

以多糖为主要部位的6种腰痛宁衍生方对巨噬细胞中炎症因子表达及软骨细胞增殖的影响

张立国, 赵丽丽, 倪力军*, 程佳佳

华东理工大学 化学与分子工程学院, 上海 200237

摘要:目的 以腰痛宁胶囊组方药材有效部位为基础, 考察6种以多糖活性部位为主的腰痛宁衍生方的细胞药理活性, 为风湿骨病处方候选药物筛选提供依据。方法 分别以甘草多糖、苍术多糖、川牛膝多糖、麻黄多糖、淫羊藿多糖、桑寄生多糖为主要部位(组方中比例50%)组成6种腰痛宁衍生方, 酶联免疫方法测定脂多糖(LPS)诱导的Ana-1细胞中前列腺素E₂(PGE₂)及Ana-1细胞中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平, CCK8法检测软骨细胞增殖活性。采用半数抑制浓度(IC₅₀)及半数有效浓度(EC₅₀)评价各样品的活性, 通过比较各组方实验EC₅₀/IC₅₀与其理论叠加值的差异, 分析样品中活性部位间的相互作用。结果 6个腰痛宁衍生方中, 以桑寄生多糖或淫羊藿多糖为主的2个组方抑制LPS诱导的Ana-1细胞分泌PGE₂、促进Ana-1细胞分泌IL-6、IL-1 β 及TNF- α 及促进软骨细胞增殖的活性显著弱于腰痛宁全方, 其余由腰痛宁处方药材多糖为主的4个组方的相关活性优于腰痛宁全方或与腰痛宁全方相当, 无统计学差异。其中川牛膝多糖占50%的组方在抑制LPS诱导的Ana-1细胞分泌PGE₂、促进Ana-1细胞分泌IL-6、IL-1 β 及促进IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖方面均具有良好效果。结论 以川牛膝多糖为主的腰痛宁衍生方具有良好的细胞抗炎、免疫调节和促进软骨细胞增殖活性, 可作为风湿骨病处方中多糖的优选部位。

关键词: 风湿骨病; 腰痛宁胶囊; 多糖; 前列腺素E₂; 白细胞介素-6; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α ; 软骨细胞增殖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)24-3710-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.017

Effect of six polysaccharides in formulas derived from Yaotongning on expression of inflammatory cytokines in macrophages and proliferation of chondrocyte

ZHANG Li-guo, ZHAO Li-li, NI Li-jun, CHENG Jia-jia

School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Objective On the basis of formulas derived from Yaotongning (YTN) Capsules to compare the different cellular pharmacological activity of six kinds of Chinese materia medica (CMM) polysaccharides, thus to supply the evidence for the screening of candidate medicines for rheumatoid bone diseases. **Methods** Six samples were designed by respectively adding the polysaccharides of *Glycyrrhizae Radix*, *Atractylodis Rhizoma*, *Cyathulae Radix*, *Ephedrae Herba*, *Epimedii Herba*, and *Taxilli Herba*, at 50% into the six mixtures based on the derived formula of YTN. Murine macrophage cells and chondrocytes were exposed to the new recipes, and then the half-inhibitive concentration (IC₅₀) and half-effective concentration (EC₅₀) were applied to evaluating their activity for inhibiting secretion of PGE₂ in Ana-1 cells induced by LPS and activities for stimulating the production of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in Ana-1 cells as well as activity for promoting IL-1 β -induced proliferation of chondrocytes by enzyme linked immunosorbent assay. The interactions among the active fractions were evaluated by comparing the experimental EC₅₀/IC₅₀ values to their corresponding additive EC₅₀/IC₅₀ values, which were calculated by the least square method. **Results** Among the six formulas derived from YTN, except for one of the two formulas mainly consisted by polysaccharides of *Taxilli Herba* or *Epimedii Herba*, whose activities for inhibiting the production of PGE₂ in Ana-1 cells induced by LPS, promoting the secretion of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in Ana-1 cells, and stimulating the secretion of chondrocytes induced by IL-1 β were significantly weaker than those of YTN. The activities of other four formulas which were respectively consisted by 50% one of polysaccharides from YTN material medicines

收稿日期: 2015-07-14

作者简介: 张立国(1963—), 男, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药研发、中药物质基础与药效关系的研究。

