

## · 实验研究 ·

## 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

张群豪<sup>1</sup> 钟 蓓<sup>2</sup> 陈可冀<sup>1</sup> 史大卓<sup>1</sup> 毛节明<sup>2</sup> 陈明哲<sup>2</sup>

**内容提要** 采用两种离体实验方法对比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(SMC)增殖的影响。第一种采用给家兔灌服血府逐瘀浓缩丸后取其血清加至细胞培养基中进行实验即血清药理学方法;第二种直接加血府逐瘀煎剂浓缩液至培养基中。结果发现含血府逐瘀浓缩丸血清和血府逐瘀煎剂浓缩液均对 SMC 增殖有抑制作用,并呈剂量依赖性,且煎剂浓缩液作用强于含药血清。表明血府逐瘀浓缩丸在体内外确均有抑制 SMC 增殖作用,血府逐瘀浓缩丸确含抗 SMC 增殖的有效成分,并且此成分口服有效。血府逐瘀煎剂浓缩液的抑制作用比含药血清强,可能与某些有效成分未能从消化道吸收或经体内代谢失活有关。

**关键词** 血清药理学 血府逐瘀浓缩丸 动脉粥样硬化 平滑肌细胞增殖

**Effect of Concentrated Xuefu Zhuyu Pill on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells in Experimental Atherosclerosis Rabbits Observed by Serologic Pharmacological Test** ZHANG Qun-hao, ZHONG Bei, CHEN Ke-ji, et al *Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)*

Two in vitro experiments were performed for comparative study to evaluate the effect of concentrated Xuefu Zhuyu pill (CXZP), a Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the proliferation of vascular smooth muscle cells (SMCs) of experimental atherosclerosis rabbits by serologic pharmacological test. The first experiment approach adopted the addition of the rabbit's serum to the culture medium while in the second experiment the CXZP was added to the medium directly. Results showed that both the serum with CXZP and the CXZP extract itself could inhibit the proliferation of SMC significantly and dose-dependently, and the inhibitory action of the latter was more potent than the former one. It suggested that CXZP could inhibit the proliferation of SMC both in vivo and in vitro, the decrease of effectiveness in vivo might be due to the non-absorption of some active ingredient of CXZP or due to metabolic inactivation.

**Key words** serologic pharmacological test, concentrated Xuefu Zhuyu pill, atherosclerosis, proliferation of smooth muscle cells

在研究药物的药理作用时,由于体内实验受到一定的限制,必不可少地需要一些体外实验。中药复方药理研究的体外实验在方法上存在一些问题,中药复方多数是通过口服而起作用的,然而,当评价其药理作用时,这个药常常是直接加入细胞培养基中。由于中药复方复杂的化学成分和其成分复杂的代谢过程,

那些临床有效的中药复方可能在体外实验中失效,体外实验有效的中药复方不一定在体内实验中亦有效。因此,我们给家兔灌服血府逐瘀浓缩丸(水丸)一定时间后,收集其血清进行实验,把血清药理学方法<sup>(1, 2)</sup>引用到血府逐瘀浓缩丸抗动脉粥样硬化(AS)家兔主动脉平滑肌细胞(SMC)增殖的实验中,观察血府逐瘀浓缩丸对 SMC DNA 合成的影响。

1. 中国中医研究院西苑医院(北京 100091); 2. 北京医科大学第三附属医院

## 材料与方 法

1 实验动物 纯种新西兰家兔,雌雄不限,体重 2~3 kg,由军事医学科学院动物中心提供。

2 主要试剂与药品 DMEM 培养基干粉、胎牛血清购自 GIBCO 公司;胰蛋白酶购自 Difco Laboratories 公司;<sup>3</sup>H-TdR 购自中国原子能科学研究院,比度 20 Ci/mmol,放射性浓度 1 mCi/ml;三氯醋酸(分析纯品),北京化工厂出品;血府逐瘀浓缩丸由厦门中药厂提供,美降脂购自 MSD 公司;Hepes 购自 DNN 公司;PPO、POPOP 购自 Fluke 公司。

