

- L. (Alismataceae)[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135(1): 43-47.
- [5] Lee JH, Kwon OS, Jin HG, et al. The rhizomes of *Alisma orientale* and alisol derivatives inhibit allergic response and *experimental atopic dermatitis* [J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2012, 35(9): 1581-1587.
- [6] Lee JH, Lee YJ, Kang SW, et al. Effects of protostane-type triterpenoids on the 5-HT_{3A} receptor-mediated ion current in *Xenopus oocytes*[J]. Brain research, 2010, 1331: 20-27.
- [7] Xu YH, Zhao LJ, Li Y. Alisol B acetate induces apoptosis of SGC7901 cells via mitochondrial and phosphatidylinositol 3-kinases/Akt signaling pathways[J]. World Journal of Gastroenterology, 2009, 15(23): 2870-2877.
- [8] Law BY, Wang M, Ma DL, et al. Alisol B, a novel inhibitor of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump, induces autophagy, endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2010, 9(3): 718-730.
- [9] Huang YT, Huang DM, Chueh SC, et al. Alisol B acetate, a triterpene from *Alismatis rhizoma*, induces Bax nuclear translocation and apoptosis in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells[J]. Cancer Letters, 2006, 231(2): 270-278.
- [10] 张朝凤, 周爱存, 张勉. 泽泻的化学成分及其免疫抑制活性筛选[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8): 994-998.
- [11] Wang C, Zhang JX, Shen XL, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by Alisol B 23-acetate[J]. Biochemical pharmacology, 2004, 68(5): 843-855.
- [12] 林文津, 徐榕青, 张亚敏, 等. 泽泻不同提取物对 SGC-7901 细胞线粒体能量代谢的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(1): 36-39.
- [13] Chen HW, Hsu MJ, Chien CT, et al. Effect of alisol B acetate, a plant triterpene, on apoptosis in vascular smooth muscle cells and lymphocytes[J]. European Journal of Pharmacology, 2001, 419(2-3): 127-138.
- [14] 吴水生, 郭改革, 施红, 等. 泽泻提取物 Alisol MonoacetateA 和 B 对 HepG2 细胞胆固醇代谢的影响[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(7): 475-477.
- (编辑: 宋威)

中药挥发油 / 水提物的细胞抗炎、免疫及骨细胞修复活性的比较

张立国, 马东升, 程佳佳, 倪力军(华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237)

摘要: 目的 以腰痛宁衍生方为基础比较桂枝、土鳖虫等 6 类中药挥发油 / 水提物有效部位对细胞抗炎、免疫及骨细胞修复的影响, 为风湿骨病处方候选药物筛选有效部位提供依据。方法 在马钱子、麻黄生物碱 + 甘草等 5 种药材和黄酮 + 甘草等 4 种药材皂苷混合物的基础上, 分别加入 50 % 的苍术、乳香 + 没药、独活、桂枝挥发油、50 % 的土鳖虫、全蝎 + 僵蚕水提液组成新的中药有效部位组方。测定各样品抑制小鼠巨噬细胞 (Ana-1) 中前列腺素 E₂ (PGE₂) 增殖的半数抑制浓度 (IC₅₀) 及促进白细胞介素 -1 β (IL-1 β)、白细胞介素 -6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 因子增殖和促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的半数有效浓度 (EC₅₀)。同时采用最小二乘优化方法, 计算各样品的 EC₅₀ 或 IC₅₀ 叠加值, 根据 EC₅₀ 或 IC₅₀ 叠加值与实验值之间的差异分析各有效部位间的相互作用关系。结果 在 6 类中药挥发油 / 水提物有效部位中, 桂枝挥发油抑制 Ana-1 分泌 PGE₂ 及促进 Ana-1 分泌 IL-1 β 、IL-6 的活性最强; 土鳖虫、僵蚕 + 全蝎水提液促进 Ana-1 分泌 TNF- α 的作用最佳, 并在细胞抗炎、促进软骨细胞增殖活性和其他细胞免疫模型中表现出较好的活性。各挥发油 / 水提物有效部位促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的活性相当。结论 桂枝挥发油具有良好的抗炎、免疫及促软骨细胞增殖等综合药理活性, 可作为风湿骨病处方的优选有效部位并用其替代腰痛宁处方中的乳香 + 没药挥发油以降低乳香 + 没药引起的不良反应。腰痛宁组方药材中虫类药材的水提物也可作为风湿骨病处方的候选有效部位。

