

蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度优选及其对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响^A

刘芳*,董改英,瞿晶田,柴士伟(天津中医药大学第一附属医院药学部,天津 300193)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3935-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.13

摘要 目的:优选蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度,并研究其对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响。方法:采用柱前衍生化反相高效液相色谱法,以煎煮1次后4种主要氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、L-羟脯氨酸和甘氨酸)的总煎出量为指标,对蕲蛇饮片及过1~8号筛部分进行筛选,优选蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度。将人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞分为阴性对照组、阳性对照组(1 μmol/L 甲氨蝶呤)和最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂组(2.0 mg/mL),分别作用48 h后,采用流式细胞术测定细胞凋亡率。结果:蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度为过6号筛,此时4种主要氨基酸总煎出量为(61.27±0.02) mg/g(n=3)。与阴性对照组比较,最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂组细胞凋亡率显著升高(P<0.05),且略高于阳性对照组。结论:蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度为过6号筛;蕲蛇煮散剂具有诱导人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的作用。

关键词 蕲蛇;煮散剂;粉碎粒度;人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞;凋亡

Optimization of the Best Crushing Particle Size of Agkistrodon Decocting Powder and Its Effect on Apoptosis of Human Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes

LIU Fang, DONG Gaiying, QU Jingtian, CHAI Shiwei (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the best crushing particle size of Agkistrodon decocting powder, and study its effect on apoptosis of human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. METHODS: Pre-column derivatization RP-HPLC was adopted. Using the total decoction amounts of 4 main amino acids (aspartic acid, glutamic acid, L-hydroxyproline, glycine) that decocted once as index, the Agkistrodon decoction pieces and those through No.1-8 sieve were screened, and the best crushing particle size of Agkistrodon decocting powder was optimized. The human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes were divided into negative control group, positive control group (1 μmol/L methotrexate) and the best crushing particle size of Agkistrodon decocting powder group (2.0 mg/mL), flow cytometry was used to determine the cell apoptosis after cultured for 48 h. RESULTS: The best crushing particle size was through No.6 sieve, when the total amount of 4 main amino acids was (61.27±0.02) mg/g (n=3). Compared with negative control group, the apoptosis rate in the best crushing particle size of Agkistrodon decocting powder group was significantly increased (P<0.05), which was slightly higher than positive control group. CONCLUSIONS: The best crushing particle size is through No.6 sieve; and Agkistrodon decocting powder shows effect on reducing the apoptosis of human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes.

KEYWORDS Agkistrodon; Decocting powder; Crushing particle size; Human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes; Apoptosis

蕲蛇为蝮科动物五步蛇[*Agkistrodon acutus* (Günther)]的干燥体,性甘,味咸,有毒,归肝经,具有祛风、通络、止痉的功效,常用于治疗风湿顽痹、麻木拘挛、中风口眼喎斜、半身不遂、搐搦挛、破伤风、麻风、疥癣等疾病^[1]。蕲蛇是我国传统名贵中药材之一,药用资源短缺。因此,无论是从提高临床疗效,还是从节约资源的角度来讲,对其进行合理有效的利用都具有重要的意义。

中药煮散剂是指将饮片粉碎成颗粒与水共同煎煮后,去渣取汁制成的液体剂型,是与传统汤剂相同的一种用药形式。采用煮散剂可以达到节约药材、提高汤剂

煎煮质量等效果^[2-3]。煮散剂的粉碎粒度影响着中药有效成分的煎出量,有效成分的煎出量会随着煮散剂粒度的变小呈现出先逐渐增高而后降低的趋势。本研究拟在传统中药煮散理论的指导下,以煎煮1次(临床常用煎煮方式)煎出的4种主要氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、L-羟脯氨酸和甘氨酸)的总煎出量为指标,对蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度进行优选。并在此基础之上,应用流式细胞技术,以细胞凋亡率为指标,评价最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂诱导人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的作用,初步揭示蕲蛇治疗类风湿性关节炎的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

△基金项目:天津市中医中西医结合科研课题(No.13060)

