

清温消热饮对小鼠 LPS 致炎模型血清中炎性因子的影响

赵婵娟

(重庆三峡职业学院动物科技系, 重庆 404155)

[收稿日期] 2016-11-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 01-0041-05 [中图分类号] S853.74

[摘要] 为了解促炎、抗炎细胞因子在小鼠 LPS 致炎模型中的动态变化,探讨中药方剂清温消热饮的抗炎治疗作用,采用酶联免疫法测定 112 例用 LPS 致小鼠急性炎症模型治疗过程中血清中促炎因子(TNF- α 、IL-1 β 、PGE2)、抗炎因子(IL-10)含量。与 LPS 致小鼠急性炎症模型组比较:清温消热饮组在 18、24 h 血清中 IL-1 β 含量明显降低,差异显著($P < 0.05$);清温消热饮组在 6、12、18 h 血清中 TNF- α 含量明显降低,6、18 h 差异显著($P < 0.05$),12 h 差异极显著($P < 0.01$);清温消热饮组血清中的 PGE2 含量均低于模型组,在 6、18、24、36 h 时血清中的 PGE2 含量明显降低,差异极显著($P < 0.01$);清温消热饮组在 18、48 h 血清中 IL-10 含量明显升高,差异极显著($P < 0.01$)。同时,清温消热饮组与地塞米松组在各时间段血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、PGE2 含量无显著差异($P > 0.05$)。结果表明,清温消热饮在急性炎症模型中能有效降低血清促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、PGE2 含量水平,提升抗炎因子(IL-10)含量水平以表现出明显的抗炎作用。

[关键词] 炎性细胞因子;清温消热饮;小鼠;LPS 致炎模型

Effect of a Traditional Chinese Prescription Drug Qingwen Xiaore Yin on Serum Inflammatory Factors in LPS-induced Inflammatory Model

ZHAO Chan-juan

(Department of Animal Science and Technology, Chongqing Three Gorges Polytechnic College, Chongqing 404155, China)

Abstract: This work aims to investigate the dynamic changes of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-induced inflammatory models in mice and explore the anti-inflammatory effect of a traditional Chinese prescription drug named Qingwen Xiaore Yin. ELISA was used to detect the contents of serum pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , PGE2) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) in 112 acute inflammatory models in mice induced by LPS. Compared to LPS-induced acute inflammatory model group, the contents of pro-inflammatory cytokines in the serum of Qingwen Xiaore Yin group dramatically decreased. Specifically, IL-1 β decreased at 18 and 24 h ($P < 0.05$), TNF- α decreased at 6 h ($P < 0.05$), 12 h ($P < 0.01$) and 18 h ($P < 0.05$), while PGE2 decreased at 6, 12 and 18 h ($P < 0.01$). On the contrary, the

基金项目: 重庆市市教委科技项目(KJ1503408);万州区区科委科技项目(201501023)

作者简介: 赵婵娟,硕士,讲师,执业兽医师,从事中兽医学及动物药理学临床方面研究。E-mail: zhaochanjuan@qq.com

content of serum IL - 10 in the Qingwen Xiaore Yin group significantly increased at 6, 18, 24 h, and 36 h ($P < 0.01$). Additionally, no significant difference was observed on the contents of TNF - α , IL - 1 β , IL - 10, and PGE2 between the Qingwen Xiaore Yin group and the dexamethasone group ($P > 0.05$). Qingwen Xiaore Yin can effectively decrease the levels of serum pro - inflammatory cytokines and enhance the level of anti - inflammatory factor in the acute inflammatory models, thus demonstrating recognizable anti - inflammatory effect.

Key words: inflammatory cytokines; Qingwen Xiaore Yin; mice; LPS - induced inflammatory model

清温消热饮方由清营汤改良,由石膏、知母、金银花等多种药物组成。在前期临床使用中,表现出良好的抗炎镇痛治疗效果^[1]。炎症为医学和兽医学临床常见病症。1988年,Rinderkecht等提出了“炎症介质学说”认为:白细胞释放的大量细胞因子形成复杂的炎症级联反应,导致系统炎症反应的发生。大量的研究表明,细胞因子(cytokines)包括TNF - α 、IL - 10、IL - 1等在急性炎症的发病过程中起到极其重要的作用。研究炎症因子可作为评价预测炎症严重程度的重要指标,因此,血清炎性细胞因子水平的变化可以在一定程度上反映药物的治疗效果。

