

黄连解毒汤的抗炎作用机理研究

王利津, 徐 强

(中国药科大学 中药药理教研室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 研究黄连解毒汤的抗炎机理。方法: 采用小鼠背部气囊内注射角叉菜胶的方法诱导急性气囊滑膜炎; 脂多糖腹腔注射造成内毒素血症模型; 噻唑蓝比色法测定细胞增殖; Griess 法检测上清中 NO_2^- 的浓度; 胸腺细胞增殖测定 IL-1 的活性。结果: 黄连解毒汤能抑制角叉菜胶所致小鼠气囊内白细胞的游出, 减少 PGE_2 的生成。在体外实验中, 黄连解毒汤能显著抑制 Con A 所致的内毒素血症小鼠脾淋巴细胞的增殖, 但对正常小鼠淋巴细胞的增殖无影响, 且不影响正常及内毒素血症小鼠的脾细胞生成 IL-2。黄连解毒汤还可抑制脂多糖诱导小鼠腹腔巨噬细胞生成 IL-1 和 NO。结论: 以上结果提示黄连解毒汤的抗炎作用主要与抑制 IL-1, NO, PGE_2 等炎症因子生成有关。

[关键词] 黄连解毒汤; IL-1; NO; PGE_2 ; 抗炎

[中国分类号] R285 [文献标识码] B [文章编号] 1001-5302(2000)08-0493-04

黄连解毒汤(HJD)源于唐·王焘所著之《外台秘要》,由黄连、黄柏、黄芩、栀子四味药组成,为清热解毒的代表方。其加减方主要用于治疗各种火毒炽盛之内、外科疾病,后者在现代医学上多属微生物感染和炎症性疾病。已有报道指出黄连解毒汤对一些实验性炎症模型有确切的抗炎活性,但其详细机理尚不明。为此,在本研究中我们首先探讨了黄连解毒汤对角叉菜胶诱导的小鼠气囊滑膜炎的作用,然后通过腹腔注射脂多糖(LPS)诱发小鼠内毒素血症,观察了黄连解毒汤对其脾细胞及腹腔巨噬细胞功能的影响,从免疫学角度初步探讨了其抗炎解毒的机理。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

黄连、黄芩、黄柏、栀子购自南京中医药大学江苏时珍药房。经中国药科大学中药复方研究室余伯阳教授鉴定分别为:毛茛科植物 *Coptis chinensis* French. 的干燥根、唇形科植物 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根、芸香科植物 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮及茜草科植物 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的干燥成熟果实。

取黄连、黄芩、黄柏和栀子按 3:2:2:3 的比例混合,加 10 倍量的水,煎煮 1.5 h,共煎 3 次。滤液合并离心后浓缩干燥得黄连解毒汤提取物粉末,收率

为 22%。实验中所用的黄连解毒汤剂量均以该粉末计算。

1.2 动物

BALB/c 小鼠(6~8 周龄,体重 18~22g),购自南京医科大学动物中心。

1.3 小鼠气囊滑膜炎实验

小鼠背部皮下注射空气 5 ml,第 3 天及第 6 天再次注入空气各 3 ml,维持气囊的膨胀。于首次注射空气的当天起经口给予黄连解毒汤 200,400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 7 d。末次给药后 2 h 囊内注射 1%角叉菜胶 1 ml/只,再 6 h 后处死动物,于气囊内注入冰生理盐水(含肝素 50 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) 2.5 ml,轻轻按压,吸出 1 ml,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,计数白细胞量,上清用紫外分光光度法检测 PGE_2 的含量,以 OD_{278} 表示。

1.4 内毒素血症小鼠的制备

小鼠腹腔注射脂多糖 0.5 mg/只,12 h 后用于实验。

1.5 Con A 致小鼠脾淋巴细胞转化试验

无菌取出小鼠脾脏,于 5 ml Hank's 液中制备获得脾细胞悬液,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后,用 0.17 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-0.75% NH_4Cl 去除红细胞,再用 RPMI-1640(GIBCO)培养液(含 100 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 青霉素、100 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 链霉素和 10% 灭活无菌的新生牛血清)洗涤两次,调成 5×10^6 个/ml 细胞悬液。取 5×10^5 个/孔置 96 孔培养板中,在 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Con A 及不同

[收稿日期] 1999-10-08

浓度黄连解毒汤的共存下,置 37 °C, 5% CO₂ 下培养 96 h。终止培养前 4 h 加入 20 μl 含 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT, 5 μg·ml⁻¹)的培养基溶液。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,将 Con A 刺激组的吸光度除以不加 Con A 组的吸光度作为 Con A 对脾细胞的刺激指数(stimulation index, SI)。

