

• 实验研究 •

网脉橐吾提取物镇痛、抗炎活性研究*

柴琬瑛^{1,2,3}, 吴德松^{1,2,3}, 赵道强^{1,2,3}, 颜 宏^{1,2,3}, 周理强^{1,2,3}, 杨和金^{1,2,3,△}

(1. 云南省药物研究所, 云南 昆明 650111; 2. 云南白药集团创新研发中心, 云南 昆明 650111;

3. 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** 研究网脉橐吾 *Ligularia dictyoneura*(Franch.)Hand.-Mazz 提取物的镇痛、抗炎活性,并对其进行安全性进行初步评价。**方法** 采用小鼠单次灌胃给药急性毒性试验,观察受试物对小鼠的急性毒性反应和死亡情况;采用醋酸、热板、甲醛所致小鼠疼痛模型,评价受试物的镇痛活性;采用二甲苯致小鼠耳肿模型,初步评价受试物的抗炎活性。**结果** 网脉橐吾提取物小鼠灌胃急性毒性试验的 LD₅₀ 为 3.65 g/kg,95%可信限为 3.30~4.04 g/kg。给药后动物出现毒性反应,主要表现为俯卧、运动减少、运动失调、腹泻、抽搐、呼吸困难等症状。镇痛试验结果显示,与溶媒对照组比较,网脉橐吾提取物可明显抑制醋酸、热板、甲醛所致小鼠疼痛反应。抗炎实验结果表明,与溶媒对照组比较,网脉橐吾提取物对二甲苯所致小鼠耳肿胀度有明显抑制作用。**结论** 网脉橐吾提取物对改善炎症及疼痛具有一定作用。

关键词: 网脉橐吾; 镇痛; 抗炎; 小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)06-0001-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.06.001

Study on Analgesic and Anti-inflammatory Activity of Extract from *Ligularia dictyoneura*(Franch.) Hand.-Mazz

CHAI Xiuying^{1,2,3}, WU Desong^{1,2,3}, ZHAO Daoqiang^{1,2,3}, YAN Hong^{1,2,3},

ZHOU Liqiang^{1,2,3}, YANG Hejin^{1,2,3}

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China;

2. Yunnan Baiyao Group Innovation and R&D Center, Kunming 650111, China;

3. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the analgesic, anti-inflammatory activity and safety of Extract from *Ligularia dictyoneura* (Franch.) Hand.-Mazz (ELD). **Methods** The acute toxicity reaction and mortality in mice were evaluated by acute toxicity assay. Pain models caused by acetic acid, hot stimulation and formaldehyde were used to observe the analgesic activity of ELD. Mouse ear swelling model induced by xylene was used to measure the anti-inflammatory activity of ELD. **Results** The LD₅₀ of ELD was 3.65 g/kg and the 95% confidence limit was 3.30 g/kg-4.04 g/kg. After the administration, animals showed some toxic reactions, such as: prone, exercise reduction, movement disorders, diarrhea, tremor, breath with difficulty. Compared with the vehicle group, the ELD group could significantly inhibit the pain response of mice induced by acetic acid, hot stimulation and formaldehyde. Moreover, the ELD group could markedly inhibit mice ear swelling caused by xylene. **Conclusion** The Extract of *Ligularia dictyoneura*(Franch.) Hand.-Mazz showed a certain effect on inflammation and pain.

KEY WORDS: *Ligularia dictyoneura*(Franch.) Hand.-Mazz; analgesic; anti-inflammatory; mice

中国属于重视天然药物的国家,自传说神农尝百草开始,中草药便成为人们治疗疾病的主要药品。经过几千年的发展,天然药物在现代科学的指导下,在

各种疾病治疗中已取得很多成效,获得越来越多的认可和支持。我国超过 50%的人治病时服用中药;患病就医时首选中药的占 24%;几乎所有人在一生中

收稿日期: 2018-12-10

* 基金项目: 云南道地中药材品质控制体系建设(2017AB005)

