

闽产三叶青地上部分提取物体内抗炎镇痛作用研究

廖淑彬, 蔡伟炜, 陈丹*, 谢平, 黄娇, 朱仙慕, 马国萍(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

摘要: 目的 研究闽产三叶青地上部分提取物体内抗炎镇痛作用。方法 分别采用低、中、高剂量的闽产三叶青地上部分提取物, 抗炎作用实验以二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型并以醋酸泼尼松为阳性药、角叉菜胶致大鼠足肿胀急性炎症模型并以醋酸地塞米松为阳性药、大鼠棉球肉芽组织增生慢性炎症模型并以醋酸地塞米松为阳性药, 镇痛作用实验以化学刺激法(扭体法)及热刺激法(热板法)并以罗通定为阳性药。结果 与模型组比较, 闽产三叶青地上部分提取物中、高剂量组及粗提物组对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀有明显的抑制作用(依次为 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), 耳肿胀抑制率分别为 22.86%, 38.79%, 20.62%; 提取物中、高剂量组及粗提物组对角叉菜胶致大鼠足肿胀急性炎症有明显的抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 提取物低、中、高剂量组及粗提物组均能显著减少大鼠棉球肉芽组织增生慢性炎症模型中大鼠肉芽肿的重量(依次为 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$), 其抑制率分别为 28.12%, 46.41%, 59.58%, 44.50%。与模型组比较, 在 60, 90 min, 提取物高剂量组能有效提高小鼠的痛阈值延长率($P<0.05$, $P<0.01$), 痛阈值延长率最高达 65.58%; 提取物中、高剂量组及粗提物组能有效抑制醋酸致痛的小鼠扭体次数(依次为 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), 小鼠扭体潜伏期明显延长(依次为 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), 扭体次数明显减少(依次为 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), 镇痛抑制率最高达 51.80%。结论 闽产三叶青地上部分提取物具有明显的体内抗炎镇痛作用。

关键词: 三叶青; 地上部分; 提取物; 福建; 抗炎; 镇痛

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)03-0319-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.004

Anti-inflammatory and Analgesic Effects of the Extracts of *Tetrastigmatis Hemsleyanum*'s Aerial Parts from Fujian *in Vivo*

LIAO Shubin, CAI Weiwei, CHEN Dan*, XIE Ping, HUANG Jiao, ZHU Xianmu, MA Guoping(Department of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the anti-inflammatory and analgesic effects *in vivo* of extracts of *Tetrastigmatis hemsleyanum*'s aerial parts from Fujian. **METHODS** High, middle and low dose groups of extracts of *Tetrastigmatis hemsleyanum*'s aerial parts from Fujian were utilized respectively, the anti-inflammatory effects study were developed with models of xylene-induced ear edema in mice of acute inflammation(use prednisone as positive drug), carrageenan-induced paw edema of acute inflammation(use dexamethasone acetate as positive drug) and cotton pellet induced granuloma tissue growth in rat of chronic inflammation(use dexamethasone acetate as positive drug); and the analgesic effects were developed with mice writhing test and mice hot plate test (use rotundine as positive drug). **RESULTS** Compared with the model group, medium and high dose of extracts of *Tetrastigmatis hemsleyanum*'s aerial parts from Fujian and crude extracts significantly inhibited xylene-induced ear edema in mice($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), and the inhibition rates were respectively 22.86%, 38.79%, 20.62%; medium and high dose of *Tetrastigmatis hemsleyanum*'s aerial parts from Fujian and crude extracts could significantly inhibit carrageenan-induced rat paw edema($P<0.05$ and $P<0.01$); low, medium and high dose of extracts of *Tetrastigmatis hemsleyanum*'s aerial parts from Fujian and crude extracts could significantly reduced the formation of granulomatous tissue($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$), and the granuloma inhibition rates were 28.12%, 46.41%, 59.58%, 44.50%, respectively; compared with the model group, at 60, 90 min, in hot plate test, high dose of extracts of *Tetrastigmatis hemsleyanum*'s aerial parts from Fujian could enhance the extension rate of pain threshold efficiency in mice($P<0.05$, $P<0.01$), the maximum of analgesic ratio was 65.58%; and in acetic acid writhing test, medium and high dose of extracts of *Tetrastigmatis hemsleyanum*'s aerial parts from Fujian and crude extracts could significantly inhibit acetic acid-induced writhing pain in mice($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), and the mice's writhing latency was remarkably prolonged($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), writhing responses decreased markedly($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), the maximum of inhibitory ratio was 51.80%. **CONCLUSION** The extracts of *Tetrastigmatis hemsleyanum*'s aerial parts from Fujian has significant anti-inflammatory and analgesic effect *in vivo*.

