

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)17-1587-05

五灵胶囊药效作用的有效成分

王胜春 胡咏武 王俊琴 李晓玮 贺雪梅 (第四军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710033)

Test study of effective pharmacodynamic components in WuLing capsules

WANG Sheng-Chun, HU Yong-Wu, WANG Jun-Qin, LI Xiao-Wei, HE Xue-Mei

Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the active components producing the pharmacodynamic effects in WuLing Capsules. **METHODS:** Liver cells were separated and the model of liver cell injuries was established. The pharmacodynamic role of WuLing capsules was demonstrated by pharmacodynamic test. The chemical components of WuLing capsules were analyzed by HPLC chromatograms and UV spectrum, and the pharmacodynamic effects of four kinds of control substance were observed by the test of cell pharmacodynamics. **RESULTS:** The D-GlaN group active enzyme of ALT, AST, MAO and MDA rose respectively to (881.8 ± 231.7) nkat/L, (1256.9 ± 265.1) nkat/L, (32.3 ± 2.3) nkat/L and (1.0 ± 0.6) $\mu\text{mol/L}$, which were more marked than those in normal group ($P < 0.05$). The drug serum in WuLing capsules antagonized the injuries of liver cell induced by D-GlaN and the enzyme activeness of ALT, AST, MAO and MDA decreased respectively to (421.8 ± 288.4) nkat/L, (980.2 ± 113.4) nkat/L, (21.7 ± 5.5) nkat/L and (1.5 ± 1.0) $\mu\text{mol/L}$, notably lower than those in model group ($P < 0.05$). Four kinds of control substance markedly decreased the level of high enzyme activity that was induced by D-GlaN and there were obvious action of restoration and protection on the injuries of liver cells induced by D-GlaN. **CONCLUSION:** Schizandrol A, Schisandrin B, Crytanshinone and Tanshinone II A are effective components of WuLing capsules in retarding the injuries of liver cells.

【Keywords】 WuLing capsule; liver injury; active component

【摘要】 目的: 探讨五灵胶囊产生药效作用的活性成分。

收稿日期 2004-03-01; 修回日期 2004-06-17

作者简介: 王胜春(1952-), 男(汉族), 湖北省监利县人, 主任药师。

Tel. (029) 82540986

方法: 分离肝细胞并建立肝细胞损伤模型, 血清药理学试验证实五灵胶囊药效作用, HPLC 色谱和紫外光谱分析含药血清中五灵胶囊化学成分, 同时采用细胞药理学试验观察 4 种对照品的药效作用。结果: 模型组培养上清 ALT, AST, MAO, MDA 酶活性分别升高至 (881.8 ± 231.7) nkat/L, (1256.9 ± 265.1) nkat/L, (32.3 ± 2.3) nkat/L (1.0 ± 0.6) $\mu\text{mol/L}$ 与正常组比较 ($P < 0.05$); 五灵胶囊含药血清能有效地拮抗 D-GlaN 对肝细胞损伤, 细胞上清液中 ALT, AST, MAO, MDA 酶活性分别降低至 (421.8 ± 288.4) nkat/L (980.2 ± 113.4) nkat/L (21.7 ± 5.5) nkat/L (1.5 ± 1.0) $\mu\text{mol/L}$, 显著低于模型组 ($P < 0.05$)。4 种对照品能明显降低由 D-GlaN 诱导肝细胞损伤时所致升高的酶谱活性水平, 对 D-GlaN 损伤的肝细胞有显著的修复和保护作用。结论: 醇甲、乙素、隐丹参酮和丹参酮 II A 是五灵胶囊阻滞肝细胞损伤的有效活性成分。

【关键词】 五灵胶囊; 肝损伤; 活性成分

【中图分类号】 R285.6 **【文献标识码】** A

0 引言

五灵胶囊是治疗慢性肝炎的有效中药复方制剂^[1], 其成分复杂产生药效作用的化学成分难以确定, 这对该药质量标准制定的合理性和如何有效地控制产品质量带来了困难, 因此探讨该药活性成分成为必要。本实验我们采用含药血清与对照品的细胞药效试验, 并结合分析含药血清中化学成分, 同时与对照品进行对照试验, 来探寻五灵胶囊产生药效作用的化学成分。

