

防己黄芪汤在大鼠体内的药动学研究及其对 T 淋巴细胞的调节作用

吕春明¹, 侯 婷¹, 张 宁¹, 王 冰^{2*}

1. 上海中医药大学 科技实验中心, 上海 201203

2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203

摘要: **目的** 比较防己黄芪汤中活性成分在大鼠体内的药动学行为, 并研究防己黄芪汤及其主要入血成分粉防己碱抑制刀豆球蛋白 A (concanavalin A, ConA) 诱导 T 淋巴细胞增殖的作用机制。**方法** 采用超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 检测大鼠 ig 不同剂量防己黄芪汤及粉防己碱后, 入血成分在不同时间点的血药浓度, 并分析其药动学行为。采用 MTT 法和 ³H-胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 掺入法检测防己黄芪汤对 T 淋巴细胞毒性及增殖的抑制作用; 采用 ELISA 法测定上清液中白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)、IL-2、 γ -干扰素 (γ -interferon, IFN- γ) 水平; 采用流式细胞仪检测调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 数量。**结果** 防己黄芪汤在大鼠体内主要入血成分为防己诺林碱、木兰花碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、甘草苷、黄芪甲苷、甘草次酸和粉防己碱。除防己诺林碱外, 其他 6 个成分在体内的吸收具有剂量相关性。粉防己碱、防己诺林碱和甘草次酸在体内吸收速率慢, 消除速率慢, 驻留时间长 [平均滞留时间 (MRT) > 10 h、清除率 (CL) < 8 L/(h·kg)]; 木兰花碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和甘草苷在体内具有吸收和消除速度快、体内驻留时间短的特点 [达峰时间 (t_{max}) < 1 h、MRT < 5.2 h、CL > 50 L/(h·kg)]。与单一成分给药相比, 防己黄芪汤中的粉防己碱的吸收程度明显增加, 而消除速率明显降低。防己黄芪汤可以抑制 T 淋巴细胞的增殖, 还可降低细胞上清液中促炎因子 IL-2、IL-17 和 IFN- γ 水平 ($P < 0.05$, 0.01), 增加 Treg 的分化数量 ($P < 0.05$, 0.01), 防己黄芪汤主要入血成分之一粉防己碱可降低细胞上清液中 IL-17 水平并增加 Treg 分化数量 ($P < 0.05$, 0.01)。**结论** 君药防己和黄芪的特征成分是防己黄芪汤的主要入血成分; 君药防己含有的粉防己碱与防己黄芪汤中其他成分存在协同作用。防己黄芪汤可抑制 T 淋巴细胞的增殖, 其作用机制可能是通过调节 Treg 的增殖分化过程, 使激活的免疫反应受到影响, 而防己黄芪汤中的粉防己碱可能起到重要作用。

关键词: 防己黄芪汤; 药动学; T 淋巴细胞; 防己诺林碱; 木兰花碱; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 甘草苷; 黄芪甲苷; 甘草次酸; 粉防己碱

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)03-0861-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.017

Pharmacokinetics of Fangji Huangqi Decoction in rats and its regulation on T lymphocytes

LYU Chunming¹, HOU Ting¹, ZHANG Ning¹, WANG Bing²

1. Science and Technology Experimental Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Shanghai Institute of Materia Medica Chinese, Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To compare the pharmacokinetics of the active ingredients in Fangji Huangqi Decoction (防己黄芪汤, FHT), and study the mechanism of FHT and tetradrine (TET) on inhibiting concanavalin (ConA)-induced T lymphocytes proliferation. **Methods** An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) technology was used to detect the plasma concentration of blood components at different time points after rats were ig different doses of FHT and TET, and the pharmacokinetic behavior was analyzed. The cytotoxicity and cell proliferation inhibitory activity of FHT on T cells was determined by MTT and ³H-thymidine (³H-TdR) incorporation method. The levels of interleukin-17 (IL-17), IL-2 and γ -interferon (IFN- γ) in the supernatant was determined by ELISA. The numbers of regulatory T cells (Treg) was detected by flow cytometry. **Results** Fangchinoline, magnoflorine, calycosin-7-glucoside, liquiritin, astragaloside IV, glycyrrhetic acid and TET were the main components

收稿日期: 2023-09-04

基金项目: 上海市科委自然科学基金资助项目 (21ZR1475200)

作者简介: 吕春明, 博士, 助理研究员, 从事中药药动学及中药药效物质发掘。E-mail: chunming83g@126.com

*通信作者: 王 冰, 副研究员, 硕士生导师, 从事炎症性疾病靶向治疗研究。E-mail: bwang@simm.ac.cn

of FHT that entered the bloodstream in rats. Except for fangchinoline, the absorption of other six ingredients in the body were dose-dependent. TET, fangchinoline and glycyrrhetic acid in the body had a slow absorption rate, a slow elimination rate and a long residence time [mean retention time (MRT) > 10 h, clearance rate (CL) < 8 L/(h·kg)]. Magnoflorine, calycosin-7-glucoside and liquiritin were rapidly absorbed, quickly eliminated, with a long residence time [$T_{\max}$ < 1 h, MRT < 5.2 h, CL > 50 L/(h·kg)]. In comparison to single component administration, the absorption of TET in FHT was increased, while the elimination rate was decreased. FHT inhibited the proliferation of T lymphocytes, significantly reduced the levels of proinflammatory cytokines IL-2, IL-17 and IFN- γ in cell supernatant ($P < 0.05, 0.01$), increased the number of Treg differentiation ($P < 0.05, 0.01$). TET, one of the major compounds of FHT that entered the bloodstream, could decrease the content of IL-17 in cell supernatant and increase the number of Treg differentiation ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The characteristic components of the monarch drug Fangji (*Stephaniae Tetrandrae Radix*) and Huangqi (*Astragali Radix*) are the major blood entering components of FHT. Tetrandrine in monarch drug *Stephaniae Tetrandrae Radix* has a synergistic effect with other components in FHT. FHT can inhibit the proliferation of T lymphocytes, and its mechanism may be related to its actions in regulating the proliferation and differentiation process of Treg, affecting the activated immune response. Tetrandrine in FHT may play an important role.

Key words: Fangji Huangqi Decoction; pharmacokinetics; T lymphocytes; fangchinoline; magnoflorine; calycosin-7-glucoside; liquiritin; astragaloside IV; glycyrrhetic acid; tetrandrine

防己黄芪汤出自张仲景《金匮要略方论》^[1],由防己、黄芪、白术和炙甘草按 4:5:3:2 比例组成。防己苦寒,可除湿利水消肿,兼能辛散祛风;黄芪补气健脾补肺,尤能固表行水,二药配伍共为君药,补气除湿利水,祛风散邪固表。白术补脾燥湿,既助黄芪补气固表,又助防己祛湿利水,为方中臣药。甘草益气健脾,调和诸药,为方中佐使药。诸药配伍,是治疗水肿之常用方,可用于治疗水湿内停及脾肾亏虚之证^[2]。目前,防己黄芪汤被广泛用于治疗自身免疫性疾病如类风湿性关节炎^[3]、肾病综合征^[4]、慢性肾炎^[5]、膝骨关节炎^[6],且该复方富含生物碱类、皂苷类、黄酮类及多糖类等活性成分^[7]。多成分定量分析结果表明,粉防己碱是防己黄芪汤中含量最高的成分,为该方中重要的物质基础^[8],具有抗炎^[9]、抗肿瘤^[10]、抗纤维化^[11]等药理作用。

自身免疫性疾病是一种局部或全身性炎症反应的疾病,包括类风湿性关节炎、炎症性肠病及系统性红斑狼疮等,主要影响因素涉及环境、遗传及免疫等^[12]。已有研究表明,CD4⁺ T 细胞是自身免疫性疾病中的重要影响因素^[13]。在一些自身免疫性疾病进展中,辅助性 T 细胞(helper T cell, Th)的功能受到影响^[14-15];此外,调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的活性也被抑制^[16]。Treg 可分泌免疫抑制性的细胞因子以维持机体自身免疫耐受,因此,调控 Th 和 Treg 之间平衡是治疗自身免疫性疾病的关键。提示探讨防己黄芪汤对 T 细胞的调控作用有助于阐明防己黄芪汤治疗自身免疫性疾病的机制。

