

痰瘀同治方含药血清的药效强度与采血时间的关系

朱盛,刘建勋*,李彭,马悦颖
(中国中医科学院西苑医院,北京 100091)

[摘要] 目的:探讨痰瘀同治方含药血清(TYTZ)的药效强度与采血时间的关系。方法:用两种不同的方案(TYTZ 78.0 g·kg⁻¹每日灌胃给药 2 次,持续 5 日和仅 1 次灌胃给药)制备痰瘀同治方的含药血清,分别在末次给药后 0.5、1、1.5、2、3 h 采血,应用 MTT 比色法检测不同方案制备的痰瘀同治方含药血清对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖作用的影响,并测定各组血清中基质细胞衍生因子(SDF-1)的含量,观察各组间的差异。结果:各组含药血清同空白血清比较,都能促进细胞增殖,且存在时间依赖;血清中 SDF-1 含量,同空白血清比较,差异有统计学意义。两种不同的给药方案相比,细胞增殖能力差异无统计学意义;血清中 SDF-1 含量差异有统计学意义。结论:在本实验条件下,制备含药血清不必拘泥于传统的“通法”,制备方案可根据具体实验情况而定。

[关键词] 痰瘀同治方; 中药血清药理学; 时效关系; 细胞增殖
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)22-0207-03

Time-effect of Serum Containing Formula of Tanyu Tongzhi

ZHU Sheng, LIU Jian-xun*, LI Peng, MA Yue-ying
(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To study the time-effect of serum containing the formula of Tanyu Tongzhi (TYTZ). **Method:** Serum containing TYTZ was obtained in 2 ways: administration was twice and once, respectively, a day or for 5 days. The blood was collected at 0.5, 1, 1.5, 2, 3 h after last administration. The influence of the serum containing TYTZ on cell proliferation was detected with MTT colorimetric method, the stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) content in the different serum was detected with the kit. **Result:** Compared with blank serum, the serum containing medicine could promote cell proliferation, which showed time-dependent. There was significant difference in SDF-1 content between the serum containing medicine and blank serum. While there was no significant difference in cell proliferation between the two ways of obtaining serum. And there was a

[收稿日期] 20120313(020)
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09303-003,2009ZX09301-005-2-6)
[第一作者] 朱盛,硕士研究生,中药药理学,Tel:18911058067,E-mail:zhusheng0812@126.com
[通讯作者] *刘建勋,研究员,博士生导师,Tel:010-62835601,E-mail: Liujsx0324@sina.com

[7] 李峰杰,姚广涛,金若敏,等. 山豆根致大鼠肝毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):190.

[8] 周俐,曹性玲,熊小琴,等. 佛甲草对实验性肝纤维化大鼠脂质过氧化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):174.

[9] 赵霞,姚希贤. 白介素与肝纤维化[J]. 中国全科医学,2006,9(10):853.

[10] Begay C K, Gandolfi A J. Late administration of COX-2 inhibitors minimize hepatic necrosis in chloroform

induced liver injury[J]. Toxicology, 2003,185(2):79.

[11] Tokyay R, Kaya E, Gur E S, et al. Prostaglandin synthetase inhibition reduces peritonitis-induced early liver oxidant stress[J]. Surg Today, 1999,29(1):42.

[12] Mantawy E M, Tadros M G, Awad A S, et al. Insights antifibrotic mechanism of methyl palmitate: impact on nuclear factor kappa B and proinflammatory cytokines [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012,258(1):134.

[责任编辑 聂淑琴]

significant difference in SDF-1 content between the two ways. **Conclusion:** In the conditions of this experiment, preparing serum need not to be constrained to the ‘general principles’, but depends on the specific experiment.

[**Key words**] Tanyu Tongzhi; Chinese medicine serum pharmacology; time-effect relationship; cell proliferation.

