

杜香不同提取部位的镇痛抗炎作用研究

张 敏, 赵旌旌, 武文斌, 赵 赟, 朱兴磊, 瞿伟菁*

华东师范大学生命科学学院, 上海 200062

摘 要: 采用小鼠醋酸扭体法和角叉菜胶致小鼠足掌肿胀模型筛选杜香三种提取部位镇痛抗炎作用。结果显示, 甲醇提取物 (10.0、1.0 mg/kg) 和水提物 (10.0 mg/kg) 能显著抑制醋酸引起的小鼠扭体反应和角叉菜胶引起的小鼠足趾水肿。水提物 (10.0 mg/kg) 在致炎后 2~4 h 内效果接近吲哚美辛。高效液相色谱结果提示甲醇提取物的镇痛抗炎效果可能通过其所含黄酮类化合物实现。

关键词: 杜香; 提取; 镇痛; 抗炎; 黄酮

中图分类号: R285.5; Q946.91

文献标识码: A

Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Ledum palustre* L. in Mice

ZHANG Min, ZHAO Jing-jing, WU Wen-bin, ZHAO Yun, ZHU Xing-lei, QU Wei-jing*

School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract: In the present study, we have investigated the analgesic effect of the essential oil, methanol extract and aqueous extract of *Ledum palustre* by using model of acetic acid-induced writhing response and anti-inflammatory effect of these three extracts by using model of lambda-carrageenan-induced paw edema in mice. In the analgesic test, methanol extract (10.0 and 1.0 mg/kg) and aqueous extract (10.0 mg/kg) decreased the acetic acid-induced writhing response. In anti-inflammatory test, methanol extract (10.0 and 1.0 mg/kg) and aqueous extract (10.0 mg/kg) decreased the paw edema at the second, third, fourth, fifth, and sixth hour after lambda-carrageenan administration. High performance liquid chromatography result suggested that the analgesic and anti-inflammatory effects of methanol extract might be related to its flavonoid components.

Key words: analgesic; anti-inflammatory; aqueous and methanol extracts; flavonoid; *Ledum palustre* L.

杜香 (*Ledum palustre* L.) 系杜鹃花科杜香属植物^[1]。我国野生杜香资源丰富, 主要分布在中国东北的长白山和大小兴安岭等地区, 为我国北方蒙古族和朝鲜族传统民药, 别名白山苔、喇叭茶^[2,3]。枝、叶入药^[2], 主治“活血调经; 化痰止咳^[4]”。杜香挥发油具有明显的镇咳、祛痰作用^[3]。杜香嫩枝煎剂具有解痛、祛痰、脱敏等作用^[5]。而杜香甲醇提取物功效未见报道, 本实验通过醋酸诱导小鼠扭体反应模型和角叉菜胶诱导小鼠足趾肿胀模型比较杜香不同提取部位的急性镇痛、抗炎作用。同时, 通过高效液相色谱法探讨杜香甲醇提取物有效成分及其镇痛抗炎机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

杜香 (*Ledum palustre* L.), 采自吉林省安图县 (吉林省白河林业局提供), 经本单位植物分类学研究室李宏庆副教授鉴定。

1.1.2 药品

吲哚美辛 (上海新帕斯制药有限公司); λ 角叉菜胶 (λ -carrageenan, Sigma Co.); 芦丁 (rutin, 上海恒信化学试剂公司); 槲皮素 (quercetin, 上海恒信化学试剂公司); 杨梅素 (myricetin, Sigma Co.); 山柰酚 (kaempferol, Sigma Co.); 异鼠李素 (isorhamnetin, 中国药品生物制品检定所); 甲醇: 色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 动物

