

发现龙葵碱能够升高 Hep G2 细胞内 caspase-3 相对活性。提示龙葵碱对 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的调控是龙葵碱诱导 Hep G2 凋亡的相对于细胞内 Ca^{2+} 和 caspase 家族的上游因素。

参考文献:

- [1] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇. 龙葵活性成分的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2004, 20 (6): 638-641.
- [2] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 等. 龙葵碱对 H₂₂ 肿瘤细胞膜唾液酸和封闭度的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 79-81.
- [3] Ji Y B, Gao S Y, Ji C F, et al. Induction of apoptosis in Hep G2 cells by solanine and Bcl-2 protein [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 115(2): 194-202.
- [4] 高世勇, 季宇彬. 龙葵碱对人肝癌 Hep G2 细胞 N-乙酰基转移酶活性的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1688-1691.
- [5] 高世勇, 邹翔, 汲晨锋, 等. 龙葵碱诱导 Hep G2 细胞凋亡的观察 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2007, 23(6): 644-650.
- [6] Gao S Y, Wang Q J, Ji Y B. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in Hep G2 cell and $[Ca^{2+}]_i$ in the cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 21(6): 3359-3367.
- [7] Flangea C, Potencz E, Anghel A, et al. Bcl-2 expression in Hodgkin s lymphoma progression [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2008, 49(3): 357-363.
- [8] Mohammad R M, Goustin A S, Chen B, et al. Preclinical studies of TW-37, a new nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2, in diffuse large cell lymphoma xenograft model reveal drug action on both Bcl-2 and Mcl-1 [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(7): 2226-2235.
- [9] Ashutosh Shrivastava, Meenakshi Tiwari, Rohit A, et al. Molecular iodine induces caspase independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria mediated pathway [J]. *Biol Chem*, 2006, 281: 19762-19771.
- [10] Szuts D, Krude T. Cell cycle arrest at the initiation step of human chromosomal DNA replication causes DNA damage [J]. *Cell Sci*, 2004, 117: 4897-4908.

藏药多舌飞蓬不同提取物抗炎镇痛活性及急性毒性研究

张志锋¹, 吴春蕾¹, 刘圆¹, 张浩^{2*}

(1. 西南民族大学少数民族药物研究所, 四川成都 610041; 2. 四川大学华西药学院, 四川成都 610041)

摘要:目的 比较藏药多舌飞蓬不同提取物的抗炎镇痛活性及急性毒性的差异。方法 样品经水提取, 采用大孔吸附树脂纯化工艺, 制备多舌飞蓬不同提取物 (EM1、EM2 和 EM3); 运用角叉菜胶致小鼠足肿胀和二甲苯致耳肿胀复制炎症模型, 冰醋酸和甲醛致疼痛小鼠模型, 观察 EM1、EM2、EM3 的抗炎镇痛活性, 并比较各提取物的急性毒性。结果 多舌飞蓬不同提取物均能减轻二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀度以及角叉菜胶诱导的小鼠足肿胀程度, 均具有抑制冰醋酸所致小鼠扭体反应和甲醛所致小鼠足痛反应, 表明多舌飞蓬不同提取物均有抗炎镇痛作用; 小鼠 ig 给药 EM1 的 LD₅₀ 为原生药 137.24 g/kg, 给予 EM2 的 LD₅₀ 为原生药 287.60 g/kg, 给予 EM3 最大剂量 (原生药 1960 g/kg) 后无动物死亡。结论 大孔吸附树脂能够有效富集多舌飞蓬中具有抗炎镇痛作用的黄酮类成分, 并去除其毒性成分。

