

基于消肿定痛功效的三七粉质量标志物研究*

韩彦琪^{1,2}, 李新^{1,2}, 王德勤³, 徐旭^{1,2}, 郭海彪³,
许浚^{1,2,4}, 张铁军^{1,2,4**}, 李楚源^{3**}

(1. 天津药物研究院/天津市中药质量标志物重点实验室 天津 300301; 2. 天津药物研究院/中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室 天津 300301; 3. 广州白云山和记黄埔中药有限公司 广州 510515;
4. 天津药物研究院/释药技术与药代动力学国家重点实验室 天津 300301)

摘要:目的 探究三七粉发挥消肿定痛功效的质量标志物。方法 首先,采用小鼠醋酸扭体实验,将ICR小鼠随机分成模型对照组、阳性对照阿司匹林组(0.12 g·kg⁻¹)、三七粉低(1.1 g·kg⁻¹)、中(2.2 g·kg⁻¹)、高(4.4 g·kg⁻¹)剂量组、三七总皂苷低(0.25 g·kg⁻¹)、中(0.5 g·kg⁻¹)、高(1.0 g·kg⁻¹)剂量组,连续给药3天每日1次,第3天给药1 h后腹腔注射1%醋酸溶液,记录15 min内扭体次数。进一步采用LPS诱导的小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7炎症模型,探讨三七粉中的三七总皂苷及14个代表性单体成分对细胞上清液中NO、TNF- α 和IL-6的含量影响。结果 实验表明,与模型组比较,三七粉及三七总皂苷中、高剂量组均能显著减少扭体反应次数($P<0.05$, $P<0.01$);三七总皂苷及14个化合物均能显著降低细胞上清液中NO、TNF- α 、IL-6含量($P<0.05$)。结论 三七粉具有良好的抗炎、镇痛作用,其发挥消肿定痛的药效物质基础可能为三七皂苷R1、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rg2、人参皂苷Rh1、人参皂苷Rd、人参皂苷Rg3、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rb2、人参皂苷Rb3、人参皂苷F2、人参皂苷Rk1、槲皮素、三七素。

关键词:三七粉 消肿定痛 镇痛 抗炎 质量标志物

doi: 10.11842/wst.20210615016 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

三七来源于五加科植物 *Panaxnotoginseng* (Burk.) F.H.Chen 的干燥根和根茎,又名田七,是我国传统名贵中药材,历代本草和各版《中华人民共和国药典》中均记载此中药,其性温,味甘、微苦,归肝、胃经,具有散瘀止血,消肿定痛的功效,主要用于咯血,吐血,衄血,便血,崩漏,外伤出血,胸腹刺痛,跌扑肿痛^[1]。《本草纲目》中记载:“三七近时始出,南人军中用为金疮要药,云有奇功”,《本草纲目拾遗》中记载:“人参补气第一,三七补血第一,味同而功亦等,故称人参三七,为中药中之最珍贵者”。现代研究发现,三七有效成分为三七总皂苷类成分,如三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rd、人参皂苷Re等,以

及三七素、黄酮类成分、挥发油成分等,其具有活血化瘀、止血、抗血栓等多种功效,目前已广泛应用于心脑血管系统、血液系统、神经系统以及免疫系统等临床治疗中^[2-5]。

除治疗内伤出血、瘀血外,三七还擅治疗跌打、金刃等外伤引起的瘀血肿痛,具有消肿、散瘀、止痛的功效,是中医伤科药物中的首选,为治疗跌打损伤的常用药^[6],著名的“云南白药”,即以之为主药。有研究者运用角叉菜胶、巴豆油、蛋清等各种致炎剂对小鼠和大鼠分别进行耳廓致炎处理和足部肿胀处理,通过三七干预后,发现其对各种致炎剂均有显著抗炎功效^[7]。

收稿日期:2021-06-15

修回日期:2021-12-13

* 广东省科技厅广东省重点领域研发计划(2020B111110002):中成药大品种复方丹参片上市后再评价,负责人:李楚源;国家自然科学基金委员会重点项目(81830111):基于“成分构成-靶标网络-生物效应”多维整合的中药质量标志物发现与确认,负责人:许海玉;国家中医药管理局国际合作司中医药国际合作专项(0610-2140NF020630):中国-德国中药与植物药创新研发国际合作基地,负责人:刘昌孝。

** 通讯作者:张铁军,研究员,主要研究方向:中药资源、中药质量;李楚源:教授级高级工程师,主要研究方向:中药有效成分和质量控制研究。

另外,三七中的三七总皂苷能有效抑制磷酸组胺、角叉菜胶诱导的大鼠踝关节肿胀,抑制炎症细胞增多和蛋白渗出,对急性炎症引起的毛细血管通透性升高、炎症渗出和组织水肿以及炎症后期肉芽组织增生也均有抑制作用^[8]。其作用机制可能与三七总皂苷阻止炎症细胞内游离钙水平的升高,抑制灌流液中磷脂酶A2的活性,减少地诺前列酮的释放有关^[9]。另有报道,三七总皂苷可以激动阿片肽样受体,对化学和热刺激引起的疼痛有一定的镇痛作用,且没有成瘾性^[10]。

