

以生物碱为主要部位的7种腰痛宁衍生方的细胞抗炎、免疫活性比较及优选组方的体内药效评价

张立国, 程佳佳, 倪力军*, 谢婷

华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237

摘要: 目的 探究以马钱子、麻黄生物碱为主要部位的7种腰痛宁衍生方的细胞药理活性, 并对细胞模型下有优效的组方进行体内药效学评价。方法 以50%马钱子生物碱+50%麻黄生物碱为组方基础, 分别与腰痛宁胶囊组方药材及8种常用风湿骨病组方中药的总黄酮、总皂苷、总挥发油/水提物及总多糖有效部位组合成7个样品, 同时以腰痛宁加黄酒药引为对照。测定各样品抑制小鼠巨噬细胞中前列腺素 E_2 (PGE $_2$)增殖的 IC_{50} 及促进小鼠巨噬细胞中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及肿瘤坏死因子(TNF- α)增殖的 EC_{50} , 并进行比较。同时采用最小二乘优化方法, 计算各样品的 EC_{50} 或 IC_{50} 叠加值, 根据 EC_{50} 或 IC_{50} 实验值和叠加值之间的差异分析各有效部位间的相互作用关系。采用小鼠耳肿胀模型和小鼠皮肤迟发型过敏反应(DTH)模型进行最优组合的体内药效学评价。结果 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与总黄酮组合(4号样品)具有最佳的综合细胞抗炎、免疫调节活性, 且各模型下该组方中有效部位间有极强的协同作用; 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱分别与总皂苷、总挥发油/水提物及总多糖组合样品(5、6、7号样品)的抗炎活性与4号样品相当; 5和7号样品有良好的综合免疫调节活性; 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱以及马钱子生物碱或麻黄生物碱与总黄酮组合样品(1、2、3号样品)的药理活性均显著弱于4号样品; 小鼠体内药效学实验表明将4号样品组合中25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱比例降为25%及5%时, 具有较好的抗炎、免疫作用。结论 马钱子生物碱不宜单独与麻黄生物碱配伍, 2种生物碱不宜单独与总黄酮配伍, 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与总黄酮、总皂苷、总挥发油/水提物及总多糖分别组合通常会产协同或叠加作用, 有助于增强25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱的细胞药理活性, 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与总黄酮组合样品的细胞抗炎和免疫调节活性在小鼠体内亦得到体现, 提示根据细胞实验结果筛选优化中药组方具有可行性。

关键词: 马钱子; 麻黄; 生物碱; 腰痛宁; 前列腺素 E_2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)06-0963-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.018

Comparison on cellular anti-inflammatory and immunoregulatory activities of seven derivative combinations of Yaotongning with alkaloid as main part and *in vivo* pharmacodynamic evaluation on optimized candidate combination

ZHANG Li-guo, CHENG Jia-jia, NI Li-jun, XIE Ting

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

Abstract: Objective To investigate which kind of Chinese medicinal effective fractions will produce good comprehensive cellular pharmacological activities when they were combined with alkaloids from *Strychnos nux-vomica* and *Ephedra sinica*, and to evaluate *in vivo* pharmacological activities of the effective fraction combination screened by cellular experiments. **Methods** The equal proportion mixture of alkaloids from *S. nux-vomica* and *E. sinica* was set as a sample (sample 1, A); Two samples (samples 2 and 3) were designed by respectively adding the equal ratio mixture of five flavonoids (F) at 50% into alkaloids from *S. nux-vomica* or *E. sinica*; Four samples (samples 4—7) were designed by respectively adding F, equal proportion mixture of four saponins (S), equal ratio mixture of six volatile oils/aqueous (V), and equal proportion mixture of six polysaccharides (P) at 50% into A. Murine macrophage cells and chondrocytes were exposed to the new recipes, and then the half inhibitory concentration (IC_{50}) of recipes for inhibiting (PGE $_2$) in macrophages and the half effective concentration (EC_{50}) for promotion of the secretion of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in macrophages were

收稿日期: 2015-11-17

基金项目: 上海市科学技术委员会支撑项目(13401901100)

