

疾病模型血清药理学及其在骨代谢研究中的若干问题

陈智能¹, 苏友新², 杨连梓²

(1. 杭州市萧山骨伤医院, 浙江 杭州 310003; 2. 福建中医学院骨伤系)

关键词 疾病模型; 血清药理学; 骨代谢

Study of serum pharmacology of disease model and bone metabolism CHEN Zhineng^{*}, SU Youxin, YANG Lianzi

^{*} Hangzhou Xiaoshan Hospital of Orthopaedic and Traumatology, Hangzhou 310003, Zhejiang, China

Key words Disease model Serum pharmacology Bone metabolism

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(1): 41-43 www.zggszz.com

中药单体及复方研究一直是国内外关注的焦点, Amaga 等自 1984 年建立血清药理方法以来, 这种方法被不断地用于体外药理实验中, 为中药复方药理研究提供了一条新的途径^[1]。载药血清方法有着中药体外药理学实验普遍采用的中药提取物直接添加法显著的方法学上的优势, 特别是疾病模型血清药理学的提出和建立, 已经成为研究中药单体及复方的常用方法。本文就疾病模型血清药理学的若干问题以及血清药理学在骨代谢中研究现状作一综述。

1 传统的中药药理体外实验存在的不足

传统的中药药理体外实验是将中药或复方制剂直接加入离体反应体系中进行的, 这种方法忽视了中药的下列特点^[2-3]: ①中药绝大多数为口服剂, 经体内代谢后, 最后进入血液的并不完全是原药成分, 有的是药物本身物质发挥作用, 还有经体内代谢而发挥的; ②中药多成分的整体效应并非简单等于各部分效应之和; ③中医临床注重辨证施治, 关联证候体现药效; ④由于中药或中药复方中存在的干扰成分以及本身不同酸碱度、渗透压、理化性质的影响, 有可能对体外实验产生干扰作用, 影响药效的判断和评价。故而通过单纯的粗制剂直接进行体外实验难以获得与体内药物作用相同的结果, 即使是正确的也是不完整的。

2 当前血清药理学存在的普遍问题

血清药理实验方法的最大优点是体外和体内实验结果的一致性, 它不仅可反映药物中可吸收部分的直接作用, 也可以反映药物在机体作用下形成代谢产物和药物诱生的机体内源性物质的间接结果, 并且排除了粗制剂中非有效成分对实验结果的干扰^[4]。目前, 多数研究者^[5-6]对药物、血清供体动物以及观察指标上的不同, 其载药血清的时效和量效存在差异, 通过对时效(不同采血时间和不同喂药时间的载药血清药效)和量效(不同灌胃剂量和不同血清添加量的载药血清药效)关系进行研究, 以确定合适的动物给药方案、取血时间、载药血清添加浓度等实验条件, 但是往往忽视了在不同的体内状态, 中药的代谢与所产生的药理作用存在差异。近年来, 随着临床药理学研究的深入, 不少学者进行了多项比较性研

究^[7], 从而揭示出在不同生理、病理或遗传背景的基础上, 不同人群对同一种药物的药代动力学参数具有不同的特点。这种比较研究的结果更加直接地告诉人们, 药物发挥其药理作用, 是药物与机体相互作用的结果。在进行血清药理学研究时要摸清中药血清药理研究的基本资料^[8], 如在动物给药方案、取样时间、血清处理、反应系统、载药血清成分的定性和定量、可能进入血清有效成分的生物膜转运等方面积累数据, 加强理论探索和实验研究。

动物在正常生理状态下制备的载药血清与在病理状态下制备的载药血清是不同的, 这是因为两种状态下的动物对药物的消化吸收功能不同, 对药物的生物转化不同, 尤其是在药物作用下机体的反应不同, 产生的内生性有效成分也不同, 因此, 为了与临床患者用药的实际情况相符, 宜采用病理状态下的动物制备载药血清^[9]。而目前的大多数文献均采用正常动物做为血清供体动物, 未能考虑血清供体动物的造模问题可能对实验结果产生的影响。

3 疾病模型血清药理学的建立和探索

疾病模型血清药理学仍然采用血清药理的方法, 即指将中药或中药复方经口给疾病模型动物灌服一定时间后采集动物血液、分离血清, 用此含有药物成分的血清进行体外实验的一种方法。

