

板蓝根抗炎作用有效部位初步筛选

陈凯¹, 窦月¹, 孟凡刚¹, 田源¹, 陈智², 田景振^{1*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355;

2. 山东省济南市第二人民医院药剂科, 济南 250022)

[摘要] **目的:**分离并初步筛选板蓝根抗炎作用有效部位。**方法:**通过膜分离将板蓝根总提取物分为不同截留相对分子质量段,采用二甲苯致小鼠耳肿胀初步筛选,再将有效相对分子质量段用大孔树脂、离子交换树脂分离得到不同部位进一步采用二甲苯致小鼠耳肿胀、小鼠腹腔毛细血管通透性评价活性,最后通过特殊颜色反应确定有效部位化学性质。**结果:**板蓝根中相对分子质量小于 1 000 的物质对二甲苯致小鼠耳肿胀模型抑制率为 40.29%,与空白组相比有显著性差异($P < 0.05$)。板蓝根小于 1 000 D 物质中被 732 阳离子交换树脂吸附部分对二甲苯致小鼠耳肿胀模型抑制率为 28.20%,对醋酸致小鼠毛细血管通透性改变模型抑制率为 17.76%,与空白组相比均有显著性差异($P < 0.05$)。颜色反应说明该部位主要为氨基酸类及生物碱类成分。**结论:**板蓝根总氨基酸、总生物碱部位可能是其抗炎有效部位。

[关键词] 板蓝根; 抗炎作用; 有效部位; 膜分离

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0200-04

Preliminary Screening of Anti-inflammatory Fraction of Isatidis Radix

CHEN Kai¹, DOU Yue¹, MENG Fan-gang¹, TIAN Yuan¹, CHEN Zhi², TIAN Jing-zhen^{1*}

(1. Pharmacy College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Department of pharmaceutical Preparation Section, The Second

People's Hospital of Ji'nan, Ji'nan 250022, China)

[Abstract] **Objective:** To separate and screen anti-inflammatory fraction of Isatidis Radix. **Method:** Membrane separation method was used to separate Isatidis Radix into different sections, their anti-inflammatory effects were evaluated by acetic acid-induced celiac capillary permeability and xylene-induced mouse ear swelling models in mice. Macroporous resin and ion exchange resin were used to further separate Isatidis Radix into different sections, and the anti-inflammatory effects were evaluated by above mentioned models, finally, their chemical property was determined by color reactions. **Result:** The substance less than 1 000 in Isatidis Radix had a good inhibiting effect in mice ear swelling model, the inhibition rate of swelling being 40.29% ($P < 0.05$). The fraction absorbed by 732 cationic resin in the less than 1 000 substances could inhibit celiac capillary permeability and ear swelling, the inhibiting rate being 17.76% and 28.20%, respectively ($P < 0.05$). Color reactions showed that the fraction was composed of amino acids and alkaloids. **Conclusion:** The amino acids and alkaloids of Isatidis Radix could be the anti-inflammatory fraction.

[Key words] Isatidis Radix; anti-inflammatory; active fraction; membrane separation

[收稿日期] 20110424(002)

[基金项目] 山东省重大创新药物综合平台一中药创新药物平台(2009ZX09301-013)

[第一作者] 陈凯, 硕士研究生, 从事中药制剂研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: sdzyyck@sina.com

[通讯作者] * 田景振, Tel: 0531-89628597, E-mail: tianjingzhen@163.com

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根, 具有清热解毒、凉血利咽等功效^[1]。板蓝根是清热解毒类中药代表药物, 其在抗感染性疾病领域具有确切的临床疗效, 抗炎作用是板蓝根发挥清热解毒作用中非常重要的一个环节^[2], 但是目前对于板蓝根中抗炎作用物质基础的研究依然仅

限于总提取物或混合部位层面^[3-4],还不能确定具体是哪一种有效部位发挥抗炎作用。因此利用膜分离、大孔吸附树脂、离子交换树脂等现代分离纯化手段并通过相关药理实验筛选板蓝根中抗炎有效部位具有现实意义。清热解毒药抗炎作用主要特点是以抑制炎症早期的毛细血管通透性亢进、渗出、水肿为较强,对中期及晚期炎症阶段作用较弱或无^[2]。因此通过膜分离耦合大孔树脂离子交换树脂分离得到板蓝根不同部位后,选择二甲苯致小鼠耳廓肿胀和醋酸致毛细血管通透性改变等经典早期炎症实验方法进行筛选,初步确定板蓝根中抗炎有效部位。

1 材料

1.1 动物 小鼠,SPF级,雌雄各半,体质量18~22 g,由山东中医药大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(鲁)2005-0015

