

胞凋亡率明显升高,同时伴有 Caspase-3 阳性表达的增加,说明 AHV 可通过诱导 RA 滑膜细胞 Caspase-3 活化,促进滑膜细胞凋亡。但有关蛇毒诱导的滑膜细胞凋亡的具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Firestein G S Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: passive responders or transformed aggressors [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 39: 1781-1790
- [2] 董庆华, 郑树, 吕庆华, 等. 浙江蝮蛇毒诱导人白血病 Jurkat 细胞凋亡的体外实验研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(11): 851-853
- [3] Cheng X, Qian Y W, Liu Q D, *et al*. Purification characterization of a new venom protein from *Agkistrodon acutus* venom [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 265(2): 530-535
- [4] Halliday D A, Clemente G, Rathjen D A, *et al*. Rapid degradation of articular cartilage proteoglycan by neutrophils: Comparison with macrophages and synovial fibroblasts [J]. *Inflamm Res*, 2000, 49(9): 441-444
- [5] Baier A, Meineck I I, Gay S, *et al*. Apoptosis in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15(3): 274-279
- [6] Lin X, Chen J S, Chen Q, *et al*. Effect of fibrinolytic enzyme

F II from *Agkistrodon acutus* venom on LPS-induced renal microvascular thrombosis [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2005, 21(3): 340-343

- [7] Lei D Q, Zhou X L, Li Y X Purification of a small peptide to inhibit platelet aggregation from *Agkistrodon acutus* venom [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, 22(9): 1126-1129
- [8] 车军, 刘洁生, 杨维东. 蛇毒抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2001, 32(8): 757-759
- [9] 吴卯斌, 呈历理. 复方祛风湿蛇毒胶囊治疗类风湿性关节炎 126 例 [J]. *蛇志*, 1999, 11(1): 30
- [10] 刘巧红, 沈凌汛, 滕云, 等. 类风湿关节炎滑膜细胞的增殖及细胞周期的研究 [J]. *临床内科杂志*, 2004, 21(12): 814-817
- [11] Fukushima S, Kato S, Maeda M, *et al*. Caspase-9 pathway activation by inhibiting endogenous fibroblast growth factor signaling in human glioma cells [J]. *Int J Oncol*, 2008, 32(2): 467-473
- [12] Xu Y H, Dong B, Luo Q Z, *et al*. Influence of element on the expression of Bcl2 family genes in rat C6 glioma cells [J]. *Chin Med J*, 2005, 85(24): 1700-1703.
- [13] Hilbers I, Hansen T, Petrow P K, *et al*. Express of the apoptosis accelerator Bax in rheumatoid arthritis synovium [J]. *Rheumatol Int*, 2003, 23(2): 75-81

白桂木抗炎镇痛作用有效部位筛选

欧阳胜¹, 申作洁², 潘琳娜^{3*}

(1. 江西中医学院 中药化学教研室, 江西 南昌 330006; 2. 兖矿集团总医院 药剂科, 山东 邹城 273500;

3. 江西中医学院 药理学教研室, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 分离并筛选白桂木抗类风湿性关节炎的有效部位。方法 通过连续 ig 给药白桂木根总提取物、石油醚部位、醋酸乙酯部位、氯仿部位提取物, 分别采用小鼠二甲苯致耳肿胀、大鼠棉球所致肉芽肿、小鼠醋酸扭体法、小鼠热板法和小鼠腹腔毛细血管通透性评价活性。结果 白桂木醋酸乙酯部位抗炎镇痛作用较明显。结论 白桂木醋酸乙酯部位可能是其治疗类风湿性关节炎的有效部位。

关键词:白桂木; 类风湿性关节炎; 有效部位; 抗炎; 镇痛

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1850-04

白桂木 *Artocarpus hypargyreus* Hance 为桑科波罗蜜属植物, 其根入药, 味甘、淡, 性温, 具有祛风利湿、活血通络等功效, 主治风湿痹痛、腰膝酸软、头痛、胃痛、黄疸、产妇乳汁不足等症。该药在赣南、粤北地区民间应用较广, 用于治疗类风湿性关节炎、慢性腰腿疼痛等。白桂木根和根皮的化学成分已进行研究^[1-2], 但目前对白桂木的基础研究尚不够深入, 其抗类风湿性关节炎的有效成分不清, 缺乏以有

