

宁泌泰胶囊的抗炎作用研究

张 飞¹, 窦圣姗¹, 张 杰^{2*}

1. 上海海天医药科技开发有限公司, 上海 200023

2. 上海中医药大学, 上海 201203

摘 要: **目的** 探讨宁泌泰胶囊的抗炎作用及其作用机制。**方法** 采用1%角叉菜胶致小鼠足趾肿胀、2%巴豆油丙酮溶液致小鼠耳肿胀模型, 观察宁泌泰胶囊(0.5、1.5、4.5 g/kg)对小鼠肿胀的抑制作用。考察25、50、100 μg/mL宁泌泰胶囊加入RAW264.7细胞作用48、72 h后的细胞毒性。运用双荧光素酶报告基因系统检测宁泌泰胶囊对NF-κB转录活性的影响。**结果** 与模型组比较, 宁泌泰胶囊(4.5 g/kg)对角叉菜胶致小鼠足趾肿胀、巴豆油致小鼠耳肿胀具有明显的抑制作用($P < 0.05$)。宁泌泰胶囊对RAW264.7细胞没有细胞毒性。50、100 μg/mL宁泌泰胶囊内容物对NF-κB的转录激活具有明显的抑制作用($P < 0.01$)。**结论** 宁泌泰胶囊具有抗炎作用, 其作用机制可能是通过NF-κB通路来抑制炎症过程。

关键词: 宁泌泰胶囊; 抗炎作用; NF-κB

中图分类号: R285.5; R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)11-1317-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.11.003

Anti-inflammatory effect of Ningmitai Capsules

ZHANG Fei¹, DOU Sheng-shan¹, ZHANG Jie²

1. Shanghai Haitian Medical Technology and Development Limited Company, Shanghai 200023, China

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: **Objective** To study the anti-inflammatory effect of Ningmitai Capsules and its mechanism. **Methods** The models of 1% carrageenan-induced mice paw edema and 2% oleum crotonis-induced ear edema were established, and the inhibition of swelling in mice administered with Ningmitai Capsules were observed. Cytotoxicity of 25, 50, and 100 μg/mL Ningmitai Capsules on RAW264.7 cells were studied after 48 and 72 h. Dual luciferase report gene system was used to detect the transcriptional activity of NF-κB. **Results** Compared with model group, Ningmitai Capsules with the dosage of 4.5 g/kg could obviously inhibit the mice foot swelling induced by carrageenan and the ear edema induced by oleum crotonis ($P < 0.05$). There was no cytotoxicity of Ningmitai Capsules on RAW264.7 cells. Ningmitai Capsules with the concentration of 50 and 100 μg/mL could inhibit the transcriptional activity of NF-κB ($P < 0.01$). **Conclusion** Ningmitai Capsules have anti-inflammatory effect, which is related to inhibition of inflammatory processes through NF-κB pathway.

Key words: Ningmitai Capsules; anti-inflammatory effect; NF-κB

宁泌泰胶囊是治疗泌尿生殖系感染的经典专利苗药, 具有清热解毒、利湿通淋的功效, 用于湿热蕴结所致淋证, 症见小便不利、淋漓涩痛、尿血以及下尿路感染、慢性前列腺炎见上述证候者。本研究通过对宁泌泰胶囊在体外抗炎作用机制进行探索, 为宁泌泰胶囊在临床上用于慢性前列腺炎的治疗提供理论依据。

1 材料

雄性昆明种小鼠, 体质量20~22 g, 购自中国医学科学院实验动物研究所动物繁育中心, 合格证号SCXK(京)2012-0001。

角叉菜胶(批号CAS9000-07-1)、吲哚美辛(批号CAS53-86-1)购自Sigma-Aldrich。MH培养基购自BD公司。RAW264.7细胞购自中国医学科学院

收稿日期: 2015-09-24

作者简介: 张 飞(1986—), 男, 山东济宁人, 中级研究员, 2009年毕业于泰山医学院, 2012年获得上海交通大学制药工程硕士学位, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: 18501655637 E-mail: zhang-fei001@hotmail.com

*通信作者 张 杰, 男, 医学博士。Tel: (021) 64222293 E-mail: guide.zhang@163.com

基础医学研究所细胞中心。FBS 血清、PRIM1640 培养基购自 Gibco 公司。CCK8 试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。巴豆油、LPS、PDTC、pGL3-NF κ B 质粒、pGL3-CMV 质粒来自于中国医学科学院药物研究所馈赠。宁泌泰胶囊购自贵阳新天药业股份有限公司, 规格 0.38 g/粒, 批号为 140802。

2 方法

2.1 角叉菜胶致小鼠足趾肿胀实验^[1]