1.2 受试对象

1.2.1 板蓝根 采购自济南建联中药店,经山东中医药大学学生药学教研室李峰教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。

1.2.2 膜分离法耦合大孔树脂制备不同部位供试品 板蓝根最粗粉1 kg,10倍量50%乙醇溶液渗漉提取,流速2 mL·min⁻¹,收集渗漉液,将渗漉液依次经过截留相对分子质量为30 000,10 000,5 000,3 000,2 000,1 000的超滤膜充分截留,在膜分离过程中发现,板蓝根中相对分子质量处于10 000~30 000,5 000~10 000,2 000~3 000,1 000~2 000的物质几乎没有,最后得到相对分子质量>30 000部分(I号)、3 000~5 000部分(II号)、<1 000(III号)。再将<1 000部分通过D101大孔树脂吸附后(树脂未达到饱和),依次用水洗脱和70%乙醇洗脱,将大孔树脂上样流出液和水洗脱液合并(IV号),70%乙醇洗脱液回收溶剂后定容(V号)。另将板蓝根50%乙醇渗漉液作为一个供试品溶液(VI号)。以上供试品用于二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验第一次筛选。

1.2.3 膜分离耦合离子交换树脂进一步制备供试品部位 将按1.2.2项下方法得到的III号部分用1% HCl水溶液调pH为3,经过732阳离子交换树脂吸附(树脂未达到饱和),先用水冲洗2 BV,将水洗液与上柱流出液合并,1% NaOH水溶液调pH为11,经过717阴离子交换树脂吸附(树脂未达到饱和),得到阴阳离子上柱流出液(A号)。用3%氨性60%乙醇溶液洗脱吸附后的732阳离子交换树脂,洗至生物碱反应为阴性,收集洗脱液,浓缩后用1%

HCl水溶液调pH为中性,定容备用(B号)。用3% HCl 60%乙醇溶液洗脱吸附后的717阴离子交换树脂,洗至有机酸颜色反应为阴性,收集洗脱液,浓缩后用1% HCl水溶液调pH为中性,定容备用(C号)。以上供试品用于二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验第二次筛选和醋酸致小鼠毛细血管通透性改变实验。

1.3 仪器及试剂 UV-2010型紫外分光光度计(日立公司),003-W,CLN-003中空纤维超滤组件(北京旭邦膜设备有限公司),NUF中空纤维超滤组件(无锡超滤设备厂),NFX-2540/30-H-F纳滤组件(招远金汇膜科技有限公司),BS110S 1/10万电子天平(北京赛多利斯天平公司),732阳离子交换树脂、717阴离子交换树脂(国药集团化学试剂有限公司),伊文氏蓝(进口分装,批号71016588,国药集团化学试剂有限公司),吡啶美辛片(批号0909131,临汾奇林药业有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验第1次筛选^[5] 取小鼠80只,雌雄各半,随机分成8组:生理盐水组(空白组)、I号样品组、II号样品组、III号样品组、IV号样品组、V号样品组、VI号样品组、吡啶美辛阳性药组,阳性药按10 mg·kg⁻¹药量ig给药,其余样品组按板蓝根生药量20 g·kg⁻¹药量ig给药。连续ig 3 d,第4天给药后45 min将二甲苯20 μL涂于小鼠右耳背廓两面,30 min后脱颈椎处死,剪下整个耳廓后,用直径9 mm打孔器在左右两耳廓相同部位打孔取样,及时称质量,计算肿胀率和抑制率。

$$\text{肿胀率} = (\text{右耳质量} - \text{左耳质量}) / \text{左耳质量} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = (\text{给药组肿胀率} - \text{空白组肿胀率}) / \text{空白组肿胀率} \times 100\%$$

2.2 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验第2次筛选 取小鼠50只,雌雄各半,随机分成5组:生理盐水组(空白组)、A号样品组、B号样品组、C号样品组、吡啶美辛阳性药组,其余步骤同2.1项下方法。

2.3 醋酸致小鼠毛细血管通透性改变 伊文思蓝溶液0.500 6%,分组及给药方法同2.2项,实验方法参考文献[2],计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{空白组A} - \text{给药组A}) / \text{空白组A} \times 100\%$$

2.4 统计学方法 实验结果用SPSS 16.0统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析,各实验组与空白组之间采用Dunnnett-t检验分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2.5 颜色鉴别反应 对筛选出的有效部位进行相

