

黑骨藤挥发油乳剂抗炎作用及机制

宋国斌^{1*}, 席国萍¹, 郁建平²

(1. 山西大同大学医学院, 山西 大同 037009; 2. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:研究黑骨藤挥发油的抗炎作用,阐明挥发油作为药用活性成分的作用机制。方法:制备挥发油乳剂,采用大鼠佐剂性关节炎药理模型,设正常对照组、模型对照组、黑骨藤挥发油乳剂高、低剂量(以挥发油量为计为 375 μL , 94 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药容积均为 15 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)治疗组及阳性药(雷公藤多苷片,6.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)对照治疗组,造模后,各用药组于致炎后 10 d 灌胃给药,1 次/d,连续给药 11 d,正常组及模型组给予等容量(3 mL)蒸馏水,灌胃给药,采用容积法测定其肿胀度;造模后 21 d,大鼠眼眶取血,采用丙二醛(MDA)测定试剂盒、一氧化氮(NO)测定试剂盒检测血清中 MDA、NO 的含量。采用醋酸致小鼠毛细血管通透性实验,设正常对照组、黑骨藤挥发油乳剂高、中、低剂量(500,250,125 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药容积均为 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)治疗组及阳性药(地塞米松,4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),灌胃给药,每天 1 次,连续给药 5 d,研究黑骨藤挥发油的抗炎作用。结果:与模型对照组比较,挥发油高、低剂量组大鼠的足趾肿胀值在 18~21 d 内均有所降低;与空白组比较,模型组大鼠血清中 MDA 和 NO 的含量显著升高($P<0.01$),与模型组比较,挥发油高、低剂量组均能降低大鼠血清中的 MDA 含量,高剂量组大鼠血清中的 NO 含量明显低于模型组($P<0.05$),但与空白对照组并无差异;模型组大鼠血清中的 NO 含量明显高于空白对照组($P<0.01$),对大鼠佐剂性关节炎药理模型有治疗效果,可以明显降低模型大鼠血清中的 NO、MDA 含量,减轻局部病理反应,起到抗炎作用;黑骨藤挥发油可明显抑制醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性亢进。结论:黑骨藤挥发油具有抗炎作用。

[关键词] 黑骨藤; 挥发油; 抗炎; 机制

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0252-04

Anti-inflammatory Effects and Mechanism of Emulsion of Volatile Oil from *Periploca forrestii*

SONG Guo-bin^{1*}, XI Guo-ping¹, YU Jian-ping²

(1. Medical College of Shanxi Datong University, Datong 037009, China;
2. College of Life Sciences of Guizhou University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] Objective: To study the anti-inflammation effect of volatile oil from *Periploca forrestii* and the mechanism of action, for providing the basis of the clinical application. Method: The emulsion of volatile oil was prepared. The model of adjuvant arthritis in mice was established with complete freund's adjuvant (CFA) and the changes of nitrogen oxide (NO), malondialdehyde (MDA) content in the serum were determined to estimate the pharmacodynamics of anti-inflammatory activities the *in vivo* and mouse capillary permeability caused by acetic acid capillary permeability experiment. Rats were randomly divided into control group, model group, positive drug group (tripterygium wilfordii, 6.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the emulsion of volatile oil high dosage group, low dosage group (the dosage 0.375, 0.094 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) by gavage administration. Mouses were randomly divided into control group, positive drug group (dexamethasone, 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the emulsion of volatile oil high dosage group, group, middle dosage group, low dosage group (the dosage 0.500, 0.250, 0.125 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$). According to a set of drug doses to weight 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ drug gavage. Result: The results indicate that volatile oil from *P. forrestii* can obviously

[收稿日期] 20120909(010)
[基金项目] 黔科合人才团队(2010)4008 资助
[通讯作者] * 宋国斌, 硕士, 讲师, 从事植物有效成分提取、分离、纯化、检测研究, Tel:13593008035, E-mail:251pangzi@sina.com

inhibit the increase of the mouse's abdominal cavity capillary permeability induced by acetic acid, protect against the paws swelling in adjuvant-induced arthritis mice, decrease NO and MDA in the serums of model mice. The volatile oil can alleviate the pathological responses. **Conclusion:** The volatile oil from *P. forrestii* had a marked anti-inflammatory effect.

