

得良好的抗病毒效果。由此看来,虽然噬菌体-指示菌系统具备了简单易行、快速敏感的特点,有成为抗病毒中药体外筛选模型的条件,但还须进一步的试验和分析。尤其是药物在体内可通过多种途径发挥抗病毒作用,如直接抑制或杀灭病毒、干扰病毒吸附、阻止病毒穿入细胞、抑制病毒生物合成、抑制病毒释放或增强宿主抗病毒能力等等,而在体外发生作用则有其局限性。不同的西药在体外也可能通过不同的方式和途径达到抗病毒目的。因此要建立较为完善的西药对照模型,尚需进行大量的噬菌体-指示菌系统模型的筛选试验,以确立每一种抗病毒途径的相应有效噬菌体-指示菌系统模型;对于部分较为特殊的病毒,尚需通过筛选找到基因结构较类似的噬菌体,以建立相应的噬菌体-指示菌系统模

型。我们选择以板蓝根和大蒜来作中药的初步筛选对象,主要在于其各自具有传统和现代抗病毒药物的象征意义,试验结果也表明大蒜具有抗枯草杆菌噬菌体和大肠杆菌噬菌体作用;板蓝根虽然在此次试验中未能取得良好的抗病毒效果,但作为传统抗病毒中药,其抗病毒作用未能在体外表现可能在于:一、通过体内途径发挥作用;二、与药材产地有关,有报道产于北方的板蓝根具有较强的抗菌作用,抗病毒作用多见于南板蓝根中的马蓝(*Baphicacanthus cusia* Bremek)根;三、枯草杆菌、大肠杆菌噬菌体-指示菌系统并非为对应其体外抗病毒途径的有效噬菌体-指示菌系统模型。以噬菌体-指示菌系统为模型进行抗病毒中药的筛选工作,虽然刚刚起步,但作为一种全新的筛

选体系,具有一定的良好应用前景,有待于进一步的深入研究和开发应用。

## 参考文献

- [1] 刘敏,王国庆. 浅述中药二次开发在中医药发展中的作用[J]. 中草药, 2004, 35(7): 721-724.
- [2] 姚新生. 借鉴国际传统药物发展经验推动中药现代化进程[J]. 世界科学技术-中药现代化, 2002, 3: 6-12.
- [3] 张志军. 从传统药物中开发抗病毒药[J]. 国外医学中医中药分册, 1999, 21(1): 12-15.
- [4] 黄欣. 对传统药物中抗病毒剂的筛选方法[J]. 国外医学. 中医中药分册, 1995, 17(5): 57-60.
- [5] 王志玉,许斌,宋艳艳,等. 大黄乙醇提取物体内抗单纯疱疹病毒作用的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(2): 169-173.
- [6] 刘明河. 细菌病毒-噬菌体的应用概况[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(4): 56-57.

## 《中国民族医药杂志》、《内蒙古中医药杂志》2006年征订启事

《中国民族医药杂志》系由国家中医药管理局主管的我国唯一反映55个少数民族医药的国家级综合性学术期刊,设有理论探讨、临床报道、诊治经验、方药纵横、疗法简介、实验研究、医苑琐谈、文献综述、教学探讨、书刊评价等栏目。本刊理论与实践并举,科研与教学兼顾,涉及面广,信息量大,是广大医药卫生工作者了解、研究、交流我国少数民族医药学的必备期刊。

本刊为双月刊,大16开,每册定价:5.50元,全年价33.00元。国内统一刊号CN15-1175/R,国际标准刊号ISSN1006-6810,国内邮发代号16-94,全国各地邮局订阅,国外发行代号6501/Q,中国国际图书贸易总公司(北京399信箱)订阅。

《内蒙古中医药杂志》系综合性中医药学术期刊,立足本区,服务全国,面向基层,注重临床,适宜各级中医、中西医结合工作者阅读和交流。本刊为双月刊,大16开,每册定价4.50元,全年定价27.00元。国内统一刊号CN15-1101/R,国际标准刊号ISSN1006-0979,国内邮发代号16-78,国外发行代号6367/Q。欢迎大家订阅。

两刊若有脱订者可直接向编辑部办理邮购。地址:呼和浩特市健康路15号邮编:010020 电话:(0471) 6920167。

# Beagle 犬含药脑脊液对神经细胞损伤保护作用的最佳剂量研究※

□ 郭建文<sup>1\*</sup> 何迎春<sup>2</sup> 指导：陈绍宏

(1. 广州中医药大学第二附属医院 广东 广州 510120

2. 杭州市中医院 浙江 杭州 310006)

