

· 专题笔谈 ·

关于血清药理学的若干思考

王宁生教授(广州中医药大学, 广州 510407) 近年来, 中日药理工作者以血清药理学的方法对中药的药理(效)作用作了不少探索性的研究, 并在研究方法和技术上不断创新改进。目前血清药理学已成为中药药理研究的热点, 也逐渐被人们认同。多数人认为血清药理学是一种体内和体外相结合研究中药药理作用的实验方法和技术(ex vivo method)。其特点是实验结果与在体实验有较好的一致性, 不但能反映中药(母体药物)及其可能的代谢产物的药理(效)作用, 而且还能反映有可能由药物诱导机体内源性成分所产生的作用。

作为一种科学的、可推广应用的实验方法和技术, 有必要对血清药理学的定义和基础研究作进一步的探讨, 以便使方法完善, 推动中药药理研究的深入。

定义: 药理作用(效应)的体外在体研究方法。它是一种研究方法, 实验技术, 而不是一门学科。这种方法、技术尚需从三方面加以探讨、研究。

(1) 受试药物的制备。即含药血清的制备, 其包括血清供体(种属、性别、年龄)的选择, 供体的给药剂量、方法(单次、重复)及采血时间的确定, 含药血清的处理和储藏; (2) 药理试验的生命系统。通常采用的有培养的动物(人)细胞、离体的组织或器官及细菌、病毒; (3) 药理(效)作用的评价。包括药理作用、效应的(观察)指标, 药理(效)作用—剂量关系, 血清药理试验与整体动物试验的相关性。上述(2)、(3)方面的一些内容许多可借鉴现代药理学研究方法, 而(1)则特别需要探讨研究。多数实验研究以小鼠、大鼠、豚鼠或兔为含药血清的供体, 也有以健康志愿者为含药血清的供体。在血清药理学中, 可把血清供体投药后的血清(血液)看作含中药有效活性成分的“粗提物”, 由于血清供体的种属、性别、个体、年龄的不同, 会导致血清中含中药有效活性成分“质”和“量”的差异。曾研究活血化瘀方对血小板聚集作用的影响, 尽管含药血清供体是健康志愿者, 由于个体和性别的差异, 结果显示, 含药血清对血小板的聚集作用(强度)存在明显差异。

血清供体的给药剂量, 给药次数及血样的采集时间都会影响血清中有效活性成分“量”及药理(效)实验中的量—效关系。以健康志愿者为血清供体, 给予相同的用药剂量(按体重计算), 给药 1 次和给药 13 次(tid), 分别于给药前及给药(1 次或连续 13 次)后 0.5、

1.0、1.5、2.0h 静脉采血, 发现给药次数不同, 明显影响含药血清的药理(效)作用, 给药 1 次后 4 个时间点的含药血清所产生的药效作用强度无规律可循, 而连续给药 13 次(tid)后, 4 个时间点的含药血清所产生的药效作用强度基本一致。研究中设计给药 13 次, 是基于中医临床用药习惯和药物代谢动力学的“平均稳态浓度”概念考虑的; 虽然中药复方各成分的消除半衰期($t_{1/2}$)难以确定, 但根据临床用药经验, 中药的给药剂量(D)和给药间隔时间(τ)是可以确定和调整的。中医临床遣方, 分两次口服用药一般 3~4 剂(每日 1 剂), 3~4 天后复诊, 或维持原方或调整处方, 也即用药 3~4 天后能明确地看到药物的作用; 平均稳态浓度($\bar{C}_{ss}$)的达到取决于药物的消除半衰期和给药的时间间隔(F, V_d 为常数), $\bar{C}_{ss}$ 是在

$$\bar{C}_{ss} = \frac{F \cdot D}{V_d \cdot K_{el} \cdot \tau} = \frac{1.44 \cdot F \cdot D \cdot t_{1/2}}{V_d \cdot \tau}$$