1.6 Con A 诱导小鼠脾细胞产生白介素-2(IL-2)

无菌摘出小鼠脾脏,制成 1×10⁷ 个/ml 细胞悬液,加入 Con A(终浓度 25 μg·ml⁻¹) 在 37 °C, 5% CO₂ 下培养 2 h。经洗涤 2 次,配成 1×10⁷ 个/ml,于 24 孔培养板中每孔加入细胞悬液 1 ml 及不同浓度的黄连解毒汤 1 ml,置 37 °C, 5% CO₂ 培养 48 h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清测 IL-2 活性。采用活化小鼠脾细胞法,将加上清组的吸光度除以不加上清组的吸光度作为刺激指数表示 IL-2 活性^[1]。

1.7 腹腔巨噬细胞的制备^[2]

取小鼠,腹腔注射 BCG 1 mg/只,4 d 后,腹腔注射无血清 RPMI-1640 培养液 2 ml,断头处死,用 75% 酒精浸泡 2 min,收集腹腔灌洗液,1 000 r·min⁻¹, 4 °C, 10 min 离心收集细胞,用含 10% 灭活新生牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 1×10⁶ 个/ml。取 24 孔细胞培养板,每孔加细胞悬液 1 ml,置 37 °C, 5% CO₂ 预培养 2 h 后,倾去培养液,再用新鲜培养液洗 2 次,除去非贴壁细胞,获单层巨噬细胞。

1.8 NO 的诱生

取上述单层巨噬细胞,加入 1 ml/孔含脂多糖(终浓度 10 μg·ml⁻¹) 的无酚红 RPMI-1640 培养液及 1 ml/孔不同浓度的黄连解毒汤。37 °C, 5% CO₂ 下培养 48h, 经 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清用 Griess 反应检测 NO₂⁻ 的浓度,计算巨噬细胞的 NO 生成量。上清与 Griess 液(1% 磺胺, 0.1% N-1-萘乙二胺盐酸盐, 2.5% 磷酸) 等体积混合,室温放置 10 min,检测 540 nm 处的吸光度。以亚硝酸钠为标准品制作标准曲线。

1.9 IL-1 的诱生

取上述单层巨噬细胞,加入 1 ml/孔含脂多糖(终浓度 10 μg·ml⁻¹) 的 RPMI-1640 培养液及 1 ml/孔不同浓度的黄连解毒汤,37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 48 h, 经 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清用胸

腺细胞增殖法检测 IL-1 的活力,以刺激指数表示。

1.10 统计

各数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 黄连解毒汤对角叉菜胶所致小鼠气囊滑膜炎的影响

与正常组相比,对照组气囊灌洗液中白细胞与 PGE₂ 的含量均明显增加。400 mg·kg⁻¹ 黄连解毒汤明显地减少了白细胞的数量并抑制了 PGE₂ 的渗出(表 1)。

表 1 黄连解毒汤对角叉菜胶诱导小鼠急性气囊滑膜炎的影响

分组	剂量/ mg·kg ⁻¹	WBC/10 ⁻⁵ ·ml ⁻¹	PGE ₂ /OD ₂₇₈
正常对照		2.78±1.40 ^①	0.168±0.03 ^①
对照		35.22±13.56	0.325±0.09
HJD	200	39.91±19.88	0.338±0.09
	400	16.08±7.98 ^①	0.204±0.06 ^①

注:① $\bar{x} \pm s$ ② *n* = 8 ^① 与对照组比 *P* < 0.01(下同)

2.2 黄连解毒汤对正常及内毒素血症小鼠脾淋巴细胞转化的影响

如表 2 所示,Con A 对正常小鼠脾淋巴细胞的刺激指数为 5.87,与其相比,10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ g·ml⁻¹ 各浓度的黄连解毒汤对 Con A 所致的淋巴细胞增殖均无影响。而对于内毒素血症小鼠的脾淋巴细胞,Con A 的刺激指数为 25,黄连解毒汤对 Con A 所致脾细胞增殖显示了浓度依赖性的抑制作用,10⁻⁵ g·ml⁻¹ 以上浓度时有显著意义。

表 2 黄连解毒汤对 Con A 诱导淋巴细胞转化的影响

分组	浓度	刺激指数	
		正常小鼠	内毒素血症小鼠
对照		5.87±0.34	25.00±0.92
HJD	10 ⁻⁷	5.97±0.41	23.93±0.64
	10 ⁻⁶	5.89±0.41	23.47±0.90
	10 ⁻⁵	5.59±0.25	17.73±2.32 ^①
	10 ⁻⁴	5.22±0.50	12.20±1.59 ^①

