

解毒活血滋阴方抗炎活性有效部位的筛选

郝鹏飞, 卞华*, 张璨方, 张超云
(南阳理工学院, 河南 南阳 473000)

[摘要] **目的:**研究解毒活血滋阴方不同部位群对机体炎症的影响,并筛选有效部位。**方法:**昆明种小鼠,分别采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀法、醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增高法、角叉菜胶致小鼠足跖肿胀法,每组10只,设正常组、模型组、吡哆美辛组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及解毒活血滋阴方5个部位组(水提取部位 $966\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,乙醚部位 $59\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,乙酸乙酯部位 $188\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,正丁醇部位 $22\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,乙醇部位 $321\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);另外Wistar大鼠分别以棉球致大鼠肉芽组织肿胀和建立佐剂性关节炎(AA)大鼠模型,每组10只,设模型组、吡哆美辛组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及解毒活血滋阴方5个部位组(水提取部位 $966\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,乙醚部位 $59\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,乙酸乙酯部位 $188\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,正丁醇部位 $22\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,乙醇部位 $321\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);分别研究了解毒活血滋阴方5个不同部位群的抗急性、亚急性和慢性炎症的活性,研究对AA大鼠血清中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。**结果:**与模型组比较,解毒活血滋阴方水提取、乙醇部位均能显著抑制小鼠耳廓肿胀、腹腔毛细血管通透性改变、角叉菜胶所致足跖肿胀及大鼠棉球肉芽肿胀,并可显著降低AA大鼠血清中IL-6、TNF- α 的表达,均具有统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**解毒活血滋阴方水提取、乙醇部位均具较强的抗炎活性,其中水提取部位长于慢性炎症,而乙醇部位长于急性炎症。

[关键词] 解毒活血滋阴方; 系统性红斑狼疮; 抗炎活性; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0151-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080151

Screening of Anti-inflammatory Fractions from Jiedu Huoxue Ziyin Recipe HAO Peng-fei, BIAN Hua*, ZHANG Li-fang, ZHANG Chao-yun (Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe and screen anti-inflammatory fractions from Jiedu Huoxue Ziyin Recipe (JHZR). **Method:** The anti-inflammatory effects were observed by series of experiments including mouse auricular edema induced by xylen, increased vascular permeability induced by acetic acid in mice, paw edema caused by carrageen glue in mice, granuloma caused by implanted cotton ball and adjuvant arthritis (AA) in rats. Every experiment included 8 groups: the normal group, the model group, the indomethacin group ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the 5 groups of different fractions from JHZR (the water extract $966\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, the diethyl ether extract $59\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, the ethyl acetate extract $188\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, the n-butyl alcohol extract $22\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and the ethyl alcohol extract $321\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The effect on acute, subacute, and chronic inflammations of these extracts were observed. The effect on serum interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by JHZR in AA rats were observed. **Result:** Compared with the model group, the water and ethyl alcohol extracts of JDZR could inhibit the increase of mouse auricular edema by xylen, and the vascular permeability induced by acetic acid, and paw edema caused by carrageen glue, and granuloma caused by implanted cotton ball. Moreover, they could significantly reduce the activities of IL-6 and TNF- α in rats' serum. **Conclusion** The water and ethyl alcohol fractions from JDZR have significant anti-inflammatory activity. The former fraction is effective on chronic inflammation, and the latter is effective on acute inflammation.

[Key words] Jiedu Huoxue Ziyin Recipe; systemic lupus erythematosus; anti-inflammatory activity; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

[收稿日期] 20140820(017)

[基金项目] 河南省重点科技攻关计划项目(102102310167)

[第一作者] 郝鹏飞, 硕士, 讲师, 从事中药及其复方中有效部位的研究, Tel:13782063300, E-mail: hpf_880129@163.com

