

藏药五脉绿绒蒿总生物碱的抗炎作用研究

于瑞雪¹, 张玉佩^{2,3}, 吴楠^{2,3}, 王秀^{2,3}, 梅丽娟², 杨小兵⁴, 李世华⁴, 于瑞涛²(1. 平顶山学院, 河南 平顶山 467000; 2. 中国科学院藏药研究重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 东莞市金美济药业有限公司, 广东 东莞 523808)

摘要: **目的** 探讨五脉绿绒蒿总生物碱对脂多糖(LPS)诱导的小鼠炎症模型的抗炎作用及其机制。**方法** 将 BALB/c 小鼠随机分为 9 组, 即正常对照组、模型组(腹腔注射 LPS 5 mg·kg⁻¹)、头孢克洛组(阳性对照药, 50 mg·kg⁻¹), 以及五脉绿绒蒿总生物碱低、中、高剂量(20、50、100 mg·kg⁻¹)治疗组与保护组, 每组 9 只。治疗组在注射 LPS 的同时以相应剂量灌胃给药 1 次; 保护组在腹腔注射 LPS 前 1 周开始灌胃给药, 每天 1 次, 连续 7 d。对小鼠外周血白细胞及肺组织浸润炎性细胞进行计数; 采用 ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素 6(IL-6)的水平; 紫外-可见分光光度法检测小鼠巨噬细胞分泌一氧化氮(NO)的含量及一氧化氮合酶(iNOS)活力; HE 染色法进行小鼠肺组织病理学观察。**结果** 与正常对照组比较, 模型组小鼠在腹腔注射 LPS 后 6、12 h 的外周血白细胞数量及肺组织炎性细胞浸润数量明显增加($P < 0.05$), 血清促炎因子 TNF- α 、IL-6 水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 模型组小鼠可见肺组织充血, 肺泡间质有炎性浸润, 伴有肺泡腔出血和渗出; 腹腔巨噬细胞上清液中的 NO 含量及 iNOS 活力明显提高($P < 0.01$)。与模型组比较, 注射 LPS 后 6 h, 五脉绿绒蒿总生物碱高剂量保护组及各剂量治疗组的白细胞数量明显降低($P < 0.05$); 注射 LPS 后 12 h, 各给药组的白细胞数量均明显降低($P < 0.05$); 各给药组小鼠在注射 LPS 后 6、12 h 的肺组织炎性细胞浸润数量明显降低($P < 0.05$), 血清 TNF- α 水平均明显降低($P < 0.05$); 五脉绿绒蒿总生物碱高剂量保护组及治疗组在注射 LPS 后 12 h 的血清 IL-6 水平明显降低($P < 0.05$); 各给药组小鼠肺组织的炎性病理改变明显减轻; 五脉绿绒蒿总生物碱各剂量组的小鼠腹腔巨噬细胞上清液中的 NO 含量及 iNOS 活力明显降低($P < 0.05$)。与治疗组比较, 五脉绿绒蒿总生物碱各保护组小鼠在注射 LPS 后 6、12 h 的血清 TNF- α 水平均明显降低($P < 0.05$)。**结论** 五脉绿绒蒿总生物碱对 LPS 诱导的急性炎症模型小鼠具有明显的抗炎作用, 可能与其抑制促炎因子 TNF- α 、IL-6 的表达与 NO 的生成, 以及降低 iNOS 活力有关。

关键词: 五脉绿绒蒿总生物碱; 抗炎作用; 炎症因子; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 6; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)04-0461-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.04.002

Study on Anti-inflammatory Effects of Total Alkaloids Extracted from *Meconopsis quintuplinervia* Regel.

