

腰痛宁胶囊活性部位组合对 PGE₂、IL-2、NO 细胞因子的影响及其相互作用

倪力军¹, 徐晓玲¹, 史万忠², 张立国^{1*}

1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237

2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021

摘要: **目的** 评价腰痛宁胶囊中不同活性部位组合的抗炎、免疫及活血活性, 以及活性部位间的相互作用。**方法** 按照腰痛宁组方原则、组合化学思想及各活性部位在腰痛宁中的重要性, 在马钱子与麻黄总生物碱基础上依次加入腰痛宁组方药材的总黄酮、总皂苷、挥发油和多糖等活性部位, 得到由不同活性部位混合组成腰痛宁拆方、组方及全方共计 6 个样品。运用脂多糖 (LPS) 诱导 Ana-1 细胞释放前列腺素 E₂ (PGE₂) 模型, 有丝分裂原 (ConA) 诱导脾淋巴细胞产生白细胞介素-2 (IL-2) 模型及刺激人脐静脉内皮细胞释放 NO 模型, 测定各样品抑制 PGE₂ 产生的半数抑制浓度 (IC₅₀), 促进 IL-2 和 NO 分泌的半数有效浓度 (EC₅₀); 同时采用最小二乘优化方法, 计算各样品的 IC₅₀/EC₅₀ 叠加值, 将其与 IC₅₀/EC₅₀ 实验值进行比较, 分析不同模型下各活性部位间的相互作用类型。**结果** 6 个样品均有抑制 PGE₂ 产生及促进 IL-2 分泌的活性, 但只有由总生物碱、总黄酮和总皂苷组成的样品 III 有刺激人脐静脉内皮细胞释放 NO 的 EC₅₀, 且样品 III 在以 PGE₂、IL-2 及 NO 为指标的抗炎、免疫及活血模型中均表现出优于其他样品的活性, 不同的活性部位组合在这 3 个模型下产生的相互作用类型不同。只有样品 III 中的总生物碱、总黄酮及总皂苷 3 个活性部位在 3 个模型下均存在协同增效作用。**结论** 腰痛宁拆方、组方及全方样品对 Ana-1 细胞中 PGE₂ 的产生均表现出良好的抑制作用、对小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 也表现出良好的促进作用, 显示出腰痛宁处方的合理性、科学性及优良的抗炎和免疫活性。腰痛宁中总生物碱、总黄酮与总皂苷间的协同增效作用使腰痛宁拆方样品 III 在抗炎、免疫与活血方面的活性均优于其他样品, 表明腰痛宁组方具有优化空间。可望以样品 III 为基础精简腰痛宁组方, 开发高效、质量易控的治疗风湿痹病新药。

关键词: 腰痛宁胶囊; 活性部位; 前列腺素 E₂; 白细胞介素-2; NO; 相互作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)23-3424-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.013

Effect of active fractions in Yaotongning Capsule on prostaglandin E₂, interleukin-2, and nitrogen monoxide production and their interactions

NI Li-jun¹, XU Xiao-ling¹, SHI Wan-zhong², ZHANG Li-guo¹

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

2. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

Abstract: Objective To evaluate the *in vitro* effects of different combinations of the active fractions in Yaotongning Capsule (YTNC) on anti-inflammation, immunity, and activating blood circulation, and the interactions among these active fractions. **Methods** Six samples were prepared by adding flavonoids, saponins, volatile oils/aqueous extracts, and polysaccharides, which were extracted from the material medicines in YTNC, to the alkaloids of *Strychnos nux-vomica* (Ma Qian Zi) and *Ephedra sinica* (Ma Huang) in turn according to the formulating principle of YTNC, combination chemistry concept, and their importance in the formula. The effects of the six samples on the production of lipopolysaccharide (LPS)-induced prostaglandin E₂ (PGE₂) in Ana-1 cells, concanavalin (ConA)-induced interleukin-2 (IL-2) in splenocyte, and nitrogen monoxide (NO) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were explored by detecting their half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) or half-maximal effective concentration (EC₅₀). An innovative method based on least square optimization was applied to calculate the additive IC₅₀/EC₅₀ value of each sample. The interactions of the active fractions in these samples were investigated by comparing the additive IC₅₀/EC₅₀ values with the corresponding experimental

收稿日期: 2014-03-08

基金项目: 上海市科技支撑项目 (13401901100)

作者简介: 倪力军 (1963—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事天然产物质量分析与控制, 中药物质基础与药效关系的研究与中药新药研发, 化学计量学方法及近红外技术的应用研究。Tel/Fax: (021)64253045 E-mail: nljfyt@163.com

*通信作者 张立国 Tel: (021)64253045 E-mail: zlgfyt@sina.com

IC₅₀/EC₅₀ values. **Results** All the six samples could inhibit the production of PGE₂ and promote the secretion of IL-2 in the investigated concentration range. Only sample III consisting of the alkaloids, flavonoids, and saponins from YTNC had the EC₅₀ value of promoting NO production. Moreover, the sample also displayed excellent activities in the three models of LPS-induced PGE₂ production, ConA-induced IL-2 production, and NO production, which could reflect the capability of anti-inflammation, enhancing the body's immunity, and activating blood circulation, respectively. Different combination of the active fractions from YTNC produced the different interaction types in the three models. And the active fractions in sample III, i.e., the alkaloids, flavonoids, and saponins from YTNC, generated high synergistic effects in all the three models. **Conclusion** All the six samples derived from the different combination of the active fractions from YTNC show the good activity of inhibiting PGE₂ production and promoting IL-2 secretion. Therefore, the YTNC formula is reasonable and has good activity of anti-inflammation and immunity. However, the YTNC formula still could be improved by reducing the categories of its active fractions because the combination of the alkaloids, flavonoids, and saponins exerted better activities than the other samples and the three kinds of active fractions produced an excellent synergistic effect in all the three models. Synthetically evaluating various activities of YTNC in the present work may lead to develop new Chinese materia medica for rheumatic arthralgia treatment, which is more effective and easily controllable in quality.

