

# 安儿宁颗粒的体外抗菌、抗炎和免疫增强活性研究<sup>Δ</sup>

刘帆<sup>1,2\*</sup>, 张颖颖<sup>1</sup>, 侯林<sup>1,2#</sup> (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学青岛中医药科学院, 山东青岛 266114)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2221-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.12

**摘要** 目的: 评价安儿宁颗粒的体外抗菌、抗炎和免疫增强活性。方法: 采用微量稀释法检测安儿宁颗粒(1.562 5~100 mg/mL)对10种临床常见致病菌的抑制作用并计算其最低抑菌浓度(MIC); 以RAW 264.7细胞(单核巨噬细胞)为对象, 采用脂多糖(LPS)诱导建立细胞炎症模型, 以MTT法考察安儿宁颗粒(0.312 5~20 mg/mL)对细胞增殖及其释放一氧化氮(NO)的影响; 以BALB/c小鼠脾脏淋巴细胞为对象, 以MTT法考察安儿宁颗粒(0.312 5~20 mg/mL)对细胞增殖的影响。结果: 安儿宁颗粒对表皮葡萄球菌和肺炎链球菌的MIC均为6.25 mg/mL, 对变形杆菌、肺炎克雷伯菌、枯草芽孢杆菌和大肠埃希菌(标准菌株)的MIC均为12.5 mg/mL, 对铜绿假单胞菌、粪肠球菌、蜡样芽孢杆菌的MIC均为25 mg/mL, 对大肠埃希菌(临床分离菌株)、伤寒沙门菌的MIC均为50 mg/mL。与LPS模型组比较, 安儿宁颗粒在0.312 5~1.25 mg/mL的剂量下能显著降低LPS诱导的RAW 264.7细胞中NO的释放( $P<0.05$ ); 与空白对照组比较, 安儿宁颗粒在试验剂量下对RAW 264.7细胞和小鼠脾脏淋巴细胞增殖无干扰或有促增殖趋势, 其在0.625、0.312 5 mg/mL剂量下能显著促进淋巴细胞增殖( $P<0.05$ )。结论: 安儿宁颗粒在体外对临床常见的革兰氏阳性和革兰氏阴性致病菌均有一定的抑制作用, 并具有抗炎和免疫增强作用。

**关键词** 安儿宁颗粒; 抗菌; 抗炎; 免疫活性

**Study on *in vitro* Antibacterial, Anti-inflammatory and Immunopotentiating Activity of An'erning Granules**  
LIU Fan<sup>1,2</sup>, ZHANG Yingying<sup>1</sup>, HOU Lin<sup>1,2</sup> (1. College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. Qingdao Academy of Chinese Medical Sciences, Shandong University of TCM, Shandong Qingdao 266114, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To evaluate the *in vitro* antibacterial, anti-inflammatory and immunopotentiating activity of An'erning granules. METHODS: Micro-dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of An'erning granules (1.562 5-100 mg/mL) on 10 kinds of common pathogenic bacteria. Using RAW 264.7 cells (mono-nuclear macrophage) as objects, LPS was used to replicate inflammation model. MTT assay was used to investigate the effects of An'erning granules (0.312 5-20 mg/mL) on proliferation and the release of NO of macrophage. Using spleen lymphocyte of BALB/c mice as objects, MTT assay was used to investigate the effects of An'erning granules (0.312 5-20 mg/mL) on lymphocyte proliferation. RESULTS: MIC of An'erning granules to *Epidermis staphylococcus* and *Streptococcus pneumoniae* was 6.25 mg/mL; MIC of An'erning granules to *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* (standard strain) were 12.5 mg/mL; MIC of An'erning granules to *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus cereus* were 25 mg/mL; MIC of An'erning granules to *E. coli* (clinical isolates) and *Salmonella typhia* were 50 mg/mL. Compared with LPS model group, An'erning granules could significantly reduce the LPS-induced release of NO in RAW 264.7 cells at the dose of 0.312 5-1.25 mg/mL ( $P<0.05$ ). Compared with blank control group, An'erning granule had no interference on the proliferation of RAW 264.7 cells and spleen lymphocytes of mice or had a tendency to promote proliferation. It could significantly promote lymphocyte proliferation at doses of 0.625 and 0.312 5 mg/mL ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: An'erning granules not only have certain *in vitro* inhibitory effects on clinical common Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria, but also have anti-inflammatory and immunization enhancement effects.