Tel/Fax: (021)64253045 E-mail: zlgfyt@163.com

*通信作者 倪力军 Tel: (021)64253045 E-mail: nljfyf@sina.com

were better than those of YTN or statistically equivalent to YTN. The sample mainly composed of polysaccharides of *Cyathulae Radix* worked well on inhibiting the production of PGE₂ in Ana-1 cells induced by LPS, promoting the secretion of IL-6, IL-1 β in macrophages, and stimulating the secretion of chondrocytes. **Conclusion** The polysaccharides of *Cyathulae Radix* have the good effect on cellular anti-inflammation, immune regulation, and chondrocytes proliferation. It can be a candidate for the active fraction of polysaccharides in the prescription of rheumatoid disease.

Key words: rheumatism; Yaotongning Capsules; polysaccharides; PGE₂; IL-6; IL-1 β ; TNF- α ; proliferation of chondrocyte

《素问·痹论》曰“风寒湿三气杂至，合而为痹也”。中医认为风湿骨病的发生主要与正虚、邪侵及痰浊瘀血有关，病机是邪气痹阻经络、筋骨，留着关节，营卫不通，气血运行受阻。轻者，肢体、关节等处酸楚、疼痛；重者则疼痛、酸楚显著，并因反复发作，日久不愈，气血运行不畅，酿成痰浊瘀血，阻痹经络。中医对本病的治疗注重健脾化痰、祛湿除寒、活血通络。西医认为这类疾病与免疫功能紊乱、低下，炎症及骨细胞损失有关。现代医学对该类疾病的通行治则是抗炎、增强免疫功能、促进骨细胞修复和增殖。

腰痛宁胶囊为治疗风湿骨病的大品种中药，用于主治寒湿痹阻导致的腰腿痛、腰肌劳损、腐蚀性关节炎及腰椎间盘突出等疾病^[1]。腰痛宁胶囊根据中药“君臣佐使”的配伍原则，以具有镇痛抗炎功能的制马钱子为君药，麻黄、苍术作为佐药助马钱子祛风胜湿止痛；乳香、没药、土鳖虫、全蝎、僵蚕具有活血通络的作用，散瘀血止痛辅以为臣；川牛膝引药下行作为使药；甘草调和诸药使各药材发挥最大的功效。以上诸药合理配伍，君臣佐使有序，具有散瘀止痛、温经通络、消肿化痰、治疗风湿寒湿痹阻和血瘀气滞之功效。本课题组前期基于腰痛宁有效部位组方的细胞药理学研究表明，腰痛宁全方具有良好的细胞抗炎、免疫调节、活血和促进骨关节细胞修复等药理活性^[2-5]。

目前关于腰痛宁胶囊对风湿关节炎及风湿骨病的研究主要集中于临床评价及毒理、药理研究^[6-10]。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、不同提取物的组合进行，缺乏同类药物（药材、有效部位）间的相互比较，难以评估同类有效部位的药理活性，不利于评价和筛选优化中药处方。本课题组从治疗风湿骨病的中药处方中筛选出使用频率较高的骨碎补、桂枝、三七、红花、人参、独活、淫羊藿、桑寄生^[11]等8味药材，提取其生物碱、皂苷、黄酮、挥发油、多糖等有效

部位，按照腰痛宁组方原则与组合化学思想构建了27个中药有效部位组方，比较各组方的细胞抗炎^[12]、促进软骨细胞增殖^[13]及免疫调节的活性^[14]，以发现优化的有效部位组合作为风湿骨病候选处方。限于篇幅，已有报道^[12-14]中未能对同类有效部位（如多糖）的综合细胞药理活性及有效部位间的相互作用进行分析，本实验以腰痛宁衍生方（腰痛宁组方药材及上述8味药材的生物碱+黄酮+皂苷+挥发油/水提物的等比例混合物）为基础构建了分别由甘草、苍术、川牛膝、麻黄4个腰痛宁处方药材多糖及来自风湿骨病处方常用药材淫羊藿和桑寄生多糖为主的中药有效部位组方，通过比较这些样品与腰痛宁全方的细胞抗炎、免疫调节活性和促软骨细胞增殖活性，在细胞层面考察不同多糖有效部位的活性差异及腰痛宁处方的比较优势，探究何种多糖有效部位在风湿骨病复方中有较优的药理作用，为研发风湿骨病中药有效部位处方提供基础。