3.1 疾病模型血清药理学的相关研究 机体不同疾病状态对药物体内代谢的影响已普遍引起人们的注意, 樊亚营等^[10]研究证治药动力学假说时认为: 同一药物不同“证”的药代动力学参数经统计学处理后有显著差异, 这种差异明显影响药物疗效和毒性反应, 经过辨证施治后, 这种差异可消失或减轻并且采用血瘀证进行了假说的验证。石磊等^[11]在研究高蛋白高脂肪饮食对普罗帕酮(PPF)在大鼠体内药物动力学的影响发现高蛋白高脂肪饮食可使其 $T_{1/2}$ 缩短, AUC 降低, 清除率(CLS)增高, 从而加速大鼠 PPF 的清除, 表明体内不同的病理生理状态影响药物的药代动力学。文爱东等^[12]研究阿魏酸发现, 阿魏酸在对不同证大鼠的处理其代谢特征有显著差异。表明疾病模型血清本身以及其在探索药物的药理作用和机制中不容忽视。

3.2 疾病模型的动物选择及造模时间长短的考虑 在选择血清供体动物方面,不少文献已作论述,不外乎大鼠^[13-15]、兔^[16]、豚鼠^[17]不同种属的动物血清对实验会产生一定的影响^[18],不但要考虑模型的选择,还要与人类生物学特性近似,与体外培养细胞一致,血量丰富的实验病理模型动物制备载药血清,家兔和大鼠可考虑为首选^[19]。

在时效方面,血清药理学中给药方法中的连续给药3 d^[19],并且很多学者也采用此种方法^[15];但在实际临床以及中药应用过程中,药物的起效往往很缓慢,这就牵涉到药物的累积效应问题,所以有学者采用灌胃1个月的大鼠血清^[14]。

然而不少学者研究发现长时间与短时间灌胃对细胞增殖的影响无明显的差异^[20],因而在确定灌胃的时间上可参照中药的半衰期,5~7个半衰期一般可达到中药的峰值,以此峰值血药浓度为好,但中药的药代动力学异常复杂,很难确定。也有人采用血药浓度测定的方法来研究中药的峰值^[21],方法科学但比较繁琐,限制在研究中的应用。故而一般需要进行时效的摸索,通常取1 d看即时吸收入血而未进行完全代谢转化的中药有效成分,也有取3~7 d看吸收入血已经达到稳态的中药,其中有进行代谢转化的也有未转化的,还有取1个月看中药在体内进行转化生成并且已经稳定的活性物质等。对于大多数药动学特性不明的中药,可通过时效关系的研究来摸索,一般可能给药期限选用7~10 d^[4]。对于疾病模型血清药理学来说,不仅要看即时血清,更要看在病理状态下的药物转化血清,或许更符合实际真实情况。而在确定理想的采血时间方法则要考虑血药浓度的高峰期,这样能够避免由于有效物质尚未吸收或代谢殆尽而造成的假阴性结果。不同药物甚至同一药物的不同有效成分,它们的达峰时间($T_{im\ e\ max}$, $T_{m\ ax}$)不尽相同,而且动物的个体差异、生理状态、病理状态同样会造成 $T_{m\ ax}$ 的不同。大多数学者在研究过程认为中药血清药理学实验中常用的采血时间可为6Q、9Q、12Q、180 m in等^[22-24],一般不超360 m in。李仪奎^[25]对412种药物的药动学指标分析认为,如以人为给药对象,每日给药2次,连续给药3 d末次给药后1 h采血,80%以上的药物其血药浓度大于1次给药的峰浓度,对动物可做参考。可见多数药物到达峰值时间在用药后1~2 h,故采血时间以用药后1~2 h为宜。而我们在研究强骨宝方糖尿病鼠血清时应用连续给药3 d间隔2 h末次给药后1 h采血的方法疗效最强,值得尝试。当然最好是通过预试确定最佳采血时间。

对于灌胃剂量问题,合适的给药剂量对保证实验的成功很重要。由于加入反应系统的血清要被稀释,应尽可能增大剂量。李仪奎^[25]提出两种方法:①增大给药剂量,给药剂量=在体实验的给药剂量×反应系统中被稀释的倍数(实际等同上述参考模式);②血清冻干粉法,此法最大的优点是可在较大范围内控制实际加入反应系统中的药量。王宁生等^[8]建议采用整体模型动物的有效剂量(即临床成人剂量的8~18倍)为妥。采用8~10倍临床剂量有一定的依据。不少学者采用低剂量(1/2临床量)、等剂量(临床使用量)、高剂量(3/2或2或5/2临床量)^[6,20],我们在研究强骨宝方糖尿病鼠血清时应用8倍临床剂量方法疗效较好,实验结果稳定。

3.3 血清添加及处理的若干问题 在对健骨二仙丸载药血清细胞毒性的观察中^[15]发现100%、50%、25%、12.5%、6.25%、3%条件下的载药血清显示50%、10%浓度组细胞生长明显受到抑制、细胞数显著减少,3%和6.25%组细胞生长缓慢,细胞数显著少于12.5%和25%组并且12.5%和25%组间比较差异无显著性统计学意义。詹红生等^[6]在研究补肾益精方时发现30%的载药血清浓度更为合适。由于培养液中包含有较丰富的营养物质以及含药血清的细胞毒作用。在离体实验中,载药血清的浓度不宜太高,应以梯度方式进行比较以确定合适的添加剂量。我们在研究强骨宝方糖尿病鼠血清时应用20%载药血清时疗效较好,且呈剂量依赖。

