

瘤果黑种草子总黄酮抗炎及平喘作用

张宏涛, 张淑锋, 陈雪莲, 耿东升*

(新疆军区联勤部药品仪器检验所, 乌鲁木齐 830063)

[摘要] **目的:** 观察瘤果黑种草子总黄酮(TFNG)的抗炎及平喘作用。**方法:** 选择昆明种小鼠、SD大鼠及健康豚鼠为实验动物, 随机分为生理盐水组、阳性药对照组、TFNG低、高剂量组(小鼠 $100, 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 大鼠 $71.5, 286 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀、大鼠棉球肉芽肿实验观察总黄酮抗炎作用; 采用整体动物小鼠喷雾致喘实验、离体豚鼠肺支气管灌流实验及离体回肠实验考察总黄酮的平喘作用。**结果:** TFNG $100, 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显抑制小鼠二甲苯所致的耳廓肿胀度, TFNG $71.5, 286 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可抑制大鼠棉球肉芽肿($P < 0.01$); TFNG $100, 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显延长小鼠哮喘反应的潜伏期($P < 0.01$); TFNG $3, 6, 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 可明显增加豚鼠肺灌流量, 降低豚鼠回肠平滑肌收缩张力($P < 0.01$)。**结论:** 瘤果黑种草子总黄酮具有一定的抗炎及平喘作用。

[关键词] 瘤果黑种草子总黄酮; 抗炎作用; 平喘作用; 耳廓肿胀; 棉球肉芽肿; 支气管肺灌流

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0166-04

[doi] 10.11653/syjf2014010166

Anti-inflammatory and Asthma-relieving Effects of Total Flavones from *Nigella glandulifera*

ZHANG Hong-tao, ZHANG Shu-feng, CHEN Xue-lian, GENG Dong-sheng*

(Institute for Drug and Instrument Control, Xinjiang Military Command, Urumqi 830063, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-inflammatory and asthma-relieving effects of total flavones from *Nigella glandulifera* (TFNG). **Method:** KM mice, SD rats and New Zealand rabbits were selected as experiment animal, randomly divided into saline control group, positive control group, TFNG low dosage and high dosage groups (mouse $100, 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, rat $71.5, 286 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The mice external ear swelling induced by dimethyl benzene and rats cotton ball granuloma experiments were employed to evaluate the anti-inflammatory effect; asthma experiment induced by spraying the whole mice, isolated lung perfusion and isolated ileum smooth muscle experiments in guinea pigs were employed to evaluate the asthma-relieving effect. **Result:** TFNG $100, 400, 71.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ could significantly inhibit dimethyl benzene-induced mice ear swelling and TFNG $286 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ could significantly inhibit cotton pellet granuloma in rats ($P < 0.01$); the low and high dosage ($100, 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) TFNG could significantly prolong the mice asthmatic response latency ($P < 0.01$); the low, middle and high dosage TFNG ($3, 6, 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) could increase the perfusion of the isolated guinea pig lung, reduce the smooth muscle contraction of isolated guinea pig ileum significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** TFNG has some anti-inflammatory and asthma-relieving effects.

[Key words] total flavones from *Nigella glandulifera*; anti-inflammatory effect; asthma-relieving effect; ear swelling; cotton pellet granuloma; bronchial-pulmonary perfusion

[收稿日期] 20130511(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960512)

[第一作者] 张宏涛, 主管药师, 从事药品检验, Tel:0991-4975201, E-mail: zht2727@163.com

[通讯作者] * 耿东升, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药与抗炎免疫药理, Tel:0991-4975278, E-mail: dongsheng811@sina.com

瘤果黑种草属毛茛科黑种草属金莲花亚科植物,是新疆特有的植物资源,其种子具油性及特异芳香,性味甘、辛、温,为我国新疆维吾尔族常用药材^[1]。黑种草子对哮喘和支气管炎有治疗作用,是呼吸道疾病常用的维药之一,如治哮喘,用黑种草子拌蜂蜜冲服^[2]。瘤果黑种草子总黄酮(TFNG)是维药瘤果黑种草的干燥成熟种子中提取的化学组分^[3]。目前,TFNG是否是瘤果黑种草子(NG)抗炎平喘的药效物质基础研究尚未见报道。为进一步探讨瘤果黑种草子总黄酮的药理作用,本文采用相关药理实验研究其抗炎及平喘作用,为研究和开发该民族药材奠定理论基础及实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级昆明种小鼠,体重18~22 g,雌雄各半;SPF级SD大鼠,体重180~220 g,雌雄各半;普通级健康豚鼠,体重350~450 g,雌雄各半,均由新疆医科大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(新)2011-0004。

