

白蚁菌圃抗炎机制的研究

薛德钧¹, 曹娟² (1.江西中医学院, 南昌 330004; 2.江西省儿童医院, 南昌 330006)

摘要: 目的 探讨白蚁菌圃抗炎的作用机制。方法 采用角叉菜胶致正常及切除双侧肾上腺小鼠足肿胀;角叉菜胶致大鼠胸膜炎;蛋清致小鼠足肿胀的炎症模型。分别用酶联免疫吸附法、紫外分光光度法和荧光分光光度法测炎性渗出液中白三烯(LTB₄)、前列腺(PGE₂)、5-羟色胺(5-HT)及组胺的水平。结果 角叉菜胶致正常组及去肾上腺组小鼠足肿胀炎症组织及血清中PGE₂含量与阴性对照组比有显著性差异;在蛋清致足肿胀中的组胺和5-羟色胺的含量与阴性对照组比有显著性差异;在角叉菜胶致胸膜炎大鼠胸腔渗出液中白三烯含量与阴性对照组比有显著性差异。结论 白蚁菌圃的抗炎作用可能与其抑制炎症部位PGE₂、LTB₄、5-HT及组胺的水平有关,其抗炎作用不依赖下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统的调节。

关键词: 白蚁菌圃; 抗炎机制

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2009)07-0521-04

Study of Anti-inflammatory Mechanism About Fungus Garden of *Odontotermes Formosanus*

XUE Dejun¹, CAO Juan² (1.Jiangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanchang 330004, China; 2.Jiangxi Children's Hospital, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE In order to study anti-inflammation mechanism of fungus garden of *Odontotermes formosanus*. **METHODS** Four types of models of the normal mouse and the excision two-sides adrenal gland mouse paw swollen induced by carrageenan, rat pleurisy induced by carrageenan, mouse paw swollen induced by allurmin were set up. The enzyme linked immunosorbent assay, the spectrophotometric and fluorometric method were used separately to measure the leukotriene (LTB₄), the prostate gland (PGE₂), hydroxy tryptamine (5-HT) and histamine level in the inflammatory percolate. **RESULTS** There was significant difference of PGE₂, 5-HT, LTB₄ or histamine between four types of models and the negative control group.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.20362006)

作者简介: 薛德钧, 男, 教授, 博导 Tel: (0791)7118621 E-mail: xdj4908@21cn.com

CONCLUSION The anti-inflammation function of fungus garden of *Odontotermes formosanus* may be related to its suppression of PGB_2 , LTB_4 , 5-HT and histamine, and does not rely on hypothalamic-pituitary-adrenocortical system.

KEYWORDS: fungus garden of *Odontotermes formosanus*; anti-inflammation mechanism

目前,在对天然药物的研究中,对动物药的研究较少,黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* 在昆虫分类系统中属比较原始的有翅昆虫等翅目白蚁科,蚁巢在生物学上称为菌圃,它是白蚁的代谢产物,是一种纯生物物质。至今,未见有从黑翅土白蚁菌圃中分离和鉴定其中所含的抗炎活性物质的报道,笔者对白蚁及其菌圃进行了系统的化学成分及生物活性研究。结果表明,它们所含的成分复杂,并从中分离或鉴定出其中所含的数十种化学成分^[1-3];药理实验表明白蚁具有显著的抗衰老作用^[4];白蚁菌圃则能减少冰醋酸诱发小鼠腹腔的炎性渗出、抑制棉球植入致大鼠的肉芽组织增生,减轻二甲苯致小鼠耳廓肿胀程度,抑制角叉菜胶致小鼠的足肿胀程度等抗炎作用^[5]。抗炎有多种作用途径,本试验应用不同抗炎原理对白蚁菌圃的抗炎作用进行研究,试图明确其抗炎机制,为白蚁菌圃的深入研究和开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 药物及试剂

白蚁菌圃粉碎成粗粉,乙醇回流提取3次,合并3次滤液,蒸馏回收溶剂,将提取物浓缩成浸膏,再用大孔树脂除杂,以富集熊果酸等五环三萜类化学成分,备用。使用时用0.5%的羧甲基纤维素钠蒸馏水溶液配成相应浓度。醋酸地塞米松(天津药业集团有限公司,批号:031042);甲醇、氢氧化钾、正丁醇、正庚烷、盐酸均为分析纯。半胱胺酸(上海蓝季科技发展有限公司,批号:050520);高碘酸钠(广东汕头市西陇化工厂,批号:0601111,分析纯);佛氏完全佐剂(Sigma公司,批号:F-5881)。角叉菜胶(Sigma公司,批号:034K0128)。

