

不同产地和叶形附子水煎液的抗炎、镇痛作用比较^Δ

缪璐琳*,熊秋韵,高继海,李梦婷,敖 慧,谢晓芳,彭 成[#](成都中医药大学药学院,成都 611137)

中图分类号 R285;R282.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3483-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.08

摘要 目的:比较不同产地(江油、布拖)和叶形(大花叶、小花叶)附子水煎液的抗炎、镇痛作用。方法:将动物随机分为空白组(蒸馏水),阳性组,江油大、小花叶附子水煎液组和布拖大、小花叶附子水煎液组(给药剂量按生药计均为5 g/kg)。分别通过二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验($n=12$)和鸡蛋清致大鼠足跖肿胀实验($n=10$)(阳性药物均为醋酸地塞米松片,0.005 g/kg)考察不同产地和叶形附子水煎液的抗炎作用;分别通过冰醋酸致小鼠扭体反应实验($n=12$)和小鼠热板致痛实验($n=12$)(阳性药物均为盐酸吗啡片,0.002 5 g/kg)考察不同产地和叶形附子水煎液的镇痛作用。结果:布拖大、小花叶附子和江油小花叶附子水煎液均可显著降低小鼠的耳廓肿胀度($P<0.01$);江油大花叶附子水煎液和布拖大花叶附子水煎液可显著降低给药6 h后大鼠的足跖肿胀度($P<0.05$);布拖小花叶附子水煎液可显著减少醋酸致痛小鼠的扭体次数、延长热板致痛小鼠的痛阈值($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:布拖大花叶、小花叶附子和江油小花叶附子的抗炎作用较好,布拖小花叶附子的镇痛作用更佳。

关键词 产地;附子;叶形;抗炎;镇痛

Comparison of the Anti-inflammation, Analgesic Effects of Decoctions Extracted from Aconiti Lateralis with Different Leaf Shapes from Different Producing Areas

MIAO Lulin, XIONG Qiuyun, GAO Jihai, LI Mengting, AO Hui, XIE Xiaofang, PENG Cheng (College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the anti-inflammation, analgesia effects of decoctions extracted from Aconiti lateralis with different leaf shapes (dahua leaf, xiaohua leaf) from different producing areas (Jiangyou, Butuo). METHODS: Animals were randomly divided into blank group (distilled water), positive group, groups of Aconiti lateralis with dahua, xiaohua leaf from Ji-angyou, groups of Aconiti lateralis with dahua, xiaohua leaf from Butuo (with dose of 5 g/kg, calculated by crude drug). The anti-inflammation effect of decoctions extracted from Aconiti lateralis with different variety sources and leaf shapes was investigated by xylene-induced ear swelling test ($n=12$) in mice and egg white-induced toe swelling test ($n=10$) in rats (positive drug was

- 升”的探讨[J].中国乡村医药,1997,4(2):30.
- [15] Monder C, Lakshmi V. Evidence for kinetically distinct forms of corticosteroid 11 beta-dehydrogenase in rat liver microsomes[J]. *J Steroid Biochem*, 1989, 32(1A):77-83.
- [16] Anderws RC, Rooyackers O, Walker BR, et al. Effects of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone on insulin sensitivity in men with type 2 diabetes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(1):285-291.
- [17] 张明发,沈雅琴.甘草酸及其苷元甘草次酸的糖皮质激素样作用[J].现代药物与临床,2011,26(1):33-35.
- [18] Diederich S, Grossmann C, Hanke B, et al. In the search

^Δ 基金项目:国家基础科学人才培养基金资助项目(No. J1310034);国家自然科学基金资助项目(No.81630101);国家中药标准化项目(No.ZYBZH-C-SC-51);四川省中医药科学技术研究专项项目(No.2016ZY008);四川省科技厅项目(No.2013SZ0114);四川省青年科技创新研究团队专项计划项目(No.2015TD0028);四川省科技计划项目(No.2014SZ0156)

* 本科生。研究方向:中药药理学。E-mail:787294002@qq.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药药理与毒理。电话:028-61800018。E-mail:pengchengchengdu@126.com

for specific inhibitors of human 11 beta-hydroxysteroid-dehydrogenases (11 beta-HSDs): chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11 beta-HSD- I [J]. *Eur J Endocrinol*, 2000, 142(2):200-207.

