

5 种黄酮有效部位的不同组方的细胞抗炎、免疫与骨细胞修复活性的比较

张立国, 倪力军*, 赵丽丽, 闫志慧
(华东理工大学 化学与分子工程学院, 上海 200237)

[摘要] **目的:**以腰痛宁中生物碱加黄酮有效部位拆方为基础比较不同中药黄酮有效部位对细胞抗炎、免疫及骨细胞修复的影响,为风湿骨病处方候选药物筛选有效部位提供依据。**方法:**在腰痛宁马钱子、麻黄生物碱基础上,分别加入 50% 的甘草黄酮、淫羊藿黄酮、红花黄酮、骨碎补黄酮、桑寄生黄酮以及 5 种黄酮的等比例混合物,得到 6 个有效部位组方。采用半数有效浓度 (EC_{50}) 或半数抑制浓度 (IC_{50}) 评价各样品对巨噬 Ana-1 细胞分泌白细胞介素 1β (IL- 1β), 白细胞介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 炎症因子的促进作用;对脂多糖 (LPS) 诱导的 Ana-1 细胞释放前列腺素 E_2 (PGE_2) 的抑制作用;对 IL- 1β 诱导的软骨细胞增殖的影响。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} 叠加值与实验值之间的差异分析各有效部位间的相互作用关系。**结果:**骨碎补黄酮为主的组方促进 IL- 1β 分泌的活性最强;红花黄酮为主的组方促进 IL-6 分泌的活性最强且其他活性仅次于最佳的组方;由马钱子、麻黄生物碱 + 5 种黄酮混合物构成的组方抑制 PGE_2 分泌及促进 TNF- α 分泌、促进软骨细胞增殖的活性最强,且各模型下该组方中有效部位间有极强的协同作用。促软骨细胞增殖模型下,单一黄酮有效部位与生物碱构成的组方中的有效部位之间均表现出较强的拮抗作用。**结论:**不同药材黄酮之间有出色的协同增效作用,红花黄酮、骨碎补黄酮及各药材黄酮混合物具有良好的抗炎、免疫及骨细胞修复等综合药理活性,提示红花黄酮、骨碎补黄酮及不同药材黄酮混合物可作为风湿骨病药物的优选有效部位。

[关键词] 风湿骨病; 腰痛宁胶囊; 黄酮有效部位; 前列腺素 E_2 ; 免疫调节; 软骨增殖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0149-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180149

Comparison Among Different Fraction Formulas of Five Flavonoids in Cellular Anti-inflammation, Immunity and Chondrocyte Proliferation Activity ZHANG Li-guo, NI Li-jun*, ZHAO Li-li, YAN Zhi-hui (School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effect of different flavonoids on a cell anti-inflammation, immunity and chondrocyte proliferation based on the decomposed formula of Yaotongning capsule (YTNC), in order to provide basis for screening candidate fractions treating rheumatoid bone diseases. **Method:** Five flavonoids: *Glycyrrhiza uralensis* (Fgu), *Epimedium sagittatum* (Fes), *Carthamus tinctorius* (Fct), *Davallia mariesii* (Fdm), *Taxillus chinensis* (Ftc), at 50% and their proportional compounds were mixed into alkaloids of *Strychnos nux-vomica* and *Ephedra sinica* to obtain six formulas. Their half effective inhibitory concentration (IC_{50}) and half effective concentrations (EC_{50}) were adopted to evaluate the effect of the samples in promoting interleukin-6 (IL-6), IL- 1β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) inflammatory factor in macrophages Ana-1, inhibiting prostaglandin in E_2 (PGE_2) secretion released from Ana-1 cells induced by LPS and promoting chondrocyte proliferation. The optimization method based on least squares was applied to calculate additive EC_{50}/IC_{50} value of each sample. The interactions between the effective fractions were analyzed by comparing the differences between the additive EC_{50}/IC_{50} values with the corresponding experimental EC_{50}/IC_{50} values. **Result:**

[收稿日期] 20140714(009)

[基金项目] 上海市科委支撑计划项目(13401901100)