**摘 要** 目的：筛选中药复方 DSQ-03 含药脑脊液对大脑皮层神经细胞凝血酶损伤保护的最佳剂量，为进一步探讨中药复方的作用机制奠定基础。方法：采用原代神经细胞培养的方法培养新生 SD 大鼠的皮层神经元，并制成凝血酶损伤的模型；Beagle 犬饲养中药复方 DSQ-02 后，穿刺脑脊液，获得含药脑脊液标本。按照含中药脑脊液的剂量分为 13 组，MTT 法测定细胞活力。结果：终浓度为 20% 的小剂量组 CSF 为最佳剂量组（相当于人体用量的 1.63 倍）。结论：高剂量的 Beagle 犬含中药复方 DSQ-03 脑脊液对神经细胞有毒害作用；中等剂量和低剂量的含药脑脊液对神经细胞凝血酶损伤有保护作用，对神经细胞的保护作用非呈线性剂量依赖关系。

**关键词** 脑脊液药理学 中药复方 剂量依赖 原代培养

中药复方 DSQ-03 是我们前期基于循证医学证据并结合中医学理论和临床经验组成的具有活血化瘀作用的中药复方，临床用于治疗急性脑血管病取得了较好的疗效<sup>[1]</sup>。本实验目的在于筛选 DSQ-03 含药脑脊液对大脑皮层神经细胞凝血酶损伤保护的最佳剂量，为进一步探讨中药复方的作用机制和确定临床剂量奠定基础。

※基金项目 甘肃省科技攻关计划项目(No:ZGS035-A43-071)

\*作者简介 郭建文，男，医学博士。主要研究方向：中医药防治急性脑血管病的临床和实验研究。目前是国家“十五”科技攻关《急性缺血中风辨证规范和疗效评价的示范研究(2004BA721A02)》的主要研究者。

## 1 材料和方法

1.1 受试动物 Beagle 犬（一级）32 只，5~6 月龄，体重 5~6kg，雌雄各半，由四川省实验动物研究所 Beagle 犬养殖场提供，合格证号：医动字 24103123，单笼喂养，观察四周。

SD 乳鼠（1 日龄），由成都中医药大学动物实验中心提供，合格证书号：川实动管质第 99-8 号。雌雄不拘，体重 6~8g，母乳喂养。

1.2 药品与试剂 中药复方浓缩液（DSQ-03，10ml/支，每 ml 药物含生药材 1.86g，由上海生工生物工程有限公司提供，批号：030504）。

多聚赖氨酸（Sigma）；DMEM 培养基（SIGMA）；胰

蛋白酶(GIBCO);HEPES(SIGMA)小牛血清;胎牛血清(杭州四季青公司);噻唑兰(MTT)(Sigma);二甲基亚砷(DMSO)。

表1 Beagle 犬分组和给 DSQ-03 剂量

组别	动物 (只)	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> 生药)	给药体积 (ml·kg <sup>-1</sup> ·d)	相当于 临床倍数
大剂量	8	43.48	20.0(10×2)	32.6
中剂量	8	21.74	10.0	16.3
小剂量	8	10.87	5.0	8.2
对照组	8			

1.3 主要实验仪器 HBO50 型倒置相差显微镜(ZEISS);MCO-150A 型二氧化碳培养箱(三洋);50CM2 培养瓶、96、24、6 孔板(COSTAR);体视显微镜及显微摄像系统(OLYMPUS)。

#### 1.4 方法

1.4.1 神经细胞培养方法<sup>[2]</sup> 新生 24h 之内 SD 大鼠,70%酒精浸泡 2s。用消毒器械无菌条件下,取出大脑。D-Hanks 液清洗,细心除去血管组织和脑膜及粘附的血细胞,科剪将脑组织剪成糊状(<2mm<sup>3</sup>)。将组织转入 10ml 离心管,加入 0.25% 胰蛋白酶在空气振动摇床上消化(37℃,10min)。加入 10ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM,275 × g 离心 7min。吸出悬浮物,加入培养基,吹打使沉淀物悬浮,200 目不锈钢网过滤。细胞悬液再次离心,弃上清,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 重悬,计数,调整细胞浓度为 1 × 10<sup>5</sup>/ml,并接种到多聚赖氨酸培养板中。在 37℃、湿度 100%、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。24h 后,倒置显微镜下观察见细胞已附壁。弃去上清,加入新鲜培养基继续培养。第 3 天后用含 10μmol/L 阿糖胞苷的培养液 24h,然后换液。第 7 天随机选 6 孔取出盖玻片,固定,用作甲苯胺蓝染色。