虽然目前对三七抗炎镇痛药效有较多的报道,但对其药效物质基础的研究依旧比较欠缺,对其消肿定痛功效的质量标志物研究更是未见报道。因此本研究首先通过小鼠醋酸扭体实验评价三七粉及三七总皂苷的镇痛药效,进一步采用LPS诱导的小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7炎症模型,探讨三七粉中的三七总皂苷及14个代表性单体成分的抗炎作用,初步解析三七粉消肿定痛药效物质基础,明确质量标志物。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞

实验动物:ICR雄性小鼠,体质量18-22 g,斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,许可证号SCXK(京)2019-0010。

RAW264.7小鼠腹腔巨噬细胞系购于上海生科院。用含1%双抗和10%FBS的DMEM高糖培养基培养于37°C、5% CO₂的培养箱中,1-2天传代一次。

1.2 实验药物及试剂

三七粉由广州白云山和记黄埔提供,三七总皂苷(PNS)由实验室自制。14个标准品人参皂苷Rb1、人参皂苷Rb2、人参皂苷Rb3、人参皂苷Rd、人参皂苷F2、人参皂苷Rg3、人参皂苷Rk1、三七皂苷R1、人参皂苷Re、人参皂苷Rh1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rg2、三七素、槲皮素购自上海源叶生物科技有限公司,纯度HPLC≥98%。阿司匹肠溶片林购自拜耳医药;羧甲基纤维素钠(CMC-Na)购自天津市凯信化学工业有限公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、地塞米松购自美国Sigma公司;一氧化氮试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。

1.3 实验主要仪器

倒置显微镜(日本Olympus公司),酶标仪(德国Berthold公司),细胞培养箱(日本Olympus公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 三七粉及三七总皂苷对小鼠扭体法镇痛实验的影响

ICR小鼠80只,随机分为8组,对照组,三七粉低、中、高剂量组,三七总皂苷低、中、高剂量组,阳性药阿司匹林组。对照组给予0.5% CMC-Na悬液,三七粉低、中、高三个剂量组分别灌胃给予三七粉混悬液1.1 g·kg⁻¹、2.2 g·kg⁻¹、4.4 g·kg⁻¹,三七总皂苷低、中、高剂量组分别灌胃给予三七总皂苷0.25、0.5、1 g·kg⁻¹,相当于1.1、2.2、4.4g生药·kg⁻¹,阳性药组给予阿司匹林0.12 g·kg⁻¹,给药体积20 mL·kg⁻¹,每日给药1次,连续给药3天。第3天给药后1 h,小鼠腹腔注射1%醋酸溶液按0.2 mL/只,室温保持在28°C左右。

注射5 min后观察15 min内小鼠体态变化情况及发生扭体反应的次数,以腹部凹陷、臀部歪扭、身体扭曲、或抽胯为扭体一次的标准。记录扭体次数,统计分析各组差异。

1.4.2 三七总皂苷及化合物对RAW264.7细胞增值的影响

取对数生长期细胞,调整密度为2×10⁵个/mL,接均匀种于96孔板,37.5°C、5% CO₂培养过夜。按实验分组,空白对照组(Control)每孔加100 μL基础培养基,三七总皂苷给药组每孔加100 μL终浓度分别为0.8 μg·mL⁻¹、4 μg·mL⁻¹、20 μg·mL⁻¹、100 μg·mL⁻¹、500 μg·mL⁻¹的溶液,三七皂苷R1、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rg2、人参皂苷Rh1、人参皂苷Rd、人参皂苷Rg3、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rb2、人参皂苷Rb3、人参皂苷F2、人参皂苷Rk1、槲皮素、三七素给药组每孔加入100 μL终浓度为1 μmol·L⁻¹、10 μmol·L⁻¹、50 μmol·L⁻¹、100 μmol·L⁻¹的溶液,每组设3个复孔,DMSO浓度为1%。给药后于37.5°C、5% CO₂培养箱中培养24 h,弃上清,每孔加入120 μL MTS(每100 μL培养基加20 μL MTS),37°C、5% CO₂的环境下孵育1 h后490nm下读取吸光值,检测不同浓度三七总皂苷及单体化合物对细胞增殖的影响。

1.4.3 三七总皂苷及单体化合物对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的影响

取对数生长期细胞,以2×10⁵个/mL均匀接种于96

表1 三七粉及三七总皂苷对醋酸诱导小鼠扭体次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	扭体次数
三七粉	1.1	41.10±10.39
	2.2	32.10±8.74*
	4.4	25.40±7.88**
三七总皂苷	0.25	38.20±7.50
	0.5	33.40±7.69*
	1.0	30.50±7.93**
阳性药组	0.12	17.50±7.49**
对照组	-	43.80±11.18

