

天麻成分对羟基苯甲醇抗实验性脑血栓形成及抗炎作用研究

李 艳, 蒋 石, 郭营营, 林 青, 李秀芳
(云南中医学院, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 观察天麻成分对羟基苯甲醇抗脑血栓形成及抗炎作用. **方法** 本实验采用经大鼠一侧颈内动脉注射花生四烯酸诱发同侧大脑半球脑血栓形成方法评价天麻成分对羟基苯甲醇的抗实验性脑血栓形成作用; 采用二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀模型、花生四烯酸、角叉菜胶诱导大鼠足趾肿胀反应模型考察了天麻成分对羟基苯甲醇的抗炎作用. **结果** 天麻成分对羟基苯甲醇 20 mg/kg 和 15 mg/kg 组均能够降低花生四烯酸注射侧大脑伊文思蓝吸光度与脑重的比值 ($P < 0.01$); 天麻成分对羟基苯甲醇 30 mg/kg、20 mg/kg 和 15 mg/kg 组均能够显著抑制二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀, 抑制率分别为 60.01%、52.72%、45% ($P < 0.01$); 天麻成分对羟基苯甲醇 20 mg/kg 组能够抑制大鼠足趾注射角叉菜胶诱导的足趾肿胀反应, 抑制率为 42.56% ($P < 0.01$), 对大鼠足趾注射花生四烯酸诱导的足趾肿胀反应无明显影响. **结论** 天麻成分对羟基苯甲醇具有显著的抑制实验性脑血栓形成及抗炎作用, 其抗炎作用与抑制花生四烯酸环氧合酶代谢途径有关.

[关键词] 天麻; 对羟基苯甲醇; 脑血栓; 炎症

[中图分类号] R743.32 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 01-0028-04

Anti-thrombotic and Anti-inflammatory Effects of 4-Hydroxybenzyl Alcohol from *Gastrodia elata*

LI Yan, JIANG Shi, GUO Ying-ying, LIN Qing, LI Xiu-fang
(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** The study was aimed to study the anti-thrombotic and anti-inflammatory effects of 4-hydroxybenzyl alcohol from *Gastrodia elata*. **Methods** Cerebral thrombosis caused by injection of arachidonic acid (AA) via intracarotid artery method was used to evaluate the anti-thrombotic effect of 4-hydroxybenzyl alcohol. Two methods were used to evaluate anti-inflammatory effect of 4-hydroxybenzyl alcohol, including mouse ear edema induced by xylene and rat metatarsal swelling induced by a single subcutaneous injection of AA or carrageenan. **Results** The results showed that 4-hydroxybenzyl alcohol markedly reduced the ratio of Evans blue and infarcted hemisphere weight in 20 mg/kg and 15 mg/kg ($P < 0.01$). And it showed significantly inhibitory effect on mouse ear edema induced by xylene ($P < 0.01$), the inhibitory rates were 60.01%, 52.72% and 45% is 30 mg/kg, 20 mg/kg and 15 mg/kg, respectively. And it showed inhibitory effect of rat metatarsal swelling reaction induced by carrageenan, the inhibitory rate was 42.56% in 20 mg/kg ($P < 0.01$), and it had no effect on Toes swelling reaction induced by AA. **Conclusion** 4-Hydroxybenzyl alcohol, a component of *G. elata*, had significant inhibition of experimental cerebral thrombosis and anti-inflammatory effect by inhibiting arachidonic acid cyclooxygenase metabolic pathways.

[Key words] *Gastrodia elata*; 4-Hydroxybenzyl alcohol; Cerebral thrombosis; Inflammation

天麻 (*Gastrodia elata* Blume.) 是云南省昭通地区地道药材, 课题组前期的研究表明, 天麻具有显著的抗血小板聚集作用^[1,2], 天麻成分对羟基苯甲醇

为其主要活性成分之一^[3]. 为进一步阐明天麻成分对羟基苯甲醇的药理作用, 本研究探讨了天麻成分对羟基苯甲醇的抗大鼠实验性脑血栓形成作用, 并

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81303263, 81160514); 教育部科学技术研究重点项目 (2111174)

[作者简介] 李艳 (1989~), 女, 云南祥云县人, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理研究与应用工作.

