

补肾活血方中单体成分的体外炎性抑制作用研究

孙东东, 闫秋莹, 刘丽萍, 沈卫星, 程海波*

南京中医药大学转化医学研究中心 国家中医药管理局名医验方评价与转化
重点研究室 江苏省抗肿瘤验方研究与产业化工程实验室, 南京 210023

摘要: 本文采用 LC-MS 技术进行定性分析, 确定补肾活血方水提液中存在芍药苷、阿魏酸、白藜芦醇、蛇床子素及补骨脂素等单体化合物。利用酶联免疫法 (ELISA) 测定试药对模型细胞释放 TNF- α 、IL-6 及 NO 的抑制作用。与空白组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6、NO 含量明显升高 ($P < 0.0$) ; 与模型组比较, 阿魏酸、白藜芦醇、补骨脂素及复方水提部位在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以及蛇床子素在 20、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均对 TNF- α 的释放具有显著的抑制 ($P < 0.01$) ; 阿魏酸及补骨脂素在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 白藜芦醇及蛇床子素在 20、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均对 IL-6 水平具有显著的抑制 ($P < 0.01$) ; 芍药苷及复方水提部位在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 阿魏酸、白藜芦醇、蛇床子素及补骨脂素在 20、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均对 NO 的释放具有显著抑制 ($P < 0.01$)。结果表明单体对炎症因子的释放抑制作用总体上强于复方水提部位, 提示补肾活血方的治疗骨关节炎活性可能是通过抑制炎症介质释放, 降低 TNF- α 、IL-6、NO 等含量发挥作用, 这对验证复方药效活性, 探究效应物质基础具有重要意义。

关键词: 补肾活血方; 骨关节炎; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6; 一氧化氮

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.08.014

In vitro Anti-Inflammatory Activity of Effective Components in Bushen Huoxue Recipe

SUN Dong-dong, YAN Qiu-ying, Liu Li-ping, SHEN Wei-xing, CHENG Hai-bo*

Translational Medicine Center of Nanjing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Famous Doctors' Proved Recipe Evaluation and Transformation of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Provincial Lab of Anticarcinoma Proved Recipe Research and Engineering Industrialization, Nanjing 210023, China

Abstract: Qualitative analysis of paeoniflorin, ferulic acid, resveratrol, osthole and psoralen in water extract of Bushen Huoxue recipe was performed using LC-MS technology. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect the effect of paeoniflorin, ferulic acid, resveratrol, osthole, psoralen and Bushen Huoxue Recipe water extract on IL-6, TNF- α and NO. The results showed that ferulic acid (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), resveratrol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), psoralen (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), recipe water extract (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and osthole (20, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) had a significant inhibition effects on the release of TNF- α ; Ferulic acid (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), psoralen (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), resveratrol (20, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and osthole (20, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) had significant inhibition effect on IL-6. Paeoniflorin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), recipe water extract (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the other 4 components (20, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) had a remarkable inhibition effect on the release of NO. The results showed that the monomers hold generally stronger inhibition effect than recipe water extract. The mechanism of Bushen Huoxue recipe in treating osteoarthritis may be performed by inhibiting the release of inflammatory mediators of TNF- α , IL-6 and NO, which were helpful for exploring material basis of Bushen Huoxue recipe.

Key words: Bushen Huoxue recipe; osteoarthritis; TNF- α ; IL-6; NO

补肾活血方是南京中医药大学第一附属医院用于治疗骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 的协定处方, 为

深入研究补肾活血方治疗骨关节炎 (OA) 的效应物质基础及药效分子机制, 前期试验采用液质联用技术 (LC-MSⁿ), 围绕复方进行了定性和定量分析^[1-3], 确定了复方中存在的若干化合物, 同时比较了配伍前后相关成分的含量变化。本研究结合文献查阅, 选取出 5 种在复方提取液中分离得到, 并且文献报

收稿日期: 2015-02-09 接受日期: 2015-04-28

基金项目: 江苏省中医药局科技项目 (LZ13013); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (2011ZYX6-013); 江苏省 2012 年度普通高校研究生科研创新计划 (CXZZ12-0626)

