

异功散对脂多糖介导的小鼠铁代谢紊乱的影响

郑 秦¹, 管 宇¹, 王志成², 王健英³, 浦益琼³, 王国华¹,
张晓峰¹, 夏 菁¹, 崔乐乐⁴, 罗梅宏^{4*}

(1. 上海中医药大学附属上海市中医医院, 上海市闸北区芷江中路 274 号, 200071; 2. 复旦大学附属华山医院; 3. 上海中医药大学药学院; 4. 上海中医药大学附属曙光医院宝山分院)

摘要 目的 探讨异功散对炎症诱发的铁代谢紊乱的影响。方法 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为空白对照组、异功散组、脂多糖组、异功散加脂多糖组, 每组 10 只。异功散组、异功散加脂多糖组给予异功散灌胃 10.57 g/(kg·d), 空白对照组每只灌胃 0.2 ml 超纯水, 各组均连续灌胃 7 天。第 8 天, 脂多糖组和异功散加脂多糖组腹腔注射脂多糖 1.5 mg/kg 建立铁代谢紊乱模型, 6h 后处死所有小鼠。检测血常规、血清铁和肝组织铁含量、血清和肝组织白细胞介素 6 (IL-6) 含量。结果 各组小鼠血常规无明显变化, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与空白对照组比较, 脂多糖组小鼠血清铁降低, 肝组织铁和血清、肝组织 IL-6 均明显上升 ($P<0.05$), 而异功散组加脂多糖组较脂多糖组肝组织铁、血清和肝组织 IL-6 均明显下降 ($P<0.05$)。结论 异功散可改善脂多糖介导的急性炎症条件下的铁代谢紊乱, 其机制可能与降低血清和肝组织 IL-6 有关。

关键词 异功散; 脂多糖; 铁代谢紊乱; 急性炎症

炎症反应参与许多疾病的发生、发展, 包括感染性疾病、非感染性疾病, 甚至老化等。长期慢性炎症反应会引起铁代谢紊乱, 进而发展为炎性贫血即慢性病贫血, 并且以住院患者最常见, 其以血清铁的降低、储存铁升高为特点^[1]。目前认为, 慢性病贫血铁代谢紊乱与肝源性杀菌蛋白密切相关^[2]。中医学认为, 脾为后天之本, 气血生化之源, 若脾失健运, 小肠的铁吸收减少, 脾不升清, 铁不能正常分布, 或不能布散于骨髓, 或贮存之铁不能被转运至造血器官而过多聚集于肝、脾, 最终至铁动态平衡紊乱。我们认为, 铁吸收减少、分布异常的发病机制, 与脾失健运、脾不散精、水谷精微输布异常的理论相符合, 因此临床应以“运脾”立法^[3]。异功散补而不滞、补中有行, 为运脾立法的代表性方剂, 故选用异功散为干预手段, 观察“运脾法”对炎症介导的铁代谢紊乱的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 40 只, 6 周龄, 体重 (17 ± 2) g, 购自上海市西普尔-必凯实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。

1.2 主要试剂和仪器

脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司, 批号: L3129); 蛋白酶抑制剂 (美国 Santa Cruz 公司, 批号: SC-3595); 铁检测试剂盒 (美国 Pointe Scientific 公司, 批号: MI48188); 小鼠白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (美国 R&D Systems 公司, 批号: M6000B)。BAY120 型全自动细胞计数仪 (德国西门子公司); WX-4000 型微波消解仪 (上海屹光分析仪器有限公司); Nano Drop200 型微量紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司)。

1.3 药物

异功散组成: 生晒参 40g (产地: 吉林, 上海青浦中药饮片有限公司, 批号: 20111009), 炒白术 40g (产地: 浙江, 上海康桥饮片厂, 批号: 120402), 茯苓 (去皮) 40g (产地: 安徽, 上海康

基金项目: 国家自然科学基金 (81102569); 上海市卫生和计划生育委员会科研项目 (201440587)

