

# 大叶胡枝子根皮抗炎镇痛活性部位及其机制

梁生林\*, 颜峰光

井冈山大学医学部, 吉安 343009

**摘要:** 筛选大叶胡枝子根皮抗炎镇痛作用的活性部位, 并探讨其作用机制。采用二甲苯致小鼠耳肿胀、蛋清致大鼠足跖肿胀以及大鼠棉球肉芽肿炎症模型, 考察大叶胡枝子根皮抗炎作用的活性部位, 采用热板和醋酸扭体疼痛模型, 考察大叶胡枝子根皮镇痛作用的活性部位, 并检测活性部位对蛋清致炎模型大鼠血清的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和足跖炎性组织的 PGE<sub>2</sub> 含量以及醋酸致痛模型小鼠血清的 NO、MDA 和 PGE<sub>2</sub> 含量, 以初步探究其抗炎镇痛作用机制。结果表明: 大叶胡枝子根皮石油醚萃取部位明显抑制二甲苯所致小鼠耳肿胀和蛋清所致大鼠足跖肿胀以及棉球肉芽肿, 明显延长热板所致小鼠痛阈值和明显减少醋酸所致小鼠扭体反应次数; 明显减少蛋清致炎大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及足跖炎性组织 PGE<sub>2</sub> 含量, 明显降低醋酸致痛小鼠血清 NO、MDA 和 PGE<sub>2</sub> 含量。结果显示, 大叶胡枝子根皮抗炎镇痛作用的活性部位主要为石油醚部位, 其抗炎机制可能与减少炎症时 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 PGE<sub>2</sub> 的产生有关, 其镇痛作用机制可能与降低疼痛时 NO、MDA 和 PGE<sub>2</sub> 的含量有关。

**关键词:** 大叶胡枝子根皮; 抗炎; 镇痛; 活性部位; 作用机制

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.10.008

## Screening of The Anti-inflammatory and Analgesic Active Fractions from The Root Bark of *Lespedeza davidii* and Its Mechanism

LIANG Sheng-lin\*, YAN Feng-guang

Jinggangshan University Health Science Center, Ji'an 343009, China

**Abstract:** To screen the anti-inflammatory and analgesic active fractions from the root bark of *Lespedeza davidii*, and to study the mechanism of the anti-inflammatory and analgesic. The acute inflammatory models, such as xylene-induced ear swelling, egg white-induced paw swelling, and the chronic inflammatory model granuloma induced by cotton pellet implantation, were used in researching the anti-inflammatory effects of the active fractions from the root bark of *Lespedeza davidii*. Meanwhile, the analgesic effects of the active fractions from the root bark of *Lespedeza davidii* were observed by hot plate and acetic acid writhing model. To explore the anti-inflammatory and analgesic mechanism, the content of the serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and foot plantar inflammatory tissue PGE<sub>2</sub> in rat with inflammation caused by egg white were detected, and the serum NO, MDA and PGE<sub>2</sub> levels in mice with pain induced by acetic acid were detected. The results showed: High- and low-dose petroleum ether fraction could significantly inhibit ear swelling in mice and paw swelling in rats. Also, petroleum ether fraction decreased the granuloma of rats. Moreover, after the treatment with high- and low-dose petroleum ether fraction, the pain threshold with hot plate method was significantly prolonged. The writhing number was reduced after administration. The petroleum ether fraction decreased significantly the content of the serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and foot plantar inflammatory tissue PGE<sub>2</sub> in rat with inflammation caused by egg white, and decreased significantly the serum NO, MDA and PGE<sub>2</sub> levels in mice with pain induced by acetic acid. These results indicated that the petroleum ether fraction of the root bark of *Lespedeza davidii* is anti-inflammatory and analgesic active fractions, and its mechanism of anti-inflammatory effect may be related to the reduction of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PGE<sub>2</sub> production, and its mechanism of analgesic effect may be related to the reduction of NO, MDA and PGE<sub>2</sub> levels.

**Key words:** the root bark of *Lespedeza davidii*; anti-inflammatory; analgesic; active fractions; mechanism

收稿日期: 2018-01-25 接受日期: 2018-05-08

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAC11B02-6); 江西省高校教改课题(JXJG-14-9-14)

\* 通信作者 Tel: 86-796-8117893; E-mail: slliang1962@163.com

大叶胡枝子 (*Lespedeza davidii* Franch.) 为豆科 (Leguminosae) 胡枝子属 (*Lespedeza* Michx.) 植物, 别名大叶乌梢、大叶马料梢、活血丹。广泛分布于江西、浙江、湖南、广东、广西、贵州等地。以根、叶入