* 通讯作者 Tel: 86-25-85811005; E-mail: chb7197@163.com

道有明确或潜在治疗 OA 活性的单体作为体外炎症试验对象,他们分别是芍药苷^[4]、阿魏酸^[5]、白藜芦醇^[6]、蛇床子素^[7]、补骨脂素^[8]。TNF- α 、IL-6 及 NO 是目前已经验证的,与炎症有关或与 OA 相关的细胞因子,这些炎症因子在 OA 的发病过程中起着重要作用,可以加速关节软骨基质的分解代谢^[9-12]。本实验采用酶联免疫法(ELISA)测定芍药苷等 5 种单体成分及复方水提部位,对脂多糖(LPS)刺激诱导的 RAW264.74 小鼠巨噬细胞释放炎症介质 TNF- α 、IL-6、NO 的抑制作用,方法快速、便利、准确,对于评价和验证复方 OA 治疗活性,阐明药效分子机制,探究效应物质基础具有重要意义。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 系统(四元泵溶剂系统,在线脱气机和自动进样器,美国 Waters 公司),Xevo TQ 型质谱检测器(美国 Waters 公司),MassLynxTM 型质谱工作站软件(美国 Waters 公司),BT125 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司);TGL16 型低温高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SY-1220 型水浴锅(美国 Crystal 公司);1300SeriesA2 型无菌操作台(美国 Thermo scientific 公司);无菌 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo scientific 公司);酶标仪(美国 Thermo scientific 公司)。

独活、桑寄生、怀牛膝、淫羊藿、当归、川芎、白芍、虎杖、制天南星等药材,均购自安徽亳州,经南京中医药大学陈建伟教授对照 2010 版药典(一部)的药材标准,进行定性和相关指标定量分析,鉴定为正

品;芍药苷(批号:0736-9811)、阿魏酸(批号:0773-9910)、白藜芦醇(批号:10040-201201)、蛇床子素(批号:0822-9802)、补骨脂素(批号:739-8701)等标准品均购于中国药品生物制品检定所;脂多糖(LPS, 1 mg/mL, Sigma 公司)、1640 培养基(Gibico 公司)、FBS(上海四季青公司)、胰酶(批号:27250018, Gibico 公司)、DMSO(批号:20110105, 上海凌风)、小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(批号:EM004-96, 规格 96t, 上海依科赛生物制品有限公司)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(批号:EM008-96, 规格 96t, 上海依科赛生物制品有限公司)、NO ELISA 试剂盒(批号:S0021-2, 规格 200t, 江苏碧云天生物技术研究);乙腈、甲酸(色谱纯,德国 Merk 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯;RAW264.74 小鼠巨噬细胞(批号:13-00302, 上海汉博生物科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 LC-MS 样品制备

独活等复方药材合并后加入 8 倍量水,煎煮 3 次,时限分别为 1、1、0.5 h,过滤后合并滤液,95%乙醇沉淀,离心后取上清液浓缩至干,精密称取 0.1000 g 浸膏用 50% 甲醇定容至 200 mL 容量瓶,经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,供液质连用分析;剩余浸膏供药效试验使用。

2.2 LC-MS 条件

色谱分离及质谱分析检测条件参考前面的定性和定量分析实验相关参数^[1-3],取样锥孔电压、碰撞能量等 5 种化合物的主要质谱检测参数参见表 1。

表 1 5 种化合物的主要质谱检测参数

Table 1 The main MS detection parameters of 5 targeted compounds

编号 No.	化合物 Compounds	分子量 MW	多反应离子检测 MRM transitions	锥孔电压 Cone voltage (V)	碰撞能量 Collision energies (eV)	保留时间 Rt (min)	离子模式 Ion mode
1	芍药苷 Paeoniflorin	480	525.35 > 449.23	20	14	2.70	ES ⁻
2	阿魏酸 Ferulic acid	194	195.00 > 144.93	16	16	3.28	ES ⁺
3	白藜芦醇 Resveratrol	228	227.00 > 185.00	20	30	6.09	ES ⁻
4	蛇床子素 Osthole	224	245.00 > 189.00	20	17	11.16	ES ⁺
5	补骨脂素 Psoralen	186	187.00 > 130.98	24	24	6.50	ES ⁺