效成分为基础的质量标准, 疗效难以保证。本实验着重对白桂木根治疗类风湿性关节炎有效部位进行筛选, 通过对白桂木根醇浸膏的 3 种不同溶媒 (石油醚、氯仿、醋酸乙酯) 萃取物以及总浸膏分别进行抗炎、镇痛活性评价, 确定其有效部位。

1 材料

1.1 动物: 小鼠, SPF 级, 雌雄兼用, 体质量 18~22 g, 由江西中医学院实验动物中心提供, 合格证号:

①收稿日期: 2010-03-29

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目 (2007GZY0926)

作者简介: 欧阳胜 (1968—), 女, 江西省南昌市人, 江西中医学院中药化学教研室副教授, 中药化学专业硕士生导师, 长期从事中药化学的教学、科研工作。Tel: 13450477365 E-mail: ouyangsheng2003@yahoo.com.cn

* 通讯作者 潘琳娜

2009-0090, 2009-0038。大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 180~220 g, 由江西中医学院实验动物中心提供, 合格证号: 2009-0111。

1.2 受试药品: 白桂木根 20 kg, 于 2008 年 4 月采自江西于都县山区, 由江西中医学院中药鉴定教研室刘庆华鉴定。将药材切成碎块后用 95% 乙醇高压提取罐提取, 得浸膏 600 g, 水溶解后分别用石油醚、醋酸乙酯、氯仿和水饱和正丁醇萃取, 旋转蒸发器浓缩后分别得浸膏 23.85、54.28、83.05、368.68 g。总浸膏和醋酸乙酯部位用蒸馏水溶解, 石油醚部位用 1% 聚山梨酯 80 水溶液溶解, 氯仿部位用 0.5% CMC-Na 水溶液溶解。

1.3 试剂: 95% 乙醇、石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇、冰醋酸、二甲苯均为分析纯; 伊文思蓝 (F20040213); 雷公藤 (上海复旦复华药业有限公司, 批号 081001); 泼尼松 (天津天药药业股份有限公司, 批号 080911)。

1.4 仪器: 高压提取罐 (韩国), 旋转蒸发器 (上海亚荣 RE-52AA), 722 型分光光度计。

2 方法

2.1 一般炎症模型

2.1.1 耳肿胀模型^[3]: 将 72 只 18~22 g 雄性昆明种小鼠随机分为 6 组, 每组 12 只。分别为白桂木总提取物、醋酸乙酯、石油醚、氯仿提取物组, 模型组和雷公藤阳性药组。各组 ig 给药, 连续 7 d, 于末次给药 1 h 后, 将二甲苯 0.02 mL 涂于小鼠右耳正反两面, 30 min 后颈椎脱臼处死, 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, 计算肿胀度 (左右耳片质量差值) 及抑制率。

抑制率 = (模型组肿胀度 - 给药组肿胀度) / 模型组肿胀度 × 100%

2.1.2 棉球肉芽肿模型^[3]: 将 48 只 180~220 g 雄性大鼠随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为模型组, 阳性对照泼尼松组, 白桂木总提取物、醋酸乙酯、石油醚、氯仿提取物组。分别 ig 给药, 第 2 次给药后乙醚麻醉, 在大鼠两侧腋窝下剪开约 1 cm 的小口, 将两个灭菌棉球 [每个棉球质量 (20 ± 1) mg, 高压灭菌, 每个棉球各加入氨苄青霉素 1 mg/0.5 mL, 50 °C 烘箱烤干] 分别植入皮下, 缝合创口。并在创口局部涂以少量抗生素。第 8 次给药后颈椎脱臼处死, 取出棉球, 剥离附着的结缔组织, 在 60 °C 烤箱烘 12 h 后称质量, 减去原来棉球质量, 即为肉芽肿净质量, 取两侧肉芽肿质量的均值。计算抑制率。