药。性平、味甘。具宣开毛窍、通经活络等功效,用于疹痧不透、头晕眼花、汗不出、手臂酸麻等的治疗<sup>[1,2]</sup>。现代研究表明大叶胡枝子茎皮、根皮主要含黄酮类<sup>[3,4]</sup>,具有抗早孕<sup>[5]</sup>等作用。当地民间也有用其根皮治疗风湿痛。在前期研究中,发现大叶胡枝子根皮水提和醇提物 ig 给药具有明显的抗炎镇痛作用,本研究采用小鼠耳肿法、大鼠足肿法及大鼠棉球肉芽肿法观察大叶胡枝子根皮不同极性溶剂萃取部位预防给药的抗炎作用,以及小鼠热板法、醋酸扭体法观察大叶胡枝子根皮不同极性溶剂萃取部位预防给药的镇痛作用,以筛选其抗炎镇痛作用的活性部位,并对蛋清致炎大鼠血清的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量和足跖炎性组织的 PGE<sub>2</sub> 含量以及醋酸致痛小鼠血清的 NO、MDA 和 PGE<sub>2</sub> 含量进行了测定,以初步探究其活性部位的抗炎镇痛作用机制,旨在为大叶胡枝子的临床应用和进一步开发利用提供实验依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

昆明种小鼠,SPF 级,体质量 18~22 g,雌雄兼用;SD 大鼠,SPF 级,体质量 180~220 g,雌雄各半,均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(湘)2011-0003。大叶胡枝子根皮采于江西吉安,挖根洗净后抽除根芯得根皮,经井冈山大学医学部药学系周秋贵副教授鉴定为豆科植物大叶胡枝子(*Lespedeza davidii* Franch.);阿司匹林片,拜耳医药保健有限公司(进口分装),规格 0.1 g/片,批号 BJ04931;盐酸吗啡注射液,东北制药集团公司沈阳第一制药厂,规格 10 mg/mL,批号 080701-2;戊巴比妥钠,上海西唐生物科技有限公司,批号 WS20110112;一氧化氮(NO)试剂盒、丙二醛(MDA)测试盒,均购自南京建成生物工程研究所;前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )试剂盒、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )试剂盒均由晶美生物工程有限公司提供;二甲苯,中国上海试剂一厂;36%醋酸,上海松江佘山化工厂;石油醚、正丁醇,分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司;乙酸乙酯,分析纯,南昌鑫光精细化工厂。

### 1.2 主要仪器

RB-200 智能热板仪(成都泰盟软件有限公司);YLS-25A 电动耳肿打耳器(济南益延科技发展有限公司);PV-200 足肿容量测量仪(成都泰盟软件有限

公司);HI850R 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);A590 紫外/可见分光光度计(翱艺仪器(上海)有限公司);BIO-RAD680 酶标仪(Bio-Rad 公司,美国);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III A 循环水式多用真空泵(上海豫康科教仪器设备有限公司);DHG-9073BS-III 型电热恒温干燥箱(上海新苗医疗器材制造有限公司);CP214 电子天平(奥豪斯仪器(常州)有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 大叶胡枝子根皮不同萃取部位的制备

#### 2.1.1 水提

取切成长 2~4 cm 的干燥大叶胡枝子根皮 800 g,用适量纯净水浸泡 30 min,第 1 次加 12 倍的纯净水用火煎煮 1 h,第 2、3 次各加 10 倍的纯净水分别煎煮 0.5 h,合并 3 次煎液,静置,滤过,取滤液,浓缩至 800 mL。取出 400 mL 水提液备用,剩余 400 mL 水提液用于萃取。

#### 2.1.2 萃取

将 400 mL 大叶胡枝子根皮水提液装于 1 000 mL 分液漏斗中,每次以 500 mL 石油醚为溶剂进行萃取,反复多次,直至萃取液无色为止,合并所得萃取液,回收石油醚,得石油醚部位浸膏 0.887 g。然后用同样方法依次用乙酸乙酯、正丁醇为溶剂进行萃取,得乙酸乙酯部位浸膏 3.302 g,正丁醇部位浸膏 10.182 g。最后将正丁醇萃取后的溶液置于旋转蒸发仪旋蒸,得水部位浸膏 40.846 g。

石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位用纯净水溶解配制。

### 2.2 大叶胡枝子根皮不同萃取部位的抗炎作用

#### 2.2.1 小鼠耳肿法<sup>[6,7]</sup>

144 只雌雄各半小鼠,按体质量和性别随机均分为 12 组:模型组(纯净水,10 mL/kg),阿司匹林(500 mg/kg)阳性对照组,大叶胡枝子根皮水提液、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位高、低剂量组。大叶胡枝子根皮水提液的给药剂量参考《中药大辞典》成人每日用量 25~50 g<sup>[1]</sup>,按动物与人的每千克体质量等效剂量折算系数(12 倍)换算成小鼠的剂量,而各萃取部位的给药剂量按萃取量相当于生药量的比例进行换算。小鼠均 ig 给药,给药容量均为 10 mL/kg,1 次/d,连续给药 5 d。于末次给药 1 h 后,将 0.05 mL 二甲苯均匀涂抹

于每鼠左耳廓两面致炎,右耳作对照。30 min 后脱颈处死小鼠,沿耳廓基线剪下双耳,用打耳器分别在左右耳的相同部位冲下圆形耳片,称质量,以两耳片的质量差作为耳肿胀度,计算肿胀抑制率。

