

狼爪瓦松的提取工艺及其抗炎作用研究

Research on the Extraction Technology and Anti-inflammatory Effect of *Orostachys Fimbriatus*

滕晓梅

Xiaomei Teng

湖南农业大学 中国·湖南长沙 410128

Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan, 410128, China

摘要:目的: 探讨狼爪瓦松的最佳提取工艺及其提取物(WS)的抗炎作用。方法: 采用正交实验法, 以总黄酮为指标确定超声法最佳提取时间、温度、固液比; 通过角叉菜胶注射和二甲苯涂抹方法建立小鼠耳廓、足肿胀模型, 分别灌胃给予同等体积3种浓度WS和阿司匹林药物, 测量并计算各组小鼠耳廓和足的抑制率和足肿胀小鼠后足趾炎症因子PGE2的浓度; 分析WS对小鼠巨噬细胞RAW264.7经脂多糖(LPS)刺激后产生的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。结果: 超声提取温度60 $^{\circ}$ C, 固液比1:25, 提取时间30 min效果最佳, 总黄酮得率最高(1.01%); 阳性药阿司匹林和WS-2均显著抑制二甲苯和角叉菜胶诱导的小鼠耳肿胀、足肿胀及TNF- α 、PGE2水平($P < 0.01$), 且与阳性药效果接近。结论: 狼爪瓦松提取物在体内、外实验中均具有较佳的抗炎效果, 可为后期临床抗炎药物的研发提供一定的实验支持。

Abstract: Objective: To explore the optimum extraction technology of *Orostachys fimbriatus* and anti-inflammatory effect of its extract (WS). **Methods:** The method of orthogonal experiment was used to determine the optimum extraction time, temperature and solid-liquid ratio of ultrasonic method with total flavonoids as index. Establishment of mouse auricle and foot swelling model by carrageenan injection and xylene smear. The same volume of WS and aspirin were given by intragastric administration respectively. Then the inhibition rate of auricle and foot of mice in each group and the concentration of inflammatory factor PGE2 in hind toe of mice with foot swelling were measured and calculated. To analyze the effect of WS on tumor necrosis factor- α (TNF- α) produced by RAW264.7 stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Results:** The ultrasonic extraction temperature was 60 $^{\circ}$ C, the solid-liquid ratio was 1:25, the extraction time was 30 min, and the yield of total flavonoids was the highest (1.01%). Both aspirin and WS-2 significantly inhibited the ear swelling, foot swelling and the levels of TNF- α and PGE2 in mice induced by xylene and carrageenan ($P < 0.01$), and the effect was similar to that of positive drugs. **Conclusion:** The extract of *Orostachys fimbriatus* had better anti-inflammatory effect in vivo and in vitro, which could provide some experimental support for the research and development of clinical anti-inflammatory drugs in the later stage.

关键词: 狼爪瓦松; 提取工艺; 抗炎作用

Keywords: *Orostachys fimbriatus*; extraction process; anti-inflammatory effect

DOI: 10.12346/pmr.v4i5.7492

1 引言

狼爪瓦松(*Orostachys fimbriatus*)为景天科(Crassulaceae)瓦松属(*Orostachys*)2年生或多年生草本植物,其主要分布在中国辽宁、吉林、黑龙江等地^[1,2]。因其互生茎生叶,总状花序呈圆柱形且花瓣鲜艳白色,长有线状长圆

形的褐色种子,高可达35cm,常植于山坡、岩石园或屋顶,是一种颇具开发价值的野生花卉,具有较高的观赏应用价值^[3]。

研究表明,瓦松属植物具有较复杂的化学成分,其含有大量草酸以及酚酸类黄酮类、强心苷等多种活性物质。《中国药典》将瓦松列为正品,全草入药,具有解热祛湿、消

【作者简介】滕晓梅(2001-),女,苗族,中国湖南怀化人,本科,从事教育研究。

肿止血、清毒消疮等功效,临床多用其为原料开发于抗菌、消炎,抗肿瘤、强心等。目前已有以瓦松为原料的药剂,主要用于局部感染的外用治疗(治疗宫颈糜烂的常用药物)。目前有关狼爪瓦松抗炎作用及相关机制的研究报道较少。本研究在探究狼爪瓦松最佳提取工艺的同时,利用小鼠的耳廓、足肿胀模型和通过脂多糖(LPS)导致的小鼠巨噬细胞RAW264.7炎症模型,探究狼爪瓦松提取物的抗炎作用,为在抗炎药物的研发及临床抗感染治疗上提供一定的实验依据。