**KEYWORDS** An'erning granule; Antibacterial; Anti-inflammatory; Immune activity

呼吸道感染疾病是由细菌、病毒及少数支原

Δ 基金项目: 山东省重点研发计划项目(No.2016CYJS08A01-8); 青海省科技项目(No.2015-GX-202)

\* 硕士研究生。研究方向: 中药炮制原理与新药研发。E-mail: 13589127500@163.com

# 通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药药理学。E-mail: houlin5027@163.com

体、衣原体等病原体感染引起的常见疾病, 在儿童中发病率最高, 而抗菌、抗炎是其主要治疗手段之一<sup>[1]</sup>。但化学类抗菌药物在治疗感染性疾病的同时也常常引起患者体内菌群失调, 加之其不合理使用导致的耐药性逐年增加<sup>[2]</sup>, 使得寻找其他安全、有效的药物用于治疗呼吸道感染疾病具有重要的临床意义。

扶正祛邪类中药能通过多途径、多靶点发挥作用,在治疗感染性疾病尤其是呼吸道感染方面优势显著<sup>[3]</sup>。安儿宁颗粒处方源于藏医经典方“九西更卓”,至今已有300年应用史;该药由天竺黄、人工牛黄、红花、岩白菜、唐古特乌头、高山辣根菜、甘草、洪连和檀香等9味药材组方精制而成,具有清热祛风、止咳化痰的功效,主要用于治疗小儿风热感冒、咽痛发热、咳嗽有痰、上呼吸道感染见上述证候者<sup>[4]</sup>。在临床实践中发现,安儿宁颗粒不仅可用于治疗小儿上呼吸道感染,还可用于治疗小儿急性支气管炎、支气管肺炎等下呼吸道感染疾病,对以上疾病引起的发热、咳嗽、咳痰、咽痛等症状也有较好的治疗作用<sup>[5]</sup>。药效学研究证实,安儿宁颗粒有较好的镇咳祛痰、解热镇痛、抗炎作用<sup>[6]</sup>,且处方中的红花、甘草也已明确具有抗菌、抗炎及增强免疫作用<sup>[7]</sup>。为明确安儿宁颗粒抗菌、抗炎和增强免疫的作用,本研究作为“安儿宁颗粒二次开发”课题的一部分,就该颗粒剂对常见呼吸道感染致病菌、脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞炎症反应的抑制作用以及对脾脏细胞增殖的影响进行考察,为该颗粒剂临床应用适应证范围的拓宽、进一步深入开发及应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BS110S型电子天平(北京赛多利斯天平公司);CKX-31型倒置显微镜(日本Olympus公司);MK3型酶标仪(芬兰Finnpipette公司);TD5Z型酶标板离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);LH-SDS型超净工作台(济南隆宏净化设备有限公司);HF90型CO<sub>2</sub>细胞恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司);MJ37600型全自动高压灭菌锅(山东德强仪器有限公司);DW-86L286型低温储物箱(海尔电器有限公司);101A-1E型电热鼓风干燥箱(上海市试验仪器总厂);LRH-250A型生化培养箱(广东医疗器械厂);Vortex3型涡旋振荡器(德国IKA公司);SZH-82型气浴恒温振荡器(江苏省金坛市城东久实验仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

安儿宁颗粒(批号:02170612)由金河藏药股份有限公司提供。处方组成:天竺黄66.7 g、人工牛黄5.3 g、甘草53.3 g、洪连66.7 g、唐古特乌头66.7 g、红花53.3 g、岩白菜53.3 g、高山辣根菜53.3 g、檀香66.7 g。提取及制备工艺:取檀香、红花提取挥发油(另器收集),残渣与天竺黄、甘草、洪连、唐古特乌头、岩白菜、高山辣根菜等6味药材混合,加入10倍量水(mL/g)煎煮2次(分别煎煮3、2 h),合并煎液,滤过,滤液浓缩至相对密度为1.30~1.35(50℃)的稠膏;取稠膏加入人工牛黄和蔗糖(辅料)适量,制粒,干燥;加入檀香、红花挥发油混匀,制成

