

血清药理学在中药药效学中的研究进展

李芳, 李辉* (云南省大理学院药学与化学学院药理学教研室, 云南大理 671000)

摘要 血清药理学是使用药物给予动物灌胃后一定时间所得血清进行体外研究的新方法。通过对血清药理学方法在中药药效学研究中建立的试验方案进行对比后, 发现其应用所得试验结果的好坏与该方法的动物选择、给药剂量与时间、取血时间与血清的处理等均有紧密的关系, 因此对近年来血清药理学方法在中药药效学的方法学研究进行了文献综述, 为血清药理学方法在中药以及中药复方研究中的使用提供理论依据。

关键词 血清药理学; 药效学; 中药

中图分类号 S852.5⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)32-12607-03

Research Advance of Serum Pharmacology in Traditional Chinese Medicine Pharmacodynamics

LI Fang et al (College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali, Yunnan 671000)

Abstract Serum pharmacology refers to a method that animal serum is taken in a certain time to study the role of traditional Chinese medicine *in vitro* after animals orally given medicine or herbal compound. The application of the method has a close relationship with their animal selection, dose and time, blood serum processing time and so on, as obtained through comparison research on the serum pharmacology studies in medicine pharmacodynamics experimental programs. Literatures about serum pharmacology in traditional Chinese medicine pharmacodynamics were reviewed, so as to provide scientific theoretical basis for utilization of serum pharmacology in traditional Chinese medicine.

Key words Serum pharmacology; Pharmacodynamics; Traditional Chinese medicine

血清药理学是指采取口服的给药途径, 动物给药后一定时间内采集血液并分离动物血清进行体外试验的一种新方法。该方法早在 1987 年由日本学者 Iwama Hiroko^[1] 首次提出, 主要针对具有复杂成分的中药以及中药复方, 因其有效成分难以捕捉, 药效学研究中不能直观突出其作用, 因此使用该方法间接从血清中反映中药在体内的整体作用, 因此国内许多学者运用血清药理学方法对中药以及中药复方进行了研究。笔者对血清药理学方法在中药药效学方法学研究中的进展进行了综述, 以此为今后研究选用该方法提供一定依据。

1 实验动物的选择

血清药理学方法在药效学研究中, 对于常用实验动物的选择以及选择正常动物还是模型动物进行试验后效果更加明显和可靠, 研究人员看法各有不同。

1.1 动物性别 王威等^[2] 选用不同性别的大鼠对其使用中药续断进行灌胃给药, 1 周后提取续断含药血清, 并观察该含药血清对成骨细胞增殖作用的影响。中药续断具有强筋骨的功效, 对成骨细胞的增殖与分化也有显著促进作用, 而结果表明不同性别大鼠的续断含药血清都具有促进成骨细胞增殖的作用。但该作用的出现在雄性大鼠体内需要较长时间, 说明续断在雌性大鼠体内的作用较雄性大鼠更为明显, 但其具体原因有待进一步研究。

1.2 动物种类 吴健宇等^[3] 使用含药血清对小鼠皮肤成纤维细胞的增值作用进行了研究, 观察不同种属动物的血清间的差异, 分别选择 SD 大鼠、豚鼠、家兔、犬等动物进行采血, 结果发现小鼠皮肤成纤维细胞生长的最适血清为大鼠血清, 其他血清虽然不影响该细胞的正常生长, 但血清的浓度均不

宜过高, 尤其犬类血清, 皮肤成纤维细胞必须在最低血清浓度下才能生长, 当采用血清药理学方法进行药效学试验时, 尤其离体试验最好选择与体系中种属亲缘接近的动物。赵秀梅等^[4] 虽然没有直接使用含药血清进行药效学试验, 但同样观察了人肿瘤细胞在 5 种动物空白血清中的生长情况, 结果表明人肿瘤细胞在牛血清中最适生长, 而在小鼠血清中适应性较差, 这也说明不同种属的血清对细胞的影响是不同的, 说明在选择血清药理学方法时, 应对空白血清是否影响药效学试验进行对照组的设置。

