

四乙酰葛根素抗炎作用及机制研究

李恒华, 陈国庆, 张毅, 张莉, 罗超利, 杨大坚*

(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

[摘要] **目的:**探讨四乙酰葛根素的抗炎作用并初步研究其作用机制。**方法:**将雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组和四乙酰葛根素高、中、低剂量(80,40,20 mg·kg⁻¹)组以及吲哚美辛(5 mg·kg⁻¹)组,四乙酰葛根素尾 iv 给药 4 d,末次给药 30 min 后予以造模,观察四乙酰葛根素对角叉菜胶所致大鼠急性足肿胀、炎性组织中前列腺素 E₂(PGE₂)和血清中肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白介素 1β(IL-1β)含量的影响。**结果:**四乙酰葛根素(80 mg·kg⁻¹)能明显抑制模型大鼠的足肿胀($P < 0.01$),降低肿胀足爪组织中 PGE₂($P < 0.05$)及血清中 TNF-α($P < 0.05$),IL-1β($P < 0.05$)的含量。**结论:**四乙酰葛根素可能通过影响炎性因子释放而起到抑制大鼠炎性足肿胀的作用。

[关键词] 四乙酰葛根素; 抗炎; 前列腺素 E₂; 肿瘤坏死因子-α; 白介素 1β

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0177-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1252.044.html>

[网络出版时间] 2012-05-04 12:52

Study on the Anti-inflammation Effects and Mechanism by Tetra-acetylated Puerarin

LI Heng-hua, CHEN Guo-qing, ZHANG Yi, ZHANG Li, LUO Chao-li, YANG Da-jian*

(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-inflammation effects of tetra-acetylated puerarin and its mechanism. **Method:** Male rats were randomly divided into normal control group, model group, tetra-acetylated puerarin high, middle and low dose (80, 40, 20 mg·kg⁻¹) group, and indomethacin (5 mg·kg⁻¹) group. Tetra-acetylated puerarin was given by injection for 4 days, and the model was established at 30 min after last

[收稿日期] 20111111(008)

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(2007AB5051);国家科技部重大新药创制(2009ZX09103-150)

[第一作者] 李恒华, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理研究, Tel:023-89029135, E-mail: lhh8010_2002@163.com

[通讯作者] *杨大坚, 博士, 研究员, 从事中药化学及新药研发, Tel:023-89029081, E-mail: yangdaji@hotmail.com

- [8] Sugiura M, Ito H. Toxicological studies of *Ganoderma lucidum* [J]. Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo, 1997, 27(5): 722.
- [9] Kim M J, Kim H W, Lee Y S, et al. Studies on safety of *Ganoderma lucidum* [J]. Korean Mycol, 1986, 14 (1):49.
- [10] Kim K C, Kim I G. *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation [J]. Intern J Mol Med, 1999, 4 (3): 273.
- [11] Chakrabarti L. Sequence of simian immunodeficiency virus from maqaque and its relationship to other human and simian retroviruses [J]. Nature, 1987, 328 (6130): 543.
- [12] Chen Z W, Luckay A, Sodora D L, et al. Human immunodeficiency virus type2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the national range of simian immunodeficiency virus infected sooty mangabeys [J]. J Virol, 1997, 71 (5): 3953.
- [13] 卢耀增, 吴小闲, 涂新明, 等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)猴模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 1994, 2(2):94.

[责任编辑] 聂淑琴]

injection. To observe the influence of tetra-acetylated puerarin on acute paw oedema induced by carrageenin, content of prostaglandin E₂ (PGE₂) in inflammatory tissue, as well as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in serum was measured. **Result:** Tetra-acetylated puerarin (80 mg · kg⁻¹) showed marked suppressive effect on paw oedema induced by carrageenin in rats ($P < 0.01$). In addition, the content of PGE₂ ($P < 0.05$) in infl-ammatory tissue along with the content of TNF- α ($P < 0.05$) and IL-1 β ($P < 0.05$) in serum was all was reduced at the dosage of 80 mg · kg⁻¹. **Conclusion:** Tetra-acetylated puerarin has a marked suppressive effect on paw oedema induced by carrageenin in rats. Its effects may be related to the inhibition on inflammatory factors.

