

苦苣菜水提物对机体炎症反应相关通路的调节作用及其机制研究

王振苗 董丽荣 贾 评 田 慧

(河北北方学院附属第二医院, 张家口, 075100)

摘要 目的: 分析苦苣菜水提物对机体炎症反应相关通路的调节作用, 并进一步对作用机制进行研究。方法: 雄性健康 SD 小鼠 100 只, 随机分成 10 组, 每组 10 只, 5 组进行耳肿实验, 5 组进行足肿实验。耳肿实验与足肿实验中, 分别设置模型组、地塞米松(2 mg/kg) 阳性药物组、苦苣菜水提物 0.26 g/10 g 剂量组、苦苣菜水提物 0.13 g/10 g 剂量组、苦苣菜水提物 0.065 g/10 g 剂量组。检测不同组间血清及炎症组织液中 COX-2、p38 MAPK、TNF- α 及 IL-6 水平。结果: 不同剂量组间小鼠耳廓肿胀度存在差异, 各组肿胀抑制率分别为 73.12%、43.62%、28.83%、9.61%。与模型组比较, 苦苣菜水提物不同剂量组小鼠耳廓肿胀度均受到不同程度的抑制, 且随着给药剂量的增大, 抑制效果逐渐增强。不同剂量组间小鼠足趾肿胀度存在差异; 各组肿胀抑制率分别为 54.80%、35.09%、29.73%、17.46%。与模型组比较, 苦苣菜水提物不同剂量组小鼠足趾肿胀度均受到不同程度的抑制, 且随着给药剂量的增大, 抑制效果逐渐增强。苦苣菜水提物对小鼠炎症组织液中炎症反应相关因子的影响: 阳性对照组、苦苣菜水提物中剂量与高剂量组的 COX-2、p38 MAPK、TNF- α 、IL-6 水平与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。苦苣菜水提物对小鼠血清中炎症反应相关因子的影响: 阳性对照组、苦苣菜水提物中剂量的 COX-2、p38 MAPK 水平与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阳性对照组、苦苣菜水提物中剂量与高剂量组的 TNF- α 、IL-6 水平与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 苦苣菜水提物的抗炎机制涉及到炎症反应发生过程中的多个环节和炎症反应因子, 有望研发成为有效的抗炎新药, 为防治炎症反应性疾病提供新的药用和食疗资源。

关键词 苦苣菜水提物; 炎症反应; 通路; 调节; 机制

Study of Water Extract of Sonchus Oleraceus on the Regulation and Mechanism of Related Pathways of Body's Inflammatory

Wang Zhenmiao, Dong Lirong, Jia Ping, Tian Hui

(Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075100, China)

Abstract Objective: To analyze water extract of Sonchus Oleraceus on the regulation of related pathways of body's inflammatory, and further investigate the mechanism of it. **Methods:** A total of 100 healthy male SD mice were randomly divided into 10 groups ($n = 10$). Five groups of mice were treated with ear swelling experiment, and foot swelling experiment was used in mice of another five groups. In ear swelling test and foot swelling experiments, model group and dexamethasone group (2 mg/kg) positive drug group, water extract of Sonchus 0.26 g/10 g dose group, water extract of Sonchus 0.13 g/10 g dose group and water extract of Sonchus 0.065 g/10 g group. The levels of COX-2, p38 MAPK, TNF- α and IL-6 in different serum and inflammatory tissue fluid of different groups were detected. **Results:** There were significant differences of ear swelling degree in different dose groups. The inhibition mice were 73.12%, 43.62%, 28.83%, respectively. Compared with the model group, mice auricle swelling with water extract of Sonchus oleraceus of different dose was inhibited, and with the increase of the dose, inhibition effect was enhanced. There were significant differences in the swelling degree of paw in different dose groups, and the inhibition rates were 54.80%, 35.09%, 29.73% respectively in each group. Compared with the model group, mice paw swelling with Sonchus oleraceus water extract of different dosage were inhibited, and with the increase of the dose, inhibition effect was enhanced. Effects of water extracted of Sonchus oleraceus related factors on the inflammatory tissue of mice in the solution: positive control group, Sonchus oleraceus water extracted dose and high dose group with COX-2, p38 MAPK, TNF- α , IL-6 levels compared with the model group, and there was significant difference ($P < 0.05$). Effects of water extract of Sonchus oleraceus of inflammation related factors in sera of mice: positive control group, Sonchus oleraceus water extract in dose of COX-2 and p38 MAPK levels compared with the model group, and there was significant difference ($P < 0.05$); The positive control group, water extract of Sonchus oleraceus middle dose group and high dose group of TNF- α and IL-6 levels compared with the model group, there was significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Anti-inflammatory mechanism of water extract of Sonchus oleraceus involves many aspects and inflammatory factors in the process of inflammation, which is expected to be developed into new anti-inflammatory drugs effectively, providing new medicinal and therapeutic resources for the prevention and treatment of inflammatory diseases.

