

紫花地丁抗炎作用及机制研究

李艳丽¹, 胡彦武^{2*}

(1. 长春中医药大学针灸推拿学院, 长春 130117;
2. 通化师范学院制药与食品科学系, 吉林 通化 134002)

[摘要] 目的:观察紫花地丁水提物及醇提物的抗炎作用,并分析其抗炎机制。方法:取 ICR 小鼠随机分模型对照组,布洛芬组(0.08 g·kg⁻¹),紫花地丁水提物高、低剂量(9.0,3.0 g·kg⁻¹)组,紫花地丁醇提物高、低剂量(9.0,3.0 g·kg⁻¹)组,每天 1 次,连续 ig 给药 7 d,末次给药 30 min 后,采用二甲苯致小鼠耳肿胀法和角叉菜胶致小鼠足肿胀法观察抗炎作用,并采用紫外分光光度法和酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测炎症组织中前列腺素 E₂(PGE₂,prostaglandin E₂)和血清中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)的含量,探讨抗炎作用机制。结果:紫花地丁水提物及醇提物各剂量组(9.0,3.0 g·kg⁻¹)对二甲苯致小鼠耳肿胀及角叉菜胶致小鼠足肿胀均具有显著的抑制作用,与模型对照组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$);并可不同程度降低角叉菜胶致炎小鼠血清 TNF- α ,IL-1 β 及炎症组织中 PGE₂ 含量,高剂量组(9.0 g·kg⁻¹)的作用显著,与模型对照组的差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论:紫花地丁水提物及醇提物均具有显著的抗炎作用,其抗炎作用机制可能与降低 TNF- α ,IL-1 β 及 PGE₂ 的表达有关。

[关键词] 紫花地丁; 抗炎; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-1 β ; 前列腺素 E₂

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0244-04

Studies on Anti-inflammatory Effects and Mechanism of *Viola yedoensis*

LI Yan-li¹, HU Yan-wu^{2*}

(1. College of Acupuncture and Tuina, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;
2. Department of Pharmaceutics and Food Science, Tonghua Teachers College, Tonghua 134002, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-inflammatory effects of *Viola yedoensis*, and analyze the mechanism. **Method:** The models of ear edema induced by xylene and paw edema induced by carrageenan in mice were used to observe the anti-inflammation effects, the spectrophotometric method and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used separately to measure the content of prostaglandin E₂ (PGE₂) in inflammatory tissue and the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) in serum. **Result:** Compared with the model control group, the aqueous extraction and alcohol extraction of *V. yedoensis* (9.0, 3.0 g·kg⁻¹) could significantly inhibit the inflammation caused by xylene or carrageenan ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), and decreased the content of PGE₂ in inflammatory tissue and the content of TNF- α , IL-1 β in serum of the mice. induced by carrageenan. There were significant difference between the high dose group (9.0 g·kg⁻¹) and the model control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The aqueous extraction and alcohol extraction of *V. yedoensis* have significant anti-inflammation effects, which may be related to the inhibition of the generation of TNF- α , IL-1 β and PGE₂.

[Key words] *Viola yedoensis*; anti-inflammatory; TNF- α ; IL-1 β ; PGE₂

紫花地丁是堇菜科植物紫花地丁的干燥全草, 具有清热解毒、凉血消肿、消痈散结之功效,临床适

[收稿日期] 20120615(011)
[第一作者] 李艳丽, 硕士, 实验师, Tel:13578942259, E-mail:liyl_l@163.com
[通讯作者] * 胡彦武, 硕士, 讲师, 从事生药有效成分的分离鉴定及生物活性研究, Tel:13844545298, E-mail:hywcz@163.com

用于疮疡肿毒、红肿热痛、毒蛇咬伤等病症的治疗^[1-2]。目前对紫花地丁的现代研究主要集中在化学成分方面,而对其与功效主治相关的药理作用及作用机制方面的研究报道较少。本文以紫花地丁水提物及醇提物为研究对象,运用现代药理学方法对其抗炎作用及机制进行了研究,以期为紫花地丁的临床应用提供理论及试验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 紫花地丁生药材,由长春中医药大学附属医院中药房提供,经长春中医药大学王朝辉副教授鉴定为堇菜科植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的干燥全草;布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司生产,批号 11090665),二甲苯(汕头市光华化学厂,批号 20100615),角叉菜胶(Sigma 公司,批号 088K0121),氢氧化钾(重庆川东化工有限公司化学试剂厂,批号 20100608),甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号 110506),乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号 100628),小鼠肿瘤坏死因子- α 试剂盒(TNF- α)及白介素-1 β (IL-1 β)试剂盒(均为南京建成生物工程研究所,批号分别为 110804,110826)。

