黑骨藤镇痛抗炎作用活性部位筛选

刘明, 刘刚, 刘育辰*, 鞠凤, 蒋融冰, 周涛
贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

摘要: 目的 研究苗药黑骨藤镇痛抗炎作用的活性部位。方法 小鼠随机分为空白组、阿司匹林组及黑骨藤水、正丁醇、氯仿、醋酸乙酯、石油醚提取部位的低、高剂量组。除空白组外, 各组 ig 给药, 空白组 ig 生理盐水。采用扭体法观察记录给药后 15 min 内小鼠扭体次数。采用热板法测定小鼠的痛觉反应时间。采用耳廓肿胀法检测小鼠耳廓肿胀度。采用棉球肉芽肿法: 观测小鼠肉芽湿质量和干质量。结果 黑骨藤各提取部位对醋酸诱发小鼠扭体反应有显著的镇痛作用, 其中黑骨藤正丁醇提取部位高剂量组效果最好, 其疼痛抑制率为 80.2%。黑骨藤正丁醇提取部位对热板法致痛有显著的镇痛作用, 与空白组比较, 能显著提高小鼠的痛阈值 ($P < 0.05, 0.01$)。黑骨藤水、醋酸乙酯、石油醚提取部位对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的急性炎症有显著的抗炎作用, 能明显减少小鼠耳廓肿胀度。黑骨藤各提取部位对小鼠肉芽湿质量和干质量均有抑制作用, 其中正丁醇提取部位效果最好。结论 黑骨藤具有良好的镇痛抗炎作用。其中, 正丁醇部位镇痛作用最好。

关键词: 黑骨藤; 活性部位; 镇痛; 抗炎

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)04-0322-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.04.007

Screening of active fractions with analgesic and anti-inflammatory effect from Miao Medicine *Periploca forrestii*

LIU Ming, LIU Gang, LIU Yu-chen, JU Feng, JIANG Rong-bing, ZHOU Tao
Guiyang College of Traditional Chinese Medicine. Guiyang 550002, China

Abstract: Objective To study the analgesic and anti-inflammatory constituents from Miao medicine *Periploca forrestii*. **Methods** Mice were randomly divided into the normal, aspirin, high- and low-dose of petroleum ether extract, ethyl acetate extract, trichloromethane extract, butyl alcohol extract, and water extract of *P. forrestii* groups. ① Twisting test: the time of twisting of mice was observed within 15 min. ② Hot-plate test: female mice were ig given relevant medicinals and the time of pain reaction was determined by using hot-plate test after the second and the third time ig administration of 30 min. ③ Ear swelling test: mouse auricle tumefaction was induced by dimethylbenzene and the mass of auricle was tested. ④ Cotton ball-granulation test: the mass of granulation was tested. **Results** ① All the extract fractions of *P. forrestii* had the significant analgesic effects on acetic acid-induced twisting reaction in mice. Compared with the normal group, the times of twisting decreased significantly in butyl alcohol extract groups. ② In butyl alcohol groups, the significant analgesic effects on hot-plate-related pain were observed and pain threshold was increased significantly compared with the normal group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ③ Butyl alcohol extract could not have the inhibition effects on auricle swelling caused by xylene in mice. ④ All the extract fractions of *P. forrestii* had the significant inhibition effects on granulation caused by cotton ball in mice. Compared with the normal group, the mass of granulation decreased significantly in butyl alcohol extract groups. **Conclusion** *P. forrestii* has the anti-inflammation and the analgesic effects, and butyl alcohol extract fractions of *P. forrestii* has the significantly analgesic and anti-inflammatory effects.

Key words: *Periploca forrestii* Schltr.; active fractions; analgesia; anti-inflammation; filtration

黑骨藤为萝藦科植物黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr. 的根或全株, 为贵州苗族习用药材, 是贵州十大苗药之一。能祛风除湿、活血通络、消痹止痛, 主治风湿性关节炎、跌打损伤、胃痛、消化不良、

收稿日期: 2014-03-10

基金项目: 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合 ZY 字 [2013] 3003 号); 贵州省科技技术基金项目(黔科合 J 字 [2012] 2069 号); 贵阳市科技局科技创新公共技术平台建设项目(筑科合同 [2010] 3-2 号); 贵阳中医学院博士基金项目; 贵阳中医学院“大学生创新性实验”项目

