

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2005)17-1594-04

# 复方黄黛片中药血清药理学研究方法的建立

向 阳, 陈楠楠, 张德杰, 黄世林 李悦萌 (解放军 210 医院中医血液科, 辽宁 大连 116021)

## Establishment of serum pharmacology testing method for Compound Reagar Natural Indigo Tablets

XIANG Yang CHEN NanNan ZHANG De-Jie HUANG Shi-Lin LI Yue-Meng

Department of TCM &amp; Hematology 210th Hospital of Chinese PLA Dalian 116021, China

**【Abstract】** AM: To establish a serum pharmacology testing method for Compound Reagar Natural Indigo Tablets (CRNII), a traditional Chinese medicine. **METHODS:** Rabbits were used as the provider to prepare the blood serum with the CRNII and NB4 cells and K562 cells were the observational objects. The factorial design was applied to observe the effect of medicine administration, deactivation, concentration of blood serum and culture time and the inhibition rates of the leukemia cell lines and to study the interaction between the four factors. **RESULTS:** ① The concentration of arsenic in the normal blood serum and the blood serum with medicine from the rabbits was  $(0.010 \pm 0.001)$  mg/L and  $(0.110 \pm 0.006)$  mg/L respectively ( $P < 0.01$ ). ② There were statistical differences between the different levels of each factor. ③ The different combined blood serum from rabbits with the concentration from 10% to 40% had different inhibitory effect on the growth of NB4 cells and K562 cells in an inhibitory rate and concentration dependent manner. **CONCLUSION:** ① 0.75 g/(kg·d) for 5 d is a relatively ideal scheme for preparing the blood serum with CRNII in rabbits. ② Four key factors for establishing the reactive system of the blood serum from rabbits with CRNII are medicine administration, deactivation, concentration of blood serum and culture time. ③ To inactivate the normal blood serum from rabbits can reduce the influence of healthy or pathologic conditions on the experimental and the deactivated blood serum from rabbits can display the anti-leukemia effect of CRNII. ④ The experimental result is stable when the concentration of the blood serum ranges from 100 mL/L to 400 mL/L in the reactive system.

**【Keyword】** Compound Reagar Natural Indigo Tablet; NB4 cell line; K562 cell line; Chinese medicine; serum pharmacology

**【摘要】**目的: 建立复方黄黛片(CRNII)中药血清药理学研究方法。方法: 以兔为含药血清的供体, 以 NB4、K562 等人白血病细胞株为研究对象, 采用析因设计, 观察给药与否、血清灭活与否、血清浓度及培养时间各因素对白血病细胞株抑制率的影响及四因素间的交互作用。结果: ①正常、含药兔血清砷浓度分别为  $(0.010 \pm 0.001)$  mg/L 和  $(0.110 \pm 0.006)$  mg/L ( $P < 0.01$ ); ②给药与否、血清灭活与否、血清浓度、培养时间各因素不同水平间的差异有统计学意义, 且四因素间有交互作用; ③不同组合的兔血清在 100~400 mL/L 浓度下对 NB4、K562 细胞株的生长均有不同的抑制作用, 抑制率与浓度间呈现出良好的依赖关系。结论: ① 0.75 g/(kg·d) 的剂量灌服于兔并给药 5 d 是制备复方黄黛片含药血清较为理想的给药方案; ② 给药与否、血清灭活与否、血清浓度、培养时间是构建 CRNII 含药兔血清反应体系的关键因素; ③ 对正常血清进行灭活处理有助于减少因动物健康生理状态与病理状态的差异而对实验结果产生的影响; 未灭活的含药兔血清可全面展示复方黄黛片的抗白血病作用; ④ 当反应体系中血清浓度为 100~400 mL/L 时, 实验结果稳定。