2.3 细胞铺板^[13]

用 1640 培养基 + 10% FBS 培养小鼠巨噬细胞 RAW264.74(培养条件:5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养),待细胞长至适量后,用 0.25% 胰酶消化细胞,计数,

稀释至 1×10^5 个/mL,以 200 μ L/孔的量铺至 48 孔板中。放入无菌培养箱中,继续培养 24 h。

2.4 给药方法及分组

用 1640 培养基将 LPS 稀释至 500 μ g/L,芍药

苷、阿魏酸、白藜芦醇、蛇床子素、补骨脂素及复方水提部位等分别用 DMSO 溶解使其浓度为 $1 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$, 而后用培养基将待测试药分别稀释至 100、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。吸净孔中培养基, 将稀释后的试药依次加入 300 μL , 实验分设阴性对照组(不加药), LPS 对照组(只加 LPS), 芍药苷组(LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍药苷、LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍药苷), 阿魏酸组(LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿魏酸、LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿魏酸), 白藜芦醇组(LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇、LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇), 蛇床子素组(LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛇床子素、LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛇床子素), 补骨脂素组(LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 补骨脂素、LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 补骨脂素), 复方水提部位组(LPS + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 复方水提部位、LPS + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 复方水提部位); 每组设三个复孔。将 48 孔板置于无菌培养箱继续培养 24 h。

2.5 检测方法

收集细胞上清液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 10 000 rpm 离心 2 min 后, 吸取上清液, 按照说明书中检测步骤处理上清液, 最后用酶标仪以 450 nm 为检测波长, 检测 TNF- α 、IL-6 水平; 以 540 nm 为波长, 检测 NO 水平。按照试剂盒说明书要求进行操作, 以标准品浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 根据样品 OD 值计算样品细胞因子浓度, 并记录。

2.6 数据计算及统计分析

抑制率(%) = $100\% - (\text{加药组 C 值} - \text{空白对照 C 值}) / (\text{LPS 组 C 值} - \text{空白组 C 值}) \times 100\%$ (C 为细胞因子浓度); 应用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 各组检测结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单

因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 补肾活血方中化合物的检测

结合 LC-MS 测定, 通过软件积分, 文献比对和数据分析, 确定补肾活血方中确实存在芍药苷、阿魏酸、白藜芦醇、蛇床子素及补骨脂素等化合物。

3.2 对 LPS 诱导 RAW264.74 细胞释放 TNF- α 、IL-6 及 NO 的抑制作用

对根据酶标仪所测结果进行数据分析, 与空白组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6、NO 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿魏酸、白藜芦醇及补骨脂素在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以及蛇床子素在 20、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均对 TNF- α 的释放具有显著的抑制 ($P < 0.01$), 并且它们的最高抑制率强于复方水提部位; 阿魏酸及补骨脂素在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 白藜芦醇及蛇床子素在 20、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均对 IL-6 水平具有显著的抑制 ($P < 0.01$), 并且它们的最高抑制率强于复方水提部位; 芍药苷在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 阿魏酸、白藜芦醇、蛇床子素及补骨脂素在 20、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均对 NO 的释放具有显著抑制 ($P < 0.01$), 并且阿魏酸、白藜芦醇、蛇床子素、补骨脂素的最高抑制率均强于复方水提部位。从实验数据来看, 样品浓度与 TNF- α 、IL-6 及 NO 的释放抑制率基本是呈正相关关系, 仅发现补骨脂素在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时对于 NO 释放的抑制率为 93.46%, 大于在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时的抑制率 81.31%, 该现象有待进一步探究其原因。实验具体数据与结果见表 2~4。

表 2 复方中 5 种单体对 LPS 诱导 RAW264.74 细胞释放 TNF- α 的抑制作用

Table 2 The inhibition effects of 5 components in recipe on TNF- α released by LPS-induced RAW264.74 cell