实验 ICR 小鼠体重 20~22 g (上海西普尔必凯实验动物有限公司, 沪动合证字 153 号)。

1.1.4 仪器

高效液相色谱仪 (Agilent 1100 series); Kromasil

收稿日期: 2009-03-18 接受日期: 2009-06-17

*通讯作者 Tel: 86-21-62232019; E-mail: wjqu@bio.ecnu.edu.cn

C18液相色谱柱 (250 ×4.6 mm, 5 μm); 电子天平 (Sartorius BP-211D); 游标卡尺 (精度 0.02 mm)。

1.2 方法

1.2.1 杜香各化学部位提取

杜香枝叶采摘后置于阴凉处风干, 200 g材料粉碎为粗粉, 水蒸气法蒸馏 4 h后收集精油; 回收杜香材料, 常温下挥干, 石油醚 70 脱脂 2次, 每次 2 h; 脱脂后材料常温下挥干, 分别用 1 L 甲醇 70 回流提取 3次, 每次 2 h, 合并提取液; 再次将材料于常温下挥干, 分别用 1 L 蒸馏水 95 回流提取 3次, 每次 2 h, 合并提取液。抽真空浓缩, 将提取物冷冻干燥, -4℃ 低温密封保存备用。

1.2.2 杜香提取物对醋酸诱发的小鼠扭体反应的影响

参照 Koster法^[6], 略作改动: 取健康小鼠 96只, 雌雄各半, 体重 20~25 g, 随机分成 8组, 每组 12只, 实验前 12 h禁食。腹腔注射 (i.p.) 待测药物 (精油 0.02, 0.01 mg/kg; 甲醇提取物 10.0, 1.0 mg/kg; 水提物 10.0, 1.0 mg/kg; v/v, 10 mL/kg体重); 注射生理盐水组作为空白对照; 吲哚美辛组作为阳性对照药。30 min后腹腔注射 0.6% 醋酸 (v/v, 10 mL/kg体重), 观察给药后 20 min内小鼠扭体次数, 并计算抑制率, 抑制率 (%) = (生理盐水组平均扭体次数 - 给药组平均扭体次数) / 生理盐水组平均扭体次数 × 100%。

1.2.3 杜香提取物对 λ角叉菜胶引起小鼠足趾肿胀的影响

参照 Winter法^[7], 并略作改动: 取健康雄性小鼠 96只, 体重 20~25 g, 随机分为 8组, 每组 12只, 实验前 24 h禁食。腹腔注射待测药物 (精油 0.02, 0.01 mg/kg; 甲醇提取物 10.0, 1.0 mg/kg; 水提物 10.0, 1.0 mg/kg; v/v, 10 mL/kg体重); 注射生理盐水组作为空白对照; 吲哚美辛组作为阳性对照药^[8]。30 min后从小鼠右后足掌心向踝关节方向进针皮下注射 1% λ角叉菜胶 (生理盐水溶解) 50 μL, 其后分别用游标卡尺测量 1、2、3、4、5、6 h后小鼠足掌心至足背厚度。以致炎后不同时间的足掌厚度减去给药前足掌厚度之差作为炎性肿胀度。

1.2.4 统计分析

数据以“mean ±S.D.”表示, 用 SPSS软件进行方差分析 (One-Way ANOVA)。

1.2.5 高效液相色谱法对杜香甲醇提取物定性分析

色谱条件: 流动相, 甲醇 / 0.4% 磷酸溶液 (60/40), 流速 1.0 mL/min, 柱温 20℃, 进样体积 20 μL, 检测波长 368 nm。样品液制备: 用色谱纯甲醇溶解甲醇提取物冷冻干粉配成 2% 溶液, 溶液用滤纸过滤, 上柱前 10000转离心 10 min。

2 结果

2.1 杜香提取物对醋酸诱发的小鼠扭体反应的影响

表 1 结果表明: 10.0 mg/kg 杜香甲醇提取物, 10.0 mg/kg 水提物及吲哚美辛均能极显著 ($P < 0.01$) 地减少醋酸腹腔注射所致小鼠扭体次数, 抑制率分别为 29.30%、53.50% 及 72.5%。所有提取物中, 10.0 mg/kg 水提物止痛效果最佳, 但不如阳性对照药吲哚美辛, 与之相比有显著差异 ($P < 0.01$)。