Key words: Yaotongning Capsule; active fractions; prostaglandin E₂; interleukin-2; nitrogen monoxide; interactions

风湿性疾病是一种以侵犯关节、骨骼、肌肉及有关软组织为主的慢性反复发作疾病,属于中医学“痹证”、“历节”等范畴。《素问·痹论》曰:“风寒湿三气杂至,合而为痹也”^[1]。腰痛宁胶囊作为治疗风湿痹病的复方中药,以马钱子为君药,并与具有活血化瘀、抗炎镇痛、增强免疫等功效的麻黄、甘草、苍术、乳香、没药、川牛膝及土鳖虫、全蝎、僵蚕这 9 味药材,按照一定比例打粉制成胶囊,伴以黄酒吞服;具有祛寒止痛、通经活络、消肿化瘀等功效^[2]。腰痛宁复方中的多药材及多成分使得对其作用机制与药效物质的现代医学和药理研究难以深入、系统开展,对药物的质量控制、疗效评价及二次开发带来很大困难。

近年有学者对由 2~3 种药材的提取物或几种主要成分的不同组合构成的复方中药进行细胞水平药理学研究,揭示了不同配伍所产生的协同、拮抗作用^[3-5],为现代中药药理研究提供了新的途径。由于仅用几种主要成分难以全面反映中药复方的物质基础,而直接采用药材粉末或粗提物进行细胞实验容易导致假阳性与假阴性。已有的中药复方分子生物学药理研究多以测试值的显著性差异分析来评估样品,不能量化评价样品的药理活性。本实验以腰痛宁胶囊组方药材中 10 味药材的 16 个活性部位(马钱子总生物碱、麻黄总生物碱、甘草总黄酮、甘草总皂苷、川牛膝总皂苷、没药挥发油、乳香挥发油、苍术挥发油、土鳖虫水提液、僵蚕水提液、全蝎水提液、川牛膝多糖、甘草多糖、苍术多糖、麻黄多糖、黄酒多糖)为基础,根据各原料药在腰痛宁组方中的重要性并借鉴组合化学思想,构造了以马钱子与麻黄生物碱为主、其他 9 味药材

的黄酮、皂苷、挥发油(水提物)、多糖等活性部位为辅的 6 个腰痛宁拆方、组方及全方样品。

风湿痹病的治则是消肿止痛、去湿除寒、补肾健脾、活血通络。从现代药理角度阐释该治则,这类药物应具有抗炎镇痛、增强免疫和改善血液循环等功效。本实验在细胞水平着重评价腰痛宁组方的抗炎、免疫和活血活性。当生物组织受到某种刺激如外伤、感染等产生炎症时,一些特定的细胞因子就会活化自身的环氧酶/环氧化酵素(COX),其中包括 COX-1 及 COX-2 两大类。COX 会使花生四烯酸大量转变为前列腺素 E₂(PGE₂),和前列腺素 E_{2α}(PGE_{2α})等前列腺素。因此,PGE₂的产生与炎症息息相关^[6],常被用来评价细胞抗炎活性^[7]。白细胞介素-2(IL-2)又名 T 细胞生长因子(TCRF),主要由活化的 CD4+Th1 细胞产生的具有广泛生物活性的细胞因子。IL-2 在体外能维持 T 细胞生长,促进 Tc 细胞成熟和扩增,也支持 Th 细胞生长,活化 NK 细胞、巨噬细胞和 B 细胞。免疫耐受和免疫抑制的形成与产生 IL-2 的功能缺陷或不全有关^[8]。一氧化氮(NO)是重要的内源性血管舒张因子,对维持血管张力的恒定与调节血压稳定起着重要作用^[9]。因此本研究选取 PGE₂、IL-2 与 NO 为指标分别评价腰痛宁组方在细胞水平的抗炎、免疫与活血活性。通过测定各样品对巨噬细胞(Ana-1)上清液中 PGE₂的半数抑制浓度(IC₅₀)、小鼠脾淋巴细胞上清液中的 IL-2 和人脐静脉内皮细胞中上清液中 NO 的半数有效浓度(EC₅₀),并比较实验 IC₅₀/EC₅₀ 值与 IC₅₀/EC₅₀ 叠加值来探究腰痛宁各活性部位间的相互作用类型,以考察腰痛宁组方的合理性及其抗炎、免疫、活血的活性与作用机制。