关键词: 风湿骨病; 腰痛宁; 挥发油; 前列腺素 E₂; 细胞免疫; 软骨细胞增殖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0034-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.009

收稿日期: 2014-08-14

作者简介: 张立国, 男, 副教授, 研究方向: 中药新药研发、中药物质基础与药效关系。Email: zlgfyt@163.com。通讯作者: 倪力军, 教授, 研究方向: 中药物质基础与药效关系的研究。Email: nljfy@sina.com。

基金项目: 上海市科技支撑项目(13401901100)。

Comparison of Anti-inflammatory, Immunoregulatory and Chondrocyte-proliferative Activities of Chinese Medicine Volatile Oil / Aqueous Extracts

ZHANG Ligu, MA Dongsheng, CHENG Jiajia, NI Lijun (School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Objective To compare the effects of six Chinese medicine effective fractions of volatile oils and aqueous extracts on cell anti-inflammation, immunoregulatory and proliferative activities based on a *Yaotongning* (YTN) derivative formula, thus to supply evidence for screening candidate medicines of rheumatoid bone diseases. **Methods** Volatile oils (extracted from *Rhizoma Atractylodis*, *Olibanum*, *Myrrha*, *Radix Angelicae Pubescentis*, or *Guizhi*) or aqueous extracts (extracted from *Tubiechong*, *Scorpio* and *Bombyx Batryticatus*) at 50 % were added into the mixture of alkaloids (extracted from *Semen Strychni* and *Herba Ephedrae*) and flavonoids (extracted from *Radix Glycyrrhizae* and other four herbs) to compose six effective fraction recipes. Murine macrophage cells and chondrocytes were exposed to the six recipes, and then their half effective inhibitory concentration (IC_{50}) for PGE_2 and the half effective concentrations (EC_{50}) to IL-6, IL-1 β , TNF- α in macrophages as well as EC_{50} to IL-1 β -induced proliferation of chondrocytes were detected. The interactions among the active fractions were evaluated by comparing the experimental EC_{50}/IC_{50} values to their corresponding additive EC_{50}/IC_{50} values calculated by the least square optimization method. **Results** Among the six investigated volatile oil/aqueous extract effective fractions, the volatile oils of *Guizhi* had the best effect on inhibiting the production of PGE_2 and promoting the secretion of IL-1 β and IL-6 in macrophages. The aqueous extracts of *Tubiechong*, *Scorpio* and *Bombyx Batryticatus* had the best effect on stimulating TNF- α factor in macrophages and had good activity in cell inflammation and other cell immunoregulatory models. The volatile oils and aqueous extracts active fractions had similar activities on promoting the secretion of chondrocytes induced by IL-1 β . **Conclusion** The volatile oils of *Guizhi* possesses good cell anti-inflammation, immunoregulatory and proliferative activities and can be the preferred candidate effective fractions of rheumatism prescription. It can replace the volatile oils of *Olibanum* and *Myrrhain* YTN prescription to reduce adverse reaction. The aqueous extracts of insect medicinal materials in YTN prescription can also be candidate effective fractions in rheumatism prescription.

Keywords: Rheumatism; *Yaotongning*; Volatile oil; PGE_2 ; Cell immunomodulation; Proliferation of chondrocytes

风湿骨病是一种常见的慢性疾病。中医认为该病是由于风、寒、湿、热等外邪侵袭人体，闭阻经络，气血运行不畅所致^[1]。各代医家对本病的治法总结为祛湿除寒、补肾健脾、活血通络。西医认为这类疾病与免疫功能紊乱、低下、炎症及骨细胞损伤有关。现代医学对该类疾病的通行治则是抗炎、增强免疫、促进骨细胞修复和增殖。

