

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.15.004

不同提取物对野棉花抗炎镇痛作用的影响研究*

李 香,许义红,孙晓惠,韩忠耀,付云燕,伍俊科

(黔南民族医学高等专科学校,贵州都匀 558000)

[摘要] **目的** 探讨不同提取方法对野棉花抗炎镇痛活性的影响。**方法** 将野棉花全草制备成不同提取物。采用扭体与电热板法观察其镇痛作用,应用小鼠耳廓肿胀、足趾肿胀及棉球肉芽肿胀实验综合评价其抗炎活性。**结果** 与空白对照组比较,小鼠耳廓肿胀、足趾肿胀及棉球肉芽肿胀实验水部位低剂量的抗炎作用差异无统计学意义($P>0.05$),其余各剂量提取部位均有显著的抗炎镇痛作用($P<0.05$)。乙酸乙酯部位在热板法镇痛试验中活性最强。正丁醇部位在小鼠耳廓肿胀、足趾肿胀及棉球肉芽肿胀抗炎实验中和扭体法中活性最强。**结论** 野棉花全草具有明显的抗炎镇痛作用,正丁醇部位与乙酸乙酯是主要有效部位。

[关键词] 野棉花;抗炎;镇痛;活性部位**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)15-1990-03

Study on effect of different extraction methods on anti-inflammatory and analgesic activity of Anemone hupehensis*

LI Xiang, XU Yihong, SUN Xiaohui, HAN Zhongyao, FU Yunyan, WU Junke
(Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun, Guizhou 558000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of different extraction methods on anti-inflammatory and analgesic activity of *Anemone hupehensis*. **Methods** The different abstracts were prepared from the whole herb of *Anemone hupehensis*. The analgesic effect was observed by adopting the mouse torsion and electric heating plate method, and the anti-inflammatory activity was comprehensively evaluated by using the mouse ear tumefaction, toe tumefaction and tampon granulation tumefaction experiments. **Results** Compared with the blank model group, the anti-inflammatory action difference of low dose in the water layer parts of mouse ear tumefaction, toe tumefaction and tampon granulation tumefaction had no statistical significance ($P>0.05$), and the extracting parts of rest doses all had significant anti-inflammatory and analgesic effect ($P<0.05$). Ethyl acetate part had strongest activity in the electric heating plate experiment. N-butanol part had strongest activity in the ear tumefaction, toe tumefaction, tampon granulation tumefaction experiments and torsion method. **Conclusion** The whole herb of *Anemone hupehensis* has prominent anti-inflammatory and analgesic effect, and the ethyl acetate part E and N-butanol part are main effective parts.

[Key words] *Anemone hupehensis* Lem; anti-inflammatory; analgesia; active site

野棉花为毛茛科银莲花属植物打破碗花花的根(*Anemone hupehensis* Lem.)或全草,多年生草本植物,苗药亦称米花棍。主要含白头翁素、多糖等成分,由于采集方便、疗效显著,在贵州黔南苗族聚集区被广泛用于脚气肿痛、风湿骨痛、跌打损伤、痈疽肿毒、蜈蚣咬伤等症候的治疗^[1-2],通过查阅相关文献资料,野棉花有镇痛作用,但其抗炎镇痛作用活性部位未见有关报道。本实验通过对野棉花全草不同提取物的抗炎镇痛作用进行比较,为其下一步抗炎镇痛有效成分及作用机制奠定基础。

1 材料与方法**1.1 动物** SPF 级昆明种小鼠 700 只,体质量 18~

22 g,雌雄各半,许可证号:SCXK(黔)2016-0002,由贵州医科大学提供。小鼠分别饲养于空调室内,室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(70 ± 5)%,喂养标准颗粒饲料,自由饮水和摄食。

1.2 药品、试剂及仪器 乙酸乙酯、正丁醇、石油醚分析纯(重庆江川化工有限公司);二甲苯、冰醋酸、角叉菜胶均为分析纯(天津市富宇精细化工有限公司);旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂);GJ-8402 型热板测痛仪(中国浙江医疗器械厂);电子天平(瑞士 METTLER);阿司匹林肠溶片(批号:ZKA1402)。