- [19] Schweizer RA, Atanasov AG, Frey BM, et al. A rapid screening assay for inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases (11beta-HSD): flavanone selectively inhibits 11 beta-HSD1 reductase activity[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 212(1/2):41-49.
- [20] Feng Y, Huang SL, Dou W, et al. Emodin, a natural product, selectively inhibits 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and ameliorates metabolic disorder in diet-induced obese mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(1): 113-126.
- [21] 严优芍,钟伟健,郭丽冰. GC-MS 分析桂枝汤不同配伍对桂枝挥发油成分的影响[J]. 中药材, 2012, 35(3): 410-415.

(收稿日期:2017-04-28 修回日期:2017-06-15)

(编辑:林 静)

Dexamethasone acetate tablet, 0.005 g/kg). And its analgesic effect was investigated by acetic acid-induced writhing body reaction test ($n=12$) and hot-plate-induced pain test ($n=12$) in mice (positive drug was Morphine hydrochloride tablet, 0.002 5 g/kg). RESULTS: The decoctions extracted from Aconiti lateralis with dahua, xiaohua leaf from Butuo and xiaohua leaf from Jiangyou can significantly reduce the ear swelling degree ($P<0.01$). The decoctions extracted from Aconiti lateralis with dahua leaf from Jiangyou and Butuo can significantly decrease the toe swelling degree after 6 h of medication ($P<0.05$). And decoctions extracted from Aconiti lateralis with xiaohua leaf from Butuo can significantly reduce the number of writhing body in mice with acetic acid-induced pain and prolong the pain threshold of mice with hot-plate-induced pain ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Aconiti lateralis with dahua and xiaohua leaf from Butuo and with xiaohua leaf from Jiangyou show better anti-inflammation effect, and Aconiti lateralis with xiaohua leaf from Butuo shows better analgesic effect.

KEYWORDS Producing areas; Aconiti lateralis; Leaf shapes; Anti-inflammation; Analgesia

附子是毛茛科乌头(*Aconitum carmichaelii* Debx.)的子根加工品,味辛、甘,性大热,具有回阳救逆、温阳通脉、散寒止痛之效,为古今常用中药^[1]。附子道地产区在四川江油,现亦主产于四川布拖、平武、安县等地。在长期人工种植栽培中,附子出现了多种种内变异。原四川中医药研究院南川药物种植研究所曾对现有附子栽培品种来源进行了调查,发现江油附子的种源川乌品种类型众多,出现了南瓜叶、鹅掌叶、大花叶、小花叶等种内变异类型^[2];中坝附子特产于四川江油、彰明两县,近年来主要以大花叶种、花叶子种(小花叶种)为栽培品种^[3],但药材采收时未按叶形分开。相关研究表明,在3个附子品系的31个生物学性状中,仅第2叶面积等7个性状未表现出差异,其余性状均有显著差异^[4]。不同种类药材中可能存在同种有效成分,特别是近源品种,但这并不意味着其有效成分含量、生物学性状相同。如不同叶形杜仲中京尼平苷酸等活性成分质量分数间存在显著差异^[5];紫花型桔梗总氨基酸含量高于粉花型^[6];云南烟叶原料的外观形状与内在品质具有密切的关系,通过外观性状可以基本判断烟叶的内在品质^[7]。因此,对不同叶形附子进行区别研究具有重要意义。

