

半夏毒针晶的致炎作用研究

朱法根¹, 史润均², 郁红礼^{1,3,4}, 吴皓^{1,3,4*}, 陶文婷¹, 宫乐¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029

2. 慈溪市中医院, 浙江 慈溪 315300

3. 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210046

4. 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210029

摘要:目的 探讨半夏毒针晶引起的刺激性炎症的机体表现及对相关炎症介质的影响。方法 采用小鼠毛细管通透性实验、小鼠腹腔炎症实验及大鼠足跖肿胀实验, 考察不同剂量半夏毒针晶的致炎效应及其量-效关系, 并测定相关炎症介质的量。结果 半夏毒针晶混悬液可使小鼠腹腔毛细血管通透性增加, 腹腔渗出液中炎症介质前列腺素 E₂ (PGE₂)、一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA) 的量增加; 亦可引起大鼠足跖肿胀, 并在一定剂量范围内表现为典型的量-效关系, 还可使大鼠致炎足跖中炎症介质 PGE₂、环氧合酶-2 (COX-2) 的量显著增加。结论 半夏毒针晶刺激性毒性在机体内表现为炎症反应。

关键词: 半夏; 半夏毒针晶; 毒性; 炎症; 炎症介质

中图分类号: R285.1; R992

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)04-0739-04

Inflammation-induced effect of toxic raphides from *Pinellia ternata*

ZHU Fa-gen¹, SHI Run-jun², YU Hong-li^{1,3,4}, WU Hao^{1,3,4}, TAO Wen-ting¹, GONG Le¹

1. College of Pharmacology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

2. Cixi City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Cixi 315300, China

3. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210046, China

4. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To study the irritating inflammation and the influence on contents of inflammatory mediators induced by the toxic raphides from *Pinellia ternata*. **Methods** The mouse capillary permeability experiment, models of peritoneal inflammation in mice and toe swelling in rats were applied to investigating the inflammatory effects of the toxic raphides from *P. ternata* at different concentration. And the content of inflammatory mediators was detected. **Results** The results showed that the suspension of the toxic raphides from *P. ternata* could enhance the capillary permeability and make the release of prostaglandin E₂ (PGE₂), nitric oxide (NO), and malondialdehyde (MDA) in peritoneal exudate increased in a dose-dependent manner. The toxic raphides from *P. ternata* also could cause toe swelling in rats and significantly increase the concentration of PGE₂ and cyclooxygenase (COX-2) in toes of rats, which showed a typical dose-response relationship in a certain dose range. **Conclusion** The toxic raphides from *P. ternata* could cause severe inflammatory toxicity *in vivo*.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; toxic raphides of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; toxicity; inflammation; inflammatory mediators

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎。自古以来, 因其味辛辣、麻舌, 具有“戟人咽”的刺激性, 被列为有毒中药。经过皮肤或黏膜接触半夏, 能产生剧烈的唇舌刺痛感、流涎、口舌肿胀、咽喉疼痛、眼结膜重

度水肿、眼睛强烈刺痛等症状^[1-3], 一般为局部反应。半夏的刺激性毒性成分为其所含的具有特殊晶型的毒针晶^[4-6], 其刺激性毒性与国外所报道的某些天南星科植物中含有的草酸钙针晶的刺激性作用非常相似, 此种毒性主要表现为炎症反应, 可造成口腔

收稿日期: 2011-09-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772785; 30973939; 81173549); “十一五”国家科技重大专项课题 (2009ZX09308-004)

作者简介: 朱法根, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制。E-mail: zhufagen315@126.com

*通讯作者 吴皓 Tel: (025)86798163 E-mail: whao5795@vip.sina.com

肿胀、结膜炎、接触性皮炎^[7-9]。研究发现半夏也可引起家兔眼结膜强烈水肿,诱发腹腔炎症反应^[1],且大量研究均表明半夏主要引起严重的黏膜刺激,但半夏对机体的刺激性表现是否与半夏毒针晶诱导的炎症反应有关尚不明确,故本实验通过几种黏膜致炎模型,研究半夏毒针晶对机体的致炎作用,深入剖析半夏的毒性表现与毒针晶致炎作用的相关性。

