

· 药理与临床 ·

葛根素对糖尿病大鼠肾功能及肾组织 MM P-10
与 TMP-1 表达的影响刘淑霞¹, 陈志强², 何 宁¹, 刘青娟¹, 李英敏¹, 段惠军^{1*}

(1. 河北医科大学 病理教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 河北医科大学中西医结合研究所, 河北 石家庄 050017)

摘 要: 目的 探讨葛根素对糖尿病大鼠肾小球结构、功能及肾组织基质金属蛋白酶 10 (MM P-10)、基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TMP-1) 表达的影响。方法 ip 链脲佐菌素 (65 mg/kg) 诱发糖尿病大鼠模型, 每日 ip 葛根素注射液, 共 16 周。给药结束后, 收集尿液, 测定尿蛋白 (U_{pro}), 尿肌酐 (U_{cr}) 含量; 腹主动脉取血, 测定血糖 (Glu), 血肌酐 (Scr), 尿素氮 (BUN) 含量; 采用原位杂交法检测肾小球 MM P-10, TMP-1 mRNA 表达, 流式细胞术和免疫组化检测肾皮质 MM P-10, TMP-1 及 IV 型胶原、层黏连蛋白 (LN) 表达。结果 糖尿病组较对照组肾小球 MM P-10, TMP-1 mRNA 及蛋白表达增加, 肾皮质 MM P-10, TMP-1 及 IV 型胶原、LN 表达亦增加; 反映肾功能的各项生化指标水平升高。葛根素用药组较糖尿病组 MM P-10, TMP-1 mRNA、蛋白及 IV 型胶原、LN 表达减少; 肾功能有所改善。结论 葛根素对糖尿病大鼠肾结构功能具有保护作用, 除降低血糖外, 调节肾小球 MM P-10, TMP-1 表达从而减轻肾小球细胞外基质沉积也可能是其作用途径之一。

关键词: 葛根素; 糖尿病肾病; 基质金属蛋白酶-10 (MM P-10); 基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TMP-1)

中图分类号: R 286.72

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0170-05

Effects of puerarin on renal function and expressions of MM P-10
and TMP-1 in kidney of diabetic ratsL I U Shu-xia¹, CHEN Zhi-qiang², HE Ning¹, L I U Qing-juan¹, L I Ying-min¹, DUAN Hui-jun¹

(1. Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Institute of Combined Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: **Object** To investigate the effects of puerarin on renal structure, function and expressions of matrix metalloproteinase-10 (MM P-10) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TMP-1) in the kidney of diabetic rats. **Methods** Nineteen nephrectomized male Wistar rats were used to induce diabetic models by ip Streptozocin (65 mg/kg). Puerarin was given daily by ip from the third day of induction to diabetes for 16 weeks. Then, U_{pro}, U_{cr} in urine and Glu, Scr, BUN in serum were determined. Situ hybridization and immunohistochemistry were used to detect MM P-10, TMP-1 mRNA expressions and MM P-10, TMP-1, collagen IV and Laminin (LN) expressions in renal glomeruli with image analysis system; flow cytometry was used to detect the expressions of MM P-10, TMP-1 of renal cortex. **Results** BUN, Ccr, and U_{pro} in diabetic rats were significant higher than that in control group. Compared with those in kidneys of control group, diabetic kidneys showed increased expressions of both MM P-10, TMP-1 mRNA, proteins and excessive deposition of glomeruli extracellular matrix. Glu and the level of expressions of MM P-10, TMP-1, collagen IV, and LN were reduced by puerarin treatment, renal function was improved. **Conclusion** Puerarin has some renal protective effect on diabetic nephropathy partly through inhibition of excessive deposition of glomeruli extracellular matrix by down-regulating MM P-10 and TMP-1 expressions besides reducing Glu.

