

三个不同品种升麻抗炎作用及药效物质基础研究

曾晓辉¹ 丁斐² 秦昆明^{2,3} 黄雨婷^{2,3} 蔡宝昌^{2,3} 范孟雪^{2,3}

(1.常州市中医院,江苏常州 213003; 2.南京海昌中药集团有限公司、江苏省企业研究生工作站,江苏南京 210061;

3.南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心,江苏南京 210023)

摘要 目的:进行三个不同品种升麻水提取物抗炎药效学评价,初步分析升麻的抗炎物质基础。方法:各组小鼠分别灌胃给药(不同剂量三个品种升麻水提取物、阳性药物地塞米松)或生理盐水后,以二甲苯致小鼠耳廓肿胀、角叉菜胶致小鼠足趾肿胀,检测各组小鼠耳肿胀抑制率、致炎后各时段足趾肿胀率,酶联免疫吸附法测量足趾组织渗出液中的一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)及前列腺素 E₂(PEG₂)含量,进行抗炎活性评价。采用 HPLC 进行三个品种升麻水提取物中总酚酸含量的测定,探讨升麻的抗炎物质基础。结果:三个品种的升麻对二甲苯所致小鼠耳肿胀和角叉菜胶所致小鼠足趾肿胀均有一定的抑制作用,高剂量组与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);三个品种升麻可不同程度降低角叉菜胶所致小鼠足趾肿胀炎症足趾中 PEG₂ 和 NO 的含量,提高 SOD 的活性。经过 HPLC 测得兴安升麻、大三叶升麻和升麻中总酚酸的含量分别为 6.3mg/kg、5.50mg/kg、4.3mg/kg。结论:三种升麻都具有一定的抗炎活性,其中大三叶升麻>升麻>兴安升麻,与总酚酸类成分的含量不具有相关性。

关键词 升麻 植物水提取物 比较研究 抗炎试验 总酚酸

中图分类号 R282.710.5

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2017)05-0075-04

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom.、兴安升麻 *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim.或升麻 *Cimicifuga foetida* L.的干燥根茎。《神农本草经》中列为“上品”药材,其味辛、微甘,微寒,归肺、脾、胃、大肠经,具发表透疹、清热解毒、升举阳气功效^[1]。主要化学成分有酚酸类,包括咖啡酸、阿魏酸及异阿魏酸;色原酮类,包括升麻素、齿阿米素等;三萜及其苷类,包括 9,19-环羊毛脂烷型三萜及其苷类^[2-3]。现代药理研究发现升麻有抗炎、抗氧化、抗血小板凝集、抗肿瘤及降血糖等作用^[4]。

化学合成抗炎药物长期使用会产生较大的副作用,因此抗炎中药的研究成为国内外研究的热点。药典中的大三叶升麻主要产于黑龙江、吉林、辽宁,兴安升麻主要产于河北、山西和内蒙古,升麻主要产于四川、甘肃、云南等地,但临床上将三个不同品种统一作为药用升麻使用。药物的品种和产地与临床疗效息息相关,现对这三种升麻的药效差异性 & 抗炎物质基础进行研究,报道如下。

1 实验材料

1.1 动物 ICR 小鼠,体重 18~22g,雄性,购自扬州大学比较医学中心,动物许可证号:SCXK(苏)2012-0004。

1.2 药品与试剂 大三叶升麻(南京海源中药饮片

有限公司,批号:150110)、兴安升麻(亳州市康豪药业有限公司,批号 151125)、升麻(天马中药饮片科技有限公司,批号:141125)经南京中医药大学陈建伟教授鉴定分别为升麻属植物大三叶升麻(DSM)、兴安升麻(XSM)和升麻(SM)的干燥根茎。醋酸地塞米松,天津天药药业股份有限公司,批号:1505143;角叉菜胶,Sigma 公司提供,批号:22049;小鼠超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、小鼠前列腺素 E₂(PEG₂)试剂盒、小鼠一氧化氮(NO)试剂盒均购自南京森贝伽生物科技有限公司,批号分别为:201606、201605、201603;对照品咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸(中国食品药品检定研究院,批号分别为:110885-200102、110773-201313、111698-201103)。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 Shimadzu LC-20AD 高效液相色谱系统(日本岛津),HH-S6 数显恒温水浴锅(金坛市恒丰仪器厂),BS2242S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(湖南湘仪实验开发有限公司),XH-C 涡旋混合器(金坛市医疗仪器厂),FW135 中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),1510-02423 系列全波长酶标仪(赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 三种升麻水煎液的制备 取大三叶升麻饮片粗

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK20141093);南京市现代中药资源开发与利用工程研究中心建设项目

