

蒙医瘟疫热症经典方查干汤对小鼠脾淋巴细胞增殖及白细胞介素-2 和干扰素- γ 分泌的影响

伊丽娜¹ 张 屏¹ 张 烜² 昌妍希¹ 杭凌宇¹ 包保全¹

(1 内蒙古医科大学药学院,呼和浩特,010100; 2 内蒙古医科大学基础医学院,呼和浩特,010100)

摘要 目的:研究蒙医瘟疫热症经典方查干汤对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱导细胞因子白细胞介素-2 和干扰素- γ 的影响。方法:选取 CCK-8 法检测不同浓度药物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响;用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测白细胞介素-2 和干扰素- γ 的含量。用查干汤不同极性提取物,4 个组方药材土木香、苦参、悬钩子木、山柰以及 6 个指标性成分土木香内酯、异土木香内酯、苦参碱、氧化苦参碱、肉桂酸乙酯、对甲氧基桂皮酸乙酯评价脾淋巴细胞增殖活性。结果:复方及组方药材土木香、苦参、悬钩子木和山柰水提物,均能不同程度促进脾淋巴细胞增殖,并诱导白细胞介素-2 和干扰素- γ 分泌,复方、组方药材醇提物及指标性成分,均无此作用。结论:查干汤及其组方药材水提物均能明显促进脾淋巴细胞增殖,并通过分泌白细胞介素-2 和干扰素- γ 发挥免疫调节作用。

关键词 传统蒙药;复方;查干汤;指标性成分;脾;淋巴细胞;增殖;细胞因子;白细胞介素-2;干扰素- γ

Effects of Classic Mongolia Medicine Prescription Chagan Decoction for the Treatment of Plague Heat Syndrome on Spleen Lymphocyte Proliferation and Secretion of IL-2 and IFN- γ

Yi Lina¹, Zhang Ping¹, Zhang Xuan², Chang Yanxi¹, Hang Lingyu¹, Bao Baoquan¹

(1 College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010100, China; 2 College of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010100, China)

Abstract Objective: On the level of compound, prescription medicine, extract and index components, to study the effects of classic Mongolia medicine prescription Chagan Decoction on rat spleen lymphocyte proliferation and cell factor of IL-2 and IFN- γ . **Methods:** CCK-8 method was used to test the effect of different degree of drug on rat lymphocyte proliferation. The content of IL-2 and IFN- γ were tested by ELISA method. Different polar extracts of Chagan Decoction, 4 composition medicinal materials including Inulae Radix, Sophorae Flavescentis Radix, Rubi Ramulus, Kaempferiae Rhizoma, as well as 6 index components, such as alantolactone, isoolantolactone, matrine, oxymatrine, ethyl cinnamate and ethyl-p-methoxycinnamate, were used for the evaluation of lymphocyte proliferation activity. **Results:** The aqueous extracts of Inulae Radix, Sophorae Flavescentis Radix, Rubi Ramulus, Kaempferiae Rhizoma could promote spleen proliferation lymphocyte in different degrees, and induce secretion of IL-2 and IFN- γ . However, compound, extracts of compound medicinal materials and index component did not show any proliferation effect. **Conclusion:** The aqueous extracts of Chagan Decoction and compound medicinal materials both could promote the spleen proliferation lymphocyte and play a role in immune regulation through IL-2 and IFN- γ .

Key Words Traditional Mongolian medicine; Compound; Chagan Decoction; Index component; Splenic lymphocyte proliferation; Cell factor; IL-2; IFN- γ

中图分类号:R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.039

查干汤又名四味土木香散,为蒙医治疗瘟疫热病的经典方和基础方,由土木香、苦参、悬钩子木和山柰四味药材粗粉,按比例(4:4:2:1)混合制成,1977 年作为首批民族用药载入《中华人民共和国药典》^[1],具有清瘟解表、使“未成熟热成熟”之功效,用于瘟病初期,发热发冷,头痛咳嗽,咽喉肿痛,胸胁作痛等症^[2],经辨证加味可形成 60 多方,用于不同