1 材料

1.1 药品与试剂

半夏鲜品,采自江苏省泰州高港半夏 GAP 基地,经南京中医药大学王春根教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的块茎。半夏鲜品搅碎,加水研磨混悬后,按低速分级离心法,离心速率从 500 r/min 逐级上升到 1 200 r/min,离心数次,每次 5~10 min,收集离心液和沉淀,滤过,蒸馏水洗涤数次,分离得针晶和不含针晶的沉淀粉末,真空干燥,得白色粉末,即为提取的毒针晶,为草酸钙、蛋白等组成的具有特殊晶型的复合物^[10],电镜下($\times 20\ 000$)可见针晶表面具倒刺,尖端锋利,见图 1。

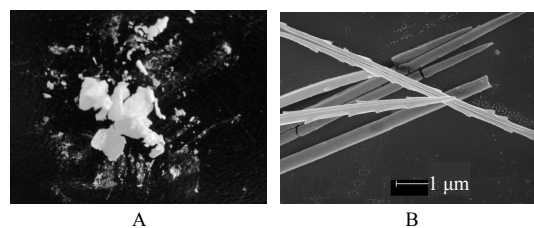


图 1 半夏毒针晶照片 (A) 及扫描电镜图 (B)

Fig. 1 Photos (A) and SEM (B) of toxic raphides isolated from *P. ternata*

伊文思蓝,美国 Sigma 公司进口分装;甲醇,色谱纯,江苏汉邦科技有限公司;前列腺素 E₂ (PGE₂) 放射免疫分析试剂盒,北京华英生物技术研究所;环氧合酶-2 (COX-2) 酶联免疫分析试剂盒,美国 R&D 公司;NO 测定试剂盒及丙二醛 (MDA) 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所。其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

ICR 小鼠,雄性,体质量 18~22 g; SD 大鼠,雄性,体质量 200~220 g,均由上海斯莱克动物有限责任公司提供,许可证号: SCXK (沪) 2007-0005。

1.3 仪器

BP211D 电子天平,德国 Sartorius 公司; SP—

754PC 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司; 80—2B 离心机,上海安亭科学仪器厂; YLS—7A 足跖容积测定仪,山东省医学科学院设备站; Stat Fax 2100 全自动酶标仪,美国 Awareness Technology 公司。

2 方法

2.1 半夏毒针晶致炎作用

2.1.1 致小鼠毛细血管通透性增加实验^[10] 小鼠 40 只随机分为 4 组 (每组 10 只): 对照组,半夏毒针晶 5、10、15 mg/kg 组。小鼠尾 iv 0.5%伊文思蓝溶液 10 mL/kg,随即对照组 iv 10 mL/kg 生理盐水,半夏毒针晶各组分别 iv 0.5、1.0、1.5 mg/mL 的半夏毒针晶生理盐水混悬液 10 mL/kg。给药 30 min 后处死小鼠, ip 5.0 mL 生理盐水,轻轻揉腹部使液体混合均匀,精密吸取腹腔内溶液 4.0 mL 于离心管中,加生理盐水至 10.0 mL,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,于 590 nm 处测定吸光度 (A) 值。

2.1.2 致小鼠腹腔炎症实验^[1, 11-12] 小鼠 60 只随机分为 6 组 (每组 10 只): 对照组,半夏毒针晶 5、10、15、30、45 mg/kg 组。对照组 ip 生理盐水,毒针晶各组分别 ip 0.5、1.0、1.5、3.0、4.5 mg/mL 的半夏毒针晶生理盐水混悬液 10 mL/kg。给药 30 min 后处死小鼠,立即给每只小鼠 ip 生理盐水 1.0 mL,轻轻揉使之混匀,在 5 min 内取出小鼠腹腔内全部溶液置离心管中,按试剂盒测定渗出液中 PGE₂ 的量。