[**Key words**] *Periploca forrestii*; volatile oil; anti-inflammation; mechanism

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为主要特征的系统性自身免疫病,是一种原因不详、发病率及致残率均较高,并且尚无特效药物治疗的常见病症。由于RA病因及发病机理尚未阐明,临床表现及治疗反应又呈现出较大的个体差异性,因此风湿病学界长期以来一直致力于关于RA的治疗研究。目前治疗RA的药物有很多种,如非甾体抗炎免疫药、肾上腺皮质激素、生物制剂、改善病情抗风湿药及免疫抑制剂、RA疫苗等,这些药物使RA的症状得到了一定程度上的控制,但是始终是治标不治本,各自存在局限性。因此寻找高效,治疗彻底且副作用小的治疗RA药物已成为当务之急。

黑骨藤系萝藦科杠柳属植物西南杠柳,在西南地区分布广泛,具有强心、祛风除湿、活血消痛的功能,是苗族习用药材,已有黑骨藤胶囊等产品上市销售。该药材主产于西南地区的贵州等地,我国产在西南少数民族地区主要用于风湿痹痛、闭经、乳痈、跌打损伤、骨折等症^[1-3]。研究发现黑骨藤中含强心苷、C₂₁甾体皂苷、三萜和挥发油^[4-5],全株挥发油含量在0.1%~0.2%。

挥发油水溶性差,易挥发,稳定性差,故未得以广泛的应用与发展。乳剂不仅可以用于营养的提供,而且是难溶性药物的重要载体,可提高药物溶解度,增加药物稳定性,降低挥发油的挥发量,分剂量准确,改善其对黏膜、皮肤的刺激性,增加挥发油的吸收,提高其生物利用度,减少剂量,降低毒副反应,达到缓释效果,延长疗效;此外可使药物具有靶向性,提高靶部位浓度并具有淋巴亲和性。我们对黑骨藤挥发油制备成乳剂,对其抗炎作用进行了研究,藉以阐明挥发油作为药用的主要活性成分及作用机制,为其临床和开发利用提供依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,雄性,体重(200±20)g,昆明种小鼠,体重(20±2)g,雌雄各半,重庆市中药研究院动物室提供,许可证号SCXK(渝)20070006。

1.2 药品与试剂 实验用黑骨藤为药材全株,采自贵阳市花溪水库旁,经贵州大学生命科学学院廖海

民教授鉴定为萝藦科杠柳属植物黑骨藤(*Periploca forrestii* Schltr)。按文献^[6-7]提取黑骨藤挥发油,黔产黑骨藤挥发油中含有较多的酸类化合物,主要有棕榈酸、11,14,17-二十碳三烯酸甲酯等^[6,7]。

黑骨藤挥发油乳剂(HGTHFY);聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(吐温-80,AR);丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)测定试剂盒(南京建成生物研究所,批号20010803);弗氏完全佐剂(freund's complete adjuvant, FCA,美国Sigma公司产品);地塞米松片(广东三才医药集团有限公司生产,批号20080859);0.5%伊文氏蓝溶液;0.6%醋酸;生理盐水;阳性对照药雷公藤多苷片(DGP,浙江普洛康裕天然药物有限公司生产,批号070601)。

1.3 仪器 1004电子分析天平(上海天平仪器厂),AR2202CN电子天平(上海奥豪斯公司),Eppendorf 5301微量移液枪(德国Eppendorf),低速离心机(德国Eppendorf),TU-1901型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 黑骨藤挥发油乳剂及药品制备 干燥黑骨藤药材2kg,粗碎过60目筛,按文献^[6-7]提取黑骨藤挥发油,得黑骨藤挥发油2.0mL,得率0.10%,加入1.0%聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(吐温-80)mL,混合溶解,制备成挥发油乳剂(25μL油/mL乳剂),制备好的挥发油乳剂在4℃冰箱密封保存备用。20mg的雷公藤多苷片研末再加入50mL的蒸馏水配成溶液(0.4g·L⁻¹药液),20mg的地塞米松片研末再加入50mL的蒸馏水配成溶液(0.4g·L⁻¹药液),备用。