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

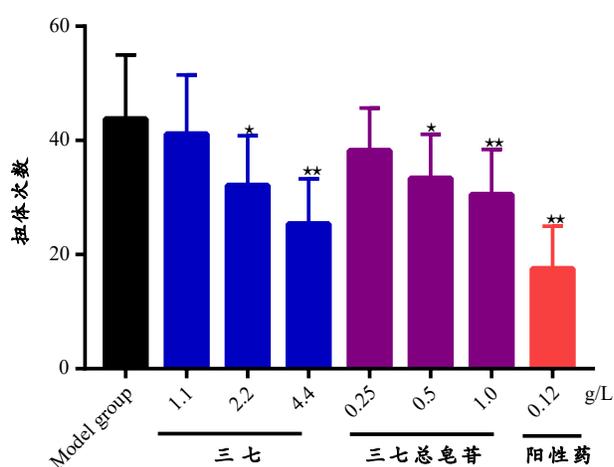


图1 三七粉及三七总皂苷对醋酸诱导小鼠扭体次数的影响

孔板,培养于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱,过夜。实验分空白组(control)、模型组、阳性药地塞米松组(Dex)、三七总皂苷给药组,空白组每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含 2% 血清的DMEM,模型组每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 终浓度为 $0.1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的LPS,阳性药组每孔加入终浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松和 $0.1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS的混合溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$,三七总皂苷给药组每孔加入终浓度为 $0.2\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 三七总皂苷及 $0.1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS的混合溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$,每组设3个复孔。

人参皂苷Rd、人参皂苷Rg3、人参皂苷F2、人参皂苷Rk1、槲皮素在 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药浓度下对细胞存活率有一定的影响,而在 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对细胞无毒性,因此以上5个单体化合物给药组每组加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 样品和 $0.1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的LPS混合溶液。MTS预实验中,三七皂苷R1、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rg2、人参皂苷Rh1、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rb2、人参皂苷

Rb3、三七素在 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药浓度下对细胞无毒性,因此以上9个化合物给药浓度设为 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每组3复孔,培养24 h后用ELISA方法对细胞上清液中的NO、TNF- α 、IL-6含量进行检测,步骤详见试剂盒说明书。

1.4.4 统计学处理

所有数据均使用GraphPad Prism 5软件进行统计处理,用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 三七粉及三七总皂苷对小鼠醋酸扭体的影响

2.1.1 小鼠体态变化情况

小鼠腹腔注射 1% 醋酸溶液后,均出现不同程度的体态变化。对照组小鼠腹痛症状最为严重。三七粉及三七总皂苷高剂量组小鼠表现为腹部连续抽搐、内凹,行动迟缓、蠕行,向后蹬腿,腹痛症状较轻。三七粉及三七总皂苷低剂量组小鼠的表现为抽搐剧烈,急躁不安,有闭眼现象,腹痛症状较为严重。由此推测,三七粉及三七总皂苷对醋酸引起的腹痛起到了一定的缓解作用。

2.1.2 小鼠扭体次数结果

由表1可知,阳性药阿司匹林组小鼠的扭体次数显著低于对照组($P < 0.01$)。小鼠灌胃给予三七粉3天,能够不同程度地减少小鼠扭体次数,与对照组比较, $2.2\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组、 $4.4\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组作用显著($P < 0.05$, $P < 0.01$);给予三七总皂苷3天,亦能够不同程度地减少小鼠扭体次数,与对照组比较, $0.5\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组、 $1\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组作用显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,高、中剂量的三七粉及三七总皂苷对醋酸所致的小鼠扭体反应有显著抑制作用,镇痛作用明显,且具有一定量效关系(图1)。

2.2 三七总皂苷及单体化合物对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的影响

2.2.1 三七总皂苷及14个化合物对细胞增值的影响

如图2所示,不同浓度三七总皂苷(PNS, $0.8\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $4\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $500\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)刺激RAW264.7细胞24 h后, $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $500\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组的细胞增殖率与空白对照组相比具有显著性差异($P < 0.001$),说明给药浓度过高,对细胞增

殖具有抑制作用,其余浓度无显著差异。故选取0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为后续三七总皂苷的给药浓度。

如图3所示,当不同浓度(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)的三七皂苷 R1 (N-R1)、人参皂苷 Re (G-Re)、人参皂苷 Rg1 (G-Rg1)、人参皂苷 Rg2 (G-Rg2)、人参皂苷 Rh1 (G-Rh1)、人参皂苷 Rb1 (G-Rb1)、人参皂苷 Rb2 (G-Rb2)、人参

