

滇细辛水提取物小鼠灌胃给药毒性和体内抗炎活性研究*

姚琦, 颜宏, 詹易, 查雨锋, 张雪梅, 苏梅[△]

(云南省药物研究所/云南白药集团创新研发中心/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** 考查滇细辛水提取物小鼠灌胃给药急性毒性和体内抗炎作用。**方法** 采用近似最小致死量联合最大耐受量法测定小鼠灌胃给药急性毒性反应;采用巴豆油致小鼠耳廓肿胀实验、角叉菜胶致大鼠足趾肿胀实验、以及大鼠植入性棉球肉芽生成实验,评价滇细辛水提取物体内抗炎效应。**结果** 小鼠急性毒性实验结果表明:①滇细辛水提取物小鼠灌胃给药最小致死量为 15.12g/kg (折算为 77.62g 生药/kg), 最大耐受量为 13.62g/kg (折算为 69.92g 生药/kg);②给药后 3、7、14d,与溶媒组比较,滇细辛水提取物各给药组动物体重无明显差异;③实验结束后解剖发现,滇细辛水提取物各给药组部分动物肾脏颜色变浅。体内抗炎实验结果表明:①与溶媒组比较,滇细辛(0.84g/kg,折算为 4.31g 生药/kg)明显降低巴豆油致小鼠耳廓肿胀度。②角叉菜胶致炎 60、120、240、360min 时,滇细辛(0.84g/kg,折算为 4.31g 生药/kg)明显降低角叉菜胶致大鼠足趾肿胀度。③与溶媒组比较,滇细辛(0.42、0.84g/kg,折算为 2.16g 生药/kg、4.31g 生药/kg)对大鼠植入性棉球肉芽重量无明显影响。**结论** 滇细辛水提取物存在一定毒性,且其主要毒性靶器官为肾脏。滇细辛水提取物对巴豆油所致小鼠耳廓肿胀、角叉菜胶致大鼠足趾肿胀等急性、亚急性炎症具有明显抑制作用,而对大鼠植入性棉球肉芽所致慢性炎症无明显抑制作用。

关键词: 滇细辛; 小鼠; 大鼠; 急性毒性; 抗炎作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)04-0034-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.04.008

滇细辛(*Asarum delavayi* Franch.)为多年生草本,民间主要用于祛风散寒,调气止痛、劳伤痛、腹痛等。到目前为止,还未见滇细辛的研究报道。

引用现行药典规定,细辛(*Asarum sieboldii* Miq.),别名华细辛,来源为马兜铃科植物北细辛(*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *Mandshuricum* (Maxim.) Kitag.)、汉城细辛(*Asarum sieboldii* Miq. var. *Seoulense* Naka)的根及根茎。其主要成分包括甲基丁香油酚(methyleugenol)、 α -蒎烯(α -pinene)、 β -蒎烯(β -pinene)、月桂烯(myrcene)、细辛醚(sarisan)等^[1]。相关药理学研究表明,细辛具有抗炎、镇痛、镇静等活性。

胡竟一研究发现,细辛处理后不含马兜铃酸的样品明显抑制稀醋酸所致小鼠扭体反应,明显减轻二甲苯所致小鼠耳廓肿胀。并且,明显延长阈剂量戊巴比妥钠所诱导小鼠的睡眠时间,增加阈下剂量戊巴

比妥钠所诱导小鼠睡眠的动物数^[2]。王冰冰等^[3]研究发现,北细辛和单叶细辛(*Asarum himalaicum* Hook.f.et Thoms.ex Klotzsch.)挥发油均具有较强的镇痛活性,但是两者的化学成分存在明显差异。北细辛挥发油主要成分为甲基丁香酚、黄樟醚、3,5-二甲氧基甲苯、优葛缕酮,而单叶细辛挥发油主要成分为广霍香醇和榄香素。魏新智等^[4]研究发现,北细辛原粉及北细辛挥发油均明显抑制巴豆油所致小鼠耳廓肿胀,挥发油还明显抑制角叉菜胶诱导的大鼠足趾肿胀。

