

· 药理实验与临床观察 ·

三七总皂苷抗炎作用机制的实验研究[△]

第三军医大学药理教研室 (重庆 400038) 李淑慧* 李晓辉

华西医科大学药理教研室 楚 延

摘 要 以角叉菜胶 (Car) 25 mg/kg sc 诱导大鼠气囊滑膜炎为模型,分别采用 Lowry 法、试管稀释法、硫代巴比妥酸分光光度法,观察了三七总皂苷 (PnS) 对气囊滑膜炎渗出液中蛋白含量、白细胞数量及脂质过氧化物丙二醛 (MDA) 含量的影响,此外,采用细胞色素 C 还原法及放射免疫分析法,进一步观察了 PnS 对渗出液中中性粒细胞 (Neu) 释放超氧阴离子 (O_2^-) 及其胞内 cAMP 含量的影响。结果发现: PnS 60, 120, 240 mg/kg 3 个剂量组均能剂量依赖性抑制 Car 诱导的白细胞游出和蛋白渗出;显著降低 MDA 含量、抑制 Neu 释放 O_2^- ;但能升高 Neu 内 cAMP 含量。提示 PnS 对大鼠气囊滑膜炎具有明显抗炎作用,其抗炎机制与升高 Neu 内 cAMP 从而抑制氧自由基生成、减轻脂质过氧化损伤有密切关系。

关键词 三七总皂苷 气囊滑膜炎 丙二醛 超氧阴离子 环磷酸腺苷

Studies on Anti-Inflammatory Mechanisms of Saponin of *Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng* (Sanchi)

Department of Pharmacology, Third Military Medical University (Chongqing 400038) Li Shuhui and Li Xiaohui

Department of Pharmacology, West China University of Medical Sciences Chu Yan

Abstract Effects of saponin of *Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng* (Burk.) Hoo et Tseng (PnS) on neutrophil (Neu) count, protein and malondialdehyde (MDA) contents in the exudate of rat acute air-pouch synovitis model induced by sc injection of 25 mg/kg carrageenan were investigated by Lowry and test tube dilution methods and thiobarbituric acid spectrophotometry. Its effects on the intracellular cAMP content in and release of O_2^- from Neu were further assessed by radioimmunoassay and cytochrome C reduction methods respectively. The results showed that PnS 60, 120, 240 mg/kg ip reduced the migration of Neu and exudation of protein, lowered the content of MDA and inhibited the release of O_2^- from Neu; but elevated the cAMP content of Neu in a dose-dependent manner. These results revealed that Pns has an obvious anti-inflammatory effect and its primary action was related to the increase of cAMP content in Neu, followed by inhibition of the free radical production.

Key words saponin of *Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng* (Burk.) Hoo et Tseng air pouch synovitis malondialdehyde O_2^- cAMP

三七是五加科人参属植物,传统用于止血化瘀、消肿镇痛。近年发现其主要有效成分三七总皂苷 [saponins of *Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng* (Burk.) Hoo et Tseng, PnS] 对多种实验性炎症模型具有良好的抗炎活性^[1]。鉴于 O_2^- 等自由基诱发的脂质过氧化损伤是炎症发生发展的重要病理机制之一^[2];加之近年研究发现胞内第二信使分子环磷酸腺苷 (cAMP) 升高具有抑制自由基释放的作用^[3],为此,本研究以交叉菜胶 (Car) 诱导大鼠气囊滑膜炎为模型,以地塞米松为阳性对照,进一步观

察了 PnS 的抗炎作用及其机制,旨在为发掘有效抗炎药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: PnS (纯度 99%,中国科学院昆明植物研究所提供);地塞米松 (Dex, 卫生部药品检定所);角叉菜胶 (Car, 辽宁药物研究所);硫代巴比妥酸 (TBA, 上海试剂二厂);十二烷基磺酸钠 (日本进口分装);四乙氧基丙烷 (瑞典产品);细胞色素 C (III型, Sigma 公司);A₂₃₁₈₇ (Sigma 公司);cAMP 放免分析药盒 (上海第二医学院);其它试剂均为国产。

* Address: Li Shuhui, Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing

李淑慧 华西医科大学 93 级药理学硕士生, 1996 年获硕士学位。主要从事抗炎免疫药理方向研究, 申请获得校管课题 1 项, 参与完成国家自然科学基金面上项目各 1 项。发表论文: Anti-inflammatory effects of total saponins of *Panax notoginseng*, Acta Pharmacol Sin, 1999, 20 (6): 551, 被 SCI 收录。

[△]重庆市中医药管理局课题 Na 99032

分析纯。

1.2 实验动物处理: 雄性 Wistar 大鼠, 体重 (185±34) g, 第三军医大学实验动物中心提供 (医动字第 24301050 号)。随机将大鼠分为 6 组: 正常组、致炎组、Car+ PnS 60, 120, 240 mg/kg 3 个组、Car+ Dex 1 mg/kg 组。药物处理组于 Car 致炎前 30 min 及致炎后 6 h 分别 ip 相应药物, 对照组给予等容量溶媒, 各组大鼠于 Car 致炎后 12 h 脱颈椎处死, 用无钙镁 Hank's 液 (HBSS) 灌洗, 收集灌洗液进行有关指标测定。