[**Key words**] tetra-acetylated puerarin; anti-inflammation; PGE₂; TNF- α ; IL-1 β

葛根素 (puerarin) 是豆科植物野葛或甘葛藤中主要有效成分,其结构式 7,4'-二羟基-8- β -D 葡萄糖异黄酮,具有改善微循环、抑制血小板聚集、清除氧自由基等功能,主要用于心脑血管疾病的治疗。近年来,葛根素的抗炎作用也正逐步为人们所认识,研究显示,葛根素能够抑制促炎症因子的产生,缓减炎症反应^[1]。但葛根素在水和有有机溶剂中溶解度小,口服生物利用度差,本课题组通过对葛根素进行结构修饰制备出葛根素衍生物即四乙酰葛根素,提高了口服生物利用度^[2]。四乙酰葛根素与葛根素均含有 7,4' 位两个酚羟基,也均为活性基团,它们也均是异黄酮类化合物,而中药或天然产物中有丰富的 COX(环氧化酶)抑制剂^[3],主要为黄酮类或多酚类、五环三帖类、生物碱类、有机酸类等植物成分,大多以羟基或酚羟基为活性基团的化合物。因此,探讨四乙酰葛根素的抗炎作用及其作用机制对于进一步将其开发成为新型的抗炎药物是很有必要的。角叉菜胶性足肿胀是典型的急性炎症模型,本研究拟采用该模型,以吲哚美辛为阳性对照药物,观察四乙酰葛根素对大鼠急性炎症的拮抗作用并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药品及试剂 四乙酰葛根素冻干制剂(本院制剂研究所提供,含量为每支 50 mg,实验前用生理盐水配制成不同浓度的药液),吲哚美辛片(重庆科瑞制药有限责任公司,批号 100702,实验前将其研磨成粉末,用蒸馏水配制成 1 g · L⁻¹ 的混悬液),角叉菜胶(Sigma 公司,批号 116K0105,临用前 1 d 用研钵研细后,以无菌生理盐水配制成 1% 质量浓度,放置冰箱过夜),氯化钠(重庆川东化工有限公司化学试剂厂,批号 20110301),氢氧化钾(重庆川东化工有限公司化学试剂厂,批号 20091213),甲醇(重庆川东化工有限公司化学试剂厂,批号 20100121),水合氯醛(中国医药集团上海化学试剂公司,批号

20020107),大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒,白介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒(Bender 公司产品,批号分别为 66482030,64728010)。

1.2 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体质量(170 ± 20) g,本院实验动物研究所提供,动物合格证号 SCXK(渝)20070006。

1.3 仪器 7140 型鼠足容积测定仪(UGO BASILE 公司),BS224 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统公司),756P 型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),HH.SY21-Ni 型电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司),Allegra X-12 型离心机(美国贝尔曼库尔特有限公司),BIO-RAD 680 型酶标仪(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 将 60 只大鼠按体重随机分为正常对照组、模型组(阴性对照)、吲哚美辛组(阳性对照)、四乙酰葛根素高、中、低剂量(80,40,20 mg · kg⁻¹)组,每组 10 只。四乙酰葛根素不同剂量药物于每日上午尾静脉 iv 给予 1 次,给药容积为 10 mL · kg⁻¹;吲哚美辛(5 mg · kg⁻¹)于每日上午 ig 给予 1 次,给药容积为 5 mL · kg⁻¹;模型组尾静脉 iv 给予相同容积的生理盐水,连续给药 4 d。末次给药后(1 min,注射剂;30 min,口服药物)予以造模:除正常对照组外 5 组大鼠均予 1% 角叉菜胶液右后足跖 sc 0.1 mL 以致炎^[4]。观察大鼠右后足外观(有无肿胀及肿胀时间、程度),肢体活动情况等。造模前及造模后 1,2,3,4 h 分别用足容积测定仪测量各组大鼠右后足容积,并按如下公式计算各时间点肿胀率:

$$\text{肿胀率} = (\text{造模后足容积} - \text{造模前足容积}) / \text{造模前足容积} \times 100\%$$

造模后 4 h,水合氯醛 ip 麻醉大鼠,腹主动脉取血,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,分离血清,置 -70 °C 冰箱保存备用,取血后处死动物,在踝关节上 0.5 cm 处剪下右后足跖,剥皮剪碎后加 5 mL 生理盐水浸泡

40 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液置 -70 ℃ 冰箱保存备用。

2.2 足跖炎性组织中前列腺素 E₂ (PGE₂) 含量测定 取前述足跖标本上清液 0.3 mL, 加入 2 mL 0.5 mol·L⁻¹ KOH, 56 ℃ 水浴异构化 20 min, 加甲醇 5 mL, 紫外-可见分光光度计 278 nm 处测 PGE₂ 的含量, 以光吸收度(A)表示^[5]。

2.3 血清 TNF-α 和 IL-1β 含量测定 取血清, 用 ELISA 法测定 TNF-α 和 IL-1β 含量, 按试剂盒说明书进行操作。

2.4 统计分析 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。数据处理在 Excel 及 SPSS 13.0 软件中进行。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般体征 各组大鼠在造模后 1 h 内, 右后足均出现不同程度的肿胀, 局部皮温增高, 稍发红, 大鼠行走迟缓, 患侧足爪卷曲, 患肢不愿着力负重, 个别甚至出现跛行。其中吡啶美辛组大鼠局部症状较

