

五味子不同炮制品对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

徐月^{1,2}, 葛会奇³, 高慧^{1,2*}, 赵敏杰^{1,2}, 贾天柱^{1,2}

- (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600;
2. 国家中医药管理局中药炮制原理解析重点实验室, 辽宁大连 116600;
3. 辽宁科技学院, 辽宁本溪 117004)

[摘要] 目的:比较五味子不同炮制品对小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响,为五味子临床合理用药提供实验依据。方法:将五味子不同质量浓度(400,200,100,50 mg·L⁻¹)提取液与细胞密度为4×10⁶个/mL的脾淋巴细胞于96孔板中共同培养48 h,每组6个复孔,以增殖率为指标,采用CCK-8比较生五味子、酒五味子、醋五味子对小鼠脾淋巴细胞、刀豆蛋白A(Con A)和脂多糖(LPS)诱导的T,B淋巴细胞增殖的影响。结果:与空白组比较,Con A,LPS可诱导T,B淋巴细胞增殖;与不同指标相应空白组比较,五味子给药组均能不同程度促进未活化脾淋巴细胞及ConA和LPS诱导的T,B淋巴细胞的增殖,同等剂量下,酒五味子增殖效果最佳,优于生五味子、醋五味子(P<0.05,P<0.01)。结论:五味子酒制后对小鼠淋巴细胞增殖作用显著增强,符合“入补药熟用”传统理论。

[关键词] 五味子;炮制;脾淋巴细胞增殖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0116-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140116

Effect of Schisandrae Chinensis Fructus Prepared with Different Processing Methods on Splenic Lymphocyte Proliferation in Mice XU Yue^{1,2}, GE Hui-qi³, GAO Hui^{1,2*}, ZHAO Min-jie^{1,2}, JIA Tian-zhu^{1,2} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Dalian 116600, China; 2. Key Laboratory of Processing Theory Analysis of State Administration of TCM, Dalian 116600, China; 3. Liaoning Institute of Science and Technology, Benxi 117004, China)

[Abstract] **Objective:** To compare Schisandrae Chinensis Fructus prepared with different processing methods on splenic lymphocyte proliferation in mice of. **Method:** The splenic lymphocyte cells were cultured with different concentrations (400, 200, 100, 50 mg·L⁻¹) of Schisandrae Chinensis Fructu extraction in 96-well plate, each concentration was repeated for six times. After 48 hours, the cell proliferation rate of spleen cells and T/B lymphocytes were measured by the CCK-8 colorimetric method. The T lymphocyte was induced by concanavalin A (Con A) and B lymphocyte was induced by lipopolysaccharide (LPS). **Result:** Compared with the blank group, Con A, LPS could induce T lymphocyte and B lymphocyte. Compared with blank group in terms of other corresponding indicators, different concentrations of Schisandrae Chinensis Fructus extraction could increase proliferation rate, especially in wine steaming Schisandrae Chinensis Fructus group with the same dosage, wine steaming Schisandrae Chinensis Fructus was better than crude Schisandrae Chinensis Fructus and vinegar steaming Schisandrae Chinensis Fructus. **Conclusion:** Wine steaming Schisandrae Chinensis Fructus could obviously increase the cell proliferation rate, the result is accordance with TCM theory of processed Schisandra Chinensis Fruits as Tonic.

[Key words] Schisandrae Chinensis Fructus; processing; splenic lymphocyte proliferation

[收稿日期] 20141110(016)

[基金项目] 2011年中医药行业科研专项项目(20110700704)

[第一作者] 徐月,在读硕士,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-85890157,E-mail:912194177@qq.com

[通讯作者] *高慧,博士,副教授,硕士生导师,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-85890157,E-mail:gaohuitem@163.com

五味子习称“北五味子”。五味子味酸、甘,性温,入肺、心、肾经,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效^[1]。五味子常见的炮制品种有醋五味子、酒五味子。传统中医理论认为五味子“入补药熟用,入嗽药生用”^[2]。中药炮制后,由于加热、加辅料等处理,无疑会使中药的化学成分发生一系列变化,进而使其发挥不同的药效。前期笔者围绕补肾^[3-4]、止咳、止泻^[5]等药效进行了五味子生熟对比研究,初步验证了五味子“生熟异用”传统理论。本文从细胞层面比较五味子不同炮制品对脾淋巴细胞增殖的影响,以筛选出五味子补益作用最佳炮制品种,为临床合理用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雄性,SPF级,体重(20±2)g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(辽)2010-0001。

