

## 滇龙胆不同部位提取物保肝抗炎作用的研究

沈磊<sup>1,2</sup>, 谢文波<sup>2</sup>, 王修波<sup>2</sup>, 张延婷<sup>2</sup>, 李会仙<sup>2</sup>, 李海峰<sup>1</sup>, 白丽<sup>3\*</sup>

(1. 大理大学药物研究所, 云南大理 671000; 2. 大理大学药学与化学学院, 云南大理 671000;  
3. 大理大学基础医学院, 云南大理 671000)

**摘要:** **目的** 比较滇龙胆根、茎、叶、花4个部位提取物的保肝抗炎作用。**方法** 用刀豆蛋白A致小鼠免疫性肝损伤模型比较滇龙胆4个部位提取物的保肝作用;用二甲苯致小鼠耳肿胀模型比较它们的抗炎作用。**结果** 滇龙胆各部位提取物能剂量依赖性地降低刀豆蛋白A致肝损伤小鼠血清中的谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性,减少其肝指数,减轻肝组织损伤,且叶和根的药效要优于茎和花;滇龙胆各部位提取物能剂量依赖性地减轻二甲苯致炎小鼠的耳肿胀程度,且叶和茎的抑制作用要优于花和根。**结论** 滇龙胆根和叶提取物有较好的保肝作用,叶和茎提取物有较好的抗炎作用。

**关键词:** 滇龙胆;根;茎;叶;花;刀豆蛋白A;二甲苯;保肝抗炎

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)04-0701-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.007

## Liver-protective and anti-inflammatory effects of extracts from different parts of *Gentiana rigescens*

SHEN Lei<sup>1,2</sup>, XIE Wen-bo<sup>2</sup>, WANG Xiu-bo<sup>2</sup>, ZHANG Yan-ting<sup>2</sup>, LI Hui-xian<sup>2</sup>, LI Hai-feng<sup>1</sup>,  
BAI Li<sup>3\*</sup>

(1. Institute of Materia Medica, Dali University, Dali 671000, China; 2. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China;  
3. College of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China)

**ABSTRACT: AIM** To compare liver-protective and anti-inflammatory effects of extracts from root, stem, leaf, and flower of *Gentiana rigescens*. **METHODS** The mouse model for the immunological liver injury induced by Concanavalin A, and mouse ear swelling model for inflammation caused by dimethylbenzene were used for the comparison of the liver-protective or anti-inflammatory effects of four parts individually. **RESULTS** Four aqueous extracts of *Gentiana rigescens* showed the dose-dependent decrease in the activity of ALT and AST in serum and liver index, and alleviation of hepatic tissue injury induced by Concanavalin A in mice. The effects of the extracts from the leaf and root were better than those from the stem and flower. These extracts presented dose-dependent inhibition against the ear swelling caused by dimethylbenzene in mice. The effects of the extracts from the leaf and stem were better than those from the flower and root. **CONCLUSION** Extracts from the root and leaf of *G. rigescens* have liver-protective effect, and parts from the stem and leaf have anti-inflammatory effect.

**KEY WORDS:** *Gentiana rigescens*; root; stem; leaf; flower; concanavalin A; dimethylbenzene; liver-protective and anti-inflammatory effects

收稿日期: 2016-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81102806);大理大学博士基金项目(KYBS201411);云南省教学质量与教学改革工程资助项目(云教高,2010,105号)

作者简介: 沈磊(1981—),男,博士,讲师,从事中药药理学研究工作。Tel: (0872) 2257412, E-mail: scort20009@163.com

\*通信作者: 白丽(1957—),女,博士,教授,从事医学微生物与免疫学研究工作。Tel: (0872) 2257104, E-mail: lbai@dali.edu.cn

滇龙胆 (*Gentiana rigescens* Franch.) 是云南道地药材, 属龙胆科龙胆属多年生草本植物, 别名坚龙胆、龙胆草、兰花根、青鱼胆等<sup>[1]</sup>, 临床上具有清热泻火、保肝、健脾、杀菌等作用<sup>[2-4]</sup>, 是龙胆泻肝片、龙胆注射液、苦胆草片等 180 多种中成药的原料。