1 材料

1.1 试剂

脂多糖 (LPS)、花生四烯酸 (AA)、刀豆蛋白 A (ConA) 购自 Sigma 公司, 新生小牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司, DMEM 培养基购自北京清大天一科技有限公司, IL-2、PGE2 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司, CCK-8 试剂盒购自东仁化学科技有限公司, NO 试剂盒购自南京建成科技有限公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 药材

制马钱子 (*Strychnos nux-vomica* L., 种子, 批号 Y302-09091-10)、苍术 [*Atractylodes lambnacea* (Thunb.) DC., 根和地下茎, 批号 Y002-101001-2]、麻黄 (*Ephedra sinica* Stapf, 茎, 批号 Y412-100601-12)、土鳖虫 (*Eupolyphaga sinensis* Walker, 虫体, 批号 Y803-110101-5)、川牛膝 (*Cyathula officinalis* K. C. Kuan, 根, 批号 Y012-110401-1)、僵蚕 (*Bombyx mori* L. 白僵菌感染的虫体, 批号 Y805-1011054)、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch., 根, 批号 Y013-110301-1)、乳香 (*Boswellia sacra* Flueck., 树脂, 批号 110301-2)、没药 [*Commiphora myrrha* (Nees) Engl., 树脂, 批号 110401-1]、全蝎 (*Buthus martensii* Karsch, 虫体, 批号 Y804-11302-4) 由承德颈复康药业集团有限公司提供, 经承德颈复康药业集团有限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。黄酒, 承德颈复康药业集团有限公司提供 (批号 291110, 10 mL/支)。

1.3 实验动物

C57 小鼠, SPF 级, 6~8 周龄, 雌性, 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。

1.4 实验仪器

YP2002 分析天平 (上海越平科学仪器有限公司), NU—4850E CO₂ 培养箱 (美国 NUAIRE), 双人垂直超净台 (日本 Air Tech), LD5—10 离心机 (北京离心机厂), SS—325 电脑控制消毒柜 (日本 TOMY), 680 多功能酶标仪 (美国 Bio-Rad), GL—88B 漩涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 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), TS100—F 荧光倒置显微镜 (NIKON 公司), Scepter 2.0 手持细胞计数器 (美国 Millipore)。

2 方法

2.1 样品制备

各药材的活性部位由本实验室提取, 其制备方法、得率、质量及药效见表 1。腰痛宁组方中马钱子为君药^[2], 麻黄为佐药^[33], 这两味药材的活性部位是生物碱, 因此本实验将马钱子生物碱与麻黄生物碱作为活性部位组方中的基本单元, 其余活性部位则根据腰痛宁组方原则及组合化学理念, 按各药材活性部位在腰痛宁组方中的功效及其重要性, 按黄酮、皂苷、挥发油/水提物及多糖的顺序依次分别加入生物碱中。构建表 2 所示的腰痛宁拆方及组方样品 I~VI, 其中腰痛宁全方 (样品 VI) 是所有药材活性部位组合加腰痛宁药引黄酒的浓缩物溶解配制。各活性部位在样品 I~VI 中的处方量按下式计算: 某活性部位的处方量 = 腰痛宁处方中该活性部位的组方药材的处方量 × 该活性部位在药材中的质量分数 / 该活性部位在提取物中的质量分数。固体活性部位 (各药材的生物碱、黄酮、皂苷和多糖) 的处方量遵照上式计算; 各挥发油是整体入药, 在上式中分母为 1; 土鳖虫、僵蚕和全蝎均取为 10 倍量提取的水提液入药, 因此在计算处方量时, 直接用腰痛宁处方中该活性部位的组方药材的处方量乘以 0.10 即可。例如, 麻黄生物碱的处方量 = 腰痛宁中麻黄的处方量 × 麻黄生物碱在麻黄中的质量分数 / 麻黄生物碱提取物中生物碱质量分数 = 6.7 g × (15 mg/g) / 0.5 = 201 mg。

按照上式计算各中药活性部位处方量, 精密称取表 1 中所列各中药活性部位, 先取热稳定性活性部位置烧杯中, 加入适量 PBS 缓冲液搅拌初步溶解, 沸水浴加热 10 min, 待其完全溶解, 冷却并加入热不稳定性活性部位, 混合超声 20 min, 冷却, 定容, 配成 1.200 mg/mL 母液并稀释至各质量浓度 (3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 μg/mL), 备用。

2.2 PGE₂ 及细胞活力检测

小鼠腹腔巨噬细胞 (Ana-1 细胞) 购自中国科学院上海细胞研究所。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^[7]将密度为 4 000 个/孔的 Ana-1 细胞接种于 96 孔培养板中, 设溶剂 DMSO 空白组、LPS 对照组及待测药物组 (终质量浓度 3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 μg/mL), 于 37 °C、5% CO₂ 培养 2 h。加

表 1 腰痛宁组方药材中各活性部位的制备方法、质量指标与药理活性

Table 1 Preparation, quality standards, and pharmacological activities of active fractions extracted from materia medica in YTNC