1.3 是否造模 许多研究者选择血清药理学方法进行药效学研究时, 大部分选择的是正常动物, 也有一部分选择模型动物, 针对使用血清药理学方法时是否需要实验动物进行造模。李丹等^[5] 将大鼠进行造模, 采用心肌缺血模型的大鼠与正常大鼠灌胃给予双参宁心方后取其含药血清, 观察该血清对缺氧/复氧 H9C2 细胞的影响, 结果发现模型与正常大鼠含药血清对 H9C2 细胞活力均有所提高, 但正常含药组血清细胞总体活力作用优于模型组。曹勇等^[6] 同样采用荷瘤模型小鼠与正常小鼠进行补肾化瘀解毒方的灌胃给药, 并将二者的血清作用于肺癌 A549/DDP 耐药细胞, 结果表明模型组含药血清对肺癌 A549/DDP 耐药细胞内 Ca^{2+} 浓度抑制作用明显高于正常组, 说明造模与否的动物含药血清药理作用存在一定差异。文爱东等^[7] 研究表明药物在不同模型大鼠的代谢特征上存在显著差异, 例如阿魏酸给大鼠灌胃给药后, 其表观分布容积在模型组大鼠体内较正常组显著减少, AUC 却显著提高。中药成分较为复杂, 其吸收、分布、代谢、排泄时间也存在差异。部分研究人员认为若要模拟人类病理状态下服药后的情况, 需要选择模型动物进行试验, 而其他研究者则认为药物在正常动物体内更好地反映了药物的情况, 目前尚无定论。

2 量效关系

血清药理学方法所得含药血清药理作用强度主要与以

作者简介 李芳(1988 -), 女, 云南曲靖人, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理。* 通讯作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事中药药理学研究。

收稿日期 2013-10-22

下方面有关:①动物的给药量。一般而言,随着动物给药剂量的增加,吸收入血的药物就越多,血药浓度也越高;②药效学试验体系中含药血清浓度比,即体积比。

2.1 给药剂量 无论给药剂量的高低,进入体内的药物浓度均会较少,产生假阴性结果,那么如何确定一个合适的给药剂量尤为重要。李仪奎等^[8]提出参考公式:给药剂量 = 在体试验的给药剂量 × 反应体系中被稀释的倍数,可以弥补含药血清进入体系中损失的含药量。石艳婷等^[9]研究表明随着给药剂量的增加,中药在体内的含药量与药物作用增强,呈一定的剂量依赖性,但药效作用并不能通过无限增加给药量而无限增加,因为给药剂量存在一定的范围,故有学者提出血清冻干粉法^[10],将小青龙汤含药血清制成冻干粉,再使其作用于致敏大鼠腹腔肥大细胞(PMC),结果发现含药血清冻干粉与小青龙汤作用相同,均对 PMC 脱颗粒和组织胺释放有抑制作用,说明该方法可靠且能保证体系与体内中的药物浓度一致。

2.2 含药血清浓度比 石艳婷等^[9]采用槟榔、蒲公英、莱菔子等中药的含药血清以不同浓度作用于大鼠离体结肠平滑肌细胞,结果发现 100% 浓度有较强的收缩作用。刘健勋等^[11]研究发现将中药有效组分配伍方剂双参通冠方(剂量 45 ~ 360 mg/kg)对大鼠进行灌胃给药,所得含药血清对心肌细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放的抑制率有减弱的趋势。李湘平等^[12]研究不同浓度平肝潜阳方含药血清对血管平滑肌细胞活性的影响,虽然不同浓度的血清都能抑制细胞生长,以 5% 浓度的含药血清抑制率最为明显($P < 0.01$)。由此可见,在反应体系中,并不是含药血清浓度越高就越好。赵婷秀^[13]认为在细胞等体外培养体系中应采用同种单一血清,且含药血清浓度不宜过高,以 10% 的浓度为最佳条件。