由于防己黄芪汤组方成分复杂,目前对其质量评价方法大多选择其中几个成分作为质控标准,难以反映复方整体水平,而且对防己黄芪汤有效成分在体内动态过程的研究不全面,但了解这些成分在体内的动态变化,对于揭示防己黄芪汤物质基础和配伍规律具有重要意义。因此,本研究拟对防己黄芪汤进行多成分表征的质量评价,研究防己黄芪汤在大鼠体内的药动学行为,以揭示其主要入血成分的体内过程;同时,为进一步考察防己黄芪汤的药效基础,从 Th 分化层面探讨该复方在免疫方面的作用,为该复方的后续研究奠定了工作基础。

1 材料

1.1 动物

体质量(270±20)g 的清洁级雄性 SD 大鼠和体质量 20~23 g 的 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于上海中医药大学动物实验中心,合格证号 SCXK(京)2012-0001,许可证号 SYXK(沪)2014-0008。实验前在室温(22±2)℃、相对湿度 45%~60%、每天光照 12 h 的条件下适应性饲养 1 周。动物实验操作方法遵循上海中医药大学实验动物伦理委员会相关规定(批准号 201801006)。所有动物研究均根据《实验动物护理和使用指南》进行。

1.2 药材

防己、黄芪、甘草、白术饮片均购自上海康桥中药饮片有限公司,批号分别为 120901、131025、131029、130221,经上海中医药大学科技实验中心张宁研究员分别鉴定为防己科植物粉防己

Stephania tetrandra S. Moore 的干燥根、豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。

1.3 药品与试剂

对照品木兰花碱、防己诺林碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、甘草次酸、黄芪甲苷、粉防己碱(批号分别为 130611、121224、130204、110723、130816、121127, 质量分数均 $\geq 98\%$)购自四川维克奇生物科技有限公司; 甘草苷对照品(批号 1116010-201106, 质量分数 $\geq 93.7\%$)购自中国食品药品检定研究院; 地西洋(批号 1159302, 质量分数 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司; 胎牛血清(批号 12483020)、RPMI 1640 培养基(批号 11875127)购自美国 Gibco 公司; ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR, 批号 100430)购自中国科学院上海应用物理研究所; 刀豆球蛋白 A(concanavalin A, ConA, 批号 C2272)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 201608)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 肝素钠(批号 20150526)购自国药集团化学试剂有限公司; 红细胞裂解液(批号 11814389001)购自上海罗氏制药有限公司; 抗小鼠白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)、IL-2、 γ -干扰素(γ -interferon, IFN- γ)捕获抗体(批号分别为 560268、554424、551309)购自美国 BD Biosciences 公司; 生物素化抗小鼠 IL-17、IL-2、IFN- γ 检测抗体(批号分别为 BAF421、BAF402、BAF485)购自美国 R&D Systems 公司; RIPA 裂解液(批号 P00138)购自上海碧云天生物技术有限公司; CD4-PE、CD25-PE-Cy7 和 FoxP3-APC 流式抗体(批号分别为 12004382、25025742、4303851)购自 Affymetrix eBioscience 公司; 水为超纯水, 甲醇、甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.4 仪器

UltiMate 3000 型超高效液相色谱-TSQ Quantum Access Max 型三重四级杆质谱联用系统(美国 Thermo 公司); Centrifuge 5810R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司); CP225D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司); PowerWave XS2 型全波长酶标仪(美国 BioTek 公司); MicroBeta TriLux/JET 闪烁/发光计数仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

2 方法

2.1 防己黄芪汤的制备

结合防己黄芪汤原方^[1], 按《方剂学》第 7 版(邓中甲主编)记载, 确定其处方组成为防己 1 两(12 g)、黄芪 1 两 1 分(15 g)、白术七钱半(9 g)、甘草半两(6 g)。分别称取适量防己、黄芪、白术、甘草饮片(4:5:3:2), 加适量水浸泡 30 min, 以 10 倍量蒸馏水煎煮 2 次, 每次 1 h, 煎液用 3 层纱布滤过, 合并滤液, 减压浓缩至适量, 于 65 °C 真空干燥, 粉碎过 80 目筛, 得防己黄芪汤粉末, 置于干燥器中保存^[17]。

2.2 防己黄芪汤多成分定量分析的超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~1 min, 20% A; 1~8 min, 20%~100% A; 8~12 min, 100% A; 12~16 min, 100%~20% A。体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 2 μL 。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描, 正、负离子切换扫描模式, 正、负离子喷雾电压分别为+3.5 kV、-2.5 kV; 去溶剂气温度 400 °C; 离子传输管温度 350 °C; 鞘气压力和辅助气压力分别为 45、15 psi(1 psi=6.895 kPa)。木兰花碱、防己诺林碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、甘草苷、黄芪甲苷、甘草次酸、地西洋(内标)和粉防己碱的 m/z 分别为 342.15~297.10、609.33~367.10、447.16~285.00、417.29~255.10、807.46~627.40、471.44~149.20、284.99~193.00、623.35~381.10, 碰撞能量分别为 18、38、19、20、49、36、27、43 eV。

2.2.3 混合对照品溶液和内标储备液的配制 分别精密称取木兰花碱、防己诺林碱、粉防己碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、甘草苷、甘草次酸、黄芪甲苷 7 种对照品适量, 置棕色 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容, 4 °C 保存, 作为对照品储备液。精密称取地西洋粉末适量, 加甲醇定容至 10 mL, 4 °C 保存, 作为内标储备液。临用前, 取一定量的混合对照品储备液, 用甲醇稀释成混合对照品溶液(各成分质量浓度分别为木兰花碱 0.75、3.75、7.50、30.00 $\mu\text{g/L}$, 防己诺林碱 3、15、30、120 $\mu\text{g/L}$, 粉防己碱 7.5、37.5、75.0、300.0 $\mu\text{g/L}$, 毛蕊异黄酮葡

葡萄糖苷 0.75、3.75、7.50、30.00 $\mu\text{g/L}$ ，黄芪甲苷 3、15、30、120 $\mu\text{g/L}$ ，甘草苷 1.87、9.35、18.70、74.80 $\mu\text{g/L}$ ，甘草次酸 45、225、450、1 800 $\mu\text{g/L}$ 。

2.2.4 给药及血液样本采集 SD 大鼠随机分为 6 组，每组 6 只。其中 3 组大鼠分别按低、中、高剂量（2.67、4.00、6.00 g/kg ）ig 防己黄芪汤混悬液。给药前 12 h 禁食，自由饮水，ig 2 h 后自由饮水和进食，分别于给药后 0.083、0.167、0.25、0.33、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、60 h 眼眶静脉采血 400 μL ，置于肝素钠处理过的离心管中。另外 3 组大鼠分别按低、中、高剂量（7.36、11.03、16.54 mg/kg ）ig 粉防己碱混悬液，分别于给药后 0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、60 h 眼眶静脉采血 400 μL ，置于肝素钠处理过的离心管中。所得血浆于 1 000 r/min 离心 10 min 后，取上清，保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.2.5 样品处理 取大鼠血浆样品 200 μL ，加入 200 $\mu\text{g/L}$ 内标储备液 50 μL ，加甲醇 850 μL 涡旋混合 2 min 以沉淀蛋白， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、13 200 r/min 离心 15 min，取上清液转移至离心管， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干，加 20% 甲醇 100 μL 复溶，涡旋 3 min，离心，取上清液进样分析。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 分别取大鼠空白血浆+低质量浓度混合对照品溶液+内标溶液、给药后 45 min 的血浆样品+内标溶液、空白血浆+内标溶液适量，按“2.2.5”项下方法处理，按“2.2.1”“2.2.2”项下条件检测。