关键词:多舌飞蓬; 抗炎作用; 镇痛作用; 急性毒性

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)10-1612-03

多舌飞蓬 *Erigeron multiradiatus* (Wall.) Benth. 为菊科飞蓬属多年生草本植物, 主要分布于我国西藏、四川西部和云南西北部高原地区^[1]。在藏医药中以全草入药, 其藏药名为“美多罗米”, 《晶珠本草》记载:“美多罗米, 味苦, 清热解暑, 治瘟病时疫”^[2]; 《藏药志》云:“美多罗米, 苦、寒、无毒; 清热解暑; 治瘟病时疫、头痛、眼病等”^[3]。本课题组先前研究主要集中在多舌飞蓬的资源分布、化学成分方面^[4,5], 为了进一步筛选多舌飞蓬中的活性物质, 对多舌飞蓬总黄酮部位进行了初步的药效学和急性毒性试验, 发现多舌飞蓬具有一定的抗炎镇痛活性, 但

具有较强的急性毒性, 因此, 本课题组采用大孔树脂纯化得到不同的多舌飞蓬提取物, 运用化学法诱导小鼠炎症及疼痛等模型和急性毒性的研究方法^[6], 比较多舌飞蓬不同提取物的抗炎镇痛作用及急性毒性的差异, 为多舌飞蓬的进一步开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 药材及受试药品: 多舌飞蓬药材于 2006 年 7 月采自四川省甘孜藏族自治州炉霍县罗锅梁子, 经笔者鉴定为多舌飞蓬 *Erigeron multiradiatus* (Wall.) Benth. 的干燥全草, 标本保存于四川大学

* 收稿日期: 2009-01-19

基金项目: 西南民族大学青年重点项目 (26701601)

作者简介: 张志锋 (1973—), 男, 四川成都人, 博士, 从事药用植物的资源研究及品质评价。

Tel: (028) 85522322 Fax: (028) 85522315 E-mail: zhangzhf99@gmail.com

华西药学院标本室。多舌飞蓬提取物 (EM1):取多舌飞蓬干燥全草,粉碎成粗粉,溶媒为水,6 倍体积,加热回流 1 h,提取 3 次,合并提取液并减压浓缩干燥,粉碎即得。收率为 20.7%,比色法测定总黄酮质量分数为 21.5%。多舌飞蓬提取物 (EM2):将 EM1 未经浓缩的提取液,直接上已经预处理好的 D141 大孔吸附树脂柱,先用 5 倍柱体积水洗脱至基本无色,再用 4 倍柱体积的 70% 乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,减压浓缩干燥,粉碎即得,收率为 5.2%,总黄酮质量分数 78.4%。多舌飞蓬提取物 (EM3):将 EM2 的乙醇洗脱液,减压回收乙醇至无醇味,再上已经预处理好的 D141 大孔吸附树脂柱,先用 5 倍柱体积水洗脱至基本无色,再用 4 倍柱体积的 30% 乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,减压浓缩干燥,粉碎即得,收率为 2.8%,总黄酮质量分数 80.4%。EM1、EM2 和 EM3 临用前用 0.5% CMC-Na 配制后备用。

1.2 试剂:D141 大孔吸附树脂为成都晨光化工研究设计院产品;盐酸吗啡注射液为沈阳第一制药厂产品(批号 071201);角叉菜胶为 Sigma 产品(批号 084 K8928);强的松片为浙江仙琚制药股份有限公司产品(批号 070249);冰醋酸为成都市恒信化学试剂公司产品(批号 070622)。

1.3 动物:健康昆明种小鼠,体质量 18~22 g,由四川大学华西医学中心动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响:小鼠 96 只,雌雄各半,随机分成 8 组,每组 12 只,即对照组,阳性对照组(强的松 10 mg/kg),EM1 大、小剂量组(原生药 40、20 g/kg),EM2 大、小剂量组(原生药 40、20 g/kg)和 EM3 大、小剂量组(原生药 40、20 g/kg)。以上各组分别按 0.2 mL/10 g ig 给予药液,对照组给予等量溶剂,每天 1 次,连续 5 d。末次给药后 50 min,在各组小鼠左后足底 sc 1% 角叉菜胶生理盐水溶液 50 μL/只致炎,致炎后 4 h 处死动物,在小鼠左、右后足的长、短毛交界处剪下左、右后足分别称质量,以其左、右后足的质量差表示肿胀度,结果见表 1。

