

通脉复方有效组分抑制肾小球系膜细胞增殖 的活性筛选及配伍研究

刘明平*, 林铿, 黄兆胜, 吴庆光
(广州中医药大学中药教研室, 广州 510405)

[摘要] 目的:筛选黄芪、三七组成的通脉复方有效组分,并确定其最佳配伍剂量。方法:SD 大鼠随机分为空白血清组、金水宝组 $1.32 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、通脉水煎 $8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、通脉提取物 $8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、复方多糖 $0.64 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、复方皂苷 $0.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、其余组分组,共 7 组。ig 给药 7 d,7 d 后采集大鼠含药血清。采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法测定不同提取组分含药血清对肾小球系膜细胞 (GMC) 增殖的影响。在此基础上,采用 2 因素 3 水平的正交试验 $L_9(3^4)$ 对“有效组分”多糖、皂苷最佳配伍组合进行了研究。结果:正常培养及 LPS 刺激条件下,复方多糖与复方皂苷、通脉提取物、水煎液、金水宝含药血清均能抑制 GMC 增殖,与空白对照组相比,均有显著或非常显著性差异 ($P < 0.05 \sim 0.01$);而其余组分含药血清对 GMC 增殖无明显抑制,与空白对照组相比无显著性差异;通脉提取物含药血清对 GMC 增殖的抑制作用强于复方多糖、复方皂苷及金水宝含药血清,组间比较,有显著或非常显著性差异 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。对主效应即 GMC 增殖的抑制作用的贡献程度 (F 值) 复方多糖 (13.69) 与复方皂苷 (13.67) 几乎无差别。有效组分不同剂量配伍中,以 A_3B_3 即复方多糖 960 mg、复方皂苷 240 mg 配伍对 GMC 的抑制作用最为显著。结论:复方多糖与复方皂苷为通脉复方的主要有效组分,其比例为 4:1 (960 mg:240 mg) 为有效组分最佳剂量配伍。

[关键词] 黄芪;三七;有效组分;配伍

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0172-04

Effective Components of Tongmai Oral Liquid for Inhibiting Proliferation of Glomerular Mesangial Cell and Study on Component Compatibility

LIU Ming-ping*, LIN Keng, HUANG Zhao-sheng, WU Qing-guang

(College of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effective compounds of the prescription of Tongmai Oral Liquid (TMOL) and its best compatible proportion. **Method:** Using method of serological pharmacology, proliferation of glomerular mesangial cell (GMC) was observed to screen the effective compounds of TMOL. Based on the result of screening, using orthogonal experiment design, the best compatible proportion between the total polysaccharides and saponins was evaluated. **Result:** The results showed the total polysaccharide and saponin, which were extracted from the prescription of TMOL could inhibit the proliferation of GMC and the best compatible proportion between total polysaccharide and saponin is 960 mg:240 mg. **Conclusions:** total polysaccharide and total saponin were the chiefly effective compounds and the best compatible proportion was 960 mg:240 mg.

[Key words] Radix Astragali; Radix Et Rhizoma Notoginseng; effective compounds; compatible proportion.

[收稿日期] 20101011(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30271605)

[通讯作者] *刘明平,博士,副教授,硕士生导师,从事中药有效组分配伍规律及免疫药理研究, Tel: 020-39358089, E-mail: liumingping@gzhtcm.edu.cn

选用恰当的药理模型和研究设计方案,筛选、分离提取中药复方化学成分或化学成分群组成的“新复方”已成为创新中药开发研制的新的生长点。通脉口服液为治疗慢性肾炎有效经验方,由黄芪、三七组成。为进一步开发通脉口服液有效组分“新复

方”,本研究以肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell,GMC)增殖为药效学导向指标,对通脉口服液复方不同提取组分进行了活性筛选,并对其有效组分最佳剂量配伍进行了研究。其目的在于寻找通脉复方有效组分及最佳剂量配比。

1 材料

1.1 动物和肾小球系膜细胞 SD 雄性大鼠 35 只,SPF 级,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号 0003467,许可证号 SCXK(粤)2003-0001。肾小球系膜细胞(GMC),武汉大学典藏细胞库提供,编号 HBZY-1。