皂苷 Rb3 (G-Rb3)、三七素 (Dencichine) 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后,各浓度组细胞增值率均大于 90% 且与空白对照组比较均无显著性差异($P<0.05$),说明以上 9 个单体化合物在 1-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 给药浓度范围内对细胞增殖无影响,属于安全给药范围。而人参皂苷 Rd (G-Rd, $P<0.05$)、人参皂苷 Rg3 (G-Rg3, $P<0.01$)、人参皂苷 F2 (G-F2, $P<0.001$)、槲皮素 (Quercetin, $P<0.01$) 的 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 给药组及人参皂苷 Rk1 (G-Rk1, $P<0.001$) 的 50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 给药组细胞增值率与空白对照组比较显著降低,因此以上 5 个化合物在后续实验中的最高给药浓度设为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 三七总皂苷对细胞 NO、TNF- α 和 IL-6 释放量的影响

三七总皂苷对 RAW264.7 细胞上清液中 NO、TNF- α 、IL-6 释放量的影响(图4),由图可知,LPS 刺激细胞后,细胞上清液中的 NO、TNF- α 、IL-6 表达量与空白对照组比较显著增强($P<0.001$),说明 LPS 诱导 RAW264.7 炎症模型建立成功。阳性对照地塞米松组(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)细胞上清液中 NO、TNF- α 、IL-6 的含

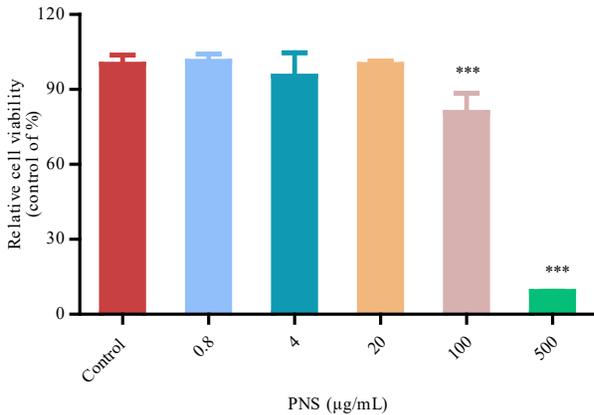


图2 不同浓度三七总皂苷给药24h后对细胞增殖的影响

注: $n=3, \bar{x} \pm s$. *** $P<0.001$ vs 空白组。

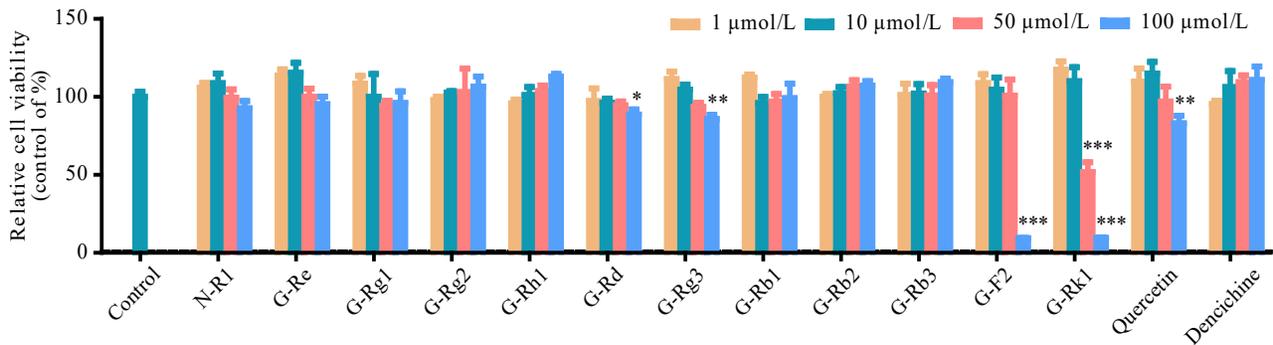


图3 不同浓度单体化合物给药24h后对细胞增殖的影响

注: $n=3, \bar{x} \pm s$. * $P<0.05$ vs 空白组; ** $P<0.01$ vs 空白组; *** $P<0.001$ vs 空白组。

