

藏药榜嘎中共有生物碱的抗炎活性研究

卿大双^{1,4}, 曾献雯³, 罗维早¹, 王欣^{1,2}, 姚林才^{1,2}, 覃瑶^{3*}

¹重庆市中药研究院, 重庆 400065; ²成都中医药大学, 成都 610072; ³太极集团有限公司, 重庆 401147;

⁴四川科伦药业简阳分公司, 简阳 641400

摘要: 本文采用烟熏建立小鼠急性气管炎模型, 研究榜嘎特征性成分大麦芽碱、异叶乌头碱、塔拉乌头胺等对支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响。通过检测经给药后小鼠的肺部病理切片, 比较和评价生物碱等对支气管炎的治疗作用。结果显示大麦芽碱、塔拉乌头胺、异叶乌头碱均有降低炎症反应的趋势。其中大麦芽碱抗炎活性最明显, 应为藏药榜嘎药材的主要活性成分之一。

关键词: 榜嘎; 生物碱; 大麦芽碱; 异叶乌头碱; 塔拉乌头胺; 抗炎活性

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.010

Research on the Anti-inflammatory Activity of Alkaloid in Herb Ponkar

QING Da-shuang^{1,4}, ZENG Xian-wen³, LUO Wei-zao¹, WANG Xin^{1,2}, YAO Lin-cai^{1,2}, QIN Yao^{3*}

¹Chongqing Institute of Chinese Materia Medica, Chongqing, 400065 P. R. China; ²Chengdu University of Traditional

Chinese Medicine, Chengdu, sichuan, 610072 P. R. China; ³Taiji Group, Chongqing, 401147 P. R. China;

4. Sichuan Kelun pharmaceutical industry Janyang Branch ShiLi Dam Industrial Park, Jiangyang, Sichuan

Abstract: To establish the mice acute bronchitis model using fumes. To evaluate the Anti-inflammatory activity by testing the expression of TNF- α and IL-1 in the Bronchoalveolar lavage fluid of mice in different groups. The pathological section to the lungs of mice also has been observed. The experimental results indicate that the three kinds of alkaloids have certain pharmacological activity. The hordenine has the strongest anti-inflammatory activities of all. Hordenine was one of the important index components of Herb Ponkar.

Key words: Herb Ponkar; alkaloid; hordeine; heteratisine; talatizamine; anti-inflammatory activity.

藏药榜嘎为毛茛科植物船盔乌头 *Aconitum naviqulare* Stapf 或甘青乌头 *A. tanguticum* (Maxim) Stapf 的干燥全草^[1]。具有生肌收口、燥湿、清热解毒的功效^[2]。现代药理研究表明其具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等多种药理活性^[3]。在《部颁标准》和《中国药典》约有 41 个品种处方中含有榜嘎, 约占藏药成方制剂 20% 左右, 其运用广泛, 是常用的藏药材之一。据文献报道, 生物碱为榜嘎抗炎镇痛的主要活性成分^[4], 虽然很多学者对榜嘎的化学成分进行了研究, 但仍未明确其共有生物碱成分及其活性。本项目前期从榜嘎药材中分离出三个主要生物碱大麦芽碱、异叶乌头碱、塔拉乌头胺。本文建立了小鼠急性气管炎模型, 对三个生物碱的抗炎活性进行了初步的比较研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

自制烟熏箱; 显微镜 (Nikon); 酶标仪 (BioTek ELX-800); 病理图像处理系统 (Mias-200, 四川大学图象图形研究所); Color video camera (SSC-DC18P, SONY CORPORATION)。

1.2 试剂

大麦芽碱、异叶乌头碱、塔拉乌头胺 (本课题组前期实验分离纯化所得, 纯度 > 98%); 醋酸地塞米松片 (安徽金太阳生化药业有限公司; 批号: 15031621); 0.9% 氯化钠注射液 (四川省科伦股份有限公司); 水合氯醛 (AR, 成都市科龙化工试剂厂, CAS: 302-17-0); 多聚甲醛 (AR, 成都市科龙化工试剂厂, CAS: 30525-89-4); 小鼠 TNF- α 试剂盒 (欣博盛生物科技有限; 批号 M160128-102a); 小鼠 IL-1 β 试剂盒 (欣博盛生物科技有限; 批号 M160128-001a)。

收稿日期: 2017-01-20 接收日期: 2017-05-02

基金项目: 重庆市基本科研业务费计划 (2016cstc-jbky-01909)