YU Ruixue¹, ZHANG Yupei^{2,3}, WU Nan^{2,3}, WANG Xiu^{2,3}, MEI Lijuan², YANG Xiaobing⁴, LI Shihua⁴, YU Ruitao²(1. Pingdingshan University, Pingdingshan 467000 Henan, China; 2. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001 Qinghai, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Dongguan Jinmeiji Pharmaceutical Co., Ltd., Dongguan 523808 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory effects and mechanism of ethanol extraction of total alkaloids from *Meconopsis quintuplinervia* Regel. on lipopolysaccharide(LPS)-induced inflammation in mice. **Methods** BALB/c

收稿日期: 2020-07-20

作者简介: 于瑞雪, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中药药理学。Email: yrx2008@yeah.net。通信作者: 于瑞涛, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然药物化学。Email: yuruitao521@163.com。

基金项目: 青海省科技项目(2021-HZ-806); 西宁市科技项目(2018-Y-23); 2017 年平顶山学院青年科研基金项目(PXYQNJJ2017009)。

mice were divided into 9 groups, namely normal control group, model control (ip, LPS, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, cefaclor treatment group (positive control, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), total alkaloids of *Meconopsis quinluplinervia* (20, 50, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) protection group and treatment group, each group has 9 animals. The treatment group was given the corresponding dose of intragastric administration once at the same time as the injection of LPS; the protection group was given intragastric administration 1 week before the intraperitoneal injection of LPS, once a day for 7 consecutive days. The peripheral blood leukocytes and lung tissue infiltrating inflammatory cells of mice in each group were counted. ELISA method was used to detect serum tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) levels. Ultraviolet-visible spectrophotometry was used to detect the content of nitric oxide (NO) secreted by mouse macrophages and the activity of nitric oxide synthase (iNOS). The HE staining method was used to observe the pathology of mouse lung tissue. **Results** Compared with the normal control group, the number of peripheral blood leukocytes and the number of inflammatory cell infiltration in lung tissue in the model group increased significantly at 6 and 12 h after intraperitoneal injection of LPS ($P < 0.05$), and the levels of TNF- α and IL-6 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Lung tissue congestion, alveolar interstitial inflammatory infiltration, accompanied by alveolar hemorrhage and exudation were observed in the model group mice, and the contents of NO and the activity of iNOS in the supernatant of peritoneal macrophages were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, 6 hours after injection of LPS, the number of white blood cells in the high-dose protection group of total alkaloids of *Meconopsis quinquefolia* and the treatment groups of all doses decreased significantly ($P < 0.05$); 12 hours after LPS injection, the numbers of white blood cells in each administration group were significantly reduced ($P < 0.05$). The numbers of inflammatory cell infiltration in lung tissues of mice in all administration groups were significantly reduced at 6 and 12 h after LPS injection ($P < 0.05$), and serum TNF- α levels were significantly reduced ($P < 0.05$). The levels of serum IL-6 in the high-dose protection group and the treatment group were significantly reduced at 12 h after LPS injection ($P < 0.05$). The inflammatory pathological changes in the lung tissues of the mice in each administration group were significantly reduced; the NO contents and iNOS activities in the supernatant of mouse peritoneal macrophages in all dose groups of the total alkaloids of *Meconopsis quinquefolia* were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the treatment group, the mice in all protection groups of the total alkaloids of *Meconopsis quinquefolia* had significantly lower serum TNF- α levels at 6 and 12 h after LPS injection ($P < 0.05$). **Conclusion** The total alkaloids of *Meconopsis quinquefolia* have obvious anti-inflammatory effects on LPS-induced mice, which may be related to the inhibition of TNF- α , IL-6 expression, NO production, and reduction of iNOS activity.

Keywords: Total alkaloids of *Meconopsis quinquefolia* Regel.; anti-inflammatory effect; inflammatory factor; TNF- α ; IL-6; NO; iNOS; mice

五脉绿绒蒿(*Meconopsis quintuplinervia* Regel.)是传统藏药“欧贝完保”的原植物之一,又名毛果七(《太白本草志》)、毛叶兔耳风(《陕西中草药》)、野毛金莲(《青海常用中草药手册》),是罂粟科(Papaveraceae)绿绒蒿属(*Meconopsis* Vig.)多年生草本植物^[1]。五脉绿绒蒿主要集中分布于青海、陕西、西藏、甘肃等地区,其所含活性成分以生物碱和黄酮类化合物等为主,也含有多糖及挥发油等^[1-2]。《藏药志》中记载五脉绿绒蒿具有清热解毒、止痛、消炎之功效,主要用于治疗头痛、肝炎、肺炎、水肿等病症^[3]。五脉绿绒蒿在30多个藏药配方中被使用,

