

· 药理学 ·

秦艽总环烯醚萜苷的抗炎作用及其机制

牛筛龙, 孙富增, 张兴耐(武警江苏省总队医院药剂科, 江苏 扬州 225003)

[摘要] 目的 观察不同浓度秦艽总环烯醚萜(GMI)对各类各期炎症模型的影响,探讨其抗炎作用的可能机制。方法 采用二甲苯致耳廓肿胀、醋酸诱发小鼠腹腔毛细血管通透性增高,蛋清致大鼠背部气囊滑膜炎,棉球诱发小鼠肉芽肿模型,探讨GMI的抗炎作用。称体质量测定各组小鼠耳的炎症肿胀程度及肉芽增生水平,用化学方法检测各组小鼠腹腔洗涤液中的伊文思蓝含量、滑膜炎渗出液容积、渗出液中的白细胞(WBC)计数和肿瘤坏死因子(TNF- α)含量,渗出液和血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量。**结果与结论** 与阴性对照组相比,GMI能够抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀、醋酸致小鼠毛细血管通透性的增加,以及小鼠棉球肉芽肿的形成;其较阴性对照组还能明显减少渗出液容积,降低渗出液中WBC、MDA、TNF- α 含量及血清中MDA水平,并能提高渗出液和血清中SOD的活性。结论 GMI能够减轻各期炎症形成,机制可能与抑制炎症因子的渗出、消除自由基和抑制脂质过氧化有关。

[关键词] 秦艽;总环烯醚萜苷;抗炎;作用机制

[中图分类号] R34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)03-0198-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.03.010

Anti-inflammatory mechanisms of *Gentiana macrophylla* iridoid glucoside

NIU Shai-long, SUN Fu-zeng, Zhang Xing-nai (Department of Pharmacy, Jiangsu Provincial Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Yangzhou 225003, China)

[Abstract] **Objective** To observe effects of different concentrations of the *Gentiana macrophylla* iridoid glucoside(GMI) in different period inflammatory models, and discuss the possibility of anti-inflammation. **Methods** The anti-inflammatory models of GMI were investigated in mice by methods of the capillary permeability increase (AIPCPI), the cotton-pellet induced-granuloma(CPIG) xylene-induced auricle swelling (XIAS), intraperitoneal injection of acetic acid-induced peritoneal capilnd egg white-induced balloon back synovial inflammation. Levels of XIAS and CPIG in mouse were detected by weighing. Levels of mouse peritoneal washing fluid in the content of Evans blue, synovitis exudate volume, white blood cells(WBC), tumor necrosis factor(TNF- α), the exudate and serum levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde were determined by chemical method respectively. **Result** Compared with negative control group, levels of XIAS, AIPCPI and CPIG decreased significantly in GMI group. Levels of WBC, MDA and TNF- α significantly decreased in GMI group than those of negative control group, but the activity of the exudate and serum SOD increased significantly in GMI group compared with that of negative control group. **Conclusion** The GMI showed protective effects on inflammation in animal models, which might be mediated through inhibition of the exudation of inflammatory factors, the lipid peroxidation and the elimination of free radicals.

[Key words] *G. macrophylla* Pall; iridoid glucoside; anti-inflammatory; mechanism

秦艽药材系龙胆科龙胆属 *Gentiana* (Toum) L. 秦艽组(Sect. Apters)植物的干燥根,2010版中国药典收载秦艽品种有4个,其中大叶秦艽(*G. macrophylla* Pall)及麻花秦艽(*G. straminea* Maxim)为国家三级重点保护植物。秦艽具有祛风湿、清湿热、止痹痛的功效^[1],现代研究表明,秦艽主要含以龙胆苦苷为主的环烯醚萜苷类成分,具有抗炎、镇痛、保肝、抗氧化等多种药理作用^[2,3]。但对秦艽总环烯醚萜苷类成分抗炎作用机制的研究至今未见报道。本研究旨在阐明秦艽总环烯醚萜苷的抗炎作用及其可能机制。

1 材料与仪器

1.1 实验药物 大叶秦艽(*G. macrophylla* Pall)于2010年9月采自甘肃天水,由第二军医大学药学院黄宝康教授鉴定,符合中国药典药用标准。

1.2 实验动物 清洁级雌性昆明种小鼠50只,体质量(22±2)g;雄性SD大鼠50只,清洁级,体质量(250±10)g,均由第二军医大学实验动物中心提供。

1.3 主要试剂 总超氧化物歧化酶(T-SOD)和丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)测定试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司)。