瘟疫热症的治疗,在蒙医药中具有重要的地位和作用^[3-5]。方中土木香、苦参和悬钩子木同为“促热疾成型类”蒙药,山柰为“祛巴达干类”蒙药^[6-7]。前期研究表明,该方不同极性提取物,具有一定程度的镇痛、抗菌、抗炎作用^[8-9],并从悬钩子木中分离得到抗炎、抗氧化活性物质^[10-11]。我们以小鼠脾淋巴细胞生长率、细胞因子白细胞介素-2 和干扰素- γ 为指

基金项目:国家自然科学基金项目(81460651);内蒙古蒙医药协同创新中心科研项目(MYYXT201506);内蒙古自治区留学回区人员开展科技活动项目择优资助重点项目

作者简介:伊丽娜(1992.10—),女,硕士研究生在读,研究方向:蒙药免疫调节作用及机理,E-mail:576163882@qq.com

通信作者:包保全(1969.02—),男,博士,教授,研究方向:天然药化及蒙药物质基础和资源可持续利用,E-mail:baobaoquan123@yeah.net

标,考察该方对免疫功能的影响,并用拆方、提取不同极性部位以及测定主要化学成分等方法,探寻该方中免疫增强活性成分,为揭示该方治疗瘟疫热症的药效物质基础提供新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级 BALB/c 纯系小鼠,雌雄兼用,6~8 周龄,体重 20~22 g,购于内蒙古医科大学实验动物中心。饲养于室温 25℃,SPF 级环境。

1.1.2 药物 土木香(20140101)、苦参(20140101) 购于济南人和中药饮片有限公司,山柰(1510179) 购于河北省福君堂药业有限公司。上述药材经检验,均符合 2015 年版《中华人民共和国药典》标准。悬钩子木药材 2015 年 10 月野生采集自内蒙古赤峰市巴林右旗,取其茎枝阴干。原植物经内蒙古医科大学药学院包保全教授鉴定,为蔷薇科悬钩子属植物库页悬钩子 *Rubus sachalinensis* Leveille., 模式标本存放于内蒙古医科大学药学院标本室。

土木香内酯(LPT2014005)、异土木香内酯(LPT2014011)、对甲氧基桂皮酸乙酯(110835-201603)、苦参碱(110805-200508)和氧化苦参碱(110780-200506)对照品(中国药品生物制品检定所);肉桂酸乙酯(MAYA-CR5019)对照品(浙江玛雅试剂有限公司)。

1.1.3 试剂与仪器 刀豆蛋白(ConA)(美国 Sigma 公司);RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁研究院);小鼠淋巴细胞分离液、小鼠白细胞介素-2(IL-2)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒、小鼠干扰素- γ (IFN- γ)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(达科为生物技术有限公司);HF90 二氧化碳培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);Multiskan GO 酶标仪、SW-CJ-2FD 超净工作台(美国 Thermo 公司);DFC450C 倒置相差显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 实验组加入 100 μ L 终浓度为 25.0、50.0、100.0、200.0 μ g/mL 的“查干汤”及其组方药材水提物;阳性对照组加入 100 μ L 终浓度为 2.5 μ g/mL 的 ConA,阴性对照组加入 100 μ L RPMI 1640 培养基,置 5% CO₂ 培养箱 37℃ 培养 48 h,离心收集上清,-20℃ 保存。

1.2.2 给药方法 水提物的制备:查干汤及其组方药材粗粉,分别加 10 倍量水,回流提取 3 次,0.5 h/次,合并提取液,浓缩,冷冻干燥,即得。

醇提物的制备:查干汤及其组方药材粗粉,95% 乙醇回流提取 1 次,再用 75% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,浓缩至无醇味,冷冻干燥,即得。

不同极性悬钩子木提取物的制备:悬钩子木醇提物,用 10 倍量水混悬,依次用等体积的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次,减压回收溶剂,即得。

给药样品的配制:上述提取物和 6 个指标性成分称重后溶解在 DMSO 中,配制成 200.0 mg/mL 的母液,用 RPMI 1640 培养基稀释至不同浓度,备用。

