

# 大黄附子汤对 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

吴丽<sup>1,2,3</sup>, 刘晓<sup>1,2,3</sup>, 蔡皓<sup>1,2,3</sup>, 吕高虹<sup>1</sup>, 郭辉<sup>1,2,3</sup>, 章莹<sup>1</sup>, 蔡宝昌<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210029; 3. 南京中医药大学国家中医药管理局中药炮制标准重点研究室, 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 研究大黄附子汤对 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响。**方法:** 制备小鼠腹腔巨噬细胞, 纯化后以  $5 \times 10^5$ /mL 细胞接种于 96 孔培养板或 6 孔板中, 分为: 细胞对照组、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 模型组 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、大黄附子汤组 (终质量浓度为 25, 50, 100, 200, 400,  $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 在细胞贴壁过夜后, 正常组给予不含血清的培养液, 其余各组给予 LPS ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 大黄附子汤组同时给予不同浓度药物, 48 h 后测细胞存活率, ELISA 法测肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 白介素-6 (IL-6) 水平, 黄嘌呤氧化酶法 (羟氨法) 测细胞上清液中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力, 硫代巴比妥酸法测丙二醛 (MDA) 含量, Griess 法测一氧化氮 (NO) 水平。**结果:** 在 25 ~  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  内, 大黄附子汤对正常细胞代谢 MTT 活力无显著影响; 剂量达  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  即能抑制 LPS 诱导 NO 的生成 ( $P < 0.01$ ),  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时能降低 MDA 含量 ( $P < 0.01$ ), 增强 SOD 酶活力 ( $P < 0.05$ ), 并能显著抑制 LPS 诱导 TNF- $\alpha$ , IL-6 等细胞因子的合成 ( $P < 0.01$ )。**结论:** 大黄附子汤能有效调节 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞免疫及抗氧化功能, 改善 LPS 对 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞的诱导作用。

**[关键词]** 大黄附子汤; 腹腔巨噬细胞; 细胞因子; 抗氧化

**[中图分类号]** R285.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0176-04

## Effects of Dahuang Fuzi Decoction on the Functions of Peritoneal Macrophages in BALB/c Mice

WU Li<sup>1,2,3</sup>, LIU Xiao<sup>1,2,3</sup>, CAI Hao<sup>1,2,3</sup>, LV Gao-hong<sup>1</sup>, GUO Hui<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yin<sup>1</sup>, CAI Bao-chang<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 3. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Dahuang Fuzi decoction on the function of peritoneal macrophages in mice. **Method:** Macrophages were seeded onto glass cover slips ( $5 \times 10^5$  cells/mL). Different concentrations of Dahuang Fuzi decoction (25, 50, 100, 200, 400,  $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were added to the normal or LPS-activated peritoneal macrophages. Metabolic activity of peritoneal macrophages was measured by MTT assay, nitric oxide was detected by Griess reagent, malondialdehyde (MDA) content was detected by hydroxylamine method, superoxide dismutase (SOD) activities was assayed by thiobarbituric acid method, concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in supernatants were determined by using quantitative sandwich enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) kits. **Result:** Dahuang Fuzi decoction had no obvious

**[收稿日期]** 20110913(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073022), 江苏省中医药局科技项目(LZ11190), 江苏省研究生科研创新计划项目(CXZZ11\_0788)

**[第一作者]** 吴丽, 硕士, 讲师, 从事抗炎免疫药理学研究, Tel: 025-85811625, E-mail: wuli87107@ yahoo. com. cn

**[通讯作者]** \* 蔡宝昌, 博士, 教授, 从事中药炮制学研究, Tel: 025-86798281, E-mail: bccai@ 126. com

effect on the metabolic activity of peritoneal macrophages, but could markedly inhibit the secretion of NO, MDA, TNF- $\alpha$  and IL-6 ( $P < 0.01$ ), furthermore, Dahuang Fuzi decoction could improved the production of SOD ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Dahuang Fuzi decoction can promote the immune and antioxidant capacity of peritoneal macrophages in BALB/c mice.