1 材料和方法

1.1 材料 ① 动物: SD 大鼠, 质量 (200 ± 20) g, δ (由第四军医大学实验动物中心提供), 动物合格证号: 医动证字 SC × K(军)2002-05; ② 试剂与试药: D-氨基半乳糖 (D-GLaN) (重庆医科大学提供); 无酚红 DMEM 培养基 (USA, Gibco 公司产品); 新生小牛血清 (NBS) (杭州四季青提供, 用前 56°C 30 min 灭活); 二甲亚砜 (DMSO) (AR, 华美物制品公司提供); 甲醇, 异丙醇 (色谱醇, TEDIA 公司产品); 五味子醇甲 (醇甲) 纯度 99%、五味子乙素 (乙素) 纯度: 98%、丹参酮 IIA 对照品纯度 99% (中国药品生物鉴定所提供); 隐丹参酮对照品由本室分离纯化制备并经氢谱 (HNMR) 确证, 纯度 99%; 五灵胶囊 (由西

京医院药剂科生产,批号 020207);③ 仪器 (BB16/贺利气体培养箱,德国 HERAES 公司);美国 Waters 公司 600 型 HPLC 系统 2996 紫外检测器 2996 型二极管阵列检测器;Millenium 32 数据处理系统;日本岛津 UV 2501 型分光光度计;美国 MD-100 生化分析仪。

1.2 色谱条件 Hypersil C-18 柱 (5.0 mm × 150 mm 5 μm) 柱温 室温;流动相:甲醇-水 (80:20);流速 0.8 mL/min 检测波长 270 nm,在此条件下能检出隐丹参酮、乙素、丹参酮 IIA 并达到基线分离,各成分保留时间隐丹参酮 11.3 min、乙素 12.9 min、丹参酮 IIA 17.6 min。醇甲 HPLC 分析,流动相:甲醇-水 (13:7);色谱柱、流速、检测波长同上。

1.3 含药血清的制备及含量测定 取 20 wk 龄大鼠 21 只,♂,随机分成空白血清组、含药血清 I 组和 II 组。空白血清组灌胃蒸馏水 10 mL/kg,含药血清 I 组和 II 组分别灌胃五灵胶囊药粉 10.0 g/kg 和 6.25 g/kg,每日 1 次,连续 3 d,第 4 日给药 2 h 后,乌拉坦麻醉 (ip, 250 mL/L),无菌操作腹主动脉取血,放置 30 min,3000 r/min,离心 20 min,分离血清。含药血清 I 组和 II 组待测化学成分分析:取血清 0.7 mL,加硫酸铵 0.25 g,再加乙腈-甲醇 (4:1) 4 mL,振荡抽提 1 min,3500 r/min,离心 10 min,取上清液置 40℃ 水浴上氮气吹干,沉淀加甲醇溶解至 1 mL,混匀,置 EP 管中 -20℃ 过夜,次日按色谱条件 (HPLC 法) 分析 4 种化学成分及含量。另取混合空白血清 0.7 mL,共 5 份,依次加入 312.5, 62.5, 12.5, 2.5 和 0.5 mg/L 的对照品溶液,同上法测定各对照品吸收度值并绘制对照品标准曲线。外标法分析含药血清 I 组和 II 组血清中 4 种化学成分及含量。余下各组血清按剂量组合并混匀,置 56℃ 水浴灭活 30 min,分装于 EP 管内置 -20℃ 冻存,为体外含药血清药效试验的供试品。

1.4 供试品液的制备 完全 DMEM 培养液:取小牛血清 10 mL 加 DMEM 培养液 90 mL,备用 0.5 mmol/L D-GlaN 供试液 精密称取 D-GlaN 5.38 mg,加完全 DMEM 培养液溶解至 10 mL,微孔滤膜除菌, -4℃ 冷藏,用时加完全 DMEM 培养液稀释至 50 mL;空白血清供试液:取空白血清与完全 DMEM 培养液以 2:8 混合,即得;含药血清 I 组和 II 组供试液:分取 2 组含药血清与完全 DMEM 培养液分别以 2:8 混合,即得 4 对照品供试液:取用二甲基亚砷溶解至 1 g/L 各对照品液,加完全 DMEM 使终浓度 100, 50, 25 μg/L 3 剂量,用前配制。