作者简介: 张立国(1963—), 男, 博士, 副教授, 从事中药物质基础及新药研发。Tel: (021)64253045 E-mail: zlgfyt@163.com

*通信作者 倪力军, 女, 博士, 教授, 从事中药物质基础与新药研发。Tel/Fax: (021)64253045 E-mail: njfyt@163.com

detected and compared. 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 optimum method. The *in vivo* pharmacodynamics of the best combination was evaluated by the ear swelling model and delayed type hypersensitivity (DTH) model in mice. **Results** Sample 4 has good comprehensive activities of cellular anti-inflammation and immunoregulation. Moreover, strong synergistic effect among the effective fractions in this sample was observed; Cellular anti-inflammatory activities of samples 5, 6, and 7 were equivalent with sample 4; Samples 5 and 7 had good comprehensive cellular immunoregulation activity; But the alkaloids mixture (A) and the combinations of *S. nux-vomica* or *E. sinica* alkaloids with F (samples 2 and 3) were significantly weaker than sample 4 in cellular anti-inflammation, immunoregulation, and chondrocyte-proliferation. Sample 4 also exhibits a certain effect on *in vivo* anti-inflammation and immunity in mice when A was decreased at 25% or 5%. **Conclusion** It is not suitable to design a combination just by alkaloids from *S. nux-vomica* and alkaloids of *E. sinica*; Alkaloids from *S. nux-vomica* or alkaloids of *E. sinica* are also not appropriate to solely combine with the mixture of flavonoids (F). When A is combined with F, S, V, and P, respectively, synergistic or additive effects among the active fractions are usually observed. These active fractions help to strengthen comprehensive cellular pharmacological activities of A. Sample 4 not only has good cellular activities of anti-inflammation and immunoregulation but also has better *in vivo* effect on anti-inflammation and immunity, suggesting that it is feasible to screen the optimized Chinese medicine formula based on cellular pharmacological experiments.

Key words: *Strychnos nux-vomica* L.; *Ephedra sinica* Stapf; alkaloids; Yaotongning; prostaglandin E_2

风湿骨病是一种常见疑难病症，中医学认为该病是由于风、寒、湿、热等外邪侵袭人体，闭阻经络，气血运行不畅所致，将其归为痹病一类，根据不同证型采用不同治则。西医认为该病与免疫功能紊乱、遗传、炎症（感染）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。中药的天然特性及其多环节、多靶点综合作用方式使其在风湿骨病治疗方面具有独特优势。对风湿骨病系列中药复方的组方规律进行系统研究不仅有助于中医临床辨证用药、促进中医药理论的发展，也是提高风湿骨病中药疗效的需要，对于创制风湿骨病现代中药亦具有重要意义和应用前景。

腰痛宁胶囊是治疗风湿骨病大品种中成药，由制马钱子、土鳖虫、川牛膝、甘草、麻黄、乳香、全蝎、没药、僵蚕、麸炒苍术 10 味中药制成，用于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已有几十年临床应用^[1-3]。马钱子占据腰痛宁处方量的 40%，通常被认为是腰痛宁的君药，其主要有效部位是生物碱，马钱子具有抗炎、镇痛、调节免疫功能等药理作用^[4-5]；其臣药麻黄中的主要有效部位麻黄生物碱有促使去甲肾上腺素神经递质的释放、兴奋神经中枢等作用^[6-7]。本课题组对治疗风湿骨病的 290 个中药处方^[8]进行总结分析，发现风湿马钱片、舒筋丸、舒风定痛丸、风湿福音丸等 12 个常用风湿骨病中成药处方含有马钱子和麻黄 2 味药材，风湿片、养血祛风丸等 15 个中药处方含药材马钱子，骨痛片、追风活络酒等