血清药理学以采用给动物经口服给药后取血分离得到的血清为研究对象,用此含药物成分的血清进行体外实验,其中,含药血清制备技术是研究的基础,有学者在对大量的中药或复方的药物代谢动力学参数进行分析后,提出一种通行的方案,即连续 3 d 口服给药,每天给药 2 次,在末次给药后 1 h 取血,继而分离出血清,此法即“通法”^[1]。笔者在实验过程中发现,仅给药一次后取血,检测含药血清对细胞的增殖率的影响同连续数日给药后取得的血清对细胞增殖率的影响在该实验条件下可能差异不明显,因此,对制备含药血清是否需要数次给药这个问题,本文进行了初步研究探讨。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 280 ~ 300 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2006-0009;健康产妇脐带,由海淀妇幼保健院提供。

1.2 受试药物 痰瘀同治方,(主要成分含有丹参、人参、山楂、川芎等,提取浸膏干粉)由中国中医科学院西苑医院实验研究中心药学研究室提供。

1.3 试剂和仪器 M199 培养基(批号 M-200-500, Gibco 公司),LSGS 添加剂(批号 S-003-10, Cascade Biologics 公司),明胶(Sigma 公司),磷酸盐缓冲液(PBS)、小牛血清(FBS)、1:250 胰蛋白酶(Gibco 公司),96 孔板(BD 公司),基质细胞衍生因子(SDF-1)试剂盒(R&D 公司)。MCO175 型 CO₂ 培养箱(SANYO 公司),超净工作台(北京昌平空气净化设备工程公司),TH4-200 型倒置相差显微镜(Olympus 公司),CMS800 型微循环生物图像分析系统(Gold Spring 公司),IEC CL31R 型离心机(Termo Scientific 公司),SYNERGY4 酶标仪(Biotek 公司)GSY 型恒温水浴锅(北京医疗器械厂),0.22 μm 微孔滤膜针式滤器(Millipore 公司)。

2 方法

2.1 给药方案及含药血清的制备 大鼠常规喂养。随机分为仅 1 次给药组、连续 5 d 给药组、空白对照组。痰瘀同治方按成人(70 公斤体重)剂量 15 倍量(即相当生药量 78.0 g·kg⁻¹)ig,空白组给予与大剂量药方组相同体积的蒸馏水。连续 5 d 给药组,每

天 ig 给药 2 次,持续 5 d。仅 1 次给药组仅给药 1 次。各给药组在组内随机分为 5 组,分别在末次给药后 0.5,1,1.5,2,3 h,用 3.5% 水合氯醛 0.35 g·kg⁻¹ip 麻醉,打开大鼠腹腔,暴露其腹主动脉,取血,室温静置分层,离心(2 000 r·min⁻¹,10 min),抽取血清,置 56 ℃ 水浴 20 min 灭活,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装后置 -20 ℃ 冰箱保存备用。

2.2 不同给药方案含药血清对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖能力的影响^[2] 取健康产妇脐带经清洗,消化,制成 HUVECs 细胞悬液,37 ℃ 培养箱中培养,传代至第二代,细胞记数按每孔 1 × 10⁴/100 μL 接种于 96 孔板。按 20 μL/孔加入不同方案制备的各组含药血清,每孔培养物总体积为 120 μL。每组平行设定 6 个复孔,置培养箱中继续常规培养 48 h 后,弃去培养液,按 MTT 法使用酶标仪测定各孔 570 nm 处的吸光度(A)。

细胞增殖率 = (含药血清组 A - 正常血清组 A) / 正常血清组 A × 100%

2.3 不同给药方案含药血清中 SDF-1 的含量测定 依照试剂盒说明进行。

2.4 统计学处理 各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 不同给药方案含药血清对 HUVECs 增殖能力的影响 连续 5 d 给药与仅 1 次给药后所取含药血清同空白血清比较,都能促进 HUVECs 增殖,且存在时间依赖。2 种不同的给药方案相比,HUVECs 增殖能力差异无统计学意义。见表 1。

3.2 不同给药方案含药血清中 SDF-1 的含量 连续 5 d 给药与仅 1 次给药后所取含药血清中 SDF-1 含量,同空白血清比较,差异有统计学意义。两种不同的给药方案相比,血清中 SDF-1 含量差异也有统计学意义。见表 2。

4 讨论

血清药理学客观地模拟了机体与药物之间的相互作用,与传统中药体外药理学实验比,一定程度上避免了将中药粗提物直接加入反应体系中存在的不足,因而结果更具可信度与客观性。因此,血清药理