[第一作者] 张立国, 博士, 副教授, 从事中药新药研发、中药物质基础与药效关系研究, Tel: 021-64253694, E-mail: zlgfyt@sina.com

[通讯作者] * 倪力军, 博士, 教授, 从事天然药物研究, Tel: 021-64253045, E-mail: nljfyf@sina.com

The formula mainly consisting of Fdm had the best effect in promoting the secretion of IL-1 β . The formula consisting of Fct had the best effect in stimulating IL-6 secretion, and other activities second only to the best formulas. The formula consisting of Strychnos nux-vomica, Ephedra sinica and the five flavonoids had the best effect among the inhibiting PGE₂ secretion and promoting TNF- α secretion and chondrocyte proliferation, and a strong synergistic effect among the effective fractions in this formula was observed. In the model for promoting chondrocyte proliferation, there were strong antagonistic effects among effective fractions in the formula consisting of single flavonoid and alkaloid. **Conclusion:** There is excellent synergistic interaction among different kinds of flavonoids. Fct, Fdm and flavonoid mixtures have good synthetic pharmacological activities in anti-inflammation, immunomodulation and chondrocyte proliferation, suggesting that Fct, Fdm and flavonoid mixtures can be used to optimize candidate effective fractions of flavonoids for traditional Chinese medicines for treating rheumatism bone diseases.

[**Key words**] rheumatism bone disease; Yaotongning capsule; effective fractions of flavonoids; prostaglandin E₂; immunomodulation; chondrocyte proliferation

风湿骨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,其中多数为自身免疫性疾病。中医对该类疾病的治则是扶正祛邪、散寒除湿、活血通络、补肾健脾。腰痛宁是治疗风湿骨病的大品种中药,已有几十年临床应用历史。本课题组前期基于腰痛宁有效部位组方的药理研究表明,腰痛宁全方具有良好的抗炎、免疫调节、活血和促进骨关节软骨细胞增殖等药理活性,并且腰痛宁生物碱 + 黄酮拆方也具有类似的活性^[1-5]。

腰痛宁胶囊的君药马钱子的主要有效部位是生物碱,具有抗炎、镇痛、调节免疫功能等药理作用^[6-7];其臣药麻黄中的生物碱,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^[8-9]。鉴于目前对中药药理的研究多是针对单一处方^[10]、单味药材、单一有效部位^[11-12]或者某一处方中若干主要成分组合^[13-14]及不同提取物的组合^[15],仅能得知研究对象是否具有某些药理活性而缺乏与同类药物(药材、有效部位)间的相互比较,很难评估孰优孰劣。本文从风湿骨病的中药处方中筛选出使用频率较高并且黄酮为主要有效部位的红花、骨碎补、淫羊藿、桑寄生等 4 味药材,这些药材的黄酮具有抗炎、镇痛、抗氧化及增强免疫功能等多种药理作用^[16-17]。因此,本文以腰痛宁生物碱和黄酮有效部位拆方为基础,以这 4 味药材黄酮替代腰痛宁生物碱 + 黄酮拆方中的甘草黄酮,通过构建巨噬细胞抗炎免疫模型及 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖模型,比较各样品的半数有效浓度(EC₅₀)或半数抑制浓度(IC₅₀)叠加值与及细胞修复评价这些样品的免疫和抗炎活性,以考察不同黄酮有效部位的活性差异,为风湿骨病候选药物的筛选提供最佳有效部位。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠 Ana-1 细胞株,购自中科院上海生物细胞所。

1.2 药物及试剂 制马钱子(批号 Y302-09091-10),麻黄(批号 Y412-100601-12),甘草(批号 Y013-110301-1),桑寄生(批号 Y807-11609-9),骨碎补(批号 Y810-11907-1),红花(批号 Y809-10401-6),淫羊藿(批号 Y812-110808-3)共计 6 味中药材均由颈复康药业集团有限公司提供及该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。DMEM 培养基(北京清大天一科技有限公司,批号 120301),小牛血清(FBS,杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 110817);白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫试剂盒(美国 R&D 公司,批号分别为 303465, 303171, 303367);CCK-8 试剂盒(东仁化学科技有限公司,批号 ES781),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 111M4035V),二甲基亚砜(DMSO,上海凌峰化学试剂有限公司,批号 090612),花生四烯酸(AA,美国 Sigma 公司,批号 071M1333V),前列腺素 E₂(PGE₂) ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号 303260),磷酸缓冲盐(PBS,瑞典 Medicago AB 公司,批号 173106),链霉素-青霉素(法国 Biowest 公司,批号 S09965L0022)。

