

金莲花总黄酮抗炎作用研究

刘平, 刘玉玲, 佟继铭*

(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 观察金莲花总黄酮(TFTL)的抗炎作用, 为其临床应用提供实验依据。方法: 以阿司匹林(Asp)及金莲花片(JLHT)为阳性对照药, 采用大鼠皮内色素渗出法、大鼠足跖肿胀实验、大鼠棉球肉芽肿法评价 0.1, 0.2, 0.4 g·kg⁻¹ TFTL 的抗炎活性。结果: TFTL 0.2, 0.4 g·kg⁻¹ 剂量组大鼠皮内蓝斑面积、蓝斑内色素含量(吸光度), 足肿胀度和肉芽肿质量均明显低于空白对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$); TFTL 0.4 g·kg⁻¹ 剂量组大鼠蓝斑内色素含量(吸光度), 足肿胀度和肉芽肿质量均明显低于 JLHT 2.4 g·kg⁻¹ 对照组($P < 0.05$); TFTL 0.4 g·kg⁻¹ 组足跖肿胀度低于 Asp 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); TFTL 对足跖肿胀度的抑制作用持续时间为 5~6 h, Asp 持续时间为 3 h。结论: TFTL 对大鼠急性炎症模型均有明显的抑制作用, 其作用优于金莲花片, 持续时间长于阿司匹林。

[关键词] 金莲花; 总黄酮; 抗炎; 色素渗出; 足跖肿胀度; 棉球肉芽肿

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0196-04

Anti-inflammatory Effect of Total Flavones of *Trollius Ledebouri* Reichb

LIU Ping, LIU Yu-ping, TONG Ji-ming*

(Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for New Drugs, Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[收稿日期] 20120215(005)

[基金项目] 河北省科技厅重大项目(07276444Z-3)

[第一作者] 刘平, 副主任医师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0314-2291116, E-mail: liu-ping18@126.com

[通讯作者] * 佟继铭, 教授, 研究生导师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0314-2290076, E-mail: tongjiming@163.com

$\text{min}^{-1} < \text{AUC 单独给药} = 6\ 945.530 (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$ 。

4 讨论

通过对配伍前后异钩藤碱在肝脏组织中的分布进行了研究且对其配伍前后的相关性进行了探讨并通过药动学件对相关数据进行分析可知, 异钩藤碱与天麻素配伍前后异钩藤碱在肝脏内的分布无显著性差异。配伍前, 异钩藤碱在肝脏中分布的 T_{\max} 在 120 min, 配伍后, 异钩藤碱在肝脏的分布最大浓度 (C_{\max}) 有一定增加, 且 T_{\max} 提前到 60 min。上述结果表明, 天麻素有一定的降低异钩藤碱在肝脏分布的作用。具体原因有待进一步分析。

[参考文献]

[1] 胡小勤, 曾学文, 等. 补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证、肝阳上亢证关联性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 203.

[2] 徐瑞琪, 徐冰. 中西药联合治疗肝阳上亢型高血压 43 例临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(5): 90

[3] 李莹, 李晓倩, 王兴, 等. 天麻与钩藤配伍前后天麻素在 SHR 大鼠肝脏和肾脏的分布与归经探讨[J]. 中国药房, 2011, 22(43): 4036

[4] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 207.

[5] 王兴, 胡瑞娟, 黄熙, 等. RP-HPLC 测定大鼠服用大川芎丸提取物后血浆中的天麻素[J]. 华西药理学杂志, 2003, 18(5): 341.

[6] 李晓倩, 王兴, 李莹, 等. 天麻与钩藤配伍前后对 SHR 大鼠肾脏相关基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 131.

[7] 张卫国, 李晓倩, 王兴, 等. 钩藤与天麻配伍前后异钩藤碱在 SHR 大鼠肝脏和肾脏的分布[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 220.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To investigate the anti-inflammatory effect of total flavones of *Trollius chinensis* Bge (TFTL). **Method:** The experiments of carrageenin-induced paw edema in rats, histamine-induced pigment oozing from skin vessel in rats and cotton pellet granuloma in rats were used to investigate the effect of TFTL (0.1, 0.2, 0.4 g·kg⁻¹) on acute and chronic inflammation. Aspirin (Asp) and Jinlianhua tablets (JLHT) were used as positive controls. **Result:** In 0.2, 0.4 g·kg⁻¹ of TFTL groups, the intradermal area of pigment infiltration and pigment content in rats, the paw edema degree in rats and the weight of cotton pellet granuloma in rats were lower than those in the model groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In 0.4 g·kg⁻¹ of TFTL group, the intradermal pigment content in rats, the paw edema degree of rats and the weight of cotton pellet granuloma in rats were lower than those in JLHT 2.4 g·kg⁻¹ group ($P < 0.05$). In 0.4 g·kg⁻¹ of TFTL group, the paw edema degree was lower than that of Asp 200 mg·kg⁻¹ group ($P < 0.05$). In the test of carrageenin-induced paw edema in rats, the duration of anti-inflammatory effect in 0.2 g·kg⁻¹ and 0.4 g·kg⁻¹ of TFTL groups were 5-6 h, while the duration of anti-inflammatory effect in 0.2 g·kg⁻¹ of Asp group were 3 h. **Conclusion:** TFTL showed significant anti-inflammatory effects on acute and chronic inflammation in a dose-dependent manner. Anti-inflammatory effect of TFTL was stronger than that of JLHT. The duration of anti-inflammatory effect of TFTL was longer than that of Asp.