2.2 对大鼠佐剂性关节炎的影响

2.2.1 大鼠佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)模型的诱导及分组^[8-15] 大鼠50只,雌雄分开,于实验前驯养3d后,随机分为5组(每组雌雄各半):正常对照组(正常组, n=10);模型对照组(模型组, n=10);黑骨藤挥发油乳剂高剂量治疗组(HGTHFY组, n=10);黑骨藤挥发油乳剂低剂量治疗组(HGTHFY组, n=10);雷公藤治疗组(雷公藤组, n=10)剂量4mg·kg⁻¹;黑骨藤挥发油乳剂(25mL·

L⁻¹乳剂)高、低剂量(以挥发油量为计为 375,94 μL·kg⁻¹),给药容积均为 15 mL·kg⁻¹,灌胃给药。AA 模型组每鼠右后足趾皮内注射 0.1 mL FCA 致炎,正常对照组注射 0.1 mL 生理盐水。各用药组于致炎后 10 d 灌胃给药,1 次/d,连续给药 11 d,正常组及模型组给予等容量蒸馏水。于造模 1,7,14,21 d 称体重。

2.2.2 对 AA 大鼠继发性肿胀的影响 采用容积法测定正常状态下大鼠左踝关节以下的容积(mL),然后分别于致炎后 10,14,18,21 d 同法测量非致炎足(左足)的容积变化,以致炎前后差值(ΔmL=致炎后容积-致炎前容积)表示其肿胀度,观察黑骨藤挥发油乳剂对大鼠继发性炎症肿胀的治疗作用。

2.2.3 对 AA 大鼠血清 MDA,NO 的影响 造模后 21 d,大鼠眼眶取血,保留血清。采用丙二醛(MDA)测定试剂盒、一氧化氮(NO)测定试剂盒(硝酸还原酶法),按说明书要求进行操作,检测血清中 MDA、NO 的含量。

2.3 醋酸致小鼠毛细血管通透性实验 取昆明种小鼠 50 只,雌雄各半,随机分 5 组,空白对照组(生理盐水);黑骨藤挥发油乳剂(25 μL·mL⁻¹乳剂)高、中、低剂量组(500,250,125 μL·kg⁻¹);阳性对照组(地塞米松,4 mg·kg⁻¹)。按设定的药物剂量以体重 20 mL·kg⁻¹灌胃给药,每天 1 次,连续给药 5 d,末次给药 1 h 后,以 0.5% 伊文思蓝生理盐水溶液尾静脉注射 10 mL·g⁻¹体重,同时 ip 0.6% 醋酸 0.2 mL/只,20 min 后脱颈处死小鼠,腹腔注射 6 mL 生

理盐水,轻揉小鼠腹部,剪开腹部,用吸管吸出洗涤液,加入生理盐水至 10 mL,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,用 TU-1901 型紫外-可见分光光度计测定 590nm 波长处的吸光度(A),比较各组间差异(剪开腹腔时注意勿损伤腹腔血管,以免因出血而影响比色结果,如有出血及洗液混浊者,A 将明显增加,应离心沉淀后再比色)。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计分析软件进行差异显著性检验分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AA 大鼠状态及体重的影响 空白组大鼠无死亡,状态良好,皮毛光泽,反应灵敏,体重增加。模型组大鼠进食有所减少,毛质粗糙,动作迟缓。给药各剂量组大鼠虽症状较轻,但进食也相对较少,伴随着体重增长缓慢,倦怠,皮毛粗糙等症状,但是反应相对灵敏。HGTHFY 高、低剂量组大鼠的摄食相对空白组有所减少,但体重还是持续增加,皮毛光滑。与模型组比较,HGTHFY 高、低剂量组大鼠的体重在 2~3 周时有差异($P < 0.05$),表明 HGTHFY 对 AA 大鼠体重增长缓慢有一定的改善作用。见表 1。