1.3 仪器 680 型多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),DS-3510DTH 型超声仪(上海生析超声仪器有限公司),NU4850-E 型 CO₂ 培养箱(美国 NUAIRE 公司),TS100-F 型荧光倒置显微镜(日本尼康公司),LD5-10 型离心机(北京离心机厂),DW-86L386

型 -80 °C 低温保存箱(海尔集团公司)。

2 方法

2.1 样品组成 表 1 列出了本文所选 7 味药材及从这 7 种原料药中所提取的生物碱、黄酮的质量、

制备方法等相关信息。本文以这 7 个有效部位作为基本物质单元,按照马钱子生物碱-麻黄生物碱-黄酮 1:1:2 的质量配比设计了表 2 所示的#1 ~ #6 有效部位组方。

表 1 7 味药材有效部位的制备方法及其质量^[4,18-19]

Table 1 Preparation and quality of 7 kinds of effective fractions

药材	有效部位	活性部位在提取物中的含量/g·g ⁻¹	提取方法
马钱子 <i>Strychnos nux-vomica</i> ¹⁾	马钱子生物碱	0.89	乙醇加热回流 + 三氯甲烷萃取
麻黄 <i>Ephedra sinica</i> ¹⁾	麻黄生物碱	0.50	乙醇加热回流 + 三氯甲烷萃取
甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i> ¹⁾	甘草黄酮	0.45	乙醇加热回流 + 大孔树脂纯化
桑寄生 <i>Taxillus chinensis</i>	桑寄生黄酮	0.01	乙醇加热回流 + 大孔树脂纯化
红花 <i>Carthamus tinctorius</i>	红花黄酮	0.41	乙醇加热回流 + 大孔树脂纯化
骨碎补 <i>Davallia mariesii</i>	骨碎补黄酮	0.41	乙醇加热回流 + 大孔树脂纯化
淫羊藿 <i>Epimedium sagittatum</i>	淫羊藿黄酮	0.20	乙醇加热回流 + 大孔树脂纯化

注: ¹⁾ 为腰痛宁处方药材。

表 2 样品配方组合

Table 2 Formulas of blending active fractions extracted from material herbs

样品序号	有效部位组合
#1	25% 马钱子生物碱 + 25% 麻黄生物碱 + 50% 甘草黄酮 Fgu
#2	25% 马钱子生物碱 + 25% 麻黄生物碱 + 50% 淫羊藿黄酮 Fes
#3	25% 马钱子生物碱 + 25% 麻黄生物碱 + 50% 红花黄酮 Fct
#4	25% 马钱子生物碱 + 25% 麻黄生物碱 + 50% 骨碎补黄酮 Fdm
#5	25% 马钱子生物碱 + 25% 麻黄生物碱 + 50% 桑寄生黄酮 Ftc
#6	25% 马钱子生物碱 + 25% 麻黄生物碱 + 50% (5 种药材黄酮等比例混合物 F)

2.2 受试样品的配制 根据表 2 所示比例,由各有效部位在提取物中的含量换算出#1 ~ #6 样品中各有效部位质量后精密称取各中药有效部位,加入适量磷酸缓冲盐溶液搅拌使之初步溶解,沸水浴加热 10 min,待其完全溶解后按表 2 方案混合,一并超声 20 min,冷却,定容,配成 2 500 mg·L⁻¹母液并稀释至 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg·L⁻¹ 和 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.61, 0.31, 0.15, 0.08 mg·L⁻¹ 2 个质量浓度系列备用。