注:每个数据代表 3 次独立实验的平均值,每个实验包括 3 个平行复孔

2.3 黄连解毒汤对 Con A 刺激正常及内毒素血症小鼠脾细胞生成 IL-2 的影响

如表 3 所示,各浓度黄连解毒汤对 Con A 刺激正常及内毒素血症小鼠脾细胞生成 IL-2 均无影响。

表 3 黄连解毒汤对 Con A 诱导脾细胞生成 IL-2 的影响

分组	浓度	刺激指数	
		正常小鼠	内毒素血症小鼠
对照		2.30±0.21	1.73±0.30
HJD	10 ⁻⁷	2.17±0.14	1.91±0.20
	10 ⁻⁶	1.94±0.38	1.96±0.17
	10 ⁻⁵	2.31±0.25	1.63±0.16
	10 ⁻⁴	2.49±0.04	1.77±0.20

注: 每个数据代表 3 次独立实验的平均值, 每个实验包括 3 个平行复孔

2.4 黄连解毒汤对脂多糖刺激小鼠腹腔巨噬细胞生成 NO 和 IL-1 的影响

与正常巨噬细胞相比, 用脂多糖刺激后, 巨噬细胞释放 NO 与 IL-1 明显增加。黄连解毒汤 10⁻⁵, 10⁻⁴ g·ml⁻¹ 显著抑制了 NO 生成, 抑制率分别为 22.3% 和 35.4%。同时, 黄连解毒汤剂量依赖性抑制了 IL-1 的产生, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 10⁻⁴ g·ml⁻¹ 的抑制率分别为 9.2%, 14.8%, 31.7%, 73.1% (图 1)。

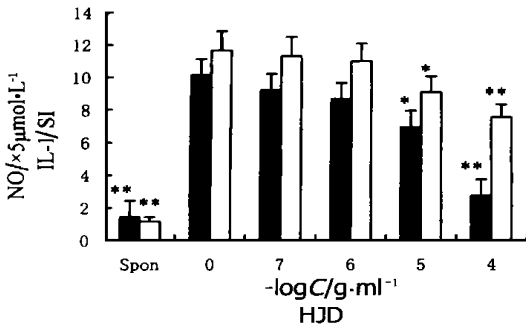


图 1 黄连解毒汤对脂多糖诱导小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 和 IL-1 的影响

每个数据代表 3 次独立实验的平均值, 每个实验包括 3 个平行复孔 与对照组比 *P<0.05 **P<0.01 NO. □ IL-1. ■

3 讨论

本文首先探讨了黄连解毒汤对角叉菜胶所致小鼠气囊滑膜炎反应的影响, 结果发现黄连解毒汤可明显抑制白细胞的游出及囊内 PGE₂ 的含量, 表明其有显著的抗炎活性, 其机理与抑制炎症介质 PGE₂ 的形成有关。鉴于炎症与免疫反应的密切关系, 我们进一步从免疫学角度考察了黄连解毒汤的抗炎机理。

现代医学认为细菌内毒素是中医理论中致病因素之“毒”的重要物质基础之一, 内毒素腹腔注射或

静脉滴注可造成内毒素血症模型, 内毒素进入血液循环可介导产生多种生物活性物质, 其中包括 TNF-α, ILs, PAF, NO, IFN-γ 等各种细胞因子。这些因子构成了复杂的网络。影响机体的整个免疫过程。适量的细胞因子可以调节机体的免疫功能, 发挥防御作用, 但细胞因子大量释放, 特别是与炎症反应关系密切的 TNF-α, IL-1 等, 可造成过度的炎症反应、局部组织细胞及全身性损害。在内毒素血症过程中, TNF-α, IL-1 等细胞因子水平继内毒素后显著上升, 提示这些细胞因子在内毒素血症中起着重要的作用。国外对 IL-1 受体拮抗剂治疗败血症休克进行了 II 期临床试验, 初步结果令人满意^[3]。本研究发现黄连解毒汤对于腹腔巨噬细胞生成 IL-1 有剂量依赖性的抑制作用, 尤其在高浓度时抑制率高达 73.1%, 这可能是其抗炎作用的主要机理之一。

NO 在炎症反应的许多环节发挥复杂的调节作用。现已发现, 在许多炎症过程中, 用 NO 合酶抑制剂如 L-NMMA 时可减轻炎症性损伤, 而 NO 的前体 L-精氨酸却可加重炎症损害^[4]。根据我们的前期研究, 内毒素血症的小鼠血清 NO 12 h 时达到高峰, 24 h 时下降至正常水平(实验数据未给出)。在本实验中, 黄连解毒汤剂量为 10⁻⁵ g·ml⁻¹ 和 10⁻⁴ g·ml⁻¹ 时, 对 NO 生成有显著的抑制作用, 这与 Suzuki 等人的研究结果颇为相似^[5], 表明抑制 NO 的生成也可能是黄连解毒汤抗炎作用的机理之一。