耳肿胀度 = 左耳片质量 - 右耳片质量

耳肿胀抑制率(%) = (模型组肿胀度 - 给药组肿胀度) / 模型组肿胀度 × 100%

### 2.2.2 大鼠足跖法<sup>[6]</sup>和血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及足跖炎性组织 PGE<sub>2</sub> 含量的测定

120 只雌雄各半大鼠随机均分为 12 组,具体分组方法及给药方法同“2.2.1”项。末次给药 1 h 后,每只大鼠左后足跖 sc 10% 蛋清生理盐水溶液(临用时新鲜配制)0.1 mL 致炎,用容积法分别测定各鼠致炎前及致炎后 1、2、4、6 h 的足跖容积,并计算足跖肿胀率。

6 h 后将模型组、阿司匹林组和大叶胡枝子根皮石油醚部位高、低剂量组的大鼠用戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,室温放置 2 h,3 000 rpm 离心 10 min,分离血清,置 -20 °C 冰箱保存备用,取血后处死动物,迅速在踝关节上 0.5 cm 处剪下左后足跖足跖,纵向切开足跖组织,放入冷生理盐水中,于 4 °C 浸泡过夜,3 000 rpm 离心 15 min,取上清液置 -20 °C 冰箱保存备用。血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量和足跖炎性组织 PGE<sub>2</sub> 含量的测定均按试剂盒说明书进行操作。

足跖肿胀率(%) = (致炎后足跖容积 - 致炎前足跖容积) / 致炎前足跖容积 × 100%

### 2.2.3 大鼠棉球肉芽肿法<sup>[6]</sup>

大鼠分组方法同“2.2.2”项。大鼠 ip 1% 戊巴比妥钠 5 mL/kg 麻醉后,在每只大鼠两侧腹股沟皮下各埋 20 mg 的灭菌棉球(10 g/L 氨苄西林液浸泡,烘干)。次日开始给药,给药途径及剂量同“2.2.1”项,连续给药 7 天。第 8 天将大鼠脱颈椎处死,打开原切口,将棉球连同周围结缔组织一起取出,剔除脂肪组织,放电热恒温干燥箱 60 °C 烘 24 h,称质量。将称得的质量减去棉球原质量即得肉芽肿质量,计算肉芽肿抑制率。

肉芽肿抑制率(%) = (模型组肉芽肿质量 - 给药组肉芽肿质量) / 模型组肉芽肿质量 × 100%

## 2.3 大叶胡枝子根皮不同萃取部位的镇痛作用

### 2.3.1 热板法<sup>[6,7]</sup>

(55 ± 0.1) °C 热板,以小鼠放入热板至舔后足所需时间作为痛阈值,筛选痛阈值为 5 ~ 30 s 雌性

小鼠 144 只,按体质量随机均分为 12 组,除阳性对照组为吗啡溶液(20 mg/kg)外,其余各组同“2.2.1”项。将每只小鼠正常痛阈值各测 2 次,取其平均值为给药前正常痛阈值。给药除阳性对照组 sc 盐酸吗啡溶液 2 d 外,其余各组同“2.2.1”项。分别于末次给药后 30、60、90、120 min 测定小鼠痛阈值,如果用药后放入热板 60 s 仍无反应,即将小鼠取出,其痛阈值按 60 s 计算。

### 2.3.2 醋酸扭体法<sup>[6]</sup>和血清 NO、MDA、PGE<sub>2</sub> 含量的测定

144 只雌雄各半小鼠随机均分为 12 组,具体分组方法及给药同“2.2.1”项。末次给药 1 h 后,各鼠均 ip 0.6% 醋酸 0.2 mL/只(临用前配制)。记录各组小鼠 ip 醋酸后 15 min 内扭体反应次数,并计算抑制率。

ip 醋酸 30 min 后,将模型组、阿司匹林组和大叶胡枝子根皮石油醚部位高、低剂量组小鼠摘眼球取血,室温静置 2 h,于 4 °C 3 000 rpm 离心 10 min,分离血清, - 20 °C 保存备用。血清 NO、MDA、PGE<sub>2</sub> 含量测定均按试剂盒说明书进行操作。

抑制率(%) = (模型组扭体反应次数 - 给药组扭体反应次数) / 模型组扭体反应次数 × 100%

## 2.4 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理,数据以 Mean ± SD 表示,组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响

与模型组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高、低剂量组均明显抑制二甲苯所致小鼠耳廓肿胀( $P < 0.01$ ),且耳廓肿胀抑制率与剂量呈正相关;乙酸乙酯、正丁醇及水部位高、低剂量组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );阿司匹林 500 mg/kg 对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀具有显著抑制作用( $P < 0.01$ )。与阿司匹林组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高剂量组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表 1。

### 3.2 对蛋清所致大鼠足跖肿胀的影响

与模型组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高、低剂量组对蛋清所致大鼠足跖肿胀有明显抑制作用( $P < 0.01$ ),且具剂量依赖性;乙酸乙酯、正丁醇及水部位高、低剂量组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );阿司匹林 500 mg/kg 给药后也显著抑

