

东北铁线莲不同提取部位的抗炎镇痛作用研究

田淑霞^{1,2} 李长艳¹ 张婧娴¹ 肖霄³ 郭澄¹ 杜江² 韩永龙^{1,3}

(1 上海交通大学附属第六人民医院药剂科,上海,200233; 2 贵阳中医学院,贵阳,550025; 3 上海中医药大学,上海,201203)

摘要 目的:研究和比较东北铁线莲不同提取部位的抗炎镇痛活性。方法:东北铁线莲经提取、萃取、浓缩得到石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位,实验分为阴性对照组、阳性对照组和实验组,分别利用小鼠醋酸扭体疼痛模型和脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎性反应模型评估 4 个提取部位的镇痛活性和抗炎活性。结果:在镇痛实验中,乙酸乙酯部位对小鼠扭体的抑制率最高;抗炎实验结果显示,乙酸乙酯部位抑制 NO 的效果最为显著。结论:东北铁线莲不同部位的抗炎镇痛效果不同,其中乙酸乙酯部位抗炎镇痛活性最强。

关键词 东北铁线莲;提取部位;抗炎;镇痛

Study on Anti-inflammatory and Analgesic Effect of Different Fractions Extracted from *Clematis manshurica* Rupr

Tian Shuxia^{1,2}, Li Changyan¹, Zhang Jingxian¹, Xiao Xiao³, Guo Cheng¹, Du Jiang², Han Yonglong^{1,3}

(1 Department of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China;

2 Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 3 Shanghai University

of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To study the anti-inflammatory and analgesic activities of different fractions extracted from *Clematis manshurica* Rupr. **Methods:** The parts of petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butanol were obtained by abstracting, extracting and concentrating. The experiment was divided into three groups: negative control group, positive control group and experimental group. In the study, mouse acetic acid writhing and lipopolysaccharide (LPS) induced RAW264.7 cell model were used to evaluate analgesic and anti-inflammatory activity of the four fractions. **Results:** In the experiment of analgesic, the inhibition rate of writhing was the most significant in the ethyl acetate fraction. The results of anti-inflammatory experiment suggested that the ethyl acetate fraction showed significant inhibitory effect on nitric oxide (NO). **Conclusion:** The anti-inflammatory and analgesic effects of different parts of *Clematis manshurica* were different, and ethyl acetate fraction showed the most significant anti-inflammatory and analgesic activity.

Key Words *Clematis manshurica* Rupr; Extract; Anti-inflammation; Analgesia

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.047

东北铁线莲(*Clematis manshurica* Rupr.)是毛茛科铁线莲属植物,其根及根茎可作为中药威灵仙入药,具有通络止痛、祛风湿之功效,在临床上主要用于风湿痹痛,肢体麻木,筋脉拘挛,屈伸不利等症。随着现代药理学和临床医学研究的不断深入,东北铁线莲更是显示出抗肿瘤、解痉、抗氧化、抗炎镇痛等诸多药理活性^[1]。研究^[2-3]发现,东北铁线莲的醇提取物和根部提取物可以通过抑制 LPS/IFN- γ 诱导的巨噬细胞中 NO 和 PGE₂ 的产生发挥抗炎作用。刘光耀等^[4]以脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)刺激 RAW264.7 细胞为炎性反应模型研究威灵仙不同提取部位的抗炎作用,结果显示活性强弱依次为威灵仙乙酸乙酯部位、石油醚部位、正丁醇部位和水部位。但是东北铁线莲中各提取部位的抗炎镇痛作用是否有差异及对巨噬细胞分泌炎性反应因子的干预

作用研究鲜有文献报道。本研究采用小鼠醋酸扭体疼痛模型和 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎性反应模型分别研究东北铁线莲不同提取部位的镇痛和抗炎作用,明确东北铁线莲抗炎镇痛的活性部位,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞 无特定病原体(SPF)级健康 ICR 小鼠 320 只,雌雄各半,体重 20~25 g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016;实验动物合格证号 2008001663805],在上海市第六人民医院实验动物中心[动物使用许可证号:SYXK(沪)2016-0020]适应性饲养 3 d,动物自由摄水,室温控制在 23~25 °C,相对湿度为 50%~70%,每天光照 10 h~12 h。

基金项目:上海市科学技术委员会民生科技支撑计划专项(14401972002);上海市第六人民医院东院人才课题(2014010)

