

导赤散及配伍组含药血清对人肾小管上皮细胞细胞周期的影响

吴建红*, 文 辉, 赵 刚, 吕银娟,
张智华, 王世友, 冯秋珍
(湖北中医学院, 湖北 武汉 430065)

导赤散为北宋儿科名医钱乙所创制。据《小儿药证直诀》^[1]卷下记载,原治小儿“心热,视其睡,口中气温,或合面睡,及上窜咬牙,皆心热也。”此后,经医家的不断临床实践,其应用范围有所扩大,主要从治疗心经有热,扩大至心移热于小肠证,又从儿科扩展至内科。导赤散由生地黄、木通、生甘草、竹叶组成,具有清热利水作用,其配伍特点为清热与养阴之品配伍,利水而不伤阴,泻火而不伐胃,滋阴而不恋邪^[2]。

关木通为马兜铃科植物木通马兜铃的藤茎,具有清心泻火,通淋,通经下乳的功效,是较多方剂中必用的药物。20世纪90年代,国内外一些学者报道应用关木通可导致以进展性肾小管间质损伤为主的肾毒性。而国家药监局于2003年做出决定,取消关木通(马兜铃科)的药用标准。目前关于关木通的研究有很多,涉及领域也很广,但关木通肾毒性机制还是不很明确,因此本文借助中药血清药理学的方法和和技术,观察比较了导赤散及配伍组含药血清对人肾小管上皮细胞细胞周期的影响,以期进一步了解关木通的肾毒性机制及导赤散和配伍组降低肾毒性的作用。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康大耳白家兔,雌雄各半,体重(2.5~3) kg,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

1.2 细胞 HK-2细胞株由武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供。

1.3 药物 关木通、竹叶、车前子、甘草、当归、生地黄均购自湖北省中药材有限公司饮片厂,关木通经湖北中医学院陈科力教授鉴定为马兜铃科木通。

1.4 主要试剂 DMEM培养基、碘化丙啶(PI)购自Sigma公司;胎牛血清(FBS)由杭州四季青生物技术有限公司提供;胰蛋白酶、EDTA-Na购自武汉博士德公司。

1.5 主要仪器 CO₂培养箱(SHELLRB型美国谢尔登公司)、倒置相差显微镜(CK-TK-C3型日本OLYMPUS)、流式细胞仪(FACSCLibur型),细胞获取软件(Cellquest)以及分析软件(ModifitLT)皆由美国BD(Becton Dickinson)公司提供。

1.6 实验所用主要溶液 培养液、双抗溶液、PBS缓冲液、1%多聚赖氨酸溶液和消化液。

2 方法

2.1 分组及药物用量 本次实验分5组,分别为空白组、关木通组、导赤散组、配伍1组(关木通与当归、生地、甘草)以及配伍2组(关木通与车前子、竹叶)。

关木通组的药物用量按2000年药典规定的成人日服量上限6g的2倍即12g。导赤散、配伍1组以及配伍2组中关木通的用量与关木通组用量相同,且3组中各药物的比例均为1:1,中药灌服组水煎剂灌胃量参照《中药药理实验方法》^[3]的剂量估换计算方法,家兔(1.5kg)日服总量=成人(70kg)日服总量×0.07,根据中药复方的成人治疗药量换算成家兔用量。各组均以3倍量蒸馏水煎煮沸腾30min,所得药渣同样方法再煎煮一次,与第1次煎煮滤液混合过滤并浓缩成中药浓煎液(1g·mL⁻¹),4℃保存备用。

2.2 含药血清和空白血清的制备 取大耳白家兔10只,雌雄各半,体重(2.5~3)kg,随机分成5组:关木通组、导赤散组、配伍一组、配伍二组以及空白组,每组2只,各组家兔先适应性喂养3d,所有动物实验期间自由饮水、进食。前4组按人与动物体表面积等效剂量比值换算法及血清药理学实验方法换算,关木通组、导赤散组、配伍1组和配伍2组以临床成人剂量的2倍,给家兔灌服中药浓煎剂,每天2次给药,连续3d。第3d最后1次喂药后2h内,颈动脉插管取血,制备血清,56℃水浴灭活30min,用0.22μm微孔滤膜过滤除菌,密封后置于-20℃超低温冰箱内保存、备用。