**【关键词】** 复方黄黛片; NB4 细胞株; K562 细胞株; 中药; 血清药理学

**【中图分类号】** R285.1 **【文献标识码】** A

## 0 引言

临床研究已表明, 由雄黄、青黛、太子参及丹参组成的复方黄黛片 (Compound Reagar Natural Indigo Tablet, CRNII) 治疗急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 的完全缓解率高达 98.3%<sup>[1]</sup>。为深入研究 CRNII 抗白血病的作用机制, 我们以兔为含药血清的供体, 以 NB4、K562 人白血病细胞株为研究对象, 采用析因设计, 观察给药与否、血清灭活与否、血清浓度及培养时间各因素对白血病细胞株抑制率的影响以及四因素之间的交互作用, 以期建立 CRNII 中药血清药理学 (Chinese medicine serum pharmacology, CMSP) 的研究方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年健康雄性新西兰兔 9 只, 体质量

收稿日期: 2004-12-07 修回日期: 2005-04-05

作者简介: 向阳 (1961-), 女 (汉族), 江苏省南京市人, 硕士, 主任医师, Tel: (0411) 85841093, Email: xm210d@yahoo.com.cn.

( $3.15 \pm 0.32$ ) kg 由大连医科大学动物实验中心提供. 人早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 由上海血液学研究所陈竺院士惠赠; 人红白血病细胞株 K562 由中国医学科学院天津血液学研究所提供. CRNII 由中国人民解放军大连 210 医院制备. RPMI1640 培养液、胎牛血清为 Gibco 产品, 小牛血清系杭州四季青生物材料公司产品, 四氮唑蓝 (MTT) 为 Sigma 产品.

## 1.2 方法

1.2.1 CRNII 含药血清的制备 每 3 只兔为 1 组, 采集的血清按等比例混合,  $-89^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用. 未给药兔血清即正常兔血清系于灌药前 1 d 自耳缘或心脏采血, 经 3000 r/min 离心 10 min 后取得; 给药兔血清即含药兔血清的制备方法为: CRNII 研磨成粉, 按  $0.75 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  的剂量 (相当于成人临床每日推荐剂量的 6 倍) 分 3 次灌服, 共给药 5 d 末次给药 8 h 后分别经耳缘或心脏采血, 3000 r/min 离心 10 min 后取血清.

1.2.2 血清砷浓度的测定 使用 AFS230 型双道原子荧光光度计, 采用双道原子荧光法分别对按等体积混合的、正常和含药兔血清砷浓度进行检测.

1.2.3 细胞培养 NB4 和 K562 细胞分别常规培养于含  $100 \text{ mL}/\text{L}$  胎牛血清和含  $100 \text{ mL}/\text{L}$  小牛血清的 RPMI1640 培养基 (含硫酸庆大霉素  $25 \text{ U}/\text{L}$ ) 中, 于  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $50 \text{ mL}/\text{L}$   $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中连续培养.

1.2.4 血清灭活 分别将所采集的各组正常、含药兔血清均分为二, 其一予  $56^{\circ}\text{C}$  水浴, 30 min 灭活, 制成正常灭活、含药灭活兔血清, 待用.

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖状态 取对数生长期的 NB4、K562 细胞株分别按  $1.50 \times 10^5/\text{L}$ 、 $1.68 \times 10^5/\text{L}$  的密度按一定体积接种于 96 孔板内; 正常、正常灭活、含药、含药灭活 4 组均按倍比稀释的方法分别将  $160$ 、 $80$ 、 $40$ 、 $20$  和  $10 \mu\text{L}$  的兔血清加入 96 孔板内, 剩余体积由不含小牛血清的 RPMI1640 培养液补齐, 每孔终体积  $200 \mu\text{L}$ , 共设 3 个平行孔. 常规培养 24、48 h 后, 加入 MTT 溶液 ( $5 \text{ mg}/\text{L}$ )  $15 \mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 终止培养后, 将培养板以 3000 r/min 离心 3 min 弃去上清液, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$  二甲基亚砷, 于旋涡振荡器振荡 5 min 沉淀充分溶解后, 于酶标仪上测定各孔  $A_{540 \text{ nm}}$  值, 计算相应的抑制率: 抑制率 (%) =  $1 - A_{540 \text{ nm}} \text{实验组} / A_{540 \text{ nm}} \text{空白组} \times 100\%$ .

