

中药有效部位组方对高温刺激小鼠肠道 淋巴细胞体外增殖的影响

王自力^{1,2}, 董虹¹, 刘风华^{3*}, 毛帅³, 刘仁志¹, 许剑琴^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 西南大学动物科技学院, 重庆 400715; 3. 北京农学院动物科学系, 北京 102206)

摘要: 根据中兽医“君、臣、佐、使”的组方原则和正交试验设计法将藿香、苍术、黄柏和石膏 4 味中药的有效部位按照不同剂量组合成 8 个不同中药有效部位复方, 利用 MTT 法检测高温刺激小鼠肠道淋巴细胞增殖情况, 探讨各个复方对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖的影响及其组方机制。结果表明: 以中药有效部位复方 A₁B₁C₁D₁ (黄柏生物碱、藿香挥发油、苍术挥发油各 200 μg/mL, 石膏水提物 100 μg/mL) 对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖效果最优, 复方中以藿香挥发油和黄柏生物碱为主药, 苍术挥发油和石膏水提物为臣、佐药, 以藿香挥发油和苍术挥发油交互作用较好。

关键词: 中药有效部位; 正交设计法; 高温刺激; 淋巴细胞增殖; 组方机制

中图分类号: S853.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)03-0360-05

Effect of Chinese Medicine Effective Component Prescription on *in vitro* Proliferation of Mouse Intestinal Lymphocyte after Stimulation with High Temperature

WANG Zi-li^{1,2}, DONG Hong¹, LIU Feng-hua^{3*}, MAO Shuai³, LIU Ren-zhi¹, XU Jian-qin^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Department of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The effective components of *herba agastachis*, *rhizoma atractylodis*, *gypsum fibrosum* and *cortex phellodendri* were composed in different combination according to the principal of traditional Chinese composing prescription and orthogonal design to form 8 prescriptions. The effects of different prescriptions on *in vitro* proliferation of mouse intestinal lymphocyte after stimulation with high temperature were studied. The results showed that *herba agastachis* aetherolea and *cortex phellodendri* alkaloid were the major drugs in the prescription, *rhizoma atractylodis* aetherolea and *gypsum fibrosum* water extract were adjuvant drug and messenger drug. The prescription composed of 200 μg/mL *herba agastachis* aetherolea, *cortex phellodendri* alkaloid and *rhizoma atractylodis* aetherolea, 100 μg/mL *gypsum fibrosum* water extract, has the best effect on the proliferation of intestinal lymphocyte, and the interaction of *herba agastachis* and *rhizoma atractylodis* aetherolea was better.

Key words: effective component of Chinese materia medica; orthogonal design method; high temperature stimulation; lymphocyte proliferation; composing prescription

收稿日期: 2007-05-25

基金项目: 北京市自然科学基金; 北京市教委资助重点课题(KZ200310020007); 北京市科委攻关课题(Y0705003041631); 国家自然科学基金项目(30771566; 30771591)

作者简介: 王自力(1979-), 男, 四川成都人, 博士, 主要从事中西医结合研究

* 通讯作者: 许剑琴, E-mail: jianqinxu@126.com; 刘风华, E-mail: liufenghua1209@126.com

方剂是在中(兽)医理论指导下,辨证论治的基础上,根据动物病情需要选择适当的(两味或多味)中药,酌定用量,按照一定的组成原则,配伍组合而成。药物决定方剂的功效,方剂中药味的增加或减少以及用量均可导致方剂配伍关系和功效变化。在中药方剂及新药研究中,虽可根据中兽医理论和临床经验选择药物和组方,但中药方剂多为复方,且药物剂量不一,即存在多因素多水平特点^[1],为中兽药作用机理研究、中药现代化和新药开发及其产业化带来很多困难。正交试验设计是采用规格化的正交表,使试验因素和水平得到合理安排,并通过试验结果分析各因素对试验观察指标的影响,分清各因素之间的主次关系和交互作用,确定各因素不同水平的最佳组合,是多因素多水平试验效率最高的设计方法。

