

中药血清药理学的方法学研究近况

薛 洁, 谢梅林

(苏州大学医学院 药理学教研室, 江苏 苏州 215007)

摘 要: 由于中药复方的特殊性, 在体外试验中研究其作用及机制, 存在困难, 为此产生了中药血清药理学。作为一门新兴的实验方法学, 尚有许多问题有待于规范化。就近几年血清药理方法学方面的动物选择、给药剂量、给药途径、给药时间以及血清处理等进行了归纳和总结。

关键词: 中药血清药理学; 中药复方; 含药血清

中图分类号: R285. 6 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2003) 06-附 9- 03

Advances in studies on methodology in serum pharmacology of Chinese materia medica

XUE Jie, XIE Mei-lin

(Department of Pharmacology, Medical School, Suzhou University, Suzhou 215007, China)

Key words serum pharmacology of Chinese materia medica; compound Chinese materia medica; serum with medicine

中国加入世界贸易组织, 给我国的中医药行业带来了机遇和挑战, 各地掀起了中医药的研究热潮, 中医药以其博大精深的内涵引起了越来越多的世人瞩目, 但是中药复方的研究领域中存在着一大难题, 那就是如何从体外试验中研究中药复方的作用及其机制。中药复方中, 尤其是较粗的制剂中含有较多的杂质, 如直接加入体外反应体系, 其酸碱度、渗透压、鞣质和无机盐等非特异性理化因素, 将严重干扰实验, 导致实验的假阳性或假阴性结果, 使实验结果的可靠性和科学性受到很大的限制。1987年, 日本学者首次提出了“血清药理学”的概念, 就是指在动物经口服给药一段时间后采血分离血清, 用此含药血清进行体外药理实验的一种实验方法, 它为科学的阐明中药复方的作用及其机制提供了新的研究方法^[1]。这种研究方法不仅可排除由于中药复方粗制剂直接加入体外试验系统对实验造成的干扰, 而且含药血清能较接近地反映药物在体内的状态, 使体外试验能较好地重复在体试验的结果。但作为一种新兴的实验方法, 尚处于探索阶段, 有许多问题有待于进一步研究和规范化, 本文将近几年的研究概况综述如下。

1 动物的选择

采用血清药理学的方法研究中药复方在体外试验中的作用及其机制, 目的是在体外尽量准确地再现在体实验时药物与机体相互作用的真实过程, 因为含药血清中不仅含有直接作用于机体的药物, 而且还含有起间接作用的药物在机体内的代谢物和药物诱生的内源性物质。为了实现这个目的, 有人主张体外试验用的离体器官、组织、细胞的供体动物和含药血清的供体动物应具有较好的同质性, 这种同质性主要表现在种属、年龄、性别、体重等方面^[2]。另外, 刘成海等^[3,4]进一步提出体外培养实验中宜采用同种单一血清, 既为细胞

提供营养, 又为药物提供载体, 这可避免多种血清的干扰。房征宇等^[5]通过建立血清药理学方法与细胞培养相结合的实验体系, 观察了含促智药阿尼西坦大鼠血清对培养新生大鼠神经元生长发育的影响, 结果证明含阿尼西坦血清能促进体外培养新生大鼠大脑皮层神经元的生长, 延长细胞存活时间, 增加神经元胞体面积, 促进突触生长。因此笔者认为血清药理学方法观察药物对培养神经细胞生长的影响可用于益智药物的体外评价, 具有一定实用性。

供体动物的同质性除了上述以外, 还有一点很重要就是供体动物是否要造模。目前许多文献报道中的含药血清均来自于正常动物血清, 而张声鹏^[2]指出, 不同的生理、病理状态中血清的药物浓度也不同, 血清供体动物如果选用正常动物, 则在同一时间点采集的血清所含药物浓度是不同于造模动物的, 用这样的含药血清进行体外实验也就不能准确反映药物整体实验的特点。不过目前由于血清中有效成分的定量分析检测尚未有突破性进展, 因此还没有关于不同状态血清中有效成分的药代动力学的研究比较。若从药物与机体相互作用这一基点出发, 可以推测不同状态的机体对药物有不同的处置, 因而会使血清中的药物浓度、代谢产物和诱生有效成分的质与量有所不同, 因此笔者认为血清供体动物最好要进行造模。