[通讯作者] *卞华, 博士, 副教授, 从事风湿病的中医临床治疗研究, Tel:13733119266, E-mail: biancrown@163.com

系统性红斑狼疮(SLE)是一种原因未明,以多系统或器官病变和血清中出现多种自身抗体为特征的自身免疫性疾病,发病机制主要受遗传、性激素、环境及免疫学等影响,有家族聚居倾向。目前,临床上对该病的治疗主要以抗炎、免疫抑制以及激素用药为主^[1]。解毒活血滋阴方以白花蛇舌草、地黄、赤芍、苏木、青蒿、山茱萸等中药组成,前期的临床研究证明,该方对于控制SLE症状,改善患者生活质量都具有较显著的疗效^[2-3]。在此基础上,本研究针对解毒活血滋阴方中的不同提取部位群,进行小鼠的抗炎活性研究,以期探索其最佳药效部位^[4-5]。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,18~22 g,6~8周龄,合格证号SCXK(豫)2014-0013;Wistar大鼠雌雄各半,180~220 g,购自于河南省实验动物中心,合格证号SCXK(豫)2014-0009。

1.2 药物及试剂 白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa*),生地黄(*Rehmannia glutinosa*),赤芍(*Paeonia veitchii*),苏木(*Caesalpinia sappan*),青蒿(*Artemisia annua*),山茱萸(*Cornus officinalis*)等由南阳理工学院张仲景国医学院附属医院提供,分别经张仲景国医学院中药教研室主任黄显章副教授分别鉴定后使用。吲哚美辛(华北制药集团,批号20131101),氨苄青霉素(华北制药集团,批号20140307),角叉菜胶(美国Sigma公司,批号SC113801),伊文思蓝(上海化学试剂采购供应站,批号82-1102),卡介苗冻干粉(上海生物制品研究所,批号201311021),ELISA反应试剂盒(美国Sigma公司,SRAB022501)。

1.3 仪器 BT125D型1/10万分析天平(德国Sartorius公司),UV-6100A型-紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司),YLS-7B型足跖肿胀度测量仪(济南益延科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 解毒活血滋阴方不同部位群的制备 将全方药材按照一定比例组合后混匀,以75%乙醇浸渍48 h,每12 h更换一次溶剂,过滤合并滤液备用;药渣分别以8,6倍量水煎煮2次合并浓缩后得水提取部位;对药渣再次分别以乙醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇进行提取,得到乙醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位;取乙醇浸出液,浓缩后冻干得干燥粉末,加入水混悬后分别以乙醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,依次分别得到乙醚萃取液、乙酸乙酯萃取液、正丁醇萃取液,分别与上述相应提取液合并;而最终所剩即为乙

醇部位;由公式分别计算其得率。

$$\text{得率} = \text{干燥粉末质量} / \text{全方药材重} \times 100\%$$

经计算,各部位得率分别为水提取部位6.32%,乙醚部位0.38%,乙酸乙酯部位1.21%,正丁醇部位0.14%,乙醇部位2.07%;临用前以蒸馏水配置成相当于生药量计质量浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的溶液(不溶者制成悬浊液,用前摇匀)。

2.2 小鼠耳廓致炎肿胀及腹腔毛细血管通透性实验^[6] 实验用小鼠80只,随机分成8组,每组10只,设正常组、模型组、阳性药组(吲哚美辛 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及解毒活血滋阴方5个部位组(水提取部位 $966 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,乙醚部位 $59 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,乙酸乙酯部位 $188 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,正丁醇部位 $22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,乙醇部位 $321 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。实验开始前5 d实验组分别*ig*给药相应药液,阳性药组*ig*给药吲哚美辛 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常组、模型组以蒸馏水代替,末次给药1 h后于右耳内外两侧均匀涂抹二甲苯致炎,并于小鼠尾静脉注射2%伊文斯蓝溶液 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,同时*ip* 0.6%醋酸溶液 $0.2 \text{ mL} / \text{只}$;30 min后颈椎脱臼处死,剪开腹腔用5 mL生理盐水冲洗腹腔,收集冲洗液,离心取上清液,于紫外-可见分光光度计590 nm处测定吸收度(A);同时剪下左右双耳并以9 mm打孔器分别在双耳同部位打下耳片,分析天平精密称重,记录结果并按以下公式计算肿胀度、抑制率。

$$\text{肿胀度}(\text{SD}) = m_{\text{右耳片}} - m_{\text{左耳片}}$$

$$\text{抑制率} = (\bar{\text{SD}}_{\text{正常组}} - \bar{\text{SD}}_{\text{给药组}}) \times 100\% / \bar{\text{SD}}_{\text{正常组}}$$