药材	活性部位在药材中的量 / (mg·g ⁻¹)	类型	活性部位在提取物中的量 / %	提取方法	主要药理活性
马钱子	40	总生物碱	89 ^[10]	加热回流法 ^[11]	镇痛、抗炎 ^[12]
麻黄	15	总生物碱	50 ^[10]	加热回流法	中枢神经系统作用 ^[13]
	50	总多糖	35 ^[14]	水煮醇沉法 ^[15]	免疫作用 ^[16]
甘草	40	总黄酮	45 ^[17]	加热回流法 ^[18]	抗炎 ^[19]
	80	总皂苷	78 ^[20]	加热回流法 ^[21]	调节心率 ^[22]
	100	总多糖	33 ^[14]	水煮醇沉法 ^[15]	免疫作用 ^[23]
川牛膝	15	总皂苷	16 ^[21]	加热回流法 ^[21]	镇痛 ^[24] 、免疫作用 ^[25]
	75.7	总多糖	96 ^[14]	水煮醇沉法 ^[15]	调节免疫原性
苍术	51	挥发油	1 mL·mL ⁻¹	提取-精馏耦合 ^[26]	镇痛 ^[27]
	28.5	总多糖	63 ^[14]	水煮醇沉法 ^[15]	免疫作用
乳香	55	挥发油	1 mL·mL ⁻¹	提取-精馏耦合 ^[26]	抗炎、抗细菌 ^[28]
没药	57.5	挥发油	1 mL·mL ⁻¹	提取-精馏耦合 ^[26]	抗炎、抗细菌 ^[29]
土鳖虫	—	水提物	0.10 g·mL ⁻¹	超声水提法	抗血栓 ^[30]
全蝎	—	水提物	0.10 g·mL ⁻¹	超声水提法	激动神经系统、抗蛇毒血清 ^[31]
僵蚕	—	水提物	0.10 g·mL ⁻¹	超声水提法	抗血栓、抗细菌 ^[32]

表 2 腰痛宁胶囊药材活性部位拆方及组方

Table 2 Disassembled prescription and prescription of blending active fractions of materia medica in YTNC

样品编号	样品组合	备注
I	麻黄总生物碱+马钱子总生物碱	腰痛宁拆方样品
II	麻黄总生物碱+马钱子总生物碱+甘草总黄酮	腰痛宁拆方样品
III	麻黄总生物碱+马钱子总生物碱+甘草总黄酮+甘草总皂苷+川牛膝总皂苷	腰痛宁拆方样品
IV	麻黄总生物碱+马钱子总生物碱+甘草总黄酮+甘草总皂苷+川牛膝总皂苷+乳香挥发油+没药挥发油+苍术挥发油+土鳖虫水提物+僵蚕水提物+全蝎水提物	腰痛宁拆方样品
V	麻黄总生物碱+马钱子总生物碱+甘草总黄酮+甘草总皂苷+川牛膝总皂苷+乳香挥发油+没药挥发油+苍术挥发油+土鳖虫水提物+僵蚕水提物+全蝎水提物+甘草总多糖+川牛膝总多糖+苍术总多糖+麻黄总多糖	腰痛宁组方样品
VI	麻黄总生物碱+马钱子总生物碱+甘草总黄酮+甘草总皂苷+川牛膝总皂苷+乳香挥发油+没药挥发油+苍术挥发油+土鳖虫水提物+僵蚕水提物+全蝎水提物+甘草总多糖+川牛膝总多糖+苍术总多糖+麻黄总多糖+黄酒提取物	腰痛宁全方样品

入 LPS(终质量浓度为 1 mg/L)培养 9 h, 溶剂 DMSO 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, 20 min, 收集上清液。细胞上清液中 PGE₂ 的测定按照 PGE₂ ELISA 试剂盒使用说明书进行测定, 每组重复 3 次, 计算 IC₅₀。同时, 按照 CCK8 试剂盒使用说明, 每孔加入 100 μL CCK8 试剂, 用多功能酶标仪于 450 nm 处检测细胞活力 (A₄₅₀)。

2.3 小鼠脾淋巴细胞的制备及 IL-2 检测

10 只雌性 C57 小鼠, 体质量 20 g 左右, 脱颈处死, 用 75%酒精浸泡消毒, 剪开腹腔取脾, 将其置于盛有适量无血清的 DMEM 培养基中清洗。将脾脏碾碎, 用无血清 DMEM 培养基清洗 2 次, 用吸管收集冲洗液至离心管中, 离心 10 min (4 °C、1 000 r/min), 弃上清。加入红细胞裂解液 3 mL, 轻轻吹打, 静置 5 min, 待红细胞完全破碎, 离心 5 min (4 °C、1 000 r/min); 弃上清去除红细胞, 重

复操作 2 次;加入无血清 DMEM,轻轻吹打,离心 5 min (4 °C、1 000 r/min),弃上清。用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养液重悬细胞,用细胞计数器计数调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL,制成脾淋巴细胞悬液备用。

参照文献方法^[34]将密度为 1×10^6 个/孔的脾淋巴细胞接种于 96 孔培养板中,设溶剂 DMEM 对照组、ConA 处理组及待测药物组(终质量浓度 3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$)。每组分别加入 50 μL ConA (终质量浓度 5 $\mu\text{g/mL}$) 和 50 μL 相应的药物(溶剂 DMEM 对照组加入 DMEM 培养基)。37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 48 h,收集上清液。细胞上清液中 IL-2 的测定按照 IL-2 ELISA 试剂盒使用说明书进行测定,计算 EC₅₀。

