文章编号: 1674 - 7054(2019) 02 - 0159 - 06

海南龙血树人工血竭与天然血竭 的抗炎镇痛活性比较

王 辉杨 宁 吴晓鹏 戴好富 梅文莉

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用 重点实验室/海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室 海口 571101)

摘 要: 为了探讨人工诱导海南龙血树(Dracaena cambodiana Pierre ex Gagnep.) 所产血竭是否具有抗炎镇痛活性 笔者分别采用小鼠扭体反应模型、小鼠耳廓肿胀模型和醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性模型对海南龙血树人工血竭和天然血竭的镇痛活性及抗炎活性做了比较。结果表明:海南龙血树人工诱导血竭可显著延长醋酸所致的小鼠扭体反应潜伏期,镇痛活性优于天然血竭;海南龙血树人工血竭和天然血竭均可显著抑制二甲苯所致的小鼠耳廓肿胀,两者具有类似的抗炎镇痛活性。

关键词: 人工诱导血竭;海南龙血树;天然血竭;抗炎,镇痛

中图分类号: R 285.5 文献标志码: A DOI: 10. 15886/j. cnki. rdswxb. 2019. 02. 010

血竭是一种珍稀名贵中药,具有活血化瘀、消肿止痛、收敛止血、生肌敛疮、补血之功效,被誉为"活血之圣药"临床用于跌打损伤、淤血止痛、妇女气血淤滞、外伤出血、浓疮久不收口[1]。现代药理研究表明,血竭是取物具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化、止血、止痛、促进伤口愈合、抗血栓等多种药理活性[1-3]。目前,血竭已被制成胶囊、分散片、滴丸、缓释胶囊、灌肠剂等多种剂型,临床应用于急性胃粘膜出血、上消化道出血、急性心肌梗死、宫颈糜烂、外痔、子宫肌瘤、各种压疮、癌性疼痛、糖尿病足等[4],在疾病的治疗或辅助治疗方面发挥着举足轻重的作用。血竭是其基源植物所产生的红色树脂提取而成。血竭的基源植物分布于百合科龙血树属(Dracaena),棕榈科黄藤属(Daemonorops),大戟科巴豆属(Croton)和豆科紫檀属(Pterocarpus)4个不同的属[1]。在我国,百合科龙血树属植物剑叶龙血树[Dracaena cochinchinensis(Lour.)S. C. Chen.]和海南龙血树(Dracaena cambodiana Pierre ex Gagnep.)可产生血竭。前者所产血竭于1991年被国家批准为一类新药(药材)称为国产血竭又称为广西血竭。后者(海南龙血树)所产血竭被收入海南省地方标准。由于国产血竭形成缓慢,大量的开发应用已经造成其资源的匮乏。目前,已有多家单位采用接种微生物或注入化学诱导剂等方法进行血竭的诱导[5-11],大大缩短了血竭形成时间,提高了产量。笔者前期的研究还发现,人工诱导海南龙血树产生的血竭的化学成分和天然血竭相似[12-14],但是其药理活性鲜有报道,能否代替天然血竭用于制药还未知。笔者对人工诱导海南龙血树所产血竭与天然血竭的抗炎和镇痛活性进行比较,旨在求证人工诱导血竭能否替代天然血竭。

1 材料与方法

1.1 实验动物 ICR 小鼠,每只的体质量为18~22g 雄性,SPF级,由北京维通利华实验动物技术有限

收稿日期: 2019 - 01 - 24 修回日期: 2019 - 03 - 03

基金项目: 海南省自然科学基金创新研究团队项目(2017CXTD020);国家自然科学基金项目(31400297);中国

热带农业科学院院级创新团队南药产业技术创新团队项目(17CXTD-15)

作者简介: 王辉(1981 –) ,女 副研究员 ,博士. 研究方向: 天然产物化学. E-mail: wanghui@ itbb. org. cn 通信作者: 梅文莉(1974 –) ,女 ,研究员 ,博士. 研究方向: 天然产物化学. E-mail: meiwenli@ itbb. org. cn 公司提供 ,合格证号: SCXK(京) 2012 - 0001。饲养条件: 温度(25 ± 1) ℃ 相对湿度(45 ± 5) % ,光暗各 12 h • d ⁻¹ ,自由进食饮水。

