

基于巨噬细胞吞噬及分泌功能的清金化痰汤生物限值测定

张琼玲¹, 孙正霄¹, 肖顺丽¹, 丁世兰¹, 许浚², 张铁军², 游云^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 天津药物研究院有限公司, 天津 300301)

[摘要] 目的: 建立基于小鼠巨噬细胞RAW264.7吞噬及分泌功能的清金化痰汤水提物冻干粉生物限值测定方法, 从生物活性层面对清金化痰汤进行质量控制。方法: 建立巨噬细胞RAW264.7吞噬模型和炎症模型, 以清金化痰汤水提物冻干粉对巨噬细胞RAW264.7吞噬指数和白细胞介素-6(IL-6)分泌量的抑制率为指标, 考察清金化痰汤水提物冻干粉的生物活性, 并寻找生物限值。结果: 巨噬细胞优选接种密度为 3×10^5 个/mL, 药物作用时间24 h, 脂多糖(LPS)质量浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 当清金化痰汤水提物冻干粉质量浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对RAW264.7巨噬细胞既无毒性也无明显促增殖作用, 在此浓度下, 对RAW264.7巨噬细胞吞噬中性红有明显促进作用, 吞噬指数均 $>113\%$, 且对LPS诱导RAW264.7巨噬细胞分泌IL-6呈现出显著且稳定的抑制作用, 抑制率 $>45\%$ 。结论: 结合清金化痰汤抗炎及免疫调节的药理活性, 建立了基于RAW264.7巨噬细胞吞噬及分泌功能的生物限值评价方法, 在设定的实验条件下, 确定 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为限值浓度, 在该限值浓度下, 清金化痰汤水提物对巨噬细胞的吞噬指数有明显的促进作用或对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞IL-6的分泌量有明显抑制作用, 均可判断为质量合格。

[关键词] 清金化痰汤; 水提物; 冻干粉; RAW264.7巨噬细胞; 吞噬指数; 白细胞介素; 生物活性评价

[中图分类号] R22; R28; R96; TQ450.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0010-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211773

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210714.1021.001.html>

[网络出版日期] 2021-07-14 11:25

Biological Evaluation for Quality Control of Water Extract of Qingjin Huatantang Based on Phagocytic and Secretory Functions of Macrophages

ZHANG Qiong-ling¹, SUN Zheng-xiao¹, XIAO Shun-li¹, DING Shi-lan¹,
XU Jun², ZHANG Tie-jun², YOU Yun^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for evaluating the biological activity of water extract lyophilized powder of Qingjin Huatantang based on the phagocytic and secretory functions of macrophages, and to control the quality of this formula from the biological activity level. **Method:** The phagocytic and inflammation models of RAW264.7 macrophages were established, the inhibition rates of water extract lyophilized powder of Qingjin Huatantang on interleukin-6 (IL-6) secretion and phagocytic index of neutral red of RAW264.7 macrophages were chosen as indicators to investigate the biological activity of Qingjin Huatantang, and the biological limit was searched. **Result:** The optimal inoculation density of RAW264.7 macrophages was 3×10^5 pcs/mL, and the concentration of lipopolysaccharide (LPS) was $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ after treatment for 24 h. When the concentration was $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, water extract lyophilized powder of Qingjin Huatantang had no toxicity and no obvious promotion effect on the proliferation of RAW264.7 macrophages, and at this concentration, the phagocytosis of RAW264.7 macrophages for neutral red was significantly promoted,

[收稿日期] 20210128(028)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09721004-006-003)

[第一作者] 张琼玲, 在读硕士, 从事中药药理及中药质量控制研究, E-mail: 2787447996@qq.com

[通信作者] * 游云, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理学研究, Tel: 010-64013996, E-mail: youyunrice@126.com

the phagocytic index was >113%. In addition, the lyophilized powder had a significant and stable inhibitory effect on IL-6 secretion of RAW264.7 macrophages induced by LPS, the inhibitory rate was >45%. **Conclusion:** Combined with the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Qingjin Huatantang, this study establishes an *in vitro* biological limit method for evaluating the quality of water extract of Qingjin Huatantang based on the phagocytic and secretory functions of RAW264.7 macrophages, and 500 mg·L⁻¹ was confirmed as the limit concentration. Under the limit concentration, Qingjin Huatantang water extract can significantly promote the phagocytic index of macrophages or significantly inhibit the secretion of IL-6 of RAW264.7 macrophages induced by LPS, which can be judged as qualified.