粉 60g, 用 10 倍蒸馏水浸泡 40min 后, 煮沸 30min, 用 4 层纱布滤过, 滤渣再加 10 倍量蒸馏水煮沸 30min, 合并滤液, 减压浓缩至 100mL, 置冰箱放置, 临用前稀释到需要的浓度。兴安升麻和升麻按照同样的方法制备水提物。

2.2 小鼠耳廓肿胀试验^[5] 取 ICR 雄性小鼠 80 只, 适宜性喂养 1 周后, 随机分成 8 组, 分别为模型组(生理盐水), 阳性药对照组(醋酸地塞米松 10mg/kg), 大三叶升麻水提物高、低剂量组(9.0、3.0g/kg), 兴安升麻水提物高、低剂量组(9.0、3.0g/kg), 升麻水提物高、低剂量组(9.0、3.0g/kg), 每组 10 只, 分别灌胃给予相应药物, 模型组给予等量生理盐水, 每日给药 1 次, 连续 5d。末次给药 30min 后, 将 100%二甲苯溶液 0.03mL 均匀涂抹于每只小鼠右耳廓两面致炎, 左耳作对照。30min 后颈椎脱臼处死小鼠, 沿耳廓基线剪下双耳, 用直径 8mm 打孔器分别在左右耳的相同部位冲下圆形耳片, 电子天平称质量, 以两耳片的质量差作为耳肿胀度, 计算肿胀抑制率。

耳肿胀度=右耳片质量-左耳片质量

耳肿胀抑制率(%)=(模型组肿胀度-给药组肿胀度)/模型组肿胀度×100%

2.3 角叉菜胶致小鼠足肿胀试验^[6] 取 ICR 雄性小鼠 80 只, 随机分成 8 组, 每组 10 只, 分组与给药方法同“2.2”项下。于末次给药后 30min, 在每只小鼠右后足跖部皮内注射 1%角叉菜胶 0.06mL, 分别于致炎前和致炎后 0.5、1、2、3、4h 用游标卡尺测量左后足跖相应部位的厚度, 计算肿胀率。

肿胀率(%)=(致炎后足厚度-致炎前足厚度)/致炎前足厚度×100%

2.4 角叉菜胶致炎小鼠足趾炎症组织液中 PEG₂、SOD、NO 的含量测定^[7] “2.3”项下各组小鼠致炎后 4h, 颈椎脱臼处死小鼠, 自踝关节剪下右足后趾, 剥皮剪碎后放入 3mL 磷酸缓冲盐溶液 PBS 中, 浸泡 30min, 3000r/min 离心 20min, 仔细收集上清液, 置-70℃冰箱中保存备用。以酶联免疫吸附法分别测定 PEG₂、SOD、NO 含量, 严格按照仪器操作规程及试剂盒说明书进行。

2.5 HPLC 分析三种升麻水提液中总酚酸的含量 色谱柱: YMC-Pack-ODS-C4 (250mm×4.6mm, 5μm); 流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(0~12min, 5%~13% A; 12~23min, 13%~18% A; 23~30min, 18%~5% A); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 30℃; 检测波

长: 320nm; 进样量: 10μL。结果表明: 峰形良好, 且各峰之间分离度均大于 1.5。三种升麻在含量测定之前, 分别取浓缩液 2mL, 加甲醇稀释定容至 30mL, 摇匀, 用 0.45μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计学分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 与模型组比较, 三个品种升麻水提液高剂量及阳性药物地塞米松均能明显抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀 ($P<0.01, P<0.05$), 且耳廓肿胀抑制率与剂量呈正相关。三个品种升麻相比, 有大三叶升麻水提物抗炎作用>升麻>兴安升麻的药效趋势, 但组间比较无统计学差异。结果见表 1。

表 1 各组小鼠耳廓肿胀程度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g/kg)	耳肿胀度 (mg)	抑制率 (%)
模型组	10		20.31±1.82	
阳性药对照组	10	0.01	6.39±0.67**	68.54
大三叶升麻高剂量组	10	9.0	10.57±1.25**	47.03
大三叶升麻低剂量组	10	3.0	15.21±1.36*	25.11
兴安升麻高剂量组	10	9.0	13.01±1.21*	35.94
兴安升麻低剂量组	10	3.0	17.86±1.63	12.06
升麻高剂量组	10	9.0	11.23±1.19**	44.71
升麻低剂量组	10	3.0	16.37±1.56	19.40