2 实验材料

2.1 药物

狼爪瓦松(2021年10月于黑龙江绥芬河流域采收);阿司匹林片(青海制药厂有限公司,批准文号:国药准字H63020201)。

2.2 试剂

角叉菜胶(上海吉至生化科技有限公司,批号:C91120-100g);二甲苯(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号:534056-20L);无水乙醇(AR,沈阳依莱普克斯化工有限公司,批号:R131);细菌内毒素(LPS,四川维克奇生物科技有限公司,批号:wkq-11809);DMEM培养基(广东环凯微生物科技有限公司,批号:XB01);ELISA试剂盒(江苏晶美生物科技,批号:2019-10)。

2.3 实验器材

超声波恒温水浴锅(上海声彦超声波仪器有限公司,型号:SCQ-HD300A);电子天平(奥豪斯仪器(上海)有限公司,型号:AEU120);高压灭菌锅(山东欧莱博医疗器械有限公司,型号:YX-600W);全自酶免分析仪LD-96B(山东莱恩德智能科技有限公司,型号:LD-96B)。

2.4 实验动物

选用SPF级质量18-22g的健康昆明种小鼠80只,雌雄各半(昆明楚商科技有限公司,合格证号:SCXK(滇)2021-0003),适应1周后,常规饲养。

3 实验方法

3.1 狼爪瓦松的最佳提取工艺

以70%乙醇以提取溶剂,选择超声温度、超声时间、固液比为试验因素,以总黄酮的率为指标,各取3次平行实验的平均值。采用亚硝酸钠-硝酸铝法,将提取液浓缩干燥,取适量用少量70%甲醇溶解后加入100mL容量瓶中,用70%甲醇定容后移取1mL制备液于25mL比色管。

3.2 抗炎实验

3.2.1 分组

选取80只健康的KM小鼠随机分为阿司匹林药物组(Y组250mg/kg)、受试药物组(WS-1(200mg/kg)、WS-2组(400mg/kg)、WS-3组(800mg/kg)和空白组(K组),

WS均浓缩至干膏(收率约为5%)。

3.2.2 二甲苯、角叉菜胶致小鼠耳廓、足肿胀实验肿胀试验

随机选取80只健康的昆明小鼠,雌雄各半且均分为5组:K组、Y组、WS-1组、WS-2组和WS-3组,每组8只。各组小鼠灌胃给予0.4mL的药物(除K组灌胃给予0.4mL生理盐水),一天一次且连续给药5d。其中40只小鼠在末次给药30min后,于小鼠右耳两面均匀涂布50 μ L二甲苯,60min后处死小鼠并用8mm的打孔器取下小鼠两耳对称处的耳片与电子天平分别称重,计算相对耳廓肿胀度[8]。相对耳廓肿胀度=空白组耳廓质量-给药组耳廓质量;末次给药1h后,采用1%角叉菜胶25 μ L注射其余40只小鼠右后足皮下,4h后处死小鼠并剪取小鼠两膝关节以下部位的后足与电子天平分别称重。相对足肿胀度=空白组足肿胀度-给药组足肿胀度。

4 统计学方法

数据使用SPSS 20.0统计学软件进行统计学处理,以($\bar{x} \pm s$)表示,采用One-way ANOVA分析符合正态分布的数据,不符合正态分布的数据采用秩和检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

5 结果

5.1 超声提取狼爪瓦松正交试验各处理的活性成分含量

以超声提取狼爪瓦松正交试验各实验组的总黄酮含量为参考依据,当提取时间30min,超声温度60 $^{\circ}$ C,固液比1:25时总黄酮得率为1.01%,得率最高,进而判断正交试验处理5为最佳工艺,即提取温度60 $^{\circ}$ C,提取时间30min,固液比1:25,结果见表1。

表1 超声提取狼爪瓦松正交试验各实验组的总黄酮含量

序号	温度/ $^{\circ}$ C	提取时间/min	固液比/ (v/v)	总黄酮得率/ %
1	50	20	1:20	0.59
2	50	30	1:25	0.86
3	50	40	1:30	0.88
4	60	20	1:20	0.67
5	60	30	1:25	1.01
6	60	40	1:30	0.96
7	70	20	1:20	0.66
8	70	30	1:25	0.93
9	70	40	1:30	0.75