作者简介: 刘明(1981—), 男, 侗族, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药、民族药理学研究。E-mail: mingliu218@126.com

*通信作者 刘育辰 Tel: (0851)5601227 E-mail: lyc8564732@163.com

闭经、痢疾等。目前对于黑骨藤的研究主要涉及化学成分及抗风湿、镇痛抗炎、抑菌等作用的研究^[1-3]。本文通过对黑骨藤有效部位的初步分离,筛选其镇痛抗炎作用的主要活性部位,为黑骨藤的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 药品

黑骨藤购于贵阳市药材市场,经贵阳中医学院药学院刘刚实验师鉴定为萝藦科植物黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr. 的根;阿司匹林肠溶片,合肥久联制药有限公司生产,批号 20101121。

1.2 试剂

冰醋酸、二甲苯、石油醚(60~90℃)、醋酸乙酯、氯仿、正丁醇均为分析纯。

1.3 动物

昆明种小鼠,雌雄兼用,SPF级,体质量(20±2)g,由第三军医大学医学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(渝)2012-0005。

1.4 仪器

ALC-210.3型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);RB-200智能热板仪(上海益联科教设备有限公司)。

2 方法

2.1 黑骨藤的提取物制备

取黑骨藤 20 g,粉碎成粗粉,70%乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,减压回收乙醇,得浓缩液,并分别以石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取,得到 5 个不同极性部位:石油醚部位、氯仿部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位,4℃冰箱保存备用。

2.2 扭体法^[4]

取昆明种小鼠 132 只,雌雄兼用,随机分为 12 组,每组 11 只(雌性 5 只,雄性 6 只),即空白组、阿司匹林组及黑骨藤水、正丁醇、氯仿、醋酸乙酯、石油醚部位高、低剂量(生药 3.00、0.75 g/kg)组。ig 给予相应的药物,每天 1 次,连续 5 d,空白组 ig 等容量的生理盐水。末次给药 30 min,各组小鼠分别 ip 0.6%醋酸溶液 0.2 mL/只,记录各组小鼠出现扭体反应的潜伏期及 15 min 内小鼠扭体反应的次数,并计算镇痛抑制率。

抑制率 = (空白组扭体均数 - 给药组扭体均数) / 空白组扭体均数

2.3 热板法^[4]

昆明种小鼠,雌性,实验前用热板仪进行筛选,选择舔后足时间(即镇痛潜伏期, s)在 5~30 s 的小鼠为合格的小鼠。132 只雌性合格小鼠进入下一步的实验。分组、给药同 2.2。ig 给予相应的药物,每天 1 次,第 2 次给药 30 min,各组小鼠分别进行热板实验,记录镇痛潜伏期;第 3 次给药 30 min,各组小鼠分别进行热板实验,记录镇痛潜伏期。

2.4 耳廓肿胀法^[4]

取昆明种小鼠 132 只,雌雄兼用,随机分成 12 组,分组、给药同 2.2。ig 给予相应的药物,每天 1 次,连续 5 d。末次给药 30 min,各组小鼠分别于右耳均匀涂抹二甲苯 0.03 mL/只,40 min 后,处死动物,剪取左右耳,用 8 mm 打孔器于同一部位打下耳片,精密称质量,以右耳片质量减去左耳片质量为该小鼠耳廓肿胀度。

2.5 棉球肉芽肿法^[4-5]

取昆明种小鼠 70 只,雌雄各半,随机分成 7 组,即空白组,阿司匹林组,黑骨藤水部位、正丁醇部位、氯仿部位、醋酸乙酯部位、石油醚部位组。药前于小鼠一侧腹股沟手术植入一个灭菌棉球(10 mg),术后第 2 天开始 ig 给药,每天 1 次,连续 14 d。末次给药 24 h,脱颈椎处死动物,取出植入的棉球及其周围增生的肉芽组织,称质量,其质量减去棉球质量,即为肉芽湿质量;再将其放入烘箱中 60℃烘烤 12 h,取出称质量,减去棉球质量,即为肉芽干质量。

2.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行统计学处理,多组间计量资料及两两比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 黑骨藤对醋酸致小鼠扭体反应的影响

从表 1 可见,黑骨藤各提取部位均能减少醋酸引起的小鼠扭体反应次数,延长扭体潜伏期,与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01),表明黑骨藤各提取部位均有镇痛作用,其中尤以正丁醇部位高剂量组效果最好,其镇痛抑制率高达 80.2%,优于阳性药阿司匹林。