1 材料

1.1 动物

健康清洁级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，许可证号SCXK（沪）2008-0016。

1.2 细胞株

正常小鼠腹腔巨噬细胞（Ana-1细胞）株，购自中国科学院上海生物细胞所。

1.3 药材

本实验以腰痛宁组方中的10味药材及其药引黄酒，以及从治疗风湿骨病的中药处方中筛选出使用频率较高的骨碎补、桂枝、三七、红花、人参、独活、淫羊藿、桑寄生8味药材为组方来源药材，以上药材均由颈复康药业集团有限公司提供，经该公司执业药师王春民鉴定为正品，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。各药材的活性部位均为自制，具体药材及各活性部位信息见表1。

表1 19种药材中各活性部位的制备方法

Table 1 Preparation methods of active fractions extracted from 19 kinds of material medicines

药材	批号	活性部位	活性部位在提取物中的量	提取方法
*马钱子 <i>Strychnos nux-vomica</i>	Y302-09091-10	马钱子生物碱	0.89 g·g ⁻¹ [15]	乙醇加热回流+氯仿萃取 ^[12,16]
*麻黄 <i>Ephedra sinica</i>	Y412-100601-12	麻黄生物碱	0.50 g·g ⁻¹ [17]	乙醇加热回流+氯仿萃取 ^[12]
		麻黄多糖	0.35 g·g ⁻¹ [18]	水煮醇沉法 ^[18]
*甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Y013-110301-1	甘草黄酮	0.45 g·g ⁻¹ [12,19]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[12,19]
		甘草皂苷	0.78 g·g ⁻¹ [20-21]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[11-12]
		甘草多糖	0.33 g·g ⁻¹ [18]	水煮醇沉法 ^[18]
*川牛膝 <i>Cyathula officinalis</i>	Y012-110401-1	川牛膝多糖	0.96 g·g ⁻¹ [18]	水煮醇沉法 ^[18]
		川牛膝皂苷	0.16 g·g ⁻¹ [11-12]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[11-12]
*苍术 <i>Atractylodes lancea</i>	Y002-101001-2	苍术多糖	0.63 g·g ⁻¹ [18]	水煮醇沉法 ^[18]
		苍术挥发油	1 mL·mL ⁻¹	提取-精馏耦合 ^[22]
*乳香 <i>Boswellia sacra</i>	110301-2	乳香挥发油	1 mL·mL ⁻¹	水蒸气蒸馏
*没药 <i>Commiphora myrrha</i>	110401-1	没药挥发油	1 mL·mL ⁻¹	水蒸气蒸馏
*全蝎 <i>Buthus martensii</i>	Y804-11302-4	全蝎水提液	0.1 g·mL ⁻¹	超声水提法 ^[12]
*土鳖虫 <i>Eupolyphaga sinensis</i>	Y803-110101-5	土鳖虫水提液	0.1 g·mL ⁻¹	超声水提法 ^[12]
*僵蚕 <i>Bombyx Batryticatus</i>	Y805-1011054	僵蚕水提液	0.1 g·mL ⁻¹	超声水提法 ^[12]
三七 <i>Panax notoginseng</i>	Y806-11508-7	三七皂苷	0.85 g·g ⁻¹ [12,21]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[11-12]
桑寄生 <i>Taxillus chinensis</i>	Y807-11609-9	桑寄生黄酮	0.01 g·g ⁻¹ [12,19]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[12,19]
		桑寄生多糖	0.38 g·g ⁻¹ [18]	水煮醇沉法 ^[18]
独活 <i>Angelica pubescens</i>	Y808-11909-4	独活挥发油	1 mL·mL ⁻¹	提取-精馏耦合 ^[22]
红花 <i>Carthamus tinctorius</i>	Y809-11401-6	红花黄酮	0.41 g·g ⁻¹ [12,19]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[12,19]
骨碎补 <i>Davallia mariesii</i>	Y810-11907-1	骨碎补黄酮	0.41 g·g ⁻¹ [12,19]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[12,19]
人参 <i>Panax ginseng</i>	Y811-11706-2	人参皂苷	0.89 g·g ⁻¹ [12,21]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[11-12]
淫羊藿 <i>Epimedium sagittatum</i>	Y812-11808-3	淫羊藿黄酮	0.20 g·g ⁻¹ [12,19]	乙醇加热回流+大孔树脂纯化 ^[12,19]
		淫羊藿多糖	0.24 g·g ⁻¹ [18]	水煮醇沉法 ^[18]
桂枝 <i>Cinnamomum cassia</i>	Y813-11301-3	桂枝挥发油	1 mL·mL ⁻¹	提取-精馏耦合 ^[22]
黄酒	291110	黄酒多糖		旋转蒸发

