

表 3 VLC 对犬结扎后心率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Table 3 Effect of VLC on heart rate of dogs after ligation ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	心率/(次· $\text{min}^{-1}$ )				
		缺血前	缺血后 1 h	缺血后 3 h	缺血后 6 h	缺血后 12 h
模型	-	138 ± 15	113 ± 12	136 ± 12	173 ± 35	197 ± 14*
VLC	8.15	146 ± 16	134 ± 19	154 ± 20	199 ± 27	189 ± 17*
	32.50	166 ± 19	144 ± 19	140 ± 27	154 ± 29	167 ± 32
丹参	13.25	151 ± 21	144 ± 40	140 ± 53	146 ± 70	144 ± 37

与缺血前比较: \* $P < 0.05$ \* $P < 0.05$  vs before ischemia

处(方法 I), 但结果显示, 无论从心肌酶还是心肌梗指数上观察, 结扎效果均不确切, 动物死亡率较高。本实验参照在结扎兔左冠状动脉左缘支基础上<sup>[7]</sup>, 同时结扎对角支中点, 建立心梗模型(方法 II)。结果可见, 此法造成心梗面积较小, 对心脏血流动力学影响轻微, 因此, 减少了心律失常发生, 提高了动物生存率, 且评价结果可靠, 故本实验选择方法 II 进行药物实验。但此法同时存在一定不足, 由于心梗面积小, 药物对血流动力学的作用无法明显体现; 另外, 不同种属之间, 冠状动脉结构也存在一定差异。

心外膜心电图已成为心血管药理研究中一种常用方法, 心电图上  $\Sigma$ ST 表示心肌损伤程度, NST 表示心肌损伤范围, NQ 表示心肌梗死范围<sup>[7]</sup>。CPK, LDH 在心梗的评价中具有重要价值, John 等<sup>[8]</sup>提出在所有酶及细胞成分中, CPK 是衡量心梗面积的最佳指标。本实验结果显示, VLC 具有明显抗心肌缺血作用。王万铁等<sup>[2]</sup>报道, 川芎嗪抗心肌缺血再灌注损伤与提高机体内 NO, 降低 ET 水平有关。缬草可通过减慢心率, 降低血压及扩张冠脉以降低心肌氧耗, 对急性心肌缺血起保护作用<sup>[1]</sup>。VLC 由缬草提取物(主要含有挥发油和环烯萜)和川芎提取物(主要含有挥发油、阿魏酸和川芎嗪)组成, 因此, 本组方可能从多个方面抑制心肌缺血损伤。VLC 中川芎嗪的质

量分数约为 1%, 但其抗心肌缺血作用近似于川芎嗪单体。这说明缬草与川芎具有协同作用, VLC 保护心肌缺血的具体作用机制仍在进一步研究中。

#### References

- [1] Zhang B H, Meng H P, Wang T, et al. Effect of *Valeriana officinalis* L. extract on cardiovascular system [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1982, 17(5): 382-384.
- [2] Wang W T, Xu Z J, Lin L N, et al. Effect of ligustrazini on nitric oxide and endothelin in the reperfusion injury after myocardial ischemia in rabbits [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2001, 17(3): 230-234.
- [3] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [4] Cinca J, Mont L, Carreno A, et al. Coronary constriction induced by muscarinic receptor stimulation in pigs [J]. *Cardiovasc Res*, 1996, 32: 311-319.
- [5] Hu Y S, Chen H, Guan Y F, et al. Effect of Shengxiangsu Pill on acute myocardial infarction in dogs [J]. *China J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 2000, 17(2): 99-101.
- [6] Barros L F M, Chagas A C P, Luz P L D, et al. Magnesium treatment of acute myocardial infarction: effect on necrosis in an occlusion/reperfusion dog model [J]. *Int J Cardiol*, 1995 (48): 3-9.
- [7] Li Y K, Wang Q M. *Methodology in Pharmacological Experiment on Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.
- [8] Kjekshus J K, Sobel B E. Depressed myocardial creatine phosphokinase activity following experimental myocardial infarction in rabbit [J]. *Circ Res*, 1970, 27: 403-414.