注: 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3.2 对角叉菜胶致大鼠足肿胀的影响 三个品种升麻水提物各剂量组在多个时间点可明显减轻小鼠的足肿胀程度, 其中大三叶升麻水提物高、低剂量组在致炎后各时间点作用明显, 与模型组比较, 小鼠足肿胀率明显降低 ($P<0.05, P<0.01$); 兴安升麻和升麻高剂量组在致炎后 1、2、3、4h 与模型组比较小鼠足肿胀率明显降低 ($P<0.05, P<0.01$)。大三叶升麻高剂量组与地塞米松阳性组抗氧作用相当, 抑制小鼠足趾肿胀作用较为明显, 在部分时间点明显优于兴安升麻和升麻组 ($P<0.05$), 在 3h 升麻组优于兴

表 2 三种不同品种升麻水提物对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g/kg)	致炎后肿胀率(%)				
			0.5h	1h	2h	3h	4h
模型组	10		71.31±0.23	77.85±0.18	87.80±0.25	93.65±0.23	109.46±0.20
阳性药对照组	10	0.01	54.39±0.21**	57.32±0.28**	68.15±0.16**	67.01±0.23**	60.25±0.24**
大三叶升麻高剂量组	10	9.0	59.79±0.12**	59.08±0.17**	63.09±0.24**	68.89±0.24**	67.57±0.17**
大三叶升麻低剂量组	10	3.0	63.95±0.13*	58.98±0.14*	71.87±0.13**	78.01±0.18**	85.58±0.15*
兴安升麻高剂量组	10	9.0	71.82±0.24*	66.75±0.24*	72.88±0.24**	88.09±0.24*	80.54±0.23**
兴安升麻低剂量组	10	3.0	73.71±0.24	83.74±0.23	78.53±0.21	97.43±0.28	97.43±0.31
升麻高剂量组	10	9.0	72.75±0.22*	61.50±0.14**	70.88±0.28*	74.71±0.20** [△]	77.45±0.14**
升麻低剂量组	10	3.0	73.36±0.19	67.80±0.13**	82.88±0.14	87.21±0.17	93.63±0.23**

注: 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与大三叶升麻高剂量组比较, # $P<0.05$; 与兴安升麻高剂量组比较, $\Delta P<0.05$ 。

安升麻组($P<0.05$)。见表2。

3.3 对角叉菜胶致炎小鼠炎性组织 PEG₂、SOD、NO 含量的影响 与模型组比较,三个品种升麻水提物各剂量及阳性药均可不同程度降低角叉菜胶致炎小鼠炎性组织中 PEG₂、NO 含量,提高 SOD 含量,结果见表3。3个品种升麻组间比较差异无统计学意义。

3.4 三种升麻水提液中总酚酸含量的测定 升麻饮片中的酚酸类成分是升麻的指标性成分,采用HPLC方法分别测得升麻三个不同品种中阿魏酸、异阿魏酸和咖啡酸的含量。以峰面积(Y)对进样量(X)进行统计回归,得咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸的回归方程分别为: $Y=2.733 \times 10^5 X - 1.149 \times 10^4$ ($r=0.9999$), $Y=7.454 \times 10^5 X + 3.814 \times 10^4$ ($r=0.9999$), $Y=1 \times 10^6 X + 2.836 \times 10^5$ ($r=0.9995$), 线性范围依次为 0.09~0.85, 0.29~2.61, 0.50~4.45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 且线性关系良好。兴安升麻、大三叶升麻和升麻总酚酸的含量分别为6.3mg/kg、5.50mg/kg、4.3mg/kg, 对照品和供试品色谱图见图1。

4 讨论

现代药理研究表明,升麻具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗骨质疏松等作用^[4]。本研究采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀、角叉菜胶致小鼠足趾肿胀模型和炎症因子酶联免疫吸附法反应,来研究不同品种升麻的抗炎作用。小鼠足趾肿胀试验是一种用于抗炎药物筛选的典型炎症模型^[8],其炎症的反应过程大致可以分为两个阶段:第一个阶段主要为5-羟色胺及组胺等炎症因子的释放;第二个阶段主要作用于环氧化酶抑制剂活性,继而影响花生四烯酸代谢产物(PEG₂)的合成。SOD可清除体内的超氧阴离子自由基,处于一个动态平衡过程。NO是重要的炎症因子,当炎症反应时可诱导增加局部诱导型 NOS 的合成,继而产生大量的 NO,发挥抑制和杀伤致病因子的作用,同时可杀死正常细胞,加重炎症病变。实验结果显示:三个不同品种升麻高、低剂量组水提物可以减轻二甲苯所致小鼠耳廓的肿胀,抑制角叉菜胶所致小鼠足趾肿胀,且均可降低足趾组织液中的 PEG₂,提高 SOD 的活性,降低炎症组织中 NO 含量,表明三