*为腰痛宁处方药材

*material medicines in YTN

1.4 试剂

DMEM 培养基 (北京清大天一科技有限公司); 聚山梨酯-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); 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、前列腺素 E₂ (PGE₂) 酶联免疫试剂盒 (R&D); CCK-8 试剂盒 (东仁化学科技有限公司); 脂多糖 (LPS, Sigma 公司); 花生四烯酸 (AA, Sigma 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, Medicago AB); 0.25% 胰酶、两性霉素、链霉素-青霉素 (Biowest); 刀豆蛋白 A (ConA, Sigma 公司)。

1.5 仪器

ML104 分析天平 (德国 METTER TOLEDO 公司); GL-88B 漩涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 680 多功能酶标仪 (Bio-Rad 公司); S10-3 恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器有限公司);

DS-3510DTH 超声仪 (上海生析超声仪器有限公司); NU4850-E CO₂ 培养箱 (NUAIRE 公司); TS100-F 荧光倒置显微镜 (NIKON 公司); TXZ-92B 台式恒温振荡器 (上海贺德实验设备厂); XX 超净台 (Air Tech 公司); SS-325 电脑控制消毒柜 (TOMY 公司); CLASS II 生物安全柜 (LABCONCO 公司)。

2 方法

2.1 6种以不同多糖为主要部位的腰痛宁衍生方样品的制备

将各有效部位按照表2所示质量百分比配制6种腰痛宁衍生方及腰痛宁全方共7个样品。其中1~4号样品所含的川牛膝多糖、甘草多糖、苍术多糖、麻黄多糖分别是腰痛宁胶囊组方药材中的有效部位。5~6号样品所含的桑寄生多糖、淫羊藿多糖则为所选8味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 搅拌初

表2 腰痛宁及其衍生方有效部位组成及比例

Table 2 Composition and proportion of active fractions from YTN Capsules and its derivative formulas

样品编号	样品组成
1	12.5%A+12.5%F+12.5%S+12.5%V+50%川牛膝多糖
2	12.5%A+12.5%F+12.5%S+12.5%V+50%甘草多糖
3	12.5%A+12.5%F+12.5%S+12.5%V+50%苍术多糖
4	12.5%A+12.5%F+12.5%S+12.5%V+50%麻黄多糖
5	12.5%A+12.5%F+12.5%S+12.5%V+50%淫羊藿多糖
6	12.5%A+12.5%F+12.5%S+12.5%V+50%桑寄生多糖
7	腰痛宁全方(含黄酒药引)

A(总生物碱)=50%麻黄生物碱+50%马钱子生物碱; F(总黄酮)=20%甘草黄酮+20%淫羊藿黄酮+20%桑寄生黄酮+20%红花黄酮+20%骨碎补黄酮; S(总皂苷)=25%甘草皂苷+25%三七皂苷+25%人参皂苷+25%川牛膝皂苷; V(总挥发油/水提物)=16.67%桂枝挥发油+16.67%独活挥发油+16.67%(乳香、没药)挥发油+16.67%苍术挥发油+16.67%(全蝎、僵蚕)水提物+16.67%土鳖虫水提物

A (total alkaloids) = alkaloids of *Ephedra sinica* and *Strychnos nux-vomica* mixed in equal ratio; F (total flavonoids) = flavonoids of *Glycyrrhiza uralensis*, *Epimedium sagittatum*, *Taxillus chinensis*, *Carthamus tinctorius* and *Davallia mariesii* mixed in equal ratio;

S (total saponins) = saponins of *Glycyrrhiza uralensis*, *Panax notoginseng*, *Panax ginseng* and *Cyathula officinalis* mixed in equal ratio; V (volatile oils/aqueous extracts) = volatile oils/aqueous extracts of *Cinnamomum cassia*, *Angelica pubescens*, *Boswellia sacra/Commiphora myrrha*, *Attractylodes lancea*, and *Eupolyphaga sinensis* mixed in equal ratio

