

结果山银花喷雾剂高、中剂量组对细菌感染小鼠的存活时间均有一定的延长,与生理盐水空白对照组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);山银花喷雾剂低剂量组与生理盐水空白对照组比较,没有显著性差异。实验证明,山银花喷雾剂在体内对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、甲型溶血性链球菌有一定的抑制作用。

2.3 山银花喷雾剂的抗炎作用

2.3.1 山银花喷雾剂对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响

小鼠 50 只,雄性,体重在 18~22g,随机分 5 组,药物各剂量组剂量同 2.2 项下,地塞米松(2mg/ml)剂量为 0.3mg/10g。灌胃给药,连续 5 天,每日 1 次。于第 5 天给药 30min 后,将每只小鼠右耳廓两面上涂上 0.05ml 的二甲苯致炎(注意给量一致),左耳作对照。30min 后将小鼠断颈处死,沿耳廓基线剪下两耳,用 7mm 打孔器分别在相同部位取下耳片,电子天平称重。以耳肿胀度和耳肿胀抑制率来表示药物的抗炎作用。右耳片重量减去左耳片重量即为耳肿胀程度;肿胀抑制率=(对照组肿胀度-药物组肿胀度)/对照组肿胀度 $\times 100\%$ 。

山银花喷雾剂高剂量组,地塞米松阳性对照组与生理盐水对照组比较,小鼠致炎后右耳重量与左耳重量的差值均明显减少,差异具有极显著意义($P < 0.01$);山银花喷雾剂中、低剂量组与生理盐水对照组比较,没有显著性差异。实验证明,山银花喷雾剂高剂量组有明显的抑制二甲苯所致小鼠的耳肿胀作用。

2.3.2 山银花喷雾剂对蛋清所致大鼠足肿胀的影响

取健康雄性大鼠 40 只,体重 150~180g,随机分为 5 组,根据《药理实验方法学》中人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表,药物各剂量组剂量分别为:地塞米松组 0.02g/kg,高剂量组 0.23g/kg,中剂量组 0.15g/kg,低剂量组 0.11g/kg。连续给药 5 天。第 5 天给药前,在各鼠右后足踝关节处作标记,用足容积测定仪测定各鼠足容积两次,取平均值作为正常足容积。给药后 30min,在大鼠右后足掌部向踝关节处注射新鲜配制的 20% 的鸡蛋清,容积为 0.1ml。分别于致炎后 1h,2h,4h 测定大鼠肿胀足容积,以足肿胀度和足肿胀抑制率来表示药物的抗炎作用。致炎后容积减去致炎前容积即为足肿胀程度,足肿胀抑制率=(对照组肿胀度-药物组肿胀度)/对照组肿胀度 $\times 100\%$ 。

结果山银花喷雾剂高剂量组、地塞米松组与生理盐水对照组相比,大鼠致炎后 1、2、4h 的肿胀程度均明显减少,差异均具有极显著意义($P < 0.01$);山银花喷雾剂中剂量组与生理盐水对照组相比,大鼠致炎后 1h 的肿胀程度有明显减少($P < 0.01$),而致炎后 2h、4h 的差值较小($P < 0.05$);山银花低剂量组与生理盐水对照组相比,没有显著性差异。实验证明,山银花喷雾剂高、中剂量均具有显著的抑制大鼠足肿胀作用。

2.3.3 山银花喷雾剂对大鼠肉芽肿的影响

取健康雄性大鼠 40 只,体重 150~180g,随机分为 5 组,药物各剂量组剂量同 2.2.3.2 项下,氢化可的松(10mg/2ml)为 20mg/kg,连续给药 5 天。在开始给药前,于大鼠前腿左侧植入无菌棉球(20.0 ± 2.0 mg),术后两小时开始给药,连续 7 天。第 8 天大鼠处死,取出前腿棉球肉芽肿组织,置于烘箱中 60℃ 烘 1 小时。取出,精密称重,减去原棉球重量,即为肉芽干重。以肉芽干重和肉芽抑制率来表示药物的抗炎作用,肉芽抑制率=(对照组肉芽重-药物组肉芽重)/对照组肉芽重 $\times 100\%$ 。