* 通信作者 Tel: 86-23-89029026; E-mail: trowal982@126.com

2 方法与结果

2.1 小鼠支气管急性炎症动物模型的制备

小鼠雌雄各半,适应性喂养两天,无异常反应后,将小鼠随机分为正常组 10 只、模型组 50 只,均雌雄各半。取模型组小鼠,每次 20 只置于自制烟熏箱中(尺寸为 60 cm × 50 cm × 50 cm)。取刨花及烟叶各 50 g,烟熏小鼠,每日早晚各 1 次,每次 30 分钟,烟熏 15 d。正常组小鼠正常饲养。烟熏后 15 天后,模型组小鼠出现咳嗽、抓鼻流涕、精神萎靡行动缓慢、呼吸急促、腹部运动加剧、扎堆、眯眼、伏卧不动、毛发枯槁等表现。

2.2 模型的建立及给药^[5-9]

将正常组小鼠(10 只)称重,标记为空白组。然后将模型组小鼠(50 只)称重后随机分为 5 组,每组 10 只,分别为:模型组、醋酸地塞米松对照组、大麦芽碱组、异叶乌头碱组、塔拉乌头胺组。均雌雄各半。

造模第 15 d 后开始灌胃给药,每天灌胃(ig)给药一次,给药前不进行空腹处理。其中醋酸地塞米松对照组剂量为 1 mg · kg⁻¹,大麦芽碱、异叶乌头

碱、塔拉乌头胺均为 60 mg · kg⁻¹。空白对照组及模型对照组灌以生理盐水。连续给药 7 d。

2.3 支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)的获取

采用水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,剪开颈部皮肤及胸腔,分离并暴露气管、支气管。从舌后气管开口进灌洗针 1 cm 并固定,分别用 1 mL、0.5 mL 生理盐水反复灌洗气管肺泡 2 次,回收支气管肺泡灌洗液。1500 r · min⁻¹离心 5 min,上清液即为肺泡灌洗液样品,置于 -20 °C 冰箱中留存待检。

2.4 肺泡灌洗液中 TNF-α 及 IL-1β 的测定

取肺泡灌洗液采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测 TNF-α 及 IL-1β 水平变化。将试剂盒平衡至室温,加各组肺泡灌洗液标本(100 μL/孔),36 °C 孵箱孵育 90 min,加生物素化抗体工作液(100 μL/孔),36 °C 孵箱避光孵育 60 min,加酶结合物抗体工作液(100 μL/孔),36 °C 孵箱避光孵育 30 min。加入 TMB(显色底物)100 μL/孔,36 °C 孵箱避光孵育 15 min,混匀后即测 OD450 值(3 min 内)。采用随行标准曲线定量。

表 1 小鼠肺泡灌洗液中 TNF-α 水平变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 The level of TNF-α in Bronchoalveolar lavage fluid of mice($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Group	TNF-α (pg · mL ⁻¹)	组别 Group	TNF-α (pg · mL ⁻¹)
空白组 Blank	69.86 ± 4.80 ^{**}	大麦芽碱 Hordeine	81.4287 ± 3.10 [*]
模型组 Control	114.12 ± 20.83	异叶乌头碱 Heteratisine	94.07 ± 16.43
塔拉乌头胺 Talatizamine	90.79 ± 11.96	地塞米松 Dexamethasone	71.76 ± 4.85 ^{**}

注:与模型组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

表 2 小鼠肺泡灌洗液中 IL-1β 水平变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 The level of IL-1β in Bronchoalveolar lavage fluid of mice($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Group	IL-1β (pg · mL ⁻¹)	组别 Group	IL-1β (pg · mL ⁻¹)
空白组 Blank	84.55 ± 31.63 ^{**}	大麦芽碱 Hordeine	114.53 ± 15.39 ^{**}
模型组 Control	233.61 ± 58.87	异叶乌头碱 Heteratisine	145.19 ± 52.78 [*]
塔拉乌头胺 Talatizamine	156.51 ± 41.79 [*]	地塞米松 Dexamethasone	97.25 ± 18.86 ^{**}

注:与模型组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

与空白组比较,模型组小鼠肺泡灌洗液(BALF)中 TNF-α 及 IL-1β 含量较高,有显著性差异($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性药(醋酸地塞米松片)小鼠肺泡灌洗液中 TNF-α 降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$),大麦芽碱对肺泡灌洗液中 TNF-α 降低,有显著性差异($P < 0.05$);塔拉乌头胺

