

接筋藤醇提物初步安全性及镇痛抗炎实验研究^{*}

张梦麒, 郭 琰, 赵春梅, 龚吕东, 杨和金, 苏 梅[△]

(云南省药物研究所/云南白药创新研发中心/云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: **目的** 研究接筋藤醇提物的小鼠灌胃给药急性毒性及镇痛抗炎作用, 为接筋藤醇提物的临床安全及开发提供实验依据。**方法** 采用最大耐受量及最小致死量实验观察接筋藤醇提物的急性毒性, 采用冰醋酸致小鼠扭体反应观察接筋藤醇提物的镇痛作用, 用二甲苯致小鼠耳肿胀法研究其抗炎作用。**结果** 本实验所设计剂量范围及条件下, 接筋藤醇提物 24h 内单次给药小鼠急性毒性实验的最小致死量为 30.91g/kg·bw (相当于生药 154.86 g/kg·bw); 最大耐受量为 24.73g/kg·bw (相当于生药 123.90g/kg·bw)。接筋藤醇提物能抑制醋酸所致小鼠扭体性疼痛, 并能抑制二甲苯所致小鼠耳廓肿胀。**结论** 本实验所设计剂量范围及条件下, 接筋藤醇提物最小致死量为 30.91g/kg·bw, 最大耐受量为 24.73g/kg·bw; 接筋藤醇提物具有明显的镇痛抗炎作用。

关键词: 接筋藤醇提物; 最小致死量; 最大耐受量; 镇痛; 抗炎

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)03-0024-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.03.006

接筋藤为水龙骨科 *Polypodiaceae* 骨牌蕨属 *Lepidogrammitis* 植物抱石莲 *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching^[1], 别名筋骨草, 形似皮条, 有小叶, 身上有毛, 无花。气味甘, 性平。主要分布于云南省南部及东北部地区, 附生于山间阴湿树干或岩石上^[2]。据《滇南本草》中记载: 接筋藤“主治跌打损伤, 散血和血, 筋骨疼痛, 以酒为使, 服之即愈”。因此推断接筋藤具有镇痛抗炎作用。本实验用接筋藤醇提物给予小鼠灌胃, 观察其急性毒性, 并采用急性炎症模型及疼痛模型, 观察其镇痛抗炎作用, 为接筋藤醇提物的临床安全及开发提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠, 周龄 4~6 周, 雌雄各半, 体质量 18~22g, 由广东省医学实验动物中心提供。许可证号: SCXK(粤)2008-0002。小鼠自由饮水, SPF 大小鼠生长繁殖饲料进食。饲养温度为 (25±2)℃, 相对湿度 40%~70%。

1.2 药品与试剂

接筋藤醇提物, 提取率为 19.96%, 由云南省药物

研究所化学研究室提供, 批号: 20160714。阿司匹林肠溶片, 100mg/片, Bayer Schering Pharma 生产, 批号: BJ20988; 冰醋酸, 国药集团化学试剂有限公司生产, 批号: 20140630; 生理盐水, 昆明南疆制药有限公司生产, 批号: B160216 E2; 二甲苯, 重庆川东化工(集团)有限公司生产, 批号: 20140701。

1.3 仪器

JJ-2000 型电子天平, 美国双杰兄弟(集团)有限公司常熟市双杰测试仪器厂生产、OSB-2000 型水浴锅, 上海爱郎仪器有限公司生产、PL-203 电子分析天平, METTER-TOLEDO(上海)有限公司生产、ELGA LA 613 超纯水机, 英国 ELGA LabWater/VWS(UK) Ltd 生产。

2 实验方法

2.1 急性毒性实验预试^[3-5]

选取 SPF 级 KM 小鼠 16 只, 体质量 18~22g, 雌雄各半。实验前小鼠禁食不禁水 6h。接筋藤醇提物能配制混悬液的最高浓度为 0.755g/mL (30.18g/kg·bw), 以 0.8 作为剂量比距。将上述小鼠随机分为 4 组, 每组 4 只, 雌雄各半, 即 30.18g/kg·bw、24.14g/kg·

^{*} 基金项目: 云南省科技厅科技重大专项(2015Z703)

收稿日期: 2017-05-05

作者简介: 张梦麒(1987-), 男, 云南个旧人, 理学硕士, 助理工程师, 研究方向: 天然药物药效学活性筛选。

[△] 通信作者: 苏梅, E-mail: smkms@126.com

bw、19.32g/kg·bw 和 15.45g/kg·bw 剂量组(相当于生药 151.20g/kg·bw、120.94g/kg·bw、96.79g/kg·bw 和 77.40g/kg·bw)。各组按 40mL/kg·bw 灌胃给药,观察动物一般症状及死亡情况,连续观察 7d,决定正式实验方法及给药剂量。