腰痛宁胶囊作为一种药效显著的治疗风湿骨病中成药，已有几十年临床应用历史。本课题组前期基于腰痛宁有效部位组方的药理研究^[2-6]表明，腰痛宁全方有良好的抗炎、免疫调节、活血和促进骨关节软骨细胞增殖等药理活性。全方中的生物碱、黄酮有效部位具有抗炎镇痛作用^[7-8]，皂苷有效部位具有显著的抗炎与增强免疫作用^[9]。其组方药材中的苍术、乳香、没药均为含有挥发油的中药材，中药挥发油具有活血化瘀、发散解表、理气止痛的功效^[10]，是很多传统药

物(包括中药)的重要有效成分。中药药理的研究通常针对单一处方、单味药材、单一有效部位或者某一处方中若干主要成分组合^[11]、不同提取物的组合^[12]进行，缺乏同类药材、有效部位间的活性比较，不利于评价和筛选优化的中药复方。本研究以腰痛宁中生物碱 + 黄酮 + 皂苷 + 挥发油 / 水提物有效部位组成的拆方为基础，选取风湿骨病中药复方中使用频次较高的三七、骨碎补、淫羊藿、人参、桑寄生、红花 6 味药材，提取其黄酮与皂苷有效部位，选取风湿骨病中药复方中经常使用的乳香、没药、苍术、独活、桂枝、土鳖虫、全蝎、僵蚕 8 味药材，提取其挥发油 / 水提物有效部位，在马钱子、麻黄生物碱与甘草、红花、骨碎补、淫羊藿、桑寄生黄酮有效部位以及三七、甘草、人参、川牛膝总皂苷有效部位组成的混合物基础上分别加入等比例乳香、没药、苍术、独活、桂枝、土鳖虫、全蝎、僵蚕总挥发油 / 水提物有效部位，得

到 6 个由腰痛宁拆方衍生的中药有效部位组方样品。通过构建巨噬细胞抗炎、免疫、软骨细胞增殖模型,分析比较各有效部位的配伍效果,评价不同挥发油/水提取物有效部位的相关活性,为筛选最佳配伍组方提供依据。

前列腺素 E_2 (PGE_2) 是一种重要的细胞生长和调节因子,是花生四烯酸环氧合酶代谢产物,为二十碳不饱和脂肪酸,是前列腺素 (PG) 的一种。具有免疫抑制和抗炎作用,同时具有扩张血管,增加器官血流量,降低血管外周阻力,降低血压的作用。 $TNF-\alpha$ 是一种由激活的巨噬细胞产生的能抑制成骨细胞和刺激破骨细胞的细胞因子。白细胞介素即是由多种细胞产生并作用于多种细胞的一类细胞因子。目前至少发现了 38 个白细胞介素,分别命名为 $IL-1\sim IL-38$, 功能复杂,呈网络,复杂重叠;在免疫细胞的成熟、活化、增殖和免疫调节等一系列过程中均发挥重要作用,此外,它们还参与机体的多种生理及病理反应。本文主要研究 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 两种白细胞介素。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 制马钱子、麻黄、甘草、红花、骨碎补、淫羊藿、桑寄生、三七、人参、川牛膝、乳香、没药、苍术、独活、桂枝、土鳖虫、僵蚕、全蝎共计 18 味中药材,均由颈复康药业集团有限公司提供,并经该公司执业药师王春民鉴定,样本保存于华东理工大学化学与分子工程学院分析化学实验室。小鼠巨噬细胞 (Ana-1) 细胞株,购自中科院上海生物细胞所。改良 Eagle 培养基 (DMEM),北京清大天一科技有限公司,批号: 120301; 吐温 -80, 国药集团化学试剂上海有限公司; 小牛血清 (FBS), 杭州四季青生物工程材料有限公司,批号: 110817; 酶联免疫 (ELISA) 试剂盒 白细胞介素 -1β ($IL-1\beta$), 白细胞介素 -6 ($IL-6$), 肿瘤坏死因子 ($TNF-\alpha$), 前列腺素 E_2 (PGE_2), R&D, 批号分别为 303465, 303171, 303367, 303260; CCK-8 试剂盒, 东仁化学科技有限公司,批号: ES781; LPS, Sigma 公司,批号: 111M4035V; 花生四烯酸 (AA), Sigma 公司,批号: 071M1333V; 磷酸缓冲盐溶液 (PBS), Medicago AB, 批号: 173106; 0.25 % 胰酶 (Biowest), 批号: S09990L0931; 两性霉素, 链霉素 - 青霉素均为 Biowest 公司产品,批号分别为 S08498L0009, S09965L0022; 刀豆蛋白 A (ConA), Sigma 公司,批号: 0011028710。

