

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 <sup>2</sup> |             |             |             |
|------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
|      | 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<sup>[3]</sup>。因而本实验应用中药血清药理学研究方法<sup>[4]</sup>,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<sup>[5]</sup>。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”<sup>[3]</sup>,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<sup>[6]</sup>,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<sup>[5]</sup>,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<sup>[1]</sup>、人类乳头瘤病毒<sup>[2]</sup>、带状疱疹病毒<sup>[3]</sup>及甲型肝炎病毒<sup>[4]</sup>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

取的有效成分。据初步研究显示其具有显著的抗疱疹病毒-1 型的作用,本研究旨在进一步观察其抗副流感病毒的作用,为研发新型、高效低毒的抗病毒药物提供实验依据。

## 1 材料

1.1 药物:紫草二氧化碳超临界萃取液,含左旋紫草素 34.98 mg/mL,由内蒙古包头医学院药理学教研室提供。实验前用崔字牌香油(一级品,杂质<0.1%,山东潍坊瑞福油脂调料有限公司生产)将其稀释成不同质量浓度的药液使用。

1.2 病毒株:副流感病毒为大连大学医学院微生物学教研室冻存。

1.3 细胞:原代鸡胚细胞由本实验室自行制备<sup>[5]</sup>。原代鸡胚选取 9~10 日龄发育正常的来亨鸡胚,购自大连市金州区得胜养鸡厂。

1.4 10% O 型人红细胞母液:本实验室自行制备。选择 21 岁男性健康 O 型血的人红细胞供血者,抽取其静脉血 3 mL,迅速打入已制备好的抗凝管中,加入 3 mL 生理盐水,摇匀,3 000 r/min 离心 15 min,弃去血浆(上清液),加入 5~10 倍量生理盐水,3 000 r/min 离心 15 min。如此反复清洗红细胞 3 次,洗涤后的红细胞按体积用生理盐水配成 10% 母液,4 ℃ 保存(不超过 1 周),临用前用生理盐水稀释成 0.5% 红细胞悬液。

1.5 仪器:CK OLYMPUS 倒置显微镜(日本);HH. B11 型电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械公司);96 孔细胞培养板(Costar 产品)。

## 2 方法与结果

2.1 病毒效价测定:将冻存副流感病毒适当稀释后接种在 9~10 d 龄鸡胚尿囊腔,置 35 ℃ 孵育,72 h 后放入 4 ℃ 冰箱过夜,取出鸡胚收获尿囊液,采用血细胞凝集实验<sup>[6]</sup>对其进行血凝滴定,测得其血凝效价为 1:640。同时将尿囊液在鸡胚细胞滴定组织培养半数感染量(TCID<sub>50</sub>)<sup>[5,7]</sup>,即将此副流感病毒尿囊液进行 10 倍稀释成  $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6}$  不同稀释度,将各稀释度的病毒感染鸡胚细胞单层,37 ℃ 吸附 1 h 后,弃病毒液,换维持液,每个稀释度重复 3 孔,设正常细胞对照,37 ℃ 培养,逐日在倒置显微镜下观察细胞病变,连续观察 3 d,记录各孔病变情况,采用 Reed and Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>,求得其 TCID<sub>50</sub> 为  $1 \times 10^4$ 。

2.2 药物毒性测定:用香油将 34.98 mg/mL 左旋紫草素药液倍比稀释成 5 个质量浓度,分别加入含

已长成单层鸡胚细胞的 96 孔培养板中,每孔 50 μL,每孔加入细胞维持液 50 μL,轻轻吹打均匀,使各孔药液终质量浓度分别为 17.49、8.75、4.37、2.19、1.10 mg/mL。每个质量浓度重复 3 孔,各设 3 个香油溶剂对照孔及正常细胞对照孔,置 37 ℃ 培养。逐日在倒置显微镜下观察细胞形态。细胞无病变为-;细胞病变在 25% 以下为+,25%~50% 为++,50%~75% 为+++,>75% 为++++。连续观察 3 d,结果见表 1。

表 1 左旋紫草素对鸡胚细胞的毒性

Table 1 Toxicity of *l*-shikonin to chicken embryo cell

| 组 别   | 质量浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> ) | 细胞病变 |
|-------|-------------------------------|------|
| 细胞对照  | —                             | —    |
| 香油对照  | —                             | —    |
| 左旋紫草素 | 17.49                         | —    |
|       | 8.75                          | —    |
|       | 4.37                          | —    |
|       | 2.19                          | —    |
|       | 1.10                          | —    |