42 个中药处方含有麻黄。本研究从这 290 个中药处方中筛选出在风湿骨病中药复方使用频次较高且经常与马钱子、麻黄同时用于风湿骨病中药复方的 8 味药材桂枝、红花、骨碎补、独活、三七、桑寄生、淫羊藿、人参，提取这 8 味药材及腰痛宁组方中 10 味药材中的黄酮、皂苷、挥发油及多糖等有效部位。以马钱子、麻黄生物碱为基础，将其与上述 18 味药材中的黄酮、皂苷、挥发油/水提物、多糖进行组合，设计了 7 个有效部位组方，并设计了有药引黄酒的腰痛宁全方样品作为阳性对照。通过构建巨噬细胞（Ana-1）抗炎、免疫模型及白细胞介素- 1β （IL- 1β ）诱导的软骨细胞增殖模型，分析比较各有效部位之间的相互作用关系以及配伍效果，评价不同有效部位及组方对相关细胞活性的影响，探讨与马钱子、麻黄生物碱组合时药效最优的有效部位，进一步对细胞实验筛选出的优效组合进行体内药效学评价验证，为含马钱子、麻黄的风湿骨病处方的优化、筛选提供依据。

1 材料

1.1 动物和细胞株

小鼠 Ana-1 细胞株，购自中国科学院上海生物细胞所。健康清洁级昆明小鼠 80 只，雌雄各半，体质量 18~22 g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，许可证号 SCXK（沪）2012-0002。

1.2 药物及试剂

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,并由该公司执业药师王春民鉴定为正品,样品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。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-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、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,美国 Sigma 公司);花生四烯酸(AA,美国 Sigma 公司);磷酸缓冲盐(PBS, Medicago AB);0.25%胰酶(Biowest 公司);两性霉素、链霉素-青霉素(Biowest 公司);刀豆蛋白 A(Con A,美国 Sigma 公司);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司);硫化钠(上海天莲精细化工有限公司);二硝基氯苯(DNCB,天津市光复化工研究所);蓖麻油(上海凌峰化学试剂有限公司);丙酮(国药集团化学试剂有限公司);阿司匹林(拜耳医药保健有限公司,批号 BJ16188)。

1.3 仪器

ML104 分析天平(德国 Metter Toledo 公司);QL-901 涡旋混合器(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);XMTE 数显调节仪(余姚新波仪器公司);DZF-6050 真空干燥箱(上海一恒科技有限公司);DS-3510DTH 超声仪(上海生析超声仪器有限公司);CELL 150CO₂ 培养箱(Thermo 公司);TS100-F 荧光倒置显微镜(Nikon 公司);CLASS II 生物安全柜(Labconco 公司);680 多功能酶标仪(美国 Bio-Rad);DK-S26 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);TS-1 脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造公司);DW-86L386 低温保存箱(-80℃,海尔集团公司);打孔器(7 mm,浙江富斯达工具有限公司)。

2 方法

2.1 样品的组成及制备

18 味原料药物提取所需的生物碱、黄酮、皂苷、挥发油/水提物及多糖,具体各提取部位的提取方法及质量标准参考文献方法^[9]。将各药材有效部位按照质量配比组成 7 个样品配方及腰痛宁全方样品(腰痛宁所有药材活性部位组合加药引黄酒的浓缩物溶解配制而成),见表 1。由各有效部位在提取物中的量换算出 1~7 号样品中各有效部位质量

表 1 样品配方组合

Table 1 Formulas of blending active fractions

样品序号	有效部位组合
1	50%马钱子生物碱+50%麻黄生物碱
2	50%马钱子生物碱+50%总黄酮
3	50%麻黄生物碱+50%总黄酮
4	25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱+50%总黄酮
5	25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱+50%总皂苷
6	25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱+50%总挥发油/水提物
7	25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱+50%总多糖
8	腰痛宁全方+药引黄酒多糖