3 主要仪器 Olympus 相差倒置显微镜(日本 Olympus 公司),CO<sub>2</sub>培养箱(美国 Nubrusmick 公司),24 孔细胞培养板(美国 GIBCO 公司),FJ-2115 自动液体闪烁计数器(国营二六二厂)。

4 血府逐瘀煎剂浓缩液的制备 血府逐瘀浓缩丸含桃仁 12 g 红花 9 g 当归 9 g 生地 9 g 川芎 5 g 赤芍 6 g 牛膝 9 g 柴胡 3 g 枳壳 6 g 桔梗 5 g 生甘草 3 g。以上药物经鉴定后按常规方法煎煮浓缩成每毫升含生药 500 mg,置 4℃ 冰箱保存备用。

5 含药血清的制备 选择纯种雄性新西兰家兔 7 只,体重均为 2.0±0.1 kg,6 只分别每日给予血府逐瘀浓缩丸 6 g/kg、3 g/kg、1 g/kg,美降脂 6 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg,溶于 20 ml 的蒸馏水中胃管灌胃,另 1 只每日给予生理盐水 20 ml 作为对照。10 天后,于最后 1 次灌药后 1 h(灌药前禁食不禁水 12 h),心脏采血,无菌分离血清,经 56℃,30 min 处理后,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤除菌,置 -20℃ 保存备用。

6 AS 模型复制与分组 纯种新西兰家兔 20 只,随机分两组。(1)正常对照组 5 只,普通饲料喂养。(2)AS 模型组 15 只,用 2% 戊巴比妥钠 0.4 ml/kg 耳缘静脉注入麻醉,4 F.Fogarty 导管自右侧股动脉逆行插入腹主动脉约达膈水平,球囊内充以 0.5 ml 气体,缓慢回拉导管至股动脉切口处,重复 5 次后移出导管,结扎股动脉,开始喂 2% 胆固醇加 10% 花生油饲料,6 周后经内皮剥脱的主动脉形成 AS 病变,任选 5 只家兔腹主动脉做病理切片及不同的染色镜下观察。

7 主动脉 SMC 培养 参照赵三妹等的方法<sup>(3)</sup>。

(1)原代细胞培养:以 20% 乌拉坦耳缘静脉麻醉家兔,在严格消毒灭菌条件下,取出腹主动脉,立即放入 PBS 液中,剥离外膜上附带的结缔组织,冲洗血

管膜内的残血,用剪刀从正中剖开,刮去内膜面,冲掉内皮后,转入另一装有 PBS 平皿中,用弯头镊撕下中膜平滑肌,丢弃外膜,将中膜剪成约 1 mm<sup>3</sup>的组织块,移入培养瓶壁上,加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,先将培养瓶竖直放入含 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 的潮湿空气的细胞培养箱静置培养 2~3 h,然后轻轻翻转培养瓶,使培养液没过组织块,每 4~5 天更换 1 次培养液,待细胞生长成致密单层时进行传代。(2)传代培养待 SMC 自组织块中长出,并增殖到占据瓶底约 80% 表面时,可传第一代,加入 0.125% 胰蛋白酶(含 0.04% EDTA)消化 0.5~1.0 min,在显微镜下观察,见到细胞收缩聚集,立即翻转培养瓶,使细胞脱离消化液,弃去消化液,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,用吸管吹打,接种于新培养瓶中,以 1:2 比例传代,分装入新培养瓶后补足培养液重新放入培养箱中,依上述方法继续培养并传代,取第 4 代 SMC 用于实验。

8 血府逐瘀浓缩丸对 SMC DNA 合成的影响 采用氘-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)掺入法。SMC 以 1×10<sup>5</sup>/ml 接种于 24 孔细胞培养板中,于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,5% CO<sub>2</sub> 孵箱,37℃ 培养 24 h,换无血清的 DEME 培养液继续培养 24 h,使细胞同步进入 G<sub>0</sub> 期,更换为含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养液,分别加入不同浓度的血府逐瘀浓缩丸和美降脂血清、血府逐瘀煎剂浓缩液(终浓度大小剂量分别为 60 mg/ml、30 mg/ml、10 mg/ml)继续孵育,每组均设 6 个平行孔,在收获细胞前 6 h 加入 <sup>3</sup>H-TdR(1 μCi/ml)进行标记,继续培养 6 h 后收集细胞;弃去培养液后,以适量 0.04% EDTA、0.125% 胰酶消化,待细胞团缩后,加入含 10% 胎牛血清的 DMER 液中和。将此液吸于直径 25 mm 孔径 0.45 μm 的微孔滤膜上抽滤,PBS(pH 7.4)冲洗 3 遍,然后以 10% 三氯醋酸固定。待微孔滤膜自然干燥后,置于闪烁液(配方:二甲苯 500 ml、PPO 2 g、POPOP 50 mg)中,液闪计数器计数测定掺入量 cpm 值。

