

连翘抗炎药效物质基础筛选研究

全云云, 袁 岸, 龚小红, 彭 成*, 李芸霞*

成都中医药大学药学院 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室

省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137

摘要: 主要探索连翘几种成分的抗炎活性, 并筛选其抗炎药效物质基础, 为连翘抗炎新药的开发提供参考依据。建立二甲苯致小鼠耳肿胀模型, 计算肿胀度。采用酶联免疫法(ELISA)测定小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)的含量。对比各组的肿胀度及 TNF- α 和 IL-6 的含量。连翘苷对小鼠耳肿胀度及 TNF- α 和 IL-6 的生成无明显抑制作用, 与空白组相比无显著性差异($P > 0.05$)。连翘脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 均能有效抑制小鼠耳肿胀及 TNF- α 和 IL-6 的生成, 与空白组相比有显著性差异($P < 0.05$)。由此可见对所筛选的连翘 4 种成分, 通过口服给药的方式, 连翘抗炎药效物质有连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B。通过口服给药, 尚未发现连翘苷的抗炎活性, 而连翘脂素、连翘酯苷 A 及连翘酯苷 B 显示较强的抗炎活性。同时推测其抗炎机制可能与抑制 TNF- α 和 IL-6 这两种炎症因子的生成和多成分作用有关。

关键词: 连翘苷; 连翘脂素; 连翘酯苷 A; 连翘酯苷 B; 抗炎

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.013

Investigation on Anti-inflammatory Components of *Forsythia suspensa*

QUAN Yun-yun, YUAN An, GONG Xiao-hong, PENG Cheng*, LI Yun-xia*

School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine National Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

Abstract: In this study, the anti-inflammatory effect of major components of *Forsythia suspensa* was explored and its bioactive components with anti-inflammatory effect were screened to provide reference for the development of new anti-inflammatory drugs of *F. suspensa*. Then xylene-induced mice ear swelling models were established and the swelling degree was calculated. The content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6) in mice serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The swelling degree and the content of TNF- α and IL-6 in mice serum of medication administration groups were compared with those of control group respectively. Compared with the control group, phillyrin had no significant inhibition effect on swelling degree or the production of TNF- α and IL-6, and there was no significant difference between the two groups($P > 0.05$). Compared with the control group, significant differences of the swelling degree and the production of TNF- α and IL-6 were detected in phillygenin, forsythiaside A and forsythiaside B group respectively($P < 0.05$). Thus it can be seen that by oral administration, only the three selected components of *F. suspensa*, including phillygenin, forsythiaside A and forsythiaside B, had anti-inflammatory effects. By oral administration, the anti-inflammatory effect of phillyrin had not been found yet, but phillygenin, forsythiaside A and forsythiaside B had stronger anti-inflammatory effects. Meanwhile, it can be speculated that the anti-inflammatory mechanism of *F. suspensa* may be related with its inhibition effect of the production of TNF- α and IL-6 and the effect of multiple components.

Key words: phillyrin; phillygenin; forsythiaside A; forsythiaside B; anti-inflammatory effect

炎症在临床病例中十分常见, 如中耳炎、鼻炎、

胆囊炎、咽炎等, 其实质是具有血管系统的活体组织对各种不良刺激的一种防御性反应。局部炎症反应表现为红、肿、热、痛及功能障碍等, 全身性炎症反应则常伴随有白细胞增多的现象。炎症与多数疾病都有关联, 同时也是多种疾病一种共有的病理现象, 如感染、心脑血管疾病及肿瘤等, 轻则造成组织损伤, 严重时可危及生命。而目前市场上已有的抗炎药

收稿日期: 2016-09-18 接受日期: 2017-01-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373943, 81573583); 四川省杰出青年基金(2013JQ0018); 四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项(2017TD0007, 2015TD0028, 2016TD0006); 成都中医药大学科技发展基金(ZRYB 201425)

* 通讯作者 Tel: 86-013699021135, E-mail: lyxcdutcm@126.com

物,虽抗炎作用明显,但同时也会引起巨大的毒副作用,如长期服用糖皮质激素类会导致机体代谢紊乱;布洛芬会引起脑膜炎;阿司匹林对胃肠道刺激很大,容易引发胃肠道溃疡和出血等,因此寻找更加安全的抗炎药物势在必行。中药作为我国的传统用药,拥有几千年的预防治疗历史,其疗效不但经受住了长期医疗实践的检验,而且已被现代科学研究所证实,其毒副作用相对较少,具有广阔的开发前景。