作者简介:田淑霞(1974.12—),女,硕士研究生,研究方向:中药药剂学和临床药学研究,E-mail:tshx20052006@126.com

通信作者:韩永龙(1975.06—),男,医学博士,主任药师,硕士研究生导师,研究方向:中药药剂学和药物代谢动力学研究,E-mail:yonglongh@126.com

RAW264.7 细胞购于中国科学院上海生命科学研究
院细胞资源中心。

1.1.2 药物 东北铁线莲购于上海虹桥中药饮片
有限公司(批号:160307),经鉴定为毛茛科铁线莲属
东北铁线莲(*Clematis manshurica* Rupr.)的干燥根
茎;冰醋酸(批号:20160308,台山市新宁制药有限公
司);阿司匹林肠溶片(批号:BJ28761,拜耳医药保健
有限公司)。

1.1.3 试剂与仪器 DMEM(Dulbecco minimum es-
sential medium)培养基(批号:319006013,维森特生
物科技有限公司);磷酸缓冲盐溶液(PBS)(批号:
171860, Biosharp 公司);胎牛血清(FBS)(批号:
20170710,杭州四季青生物工程材料有限公司);脂
多糖(LPS)(批号:017M4112V, Sigma 公司);MTT
(批号:303H0528,索莱宝 Solarbio 公司);NO 检测试
剂盒(批号:20170919,南京建成生物工程研究所
有限公司)。二甲苯(分析纯),上海江莱生物科技有
限公司;二甲基亚砜(DMSO,分析纯),国药集团化
学试剂有限公司;其他化学试剂乙醇、石油醚、乙酸
乙酯、氯仿、正丁醇等均为分析纯,购于上海凌峰化
学试剂有限公司。N-1100D 型旋转蒸发器(上海爱
朗仪器有限公司);SB-2000 型水浴锅(上海爱朗仪
器有限公司);KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆
山市超声仪器有限公司);DHG-9147A 型电热鼓风
干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);SL2001N 型
电子分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);
CKX31SF 型倒置显微镜(Olympus 公司);SIMPLI-
TY 型超纯水系统(Millipore 公司);微量加样器(Ep-
pendorf 公司);TDL-80-2B 型低速离心机(上海安亭
科学仪器厂);ALLEGRA-22R 型高速离心机
(Beckman 公司);SW-CJ-2FD 型洁净工作台(苏净集
团苏州安泰空气技术有限公司);HWS24 型电热恒
温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);Epoch 型
酶标仪(BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 东北铁线莲提取 取 48 kg 东北铁线莲用
75%乙醇料液比 1:10 浸泡 16 h,80 °C 提取 1 次,3
h;再用 75%乙醇料液比 1:8,80 °C 提取 2 次,每次 2
h。合并 3 次提取液,过滤浓缩至 31L。浓缩液去沉
淀后,用石油醚 1:1 萃取 3 次,合并石油醚层;水层用
氯仿 1:1 萃取 3 次,合并氯仿层;水层用乙酸乙酯 1:1
萃取 3 次,合并乙酸乙酯层;水层用正丁醇 1:1 萃
取 3 次,合并正丁醇层。4 种萃取液分别浓缩至干,得到
东北铁线莲石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇部位。

1.2.2 动物分组与给药方法

1.2.2.1 药液及工作液的配制 阴性对照组药液:
0.5% CMC-Na;阳性对照组药液:用 0.5% CMC-Na
配制阿司匹林至终浓度 20 mg/mL;实验工作液:用
0.5% CMC-Na 配制石油醚部位 0.2 mg/mL、0.4 mg/
mL、0.8 mg/mL,氯仿部位 0.55 mg/mL、1.1 mg/mL、
2.2 mg/mL,乙酸乙酯部位 1.75 mg/mL、3.5 mg/
mL、7 mg/mL,正丁醇部位 8 mg/mL、16 mg/mL、32
mg/mL。

1.2.2.2 小鼠醋酸扭体实验 采用小鼠醋酸扭体
模型筛选威灵仙中具有镇痛活性的有效部位。将小
鼠分为模型组、阳性对照组和给药组(4 种浸膏),且
给药组分别设高、中、低剂量组,每组 10 只,给药 1
周后,小鼠腹腔注射 1.2% 醋酸溶液 0.2 mL/10 g,记
录每只小鼠 15 min 内扭体次数,计算扭体抑制率。
并将 4 个部位低中高剂量对小鼠扭体抑制率制图,
比较其镇痛活性强弱。