KEY WORDS: *Tetrastigmatis hemsleyanum*; aerial parts; extract; Fujian; anti-inflammatory; analgesic effect

基金项目: 福建省科技计划项目(2010Y2004); 中管局中药分析学重点学科校管课题(X2014096-学科)

作者简介: 廖淑彬, 女, 硕士生 Tel: 13358261594 E-mail: 1281397802@qq.com *通信作者: 陈丹, 女, 博士, 教授 Tel: 13515026709 E-mail: gscd2@163.com

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et. Gilg) 别名蛇附子、石抱子、三叶扁藤、金线吊葫芦、金丝吊葫芦、破石珠、三叶对等,为葡萄科崖爬藤属植物。中医临床常用于治疗高热惊厥、肺炎、肝炎、风湿、咽痛、瘰癧、痈疮疮疖等。近年来,临床上将三叶青用于抗肿瘤、抗艾滋病毒、治疗血液病及心血管疾病、肝炎、肺炎等感染性疾病^[1-2]。炎症是机体对损伤因子所产生的正常防御反应过程,有研究发现炎症与多种疾病,包括血栓、动脉硬化、肿瘤等疾病的形成有关^[3-4]。抗炎类生物化学药物由于有较大的不良反应而限制了其长期临床用药。近年来,有关传统中医药通过整体论治、辨证论治、调节患者全身免疫状况等手段,对炎症性疾病的治疗在临床上也取得了显著疗效^[5-6]。课题组前期实验证实,闽产三叶青地上部分提取物(extracts of *Tetrastigmatis hemsleyanum's* aerial parts from Fujian, THAA)具有一定的抗炎作用^[7]。本实验在前期研究基础上分别采用二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型、角叉菜胶致大鼠足肿胀急性炎症模型以及大鼠棉球肉芽组织增生慢性炎症模型,对低、中、高剂量的闽产三叶青地上部分提取物及粗提物进行体内抗炎作用研究,阐明其体内抗炎作用,为进一步开发三叶青地上部分的药用价值、开展制剂研究及体内过程研究奠定实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AR2140 万分之一电子天平和 ARA520 百分之一电子天平均购自梅特勒-托利多仪器上海有限公司;ZH-ZZY 型足趾容积测量仪(广州飞迪生物科技有限公司);LDZX 型高压蒸汽灭菌锅(上海茸研仪器公司);RB-200 智能热板仪(成都泰盟软件有限公司)。

1.2 试药

THAA(自制,批号:20150205,总黄酮含量:59.98%);三叶青地上部分粗提物(自制,批号:20141115,总黄酮含量:12.80%);0.9%氯化钠注射液(福州海王福药制药有限公司,批号120624A04);醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:1409071,规格:每片 5 mg);醋酸地塞米松片(福州海王福药制药有限公司,批号:1507110,规格:每片 0.75 mg);角叉菜胶(美国 Sigma 公司,批号:127H1227);戊巴比妥钠(上海

医药集团有限公司,批号:060406);医用碘伏棉球(浙江欧洁科技股份有限公司,批号:150211);罗痛定片(广东九连山药业有限公司,批号:140503,规格:每片 30 mg);冰乙酸、二甲苯等试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级昆明种小鼠,♀♂皆用,体质量 18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号:SCXK(沪)2007-0005;清洁级 SD 大鼠,♂,体质量 175~185 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号:SCXK(闽)2012-0001。饲养环境温度(22±2)℃,环境湿度(55±5)%,保持室内自然通风,自由饮食、饮水。清洁级医学实验动物环境设施由福建中医药大学实验动物中心提供,使用许可证号:SYXK(闽)2014-0001。实验动物处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取三叶青地上部分药材粗粉,用 25 倍量 60%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h;合并提取液,滤过,减压回收乙醇并干燥,制得三叶青地上部分粗提物。取粗提物加水制成总黄酮含量约 3 mg·mL⁻¹ 溶液,经 HPD-100 大孔吸附树脂柱,先用蒸馏水洗至无混浊后,再用 40%乙醇洗脱收集并回收乙醇,浸膏 40℃下真空干燥成粉末,即得 THAA。