热应激可引起动物免疫功能下降,如引起小鼠胸腺指数、脾脏指数、淋巴细胞增殖活性、IL-2 浓度及其受体表达等下降^[2],诱导胸腺细胞和脾脏细胞凋亡,并引起动物胸腺和脾脏萎缩^[3],还可通过下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴引起皮质醇水平升高而影响动物正常的生理和免疫功能^[4-6]。因此,本试验在中兽医方剂“君、臣、佐、使”组方原则的指导下,通过正交设计法和 MTT 法检测淋巴细胞增殖,以研究不同水平及藿香、苍术、黄柏和石膏有效部位不同组方对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

中药有效部位:石膏水提物(*Gypsum fibrosum* water extract, GFWE)(硫酸钙含量为 92%)、黄柏生物碱(*Cortex phellodendri's* alkaloid, CPA)(小檗碱含量为 42.0%)、藿香挥发油包合物(*Herba agastachis's* aetherolea, HAA)(百秋里醇含量 30.47%)、苍术挥发油包合物(*Rhizoma atractylo-di's* aetherolea, RAA)(β -桉叶油醇含量 33.63%),均由本课题组制备和定量测定,临用前分别用 RPMI-1640 基础培养基配制制成 1 mg/mL。

RPMI-1640 基础培养基、Hank's 干粉为 Hyclone 公司产品;小牛血清,购自北京元亨圣马生物技术研究所;二硫苏糖醇(DTT),购自北京科昊泽生物技术有限公司;噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO),购自 Amresco 公司;II 型胶原酶、ED-

TA、植物血凝素(PHA)购自 Sigma 公司;小鼠淋巴细胞分离液,购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 小鼠肠道淋巴细胞分离与培养 参照文献方法^[7-8]分离肠道淋巴细胞,即脱臼处死 18~22 g BALB/c 鼠,置于 75%酒精中浸泡 5 min,取出十二指肠到回盲肠结之间的肠道组织;用含有 1 000 IU 双抗的 Hank's 洗涤液反复冲洗;将肠道组织块剪成 1 cm×1 cm 大小置于含 1 000 IU 双抗、5%小牛血清 Hank's 洗涤液中浸泡 5 min,重复 3 次;加入 20 mL 37℃ EDTA-DTT 消化液,间断振荡消化 30 min,收集消化液 1 000 r/min 离心 5 min 以获取淋巴细胞;向剩余组织块中加入 20 mL 37℃ 的 0.1% II 型胶原酶液,37℃ 恒温振荡水浴锅中以 250 r/min 振荡消化 40 min;将剩余消化液经 2 层无菌医用纱布过滤;10 000 r/min 离心滤液 5 min,收集细胞后用完全培养基洗涤 2 次;将 2 次收集的淋巴细胞悬液缓慢加入到淋巴细胞分离液上层,以 2 000 r/min 离心 20 min,收集淋巴细胞分离液层和培养液中间的淋巴细胞层;用 10%小牛血清 RPMI-1640 完全细胞培养基以 1 000 r/min 离心 5 min 方式洗涤淋巴细胞 2 次,并经玻璃纤维棉柱过滤;经 0.3%台盼蓝拒染法计算细胞活力>90%后,用 10%小牛血清完全培养基调整淋巴细胞数量为 1×10^6 /mL,按照 0.5 mL/孔加入 96 孔细胞培养板后,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 正交试验设计 根据正交试验设计要求,考察藿香挥发油、苍术挥发油、黄柏生物碱和石膏水提物不同水平组方对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖的影响,即 A、B、C、D、A×B、A×C、B×C,选用正交表 L8(2⁷)。因需考察 A×B,就先将 A 放在第 1 列,B 放在第 2 列,由 L8(2⁷)交互作用列表查出 A×B 在第 3 列;将 C 放在第 4 列,同法查出 A×C 在第 5 列,B×C 在第 6 列,D 放在第 7 列。中药有效部位复方组成、水平、表头设计和试验方案见表 1 和 2。

1.2.3 小鼠肠道淋巴细胞处理与数据处理 向分离获得的小鼠肠道淋巴细胞悬液中加入不同浓度中药有效部位组合复方以及 1 μ g/mL PHA 后,用 10%小牛血清 RPMI-1640 完全培养基补足至 1 mL,将小鼠肠道淋巴细胞置 43℃ 高温刺激 1h 后于