## 射干的抗病毒实验研究

韩 杨<sup>1</sup>, 孔 红<sup>2</sup>, 李宜平<sup>\*</sup>

(1. 长春中医学院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第三附属医院, 吉林 长春 130021)

射干为鸢尾科植物射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 的根茎。其味苦、性寒, 能清热解毒、消痰利咽。用于热毒痰火郁结、咽喉肿痛、痰涎壅盛、咳

嗽、气喘。本实验研究其体内、体外抗病毒作用。

### 1 材料

1.1 药物与试剂: 射干 60% 乙醇提取物原液, 由

\* 收稿日期: 2003-05-08

作者简介: 韩 杨(1959—), 女, 吉林省长春市人, 长春中医学院基础医学部副教授, 主要从事药理学研究。  
Tel: (0431) 6172352 E-mail: hanyang\_369@yahoo.com.cn

长春中医学院药学院药剂教研室提供, 制备方法: 射干 100 g, 分 3 次水煎, 加水量分别为射干 8, 6, 6 倍, 第 1 次水煎 2 h, 第 2, 第 3 次各水煎 1 h, 3 次水煎液合并浓缩成相对密度 1.08, 加乙醇调含醇量至 60%, 静止滤过, 滤液回收乙醇, 挥尽乙醇, 得射干 60% 乙醇提取物, 以蒸馏水配成 1 g/mL, 0.45 μm 微孔滤器滤过除菌备用, 贮于 4 ℃。病毒唑注射液 (100 mg/mL), 河南焦作市第二制药厂, 批号 960728-2, 实验前配成 0.8% 溶液, 滤过除菌备用。培养液 MDM, Sigma 公司; 胎牛血清, 长春生物制品研究所; 胰蛋白酶, 日本产上海分装。

1.2 细胞与病毒株: Hep-2 传代细胞、单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1), 购于中国药品生物制品检定所。FL 细胞、流感病毒 FM<sub>1</sub> 株、肠道病毒 CoxB<sub>3</sub> 均由白求恩医科大学微生物教研室保存。腺病毒 III 型来源于白求恩医科大学附属医院儿科研究室。

1.3 动物: 昆明种小鼠 (20 ± 2) g, 雌雄各半, 购自吉林省中医中药研究院试验动物室。

## 2 方法与结果

2.1 对小鼠流感病毒性肺炎的作用<sup>[1]</sup>: 取健康小鼠 (20 ± 2) g, 雌雄各半, 随机分 5 组, 每组 10 只。于感染前一天开始 ig 给药, 连续 5 d。病毒唑组 ig 0.07 g/kg 病毒唑, 射干高、低剂量组分别 ig 射干 60% 乙醇提取物 12.0, 6.0 g/kg, 正常对照组与模型组 ig 等容积蒸馏水。除正常对照组外, 其余各组小鼠乙醚浅麻醉下滴鼻感染流感病毒 FM<sub>1</sub> 株 10 LD<sub>50</sub>, 感染后 96 h 处死动物, 取肺称质量, 计算肺指数和抑制率, 进行 t 检验。结果见表 1。

肺指数 = 肺质量 / 体重 × 100%

肺指数抑制率 = (模型组平均肺指数 - 实验组平均肺指数) / 模型组平均肺指数 × 100%

表 1 射干对小鼠流感病毒性肺炎的作用 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 10)

Table 1 Effect of Rhizoma Belamcandae on influenzal virus pneumonia in mice ( $\bar{x} \pm s$ , n = 10)

组别	剂量/(g · kg <sup>-1</sup> )	肺指数/%	抑制率/%
模型	-	1.47 ± 0.06	-
正常对照	-	0.94 ± 0.06	-
病毒唑	0.07	1.24 ± 0.04***	15.64
射干	12.0	1.22 ± 0.05***	17.00
	6.00	1.32 ± 0.05***	11.36

与模型组比较: \*\*\* P < 0.001

\*\*\* P < 0.001 vs model group

结果表明射干高、低剂量组肺指数明显低于模型组, 高、低剂量组肺指数抑制率分别为 17.00%, 11.36%, 表明射干 60% 乙醇提取物对小鼠流感病毒所致肺炎具有抑制发生发展, 使其炎症减轻作用。