在本研究中,首先测定滇细辛水提取物小鼠灌胃给药急性毒性反应。在此基础上,设定药效学实验给药剂量,考查该提取物对一般非特异性炎症动物模型炎症反应的抑制作用。通过上述实验研究,我们希望对滇细辛水提取物用于炎症相关疾病的治疗提供一定实验依据。

* 基金项目: 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室建设(2015DG043)

收稿日期: 2017-07-30

作者简介: 姚琦(1978-),湖北武汉人,医学博士,高级工程师,研究方向:抗炎免疫药物筛选和机制研究。

[△]通信作者: 苏梅, E-mail: m_ssu@sina.com

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品制备

称取干燥滇细辛 1.5kg,加水 20L,煎煮 2h,滤过。药渣加水 10L,煎煮 1h,滤过。药渣再加水 10L,煎煮 1h,滤过。合并 3 次滤液,浓缩,水浴蒸干,真空干燥,打粉。最后得到干膏 292.2g,得率为 19.48%,批号:20161123。

1.1.2 实验动物

SPF 级昆明种小鼠(18~22g)或 SD 大鼠(180~200g),均由辽宁长生生物科技有限公司提供,生产许可证号:SCXK(辽)2010-0001。动物饲养管理:塑料盒群养,每日喂饲鼠用配合饲料,自由饮水,视情况每周更换 2~3 次垫料。饲料来源于北京科澳协力饲料有限公司,许可证号:SCXK(京)2014-0010。

1.1.3 主要实验仪器

SQP 型电子分析天平,北京塞托利斯科学仪器有限公司;YLS-7B 足趾容积测量仪,济南益延科技发展有限公司。

1.1.4 主要试剂

巴豆油(批号:C6719-10G)、角叉菜胶(批号:9000-07-1 25G)均购自美国 SIGMA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠灌胃给药急性毒性实验^[5]

将滇细辛水提取物配制成一个最高且利于小鼠灌胃给药的浓度,该浓度为 0.14g/mL。以间距 0.9 倍向下稀释成 2 个低浓度 0.126、0.113g/mL。灌胃体积:40ml/kg。动物禁食不禁水 12h,将合格的动物称重,随机分为 4 组,包括溶媒组和 3 个滇细辛水提取物给药剂量组(5.6、5.04、4.54g/kg,分别折算为 28.74、25.87、23.31g 生药/kg),每组 20 只动物,雌雄各半。计划连续灌胃给药 3 次,间隔 4h,观察每次灌胃给药后动物死亡情况及毒性反应。若每次灌胃给药后 4h 观察期内出现动物死亡即中止灌胃给药。灌胃给药后 3、7、14d 称量动物体重。实验结束后解剖动物,肉眼观察主要脏器病变情况。

在后续体内抗炎实验中,采用近似最小致死量约 1/10 作为小鼠抗炎实验的高剂量,采用最小致死量约 1/20 作为低剂量。

1.2.2 巴豆油致小鼠耳廓肿胀^[6]

选取 40 只 KM 小鼠(18~22g,全雄),随机分为 4

组,每组 10 只动物。即:溶媒组、阿司匹林组(300mg/kg)组、滇细辛低剂量组(0.84g/kg,折算为 4.31g 生药/kg)、滇细辛高剂量组(1.68g/kg,折算为 8.62g 生药/kg)。给药组给予相应药物处理,溶媒组灌胃给予等体积纯水。按体重连续灌胃给药 7d,1 次/d,给药体积:0.2mL/10g。于末次给药后 1h 各组动物右耳涂布 50μL 巴豆油溶液($V_{\text{巴豆油}}:V_{\text{乙醇}}:V_{\text{吡啶}}:V_{\text{乙醚}}=1:10:20:69$),致炎 4h 后颈椎脱臼处死动物并剪下两侧耳廓,9mm 直径打孔器打下耳片,称重,计算耳肿胀度。