* 通讯作者: lmh021009@163.com, 13585703963

桥饮片厂,批号:120405),炙甘草 40 g (产地:新疆,上海信德中药饮片厂,批号:XD1211201),陈皮 40 g (产地:浙江,上海雷允上中药饮片厂,批号:12020325)。上述药物水煎、浓缩,60℃真空加压干燥,粉碎成 100 目粉,1 g 干粉相当于 4.1 g 生药,由上海中医药大学药学院制备,常温干燥保存。

1.4 动物分组及处理方法

40 只小鼠按随机数字表法分为空白对照组、异功散组、脂多糖组、异功散加脂多糖组,每组 10 只。异功散组、异功散加脂多糖组给药剂量按照人和小鼠间体表面积折算^[8]的等效剂量估算为 10.57 g/(kg·d),将粉末状的中药配置终浓度为 1.057 g/ml 的水溶液,按 0.01 ml/g 灌胃。空白对照组每只小鼠灌胃 0.2 ml 超纯水,各组均连续灌胃 7 天。第 8 天,脂多糖组和异功散加脂多糖组腹腔注射 LPS 1.5 mg/kg 建立铁代谢紊乱模型^[9],6 h 后处死,其余两组同时处死,采集标本。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 血常规 经眼眶后静脉丛采集约 400 μl 全血于 EDTA 处理的微量采血管内,送至上海市食品药品管理研究所药理毒理实验室检测,使用动物专用自动细胞计数仪检测红细胞(RBC)计数、血红蛋白(Hb)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)。

1.5.2 血清铁 经眼眶后静脉丛采集全血约 200 μl,3000 r/min 离心 25 min,4℃ 分离血清,约 40 μl。依照试剂说明书先将 50 μl 铁缓冲液加入 96 孔板,再加标准品及待测样本 10 μl,设 3 复孔,同时设空白孔,使用微量紫外分光光度计读取 A1 值(波长 560 nm);再加入 1 μl 铁显色剂于各孔中,37℃、10 min 使用微量紫外分光光度计读取 A2 值(波长 560 nm)。按如下公式计算血清铁含量:血清铁 = 500 × (A2 标本 - A1 标本) / (A2 标准品 - A1 标准品)。

1.5.3 肝组织铁 取 100 ~ 200 mg 肝组织,放入 1.5 ml 离心管中,向每个离心管中加硝酸溶液 1 ml 震荡混匀;放入微波消解仪消解组织后,用硝酸将

溶液定容到 1.5 ml;12000 r/min 离心,3 min。将标准品及待测样本加样于 96 孔板,设 3 复孔,同时设空白孔和校样孔,加入工作液;室温孵育 10 min 后,微量紫外分光光度计读取 OD 值(波长 535 nm)。按公式计算组织铁含量:组织铁 = [(At - Ab) × Fes × (Vt + 0.75W) × (1 + Ve)] / [(As - Ab) × W × Ve × 1.1],At = 样本吸光度;Ab = 空白孔吸光度;As = 标准品吸光度;Fes = 标准品铁含量(μg);W = 组织克重;Vt = 加入组织标本的酸体积(ml);Ve = 酸萃取物体积(ml)。

1.5.4 血清及肝组织 IL-6 含量 制备肝组织匀浆:取 100 mg 肝组织,在含有 1 ml 蛋白酶抑制剂的溶液中匀浆后,3000 r/min、15 min,4℃ 离心,取上清。血清制备同前。微量紫外分光光度计读取 OD 值(波长 450 nm,校正波长为 540 nm 或 570 nm),根据标准品的浓度及其 OD 值作出标准曲线,再依据标准曲线算出样本中 IL-6 的含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理,计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,方差齐的采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验;方差不齐采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血常规指标比较

表 1 示,各组小鼠 RBC、Hb、HCT、MCV 均无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠血清铁和肝组织铁水平比较

