

# 金铁锁及其总皂苷体内抗炎作用分析

邓祎, 钱子刚, 刘武林, 丁雄, 陈海丰\*  
(云南中医学院, 昆明 650500)

**[摘要]** **目的:**探讨金铁锁(PR)及其总皂苷(PRTS)的抗炎镇痛作用,并探讨其抗炎机制。**方法:**实验动物随机分为空白组(大鼠),模型组(大鼠、小鼠),阳性药组(小鼠:吡罗美辛,元胡止痛胶囊 $0.585\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),金铁锁75%乙醇提取物(PR)高、中、低剂量组(小鼠: $0.651\ 1, 0.217, 0.072\ 35\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,大鼠: $0.450\ 8, 0.150\ 3, 0.050\ 08\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),金铁锁总皂苷(PRTS)高、低剂量组(小鼠: $0.233\ 4, 0.025\ 94\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,大鼠: $0.161\ 6, 0.017\ 96\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。采用醋酸诱导扭体实验和热板实验来评价镇痛作用;采用二甲苯诱导小鼠耳肿胀实验,脂多糖(LPS)诱导大鼠腹膜炎来评价抗炎作用,通过苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠腹膜组织的病理变化,酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清中的炎症因子白细胞介素(IL)-6,IL-10。探寻潜在机制,通过大鼠肠系膜组织免疫组化观察肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65的表达。**结果:**与空白组比较,PR及PRTS各剂量组减轻小鼠耳肿胀( $P < 0.01$ ),减少小鼠化学致痛扭体次数( $P < 0.05, P < 0.01$ );PRTS高剂量组能提高小鼠痛阈值( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,PR及PRTS各剂量组对急性腹膜炎大鼠腹膜组织病变有所改善,能降低炎症因子IL-6含量( $P < 0.01$ ),同时降低TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,NF- $\kappa$ B p65在肠系膜组织的表达,PR高剂量及PRTS高剂量组能降低IL-10含量( $P < 0.05$ )。**结论:**金铁锁及总皂苷具有一定的镇痛抗炎作用,其机制可能与下调炎症因子的释放与表达,抑制NF- $\kappa$ B信号通道有关。

**[关键词]** 金铁锁; 总皂苷; 抗炎; 镇痛; 核转录因子- $\kappa$ B p65; 免疫组化

**[中图分类号]** R22;R285.5;R281;R254.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0165-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180633

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1413.025.html>

**[网络出版时间]** 2017-12-27 13:49

## Anti-inflammatory Activity of Psammosilenes Radix and Total Saponins *in Vivo*

DENG Yi, QIAN Zi-gang, LIU Wu-lin, DING Xiong, CHEN Hai-feng\*  
(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-inflammatory and analgesic effects of Psammosilenes Radix (PR) and PR total saponins (PRTS), and explore its possible mechanism of anti-inflammatory. **Method:** The animals were randomly divided into blank control group, model control group, positive drug group (mice: indomethacin, Yuanhu Zhitong capsule  $0.585\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), PR high, medium and low dose groups (mice:  $0.651\ 1, 0.217, 0.072\ 35\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , rats:  $0.450\ 8, 0.150\ 3, 0.050\ 08\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), PRTS high and low dose groups (mice:  $0.233\ 4, 0.025\ 94\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , rats:  $0.161\ 6, 0.017\ 96\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The analgesic effect was evaluated by acetic acid-induced writhing experiments and hot plate experiments. Xylene-induced mouse ear swelling test and lipopolysaccharide (LPS) induced acute peritonitis in rats were used to evaluate its anti-inflammatory effect; the pathological changes of peritoneal tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; cell factor of interleukin (IL)-6, IL-10 were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression

**[收稿日期]** 20170920(010)

**[基金项目]** 云南省应用基础研究计划项目(2014FZ071)

**[第一作者]** 邓祎,在读硕士,从事金铁锁抗炎机制研究,Tel:18487476424,E-mail:952364654@qq.com

**[通信作者]** \*陈海丰,博士,副教授,硕士生导师,从事中药学教学和和相关研究工作,Tel:18669222090,E-mail:chenhaifeng0701@sina.com

levels of tumor necrosis factor (TNF)  $-\alpha$ , IL-1 $\beta$  and nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) p65 were detected by immunohistochemistry in rat mesenteric tissues. **Result:** As compared with the blank control group, PR and PRTS treatment groups could inhibit the mice ear swelling ( $P < 0.01$ ), and obviously decrease writhing times ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); PRTS high dose group could remarkably improve the pain threshold of hot-plate test ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, PR and PRTS treatment groups could improve the peritoneal histopathology of acute peritonitis rats and decrease the content of IL-6 ( $P < 0.01$ ); the expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B p65 in the mesenteric tissues were significantly decreased; and the high dose of PR and PRTS could significantly decrease the levels of IL-10 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PR and PRTS have certain analgesic and anti-inflammatory effects, and its mechanism may be related to down-regulating the expression of inflammatory factors and inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

[**Key words**] Psammosilenes Radix (PR); total saponins; anti-inflammatory; analgesia; nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) p65; immunohistochemical

炎症是具有血管系统的活体组织对损伤因子所发生的复杂的防御反应,是人类疾病中最常见的一种病理过程,与大多数疾病相关。炎症的基本病理变化包括局部组织的变质、渗出和增生<sup>[1-2]</sup>。多数学者将炎症分为急性和慢性 2 种。急性反应主要为淋巴细胞浸润还让激活,具有免疫和防御功能,可以防控病原体的侵入和损害。慢性炎症是由于致炎因子持续存在和作用,产生细胞和组织的损伤,还可以产生各种疾病,如肿瘤、心脑血管病、神经退行性变、变态反应性疾病等。因此,抗炎是防治人类重大疾病的一个非常重要的环节。为寻找效果好,毒副作用小的抗炎药物,了解药物对炎症信号通路的影响,发现其作用机制显得尤为重要。

金铁锁为石竹科植物,其主要化学成分为三萜、三萜皂苷及环肽类成分,其中三萜皂苷为齐墩果烷型五环三萜。首载于《滇南本草》,治疗胃气、心气痛。民间更常用于跌打损伤、风湿痹证。金铁锁更是传统经典云南白药的重要组方药材之一,而云南白药有抗炎、镇痛、止血、化瘀之功效。现代药理研究发现,金铁锁水煎浸膏对实验性类风湿关节炎小鼠的关节痛有显著的镇痛作用<sup>[3]</sup>。目前针对金铁锁及其总皂苷的抗炎活性响应研究较少,因此,本研究结合金铁锁的临床应用以及云南白药的功效,运用现代药理的方法筛选金铁锁抗炎活性部位群并研究其抗炎机制,为金铁锁的临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物和试剂** 冰乙酸(广东光华化学厂有限公司,批号 20101119);二甲苯,甲醛,无水乙醇,95%乙醇(四川西陇化工有限公司,批号分别为 160203,160702,141008,150504);元胡止痛胶囊(云南龙发制药有限公司,批号 160503);吡哆美辛缓释

胶囊(北京红林制药有限公司,批号 1160301);水合氯醛(上海国药有限公司,批号 20161023);脂多糖(LPS)(美国 Sigma 公司,055:B5,批号 L2880);白细胞介素(IL)-6,IL-10 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为 B10010577,Y05010578);苏木素-伊红(HE)染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1120);中性树胶(上海华灵康复器械厂,批号 20140226);柠檬酸组织抗原修复液,DAB 显色试剂盒,MaxVision™ 试剂盒(鼠抗兔),磷酸盐缓冲液(PBS)(福建迈新试剂,批号分别为 160406432D,1612010031,161110407Q,15041301);兔抗大鼠多克隆肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ );IL-1 $\beta$  抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab6671,ab9722);兔抗大鼠多克隆核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) p65 抗体(美国 Proteintech 公司,批号 10745-1-AP);封闭用正常山羊血清(北京索莱宝科技有限公司,批号 20160929)。