分别精密称取 THAA 适量,加生理盐水分别制成 12 或 48 mg·mL⁻¹ 高剂量组、6 或 24 mg·mL⁻¹ 中剂量组、3 或 12 mg·mL⁻¹ 低剂量组的供试品药液。

精密称取三叶青地上部分粗提物适量,加生理盐水制成 53 或 106 mg·mL⁻¹ 的三叶青地上部分粗提物组药液。

2.2 阳性药溶液的制备

取醋酸泼尼松片 10 片,精密称定,研细。精密称取适量粉末(约相当于醋酸泼尼松 25 mg),置 25 mL 量瓶中,加生理盐水溶解并稀释至刻度,即得浓度约为 1 mg·mL⁻¹ 的醋酸泼尼松药液。

取醋酸地塞米松片 10 片,精密称定,研细。精密称取适量粉末(约相当于醋酸地塞米松 25 mg),置 50 mL 量瓶中,加生理盐水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度约为 0.5 mg·mL⁻¹ 的醋酸地塞米松药液。

取罗通定片 10 片,精密称定,研细。精密称取适量粉末(约相当于罗通定 125 mg),置 25 mL 量瓶中,加生理盐水溶解并稀释至刻度,即得浓度约为 5 mg·mL⁻¹。

2.3 统计学分析

数据资料采用 SPSS 18.0 统计分析软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以单因素方差分析对多组数据进行比较,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异, $P < 0.01$ 为统计学上有极显著性差异。

2.4 THHA 对耳肿胀小鼠抑制作用

2.4.1 二甲苯致小鼠耳肿胀实验方法 取昆明种小鼠 60 只,♂,随机分为 6 组,每组 10 只,各组小鼠均灌胃给药,模型组灌胃生理盐水 [0.2 mL·(10 g)⁻¹],阳性对照组灌胃醋酸泼尼松 (10 mg·kg⁻¹),THAA 高剂量组(120 mg·kg⁻¹)、THAA 中剂量组(60 mg·kg⁻¹)、THAA 低剂量组(30 mg·kg⁻¹)和三叶青地上部分粗提物组(530 mg·kg⁻¹),分别灌胃给药,连续 3 d,每天 1 次。于末次给药后 1 h,在各组小鼠右耳廓两面均匀涂布二甲苯,每只 50 μL。左耳不涂为正常耳。致炎肿胀后 2 h,将小鼠颈椎脱臼处死,即刻沿耳廓边缘剪下小鼠的左、右两耳,用直径为 9 mm 打孔器分别在左、右耳的相同一部位打下圆耳片,于万分之一电子天平精密称重。每只小鼠右耳片质量与左耳片质量差值即为肿胀度 Δm ,并按以下公式计算耳肿胀抑制率 $I(\%)$: 肿胀度 Δm = 右耳片质量(g) - 左耳片质量(g); 耳肿胀抑制率 $I(\%) = [(\Delta m_{\text{模型组平均耳肿胀度}} - \Delta m_{\text{给药组平均耳肿胀度}}) / \Delta m_{\text{模型组平均耳肿胀度}}] \times 100\%$ 。

2.4.2 二甲苯致小鼠耳肿胀实验结果分析 实验结果表明,各组小鼠右耳涂布二甲苯致炎后 30 min,与未涂布二甲苯小鼠左耳比较,小鼠右耳开始出现明显红肿,提示二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型成立。与模型组比较,醋酸泼尼松组抑制耳廓肿胀度差异显著($P < 0.01$),肿胀抑制率为 40.24%; THAA 的中、高剂量组对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀有明显的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),抑制率分别为 22.86%, 38.79%,提示 THAA 具有一定的抗炎作用且呈剂量依赖性。结果见表 1。