表 1 杜香提取物对醋酸诱发小鼠扭体反应的镇痛效果

Table 1 Analgesic effect of the extracts of leaves of *Ledum palustre* on acetic acid-induced writhing response in mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg, i.p.)	扭体次数 No. of writhing ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Percentage inhibition (%)
生理盐水	—	76.8 ±16.7	—
吲哚美辛	10.00	21.1 ±6.0**	72.50
精油	0.02	65.6 ±16.1	14.60
精油	0.01	67.1 ±12.3	12.60
甲醇提取物	10.00	54.3 ±16.6**	29.30
甲醇提取物	1.00	60.9 ±12.8*	20.70
水提物	10.00	35.7 ±14.7**	53.50
水提物	1.00	66.3 ±14.6	13.67

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 12$ 。

2.2 杜香提取物对 λ角叉菜胶引起小鼠足趾肿胀的影响

表 2 结果显示: 10.0、1.0 mg/kg 杜香甲醇提取物, 10.0 mg/kg 水提物在 λ角叉菜胶注射后 2~6 h 内, 均能极显著地 ($P < 0.01$) 抑制小鼠足趾肿胀。其中以 10.0 mg/kg 水提物效果最强, 在致炎后 2~4 h 内, 效果近似于吲哚美辛 (与吲哚美辛组比较, $P > 0.05$)。1.0 mg/kg 水提物在致炎后 3~6 h 内能极显著地 ($P < 0.01$) 抑制小鼠足趾肿胀。此外, 0.02 mg/kg 精油在致炎后 3 h 时, 0.01 mg/kg 精油在致炎后 3~4 h 内也有一定的消肿作用 ($P < 0.05$), 但效果不持续。

表 2 杜香提取物对 λ 角叉菜胶引起小鼠足趾肿胀的影响Table 2 Effect of the extracts of leaves of *Ledum palustre* on hind paw edema induced by λ -carrageenan in mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg, i.p.)	致炎后不同时间小鼠后掌肿胀度 Changes of edema volume (mm, $\bar{x} \pm s$)					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
生理盐水	-	1.22 $\pm$ 0.26	1.88 $\pm$ 0.24	2.17 $\pm$ 0.17	1.94 $\pm$ 0.20	1.78 $\pm$ 0.19	1.65 $\pm$ 0.17
吡咯美辛	10.00	1.127 $\pm$ 0.33	0.96 $\pm$ 0.31**	0.85 $\pm$ 0.41**	1.06 $\pm$ 0.41**	0.69 $\pm$ 0.38**	0.78 $\pm$ 0.36**
精油	0.02	0.98 $\pm$ 0.32*	1.75 $\pm$ 0.39	1.89 $\pm$ 0.35*	1.72 $\pm$ 0.39	1.64 $\pm$ 0.40	1.45 $\pm$ 0.36
精油	0.01	1.31 $\pm$ 0.15	1.89 $\pm$ 0.14	1.94 $\pm$ 0.13*	1.90 $\pm$ 0.16**	1.84 $\pm$ 0.13	1.79 $\pm$ 0.14
甲醇提取物	10.00	1.30 $\pm$ 0.31	1.38 $\pm$ 0.24**	1.48 $\pm$ 0.32**	1.31 $\pm$ 0.32**	1.27 $\pm$ 0.27**	1.26 $\pm$ 0.31**
甲醇提取物	1.00	1.10 $\pm$ 0.29	1.26 $\pm$ 0.15**	1.30 $\pm$ 0.17**	1.17 $\pm$ 0.27**	1.12 $\pm$ 0.23**	1.16 $\pm$ 0.30**
水提物	10.00	1.20 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.15**	1.02 $\pm$ 0.16**	1.02 $\pm$ 0.15**	1.03 $\pm$ 0.21**	1.03 $\pm$ 0.22**
水提物	1.00	1.15 $\pm$ 0.21	1.93 $\pm$ 0.26	1.67 $\pm$ 0.30**	1.29 $\pm$ 0.36**	1.27 $\pm$ 0.41**	1.12 $\pm$ 0.40**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与吡咯美辛组比较, $P > 0.05$; $n = 12$ 。

