

藏药水母雪莲乙醇提取物抗炎作用研究

于瑞雪¹ 梅丽娟² 陶燕铎² 于瑞涛^{2*}

(1. 平顶山学院, 河南 平顶山 467000;

2. 中国科学院藏药研究重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

摘要: 目的 研究水母雪莲乙醇提取物对两种炎症模型的抗炎作用及其机理。方法 应用二甲苯导致小鼠耳肿胀实验法, 观察水母雪莲乙醇提取物对耳肿胀的影响; 采用 LPS 诱导小鼠全身炎症法, 进行小鼠血白细胞计数、血清促炎因子 TNF- α 和 COX-2 水平检测, 同时分析肺组织炎症反应及炎性细胞浸润情况。结果 水母雪莲乙醇提取物中、高剂量治疗组 (40、80mg/kg) 对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀度有显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 同时降低因全身炎症而增加的小鼠血白细胞数 ($P < 0.05$) 抑制 TNF- α 和 COX-2 的表达 ($P < 0.05$), 减少肺组织炎症反应和炎性细胞的浸润 ($P < 0.01$)。结论 水母雪莲乙醇提取物具有显著的抗炎作用。

关键词: 水母雪莲; 促炎因子; 抗炎

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2017.03.017

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2017)03-0558-03

Study of Alcohol Extract from *Saussurea medusa* Maxim. on Anti-inflammatory

YU Rui-xue¹, MEI Li-juan², TAO Yan-duo², YU Rui-tao^{2*}

(1. Pingdingshan University, Pingdingshan Henan 467000, China; 2. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining Qinghai 810001, China)

Abstract: Objective To observe the anti-inflammatory effect of the *Saussurea medusa* Maxim. extract. **Methods** Alcohol extract of *Saussurea medusa* Maxim. were given to mice by gavage. Anti-inflammatory effects were investigated by xylene-induced auricle swelling and endotoxin-induced systemic inflammation models in mice. **Results** The results showed that the middle (40mg/kg) and high (80mg/kg) dosages of *Saussurea medusa* Maxim. alcohol extract could significantly relieve swollen auricle of mice induced by xylene compared with model control group ($P < 0.05$). The extract showed anti-inflammatory effect by repressing the inflammatory progress in LPS-induced inflammation models through multiple pathways, including down-regulating the increasing leukocytes count in mice blood ($P < 0.05$), reducing tumor necrosis factor- α (TNF- α) and cyclooxygenase (COX)-2 concentration in sera ($P < 0.05$), markedly inhibiting inflammatory response and inflammatory cells infiltration in lung tissue ($P < 0.01$). **Conclusion** Alcohol extract from *Saussurea medusa* Maxim. has remarkable anti-inflammatory effects.

Key words: *Saussurea medusa* Maxim.; Proinflammatory factor; Anti-inflammatory

水母雪莲, 为菊科凤毛菊属植物水母雪莲花 *Saussurea medusa* Maxim. 的干燥全草, 分布于甘肃、青海、西藏等地^[1], 是藏药中的名贵药材, 已被收入藏药部颁标准。水母雪莲具有清热解毒、消肿止痛等功效, 可用于头部创伤、炭疽、热性刺痛、妇科病、类风湿性关节炎、中风、外敷消肿等^[2]。水母雪莲含有黄酮类、黄酮苷类、木脂素类、香豆素类、挥发油、多糖等多种成分^[3]。杨伟鹏、林秀仙等^[4,5]报道水母雪莲中有效成分对炎症早期的渗出、水肿有明显的抑制作用。本研究采用两种急性炎症动物模型, 观察水母雪莲乙醇提取物的抗炎作用及其机制, 为新型抗炎药物研发提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 动物 BALB/c 小鼠, 体重 18~22g, 雌雄各半, 许可证号:

收稿日期: 2016-08-03; 修订日期: 2016-12-27

基金项目: 中国科学院西部之光一般项目 (No. Y329211211);

国家自然科学基金 (No. 31101012)

作者简介: 于瑞雪 (1983-), 女 (汉族), 内蒙古赤峰人, 平顶山学院讲师, 硕士学位, 主要从事分子药理学研究工作。

* 通讯作者简介: 于瑞涛 (1979-), 女 (汉族), 内蒙古赤峰人, 中国科学院藏药研究重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所副研究员, 博士学位, 主要从事天然药物化学研究工作。