第一作者简介: 柴琬瑛(1991-),女,助理工程师,研究方向:天然药物药效学活性筛选。

△通信作者: 杨和金, E-mail: 592466174@qq.com

使用过中药^[1]。我国天然药物资源丰富,从中药中寻找创新药物是我国制药工业发展现状的要求^[2]。

网脉橐吾 *Ligularia dictyoneura* (Franch.)Hand.-Mazz 为菊科橐吾属植物,多年生草本,长于海拔 1 900~3 600 m 的水边、林下、灌丛及山坡草地,分布在云南西北部、四川西南部^[3]。网脉橐吾属植物含有三萜类、倍半萜类、本丙脂类、挥发油、丙烯酸类、生物碱类等化学成分。在抗肿瘤、消炎、镇咳方面发挥着重要作用^[4]。目前,对于网脉橐吾的药效学活性研究较少,阻碍了其进一步开发利用。因此,笔者根据其传统应用,采用疼痛和炎症模型对其镇痛抗炎活性进行研究,并对其安全性进行了初步评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品来源及制备 原植物经云南省药物研究所天然药物资源研究室鉴定为菊科植物网脉橐吾 *Ligularia dictyoneura*(Franch.)Hand.-Mazz,其药用部位为根。制备时,取网脉橐吾干燥根,粉碎后用石油醚冷浸提取 3 次,滤过,合并滤液,减压回收石油醚,得黄色油状提取物。

1.1.2 实验动物 SPF 级 KM 小鼠,体质量为 18~22 g,由广东医学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002。

1.1.3 主要试剂 二甲苯,化学纯,广州化学试剂厂,批号:850801;冰醋酸,上海申博化工有限公司,批号:070512;甲醛溶液,重庆川东化工(集团)有限公司,批号:20131201;阿司匹林肠溶片,拜耳医药保健有限公司,批号:BJ02247;盐酸吗啡注射液,沈阳第一制药厂,批号:090724。

1.1.4 主要仪器 PL-203 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;JJ2000 型电子天平,江苏常熟市双杰测试仪器厂生产;YLS-21A 型冷热板测痛仪,济南益延科技发展有限公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠急性毒性试验 参照文献[5-6]方法,取 KM 小鼠 80 只,随机分为溶媒对照组和网脉橐吾提取物 8.00、6.40、5.12、4.08、3.28、2.64 和 2.08 g/kg 剂量组,每组 10 只,雌雄各半。各组均以 0.4 mL/10 g 灌胃给药,给药后连续 4 h 观察动物的毒性反应及死亡

情况;以后每天观察 1 次,连续 14 d。主要观察动物饮食、外观、行为活动、分泌物、排泄物等是否异常,死亡情况,中毒反应症状及其起始时间、严重程度、持续时间、是否可逆及恢复时间等。分别于第 3、7、14 天称量动物体重;观察期结束后,颈椎脱臼处死存活动物,解剖观察动物各脏器、器官的体积、颜色、质地等有无异常。最后根据动物死亡情况,计算网脉橐吾提取物的 LD₅₀ 值及 95%可信限。

1.2.2 对醋酸所致小鼠扭体反应的影响 参考文献[7-8]方法,取 SPF 级 KM 小鼠 60 只,随机分为溶媒对照组、阿司匹林组 0.30 g/kg、网脉橐吾提取物 0.175、0.35 和 0.70 g/kg 剂量组,每组 12 只,雌雄各半。各组均以 0.2 mL/10 g 灌胃给药,溶媒对照组给予等体积纯水,1 次/d,连续 5 d。末次给药后 45 min,以 0.1 mL/10 g 体重给药体积腹腔注射 0.6%冰醋酸,10 min 后观察小鼠在 15 min 内的扭体反应次数(以小鼠出现腹部内凹、躯干与后肢伸张,臀部抬起反应为准),并对结果进行统计学分析。

1.2.3 对热板所致小鼠疼痛反应的影响 参考文献[9-10]方法,挑选痛阈值在 5~30 s 内的 KM 雌性小鼠 60 只,随机分为溶媒对照组、盐酸吗啡组 0.02 g/kg、网脉橐吾提取物 0.175、0.35 和 0.70 g/kg 剂量组,每组 12 只。受试组均 0.2 mL/10g 灌胃给药,溶媒对照组给予等体积纯水,1 次/d,连续 5 d;阳性对照组于测痛前以 0.1 mL/10g 体重给药体积腹腔注射给予盐酸吗啡溶液,单次给药。于末次给药后 30、60、90 min 分别测定小鼠痛阈值,如小鼠 60 s 仍无反应,则以痛阈为 60 s 计算,并对结果进行统计学分析。

1.2.4 对甲醛所致小鼠疼痛的影响 参考文献[11-13]方法,取 SPF 级 KM 小鼠,随机分为溶媒对照组、盐酸吗啡组 0.02 g/kg、阿司匹林组 0.30 g/kg、网脉橐吾提取物 0.175、0.35 和 0.70 g/kg 剂量组,每组 12 只,雌雄各半。其中,盐酸吗啡组于造模前 30 min 以 0.1 mL/10 g 腹腔注射盐酸吗啡溶液,其余各组均以 0.2 mL/10 g 灌胃给药,1 次/d,连续 5 d,溶媒对照组给予等体积纯水。末次给药后 30 min,用微量注射器向动物足底皮下注射 5%甲醛溶液 30 μ L,立即计时。①观察动物疼痛反应潜伏期(s),即动物出现疼痛反应(舔、咬或抖足)的潜伏期。②观察动物 I 相疼痛反