2.4 NO 检测

人脐静脉内皮细胞 HUVEC,购自上海博升生物技术有限公司。HUVEC 细胞传代培养,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基制成 2×10^6 个/mL 细胞悬液,细胞接种 96 孔板,每孔 100 μL ,设 3 个复孔;药物组(终质量浓度 3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$)加药每孔 100 μL ,空白组每孔加入 100 μL 不含 10% FBS 的 DMEM 培养液;37 °C、5% CO₂ 培养 48 h。取细胞上清液,用酶标仪在 550 nm 处测定吸光度(A)值,检测 NO 水平,计算 EC₅₀。

2.5 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并均采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析。

两种药物 A、B 配方后进入细胞后产生的作用,通常存在以下 3 种情况:

(1) 两种药物的作用之间不存在相互影响时,配方药物的作用关系为叠加作用:即 IC_{50} 实验值 $-s < X_A \cdot IC_{50A} + X_B \cdot IC_{50B}$ (即 IC_{50} 叠加值) $< IC_{50}$ 实验值 $+s$ 。其中 X_A 为药物 A 在配方中所占的百分比, X_B 为 B 药物在配方中所占的百分比, IC_{50A} 与 IC_{50B} 分别代表药物 A 与 B 单独作用时的 IC_{50} ;SD 为 IC_{50} 实验值的标准方差。本研究将 $X_A \cdot IC_{50A} + X_B \cdot IC_{50B}$ 定义为 IC_{50} 叠加值。

(2) 两种药物的作用产生拮抗作用,即 $IC_{50} - s > IC_{50}$ 叠加值。

(3) 两种药物的作用产生协同作用,即 $IC_{50} + s < IC_{50}$ 叠加值。

假设上述配方中药物之间不存在相互影响,求解

$\lim G = \| X_A \cdot IC_{50A} + X_B \cdot IC_{50B} - IC_{50} \|$ 的最小值问题,即可求得各 IC_{50A} 与 IC_{50B} 。以上计算过程通过 MATLAB 实现,详细过程及程序源代码见文献报道^[35]。

3 结果

3.1 腰痛宁各样品对 Ana-1 细胞产生 PGE₂ 的影响

3.1.1 腰痛宁各样品对 Ana-1 细胞活力的影响 为了探究 PGE₂ 的减少是否与细胞的大量死亡有关,本实验对 6 个样品的 Ana-1 细胞毒性进行了检测。各样品作用于细胞后并未出现大量的细胞死亡情况,各样品在不同质量浓度下对 Ana-1 细胞基本无杀伤作用,故 PGE₂ 检测结果可信。

3.1.2 腰痛宁各样品对 Ana-1 细胞产生 PGE₂ 的影响 由图 1 可知,Anal-1 细胞中产生的 PGE₂ 随着各样品质量浓度的升高而降低,且样品质量浓度低时 PGE₂ 降低速度较慢,样品质量浓度高时 PGE₂ 降低速度较快,在样品浓度最高(400 $\mu\text{g/mL}$) 时 PGE₂ 水平达到最低,即样品对 PGE₂ 抑制作用在高浓度时达到最大。由此得出,各样品在考察质量浓度范围内均对小鼠巨噬细胞生成 PGE₂ 产生了抑制作用,且此抑制作用与药物质量浓度呈正相关关系。其中样品 III 对小鼠巨噬细胞产生 PGE₂ 的抑制作用最强。

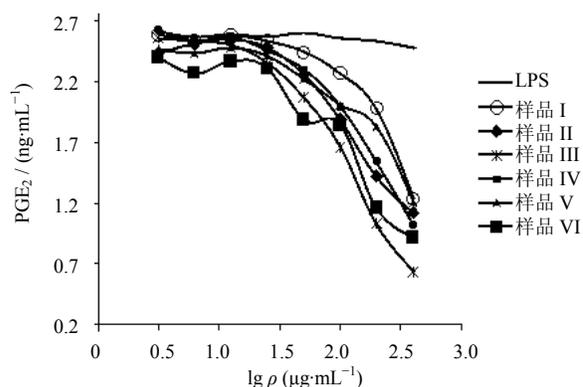


图 1 腰痛宁各样品对 Ana-1 细胞产生 PGE₂ 的影响 (n=3)
Fig. 1 Effect of samples from YTNC on PGE₂ production (n=3)

根据图 1 求得各样品的 IC_{50} 实验值的平均值,进而可以求得各样品的 IC_{50} 叠加值,各样品的 IC_{50} 实验值均值、s 及 IC_{50} 叠加值见图 2。可知,样品 I 的 IC_{50} 实验值 $-s >$ 其 IC_{50} 叠加值,表明样品 I 中的两种生物碱在抑制 PGE₂ 产生时呈现拮抗作用。样品 II 在样品 I 的基础上,加入了甘草总黄酮,其质量浓度最高时 Anal-1 细胞的 PGE₂ 水平较样品 I 略高(图 1),但无统计学意义;而样品 II 的 IC_{50} 实验值 $-s <$ 其 IC_{50} 叠加值 $< IC_{50}$ 实验值 $+s$,说明