SCXK(鄂) 2014-0015, 由湖北省实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 精制大肠杆菌内毒素即脂多糖 LPS (0111: B4 血清型), 购自美国 Sigma 公司; 小鼠 TNF- α 和 COX-2 ELISA 试剂盒购自上海依科赛生物制品有限公司; 地塞米松购自郑州市瑞达制药有限公司, 生产批号: 15060526。二甲苯购自成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20151203。

1.3 仪器 超净工作台 (苏州净化设备厂); 图像分析系统 (Syn-gene 公司); 冰冻切片机 (德国 Leica 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 植物样本处理 阴干后的水母雪莲 1kg 粉碎, 过 20 目筛, 5 倍量的 95% 乙醇浸泡 12h, 回流提取 2 次, 1h/次, 浓缩回收乙醇, 真空干燥, 得水母雪莲乙醇提取物浸膏, 用去离子水溶解并稀释, 4℃ 保存备用。

2.2 二甲苯致小鼠耳肿胀实验法 50 只 BALB/c 小鼠随机分为 5 组: 空白对照组 (生理盐水灌胃)、阳性对照组 (0.003g/kg 地塞米松灌胃) 及水母雪莲乙醇提取物低、中、高剂量 (20、40、80mg/kg) 组。连续灌胃给药 7d, 末次给药 6h 后, 在每只小鼠右耳背腹两侧均匀涂抹二甲苯 20 μ l 致炎, 1h 后脱颈处死, 沿耳廓基线剪下两耳, 重叠对齐, 用直径为 7mm 的打孔器分别在两耳相同部位

打下圆耳片,电子天平称重^[6]。计算右耳与左耳重量差(肿胀度)及肿胀抑制率。

肿胀抑制率(%)=(对照组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/对照组平均肿胀度×100%。

2.3 LPS 致炎模型实验法 将 81 只 BALB/c 小鼠随机分为 9 组。空白对照组:生理盐水 0.1ml 腹腔注射(ip)+双蒸水灌胃(ig);模型对照组:LPS(50mg/kg,ip)+双蒸水 ig;阳性对照组:LPS ip+地塞米松(0.003g/kg) ig;水母雪莲低、中、高剂量(20、40、80mg/kg,ig,1 次/日)保护组和治疗组,每组 9 只。每组内 LPS 或 NS 腹腔注射后 1h、6h、12h 各处理 3 只。治疗组注射 LPS 同时药物灌胃,保护组在 LPS 腹腔注射前 1 周开始以相应剂量药物灌胃,1 次/日。

2.4 小鼠血白细胞计数 分别于 LPS 或 NS 腹腔注射后 1h、6h、12h 给与含水氯醛(40mg/kg,ig)进行麻醉,心脏采血约 1.5ml/只。分装于三个 EP 管中,其一加入 0.03ml EDTA 抗凝,1%冰醋酸稀释血样 5 倍,裂解红细胞,流式细胞仪计数后换算出每升小鼠血中白细胞数。

2.5 小鼠血清促炎因子水平检测 另两个分装血样静置 30min 后 4500r/min、4℃离心 10min,取血清,按 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF-α 和 COX-2 的表达水平。

2.6 小鼠肺组织炎细胞浸润检测 心脏采血后取小鼠肺脏,PBS 充分洗涤后固定 12h,20%蔗糖、30%蔗糖依次梯度脱水、包埋、切片,厚度 8μm。HE 染色后观察拍照。使用 Image-ProPlus 6.0 软件计数小鼠肺组织浸润的炎性细胞。

2.7 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS19.0 进行分析。组间比较采用 *t* 检验 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。每组实验在相同条件下至少重复 3 次。

3 结果

3.1 二甲苯致小鼠耳肿胀实验法 地塞米松组与水母雪莲醇提取物高、中剂量组能明显减轻小鼠耳肿胀度,与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),高剂量组肿胀抑制率为 51.60%,与地塞米松组比较差异不显著。表明水母雪莲乙醇提取物可减轻二甲苯所致的炎症反应,具有一定的抗急性炎症作用。结果见表 1。