[Keywords] Qingjin Huatantang; water extract; lyophilized powder; RAW264.7 macrophage; phagocytic index; interleukin; bioactivity assessment

清金化痰汤来源于明代叶文龄所著的《医学统旨》，由黄芩、山栀、贝母、桑白皮、橘红、桔梗、知母、茯苓、甘草、麦门冬（去心）和瓜蒌仁（炒）11味药物组成，功效清热润肺、化痰止咳，是《古代经典名方目录（第一批）》100首经典方剂之一。现代药理研究表明，该方具有镇咳祛痰、抗炎、松弛气管平滑肌、免疫调节等作用^[1-4]，被广泛用于治疗慢性阻塞性肺疾病、社区获得性肺炎、急慢性支气管炎、支气管扩张症等常见感染性肺系疾病，且疗效显著^[5-8]。

目前，主要通过指标成分的定性、定量分析对中药进行质量控制，但该方式难以关联其临床功效。为支持经典名方的研究和开发，《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》提出，应将经典名方物质基准作为保证经典名方制剂质量一致的“标准对照物质”。因清金化痰汤组方复杂，所含化学成分丰富，通过文献检索发现，目前关于清金化痰汤物质基准及质量控制的研究报道极少，仅刘静等^[9]采用超高效液相色谱法（UPLC）测定该方中7个成分的含量，为清金化痰汤物质基准的全面质量控制提供了思路和方法。近年来，生物活性测定方法因其直接关联药效，已在活血化痰类^[10-13]和清热解毒类^[14-17]中药的质量控制中开展了探索性研究。基于此，本实验结合清金化痰汤抗炎及免疫调节的药理作用，拟建立基于RAW264.7巨噬细胞吞噬及分泌功能的生物限值测定方法，用于该复方的质量控制，为清金化痰汤及其他经典名方的质量控制提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 细胞 小鼠RAW264.7巨噬细胞购于北京协和医学院细胞资源中心。

1.2 仪器 VS-1300-U型超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司），MCO-15A型CO₂培养箱（日本三洋电机国际贸易有限公司），Axiovret 135A型倒置

显微镜（德国ZEISS公司），DT5-6A型台式离心机（北京时代北利离心机有限公司），ZW-A型微量振荡器（江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司），Multiskan FC型酶标仪（美国Thermo公司），ME104E型1/1万电子分析天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]。

1.3 试剂 胎牛血清（美国Gemini公司，批号A73G00K），DMEM培养基（美国HyClone公司，批号AF29422282），细胞增殖与活性检测试剂盒（CCK-8）和中性红染色液（碧云天生物技术有限公司，批号分别为090619191021，031120200929），脂多糖（LPS，美国Sigma公司，批号12190801），磷酸盐缓冲液（PBS，北京益美源生物科技有限责任公司，批号11310210），白细胞介素（IL）-1 β 和IL-6酶联免疫吸附测定法（ELISA）试剂盒（达科为生物技术股份有限公司，批号分别为2012-2，2101-1），96孔细胞培养板（美国Costar公司）。

1.4 药物制备 5批清金化痰水提取物冻干粉由天津药物研究院有限公司制备（称取黄芩5.60 g，栀子5.60 g，桔梗7.46 g，麦冬3.73 g，桑白皮3.73 g，浙贝母3.73 g，知母3.73 g，炒瓜蒌子3.73 g，橘红3.73 g，茯苓3.73 g，甘草1.49 g，加入水600 mL浸泡1 h，以封闭式电炉首先用5档煎至沸腾，然后用4档煎煮60 min，至剩余药液约240 mL，趁热使用100目尼龙滤布过滤，挤压药渣，收集滤液，预冻4 h，冷冻干燥48 h，即得），批号分别为19112606，19112607，19112608，19112609，19112610。

1.5 药物与试剂配制 精密称取各批清金化痰水提取物冻干粉适量，加DMEM培养基使其溶解，经0.22 μ m微孔滤膜过滤，配制得到1.0 g·L⁻¹清金化痰汤物质基准母液；再用DMEM培养基稀释至相应工作液质量浓度，现用现配。称取LPS粉末25 mg，加PBS 25 mL使溶解，经0.22 μ m微孔滤膜过滤，得