结果山银花喷雾剂高剂量组、氢化可的松组与生理盐水对照组相比,大鼠肉芽组织重量明显减少,差异具有极显著意义($P < 0.01$);山银花喷雾剂中剂量组与生理盐水对照组相比,差异具有显著意义($P < 0.05$);山银花喷雾剂低剂量组与生理盐水对照组相比,无显著性差异。实验证明,山银花喷雾剂高、中剂量均具有显著的抑制大鼠肉芽肿作用。

3 讨论

山银花喷雾剂以山银花、薄荷脑等经过现代提取工艺加工而成,具有清热解毒、抗菌消炎的作用。体外和体内抗菌实验表明,山银花喷雾剂对金葡菌、甲型溶血性链球菌、绿脓杆菌等急性咽炎常见致病菌均有不同程度的抑制作用,还可抑制急性炎症的早期肿胀和炎症后期的肉芽增生。实验对于山银花喷雾剂能否影响动物毛细血管通透性没有做相关研究,应在日后的研究中进一步补充。

1 广西中医学院第一附属医院药剂科(530023);

2 河南省郑州市中心医院药剂科;

3 广西中医学院

解毒化瘀含药血清抗白血病细胞及白血病多药耐药细胞的体外实验研究

姚宇红* 严鲁萍* 李秀军* 高 蕾*

1 材料与方法

1.1 细胞株

白血病细胞株 K562 在含 10% FBS 的 IMDM 培养基中培养。阿霉素(ADR)诱导的白血病多药耐药细胞株 K562/A^[1],在含 10% FBS 的 IMDM 培养基中添加 1μg/ml 的 ADR 以维持其耐药性,实验前两周脱离 ADR 培

养。白血病细胞株 HL-60 在含 20% FBS 的 IMDM 培养基中培养。阿霉素(ADR)诱导的白血病多药耐药细胞株 HL-60/A,在含 20% FBS 的 IMDM 培养基中添加 0.5μg/ml 的 ADR 以维持其耐药性,实验前两周脱离 ADR 培养。K562、K562/A、HL-60 及 HL-60/A 均由中国医学科学院血液学研究所药理实验室提供。

1.2 药品及主要试剂

IMDM 培养基, 美国 GIBCO 公司产品; 四氮唑蓝 (MTT), 美国 AMRESCO 公司产品; 注射用盐酸多柔比星速溶型, Pfizer Italia S. r. l. 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清的制作 新西兰大白兔 10 只随机分为 2 组, 分别为实验组和对照组。实验组以解毒化瘀中药汤剂灌胃, 2 次/日, 连续 3 天; 对照组以等剂量生理盐水灌胃, 2 次/日, 连续 3 天。于末次灌胃后 2h, 心脏取血。分离血清, 将同组血清混匀, 过滤分装, 零下 20℃ 保存备用。

1.3.2 MTT 法检测含药血清的细胞毒作用 按周氏改良 MTT 法^[2]。①接种细胞: 分别收集 K562、K562/A、HL-60 及 HL-60/A 细胞悬液, 离心, 弃上清, 用含 2.5% 血清的 IMDM 培养液配成单个细胞悬液, 在 EP 管中与占总体积 50%, 依不同比例稀释的含药血清混匀, 并调整 K562 及 K562/A 细胞浓度为 1×10^5 /ml, 调整 HL-60 及 HL-60/A 细胞浓度为 2×10^5 /ml。于 96 孔板中每孔接种混悬液 100 μ l, 另设对照孔、空白对照孔及调零孔; ②培养细胞: 将 96 孔板移入 CO₂ 培养箱中, 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养 48h; ③显色: 48h 后每孔加入 MTT 液 (5g/L) 20 μ l, CO₂ 培养中, 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下继续培养 4h, 每孔加入三联溶解液 100 μ l, 37℃ 温箱中静置 12h, 使结晶充分溶解; ④比色: 在酶标仪上测 550nm 处光吸收度 (OD550), 实验重复 3 次。

1.4 计算方法

由 OD 值计算生长抑制率, 公式为: 细胞生长抑制率 IR = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})] \times 100\%$ 。由 SPSS14.0 软件求得回归方程。