2 给药方案

用血清药理学研究中药复方, 在给药方案包括给药剂量、给药方式等方面已经取得了一定的经验, 但由于中药复方的特殊性, 这方面的研究至今还没有规范化, 现将近年来的研究情况归纳一下。

2.1 给药剂量: 用血清药理学方法研究中药复方的药理作用, 是将含药血清加入体外实验体系中, 这时含药血清的浓

* 收稿日期: 2002-08-02

作者简介: 薛 洁 (1976-), 女, 江苏常熟人, 在读硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。

度就会被稀释。如 $1\mu\text{L}$ 的含药血清加到 $10\mu\text{L}$ 的反应体系中则被稀释 11 倍,那么就有可能因为含药血清的浓度不够使试验结果出现阴性反应。如何提高体外实验系统中含药血清浓度使其达到整体动物实验时可比拟的血药浓度,是血清药理方法学研究中要解决的问题。目前的方法主要有以下几种: (1)增加给药剂量。王力倩等^[6]通过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,提出参考公式: 给药剂量 = 临床常用量 $\times$ 动物等效面积系数 $\times$ 培养基内血清稀释度,计算给药剂量,从而制备的含药血清有一定的可行性。但存在的问题是含药血清并不会随给药剂量的倍数增加而等倍数的增加,并且有时给药剂量会受灌胃药物浓度和体积的限制。(2)以临床日用量的 5、10、30 倍制定给药剂量。刘成海^[3]等研究扶正化瘀方药物血清对大鼠肝贮脂细胞增殖和胶原合成的影响中制定的给药剂量是成人临床日用量的 5、10、30 倍。(3)李仪奎等^[7]提出把含药血清制成血清冻干粉,再加入反应体系中,以控制反应体系中的药物浓度。采用血清冻干粉法可以使体外反应系统中的药物浓度同体内血药浓度相等,在这种条件下,实验结果具有可比性。除此以外还有文献建议用含药组织液来代替含药血清,但其可行性还有待于进一步研究。

2.2 给药方式:除了给药剂量以外,在给药方案中还要解决的问题是给药方式,这样取得的血清才能比较真实完整的反映药物的作用。给药方式包括给药途径、给药时间。一般在制备含药血清时,供体动物的给药途径应该与临床给药途径一致,如注射剂应注射给药等,以避免由于给药途径的不同带来实验结果的差异。在给药时间的问题上存在着 1 d 内以一次给药还是二次给药或者是长时间给药还是短时间给药的问题。不同的文献有不同的报道,各自都做了不同的探索,总之是尽量使采血时间落在血药浓度最高峰期间。目前的观点大致有以下几种:李仪奎等^[7]认为,根据 412 种药物的 $t_{1/2}$ 、 $t_{\max}$ 等数据的分析,可以初步推断,以每天给药 2 次,连续给药 3 d,末次给药后 1 h 采血,80% 以上的药物的血药浓度可以将大于一次给药的 $C_{\max}$;蒙一纯等^[8]认为,应根据实验消化生理学特点和复方中药组分被吸收、转化特点,确定取血时间范围的合理性、可行性;徐瑶等^[9]在研究淫羊藿提取物对内皮细胞释放 NO 的影响中,采取单次给药多个时间点 (0、60、120、180、240、300 min) 取血制备含药血清,结果是含药血清促进内皮细胞释放 NO, 120 min 达高峰, 180 min 减弱, 240 min 作用消失。包金凤等^[10]在研究脑力智宝含药血清对细胞的保护作用,采用含药血清不同的给药次数和采血时间,结果表明单次给药 0.5~3 h 采集的含药血清不具有细胞保护作用,而两次给药的含药血清 1、2 h 有明显的保护作用,每日两次给药连续 3.5 d (7 次给药) 各时间点 (末次给药后 0.5、1、2、3 h) 的含药血清均具有明显的保护作用。杨彦芳^[11]进一步提出,中药复方血清制备采血时间应综合考虑复方的功效类型、剂型、机体状态,结合药动学及中药复方化学成分药动学参数。阴赓宏等^[12,13]利用血清药理学方法研究了当归补血汤抗自由基作用的药效动力学,测定了有关