小鼠脾淋巴细胞悬液的制备:脱颈椎处死小鼠,75% 乙醇浸泡消毒,无菌条件下取出脾脏,置 4~5 mL Mouse 1 $\times$ 淋巴细胞分离液中,轻研,200 目尼龙网滤过。把悬有脾淋巴细胞的分离液立即转移至离心管中,覆盖 500~1 000 μ L RPMI 1640 培养基,800 $\times$ g 离心 30 min,吸取淋巴细胞层,再加入 10 mL RPMI 1640 培养基,颠倒洗涤,250 $\times$ g 离心 10 min,收集细胞^[12]。倾倒入上清液,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬细胞,台盼蓝染色计数,活细胞数大于 95%,调整细胞浓度为 5×10^6 /mL,备用。

1.2.3 检测指标与方法 将脾淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L。实验组分别加入 100 μ L 终浓度为 0.7、3.3、16.7、50.0、100.0、200.0 μ g/mL 的待测药物,阳性对照组加入 100 μ L 终浓度为 2.5 μ g/mL 的 ConA,阴性对照组加入 100 μ L RPMI 1640 培养基,置 5% CO₂ 培养箱 37℃ 培养 48 h 后,每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液,置 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 反应 4 h,酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)。

淋巴细胞生长率(%) = $[(As - Ab)/(Ac - Ab)] \times 100\%$ (As 实验孔;Ac 对照孔;Ab 空白孔)。

白细胞介素-2 和干扰素- γ 的诱生及测定:将脾淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L。按照试剂盒说明,用 ELISA 测定细胞上清液中白细胞介素-2 和干扰素- γ 的水平^[13-19]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义^[20-22]。

2 结果

2.1 水提物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 在一定浓度范围内,各样品均能不同程度提高淋巴细胞生长率。复方、苦参、悬钩子木和山柰水提物在 0.7~200.0 μ g/mL 均能促进脾淋巴细胞增殖,且 3 个组方药材的促增殖作用均呈剂量依赖性;土木香在

表 1 查干汤及其组方药材水提取物对小鼠脾淋巴细胞生长率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

药物($\mu\text{g/mL}$)	查干汤水提取物	土木香水提取物	苦参水提取物	悬钩子木水提取物	山柰水提取物
200.0	124.842 $\pm$ 3.870 *	34.395 $\pm$ 11.425	175.605 $\pm$ 1.451 *	191.211 $\pm$ 4.392 *	217.796 $\pm$ 2.373 *
100.0	160.211 $\pm$ 5.508 *	43.974 $\pm$ 5.992	170.921 $\pm$ 2.121 *	183.368 $\pm$ 2.754 *	205.684 $\pm$ 2.159 *
50.0	167.105 $\pm$ 5.508 *	116.132 $\pm$ 1.228 *	152.105 $\pm$ 6.327 *	165.500 $\pm$ 1.600 *	201.474 $\pm$ 5.136 *
16.7	158.237 $\pm$ 6.587 *	147.263 $\pm$ 1.935 *	138.895 $\pm$ 2.010 *	151.394 $\pm$ 3.089 *	193.579 $\pm$ 4.764 *
3.3	142.790 $\pm$ 4.217 *	142.342 $\pm$ 1.451 *	131.447 $\pm$ 2.121 *	135.763 $\pm$ 3.573 *	173.500 $\pm$ 4.131 *
0.7	139.290 $\pm$ 2.940 *	130.237 $\pm$ 3.684 *	124.474 $\pm$ 2.680 *	132.579 $\pm$ 3.387 *	170.184 $\pm$ 3.759 *

注:阴性对照细胞生长率为 100%;与阴性对照组比较,* $P < 0.05$

0.7 ~ 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 能促进脾淋巴细胞增殖,高浓度 100.0、200.0 $\mu\text{g/mL}$ 无促增殖作用。见表 1。药物对脾淋巴细胞增殖作用强弱顺序为,山柰水提取物 > 悬钩子木水提取物 > 苦参水提取物 > 复方水提取物 > 土木香水提取物(图 1)。