应总时间(s),即造模后 0~5 min 小鼠舔足总时间。③观察动物Ⅱ相疼痛反应总时间(s),即造模后 15~30 min 小鼠舔足总时间。结果以($\bar{x} \pm s$)表示,并进行统计学分析。

1.2.5 对二甲苯所致小鼠耳肿的影响 参考文献[14-15]方法,取 SPF 级 KM 小鼠 60 只,分组、给药方法同“1.2.2”所述。末次给药后 45 min,各组小鼠于右耳两面均匀涂抹二甲苯 0.05 mL,左耳不涂为对照。致炎后 1h 脱颈椎处死小鼠,用直径 8 mm 的打孔器将双耳同部位等面积切下,取耳片称重,以两耳片重量之差作为肿胀度,并对结果进行统计学分析。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据统计分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。经正态性检验和方差齐性检验满足正态分布和方差齐同后,作单因素方差分析,组间差异用 LSD 法比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠急性毒性试验

2.1.1 毒性反应 溶媒对照组所有动物给予纯水后一般状况良好,未见明显异常反应。小鼠灌胃给予网脉囊吾提取物后在 30 min 之内出现毒性反应,主要

表现为俯卧、运动减少、运动失调、腹泻、呼吸困难、抽搐等症状,动物毒性反应至给药后第 4d 恢复。给药各组动物的毒性反应见表 1。

表 1 网脉囊吾提取物小鼠灌胃急性毒性试验
各组动物的毒性反应(只,♀/♂)

组别	剂量 (g/kg)	俯卧	运动 减少	抽搐	腹泻	呼吸 困难	运动 失调
溶媒对照		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	8.00	5/5	5/5	5/5	4/3	1/0	0/0
	6.40	5/5	5/5	5/5	4/4	0/0	0/0
网脉囊吾 提取物	5.12	5/5	3/4	0/0	1/4	0/0	0/0
	4.08	5/1	3/4	1/0	2/3	0/0	1/0
	3.28	5/5	5/5	0/0	2/5	0/0	0/0
	2.64	4/5	5/5	0/0	3/2	0/0	0/0
	2.08	2/2	2/3	0/0	1/1	0/0	0/0

2.1.2 死亡情况 各组动物给药后,8.00、6.40、5.12 g/kg 组均死亡 10 只小鼠、4.08 g/kg 组死亡 7 只小鼠、3.28 g/kg 组死亡 3 只小鼠、2.64 g/kg 组死亡 1 只小鼠、2.08 g/kg 组无动物死亡,溶媒对照组动物无死亡,各组动物死亡数随给药剂量的下降有所减少。

2.1.3 体重 实验期间各组动物体重变化情况见表 2。

表 2 实验期间各组动物体重变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	性别	体重(g)			
			给药前	d ₃	d ₇	d ₁₄
网脉囊吾提取物	8.00	♀	18.32±0.22	14.80	—	—
		♂	18.50±0.31	—	—	—
	6.40	♀	18.54±0.65	—	—	—
		♂	18.22±0.25	—	—	—
	5.12	♀	18.48±0.43	15.00	—	—
		♂	18.28±0.29	—	—	—
	4.08	♀	18.54±0.27	18.23±4.52**	22.65±7.01	29.53±6.95
		♂	18.48±0.45	15.73±1.25**	—	—
	3.28	♀	19.18±0.65	18.58±0.97**	24.20±1.52**	28.55±3.81
		♂	18.70±0.45	17.86±1.95**	23.58±2.48**	33.20±2.52*
	2.64	♀	18.20±0.33	18.18±1.24**	23.52±2.58**	30.68±1.58
		♂	18.30±0.29	18.30±1.04**	21.66±2.91**	33.58±2.50*
	2.08	♀	18.68±0.35	19.80±1.76**	26.50±3.33	33.00±1.82
		♂	18.46±0.40	19.70±0.51**	26.00±1.21**	36.10±2.28
	溶媒对照组	♀	18.44±0.18	24.66±0.62	28.58±1.52	31.56±1.55
		♂	18.38±0.31	25.64±0.93	30.32±1.66	38.42±2.98

