

四逆散药对及全方对刀豆蛋白 A 活化的小鼠脾细胞移动和粘附能力的影响

孙洋¹, 徐强^{1,2*}

¹中国药科大学中药药理教研室, 南京 210038; ²南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093

【摘要】 目的: 考察四逆散药对及全方对刀豆蛋白 A(Con A)活化的小鼠脾细胞移动和粘附能力的影响并就药对和全方的作用进行比较。方法: 明胶酶谱分析检测基质金属蛋白酶的活性和结晶紫染色法检测细胞粘附能力。结果: 四逆散药对及全方体外给药能明显抑制 Con A 活化的小鼠脾细胞分泌基质金属蛋白酶-2 和 9 以及粘附 I 型胶原的能力, 但对正常小鼠脾细胞分泌基质金属蛋白酶-2 和 9 无明显影响。在三个药对中, 以柴胡-芍药的作用最为显著, 并与四逆散全方的作用较为一致。结论: 四逆散对体外过度活化的脾细胞移动和粘附能力有抑制作用, 全方的这种作用主要由柴胡-芍药所担当。

【关键词】 四逆散; 药对; 刀豆蛋白 A; 基质金属蛋白酶; 粘附

【中图分类号】 R944.9; R945; R979.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-3651(2003)02-0103-04

四逆散(Si-Ni-San)源自东汉张仲景的《伤寒论》,由柴胡、白芍、枳实、甘草各等份组成。全方疏肝理脾、透解郁热、和中缓急,配伍十分精妙,散收结合、升中有降。其加减方主要用于治疗临床上肝气郁结的症状,包括肝炎、胆囊炎、胃炎、肠炎、乳腺炎等一系列病机以炎症为主的疾病,但其抗炎机理尚不明。

近来研究发现淋巴细胞的激活并向炎症部位的浸润转移是炎症发生的重要环节之一^[1]。在这一过程中,淋巴细胞需要和血管内皮细胞、基底膜以及细胞外基质相互作用。这种相互作用包括粘附、降解、变形和迁移等,其中粘附和基质的降解在这一过程中起着十分重要的作用。我们的前期研究报道了四逆散可通过影响免疫细胞活化、移动及杀伤能力显著改善细胞免疫性肝损伤^[2],本文进一步从体外抑制过强淋巴细胞功能的角度探讨其抗炎的机理,并对四逆散组成中三个药对的作用进行了比较。

1 材料与方

1.1 药品与试剂

柴胡、白芍、枳实、甘草均购自南京市药材公

司,经本校中药复方研究室余伯阳教授鉴定分别为:伞形科植物 *Bupleurum chinensis* DC. 的干燥根、芍药科植物 *Paeonia albiflora* Pall. 的干燥根、芸香科植物 *Citrus aurantium Immaturus* L. 的干燥幼果及豆科植物 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根。

称取上述各单味药材各 100 g,以等比配成柴胡-芍药、柴胡-枳实、芍药-甘草三个药对及四逆散全方,用 5 倍量的 70%乙醇浸泡 1 h,加热回流 1 h 后过滤,再加入 3 倍量的 70%乙醇加热回流 1 h 后过滤,两次滤液合并离心浓缩干燥得提取物粉末,收率分别为 13.6%、26.3%、18.1%和 23.3%。实验中所用剂量均以该粉末计算。

RPMI 1640 培养基(GIBCO)内含 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素,用双蒸水配制,过滤灭菌,4℃保存,临用前加 10%灭活除菌的新生牛血清(newborn bovine serum, NBS, 杭州四季青);刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A, Sigma);噻唑蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT, Sigma];二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, 上海凌峰化学试剂公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 上海中科院生物化学所);十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, 日本进口分装,上海化学试剂采购供应站);丙烯酸酰胺,双丙烯酸酰胺(上海生工);明胶,考马司亮蓝 R-250(Sigma);鼠尾 I 型胶原(Collaborative Biomedical Products, MA);结晶紫(上海远航试剂公司)。

【收稿日期】 2003-02-12

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(No. 39970887)

【*通讯作者】 徐强:教授,博导,长江学者,南京大学生命科学学院副院长, Tel(Fax): 025-3597620 E-mail: molpham@163.com

1.2 实验动物

昆明种雌性小鼠(体重 18~22 g), 购自中国药科大学动物房; 饲养温度 21 ± 1 °C, 正常饲料, 自由饮水。

1.3 制备脾细胞悬液

取小鼠, 无菌摘取脾脏, 置于盛有 D-Hanks 液的培养皿中, 用灭菌针芯挤压, 使细胞进入溶液中, 吹打使分散, 经 8 层纱布过滤, 4 °C、 200 g 离心 5 min, 除上清, 加入 0.17 mol/L Tris- 0.75% NH_4Cl 溶液去除红细胞, 离心, 再以 D-Hanks、RPMI 1640 培养基各洗涤一次, 以台酚蓝染色计算存活率 ($>99\%$) 及总细胞数, 最后以含 10% NBS 的 RPMI 1640 配成所需浓度的细胞悬液。