[通讯作者] 李秀芳. E-mail:sofinelxf@163.com

对其抗炎作用进行了考察。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物与试剂 对羟基苯甲醇,北京百灵威科技有限公司,批号:G6B21-CM,纯度98%;花生四烯酸(arachidonic acid, AA),日本TCI,批号:A0781;角叉菜胶(Sigma,批号:117H0151);伊文思蓝(Sigma,批号:MKBH2094V);阿司匹林(Sigma批号:129K5400V);地塞米松,上海源叶生物科技有限公司,批号:SA0419GA13;吐温-80,二甲苯,均购自国药集团化学试剂有限公司;水合氯醛(分析纯),天津市瑞金特化学品有限公司,批号:20090814。

1.1.2 动物 昆明种小鼠,清洁级,雌雄各半,体重18~22 g,动物合格证号:Dossy-2011-03;清洁级雄性SD大鼠,体重250~300 g,动物合格证号:SCXK(川)2008-24。动物均由四川省医学科学院实验动物研究所提供。饲养于云南中医学院实验动物中心,清洁级环境。

1.1.3 仪器 酶标仪:infinite M200 PRO;赛多利斯XS125A分析天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司;台式低速离心机:上海电机厂;大鼠足趾容积测量仪:山东省医学科学院设备站。

1.2 实验方法

1.2.1 对羟基苯甲醇对大鼠实验性脑血栓的影响 健康SD雄性大鼠,体重240~280 g,分为5组,每组8只,即模型组(1%吐温-80),对羟基苯甲醇高、中、低剂量组,阳性对照组(阿司匹林),上述各组均以1 mL/100 g体积灌胃给予相应药物,1次/d,连续7 d。各组动物于末次给药后1 h,参考文献方法^[4],建立大鼠脑血栓模型,即以3%戊巴比妥钠腹腔注射(30 mg/kg)麻醉,分离右侧颈总动脉并结扎其颈外动脉分支和颈总动脉向心端,

$$\text{鼠趾肿胀的抑制率} = \frac{\text{对照组鼠爪肿胀体积} - \text{给药组鼠爪肿胀体积}}{\text{对照组鼠爪肿胀体积}} \times 100\%$$

1.3 统计学方法

采用SPSS统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析或两因素方差分析法处理数据,两两比较方差齐者采用LSD法检验,方差不齐者采用Tamhane's法检验。

2 结果

于右颈总动脉远心端插入三通管,5 min后,经三通管向右颈总动脉以0.1 mL/100 g体重注入0.5 mg/kg的AA,5 min后再由三通管注入0.2%伊文思蓝(注入体积:0.5 mL/100 g体重),5 min后,迅速断头,取出大脑分成左右两半分别称湿重,再分别置匀浆器中,加入5 mL,0.5%Na₂SO₄及丙酮(体积比为3:7)的混合液制成匀浆,密闭静置90 min,3 000 r/min离心10 min,取上清液在620 nm处测吸光度(A),以栓塞区脑组织吸光度与同侧脑组织重量的比值(I/g)表示脑血栓严重程度。

1.2.2 对羟基苯甲醇对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 昆明种小鼠,体重18~22 g,分5组,每组10只,分别为溶媒组(1%吐温-80),阳性对照组(阿司匹林),对羟基苯甲醇高、中、低剂量组,各组动物于实验前灌胃给予相应药物,1次/d,连续3 d,末次给药1 h后,在小鼠右耳耳廓涂上二甲苯50 μL致炎,40 min后脱颈椎处死,剪下双耳,用直径为8 mm的不锈钢冲子冲下左、右两耳耳片,分析天平上称重,以左右耳耳片重量之差作为衡量肿胀程度的指标,抗炎作用强度以抑制率%表示。

$$\text{抑制率}\% = \frac{\text{溶媒组肿胀度} - \text{给药组肿胀度}}{\text{溶媒组肿胀度}} \times 100\%$$

1.2.3 对羟基苯甲醇对角叉菜胶或AA致大鼠足趾肿胀的影响 将大鼠随机分为2个大组,一组足趾皮下注射AA,另一组足趾皮下注射角叉菜胶,每个大组中的动物又分为5个小组,每组8只,分别为溶媒组(1%吐温-80),阳性对照组(地塞米松),对羟基苯甲醇高、中、低剂量组,单次给药后2 h,动物按分组分别于足趾皮下注射AA或角叉菜胶。炎症反应的强度以足爪肿胀体积作为评估指标,足爪肿胀体积以左后爪体积减右后爪体积计算。于注射后1 h、2 h、3 h、4 h各时间点将大鼠鼠爪浸入足趾容积测量仪的液体中,保持每次浸入的深度一致。根据液平面高度的增加值,溶剂测量仪将其自动转化为体积值。

2.1 对羟基苯甲醇对大鼠脑血栓形成的影响

结果显示,造模之后,肉眼可明显看出右侧脑半球染蓝,脑颅底部蓝染最深,左侧脑没有染蓝,说明造模成功。对羟基苯甲醇高、中剂量组均能显著降低栓塞区脑组织吸光度与同侧脑组织重量的比值,见表1。

2.2 对羟基苯甲醇对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响

结果显示, 对羟基苯甲醇高、中剂量能显著的抑制二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀, 见表 2.

