

· 药 理 学 ·

镰形棘豆中 2', 4'-二羟基查尔酮抗炎止血作用的实验研究

吴 诚, 许惠琴 (南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的 观察镰形棘豆中 2', 4'-二羟基查尔酮的抗炎和止血作用。方法 取 2', 4'-二羟基查尔酮配成溶液, 小鼠 ig 给药连续 5 d 使用二甲苯致小鼠耳肿胀后, 观察其抗炎作用; 同样给药方式, 采用断尾法测定出血时间、玻片法和毛细管法测定凝血时间、眼眶采血测定凝血酶原时间 (PT); 以此观察 2', 4'-二羟基查尔酮的止血作用。结果 2', 4'-二羟基查尔酮能抑制二甲苯所致小鼠耳肿胀的肿胀度, 其高剂量 (80 mg/ml) 对肿胀的抑制率接近地塞米松抑制率; 2', 4'-二羟基查尔酮有缩短小鼠出血时间、加速凝血和缩短 PT 的作用, 其中高剂量 (80 mg/ml) 作用更为明显。结论 镰形棘豆中 2', 4'-二羟基查尔酮具有良好的抗炎、止血和促凝血作用。

[关键词] 镰形棘豆; 2', 4'-二羟基查尔酮; 抗炎; 止血

[中图分类号] R 285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)06-0431-03

Experimental study on the effect of anti-inflammatory and hemostasis of 2', 4'-dihydroxy chalcone in *Oxytropis Falcate Bunge*

WU Cheng XU Huiqin (School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of anti-inflammatory and hemostasis of 2', 4'-dihydroxy chalcone in *Oxytropis Falcate Bunge*. **Methods** the mice were taken 2', 4'-dihydroxy chalcone by gavage in 5 days. The anti-inflammatory effect was determined by using the model of xylene induced mouse ear edema. The hemostasis effect was measured by bleeding time, clotting time and prothrombin time in mice. **Results** The compounds reduced the bleeding time, accelerated blood clotting and decreased the role of PT in mice, which was more obviously effective in high dose (80 mg/kg). **Conclusion** 2', 4'-dihydroxy chalcone in *Oxytropis Falcate Bunge* has good effects on anti-inflammatory, hemostasis and blood coagulation.

[Key words] *Oxytropis Falcate Bunge*; 2', 4'-dihydroxy chalcone; anti-inflammatory; hemostasis

镰形棘豆藏药名为“莪大夏”, 具有抗炎止痛、清热解毒和止血等功效, 在藏医临床中使用广泛。吕芳^[1]和杨欢等^[2]对镰形棘豆中黄酮类及其他化学成分进行了分离与鉴定, 成分研究发现 2', 4'-二羟基查耳酮 (2', 4'-DC) 为药材中含量较高的一类黄酮苷元, 化学结构见图 1。有关该化合物鲜有报道, 吴诚等^[3]采用 HPLC 法测量了不同产地镰形棘豆中 2', 4'-DC 的含量, 楼成华等^[4]通过体外实验发现 2', 4'-DC 具有抑制人癌细胞株增殖的作用。整体实验中发现, 镰形棘豆具有抗炎和止血作用, 但 2', 4'-DC 未有关于其抗炎止血方面报道。本实验研究 2', 4'-DC 在二甲苯致小鼠耳肿胀模型中的抗炎作用, 另观察该化合物对小鼠出血时间、凝血时间和凝血酶原时间的影响, 为进一步研究化合物提供科学

依据。

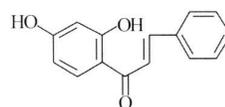


图 1 2', 4'-dihydroxy chalcone 的化学结构

1 材料与方 法

1.1 药物及试剂 2', 4'-DC 由本实验室自制, 纯度为 98%; 醋酸地塞米松片 (0.75 mg 天津药业集团新郑股份有限公司, 批号 090528), 安络血 (肾上腺素片 2.5 mg 江苏亚邦爱普森药业有限公司, 批号 0902002); 柠檬酸钠 (AR, 上海化学试剂研究所, 批号 20000410); 二甲苯 (AR, 上海凌峰化学试剂有限公司, 批号 050403); 聚山梨酯 80 (吐温-80 上海申宇医药化工有限公司, 批号 090709VI)。