表 2 示,与空白对照组比较,脂多糖组血清铁降低、肝组织铁升高($P < 0.05$);与脂多糖组比较,异功散加脂多糖组血清铁升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),肝组织铁降低($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠肝组织及血清 IL-6 含量比较

表 3 示,与空白对照组比较,脂多糖组血清和肝脏组织 IL-6 含量明显升高($P < 0.05$);与脂多糖组比较,异功散加脂多糖组肝脏组织和血清 IL-6 明显降低($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠血常规指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	HCT (%)	MCV (fL)
空白对照组	8	9.07 ± 0.25	13.60 ± 0.52	50.62 ± 2.51	55.82 ± 2.80
脂多糖组	8	8.93 ± 0.48	13.02 ± 1.78	48.48 ± 1.95	54.33 ± 1.29
异功散组	8	8.98 ± 0.27	11.60 ± 3.86	50.13 ± 1.81	55.87 ± 1.33
异功散加脂多糖组	8	8.81 ± 0.63	13.25 ± 0.71	48.41 ± 3.30	55.01 ± 1.91

注:RBC,红细胞;Hb,血红蛋白;HCT,红细胞压积;MCV,平均红细胞体积

表 2 各组小鼠血清铁和肝组织铁水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血清铁 ($\mu\text{g/dl}$)	肝组织铁 ($\text{mg}/100\text{g}$)
空白对照组	298.3205 $\pm$ 21.4781 (6)	5.6383 $\pm$ 0.7949 (10)
脂多糖组	86.1396 $\pm$ 12.3560* (6)	7.2818 $\pm$ 0.8381* (10)
异功散组	271.2629 $\pm$ 61.2883 (6)	6.4515 $\pm$ 1.8762 (10)
异功散加脂多糖组	94.8213 $\pm$ 17.3082 (6)	5.7112 $\pm$ 0.7663 $^{\Delta}$ (10)

注: () 内为鼠数; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与脂多糖组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组小鼠肝组织和血清 IL-6 水平比较 (pg/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肝组织 IL-6	血清 IL-6
空白对照组	8	69.1043 $\pm$ 5.2285	225.6758 $\pm$ 14.8473
脂多糖组	8	264.1195 $\pm$ 230.3933*	1270.4734 $\pm$ 298.5601*
异功散组	8	103.5843 $\pm$ 34.4884	253.5974 $\pm$ 28.5176
异功散加脂多糖组	8	70.3190 $\pm$ 15.8199 $^{\Delta}$	747.2480 $\pm$ 84.9043 $^{\Delta}$

注: IL-6, 白细胞介素 6; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与脂多糖组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

铁是生命体必不可少的元素, 是人体的精微物质, 机体内存在严格的铁稳态调节机制, 以维持细胞和组织器官铁水平的相对稳定^[1]。我们认为, 铁吸收在小肠, 循环不息于肝、脾、骨髓之间, 此化生、转运、转化和代谢过程有赖于脾的运化和升清功能。若脾失健运, 小肠不能“受盛”“化物”“泌别清浊”, 则铁吸收减少, 脾亦无物质来“变化而赤”, 即可出现贫血。另外, 铁在肝、脾、骨髓间的循环乃脾之散精的结果。若脾不升清, 则铁不能正常分布, 或不能布散于骨髓, 或贮存之铁不能被转运至造血器官而过多聚集于肝、脾, 最终至铁动态平衡紊乱, 出现面色苍白、神疲、心悸、乏力之血虚症。运脾法属于汗吐下和消清温补“八法”中的和法, “补中寓消, 消中有补, 补不碍滞, 消不伤正”。健脾者旨在运脾, 欲使脾健则不在补而贵在运。异功散记载于《小儿药证直诀》, 功用补气健脾、行气化滞。此方由四君子汤加味而成, 方中“参、术、苓、草, 甘温益胃, 有健运之功, 具冲和之德”(《名医方论》), 加陈皮意在行气化滞, 醒脾助运, 有补而不滞、补中有行的优点, 当为运脾立法之良方。