连翘被喻为“疮家圣药”,是临床上常用的清热药,具有清热解毒、疏散风热、消痈散疔的功效,在临床上常被用来治疗各种与炎症相关的疾病,如溃疡、尿频、风热感冒等。此外连翘还是 40 多种常见中药复方制剂的重要成分,如 VC 银翘片、莲花清瘟胶囊、双黄连口服液及银翘解毒片等。现代研究表明连翘具有抗炎、抗氧化、解热、抗菌、利胆、镇吐止呕、增强免疫、治疗癌症及白化病等多方面药理作用^[1]。连翘的主要化学成分多达 150 多种,主要包括木脂素类、苯乙醇苷类、五环三萜类和黄酮类等。木脂素类化合物连翘苷和苯乙醇苷类化合物连翘酯苷 A 在 2015 版《中华人民共和国药典》里作为连翘的质量控制指标成分。连翘脂素作为连翘苷的苷元也是一种重要的木脂素类成分,被纳为连翘的指纹成分。

连翘具有较强的抗炎作用:1998 年国外学者 Cuellar MJ^[2] 在十多种具有抗炎作用的药用植物筛选中发现,连翘在由花生四烯酸(AA)所致小鼠耳部炎症实验中,表现出极强的抗炎活性,其炎症抑制率大于 40%。近年来也有报道连翘提取物可以减轻鱼藤酮引起 PC12 细胞的炎症反应^[3];连翘脂素的低剂量就有极强的抗炎活性^[4];连翘酯苷 A 可以抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞中 TNF- α 的产生^[5];连翘酯苷可降低 LPS 诱导的肉鸡及胸腺内 TNF- α 和 IL-6 的含量^[6]等。不过尽管如此,但目前对连翘抗炎的主要药效成分及其抗炎作用机制并无一致结论。因此本实验以药效为引导,对连翘中的连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B 的抗炎作用及其机制进行研究,筛选连翘抗炎药效物质基础,同时比较这几种成分的抗炎活性,旨在为连翘抗炎作用机制及其新药的开发提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 试药

连翘苷(成都曼思特生物科技有限公司,批号:

MUST-12030601)、连翘脂素(成都克洛玛生物科技有限公司,批号:140722)、连翘酯苷 A(成都曼思特生物科技有限公司,批号:MUST-11052002)、连翘酯苷 B(成都曼思特生物科技有限公司,批号:MUST-14053102)、地塞米松(新乡市常乐制药有限责任公司,批号:1501156)。

1.2 动物

昆明种雄性小鼠(18~22 g)48 只,由成都中医药大学实验动物中心提供,合格证编号:SCXK(川)2013-19。实验前适应性饲养一周。

1.3 试剂

二甲苯(成都市科龙化工试剂厂生产,分析纯,批号:20110117)、TNF- α ELISA 试剂盒(上海丽臣生物科技有限公司)、IL-6 ELISA 试剂盒(上海丽臣生物科技有限公司)。

1.4 仪器

METTLER TOLLEDO 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、Allegra X-30R Centrifuge 离心机(美国贝克曼库尔特有限公司)、Multiskan Mk3 酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]。

2 实验方法

2.1 给药及造模

实验前以生理盐水为溶剂将连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B,分别配成 0.6 g/L 的溶液(超声 10 min)。同样以生理盐水为溶剂将地塞米松配成 0.5 g/L 的混悬液(超声 10 min)。称重并将禁食 12 h 的 48 只雄性小鼠随机分为 6 组,分别是给药组(A、B、C、D),阳性对照组和空白对照组。给药组以 6 mg/kg 的给药剂量分别对 A~D 组小鼠灌胃连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B 溶液;阳性对照组则以 5 mg/kg 的给药剂量对该组小鼠灌胃地塞米松溶液;空白对照组灌胃等体积的生理盐水(各组灌胃体积均为 0.01 mL/g)。灌胃 1 h 后,在小鼠右耳上均匀地涂抹 40 μ L 二甲苯致炎;各组小鼠均于右耳正反两面均匀涂抹二甲苯,每面 20 μ L,左耳不涂作为空白对照。

2.2 样品采集及指标测定

致炎 1 h 后,小鼠摘除眼球取血 0.5 mL。血样 4 $^{\circ}$ C 静置 1 h 后,于 4 $^{\circ}$ C 3000 rpm 离心 10 min,取上清液(血清),保存在 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中待用。小鼠取血后处死,剪下双耳,用直径 8 mm 自动打孔器,在两耳廓中间部位同一位置打下耳片,称重。以左右