2.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响:小鼠 96 只,雌雄各半,分组同 2.1 项,以上各组分别按 0.2 mL/10 g ig 给予药液,对照组给予等量溶剂,每天 1 次,连续 5 d,末次给药后 50 min,在各组小鼠左耳均匀涂布二甲苯 30 μL/只致炎,致炎后 30 min 处死动物,用直径为 9 mm 的不锈钢冲子取下左右耳分别

称质量,以左、右耳片的质量差表示肿胀度,结果见表 1。可见,EM1、EM2 和 EM3 对角叉菜胶致小鼠足肿胀和二甲苯致小鼠耳肿胀均有不同程度的抑制作用,EM2 和 EM3 大剂量组(原生药 40 g/kg)的作用较强,与对照组比较有统计学差异($P < 0.05$ 、 0.01);而 EM1 大、小剂量组(原生药 40、20 g/kg)的作用较弱,与对照组比较无统计学差异。

表 1 多舌飞蓬各提取物对小鼠炎症模型的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Effect of extracts from *E. multiradiatus* on inflammatory model of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	足肿胀度/ mg	抑制率/ %	耳肿胀度/ mg	抑制率/ %
对照	-	90.4 ± 25.6	-	12.7 ± 4.2	-
强的松	0.01	27.6 ± 12.4 ^{***}	69.5	5.6 ± 3.8 ^{**}	55.9
EM1	20	75.4 ± 19.4	16.6	10.5 ± 5.4	17.3
	40	68.2 ± 24.3	24.6	10.3 ± 6.7	18.9
EM2	20	64.3 ± 17.5	28.9	10.7 ± 3.8	15.7
	40	55.9 ± 21.8 [*]	38.2	7.1 ± 5.9 [*]	44.1
EM3	20	62.7 ± 17.5	39.6	9.9 ± 4.3	22.0
	40	48.1 ± 21.8 ^{**}	46.8	6.3 ± 3.2 ^{**}	50.4

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

2.3 对冰醋酸诱发小鼠扭体反应的影响:小鼠 96 只,雌雄各半,随机分成 8 组,每组 12 只,除阳性对照组(盐酸吗啡 30 mg/kg)外,其余分组同 2.1 项。以上各组分别按 0.2 mL/10 g ig 给予药液,对照组给予等体积的蒸馏水,每天 1 次,连续 5 d,末次给药后 1 h,ip 0.9% 冰醋酸(10 mL/kg),盐酸吗啡组则在实验前 30 min ip 给药。并计数各小鼠在注射冰醋酸后 5~20 min 内的扭体次数。结果见表 2。可见,EM1、EM2 和 EM3 均有减少冰醋酸致小鼠扭体反应的趋势,EM2 和 EM3 各剂量组的作用均较强,与对照组比较均有统计学差异;而 EM1 大、小剂量组作用均较弱,与对照组比较均无统计学差异。

表 2 多舌飞蓬各提取物对冰醋酸致小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 2 Effect of extracts from *E. multiradiatus* on body-writhing response of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	扭体次数	抑制率/%
对照	-	15.6 ± 9.7	-
盐酸吗啡	0.03	0.7 ± 0.7 ^{***}	95.5
EM1	20	12.4 ± 6.4	20.5
	40	10.2 ± 2.9	33.3
EM2	20	7.9 ± 4.5 [*]	49.3
	40	5.4 ± 3.9 [*]	65.4
EM3	20	6.1 ± 3.7 [*]	60.9
	40	4.8 ± 2.9 ^{**}	69.3

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

2.4 对甲醛致小鼠足疼痛反应的影响:小鼠 96 只,雄性,分组方法同 2.3 项,以上各组分别按 0.2 mL/10 g ig 给予药液,对照组给予等体积的蒸馏水,每天 1 次,连续 5 d,末次给药后 50 min,在各组小鼠左后足底 sc 5% 甲醛溶液 (30 μ L/只) 后立即置入平底大玻璃容器内,观察动物足部反应(观察时间为注射后 0~5 min 和 50~55 min 两个时间段,分别为相、相反)并进行打分:舔、咬或抖足 3 分;提足 2 分;轻触底面但不负重,行走时跛行 1 分;正常负重,走动自如 0 分。结果见表 3。可见,与盐酸吗啡的作用不同,EM2 和 EM3 对甲醛所致小鼠足疼痛相减轻作用均不明显。然而相与对照组比较均有统计学差异,而盐酸吗啡的镇痛作用主要表现在相,对相反的作用不强,推测是盐酸吗啡作用时间已过,EM2 和 EM3 的作用时间主要在第 1 时相。然而,EM1 对甲醛所致小鼠足疼痛反应无明显影响,与对照组比较均无统计学差异。