1.2 动物 健康 SD 大鼠 6 只, 7 日龄, 雌雄各半,

购自上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司, 动物许可证号: SCXK(沪)2008-0016。

1.3 样品制备^[3] 以 A 代表麻黄生物碱和马钱子生物碱的等比例混合物; F 代表甘草、淫羊藿、红花、骨碎补、桑寄生黄酮的等比例混合物; S 代表三七、甘草、人参、川牛膝皂苷的等比例混合物。1 号样品由 A+F+S+50 % 乳香 + 没药挥发油组成; 2 号样品由 A+F+S+50 % 苍术挥发油组成; 3 号样品由 A+F+S+50 % 独活挥发油组成; 4 号样品由 A+F+S+50 % 桂枝挥发油组成; 5 号样品由 A+F+S+50 % 土鳖虫水提取物组成; 6 号样品由 A+F+S+50 % 僵蚕 + 全蝎水提取物组成。且 1~6 号样品中的 A : F : S=1 : 1 : 1。其中, 1、2、5 和 6 号样品所含的乳香 + 没药挥发油、苍术挥发油、土鳖虫水提取物、僵蚕 + 全蝎水提取物分别对应的是腰痛宁胶囊组方中的有效部位。独活和桂枝挥发油则为风湿骨病常用处方药材中的有效部位。精密称取各有效部位, 加入适量 PBS 搅拌使之初步溶解, 沸水浴加热 10 min, 待其完全溶解后按上述制备方案混合, 一并超声 20 min, 冷却, 定容, 配成 $2500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤并稀释至各浓度 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 与 $3.125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 备用。

1.4 受试样品对 Ana-1 细胞免疫、抗炎及 $IL-1\beta$ 诱导的软骨细胞增殖活性的影响

1.4.1 小鼠巨噬细胞培养 小鼠腹腔 Ana-1 细胞在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 条件下, 用含 10 % 小牛血清、青霉素 ($1\times 10^5\text{ }\mu\cdot\text{L}^{-1}$) 及链霉素 ($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 DMEM 培养液进行传代培养, 实验用细胞均处于对数生长期。

1.4.2 软骨细胞的提取与培养 SD 大鼠脱颈椎处死, 浸泡于 95 % 酒精数分钟后取出, 剪开表皮及肌肉组织, 取出股骨头、肩关节及膝关节软骨组织, 加入少量 PBS 剪碎, 用 1 mL, 0.2 % 的 II 型胶原酶 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化数次, 至细胞较纯且数量较多, 移取上清液作为单个细胞悬液接种于培养皿中培养。

1.4.3 受试样品对 Ana-1 细胞增殖及上清液中 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 表达的影响 取对数生长期的 Ana-1 细胞, 用含 10 % 的小牛血清的 DMEM 培养基制成 $2\times 10^6\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞悬液, 接种于 96 孔培养板, 每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$; 分组加药每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$, 空白组每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 不含小牛血清的 DMEM 培养液; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 培养 48 h。48 h 后, 酶标仪在 450 nm 处测定细胞培养液上清 OD 值。加入 CCK-8 试剂, 置微量振荡器混匀后, 静置 4 h, 用酶标仪在 450 nm 处

测定 OD 值, 根据 OD 值变化情况判断样品对细胞活力的影响。取 Ana-1 细胞上清液, 用 ELISA 方法测定空白组和受试样品各组细胞培养液上清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平。

1.4.4 受试样品对 Ana-1 细胞增殖及上清液中 PGE₂ 表达的影响 将密度为每孔 4000 个的 Ana-1 细胞接种于 96 孔培养板中, 设溶剂 DMSO 对照组、LPS 处理组及待测药物组 (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO₂ 培养 2 h。加入 LPS (终浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养 9 h, 溶剂 DMSO 对照组不加 LPS。弃去旧培养液, 用新鲜培养液洗涤 3 次, 分别加入各浓度的待测药物孵育 30 min, 加入底物 AA (终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 37 $^{\circ}\text{C}$, 20 min, 收集上清液。细胞上清中 PGE₂ 含量的测定按照 ELISA 试剂盒使用说明测定, 每组重复 3 次。同时, 按照 CCK-8 试剂盒使用说明, 每孔加入 100 μL CCK-8 试剂, 用多功能酶标仪于 450 nm 处检测细胞活力。