Key words: puerarin; diabetic nephropathy; matrix metalloproteinase-10 (MM P-10); tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TMP-1)

糖尿病属于中医消渴病范畴, 葛根是治疗消渴病的传统中药。葛根素是葛根的一个重要成分, 具有

* 收稿日期: 2003-05-28

基金项目: 教育部归国博士基金资助项目 (980601)

作者简介: 段惠军 (1955—), 男, 河北省石家庄市人, 河北医科大学副校长, 教授, 博士生导师, 于 1991 年在日本信州大学获博士学位, 1991~1993 年在日本信州大学从事博士后研究工作, 研究方向为肾脏病理学和肿瘤病理学。
Tel: (0311) 6266942 (办) E-mail: duanhj@hebmu.edu.cn

降血糖、改善微循环及凝血纤溶系统活性、调节内皮细胞舒缩功能的作用^[1~3]。糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病常见的微血管并发症, 本实验试用葛根素对糖尿病大鼠模型进行干预, 研究葛根素对 DN 的发生、发展的影响, 为扩大该药的临床应用范围提供理论依据, 并通过观察用药组肾组织基质金属蛋白酶 10 (MMP-10)、基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP-1)、IV 型胶原、层粘连蛋白 (LN) 表达的变化探讨其对 DN 可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物: Wistar 雄性大鼠, 由河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和药物: 原位杂交和免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 其中试剂包括: MMP-10、TIMP-1 探针 (美国 Sigma 公司)、兔抗 MMP-10、TIMP-1、LN 多克隆抗体, 鼠抗 IV 型胶原单克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 链脲佐菌素 (Sigma 公司), 麦普宁注射用葛根素 (山东瑞阳制药有限公司, 主要成分为葛根素, 纯度 98%, 100 mg/支, 国药准字 X20010181)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备: 按 Anderson 等^[4]建立的方法, 选取体重 150~180 g Wistar 雄性大鼠 30 只, 戊巴比妥钠 ip 麻醉 (40 mg/kg) 后行右肾切除术, 2 周后切口完全愈合。将大鼠随机分为 5 组: 右肾切除对照组, 糖尿病模型组, 葛根素低、中、高剂量组, 每组 6 只。除右肾切除对照组 ip 等体积枸橼酸缓冲液外, 其余各组大鼠按 65 mg/kg ip 链脲佐菌素 (溶于 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液 pH 4.5), 48 h 后尾尖取血测定血糖, 取尿液测定尿糖, 血糖 ≥ 16.7 mol/L, 尿糖 + + + ~ + + + + 者确定为糖尿病模型。实验期间动物自由进食饮水, 不使用胰岛素及其他降糖药物, 模型成立 3 d 后, 葛根素各组每日分别 ip 麦普宁注射用葛根素 40, 80, 160 mg/kg, 对照组及糖尿病模型组 ip 等量生理盐水。

2.2 标本收集: 糖尿病模型建成后 16 周时分别用代谢鼠笼收集 24 h 尿液, 用于尿蛋白 (Up_{ro})、尿肌酐 (U_{cr}) 测定; 用 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 腹主动脉取血, 分离血清测定血糖 (Glu)、血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN); 切除左肾, 去掉被膜, 滤纸吸干血迹后称质量, 部分置于 4% 多聚甲醛固定留做光镜、原位杂交、免疫组化检测, 部分置于 70% 乙醇固定后进行流式细胞术检测。

2.3 常规光镜检查: 肾组织经 4% 多聚甲醛固定

后, 常规脱水、包埋, 切片厚 2 μ m, 分别行 HE 和 PAS 染色。

2.4 血、尿生化指标测定: Glu, Scr, Up_{ro}, U_{cr}, BUN 均用日立 7170 全自动生化分析仪测定, 并根据 U_{cr}, Scr 计算肌酐清除率 (C_{cr})。

2.5 原位杂交测定: 组织切片常规脱蜡水化, 经 3% H₂O₂、胃蛋白酶 (1 μ g/mL) 消化及预杂交液处理后滴加含 MMP-10 或 TIMP-1 探针的杂交液 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜, 经梯度 SSC 37 严格冲洗, 地高辛抗体孵育和 DAB 显色, 杂交前切片用预杂交液代替探针杂交液做阴性对照。

2.6 MMP-10, TIMP-1, IV 型胶原, LN 免疫组化染色: 切片常规脱蜡至水, 一抗为兔抗鼠 MMP-10, TIMP-1, LN 多克隆抗体或鼠抗 IV 型胶原单克隆抗体 (1:100), 二抗为生物素化 IgG (1:100), 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, DAB 显色, 光镜观察阳性信号。

