

四倍体金银花水提物抗炎作用和急性毒性实验研究

胡璇^{1,2}, 李卫东^{2,3*}, 张硕峰^{2*}, 李欧², 郝江波^{2,3}, 莫愁^{2,3}

1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室, 海南 儋州 571737

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

3. 北京中医药大学 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102

摘要: 目的 对四倍体金银花水提物的抗炎作用以及急性毒性进行评价。方法 以二倍体金银花为对照, 分别采用角叉菜胶诱导大鼠足肿胀实验、大鼠棉球肉芽肿实验对四倍体金银花水提物进行抗炎活性评价; 采用 Bliss 法测定小鼠的半数致死量(LD₅₀) 对其进行急性毒性评价。结果 四倍体金银花水提物具有明显的抗急性炎症作用, 与亲本二倍体金银花之间抗炎作用差异不具有统计学意义, 2 个种质均不具有明显的抗亚急性炎症作用。四倍体和二倍体金银花水提物 ig 给药对小鼠的 LD₅₀ 值分别为 72.12、69.92 g/kg, 急性毒性差异不明显, 分别相当于人体(体质量 60 kg) 安全用量的 412 和 400 倍。结论 四倍体金银花水提物具有明显的抗急性炎症作用, 在一定剂量范围内使用较为安全。

关键词: 金银花; 四倍体; 二倍体; 抗炎作用; 急性毒性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)11-1649-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.11.016

Experimental study on anti-inflammatory effects and acute toxicity of aqueous extract from tetraploid *Lonicerae Flos*

HU Xuan^{1,2}, LI Wei-dong^{2,3}, ZHANG Shuo-feng², LI Ou², HAO Jiang-bo^{2,3}, MO Chou^{2,3}

1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou 571737, China

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

3. Engineering Research Center of Good Agricultural Practice for Chinese Crude Drugs, Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To evaluate the anti-inflammatory effects and acute toxicity of the aqueous extract from tetraploid *Lonicerae Flos*. **Methods** Compared with the diploid, the paw swelling of rats induced by carrageenan and cotton pellet granuloma tests were obtained to study the anti-inflammatory effects of the tetraploid *Lonicerae Flos*. A pretest was used to judge the possibility of LD₅₀ in the acute toxicity test. The experimental data are calculated LD₅₀ on mice by Bliss method to evaluate the acute toxicity of the diploid *Lonicerae Flos*. **Results** The tetraploid *Lonicerae Flos* had the significant resistance to acute inflammation, but there was not significance between the two ploidies. Neither the tetraploid nor the diploid had the obvious subacute inflammation resistance effects. The possibility of measuring LD₅₀ was definite through pre-test. The LD₅₀ of the aqueous extract from the two ploidies were 72.12 and 69.92 g/kg, respectively. However, there was no obvious difference in acute toxicity between the two ploidies. And the LD₅₀ of mice was equal to 412 and 400 times of 60 kg normal human's daily dried medicinal herb expenses respectively. **Conclusion** The tetraploid *Lonicerae Flos* has the significant anti-inflammation with less toxic and side effect. It could be used safely in a certain dose range.

Key words: *Lonicerae Flos*; tetraploid; diploid; anti-inflammation; acute toxicity

金银花 *Lonicerae Flos* 为忍冬科(Caprifoliaceae) 带初开的花, 性味甘、寒^[1]。其具有清热解毒、凉植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或 散风热之功效, 主治痈肿疔疮、丹毒、喉痹、风热

收稿日期: 2014-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370360)

作者简介: 胡璇(1986—), 女, 硕士, 研究方向为南药资源综合利用。Tel: (0898)23301253 E-mail: mchuxuan@163.com

*通信作者 李卫东(1970—), 副研究员, 硕士生导师。Tel: (010)84738334 E-mail: liweidong2005@126.com

张硕峰(1969—), 硕士生导师。Tel: (010)84738627 E-mail: shuofengzhang@sina.com

感冒、热毒血痢、温病发热^[2]。金银花是重要的大宗药材,也是重要的药食两用药材,广泛应用于医药、食品、日化用品等领域,特别是在抗击非典型肺炎中发挥了重要作用。

为开辟金银花新药源,以二倍体金银花“大毛花”为亲本,采用秋水仙素诱导培育而成了四倍体金银花“九丰一号”,并通过了国家级品种审定。四倍体金银花具有产量高^[3]、品质优、抗逆性强、采摘省工^[4-5]等优势,已在全国大面积推广种植。前期研究表明,四倍体金银花中绿原酸和木犀草苷的量显著高于二倍体金银花^[6],但是,目前缺乏其药效学和相关安全性评价研究。已获得的大部分多倍体药材如丹参^[7]、天山雪莲^[8]、白术^[9]、板蓝根^[10]等是从产量和化学的角度对药材进行分析评价,目前缺少多倍体药材药效和毒性研究。本研究选择四倍体金银花为受试药物,以二倍体金银花为对照药材,对四倍体金银花水提物的抗炎作用和急性毒性进行评价,探究四倍体金银花临床应用的可能性和安全性。