## 2.2 射干对病毒致细胞病变的作用<sup>[2]</sup>

2.2.1 细胞准备: 将 Hep-2 传代细胞和 FL 细胞培养 5 d, 使之成片, 胰蛋白酶消化, 待细胞面出现针尖样小孔, 吸尽消化液, 取数毫升培养液吹散细胞计数至约 5 × 10<sup>4</sup>/mL, 接种于 96 孔培养板, 待细胞长成单层。

2.2.2 药物的无毒界限及病毒效价测定: 将射干 60% 乙醇提取物稀释成 1/2, 1/3, 1/4, 1/8, 1/16 浓度, 并分别加入 Hep-2、FL 单层细胞上, 每孔 0.2 mL, 置 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养, 求出药物对细胞的无毒界限。射干在 1/4 稀释浓度 (250 mg/mL) 以下对细胞无毒性作用, 实验时选用 1/4 浓度 (250 mg/mL)。病毒唑在 10 mg/mL 浓度以下对细胞无毒性作用, 实验时选用 2 mg/mL 浓度。

将流感病毒 FM<sub>1</sub>、肠道病毒 CoxB<sub>3</sub>、腺病毒 III、单纯疱疹病毒 (HSV-I) 进行 10 倍稀释成 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-6</sup> 不同稀释度, 并将各稀释度的病毒感染 Hep-2 和 FL 细胞, 吸附后洗去病毒液, 每一病毒稀释度各加 4 孔, 置 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 每天在倒置显微镜下观察病变, 连续 3 d, 记录各孔病变情况, 用改进寇氏法 (Karber 法) 分别求出 FM<sub>1</sub>、CoxB<sub>3</sub>、腺病毒 III、HSV-1 病毒滴度 (TCID<sub>50</sub>)。

$$TCID_{50} = \lg^{-1} (X_m + 1/2i - \sum p_i / 100)$$

X<sub>m</sub>: 最大病毒浓度病毒量的对数值; i: 相邻两组病毒浓度病毒量的对数值; Σp: 各组病毒稀释度病毒致细胞病变的总和。

2.2.3 对病毒致细胞病变作用的影响: 在 96 孔培养板上已培养成单层的 Hep-2 传代细胞和 FL 细胞内分别加入 250 mg/mL 的射干 60% 乙醇提取物、2 mg/mL 的病毒唑药液及 30 TCID<sub>50</sub> 的病毒, 37 ℃ 孵育培养后于显微镜下观察细胞病变, 病变程度可分为无病变、有病变, 并于孵育的不同时间 (1, 2, 3 d) 观察细胞病变, 以判断药物能否延迟病毒的致细胞病变作用。实验重复 3 次。结果中“+”表示对细胞病变有抑制作用,“-”表示对细胞病变无抑制作用,“±”表示对细胞病变有延迟作用。见表 2。结果表明, 在感染的 4 种病毒的 30TCID<sub>50</sub> 剂量下, 射干 60% 乙醇提取物 250 mg/mL 对流感病毒 FM<sub>1</sub>

表 2 射干对病毒致细胞病变的作用

Table 2 Effect of Rhizoma Belamcandae on cytopathy caused by virus in mice

组别	浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> )	流感 FM <sub>1</sub>	CoxB <sub>3</sub>	腺病毒 III 型	疱疹病毒 I 型
射干	250	+	-	+	±
病毒唑	2	+	+	+	+

株,腺病毒III型的致细胞病变有抑制作用,对疱疹病毒 I 有一定延迟作用。

### 3 讨论

小鼠流感病毒性肺炎是用流感病毒小鼠适应株所致的出血性肺炎模型,是最常用的病毒致整体动物感染模型。小鼠感染病毒后引起肺炎导致肺组织内炎症细胞渗出增多,形成肝样实变,使全部肺质量增加,肺质量增加和肺炎的严重程度相关。该模型用于观察药物对流感病毒所致肺炎的预防和治疗作用。本实验于感染流感病毒 96 h 解剖称取肺质量,计算肺指数及其抑制率,结果射干高、低剂量组肺指数明显低于模型组,高剂量组肺指数抑制率明显高于低剂量组,并强于病毒唑。表明射干对小鼠流感病毒所致肺炎有抑制发生发展,使其炎症减轻作用。