$\bar{C}_{ss}^{max}$ (最大稳态浓度)和 $\bar{C}_{ss}^{min}$ (最小稳态浓度)间波动的血药浓度。若固定给药剂量, 给药时间间隔缩短, 达稳态血药浓度时, $\bar{C}_{ss}^{max}$ 与 $\bar{C}_{ss}^{min}$ 间的波动范围较小; 若固定给药剂量, 延长给药时间间隔, 达稳态血药浓度时, $\bar{C}_{ss}^{max}$ 与 $\bar{C}_{ss}^{min}$ 间的波动较大。为使药理(效)试验的含药血清有较高且稳定的中药活性有效成分, 同时药后血样采集时间又不受严格的时间控制(相对而言), 即血样中活性有效成分含量在一段时间内相对稳定, 故以近似达到稳态血药浓度时采血制备含药血清为妥。有注意到给药次数对含药血清中活性有效成分含量影响的实验报道, 如给药 2 次(相隔 4h), 末次给药后 1h 采血制备血清; 也有每天给药 1 次, 连续 10 天, 末次给药后 1h 采血制备血清, 后者也有可能达到稳态血药浓度, 但由于 $\bar{C}_{ss}^{max}$ 与 $\bar{C}_{ss}^{min}$ 间的波动较大, 对药后一定时间内采得血样中所含中药有效成分含量会有较大差异, 因此影响含药血清的药理(效)作用。

有人也注意到血清供体的给药剂量, 并提出了剂量的计算方法, 即以临床用药剂量转换成动物等效剂量, 乘以培养基内血清稀释度, 作为动物(血清供体)的给药剂量, 这种计算只是作了简单的浓度换算, 却忽视了药物在体内的生物反应(包括毒性反应), 及所得含药血清的受试对象是细胞、组织(器官), 而不是整体(人或动物), 因此以临床用药量(志愿者)或临床等效

剂量(动物)给药,是血清供体的较为合适剂量。

一般认为采得的含药血清应置于 56℃ 水浴中 30min,作灭活处理,以除去血清中存在的补体。补体是人体和动物新鲜血清中一组具有酶活性的球蛋白,它们大多数是酶原、酶及酶的抑制剂和激动剂。补体有协同、补充和放大机体的特异性体液免疫功能,在抗原抗体反应中参与免疫反应,对机体抗击和清除病原微生物起重要作用,同时在变态反应中补体也参与免疫损伤过程。因此在分析药物作用机理时,应注意补体活性的影响。含药血清的灭活处理与否,除应注意药物的作用机理外,尚应考虑血清中所含活性成分的热稳定性(包括化学变化和物理变化)。

用含药血清进行中药药理(效)作用的观察、研究,增加了中药药理研究的方法和手段,有利于从细胞水平上探讨中药的作用机理,但这种方法在技术上尚需探讨、规范和完善。由于细胞在体外培养环境的局限性,使细胞的形态与功能不能与体内的同类细胞完全相同;生态条件的变迁必然带来细胞生物学特性的差异,因此含药血清的中药药理研究方法不可能完全替代在体(整体)动物的中药药理试验方法。

(收稿:1999-01-18)

雷 燕副主任医师(北京中医药大学基础病理室,北京 100029;现在中国中医研究院西苑医院,100091)

药血清药理学是指动物经口服给药后,采集含药的动物血清进行体外试验的一种实验方法。时值世纪之交,中医药学的研究和发展正面临着新的机遇和挑战,从细胞水平、分子水平验证并揭示中药及其复方的药效物质基础的研究已成为当今中药复方研究的一个重要动向,而血清药理学方法即利用含药动物血清进行体外实验不失为研究中药及其复方的一个更为科学的途径,特别是为从细胞、分子水平研究中药提供了一个新的手段。

既往中药药理离体实验多应用中药粗制剂直接体外给药,但由于中药粗提物并不能代表在体内真正发挥作用的有效成分,加之中药本身的理化性质也会干扰体外实验结果,致使许多情况下难以客观地评估和评价体外实验结果。而应用含药动物血清替代中药粗提物进行体外实验,即血清药理学研究方法,可在某种程度上克服中药制剂本身的理化性质等不确定因素对实验结果的干扰,而且相对接近药物在体内生物转化的真实过程,从而使研究结果的可信度大大提高。