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;总皂苷=25%甘草皂苷+25%三七皂苷+25%人参皂苷+25%川牛膝皂苷;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%鳖虫水提物;总多糖=16.67%苍术多糖+16.67%川牛膝多糖+16.67%甘草多糖+16.67%麻黄多糖+16.67%淫羊藿多糖+16.67%桑寄生多糖

total flavonoids = flavonoids of *Glycyrrhiza uralensis*, *Epimedium sagittatum*, *Taxillus chinensis*, *Carthamus tinctorius* and *Davallia mariesii* mixed in equal ratio of 20%; total saponins = saponins of *G. uralensis*, *Panax notoginseng*, *Panax ginseng* and *Cyathula officinalis* mixed in equal ratio of 25%; volatile oils/aqueous extracts = volatileoils/aqueous extracts of *Cinnamomum cassia*, *Angelica pubescens*, *Boswellia sacra/Commiphora myrrha*, *Atractylodes lancea*, and *Eupolyphaga sinensis* mixed in equal ratio of 16.67%; total polysaccharides = polysaccharides of *Atractylodes lancea*, *Cyathula officinalis*, *G. uralensis*, *E. sinica*, *E. sagittatum* and *T. chinensis* mixed in equal ratio of 16.67%

后,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,待其完全溶解后按表 1 方案混合,一并超声 20 min,冷却,定容,配成 2.5 g/L 母液,0.22 μ m 滤膜滤过并进行稀释。经过一系列预试验,发现质量浓度过高容易抑制 Ana-1 细胞生长,质量浓度偏低时细胞实验结果差异不明显,最终确定将样品分别稀释至质量浓度为 400.000、200.000、100.000、50.000、25.000、12.500、6.250、3.125 mg/L,备用。

2.2 受试样品对 Ana-1 细胞抗炎、免疫活性的比较

2.2.1 对 Ana-1 细胞分泌 PGE₂ 的影响 Ana-1 细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下,用含 10% 小牛血清、青霉素(1 \times 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。将密度为 4 \times 10³ 个/孔的 Ana-1 细胞接种于 96 孔培养板中,设对照组、LPS 处理组及待测药物组(400.000、200.000、100.000、50.000、25.000、12.500、6.250、3.125 mg/L),于 37℃、5% CO₂ 条件下培

养 2 h。加入 LPS (终质量浓度为 1 mg/L) 培养 9 h, 对照组不加 LPS。弃去旧培养液, 用新鲜培养液洗涤 3 次, 分别加入各质量浓度的待测药物孵育 30 min, 加入底物 AA (终浓度为 10 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C, 20 min, 收集上清液。细胞上清液中 PGE₂ 量的测定按照 PGE₂ 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒使用说明进行测定, 每组重复 3 次。同时, 按照 CCK-8 试剂盒使用说明, 每个孔加入 100 μ L CCK-8 试剂, 用多功能酶标仪于 450 nm 处检测细胞活力。

2.2.2 对 Ana-1 细胞分泌 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 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 2×10^6 个/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L; 待测药物组每孔加药 100 μ L, 空白组每孔加入 100 μ L 不含小牛血清的 DMEM 培养液; 37 $^{\circ}$ 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 处测定吸光度 (*A*) 值, 根据 *A* 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, 用酶联免疫方法测定空白组和受试样各组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的水平。

2.3 样品的药理活性评价与数据分析

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, 实验值以 EC₅₀ \pm SD 或 IC₅₀ \pm 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^[10]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。

2.4 小鼠体内药效学实验

预试验表明 4 号样品喂食小鼠, 由于马钱子生物碱的毒性导致小鼠死亡, 最终确定马钱子生物碱+麻黄生物碱在组方中比例小于 25% 为安全剂量, 体内药效评价实验分别采用马钱子生物碱+麻黄生物碱在各组方中占比 25%、5% 进行, 即 12.5% 马钱子生物碱+12.5% 麻黄生物碱+75% 总黄酮 (优选组方 1) 和 2.5% 马钱子生物碱+2.5% 麻黄生物碱+95% 总黄酮 (优选组方 2)。

2.4.1 优选组方对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 取小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 分别为对照组、阿司匹林组、优选组方 1 组、优选组方 2 组, 各组均 ig 给药, 剂量均为 50 mg/kg, 对照组给予等体积溶媒, 连续给药 3 d, 每天 1 次, 末次给药 0.5 h 后, 于小鼠右耳两面均匀涂二甲苯 (50 μ L/只) 致炎。

