

# 中药复方血清药理研究方法学探讨——IV\*

崔晓兰,周爱香,贺玉琢,高英杰,李小芹,田甲丽,郭淑英,霍海茹,姜廷良

(中国中医研究院中药研究所,北京 100700)

**摘要:**家兔灌胃桂枝汤,1日1次,连续3d给药以及1日2次,连续3d给药,末次给药后0.5~9h采血,分离血清,观察各含药血清对病毒致细胞病变作用的影响。结果:上述各方法制备的含药血清抗副流感病毒致CPE作用所表现出的有效时间点分别为:无明显有效时间点、4~5h、2h、5~7h、1~6h,1日2次给药3d及1日3次给药后采集的含药血清可引起培养细胞明显的退行性改变。

**关键词:**中药血清药理学;细胞病变(CPE);桂枝汤

**中图分类号:**285.5   **文献标识码:**B   **文章编号:**1005-9903(2000)02-0023-03

## Study on Method of Serum-pharmacology of Compound

### Prescription of Traditional Chinese Medicine——IV

*CUI Xiao-lan, ZHOU Ai-xiang, HE Yu-zhuo, GAO Ying-jie, LI Xiao-qin,*

*TIAN Jia-li, GUO Shu-ying, HUO Hai-ru, JIANG Ting-liang*

*(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700)*

**Abstract:** Rabbits were dosed with Guizhi Tang once, twice and three times a day for one, two and three days, respectively. The rabbit blood was sampled after 0.5 to 9 hours of last dosing and serum was separated. Inhibitory effect of the contained-herb serum on cytopathy was observed. Compared with normal serum, the contained-herb serum of single dosing showed no inhibitory effect on cytopathy. The serum sampled from the 4th to 5th hour when dosing once a day for two day and that at the 2nd hour when dosing once a day for three days markedly showed inhibitory effect on cytopathy. The serum sampled from the 5th to 7th hour when dosing twice a day for one day and that from the 1st to 6th hour when dosing twice a day for two days also showed inhibitory effect on cytopathy. But when dosing twice a day for

\* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(39630360)

three days or three times a day, the serum sampled after administration could cause clear de-generation of culture cells.

**Key words:** serum-pharmacology of TCM; cytopathy; Guizhi Tang

给药次数、给药天数、采血时间是血清药理学中含药血清制备技术规范化的关键和基础,我们在以往研究的基础上对上述内容进行了更进一步的研究,现将实验结果报告如下。

1 材料 详见参考文献<sup>[1]</sup>。

1.1 细胞 人喉癌上皮细胞 Hep-2 株。

1.2 病毒 副流感病毒-1 型。购自中国预防医学科学院病毒研究所,由我室传代后, -70℃ 保存备用。

1.3 培养液 含 10% 小牛血清的 Engls 液。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 含药血清的制备 健康雄性大耳白兔 6~ 8 只,体重 2.5~ 3.0kg,购自中国医学科学院动物研究所。每次每只按 2.3g(饮片)/kg 体重灌胃给药,根据实验要求每日一次、多次或多日连续给药。1 日内多次给药时每次间隔 3h,于末次给药后 0.5~ 9h 耳中央动脉采血,分离血清。正常血清 1 日给药时在给药前同体采血,若多日给药则另投 1 组在同等条件下灌胃蒸馏水。各血清经 1: 4 稀释后用于实验。

2.1.2 血清对病毒致细胞病变作用的影响

取已长成单层的 Hep-2 细胞板,用 100TCID<sub>50</sub>的副流感病毒攻击,1h 后弃去病毒液,加相应的血清 100μl/ 孔,同时设病毒对照组和细胞对照组。结果按 6 级分类标准判断<sup>[2]</sup>。当病毒对照组结果为++++ 的记录实验结果。细胞病变程度按以下方式转换为数字表示