1.2 药材与试剂 五味子购自丹东大梨树五味子GAP基地,经由辽宁中医药大学药学院王冰教授鉴定为五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实。酒五味子:净五味子加黄酒拌匀,闷润1h,蒸制4h,50℃干燥至恒重。五味子:黄酒(100:20)。醋五味子:净五味子加米醋拌匀,闷润1.5h,蒸制5h,50℃干燥至恒重。五味子:米醋(100:20)。CCK-8(上海生博生物医药科技有限公司,编号SCK0105);脂多糖(LPS, Sigma公司,编号L2880)、刀豆蛋白(Con A, Sigma公司,编号C-2010), RPMI1640培养基 Hyclone改良型(批号15140-122,赛默飞世尔生物化学制品有限公司),小牛血清(批号16010-142, Gibco公司)。

1.3 仪器 ZHJH-C1112B型超净工作台(上海智城), NIB-100型倒置显微镜(宁波永新), MCO-15AC型CO₂培养箱(日本三洋), Thermo酶标仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液制备 分别称取五味子、酒五味子、醋五味子粉末适量,加水回流提取,制得质量浓度为30g·L⁻¹溶液。精密量取上述供试品溶液适量,冷冻干燥。参照文献^[6-7]中五味子浓度,在无菌条件下,加RPMI-1640培养基制成400, 200, 100, 50mg·L⁻¹溶液,备用。

2.2 小鼠脾淋巴细胞悬液的制备 参照文献^[8], 断颈处死小鼠,于75%乙醇浸泡3min,在无菌条件取其脾脏,置于培养皿中,依次放入含不同质量浓度双抗的PBS磷酸盐缓冲液中清洗,剪去脂肪和筋膜

组织,用无菌玻璃棒磨碎,加入适量PBS液冲洗,过200目筛网,制成脾细胞悬液。将得到的细胞悬液置于离心管中,加入3~5倍红细胞裂解液,室温震荡5min, 1200r·min⁻¹离心5min,弃去上清,沉淀应为白色,如有红色,继续加入裂解液,重复上述离心操作。依次用PBS洗沉淀2次,培养液洗沉淀1次,每次洗涤均用1200r·min⁻¹离心5min。最后向沉淀中加入含有10%小牛血清及100g·L⁻¹双抗的RPMI-1640培养液吹打,台盼蓝染色计数,活细胞数大于95%即可用于实验。

2.3 五味子不同炮制品对未活化脾淋巴细胞及ConA, LPS诱导的脾淋巴细胞增殖的影响 将上述脾细胞于不含小牛血清的RPMI-1640培养基中饥饿24h后,离心弃去含细胞代谢产物的培养基,用新鲜不含小牛血清的RPMI-1640培养基吹打,调至细胞密度至4×10⁶个/mL。分为未活化脾淋巴细胞组、T淋巴细胞组(加入诱导剂Con A), B淋巴细胞组(加入诱导剂LPS)。于96孔板中分别接种上述3种脾淋巴细胞悬液,每孔100μL,每种悬液中再分为生五味子、酒五味子、醋五味子,给予不同质量浓度药液。空白组(未活化脾细胞)和LPS, ConA组(含刺激剂的细胞悬液)分别加入100μL RPMI-1640培养基,给药组每孔加入100μL不同质量浓度供试药液,每孔总体积为200μL, ConA, LPS终质量浓度分别为5, 10mg·L⁻¹^[9]。每组设6个复孔,培养48h。采用CCK-8法^[10],每孔均加入10μL CCK-8溶液,继续孵育4h,终止培养。在450nm下测定其A,并计算细胞增殖率。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{加药组}} - A_{\text{不加药组}}) / A_{\text{不加药组}} \times 100\%$$

2.4 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 17.0统计分析软件进行分析,组间比较行单因素方差分析,以P<0.05为有统计学差异。

3 结果

3.1 对小鼠脾细胞增殖的影响 五味子不同炮制品提取液与脾细胞培养48h后,均可促进未活化的脾细胞增殖,其中酒五味子增殖效果最优,其次为生五味子、醋五味子。酒五味子各浓度均与空白组存在显著性差异(P<0.05),且量效关系明显,浓度至200mg·L⁻¹时,增殖率达到最大。生五味子仅在200mg·L⁻¹时,与空白组相比有显著性差异(P<0.05)。醋五味子对小鼠脾细胞的增殖表现出一定的作用,但相对于空白组无显著性差异。见表1。

