01$)。提示含药血清进行低温冰冻保存仍影响其药效,进行血清药理学实验以使用新鲜血清或保存时间较短的含药血清为宜^[12]。但也有报道,血清在-20℃保存3个月,其抑制病毒的作用无明显下降^[15]。同时对血清加入量也进行了研究,探讨了反应体系中含药血清的加入量对实验结果的影响。结果表明当含药血清与富血小板血浆(PRP)的比值为1:4时,抗血小板释放5-HT作用最强;反应体系中含药血清加入量的药理效应曲线呈正态分布状。提示在采用血

清药理学方法进行研究时,应考虑血清本身所含物质及血清体积等因素对体外实验结果的影响;对最佳反应体系进行探索,具有一定的实际意义^[16]。在研究补阳还五汤保护自由基损伤血管内皮细胞的血清药理实验方法中,也对血清加入量进行了研究。结果表明,以10%的血清添加量为宜^[4]。

4 存在的问题及注意事项

由于血清药理学方法在中药及其制剂研究中的应用越来越多,已经成为细胞分裂增殖研究、抗病毒研究、抗菌实验等药理研究的常用方法,所以它的方法学研究就应进一步加强,从动物给药方法到实验完成的每一步都可能影响实验结果。从目前的方法学研究中看,动物给药形式主要是研究了动物口服给药的次数和给药量,那么以其它的给药方式就研究得不多,比如直肠给药、皮下给药、腹腔给药、静脉给药等等,这些都需要我们进一步研究。在动物采血研究中,除对时间进行了一些研究外,对采血方法研究得不多,所用的动物基本上都是一些大动物,对于小动物是否也可以进行血清药理学研究,对它的采血方法和血清加入量也要进行深入的研究,以适应科研工作的经济要求。还有动物的种属和年龄等的选择也可能影响实验结果,也要进行必要的研究。在应用领域上,目前中药血清药理学研究主要在上述的抗肿瘤、抗病毒、抗菌实验等体外实验,其他领域的应用前景如何,其研究结果的可信度、实用性和优缺点如何,都是以后我们研究的方向和问题。

总之,中药血清药理学研究方法开辟了中药研究的新思路,拓宽了研究领域,使那些先前由于实验技术的限制而无法进行的研究成为可能。血清药理学的方法学研究也取得了一些进展,基本上能适合实验的要求,但上述的有些问题也需要我们进一步研究,使血清药理方法学更具体、更完善,更能适应日益发展的血清药理学实验的需要。

参考文献:

- [1] 崔晓兰,贺玉琢,高英杰. 中药复方血清药理学研究方法的探讨-I[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 13—15.
- [2] 杨奎,陈槐卿,蒲旭峰,等. 中药血清药理学的方法研究——给药方案的研究[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(3): 43—44.
- [3] 刘成海,徐列明,刘成,等. 扶正化癥复方药物血清对大鼠肝贮脂细胞增殖及胶原合成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(2): 16—19.
- [4] 吴健宇,李仪奎,符胜光. 补阳还五汤保护自由基损伤血管内皮细胞的血清药理实验方法的建立[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(1): 45—46.
- [5] 崔晓兰,贺玉琢,高英杰. 中药复方血清药理学研究方法的探讨-II[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(3): 45—45.
- [6] 张英华,武桂兰,姜廷良. 当归补血汤及其组成药味的含药血清对制备祖细胞(CFU-GM)的影响[J]. 中药药理

- 与临床, 1998, 14(4): 3—5.
- [7] 张群豪, 林志彬. 含黄芪血清对淋巴细胞增殖及 IL-2 产生的影响[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 17—20.
- [8] 周云中, 季克胜, 孙小玉. 金荞麦片的血清药理学研究: 对离体豚鼠回肠的影响[J]. 中成药, 1999, 21(1): 34—35.
- [9] 王力倩, 李仪奎, 符胜光, 等. 血清药理学方法研究探索[J]. 中药药理与临床, 1997, 13(3): 29—31.
- [10] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理学方法探讨- III[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(3): 36—37.
- [11] 周明眉, 杨奎, 姜远平. 中药血清药理学的方法学研究——采血时间的确定及时效关系研究[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(1): 43—44.
- [12] 周明眉, 杨奎, 陈槐卿. 中药血清药理学的方法研究——含药血清低温保存和血清灭活的影响[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(2): 44—45.
- [13] 周芝兰, 耿娅, 付惠娣. 中药血清药理学研究方法中几种血清预处理方法对消除正常血清活性的比较[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(3): 46—47.
- [14] 黄坚, 陈长勋, 李仪奎. 用血清实验法观察小青龙汤对离体豚鼠气管平滑肌的作用[J]. 中药药理与临床, 1995, 11(6): 12—13.
- [15] 贺玉琢, 高英杰, 富杭育. 含桂枝汤大鼠血清对病毒致细胞病变作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(4): 26—28.
- [16] 周明眉, 杨奎, 姜远平. 中药血清药理学的方法学研究——反应体系中含药血清加入量的研究[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(6): 43—44.