IL-6 是肝细胞急性炎症的主要调节因子, 在炎症刺激情况下, IL-6 释放并与 IL-6 受体 α 及膜糖蛋白 gp130 形成的复合物相结合^[2]。研究发现, IL-6 是炎症过程中 hepcidin 表达所必需和充分的前提^[3]。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的组成成分, 可以导致机体释放大量的细胞因子和免疫介质, 同时

引起血清铁的减少^[4]。对人的体内研究表明, 当对健康个体注射 LPS 以模拟炎症反应时, 注射后 3h 体内 IL-6 含量会急剧升高, 随后引起血浆中铁含量的显著下降^[5]。

实验结果表明, 异功散组小鼠血液指标、血清铁和肝组织铁、血清和肝组织 IL-6 水平与空白对照组差异均无统计学意义, 说明异功散本身对正常的铁代谢没有影响。但异功散加脂多糖组小鼠肝组织铁水平较脂多糖组明显降低, 说明异功散具有改善急性炎症所引起的低铁状态, 纠正肝组织铁贮存过多的作用, 即可以调节急性炎症诱发的铁代谢紊乱。同时, 我们还观察到异功散加脂多糖组能减少肝脏 IL-6 的分泌, 降低血清 IL-6 水平, 提示异功散可能是通过降低 IL-6 的水平来调节铁代谢, 至于具体的作用机制还有待进一步深入研究。此外, 由于本研究采用的模型并不能诱发血液学的改变, 无法观察异功散能否纠正炎症引起的贫血, 因此课题组将在此研究的基础上, 进一步研究运脾法对于慢性病贫血模型或慢性病贫血患者铁代谢的影响。

参考文献

- [1] Yuan L, Geng L, Ge L, et al. Effect of iron liposomes on anemia of inflammation [J]. Int J Pharm, 2013, 454(1): 82-89.
- [2] Ganz T. Molecular control of iron transport [J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(2): 394-400.
- [3] 罗梅宏. 从“脾主运化”和“运脾生血”理论探讨慢性贫血的中医病机和治疗 [J]. 中医杂志, 2013, 54(18): 1556-1557.
- [4] Means RT Jr. Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine mediated anemia [J]. Stem Cells, 1995, 13(1): 32-37.
- [5] Rivera S, Ganz T. Animal models of anemia of inflammation [J]. Semin Hematol, 2009, 46(4): 351-357.
- [6] Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity [J]. FEBS Lett, 2000, 480(2-3): 147-150.
- [7] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation [J]. Biochem J, 2003, 374(Pt1): 1-20.
- [8] Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin [J]. J Clin Invest, 2004, 113(9): 1271-1276.
- [9] Deschemin JC, Vaulont S. Role of hepcidin in the setting of hypoferrremia during acute inflammation [J]. PLoS One,

2013, 8(4): e61050.

[10] Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, et al. Time course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine

levels in humans injected with LPS [J]. Blood, 2005, 106(5): 1864-1866.

Impact of Yigong Powder (异功散) on Mice with Iron Metabolism Disorder Mediated by Lipopolysaccharide

ZHENG Qin¹, GUAN Yu¹, WANG Zhicheng², WANG Jianying³, PU Yiqiong³, WANG Guohua¹, ZHANG Xiaofeng¹, XIA Jing¹, CUI Lele⁴, LUO Meihong⁴