- 1.2 药物与试剂 天然血竭采自海南昌江霸王岭的龙血树 刮取红色的木质部 经粉碎 $\varphi=95\%$ 乙醇提取 减压浓缩 真空冷冻干燥 得天然血竭 得率为 24%。人工诱导血竭原材料采自海南省海口市三江镇龙血树基地 经1年诱导所得 诱导方法见文献 [11] 处理方法与天然血竭相同 得人工诱导血竭(人工血竭) 得率为 13%。阿斯匹林肠溶片(国药准字 J20130078 ,拜耳医药保健有限公司产品 ,每片含有效成分 100 mg ,批号为 200610011)。伊文思蓝(批号 WC20070607 ,国药集团化学试剂有限公司 , $10 \text{ g} \cdot$ 瓶)。醋酸泼尼松片(国家准字 H12020123 ,天津力生制药股份有限公司)。
- 1.3 天然血竭和人工血竭对醋酸致小鼠扭体反应的影响 将 ICR 小鼠随机分组: 空白组 模型组 天然 血竭高、中、低剂量组 人工血竭高、中、低剂量组 阳性对照组。对照组 14 只 其他每组 12 只 称量标记 灌胃给药 7 d。天然血竭和人工血竭高、中、低剂量组给药量分别为 $0.9~0.3~0.1~{\rm g} \cdot {\rm kg}^{-1}$ 分别配成 0.09~0.03 , $0.01~{\rm g} \cdot {\rm mL}^{-1}$ 的悬浮液 依小鼠体质量灌胃给药(每克体质量给药 $0.01~{\rm mL}$)。阳性药阿司匹林肠溶片小鼠用量为 $128~{\rm mg} \cdot {\rm kg}^{-1}$,生理盐水配置。各组小鼠末次灌胃给药 $30~{\rm min}$ 后,均依小鼠体质量 腹腔注射 w=0.7% 的醋酸溶液 用药量为 $0.01~{\rm mL} \cdot {\rm g}^{-1}$ 。观察扭体出现的时间及 $15~{\rm min}$ 内小鼠的扭体次数。
- 1.4 天然血竭和人工血竭对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 小鼠分组及给药同 1.3。以醋酸泼尼松为阳性对照 给药剂量为 $6~mg \cdot kg^{-1}$ 。各组小鼠末次给药 60~min 后 右耳涂以二甲苯 $0.05~mL \cdot$ 只 左耳作对照 不做处理。30~min 后处死动物 沿耳廓基线剪下双耳 用直径 7~mm 角膜钻环将双耳同部位等面积切下 称切下耳片质量 计算鼠耳肿胀率。

鼠耳肿胀率 = (右耳片质量 - 左耳片质量) /左耳片质量 × 100%。

- 1.5 天然血竭和人工血竭对醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响 小鼠分组及给药同 1.3。以阿司匹林肠溶片作为阳性对照 小鼠用药量为 $128~{\rm mg} \cdot {\rm kg}^{-1}$, 生理盐水配置。各组小鼠末次灌胃给药 $30~{\rm min}$ 后,均依小鼠体质量 静脉注射 w=0.5% 伊文思蓝生理盐水溶液和腹腔注射 w=0.7% 醋酸 ,用量均为 $0.01~{\rm mL} \cdot {\rm g}^{-1}$, $10~{\rm min}$ 后脱颈椎处死,用 $4~{\rm mL}$ 生理盐水分 $2~{\rm cmin}$ 次洗涤腹腔,用采血针注射器吸出洗涤液 $1~{\rm mL}$, $10~{\rm min}$ 不同的 $10~{\rm min}$ 和 $10~{\rm min}$ 和 10~
- 1.7 统计方法 各组计算均值(\bar{x})、标准差(s) 运用 SPSS 16.0 进行数据统计分析 数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 ANOVA 分析 ,两组间方差齐者采用 LSD 检验比较 ,方差不齐者用 Dunnett's T3 检验。

