

## 含药血清方法在中药调节骨与软骨代谢基础研究中的应用

詹红生 赵咏芳 冯伟 石印玉

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

体外药理学实验是中药防治代谢性骨病研究的重要方面之一,而药物添加方法一直是研究者们关注的焦点,近年来,含药血清方法开始受到重视,本文就这一方法的研究进展及其在中药调节骨与软骨代谢基础研究中的应用概况进行了回顾与思考。

### 1 含药血清方法概况

长期以来,中药体外药理学实验普遍采用的是中药提取物直接添加法,这种方法明显地忽视了中药的以下特点:中药以口服居多,经胃肠道和肝脏代谢后,最终起效的并不完全是原药成份;中药多成份的整体效应并非等于各部分效应之和;中医临床注重辨证施治,也就是说,某些中药可能在某一证候存在的前提下(即某种特定的机体状态下)才发挥药效作用;中药提取物的理化性质不十分恒定,可能对实验产生干扰作用。基于此,日本学者田代真一于 1984 年提出了中药含药血清方法的设想<sup>[1,2]</sup>,即在给动物灌服药物后一定时间采血,分离血清并观察其药效,从理论上讲,这一血清中至少包含中药原药成份、原药成份的代谢产物和新的生理活性物质等三种成份,所以称之为含药血清。

国内有关中药含药血清的研究报道始见于 1994 年<sup>[3]</sup>,近几年的文献量明显增多,研究内容主要涉及到含药血清的方法学探索和中药含药血清的药效评价两方面,并且,该方法也开始用于中药调节骨与软骨代谢的基础研究中。

### 2 含药血清方法研究进展

含药血清的时效关系和量效关系是应用该方法时需要首先解决的两个基本问题,前者是要找到一个药效较强的采血时间点,而后者是为了确定合适的含药血清添加量。

**2.1 含药血清的时效关系研究** 时效关系包括给药时间和取血时间两层含义。研究表明,单次给药<sup>[3~7]</sup>、连续两次(间隔 2h<sup>[5,8~10]</sup>或 4h<sup>[11]</sup>)给药、以及连续 3d<sup>[12]</sup>、8d<sup>[13,14]</sup>、10d<sup>[15,16]</sup>给药所获得的血清皆可表现出一定的药效;也有研究者认为单次给药所获得的血清无效<sup>[17]</sup>或药效不如 3d 给药者<sup>[18]</sup>。

在取血时间方面,末次给药后 0.5h 血清无效或弱效<sup>[7,8]</sup>;1h<sup>[3~5,7,12,15~18]</sup>、1.5h<sup>[7]</sup>、2h<sup>[7,13,17,18]</sup>血清普遍表现出较强的药效;3h<sup>[18]</sup>血清药效一般不及前三个时间点;4h<sup>[13]</sup>血清(喂药 8d)药效较强。可见短时间给药,取血时间点以 1~2h 为宜,较长时间给药似乎可适当延长取血的时间点,这也许与血药浓度已达到稳态有关。

**2.2 含药血清的量效关系研究** 量效关系包括动物给药量和含药血清添加量两层含义,而最终作用于研究对象的药物

剂量的大小是由这两者共同决定的。部分研究者观察到,含药血清药效的强弱与动物给药量的高低并非呈平行关系,如当归补血汤促进血祖细胞(CFU-GM)增殖的作用随剂量增大而增强<sup>[4]</sup>,而黄芩抑制单核细胞 DNA 合成和  $Ca^{2+}$  内流的作用则相反<sup>[3]</sup>;又如虫草菌丝促肝枯否氏细胞生成 IL-1 和 IFN 的作用,以中剂量最强,大剂量次之,小剂量最弱<sup>[5]</sup>,而扶正化瘀方抑制肝贮脂细胞内胶原合成的作用,则以中剂量最强,小剂量次之,大剂量最弱<sup>[8]</sup>。可以看出,血清药效与动物给药量之间的关系是极其复杂的,其背后隐含的机理目前更是鲜为人知。如何确定动物的给药量?目前比较一致的意见是可根据临床常用量按其体表面积折算为等效剂量的方法来确定。