表 1 水母雪莲乙醇提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	左耳片重 /mg	右耳片重 /mg	肿胀度 /mg	肿胀抑制率 /%
空白对照	-	11.51±1.25	16.02±5.23	7.58±3.84	-
地塞米松	3	9.25±1.04	12.84±1.89	3.62±1.67*	52.53
低剂量组	20	10.19±2.29	15.35±3.53	8.44±2.01	28.85
中剂量组	40	10.83±1.62	13.46±3.74	4.08±2.68*	46.22
高剂量组	80	9.85±1.21	12.97±2.25	3.72±3.14*	51.60

与空白对照组比较,* $P < 0.05$; $n = 9$

3.2 小鼠血白细胞计数 模型对照组血白细胞数较空白对照组明显增加($P < 0.05$),说明 LPS 致炎模型有效;而药物保护组和中、高剂量治疗组白细胞数无明显增加。各组内三个时间点之间血白细胞计数比较无统计学意义。与模型对照组比较,地塞米松治疗组、高剂量保护组和治疗组在三个时间点均显著降低白细胞数($P < 0.05$),表明水母雪莲乙醇提取物可能通过降低小鼠白细胞渗出来抑制小鼠炎症反应。结果见表 2。

3.3 小鼠血清中促炎因子水平 与空白对照比较,模型对照组 TNF-α 和 COX-2 在 LPS 腹腔注射后 6h 后水平较高,说明造模

有效。地塞米松组和水母雪莲乙醇提取物高剂量保护组和治疗组 6h 及 12h 组 TNF-α 和 COX-2 水平显著降低($P < 0.05$),并且呈量效关系。用药组中除高剂量保护组外,其余组 1h、12h 小鼠血清 TNF-α 与各组内 6h 比较有统计学差异($P < 0.05$),血清 TNF-α 和 COX-2 在三个时间点呈先上升后下降的趋势。药物保护组 TNF-α 水平下降普遍比对应治疗组显著,说明预防性用药比治疗用药抗炎效果更好。结果见表 3、表 4。

表 2 水母雪莲乙醇提取物对小鼠血白细胞计数的影响($\bar{x} \pm s$)
×10⁹·L⁻¹

组别	1h	6h	12h
空白对照组	2.20±0.67	2.96±0.65	2.51±1.91
模型对照组	2.43±0.95	3.95±0.21*	3.78±0.76*
地塞米松组	1.35±0.17 [△]	1.92±0.58 [△]	1.06±0.38 [△]
低剂量保护组	1.72±0.45	1.88±1.20	2.03±0.51
中剂量保护组	1.51±0.16	1.96±0.27	1.67±0.47 [△]
高剂量保护组	1.46±0.78 [△]	1.35±0.40 [△]	1.97±0.92 [△]
低剂量治疗组	1.86±0.52	1.80±0.50	2.33±0.68
中剂量治疗组	1.56±0.47	1.86±0.32	2.25±0.49
高剂量治疗组	1.28±0.58 [△]	1.73±0.44 [△]	1.91±0.60 [△]

与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,[△] $P < 0.05$; $n = 9$

表 3 对小鼠血清 TNF-α 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	1h	6h	12h
空白对照组	140.12±5.19	123.87±9.74*	121.98±13.24*
模型对照组	142.48±10.44	668.96±36.73	278.87±18.98
地塞米松组	116.07±12.30	87.87±5.86*	46.25±9.17* [△]
低剂量保护组	132.72±8.12 [△]	552.63±36.44	156.24±15.26
中剂量保护组	120.43±15.08 [△]	313.15±29.94*	125.98±4.14 [△]
高剂量保护组	134.27±16.12	100.59±6.91*	73.33±23.35*
低剂量治疗组	120.92±9.82 [△]	399.74±22.65*	191.02±20.99 [△]
中剂量治疗组	132.98±9.75 [△]	331.20±32.70*	177.89±16.77* [△]
高剂量治疗组	130.28±8.22 [△]	312.72±33.74*	152.11±15.22* [△]