1.3 大鼠气囊滑膜炎模型复制: 参照文献方法进行^[4]。气囊内注射 Car 25 mg/kg 致炎, 各组动物处死后, 用 HBSS 灌洗气囊, 收集灌洗液, 少许行白细胞计数及分类计数, 其余离心, 分别收集上清液和白细胞 (Typan blue 检查白细胞活力大于 97%, Neu 占约 95%), 供各项指标测定。

1.4 白细胞计数及分类计数: 按常规法进行^[5]。

1.5 灌洗液中蛋白含量的测定: 按 Lowry 法进行^[6]。

1.6 灌洗液中脂质过氧化物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量测定: 参照向荣等硫代巴比妥酸分光光度法进行^[7]。

1.7 Neu 释放 $\dot{O}_2^-$ 的测定: 参照文献方法^[8]略加改进。取已制备好的细胞悬液, 用 HBSS 调整成 5×10^5 /mL, 各取悬液 0.2 mL, 加入 HBSS 0.3 mL, 置 37℃ 振荡孵育 15 min, 立即置于冰浴中, 加 HBSS 1.5 mL, 离心 (4℃, 3 000×g, 5 min), 弃沉淀, 上清液于 550 nm 处测定 A 值。对照管不加刺激剂, 余与测定管相同。按下列公式计算细胞色素 C 减少量, 以代表 $\dot{O}_2^-$ 生成量

$$\text{Cyt C 减少量} = \frac{\text{对照管 A} - \text{测定管 A}}{\text{消光系数} \times \text{时间} \times t}$$

$$\epsilon = 21.0 \text{ L/mm} \cdot \text{cm}$$

最后结果以 Cyt C 减少量 (nmol/10⁶ cells / 5 min) 间接代表 $\dot{O}_2^-$ 释放量。

表 2 PnS 对灌洗液中 MDA 含量、Neu 释放 $\dot{O}_2^-$ 及 Neu 内 cAMP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量 (mg/kg)	MDA (nmol/mL)	$\dot{O}_2^-$ (nmol/10 ⁶ cell [*] 15min)	cAMP (pmol/10 ⁶ cell)
正常组	—	7.26±2.59	34.58±6.29	1.960±0.460
致炎组	—	29.0±8.6 ^{△△}	116.8±11.1 ^{△△}	0.725±0.216 ^{△△}
Car+ PnS	60	28.2±7.4 ^{△△}	104.9±12.3 ^{△△}	0.665±0.195 ^{△△}
	120	19.4±5.6 ^{△△*}	81.8±8.3 ^{△△*}	1.247±0.547 [*]
	240	18.1±5.7 ^{△△*}	68.4±6.3 ^{△△*}	1.823±0.520 [*]
Car+ Dex	1	16.3±4.7 ^{△△*}	67.8±8.4 ^{△△*}	1.414±0.503 ^{△*}

与正常组比较: [△] $P < 0.01$, ^{△△} $P < 0.01$; 与致炎组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

2.3 对灌洗液中 Neu 释放 $\dot{O}_2^-$ 的影响: 由表 2 可

1.8 Neu 内 cAMP 含量的测定: 参照文献方法进行样品处理及测定^[9]。(1)样品处理: 取细胞悬液 (1×10^6 /mL) 1 mL, 于已硅化试管中, 于 100℃ 水浴煮沸 3 min, 立即冰浴冷却, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清于另一试管中, 真空干燥待测。(2)测定: 具体操作方法按 cAMP 放免药盒说明书进行。结果以 pmol/10⁶ cell 表示。

1.9 统计分析: 将各组数据在电子计算机上进行 t 检验和相关显著性检验, 结果用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 PnS 对灌洗液白细胞数及蛋白含量的影响: Car 致炎前 30 min 及致炎后 6 h, 分别 ip PnS 60, 120, 240 mg/kg 及 Dex 1 mg/kg, 于 Car 致炎后 12 h 活杀大鼠, 收集灌洗液进行测定。PnS 3 个剂量组均能一定程度地降低灌洗液中白细胞数 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。Dex 具有类似作用 (见表 1)。

表 1 PnS 对灌洗液白细胞数及蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量 (mg/kg)	Neu (10^6 /L)	蛋白 (g/L)
正常组	—	2.95±0.54	0.59±0.20
致炎组	—	47.9±15.3 ^{△△}	7.46±1.26 ^{△△}
Car+ PnS	60	30.3±9.5 ^{△△*}	7.4±1.55 ^{△△}
	120	21.2±7.2 ^{△△*}	5.70±1.47 ^{△△*}
	240	17.0±6.2 ^{△△*}	4.4±1.35 ^{△△*}
Car+ Dex	1	16.9±7.0 ^{△△*}	5.39±1.20 ^{△△*}