2.3 小鼠角叉菜胶致炎足跖肿胀实验^[7] 实验用小鼠80只,按照2.2项下设置分组。实验开始前7 d,按照2.2项下所述*ig*给药,末次给药1 h后,小鼠右后足跖*ih* 1%角叉菜胶生理盐水溶液 $20 \mu\text{L}$,于不同时间(注射前、注射后1,2,3,4,5 h),用足跖肿胀度测量仪测量左右足跖体积,记录结果并按以下公式计算肿胀度、抑制率。

$$\text{SD} = V_{\text{右足跖}} - V_{\text{左足跖}}$$

2.4 大鼠棉球肉芽肿实验^[8] 实验用大鼠70只随机分为7组,每组10只,分别为模型组,阳性药组(吲哚美辛 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及解毒活血滋阴方5个部位组(水提取部位 $966 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,乙醚部位 $59 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,乙酸乙酯部位 $188 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,正丁醇部位 $22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,乙醇部位 $321 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。按照2.2项下所述*ig*给药,于第2天给药后乙醚麻醉,在大鼠两侧腋窝下剪开约1 cm的小口,将两个灭菌棉球分别植入皮下[每个棉球均含1 mg氨苄青霉素,

50 ℃ 烘箱烘干, 质量 (20 ± 1) mg], 缝合创口并在局部涂以少量抗生素; 给药 8 d, 末次给药后 1 h, 颈椎脱臼处死, 取出棉球, 剥离附着结缔组织, 60 ℃ 烘箱烘 12 h 后精密称定, 减去棉球原质量, 即为肉芽肿净质量, 取两侧肉芽肿质量的均值计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{m}_{\text{模型组肉芽}} - \text{m}_{\text{给药组肉芽}}) / \text{m}_{\text{模型组肉芽}} \times 100\%$$

2.5 佐剂性关节炎大鼠白细胞介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 实验^[9-10] 将卡介苗冻干粉 80 ℃ 水浴灭活 1 h, 与高压后的液体石蜡于超净台内充分混匀, 制成浓度为 10 mg · kg⁻¹ 的佐剂备用。取大鼠 80 只按照 2.2 项下设置分组; 模型组、阳性药组 (吡哌美辛 10 mg · kg⁻¹) 和解毒活血滋阴方 5 个部位组于大鼠右后足跖皮内注射 0.1 mL 佐剂, 正常组以生理盐水代替; 造模 14 d 后按照 2.2 项下所述 ig 给药 14 d, 于末次给药 1 h 后心脏采血, 分离血清;

操作步骤按试剂盒说明书进行, 酶标仪波长 450 nm, 参考波长 550 nm 处检测各细胞因子浓度, 再除以样品中总蛋白浓度即为血清中 IL-6 和 TNF-α 的水平。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 处理数据, 计量资料比较采用单因素方差分析, 以 *t* 检验进行组间统计比较, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠耳廓致炎肿胀及腹腔毛细管通透性影响 小鼠急性耳部炎症模型、腹腔染料渗出模型较正常组均明显增加 (*P* < 0.01), 证明造模成功; 与模型组比较, 解毒活血滋阴方的水提取、乙醇部位均能抑制小鼠耳壳的肿胀及腹腔毛细管的通透性改变 (*P* < 0.05, *P* < 0.01); 与吡哌美辛组比较, 不同提取部位组则无显著性差异。见表 1。

表 1 解毒活血滋阴方不同提取部位对小鼠耳廓致炎肿胀及腹腔毛细管通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of different extract fractions of Jiedu Huoxue Ziyin recipe on auricle swelling and penetrance of peritoneal capillaries in DTH mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	耳部炎症		腹腔液	
		肿胀度/mg	抑制率/%	A	抑制率/%
正常	-	0.3 ± 0.9	-	0.33	-
模型	-	12.2 ± 1.8 ²⁾	0.0	1.8 ± 0.1 ²⁾	0.0
吡哌美辛	10	6.1 ± 0.7 ⁴⁾	49.8	0.8 ± 0.1 ⁴⁾	59.1
水提取部位	966	9.5 ± 1.2 ³⁾	47.0	1.2 ± 0.1 ³⁾	53.6
乙醚部位	59	12.0 ± 2.0	1.4	1.5 ± 0.1	16.4
乙酸乙酯部位	188	11.5 ± 1.5	5.6	1.7 ± 0.2	6.2
正丁醇部位	22	11.9 ± 1.5	2.7	1.7 ± 0.1	7.4
乙醇部位	321	6.1 ± 1.1 ⁴⁾	41.9	0.9 ± 0.1 ⁴⁾	48.4