**1.2 仪器** RB-200 型智能热板仪(成都泰盟科技有限公司),9010-0080 BD 53 型恒温箱(德国 Binder 公司),L420 型台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),SpectraMax Plus384 型连续光谱扫描式酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),EYELA SB-1100 型旋转蒸发仪(日本东京理化),YP6001N 型电子天平(上海精科天美仪器有限公司),Eclipse 80i 型高级研究用正置(明场微分干涉系统)生物数码摄影显微镜(日本 Nikon 公司)。

**1.3 植物来源及样品制备** 研究植物采购于云南绿生中草药开发有限公司,经云南中医学院钱子刚教授鉴定为金铁锁 *Psammosilene tunicoides* 的根。称取金铁锁粉末 800 g,加 5 倍量 75% 乙醇,回流提取 3 次,合并滤液,回收乙醇,得到金铁锁 75% 乙醇提

取物 (PR, 300.9 g)。取部分提取物 (87.6 g) 进一步使用 AB-8 大孔吸附树脂净化, 依次用水和 90% 乙醇洗脱, 收集 90% 乙醇洗脱部分, 回收乙醇, 得到金铁锁总皂苷 (PRTS, 31.1 g)。给药前用蒸馏水稀释到所需浓度。

**1.4 动物分组** 小鼠 ( $20 \pm 2$ ) g 和 SD 大鼠 ( $200 \pm 20$ ) g 由云南中医学院动物实验中心提供, 动物合格证号分别为 SCXK (湘) 2013-0004, SCXK (川) 2013-0024。所有动物实验均符合云南中医学院动物实验伦理委员会的要求。在所有实验开始之前, 动物需要适应性喂养 3 d, 自由采食饮水。

## 2 方法

**2.1 二甲苯诱导小鼠耳肿胀的检测** 70 只雄性小鼠被随机分成 7 组, 分别灌胃 (*ig*) 给予金铁锁醇提取物高、中、低剂量  $0.6511, 0.217, 0.07235 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (按生药量计), 金铁锁总皂苷高、低剂量  $0.2334, 0.02594 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (按生药量计), 阳性药组灌胃给予吡哌美辛  $0.585 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 模型组给予相同体积的生理盐水。连续给药 7 d, 1 d/次。末次给药 40 min 后, 右耳廓正、反两面均匀涂抹二甲苯 ( $20 \mu\text{L}/\text{只}$ )<sup>[4]</sup>, 20 min 后颈椎脱臼法处死, 沿耳廓线剪下双耳, 用打孔器在两耳同一位置冲下耳片, 分别称重 (左耳作为对照), 以两耳片的差值作为肿胀度。

**2.2 小鼠热板法致痛反应的检测** 调节热板仪温度为 ( $55 \pm 0.5$ ) °C, 以雌性小鼠舔后足为疼痛反应指标, 并记录小鼠的初始痛阈值。每只小鼠间隔 5 min 测试 2 次, 计算平均热痛反应时间。小鼠痛阈值  $< 5 \text{ s}$  或  $\geq 30 \text{ s}$  则被淘汰。将所有合格的小鼠随机分成 7 组, 分别 *ig* 给予金铁锁醇提取物高、中、低剂量  $0.6511, 0.217, 0.07235 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 金铁锁总皂苷高、低剂量  $0.2334, 0.02594 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 阳性药组灌胃给予元胡止痛胶囊  $0.585 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 空白组给予相同体积的生理盐水。连续给药 7 d, 1 次/d。末次给药后 15, 30, 60 min 分别记录小鼠舔后足时间, 未出现舔足 60 s 拿出, 按 60 s 计算<sup>[5]</sup>。

**2.3 醋酸所致小鼠扭体反应的检测** 将 70 只雌性小鼠随机分组同 2.1 项, 末次给药 40 min 后腹腔注射 (*ip*) 0.6% 冰醋酸 ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 3 min 后开始记录, 记录 15 min 内的扭体次数<sup>[5]</sup>。

