

广西地不容总生物碱体内抗炎镇痛作用研究

罗昱澜¹, 廖曾珍¹, 廖露琴¹, 毛柳珺¹, 李冬雯²

1. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001

2. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541001

摘要: 目的 研究广西地不容 *Stephania kwangsiensis* 总生物碱 (TARS) 的体内镇痛抗炎作用。方法 清洁级昆明种小鼠按性别、体质量分层随机分为 5 组: 对照组 (等体积蒸馏水), TARS 低、中、高剂量 (0.15、0.20、0.25 g/kg) 组, 阿司匹林 (阳性对照, 0.2 g/kg) 组。采用福尔马林致痛法、热水致小鼠缩尾法, 观察 TARS 的镇痛作用; 采用小鼠棉球肉芽肿法、蛋清致小鼠足肿胀法, 观察其抗炎作用。结果 与对照组比较, 高、中、低剂量 TARS 均可显著降低福尔马林致痛小鼠的疼痛强度, 减少小鼠舔后足时间; 显著延长热水所致的小鼠缩尾时间; 显著减少棉球肉芽组织增生模型中小鼠肉芽肿质量; 对蛋清引起的小鼠足肿胀发挥显著抑制作用; 且均呈剂量相关性。结论 TARS 具有显著的镇痛抗炎作用。

关键词: 广西地不容; 总生物碱; 抗炎; 镇痛

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)10-1424-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.011

Analgesic and anti-inflammatory effects of total alkaloid in *Stephania kwangsiensis* in vivo

LUO Yu-lan¹, LIAO Zeng-zhen¹, LIAO Lu-qin¹, MAO Liu-jun¹, LI Dong-wen²

1. Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China

2. Department of Pharmacy, Guilin Medical College, Guilin 541004, China

Abstract: Objective To study the analgesic and anti-inflammatory effects *in vivo* of the total alkaloids in *Stephania kwangsiensis* (TARS). **Methods** Mice were respectively ig with high, middle, and low doses of TARS. The analgesic effects of TARS were evaluated by the formaldehyde induced pain method and tail-immersion response induced by hot water in mice, and anti-inflammatory effects were observed by cotton ball granuloma, egg white induced paw swelling method in mice. **Results** TARS could significantly inhibit formaldehyde induced pain in mice, reduce the hind licking times, extend tail withdrawal time induced by hot water, obviously reduced the formation of granulomatous in mice; Inhibited egg white induced paw swelling. **Conclusion** TARS has significant analgesic and anti-inflammatory effect.

Key words: *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo; total alkaloid; anti-inflammation; analgesia effect

广西地不容 *Stephania kwangsiensis* 属防己科千金藤属多年生草质落叶藤本植物^[1], 主要产于广西西北至西南部, 生于石灰岩地区的山地灌丛, 是广西壮族等少数民族民间常用草药, 主要含有延胡索乙素^[2-3]等生物碱成分, 具有清热解毒、利湿、止痛的功效^[4], 临床用于胃痛、腹痛、急性胃肠炎、风湿性关节炎等的治疗。现有资料对广西地不容的研究主要集中在化学成分、有效成分的分离鉴定以及种属资源方面, 关于其镇痛抗炎作用的研究较少,

本实验采用不同模型, 对广西地不容总生物碱 (TARS) 的镇痛抗炎作用进行初步探讨。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

广西地不容块根, 购自广西玉林市药材市场, 经桂林医学院附属医院蔡小玲主任中药师鉴定, 鉴定结果为广西地不容 *Stephania kwangsiensis* 的干燥块根; 阿司匹林肠溶片 (湖南亚大制药有限公司, 批号 20160401, 规格 50 mg/片); 福尔马林 (西陇

收稿日期: 2017-05-04

基金项目: 广西高等学校科学研究项目 (KY2015LX258)

作者简介: 罗昱澜 (1975—), 女, 硕士, 主任药师, 主要从事新药开发与质量控制研究。E-mail: l_yulan@163.com

化工股份有限公司, 分析纯, 批号 1511102); 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯, 批号 3003715); 95%乙醇、无水乙醇均为分析纯。