2.3.2 线性范围及定量限考察 分别精密吸取一定量的混合对照品储备液，加甲醇稀释，得 7 种不同质量浓度的混合对照品溶液，精密吸取 100 μL ，分别加至 200 μL 的空白血浆中，按“2.2.5”项下方法处理，按“2.2.1”“2.2.2”项下条件检测，记录峰面积。以各成分峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标（ Y ），各成分的质量浓度为横坐标（ X ），采用加权最小二乘法，权重系数为 $1/\chi^2$ ，绘制标准曲线，以信噪比（ S/N ）=10 为定量限。

2.3.3 精密度和准确度考察 分别精密吸取“2.2.3”项下 4 种质量浓度的混合对照品溶液 100 μL ，加至 200 μL 的空白血浆中，每个质量浓度平行 5 份，按“2.2.5”项下方法处理，按“2.2.1”“2.2.2”项下条件检测，1 d 内连续测定 3 次，评价日内精密度；连续测定 3 d，评价日间精密度。

2.3.4 提取回收率与基质效应考察 取生理盐水 200 μL ，加入 4 种质量浓度的混合对照品溶液 100 μL 和 200 $\mu\text{g/L}$ 内标溶液 50 μL ，按“2.2.5”项下方法处理，按“2.2.1”“2.2.2”项下条件检测，测定各成分峰面积，记为 A 。取空白血浆 200 μL ，加入内标溶液 50 μL ，加甲醇 850 μL 涡旋混合 2 min，离心，取上清液，加入 4 种质量浓度的混合对照品溶液 100 μL ， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干，加 20% 甲醇 100 μL 复溶，涡旋 3 min，离心，吸取上清液，按“2.2.1”“2.2.2”项下条件检测各成分峰面积，记为 B 。取空白血浆 200 μL ，加入 4 种质量浓度的混合对照品溶液 100 μL 和内标溶液 50 μL ，按“2.2.5”项下方法处理，按“2.2.1”“2.2.2”项下条件检测，测定各待测物的峰面积，记为 C 。计算提取回收率和基质效应。

$$\text{提取回收率} = C/B$$

$$\text{基质效应} = C/A$$

2.3.5 稳定性考察 取大鼠空白血浆 200 μL ，分别加入 4 种质量浓度的混合对照品溶液 100 μL ，按“2.2.5”项下方法处理，按“2.2.1”“2.2.2”项下条件检测，考察不同储存条件下（ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 15 d、3 次冻融循环）样品的稳定性。

2.4 药动学研究

按“2.2.4”项下方法给药、收集样品，测定前于室温溶解血浆样品，涡旋，按“2.2.5”项下方法处理，按“2.2.1”“2.2.2”项下条件检测，所得数据采用 Kinetica 4.4 软件非房室模型分析，计算各成分的达峰时间（ t_{max} ）、达峰浓度（ C_{max} ）、消除半衰期（ $t_{1/2}$ ）、药时曲线下面积（AUC）、平均驻留时间（MRT）、清除率（CL）和表观分布容积（ V_z ）。

2.5 防己黄芪汤对 Th 分化的调节作用

2.5.1 给药溶液的配制 精密称取防己黄芪汤粉末 10 mg，用 RPMI 1640 培养基溶解并稀释成不同质量浓度的防己黄芪汤药液，使用前经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。精密称取粉防己碱 5 mg，加 1 mol/L HCl 充分溶解并定容至 0.1 mg/L ，精密吸取一定量于量瓶中，加 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 7.2，加 RPMI 1640 培养基定容成 0.6 mg/L 粉防己碱溶液，使用前经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.5.2 小鼠脾脏单细胞悬液的制备 BALB/c 小鼠脊椎脱臼处死，置于 75% 乙醇中消毒灭菌，在生物安全柜中取出脾脏。用玻璃片将脾脏磨碎，200 目

尼龙网滤过,得到的细胞悬液于 4℃、1 000 r/min 离心 5 min (离心半径 10 cm),弃去上清液。向沉淀细胞中加入一定量的红细胞裂解液,混匀,室温静置 3 min,离心,弃上清液。加入磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 重悬,200 目尼龙网滤过,离心,弃上清液,加入一定量含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,混匀,在倒置显微镜下对细胞悬液进行计数。

2.5.3 防己黄芪汤对 T 淋巴细胞毒性的影响 将 T 细胞悬液用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释至 3×10^5 个/mL,按 100 μ L/孔接种于 96 孔板中,空白组仅加入 RPMI 1640 培养基,给药组按 50 μ L/孔加入不同质量浓度 (100、10、1、0.1、0.01、0.001、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mg/mL) 的防己黄芪汤药液,空白组和对照组均按 50 μ L/孔加入 RPMI 1640 培养基,每组设置 6 个复孔,于细胞培养箱中培养 92 h,按 20 μ L/孔加入 MTT 溶液,继续孵育 4 h,弃去上清液,按 150 μ L/孔加入 DMSO,摇床振荡 10 min,采用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度 (A) 值,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5.4 防己黄芪汤对 T 淋巴细胞增殖的影响 将 T 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,平行 6 个复孔,按 100 μ L/孔加入细胞混悬液,空白组仅加入 RPMI 1640 培养基,对照组和给药组先按 50 μ L/孔加入 8 mg/L ConA 溶液,给药组再按 50 μ L/孔加入不同质量浓度 (100、10、1、0.1、0.01、0.001、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mg/mL) 的防己黄芪汤药液,空白组按 50 μ L/孔加入 RPMI 1640 培养基,于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内培养 56 h,在终止培养前 16 h,每孔加入 ³H-TdR 20 μ L,使其终浓度为 1 μ Ci/mL,继续培养 16 h。等标记反应完成后将标记的细胞收集至玻璃纤维膜上滤过,用蒸馏水多次洗涤,把滤纸片放在 80℃烘箱内烘干后,放入含有脂溶性闪烁液 10 mL 的闪烁杯中,采用闪烁/发光计数器测定样品的每分钟脉冲数 (cpm)。

2.5.5 防己黄芪汤对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞炎症因子水平的影响 将 T 淋巴细胞以 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,设置对照组、模型组和各给药组,对照组加入 RPMI 1640 培养基,其余各组加入 2 mg/L ConA,各给药组再加入不同质量浓度 (0.2、1.0、5.0 mg/L) 的防己黄芪汤或 0.6 mg/L 粉防己碱,培养 96 h,于给药后 48 h 收集细胞上清液,采用 ELISA 法测定 IL-2 和 IL-17 水平;于给药后 96 h 收

集细胞上清液,测定 IFN- γ 水平。

2.5.6 防己黄芪汤对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞 CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 数目的影响 将 T 淋巴细胞悬液以 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,按“2.5.5”项下方法进行分组与给药,培养 24 h 后收集细胞。加入具有荧光标记的 CD4-PE 和 CD25-PE-Cy7 抗体用于标记细胞表面, FoxP3-APC 抗体用于细胞内染色,通过流式细胞仪采集数据,使用 CellQuest™ 软件进行分析。

2.6 统计学分析

运用 SPSS Statistics 18.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验和 One-way ANOVA 检验进行分析。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性 大鼠 ig 防己黄芪汤后血浆样品的 UPLC-MS/MS 图谱见图 1,表明该方法具有良好的专属性。

