

阿魏酸钠与苦参素的协同抗炎作用研究

孙妍¹, 刘汉清¹, 陈方芳¹, 高艳¹, 许明波², 刘志峰^{1*}

1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005

2. 北京双鹭药业股份有限公司, 北京 100041

摘要: **目的** 探讨阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)与苦参素(kushenin)即氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)联合用药的协同抗炎作用。**方法** 采用小鼠耳肿胀、大鼠足肿胀、大鼠棉球肉芽肿模型观察 SF 与 OMT 联合用药的抗炎作用。体外采用 RAW264.7 细胞观察联合用药对脂多糖(LPS)诱导的 NO 合成的影响, 用 Griess 法测定 NO 生成量。**结果** SF 与 OMT 联合应用时, 可明显降低二甲苯所致的小鼠耳肿胀和角叉菜胶所致的大鼠足肿胀, 大剂量可减轻大鼠棉球肉芽肿的质量, 但单独给予 SF 或 OMT 对上述 3 种炎症模型均无显著作用。体外实验结果显示, SF 与 OMT 联合应用可明显降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的产生, 且二者之间存在协同作用。**结论** SF 与 OMT 联合应用具有明显的协同抗炎作用, 降低 LPS 诱导的炎性因子 NO 的产生, 可能是其减轻炎症反应的机制之一。

关键词: 阿魏酸钠(SF); 苦参素; 氧化苦参碱(OMT); 抗炎; 协同作用; 一氧化氮(NO)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)03-0538-04

Observation of synergistic anti-inflammatory effect of combination of sodium ferulate and oxymatrine

SUN Yan¹, LIU Han-qing¹, CHEN Fang-fang¹, GAO Yan¹, XU Ming-bo², LIU Zhi-feng¹

1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China

2. Beijing SL Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100041, China

Abstract: Objective To assess the synergistic anti-inflammatory effect of sodium ferulate (SF) and kushenin, i.e. oxymatrine (OMT). **Methods** The anti-inflammatory effect of the combination of SF and OMT was evaluated on xylene-induced murine ear edema model, carrageenin-induced rat paw edema model, and rat tampon-induced granuloma model *in vivo*. *In vitro*, the effect of SF and OMT on the nitric oxide (NO) production induced by LPS was observed on RAW264.7 cells. The content of NO in the supernatant was detected with Griess reagent. **Results** When SF was used in combination with OMT, the edema induced by xylene and carrageenin was markedly inhibited, the weight of granuloma caused by tampon was also reduced in the high dose group, and the inhibition rate was more considerable by combined treatment than those by SF or OMT alone. *In vitro*, the NO production induced by LPS was depressed by combined treatment, and a synergistic anti-inflammatory effect was observed. **Conclusion** The present study demonstrates that the combination of SF and OMT could exert conspicuous synergistic anti-inflammatory effect, and the mechanism may be related to the inhibited effect of NO production in inflammatory factors induced by LPS.

Key words: sodium ferulate (SF); kushenin; oxymatrine (OMT); anti-inflammation; synergistic effect; nitric oxide (NO)

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 和苦参 *Sophora flavescens* Ait. 是我国传统医学中的常用药材, 且二者经常配伍使用, 用于治疗痤疮、前列腺炎等疾病。阿魏酸是当归的主要有效成分之一, 阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)是阿魏酸的钠盐; 苦参素(kushenin)又名氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)是从苦参中提取的生物碱。近年研究表明

SF 和 OMT 均具有抗心律失常、抗炎及改善微循环等多方面作用^[1-2]。但有关 SF 与 OMT 联合用药的相关研究未见报道。本实验初步探讨 SF 与 OMT 联合用药对不同炎症模型的协同抗炎作用及其机制。

1 材料与仪器

1.1 动物

健康雄性昆明小鼠, 体质量 18~22 g; 健康雄

收稿日期: 2010-05-20

作者简介: 孙妍(1984—), 女, 辽宁省辽阳市人, 硕士。Tel: (0535)6706030-8021 E-mail: ronnie.8023@163.com

*通讯作者 刘志峰 Tel: (0535)2102150 E-mail: lzhf@luye.cn

性 SD 大鼠, 体质量 220~250 g, 由山东绿叶制药股份有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(鲁) 20090009。