1.0 g·L⁻¹母液,于-20℃冻存,使用时用DMEM培养基稀释至相应工作液质量浓度。

1.6 细胞培养 RAW264.7巨噬细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃,5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.7 巨噬细胞接种密度及孵育时间考察 选取对数生长期的RAW264.7巨噬细胞,调整细胞悬液密度分别为1×10⁵,3×10⁵,5×10⁵个/mL,接种于96孔板,每孔100 μL,加DMEM培养基100 μL,置37℃,5%CO₂培养箱内培养,分别于培养12,24,36,48,60 h后观察细胞状态并拍照,加CCK-8试剂20 μL,2 h后用酶标仪于450 nm处测定吸光度A。

1.8 清金化痰汤对RAW264.7活力的影响 选取对数生长期的RAW264.7巨噬细胞,调整细胞悬液密度为3×10⁵个/mL,接种于96孔板,每孔100 μL,置37℃,5%CO₂培养箱内贴壁培养12 h。分为空白组、正常组和清金化痰汤水提物冻干粉不同质量浓度组(批号19112607,19112608,19112609,终质量浓度分别为62.5,125,250,500,1 000 mg·L⁻¹,以冻干粉质量计,下同),每组设3个复孔,给药后于37℃,5%CO₂培养箱培养24 h,每孔加入CCK-8试剂20 μL,2 h后于450 nm处测定A。

1.9 清金化痰汤生物活性限值测定

1.9.1 对巨噬细胞分泌IL-1β和IL-6含量的影响 选取对数生长期的RAW264.7巨噬细胞,按1.8项下方法贴壁培养后分为正常组、模型组、清金化痰汤水提物冻干粉(批号19112607)不同质量浓度(62.5,125,250,500 mg·L⁻¹)组,清金化痰汤水提物冻干粉不同质量浓度处理组及模型组均加入终质量浓度为1 mg·L⁻¹的LPS,各组设6个复孔,于37℃,5%CO₂培养箱培养24 h,收集上清,检测IL-1β和IL-6的含量。按ELISA试剂盒说明书完成实验操作,测定A,按公式计算清金化痰汤对LPS诱导RAW264.7巨噬细胞分泌IL-6和IL-1β的抑制率,抑制率= $(A_{模型组}-A_{给药组})/(A_{模型组}-A_{正常组})\times 100\%$ 。

1.9.2 限值浓度考察 选取对数生长期的RAW264.7巨噬细胞,按1.8项下方法贴壁培养过夜后分正常组、模型组和清金化痰汤水提物冻干粉不同质量浓度组(批号19112607,19112608,19112609,终质量浓度分别为125,250,500 mg·L⁻¹),按1.9.1项下方法加入1 mg·L⁻¹ LPS和设定复孔,给药后按1.9.1项下方法收集上清用于检测IL-6含量并计算抑制率。

1.9.3 方法学考察 取清金化痰汤水提物冻干粉

(批号分别为19112607,19112608,19112609)适量,加入DMEM培养基使其终质量浓度为500 mg·L⁻¹,按1.9.1项下方法测定其对1 mg·L⁻¹ LPS诱导RAW264.7巨噬细胞分泌IL-6的抑制率,重复3次,以考察方法的重复性。取批号为19112606,19112610的清金化痰汤水提物冻干粉,加入DMEM培养基使其终质量浓度为500 mg·L⁻¹,按1.9.1项下方法测定其对1 mg·L⁻¹ LPS诱导RAW264.7巨噬细胞分泌IL-6的抑制率,以考察方法的适用性。

1.10 基于巨噬细胞吞噬功能的清金化痰汤生物活性限值测定

1.10.1 限值浓度考察 取对数生长期RAW264.7巨噬细胞,按1.8项下方法贴壁培养后分为空白组、正常组,LPS组(质量浓度0.25 mg·L⁻¹)和3批清金化痰汤水提物冻干粉组(批号分别为19112607,19112608,19112609),加入DMEM培养基使清金化痰汤水提物冻干粉终质量浓度为500 mg·L⁻¹,各组设置3个复孔,给药后于37℃,5%CO₂培养箱内培养24 h,弃上清,每孔加入中性红染色液100 μL,孵育1 h后弃中性红染色液,PBS洗1遍,每孔200 μL,加入细胞裂解液[50%乙酸-50%乙醇(1:1)],每孔100 μL,微量震荡器震荡15 min,静置2 h,于波长562 nm处测定A,按公式计算各组吞噬指数,吞噬指数= $(A_{给药组}-A_{正常组})/(A_{正常组}-A_{空白组})$ 。