1.5 血清药效学试验 取 12 wk 龄大鼠 2 只,♂,腹腔注射 250 mL/L 乌拉坦麻醉,按程涛等^[21]介绍方法

操作制备原代肝细胞,肝细胞重悬于 200 mL/L 小牛血清 DMEM 培养液中,调整细胞密度为 2×10^6 /mL,接种于 24 孔培养板内,置 37℃ 50 mL/L CO₂ 孵箱内培养 48 h,换液继续培养 12 h,吸弃上清液,分成 6 组,每组 6 孔。正常组、D-GlaN 组、空白血清组、模型组、含药血清 I 组和 II 组。正常组、空白血清组加完全 DMEM 培养液 1 mL,其余各组每孔均加 0.5 mmol/L D-GlaN 供试液 1 mL,培养 24 h,吸弃上清液,正常组、D-GlaN 组加完全 DMEM 培养液,空白血清组及模型组加 200 mL/L 空白血清供试液,含药血清 I 组和 II 组分别加含药血清供试液培养 20 h,收集取尽培养上清测定 ALT, AST, MAO 和 MDA; 各组肝细胞再加完全 DMEM 培养液继续培养 20 h,收集培养上清测定 ALT, AST, MAO 和 MDA,检测含药血清的延迟效应。

1.6 对照品对肝细胞修复作用试验 细胞制备方法同 1.5, 分组:正常组、D-GlaN 组、醇甲 + 乙素组、隐丹参酮组、丹参酮 IIA 组,正常组加完全 DMEM 培养液 1 mL,其余各组每孔肝细胞均加含 0.5 mmol/L D-GlaN 供试液 1 mL,培养 24 h,吸弃上清液。正常组、D-GlaN 组加完全 DMEM 培养液 1 mL,对照品组每组为 3 剂量 (100, 50, 25 mg/L),分别加入相应剂量的对照品供试液 1 mL,每剂量重复 8 孔,置 37℃ 50 mL/L CO₂ 孵箱内继续培养 24 h,收集各组细胞培养上清,测定细胞酶谱活性。

1.7 对照品对肝细胞的保护作用试验 细胞制备方法同 1.5, 分组同 1.6, 正常组、D-GlaN 组加完全 DMEM 培养液,对照品组每组为 3 剂量 (100, 50, 25 mg/L),分别加入相应剂量的对照品供试液 1 mL,每剂量重复 8 孔,置 37℃ 50 mL/L CO₂ 孵箱内培养 24 h,吸弃上清液,正常组加完全 DMEM 培养液 1 mL,其余各组均加 0.5 mmol/L D-GlaN 供试液 1 mL,继续培养 20 h,收集各组培养上清测定细胞酶谱活性。

统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件统计。对 Tab 1 ~ 4 数据进行 Kruskal-wallis 秩和检验,对 Tab 5 数据行 Wilcoxon 秩和检验。

2 结果

2.1 含药血清对 D-GlaN 所致肝细胞损伤的影响 在体外培养条件下,原代肝细胞经台盼蓝染色活性为 97%,与 0.05 mmol/L D-GlaN 供试液作用 24 h,培养上清 ALT, AST, MAO 和 MDA 酶活性值均显著高于正常肝细胞组 ($P < 0.01$),肝细胞产生损伤。模型组肝细胞更换含 0.05 mmol/L D-GlaN 的 200 mL/L 空白血清供试液后其 ALT, AST, MAO 和 MDA 值低于 D-GlaN 组,但无显著性差异,显著高于空白血清组