2.1.3 致大鼠足跖炎症实验^[13] 大鼠 24 只随机分为 4 组 (每组 6 只): 对照组,半夏毒针晶 0.5、1.0、2.0 mg/kg 组。实验前在大鼠右后足踝关节处作标记,按足体积测定法测定大鼠足体积 2 次,取平均值作为大鼠给药前正常足体积。对照组每只大鼠右后足跖部 sc 生理盐水,半夏毒针晶各组在大鼠右后足跖部分别 sc 1.0、2.0、4.0 mg/mL 的半夏毒针晶生理盐水混悬液,给药体积为 0.5 mL/kg。分别于致炎后 0.5、1、2、3、4、5 h 同法测定右后足体积,计算各大鼠致炎前后右后足跖容积变化值,以肿胀度判定毒针晶的致炎效应。

肿胀度 = 给药后大鼠右足体积 - 给药前大鼠右足体积

2.2 半夏毒针晶对炎症介质的影响

2.2.1 对大鼠致炎足跖中 PGE₂、COX-2 的影响 大鼠 12 只随机分为 2 组 (每组 6 只): 对照组、半夏毒针晶 0.5 mg/kg 组。对照组大鼠右后足跖部 sc 生理盐水,半夏毒针晶组在大鼠右后足跖部 sc 0.1 mg/mL 半夏毒针晶生理盐水混悬液,给药体积为 0.5

mL/kg。于致炎后 2 h 取大鼠右足, 去除皮肤和筋膜, 取足跖皮下肌肉 100 mg, 制成 10% 组织匀浆, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按试剂盒方法测定 PGE₂、COX-2 的量。

2.2.2 对小鼠腹腔炎症渗出液中 NO、MDA 的影响 小鼠 20 只随机分为 2 组: 对照组、半夏毒针晶 20 mg/kg 组, 实验方法同“2.1.2”项。取小鼠腹腔炎症渗出液 100 μL, 按 NO 测定试剂盒说明书操作测定渗出液中 NO 的量。另取腹腔炎症渗出液 100 μL, 按 MDA 测定试剂盒说明书操作测定渗出液中 MDA 的量。

2.3 统计学方法

采用统计软件 SPSS 16.0 进行数据处理, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用方差分析, 进行方差性检验。

3 结果

3.1 半夏毒针晶致炎作用

3.1.1 致小鼠毛细血管通透性增加作用 半夏毒针晶各组小鼠毛细血管通透性与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 表明半夏毒针晶能引起使小鼠毛细血管通透性增加, 且呈剂量相关性。结果见表 1。

3.1.2 致小鼠腹腔炎症作用 半夏毒针晶各组小鼠腹腔渗出液中 PGE₂ 的量与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 表明半夏毒针晶诱发炎症。半夏毒针晶剂量 5~45 mg/kg 时, 呈线性量-效关系, 以半夏毒针晶剂量为横坐标 (*X*), PGE₂ *A* 值为纵坐标 (*Y*), 量-效曲线为 $Y = 0.059\ 6\ X + 0.271\ 4$, $r = 0.977$ 。结果见表 2。

3.1.3 致大鼠足跖炎症作用 半夏毒针晶注入大鼠足跖 0.5 h 后, 大鼠足跖明显肿胀, 与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 2~3 h 肿胀度值最高 ($P < 0.01$), 表明半夏毒针晶引起大鼠足跖明显肿胀并持续较长时间。结果见图 2。

表 1 半夏毒针晶对小鼠毛细血管通透性的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of toxic raphides from *P. ternata* on capillary permeability of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	<i>A</i> 值
对照	—	0.013 ± 0.003
半夏毒针晶	5	0.235 ± 0.041**
	10	0.301 ± 0.036**
	15	0.391 ± 0.039**