2.5 THAA 对角叉菜胶致大鼠足肿胀的抑制作用

2.5.1 致炎剂的制备 精密称取角叉菜胶约 1 g,加生理盐水制成 1%的致炎剂。于 4 ℃冰箱保存备用。

表 1 THAA 对二甲苯耳肿胀致小鼠耳肿胀的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The influence of THAA effects on swelling of mouse ear caused by dimethylbenzene($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	耳肿胀度/mg	抑制率/%
模型组	—	14.20±1.44	—
醋酸泼尼松组	10	8.49±2.63 ²⁾	40.24
THAA 高剂量组	120	8.68±3.15 ²⁾	38.79
THAA 中剂量组	60	10.95±3.49 ¹⁾	22.86
THAA 低剂量组	30	12.06±3.44	15.09
粗提物组	530	11.27±3.37 ¹⁾	20.62

注:与模型组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

2.5.2 角叉菜胶致大鼠足肿胀造模方法 取 SD 大鼠 60 只,♂,随机分组,共 6 组,每组 10 只,即模型组[生理盐水, 1 mL·(100 g)⁻¹]、醋酸地塞米松组(0.005 g·kg⁻¹)、THAA 高剂量组(0.480 g·kg⁻¹)、THAA 中剂量组(0.240 g·kg⁻¹)、THAA 低剂量组(0.120 g·kg⁻¹)、三叶青地上部分粗提物组(1.060 g·kg⁻¹),均分别灌胃给药,连续给药 7 d。第 7 天,各组大鼠在灌胃给药前,在每只大鼠左后肢足趾踝关节正面上端 1.5 cm 处做一清晰横线标记,用足趾容积测量仪分别测定每只大鼠左后肢正常足趾的排水量。即为该鼠致炎前的足趾体积。各组大鼠分别灌胃给药 10 mL·kg⁻¹,给药 1 h 后,各组大鼠均用 1%的角叉菜胶上清液于大鼠左后肢足趾部(左后足掌心向踝关节方向)皮下注射,注射容积为每只 0.1 mL,造成急性足肿胀模型。

2.5.3 测定方法 采用排水法测定足趾排水容积,分别测量致炎前和致炎后 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h 大鼠的左后肢足容积,记录数据,并按以下公式计算足肿胀度 Δm 及足肿胀抑制率 $I(\%)$,采用 *t* 检验比较致炎前和致炎后的大鼠左后足趾容积变化,以 $P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异。肿胀度(Δm) = 致炎后左后足容积(μL) - 致炎前左后足容积(μL); 足肿胀抑制率 $I(\%) = [(\Delta m_{\text{模型组平均足肿胀度}} - \Delta m_{\text{给药组平均足肿胀度}}) / \Delta m_{\text{模型组平均足肿胀度}}] \times 100\%$ 。

2.5.4 角叉菜胶致大鼠足肿胀结果分析 实验结果表明,角叉菜胶能够明显诱导足趾肿胀,致炎后 0.5 h,足肿胀度约 1.5 mL;致炎后 1 h,足肿胀度约 1.8 mL;致炎后 2 h,足肿胀度约 2.5 mL;致炎后 4 h,足肿胀度约 2.8 mL,达到足肿胀高峰;致炎后 6 h,足肿胀度约 2.1 mL;致炎后 8 h,足肿胀度逐渐恢复至约 1.6 mL,与致炎后 0.5 h 相当,

而右后足趾容积并未发生明显变化, 以上结果提示角叉菜胶致大鼠足肿胀急性炎症模型成立。考察致炎后的多个时间点, 与模型组比较, 醋酸地塞米松组能显著抑制足肿胀($P<0.01$), THAA 中剂

量组、高剂量组、粗提物组对足趾肿胀炎症都有明显的抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示 THAA 对角叉菜胶诱导的大鼠足趾肿胀急性炎症具有抑制作用且呈剂量依赖性。结果见表 2~3。