统计学处理: 各种计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示; 正常和含药兔血清砷浓度的比较采用配对 t 检验, 其余采用  $2 \times 2 \times 2 \times 5$  析因设计的方差分析; 所有统计均用 SPSS 11.5 专用统计软件进行,  $P < 0.05$  有统计学

意义.

## 2 结果

正常和含药兔血清的砷浓度分别为 ( $0.010 \pm 0.001$ )  $\text{mg}/\text{L}$  和 ( $0.110 \pm 0.006$ )  $\text{mg}/\text{L}$ , 两者差异显著 ( $P < 0.01$ ). 反应体系中不同兔血清的加入量分别为  $160$ 、 $80$ 、 $40$ 、 $20$ 、 $10 \mu\text{L}$ , 因而血清最终体积比分别为  $0.8$ 、 $0.4$ 、 $0.2$ 、 $0.1$  和  $0.05$ , 经换算含药兔血清浓度相对应的砷剂终浓度分别为  $0.088$ 、 $0.044$ 、 $0.022$ 、 $0.011$ 、 $0.006 \text{ mg}/\text{L}$ . 不同组合兔血清对 NB4 细胞株 24、48 h 的抑制率结果见 Tab 1、2, 各因素不同水平间的差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 四因素之间有交互作用. 不同组合的兔血清对 K562 细胞株 24 及 48 h 的抑制率见 Tab 3、4, 各因素不同水平间的差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 四因素之间有交互作用.

表 1 不同组合的兔血清对 NB4 细胞株的抑制率

Tab 1 Inhibition rates of NB4 cells by blood serum from rabbits with different combinations ( $n = 3$ , %,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Concentration of blood serum (mL/L)	Activating		Deactivating	
		24 h	48 h	24 h	48 h
Normal blood serum	50	2.54 ± 0.21	16.33 ± 0.09	18.56 ± 0.47	10.08 ± 0.20
	100	35.42 ± 0.33	42.78 ± 0.41	3.44 ± 0.36	19.63 ± 0.47
	200	54.65 ± 0.77	61.83 ± 0.35	30.79 ± 0.36	34.68 ± 0.42
	400	59.54 ± 0.57	62.57 ± 0.38	43.48 ± 0.47	49.02 ± 1.49
Blood serum with medicine	800	60.29 ± 0.36	62.73 ± 0.28	50.81 ± 0.42	52.46 ± 0.10
	50	1.03 ± 0.06	13.55 ± 0.46	3.47 ± 0.69	5.30 ± 0.31
	100	29.43 ± 0.37	32.93 ± 0.14	6.59 ± 0.76	31.89 ± 0.11
	200	54.25 ± 0.76	55.51 ± 0.56	32.48 ± 0.54	46.21 ± 0.33
400	54.42 ± 0.42	58.37 ± 0.82	47.33 ± 1.41	51.01 ± 0.23	
	800	56.33 ± 0.43	61.16 ± 1.61	58.34 ± 0.44	58.97 ± 0.18

## 3 讨论

CMSP 方法是 20 世纪 80 年代中期日本学者 Iwama 等<sup>[2]</sup>率先提出的, 它是将中药或复方经口给动物灌服一定时间后, 采集动物血液、分离血清、用含药物成分的血清进行体外实验的一种方法. 目前含砷中药复方抗白血病作用的 CMSP 研究未见报道<sup>[3]</sup>.

依据 CMSP 研究中对动物血清供体的要求, 选择了雄性新西兰兔, 根据 CMSP 研究的给药原则<sup>[4]</sup>, 借鉴了 CRNII 长期毒性试验的结果与临床用药经验, 以  $0.75 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  的剂量, 连续给药 5 d 参照健康人与兔 CRNII 和雄黄的药代动力学研究结果<sup>[5,6]</sup>, 采血时间选择在末次给药后的 8 h 采血方式为经耳缘或心脏取血. 由于 CRNII 中含雄黄, 主要成分为硫化