[Key words] *Trollius chinensis*; total flavones; anti-inflammation; pigment oozing; paw swelling; cotton pellet granuloma

金莲花总黄酮为金莲花主要有效部位。金莲花(*Trollius chinensis* Bge)为毛茛科金莲花属植物金莲花或亚洲金莲花的花。《中药大辞典》记载金莲花清热解毒、治上呼吸道感染、扁桃体炎、咽炎、急性中耳炎、急性鼓膜炎、急性淋巴管炎、口疮、疔疮^[1-2]。感冒风热证或上呼吸道感染,系因风热邪毒袭肺,热毒内盛引起。金莲花质轻升散,味苦清泄,性寒清热,其治疗感冒风热证或上呼吸道感染恰切病机,故疗效颇著^[3-4],毒性低、副作用少,在临床广泛应用。目前临床应用的金莲花制剂多以金莲花为粗提物制剂,其中成分复杂,质量可控性差,用量较大。本项研究的目的是以 TFTL 为有效部位制备金莲花的新制剂,以提高质量的可控性、减小用药剂量,使其更便于应用。为了评价 TFTL 的临床疗效,本文采用多种炎症动物模型对 TFTL 和 JLHT 的抗炎作用进行比较研究,为 TFTL 在制备新药中的应用奠定基础。

1 材料

1.1 药物 金莲花药材购于承德市围场县坝上草原,经承德医学院中药研究所李守拙教授鉴定,为短瓣金莲花 *Trollius Ledebouri* Reichb 的干燥花或花蕾。

金莲花总黄酮,含量为 57%,承德医学院中药研究所植物化学研究室制备,批号 20090414;金莲花片,承德颈复康药业集团有限公司生产,批号 080901;阿司匹林片,石家庄康力制药厂生产,批号 080810。

1.2 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重 200 ~ 220 g,由河北医科学实验动物管理中心提供,动物许可证号 SCXK(冀)2008-1-003。

1.3 仪器 752N 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 金莲花总黄酮的制备 金莲花药材加 10 倍水煎提取 2 次,每次 1 h,过滤,合并两次煮提液,浓缩成药材量的 4 倍药液,放置 12 h,离心,上清液加盐酸调 pH 为 3,上已处理好的 10 ~ 30 目聚酰胺柱吸附,95% 乙醇洗脱,回收乙醇并干燥,得金莲花总黄酮,得率为 4.0%。用荜草苷作为质量标准,UV 分光光度法测定其含量。

2.2 剂量设计 通过预实验确定金莲花总黄酮提取物最低有效剂量为 0.1 g·kg⁻¹,中、高剂量分别为 0.2 g·kg⁻¹ 和 0.4 g·kg⁻¹ (分别相当金莲花药材 2.5, 5.0, 10.0 g·kg⁻¹)。

以等量金莲花药材剂量(10.0 g·kg⁻¹)设计金莲花片实验用药剂量为 2.7 g·kg⁻¹ (提取率 26.6%)。

2.3 大鼠皮内色素渗出实验^[5] 大鼠禁食 12 h,不禁水,随机分为金莲花总黄酮 0.1, 0.2, 0.4 g·kg⁻¹ 组、阿司匹林 0.2 g·kg⁻¹ 组、金莲花片 2.7 g·kg⁻¹ 组和对照组。ig 给药,给药容积 5 mL·kg⁻¹,对照组给予等容积蒸馏水。药后 45 min,去掉大鼠脊柱右侧背部的毛,皮内注射磷酸组织胺(1 mg·L⁻¹) 0.1 mL,立即舌静脉注射 1% 的伊文思蓝 5 mL·

kg⁻¹, 15 min 后断头放血处死大鼠, 剥开背部皮肤, 测定注射部位皮内着色面积[以长径 × 短径 = 面积 (mm²) 表示]。剪下背部着色的皮肤, 切碎, 放入水-丙酮溶液(3:7)内浸泡 24 h, 离心, 取上清液, 752N 紫外-可见分光光度计波长 610 nm 处测定吸光度。