1.2 药品与试剂

SF (质量分数>99%, 批号 080303) 购于丽珠集团利民制药厂。OMT (质量分数>98%, 批号 20081204) 由江苏天晟制药股份有限公司提供。地塞米松 (Dexamethasone, DEX) 磷酸钠注射液为济南利民制药有限责任公司产品, 规格 5 mg/mL。角叉菜胶、LPS 购于 Sigma 公司。二甲苯为莱阳市康德化工有限公司产品。磷酸为天津市化学试剂厂产品。磺胺、盐酸萘乙二胺为国药集团化学试剂有限公司产品。

1.3 主要仪器

YLS—7B 足趾容积测量仪 (济南益延科技发展有限公司), SPX—150B—Z 生化培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), 酶标仪 (Bio. TEK Synergy HT, 美国), TGL—16G 型台式高速离心机 (上海医用分析仪器厂), BCN—1360 型超净工作台 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司), Nikon TE—2000 倒置显微镜。

2 方法与结果

2.1 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间采用两样本均数 t 检验, 用 Microsoft Excel 2003 完成, IC_{50} 的计算应用 SPSS17.0 软件完成。

2.2 SF 与 OMT 联合用药对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响^[3-4]

将 70 只小鼠按体质量随机分为 7 组, 即对照组、DEX (1 mg/kg) 组、SF (20 mg/kg) 组、OMT (40 mg/kg) 组、SF+OMT 低、中、高剂量 [(10+20)、(20+40)、(40+80) mg/kg] 组, 每组 10 只。各组小鼠分别 iv 相应药物, 30 min 后每只小鼠均在右耳前后两面涂布二甲苯 (20 μ L/只) 致炎, 左耳不做任何处理。致炎 30 min 后脱臼处死动物, 剪下双耳, 用 8 mm 直径打孔器分别在两耳同一部位打下耳片, 用电子天平称质量。以每鼠右耳片质量减去左耳片质量为肿胀度, 结果见图 1。单独给予 SF (20 mg/kg) 或 OMT (40 mg/kg) 未见明显抗炎作用 ($P>0.05$), 但当二者联合用药时, 对二甲苯所致的小鼠耳肿胀具有明显的抑制作用 ($P<0.001$)。SF+OMT 低、中、高剂量组小鼠的耳肿胀程度与对照组比较均有显著差异 ($P<0.01$ 、 0.001), 且呈明显剂量关系。

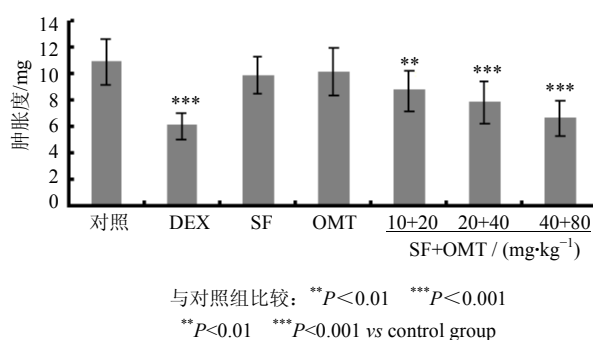


图 1 SF 与 OMT 联合用药对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effect of SF combined with OMT on xylene-induced ear edema in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.3 SF 与 OMT 联合用药对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响^[3,5]

将 70 只大鼠按体质量随机分为 7 组, 分组及给药剂量同“2.2”项。应用足趾容积测量仪测定各鼠右后足容积作为给药前正常值。各组大鼠均右后足跖 sc 1%角叉菜胶溶液 0.1 mL/只, 2 h 后 iv 相应药物, 观察记录致炎 4 h 大鼠足跖容积数值的变化, 以致炎后右后足容积减去致炎前右后足容积为肿胀度, 结果见图 2。对照组大鼠足爪肿胀明显, SF 与 OMT 联合用药组在致炎后 4 h 大鼠的足爪肿胀度较对照组显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 而 SF 和 OMT 单独用药组对大鼠的足爪肿胀度未见明显影响。

