镰形棘豆提取物经皮给药的抗炎镇痛活性

瞿敏明^{1,2}, 陈志鹏², 刘丹³, 蔡宝昌^{1,2,3*}

1. 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210029

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

3. 南京海昌中药饮片有限公司, 江苏 南京 210061

摘要: 目的 研究镰形棘豆总黄酮与挥发油组合物(FEO)经皮给药的抗炎镇痛活性。方法 用二甲苯诱导的小鼠耳肿胀模型和大鼠佐剂性关节炎模型研究 FEO 的抗炎活性, 采用热板法和醋酸扭体法研究 FEO 对小鼠的镇痛活性。FEO 对小鼠的给药剂量分别为生药 3.120、0.390、0.195 g/kg; 对大鼠的给药剂量分别为生药 2.160、0.270、0.135 g/kg。以扶他林为阳性对照药。结果 FEO 高剂量经皮给药对小鼠耳肿胀的抑制率达 66.03%; 使大鼠佐剂性关节炎的早期肿胀和继发性肿胀明显减轻至 35.79%、3.27%。在热板法实验中, FEO 高剂量给药 30、60、90 min 后对热板致小鼠疼痛的抑制率分别为 42.37%、47.49%、72.00%; 对醋酸扭体法引起的疼痛也有一定镇痛作用, 抑制率为 56.67%。结论 FEO 高剂量经皮给药方式有良好的抗炎镇痛活性。

关键词: 镰形棘豆; 总黄酮; 挥发油; 经皮给药; 抗炎; 镇痛

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1788-04

Anti-inflammatory and analgesic activity of extract from *Oxytropis falcata* by transdermal administration

QU Min-ming^{1,2}, CHEN Zhi-peng², LIU Dan³, CAI Bao-chang^{1,2,3}

1. Engineering Research Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

3. Nanjing Haichang Chinese Medicine Pieces Limited Company, Nanjing 210061, China

Key words: *Oxytropis falcata* Bunge; total flavonoids; essential oil; transdermal administration; anti-inflammatory; analgesic

镰形棘豆 *Oxytropis falcata* Bunge 是豆科棘豆属多年生无茎草本植物, 主产于青藏高原, 药用部位为根茎或全草, 藏药名为“俄达夏”, 具有消炎镇痛、生肌愈疮、止血等功效, 是藏医“三消炎药”之一, 《如意宝树》称其为“草药之王”^[1]。镰形棘豆被藏医广泛用于治疗痛风、湿痹、“冈巴”(皮肤病)、疮疖肿痛、骨伤疼痛等, 是奇正消痛贴膏、青鹏膏剂、藏奇神风湿贴、奇正藏贴、万痛筋骨帖、藏药奇正贴、风骨 1 号、藏红花油等数十种藏药复方或藏成药的主要药物。因镰形棘豆具有良好的抗炎镇痛活性, 对其研究多集中在化合物分离方面^[2-4], 药理学研究相对较少。前期研究发现镰形棘豆总黄酮 ig 给药抗炎镇痛活性显著^[5], 脂溶性挥发油经皮

给药时可能有良好的透皮性能。故本实验通过小鼠耳肿胀模型、大鼠佐剂性关节炎模型、热板法、醋酸扭体法, 考察镰形棘豆黄酮与挥发油组合物(FEO)经皮给药的抗炎镇痛活性及最佳剂量, 为将镰形棘豆开发成一种更安全有效的经皮给药制剂提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

镰形棘豆药材采自西藏班戈地区, 由南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定, 药材阴干后粉碎, 过筛, 收集 20~40 目药材粉末, 密闭玻璃干燥器内保存。扶他林, 北京诺华制药有限公司产品, 规格 20 g : 0.2 g (以双氯芬酸钠计), 批号 X1508。芦丁,

收稿日期: 2010-12-14

基金项目: 南京市科技局指导及指令性计划 (2010zd123)

作者简介: 瞿敏明 (1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。Tel: (025)86798281 E-mail: quminming@163.com

*通讯作者 蔡宝昌 Tel: (025)51995100 E-mail: bccai@126.com

批号 100080-200306, 购自中国药品生物制品检定所。冰醋酸, 国药集团化学试剂有限公司产品; 二甲苯, 南京化学试剂一厂产品; 弗氏完全佐剂, 美国 Sigma 公司产品。

1.2 仪器

5975B GC-MS 联用仪, 美国 Agilent 公司; AG—285 电子天平, 瑞典 Mellter 公司; ZH—YLS—7A 足趾容积测量仪, 上海中胜科教设备有限公司; TU—1800S 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 动物