*副主任药师,硕士。研究方向:中药临床药学。电话:022-27987205。E-mail:tjcs008@163.com

1200 高效液相色谱仪、G1314B 紫外-可见检测器(美国安捷伦科技有限公司);AL104 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);CKX31 倒置相差显微镜(日本奥林巴斯株式会社);Dynex Mrx II 酶标仪(美国 Dynex 公司);Dikma Diamonsil C₁₈柱(中国迪马科技有限公司,规格:150 mm×4.6 mm,5 μm)。

1.2 药品与试剂

注射用甲氨蝶呤(山西普德药业有限公司,批号:20130531,规格:5 mg/支);天冬氨酸对照品(批号:140624-200805,纯度:100%)、谷氨酸对照品(批号:140624-200805,纯度:99.5%)、L-羟脯氨酸对照品(批号:111578-200201,纯度:99.5%)、甘氨酸对照品(批号:140624-200805,纯度:100%)均购自中国食品药品检定研究院;MTT(美国 Sigma 公司,批号:9BT10330);硫酸链霉素(华北制药有限公司,批号:080902);荧光素 FITC 标记的膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡试剂盒(美国基础基因联盟生物公司,批号:556547);甲醇和乙腈为色谱纯,异硫氰酸苯酯及其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

蕲蛇(河北美威药业股份有限公司,批号:140201),经我院王中华副主任药师鉴定为真品。

1.4 滑膜组织

试验所需滑膜标本取自 2013 年 4 月—2014 年 8 月在我院确诊为类风湿性关节炎的 6 例住院患者(诊断标准符合 1987 年美国风湿病协会修订的分类标准),其中女性 5 例、男性 1 例,年龄范围为(58±6)岁,滑膜标本经手术病理标本检查证实。

2 方法

2.1 成纤维样滑膜细胞的分离与鉴定

将无菌取出的滑膜组织漂洗后放在平皿中,尽量剪碎,放入离心管,加 0.25% II 型胶原酶于恒温振荡器上连续消化 3 次,每次 20 min。合并 3 次消化液后过 6 号金属筛,收集细胞悬液。将细胞悬液置于离心管中,以离心半径为 8 cm、1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用含有双抗和 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液将细胞制成细胞悬液,吹打均匀,调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,接种于细胞培养瓶中。将细胞置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下进行培养,隔日更换培养基。待细胞铺满 80% 瓶底时,用 0.25% 胰蛋白酶常规消化、传代。取细胞置于倒置相差显微镜下观察。

2.2 蕲蛇煮散剂最佳粉碎粒度的确定

取蕲蛇原药材,粉碎。根据粉碎粒度的不同,将其分为饮片和过 1~8 号筛部分。分别精密称取蕲蛇饮片或各过筛部分 0.90 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,加超纯水 50 mL,称质量,然后分别加热回流提取 1 h,放冷,再次称质量,用超纯水补足减失的质量。之后,参考文献[4]方法,采用柱前衍生化反相高效液相色谱法分别测定各溶液中 4 种氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、L-羟脯氨酸和

甘氨酸)的煎出量,以 4 种氨基酸的总煎出量为指标,确定蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度。

2.3 最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂对成纤维样滑膜细胞凋亡的影响

2.3.1 最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂冷冻干燥物的制备 取最佳粉碎粒度筛蕲蛇煮散剂 50.00 g,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加水 500 mL,加热回流提取 1 h,抽滤,用旋转蒸发仪回收水溶液。浓缩物进行冷冻干燥,得蕲蛇最佳粉碎煮散剂冻干粉 5.77 g。

2.3.2 煮散剂冻干粉对成纤维样滑膜细胞凋亡的影响考察 取 3~5 代生长稳定的成纤维样滑膜细胞,用 DMEM/F12 培养液调整细胞密度为 $5 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,取 4 mL 细胞悬液复种于 25 cm² 培养瓶中。将试验分为阴性对照组、阳性对照组和最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂组。待培养瓶中成纤维样滑膜细胞生长融合后(培养 72 h),最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂组细胞加入 4 mL 的最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂冷冻干燥物(2.0 mg/mL)的 DMEM/F12 溶液;阳性对照组细胞加入 1 μmol/L 甲氨蝶呤,阴性对照组细胞加入空白 DMEM/F12 溶液。继续培养 48 h 后,用 2.5 g/L 的胰酶消化 1 min 左右,收集细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,然后按 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明书操作染色,随即进行流式细胞术分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 成纤维样滑膜细胞的分离鉴定结果