注:“—”表示动物已全部死亡,无此数据;与溶媒对照组相比:*P<0.05,**P<0.01

2.1.4 解剖观察 观察结束后脱颈椎处死的动物进行大体解剖观察,肉眼观察动物各组织和器官的体积、颜色、质地等,发现部分动物出现肺充血、肝肾颜色浅、肝脏及脾脏可见针尖样白色病灶等症状。

2.1.5 LD₅₀ 参考文献 [16–17] 方法计算样品的 LD₅₀

值,结果显示:网脉橐吾提取物小鼠灌胃急性毒性试验的 LD₅₀ 为 3.65 g/kg,95%可信限为 3.30~4.04 g/kg。

2.2 对醋酸所致小鼠扭体反应的影响 结果显示:与溶媒对照组比较,网脉橐吾提取物 0.70 g/kg 剂量可明显抑制醋酸所致小鼠扭体反应($P<0.01$),结果见表 3。

表 3 网脉橐吾提取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 (g/kg)	体重/g		扭体数	抑制率/%
		给药 0 d	给药 5 d		
溶媒		19.85±0.84	23.67±1.59	34.83±20.81	—
阿司匹林	0.30	19.58±0.95	23.46±1.20	24.82±14.68	28.75
网脉橐吾提取物	0.175	19.54±0.98	22.98±1.41	29.50±12.97	15.31
	0.35	19.68±0.92	23.17±1.29	34.55±18.63	0.83
	0.70	19.38±0.79	21.48±1.35**	13.18±14.63**	62.16

注:与溶媒对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 对热板所致小鼠疼痛反应的影响 结果显示:与溶媒对照组比较,网脉橐吾提取物 0.70 g/kg 剂量

给药后 60 min 可明显抑制热板所致小鼠疼痛反应,延长动物痛阈值($P<0.01$),结果见表 4。

表 4 网脉橐吾提取物对热板所致小鼠痛阈的影响($\bar{x}\pm s,n=12$)

组别	剂量 (g/kg)	痛阈值/s			
		基础值	30 min	60 min	90 min
溶媒		17.59±5.26	13.95±5.14	16.77±5.89	18.68±9.22
盐酸吗啡	0.02	17.81±5.60	57.47±8.77**	50.80±16.35**	39.22±22.27**
网脉橐吾提取物	0.175	17.87±3.29	15.40±8.79	17.37±4.03	22.07±5.59
	0.35	17.75±5.20	19.00±13.26	21.20±10.49	23.45±9.36
	0.70	17.97±3.47	19.00±9.20	25.33±7.97**	20.81±4.97

注:与溶媒对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.4 对甲醛所致小鼠疼痛反应的影响 结果显示:与溶媒对照组比较,网脉橐吾提取物各剂量组小鼠 I 相舔足时间均明显缩短($P<0.01$);网脉橐吾提取物各

剂量组小鼠 II 相舔足时间均明显缩短 ($P<0.05,P<0.01,P<0.01$),结果见表 5。

表 5 网脉橐吾提取物对甲醛所致小鼠疼痛反应的影响($\bar{x}\pm s,n=12$)

组别	剂量 (g/kg)	体重/g		舔足潜伏期/s	I 相舔足时间	II 相舔足时间
		给药 0 d	给药 5 d			
溶媒		21.03±1.44	25.05±2.24	15.80±7.54	32.94±11.17	104.63±36.34
阿司匹林	0.30	21.24±1.04	25.41±1.80	15.40±5.83	30.63±22.60	85.55±69.41
盐酸吗啡	0.02	21.23±0.90	25.77±1.65	249.30±107.61**	3.36±7.12**	0.81±1.75**
网脉橐吾提取物	0.175	21.20±0.85	25.23±1.80	13.00±4.78	15.11±6.51**	50.41±46.09*
	0.35	21.48±0.61	24.57±2.37	14.50±3.66	11.19±9.82**	22.43±37.13**
	0.70	21.41±0.87	23.84±2.18	28.89±19.02	5.09±2.93**	1.03±2.90**

注:与溶媒对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.5 对二甲苯所致小鼠耳肿的影响 结果显示:与溶媒对照组比较,网脉橐吾提取物 0.70 g/kg 剂量对二甲苯所致小鼠耳肿有明显的抑制作用($P<0.05$),结果见表 6。