Wistar 大鼠, 雄性, 体质量 (200±20) g; 昆明种小鼠, 雌雄兼用, 体质量 (20±2) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号 SCXK 2007-0005。

2 方法

2.1 挥发油的制备

称取 100.0 g 药材粉末, 加入石油醚 1.5 L, 用索氏提取器加热回流提取约 24 h, 提取液于 40 °C 水浴中减压回收石油醚, 向提取物中加入无水乙醇 50 mL, -20 °C 左右冷冻约 12 h, 迅速减压滤过, 收集滤液, 转入洁净且已称质量的蒸发皿中, 于 80 °C 水浴中加热挥去乙醇, 再次称定质量, 挥发油收率 1.8%。GC-MS 测定结果显示, 挥发油主要成分为黄酮、查耳酮、有机脂肪酸、长链烷烃。其中 2', 4'-二羟基查尔酮的量最高 (质量分数 8.97%)。

2.2 总黄酮的制备

称取 100.0 g 药材粉末, 加入 1 L 无水乙醇于室温下超声提取 3 次, 每次 60 min, 药渣再用 50%乙醇超声提取 3 次, 每次 60 min, 减压滤过, 收集所有滤液并于 50 °C 下减压浓缩成浸膏, 加入 2%氢氧化钠水溶液, 超声促溶解, 减压滤取碱水液, 重复溶解多次至滤液近无色, 合并所有碱水液, 用 1%盐酸溶液调至 pH 5, 依次用氯仿和醋酸乙酯各萃取 6 次, 合并萃取液, 50 °C 下减压浓缩后, 转入洁净并已称质量的蒸发皿中, 于 80 °C 水浴中加热挥干溶剂, 再次称定质量, 总黄酮得率 2.4%, 质量分数为 83.7%。

2.3 FEO 溶液的配制与给药

大鼠用药: 分别称取总黄酮 162 mg 与挥发油 121.5 mg 至 50 mL 量瓶中, 用 40%乙醇溶解, 并稀释至刻度作为中剂量 (生药 0.270 g/kg), 高剂量与低剂量分别为中剂量的 8、0.5 倍, 即分别为生药

2.160、0.135 g/kg。

小鼠用药: 分别称取总黄酮 46.8 mg 与挥发油 35.1 mg 至 50 mL 量瓶中, 用 40%乙醇溶解, 并稀释至刻度作为中剂量 (生药 0.390 g/kg), 高剂量与低剂量分别为 FEO 中剂量的 8、0.5 倍, 即分别为生药 3.120、0.195 g/kg。

小鼠、大鼠均于实验前 24 h 腹部脱毛, 脱毛面积分别为 2 cm×2 cm、3 cm×3 cm, 作为给药部位。

2.4 FEO 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

取健康昆明种雄性小鼠 50 只, 随机分为模型组 (给予 40%乙醇溶液)、阳性药扶他林 (0.390 g/kg) 组及 FEO 高、中、低剂量组, 每组 10 只。FEO 给药体积为 0.01 mL/g, 扶他林乳胶剂给药 7.8 mg, 每日给药 1 次, 连续 5 d。于末次给药 30 min 后, 在每只小鼠右耳前后两面分别涂抹二甲苯 20 μL, 30 min 后将小鼠脱臼处死, 沿耳廓剪下两耳, 用直径 8 mm 打孔器在其中央位置打下耳片, 立即称定湿质量, 计算耳肿胀率和肿胀抑制率。

$$\text{耳肿胀度} = (\text{右耳质量} - \text{左耳质量}) / \text{右耳质量}$$

$$\text{抑制率} = (\text{对照组耳肿胀度} - \text{给药组耳肿胀度}) / \text{对照组耳肿胀度}$$

2.5 FEO 对大鼠佐剂性关节炎的影响

取健康 Wistar 大鼠 30 只, 随机分为模型组 (给予 40%乙醇溶液)、阳性药扶他林 (0.270 g/kg) 组及 FEO 高、中、低剂量组, 每组 6 只。FEO 给药体积为 0.002 mL/g, 扶他林乳胶剂给药 54 mg, 每日 1 次, 连续 18 d。第 3 天给药 30 min 后, 于每鼠右后足跖内注射弗氏完全佐剂 0.05 mL 致炎。在致炎前 24 h 和致炎后 24 h、第 4、9、15 天, 分别测量大鼠左右后足的体积, 计算各组的足肿胀率。

$$\text{足肿胀度} = (\text{致炎后足趾体积} - \text{致炎前足趾体积}) / \text{致炎前足趾体积}$$

致炎后的第 9 天起观察大鼠前肢、耳和尾部病变情况和体质量变化。

2.6 FEO 对热板法致小鼠疼痛的影响

实验前测定各小鼠痛阈值, 筛选痛阈值小于 30 s 的小鼠 50 只, 记录其痛阈值作为给药前的痛阈值。将小鼠分为 5 组: 模型组 (给以 40%乙醇溶液), 阳性药扶他林组, FEO 高、中、低剂量组, 每组 10 只, 给药方式同“2.4”项。于末次给药后 30、60、90 min 以热板法测各鼠的痛阈值, 计算不同时间各组小鼠疼痛抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{给药后痛阈值} - \text{给药前痛阈值}) / \text{给药前痛阈值}$$