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 下表、图同

** $P < 0.01$ vs control group; same as below

表 2 半夏毒针晶对小鼠腹腔渗出液中 PGE₂ 的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of toxic raphides from *P. ternata* on contents of PGE₂ in peritoneal exudate of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	<i>A</i> 值	PGE ₂ / (mg·L ⁻¹)
对照	—	0.104 ± 0.018	6.84 ± 1.18
半夏毒针晶	5	0.337 ± 0.029**	22.16 ± 1.90**
	10	0.397 ± 0.105**	26.11 ± 4.91**
	15	0.444 ± 0.113**	29.19 ± 3.21**
	30	0.479 ± 0.094**	31.50 ± 4.18**
	45	0.594 ± 0.198**	39.06 ± 3.03**

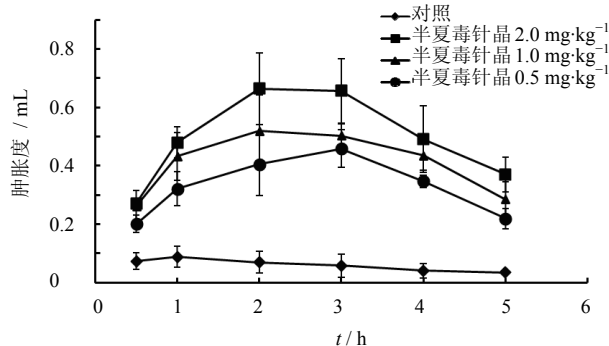


图 2 半夏毒针晶致大鼠足跖肿胀的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Toe swelling rates in rats induced by toxic raphides from *P. ternata* ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.2 半夏毒针晶对炎症介质的影响

3.2.1 对大鼠致炎足跖中 COX-2 和 PGE₂ 的影响 大鼠右足跖皮下注射半夏毒针晶后, 炎足中 PGE₂ 的量显著增加, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), 表明半夏毒针晶引起的大鼠足跖肿胀可能与其诱导 PGE₂ 和 COX-2 的合成与释放有关。结果见表 3。

3.2.2 对小鼠腹腔炎症渗出液中 NO 和 MDA 的影响 小鼠 ip 半夏毒针晶后, 腹腔渗出液中 NO 与 MDA 的量显著增加, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), 表明半夏毒针晶引起小鼠腹腔炎症可能与其增加 NO 与 MDA 的合成和释放有关。结果见表 4。

表 3 半夏毒针晶对大鼠炎症足跖中 COX-2 和 PGE₂ 的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of toxic raphides from *P. ternata* on contents of COX-2 and PGE₂ in inflammatory toes of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	COX-2 / (pg·mg ⁻¹)	PGE ₂ / (pg·mg ⁻¹)
对照	—	3.73 ± 0.74	3.55 ± 1.25
半夏毒针晶	0.5	8.99 ± 3.78**	11.91 ± 5.21**

表4 半夏毒针晶对小鼠腹腔渗出液中NO和MDA的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of toxic raphides from *P. ternata* on contents of NO and MDA in peritoneal exudate of mice
($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	NO / (μmol·L ⁻¹)	MDA / (nmol·mL ⁻¹)
对照	—	21.39 ± 6.69	1.27 ± 0.54
半夏毒针晶	20	48.67 ± 9.40**	4.81 ± 1.31**

4 讨论

急性炎症是机体对于损伤因子作出的立即和早期反应, 主要以血流动力学改变、血管通透性增高和白细胞渗出为特征, 表现为组织肿胀, 毛细血管扩张、通透性增加, 富含蛋白质的渗出液积聚, 中性粒细胞趋化和游走以及炎症介质释放^[12]。因此本实验选择小鼠毛细血管通透性实验、小鼠腹腔炎症实验和大鼠足跖肿胀实验3个炎症模型, 研究半夏毒针晶的刺激性毒性。结果表明, 半夏毒针晶可引起小鼠毛细血管通透性显著增加, 腹腔渗出液中炎症介质PGE₂急剧增高并呈剂量相关性, 也可引起大鼠足跖肿胀发炎, 证实半夏在机体的毒性表现为急性炎症反应。

