

● 实验研究 ●

月华丸(胶囊)及其拆方对巨噬细胞增殖影响的研究

宁尚圣¹, 伍参荣¹, 欧阳建军¹, 王 茜¹, 邹俊驹¹, 陈国茜², 刘婷婷¹

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208; 2. 广州中医药大学, 广东 广州, 510403)

[摘要] 目的: 研究月华丸(胶囊)对小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)活性的影响, 为后续研究月华丸(胶囊)对耐多药结核分支杆菌感染细胞自噬的影响提供前期实验基础。方法: 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 用 10% 胎牛血清培养制成的细胞悬液加入 96 孔培养板中培养。分别采用终浓度为 1.25g/mL、0.63g/mL、0.32g/mL、0.16g/mL、0.125g/mL、0.063g/mL、0.032g/mL、0.016g/mL 不含阿胶的月华丸(胶囊)以及相同浓度梯度含阿胶的月华丸(胶囊)处理 RAW264.7 细胞, 并设不加药的对照组。以 4-甲偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞存活情况。结果: (1) 不含阿胶的月华丸(胶囊)在 1.25g/mL、0.63g/mL 浓度时对 RAW264.7 细胞增殖抑制率明显升高, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 表明不含阿胶的月华丸(胶囊)高浓度对巨噬细胞的增殖有一定的抑制作用。(2) 含阿胶的月华丸(胶囊)对 RAW264.7 细胞增殖率明显升高, 各浓度组与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 提示含阿胶的月华丸(胶囊)对巨噬细胞的增殖有明显促进作用。(3) 浓度为 0.32g/mL 的含阿胶月华丸(胶囊)对 RAW264.7 细胞增殖率最高, 为最佳促细胞增长药液浓度。结论: 月华丸(胶囊)能提高巨噬细胞的活力, 增强巨噬细胞的增殖。

[关键词] 月华丸(胶囊); 单核巨噬细胞; 细胞增殖; MTT; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.09.070

Effect of Yuehua Pill(capsules) and its decomposed formulas on the proliferation of macrophages

NING Shang - sheng¹, WU Can - rong¹, OUYANG Jian - jun¹,WANG - Qian¹, ZOU Jun - ju¹, CHEN Guo - qian², LIU Ting - ting¹

1. Hunan University of Traditional Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. Guangzhou University of Traditional Medicine, Guangzhou 510403, Guangdong, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Yuehua pills/capsules on the viability of mouse mononuclear macrophages (RAW264.7), and to provide a preliminary experimental basis for the research on the effect of Yuehua pills/capsules on the autophagy of cells with multidrug - resistant Mycobacterium tuberculosis infection. Methods: RAW264.7 cells in the logarithmic growth phase were selected, and cell suspension was prepared with 10% fetal bovine serum and then cultured in a 96 - well plate. RAW264.7 cells were treated with Yuehua pills/capsules with or without donkey - hide gelatin at a final concentration of 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0.125, 0.063, 0.032, and 0.016g/mL, respectively, and a control group with untreated cells was established. MTT assay was used to measure cell viability. Results: Yuehua pills/capsules without donkey - hide gelatin had a significant increase in the inhibition rate of RAW264.7 cell proliferation at a concentration of 1.25 and 0.63 g/ml, and there was a significant difference between these two concentration groups and the control group ($P < 0.05$), suggesting that Yuehua pills/capsules without donkey - hide gelatin at a high concentration had a certain inhibitory effect on the proliferation of macrophages. Yuehua pills/capsules with donkey - hide gelatin had a significant increase in the inhibition rate of RAW264.7 cell proliferation and there was a significant difference between each concentration group and the control group ($P < 0.05$), suggesting that Yuehua pills/capsules with donkey - hide gelatin significantly promoted the proliferation of macrophages. RAW264.7 cells treated with Yuehua pills/capsules with donkey - hide gelatin at a

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81470192); 湖南省教育厅科学研究重点项目(编号: 13A065); 湖南省重点学科开发基金项目(编号: 4982 - 0009005)

第一作者: 宁尚圣, 男, 2013 级本硕连读研究生, 研究方向: 针灸推拿学

通讯作者: 欧阳建军, 女, 医学硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 经方名方配伍及其作用机制研究, E-mail: 13469072760@163.com

concentration of 0.32g/mL had the highest proliferation rate, suggesting that this was the optimal concentration for cell growth promotion. Conclusion: Yuehua pills/capsules can increase the viability of macrophages and promote their proliferation.