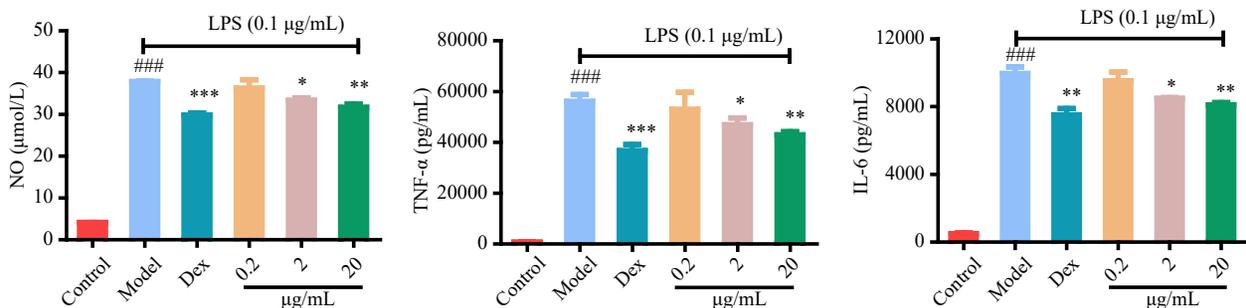


图4 三七总皂苷与LPS共孵育24h对Raw264.7细胞培养上清液中NO(A)、TNF- α (B)、IL-6(C)释放量的影响

注: $n=3, \bar{x} \pm s$. ### $P<0.001$ vs 空白组; * $P<0.05$ vs 模型组; ** $P<0.01$ vs 模型组; *** $P<0.001$ vs 模型组。

量与空白组比较有显著性降低($P<0.001, P<0.001, P<0.01$)。三七总皂苷高、中浓度组与模型对照组比较,能显著降低细胞上清液中的NO、TNF- α 、IL-6含量($P<0.05, P<0.01$),且表现出一定的浓度依赖性。

2.2.3 14个单体化合物对细胞NO、TNF- α 和IL-6释放量的影响

如图5所示,LPS刺激细胞后,与空白对照组比较,细胞上清液中的NO、TNF- α 、IL-6分泌量显著增加($P<0.001$),说明LPS诱导RAW264.7炎症模型建立成功。阳性药地塞米松组($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞上清液中NO、TNF- α 、IL-6的含量显著低于LPS组($P<0.001$)。

与模型组比较,G-Rd、G-Rg3、G-Rk1高浓度($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)以及G-Rg1、G-Rg2、G-Rb2、G-Rb3、三七素高浓度($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对NO有显著抑制作用($P<0.05$);G-F2和槲皮素在中($1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、高($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度以及N-R1、G-Re、G-Rh1、G-Rb1在高($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、中($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度对NO均有显著抑制活性($P<0.05$)。与模型组比较,G-Rd、G-F2、G-Rk1、G-Rg1、G-Rg2、G-Rb2、G-Rb3、三七素仅在高浓度给

药组对细胞上清中TNF- α 的含量有显著抑制作用($P<0.05$),其它化合物在高、中浓度给药组对TNF- α 的释放均有抑制作用。G-Rd、G-Rg3、G-Rk1、槲皮素、G-Rg2、G-Rb2、G-Rb3在高浓度给药组对IL-6的释放有显著抑制作用($P<0.05$),其它化合物在高、中浓度给药组对IL-6的释放均有抑制作用。

3 讨论

在基础医学研究中筛选镇痛药的常用致痛方法有物理法(热、电、机械)和化学法。化学法中采用腹腔注射乙酸可引起腹腔脏器出现化学性炎症,产生内脏痛,行为学表现为:腹部凹陷、后肢外伸。扭体实验操作简单,不需使用麻醉剂,行为学明显,且重复性好。因此本实验采用此模型评价三七粉和三七总皂苷的镇痛效果。已有研究发现^[1],三七总皂苷对化学性和热刺激性引起的疼痛均有明显的对抗作用,且三七总皂苷是一种阿片肽样受体激动剂、不具有成瘾的副作用;还可以显著抑制星形胶质细胞活化,减少其释放的促炎性因子和神经营养因子的释放,抑制痛觉过敏和中枢敏化。本实验研究发现,三七粉可剂量依