1.2 试剂及仪器 CO₂ 恒温培养箱:美国 Harris 公司生产;倒置相差显微镜:日本 Nikon 公司生产;酶联免疫检测仪:美国 Bio-Rad 公司 Smartspec3000 型。

1.3 药物 金水宝胶囊:由江西金水宝制药有限公司生产,批号 040511。通脉水煎液:通脉由黄芪、三七按 3:1 比例组成。取复方药材,加 10 倍水浸泡 12 h,加热至沸腾,提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,浓缩,定容至相当于 1 g 生药/mL。通脉复方提取物:将复方如通脉水煎液法提取后,采用醇沉法沉淀出多糖,上清液过 D101 大孔树脂,富集皂苷部位,将分离出的总多糖和总皂苷部位混合,加水溶解,定容至相当于 1 g 生药/mL。其余组分组:将复方如通脉复方提取物法提取后,将分离出多糖和皂苷后余下的部位,浓缩定容至相当于 1 g 生药/mL。复方多糖:将复方如通脉水煎液法提取后,采用醇沉法提取分离出多糖部位,加水溶解,定容至相当于 1 g 生药/mL。复方皂苷:将复方如通脉水煎液法提取后,采用醇沉法分离出多糖,再用 D101 大孔树脂富集,得到总皂苷部位,加水溶解,定容至相当于 1 g 生药/mL。

上述提取物均由广州中医药大学中药学院实验中心提取、鉴定。

2 方法

2.1 含药血清制备 将 SD 大鼠随机分为 7 组,即空白血清组、金水宝组 1.32 g·kg⁻¹、通脉水煎 8 g·kg⁻¹组、通脉提取物 8 g·kg⁻¹组、复方多糖 0.64 g·kg⁻¹组、复方皂苷 0.16 g·kg⁻¹组、其余组分组,每组 5 只。ig 给药 7 d,其余组分组、空白血清组 ig 等量其余组分及生理盐水。第 7 天重复给药 2 次,间隔时间 2 h,并于末次给药后 1 h,无菌操作,眼眶静脉取血,静置 1 h,待血凝固后离心(1 500 r·min⁻¹,10

min),分离血清,并将含药血清置于 56 ℃ 水浴箱中,水浴 30 min 灭活处理。置于 -20 ℃ 冰箱保存备用。金水宝、通脉按临床用量的 20 倍,提取物剂量根据复方临床用量及复方多糖、皂苷提取率进行相应换算而确定。

2.2 分组与给药 取第 3 代 GMC(由武汉大学典藏细胞库提供,编号 HBZY-1,用含 10% FCS 的 DMEM 调整细胞密度到 7 × 10⁴/mL,转种于 96 孔培养板中,100 μL/孔,则每孔细胞数为 7 × 10³/个。37 ℃ 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h,各孔均换液,加入不含 FCS 的 DMEM 培养液 200 μL 以同步各组细胞于 G₀ 期。然后分①空白对照组(加 10% 正常鼠血清);②金水宝(加 10% 金水宝含药血清);③通脉水煎组(加 10% 通脉水煎含药血清);④通脉提取物组(加 10% 通脉提取物含药血清);⑤复方多糖组(加 10% 复方多糖含药血清);⑥复方皂苷组(加 10% 复方皂苷含药血清);⑦其余组分组(加 10% 其余组分含药血清);⑧ LPS 组(加 LPS 10 mg·L⁻¹和 10% 正常鼠血清);⑨金水宝(加 LPS 10 mg·L⁻¹和 10% 金水宝含药血清);⑩通脉水煎组(加 LPS 10 mg·L⁻¹和 10% 通脉水煎含药血清);⑪通脉提取物组(加 LPS 10 mg·L⁻¹和 10% 通脉提取物含药血清);⑫复方多糖组(加 LPS 10 mg·L⁻¹和 10% 复方多糖含药血清);⑬复方皂苷组(加 LPS 10 mg·L⁻¹和 10% 复方皂苷含药血清);⑭其余组分组(加 LPS 10 mg·L⁻¹和 10% 其余组分含药血清),共 14 组。每组设 6 复孔。

