

苗药了哥王“汗渍法”炮制前后抗小鼠免疫性炎症的“量-效-毒”关系研究[△]

郑传奇^{1*}, 冯果^{1,2#}, 李玮^{1,2}, 周志容¹, 许琴¹, 李志平¹, 易懂斌¹, 李金徽¹(1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550025)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)06-0661-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.06.05

摘要 目的: 探讨苗药了哥王炮制前后抗小鼠免疫性炎症的“量-效-毒”关系。方法: 将小鼠分成空白组、模型组、了哥王生品醇提物1~6组、了哥王“汗渍法”炮制品醇提物1~6组(以下分别简称为“生品1~6组”“炮制品1~6组”, 剂量均分别为0.13、0.20、0.26、0.52、1.04、2.6 g/kg)和阳性组(环磷酰胺, 36.4 mg/kg), 每组10只。除空白组外, 其余各组小鼠均以1% 2,4-二硝基氟苯-丙酮-麻油混合溶液复制迟发型超敏反应模型。造模后, 空白组和模型组小鼠均灌胃等容1.0%羧甲基纤维素钠溶液, 各给药组小鼠灌胃相应药液20 mL/kg, 每日1次, 连续5 d。末次给药后, 记录各组小鼠耳肿胀度, 并计算生品及炮制品的肿胀抑制率、半数有效剂量(ED₅₀)及其95%置信区间(CI); 称定小鼠心、肝、脾、肺、肾的质量, 并计算各脏器指数; 采用酶联免疫吸附测定法、改良化学氧化法分别检测小鼠血清中炎症因子[肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素10(IL-10)]和肝肾功能指标[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、尿素氮(BUN)、血肌酐(CREA)]水平。结果: 与空白组比较, 模型组小鼠耳肿胀度显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 了哥王生药及炮制品醇提物各剂量组小鼠耳肿胀度均显著降低($P < 0.05$), 其肿胀抑制率均有随剂量增加而升高的趋势, 两者抗小鼠迟发型超敏反应耳肿胀的ED₅₀及95% CI分别为0.239 6(0.129 0, 0.445 2)g/kg, 0.147 3(0.076 8, 0.282 7)g/kg。与空白组比较, 模型组小鼠肝指数、血清TNF-α水平均显著升高, 肺指数、血清IL-10水平均显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 不同给药组小鼠肝指数(阳性组、生品3组和炮制品1~6组)、血清TNF-α水平(阳性组、生品1~3组及炮制品1~4组)均显著降低, 肺指数(阳性组、生品3~6组及炮制品3~6组)、血清IL-10水平(生品1、2、4、5组以及炮制品2~6组)以及ALT、AST、BUN、CREA水平(生品4~6组)和TBIL水平(生品3~6组)均显著升高($P < 0.05$)。结论: 了哥王生品醇提物具有一定的抗免疫炎症活性, 且对小鼠具有肝肾毒性, 呈一定的“量-效-毒”关系; 炮制品醇提物也具有一定的抗免疫炎症活性, 但肝肾毒性弱于生品。“汗渍法”具有“存效减毒”的效果。

关键词 了哥王; 汗渍法; 免疫性炎症; 剂量; 药效; 毒性

Correlation Study of “Dose-effect-toxicity” of Miao Medicine *Wikstroemia indica* on Anti-immune Inflammation of Mice before and after Processed by “Sweat Soaking Method”