扭体抑制率(%) = (阴性对照组平均扭体次数
- 给药组平均扭体次数) / 阴性对照组平均扭体次数
× 100%

1.2.3 细胞培养与给药方法

1.2.3.1 工作液的配制 石油醚、氯仿、乙酸乙酯、
正丁醇 4 个部位分别加 DMSO 配制浓度为 2 mg/mL
母液,-20 °C 保存,实验时用 10% FBS 培养基将石
油醚部位稀释成 100 μg/mL、80 μg/mL、60 μg/mL、
40 μg/mL、20 μg/mL;将氯仿部位西施至 50 μg/mL、
25 μg/mL、10 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL;将乙酸乙
酯部位稀释至 100 μg/mL、80 μg/mL、60 μg/mL、40
μg/mL、20 μg/mL;将正丁醇稀释至 200 μg/mL、100
μg/mL、50 μg/mL、10 μg/mL、2 μg/mL(保证细胞毒
性不能过大)。LPS 加 PBS 配制浓度为 1.25 mg/mL
母液,-20 °C 保存,实验时用 10% FBS 培养基稀
释成 100 μg/mL 模型工作液。

1.2.3.2 RAW264.7 细胞培养 RAW264.7 细胞
在 37 °C,5% CO₂ 条件下,用含 10% 胎牛血清、1% 青
霉素/链霉素的 DMEM 培养液传代培养。

1.2.3.3 RAW264.7 细胞活力检测 RAW264.7
细胞按 3 × 10⁴/孔接种于 96 孔板中,培养箱中培养
12 h 后吸去原培养基,更换 2% FBS 培养基饥饿 12
h。饥饿后,实验组每孔分别加入不同浓度的实验工
作液 100 μL;阴性对照组和模型组均加入 10% FBS
培养基 100 μL(均设 3 个复孔)。培养 1 h 后,模型
组和实验组每孔加入 LPS 工作液 1 μL(此时 LPS 浓
度为 1 μg/mL),继续培养 36 h。36 h 后吸取上层培

养液至离心管,每孔加入新鲜培养液 100 μL,再加入新配制的 5 mg/mL MTT 液 10 μL,37 °C 避光孵育 4 h,终止培养。吸去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,置摇床上低速振荡 10 min 后,用酶标仪于 490 nm 处测量各孔的吸光度值(OD490 nm)。

细胞活力 = (药物孔 OD 值 - 调零孔 OD 值) / (阴性对照孔 OD 值 - 调零孔 OD 值) × 100%

1.2.3.4 NO 含量测定 收集至离心管的上层培养液,4 000 r/min 离心 5 min,取上清。采用 NO 检测试剂盒测定上清中 NO 含量,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法 小鼠醋酸扭体法模型采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用因素方差分析。RAW264.7 细胞抗炎模型采用 GraphPad5.02 软件绘图,组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 东北铁线莲不同部位的镇痛活性 利用小鼠醋酸扭体疼痛模型对东北铁线莲不同部位的镇痛活性进行筛选,发现乙酸乙酯部位中剂量的小鼠扭体抑制率最高,高达 61.91%。见表 1、表 2。同时发现乙酸乙酯部位镇痛活性最强。见图 1。

表 1 醋酸扭体实验中乙酸乙酯部位和正丁醇部位的镇痛效果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数(只)	剂量(mg/kg)	15 min 扭体(次)	抑制率(%)
阴性对照组	9	—	35 ± 18	—
阳性对照组	9	200	15 ± 8 *	57.59
乙酸乙酯组	10	17.5	21 ± 10 *	41.04
	10	35	11 ± 7 **	61.91
	6	70	11 ± 11 **	61.27
正丁醇组	9	80	19 ± 9 *	45.89
	10	160	22 ± 6 *	37.91
	8	320	19 ± 9 *	45.17

注:与阴性对照组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01

表 2 醋酸扭体实验中石油醚部位和氯仿部位的镇痛效果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数(只)	剂量(mg/kg)	15 min 扭体(次)	抑制率(%)
阴性对照组	10	—	36 ± 4	—
阳性对照组	10	200	18 ± 7 **	50.0
石油醚组	10	2	26 ± 6 *	26.7
	10	4	26 ± 5 *	27.6
	10	8	14 ± 6 **	61.7
氯仿组	10	5.5	20 ± 6 **	44.7
	10	11	22 ± 9 **	37.6
	10	22	24 ± 10 **	32.5