1.2 药物与试剂 瘤果黑种草子购自新疆和田墨玉县,经新疆中药民族药研究所研究员李晓瑾鉴定为*Nigella glandulifera* Freyn的种子,批号2011308;总黄酮苷粉末由课题前期对瘤果黑种草子采用40%乙醇回流提取,大孔树脂分离及聚酰胺树脂纯化而得,总黄酮质量分数为65.5%;NG水煎液浓缩至1 mL药液含1 g药材浸膏后加蒸馏水配成相应浓度的溶液。戊巴比妥钠,中国医药集团上海化学试剂公司,批号F20030816;二甲苯,天津市百世化工有限公司,批号20070416;阿司匹林片,西安利君制药有限公司,批号20101006;氯化乙酰胆碱,四川锡成药业有限公司,批号11070203;磷酸组胺,上海蓝季科技发展有限公司,批号110318;氨茶碱片,四川锡成药业有限公司,批号11070203;异丙肾上腺素溶液,上海禾丰制药有限公司,批号20060903;硫酸阿托品,上海禾丰制药有限公司,批号20081029。

1.3 仪器 AB104-N型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),BS124S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),支气管灌流装置(新疆医科大学机能中心药理实验室),恒温水浴泵(重庆试验设备厂一分厂),BL-420生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司),HV-20型无油空压机(济南浩伟实验仪器有限公司)。

2 方法

2.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验^[4] 小鼠50只,随

机分成5组,每组10只,雌雄各半。分组为:对照组、阳性药(阿司匹林100 mg·kg⁻¹)组、NG水煎液对照组(900 mg·kg⁻¹)及TFNG低、高剂量组(100,400 mg·kg⁻¹)。均ig给药10 mL·kg⁻¹,1次/d,连续5 d,末次给药后30 min,在小鼠右耳廓内外侧涂抹二甲苯0.02 mL/只,30 min后处死并剪下左右耳,以6 mm打孔器在每只小鼠的左右耳取相同面积的耳片,分别称重,以右耳减去左耳的差值为肿胀度,计算各组耳廓肿胀抑制率。

$$\text{肿胀抑制率} = (\text{肿胀度}_{\text{对照组}} - \text{肿胀度}_{\text{给药组}}) / \text{肿胀度}_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.2 大鼠棉球肉芽肿实验^[5] 大鼠40只随机分为5组,雌雄各半,每组8只。分别为模型组、阳性对照组(阿司匹林70 mg·kg⁻¹)、NG水煎液对照组(650 mg·kg⁻¹)及TFNG低、高剂量组(71.5,286 mg·kg⁻¹)。大鼠用0.3%戊巴比妥钠溶液(10 mL·kg⁻¹)麻醉后,腹部去毛消毒,在无菌操作下经腹部切口,将2个无菌棉球(分别植入大鼠腹部两侧皮下,随即缝合皮肤,用碘液消毒后常规饲养。各给药组在手术次日灌胃给药,连续7 d,第8天颈椎脱臼处死,取出棉球,在60℃烤箱放置12 h后称重,计算各组棉球肉芽抑制率。

$$\text{肉芽抑制率} = (\text{肉芽肿重}_{\text{正常对照}} - \text{肉芽肿重}_{\text{给药组}}) / \text{肉芽肿重}_{\text{正常对照}} \times 100\%$$

2.3 小鼠喷雾致喘实验^[6] 选择在引喘预实验中引喘潜伏期>15 s的小鼠50只,除阳性药为氨茶碱100 mg·kg⁻¹外,分组及给药剂量同2.1,于末次给药后1 h分别置于2.5 L的玻璃钟罩内,恒压引喘装置均匀并持续雾化喷入2%氯化乙酰胆碱和0.1%磷酸组胺等量混合液15 s,记录小鼠的引喘潜伏期(从喷雾开始到哮喘发作、呼吸极度困难,直至抽搐跌倒的时间),超过360 s以360 s计算。

2.4 豚鼠肺支气管灌流实验^[4,7] 豚鼠36只随机分为6组,雌雄各半,每组6只。分别为模型组、阳性对照(异丙肾上腺素50 g·L⁻¹)组、NG水煎液对照组(27 g·L⁻¹)及TFNG低、中、高剂量组(3,6,12 g·L⁻¹)。预先准备好肺支气管灌流装置,贮流瓶内充满含氧的乐氏营养液。取豚鼠,木槌击毙,切开颈动脉放血,迅速打开胸腔,暴露心脏及肺,剪下一段气管连同心脏及左右肺取出胸腔外,将肺浸入37℃含氧乐氏营养液的培养皿中,轻轻挤捏肺数次,以排除肺内的气体,然后将气管用线扎于灌流装置的套管上,以乐氏液灌流之,在肺表面可用针头散在穿孔7~9个,并调节灌流速度,液体流速为25