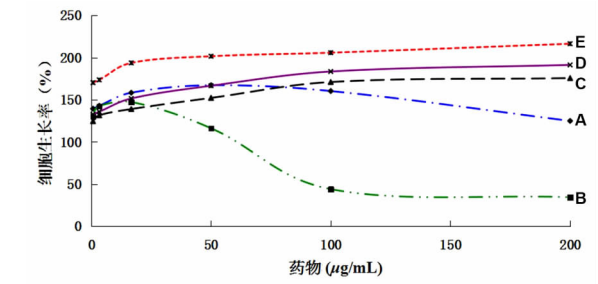


图 1 查干汤及其组方药材水提取物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

注:A 查干汤水提取物;B 土木香水提取物;C 苦参水提取物;D 悬钩子木水提取物;E 山柰水提取物

2.2 醇提取物及组方药材中主要化学成分对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 复方及其各组方药材醇提取物,土木香指标性成分土木香内酯和异土木香内酯,山柰指标性成分肉桂酸乙酯和对甲氧基桂皮酸乙酯,苦参指标性成分苦参碱和氧化苦参碱,悬钩子木石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇层粗提取物,在 0.7 ~ 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 药物浓度均无促进脾淋巴细胞增殖作用,各剂量组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 水提取物对小鼠脾淋巴细胞诱生白细胞介素-2 和干扰素- γ 的影响 复方及其组方药材水提取物均能促进脾淋巴细胞分泌白细胞介素-2,复方、苦参和悬钩子木水提取物在 50.0 ~ 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 均能促进脾淋巴细胞分泌白细胞介素-2;土木香水提取物在 25.0 ~ 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 能促进脾淋巴细胞分泌白细胞介素-2;山柰水提取物在 25.0 ~ 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 均能促进脾淋巴细胞分泌白细胞介素-2。见表 2。药物对小鼠脾淋巴细胞分泌白细胞介素-2 的影响强弱顺序为,山柰水提取物 > 苦参水提取物 > 复方水提取物 > 悬钩子木水提取物 > 土木香水提取物。见图 2。

复方及其组方药材苦参、悬钩子木和山柰水提取物在 25.0 ~ 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 均能促进脾淋巴细胞分泌干扰素- γ ;土木香水提取物对脾淋巴细胞分泌干扰素- γ 水平无明显影响。见表 2。药物对小鼠脾淋巴细胞分泌干扰素- γ 的影响强弱顺序为,山柰水提取物 > 苦参水提取物 > 复方水提取物 > 悬钩子木水提取物 > 土木香水提取物。见图 3。

表 2 查干汤水提取物对小鼠脾淋巴细胞诱生白细胞介素-2 和干扰素- γ 的影响($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	白细胞介素-2	干扰素- γ
查干汤水提取物($\mu\text{g/mL}$)		
200.0	28.45 $\pm$ 2.15 *	85.61 $\pm$ 1.09 *
100.0	40.33 $\pm$ 1.92 *	793.67 $\pm$ 9.40 *
50.0	4.05 $\pm$ 0.24 *	1 540.37 $\pm$ 18.28 *
25.0	2.85 $\pm$ 0.76	1 044.81 $\pm$ 12.60 *
土木香水提取物($\mu\text{g/mL}$)		
200.0	4.03 $\pm$ 0.13	12.52 $\pm$ 0.20
100.0	12.12 $\pm$ 0.40 *	12.82 $\pm$ 0.18
50.0	15.08 $\pm$ 1.27 *	12.81 $\pm$ 0.19
25.0	23.36 $\pm$ 0.82 *	12.88 $\pm$ 0.19
苦参水提取物($\mu\text{g/mL}$)		
200.0	43.74 $\pm$ 1.92 *	1 921.46 $\pm$ 37.65 *
100.0	42.21 $\pm$ 3.87 *	1 689.34 $\pm$ 22.38 *
50.0	30.05 $\pm$ 1.14 *	935.80 $\pm$ 9.40 *
25.0	7.11 $\pm$ 0.99	212.31 $\pm$ 2.37 *
悬钩子木水提取物($\mu\text{g/mL}$)		
200.0	28.12 $\pm$ 0.34 *	34.71 $\pm$ 0.53 *
100.0	35.14 $\pm$ 1.11 *	168.46 $\pm$ 2.39 *
50.0	11.37 $\pm$ 0.59 *	137.21 $\pm$ 1.50 *
25.0	2.19 $\pm$ 0.37	56.98 $\pm$ 0.72 *
山柰水提取物($\mu\text{g/mL}$)		
200.0	63.23 $\pm$ 2.61 *	142.45 $\pm$ 1.35 *
100.0	90.01 $\pm$ 3.11 *	958.88 $\pm$ 11.36 *
50.0	21.14 $\pm$ 1.08 *	1 820.98 $\pm$ 17.56 *
25.0	16.71 $\pm$ 0.81 *	1 820.98 $\pm$ 17.56 *
阴性对照组	0.36 $\pm$ 0.17	11.91 $\pm$ 1.18