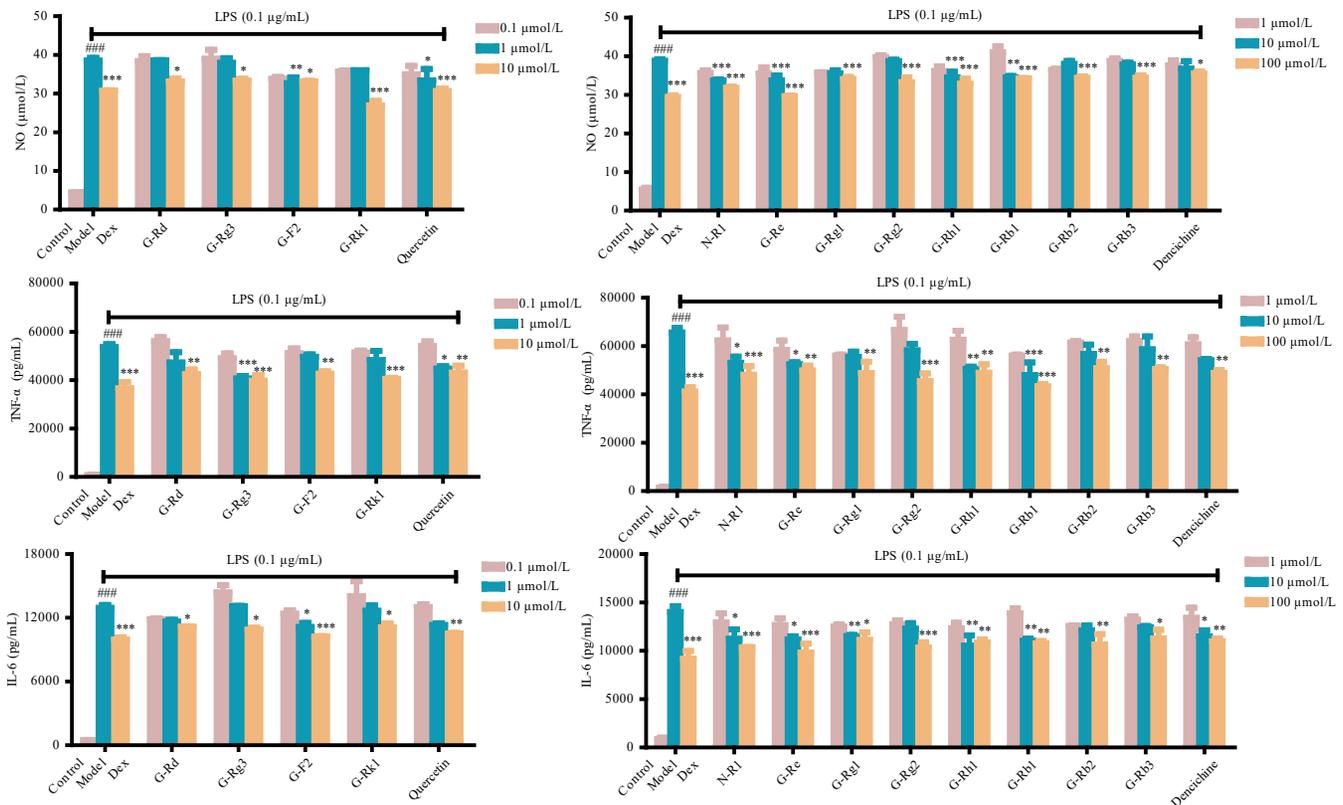


图5 单体化合物与LPS共孵育24h对Raw264.7细胞培养上清液中NO(A、B)、TNF- α (C、D)、IL-6(E、F)释放量的影响

注: $n=3, \bar{x} \pm s$ 。### $P<0.001$ vs 空白组; * $P<0.05$ vs 模型组; ** $P<0.01$ vs 模型组; *** $P<0.001$ vs 模型组。

赖性的降低醋酸诱导的小鼠疼痛反应,表现在降低小鼠的扭体产生次数。三七总皂苷为三七中富含皂苷成分的提取物,也可以剂量依赖性的降低小鼠扭体次数,表明三七总皂苷为三七镇痛的有效部位。

现代医学认为,软组织损伤的最初反应是炎症,消除炎症介质在抗炎过程中起到很重要的作用,而消除损伤伴随的疼痛也是临床治疗的重要方面^[12]。巨噬细胞生成于骨髓,为人体免疫系统主要反应细胞,可作为中心细胞启动炎症介质的产生,其具有吞噬外来物质、抗原呈递和免疫调节的作用^[13-14]。软组织损伤后,大量的炎症细胞如巨噬细胞、中性粒细胞等浸润到损伤的局部组织,并产生导致持久炎症和参与疼痛

传输的大量炎症细胞因子,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6及PGE2等^[15-16]。TNF- α 具有很强的炎症损伤作用,具有对IL-1 β 、IL-6等的协调和调节作用;IL-6是由TNF- α 、IL-1 β 刺激后产生,主要由T、B细胞与单核巨噬细胞分泌,能促进中性粒细胞活化和聚集,血清中IL-6水平可反映组织损伤的程度。所以通过控制TNF- α 、IL-6等的产生,可以有效抑制炎症的发展^[17-19]。NO是介导炎症反应的关键因子,可杀灭侵入机体的病原微生物,维持机体正常的免疫防御功能。少量的NO是维持正常细胞功能必不可少的物质,然而研究表明LPS、细胞因子等刺激因子能诱导单核巨噬细胞高表达一氧化氮合成酶(iNOS)从而合成过量