绝大部分工作显示,培养体系中含药血清的浓度(体积比,下同)愈高则药效愈强。如扶正化瘀方抑制肝星状细胞和贮脂细胞增殖的作用,血清浓度 20% > 10% > 5%<sup>[8]</sup>。但也有个别相反结果的报道<sup>[19]</sup>。细胞培养体系中的血清浓度过高可能会对细胞产生毒性作用,所以,相对固定含药血清浓度,通过改变动物给药量来调整药物血清的含药量,是一种较为现实的办法。

**2.3 含药血清方法其它相关问题的研究** 制备和应用含药血清的过程中,还涉及到动物种属、血清处理与保存等其它问题。一般认为,制备含药血清所用动物与观察的细胞在种属上尽量一致或接近,因为种属差异越大其血清本身对细胞的毒性作用也可能越大。制备血清时应避免溶血,离心条件通常为 1500~2500rpm、20~25min,血清需要经过 56℃、30min 灭活,并经 0.22 $\mu$ m 滤膜抽滤除菌,-20℃ 以下保存<sup>[18,20,21]</sup>。

### 3 含药血清方法在中药调节骨与软骨代谢基础研究中的应用

有报道,用含 11 味中药的补肾复方制备的含药血清对成骨细胞的增殖无影响,进一步研究发现,采用两种水提物分别制备含药血清,一组具有促成骨细胞增殖作用,另一组无效;而两种醇提物制备的含药血清均抑制成骨细胞增殖<sup>[22]</sup>。目前,我们采用含药血清方法分别观察了中药对成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞的影响,初步得到以下结果。

**3.1 中药含药血清对成骨细胞增殖能力的影响** 采用以补肾为主而侧重于养阴的补肾益精方,给大鼠以等效剂量连续两次(间隔 2h)灌胃,末次灌胃后 1h、2h、3h 采血,结果显示,在促成骨细胞增殖方面,以 1h 含药血清的药效最强;在给药时间方面,灌胃 1d(连续两次,间隔 2h)与 30d 的含药血清药效无明显差别,而灌胃 3d 的含药血清药效不如前两者;在含药血清添加量方面,10% 和 20% 的含药血清药效无明显差

别,而 30% 的含药血清则抑制成骨细胞增殖。所以,将补肾益精方用于对大鼠成骨细胞药效观察的含药血清制备条件确定为等效剂量连续两次(间隔 2h)灌胃,末次灌胃后 1h 采血,含药血清添加量为 10%<sup>[10]</sup>。

3.2 中药含药血清对破骨细胞功能的影响 采用与成骨细胞实验相似的方法观察到,补肾益精方等效剂量连续两次(间隔 2h)灌胃,末次灌胃后 1h 采血,30% 含药血清添加浓度可明显抑制体外培养破骨细胞的骨吸收陷窝形成能力。

3.3 中药含药血清对软骨细胞增殖能力的影响 研究结果显示,在促软骨细胞增殖方面,补肾方和柔肝方等效剂量给家兔连续两次(间隔 2h)灌胃,末次灌胃后 3h 采血,补肾方 10% 的含药血清药效较强,柔肝方 5% 和 10% 的含药血清均有较好药效。

此外,我们还就含药血清的药效物质进行了初步观察,经高效液相分析,发现含药血清中存在与原药相似的成份,进一步研究尚在进行中。

#### 4 结语

含药血清方法的研究已经积累了一些经验,但方法学的不断完善还有赖于相关学科的支持。在制备含药血清时,目前比较一致的意见是,不同处方用于不同的实验对象,应首先进行时效和量效关系研究,以便确定用于正式实验的含药血清制备条件。

含药血清方法应用于中药调节骨与软骨代谢的基础研究中,将有助于阐明中药治疗代谢性骨病的机制和复方的配伍规律,而血清药化学研究将为进一步弄清含药血清的药效物质基础提供实验依据。

#### 参考文献

[1] 田代真一. ヒト由来培養細胞を用いた漢方薬理学研究系の開発. 和漢医学学会誌, 1985, 2: 106-107.

[2] 田代真一. 血清薬理学と血清薬化学. 現代東洋医学, 1992, 13(1): 113-117.

[3] 杨奎, 张德波, 史焱, 等. 含黄芩血清及黄芩甙影响内生致热原产生的研究. 中药药理与临床, 1994, 10(6): 13-1410.

[4] 张英华, 武桂兰, 姜廷良. 当归补血汤及其组成药味的含药血清对造血祖细胞(CFU - GM)的影响. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 3-5.