ZHENG Chuanqi¹, FENG Guo^{1,2}, LI Wei^{1,2}, ZHOU Zhirong¹, XU Qin¹, LI Zhiping¹, YI Dongbin¹, LI Jinhui¹(1. College of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. National Engineering and Technology Research Center of Miao Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the “dose-effect-toxicity” correlation of Miao medicine *Wikstroemia indica* before and after processed on anti-immune inflammation of mice. METHODS: Mice were divided into blank group, model group, ethanol extract of *W. indica* raw product groups 1-6, ethanol extract of *W. indica* processed product by “sweat soaking method” groups 1-6 (hereinafter called “raw groups 1-6” “processed groups 1-6” for short, drug dosage were 0.13, 0.20, 0.26, 0.52, 1.04, 2.6 g/kg), positive group (cyclophosphamide, 36.4 mg/kg), with 10 mice in each group. Except for blank group, other groups were given 1% 2,4-dinitrofluorobenzene-acetone-sesame oil mixed solution to induce delayed type hypersensitivity model. After modeling, blank group and model group were given constant volume of 1.0% CMC-Na solution intragastrically, and administration groups were given relevant medicine 20 mL/kg intragastrically, once a day, for consecutive 5 d. After last medication, ear swelling degree of mice were recorded; the inhibition rate of swelling degree, half effective dose (ED₅₀) and 95% confidence interval (CI) of raw and processed products were calculated; the weight of heart, liver, spleen, lung and kidney were measured and the indexes of organs were calculated; ELISA and modified chemical oxidation method were used to determine the serum levels of inflammatory factors (TNF-α, IL-10) and liver and renal function indexes (ALT, AST,

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81760766); 国家中医药管理局“中药炮制技术传承基地建设”项目(No.国中医药科技中药便函[2015]132); 贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2017]1007); 贵州省一流专业(中药学)建设项目(No.黔高教发[2017]158-02-32); 贵州中医药大学科研项目(No.贵中医科研内[2016]40); 贵州中医药大学博士启动基金项目(No.贵中医博士基金[2017]1)

* 硕士研究生。研究方向: 中药新制剂新技术。E-mail: 1161472062@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药新制剂新技术、药动学。E-mail: 453989352@qq.com

TBIL, BUN, CREA). RESULTS: Compared with blank group, the degree of ear swelling in the model group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, ear swelling degree of mice were decreased significantly in different doses groups of ethanol extract of raw and processed products of *W. indica* ($P<0.05$). The inhibition rate of swelling increased with the increase of dose, ED₅₀ and 95% CI of delayed hypersensitivity ear swelling were 0.239 6(0.129 0, 0.445 2)g/kg and 0.147 3(0.076 8, 0.282 7)g/kg, respectively. Compared with blank group, liver index and serum TNF- α level of mice were increased significantly in model group, while lung index and serum IL-10 level were decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the levels of liver indexes (positive group, raw group 3, processed groups 1-6) and serum TNF- α levels (positive group, raw groups 1-3, processed groups 1-4) were decreased significantly in different administration groups; while the levels of lung indexes (positive group, raw groups 3-6 and processed groups 3-6), serum IL-10 levels (raw groups 1, 2, 4 and 5, processed groups 2-6), ALT, AST, BUN and CREA levels (raw groups 4-6), TBIL levels (raw groups 3-6) were increased significantly ($P<0.05$). CONCLUSIONS: The ethanol extract of raw product of *W. indica* has certain anti-inflammatory activity, and has certain hepatorenal toxicity to mice, with certain "dose-effect-toxicity" correlation. The ethanol extract of processed product of *W. indica* has certain anti-inflammatory activity too, but its hepatorenal toxicity was lower than raw product. The "sweat soaking method" possesses the function of "retaining efficiency and reducing toxicity" for processing *W. indica*.

KEYWORDS *Wikstroemia indica*; Sweat soaking method; Immune inflammation; Dose; Effect; Toxicity