及异叶乌头碱组 TNF-α 略降低,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。与模型对照组比较,阳性药(醋酸地塞米松片)及大麦芽碱小鼠肺泡灌洗液中 IL-1β 均降低,有显著性差异($P < 0.01$);异叶乌头碱、塔拉乌头胺组肺泡灌洗液中 IL-1β 均降低,有显著性差异($P < 0.05$)。

综上所述,大麦芽碱、醋酸地塞米松片、异叶乌头碱及塔拉乌头胺各组中小鼠肺泡灌洗液中 IL-1 β 和 TNF- α 有降低趋势,均有一定的抗炎作用。

2.5 病理检测

将支气管肺组织分离并放入 4% 多聚甲醛溶液

中固定,常规组织脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,将切片贴于载玻片上,分别进行 HE 染色和 Masson 染色,进行肺组织病理炎性分析。结果见图 1-2。

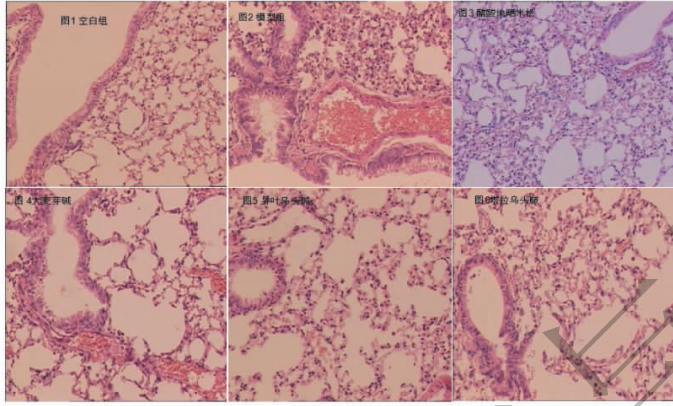


图 1 肺组织 HE 染色病理切片图

Fig. 1 The pathological section of lung tissue by HE staining

注:HE 染色,放大倍数 $\times 100$;1 空白组、2 模型组、3 醋酸地塞米松组、4 大麦芽碱组、5 异叶乌头碱组、6 塔拉乌头胺组

根据 HE 染色病理切片可见,空白组小鼠肺组织切片基本正常,支气管黏膜上皮细胞光滑完整且管腔内无炎性渗出物,肺泡完整无渗出物;模型组小鼠肺组织病理切片镜下可以发现支气管壁加厚且黏膜上皮细胞脱落,腔内有炎性渗出物,且周围有大量

的炎性细胞浸润,肺泡壁存在大量的间质炎;地塞米松、大麦芽碱、塔拉乌头胺、异叶乌头碱组病理切片镜下可以发现支气管黏膜细胞均光滑完整无脱落,腔内无渗出物,炎症细胞浸润及间质炎均减少。