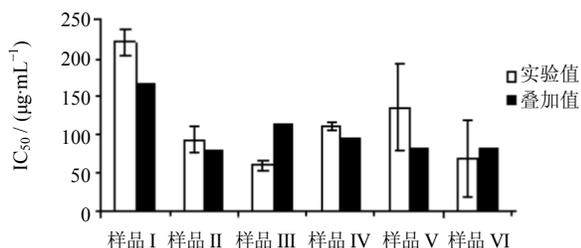


图 2 腰痛宁各样品对 Ana-1 细胞产生 PGE₂ 的相互作用关系

Fig. 2 Interactions of each sample of YTNC on PGE₂ production induced by Ana-1

甘草总黄酮与 2 个生物碱混合物产生的作用仅仅为简单的叠加作用，无增效减效功能。而当川牛膝总皂苷和甘草总皂苷加入样品 II 组成样品 III 后，其在最高质量浓度时较其余样品具有最强抑制 PGE₂ 产生的作用（图 1，样品 II、III 之间具有显著性差异， $P < 0.01$ ）；且样品 III 的 IC_{50} 叠加值 $> IC_{50}$ 实验值 $+s$ ，表明加入的 2 种总皂苷与样品 II 中的生物碱+总黄酮混合物组合后，产生了较强的协同增强样品 III 抗炎的作用。该结果与中医理论中甘草具有调和诸药使其药性达到最佳、川牛膝具有引药下行更好到达用药靶点的观点相符；同时，从甘草总皂苷与生物碱+总黄酮混合物的作用为协同作用，而甘草总黄酮与生物碱混合物的作用仅为叠加作用来看，可初步推测，甘草调和诸药的功能主要来自于其中的总皂苷成分。样品 IV 为各药材挥发油（含水提物）与生物碱+总黄酮+总皂苷混合物的组合，样品 IV 的 IC_{50} 实验值 $-s > IC_{50}$ 叠加值，表明挥发油（含水提物）对样品 III 中各活性部位的组合产生了拮抗作用，导致样品 IV 的 IC_{50} 大于样品 III；样品 V 为多糖与样品 IV 中各活性部位的组合，样品 VI 为黄酒浓缩物（黄酒多糖）与样品 V 的组合，样品 V 与 VI 的 IC_{50} 叠加值在实验 IC_{50} 波动区间内，表明多糖活性部位对样品 IV、黄酒多糖对样品 V 产生的作用均为叠加作用。鉴于样品 V 的 IC_{50} 高于样品 IV，说明腰痛宁中的多糖部位并未增强样品 IV 的抗炎活性反而使其有所降低；而样品 VI 的 IC_{50} 大大低于样品 V，说明黄酒多糖作为药引有利于促进腰痛宁中各药物的抗炎作用。

3.2 腰痛宁各样品对小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 的影响

由图 3 可知，小鼠脾淋巴细胞中产生的 IL-2 在腰痛宁各样品质量浓度较低时基本保持不变，样品质量浓度达到 50 µg/mL 后，IL-2 产生量逐渐增大，

从 100 µg/mL 开始，样品组与 ConA 处理组间均有显著差异 ($P < 0.05$)。由此可知，腰痛宁各样品在考察质量浓度范围内均可对小鼠脾淋巴细胞有较好的促进 IL-2 分泌的作用，且在高质量浓度时，促进作用与样品质量浓度呈正相关关系。样品 I 和 III 的促进 IL-2 分泌作用最为明显。各样品的 EC_{50} 实验值均值、 s 及 EC_{50} 叠加值见图 4。

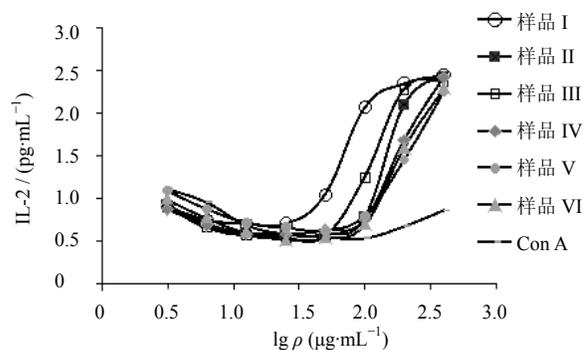


图 3 腰痛宁各样品对小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2 的影响 ($n=3$)

Fig. 3 Effect of each sample of YTNC on IL-2 production induced by splenic lymphocytes of mice ($n=3$)

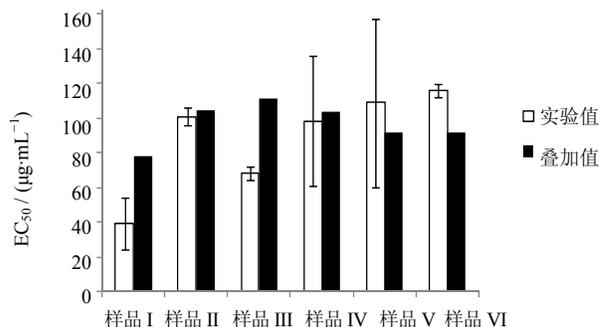


图 4 腰痛宁各样品对小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2 的相互作用关系

Fig. 4 Interactions of each sample of YTNC on IL-2 production induced by splenic lymphocytes of mice