表 1 中药有效部位复方组成和水平

Table 1 Components and levels of Chinese medicine effective component prescription

 $\mu\text{g}/\text{mL}$

因素 Factors	藿香挥发油 HAA	苍术挥发油 RAA	黄柏生物碱 CPA	石膏水提物 GFWE
种类 Type	A	B	C	D
1	200	200	200	100
2	100	100	100	50

表 2 试验表头设计和方案

Table 2 Design and scheme table of experiment

列 Array	1	2	3	4	5	6	7
因子 Factors	藿香 HAA	苍术 RAA	藿香×苍术 HAA×RAA	黄柏 CPA	藿香×黄柏 HAA×CPA	苍术×黄柏 RAA×CPA	石膏 GFWE
1	1(200)	1(200)	1	1(200)	1	1	1(100)
2	1(200)	1(200)	1	2(100)	2	2	2(50)
3	1(200)	2(100)	2	1(200)	1	2	2(50)
4	1(200)	2(100)	2	2(100)	2	1	1(100)
5	2(100)	1(200)	2	1(200)	1	1	2(50)
6	2(100)	1(200)	2	2(100)	2	2	1(100)
7	2(100)	2(100)	1	1(200)	1	2	1(100)
8	2(100)	2(100)	1	2(100)	2	1	2(50)

37℃、5%CO₂、65%湿度条件下培养 44 h,加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT 液于 37℃、5%CO₂、65%湿度条件下培养 4 h,加入 100 μL DMSO 混匀于 570 nm 波长检测 OD 值。数据用 SPSS11.5 统计软件按照正交设计法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 直观分析

据直观分析结果可知(见表 3),黄柏和藿香的极差大,故黄柏和藿香作为主药,且分别以 1 水平

表 3 中药有效部位复方对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖影响的直观分析

Table 3 Direct analysis of effect of Chinese medicine effective component prescription on *in vitro* proliferation of mouse intestinal lymphocyte after stimulation with high temperature

药物与交互作用 Medicine and interaction	藿香 HAA	苍术 RAA	藿香×苍术 HAA×RAA	黄柏 CPA	藿香×黄柏 HAA×CPA	苍术×黄柏 RAA×CPA	石膏水提物 GFWE	淋巴细胞增殖 Proliferation of lymphocyte
1	1	1	1	1	1	1	1	0.303
2	1	1	1	2	2	2	2	0.295
3	1	2	2	1	1	2	2	0.301
4	1	2	2	2	2	1	1	0.284
5	2	1	2	1	2	1	2	0.294
6	2	1	2	2	1	2	1	0.282
7	2	2	1	1	2	2	1	0.302
8	2	2	1	2	1	1	2	0.285
T1	1.183	1.174	1.185	1.2	1.171	1.166	1.171	2.346
T2	1.163	1.172	1.161	1.146	1.175	1.18	1.175	
R	0.02	0.002	0.024	0.054	-0.004	-0.014	-0.004	
R_i^2	4.0×10^{-4}	4.0×10^{-6}	5.76×10^{-6}	2.92×10^{-6}	1.6×10^{-6}	1.96×10^{-6}	1.6×10^{-6}	
$SSi = R_i^2 / 8$	5.0×10^{-5}	5.0×10^{-7}	7.2×10^{-6}	3.65×10^{-7}	2.0×10^{-7}	2.45×10^{-7}	2.0×10^{-7}	

表中 R_i^2 为各种药物极差的平方, SSi 公式中 8 为复方总数

R_i^2 means the square of range of different experimental medicines; The '8' means the total number of the prescription

(即 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对小鼠肠道淋巴细胞体外增殖促进作用最大;苍术和石膏为次要药物,其水平分别选 1 水平(即分别为 200 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。最佳组方为 $A_1B_1C_1D_1$,以中药有效部位复方 1 对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖影响最大。

2.2 方差分析

根据表 3 结果,选择离差平方和较小的 SS_2 、 SS_5 和 SS_7 作为误差,计算各因子 F 值,并评定药物 2 个水平的作用,分析最佳交互列作用,以找出最佳剂量的最佳配伍,方差分析结果见表 4。

