

节,抑制肿瘤细胞增殖与微血管形成,诱导肿瘤细胞分化与凋亡以及逆转肿瘤细胞的生物学行为等多方面,为温阳法治肿瘤提供科学依据。

②对肝癌细胞增殖周期的影响:在本实验中,同种药物作用于不同的细胞株之间,或同一细胞株的不同环境之间(体内和体外)所引起的周期阻滞是不同的。体外部分的细胞周期测定中,温阳各浓度组对两种不同的肝癌细胞有不同程度的 G2/M 期阻滞作用。对 SMMC-7721 肝癌细胞周期的影响中,温阳组 G0/G1 期的比例下降不

明显,温阳 S 期比例有下降趋势。对 Hepa1-6 肝癌细胞周期的影响中,G0/G1 期的比例有一定程度下降,G2/M 期比例上升,提示温阳法阻滞细胞于 G2/M 期。本实验的初步结果提示,在扶正法的研究中,扶阳是一个重要的法则,亦是目前临床研究较为薄弱的环节,从事中医临床研究的中医工作者更应重视温阳法的临床与实验研究。

* 江苏省苏州市中医医院肿瘤科(215003)

山银花喷雾剂的制备及药效学研究

伍小燕¹ 刘凡凡² 杜兰哲³

山银花(忍冬科植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. - Mazz.、红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq. 或华南忍冬 *Lonicera confusa* DC. 的干燥花蕾或带初开的花)具有清热解毒、疏风散热之功效,2005 版《中国药典》把山银花单独列为一味常用中药。山银花是广西特产大宗药材商品,长期作为多种中成药的生产原料和临床用药,其主要成分为有机酸类、挥发油类、黄酮类、三萜皂苷类、裂环环烯醚萜苷类等化学成分,其中绿原酸是其主要有效成分和质量控制指标,具有抗菌抗病毒、抗炎解热、调节免疫系统的作用。临床主要用于治疗上呼吸道感染、急性慢性咽炎、口腔感染、流行性感冒、痈疖脓肿等疾病。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与动物

RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),101A-3E 电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂)。昆明种小鼠,普通级(CV),体重 16~22g,SD 大鼠,体重 150~180g,实验室室温为 25±2℃(空调),由广西中医学院实验动物中心提供,动物合格证号:桂医动字第 11004 号。

1.2 实验试剂及菌种

山银花药材采自广西忻城县,经广西中医药研究院方鼎研究员鉴定为红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.;薄荷脑(购自南宁市老百姓大药房);吐温 80(化学纯,天津市大茂化学试剂厂)。金黄色葡萄球菌,绿脓杆菌,溶血性甲型链球菌(广西中医学院微免教研室提供);营养琼脂(杭州天和微生物试剂有限公司);营养肉汤(北京检验检疫科学研究院,北京陆桥技术责任有限公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);地塞米松磷酸钠注射液(天津药业集团新郑股份有限公司);氯化可的松注射液(西南药业股份有限公司)。

1.3 处方组成及制备工艺

山银花 250g,薄荷脑 6.25g,吐温 8021.9g,蒸馏水加至 1000ml。山银花粉末(过 40 目筛)加 70%乙醇 3000ml,加热浸提 1h,溶液滤过,7%乙醇 1000~3000ml 继续提取 1h,连续 3 次,合并滤液,减压回收溶剂至无醇味,加入用吐温 80 溶解的薄荷脑,加入蛋白糖混匀,分装

喷雾瓶,每瓶 20ml。山银花药材采用 70%乙醇加热提取,溶解性能较好,溶液杂质含量少,提取物可以直接用于制备喷雾剂,无需再精制。

2 药效学研究

2.1 山银花喷雾剂的体外抑菌作用

取 30g 营养肉汤干粉,加入 1000ml 的蒸馏水,121℃、0.1MPa 高压灭菌后冷却,配制成肉汤培养基。甲型溶血性链球菌营养要求比较高,将灭菌后的肉汤培养基冷却后,加入 5%的灭活胎牛血清(50℃加热 30min),于 4℃冷藏保存备用。取 30g 营养琼脂干粉,加入 1000ml 蒸馏水,121℃、0.1MPa 高压灭菌后冷却,配制成琼脂培养基,4℃冷藏保存,临用时加热溶解。

取无菌小试管 11 支,除第 1 支外,第 2~11 管各加肉汤培养基 1ml;于第 1 支试管中加入山银花喷雾剂药液 2ml,取 1ml 加入第 2 管,充分混匀后再取 1ml 加入第 3 管,依次倍比稀释,自第 10 管吸出 1ml 后弃去,第 11 管加入 1ml 生理盐水作空白对照管,于第 1 管加入 1ml 肉汤培养基作无菌对照。向各管中加入金黄色葡萄球菌,绿脓杆菌,甲型溶血性链球菌的 105cfu/ml 的菌悬液 0.1ml,混匀,然后放入 37℃恒温培养箱中培养 18~24h,观察结果。与生理盐水空白对照管对比,不长菌的最低浓度的平均值即为山银花喷雾剂的最低抑菌浓度(MIC)。结果见表 1。

表 1 山银花喷雾剂 MIC 测定

浓度	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
金葡萄	—	—	—	—	+	+	+	+
绿脓杆菌	—	+	+	+	+	+	+	+
甲链	—	—	—	—	+	+	+	+

注:—表示无菌生长,+表示有菌生长

2.2 山银花喷雾剂的体内抗菌作用

小鼠 120 只,雌雄各半,体重在 18~22g,随机分成 4 组,每组 30 只,每种细菌感染 10 只,高剂量组 0.33g/kg,中剂量组 0.21g/kg,低剂量组 0.16g/kg。每组灌胃给予小鼠,空白对照组给予 0.2ml/10g 生理盐水,每日 2 次,连续 3 天。第 3 天给药后 60min,按 0.5ml/只腹腔注射菌液,观察 72h 内动物的死亡情况,统计死亡数。

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。