Key Words Water extract of *Sonchus oleraceus*; Inflammation; Pathway; Regulation; Mechanism

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.048

苦苣菜(*Sonchus oleraceus* L.),又名:苦菜、滇苦菜、苦苣菜等,属菊科,苦苣菜属。苦苣菜属植物的主要活性成分是倍半萜类和黄酮类,此外,还有香豆素类、甘油酸酯苷类、木脂素类等。苦苣菜及提取物具有降血糖、降压、降脂、利尿、保肝、抗肿瘤等多种药理作用^[1]。近年来,动物实验发现苦苣菜属植物可明显抑制动物耳肿、足肿,抑制毛细血管的通透性,从而发挥抗菌、抗炎作用^[2]。在临床常与其他中药配伍用于治疗胃肠炎、肺炎、咽喉炎等多种疾病。抗炎机制涉及到抗氧化、抑制 NO 生成和细胞凋亡等多方面内容,机制复杂,因此目前尚缺乏系统的阐明^[3]。本课题通过二甲苯致小鼠耳廓肿胀、角叉菜胶诱导小鼠后足跖肿胀建立动物模型,以探讨苦苣菜水提物的抗炎作用;通过检测小鼠炎性组织液和血清中环氧化酶(Epoxidase-2, COX-2)、p38 丝裂原活化蛋白酶(p38 Mitogen-activated Protein Kinases, p38 MAPK)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎症反应相关因子的水平变化,进一步分析苦苣菜水提物通过炎性递质对机体炎性反应相关通路的调节作用,为防治炎性反应性疾病提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性健康 SD 小鼠 100 只,体质量 20~22 g,由中国食品药品检定研究院提供,许可证号:SCXK(京)2014-0013。饲养于室温(23.0 $\pm$ 2.0) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 40% 动物室内,自由摄食,饮水,1 周后用于实验,至实验时体质量为 30~35 g。

1.1.2 药物 苦苣菜水提物的制备:称取苦苣菜全草原生药 130 g,水中浸泡 30 min,按照 1:10 比加水煎煮 60 min,收集滤液 A,滤渣再次按 1:10 加水煎煮 45 min,得滤液 B,合并两次所得滤液,浓缩得 1.3 g/mL 浓缩液,冷却,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.1.3 试剂与仪器 Sigma4-15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),Tecan Safire2 酶标仪(意大利 Tecan 公司),LE225D 电子天平(德国 Sartorius 公司),RE-52AA 旋转蒸发仪及电热恒温水浴锅(北京精科华瑞仪器有限公司)等。二甲苯分析纯(天津市永大化学试剂有限公司,批号 20110707),角叉菜胶(德国 Sigma 公司,批号 127H1227),COX-2 酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent As-

say, ELISA)试剂盒、p38 MAPK(ELISA)试剂盒、TNF- α (ELISA)试剂盒、IL-6(ELISA)试剂盒(均购自北京冬歌生物科技有限公司,批号 201501)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将小鼠随机分成 10 组,每组 10 只,其中耳肿实验和足肿实验各 5 组。二甲苯致耳肿胀模型:末次给药 30 min 后,于小鼠右耳内外两侧各涂抹二甲苯 0.02 mL,30 min 后处死小鼠,剪下左右耳,使用打孔器在双耳同一部位打下等大的圆形耳片,称重左、右耳片,以重量之差作为肿胀度。角叉菜胶致足跖肿胀模型:末次给药 30 min 后,于小鼠右后跖皮下注射 1% 角叉菜胶 30 μL ,5 h 后处死小鼠,于跟骨水平对称剪下鼠足,称重左、右足,以重量差作为鼠足肿胀度。肿胀抑制率(%)=(模型组-给药组)/模型组 $\times$ 100。

1.2.2 给药方法 参照“常用动物与人体表面积比值表”,确定本次实验各组苦苣菜水提物给药浓度分别为 0.26 g/10 g、0.13 g/10 g、0.065 g/10 g。稀释