课题组前期研究发现,大花叶和艾叶两种叶形的乌头DNA甲基化修饰有较大差异。根据表观遗传学,同种植物核苷酸序列相同时,非DNA序列的改变,如染色体结构和DNA甲基化状态的改变会使个体性状的表现产生差异。DNA甲基化修饰虽不改变基因序列,但对植物生命过程如基因表达、生长发育、抗逆境胁迫等具有重要的调节作用^[8-9]。植物的叶形与药用部位选择及化学成分分布之间存在一定相关性,叶形也可粗略反映出某些化学成分分布规律。

鉴于此,本研究选取道地产区江油和主产区布拖目前主要栽培的两个品种(大花叶、小花叶)附子作为研究对象,比较不同产地和叶形附子的抗炎、镇痛作用,以期对不同品系附子的临床合理应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

AL104型十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器

(上海)有限公司];PV-200型足趾容积测试仪、RB-200型智能热板仪(成都泰盟软件有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

江油大花叶附子、布拖大花叶附子、江油小花叶附子、布拖小花叶附子均由课题组到当地采收,经洗净、切片、烘干(45℃)后制得,经成都中医药大学药教研室卢先明教授鉴定均为真品;醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:140327,规格:0.75 mg/片);盐酸吗啡片(青海制药厂有限公司,批号:20130513,规格:5 mg/片);二甲苯、冰醋酸(成都市科龙化工试剂厂,批号:2010111110、2014020801)。

1.3 动物

SPF级KM小鼠216只,♀♂各半,体质量20~25 g;清洁级SD大鼠60只,♂,体质量180~200 g。实验动物均由四川省中医药科学院实验动物中心提供[动物质量合格证号:SCXK(川)2013-19]。

2 方法

2.1 附子水煎液的制备

称取江油大花叶附子、布拖大花叶附子、江油小花叶附子、布拖小花叶附子各700 g,分别加入10倍量水,浸泡30 min后,煎煮5 h,收集水煎液;药渣再加入8倍量水,煎煮3 h,收集水煎液。混合2次水煎液,浓缩至最大质量浓度(江油大花叶为25.828 g/kg、布拖大花叶为16.118 g/kg、江油小花叶为13.488 g/kg、布拖小花叶为14.368 g/kg)。

2.2 抗炎作用考察

2.2.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验 将72只KM小鼠(♂)随机分为空白组、阳性组、江油大花叶附子水煎液组、布拖大花叶附子水煎液组、江油小花叶附子水煎液组和布拖小花叶附子水煎液组,每组12只。空白组小鼠ig蒸馏水10 mL/kg,阳性组小鼠ig醋酸地塞米松片0.005 g/kg(蒸馏水溶解)^[10],各附子水煎液组小鼠均ig生药量为5 g/kg的相应水煎液(相当于临床最大用量的20倍)^[11],每天给药1次,连续7 d。末次给药1 h后,于每只小鼠右耳廓均匀涂抹二甲苯0.04 mL。0.5 h后脱颈椎处

死小鼠,小心取下双耳,在双耳同一部位打孔并迅速称定耳片质量,计算耳廓肿胀度[耳廓肿胀度(%)=(右耳片质量-左耳片质量)/左耳片质量×100%]。

2.2.2 鸡蛋清致大鼠足跖肿胀实验 将60只SD大鼠(♂)按“2.2.1”项下分为6组,每组10只,并按“2.2.1”项下方法连续给药6d。末次给药1h后,每只大鼠右后足跖sc新鲜蛋清0.05 mL致炎,测定致炎后0.5、1、2、3、4、6 h小鼠足容积(mL),以给药前后右后足容积之差计算足跖肿胀度,并计算肿胀抑制率[肿胀抑制率(%)=(空白组平均足跖肿胀度-给药组平均足跖肿胀度)/空白组平均足跖肿胀度×100%]。