然而,血清药理学作为一种新的方法学自身还存在不少问题,亟待深入开拓,使其规范化,并臻于完善。

鉴此,我们认为目前最重要的是摸清中药血清药理研究的本底资料,如在动物给药方案、取样时间、血清处理、反应系统、含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,以及可能诱导的体内活性物质的生成等方面都需要积累数据,加强理论探索与实验研究,而二维和三维色谱等高精尖分析仪器的成熟也为实现预期目标提供了强有力的分离、分析手段。建议可从以下几方面开展研究:(1)进行动物含药血清、正常血清和中药粗制剂的同步比较研究,包括细胞毒性实验及药效粗筛实验,也可对同一方剂的不同种系动物的含药血清进行药效比较分析,同时结合药代动力学和血清化学成分谱改变的同步检测,以了解含药血清体内吸收和代谢等情况,探讨血清药理学研究的意义;(2)通过临床不同疗效患者血清与动物含药血清的药效比较,以及血清给药与整体给药的药效比较,探讨血清药理学实验方法与整体实验和临床疗效的相关性,全面评价该方法的优、缺点;(3)进行药后不同采血时间、以及不同浓度的含药血清的药效比较研究,以确定较恰当的采样时间和含药血清浓度;国内有人研究发现首次给药后 2h 即可达到有效血药浓度,但我们认为于给药 3d 以上,末次给药 2h 后采血为宜;此外,由于培养液中多包含有较多的营养物质以及含药血清的细胞毒性作用,因此在离体实验中,含药血清浓度不宜过高,以不超过 20% 为宜;(4)尽量采用新鲜血清标本,如需长期保存,血清宜冷存于 -20℃ 以下;为避免麻醉剂和抗凝剂干扰药效,建议使用血清而不用血浆,必要时采用乙醚吸入麻醉,尽量不用或少用麻醉剂。

总之,中药血清药理学的方法比中药粗提物直接体外实验有明显的优势,能较客观和真实地阐明中药的药效和作用机理;能在一定程度上揭示中药和复方在体内代谢过程中活性成分的转化和改变;从而有助于研究中药复方配伍规律和促进中药复方药代动力学研究的深入开展;有助于中药中真正有效部位、活性成分地发现,为新药开发提供科学依据。我们相信,血清药理学的深入开拓和广泛应用必将促进中医药现代化研究的进程,并将有助于创立和发展具有中医药特色的新的药理学分支——中药血清药理学。

(收稿:1999-01-18)

刘 平教授(上海中医药大学,上海 200032) 由于中药成分的复杂性极大地阻碍了体外药理研究的深入,经口给药后分离药物血清进行体外实验研究的方法也正是针对这一问题应用而生。结合我们 6 年来的

研究可以认为,该方法与中药粗制品直接用于体外药理实验相比,当是一大进步,能较为确切地反映药物的药理效应;有关药物血清制备的诸条件是影响实验结果的重要因素,尚需结合各种不同的体外实验条件进行细致的分析探讨;中药有效成分的定量分析检测是目前影响血清药理深入研究的最大难点。

我们采用大鼠口服给药后分离药物血清,自大鼠肝脏分离肝星状细胞(HSC,肝纤维化时细胞外基质的主要生成细胞)及肝细胞,对临床有效的抗肝纤维化复方——扶正化瘀方(FZHY;虫草菌丝、松花粉、丹参、桃仁等组成)的作用机理进行了较为系统的研究。以传代培养的大鼠 HSC 增殖为参数的观测结果表明, FZHY 0.46g/kg 体重(临床成人剂量的 10 倍)剂量的药物血清均能显著抑制 HSC 的增殖,对细胞形态无明显影响,尚能提高细胞的活力。对 HSC 增殖的抑制效果随着口服给药剂量及药物血清浓度的提高而增强, 0.23g、0.46g 及 1.38g/kg 剂量的药物血清对细胞 [^3H] TdR 掺入均有抑制作用(0.46g 及 1.38g 的作用显著),呈一定的剂量依赖性;MTT 转化试验的也呈现相同的效果。不同剂量给药的动物血清对细胞内、外胶原生成率的抑制作用与抑制细胞增殖的结果一致;对于正常大鼠肝细胞的体外增殖,药物血清的促进作用同样随着给药剂量的提高而增强;另外, HSC 的增殖随着培养液中正常大鼠(口服生理盐水)血清浓度(5%、10%、20%)的提高而增强,但细胞的增殖却随着添加药物血清浓度的提高而降低。更值得一提的是,不同口服剂量的动物血清的体外作用与不同药物剂量预防 CCl_4 大鼠肝纤维化整体实验结果也是类同(0.23g 无明显的作用)的。充分表明动物血清的体外实验能较为确切地反映药物的药理效应。