关颜色鉴别反应,初步确定属于哪一大类化合物。

3 结果

3.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验第 1 次筛选 板蓝根 50% 乙醇渗漉液和板蓝根中相对分子质量 <1 000 的物质对二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型有明显抑制作用,抑制率分别为 37.24% 和 40.29%,与空白组相比有显著性差异 ($P < 0.05$),其他组段则无显著性差异。而 <1 000 组物质经 D101 大孔树脂分成水洗脱和 70% 乙醇洗脱两部分后,二者的抑制率与空白组无显著性差异,但是具有一定抗炎趋势,表明板蓝根发挥抗炎作用是 <1 000 组段中某些极性偏大和极性偏小的物质共同作用的结果。见表 1。

表 1 板蓝根不同组分对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 生药剂量 /g·kg ⁻¹ | 肿胀率 /% | 抑制率 /% |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 空白 | - | 96.64 ± 28.90 | - |
| I 号样品 | 20 | 85.11 ± 22.90 | 11.93 |
| II 号样品 | 20 | 100.74 ± 30.33 | - |
| III 号样品 | 20 | 57.70 ± 19.54 ¹⁾ | 40.29 ¹⁾ |
| IV 号样品 | 20 | 87.60 ± 38.10 | 9.35 |
| V 号样品 | 20 | 78.63 ± 17.18 | 18.64 |
| VI 号样品 | 20 | 60.65 ± 27.31 ¹⁾ | 37.24 ¹⁾ |
| 吡啶美辛 | 0.010 | 57.09 ± 18.14 ¹⁾ | 40.93 ¹⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验第 2 次筛选 板蓝根中相对分子质量为 <1 000 D 物质中被 732 阳离子交换树脂吸附的部位对二甲苯致小鼠耳廓肿胀有明显抑制作用,抑制率为 28.24%,与空白组相比有显著性差异 ($P < 0.05$),其他组则无显著性差异。说明板蓝根中抗炎有效物质为相对分子质量 <1 000 D 物质中被 732 阳离子交换树脂吸附的部位,见表 2。

表 2 板蓝根 <1 000 的物质中不同组分对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 生药剂量 /g·kg ⁻¹ | 肿胀率/% | 抑制率/% |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 空白 | - | 102.83 ± 11.76 | - |
| A 号样品 | 20 | 90.81 ± 24.44 | 11.69 |
| B 号样品 | 20 | 73.83 ± 16.95 ¹⁾ | 28.20 ¹⁾ |
| C 号样品 | 20 | 98.10 ± 27.86 | 4.60 |
| 吡啶美辛 | 0.010 | 61.46 ± 17.57 ²⁾ | 40.23 ²⁾ |

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

3.3 醋酸致小鼠毛细血管通透性改变实验 板蓝根中相对分子质量为 <1 000 D 物质中被 732 阳离子交换树脂吸附的部位对二甲苯致小鼠耳廓肿胀有明显抑制作用,抑制率为 17.76%,与空白组相比有显著性差异 ($P < 0.05$),但效果不如阳性药组 ($P < 0.01$),其他组则无显著性差异。这进一步证实板蓝根中抗炎有效物质为相对分子质量 150 ~ 1 000 D 物质中被 732 阳离子交换树脂吸附的部位。见表 3。

表 3 板蓝根 <1 000 的物质中不同组分对醋酸致小鼠毛细血管通透性改变的影响

| 组别 | 生药剂量 /g·kg ⁻¹ | A | 抑制率 /% |
|-------|-----------------------------|---------------|---------------------|
| 空白 | - | 0.366 ± 0.052 | - |
| A 号样品 | 20 | 0.346 ± 0.045 | 5.46 |
| B 号样品 | 20 | 0.301 ± 0.052 | 17.76 ¹⁾ |
| C 号样品 | 20 | 0.355 ± 0.043 | 3.00 |
| 吡啶美辛 | 0.010 | 0.211 ± 0.027 | 42.35 ²⁾ |

3.4 颜色鉴别反应 将板蓝根中相对分子质量为 150 ~ 1 000 物质中被 732 阳离子交换树脂吸附的部位进行一系列颜色鉴别反应,其中碘化铋钾反应、硅钨酸反应、碘-碘化钾反应、茚三酮反应均为阳性,溴甲酚绿反应、Molish 反应均为阴性。结果初步表明该部位中主要是氨基酸类和生物碱类成分。

4 讨论

为了最大限度的把板蓝根中的化学成分提取出来用于筛选,本实验以总干膏、多糖和氯仿萃取物为指标,综合加权评价回流法、超声法、渗漉法以及不同乙醇浓度的提取效率,得出 50% 乙醇浓度为最佳乙醇浓度,渗漉法和回流法提取效率最高,二者相差不大,考虑到温度可能会破坏某些不易受热成分故选择渗漉法。