1 000 g,即得。以甘草酸的含量为指标进行成分转移监测,每1 g干浸膏粉相当于安儿宁颗粒13.68 g,相当于生药材6.57 g。因辅料蔗糖可导致抗菌试验产生假阳性结果,故本研究以安儿宁颗粒未加蔗糖前的干浸膏粉(即稠膏在鼓风干燥箱中干燥后获得)添加人工牛黄和檀香、红花挥发油制成不含蔗糖的安儿宁颗粒样品,用于后续试验。

LPS(美国Sigma公司,批号:S11060);硫酸庆大霉素注射液(辰欣药业股份有限公司,批准文号:国药准字H37021973,规格:2 mL/支);2% RPMI 1640细胞维持液[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号:61870-036];MH(B)肉汤(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号:20151206001);红细胞裂解液(美国Hyclone公司,批号:00-4333-57);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);青霉素、链霉素(山东鲁抗医药股份有限公司);pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS,无菌级别)、0.25%胰蛋白酶-EDTA(美国Gibco公司);二甲基亚砜(DMSO,天津化学试剂厂);噻唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司);生理盐水(辰欣药业股份有限公司);水为蒸馏水。

### 1.3 菌株及细胞株

革兰氏阳性菌:肺炎链球菌CMCC(B)31001,大肠埃希菌(标准菌株)CMCC(B)44102,枯草芽孢杆菌CMCC(B)63501,蜡样芽孢杆菌CMCC(B)63301,伤寒沙门菌CMCC(B)50071,粪肠球菌ATCC 35667,大肠埃希菌(临床分离菌株)D1812;革兰氏阴性菌:表皮葡萄球菌ATCC 12228,铜绿假单胞菌CMCC(B)10104,变形杆菌CMCC(B)49027,肺炎克雷伯菌CMCC(B)46117。以上菌株均由山东中医药大学微生物教研室提供。

RAW 264.7细胞株(单核巨噬细胞)由山东省医学科学院微生物室提供。

### 1.4 动物

BALB/c小鼠,SPF级,雄雌各半,体质量(20±2)g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(鲁)20140007。

## 2 方法

### 2.1 安儿宁颗粒的体外抑菌试验

参考文献[8],采用微量稀释法进行试验。取“1.2”项下不含蔗糖的安儿宁颗粒样品,以生理盐水配制成100 mg/mL的药液,以一次性无菌0.22 μm微孔过滤器滤去杂质和细菌,备用。在96孔板每行的第1~8孔分别加入液体细菌培养基[MH(B)肉汤粉21 g,加入1 000 mL水中加热搅拌至溶解,121℃灭菌20 min,即得]100 μL;在第1孔中加入100 mg/mL的安儿宁颗粒药液100 μL,从第2~6孔依次对半稀释至最低质量浓度1.562 5 mg/mL,作为不同给药剂量组(剂量根据文献[8]方法制

定);在第7孔中加入质量浓度为0.4 mg/mL的庆大霉素药液(生理盐水配制)10  $\mu$ L,作为阳性对照组;然后在每行的第1~8孔中均分别加入“1.3”项下11种菌株(其中大肠埃希菌有2种来源菌株)的菌液( $1 \times 10^6$  CFU/mL,均以液体细菌培养基配制)10  $\mu$ L,第8孔作为阴性对照组;同时设置不含菌、只加入液体细菌培养基的空白对照组。将96孔板在37  $^{\circ}$ C条件下培养24 h,观察细菌的生长状况。每种细菌的每个浓度均设置3个复孔。

## 2.2 安儿宁颗粒的体外抗炎活性试验

2.2.1 安儿宁颗粒对巨噬细胞增殖的影响 参照文献[9-10]方法进行试验。取生长状态良好的RAW 264.7细胞,用10% RPMI 1640细胞培养基调整密度至 $1 \times 10^5$ 个/mL,按每孔100  $\mu$ L加入96孔板,然后每孔加入质量浓度为20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 mg/mL的安儿宁颗粒药液(取“1.2”项下不含蔗糖的安儿宁颗粒样品,以2% RPMI 1640维持液配制)100  $\mu$ L,作为不同给药剂量组(剂量根据文献[9-10]方法和预试验结果制定);同时设置加入等体积2% RPMI 1640维持液的空白对照组。将96孔板在37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养48 h后,每孔加入5 mg/mL的MTT溶液(以PBS配制)20  $\mu$ L,继续按上述条件培养4 h;弃去上清液,每孔加DMSO 150  $\mu$ L,于37  $^{\circ}$ C条件下采用酶标仪震荡10 min后,在492 nm波长处测定各孔光密度(OD)值,用以表示存活细胞数。每组均设置3个复孔。