2.7 流式细胞术检测 MMP-10, TIMP-1 蛋白表达: 标本用网搓法制备单细胞悬液, 采用间接免疫荧光标记法, 在细胞悬液中分别加入 1:100 稀释的兔抗 MMP-10 或 TIMP-1 多克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 后洗涤, 加入 1:50 羊抗兔 FITC-IgG, 温浴洗涤后用流式细胞仪进行检测 (美国 BD 公司, FACS420), 测量的数据输入计算机, 应用相应的程序进行资料处理, 测定前以鸡红细胞作为标准细胞样品调整仪器的 RSD 值在 5% 以内。

2.8 图像及统计学分析: 原位杂交和免疫组化结果均应用 HPA S-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统, 分别测量出每个肾小球中 LN, IV 型胶原, MMP-10, TIMP-1 mRNA 的着色阳性面积、积分吸光度和肾小球面积, 以前两个参数与肾小球面积比表示该成分的相对含量和表达强度。每组分析 6 个标本, 每个标本切片取 10 个完整的肾小球进行分析, 取均值代表一只大鼠某种成分在肾小球中的相对含量和表达强度。流式细胞术 MMP-10, TIMP-1 表达的定量分析: 按照 Morkve 等^[5]的方法, 以荧光指数 (FI) 表示 MMP-10, TIMP-1 的相对含量。实验结果统计采用 *F* 检验, 应用 SAS 统计软件完成。

$$FI = \frac{\text{样品平均荧光强度} - \text{对照样品平均荧光强度}}{\text{正常组织平均荧光强度} - \text{对照样品平均荧光强度}}$$

3 结果

3.1 各组动物体重、肾质量、及肾质量/体重 (肥大指数) 变化: 16 周时糖尿病模型组与对照组相比, 体重下降而肾质量变化不明显, 肥大指数增加 ($P <$

0.01), 葛根素各组与糖尿病模型组相比, 体重增高, 肥大指数降低, 尤以高剂量组明显 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 各组大鼠体重、肾质量、肥大指数的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Changes of body weight, kidney weight, and kidney/body weight ratio of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	体重/g	肾质量/g	肥大指数
对照	-	367.80 ± 18.51	2.16 ± 0.25	0.0059 ± 0.0005
糖尿病模型	-	166.60 ± 22.39 ^{**}	2.68 ± 0.61	0.0160 ± 0.0023 ^{**}
葛根素	40	177.00 ± 12.77	2.27 ± 0.31	0.0128 ± 0.0008 [#]
	80	184.29 ± 38.12	2.51 ± 0.48	0.0147 ± 0.0011 [#]
	160	360.00 ± 22.52 [#]	2.70 ± 0.58	0.0075 ± 0.0039 [#]

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$

与糖尿病模型组比较: [#] $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group

[#] $P < 0.01$ vs diabetic model group

3.2 各组肾功能改变: 16 周时糖尿病模型组与对照组相比, Glu, BUN, Ccr, Up_{pro} 显著增高 ($P < 0.05, 0.01$), 葛根素各组与糖尿病模型组相比各项指标明显改善 ($P < 0.05, 0.01$), 见表 2。

3.3 一般形态学改变: 糖尿病模型组大鼠较对照组肾小球增大, 系膜基质增多, 葛根素组较糖尿病模型组有不同程度改善。

3.4 MMP-10, TMP-1 mRNA 在肾小球中的表达: 主要表达在肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞胞质内。糖尿病模型组肾小球内 MMP-10, TMP-1 mRNA 相对含量及积分吸光度均增强, 与对照组相比差异均有显著性 ($P < 0.01$); 葛根素各组 MMP-10, TMP-1 mRNA 的表达与糖尿病模型组相比均有不同程度的降低, 尤以高剂量组降低明显 ($P < 0.01, 0.05$), 见表 3。

3.5 MMP-10, TMP-1 蛋白在肾脏组织中的定位和定量检测: 免疫组化染色显示阳性颗粒主要定位

表 2 葛根素对糖尿病大鼠生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of puerarin on Glu, BUN, Ccr and 24 h Up_{pro} of diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	Glu/(mmol · L ⁻¹)	BUN/(mmol · L ⁻¹)	Ccr/(mL · min ⁻¹)	Up _{pro} /(mg · 24 h ⁻¹)
对照	-	7.45 ± 1.56	13.96 ± 6.76	0.17 ± 0.10	31.52 ± 10.44
糖尿病模型	-	20.51 ± 5.25 ^{**}	29.89 ± 4.65 ^{**}	0.69 ± 0.37 [*]	143.55 ± 13.89 ^{**}
葛根素	40	27.25 ± 2.75 [#]	29.71 ± 7.48	0.62 ± 0.11	96.22 ± 4.29 [#]
	80	15.57 ± 3.37 [#]	25.67 ± 4.67	0.62 ± 0.31	78.66 ± 9.43 [#]
	160	10.35 ± 5.32 [#]	13.94 ± 4.40 [#]	0.58 ± 0.24	46.29 ± 4.37 [#]