1.3 方法

* 基金项目:黔南医专科研基金资助项目(QNYZ201413)。 作者简介:李香(1982-),副教授,硕士,主要从事中药质量控制及新药的研究。

1.3.1 样品制备 野棉花采自贵州黔南苗族布依族自治州都匀市,经黔南民族医学高等专科学校魏学军教授鉴定为毛茛科银莲花属植物打破碗花花(*Anemone hupehensis* Lem.)全草。野棉花全草用 75%乙醇回流提取,减压浓缩,回收乙醇至稠膏,得粗提物,将粗提取物用蒸馏水混悬,分别用乙酸乙酯、正丁醇萃取,回收溶剂,冷冻干燥,得到野棉花粗提物、乙酸乙酯、正丁醇提取物和水部位,各提取物密封置冰箱中冷藏,临用前以配成所需浓度。

1.3.2 分组及给药 小鼠分为 70 组,每组 10 只。即生理盐水组(空白对照组),根据全草生药用量 6~12 g 及提取后得膏率折算小鼠用量后选取中剂量 0.78 g/kg 作为阿司匹林组(阳性对照组)浓度。将野棉花 75%乙醇粗提物、乙酸乙酯、正丁醇、水部位的高、中、低剂量组,根据其得膏率及其全草生药用量,设计其高中低剂量分别为 1.56、0.78、0.39 g/kg。

1.3.3 耳廓肿胀^[3] 各组小鼠连续灌胃给药 7 d,末次给药 30 min,于小鼠右耳正反两面均匀涂二甲苯每只 0.2 mL,左耳不涂以对照。30 min 后小鼠脱颈处死,剪下左、右耳片,用 6 mm 打孔器沿同一位置打下左右耳片,于电子天平精密称重,右耳质量-左耳质量=肿胀度,肿胀抑制率=(模型组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)×100%/模型组平均肿胀度。

1.3.4 足跖肿胀^[4-5] 各组小鼠连续灌胃给药 7 d 后于小鼠右后足垫皮下注射 1.0%角叉菜胶 45 μL 致炎,再给予对应药物,于次日处死小鼠,剪下双后足,精密称量,足跖肿胀度=右足重量-左足重量。肿胀抑制率=(模型组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)×100%/模型组平均肿胀度。

1.3.5 棉球肉芽肿胀^[6-7] 各组小鼠注射乙醚进行浅麻醉,将灭菌的棉球约 4.5 mg 植入小鼠右腋窝下,缝合,各组小鼠连续灌胃给药 7 d,末次给药 1 h 后处死,取出棉球,70℃烘箱干燥至恒重,精密称重,肉芽肿胀重=干燥后棉球重-原棉球重,计算小鼠肉芽肿胀抑制率。肿胀抑制率=(模型组平均肉芽肿干重-给药组平均肉芽肿干重)×100%/模型组平均肉芽肿干重。

1.3.6 热板致痛^[8] 取小鼠于实验前用热板测痛仪(55.0±0.5)℃测定小鼠舔后足所需时间作为小鼠的痛阈值,挑选痛阈值在 5~30 s 内的。各组小鼠连续灌胃给药 7 d,末次给药 1 h 后,分别将小鼠置于热板上测定痛阈值,痛阈提高率(%)=(给药后平均痛阈值-给药前平均痛阈值)/给药前平均痛阈值×100%。

1.3.7 醋酸致扭体反应^[9] 各组小鼠连续灌胃给药 7 d,末次给药 1 h 后,各小鼠腹腔分别注射 0.6%冰乙酸 20 mL/kg,观察并记录小鼠扭体潜伏期及 15 min 内各小鼠扭体反应的次数,计算镇痛率。镇痛率=(空白对照组平均扭体次数-给药组平均扭体次

数)×100%/空白对照组平均扭体次数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用 ANOVA 单因素方差分析,组间比较采用 LSD 方法分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗炎作用效果分析 与空白对照组比较,小鼠耳廓肿胀、足趾肿胀及棉球肉芽肿胀实验水部位低剂量的抗炎作用差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各剂量提取部位均有明显的抗炎作用($P < 0.05$),见表 1~3。