表 2 析因设计的方差分析结果

Tab 2 Results of variable analysis for the factorial design

Source of variation	Sum of squares	df	Mean square	F	P
A	21.982	1	21.982	62.874	<0.01
B	5274.032	1	5274.032	15085.042	<0.01
C	49087.113	4	12271.778	35100.332	<0.01
D	2113.777	1	2113.777	6045.927	<0.01
A×B	757.820	1	757.820	2167.554	<0.01
A×C	39.220	4	9.805	28.045	<0.01
B×C	1073.294	4	268.324	767.472	<0.01
A×B×C	67.231	4	16.808	48.074	<0.01
A×D	9.988	1	9.988	28.568	<0.01
B×D	173.954	1	173.954	497.551	<0.01
A×B×D	1.164	1	1.164	3.330	>0.05
C×D	823.796	4	205.949	589.065	<0.01
A×C×D	174.733	4	43.683	124.945	<0.01
B×C×D	266.895	4	66.724	190.846	<0.01
A×B×C×D	292.054	4	73.013	208.837	<0.01
Error	27.970	80	0.350		
Corrected Total	60205.023	119			

A: administration or not; B: deactivation or not; C: concentration of blood serum; D: culture time

表 3 不同组合的兔血清对 K562 细胞株的抑制率 (%)

Tab 3 Inhibition rates of K562 cells by blood serum from rabbits with different combinations (n=3, x±s)

Group	Concentration of blood serum (mL/L)	Activating		Deactivating	
		24 h	48 h	24 h	48 h
Normal blood serum	50	20.41±1.42	44.16±2.35	10.20±3.33	22.06±2.29
	100	44.59±0.22	47.08±4.70	17.34±3.06	42.88±2.03
	200	84.10±0.29	62.80±2.96	31.29±5.71	61.71±3.02
	400	88.28±0.84	78.88±2.67	73.37±4.38	69.46±5.69
	800	76.26±6.18	85.82±0.38	73.61±1.59	79.83±1.18
Blood serum with medicine	50	24.35±3.51	34.08±1.21	11.40±4.97	33.13±3.74
	100	49.54±6.77	66.08±2.61	27.54±2.22	39.58±1.23
	200	86.68±0.51	73.46±1.04	50.08±2.63	70.96±1.80
	400	87.42±1.14	75.98±7.81	75.03±0.68	73.21±2.63
800	75.89±0.18	84.89±0.32	76.54±1.52	82.56±2.56	

砷,通过对正常和含药兔血清砷浓度以定量检测,表明以 0.75 g/(kg·d)的剂量连续给药 5 d是制备 CRN II 含药血清的较为理想的给药方案。

采用析因设计,以细胞抑制率为检测指标,观察给药与否、血清灭活与否、血清浓度、培养时间各因素对 NB4 K562 细胞株抑制率的影响以及四因素之间

表 4 析因设计的方差分析结果

Tab 4 Results of variable analysis for the factorial design

Source of variation	Sum of squares	df	Mean square	F	P
A	536.026	1	536.026	51.859	<0.01
B	5414.977	1	5414.977	523.884	<0.01
C	53980.001	4	13495.000	1305.603	<0.01
D	1576.005	1	1576.005	152.474	<0.01
A×B	79.512	1	79.512	7.693	<0.01
A×C	488.400	4	122.100	11.813	<0.01
B×C	1634.734	4	408.684	39.539	<0.01
A×B×C	285.014	4	71.253	6.894	<0.01
A×D	2.269	1	2.269	0.219	>0.05
B×D	966.850	1	966.850	93.540	<0.01
A×B×D	20.468	1	20.468	1.980	>0.05
C×D	2050.205	4	512.551	49.588	<0.01
A×C×D	5.459	4	1.365	0.132	>0.05
B×C×D	2028.474	4	507.119	49.062	<0.01
A×B×C×D	595.500	4	148.875	14.403	<0.01
Error	826.897	80	10.336		
Corrected Total	70490.790	119			

A: administration or not; B: deactivation or not; C: concentration of blood serum; D: culture time

的交互作用,结果表明:①各因素不同水平间的差异有统计学意义;②四因素之间有交互作用.可见给药与否、血清灭活与否、血清浓度、培养时间是构建 CRN II 含药兔血清反应体系的关键因素。