$$\text{药物抑制率} = \frac{\text{模型组 cpm} - \text{治疗组 cpm}}{\text{模型组 cpm}} \times 100\%$$

9 统计学处理 采用 t 检验。

## 结 果

1 培养的主动脉 SMC 生长性状 正常主动脉中膜组织植块培养 10~14 天可见细胞长出,在植块周围形成生长晕。约 3~4 周时间,相邻生长晕融合

成片，可进行传代培养，生长的 SMC 呈长梭形，多层生长，高低起伏呈现 SMC 特征性的“丘和谷”状。AS 组 SMC 生长较正常组快，原代 5~7 天后，见有细胞从植块边缘萌出，逐渐形成生长晕，10~15 天，相邻的生长晕细胞连接形成细胞单层，可以传代培养。

2 主动脉病变分布情况 正常对照组未见病变，AS 模型组腹主动脉内膜可见到许多黄白色隆起条纹，或隆起的橘红色条状脂纹，病变严重者，腹主动脉大部分被融合的斑块覆盖。光镜下观察：AS 模型组主动脉壁内皮细胞增生肿胀，部分坏死脱落，有少许新生内皮细胞修复，泡沫细胞出现并浸润，平滑肌细胞、纤维细胞及胶原、弹力纤维不断增生，因此致使层次紊乱动脉壁增厚，并可见弹力纤维断裂及排列紊乱。

3 血府逐瘀浓缩丸对同步化 SMC DNA 合成的影响 见附表。

附表 血府逐瘀浓缩丸对家兔主动脉 SMC DNA 合成的影响 ( $\bar{x} \pm S$ )

组别	剂量	SMC DNA (cpm)
正常对照	—	8406.3±202.6
AS 模型	—	9622.5±188.3 $\Delta$
空白血清	—	9603.7±107.9
血府逐瘀浓缩丸血清	6 g/kg	8832.2±186.4*
	3 g/kg	8950.2±95.3*
	1 g/kg	9244.8±172.1*
血府逐瘀煎剂浓缩液	60 mg/ml	8540.5±212.6*
	30 mg/ml	8627.3±110.4*
	10 mg/ml	8750.7±198.9*
美降脂血清	6 mg/kg	9570.3±127.9
	3 mg/kg	9562.7±126.8
	1 mg/kg	9604.3±134.8

注：与 AS 模型组比较，\* $P < 0.01$ ；与正常对照组比较， $\Delta P < 0.01$ ；每组动物均为 6 只

从附表中可见 AS 模型组的 SMC DNA 合成速率显著大于正常 SMC 组；含血府逐瘀浓缩丸血清对 AS SMC 的 DNA 合成有显著抑制作用，且其抑制作用有剂量依赖性，抑制率分别为 7.0%，5.3%，3.9%；血府逐瘀煎剂浓缩液对 SMC DNA 合成亦有显著抑制作用，亦呈剂量依赖性，抑制率分别为 11.2%，10.6%，10.3%；空白血清和美降脂血清对 SMC DNA 的合成速率无明显影响 ( $P > 0.05$ )。