随着对滇龙胆研究和开发的深入, 其资源需求量很大。中国药典中规定滇龙胆的药用部位为根及根茎, 而其地上部分在采收时废弃。为增加滇龙胆药用资源的利用率, 现在的很多研究都致力于探讨其地上部分代替地下部分入药的可能性。但是这些实验主要集中在对其活性成分含有量的比较上<sup>[5-6]</sup>, 而缺少药理学和临床方面的资料。因此, 本实验选用刀豆蛋白 A 致小鼠免疫肝损伤的模型和二甲苯致小鼠耳肿胀的炎症模型来比较滇龙胆各部位提取物的保肝抗炎作用, 初步探讨滇龙胆地上部位替代根入药的可能性, 为综合利用滇龙胆资源提供科学依据。

## 1 材料与仪器

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠, 雄性, 体质量 18 ~ 22 g, 昆明医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (滇) 2011-0004。

1.2 药物及试剂 开花期滇龙胆全草购自云南省临沧市云县药材公司, 经大理大学李海峰教授鉴定为龙胆科滇龙胆 (*Gentiana rigescens* Franch.)。联苯双酯滴丸 (浙江万邦药业公司产品, 批号 A02140807); 阿司匹林肠溶片 (湖南新汇制药股份有限公司产品, 批号 150208); 刀豆蛋白 A (ConcanavalinA, ConA) (Sigma 公司产品, 批号 089K2010); 谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20150401、20150406; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); EMP-168G 半自动生化分析仪 (深圳市思普电子科技有限公司); 台式高速冷冻离心机 (上海市离心机械所)。

## 2 方法

2.1 滇龙胆不同部位提取物的制备 将自然干燥后的滇龙胆全草分成根、茎、叶、花 4 个部位, 每个部位分别粉碎后制成粗粉, 加热水煎煮 6 次 (前 3 次各煮 2 h, 后 3 次各煮 1 h, 温度控制在 50 ~ 65 ℃), 合并水提液并过滤, 滤液减压浓缩成稠膏状, 冷冻干燥。干燥后的各部位提取物密封保

存。实验时, 用生理盐水配制成相应部位的混悬液。根据滇龙胆的人用量 [0.05 ~ 0.1 g/(kg · d)] 换算为小鼠用量约为 0.5 ~ 1 g/(kg · d), 之后经过预实验, 确定正式实验时给小鼠的药物剂量为 1、2 g/(kg · d)。

2.2 滇龙胆不同部位提取物对刀豆蛋白 A (ConA) 致小鼠免疫性肝损伤的作用<sup>[7]</sup> 取 110 只小鼠随机分为 11 组, 每组 10 只。分别为正常组, 模型组, 阳性药联苯双酯 (0.1 g/kg) 组, 滇龙胆根、茎、叶、花提取物 (1、2 g/kg) 组。联苯双酯组和滇龙胆根、茎、叶、花提取物组按 10 mL/kg 灌胃给药, 正常组和模型组等体积灌胃给予生理盐水, 1 次/d, 连续 7 d。除正常组外, 末次给药 1 h 后, 各组均尾静脉注射 ConA 15 mg/kg 造成肝损伤。于注射后 8 h, 对所有组的小鼠摘眼球取血, 静置 2 h 后, 于冷冻离心机 2 500 r/min 离心 10 min, 取血清, 参照试剂盒说明书在半自动生化分析仪上测定 ALT、AST 活性; 然后取肝脏称重, 计算肝指数 = 肝脏质量/小鼠体质量 × 100%; 之后取一部分肝脏左叶置于 10% 福尔马林固定, 做常规 HE 切片, 光镜下连续观察整个肝组织的病理学变化, 并进行病理指数评定。评分标准为: 整个肝组织无损伤病变记为“0”分; 偶见坏死细胞记为“1”分; 坏死细胞小于整个视野的 1/4 记为“2”分; 坏死细胞占整个视野的 1/4 ~ 1/2 记为“3”分; 坏死细胞占整个视野的 1/2 ~ 3/4 记为“4”分; 坏死细胞弥漫整个视野记为“5”分。