细胞培养抗病毒试验常用抑制病毒致细胞病变

(CPE) 法,是因为许多病毒可使感染细胞产生明显的病变,在光学显微镜下可见到细胞变圆,折光增加,空泡形成,细胞融合和细胞溶解。这些变化很容易与药物毒性所造成的细胞损害相区别,所以 CPE 法是最常用于研究药物的抗病毒试验的方法。射干对流感病毒 FM<sub>1</sub>株、腺病毒III型致细胞病变有抑制作用,对疱疹病毒 I 有一定延迟作用。可见,射干在体内、体外均有较好的抗病毒作用,在防治病毒性疾病方面具有广泛的开发前景。

### References:

[1] Ministry of Public Health of the People's Republic of China. *The Guide of Traditional Chinese Drug Research* (中药新药研究指南) [S]. 1995.

[2] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.

## 培补肝肾中药对 MPP<sup>+</sup> 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

陈建宗<sup>1</sup>, 田季雨<sup>2</sup>, 陈晓莉<sup>1</sup>, 杨 浩<sup>2\*</sup>

(1. 第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学神经科学研究所, 陕西 西安 710033)

培补肝肾中药由肉苁蓉、枸杞子、何首乌组成, 临床实验证明其治疗帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 有一定疗效<sup>[1,2]</sup>。本实验采用 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP<sup>+</sup>) 建立 PC12 细胞凋亡模型, 观察培补肝肾中药对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响。

### 1 材料与方法

1.1 细胞培养: PC12 细胞 (购自日本生命科学基金会) 常规培养在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液 (Sigma 公司) 中, 细胞培养瓶及培养皿 (内置盖玻片) 使用前均用 0.2 mg/mL 鼠尾胶原覆壁。培养细胞置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 (Heraeus HERA cell, 德国) 中, 3 d 换 1 次液, 待单层培养细胞将要融合时, 用 0.125% 胰蛋白酶消化, 传代培养。当传代细胞进入对数生长期时即可加药。

1.2 中药冻干粉及含中药兔血清制备: 中药冻干粉制备参照文献<sup>[3]</sup>, 将中药肉苁蓉、枸杞子、何首乌 (购于西安市中药饮片厂, 由本院药剂科苏世银主管药师鉴定), 按 1:2:2 质量比, 取 1 kg 置不锈钢锅

内, 加水 5 000 mL, 煎煮 1 h, 得滤液 3 000 mL, 再加水煎煮 1 h, 得滤液 1 000 mL, 合并滤液 (4 000 mL) 常温常压下浓缩至 800 mL, 静置 10 min, Whatman 1 号滤纸滤过, 得滤液 700 mL。将滤液放入冻结干燥机 (FD-5N 型, 东京理化器械株式会社) 进行冻结干燥, 制成冻干粉, -20℃ 冰箱保存。每克冻干粉相当于中药生药 5.67 g, 用时以蒸馏水稀释。将新西兰大耳白兔 (雄性, 体重 2.5~3 kg, 由第四军医大学实验动物中心提供) 随机分 5 组。A 组每天 ig 中药冻干粉 1.6 g/kg (相当于人等效剂量的 1/2); B 组每天 ig 中药冻干粉 3.2 g/kg (相当于人等效剂量); C 组每天 ig 中药冻干粉 6.4 g/kg (相当于人等效剂量的 2 倍); D、E 组分别为空白对照组和 MPP<sup>+</sup> 模型组, 每天 ig 与 B 组药物稀释液等体积生理盐水。各组动物每天 ig 2 次, 共 3 d。于最后 1 次 ig 后 1 h, 颈动脉放血, 4℃ 过夜, 2 500 r/min, 离心 25 min, 小心分离血清, 于 56℃ 灭活 30 min, 经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌, -20℃ 保存。

1.3 药物处理: 倒置显微镜下观察传代培养细胞呈

\* 收稿日期: 2003-07-07

基金项目: 国家中医药管理局科研基金资助项目 (2000-J-P69)

作者简介: 陈建宗 (1957—), 男, 陕西省扶风县人, 医学博士, 副教授, 硕士生导师, 副主任医师, 多年来从事中西医结合治疗老年脑病临床与基础研究。Tel: (029) 83375354