由图 4 可知，样品 I 的 EC_{50} 实验值 $+s <$ 其 EC_{50} 叠加值，表明样品 I 中的马钱子总生物碱与麻黄总生物碱配伍时，两者相互作用关系呈现协同作用，可更好地促进小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2。样品 II 在样品 I 的基础上，加入了甘草总黄酮，其 EC_{50} 实验值 $-s <$ 其 EC_{50} 叠加值 $< EC_{50}$ 实验值 $+s$ ，说明甘草总黄酮与 2 个生物碱混合物之间产生的作用为简单的叠加作用，对细胞因子 IL-2 的分泌无增强减弱功能。在样品 II 的基础上，继续加入皂苷活性部位（甘草总皂苷、川牛膝总皂苷）后组成样品 III。样品 III 的 EC_{50} 实验值 $+s <$ 其 EC_{50} 叠加值，说明活性部位

总皂苷与样品 II 之间产生了较好的协同作用,可显著促进小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2 以增强免疫作用。样品 II、样品 III 结果中的相互作用关系与“3.1”项中 LPS 诱导 Ana-1 细胞释放 PGE₂ 的模型结果完全一致,进一步为甘草调和诸药的功能主要来自于其皂苷成分的推论提供了依据。样品 IV 的 EC₅₀ 实验值 -s < 其 EC₅₀ 叠加值 < EC₅₀ 实验值 +s, 说明腰痛宁中的挥发油(水提物)在 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2 的模型下,与样品 III 之间为叠加作用。同样的叠加作用也可见于样品 V 中,样品 V 的 EC₅₀ 实验值 -s < 其 EC₅₀ 叠加值 < EC₅₀ 实验值 +s。在样品 V 中加入腰痛宁胶囊药引-黄酒浓缩物后,样品 VI 的 EC₅₀ 实验值 -s > 其 EC₅₀ 叠加值。该数据表明,药引-黄酒的浓缩物与样品 V 之间产生的主要作用为拮抗作用。在该免疫模型下,黄酒提取物并不能很好地促进脾淋巴细胞分泌 IL-2,而是会一定程度上减弱该种细胞产生 IL-2 的作用。

3.3 腰痛宁各样品对 HUVEC 细胞产生 NO 的影响

由图 5 可知,大部分腰痛宁样品促进人脐静脉内皮细胞 HUVEC 产生的 NO 浓度随着样品质量浓度的升高基本呈现稳态模式,但样品 III 产生 NO 的浓度先上升,在 100 μg/mL 时达到最大,后逐渐下降。样品 VI 对 HUVEC 细胞产生 NO 的浓度随着样品质量浓度的上升不断增大。

计算各样品的 EC₅₀ 实验值均值、s 及 EC₅₀ 叠加值,结果除样品 III 外,其他 5 个样品均不存在促进 HUVEC 产生 NO 的 EC₅₀, 样品 III 含有麻黄总生物碱、马钱子总生物碱、甘草总黄酮、甘草总皂苷、川牛膝总皂苷,并且其 EC₅₀ 实验值 +s (15.37 ±

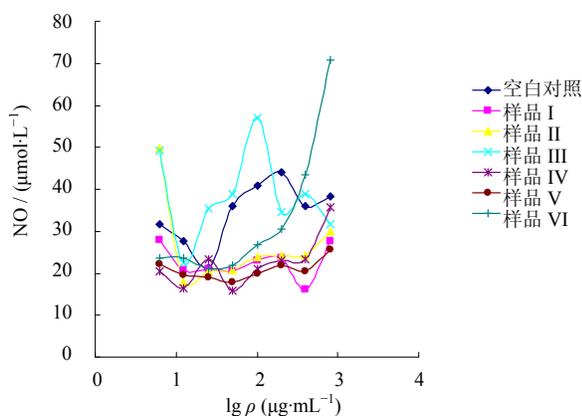


图 5 腰痛宁各样品对 HUVEC 细胞产生 NO 的影响 (n=3)

Fig. 5 Effect of each sample of YTNC on NO production induced by HUVEC (n=3)

12.81 μg/mL)远小于其 EC₅₀ 叠加值(36.81 μg/mL),说明样品 III 中的活性部位之间有很强的协同作用。样品 IV、样品 V、样品 VI 分别在样品 III 的基础上加入了挥发油(水提物)类有效部位和多糖类有效部位及黄酒浓缩物,这 3 个样品没有表现出促进 HUVEC 细胞分泌 NO 的作用,说明在样品 III 基础上加入的这些有效部位与样品 III 中所含的有效部位产生了很强的拮抗作用,以致样品 IV~VI 没有促进 HUVEC 产生 NO 的活性。

4 讨论

尽管腰痛宁中不同活性部位的组合在各模型下显示出不同的相互作用关系,但无论是腰痛宁胶囊的拆方样品 I~IV、组方样品 V 还是全方样品 VI,在抗炎模型和免疫模型下均有抑制 PGE₂ 炎症因子产生和促进 IL-2 免疫因子分泌的实验 IC₅₀/EC₅₀ 值,说明这些样品均有良好的抗炎和免疫作用,表明了腰痛宁组方的合理性与科学性。

鉴于只有样品 III 在抗炎、免疫和活血 3 个模型下均有实验 IC₅₀/EC₅₀ 值,且该样品只有 3 味药材(马钱子、麻黄、甘草)所对应的总生物碱、总黄酮及总皂苷 3 个活性部位,其组方比腰痛宁全方要精简得多。综合活血化瘀、抗炎镇痛、增强免疫这些指标的评价结果,样品 III 是一个备选治疗风湿痹病的良方,以其为基础进一步开展体内药理实验及临床研究,可望研发组方更为精简、疗效好、质量易于控制的风湿痹病新药。

