

水母雪莲总黄酮和水母雪莲细胞培养物总黄酮 对致炎大鼠血清中炎症因子的影响

杨伟鹏¹, 林 娜¹, 刘春芳¹, 周钟鸣¹, 付春祥², 赵德修²

(1 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要:目的: 通过观察水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清中炎症因子的影响, 探讨其抗炎机理。方法: 采用角叉菜胶致足肿胀法造成大鼠炎症模型, 观察水母雪莲细胞培养物总黄酮(C)和水母雪莲总黄酮(W)对致炎大鼠血清中炎症介质和细胞因子的影响。其中 IL-1 β 用¹²⁵I 标记 RIA 试剂盒, PGE₂ 含量用³H 标记 RIA 试剂盒测定; NO 含量用 Griess 法测定。结果: 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮各剂量组与模型组相比均可明显抑制 IL-1 β 、NO、PGE₂ 的分泌作用, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$, 二者组间无显著差异。结论: 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对 IL-1 β 、NO、PGE₂ 的分泌均有抑制作用, 二者无显著性差异, 其抗炎作用的机理可能与此有关。

关键词: 水母雪莲; 总黄酮; 抗炎机理; 细胞因子

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)06-0039-03

Influence of Total Flavone in Culture of *Saussurea Medusa Maxim* and the Wild One on Inflammatory Factors in Blood serum of Inflammation Model Rat

YANG Wei-peng¹, LIN Na¹, LIU Chunfang¹, ZHOU Zhong-ming¹, FU Chun-xiang², ZHAO De-xiu²

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Beijing 100093, China)

Abstract: Objective: To study anti-inflammatory mechanisms of total flavone in Culture of *Saussurea medusa Maxim* and the wild one, inflammatory factors of blood serum from inflammation model of rat were investigated. Methods: The inflammation model of rat paw edema caused by Carrageenan lambda was used, and then effects of Culture of *Saussurea medusa Maxim* and the wild one on inflammatory factors of blood serum were observed. The IL-1 β and PGE₂ was measured with RIA marked ¹²⁵I and ³H kits, respectively, and the level of NO was measured with Griess method. Results: Both groups of Culture of *Saussurea medusa Maxim* and the wild one exerted the inhibition on the IL-1 β , NO, PGE₂ secretion. There is no difference between the two groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion: The anti-inflammatory mechanisms by Culture of *Saussurea medusa Maxim* and the wild one may have relationship with inhibited release of IL-1 β , NO, PGE₂.

Key words: *Saussurea medusa Maxim*; Total flavone; Anti-inflammatory mechanism; Cell factor

水母雪莲是我国三级保护植物, 对风湿性炎症、月经不调、白带等症有极好的疗效; 但目前雪莲资源已经严重匮乏, 为解决水母雪莲的药用资源不足问题, 我们拟用水母雪莲细胞培养物替代水母雪莲, 目前对水母雪莲的药理研究发现, 其有效成分黄酮类化合物和多糖等有明显的活性和治疗作用, 雪莲提取物中黄酮类化合物高车前素(hispidulin)和金合欢

素(jaceosidin) 对治疗癌症、抗多种炎症等具有良好的作用^[1]。所以, 我们拟从水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清中炎症因子的影响, 来探讨其抗炎机理, 为用植物细胞培养物产生的有效次生代谢产物代替野生植物资源提供理论依据, 为开发有我国自主知识产权的新药奠定基础。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重 180~220g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。合格证号: SCXK(京)2002-0003。

1.2 药品与试剂 水母雪莲(为菊科植物水母雪莲

收稿日期: 2005-05-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No: 30171202)

通讯作者: 周钟鸣, Tel: (010) 64046469, E-mail: bjzhouzn@263.net

花 *Saussurea medusa Maxim* 的干燥地上部分) 总黄酮 (纯度 75%)、水母雪莲细胞培养物总黄酮(水母雪莲红色系固体培养细胞) 的碱洗部分(纯度 82%), 由中科院植物所提供, 经赵德修研究员鉴定; 氢化可的松, 上海第九制药厂, 批号 981002; 角叉菜胶, Sigma 公司, 批号 121K1653; 亚硝酸钠, 上海试剂总厂, 批号 200608, 磺胺, 沈阳市新西试剂厂, 批号 201024; N-1-苯乙二胺盐酸盐, 日本和光纯药工业株式会社, 批号 LDQ9875; IL-1 β 、PGE₂ 放免试剂盒, 中国人民解放军总医院科技开发中心。

