

海洋三羟基甾醇抗炎作用的研究

中山大学生命科学学院药理研究室(广州 510275) 许实波* 胡 群 赵金华
王正谦** 刘 清***

摘要 从中国南沙群岛附近海域的唇软珊瑚中分离得到的化合物三羟基甾醇,能明显抑制二甲苯致小鼠耳肿胀,对鸡蛋清致大鼠足趾肿胀、棉球肉芽肿增生和毛细血管通透性增加及大鼠急性胸膜炎均有明显的抑制作用。该三羟基甾醇具有膜稳定性作用,能够使大鼠炎性组织释放的 PGE₂ 明显减少。

关键词 三羟基甾醇(MCT) 抗炎作用 醋酸可的松 肉芽肿 毛细血管通透性

三羟基甾醇(24-亚甲基-5-胆甾烯-3 β , 7 β , 19-三醇, 24-methylene-5 α -cholesten-3 β , 7 β , 19-triol, MCT), 该化合物是从中国南海南沙群岛附近海域的唇软珊瑚 *Nephthea brasinca* 中提得的新结构化合物, 为无色片状结晶, 由光谱数据定出该化合物的结构式。报道对其抗炎作用的研究。

1 实验材料

三羟基甾醇(MCT)由中山大学化学系天然有机化学研究室李瑞声教授提供, 纯度为光谱纯; 醋酸可的松, 上海第九制药厂产品; 其它化学药品均为市售购得。NIH 纯系小鼠、SD 大鼠由中山大学生命科学学院药理学实验动物养殖场提供。

2 方法与结果

2.1 对二甲苯致小鼠耳肿胀的抑制作用: 健康雄性小鼠 50 只, 体重 20 \pm 2 g, 随机分为 5 组; 高剂量组(H), 中剂量组(M), 低剂量组(L), 生理盐水对照组(Contra, Con), 醋酸可的松阳性药对照组(Cortisone, Cor); 给药剂量如表 1 所示, ip 给药 30 min 后, 每鼠左耳涂 30 μ L 的二甲苯, 右耳涂等量的蒸馏水

作对照。致炎后 2 h 脱颈椎处死小鼠, 剪下双耳, 用直径 8 mm 打孔器在对称处取下耳片, 用扭力天平称重, 左右耳重量差为肿胀度⁽¹⁾, 结果提示: MCT 能显著抑制二甲苯对小鼠耳的致炎作用, 且具明显的量效关系。

表 1 MCT 对二甲苯致小鼠耳肿胀的保护作用($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (/kg)	n	耳廓增加重量 (mg)	抑制率 (%)
Con	NS 10 mL	10	22.85 \pm 5.89	--
H	0.979 mg	10	8.50 \pm 4.41***	62.80
M	0.374 mg	10	12.38 \pm 5.41***	45.82
L	0.163 mg	10	14.40 \pm 7.79***	36.98
Cor	10 mg	10	11.50 \pm 5.67***	49.67

与对照组比较***P<0.01

2.2 MCT 对鸡蛋清致大鼠足趾肿胀的保护作用: 选取 200 \pm 2 g 大鼠 32 只, 随机分为 4 组, 每组 8 只, 按表 2 剂量 ip 给药 30 min 后, 立即于鼠左后足内注射 10% 鸡蛋清 0.1 mL, 用毛细管放大法测量致炎前后大鼠足趾体积的变化, 致炎后于 30、60、90、150 min 测量足趾体积变化⁽²⁾ (用致炎足和未致炎足趾体积差来反映)。

* Address: Xu Shibao, School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou

** 华南濒危动物研究所 *** 云南昆明医学院化学教研室

许实波 男, 教授, 博士生导师, 药理学系主任, 药理研究室主任, 《中国海洋药物》、《热带海洋》、《中药材》杂志编委。长期从事心血管实验药理学教学及科研工作, 研究方向: 天然产物生理活性及药学的研究。于 1992 年享受政府专家特殊津贴待遇, 同年被评为中山大学优秀研究生导师, 1993 年获广东省南粤教书育人优秀教师奖。发表学术论文 45 篇, 专著论文集《天然产物生理活性研究论文集》二册。获国家级、省级科技成果奖 8 项, 中国专利局受理发明专利 2 项。