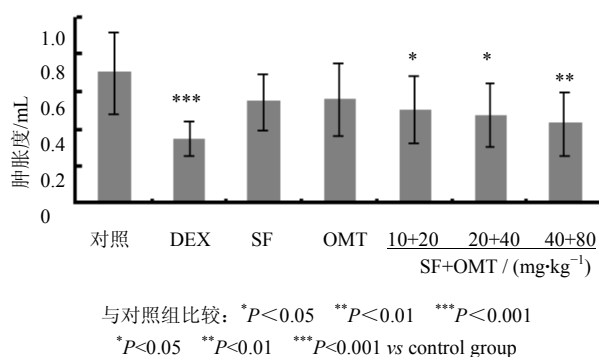


图 2 SF 与 OMT 联合用药对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of SF combined with OMT on carrageenin-induced hind paw edema in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.4 SF 与 OMT 联合用药对大鼠棉球肉芽肿形成的影响^[3,6]

将 70 只大鼠按体质量随机分为 7 组, 分组及给药剂量同“2.2”项。各组大鼠均以 10%水合氯醛

ip 麻醉, 剪去腹部被毛, 无菌条件下剪开两侧腹股沟处皮肤, 植入 (50 ± 1) mg 无菌干燥棉球 (实验前以电子天平精确称量, 常规高压灭菌后备用), 缝合切口。术后尾 iv 受试药物, 每天 1 次, 连续给药 7 d。末次给药 2 h 后将大鼠处死, 剥离并取出棉球肉芽组织, 置于 60°C 烘箱中干燥 24 h, 称质量, 减去棉球质量即为肉芽肿质量, 结果见图 3。对照组大鼠肉芽肿组织增生明显, 单独给予 SF (20 mg/kg) 或 OMT (40 mg/kg) 均未见明显的抑制肉芽肿生成的作用 ($P > 0.05$), SF 与 OMT 联合用药在中、低剂量时抗炎作用也不明显 ($P > 0.05$), 而 SF+OMT 高剂量组和阳性药 DEX 组对棉球诱导的大鼠肉芽组织增生有显著的抑制作用 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

2.5 SF 与 OMT 联合用药对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成的影响^[7]

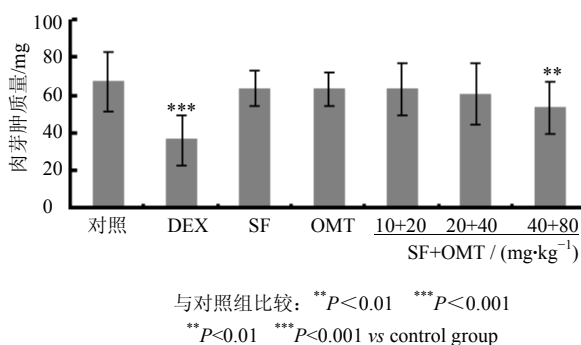
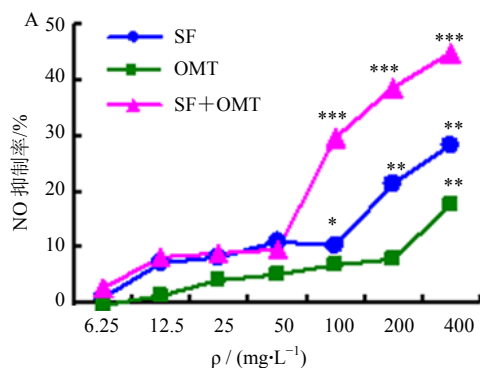


图3 SF 与 OMT 联合用药对大鼠棉球肉芽肿的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of SF combined with OMT on cotton ball granuloma model in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

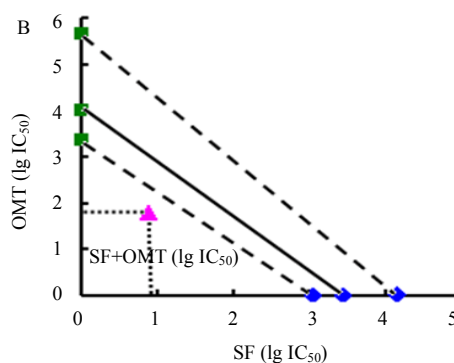
图4 SF 与 OMT 联合用药对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞合成 NO 的影响 ($n = 3$)

Fig. 4 Effect of OMT combined with SF on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells ($n = 3$)