2.4 角叉菜胶诱发大鼠足跖肿胀实验^[6-8] 分组、给药剂量、给药途径均同 **2.3**。每天 ig 给药 1 次, 连续 5 d, 末次给药 1 h 后, 先用游标卡尺, 测定大鼠右足跖厚度, 然后在大鼠右后足跖部皮下注射 1% 角叉菜胶 0.1 mL/只, 致炎, 分别于致炎后 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 测量致炎后足跖厚度, 计算足肿胀度。

足肿胀度 = 致炎后足跖厚度 - 致炎前足跖厚度

2.5 大鼠棉球肉芽肿实验 雄性大鼠 57 只, 乙醚浅麻醉, 剪掉胸部毛, 在无菌条件下胸部开一小口, 将灭菌棉球(20 mg)植入两侧腋窝部皮下。术后随机将大鼠分组, 分组方法、给药剂量、给药途径均同 **2.3**, 连续给药 7 d, 第 8 天颈椎脱臼处死, 取出肉芽肿组织, 置于烘箱中 90 °C 干燥 1 h, 称重, 减去 20 mg 棉球质量为肉芽肿净重。

2.6 统计学分析 应用 SPSS 11.15 统计软件进行数据分析, 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 对大鼠皮内蓝斑面积及色素渗出量的影响

TFTL 大剂量组及 Asp 组大鼠皮内蓝斑色素浸出液的吸光度(A)明显减小, 与对照组相比差异有显著意义($P < 0.05, P < 0.01$); TFTL 高、中剂量组、阿司匹林组及 JLHT 大鼠皮内蓝斑面积明显减小, 与对照组相比差异有显著意义($P < 0.05, P < 0.01$), 提

示 TFTL 可拮抗组织胺引起的毛细血管通透性增强作用, 降低局部炎症组织中毛细血管通透性。提示其对急性炎症有明显的抑制作用, 见表 1。

表 1 金莲花总黄酮对大鼠皮片蓝斑面积及吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	皮片面积 /mm ²	吸光度
TFTL	0.4	0.81 ± 0.07 ²⁾	0.088 ± 0.051 ¹⁾
	0.2	0.94 ± 0.23 ¹⁾	0.099 ± 0.034
	0.1	0.99 ± 0.23	0.114 ± 0.041
Asp	0.2	0.78 ± 0.17 ²⁾	0.078 ± 0.020 ²⁾
JLHT	2.7	0.93 ± 0.25 ¹⁾	0.095 ± 0.029
对照	-	1.16 ± 0.35	0.126 ± 0.032

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$; 与 JLHT 组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.2 对大鼠足跖肿胀度的影响 TFTL 高剂量组在药后 1~6 h 内足跖肿胀度明显减小, 与对照组相比差异有显著意义($P < 0.05, P < 0.01$); TFTL 中剂量组在药后 1~5 h 内足跖肿胀度明显减小, 与对照组相比差异有显著意义($P < 0.05, P < 0.01$); Asp 组在 1~3 h 内足跖肿胀度明显减小与对照组相比差异有显著意义($P < 0.05, P < 0.01$); TFTL 低剂量组及 JLHT 组足跖肿胀度减小, 但与对照组相比差异无统计学意义, TFTL 0.2, 0.4 g·kg⁻¹ 组致炎后 1~6 h 大鼠足跖肿胀度明显低于同等生药剂量的 JLHT 组, 提示 TFTL 对角叉菜胶刺激引起足跖肿胀有明显的抑制作用, 且其作用强于 JLHT 组, 抗炎作用持续时间长于 Asp 组, 见表 2。

表 2 TFTL 对大鼠不同时间足跖肿胀厚度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	足跖肿胀度/mm					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
TFTL	0.4	0.60 ± 0.37 ^{2,3)}	0.59 ± 0.43 ^{1,3)}	0.27 ± 0.58 ^{2,3)}	0.62 ± 0.34 ^{1,3)}	0.45 ± 0.22 ^{2,3)}	0.35 ± 0.19 ^{2,3)}
	0.2	0.71 ± 0.45 ^{2,3)}	0.66 ± 0.72 ^{1,3)}	0.42 ± 0.47 ²⁾	0.53 ± 0.56 ^{1,3)}	0.69 ± 0.57 ^{1,3)}	0.64 ± 0.61 ^{1,3)}
	0.1	1.24 ± 0.67	1.10 ± 0.68	1.09 ± 0.57	1.01 ± 0.64	0.83 ± 0.53	1.01 ± 0.54
Asp	0.2	0.71 ± 0.32 ^{2,3)}	0.65 ± 0.37 ^{*3)}	0.53 ± 0.44 ^{1,3)}	0.85 ± 0.45	0.77 ± 0.60	0.62 ± 0.61
JLHT	2.7	1.26 ± 0.38	0.94 ± 0.39	0.91 ± 0.39	0.85 ± 0.35	0.93 ± 0.54	0.88 ± 0.54
对照	-	1.37 ± 0.51	1.24 ± 0.52	1.26 ± 0.69	1.11 ± 0.47	1.19 ± 0.51	1.04 ± 0.68