1.10.2 方法学考察 取清金化痰汤水提物冻干粉(批号19112607)适量,加DMEM培养基溶解至终质量浓度为500 mg·L⁻¹,按1.10.1项下方法测定清金化痰汤水提物冻干粉对RAW264.7巨噬细胞吞噬指数的影响,重复6次,以考察方法的重复性。同实验室不同实验人员采用500 mg·L⁻¹清金化痰汤水提物冻干粉作用于RAW264.7巨噬细胞后,按1.10.1项下方法测定其吞噬指数,考察中间精密度。按1.10.1项下方法,取待检清金化痰汤水提物冻干粉(批号19112610)作用于RAW264.7巨噬细胞后测定其吞噬指数,考察方法适用性。

1.11 统计学分析 利用SPSS Statistics 19.0统计软件对实验数据进行统计学处理。多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞接种密度及孵育时间考察 RAW264.7巨噬细胞的生长状态与细胞密度密切相关,故采用CCK-8法对不同密度的细胞活力进行考察。结合显微观察结果发现,当细胞密度为3×10⁵个/mL时,

细胞形态稳定,生长状态良好,当培养时间为48 h时,细胞密度处于饱和状态,分裂减缓;当细胞密度为 1×10^5 个/mL时,细胞持续生长,形态改变较细胞密度 3×10^5 个/mL时多;当细胞密度为 5×10^5 个/mL时,细胞形态易发生改变,且密度过大不利于药物作用时间的考察。综合实验稳定性和时间考虑,选择RAW264.7巨噬细胞的接种密度为 3×10^5 个/mL,实验在36 h内完成,见图1,2。

2.2 清金化痰汤对RAW264.7活力的影响 当清金化痰汤水提物冻干粉质量浓度 $62.5 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,3批清金化痰汤水提物冻干粉样品对RAW264.7巨噬细胞均无毒性作用;且当终质量浓度为 $62.5 \sim 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,批号19112607和19112609样品均具

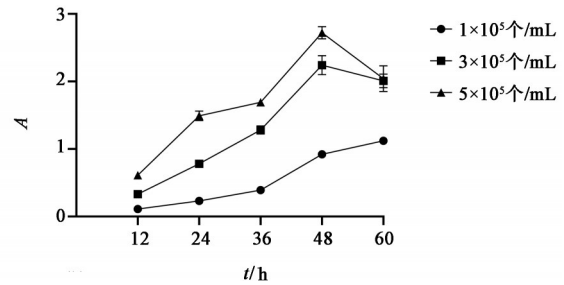


图1 RAW264.7巨噬细胞的细胞密度考察($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Growth of RAW264.7 cells at different densities ($\bar{x} \pm s, n=3$)

有明显的促增殖作用($P < 0.05, P < 0.01$);当清金化痰汤水提物冻干粉终质量浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与正常组相比,3批样品对RAW264.7巨噬细胞增殖均无影响,见表1。