表 1 野棉花不同提取物对小鼠耳廓肿胀的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	耳肿胀度(mg)	肿胀抑制率(%)
空白对照组		8.97±2.11	
阿司匹林组	0.78	3.33±0.79*	62.88
粗提物	1.56	4.91±1.21*	45.26
	0.78	5.71±1.01*	36.34
	0.39	6.58±2.33*	26.64
乙酸乙酯部位	1.56	4.41±1.31*	50.84
	0.78	4.98±1.04*	44.48
	0.39	5.65±1.38*	37.01
正丁醇部位	1.56	3.76±0.87*	58.08
	0.78	4.58±0.71*	48.94
	0.39	5.66±1.45*	36.90
水部位	1.56	6.07±0.71*	32.33
	0.78	7.01±0.89*	21.85
	0.39	7.99±1.89	10.93

*: $P < 0.01$,与空白对照组比较

表 2 野棉花不同提取物对小鼠足跖肿胀的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	足跖肿胀度(mg)	肿胀抑制率(%)
空白对照组		42.92±4.57	
阿司匹林组	0.78	17.14±3.81*	60.07
粗提物	1.56	23.71±4.05*	44.76
	0.78	27.76±3.81*	35.32
	0.39	31.17±3.78*	27.38
乙酸乙酯部位	1.56	21.85±3.48*	49.09
	0.78	24.31±3.98*	43.35
	0.39	27.32±3.29*	36.35
正丁醇部位	1.56	18.42±4.76*	57.08
	0.78	20.14±2.66*	46.09
	0.39	26.44±3.22*	38.40
水部位	1.56	28.23±2.59*	34.23
	0.78	34.25±4.21*	20.20
	0.39	39.48±4.38	8.01

*: $P < 0.01$,与空白对照组比较

2.2 镇痛作用效果分析 与空白对照组比较,其他

各组均有明显的镇痛作用($P < 0.05$),见表 4、5。

表 3 野棉花不同提取物对小鼠棉球肉芽肿的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	肉芽肿干重(mg)	肿胀抑制率(%)
空白对照组		14.91±2.86	
阿司匹林组	0.78	6.31±1.81*	57.68
粗提物	1.56	8.01±1.85*	46.28
	0.78	10.03±1.59*	32.73
	0.39	11.21±1.91*	24.82
乙酸乙酯部位	1.56	7.75±1.98*	48.02
	0.78	8.69±1.34*	41.72
	0.39	9.87±1.49*	33.80
正丁醇部位	1.56	7.01±1.07*	52.98
	0.78	8.02±1.61*	46.21
	0.39	9.16±1.91*	38.56
水部位	1.56	9.81±1.11*	34.21
	0.78	11.31±1.32*	24.14
	0.39	13.38±1.59	10.26

*: $P < 0.01$,与空白对照组比较

表 4 野棉花不同提取物对热板法致痛的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	痛阈值		痛阈提高百分率(%)
		给药前	给药后	
空白对照组		13.40±2.13	13.42±2.08	
阿司匹林组	0.78	13.41±2.83	21.33±1.43*	59.06
粗提物	1.56	13.26±1.85	20.01±2.52*	50.90
	0.78	13.38±1.89	19.31±1.97*	44.32
	0.39	14.02±1.73	18.78±2.12*	33.95
乙酸乙酯部位	1.56	14.22±1.79	22.47±2.85*	58.02
	0.78	13.86±0.99	20.65±1.67*	48.99
	0.39	13.28±1.62	18.58±1.86*	39.91
正丁醇部位	1.56	14.78±2.11	22.75±1.73*	53.92
	0.78	13.98±1.98	20.41±2.45*	45.99
	0.39	14.09±1.69	18.97±1.21*	34.63
水部位	1.56	13.34±2.21	17.25±2.33*	29.31
	0.78	14.08±1.98	16.11±1.97*	14.42
	0.39	14.33±2.11	15.88±2.18*	10.82

*: $P < 0.01$,与空白对照组比较

表 5 野棉花不同提取物对扭体法小鼠疼痛的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	扭体潜伏期(min)	扭体次数(次/15 min)	镇痛率(%)
空白对照组		3.48±1.02	44.52±3.09	
阿司匹林组	0.78	7.92±1.58*	16.51±1.68*	62.92
粗提物	1.56	6.91±2.14*	22.78±2.30*	48.83
	0.78	6.41±1.56*	26.81±2.72*	39.78
	0.39	5.96±2.11*	30.24±3.06*	32.08