2.2.2 安儿宁颗粒对LPS诱导巨噬细胞释放一氧化氮(NO)的影响 参照文献[11]方法进行试验。取生长状态良好的RAW 264.7细胞,按“2.2.1”项下方法设置安儿宁颗粒20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 mg/mL剂量组并加入相应药液;另设空白对照组和LPS模型组,均分别加入等体积2% RPMI 1640维持液;除空白对照组外,各给药剂量组和LPS模型组细胞均加入LPS溶液(以生理盐水配制,终质量浓度均为2  $\mu$ g/mL)。将96孔板在37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养48 h后,以Griess法<sup>[12]</sup>测定上清液OD值。以OD值为横坐标(x)、细胞中的亚硝酸根离子含量(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)为纵坐标(y),得标准曲线方程为 $y=45.685x^2+115.82x-5.1128$ ( $r=0.9998$ )。按标准曲线法计算各组细胞上清液中NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的含量,用以间接表示细胞释放的NO含量。按公式计算NO释放抑制率:抑制率(%)=[1-(给药组NO含量-空白对照组NO含量)/(模型组NO含量-空白对照组NO含量)] $\times$ 100%。每组均设置3个复孔。

## 2.3 安儿宁颗粒的体外免疫活性试验

参照文献[13]方法进行试验。

2.3.1 小鼠淋巴细胞的制备 取BALB/c小鼠,断颈脱臼处死后放入75%乙醇中浸泡2~3 min后转移至超净

工作台上,在无菌条件下切开其腹腔,剪去与脾脏相连的组织,取下脾脏,用钝头镊子在灭菌后的200目钢丝网上磨碎,用无菌PBS 2 mL冲洗。将含脾脏细胞的PBS冲洗液以800 r/min离心10 min;弃去上清液,向离心管中加入红细胞裂解液200  $\mu$ L,于冰上放置13 min,以涡旋震荡仪轻轻涡旋2次,再以800 r/min离心5 min;弃去上清液,加入红细胞裂解液100  $\mu$ L,再以800 r/min离心5 min;弃去上清液,将细胞以10% RPMI 1640细胞培养基重悬,计数并稀释至密度为 $1.5 \times 10^6$ 个/mL,备用。

2.3.2 安儿宁颗粒对小鼠淋巴细胞的影响 取“2.3.1”项下的脾脏淋巴细胞重悬液,用10% RPMI 1640细胞培养液稀释至密度为 $1.0 \times 10^5$ 个/mL,按每孔100  $\mu$ L加入96孔板,按“2.2.1”项下方法设置安儿宁颗粒不同给药剂量组并加入相应药液;同时设置加入等体积2% RPMI 1640维持液的空白对照组。将96孔板在37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养44 h后,按“2.2.1”项下“每孔加入5 mg/mL的MTT溶液(以PBS配制)……用以表示存活细胞数”步骤同法操作。每组均设置3个复孔。

## 2.4 统计学方法

采用SPSS 22.0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 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 安儿宁颗粒的体外抗菌活性

肉眼观察结果显示,阴性对照组孔培养基浑浊、细菌生长良好,阳性对照组孔培养基澄清、细菌生长不明显,空白对照组孔培养基澄清、细菌生长不明显,提示安儿宁颗粒对11种细菌均有抑制作用。安儿宁颗粒对伤寒沙门菌和大肠埃希菌(临床分离菌株)的最低抑菌浓度(MIC)为50 mg/mL,对粪肠球菌和蜡样芽孢杆菌的MIC为25 mg/mL,对变形杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌(标准菌株)、肺炎克雷伯菌和枯草芽孢杆菌的MIC为12.5 mg/mL,对表皮葡萄球菌和肺炎链球菌的MIC为6.25 mg/mL。安儿宁颗粒的体外抑菌活性检测结果见表1。