Key words: Yuehua pill/capsule; mononuclear macrophage; cell proliferation; MTT assay; experimental study

肺结核是指由肺部感染结核分枝杆菌(MTB)引发的慢性传染病,具有感染性强的特点^[1]。因易产生耐药,故结核病化疗药物需联合应用,因此带来极大的毒副作用^[2]。本病属中医学“肺癆”范畴,系体内正气虚弱,肺脏因感染癆虫并被其侵蚀所致^[3],亦有倡“癆瘵”病机主阴虚之说^[4]。月华丸功能滋阴润肺、宁嗽杀虫^[5],为治疗肺癆之传统要方,改革制剂为胶囊便于临床运用,称月华胶囊。

MTB是兼性胞内微生物,常寄生于宿主巨噬细胞内,感染机体后可在巨噬细胞内长期存活,巨噬细胞自噬在抗结核感染中发挥重要作用^[6-7]。本实验以小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)为研究对象,采用4-甲偶氮唑蓝(MTT)法观察月华丸(胶囊)对巨噬细胞增殖的影响,为后续月华丸(胶囊)对耐药药结核菌感染细胞自噬影响的研究提供前期实验基础和依据。

1 实验材料

1.1 月华丸(胶囊)及其拆方药物制备 月华丸(胶囊)全方由14味组成,即天门冬30g、生地黄30g、麦冬30g、熟地黄30g、山药30g、百部30g、沙参30g、川贝母30g、阿胶30g、茯苓15g、三七15g、白及15g、白菊花60g、桑叶60g。月华丸(胶囊)拆方即全方减阿胶。所有中药饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院。将饮片除阿胶外洗净,依原方煎法以桑叶、菊花水煎3次,合并煎液;余药加适量水浸泡12h,以水和桑叶、菊花煎液为溶剂分别煎煮3次,第1次3h,第2次2h,第3次1h。合并煎液,滤过,于水浴锅浓缩至药液用玻璃棒挑起呈“挂旗状”。月华丸(胶囊)全方将隔水炖化好的阿胶放入药液中混匀;月华丸(胶囊)拆方不加入阿胶。分别继续搅拌浓缩,冷冻干燥至含生药2.45g/mL、2.23g/mL,4℃储存备用。为便于临床运用可继续冷冻干燥至固化,粉碎不加辅料装入胶囊,即成月华胶囊。

1.2 细胞株 小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)源自ATCC,由中南大学提供。

1.3 主要试剂 DMEM培养液、胰蛋白酶、胎牛血清(美国Gibco公司);MTT、DMSO(美国Sigma公司);PBS缓冲液(北京华迈科生物技术有限公司)。

1.4 仪器与设备 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱(美国REVC公司);生物净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);4℃冰箱(青岛海尔股份有限公司);全自动型酶联免疫检测仪(美国生物技术仪器公司);低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂);一次性0.22μm除菌滤膜、封口膜,一次性使用无菌配药用注射器、冻存管、离心管、巴氏管、无粉乳胶手套,一次性塑料培养瓶、96孔板(长沙赛晶生物技术公司)。

2 实验方法

2.1 月华丸(胶囊)及其拆方不同浓度药液制备 分别取前述制备好的月华丸(胶囊)全方、月华丸(胶囊)拆方药物,用含10%的胎牛血清的培养基稀释,以一次性0.22μm除菌滤膜除菌。在前期预备实验的基础上,选定1.25g/mL、

0.125g/mL 2个浓度,按倍比稀释法,分别将全方、拆方配制出最终浓度为1.25g/mL、0.63g/mL、0.32g/mL、0.16g/mL、0.125g/mL、0.063g/mL、0.032g/mL、0.016g/mL的药液。

2.2 细胞培养及分组 将RAW264.7细胞株接种在装有适量培养液的培养瓶中,置于37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,细胞呈贴壁生长。每1~2d换液1次,3~5d后细胞融合至85%~90%时,以0.25%胰蛋白酶进行传代,取对数生长期细胞进行实验。将细胞分为月华丸(胶囊)全方组、月华丸(胶囊)去阿胶拆方组;每组细胞又分别设8个不同的浓度。并设不加药物的对照组。