为更进一步的研究清温消热饮抗炎镇痛的药效活性及作用机制,本试验通过LPS诱导产生小鼠急性炎症模型,研究该药通过血清促炎因子(TNF - α 、IL - 1 β 、PGE2)、抗炎因子(IL - 10)等介导抗炎作用的机制,为清温消热饮进一步研究奠定基础。

1 材料

1.1 试验动物 SPF级健康昆明系小鼠,体重18~22 g,雌雄各半,购自重庆市中药研究院试验动物研究所,许可证号:SCXK(渝)2015-0037。实验动物适应环境饲养7 d,环境要求温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度保持(55 ± 5)%,饲养期间饮水、采食自由,所有条件均严格按照实验动物相关要求执行。

1.2 药物 清温消热饮方中石膏、知母、金银花等中药材购于重庆市万州区全宏药店,并经重庆三峡职业学院动物科技系中兽医药教研室具有中药鉴定师资格的教师鉴定。按文献方法制备试验制剂:取石膏先行煎煮30 min,然后将知母、金银花、甘草

等药混合,煎煮3次合并煎液,浓缩至500 mL。加4%明胶搅拌至无沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置24 h,过滤,取滤液。加无水乙醇使含醇量分别达65%、4 $^{\circ}\text{C}$ 静置24 h,离心过滤,取滤液于旋转蒸发仪中,挥发乙醇至无醇味。加无水乙醇使含醇量分别达75%、85%后,重复上述步骤。滤液加活性炭1.5 g,45 $^{\circ}\text{C}$,静置30 min,过滤,调节pH值至7.0,定容至含生药1 g/mL,高压灭菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[2-3]。

1.3 主要试剂 地塞米松磷酸注射液(湖北天药药业,批号:51409222)规格5 mg/ml、脂多糖(LPS, Sigma公司,美国,批号:201506),小鼠TNF - α 、IL - 1 β 、IL - 10、PGE2试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司(批号:201510)。

2 方法

2.1 LPS致小鼠急性炎症模型 112只SPF小鼠随机分成4个组,即阴性对照组、炎症模型组(以下简称模型组)、清温消热饮组、地塞米松组。模型组、清温消热饮组、地塞米松对照组按照0.2 mL/10 g体重进行腹腔注射LPS剂量,阴性对照组腹腔注射等量的灭菌生理盐水。造模后:给药组按照0.1 mL/10 g采用灌胃给药,在0 h、4 h进行两次灌服;阴性对照组和模型组以灭菌蒸馏水(等容积)灌服。

2.2 样本采集及处理 分别于致炎后6、12、18、24、32、64、72 h,采用摘眼球取血,血样室温放置30 min后3000 r/min离心10 min,分离血清,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。按照试剂盒说明的方法检测血清TNF - α 、IL - 1 β 、IL - 10、PGE2含量水平。

2.3 统计学分析 采用SPSS19.0统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示,组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 清温消热饮对 LPS 致急性炎症模型小鼠血清中 TNF-α 含量水平的影响 根据试验结果可以得出造模后各组中小鼠血清中 TNF-α 含量均有不同程度的升高。模型组 12 h 时达到峰值,与阴性对照组比较差异极显著($P<0.01$),随后含量逐步降低。与模型组比较,清温消热饮组、地塞米松

组在各时间点血清中的 TNF-α 含量均低于模型组,在 6、18 h 时清温消热饮组血清中的 TNF-α 含量显著低于模型组($P<0.05$) 在 12 h 时清温消热饮组血清中的 TNF-α 含量极显著低于模型组($P<0.01$),清温消热饮组与地塞米松组在各时间段血清中 TNF-α 含量无显著差异($P>0.05$)。结果详见表 1。

表 1 清温消热饮对 LPS 致急性炎症模型小鼠血清 TNF-α 含量水平的影响				单位:ng/L
组别	阴性对照组 (n = 14)	模型组 (n = 14)	清温消热饮组 (n = 42)	地塞米松组 (n = 42)
时间				
6 h	554.27 ± 48.82	1059.04 ± 36.67A	946.18 ± 52.68Ab	951.69 ± 26.47Ab
12 h	563.25 ± 39.70	1122.21 ± 58.87A	989.22 ± 39.94AB	980.32 ± 24.42Ab
18 h	603.13 ± 38.03	956.22 ± 38.61A	831.28 ± 63.80Ab	843.52 ± 39.30Ab
24 h	593.68 ± 37.30	823.28 ± 36.51A	801.13 ± 43.28A	767.52 ± 47.91Ab
36 h	570.37 ± 19.00	785.13 ± 15.24A	639.32 ± 43.14	623.18 ± 19.34
48 h	604.86 ± 65.39	623.02 ± 13.31	607.13 ± 19.92	614.31 ± 33.31
72 h	614.16 ± 35.90	598.15 ± 27.38	573.15 ± 28.32	582.13 ± 34.90