昆明种小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为模型组、吲哚美辛 (5 mg/kg) 组以及宁泌泰胶囊 (0.5、1.5、4.5 g/kg, 相当于临床等效剂量的 1、3、9 倍) 组, 每组 8 只, ig 给药, 1 次/d, 给药容积 10 mL/kg。模型组给予 0.9% 生理盐水。连续给药 3 d。末次给药后 1 h 于小鼠右后肢足趾注射 1% 角叉菜胶致炎, 0.05 mL/只。造模 5 h 后脱颈椎处死小鼠, 于踝关节处剪下左右后肢, 称定质量, 计算肿胀率、抑制率。

肿胀率 = (右后足质量 - 左后足质量) / 左后足质量

抑制率 = (模型组平均肿胀率 - 给药组平均肿胀率) / 模型组平均肿胀率

2.2 巴豆油致小鼠耳部急性肿胀实验^[2]

昆明种小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分组, 每组 8 只, 分别为模型组、吲哚美辛 (5 mg/kg) 组以及宁泌泰胶囊 (0.5、1.5、4.5 g/kg, 相当于临床等效剂量的 1、3、9 倍) 组, ig 给药, 1 次/d, 给药容积 10 mL/kg。模型组给予 0.9% 的生理盐水。连续给药 3 d。末次给药 1 h 后, 于小鼠右耳两面涂抹 2% 巴豆油丙酮溶液 20 μ L 致炎, 左耳不涂为正常耳。4 h 后处死小鼠, 沿耳廓基线剪下双耳, 用打孔器在同一部位取下耳片, 称定质量, 以左右耳片质量差值表示炎性肿胀程度, 计算肿胀率和抑制率。

肿胀率 = (右耳质量 - 左耳质量) / 左耳质量

抑制率 = (模型组平均肿胀率 - 给药组平均肿胀率) / 模型组平均肿胀率

2.3 细胞毒性检测

RAW264.7 细胞在 PRIM1640+10% FBS 培养基中培养至对数生长期, 然后接种于 96 孔板, 细胞数为 1×10^3 /孔, 加入 25、50、100 μ g/mL 宁泌泰胶囊内容物、DMSO 对照的新鲜培养基, 培养 48、72 h。每组设 3 个平行孔, 37 $^{\circ}$ C 培养结束后, 每孔加 CCK8 试剂 10 μ L, 继续培养 4 h, 酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度 (A) 值, 以 DMSO 处理的细胞为对照组, 计算药物对细胞的相对增殖率。

相对增殖率 = 给药组平均 A 值 / 对照组平均 A 值

2.4 双荧光素酶报告基因检测

待 RAW264.7 细胞长至对数生长期, 胰酶消化至 48 孔板中。第 2 天用将 pGL3-NF κ B 质粒、pGL3-CMV 质粒通过 lipO2000 试剂转染。转染 3 h 后, 按照不同组别加入相应培养基和含不同质量浓度宁泌泰胶囊内容物或 PDTC 的培养基。对照组和模型组加入含 10% FBS 的培养基。PDTC 组加入含 1 μ mol/L PDTC 的培养基。待测化合物组分别加入含 100、50、25 μ g/mL 宁泌泰胶囊内容物的培养基。24 h 后加入 LPS 1 mg/mL 继续培养 24 h。实验结束时, 按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒进行检测。

2.5 数据统计及分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。数据经过方差齐性检验, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 总体间用单因素资料方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 角叉菜胶致小鼠足趾肿胀实验

与模型组比较, 吲哚美辛 (5 mg/kg) 对角叉菜胶致小鼠足趾肿胀具有非常明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 宁泌泰胶囊 (4.5 g/kg) 对小鼠足趾肿胀具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 宁泌泰胶囊对角叉菜胶致小鼠足趾肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Effects of Ningmitai Capsules on carrageenan-induced paw edema of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀率/%	抑制率/%
模型	—	44.24 $\pm$ 4.35	—
吲哚美辛	0.005	23.08 $\pm$ 5.85**	47.83
宁泌泰胶囊	0.5	39.83 $\pm$ 4.89	9.96
	1.5	36.52 $\pm$ 3.50	17.44
	4.5	31.63 $\pm$ 7.83*	28.49

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

3.2 巴豆油致小鼠耳部急性肿胀实验

与模型组比较, 吲哚美辛 (5 mg/kg) 对巴豆油致小鼠耳肿胀具有非常明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 宁泌泰胶囊 (4.5 g/kg) 对小鼠耳肿胀具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对 RAW264.7 细胞的细胞毒作用