**2.4 LPS + 冰醋酸所致大鼠腹膜炎的检测** 将 56 只大鼠随机分成 7 组, 分别 *ig* 给予金铁锁醇提取物高、中、低剂量  $0.4508, 0.1503, 0.05008 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (按生药量计), 金铁锁总皂苷高、低剂量  $0.1616, 0.01796 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (按生药量计), 空白组和模型组给

予相同体积的生理盐水, 连续灌胃给药 7 d, 1 次/d。造模前 12 h 禁食不禁水, 末次给药 40 min 后 *ip*  $0.6\%$  冰乙酸 ( $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 1 h 后 *ip* LPS ( $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 造模后自由进食、饮水<sup>[10]</sup>。造模 24 h 后, 用水合氯醛 ( $10\%, 0.03 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 麻醉, 腹主动脉取血, 离心, 分离血清,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。ELISA 测定血清中的 IL-6, IL-10 含量 (测定方法参照 ELISA kit 说明书), 留取右侧的腹膜及肠系膜, 10% 甲醛固定, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋, 切片, 做腹膜组织病理检查和免疫组化。

**2.4.1 HE 染色观察腹膜和肠系膜组织病理** 腹膜和肠系膜组织经 10% 甲醛固定, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明后, 用石蜡包埋, 做  $4 \mu\text{m}$  的薄片, 经  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  烤片融蜡后, 脱蜡复水, 0.5% 伊红水溶液染色, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察组织的病理变化。

**2.4.2 免疫组化测定大鼠肠系膜组织中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 的表达** 石蜡包埋的肠系膜组织做  $4 \mu\text{m}$  的薄片, 烤片融蜡, 二甲苯脱蜡复水后, 柠檬酸修复液高温高压抗原修复, 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 3 次, 每次 3 min, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育 10 min, 10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 滴加一抗 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, 1:1 000),  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜。PBS 洗 3 次, 再滴加适量生物素标记二抗工作液,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育。DAB 显色, 复染, 脱水, 透明, 封片。光学显微镜下观察炎症细胞的表达。

**2.5 统计学分析** 采用 origin6.0 统计软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 金铁锁醇提取物及其总皂苷对二甲苯诱导小鼠耳肿胀的影响** 吡哌美辛, 金铁锁醇提取物高、中剂量组, 金铁锁总皂苷高、低剂量组与空白组比较均明显减轻小鼠耳廓肿胀 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 金铁锁醇提取物及其总皂苷对二甲苯诱导小鼠耳肿胀的影响  
Table 1 Effect of PR and PRTS on ear edema by dimethyl benzene

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿胀度 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )	
		/mg	肿胀率 /%
模型	-	22.20 $\pm$ 3.82	147.02
吡哌美辛	0.585	3.90 $\pm$ 2.85 <sup>1)</sup>	23.08
金铁锁醇提取物	0.6511	1.60 $\pm$ 0.97 <sup>1,2)</sup>	11.51
	0.217	2.36 $\pm$ 1.12 <sup>1)</sup>	15.77
	0.07235	20.30 $\pm$ 2.45	117.35
金铁锁总皂苷	0.2334	2.64 $\pm$ 1.63 <sup>1)</sup>	16.77
	0.02594	8.70 $\pm$ 3.56 <sup>1,2)</sup>	58.39

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与吡哌美辛组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 金铁锁醇提取物及其总皂苷对小鼠致痛反应的影响** 金铁锁醇提取物 (PR) 高、中、低剂量及其金铁锁总皂苷高剂量均能减少扭体次数 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 金铁锁醇提取物高剂量组的抑制作用 (69.66%) 与吲哚美辛组比较 (62.76%) 镇痛率无明显差异。见表 2。热板实验结果表明, 在 30, 60 min 时金铁锁总皂苷高剂量组与空白组比较能显著延长舔后足时间 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 金铁锁高、中、低剂量及金铁锁醇提取物低剂量组对提高热刺激疼痛反应时间无明显影响。见表 3。