表 4 中药有效部位复方对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖影响的方差分析

Table 4 Effect of Chinese medicine effective component prescription on *in vitro* proliferation of mouse intestinal lymphocyte after stimulation with high temperature (Analysis of variance)

变异来源 Source of variation	SS	df	MS	F	P	$F_{0.05}(1, 3)$	$F_{0.01}(1, 3)$
A	0.000 05	1	0.000 05	33.33	<0.05	10.1	34.1
B	0.000 000 5	1					
A×B	0.000 072	1	0.000 072	48.00	<0.01		
C	0.000 364 5	1	0.000 364 5	243.00	<0.01		
A×C	0.000 002	1					
B×C	0.000 024 5	1	0.000 024 5	16.33	<0.05		
D	0.000 002	1					
误差	$SS_2 + SS_5 + SS_7$	3	0.000 001 5				
Relative accuracy	=0.000 004 5						

由表 4 可知,对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖影响较大的药物有效部位是黄柏生物碱及藿香挥发油(F 值分别为 243.00 和 33.33)。交互作用较好的交互列依次为: $A \times B$ (藿香挥发油和苍术

挥发油)和 $B \times C$ (苍术挥发油和黄柏生物碱)。由表 5 可知,苍术挥发油和藿香挥发油的浓度增加,对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖具有较大影响,以藿香挥发油浓度增加效果尤为明显。

表 5 藿香和苍术($A \times B$)对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖的交互作用分析

Table 5 Analysis of interaction of herba *agastachis* aetherolea and rhizoma *atractylodis* aetherolea ($A \times B$) on *in vitro* proliferation of mouse intestinal lymphocyte after stimulation with high temperature

	A1(藿香 200 mg/mL)	A2(藿香 100 mg/mL)
B1(苍术 200 mg/mL)		
B1 (RAA200 mg/mL)	0.303+0.295=0.598	0.294+0.282=0.576
B2(苍术 100 mg/mL)		
B2 (RAA100 mg/mL)	0.301+0.284=0.585	0.302+0.285=0.587

综合直观分析、方差分析和交互作用分析,即认为藿香、苍术、黄柏和石膏 4 味中药有效部位复方对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞体外增殖的最优组合为 $A_1B_1C_1D_1$,即藿香挥发油、黄柏生物碱、苍术挥发油各 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,石膏水提物 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

肠道黏膜免疫系统包括 3 种淋巴细胞:分布于肠道黏膜上皮细胞内的淋巴细胞,即上皮内淋巴细胞(IEL)、固有层淋巴细胞(LPL)、集合淋巴结(PP

结)淋巴细胞,构成肠道黏膜免疫主要部分,其功能的正常对于维护肠道黏膜免疫功能具有重要作用;夏季高温气候易引起动物热应激,导致其免疫力下降而给畜牧生产带来巨大损失^[2-6]。根据中兽医理论,我国大部分养猪场夏季环境多属于高温高湿环境,常被认为是湿热之邪。夏季动物产生热应激与饲养环境因素有关,即感受湿热病邪。湿热病邪常从上焦而入,也可直中中焦,后入下焦,由表及里;湿热之邪常郁阻中焦脾胃,导致中焦脾胃运化功能障碍,且湿为阴邪,热为阳邪,二者属性不一,故病程中

可见湿偏重、热偏重或者湿热并重等类型。因此,在防治中常采取清热祛湿为原则。本试验中组方为藿香、黄柏、苍术、石膏 4 味药组成,主要功效为清热泻火、解表和中、燥湿健脾,用于动物在夏季高温高湿环境中感受湿热之邪后出现的湿热证。方中藿香芳香化浊,开胃止呕,发表解暑及醒脾祛湿;黄柏苦寒,入肾、膀胱和大肠经,主泻下焦火,具有清湿热、泻火解毒功效,使湿热下泄,与藿香共为方中主药。苍术燥湿以健脾,祛风湿,为臣药;石膏辛甘大寒,清泄气分实热,为佐使药。