25、50、100 μ g/mL 宁泌泰胶囊内容物加入 RAW264.7 细胞, 作用 48、72 h 后对 RAW264.7 细胞没有毒性。见表 3。

3.4 对 NF-κB 的影响

双荧光素酶报告基因检测结果显示: 50、100 μg/mL 宁泌泰胶囊内容物对 NF-κB 的转录激活具有明显的抑制作用 ($P<0.01$)。见表 4。

表 2 宁泌泰胶囊对巴豆油致小鼠耳部急性肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of Ningmitai Capsules on oleum crotonis-induced ear edema of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀率/%	抑制率/%
模型	—	10.70±0.88	—
吡喹啉美辛	0.005	7.89±0.74**	26.29
宁泌泰胶囊	0.5	10.71±0.94	0
	1.5	10.14±0.61	5.26
	4.5	8.79±1.19*	17.86

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

表 3 宁泌泰胶囊对 RAW264.7 细胞的细胞毒作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of Ningmitai Capsules on cytotoxicity of RAW264.7 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ (μg·mL ⁻¹)	A 值		相对增殖率/%	
		48 h	72 h	48 h	72 h
对照	—	3.19±0.07	3.28±0.04	100.00	100.00
宁泌泰 胶囊	25	3.17±0.03	3.36±0.05	100.25	102.70
	50	3.16±0.02	3.27±0.07	100.29	102.84
	100	3.15±0.02	3.18±0.05	98.77	96.83

表 4 宁泌泰胶囊对 NF-κB 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of Ningmitai Capsules on NF-κB ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	荧光值
对照	—	23.67±0.03
模型	1 mg·mL ⁻¹	45.67±0.07**
PDTC	1 μmol·L ⁻¹	23.33±0.04 ^{△△}
宁泌泰胶囊	25	40.62±0.05
	50	26.22±0.02 ^{△△}
	100	22.58±0.01 ^{△△}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{△△} $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; ^{△△} $P<0.01$ vs model group

4 讨论

宁泌泰胶囊由四季红、白茅根、大风藤、三颗针、仙鹤草、芙蓉叶、连翘经粉碎或水煎煮后浓缩并经混匀、干燥、粉碎后所得的复方胶囊, 并不包含其他辅料, 具有清热解毒、利湿通淋的功效, 用

于下尿路感染、慢性前列腺炎等疾病的治疗^[3]。

角叉菜胶致小鼠足肿胀模型是一个评价药物抗炎作用的经典炎症模型^[4]。巴豆油致小鼠耳肿胀实验也是常用的急性炎症模型, 其中巴豆油的主要成分佛波酯也是一种强的致炎物质, 常被用来制造各种炎症模型^[5]。本研究采用角叉菜胶致小鼠足肿胀模型和巴豆油致小鼠耳肿胀模型评价了宁泌泰胶囊的抗炎作用。结果表明宁泌泰胶囊 (4.5 g/kg) 组对小鼠足肿胀和耳肿胀均具有明显的抑制作用 ($P<0.05$), 说明 4.5 g/kg 宁泌泰胶囊具有明显抗炎作用。

核转录因子-κB (NF-κB) 是目前发现的与炎症有关的重要转录因子之一, 广泛存在于真核细胞内, 被公认为是参与炎症过程的重要信号传导通路之一^[6-7]。NF-κB 是一个多功能核转录因子, 具有广泛的生物学活性, 激活后可促进细胞因子、黏附分子、趋化因子等基因转录, 在炎症反应中起重要作用^[8]。本研究采用的双荧光素酶报告基因实验结果表明宁泌泰胶囊可以明显抑制 NF-κB 基因的转录激活, 表明宁泌泰胶囊可以通过 NF-κB 通路来抑制炎症过程, 但其具体作用机制尚需进一步研究。

综上所述, 本研究证实了宁泌泰胶囊具有明显的抗炎作用, 为其临床应用提供了理论依据, 但其抗炎作用机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 马瑜红, 李 玲, 欧阳静萍, 等. 荔枝草抗炎作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2209-2210.
- [2] 金哲雄, 齐 典. 刺玫果鞣质预防肿瘤作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 647-648.
- [3] 蔡 健, 陈熙猛, 汪广兵. 宁泌泰胶囊治疗精囊炎所致血精症的疗效观察 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3440-3442.
- [4] 陈一村, 蔡聪艺, 冀 宾, 等. 海蜇牵牛有效部位对巴豆油所致小鼠耳肿胀抑制作用的研究 [J]. 汕头大学医学院学报, 2010, 23(1): 7-9.
- [5] 刘扬俊, 邱腾颖. 石菖蒲微波水提液的抗炎及体外抗菌作用研究 [J]. 海峡药学, 2012, 24(6): 22-23.
- [6] Mankan A K, Lawless M W, Gray S G, et al. NF-kappa B regulation: the nuclear response [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(4): 631-643.
- [7] Chiba T, Inoko H, Kimura M, et al. Role of nuclear IκBs in inflammation regulation [J]. Biomol Concepts, 2013, 4(2): 187-189.
- [8] 李永春, 何 冰. 核因子-κB 与炎症性疾病 [J]. 国外医学: 内科学分册, 2000, 27(11): 488-494.