续表 5 野棉花不同提取物对扭体法小鼠疼痛的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	扭体潜伏期(min)	扭体次数(次/15min)	镇痛率(%)
乙酸乙酯部位	1.56	7.08±2.09*	22.28±2.21*	49.96
	0.78	6.61±1.89*	25.91±1.91*	41.80
	0.39	6.08±2.12*	28.55±2.71*	35.87
正丁醇部位	1.56	7.42±2.28*	20.51±1.95*	53.93
	0.78	6.99±2.85*	22.81±2.32*	48.76
	0.39	6.64±2.88*	25.38±2.86*	42.99
水部位	1.56	5.79±1.82*	32.35±2.38*	27.34
	0.78	5.32±2.27*	36.21±1.99*	18.67
	0.39	5.02±2.01*	39.71±2.69*	10.80

*: $P < 0.01$,与空白对照组比较

3 讨论

疼痛是机体受到内外环境的一种伤害性刺激时出现的情绪反应的生理病理过程。可视为机体受到伤害的警告,发挥防御保护的作用,同时也是多种疾病一种症状。中医方面认为,通则不痛,痛则不通。如果经脉流行,血气环转,上下内外,若病邪相加,气行不畅,血运不调则气血不通,不通则痛。现代医学很多组胺,钾离子等炎性介质既引起炎症又致痛。目前相关文献表明,很多生物碱,苷类,多糖有一定抗炎镇痛的作用^[10-11]。

野棉花全草盛产于贵州省黔南苗族聚集区,一年四季均可采集使用,课题组在开展课题之前,走访贵州黔南许多中医医生,称其在肿瘤、积食、肿痛、杀虫方面有一定作用,特别是镇痛与杀虫效果比较显著,在民间被广泛用于脚气肿痛、风湿骨痛、跌打损伤、痈疽肿毒、马腹痛、牙痛^[12-13]等症候的治疗。由于全年可采,镇痛疗效显著,因此成为贵州黔南民间常用的中药,虽然该药具备一定镇痛作用,但其镇痛作用的活性部位,镇痛抗炎有效成分,镇痛抗炎机制未见相关文献报道,因此本课题第一次通过实验来探索野棉花在抗炎镇痛方面的疗效,为下一步其镇痛抗炎的有效成分及镇痛抗炎机制提供研究基础,并为镇痛抗炎新药研究奠定一定理论基础。

本实验以抗炎、镇痛为主要指标。根据相关参考文献制备野棉花全草的粗提物、乙酸乙酯、正丁醇、水层等不同提取物。根据其用药 6~12 g 及其得膏率,设计高、中、低 3 个不同剂量组。与空白对照组比较,小鼠耳廓肿胀、足趾肿胀及棉球肉芽肿胀实验水部位低剂量的抗炎作用差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各剂量提取部位均有显著的抗炎镇痛作用($P < 0.05$)。乙酸乙酯部位在热板法镇痛试验中活性最强,正丁醇部位在小鼠耳廓肿胀、足趾肿胀及棉球肉芽肿胀抗炎实验中和扭体法中活性最强。初步判断正丁醇和乙酸乙酯部位是其主要的(下转第 1996 页)

跃,于紫外线下 20~30 min 可使皮肤晒伤变红,长期暴露局部皮肤,色素沉着明显,加速皮肤老化过程^[12]。中波紫外线使黑素细胞增多进而黑色素生成增多^[13],作为一种外源性刺激作用于大鼠,黑色素颗粒增加,并形成黑色素小体,从而形成黄褐斑^[12]。本实验用中波紫外线刺激从而建立黄褐斑大鼠模型,设置了高低剂量两个组,分别辐照 30 min 和 60 min,结果显示高低剂量组之间无明显差异,建模第 14 天后大鼠背部皮肤均可见色素沉着,血清、肝脏组织、皮肤组织的 SOD 水平降低($P < 0.05$),MDA 升高($P < 0.05$),变化幅度无明显差异,大鼠皮肤病理组织检查均可见位于基底层和棘层的单线型密集排列的黑色素颗粒。