3 时效关系

因为中药以及中药复方成分较为复杂,所以使用血清药理学方法进行药效学试验前,对其给药时间以及取血时间都应进行探索。

3.1 给药时间 姚树坤等^[14]研究肝癌患者在不同服药时间后的含药血清对肝癌细胞增殖的影响,患者服药时间分别为 2、4、6 周,结果发现随着服药时间的延长,含药血清肝癌细胞的抑制作用也有所增加,其中以服药 6 周的血清抑制率最高,可达 36.2%。李湘平等^[12]对给大鼠中药复方灌胃后 3、7 d 的含药血清药理学作用进行了对比,结果发现给药 7 d 的动物血清中天麻素浓度维持时间比给药 3 d 的稳定性更好。

3.2 取血时间 血清药理学方法取血时间在药物代谢动力学中的研究较多,大部分研究在给药后不同给药时间取血,通过高效液相色谱仪(HPLC)观察血药浓度的高低。在中药药效学中,有学者对不同时间所取含药血清进行药效学试验对比,结果发现家兔与小鼠灌胃给药后 60 min 的含药血清作用最强。隋因^[15]研究发现给家兔红花提取物灌胃后 60 min 的含药血清对豚鼠离体心脏的心博幅度与冠脉流量作用最强,同时在这个时间段血清中出现新的峰值,说明可能有新的代谢物产生。李湘平^[12]发现大鼠灌胃 60 min 后所取血清

中含药浓度最高,药理作用也最强。此外,也有学者研究发现大鼠给药后 90 min 的含药血清药理作用较好。倪建新^[16]研究大鼠四逆汤含药血清对蛙离体心脏心肌收缩力的作用。刘建勋^[11]观察大鼠中药含药血清对心肌细胞 LDH 释放抑制率的影响等。他们发现动物给药后 90 min 所取的血清药理效应最佳。

不同中药的最佳给药时间与取血时间不同。李仪奎等^[17]对 412 种中药在体内蓄积情况进行研究,发现大多数药物在多次给药后的血药浓度均高于一次给药后的浓度,其中又根据 113 种中药的药物谱频记载的血药高峰时间(T_{max})进行分析,这些中药的血药达峰时间有 59 个在给药后 1 h,所占比例为 52.2%,因此提出中药血清药理学方法研究给药方案的常规方法,同时也是使用血清药理学方法预试的常规方法,即给药次数为每日 2 次,连续给药 3 d,取血时间为末次给药后 1 h。

4 血清的处理

4.1 灭活与冰冻处理 血清药理学方法进行中药药效学试验的研究,大部分研究人员对采取的含药血清进行了处理后才运用于试验系统中,其中对含药血清采取 56 °C 水浴加热,灭活 30 min 的方式较多^[18-19],尤其与细胞有关的离体试验,研究者们采取高温灭活的方式处理含药血清,可以除去血清本身含有的补体等干扰试验的活性成分,从而保留药物本身的作用。此外,也有研究者将含药血清冰冻保存一段时间后再进行相关试验。周明眉等^[20]对比了含头风饮含药血清灭活前后以及冰冻处理后的药效学作用,结果发现采用灭活后的血清进行血小板释放 5-HT 和内皮细胞钙离子通道试验,发现仍对二者有抑制与阻滞作用,但无显著差异($P > 0.05$),说明灭活血清中除去的生物活性物质对试验结果影响不大,而长时间的低温保存可能会使含药血清中有效成分损失至活性下降。李平^[21]则采用新鲜灭活与未灭活以及冰冻 3 周 3 种方式处理含药血清进行体外抑菌试验,结果发现 3 种方式处理的含药血清中新鲜未灭活的对幽门螺杆菌(HP)有明显抑制作用,其余 2 组药效作用均有所下降,说明用血清药理学进行抑菌试验时,选择新鲜未灭活的血清最好,灭活与冰冻的血清抗菌效果均会受到影响。也有研究人员认为含药血清是否需要灭活与试验所选指标以及药物本身性质有关^[22]。