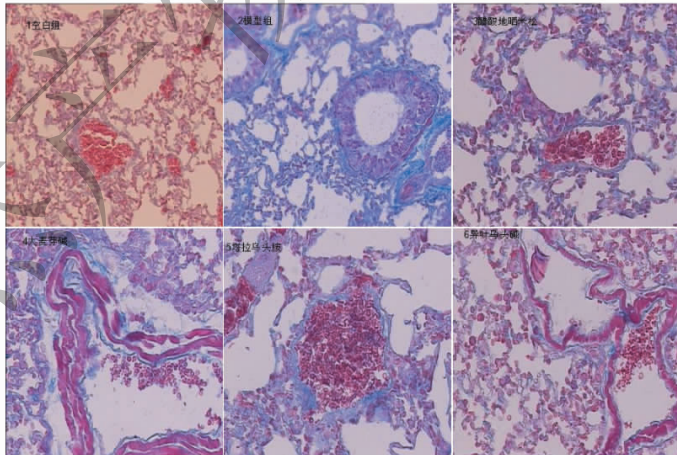


图 2 肺组织 Masson 染色病理切片图

Fig. 2 The pathological section of lung tissue by Masson staining

注:Masson 染色,放大倍数 $\times 100$;1 空白组、2 模型组、3 醋酸地晒米松组、4 大麦芽碱组、5 塔拉乌头胺组、6 异叶乌头碱组

根据 Masson 染色病理切片可见,空白组小鼠肺组织中胶原纤维较少,主要分布在血管周围,是细胞外基质的组成部分;模型组小鼠肺组织中胶原纤

维增多,呈条索状,肺间质纤维化程度加重;各治疗组与模型组相比胶原纤维均有不同程度的减少,肺间质纤维化程度减轻。

3 结论与讨论

3.1 已有研究从榜嘎中已初步分离得到了 22 个生物碱^[3],但由于榜嘎生长环境多变,其生物碱种类及含量差异极大,尚没有研究确定其主要的共有活性生物碱。本研究对多批次的榜嘎进行成分分析,发现异叶乌头碱、大麦芽碱、塔拉乌头胺存在于大部分的榜嘎药材中。故对三种生物碱的抗炎活性进行研究,探索其与药材用途的相关性,根据此结果探索榜嘎生物碱物质基础,并为质量标准指标成分的确和定量奠定基础。

3.2 大麦芽碱属于拟交感胺类,其作用类似于麻黄碱或麻黄素,有松弛支气管平滑肌、收缩血管、血管加压、升血压和兴奋中枢之效,可用于缓解支气管炎和支气管哮喘^[10];可以促进血液循环,具有抗肿瘤活性的作用^[11]。本研究证明其具有较为显著的抗炎活性,应为榜嘎药材抗炎的主要共有活性成分。异叶乌头碱及塔拉乌头胺的活性研究较少。

3.3 通过对肺泡灌洗液中的白细胞以及炎症因子的检测表明三种生物碱均由一定的抗炎活性,且以大麦芽碱最为显著。后续将进一步针对大麦芽碱展开更为系统药效学研究。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010, Vol I.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. *Drug Standard of Ministry of Public Health of the Peoples Republic of China-Tibet herb and drug* (中华人民共和国卫生部药品标准藏药), 1995, Vol I.

- 3 Luo M(罗明), Li C(李春), Lin LM(林丽美), *et al.* Research progress on Tibetan Medicinal Herb Ponkar. *China J Experimental Tradit Med Formulæ* (中国实验方剂学), 2010, 21:1644-1646.
- 4 Liang LJ(梁敬钰), Xue J(薛姣), Liu LH(刘静涵), *et al.* Recent advance of diterpenoid alkaloids in genus Aconitum. *Strait Pharm J*(海峡药理学), 2009, 21(2):1.
- 5 Qian BC(钱伯初), Development of animal models of chronic bronchitis. *Chin J Comparative Med*(中国比较医学杂志), 2008, 18(8):53-57.
- 6 March TH, Kolar LM, Enhanced pulmonary epithelial replication and axial airway mucosubstance changes in F344 rats exposed short term to mainstream cigarette. *smoke. Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, 161:171-179.
- 7 Dai GD(戴贵东), Yan L(闫琳), Yu JQ(余建强), *et al.* Study on the anti-inflammatory and analgesic effects of pseudoephedrine. *Shaanxi Med J*(陕西医学杂志), 2003, 32:641-642.
- 8 Yuan Y(袁颖), Gao JY(高静琰), Xue MM(薛明明), *et al.* Protective effects of Shufeng Jiedu Capsule on rat model of acute bronchitis. *C J TCMP*(中华中医药杂志), 2017, 32:278-281.
- 9 Li D(李东), Effect of hmpLus scandens particles on chronic bronchitis models of mice. *Herald of Medicine*(医药导报), 2015, 34:1284-1287.
- 10 Liu WJ(刘卫建), Tan R(谭锐). Trial exploration of research and development of traditional Xizang medicine and analysis of its present situation. *World Science and Technology, Moder Tradit Chin Med* (世界科学技术-中药现代化), 2002, 4(3):34-36.
- 11 Li S(黎霜), Huang KL(黄可龙), Study advances on *Selaginella doederleinii*. Lishizhen. *Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2010, 21:2637-2639.

(上接第 237 页)

- 18 Xu J(徐菁), Gao HY(高鸿悦), Ma SL(马淑丽), *et al.* Chemical constituents and bioactivity of *kalimers indica*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45:3246-3250.
- 19 Fu XY(傅旭阳), Tian ML(田均勉). Chemical constituents from *Dianthus superbus*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46:645-648.

- 20 Jie XY(解笑瑜), Su YF(苏艳芳), Chai X(柴欣), *et al.* Chemical constituents of *Conyza sumatrensis walker*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40:1716-1719.
- 21 Li ZP(李作平), Zhang ML(张嫫丽), Liu WN(刘伟娜), *et al.* Chemical studies on the flower of *Durazz Albizzia julibrissin*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17:585-587.