3.2 对小鼠T淋巴细胞增殖的影响 培养48h后,五味子不同炮制品对Con A诱导的T淋巴细胞

表 1 五味子不同炮制品对小鼠脾细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Schisandrae Chinensis Fructus with different processing methods on splenic lymphocyte proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	A _{450 nm}	增殖率/%
空白	-	0.286 ± 0.031	-
生五味子	25	0.300 ± 0.075	4.90
	50	0.308 ± 0.040	7.69
	100	0.347 ± 0.050	21.24
	200	0.361 ± 0.062 ¹⁾	26.14
酒五味子	25	0.400 ± 0.041 ^{2,4,6)}	39.69
	50	0.368 ± 0.029 ¹⁾	28.58
	100	0.432 ± 0.041 ^{2,3,6)}	50.87
	200	0.441 ± 0.053 ^{2,3,5)}	54.28
醋五味子	25	0.290 ± 0.046	1.31
	50	0.338 ± 0.063	18.18
	100	0.309 ± 0.046	7.95
	200	0.352 ± 0.055	22.90

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 同等剂量与生五味子相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 同等剂量与醋五味子相比⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

增殖有一定促进作用, 各组间存在差异, 酒五味子作用明显优于生五味子、醋五味子。酒五味子最大质量浓度(200 mg·L⁻¹)时, 增殖率最大, 但在 25~50 mg·L⁻¹无量效关系。醋五味子仅在最大质量浓度下(200 mg·L⁻¹), 与空白组相比有显著促进增殖作用。生五味子各浓度相对于空白组均无显著性差异。见表 2。

3.3 对小鼠 B 淋巴细胞增殖的影响 培养 48 h 后, 各给药组均能促进小鼠 B 淋巴细胞增殖, 其中酒五味子作用最佳。在 25~100 mg·L⁻¹五味子不同炮制品所表现出的增殖率, 均是随质量浓度增大而增加, 当质量浓度达最大值(200 mg·L⁻¹)后, 却呈现下降趋势。酒五味子各质量浓度相对于空白组均有显著性差异。生五味子、醋五味子与空白组相比, 无显著性差异。见表 3。

4 讨论

免疫调节包括细胞免疫和体液免疫两方面, ConA, LPS 分别是 T, B 淋巴细胞促有丝分裂剂, 可促进淋巴细胞的增殖。T 淋巴细胞增殖程度可以反映机体的细胞免疫水平, 而 B 淋巴细胞能分泌多种抗体, 参与机体的体液免疫^[11]。淋巴细胞是机体的重要免疫细胞, 其增殖效果反映了机体免疫功能。

表 2 五味子不同炮制品对小鼠 T 淋巴细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Schisandrae Chinensis Fructus with different processing methods on T lymphocyte proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	A _{450 nm}	增殖率/%
空白组(ConA)	-	0.353 ± 0.032	-
生五味子 + ConA	25	0.379 ± 0.046	7.29
	50	0.382 ± 0.053	8.14
	100	0.406 ± 0.048	14.94
	200	0.378 ± 0.086	7.01
酒五味子 + ConA	25	0.450 ± 0.049 ^{1,3)}	27.34
	50	0.430 ± 0.016 ^{1,5)}	21.74
	100	0.483 ± 0.038 ^{2,3,6)}	36.76
	200	0.555 ± 0.011 ^{2,4,5)}	57.15
醋五味子 + ConA	25	0.407 ± 0.027	15.23
	50	0.360 ± 0.020	2.05
	100	0.371 ± 0.042	5.03
	200	0.483 ± 0.076 ^{2,4)}	36.69

表 3 五味子不同炮制品对小鼠 B 淋巴细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Schisandrae Chinensis Fructus with different processing methods on B lymphocyte proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	A _{450 nm}	增殖率/%
空白组(LPS)	-	0.371 ± 0.023	-
生五味子 + LPS	25	0.443 ± 0.059	19.47
	50	0.447 ± 0.099	20.35
	100	0.460 ± 0.085	23.99
	200	0.411 ± 0.082	10.78
酒五味子 + LPS	25	0.518 ± 0.044 ^{2,6)}	39.56
	50	0.521 ± 0.084 ^{2,5)}	40.50
	100	0.529 ± 0.102 ^{2,5)}	42.65
	200	0.492 ± 0.099 ¹⁾	32.48
醋五味子 + LPS	25	0.375 ± 0.080	1.15
	50	0.411 ± 0.061	10.71
	100	0.424 ± 0.032	14.35
	200	0.398 ± 0.030	7.14