2.3 样品的药理活性评价 测试 6 个样品促进小鼠巨噬细胞分泌 IL-1 β , IL-6 及 TNF- α 诱导的软骨细胞增殖的 EC₅₀ 及抑制 PGE₂ 分泌的 IC₅₀。进一步通过分析各有效部位 IC₅₀/EC₅₀ 叠加值与实验 IC₅₀/EC₅₀ 值间的差异来探究组方中各有效部位间的相互作用关系,为中药组方的筛选和优化提供基础与理论依据。

中药组方中各活性部位间的相互作用通常存在以下 3 种情况。

(1) 若 EC₅₀ (或 IC₅₀) 实验值 - SD < EC₅₀ (或 IC₅₀) 叠加值 < EC₅₀ (或 IC₅₀) 实验值 + SD, 即各有

效部位对 EC₅₀ (或 IC₅₀) 贡献的加和值在实验值波动范围之内,说明各有效部位间无相互影响,即存在叠加作用。

(2) 若 EC₅₀ (或 IC₅₀) 实验值 - SD > EC₅₀ (或 IC₅₀) 叠加值,即各有效部位对 EC₅₀ (或 IC₅₀) 贡献的加和值小于样品的实验值,表明样品中的有效部位间有拮抗作用。

(3) 若 EC₅₀ (或 IC₅₀) 实验值 + SD < EC₅₀ (或 IC₅₀) 叠加值,即各有效部位对 EC₅₀ (或 IC₅₀) 贡献的加和值大于样品的实验值,表明样品中的有效部位间有协同作用。

2.3.1 小鼠巨噬细胞培养 小鼠腹腔巨噬细胞 (Ana-1 细胞) 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下,用含 10% 小牛血清、青霉素 (1 × 10⁵ U·L⁻¹) 及链霉素 (100 mg·L⁻¹) 的 DMEM 培养液进行传代培养,实验用细胞均处于对数生长期。

2.3.2 受试样品对 Ana-1 细胞上清液中 PGE₂ 表达的影响 参照文献[20]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 对照组, LPS 处理组 (模型组) 及待测药物组,于 37 °C, 5% CO₂

培养 2 h。加入 LPS(终质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养 9 h, 溶剂 DMSO 对照组不加 LPS。弃去旧培养液, 用新鲜培养液洗涤 3 次, 分别加入各浓度的待测药物孵育 30 min, 加入底物花生四烯酸(终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min, 收集上清液。细胞上清中 PGE_2 含量的测定按照 PGE_2 ELISA 试剂盒使用说明进行测定, 每组重复 3 次。

2.3.3 受试样品对 Ana-1 细胞增殖及其上清液中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 表达的影响 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; 分组加药每孔 100 μL , 空白组每孔加入 100 μL 不含小牛血清的 DMEM 培养液; $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养 48 h。48 h 后, 用酶标仪在 450 nm 处测定细胞培养液上清吸光度 A 。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 A , 根据 A 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培养液上清中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的水平, 每组重复 3 次。

2.3.4 受试样品对软骨细胞增殖的影响 取 7 日龄 SD 大鼠 6 只, 用 II 型胶原酶消化法分离大鼠软骨细胞, 接种 24 h 后随机分为空白组(含 5% 小牛血清(FBS)及 0.02% 聚山梨酯-80 的 DMEM 培养基), 模型组(含 5% FBS, 0.02% 聚山梨酯-80 及 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IL-1 β 的 DMEM 培养基)及受试药物组(含 5% FBS, 0.02% 聚山梨酯-80, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IL-1 β 及 $9.77 \sim 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 受试药物的 DMEM 培养基), 将 2.2 项中质量浓度为 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.61, 0.31, 0.15, 0.08 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的各样品给药 48 h 后, 运用 CCK-8 及亚甲基蓝染色法, 测定各样品对大鼠软骨细胞增殖的影响^[2,5]。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 处理数据, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料比较采用单因素方差分析, 以 t 检验进行组间统计比较, 运用自编 Matlab 程序计算各样品的叠加 EC_{50} 或 IC_{50} 值^[1-5], 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同组方对 Ana-1 细胞活力的影响 #2 与 #5 在高质量浓度($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)下抑制 Ana-1 细胞生长, 在测定这 2 个样品促进 IL-1 β , IL-6, TNF- α 分泌的 EC_{50} 及抑制 PGE_2 分泌的 IC_{50} 时剔除了这一浓度。表 3 ~ 5 分别列出了各样品抑制 Ana-1 分泌 PGE_2 的 IC_{50} , 促进 Ana-1 分泌 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的