2.3 滇龙胆不同部位提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的作用<sup>[8]</sup> 取 110 只小鼠随机分为 11 组, 每组 10 只。分别为正常组, 模型组, 阳性药阿司匹林 (0.1 g/kg) 组, 滇龙胆根、茎、叶、花提取物 (1、2 g/kg) 组。阿司匹林组和滇龙胆根、茎、叶、花提取物组按 10 mL/kg 灌胃给药, 正常组和模型组等体积灌胃给予生理盐水, 1 次/d, 连续 7 d。除正常组外, 末次给药 1 h 后, 每只小鼠右耳前后两面涂 0.04 mL 二甲苯致炎, 左耳涂生理盐水作为对照。1 h 后脱臼处死小鼠, 剪下双耳。用直径为 8 mm 打孔器打下耳片, 称重, 以右耳减去左耳的质量差计算肿胀度 (mg)。

2.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料多组间差异比较使用 one-ANOVA 分析, 然后用 LSD 法计算 2 组间差异。计数资料组间差异比较使用非参数秩和检验。

### 3 结果

#### 3.1 滇龙胆不同部位提取物对 ConA 致肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性以及小鼠肝指数的影响

结果见表 1, 与正常组相比, 模型组血清中的 ALT、AST 活性和肝指数均明显升高, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 联苯双酯和滇龙胆各部位提取物的各剂量组均能显著降低 ALT 活性 ( $P < 0.01$ ), 其中, 使用 1 g/kg 剂量时降低 ALT 的能力为叶 > 根 > 花 > 茎, 而使用 2 g/kg 剂量时为根 > 叶 > 花 > 茎; 除了滇龙胆花提取物 1 g/kg 对

AST 水平影响不明显外 ( $P > 0.05$ ), 联苯双酯和滇龙胆各部位提取物的各剂量组均能显著降低 AST 活性 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 其中, 使用 1 g/kg 剂量时降低 AST 的能力为叶  $\approx$  根 > 茎 > 花, 而使用 2 g/kg 剂量时为根 > 叶 > 茎 > 花; 除了滇龙胆花提取物 1 g/kg 对肝指数影响不明显外 ( $P > 0.05$ ), 联苯双酯和滇龙胆各部位提取物的各剂量组均能显著降低肝指数 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 其中, 使用 1 g/kg 剂量时降低肝指数的能力为根 = 叶 > 茎 > 花, 使用 2 g/kg 剂量时为根 > 叶 > 茎 > 花。

表 1 滇龙胆不同部位提取物对 ConA 致肝损伤小鼠血清 ALT、AST 含有量和小鼠肝指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 1 Effects of extracts from different parts of *Gentiana rigescens* on ALT, AST in serum and liver index of mice with liver injury induced by ConA ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	提取部位	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	ALT/卡门氏单位	AST/卡门氏单位	肝指数/%
正常组	—	—	11.4 ± 3.4**	35.6 ± 20.8**	4.6 ± 0.2**
模型组	—	—	257.5 ± 48.4	195.4 ± 56.2	6.0 ± 0.7
联苯双酯组	—	0.1	71.7 ± 52.3**	81.3 ± 40.6**	5.0 ± 0.4**
	根	1	108.3 ± 45.4**	94.9 ± 43.4**	5.2 ± 0.3**
	2	83.1 ± 51.6**	76.8 ± 25.2**	5.0 ± 0.3**	
滇龙胆	茎	1	159.2 ± 42.5***	139.0 ± 64.8*	5.4 ± 0.4*
	2	144.8 ± 32.6** $\Delta\Delta$	115.9 ± 31.6** $\Delta$	5.3 ± 0.3**	
	叶	1	102.7 ± 45.1**	94.8 ± 29.6**	5.2 ± 0.4**
	2	91.5 ± 31.3**	84.5 ± 31.6**	5.1 ± 0.4**	
花	1	111.8 ± 51.6**	150.6 ± 61.7#	5.6 ± 0.4	
	2	93.2 ± 28.3**	135.7 ± 48.8* $\Delta$	5.5 ± 0.3**	