($P < 0.01$)。空白血清组肝细胞 ALT 和 MAO 值显著高于正常组($P < 0.01$)，AST 略高于正常组，可使 MDA 降低并低于正常组，血清可拮抗 D-GlaN 导致肝细胞产生 MDA。D-GlaN 组和模型组均为损伤组，只是模型组含 200 mL/L 血清之异，以消除试验中血清对药效试验的影响。含药血清 I 组对 D-GlaN 损伤肝细胞所致升高的 ALT 和 AST 酶活性值有降低作用，但无显著性差异。含药血清 II 组对 D-GlaN 损伤肝细胞而导致的高酶活性值均有显著降低作用，其作用强于含药血清 I 组，与模型组比较差异显著($P < 0.05$ ，Tab 1)，当各试验组弃除各供试液，更换完全 DMEM 培养液于肝细胞继续培养 20 h，观察延迟效应。结果含药血清 I 组对高 ALT 和 AST 酶活性值有明显降低作用($P < 0.05$)，MAO 值和模型组相似，MDA 值升高。含药血清 II 组仍能有效地拮抗 D-GlaN 对肝细胞的损伤($P < 0.05$ ，Tab 2)。

表 1 五灵胶囊含药血清对 D-GlaN 所致肝细胞损伤的作用
Tab 1 Effects of WuLing capsules contained drug serum on injuries of liver cells induced by D-GlaN ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

Group	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	MAO (nkat/L)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)
Normal	145.5 ± 86.4	800.2 ± 73.4	12.0 ± 2.2	1.9 ± 1.5
D-GlaN	1011.9 ± 471.8 ^d	1795.4 ± 698.5 ^d	46.7 ± 6.3 ^d	3.6 ± 1.2
Blank serum	436.8 ± 261.7 ^{df}	901.8 ± 95.0 ^f	23.0 ± 9.8 ^{df}	1.1 ± 0.2 ^f
Model	881.8 ± 231.7 ^{de}	1256.9 ± 265.1 ^{eo}	32.3 ± 2.3 ^{de}	1.0 ± 0.6 ^f
Drug contained serum I	785.2 ± 258.4	1149.6 ± 215.0	22.2 ± 9.3 ^a	1.3 ± 0.2
Drug contained serum II	421.8 ± 288.4 ^b	980.2 ± 113.4 ^a	21.7 ± 5.5 ^a	1.5 ± 1.0

^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ vs model；^c $P < 0.05$ ，^d $P < 0.01$ vs normal；^e $P < 0.05$ ，^f $P < 0.01$ vs D-GlaN。D-GlaN：D-galactosamine；ALT：alanine aminotrasferase；AST：aspartate aminotransferase；MAO：monoamine oxidase；MDA：maleic dialdehyde。

表 3 各对照品对 D-GlaN 所致肝细胞损伤的修复作用

Tab 3 Restorable effect of each control substance on injuries of liver cell induced by D-GlaN ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Group	Dosage(mg/L)	ALT(nkat/L)	LDH-I(nkat/L)	GSH-ST(nkat/L)	MAO(nkat/L)	MDA($\mu\text{mol/L}$)
Normal		934.5 ± 101.7	850.2 ± 320.1	949.8 ± 203.4	35.7 ± 15.0	1.0 ± 0.2
D-GlaN		2659.5 ± 773.5	4400.9 ± 916.8	3405.7 ± 613.4	207.0 ± 20.0	4.9 ± 2.8
Schizandrol A +	100	679.6 ± 83.35 ^b	1450.6 ± 246.7 ^b	744.3 ± 423.4 ^b	22.7 ± 6.7 ^b	1.9 ± 0.6 ^a
Schisandrin B	50	1567.9 ± 671.8 ^a	2367.1 ± 1123.6 ^a	1606.9 ± 340.1 ^b	27.2 ± 8.3 ^b	4.1 ± 2.6
	25	1244.9 ± 215.0 ^b	1653.0 ± 236.7 ^b	2195.1 ± 1260.2 ^a	75.8 ± 15.0 ^b	5.1 ± 2.2
Cryptanshinone	100	1245.6 ± 103.4 ^b	595.9 ± 290.1 ^b	1548.3 ± 376.7 ^b	46.3 ± 13.3 ^b	0.9 ± 0.4 ^a
	50	1400.6 ± 580.1 ^a	1735.7 ± 943.5 ^b	2607.2 ± 481.8 ^a	35.3 ± 13.3 ^b	1.7 ± 0.8 ^a
	25	996.0 ± 161.9 ^b	1331.9 ± 376.7 ^b	2102.4 ± 453.4 ^b	72.0 ± 16.7 ^b	3.1 ± 0.5
Tanshinone II A	100	1261.6 ± 83.4 ^b	1973.4 ± 260.0 ^b	2236.1 ± 34.2 ^b	65.7 ± 16.67 ^b	1.5 ± 1.0 ^a
	50	1495.3 ± 635.1 ^a	1708.7 ± 766.3 ^b	2563.8 ± 481.8 ^b	49.3 ± 18.3 ^b	3.3 ± 0.8
	25	1251.6 ± 146.7 ^b	1707.7 ± 598.4 ^b	3969.3 ± 1048.5	84.7 ± 16.7 ^b	0.7 ± 0.4 ^a