1.4 细胞毒实验

无菌制备脾细胞悬液, 调成 5×10^6 /ml, 0.1 ml/孔加入 96 孔培养板中, 与含有不同浓度药物的 RPMI 1640 + 10% NBS 溶液(终浓度分别为 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} g/ml)共存, 置 37 °C、 5% CO_2 , 培养 72 h。终止培养前 4 h 加入 20 μl MTT (5 mg/ml) 培养基溶液。 4 h 后吸去上清, 每孔加入 200 μl 二甲亚砜, 振荡, 使沉淀完全溶解, 540 nm 处测吸光度。

1.5 明胶酶谱分析^[3]

使用酶谱分析可检测基质金属蛋白酶-2(MMP-2, 72KD)和 9(MMP-9, 92KD)的活性。制备小鼠脾细胞, 以 1×10^6 /孔的密度悬于 96 孔培养板中, 加入不同浓度的药物及 Con A (终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 在 37 °C、 5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h, 离心, 取上清。将 20 μl 上清与 10 μl Tris 缓冲液 (62.5 mmol/L Tris-HCl, 10% 甘油, 0.00125% 溴酚蓝, 12% SDS) 混合, 以含 2 mg/ml 明胶的 5% SDS-PAGE 分离。电泳后凝胶用洗涤缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 2.5% Triton X-100, 5 mmol/L CaCl_2 , 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ZnCl_2 , 0.05% NaNO_3) 洗两次, 每次 30 min, 以除去 SDS。然后将凝胶置于孵育缓冲液中 (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L CaCl_2 , 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ZnCl_2 , 0.05% NaNO_3) 37 °C 孵育 36 h, 用蒸馏水洗两次后再用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min, 并用含 10% 醋酸和 10% 异丙醇的溶液脱色 8 h。蓝色背景上的亮带(明胶降解区)即显示蛋白裂解活性。经典酶谱法显示两条 MMP-9 带, 分别与 MMP-9 的酶原及激活的 MMP-9 相对应。

1.6 粘附实验^[4]

鼠尾 I 型胶原用 0.02 mol/L 冰醋酸稀释为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 μl /孔加入酶标板中, 4 °C 过夜, PBS 洗 3 次, 0.2% BSA 室温封闭 2 h, 以阻断非特异性作用位点, PBS 洗 3 次; 将制备好的脾细胞悬于含 10% NBS 的 RPMI 1640 中, 5×10^5 /孔加入包被好胶原的酶标板, 同时加入不同浓度的药物及 Con A (终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 于 37 °C、 5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h 后, 用 RPMI 1640 洗 3 次以除去非粘附细胞, 粘附细胞用甲醛-丙酮 ($1:1$) 液室温固定 10 min, PBS 洗 3 次, 然后加 0.5% 结晶紫染色 10 min, 用水洗 3 次后, 每孔加入 1% SDS 100 μl , 振荡 10 min, 在 592 nm 处测吸光度。将不经洗涤而直接固定的 5×10^5 细胞产生的吸光度作为 100% 细胞粘附 (OD_{total}), 以只用 BSA 包被的孔作为对照孔, 数据表示为粘附细胞百分数。每次分析均设三复孔。

$$\text{粘附细胞百分数}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\text{测定孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}})}{\text{OD}_{\text{total}}} \times 100\%$$

1.7 统计

所有的数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计采用方差分析, 对方差分析有显著性差异的, 进一步进行 Student-Newman-Kuels 检验。

2 结果

2.1 对小鼠脾细胞的细胞毒作用

从表 1 可以看出, 四逆散药对及全方体外三个浓度对正常小鼠脾细胞无直接的细胞毒作用。

Tab 1 Cytotoxicity of Si-Ni-San and its drug-pairs on the spleen cells isolated from normal mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	Concentration (-log C, $\mu\text{g}/\text{ml}$)	OD ₅₄₀
Control	-	0.200 ± 0.020
Si-Ni-San	6	0.211 ± 0.037
	5	0.208 ± 0.008
	4	0.184 ± 0.042
Chaihu-Shaoyao	6	0.198 ± 0.018
	5	0.183 ± 0.028
	4	0.192 ± 0.037
Chaihu-Zhishi	6	0.220 ± 0.028
	5	0.212 ± 0.013
	4	0.239 ± 0.034
Shaoyao-Gaocao	6	0.218 ± 0.027
	5	0.196 ± 0.008
	4	0.229 ± 0.021

Spleen cells were isolated from naive mice. Five hundred thousands of spleen cells were incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO_2 in the presence of various concentrations of the extracts.