表 3 多舌飞蓬各提取物对甲醛所致小鼠足疼痛的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Effect of extracts from *E. multiradiatus* on foot ache of mice induced by formaldehyde ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	0~5 min 分值	50~55 min 分值
对照	-	3.0 \pm 0	1.2 \pm 0.4
盐酸吗啡	0.03	1.0 \pm 0 ^{***}	1.0 \pm 0.0
EM1	20	3.0 \pm 0	1.3 \pm 1.1
	40	3.0 \pm 0	1.0 \pm 0.8
EM2	20	3.0 \pm 0	0.7 \pm 0.5 [*]
	40	3.0 \pm 0	0.4 \pm 0.5 ^{**}
EM3	20	3.0 \pm 0	0.6 \pm 0.4 [*]
	40	3.0 \pm 0	0.0 \pm 0.0 ^{***}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs control group

2.5 急性毒性研究:取小鼠,雌雄各半,随机分组,每组 10 只,在禁食不禁水 16 h 后按预试验结果分别 ig 不同剂量的 EM1、EM2 和 EM3。给受试药物后每日观察小鼠的行为活动、精神状态、被毛、摄食、饮水、呼吸、粪便等情况及鼻、眼、口腔有无异常分泌物,体质量变化及死亡等情况。连续观察 7 d,并记

录动物中毒症状和死亡数。死亡动物即刻尸检,肉眼观察其主要脏器变化。结果在给予 EM1 和 EM2 30 min 后,部分动物出现全身抽搐,运动功能障碍,意识不清等异常状态,直到死亡,采用 Bliss 法计算 EM1 和 EM2 的 LD₅₀ 分别为原生药 137.24、287.60 g/kg。实验结束后,解剖观察动物脏器未见明显异常。给予 EM3 最大剂量(原生药 1960 g/kg)后的小鼠,连续观察 7 d,未见任何异常状态及死亡。

3 讨论

本研究采用大孔吸附树脂富集后得到的多舌飞蓬提取物,其中柱后总黄酮质量分数明显高于柱前,随着总黄酮质量分数的提高,其抗炎镇痛作用有所增强,推测多舌飞蓬总黄酮可能是起抗炎镇痛作用的有效部位。

急性毒性实验表明多舌飞蓬提取物具有一定的急性毒性,但有关其毒性成分目前并没有相关的报道。本研究所采用的大孔树脂纯化工艺可以知道,柱后提取物的急性毒性低于柱前提取物。其中经过 2 次上柱纯化后得到的 EM3,其急性毒性明显降低。同时结果还发现,EM2 和 EM3 中总黄酮质量分数差异较小,但其急性毒性差异较大。通过 2 次纯化后,EM3 中去掉了极性较小的黄酮类成分,而富集了极性较大的黄酮类成分,因此推测这部分极性较小的黄酮可能是多舌飞蓬中具有毒性的成分,还有待进一步对该部分进行分离纯化和筛选。

参考文献:

- [1] 林 镨,陈艺林. 中国植物志 [M]. 第 74 卷,北京:科学出版社,1985.
- [2] 帝玛·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 青海:青海人民出版社,1991.
- [4] 张 浩,张志锋. 多舌飞蓬的生药学研究 [J]. 中草药, 2004, 35(3): 321-323.
- [5] 张印俊,杨培全,张 浩. 多舌飞蓬中黄酮成分的研究 [J]. 中草药, 1998, 29(12): 798-799.
- [6] 徐叔云,卞如濂. 药理实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2002.