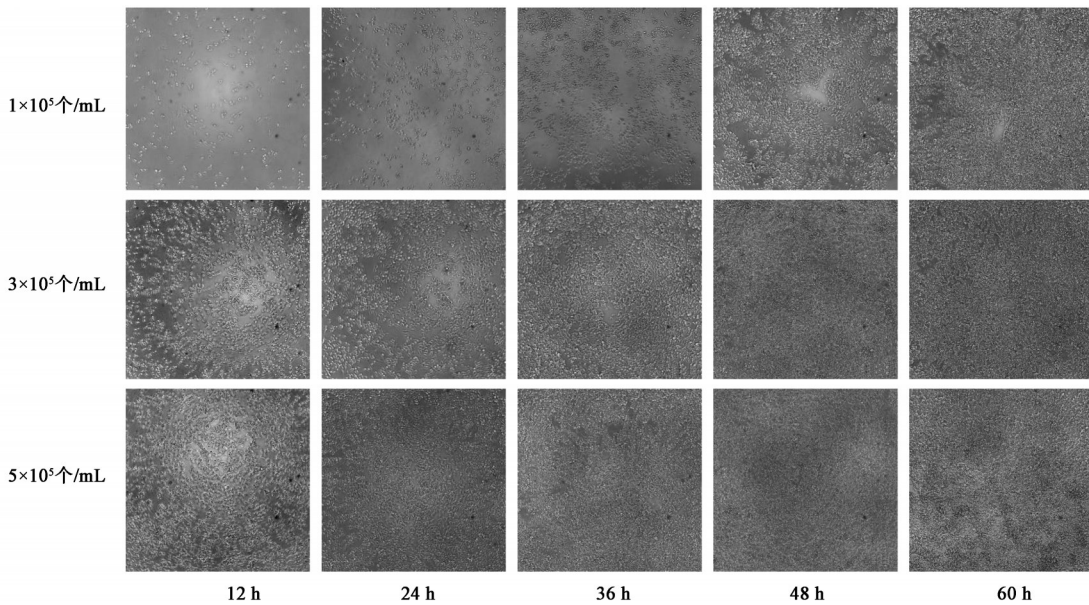


图2 不同密度RAW264.7巨噬细胞在不同时间点的生长状况($\times 10$)

Fig. 2 Growth of RAW264.7 macrophages with different densities at different time points($\times 10$)

表1 清金化痰汤对RAW264.7细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of Qingjin Huatantang on viability of RAW264.7 cells at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A		
		批号19112607	批号19112608	批号19112609
正常		1.42 ± 0.10	1.24 ± 0.03	2.06 ± 0.06
清金化痰汤水提物 冻干粉	62.5	$1.75 \pm 0.15^{2)}$	1.57 ± 0.17	$2.55 \pm 0.07^{2)}$
	125	$1.76 \pm 0.10^{2)}$	1.58 ± 0.12	$2.47 \pm 0.12^{2)}$
	250	$1.66 \pm 0.09^{2)}$	1.44 ± 0.06	$2.30 \pm 0.19^{1)}$
	500	1.52 ± 0.05	1.39 ± 0.01	2.17 ± 0.13
	1 000	1.33 ± 0.02	1.22 ± 0.08	2.18 ± 0.09

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

2.3 基于细胞分泌功能的生物活性限值测定

2.3.1 对巨噬细胞分泌IL-1 β 和IL-6的影响

由表2可知,终质量浓度为 $62.5, 125, 250, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 清金化痰汤水提物冻干粉对LPS诱导的RAW264.7

巨噬细胞分泌的IL-1 β 和IL-6含量表现出明显抑制作用($P<0.05, P<0.01$),且对IL-6分泌量的抑制表现

出了明显的量效关系,故选择IL-6作为质量控制指标并寻找生物限值。

表2 清金化痰汤对LPS诱导RAW264.7巨噬细胞分泌IL-1 β 和IL-6含量的影响($n=3$)

Table 2 Effect of Qingjin Huatantang on IL-1 β and IL-6 contents of RAW264.7 macrophages induced by LPS ($n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 β		IL-6	
		质量浓度($\bar{x}\pm s$)/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%	质量浓度($\bar{x}\pm s$)/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%
正常		3.96 \pm 0.01	-	0.47 \pm 0.01	-
模型		15.32 \pm 2.50 ²⁾	-	18.05 \pm 0.90 ²⁾	-
清金化痰汤水提物冻干粉	62.5	9.01 \pm 1.85 ⁴⁾	55.55	13.32 \pm 0.17 ³⁾	26.91
	125	4.90 \pm 1.47 ⁴⁾	91.73	10.48 \pm 1.25 ⁴⁾	43.06
	250	3.16 \pm 0.51 ⁴⁾	107.04	9.91 \pm 0.38 ⁴⁾	46.30
	500	5.16 \pm 0.11 ⁴⁾	89.44	5.02 \pm 0.19 ⁴⁾	74.12

注:与模型组比较³⁾ $P<0.05, ^4)$ $P<0.01$ 。

2.3.2 清金化痰汤限值浓度考察 由表3可知,当清金化痰汤水提物冻干粉的终质量浓度处于125~500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,批号19112607,19112608,19112609样品对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞分泌IL-6的分泌量均表现出明显抑制作用;尤其是当终质量浓度为500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,3批样品的抑制率较为稳定,故选择500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为限值浓度进行方法学考察。

表3 清金化痰汤对LPS诱导RAW264.7巨噬细胞分泌IL-6含量的影响($n=3$)

Table 3 Effect of Qingjin Huatantang on IL-6 secretion of RAW264.7 macrophages induced by LPS ($n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%		
		批号	批号	批号
		19112607	19112608	19112609
正常		-	-	-
模型		-	-	-
清金化痰汤水提物冻干粉	125	8.11	21.50	13.08
	250	48.52	33.97	29.89
	500	75.94	69.76	69.47