表1 大叶胡枝子根皮不同萃取部位对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )Table 1 Effects of different fractions from root bark of *Lespedeza davidii* on ear swelling induced by xylene in mice ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Doses (mg/kg)	肿胀度 Swelling degree (mg)	抑制率 Inhibitory rate (%)
模型 Model	-	8.32 ± 2.02	-
阿司匹林 Aspirin	500.00	2.83 ± 0.99 **	66.05
大叶胡枝子根皮石油醚部位 Petroleum ether fraction	11.09	4.73 ± 1.40 **	43.15
	22.18	3.62 ± 1.17 ** #	56.49
大叶胡枝子根皮乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction	41.28	7.85 ± 2.02	5.65
	82.55	8.47 ± 1.95	-1.80
大叶胡枝子根皮正丁醇部位 <i>n</i> -butyl alcohol fraction	127.27	7.50 ± 1.62	9.86
	254.54	7.66 ± 1.90	7.93
大叶胡枝子根皮水部位 Water fraction	510.50	6.97 ± 1.38	16.23
	1 021.00	6.91 ± 1.65	16.95
大叶胡枝子根皮水提液 Water extract	5 000.00	4.18 ± 1.59 **	49.76
	10 000.00	3.13 ± 1.21 ** #	62.38

注:与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与阿司匹林组比较, # $P > 0.05$ 。

Note: Compare with model group, \*\* $P < 0.01$ ; compare with aspirin group, # $P > 0.05$ .

制蛋清所致大鼠足跖肿胀 ( $P < 0.01$ )。与阿司匹林组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高、低剂量组给药后 1、2、4、6 h 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见表 2。

表2 大叶胡枝子根皮不同萃取部位对蛋清致大鼠足跖肿胀的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )Table 2 Effects of different fractions from root bark of *Lespedeza davidii* on paw swelling induced by egg white in rats ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Doses (mg/kg)	致炎后不同时间足肿胀率 Different time after inflammatory paw swelling rate (%)			
		1 h	2 h	4 h	6 h
模型 Model	-	27.22 ± 4.16	31.46 ± 3.74	31.04 ± 6.47	29.71 ± 5.28
阿司匹林 Aspirin	500.00	15.43 ± 2.91 **	17.27 ± 3.46 **	16.76 ± 2.53 **	15.96 ± 2.68 **
大叶胡枝子根皮石油醚部位 Petroleum ether fraction	11.09	16.78 ± 2.65 ** #	19.75 ± 3.44 ** #	18.92 ± 3.09 ** #	14.19 ± 2.41 ** #
	22.18	15.91 ± 2.81 ** #	18.96 ± 3.46 ** #	15.88 ± 2.63 ** #	13.79 ± 2.83 ** #
大叶胡枝子根皮乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction	41.28	23.79 ± 3.41	28.39 ± 6.25	27.48 ± 3.92	24.59 ± 5.12
	82.55	24.61 ± 4.55	30.69 ± 4.98	30.68 ± 4.78	25.86 ± 5.31
大叶胡枝子根皮正丁醇部位 <i>n</i> -butyl alcohol fraction	127.27	28.39 ± 6.12	29.46 ± 5.68	30.59 ± 5.27	28.91 ± 3.44
	254.54	27.98 ± 3.34	32.29 ± 6.42	30.05 ± 6.34	26.92 ± 5.29
大叶胡枝子根皮水部位 Water fraction	510.50	25.18 ± 4.29	28.91 ± 4.49	29.63 ± 4.93	24.69 ± 4.84
	1 021.00	23.75 ± 5.13	27.83 ± 3.57	26.62 ± 6.01	24.96 ± 4.74
大叶胡枝子根皮水提液 Water extract	5 000.00	15.97 ± 3.41 ** #	19.03 ± 3.38 ** #	18.21 ± 3.35 ** #	15.64 ± 4.96 ** #
	10 000.00	15.12 ± 2.79 ** #	18.54 ± 3.95 ** #	15.73 ± 2.35 ** #	14.15 ± 4.12 ** #

注:与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与阿司匹林组比较, # $P > 0.05$ 。

Note: Compare with model group, \*\* $P < 0.01$ ; compare with aspirin group, # $P > 0.05$ .

### 3.3 对蛋清致炎大鼠血清 TNF- $\alpha$ 及 IL-1 $\beta$ 和足跖炎性组织 PGE<sub>2</sub> 含量的影响

与模型组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位高、

低剂量组和阿司匹林组明显减少蛋清所致大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量及足跖炎性组织 PGE<sub>2</sub> 含量 ( $P < 0.01$ )。与阿司匹林组相比,大叶胡枝子根皮石油