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (可计滴数)。待灌流量恒定后,可将 0.5 mL 药物注入套管顶端的橡皮管内。灌流量恒定后,注入 0.01% 组胺溶液 ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 mL,用药后 0.5 min,开始记录每分钟液体流出量,仔细观察其作用到达高峰时间及其作用持续时间;待恢复稳定后重复注入等量组胺,其作用明显后,各给药组按不同剂量分别注入药液 0.5 mL,模型组注入等量生理盐水。观察各组 10 min 内液体流出量,计算灌流量 ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)。

2.5 豚鼠离体回肠实验^[8] 取豚鼠 36 只,除阳性药为硫酸阿托品 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 外,分组及给药剂量同 2.4。豚鼠在实验前 1 d 禁食 (不禁水) 过夜,实验前木槌猛击其头部致死,颈动脉放血,迅速剖腹,取近盲肠部约 10 cm 回肠,置于盛有 37 °C 的 botting 液器皿中,沿肠壁剪去肠系膜,将肠管剪成 1.5 ~ 2 cm 的小段备用。将压力换能器与 BL420 生物机能实验系统连接,水温保持在 (37 ± 0.5) °C。取回肠 1 段,两端各穿 1 线,其中 1 线固定于 L 型通气管上,放入有 15 mL botting 液的浴槽内,溶液呈无色透明,溶液 pH 7.3,固定 L 型通气管,并调节恒温平滑肌槽的高度,然后缓慢通入氧气 (2 个气泡/s)。肠管另一端与压力换能器相连,加 1 g 负荷,打开 BL420 生物机能实验系统,待肠管运动恢复正常后,记录一段回肠正常活动的曲线,然后开始滴加药物。浴槽内加入乙酰胆碱 ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 mL,待作用明显时加入各组药物 0.5 mL,给药剂量同 2.4。每次加入药物后使之作用 3 ~ 5 min,观察其对回肠平滑肌收缩张力的影响,随后加入等量乙酰胆碱,观察其曲线的变化后,以 botting 液冲洗 2 ~ 3 次,待肠管收缩曲线恢复后再加入另一种药物。实验通过观察给药前后回肠肌收缩张力的变化来判断药物对平滑肌收缩的影响。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 阿司匹林组及 TFNG 高剂量组小鼠耳廓肿胀度均明显低于对照组 ($P < 0.01$); TFNG 低、高剂量对小鼠耳廓肿胀抑制率随剂量的增加而升高,见表 1。

3.2 对大鼠棉球肉芽肿的影响 阿司匹林组、NG 水煎液组及 TFNG 低、高剂量组大鼠棉球肉芽肿质量明显轻于模型组 ($P < 0.01$),阿司匹林组棉球肉芽肿质量明显轻于水煎液组 ($P < 0.01$),见表 2。

表 1 TFNG 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿胀度/mg	抑制率/%
对照	-	9.52 ± 3.38	
阿司匹林	100	$5.08 \pm 2.94^{1)}$	46.64
NG 水煎液	900	7.84 ± 3.62	17.65
TFNG	100	7.02 ± 3.74	26.26
	400	$5.90 \pm 2.29^{1)}$	38.03

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 TFNG 对大鼠棉球肉芽肿的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肉芽肿重/mg	肉芽抑制率/%
模型	-	131.0 ± 22.1	
阿司匹林	70	$82.0 \pm 16.9^{1,2)}$	37.4
NG 水煎液	650	$106.2 \pm 16.3^{1)}$	18.9
TFNG	71.5	$99.6 \pm 15.4^{1)}$	24.0
	286	$102.2 \pm 16.1^{1)}$	22.0

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 NG 水煎液组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 5 同)。

3.3 对小鼠平喘实验的影响 与对照组比较阳性药 (氨茶碱) 组、NG 水煎液组及 TFNG 低、高剂量均可明显延长小鼠哮喘反应潜伏期 ($P < 0.01$)。氨茶碱组及 TFNG 高剂量小鼠哮喘反应潜伏期长于 NG 水煎液组 ($P < 0.01$),见表 3。

表 3 TFNG 对小鼠平喘实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	潜伏期/s
对照	-	81.9 ± 4.28
氨茶碱	100	$150.5 \pm 7.84^{1,2)}$
NG 水煎液	900	$103.2 \pm 6.34^{1)}$
TFNG	100	$108.8 \pm 5.90^{1)}$
	400	$133.9 \pm 30.03^{1,2)}$