现代药理研究^[4]表明其具有抗炎镇痛、保肝降酶、抗氧化等作用。为进一步探讨五脉绿绒蒿的抗炎效果,本研究拟采用脂多糖(LPS)诱导急性炎症小鼠模型,探讨五脉绿绒蒿乙醇提取物(总生物碱)的抗炎作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物 BALB/c小鼠81只,SPF级,10周龄,体质量18~22 g,雌雄各半,由南通大学医学院动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(苏)20160387,动物质量合格证号:00706453204。

1.2 药物及试剂 五脉绿绒蒿采集自青海省祁连县,由中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟研究员鉴定为罂粟科绿绒蒿属五脉绿绒蒿 *Meconopsis quintuplinervia* Regel。取阴干后的五脉绿绒蒿 1 kg,粉碎,过 200 目筛;95%乙醇回流提取 2 次(第 1 次,7 000 mL 乙醇,浸渍 12 h,回流 1.5 h;第 2 次,7 000 mL 乙醇,回流 1 h),滤过,合并滤液;减压回收至 20 mL,再加入石油醚过滤,弃去石油醚层;残留物用 1 mol·L⁻¹ HCl 溶液溶解,调节 pH 值至 2~3,过滤,酸水层部分为生物碱类粗品;用浓氨水调节 pH 值至 9~10,再用氯仿萃取数次,回收氯仿层,即得五脉绿绒蒿总生物碱;用去离子水溶解并稀释,4℃保存备用。

LPS,美国 Sigma 公司,批号:042M3977V;头孢克洛,上海美优制药有限公司,批号:17081511;胎牛血清,美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号:A42D6491;RPMI-1640 培养基,美国 Gibco 公司,批号:C23400176BT;小鼠肿瘤坏死因子 α(TNF-α)ELISA 试剂盒,美国 R&D 公司,批号:20170912A;白细胞介素 6(IL-6)ELISA 试剂盒,武汉华美生物工程有限公司,批号:CSB-E05246m;一氧化氮(NO)检测试剂盒,上海碧云天生物技术公司,批号:S0030;一氧化氮合酶(iNOS)检测试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:1793745。

1.3 主要仪器 UV-1800 型紫外-可见分光光度计,日本岛津仪器有限公司;Multiskan Go 全波段酶标仪、Thermo Forma 311 型直热式 CO₂ 细胞培养箱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Leica CM1860 型冰冻切片机,德国 Leica 公司;TS100 型倒置相差显微镜,日本 Nikon 公司;Leica Qwin 图像分析软件,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 分组、模型复制及给药 将 81 只 BALB/c 小鼠随机分为 9 组,分别为正常对照组、模型组(腹腔注射 LPS 5 mg·kg⁻¹)、头孢克洛组(阳性对照药,50 mg·kg⁻¹),以及五脉绿绒蒿总生物碱低、中、高剂量(20、50、100 mg·kg⁻¹)治疗组与保护组,每组 9 只。五脉绿绒蒿总生物碱治疗组在注射 LPS 的同时以相应剂量灌胃给药 1 次;保护组在腹腔注射 LPS 前 1 周开始灌胃给药,每天 1 次,连续 7 d;给药组的灌胃体积均为 20 mL·kg⁻¹。正常对照组及模型组分别灌胃给予同体积蒸馏水。

1.5 小鼠外周血采集 以水合氯醛 8.5 g、硫酸镁 4.24 g、戊巴比妥钠 1.772 g、无水乙醇 28.5 mL、丙

二醇 67.6 mL,加蒸馏水定容至 200 mL,配制成复合麻醉剂。小鼠腹腔注射 35~50 mg·kg⁻¹ 复合麻醉剂,进行全身麻醉后,分别于注射 LPS 后 1、6、12 h 3 个时间点进行心脏采血,每只小鼠采血量约 1 mL,平均分装于两个 1.5 mL EP 管中,分别进行白细胞计数和血清促炎因子水平检测。

1.6 小鼠外周血白细胞计数 将“1.5”项下采集的外周血加入 0.03 mL EDTA 抗凝,保存于 4℃冰箱;用新鲜配制的 1%冰醋酸将血液样本稀释 5 倍,将红细胞破坏后冲入血细胞计数池内,约 20 μL;在显微镜下计数后,换算为每升血液中的白细胞数。每个样本由不同人员计数 3 遍后,取平均值。