显微镜下可见,细胞呈梭状成纤维样,为人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞,结果见图 1。

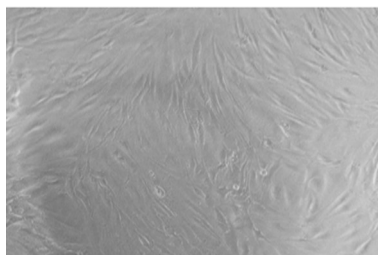


图 1 倒置显微镜下人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞的形态观察结果(×100)

Fig 1 Morphology result of human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes under inverted microscope(×100)

3.2 蕲蛇煮散剂最佳粉碎粒度的考察结果

蕲蛇饮片和不同粉碎粒度蕲蛇煮散剂水煎煮 1 次后测定,结果过 6 号筛蕲蛇煮散剂中 4 种氨基酸的煎出量均最高,总煎出量为(61.27±0.02) mg/g,因此蕲蛇煮散剂最佳粉碎粒度为过 6 号筛,结果见表 1。

3.3 最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂对成纤维样滑膜细胞凋亡的影响结果

表1 蕲蛇饮片及不同粉碎粒度蕲蛇煮散剂4种氨基酸煎出量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)

Tab 1 Determination results of amounts of 4 amino acids in Agkistrodon decoction pieces and Agkistrodon decocting powder with different crushing particle sizes ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)

粉碎度	天冬氨酸	谷氨酸	L-羟脯氨酸	甘氨酸	总煎出量
饮片	2.58±0.07	5.27±0.12	1.73±0.01	6.50±0.08	16.08±0.27
过1号筛	5.56±0.19	9.72±0.26	6.17±0.26	16.38±0.09	37.84±0.43
过2号筛	5.63±0.16	10.02±0.24	5.67±0.02	15.42±0.18	36.74±0.57
过3号筛	7.57±0.29	13.42±0.43	7.34±0.02	19.97±0.20	48.30±0.91
过4号筛	8.33±0.33	14.97±0.63	8.03±0.13	21.78±0.12	53.10±0.95
过5号筛	9.88±0.22	16.75±0.33	8.30±0.22	22.92±0.69	57.85±0.39
过6号筛	10.29±0.17	18.23±0.33	8.76±0.14	24.00±0.37	61.27±0.02
过7号筛	10.63±0.17	18.66±0.36	8.37±0.08	23.21±0.15	60.86±0.34
过8号筛	9.96±0.19	17.34±0.31	6.43±0.08	18.75±0.17	52.48±0.39

2.0 mg/mL 蕲蛇煮散剂可促进成纤维样滑膜细胞凋亡。与阴性对照组比较,阳性对照组和最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂组细胞总凋亡率均显著升高($P < 0.05$)。阴性对照组、阳性对照组、最佳粉碎粒度蕲蛇煮散剂组细胞总凋亡率分别为(2.71 ± 1.05)%、(23.29 ± 1.85)%、(28.07 ± 1.45)% ($n=3$),流式图见图2。