与正常组比较: ^{△△} $P < 0.01$

与致炎组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

2.2 对灌洗液中 MDA 含量的影响: Car 致炎后, 大鼠气囊灌洗液中 MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$), PnS 60, 120, 240 mg/kg 剂量依赖性阻止灌洗液中 MDA 含量的升高, 其抑制率分别为: 2.75%, 33.10%, 37.95%, Dex 也具有类似作用 (见表 2)。

见, Car 致炎后, 灌洗液 Neu 释放 $\dot{O}_2^-$ 显著增加, PnS

3个剂量组均能抑制 Neu 释放 O_2^- ,且呈剂量依赖性,其抑制率分别为 10.19%、29.96%、41.43%。

2.4 对灌洗液中 Neu 内 cAMP 含量的影响:由表 2 可见,Car 致炎后,灌洗液 Neu 内 cAMP 含量明显降低 ($P < 0.01$);PnS 能剂量依赖性地增加 Neu 内 cAMP 含量,且其大剂量组能使 Neu 内 cAMP 含量恢复到正常水平。Dex 也具有类似作用。

3 讨论

自由基是广泛存在于生物体组织细胞内的非特异性损伤因素,也是炎症发生发展的重要病理机制之一^[2]。炎症时,活化的白细胞呼吸暴发过程产生的 O_2^- 等活性氧自由基,不仅具有增加血管通透性的作用,而且极易与生物膜的多不饱和脂肪酸发生脱氢反应,从而诱发组织细胞的脂质过氧化损伤^[10]。本实验结果发现,PnS 3个剂量组均能剂量依赖性地抑制 Car 致炎大鼠 Neu 释放 O_2^- 、降低灌洗液中脂质过氧化物 MDA 的含量,且与其降低 Neu 数量及蛋白含量呈平行性变化。这与 PnS 对体外多形核白细胞呼吸暴发时产生的氧自由基及黄嘌呤氧化酶体系产生的 O_2^- 均具有清除作用的结果相一致^[11]。

细胞内的第二信使分子 cAMP 在调控炎症发生发展中具有重要作用,胞内升高的 cAMP 可抑制

炎细胞释放自由基而产生抗炎活性^[3]。本实验观察到,Car 致炎后,气囊灌洗液中 Neu 内 cAMP 含量明显下降 ($P < 0.01$),PnS 3个剂量组均能剂量依赖性升高 Neu 内 cAMP 含量,相关分析结果显示,PnS 升高 Neu 内 cAMP 含量与其抑制 Neu 释放 O_2^- 呈显著负相关 ($r = -0.9384, P < 0.01$)。上述结果表明,升高 Neu 内 cAMP 从而抑制 Neu 释放 O_2^- 、减轻脂质过氧化损伤是 PnS 发挥抗炎作用的重要分子机制之一。

参 考 文 献

- 1 张晓丹,刘建军,马英丽,等. 中医药信息,1993,(5): 28
- 2 Maeda H, Akaike T. Biochemistry Mosc, 1998, 63(7): 854
- 3 Takei K, Tokuyama K, Kato M, *et al.* Pharmacology, 1998, 57(1): 1
- 4 Edwards J C W, Sedgwick A D, Willoughby D A, *et al.* J Pathology, 1981, 134(2): 147
- 5 福州部队总医院编. 临床医学检验. 上海: 上海科技出版社, 1978 15
- 6 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* J Biol Chem, 1951, 193 265
- 7 向 荣,王鼎年. 生物化学与生物物理进展,1990,17 241
- 8 Braquet M, Lavaud P, Dormont D, *et al.* Prostaglandines, 1985, 29(5): 747
- 9 陈海鑫,李振甲. 生物化学与生物物理进展,1986,5 78
- 10 Ignatowicz E. Pol J Pharmacol, 1994, 46(3): 103
- 11 周金黄. 免疫药理学进展—基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 1993 170

(2000-03-08收稿)

Studies on the Basic Principles for the Processing of *Rhizoma Cibotii* Part I Influence of *Rhizoma Cibotii* and Its Processed Samples on Thrombin Induced Rabbit Platelet Aggregation

Liaoning College of TCM (Shenyang 110032) Li Jun* (李 军), Jia Tianzhu (贾天柱), Du Guangli and Han Hongwei

The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University Liu Jinpeng (刘进鹏)

摘 要 比较研究了狗脊及其不同炮制品对凝血酶诱导的兔血小板聚集作用的影响,各炮制品均有抑制血小板聚集作用,抗血小板聚集作用砂烫品>盐制品>酒蒸品>单蒸品>生品。

关键词 狗脊 凝血酶 血小板聚集作用

Abstract The influence of *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. and its processed samples on thrombin-induced platelet aggregation in rabbits was studied. The results showed that all differently processed samples tested could inhibit platelet aggregation, with activities in the decreasing order of *Rhizoma Cibotii* roasted in stirring sand> steamed after being salted> steamed after steeped in wine> simply steamed> the unprocessed crude *Rhizoma Cibotii*.

Key words *Rhizoma Cibotii* thrombin platelet aggregation