注: 与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; 与模型组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01 (表 2 ~ 3, 图 1 同)。

3.2 对小鼠角叉菜胶致足跖肿胀的影响 造模后, 模型组、吡哌美辛组及不同提取部位组的足跖肿胀程度较正常组均明显升高 (*P* < 0.01); 解毒活血滋阴方的水提取、乙醇部位均能抑制小鼠因角叉菜胶引起的亚急性足跖肿胀, 早期 (2 ~ 3 h) 较明显, 后期 (4 ~ 5 h) 具极显著性差异, 而与同样具统计学意义的吡哌美辛组比较, 则无显著性差异。见图 1。

3.3 对大鼠棉球肉芽肿的影响 与模型组比较, 其中水提取、乙醇部位明显降低肉芽肿重 (*P* < 0.05, *P* < 0.01); 与同样具极显著性差异的吡哌美辛组比较, 则无显著性差异。见表 2。

3.4 对 IL-6 及 TNF-α 表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠的 IL-6, TNF-α 表达量明显增加 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 在解毒活血滋阴方的在水提、乙醇部位作用下, 大鼠的 IL-6, TNF-α 表达量明显降低 (*P* < 0.01)。见表 3。

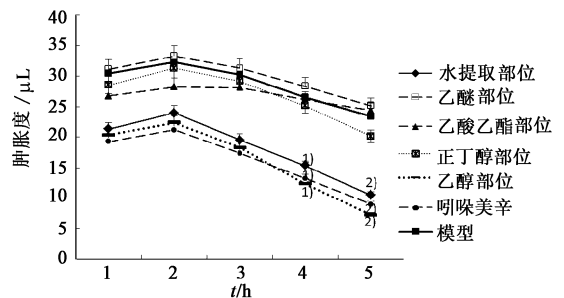


图 1 解毒活血滋阴方不同提取部位对小鼠角叉菜胶性致炎的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of different extract fractions of Jiedu Huoxue Ziyin recipe on inflammatory carageen glue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

SLE 的发生与遗传、环境、感染、性激素等有关, 其大部分临床表现都是由致病性抗体、免疫复合物和 T 细胞所致, 免疫系统功能失调是 SLE 的主要发病机制^[11]。目前临床上常用的免疫抑制剂如环磷酰胺、

表 2 解毒活血滋阴方不同提取部位对大鼠棉球肉芽性致炎的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of different extract fractions of Jiedu Huoxue Ziyin recipe on tampon granulation inflammation ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肉芽肿重 /mg·10 g ⁻¹	抑制率/%
模型	-	13.3 ± 1.3	0.0
吡啶美辛	10	7.2 ± 1.0 ⁴⁾	45.5
水提取部位	966	6.7 ± 1.5 ⁴⁾	26.9
乙醚部位	59	12.5 ± 0.6	5.9
乙酸乙酯部位	188	11.7 ± 0.7	12.2
正丁醇部位	22	13.2 ± 0.8	0.7
乙醇部位	321	9.6 ± 1.7 ³⁾	50.7

表 3 解毒活血滋阴方不同提取部位对 IL-6, TNF-α 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of different extract fractions of Jiedu Huoxue Ziyin recipe on IL-6, TNF-α ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹	TNF-α /ng·L ⁻¹
正常	-	80.09 ± 0.63	100.55 ± 1.4
模型	-	97.65 ± 0.5 ²⁾	138.35 ± 1.86 ²⁾
吡啶美辛	10	80.69 ± 0.62 ⁴⁾	104.98 ± 1.26 ⁴⁾
水提取部位	966	81.16 ± 1.21 ⁴⁾	116.01 ± 1.2 ³⁾
乙醚部位	59	94.12 ± 1.15	135.58 ± 2.63
乙酸乙酯部位	188	95.21 ± 1.35	137.57 ± 1.79
正丁醇部位	22	95.15 ± 1.4	138.04 ± 1.32
乙醇部位	321	80.40 ± 1.06 ⁴⁾	104.43 ± 0.89 ⁴⁾