1.2 药物及试剂配制 取 2', 4'-DC, 加入 0.1 ml 吐温-80, 搅匀至完全溶解后缓缓加入蒸馏水配成浓度分别为 1, 2, 4 g/L 的 2', 4'-DC 溶液; 将醋酸地塞

[基金项目] 国家药典委员会资助项目 (YS-130)。

[作者简介] 吴 诚 (1985-), 男, 硕士研究生。Tel 13809008521, E-mail wucheng339@qq.com。

[作者简介] 许惠琴。Tel (025) 85811933, E-mail hqxu309@yaho.com.cn

米松片研磨,用蒸馏水配成 0.125 g/L 的地塞米松溶液;同法配得 0.25 g/L 的安络血溶液;取柠檬酸钠 3.8 g 置于 80 mL 蒸馏水中,不断搅拌至完全溶解,加入双蒸馏水至 100 mL 配成 3.8% 的柠檬酸钠溶液,4℃保存备用。

1.3 实验动物 清洁级 ICR 小鼠,18~22 g 雌雄各半,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号:SCXK(沪)2007-0005;清洁级 ICR 小鼠,20~22 g 雌雄各半,由南通大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(苏)2008-0010。

1.4 主要仪器 LG-PABER 凝血因子分析仪(北京中勤世帝科学仪器公司);FA1104N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);TD6001 电子称(天津市天马仪器厂);直径约 9 mm 打孔器。

1.5 实验方法

1.5.1 2', 4'-DC 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 取健康 ICR 雄性小鼠 40 只,按体重随机均分为 5 组,即正常对照组(蒸馏水 10 mL/kg)、地塞米松组(2.5 mg/kg)、2', 4'-DC 低剂量组(20 mg/kg)、2', 4'-DC 中剂量组(40 mg/kg)、2', 4'-DC 高剂量组(80 mg/kg)。实验动物颗粒饲料喂养、自由饮水,适应饲养。一周后各组小鼠按上述剂量给药 5 d 给药容积均为 20 mL/kg。

末次给药 1 h 后,于小鼠右耳正反两面涂抹二甲苯 0.05 mL/只,左耳不处理,作对照。1 h 后,将小鼠颈椎脱臼致死,沿耳廓基线剪下两耳,于同一部位用打孔器冲下耳片,称重,以两耳片重量之差为肿胀度,算出各组的肿胀抑制率。肿胀抑制率(%) = [(空白小鼠耳片肿胀度 - 给药组小鼠耳片肿胀度) / 空白小鼠耳片肿胀度] × 100%。

1.5.2 2', 4'-DC 对小鼠出血时间的影响 取健康 ICR 小鼠 40 只,雌雄各半,按体重随机均分为 5 组,即正常对照组(蒸馏水 10 mL/kg)、安络血组(5 mg/kg)、2', 4'-DC 低剂量组(20 mg/kg)、2', 4'-DC 中剂量组(40 mg/kg)、2', 4'-DC 高剂量组(80 mg/kg)。

实验动物颗粒饲料喂养、自由饮水,适应饲养。一周后各组小鼠按上述剂量给药 5 d 给药容积均为 20 mL/kg。

末次给药 30 min 后,将小鼠尾尖 0.5 cm 处横向切断。待血液自行溢出,开始计时,每隔 30 s 用滤纸吸去血滴 1 次,直至血液自然停止(滤纸吸时无血)为止,即为出血时间。