1.4.5 受试样品对软骨细胞增殖的影响 待软骨细胞基本长满后传代培养, 传至第 2 代时, 调整细胞浓度为 1×10^7 个 $\cdot\text{L}^{-1}$, 接种于 96 孔培养板内用于实验。每孔接种 200 μL 细胞悬液, 接种 24 h 后把培养孔分为空白对照组、IL-1 β 对照组 (模型组)、受试样品组, 每样 3 复孔, 分别更换培养液: ①空白对照组: 换 DMEM (含 5 % PBS); ②模型组: 换 DMEM (含 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IL-1 β 及 5 % PBS); ③受试药物组: 换 DMEM (含 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IL-1 β , 5 % PBS 及各浓度药物), 放入培养箱中继续培养 48 h。

1.4.6 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 含量的测定 取 Ana-1 细胞上清液, 采用 ELISA 检测试剂盒, 按照说明书方法分别检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 的含量。

1.5 统计学处理方法 将样品中各有效部位对 EC₅₀ (或 IC₅₀) 贡献之和称为该样品的 EC₅₀ (或 IC₅₀) 叠加值, 运用自编 Matlab 程序计算各样品的叠加 EC₅₀ 或 IC₅₀, 实验值以 EC₅₀ $\pm$ S 或 IC₅₀ $\pm$ S (S 为标准方差) 表示, 并采用 SPSS18.0 统计软件进行单因素方差分析。两组间差异比较采用 Student's *t* 检验。

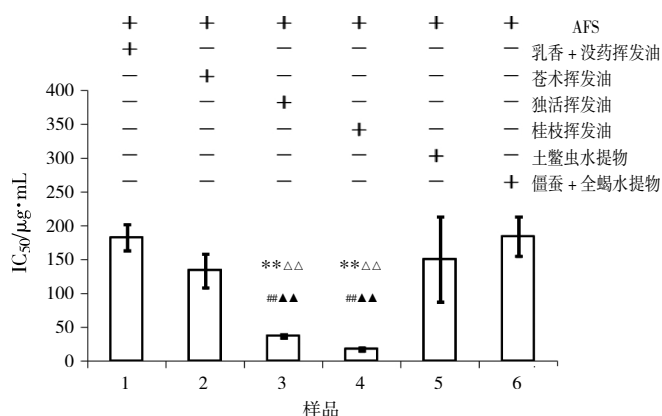
2 结果

2.1 受试样品对细胞活力的影响 6 类样品对 Ana-1 细胞活力影响的测定结果表明, 4 号样品在 100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围抑制了 Ana-1 细胞生长, 在测定这些样品促进 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 增殖的半数有效

浓度 (EC₅₀) 及抑制 PGE₂ 增殖的半数抑制浓度 (IC₅₀) 时剔除了这一浓度。

2.2 含不同挥发油/水提物的受试样品的细胞活性

图 1~图 5 分别为 6 类样品抑制 Ana-1 分泌 PGE₂ 的 IC₅₀、促进 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的 EC₅₀ 及促进软骨细胞增殖的 EC₅₀。

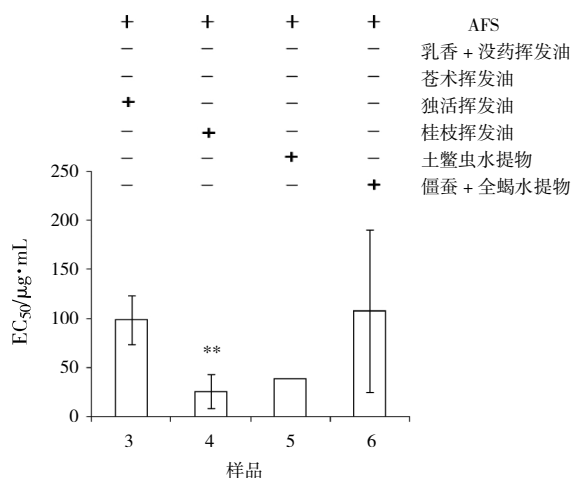


注: 与 1 号样品比较, ** $P < 0.01$; 与 2 号样品比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 5 号样品比较, $\equiv P < 0.01$; 与 6 号样品比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