1.3 g/mL 浓缩液得各组所用溶液。耳肿实验中分为耳肿模型组、地塞米松(2 mg/kg)阳性对照组、苦苣菜水提物 0.26 g/10 g、0.13 g/10 g 及 0.065 g/10 g 剂量组。足肿实验中分为足肿模型组、地塞米松(2 mg/10 g)阳性对照组、苦苣菜水提物 0.26 g/10 g、0.13 g/10 g 及 0.065 g/10 g 剂量组。各组均采用灌胃(ig)给药,苦苣菜水提物各剂量组给药剂量按体质量计算(0.2 mL/10 g),阳性对照组按 2 mg/10 g 给予地塞米松磷酸钠溶液,模型组给予等量生理盐水。连续给药 5 d。

1.2.3 检测指标与方法 炎症反应相关细胞因子和炎性递质的含量测定。血清:室温血液自然凝固 10~20 min,离心 20 min(3 000 r/min)。收集上清,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。保存过程中如出现沉淀,可再次离心。炎性组织液:整个致炎小鼠足爪称重后,剪碎,放入 3 mL 0.9% 的生理盐水中,充分浸泡。离心 20 min(3 000 r/min,-4 $^{\circ}\text{C}$),制得炎性组织液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。依据 ELISA 试剂盒说明,应用双抗体夹心法,检测血清及炎性组织液中 COX-2、p38 MAPK、TNF- α 及 IL-6 水平。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦苣菜水提物对二甲苯所致小鼠耳肿的影响

不同剂量组间小鼠耳廓肿胀度存在差异;各组肿胀抑制率分别为 73.12%、43.62%、28.83%、9.61%。相较于模型组,苦苣菜水提物各组小鼠的耳廓肿胀均受到程度不等的抑制,且随着给药剂量的增大,抑制效果逐渐增强。见表 1。

表 1 苦苣菜水提物对二甲苯所致小鼠耳肿的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肿胀度 (mg)	肿胀抑制率 (%)
模型组	13.32 ± 3.58	—
阳性对照组	4.87 ± 1.93	73.12
高剂量组	7.51 ± 2.14	43.62
苦苣菜水提物 中剂量组	9.48 ± 2.51	28.83
低剂量组	12.04 ± 3.27	9.61

2.2 苦苣菜水提物对角叉菜胶所致小鼠足肿的影响

不同剂量组间小鼠足跖肿胀度存在差异;各组肿胀抑制率分别为 54.80%、35.09%、29.73%、17.46%。与模型组比较,苦苣菜水提物不同剂量组小鼠足跖肿胀均受到不同程度的抑制,且随着给药剂量的增大,抑制效果逐渐增强。见表 2。

表 2 苦苣菜水提物对角叉菜胶所致小鼠足肿的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肿胀度 (mg)	肿胀抑制率 (%)
模型组	34.20 ± 8.31	—
阳性对照组	15.46 ± 3.42	54.80
高剂量组	22.20 ± 5.47	35.09
苦苣菜水提物 中剂量组	25.03 ± 6.84	29.73
低剂量组	28.23 ± 6.73	17.46

2.3 苦苣菜水提物对小鼠炎性组织液中炎性反应

表 3 苦苣菜水提物对小鼠血清中炎性反应相关因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	COX-2 (ng/mL)	p38 MAPK (pg/mL)	TNF-α (mg/L)	IL-6 (ng/L)
模型组	4.79 ± 1.05	106.41 ± 10.20	0.547 ± 0.035	120.41 ± 11.07
阳性对照组	3.50 ± 0.85 *	98.66 ± 9.14 *	0.462 ± 0.038 *	100.15 ± 9.12 *
高剂量组	3.96 ± 0.96 *	100.41 ± 8.96 *	0.478 ± 0.049 *	106.41 ± 10.62 *
苦苣菜水提物 中剂量组	4.22 ± 0.93 *	101.15 ± 10.41 *	0.508 ± 0.057 *	115.11 ± 10.84 *
低剂量组	4.63 ± 1.01	105.52 ± 11.86	0.510 ± 0.061	121.14 ± 11.51