3.1.2 线性范围及定量限 如表 1 所示,该方法满足血浆样品的测定要求。

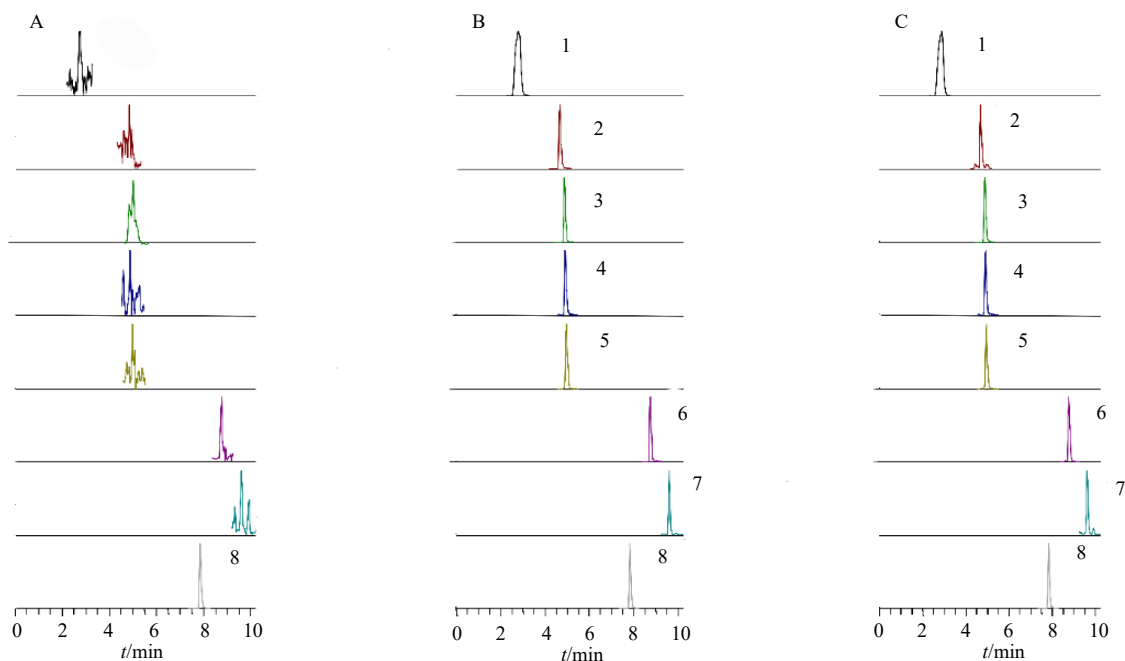
3.1.3 精密度和准确度 如表 2 所示,7 个成分的日间、日内准确度为 85.14%~105.50%,日间精密度和日内精密度的 RSD 为 0.2%~10.9%,符合生物样品的检测要求。

3.1.4 提取回收率与基质效应 如表 2 所示,各成分的提取回收率为 86.90%~113.04%,基质效应为 52.33%~112.50%,其中粉防己碱受基质效应影响较大 (52.33%~64.76%),但粉防己碱的回收率较高 (103.49%~111.68%),表明血浆中物质只对粉防己碱在质谱中的响应有抑制,因 4 个不同质量浓度的粉防己碱基质效应 RSD<15%,说明这种抑制作用可通过建立随行标曲计算浓度抵消,满足分析要求。各成分回收率良好。

3.1.5 稳定性 如表 3 所示,7 个成分的准确度为 84.70%~115.65%,满足生物样品的分析要求。

3.2 药动学研究

各成分的药时曲线见图 2,药动学参数见表 4。木兰花碱、粉防己碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、甘草苷、黄芪甲苷和甘草次酸的 AUC_{0~t} 和 AUC_{0~∞} 具有剂量相关性趋势;木兰花碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、甘草苷在体内可被快速吸收并消除 [$t_{\max}$ <1 h、CL>50 L/(h·kg)];粉防己碱、防己诺林碱和甘草次酸在大鼠体内消除缓慢 [CL<8 L/(h·kg)],体内驻留时



A-空白血浆+内标; B-空白血浆+混合对照品+内标; C-给药 45 min 后的血浆样品+内标; 1-木兰花碱; 2-防己诺林碱; 3-粉防己碱; 4-毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 5-甘草苷; 6-黄芪甲苷; 7-甘草次酸; 8-内标。
A-blank plasma with internal standard; B-blank plasma with mixed standards and internal standard; C-plasma sample at 45 min postdosing with internal standard; 1-magnoflorine; 2-fangchinoline; 3-tetradrine; 4-calycosin-glucoside; 5-liquiritin; 6-astragaloside; 7-glycyrrhetic acid; 8-internal standard.

图 1 大鼠 ig 防己黄芪汤后血浆样品的 UPLC-MS/MS 图谱
Fig. 1 UPLC-MS/MS spectrum of plasma samples after ig Fangji Huangqi Decoction in rats.

表 1 大鼠血浆中 7 种成分的线性范围和定量限

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
木兰花碱	$Y=0.0357X+0.0019$	0.9958	0.29~37.50	0.29
防己诺林碱	$Y=0.0091X+0.0012$	0.9995	0.57~75.00	0.57
粉防己碱	$Y=0.0910X+0.0038$	0.9998	0.73~375.00	0.73
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=0.0125X+0.0007$	0.9994	0.29~37.50	0.29
甘草苷	$Y=0.0062X+0.0044$	0.9966	0.73~93.75	0.73
黄芪甲苷	$Y=0.0043X+0.0005$	0.9999	0.29~150.00	0.29
甘草次酸	$Y=0.0021X+0.0005$	0.9995	2.20~2250.00	2.20

表 2 大鼠血浆中 7 种成分的精密性、回收率和基质效应

成分	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	日内精密性 ($n=3$)		日间精密性 ($n=3$)		提取回收率/%	基质效应/%
		准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%		
木兰花碱	0.75	87.36	5.7	88.33	1.5	96.78±8.82	111.95±6.25
	3.75	85.79	0.4	85.14	0.7	100.43±7.71	107.71±5.49
	7.50	88.77	0.4	88.74	1.7	106.60±6.37	107.97±2.88
	30.00	87.11	1.3	87.56	1.5	113.04±5.09	106.88±1.99
防己诺林碱	3.00	89.29	3.2	86.42	1.6	91.60±14.08	81.31±12.43
	15.00	86.95	3.2	85.35	2.7	100.13±5.55	82.95±8.41
	30.00	91.35	4.6	88.05	3.3	103.78±7.20	87.52±11.63
	120.00	88.22	5.0	85.54	2.2	105.77±2.53	84.55±4.19
粉防己碱	7.50	86.46	0.5	88.30	1.2	104.58±11.04	57.15±8.03
	37.50	91.13	1.3	90.50	1.7	103.49±4.83	52.33±5.36
	75.00	92.66	1.2	92.57	2.4	108.64±3.95	55.19±3.63
	300.00	85.43	0.6	85.40	1.4	111.68±3.14	64.76±1.93

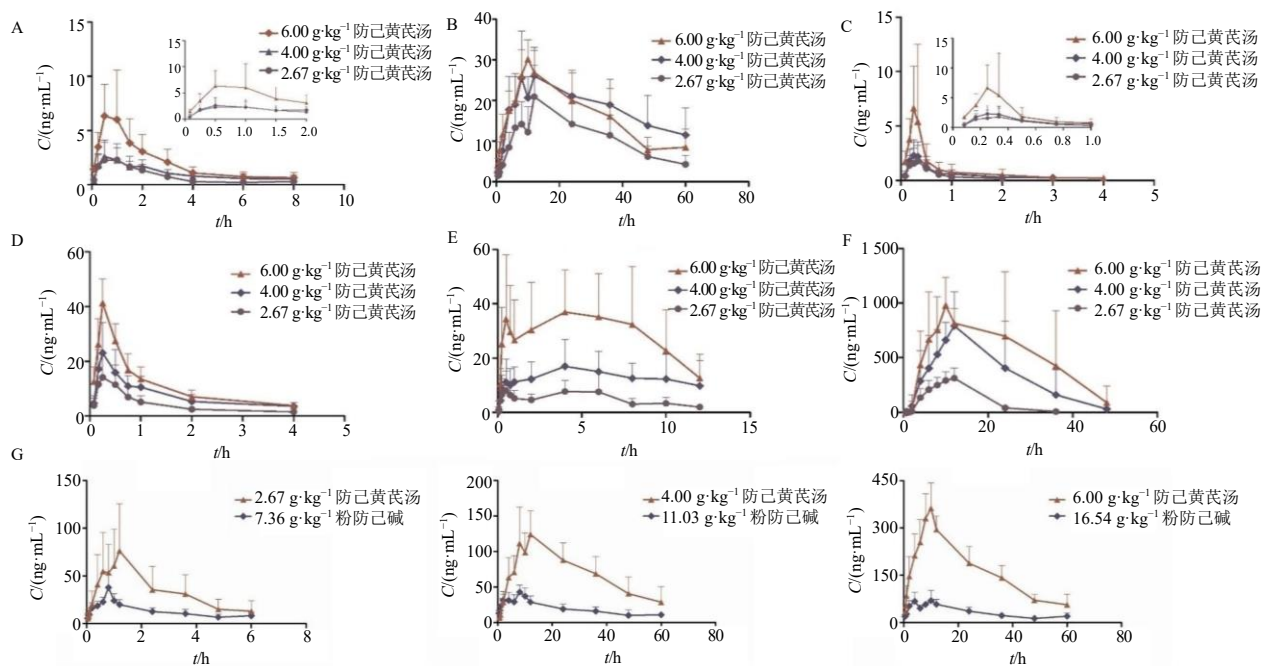
表 2 (续)