1.2 主要仪器

722 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司产品);FN60 电子天平(上海天平仪器厂产品);YXQ-SG46-280 压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);CSYF 烤箱(重庆试验设备厂)。Mikro.22R 低温离心机(Hettich);酶标仪(Thermo Multiskan Mk3)。

1.3 实验动物

昆明种雄性小鼠,体重18~22 g;SD雄性大鼠,

体重180~220 g;购于江西医学院实验动物中心,合格证号:021~9602。

2 方法

2.1 对角叉菜胶致正常小鼠足肿胀炎症组织及血清中 PGE_2 含量的影响

取健康小鼠60只,按体重随机分为5组,即阴性对照组(造模后生理盐水组)、阳性对照(地塞米松 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、白蚁菌圃高($40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、低剂量组($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、正常组。每天ig给药1次,连续7 d,末次给药后1 h,每只小鼠左后足跖皮下进针穿过肌层至踝关节处注射0.1%角叉菜胶生理盐水溶液0.1 mL致炎,在致炎后4 h,拔眼球取血并脱臼处死小鼠。参照文献^[6]测 PGE_2 含量,自踝关节下剪下致炎足,称重,划破足跖部皮肤投入有2.5 mL生理盐水的试管中,浸泡并不停地振摇,2 h后弃足,将浸泡液和血于 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min。各取上清液0.15 mL,加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的KOH甲醇2 mL。于 50°C 下温育。20 min后每管加入2.5 mL甲醇。于278 nm波长下比色,以吸光度表示 PGE_2 含量。

2.2 对角叉菜胶致去肾上腺小鼠足肿胀炎症组织及血清中 PGE_2 含量的影响

取健康小鼠60只,在无菌条件下手术摘除双侧肾上腺。术后当天肌注青霉素抗感染,每天1次,共3 d,并以糖盐水代替自来水饲养。按体重随机分为5组,同“2.1”项。术后第4天开始给药每天ig给药1次,连续7 d。末次给药后1 h,每只小鼠左后足跖皮下进针穿过肌层至踝关节处注射0.1%角叉菜胶生理盐水溶液0.1 mL致炎,在致炎后4 h,拔眼球取血并脱臼处死小鼠。自踝关节下剪下致炎足,称重,划破足跖部皮肤投入有2.5 mL生理盐水的试管中,浸泡并不停地振摇。2 h后弃足,将浸泡液和血于 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min。各取上清液0.15 mL,同“2.1”法测定 PGE_2 的含量。

2.3 对角叉菜胶致胸膜炎大鼠胸腔渗出液中白三烯 LTB_4 含量的影响

取雄性SD大鼠50只,按体重随机分为5组,分组给药,方法同“2.1”。于末次给药12 h后,每只大鼠胸腔注射2%角叉菜胶致炎。致炎10 d后,

股动脉取血留用,并脱臼处死。在横膈周边部打开胸腔,吸出渗出液,于 4℃下 4 000 r·min⁻¹离心 15 min。取上清液留用。按照大鼠白三烯 LTB₄试剂盒说明书用酶标法测 LTB₄的含量。

2.4 对蛋清致小鼠足肿胀炎性组织中组织胺和 5-羟色胺的影响

取健康小鼠 60 只,分组给药同“2.1”项。末次给药后 1 小时,每只小鼠右后跖部皮下注射 10%新鲜蛋清生理盐水溶液 0.1 mL。致炎后 40 min 沿踝关节上 0.5 mm 处剪下致炎足,称重,划破皮肤组织后浸泡于酸化正丁醇 4.0 mL 中 4 h,超声处理 20 min 后去足离心,取上清液 2.5 mL 加入有正庚烷 3 mL 和 0.1 mol·L⁻¹ HCl 1.2 mL 溶液中,振荡 5 min,离心(5 min, 3 000 r·min⁻¹),分别取水相 0.5 mL 两份,一部分加三蒸水 1.5 mL 再加 0.4 mol·L⁻¹ NaOH 0.5 mL,混匀,再到到含 0.1%OPT 甲醇液 0.1 mL 试管内,于 21-22℃环境中反应 10 min 后加 0.5 mol·L⁻¹ HCl 0.5 mL 终止反应,于 360 nm/440 nm 处测定组织胺含量;另一部分加 0.1 mL 0.5%半胱氨酸于含 0.04%OPT-HCl 溶液 3 mL 的试管内,再加 0.1 mL 0.02%NaIO₄ 溶液于试管内,沸水浴 10 min,于 365 nm/480 nm 处测 5-HT^[7]。