### 3.2 安儿宁颗粒的体外抗炎活性

3.2.1 安儿宁颗粒对RAW 264.7细胞增殖的影响 与空白对照组比较,安儿宁颗粒0.312 5、1.25 mg/mL剂量组细胞OD值未明显降低,表明此剂量对细胞无毒性;0.625 mg/mL剂量组OD值有一定升高,表明此剂量有促进细胞增殖的趋势,但差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。安儿宁颗粒对RAW 264.7细胞增殖的影响考察结果见表2(注:当安儿宁颗粒剂量 $\geq 2.5$  mg/mL时,药液颜色较深,干扰试验结果,略去)。

表1 安儿宁颗粒的体外抑菌活性(n=3)

Tab 1 Antibacterial activity of An'erning granule *in vitro* (n=3)

菌种	安儿宁颗粒剂量,mg/mL							达MIC时药物稀释度	MIC
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625		
伤寒沙门菌	-	-	+	+	+	+	+	2	50
大肠埃希菌(临床分离菌株)	-	-	+	+	+	+	+	2	50
铜绿假单胞菌	-	-	-	+	+	+	+	4	25
粪肠球菌	-	-	-	+	+	+	+	4	25
蜡样芽孢杆菌	-	-	-	+	+	+	+	4	25
变形杆菌	-	-	-	-	+	+	+	8	12.5
大肠埃希菌(标准菌株)	-	-	-	-	+	+	+	8	12.5
肺炎克雷伯菌	-	-	-	-	+	+	+	8	12.5
枯草芽孢杆菌	-	-	-	-	+	+	+	8	12.5
肺炎链球菌	-	-	-	-	-	+	+	16	6.25
表皮葡萄球菌	-	-	-	-	-	+	+	16	6.25

注：“+”表示培养基浑浊；“-”表示培养基澄清

Note: “+” means turbid culture medium; “-” means clear culture medium

表2 安儿宁颗粒对RAW 264.7细胞和小鼠脾脏细胞增殖的影响(n=3)

Tab 2 Effects of An'erning granule on the proliferation of RAW 264.7 cells and spleen lymphocyte of mice (n=3)

组别	剂量,mg/mL	OD值( $\bar{x} \pm s$ )	
		RAW264.7细胞	小鼠脾脏淋巴细胞
空白对照组		0.145 ± 0.013	0.217 ± 0.007
安儿宁颗粒给药组	1.25	0.148 ± 0.012	0.226 ± 0.019
	0.625	0.157 ± 0.009	0.240 ± 0.012 <sup>*</sup>
	0.3125	0.149 ± 0.012	0.237 ± 0.005 <sup>*</sup>

3.2.2 安儿宁颗粒对LPS诱导RAW 264.7细胞释放NO的影响 与空白对照组比较,LPS模型组细胞中NO含量显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明炎症模型成功建立;与模型组比较,安儿宁颗粒0.3125~1.25 mg/mL剂量组细胞中NO含量显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明上述剂量安儿宁颗粒均能抑制LPS诱导的RAW 264.7细胞释放NO,且NO释放抑制率呈剂量依赖趋势,提示其抗炎效果良好。安儿宁颗粒对LPS诱导RAW 264.7细胞释放NO的影响考察结果见表3。

### 3.3 安儿宁颗粒的体外免疫活性

与空白对照组比较,安儿宁颗粒0.3125、0.625 mg/mL剂量组细胞OD值显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),并呈剂量依赖趋势,表明此剂量能明显促进淋巴细胞增殖。安儿宁颗粒对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响考察结果见表2(注:当安儿宁颗粒剂量 $\geq 2.5$  mg/mL时,药液颜色较深,干扰试验结果,略去)。

## 4 讨论

表皮葡萄球菌滋生于人体的皮肤和阴道等,是导致医院交叉感染的主要细菌之一<sup>[14-15]</sup>。肺炎链球菌和肺炎

表3 安儿宁颗粒对LPS诱导RAW 264.7细胞释放NO的影响(n=3)

Tab 3 Effects of An'erning granule on the release of NO in LPS-induced RAW 264.7 cells (n=3)