1.7 ELISA 法检测小鼠血清中 TNF-α、IL-6 的含量 将“1.5”项下采集的外周血不加抗凝剂静置 0.5 h 后,4℃下以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,离心半径 12 cm,取上清。严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,检测血清中 TNF-α、IL-6 的含量。

1.8 紫外-可见分光光度法检测小鼠巨噬细胞分泌 NO 的含量及 iNOS 活力 参考文献[5]方法制备小鼠腹腔巨噬细胞。将巨噬细胞接种于 24 孔板,每孔加入 500 μL 细胞悬液;培养 12 h 后,按照下列方法分组并加入药物干预:(1)正常对照组,加入培养液 500 μL;(2)模型组,加入含有 LPS(终质量浓度为 50 ng·mL⁻¹)的培养液 500 μL;(3)五脉绿绒蒿总生物碱低、中、高剂量组,分别加入含有 50 ng·mL⁻¹ LPS+五脉绿绒蒿总生物碱(终质量浓度依次为 3.48、10.43、31.29 μg·mL⁻¹)的培养液 500 μL;每组设 4 个复孔,培养 6 h 后,收集各孔细胞上清液。按照 NO、iNOS 检测试剂盒说明书步骤进行操作,分别测定各孔在波长 550 nm 及 530 nm 的吸光度值;计算 NO 含量及 iNOS 活力。

1.9 小鼠肺组织病理学观察及浸润炎性细胞计数 心脏采血后立即处死小鼠,剖取肺脏组织并用 PBS 充分洗涤后,浸于固定液(4%多聚甲醛)中 12 h;再用 20%、30%蔗糖依次梯度脱水;取肺脏组织,以 OCT 包埋,连续冰冻切片,切片厚度 8 μm;取切片行常规 HE 染色,待干燥后分别于低倍镜(×50)和高倍镜(×200)下拍摄;采用 Image-Pro Plus 6.0 软件于镜下取至少 3 个不同视野,进行肺部浸润炎性细胞计数。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较用 LSD 检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 五脉绿绒蒿总生物碱对 LPS 诱导小鼠外周血白细胞计数的影响 结果见表 1。与正常对照组比较, 模型组小鼠腹腔注射 LPS 后 6、12 h 的外周血白细胞数明显增加, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 说明 LPS 致炎模型复制成功。与模型组比较, 注射 LPS 之后 6 h, 头孢克洛组、五脉绿绒蒿总生物碱高剂量保护组及各剂量治疗组的白细胞数量明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 注射 LPS 之后 12 h, 各给药组的白细胞数量均明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明, 五脉绿绒蒿总生物碱能够抑制 LPS 诱导的小鼠血液白细胞增加, 进而抑制小鼠炎症反应。

表 1 五脉绿绒蒿总生物碱对脂多糖(LPS)诱导小鼠外周血白细胞计数的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Effects of total alkaloids from *Meconopsis quintuplinervia* Regel. on white blood cell counts in peripheral blood of LPS-induced mice($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	白细胞计数/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)		
		注射 LPS 后 1 h	注射 LPS 后 6 h	注射 LPS 后 12 h
正常对照组	-	2.95±0.23	3.10±0.35	2.89±0.26
模型组	-	2.69±0.25	3.72±0.28 [*]	3.90±0.29 [*]
头孢克洛组	50	2.30±0.29	2.95±0.17 [#]	3.29±0.24 [#]
低剂量保护组	20	2.54±0.25	3.14±0.15	2.65±0.30 [#]
中剂量保护组	50	2.25±0.10	2.97±0.15	2.29±0.32 [#]
高剂量保护组	100	2.17±0.26 [#]	2.63±0.33 [#]	2.05±0.31 [#]
低剂量治疗组	20	2.43±0.30	2.44±0.37 [#]	2.39±0.21 [#]
中剂量治疗组	50	2.36±0.17	2.22±0.24 [#]	2.13±0.16 [#]
高剂量治疗组	100	2.04±0.12 [#]	2.05±0.32 [#]	2.10±0.37 [#]

注: 与正常对照组(同时点)比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组(同时点)比较, [#] $P < 0.05$