1.2.3 角叉菜胶致大鼠足趾肿胀^[7]

选取 40 只 SPF 级 SD 大鼠(180~200g,全雄),随机分为 4 组,每组 10 只动物。即:溶媒组、阿司匹林组(150mg/kg)组、滇细辛低剂量组(0.42g/kg,折算为 2.16g 生药/kg)、滇细辛高剂量组(0.84g/kg,折算为 4.31g 生药/kg)。给药组给予相应药物处理,溶媒组灌胃给予等体积纯水。按体重连续灌胃给药 7d,1 次/d,给药体积:1.0mL/100g。末次给药后 1h,于右后足趾皮下注射 50μL 2%角叉菜胶溶液,致炎 0、30、60、120、240、360min 时采用足容积测量仪连续测量各组动物双侧足容积。足肿胀度=注射侧足容积-未注射侧足容积。

1.2.4 大鼠植入性棉球肉芽生成^[8]

选取 40 只 SPF 级 SD 大鼠(180~200g,全雄),给药前采用 3.5%水合氯醛麻醉动物(0.9mL/100g),将事先准备好的灭菌棉球(约 75mg)分别植入大鼠前肢左右腋下,缝合肌肉层、皮肤层,碘伏消毒。第 2 天,动物清醒后随机分为 4 组,即:溶媒组、地塞米松组(0.15mg/kg)、滇细辛低剂量组(0.42g/kg,折算为 2.16g 生药/kg)、滇细辛高剂量组(0.84g/kg,折算为 4.31g 生药/kg)。给药组给予相应药物处理,溶媒组灌胃给予等体积纯水。按体质量连续灌胃给药 7d,1 次/d,给药体积:1.0mL/100g。末次给药后 60min,颈椎脱臼处死动物,取出棉球肉芽,置于 60℃烘箱中烘烤 12h,称重,减去原棉球重量即为肉芽净重。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行统计分析。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较组间数据,以 $P<0.05$ 为检验水准。

2 实验结果

2.1 小鼠灌胃给药急性毒性

2.1.1 一般情况

滇细辛各给药组动物灌胃给药后 4、8、12h 观察期内,动物活动正常,饮食、饮水正常,未见腹泻、竖毛、惊厥、俯卧等明显毒性反应。

2.1.2 死亡情况

滇细辛 16.8g/kg (折算为 86.24g 生药/kg) 组灌胃给药后第 2 天死亡 1 只动物,至实验结束共计死亡 1

表 1 滇细辛水提取物各给药组动物死亡情况

受试药物	剂量/(g·kg ⁻¹)	死亡只数/(♀/♂)	死亡率/%
溶媒	—	0/0	0
滇细辛	16.8	0/1	5
	15.12	1/1	10
	13.62	0/0	0

表 2 滇细辛水提取物小鼠灌胃给药后不同时间点动物体重(g)($\bar{x} \pm s$, n=8~10)

受试样品	剂量/(g·kg ⁻¹)	性别	体重/g			
			第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
溶媒	—	♀	19.35±0.62	24.64±0.70	29.45±1.43	31.01±1.50
		♂	20.09±0.95	25.93±1.19	32.92±2.05	36.09±1.71
滇细辛	16.8	♀	19.73±0.96	24.05±1.51	29.26±2.03	32.05±2.18
		♂	20.72±0.66	26.11±1.00	33.19±1.69	36.60±1.77
	15.12	♀	19.86±0.67	24.93±1.09	30.30±1.33	32.51±1.66
		♂	20.28±0.83	25.76±1.66	33.10±2.37	36.67±2.69
	13.62	♀	19.90±0.57	24.39±0.63	29.13±1.53	31.65±1.96
		♂	20.77±1.28	26.11±2.00	33.61±2.81	36.91±2.89