药物血清制备诸条件包括口服给药的剂量、次数以及给药后至血清采集的间隔时间等。根据我们的实验结果,给药剂量以整体模型动物的有效剂量(为临床成人剂量的 8~18 倍量)为妥;有关给药次数问题目前各实验室报道不一,我们从简便角度出发,首先仅一次给药,给药后间隔 1h、2h 的动物血清可影响大鼠 HSC、肝细胞及人肝癌细胞(SMMC-7721 细胞株)增殖,但并不显著;继而后于 1 次给药 2h 后以同剂量再次(2t)给药,然后不同时相采血,结果 2 次给药后 1h、2h 的动物血清均可显著影响 3 种细胞的增殖及细胞代谢的相关指标。比较 2 次给药后与 3 天(1 天 2 次)连续给药后的血清对肝癌细胞增殖的影响,其结果并未见到显著性差异,末次给药后 1h、2h 的动物血清可抑制细胞的增殖,且均以药后 1h 的血清作用最佳。表明 2

次重复给药后间隔 1h 采血是一种简便、经济、有用的药物血清制备方法。另外,1 次给药时即便提高口服给药剂量(增至临床成人剂量的 30 倍),其动物血清也无显著效果,而 2 次重复给药(10 倍量)后的动物血清则有显著的作用,这一细胞生物学效应提示,经口给药通过胃肠道的吸收有一定限度,药物体内代谢的速率以及 2 次给药能有效地提高血药浓度,这对我们临床用药也有启迪,改革 1 日 2 次的传统方法(改为间隔 3~4h 1 次)可能有助于临床治疗效果的提高。

关于制备动物血清的动物种类,尽可能以采用与细胞来源相同种属动物为宜。对于动物的大小,应结合具体实验而选择;目前多采用大鼠,其幼鼠血清有利于细胞的生长,但由于太小而难以获得足够量的血清,若过大则可能由于动物的老化则会受到药物之外因素的影响,我们在实验中采用的是成年大鼠(体重 250~300g),并将数只大鼠的血清混合,这样既能适应实验的需要,也减少了动物的个体差异。

关于动物血清的添加方法,以一种动物血清灭活后添加于体外实验系统中为宜。与小牛血清相比,正常大鼠血清促细胞生长的作用较弱,但基本能满足维持细胞生长的需要。与混合(大鼠血清与小牛血清混合)血清相比既可减少影响因素,对于大鼠细胞来说,尚可减少异种血清的影响。血清灭活与否对细胞功能也有一定的影响,与未灭活血清相比,灭活的血清的促细胞增殖作用较弱,对细胞活力的影响也较低,实验条件较为稳定,也符合细胞培养的常规要求。至于培养液中的血清浓度,以 10% 较为合适;培养作用的时间则需根据不同的实验系统进行探索、区别对待;按一般体外实验的要求,动物血清作用后,应更换为无血清条件培养一定时间后再制备样品作相关指标的检测,以消除动物血清本身对实验结果的直接干扰。

目前,有效化学成分的分析及跟踪检测是影响中药动物血清深入研究的难点,今后的重点应该结合动物血清的药理效应,分析、检测有效的化学成分并探讨其代谢规律与药理效应的关系,阐明动物血清药理效应的物质基础,使中药动物血清的体外研究上一个新台阶。

(收稿:1999-01-18)

杨 奎副教授(成都中医药大学,成都 610072)
动物灌胃给予中药制剂后,经吸收进入机体血液循环,在一定时间内采取血液,分离所得血清,必定含有一定量的该药物成分,此时的血药浓度反映了机体的真实血药浓度。以此含动物血清加入到体外细胞培养体

剂量(动物)给药,是血清供体的较为合适剂量。

一般认为采得的含药血清应置于 56℃ 水浴中 30min,作灭活处理,以除去血清中存在的补体。补体是人体和动物新鲜血清中一组具有酶活性的球蛋白,它们大多数是酶原、酶及酶的抑制剂和激动剂。补体有协同、补充和放大机体的特异性体液免疫功能,在抗原抗体反应中参与免疫反应,对机体抗击和清除病原微生物起重要作用,同时在变态反应中补体也参与免疫损伤过程。因此在分析药物作用机理时,应注意补体活性的影响。含药血清的灭活处理与否,除应注意药物的作用机理外,尚应考虑血清中所含活性成分的热稳定性(包括化学变化和物理变化)。