抑制率 = (模型组肉芽肿质量 - 给药组肉芽肿质量) / 模

型组肉芽肿净质量 × 100%

2.2 镇痛模型

2.2.1 扭体法^[3]: 分组及给药方法同 2.1.1 项, 于末次给药 1 h 后, ip 新鲜配制的 0.6% 的醋酸生理盐水溶液 0.2 mL/只, 观察和记录 30 min 内小鼠的扭体次数, 其扭体表现为腹部内凹、躯干与后腿伸展、臂部高起。计算抑制率。

抑制率 = (模型组扭体次数 - 给药组扭体次数) / 模型组扭体次数 × 100%

2.2.2 热板法^[3]: 体质量 18~22 g 雌性昆明小鼠, 热板温度保持在 (55 ± 2) °C, 测定每只小鼠的痛阈值 (即痛反应潜伏期, 指小鼠接触热板至舔后足的时间)。痛阈值在 5~30 s 内为合格小鼠。痛阈合格小鼠分组及给药方法同 2.1.1 项, 于末次给药 1 h 后, 以动物出现舔后爪行为作为痛反应指标, 记录自投入热板到出现舔后爪的潜伏期, 连续测 3 次, 取平均值, 为痛阈值。计算抑制率。

抑制率 = (给药组痛阈值 - 模型组痛阈值) / 模型组痛阈值 × 100%

2.3 毛细血管通透性模型^[3]: 分组及给药方法同 2.1.1 项, 各组于末次给药 1 h 后, 尾 iv 1% 伊文思蓝 (0.1 mL/mg), 同时 ip 0.6% 冰醋酸 0.2 mL, 30 min 后颈椎脱臼处死小鼠, 并 ip 5 mL 生理盐水, 抽取腹腔液于 4 °C 放置 6 h, 取其上清液, 用 722 分光光度计 (590 nm) 测定吸光度 (A) 值, 计算抑制率。

抑制率 = (模型组 A 值 - 给药组 A 值) / 模型组 A 值 × 100%

2.4 统计学方法: 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 16.0 软件包进行统计分析, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 对一般炎症模型的影响

3.1.1 对二甲苯致小鼠耳肿胀的作用: 白桂木总提取物和醋酸乙酯提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀有明显的抑制作用, 抑制率分别为 58.22%、80.48%, 分别与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 氯仿提取物组和石油醚提取物组与模型组的肿胀度无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

3.1.2 对大鼠棉球所致肉芽肿的影响: 白桂木总提取物和醋酸乙酯提取物对大鼠棉球所致肉芽肿有明显的抑制作用, 抑制率分别为 19.65%、17.41%, 分别与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 氯仿提取物组和石油醚组与模型组的肉芽肿质量无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 白桂木不同提取物对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Effect of different extracts from *A. hypargyreus* on ear edema of mice induced by xylene
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿胀度/mg	抑制率/%
模型	-	5.60±1.53	-
雷公藤	13.636	1.50±0.52*	73.08
总提取物	420	2.40±0.74*	58.22
醋酸乙酯提取物	420	1.10±0.30*	80.48
氯仿提取物	420	5.30±1.20	6.10
石油醚提取物	420	5.40±0.95	4.72

与模型组比较: * $P < 0.05$, 下表同
* $P < 0.05$ vs model group, following tables are same

表 2 白桂木不同提取物对大鼠棉球所致肉芽肿的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Effect of different extracts from *A. hypargyreus* on granuloma of rats induced by cotton balls
($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肉芽肿质量/mg	抑制率/%
模型	-	58.56±4.53	-
雷公藤	6.455	40.51±4.46*	30.83
总提取物	200	47.05±7.64*	19.65
醋酸乙酯提取物	200	48.36±5.29*	17.41
氯仿提取物	200	50.92±4.96	13.04
石油醚提取物	200	52.11±6.15	11.00

3.2 对镇痛模型的影响

3.2.1 对醋酸所致扭体次数的影响: 白桂木总提取物和醋酸乙酯提取物对小鼠醋酸所致扭体次数有明显的抑制作用, 抑制率分别为 31.78%、53.37%, 分别与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 氯仿提取物组和石油醚提取物组与模型组的扭体次数无显著差异 ($P > 0.05$)。结果见表 3。