1.2 动物 ICR 小鼠,体质量 18~22 g,由长春高新医学动物实验中心提供,动物许可证号 SCXK(吉)2003-0004。

1.3 仪器 MP21001 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品],PV-200 足趾容积测量仪(成都泰盟科技有限公司产品),TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),RT-6000 酶标仪(美国 Rayto 雷杜公司)。

2 方法

2.1 紫花地丁水提物的制备^[3] 将紫花地丁粉碎成粗粉,取粗粉 100 g,纱布包裹,以 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h,武火煮沸,继以文火煎煮 1 h,过滤,同法煎煮 2 次,合并滤液,浓缩成浸膏,并浓缩至 100 mL(1 mL 水提物溶液含 1 g 生药),制成紫花地丁水提物,置 4 ℃ 的冰箱保存,临用时浓缩或稀释成相应浓度。

2.2 紫花地丁醇提物的制备^[3] 将紫花地丁粉碎成粗粉,取粗粉 100 g,以 10 倍量 95% 乙醇加热回流提取 1 h,过滤,同法提取 3 次,合并滤液,浓缩成浸膏,用 0.5% 的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液定容至 100 mL(1 mL 醇提物溶液含 1 g 生药),制成紫花地丁醇提物,置 4 ℃ 的冰箱保存,临用时浓缩或稀释成相应浓度。

2.3 小鼠给药剂量设计及理由^[4-5] 小鼠临床等效量(按照成人每日临床用量 20 g 计算)为:(20 g 生药/60 kg) $\times$ 70 kg $\times$ 0.002 6/0.02 kg = 3.0 g $\cdot$ kg⁻¹;以此临床等效量作为小鼠的给药低剂量(经过预试验),并以此剂量的 3 倍作试验时的高剂量,即低剂量 3.0 g $\cdot$ kg⁻¹,高剂量 9.0 g $\cdot$ kg⁻¹。

2.4 紫花地丁提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响^[6] 取小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为 6 组,每组 10 只,即模型对照(蒸馏水)组,阳性对照药(布洛芬)组,紫花地丁水提物高、低剂量[9.0,3.0 g $\cdot$ kg⁻¹(生药)]组,紫花地丁醇提物高、低剂量[9.0,3.0 g $\cdot$ kg⁻¹(生药)]组,紫花地丁水提物及醇提物各剂量组分别给予不同浓度的药液,阳性对照药组给予布洛芬 0.08 g $\cdot$ kg⁻¹,模型对照组给予同体积蒸馏水,ig,连续 7 d。末次给药 30 min 后,于各鼠右耳均匀涂抹二甲苯 50 μ L/只,左耳不涂作为对照,致炎 30 min 后脱臼处死小鼠,剪下双耳廓,用直径 8 mm 的打孔器在双耳同一位置打下耳片,并称其质量,计算肿胀度和肿胀抑制率。

肿胀度 = 右耳片质量 - 左耳片质量

肿胀抑制率 = (模型对照组平均肿胀度 - 给药组平均肿胀度) / 模型对照组平均肿胀度 $\times$ 100%

2.5 紫花地丁提取物对角叉菜胶所致小鼠足肿胀的影响^[7] 分组及给药同 2.4,末次给药前测量并记录各鼠右后足容积,末次给药 30 min 后,于各鼠右后足跖皮下注射 0.1% 角叉菜胶生理盐水溶液 0.1 mL,并于致炎后的 0.5, 1, 1.5, 2 h 分别测量并记录各鼠右后足容积,并计算各时间点肿胀率。

肿胀率 = (致炎后足容积 - 致炎前足容积) / 致炎前足容积 $\times$ 100%

致炎后 4 h,摘眼球取血后脱臼处死小鼠。自踝关节下剪下右后足跖,剥皮剪碎后放入装有 3 mL 生理盐水的试管中浸泡 1 h,以 3 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心血液和炎性组织标本浸泡液 15 min,分离血清及炎性组织标本上清液,置于 -70 ℃ 冰箱保存备用。