2.1.5 主要脏器病变

观察结束后脱颈椎处死的动物进行大体解剖观察,肉眼观察滇细辛水提取物各给药剂组部分动物出现肾脏颜色变浅,肾脏毒性发生率随灌胃剂量的增大而增加,见表 3。精囊、前列腺、睾丸、胃、肠及胸腔、腹腔等各组织和器官的体积、颜色、质地等无肉眼所见异常。

表 3 滇细辛水提取物小鼠灌胃急性毒性反应(只,♀/♂)

受试样品	剂量/(g·kg ⁻¹)	肾脏毒性	发生率/%
溶媒对照	—	0/0	0
滇细辛	16.8	3/10	65
	15.12	1/7	40
	13.62	2/2	20

2.2 抗炎实验

2.2.1 巴豆油致小鼠耳廓肿胀

与溶媒组比较,滇细辛(0.84g/kg,折算为 4.31g 生药/kg)明显降低巴豆油致炎小鼠耳廓肿胀度,差

只动物;滇细辛 15.12g/kg (折算为 77.62g 生药/kg) 组灌胃给药后第 2 天死亡 2 只动物,至实验结束共计死亡 2 只动物;滇细辛 13.62g/kg (折算为 69.92g 生药/kg) 组灌胃给药后至实验结束未见动物死亡。动物死亡情况见表 1。

2.1.3 最小致死量与最大耐受量

根据实验结果,滇细辛水提取物小鼠灌胃给药最小致死量为 15.12g/kg (折算为 77.62g 生药/kg),最大耐受量为 13.62g/kg (折算为 69.92g 生药/kg)。

2.1.4 体重

给药后 3、7、14 天,与溶媒组比较,滇细辛水提取物各给药组动物体重无明显差异(P>0.05),见表 2。

异具有统计学意义(P<0.05)。见表 4。

表 4 滇细辛水提取物对巴豆油致炎小鼠耳廓肿胀的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)

受试样品	剂量/(g·kg ⁻¹)	耳廓肿胀度/Δmg
溶媒对照	—	12.4±3.0
阿司匹林	0.3	5.9±3.5**
滇细辛	0.84	9.7±2.3*
	1.68	11.0±2.7

注:与溶媒组比较,*P<0.05,**P<0.01

2.2.2 角叉菜胶致炎大鼠足趾肿胀

结果表明,与溶媒组比较,角叉菜胶致炎 60、120、240、360min 时,滇细辛(0.84g/kg,折算为 4.31g 生药/kg)明显降低角叉菜胶致炎大鼠足趾肿胀度,差异具有统计学意义(P<0.05),见表 5。

2.2.3 大鼠植入性棉球肉芽生成

与溶媒组比较,滇细辛(0.42、0.84g/kg,分别折算为 2.16、4.31g 生药/kg)对大鼠植入性棉球肉芽重量均无明显影响,见表 6。

表 5 滇细辛水提取物对角叉菜胶致炎大鼠足趾肿胀度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

受试样品	剂量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	足趾肿胀度/ ΔmL				
		30min	60min	120min	240min	360min
溶媒	—	0.20 ± 0.08	0.26 ± 0.09	0.42 ± 0.16	0.63 ± 0.15	0.65 ± 0.18
阿司匹林	0.15	$0.12 \pm 0.09^*$	$0.12 \pm 0.04^{**}$	$0.20 \pm 0.15^{**}$	$0.39 \pm 0.18^{**}$	$0.34 \pm 0.17^{**}$
滇细辛	0.42	0.19 ± 0.13	0.20 ± 0.08	0.52 ± 0.36	0.75 ± 0.36	0.61 ± 0.28
	0.84	0.13 ± 0.09	$0.14 \pm 0.08^{**}$	$0.24 \pm 0.14^{**}$	$0.42 \pm 0.22^*$	$0.39 \pm 0.25^*$

注:与溶媒组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$

表 6 滇细辛水提取物对大鼠植入性棉球肉芽生成的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

受试样品	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	棉球肉芽净重/mg
溶媒对照	—	13.9 ± 3.8
地塞米松	0.1	$5.6 \pm 1.1^{**}$
滇细辛	420	12.3 ± 2.9
	840	12.2 ± 3.3