结果显示,左旋紫草素在本实验的质量浓度范围内对鸡胚细胞无毒性作用,故在抗病毒实验中可排除药物本身毒性对细胞的影响。香油对细胞生长也无抑制作用。

## 2.3 药物抗病毒实验

2.3.1 平皿内直接杀灭副流感病毒实验:将直径 2 cm 的无菌滤纸片分别置于直径为 9 cm 的平皿底部,分别取 6.0、3.0、1.5、0.75、0.375 mg/mL 左旋紫草素药液各 200 μL,浸涂于上述无菌滤纸片上,同时设香油溶剂对照组及空白对照组(以生理盐水浸涂无菌滤纸片)。上述各滤纸片周围加少许生理盐水,以维持平皿内部的湿度。另吸取病毒液 200 μL 滴加在每个平皿盖上,并均匀摊开,盖好皿盖,密封。放置于电热恒温培养箱内,温度保持于 33 ℃,接触 60 min,然后取下皿盖,分别用 1 800 μL 的生理盐水洗下病毒液,此病毒液的稀释度为 1:10。将洗下的病毒液依据血细胞凝集实验中病毒液稀释的方法分别稀释成 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 的稀释液,然后利用血细胞凝集实验对病毒液进行效价测定。每管设 3 个重复管。结果见表 2。

结果可见,当药物质量浓度由 6.0~0.75 mg/mL 依次递减时,病毒效价依次为 1:40、1:80、1:80、1:160。表明左旋紫草素对副流感病毒具有明显的直接杀灭作用,且呈现良好的量效关系。而 0.375 mg/mL 药物和香油则对副流感病毒无杀灭作用。

表 2 左旋紫草素对副流感病毒的直接杀灭作用

Table 2 Direct virucidal effect of *l*-shikonin on parainfluenza virus

| 组 别   | 质量浓度<br>(/mg · mL <sup>-1</sup> ) | 病毒稀释度  |        |        |        |         |         |         |    |
|-------|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|----|
|       |                                   | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 40 | 1 : 80 | 1 : 160 | 1 : 320 | 1 : 640 | NS |
| 左旋紫草素 | 6.0                               | ++++   | +++    | ++     | +      | —       | —       | —       | —  |
|       | 3.0                               | ++++   | +++    | +++    | ++     | +       | +       | —       | —  |
|       | 1.5                               | ++++   | ++++   | +++    | ++     | +       | +       | —       | —  |
|       | 0.75                              | ++++   | ++++   | +++    | ++     | ++      | +       | —       | —  |
|       | 0.375                             | ++++   | ++++   | ++++   | ++++   | ++      | ++      | ++      | —  |
| 香油    | —                                 | ++++   | ++++   | ++++   | ++++   | +++     | ++      | ++      | —  |
| 生理盐水  | —                                 | ++++   | ++++   | ++++   | ++++   | +++     | +++     | ++      | —  |

2.3.2 药物对副流感病毒的抑制作用:采用细胞病变(CPE)法<sup>[5]</sup>。将鸡胚细胞 2.5×10<sup>8</sup>/L 接种到 96 孔培养板中,每孔 100 μL,37 ℃ 培养,次日弃去培养液,分别加入 100 TCID<sub>50</sub>副流感病毒液 100 μL,37 ℃ 吸附 1 h 后,弃病毒液。每孔分别加入左旋紫草素药液 50 μL 及维持液 50 μL,轻轻吹打均匀,使各孔的药液终质量浓度分别为 6.0、3.0、1.5、0.75、0.375 mg/mL。每个质量浓度重复 3 孔,同时设正常细胞对照组、病毒对照组及香油溶剂对照组。37 ℃ 培养,逐日在倒置显微镜下观察细胞病变进展情况。当病毒对照组细胞病变出现++++,而细胞对照组为一时,即可终止实验。细胞发生病变为+++ (≥50% 细胞产生病变),可判断药液对病毒无抑制作用。结果见表 3。

表 3 左旋紫草素对副流感病毒的抑制作用

Table 3 Inhibitory effect of *l*-shikonin on parainfluenza virus

| 组 别   | 质量浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> ) | 细胞病变 |
|-------|-------------------------------|------|
| 细胞对照  | —                             | —    |
| 病毒对照  | —                             | ++++ |
| 香油对照  | —                             | ++++ |
| 左旋紫草素 | 6.0                           | —    |
|       | 3.0                           | —    |
|       | 1.5                           | +    |
|       | 0.75                          | ++   |
|       | 0.375                         | +++  |