3.2 HGTHFY 对 AA 大鼠继发性炎症足肿胀的影响 与模型对照组比较,HGTHFY 高、低剂量组大鼠的足趾肿胀值在 18 d~21 d 内均有所降低,表明 HGTHFY 对佐剂性关节病变有一定的预防和治疗作用。见表 2。

表 1 黑骨藤挥发油乳剂 ig 给药对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) g

组别	剂量/油 μL·kg ⁻¹	1 d	7 d	14 d	21 d
空白对照	-	198.4 ± 13.0	210.9 ± 15.0 ²⁾	224.5 ± 13.3 ⁴⁾	232.2 ± 18.7 ⁴⁾
模型	-	196.9 ± 11.3	201.5 ± 11.3	206.1 ± 16.9 ¹⁾	201.4 ± 25.8 ²⁾
DGP ⁵⁾	4	198.3 ± 13.1	208.5 ± 15.5	208.8 ± 22.5	212.9 ± 25.8 ³⁾
HGTHFY	94	197.5 ± 12.6	205.2 ± 17.5	208.8 ± 22.5	212.9 ± 25.8 ³⁾
	375	199.4 ± 12.2	212.8 ± 19.3	220.1 ± 21.7	226.6 ± 20.3 ⁴⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;⁵⁾剂量为 mg·kg⁻¹(表 2~3 同)。

表 2 黑骨藤挥发油乳剂 ig 给药对 AA 大鼠继发性炎症足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/油 μL·kg ⁻¹	不同时间的继发性足肿胀/mL			
		7 d	14 d	18 d	21 d
空白对照	-	0.06 ± 0.02 ²⁾	0.10 ± 0.04 ²⁾	0.13 ± 0.06 ²⁾	0.19 ± 0.05 ²⁾
模型	-	0.28 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.39 ± 0.06	0.49 ± 0.04
DGP ⁵⁾	4	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.05	0.29 ± 0.05 ²⁾	0.25 ± 0.07 ²⁾
HGTHFY	94	0.29 ± 0.03	0.35 ± 0.06	0.36 ± 0.05 ¹⁾	0.35 ± 0.05 ¹⁾
	375	0.28 ± 0.04	0.31 ± 0.04	0.34 ± 0.06 ¹⁾	0.29 ± 0.07 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对 AA 大鼠血清 MDA,NO 含量的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中 MDA 和 NO 的含量显著升高 ($P < 0.01$),这显示出 AA 大鼠出现严重的炎症反应。与模型组比较可知,HGTHFY 高、低剂量组均能降低大鼠血清中的 MDA 含量,但与模型组比较没有显著性差异;HGTHFY 高剂量组大鼠血清中的 NO 含量明显低于模型组 ($P < 0.05$),但与空白对照组并无差异;模型组大鼠血清中的 NO 含量明显高于空白对照组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 HGTHFY 对 AA 大鼠 NO 和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	MDA	NO
	/油 $\mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照	-	11.32 $\pm$ 3.56 ³⁾	37.11 $\pm$ 10.12 ⁴⁾
模型	-	18.44 $\pm$ 5.81 ²⁾	48.86 $\pm$ 8.90 ²⁾
DGP ⁵⁾	4	14.35 $\pm$ 6.98 ³⁾	40.81 $\pm$ 8.95 ³⁾
HGTHFY	94	15.23 $\pm$ 7.15	43.47 $\pm$ 9.15
	375	15.21 $\pm$ 6.89	42.15 $\pm$ 9.02 ³⁾

3.4 对醋酸致小鼠毛细血管通透性的影响 黑骨藤挥发油乳剂高、中剂量组和阳性对照组动物腹腔炎性渗出液的 A 明显低于空白对照组 ($P < 0.01$),低剂量组与空白对照组 A 的差异有显著性 ($P < 0.05$),毛细血管通透性有降低趋势。黑骨藤挥发油乳剂高、低剂量组及地塞米松组均能显著抑制醋酸所致的小鼠毛细血管通透性增高 ($P < 0.01$),使腹腔内渗出的染料明显减少。见表 4。