2.2 五脉绿绒蒿总生物碱对 LPS 诱导小鼠肺组织炎性细胞浸润的影响 结果见表 2。与正常对照组比较, 模型组小鼠在注射 LPS 后 6、12 h 的肺组织炎性细胞浸润数量明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示一定时间内肺组织炎症随 LPS 作用时间延长而加重。与模型组比较, 各给药组小鼠在注射 LPS 后 6、12 h 的肺组织炎性细胞浸润数量明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明, 五脉绿绒蒿总生物碱对 LPS 诱导的小鼠肺部炎性细胞浸润具有明显抑制作用。

2.3 五脉绿绒蒿总生物碱对 LPS 诱导小鼠血清促炎因子表达的影响 结果见表 3、表 4。与正常对照组比较, 模型组小鼠腹腔注射 LPS 后 6、12 h 的外周血

表 2 五脉绿绒蒿总生物碱对脂多糖(LPS)诱导小鼠肺组织炎性细胞浸润的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effect of total alkaloids from *Meconopsis quintuplinervia* Regel. on inflammatory cell infiltration in lung tissue of LPS-induced mice($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	每视野炎性细胞数量		
		注射 LPS 后 1 h	注射 LPS 后 6 h	注射 LPS 后 12 h
正常对照组	-	844.67±46.95	898.78±88.11	890.00±76.34
模型组	-	884.89±67.12	1 293.92±118.97 [*]	1 284.63±84.71 [*]
头孢克洛组	50	867.22±57.59	918.89±66.34 [#]	897.56±83.43 [#]
低剂量保护组	20	874.78±19.08	938.00±24.87 [#]	850.81±22.07 [#]
中剂量保护组	50	865.33±31.21	899.67±17.24 [#]	844.02±18.08 [#]
高剂量保护组	100	854.33±17.01	866.67±28.29 [#]	839.67±26.10 [#]
低剂量治疗组	20	821.67±42.50	980.33±35.92 [#]	855.33±15.95 [#]
中剂量治疗组	50	839.32±30.81	931.30±26.51 [#]	863.67±29.01 [#]
高剂量治疗组	100	853.67±16.56	851.67±22.37 [#]	876.33±25.58 [#]

注: 与正常对照组(同时点)比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组(同时点)比较, [#] $P < 0.05$

表 3 五脉绿绒蒿总生物碱对脂多糖(LPS)诱导小鼠血清 TNF-α 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Effect of total alkaloids from *Meconopsis quintuplinervia* Regel. on serum TNF-α level in LPS-induced mice($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)		
		注射 LPS 后 1 h	注射 LPS 后 6 h	注射 LPS 后 12 h
正常对照组	-	148.00±14.14	132.24±26.02	139.65±41.80
模型组	-	158.98±13.47	662.12±51.24 ^{**}	489.28±22.48 ^{**}
头孢克洛组	50	131.71±28.45	110.94±19.98 [#]	239.14±27.04 [#]
低剂量保护组	20	141.49±13.15	302.79±44.28 ^{#△}	297.93±9.49 ^{#△}
中剂量保护组	50	139.15±16.24	253.64±41.75 ^{#△}	249.05±14.45 ^{#△}
高剂量保护组	100	143.89±12.58	148.54±18.17 ^{#△}	235.82±15.39 ^{#△}
低剂量治疗组	20	139.57±12.52	466.39±19.51 [#]	375.53±12.08 [#]
中剂量治疗组	50	138.92±11.36	359.82±18.09 [#]	344.79±10.86 [#]
高剂量治疗组	100	150.08±12.18	214.63±13.68 [#]	341.14±9.67 [#]

注: 与正常对照组(同时点)比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组(同时点)比较, [#] $P < 0.05$; 与治疗组(同剂量、同时点)比较, [△] $P < 0.05$

中 TNF-α、IL-6 水平显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组小鼠在注射 LPS 后 6、12 h 的血清 TNF-α 水平均明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 五脉绿绒蒿总生物碱高剂量保护组及治疗组在注射 LPS 后 12 h 的血清 IL-6 水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与治疗组比较, 五脉绿绒蒿总生物碱各保护组小鼠在注射 LPS 后 6、12 h 的血清 TNF-α 水平均明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明, 五脉绿绒蒿总生物碱可降低 LPS 诱导小鼠的血清促炎因子 TNF-α、IL-6 的表达水平。