2.3 镇痛作用考察

2.3.1 冰醋酸致小鼠扭体反应实验 将72只KM小鼠(♀♂各半)按“2.2.1”项下方法分为6组,每组12只。空白组小鼠ig蒸馏水10 mL/kg,阳性组小鼠ig盐酸吗啡片2.5 mg/kg(蒸馏水溶解),不同叶形附子水煎液组小鼠均ig生药量为5 g/kg的水煎液,每天1次,连续7d。末次给药后1h,每只小鼠ip 0.6%冰醋酸10 mL/kg致痛,即刻计时,记录小鼠首次出现扭体反应的时间(即为扭体潜伏期),同时记录每只小鼠造模后15 min内出现的扭体次数。

2.3.2 小鼠热板致痛实验 取KM小鼠(♀),用热板仪[温度为(55±0.5)℃]筛选基础痛阈值(小鼠开始出现舔后足反应的时间)在5~30 s的小鼠72只,然后按基础痛阈值的高低将小鼠随机分为6组,分组及给药同“2.3.1”项下,连续给药6d。分别在末次给药后0.5、1、1.5、2 h采用热板仪测定各组小鼠的痛阈值。

2.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素分析。 $P < 0.05$ 表示差

异有统计学意义。

3 结果

3.1 抗炎作用考察结果

3.1.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验结果 与空白组比较,阳性组,布拖大、小花叶附子水煎液组和江油小花叶附子水煎液组小鼠的耳廓肿胀度均显著降低($P < 0.01$),且以布拖小花叶附子水煎液组小鼠耳廓肿胀度降低程度最大,结果见表1。

表1 各组小鼠耳廓肿胀度的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 1 Determination results of ear swelling degree of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量,g/kg	左耳片质量,mg	右耳片质量,mg	耳廓肿胀度,%
空白组		5.98±0.99	13.71±2.17	129.98±20.51
阳性组	0.005	3.87±1.36**	7.78±1.65**	99.38±28.79**
江油大花叶附子水煎液组	5	5.39±0.56*	11.73±0.99**	118.95±21.61
布拖大花叶附子水煎液组	5	5.70±0.51	11.19±2.02**	95.17±24.06**
江油小花叶附子水煎液组	5	5.20±0.56**	10.05±1.10**	94.37±22.14**
布拖小花叶附子水煎液组	5	5.30±0.52*	9.52±0.98**	80.58±19.77**

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.1.2 鸡蛋清致大鼠足跖肿胀实验结果 与空白组比较,阳性组大鼠在给药后0.5~6 h足跖肿胀度均显著降低($P < 0.01$);各附子水煎液组大鼠在给药后0.5 h足跖肿胀度均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);布拖大、小花叶附子水煎液组和江油小花叶附子水煎液组大鼠在给药后3 h足跖肿胀度均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);布拖大花叶附子小煎液组和江油小花叶附子水煎液组大鼠在给药后4 h足跖肿胀度均显著降低($P < 0.05$);江油大花叶附子水煎液组和布拖大花叶附子水煎液组大鼠在给药后6 h足跖肿胀度均显著降低($P < 0.05$)。总体而言,各附子水煎液抑制鸡蛋清致大鼠足跖肿胀的作用效果差别不大,结果见表2。