1.3 实验仪器 LS-9800 液体闪烁计数仪, 美国 BECKMAN 公司产品; SN-695B 型智能放免 γ 测量仪, 上海核所日环光电仪器有限公司生产; 酶标仪, BIO-RAD Model 450, 日产。

2 实验方法

大鼠 90 只, 随机分为对照组(生理盐水)、模型组、水母雪莲总黄酮(用 W 表示)、水母雪莲细胞培养物总黄酮(用 C 表示)高、中、低剂量组(40、20、10mg/kg) 和阳性药氢化可的松组(25mg/kg), 除阳性药为腹腔给药外, 其余均口服, 连续给药 3d(1 次/d), 末次给药 1h 后, 在其右后肢足跖部皮下注射 1% 的角叉菜胶 100 μ L, 于注射后 4h 眼球取血, 离心血清, 备用。

2.1 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 IL-1 β 含量的影响 采用放免法测定, 测定严格按 IL-1 β 试剂盒说明书方法进行。

2.2 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 PGE₂ 含量的影响 采用放免法测定, 测定严格按 PGE₂ 试剂盒说明书方法进行。

2.3 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 NO 含量的影响 采用 Griess 法, Griess 试剂配制; 准确称取磺胺 1.0g、N-1-苯乙二胺盐酸盐 0.1g 加适量双蒸水溶解, 再取 2.94mL 磷酸(85%) 加入溶液中, 用双蒸水定容至 100mL, 置于棕色瓶中, 4 $^{\circ}$ C 贮存备用。NaNO₂ 标准液制备: 称取 6.9mg NaNO₂ 加入 100mL 双蒸水溶解, 配成 1mmol/L 的 NaNO₂ 溶液, 依次稀释成 100、80、60、40、20、0 μ mol/L, 取 96 孔板, 标准曲线和样品各 3 孔, 每孔 100 μ L, 再加入 Griess 试剂 100 μ L, 混匀, 室温放置 10min, 在酶标仪上 620nm 参考波长, 570nm 测定波

长, 测定 OD 值。

2.4 数据的统计学处理 各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行检验, 用 SPSS 11.5 for windows 统计软件处理。

3 实验结果

3.1 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 IL-1 β 含量的影响 结果: 水母雪莲总黄酮和水母雪莲细胞培养物总黄酮高、中剂量组与模型组相比均可明显减少 IL-1 β 的含量, $P < 0.01$ 。两者组间无显著差异。

表 1 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 IL-1 β 含量的影响($\bar{x} \pm s$), ($n = 10$)

组别	给药剂量 (mg/kg)	IL-1 β 含量 (ng/mL)
空白组	—	0.36 \pm 0.20
模型组	—	0.43 \pm 0.11
W 高	40	0.14 \pm 0.06 ²⁾
W 中	20	0.17 \pm 0.13 ²⁾
C 高	40	0.20 \pm 0.12 ²⁾
C 中	20	0.26 \pm 0.05 ²⁾
C 低	10	0.31 \pm 0.18
氢化可的松	25	0.29 \pm 0.14 ¹⁾

注: 与模型组相比, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ (下同)

3.2 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 PGE₂ 含量的影响 结果: 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮各剂量组同模型组相比, 水母雪莲总黄酮大剂量、水母雪莲细胞培养物总黄酮中、小剂量均能显著减少 PGE₂ 含量, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 。二者组间无显著差异。

表 2 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 PGE₂ 含量的影响($\bar{x} \pm s$), ($n = 10$)

组别	给药剂量 (mg/kg)	PGE ₂ 含量 (ng/mL)
空白组	—	266.00 \pm 20.81
模型组	—	294.90 \pm 27.2
W 高	40	238.60 \pm 27.09 ²⁾
W 中	20	272.30 \pm 22.59
C 高	40	271.70 \pm 34.65
C 中	20	263.30 \pm 35.77 ¹⁾
C 低	10	260.40 \pm 20.13 ²⁾
氢化可的松	25	263.50 \pm 18.40 ²⁾