步溶解,沸水浴加热 10 min,待其完全溶解后按表 2 方案混合,一并超声 20 min,冷却,定容,配成 2 500 mg/L 母液,0.22 μm 滤膜滤过并稀释至质量浓度为 400、200、100、50、25、12.5、6.25 与 3.125 mg/L,备用。其中 7 号样品中各有效部位按照腰痛宁胶囊原料药材的比例进行混合^[4],并加入黄酒浓缩物。

2.2 对 Ana-1 细胞增殖及 LPS 诱导的 Ana-1 细胞上清液中 PGE₂ 水平的影响

Ana-1 细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下,用含 10% 小牛血清、青霉素 (1×10⁵ U/L) 及链霉素 (100 mg/L) 的 DMEM 培养液进行传代培养,实验用细胞均处于对数生长期。参照文献方法^[23]将密度为 4 000 个/孔的 Ana-1 细胞接种于 96 孔培养板中,设空白对照组、LPS 处理组及待测药物组 (400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 mg/L)。细胞先于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2 h,除空白对照组外,其余各组细胞加入 LPS (终质量浓度为 1 mg/L) 培养 9 h;弃去旧培养液,用新鲜培养液洗

涤 3 次,待测药物组分别加入各质量浓度的待测药物孵育 30 min,加入底物 AA(终浓度为 10 μmol/L),37 °C 孵育 20 min,收集上清液。细胞上清液中 PGE₂ 的测定按照 PGE₂ 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒使用说明进行,每组重复 3 次,计算各待测药物对 PGE₂ 的 IC₅₀ 值。同时,按照 CCK8 试剂盒使用说明,每个孔加入 100 μL CCK8 试剂,用多功能酶标仪于 450 nm 处检测吸光度 (A) 值。

2.3 对 Ana-1 细胞增殖及上清液中 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平的影响

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 2×10⁶ 个/mL 细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL;各待测药物组每孔加药体积 100 μL,对照组每孔加入 100 μL 不含小牛血清的 DMEM 培养液;37 °C、5% CO₂ 培养 48 h。48 h 后,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 A 值。取 Ana-1 细胞上清液,用酶联免疫方法测定各组细胞上清液中 IL-6、IL-1β、TNF-α 的水平。

2.4 对 IL-1β 诱导的软骨细胞增殖的影响

SD 大鼠脱颈处死,浸泡于 95% 乙醇中数分钟,取出后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 °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。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 1×10⁷ 个/L,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 后把培养孔分为对照组、IL-1β 组、各待测药物组,每组 3 个复孔,分别更换培养液:对照组更换含 5% FBS 的 DMEM 培养液;模型组更换含 10 μg/L IL-1β 及 5% FBS 的 DMEM 培养液;各待测药物组更换含 10 μg/L IL-1β、5% FBS 及各质量浓度药物的 DMEM 培养液,培养 48 h 后,去除培养基,加入 100 μL CCK8 试剂,用多功能酶标仪在 450 nm 处测定 A 值。

2.5 数据处理

各有效部位对检测指标的 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^[6-9,17-18],实验值以 EC₅₀±SD 或 IC₅₀±SD (SD 为实验值的标准方差)表示,并采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析。按文献方法^[4]将组方中各

活性部位间的相互作用分为 3 种形式：叠加作用、拮抗作用、协同作用。

3 结果

3.1 对 Ana-1 细胞活力的影响

7 个样品对 Ana-1 细胞活力影响的测定结果表明，1、2、4、6 号样品在 400 mg/L 以及 3 号样品在 200~400 mg/L 抑制了 Ana-1 细胞的生长，在测定这些样品促进 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 分泌的 EC₅₀ 及抑制 PGE₂ 分泌的 IC₅₀ 时剔除了相应质量浓度。

3.2 对 LPS 诱导的 Ana-1 细胞分泌 PGE₂ 的影响

由图 1 可知，对 LPS 诱导的 Ana-1 细胞产生 PGE₂ 的影响中，除以淫羊藿多糖为主的 5 号样品中的有效部位间产生了拮抗作用外，其余 5 个分别以川牛膝多糖、甘草多糖、苍术多糖、麻黄多糖、桑寄生多糖为主的腰痛宁衍生方 1~4、6 号样品及腰痛宁全方 7 号样品中的有效部位之间均为叠加或协同作用，且这些样品的 IC₅₀ 值无显著性差异；5 号样品的 IC₅₀ 值显著高于其他样品的 IC₅₀ 值。