黄连解毒汤对 Con A 所致正常小鼠的淋巴细胞转化无影响, 而对于内毒素血症小鼠淋巴的细胞的增殖则有一定的抑制作用, 表明黄连解毒汤对正常淋巴细胞的活化过程影响较小。进一步研究发现, 黄连解毒汤对正常及内毒素血症小鼠脾细胞生成 IL-2 的能力亦无影响。已有报道指出, 脾淋巴细胞中含有微量的巨噬细胞, 除去巨噬细胞后的脾淋巴细胞对 Con A 无应答反应, 加入 IL-1 或巨噬细胞, 则可使 T 细胞增殖^[6], 这表明了巨噬细胞对于 Con A 所致 T 淋巴细胞增殖的重要作用。另一方面, 脂多糖可刺激巨噬细胞的功能, 本实验发现内毒素血症小鼠脾细胞对 Con A 的敏感性大大提高。黄连解毒汤抑制内毒素血症小鼠脾细胞的增殖可能与其抑制 IL-1 的生成或巨噬细胞的功能有关。

综上所述, 黄连解毒汤有确切的抗炎作用, 其作用机理主要包括抑制某些致炎因子, 如 IL-1, NO, PGE₂ 等的生成。

[参考文献]

- [1] 丁桂凤, 席宏丽, 邓玉兰, 等. 用活化的小鼠脾细胞测定 IL-2. 上海免疫学杂志, 1988, 8(1): 64.
- [2] Shinji Fushiya, Yoji Kishi, Koichi Hattori, et al. Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages in vitro. *Planta Medica*, 1999, 65: 404.
- [3] Arend W P. IL-1 Receptor Antagonist: A New Member of the IL-1 Family. *J Clin Invest*, 1991, 88: 1445.
- [4] 蒋波, 楚正绪. 一氧化氮与炎症. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 1998, 18(1): 44.
- [5] Rie Suzuki, Toshitaka Kido, Naoko Miura, et al. Inhibitory Effects of Herbal Medicines on Nitric Oxide Production in Macrophage and Hepatome Cell Lines Induced by Inflammatory Stimuli. *Journal of Traditional Medicines*, 1996, 13(2): 165.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1243.

Mechanism of Anti-inflammatory Action of Huanglian Jiedu Decoction A Traditional Chinese Prescription

WANG Li-jin, XU Qiang

(Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica,
China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the mechanism of anti-inflammatory action of Huanglian Jiedu Decoction (HJD). **Methods:** An acute inflammatory air-pouch was established in mice by s. c. injecting air and 1% carageenan. A mouse endotoxaemia induced by lipopolysaccharide was also used. Splenocyte proliferation was quantified with 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetry. NO⁻ concentration was examined by a Griess reagent and interleukin-1 activity was evaluated in thymocyte proliferation. **Results:** HJD significantly inhibited the leukocyte infiltration and PGE₂ production in the mouse air-pouch model. In the in vitro assay, HJD significantly inhibited concanavalin A (Con A)-induced transformation of spleen cells isolated from the endotoxaemia mice, but did not influence that from the normal mice. HJD did not affect Con A-induced interleukin-2 production in splenocytes in either normal or endotoxaemia mice. HJD remarkably reduced interleukin-1 and NO production in peritoneal macrophages elicited by lipopolysaccharide. **Conclusion:** HJD displays an anti-inflammatory effect mainly through inhibiting the production of inflammatory cytokines including IL-1, NO and PGE₂.

[Key words] Huanglian Jiedu Decoction; IL-1; NO; PGE₂; anti-inflammation

[责任编辑 方文贤]

复方丹参滴丸以药品身份获准在俄罗斯上市

天津天士力集团复方丹参滴丸成功通过俄罗斯卫生部处方药注册, 获准在俄罗斯上市。丹参滴丸是俄罗斯卫生部批准的第一例治疗心血管疾病的复方天然植物的处方用药。申报过程: 复方丹参滴丸通过了俄罗斯药典委员会、管理委员会的审查, 并在俄罗斯科学院、心脏病权威专家指导下, 在几家俄罗斯国家临床医院进行严格的临床试验。临床结果表明, 复方丹参滴丸对心绞痛有迅速起效的治疗作用, 并可降低冠心病患者对硝酸甘油的依赖性。与俄罗斯目前治疗心血管病同类药物相比, 具有疗效好、安全性好、质量可靠、速效及标本兼治的优点。

据俄罗斯卫生部介绍, 俄罗斯是一个高比例心脑血管患者的国家, 所以复方丹参滴丸成功的处方药身份在俄罗斯注册将有广阔的市场前景。