成分	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	日内精密度 ($n=3$)		日间精密度 ($n=3$)		提取回收率/%	基质效应/%
		准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.75	85.90	3.0	87.42	0.8	86.90 $\pm$ 5.23	111.56 $\pm$ 6.16
	3.75	88.50	1.0	90.57	3.7	94.88 $\pm$ 4.84	97.31 $\pm$ 4.97
	7.50	92.12	0.4	93.21	1.9	100.25 $\pm$ 4.48	95.59 $\pm$ 2.54
	30.00	89.71	0.4	91.94	4.1	99.97 $\pm$ 2.65	94.28 $\pm$ 2.56
甘草苷	1.87	88.44	1.9	91.81	4.5	91.91 $\pm$ 11.51	109.74 $\pm$ 6.71
	9.35	93.58	8.8	101.40	3.5	102.48 $\pm$ 7.97	106.86 $\pm$ 2.41
	18.70	95.74	10.9	105.50	3.4	105.44 $\pm$ 6.79	101.91 $\pm$ 2.42
	74.80	85.46	3.6	89.33	3.9	104.95 $\pm$ 4.08	110.44 $\pm$ 2.90
黄芪甲苷	3.00	89.02	2.6	92.06	6.4	103.07 $\pm$ 5.44	86.16 $\pm$ 13.28
	15.00	92.27	0.6	90.02	2.3	102.41 $\pm$ 1.03	85.01 $\pm$ 6.29
	30.00	95.50	0.8	93.34	2.5	106.98 $\pm$ 4.78	88.56 $\pm$ 10.69
	120.00	88.79	0.7	87.67	1.4	104.81 $\pm$ 1.74	99.59 $\pm$ 2.96
甘草次酸	45.00	95.86	0.6	98.64	2.4	103.00 $\pm$ 6.14	112.50 $\pm$ 4.02
	225.00	100.39	0.8	103.63	3.8	99.54 $\pm$ 2.00	103.91 $\pm$ 7.81
	450.00	99.12	0.2	103.87	5.4	99.62 $\pm$ 3.74	96.51 $\pm$ 8.50
	1 800.00	87.29	1.0	90.26	4.1	100.98 $\pm$ 2.31	101.02 $\pm$ 10.52

表 3 大鼠血浆中 7 种成分的稳定性 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Stability of seven components in plasma of rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

成分	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	4℃放置 24 h		25℃放置 12 h		-20℃放置 15 d		3 次冻融循环	
		实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	准确度/%	实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	准确度/%	实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	准确度/%	实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	准确度/%
木兰花碱	0.75	0.64 $\pm$ 0.02	85.31	0.82 $\pm$ 0.04	109.10	0.76 $\pm$ 0.03	101.75	0.79 $\pm$ 0.03	105.76
	3.75	3.21 $\pm$ 0.16	85.47	4.23 $\pm$ 0.17	112.74	4.21 $\pm$ 0.14	112.19	4.31 $\pm$ 0.15	114.98
	7.50	6.64 $\pm$ 0.52	88.49	8.62 $\pm$ 0.16	114.87	7.90 $\pm$ 0.12	105.28	8.38 $\pm$ 0.17	111.77
	30.00	25.87 $\pm$ 0.22	86.25	32.94 $\pm$ 1.21	109.78	30.84 $\pm$ 1.32	102.79	32.94 $\pm$ 1.68	109.81
防己诺林碱	3	2.77 $\pm$ 0.09	92.42	3.47 $\pm$ 0.09	115.57	3.43 $\pm$ 0.02	114.27	3.38 $\pm$ 0.06	112.73
	15	12.71 $\pm$ 0.70	84.70	17.06 $\pm$ 0.25	113.75	15.94 $\pm$ 1.44	106.28	17.11 $\pm$ 0.37	114.08
	30	26.56 $\pm$ 2.05	88.53	34.48 $\pm$ 0.16	114.94	33.32 $\pm$ 0.70	111.06	32.81 $\pm$ 1.41	109.35
	120	102.76 $\pm$ 2.82	85.64	135.04 $\pm$ 2.95	112.53	129.21 $\pm$ 3.83	107.68	127.14 $\pm$ 3.94	105.95
粉防己碱	7.5	6.66 $\pm$ 0.34	88.76	8.63 $\pm$ 0.66	115.04	8.46 $\pm$ 0.38	112.76	8.60 $\pm$ 0.30	114.67
	37.5	34.00 $\pm$ 1.51	90.68	37.83 $\pm$ 8.75	100.87	42.24 $\pm$ 0.89	112.65	38.27 $\pm$ 2.23	102.06
	75.0	69.05 $\pm$ 2.82	92.06	85.82 $\pm$ 4.99	114.42	83.82 $\pm$ 0.85	111.76	83.47 $\pm$ 0.59	111.29
	300.0	255.02 $\pm$ 1.21	85.01	312.38 $\pm$ 5.99	104.13	306.54 $\pm$ 11.80	102.18	313.58 $\pm$ 4.66	104.53
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.75	0.66 $\pm$ 0.06	87.36	0.65 $\pm$ 0.03	86.34	0.64 $\pm$ 0.03	85.48	0.66 $\pm$ 0.02	88.11
	3.75	3.28 $\pm$ 0.14	87.48	3.24 $\pm$ 0.03	86.28	3.20 $\pm$ 0.09	85.43	3.49 $\pm$ 0.23	92.97
	7.50	6.93 $\pm$ 0.16	92.37	6.39 $\pm$ 0.61	85.15	6.68 $\pm$ 0.14	89.09	6.56 $\pm$ 0.48	87.47
	30.00	26.84 $\pm$ 0.29	89.48	28.89 $\pm$ 1.17	96.30	26.22 $\pm$ 0.96	87.41	28.44 $\pm$ 0.46	94.79
甘草苷	1.87	1.68 $\pm$ 0.59	89.71	1.66 $\pm$ 0.14	88.77	1.62 $\pm$ 0.09	86.63	1.65 $\pm$ 0.08	88.24
	9.35	9.15 $\pm$ 0.74	97.85	8.04 $\pm$ 0.22	86.04	8.25 $\pm$ 0.28	88.21	8.80 $\pm$ 0.36	94.09
	18.70	19.01 $\pm$ 0.92	101.67	16.30 $\pm$ 0.90	87.14	16.70 $\pm$ 0.54	89.29	16.22 $\pm$ 0.79	86.73
	74.80	65.16 $\pm$ 0.84	87.11	63.61 $\pm$ 3.05	85.04	63.99 $\pm$ 2.95	85.54	63.70 $\pm$ 1.14	85.16
黄芪甲苷	3	2.74 $\pm$ 0.11	91.31	2.86 $\pm$ 0.07	95.30	2.74 $\pm$ 0.09	91.29	2.83 $\pm$ 0.06	94.18
	15	13.80 $\pm$ 0.34	92.01	16.64 $\pm$ 0.31	110.90	15.80 $\pm$ 0.47	105.36	16.84 $\pm$ 0.43	112.25
	30	28.40 $\pm$ 0.56	94.65	31.14 $\pm$ 0.44	103.81	29.80 $\pm$ 0.28	99.32	29.90 $\pm$ 2.18	99.66
	120	105.71 $\pm$ 1.77	88.09	120.02 $\pm$ 2.72	100.01	116.41 $\pm$ 2.50	97.01	119.84 $\pm$ 3.28	99.87
甘草次酸	45	42.92 $\pm$ 1.45	95.38	50.93 $\pm$ 1.73	113.18	51.85 $\pm$ 1.30	115.23	51.71 $\pm$ 2.14	114.92
	225	223.84 $\pm$ 4.89	99.49	257.72 $\pm$ 9.09	114.54	260.20 $\pm$ 11.10	115.65	240.61 $\pm$ 8.53	106.94
	450	445.53 $\pm$ 14.17	99.01	515.83 $\pm$ 7.71	114.63	498.92 $\pm$ 5.14	110.87	499.64 $\pm$ 19.47	111.03
	1 800	1 588.55 $\pm$ 23.73	88.25	1 819.79 $\pm$ 69.77	101.10	1 832.85 $\pm$ 84.19	101.82	1 813.87 $\pm$ 43.66	100.77