(1. Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200071; 2. Huashan Hospital Fudan University; 3. College of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 4. Baoshan Branch of Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the impact of *Yigong Powder* on iron metabolism disorder induced by inflammation. **Methods** 40 C57BL/6 mice were randomly divided into control group (n = 10), *Yigong Powder* group (n = 10), lipopolysaccharide group (n = 10) and *Yigong Powder* combined with lipopolysaccharide group (n = 10). *Yigong Powder* group and *Yigong Powder* combined with lipopolysaccharide group were given 10.57 g/ (kg · d) of *Yigong Powder* by gavage. Control group was given 0.2 ml of ultrapure water, all for seven days. On the eighth day, lipopolysaccharide group and *Yigong Powder* combined with lipopolysaccharide group were given 1.5 mg/kg of lipopolysaccharide by intraperitoneal injection to establish iron metabolism disorder models. Six hours later, all mice were sacrificed. Blood routine, serum levels of iron and interleukin 6 (IL-6), and content of iron and IL-6 in liver tissue were detected. **Results** Blood routine changed little in every group (P > 0.05). Compared with control group, serum level of iron decreased, serum level of IL-6, as well as content of iron and IL-6 in liver tissue increased in lipopolysaccharide group (P < 0.05). Compared with lipopolysaccharide group, iron content in liver tissue, as well as IL-6 in serum and liver tissue decreased in *Yigong Powder* combined with lipopolysaccharide group (P < 0.05). **Conclusion** *Yigong Powder* could improve iron metabolism disorder mediated by lipopolysaccharide under acute inflammation. The mechanism may relate to decrease of IL-6 in serum and liver tissue.

Keywords *Yigong Powder*; lipopolysaccharide; iron metabolism disorder; acute inflammation

(收稿日期: 2015-01-10; 修回日期: 2015-03-13)

编辑: 邓 媛

颈复康颗粒、腰痛宁胶囊、蚁参蠲痹胶囊临床研究与应用征文获奖名单

由中医杂志社与承德颈复康药业集团有限公司联合主办的“颈复康颗粒、腰痛宁胶囊、蚁参蠲痹胶囊临床研究与应用征文”，经专家评审，获奖论文如下。

一等奖：范璐（蚁参蠲痹胶囊对大鼠佐剂性关节炎保护作用及其机制研究）；孙世光等（蚁参蠲痹胶囊治疗类风湿性关节炎的系统评价）。

二等奖：石彩云等（颈复康颗粒联合甲钴胺片治疗糖尿病远端对称性多发性神经病变 47 例临床观察）；臧海洋（颈复康颗粒治疗偏头痛 48 例临床观察）；张文义等（腰痛宁胶囊加穴位艾灸治疗腰肌劳损 100 例）；周利军等（蚁参蠲痹胶囊治疗类风湿关节炎 108 例临床观察）；闵重函等（蚁参蠲痹胶囊治疗类风湿性关节炎的疗效观察）；田谧（蚁参蠲痹胶囊治疗痛风伴高脂血症 52 例疗效观察）；史耀勋（蚁参蠲痹胶囊治疗痛风性肾病的临床研究）；赖建荣等（颈复康颗粒联合前列地尔注射液快速缓解颈性眩晕的疗效观察）。

三等奖：赖建荣等（颈复康颗粒联合前列地尔注射液治疗颈性眩晕的疗效观察）；张金龙（颈复康颗粒治疗慢性脑供血不足患者临床疗效观察）；周利军等（颈复康颗粒治疗椎动脉型颈椎病 128 例临床观察）；吴建华（颈复康颗粒治疗椎动脉型颈椎病 50 例疗效观察）；杨政华等（腰痛宁胶囊对西藏高原痛风病的治疗与体会）；李怀生等（腰痛宁胶囊联合壮骨关节丸治疗腰椎骨质增生 34 例）；杨代权（腰痛宁胶囊临床应用举例）；刘少林等（腰痛宁胶囊配合牵引治疗腰椎间盘突出症临床观察）；周利军等（腰痛宁胶囊治疗类风湿关节炎 98 例临床观察）；王木闰（腰椎间盘突出症应用腰痛宁胶囊的治疗经验）；罗志军等（中西医结合治疗颈椎病综合症的疗效观察）。

优秀奖：黄根（颈椎综合症中西医结合治疗临床体会）；何重敏（内服外敷中药配合手法治疗颈椎病 48 例疗效观察）；申湘葵等（腰痛宁胶囊在腰椎间盘突出症中的临床应用）；王友民（治疗颈椎病良药有奇效）。

获奖证书及奖金将由主办单位邮寄至第一作者。