^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ vs D-GlaN。D-GlaN：D-galactosamine；ALT：alanine aminotrasferase；LDH-L：lactate hydrogenase；GSH-ST：glutathione s-transferase；MAO：monoamine oxidase；MDA：maleic dialdehyde。

表 2 五灵胶囊含药血清对 D-GlaN 所致肝细胞损伤的延迟效应

Tab 2 Late effect of WuLing capsules contained drug serum on injuries of liver cells induced by D-GlaN ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

Group	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	MAO (nkat/L)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)
Normal	266.7 ± 131.7	495.1 ± 113.4	23.2 ± 6.2	0.5 ± 0.2
D-GlaN	1216.9 ± 571.8 ^d	1450.3 ± 240.0 ^d	80.2 ± 18.2 ^d	7.9 ± 0.9 ^d
Blank serum	266.7 ± 198.4 ^f	511.8 ± 135.0 ^f	21.0 ± 4.0 ^f	0.9 ± 0.6 ^f
Model	680.1 ± 140.9 ^{df}	1465.3 ± 431.8 ^d	50.8 ± 8.2 ^{df}	2.4 ± 0.6 ^{df}
Drug contained serum I	271.7 ± 219.0 ^b	831.8 ± 453.4 ^a	51.7 ± 26.7	4.3 ± 0.3 ^b
Drug contained serum II	485.1 ± 65.3 ^b	1072.5 ± 148.8 ^a	28.3 ± 0.6 ^b	3.3 ± 1.9

^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ vs model；^d $P < 0.01$ vs normal；^f $P < 0.01$ vs D-GlaN。D-GlaN：D-galactosamine；ALT：alanine aminotrasferase；AST：aspartate aminotransferase；MAO：monoamine oxidase；MDA：maleic dialdehyde。

2.2 对 D-GlaN 损伤的肝细胞修复作用 正常肝细胞在完全 DMEM 培养液中培养 24 h，培养上清中 ALT，LDH-L，MAO，GSH-ST 及 MDA 值见 Tab 3。生长稳定的肝细胞加入 D-GlaN 作用 24 h 后，导致肝细胞损伤，其培养上清中 ALT，LDH-L，MAO，GSH-ST 及 MDA 值显著高于正常组($P < 0.01$)。对照品醇甲 + 乙素组 3 种剂量对由 D-GlaN 所致肝细胞损伤而升高的 ALT，LDH-L，MAO，GSH-ST 及 MDA 值有显著降低作用，显著低于模型组($P < 0.05$)，降 MAO，GSH-ST 有量效关系，大剂量组有降 MDA 作用而中小剂量则无此作用。对照品隐丹参酮和丹参酮 IIA 均能拮抗 D-GlaN 所致的肝细胞损伤，使 D-GlaN 升高的酶谱活性值显著降低或趋向正常，较模型组差异显著($P < 0.05$ ，Tab 3)。