A-木兰花碱; B-防己诺林碱; C-毛蕊异黄酮葡萄糖苷; D-甘草苷; E-黄芪甲苷IV; F-甘草次酸; G-低、中、高剂量防己黄芪汤与对应剂量粉防己碱分别给药后, 粉防己碱药时曲线对比。

A-magnoflorine; B-fangchinoline; C-calycosin-7-glucoside; D-liquiritin; E-astragaloside IV; F-glycyrrhetic acid; G-comparison of drug-time curve of tetrandrine after administration of Fangji Huangqi Decoction at low, modedium and high doses and tetrandrine at corresponding doses.

图2 大鼠ig防己黄芪汤后7种成分的药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Drug-time curve of seven compounds in rats after ig Fangji Huangqi Decoction ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表4 大鼠ig防己黄芪汤和粉防己碱后7种成分的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of seven ingredients in rats after ig Fangji Huangqi Decoction and tetrandrine

($\bar{x} \pm s, n=6$)

成分	剂量/ (g·kg ⁻¹)	t _{max} /h	C _{max} /(μg·L ⁻¹)	AUC ₀₋₁₂ /(h·μg·L ⁻¹)	AUC _{0-∞} /(h·μg·L ⁻¹)	t _{1/2} /h	MRT/h	CL/(L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹)	V _d /(L·kg ⁻¹)
木兰花碱	2.67	0.50±0.31	3.09±1.51	4.36±2.07	4.80±2.13	1.58±0.61	2.26±0.81	89.69±50.69	203.33±155.92
	4.00	0.71±0.70	3.04±1.41	6.89±1.58	9.06±2.64	3.53±1.03	5.10±1.17	62.12±15.56	302.42±64.38
	6.00	0.32±0.12	6.91±4.11	12.78±6.63	15.42±8.56	2.90±0.98	3.89±1.55	58.81±28.21	220.06±162.58
防己诺林碱	2.67	12.00±0.00	20.92±7.73	650.18±234.14	764.81±295.77	17.51±4.54	34.57±5.19	5.84±2.32	145.36±62.24
	4.00	19.43±15.90	30.44±8.39	1 020.12±275.1	1 345.94±415.18	23.51±8.32	41.95±13.71	4.77±1.59	148.94±28.19
	6.00	9.67±0.82	30.59±5.22	950.77±272.58	1 259.92±542.32	22.44±9.74	39.60±12.90	7.82±2.37	231.96±57.86
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	2.67	0.25±0.07	2.09±1.54	0.84±0.72	0.92±0.72	0.29±0.15	0.54±0.17	1 594.95±1 457.71	731.36±844.50
	4.00	0.29±0.04	2.37±1.43	1.73±0.80	2.12±0.95	1.08±0.87	1.70±1.31	640.98±406.27	718.42±412.19
	6.00	0.24±0.06	7.77±6.13	3.54±2.69	3.94±2.79	1.21±0.27	1.50±0.32	538.44±263.86	969.95±594.93
甘草苷	2.67	0.33±0.13	15.38±8.33	12.28±7.97	14.80±8.08	0.72±0.21	1.13±0.28	350.99±179.62	335.18±139.21
	4.00	0.36±0.28	23.31±10.89	28.72±8.04	37.72±10.78	1.62±0.71	2.50±1.13	173.43±54.43	382.30±135.10
	6.00	0.24±0.03	41.37±8.78	43.01±8.54	51.70±8.61	1.59±0.51	2.16±0.40	180.21±32.18	414.71±148.57
黄芪甲苷	2.67	4.75±3.37	12.11±6.96	57.73±25.22	59.62±16.51	2.04±0.79	5.33±1.81	1.97±0.61	5.49±1.48
	4.00	4.43±4.07	22.44±6.93	154.74±59.68	161.96±64.56	3.14±1.39	6.57±1.84	1.29±0.80	5.69±3.88
	6.00	3.36±3.00	47.21±21.10	347.80±169.09	443.93±190.02	5.05±5.39	9.55±6.85	0.70±0.43	4.36±3.89
甘草次酸	2.67	14.00±7.90	353.24±54.55	3 840.88±934.84	3 425.07±1 841.45	3.36±1.77	10.38±5.32	0.01±0.00	0.02±0.01
	4.00	13.00±5.62	804.01±217.18	15 072.44±8 022.39	15 265.82±8 227.71	5.06±0.91	16.51±5.47	0.00±0.00	0.01±0.01
	6.00	9.00±2.76	1 063.86±257.49	24 245.92±10 980.03	25 559.35±13 392.71	7.37±2.61	20.30±6.77	0.00±0.00	0.02±0.01
粉防己碱	0.007 36	8.00±1.15	38.30±12.10	783.11±192.82	1 167.25±371.63	30.68±7.66	48.98±11.80	7.04±2.84	291.92±62.74
	2.670 00	12.00±0.00	87.58±45.61	2 327.39±1 239.91*	2 770.02±1 569.78*	19.88±3.24**	33.20±3.78	3.38±1.71*	94.47±51.51*
粉防己碱	0.011 03	7.67±2.94	45.18±9.85	1 147.25±365.13	1 546.48±490.51	24.77±3.20	41.78±3.21	7.92±3.08	274.19±80.34
	4.000 00	12.57±5.38	133.34±42.24**	4 081.93±1 016.07**	5 742.23±3 419.01**	16.25±5.05**	31.60±6.88	2.38±1.00**	64.03±21.18**
粉防己碱	0.016 54	7.20±3.03	90.22±20.93	1 941.03±463.97	2 436.85±569.34	21.27±1.47	36.27±3.29	7.10±1.69	219.96±64.39
	6.000 00	9.33±1.03	373.64±85.62**	9 671.86±1 291.46**	11 523.07±2 171.49**	19.07±7.53	33.07±10.99	1.48±0.28**	38.97±11.22**

与同等剂量粉防己碱比较: *P<0.05 **P<0.01。

*P<0.05 **P<0.01 vs same level of dosage of tetrandrine.