**3.3 金铁锁醇提取物及其总皂苷对腹膜炎大鼠血清 IL-6, IL-10 水平的影响** 模型组血清中 IL-6, IL-10 含量高于正常组 ( $P < 0.01$ ), 金铁锁醇提取物高、中、

表 2 金铁锁醇提取物及其总皂苷对醋酸诱导小鼠扭体的影响

Table 2 Effect of PR and PRTS in acetic acid-induced writhing test

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	15 min 内扭体数 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) /次	抑制率 /%
空白	-	29.00 ± 4.43	-
吲哚美辛	0.585	10.75 ± 5.85 <sup>2)</sup>	62.76
金铁锁醇提取物	0.651 1	8.5 ± 4.34 <sup>2)</sup>	69.66
	0.217	23.6 ± 6.58 <sup>2)</sup>	20.69
	0.072 35	24.75 ± 5.68 <sup>1)</sup>	14.49
金铁锁总皂苷	0.233 4	20.5 ± 1.29 <sup>2)</sup>	29.31
	0.025 94	26 ± 2.83	10.35

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

表 3 金铁锁醇提取物及其总皂苷对小鼠热板法致痛的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of PR and PRTS in hot-plate test ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	给药前痛阈	给药后痛阈 (提升率/%)		
			15 min	30 min	60 min
空白	-	9.33 ± 1.93	9.54 ± 3.39	9.90 ± 3.62	9.97 ± 2.78
元胡止痛胶囊	0.585	7.78 ± 1.98	14.28 ± 3.93 (83.55) <sup>2)</sup>	14.77 ± 3.42 (89.85) <sup>2)</sup>	15.70 ± 4.67 (101.80) <sup>2)</sup>
金铁锁醇提取物	0.651 1	9.04 ± 1.87	12.00 ± 2.82 (32.75) <sup>1)</sup>	10.96 ± 3.63 (21.24)	10.80 ± 3.18 (19.47)
	0.217	8.49 ± 2.78	8.89 ± 3.30 (4.72)	9.92 ± 4.76 (16.85)	9.27 ± 3.21 (9.19)
	0.072 35	9.32 ± 0.69	11.21 ± 3.50 (20.28)	12.25 ± 4.30 (31.44)	11.50 ± 4.13 (23.39)
金铁锁总皂苷	0.233 4	9.64 ± 2.29	10.94 ± 2.77 (13.49)	12.41 ± 2.45 (28.74) <sup>1)</sup>	13.02 ± 1.67 (35.07) <sup>2)</sup>
	0.025 94	9.11 ± 2.02	10.68 ± 5.03 (17.24)	11.45 ± 4.06 (25.69)	11.62 ± 2.91 (27.56)

低剂量及总皂苷高、低剂量组与模型组比较血清中 IL-6 水平均有明显降低 ( $P < 0.01$ ), 金铁锁高剂量组、金铁锁醇提取物高剂量组与模型组比较血清中 IL-10 水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 金铁锁醇提取物及其总皂苷对腹膜炎大鼠血清 IL-6, IL-10 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of PR and PRTS on level of IL-6, IL-10 in rat peritoneum ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	IL-6	IL-10
空白	-	18.49 ± 2.72	24.05 ± 2.07
模型	-	28.55 ± 2.58 <sup>1)</sup>	33.99 ± 2.31 <sup>1)</sup>
金铁锁醇提取物	0.450 8	17.03 ± 3.14 <sup>2)</sup>	23.42 ± 1.42 <sup>2)</sup>
	0.150 3	23.47 ± 2.23 <sup>2)</sup>	32.28 ± 2.03
	0.050 08	7.45 ± 2.39 <sup>2)</sup>	33.54 ± 3.01
金铁锁总皂苷	0.161 6	16.21 ± 1.49 <sup>2)</sup>	22.27 ± 1.63 <sup>2)</sup>
	0.017 96	5.47 ± 1.66 <sup>2)</sup>	40.39 ± 4.24