注:与溶媒组比较, $^{**}P<0.01$

3 讨论

在本研究中,笔者首先考查了滇细辛水提取物小鼠灌胃给药急性毒性反应。结果表明,滇细辛水提取物小鼠灌胃给药近似最小致死量为 15.12g/kg ,最大耐受量为 13.62g/kg 。同时,实验结束时解剖动物发现,给药组部分动物肾脏颜色就浅。且滇细辛水提取物给药剂量增加,肾脏毒性动物数随之增加。推测小鼠灌胃给药肾脏毒性可能与滇细辛中所含有的马兜铃酸有关,马兜铃酸是细辛中起肾功能衰竭及致癌的主要成分之一^[9-10]。除此之外,细辛挥发油中所含黄樟醚具有肝毒性。在本研究中发现,滇细辛水提取物具有肾毒性但未观察到肝毒性,可能与本研究中所制备的滇细辛水提取物中含黄樟醚含量低有关。同时,肉眼所观察到的肾脏颜色变浅需进一步行病理组织学检查。

在后续抗炎实验中发现,滇细辛水提取物明显抑制巴豆油所致小鼠耳廓肿胀以及角叉菜胶所致大鼠足趾肿胀,但对大鼠植入性棉球肉芽增殖无明显影响。实验结果与胡竟一^[2]和魏明智^[4]研究结果相似,他们通过相关非特异性急性炎症动物模型,证实了细辛及其相关提取物的抗炎活性。

非特异性炎症反应一般来说具有 3 个明显的时相:①急性时相,时间较短暂,以局部血管扩张和毛细血管通透性增加为特征;②亚急性时相,以白细胞和吞噬细胞的浸润的特征;③慢性增殖相,以组织变性和纤维化为特征^[11-12]。以此为依据,巴豆油所致小

鼠耳廓肿胀属非特异性炎症反应急性时相,角叉菜胶所致大鼠足趾肿胀属非特异性炎症反应亚急性时相,而大鼠植入性棉球肉芽增殖则属非特异性炎症反应慢性增殖相。

巴豆油所致小鼠耳廓肿胀^[13-14]、角叉菜胶所致大鼠足趾肿胀^[15-17]实验常用于抗炎药物的常规筛选,大鼠植入性棉球肉芽增殖^[18]实验主要用于抑制炎症增殖期药物的筛选。根据实验结果,笔者认为滇细辛水提取物主要通过抑制非特异性炎症反应的急性和亚急性时相,从而达到抗炎作用。

参考文献:

- [1] 孙录,胡文,刘程惠,等. 辽细辛功能成分的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 4(37): 391-394.
- [2] 胡竟一,邱春燕,雷玲,等. 细辛的镇痛和抗炎作用[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(2): 67-69.
- [3] 王冰冰,齐文,王莉莉,等. 三种细辛挥发油的化学成分、镇痛作用及急性毒性实验的比较研究[J]. 中国药理学(英文版), 2014, 23(7): 480-489.
- [4] 魏新智,王清华,付勇强,等. 北细辛原粉及其不同提取物抗炎作用初探[J]. 海南医学, 2015, 26(9): 1253-1255.
- [5] 李晓骄阳,栾永福,孙蓉. 附子不同组分对正常小鼠的急性毒性实验比较研究[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(10): 583-587.
- [6] 阮公梁,王柳萍,钟霞军,等. 广西产石韦和柔软石韦抗炎镇痛作用研究[J]. 广西医科大学学报, 2015, 32(2): 182-185.
- [7] 邱建永,欧阳炜,陈玉兴. 桑麻合剂对鼠耳廓炎性肿胀、足趾肿胀及炭粒廓清能力的影响[J]. 广东医学, 2014, 35(13): 2010-2012.
- [8] 张丽,薛国娜,朱镭,等. 消痈胶囊治疗痤疮抗炎作用的实验研究[J]. 中医药导报, 2014, 20(11): 10-12.
- [9] 彭金玲,边育红,王丽,等. 马兜铃酸肾毒性的研究进展[J]. 环球中医药, 2013, 6(1): 60-64.