组别	剂量,mg/mL	NO含量( $\bar{x} \pm s$ ), $\mu$ mol/mL	NO释放抑制率,%
空白对照组		1.154 ± 0.121	
LPS模型组		4.240 ± 0.256 <sup>*</sup>	
安儿宁颗粒给药组	1.25	1.235 ± 0.251 <sup>Δ</sup>	97.39
	0.625	2.893 ± 0.461 <sup>Δ</sup>	43.64
	0.3125	2.812 ± 0.070 <sup>Δ</sup>	46.29
	0.15625	3.912 ± 0.071	10.61

注:与空白对照组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与LPS模型组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; vs. LPS model group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

克雷伯菌均存在于呼吸道,可引起支气管炎、大叶性肺炎和脑膜炎等疾病,其中前者为革兰氏阳性球菌,对青霉素类抗生素的耐药现象目前极少,而后者为革兰氏阴性球菌,存在于呼吸道和肠道,其感染致死率较高<sup>[16]</sup>。粪肠球菌、大肠埃希菌和变形杆菌均可引起消化道感染,诱发各种疾病<sup>[17]</sup>。枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌及伤寒沙门菌易污染食物产生肠毒素,并导致食物中毒<sup>[18]</sup>。铜绿假单胞菌感染易引起败血症和菌血症,且具有高度耐药性,在烧伤后感染可能导致患者死亡<sup>[19]</sup>。本研究发现,安儿宁颗粒对上述多种临床常见细菌均具有一定抑制作用,表现出较好的广谱抗菌效果;根据MIC值结果可知,其对表皮葡萄球菌和肺炎链球菌具有相对较强的抑制作用,对大肠埃希菌(临床分离菌株)和伤寒沙门菌的抑制作用较弱。该颗粒剂的体内抗菌效果有待于进一步研究。

巨噬细胞是重要的免疫细胞,能对机体起到免疫防御、免疫监视、免疫调节和抗原呈递等作用,在免疫系统中发挥着重要作用<sup>[20]</sup>。活化后的巨噬细胞对多种肿瘤细胞均有杀灭作用,可通过释放NO、白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-12等因子诱导细胞免疫,杀灭病原体<sup>[21]</sup>。巨噬细胞主要通过释放NO发挥抗病原生物、杀伤病毒感染细胞和肿瘤细胞等作用:一方面,巨噬细胞能通过分泌NO,提高对各种病原体杀灭的效率;另一方面,其产生的过量NO可促进炎症发生,诱导炎症因子,如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6等的释放,从而启动炎症反应<sup>[9]</sup>。当巨噬细胞经LPS诱导活化后,会合成并释放大量炎症因子如NO,加重机体的炎症反应,对组织器官造成损伤<sup>[21]</sup>。因此,可采用LPS建立巨噬细胞炎症模型,并根据药物降低巨噬细胞中NO释放量的程度来反映药物的抗炎活性<sup>[10]</sup>。本研究发现,安儿宁颗粒在0.3125~1.25 mg/mL的剂量下对细胞中NO释放的抑制率达46.29%~97.39%,表明其能抑制LPS诱导巨噬细胞中NO的产生,具有一定的体外抗炎活性。

脾脏是哺乳动物最重要的外周免疫器官,脾细胞中含有有约40% T淋巴细胞和60% B淋巴细胞,是机体应对外界抗原入侵、进行免疫反应、产生相应抗体的重要器官,其主要参与体液免疫,在细胞免疫中也具有重要的作用<sup>[22]</sup>。有些免疫细胞激活物如LPS在体内外均可刺激脾脏中的B淋巴细胞增殖分化,刀豆蛋白或植物血凝素等在体内外可刺激脾脏中T淋巴细胞的增殖分化,进而增强机体的免疫应答能力,因此脾脏细胞的增殖情况可直接反映机体的免疫状态<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,安儿宁颗粒在0.625、0.312 5 mg/mL的剂量下作用于脾脏细胞后的OD值较空白对照组明显增高,表明该颗粒剂在一定剂量下可促进脾脏淋巴细胞的增殖,并呈现剂量依赖趋势,提示其具有增强机体免疫的作用。

综上所述,安儿宁颗粒在体外对临床常见的革兰氏阳性和革兰氏阴性致病菌均有一定的抑制作用,并具有抗炎和增强免疫的作用,在感染性疾病的治疗方面具有较好的前景,尚待进一步深入研究开发。

### 参考文献

[1] 佟德恩.急诊治疗上呼吸道感染临床用药分析[J].中国卫生产业,2013,10(23):10-11.