2.2 对Con A 活化的脾细胞及正常小鼠脾细胞分泌MMP-2和9的影响

脾细胞在Con A 体外活化下分泌MMP-2和9较正常小鼠脾细胞明显增多,四逆散全方和柴胡-芍药体外三个浓度均呈剂量依赖性的抑制了这种增加,而柴胡-枳实和芍药-甘草则无明显影响(见图1);然而,四逆散各药对及全方体外三个浓度对正常小鼠脾细胞分泌MMP-2和9无明显影响(见图2)



Fig 1 Effect s of Si-Ni-San and its drug-pairs on activities of MMP-2 and 9 produced by mouse spleen cells activated by Con A

Lane 1: cell alone; Lane 2: cell + Con A; Lane 3-5: Si-Ni-San (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/ml); Lane 6-8: Chaihu-Shaoyao (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/ml); Lane 9-11: Chaihu-Zhishi (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/ml); Lane 12-14: Shaoyao-Gancao (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/ml).



Fig 2 Effect s of Si-Ni-San and its drug-pairs on activities of MMP-2 and 9 produced by spleen cells from normal mice

Lane 1: cell alone; Lane 2-4: Si-Ni-San (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/ml); Lane 5-7: Chaihu-Shaoyao (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/ml); Lane 8-10: Chaihu-Zhishi (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/ml); Lane 11-13: Shaoyao-Gancao (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/ml).

2.3 对Con A 活化的脾细胞粘附I型胶原的影响

从表2可以看出,Con A 体外活化的脾细胞粘附胶原水平明显较正常小鼠脾细胞增加,四逆散各药对及全方体外三个浓度均呈不同程度的抑制作用,其中以柴胡-芍药的高浓度组 (1×10^4 g/ml) 抑制效果最为显著 ($P < 0.01$).

3 讨论

根据复方配伍理论,四逆散全方包含了三个配伍特色明显的药对:柴胡-芍药(一散一收)、柴胡-枳实(一升一降)、芍药-甘草(典型镇痛方)。鉴于药对是最小、最简单的复方,一个药对可存在于多个复方当中,了解它们的作用规律,不仅可以揭示复方作用的特点及其配伍的科学内涵,而且可为重组高效优质的复方提供科学依据。因此,我们对四逆散全方及其组成的三个典型的药对进行了比较研究。

Tab 2 Effect of Si-Ni-San and its drug-pairs on the adhesion of mouse spleen cells activated by Con A to type I collagen ($\bar{x} \pm s$)

Group	Concentration (-log C, g/ml)	Bound cells (%)
Normal	-	24.8 ± 4.6 **
Control	-	48.4 ± 5.3
Si-Ni-San	6	31.8 ± 6.5 *
	5	33.8 ± 5.5 *
	4	37.6 ± 10.5
Chaihu-Shaoyao	6	37.6 ± 9.7
	5	32.5 ± 10.2
	4	28.4 ± 3.4 **
Chaihu-Zhishi	6	22.7 ± 10.0 *
	5	24.7 ± 8.8 *
	4	31.9 ± 6.1 *
Shaoyao-Gancao	6	21.2 ± 11.7 *
	5	27.2 ± 12.1
	4	28.4 ± 7.3 *

Spleen cells were isolated and incubated with various concentrations of the extracts in the presence of Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) for 24 h at 37°C , 5% CO_2 . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

在炎症的发展过程中,淋巴细胞向炎症部位的迁移与浸润是关键性的环节之一。在这一过程中,淋巴细胞首先与血管内皮细胞相互作用并穿越血管壁,然后与基底膜、细胞外基质相互作用,继续迁移并活化,最终到达炎症部位^[1]。细胞外基质是由糖蛋白组成的复杂的大分子网状结构,其中包括纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、胶原等^[5]。激活的淋巴细胞在迁移的过程中会分泌更多的基质金属蛋白酶(MMP),以降解基底膜和细胞外基质,使得细胞的移行更加容易。MMP 是一类以降解基底膜和细胞外基质为主的 Zn^{2+} 依赖性的蛋白酶,它在肿瘤迁移、新血管生成、胚胎发育以及炎症反应中均发挥着十分重要的作用。临床和实验室研究亦给出了可信的证据表明抑制基质金属蛋白酶可改善包括类风湿性关节炎^[9]、肠炎^[7]在内的多种炎症性疾病。我们通过研究发现,四逆散和柴胡-芍药体外可剂量依赖性的抑制Con A 活化的小鼠脾细胞分泌MMP-2和9,而柴胡-枳实和芍药-甘草则基本上无影响(图1);令人感兴趣的是四逆散各药对和全方对正常小鼠脾细胞分泌MMP-2和9则无影响(图2)。从这一点我们可以看出药物作用的选择性,对活化状态的细胞有抑制作用,而对正常状态下的细胞功能无影响。为了了解药物对活化脾细胞分泌MMP的抑制作用是否是通过直接杀伤淋巴细胞而实现,我们又考察了药物的细胞毒作用。从表1我们可以看出,四逆散各药对及全方体外三个浓度对正常小鼠脾细胞无直接的细胞毒作用,排