药效动力学参数,并与整体药效试验结果进行了相关性研究,结果表明体外试验的结果与整体药效具有一致性,提示可借助整体药效动力学研究结果来确定最佳的采血时间。

3 血清的处理

中药血清药理学方法研究的另一个关键的问题是含药血清的处理。由于含药血清并不是一般的没有活性的生理溶液,在血清中含有体内固有的活性物质,如激素、酶、抗体、补体及前列腺素等各种自体活性物质,直接加入体外实验系统中去,是否对体外培养的细胞、病毒、病原菌以及直接作用于体外实验的组织器官,会产生毒性及严重干扰。目前有几种观点:李仪奎等^[7]提出当空白血清出现显著的阳性反应或者当进行离体器官实验,血清量加入太多,通氧时形成大量泡沫,都会严重妨碍实验进行,那么就用丙酮法或乙醇法对含药血清进行预处理,从而降低或消除空白血清的干扰作用;刘成海等^[3,4]认为含药血清应经 56°C , 30 min 灭活,从而有助于减少血清的非药理性因素的干扰,而且又符合常规细胞培养的要求;而徐海波等^[14]却认为含药血清不宜灭活,因为含药血清灭活后,药物在体内继发性变化诱生的体内有效活性物质会减少或丧失生物活性,从而影响药理实验结果,使与体内作用机制不一致。他们认为可以通过设立空白血清对照组来排除非药理性因素的干扰,而细胞培养中的微生物感染可以通过微孔滤膜除菌, 56°C 的灭活并不能灭菌;孟李等^[15]以复方丹参为例,比较了未灭活与灭活含药血清对中性粒细胞释放活性氧的影响,结果显示两种含药血清对中性粒细胞释放活性氧的影响是相似的。由此认为血清灭活与否,与实验所选指标和药物本身性质有关。对含药血清的保存,周明眉等^[16]认为长期低温保存会使血清中的有效成分降解,从而使含药血清失效,所以应选运用新鲜或保存时间较短的含药血清进行试验。

4 其他

除上述几方面外,为了保证血清药理学方法研究实验的稳定性、重复性,应该还需注意下面几点: (1)空白对照组的设立。李仪奎等^[7]认为规范血清药理学实验方法,最重要的就是要设立非常严格的空白血清对照组。如果以不同剂量的受试药物给予动物,取同体积的血清作为不同药物剂量加入体外反应体系,则空白血清对照组可只设一组 (等体积空白血清);如以一种剂量给予动物,以不同体积的药物血清加入量作为不同剂量组,则空白血清对照组应设相应的不同加入量的数个对照组,使加入血清的体积可比,而且在统计处理时,不能把空白血清对照组作为零而应以实验测的数据表示。(2)血清添加量,应该按照不同的反应体系的培养要求,加入适当体积的含药血清。戴馨仪等^[17]以荷瘤动物模型观察参桃软肝丸的抑瘤作用,20% 含药血清的抑瘤率为佳。包金凤等^[10]以脑力智宝对 PC_{12} 细胞缺血性损伤的保护作用研究中,发现血清加入量以 5% 效果最好,大于 10% 则影响药物的作用。

5 结语

血清药理学作为一种新兴的实验方法学,目前已广泛应

用于肿瘤、心血管、免疫、消化等方面,随着研究的深入,相信其推广应用将可对提高中药复方的药理研究水平产生重大的影响,但也有缺点,例如不同的生理、病理个体制备的含药血清存在个体差异或者细胞存在反馈机制,血清二次重复作用于细胞,将可能掩盖药物血清的实际作用以及有些实验条件的限制等。中药复方现代化药理研究应该根据其作用的多组分、多靶点和讲究整体观等特点,从多层次、多方面来找出中药复方的作用及其机制。