血清灭活与否是 CMSP 研究与争论的重点之一<sup>[7]</sup>.实验结果显示血清灭活与否是影响实验结果的重要因素,给药与否是制备正常血清与含药血清的基本条件,两者的不同组合,在体外实现了兔血清有效成分的增与减.如正常未灭活的兔血清为正常状态下的兔血清,其中含有体内固有的激素、酶、抗体、补体等生物活性物质;正常灭活兔血清组则清除了体内固有的生物活性成分;含药未灭活的兔血清除含上述体内固有的生物活性物质外,尚含砷剂、中药复方抗白血病的有效成分及其诱生的抗白血病生物活性成分;含药灭活的兔血清则保留了砷剂与中药复方抗白血病的有效成分,清除了体内固有及中药复方诱生的生物活性成分.因此,通过两因素的不同组合可客观地评价血清灭活与否对实验结果产生的影响.如正常未灭活兔血清表现的较高抑制率缘于此乃健康生理状态下的兔血清,故对正常血清进行灭活处理,有

助于减少因动物健康生理状态与病理状态的差异而对实验结果产生的影响,而未灭活的含药兔血清可全面展示 CRNI 的抗白血病作用。

不同组合兔血清对白血病细胞株的抑制率随着血清浓度的增加、培养时间延长呈增加趋势。但综合分析结果表明当血清浓度为 100~400 mL/L 时,实验结果稳定,抑制率与浓度间呈现出良好的量效关系,且以 400 mL/L 血清浓度的抑制率最高。

【参考文献】

[1] 黄世林,郭爱霞,向阳,等. 复方青黛片为治疗急性早幼粒白血病临床研究[J]. 中华血液学杂志, 1996, 16(1): 26-28.  
Huang SL, Guo AX, Xiang Y et al. Clinical study on the treatment of acute promyelocytic leukemia in China with Composite Natural Indigo Realgar Tablets [J]. Chin J Hematol 1996; 16(1): 26-28

[2] Iwama H, Amagaya S, Oghara Y. Effect of Shosaikoto a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: A new pharmacology testing method [J]. J Ethnopharmacol 1987; 21(1): 45-53.

[3] 韩克起,凌昌全. 中药体外抗肿瘤效应血清药理学研究现状与前景[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(9): 717-719.  
Han KQ, Ling CQ. Actuality and foreground on the study of anti-

tumor effect with Chinese medicine serum Pharmacology in vitro [J]. Chin J Integr Tradit Western Med 2003; 23(9): 717-719

[4] 杨彦芳,王玉芹. 中药复方血清药理学研究规范化探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(5): 380-382.  
Yang YF, Wang YQ. Approach on normalization of the study for Chinese medicine serum Pharmacology [J]. Chin J Integr Tradit Western Med 2000; 20(5): 380-382

[5] 王晓波,龚荣刚,姚文,等. 复方黄黛片在健康志愿者体内的药代动力学研究[J]. 解放军药学报, 2002, 18(5): 265-267.  
Wang XB, Gong RG, Yao W, et al. Study on Pharmacokinetics of the Compound Realgar Natural Indigo Tablets in healthy volunteers [J]. Pharm J Chin PLA 2002; 18(5): 265-267.

[6] 王晓波,龚荣刚,张治然,等. 纳米级雄黄粉体药代动力学研究[J]. 解放军药学报, 2002, 18(6): 324-326.  
Wang XB, Gong RG, Zhang ZR, et al. Study on Pharmacokinetics of nanoparticle realgar powders in rabbit [J]. Pharm J Chin PLA 2002; 18(6): 324-326

[7] 张良,徐立,袁冬萍,等. 中药血清药理学方法的研究进展[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2002, 18(4): 254-256.  
Zhang L, Xu L, Yuan DP, et al. Progress of the study on Chinese medicine serum Pharmacology [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (Natural Science), 2002; 18(4): 254-256

编辑 王睿

· 经验交流 · 文章编号: 1000-2790(2005)17-1597-01

胸腹部联合损伤 73 例诊治分析

张满赐, 庞国栋, 王晓俊, 赵敏  
(解放军 15 医院外一科, 新疆 乌苏 833000)