两侧耳片重量差来表示肿胀度,抗炎作用强度则以肿胀抑制率来表示。用 ELISA 测出各组血清中 TNF- α 和 IL-6 的浓度。

小鼠耳肿胀度计算:肿胀度 = 右耳重量 - 左耳重量

小鼠耳肿胀抑制率计算:

$$\text{肿胀抑制率} = \frac{\text{空白组平均肿胀度} - \text{给药组平均肿胀度}}{\text{空白组平均肿胀度}} \times 100\%$$

2.3 统计学处理

运用 SPSS 21.0 统计软件处理数据,结果用平均值 \pm 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$)。多组之间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用最小显著性差异 (LSD) 法,以 $P < 0.05$ 作为有显著性检验的标准,以

$P < 0.01$ 作为有极显著性检验的标准。

3 实验结果

3.1 连翘主要成分对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

各成分对小鼠耳肿胀度及抑制率的影响结果见表 1。与空白组相比,除连翘苷组外,其余各组与空白组相比均有显著性差异,其中连翘脂素组和地塞米松组有极显著差异 ($P < 0.01$)。与阳性对照组相比,连翘苷与地塞米松组有极显著性差异,其余各给药组与地塞米松组无明显差别。结果显示,连翘苷对小鼠耳肿胀度无明显抑制作用,而连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B 均能显著抑制小鼠耳肿胀度,其中以连翘脂素效果最为显著。

表 1 连翘主要成分对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of the major ingredients of *F. suspensa* on the xylene-induced mice ear swelling model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	肿胀度 Swelling degree (mg)	抑制率 Inhibition ratio (%)
连翘苷 Phillyrin	6	15.175 \pm 6.502 ^{##}	0.979
连翘脂素 Phillygenin	6	7.788 \pm 5.119 ^{**}	49.184
连翘酯苷 A Forsythiaside A	6	8.825 \pm 5.682 [*]	42.414
连翘酯苷 B Forsythiaside B	6	9.000 \pm 5.679 [*]	41.272
地塞米松 Dexamethasone	5	7.463 \pm 3.411 ^{**}	51.305
生理盐水 Control	-	15.375 \pm 4.033	-

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with dexamethasone, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

3.2 连翘主要成分对小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 含量的影响

各成分对小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 含量的影响结果见表 2。与空白组相比,除连翘苷组外,其余各组与空白组相比均有显著性差异。其中地塞米松组对小鼠血清中 IL-6 含量的影响与空白组比较有

极显著性差异。与阳性对照组相比,连翘苷对小鼠血清中 IL-6 含量的影响与地塞米松组比较有极显著性差异,其余各给药组与地塞米松组比较无明显差别。结果显示,连翘苷对 TNF- α 和 IL-6 的生成无明显抑制作用,而连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B 均能显著抑制小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的生成。

表 2 连翘主要成分对小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of the major ingredients of *F. suspensa* on the content of TNF- α and IL-6 in mice serum ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
连翘苷 Phillyrin	6	78.228 \pm 10.276	34.996 \pm 3.796 ^{##}
连翘脂素 Phillygenin	6	73.437 \pm 5.724 [*]	31.113 \pm 4.346 [*]
连翘酯苷 A Forsythiaside A	6	73.651 \pm 7.400 [*]	31.345 \pm 1.633 [*]
连翘酯苷 B Forsythiaside B	6	73.702 \pm 8.944 [*]	31.459 \pm 0.822 [*]
地塞米松 Dexamethasone	5	73.366 \pm 5.897 [*]	29.719 \pm 5.135 ^{**}
生理盐水 Control	-	81.376 \pm 5.635	35.123 \pm 0.720

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with dexamethasone, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

4 讨论与结论

小鼠耳肿胀模型稳定且操作方法简单易行,在国内外被广泛采用作为抗炎药物筛选的实验模型。二甲苯是一种化学致炎剂,涂抹到小鼠耳廓后会导致小鼠体内一些炎症介质的合成和分泌(如 TNF- α 、PGE2、IL-1、IL-6 和 NO 等)而使小鼠耳部毛细血管通透性增加,造成小鼠耳部组织液渗出增加,引起小鼠耳廓急性水肿。地塞米松是一种糖皮质激素药,可以通过抑制机体内某些炎症介质的生成和炎症细胞的聚集等方式,防止和减轻炎症反应。TNF- α 是炎症反应中最早出现的重要因子之一,在炎症过程中最先作用,对于局部炎症反应以及炎症反应的早期阶段有较强的致炎作用。IL-6 作为多功能细胞因子,是炎症反应介质网络中的重要成分。因而本实验将 TNF- α 和 IL-6 作为炎症反应的指标。