2.3.3 方法学考察 在方法重复性考察时,批号分别为19112607,19112608,19112609的清金化痰汤水提物冻干粉样品对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞分泌IL-6的含量有显著抑制作用,其抑制率处于45.41%~55.41%,相对标准偏差(RSD)分别为5.8%,3.8%,2.5%,重复性良好。综合以上实验结果,在本文确定的实验条件下,当清金化痰汤水提物冻干粉的终质量浓度为500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其对1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞IL-6分泌量有明显抑制作用($P<0.05$),即可判断为质量合格。在方法适用性考察时,正常组、模型组及清金化痰汤水提物冻

干粉组(批号19112606和19112610)的IL-6质量浓度分别为(1.63 \pm 0.01), (33.37 \pm 1.34), (11.13 \pm 0.61), (13.53 \pm 1.12) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;计算这2批清金化痰汤水提物冻干粉对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞分泌IL-6的抑制率分别为70.09%和62.53%,判断合格。

2.4 基于RAW264.7巨噬细胞吞噬功能的生物活性限值测定

2.4.1 清金化痰汤水提物冻干粉限值浓度考察

正常组,LPS组和500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 清金化痰汤水提物冻干粉组(批号19112607,19112608,19112609)的吞噬指数分别为100%,124.03% \pm 1.81%,116.20% \pm 5.27%,117.63% \pm 4.41%,116.16% \pm 0.12%。说明清金化痰汤水提物冻干粉对RAW264.7巨噬细胞的吞噬功能均表现出明显的促进作用,结合该质量浓度对巨噬细胞的增殖无明显影响,故确定500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为限值浓度进行方法学考察。

2.4.2 方法学考察 重复性考察时发现,质量浓度500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的清金化痰汤水提物冻干粉对巨噬细胞吞噬指数有促进作用,吞噬指数124.77% \pm 4.06%,RSD 3.3%,重复性良好。中间精密密度考察时发现,同实验室不同实验人员将500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 清金化痰汤水提物冻干粉作用于RAW264.7巨噬细胞后,采用中性红试验检测RAW264.7巨噬细胞吞噬指数为126.00% \pm 6.32%,RSD 5.0%,表明该方法精密密度较好。综上分析,当清金化痰汤水提物冻干粉的终质量浓度为500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其对RAW264.7巨噬细胞对中性红的吞噬指数有明显促进作用,即可判断为质量合格。方法适用性考察时发现,样品19112610作用于RAW264.7巨噬细胞后,其吞噬指数123.18% \pm 2.86%,RSD 2.3%,判断合格。

3 讨论

中药质量可控是保证中药安全、有效的重要前提。常用的中药质量控制方法包括药材的外观形状鉴别、化学定性鉴别、指标成分检测、化学指纹图谱等。近年来,随着高效液相色谱法(HPLC)和UPLC串联质谱法(UPLC-MS/MS)等技术的广泛应用,中药在质量控制方法上有了很大的提升。但由于中药化学成分复杂,应用单一的质量控制方法难以全面控制其质量并准确反映临床疗效^[18-19]。因此,建立综合的质量控制方法是当前亟待解决的问题。生物活性测定是指结合中药及其制剂的功能主治或不良反应,寻找在生物体上的适宜反应,从而更加全面、有效地评价和控制中药质量,完善中药质量评价体系,保证药物临床使用的安全有效^[20-23]。生物活性测定方法包括生物效价测定法和生物活性限值测定法,生物效价测定方法是指在严格控制的实验条件下,通过比较对照品和供试品对生物体或离体器官与组织的特定生物效应,从而评价和控制供试品的质量和活性,但对照品的选择是生物效价测定方法的难点。生物活性限值测定法是指达到某一特定的给药量,出现某种生物学效应,关键在于保证实验方法具有良好的重复性。近年来已有不少研究报道了将生物活性测定应用于中药生物效应评价方面^[24-25],且水蛭生物活性测定方法已被2020年版《中华人民共和国药典》收载^[26],将生物活性测定应用于中药质量控制领域将成为未来的一种趋势。