### 讨论

中药复方多数是通过口服而起作用的。用中药粗制剂直接加入离体反应体系中(如细胞培养或酶反应等)进行实验研究，在方法上存在很多问题，如中药

的杂质成分、各种电解质或鞣质、酸碱度等，都会对细胞的生长造成一定的影响，从而影响实验结果，由此得出的结论并不可靠。而采用血清药理学研究方法，中药粗制剂经口服吸收后，用含药血清进行体外实验，可以排除各种影响因素的干扰，更接近药物体内环境中产生药理效应的真实过程，提高实验结果的可信度。另外，当中药复方含有的有效成分没从胃肠道吸收(如某些高分子化合物)，或经体内吸收代谢后失活，以及本身无直接作用，但经体内代谢后产生作用，或通过刺激第二信使而间接起作用等各种情况，通过这一方法均能很好地反映出来。

有人研究中药复方小柴胡汤的致有丝分裂作用时发现，小柴胡汤煎剂浓缩液直接加到细胞培养基中有致有丝分裂作用，而用含小柴胡汤的血清则无此作用，并分析其原因认为小柴胡汤的致有丝分裂作用，可能由一些不能从胃肠道吸收的大分子物质产生或因有效成分经消化道或肝脏代谢失效所致<sup>(2)</sup>。还有人研究 6 种中药黄连、赤芍、生姜、丹皮、黄芩、黄精对花生四烯酸生物转化的影响时发现，含黄连和赤芍的血清抑制花生四烯酸的生物转化，而其煎剂浓缩液则无效；相反地，生姜、丹皮、黄芩、黄精则其煎剂浓缩液有效，而含药血清无效<sup>(4)</sup>。

本实验结果表明，空白血清和含美降脂血清均对家兔主动脉 SMC DNA 合成无明显作用。血府逐瘀煎剂浓缩液和含血府逐瘀浓缩丸血清均对 SMC DNA 合成有显著的抑制作用，而且均表现出剂量依赖性，表明血府逐瘀浓缩丸在体内外确均有抑制 SMC 增殖的作用，血府逐瘀浓缩丸确实含抗 SMC 增殖的有效成分，并且此成分口服有效。

此外，从本实验结果来看，血府逐瘀煎剂浓缩液组的抑制作用比含血府逐瘀浓缩丸血清组强，这可能与某些有效成分未能从消化道吸收或经体内代谢失活有关。

### 参考文献

1. Sakae Amagaya, Kazumichi, Akira Miyake, et al. A new pharmacological testing method — Different effects of levamisole and the serum of mice orally treated with levamisole on mitogenic activity of lipopolysaccharide. *J Chem Pharm Bull* 1989; 37(4) : 1117—1119.
2. Hiroko Iwama, Sakae Amagaya and Yukio Ogihara. Effect of Shosaikoto, a Japanese and Chinese herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide. a new pharmacological testing method. *J Ethnopharmacol* 1987; 211 : 45—53.

3. 赵三妹, 夏人仪, 王宗立, 等. 动脉平滑肌细胞培养方法及应用. 中华病理学杂志 1987; 16(4): 260-262.
4. Masaomi Umeda, Sakae Amagaya and Yukio Ogihara. Effects of certain herbal medicines on the biotransforma-

tion of arachidonic acid: a new pharmacological testing method using serum. J Ethnopharmacol 1988; 23: 91-98.

(收稿: 1995-12-01 修回: 1995-12-25)

## 中西医结合治疗慢性荨麻疹 96 例

刘天骥<sup>1</sup> 苗恕成<sup>1</sup> 王新明<sup>2</sup>

慢性荨麻疹瘙痒剧烈, 缠绵难愈, 目前中西医均无特效疗法。我们用中西医结合疗法观察 96 例, 并与单用中药及单用西药治疗比较, 现小结如下。

**临床资料** 168 例门诊患者随机分为 3 组。治疗组 96 例, 男 53 例, 女 43 例; 年龄 4~42 岁, 平均 13.9 岁; 病程 2 个月~12 年, 平均 2.5 年。对照组 72 例(中药、西药组各 36 例), 西药组 36 例, 男 19 例, 女 17 例; 年龄 6~36 岁, 平均 13 岁; 病程 3 个月~10 年, 平均 2.5 年; 中药组 36 例, 男 20 例, 女 16 例; 年龄 5~39 岁, 平均 11.6 岁; 病程 2 个月~8 年, 平均 2.1 年; 3 组性别、年龄、病程均无显著差异( $P>0.05$ )。诊断标准根据《实用皮肤病学》(刘辅仁, 张志礼主编, 第一版, 北京: 人民卫生出版社, 1984: 263-267)。治疗组 96 例中, 风寒型 49 例, 风热型 26 例, 阴血不足型 21 例。西药组不分型, 中药组 36 例中, 风寒型 20 例, 风热型 9 例, 阴血不足型 7 例。