左旋紫草素在 6.0~0.75 mg/mL 可抑制副流感病毒对鸡胚细胞的致病变作用,且呈剂量依赖性。而 0.375 mg/mL 药物和香油则不能抑制副流感病毒的致细胞病变作用。这与药物在平皿内直接杀灭副流感病毒实验的结果相吻合。以上结果提示左旋紫草素具有一定的体外抗副流感病毒作用。

3 讨论

本实验采用的病毒液是用鸡胚培养法中的尿囊腔接种法获得的。鸡胚培养法是常用的病毒培养法之一,操作简单,鸡胚来源容易,且鸡胚本身带病毒的情况也极为少见。培养方法主要有 4 种途径接种

不同的部位,即绒毛尿囊膜、尿囊腔、羊膜腔及卵黄腔,其中以尿囊腔接种法最为简单易行,且病毒液收获容易,病毒效价高,因此,本实验采用此方法培养副流感病毒。

本实验所采用的血细胞凝集反应测定病毒效价是基于副流感病毒能够释放出血细胞凝集素,该物质能够使豚鼠及人 O 型血红细胞发生凝集,通过细胞凝集的情况判断病毒的效价。实验所用红细胞悬液必须新鲜,因为陈旧的红细胞将出现非特异性的凝集,影响实验结果。

目前在国内外绝大多数的医学病毒还没有有效的治疗药物,而作为抗病毒药物所必须具备的最重要的条件就是只对细胞内的病毒有抑制作用,而对细胞的正常生命代谢无影响。由于当前使用的抗病毒药物均不能满足这一要求,开发研制新型抗病毒药物就成为国内外研究的热点问题之一。

紫草为中医治疗中的常用药物,关于其药理作用及临床应用的报道有很多,但关于紫草有效活性提取物抗病毒作用的研究报道所见甚少。本实验采用血细胞凝集反应及细胞病变法来研究紫草提取物中左旋紫草素的抗副流感病毒作用,实验结果显示其在实验所用的质量浓度范围内毒性较低,且具有一定的体外抗副流感病毒活性及直接杀灭副流感病毒的作用。这一研究结果为紫草素的抗病毒作用又增添了新的内容,也为其在临床上的进一步广泛应用提供了有价值的实验依据。然而,左旋紫草素的抗副流感病毒作用机制,以及其在体内的抗副流感病毒效果,均有待于更深入的研究与探索。

References:

[1] Ying J Z. Example of Zicao' s clinical application in paediatrics [J]. *Zhejiang Clin Med* (浙江临床医学), 2002, 4 (10): 729.

[2] Xie Y Y. Treating to verruca plana of traditional Chinese medicine to be taken orally and used externally in 30 cases [J]. *Sichuan J Tradit Chin Med* (四川中医), 2001, 19(6): 54.

[3] Jiang A L, Jiang S Y. Zicaodixin oil' s treatment to herpes

- zoster in 132 cases [J]. *J Jiangxi Coll Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 2002, 14(4): 48.
- [4] Wei Y E. Zicao's clinical application [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med* (陕西中医), 2002, 23(12): 1132.
- [5] Zhang J T. *Modern Experimental Methods in Pharmacology* (现代药理实验方法) [M]. Beijing: Beijing Medical Univer-

- sity and Peking Union Medical College United Press, 1998.
- [6] Zhang Z R. *Experimentation in Medical Microbiology* (医学微生物实验学) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [7] Han Y, Kong H, Li Y P. Experimental research on antiviral effect of *Belamcanda chinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 306-308.