醚部位高、低剂量组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见表3。

表3 大叶胡枝子根皮石油醚部位对蛋清致炎大鼠血清 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  和足跖炎性组织 PGE<sub>2</sub> 含量的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Effects of petroleum ether fractions from root bark of *Lespedeza davidii* on content of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in serum and PGE<sub>2</sub> in the inflammatory tissue in rats ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	PGE <sub>2</sub> (ng/L)
模型 Model	-	618.19 $\pm$ 116.54	648.16 $\pm$ 127.63	31.32 $\pm$ 7.22
阿司匹林 Aspirin	500.00	256.31 $\pm$ 56.51 **	75.27 $\pm$ 78.41 **	11.46 $\pm$ 4.34 **
大叶胡枝子根皮石油醚部位 Petroleum ether fraction	11.09	287.22 $\pm$ 59.21 ** #	231.76 $\pm$ 68.17 **	13.49 $\pm$ 4.12 ** #
	22.18	276.32 $\pm$ 61.37 ** #	205.33 $\pm$ 66.69 **	12.32 $\pm$ 4.11 ** #

注:与模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与阿司匹林组比较, #  $P > 0.05$ 。

Note: Compare with model group, \*\*  $P < 0.01$ ; compare with aspirin group, #  $P > 0.05$ .

### 3.4 对大鼠棉球肉芽肿的影响

与模型组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高、低剂量组对大鼠棉球肉芽肿均有显著抑制作用 ( $P < 0.01$ ),且具有剂量依赖性;乙酸乙酯、正丁醇及水部位高、低剂量组差异不显著 ( $P >$

0.05);阿司匹林 500 mg/kg 给药后也明显抑制大鼠棉球肉芽肿 ( $P < 0.01$ )。与阿司匹林组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高、低剂量组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。结果见表4。

表4 大叶胡枝子根皮不同萃取部位对大鼠棉球肉芽肿的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )  
Table 4 Effects of different fractions from root bark of *Lespedeza davidii* on granuloma induced by cotton pellet implantation ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	肉芽组织干重 Granuloma dry weight (mg)	抑制率 Inhibitory rate (%)
模型 Model	-	91.22 $\pm$ 9.01	-
阿司匹林 Aspirin	500.00	65.78 $\pm$ 6.20 **	27.89
大叶胡枝子根皮石油醚部位 Petroleum ether fraction	11.09	69.73 $\pm$ 6.29 ** #	23.56
	22.18	65.96 $\pm$ 8.65 ** #	27.69
大叶胡枝子根皮乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction	41.28	92.52 $\pm$ 10.60	-1.42
	82.55	88.93 $\pm$ 8.31	2.51
大叶胡枝子根皮正丁醇部位 <i>n</i> -Butyl alcohol fraction	127.27	90.96 $\pm$ 10.51	0.29
	254.54	85.94 $\pm$ 9.68	5.79
大叶胡枝子根皮水部位 Water fraction	510.50	88.11 $\pm$ 9.22	3.41
	1 021.00	92.75 $\pm$ 10.01	-1.68
大叶胡枝子根皮水提液 Water extract	5 000.00	69.07 $\pm$ 7.04 ** #	24.28
	10 000.00	65.06 $\pm$ 7.16 ** #	28.68

注:与模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与阿司匹林组比较, #  $P > 0.05$ 。

Note: Compare with model group, \*\*  $P < 0.01$ ; compare with aspirin group, #  $P > 0.05$ .

### 3.5 对热板法所致小鼠疼痛的影响

与模型组相比,给药前各组痛阈值比较差异无统计学意义;大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高、低剂量组,给药后 30、60、90、120 min 明显延长热板所致小鼠的痛阈值 ( $P < 0.01$ ),且具剂量依赖性;乙酸乙酯、正丁醇及水部位高、低剂量组给药后 30、60、90、120 min 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );吗啡

溶液 20 mg/kg 给药后 30、60、90、120 min 显著延长热板所致小鼠的痛阈值 ( $P < 0.01$ )。与自身给药前相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高、低剂量组以及吗啡溶液组,给药后 30、60、90、120 min 明显延长热板所致小鼠的痛阈值 ( $P < 0.01$ );乙酸乙酯、正丁醇及水部位高、低剂量组给药后 30、60、90、120 min 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见表5。