### 治疗方法

1 治疗组 (1) 中药穴位贴敷, 药用: 川芎、羌活各 30 g 地龙、肉桂各 10 g。风寒型加麻黄、细辛各 10 g; 风热型加黄芩 10 g 金银花 20 g; 阴血不足型加黄芪、当归各 15 g。上药粉碎过 80 目筛, 装瓶备用。每次取药粉 16~24 g(小儿酌减), 陈醋适量调膏, 分摊于 8 块 4 cm×5 cm 的塑料薄膜上, 贴于曲池、风市、膈俞、血海(均为双侧)穴位, 胶布固定, 每次贴 24 h, 3 天贴 1 次, 连贴 5 次为 1 个疗程。嘱忌食辛辣、鱼虾等食物。(2) 西药: 扑尔敏成人每次 4 mg, 每日 3 次口服; 儿童每日 0.35 mg/kg, 分 3 次服。苯海拉明成人每次 25 mg, 每日 3 次口服, 儿童每日 3 mg/kg, 分 3 次服, 连服 15 天停药观察。部分瘙痒较重的成人患者, 用 10% 葡萄糖酸钙 10 ml 肌肉注射, 每日 1 次, 连用 3 天。治疗期间不另配用其他药物和疗法。

2 中药组 风寒型用赵炳南麻黄方(麻黄 3 g 杏仁 4.5 g 干姜皮 3 g 浮萍 3 g 白藜皮、丹参各 15 g 陈皮、丹皮、僵蚕各 9 g); 风热型用桑菊饮加减(桑叶、菊花、杏仁、甘草各 10 g, 连翘、芦根各 15 g 白藜皮、地肤子、徐长卿各 20 g); 阴血不足型用当归饮子加减(当归、黄芪、制首乌、白蒺藜各 15 g, 熟地、白藜皮、地肤子各 20 g, 川芎、赤芍、僵蚕各 10 g) 均每日 1 剂, 水煎早晚服, 连服 15 天为 1 个疗程。

3 西药组 同治疗组所用西药。

### 结果

1 疗效标准 痊愈: 风团、瘙痒完全消失, 停药 1 个月以上无复发者; 显效: 风团、瘙痒基本消失, 停药后偶而复发, 需小剂量药物控制者; 有效: 发作次数减少, 皮疹范围缩小, 仍需服药治疗者; 无效: 经 2 周治疗, 皮疹、瘙痒无好转者。

2 疗效分析 治疗组痊愈 49 例(51.04%), 显效 26 例(27.08%); 有效 17 例(17.70%), 无效 4 例(4.16%), 总有效率 95.82%。中药组痊愈 10 例(27.78%), 显效 12 例(33.33%), 有效 8 例(22.22%), 无效 6 例(16.67%), 总有效率 83.33%。西药组痊愈 6 例(16.67%), 显效 10 例(27.77%), 有效 13 例(36.11%), 无效 7 例(19.44%), 总有效率 80.56%。治疗组与单用中、西药组总有效率比较有显著性差异( $P<0.01$ )。

**体会** 慢性荨麻疹中医认为因禀赋不耐, 风邪客于皮肤所致, 其治疗初起以祛邪为主, 久则扶正祛邪并用, 然屡服中药而时有复发。我们根据中医理论选用祛风活血中药贴敷穴位, 取中药合俞穴的双重作用, 增强体质, 祛风除邪以治本; 又运用抗组织胺药控制病情, 减少皮疹发生而治标。本法中西医结合, 内外兼治, 标本同疗, 故临床疗效显著, 尤小儿往往贴 1 次即效, 免去了打针及服中药之苦, 故患者乐于接受, 值得推广。

(收稿: 1995-08-25 修回: 1995-10-15)

1. 河南省驻马店地区中医院(河南 463000); 2. 河南省泌阳县人民医院