表 2 THAA 对大鼠足趾肿胀的抑制作用($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The inhibition of THAA on rat paw swelling($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	足趾肿胀度/ μL					
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
模型组	—	1 554.8±50.8	1 717.4±43.6	2 454.7±28.2	2 788.3±59.9	2 114.1±84.0	1 646.4±77.9
醋酸地塞米松组	0.005	1 027.4±37.2 ²⁾	1 111±46.4 ²⁾	1 760.9±35.6 ²⁾	1 825.7±41.8 ²⁾	1 586.7±49.7 ²⁾	1 153±29.8 ²⁾
THAA 低剂量组	0.120	1 468.9±110.2	1 611.5±106.7	2 418.8±38.5	2 719.4±95.4	2 105.2±55.1	1 534.5±73.5
THAA 中剂量组	0.240	1 287.1±102.9 ¹⁾	1 399.7±75.9 ¹⁾	2 227.0±56.9 ²⁾	2 435.4±93.7 ¹⁾	1 881.6±68.8 ²⁾	1 322.7±44.9 ¹⁾
THAA 高剂量组	0.480	1 144.2±34.1 ²⁾	1 215.8±55.7 ²⁾	2 114.1±53.3 ²⁾	2 202.6±70.3 ²⁾	1 763.5±61.8 ²⁾	1 266.0±25.3 ²⁾
粗提物组	1.060	1 241.6±19.4 ¹⁾	1 443.2±37.6 ¹⁾	2 150.5±41.1 ¹⁾	2 540.9±32.8 ¹⁾	1 839.9±30.8 ²⁾	1 346.2±38.7 ¹⁾

注: 与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表 3 THAA 对大鼠足趾肿胀的抑制作用($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The inhibition of THAA on rat paw swelling($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	抑制率/%					
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
醋酸地塞米松组	0.005	50.00	49.81	35.49	42.07	32.67	43.04
THAA 低剂量组	0.120	8.14	8.70	1.84	3.01	0.55	9.76
THAA 中剂量组	0.240	25.38	26.10	11.65	15.42	14.40	28.24
THAA 高剂量组	0.480	38.93	41.20	17.42	25.60	21.72	33.18
粗提物组	1.060	29.69	22.52	15.56	10.81	16.99	26.19

2.6 THAA 对大鼠棉球肉芽肿增生的抑制作用

2.6.1 棉球的处理 将脱脂棉制成约(20±1)mg 紧致的小棉球, 直径约 0.4 cm, 经高压灭菌预处理后, 置恒温干燥箱 60 ℃干燥 3 h, 取出无菌条件下称重, 干燥保存, 备用。

2.6.2 肉芽肿的形成和测定 取 SD 大鼠 60 只, ♂, 随机分组, 共 6 组, 每组 10 只, 实验前 1 d, 大鼠饥饿过夜, 正常饮水, 当日称重, 用 2%戊巴比妥钠 2.0 mL·kg⁻¹ 腹腔麻醉后固定, 用脱毛器脱去大鼠两侧腹股沟及背部处的毛, 碘伏消毒, 在无菌条件下, 切开大鼠右侧皮肤约 0.4 cm 的小口, 以止血钳扩充皮下组织, 将一个已高压灭菌棉球植入大鼠背部皮肤, 然后缝合皮肤, 碘伏消毒。次日开始给药, 各组大鼠分别灌胃给药 10 mL·kg⁻¹, 即模型组[生理盐水, 1 mL·(100 g)⁻¹], 醋酸地塞米松组(0.005 g·kg⁻¹), THAA 高剂量组(0.480 g·kg⁻¹), THAA 中剂量组(0.240 g·kg⁻¹)、THAA 低剂量组(0.120 g·kg⁻¹), 三叶青地上部分粗提物组(1.060 g·kg⁻¹), 均连续灌胃 7 d。第 8 天, 各组大鼠灌胃 1 h 后, 将各组大鼠颈椎脱臼处死, 在原缝