3 结果

3.1 白蚁菌圃提取物对角叉菜胶致正常小鼠足肿胀炎症组织及血清中 PGE₂ 含量的影响

与阴性对照组比,白蚁菌圃的高剂量组能显著抑制致炎足中 PGE₂ 的增加($P < 0.01$),强度比阳性组的更大,白蚁菌圃的高低剂量组及地塞米松都能显著的抑制血清中 PGE₂ 的增加($P < 0.01$),但是对正常组小鼠血清中 PGE₂ 的未显示出明显影响,结果见表 1。

表 1 对角叉菜胶致正常小鼠肿胀足中 PGE₂ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 1 Effect on the contents of PGE₂ in edema of normal mice swollen paws induced by carrageenan ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量	致炎足中 PGE ₂	血清中 PGE ₂
阴性对照组	20 mL·kg ⁻¹	0.298±0.011	0.602±0.018 ³⁾
阳性对照组	5 mg·kg ⁻¹	0.260±0.011 ¹⁾	0.367±0.044 ²⁾
白蚁菌圃	40 g·kg ⁻¹	0.223±0.016 ²⁾	0.445±0.038 ²⁾
	23 g·kg ⁻¹	0.277±0.014	0.394±0.0474 ²⁾
正常组	20 mL·kg ⁻¹	—	0.337±0.0413

注:与阴性对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较,³⁾ $P < 0.01$
Note:Compared with the negative control group,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; compared with the normal group,³⁾ $P < 0.01$

3.2 白蚁菌圃对角叉菜胶致去肾上腺小鼠足肿胀炎症组织及血清中 PGE₂ 含量的影响

与正常组比较,阴性对照中 PGE₂ 含量显著增高,说明造模成功;与阴性对照组比,白蚁菌圃的高剂量组去肾上腺小鼠足肿胀炎症组织中的 PGE₂ 含量明显减低($P < 0.01$);白蚁菌圃的两个剂量组及阳性组致炎血清中 PGE₂ 的含量都明显减少,而且白蚁菌圃的高低两组有较明显的量效关系;正常组中 PGE₂ 含量无明显变化,结果见表 2。

表 2 对角叉菜胶致去肾上腺小鼠肿胀足中 PGE₂ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 2 Effect on the contents of PGE₂ on edema of adrenalectomized mice swollen paws induced by carrageenan ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量	致炎足中 PGE ₂	血清中 PGE ₂
阴性对照组	20 mL·kg ⁻¹	0.400±0.0095	0.949±0.069 ³⁾
阳性对照组	5 mg·kg ⁻¹	0.298±0.0116 ²⁾	0.646±0.059 ²⁾
白蚁菌圃	40 g·kg ⁻¹	0.346±0.0084 ²⁾	0.714±0.056 ²⁾
	23 g·kg ⁻¹	0.368±0.0088 ¹⁾	0.742±0.0689 ²⁾
正常组	20 mL·kg ⁻¹	—	0.650±0.0405

注:与阴性对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较,³⁾ $P < 0.01$
Note:Compared with the negative control group,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; compared with the normal group,³⁾ $P < 0.01$

3.3 对角叉菜胶致大鼠胸膜炎渗出液中 LTB₄ 含量的影响

白蚁菌圃的高低剂量组与阴性对照组比能显著减少胸膜炎大鼠渗出液中白三烯含量的增加($P < 0.01$),高低剂量组间有一定区别,但不显著,结果见表 3。

表 3 对角叉菜胶致大鼠胸膜炎渗出液中 LTB₄ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Effects on the contents of LTB₄ in the pleural exudates in pleuritis model rats induced by carrageenan ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	白三烯/pg·mL ⁻¹
阴性对照组	20 mL·kg ⁻¹	85.066±7.266 ²⁾
阳性对照组	5 mg·kg ⁻¹	48.364±2.624 ¹⁾
白蚁菌圃	40 g·kg ⁻¹	58.259±4.661 ¹⁾
	23 g·kg ⁻¹	54.389±3.572 ¹⁾
正常组	20 mL·kg ⁻¹	47.165±2.9501

注:与阴性对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与正常组比较,²⁾ $P < 0.01$
Note:Comporred with the negative xontrol group,¹⁾ $P < 0.01$; compared with the normal group,²⁾ $P < 0.01$