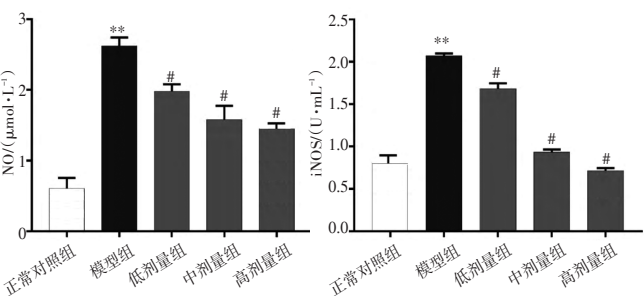
表 4 五脉绿绒蒿总生物碱对脂多糖(LPS)诱导小鼠血清 IL-6 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 4 Effect of total alkaloids from *Meconopsis quintuplinervia* Regel. on serum IL-6 level in LPS-induced mice($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)		
		注射 LPS 后 1 h	注射 LPS 后 6 h	注射 LPS 后 12 h
正常对照组	-	85.86 ± 18.44	85.08 ± 15.39	84.21 ± 21.05
模型组	-	89.75 ± 23.45	159.14 ± 17.35*	106.92 ± 23.45*
头孢克洛组	50	83.41 ± 15.17	106.56 ± 13.32*	84.97 ± 11.16*
低剂量保护组	20	86.69 ± 7.57	137.65 ± 9.37	97.25 ± 5.61
中剂量保护组	50	83.10 ± 7.16	148.17 ± 9.01	93.89 ± 8.51
高剂量保护组	100	81.39 ± 5.51	138.84 ± 10.02	85.15 ± 12.19*
低剂量治疗组	20	87.77 ± 6.39	152.46 ± 7.64	89.42 ± 7.05
中剂量治疗组	50	83.50 ± 6.18	142.14 ± 14.83	88.43 ± 6.39
高剂量治疗组	100	81.53 ± 4.99	137.42 ± 12.06	84.76 ± 7.02*

注:与正常对照组(同时时间点)比较, * $P < 0.05$;与模型组(同时时间点)比较, # $P < 0.05$

2.4 五脉绿绒蒿总生物碱对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞分泌 NO、iNOS 的影响 结果见图 1。与正常对照组比较,模型组小鼠腹腔巨噬细胞上清液中的 NO 含量及 iNOS 活力明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,五脉绿绒蒿总生物碱各剂量组的小鼠腹腔巨噬细胞上清液中的 NO 含量及 iNOS 活力明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。结果表明,五脉绿绒蒿总生物碱对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞分泌 NO、iNOS 具有明显抑制作用。



注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$

图 1 五脉绿绒蒿总生物碱对脂多糖(LPS)诱导小鼠腹腔巨噬细胞分泌 NO、iNOS 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Figure 1 Effect of total alkaloids from *Meconopsis quintuplinervia* Regel. on secretion of NO and iNOS in LPS-induced mice peritoneal macrophages($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

2.5 五脉绿绒蒿总生物碱对 LPS 诱导小鼠肺组织病理学的影响 结果见图 2。正常对照组小鼠的肺组织小叶结构清晰,肺泡腔干净,肺泡间质无炎性细胞浸润,纤维结缔组织无增生,肺泡壁无增厚,肺