左耳不涂为正常耳。1 h 后脱颈椎处死小鼠, 用 7 mm 打孔器打下左耳和右耳同一部位的圆片, 于分析天平上称质量。计算耳肿胀度及肿胀抑制率, 比较药物的抗炎作用。

$$\text{耳肿胀度} = \text{右耳质量} - \text{左耳质量}$$

$$\text{肿胀抑制率} = (\text{耳肿胀度}_{\text{对照组}} - \text{耳肿胀度}_{\text{给药组}}) / \text{耳肿胀度}_{\text{对照组}}$$

2.4.2 优选组方对 DNCB 致小鼠皮肤迟发性超敏反应 (DTH) 的影响 小鼠分组及给药方法同“2.4.1”项, 各组每天按设定剂量连续给药 7 d。给药第 4 天, 小鼠腹部以 8% 的硫化钠溶液脱毛 3 cm \times 3 cm, 以 2.5% DNCB 溶液 (丙酮-蓖麻油 1:1 为溶剂) 新鲜配制 20 μ L 均匀涂抹于小鼠腹部致敏; 给药第 6 天, 以 1% 的 DNCB 溶液 20 μ L 均匀涂于小鼠右耳, 方法同“2.4.1”项, 24 h 后脱颈椎处死动物, 以 8 cm 打孔器取两耳同一部位圆片, 称质量, 并摘取各组小鼠脾脏、胸腺, 均以电子天平称质量, 计算耳肿胀度及脾脏、胸腺指数。

$$\text{脾脏(胸腺)指数} = \text{脾脏(胸腺)质量} / \text{体质量}$$

3 结果与分析

3.1 受试样品对 Ana-1 细胞活力的影响

各模型下 7 个样品对 Ana-1 细胞活力影响的测定结果表明, 6 号样品在 200、400 mg/L 抑制了 Ana-1 细胞生长, 在测定该样品促进 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 分泌的 EC₅₀ 及抑制 PGE₂ 分泌的 IC₅₀ 时剔除了这 2 个质量浓度, 其他样品在 3.125~400.000 mg/L 均未产生细胞毒性。

3.2 受试样品对 Ana-1 细胞分泌 PGE₂ 的影响

由表 2 可知, 1、7 号样品中各有效部位间产生了拮抗作用, 其中 7 号样品中有效部位间的拮抗作用最强, 使得该样品的 IC₅₀ 在所有样品中最高。4~6 号样品中的各有效部位间产生了协同增效作用, 且 4 号样品中有效部位间的协同作用最强, 因而 4 号样品的 IC₅₀ 最低, 但与 5、6、8 号样品的 IC₅₀ 比较无显著性差异, 说明这 4 个样品的细胞抗炎活性相当。结果表明, 由马钱子、麻黄与 5 种药材总黄酮组合样品 (4 号) 抑制 Ana-1 细胞分泌 PGE₂ 的活性最佳, 马钱子生物碱与麻黄生物碱一起与总黄酮配伍有利于提高 2 种生物碱及各药材黄酮的细胞抗炎活性。本课题组前期将 25% 马钱子生物碱+25% 麻黄生物碱分别与红花黄酮、甘草黄酮、桑寄生黄酮、骨碎补黄酮及淫羊藿黄酮等比例组合, 考察各样品抑制巨噬细胞产生 PGE₂ 的 IC₅₀, 发现 25% 马钱子生物碱+25% 麻黄生物碱与红花黄酮组合样品

表 2 各样品抑制 Anal-1 分泌 PGE₂ 的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Inhibitory effects of various samples on secretion of PGE₂ in Anal-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	IC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)		样品	IC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	
	实验值	叠加值		实验值	叠加值
1	220.11 ± 17.45**	163.84	5	67.46 ± 19.66	105.06
2	105.27 ± 51.95**	116.51	6	20.52 ± 8.32	114.69
3	75.89 ± 45.62*	104.44	7	243.42 ± 113.44**	120.53
4	7.01 ± 2.04	89.91	8	68.68 ± 50.11	113.87