了哥王是瑞香科茛菪花亚族茛菪花属植物了哥王[*Wikstroemia indica*(L.)C. A. Mey.]的干燥根或根皮,学名南岭茛菪花(*Wikstroemia viridiflore meisen*),是苗族地区民间常用苗药之一。该药味苦、微辛,性寒,归肺、肝经,具有化痰散瘀、通经利水、杀虫拔疮、清热解毒等功效^[1]。现代药理研究表明,了哥王具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种活性^[1-4],临床主要用于治疗肝炎、肝硬化、急性扁桃体炎、慢性支气管炎、肾炎、肢体疼痛等,同时还用于治疗恶性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌及其他体表癌^[5-6]。该药疗效确切,但毒性较大。有文献指出,了哥王有大毒,其果实、茎、叶和根皮均有毒,中毒时可导致腹泻、呕吐等消化道反应以及皮疹等皮肤反应^[7-8]。为降低了哥王的毒性作用,本课题组前期对其炮制减毒方法进行了深入研究,优选出其最佳炮制减毒方法“汗渍法”^[9-10];同时,对了哥王生品不同溶剂提取物以及不同炮制品乙醇提取物进行了初步的急性毒性研究,结果发现生品中非极性部位石油醚提取物和乙酸乙酯提取物均具有较大毒性,且生品毒性明显大于炮制品^[9,11-12]。基于上述研究,本课题组对了哥王炮制前后抗免疫性炎症的“量-效-毒”关系进行了探讨,旨在为该药炮制方法及炮制机制研究提供依据,为其临床合理应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ADVIA 1800型全自动生化分析仪(德国 Siemens Healthcare Diagnostics公司);Multiskan FC型酶标仪、Sorvall RC 6型离心机(美国 Thermo Fisher Scientific公司);FA 2004型电子分析天平(上海衡平仪器仪表厂);Targin VX-02型多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司);202-3 AB型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);RE52-99型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DZF-6020型减压真空干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 药品与试剂

了哥王药材购自广西壮族自治区玉林市玉林银丰

国际中药港(产地:广西玉林,批号:20160115),经贵州中医药大学药学院李玮教授鉴定为瑞香科茛菪花属植物了哥王[*W. indica*(L.)C. A. Mey.]的根。

注射用环磷酰胺(阳性对照,江苏盛迪医药有限公司,批号:16070925,规格:200 mg/瓶);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素10(IL-10)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20160905、20160910、20160912、20160915、20160920、20160515、20160511);2,4-二硝基氟苯(DNFB,广东翁江化学试剂有限公司,批号:1612101101R);羧甲基纤维素钠、氢氧化钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号分别为20170110、20170501);L-组氨酸盐酸盐(北京博奥拓达科技有限公司,批号:645-35-2);氯化钠[重庆川东化工(集团)有限公司,批号:20180401];二水合磷酸二氢钠(天津市光复科技发展有限公司,批号:20160107);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级昆明种小鼠150只,雄性,体质量(20.0 \pm 2.0)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2014-0011。所有小鼠均饲养于每12 h明暗交替的动物房内,控制室内温度为(25.0 \pm 1.0) $^{\circ}$ C、相对湿度为(50.0 \pm 10.0)% ,并予以标准饲料和饮用水。

2 方法

2.1 了哥王生品及炮制品醇提物的制备

2.1.1 了哥王生品醇提物 取了哥王药材,粉碎后取粗粉5 kg,以14倍量(g/mL,下同)的70%乙醇按5 mL/(min \cdot kg)的速度进行渗漉提取。收集提取液,回收乙醇至无醇味,采用低压真空浓缩干燥法(温度:60 $^{\circ}$ C,真空度:0.07~0.08 MPa)进行浓缩、干燥后,粉碎成细粉(过80目筛),即得了哥王生品醇提物(每100 g醇提物相当于992 g生药)^[13]。

2.1.2 了哥王炮制品醇提物 取了哥王生品药材粗粉

5 kg,每日喷洒人工汗液(含L-组氨酸盐酸盐0.5 g/L、氯化钠5 g/L、二水合磷酸二氢钠2.2 g/L,用0.05 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至5.5,即得),每100 kg药材粗粉喷洒人工汗液30 kg^[14],拌匀,闷润,待吸尽水分后置于(37.0±0.5)℃的干燥箱中烘干24 h。同法反复炮制14 d,即得了哥王汗渍法炮制品药材。取上述炮制品药材适量,按“2.1.1”项下渗漉法提取,制得了哥王炮制品醇提物(每100 g醇提物相当于992 g生药)^[13]。