1.2 实验动物

清洁级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 购自桂林医学院实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (桂) 2013-0001。饲养环境温度 (22±2) °C、环境湿度 (55±5) %, 保持室内自然通风, 自由饮食、饮水, 清洁级医学实验动物环境设施由桂林医学院实验动物中心提供。

1.3 主要仪器

RE-52AA 型旋转蒸发仪、SHZ-III型循环水真空泵 (上海亚荣生化仪器厂); B2500-G-MT 型超声波清洗器 (上海必能信超声有限公司); DT 系列电子天平 (常熟市佳衡天平仪器有限公司); 恒温水浴锅 (金坛市恒丰仪器厂)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

广西地不容块根干燥后粉碎, 精密称定粉末 50 g, 放入 500 mL 圆底烧瓶中, 加入 350 mL pH 值为 4~5 (3 mol/L 的硫酸) 的 75%乙醇, 在室温下浸泡 1 h, 先超声提取 30 min, 再加热回流 1 h, 抽滤得滤液浓缩至无醇味, 共回流 2 次, 合并 2 次滤液, 减压浓缩至膏状, 浸膏 40 °C 下真空干燥即得 TARS, 生物碱含量为 9.5%^[5]。精密称取 TARS 适量, 加蒸馏水分别制成低、中、高剂量 (15、20、25 mg/mL) 组的供试品溶液。

2.2 阳性药溶液的制备

取阿司匹林片 10 片, 精密称定, 研细。精密称取适量粉末 (相当于阿司匹林 200 mg), 置 10 mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 即得质量浓度约为 20 mg/mL 的阿司匹林药液。

2.3 镇痛活性实验

2.3.1 福尔马林致痛实验^[6-7] 取小鼠 50 只, 雌雄各半, 按性别、体质量分层随机分为 5 组: 对照组 (等体积蒸馏水)、TARS 低、中、高剂量 (0.15、0.20、0.25 g/kg, 剂量根据前期研究结果^[5]调整设置) 组, 阿司匹林 (阳性对照, 0.2 g/kg) 组, 每天 ig 给药 1 次, 连续 3 d。末次给药 0.5 h 后, 于各组小鼠右后足底 sc 5% 的福尔马林 0.02 mL, 观察小鼠足部反应, 分别记录第 I 时相 (0~10 min) 和第 II 时相 (10~30 min) 的累计舔足时间, 计算疼痛抑制率。

疼痛抑制率 = (对照组舔足时间 - 给药组舔足时间) / 对照组舔足时间

2.3.2 热水缩尾实验^[8] 将小鼠尾下部垂直浸入 50 °C 恒温水浴锅中, 浸入长度为 3 cm, 记录自尾部放入热水中至尾回缩出水面的时间, 即缩尾潜伏期为痛阈值。小鼠痛阈值以 >5 s、<30 s 视为痛阈合格小鼠 (测定 2 次, 间隔 5 min, 取平均值)。取痛阈合格的小鼠 50 只, 雌雄各半, 按性别、体质量分层随机分为 5 组, 每组 10 只, 分组给药方法同“2.2.1”项。末次给药前和给药 0.5 h 后, 分别测定痛阈值。测尾时间以 30 s 为限, 超过 30 s 以 30 s 计。

2.4 抗炎活性试验

2.4.1 小鼠棉球肉芽肿实验^[9-10] 取小鼠 50 只, 雌雄各半, 分组同“2.2.1”项。水合氯醛 ip 麻醉小鼠, 于小鼠腹股沟皮下植入消毒棉球 10 mg, 术后次日开始给药, 每天 ig 给药 1 次, 连续 7 d。末次给药 24 h 后, 处死小鼠, 取出棉球及肉芽组织, 置于 60 °C 恒温干燥, 称质量, 按以下公式计算肉芽肿净质量 (Δm) 及肉芽肿增生抑制率 (I)。