表 3 白桂木不同提取物对醋酸所致小鼠扭体次数的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 3 Effect of different extracts from *A. hypargyreus* on body writhing of mice induced by acetic acid
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	扭体次数/次	抑制率/%
模型	-	44.500±3.060	-
雷公藤	13.636	24.750±3.223*	44.38
总提取物	200	30.360±2.976*	31.78
醋酸乙酯提取物	200	20.750±2.768*	53.37
氯仿提取物	200	43.250±2.734	2.81
石油醚提取物	200	42.830±3.614	3.75

3.2.2 对小鼠热板所致舔足时间的影响: 白桂木总提取物和醋酸乙酯提取物对小鼠热板所致舔足时间有明显的抑制作用, 抑制率分别为 20.35%、35.11%, 分别与模型组比较有显著差异 ($P <$

0.05); 氯仿提取物组和石油醚提取物组与模型组的舔足时间无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 白桂木不同提取物对小鼠所致舔足时间的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 4 Effect of different extracts from *A. hypargyreus* on licking foot time of mice induced by hot plate
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	痛阈值/min	抑制率/%
模型	-	17.37±2.00	-
雷公藤	13.636	27.19±2.63*	36.24
总提取物	200	21.80±1.99*	20.35
醋酸乙酯提取物	200	24.63±2.79*	35.11
氯仿提取物	200	17.76±1.64	10.01
石油醚提取物	200	17.45±2.23	0.66

3.3 对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响: 白桂木总提取物和醋酸乙酯提取物对小鼠腹腔毛细血管通透性有明显的抑制作用, 抑制率分别为 38.23%、44.17%, 分别与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 氯仿提取物组和石油醚提取物组与模型组的腹腔洗液 A 值无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 白桂木不同提取物对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 5 Effect of different extracts from *A. hypargyreus* on capillary permeability of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	腹腔洗液 A 值	抑制率/%
模型	-	0.453±0.130	-
雷公藤	13.636	0.225±0.078*	50.35
总提取物	200	0.279±0.100*	38.23
醋酸乙酯提取物	200	0.253±0.058*	44.17
氯仿提取物	200	0.291±0.096	35.78
石油醚提取物	200	0.342±0.103	24.56

4 讨论

类风湿性关节炎 (RA) 是一种以关节慢性、反复发作性炎症为主的全身性疾病, 它的发生和发展与患者免疫系统功能失调密切相关, 是一种多发性常见病, 主要表现为关节肿痛、关节强直、疲劳、抑郁。近年来, 对 RA 的机制进行了广泛的研究, 许多研究已经表明淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、滑膜细胞等多种炎症细胞介导的异常细胞免疫、体液免疫, 导致关节局部和全身的免疫功能紊乱, 在 RA 的病理中起着重要作用, 其发病与机体免疫系统的多种细胞功能及其分泌的细胞因子失调密切相关。目前临床上治疗 RA 的方法主要为缓解急性发作症状 (如关节疼痛和肿胀), 抑制炎症因子的释放, 以及提高机体免疫抑制功能等, 但这些药物一般具有一定副作用, 选用中药治疗具有较高的安全性。

在白桂木已发现的化学成分中, 主要以黄酮类

化合物、芪类(stilbene, 1, 2-二苯乙烯)^[1-2]、苯丙酸类化合物的相关生物活性研究较多。其生物活性表现在抗炎、抗氧化^[4-5]作用,抑制环氧酶(COX)^[6]活性,镇痛,对癌细胞的毒性作用,抑制5 α 还原酶活性,抑制苏氨酸酶活性等。其中抗炎、抗氧化,抑制环氧酶(COX)活性,镇痛作用与抗RA密切相关。