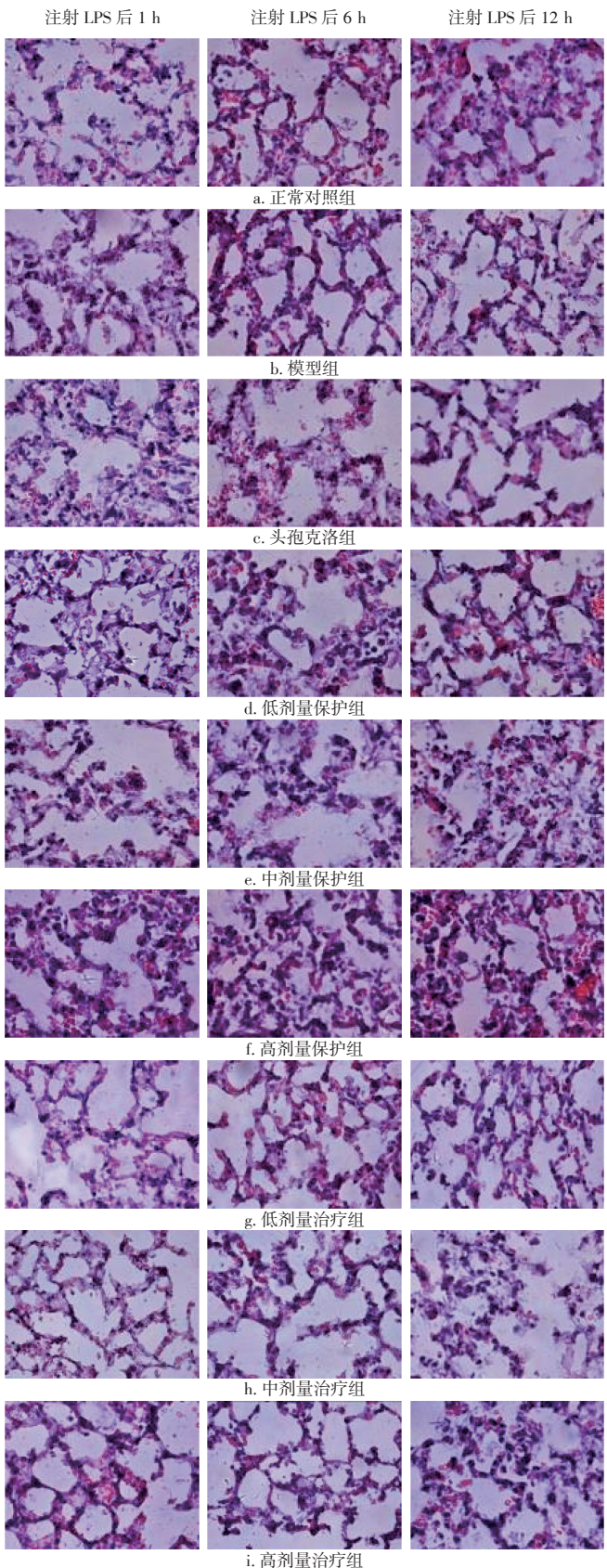


图 2 五脉绿绒蒿总生物碱对脂多糖(LPS)诱导小鼠肺组织病理学特征的影响(HE 染色, $\times 200$)

Figure 2 Effect of the total alkaloids from *Meconopsis quintuplinervia* Regel. on the characteristics of lung tissue lesions in LPS-induced mice(HE staining, $\times 200$)

泡 I 型和 II 型细胞结构清晰。模型组小鼠肺组织可见充血明显, 肺泡间质有炎性浸润, 肺泡壁增宽, 肺泡腔内可见出血和渗出, 肺泡 I 型和 II 型细胞结构不清晰。与模型组比较, 五脉绿绒蒿总生物碱各保护组和治疗组小鼠肺组织的炎性病理改变均明显减轻, 肺组织结构正常, 肺泡间质只有少量的炎性细胞, 肺泡 I 型和 II 型细胞结构较清晰。

3 讨论

五脉绿绒蒿味甘、涩, 性凉, 具有清热、消炎、止痛、镇咳、平喘、利尿等功效, 藏医主要用其治疗肝炎、肺炎、胆囊炎、肺结核、胃溃疡等疾病, 并且其消炎止痛的功效在临床上尤为突出^[6]。研究^[7]表明, 总生物碱与总黄酮是五脉绿绒蒿抗炎、镇痛作用的共同药效物质基础。五脉绿绒蒿总黄酮是其抗肝纤维化的主要有效部位^[8]。有关五脉绿绒蒿总生物碱的抗炎药理作用及机制研究尚未见报道。目前, 与五脉绿绒蒿同种属的植物资源中尚有很多植物种类的药用价值未被开发。因此, 本研究通过分离提取五脉绿绒蒿的总生物碱成分, 探讨其对脂多糖(LPS)诱导的炎症模型小鼠的抗炎作用及机制, 以期该类植物的抗炎作用开发与临床应用奠定基础。