急性炎症与机体中炎症介质的释放密切相关。COX-2是一种诱导酶, 当机体发生炎症时COX-2的生成增加, 诱导前列腺素(PG)大量合成和释放, 尤其PGE₁和PGE₂可趋化、激活炎症细胞, 增强血管通透性, 致血管扩张和组织水肿, 也与缓激肽等协同致炎^[14]。因此, COX-2与PGE₂在炎症过程中起重要作用。在本实验中, 大鼠右足跖sc半夏毒针晶后, 致炎足跖中COX-2、PGE₂的量显著增加, 表明半夏毒针晶可诱导COX-2生成, 从而促使PGE₂的大量合成、分泌, 诱发炎症。

机体发生炎症时, 局部产生大量的氧自由基, MDA的量可间接反映组织受自由基损伤的程度。本实验结果表明, 半夏毒针晶能显著增加腹腔渗出液中NO、MDA的量, 提示其也可通过激活炎症急性期的NO、MDA的大量产生而产生致炎作用。

半夏毒针晶的结构极为特殊, 它细长、质地柔韧, 具倒刺、凹槽, 两端尖而锋利, 可刺入机体产生毒性。半夏毒针晶中除含有草酸钙外, 还主要含蛋白类成分。本课题组前期研究证明半夏毒针晶蛋

白中主要含有半夏凝集素蛋白^[15]。半夏凝集素可诱导大鼠腹腔中性粒细胞迁移, 引起炎症反应^[15-16]。本实验亦通过多种炎症模型表明半夏毒针晶可诱导机体产生强烈的炎症刺激, 刺激性毒性可能与半夏毒针晶诱导炎症介质产生有关, 但具体毒性机制仍需深入研究。

参考文献

- [1] 吴皓, 季睿, 邱鲁婴, 等. 半夏刺激性(动物实验)量化指标的研究[J]. 中成药, 2000, 22(6): 419-421.
- [2] 中医研究院中药研究所药理室、生药室炮制组. 半夏炮制的毒性研究[J]. 新医药杂志, 1997(7): 38-40.
- [3] 罗国亮. 半夏的毒性及临床应用[J]. 中草药, 1999, 30(2): 156.
- [4] 吴皓, 李伟, 韩洪滔, 等. 半夏刺激性成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(12): 725-730.
- [5] 钟凌云, 吴皓, 张科卫, 等. 生半夏中草酸钙针晶的刺激性作用研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1706-1710.
- [6] 吴皓, 钟凌云. 天南星科有毒中药的刺激性作用的比较[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 380-384.
- [7] Seet B, Chan W K, Ang C L. Crystalline keratopathy from *Dieffenbachia* plant sap [J]. *Br J Ophthalmol*, 1995, 79(1): 98-99.
- [8] Lin T J, Hung D Z, Hu W H, et al. Calcium oxalate is the main toxic component in clinical presentations of *Alocasis macrorrhiza* (L.) Schott and Endl poisonings [J]. *Vet Hum Toxicol*, 1998, 40(2): 93-98.
- [9] Hsueh K F, Lin P U, Lee S M, et al. Ocular injuries from plant sap of genera *Euphorbia* and *Dieffenbachia* [J]. *J Chin Med Assoc*, 2004, 67(2): 93-98.
- [10] 葛秀允, 吴皓. 天南星科有毒中药毒针晶的组成成分分析[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2): 190-193.
- [11] 魏伟, 李晓辉, 张洪泉, 等. 抗炎免疫药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [12] 史闰均, 吴皓, 郁红礼, 等. 生姜解半夏毒的研究-生姜汁对半夏毒针晶所致炎症反应的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(4): 42-44.
- [13] 黄秋菊, 季晖, 赖宜生. ZLJ2601 抗炎作用及其机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2008, 34(4): 333-337.
- [14] 杨世杰. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [15] 郁红礼. 半夏及掌叶半夏毒针晶中化学刺激性毒性成分研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [16] 郁红礼, 朱法根, 吴皓. 半夏及掌叶半夏毒针晶中共性毒蛋白的研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1037-1042.