2.3 月华丸(胶囊)及其拆方对细胞增殖的影响 运用MTT法检测月华丸(胶囊)及其拆方药液对RAW264.7细胞活性的反应,了解其对细胞增殖的影响。方法:将细胞悬液接种于96孔培养板,每孔100μL,含1×10⁴个细胞,置于37℃、5% CO₂ 培养箱中,24h待细胞贴壁后小心吸出各孔内培养液,PBS冲洗2次,吸出PBS液,分别加入上述全方、拆方不同浓度药液100μL,使2组药物终浓度分别为1.25g/mL、0.63g/mL、0.32g/mL、0.16g/mL和0.125g/mL、0.063g/mL、0.032g/mL、0.012g/mL,每组每个浓度设3个复孔,并分别设不加药物的对照组(含10%胎牛血清的培养基+细胞)和空白组(含10%胎牛血清的培养基)。培养48h后,吸出孔内液体,PBS冲洗2次,吸出PBS液,并于每孔加入10μL MTT(5mg/mL),继续培养4h后,吸弃原液体,每孔中加入100μL二甲基亚砜(DMSO),置摇床上低速振荡10min,使结晶物充分溶解。

2.4 观察指标 倒置显微镜下观察给药前后细胞生长及形态的变化。于酶联免疫检测仪490nm波长处检测吸光度(OD值),以OD值表示细胞存活状态,计算细胞增殖抑制率、细胞增殖率。实验重复3次,取平均值。细胞增殖抑制率计算方法:月华丸(胶囊)去阿胶拆方组细胞增殖抑制率=(1-OD值_{药物组}/OD值_{对照组})×100%;月华丸(胶囊)全方组细胞增殖率=(OD值_{药物组}-OD值_{对照组})/OD值_{对照组}×100%。

2.5 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析的Dunnett T检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 月华丸(胶囊)及其拆方对细胞的生长及形态变化的影响 倒置显微镜下观察,给药前可见细胞生长状态良好,紧贴瓶壁,逐渐变大,呈棱形或多角形。给药后48h,与阴性对照组比较:月华丸(胶囊)无阿胶拆方组药物达到一定的浓度时,细胞出现贴壁能力下降,影响细胞数量的增加,随着药物浓度的稀释,对细胞贴壁能力的影响也越来越小;月华丸(胶囊)全方组各个浓度的细胞,均出现细胞间隙变小,数量增多,细胞生长增快的现象。

3.2 月华丸(胶囊)及其拆方对细胞增殖的影响 (1)从表1、图1可以看出,与对照组比较,不含阿胶的月华丸(胶囊)拆方药液对RAW264.7增殖抑制率均有所升高,当浓度

达到 0.63g/mL、1.25g/mL 时升高明显,差异有统计学意义;增殖抑制率随浓度的稀释而降低。当药液浓度为 0.125g/mL 时,细胞增殖抑制率最低。表明不含阿胶的月华丸(胶囊)拆方药液对 RAW264.7 的增殖高浓度时有一定的抑制作用。

(2)从表 2、图 2 可以看出,与对照组比较,含阿胶的月华丸(胶囊)全方 1.25g/mL、0.63g/mL、0.32g/mL、0.16g/mL 和 0.125g/mL、0.063g/mL、0.032g/mL、0.012g/mL 各浓度药液均能使 RAW264.7 增殖率升高,差异均有统计学意义,其中以 0.32g/mL 浓度差异最明显,表明月华丸(胶囊)全方各浓度药液均能明显地促进小鼠单核巨噬细胞的生长,提高细胞的存活率,以 0.32g/mL 的药液浓度为最佳。

表 1 不含阿胶月华丸(胶囊)拆方不同药液浓度细胞抑制率

浓度(g/mL)	抑制率(%)
1.25	14 ^a
0.63	10 ^a
0.32	5
0.16	3
0.125	2
0.063	3
0.032	3
0.016	4
对照组	—

注:与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

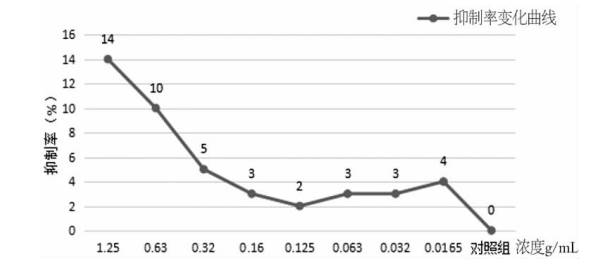


图 1 抑制率变化曲线

表 2 月华丸(胶囊)不同药液浓度细胞促增殖率

浓度(g/mL)	促增殖率(%)
1.25	14 ^a
0.63	15 ^a
0.32	19 ^b
0.16	18 ^a
0.125	14 ^a
0.063	13 ^a
0.032	15 ^a
0.016	16 ^a
对照组	—