表5 大叶胡枝子根皮不同萃取部位对小鼠热板法痛阈的影响( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )Table 5 Effects of different fractions from root bark of *Lespedeza davidii* on threshold of mice in hot plate test ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	给药前痛阈 The pain threshold before administration (s)		给药后痛阈 The pain threshold after administration (s)			
		30 min	60 min	90 min	120 min		
模型 Model	-	15.37 ± 2.60	15.77 ± 3.92	15.07 ± 2.41	15.23 ± 2.53	15.26 ± 2.42	
盐酸吗啡 Morphine hydrochloride	20.00	15.23 ± 1.85	59.06 ± 1.84 <sup>**&amp;&amp;</sup>	58.58 ± 2.67 <sup>**&amp;&amp;</sup>	56.14 ± 5.39 <sup>**&amp;&amp;</sup>	53.99 ± 6.36 <sup>**&amp;&amp;</sup>	
大叶胡枝子根皮石油醚部位 Petroleum ether fraction	11.09	15.33 ± 1.46	27.76 ± 2.18 <sup>**&amp;&amp;</sup>	30.31 ± 3.39 <sup>**&amp;&amp;</sup>	29.82 ± 3.31 <sup>**&amp;&amp;</sup>	27.71 ± 2.93 <sup>**&amp;&amp;</sup>	
	22.18	15.11 ± 2.42	28.42 ± 4.89 <sup>**&amp;&amp;</sup>	33.58 ± 4.45 <sup>**&amp;&amp;</sup>	32.04 ± 5.19 <sup>**&amp;&amp;</sup>	30.17 ± 3.75 <sup>**&amp;&amp;</sup>	
大叶胡枝子根皮乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction	41.28	15.23 ± 3.48	15.60 ± 3.41	15.19 ± 3.62	15.29 ± 2.58	15.09 ± 3.51	
	82.55	15.74 ± 2.59	15.96 ± 3.53	15.07 ± 3.90	15.64 ± 3.52	15.05 ± 2.69	
大叶胡枝子根皮正丁醇部位 <i>n</i> -Butyl alcohol fraction	127.27	15.10 ± 2.77	15.78 ± 3.15	15.67 ± 3.77	14.99 ± 3.02	15.52 ± 3.21	
	254.54	15.24 ± 2.69	14.91 ± 3.41	15.46 ± 2.95	14.99 ± 3.76	15.25 ± 2.23	
大叶胡枝子根皮水部位 Water fraction	510.50	15.21 ± 2.58	15.09 ± 3.22	15.21 ± 3.91	15.84 ± 2.77	15.26 ± 2.94	
	1 021.00	15.45 ± 1.94	15.67 ± 2.81	15.17 ± 3.30	15.75 ± 3.35	15.39 ± 3.47	
大叶胡枝子根皮水提液 Water extract	5 000.00	15.56 ± 3.21	28.13 ± 3.45 <sup>**&amp;&amp;</sup>	31.12 ± 4.92 <sup>**&amp;&amp;</sup>	30.50 ± 3.69 <sup>**&amp;&amp;</sup>	28.08 ± 2.49 <sup>**&amp;&amp;</sup>	
	10 000.00	14.91 ± 3.78	30.85 ± 3.45 <sup>**&amp;&amp;</sup>	34.75 ± 2.85 <sup>**&amp;&amp;</sup>	32.48 ± 3.11 <sup>**&amp;&amp;</sup>	30.22 ± 3.29 <sup>**&amp;&amp;</sup>	

注:与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与自身药前痛阈比较,<sup>&&</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compare with model group, \*\* $P < 0.01$ ; Compare with the data before the administration of drugs, <sup>&&</sup> $P < 0.01$ .

### 3.6 对醋酸所致小鼠扭体反应的影响

表6结果表明,与模型组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位和水提液高、低剂量组均明显减少醋酸所致小鼠扭体反应次数( $P < 0.01$ ),且具有剂量依

赖性;乙酸乙酯、正丁醇及水部位高、低剂量组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );阿司匹林 500 mg/kg 给药后能显著减少醋酸所致小鼠扭体反应次数( $P < 0.01$ )。

表6 大叶胡枝子根皮不同萃取部位对小鼠扭体次数的影响( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )Table 6 Effects of different fractions from root bark of *Lespedeza davidii* on acetic acid writhing of mice ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	扭体次数 Writhing number	抑制率 Inhibition rate (%)
模型 Model	-	26.75 ± 5.44	-
阿司匹林 Aspirin	500.00	7.75 ± 2.01 <sup>**</sup>	71.03
大叶胡枝子根皮石油醚部位 Petroleum ether fraction	11.09	15.08 ± 3.84 <sup>**</sup>	43.63
	22.18	12.42 ± 3.65 <sup>**</sup>	53.57
大叶胡枝子根皮乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction	41.28	25.17 ± 3.66	5.91
	82.55	27.07 ± 5.56	-1.19
大叶胡枝子根皮正丁醇部位 <i>n</i> -Butyl alcohol fraction	127.27	29.75 ± 6.41	-11.21
	254.54	27.75 ± 8.25	-3.74
大叶胡枝子根皮水部位 Water fraction	510.50	23.50 ± 7.72	12.15
	1 021.00	22.08 ± 7.46	17.46
大叶胡枝子根皮水提液 Water extract	5 000.00	14.41 ± 4.16 <sup>**</sup>	46.13
	10 000.00	11.97 ± 2.90 <sup>**</sup>	55.25

注:与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compare with model group, \*\* $P < 0.01$ 。

### 3.7 对醋酸致痛小鼠血清 NO、MDA、PGE<sub>2</sub> 含量的影响

与模型组相比,大叶胡枝子根皮石油醚部位高、

低剂量组明显降低醋酸致痛小鼠血清 NO、MDA 和 PGE<sub>2</sub> 含量( $P < 0.01$ ),且具剂量依赖性;阿司匹林 500 mg/kg 给药后也明显降低醋酸所致小鼠血清