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

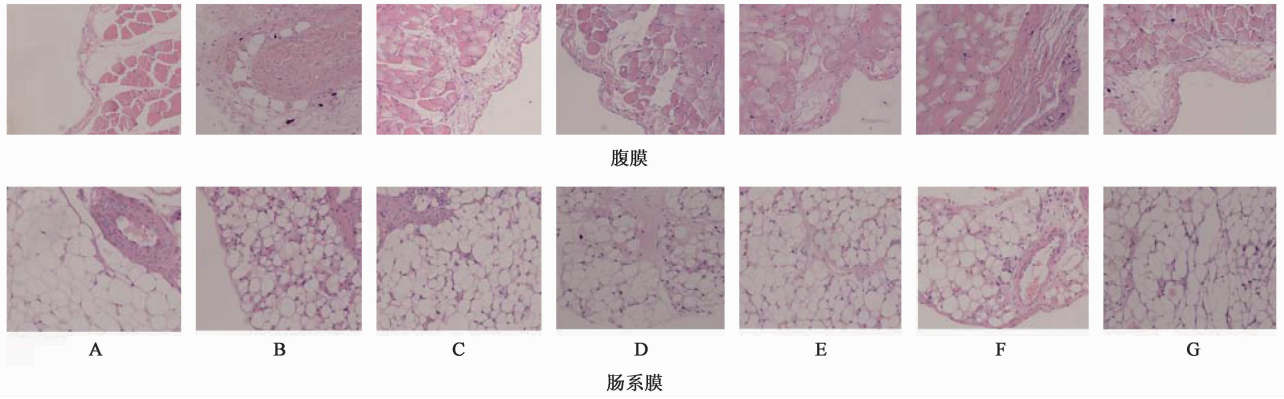
**3.4 金铁锁醇提取物及其总皂苷对腹膜组织和肠系膜组织病理改变的影响** 与空白组对比, 模型组腹

膜组织出现明显充血水肿, 肠系膜组织出现炎性细胞浸润。金铁锁及其总皂苷各剂量组治疗的动物腹膜组织充血水肿, 肠系膜组织炎性细胞浸润均有所减轻。见图 1。

**3.5 金铁锁醇提取物及其总皂苷对肠系膜组织 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响** TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 在大鼠造模后与空白组比较 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 阳性表达均上调 ( $P < 0.01$ ), 金铁锁高、中、低剂量及金铁锁总皂苷高剂量组中活化的 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65 与模型组比较阳性表达明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 金铁锁总皂苷低剂量组中活化的 TNF- $\alpha$  与模型组比较阳性表达明显减少 ( $P < 0.01$ )。见表 5, 图 2。

#### 4 讨论

本研究的目的是观察金铁锁醇提取物及其总皂苷的抗炎镇痛作用, 探讨其抗炎机制。金铁锁作为云南白药的主要组方药材之一, 在本研究中, 结合金铁锁的临床应用及云南白药的主要功效, 采用醋酸诱导扭体实验和热板实验评价镇痛作用<sup>[6]</sup>, 实验结果



A. 空白组; B. 模型组; C~E. 金铁锁粗提物高、中、低剂量组; F~G. 金铁锁总皂苷高、低剂量组(图 2 同)

图 1 金铁锁醇提物及其总皂苷对大鼠腹膜、肠系膜组织炎症病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of PR and PRTS on pathology of peritoneal, mesenteric inflammation(HE, ×200)

表 5 金铁锁醇提物及其总皂苷对肠系膜组织 TNF-α, IL-1β, NF-κB p65 蛋白阳性细胞数的影响(̄x ± s, n = 3)