RAW264.7 细胞 (购于中国科学院细胞库) 用 RPMI 1640 完全培养基传代培养, 实验时用 0.25% 胰酶消化后收集细胞, 调节细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 加入到 96 孔培养板, 每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$, 于 $5\%\text{ CO}_2$ 、 37°C 条件下培养 2 h, 加入 LPS $2\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ (控制其终质量浓度为 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$), 各孔加入相应质量浓度的药物, 培养 24 h。吸取培养上清液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加入 96 孔板, 加入等体积 Griess 试剂 (5% 磷酸配制 1% 磺胺, 蒸馏水配制 0.1% 盐酸萘乙二胺, 临用前等体积混合) 与之混匀, 室温避光静置 10 min, 用酶标仪于 540 nm 处测定吸光度值。用亚硝酸钠绘制标准曲线, 计算样品中 NO 的量。由图 4-A 可见, 单独给予 SF $\geq 100\text{ mg/L}$ 时, 对 NO 合成具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)。单独给予 OMT, 只有 400 mg/L 组显示出明显抑制作用 ($P < 0.01$)。当 SF 与 OMT 以摩尔浓度比 1:2 联合应用时, 能显著抑制 LPS 诱导的 NO 产生 ($P < 0.001$), 且其抑制率明显高于同剂量下单独用药组。依据等效线图解法^[8]做 SF 与 OMT 联合用药的等效线图, 见图 4-B。SF、OMT 及联合用药组的半数抑制浓度 (IC_{50}) 对数值分别为 3.447、4.009、2.670。SF 与 OMT 联合用药组的 IC_{50} 对数值在等效线以下, 说明两者之间存在协同作用。

3 讨论

炎症是机体对于刺激的一种防御反应, 表现为红、肿、热、痛和功能障碍。在炎症早期一般以变质和血管反应为主, 以发红、肿胀、疼痛等为主要征候。后期则以增生为主, 增生具有限制、清除病原和病理产物的作用, 有利于炎灶部位损伤的修复。



但增生也可造成局部组织结构改变,引起组织器官不同程度的功能障碍。

近年来,中药的抗炎作用已得到广泛关注。临床及实验研究证实,许多中药材或其有效成分具有良好的抗炎作用,且不良反应少。可通过影响下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的功能,影响花生四烯酸代谢、免疫调节等发挥抗炎作用。当归和苦参是我国传统医学中的常用药材,且二者经常配伍使用用于治疗痤疮、前列腺炎等疾病。SF和OMT是其中的主要有效成分,研究表明,二者均具有抗炎活性^[9-10]。

本实验结果表明,SF与OMT联合应用可明显减轻二甲苯、角叉菜胶和棉球异物所致的急、慢性炎症反应,且其抗炎效果优于单独用药。SF与OMT联合应用对LPS诱导的巨噬细胞NO生成有明显的抑制作用,随着给药剂量增高,抑制作用增强,表明抑制NO的产生可能是SF与OMT联合用药发挥抗炎作用的机制之一。在等效线图上可见,SF与OMT联合用药组的 IC_{50} 在等效线以下,说明两者之间存在协同作用。两者联合用药对其他炎症因子生成的影响是否也具有协同作用,以及二者联合用药抗炎的具体机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 刘会荣. 阿魏酸钠的药理作用与临床应用 [J]. 中国药业, 2005, 14(3): 78-79.
- [2] 王红程, 姜新道. 苦参素药理作用研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2008, 27(12): 106-108.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [4] 陈长勋, 刘占文, 孙峥嵘. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 814-816.
- [5] 沈建芬, 肖军花, 王嘉陵. 当归 A_3 活性部位的抗炎作用及其对大鼠离体子宫环氧化酶-2 表达的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(9): 1371-1374.
- [6] 谢世荣, 黄彩云, 黄胜英. 山豆根碱抗炎作用的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 355-357.
- [7] Shin K M, Kim Y H, Park W S, et al. Inhibition of methanol extract from the fruits of *Kochia scoparia* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin E_2 , and tumor necrosis factor- α production from murine macrophage RAW264. 7 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(4): 538-543.
- [8] Luszczki J J, Czuczwar S J. Isobolographic profile of interactions between tiagabine and gabapentin: a preclinical study [J]. *Naunyn-Schmiede Arch Pharmacol*, 2004, 369(4): 434-446.
- [9] 杨柳, 吴本俨, 顾瑛. 阿魏酸钠治疗缺血性结肠炎的研究 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(24): 2024-2026.
- [10] 刘芬, 刘洁, 陈霞. 氧化苦参碱的抗炎作用及其机制 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2005, 31(5): 728-730.