5.2 二甲苯对小鼠耳廓的影响

K组的小鼠的耳廓的肿胀非常明显代表耳廓肿胀模型成功。与K组比较,各给药组对耳廓肿胀均能显著抑制($P < 0.01$);与Y组比较,WS-1组效果较差且有显著差

异 ($P < 0.01$), WS-2、3 无明显差异, WS-2 更接近阳性组, 结果见表 2。

表 2 狼爪瓦松提取物对小鼠耳廓肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量 (mg/kg)	肿胀度 (mg)
K	-	22.33 ± 3.21
Y	250	10.29 ± 3.73**
WS-1	200	15.30 ± 3.02** ^{△△}
WS-2	400	13.20 ± 4.47**
WS-3	800	14.10 ± 4.07**

注: 与 K 组比较, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; 与 Y 组比较, [△]表示 $P < 0.05$, ^{△△}表示 $P < 0.01$ 。

5.3 角叉菜胶对小鼠后足的影响

K 组小鼠足胀明显代表造模成功。与 K 组比较, 各给药组小鼠足肿胀程度均显著降低 ($P < 0.01$); 与 Y 组比较, WS-1、3 组效果较差且均有显著差异 ($P < 0.01$), 结果见表 3。

表 3 狼爪瓦松提取物对小鼠足肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量 (mg/kg)	肿胀度 (mg)
K	-	88.24 ± 15.77
Y	250	33.12 ± 6.76**
WS-1	200	60.11 ± 10.89** ^{△△}
WS-2	400	39.46 ± 11.81**
WS-3	800	58.72 ± 12.03** ^{△△}

注: 与 K 组比较, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; 与 Y 组比较, [△]表示 $P < 0.05$, ^{△△}表示 $P < 0.01$ 。

5.4 小鼠足趾 PGE2 检测结果

与 K 组比较, 各给药组小鼠足趾 OD 值均显著降低 ($P < 0.01$); 与 Y 组比较, WS-1、3 组小鼠足趾 OD 值均显著升高 ($P < 0.01$), 但是 WS-2 组小鼠足趾 OD 值无明显差异, 即 WS-2 效果与阳性药相当, 结果见表 4。

5.5 WS 对 LPS 刺激下 RAW264.7 细胞中 TNF- α 含量的影响

与 N 组相比, LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 TNF- α 分泌量显著上升 ($P < 0.01$); 加入三种不同浓度的 WS 药物后, RAW264.7 细胞产生的 TNF- α 含量显著下降 ($P < 0.01$), 且比 N 组 RAW264.7 细胞产生的 TNF- α 含量低且具有显著性差异 ($P < 0.01$), 表明 WS 对炎症因子 TNF- α 具有较强的抑制作用, 结果见表 5。

表 4 狼爪瓦松提取物对小鼠足趾 PGE2 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量 (mg/kg)	OD 值
K	-	0.338 ± 0.100
Y	250	0.098 ± 0.020**
WS-1	200	0.181 ± 0.060** ^{△△}
WS-2	400	0.109 ± 0.040**
WS-3	800	0.178 ± 0.040** ^{△△}

注: 与 K 组比较, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; 与 Y 组比较, [△]表示 $P < 0.05$, ^{△△}表示 $P < 0.01$ 。

表 5 WS 对 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TNF- α (ng/L)
N 组	712.30 ± 162.62
LPS 组	1462.10 ± 233.44**
WS 100+LPS 组	326.70 ± 124.40** ^{△△}
WS 200+LPS 组	215.60 ± 2.90** ^{△△}
WS 400 +LPS 组	258.30 ± 67.18** ^{△△}

注: 与 K 组比较, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; 与 Y 组比较, [△]表示 $P < 0.05$, ^{△△}表示 $P < 0.01$ 。

6 讨论

前期研究表明, 70% 乙醇作为提取剂有较高的浸提率, 超声波法作为提取方法有良好操作性。通过正交试验优化分析表明, 其最佳提取工艺为提取温度 60 °C, 提取时间 30min, 固液比 1 : 25, 在该工艺条件下的总黄酮收率高达 1.01%。即该超声波法在狼爪瓦松总黄酮提取方面具有提取时间短、固液比适中、耗能较低等特点。

综上所述, 超声法提取法可获得狼爪瓦松的有效抗炎成分, 为该药用于临床抗炎症治疗提供了理论依据, 也为狼爪瓦松进一步开发应用提供实验基础。

参考文献

- [1] 王子豪,姜莹,陈炜琪,等.长白山区3种瓦松属植物的群落生态特征[J].延边大学农学报,2021,43(4):22-27+68.
- [2] 关清文,朴炫春,孙雪,等.狼爪瓦松生物学特性研究[J].林业调查规划,2017,42(5):37-40.
- [3] 朴哲虎,全雪丽,金英花.长白山区狼爪瓦松花器结构初步观察[J].延边大学农学报,2017,39(2):47-52.