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

该实验在复方、组方药材、提取物和指标性成分层面上,研究了查干汤及其组方药材对免疫功能的影响。结果,复方及其组方药材的水提取物均能促进脾淋巴细胞增殖,并通过分泌白细胞介素-2 和干扰

素- γ 发挥免疫调节作用,但其醇提物、指标性成分以及悬钩子木不同极性部位均无作用。结果表明,该方发挥免疫调节功能的药效物质基础为其中水溶性成分,应进一步对该方的水提物进行系统的化学成分和作用机制研究。同时,本研究为该方的传统剂型“水煎剂”提供了实验依据,为现代剂型开发奠定基础。

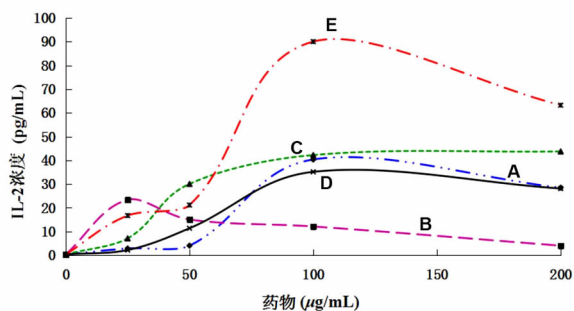


图2 查干汤及其组方药材水提物对小鼠脾淋巴细胞诱导白细胞介素-2 的影响

注:A 查干汤水提物;B 土木香水提物;C 苦参水提物;D 悬钩子木水提物;E 山柰水提物

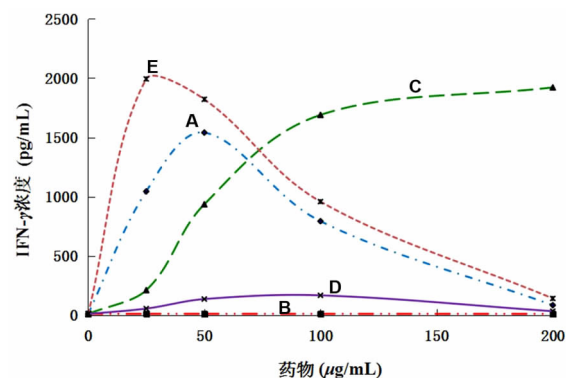


图3 查干汤及其组方药材水提物对小鼠脾淋巴细胞诱导干扰素- γ 的影响

注:A 查干汤水提物;B 土木香水提物;C 苦参水提物;D 悬钩子木水提物;E 山柰水提物

查干汤为瘟疫热症基础方,方中土木香、苦参和悬钩子木为“促热疾成型类”蒙药,山柰为“祛巴达干类”蒙药。实验表明,两类蒙药及其复方均能促进脾淋巴细胞增殖,具有一定的免疫增强作用,在一定程度上阐释了治疗瘟疫热症用蒙药的功效主治与药效学之间的联系,为该类蒙药的药效物质基础研究提供新的思路与方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版[S]. 1 部. 北京:中国医药科技出版社,2015:784-785.
- [2] 张屏,海花,哈斯其木格,等. 蒙药“四味土木香散”的研究进展[J]. 中国民族民间医药杂志,2013,22(12):1-3.