- [10] 宋海波,任经天,杨乐,等. 马兜铃酸毒性研究进展及风险因素分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (12): 2246-2250.
- [11] Nakajima H, Hirose K. Role of IL-17 family cytokines in allergic inflammation [J]. Arerugi, 2013, 62 (7): 822-826.
- [12] Aldrich MB, Sevic-Muraca EM. Cytokines are systemic effectors of lymphatic function in acute inflammation [J]. Cytokine, 2013, 64 (1): 362-369.
- [13] Hajhashemi V, Khanjani P. Analgesic and anti-inflammatory activities of bupropion in animal models [J]. Res Pharm Sci, 2014, 9 (4): 251-257.
- [15] Mo J, Panichayupakaranant P, Kaewnopparat N, et al. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid in vivo [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148 (3): 901-908.
- [16] Petrosino S, Campolo M, Impellizzeri D, et al. 2-Pentadecyl-2-Oxazoline, the Oxazoline of Pea, Modulates Carrageenan-Induced Acute Inflammation [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 308.
- [17] Impellizzeri D, Cordaro M, Bruschetta G, et al. 2-pentadecyl-2-oxazoline: identification in coffee, synthesis and activity in a rat model of carrageenan-induced hindpaw inflammation [J]. Pharmacol Res, 2016, 108: 23-30.
- [18] Shi X, Li X, He J, et al. Study on the antibacterial activity of *Bergenia purpurascens* extract [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2014, 11 (2): 464-468.

(编辑:徐建平)

Study on Acute Toxicity in Mice and in Vivo Anti-inflammatory Activity of Aqueous Extract from *Asarum Delavayi* Franch

YAO Qi, YAN Hong, ZHAN Yi, CHA Yufeng, ZHANG Xuemei, SU Mei

(Yunnan Institute of Materia Medica/Yunnan Bai Yao 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 investigate acute toxicity in mice and in vivo anti-inflammatory activity of aqueous extract from *Asarum delavayi* Franch. **Methods** The acute toxicity of the extracts in mice was determined by minimum lethal dose (MLD) combined with maximum tolerance dose (MTD). Croton oil-induced mouse ear edema, carrageenan-induced rat toe edema, and cotton pellet granulation tissue hyperplasia were used to assess the in vivo anti-inflammatory effect of the extract. **Results** The acute toxicity results showed that ① the MLD of the aqueous extract from *Asarum delavayi* Franch was 15.12 g/kg and the MTD was 13.62g/kg. ② 3, 7, and 14 days after the administrations, there were no significant differences in the body weight among the vehicle group and various dose groups of the extract. ③ At the end of the experiment, the anatomical results suggested that the color of the kidney became lighter in parts of the animals after the administrations. The in vivo anti-inflammation results revealed that ① compared with the vehicle group, the aqueous extract (0.84g/kg, equal to 4.31g crude drug/kg) markedly reduced the ear edema of the mice. ② the extract (0.84g/kg, equal to 4.31g crude drug/kg) remarkably decreased carrageenan-induced rats toe swelling 60, 120, 240, 360 min after the sensitization. ③ the extract (0.42, 0.84g/kg) had no significant inhibitory effect on the cotton pellet granulation tissue hyperplasia. **Conclusion** The aqueous extract from *Asarum delavayi* Franch has a certain toxicity, and its toxic target organs are kidneys. The extract significantly suppresses acute inflammation such as croton oil-induced mouse ear edema and carrageenan-induced rat toe edema and not chronic inflammation like cotton pellet granulation tissue hyperplasia.

KEY WORDS: *Asarum delavayi* Franch.; mouse; rat; acute toxicity; anti-inflammatory activity