2.3 对照品对 D-GlaN 损伤的肝细胞保护作用 醇甲 + 乙素、隐丹参酮、丹参酮 IIA 组 3 种剂量均能拮抗 D-GlaN 对肝细胞的损伤,所测培养上清中酶活性

值显著低于模型组 ($P < 0.01$, Tab 4)。醇甲 + 乙素组降 LDH-L, MAO, GSH-ST 和 MDA 有量效关系,隐丹参酮组降 MAO 和 MDA 有量效关系。

表 4 对照品对 D-GlaN 所致肝细胞损伤的保护作用

Tab 4 Protective effects of each control substance on injuries of liver cells induced by D-GlaN ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Group	Dosage(mg/L)	ALT(nkat/L)	LDH-L(nkat/L)	GSH-ST(nkat/L)	MAO(nkat/L)	MDA($\mu\text{mol/L}$)
Normal		571.1 \pm 183.4	836.8 \pm 413.4	1023.5 \pm 281.7	19.0 \pm 3.3	2.5 \pm 0.6
D-GlaN		1783.5 \pm 810.2	2568.8 \pm 333.4	2677.2 \pm 518.4	196.5 \pm 21.7	7.9 \pm 0.6
Schizandrol A +	100	679.6 \pm 83.4 ^a	566.8 \pm 151.7 ^b	861.2 \pm 386.7 ^b	47.7 \pm 10.0 ^b	1.8 \pm 0.8 ^b
Schisandrin B	50	1211.9 \pm 280.0	1303.6 \pm 175.0 ^b	1186.9 \pm 738.5 ^b	38.7 \pm 13.3 ^b	1.4 \pm 0.4 ^b
	25	929.8 \pm 238.4 ^a	2192.8 \pm 771.8	1532.1 \pm 410.1 ^b	66.7 \pm 16.7 ^b	2.1 \pm 0.6 ^b
Crytanshinone	100	917.2 \pm 120.0 ^a	944.5 \pm 226.7 ^b	947.2 \pm 375.1 ^b	49.0 \pm 6.7 ^b	2.6 \pm 1.2 ^b
	50	968.6 \pm 110.0 ^a	1200.7 \pm 181.7 ^b	1299.6 \pm 405.1 ^b	42.7 \pm 10.0 ^b	3.2 \pm 0.7 ^b
	25	893.8 \pm 123.4 ^a	1078.0 \pm 190.0 ^b	1840.4 \pm 118.4 ^b	68.0 \pm 6.7 ^b	3.3 \pm 1.3 ^b
Tanshinone II A	100	925.5 \pm 150.0 ^a	1838.7 \pm 353.4 ^a	1454.4 \pm 143.4 ^b	56.0 \pm 13.3 ^b	4.0 \pm 2.0 ^b
	50	1267.9 \pm 103.4	1620.6 \pm 286.7 ^b	2125.4 \pm 681.8	78.7 \pm 23.3 ^b	2.4 \pm 0.8 ^b
	25	1542.6 \pm 223.4	2142.3 \pm 715.1	3582.0 \pm 1388.6	50.5 \pm 10.0 ^b	1.97 \pm 1.0 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs D-GlaN. D-GlaN : D-galactosamine ; ALT : alanine aminotrasferase ; LDH-L : lactate hydrogenase ; GSH-ST : glutatnion s-transferase ; MAO : monoamine oxidase ; MDA : maleic dialdehyde.

2.4 五灵胶囊含药血清中化学成分分析 采用对照品平行试验分析,经 HPLC 色谱和 UV 光谱确证,大鼠血清中含有五灵胶囊 4 种化学成分,即醇甲、乙素、隐丹参酮和丹参酮 IIA,这 4 种成分的色谱和 UV 光谱与相应对照品一致.同时测定两剂量组大鼠血清中 4 种成分的含量,结果大剂量组血清中醇甲、乙素、隐丹参酮 3 种化学成分的含量明显低于小剂量组 ($P < 0.05$, Tab 5),两剂量组血清中丹参酮 IIA 含量相似。