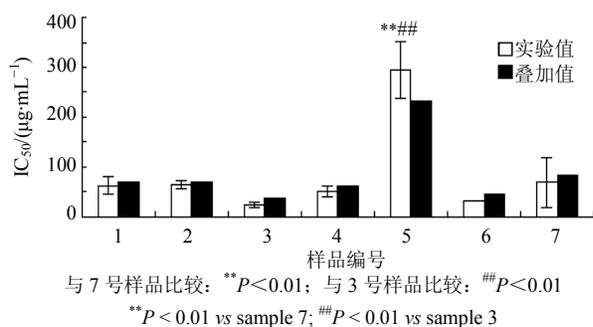


图 1 不同样品对 Ana-1 细胞分泌 PGE₂ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of various samples on secretion of PGE₂ in Ana-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 对 Ana-1 细胞分泌 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的影响

在促进 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的实验中，在本研究确定的质量浓度范围内分别以苍术多糖、麻黄多糖为主的 3、4 样品对 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的促进率均未达到 50%，没有得到 EC₅₀ 值；分别以淫羊藿多糖和桑寄生多糖为主的 5、6 样品促进 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的 EC₅₀ 值显著高于其他样品，分别以川牛膝多糖、甘草多糖为主的 1、2 及腰痛宁全方 7 样品促进 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的 EC₅₀ 值之间无显著性差异。除腰痛宁全方中的有效部位间产生协同作用外，1、2、5、6 样品中的有效部位之间为叠加作用。结果见图 2。

在促进 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β 的实验中，在本研究确定的质量浓度范围内分别以甘草多糖、

苍术多糖、麻黄多糖为主的 2~4 样品对 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β 的促进率均未达到 50%，没有得到 EC₅₀ 值；分别以淫羊藿多糖、桑寄生多糖为主的 5、6 样品中的有效部位间分别存在拮抗、叠加作用，且二者的 EC₅₀ 显著高于以川牛膝多糖为主的 1 号及腰痛宁全方 7 号的 EC₅₀。结果见图 3。

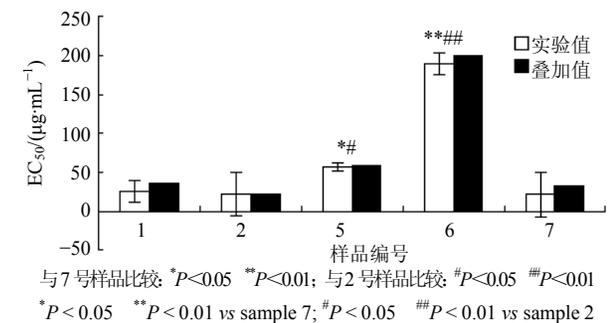


图 2 不同样品对 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of samples on secretion of IL-6 in Ana-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

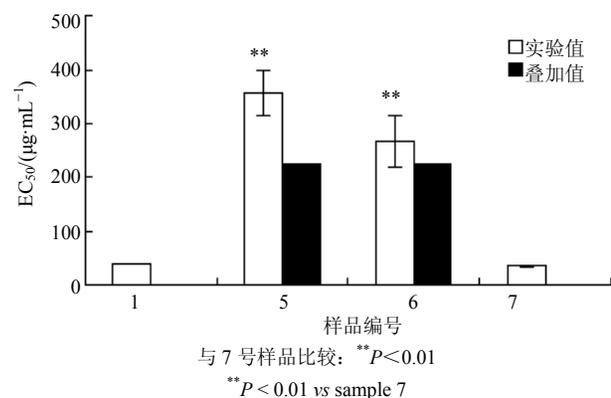


图 3 不同样品对 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of various samples on secretion of IL-1 β in Ana-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