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

4 讨 论

肺结核是我国重点控制的疾病^[8],世界范围内结核病的发病率越来越高,据第 4 次 WHO 结核病耐药监测报告显示,已有近 900 万人患结核病,而其中我国的结核病患病率成为世界范围内负担最重的国家之一^[9-10]。

近年来,耐多药菌株和高耐药率结核杆菌使得难治性

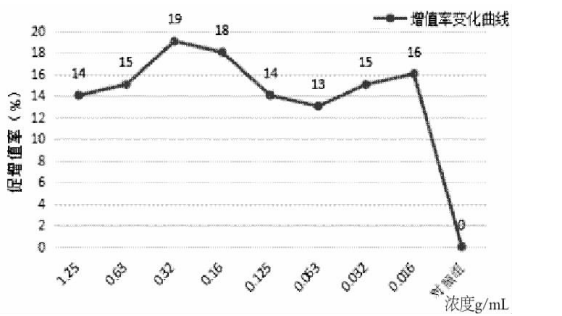


图 2 促增殖率变化曲线

肺结核迅速增多。西药“全程联合”化疗模式的肝毒性致命弱点,使得西药治疗肺结核受到局限,中医药治疗结核病成为关注的热点^[11]。

月华丸为清代名医程钟龄所制,“月华”,古人指月亮或月亮周围的光环。因肺属阴,为五藏之华盖,犹如月亮之光彩华美,故名“月华丸”。方由天门冬、麦冬、熟地黄、生地黄、山药、百部、沙参、川贝母、阿胶各一两,茯苓、獭肝、广三七各五钱,白菊花、桑叶各二两组成,为治疗肺癆之要方。方中麦冬、天门冬、生地黄、熟地黄滋阴补虚,肺肾同补,金水相生,四药相配为君;沙参养阴清肺,阿胶润燥止血,川贝母止咳化痰,三药合用为臣;獭肝、百部杀“癆虫”,茯苓、山药健脾以培土生金,三七止活血化瘀,五药共用为佐;桑叶、菊花清肺止咳,并引诸药到达病所,为佐使之用。诸药合用,共奏滋阴润燥、宁嗽止血、杀虫护肺之效^[5]。因獭肝缺乏药源,我们代之以白及并改制剂为胶囊,称月华胶囊。本方所具有滋阴杀虫的作用,体现了“一则杀其虫以绝其根本,一则补其虚以复其真元”的中医治癆原则。月华丸相比其他同类方剂滋补养阴之力强,又因其效用兼全,力量大,且独具有杀癆虫之功,故为治结核的特效方^[12-13]。

细胞作为 MTB 感染人体后的主要寄居场所,在抗 MTB 感染免疫中发挥着重要作用^[14]。自噬是巨噬细胞执行免疫防御的重要手段,因自噬可降解胞质蛋白如核糖体蛋白、泛素等,产生一些新的抗菌肽,杀伤结核分枝杆菌的活性^[15]。故巨噬细胞通过自噬可杀灭 MTB^[16]。

本实验通过观察月华丸(胶囊)全方及其不含阿胶拆方对小鼠单核巨噬(RAW264.7)细胞活性的影响,以了解其对细胞生长的作用,从细胞水平研究月华丸(胶囊)对耐多药结核菌感染巨噬细胞自噬的影响,从抗结核免疫方面探讨其治肺结核的作用机制,摸索细胞作用的最佳有效药物浓度。结果发现,不含阿胶的月华丸(胶囊)拆方药液在一定浓度范围内对单核巨噬细胞的增殖抑制率有一定的升高,并呈浓度依赖,说明不含阿胶的月华丸(胶囊)拆方药液在高浓度时对巨噬细胞的生长有一定的抑制作用。含阿胶的月华丸(胶囊)全方药液,各个浓度所表现的细胞增殖率有明显升高,说明含阿胶的月华丸(胶囊)能促进单核细胞的生长。提示月华丸(胶囊)能促进巨噬细胞的增殖,增强巨噬细胞的活力。这一结果一方面以现代研究方法论证了月华丸(胶囊)配入阿胶组方配伍的合理性,阿胶甘平,为“血肉有情之品”,善补血滋阴,体现了“精不足者,补之有味”的中医补虚原则;另一方面表明月华丸(胶囊)滋阴杀虫治肺癆的作用机制可能与其能增强巨噬细胞的活力、提高细胞的吞噬能力有关;