3.3 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 NO 含量的影响 结果: 同模型组相比, 水母雪莲细胞培养物总黄酮高剂量、水母雪莲总黄酮各剂量组均能显著抑制 NO 的产生, 二者组间无显著差异。

表 3 水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮对致炎大鼠血清 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s$) (n= 10)

组别	给药剂量 (mg/kg)	NO 含量 ($\mu\text{mol/L}$)
空白组	—	2.26 \pm 0.61
模型组	—	6.61 \pm 2.26
W 高	40	4.52 \pm 0.76 ¹⁾
W 中	20	5.54 \pm 1.64
W 低	10	5.13 \pm 1.08
C 高	40	4.46 \pm 0.74 ¹⁾
C 中	20	4.11 \pm 1.73 ¹⁾
C 低	10	4.30 \pm 1.31 ¹⁾
氢化可的松	25	3.24 \pm 1.00 ²⁾

4 讨论

机体在致炎因子的作用下, 可引起多种细胞产生和释放细胞因子和炎症介质, 如 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 等, 引起溶酶体释放 β -NAG 等, 诱导 iNOS 生成, 促进 NO 合成和释放, 这些因子互相影响, 促进炎症发展^[2-4]; IL-1 β 与炎症关系极为密切, 它可使中性粒细胞聚集和发生急性反应, 还可引起其他炎症因子的产生, 可以通过诱导 COX-2 基因的表达, 使前列腺素的分泌增加而参与介导炎症和免疫反应^[5]; 前列腺素是炎症反应中一类活性很强的介质, 将其微量的 PGE₂ 皮内或静脉注射, 均能引起炎症反应^[6], 并且前列腺素合成常伴有氧自由基的生成, 而自由基也参与炎症反应^[7]; NO 在炎症反应的许多环节发挥复杂的调节作用, 在炎症反应时, 致炎物可诱导或增加局部 NO 的合成和释放, 促进炎症反应, 如血管扩张充血、水肿、细胞毒性及细胞因子依赖过程的间介作用, 增加炎性渗出, 促进败血症的发展, 激

活前列腺素合酶以及参与类风湿的发展等^[8], 本研究结果表明, 水母雪莲总黄酮和水母雪莲细胞培养物总黄酮均能抑制致炎鼠血清中 IL-1 β 、PGE₂、NO 的分泌而起到抗炎作用。水母雪莲总黄酮、水母雪莲细胞培养物总黄酮抗炎作用机理可能与抑制某些炎症介质和细胞因子, 如 IL-1 β 、PGE₂、NO 等生成有关。二者对以上这些炎症介质和细胞因子作用大致相当, 无明显差异。这也为水母雪莲细胞培养物总黄酮替代水母雪莲解决药源紧张问题提供了实验依据。

参考文献:

[1] 李君山, 蔡少青. 雪莲花类药材的化学和药理研究进展 [J]. 中国药学杂志, 1998, 33(8): 449.

[2] Salve mini D, Wang ZQ, Zweier JL, et al. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats [J]. Science, 1999, 286(5438): 304-306.

[3] Hikiji H, Shin WS, Koizumi T, et al. Peroxynitrite production by TNF- α and IL-1 β : implication for suppression of osteoblastic differentiation [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 278(6): E1031-1037.

[4] Brady TC, Chang LY, Day BJ, et al. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF- κ B activation [J]. Am J Physiol, 1997, 273(5pt1): L1002-1006.

[5] Smith WL, Gamvito RM, Dewitt DL. Prostaland in endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and 2 [J]. J Biolchem, 1996, 271: 33157-33160.

[6] 江明性. 药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 130-131.

[7] 宋必卫, 王洁, 马传庚, 等. 清除氧自由基可能是非甾体抗炎药的部分镇痛机制 [J]. 中国疼痛医学杂志, 1997, 25(3): 25.

[8] Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation [J]. Proc Soc EXP Biol Med, 1995, 210(2): 93-101.