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比较: [#] $P < 0.05$ [#] $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ [#] $P < 0.01$ vs diabetic model group

表 3 各组肾小球中 MMP-10, TMP-1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Expressions of MMP-10, TMP-1 mRNA in renal glomeruli of different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	MMP-10 mRNA		TMP-1 mRNA	
		相对含量/%	积分吸光度	相对含量/%	积分吸光度
对照	-	9.60 ± 3.57	1.52 ± 0.54	14.10 ± 2.72	1.85 ± 0.70
糖尿病模型	-	22.52 ± 5.03 ^{**}	4.73 ± 1.02 ^{**}	37.98 ± 5.11 ^{**}	6.94 ± 2.46 ^{**}
葛根素	40	19.92 ± 2.94	3.76 ± 1.05	24.13 ± 10.58 [#]	5.50 ± 3.78
	80	21.40 ± 5.92	3.20 ± 4.14	7.21 ± 2.52 [#]	1.06 ± 0.44 [#]
	160	4.66 ± 3.15 [#]	0.78 ± 0.33 [#]	0.41 ± 0.26 [#]	0.51 ± 0.23 [#]

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比较: [#] $P < 0.05$ [#] $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ [#] $P < 0.01$ vs diabetic model group

于肾小球和肾小管, 对照组肾小球和肾小管 MMP-10 和 TMP-1 有弱表达, 糖尿病模型组表达明显增强 ($P < 0.01$)。流式细胞术显示糖尿病模型组 MMP-10 和 TMP-1 相对含量较对照组明显增强, 而葛根素各组与糖尿病模型组相比, 表达有不同程度的减弱, 见表 4。

3.6 IV 型胶原 LN 肾小球中表达: IV 型胶原 LN

阳性染色在肾小球主要分布于系膜区、毛细血管基膜、肾小球囊壁和肾小管基膜、肾间质中。与对照组相比, 糖尿病模型组肾小球中 IV 型胶原 LN 明显增强; 葛根素各组较糖尿病模型组表达减弱, 见表 5。

4 讨论

本实验研究证明糖尿病模型大鼠在注射链脲佐菌素 16 周后 BUN, Ccr, Up_{pro} 及肥大指数均明显高

表 4 各组大鼠 MMP-10、TMP-1 在肾脏中的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 MMP-10, TMP-1 expressions in renal tissues of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	MMP-10	TMP-1
对照	-	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
糖尿病模型	-	1.56 $\pm$ 0.10 ^{**}	1.20 $\pm$ 0.06 ^{**}
葛根素	40	1.35 $\pm$ 0.41 [#]	1.06 $\pm$ 0.04 [#]
	80	1.24 $\pm$ 0.06 [#]	1.04 $\pm$ 0.11 [#]
	160	1.15 $\pm$ 0.06 [#]	1.03 $\pm$ 0.06 [#]

与对照组比较: ^{*} $P < 0.01$;

与糖尿病模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

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

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs diabetic model group

表 5 各组肾小球中 IV 型胶原和 LN 相对含量和积分吸光度比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Comparison of relative content and integral optical density of collagen IV and LN in renal glomeruli of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	IV 型胶原		LN	
		相对含量/%	积分吸光度	相对含量/%	积分吸光度
对照	-	27.41 $\pm$ 11.57	12.47 $\pm$ 14.21	38.36 $\pm$ 3.66	38.18 $\pm$ 25.68
糖尿病模型	-	56.30 $\pm$ 14.20 [*]	154.18 $\pm$ 45.75 ^{**}	66.71 $\pm$ 6.96 [*]	833.89 $\pm$ 93.23 [*]
葛根素	40	48.51 $\pm$ 7.11	77.36 $\pm$ 56.88	31.03 $\pm$ 7.55 [#]	46.52 $\pm$ 44.44 [#]
	80	22.25 $\pm$ 8.63 [#]	10.03 $\pm$ 7.77 [#]	14.20 $\pm$ 8.02 [#]	4.83 $\pm$ 2.07 [#]
	160	11.94 $\pm$ 3.29 [#]	3.73 $\pm$ 3.73 [#]	13.06 $\pm$ 8.20 [#]	3.92 $\pm$ 2.73 [#]