同期模型组明显减轻, 四乙酰葛根素高剂量组和中剂量组大鼠局部症状较模型组也有所减轻。

3.2 右后足肿胀率 造模后 1 h, 吡啶美辛组大鼠右后足肿胀率较模型组明显减小 ($P < 0.01$), 四乙酰葛根素高剂量组和四乙酰葛根素中剂量组大鼠右后足肿胀率与模型组相比有减小趋势, 但无显著性差异。造模后 2 h, 吡啶美辛组大鼠右后足肿胀率较模型组明显减小 ($P < 0.01$), 四乙酰葛根素高剂量组和四乙酰葛根素中剂量组大鼠右后足肿胀率与模型组相比有减小趋势, 但无显著性差异。造模后 3 h, 吡啶美辛组和四乙酰葛根素高剂量组大鼠右后足肿胀率较模型组明显减小 ($P < 0.01$), 四乙酰葛根素中剂量组大鼠右后足肿胀率与模型组相比有减小趋势, 但无显著性差异。造模后 4 h, 四乙酰葛根素高剂量组和吡啶美辛组大鼠右后足肿胀率较模型组明显减小 ($P < 0.01$), 四乙酰葛根素中剂量组大鼠右后足肿胀率与模型组相比有减小趋势, 但无显著性差异。见表 1。

表 1 四乙酰葛根素对大鼠右后足肿胀率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肿胀率/%			
		造模后 1 h	造模后 2 h	造模后 3 h	造模后 4 h
模型	-	22.63 ± 8.69	28.79 ± 10.40	34.03 ± 8.13	31.96 ± 8.86
四乙酰葛根素	20	28.19 ± 14.42	32.61 ± 14.67	34.86 ± 13.43	36.61 ± 11.30
	40	13.87 ± 8.74	21.38 ± 11.37	26.04 ± 7.32	23.53 ± 11.46
	80	13.75 ± 8.84	19.93 ± 11.59	12.59 ± 11.73 ¹⁾	10.05 ± 9.75 ¹⁾
吡啶美辛	5	6.80 ± 4.61 ¹⁾	12.77 ± 6.33 ¹⁾	16.18 ± 12.29 ¹⁾	13.72 ± 12.53 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对足跖炎性组织中 PGE₂ 含量的影响 与正常对照组相比, 模型组大鼠足跖组织中 PGE₂ 含量明显增高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 四乙酰葛根素高剂量组和吡啶美辛组足跖组织中 PGE₂ 含量明显降低 ($P < 0.05$), 四乙酰葛根素中剂量组和低剂量组足跖组织中 PGE₂ 含量有降低的趋势, 但与模型组相比无统计学上的显著性差异, 结果见表 2。

表 2 四乙酰葛根素对大鼠右后足跖组织中 PGE₂ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	A
正常对照	-	0.136 ± 0.023 ¹⁾
模型	-	0.215 ± 0.057
四乙酰葛根素	20	0.176 ± 0.036
	40	0.175 ± 0.020
	80	0.146 ± 0.018 ¹⁾
吡啶美辛	5	0.140 ± 0.011 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.4 对血清 TNF-α 含量的影响 与正常对照组相

比, 模型组大鼠血清中 TNF-α 含量明显增高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 四乙酰葛根素高剂量组和吡啶美辛组大鼠血清中 TNF-α 含量明显降低 ($P < 0.05$), 四乙酰葛根素中剂量组和低剂量组大鼠血清中 TNF-α 含量与模型组相比无显著性差异, 见表 3。

3.5 对血清 IL-1β 含量的影响 与正常对照组相比, 模型组大鼠血清中 IL-1β 含量明显增高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 四乙酰葛根素高剂量组和吡啶美辛组大鼠血清中 IL-1β 含量明显降低 ($P < 0.05$), 四乙酰葛根素中剂量组和低剂量组大鼠血清中 IL-1β 含量有降低的趋势, 但与模型组相比无统计学上的显著性差异, 见表 3。

4 讨论

炎症是活的机体对损伤因子所发生的一种特异性防御反应, 其对机体的危害主要是由炎症过程中

表 3 四乙酰葛根素对大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹
正常对照	-	92.95 \pm 29.51 ¹⁾	50.51 \pm 24.18 ¹⁾
模型	-	617.18 \pm 216.56	659.08 \pm 226.62
四乙酰葛根素	20	557.80 \pm 295.24	452.73 \pm 149.13
	40	544.40 \pm 184.37	442.20 \pm 128.33
	80	332.31 \pm 58.05 ¹⁾	232.99 \pm 62.39 ¹⁾
吲哚美辛	5	275.36 \pm 59.61 ¹⁾	72.38 \pm 56.44 ¹⁾