本文以未活化脾淋巴细胞及 T, B 淋巴细胞为指标, 比较五味子不同炮制品对其增殖效果的影响, 进而筛选最佳炮制品种。

在本实验操作过程中, 调整了文献^[12]中 ConA, LPS 刺激剂的加入顺序, 将其于接种前加入到已知浓度的脾细胞悬液中, 反复吹打, 使其充分混匀。该

方法操作简便,可减小由于刺激剂混合不均及加入量较小所引起的误差。在实验过程中对脾细胞进行了饥饿,使得药物充分利用,更真实反映实验真实性。

本实验采用 CCK-8 法比较了五味子炮制前后对脾淋巴细胞增殖的影响,实验结果显示,相同剂量下,酒五味子增殖效果显著优于生五味子、醋五味子,仅个别浓度生五味子、醋五味子存在显著差异。相对于空白组而言,生五味子对 T, B 淋巴细胞增殖效果未见显著性差异,仅在最大质量浓度 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可显著促进自身未活化的脾淋巴细胞的增殖,而五味子醋制后改变了作用靶点,在最大浓度时可显著促进 T 淋巴细胞增殖,参与机体细胞免疫。酒五味子在低剂量时即可显著促进未活化脾细胞及 T, B 淋巴细胞增殖。当质量浓度达到 $100 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量时,酒五味子对未活化的脾淋巴细胞的增殖率趋于平衡,接近最大值,而 T 淋巴细胞增殖率变化较为明显,随浓度增大增殖率显著增加,这一趋势与 B 淋巴细胞增殖趋势相反。

综合上述指标,五味子不同炮制品对小鼠自身脾淋巴细胞及活化后的 T, B 淋巴细胞均有一定的促进增殖作用,可通过直接作用于免疫细胞而增强免疫功能。五味子不同炮制品间存在显著性差异,酒五味子作用最优,关于五味子“入补药熟用”的记载见于明代《本草纲目》,近代才新增了醋五味子的品种,故古代“入补药熟用”恐是指酒五味子,与我们的实验结果以及我们前期进行的五味子“生熟异用”之补肾作用的实验结果相一致^[3-4],所以研究提示在临床上“入补药熟用”应首选酒五味子。

我们研究发现五味子酒制后多糖含量增加,醋制后多糖含量降低,可能是造成补益作用差异的原因之一。在今后的研究工作中,我们将继续对五味

子补益作用的物质基础进行研究,为五味子“生熟异治”的合理应用提供研究依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:61-62.
- [2] 明·李时珍著;张守康校. 本草纲目[M]. 北京:中国中医药出版社, 1998:534-534.
- [3] 高慧,佟鑫,裴启洋,等. 五味子“生熟异用”之补肾阳作用[J]. 中草药, 2014, 45(13):1889-1893.
- [4] 高慧,佟鑫,裴启洋,等. 五味子“生熟异用”之补肾阴作用[J]. 中成药, 2014, 36(12):2471-2474.
- [5] 佟鑫,高慧,裴启洋,等. 五味子“生熟异用”之止泻作用[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(7):523-526.
- [6] 曹丽萍,贾睿,丁炜东,等. 五味子提取物对用 t-BHP 损伤的异育银鲫原代肝细胞的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(3):197-202.
- [7] 高文荣,金香子,李香丹,等. 五味子水提液对 D-半乳糖所衰老神经细胞的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10):2705-2706.
- [8] 朱科学,聂少平,李文娟. 黑灵芝多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱生细胞因子的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(19):351-354.
- [9] 盛喜霞,李涛,刘继平. 黄连解毒汤不同提取部位及相关单体对小鼠脾淋巴细胞增殖作用研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1):19-22.
- [10] 徐钢,裴启洋,鞠成国,等. CCK-8 法检测狗脊不同炮制品对成骨细胞的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24):4319-4323.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:710-711.
- [12] 尚智,丁涛,温富春,等. 苦参碱对小鼠免疫功能的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2007, 23(2):21-22.

[责任编辑 聂淑琴]