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比较: [#] $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.01$ vs diabetic model group

组织结构破坏乃至肾小球硬化的关键性病理过程。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 家族是肾脏内主要的基质降解酶体系, 其表达量与活性的高低直接影响肾小球细胞外基质的表达量和局部沉积^[6]。MMP-10 属于 MMPs 家族, 它以酶原的形式释放, 由纤溶酶激活, 激活后其降解基质的活性还会受到基质金属蛋白酶组织抑制剂的调节。TMPs 与活化的 MMPs 有高度的亲和性。每种 TMP 都能在一定程度上结合和抑制 MMPs。MMP-10 可以降解基质从而引起肿瘤转移和浸润^[7,8]。Saghizadeh 等^[9]应用 RT-PCR 等方法研究糖尿病视网膜病变角膜中 MMP-10 表达, 表明糖尿病患者其 mRNA 表达明显增强, 而其 3 种组织抑制剂未见明显改变。有关 MMP-10 在糖尿病肾脏中的表达及作用, 国内外尚未见报道。本研究表明: 糖尿病肾组织 MMP-10, TMP-1 mRNA 及蛋白表达增加。

注射用葛根素由野葛根的提取物制成, 其主要成分是葡萄糖基异黄酮, 是醛糖还原酶的抑制剂, 国内近来研究表明, 黄酮类药物具有降低糖尿病病人

于正常对照组, 提示已有 DN 发生。葛根素用药组上述各项指标均有不同程度改善, 说明葛根素对糖尿病大鼠肾结构和功能具有保护作用。本实验验证, 葛根素具有明显的降血糖作用, 血糖水平下降可通过减轻糖尿病时出现的“三高”现象(高灌注压、高流量和高滤过), 从而影响肾病的发生、发展。葛根素是否直接作用于糖尿病大鼠的肾脏特别是肾小球血管而影响肾病的发生、发展, 有待进一步研究。

DN 是糖尿病微血管并发症之一, 肾小球细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积是其主要的病理改变, ECM 主要由 IV 型胶原、LN、Fibronectin 等组成, 其生理状态下处于快速更新代谢的动态平衡过程中, 该过程的失衡是导致肾小球

蛋白尿的作用。本实验葛根素用药组大鼠在血糖降低、蛋白尿减轻、肾功能改善的同时, 肾小球 MMP-10 和 TMP-1 表达明显下调, 肾小球细胞外基质沉积明显减轻, 提示葛根素有可能通过调节基质金属蛋白酶及其组织抑制剂的表达影响肾小球细胞外基质的质和量, 从而保护肾小球结构和功能。实验还发现, 16 周时右肾切除对照组肾小球基底膜有轻度增厚, 而高剂量用药组 IV 型胶原、LN 等水平较右肾切除对照组低, 提示葛根素通过改善肾脏微循环, 可能对正常老龄大鼠肾小球硬化有一定的预防作用。

实验结果表明, 葛根素可以保护糖尿病大鼠的肾小球结构和肾功能。降低血糖改善肾小球内血液动力学状况是其作用途径之一, 此外, 调节肾小球基质金属蛋白酶及其组织抑制剂的表达, 从而减轻肾小球细胞外基质的沉积也可能是其作用途径之一。

References

- [1] Han H. Effects of puerarin for injection on 36 cases of diabete [J]. A cta A cad M ed Guangzhou (广州医学院学报), 2000, 28: 75-76.
- [2] Yu ZL, Zhang G Q, Zhao H Q. Effects of puerariae iso flavone against cerebral ischemia [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 1997, 28: 310-312.