在给药剂量的确定上,本实验依据叶良红等报道的大鼠连翘脂素给药剂量 1.08 mg/kg,按照大、小鼠剂量换算关系,确定小鼠的给药剂量为 1.54 mg/kg。并设置浓度梯度:低剂量(1.5 mg/kg)、中剂量(3 mg/kg)和高剂量(6 mg/kg),结果发现连翘苷的高、中、低剂量无明显差别,而高剂量的连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B 均能显著抑制小鼠耳肿胀度,因此选择以 6 mg/kg 作为给药组的剂量。而目前对于阳性药地塞米松在二甲苯致小鼠耳肿胀实验的给药剂量并不统一,有报道 5、7、12.5 和 30 mg/kg 等。为此预实验中设置浓度梯度分别是低剂量(5 mg/kg)、中剂量(10 mg/kg)和高剂量(20 mg/kg),结果发现低剂量的地塞米松已能显示很好的抗炎效果,因此本实验最终以 5 mg/kg 作为阳性组的剂量。

本实验通过口服给药,尚未发现连翘苷的抗炎活性,而连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B 均显示较强的抗炎活性。连翘苷未显示抗炎活性的原因可能是由于连翘苷是药物外排泵 P-gp 的底物,口服吸收很少^[7]。李芸霞^[8]等用 Caco-2 和 MDR1-MDCK II 细胞证实了连翘苷口服灌胃生物利用度不高,但对比格犬静脉给药后在比格犬的各组织中都能检测到连翘苷的分布。胡竟一在二甲苯致小鼠耳肿胀实验中,用给药剂量为 20000 mg/kg 的连翘苷灌胃小鼠,结果发现连翘苷组与空白对照组间无显著性差异($P > 0.05$),其对小鼠耳肿胀无明显抑制作用。说明连翘苷的低吸收是其口服给药后无抗炎活性的

原因,且与给药剂量无关。

抗炎和抗氧化之间存在着一定的联系,中药发挥抗炎作用的重要机制之一就是抗氧化作用,现已证实 TNF- α 可以诱导氧自由基的产生。连翘因其具有较强的抗氧化作用,在工业上被用来制成天然抗氧化剂,除了用于化妆品外,还被用于食品保鲜。连翘脂素和连翘酯苷 A 都是连翘的主要抗氧化成分,其抗氧化活性强于维生素 C。有文献报道连翘脂素的对苯羟基取代基或许是其具有极强抗氧化作用的原因。连翘酯苷不仅有远远强于连翘苷的抗炎作用,同时还具有抗羟基自由基作用。研究发现连翘脂素和连翘酯苷 A 在增强超氧化物歧化酶(SOD)活性的同时,能显著降低大鼠血浆中 TNF- α 和 IL-6 的含量,而连翘酯苷 B 在发挥抗氧化作用的同时也具有抗炎作用。因此,我们相信连翘的抗炎作用与其主要成分的抗氧化作用间存在一定关系。

近年来,一些科研工作者提出了中药多成分和多靶点协同作用的理论,并选择现代药理学指标,采用中药现代化技术,来探索中药的药效作用及其作用机制。由连翘的醇提物和其果壳的水提物都具有较强的抗炎作用,可知连翘抗炎作用的发挥也是多成分作用的结果。TNF- α 和 IL-6 是与炎症密切相关的重要因子,而调节各种炎症因子的生成是治疗多种与炎症相关疾病的重要靶点。有人用 IL-6 和连翘中的 150 个化学成分进行了分子对接实验,结果几乎有一半成分的对接分数都比其配体分数高。表明连翘中多种成分都可以通过 IL-6 途径发挥抗炎作用。而本实验研究发现连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B 不仅能通过 IL-6 途径发挥抗炎作用还能通过 TNF- α 途径发挥抗炎作用。提示,连翘抗炎作用的发挥可能还与多靶点有关系。

综上,连翘这 4 种主要成分口服给药后,抗炎药效物质有连翘脂素、连翘酯苷 A 和连翘酯苷 B,其抗炎活性顺序为:连翘脂素 > 连翘酯苷 A > 连翘酯苷 B。其抗炎机制可能与抑制 TNF- α 和 IL-6 这两种炎症因子的生成和多成分作用有关。

参考文献

- 1 Yuan A(袁岸), Zhao MJ(赵梦洁), Li Y(李燕), et al. The review of pharmacological effects of Lianqiao. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药与临床), 2015, 6(5): 56-59.