槲皮素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞体外增殖与凋亡的影响

孙南阳¹, 符芳姿², 谭江波³

- (1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙, 410005;
2. 中南大学湘雅医学院附属海口医院, 海南 海口, 570208;
3. 湖南师范大学附属湘东医院, 湖南 株洲, 412200)

[摘要] 目的: 观察槲皮素对人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和凋亡的影响。方法: 不同浓度的槲皮素作用于体外培养的 MG-63 细胞, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测槲皮素对 MG-63 细胞增殖的抑制能力, 流式细胞术 (FCM) 检测槲皮素对 MG-63 细胞凋亡的影响。结果: 槲皮素可显著抑制 MG-63 细胞增殖, 具有明显剂量和时间依赖性; 槲皮素可明显诱导 MG-63 细胞凋亡。结论: 槲皮素能够抑制 MG-63 细胞增殖, 诱导 MG-63 细胞凋亡。

[关键词] 槲皮素; 人成骨肉瘤 MG-63 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.09.071

Effect of quercetin on in vitro proliferation and apoptosis of human osteosarcoma MG-63 cells

SUN Nan-yang¹, FU Fang-zi², TAN Jiang-bo³

- (1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China;
2. Haikou Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, Hainan, China;
3. Xiangdong Hospital Affiliated to Hunan Normal University, Zhuzhou 412200, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of quercetin on in vitro proliferation and apoptosis of human osteosarcoma MG-63 cells. Methods: Different concentrations of quercetin were used for in vitro culture of MG-63 cells. MTT assay was used to assess the inhibitory effect of quercetin on the proliferation of MG-63 cells, and flow cytometry was used to evaluate the effect of quercetin on the apoptosis of MG-63 cells. Results: Quercetin significantly inhibited the proliferation of MG-63 cells in a dose- and time-dependent manner. It also induced the

同时本研究也为后续探讨月华丸 (胶囊) 是否通过影响巨噬细胞的自噬发挥抗结核的作用提供了一定的前期实验支撑, 其具体机制和可能途径还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吴恩强, 陈江平, 池宏亮. 我国肺结核患者治疗效果的影响因素分析[J]. 临床合理用药, 2016, 9(11A): 111-112.
- [2] 李文红, 王芳, 付莹, 等. 肺结核药物性肝损伤的相关因素分析[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(11): 2097-2100.
- [3] 苏建华, 屠德华, 刘剑君. X 线片检查对考核肺病六个月短程化疗效果的评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 18(3): 173-174.
- [4] 张伯礼, 薛博瑜. 中医内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 56.
- [5] 李飞. 方剂学 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 936.
- [6] 胡东, 王婉, 赵润鹏, 等. 结核分枝杆菌分泌性酸性磷酸酶 (SapM) 抑制小鼠巨噬细胞自噬[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(6): 726-729.
- [7] 秦欢, 高绍莹, 袁建波, 等. 结核分枝杆菌小分子热休克蛋白 16.3 蛋白的原核表达及功能检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(5): 480-484.

- [8] 郑钰晖. 中医药治疗肺结核的研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 29(9): 98-99.
- [9] 万轲. 左氧氟沙星和利福平治疗初治肺结核的临床疗效比较[J]. 中国医学创新, 2012, 9(23): 51-52.
- [10] 杨彩娥, 王琰, 雷红, 等. 结核分枝杆菌利福平依赖株与耐药株的耐药状况比较[J]. 中国防痨通讯, 2011, 33(3): 163-165.
- [11] 钱继伟. 肺结核中医治疗研究进展[J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2011, 28(1): 71-73.
- [12] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 219.
- [13] 许济群, 王绵之. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 28.
- [14] 孟繁荣, 谢贝, 刘志辉. 巨噬细胞对结核分枝杆菌免疫反应的研究进展[J]. 现代医院, 2013, 13(12): 10-13.
- [15] Ponpuak M, Deretic V. Autophagy and p62/sequestosome 1 generate neo-antimicrobial peptides (cryptides) from cytosolic proteins[J]. Autophagy, 2011, 7(3): 336-337.
- [16] 胡少婷, 李升锦, 黄秦. 髓样分化因子 88 抑制剂 ST2825 对重组耻垢分枝杆菌感染 THP-1 细胞自噬的影响[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(6): 562-564, 572.

(收稿日期: 2018-03-26)

第一作者: 孙南阳, 男, 医学硕士, 医师, 研究方向: 骨科疾病的中医药防治

通讯作者: 谭江波, 男, 硕士研究生在读, 主治医师, 研究方向: 恶性肿瘤的中医药防治