1 材料

1.1 药材

以山东平邑九间棚基地种植的四倍体金银花“九丰一号”品种为受试药材,以二倍体金银花“大毛花”品种为对照药材,同期分别采集2个品种的第1茬二白期鲜花蕾,鲜花蕾采用滚筒杀青烘干加工方法干燥^[7],样品由北京中医药大学李卫东副研究员鉴定均为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。

1.2 动物

清洁级SD大鼠,雄性,体质量180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2007-0001。清洁级ICR小鼠,雌雄各半,体质量18~22 g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,合格证号SCXK(京)2011-0004。

1.3 药品和试剂

醋酸地塞米松片,天津太平洋制药有限公司提供,批号1110020;庆大霉素,上海现代哈森(商丘)药业有限公司提供,批号10040512;角叉菜胶, Sigma公司提供,批号127H1227;棉球,每个50 mg,高压灭菌,加入庆大霉素0.1 mL,50℃烘箱烤干。

2 方法

2.1 金银花提取物的制备

取四倍体金银花药材500 g,用20倍蒸馏水浸

泡静置40 min后煎煮30 min,用4层纱布滤过,滤渣再煎煮30 min,纱布滤过后合并滤液,煎液减压浓缩至含生药0.595 g/mL,置于冰箱备用,临用前稀释。取二倍体金银花对照药材500 g,同样方法制备水提物。

急性毒性实验受试和对照药材制备方法同前,但受试药材浓缩至混悬液含生药1.85 g/mL,确定为小鼠ig给药的最大质量浓度。对照药材浓缩至混悬液含生药2 g/mL。

2.2 角叉菜胶致大鼠足肿胀实验^[11]

取SD大鼠78只,随机分成6组,分别为模型组,阳性对照组,四倍体金银花水提物高、低剂量(2.97、1.44 g/kg)组,二倍体金银花水提物高、低剂量(2.97、1.44 g/kg)组,每组13只。模型组ig给予等量的蒸馏水,阳性对照组ig给予醋酸地塞米松溶液0.5 mg/kg,四倍体金银花提取物组和二倍体金银花水提物组分别ig给予相应剂量的提取物,各组每天给药1次,连续5 d。于末次给药后1 h,在每只大鼠右后足跖部皮内注射1%角叉菜胶0.1 mL,分别于致炎后1、2、4、6 h用软皮尺测量右后足跖周长,并测量左后足跖相应部位的周长,计算肿胀率。

肿胀率=(右后足跖周长-左后足跖周长)/左后足跖周长

2.3 大鼠棉球肉芽肿增生实验^[12]

大鼠分组和给药剂量、途径同“2.2”项。各组大鼠用水合氯醛麻醉,在无菌条件下于腹部正中作一开口,用止血钳剥离皮肤至腹股沟处,将预先高压灭菌并加入庆大霉素0.1 mL的50 mg棉球植入腹股沟处。待动物清醒后开始给药,连续14 d。末次给药后1 h,脱颈椎处死大鼠,剥离并取出棉球肉芽肿组织,置于电子天平上称质量,即为棉球肉芽肿湿质量,将棉球肉芽肿置于110℃烘箱中,干燥48 h,取出称量即为棉球肉芽肿干质量。分别用棉球肉芽肿湿质量或干质量减去原棉球质量即为肉芽肿质量。

2.4 急性毒性实验^[13]

取小鼠100只,雌雄各半,随机分为10组,1~5组为不同剂量的四倍体金银花水提物组,给药剂量分别为90.80、75.67、62.06、52.55、43.79 g/kg,6~10组为不同剂量的二倍体金银花水提物组,给药剂量分别为83.33、69.44、57.87、48.22、40.19 g/kg,给药体积均为小鼠最大给药量。给药前,小鼠禁食12 h(自由饮水),于次日上午ig给药1次,

常规饲养,连续观察 14 d,记录动物的毒性反应和死亡情况。在给药 14 d 后处死所有小鼠,肉眼观察小鼠主要脏器的变化,发现病变情况需要做组织病理学检查。

2.5 统计学方法

抗炎实验各组实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;急性毒性实验中半数致死剂量 (LD_{50}) 采用 Bliss 法进行计算。