合处剪开皮肤, 剥离并取出棉球及周围肉芽组织, 置于已称重洁净平皿中, 恒温干燥箱 60 ℃开盖干燥至恒重, 放置室温后称重, 按以下公式计算肉芽肿净重 Δm 及肉芽肿增生抑制率 $I(\%)$ 。肉芽肿净重 $\Delta m[\text{mg}/(100 \text{ g})^{-1}]$ =干燥后棉球肉芽肿质量 $[\text{mg}/(100 \text{ g})^{-1}]$ -原棉球质量 $[\text{mg}/(100 \text{ g})^{-1}]$; 抑制率 $I(\%)=[(\Delta m_{\text{模型组平均肉芽肿净重}}-\Delta m_{\text{给药组平均肉芽肿净重}})/\Delta m_{\text{模型组平均肉芽肿净重}}] \times 100\%$ 。

2.6.3 大鼠棉球肉芽肿炎症实验结果分析 实验结果表明, 模型组大鼠干燥后棉球肉芽肿与原棉球质量有极显著差异($P<0.01$), 提示大鼠棉球肉芽肿慢性炎症模型成立。与模型组比较, 醋酸地塞米松组对大鼠肉芽肿炎症造成增生有明显的抑制作用, 其抑制率为 71.82 %; THAA 各剂量组均能显著减少大鼠肉芽肿的重量($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其中, 中、高剂量组对大鼠肉芽肿炎症造成组织增生的抑制作用均具有极显著性差异($P<0.01$), 低剂量组对大鼠肉芽肿炎症造成组织增生的抑制作用具有显著性差异($P<0.05$); 粗提物组对大鼠肉芽肿组织增生的抑制作用与 THAA 中剂量组相当,

对大鼠肉芽肿炎症造成组织增生的抑制作用具有显著性差异($P<0.05$)；THAA 低、中、高剂量组、粗提物组对大鼠棉球肉芽肿炎症造成组织增生的抑制率分别为 28.12%，46.41%，59.58%，44.50%。提示 THAA 具有抗炎作用且对大鼠肉芽肿组织增生的抑制作用呈剂量依赖性。结果见表 4。

表4 THAA 对大鼠棉球肉芽肿增生的抑制作用($n=10, \bar{x} \pm s$)
Tab. 4 The inhibition of THAA on rat granuloma hyperplasia($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肉芽肿净重/ $\text{mg} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$	抑制率/%
模型组	—	124.01 $\pm$ 2.28	—
醋酸地塞米松组	0.005	34.94 $\pm$ 3.42 ²⁾	71.82
THAA 低剂量组	0.120	89.14 $\pm$ 0.58 ¹⁾	28.12
THAA 中剂量组	0.240	66.45 $\pm$ 5.43 ²⁾	46.41
THAA 高剂量组	0.480	50.13 $\pm$ 1.45 ²⁾	59.58
粗提物组	1.060	68.82 $\pm$ 0.88 ²⁾	44.50

注：与模型组相比，¹⁾ $P<0.01$ ，²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$.

2.7 THAA 对小鼠的镇痛作用

2.7.1 热板法实验及结果分析 取昆明种小鼠，♀，采用热板法筛选小鼠，设定智能热板仪温度为(55 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ ，记录小鼠从放入智能热板仪中至出现

表5 THAA 对热刺激小鼠痛阈值的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 5 The influence of THAA effects on the pain threshold of mice($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	基础痛阈值/s	给药后不同时间痛阈值/s		
			30 min	60 min	90 min
模型组	—	15.81 $\pm$ 5.00	16.00 $\pm$ 6.21	15.78 $\pm$ 6.47	15.67 $\pm$ 5.92
罗通定组	50	15.49 $\pm$ 5.02	24.96 $\pm$ 13.94 ¹⁾	28.26 $\pm$ 11.19 ²⁾	30.22 $\pm$ 10.66 ²⁾
THAA 高剂量组	120	15.95 $\pm$ 7.45	19.95 $\pm$ 7.39	23.37 $\pm$ 6.94 ¹⁾	26.40 $\pm$ 8.53 ²⁾
THAA 中剂量组	60	14.86 $\pm$ 5.63	18.78 $\pm$ 7.02	20.77 $\pm$ 9.17	21.74 $\pm$ 7.62
THAA 低剂量组	30	16.47 $\pm$ 5.64	19.20 $\pm$ 5.80	18.63 $\pm$ 4.42	19.30 $\pm$ 4.09
粗提物组	530	14.26 $\pm$ 2.79	18.61 $\pm$ 6.97	18.94 $\pm$ 7.07	21.07 $\pm$ 5.98