与 4 号样品比较: *P<0.05 **P<0.01, 表 3 同

*P<0.05 **P<0.01 vs sample 4, Table 3 is same

的 IC₅₀ (32.34 mg/L) 显著低于其他组合的样品^[11]。本实验结果表明 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与 5 种药材总黄酮混合样品的 IC₅₀ 只有 7.01 mg/L。表明 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与多种药材总黄酮组合后细胞抗炎活性优于其与单一药材黄酮的组合。

3.3 受试样品对 Ana-1 细胞分泌 IL-6、IL-1β、TNF-α 的影响

由表 3 可知, 对 Ana-1 细胞分泌 IL-6, 2 和 3 号样品无 EC₅₀, 表明马钱子或麻黄生物碱与总黄酮组合促 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的活性不足以测定半数有效浓度。1、6 号样品中的各有效部位产生叠加作用, 4、5 及 8 号样品中各有效部位间产生协同作用, 4 号样品的 EC₅₀ 最低, 但样品 4~8 的 EC₅₀ 无统计学差异, 表明 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与总黄酮、总皂苷、总挥发油/水提物、总多糖 4 种不同类型有效部位组合以及腰痛宁全方促 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的活性相当。

由表 3 可知, 对 Ana-1 细胞分泌 IL-1β, 1~4 号样品无 EC₅₀, 表明各组合促 Ana-1 细胞分泌 IL-1β 的活性不足以测定 EC₅₀, 5 和 6 号样品中的有效部位间呈现叠加作用, 7 号样品中的有效部位间产生

协同作用, 但 5~8 号样品的 EC₅₀ 无显著性差异, 表明 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与总皂苷、总挥发油/水提物、总多糖 3 种不同类型有效部位组合以及腰痛宁全方促 Ana-1 细胞分泌 IL-1β 的活性相当。

由表 3 可知, 对 Ana-1 细胞分泌 TNF-α, 2、3、6 号样品无 EC₅₀, 表明各组合促 Ana-1 细胞分泌 TNF-α 的活性不足以测定 EC₅₀, 8 号样品的 EC₅₀ 最低, 且与 4 号样品无显著性差异, 1、5 与 7 号样品的 EC₅₀ 显著高于 8 号及 4 号样品, 说明 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与总黄酮有效部位的组合促 Ana-1 细胞分泌 TNF-α 的活性优于 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与其他有效部位的组合。

综合以上结果, 在 8 个样品中, 4 号样品促 Ana-1 细胞分泌 IL-6、TNF-α 的活性最佳, 5 号样品促 Ana-1 细胞分泌 IL-6 的活性次之, 8 号样品促 Ana-1 细胞分泌 IL-1β 的活性最佳, 但与 5~7 号样品差异不显著。4 号样品具有良好的综合免疫调节活性且显著强于 2 种生物碱混合物 (1 号) 以及单一生物碱与 5 种药材黄酮有效部位的组合样品 (2、3 号)。只有 5 和 7 号样品同时具有促进 IL-6、IL-1β

表 3 各样品促进 Anal-1 分泌 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 免疫因子的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of various samples on secretion of IL-1β, IL-6, and TNF-α in Anal-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	IL-6 EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)		IL-1β EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)		TNF-α EC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	
	实验值	叠加值	实验值	叠加值	实验值	叠加值
1	55.10 ± 63.50	6.10	—	—	107.38 ± 32.77**	53.22
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	5.95 ± 2.22	37.46	—	—	42.11 ± 11.65	—
5	9.83 ± 8.68	56.09	92.40 ± 72.23	92.96	95.23 ± 19.68**	—
6	50.92 ± 40.30	47.27	40.02 ± 4.36	43.45	—	—
7	49.11 ± 0.89	—	39.74 ± 2.72	89.32	122.78 ± 10.31**	113.38
8	21.39 ± 28.32	59.91	35.56 ± 1.93	—	13.13 ± 3.60	20.78

与 TNF- α 因子分泌的 EC₅₀，相关研究表明，本实验所用的各药材皂苷、多糖具有良好的免疫调节活性^[12-16]，表 3 的结果说明各药材皂苷混合物、多糖混合物分别与 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱组合后保留了各药材多糖及皂苷的免疫调节活性。