2.6 角叉菜胶致炎小鼠足跖炎性组织中 PGE₂ 含量测定^[8] 取 2.5 中足跖标本上清液 0.3 mL,加入 2 mL 0.5 mol $\cdot$ L⁻¹ KOH,于 50 ℃ 水浴下温育 20 min 后,加入 2.5 mL 甲醇。于 278 nm 波长下测定吸光度(A),以每克炎性组织相当的 A 表示 PGE₂ 的含量。

2.7 角叉菜胶致炎小鼠血清 TNF- α , IL-1 β 含量测定^[8] 取 2.5 中血清,以酶联免疫吸附法(ELISA)法测定血清 TNF- α , IL-1 β 含量,均严格按照仪器操

作规程及试剂盒说明书进行。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 与对照组比较,紫花地丁水提物、醇提物各剂量组及布洛芬组对二甲苯所致小鼠耳肿胀均有显著的抑制作用,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。紫花地丁水提物及醇提物抗炎作用呈剂量依赖性,高剂量组抗炎作用强于低剂量组,且与布洛芬组抗炎作用强度大体相当。见表 1。

表 1 紫花地丁提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	耳肿胀度	肿胀抑制率
	/g·kg ⁻¹	/mg	/%
模型对照	—	18.65 ± 1.67	—
布洛芬	0.08	7.59 ± 0.79 ²⁾	59.30
紫花地丁水提物	3.0	12.03 ± 1.08 ¹⁾	35.50
	9.0	7.67 ± 0.82 ²⁾	58.87
紫花地丁醇提物	3.0	11.38 ± 1.14 ¹⁾	39.98
	9.0	7.28 ± 0.74 ²⁾	60.96

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对角叉莱胶致小鼠足肿胀的影响 与模型对照组比较,紫花地丁水提物、醇提物各剂量组及布洛芬组对角叉莱胶致小鼠足肿胀均有显著的抑制作

表 2 紫花地丁提取物对角叉莱胶致小鼠足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	致炎后肿胀率/%			
		0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
模型对照	—	32.86 ± 3.09	40.57 ± 3.98	51.20 ± 4.97	54.07 ± 5.21
布洛芬	0.08	14.67 ± 1.50 ²⁾	19.67 ± 2.13 ²⁾	22.38 ± 2.19 ²⁾	23.12 ± 2.30 ²⁾
紫花地丁水提物	3.0	19.86 ± 2.01 ¹⁾	31.01 ± 3.06 ¹⁾	32.97 ± 3.24 ¹⁾	35.02 ± 3.48 ¹⁾
	9.0	14.95 ± 1.50 ²⁾	18.88 ± 1.98 ²⁾	22.95 ± 2.32 ²⁾	24.05 ± 2.51 ²⁾
紫花地丁醇提物	3.0	20.02 ± 2.06 ¹⁾	30.96 ± 3.19 ¹⁾	31.89 ± 3.26 ¹⁾	34.02 ± 3.39 ¹⁾
	9.0	14.98 ± 1.52 ²⁾	19.99 ± 2.13 ²⁾	23.01 ± 2.29 ²⁾	21.97 ± 2.21 ²⁾

表 3 紫花地丁提取物对角叉莱胶致炎小鼠血清 TNF-α,IL-1β 及炎性组织中 PGE₂ 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹	IL-1β/ng·L ⁻¹	PGE ₂ /A
模型对照	—	598.23 ± 62.33	575.45 ± 58.80	0.86 ± 0.09
布洛芬	0.08	262.64 ± 29.38 ²⁾	268.65 ± 29.58 ²⁾	0.34 ± 0.05 ²⁾
紫花地丁水提物	3.0	520.63 ± 55.43	448.57 ± 46.51	0.72 ± 0.09
	9.0	309.55 ± 31.21 ²⁾	312.61 ± 32.65 ²⁾	0.46 ± 0.06 ²⁾
紫花地丁醇提物	3.0	511.18 ± 52.42	451.24 ± 46.39	0.69 ± 0.07
	9.0	296.64 ± 29.38 ²⁾	308.42 ± 31.23 ²⁾	0.41 ± 0.04 ²⁾