- [3] Luo Z R, Ge X B, Zheng W X, *et al* Effects of puerarin on unstable angina pectoris and its coagulant, fibrinolytic and function of endothelial cells [J]. *Chin J Intergrated Tradit West Med Intensive Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2000, 7: 105-106.
- [4] Anderson S, Rennke H G, Brenner B M. Nifedipine versus fosinopril in uninephrectomized diabetic rats [J]. *Kidney Int*, 1992, 41: 891-897.
- [5] Morkve O, Learun O D. Flow cytometric measurement of P53 protein expression and DNA content in paraffin embedded tissue from bronchial carcinomas [J]. *Cytometry*, 1991, 12: 438-441.
- [6] McClennan S V, Kelly D J, Cox A J, *et al* Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effect of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases [J]. *Diabetologia*, 2002, 45: 268-275.
- [7] Van Bilsen J H, Wagenaar-Hilbers J P, Van der Cammen J M, *et al* Successful immunotherapy with matrix metalloproteinase-derived peptides in adjuvant arthritis depends on the timing of peptide administration [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4: R2.
- [8] Mathew R, Khanna R, Kumar R, *et al* Stromelysin-2 overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma: potential clinical implications [J]. *Cancer Detect Prev*, 2002, 26: 222-228.
- [9] Saghizadeh M, Brown D J, Castellon R, *et al* Overexpression of matrix metalloproteinase-10 and matrix metalloproteinase-3 in human diabetic corneas: a possible mechanism of basement membrane and integrin alterations [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158: 723-734.

枇杷叶抗炎和止咳作用研究

王立为¹, 刘新民¹, 余世春², 肖培根¹, 杨峻山^{1*}

- (1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094;
2. 安徽省安泰医药生物技术有限责任公司, 安徽 合肥 230088)

摘要:目的 研究枇杷叶抗炎和止咳作用的有效成分, 为制定枇杷叶的质量标准提供科学可靠的实验依据。方法 采用二甲苯致小鼠耳肿胀法、二氧化硫引起小鼠咳嗽和枸橼酸喷雾致豚鼠咳嗽模型, 观察枇杷叶不同分离部分及单体成分的抗炎及止咳作用。结果 P2 和 P3 部分对小鼠耳肿胀法所致的炎症具有较好的对抗作用, 且 P2 部分具有明显的止咳作用。P2 部分中的枇杷苷 I, P3 部分中的总三萜酸和熊果酸均具有良好的抗炎、止咳效果。结论 枇杷苷 I、熊果酸和总三萜酸是枇杷叶抗炎、止咳作用的主要成分, 可作为制定枇杷叶质量标准的定量指标。

关键词: 枇杷叶; 抗炎; 止咳; 枇杷苷 I

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0174-03

Anti-inflammatory and antitussive effects of *Eriobotrya japonica*

WANG Liwei¹, LIU Xinmin¹, YU Shichun², XIAO Peigen¹, YANG Junshan¹

- (1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union of Medical College, Beijing 100094, China; 2. Anhui Antech Medicine & Biological Technology Co. Ltd., Hefei 230088, China)

Abstract: **Object** To research the active components from leaves of *Eriobotrya japonica* Thunb. on anti-inflammatory and antitussive effect for controlling its quality. **Methods** Inflammatory model induced by dimethyl benzene of ear edema in mice; tussive models induced by SO₂ in mice, and cough model induced by citric acid in guinea pigs were used to observe the anti-inflammatory and antitussive effects of different part from the leaves of *E. japonica*. **Results** Five fractions from raw materials of *E. japonica* were tested on anti-inflammatory and antitussive effects with mice and guinea pigs. The results showed that the ear edema induced by dimethyl benzene could be obviously reduced when ig P2 and P3 105 mg/kg in mice; The EJA (eribotroside I) isolated from P2, EJB (ursolic acid) and EJC (total triterpenic acid) isolated from P3 were main components on anti-inflammatory effect. P2 and P3 75 mg/kg could reduce the episodes of cough and prolong the latency of cough induced in mice by SO₂. After 1 h ig P2 105 mg/kg showed the relief effects to cough induced by citric acid in guinea pigs, and further experimental results also showed the EJA, EJB, and EJC are antagonist components to cough. **Conclusion** The EJA, EJB, and EJC isolated from the leaves of *E. japonica* are main anti-inflammatory and antitussive components. The present experimental results firstly provide strong evidence to control quality of *E. japonica*.

Key words: the leaves of *Eriobotrya japonica* Thunb.; anti-inflammation, antitussive; eribotroside I