NO 和 PGE<sub>2</sub> 含量 ( $P < 0.01$ )。结果见表 7。

表 7 大叶胡枝子根皮石油醚部位对醋酸致痛小鼠血清 NO、MDA、PGE<sub>2</sub> 含量的影响 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

Table 7 Effects of petroleum ether fractions from root bark of *Lespedeza davidii* on content of NO, MDA and PGE<sub>2</sub> in mice serum ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	PGE <sub>2</sub> (ng/L)
模型 Model	-	68.26 $\pm$ 3.57	21.31 $\pm$ 3.53	226.17 $\pm$ 13.24
阿司匹林 Aspirin	500.00	46.21 $\pm$ 3.48 **	20.69 $\pm$ 4.23	119.47 $\pm$ 12.66 **
大叶胡枝子根皮石油醚部位 Petroleum ether fraction	11.09	49.32 $\pm$ 3.25 **	14.89 $\pm$ 3.69 **	123.34 $\pm$ 14.39 **
	22.18	47.33 $\pm$ 4.17 **	12.46 $\pm$ 3.67 **	120.15 $\pm$ 11.32 **

注:与模型组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with model group, \*\*  $P < 0.01$ .

## 4 讨论与结论

本实验采用小鼠耳肿法、大鼠足肿法及棉球肉芽肿法炎症模型预防给药来考察大叶胡枝子根皮不同萃取部位的抗炎作用,以筛选出抗炎作用的活性部位;采用小鼠热板法、醋酸扭体法疼痛模型预防给药来考察大叶胡枝子根皮不同萃取部位的镇痛作用,以筛选出镇痛作用的活性部位;并对蛋清致炎大鼠血清的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和足跖炎性组织的 PGE<sub>2</sub> 含量以及醋酸致痛模型小鼠血清的 NO、MDA、PGE<sub>2</sub> 含量进行了测定,以初步探究其抗炎镇痛作用机制。

用二甲苯致小鼠耳廓肿胀及蛋清致大鼠足跖肿胀是以水肿和渗出为主的急性炎症反应,用棉球致大鼠肉芽肿是以增生为主的慢性炎症反应<sup>[8]</sup>。本实验石油醚部位 ig 给药对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀,蛋清所致大鼠足跖肿胀和棉球所致大鼠肉芽肿增生均有明显抑制,表明石油醚部位 ig 给药对急性慢性炎症具有显著抑制作用。

小鼠热板实验是通过一定强度的温度(55  $^{\circ}\text{C}$ )刺激小鼠足部以产生疼痛反应。常以热刺激开始至出现舔足反应的时间为测痛指标<sup>[8]</sup>,并以此评价药物的镇痛作用。热板反应有高位中枢参与<sup>[9]</sup>。小鼠醋酸扭体实验是通过醋酸刺激引起小鼠腹膜炎而产生疼痛,表现为腹部内凹、躯干与后肢伸张、臀部高起等扭体反应<sup>[10,11]</sup>。小鼠醋酸扭体实验是筛选弱镇痛药的一种敏感、简便、重复性好的方法<sup>[9]</sup>。本实验石油醚部位明显提高热板所致小鼠的痛阈值,明显减少醋酸诱发的小鼠扭体反应,这表明石油醚部位对温度等物理因素导致的疼痛和醋酸等导致的炎性疼痛均有镇痛作用。

PGE<sub>2</sub> 是一种重要的炎症介质,参与和介导炎性

反应。PGE<sub>2</sub> 不仅能促进血管扩张,增加炎症组织水肿,而且也会增敏血管对其他炎症介质如组胺、缓激肽等的作用<sup>[12,13]</sup>,还能加强其他趋化因子的作用,使白细胞向炎症部位集中,介导炎症的发生发展<sup>[14,15]</sup>。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  作为一种起始的促炎细胞因子,可以作用于血管内皮细胞,使之表达黏附分子和分泌趋化性细胞因子,参与血管内皮黏附,促进单核细胞、中性粒细胞趋化,并刺激其活化释放出炎症介质,引起炎症反应<sup>[16,17]</sup>。本实验显示,石油醚部位能降低炎症时 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 PGE<sub>2</sub> 的产生,这表明石油醚部位抗炎作用的部分机制涉及到抑制炎症过程中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 PGE<sub>2</sub> 的产生。

NO 是细胞间信息传递的重要调节因子,通过提高靶细胞的 cGMP 水平,即 NO-cGMP 途径发挥镇痛作用<sup>[18]</sup>。本研究显示,石油醚部位可降低醋酸致痛小鼠血清中 NO 含量,提示石油醚部位的镇痛作用机制可能与抑制 NO 的产生有关。

PGE<sub>2</sub> 也是重要的致痛因子,PGE<sub>2</sub> 的增加既可直接刺激神经末梢引起疼痛,又可提高痛觉感受器对其他致痛因子的敏感性,还可启动疼痛所介导的信号转导通路<sup>[19,20]</sup>。PGE<sub>2</sub> 的产生常伴有大量氧自由基的生成。氧自由基在诱发脂质过氧化引起细胞损伤的同时,也有强烈的致痛作用。本研究显示,石油醚部位能降低醋酸致痛小鼠血清中 PGE<sub>2</sub> 含量和脂质过氧化反应产物 MDA 的含量,提示石油醚部位的镇痛作用机制也可能与抑制 PGE<sub>2</sub> 的合成和氧自由基的生成有关。