综上所述,中波紫外线相对于黄体酮建模而言具有快速、高效、个体差异小、操作简单等优点。

参考文献

- [1] CAYCE K A, MCMICHAEL A J, FELDMAN S R. Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions [J]. *Dermatol Nurs*, 2004, 16(16): 401-406, 413-417.
- [2] MOIN A, JABERY Z, FALLAH N. Prevalence and awareness of melasma during pregnancy [J]. *Int J Dermatol*, 2006, 45(3): 285-288.
- [3] 汤楠, 吴艳华, 李其林, 等. 黄褐斑病因及发病机制研究现状 [J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2013, 20(4): 302-304.
- [4] 张国栋, 周需, 黄亦琦. 黄褐斑发病机制及治疗 [J]. *福建医药杂志*, 2015, 37(1): 128-130.
- [5] 李娟, 颜敏, 张媛, 等. 黄褐斑病因、发病机制及治疗进展 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2016, 32(2): 123-126.
- [6] 张海燕, 王军. 黄褐斑实验动物模型的应用研究概况 [J]. *中国民族民间医药*, 2009, 18(8): 41-42.
- [7] 杨鹏, 杨慧兰, 麦跃, 等. 慢性应激抑郁型黄褐斑动物模型建立与现有模型比较研究 [J]. *中国美容医学杂志*, 2013, 22(3): 349-354.
- [8] GRIMES P E, YAMADA N, BHAWAN J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma [J]. *Am J Dermatopathol*, 2005, 27(2): 96-101.
- [9] 过伟峰, 徐立, 项晓人, 等. 建立小鼠黄褐斑实验动物模型的初步研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2001, 7(2): 49-51.
- [10] FOLBERG R, BARON J, REEVES R D, et al. Animal model of conjunctival primary acquired melanosis [J]. *Ophthalmology*, 1989, 96(7): 1006.
- [11] 陈庭仁. 紫外线治疗学 [M]. 重庆: 科学技术出版社重庆分社, 1986: 61.
- [12] 张琳西, 王臻, 郭树忠, 等. 中波紫外线对体外培养的人黑色素细胞的影响 [J]. *中国美容医学*, 2001, 10(3): 180-182.
- [13] KANG H Y, HWANG J S, LEE J Y, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma [J]. *Brit J Dermatol*, 2006, 154(6): 1094-1099.

(收稿日期: 2017-11-06 修回日期: 2018-01-14)

(上接第 1992 页)

抗炎镇痛活性部位。实验表明,野棉花具备良好的抗炎镇痛作用,同时,随着增加不同提取物的剂量,其镇痛率、痛阈值、抑制率越高,肿胀度与扭体次数降低,证明高剂量组有较好的镇痛抗炎效果,下一步将对其具体作用机制和有效成分进行深入研究。

参考文献

- [1] 邱德文, 杜江. 中华本草苗药卷 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005: 503-504.
- [2] 王夏茵, 汤海峰, 涂宏海, 等. 打破碗花花根茎化学成分研究 [J]. *中中药学*, 2015, 13(2): 128-132.
- [3] 肖静, 朱梦军, 肖晖. 百眼腾抗炎镇痛作用有效部位的筛选 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(15): 1281-1282.
- [4] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 882-911.
- [5] 冯洁, 周劲帆, 覃富景, 等. 两面针根和茎抗炎镇痛不同部位活性比较研究 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(6): 60-63.
- [6] 韦锦斌, 周劲帆, 冯洁, 等. 两面针叶不同提取部位的抗炎镇痛作用研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(2): 122-125.
- [7] 赵平, 叶志文, 凌玉云, 等. 珍黄丸抗炎镇痛作用的药效学研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(9): 86-88.
- [8] 夏亚兰, 姚欣凯, 许义红, 等. 水芍药广瓦镇痛抗炎作用的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(23): 2762-2764.
- [9] 钱海兵, 孙宜春, 黄婕, 等. 芭蕉根不同提取物的抗炎镇痛作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(4): 780-781.
- [10] 周志梅, 郭世民, 何静, 等. 镇痛中药的研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2007, 28(4): 52-54.
- [11] 张轩萍, 杨彩虹, 王洁, 等. 祛风息痛丸的抗炎作用机制研究 [J]. *中国药物与临床*, 2009, 9(3): 225-228.
- [12] 赵桂芝. 牙痛民间外治法 [J]. *中国民间疗法*, 2004, 12(1): 18-19.
- [13] 姜维龙, 唐勇, 董超. 关节疼痛的中医理论认识 [J]. *四川中医中药杂志*, 2010, 28(3): 11-13.

(收稿日期: 2017-11-02 修回日期: 2018-02-08)