2 结果

2.1 10%解毒化瘀含药兔血清对 K562 和 K562/A 细胞的生长有明显抑制作用, 等剂量对照组兔血清及胎牛血清对 K562 和 K562/A 细胞的生长无明显抑制作用, 且呈增殖作用, K562 和 K562/A 对不同血清的反应见表 1。

表 1 不同血清分别作用于 K562、K562/A、HL-60、HL-60/A 48h 的生长抑制率 (% , $\bar{x} \pm s$)

细胞	10%解毒化瘀含药血清	10%空白兔血清对照组	10%胎牛血清对照组
K562	84.26 $\pm$ 0.04	-6.21 $\pm$ 0.03	-14.13 $\pm$ 0.03
K562/A	90.65 $\pm$ 0.04	-23.95 $\pm$ 0.02	-28.62 $\pm$ 0.01
HL-60	49.71 $\pm$ 0.04	-30.18 $\pm$ 0.05	-124.71 $\pm$ 0.05
HL-60/A	88.83 $\pm$ 0.01	-27.30 $\pm$ 0.12	-46.14 $\pm$ 0.07

注: n=3

2.2 K562/A 和 HL-60/A 细胞在解毒化瘀含药血清 8 个浓度范围的生长抑制曲线

结果显示, 解毒化瘀含药血清对 K562/A 和 HL-60/A 细胞的细胞毒作用呈剂量依赖性。解毒化瘀含药血清对 K562/A 细胞生长抑制作用的概率单位回归方程为 PROBIT(p) = -0.062 + 5.093X; 解毒化瘀含药血清对 HL-60/A 细胞生长抑制作用的概率单位回归方程为 PROBIT(p) = -0.321 + 6.462X

3 讨论

白血病正严重危害世界人民的身体健康, 复发和耐药是白血病治疗中的难点。传统化疗药物长期应用可诱导肿瘤耐药产生, 其中多药耐药 (MDR) 是导致肿瘤化疗失败的最主要原因, 90% 以上患者的死亡都与此相关。逆转白血病多药耐药成为白血病治疗中亟待解决的问题之一。中医药临床应用是综合治疗恶性肿瘤的重要措施, 特别是晚期肿瘤患者以中医药为主治疗可明显提高生活质量, 延长生存期。对其疗效机制多数文献认为与中药的整体调节、免疫调控有密切关系。而且, 中药与化疗伍用还具有较为显著的增效减毒作用。除此以外, 中药直接杀伤肿瘤细胞、诱导肿瘤细胞凋亡与分化以及中药逆转多药耐药效应也是中药治疗恶性肿瘤重要机制之一。关于白血病 MDR 的逆转研究, 国内外早已有报道, 已发现异博定能通过增加细胞内药物浓度来逆转抗癌药物, 但毒副作用限制了其应用^[3]。寻找高效、低毒, 能克服 MDR 的逆转剂有着十分重要的意义。近年来从中草药中筛选有效逆转剂的体外研究已逐渐开展, 也取得了一定成绩。

中医认为, 白血病多药耐药产生主要是由于毒邪留恋, 扰乱血络, 导致毒瘀互结, 病情顽缠, 反复发作。在此中医理论指导下, 我们以解毒化瘀为法, 应用解毒化瘀药 (药物青黛、山慈菇、重楼、虎杖、莪术、川芎、丹参、补骨脂等组成) 联合西药化疗应用于临床, 提高难治性或复发性白血病的缓解率, 减轻化疗毒副作用, 临床取得了良好的效果。

参考文献

- [1] 杨纯正. 阿霉素诱导的人白血病细胞系 K562/A02 多药耐药性[J]. 中国药理学报, 1995, 16(4): 333.
- [2] 周建军. 评价抗癌物质活性的改良 MTT 法[J]. 中国医药工业杂志, 1993, 24(10): 455-457.
- [3] Ford JM, Hait W. Pharmacology of drugs that alter multi-drug resistance in cancer[J]. Pharmacol. Rev, 1990, 42: 155.

* 贵州省贵阳市贵阳中医学院第二附属医院血液科 (550003)

通讯作者: 姚宇红, lx8857@163.com