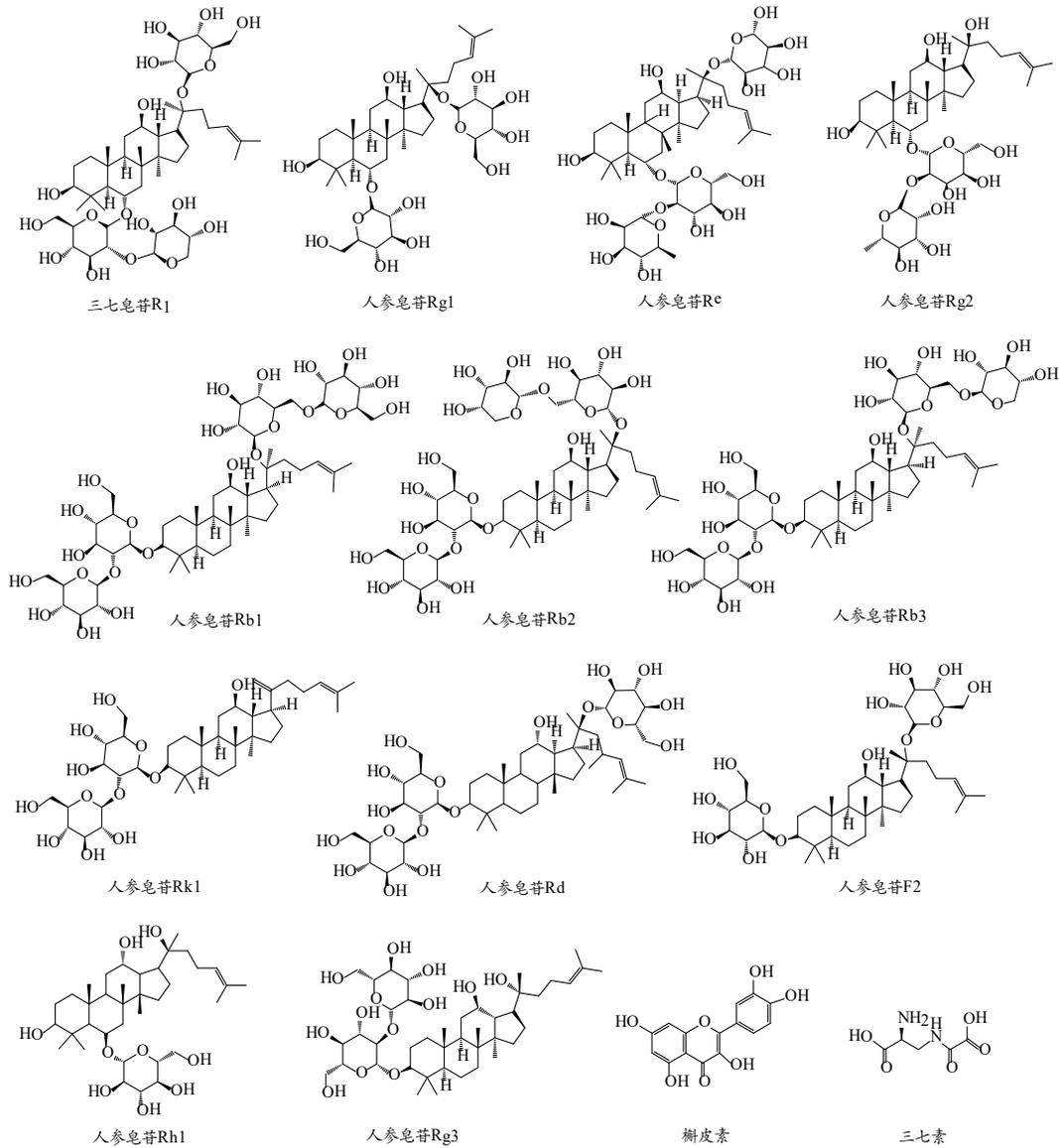


图6 14个化合物结构式

的NO,造成细胞毒性和组织损伤等一系列炎症反应^[20-23]。因此,本实验以LPS诱导的小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7炎症模型对三七总皂苷及14个关键化学成分(包括原人参三醇型:三七皂苷R1、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rg2、人参皂苷Rh1;原人参二醇型:人参皂苷Rd、人参皂苷Rg3、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rb2、人参皂苷Rb3、人参皂苷F2、人参皂苷