3.2 黑骨藤对热板致小鼠疼痛的影响

从表 2 可见,第 2 次药后,黑骨藤水部位、正丁醇部位、氯仿部位能显著延长小鼠痛阈潜伏期;而第 3 次给药后,黑骨藤正丁醇部位、石油醚部位能显著延长小鼠痛阈潜伏期,其中均以正丁醇部位镇痛作用为最好,与阳性药阿司匹林相当。

表1 黑骨藤各提取部位对醋酸致小鼠扭体反应的影响
($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 1 Effect of each extract fraction from *P. forrestii* on writhing response of mice induced by acetic acid
($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	潜伏期/min	扭体次数/次	抑制率/%
空白	—	3.3±1.0	33.4±7.9	
阿司匹林	1.2	7.5±2.9**	8.5±8.1**	74.6
水部位	0.75	4.5±1.5*	18.6±13.4**	44.3
	3.0	6.9±3.1**	15.9±11.6**	52.4
正丁醇部位	0.75	8.1±4.6**	11.1±11.1**	66.8
	3.0	8.1±4.6**	6.6±7.5**	80.2
氯仿部位	0.75	6.3±3.3**	14.0±9.8**	58.1
	3.0	6.8±3.1**	10.3±8.6**	69.2
醋酸乙酯部位	0.75	7.8±4.8**	9.1±7.8**	72.8
	3.0	6.9±3.5**	13.6±9.5**	59.3
石油醚部位	0.75	4.9±1.1**	12.3±5.6**	63.2
	3.0	5.8±2.7**	12.7±6.6**	62.0

与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group

表2 黑骨藤各提取部位对小鼠热板致痛的影响
($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 2 Effect of each extract fraction from *P. forrestii* on hot-plate-related pain of mice ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	药前潜伏期/s	第二次药后药前潜伏期/s	第三次药后药前潜伏期/s
空白	—	19.2±6.9	14.3±2.7	13.6±7.8
阿司匹林	1.2	21.24±6.7	24.5±12.5**	33.0±17.5**
水部位	0.75	22.1±5.8	21.9±9.2**	13.8±5.9
	3.0	22.3±7.3	24.9±14.6*	20.3±14.8
正丁醇部位	0.75	20.7±7.7	21.1±11.3*	24.5±18.3*
	3.0	23.5±5.3	28.9±19.3*	29.4±18.0**
氯仿部位	0.75	20.7±5.6	15.8±5.7	19.3±16.1
	3.0	16.6±6.6	19.5±8.4*	16.8±9.3
醋酸乙酯部位	0.75	20.4±5.6	20.7±12.8	21.0±14.6
	3.0	17.2±3.1	16.6±9.3	17.9±10.9
石油醚部位	0.75	18.8±6.4	14.0±5.6	25.1±18.3*
	3.0	21.6±5.8	15.1±5.7	18.9±7.7

与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group

3.3 黑骨藤对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响

从表3可见,黑骨藤水部位、醋酸乙酯部位、石油醚部位能显著减轻小鼠耳廓肿胀度,表明其具有抗急性炎症的作用,而黑骨藤正丁醇部位、氯仿部位有一定的抗急性炎症作用,但差异不显著。

表3 黑骨藤各提取部位对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响
($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 3 Effect of each extract fraction from *P. forrestii* on ear swelling of mice induced by xylene ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	耳廓肿胀度/mg
空白	—	11.0±3.7
阿司匹林	1.2	2.9±1.6**
水部位	0.75	6.0±4.4**
	3.0	7.4±4.4*
正丁醇部位	0.75	10.4±4.5
	3.0	10.4±4.8
氯仿部位	0.75	10.7±4.4
	3.0	8.9±4.7
醋酸乙酯部位	0.75	7.8±4.7*
	3.0	7.2±5.1*
石油醚部位	0.75	10.8±3.8
	3.0	7.4±4.0*

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group

3.4 黑骨藤对小鼠棉球肉芽肿的影响

从表4可见,黑骨藤各提取部位均能显著减轻小鼠肉芽湿质量和干质量,与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),与阳性药阿司匹林相当。