2.2 分组、造模与给药

取雄性小鼠150只,随机分为空白组、模型组、了哥王生品醇提物1~6组(简称“生品1~6组”;剂量分别为0.13、0.20、0.26、0.52、1.04、2.6 g/kg,按人用临床最高剂量的10倍换算得最高剂量^[1],以1.0%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂,下同)、了哥王炮制品醇提物1~6组(简称“炮制品1~6组”;剂量分别为0.13、0.20、0.26、0.52、1.04、2.6 g/kg)和阳性组(环磷酰胺,36.4 mg/kg,按人用临床最高剂量换算而得^[15],以1.0%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂),每组10只。除空白组外,其余各组小鼠均于腹部去毛(面积约为3 cm×3 cm),并将1%DNFB-丙酮-麻油混合溶液[将DNFB 50 mg溶于丙酮-麻油溶液(1:1, V/V)5 mL中,即得]50 μL均匀涂抹至去毛处致敏以复制迟发型超敏反应模型。模型复制成功(即出现皮肤红肿胀、局部有渗出液、水肿等症状^[15])后,空白组和模型组小鼠均灌胃等容1.0%羧甲基纤维素钠溶液,各给药组按20 mL/kg灌胃相应药液,每日1次,连续5 d。

2.3 小鼠耳肿胀情况及脏器指数检测

末次给药后,将1%DNFB-丙酮-麻油混合溶液10 μL均匀涂抹于小鼠右耳(两面)进行攻击。攻击24 h后,于眼内眦静脉丛取血,随后颈椎脱臼处死小鼠,剪下双耳,用9 mm直径打孔器分别在两耳同一部位处打孔,取圆耳片称定质量,以右耳片与左耳片的质量之差(即肿胀度)为观察指标,计算每只小鼠的耳肿胀抑制率:肿胀抑制率=(给药组肿胀度-空白组肿胀度)/空白组肿胀度×100%。采用Bliss法^[16]计算生品与炮制品的半数有效剂量(ED₅₀)及其95%置信区间(CI)。将小鼠解剖后,取心、肝、脾、肺、肾并精密称定质量,计算脏器指数:脏器指数=某脏器质量/体质量×100%。

2.4 小鼠炎症因子及肝肾功能指标检测

取“2.3”项下血液样品适量,以4 500 r/min离心15 min,取血清,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)以酶标仪检测血清TNF-α、IL-10水平,采用改良化学氧化法以全自动生化分析仪测定血清ALT、AST、TBIL、BUN、CREA水平。严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.5 统计学方法

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。计量资

料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 了哥王生品及炮制品醇提物对迟发型超敏反应模型小鼠耳肿胀情况的影响

与空白组比较,模型组小鼠耳肿胀度显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,了哥王生品及炮制品醇提物各剂量组小鼠耳肿胀度均显著降低($P < 0.05$),且肿胀抑制率有随剂量增加而升高的趋势。了哥王生品及炮制品醇提物抗小鼠迟发型超敏反应耳肿胀的ED₅₀及95%CI分别为0.239 6(0.129 0, 0.445 2)g/kg、0.147 3(0.076 8, 0.282 7)g/kg,详见表1。

表1 了哥王生品及炮制品醇提物对迟发型超敏反应模型小鼠耳肿胀情况的影响($n=10$)

Tab 1 Effects of ethanol extract of *W. indica* raw and processed products on ear swelling of delayed type hypersensitivity model mice ($n=10$)