用,且抗炎作用持续时间较长,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。紫花地丁水提物及醇提物抗炎作用呈剂量依赖性,高剂量组抗炎作用强于低剂量组,且与布洛芬组抗炎作用强度大体相当。见表 2。

3.3 对角叉莱胶致炎小鼠血清 TNF-α,IL-1β 及炎性组织中 PGE₂ 含量的影响 与模型对照组比较,紫花地丁水提物、醇提物各剂量组及布洛芬组均可不同程度降低角叉莱胶致炎小鼠血清 TNF-α,IL-1β 及炎性组织中 PGE₂ 含量,其中紫花地丁水提物、醇提物高剂量组及布洛芬组上述指标成分降低明显,与模型对照组的差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

炎症是具有血管系统的活体组织对损伤因子所发生的防御反应,在炎症反应过程中,受伤组织及血液可产生并释放具有致炎作用的细胞因子、炎性介质、趋化因子等多种化学活性物质,从而引起局部红、肿、热、痛等临床表现^[9]。PGE₂ 是炎症反应的重要介质,由花生四烯酸的代谢产物,具扩张血管、致热、致痛等生物活性,并可通过加强组胺及缓激肽的效应而引起血管通透性增强、加强其他趋化因子的作用而使白细胞向炎区聚集,从而引起水肿、充血、局部红斑等炎症反应症状^[10]。TNF-α,IL-1β 亦是重要的炎症细胞因子,均可促进炎症反应和组织

损伤,二者可诱导机体产生急性时相反应蛋白,并可作用于血管内皮细胞,使之分泌趋化性细胞因子,从而趋化单核细胞及中性粒细胞,并刺激其活化,释放出多种炎症介质,引起炎症反应^[8]。因此,能够抑制生物体 PGE₂,TNF- α ,IL-1 β 等炎症细胞因子产生的药物,均具有一定的抗炎作用。

本研究采用二甲苯致小鼠耳肿胀模型及角叉菜胶诱导小鼠足肿胀模型的方法制造急性非特异性炎症模型和免疫性炎症模型,并以布洛芬为阳性对照药,初步分析了紫花地提取物的抗炎作用及机制。研究结果显示,上述两种制造炎症造模的方法均可靠,造模成功。紫花地丁水提物及醇提物对二甲苯致小鼠耳肿胀及角叉菜胶诱导小鼠足肿胀均具有不同程度的抑制作用,并可不同程度的降低角叉菜胶致炎小鼠血清血清 TNF- α ,IL-1 β 及炎性组织中 PGE₂ 含量,且高剂量组抗炎作用强于低剂量组。

综上所述,紫花地丁水提物具有显著的抗炎作用,其抗炎作用机制可能与降低 TNF- α ,IL-1 β 及 PGE₂ 的表达有关。此研究结果与该中药清热解毒、凉血消肿等功效相关,为紫花地丁的临床应用及药用价值开发利用提供了药效学基础,但其抗炎作用的具体药效成分尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京:中国医药科技出版社,2010:317.

[2] 周驰,张启,常章富. 紫花地丁的本草考证[J]. 中国中药杂志,2010,35(22):3086.

[3] 沙爱龙,陈红玲,孟庆艳. 维药芳香新塔花水提物的抗炎镇痛作用及其急性毒性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):202.

[4] 叶绿萍,黄志俭,刘小意,等. 赶山鞭水提取物及醇提取物毒性及抗炎镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):204.

[5] 胡彦武,于俊林. 五味子藤茎提取物急性毒性试验及对小鼠试验性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):172.

[6] 孙付军,路俊仙,崔璐,等. 不同含油量木鳖子霜抗炎镇痛作用比较[J]. 时珍国医国药,2010,21(5):1084.

[7] 张大方. 药理与中药药理实验[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:44,93.

[8] 李恒华,陈国庆,张毅,等. 四乙酰葛根素抗炎作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):151.

[9] 邓琪,黄美景,郭丽冰,等. 三丫苦抗炎镇痛作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):125.

[10] 赵杰,余林中,方芳,等. 麻黄-甘草药对的抗炎作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):159.

[责任编辑 聂淑琴]