表2 给药不同时间后各组大鼠足跖肿胀度的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Determination results of toe swelling degree in rats in each group after different administration time($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,g/kg	0.5 h		1 h		2 h		3 h		4 h		6 h	
		肿胀度,mL	抑制率,%	肿胀度,mL	抑制率,%	肿胀度,mL	抑制率,%	肿胀度,mL	抑制率,%	肿胀度,mL	抑制率,%	肿胀度,mL	抑制率,%
空白组		1.713 0±0.363 0		1.553 0±0.274 0		1.403 0±0.259 4		1.200 0±0.237 3		0.921 0±0.213 9		0.748 0±0.217 4	
阳性组	0.005	0.168 0±0.158 9**	90.19	0.097 0±0.090 4**	93.75	0.089 0±0.122 4**	93.66	0.108 0±0.115 3**	91.00	0.066 0±0.102 6**	92.83	0.046 0±0.103 1**	93.85
江油大花叶附子水煎液组	5	1.346 0±0.267 4**	21.42	1.292 0±0.252 0	16.81	1.187 0±0.246 4	15.40	1.055 0±0.190 1	12.08	0.775 0±0.179 7	15.85	0.553 0±0.177 3*	26.07
布拖大花叶附子水煎液组	5	1.336 0±0.196 8**	22.01	1.279 0±0.220 9	17.64	1.229 0±0.207 3	12.40	0.924 0±0.145 6**	23.00	0.700 0±0.212 1*	14.55	0.563 0±0.222 9*	24.73
江油小花叶附子水煎液组	5	1.280 0±0.212 9**	25.28	1.279 0±0.299 1	17.64	1.187 0±0.312 2	15.40	0.894 0±0.305 3**	25.50	0.696 0±0.260 7*	24.43	0.601 0±0.291 6	19.65
布拖小花叶附子水煎液组	5	1.434 0±0.246 2*	16.29	1.411 0±0.233 2	9.14	1.290 0±0.264 7	8.05	0.968 0±0.159 6*	19.33	0.911 0±0.228 1	1.09	0.622 0±0.170 2	16.84

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.2 镇痛作用考察结果

3.2.1 冰醋酸致小鼠扭体反应实验结果 与空白组比较,各给药组小鼠的扭体次数均不同程度地减少,其中布拖小花叶附子水煎液组差异有统计学意义($P <$

0.05),提示布拖小花叶附子水煎液的镇痛效果较好,结果见表3。

3.2.2 小鼠热板致痛实验测定结果 与空白组比较,除阳性组大鼠在给药后1.5 h的痛阈值略有缩短外,其余各

表3 各组小鼠扭体反应的测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 3 Determination results of numbers of writhing body in mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量,g/kg	扭体潜伏期,min	扭体次数,次/15 min
空白组		3.10±0.97	33.89±17.08
阳性组	0.002 5	5.14±3.52	14.20±6.41
江油大花叶附子水煎液组	5.0	4.64±2.47	12.20±5.87
布拖大花叶附子水煎液组	5.0	4.18±0.99	13.70±7.66
江油小花叶附子水煎液组	5.0	4.35±3.85	12.50±7.88
布拖小花叶附子水煎液组	5.0	3.96±1.08	10.20±4.49*

注:与空白组比较,* $P<0.05$

Note: vs. blank group,* $P<0.05$

给药组小鼠在给药后0.5~2.0 h的痛阈值均不同程度地延长,其中以布拖小花叶附子水煎液组小鼠痛阈值延长较为显著,且在给药后1 h差异有统计学意义($P<0.01$),结果见表4。

表4 给药不同时间后各组小鼠痛阈值的测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 4 Determination results of pain threshold in mice in each group after different administration time ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量,g/kg	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h
空白组		11.92±3.87	16.29±8.38	21.06±14.20	25.53±17.28
阳性组	0.002 5	14.22±7.28	19.23±9.39	19.87±11.15	25.14±13.99
江油大花叶附子水煎液组	5.0	17.04±7.79	21.10±16.57	33.07±21.01	25.80±15.60
布拖大花叶附子水煎液组	5.0	20.18±15.14	28.27±15.59	22.60±11.14	31.40±17.47
江油小花叶附子水煎液组	5.0	20.85±13.55	31.87±19.77	31.47±18.81	30.77±17.78
布拖小花叶附子水煎液组	5.0	23.82±14.07	43.06±17.32**	35.26±18.91	36.46±16.98