2 结果与分析

2.1 天然血竭和人工血竭对醋酸致小鼠扭体反应的影响 结果(表1)表明,与模型组相比,阳性药阿司匹林组、人工血竭高、中、低剂量组和天然血竭低剂量组的小鼠扭体反应均延迟。阳性药阿司匹林组、人工血竭高、低剂量组明显降低小鼠扭体反应次数,且人工血竭高剂量组对扭体反应的抑制效果与阳性对照阿司匹林相当。其他组和模型组在统计学上无显著差别。因此,人工血竭有显著的镇痛活性,其效果明显优于天然血竭。

表 1 天然血竭和人工血竭提取物对醋酸致小鼠扭体反应的影响

Tab. 1 Effect of extract of natural or artificially induced dragon's blood on mouse writhing induced by acetic acid

分组 Groups		动物数 /只 Animals	扭体出现时间/min Latency of writhing	扭体次数 Writhing times
模型组 Model group		12	7.75 ± 2.29	8.58 ± 2.81
人工血竭	高剂量组 Artificially induced dragon's blood , high dose	12	12.79 ± 2.42 * *	1.50 ± 1.78 * *
	中剂量组 Artificially induced dragon's blood , moderate dose	12	$10.48 \pm 3.74^*$	5.67 ± 4.94
	低剂量组 Artificially induced dragon's blood , low dose	12	12.56 ± 1.72 * *	$3.67 \pm 1.61^*$
天然血竭	高剂量组 Natural dragon's blood , high dose	12	9.81 ±4.17	7.33 ± 6.44
	中剂量组 Natural dragon's blood , moderate dose	12	8.42 ± 3.49	11.00 ± 6.19
	低剂量组 Natural dragon's blood , low dose	12	$10.50 \pm 3.16^*$	6.67 ± 6.36
阿司匹林 Aspirin		12	12. 10 ± 2. 99 * *	2.83 ± 2.69 * *

注: 和模型组比较 ,** P < 0.01 ,* P < 0.05 ,下同

Note: Difference between the experimental group and model group at $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$. Similarly hereinafter

2.2 天然血竭和人工血竭对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 从表 2 可知 ,天然血竭和人工血竭的所有剂量组均可抑制二甲苯所致的耳廓肿胀 ,与模型组比较具有显著差异 ,各组抑制效果和阳性对照醋酸泼尼松相当 表明天然血竭和人工血竭具有显著的抗炎活性。

表 2 天然血竭和人工血竭提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀率的影响

Tab. 2 Effect of extract of natural or artificially induced dragon's blood on mouse auricle swelling degree induced by dimethylbenzene

分组 Groups		动物数/只 Animals	肿胀率/% Auricle swelling degree
模型组 Mo	odel group	10	124.50 ± 40.78
	高剂量组 Artificially induced dragon's blood , high dose	11	50.73 ± 30.31 * *
人工血竭	中剂量组 Artificially induced dragon's blood , moderate dose	12	72. 33 ± 32. 27 * *
	低剂量组 Artificially induced dragon's blood , low dose	12	88. 17 \pm 41. 47*
	高剂量组 Natural dragon's blood , high dose	12	60.75 ± 36.32 * *
天然血竭	中剂量组 Natural dragon's blood , moderate dose	11	52.73 ± 24.48 * *
	低剂量组 Natural dragon's blood , low dose	12	79.83 ± 39.25 * *
醋酸泼尼	☆ Prednisone acetate	12	67. 42 ± 19. 85 * *

- 2.3 天然血竭和人工血竭对醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响 从表 3 可知 ,人工血竭高剂量组和阳性药阿司匹林组显著减少伊文思蓝渗出量 ,其他各组与模型组相比无显著差异。可见人工血竭高剂量组可降低醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性 ,与阳性对照阿司匹林效果相当 ,具有显著的抗炎活性。
- 2.4 天然血竭和人工血竭有效成分含量的测定 HPLC 定量分析结果表明 ,天然血竭中的 3 种成分远远低于人工血竭(表4)。黄酮类化合物存在于多种植物中 ,主要用于抵御微生物入侵等伤害。本次检测到天然血竭中的 3 种黄酮类成分远远低于人工血竭 ,其原因还需要进一步研究。