3.3 对大鼠棉球肉芽肿质量的影响 TFTL 高、中剂量组, 阿司匹林组、JLHT 组大鼠肉芽肿质量均低于空白对照组($P < 0.05, P < 0.01$), TFTL 0.4 g·kg⁻¹ 组足跖肿胀度低于 JLHT 组($P < 0.05$), 见表 3。

4 讨论

炎症是指具有血管系统的活体组织对各种致炎因子引起损伤所发生的以防御反应为主的病理过程。病理变化为变质、渗出和增生。急性炎症主要

表3 TFTL对大鼠肉芽肿质量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	肉芽肿质量/mg
TFTL	9	0.4	34.5 ± 6.4 ²⁾
	10	0.2	38.2 ± 6.4 ¹⁾
	9	0.1	42.9 ± 7.7
JLHT	10	2.7	38.4 ± 6.9 ¹⁾
Asp	9	0.2	35.3 ± 6.8 ²⁾
空白对照	10	-	44.3 ± 8.8

是由于多种致炎介质作用于血管,使血管扩张、通透性增加,引起渗出,吸引白细胞到达炎症部位,导致组织损伤,引起局部炎症反应和全身反应,表现是红、肿、热、痛发热等症状。慢性肉芽肿性炎症,是由于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。

角叉菜胶致大鼠足肿胀是一个常用于评价或筛选药物抗炎作用的经典的急性炎症模型。大鼠足跖内注射角叉菜胶可引起局部毛细血管扩张、血管通透性增高、渗出、水肿等一系列类似于人体急性炎症的反应。本研究结果显示,TFTL对角叉菜胶诱发的大鼠肿胀均有明显的抑制作用;高、中剂量组致炎后1~6 h大鼠足跖肿胀度均明显低于JLHT组;不同剂量TFTL对角叉菜胶诱发的大鼠肿胀抑制作用持续时间为5~6 h,而Asp的抑制作用持续时间为3 h,提示JLHT对致炎物引起的急性炎症有明显的抑制作用,其抑制作用强于同等生药剂量的JLHT,作用持续时间长于Asp。

组胺致大鼠毛细血管通透性增强可评价药物对致炎物质引起血管通透性增加的抑制作用。在炎症过程中,炎性细胞被激活后,炎性递质(组胺、前列腺素、白三烯等)被释放出来,导致动静脉扩张,引起毛细血管的通透性增加,使体液和血浆蛋白外渗,形成水肿。膜稳定药可抑制毛细血管的通透性,减少局部炎症部位伊文思蓝的渗出面积和渗出量^[9]。本研究结果显示,TFTL可明显减小大鼠皮内伊文思蓝渗出面积及渗出量,提示其可抑制组胺扩张血管作用。

棉球肉芽肿是由于作为一种不能被消化的异物,较长时间刺激局部,大量多核巨噬细胞(异物巨细胞围绕在刺激物周围并互相融合,形成由多数巨噬细胞质膜包围刺激物的巨大吞噬体,引起的慢性肉芽肿性炎症^[10])。TFTL可剂量依赖性的减小大鼠棉球肉芽肿的质量,提示其对慢性炎症也有明显的抑制作用。

综上所述,TFTL对急慢性炎症均有明显的抑制作用,其作用强于同等生药剂量的JLHT为将其开发成为用量小、疗效可靠的抗炎新药奠定一定的基础。

[参考文献]

- [1] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京:人民卫生出版社,1983:256.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典上册.[M]. 上海:人民出版社,1997:1398.
- [3] 刘静,刘建中,郭金甲,等. 金莲花片治疗上呼吸道感染临床观察[J]. 湖北中医杂志,2007,29(10):29.
- [4] 王颖,王和平. 金莲花片对上呼吸道感染100例临床观察[J]. 中国中医基础医学杂志,2008,14(6):449.
- [5] 徐叔云,卞如廉,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:911,918.
- [6] 岳南,只德广,赵益桂,等. 炎康颗粒的抗炎作用及机制研究[J]. 现代药物与临床,2009,24(3):98.
- [7] 刘芳,曲极冰,李红,等. 白藜芦醇抗炎作用机制的初步研究[J]. 中国药学杂志,2006,41(15):1138.
- [8] [德]H. G. 沃格尔,等著;杜冠华,李学军,张永祥,等译. 药理实验方法学-新药发现和药理学评价[M]. 北京:科学出版社,2001:531.
- [9] 林婷,李昌煜,章建华,等. 芪参健骨颗粒抗炎镇痛作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):151.
- [10] 刘平怀,刘洋洋,陈德力,等. 野生南药海南萝芙木抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):117.

[责任编辑 李玉洁]