$$\Delta m = \text{干燥后棉球肉芽肿质量} - \text{原棉球质量}$$

$$I = (\Delta m_{\text{对照组}} - \Delta m_{\text{给药组}}) / \Delta m_{\text{对照组}}$$

2.4.2 蛋清致小鼠足肿胀实验^[11] 取小鼠 50 只, 雌雄各半, 分组同“2.2.1”项, 每天 ig 给药 1 次, 连续 5 d。末次给药 0.5 h 后, 于各组小鼠左后足跖部 sc 10% 的鸡蛋清 0.1 mL, 致炎 4 h 后, 处死小鼠, 于踝关节切下两后肢, 称质量, 计算肿胀度和肿胀率。

肿胀度 = 左后足跖质量 - 右后足跖质量

肿胀率 = (左后足跖质量 - 右后足跖质量) / 右后足跖质量

2.5 统计方法

数据的统计分析采用 SPSS 17.0 软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以单因素方差分析对多组数据进行比较, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 福尔马林致痛实验

TARS 对福尔马林致痛的镇痛作用结果见表 1。给药后, 与对照组比较, 阿司匹林、TARS 低、中、高剂量组的 I、II 时相小鼠累计舔足时间均显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001)。随着 TARS 剂量的增加, 小鼠舔足时间减少, 疼痛抑制率增加。提示 TARS 具有较好的镇痛效果, 且呈剂量相关性。

表1 TARS对福尔马林致小鼠疼痛反应的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Effects of TARS on formaldehyde induced pain test in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	第I时相舔足时间/s	疼痛抑制率/%	第II时相舔足时间/s	疼痛抑制率/%
对照	—	142.00±45.47	—	360.00±111.47	—
阿司匹林	0.20	57.00±15.55**	69.68	148.00±23.03**	64.20
TARS	0.15	93.00±21.89*	47.12	260.33±24.93*	44.41
	0.20	67.00±20.75**	69.76	158.33±18.89**	66.19
	0.25	51.00±17.81**	72.64	140.00±14.91**	70.04

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

3.2 热水缩尾实验

TARS的低、中、高剂量均能显著提高小鼠热刺激体表的痛阈,延长其缩尾时间,且呈剂量相关性,与对照组比较差异显著($P<0.01$ 、 0.001)。结果见表2。

表2 TARS对小鼠热水缩尾反应的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effects of TARS on tail-immersion response induced by hot water in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	痛阈/s	
		末次给药前	药后0.5 h
对照	—	9.20±1.00	11.00±1.60
阿司匹林	0.20	11.00±1.40	17.70±4.20**
TARS	0.15	10.80±1.20	15.40±2.60*
	0.20	10.90±1.30	17.90±4.40**
	0.25	10.90±1.20	18.80±4.80**

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

3.3 小鼠棉球肉芽肿实验

与对照组比较, TARS各剂量组均能显著减少小鼠肉芽肿质量($P<0.01$ 、 0.001), 其中中、高剂具有极显著性差异($P<0.001$)。提示TARS具有抗炎作用, 且呈剂量相关性, 结果见表3。

表3 TARS对棉球诱导小鼠肉芽组织增生的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Effects of TARS on mice granuloma hyperplasia ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	$\Delta m/mg$	I/%
对照	—	40.02±2.09	—
阿司匹林	0.20	26.70±2.52**	29.32
TARS	0.15	29.58±2.34*	26.07
	0.20	23.62±1.51**	40.98
	0.25	20.27±2.25**	49.35

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

3.4 蛋清致小鼠足肿胀实验

与对照组比较, TARS低、中、高剂量组小鼠足肿胀度显著减轻($P<0.01$ 、 0.001), 抗炎效果呈剂量相关性, 结果见表4。

表4 TARS对蛋清致小鼠足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Effects of TARS on paw swelling induced by egg white in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg	抑制率/%
对照	—	68.20±15.43	—
阿司匹林	0.20	43.50±14.99**	36.22
TARS	0.15	46.10±16.68*	32.40
	0.20	37.60±13.38**	44.87
	0.25	34.00±14.90**	50.15