2.7 FEO 对醋酸扭体法致小鼠疼痛的影响

取雄性小鼠 50 只, 随机分为模型组 (给予 40% 乙醇溶液), 阳性药扶他林组, FEO 高、中、低剂量组, 每组 10 只, 给药方式参照 “2.4” 项方法。于末次给药后 30 min, 每鼠 ip 1% 冰醋酸溶液 0.02 mL/g, 观察并记录注射冰醋酸后 20 min 内小鼠扭体次数。

2.8 数据分析方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 Student *t* 检验进行数据分析。

3 结果

3.1 FEO 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

结果显示, FEO 高剂量组小鼠耳廓肿胀程度明显低于模型组 ($P < 0.01$), FEO 中、低剂量组小鼠耳肿胀程度与模型组比较无显著差异, 表明 FEO 高剂量经皮给药对二甲苯致小鼠耳肿胀有较强的抑制作用。结果见表 1。

3.2 FEO 对大鼠佐剂性关节炎的影响

致炎后 24 h, 大鼠右后足肿胀度达峰值, 其后 4 d 内肿胀无明显变化。FEO 各组在致炎后的 24 h 和第 4 天的肿胀度明显减轻, 各剂量间差异不显著, 表明 FEO 对早期局部炎症具有明显抑制作用。致炎

表 1 FEO 对二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of FEO on xylene-induced ear edema of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/%	抑制率/%
模型	—	46.39 ± 13.52	—
FEO	0.195	44.46 ± 9.20	4.16
	0.390	43.52 ± 13.32	6.19
	3.120	15.76 ± 8.07 ^{**△}	66.03
扶他林	0.390	28.08 ± 6.69 [*]	39.48

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与扶他林组比较: $\Delta P < 0.05$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs Votalin group

后第 9 天, 右后足再度发生肿胀, 并因迟发型超敏反应引起继发性病变, 表现为对侧左后足的肿胀, 耳和尾部出现 “关节炎” 小结节等。但 FEO 高、中剂量对其具有显著抑制作用。在致炎后第 15 天, 扶他林组及 FEO 高剂量组大鼠对侧左后足的肿胀度明显低于模型组 ($P < 0.001$), 且其他继发性症状也明显减轻。表明 FEO 经皮给药对大鼠佐剂性关节炎模型的早期局部炎症与继发性病变引起的炎症均有明显的抑制作用。结果见表 2。

表 2 FEO 对佐剂性关节炎模型大鼠足肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of FEO on paw swelling of rats with adjuvant arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	致炎后不同时间足肿胀度/%			
		24 h (右足)	4 d (右足)	9 d (右足)	15 d (左足)
模型	—	63.26 ± 11.46	65.97 ± 19.84	80.68 ± 30.79	37.99 ± 13.24
FEO	0.135	32.51 ± 8.20 ^{***}	25.52 ± 11.86 ^{**}	50.86 ± 27.52	25.69 ± 9.02
	0.270	42.67 ± 3.45 ^{**}	31.09 ± 8.56 ^{**}	39.35 ± 10.09 [*]	22.01 ± 6.13 [*]
	2.160	35.79 ± 8.22 ^{***}	25.67 ± 7.77 ^{**}	37.39 ± 8.43 [*]	3.27 ± 2.30 ^{***}
扶他林	0.270	42.50 ± 8.83 ^{**}	43.77 ± 5.59 [*]	59.11 ± 7.16	7.45 ± 4.98 ^{***}

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

3.3 FEO 对热板法致小鼠疼痛的影响

FEO 中、低剂量在末次给药后 30、60、90 min 对热刺激引起的小鼠疼痛无明显抑制作用, 其高剂量在末次给药后 30 min 即表现出显著的镇痛活性 ($P < 0.001$), 在 60、90 min 也有明显镇痛活性 ($P < 0.01$)。在 30、60 min, FEO 高剂量比扶他林有更好的镇痛活性, 但在 90 min 时两药效果无差异。结果见表 3。