【关键词】急诊; 胸腹部联合损伤; 手术  
【中图分类号】R605.97 【文献标识码】B

1 临床资料 1995-07/2003-12 收治胸腹联合伤 73 (男 52 女 21) 例, 年龄 3~72 (平均 47) 岁。急诊入院 69 例, 受伤至急诊入院时间为 1/3~16 h。致伤原因: 穿透伤 26 例, 其中刀刺伤 23 例, 枪伤 3 例。闭合伤 47 例, 其中车祸 38 例, 坠落伤 9 例。入院时伴休克 50 例, 呼吸急促 36 例, 胸痛 29 例, 腹痛 20 例, 胸腹联合痛 14 例, 昏迷 10 例, 气管移位 11 例, 伤侧呼吸音减弱或消失 17 例。其中 4 例胸部闻及肠鸣音, 腹部膨隆饱满 41 例。腹肌紧张并压痛、反跳痛 37 例。腹腔穿刺 46 例, 阳性 37 例。经 X 线检查的 49 例中发现膈下游气体 9 例, 胸腔内见胃空泡影及肠袢影者 9 例, 血气胸 16 例, 膈肌升高 6 例。X 线检查阴性者 10 例。术前确诊 61 例, 其中常规体格检查确诊 13 例, 查体加 X 线确诊 34 例, X 线及 B 超、CT 检查确诊 14 例。另 12 例术前未确诊于术中发现确诊。本组均行手术治疗, 其中开胸探查 17 例, 剖腹探查 46 例, 胸腹联合探查 10 例。剖腹 46 例中有 16 例术前及术中行伤侧胸腔闭式引流, 6 例术后胸穿, 7 例术后胸腔闭式引流术。受伤部位如表 1。治

愈 67 例, 死亡 6 例。死亡原因: 闭合伤 4 例, 1 例因漏诊食管破裂, 术后出现 ARDS 及纵隔感染, 3 例因失血性休克死亡。穿透伤 1 例死于出血性休克, 1 例死于胸腔感染, 呼吸衰竭。

表 1 胸腹部联合损伤受伤部位

受伤部位	n	受伤部位	n
膈肌破裂	16	肺裂伤	6
肝破裂	28	肋骨骨折	31
脾破裂	12	心包破裂	1
胃、肠破裂	9	骨盆骨折	9
食管穿孔	2	血气胸	29

2 讨论 胸腹联合伤多发生在第 4 前肋间隙平面以下的穿透伤及上下胸部的严重闭合伤, 穿透伤多于闭合伤, 其膈肌发生率低<sup>[1]</sup>。多数胸腹联合伤都存在合并伤, 肝脾胃损伤多见。胸部伤后出现进行性呼吸困难, 胸部运动一侧受限, 气管移位, 伤侧肺呼吸音减弱或消失并胸腔闻及肠鸣音, 胸腔穿刺抽出血液先考虑胸腹联合伤。胸部伤并膈下游气体或异物存留, 腹部伤并血气胸, 胸腔见胃泡或肠管, 膈肌升高, 纵隔移位者应高度怀疑。胸腹联合伤多需急诊手术, 快速输血输液缩短休克时间。急性期除心脏大血管伤优先开胸外, 其余宜选用剖腹切口。术前应行伤侧胸腔闭式引流以防术中正压呼吸或气体经膈肌破口进入胸腔发生张力性气胸, 严密观察血氧饱和度变化。诊断性人工气腹、CT 扫描、B 超、X 线诊断胸腹联合伤的作用评价不一。

【参考文献】

[1] Orringer MB, Kirsch MM, Span H. Congenital and traumatic diaphragmatic hernias exclusive of the hiatus [J]. Curr Probl Surg 1975 Mar; 1-64.

编辑 潘伯荣

收稿日期: 2005-01-06 修回日期: 2005-03-07  
作者简介: 张满赐 (1971-) 男 (汉族) 甘肃省白银市人, 学士, 主治医师。Tel: (0992) 8835352