注:与阴性对照组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01

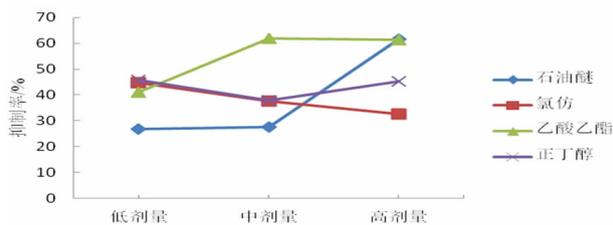


图 1 东北铁线莲 4 个部位低中高剂量扭体抑制率趋势

2.2 东北铁线莲不同部位的抗炎活性 采用 RAW264.7 细胞炎性反应模型检测东北铁线莲不同部位的抗炎活性,乙酸乙酯部位浓度高达 100 μg/mL 时出现较弱的细胞毒性;正丁醇部位 10 μg/mL 也具有较弱的细胞毒性。见图 2。NO 抑制实验结果显示氯仿、乙酸乙酯部位的抗炎效果较明显,其中乙酸乙酯部位对 NO 的抑制呈浓度依赖性,且浓度为 60 μg/mL 时抗炎效果最好。见图 3。

3 讨论

炎性反应发生时机体组织会分泌许多抗炎因子来保护组织免受损伤,当持续过量产生促炎因子会使调节网络失衡,进而诱发炎症反应的级联反应。威灵仙作为传统的中药,近年来研究发现其具有显著的抗炎镇痛作用,但是对于东北铁线莲的抗炎镇痛作用研究和不同提取部位间作用的差异性鲜有文献报道,仅有学者研究证明了东北铁线莲的醇提取物^[2]、根部提取物^[3]和少数单体^[5-8]可以通过抑制炎症反应因子的产生发挥抗炎作用。因此,本研究采用 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎性反应模型和小鼠醋酸扭体反应模型,比较东北铁线莲不同提取部位的抗炎镇痛活性差异。实验发现东北铁线莲石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位均能不同程度抑制 RAW264.7 细胞分泌产生 NO 和醋酸诱导小鼠扭体次数,且乙酸乙酯部位抗炎镇痛活性最强。

小鼠腹腔注射醋酸后能够引起行为学改变即发生扭体反应,这一模型是实验中常用的与疼痛相关的模型,如有学者利用此模型研究了胆碱和对乙酰氨基酚的协同镇痛作用及其机制^[9],另有学者利用此模型进行了中药提取物的抗炎镇痛作用研究^[10]。本文研究了东北铁线莲不同提取部位对小鼠扭体次数的抑制率,进而比较其镇痛作用的强弱。

LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎性反应模型是研究炎症反应的经典模型,有多位国内外学者利用这一模型进行炎症反应研究^[2,7,11]。NO 是由一氧化氮合酶催化合成的气体分子,具有介导炎症反应的功能,LPS 刺激与炎症反应有关的一氧化氮合酶的表达,