组别	肿胀度($\bar{x} \pm s$),mg	肿胀抑制率($\bar{x} \pm s$),%	ED ₅₀ ,g/kg	95%CI,g/kg
空白组	11.1±1.6			
模型组	22.5±6.6*			
阳性组	13.2±1.9 ^a	37.60±9.19		
生品1组	15.2±2.1 ^a	28.12±10.10	0.239 6	0.129 0, 0.445 2
生品2组	14.5±1.8 ^a	31.28±7.63		
生品3组	14.0±1.8 ^a	33.57±7.69		
生品4组	11.6±3.8 ^a	45.02±16.00		
生品5组	11.7±4.9 ^a	44.71±11.31		
生品6组	11.3±0.6 ^a	46.29±2.74		
炮制品1组	15.0±1.3 ^a	28.91±5.47	0.147 3	0.076 8, 0.282 7
炮制品2组	14.5±1.4 ^a	31.28±6.53		
炮制品3组	13.2±2.8 ^a	37.60±13.20		
炮制品4组	9.2±4.8 ^a	56.56±12.90		
炮制品5组	9.0±3.4 ^a	57.35±16.14		
炮制品6组	8.7±1.5 ^a	58.93±7.13		

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^a $P < 0.05$

Note: vs. blank group, * $P < 0.05$; vs. model group, ^a $P < 0.05$

3.2 了哥王生品及炮制品醇提物对迟发型超敏反应模型小鼠脏器指数的影响

与空白组比较,模型组小鼠肝指数显著升高,肺指数显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,阳性组、生品3组和炮制品1~6组小鼠肝指数均显著降低,阳性组、生品3~6组及炮制品3~6组小鼠肺指数均显著升高($P < 0.05$);而其余脏器指数组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表2。

3.3 了哥王生品及炮制品醇提物对迟发型超敏反应模型小鼠炎症因子的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清TNF-α水平显著升高,IL-10水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性组、生品1~3组以及炮制品1~4组小鼠血清TNF-α水平均显著降低,生品1、2、4、5组以及炮制品2~6组小鼠

血清IL-10水平均显著升高($P<0.05$),详见表3。

表2 了哥王生品及炮制品醇提物对迟发型超敏反应模型小鼠脏器指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10, \%$)

Tab 2 Effects of ethanol extract of *W. indica* raw and processed products on organ indexes of delayed type hypersensitivity model mice ($\bar{x}\pm s, n=10, \%$)

组别	心指数	肝指数	脾指数	肺指数	肾指数
空白组	0.48±0.09	4.84±0.75	0.51±0.19	0.84±0.07	1.30±0.23
模型组	0.44±0.08	5.38±0.35 [*]	0.50±0.16	0.69±0.18 [*]	1.11±0.15
阳性组	0.57±0.16	4.91±0.36 [†]	0.41±0.04	1.07±0.18 [†]	1.35±0.11
生品1组	0.55±0.14	5.33±0.50	0.63±0.11	0.75±0.14	1.29±0.14
生品2组	0.53±0.12	5.43±0.50	0.66±0.17	0.81±0.24	1.30±0.11
生品3组	0.53±0.21	4.86±1.41 [†]	0.67±0.23	1.08±0.43 [†]	1.37±0.42
生品4组	0.54±0.09	5.08±0.54	0.62±0.22	1.15±0.34 [†]	1.26±0.14
生品5组	0.53±0.08	5.21±0.38	0.49±0.12	0.93±0.23 [†]	1.32±0.18
生品6组	0.56±0.20	5.46±0.53	0.34±0.25	0.89±0.10 [†]	1.43±0.21
炮制品1组	0.46±0.04	4.86±0.21 [†]	0.48±0.12	0.77±0.26	1.22±0.14
炮制品2组	0.45±0.02	4.91±0.32 [†]	0.42±0.12	0.78±0.07	1.11±0.12
炮制品3组	0.46±0.04	4.83±0.58 [†]	0.40±0.13	0.86±0.12 [†]	1.20±0.25
炮制品4组	0.49±0.06	4.86±0.26 [†]	0.46±0.09	0.97±0.38 [†]	1.27±0.19
炮制品5组	0.44±0.10	4.85±0.70 [†]	0.55±0.15	0.96±0.08 [†]	1.23±0.14
炮制品6组	0.53±0.08	4.79±0.63 [†]	0.39±0.11	0.88±0.08 [†]	1.33±0.06