时间较长 ($MRT > 10\text{ h}$), 表明其在体内具有吸收时间长、消除速度慢、驻留时间长的特点。黄芪甲苷的药时曲线呈双峰现象, 第 1 个峰的 $t_{\max}$ 为 0.5 h, 第 2 个峰的 $t_{\max}$ 为 4 h; 第 1 个峰的吸收和消除速率均比第 2 个快, 在其他含有黄芪的中药复方中也出现了此现象^[18], 但黄芪甲苷单体和黄芪提取物中黄芪甲苷的药动学研究并未发现有双峰现象^[19-20], 推测黄芪甲苷的吸收、消除等过程易受复方中其他成分的影响。粉防己碱是防己黄芪汤入血最多的生物碱, ig 不同剂量的粉防己碱是为了对比单一给药和复方给药时粉防己碱药动学的区别, 探索复方是否有增进粉防己碱入血的作用。实验中采用的粉防己碱给药剂量根据防己黄芪汤给药剂量折算。与单一成分给药相比, 防己黄芪汤中的粉防己碱的吸收程度明显增加, 而消除速率明显降低。

3.3 防己黄芪汤对 Th 分化的调节作用

3.3.1 防己黄芪汤对 T 淋巴细胞毒性的影响 如表 5 所示, 防己黄芪汤在 $1 \times 10^{-7} \sim 100\text{ mg/L}$ 对 T 淋巴细胞无明显细胞毒性作用。

表 5 防己黄芪汤对 T 淋巴细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 5 Effect of Fangji Huangqi Decoction on cytotoxicity of T lymphocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	A	抑制率/%
空白	—	0.167 ± 0.003	—
对照	—	0.300 ± 0.013	—
防己黄芪汤	100	0.246 ± 0.008	41
	10	0.265 ± 0.006	26
	1	0.314 ± 0.028	1
	0.1	0.296 ± 0.012	3
	0.01	0.292 ± 0.022	6
	0.001	0.304 ± 0.017	-3
	1×10^{-4}	0.304 ± 0.017	-3
	1×10^{-5}	0.298 ± 0.017	1
	1×10^{-6}	0.282 ± 0.005	13
	1×10^{-7}	0.288 ± 0.005	9

表 7 防己黄芪汤对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞炎症因子水平和 Treg 数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of Fangji Huangqi Decoction on inflammatory cytokine levels and Treg count of ConA-induced T lymphocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-2/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-17/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IFN- γ /($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ /%
对照	—	1.2159 ± 0.0235	0.1016 ± 0.0081	0.0962 ± 0.0038	22.3333 ± 17.8979
模型	—	$8.6375 \pm 0.0721^{###}$	$0.9667 \pm 0.0410^{###}$	$0.1200 \pm 0.0041^{###}$	$107.6667 \pm 26.5393^{###}$
防己黄芪汤	0.2	$7.1847 \pm 0.5224^*$	$0.8483 \pm 0.0159^{**}$	0.1073 ± 0.0000	151.0000 ± 48.0416
	1.0	7.4771 ± 0.1801	$0.6697 \pm 0.0197^{**}$	0.1062 ± 0.0020	$306.3333 \pm 81.5128^*$
	5.0	$6.8471 \pm 0.3196^{**}$	$0.7095 \pm 0.0153^{**}$	$0.1017 \pm 0.0019^*$	$343.6667 \pm 64.1275^{**}$
粉防己碱	0.6	8.9551 ± 0.8452	$0.6084 \pm 0.0067^{**}$	0.1144 ± 0.0138	$280.3333 \pm 61.8088^*$

与对照组比较: $^{###}P < 0.01$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ 。

$^{###}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group.

3.3.2 防己黄芪汤对 T 淋巴细胞增殖的影响 如表 6 所示, 防己黄芪汤在 $1 \times 10^{-7} \sim 100\text{ mg/L}$ 对 T 淋巴细胞的增殖具有抑制作用, 其半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 为 1.76 mg/L 。

表 6 防己黄芪汤对 T 淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 6 Effect of Fangji Huangqi Decoction on proliferation of T lymphocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	每分钟脉冲数/cpm	抑制率/%
空白	—	125 ± 8	—
对照	—	$4\,640 \pm 406$	—
防己黄芪汤	100	68 ± 10	101
	10	219 ± 39	98
	1	$2\,841 \pm 708$	40
	0.1	$3\,471 \pm 540$	26
	0.01	$3\,694 \pm 685$	21
	0.001	$4\,106 \pm 581$	12
	1×10^{-4}	$4\,162 \pm 543$	11
	1×10^{-5}	$4\,369 \pm 884$	6
	1×10^{-6}	$4\,474 \pm 623$	4
	1×10^{-7}	$4\,523 \pm 1\,286$	3

3.3.3 防己黄芪汤对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞炎症因子水平的影响 如表 7 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 IL-2、IFN- γ 和 IL-17 水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 防己黄芪汤高剂量组细胞上清液中 IL-2、IFN- γ 和 IL-17 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 防己黄芪汤中剂量组 IL-17 水平明显降低 ($P < 0.01$), 防己黄芪汤低剂量组 IL-2 和 IL-17 水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 粉防己碱组 IL-17 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.3.4 防己黄芪汤对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞 Treg 数目的影响 如表 7 所示, 与对照组比较, 模型组 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞比例明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 粉防己碱组和防己黄芪汤中、高剂量组 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞比例显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

目前关于防己黄芪汤中黄酮类和皂苷类成分的药动学研究报道较少,本研究建立了同时测定大鼠血浆中木兰花碱、防己诺林碱和粉防己碱等 7 个成分含量的 UPLC-MS/MS 分析方法。通常情况下,进入体循环的成分才有可能成为中药复方的药效物质。研究表明,防己诺林碱、木兰花碱、黄芪甲苷、甘草次酸和粉防己碱具有抗炎作用^[21-24],这些成分可能是防己黄芪汤发挥抗炎作用的重要物质基础。此外,防己黄芪汤中木兰花碱、黄芪甲苷、甘草次酸和粉防己碱的吸收表现出了剂量相关性,这与防己黄芪汤产生剂量相关性的抗炎药效相关^[25]。

中药复方中活性成分的药时曲线呈现双峰是较为普遍的现象。造成这种现象的原因可能有以下几种:①肝肠循环,经胆汁排入肠道的原型药物或者代谢物被肠黏膜重新吸收,由肝门静脉进入肝脏^[26];②胃排空和小肠转运异常^[27];③特定吸收位置^[28];④药物剂型因素^[29]。黄芪甲苷的药时曲线呈双峰现象,这种现象也同样发生在其他含有黄芪的中药复方中^[17],但关于黄芪甲苷单体和黄芪提取物中黄芪甲苷的药动学研究并未发现有双峰现象^[30],推测黄芪甲苷的药动学行为易受复方中其他成分的影响。除黄芪甲苷外,防己黄芪汤中的其他成分也会相互影响。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 3A 是人体肝脏和小肠中最丰富的 CYP 酶之一,其代谢介导的化合物的药动学特性会因药物相互作用而发生改变^[31]。研究表明,粉防己碱的代谢过程需要 CYP3A4 和 CYP3A5 的参与^[32]。粉防己碱水溶性较差、生物利用度较低^[33],而本研究表明防己黄芪汤给药时能够提高粉防己碱的生物利用度,此现象表明粉防己碱与复方中其他成分可能存在协同作用。甘草次酸是甘草酸具有药理活性的主要代谢物,研究显示,甘草次酸是 CYP3A4 的抑制剂^[34],因此,推测甘草次酸可能会通过 CYP3A4 抑制粉防己碱的代谢过程,减缓其消除速率,增加其在体循环中的暴露量,从而增加防己黄芪汤中粉防己碱的生物利用度。

此外,本研究发现防己黄芪汤可以抑制 T 淋巴细胞增殖,并下调炎症细胞因子水平,对于免疫疾病的临床应用具有重要意义。FoxP3 是 Treg 的关键和特异性转录因子,是增加 Treg 活性的先决条件^[35-37]。本研究结果显示防己黄芪汤可以促进 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg 的分化,表明防己黄芪汤可能通过促进

Treg 的分化,从而抑制 ConA 诱导的 T 淋巴细胞的增殖。因此, Treg 可能是防己黄芪汤治疗疾病的关键。防己黄芪汤主要入血成分粉防己碱可在体外诱导 Treg 分化,这与其他研究者的结论一致^[38],因此,粉防己碱可能是防己黄芪汤发挥疾病治疗的关键药效物质。