培养液继续培养 24 h,肝细胞酶谱值与正常值相似,而相同剂量的小牛血清则无此作用,鼠血清导致肝细胞 ALT 和 MAO 酶值明显升高并非是肝细胞损伤所致,MTT 活性试验与镜检观察肝细胞再生现象表明:鼠血清有刺激肝细胞再生作用,ALT 与 MAO 活性增高可能与此有关.提示空白血清可屏蔽含药血清的作用.模型组肝细胞在含 200 mL/L 空白血清的 0.05 mmol/L D-GlaN 供试液作用下,ALT 由 881.8 \pm 231.7 下降至 680.1 \pm 140.9,AST 和 MAO 则继续升高,各指标测定值仍显著高于空白血清组,说明肝细胞损伤模型是成功的,正常组、D-GlaN 组、200 mL/L 鼠空白血清组、模型组酶谱值分析证实这点.含药血清 I 组对 D-GlaN 造成肝细胞损伤所致升高的 ALT 和 AST 有降低作用,与空白血清比较无明显差异,降 MAO 作用显著.含药血清 II 组对 D-GlaN 所致肝损伤有明显地修复作用,所测酶谱指标显著下降,较空白血清组差异显著 ($P < 0.05$).延迟效应试验表明:当各实验组弃去上清液,更换完全 DMEM 培养液于肝细胞培养一定时间测定酶谱,模型组除 ALT 略下降,AST, MAO 和 MDA 值均增加,说明 D-GlaN 诱导肝细胞损伤仍正在继续,含药血清 I 组对 D-GlaN 导致的继发性损伤有阻止作用,其 ALT 和 AST 值较模型组显著下降,但 MAO 与 MDA 值同模型组相似,含药血清 II 组仍对 D-GlaN 继发性损伤有显著阻止作用,这与江

表 5 五灵胶囊大鼠血清中 4 种成分的血药浓度测定

Tab 5 Assay of blood drug concentration of four kinds of component in the serum of WuLing capsules in rat

Dosage (g/kg)	($n = 7, \text{mg/L}, \bar{x} \pm s$)			
	Schizandrol A	Schisandrin B	Crytan-shinone	Tanshi-none II A
10.0	0.37 \pm 0.10	0.11 \pm 0.02	0.65 \pm 0.09	0.16 \pm 0.04
6.2	0.54 \pm 0.15 ^a	0.30 \pm 0.12 ^b	1.42 \pm 0.10 ^b	0.16 \pm 0.03

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 10 g/kg.

3 讨论

中药固有成分经胃肠吸收入血后才能产生作用,从血清探寻中药方剂活性物质是一种可行尝试,血清药理结果表明,空白血清可使肝细胞 ALT 和 MAO 酶活性值明显升高,当弃除空白血清更换完全 DMEM

艳艳等^[3,4]报道体内试验结果一致。结果提示在含药血清内确有五灵胶囊阻止 D-GlaN 对肝细胞产生损伤的活性成分存在。进一步研究显示:HPLC 分析含药血清中化学成分,经对对照品平行对照试验 HPLC 色谱和 UV 光谱确证,大鼠血清中含有五灵胶囊 4 种成分,即醇甲、乙素、隐丹参酮和丹参酮 IIA 4 种成分的色谱和 UV 光谱与相应对照品一致。HPLC 所分析血清中 4 种化学成分是否显现或部分显现五灵胶囊所具有的药效作用,细胞药效试验印证 4 对照品对 D-GlaN 诱导肝细胞损伤有良好的修复和保护作用。这为前述分析含药血清中五灵胶囊化学成分醇甲、乙素、隐丹参酮和丹参酮 IIA 是治疗肝损伤的活性成分提供了间接依据。一般来讲,药物经吸收入血在体内产生作用,五灵胶囊为中药复方制剂,其成分复杂而含量甚微,并非任意物质能在血清中测得含量,血清中药物量的存在才能反映了药物有效性,含药血清和细胞药效学实验,以及 HPLC 分析其化学成分提示醇甲、乙素、隐丹参酮和丹参酮 IIA 是五灵胶囊治疗肝损伤的活性成分。五灵胶囊 10.0 g/kg 和 6.2 g/kg 剂量灌胃给药大鼠,HPLC 分析小剂量组大鼠血清中醇甲、乙素、隐丹参酮和丹参酮 IIA 的浓度大于大剂量组,说明过大的给药剂量造成胃肠吸收减慢,进入血