2.2 最大耐受量及最小致死量实验^[3-6]

选取 SPF 级 KM 小鼠 60 只,体重 18~22g,雌雄各半,随机分为 3 组,即溶媒对照组和不同剂量供试品组,每组 20 只,雌雄各半。将接筋藤醇提物设 30.91g/kg·bw 和 24.73g/kg·bw 2 个剂量(相当于生药 154.86g/kg·bw 和 123.90g/kg·bw)。动物禁食不禁水 6h 后,接筋藤醇提物剂量组按 40mL/kg 体重灌胃给予相应供试品,溶媒对照组按相同的灌胃容积给予纯水,观察其急性毒性反应和死亡情况,以后每天观察 1 次,连续 14d。于给药后第 3、7、14 天称量体重。观察结束处死动物,大体解剖观察各动物脏器、器官的体积、颜色、质地等有无明显异常。

2.3 镇痛实验—醋酸致小鼠扭体反应实验^[7-9]

选取 SPF 级 KM 小鼠 60 只,体质量 18~22g,雌雄各半,按体重分层随机分为 5 组,每组 12 只,分别为模型对照组、阿司匹林组、接筋藤醇提物低、中、高剂量组,除模型对照组小鼠给予纯水按 20mL/kg·bw 灌胃外,其余各组按 20mL/kg·bw 灌胃给药,每天 1 次,连续 7d。末次给药后 1h,腹腔注射 0.6%冰醋酸 0.2mL/只,立即记录 15min 内的扭体反应(小鼠出现腹部内凹、躯干与后肢伸张,臀部抬起反应为准)次数,并计算其镇痛率。

镇痛率(%)=[(模型对照组扭体次数-给药组扭体次数)/模型组扭体次数]×100%

2.4 抗炎实验—二甲苯致小鼠耳肿胀实验^[10-13]

选取 SPF 级 KM 小鼠 60 只,体重 18~22g,雌雄各半,按体重分层随机分为 5 组,每组 12 只,分别为模型对照组、阿司匹林组、接筋藤醇提物低、中、高剂量

组,除模型对照组小鼠给予纯水按 20mL/kg·bw 灌胃外,其余各组按 20mL/kg·bw 灌胃给药,每天 1 次,连续 7d。末次给药后 1h,各组小鼠于右耳两面均匀涂抹二甲苯 0.05mL,左耳不涂为对照。致炎后 1h 脱颈椎处死动物,沿耳廓基线剪下双耳,用直径 6mm 的打孔器将双耳同部位等面积切下,取耳片称重,计算肿胀度(每鼠左右耳片重量差)和肿胀抑制率(100%)。

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×100%

2.5 统计结果处理

所有数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。应用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析统计,两两比较,假定方差齐者用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett's T3 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 急性毒性预实验、最大耐受量及最小致死量实验结果

急性毒性预实验中,30.18g/kg·bw 剂量组动物 1 只死亡,其他各组无动物死亡,各给药组给药后未出现中毒症状。死亡动物解剖观察可见肺部充血。

小鼠灌胃给予接筋藤醇提物后连续观察 4h,30.91g/kg·bw 剂量组给药后 4h 之内部分小鼠出现竖毛、俯卧等毒性反应,其中雌雄各 1 只小鼠出现死亡,对其进行大体解剖观察,死亡动物均表现为肺部充血,但未进行进一步病检分析。24.73g/kg·bw 剂量组给药后 4h 未出现明显中毒症状及死亡,各组动物死亡数见表 1。

表 1 接筋藤醇提物小鼠灌胃急性毒性实验各组动物死亡数

剂量 (g·kg ⁻¹)	动物总数 (♂/♀)	动物死亡 (♂/♀)	死亡率 /%
30.91	10/10	1/1	10
24.73	10/10	0/0	0
溶媒对照	10/10	0/0	0

表 2 接筋藤醇提物小鼠灌胃急性毒性实验各组动物的体质量($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

剂量 (g·kg ⁻¹)	性别	体质量/g			
		给药前	给药后第 3 天	给药后第 7 天	给药后第 14 天
30.91	♂	21.77±0.46	24.19±1.66	31.34±0.66	39.87±3.23
	♀	20.02±0.58	25.30±1.19	26.62±1.89	30.08±3.31
24.73	♂	22.57±1.15	28.80±1.18	28.23±1.46	32.09±1.51
	♀	21.4±1.16	24.29±1.09	26.26±4.65	32.63±1.30
溶媒对照	♂	22.38±0.75	28.74±0.92	31.94±1.41	39.63±2.15
	♀	20.04±0.74	24.18±1.42	27.83±1.94	32.04±2.15