用含药血清进行中药药理(效)作用的观察、研究,增加了中药药理研究的方法和手段,有利于从细胞水平上探讨中药的作用机理,但这种方法在技术上尚需探讨、规范和完善。由于细胞在体外培养环境的局限性,使细胞的形态与功能不能与体内的同类细胞完全相同;生态条件的变迁必然带来细胞生物学特性的差异,因此含药血清的中药药理研究方法不可能完全替代在体(整体)动物的中药药理试验方法。

(收稿:1999-01-18)

雷 燕副主任医师(北京中医药大学基础病理室,北京 100029;现在中国中医研究院西苑医院,100091)

药血清药理学是指动物经口服给药后,采集含药的动物血清进行体外试验的一种实验方法。时值世纪之交,中医药学的研究和发展正面临着新的机遇和挑战,从细胞水平、分子水平验证并揭示中药及其复方的药效物质基础的研究已成为当今中药复方研究的一个重要动向,而血清药理学方法即利用含药动物血清进行体外实验不失为研究中药及其复方的一个更为科学的途径,特别是为从细胞、分子水平研究中药提供了一个新的手段。

既往中药药理离体实验多应用中药粗制剂直接体外给药,但由于中药粗提物并不能代表在体内真正发挥作用的有效成分,加之中药本身的理化性质也会干扰体外实验结果,致使许多情况下难以客观地评估和评价体外实验结果。而应用含药动物血清替代中药粗提物进行体外实验,即血清药理学研究方法,可在某种程度上克服中药制剂本身的理化性质等不确定因素对实验结果的干扰,而且相对接近药物在体内生物转化的真实过程,从而使研究结果的可信度大大提高。

然而,血清药理学作为一种新的方法学自身还存在不少问题,亟待深入开拓,使其规范化,并臻于完善。

鉴此,我们认为目前最重要的是摸清中药血清药理研究的本底资料,如在动物给药方案、取样时间、血清处理、反应系统、含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,以及可能诱导的体内活性物质的生成等方面都需要积累数据,加强理论探索与实验研究,而二维和三维色谱等高精尖分析仪器的成熟也为实现预期目标提供了强有力的分离、分析手段。建议可从以下几方面开展研究:(1)进行动物含药血清、正常血清和中药粗制剂的同步比较研究,包括细胞毒性实验及药效粗筛实验,也可对同一方剂的不同种系动物的含药血清进行药效比较分析,同时结合药代动力学和血清化学成分谱改变的同步检测,以了解含药血清体内吸收和代谢等情况,探讨血清药理学研究的意义;(2)通过临床不同疗效患者血清与动物含药血清的药效比较,以及血清给药与整体给药的药效比较,探讨血清药理学实验方法与整体实验和临床疗效的相关性,全面评价该方法的优、缺点;(3)进行药后不同采血时间、以及不同浓度的含药血清的药效比较研究,以确定较恰当的采样时间和含药血清浓度;国内有人研究发现首次给药后 2h 即可达到有效血药浓度,但我们认为于给药 3d 以上,末次给药 2h 后采血为宜;此外,由于培养液中多包含有较多的营养物质以及含药血清的细胞毒性作用,因此在离体实验中,含药血清浓度不宜过高,以不超过 20% 为宜;(4)尽量采用新鲜血清标本,如需长期保存,血清宜冷存于 -20℃ 以下;为避免麻醉剂和抗凝剂干扰药效,建议使用血清而不用血浆,必要时采用乙醚吸入麻醉,尽量不用或少用麻醉剂。

总之,中药血清药理学的方法比中药粗提物直接体外实验有明显的优势,能较客观和真实地阐明中药的药效和作用机理;能在一定程度上揭示中药和复方在体内代谢过程中活性成分的转化和改变;从而有助于研究中药复方配伍规律和促进中药复方药代动力学研究的深入开展;有助于中药中真正有效部位、活性成分地发现,为新药开发提供科学依据。我们相信,血清药理学的深入开拓和广泛应用必将促进中医药现代化研究的进程,并将有助于创立和发展具有中医药特色的新的药理学分支——中药血清药理学。

(收稿:1999-01-18)

刘 平教授(上海中医药大学,上海 200032) 由于中药成分的复杂性极大地阻碍了体外药理研究的深入,经口给药后分离药物血清进行体外实验研究的方法也正是针对这一问题应用而生。结合我们 6 年来的