1.4 主要仪器 SHD-Ⅲ型循环水式多用真空泵、LABORTA 旋转蒸发仪 40.00 (Heidolph)、DZF-1 型 (6050A) 电热真空干燥箱 (上海福玛实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 秦艽总环烯醚萜苷的制备 秦艽药材 10 kg, 粉碎成粗粉, 以 75% 乙醇 100 L 回流提取, 每次 3 次, 共提取 2 次。合并 2 次提取液, 减压浓缩至 20 L, 通过 HP20 大孔吸附树脂柱; 先以 50 L 去离子水洗脱, 再以 40% 乙醇 80 L 洗脱, 收集 40% 乙醇洗脱液, 减压浓缩至干, 得到秦艽总环烯醚萜苷 125 g。

2.2 小鼠耳廓肿胀实验 采用小鼠二甲苯致炎法^[4]。将雌性小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只。第 1 组为空白对照组, 给予同等容量的生理盐水; 第 2 组为阳性对照组, 给予阿司匹林 200 mg/kg; 第 3~5 组分别为低、中、高大叶秦艽总环烯醚萜苷剂量组, 分别给予 200、400 及 800 mg/kg 的 GMI, 1 次/d, 连续 5 d, 末次给药 1 h 后在小鼠右耳涂 0.03 ml 的二甲苯致炎, 左耳涂生理盐水作为自身对照, 涂耳 2 h 后处死。沿耳廓基线剪下两耳, 用直径为 6 mm 的穿孔器将两耳廓同一部位穿孔取下, 以肿胀度抑制率作为炎症肿胀程度的指标:

肿胀度抑制率 (%) = (给药组肿胀度 - 对照组肿胀度) / 对照组肿胀度 × 100%。

2.3 小鼠腹腔毛细血管通透性实验 采用醋酸致炎法^[5]。动物的分组、给药剂量、给药途径与小鼠耳廓肿胀实验相同, 末次给药 1 h 后, 尾静脉按 10 μl/g 注射 0.5% 伊文斯蓝溶液, 随即腹腔注射等量的 0.6% 冰醋酸致炎, 20 min 后脱臼处死, 腹腔注射 6 ml 生理盐水洗涤并取出洗涤液, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用紫外分光光度计, 在 590 nm 测定光密度 (OD) 值, 以反映小鼠腹腔透出伊文斯蓝的含量。

2.4 大鼠气囊滑膜炎实验 采用蛋清致大鼠背部气囊滑膜炎。参照王玮等^[6]的方法稍加修改, 该实验选用雄性 SD 大鼠, 动物的分组、给药剂量、给药途径与小鼠耳廓肿胀实验相同。在 0、3 d 分 2 次于大鼠背肩胛正中区皮下注入无菌空气 20 ml, 使大鼠背部形成气囊, 于首次注入空气的当天开始, 大鼠灌胃给药, 连续灌注 7 d, 末次给药后, 在大鼠原有部位再注入 20 ml 无菌空气, 并向气囊内注入 30% 蛋清 1 ml (阴性对照组注入等量的溶媒) 诱导炎症。致炎 6 h 后, 内眦采血, 处死大鼠, 用 Hank'S 液 1 ml 灌洗气囊, 收集灌洗液, 离心, 留取上清液, 供各项指标测定。渗出液容量 (ml) = (灌洗液量 - 1) ml, 灌洗液中白细胞 (WBC) 应用细胞计数仪测定; 灌洗液与血

清中 MDA 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性按试剂盒说明操作。

2.5 小鼠肉芽肿实验 采用棉球诱发小鼠肉芽肿^[6]。动物分组、给药剂量、给药途径同小鼠耳廓肿胀实验, 小鼠在乙醚浅麻醉后, 与左右腹股沟两侧剪毛消毒, 切一个 0.5 cm 的小口, 从切口向腹股沟两侧皮下各植入 5 mg 的灭菌棉球, 缝合皮肤。术后 4 h 后给药, 1 次/d, 连续 7 d, 8 d 后脱颈白处死小鼠, 剥离棉球肉芽组织, 80 °C 干燥烘干, 称质量, 减去棉球质量即为肉芽组织增生的质量, 实验结果以 mg/kg 体质量表示。

2.6 统计学分析 数据用“均数 ± 标准差”表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件对试验结果进行 ANOVA 方差分析, 检验分析不同组之间数据的差异显著性。