表3 不同品种升麻角叉菜胶致炎小鼠及炎性组织 PEG₂、SOD、NO 含量的影响

组别	动物数(只)	剂量(g/kg)	PEG ₂ ($\mu\text{mol/L}$)	SOD($\mu\text{mol/L}$)	NO($\mu\text{mol/L}$)
模型组	10		5.93 $\pm$ 1.00	2.11 $\pm$ 0.99	10.07 $\pm$ 1.21
阳性药对照组	10	0.01	2.53 $\pm$ 0.67**	3.13 $\pm$ 0.86**	9.37 $\pm$ 3.01*
大三叶升麻高剂量组	10	9.0	3.70 $\pm$ 0.88*	2.81 $\pm$ 0.39**	9.66 $\pm$ 2.17*
大三叶升麻低剂量组	10	3.0	5.65 $\pm$ 1.34	2.26 $\pm$ 1.11*	9.14 $\pm$ 2.69*
兴安升麻高剂量组	10	9.0	3.44 $\pm$ 0.37**	2.65 $\pm$ 0.75**	9.51 $\pm$ 2.41*
兴安升麻低剂量组	10	3.0	4.96 $\pm$ 2.10	2.20 $\pm$ 0.59**	9.73 $\pm$ 3.20*
升麻高剂量组	10	9.0	3.96 $\pm$ 0.88**	2.48 $\pm$ 0.69**	9.86 $\pm$ 3.88*
升麻低剂量组	10	3.0	4.32 $\pm$ 1.36*	2.33 $\pm$ 0.80**	10.03 $\pm$ 2.63

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

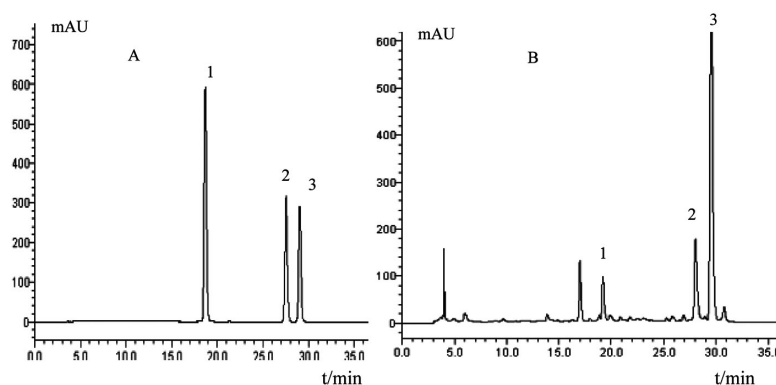


图1 升麻 HPLC 图

(A.对照品;B.供试品;1.咖啡酸;2.阿魏酸;3.异阿魏酸)

个品种升麻水提液灌胃给药可减少局部血管扩张,抑制渗出和水肿,其抗炎机制可能与 PEG₂、SOD 和 NO 的代谢途径有关。

通过对三种升麻抗炎活性的比较分析,在急性炎症反应过程中,大三叶升麻的抗炎活性>升麻>兴安升麻,采用 HPLC 分别对三个品种升麻中咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸等酚酸类成分进行含量测定,得出总酚酸的含量兴安升麻>大三叶升麻>升麻,与其抗炎药效没有相关性。但有研究报道升麻中所含的咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸都具有一定的抗炎活性^[9-10],推测升麻的抗炎作用可能与其含有的酚酸类成分配比有关。升麻中含有大量的皂苷类成分,一些皂苷类成分也具有较强的抗炎活性^[11-12],因此,升麻抗炎作用物质基础及组分之间配伍关系,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:68.
- [2] 李从军,陈迪华,肖培根.中药升麻的化学成分[J].药学学报,1993,28(10):777.
- [3] 赵晓宏,陈迪华,斯建勇,等.中药升麻酚酸类化学成分研究[J].药学学报,2002,37(7):535.
- [4] 张丽蓉,鄢连和.升麻属植物有效成分抗病毒作用研究进展[J].山东中医药大学学报,2015,39(4):384.