在采血清时,我们建议采用无菌状态下腹主动脉,取血质量高,量充足,较少溶血发生。所取血清静置1 h或4℃过夜,每分钟1 800~3 000 r离心15~20 m in,0.22 μm的滤膜过滤,-20℃保存备用。血清中存在的补体和抗体成分,为了防止发生免疫反应和细胞毒性,可采用灭活,然而灭活也会可能损耗药物血清的有效成分,因而在实际操作中对于灭活(一般采用56℃水浴30 m in)与否的问题,主要看对细胞的影响,不必拘泥。特别在对于疾病状态下如糖尿病状态,细胞膜的稳定性是影响是否发生溶血的关键。实验条件需要摸索,对于血清是否需要特殊的处理方法,不能完全参照文献方法。对于血清使用的长短问题,我们的意见是能尽快就不要留置,放置需在-20℃条件保存。

4 血清药理学在骨代谢研究中的应用

骨代谢较特殊,骨转化时间较长,一般需要6个月。体外培养骨系细胞应用血清药理学的方法具有一定的科学依据,具有抑制骨吸收的西药同样在体外仍有明显的作用^[13]。针对破骨细胞是骨吸收的直接承担者,破骨细胞的破骨活动相对强于成骨细胞的造骨活动,是骨质疏松症发生的细胞学基础,不但在体外采用正常大鼠制备的补肾方载药血清可显著抑制体外培养破骨细胞的活性,而且采用切除卵巢模型大鼠经补肾方治疗后制备载药血清对破骨细胞同样具有抑制骨吸收作用,表明补肾方一方面可能是由于血清中含有抑制破骨细胞活化的药物活性成分,另一方面还可能与补肾方治疗后血清中促破骨细胞活化的作用因子水平降低有关。健骨二仙丸对成骨细胞凋亡具有抑制作用,这可能是中药防止骨丢失的作用机制之一。增龄可致成骨细胞活性下降,采用老年大鼠作为实验材料,与壮年大鼠相比,其整体呈现衰老(性腺功能下降、骨质疏松)趋势,其血清中含有促进细胞生长分化的因素,特别是促进成骨细胞生长的因子可能较少,制备的淫羊藿载药血清在体外能够增强成骨细胞的活性,表明淫羊藿载药血清可能是通过多环节来发挥其刺激成骨细胞增殖和分化的作用的,而不是单一因素在起作用^[14]。

5 疾病模型血清药理学研究展望

中药血清药理学是一门新兴的科学,将中医药研究向前推进了一大步,是中医药研究的一个里程碑,虽然较客观地反映了中药体内作用的具体机制和可能的环节,但是仍然存在着很大的缺陷。而疾病模型血清药理学可望很好的解决这一难题。在病理状态下,体内物质的代谢途径、代谢方式、代谢产物、代谢环节等与正常状态下显然存在着巨大的差距,用正

常动物来研究病理状态某种程度上只能反映一部分作用机制,也许一点都不能反映。虽然疾病动物模型与人疾病模型也有一定的差异,但在很大程度上能够反映药物防治疾病的作用机制和环节。

在应用疾病模型血清药理学时,首先要明确需应用血清药理学的方法包括时效与量效关系的探索,再次要考虑模型的造模方法,主要在于研究的目的比如糖尿病可取高糖状态下的病理生理,也可免疫状态下的病理生理即 1、2型还是 1.5型糖尿病模型;造模的时限、造模的程度、造模对可比性的影响、时效与量效关系与造模等,应综合起来加以考虑,权衡利弊。

参考文献

- 1 张群豪,陈可冀.血清药理学在中药及复方研究中应用的评价.中国中西医结合杂志,1996 16(3): 131
- 2 赵万红,曹永孝,袁泽飞.中药血清药理学的方法学探讨.中药新药与临床药理,2002 13(2): 122-124
- 3 曹俊,张红梅,王旋.中药血清药理学研究概况.中国中医药信息杂志,2002,9(1): 80-82
- 4 Umeda M, Amagaya S, Oghara Y, et al. Effects of certain herbal medicine on the bio transformation of arachidonic acid: A new pharmacological testing method using serum. J Ethnopharmacol 1988, 23: 91-98
- 5 崔晓兰,贺玉琢,高英杰,等.中药复方血清药理学方法学的探讨.中国实验方剂学杂志,1998 5(3): 45-46
- 6 詹红生,赵咏芳,石印玉,等.用载药血清方法观察补肾益精方对破骨细胞功能的影响.中国骨伤,2001 14(3): 145-147
- 7 张声鹏,施旭光,桂蜀华.关于中药血清药理学中血清供体动物是否造模的思考.中国中西医结合杂志,2001 21(5): 388-389
- 8 王宁生,雷燕,刘平,等.关于中药血清药理学的若干思考.中国中西医结合杂志,1999 19(5): 263-266
- 9 徐海波,李彩君.中药血清药理学方法学探讨.中国中医基础医学杂志,1999,8(5): 13-16
- 10 樊亚营,文爱东,黄熙,等.正常及急性局部血瘀证犬动物模型静脉注射四甲基吡嗪的药理学.第四军医大学学报,1995,16(6): 479-480