3.4 对蛋清致小鼠肿胀足中组胺和 5-HT 含量的影响

白蚁菌圃的两个组分及地塞米松都能显著的

抑制炎症组织中组织胺和 5-羟色胺的增加，同时也显示对正常组小鼠体内组胺和 5-羟色胺无明显影响，结果见表 4。

表 4 对蛋清致小鼠肿胀足中组胺和 5-HT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Tab 4 Effect on the contents of histamine and 5-HT on edema of mice swollen paws induced by albumin ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂 量	组 胺	5-羟色胺
阴性对照组	20 mL·kg ⁻¹	65.31±5.93	56.976±4.666 ³⁾
阳性对照组	5 mg·kg ⁻¹	51.14±4.27	38.119±6.160 ²⁾
白蚁菌圃	40 g·kg ⁻¹	54.36±5.09	43.001±3.706 ¹⁾
	23 g·kg ⁻¹	58.73±6.11	41.692±3.878 ¹⁾
正常组	20 mL·kg ⁻¹	50.13±3.98	38.093±4.901

注：与阴性对照组比较，¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与正常组比较，³⁾ $P<0.01$
Note:Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the normal group, ³⁾ $P<0.01$

4 讨论

炎症是对感染、脓毒血症、组织创伤和坏死组织、缺血再灌流损伤等的局部反应，由激活的免疫细胞介导，并合成、释放致炎因子，有利于消灭入侵的微生物、清除坏死组织、促进修复及伤口的愈合。适当的免疫与炎症反应是维持健康所必需的，但炎症反应过强或不当都会对人体造成危害，此时需要药物干预，药物的抗炎作用主要是通过以下途径进行：影响下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统；调节花生四烯酸代谢；影响炎症介质的合成释放等。

前列腺素是花生四烯酸经环氧化酶催化加氧生成的,而 LTB₄ 是花生四烯酸脂氧酶途径的产物，白蚁菌圃能显著降低角叉菜胶致正常小鼠和去肾上腺小鼠肿胀足中 PGE₂ 含量和急性胸膜炎模型胸腔渗液中的 LTB₄ 含量，说明白蚁菌圃对环氧酶和脂氧酶途径都有一定的抑制作用;对正常小鼠体内的 PGE₂ 及 LTB₄ 含量无明显影响，说明白蚁菌圃不会影响提内正常的介质分泌释放；组胺是最早

发现的化学介质之一,它参与多种病理、生理活动，5-HT 既是神经递质又是免疫细胞的活性分泌物，其炎性作用主要是通过多种受体介导，白蚁菌圃能降低蛋清致小鼠足肿胀炎性组织中组织胺和 5-HT 的含量，而对正常小鼠体内组胺和 5-HT 无明显影响，说明白蚁菌圃的抗炎作用与其能抑制炎症介质的释放有关并不影响机体正常分泌功能；下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴调控肾上腺糖皮质激素的释放，具有脑源性炎症调节机制，而起作用的靶位就是肾上腺，很多药物的抗炎作用与其启动体内 HPA 系统有关，本试验表明，白蚁菌圃对去肾上腺致炎小鼠提内的 PGE₂ 有抑制作用，说明白蚁菌圃的抗炎作用不依赖于下丘脑-垂体-肾上腺的调节。

REFERENCES

[1] XUE D J, ZHOU H, ZHANG M, et al. Study of fat-soluble compounds from fungus garden of *Odontotermes formosanus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(Spl): 76.
[2] XUE D J, ZHOU H, ZHANG M,et al.Study of water-soluble compounds from fungus garden of *Odontotermes formosanus* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2005, 28(10):873-875.
[3] XUE D J, WANG X L. Study of chemical composition from *Odontotermes formosanus* Skiraki [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006,37(7):989-990.
[4] WANG H X, WANG X L,ZHU J G,et al.Study of delays senile pharmacology active preliminary from *Odontotermes formosanus* Skiraki [J]. J Jiangxi Coll Tradit Chin Med(江西中医学院学报), 2003,15(3):45.
[5] CAO J,SUN T, ZHANG M.Anti-inflammatory effect of termitarium [J].J Chin Med Mater (中药材), 2006, 29(10): 1011-1013.
[6] HUANG P G, MA C G, XU S Y. The anaigesic effects of indomethacin are strengthened with verapmil,nifedipine and tetrandrine [J]. Acta Pharmacol Sin(中国药理学报), 1993, 9(1): 36.
[7] HE G H,ZHOU S Y,HU J,et al.Determination of histamine in tissues by fluorometric method [J]. J Huazhong Univ Sci Technol (华中科技大学学报), 2007, 36(2): 275-278.