芪珠方对铁超载致小鼠肝损伤保护作用的研究

谢海纳¹ 刘霖² 钱知知³ 叶晶³ 姜文静² 叶枝红⁴ 谢东浩^{2,4} 张良³

(1.南京中医药大学基础医学院,江苏南京 210023; 2.上海市徐汇区大华医院,上海 200237;

3.南京中医药大学药学院,江苏南京 210023;4.江苏大学药学院,江苏镇江 212013)

摘要 目的:研究芪珠方对铁超载引起小鼠肝损伤的保护作用。方法:小鼠随机分为7组,分别为正常对照组和模型对照(右旋糖酐铁)低、中、高剂量组及芪珠方低、中、高剂量组。模型对照组分别采用小鼠腹腔注射总剂量为150、300、500mg/kg的右旋糖酐铁复制铁超载致肝损伤模型,喂食正常饲料;芪珠方各剂量组小鼠腹腔注射总剂量为500mg/kg右旋糖酐铁,喂食分别含有0.3%、0.5%和1%芪珠方饲料;正常对照组腹腔注射等量生理盐水,喂食正常饲料。喂食45d后,用生化试剂盒测定各组小鼠血清中血清铁(Serum iron)、总铁结合力(TIBC)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(T-BIL)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)水平及肝组织中铁(Liver iron)含量水平;苏木精-伊红(HE)染色法检测肝损伤情况;免疫组织化学的方法检测小鼠肝脏组织中3-硝基酪氨酸(3-NT)水平;TUNEL染色法检测肝组织细胞的凋亡水平。结果:与正常对照组比较,各模型组小鼠血清中MDA、ALT、AST、T-BIL水平出现不同程度的升高,GSH、TIBC水平降低,肝脏中铁含量升高,以模型对照高剂量组改变最为明显;与模型对照高剂量组比较,芪珠方各剂量组MDA、ALT、AST、T-BIL水平不同程度降低,GSH、TIBC水平升高,肝脏铁含量降低,以芪珠方高剂量组改善最为明显。血清铁含量各模型对照组与芪珠方各剂量组均偏高。肝脏病理显示,芪珠方可显著改善由右旋糖酐铁引起的肝脏病理损伤,抑制铁超载引起的蛋白质硝化、肝细胞凋亡状况。结论:铁超载可引起肝细胞蛋白质硝化、凋亡等异常反应,造成肝损伤,芪珠方可有效地减轻铁超载引起的肝损伤。

关键词 芪珠方 实验性肝损伤 病理学 细胞凋亡 蛋白质硝化 实验研究**中图分类号** R289.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)05-0078-05

肝脏作为人类最重要的代谢以及铁储存器官,是铁超载引起损伤的主要靶器官^[1-2]。大量研究表明,铁超载在肝脏纤维化、非酒精性脂肪性肝病、肝硬化等多种疾病发生发展中发挥着重要的作用^[3-6],体内铁的聚集可导致细胞凋亡,随着补铁剂量的增

加,凋亡的细胞增加。中医学认为慢性乙型肝炎的主要病理因素是湿热毒邪瘀阻。芪珠方由叶下珠、虎杖、丹参、黄芪、赤芍、蛇舌草、土茯苓7味药材组成,具有清肝化瘀之功,目前临床多应用于治疗肝纤维化、慢性乙肝等疾病^[7-8]。本实验观察了芪珠方

- [5] 梁生林,梁琮,钟卫华,等.苕草提取物抗炎镇痛作用实验研究[J].中草药,2014,45(21):3131.
- [6] 胡璇,李卫东,张硕峰,等.四倍体金银花水提物抗炎作用和急性毒性实验研究[J].中草药,2015,46(11):1649.
- [7] 张星海.不同来源菊花化学成分、抗炎作用及其机理的研究[D].南京:南京中医药大学,2014.
- [8] SARKHEL S. Evaluation of the anti-inflammatory activities of Quillaja saponaria Mol. saponin extract in mice[J]. Toxicology Reports,2016,3:1.
- [9] 杨九凌,祝晓玲,李成文,等.咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展[J].中国药理学杂志,2013,48(8):577.
- [10] 欧仕益,包惠燕,蓝志东.阿魏酸及其衍生物的药理作用研究进展[J].中药材,2001,24(3):220.
- [11] MOON L,HA Y M,JANG H J,et al.Isoimperatorin, cimicid E and 23-O-acetylshengmanol-3-xyloside from Cimicifugae rhizome inhibit TNF- α -induced VCAM-1

expression in human endothelial cells:involvement of PPAR- γ upregulation and PI3K,ERK1/2,and PKC signal pathways[J]. J Ethnopharmacol,2011,133(2):336.

- [12] MUN L,JUN M S,KIM Y M,et al.7,8-didehydrocimigenol from Cimicifugae rhizoma inhibits TNF- α -induced VCAM-1 but not ICAM-1 expression through upregulation of PPAR- γ in human endothelial cells[J]. Food Chem Toxicol,2011,49(1):166.

第一作者:曾晓辉(1972—),男,本科学历,主管中药师,中药学专业。

通讯作者:范孟雪,硕士研究生。fandana@126.com

收稿日期:2016-12-20

编辑:吴宁