组别 Groups	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TNF-a (ng/L)	抑制率 Inhibition rate (%)
空白对照 Blank control	-	338	-
脂多糖 LPS	0.5	8063	-
芍药苷 Paeoniflorin	20	8033	0.39
	100	7932	1.71
阿魏酸 Ferulic acid	20	7769	3.81
	100	4768	42.65 **
白藜芦醇 Resveratrol	20	6790	16.48 *
	100	228	101.42 **
蛇床子素 Osthole	20	1066	90.58 **
	100	25	104.05 **

补骨脂素 Psoralen	20	6790	16.48 *
	100	3090	64.38 * *
复方水提部位 Bushen Huoxue Recipe water extract	20	7949	1.51
	100	5302	35.82 * *

注: $\bar{x} \pm s, n=3$, 加药组与 LPS 模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: $\bar{x} \pm s, n=3$, compared with LPS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 3 复方中 5 种单体对 LPS 诱导 RAW264.74 细胞释放 IL-6 的抑制作用

Table 3 The inhibition effects of 5 components in recipe on IL-6 released by LPS-induced RAW264.74 cell

组别 Groups	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	IL-6 (ng/L)	抑制率 Inhibition rate (%)
空白对照 Blank control	-	7	-
脂多糖 LPS	0.5	3362	-
芍药苷 Paeoniflorin	20	3139	6.65
	100	2791	17.02 *
阿魏酸 Ferulic acid	20	2972	11.62 *
	100	935	72.34 * *
白藜芦醇 Resveratrol	20	551	83.79 * *
	100	11	99.88 * *
蛇床子素 Osthole	20	28	99.37 * *
	100	6	100.03 * *
补骨脂素 Psoralen	20	2736	18.66 *
	100	304	91.15 * *
复方水提部位 Bushen Huoxue Recipe water extract	20	3340	0.61
	100	2919	13.12 *

注: $\bar{x} \pm s, n=3$, 加药组与 LPS 模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: $\bar{x} \pm s, n=3$, compared with LPS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 4 复方中 5 种单体对 LPS 诱导 RAW264.74 细胞释放 NO 的抑制作用

Table 4 The inhibition effects of 5 components in recipe on NO released by LPS-induced RAW264.74 cell

组别 Groups	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	抑制率 Inhibition rate (%)
空白对照 Blank control	-	0	-
脂多糖 LPS	0.5	10.70	-
芍药苷 Paeoniflorin	20	9.39	12.24 *
	100	5.91	44.77 * *
阿魏酸 Ferulic acid	20	7.67	28.32 * *
	100	3.30	69.16 * *
白藜芦醇 Resveratrol	20	5.91	44.77 * *
	100	1.57	85.33 * *
蛇床子素 Osthole	20	2.43	77.29 * *
	100	1.13	89.44 * *
补骨脂素 Psoralen	20	0.70	93.46 * *
	100	2.00	81.31 * *
复方水提部位 Bushen Huoxue Recipe water extract	20	8.94	16.26 *
	100	4.62	56.88 * *

注: $\bar{x} \pm s, n=3$, 加药组与 LPS 模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: $\bar{x} \pm s, n=3$, compared with LPS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论

TNF- α 可激活多型核细胞,刺激滑膜细胞的 PGE 产生,增加骨、软骨的破坏。邓康夫等通过对 TNF- α 的研究指出,TNF- α 以促滑膜成纤维细胞样细胞增殖作用为主,并因其增强滑膜细胞 RNA 的表达功能,而使滑膜组织纤维性变大及滑液中细胞因子水平异常升高,从而改变关节的力学特征和软骨细胞的生活微环境,而成为参与 OA 关节软骨退变的途径之一^[9]。IL-6 又称 B 细胞分化因子,其作用与 B 细胞功能相关联,IL-6 可激活 B 细胞和 T 细胞,通过其自分泌形式作用于软骨细胞,促进软骨细胞的增殖^[10]。NO 是多种细胞因子的信号分子,介导它们发挥生物学作用。正常情况下,NO 起着宿主防疫作用,但过量的 NO 可导致各种慢性炎症。OA 发病早期,受损裸露的软骨细胞在周围细胞因子的作用下诱发诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)蛋白表达,从而导致 NO 大量释放。NO 又进一步促进炎症细胞因子释放,从而抑制软骨细胞分泌细胞外基质和合成 II 型胶原,影响软骨的营养交换,使软骨处在一个不良的微环境中,最终导致软骨质量不断下降和进行性退化^[11]。作为具有明确功能和效应的炎症介质,抑制细胞 TNF- α 、IL-6 及 NO 的释放水平,对于缓解炎症症状、控制炎症进程具有重要意义。