与阴性对照组比较 A($P<0.01$)、a($P<0.05$)与模型组比较 B($p<0.01$)、b($p<0.05$)

3.2 清温消热饮对 LPS 致急性炎症模型小鼠血清中 IL-1β 含量水平的影响 根据试验结果可以得出造模后各组中小鼠血清中 IL-1β 含量均有不同程度的升高。与模型组比较,清温消热饮组血清中

IL-1β 含量均低于模型组,12 h 差异极显著($P<0.01$),18、24 h 差异显著($P<0.05$)。清温消热饮组和地塞米松组各时间段血清中 IL-1β 含量无显著差异($P>0.05$)。结果详见表 2。

表 2 清温消热饮对 LPS 致急性炎症模型小鼠血清 IL-1β 含量水平的影响				单位:ng/L
组别	阴性对照组 (n = 14)	模型组 (n = 14)	清温消热饮组 (n = 42)	地塞米松组 (n = 42)
时间				
6 h	78.48 ± 3.38	83.60 ± 4.58	81.60 ± 4.58	83.33 ± 1.53
12 h	77.60 ± 2.94	108.71 ± 6.02A	91.31 ± 8.15B	91.56 ± 9.64ab
18 h	77.63 ± 3.22	105.71 ± 10.56A	83.35 ± 5.68b	85.80 ± 12.44b
24 h	83.64 ± 5.81	100.71 ± 12.57ba	84.85 ± 8.85Ab	90.47 ± 6.02b
36 h	79.41 ± 4.66	81.62 ± 10.19	80.85 ± 6.79	80.47 ± 4.49
48 h	75.08 ± 2.67	77.96 ± 2.00	76.47 ± 4.57	76.47 ± 5.44
72 h	76.31 ± 4.72	80.11 ± 3.35	79.52 ± 5.43	77.43 ± 8.78

与阴性对照组比较 A($p<0.01$)、a($p<0.05$)与模型组比较 B($p<0.01$)、b($p<0.05$)

3.3 清温消热饮对 LPS 致急性炎症模型小鼠血清中 PGE2 含量水平的影响 根据试验结果可以得出造模后各组中小鼠血清中 PGE2 含量均有不同程度的升高 18 h 时达到峰值,与阴性对照组比较差异极显著($P<0.01$)。与模型组比较,清温消热

饮组、地塞米松组在 6、18、24、36 h 时血清中的 PGE2 含量均低于模型组($P<0.01$)。清温消热饮组与地塞米松组在各时间段血清中 PGE2 含量无显著差异($P>0.05$)。结果详见表 3。

表3 清温消热饮对 LPS 致急性炎症模型小鼠血清中 PGE2 含量水平的影响

单位:ng/L

组别 时间	阴性对照组 (n = 14)	模型组 (n = 14)	清温消热饮组 (n = 42)	地塞米松组 (n = 42)
6 h	356.24 ± 20.79	562.71 ± 35.61A	407.02 ± 52.63AB	409.48 ± 3.95AB
12 h	362.91 ± 20.66	614.28 ± 56.71A	514.90 ± 42.88A	491.32 ± 86.53aB
18 h	376.24 ± 6.00	713.69 ± 26.77A	554.31 ± 18.54AB	532.65 ± 54.50AB
24 h	306.37 ± 5.87	657.05 ± 28.94A	517.64 ± 16.58AB	479.72 ± 19.46AB
36 h	328.37 ± 12.07	560.39 ± 15.17A	472.41 ± 24.37AB	425.18 ± 14.81AB
48 h	348.77 ± 9.69	360.39 ± 6.77	347.87 ± 7.67	342.65 ± 6.13a
72 h	344.37 ± 2.82	345.72 ± 6.61	351.20 ± 3.32	352.65 ± 11.25

与阴性对照组比较 A($P < 0.01$)、a($P < 0.05$)与模型组比较 B($P < 0.01$)、b($P < 0.05$)