## 合成冰片和天然冰片的小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

胡利民<sup>1</sup>, 屈彩芹<sup>1</sup>, 李怡岚<sup>2</sup>, 刘 洋<sup>1</sup>, 孙玉敏<sup>1</sup>, 张伯礼<sup>1</sup>

(1. 天津中医学院 中医药研究中心, 天津 300193; 2. 天津市卫生防病中心, 天津 300011)

冰片为临床常用的内服或外用中药, 来源有天然与合成之分, 含右旋龙脑 (*d*-borneol) 的天然冰片, 传统认为是冰片中的正品。合成冰片是经化学方法合成而得, 除含有龙脑外, 还含有大量异龙脑 (龙脑的差向异构体), 目前大多中成药均使用合成冰片。近年, 在湖南等地发现从樟属植物中可提取纯度 95% 以上的右旋龙脑, 增添了一种新的天然冰片药物资源<sup>[1]</sup>, 临床和制药选择时, 需对其安全性进行较系统的研究。本实验对该来源冰片和现用合成冰片的毒性进行了较系统的对比研究, 对两种冰片进行了小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验。

### 1 材料

1.1 药品: 天然冰片和合成冰片, 均为白色结晶体, 脂溶性, 不溶于水。GC 检测, 天然冰片含右旋龙脑 95.2% 左右, 合成冰片含右旋龙脑 60.2%, 异龙脑 36.7%。均由天津天士力制药集团有限公司提供。

1.2 动物: ICR 小鼠 (SPF 级), 体重 18~22 g, 雌雄各半。北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号 SCXK11-00-0008。

1.3 试剂: 羧甲基纤维素钠 (CMC), 上海化学试剂站分装 (批号 960823); 环磷酰胺 (CTX), 上海华联制药有限公司 (批号 011211)。

### 2 方法与结果

2.1 两种冰片 LD<sub>50</sub> 值测定: 两种冰片粉碎, 过 120 目筛, 1% CMC 蒸馏水溶液配成混悬液; 采用同种来源和种属小鼠 120 只, 给药前禁食 16 h, 自由饮水。按体重随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半。各组 ig 给药 1 次, 连续观察 14 d, 记录每日动物死亡情况, 用孙瑞元等编制的《NDST 新药统计程序》软件,

Bliss 法计算 LD<sub>50</sub>。结果合成冰片 ig 给药 LD<sub>50</sub> 为 4.881 g/kg, 天然冰片 ig 给药 LD<sub>50</sub> 为 4.656 g/kg。

2.2 取材时间点的确定: 取体重 18~22 g 雄性 ICR 小鼠, 分别按 2.44、2.33 g/kg 等容积 (0.4 mL/10 g) ig 给予合成冰片、天然冰片, 在给药后 6、12、24、48、72 h 5 个时间点分别处死 3 只动物, 取胸骨, 直接法制备骨髓涂片, Giemsa 染色, 显微镜油镜下计数 1 000 个嗜多染红细胞 (PCE) 的微核发生率。结果显示给药后 5 个时间点小鼠 PCE 微核率无明显差异。因此正式试验选择给药后 24 h 作为制备骨髓标本时间点。

2.3 正式试验: 两种冰片最高剂量均取 1/2 LD<sub>50</sub> 剂量, 以 1/4 LD<sub>50</sub>、1/8 LD<sub>50</sub> 作为中、低剂量。将 ICR 小鼠按体重随机分成 8 组, 每组 10 只, 雌雄各半。其中 6 组分别为合成冰片 0.601 0、1.220 3、2.440 5 g/kg 组; 天然冰片 0.582、1.164、2.328 g/kg 组, 均 ig 给药; 溶剂对照组 (CMC 组) ig 给予 1% CMC (0.4 mL/10 g); 阳性对照组 (CTV 组) 按 60 mg/kg 剂量, 生理盐水稀释后 ip 环磷酰胺。采用一次染毒法, 各组给药后 24 h 同 2.2 项方法制备胸骨骨髓涂片, Giemsa 染色, 显微镜油镜下计数 PCE 微核率及计数 200 个 PCE 时与正常红细胞 (NCE) 的比例。数据处理: 采用 Poisson 分布的  $\chi^2$  检验进行统计处理; 结果见表 1。各组 PCE/NCE 在正常值范围, 表明两药各剂量均无明显骨髓抑制作用。合成冰片与天然冰片各剂量组微核发生频率雌鼠与雄鼠比较差异不显著 ( $P>0.05$ ); 合成冰片与天然冰片各剂量组微核率与 CMC 组比较差异不显著 ( $P>0.05$ ), 且均显著低于 CTX 组 ( $P<0.01$ )。

收稿日期: 2004-08-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目 (1999054403); 天津市自然科学基金资助项目 (013613711)

作者简介: 胡利民 (1966—), 男, 内蒙古呼和浩特市人, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药药理及毒理研究, 发表论文 20 余篇。

Tel: (022) 23051076 E-mail: tonghon@eyou.com