表 1 痰瘀同治方单次与连续 5 d ig 78.0 g·kg⁻¹制备的含药血清对 HUVECs 增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	药后取血 时间点/h	A	细胞增殖率 /%
空白血清		0.787 ± 0.101	—
连续 5 d 给药	0.5	0.997 ± 0.097 ¹⁾	26.68
	1	0.961 ± 0.091 ²⁾	22.11
	1.5	0.940 ± 0.083 ²⁾	19.44
	2	0.956 ± 0.090 ²⁾	21.47
	3	0.947 ± 0.041 ¹⁾	20.33
仅 1 次给药	0.5	0.985 ± 0.096 ¹⁾	25.16
	1	0.956 ± 0.091 ²⁾	21.47
	1.5	0.927 ± 0.091 ²⁾	17.79
	2	0.993 ± 0.106 ¹⁾	26.18
	3	0.936 ± 0.026 ¹⁾	18.93

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$;与仅 1 次给药组相应时间点比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 痰瘀同治方单次与连续 5 d ig 78.0 g·kg⁻¹制备的含药血清中 SDF-1 的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	药后取血时间点/h	SDF-1/ng·L ⁻¹
空白血清		2.39 ± 0.09
连续 5 d 给药	0.5	2.24 ± 0.09 ^{2,3)}
	1.5	1.97 ± 0.07 ^{1,3)}
	2	1.76 ± 0.20 ^{1,3)}
	3	1.82 ± 0.18 ^{1,3)}
仅 1 次给药	0.5	2.67 ± 0.06 ¹⁾
	1.5	2.75 ± 0.13 ¹⁾
	2	2.85 ± 0.18 ¹⁾
	3	2.39 ± 0.24

学方法已经成为体外研究中药单体及复方的常用方法^[3-5]。在采用血清药理学方法进行实验前,对药物的时效关系进行研究是必要的,找出最合适的取血时间,使药物中的有效物质避免因代谢而减少而造成假阴性的结果^[6]。MTT 比色法是由学者 Mosman 建立的一种可快速测定细胞增殖的简易

的方法。用酶标仪在 570 nm 处检测给药后细胞液的吸光度,可间接提示细胞存在的数量^[7]。所以本实验采用了 MTT 法进行痰瘀同治方含药血清的药效强度与采血时间方面的摸索是可行的。

笔者通过比较连续 5 d 给药与仅 1 次给药后,检测含药血清在 570 nm 处的吸光度来观察对细胞增殖率的影响,同时也对各组血清内 SDF-1 含量进行测定观察,SDF-1 首先在 P6 系小鼠骨髓基质细胞分泌的细胞因子中发现,在内皮祖细胞的迁移、血管生成方面起着重要作用。结果显示,痰瘀同治方各时间段含药血清对细胞增殖有明显促进作用,但连续 5 d 给药与仅 1 次给药这两种方案差异无统计学意义;各组含药血清中 SDF-1 含量与空白血清组比较都由显著差异,且两种方案制备的含药血清中 SDF-1 含量差异明显,有统计学意义。因此,笔者认为,在本实验条件下,制备含药血清不必拘泥于传统的“通法”,制备方案可根据具体实验情况而定以省时省力。对中药复方含药血清制备方法的研究,本实验只是一个初步的探讨,尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 詹红生. 含药血清实验方法及其在中药新药研制中的应用展望[J]. 浙江中医学院学报, 2000,24(2):79.

[2] 马悦颖,刘建勋,李澎,等. 痰瘀同治方含药血清对 ox-LDL 损伤人脐静脉内皮细胞 NF-κB 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):139.

[3] 张金梁,崔志清. 中药血清药理学实验方法的研究探微[J]. 中医药学刊, 2004, 22(12): 2271.

[4] 崔晓兰,贺玉琢,高英杰. 中药血清药理方法学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,1998,4(2):79.

[5] 马悦颖,刘建勋,李澎,等. 痰瘀同治方含药血清对 ox-LDL 损伤的人脐静脉内皮细胞产生 NO,caveolin-1 和 eNOS 的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7):974.

[6] 陈长勋,金若敏. 含药血清药理学实验方法观察附子的强心作用[J]. 中国中医药科技,1996,3(3):12.

[7] 黄柏英,彭聪,祝和成. 应用 MTT 比色法评价新生小牛血清对培养细胞生长的影响[J]. 中南大学学报:医学版, 2004, 29(2): 236.

[责任编辑 聂淑琴]