3 结果

3.1 GMI 对小鼠耳廓肿胀及腹腔毛细血管通透性增高的影响 二甲苯致炎后, 阳性对照组和 GMI 低、中、高剂量组耳廓肿胀较阴性对照组均减轻, 差异有统计学意义。醋酸致炎后, 阳性对照组和 GMI 中、高剂量组 OD 值较阴性对照组均降低, 差异有统计学意义, GMI 低剂量组腹腔毛细血管通透性与阴性对照组差异无统计学意义, 详见表 1。

表 1 GMI 对小鼠耳廓肿胀及毛细血管通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肿胀程度 (mg/kg)	抑制率 (%)	毛细血管通透性 (OD 值)	抑制率 (%)
空白对照组	246.8 ± 38.2	—	0.34 ± 0.05	—
阳性对照组	78.3 ± 41.4 ²⁾	68.27	0.21 ± 0.03 ²⁾	38.24
低剂量组	81.7 ± 38.6 ²⁾	66.90	0.32 ± 0.06	5.89
中剂量组	74.2 ± 40.1 ²⁾	69.94	0.28 ± 0.04 ¹⁾	17.65
高剂量组	62.6 ± 36.9 ²⁾	74.64	0.20 ± 0.04 ²⁾	41.18

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与空白对照组相比。

3.2 GMI 对大鼠气囊滑膜炎的影响 蛋清致炎后, 阳性对照组和 GMI 中、高剂量组大鼠气囊中渗出液体积、WBC、TNF-α 含量较阴性对照组减少, 差异有统计学意义, 见表 2。GMI 各剂量组血清和渗出液 MDA、SOD 与阴性对照组比较差异有统计学意义, 见表 3。

表 2 GMI 对气囊滑膜炎大鼠渗出液体积、WBC 和 TNF-α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	渗出液体积 (ml)	WBC ($\times 10^7/L$)	TNF-α (ng/L)
空白对照组	0.67 ± 0.21	66.48 ± 15.12	133.38 ± 6.92
阳性对照组	0.32 ± 0.13 ²⁾	33.19 ± 8.12 ²⁾	115.41 ± 7.28 ²⁾
低剂量组	0.58 ± 0.32	58.32 ± 11.03	129.36 ± 5.96
中剂量组	0.45 ± 0.27 ¹⁾	45.11 ± 9.95 ¹⁾	120.74 ± 6.03 ¹⁾
高剂量组	0.35 ± 0.16 ²⁾	36.28 ± 7.38 ²⁾	118.33 ± 6.78 ²⁾

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与空白对照组相比。

表3 GMI对气囊滑膜炎大鼠血清和渗出液MDA和SOD含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	MDA($\mu\text{mol/L}$)		SOD(U/mL)	
	血清	渗出液	血清	渗出液
空白对照组	10.93 \pm 5.09	11.18 \pm 4.82	89.37 \pm 8.12	61.29 \pm 7.16
阳性对照组	4.02 \pm 0.81 ²⁾	3.85 \pm 0.77 ²⁾	141.36 \pm 12.72 ²⁾	88.33 \pm 9.11 ²⁾
低剂量组	7.92 \pm 2.23 ²⁾	7.04 \pm 1.55 ²⁾	102.22 \pm 9.59 ¹⁾	69.04 \pm 6.21 ¹⁾
中剂量组	6.49 \pm 1.77 ²⁾	6.05 \pm 1.23 ²⁾	120.54 \pm 11.03 ²⁾	78.95 \pm 8.17 ²⁾
高剂量组	5.13 \pm 1.97 ²⁾	5.22 \pm 1.36 ²⁾	133.21 \pm 12.17 ²⁾	85.39 \pm 7.22 ²⁾

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与空白对照组相比。

3.3 GMI对小鼠棉球肉芽肿的影响 阳性对照组和GMI中、高剂量组小鼠棉球肉芽肿质量较空白对照组均减轻, 差异有统计学意义, 见表4。

表4 GMI对小鼠棉球肉芽肿的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	肉芽肿质量(mg/kg)	抑制率(%)
空白对照组	163.9 \pm 97.5	—
阳性对照组	88.5 \pm 29.6 ²⁾	46.00
低剂量组	155.7 \pm 42.9	5.00
中剂量组	133.6 \pm 35.6 ¹⁾	18.49
高剂量组	92.9 \pm 36.4 ²⁾	43.32