3.4 清温消热饮对 LPS 致急性炎症模型小鼠血清中 IL-10 含量水平的影响 根据试验结果可以得出造模后各组中小鼠血清中 IL-10 含量均有不同程度的升高,极显著高于阴性对照组 ($P < 0.01$)。与模型组比较,清温消热饮组、地塞米松组在各时

间点血清中的 TNF- α 含量均高于模型组,在18 h、48 h 时清温消热饮组血清中的 IL-10 含量极显著高于模型组 ($P < 0.01$),清温消热饮组与地塞米松组在各时间段血清中 IL-10 含量无显著差异 ($P > 0.05$)。结果详见表 4。

表4 清温消热饮对 LPS 致急性炎症模型小鼠血清中 IL-10 含量水平的影响

单位:pg/mL

组别 时间	阴性对照组 (n = 14)	模型组 (n = 14)	清温消热饮组 (n = 42)	地塞米松组 (n = 42)
6 h	642.36 ± 4.11	698.28 ± 1.15	664.54 ± 74.87	703.33 ± 6.04
12 h	687.69 ± 35.09	1049.44 ± 40.55A	699.12 ± 15.15A	1192.59 ± 24.08
18 h	681.17 ± 33.41	1049.03 ± 50.30A	1338.68 ± 46.98AB	1306.02 ± 54.03AB
24 h	707.51 ± 28.69	974.95 ± 12.26A	976.53 ± 36.07A	986.47 ± 55.03A
36 h	655.64 ± 20.56	994.37 ± 17.53A	968.13 ± 106.25A	946.76 ± 71.52A
48 h	650.31 ± 30.29	693.29 ± 4.38	933.45 ± 70.79AB	697.62 ± 52.49
72 h	655.94 ± 28.97	672.33 ± 33.36	672.24 ± 27.27	694.72 ± 21.45

与阴性对照组比较 A($P < 0.01$)、a($P < 0.05$)与模型组比较 B($P < 0.01$)、b($P < 0.05$)

4 讨论

现代医学研究证明,LPS(革兰氏阴性菌细胞壁主要成分)对机体具有毒害作用,其释放进入血液达到一定浓度可导致急性炎症反应的发生,可以通过与 Toll 样受体 (TLR4) 结合激活炎症信号通路,诱导研究体内释放大量细胞因子和细胞介质在炎症反应过程中大量的表达,如 IL-1 β 、TNF- α 以及次一级的炎症介质 PGE2 等的合成和释放。TNF- α 在炎症反应发生时即开始分泌,其作用在于激活其他细胞因子的级联,低浓度时则可诱导炎症反应^[4]。IL-1 β 主要由单核巨噬细胞产生的一种促炎细胞因子,参与多种细胞生物学功能,包括细胞的增殖、分化和凋亡等。在炎症开始反应期为

主要的促炎因子,能较早的生成并介导组织病理损伤过程,激活细胞产生前列腺素等以及诱导 IL-6 等其他炎症介质的产生,具备进一步诱发、放大炎症反应的作用^[5]。整个过程中,抗炎介质、促炎介质两者水平失衡为炎症发生、发展和加剧的重要因素。故为了防止过度的炎症反应,机体在大量促炎介质释放的同时,也会伴随产生多种抗炎介质。IL-10能有效抑制抑制巨噬细胞、单核细胞的抗原呈递作用,从而起到抑制促炎细胞因子的产生以及降低血清中炎性细胞因子的水平,通过抑制免疫细胞炎性细胞因子的产生而达到抗炎作用^[6-8]。前列腺素 E2 (PGE2) 作为一种免疫调节剂,具有对 IL-10、TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的调节作

用^[9]。本研究发现,灌服清瘟消热饮后,小鼠血清中 TNF- α 在 6、12、18 h 含量显著降低;IL-1 β 在 12、18、24 h 含量显著降低;PGE2 在 18、24、36 h 含量显著降低;IL-10 在 18、48 h 含量显著升高,表现出一定的抗炎效果。

通过长期、多角度的研究发现,中药抗炎作用的药理活性包含了多途径的抗炎作用。周永学等^[10]发现石膏能显著降低甘醇母诱导大鼠发热模型中大鼠下丘脑中 PGE2 的含量。Lu 等^[11]发现知母苷 B II 可以在 mRNA 和蛋白质水平上减少炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的生成,且呈现剂量依赖性,表现出很好的抗炎效果。张罗修等^[12]通过试验发现丹参素能显著抑制巨噬细胞在酵母多糖诱导下合成的 PGE2。OK-Hwa 等^[13]证实金银花中的木犀草素(Luteolin)能够通过 NF- κ B 和 MAPKs 激活途径抑制 TNF- α 、IL-8、IL-6 等促炎细胞介质的释放。