清金化痰汤作为中医临床广泛使用的经典名方,疗效确切,但由于组方复杂且药材来源广泛,其所含化学成分丰富,因此,建立关联其临床功效的质量评价方法具有重要意义。已有研究表明,清金化痰汤可明显改善气道炎症动物模型的炎症介质水平,如赵媚等^[27]和许光兰等^[2]的实验研究均发现,清金化痰汤可明显降低慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)大鼠肺泡灌洗液中炎症因子IL-1 β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量,孟倩等^[28]研究发现清金化痰汤可明显降低哮喘小鼠中标志性炎症因子IL-1 β ,TNF- α 和IL-6的含量;这些实验研究均表明清金化痰汤可通过降低炎症因子的分泌发挥良好的抗炎功效。本文结合清金化痰汤抗炎的生物活性,建立了LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症模型,通过考察清金化痰汤对LPS诱导RAW264.7分泌IL-1 β 和IL-6含量的影响,发现在一定质量浓度范围内,清金化痰汤水提物冻干粉对IL-6的分泌

量表现出明显抑制作用并呈剂量依赖性,故选择对IL-6分泌量的抑制率作为考察指标。本文研究结果表明,质量浓度为500 mg·L⁻¹的清金化痰汤水提物冻干粉对IL-6分泌量呈现较为显著的抑制作用,抑制率均>45%,且RSD均<10%,重复性良好,故选择500 mg·L⁻¹为限值浓度;提示清金化痰汤水提物在500 mg·L⁻¹质量浓度下对IL-6分泌量呈现了明显抑制作用($P<0.05$),即可判断为质量合格。

已有研究表明清金化痰汤可通过免疫调节作用改善患者的临床症状。巨噬细胞是机体重要的免疫细胞,吞噬功能作为巨噬细胞重要的生物学功能之一,可通过考察药物对其吞噬功能的影响从而反映其免疫调节能力。中性红试验是考察药物对巨噬细胞吞噬功能调节作用的常用方法,但巨噬细胞对中性红的吞噬量与巨噬细胞数量及其本身吞噬能力关系密切。本文研究发现,一定质量浓度的清金化痰汤水提物冻干粉对巨噬细胞起到了促增殖作用,但关于其促增殖的机制还需进行深入研究,通过查阅相关文献,分析其潜在原因可能有以下2个方面^[29-30]:①药物刺激RAW264.7巨噬细胞产生集落刺激因子、表皮生长因子等细胞因子,对细胞增殖产生促进作用。②清金化痰汤组方复杂,其水提物中含有多糖、苷类等化学成分,对细胞增殖产生促进作用。当使用中性红试验考察药物对吞噬功能的影响时,应考虑其对RAW264.7巨噬细胞增殖的影响。本文研究结果表明,当清金化痰汤水提物冻干粉终质量浓度为500 mg·L⁻¹时,对巨噬细胞增殖无明显影响,对其吞噬功能具有明显的促进作用,其吞噬指数均>113%,RSD \leq 5.0%,试验重复性良好,故确定500 mg·L⁻¹为限值浓度。提示质量浓度为500 mg·L⁻¹的清金化痰汤水提物能明显提高RAW264.7巨噬细胞对中性红的吞噬指数,即可判断为质量合格。