与模型对照组比较,* $P < 0.05$;与各组内 6h 组比较,[△] $P < 0.05$; $n = 9$

表 4 对小鼠血清 COX-2 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	1h	6h	12h
空白对照组	89.57±24.31	85.80±15.63*	84.12±21.05*
模型对照组	85.86±18.14	158.24±17.35	106.29±23.52
地塞米松组	84.14±15.47 [△]	108.62±14.32*	85.79±11.63*
低剂量保护组	87.53±8.63 [△]	178.26±18.13	85.62±10.09* [△]
中剂量保护组	88.19±13.52	147.45±14.07	76.94±5.73* [△]
高剂量保护组	87.81±6.65	149.22±10.36	79.15±17.98*
低剂量治疗组	89.24±7.68	159.81±16.57	81.62±13.02 [△]
中剂量治疗组	76.92±10.64 [△]	153.49±32.68	84.34±9.56 [△]
高剂量治疗组	85.93±9.42	141.64±16.24	66.23±12.55* [△]

与模型对照组比较,* $P < 0.05$;与各组内 6h 组比较,[△] $P < 0.05$; $n = 9$

3.4 小鼠肺组织 HE 染色 结果显示空白对照组小鼠肺组织结构清晰,肺泡间隔及肺泡细胞结构正常,无炎性细胞浸润。模型对照组 LPS 注射后 6~12h 肺组织炎性细胞浸润明显增加,肺泡腔内可见出血和渗出,肺泡壁增宽,肺泡细胞结构不清晰。水母雪莲乙醇提取物保护组和治疗组中,炎症模型的肺组织病理改变改善明显,肺泡间质只有少量的炎性细胞,肺泡细胞结构较清晰。见图 1。

3.5 肺组织炎性细胞浸润情况 模型对照组小鼠注射 LPS 后 6h 和 12h 的肺组织炎性细胞数目较 1h 增加显著($P < 0.01$),提示一定时间内肺组织炎症随 LPS 作用时间延长而加重。用药组中除高剂量保护组外,其余组 1h、12h 小鼠肺组织浸润细胞数与相应 6h 比较有统计学差异($P < 0.05$),浸润细胞数在 3 个时间点呈先升后降的趋势。结果见表 5。

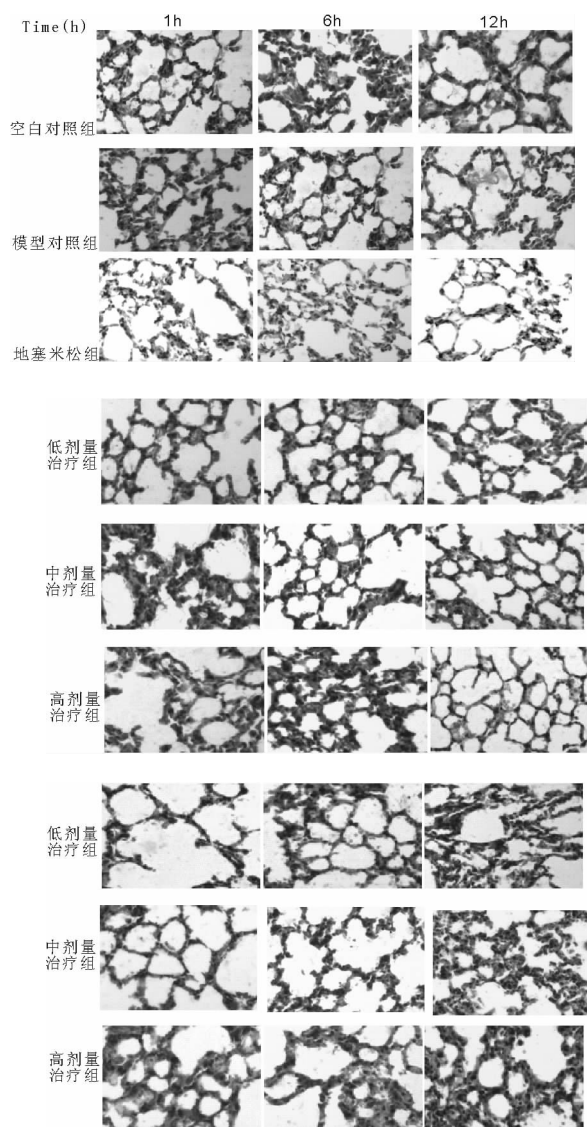


图 1 小鼠肺组织形态学观察(HE 200 ×)