表 2 MCT 对鸡蛋清致大鼠足趾肿胀的保护作用($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	足趾肿胀度(mL)			
		30 min	60 min	90 min	150 min
NS		0.61±0.1	0.5±0.1	0.48±0.13	0.36±0.08
L	0.374	0.62±0.12	0.22±0.02**	0.25±0.11*	0.22±0.07
H	0.978	0.56±0.11	0.13±0.04***	0.19±0.04**	0.2±0.12*
Cor	10	0.53±0.19	0.26±0.06**	0.28±0.04*	0.25±0.04

与对照组比较 $P>0.05$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ (下表同)

2.3 MCT 对大鼠棉球肉芽肿的影响:选取 40 只体重 110 ± 25 g 的雄性大鼠,随机分为 4 组,每组 10 只,于实验前 24 h 用硫化钡(BaS)糊剂脱毛,ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉动物,在无菌操作下切开背部皮肤皮下植入一个 10 mg 的棉球(棉球用扭力天平精确称重,高压灭菌后滴入青霉素,60℃烘干)。术后动物肌注 8 万 u/kg 的青霉素和 10 万 u/kg 的链霉素,预防感染。当日按下表剂量 ip 给药,连续 7 d,第 8 天处死动物,剥离肉芽棉球于 80℃烘干 4 h,冷却后称重,减去棉球重量,得净肉芽肿重^[1]。结果见表 3, MCT 能显著抑制大鼠肉芽肿重量。

表 3 MCT 对大鼠棉球肉芽肿的影响

组别	剂量(/kg)	肉芽重(mg)	抑制率(%)
Con	NS 1 mL	86.50±7.68	—
H	0.978 mg	48.16±6.43***	44.32
L	0.163 mg	58.16±11.01**	32.76
Cor	10 mg	54.00±6.75***	37.57

2.4 MCT 对腹腔毛细血管通透性的影响:选取 40 只小鼠,体重 20 ± 2 g,雌雄各半,随机分为 4 组,按表 4 所示剂量 po 给药 30 min 后,尾静脉注射 0.5%伊文思蓝 5 mL/kg,5 min 后 ip0.7%乙酸 10 mL/kg,30 min 后脱颈椎处死小鼠,腹腔注入 5 mL NS,轻揉小

表 5 MCT 对大鼠急性胸膜炎渗出量和白细胞计数影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(/kg)	渗出量(mL)	抑制率(%)	白细胞总数	抑制率(%)
Con	NS 1 mL	2.03±0.41	—	80.60±17.30	—
H	0.978 mg	0.81±0.14***	60.10	43.11±14.24***	46.51
M	0.374 mg	1.01±0.14**	50.25	60.31±17.41*	25.17
L	0.163 mg	1.3±0.26**	35.96	68.24±13.07*	15.38
Cor	10 mg	0.76±0.16***	62.56	37.22±10.50***	53.82

2.6 MCT 对红细胞(RBC)膜脆性的影响:按 Glenn 法^[7],将大鼠血液用肝素抗凝,离心

鼠腹部 2~3 次,然后打开腹腔,收集 3 mL 腹腔液,加入 NaOH 0.1 mol/L 0.1 mL 放置 30 min 后,用 721A 型分光光度计比色(波长 590 nm)^[3,4],结果见表 4。MCT 能显著抑制醋酸介导的毛细血管通透性且具有量效关系。

表 4 MCT 对腹腔毛细血管通透性的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(/kg)	伊文思蓝 OD 值	抑制率(%)
Con	NS 10 mL	0.898±0.060	—
H	0.979 mg	0.286±0.022***	68.15
L	0.163 mg	0.584±0.107***	34.97
Cor	10 mg	0.460±0.046***	48.78

2.5 MCT 对大鼠胸膜炎渗出量及白细胞总数的影响:选取大鼠 40 只,体重 180 ± 2 g,雌雄均用,随机分为 5 组,每组 8 只。按药理实验方法学^[5],参照文献^[6]制备大鼠胸膜炎模型。ip 给药 30 min 后,乙醚浅麻醉,自胸腔注入 2%乙酸 0.2 mL 致炎,3 h 后放血处死动物,打开胸腔,吸取胸腔内全部渗液,用 5 mL 0.2% EDTA Hanks 液冲洗胸腔,收集计量,并作白细胞计数。结果见表 5, MCT 对大鼠急性胸膜炎溶液有显著的抑制作用,且抑制白细胞的游走。