注:与模型组比较,**P* < 0.05

表 4 苦苣菜水提物对小鼠血清中炎性反应相关因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	COX-2 (ng/mL)	p38 MAPK (pg/mL)	TNF-α (mg/L)	IL-6 (ng/L)
模型组	3.87 ± 0.62	73.52 ± 7.20	0.613 ± 0.037	118.71 ± 11.25
阳性对照组	3.08 ± 0.53 *	88.53 ± 8.96 *	0.508 ± 0.049 *	99.54 ± 8.41 *
高剂量组	3.64 ± 0.54	75.56 ± 6.85	0.443 ± 0.037 *	91.41 ± 8.23 *
苦苣菜水提物 中剂量组	3.41 ± 0.42 *	84.41 ± 8.13 *	0.558 ± 0.043 *	90.56 ± 8.53 *
低剂量组	3.78 ± 0.59	71.86 ± 6.96	0.599 ± 0.052	111.41 ± 7.54

注:与模型组比较,**P* < 0.05

相关因子的影响

阳性对照组、苦苣菜水提物中剂量与高剂量组的 COX-2、p38 MAPK、TNF-α、IL-6 水平与模型组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 3。

2.4 苦苣菜水提物对小鼠血清中炎性反应相关因子的影响

阳性对照组、苦苣菜水提物中剂量的 COX-2、p38 MAPK 水平与模型组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05);阳性对照组、苦苣菜水提物中剂量与高剂量组的 TNF-α、IL-6 水平与模型组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 4。

3 讨论

炎症反应是指机体在致炎因子作用下所发生的以防御反应为主的病理过程。既有红、肿、热、痛、功能障碍等局部反应,也有发热、白细胞种类和数量的变化等全身反应^[4]。炎症递质是指在炎症反应过程中在细胞或体液中产生的生物活性物质,其通过各种途径作用于血管,造成血管扩张、通透性增加,在炎症反应的发生发展过程中发挥着重要作用^[5]。本研究通过二甲苯致小鼠耳廓肿胀和角叉菜胶诱导小鼠后足跖肿胀建立急性炎症反应模型,以研究苦苣菜水提物对炎症反应的拮抗作用。本研究结果显示,苦苣菜水提物可明显改善二甲苯所致小鼠的耳廓肿胀与角叉菜胶所致小鼠的足跖肿胀,且在本实验范围内,抑制效果与所用剂量呈正相关。提示苦苣菜水提物具有明显的抗炎作用,与之前文献报道相一致^[6]。

炎症反应的发生涉及到多方面的因素,炎症反应递质的产生与作用过程亦非常之复杂^[7]。单靶点抗炎药物往往无法获得满意疗效,因此多靶点药

物的研发成为抗炎领域的研究热点^[8]。在我国历史上很早就有苦苣菜被当做药物使用的记载,在药学专著《神农本草经》和《本草纲目》中都详细记载了苦苣菜的药理作用,由于药性偏寒,味道较苦,被认为具有清热解毒、凉血止血等功效,在肠炎、痢疾、吐血等病症的治疗方面取得显著效果^[9]。苦苣菜含有多种活性成分,除槲皮素、槲皮黄甙、吡喃葡萄糖甙等黄酮类成分外,还含有多种人体必需的微量元素,被认为是具有多靶点抗炎作用的传统中药^[10]。

目前,文献报道较多的炎症反应通路主要包括细胞因子及其受体、一氧化氮途径、花生四烯酸代谢途径、MAPK 信号及 NFJB 信号途径等^[11]。本研究主要选取 COX-2-MAPK 通路志 TNF- α -IL-6 通路对苦苣菜水提物的抗炎作用进行深入探讨。

COX-2 又称前列腺素过氧化物合成酶,是前列腺素(PG)合成过程中一个重要的限速酶,可以将花生四烯酸代谢成各种前列腺素产物,从而在机体的生理和病理过程中发挥作用。研究发现,COX-2 与哮喘、类风湿性关节炎、骨关节炎等多种炎症反应性疾病的发生发展密切相关^[12]。在多种炎症反应性疾病的渗出液中均可检测到 COX-2mRNA 和 COX-2 蛋白的高表达^[13]。因此,近年来 COX-2 被作为新型非甾体抗炎药的作用靶点,从天然药物中筛选有效的 COX-2 抑制剂成为研发新型抗炎药物的有效途径。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated Protein Kinases, MAPKs)在细胞内广泛存在^[14]。目前已发现存在多条并行的 MAPKs 信号通路,哺乳类细胞主要存在以下 3 条并行的 MAPKs 信号通路:ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase)信号通路,JNK (c-Jun N-terminal Kinase, JNK)/SAPK (Stress-activated Protein Kinase, SAPK) 通路及 p38 MAPK 通路。其中 p38 MAPK 通路在转录和翻译水平参与了炎症反应递质的合成调控,被认为是抗炎药物的重要靶点。TNF- α 是一种由内毒素激活的淋巴细胞所分泌的具有多活性的细胞因子,具有双重生物学作用,一方面是机体免疫防护的重要递质,另一方面也可参与机体的免疫病理损伤。TNF- α 是迄今为止发现的具有抗肿瘤和炎症反应作用最强的细胞因子,同时还能刺激其他细胞因子如 IL-4 和 IL-6 的释放,扩大后者的生物效应,作为一种重要炎症反应递质为人们所重视。IL-6 被称为细胞因子的核心成员,是机体复杂的细胞因子网络中的重要成员。已证明在多种自身免疫及肿瘤性疾病中均有异常,并与这些疾