表 3 天然血竭和人工血竭提取物对醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响

Tab. 3 Effect of extract of natural or artificially induced dragon's blood on capillary permeability in abdominal cavity of mice induced by acetic acid

分组 Groups		动物数/ 只 Animals	伊文思蓝渗出量/(mg • L ⁻¹) Evans blue exudation
正常组 Normal group		14	0.049 ± 0.031 * *
模型组 Model group		11	0.158 ± 0.022
	高剂量组 Artificially induced dragon's blood , high dose	11	0.082 ± 0.041 * *
人工血竭	中剂量组 Artificially induced dragon's blood , moderate dose	12	0.162 ± 0.079
	低剂量组 Artificially induced dragon's blood , low dose	12	0.128 ± 0.081
	高剂量组 Natural dragon's blood , high dose	12	0.158 ± 0.106
天然血竭	中剂量组 Natural dragon's blood , moderate dose	12	0.116 ± 0.045
	低剂量组 Natural dragon's blood , low dose	12	0.129 ± 0.061
阿司匹林	Aspirin	11	0.091 ± 0.017 * *

表 4 天然血竭和人工血竭中的 3 种化学成分的含量

Tab. 4 Contents of three compounds in natural or artificially induced dragon's blood

g • kg -1

化合物 Compounds	天然血竭 Natural dragon's blood	人工血竭 Artificially induced dragon's blood	
4 4′-二羟基-2-甲氧基二氢查耳酮	0.666	4.30	
4 4′-二羟基-2 6-二甲氧基二氢查耳酮	13.700	20.90	
(2S) -7 3´-二羟基-4´-甲氧基黄烷	0	5.14	

3 讨论

罗宇东等 $^{[16]}$ 的实验结果表明 化学法和生物法诱导的剑叶龙血树 ($D.\ cochinchinensis$) 所产血竭可以显著减少冰醋酸诱导的小鼠扭体反应 效果与阳性对照阿司匹林相当 但其最小剂量为 $1\ g \cdot kg^{-1}$ 大于笔者的大剂量组 $0.9\ g \cdot kg^{-1}$ 。陈素等 $^{[17]}$ 报道了剑叶龙血树产生的血竭中剂量 $(0.5\ g \cdot kg^{-1})$ 和高剂量组 $(1\ g \cdot kg^{-1})$ 可以显著减少冰醋酸诱导的小鼠扭体反应。本研究中 人工诱导海南龙血树所产血竭的镇痛作用仅最大和最小剂量达到了文献报道的效果 而天然血竭未达到镇痛效果 可能与笔者的剂量低有关。同时发现 人工血竭所有剂量组均可延长扭体反应出现的时间 说明其具有一定的镇痛活性 其效果优于天然血竭。

人工血竭对醋酸所致的小鼠扭体反应的抑制活性总体优于天然血竭,可能与其有效成分的含量有关。植物中的许多黄酮类化合物具有良好的抗炎镇痛活性^[18-20]。笔者在前期的研究中,从天然血竭中分离到大量黄酮类化合物^[21-22],也从人工血竭中分离到大量和天然血竭相似的黄酮类化合物^[12-14]。本研究也发现,人工血竭中的3种重要黄酮化合物的含量远远高于天然血竭,从一方面解释了人工血竭的抗炎镇痛活性优于天然血竭。

天然血竭和人工血竭的所有剂量组均可抑制二甲苯所致的耳廓肿胀,表现出很好的抗炎活性,但是仅人工血竭高剂量组可显著降低毛细血管的通透性。炎症反应的病理过程复杂多样,其基本病理变化为局部组织、细胞的变质、渗出和增生等3种变化。在一般的炎症过程中,早期以变质和渗出为主,急性炎症持续时间短,以渗出性病变为主^[23]。本实验的中、低剂量组虽然未能表现出降低血管通透性,但仍然表现出了抑制耳廓肿胀的抗炎活性,其可能的原因是通过减轻炎性细胞的浸润,或者减少炎性介质如前列