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与空白对照组相比。

4 讨论

炎症是伴随外伤出现的常见症状, 也是感染及许多疾病的最基本病理过程。二甲苯所致小鼠耳廓肿胀模型和小鼠腹腔毛细血管通透性升高实验属于炎症反应的早期, 这两种模型可以反映药物对急性炎症的作用。本研究实验结果表明, GMI可显著抑制由二甲苯所致小鼠耳廓肿胀及由醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性的升高, 提示GMI对急性炎症有一定的抑制作用。大鼠气囊滑膜炎模型属炎症反应中期, 本研究结果显示, 蛋清致炎后气囊灌洗液体积增大, 炎细胞数量显著增多, 表明白细胞向气囊滑膜炎区的游出活性增强, 考虑原因为白细胞向炎症部位的游走导致了血管通透性增加及组织损害, 引起了炎细胞的增多, 表明其在急性炎症发病中具有重要的意义。棉球肉芽肿属炎症反应的晚期, 本实验结果表明, GMI既可抑制小鼠耳廓肿胀和毛细血管的通透性, 又可抑制渗出液的体积和白细胞的数量, 并对肉芽组织的增生也有一定的抑制作用, 提示GMI对各期炎症模型均有一定的抑制作用。

炎症反应可使脂质过氧化, 其中间产物MDA含量也增高, 而MDA水平可以反映体内脂质过氧化的程度, 并间接反映细胞损伤的程度。SOD是机体清除体内氧自由基(oxygen free radical, OFR)的重要金属酶, 具有强烈的抗氧化作用, 其活性可反映机

体清除氧自由基的能力。本实验结果显示, 蛋清诱导气囊滑膜炎大鼠血清和渗出液中MDA含量升高, SOD活性降低, 补充PSP可明显降低血清和滑膜炎渗出液中MDA的含量, 提高SOD活性, 表明GMI可有效对抗炎症对大鼠造成的过氧化损伤, 具有明显的抗氧化作用。因而, 减轻脂质过氧化损伤可能是秦艽总环烯醚萜苷发挥抗炎作用的重要机制之一。

细胞因子由激活的淋巴细胞和单核细胞产生, 可调节其他类型细胞的功能, 在细胞免疫反应中起重要作用, 是重要的炎症介质。IL-1和TNF- α 等细胞因子的过量存在, 进一步激活多形核白细胞和上皮细胞等效应细胞, 并释放氧自由基、蛋白酶等, 加速花生四烯酸代谢, 释放前列腺素、白三烯等炎症介质, 形成瀑布效应, 导致过度炎症反应^[7]。TNF- α 还能促进中性粒细胞的聚集和激活间质组织释放蛋白水解酶。本实验结果显示, GMI能降低蛋清诱导的大鼠滑膜细胞产生的TNF- α , 表明GMI的抗炎功效与抑制炎症细胞因子的产生有关, 提示抑制TNF- α 、IL-1等炎症介质的释放也可能是秦艽总环烯醚萜苷的抗炎作用机制之一。

秦艽中主要含有环烯醚萜苷类成分, 包括龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苷、三花苷, 秦艽苷A、哈巴苷等, 其中龙胆苦苷的抗炎镇痛活性已有文献报道, 秦艽总环烯醚萜苷以及其他成分的活性研究未见报道。本研究初步阐明秦艽总环烯醚萜苷抗炎作用的机制, 能为秦艽药材的开发应用提供参考依据。

【参考文献】

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第1版[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 62.
- [2] Tan Rx, Wolfender JL, Zhang LX, et al. Acyl secoiridoids and antifungal constituents from *Gentiana macrophylla* [J]. *Phytochem*, 1996, 42(5): 1305.
- [3] 刘艳红, 李兴从, 刘玉清, 等. 秦艽中的环烯醚萜苷类成分[J]. *云南植物研究*, 1995, 15(1): 85.
- [4] 张均智, 莫刚, 杨成芳, 等. 茅莓正丁醇组分的抗炎作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8): 204.
- [5] 钱海兵, 蒲金山, 王龙, 等. 苗药铁筷子挥发油的抗炎作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(8): 1961.
- [6] 王玮, 白月, 王俊平, 等. 黄芩茎叶总黄酮对大鼠气囊滑膜炎抗炎作用机制的研究[J]. *临床与用药*, 2009, 26(4): 460.
- [7] 韩磊, 向云霞, 徐磊. 中药抗炎与免疫药理[J]. *新疆中医药*, 2011, 29(4): 114.

[收稿日期] 2012-11-20

[修回日期] 2013-04-10