表4 黑骨藤各提取部位对小鼠棉球肉芽肿的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of each extract fraction from *P. forrestii* on granuloma of mice induced by cotton balls
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肉芽湿质量/mg	肉芽干质量/mg
空白	—	115.4±21.9	28.6±8.1
阿司匹林	1.2	81.9±21.5**	13.8±5.9**
水部位	1.5	70.9±13.8**	12.3±3.5**
正丁醇部位	1.5	65.4±10.6**	7.9±2.8**
氯仿部位	1.5	81.2±14.8**	12.4±4.1**
醋酸乙酯部位	1.5	77.7±16.9**	11.4±3.3**
石油醚部位	1.5	77.2±13.9**	13.5±2.9**

与空白组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank group

4 讨论

疼痛与炎症是临床常见症状,是一组复杂的病理、生理改变的临床表现,疼痛与炎症可以是局部的,也可以是全身性疾病的反应,且两者常伴随出现。西医学中疼痛与炎症依然是困扰人类最大的医

学问题之一,是医学界公认的难题。目前治疗疼痛与炎症的药物包括单一的止痛作用的中枢性止痛药、麻醉性止痛药;单一的抗炎作用的糖皮质激素类药,以及既止痛又抗炎的解热镇痛抗炎药等。鉴于现有药物存在胃肠反应、肺损伤、成瘾等多种副作用,有必要开发新的天然镇痛抗炎药物,将止痛与抗炎合二为一,为临床治疗炎症性又伴有疼痛的疾病提供实验基础。

本实验采用醋酸扭体法、热板法、二甲苯耳廓肿胀法、棉球肉芽肿法研究黑骨藤的镇痛抗炎作用和部位。实验结果显示,①黑骨藤提取物能有效减少醋酸诱发的小鼠扭体反应,特别是正丁醇提取部位对扭体反应抑制明显,疼痛抑制率达80.2%,提示黑骨藤对炎症性疼痛有一定的镇痛作用,其有效成分以中等极性的成分为好。②黑骨藤正丁醇提取部位在第2次及第3次给药后均具有明显的镇痛作用($P < 0.05$ 、 0.01),提示黑骨藤中等极性成分更接近于中枢镇痛药物,对急性疼痛显示良好效果。③黑骨藤水、醋酸乙酯和油醚提取部位均能减轻小鼠耳廓肿胀度,具有明显的抗急性炎症作用($P < 0.05$ 、 0.01),而黑骨藤中等极性部位作用不明显,提示黑骨藤中等极性成分对急性炎症疗效较差。④黑骨藤提取物能有效减轻小鼠肉芽组织湿质量和干质量,提示黑骨藤对慢性炎症具有良好的抑制作用。

阿司匹林作为解热镇痛抗炎的药物,具有显著的镇痛、抗炎作用。已有的资料显示,阿司匹林对于实验性外周及中枢性疼痛均有一定抑制作用,对炎症早期、晚期也有一定的抑制作用,故本研究在热板实验、扭体实验、耳廓肿胀实验、棉球肉芽肿

实验中对黑骨藤进行前期的筛选研究均以阿司匹林作为阳性药物,且阿司匹林在实验中均表现出阳性反应。热板法实验中,水提物在第2次药后具有显著地增加痛阈值作用,而在第3次药后无显著性,可能是由于水溶性成分较多,吸收较差,多次给药后反而影响了药物的吸收,没有表现出良好的抗急性疼痛的作用。

黑骨藤镇痛抗炎作用确切,是有潜力的天然的镇痛抗炎药物,极具开发前景。黑骨藤正丁醇提取部位在扭体法和热板法中均表现出强大的镇痛作用,为黑骨藤镇痛作用的最强活性部位,而其镇痛作用的部位到底是在外周还是在中枢,是否有成瘾性等,还需要进一步的研究;在耳廓肿胀法和棉球肉芽肿法中,黑骨藤抗炎作用明显,但未观察到对急、慢性炎症作用均突出的活性部位,其抗炎活性成分有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 苗药卷 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005.
- [2] 宋国斌, 席国萍, 郁建平, 等. 黑骨藤石油醚提取物成分及抑菌活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1085-1087.
- [3] 黄明进, 罗春丽, 郭刚, 等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 174-177.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [5] 李丽, 李勇文, 唐爱存, 等. 蝉翼藤氯仿提取物的抗炎和免疫增强作用 [J]. 中药药理与临床, 2001, 27(4): 62-64.