图 1 各样品抑制 Ana-1 产生 PGE₂ 的半数抑制浓度

Figure 1 IC₅₀ of each sample for inhibiting the generation of PGE₂ in Ana-1 cells

由图 1 可知, 3 号和 4 号样品的 IC₅₀ 值比其他 4 个含腰痛宁活性部位样品的 IC₅₀ 低一个量级并有显著性差异, 表明生物碱 + 黄酮 + 皂苷和挥发油的有效部位组方中, 独活挥发油和桂枝挥发油抑制巨噬细胞产生 PGE₂ 的活性显著优于 4 个腰痛宁组方药材中的挥发油/水提物。该结果与独活、桂枝具有抗炎作用的研究报道相一致^[13-16]。

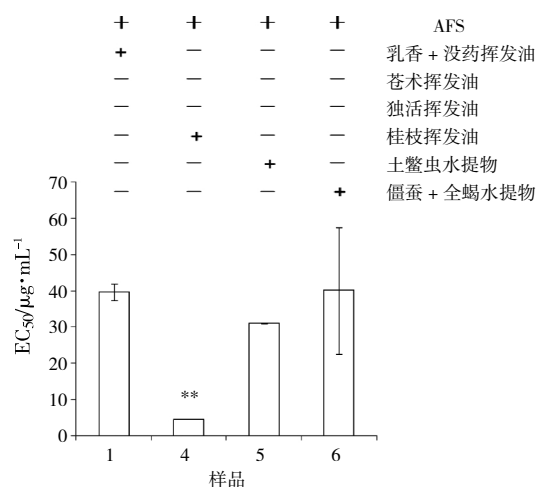


注: 与 3、6 号样品比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 各样品促进 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β 的半数有效浓度

Figure 2 EC₅₀ of each sample for promoting the generation of IL-1 β in Ana-1 cells

由图 2 可知, 在促进 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β 方面, 含有腰痛宁中乳香 + 没药挥发油的 1 号样品及苍术挥发油的 2 号样品无 EC₅₀, 说明这两类挥发油促进 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β 的作用远弱于桂枝、独活挥发油、土鳖虫水提液及僵蚕 + 全蝎水提液。桂枝挥发油为主的 4 号样品 EC₅₀ 在 4 个样品中最低并低于 3 号与 6 号样品一个量级, 与 3 号和 6 号样品比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。表明桂枝挥发油在 6 类挥发油 / 水提取物中促进 Ana-1 分泌 IL-1 β 的活性最佳。



注: 与 1, 5, 6 号样品比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 各样品促进 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的半数有效浓度

Figure 3 EC₅₀ of each sample for promoting the generation of IL-6 in Ana-1 cells

图 3 中含有苍术挥发油的 2 号样品与含有独活挥发油的 3 号样品无 EC₅₀ 值, 说明这两类挥发油与 A+F+S 结合时, 促进 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的作用较其他药材挥发油 / 水提液要弱。以桂枝挥发油为主的 4 号样品的 EC₅₀ 最低, 且低于其他 3 个样品的 EC₅₀ 一个量级, 与其他 3 个样品的 EC₅₀ 比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。说明在 6 类挥发油 / 水提取物有效部位中, 桂枝挥发油促进 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的活性最佳。

如图 4, 在促进 Ana-1 细胞分泌 TNF- α 过程中只有含土鳖虫水提取物的 5 号样品和含僵蚕 + 全蝎水提取物的 6 号样品存在 EC₅₀, 且其 EC₅₀ 的水平很低 ($< 25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 而其余 4 个含挥发油的样品不存在 EC₅₀。表明土鳖虫、全蝎 + 僵蚕水提液具有促进 Ana-1 细胞分泌 TNF- α 的显著优势, 这一结果在细胞层面上为中医采用虫类动物药增进机体抗肿瘤免疫活性提供了药理学依据。