2.3 细胞毒性实验 生长于 12 孔板(5 × 10⁴个/孔)的亚融合状系膜细胞在含 0.5% FCS 的 DMEM 培养液中培养 24 h,使细胞处于静息状态。然后分别加入各组含药血清(终浓度分别为 5%,10%,20%),同时设不加含药血清的对照组。分别在作用 24,48,72 h 时收集细胞,台盼蓝染色,计数活细胞数,计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{活细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

2.4 肾小球系膜细胞(GMC)增殖的检测 培养 48 h 时分别取出相应的培养板,每孔加入 MTT 20 μL,继续培养 4 h,小心吸弃各孔培养液,加入 100 μL DMSO,室温避光,轻轻震荡 10 min,使结晶充分溶解。选择 490 nm 波长条件下用酶标仪测定吸光度(A)。

3 结果

3.1 各组含药血清对大鼠肾小球系膜细胞活力的

影响 台盼蓝染色结果显示:各组含药血清作用 24,48,72 h,细胞活力均在 96% 以上,表明各组含药血清对大鼠肾小球系膜细胞无明显细胞毒作用。

3.2 各组分含药血清在正常及 LPS 刺激培养条件下对 GMC 增殖的影响 结果显示,复方多糖与复方皂苷对 GMC 增殖均有较明显的抑制作用,通脉提取物组(复方多糖+复方皂苷)对 GMC 增殖作用与通脉水煎液作用相当,其余组分对 GMC 增殖无明显影响,初步认为复方多糖与复方皂苷为通脉复方的有效组分。见表 1,2。

表 1 10% 各组分含药血清在正常培养条件下作用 72 h 对 GMC 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	A
空白血清	0.683 ± 0.046
金水宝	0.601 ± 0.046 ^{1,2)}
通脉水煎液	0.498 ± 0.025 ¹⁾
通脉提取物	0.471 ± 0.027 ¹⁾
复方多糖	0.574 ± 0.035 ^{1,3)}
复方皂苷	0.518 ± 0.028 ^{1,2)}
其余组分	0.676 ± 0.045

注:与空白血清比较¹⁾ $P < 0.01$;与通脉提取物比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 10% 各组分含药血清作用 72 h 对 LPS 刺激下 GMC 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	A
空白血清 + LPS	0.766 ± 0.034
金水宝 + LPS	0.621 ± 0.041 ^{1,3)}
通脉水煎液 + LPS	0.575 ± 0.021 ¹⁾
通脉提取物 + LPS	0.544 ± 0.032 ¹⁾
复方多糖 + LPS	0.635 ± 0.027 ^{1,3)}
复方皂苷 + LPS	0.568 ± 0.030 ^{1,2)}
其余组分 + LPS	0.747 ± 0.038

注:与空白血清 + LPS 比较¹⁾ $P < 0.01$;与通脉提取物 + LPS 比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

表 1~2 结果显示:正常培养及 LPS 刺激条件下,复方多糖与复方皂苷、通脉提取物、水煎液、金水宝,均能抑制 GMC 增殖,与空白对照组相比,均有显著或非常显著性差异($P < 0.05 \sim P < 0.01$);而其余组分组对 GMC 增殖无明显抑制,与空白对照组相比无显著性差异;通脉水煎液、通脉提取物对 LPS 刺激条件下 GMC 增殖的抑制作用强于复方多糖、复方皂苷及金水宝组间比较,有显著或非常显著性差异

($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。

3.3 各有效组分不同剂量配伍含药血清对 LPS 刺激下 GMC 增殖的影响 通过上述实验筛选,确定复方多糖与复方皂苷为通脉有效组分,为寻求有效组分之间的最佳配比组合,设计 2 因素 3 水平的正交试验 $L_9(3^4)$,检测各有效组分不同剂量配伍含药血清对 LPS 刺激条件下对 GMC 增殖的影响.实验设计及结果分析见表 3~5。

表 3 2 因素 3 水平正交设计表 $L_9(3^4)$

水平	复方多糖/ $g \cdot kg^{-1}$ (A)	复方皂苷/ $g \cdot kg^{-1}$ (B)
1	0.32	0.08
2	0.64	0.16
3	0.96	0.24