EC_{50} 及促进软骨细胞增殖的 EC_{50} 。

3.2 不同组方对 Ana-1 细胞分泌 PGE_2 的影响 5 种药材黄酮混合物为主的 #6 样品的 IC_{50} 最低, 以红花黄酮为主的 #3 样品次之, 且这 2 个样品抑制 Ana-1 细胞中产生 PGE_2 的 IC_{50} 无统计学差异。但 #1, #2, #5 和 #4 的 IC_{50} 显著高于 #6 的 IC_{50} , 说明在生物碱中分别加入 50% 红花黄酮和 50% 的黄酮混合物所构成的样品具有很好的抑制 Ana-1 细胞产生 PGE_2 的药理活性。6 个样品中, #1, #2, #5 的 IC_{50} 实验值略大于叠加值, 说明这 3 个样品的有效部位之间有较弱的拮抗作用; #4 的 EC_{50} 叠加值位于实验值波动区间, 说明骨碎补黄酮与马钱子、麻黄生物碱之间存在叠加作用; #3 与 #6 的 IC_{50} 实验值明显小于叠加值, 表明红花黄酮, 5 种黄酮混合物与生物碱之间存在极强的协同增效作用。鉴于甘草黄酮、淫羊藿黄酮、桑寄生黄酮与生物碱混合时产生拮抗作用, 故可认为 #6 的协同增效作用主要来自红花黄酮和骨碎补黄酮。见表 3。

表 3 不同组方抑制 Ana-1 细胞分泌 PGE_2 的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effects of traditional Chinese medicine samples on inhibiting secretion of PGE_2 in Ana-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\text{PGE}_2/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	
	实验值 IC_{50}	叠加值 IC_{50}
#1	$93.43 \pm 16.60^{2)}$	70.06
#2	$132.38 \pm 28.08^{2)}$	126.50
#3	32.34 ± 14.81	106.46
#4	$89.06 \pm 21.68^{2)}$	72.89
#5	$141.46 \pm 19.76^{2)}$	121.82
#6	7.01 ± 2.05	89.91

注: 与最小值比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4 ~ 5 同)。

3.3 不同组方对 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的影响 甘草黄酮与黄酮混合物为主的 #1 及 #6 样品无 EC_{50} 值, 表明这 2 个样品没有明显的促 IL-1 β 分泌的量效作用。在 4 个有 EC_{50} 值的样品中, 以淫羊藿黄酮为主的 #2 样品 EC_{50} 值显著高于其他样品, 且 #3, #4, #5 的 EC_{50} 值无统计学差异。表明红花黄酮、骨碎补黄酮和桑寄生黄酮促进 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β 的作用显著优于淫羊藿黄酮。#2 中的淫羊藿黄酮与 2 种生物碱之间存在较强的拮抗作用, 而 #3 与 #4 中的红花黄酮、骨碎补黄酮与生物碱之间存在协同作用, 因此 #2 的 EC_{50} 值显著高于 #3 与 #4。#5 中的桑寄生黄酮与 2 种生物碱之间存在叠加作用,

因而#5 的 EC_{50} 高于#3 与#4 但低于#2。这一结果体现出中药有效部位间的协同、拮抗及叠加作用对活性强度的影响。

由表 4 第 4 行可知,6 个样品均有促进 Ana-1 分泌 IL-6 的 EC_{50} ,以红花黄酮为主的#3 样品的 EC_{50} 最低,说明红花黄酮促 IL-6 分泌的活性最佳。除以淫羊藿黄酮为主的#2 样品的 EC_{50} 显著高于#3 外,其余样品的活性与#3 无统计学差异。#3,#4 及#6 中的红花黄酮、骨碎补黄酮,5 种黄酮混合物分别与 2 种生物碱之间有协同增效作用,而#1,#2 及#5 中的甘草