30.91g/kg·bw 剂量组给药 1d 后,毒性反应消失,小鼠进食和活动均恢复正常,剩余观察期内各剂量组均未出现毒性反应,且各组小鼠体重持续增长,与溶媒对照组相比较没有显著性差异($P>0.05$)。各组动物的体质量见表 2。

各组小鼠观察期结束后进行大体解剖,肉眼观察心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、卵巢、子宫、精囊、前列腺、睾丸、胃、肠、胸腔、腹腔等组织和器官的体积、颜色、质地,各组小鼠均无异常。

本实验所设计剂量范围及实验条件下,接筋藤醇提物的最小致死量是 30.91g/kg·bw; 最大耐受量是 24.73g/kg·bw。

3.2 接筋藤对醋酸致小鼠扭体反应的影响

实验结果如表 3 所示,接筋藤醇提物以 0.33g/kg、0.66g/kg、1.32g/kg(相当于生药 1.65g/kg、3.31g/kg、6.62g/kg)的剂量(给药剂量由小鼠急性毒性实验及药效实验预实验得出)连续灌胃给药 7d,与模型对照组比较,0.66g/kg、1.32g/kg 剂量组均能显著降低醋酸所致小鼠扭体次数(均 $P<0.001$)。与模型对照组比较,0.33g/kg 剂量组小鼠扭体次数明显降低,但结合镇痛率(35.91%)考虑,0.33g/kg 剂量不具有明显的镇痛作用。

各给药剂量组之间比较,与 0.33g/kg·bw 比较,0.66g/kg·bw 和 1.32g/kg·bw 剂量组具有显著性差异(均 $P<0.001$)。

结果提示:接筋藤醇提物可缓解冰醋酸刺激小鼠致疼痛的反应,对炎症性疼痛有抑制作用。

表 3 接筋藤醇提物对醋酸所致小鼠扭体反应的影响

($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/kg ⁻¹	扭体次数/次	镇痛率/%
模型对照组	—	33.42±9.32	—
阿司匹林	400mg	10.83±9.68***	67.58
接筋藤醇提物	0.33g	21.42±11.09**	35.91
	0.66g	13.50±13.22****	59.60
	1.32g	11.36±11.25****	66.01

注:与模型对照组比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与低剂量组比较,**** $P<0.001$

3.3 接筋藤对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

实验结果如表 4 所示,接筋藤醇提物以 0.33g/kg、0.66g/kg、1.32g/kg(相当于生药 1.65g/kg、3.31g/kg、6.62g/kg)的剂量连续灌胃给药 7d,与模型对照

组比较,0.33g/kg、0.66g/kg、1.32g/kg 剂量组均能显著降低二甲苯所致小鼠耳廓肿胀度($P<0.05$)。

各给药剂量组之间比较,0.33g/kg·bw、0.66g/kg·bw 和 1.32g/kg·bw 剂量组均未出现显著性差异($P>0.001$)。

结果提示:接筋藤醇提物有抗炎消肿的作用。

表 4 接筋藤醇物对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的影响

($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/kg ⁻¹	耳肿胀度/mg	肿胀抑制率/%
空白对照组	—	12.60±2.73	—
阿司匹林	800mg	6.80±3.93***	46.07
接筋藤醇提物	0.33g	9.80±2.23*	22.44
	0.66g	9.60±2.70*	23.89
	1.32g	9.67±2.13*	23.25

注:与空白对照组比:* $P<0.05$,*** $P<0.001$

4 讨论

目前国内外对接筋藤的药理作用研究报道较少,据《滇南本草》记载,接筋藤主治跌打损伤,筋骨疼痛^[2],因此,本实验对接筋藤醇提物的急性毒性作用及抗炎镇痛作用进行研究,对《滇南本草》进行验证及完善补充。

在急性毒性实验研究中,以最大配药浓度及最大体积给予小鼠灌胃后,仅最高剂量动物死亡 1 只,其余小鼠状态良好,脏器大体观察未见明显异常。因此,采用最大耐受量(MTD)实验对接筋藤醇提物的最大耐受量及最小致死量进行研究,结果表明接筋藤醇提物的毒性较小。然而本实验观察期仅为 14d,还需结合长期毒性实验对接筋藤醇提物的毒性进行进一步观察。

冰醋酸致小鼠扭体模型和二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型均是药理学研究中常用的镇痛抗炎模型。冰醋酸是一种化学刺激物,腹腔注射入小鼠体内后,可能引起深的、较大面积且持久性的疼痛刺激^[14],故而引起小鼠产生扭体反应。观察腹腔注射冰醋酸后小鼠的扭体次数,是一种研究药物镇痛作用,特别是急性疼痛的典型方法^[15]。二甲苯是一种比较常用的化学致炎剂,可诱导体内炎症介质的释放,从而引起局部血管扩张、毛细血管通透性增加、急性渗出性炎性水肿等^[16-17]。由于二甲苯致炎与临床常见炎症相似,且操作简单、见效快、重复性好,故常采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型研究药物的抗炎作用。本实验中