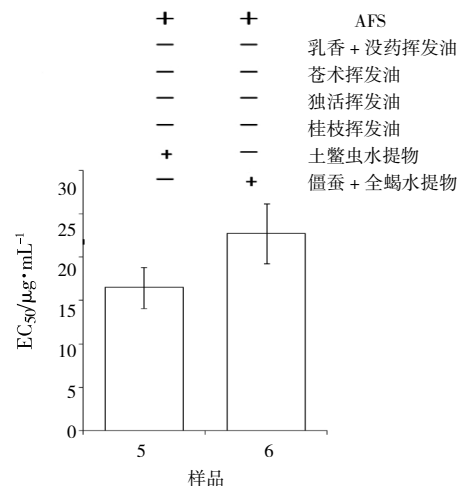


图 4 各样品促进 Ana-1 细胞分泌 TNF- α 的半数有效浓度

Figure 4 EC₅₀ of each sample for promoting the generation of TNF- α in Ana-1 cells

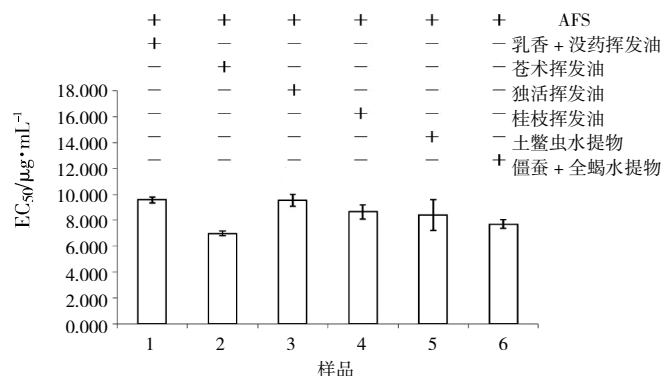


图 5 各样品促进软骨细胞增殖的半数有效浓度

Figure 5 EC₅₀ of each sample for promoting the proliferation of chondrocytes

由图 5 可知, 6 类样品促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的 EC₅₀ 在 7~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围波动, 无量级差异。说明 6 类挥发油 / 水提取物有效部位促进软骨细胞增殖的活性无明显差异。

研究^[17]表明, 桂枝挥发油作用在调节炎症免疫方面有显著作用, 而乳香、没药的挥发油会导致不良反应^[18]。根据上述结果, 采用桂枝挥发油替代腰痛宁胶囊中的乳香和没药挥发油, 可提高腰痛宁胶囊组方的安全性和抗炎、免疫活性。

3 讨论

本研究所建立的细胞模型中, 对于由马钱子、麻黄生物碱 + 甘草等 5 味药材和黄酮 + 甘草等 4 味药材皂苷以及桂枝等 8 味药材挥发油 / 水提取物组成的腰痛宁衍生方构成的有效部位组方而言, 桂枝挥发油为主的有效部位组方均表现出很好的抗炎、免疫及促进

软骨细胞增殖活性,表明桂枝挥发油是一个风湿骨病处方的优选有效部位。进一步可用桂枝挥发油替代腰痛宁处方药材中乳香没药挥发油,以提高其疗效和安全性。腰痛宁组方药材中土鳖虫、僵蚕、全蝎等 3 种虫类药材的水提液具有很好的促进 Anal-1 细胞分泌 TNF- α 肿瘤因子的活性并在抗炎、软骨细胞增殖及其他细胞免疫模型中均表现出较好的活性,也可作为风湿骨病处方的候选有效部位。

参考文献:

- [1] 刘维. 中西医结合风湿免疫病学[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2009: 191.
- [2] 张立国, 欧阳霄雯, 吴婷婷, 等. 腰痛宁胶囊药材活性部位不同组合对大鼠软骨细胞的影响[J]. 中国实验方剂学, 2014, 20(10): 151-155.
- [3] Li JN, Xiao LX, Li GZ, et al. Quantitative evaluation of the in vitro effect and interactions of active fractions in Yaotongning-based formulae on prostaglandin E₂ production [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 154(3): 807-817.
- [4] Li GZ, Xiao WOY, Ting TW, et al. Quantitative evaluation of in vitro effects and interactions of active fractions in a Chinese medicinal formula (Yaotongning Capsule) on rat chondrocytes [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 155(3): 1424-1432.
- [5] 倪力军, 郭燕子, 徐晓玲, 等. 腰痛宁对 Ana-1 细胞免疫功能的影响及其配伍过程的效果评价[J]. 中成药, 2014, 36 (11): 2252-2257.
- [6] 倪力军, 徐晓玲, 史万忠, 等. 腰痛宁胶囊中活性部位的不同组合对 PGE₂、IL-2、NO 细胞因子的影响及其相互作用[J]. 中草药, 2014, 45(23): 3424-3431.
- [7] 黄喜茹, 曹冬. 马钱子研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2005, 39 (1): 62-65.
- [8] 安晓晶, 王晓娜, 马成俊, 等. 红花和甘草黄酮的协同抗炎镇痛作用分析[J]. 西部中医药, 2012, 25(10): 20-22.
- [9] 卢克明, 袁丁, 张长城, 等. 皂苷抗炎活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1658-1660.
- [10] Zhang LG, Ouyang XW, Ni LJ, et al. Preparation and evaluation of the microcapsule containing volatile oil of Herba Schizonepetae by emulsion solvent diffusion method [J]. Transactions of Tianjin University, 2014, 20: 103-111.
- [11] Wang L, Zhou GB, Liu P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis an effective treatment for Promyelocytic leukemia[J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2008, 105: 4826-4831.
- [12] Wang QS, Cui YL, Dong TJ. Ethanol extract from a Chinese herbal formula, "Zuojin Pill", inhibit the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 mouse macrophages[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 141: 377-385.
- [13] 徐世军, 沈映君, 解宇环. 桂枝挥发油的抗炎作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 3: 186-189.
- [14] 徐世军, 沈映君, 金沈锐, 等. 桂枝挥发油对 LPS 致急性肺损伤大鼠模型蛋白酪氨酸激酶活性的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2007, 4: 28-30.
- [15] 宋京都, 王巍, 姚世霞, 等. 甘肃三种独活商品镇痛、抗炎作用研究[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(1): 33-34.
- [16] 范莉, 李林, 何慧凤. 独活挥发油抗炎、镇痛药理作用的研究[J]. 安徽医药, 2009, 13(2): 133-134.
- [17] 许利平. 桂枝抗炎免疫作用及其机理探讨[D]. 成都: 成都中医药大学, 1997.
- [18] 李亮, 屈彩琴, 周昆. 乳香没药的临床不良反应及其毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2009, 22(6): 495-496.

(编辑: 宋威)

附子人参有效组分配伍对阿霉素致慢性心衰大鼠血流动力学的影响及其机制研究

王楚盈, 李玉梅, 刘 畅, 李庆玲, 柏 迪, 李超英, 张大方(长春中医药大学, 吉林 长春 130117)

摘要: **目的** 观察附子人参有效组分不同比例配伍对阿霉素(ADR)诱导的慢性心力衰竭大鼠血流动力学的影响, 探讨其对心力衰竭的保护机制。 **方法** 采用腹腔注射 ADR 方法建立慢性心力衰竭大鼠模型。附子人参有效组分按 2:1, 1:1, 1:2 每天灌胃, 末次给药后, 用 16 导生理记录仪记录血流动力学指标; 称重法检测心肌肥厚指数; ELISA 法检测大鼠血浆血管紧张素 II (Ang II) 和血管紧张素 II 受体 1 (At₁) 含量; 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 法检测心肌组织中 At₁ mRNA 的表达。 **结果** 与模型组比较, 附子人参有效组分配伍各组均可明显改善 ADR 所致的慢性心衰大鼠的血流动力学异常; 附子人参 2:1 组可明显降低 ADR 诱导的慢性心衰大鼠心肌肥厚指数的异常升高; 也可显著改善慢性心衰大鼠血浆 Ang II 和 At₁ 的异常升高, 而且能显著升高心肌

收稿日期: 2014-06-15

作者简介: 王楚盈, 女, 讲师, 博士研究生。研究方向: 中药复方药效作用物质基础及机理研究。Email: chuying820713@126.com。通讯作者: 张大方, 教授, 博士生导师。研究方向: 中药复方药效作用物质基础及机理研究。Email: zdf0431@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81173597); 教育部博士点基金(20102227110002); 吉林省医药产业发展专项(YYZX201265)。