1.5.3 2', 4'-DC 对小鼠凝血时间的影响

1.5.3.1 玻片法 分组与给药同“1.5.2”。末次给药 40 min 后,小鼠眼眶采血,取一滴血滴在玻璃片上,血滴直径约 5 mm,立即用秒表计时。每 30 s 用针尖刺自血液边缘向里轻轻挑动一次,当有血丝挑起时即为血液凝固时间。实验时室温为 20℃(下同)。

1.5.3.2 毛细管法 分组与给药同“1.5.2”。末次给药 40 min 后,用 1 mm 毛细玻管插入小鼠内眦球后静脉丛,深约 4~5 mm,自血液流进管内计时,注满毛细管后平放于桌上,每隔 30 s 折断两端约 0.5 cm,并缓慢向左右拉开。仔细观察折断处有无血凝丝出现,出现血丝时停表即为血液凝固时间。

1.5.4 2', 4'-DC 对小鼠凝血酶原时间(PT)的影响 分组与给药同“1.5.2”。末次给药 30 min 后,小鼠眼眶采血。全血与柠檬酸钠溶液以体积比 1:9 混合均匀,2500 r/min 离心 15 min 移出血浆。按《PT 测定试剂盒》说明书用 LG-PABER 凝血因子分析仪测定 PT。

1.6 数据处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 显示,用 *t* 检验法,统计软件采用微软 Excel 软件。

2 结果

2.1 2', 4'-DC 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 2', 4'-DC 3 个剂量与地塞米松均能有效抑制二甲苯所致小鼠耳肿胀的肿胀度,与正常对照组相比有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。2', 4'-DC 高剂量(80 mg/kg)对肿胀的抑制率接近地塞米松,结果表明,2', 4'-DC 具有较好的抗炎活性。见表 1。

表 1 2', 4'-DC 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	耳壳重量 (mg)		肿胀度 (mg)	肿胀抑制率 (%)
		左	右		
正常对照组	—	12.9 ± 1.1	37.1 ± 2.4	24.2 ± 2.5	—
地塞米松组	2.5	10.8 ± 0.7	26.2 ± 5.5	15.4 ± 6 ¹⁾	36.3
低剂量组	20	13.0 ± 0.9	32.0 ± 5.0	19.1 ± 4.6 ¹⁾	21.2
中剂量组	40	13.3 ± 1.6	30.0 ± 7.1	16.6 ± 6.5 ¹⁾	31.2
高剂量组	80	14.0 ± 1.9	29.5 ± 3.2	15.5 ± 4.6 ²⁾	35.8

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与正常对照组比较。

代肝细胞损伤的保护作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26 (11): 1333

- [12] 曹艳, 许自川, 何小解, 等. 儿茶素拮抗过氧化氢诱导的大鼠内皮祖细胞凋亡 [J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(1): 61.
- [13] 林朝朋, 芮汉明, 许晓春. 墨旱莲黄酮类提取物抗自由基作用

及体内抗氧化功能的研究 [J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(4): 344.

[收稿日期] 2010-07-08

[修回日期] 2010-10-16

(上接第 432 页)

2, 4'-DC 对小鼠出血时间、凝血时间和 PT 的影响 2, 4'-DC 有缩短小鼠出血时间的作用, 其中高剂量 (80 mg/kg) 和安络血与正常对照比较有显著差异 ($P < 0.05$); 玻片法与毛细管法结果显示, 2, 4'-DC 中剂量 (40 mg/kg)、高剂量 (80 mg/kg) 和

安络血加速小鼠凝血作用, 与正常对照比较有显著差异 ($P < 0.05$ $P < 0.01$); PT 检测结果显示, 2, 4'-DC 中剂量 (40 mg/kg)、高剂量 (80 mg/kg) 和安络血均有缩短 PT 作用, 与正常对照比较有显著差异 ($P < 0.05$ $P < 0.01$)。以上结果表明 2, 4'-DC 对正常小鼠具有止血效果, 详见表 2。