3 结果

3.1 对角叉菜胶致大鼠足肿胀的影响

由表 1 可知,四倍体、二倍体金银花水提取物各剂量组在多个时间点可明显减轻大鼠的足肿胀程度。其中四倍体金银花水提取物高剂量组在致炎后 2、4、6 h,低剂量组在致炎后 1、4、6 h 作用明显,与模型组比较,大鼠足肿胀率明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。二倍体金银花水提取物高、低剂量组在致炎

后各时间点作用明显,与模型组比较,大鼠足肿胀率明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。四倍体金银花水提取物和二倍体金银花水提取物各组之间差异不显著。

3.2 对大鼠棉球肉芽肿增生的影响

由表 2 可知,四倍体和二倍体金银花水提取物各剂量组对大鼠棉球肉芽肿干、湿质量无明显影响。四倍体和二倍体金银花水提取物各剂量组间肉芽肿干、湿质量差异不显著。

3.3 急性毒性反应及 LD_{50} 测定结果

四倍体和二倍体金银花水提取物各剂量组 ig 给药后小鼠活动量减少,食欲减弱,出现便溏现象,约 15 h 后恢复正常。动物死亡主要发生在 48 h 内,对死亡动物进行尸检,裸眼下观察心、肺、肝、肾、脾、胸腺等重要器官,无明显异常。对存活下来的小鼠连续观察 14 d,情况良好,未出现其他毒性反应情况,死亡情况也未继续发生。给药 14 d 后,处

表 1 四倍体和二倍体金银花水提取物对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

Table 1 Effects of aqueous extract from tetraploid and diploid *Lonicerae Flos* on paw swelling of rats induced by carrageenan ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	致炎后不同时间点大鼠足肿胀率/%			
		1 h	2 h	4 h	6 h
模型	—	30.3 ± 7.8	38.7 ± 5.9	42.8 ± 10.3	45.4 ± 15.9
地塞米松	0.000 5	18.9 ± 9.9**	28.2 ± 7.7**	28.3 ± 8.1**	24.1 ± 7.0**
四倍体金银花	2.97	22.6 ± 11.7	26.1 ± 12.9**	29.2 ± 11.9**	29.3 ± 14.7*
	1.44	17.3 ± 8.0**	36.9 ± 11.1	31.1 ± 11.2*	22.1 ± 9.4**
二倍体金银花	2.97	14.8 ± 10.7**	22.5 ± 10.4**	27.0 ± 10.4*	29.0 ± 14.9*
	1.44	14.7 ± 10.4**	26.9 ± 10.9**	24.8 ± 13.3**	31.2 ± 16.2*

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 2 四倍体和二倍体金银花水提取物对大鼠棉球肉芽肿质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

Table 2 Effects of aqueous extract from tetraploid and diploid *Lonicerae Flos* on granuloma quality of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肉芽肿湿质量/mg	肉芽肿干质量/mg
模型	—	725.7 ± 74.9	148.8 ± 24.0
地塞米松	0.000 5	491.6 ± 85.7**	91.6 ± 18.4**
四倍体金银花	2.97	743.2 ± 102.9	150.1 ± 19.5
	1.44	750.2 ± 62.1	151.8 ± 11.9
二倍体金银花	2.97	703.1 ± 99.8	143.7 ± 20.2
	1.44	737.8 ± 107.1	151.5 ± 19.9

死所有小鼠,肉眼观察其内脏组织均未见明显异常,统计各剂量组的死亡率,通过 Bliss 软件计算四倍体和二倍体金银花水提取物的 LD_{50} 分别为 72.12、69.92 g/kg, 95%可信限分别为 64.83~82.93、62.13~84.99 g/kg, 差异不显著。结果见表 3。

4 讨论

多倍体植物作为新药用植物资源药材在使用前,需要进行有效性和安全性评价。药用植物加倍后会导致化学组分和有效成分量的变化,研究报道,在相同剂量下,四倍体丹参比二倍体丹参有较强的改善微循环及增加微血管口径的作用,而对毛细血管开放数的影响两者无明显差异^[14]。但是目前关于多倍体的毒性研究未见报道。

表3 四倍体和二倍体金银花水提物对小鼠急性毒性结果
Table 3 Results of aqueous extract from tetraploid and diploid *Lonicerae Flos* on LD₅₀ of mice