References

- [1] Iwama H, Amagaya S, Ogiwara Y, *et al.* Effect of shosaiko-to a Japanese and Chinese traditional herbal medical mixture on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing model [J]. *J Ethnopharmacol*, 1987, 21 (1): 45.
- [2] Zhang S P, Shi X G, Gui S H. Thinking on whether the serum Donor animal: a model in pharmacological researches of drug-serum of Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Integrated Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2001, 21(5): 388-389.
- [3] Liu C H, Liu C, Liu P, *et al.* Effect of sera containing Fuzheng Huayu Decoction on its cell proliferation and collagen synthesis in rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1996, 2(2): 16-19.
- [4] Liu C H, Liu P, Liu C, *et al.* Study on the anti-liver fibrosis of serum-pharmacologic study on Chinese composite recipes [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1998, 4(2): 16-19.
- [5] Fang Z Y, Zhang B L, Han Z T, *et al.* The studies on efficacy of Aniracetam serum on the upgrowth of cultured neurons [J]. *Acad J PLA Postgrad Med School* (军医进修学院学报), 2001, 22(1): 34-36.
- [6] Wang L Q, Li Y K, Fu S G, *et al.* Study on the methods of serum pharmacology [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1997, 13(3): 29-31.
- [7] Li Y K. Several of questions about the experimental methods of Chinese herbs' serum pharmacology [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1999, 10 (2): 95-98.
- [8] Meng Y C, Ding X, Peng C E, *et al.* The prospect on the application of Chinese herbs' serum pharmacology [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 1999, 22(4): 42-43.
- [9] Xu Y, Bian G W, Wu M L. Effect of alcohol extract of herb *Epimedium* on the release of NO from human umbilical vein endothelial cells *in vitro* [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2001, 12(1): 38-40.
- [10] Bao J F, Liu G Q. Study of the effect of NLZB on PC12 cell injury via serological pharmacological methods [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2000, 31(2): 126-129.
- [11] Yang Y F, Wang Y Q. Study on standardization of serum pharmacologic study on Chinese composite recipes [J]. *Chin J Integrated Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2000, 20(5): 380-381.
- [12] Yin C H, Li L F, Jin Y H, *et al.* Study on the pharmacodynamics of Danggui Buxue Decoction about antifree-radical action [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1999, 5(1): 24-26.
- [13] Yin C H, Li L F, Jin Y H, *et al.* Primary study on the relationship between drug-serum pharmacology and pharmacodynamics *in vivo* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 1999, 6(10): 35-37.
- [14] Xu H B, Li C J. Discuss the methods of Chinese herbs' serum pharmacology [J]. *China J Basic Med Tradit Chin* (中国中医基础医学杂志), 1999, 5(8): 13-16.
- [15] Meng L, Wang N S. Study on preparation for drug serum [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1999, 10(5): 290-292.
- [16] Zhou M M, Yang K, Jiang Y P, *et al.* Study on the methods of Chinese herbs' serum pharmacology: the effects of drug serum keep in low temperature and inactivation [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1999, 15 (2): 44-46.
- [17] Dai X Y, Chen L X, Zhou D H, *et al.* The effect of Shentao Ruangan Pill on tumor inhibition and immunity in tumor-bearing mice [J]. *Bull Chin Cancer* (中国肿瘤), 2001, 10 (7): 426-428.

天然多羟基芪类化合物抗病毒及抗肿瘤活性的研究进展

陈志强, 吴祖泽

(军事医学科学院放射医学研究所 实验血液学研究室, 北京 100850)

多羟基芪类化合物 (polyhydrostilbenes, PHS) 又称芪多酚, 是具有均二苯乙烯母核的酚羟基衍生物或其聚合物的一类物质的总称, 在植物的木质部的薄壁细胞中含量最多, 是植物受到病虫害或其他不利刺激时产生的应激产物。PHS 主要存在于种子植物中, 在苔藓植物中也发现该类物质^[1]。自 1822 年从大黄中分离出第一个天然 PHS 以来, 已经从 24 个科 53 个属的植物中分离出大约 100 余种此类化合物。含

有 PHS 的植物不易腐烂, 因此 PHS 又被称为植物杀菌素 (phytoalexin)^[2]。近年来大量的研究发现 PHS 具有广泛的生物活性, 除早已知道的抗菌作用以外, 还有扩张毛细血管、改善微循环^[3]、降血脂、降血糖、抗肿瘤、抑制过敏反应、调控机体免疫防御系统、抗血栓以及抗氧化等作用, 从而引起了人们的极大兴趣。尤其是 1997 年美国 Illinois 大学 Pezzuto 博士发现, 葡萄皮中含有天然抗癌活性物质——白藜芦醇

* 收稿日期: 2002-08-26

作者简介: 陈志强 (1972-), 男, 1994 年毕业于第二军医大学药学院, 获理学学士学位, 2001 年毕业于军事医学科学院, 获药物分析学硕士学位, 现为军事医学科学院天然药物专业博士研究生。