-	±	+	++	+++	++++
0	0.5	1	2	3	4

$$\text{相对细胞病变度} = \frac{\sum (\text{孔数} \times \text{转换后数字})}{\text{总孔数}}$$

2.1.3 细胞存活率的测定 采用中性红染料吸收法<sup>[3]</sup>。原理:正常细胞能够从溶液中充分摄取活性染料中性红。病毒感染后的细胞对中性红的摄取能力降低,细胞内中性红量(可以光密度值表示)的多少可间接判断细胞的病变程度。步骤:当病毒对照组的细胞病变为+++ 至++++ 时,将培养板内液体弃去,每孔加 5mg/ml 的中性红染料 100μl,置 37℃, 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2h,弃去染液,用生理盐水洗细胞面二次,加脱色剂每孔 100μl,室温下放置 10min,立即置酶标仪下测其 OD 值。细胞存活率按以下公式计算:

$$\text{细胞存活率} \% = \frac{\text{实验组(病毒组)OD 值}}{\text{细胞对照组 OD 值}} \times 100\%$$

结果采用 t 检验进行统计学处理。

2.2 结果 见表 1, 2。以上结果经统计学处理后显示:正常血清组细胞存活率有高于病毒对照组的趋势;含药血清组细胞存活率与病毒对照组比较无显著性差异。

表 1 含桂枝汤兔血清对副流感病毒-1 致 CPE 的影响

组别	有效时间点
1 日 1 次 1 天	0
1 日 1 次 2 天	4~ 5
1 日 1 次 3 天	2
1 日 2 次 1 天	5~ 7
1 日 2 次 2 天	1~ 6

注:表中有效时间点为各不同时间采集的含药血清与正常血清组比较所表现出的有效时间点, P < 0.01

3 讨论

3.1 正常血清中含有大量特异和非特异抗病毒成分,因而具有直接抗病毒作用。本实验中,正常血清组与病毒组比较有抑制病毒致细胞病变的作用趋势。因此,在实验中评价含药血清的药效,应充分考虑到正常血清的作用,各实验组应与正常血清进行比较,以便排除其对实验结果的干扰。

表2 每日2次给药3d含药血清对细胞存活率的影响

组别	采血时间	OD值 ( $\bar{x} \pm s$ )	存活率 %
细胞对照组	—	0.268±0.074*	100
病毒对照组	—	0.173±0.038	64.37
正常血清组	—	0.197±0.058	73.4
含药血清组	0.5h	0.175±0.053	65.37
	1h	0.165±0.043	61.65
	2h	0.179±0.051	64.43
	3h	0.163±0.037	60.73
	4h	0.176±0.053	64.57
	5h	0.161±0.043	60.16
	6h	0.164±0.043	61.27
	7h	0.167±0.053	62.47
	8h	0.167±0.040	62.2
	9h	0.177±0.058	66.05

与病毒对照组比较\*  $P < 0.01$   $n = 8$

**3.2 桂枝汤单次给药后采集的含药血清, 经1:4稀释后用于体外抗病毒实验, 与正常血清比较无抑制病毒致细胞病变的作用, 可见单次给药这种方式所制备的含药血清不能反映药效, 需进一步改进。将单次给药的给药天数增加, 即每日1次给药连续2d或连续3d, 各时间点的含药血清与正常血清比较时分别表现为4~5h和2h采集的血清有明显抑制病毒致细胞病变的作用。可见在单次给药不能反映药效的基础上增加给药天数可反映出有效的时间点, 突出含药血清本身的药效, 优于单次给药方式; 如果增加给药次数, 即1日内重复给药2次或3次, 结果: 1日内2次药**

后采集的含药血清与正常血清比较在5~7h有明显抑制病毒致细胞病变的作用, 重复2次给药连续2d的含药血清与正常血清比较在1~6h有显著抑制病毒致细胞病变的作用。归纳可得: (1) 单次给药不能突出含药血清的药效, 若增加给药天数可反映有效时间点, 故多日给药优于1日给药; (2) 增加1日内给药次数也可反映出有效时间点, 故多次给药优于单次给药; (3) 在1日给药次数相同的基础上, 随着给药天数增加起效时间提前; (4) 增加给药次数后再多日给药, 不仅起效时间提前, 而且药效维持时间延长, 更容易掌握有效的时间点, 这样从总体上讲多日多次给药可能是更好的给药方式。但这一规律有一定的限度, 当1日内重复给药3次或重复2次给药连续3d时, 此时的含药血清不仅不表现出抑制病毒致细胞病变的作用, 反而对培养细胞有明显的“毒性”作用, 表现为细胞生长受抑制、退变、存活率降低、细胞病变不典型, 从而无法判断结果。

#### 参考文献:

- [1] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药血清药理方法学研究-I. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 13
- [2] 卢长安. 润喉宁抗病毒作用的研究. 中草药, 1994, 16(6): 31
- [3] 高英杰, 贺玉琢, 崔晓兰, 等. 中性红染料吸收法在抗病毒药物研究中的应用. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 45

(收稿日期: 1999-03-16)