- 11 石磊,张远.高蛋白高脂肪饮食对普罗帕酮在大鼠体内药物动力学的影响.中国临床药理学杂志,1998,7(2): 74-77
- 12 文爱东,宋岭,黄熙,等.阿魏酸在脾虚血瘀证大鼠体内的药代动力学.第四军医大学学报,1995,16(2): 140-141
- 13 詹红生,石印玉,赵咏芳.几种西药载药血清与直接添加对骨吸收陷窝数量影响的比较研究.浙江中医学院学报,2000 24(6): 41-43
- 14 马涛,崔燎,吴铁,等.老年大鼠含淫羊藿血清对成骨细胞的增殖与分化的影响.中国骨质疏松杂志,2002,8(1): 55-57
- 15 程志安,吴燕峰,曾志勇,等.健骨二仙丸载药血清对人成骨细胞增殖及细胞周期的影响.中国中西医结合杂志,2002 22(2): 129-132
- 16 冯伟,石印玉,沈培芝,等.补肾方和柔肝方载药血清对软骨细胞增殖动力学研究.浙江中医学院学报,2001 25(4): 15-17
- 17 陈长勋,金若敏,贺劲松,等.用血清药理学实验方法观察附子的强心作用.中国中医药科技,1996,3(3): 12-13
- 18 詹红生,石印玉,赵咏芳,等.补肾复方载药血清对骨吸收陷窝影响的时效关系研究.浙江中医学院学报,2001 25(2): 21-22
- 19 李仪奎,吴建宇.血清药理学实验中采血时间的通法方案.中国药理学通报,1999 15(6): 569-570
- 20 冯伟,石印玉,沈培芝,等.MTT法分析中药载药血清对体外软骨细胞增殖影响的研究.上海中医药大学学报,2000 14(1): 43-45
- 21 包云,王灵台.高效液相色谱法在抗纤复方药物血清质量控制中的应用研究.江苏临床医学杂志,2000,4(4): 266-268
- 22 阴赤贞宏,李兰芳,金亚宏,等.当归补血汤载药血清对小鼠白细胞的活化作用.中国中医药科技,1999,6(1): 19-21
- 23 徐瑶,卞国武,吴敏璇.淫羊藿醇提取物对内皮细胞释放 NO 的影响.中药新药与临床药理,2001,12(1): 38-40
- 24 周明眉,杨奎,姜远平,等.中药血清药理学的方法学研究—含药血清低温保存和血清灭活的影响.中药药理与临床,1999,15(2): 44-46
- 25 李仪奎.中药血清药理学实验方法的若干问题.中药新药与临床药理,1999 9(2): 95-98

(收稿日期: 2006-01-08 本文编辑: 李为农)

好及施 同息通 临床应用有奖征文通知

好及施 同息通 是由广东省医药进出口公司珠海公司总代理的消炎镇痛外贴剂和肾上腺皮质激素类药物。目前,在临床应用中得到广大医务工作者的认可。为了更好地总结、交流好及施 同息通 临床应用的经验,现将有奖征文形式通知如下。

1. 征文内容 使用“同息通”“好及施”的临床疗效和经验总结,主要方向是:①临床治疗进展、临床药物应用评价、临床实验结果分析等;②外用临床应用进展和评价;③激素应用临床进展和评价;④独特的案例分析、总结;⑤药物不良反应监测和对策。

2. 征文要求 3000字以内全文及 500字左右摘要各 1份(打印并附磁盘),姓名、单位及地址、邮政编码请务必写清楚。

3. 征文评选方法 ①评选标准:依据论文的设计水平、科学性、真实性等进行评审;②所有征文将组织有关专家对论文进行评审。

4. 奖励办法 ①一等奖 1名,800元稿费;②二等奖 5名,400元稿费;③三等奖 10名,200元稿费;④参与奖 30名,“好及施”2贴装温、冷感各 2包。

5. 征文截稿日期 2007年 3月 31日(以当地邮戳为准)。征文请寄:北京市东直门内南小街甲 16号《中国骨伤》杂志社收,邮编:100700并在信封左下角注明“有奖征文”字样。