清的成分降低。

【参考文献】

- [1] 孙利,周永兴,连建奇. 五灵胶囊治疗慢性肝炎的临床随访观察[J]. 第四军医大学学报, 2000 21(7): 905.
Sun L, Zhou YX, Liang JQ. The follow up study on effect of the chronic viral hepatitis patients treated with WuLing capsule[J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2000 21(7): 905.
- [2] 程涛,胡大荣,聂青和等. 一种改良的 Ito 细胞分离培养方法[J]. 第三军医大学学报, 1999 21(8): 598-600.
Cheng T, Hu DR, Nie QH, et al. A modified method for isolation and culture of Ito cell[J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 1999 21(8): 598-600.
- [3] 江艳艳,王胜春,蒋永培等. 五灵胶囊对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤保护作用[J]. 时珍国医国药, 2000 11(11): 961-962.
Jiang YY, Wang SC, Jang YP, et al. Protective effects of WuLing capsules on chronic hepatic injury induced by CCl₄ in rats[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 2000 11(11): 961-962.
- [4] 王胜春,胡咏武,李剑锋等. 复方中药五灵胶囊对小鼠免疫功能的影响[J]. 第四军医大学学报, 2002 23(16): 1518-1521.
Wang SC, Hu YW, Li JF, et al. Effects of Chinese drug WuLing capsule on immune function in mice.[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002 23(16): 1518-1521.

编辑 井晓梅

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)17-1591-01

肾移植术后癫痫 8 例

李小顺,刘锐,谢飞,陈飞鸿,李俊贤,陈瑞,闫鲲,张谦(武警陕西总队医院肾移植中心,陕西西安 710054)

【关键词】肾移植;癫痫

【中图分类号】R742.19 【文献标识码】B

1 临床资料 1997-05/2003-05 行尸肾移植 462 例,出现癫痫 8 例,占 1.73%,男 2 例,女 6 例,年龄 14~56 岁,既往均无癫痫病史,原发病均为慢性肾炎。术前接受血液透析 7 例,腹膜透析 1 例。部分性发作 4 例,全身性发作 2 例,癫痫持续状态 2 例,发病时间:肾功恢复正常组术后 4~14(9±5)h 5 例,肾功

延迟恢复组 7~21(14±7)d 3 例。8 例患者均有不同程度的水电解质平衡紊乱,低钠(127.5±6.5)mmol/L,低钙(0.95±0.75)mmol/L 血症 6 例,高钠(149.5±2.5)mmol/L 并颅内水肿、颅内高压 2 例。均经镇静、纠正水电解质平衡紊乱症状于发病后 2~26 h 控制。

2 讨论 肾移植术后癫痫的易发因素为^[1] ①水电解质平衡紊乱,脑皮质兴奋性改变;②脑水肿、颅内高压神经细胞缺氧致电活动异常;③大量的糖皮质激素对大脑皮层的过度兴奋作用;④尿素氮、肌酐等毒素水平在脑组织中的急剧变化。早期监测电解质,出现电解质紊乱及时调整,多尿期补液对电解质及时补充,慎用利尿剂以防出现类似失衡综合征表现。在肾功延迟恢复期严格量出为入,以防出现医源性水钠负荷过重。脑水肿、颅内高压根据尿量及肾功情况可慎用甘露醇脱水。癫痫症状出现及早给予镇静及纠正水电解质酸碱平衡紊乱处理,能缩短病程,减少并发症发生。

【参考文献】

- [1] 杨欣伟,黄莹,王艳秋. 儿童癫痫脑电地形图[J]. 第四军医大学学报, 2002 23(4): 354-355.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-06-28; 修回日期 2004-07-12

作者简介:李小顺(1974-),男(汉族),湖北省孝感市人。医师。Tel. 13002940382 Email. lxshwjy01@medmail.com.cn