表 2 2, 4'-DC 对出血时间、凝血时间和 PT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量 (mg/kg)	出血时间 (s)	凝血时间 (s)		PT (s)
			玻片法	毛细管法	
正常对照组	—	693 ± 166	404.6 ± 26.8	190.9 ± 97.4	10.1 ± 0.9
安络血组	5	343 ± 91 ¹⁾	347.1 ± 20.8 ²⁾	95.2 ± 40.7 ¹⁾	8.7 ± 1.4 ¹⁾
低剂量组	20	498 ± 205	371.1 ± 85.1	131.8 ± 38.8	9.6 ± 0.5
中剂量组	40	432 ± 258	288.7 ± 104.7 ¹⁾	116.0 ± 54.3	8.6 ± 1.9 ¹⁾
高剂量组	80	367 ± 185 ¹⁾	296.0 ± 64.8 ²⁾	85.1 ± 36.0 ¹⁾	8.4 ± 2.0 ¹⁾

¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$ 与正常对照组比较。

3 讨论

2, 4'-DC 为黄色针晶, 难溶于水, 易溶于甲醇, 乙酸乙酯等极性较大的有机溶剂。本实验样品从镰形棘豆中提取分离制得 (相关制备工艺流程已申报国家专利)。该黄酮类化合物是二氢黄酮 C 环的 1, 2 位键断裂生成的开环衍生物, 可视为由苯甲醛与苯乙酮类缩合而成的化合物, 与之结构相似的有槲皮素、红花黄素 A、B 等。槲皮素既能有效抑制血小板聚集, 又能抑制血小板释放^[5]; 红花黄素具有抗炎镇痛效果; 甘草查尔酮抗氧化、黄芩素抑菌等屡见报道。可见, 黄酮类化合物普遍有抗炎、止血、抗氧化、抑菌等作用。本实验表明, 2, 4'-DC 的抗炎止血功效显著, 其抗氧化和抑菌等作用有待实验证实。

黄酮类体外实验发现有稳定溶酶体膜的作用; 部分黄酮是缓激肽和前列腺素 (PGs) 拮抗剂; 现有研究表明, d-儿茶素、槲皮素和氧化苏木素明显抑制组胺脱羧酶活性, 造成组胺代谢障碍。以上说明黄酮类化合物均能不同水平抑制炎症因子的发生与发展。本实验中 2, 4'-DC 显示出良好的抗炎效果, 表明该化合物能抑制 PLA₂ 活性, 减少脂类介质及脂质过氧化物的产生, 也有可能抑制 PGs 活性有关。

止血过程涉及凝血因子、纤溶系统、血管状态、

血小板等, 其中 PT 直接反映外源性凝血是否正常。止血实验发现, 2, 4'-DC 可明显降低小鼠 PT, 缩短出血时间和凝血时间, 说明该化合物能活化外源凝血通路, 主要影响血中凝血因子 (III, VIIa, Ca⁺ 等) 含量。2, 4'-DC 对内源性凝血途径是否有影响可通过测定血浆复钙时间判定。

综上所述, 2, 4'-DC 有抗炎和止血功效, 这些作用与其结构中羰基及 2', 4' 位羟基可能有密切关系, 其具体构效关系有待进一步研究探讨。

【参考文献】

- [1] 吕芳, 徐筱杰. 藏药镰形棘豆中化学成分研究 [J]. 中药材, 2006, 29(12): 1303
- [2] 杨欢, 王栋, 董丽, 等. 镰形棘豆的化学成分研究 (I) [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(5): 338
- [3] 吴诚, 沈存思, 崔姣, 等. HPLC 法测定不同批次镰形棘豆中 2', 4'-二羟基查耳酮含量 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(5): 990
- [4] 楼成华, 王明艳, 杨欢, 等. 镰形棘豆中黄酮类化合物抗肿瘤活性的体外实验研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(1): 46
- [5] 顾振纶, 钱增年, 肖东, 等. 槲皮素对血小板的抑制作用及其机理分析 [J]. 苏州医学院学报, 1991, 11(4): 262

[收稿日期] 2010-04-30

[修回日期] 2010-05-27