病的病情严重程度相关。IL-6 可诱导淋巴细胞的分化,刺激肝细胞合成急性期反应蛋白,后者可促进中性粒细胞的活化与聚集,催化和放大炎症反应,对组织细胞带来损害,因此被当做反映机体炎症反应和组织损伤严重程度的重要指标。IL-6 不能刺激相应细胞分泌其他细胞因子,其主要免疫学功能是加强其他细胞因子的效果。许多研究表明,IL-6 是某些自身免疫性疾病中的关键炎症因子,疾病的发生与转归密切相关^[15]。本研究结果显示,苦苣菜水提物可不同程度抑制 COX-2、p38 MAPK 的生成,对炎症反应递质的合成起到有效的调控作用,进而缓解炎症反应的发生发展。

综上所述,苦苣菜水提物的抗炎机制涉及到炎症反应发生过程中的多个环节和炎症反应因子,具有多靶点作用抗炎药物的特点,符合目前抗炎有效药物的研究方向,有望研发成为有效的抗炎新药,为防治炎症反应性疾病提供新的药用和食疗资源。

参考文献

- [1]王振苗,董丽荣,贾贻,等.苦苣菜水提物抗急性炎症活性及其机制研究[J].中国医药导报,2017,14(10):31-34.
- [2]王振霖,李鹏,李源,等.p38 丝裂原激活蛋白激酶通路对变应性鼻炎中黏蛋白 5AC 的信号转导机制初探[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2011,25(20):943-946.
- [3]葛红娟,杜鹃.苦苣中黄酮类化合物的抗氧化活性研究[J].吉林医药学院学报,2016,37(6):425-427.
- [4]祝双来,黄洪林.黄芩黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展[J].江西中医学院学报,2010,22(3):97-100.
- [5]饶澄,黄显.黄酮类化合物抗炎和抗肿瘤共同作用机制的研究进展[J].海峡药学,2010,22(6):8-11.
- [6]吴海璇,冯璐璐,徐辉,等.蛇床子素对髓核致神经根炎性痛大鼠 ERK/MAPK 信号通路及 COX-2 mRNA 表达的影响[J].中国药理学通报,2014,30(8):1096-1100,1101.
- [7]董静.青白散抗炎作用及对损伤组织 TNF- α 、IL-6、iNOS 和 NO 表达的影响[J].中药材,2011,34(11):1771-1773.
- [8]刘建新,何珏,周刚,等.黄芩苷元对大鼠角叉菜胶所致炎症反应的影响[J].中药药理与临床,2008,24(5):26-27.
- [9]吴晓宁,余陈欢,包启年.杭白菊总黄酮抗炎作用及其机制初探[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(9):1000-1004.
- [10]卢新华,唐伟军,谢应桂,等.苦菜提取物抗炎作用的实验研究[J].中国中医药科技,2006,13(4):240-241.
- [11]霍碧姝,秦民坚.217 苦苣菜属植物化学成分与药理作用[J].国外医药:植物药分册,2008,23(5):203-208.
- [12]张黎,陈志武,王瑜,等.银杏叶总黄酮抗炎作用及机制的探讨[J].安徽医科大学学报,2001,36(5):350-352.
- [13]梁统,覃燕梅,梁念慈,等.侧柏总黄酮的抗炎作用及机制[J].中国药理学通报,2003,19(12):1407-1410.
- [14]赵晓霞,王梦亮.苦菜的营养成分及开发[J].现代园艺,2014,21(23):40-41.
- [15]延卫东,王瑞君,何琰,等.黄芩苷药理作用研究进展[J].陕西中医,2002,23(12):1127-1129.