2.3 高效液相色谱法对杜香甲醇提取物定性分析

结果如图 1A 所示:检测波长 368 nm 下, 5 种黄酮标准品保留时间 (min) 分别为: 芦丁 3.480、杨梅素 4.634、槲皮素 7.005、山柰酚 11.269 和异鼠李素 12.106。

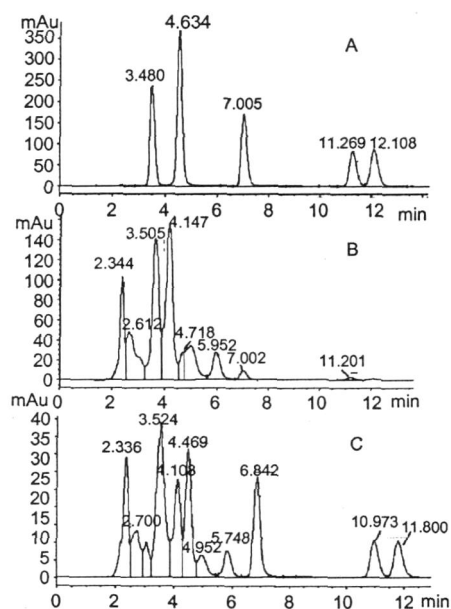


图 1 高效液相色谱法对杜香甲醇提取物定性分析

Fig. 1 Quality analysis of methanol extracts of *Ledum palustre* by high performance liquid chromatography

A. 5 种黄酮类化合物标准品 (芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素) 高效液相色谱图; B. 杜香甲醇提取物高效液相色谱图; C. 标准品加入杜香水提物形成的叠加色谱图 A. HPLC chromatograms of standards (rutin, myricetin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin); B. HPLC chromatograms of methanol extracts of leaves of *Ledum palustre*; C. Overlapping HPLC chromatograms of methanol extracts of leaves of *Ledum palustre* added with standards

图 1B 显示: 杜香甲醇提取物在同样条件下, 在保留时间为 3.605、4.718、7.002 和 12.201 min 处有吸收峰存在, 且添加标准品溶液后, 显示上述四个吸收峰与标准品吸收峰有叠加 (如图 C 所示), 判断样品中存在芦丁、杨梅素、槲皮素和山柰酚 4 种黄酮。

用同样方法将杜香水提物与标准品 HPLC 色谱图比对, 并在杜香水提物中添加标准品溶液后, 获得一个叠加峰, 推测杜香水提物中可能含有槲皮素。

3 讨论

药用植物中黄酮类和萜类化合物的镇痛、抗炎作用引人关注^[9,10], 其效果通过抑制炎症过程中多种关键酶的活性实现^[11], 并与非甾醇类抗炎药物 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 靶点类似。

杜香精油的主要组分是萜类化合物^[3], 具有一定毒性^[2], 10.0、1.0 mg/kg 精油 (i.p.) 在实验中发现致死现象 (结果未显示)。0.02、0.01 mg/kg 杜香精油 (i.p.) 为安全剂量, 但对小鼠扭体和小鼠足趾肿胀均无明显药效。杜香甲醇提取物能极显著地抑制小鼠扭体反应以及小鼠足趾水肿, 其中黄酮类化合物含量达 29.3% $\pm$ 8.5% (分光光度法测定^[12], 结果未显示)。高效液相色谱结果显示: 杜香甲醇提取物中存在芦丁、杨梅素、槲皮素和山柰酚 4 种黄酮。这四种黄酮单体均见报道具有一定的镇痛、抗炎作用^[11,13,14], 提示: 黄酮类化合物可能是杜香甲醇提取物镇痛、抗炎的药效部位。而通过标准品比对, 推断杜香水提物中可能存在槲皮素。其他有效成分有待进一步鉴定。

本实验采用的醋酸诱导的小鼠扭体反应是一种内脏性疼痛模型^[6], 由 COX 释放花生四烯酸和前列

腺素致痛^[15]。阳性对照药吲哚美辛具有抑制 COX 活性,减少前列腺素生成的作用^[16]。杜香甲醇提取物、水提物镇痛效果不及吲哚美辛,其作用靶点和作用量效关系尚待深入研究。