除了刚才的假设。在三个药对中,以柴胡-芍药的作用最好,与四逆散全方的作用也较为一致。

有报道指出,淋巴细胞与细胞外基质之间的粘附作用在许多炎症性动物模型中发挥着重要作用,如胶原诱导的关节炎、接触性皮炎、足跖肿胀等^[8]。这种粘附作用对淋巴细胞向炎症部位的迁移起着必不可少的作用,一些单克隆抗体和合成肽类可通过阻断这种相互作用而有效地抑制炎症的发生^[9]。本研究中,我们观察到四逆散各药对及全方的三个浓度均不同程度的抑制了 Con A 活化的脾细胞粘附于 I 型胶原(表 2),并以柴胡-芍药的高浓度组作用最为显著。

以上结果表明,四逆散药对及全方对体外活化的淋巴细胞分泌 MMP 及粘附功能的抑制作用可能是其临床发挥抗炎疗效的基础,在三个药对中,以柴胡-芍药的作用最为显著,与四逆散全方的作用也较为一致,体现了方剂配伍理论中“君药”、“臣药”的重要性。有关四逆散抑制 MMP 和粘附的详细机理正在进一步探讨中。

参考文献

[1] Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity [J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 53: 241-

245.

[2] 周春祥(Zhou CX), 徐强(Xu Q), 曹劲松(Cao JS)等. 四逆散改善细胞免疫性肝损伤作用机理研究[J]. 中国中医基础医学杂志(*Chin J Basic Med Tradit Chin Med*), 2000, 8(5): 47-49.

[3] Torimura T, Ueno T, Kin M, et al. Laminin deposition to type IV enhances hepatotaxis, chemokinesis, and adhesion of hepatoma cells through β 1-integrins[J]. *J Hepatol*, 2001, 35: 245-253

[4] Franitza S, Hershkovitz R, Kam N, et al. TNF- α associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells [J]. *J Immunol*, 2000, 165: 2738-2747.

[5] Wright JW, Kramar EA, Meighan SE, et al. Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system [J]. *Peptides*, 2002, 23: 221-246.

[6] Elliott S, Cawston T. The clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic disorders [J]. *Drugs Aging*, 2001, 18: 87-99

[7] Di Sebastiano P, Di Mola FF, Artese L, et al. Beneficial Effect of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis [J]. *Digestion*, 2001, 63: 234-239.

[8] De Fougères AR, Sprague AG, Nickerson-Nutter CL, et al. Regulation of inflammation by collagen-binding integrins α β ₁ and α β ₂ in models of hypersensitivity and arthritis [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105: 721-729.

[9] Haworth D, Rees A, Alcock PJ, et al. Anti-inflammatory activity of c(ILDV-NH(CH₂)₅CO), a novel, selective, cyclic peptide inhibitor of VLA-4 mediated cell adhesion [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 126: 1751-1760

Effects of Si-Ni-San, a Traditional Chinese Formula, and Its Drug-pairs on Activities of Metalloproteinases and Adhesion of Mouse Spleen Cells Activated by Concanavalin A

SUN Yang¹, XU Qiang^{1,2}

¹Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing, China 210038;

²State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing, China 210093

【ABSTRACT】 AIM: To examine the effects of Si-Ni-San and its drug-pairs on activities of metalloproteinases and adhesion of mouse spleen cells activated by Con A *in vitro* and to compare the effect of the formula with its drug-pairs. **METHOD:** The activities of matrix metalloproteinases-2, 9 and adhesion were measured by gelatin zymography assay and violet crystal staining, respectively. **RESULT:** The ethanol extracts of Si-Ni-San and its drug-pairs exhibited a significant potency in inhibiting the activities of matrix metalloproteinase-2, 9 and adhesion to type I collagen of mouse spleen cells activated by Con A *in vitro*. However, the extracts did not have inhibitory effects on the metalloproteinases produced by spleen cells isolated from normal mice. Among three drug-pairs, Chaihu-Shaoyao showed a comparatively notable and coincident effect with Si-Ni-San. **CONCLUSION:** Si-Ni-San may inhibit the over-activation of spleen cells through down-regulation of metalloproteinases and inhibition of the cell adhesion to extracellular matrix. This effect is mainly displayed by the combination of Chaihu and Shaoyao.

【KEY WORD】 Si-Ni-San; Drug-pair; Concanavalin A; Matrix metalloproteinases; Adhesion

【Foundation Item】 This project was supported by the National Natural Science Foundation(No. 39970887)