

细胞的抑制作用要强于其他组,初步说明麻黄汤中麻黄、桂枝作为君臣药味的合理性,但是麻黄汤全方和有麻黄、桂枝的配伍组间的抑制作用差异不显著。其配伍规律的合理性有待进一步验证。

References:

- [1] Wei F H, Luo J B, Shen Q, et al. Pharmacokinetics of ephedrine and pseudoephedrine from *Herba Ephedrae* Decocted and *Herba Ephedrae* in mice tissues [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(7): 781-784.
- [2] Mark A B, Cliff H B, Paul W, et al. Dissociation by steroids of eosinophilic inflammation from airway hyperresponsiveness in murine airways [J]. *Respir Res*, 2003, 4: 3-13.
- [3] Jin S H, Xie M Q, Shen W H, et al. Inhibitory effect of Chuanning Soft Capsule on eosinophils and mast cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 242-245.
- [4] Xu S Y, Bian R L. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.

毛茛提取液含药血清对家兔子宫平滑肌细胞的影响

蔡 颀¹, 江 涛¹, 李淑芳², 吴春高²

(1. 广东药学院药理学系, 广东 广州 510224; 2. 贵阳医学院 药理教研室, 贵州 贵阳 550004)

毛茛为毛茛科植物毛茛 *Ranunculus japonicus* Thunb. 的全草及根, 味辛、性湿。全草含原白头翁素 (protoanemonin) 和其二聚体白头翁素 (anemonin)。研究发现毛茛 70% 乙醇提取物对乙酰胆碱、催产素和 5-羟色胺所致的非妊娠大鼠子宫的收缩有明显的松弛作用, 并有剂量依赖性^[1], 但未对此作用深入研究。笔者在前期工作中, 已利用离体和在家兔子宫平滑肌实验明确毛茛乙醇提取液 (RJTE) 对子宫平滑肌 (USMC) 的舒张作用, 本实验采用体外细胞培养技术及血清药理学方法从细胞水平探索其作用机制。

1 材料

1.1 动物: 家兔由贵阳医学院实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK (黔) 2002—0001。

1.2 药品与试剂: RJTE, 由暨南大学医药生物技术研究开发中心提供。制备方法: 取干品毛茛全草 100 g, 加 70% 乙醇 300 mL, 浸泡 1 h, 回流提取 2 h, 滤过, 滤渣再加 70% 乙醇 200 mL 回流提取 1 h。滤过, 合并滤液, 回收乙醇, 并浓缩至含生药 1 g/mL, 经定性定量鉴定其主要成分为生物碱类 (>15 mg/mL)、不饱和甾醇 (>10 mg/mL)。DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国); 台盼蓝 (购自北京环亚泰克生物工程公司, 用生理盐水配成 0.4% 台盼蓝溶液); INDO—1—AM (美国 Sigma 公司, 用 DMSO 溶解 INDO 粉配成浓度为 $1 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$ 的母液 I; 用 Hepes 液将母液 I 配成浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的母液 II, -20°C 冻存备用)。

1.3 仪器: SW—CJ—2FD 净化工作台 (苏州净化

设备有限公司); CK30 细胞培养用显微镜 (日本 Olympus 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Forma 公司); 960MC/960CRT 型荧光分光光度计 (上海分析仪器总厂)。

2 方法

2.1 含药血清的制备: 取家兔 4 只, 体重为 (2.5 ± 0.5) kg, 3 只分别每日给予 RJTE (用蒸馏水配制) 20.8、10.4、5.2 g/kg, 以 5 mL/kg 分 2 次 ig (间隔约 8 h), 另一只每日 ig 等量生理盐水作为对照。连续给药 3 d。于末次给药后 1、2、3 h (给药前禁食不禁水 8 h), 心脏采血各 6 mL, 无菌分离血清, 经 56 °C、30 min 灭活处理后, -20°C 冰箱保存备用。

2.2 USMC 的培养

2.2.1 原代细胞培养: 取雌性家兔, 体重 (2.0 ± 0.5) kg, 迅速打击头部致死, 无菌条件下取子宫。剔除外层浆膜层, 无菌棉签刮去内层黏膜层, 将中间平滑肌剪切成 3~4 mm³ 组织小块。采用贴壁组织块法和酶消化法结合的培养方法, 向组织块中加入 0.15% 胰酶作用 20 min, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 重复 3 次。再加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液 (约可淹没组织块而不致使其漂浮), 并将培养瓶直立放置于 CO₂ 培养箱 (持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体, 37 °C 恒温, 湿度保持在 85%~95%) 中 2 h 待组织块贴壁, 将培养瓶倒转平放。根据瓶中培养液颜色变化情况进行换液。当细胞占瓶底面积约 50%, 去掉组织块, 在 1~2 周出现致密细胞层后 (即细胞占瓶底面积 95% 以上), 加入消化液消化传代。