[**Key words**] Dahuang Fuzi decoction; peritoneal macrophages; cytokine; antioxidant

大黄附子汤源自汉·张仲景《金匱要略》,由大黄、附子、细辛组成,具有温阳止痛、通腑化癥的功效。方中大黄性苦寒,可荡涤肠胃、推陈出新、通利水谷;附子细辛性温热,散寒止痛、温运脾胃,三者合用,寒热并投,刚柔并用,使脏腑通畅、气血调和、邪去正安、危病得愈,是中医临床治疗重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)等急危重症的常用方剂<sup>[1]</sup>。有研究显示,大黄附子汤能抑制胰酶释放、保护腺泡细胞、减轻胰腺及肺脏等胰外器官损伤<sup>[2-3]</sup>,本课题组前期研究发现,大黄附子汤对雨蛙素、脂多糖(LPS)及L-精氨酸诱导的两种小鼠SAP模型均具有保护作用,该作用是否与调节腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PM)功能、减轻机体炎症反应有关?本研究采用LPS刺激BALB/c小鼠PM,考察大黄附子汤对PM功能的影响,试图探讨大黄附子汤治疗SAP的可能机制。

## 1 材料

**1.1 动物** BALB/c小鼠,雄性,清洁级,体重18~22g,由南京中医药大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(沪)2007-0005。

**1.2 药物及试剂** 大黄、附子(黑顺片)、细辛均购自北京同仁堂饮片有限责任公司。经南京中医药大学陈建伟教授鉴定符合《中国药典》(2010年版)项下规定。药物制备:50g附子加500mL水浸泡30min后先煎30min,在煎煮附子同时将大黄37.5g、细辛12.5g加500mL水浸泡30min后共同煎30min,过滤,滤渣加800mL水煎煮30min,过滤,合并滤液,减压浓缩得干浸膏,经南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心HPLC分析建立指纹图谱确认其主要化学成分。临用前用PBS配成25, 50, 100, 200, 400, 800 mg·L<sup>-1</sup>等6个质量浓度。

RPMI 1640培养粉,胎牛血清(Gibco公司产品)。LPS, MTT, 胰蛋白酶(Sigma公司产品)。一氧化氮(NO), 丙二醛(MDA), 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒, 南京建成生物工程研究所产品。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 白介素-6(IL-6)试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司产品。

**1.3 仪器与设备** SW-CJ-1G型超净工作台(苏州净化设备有限公司), MCo-20AIC型CO<sub>2</sub>培养箱(日本SANYO公司), A1301026型低温高速离心机(上海艾测电子科技有限公司), Synekgy HT型酶联免疫检测仪(美国BIO-Tek公司), CKX-31型生物显微镜(日本Olympus公司)。

## 2 方法

**2.1 小鼠腹腔巨噬细胞的制备与培养** BALB/c小鼠眼眶放血后颈椎脱臼处死(减少血细胞干扰), 放入75%的酒精中浸泡2~3min, 腹腔注入6~8mL冰中预冷的无菌PBS缓冲液(含肝素10 u·mL<sup>-1</sup>, 10%胎牛血清), 轻揉腹部1~2min后, 静置5min, 无菌条件下打开腹腔, 吸管吸取腹腔液于离心管中, 以1 000 r·min<sup>-1</sup>离心5min, 弃上清液收集巨噬细胞, 用上述PBS缓冲液洗涤细胞两次, 用含10%胎牛血清的1640培养液调整细胞密度至5×10<sup>5</sup>/mL, 以每孔200 $\mu$ L接种于96孔板、1mL接种于24孔板, 置5%CO<sub>2</sub>, 37℃培养, 12h后用PBS洗去未贴壁细胞, 即得纯化的腹腔巨噬细胞, 供试验用。

**2.2 对腹腔巨噬细胞活力的影响** 上述细胞贴壁纯化后以5×10<sup>5</sup>/mL细胞接种于96孔培养板中, 分为:细胞对照组、LPS模型组(10 mg·L<sup>-1</sup>)、大黄附子汤组(终质量浓度为25, 50, 100, 200, 400, 800 mg·L<sup>-1</sup>), 以不含胎牛血清的1640培养液补充至每孔200 $\mu$ L, 每个质量浓度设置6个复孔。在37℃, 5%CO<sub>2</sub>条件下培养48h后, 每孔加20 $\mu$ L MTT (5 mg·L<sup>-1</sup>), 继续培养4h后, 移去微孔中所有液体, 再加入150 $\mu$ L DMSO终止反应, 振荡10min, 酶标仪检测570nm处吸光度(A)。

**2.3 对腹腔巨噬细胞功能的影响** 另取贴壁纯化细胞, 以5×10<sup>5</sup>/mL细胞接种于24孔培养板中, 分为:细胞对照组、LPS模型组、大黄附子汤组(终质量浓度为25, 50, 100, 200, 400, 800 mg·L<sup>-1</sup>), 模型组和大黄附子汤各剂量组分别加入LPS(10 mg·L<sup>-1</sup>)、不同浓度大黄附子汤或溶媒, 每组设3个复孔(终体积200 $\mu$ L)。在37℃, 5%CO<sub>2</sub>条件下培养24h后, 离心, 收集24孔板中的培养上清液待测。