3 讨论

在临床就诊患者中,与疼痛相关的疾病占有 80% 的比例。疼痛可引起强烈的应激反应,延缓机体恢复和伤口愈合,严重影响生活质量^[18]。因此,适当、有效

表 6 网脉橐吾提取物对二甲苯所致小鼠耳肿的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 (g/kg)	体重/g		耳肿胀度 /mg
		给药 0 d	给药 5 d	
溶媒		18.49±0.81	24.31±0.79	12.78±3.33
阿司匹林	0.30	18.46±0.57	24.66±0.80	9.99±2.79*
网脉橐吾提取物	0.175	18.54±0.89	24.31±0.97	11.44±3.56
	0.35	18.30±0.70	24.23±0.75	12.07±2.02
	0.70	18.18±0.55	23.51±1.11	10.31±3.67*

注:与溶媒对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

镇痛药对患者来说意义重大。本实验采用 3 种疼痛模型研究网脉橐吾提取物的镇痛作用。结果表明,网脉橐吾提取物 0.7 g/kg 剂量可明显减少小鼠的扭体次数、延长模型小鼠痛阈值;同时,网脉橐吾提取物各给药剂量可明显减少甲醛法小鼠 I 相、II 相舔足时间。结果提示,网脉橐吾提取物具有较好的镇痛作用,为后期镇痛药物的开发提供可靠的依据。发生炎症时,疼痛感受器可逐渐被激活,致使炎症部位疼痛表现较为敏感^[9]。由此可见,消炎亦是减轻疼痛的一个有效可行的措施。抗炎实验结果表明,网脉橐吾提取物 0.7 g/kg 剂量可明显减轻小鼠耳肿胀度,提示网脉橐吾提取物对二甲苯所致小鼠急性非特异性炎症具有明显的活性。综上所述,网脉橐吾提取物对改善炎症及疼痛具有一定作用,为云南少数民族习用药物之一^[20],具备一定的开发价值。

参考文献:

[1] 刘冬玲,金萍. 浅谈中医中药的发展前景[J]. 时珍国医国药,2005,16(10):1053-1054.
[2] 王莹. 中药的应用与发展前景 [J]. 中国卫生产业,2011 (Z4):113.
[3] 檀爱民,何红平,杨虹,等. 网脉橐吾的倍半萜类成分[J]. 药学学报,2003,38(12):924-926.
[4] 赵玲,楼一层,苏锋平. 网脉橐吾不同萃取部位抗菌活性研究[J]. 亚太传统医药,2013,9(1):11-13.

[5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2011,109-117.
[6] 刘向辉,谢人明,陈琳,等. 桦褐孔菌不同提取物小鼠急性毒性实验研究[J]. 中国药物警戒,2013,10(7):390-392.
[7] 王静,王海华,姜玉新,等. 金叶女贞果实花青素的镇痛作用初探[J]. 中国临床药理学与治疗学,2015,20(1):38-42.
[8] 张立军,李芸,杨志军,等. 毒性中药高乌头炮制前后水煎液与三氯甲烷部分对小鼠的镇痛抗炎作用 [J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(7):624-627.
[9] 刘晓霞,王继龙,魏舒畅,等. 超滤对身痛逐瘀汤镇痛抗炎效果的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(2):14-16.
[10] 李蒙,沈佳瑜,李听弦,等. 苍耳子炮制前后的抗炎、镇痛作用比较[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(3):232-234.
[11] 魏立琴,王东升,苗小楼,等. 丹翘灌注液抗炎镇痛作用的研究[J]. 中国农学通报,2015(2):75-79.
[12] 李芸,苗小楼,吴平安,等. 高乌头炮制前后镇痛作用比较及生物碱含量测定[J]. 中兽医医药杂志,2015,34(4):36-39.
[13] 孙爱静,徐先祥,黄晓东,等. 七叶莲花抗炎镇痛作用及机制研究[J]. 中药材,2014,37(2):311-315.
[14] 孙慧静. 吲哚-2,3-二酮对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响[J]. 山东医药,2011(6):30-31.
[15] 童东锡,唐坤,曾颂,等. 女贞叶醇提取物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国医药科学,2013,3(6):26-28.
[16] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD₅₀ [J]. 药学进展,2003,27(5):314-316.
[17] 李孝容,华桦,鄢良春,等. 苍耳子微毒测试(Microtox)与小鼠急性毒性的相关性研究 [J]. 中药药理与临床,2016,32(2):134-138.
[18] 胡博. CBI 受体参与电针镇痛作用的机制 [D]. 西安:第四军医大学,2013.
[19] 岳寿伟,刘庆. 腰腿痛发病机制研究[J]. 中国临床康复,2002(12):1724-1725.
[20] 明全忠,任杰红. 一把掌(网脉橐吾根)的生药学研究[J]. 现代应用药学,1990(4):12-13.