3.4 FEO 对醋酸扭体法致小鼠疼痛的影响

模型组小鼠在给予冰醋酸后 20 min 内的扭体次数为 (40.00 ± 5.43) 次, 扶他林组和 FEO 中剂量

组分别为 (26.10 ± 10.34)、(22.67 ± 5.81) 次, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01), 高剂量组小鼠平均扭体次数为 (17.33 ± 5.89) 次, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$ 、0.001), 表明 FEO 中、高剂量对冰醋酸引起的急性疼痛有较好的抑制作用, 且与扶他林的效果无显著性差异。结果见表 4。

4 讨论

依据镰形棘豆临床人用量为 3 g^[6], 经换算得到大鼠与小鼠的 FEO 给药剂量分别为 0.390、0.270 g/kg^[7]。考虑到经皮给药在无促渗剂的情况下吸收可能不理想, 故选择此剂量为中剂量, 黄酮与挥发

表 3 FEO 对热板法致小鼠疼痛的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Effect of FEO on pain of mice in hot plate test ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	抑制率/%		
		30 min	60 min	90 min
模型	—	4.80 ± 2.70	21.18 ± 7.66	16.12 ± 4.06
FEO	0.195	10.28 ± 5.84	30.08 ± 7.43*	40.25 ± 10.11**
	0.390	8.47 ± 8.81	28.45 ± 7.27*	48.97 ± 13.60**
	3.120	42.37 ± 14.20** $\Delta\Delta\Delta$	47.49 ± 5.28*** $\Delta\Delta$	72.00 ± 9.94*** $\Delta\Delta$
扶他林	0.390	6.84 ± 7.38	25.51 ± 7.82	44.70 ± 5.06***

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与扶他林组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs Votalin group

表 4 FEO 对醋酸致小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 4 Effect of FEO on acetic acid-induced writhing of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	扭体次数/次	抑制率/%
模型	—	40.00 ± 5.43	—
FEO	0.195	36.50 ± 8.75	8.75
	0.390	22.67 ± 5.81**	43.33
	3.120	17.33 ± 5.89***	56.67
扶他林	0.390	26.10 ± 10.34**	34.75

与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

油的比例按照两者在生药中的比例, 未考察黄酮与挥发油不同质量配比的药效活性。

镰形棘豆作为多种市售抗类风湿性关节炎疼痛经皮给药制剂的君药, 其有效部位的组合 FEO 对佐剂性关节炎的早期局部炎症与继发性病变炎症均有良好的抑制作用。FEO 高剂量在佐剂性关节炎模型以及二甲苯诱导小鼠耳肿胀模型中抗炎作用确切, 效果优于扶他林, 与模型组比较有显著差异。在热板法诱导的疼痛实验中, FEO 高剂量的镇痛效果明显, 中、低剂量随着时间的延长痛阈值增加, 可能与小鼠产生耐受性有关。在醋酸扭体法诱导的疼痛实验中, FEO 中、高剂量对化学性刺激引起的疼痛抑制作用明显, 与阳性药比较无明显差异。

前期研究对黄酮与挥发油组合物经皮给药与二者单独经皮给药的药效进行比较, 发现组合物经皮

给药的效果更好。组合给药后, 挥发油中的黄酮类、查耳酮类化合物产生抗炎镇痛活性, 而其脂肪酸可能有一定的促渗作用^[8], 因而表明中药经皮给药的药效不仅与活性成分相关, 而且也与药物的促渗能力有关, 必要时应使用促渗剂来提高药效。

经皮给药的药效与皮肤透药量有关, 这可能是 FEO 中、低剂量在多种实验模型中未表现出显著活性的原因。FEO 高剂量是药物透过量明显增加, 可能是其表现显著抗炎镇痛活性的原因。关于 FEO 经皮给药后的绝对生物利用度的研究将进一步研究。

参考文献

[1] 姜 华, 胡君茹, 刘 霞, 等. 藏药镰形棘豆的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 314-315.
[2] 确 生, 张岩松, 赵玉英. 藏药镰形棘豆的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(10): 1458-1460.
[3] 杨 欢, 王 栋, 蔡宝昌, 等. 镰形棘豆的化学成分研究 (III) [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(1): 43-44.
[4] 杨 欢, 王 栋, 蔡宝昌, 等. 镰形棘豆的化学成分研究 (IV) [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(20): 1538-1540.
[5] 杨 欢. 藏药镰形棘豆的抗炎活性及化学成分研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2008.
[6] 王 栋, 杨 欢, 童 丽, 等. 藏药镰形棘豆的镇痛抗炎活性 [J]. 药学与临床研究, 2008, 16(2): 90-93.
[7] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
[8] 石 磊, 李小峰, 张 莉, 等. 类风湿关节炎动物模型的研究进展 [J]. 中国药物与临床, 2009, 9(3): 215-217.