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	对数剂量	死亡数/ 只	死亡率/ %
四倍体金银花	90.80	1.958 1	8	80
	75.67	1.878 9	6	60
	62.06	1.792 8	3	30
	52.55	1.720 6	1	10
	43.79	1.641 4	0	0
二倍体金银花	83.33	1.920 8	7	70
	69.44	1.841 6	5	50
	57.87	1.762 5	3	30
	48.22	1.683 2	1	10
	40.19	1.604 1	0	0

本实验采用了急性和亚急性炎症动物模型,对四倍体金银花水提物的抗炎作用进行了探讨。研究表明,四倍体金银花与二倍体金银花水提物在多个时间点均能有效抑制大鼠角叉菜胶足跖肿胀,对急性渗出性炎症均有明显抑制作用,但是2个种质之间差异不具有统计学意义,二者对慢性炎症的肉芽组织增生均无明显抑制作用。本研究表明,四倍体金银花在急性渗出性炎症方面能够应用于临床。二倍体金银花水提物高、低剂量组在致炎后1 h后有明显抑制作用,而四倍体金银花水提物只有低剂量组在致炎后1 h有明显抑制作用,表明在相同剂量下,四倍体和二倍体产生抑制作用的时间点是有差异的,这种差异有待于进一步研究。

急性毒性实验中四倍体和二倍体金银花水提物均未使小鼠有明显临床中毒表现,但是出现死亡现象,通过预试验判断存在LD₅₀。采用Bliss法计算四倍体和二倍体金银花水提物的LD₅₀,两者的95%可信区间范围较窄,方法精确度高。四倍体金银花水提物LD₅₀值为生药72.12 g/kg,按《中国药典》2010年版规定金银花人体日用量为6~15 g^[1],按60 kg体质量算,相当于人体安全用量的412倍,二倍体金银花水提物LD₅₀值为69.92 g/kg,相当于人体用量的400倍,两者急性毒性相当,没有显著差异。一般按体质量计算,小鼠最大给药量相当于成人临床日用量100倍以上则认为是较为安全的^[15]。本研究认

为,四倍体金银花在一定剂量内使用是安全的。

本实验结果表明四倍体金银花抗炎作用与急性毒性同亲本二倍体金银花比较,并无显著差异,为四倍体金银花的开发利用提供了初步的药效学和毒理学基础,其临床应用有效性及安全性尚需深入探讨。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 徐 晖. 金银花药理作用研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(9): 148-149.
- [3] 谭 忠, 沈 华, 徐常青, 等. 四倍体金银花新品种九丰一号的特征特性 [J]. 作物杂志, 2005(1): 55.
- [4] Li W D, Biswas D K, Xu H, *et al.* Photosynthetic responses to chromosome doubling in relation to leaf anatomy in *Lonicera japonica* subjected to water stress [J]. *Funct Plant Biol*, 2009, 36(9): 783-792.
- [5] Li W D, Hu X, Liu J K, *et al.* Chromosome doubling can increase heat tolerance in *Lonicera japonica* as indicated by chlorophyll fluorescence imaging [J]. *Biol Planta*, 2011, 55(2): 279-284.
- [6] 胡 璇, 李卫东, 李 欧, 等. 滚筒杀青烘干加工方法对四倍体金银花药材质量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2554.
- [7] 朱丹妮, 高山林, 蔡朝晖, 等. 丹参多倍体株系中三种丹参酮含量的比较 [J]. 药物生物技术, 1996, 3(1): 22-26.
- [8] 张蜀敏, 王晓军, 陈建业. 天山雪莲二倍体与四倍体总黄酮含量的测定与比较 [J]. 当代医学, 2009, 15(33): 46.
- [9] 唐 宁, 高山林, 白术同源四倍体株系的鉴定和有效成分的含量测定 [J]. 药物生物技术, 2006, 13(2): 102-106.
- [10] 李 彬, 陈万生, 郑水庆, 等. 四倍体板蓝根中的两个新生物碱 [J]. 药学报, 2000, 35(7): 508-510.
- [11] 肖翔林, 陈文瑛, 李 薇. 通窍止咳液口鼻给药抗炎作用的研究 [J]. 广东药学院学报, 2007, 23(2): 180-181.
- [12] 祝司霞. 复方囊立消胶囊抗炎镇痛作用的实验研究 [J]. 山西中医学院学报, 2008, 9(5): 12-13.
- [13] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [14] 朱丹妮, 高山林, 卞云云, 等. 丹参四倍体优良品系有效成分的含量测定及药理学实验 [J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(2): 7-10.
- [15] 姜放军. 湘蕾金银花提取物体外抑菌及抗氧化作用研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.