课题组前期工作表明^[17]，25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与 5 种药材黄酮分别组合的样品均有促进 Anal-1 细胞分泌 IL-6 的 EC₅₀(12.09~116.87 mg/L)，本实验结果表明这 5 种药材黄酮混合后与 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱组合的样品(4 号)的 EC₅₀有所降低(5.95 mg/L)，说明这 5 种黄酮混合物与 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱组合有助于提高样品促 IL-6 分泌的活性；25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱分别与 5 种药材黄酮组合的样品均有促进 IL-1 β 分泌的 EC₅₀(13.96~112.58 mg/L)^[18]，但本实验中 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与 5 种药材总黄酮混合物组合样品(4 号)反而未能测得促进 Anal-1 细胞分泌 IL-1 β 的 EC₅₀，说明这些药材总黄酮混合物与 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱组合后促 IL-1 β 分泌的活性不及各药材黄酮与 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱的组合；文献报道^[17]中只有 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱与甘草黄酮的组合有促进 TNF- α 分泌的 EC₅₀(100 mg/L)，该数据远远大于 4 号样品的 EC₅₀(9.78 mg/L)，说明虽然另外 4 种药材黄酮分别与 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱组合时促进 Ana-1 分泌 TNF- α 的活性不佳，但它们与甘草黄酮一起与 25%马钱子生物碱+25%麻黄生物碱组合后提高了样品促 TNF- α 分泌的作用。

3.4 优选组方对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

由表 4 可知，致炎后各给药组耳肿胀度均不同程度小于对照组 ($P < 0.05, 0.01$)，与阿司匹林组相比，优选组方 1 和 2 组耳肿胀度无显著性差异。

本课题组前期将腰痛宁全方与对照组比较，发现腰痛宁组的肿胀抑制率为 17.8%^[18]，本实验优选

表 4 各样品对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of various samples on xylol-induced auricle swelling in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	耳肿胀度/mg	肿胀 抑制率/%
对照	—	15.0±0.3	—
阿司匹林	0.5	8.8±0.2 ^{###}	41.5
优选组方 1	0.5	12.4±0.3 [#]	17.3
优选组方 2	0.5	12.0±0.4 [#]	20.0

与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ ，表 5 同

[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs control group, Table 5 is same

组方 2 的肿胀抑制率为 20%，但均不及阿司匹林组(41.5%)。表明本实验中优选组方 1 和 2 与腰痛宁全方的抗炎作用相当。

3.5 优选组方对 DNCB 致小鼠 DTH 的影响

由表 5 可知，阿司匹林组、优选组方 1、2 组的耳肿胀度均低于对照组，且优选组方 1、2 组与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)；优选组方 1、2 组的脾脏指数显著低于对照组 ($P < 0.05$)；阿司匹林组、优选组方 1 组、优选组方 2 组的胸腺指数低于对照组 ($P < 0.05$)。本课题组前期将腰痛宁全方与对照组比较，发现腰痛宁全方组与对照组的脾脏指数分别为 4.00 mg/g 与 4.41 mg/g、胸腺指数分别为 4.28 mg/g 与 4.17 mg/g^[18]，腰痛宁全方对脾脏指数及胸腺指数的改善很有限，而本实验优选组方 1、2 组对脾脏及胸腺指数的改善均优于腰痛宁全方及阿司匹林或与阿司匹林相当。说明优选组方 1、2 组对特异性免疫造成的胸腺、脾脏肿大较好的抑制作用。

4 讨论

为获得良好的细胞抗炎、免疫调节及促进骨细胞修复等药理活性，马钱子、麻黄生物碱不宜单独使用或者单独与各药材黄酮混合物配伍；马钱子、麻黄生物碱等比例混合物与甘草、淫羊藿、桑寄生、红花、骨碎补 5 种药材黄酮等比例混合物配伍时，