[5] 刘平, 朱剑亮, 黄耀羲, 等. 虫草菌丝及其药物血清对肝脏枯否氏

细胞生成 IL-1、IFN 及 TNF 的影响. 中国中药杂志, 1996, 21(6): 367-369.

[6] 黄坚, 陈长勋, 李仪奎. 用血清实验法观察小青龙汤对离体豚鼠气管平滑肌的作用. 中药药理与临床, 1995, 11(6): 12-13.

[7] 杨奎, 沈映君, 王一涛, 等. 含香薷、羌活胜湿汤和九味羌活汤血清对内生致热原产生的影响. 中药药理与临床, 1995, 11(4): 1-3.

[8] 刘成海, 刘成, 刘平, 等. 扶正化瘀复方药物血清对大鼠肝贮脂细胞增殖及胶原合成的影响. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(2): 16-19.

[9] 刘平, 季光, 洪嘉禾, 等. 四氯化碳大鼠肝纤维化肝生成白蛋白与胶原的变化及中药药物血清的影响. 中华肝脏病杂志, 1998, 6(1): 44-45.

[10] 赵咏芳, 石印玉, 沈培芝, 等. 用血清药理学方法研究中成药骨胶囊对体外培养成骨细胞的影响. 见: 第四届全国骨代谢研究学术研讨会论文集汇编. 珠海, 1998. 98.

[11] 王力债, 余上才, 李仪奎, 等. 用血清药理学方法研究中成药苦参、仙鹤草的抗肿瘤作用. 中国中医药科技, 1995, 2(5): 19-21.

[12] 王力倩, 李仪奎, 符胜光, 等. 血清药理学方法研究探索. 中药药理与临床, 1997, 13(3): 29-31.

[13] 徐成钢, 吴志英. 肾泻浊方血清对慢性肾衰大鼠肾小球系膜细胞的影响. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(7): 423-424.

[14] 孟季, 王宁生. 含药血清的制备方法研究. 中药新药与临床药理, 1999, 10(5): 290-292.

[15] 张群豪, 林志彬. 含黄芪血清对淋巴细胞增殖及 IL-2 产生的影响. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 17-20.

[16] 张群豪, 钟蓓, 陈可冀, 等. 用血清药理学方法观察血府逐瘀浓缩丸对实验性动脉粥样硬化家兔主动脉平滑肌细胞增殖的影响. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(3): 156-159.

[17] 贺玉琢, 高英杰, 富杭育. 含桂枝汤大鼠血清对病毒致细胞病变作用的影响. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(4): 26-28.

[18] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理研究方法学探讨一. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 13-15.

[19] 王力倩, 金若敏, 孙峥嵘, 等. 复方仙人球对肿瘤细胞体外生长影响的实验观察. 上海中医药杂志, 1997, (4): 44-46.

[20] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理研究方法学探讨一. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(3): 45-46.

[21] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理研究方法学探讨一. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(3): 36-37.

[22] 李芳芳, 李恩, 宋士军, 等. 补肾方剂及不同分离组分对成骨细胞增殖分化的影响. 中国骨质疏松杂志, 1998, 4(3): 71-75.

(编辑:房世源)

## 中国中医研究院针灸研究所针灸培训学校常年招生

(京)教社证字 A91048H 号 京教社广字(东城)2000072 号

我校常年主办以名老中医临床经验传授班为主要教学任务,办学数年为全国培训近万名针灸、推拿医师,普遍受到好评。办学正规、内容实用、特色突出、服务周到是我校办学显著特点。为满足广大医务工作者的要求,2000 年我校继续办班如下:

- 11 月 11 日—11 月 25 日 全国高级针灸进修班
- 11 月 28 日—12 月 7 日 八卦针灸学学习班
- 11 月 28 日—12 月 7 日 名老中医临床经验传授班改为八卦针灸学学习班

学费:经筋特效班、名老中医班每班 700 元,针灸进修班、推拿进修班每班 800 元,凡针灸、推拿医务工作者及具有一定医学基础爱好者均可报名。学习结束颁发中英对照、钢印结业证书,免费提供招生简章。来信请寄北京市东直门内北新仓 18 号中国中医研究院针灸研究所针灸培训学校裴、王女士收。邮编:100700,联系电话:(010)64007111 或(010)64014411 - 2781 或 2911 或 2749。广告刊出,按时开课。