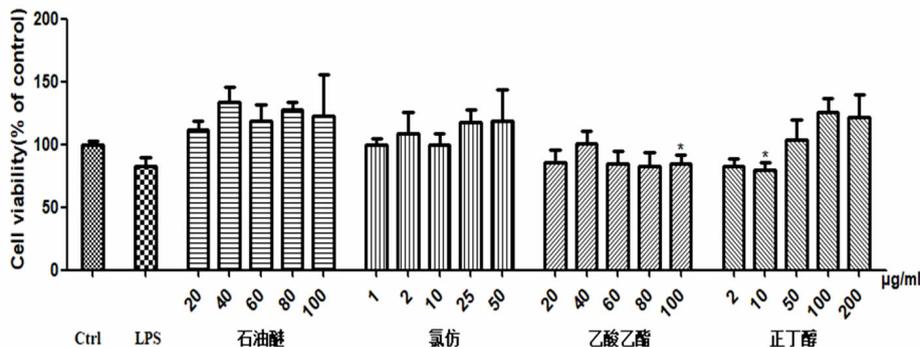


图2 加药刺激 36 h 后细胞活力

注:与 Control 组比较, * P < 0.05

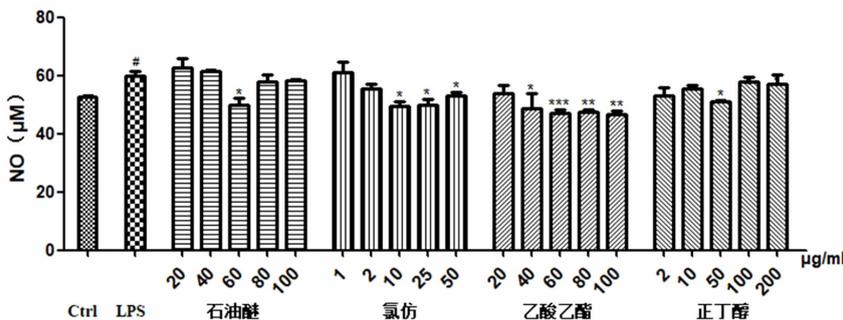


图3 加药刺激 36 h 后 NO 含量

注:与 Control 组比较, #P < 0.05;与 LPS 组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

促使 NO 水平升高^[12]。因此抑制机体 NO 的产生是治疗炎症反应的重要手段。本实验结果表明, RAW264.7 细胞经 LPS 刺激后 NO 含量明显增加, 用东北铁线莲不同部位处理后, NO 的产生受到了明显的抑制, 且乙酸乙酯部位抑制作用最显著。

综上所述, 东北铁线莲具有潜在的抗炎镇痛药理作用, 其不同提取部位均能抑制醋酸诱导小鼠的扭体反应和 LPS 诱导 RAW264.7 的 NO 分泌, 并且乙酸乙酯部位效果最为显著。目前的研究初步证实, 抑制炎症反应因子的产生是东北铁线莲不同提取部位发挥抗炎镇痛作用的机制之一, 且乙酸乙酯部位的抗炎镇痛作用最强, 但是发挥抗炎镇痛作用的具体成分和作用机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 刘艳红, 周小平, 刘荣华. 东北铁线莲药理作用研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2013, 25(6): 98-100.

[2] Park EK, Ryu MH, Kim YH, et al. Anti-inflammatory effects of an ethanolic extract from *Clematis mandshurica* Rupr[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108(1): 142-147.

[3] Lee CW, Park SM, Kim YS, et al. Biomolecular evidence of anti-inflammatory effects by *Clematis mandshurica* Ruprecht root extract in rodent cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1141-1155.

[4] 刘光耀, 王海燕, 白彩虹, 等. 威灵仙不同提取部位对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成及 iNOS 和 TNF-α 表达的影响[J]. 三峡大学学报, 2014, 36(3): 102-107.

[5] Dilshara MG, Lee KT, Kim HJ, et al. Anti-inflammatory mechanism of α-viniferin regulates lipopolysaccharide-induced release of proinflammatory mediators in BV2 microglial cells [J]. *Cell Immunol*, 2014, 290(1): 21-29.

[6] Dilshara MG, Lee KT, Lee CM, et al. New compound, 5-O-isoferuloyl-2-deoxy-D-ribose-γ-lactone from *Clematis mandshurica*: Anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(1): 14-23.

[7] Lee CW, Park SM, Zhao R, et al. Hederagenin, a major component of *Clematis mandshurica* Ruprecht root, attenuates inflammatory responses in RAW 264.7 cells and in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 528-537.

[8] Dilshara MG, Lee KT, Jayasooriya RG, et al. Downregulation of NO and PGE₂ in LPS-stimulated BV2 microglial cells by trans-isoferulic acid via suppression of PI3K/Akt-dependent NF-κB and activation of Nrf2-mediated HO-1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(1): 203-211.

[9] 张卫东, 郭梦倬, 张娜, 等. 胆碱和对乙酰氨基酚的协同镇痛作用及其机制[J]. 药理学报, 2017, 8(52): 1262-1267.

[10] 郭佳佳, 刘海, 朱燕红, 等. 蒙药芯芭提取物的抗炎、镇痛作用研究[J]. 中国药房, 2017, 28(1): 64-67.

[11] Xu J, Zhao Y, Aisa HA. Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 2095-2101.

[12] Fernando IPS, Sanjeewa KKA, Samarakoon KW, et al. A fucoidan fraction purified from *Chnoospora minima*; a potential inhibitor of LPS-induced inflammatory responses [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2017, 104(Pt A): 1185-1193.