受伤组织及血液产生释放的多种具有致炎作用的化学活性物质(细胞因子、炎性介质、趋化因子等)共同作用所致,炎性因子可引起血管扩张、血管通透性增加、发热、疼痛、组织损伤等^[6]。PGEs 是膜磷脂在环氧化酶(COX)作用下形成的酸性脂类,为一种重要的炎症介质,具有广泛的生理及病理作用,如扩血管、趋化、致热和致痛等,能明显加强组胺和缓激肽的效应而引起血管通透性升高,也能加强其他趋化因子的作用,使白细胞向炎区集中,从而引起炎症反应性水肿、渗出、局部红斑和充血,产生红肿热痛的症状,介导炎症的发生发展^[7-9]。炎症反应中细胞因子如 TNF- α 和 IL-1 β 等释放,也可促进炎症反应和组织损伤。TNF- α 和 IL-1 β 作为一种起始的促炎因子,可以作用于血管内皮细胞,使之表达黏附分子和分泌趋化性细胞因子,参与血管内皮黏附,对中性粒细胞、单核细胞有趋化作用,并刺激其活化,释放出炎症介质,引起炎症反应,同时,它们还能诱导机体合成急性期反应蛋白等,从而参与了机体炎症反应和一系列病理生理过程^[10]。因此,药物如果能抑制致炎物质的产生释放,则可能会表现出一定的抗炎效应。

本实验成功复制了角叉菜胶诱发的大鼠急性足肿胀模型,并以吲哚美辛为阳性对照药,初步研究了四乙酰葛根素对该模型的防治作用及其可能的作用机制。结果提示,四乙酰葛根素 80 mg·kg⁻¹对模型大鼠的足肿胀有明显的抑制作用,与模型组相比,差异显著,与阳性对照药吲哚美辛 5 mg·kg⁻¹相比作用相当,提示四乙酰葛根素对急性实验性炎症模型具有较好的抗炎作用。本研究发现在大鼠角叉菜胶性足肿胀模型中,PGE₂, TNF- α 和 IL-1 β 这些细胞因子和炎症介质生成增多,与以往的文献报道类

似^[11-13],本研究还显示,四乙酰葛根素 80 mg·kg⁻¹能降低炎症时细胞因子(如 TNF- α 和 IL-1 β)和炎症介质(如 PGE₂)的产生,这一方面部分说明了该炎症模型的形成机制,另一方面也揭示了四乙酰葛根素的抗炎作用机制涉及到抑制炎症过程中的细胞因子、炎症介质的产生,这可能是其发挥抗炎作用的部分机制。此外,PGEs 合成的关键酶—环氧化酶(COX)在炎症的发生发展中发挥着重要的作用,四乙酰葛根素是否可通过抑制环氧化酶(COX)的表达和/或抑制 COX 的活性从而减少炎性介质 PGE₂ 的生成尚待进一步实验研究。

[参考文献]

- [1] 陈超. 葛根素抗炎作用研究进展[J]. 宁德师专学报:自然科学版, 2010, 22(3): 225.
- [2] 郭东艳, 杨大坚, 陈士林. 葛根素及其衍生物在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 陕西中医学院学报, 2008, 31(1): 52.
- [3] 陈科力, 陈刚. 中药中的天然环氧化酶和脂氧化酶抑制剂及其作用[J]. 中南民族大学学报:自然科学版, 2009, 28(1): 42.
- [4] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 911.
- [5] 韩召敏, 华小黎, 吕永宁, 等. 拔莖抗炎作用及对炎症介质的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(2): 295.
- [6] 王文魁, 沈映君, 齐云, 等. 望春花油的抗炎机理[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(3): 301.
- [7] 李淑雯, 黄萍, 吴清和. 还原痹痛宁胶囊的抗炎作用及机理研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 640.
- [8] 朱伟, 孙红光, 朱迅. 黄芩苷元对炎症反应的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 194.
- [9] 李晓红, 齐云, 蔡润兰, 等. 甘草总皂苷抗炎作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 110.
- [10] 郝钰, 邱全璞. 小檗碱对 IL-1 或 TNF 诱导的多形核白细胞与内皮细胞粘附的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16: 585.
- [11] 肖百全, 朱少璇, 杨威, 等. 角叉菜胶致大鼠足肿胀模型探讨及其机制研究[J]. 中国实用医药, 2008(23): 63.
- [12] 黄秀梅, 李波. 氧化苦参碱对 TNF- α , IL-6 和 IL-8 的影响[J]. 中成药, 2003, 25(11): 903.
- [13] 魏安祥, 杨士友, 阚红卫, 等. 柴黄复方颗粒抗炎镇痛作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10): 80.

[责任编辑 聂淑琴]