表 4 黑骨藤挥发油乳剂对醋酸所致小鼠毛细血管通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/油 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	腹腔洗出液/A
空白对照组	-	0.621 $\pm$ 0.053
HGTHFY	500	0.479 $\pm$ 0.107 ²⁾
	250	0.521 $\pm$ 0.098 ²⁾
	125	0.583 $\pm$ 0.061 ¹⁾
地塞米松 ⁵⁾	4	0.389 $\pm$ 0.054 ²⁾

4 讨论

本研究选用了弗氏完全佐剂成功复制了 AA 大鼠模型,试验动物均出现了继发性的关节肿胀炎症;实验结果证实黑骨藤挥发油乳剂对佐剂性关节继发性足肿胀有一定的治疗作用。

NO 在 RA 发病过程中作为一种重要炎症介质直接参与炎症反应过程,研究认为急性炎症的发生均与 NO 有关系^[16]。黑骨藤挥发油乳剂可以明显降低 AA 大鼠血清中的 NO 含量,提示黑骨藤挥发油的抗炎机制可能与抑制 NO 的生物合成有关。

通过醋酸致小鼠毛细血管通透性实验结果揭

示,黑骨藤挥发油对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性亢进有明显抑制作用,从而证实黑骨藤挥发油有一定抗炎活血化瘀的作用。

黑骨藤挥发油乳剂可降低挥发油的挥发量,使挥发油具有水溶性,达到分剂量准确,改善其对粘膜、皮肤的刺激性;可增加挥发油的吸收,提高其生物利用度,减少剂量,降低毒副反应;可以达到缓释的效果,延长疗效。

[参考文献]

[1] 《贵州植物志》编辑委员会. 贵州植物志. 第四卷 [M]. 成都:四川民族出版社,1989:507.

[2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准 [M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:381.

[3] 包骏,冉懋雄. 贵州苗族医药研究与开发 [M]. 贵阳:贵州科技出版社,1999:188.

[4] 张援虎,扬亚婷,陈东林,等. 黑龙骨化学成分的研究 [J]. 中草药,2006,37(3):345.

[5] 胡英杰,木全章. 缙杠柳的化学成分 [J]. 云南植物研究,1989,11(4):465.

[6] 黄烈军,罗波,穆淑珍,等. 黔产黑骨藤挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 贵州科学,2006,24(4):25.

[7] 赵延涛,赵宝玉,张援虎,等. 黑骨藤和青蛇藤挥发油成分的比较研究 [J]. 西北农学报,2007,16(6):38.

[8] 徐礼英,张小平,蒋继宏. 栝楼子挥发油的成分分析及其生物活性的初步研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):38.

[9] 曾南,沈映君,任永欣,等. 荆芥挥发油抗炎作用机理的实验研究 [J]. 中药材,2006,29(4):359.

[10] 袁艺,龙子江,刘伟,等. 鱼腥草野生苗与组培苗挥发油抗炎作用的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(9):41.

[11] 陶玲,沈祥春,彭佼. 艳山姜挥发油抗炎镇痛作用的实验研究 [J]. 中国医院药学杂志,2010,30(9):722.

[12] 高洪元,田青. 佛手挥发油的抗抑郁作用机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):231.

[13] 袁娟丽. 花椒挥发油的抗炎、镇痛作用 [J]. 中药材,2010,33(5):794.

[14] 袁艺,龙子江,杨俊杰. 洋甘菊挥发油抗炎作用的研究 [J]. 药物生物技术,2011,18(1):52.

[15] 张迎春,陈畅,李韶菁,等. 藁本、辽藁本和新疆藁本挥发油化学成分分析及其血管活性观察 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):159.

[16] Dinarello C A. Role of pro-and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings [J]. J Biol Reg Homeosag, 1997, 11(3):91.

[责任编辑 聂淑琴]