综上,大鼠 ig 防己黄芪汤后血液中的主要成分有木兰花碱、防己诺林碱、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、甘草苷、黄芪甲苷、甘草次酸和粉防己碱,且粉防己碱与复方中的其他成分存在着协同作用,可提高该成分的生物利用度,体现了中药配伍的合理性和科学性。另外,本研究还考察了防己黄芪汤及其主要入血成分粉防己碱对 T 淋巴细胞分化的调节作用,发现 Treg 可能是防己黄芪汤治疗免疫性疾病的关键免疫细胞,而粉防己碱在其中发挥重要作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 汉·张仲景撰,晋·王叔和集.金匱要略方论(三卷)[M].北京:人民卫生出版社,1963:9.
- [2] 张文雷,王耀光.王耀光运用黄芪系列方治疗肾脏病临床经验[J].天津中医药,2021,38(4):442-446.
- [3] 万里伟,王燕君,兰凌凌,等.防己黄芪汤合独活寄生汤治疗类风湿性关节炎临床观察[J].中国中医药现代远程教育,2020,18(3):71-72.
- [4] 马文政,王丽,邓铭,等.肾病综合征患者防己黄芪汤治疗的临床效果及对患者 24h 尿蛋白、ALB、TC 的影响[J].中国医学创新,2020,17(36):69-72.
- [5] 李玉卿,陈美雪,张雪锋.防己黄芪汤治疗慢性肾炎的效果及对其血管微炎状态的影响[J].光明中医,2020,35(3):314-316.
- [6] 韩海慧.防己黄芪汤调控淋巴回流功能治疗膝骨关节炎的机制研究[D].上海:上海中医药大学,2019.
- [7] Wang X L, Liu X, Zhu T T, et al. Development and validation of an UHPLC-QqQ-MS technique for simultaneous determination of ten bioactive components in Fangji Huangqi Tang [J]. *J Anal Methods Chem*, 2016, 2016: 1435106.
- [8] 陈萌,李爱平,李科,等.防己黄芪汤及其组方化学成分与分析方法研究进展[J].中草药,2018,49(7):1695-1702.
- [9] Su L Y, Cao P, Wang H Y. Tetrandrine mediates renal function and redox homeostasis in a streptozotocin-induced diabetic nephropathy rat model through Nrf2/HO-1 reactivation [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(16): 990.
- [10] Liao D, Zhang W, Gupta P, et al. Tetrandrine interaction with ABCB1 reverses multidrug resistance in cancer cells through competition with anti-cancer drugs followed by downregulation of ABCB1 expression [J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4383.
- [11] Su W Q, Liang Y M, Meng Z P, et al. Inhalation of tetrandrine-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion

- complexes for pulmonary fibrosis treatment [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(5): 1596-1607.
- [12] 张玲玲, 魏伟. 治疗自身免疫病药物研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2): 149-156.
- [13] Rao D A, Gurish M F, Marshall J L, *et al.* Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2017, 542(7639): 110-114.
- [14] Vyas S P, Hansda A K, Goswami R. Rheumatoid arthritis: 'melting pot' of T helper subsets [J]. *Int Rev Immunol*, 2019, 38(5): 212-231.
- [15] Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease [J]. *Lancet*, 2013, 382(9894): 819-831.
- [16] Massalska M, Radzikowska A, Kuca-Warnawin E, *et al.* CD4⁺FOXP3⁺ T cells in rheumatoid arthritis bone marrow are partially impaired [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 549.
- [17] Wang X L, Liu X, Cai H, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the determination of tetrandrine and fangchinoline in rat plasma after oral administration of Fangji Huangqi Tang and *Stephania tetrandra* S. Moore extracts [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(8): 1286-1293.
- [18] Shaw L H, Lin L C, Tsai T H. HPLC-MS/MS analysis of a traditional Chinese medical formulation of Bu-Yang-Huan-Wu-Tang and its pharmacokinetics after oral administration to rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43848.
- [19] Liu X H, Zhao J B, Guo L, *et al.* Simultaneous determination of calycosin-7-O- β -D-glucoside, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, and astragaloside II in rat plasma after oral administration of *Radix Astragali* extraction for their pharmacokinetic studies by ultra-pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(1): 677-686.
- [20] Huang C R, Wang G J, Li H, *et al.* Sensitive and selective liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of astragaloside-IV in rat plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(3): 788-793.
- [21] Choi H S, Kim H S, Min K R, *et al.* Anti-inflammatory effects of fangchinoline and tetrandrine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 69(2): 173-179.
- [22] Sharma U, Bala, Kumar N, *et al.* Immunomodulatory active compounds from *Tinospora cordifolia* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(3): 918-926.
- [23] Gui D K, Huang J H, Guo Y P, *et al.* Astragaloside IV ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibiting NF- κ B-mediated inflammatory genes expression [J]. *Cytokine*, 2013, 61(3): 970-977.
- [24] Kao T C, Shyu M H, Yen G C. Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid inhibit inflammation via PI3K/Akt/GSK3 β signaling and glucocorticoid receptor activation [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(15): 8623-8629.
- [25] Lin Y C, Chang C W, Wu C R. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and toxicological evaluation of Fang-Ji-Huang-Qi-Tang in rodents [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 10.
- [26] Okusanya O, Forrest A, DiFrancesco R, *et al.* Compartmental pharmacokinetic analysis of oral amprenavir with secondary peaks [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(5): 1822-1826.
- [27] Metsugi Y, Miyaji Y, Ogawara K, *et al.* Appearance of double peaks in plasma concentration-time profile after oral administration depends on gastric emptying profile and weight function [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(4): 886-895.
- [28] Yin O Q, Tomlinson B, Chow A H, *et al.* A modified two-portion absorption model to describe double-peak absorption profiles of ranitidine [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42(2): 179-192.
- [29] Weitschies W, Bernsdorf A, Giessmann T, *et al.* The talinolol double-peak phenomenon is likely caused by presystemic processing after uptake from gut lumen [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(5): 728-735.
- [30] Gu Y C, Wang G J, Fawcett J P. Determination of astragaloside IV in rat plasma by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 801(2): 285-288.
- [31] Gibbs M A, Hosea N A. Factors affecting the clinical development of cytochrome p450 3A substrates [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42(11): 969-984.
- [32] Jin H, Li L, Zhong D F, *et al.* Pulmonary toxicity and metabolic activation of tetrandrine in CD-1 mice [J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(12): 2142-2152.
- [33] Zhao Y Q, Wang L P, Ma C, *et al.* Preparation and characterization of tetrandrine-phospholipid complex loaded lipid nanocapsules as potential oral carriers [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 4169-4181.
- [34] Lv Q L, Wang G H, Chen S H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* inhibitory effects of glycyrrhetic acid in mice and human cytochrome P450 3A4 [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 13(1): 84.
- [35] Lozano T, Soldevilla M M, Casares N, *et al.* Targeting inhibition of Foxp3 by a CD28 2'-fluoro oligonucleotide aptamer conjugated to P60-peptide enhances active cancer immunotherapy [J]. *Biomaterials*, 2016, 91: 73-80.
- [36] Goldstein J D, Burlion A, Zaragoza B, *et al.* Inhibition of the JAK/STAT signaling pathway in regulatory T cells reveals a very dynamic regulation of Foxp3 expression [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153682.
- [37] Bin Dhuban K, Kornete M, S Mason E, *et al.* Functional dynamics of Foxp3⁺ regulatory T cells in mice and humans [J]. *Immunol Rev*, 2014, 259(1): 140-158.
- [38] Yuan X S, Tong B, Dou Y N, *et al.* Tetrandrine ameliorates collagen-induced arthritis in mice by restoring the balance between Th17 and Treg cells via the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 101: 87-99.

[责任编辑 李亚楠]