空白组灌服0.9%生理盐水连续3d,给药时间和获取血清方法同给药组。

2.3 HK-2细胞的培养、传代 HK-2细胞采用含10%胎牛血清的DMEM培养基,加入青霉素100μg·mL⁻¹,链霉素100μg·

[收稿日期] 2007-04-04

[基金项目] 湖北省教育厅课题(D200616001)

[通讯作者] * 吴建红, Tel: 13907128033; E-mail: e78-1@163.com

mL^{-1} , 培养条件为体积分数为 5% 的 CO_2 , 湿度饱和, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温孵箱贴壁培养 1 d。待 HK-2 细胞在培养瓶内铺满单层时, 弃原培养基, 用 PBS 液轻轻荡洗一次, 加入 1 mL 的胰蛋白酶/EDTA 消化液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下消化 30 s~ 1 min, 待单层细胞即将浮起时, 加入完全培养基终止消化, 小心弃去消化液, 加入少许新鲜的培养液, 用吸管轻轻吹打数次, 使细胞完全分散。通过倒置显微镜下观察细胞计数, 用完全培养基稀释为 1×10^6 个细胞/mL 的细胞悬液, 接种于培养瓶中传代。3 d 换一次液, (5~ 6) d 传代一次。

2.4 含药血清的添加方案 接种于培养瓶中的 HK-2 细胞随机分为 5 组, 每组 2 瓶, 按如下方案给药: ①关木通组含药血清; ②导赤散组含药血清; ③配伍 1 组含药血清; ④配伍 2 组含药血清; ⑤空白组血清。每组均加入 0.1 mL, 所有组最后均补加完全培养液至 2 mL, 各组进行相应处理 24 h。

2.5 检测指标

2.5.1 观察细胞的形态 细胞分组处理 24 h 后, 置于倒置相差显微镜下, 观察各组细胞形态并取 5 个不同视野摄片。

2.5.2 流式细胞术检测细胞周期 终止培养, 将培养基吸出, 用 PBS 清洗, 加入胰蛋白酶/EDTA 1 mL 消化后, 获取各组 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞, 于 $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 去上清后, 用含 $1\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 PBS 洗 1 次, $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 再离心 5 min, 去上清, 以 70% 冰乙醇 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 悬浮固定 24 h, 离心去除固定液后, PBS 洗 2 次, 加入 $2\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RNaseA 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下温育 30 min, 再加入 $1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PI 室温孵育 20 min 后, 300 目尼龙筛网过滤, 于流式细胞仪获取 10 000 个细胞进行检测, 分析细胞周期的分布。

2.6 统计学处理 所有数据均用 SPSS 11.5 for windows 软件进行统计处理。

3 结果

3.1 对细胞形态的影响 细胞在空白血清的作用下, 生长背景清晰, 胞体饱满折光性好, 胞浆均匀、透亮, 细胞表面无明显斑点及沉积物。在关木通含药血清的作用下, 细胞生长背景不良, 可见若干甚至大片死亡细胞和细胞碎片漂浮, 而在 3 个配伍组含药血清作用下的细胞生长态势较好, 死亡细胞及漂浮碎片基本不见, 其中以导赤散含药血清组细胞情况最好。

3.2 对细胞周期的影响(见表 1) 空白组细胞周期分布正常, 关木通组细胞在 G_0/G_1 期明显增多, 而 S 期显著减少, 3 个配伍组与关木通组细胞相比, G_0/G_1 期细胞有所减少, S 期细胞显著增加, 尤以导赤散组细胞改善明显。

4 讨论

导赤散是清热利水的常用方剂。近 20 年的文献资料证实, 关木通所在的导赤散等经方临床疗效确切, 未见“中草药肾病”的报道。通过对导赤散拆方分析, 笔者发现在导赤散的组方中体现了方剂学组成理论中的两个重要原则, 一是增效, 功效类似的药物同用, 可以相辅相成, 增强药物的作用,