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 NG 水煎液组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 对豚鼠离体肺支气管灌流量的影响 与模型组比较,异丙肾上腺素组及 TFNG 低、中、高剂量均可显著增加豚鼠离体肺支气管气道灌流量 ($P < 0.01, P < 0.05$),异丙肾上腺素对照组及 TFNG 高剂量豚鼠离体肺支气管气道灌流量,明显高于 NG 水煎液组 ($P < 0.01$),见表 4。

3.5 对豚鼠离体回肠平滑肌的影响 与模型组比较,硫酸阿托品组、NG 水煎液组及 TFNG 低、中、高剂量均可显著降低豚鼠离体回肠平滑肌收缩张力 ($P < 0.01$);硫酸阿托品组及 TFNG 低、中、高剂量豚鼠离体回肠平滑肌收缩张力明显低于 NG 水煎液组 ($P < 0.01$);低、中、高剂量的 TFNG 对豚鼠离体

表4 TFNG对豚鼠离体肺支气管平滑肌的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	灌流量/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
模型	-	6.78 ± 0.19
异丙肾上腺素	50	16.30 ± 0.69 ^{1,3)}
NG水煎液	27	8.70 ± 0.21 ²⁾
TFNG	3	8.20 ± 0.55 ²⁾
	6	9.33 ± 0.98 ¹⁾
	12	10.90 ± 0.81 ^{1,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$;与NG水煎液组比较³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

回肠平滑肌收缩张力随剂量的增加而降低,见表5。

表5 TFNG对豚鼠离体回肠平滑肌的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	张力/g		收缩幅度降低/g
		给药前	给药后	
模型	-	1.24 ± 0.03	1.31 ± 0.03	0.07 ± 0.02
硫酸阿托品	2.0	0.92 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.62 ± 0.02 ^{1,2)}
NG水煎液	27	3.47 ± 0.75	3.34 ± 0.03	0.13 ± 0.06 ¹⁾
TFNG	3	1.37 ± 0.16	1.16 ± 0.01	0.21 ± 0.02 ^{1,2)}
	6	0.89 ± 0.32	0.58 ± 0.05	0.31 ± 0.03 ^{1,2)}
	12	1.59 ± 0.49	1.02 ± 0.03	0.57 ± 0.03 ^{1,2)}

4 讨论

急性炎症是由致炎因子作用于血管,使血管扩张、通透性增加,引起渗出,导致组织损伤,引起局部炎症反应和全身反应。慢性肉芽肿炎症是由致炎因子长期刺激局部引起慢性炎症及免疫反应,形成肉芽肿。本文采用了急性、慢性炎症动物模型,对TFNG的抗炎作用进行了初步研究,发现TFNG对二甲苯致小鼠耳廓肿胀及大鼠棉球肉芽肿均有明显的抑制作用,提示该药具有一定抗急性炎症和慢性炎症作用。

本实验通过对TFNG的平喘作用研究发现,乙酰胆碱和组胺混合液引发哮喘的整体动物实验中TFNG可明显延长小鼠哮喘反应潜伏期,提示该药

具有一定的平喘作用。本文进一步通过豚鼠肺灌流实验和离体回肠实验发现,TFNG各剂量可明显抑制组胺引起的离体肺支气管痉挛和乙酰胆碱引起的豚鼠离体回肠平滑肌收缩,提示该药物对平滑肌有一定的扩张作用。由此,笔者推测TFNG的平喘作用与使支气管平滑肌扩张有关。实验结果发现,水煎液的抗炎及对平滑肌舒张作用不及TFNG,说明TFNG可能是瘤果黑种草子中发挥抗炎、平喘作用的活性成分。另一方面,目前认为,气道慢性炎症可导致支气管平滑肌痉挛,因此考虑TFNG对慢性炎症的抑制作用也可能是其发挥平喘作用的主要原因之一,但作用的具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志. 第2卷. 第1分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1993:231.
- [2] 耿东升,张淑锋,兰建国. 瘤果黑种草子挥发油的化学成分分析及百里醌的定量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22):2887.
- [3] 刘玉明,杨峻山,刘庆华. 瘤果黑种草子化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(13):980.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:911,1359.
- [5] 郭强,李孟全,董凯,等. 咳尔康口服液对棉球所致肉芽肿的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2009, 30(6):5.
- [6] 洪佳璇,陈素红,高雅文,等. 消喘煎镇咳,平喘,抗炎作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2):169.
- [7] 王辉,苑艳霞,邱琳,等. 芥子碱平喘作用及其机制研究[J]. 中草药, 2011, 42(1):134.
- [8] 李仪奎,王钦茂. 中药药理学实验方法学[M]. 上海:上海科技出版社, 2002:432.

[责任编辑 李玉洁]