黄酮、淫羊藿黄酮、桑寄生黄酮分别与生物碱之间存在叠加作用,因此以甘草黄酮、淫羊藿黄酮、桑寄生黄酮为主的#1,#2,#5 的 EC_{50} 高于红花黄酮、骨碎补黄酮,5 种黄酮混合物为主的#3,#4,#6。由表 4 第 6 列可知,只有甘草黄酮为主的#1 以及 5 种黄酮混合物为主的#6 具有促进 Ana-1 细胞分泌 TNF- α 的 EC_{50} 值。说明淫羊藿黄酮、红花黄酮、桑寄生黄酮和骨碎补黄酮没有明显的促 Ana-1 细胞分泌 TNF- α 的量效作用。#1 的 EC_{50} 实验值略小于叠加值,表明甘草黄酮与生物碱之间存在微弱的协同作用。

表 4 不同组方对 Ana-1 细胞分泌 IL-1 β ,IL-6 及 TNF- α 免疫因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of traditional Chinese medicine samples on promoting secretion of IL-1 β ,IL-6 及 TNF- α in Ana-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$) mg·L⁻¹

组别	IL-1 β		IL-6		TNF- α	
	实验值 EC_{50}	叠加值 EC_{50}	实验值 EC_{50}	叠加值 EC_{50}	实验值 EC_{50}	叠加值 EC_{50}
#1	-	-	26.46 ± 13.56	15.79	100.00	108.78
#2	112.58 ± 3.21 ²⁾	23.45	116.87 ± 96.34 ²⁾	124.13	-	-
#3	21.14 ± 0.71	23.45	5.00 ± 1.04	15.79	-	-
#4	13.96 ± 7.65	23.45	5.55 ± 1.93	15.79	-	-
#5	40.28 ± 33.28	23.45	12.09 ± 8.32	15.79	-	-
#6	-	-	6.27 ± 0.54	6.44	9.78	-

3.4 不同组方对软骨细胞增殖的影响 6 个样品均有促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖的 EC_{50} 值且各样品的 EC_{50} 无量级差异。各药材黄酮与 2 种生物碱之间均存在较强的拮抗作用,但 5 种黄酮混合物与生物碱之间存在良好的协同作用,因此以 5 种黄酮混合物为主的#6 样品的 EC_{50} 最低,说明黄酮混合物促软骨细胞增殖的活性最佳。见表 5。

表 5 不同组方对软骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of traditional Chinese medicine samples in promoting chondrocytes proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞增殖	
	实验值	叠加值
#1	8.17 ± 0.26	6.97
#2	8.05 ± 0.30	6.96
#3	7.36 ± 0.61	6.25
#4	6.68 ± 0.75	5.70
#5	7.39 ± 0.40	6.31
#6	6.27 ± 0.54	6.31

4 讨论

淫羊藿黄酮、骨碎补黄酮、桑寄生黄酮重在以“补”治痹,是具有悠久“壮骨”历史的传统中药,文献多报道这 3 种药材具有治疗骨质疏松的疗

效^[21-22]。红花黄酮以“通”治痹,具通经活络、活血化瘀之功,这可能与红花黄酮类成分具有抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用有关^[23]。甘草具有调和诸药的作用,甘草黄酮具有广泛的药理活性,包括抗氧化、抗肿瘤、抗 HIV、抗溃疡、抗心律失常等作用^[24]。上述 5 种药材在治疗风湿骨病方面均有悠久的用药历史和一定的疗效,但究竟哪种药材的黄酮有效部位疗效更显著未见研究。

本文在腰痛宁拆方的基础上,采用 PGE₂, IL-1 β ,IL-6 与 TNF- α 及促进软骨细胞增殖等 5 个细胞模型对 5 种药材的黄酮的抗炎、免疫调节活性及骨细胞修复活性进行比较,以优化筛选出在抗炎、免疫方面具有更好疗效的组方。其中 IL-1 β , IL-6 与 TNF- α 的 EC_{50} 可量化描述各样品免疫调节活性,促软骨细胞增殖的 EC_{50} 反映了样品促进骨细胞修复的活性,PGE₂ 的 IC₅₀ 是各样品抗炎活性的量化描述指标。在细胞层面评价药物免疫活性的指标有很多,不同指标代表不同的免疫作用机制。本文结果表明含不同黄酮有效部位促进免疫活性的机制不同,不同黄酮有效部位的细胞抗炎及免疫调节活性差异较大而促进软骨细胞增殖的活性无明显差异。综合各模型考察结果,不同药材黄酮有效部位的混合物具有出色的细胞免疫调节、抗炎及促进骨细胞