如方中的木通和竹叶, 均为寒凉之品, 皆有清热利水之功, 相互配伍则其功益彰; 二是减毒, 消除或减轻药物的毒副作用, 如方中的生地黄、甘草, 有制约其利水伤阴、苦寒败胃的毒副作用。在《中华医典》^[4] 名方部分, 含木通方剂有 118 首, 其主要的药物配伍是清热解毒药、滋阴养血药以及淡渗利湿药。本实验中的两个配伍组(配伍 1 组和配伍 2 组)就是根据上述的依据设立的。当归和生地黄, 具有滋养阴血的功效, 而车前子和竹叶也具有清热利水的作用。

表 1 各组细胞周期分布表(%)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	68.95	30.28	0.77
关木通组	93.93	2.33	3.73
配伍一组	85.74	13.77	0.48
配伍二组	86.45	11.7	1.85
导赤散组	79.92	20.08	0

目前中药体外药理学试验普遍采用对某些成分进行提取、分离, 然后将这些成分直接加入体外培养体系或反应体系中, 观察其效应, 最后把各种成分的效应相加, 来说明某一药物或复方的功效。中药或复方以口服居多, 经胃肠道和肝脏代谢后, 最终起效的不能简单地归结为该药某一成分: 研究已经证实, 中药复方的疗效往往明显优于单味药物和单一成分。中药成分复杂, 提取物的理化性质不十分恒定, 对体外实验产生干扰, 影响药效的判断和评价。因此我们采用了中药血清药理学的方法和技术, 该方法主要针对中药及其复方复杂多样的化学成分特点, 用含药血清代替煎剂或粗提物进行体外实验, 具有更强的可信性和科学性^[5]。既弥补了单体研究的不足, 又充分考虑了药物在体内的变化。

通过查阅大量的文献资料和书籍, 发现临床上患者在服用关木通或者是含有关木通的复方制剂时, 会有很多不同的临床转归, 有些患者在服用药物后, 即使停药很长一段时间仍可导致肾损害或者病情呈进行性发展, 而且多为不可逆, 而有些患者却不表现任何症状。解放军肾脏病研究所在研究马兜铃酸 I(AA-I) 对肾小管上皮细胞的超微结构的影响时, 发现其具有 DNA 损伤作用^[6]。与此同时也有学者发现马兜铃酸 I(AA-I) 可导致猪肾小管上皮细胞(LLC-PK1) 发生周期阻滞^[7]。众所周知, DNA 受损常会引起严重的细胞毒性反应, 但在一定的极限范围内, 机体对 DNA 损伤又可通过阻止细胞周期运行, 等待受损 DNA 自身修复, 或将受损 DNA 的细胞凋亡出去, 防止发生 DNA 突变的严重恶果, 因此近年来对 DNA 受损引起阻止细胞周期运行的分子机制研究, 受到特别重视。根据上述的研究报道, 本实验采用了细胞周期的分布作为主要指标, 以期对关木通的肾毒性机制及导赤散和配伍组降低肾毒性的作用进行一些初步探索。

从实验结果看, 关木通确实对细胞周期产生了较大的影响, 主要体现在 G_0/G_1 期, 它可以使细胞周期停滞在 G_0/G_1 期。因此大剂量的关木通导致肾毒性的机制可能是影响了

细胞周期的运行,使细胞周期停滞在 G_0/G_1 期,从而引发了一系列的临床症状。空白组与关木通组比较,关木通组细胞在 G_0/G_1 期明显增多,而 S 期显著减少。导赤散组和 2 个配伍组与关木通组细胞相比, G_0/G_1 期细胞有所减少,S 期细胞显著增加,尤以导赤散组细胞改善明显。说明按照方剂组方理论合理的使用药物可以显著改善或者制约关木通的肾毒性。这在一定程度上证实了方剂组方理论的可靠性与真实性。

关木通的肾毒性机制与细胞周期停滞(G_0/G_1 期)以及 DNA 损伤有一定的关系,目前研究认为有二种机制学说,一个是非 p53 依赖性的 G_0/G_1 期快速阻止学说,另一个是 p53 依赖性的 G_0/G_1 期迟缓性持续阻止学说,具体是哪种机制在起作用,还有待进一步的研究发现。

[参考文献]

- [1] 钱乙. 小儿药证直诀[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1983. 48.
- [2] 李飞. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 567.
- [3] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社, 1994. 205-208.
- [4] 中华医典[M]. 长沙:湖南电子音像出版社, 2000.
- [5] 刘焯. 关于中药血清药理学实验方法的讨论[J]. 贵阳中医学院学报, 2004, 26(1): 53-56.
- [6] 李瑛, 刘志红, 郭啸华. 马兜铃酸 I 致肾小管上皮细胞 DNA 损伤的实验研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2004, 13(1): 7-12.
- [7] 李恒, 刘志红. 马兜铃酸 I 对肾小管上皮细胞超微结构的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2001, 10(3): 242-246.