本实验通过膜分离技术耦合大孔树脂、膜分离耦合离子交换树脂将板蓝根分成不同部分,通过二甲苯致小鼠耳廓肿胀和醋酸致小鼠毛细血管通透性改变两个经典抗早期炎症实验进行筛选板蓝根抗炎有效部位。从以上实验结果可以看出,板蓝根中 <1 000 组分经过阴阳离子交换树脂分离后,被阳离子交换树脂吸附的部位具有显著抗炎作用 ($P < 0.05$),颜色反应结果显示该部分中含有氨基酸类和生物碱类成分,结合这两个实验结果可以初步得出板蓝根抗炎有效部位是氨基酸类和生物碱类成分,但具体是氨基酸类或生物碱类成分起作用还是二者共同作用的结果还有待进一步研究。

膜分离技术是现代中药制剂工艺中具有极大应用前景的分离纯化技术,将膜分离技术应用于中药

明党参根皮中5种呋喃香豆素类成分的体外抗肿瘤活性

王萌, 陈建伟*, 李祥

(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

[摘要] **目的:**研究明党参根皮中异欧前胡素、欧前胡素、花椒毒酚、珊瑚菜内酯、5-羟基-8-甲氧基补骨脂素5种呋喃香豆素类成分的体外活性。**方法:**选取人肝癌细胞株 SMMC-7721, HepG2, 人肺癌细胞株 A-549, 人胃癌细胞株 MKN-45, 人宫颈癌细胞株 HeLa, 人乳腺癌细胞株 MCF-7, MDA-MB-2317 种肿瘤细胞。以 5×10^4 个/mL 的细胞密度接种于 96 孔板, 给予不同浓度的药物后培养 72 h, 采用 MTT 法观察 5 种成分对各细胞活性的影响。**结果:**5 种呋喃香豆素对 7 种肿瘤细胞均表现出不同程度的增殖抑制作用, IC_{50} 在 $0.30 \sim 17.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 其中异欧前胡素效果最显著, IC_{50} 从 $0.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $4.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论:**明党参根皮中 5 种呋喃香豆素类成分具有明显的抗肿瘤活性。

[关键词] 明党参根皮; 呋喃香豆素; 肿瘤细胞; 抑制作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0203-03

Study on Antitumor Activity of Five Furanocoumarins from the Root Bark of *Changium myrnioides* in vitro

WANG Meng, CHEN Jian-wei*, LI Xiang

(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the *in vitro* activity of five furanocoumarins from the root bark of *Changium myrnioides* Wolff. isoimperatorin, imperatorin, xanthotoxol, phellopterin and 5-hydroxyl-8-methoxy-psoralen. **Method:** The antitumor effect against human liver cancer (SMMC-7721 and HepG2), human lung cancer (A549), human gastric cancer (MKN-45), human uterine cervix cancer (Hela) and human breast cancer

[收稿日期] 20110924(001)

[基金项目] 江苏高校优秀学科建设工程项目; 高等学校博士学科点专项科研基金(200803150009); 江苏省自然科学基金项目(BK2003107)

[第一作者] 王萌, 硕士研究生, 从事中药资源化学与利用研究, Tel: 13851845199, E-mail: wmaxl99@126.com

[通讯作者] * 陈建伟, 教授, 博士生导师, 从事中药品质评价与中药生物技术研究, Tel: 025-85811695, E-mail: chenjiw695@126.com

有效部位的药理筛选是本实验创新之处, 有学者将这种思路和方法应用于鼠尾藻多酚抗凝血活性物质筛选^[6]。通过不同截留相对分子质量的超滤膜将中药(复方)的化学成分截留成不同相对分子质量组段, 通过相关药理实验筛选得到活性组段, 进一步耦合其他分离纯化手段得到相关部位再进行活性筛选, 这样得到的有效部位群能更好的符合中医传统用药中的多成分多靶点、组方配伍、综合调节的特色, 具有一定的借鉴和推广作用。

[参考文献]

[1] 中国药典[S]. 一部. 2010:191.

- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006:261, 300.
- [3] 汤杰, 施春阳, 徐晗, 等. 板蓝根抑菌抗炎活性部位的评价[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(6):327.
- [4] 高欣, 董堃瑾, 金鑫, 等. 板蓝根抗炎活性部位筛选的初步研究[J]. 武警医学院学报, 2010, 19(9):709.
- [5] 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, 2002:1664.
- [6] 魏玉西, 李敬, 汪靖超. 鼠尾藻多酚及其各组分的抗凝血活性筛选[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(4):227.

[责任编辑 聂淑琴]