利用 LPS 致小鼠急性炎症模型是目前评价或筛选抗炎药物活性作用的经典急性渗出性炎症模型,主要表现为局部的充血、水肿及渗出等病理反应过程^[14-15],该模型在新药评价中应用较为广泛^[16]。本研究通过建立 LPS 致小鼠急性炎症模型研究清瘟消热饮对急性炎症反应的干预影响,通过对试验小鼠血清中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 以及 PGE2 水平变化来了解其作用机制。试验结果证明,清瘟消热饮可降低 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE2 水平,促进 IL-10 的释放,即通过对促炎细胞因子的合成与释放,促进抗炎因子的释放过程来达到抑制过度炎症反应,从而起到抗炎作用。

中兽药创新研究务必在传统中兽药的理论指导下选择药物,通过建立动物病理模型、细胞损伤模型等方法来阐释中药的作用机理^[17]。试验是根据清瘟消热饮对 LPS 致炎小鼠血清中的部分抗炎、致炎因子的含量变化,阐述抗炎的作用机理,对于中药通过什么通路影响血清中的抗炎、致炎因子的含量变化还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 赵婵娟. 清瘟消热饮治疗猪高热综合征的随机临床对照试验[J]. 黑龙江畜牧兽医. 2016(02):126-128.
- [2] 赵婵娟. 中药清瘟消热饮的抗炎镇痛活性研究[J]. 中国兽药杂志. 2016. 50(04):41-44.
- [3] 杨明. 中药药剂学[M]. 9 版. 北京:中国中医药出版社, 2012
- [4] 张馨方,王强松,崔元璐,等. 痹祺胶囊提取物对 RAW264.7 细胞模型的抗炎作用[J]. 中成药, 2014, 3(1):26.
- [5] 莫琼. 白芍对 LPS 脓毒血症小鼠血清中部分炎症因子含量的影响[D]. 西南大学, 2014:54-55.
- [6] 牟宜双,周黎明,熊尧,等. 小儿解表颗粒解热镇痛抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2014. 30(5):121-125.
- [7] 陈建粮,李晓玫,王海燕,等. 白细胞介素 IL-10 的免疫调节作用研究进展,肾脏病与透析肾移植杂志, 1998;7(2):147-151.
- [8] 范祖森,曹容华,孙汶生,等. IL-10 对大鼠佐剂性关节炎的治疗及免疫机理探讨. 山东医科大学学报, 1996;34(3):194-197.
- [9] 李劲节,蓝升红,周丽萍,等. 前列腺素 E2 对急性坏死性胰腺炎大鼠 IL-10、TNF- α 及 IL-1 β 的调控和对肺坏死组织损伤的影响[J]. 肝胆胰外科杂志, 2002. 14(2):85-88.
- [10] 周永学,李敏,唐志书,等. 中药石膏及其主要成份解热抗炎作用及机制研究[J]. 陕西中医学院学报. 2012. 35(5):74-76.
- [11] Lu W Q, Qiu Y, Li T J, *et al.* Timosaponin B-II inhibits pro-inflammatory cytokine induction by lipopolysaccharide in BV2 cells[J]. Arch Pharm res. 2009. 32(9):1301-1308.
- [12] 张罗修,王梦,钱芸,等. 丹参素、黄芩甙对大鼠腹腔巨噬细胞产生 PGE2 及 TXB2 的影响[J]. 中药药理与临床, 1990, 6(4):31-34.
- [13] Ok H K, Jang G C, Jong H L, *et al.* Luteolin isolated from the flowers of *Lonicera japonica* suppresses Inflammstory mediator release by blocking NF- κ B and MAPAKs actication pathways in NMC-I cells[J]. molecules. 2010. 15(4):385-398 2013;150(3):1071-1079.
- [14] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2010:742.
- [15] 万春平,彭江云,李玲玉,等. 蜀痹颗粒抗炎作用及机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014(5):117-121.
- [16] 肖百全,朱少璇,杨威,等. 角叉菜胶致大鼠足趾肿胀模型探讨及其机制研究[J]. 中国实用医药, 2008. 8(23):63-65.
- [17] 陈希,穆祥,许剑琴. 抗菌中药筛选思路的解析及实践[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(2):1-6.

(编辑:陈希)