Table 5 Effect of PT and PTTS on Expression of TNF-α, IL-1β and NF-κB p65 in mesentery tissue(̄x ± s, n = 3)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF-α	IL-1β	NF-κB p65
空白	-	1.25 ± 0.50	1.25 ± 0.50	1.5 ± 0.58
模型	-	14.33 ± 5.03 <sup>1)</sup>	9.67 ± 0.58 <sup>1)</sup>	10.67 ± 1.89 <sup>1)</sup>
金铁锁醇提物	0.450 8	6.00 ± 0.82 <sup>3)</sup>	7.00 ± 1.00 <sup>3)</sup>	5.00 ± 2.00 <sup>3)</sup>
	0.150 3	5.75 ± 1.71 <sup>3)</sup>	6.00 ± 1.00 <sup>2)</sup>	5.75 ± 1.50 <sup>3)</sup>
	0.050 08	6.20 ± 1.10 <sup>2)</sup>	6.33 ± 1.53 <sup>2)</sup>	5.25 ± 0.96 <sup>3)</sup>
金铁锁总皂苷	0.161 6	5.33 ± 0.58 <sup>2)</sup>	6.33 ± 0.58 <sup>3)</sup>	5.33 ± 1.53 <sup>2)</sup>
	0.017 96	4.33 ± 0.58 <sup>2)</sup>	6.67 ± 2.52	8.33 ± 2.08

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05, <sup>3)</sup>P < 0.01。

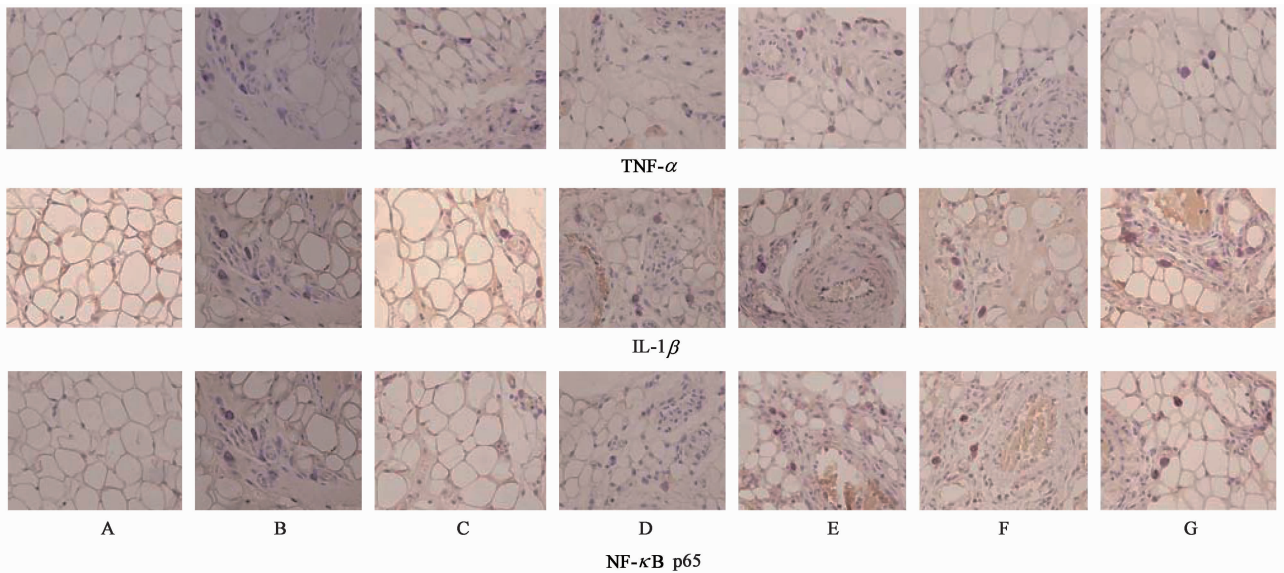


图 2 金铁锁醇提物及其总皂苷对 TNF-α, IL-1β, NF-κB p65 蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 2 Effect of PT and PTTS on expression of TNF-α, IL-1β and NF-κB p65 (IHC, ×400)