[2] 王兆霞.抗生素的使用情况调查及细菌耐药性分析[J].北方药学,2018,15(3):191.

[3] 许玲,吕书勤.扶正祛邪中药对急性呼吸窘迫综合征模型大鼠影响研究[J].实用中医药杂志,2009,25(3):141-142.

[4] 刘宪勇,付加雷,王丽娥,等.安儿宁颗粒治疗小儿上呼吸道感染108例疗效观察[J].山东医药,2009,49(15):79.

[5] 王海莘.安儿宁颗粒药理作用及临床应用[J].中国中医药现代远程教育,2014,12(3):160-161.

[6] 宋艳芹,杜源,孙雪,等.安儿宁颗粒解热抗炎镇痛作用[J].医药导报,2013,10(32):1300-1302.

[7] 扈晓佳,殷莎,袁婷婷,等.红花的化学成分及其药理活性研究进展[J].药学实践杂志,2013,31(3):161-169.

[8] 王新红,殷丽,魏娟,等.西吡氯铵漱口液对铜绿假单胞菌和MRSA的抗菌活性研究[J].现代医药卫生,2015,31(9):1389-1391.

[9] 孟庆然.酸浆宿萼总皂苷对巨噬细胞炎症反应的调控作用[D].晋中:山西农业大学,2014.

[10] 房雷雷,赵肖通,张彦青,等.姬松茸多糖诱导巨噬细胞释

放NO的机制[J].食品与机械,2018,34(5):16-19.

[11] 刘鹏飞,朱伟,万进,等.人参多糖对LPS诱导小鼠巨噬细胞炎症因子生成的抑制作用及其机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(14):102-107.

[12] 于红红,吴玛莉,张智伟,等.黄连解毒汤含药血清对脂多糖诱导的巨噬细胞炎症因子影响研究[J].亚太传统医药,2016,12(14):11-13.

[13] 张艳.溪黄草提取物的免疫活性筛选及其有效单体成分的免疫抑制机理研究[D].上海:华东理工大学,2006.

[14] 曹晓光.临床分离表皮葡萄球菌的耐药性分析及与icaD基因表达关系的研究[D].合肥:安徽医科大学,2012.

[15] 席晓霞.初生婴儿肠道菌群与母体各部位菌群相关性研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2017.

[16] HAQUE NZ, ZUNIGA LC, PEYRANI P, et al. Relationship of vancomycin minimum inhibitory concentration to mortality in patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureushospital-acquired, ventilator-associated, or health-care-associated pneumonia[J]. Chest, 2010, 138(6):1356-1362.

[17] 刘百祥,黄旭,宾琳,等.试管中椒艾合剂对常见肠道感染菌的抑制作用[J].中医药导报,2006,12(3):9-10,21.

[18] 张颖颖,付业佩,王萍.罗勒多糖抗菌作用研究[J].山东化工,2017,46(20):6-7.

[19] 王文晶,黄茂,赵旺胜,等.下呼吸道感染铜绿假单胞菌流行和耐药现状分析[J].实用临床医药杂志,2006,10(3):33-36.

[20] MULLINS DW, WALKER TM, BURGER CJ, et al. Taxo-lmediated changes in fibrosarcoma-induced immune cell function: modulation of antitumor activities[J]. Cancer Immunol Immunother, 1997, 45(1):20-28.

[21] 李敏,刘耕陶.双环醇对脂多糖诱导巨噬细胞iNOS蛋白的表达和NF-κB活化的抑制作用[J].中国药理学通报,2006,22(12):1438-1443.

[22] 陈星星,李焰,杨小燕,等.铁皮石斛对免疫抑制模型小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖的影响[J].中国兽医杂志,2018,54(4):100-103.

[23] 林志.药物免疫毒性评价关键技术的研究[D].北京:北京中医药大学,2013.

(收稿日期:2018-12-28 修回日期:2019-07-02)

(编辑:段思怡)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