注: 1 卡门氏单位 = 0.482 IU/L; 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与滇龙胆根提取物组 1 g/kg 比较, #  $P < 0.05$ ; 与滇龙胆根提取物组 2 g/kg 比较,  $\Delta$   $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$

#### 3.2 滇龙胆不同部位提取物对 ConA 致肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

首先进行光镜下观察, 正常组肝小叶结构清晰, 肝细胞呈放射状排列, 整个视野未见炎细胞浸润; 模型组肝细胞肿大, 有空泡变性, 整个视野可见灶状、片状坏死, 坏死区大小不一; 相对于模型组, 联苯双酯和滇龙胆各部位提取物 2 g/kg 均能不同程度改善肝细胞的损伤。然后根据肝组织坏死程度进行病理指数评分。联苯双酯组和滇龙胆根提取物 2、1 g/kg 组, 叶提取物 2、1 g/kg 组, 茎提取物 2 g/kg 组和花提取物 2 g/kg 组的病理指数评分均显著低于模型组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 滇龙胆茎提取物 1 g/kg 组和花提取物 1 g/kg 组的病理指数评分较模型组也有下降, 但差异不明显 ( $P > 0.05$ )。使用 1 g/kg 剂量时减轻肝损伤的能力为根 > 叶 > 茎 > 花, 而使用 2 g/kg 剂量时为根 > 叶 > 花 > 茎。结果见表 2、图 1。

#### 3.3 滇龙胆不同部位提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

结果见表 3, 与正常组相比, 模型组的耳肿胀度明显增加, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 阿司匹林和滇龙胆各部位提取物的

#### 表 2 滇龙胆不同部位提取物对 ConA 致肝损伤小鼠肝组织病理指数评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Tab. 2 Effects of extracts from different parts of *Gentiana rigescens* on evaluation of pathology index of hepatic histology in mice with liver injury induced by ConA ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	提取部位	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	病理评分/分
正常组	—	—	0
模型组	—	—	4.0 ± 0.8
联苯双酯组	—	0.1	1.8 ± 0.8**
	根	1	2.1 ± 0.6**
	2	1.8 ± 0.7**	
滇龙胆	茎	1	3.0 ± 1.4
	2	2.8 ± 0.5* $\Delta$	
	叶	1	2.3 ± 0.8**
	2	2.3 ± 0.5**	
花	1	3.3 ± 0.9#	
	2	2.7 ± 0.6* $\Delta$	

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与滇龙胆根提取物组 1 g/kg 比较, #  $P < 0.05$ ; 与滇龙胆根提取物组 2 g/kg 比较,  $\Delta$   $P < 0.05$