消毒剂“毒杀死”用于 环境空气消毒的实验研究

刘顺良*, 蔡大伟
(中国人民解放军第 251 医院,
河北 张家口 075000)

为防范生物战、细菌战和恐怖袭击等造成的细菌病毒污

染;研究解决震灾、洪灾等突发事件所致疫源地的消毒及环保问题,我们研制了高效杀菌无腐蚀性消毒剂“毒杀死”。经在实验室试验证实,该产品具有杀菌、灭活病毒效果可靠,且对多种成份的金属材料浸泡不腐蚀、不锈蚀,对带色织物有效消毒时间 20 min 内不腐蚀不脱色无毒环保。本文研究“毒杀死”水溶液对环境空气中细菌的杀灭作用,并与紫外线灯照射对环境空气消毒进行比较,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 实验材料 选择本院 12 个不同病区,每个病区选取邻近同等大小病房 6 间,共计 72 间(所有病房消毒期间病人不得停留),进行编号,每个病区 1 3 5 号病房为试验组;2 4 6 号病房为对照组;“毒杀死”消毒剂(本院研制,批号 061012);LWC-I 型离心式空气采样器(辽阳市康洁仪器研究所);可反射式紫外线灯(江苏武进消毒设备厂);羊血琼脂培养基;喷雾器;恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)等。

1.2 实验方法

1.2.1 “毒杀死”水溶液的制备 取“毒杀死”浓溶液适量,加自来水配成每 100 mL 含有效氯为 0.05 g 的稀溶液备用。

1.2.2 “毒杀死”水溶液对实验病房环境空气的消毒 采用含有效氯 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的“毒杀死”水溶液喷雾消毒,喷雾剂量为 $15 \text{ mL} / \text{m}^3$,分消毒作用 10 min 组和 20 min 组后取样(消毒时间 $\geq 30 \text{ min}$ 后病人返回病房)。

1.2.3 紫外线照射对环境空气的消毒 对照组病区病房采用可反射式紫外线灯直接照射,灯管距地面、墙壁、房顶距离均 $\leq 2.0 \text{ m}$,分为照射 30 min 组和 60 min 组后取样。

1.2.4 消毒前后空气中细菌数监测 两组每间病房在消毒前和消毒后均用 LWC-I 型离心式空气采样器采样 5 min(采样器采样体积为 $40 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$),接种于血琼脂培养基上,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 48 h 后,计数生长细菌数量,每个病区取 3 间病房菌落数均值。

1.3 环境空气消毒合格评价标准^[1] 结果判定依照 GB 15982-1995《医院消毒卫生标准》规定的标准:空气以 I 类区域细菌总数 $\leq 10 \text{ cfu} / \text{m}^3$, II 类区域 $\leq 200 \text{ cfu} / \text{m}^3$, III 类区域 $\leq 500 \text{ cfu} / \text{m}^3$ 合格。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件包,对两组实验平均杀菌率之间比较采用四格表资料 χ^2 检验,每组消毒前后生长菌落数之间比较采用 t 检验, $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 杀菌效果 采用“毒杀死”水溶液喷雾和可反射式紫外线照射对环境空气中所含细菌和真菌两种消毒方法对比结果表明。采用含有效氯 0.5 g/L 的“毒杀死”水溶液喷雾消毒 20 min 以上对病房环境空气中的细菌杀灭率达 100.00%;采用可反射式紫外线照射消毒 60 min 对病房环境空气中的细菌杀灭率为 85.58%。两种消毒方法相比,差异有显著性($P < 0.01$)。结果见表 1。

(下转封三)

[收稿日期] 2007-05-28

[通讯作者] * 刘顺良, Tel: (0313) 8785281; E-mail: odaweil@163.com