4.2 其他处理 有研究人员将含药血清经有机试剂处理,通过使蛋白质变性去除血清中的酶、激素等,以减少血清中非药物的干扰。姚树坤、周芝兰等^[23-24]研究发现,与正常含药血清相比,经乙醇、丙酮、甲壳素等预处理的血清,药效学作用均有所下降,含药血清经处理后药物活性虽没有有效去除,但药物作用中的有效成分还是因为处理后失去或减少了它的原有疗效。

5 讨论

血清药理学方法针对具有复杂成分的中药以及中药复方,间接从血清中反映了中药在体内的整体作用,为中国传统中药的药效学研究提供了方便。

综上所述,该方法在中国传统中药药理学研究中得以较广泛地应用,主要优点包括:①减少了中药以及中药复方制剂成分复杂、有效部位与成分难以判断以及分离给其带来的作用机制不易寻找的不便利;②直接使用含药血清进行试验,间接避免了直接使用中药进行体外实验可能得到的阴性结果;③能较直观地反映药物在机体内的药效学作用。根据目前药效学研究的结果,笔者认为使用该方法时动物需选择与反应体系中种属接近的动物;给药剂量与给药时间可先采取常规方法进行预试,若能将该方法与 HPLC 测血药浓度方法结合,再选取合适的给药剂量与时间最为理想;含药血清最好选择新鲜血清,这可以避免血清在处理过程中有效成分的丢失,保证了含药血清的最初性质不受外界其他因素的影响。初次使用该方法时应首先对整个方法学进行考证。魏雅芹^[25]在研究银杏叶提取物含药血清作用前,对方法学进行了建立与验证,得到了最佳的给药时间、取血时间、血清的浓度等,在此条件下制备的含药血清在药效学研究中具有明显的抗氧化能力,说明方法学的考察在血清药理学方法中占着重要的地位。

目前,该试验方法因其方法学上仍存在不足,且与其他学科包括微生物学、血清药物代谢动力学、免疫学等试验学科连接不够紧密,在实际应用中存在一定的局限性,在中药以及中药复方制剂的药效学研究应用上血清药理学试验方法需要进行更加全面地改进,今后该方法对我国传统中药以及中药复方的研究上能有较多的帮助与贡献。

参考文献

- [1] IWAMA HIROKO, AMAGAYA SAKAE, OGIHARA YUKIO. Effect of sho-saikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: A new pharmacological testing method[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1987, 21(1): 45-53.
- [2] 王威, 何永至, 史红, 等. 不同性别大鼠中药含药血清对成骨细胞增殖的影响[J]. *天津中医药*, 2009, 26(1): 9-11.
- [3] 吴健宇, 穆静, 李仪奎. 血清药理实验中异种动物血清对细胞的毒性和灭活后的减毒作用[J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(1): 118-119.
- [4] 赵秀梅, 冯文茹, 胡人杰. 异种动物血清对体外培养人肿瘤细胞生长的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(6): 35-38.
- [5] 李丹, 韩笑, 侯金才, 等. 双参宁心方的正常与心肌缺血模型大鼠血清对缺氧/复氧 H9C2 细胞作用的比较[J]. *中医实验方剂学杂志*, 2011, 17(22): 127-130.