弃血浆,将 RBC 0.15 mol/L, pH7.4 磷酸缓冲液洗涤数次,然后配成 5%RBC 悬液。按表

6 剂量给药。每试管中分别加不同剂量 MCT 或 Cor 0.3 mL, 再加上上述 RBC 悬混液 4.7 mL, 充分混匀, 在 53℃ 水浴加热 20 min, 取出后迅速用冰水冷却, 离心沉淀, 取上清液用 72 型分光光度计在 540 nm 下测吸光度。结果见表 6, MCT 对 RBC 膜有明显稳定作用。

表 6 MCT 对 RBC 膜脆性的影响 ($n=7, \bar{x} \pm s$)

MCT (mg/L)	O. D	抑制率 (%)	Cor (mg/L)	O. D	抑制率 (%)
0	0.125±1 E -03	—	0	0.125±1 E -03	—
0.625	0.114±3 E -03***	8.8	50	0.122±0*	2.4
1.25	0.104±1 E -03***	16.8	150	0.113±4 E -03**	9.6
2.50	0.1±1 E -03***	20.0	300	0.106±3 E -03***	15.2
5.00	0.092±3 E -03***	26.4	500	0.104±1 E -03***	16.8

2.7 MCT 对大鼠足趾炎症组织释放 PGE 量的影响^[8,9]: 雄性大鼠 30 只, 体重 150±20 g, 均分为 3 组, 分别 ip 生理盐水, MCT 0.374 mg/kg, Cor 10 mg/kg ($n=8$)。给药后 30 min, 每鼠足趾皮下注射 27% 鸡蛋清 0.1 mL, 致炎 2 h 后脱颈椎处死, 将致炎足自踝关节上 1 cm 处剪下, 称重, 剥皮后放入 5 mL 生理盐水浸泡 1 h, 离心浸泡液, 取上清液 0.3 mL 加入 KOH 0.5 mol/L 溶液 2 mL, 在 50℃ 水溶液中异构化 20 min, 加甲醇溶液 5 mL。用上海产 7520 紫外分光光度计于 278 nm 波长测定 PGE₂ 含量 (以 O. D 值来表示)。生理盐水组大鼠炎症组织浸泡液 O. D 值为 0.258±0.037, MCT 组为 0.132±0.03 ($P<0.001$), Cor 组为 0.164±0.03 ($P<0.01$)。结果显示, MCT 能显著降低炎症组

织中 PGE 的含量。

3 讨论

MCT 能明显抑制二甲苯致小鼠耳肿胀, 对鸡蛋清引起的大鼠足肿胀, 对醋酸介导的毛细血管通透性, 对大鼠急性胸膜炎及棉球诱导的大鼠肉芽肿等炎症均有显著的抑制作用。说明该化合物对各种急性炎症及慢性增生性炎症均显示良好的抗炎作用。能稳定 RBC 膜, 提示其有稳定溶酶体膜, 抑制溶酶体的释放及其致炎作用; 其显著降低炎症组织 PGE 的含量, 说明能够抑制 PG 的合成释放及其致炎活性; MCT 能减少脂质过氧化物 MDA 含量 (文章待发表), 显示其有一定的清除自由基的作用。实验显示的该化合物的显著的抗炎作用, 可能与上述的因素有关。

作者报道的 MCT 是一个新结构的海洋化合物, 其结构不同于天然的糖皮质激素甾体抗炎药。和醋酸可的松相比, 较小用量的 MCT 就显示出较好的抗炎作用, 说明了从海洋中寻找高效药物的前景。

参考文献

- 林志共, 等. 中国药理学与毒理学杂志, 1987, 1(2): 93
- 徐叔云主编. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 第二版, 1991. 713
- 祝兰卿, 等. 中国药理学报, 1989, 10(1): 81
- 曲叔岩, 等. 药学学报, 1982(7): 12
- 徐叔云主编. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 第二版, 1991. 719
- Mikami T, et al. Eur J Pharmacol, 1983, 95(11): 897
- 津田恭介, 等编集. 药效的评价(1) 药理试验法(上). 东京: 地人书馆, 1971. 258
- 吉林医科大学化学教研室新药组. 吉林医科大学学报, 1976(2): 24
- Zhou C C, et al. Ada Pharm Sin, 1985, 20: 257

(1996-02-12 收稿)