腺素 E2(PGE2)、组胺、5-羟色胺(5-HT)的产生,而产生了抗炎活性。。

本实验结果表明,人工诱导海南龙血树产生的血竭可显著延长醋酸所致的小鼠扭体反应出现的时间,具有一定的镇痛活性,效果优于天然血竭。同时,人工血竭可显著抑制二甲苯所致的小鼠耳廓肿胀,具有良好的抗炎活性。综上所述,人工诱导海南龙血树产生的血竭具有与天然血竭相似的抗炎镇痛效果,可以替代天然血竭。

参考文献:

- [1] GUPTA D , BLEAKLEY B , GUPTA R K. Dragon's blood: Botany , chemistry and therapeutic uses [J]. J. Ethnopharmacol , 2008 , 115: 361 – 380.
- [2] XIN N, LIYJ, LIY, et al. Dragon's blood extract has antithrombotic properties, affecting platelet aggregation functions and anticoagulation activities [J]. J. Ethnopharmacol, 2011, 135: 510 514.
- [3] YI T, CHEN H B, ZHAO Z Z, et al. Comparison of the chemical profiles and anti-platelet aggregation effects of two "Dragon's Blood" drugs used in traditional Chinese medicine [J]. J. Ethnopharmacol, 2011, 133: 796 802.
- [4] 张荣平, 王兴红, 赵荣华, 等. 龙血竭 [M]. 北京: 人民卫生出版社 2017.
- [5] 杨靖,江东福,马萍. 特异性真菌作用于龙血树材质形成血竭的研究[J]. 中草药,2004,35(5): 572-574.
- [6] WANG X H, ZHANG C H, YANG L L, et al. Production of dragon's blood in *Dracaena cochinchinensis* plants by inoculation of Fusarium proliferatum [J]. Plant Sci., 2011, 180(2): 292-299.
- [7] OU L C, WANG X H, ZHANG C H, et al. Production and characterization of dragon's blood from leaf blades of *Dracaena* cambodiana elicited by Fusarium proliferatum [J]. Ind Crop Prod., 2013, 45: 230 235.
- [8] CUI J L , WANG C L , GUO S X , et al. Stimulation of dragon's blood accumulation in *Dracaena cambodiana* via fungal inoculation [J]. Fitoterapia , 2013 , 87: 31 36.
- [9] 赵洁,李尚真,宋启示. 发酵生产龙血竭中龙血素 A 和 B 的分析[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(6): 1163-1166.
- [10] 杨本鹏,张树珍,杨学,等. 一种人工栽培龙血树诱导产生血竭的方法:中国 ZL 200710100470 [P]. 2007-09-12.
- [11] 梅文莉,戴好富,王辉. 一种人工诱导血竭的方法:中国 ZL 201310207182.5 [P]. 2013 05 29.
- [12] WANG H, JIANG HM, LIFX, et al. Flavonoids from artificially induced dragon's blood of Dracaena cambodiana [J]. Fitoterapia, 2017, J21: 1-5.
- [13] LI F X, WANG H, GAI CJ, et al. Three new flavanoids from artificially induced dragon's blood of *Dracaena cambodiana* [J]. J. Asian Nat Prod Res., 2018, 20 (1): 55-61.
- [14] 蒋和梅 戴好富 汪辉 等. 人工诱导海南龙血树所产血竭的抗菌活性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 4002-4006.
- [15] 王佳媛,戴好富,王辉,等. 海南龙血竭 HPLC 分析方法及三种黄酮成分含量的测定 [J]. 时珍国医国药,2014,25 (12): 2828-2830.
- [16] 罗宇东,吴玉强,李萍,等. 不同人工诱导方法产生龙血竭的镇痛、抗炎效果的比较 [J]. 中国当代医药, 2016, 23 (15): 87-90.
- [17] 陈素,吴水才,曾毅,等. 龙血竭总黄酮抗炎镇痛作用及其镇痛机制探讨 [J]. 时珍国医国药,2013,24(5): 1030-1032.
- [18] XIAO X, WANG XY, GUI X, et al. Natural flavonoids as promising analgesic candidates: A systematic review [J]. Chem Biodivers, 2016, 13(11): 1427-1440.
- [19] SPERONI E, CERVELLATI R, COSTA S, et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Cyclamen repandum* S. et S. [J]. Phytother Res., 2007, 21 (7): 684-689.
- [20] 丁立帅,赵猛,李燕敏,等. 七叶一枝花根茎和地上部分提取物镇痛抗炎作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(5):832-839.
- [21] SHEN H Y , ZUO W J , WANG H , et al. Steroidal saponins from dragon's blood of *Dracaena cambodiana* [J]. Fitoterapia , 2014 , 94: 94 101.
- [22] LUO Y, WANG H, ZHAO Y X, et al. Cytotoxic and antibacterial flavonoids from dragon's blood of *Dracaena cambodiana* [J]. Planta Medica, 2011, 77: 2053 2056.
- [23] 李玉林, 唐建武, 文剑明, 等. 病理学[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