2.2.2 细胞传代:用无血清培养液涮洗 2 次,加入 0.15% 胰酶消化,并随时镜下观察,待细胞形态变圆,边界较清晰后,弃掉消化液,加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,用吸管吹打使细胞均匀悬浮,接种于另一培养瓶中(即按 1:2 比例传代),置于培养箱中继续培养。取第 3~7 代细胞进行实验。

2.3 细胞悬液的制备及含药血清细胞毒性的测定:细胞消化后,用培养液均匀吹打使细胞完全悬浮,细胞悬液调成 $1 \times 10^5/L$,台盼蓝染色显示细胞存活率为 85%~95%,备用。灭活血清采用对倍稀释法按一定比例(1/5、1/10、1/20、1/40、1/80、1/160、1/320)将细胞接种在 96 孔细胞培养板,每一稀释比例设 8 孔,测定含药血清的细胞毒性,连续观察 5 d,注意细胞生长变化情况。5 d 后,各组细胞与正常细胞比较均生长良好,未见细胞变形、皱缩、脱落死亡。故得出各稀释血清对细胞无毒性,按常规确定以下实验用含药血清稀释度为 10%^[2]。

2.4 USMC 细胞内钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的测定:细胞传代时,均匀接种至 24 孔培养板中,每孔培养基总量为 2 mL。按下述分组孵育细胞 72 h 后,弃培养液,加入胰酶消化。Hepes 液涮洗并悬浮细胞,调整细胞数为 $2.5 \times 10^5/L$ 。从中取 1 mL 细胞悬液,加入 INDO-AM 母液 II 100 μL ,使其终浓度为 1 $\mu mol/L$,37 $^{\circ}C$ 恒温水浴 20 min,期间反复振摇。负载染料后,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 Hepes 液洗尽染料。用 2.5 mL Hepes 液悬浮细胞,细胞数为 $1 \times 10^6/mL$ 。365 nm 紫外光为 INDO-1 激发光,在未与钙结合时 INDO-1 发射波长为 485 nm,结合钙后改变为 405 nm,未刺激前先测定 405 nm 处荧光强度 1 min 以获得稳定基线,然后加入缩宫素 (0.005 U/mL),1 min 后动态记录 405 nm 处荧光强度变化 10 min,即 $[Ca^{2+}]_i$ 变化曲线,再经 Mias 图像分析系统软件处理计算出曲线下积分面积,减去基线下面积即代表了完整的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化过程。

2.4.1 同一稀释度含药血清对 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响:分别取 RJTE 含药血清高、中、低 3 个剂量组和空白对照组 1 h 时相血清,分别加入至 USMC 培养板,每组 8 孔,各组血清稀释度为 10%。作用时间 72 h。

2.4.2 RJTE 高剂量组不同时相含药血清对 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响:分别取 RJTE 高剂量组末次给药后 1、2、3 h 3 个时相的含药血清和空白对照组血清,分别加入至 USMC 培养板,每组 8 孔,血清稀释度及作用时间同 2.4.1 项。

2.4.3 不同稀释度含药血清对 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响:取 RJTE 高剂量组 2 h 时相血清分为 4 组:药物血清稀释度分别为 5%、10%、15%、20%;空白对照组 2 h 时相血清稀释度分别为 5%、10%、15%、20%,分别作用于 USMC,每组 8 孔,孵育 72 h。

2.5 统计处理:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,在进行方差齐性检验后,用 t 检验比较各组间差异。

3 结果

3.1 同一稀释度含药血清对 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响:末次给药后 1 h 时相血清以 10% 稀释后温育细胞,与空白对照血清比较,3 个剂量含药血清均能减少 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加 ($P < 0.05$ 、0.01),并随剂量的增加作用有增强趋势。见表 1。

表 1 同一稀释度含药血清对 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effects of drug-containing serum at same dilution on $[Ca^{2+}]_i$ increase in USMC ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	剂量/(g · kg ⁻¹)	曲线下面积/cm ²
对照	—	11.12 ± 0.15
RJTE	5.2	9.18 ± 0.30*
	10.4	6.86 ± 0.28*
	20.8	4.50 ± 0.30**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 RJTE 高剂量组不同时相含药血清对 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响:RJTE 高剂量各时相含药血清均能对抗由缩宫素诱导的 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,对照血清组,RJTE 高剂量 1、2、3 h 时相血清组曲线下面积分别为 (10.83 ± 0.29)、(4.44 ± 0.33)、(6.18 ± 0.20)、(7.07 ± 0.39) cm²。与对照组比较,其中以 1 h 时相含药血清作用最强 ($P < 0.01$);2、3 h 时相血清作用显著 ($P < 0.05$)。

3.3 不同稀释度含药血清对 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响:用含 5%、10%、15%、20% RJTE 高剂量 1 h 时相血清的培养液温育细胞,与以相同稀释度正常血清温育的细胞相比较,4 个稀释度均能抑制钙库中 Ca^{2+} 的释放,以 20% 血清作用较为明显 ($P < 0.05$ 、0.01),见表 2。