2.3 对羟基苯甲醇对角叉菜胶致大鼠足趾肿胀的影响

结果显示, 注射角叉菜胶前 2 h 给予天麻苷元可以显著抑制鼠爪水肿, 其中对羟基苯甲醇高剂量

(20 mg/kg) 的平均抑制率为 42.56%, 其抑制作用可以持续 4 h, 见表 3.

2.4 对羟基苯甲醇对 AA 致大鼠足趾肿胀的影响

结果显示, 注射 AA 前 2 h 给予对羟基苯甲醇仅高剂量 (20 mg/kg) 在 1 h 及 2 h 时可显著抑制鼠爪水肿, 见表 4.

表 1 对羟基苯甲醇对大鼠脑血栓形成的影响 $[(\bar{x} \pm s), n = 8]$

Tab. 1 The effect of 4-hydroxybenzyl alcohol on cerebral thrombosis of rats $[(\bar{x} \pm s), n = 8]$

组别	剂量 (mg/kg)	左脑伊文思蓝吸光度 / 左脑重(g)	右脑伊文思蓝吸光度 / 右脑重(g)
溶媒组	1%吐温 -80	0.146 ± 0.008	0.325 ± 0.009
阿司匹林	30	0.147 ± 0.009	0.204 ± 0.006**
对羟基苯甲醇	20	0.142 ± 0.009	0.208 ± 0.004**
	15	0.148 ± 0.009	0.228 ± 0.006**
	10	0.148 ± 0.005	0.313 ± 0.012

与溶媒组比较, ** $P < 0.01$.

表 2 对羟基苯甲醇对小鼠耳廓肿胀的影响 $[(\bar{x} \pm s), n = 8]$

Tab. 2 The effect of 4-hydroxybenzyl alcohol on mouse ear edema induced by xylene $[(\bar{x} \pm s), n = 8]$

组别	剂量 (mg/kg)	右耳 - 左耳 (g)	抑制率 (%)
溶媒组	1%吐温 -80	0.0105 ± 0.0011	0.00 ± 0.00
阿司匹林	100	0.0027 ± 0.0012**	73.65 ± 9.12**
对羟基苯甲醇	30	0.0049 ± 0.0009**	60.01 ± 5.53**
	20	0.0072 ± 0.0007**	52.72 ± 3.42**
	15	0.0087 ± 0.0006**	45.00 ± 4.81**

与溶媒组比较, ** $P < 0.01$.

表 3 对羟基苯甲醇对角叉菜胶致大鼠足趾肿胀的影响 $[(\bar{x} \pm s), n = 8]$

Tab. 3 The effect of 4-hydroxybenzyl alcohol on rat metatarsal swelling induced by carageenan $[(\bar{x} \pm s), n = 8]$

分组	剂量(mg/kg)	1 h	2 h	3 h	4 h
溶媒组	1%吐温 -80	0.393 ± 0.090	0.634 ± 0.201	0.721 ± 0.189	0.884 ± 0.151
地塞米松	1	0.060 ± 0.033**	0.157 ± 0.100**	0.203 ± 0.135**	0.249 ± 0.159**
对羟基苯甲醇	20	0.212 ± 0.059**	0.352 ± 0.086**	0.589 ± 0.047*	0.699 ± 0.060**
	15	0.288 ± 0.059**	0.462 ± 0.101*	0.656 ± 0.101	0.772 ± 0.073
	10	0.325 ± 0.056*	0.539 ± 0.118	0.694 ± 0.089	0.826 ± 0.065

与溶媒组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 对羟基苯甲醇对 AA 致大鼠足趾肿胀的影响 $[(\bar{x} \pm s), n = 8]$

Tab. 4 The effect of 4-hydroxybenzyl alcohol on rat metatarsal swelling induced by AA $[(\bar{x} \pm s), n = 8]$