- [3] 苏和,布仁达来. 国家中药管理局民族医药文献整理丛书·蒙医文献学[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,2006:341-343.
- [4] 罗布桑. 蒙药学家罗布桑学术著作大成(1) 蒙药研究新成果(蒙古文)[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,2011:150-159.
- [5] 哲里木蒙医研究所藏译蒙. 医药月帝(蒙古文)[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1985:7.
- [6] 中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书·蒙医学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1992:201.
- [7] 《中华本草》编委会. 中华本草·蒙药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:55,80,246,271.
- [8] 格根塔娜. 蒙药材库页悬钩子木的活性成分研究—乙酸乙酯层和正丁醇层的活性成分研究[D]. 通辽:内蒙古民族大学,2012.
- [9] 格根塔娜,张屏,包保全. 蒙药材库页悬钩子木抗菌活性的研究[J]. 求医问药:学术版,2012,10(3):198.
- [10] 任珊珊,包保全,格根塔娜,等. 蒙药悬钩子木黄酮类成分及其生物活性研究[J]. 中药材,2016,39(9):2019-2023.
- [11] 任珊珊,张屏,格根塔娜,等. 蒙药悬钩子木三萜类成分及其生物活性研究[J]. 中药材,2017,40(2):354-358.
- [12] 杜联峰,田忠,夏婧,等. 西红花苷促进小鼠脾淋巴细胞增殖[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2016,32(6):793-796.
- [13] Ottenlinger F, Schwiebs A, Pfarr K, et al. Fingolimod targeting protein phosphatase 2A differently affects IL-33 induced IL-2 and IFN- γ production in CD8(+) lymphocytes[J]. Eur J Immunol,2016,46(4):941-951.
- [14] Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, et al. Complete response to high-dose IL-2 and enhanced IFN- γ + Th17:TREG ratio in a melanoma patient[J]. Melanoma Res,2016,26(5):535-539.
- [15] Gastelum-Aviña P, Lares-Villa F, Espitia C, et al. A rapid alternative method to evaluate T-cell hybridoma activation using an improved cytokine(IL-2) secretion assay[J]. J Immunol Methods,2016,438:42-50.
- [16] 迟莉丽,宋钦兰,程艳,等. 中药安肠愈疡汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织中 IL-2、IL-13 含量及 NF- κ B 表达的影响[J]. 世界中医药,2016,11(1):113-116.
- [17] 孙美花,程卫东,张文君,等. 含红芪与含黄芪的玉屏风散对 SAMP8 小鼠脾 T 细胞及 PI3K 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2017,32(3):1276-1280.
- [18] 王萌,韩嘉祺,张凤,等. 桔梗皂苷 D 对小鼠脾淋巴细胞免疫调节活性的研究[J]. 中国兽医学,2018,48(1):93-100.
- [19] 郝璐. 银杏叶提取物对小鼠体内外免疫调节活性的研究[D]. 锦州:锦州医科大学,2017.
- [20] 黄为钧,王世东,赵进喜,等. 益气活血散结法对糖尿病肾病大鼠肾组织中 MCP-1、TGF- β 的影响[J]. 世界中医药,2017,12(1):16-20.
- [21] 郭杨志,杜娟,李向民,等. 黄连对糖尿病肾病大鼠肾脏 NF- κ B 及 PPAR- γ 表达的影响[J]. 世界中医药,2017,12(4):884-887.
- [22] Zhang HC, Zhang ZS, Zhang L, et al. Connexin 43 in splenic lymphocytes is involved in the regulation of CD4⁺ CD25⁺ T lymphocyte proliferation and cytokine production in hypertensive inflammation[J]. Int J Mol Med,2018,41(1):13-24.

(2017-10-13 收稿 责任编辑:杨觉雄)