**2.4 TNF- $\alpha$ , IL-6检测** 采用酶联免疫法(ELISA),

具体操作方法按照试剂盒说明书进行。

**2.5 MDA, SOD, NO 检测** MDA 含量采用硫代巴比妥酸法, SOD 活力采用黄嘌呤氧化酶法, NO 含量采用 Griess 试剂法。具体操作方法按照试剂盒说明书进行。

**2.6 统计处理** 使用 SPSS 10.0 统计软件, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 PM 活力的影响** LPS 作为 PM 产生炎性介质的重要刺激因子, 在与 PM 共培养的 48 h 内, 对细胞活力无显著影响。大黄附子汤 (25 ~ 400 mg · L<sup>-1</sup>) 对腹腔巨噬细胞活力无明显影响, 但大黄附子汤剂量达到 800 mg · L<sup>-1</sup> 时, 抑制细胞增殖。因此, 后续实验剂量选择 25 ~ 400 mg · L<sup>-1</sup> 进行。见表 1。

**3.2 对 PM 培养上清液 TNF-α, IL-6 的影响** 腹腔巨噬细胞与 LPS 共培养 24 h 后, 上清液中 TNF-α, IL-6 水平升高, 大黄附子汤 (100, 200, 400 mg · L<sup>-1</sup>) 能抑制 PM 释放 TNF-α, IL-6。见表 2。

**3.3 对 PM 抗氧化功能的影响** 表 3 结果显示, 腹腔巨噬细胞与 LPS 共培养可使培养上清液中 MDA, NO 水平升高, SOD 酶活性明显降低。大黄附子汤在 50 ~ 400 mg · L<sup>-1</sup> 剂量, 呈剂量依赖性抑制 NO 水平, 增加 SOD 酶活性, 降低上清液中 MDA 的含量。

表 3 大黄附子汤对与 LPS 共培养腹腔巨噬细胞抗氧化功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	NO/μmol·L <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>
细胞对照	-	20.03 ± 6.39	28.85 ± 8.91	264.99 ± 56.28
LPS	10	38.58 ± 10.02 <sup>1)</sup>	47.84 ± 9.72 <sup>1)</sup>	162.47 ± 52.34 <sup>1)</sup>
大黄附子汤	25	34.72 ± 9.90	40.92 ± 8.87	183.28 ± 26.82
	50	19.29 ± 4.83 <sup>3)</sup>	36.78 ± 10.89	184.87 ± 21.47
	100	17.51 ± 1.75 <sup>3)</sup>	33.16 ± 7.82 <sup>2)</sup>	203.86 ± 34.57
	200	17.66 ± 2.72 <sup>3)</sup>	30.25 ± 6.63 <sup>3)</sup>	233.07 ± 23.34 <sup>2)</sup>
	400	17.21 ± 5.68 <sup>3)</sup>	29.48 ± 7.95 <sup>3)</sup>	227.02 ± 48.12 <sup>2)</sup>

### 4 讨论

SAP 是临床常见急腹症, 并发的全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 可导致肺、肝、肾、肠道等器官损伤甚至多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)<sup>[4-5]</sup>。一旦并发 MODS, 治疗十分困难, 其死亡率高达 20% ~ 30%。阻断 SIRS 向 MODS 的进展是降低 SAP 死亡率的关键。

SAP 发病时, 受损的胰腺腺泡细胞一方面分泌激活胰蛋白酶原及多种细胞因子引起化学性炎症反应, 另一方面作为炎症介质的靶细胞, 大量死亡<sup>[6]</sup>。

表 1 大黄附子汤对腹腔巨噬细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	A
细胞对照	-	0.552 ± 0.254
LPS	10	0.573 ± 0.132
大黄附子汤	25	0.575 ± 0.112
	50	0.615 ± 0.175
	100	0.585 ± 0.157
	200	0.537 ± 0.270
	400	0.515 ± 0.164
	800	0.425 ± 0.278 <sup>1)</sup>

注: 与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

表 2 大黄附子汤对腹腔巨噬细胞与 LPS 共培养 24 h 培养上清液 TNF-α, IL-6 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	TNF-α	IL-6
细胞对照	-	20.66 ± 2.82	280.70 ± 61.29
LPS	10	37.56 ± 3.19 <sup>1)</sup>	603.80 ± 67.95 <sup>1)</sup>
大黄附子汤	25	31.65 ± 3.99	529.08 ± 75.74
	50	27.57 ± 5.81	483.69 ± 71.82
	100	26.23 ± 2.31 <sup>2)</sup>	371.79 ± 42.37 <sup>3)</sup>
	200	19.10 ± 2.61 <sup>3)</sup>	353.58 ± 22.35 <sup>3)</sup>
	400	12.78 ± 3.50 <sup>3)</sup>	343.38 ± 52.22 <sup>3)</sup>