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[†] $P<0.05$

Note: vs. blank group, * $P<0.05$; vs. model group, [†] $P<0.05$

表3 了哥王生品及炮制品醇提物对迟发型超敏反应小鼠血清炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=10, \text{ng/L}$)

Tab 3 Effects of ethanol extract of *W. indica* raw and processed products on serum inflammatory factors of delayed type hypersensitivity model mice ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{ng/L}$)

组别	TNF- α	IL-10
空白组	53.34±1.72	36.13±4.16
模型组	111.98±6.49 [*]	15.37±0.99 [*]
阳性组	57.19±9.47 [†]	22.80±2.70
生品1组	95.25±9.54 [*]	44.10±6.89 [†]
生品2组	59.06±9.83 [†]	40.17±1.92 [†]
生品3组	74.31±13.54 [†]	25.90±1.81
生品4组	98.81±10.80	38.17±3.18 [†]
生品5组	105.22±8.64	44.10±3.98 [†]
生品6组	98.47±4.88	32.57±5.23
炮制品1组	82.03±11.11 [†]	20.70±4.01
炮制品2组	96.95±6.97 [†]	38.73±3.74 [†]
炮制品3组	97.63±10.17 [†]	39.43±5.06 [†]
炮制品4组	74.34±11.46 [†]	37.27±4.93 [†]
炮制品5组	103.75±13.71	62.77±8.24 [†]
炮制品6组	110.56±19.09	39.47±1.82 [†]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[†] $P<0.05$

Note: vs. blank group, * $P<0.05$; vs. model group, [†] $P<0.05$

3.4 了哥王生品及炮制品醇提物对迟发型超敏反应模型小鼠血清肝肾功能指标的影响

与空白组比较,模型组小鼠各肝肾功能指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,生品4~6组小鼠血清ALT、AST、BUN、CREA水平以及生品3~6组

TBIL水平均显著升高($P<0.05$),且上述各指标有随剂量增大而升高的趋势;而炮制品各剂量组上述指标与模型组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表4。

表4 了哥王生品及炮制品醇提物对迟发型超敏反应模型小鼠血清肝肾功能指标的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 4 Effects of ethanol extract of *W. indica* raw and processed products on serum liver and renal indexes of delayed type hypersensitivity model mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	ALT, U/L	AST, U/L	TBIL, $\mu\text{mol/L}$	BUN, mmol/L	CREA, $\mu\text{mol/L}$
空白组	36.87±7.83	41.55±6.34	10.15±2.35	16.45±2.12	110.83±15.68
模型组	37.16±8.42	42.47±7.05	11.31±3.05	16.02±3.58	115.90±18.31
阳性组	36.42±5.39	40.85±6.36	10.78±2.17	15.95±2.83	108.53±12.66
生品1组	42.22±10.25	48.28±9.76	13.93±6.02	18.55±4.59	119.42±17.29
生品2组	45.63±12.48	51.53±11.32	15.64±5.91	18.96±5.33	121.74±16.11
生品3组	53.77±15.20	55.04±13.96	17.44±7.08 [*]	21.34±6.37	125.84±15.33
生品4组	58.93±17.05 [*]	64.16±15.09 [*]	19.35±5.36 [*]	25.82±8.01 [*]	139.60±18.61 [*]
生品5组	70.34±19.72 [*]	71.16±16.16 [*]	22.69±7.20 [*]	23.82±7.77 [*]	145.79±15.44 [*]
生品6组	78.57±15.46 [*]	80.26±13.94 [*]	21.98±6.41 [*]	30.60±8.01 [*]	158.45±13.75 [*]
炮制品1组	44.86±4.76	43.78±6.06	13.53±2.18	17.43±5.79	112.54±9.56
炮制品2组	42.23±5.00	42.97±5.47	11.01±3.13	16.65±7.33	108.86±12.34
炮制品3组	47.82±6.30	44.73±5.98	14.27±2.11	15.40±4.06	111.27±10.69
炮制品4组	50.31±11.24	47.30±6.32	17.07±3.86	19.69±5.05	115.32±14.30
炮制品5组	49.41±10.28	53.39±13.17	15.84±4.01	21.05±6.06	118.36±5.19
炮制品6组	55.43±12.00	47.55±12.51	18.48±5.47	21.83±4.23	117.04±11.55