注：与模型组相比，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表6 THAA 对热刺激小鼠痛阈值延长率的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 6 The influence of THAA effects on extension rate of pain threshold of mice($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药后不同时间痛阈值延长率/%		
		30 min	60 min	90 min
罗通定组	50	61.12	82.48	95.14
THAA 高剂量组	120	25.13	46.56	65.58
THAA 中剂量组	60	26.34	39.77	46.27
THAA 低剂量组	30	16.54	13.06	17.17
粗提物组	530	30.57	32.84	47.81

舔后足行为的时间(s)，作为该只小鼠的给药前痛阈值。于实验前对小鼠进行逐只筛选，5 s 内出现舔后足行为或 30 s 不出现舔后足行为的小鼠弃之不用。将筛选合格的 60 只小鼠随机分为 6 组，每组 10 只，即模型组[生理盐水，0.2 mL $\cdot$ (10 g) $^{-1}$]，罗通定组(50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)、THAA 高剂量组(120 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)，THAA 中剂量组(60 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)，THAA 低剂量组(30 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)，三叶青地上部分粗提物组(530 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)。

各组小鼠均分别灌胃给药，连续 3 d，每天 1 次。末次给药后，每隔 30 min 分别将各组小鼠依次放入智能热板仪，观察小鼠对热刺激的反应，以舔后足为指标，测定其痛阈值，连续 3 次。痛阈值 >60 s 者按 60 s 计。比较不同组别小鼠在不同时间的痛阈值，按下式计算痛阈值延长率(%)。

痛阈值延长率(%)=(给药后痛阈值-给药前痛阈值)/给药前痛阈值 $\times 100\%$ 。

实验结果表明，给药后 90 min，与模型组相比，THAA 可有效提高小鼠的痛阈值延长率，高剂量组痛阈值显著提高($P<0.01$)。提示 THAA 具有镇痛作用且镇痛效果与药物剂量呈正相关。结果见表 5~6。

2.7.2 扭体法实验及结果分析 取♀昆明种小鼠 60 只，按“2.7.1”项下分组，各组小鼠均分别灌胃给药，连续给药 3 d，每天 1 次。末次给药后 1 h，各组小鼠均腹腔注射 0.6%醋酸溶液(精密量取 150 μL 冰醋酸至 25 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得) 0.2 mL，记录每只小鼠自注射 0.6%醋酸溶液后 20 min 内出现的扭体反应次数，并按下式计算镇痛率(%)。实验结果表明，与模型组相比，THAA 中、高剂量组及三叶青地上部分粗提物均

可有效抑制醋酸致痛的小鼠扭体次数($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$), 且 THAA 高剂量组镇痛率 $>50\%$ 。结果见表 7。

镇痛率(%)=(给药组扭体次数-模型组扭体次数)/模型组扭体次数 $\times 100\%$ 。

表 7 THAA 对醋酸所致小鼠扭体反应的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 7 The influence of mouse torsion reaction caused by acetic acid($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	扭体次数/次	镇痛率%
模型组	—	38.80 ± 14.49	—
罗通定组	50	$10.70 \pm 6.72^{2)}$	72.42
THAA 高剂量组	120	$18.70 \pm 11.87^{2)}$	51.80
THAA 中剂量组	60	$24.40 \pm 12.45^{1)}$	37.11
THAA 低剂量组	30	28.20 ± 17.41	27.32
粗提物组	530	$23.50 \pm 14.98^{1)}$	39.43

注: 与模型组相比, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ 。

Note: Compared with model group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ 。

3 讨论

实验参考三叶青块根饮片的成人用药剂量, 成人 $15 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 以此剂量换算作为药理实验的中剂量组生药量, 再根据前期实验中 THAA 提取纯化得率折算出三叶青地上部分粗提物组剂量及 THAA 中剂量组剂量, 计算 THAA 高、低剂量组剂量。