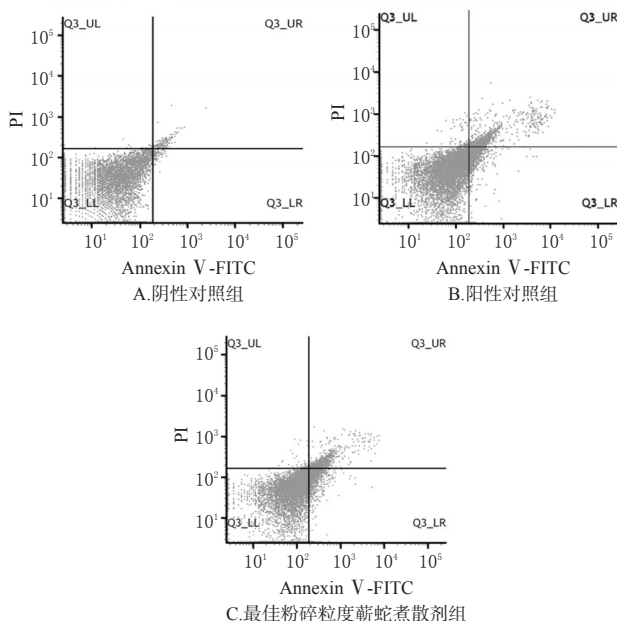


图2 各组细胞凋亡率测定的流式图

Fig 2 Flow cytometry of apoptosis rate determination of cell in each group

4 讨论

现代药理学证实,蕲蛇具有抗炎、镇痛的作用^[5-6],能够缓解胶原诱导性关节炎大鼠的症状,其作用机制可能与降低血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量和升高血清中白细胞介素10(IL-10)含量有关^[7]。进一步研究发现,蕲蛇发挥作用的有效成分为II型胶原蛋白类成分^[8]。考虑到蛋白类成分水解后为氨基酸,因此本研究以煎煮剂中4种主要氨基酸成分的总煎出量为指标,参考阿胶中氨基酸的测定方法^[9-10]——柱前衍生化法进行含量测

定,并对其进行了部分优化,以确定蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度。本研究结果显示,粉碎粒度对蕲蛇多肽类物质的煎出率具有明显的影响,随着粉碎粒度的逐渐变小,蕲蛇4种氨基酸的煎出量逐渐增加,达到最大值后又逐渐变小。当蕲蛇煮散剂过6号筛后,4种总氨基酸的总煎出量达到最大,并且明显高于传统饮片。

本研究所用细胞为从类风湿性关节炎患者身上提取的成纤维样滑膜细胞,细胞状态比经过改造的能稳定遗传的细胞株更能反映细胞的实际病理状态。笔者认为,从患者身上取得的标本,由于只进行滑膜细胞的提取,故排除了其他因素对试验结果的影响。由于1 mL 细胞培养液最多能溶解2.00 mg 蕲蛇煮散剂的冷冻干燥物,故本研究细胞凋亡试验中蕲蛇煮散剂的最大质量浓度为2.0 mg/mL。本研究结果显示,过6号的筛蕲蛇煮散剂(2.0 mg/mL)具有一定的诱导人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的作用,细胞凋亡率为(28.07 ± 1.45)% ($n=3$)。

综上所述,蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度为过6号筛。蕲蛇煮散剂在细胞模型基础上具有一定的诱导人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的作用,其在体内是否具有相同的作用、作用强度如何,都需要应用动物模型进一步验证。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:372.
- [2] 姚佳音.煮散剂研究进展[J].上海中医药杂志,2014,48(9):93-95.
- [3] 张卫,张瑞贤.煮散剂的剂量与兴衰[J].中国医学创新,2014,11(3):94-96.
- [4] 柴士伟,董改英,瞿晶田,等.正交试验优选蕲蛇煎煮工艺[J].中国药房,2015,26(25):3569-3571.
- [5] 蒋福升,马哲龙,陈金印,等.蕲蛇提取物抗炎镇痛药理作用的研究[J].蛇志,2013,25(2):97-99.
- [6] 谷恒存,丁兴红,马哲龙,等.蕲蛇水提液对佐剂性关节炎大鼠的免疫调节作用[J].中华中医药杂志,2012,27(10):2676-2678.
- [7] 张纪达,范永升,温成平,等.蕲蛇水提取物对胶原诱导性关节炎大鼠血清TNF- α 、IL-6和IL-10的影响[J].中华中医药杂志,2012,27(5):1407-1409.
- [8] 谷恒存,胡金波,丁志山,等.蕲蛇II型胶原蛋白对CIA大鼠的治疗作用[J].中华中医药学刊,2013,31(10):2207-2209.
- [9] 谢谊,易艳,王实强,等.柱前衍生HPLC测定阿胶中17种水解氨基酸含量[J].湖南中医药大学学报,2012,32(5):46-49.
- [10] 程显隆,肖新月,邹秦文,等.柱前衍生HPLC法同时测定阿胶中4种主要氨基酸的含量[J].药物分析杂志,2008,28(12):1997-2000.

(收稿日期:2017-01-03 修回日期:2017-06-29)

(编辑:林 静)