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[†] $P<0.05$

Note: vs. blank group, * $P<0.05$; vs. model group, [†] $P<0.05$

4 讨论

了哥王为我国苗族地区常用的一种苗药,其疗效确切,但具有一定的毒性^[7-8]。《岭南采药录》记载“了哥王有毒,能使狗中毒,狗食之必死”;《生草药性备要》记载“了哥王能杀人,不能乱服”。有研究指出,炮制是降低有毒中药毒性的有效方法^[17]。经本课题组前期调查研究发现,在贵州黔东南苗族地区的苗族群众常采用“汗渍法”(又称“身背汗湿法”)炮制了哥王以减轻其毒性,即将药材捆于人腰部,以汗液浸渍、以体温温煦药材,从而达到降低药材毒性的目的。经本课题组深入研究发现,该炮制方法确实具有较好的减毒作用,但存在操作不便、无法大规模炮制、不能控制其炮制质量的缺点。因此,本课题组在尊重少数民族民间用药经验及炮制方法的基础上,对其炮制工艺进行了优化,以人工汗液炮制了哥王药材,并于37℃条件下反复干燥,建立了了哥王药材科学、合理、简便、稳定、可控的炮制方法——汗渍法^[14]。

本文在前期研究的基础上,建立了小鼠迟发型超敏反应模型,初步研究了了哥王生品及“汗渍法”炮制品抗小鼠免疫性炎症的“量-效-毒”关系。结果显示,模型组小鼠耳肿胀度较空白组显著升高;经药物干预后,了哥王生品及炮制品醇提物各剂量组小鼠耳肿胀度均较模型组显著降低,且肿胀抑制率有随剂量增加而升高的趋势;了哥王生品及炮制品醇提物抗小鼠迟发型超敏反应

耳肿胀的ED₅₀及其95%CI分别为0.239 6(0.129 0, 0.445 2)g/kg、0.147 3(0.076 8, 0.282 7)g/kg。了哥王生品的ED₅₀值大于炮制品,提示炮制品抗小鼠迟发型超敏反应耳肿胀的作用比生品的作用要强。但由于ED₅₀及95%CI较低,部分结果低于剂量设置范围最低值,故仍有待进一步验证。

本研究结果还显示,模型组小鼠肝指数较空白组显著升高,肺指数较空白组显著降低;经药物干预后,阳性组、生品3组和炮制品1~6组小鼠肝指数均较模型组显著降低,阳性组、生品3~6组及炮制品3~6组小鼠肺指数均较模型组显著升高。此外从数据上看,了哥王炮制品1~6组小鼠的肝指数均较同剂量生品小,且炮制品1~6组小鼠肝指数以及其较高剂量组别(3~6组)小鼠的肾指数更接近于空白组水平。这提示了哥王生品、炮制品的药效、剂量之间可能存在一定的正相关关系,且炮制品降低迟发型超敏反应模型小鼠肝指数的作用较生品稍强,而生品所致毒性有随着剂量增加而增强的趋势。