综上所述,本实验结合清金化痰汤抗炎及免疫调节的药理活性,建立了RAW264.7巨噬细胞炎症及中性红吞噬的生物效应模型,通过考察清金化痰汤水提物冻干粉对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞分泌炎症因子IL-6的抑制能力及其对中性红的吞噬能力的影响,寻找生物限值,从而建立清金化痰汤水提物冻干粉的生物评价方法,当任意指标合格即可判断其质量合格,且该方法简单易行,可快速直观地评价药物生物活性,可对现有质量评价体系进行补充,保证清金化痰汤临床使用的安全有效。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 杜建超,冯淬灵,葛东宇,等.清金化痰汤对慢性阻塞性肺疾病急性加重期模型大鼠肺组织 Foxp3 和 ROR γ t 表达的影响[J].北京中医药大学学报,2016,39(12):1006-1012.
- [2] 许光兰,赵媚,钟云青,等.清金化痰颗粒对 COPD 急性期(痰热郁肺型)大鼠肺组织 STAT1, STAT3 的调控作用[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(2):91-97.
- [3] 韩超,杨柳,张秋玲,等.黄芩苷对哮喘大鼠气道重塑作用的实验研究[J].中国临床药理学与治疗学,2017,22(7):749-754.
- [4] 郭昉.清金化痰汤治疗慢阻肺急性加重期痰热壅肺证的调节性免疫机制探讨[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [5] 魏钢,牛永亮.清金化痰汤联合西药治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期临床研究[J].陕西中医,2017,38(12):1662-1663,1702.
- [6] 韩利峰.清金化痰汤联合西药治疗社区获得性肺炎临床研究[J].新中医,2019,51(10):60-63.
- [7] 王晶波,姚金彤,张超,等.加味清金化痰汤治疗急性支气管扩张症的临床研究[J].中医药导报,2019,25(4):98-100.
- [8] 周永红.清金化痰汤治疗慢性支气管炎急性发作 40 例[J].浙江中医学院学报,2005,29(4):31.
- [9] 刘静,刘然,李丹丹,等.UHPLC 法测定经典名方清金化痰汤物质基准中多指标成分的含量[J].药学学报,2020,55(8):1872-1876.
- [10] 金家金,王志斌,苏斌,等.水蛭体外抗凝血实验研究及其生物活性测定方法反应体系的筛选[J].中国药理学杂志,2014,49(22):1997-2001.
- [11] 韩冰,毛鑫,韩淑娟,等.基于抑制血小板聚集活性检测的血栓通胶囊质量控制研究[J].中国中药杂志,2015,40(23):4597-4602.
- [12] 罗云,谭婷,梁新丽,等.基于抗凝血酶活性效价的麝香质量生物评价方法研究[J].中国中药杂志,2018,43(10):2112-2117.
- [13] 王晓晓,张丽宏,李曦,等.当归药材补血活性的定量测定[J].中国中药杂志,2015,40(7):1381-1387.
- [14] 徐容.基于生物抑菌活性的金银花颗粒效价测定方法[J].中国药师,2016,19(2):369-371.
- [15] 李寒冰,鄢丹,王伽伯,等.基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质的生物评价[J].药学学报,2009,44(2):162-166.
- [16] 李会芳,王伽伯,肖小河.基于致泻效价检测的大黄不同炮制品的生物品质研究[J].时珍国医国药,2012,23(5):1215-1216.
- [17] 王丛,张慧,李慕睿,等.基于抗菌抗病毒效价检测的穿心莲药材质量评价研究[J].中药材,2015,38(9):1858-1861.
- [18] SONG J H, CHEN F Z, LIU J, et al. Combinative method using multicomponents quantitation and HPLC fingerprint for comprehensive evaluation of gentiana crassicaulis [J]. Pharmacogn Mag, 2017, 13 (49) : 180-187.
- [19] YAN Y, ZHANG Q Q, FENG F. HPLC-TOF-MS and HPLC-MS/MS combined with multivariate analysis for the characterization and discrimination of phenolic profiles in nonfumigated and sulfurfumigated rhubarb [J]. J Sep Sci, 2016, 39(14):2667-2677.
- [20] 游云,廖福龙,黄璐琦.基于生物活性测定开展中药质量控制的研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(3):452-456.
- [21] 李波,朴晋华.中药生物活性质量控制的思考[J].中国药品标准,2012,13(1):5-8.
- [22] 张旭,任晓航,王慧,等.生物效应评价在中药质量控制研究中的应用进展[J].中草药,2018,49(11):2686-2691.
- [23] 刘蕾,张琼玲,王继永,等.制附子水提物的生物活性限值测定研究[J].中国药物警戒,2020,17(2):75-80.
- [24] 宋雨泽,曾滨阳,任历,等.生物效价法测定大黄炮制品活血化瘀功效[J].中成药,2014,36(9):1921-1924.
- [25] 赵云生,谢丽霞,毛福英,等.基于平喘生物效价的麻黄品质评价研究[J].中草药,2015,46(24):3695-3703.
- [26] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:85-86.
- [27] 赵媚,许光兰,李娇,等.清金化痰颗粒对慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热郁肺型大鼠肺组织 JAK/STAT 信号通路的影响[J].中医杂志,2019,60(8):696-700.
- [28] 孟倩,宋春梅,陈丽军.清金化痰汤调节 ERK/p38MAPK 信号通路改善哮喘大鼠模型气道炎症的研究[J].四川中医,2019,37(10):51-55.
- [29] 张琼玲,李颖,肖苏萍,等.经典名方清金化痰汤的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(3):198-207.
- [30] 黄进.补肾益精法对骨髓间充质干细胞增殖的影响及机理研究[D].广州:广州中医药大学,2010.

[责任编辑 刘德文]