1.4.2 Beagle 犬含药脑脊液的制备 分组及给药剂量见表 1。所有动物在连续给药 6 个月,最后一次灌胃给药的 1h、2h 在无麻醉的情况下,小脑延髓池无菌穿刺,缓慢抽出无色清亮脑脊液 2ml,然后注入 2ml 生理盐水。标本用 PE 管液氮-80℃冻存,备用。在进行细胞培养前,用无菌微孔滤膜过滤脑脊液,除去细菌和细胞。

1.4.3 凝血酶神经细胞损伤模型的复制及鉴定 培养至 7 天的神经细胞,经尼氏小体染色鉴定后,神经元的纯度在 95% 之上。凝血酶加入到高糖 20% DEME 溶液中配成 150U/ml 的浓度。第 7 天神神经细胞全部换液后,换用含凝血酶的高糖 DEME 培养液。过夜后,倒置显微镜下观察,MTT 法测定细胞活力,甲苯胺蓝染色计算细胞丧失率。将含细胞盖玻片取出,0.01 M PBS 冲洗(3 × 5min);冷丙酮固定 30min,自然晾干后置-20℃冰箱保存备用。甲苯胺蓝染色后细胞核呈淡蓝色,尼氏小体为深蓝色而背景无色。利用图像分析仪,在 400 倍视野下,随机观察并计数 3 个不重复视野的甲苯胺蓝染色阳性细胞数目。计算后凝血酶损害组 OD 值比正常有明显下降,说明模型复制成功<sup>[3]</sup>。

1.4.4 Beagle 犬含药 CSF 对 SD 大鼠皮层神经元凝血酶损伤模型的作用的剂量筛选

1.4.4.1 剂量分组 凝血酶损伤模型制作成功后,将 96 孔板分为 13 组,每组设 6 个复孔,分组情况如下:

表2 DSQ-03 含药脑脊液最佳剂量的筛选

组别	加入浓度	相当于临床剂量的倍数
(1)	终浓度为 20% 的大剂量组 CSF	6.52
(2)	终浓度为 10% 的大剂量组 CSF	3.26
(3)	终浓度为 5% 的大剂量组 CSF	1.63
(4)	终浓度为 20% 的中剂量组 CSF	3.26
(5)	终浓度为 10% 的中剂量组 CSF	1.63
(6)	终浓度为 5% 的中剂量组 CSF	0.815
(7)	终浓度为 20% 的小剂量组 CSF	1.63
(8)	终浓度为 10% 的小剂量组 CSF	0.815
(9)	终浓度为 5% 的小剂量组 CSF	0.41
(10)	终浓度为 20% 的对照组 CSF	
(11)	终浓度为 10% 的对照组 CSF	
(12)	终浓度为 5% 的对照组 CSF	
(13)	空白对照组,不加任何 CSF	

1.4.4.2 噻唑兰(MTT)测定神经细胞活力 分别向凝血酶损伤模型细胞加入不同终浓度的 CSF 后(每孔总量为 100ul),置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 24h 后,加入 MTT100ul,37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 4h,吸净培养液,再加入 DMSO150ul 溶解甲瓞(formazan),充分震荡后,在酶标仪上,用波长 560nm 和参比波长

630nm 测定 OD 值。

## 2 结 果

**2.1 形态学观察** 神经细胞接种后 6h 开始贴壁, 24h 后细胞伸出粗细不等的突起; 72h 后, 神经细胞开始呈锥体状、卵圆状或梭形等状态, 突起分支细长, 光晕明显, 大多数细胞折光强, 但中心部分较暗 (图 1)。经凝血酶损伤造模后, 损伤的神经细胞逐渐

退化, 胞体肿胀, 出现沉积, 神经突起断裂, 神经元崩解, 坏死的神经元漂浮在培养液上层 (图 2)。不同剂量中药复方 DSQ-03 含药 CSF 处理后的细胞, 能明显干预凝血酶引起的形态学改变 (图 3-5); 最佳剂量 CSF 干预后, 表现为减少细胞突起结构的消失, 减少细胞碎片的形成 (图 6)。

### 2.2 MTT 法筛选剂量含药 CSF 的结果