Anti-inflammatory Action of 24-methylene-5 α -cholesten-3 β , 7 β , 19-triol

Xu Shibo, Hu Qun, Zhao Jinghua, et al

Sterol 24-methylene-5 α -cholesten-3 β , 7 β , 19-triol (MCT) was isolated from a soft coral *Nephthea brassica* collected from South China Sea. It showed obvious inhibition on many kinds of inflammation such as swelling ears of mice induced by xylene, swelling hind paws of rats induced by egg white, proliferating granuloma induced by cotton pellet in rats and increasing capillary permeability of mice induced by acetic acid. MCT also

decreased volume of pleural exudate on acetic acid induced acute pleurisy of rats. These experiments showed its strong anti-inflammatory effects. Dose range used was 0.163~0.978 mg/kg ip which presented a good dose-effect relationship.

The study on anti-inflammation mechanism indicated that MCT could inhibit the release of inflammation factors such as PGE₂, decrease production of MDA and enhance the stability of membrane.

黄杨宁对急性实验性脑缺血的保护作用[△]

南京中医药大学中药学院药理教研室(210029) 方泰惠* 许惠琴 徐立 全胜斌

摘要 药理实验研究表明,黄杨宁能明显延长小鼠因结扎带迷走神经的两侧颈总动脉造成急性脑缺血的存活时间;能减轻大鼠实验性血栓的湿重和干重。提示黄杨宁有保护急性脑缺血及抗血栓形成的作用。

关键词 黄杨宁 急性脑缺血 抗血栓作用

黄杨宁的有效成分为环维黄杨星 D,是从黄杨科植物中国黄杨 *Buxus microphylla* sieb. et Zucc. var. *Sinica* Rehd. et Wils 中提取分离而制得的。其临床及药理研究表明,对冠心病、心绞痛、心律失常等均具有较好的作用(黄杨研究成果鉴定资料汇编,1986.10)。近年来临床用于缺血性脑病(包括脑栓塞、动脉硬化症、基底动脉供血不足等)亦取得了满意的疗效(全国“黄杨宁片”学术交流会议论文集,1993-04-13)。为此,我们进行了实验室的初步研究。

1 实验材料

1.1 药品:黄杨宁为白色粉末,由南京空军小营制药厂供给,临用前用蒸馏水溶解,用冰醋酸调至 pH5;磷酸川芎嗪,广东利民制药厂,批号 840603;阿斯匹林,南京市医药公司分装。

1.2 动物:ICR 小鼠,体重 24~26 g,雄性;

SD 大鼠,体重 250~300 g,雄性,均由本校实验动物中心提供,苏动(质)93008。

2 方法与结果

2.1 黄杨宁对小鼠急性脑缺血的影响^[1,2]:取小鼠 80 只,随机分为 4 组,每组 20 只,即为黄杨宁小剂量组:5.28 mg/kg;黄杨宁大剂量组:13.2 mg/kg;磷酸川芎嗪组:625 mg/kg;生理盐水组:10 mL/kg 生理盐水。各组每天灌胃给药 1 次,连续给药 5 d。末次给药 30 min 后,将小鼠仰位固定于手术台上,切开颈部皮肤,分离两侧颈总动脉,用 4 号手术线分别结扎带迷走神经的左右颈总动脉,记录小鼠死亡时间,结果见表 1。黄杨宁两个剂量组均可明显延长小鼠因结扎两侧带迷走神经的颈总动脉造成急性脑缺血的存活时间,与生理盐水组比较差异非常显著($P < 0.01$),提示黄杨宁对小鼠急性脑缺血有明显的保护作用。

* Address: Fang Taihui, Dept. of Pharmacology, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Nanjing

方泰惠 1969 年毕业于中国药科大学药学专业。副教授、教研室主任、硕士生导师,江苏省药品审评委员会委员。多年来主要从事中药药理学及毒理学研究。近几年来作为分课题负责人,担任过国家级课题 3 项,省级 6 项,均已通过各级鉴定,国家中医药管理局课题“消化病毒、调养肝脾辨证治疗慢性乙型病毒性肝炎研究”,获 95 年国家中医药管理局科技进步一等奖;“麝香定喘膏的临床与实验研究”1995 年获江苏省中医药科技进步二等奖;与成都中医药大学协编《药理实验方法学》,任主编。并在国家级杂志上发表论文 10 余篇。

[△] 本课题已获国家科委颁发的 1993 年科技发明三等奖