在促进 Ana-1 细胞分泌 TNF- α 的实验中，在本研究确定的质量浓度范围内分别以川牛膝多糖、甘草多糖、苍术多糖、麻黄多糖为主的 1~4 号样品对 Ana-1 细胞分泌 TNF- α 的促进率均未达到 50%，没有得到 EC₅₀ 值；以淫羊藿多糖为主的 5 号样品与腰痛宁全方中的有效部位间存在协同作用，以桑寄生多糖为主的 6 号样品中的有效部位间产生叠加作用，其促进 Ana-1 细胞分泌 TNF- α 的 EC₅₀ 显著高于 5 号样品与腰痛宁全方。结果见图 4。

3.4 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的影响

图 5 表明腰痛宁全方及 6 个以不同多糖为主的腰痛宁衍生方均具有良好的促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖作用。部分样品的 EC₅₀ 虽有统计学差异，但均在同一量级范围内小幅波动。

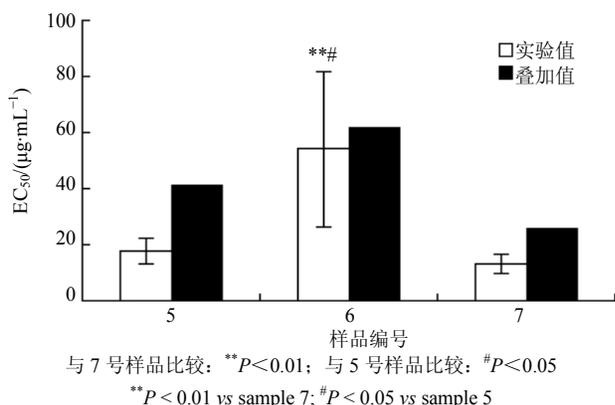


图4 不同样品对Ana-1细胞分泌TNF-α的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of various samples on secretion of TNF-α in Ana-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

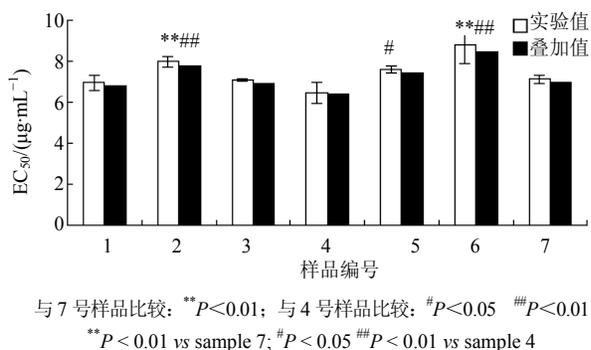


图5 不同样品对IL-1β诱导的软骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of various samples on proliferative activity of chondrocytes induced by IL-1β ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本实验通过考察分别以一种药材多糖为主(组方中多糖比例50%)的6个腰痛宁衍生方的相关细胞药理活性,比较川牛膝多糖、苍术多糖、甘草多糖、麻黄多糖、淫羊藿多糖、桑寄生多糖的抗炎及促进软骨细胞增殖的活性,筛选风湿骨病中药组方中多糖的优选部位。本实验结果表明,分别以川牛膝多糖、甘草多糖、苍术多糖、麻黄多糖、桑寄生多糖为主的组方均表现出很好的抑制LPS诱导的Ana-1细胞分泌PGE₂因子的活性,显著优于以淫羊藿多糖为主的5号样品,提示5号样品中各有效部位间的拮抗作用导致其细胞抗炎活性显著弱于产生协同或叠加作用的其他组方。分别以川牛膝多糖和甘草多糖为主的组方(1、2号样品)促进Ana-1细胞分泌IL-6因子的活性显著优于由其他多糖组成的组方;以川牛膝多糖为主的组方促进Ana-1细胞分泌IL-1β的活性显著优于由其他多糖组成的组

方;以淫羊藿多糖为主的组方促进Ana-1细胞分泌TNF-α的活性显著优于由其他多糖组成的组方。

综合评价实验结果,以川牛膝多糖为主的组方(1号样品)具有良好的细胞抗炎、免疫调节及促进骨细胞修复等活性,同时考察了腰痛宁衍生方与腰痛宁全方在细胞抗炎、免疫调节及促进骨细胞增殖活性方面的差异,结果表明1号样品作用强度与腰痛宁全方相当,并无统计学差异,提示川牛膝多糖可作为腰痛宁衍生方中的多糖优选部位。