4 讨论

由于中药成分复杂,且多数是通过口服而发挥作用的,若将药物直接加入培养体系进行实验,并不能代表在体内环境真正发挥作用的有效成分,并且药物本身的理化性质(如电解质或鞣质、酸碱度等)及杂质成分等也会对细胞的生存环境造成一定的影

表2 不同稀释度含药血清对 USMC 内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effects of drug-containing serum at different dilution on $[Ca^{2+}]_i$ increase in USMC ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	曲线下面积/cm ²			
	5% 血清	10% 血清	15% 血清	20% 血清
对照	10.78±0.28	10.42±0.38	10.63±0.39	10.43±0.41
RJTE	6.66±0.30*	4.51±0.32**	4.59±0.22**	4.31±0.26**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

响^[3]。因而本实验应用中药血清药理学研究方法^[4],它可在某种程度上克服中药本身理化性质等因素对实验结果的干扰,不仅反映药物中可吸收部分的直接作用,也可反映药物在机体作用下形成的代谢物和药物诱生的机体内源性物质的间接结果,真实地反映药物在体内的实际作用^[5]。本实验含药血清的制备过程中,选用家兔来制备含药血清从而保证物种与人类生物学特性的相近似,并同时兼顾与体外培养细胞一致。在目前众多的给药方案中,本实验采用了“通法”^[3],它是研究者在对大量的中药药动学参数进行分析后提出的一种通行方案,即每天给药2次,连续3d,末次给药后1h采血,同时本实验也通过对少量动物进行预实验,将不同时间的含药血清进行比较后,对“通法”进行适当的调整,确定末次给药后1、2、3h作为采血时间,这样所取血清才能较真实完整地反映药物的作用。在给药剂量上,采用公式:给药剂量=在体试验的给药剂量×反应系统中被稀释的倍数,并进行适当调整选择了高、中、低3个剂量组。而对于血清的处理和使用,为减少血清的非药理性干扰和降低微生物感染机率,以符合常

规的细胞培养要求^[6],将血清进行了灭活处理。另外,为防止含药血清在保存过程中其中药有效成分发生变化^[5],实验中均使用新灭活及保存时间较短的含药血清。并严格设立空白血清对照组,以排除空白血清本身活性对实验结果的影响。实验结果显示,RJTE的3个剂量组均能降低由缩宫素诱发的USMC内 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高。高剂量组药物血清以5%、10%、15%、20%稀释度温育细胞后,其作用有随稀释度增加而增加的趋势。而空白血清对细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显影响。高剂量组1、2、3h3个时相采集的血清均能明显抑制细胞内 $[Ca^{2+}]_i$,其中1h含药血清作用较强。实验结果与离体和在体平滑肌标本实验结果基本相符。

References:

- [1] Cai Y Q. The relaxing effects of *Ranunculus japonicus* Thunb. on the uterus and bronchus of rats [J]. *Foreign Med Sci—Tradit Chin Med Section* (国外医学·中医中药分册), 1999, 21(5): 31.
- [2] Karaki H, Ozaki H, Horl M, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle [J]. *Pharm Rev*, 1997, 49(2): 157-161.
- [3] Li Y K. The problems of the experimental methods of serum pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1999, 10(2): 136-138.
- [4] Umeeda M, Amagava S, Ogiyara Y. Effects of certain herbal medicines on the biotransformation of arachidonic acid: A new pharmacological testing method using serum [J]. *Ethnopharmacology*, 1988, 23: 91-98.
- [5] Bao J F, Liu G Q. The research outlines of the methodology of serum pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2000, 24(2): 89-92.
- [6] Liu C H, Liu P, Xu L M. Effect of sera containing Fuzhenghuayu (FZHY) decoction on I to cell proliferation and collagen synthesis in rat [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1996, 2(2): 16-19.

左旋紫草素抗副流感病毒作用

罗学娅,李明辉*,伦永志,吕莉*,藤美君,罗原丽*,张宁**

(大连大学医学院 辽宁省教育厅生物有机化学重点实验室,辽宁 大连 116622)

紫草为多年生草本植物,药用部分为紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 的干燥根,为我国传统的中药之一。紫草作为一种具有抗菌、消炎止痛、抗病毒、抗癌、免疫调节、抗生育、止血

等多方面药理作用的中药,在临床上广泛应用。紫草对单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒^[1]、人类乳头瘤病毒^[2]、带状疱疹病毒^[3]及甲型肝炎病毒^[4]等均有抗病毒作用。左旋紫草素 (*L*-shikonin) 系从紫草中提

收稿日期:2004-07-07

作者简介:罗学娅(1960—),女,重庆市人,医学硕士,药理学教授,现任大连大学医学院药理学教研室主任,主要研究方向为天然药物的研制与开发,曾获“2001年度大连市科学论文奖”一等奖,发表学术论文29篇。

Tel: (0411) 87402364 (O) E-mail: xxyluo@sina.com

* 大连大学医学院1999级临床医学专业学生 ** 沈阳药科大学2002级硕士研究生