注: 与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

病变胰腺组织作为抗原或炎症刺激物可以持续激活 PM, 产生 TNF-α、IL-1β、IL-6 等多种细胞因子与活性氧不仅直接加重胰腺损伤, 同时也是 SAP 从胰腺局部病变迅速发展为 SIRS 和 MODS 的关键所在<sup>[7]</sup>。在 PM 释放的诸多细胞因子中, TNF-α 与 IL-6 备受关注, 他们作为早期促炎细胞因子, 直接介导组织炎症损伤、促进其他细胞因子的释放, 介导炎症反应的连锁放大效应, 更为重要的是, 越来越多的研究表明, 其体内水平的高低与疾病严重程度及预后直接相关。在炎症反应中, TNF-α 具有刺激产生其他细胞因子、介导补体瀑布效应, 激活中性粒细胞、淋巴

细胞、巨噬细胞,是最关键的炎症启动因子,同时能刺激 PM 产生过氧化物,诱发其他细胞因子释放<sup>[8]</sup>; IL-6 是人体炎症反应急性期蛋白合成的主要诱导物,能升高白细胞、增加血管通透性、激活补体,介导炎症急性期反应。IL-6 还可通过调控成熟炎细胞功能进而刺激炎症反应,强化炎性细胞对炎性介质的效应。最新的一项关于 IL-6 与 SIRS 患者相关性研究结果显示,血清 IL-6 水平与 SIRS 评分及患者预后均密切相关<sup>[9]</sup>。

在各种损伤因素作用下,细胞内活性氧(ROS)的产生系统和清除系统的平衡遭到破坏,如体内自由基的主要清除酶 SOD 等数量减少、活性降低,ROS 不断增多,使细胞膜流动性和通透性发生变化。同时,ROS 可作为细胞内的第二信使,介导许多促炎性细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL 和趋化因子(MCP-1)的表达,放大炎症连锁效应<sup>[10]</sup>。可以说,PM 释放的细胞因子与氧化、抗氧化系统在损伤因素作用下,既作为独立的反应系统发挥作用又相互协同放大炎症反应连锁效应。

本研究考察了 LPS 及大黄附子汤对 PM 活力及功能的影响,结果显示,LPS 在  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  剂量时对细胞活力无显著影响,但能显著刺激细胞释放 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 MDA,NO,降低 SOD 活力,抑制其清除活性氧的能力。大黄附子汤在不影响细胞活力的前提下抑制 LPS 诱导 NO 的生成,增强 SOD 酶活力,进而降低细胞上清液中 MDA 含量,并能显著抑制 LPS 诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等细胞因子的合成。由此可见,大黄附子汤能有效调节 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞免疫及抗氧化功能,改善 LPS 对 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞的诱导作用。综合大黄附子汤在治疗 SAP 的文献报道及课题组前期研究结果,认为大黄附子汤治疗 SAP 除了对胰腺的直接保护作用外,减轻 PM 诱导的炎症级联反应可能是其发挥作用的重要机制。

重要机制。

#### [参考文献]

- [1] 梁晓夏,张保国,刘庆芳. 大黄附子汤现代药效学研究及临床运用[J]. 中成药,2008,30(11):1670.
- [2] 路小光,战丽彬,曲明阳,等. 大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠细胞因子的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2004,11(6):352.
- [3] 路小光,战丽彬,康新,等. 重症急性胰腺炎并发肺损伤促/抗炎因子的变化及大黄附子汤的干预研究[J]. 中华临床医师杂志,2010,4(11):2098.
- [4] Bhatia M. Acute pancreatitis as a model of SIRS[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2009, 14(1):2042.
- [5] 高伟,崔乃强. 重症急性胰腺炎器官损害的临床特征及治疗[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):253.
- [6] Husain S, Thrower E. Molecular and cellular regulation of pancreatic acinar cell function [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2009, 25(5):466.
- [7] Shrivastava P, Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(32):3995.
- [8] Perides G, Weiss E R, Michael E S, et al. TNF- $\alpha$ : dependent regulation of acute pancreatitis severity by LY-6Chi monocytes in mice [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15):13327.
- [9] Gregoric P, Sijacki A, Stankovic S, et al. SIRS score on admission and initial concentration of IL-6 as severe acute pancreatitis outcome predictors [J]. *Heoato-Gastroentemology*, 2010,57(7):349.
- [10] 潘会君,唐宁,华晓东,等. 中药调控一氧化氮合酶-一氧化氮系统的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):202.

[责任编辑 聂淑琴]