角叉菜胶诱导小鼠足趾肿胀实验是常用的急性炎症模型。角叉菜胶注射会激发肝脏组织内自由基积累、血管舒缓激肽 (bradykinin) 释放^[17]以及血清 COX 含量增加^[18]等多条途径,促使前列腺素合成,前列腺素和其他内分泌物积累是导致炎症水肿的主要原因^[19]。非甾醇类抗炎药吲哚美辛对角叉菜胶诱导的水肿药效显著^[20]。在本实验中,杜香甲醇提取物和水提物均能显著地抑制局部水肿,且作用效果持久,致炎后 2~6 h 内与对照组比较均有极显著差异。1 mg/kg 甲醇提取物在致炎后 3 h, 10 mg/kg 水提物在致炎后 2~4 h 内抑制效果接近吲哚美辛。

综合以上结果,杜香甲醇提取物具有一定的镇痛、抗炎效果。黄酮类化合物可能是杜香镇痛、抗炎的主要药效部位。而其效果是通过抑制 COX,还是影响前列腺素生成的其他环节,则有待于进一步研究。

参考文献

- Editorial Commission of China Flora of Chinese Academy of Sciences (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China (中国植物志), 1st. Beijing: Science Press, 1997, 57 (1): 4-7.
- Zhu YM (朱亚明). Herbal Drugs Records of Inner Mongolia (内蒙古植物药志). Hohhot: Inner Mongolia People's Press, 1989, 2: 523-524.
- Nature Reserve Bureau of Changbai Mountain Research Institute of Chinese Medicine and Drug in Jilin Province, Department of Biology in Northeast Normal University (吉林省中医药研究所, 长白山自然保护区, 东北师范大学生物系). Herbal Drugs Records on Changbai Mountain (长白山植物药志), Changchun: Jilin People's Press, 1982: 863.
- Editorial Board of China Herbal (中华本草编委会), State Administration of Traditional Chinese Medicine (国家中医药管理局). China Herbal (中华本草). Shanghai: Shanghai Scientific and Technology Publishers, 1998, 16: 5251-5252.
- Ma XM (马雪梅), Mao ZJ (毛子军), Yang YF (杨永富), et al A Summary on the exploitation and utilization of source plant *Ledum palustre* L. J NE Fore Univ (东北林业大学学报), 2003, 31 (6): 52-54.
- Koster R, Anderson M, Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc*, 1959, 18: 412-416.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced oedema in hind paw on the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1962, 111: 544-547.
- Mascolo N, Jain R, Jain SC, et al Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*). *J Ethnopharmacol*, 1989, 27 (1-2): 129-140.
- Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, et al The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13: 319-328.
- Heras Bde L, Hortelano S Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8 (1): 28-39.
- Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, et al Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69: 395-406.
- Qu WJ (瞿伟菁), Zhang ZL (张志良). A Instruction of Plant Physiology Experiments (植物生理学实验指导), 3rd. Beijing: Higher Education Press, 2004. 133-134.
- Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, et al Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, 2003, 74: 709-721.
- Garcia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, et al The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 557: 221-229.
- Franzotti EM, Santos CV, Rodrigues HM, et al Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (*Malva-branca*). *J Ethnopharmacol*, 2000, 72: 273-277.
- Katler E, Weissmann G Steroids, aspirin, and inflammation. *Inflammation*, 1977, 2: 295-307.
- Ueno A, Naraba H, Ikeda Y, et al Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in IP-receptor-deficient mice. *Life Sci*, 2000, 66 (12): PL155-160.
- Nantel F, Denis D, Gordon R, et al Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol*, 1999, 128: 853-859.
- Spector WG, Willoughby DA. The inflammatory response. *Bacteriol Rev*, 1963, 27: 17-154.
- Lu TC, Ko YZ, Huang HW, et al Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Glycyne tomentella* root in mice. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113 (1): 142-148.