硫唑嘌呤、糖皮质激素等在治疗 SLE 中发挥着重要作用,但这些药物存在选择性不强、毒副作用大等缺点^[12]。因此,研究开发治疗 SLE 的新型免疫抑制剂是目前亟待解决的问题。解毒活血滋阴方以白花蛇舌草、生地黄、赤芍、苏木、青蒿、山茱萸等药材组成,其复方所含成分包括:黄酮类、苯丙素类、萜类、挥发油、鞣质以及多种植物多糖、氨基酸等。由于各类成分间性质差异较大,传统的水煎煮法不能充分利用该方有效成分,故本研究将解毒活血滋阴方全方药材分别以有机性和水性溶剂进行提取,并建立不同部位研究体系,旨在全面把握复方中不同性质的有效成分,以其根本的药效物质基础来阐述所具有的药理活性,为后续对于解毒活血滋阴方针对抗炎活性的药效理论、药效机制研究奠定坚实基础。

本研究分别从急性、亚急性和慢性炎症角度考察了解毒活血滋阴方不同部位群抗炎的活性,据实验结果分析可知:水提取部位、乙醇部位具有较好的抗炎活性,这可能与复方中所含的苷类(白花蛇舌草、山茱萸)、萜类(青蒿、地黄、赤芍)、苯丙素类(赤芍)等有莫大关系,而该类成分受极性等性质约束

主要集中于水提取部位、乙醇部位,也从理论上验证了本研究结果的科学性。

通过一系列抗炎活性药理实验以及对 IL-6 及 TNF-α 表达的影响研究,证明解毒活血滋阴方有效部位群中,水提取部位、乙醇部位有较好的抗炎效果。它们的抗炎活性与阳性药组(吡啶美辛)相比无显著性差异;水提取部位与乙醇部位在对抗炎症时又各有所长,水提取部位在急性抗炎试验中表现出显著性,而在慢性抗炎实验中表现出极显著性;这与乙醇部位恰巧相反,说明水提取部位长于慢性炎症,而乙醇部位长于急性炎症,但具体机制以及作用机制尚需进一步实验探讨。

[参考文献]

[1] 中华医学会风湿病学分会. 系统性红斑狼疮诊治指南(草案)[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(8): 508-513.

[2] 卞华, 吕芹, 毛秉豫, 等. 解毒祛瘀滋阴法对系统性红斑狼疮发病中 CD28/B7 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(4): 501-503.

[3] 卞华, 吕芹. 系统性红斑狼疮从虚毒瘀论治[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(10): 31-32.

[4] 陈永康. 白花蛇舌草的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学, 2010, 16(7): 290-293.

[5] 王瑞, 鲁岚, 李颖伟, 等. 赤芍与白芍的药理作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 112-114.

[6] 力弘. 小鼠狼疮样综合征模型的建立以及雷公藤红素抗炎免疫抑制作用的研究[D]. 上海: 复旦大学博士论文, 2006.

[7] 方剑乔, 刘芳, 邵晓梅, 等. 电针对角叉菜胶致炎大鼠的抗炎效应及对白细胞介素-1β、肿瘤坏死因子-α 的影响[J]. 针刺研究, 2007, 32(4): 224-228.

[8] 付桂香, 李建民, 周勇, 等. 山茱萸总苷抗炎免疫抑制作用及其机理的大鼠实验研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(4): 316-320.

[9] 吕晓东, 杨胜, 齐春会, 等. 山茱萸鞣质活性部位对佐剂性关节炎大鼠免疫功能的影响[J]. 中草药, 2004, 35(9): 1023-1026.

[10] 王宇翎, 张艳, 方明, 等. 白花蛇舌草总黄酮的抗炎及抗菌作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 348-350.

[11] Rajadhyaksha A G, Mehra S, Nadkar M Y. Biologics in SLE: the current status[J]. J Assoc Physicians India, 2013, 61(4): 262-267.

[12] Gurevitz S L, Snyder J A, Wessel E K, et al. Systemic lupus erythematosus: a review of the disease and treatment options[J]. Consult Pharm, 2013, 28(2): 110-121.

[责任编辑 周冰冰]