表明,金铁锁醇提物及其总皂苷对醋酸所致小鼠扭体镇痛作用较为明显,采用二甲苯诱导小鼠耳肿胀

来评价抗炎作用,该模型操作简便、重复性较好,是国内外抗炎活性研究中应用较普遍的模式<sup>[7-9]</sup>。结

果表明金铁锁醇提物及其总皂苷能显著抑制小鼠耳肿胀。通过经典模型试验,结果表明金铁锁具有良好的抗炎镇痛的作用,且有效部位群为总皂苷。

为了进一步深入研究其抗炎作用的机制,通过对LPS诱导腹膜炎模型,进行腹膜、肠系膜组织病理学检查,结果表明金铁锁及总皂苷治疗组减轻腹膜组织水肿充血,减少肠系膜组织炎性细胞的浸润。

有研究报道<sup>[10]</sup>,NF- $\kappa$ B信号通道参与了LPS诱导的腹膜炎,通过下调NF- $\kappa$ B p65从而改善腹膜炎。本研究结果表明,金铁锁高、中、低剂量及其总皂苷高剂量组NF- $\kappa$ B p65免疫组化阳性细胞表达有明显降低。NF- $\kappa$ B信号转导通路被激活后,促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$ 等)、黏附分子、趋化因子、凝血因子的大量合成和释放,从而加重炎症反应。通过抑制炎症中促炎因子产生(TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$ ),下调炎症介质NF- $\kappa$ B的表达,从而达到缓解炎症的作用<sup>[11-12]</sup>。研究结果显示,通过ELISA测试金铁锁醇提物及其总皂苷治疗组血清中IL-6的含量均有所降低,金铁锁醇提物及总皂苷高剂量组能明显降低血清中IL-10,金铁锁及其总皂苷各剂量组中TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 免疫组化阳性细胞表达均有明显减少。

综上所述,金铁锁醇提物及总皂苷具有显著的抗炎活性,能降低炎症因子的释放TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$ ,IL-10,抑制NF- $\kappa$ B p65的表达,这提示金铁锁醇提物及其总皂苷抗炎作用机制与抑制NF- $\kappa$ B信号通路有关。

#### [参考文献]

[1] 李玉林. 病理学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2008:300-301.  
[2] Kumar V, Abbas A K, Fausto N, et al. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* [M]. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005: XV1525p.  
[3] 许建阳,王发强,郑维发,等. 金铁锁对实验性RA小鼠痛阈及血清NO/NOS含量的影响[J]. 中医药学刊,2004,22(1):82-84.  
[4] 余昕,欧丽兰,钟志容,等. 坚龙胆抗炎活性部位筛选

及抗炎机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(6):160-164.

[5] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006:366-367.  
[6] LIU X B, YANG B X, ZHANG L, et al. An *in vivo* and *in vitro* assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of *Clematis terniflora* DC. extract, participation of aurantiamide acetate [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015,169(4):287-294.  
[7] CHEN X B, SU H W, LIU H X, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of Bi-yuan-ling granules [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2016,36(3):456-462.  
[8] 何雷,杨顺丽,吴德松,等. 乔木茵芋中的香豆素类化合物及其抗炎活性研究 [J]. 中国中药杂志,2012,38(6):811-813.  
[9] LI Q Z, YANG S R, YANG S L, et al. Anti-inflammatory activity of phlomisioside F isolated from *Phlomis younghusbandii* Mukerjee [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015,28(1):724-730.  
[10] ZHANG Y F, ZOU X L, WU J, et al. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  agonist, attenuates inflammation *via* NF- $\kappa$ B inhibition in lipopolysaccharide-induced peritonitis [J]. *Inflammation*, 2015,38(6):2105-2115.  
[11] Doss H M, Ganesan R, Rasool M. Trikatu, an herbal compound ameliorates rheumatoid arthritis by the suppression of inflammatory immune responses in rats with adjuvant-induced arthritis and on cultured fibroblast like synoviocytes *via* the inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2016,258(6):175-186.  
[12] Rohit K, Vinod N, Yogendra K G, et al. Berberis aristata ameliorates adjuvant-induced arthritis by inhibition of NF- $\kappa$ B and activating nuclear factor-E<sub>2</sub>-related factor 2/hemoxygenase (HO)-1 signaling pathway [J]. *Immunol Invest*, 2016,45(6):473-489.

[责任编辑 邹晓翠]