各剂量组均能显著抑制耳肿胀度 ( $P < 0.01$  或  $P <$

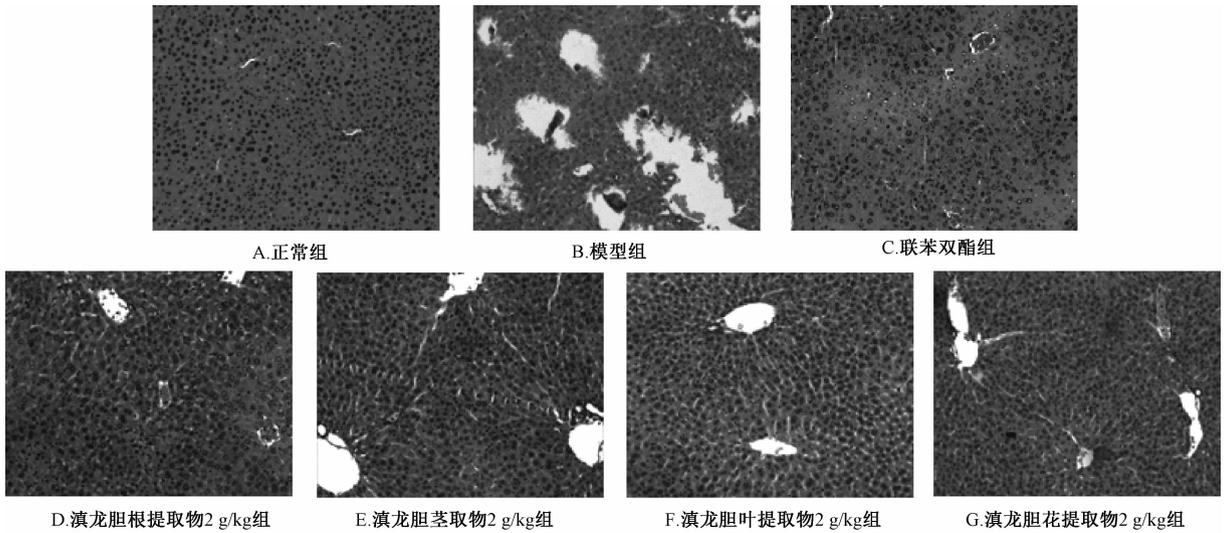


图1 滇龙胆不同部位提取物对 ConA 致肝损伤小鼠肝组织的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effects of extracts from different parts of *Gentiana rigescens* on hepatic tissue of mice with liver injury induced by ConA (HE, ×100)

0.05), 使用 1 g/kg 剂量时抑制耳肿胀的能力为叶 ≈ 茎 > 花 > 根, 而使用 2 g/kg 剂量时为叶 > 茎 > 花 > 根。

表3 滇龙胆不同部位提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 3 Effects of extracts from different parts of *Gentiana rigescens* on ear swelling in mice induced by xylene ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	提取部位	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	耳肿胀度/mg
正常组	—	—	0.23 ± 1.74 **
模型组	—	—	17.46 ± 3.87
阿司匹林组	—	0.1	4.50 ± 4.75 **
滇龙胆	根	1	13.21 ± 4.89 *
		2	11.06 ± 2.43 **
	茎	1	8.45 ± 2.90 **#
		2	7.15 ± 3.43 **△
	叶	1	8.32 ± 4.46 **#
		2	6.38 ± 3.18 **△
	花	1	12.02 ± 5.32 *
		2	9.63 ± 3.62 **

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与滇龙胆根提取物组 1 g/kg 比较, #  $P < 0.05$ ; 与滇龙胆根提取物组 2 g/kg 比较, △  $P < 0.05$

#### 4 讨论

滇龙胆发挥药理作用的主要成分为龙胆苦苷和龙胆碱。龙胆苦苷具有显著的保肝作用而龙胆碱主要的药效为抗炎、抑菌等, 因此我们重点比较了滇龙胆各部位提取物的保肝、抗炎作用。

本研究首先使用了 ConA 致小鼠免疫性肝损伤模型来评价滇龙胆的保肝作用。ConA 是一种对肝

细胞有特异毒性的植物凝集素, 其诱导的小鼠急性肝损伤能很好地模拟人类的病毒性肝炎、自身免疫性肝病等疾病的病理过程, 被认为适合用于筛选抗免疫性肝损伤的药物<sup>[9-11]</sup>。实验中, ConA 可导致血清 ALT 和 AST 活性的明显升高, 肝脏肿大, 且肝组织内可见大量灶状和片状坏死, 这些都是小鼠免疫性肝损伤的主要标志。在成功复制免疫性肝损伤的病理模型上, 本研究以药典中规定的药用部位一根为参照, 评价了滇龙胆各部位提取物的药效等同性。结果表明: 滇龙胆根、茎、叶、花 4 个部位的提取物都能剂量依赖性地降低肝损伤小鼠血清中升高的 ALT 和 AST 水平, 抑制肝肿大, 减轻 ConA 对肝组织造成的损伤, 其中, 根和叶对肝损伤的保护作用比较类似, 而要好于茎和花。本实验对滇龙胆各部位药效等同性评价的结果并不完全等同于其他研究者对滇龙胆中龙胆苦苷质量等同性的研究结果。有学者认为滇龙胆地上部位的龙胆苦苷与地下部位类似。如张琳等人<sup>[12]</sup>发现滇龙胆花的龙胆苦苷和獐牙菜苦苷含有量高于国家标准, 而类似于根中的含有量; 赵磊等人<sup>[13]</sup>发现滇龙胆地上部分的龙胆苦苷含有量类似于地下部分。而本实验结果表明: 尽管滇龙胆各部位龙胆苦苷的含有量比较类似, 它们的保肝还是存在差异, 要得到和根、叶类似的药效, 需增加茎和花的用药剂量。出现这种结果的可能是由于茎是输送养料的器官而不能存储养料, 花虽能存储养料但是花期较短, 活性成分较少。