参考文献

- [1] 倪力军, 张强祖, 朱立中, 等. 腰痛宁胶囊治疗腰腿痛、腰肌劳损和风湿性关节炎临床研究的 meta 分析 [J]. 中成药, 2012, 34(9): 1653-1660.
- [2] 倪力军, 郭燕子, 徐晓玲, 等. 腰痛宁胶囊及其拆方对 Ana-1 细胞免疫功能的影响 [J]. 中成药, 2014, 11(36): 2251-2257.
- [3] 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]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 155-159.
- [4] 倪力军, 徐晓玲, 张立国, 等. 腰痛宁胶囊中活性部位的不同组合对 PGE₂、IL-2 及 NO 产生的影响及其相互作用 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3424-3431.
- [5] 张立国, 赵丽丽, 倪力军, 等. 腰痛宁胶囊有效部位组合对 IL-1β 诱导大鼠滑膜细胞增殖及 IL-6 的影响 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(9): 813-817.
- [6] 刘勇, 刘振义, 王素芳. 腰痛宁胶囊治疗类风湿性关节炎活动期临床研究 [J]. 中医杂志, 2011, 52(S1): 64-65.
- [7] 邢淑芳, 李树霞, 丁静, 等. 腰痛宁胶囊治疗腰椎间盘突出症的疗效观察 [J]. 中国药房, 2011(48): 4556-4557.
- [8] 李兰芳, 李国风, 解丽君, 等. 腰痛宁胶囊的毒理学研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11): 1102-1106.
- [9] 李晨光, 侯莉娟, 王拥军. 腰痛宁对腰椎间盘突出模型大鼠比目鱼肌 BDNF 和 NT-3 蛋白表达的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(4): 8-10.
- [10] 徐阳平, 杨功旭, 李胜利, 等. 腰痛宁胶囊治疗腰肌纤维炎多中心临床试验研究 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2764-2767.
- [11] 方聪颖. 腰痛宁胶囊组方及三七、人参中皂苷的制备、分析与活性评价 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [12] Ni L J, Xu X L, Zhang L G, et al. Quantitative evaluation of the in vitro effect and interactions of active fractions in Yaotongning-based formulae on prostaglandin E₂ production [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 807-817.

- [13] Zhang L G, Ouyang X W, Wu T T, *et al.* Quantitative evaluation of *in vitro* effects and interactions of active fractions in a Chinese medicinal formula formula (Yaotongning Capsule) on rat chondrocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(3): 1424-1432.
- [14] 郭燕子. 以腰痛宁组方原则与活性部位为基础的系列中药复方对 Ana-1 巨噬细胞免疫活性的分析与系统评价 [D]. 上海: 华东理工大学, 2014.
- [15] Ni L J, Zhao W W, Zhang L G, *et al.* Microstructure, content and *in vitro* release of brucine and strychnine of *Strychnos nux-vomica* powder with different particle sizes [J]. *Transact Tianjin Univ*, 2014, 20(6): 444-450.
- [16] 倪力军, 盖群, 张立国, 等. 不同粒径马钱子粉中马钱子碱、土的宁的含量分析与比较 [J]. 华东理工大学学报, 2012, 38(2): 195-199.
- [17] 吴婷婷. 风湿痹病候选复方祛风四味方的质量分析及其体内药效学评价 [D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [18] 倪力军, 王媛媛, 何婉英, 等. 八种多糖的单糖组成、活性测定及其相关性分析 [J]. 天津大学学报, 2014, 47(4): 326-330.
- [19] 张强组. 中药材黄酮的大孔吸附树脂分离工艺研究及其生产线设计 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [20] 张立国, 闫志慧, 陈露, 等. 粒径对甘草粉末中甘草酸、甘草苷的影响 [J]. 中草药, 2013, (23): 3328-3333.
- [21] Zhang L G, Fang C Y, Ouyang X W, *et al.* Simultaneous determination of saponins in *Radix Glycyrrhizae*, *Notoginseng* and *Ginseng* by high performance liquid chromatography [J]. *Transact Tianjin Univ*, 2013, 19(6): 430-435.
- [22] Zhang L G, Zhang C, Ni L J, *et al.* Rectification extraction of Chinese herbs' volatile oils and comparison with conventional steam distillation [J]. *Separat Purificat Technol*, 2011, 77: 261-268.
- [23] 陈美珺, 梁统, 周克元. 原花青素对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞 COX-2 酶活性、mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. 药学报, 2005, 40(5): 406-409.