内毒素位于革兰氏阴性细菌细胞壁外膜的最外层, 其主要成分是 LPS, 能引起全身失控性炎症反应, 最终导致休克甚至死亡^[9]。LPS 可上调促炎蛋白一氧化氮合酶(iNOS)的表达, 后者使 L-精氨酸氧化生成一氧化氮(NO), 因此 iNOS 水平的提高可增加 NO 的生成量。NO 既参与多种重要的生理防御过程, 又可促进机体合成和释放肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)、前列腺素 E_2 (PGE₂)等炎症因子, 过量的 NO 可对机体造成多种病理性损伤^[10]。作为重要的炎症致病因子, LPS 的致炎机制之一就是产生过量的炎症细胞因子, 包括 TNF- α 、IL-6^[11]。TNF- α 是肿瘤坏死因子家族的重要成员, 主要由单核巨噬细胞、T 淋巴细胞产生, 可以杀伤肿瘤细胞, 也能刺激 T 细胞产生各种炎症性细胞因子, 加剧炎症反应^[12]。IL-6 参与多种慢性炎症疾病的发病过程, 可作为判别病情严重程度的灵敏指标。在各级炎症创伤中, 小鼠机体的炎症越严重, TNF- α 、IL-6 表达越显著^[13]。

本研究通过建立 LPS 诱导的小鼠全身炎症模型, 以及检测 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞分泌 NO 及

iNOS 的含量, 探讨了五脉绿绒蒿总生物碱的抗炎作用。结果表明, 五脉绿绒蒿总生物碱能够抑制 LPS 诱导的炎症模型小鼠血液白细胞增加, 减少小鼠肺部组织炎症细胞浸润数量, 降低血清促炎因子 TNF- α 、IL-6 的表达水平, 抑制小鼠巨噬细胞的 NO、iNOS 分泌, 减轻小鼠肺组织炎性病理改变, 有明显的抗炎作用。同时, 在实验中还观察到五脉绿绒蒿总生物碱保护组小鼠的 TNF- α 水平明显低于同剂量治疗组, 提示与注射 LPS 的同时给药相比, 预防性给予相应剂量的五脉绿绒蒿总生物碱降低 TNF- α 水平的作用更强。然而, 五脉绿绒蒿生物碱中起抗炎作用的具体化合物及其作用特点还有待后续进一步探讨。

参考文献:

- [1] 康云鹰, 谢国芳, 王薇. 藏药五脉绿绒蒿的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2010, 25(3): 239-240.
- [2] 赵庆帅, 周玉碧, 孙胜男, 等. 藏药五脉绿绒蒿不同部位红外光谱的识别[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(6): 1052-1055, 1051.
- [3] 徐达宇, 陈湘宏, 康文娟, 等. 不同提取方法提取藏药五脉绿绒蒿挥发油主成分的研究[J]. 青海医学院学报, 2016, 37(3): 164-169.
- [4] 徐玉婷, 徐惠芳. 五脉绿绒蒿的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(4): 451-453.
- [5] 郭瑞清, 祝彼得. 小鼠腹腔巨噬细胞的分离纯化[J]. 重庆医科大学学报, 1991, 16(2): 157-159.
- [6] 孙政华, 郭玫, 邵晶, 等. 大孔吸附树脂纯化富集五脉绿绒蒿总生物碱[J]. 中成药, 2016, 38(1): 77-83.
- [7] 王志旺, 郭枚, 马骏, 等. 五脉绿绒蒿抗炎镇痛作用有效部位的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(1): 21-22.
- [8] 王志旺, 邵晶, 郭玫, 等. 五脉绿绒蒿总黄酮和总生物碱抗大鼠肝纤维化[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1125-1128.
- [9] 纪雯婷, 尹湘君, 刘姝伶, 等. 栀子苷干预LPS诱导RAW264.7巨噬细胞炎症反应递质的研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(10): 2585-2589.
- [10] 谢雪艳, 李天珍, 王万林, 等. 不同产源艾纳香油化学成分及其抗炎活性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1069-1076.
- [11] 刘兰, 刘燕芳, 李宝才, 等. 白菊木树皮和枝叶甲醇提取物及化学成分的体外抗炎活性研究[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(4): 101-103.
- [12] 吴建魏, 黄觉生, 谭利斌, 等. 姜黄素预处理对肺缺血再灌注损伤模型大鼠炎性及抗炎性细胞因子的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(4): 668-672.
- [13] 李倩, 高慧婕, 高沁航. 远志酊对脂多糖致炎小鼠抗炎活性的实验研究[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(4): 361-364.

(编辑: 邹元平)