分组	剂量 (mg/kg)	1 h	2 h	3 h	4 h
溶媒组	1%吐温 -80	0.339 ± 0.035	0.414 ± 0.054	0.442 ± 0.067	0.485 ± 0.088
地塞米松	1	0.108 ± 0.033**	0.183 ± 0.057**	0.203 ± 0.062**	0.214 ± 0.044**
对羟基苯甲醇	20	0.199 ± 0.075**	0.301 ± 0.076*	0.372 ± 0.088	0.372 ± 0.096
	15	0.316 ± 0.072	0.333 ± 0.068	0.418 ± 0.104	0.427 ± 0.067
	10	0.269 ± 0.079	0.339 ± 0.060	0.412 ± 0.76	0.372 ± 0.055

与溶媒组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

脑血栓形成是缺血性脑卒中潜在的病理生理学基础^[4,5],近年来的研究认为,血小板异常活化在脑血栓形成及缺血性脑卒中发生发展过程扮演着重要的角色^[6],抗血小板治疗被推荐用于降低复发性脑卒中的风险^[7].课题组前期研究提示,天麻成分对羟基苯甲醇具有显著的抗 AA 诱导的家兔体外血小板聚集作用,本实验对其抗脑血栓形成作用进行了考察,结果显示,对羟基苯甲醇能够剂量依赖性降低 AA 诱导的大鼠实验性脑血栓形成.由于 AA 是炎症反应中细胞膜磷脂经磷脂酶 A2 代谢过程的重要产物,其可通过其代谢产物前列腺素类及白三烯类介导一系列的炎症反应,故本实验对对羟基苯甲醇的抗炎作用进行了探讨,在二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀反应实验中对羟基苯甲醇显示了显著的抑制作用,提示其具有抗炎作用,随后采用大鼠足趾注射 AA 或角叉菜胶的方法对对羟基苯甲醇的抗炎机制进行了初步探讨.大鼠足趾皮下注射 AA 可导致快速、持续的红肿,该动物模型对 LOX 的抑制剂具有相对的选择性,已经广泛应用于筛选评估新药是否具有 5-LOX 抑制作用^[8].而大鼠足趾皮下注射角叉菜胶常用于评估新药是否具有环氧合酶(COX)抑制作用^[9].结果显示,对羟基苯甲醇高、中、低剂量对大鼠足趾皮下注射角叉菜胶引起的足趾肿胀具有更为明显的抑制作用,其中对羟基苯甲醇高剂量(20 mg/kg)抑制作用可以持续 4 h,对足趾皮下注射 AA 引起的肿胀反应仅高剂量在注射 AA 后 1 h、2 h 具有抑制作用,中、低剂量作用不明显,提示对羟基苯甲醇可能主要是通过抑制 AA 的 COX 代谢途径而达到抗炎的作用,其深入机制有待进一步探讨.

[参考文献]

- [1] 林青,李秀芳,李文军,等.天麻提取物对血小板聚集的影响[J].中国微循环,2006,10(1):33-35.
- [2] 郭莹莹,林青,李秀芳.天麻成分抗花生四烯酸诱导的家兔体外血小板聚集活性研究云[J].云南中医学院学报,2012,35(5):1-3.
- [3] 郭莹莹,蒋石,林青,等.天麻中对羟基苯甲醇抗血小板聚集的作用及机制研究[J].时珍国医国药,2014,25(1):4-6.
- [4] 云宇,张燕斌,吴鹰,等.天麻醒脑胶囊对家兔血小板聚集和花生四烯酸诱导大鼠脑血栓形成的影响[J].天然产物研究与开发,2005,17(10):762-765.
- [5] ALBERS G W, AMARENCO P, EASTON J D, et al. Anti-thrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy [J]. Chest, 2004, 126 (3): 483S - 512S.
- [6] LUKASIK M, DWORACKI G, MICHALAK S, et al. Chronic hyper-reactivity of platelets resulting in enhanced monocyte recruitment in patients after ischemic stroke [J]. Platelets, 2012, 23(2): 132 - 142.
- [7] FURIE K L, KASNER S E, ADAMS R J, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association [J]. Stroke, 2011, 42(6): 227 - 276.
- [8] PICHAT P, ANGEL I, ARBILLA S, et al. Anti-inflammatory properties of mizolastine after oral administration on arachidonic acid-induced cutaneous reaction in the rat [J]. Drug Res, 1998, 48(2): 173 - 178.
- [9] PINHEIRO R M, CALIXTO J B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation [J]. Inflammation Res, 2002, 51 (12): 603 - 610.

(2014-06-20 收稿)