表 5 各样品对 DNCB 致敏后小鼠耳肿胀、脾脏指数及胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of various samples on ear swelling, spleen index, and thymus index in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量/(mg·kg ⁻¹)	耳肿胀度/mg	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	24.0±4.0	4.45±0.45	3.89±0.72
阿司匹林	0.5	17.0±3.0	3.93±0.80	2.25±1.23 [#]
优选组方 1	0.5	12.0±2.0 ^{###}	3.41±0.35 [#]	2.27±0.27 [#]
优选组方 2	0.5	10.0±1.0 ^{###}	3.21±0.69 [#]	1.95±0.83 [#]

该样品的有效部位之间在巨噬细胞 PGE₂ 抗炎模型、IL-6 免疫调节模型均产生极强的协同作用,使得该样品组合(4号)具有良好的细胞抗炎、免疫调节活性。从细胞药理层面表明了马钱子、麻黄同时出现在风湿骨病中药复方中、并与以黄酮为主要有效部位的药材配伍的合理性。25%马钱子+25%麻黄生物碱物与总多糖以及与总皂苷的组合样品(7号和5号)具有良好的综合免疫调节活性,表明马钱子和麻黄生物碱混合物在与各药材多糖、皂苷的混合物组合后,保留了各药材多糖(或皂苷)促进免疫调节的活性。小鼠体内药效学评价表明 25%马钱子+25%麻黄生物碱物与总黄酮组合中 25%马钱子+25%麻黄生物碱物占比 25%及 5%时,2个样品均有较好的体内抗炎及免疫作用。

本研究突破了孤立地对单一处方、单味药材有效部位进行药理研究的局限,从细胞药理学层面提供了中药复方取多种药材进行配伍的药理学依据,为有效发挥马钱子、麻黄生物碱的药理功效提供了基础研究数据,可为优化、筛选风湿骨病中药有效部位组方提供支持。

参考文献

- [1] 倪力军,张强祖,朱立中,等.腰痛宁胶囊治疗腰痛、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] 刘艳平,李引刚.腰痛宁胶囊治疗寒湿瘀阻型坐骨神经痛临床疗效观察 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2916-2918.
- [3] 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.
- [4] 林昌松,陈纪藩,刘晓玲,等.马钱子药理研究及临床应用概况 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(2): 158-160.
- [5] 魏世超,徐丽君,张秀桥.马钱子总生物碱对大鼠佐剂性关节炎的作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(4): 479-480.
- [6] 郑萍,戴贵东,李汉青.麻黄碱及伪麻黄碱药理作用研究进展 [J]. 宁夏医学杂志, 2002, 24(2): 126-127.
- [7] 蒋袁絮,闫琳,余建强,等.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.
- [8] 药品生产质量管理规范 [S]. 1998.
- [9] 张立国,赵丽丽,倪力军,等.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 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3710-3716.
- [10] 倪力军,徐晓玲,史万忠,等.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 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3424-3431.
- [11] Ni L J, Xu X L, Zhang L G, et al. 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(3): 807-817.
- [12] Feng H B, Du X G, Liu J, et al. Novel polysaccharide from *Radix Cyathulae officinalis* Kuan can improve immune response to ovalbumin in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 65: 121-128.
- [13] 刘俊峰,郭雪峰.甘草皂苷对卡拉库尔羊血液中免疫球蛋白 IgA 和 IgG 的影响 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 172-174.
- [14] Xie F, Sakwivatkul K, Zhang C R, et al. *Atractylodis macrocephalae* Koidz. polysaccharides enhance both serum IgG response and gut mucosal immunity [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 91(1): 68-73.
- [15] 徐颖,牟孝硕,孙悦朋,等.淫羊藿多糖对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(6): 434-437.
- [16] Sun H X, Pan H J. Immunological adjuvant effect of *Glycyrrhiza uralensis* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice [J]. *Vaccine*, 2006, 24(11): 1914-1920.
- [17] Ni L J, Wang N N, Guo Y Z, et al. Evaluation of the effects of active fractions of Chinese medicine formulas on IL-1 β , IL-6, and TNF- α release from ANA-1 murine macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 420-431.
- [18] 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.