醋酸泼尼松和醋酸地塞米松均是目前临床常用的抗炎药之一。实验中发现, 醋酸泼尼松对二甲苯致小鼠耳肿胀模型有较好的抗炎效果, 醋酸地塞米松对角叉菜胶致大鼠足肿胀模型和大鼠棉球肉芽肿增生模型均有较好的抗炎效果, 而醋酸泼尼松对后 2 种模型的抗炎药效不佳, 因此, 分别选用醋酸泼尼松和醋酸地塞米松为这 3 种炎症动物模型的阳性对照药。

炎症的发生发展与机体的年龄和环境温度关系密切, 年龄越小, 体内白细胞越活跃, 炎症反应较剧烈, 随着年龄增大, 机体的炎症反应降低; 并且, 环境温度越高, 白细胞的趋化作用越强, 炎症反应越强, 相反, 低温能抑制炎症反应。故实验选用小鼠体质量(20 ± 2)g, 大鼠体质量(180 ± 5)g, 环境温度为(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 环境湿度(55 ± 5)%, 实验结果重复性良好。

热板法是小鼠足部温度感受器受到热刺激后, 信息传导到高位中枢, 在其参与下完成的躯体缩爪反应^[8]。该法简便易行, 且对组织损伤小、动物可重复利用。考虑到♂小鼠受热后阴囊下垂,

阴囊触及热板会导致对反应过于敏感, 影响实验结果, 故热板法选用♀小鼠; 另外, 为了减少个体差异对热板法的实验结果产生影响, 实验前小鼠经过预先筛选, 剔除过分敏感的或过分迟钝的小鼠。

综合分析 THAA 对二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型抗炎作用、角叉菜胶致大鼠足肿胀急性炎症模型抗炎作用、大鼠棉球肉芽肿增生慢性炎症模型抗炎作用以及对小鼠的镇痛作用的研究结果表明, 闽产三叶青地上部分提取物对急性炎症早期的渗出和肿胀有明显的拮抗作用, 对炎症造成的纤维组织增生有抑制作用, 在一定程度上能提高热刺激小鼠的痛阈值, 减少醋酸所致小鼠的扭体反应, 并且 THAA 对急、慢性炎症的抑制效果及镇痛药效均与药物剂量呈正相关; THAA 的抗炎及镇痛药效多优于粗提物, 也提示这与由三叶青提纯制备的 THAA 总黄酮含量获得提高有关联, 说明运用优化后的制备工艺制得的 THAA 基本保留三叶青地上部分的抗炎有效成分。

REFERENCES

- [1] LIU D, YANG J S. A study on chemical components of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. native to China [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1999, 24(10): 611-612.
- [2] CAI W W, CHEN D, FAN S M, et al. Research review on chemical components and pharmacological effects of *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. Tianjin Pharm(天津药学), 2014, 26(1): 38-41.
- [3] LIAO Y H, YANG Y. The novel exploration of inflammation in atherosclerosis [J]. J Clin Cardiol(China)(临床心血管病杂志), 2014, 30(6): 461-463.
- [4] DANIEL W, JANELLE M W, GEOFFREY M C. Inflammation and cancer tumor initiation, progression and metastasis and Chinese botanical medicines [J]. J Chin Integr Med(中西医结合学报), 2010, 8(11): 1006-1013.
- [5] ZHU X M, YANG G S, LI X C. Research review on anti-inflammatory mechanism of action of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2013, 5(24): 111-112.
- [6] WANG J, CHENG X X, ZHU X L, et al. Effect of the union of Yiqi Bushen Fang and tripterygium wilfordii polyglycosidum on expression of VEGF and secretion of IL-6 and TNF- α in rats with diabetic nephropathy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(6): 711-716.
- [7] CAI W W, CHEN D, FAN S M, et al. Component analysis of aerial parts of *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. J Fujian Univ TCM(福建中医药大学学报), 2013, 23(5): 34-35, 42.
- [8] ZHANG Y Y, DU L L, PAN H, et al. Enhanced analgesic effects of propacetamol and tramadol combination in rats and mice [J]. Biol Pharm Bul, 2011, 34(3): 349-353.

收稿日期: 2016-08-18

(本文责编: 曹粤锋)