依据中医君臣佐使组方原则,采用药材活性部位进行组合构建样品库开展腰痛宁复方的分子生物学药理研究,可更好地描述中药复方的有效物质基础并消除非活性物质的干扰,有助于组方药物的溶解及细胞实验的开展,为中药复方药效和作用机制的研究提供新思路,基于最小二乘优化评价组方中各活性部位的相互作用对于中药复方作用机制的研究提供了简便可行的路线。

参考文献

- [1] 唐·王冰. 黄帝内经素问 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] Wang L, Zhou G B, Liu P, *et al.* Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4826-4831.
- [4] Ma B L, Ma Y M, Yan D M, *et al.* Effective constituents

- in Xiexin Decoction for anti-inflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125(1): 151-156.
- [5] Lau K M, Lai K K, Liu C L, *et al.* Synergistic interaction between *Astragali Radix* and *Rehmanniae Radix* in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(1): 250-256.
- [6] 郭瑞珍, 于燕妮. 病理学 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1997.
- [7] 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]. *药学学报*, 2005, 40(5): 406-409.
- [8] 林飞卿. 医学基础免疫学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1992.
- [9] 周红宇, 陈醒言. 临床药理学与治疗学 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005.
- [10] 倪力军, 盖 群, 陈 露, 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: 自然科学版*, 2012, 38(2): 195-199.
- [11] 王银亮. 中药挥发油与马钱子生物碱混合物微囊的制备及评价 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [12] Yin W, Wang T S, Yin F Z, *et al.* Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 88(2): 205-214.
- [13] 蒋袁絮, 闫 琳, 余建强. 麻黄碱、伪麻黄碱及其水杨酸衍生物对小鼠中枢神经系统作用的比较 [J]. *中草药*, 2004, 35(11): 1274-1277.
- [14] 倪力军, 王媛媛, 何婉瑛, 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: 自然科学版*, 2014, 47(4): 1-5.
- [15] 王媛媛. 腰痛宁胶囊等组方中药材多糖的制备与质量评价 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [16] 孟达理, 严士海, 许芝银. 麻黄多糖对绵羊红细胞所致小鼠溶血素生成的影响 [J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2007, 17(5): 379-380.
- [17] 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, 44(23): 3328-3333.
- [18] 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.
- [19] 管 燕, 谢强敏. 甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用 [J]. *中草药*, 2009, 40(8): 1254-1259.
- [20] 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]. *Trans Tianjin Univ*, 2013, 19(6): 430-435.
- [21] 方聪颖. 腰痛宁胶囊组方及三七、人參中皂苷的制备、分析与活性评价 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [22] 李开龙, 贾昆霞, 张建国, 等. 甘草酸对实验性梗阻性肾病大鼠的保护作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2001, 23(5): 573-575.
- [23] 王岳五, 张海波, 吕 杰, 等. 甘草残渣中多糖 GPS 抗肿瘤作用的研究 [J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 2000, 33(4): 46-48.
- [24] 高昌琨, 高 建, 马如龙. 牛膝总皂苷抗炎、镇痛和活血作用研究 [J]. *安徽医药*, 2003, 7(4): 248-249.
- [25] 张宇明. 牛膝的药理作用研究进展 [J]. *中国医学创新*, 2009, 6(6): 112-113.
- [26] Zhang L G, Zhang C, Ni L J, *et al.* Rectification extraction of Chinese herbs' volatile oils and comparison with conventional steam distillation [J]. *Sep Pur Technol*, 2011, 7(2): 261-268.
- [27] 李 霞, 杨静玉, 孟大利, 等. 麸炒北苍术挥发油成分的分析及镇痛活性的研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(10): 886-887.
- [28] Singh G B, Atal C K. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-Boswellia serrata, a new non-steroidal anti-inflammatory agent [J]. *Agents Actions*, 1986, 18(3/4): 407-412.
- [29] 李舍予, 田报春, 张勇刚. 没药挥发油对大鼠神经胶质瘤细胞体外增殖的抑制作用 [J]. *中草药*, 2009, 40(7): 1103-1106.
- [30] Wang Y, Yan H, Wang Y, *et al.* Proteomics and transcriptome analysis coupled with pharmacological test reveals the diversity of anti-thrombosis proteins from the medicinal insect, *Eupolyphaga sinensis* [J]. *Ins Biochem Mol Biol*, 2012, 42(8): 537-544.
- [31] Mazzei de Dávila C A, Dávila D F, Donis J H, *et al.* Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation [J]. *Toxicon*, 2002, 40(9): 1339-1346.
- [32] 张廷模. 临床中药学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2012.
- [33] 王兆铭. 中西医结合治疗风湿类疾病 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1989.
- [34] 李海瑞, 吴希哲, 徐韶瑜, 等. 海洋真菌多糖 (YCP) 对小鼠淋巴细胞免疫功能的影响 [J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 28(2): 91-93.
- [35] Ni L J, Xu X L, Zhang L G, Shi W Z. Quantitative evaluation of the *in vitro* effect and inter actions of active fractions in Yaotongning-based formulae on prostaglandin E2 production [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154: 807-817.