综上所述,本研究采用了 3 种炎症动物模型和 2 种疼痛动物模型预防给药来研究大叶胡枝子根皮不同萃取部位的抗炎镇痛作用。实验结果显示,石油醚部位 ig 给药对急性、慢性炎症均具有良好的抑制

作用,表明大叶胡枝子根皮的抗炎作用活性部位主要为石油醚部位;在镇痛方面,石油醚部位对热板和醋酸所致的疼痛均有明显镇痛作用,说明其镇痛活性部位也主要为石油醚部位;其抗炎作用机制可能与抑制炎症时 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 PGE<sub>2</sub> 的产生有关;其镇痛作用机制可能与降低疼痛时 NO、MDA 和 PGE<sub>2</sub> 的含量有关。实验结果为大叶胡枝子临床应用和综合开发利用提供了一定的实验依据。但是,是哪种活性成分发挥了主要的抗炎镇痛作用,对其他致痛和炎症介质是否有影响,有何影响,这还有待于后续更深入的研究。

#### 参考文献

- 1 Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). The dictionary of traditional Chinese medicine(中药大辞典)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing Press, 1979; 2825-2826.
- 2 Cao P(曹平), Zhang LS(张兰胜). Research progress of *Lespedeza Michx. plants*[J]. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), 2017, 56: 2406-2409.
- 3 Li JR, Wang MS, Liu WG. Two flavanones from the root bark of *Lespedeza davidii*[J]. *Phytochemistry*, 1987, 26: 1218-1219.
- 4 Sin MG(申文吉), Li JR(李景荣), Ding NP(丁南平), et al. Studies on chemical constituents of *Lespedeza davidii*[J]. *J Chin Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1991, 22: 148-149.
- 5 Zhang S(张颂), Zhang ZY(张宗禹), Liu H(刘桦), et al. Interceptive action of *Lespedeza davidii* Franch in the early pregnant mice[J]. *J Chin Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1990, 21: 57-58.
- 6 Liang SL(梁生林), Huang FH(黄芳辉), Zhong XH(钟兴华), et al. Screening of anti-inflammatory and analgesic effective fractions from *Cayratia japonica*[J]. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药), 2016, 47: 634-639.
- 7 Ouyang K(欧阳凯), He XY(何先元), Zhou MQ(周卯勤), et al. Anti-inflammatory, analgesic and immunomodulatory effects of *Schnabelia tetradonta*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1372-1376.
- 8 Chen Q(陈奇). Research methodology of pharmacology of traditional Chinese medicine; 2nd ed(中药药理研究方法学:第2版)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006; 346-368.
- 9 Xu SY(徐叔云), Bian RL(卞如濂), Chen X(陈修). Experimental methodology of pharmacology; 3rd ed(药理实验方法学:第三版)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005; 882-887.
- 10 Chao J, Lu TC, Liao JW, et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanol root extract of *Mahonia oiwakensis* in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125: 297-303.
- 11 Su SL, Wang TJ, Duan JA, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134: 251-258.
- 12 Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE<sub>2</sub> in inflammation and cancer[J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35: 123-137.
- 13 Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E<sub>2</sub>[J]. *J Immunol*, 2012, 188: 21-28.
- 14 Zhu W(朱伟), Sun HG(孙红光), Zhu X(朱迅). Effects of baicalein on inflammation[J]. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2009, 25: 194.
- 15 Li XH(李晓红), Qi Y(齐云), Cai RL(蔡润兰), et al. Studies on the anti-inflammatory mechanism of total saponins of *Radix Glycyrrhiza in vitro*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 110.
- 16 Hao Y(郝钰), Qiu QY(邱全瑛), Wu J(吴珺), et al. Effects of berberine on IL-1 or tumour necrosis factor induced polymorphonuclear leucocyte-endothelium adhesion[J]. *Chin J Pathophysiol*(中国病理生理杂志), 2000, 16: 585-587.
- 17 Quan YY(全云云), Yuan A(袁岸), Gong XH(龚小红), et al. Investigation on anti-inflammatory components of *Forsythia suspensa*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29: 435-438.
- 18 Tian JH(田今华), Wang XM(王晓民), Han JS(韩济生). Nitric oxide and pain modulation[J]. *Prog Physiol Sci*(生理科学进展), 1996, 27: 161-164.
- 19 Flodgren GM, Crenshaw AG, Alfredson H, et al. Glutamate and prostaglandin E<sub>2</sub> in the trapezius muscle of female subjects with chronic muscle pain and controls determined by microdialysis[J]. *Eur J Pain*, 2005, 9: 511-515.
- 20 Heinricher MM, Martenson ME, Neubert MJ. Prostaglandin E<sub>2</sub> in the midbrain periaqueductal gray produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla[J]. *Pain*, 2004, 110: 419-426.