注:与空白组比较,** $P<0.01$

Note: vs. blank group,** $P<0.01$

4 讨论

本研究采用抗炎、镇痛实验的经典造模方法比较了不同产地和叶形附子水煎液的抗炎、镇痛作用。在抗炎实验中,二甲苯致小鼠耳廓肿胀及鸡蛋清致大鼠足跖肿胀分别是以水肿和渗出为主的急性炎症反应^[12],雌性激素对此有一定抗炎作用,故本研究选用雄性动物(δ)进行研究。醋酸地塞米松是一类肾上腺皮质激素,可减轻和防止组织对炎症的反应,从而减轻炎症的表现。本研究结果显示,醋酸地塞米松,布拖大、小花叶附子水煎液和江油小花叶附子水煎液均可明显减轻二甲苯致小鼠的耳廓肿胀;各附子水煎液对鸡蛋清致大鼠早期(0.5 h)足跖肿胀均有一定抑制作用,但随时间延长此效果减弱。这提示布拖大花叶、江油小花叶、布拖小花叶附子对急性炎症有一定抑制作用。在镇痛实验中,镇痛阳性药吗啡效果不明显,其具体原因有待分析。布拖小花叶附子的镇痛效果较佳,对于减少扭体疼痛次数及延

长热板痛阈值均有较为显著的作用。

综上所述,布拖大、小花叶附子水煎液和江油小花叶附子水煎液的抗炎作用好,布拖小花叶附子水煎液对物理性疼痛(热板致痛)和炎性疼痛(冰醋酸致痛)均具有明显的镇痛作用。中药疗效的物质基础主要为植物次生代谢产物,其含量的高低不仅与外界生长环境、栽培、采收等有关,还与有机体的遗传特性有关,即品种来源对药材的品质有重要的影响。本研究结果也显示,不同产地、不同叶形的附子抗炎镇痛药效有明显的差异,这为不同产地和不同叶形附子的临床应用提供了一定依据。

参考文献

- [1] 彭成,彭代银.中药药理学[M].北京:中国医药科技出版社,2014:61-163.
- [2] 王宪楷,赵同芳.中坝附子及其化学成分[J].中国药学杂志,1993,28(11):690-692.
- [3] 侯大斌.川乌(*Aconitum carmichaeli* Debx.)生物学与遗传多样性研究[D].雅安:四川农业大学,2005.
- [4] 夏燕莉,胡平,张美.附子优良品种选育及生物学特性研究[J].种子,2009,28(2):85-89.
- [5] 朱景乐,杜红岩,李芳东,等.3个杜仲品种叶片性状及活性成分质量分数[J].东北林业大学学报,2014,42(3):42-44.
- [6] 陈宝芳,仇劲,毕研文,等.粉花桔梗与紫花桔梗中氨基酸组成与含量的比较[J].农业科技通讯,2016(6):140-142.
- [7] 史宏志,刘国顺,杨惠娟,等.烟草香味学[M].北京:中国农业出版社,2011:24.
- [8] 吕芳,苏幼红,张富春,等.植物活性成分对表观遗传调节的研究概况[J].中草药,2008,39(10):1580-1583.
- [9] 文欢,彭成,饶朝龙,等.花叶型与艾叶型乌头叶片基因组DNA甲基化修饰的MSAP分析[J].中国中药杂志,2016,41(19):3602-3608.
- [10] 杨辉,杨亮,蒋玲,柴胡,竹叶柴胡对小鼠的抗炎镇痛作用研究[J].中国药房,2012,23(47):4442-4444.
- [11] 梅超南,曾瑾,赵军宁.不同产地附子炮制品对急性心衰大鼠心功能指标作用的比较研究[J].世界科学技术(中医药现代化),2014,16(12):2652-2657.
- [12] Garbacki N, Gloguen V, Damas J, et al. Inhibition of cotton oil-induced oedema in mice ear skin by capsular polysaccharides from cyanobacteria[J]. *N-S Arch Pharmacol*, 2000,361(4):460-464.

(收稿日期:2016-11-17 修回日期:2017-05-12)

(编辑:林 静)