目前对中药复方的药理研究方法可分为全方研究和拆方研究。全方有助于药效学研究,但不利于研究中药复方的组方规律;拆方研究可说明中药复方的配伍关系和组方理论,可通过正交试验法和拆方分析法^[9]进行。本试验中采用的正交试验法是按照一定的正交试验设计表将一个方剂中的药物(因素)和剂量(水平)按照一定规律设置,遵循这种规律性设计,以最少的试验次数得出尽可能最佳的试验结果;试验结果经过直观分析、方差分析和交互分析确定藿香、苍术、黄柏和石膏有效部位组成复方的最优组合是 A₁B₁C₁D₁,即藿香挥发油、黄柏生物碱、苍术挥发油各 200 μg/mL、石膏水提物 100 μg/mL;对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞增殖交互作用较好的是藿香挥发油和苍术挥发油,且以藿香挥发油剂量增加效果更好,说明中药有效部位剂量在组方中剂量效应的重要性;黄柏生物碱对高温刺激小鼠肠道淋巴细胞增殖影响最大,藿香挥发油影响居其次,二者共为方中主药,而苍术挥发油和石膏水提物对肠道淋巴细胞增殖影响较小,作为臣、佐使药,与中兽医对热应激的辨证论治结果一致。

根据正交法设计的试验,其试验点均衡分布,代表性强,可以最大限度节约人力、物力、时间,同时可以避免完全设计方法的盲目性,试验结果分析具有计算简单和结论可靠的特点^[10]。对于正交试验设计中的因素选择必须在专业知识(中兽医理论)指导下进行筛选,使其具有可控性和独立性,水平的选择应该具备合理性,符合专业理论知识和实践经验的要求,否则易导致出现无效结果^[11-12]。因此,根据中兽医辨证和方剂理论,及正交试验设计法确定中药有效部位不同组方,利用高温刺激引起肠道淋巴细胞增殖抑制模型,确定中药有效部位复方组成和剂量,可作为探讨中药组方机制和开发中兽药的重要

途径。

参考文献:

- [1] 吴翠珍. 正交设计在中药方剂研究中的重要意义[J]. 山东中医杂志, 1999, 18(9): 426-427.
- [2] 吉雁鸿, 罗海吉. 精氨酸对热应激小鼠免疫功能的影响[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(6): 670-672.
- [3] JOSEPH I M, NAMASIVAYA A, SUTHANTHIRAJA N. Effect of acute heat stress on certain immunological parameters in albino rats [J]. Indian J Physiol Pharmacol, 1991, 35 (4): 269-271.
- [4] BODEY B, BODEY B, J KAISER H E. Apoptosis in the mammalian thymus during normal histogenesis and under various *in vitro* and *in vivo* experimental conditions [J]. In vivo, 1998, 12 (1): 123.
- [5] PARDON M C, MA S, MORILAK D A. Chronic cold stress sensitizes brain noradrenergic reactivity and noradrenergic facilitation of the HPA stress response in Wistar Kyoto rats [J]. Brain Res, 2003, 971 (1): 55-65.
- [6] 郭健, 刘辉. 束缚和热应激小鼠内分泌-免疫变化与 H2 基因多态性的关系[J]. 中国行为医学科学, 2004, 13(6): 604-606.
- [7] SMIT-MC BRIDE Z, MATTAPALLIL J J, MCCHESENEY M, et al. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4+ T-Cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes [J]. Journal of Virology, 1998, 72: 6 646-6 656.
- [8] VICTORIA C, BEATE C, RICHARD A, et al. Generation of intestinal mucosal lymphocytes in SCID mice reconstituted with mature, thymus-derived T cells [J]. Journal of Immunology, 1998, 160(6): 2 608-2 617.
- [9] 谭玮, 宋崇顺, 高月. 中药复方方法学研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(5): 458-461.
- [10] 闫润红. 正交设计法在中药配伍研究中的应用[J]. 山西中医学院学报, 2000, 1(1): 33-35.
- [11] 张志波, 徐庆臻, 申庆亮. 正交设计法研究中药不同组方对实验家兔血液流变学参数的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 2001, 11(2): 160-162.
- [12] 张传平. 中药研究中正交实验设计运用存在的问题探讨[J]. 陕西中医学院学报, 2001, 24(4): 54-56.