本实验选取了小鼠醋酸扭体法、小鼠热板法疼痛试验以及二甲苯致小鼠耳廓肿胀、醋酸诱导的毛细血管通透急性炎症模型和大鼠棉球肉芽肿的慢性炎症模型,观察白桂木不同提取部位的活性,实验结果表明白桂木根醋酸乙酯提取物有镇痛作用和对炎症中出现的变质渗出和增生都有较好的抑制作用,这表明该部位具有较好的抗炎镇痛活性,初步揭示白桂木醋酸乙酯提取物在治疗RA中的作用,但有关白桂木的镇痛抗炎作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 甘茂罗,欧阳胜,谢平,等. 白桂木的化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(7): 988-989
- [2] 陈黎明,谢平,肖庆青,等. 白桂木化学成分研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 815-818
- [3] 徐叔云,卞如谦,陈修,等. 药理实验方法学[J]. 北京: 人民卫生出版社, 2002
- [4] Oh H, Ko E K, Jun J Y, et al. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of prenylflavonoids, coumarin, and stilbene from *Morus alba* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(10): 932-934
- [5] Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, et al. Oxys-veratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cell [J]. *Nitric Oxide*, 2003, 9(2): 64-76
- [6] Su B N, Cuendet M, Hawthorne M E, et al. Constituents of the bark and twigs of *Artocarpus dadah* with cyclooxygenase inhibitory activity [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(2): 163-169

生血丸对骨髓抑制小鼠造血功能的调控作用

严苏纯¹,王光普¹,刘彤^{2*}

(1 天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052; 2 中新药业达仁堂制药厂, 天津 300052)

摘要:目的 观察生血丸对⁶⁰Co 合并环磷酰胺致骨髓抑制小鼠造血功能的影响,探讨该方促进全血细胞上调的作用机制。方法 通过全自动血细胞分析仪检测外周血象;流式细胞术检测骨髓细胞细胞周期;ELISA(酶联免疫吸附法)检测骨髓基质中红细胞生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)、粒细胞生长因子(G-CSF)的量。结果 生血丸能明显改善骨髓抑制小鼠外周血中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HB)、血小板计数(PLT)、骨髓有核细胞(BMC)的量($P < 0.05$),生血丸组升红细胞疗效更为突出($P < 0.05$);生血丸组能解除G₀/G₁期细胞阻滞,促进G₀/G₁期细胞进入增殖周期;生血丸能有效平衡微环境中TPO的量;能改善EPO的表达;对骨髓抑制小鼠骨髓细胞上清中G-CSF有明显的正调控作用。结论 生血丸能提高骨髓抑制小鼠外周血血细胞和骨髓有核细胞计数;可促进骨髓抑制小鼠骨髓细胞从G₀/G₁期进入增殖周期;并能有效调节骨髓微环境中TPO、EPO和G-CSF的表达,从而促进骨髓抑制小鼠的造血功能。

关键词:生血丸;骨髓抑制;造血功能;红细胞生成素(EPO)

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)11-1853-04

生血丸源于中医研究院广安门医院名老中医谢海洲教授数十年临床之验方。方中有鹿茸、黄柏、山药、炒白术、桑枝、白扁豆、稻芽、紫河车,具有补肾健脾、填精补髓之功效。主药鹿茸温肾壮阳、强筋健骨、生精益血,是峻补元阳之要药,用于治疗精血两亏,活血又补血,具有促进造血之功能;紫河车益气、养血、补精,有强壮作用;白术、山药为健脾开胃之品,于大补之中防滋腻,有益气生血之作用;黄柏为泻火滋阴、清解清泻之品,取其缓解滋补过峻之作用

而有利于体内吸收,该方组方严谨,临床应用功效确切。本实验拟从造血干细胞的增殖状况、造血微环境的变化来探讨生血丸的作用机制。

1 材料

1.1 动物:雄性BalB/C小鼠,中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,体质量(20 $\pm$ 2)g,8~12周龄,许可证号SCXK-(军)2007-004。

1.2 仪器:ST-360型酶标仪,湖北中盛千湖科技有限公司;EPICS XL型流式细胞仪,美国BECK-

①收稿日期:2010-04-23

作者简介:严苏纯(1967—),女,江苏人,副教授,博士,研究方向为中医药对造血的调控。

Tel: 13207607682 E-mail: d2004012@163.com