本研究还考察了不同剂量了哥王生品及炮制品醇提取物对迟发型超敏反应模型小鼠血清炎症因子和肾功能指标的影响。结果显示,模型组小鼠血清TNF- α 水平较空白组显著升高,IL-10水平较空白组显著降低;经药物干预后,阳性组、生品1~3组以及炮制品1~4组小鼠血清TNF- α 水平均较模型组显著降低,生品1、2、4、5组以及炮制品2~6组小鼠血清IL-10水平,生品4~6组ALT、AST、BUN、CREA水平以及生品3~6组TBIL水平均较模型组显著升高。这提示了哥王生品及炮制品均可减轻小鼠的免疫性炎症,且生品与炮制品的“药效-剂量”之间也呈一定的变化趋势,其中炮制品的肝肾毒性比生品要小。

综上所述,了哥王生品醇提取物(0.13~2.6 g/kg)具有抗免疫性炎症的作用,同时对小鼠脏器也具有一定的毒副作用,其毒性有随剂量增加而增强的趋势,可能存在一定的“量-效-毒”依赖性关系;炮制品醇提取物(0.13~2.6 g/kg)也具有抗免疫性炎症的作用,具有一定的“量-效”关系,但与生品组比较,其肝肾毒性相对较小,提示“汗渍法”具有“存效减毒”的效果。本研究为苗药了哥王临床应用的安全性、有效性以及“汗渍法”的炮制机制研究提供了一定的参考。但是,目前该药毒性成分尚未明确,其药理作用的物质基础研究还不够深入,故仍有待后续研究予以完善。

参考文献

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科技出版社,2005:68-71.

- [2] 张金娟,熊英,李玮,等.了哥王炮制前后的药效比较研究[J].时珍国医国药,2015,26(5):1118-1120.
- [3] 徐骏军,王国伟,熊友香,等.了哥王抗炎有效部位研究[J].江西中医药大学学报,2014,26(6):40-41.
- [4] HUANG WH, ZHOU GX, WANG GC, et al. A new biflavonoid with antiviral activity from the roots of *Wikstroemia indica*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(4): 401-406.
- [5] SHAO M, HUANG XJ, LIU JS, et al. A new cytotoxic biflavonoid from the rhizome of *Wikstroemia indica*[J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(12): 1417-1422.
- [6] 姜洪芳,白雪,牛慧彦,等.西瑞香素对肺癌A549细胞侵袭及迁移能力的影响[J].实用药物与临床,2016,19(2):131-134.
- [7] 丁涛,黄晖.中草药不良反应及预防[M].北京:中国中医药出版社,1992:144.
- [8] 刘梦醒,陈永刚,罗季,等.了哥王片致重症多形红斑型药疹伴药物性肝损伤1例[J].中国药物警戒,2018,15(5):314-317.
- [9] 冯果,李玮,何新,等.苗药了哥王不同炮制品乙醇提取物对小鼠的急性毒性作用比较[J].中国药房,2017,28(25):3536-3540.
- [10] FENG G, CHEN YL, LI W, et al. Exploring the Q-marker of “sweat soaking method” processed radix *Wikstroemia indica*: based on the “effect-toxicity-chemicals” study[J]. *Phytomedicine*, 2018. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.03.063.
- [11] 张金娟,熊英,李玮,等.了哥王生品及2种炮制品的急性毒性比较研究[J].中国中药杂志,2011,36(9):1172-1174.
- [12] 冯果,李玮,何新,等.苗族药了哥王不同提取物对正常大鼠肝毒性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):96-102.
- [13] 冯果,李玮,何新,等.正交试验结合综合评分法优化苗药了哥王的提取工艺[J].中国药房,2017,28(16):2216-2219.
- [14] 王建科,李玮,郭建民,等.汗渍法炮制了哥王饮片的质量标准研究[J].中药材,2011,34(12):1848-1850.
- [15] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:227-229、1429.
- [16] 赵庆华,李晓宇,冯群,等.基于剂量的雷公藤抗小鼠免疫性炎症“效-毒”关联性评价[J].中国中药杂志,2015,40(6):1139-1143.
- [17] 张明.中药炮制方法与降低中药毒副作用研究[J].心理月刊,2019,14(5):178.

(收稿日期:2019-06-09 修回日期:2019-11-19)

(编辑:张元媛)