- [6] 曹勇, 张丹, 郑广娟, 等. 补肾化痰解毒方药物血清对肺癌耐药细胞内 Ca^{2+} 浓度影响的研究[J]. *四川中医*, 2003, 21(11): 24-26.
- [7] 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[J]. *第四军医大学学报*, 1995, 16(2): 140-141.
- [8] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. *中药新药与临床药理*, 1999, 10(2): 95-98.
- [9] 石艳婷, 司春峰, 刘斌, 等. 四种中药含药血清对大鼠离体结肠平滑肌细胞作用的筛选研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(5): 422-424.
- [10] 李仪奎, 吴健宇, 吴晓芬, 等. 小青龙汤药物血清对致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒以及组织胺释放的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20(1): 40-42.
- [11] 刘建勋, 韩笑, 孙宇扬. 含药血清药理作用强度与体内给药的量效、时效关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(10): 829-831.
- [12] 李湘平, 罗艳红, 钟广伟, 等. 平肝潜阳方含药血清中天麻素水平测定及其对血管平滑肌细胞活性的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(15): 2735-2739.
- [13] 赵婷秀, 陈振发, 邱幸凡, 等. MIT 法分析含药血清对体外培养肺癌细胞增殖的影响[J]. *数理医学杂志*, 2006, 19(3): 239-241.
- [14] 姚树坤, 殷飞, 李静. 经乙醇处理后肝癌患者清肝化痰方含药血清对肝癌细胞 HepG2 增殖的抑制作用[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(12): 942-943.
- [15] 隋因, 孙沂, 郭涛, 等. 运用血清药理学方法研究红花对豚鼠离体心脏的作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2003, 20(5): 373-375.
- [16] 倪建新, 林跃虹, 陈妙珠. 血清药理学方法研究四逆汤对离体蛙心心肌收缩力的影响[J]. *中国医药科学*, 2012, 2(5): 40-41.
- [17] 李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. *中国药理学通报*, 1999, 15(6): 569-700.
- [18] 付莹坤, 王阶, 杨戈, 等. 三七总皂苷含药血清对溶血磷脂酸诱导血管平滑肌细胞增殖的影响及其机制研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2009, 36(9): 1606-1608.
- [19] 张秋林, 洪钦国. 尿毒清胶囊含药血清对人近端肾小管上皮细胞结缔组织生长因子表达的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2011, 13(2): 8-11.
- [20] 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[J]. *中药药理与临床*, 1999, 15(2): 44-46.
- [21] 李平, 楚更五, 周华, 等. 蜂胶左金丸含药血清抗幽门螺杆菌的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(3): 59-60.
- [22] 孟李, 王宁生. 含药血清的制备方法研究[J]. *中药新药与临床药理*, 1999, 10(5): 290-292.
- [23] 姚树坤, 殷飞, 李静. 经乙醇处理后肝癌患者清肝化痰方含药血清对肝癌细胞 HepG2 增殖的抑制作用[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(12): 942-943.
- [24] 周芝兰, 耿姬, 付惠娣, 等. 中药血清药理研究方法中几种血清预处理方法对消除正常血清活性的比较[J]. *中药药理与临床*, 1999, 15(3): 46-47.
- [25] 魏雅芹, 汤道权, 高媛媛, 等. 银杏叶提取物血清药理学方法的建立及验证[J]. *中药药理与临床*, 2009, 25(3): 74-77.

(上接第 12586 页)

林还草、社会主义新农村建设工程、农民固定放牧工程,利用当地水资源、土地资源,建立现代畜牧业基地、人工饲草基地,减少现有夏牧场牲畜载畜量,夏牧场牲畜数量应控制在 200 万~250 万头,不仅保护草地资源的合理保护利用,而且对生长在草原的药用植物也会提供良好的生存环境。

3.5 最低限度的控制滥采乱挖的采矿活动 应加大执法力度,制止和严厉打击非法进入林区破坏生态环境和自然资源的各种行为,对个体采矿活动依法彻底取缔。应制定发展总体规划,对利害作全面权衡,对可能造成的生态问题作深入评估,并提出可行的对策途径,将对生态环境的影响控制在最低限度,以保证生态建设目标的如期实现。应结合建立保

护区、退牧还草、还林工程,积极争取国家对大江大河源头治理工程,尽快对已出现水土流失的草场进行封育,矿点和裸露沙石进行回填平整,治理水土流失,修复生态伤疤,恢复该区自然生态环境,使生态建设步入良性发展的轨道。

参考文献

- [1] 国家环保局,中国科学院植物研究所. 中国濒危保护植物名录[M]. 北京:科学出版社,1987.
- [2] 国家林业局和农业部. 国家重点保护野生植物名录(第一批)[M]. 北京:国家林业局办公室,1999:1-13.
- [3] 国家重点保护野生植物名录(第一批)[R]. 中华人民共和国国务院公报,2000:39-47.
- [4] 中国珍稀濒危保护植物名录[J]. *生物学通报*, 1987(7): 23-28.
- [5] 王兆松, 许正. 新疆北疆地区野生资源植物[M]. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社,2006.