表 5 小鼠肺组织中炎性细胞浸润情况($\bar{x} \pm s$)

组别	1h(个/视野)	6h(个/视野)	12h(个/视野)
空白对照组	842.56 ± 143.39	861.42 ± 156.41	814.38 ± 153.24
模型对照组	812.39 ± 176.24	1176.85 ± 135.66***	1107.08 ± 90.28***
地塞米松组	830.65 ± 76.15	783.57 ± 111.64*	880.27 ± 101.16
低剂量保护组	821.33 ± 146.88 $\Delta\Delta$	1273.67 ± 127.70*	876.56 ± 107.49 Δ
中剂量保护组	813.89 ± 89.35 $\Delta\Delta\Delta$	1159.22 ± 201.01*	855.33 ± 97.37 $\Delta\Delta\Delta$
高剂量保护组	823.33 ± 99.08	1034.56 ± 226.78*	769.67 ± 196.98 Δ
低剂量治疗组	834.33 ± 125.87 $\Delta\Delta\Delta$	1431.78 ± 173.58*	1146.11 ± 192.00* Δ
中剂量治疗组	747.78 ± 106.21 $\Delta\Delta\Delta$	1358.78 ± 219.71*	904.89 ± 183.55 $\Delta\Delta\Delta$
高剂量治疗组	773.22 ± 143.10 $\Delta\Delta\Delta$	1368.67 ± 271.25*	823.33 ± 105.37 $\Delta\Delta\Delta$

与模型对照组 1h 比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与各组 6h 比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; $n = 9$

4 讨论

非特异性炎症反应通常分为急性期(以毛细血管通透性增加导致肿胀为特征)、亚急性期(以白细胞、巨噬细胞浸润为特征)和慢性增殖期(以组织变性和纤维化为特征)^[7]。本实验通过制造小鼠炎症模型,分别观察地塞米松和水母雪莲提取物对炎症三个发展时期的影响。结果显示,中(40mg/kg)、高(80mg/kg)剂量的水母雪莲乙醇提取物能显著减轻二甲苯诱导的小鼠耳肿胀,表明其对炎症急性发作期有明显抑制作用。同时中、高剂量保护组和治疗组还能显著抑制 LPS 诱导的小鼠血白细胞增高,表明水母雪莲可能通过抑制白细胞的渗出发挥其抗亚急性期炎症的作用。此外,水母雪莲乙醇提取物可有效抑制 LPS 所引起的肺损伤和炎性细胞浸润,同时明显下调小鼠血清中 TNF- α 和 COX-2 水平,提示水母雪莲乙醇提取物可能通过下调 TNF- α 和 COX-2 的释放而抑制慢性增殖期炎症。基于此实验结果,表明在水母雪莲乙醇提取物可能对革兰氏阴性菌感染性疾病有治疗作用^[8]。笔者将进一步研究水母雪莲提取物抗炎作用的有效部位及成分,为开发水母雪莲的药用功能提供科学依据。

参考文献:

[1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 20.

[2] Fan CQ, Yue JM. Biologically active phenols from Saussurea medusa [J]. Bioorg Med Chem 2003, 11: 703.

[3] 李菁, 侯苑茗, 葛发欢. 水母雪莲花超临界 CO₂ 萃取物化学成分研究 [J]. 中药材 2002, 25(10): 718.

[4] 杨伟鹏, 周钟鸣. 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 [J]. 中国实验方剂学杂志 2005, 11(6): 39.

[5] 林秀仙, 李菁, 荣祖元. 水母雪莲花超临界 CO₂ 萃取物的抗炎作用 [J]. 广东药学院学报 2004, 20(3): 253.

[6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学, 第 3 版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 822.

[7] 蒋霞, 黎格, 杨柯, 等. 民族药朝天罐提取物抗炎作用及机理研究 [J]. 时珍国医国药 2010, 21(10): 2693.

[8] 刘晓娟, 魏红, 杨娇, 等. 藏药细果角茴香乙醇提取物对内毒素炎症小鼠的保护作用 [J]. 苏州大学学报(医学版) 2012, 32(6): 755.