Comparison of Analgesic and Anti-inflammatory Activities Between Natural and Artificially Induced Dragon's Blood of Dracaena cambodiana

WANG Hui, YANG Ning, WU Xiaopeng, DAI Haofu, MEI Wenli

- (1. Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops/ Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571001, China;
- 2. Hainan Key Laboratory for Research and Development of Natural Products from Li Folk Medicine, Haikou, Hainan 571001, China)

Abstract: To evaluate analgesic and anti-inflammatory activities of artificially induced dragon's blood of *Dracae-na cambodiana*, the natural and artificially induced dragon's bloods were evaluated and compared in terms of analgesic and anti-inflammatory activities by using the writhing model in mice, the mouse auricle swelling model and the capillary permeability in abdominal cavity of mice. Artificially induced dragon's blood of *D. cambodi-ana* significantly increased the latency of mouse writhing induced by acetic acid, indicating that it had a higher analgesic activity than natural one. Both natural and artificially induced dragon's blood markedly reduced auricle swelling caused by dimethylbenzene in mice, suggesting their similarity in anti-inflammatory activity. Artificially induced dragon's blood of *D. cambodiana* had similar analgesic and anti-inflammatory activities with natural dragon's blood.

Keywords: Artificially induced dragon's blood; *Dracaena cambodiana*; natural dragon's blood; anti-inflammatory activity; analgesic activity

(责任编辑:潘学峰)

(上接第139页)

Acute Toxicity of Cyantraniliprole to Selenasidium capricornutum

XU Chengbin , WANG Yuxin , KONG Weihao , ZHANG Xiaokai , LIU Shiyin , FAN Yongmei¹ (Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University/Ministry of Education Key Laboratory for Green Management of Tropical Plant Diseases and Pests , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: Environmental toxicology of pesticide is one of research hot topics at present. Selenastrum capricornutumwas was used as biological model to analyze acute toxicity of cyantraniliprole against *Selenastrum capricornutum*. *S. capricornutum* was exposed to cyantraniliprole at different concentrations to determine the contents of biomass , photosynthetic pigments and malonaldehyde (MDA) , and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The results showed that 72 h ErC_{50} and EyC_{50} of cyantraniliprole to S. capricornutum were 24.15 and 20.01 mg \cdot L⁻¹ , respectively. Cyantraniliprole inhibited the growth of S. capricornutum and reduced the synthesis of photosynthetic pigments (chlorophyll a , chlorophyll b and carotenoid r). *S. capricornutum* exposed to cyantraniliprole showed an oxidative stress response , leading to a decline in the SOD activity and an increase in the CAT activity and the MDA content.

Keywords: Cyantraniliprole; *Selenastrum capricornutum*; acute toxicity; photosynthetic pigments; antioxidase activity

(责任编辑: 叶 静)