复方中的多种成分对于 TNF- α 、IL-6 及 NO 的释放显示了不同程度的抑制作用,这正验证了中药药效以及复方治疗的多靶点效应;复方其他的提取部位以及废弃的醇沉部位是否具有炎症因子释放抑制效应,这是我们活性实验需要补充努力的方向,为复方的多功能、不同药效找到科学实验依据;此外对于这些部位或成分还可以探索开展针对其他炎症因子的抑制效应研究,为更深层次的药理药效评价、作用机制分析提供支撑;另外补骨脂素在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的实验浓度时对于 NO 的释放抑制率为 93.46%,大于在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时的抑制率 81.31%,其是否属于实验误差,还是具有双向调节机制作用,需要进一步探究其原因。

目前临床上治疗 OA,主要采用非甾体抗炎药、镇痛剂以及关节注射透明质酸钠等手段,但是实际疗效往往并不理想,经常加重 OA 的发病程度,延长病情;补肾活血方作为一个治疗 OA 的临床验方,实践证明其疗效确切、安全可行;OA 从中医的角度应归于痹症范畴,痹症往往伴随大量的炎症反应,所以

说如何有效结合中医的病机研判,从治则、治法等角度,通过药效实验,揭示复方治疗和干预的协同机制。反证中医的病机理论,提升完善中医理论,较好地达到医药结合,中药研究与中医理论的科学呼应,这也是我们复方研究下一步的重点和方向。

参考文献

- 1 Sun DD(孙东东),Xu XF(徐晓芳),Yan SH(严世海), *et al.* Analysis on chemical components from water extract of *Angelicae pubescentis* Radix by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2014,26:69-76.
- 2 Sun DD(孙东东),Xu XF(徐晓芳),Liu LP(刘丽萍), *et al.* Content determination of twelve kinds of active ingredients in compound Bushen Huoxue Formula with UPLC-ESI-TQ-MS. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志),2014,29:1587-1590.
- 3 Sun DD(孙东东),Xu XF(徐晓芳),Cui JC(崔九成), *et al.* Analysis on chemical components from water extract of *Paeoniae Radix Alba* by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志),2013,38:1760-1765.
- 4 Zheng SC(郑世存),Li XY(李晓宇),Ouyang B(欧阳兵), *et al.* Research development on pharmacological of paeoniflorin. *Chin J Pharmacovigilance* (中国药物警戒),2012,9:100-103.
- 5 Huang F(黄丰),Deng HM(邓华明),Zhu MM(朱苗苗), *et al.* Inhibitory effect of ferulic acid on inflammatory response in microglia induced by lipopolysaccharides. *Zoologic Res* (动物学研究),2011,32:311-316.
- 6 Shen JL(沈皆亮),Hu ZM(胡侦明),Zhong XM(钟小明), *et al.* Resveratrol stimulates extracellular matrix synthesis in degenerative nucleus pulposus cells *via* upregulation of SIRT1. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志),2012,28:1146-1150.
- 7 Ming LG(明磊国),Wang MG(王鸣刚),Chen KM(陈克明), *et al.* Effect of osthon on apoptosis and bone resorption of osteoclasts cultured *in vitro*. *Acta Pharm Sin* (药学学报),2012,47:174-179.
- 8 Zhai YK(翟远坤),Pan YL(潘亚磊),Niu YB(牛银波), *et al.* Comparative studies on the differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts by psoralen and isopsoralen *in vitro*. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报),2012,28:355-361.