然后本实验使用了二甲苯致小鼠耳肿胀的急性炎症模型来评价滇龙胆的抗炎作用。二甲苯通过扩张血管,增加血管通透性来增加炎性渗出<sup>[14]</sup>。该实验的结果表明:滇龙胆根、茎、叶、花4个部位的提取物能剂量依赖性地抑制小鼠耳肿胀,但是与保肝作用不同的是,叶和茎的抗炎作用要优于花和根。推测其可能是由于各部位所含龙胆碱含有量的差别造成的,但目前我们未查到对滇龙胆各部位龙胆碱含有量比较的报道,具体的原因还需进一步确定。

综上所述,对ConA所致的小鼠免疫性肝损伤的影响中,滇龙胆叶和根的保护作用要优于茎和花。而对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响中,滇龙胆叶和茎的抑制作用要优于花和根。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 89-90.

[2] Jia N, Li Y, Wu Y, et al. Comparison of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Gentiana macrophylla* Pall. and *Gentiana straminea* Maxim., and identification of their active constituents[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 144(3): 638-645.

[3] Lian L H, Wu Y L, Wan Y, et al. Anti-apoptotic activity of gentiopicroside in D-galactosamine/ lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(1): 127-133.

[4] 刘学伟, 曹敏, 刘树民. 龙胆碱的解热作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 24(11): 128-131.

[5] 赵磊, 李智敏, 白艳婷, 等. 滇龙胆地上部分的化学成分研究[J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(2): 27-31.

[6] 沈涛, 李远菊, 张霁, 等. 栽培滇龙胆药材不同极性部位紫外吸收光谱特征与判别分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 31-35.

[7] 邓利娟, 李湛军, 罗楹, 等. Caspase 抑制剂 F1013 对刀豆蛋白 A 诱导小鼠急性肝损伤的治疗作用[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(1): 136-139.

[8] 潘利明, 林励. 玉叶金花苷酸甲酯抗炎、镇痛、抑菌作用研究[J]. 中成药, 2015, 37(3): 633-636.

[9] 崔佳丽, 山丽梅, 张萍, 等. 大黄甘草汤对刀豆蛋白诱导肝损伤小鼠与腺嘌呤诱导肾损伤大鼠的保护作用[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1539-1542.

[10] 谭友文, 吴建成. 刀豆蛋白 A 诱导急性肝损伤的模型建立[J]. 江苏医药, 2009, 35(6): 702-704.

[11] 徐雪钰, 刘军, 于珊, 等. 灵五颗粒对刀豆蛋白 A 所致小鼠免疫肝损伤的保护作用[J]. 解放军药学报, 2011, 27(2): 113-117.

[12] 张琳, 罗智渊, 冯丽丽, 等. 滇龙胆花药材质量标准及品质评价的研究[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(16): 1451-1457.

[13] 赵磊, 李智敏, 杨俊, 等. 不同产地滇龙胆地上部分龙胆苦苷的含量测定[J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(5): 23-25.

[14] 余昕, 朱焯, 欧丽兰, 等. 鸭跖草抗炎活性部位筛选及抗炎机制[J]. 中成药, 2015, 37(8): 1824-1827.