修复的综合活性,在细胞药理学层面验证了中药复方的科学性与合理性。红花、骨碎补黄酮在单一黄酮有效部位中具有良好的综合免疫调节、抗炎及促进骨细胞修复的活性。风湿骨病处方的黄酮有效部位宜选用含骨碎补、红花黄酮或者5种药材的黄酮混合物。

本研究通过量化评估不同药材的黄酮有效部位与马钱子、麻黄生物碱组合的免疫调节、抗炎和骨细胞修复活性,比较不同药材黄酮有效部位的相关药理活性,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,为优化、筛选中药有效部位组方提供了新思路。

[参考文献]

[1] 倪力军,徐晓玲,张立国,等.腰痛宁胶囊中活性部位的组合对PGE₂,IL-2及NO细胞因子的影响及其相互作用[J].中草药,2014,45(23):3424-3431.

[2] 张立国,欧阳霄雯,吴婷婷,等.腰痛宁胶囊药材活性部位不同组合对大鼠软骨细胞的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):151-155.

[3] 倪力军,郭燕子,徐晓玲,等.腰痛宁胶囊及其拆方对Ana-1细胞免疫功能的影响[J].中成药,2014,36(11):2252-2257.

[4] Ni L j, Xu X L, Zhang L G, et al. Quantitative evaluation of the *in vitro* effect and interactions of active fractions in Yaotongning-based formulae on prostaglandin E₂ production[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 807-817.

[5] Zhang L G, Ouyang X W, Wu T T, et al. Quantitative evaluation of *in vitro* effects and interactions of active fractions in a Chinese medicinal formula (Yaotongning Capsule) on rat chondrocytes[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(3):1424-1432.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 丁丽丽,施松善,崔健,等.麻黄化学成分与药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(20):1661-1664.

[10] 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.

[11] 柯敏,李居怡,刘新国,等.中药复方有效部位群与创新药物的研究[J].时珍国医国药,2013,24(4):920-922.

[12] 张帆,张小磊,苗明三.毛冬青总黄酮对大鼠血瘀合并脑缺血模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):187-191.

[13] 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.

[14] 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 Nat Acad Sci USA, 2008, 105(12):4826-4831.

[15] 王君,戴丽,李鹏跃,等.芍药与甘草配伍协同增效作用的物质基础研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(11):83-86.

[16] 黄河胜,马传庚,陈志武.黄酮类化合物药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2000,25(10):589-592.

[17] 唐栩,许东晖,梅雪婷,等.26种黄酮类天然活性成分的药理研究进展[J].中药材,2003,26(1):46-54.

[18] Ni L J, Zhao W W, Zhang L G. Microstructure, content and *in vitro* release of brucine and strychnine of Strychnos nux-vomica powder with different particle sizes [J]. Trans Tianjin Univ, 2014, 20(6):444-450.

[19] 张强祖.中药材黄酮的大孔树脂吸附工艺研究及生产线设计[D].上海:华东理工大学,2013.

[20] 陈美璐,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].药学报,2005,40(5):405-409.

[21] 罗静华,潘晓华,张戈,等.淫羊藿黄酮治疗骨质疏松性骨折的动物实验研究[J].中国中医骨伤科杂志,2010,18(9):10-15.

[22] 董佳梓,鞠大宏,贾朝娟,等.桑寄生、枸杞子、桑椹对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用及其机理探讨[J].中国中医基础医学杂志,2010,16(6):483-486.

[23] 陈文梅,金鸣,吴伟,等.红花黄酮成分抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用[J].药学报,2001,36(12):881-885.

[24] 丛景香,高丽娟,林炳昌.甘草黄酮类化合物研究进展[J].精细化工,2004,21:121-124.

[责任编辑 周冰冰]