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

4 讨论

福尔马林致痛模型模拟的是急性组织损伤所致的持续性疼痛, 其特点是, 引起的疼痛分为两个时相, I相是由于直接刺激外周神经末梢所致, II相则主要为炎症介质的产生、释放引起, 小鼠右后足跖sc福尔马林0~10 min为第I相反应(早期相), 10~30 min为第II相反应(晚期相)。解热镇痛抗炎药如阿司匹林能抑制II相反应, 选择阿司匹林为阳性对照药可以初步了解实验药物的作用机制^[12]。研究发现, TARS对第I时相和第II时相疼痛均有抑制作用, 且在福尔马林致痛实验中TARS的高剂量组第I时相抑制率为72.6%, 第II时相抑制率为70.0%, 均高于阿司匹林组, 提示TARS可以抑制继发的炎症反应所致疼痛, 又能抑制外周神经末梢作用而减轻疼痛。

热水缩尾实验是一种常用的热刺激致痛模型, 结果表明, TARS的高、中、低剂量均能显著抑制热水所致的小鼠缩尾反应, 明显延长小鼠的缩尾潜

伏期,表明 TARS 具有一定的镇痛作用。

炎症反应是机体对各种损伤刺激所表现的以防御为主的免疫应答反应,是多细胞、多因子共同参与的过程,其中炎性渗出、组织肿胀是炎症早期的重要指标。本实验采取小鼠棉球肉芽肿实验及蛋清致小鼠足肿胀进行炎症实验,在棉球肉芽肿实验中,TARS 高、中、低剂量组均对炎症造成的纤维组织增生有抑制作用;在蛋清致小鼠足肿胀实验中,对早期的渗出和肿胀有明显的拮抗作用。

综上所述,高、中、低剂量 TARS 均可延长小鼠的痛阈值、抑制热水所致的缩尾反应,亦可抑制棉球诱导的小鼠肉芽组织增生,减轻蛋清致小鼠足肿胀度,对急性、慢性不同阶段的炎症反应均有显著抑制作用,且呈剂量相关性。实验通过对 TARS 镇痛抗炎效果的研究,证明其具有很好的药用价值,为广西地不容的药学研究提供参考,对于 TARS 抗炎镇痛的物质基础和作用机制有待深入研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第三十卷第一分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 邓业成, 徐汉虹. 广西地不容块根生物碱成分研究 [J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2004, 22(12): 73-77.
- [3] 罗昱澜, 李江, 毛柳珺, 等. 广西地不容生物碱化学成分、药理及质量控制研究进展 [J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(2): 304-306.
- [4] 柏云娇, 于淼, 赵思伟. 生物碱的药理作用及机制研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2013, 29(1): 8-11.
- [5] 罗昱澜, 李江, 廖露琴, 等. 广西地不容总碱的镇痛抗炎作用及其急性毒性研究 [J]. 海峡药学, 2015, 27(12): 25-27.
- [6] 张蓓蓓, 陈志武, 罗胜勇, 等. 滁菊总黄酮的镇痛作用及一氧化氮和前列腺素 E2 的关系 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(3): 323-326.
- [7] 李静, 田芳, 李美艳, 等. 白屈菜提取物中生物碱的镇痛抗炎作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 262-265.
- [8] 马毅敏, 李娜, 刘承伟, 等. 板蓝根不同提取部位抗炎镇痛活性比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2517-2521.
- [9] 储美娜, 朱毅, 董志, 等. 海南地不容总碱的镇痛抗炎作用及毒性观察 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(6): 719-721.
- [10] 廖淑彬, 蔡韦炜, 陈丹, 等. 闽产三叶青地上部分提取物体内抗炎镇痛作用研究 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(3): 319-324.
- [11] 黄礼德, 郭立强, 潘廷啟. 半边莲不同提取物镇痛抗炎作用[J]. 医药导报, 2012, 31(8): 982-985.
- [12] 徐淑云, 卞如镰, 陈修. 药理实验方法学(第三版). 北京: 人民卫生出版社, 2002.