表 4 各有效组分不同剂量配伍含药血清对 LPS 刺激下 GMC 增殖的影响

试验号	A	B	C	D	A
	1	2	3	4	χ
1	1	1	1	1	0.686
2	1	2	2	2	0.531
3	1	3	3	3	0.537
4	2	1	2	3	0.676
5	2	2	3	1	0.610
6	2	3	1	2	0.637
7	3	1	3	2	0.574
8	3	2	1	3	0.517
9	3	3	2	1	0.470
I	1.754	1.936	1.840	1.766	5.238
II	1.923	1.668	1.677	1.742	
III	1.558	1.644	1.721	1.730	
($I^2 + II^2 + III^2/3$)	3.067	3.078	3.053	3.049	
∑	6.153 3	6.142 7	6.063 0	6.111 3	

表 5 有效组分含药血清对 GMC 增殖的的贡献度方差分析

来源	∑	ν	MS	F	P
A	6.153 3	2	3.076 7	13.69	<0.05
B	6.142 7	2	3.071 3	13.67	<0.05
C	6.063 0	2	3.031 5		
D	6.111 3	2	3.055 7		
误差	0.449 4	2	0.224 7		

上述正交试验结果显示:对主效应即 GMC 增殖的抑制作用的贡献程度(F 值)复方多糖(13.69)与复方皂苷(13.67)几乎无差别。各剂量水平方面,

以 A_3B_3 即复方多糖 960 mg, 复方皂苷 240 mg 对 GMC 的抑制作用最为显著。

4 讨论

复方有效部位与有效成分的活性筛选工作难度大, 涉及面广, 目前尚处于起步阶段^[1]。本研究运用化学与药理相结合的方法, 提取复方中的“总多糖”与“总皂苷”, 并以显示中药微观作用的肾小球系膜细胞增殖(GMC)为药效学导向评价指标, 对复方提取物中的“总多糖”与“总皂苷”及“无效部位”进行了活性筛选。结果显示复方多糖与复方皂苷均对 GMC 增殖具有明显的抑制作用, 而“无效部位”对 GMC 增殖无抑制作用, 提示复方“总多糖”和“总皂苷”为该方中 2 类主要有效部位。在此基础上, 通过正交试验设计对“有效部位”总多糖、总皂苷最佳配伍组合剂量进行了研究。结果显示, 复方多糖与复方皂苷最佳剂量组合为 960 mg: 240 mg 时对 GMC 增殖抑制作用最显著, 为有效部位最佳剂量配比组合。

本研究由于受提取分离技术的限制, 对复方中黄酮类组分以及其他非水溶性组分的活性尚无法进

行进一步的评价。如严永清^[2]提出复方物质基础研究应注意化学成分之间形成的复合物, 无机物, 这些亦可能是复方物质基础的增效因素。因此, 复方中黄酮类组分以及其他非水溶性组分是否就为“无效成分”尚有待进一步深入研究。同时, 开展有效成分组的研究还存在许多尚未解决的问题, 如生物活性检测指标的选择, 活性筛选结果、多种活性成分的综合分析以及作用机制研究等, 都有待于在实践中进一步完善^[3-4]。

[参考文献]

- [1] 孔令义, 杨智, 闵知大. 对中药现代化中有效成分研究的思考[J]. 中草药, 1998, 29(5): 354.
- [2] 严永清. 中药复方物质基础的增效因素[J]. 世界科学技术——中药现代化. 基础研究, 2001, 3(2): 55.
- [3] 杜冠华. 药物筛选新技术与中药现代化[J]. 世界科学技术——中药现代化, 2000(2): 47.
- [4] 杜冠华. 高通量药物筛选与中药现代化[J]. 中成药, 1999, 21(5): 268.

[责任编辑 聂淑琴]

简 讯

据中国高等学校自然科学学报研究会、中国科学技术期刊编辑学会 2009 年统计结果报道, 2008 年《中国实验方剂学杂志》登载的学术论文中, 有 224 篇被美国化学文摘(CA)收录, 标志着《中国实验方剂学杂志》已成为 CA 在国内的主要统计源期刊之一, 也标志着该杂志的学术水平又迈上了一个新台阶。

在此, 谨向热心于《中国实验方剂学杂志》审稿、组稿工作的人员表示衷心感谢, 向各学术论文作者对《中国实验方剂学杂志》工作支持表示诚挚谢意!