采用冰醋酸致小鼠扭体模型进行镇痛作用研究,采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型进行抗炎作用研究,初步研究了接筋藤醇提物的镇痛抗炎作用。对冰醋酸致小鼠扭体的影响实验结果表明,接筋藤醇提物可能具有外周镇痛的药理作用,具有一定的抗急性疼痛的作用。对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响实验结果表明,接筋藤醇提物有一定的抗急性炎症的作用,但未呈现明显的剂量—反应关系。

综上所述,接筋藤醇提物具有明显的镇痛、抗炎作用,具体作用机制还有待进一步的实验深入研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2004:96.
- [2] 兰茂. 滇南本草. 第三卷[M]. 昆明:云南人民出版社,1978:54-56.
- [3] 国家药品食品监督管理局药品审评中心. 药物单次给药毒性研究技术指导原则[S]. 2014.
- [4] 田甜,许忠,靳剑. 九节菖蒲醇提取物小鼠急性毒性实验研究[J]. 内蒙古中医药,2013,32(26):31.
- [5] 毛勇,苏敏,王京昆,等. 两种 LC 乙醇提取物急性毒性试验毒性比较[J]. 临床合理用药,2014,7(1):15-16.
- [6] 陈奇. 中药药理学研究方法 [M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:109.
- [7] 吴凤荣,曾聪彦,戴卫波,等. 宽筋藤水提液镇痛抗炎作用的实验研究 [J]. 中华中医药学刊,2016,34(7):1775-1777.
- [8] 曾晶,李子奎,王乐. 益气化瘀方抗炎止血镇痛作用的药效学研究[J]. 江苏中医药,2015,47(3):74-76.
- [9] 梁业飞,周有旺. 白饭树提取物抗炎镇痛作用研究[J]. 内科,2015,10(6):845-847.
- [10] 陈奇. 中药药理学研究方法[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:367-368.
- [11] 任美萍,刘艳,李蓉,等. 槐木皂苷抗炎、镇痛作用的实验研究 [J]. 泸州医学院学报,2012,35(2):133-135.
- [12] 杨柳,王小蒙,余邦良,等. 海南眼树莲醇提取物急性毒性及抗炎活性实验研究 [J]. 时珍国医国药,2015,26(10):2363-2365.
- [13] 李姗姗,白雪梅,周奋进,等. 桂花根茎中一新成分的镇痛抗炎活性初步研究 [J]. 中药药理与临床,2016,32(4):38-41.
- [14] 刘和莉,李月玲,薛永志. 不同温度和醋酸浓度对小鼠扭体疼痛模型的影响 [J]. 包头医学院学报,2006,22(2):137-138.
- [15] 刘虎,李洁,王喜梅,等. 苧苳膏醋酸扭体法镇痛实验研究[J]. 新疆中医药,2014,32(2):54-55.
- [16] 谷捷,李鑫,余黄合,等. 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立 [J]. 湖南中医药大学学报,2016,36(5):32-35.
- [17] 赵桂芝,王绪平,俞忠明,等. 艾叶挥发油对耳肿胀急性炎症模型小鼠的抗炎作用研究[J]. 浙江中医杂志,2016,51(4):288-289.

(编辑:徐建平)

Study on Acute Toxicity and Analgesic and Anti-inflammatory Effects of the Ethanol Extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching

ZHANG Mengqi, GUO Yan, ZHAO Chunmei, GONG Lvdong, YANG Hejing, SU Mei

(Yunnan Institute of Materia Medica/Yunnan Baiyao Group Innovation and R&D Center/Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the acute toxicity and analgesic and anti-inflammatory effects of the ethanol extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching in mice. **Methods** The acute toxicity was observed by maximum tolerance dose (MTD) experiment in mice, observed analgesic effect in mice by writhing reaction induced by glacial acetic acid, and to study the anti-inflammatory effect using the model of auricle edema in mice induced by xylene. **Results** The minimum lethal dose of the ethanol extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching in mice is 30.91g/kg·bw, and the maximum tolerance dose of that is 24.73g/kg·bw. The ethanol extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching could inhibit writhing pain induced by glacial acetic acid, and also could inhibit auricle edema induced by xylene in mice. **Conclusion** The minimum lethal dose of the ethanol extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching in mice is 30.91g/kg·bw, and the maximum tolerance dose of that is 24.73g/kg·bw. The ethanol extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching has significant analgesic anti-inflammatory effect.

KEY WORDS: the ethanol extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching; minimum lethal dose; maximum tolerance dose; analgesic; anti-inflammatory