Rk1;黄酮类:槲皮素以及氨基酸类:三七素)进行了体外抗炎活性评价。结果表明,三七总皂苷及14个化合物能显著降低LPS诱导的RAW264.7细胞上清液中NO、TNF- α 和IL-6的含量,显示较好的抗炎效果,推测以上14个化合物(结构式见图6)可能为三七粉发挥消肿定痛作用的关键药效物质基础,可作为三七粉消肿定痛功效的质量标志物。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 2020. 10.
- 2 刘耀晨, 张铁军, 郭海彪, 等. 三七的研究进展及其质量标志物预测分析. 中草药, 2021, 52(9):2733-2745.
- 3 王小其. 中药三七对血液系统的药理药效研究进展. 山西医药杂志, 2020, 49(10):1231-1233.
- 4 项昌培, 周瑞, 张毅, 等. 三七中皂苷类成分及其抗脑缺血分子机制研究进展. 中国中药杂志, 2020, 45(13):3045-3054.
- 5 黄周艳, 刘政君, 陈勇, 等. 三七黄酮研究进展. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1):81-84.
- 6 消肿止痛, 止血散瘀——三七. 开卷有益-求医问药, 2020(6):71.
- 7 李青融, 王子好. 三七总皂苷药理作用的研究进展. 湖南中医杂志, 2017, 9(33):216-218.
- 8 陈非. 活血化痰中药组方预防盆腔粘连机理研究. 首都医药, 2010, 17(24):36-37.
- 9 于慧妍. 三七研究进展. 世界最新医学信息文摘, 2017, 39(17):21-22.
- 10 蔡琳, 彭鹏. 三七药理作用的研究进展. 山东化工, 2021, 3(50):70-71.
- 11 杨帆, 刘红, 万炜. 三七总皂苷对大鼠扭体模型的镇痛作用. 中医临床研究, 2014, 6(9):70-71.
- 12 姜慧婷, 杨婉花, 陈冰, 等. 伸筋活血合剂抗炎镇痛和治疗软组织损伤作用的研究. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10):269-272.
- 13 Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9):6425-6440.
- 14 Verschoor C P, Puchta A, Bowdish D M. The macrophage. *Methods Mol Biol*, 2012, 844:139-156.
- 15 侯本祥. 内毒素诱导单核-巨噬细胞产生细胞因子的作用机理. 国外医学. 口腔医学分册, 1997, 24(4):201-204.
- 16 Moudgil K D, Choubey D. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(10):695-703.
- 17 Floege J, Lüscher B, Müller-Newen G. Cytokines and inflammation. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91(6-7):427.
- 18 Cavaillon J M. Cytokines in inflammation. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1995, 189(4):531-544.
- 19 Savale L, Tu L, Rideau D, et al. Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res*, 2009, 10(1):6-12.
- 20 Cinelli M A, Do H T, Miley G P, et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*, 2020, 40(1):158-189.
- 21 Lind M, Hayes A, Caprnda M, et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93:370-375.
- 22 Wang X, Gray Z, Willette-Brown J, et al. Macrophage inducible nitric oxide synthase circulates inflammation and promotes lung carcinogenesis. *Cell Death Discov*, 2018, 4:46.
- 23 谢斌, 吴蓓, 欧阳辉, 等. 杏香兔耳风中5种单体对LPS诱导RAW264.7细胞内NO生成的影响. 江西中医药, 2015, 12(46):60-62.

Study on the Quality Markers of *Panax Notoginseng* Powder for Reducing Swelling and Relieving Pain

Han Yanqi^{1,2}, Li Xin^{1,2}, Wang Deqin³, Xu Xu^{1,2}, Guo Haibiao³, Xu Jun^{1,2,4}, Zhang Tiejun^{1,2,4}, Li Chuyuan³

(1. Tianjin Key Laboratory of Quality Markers for Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China; 2. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China; 3. Guangzhou Baiyun Mountain and Hutchison Whampoa

Ltd., Guangzhou 510515, China ;4. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China)

Abstract: Objective To explore the quality markers of *Panax Notoginseng* powder for reducing swelling and relieving pain. Methods ICR mice were randomly divided into model control group, positive control aspirin group ($0.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), low ($1.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium ($2.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high ($4.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) dosage groups of *Panax Notoginseng* powder, and low ($1.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium ($2.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high ($4.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) dosage groups of *Panax Notoginseng* saponins. The mice were administered once a day for 3 days, and 1% acetic acid solution was injected intraperitoneally 1 hour after administration on the third day. The twisting times in 15 minutes were recorded. Furthermore, LPS-induced mouse peritoneal macrophage RAW264.7 inflammatory model was used to investigate the effects of total saponins and 14 representative compounds in *Panax Notoginseng* powder on the contents of NO, TNF- α and IL-6 in cell supernatant. Results Compared with the model group, medium and high dose groups of *Panax Notoginseng* powder and *Panax Notoginseng* saponins medium could significantly reduce the number of writhing reactions ($P<0.05$, $P<0.01$). The *Panax Notoginseng* saponins and 14 representative compounds could significantly reduce the content of NO, TNF- α and IL-6 in cell supernatant ($P<0.05$). Conclusion *Panax Notoginseng* powder has good anti-inflammatory and analgesic effects. The material basis of its reducing swelling and relieving pain effect may be notoginsenoside R1, ginsenoside Re, ginsenoside Rg1, ginsenoside Rg2, ginsenoside Rh1, ginsenoside Rd, ginsenoside Rg3, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rb2, ginsenoside RB3, ginsenoside F2, ginsenoside RK1, quercetin and dencichine.

Keywords: *Panax Notoginseng* powder, Reducing swelling and relieving pain, Abirritation, Anti-inflammation, Quality marker

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)