

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.04.11

# 复方杨树花口服液体内抗炎效果的研究

郭金梅<sup>1</sup>, 魏淑英<sup>1</sup>, 李得鑫<sup>2</sup>, 高录军<sup>3\*</sup>

(1. 潍坊市农业农村局, 山东潍坊 261000; 2. 山东畜牧兽医职业学院, 山东潍坊 261061; 3. 山东华农生物制药有限公司, 山东潍坊 262000)

[收稿日期] 2022-01-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2022)04-0066-05 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 为了探究复方杨树花口服液在体内的抗炎作用, 将试验分为三个子试验。取 40 只雄性小鼠, 随机分为 5 组, 8 只/组, 分别是空白对照组(生理盐水: 6 mL/kg), 阳性对照组(阿斯匹林: 200 mg/kg)和复方杨树花组(高剂量组(12 mL/kg)、中剂量组(6 mL/kg)、低剂量组(3 mL/kg))。左耳涂抹 20  $\mu$ L 二甲苯计算耳肿胀率; 取 40 只小鼠做相同处理后, 左足注射 0.1 mL 10% 蛋清制造小鼠足趾肿胀模型, 计算小鼠足趾肿胀度; 另取 40 只小鼠随机分为 5 组, 8 只/组, 分别是空白对照组, 阳性对照组和给药组(高、中、低剂量组), 除空白对照组, 其余组注射 15 mg/kg LPS 腹腔注射制作小鼠炎症模型, 测定血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 含量。结果表明: 高剂量复方杨树花口服液能显著性抑制小鼠的耳肿胀率和足趾肿胀度( $P < 0.01$ ); 并能显著性抑制 LPS 引起的小鼠血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 含量的升高( $P < 0.01$ ), 与阿司匹林效果相似( $P > 0.01$ )。说明: 复方杨树花在小鼠体内具有一定的抗炎效果, 以 12 mL/kg 灌胃体内抗炎效果较好。

**[关键词]** 复方杨树花口服液; 小鼠; 体内炎症; 抗炎

## Study on Anti-inflammatory Effect of Compound Yangshuhua Oral Liquid *in vivo*

GUO Jin-mei<sup>1</sup>, WEI Shu-ying<sup>1</sup>, LI De-xin<sup>2</sup>, GAO Lu-jun<sup>3\*</sup>

(China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 100081, China)

(1. Weifang Bureau of Agricultural and Rural Areas, Weifang, Shandong 261000, China;

2. Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang, Shandong 261061, China;

3. Shandong Huanong Biopharmaceutical limited company, Weifang, Shandong 262000, China)

Corresponding author: GAO Lu-jun, E-mail: 361981648@qq.com

**Abstract:** In order to study the anti-inflammatory effect of compound Yangshuhua oral liquid *in vivo*, the experiment was carried out by three independent sub-experiments. In the first sub-experiment, 40 male mice were randomly grouped into five groups which were the blank control group (saline 6 mL/kg), positive control

基金项目: 潍坊市科技发展计划项目(2020ZJ1033); 山东省科技特派员行动计划(2020KJTPY018)

作者简介: 郭金梅, 兽医师, 硕士研究生, 从事农业推广方面工作。

通讯作者: 高录军。E-mail: 361981648@qq.com

group (aspirin 200 mg/kg) and three compound Yangshuhua groups (high dose 12 mL/kg, medium dose 6 mL/kg and low dose 3 mL/kg), mice were treated by their medicines then calculate the ear swelling rate by applying 20  $\mu$ L xylene to their left ear. In the second sub-experiment, 40 male mice were divided into five groups with same treatment as in the first sub-experiment, then mice' left feet were injected 0.1 mL 10% egg white to create the model of mice toe swelling and calculate the toe swelling rate. In the last sub-experiment, 40 male mice were randomly grouped into five groups which were the blank control group, positive control group and dosing groups (high dose, medium dose and low dose). The inflammatory models of mice was made by intraperitoneal injection of 15 mg/kg LPS, except the blank control group and determine the contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 in mice' serum. The results showed that high dose compound Yangshuhua oral liquid could significantly inhibit the ear swelling and toe swelling rate of mice ( $P < 0.01$ ), and significantly inhibit the LPS-induced increase of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 content in serum ( $P < 0.01$ ) which has similar effects of aspirin ( $P > 0.01$ ). The conclusion is that compound Yangshuhua oral liquid has certain anti-inflammatory effect in mice, and high dose 12 mL/kg by oral gavage perform better anti-inflammatory effect in vivo.

**Key words:** compound Yangshuhua oral liquid; mice; inflammation *in vivo*; anti-inflammation

炎症是机体对感染、组织损伤及伤害性刺激等做出的保护性反应<sup>[1]</sup>。表现为红、肿、热、痛及功能障碍,在一定范围内可提高机体抵抗力,但持续炎症反应会对机体造成损伤,攻击自身组织,影响动物机体的健康<sup>[2]</sup>,炎症反应也是一些疾病的发病基础<sup>[3]</sup>。复方杨树花口服液在杨树花口服液的基础上进行复方改良,以期解决动物体肠道炎症问题。因此,试验通过预先使用复方杨树花口服液,对小鼠耳肿胀、足趾肿胀和血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 分泌量的影响,以探究复方杨树花口服液的体内抗炎效果。为进一步开发复方杨树花口服液的药理作用提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 试验药品 复方杨树花口服浓度 1 g/mL (生产批号:20200402),由潍坊富言中药研发有限公司提供;阿司匹林片(生产批号:A100601),购自山西云鹏制药有限公司。

1.2 试验动物 昆明小鼠 120 只,雄性,体重(30  $\pm$  2 g),购自斯贝福(北京)生物技术有限公司(动物许可证号 SCXK(京)2020-0002)。

1.3 主要试剂 二甲苯(生产批号:20190325),购自南京试剂公司;LPS(生产批号:084M4159V),购自 Sigma 公司型号 L2880;TNF- $\alpha$ (生产批号:

P131773),IL-1(生产批号:338392),IL-6(生产批号:333552)ELISA 试剂盒,购自 RD 公司。

1.4 主要仪器 打孔器,购自河南智科弘润环保科技有限公司;分析天平,购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;高速离心机,购自上海安亭科学仪器厂,CKX41 光学显微镜,购自 Olympus 公司,全波长酶标仪,自 Bio-Tek 公司。

### 1.5 试验设计及分组

1.5.1 小鼠耳廓肿胀试验 取雄性小鼠 40 只,随机分为 5 组,8 只/组,分别是空白对照组(生理盐水:6 mL/kg),阳性对照组(阿斯匹林:200 mg/kg)和给药组(高剂量组(12 mL/kg)、中剂量组(6 mL/kg)、低剂量组(3 mL/kg)),每天灌胃给药 1 次,连续给药 7 d。末次给药 45 min 后,左耳涂抹二甲苯 20  $\mu$ L/只,右耳对照,40 min 后脱颈椎处死小鼠,沿耳廓基线剪下两耳,用打孔器(8 mm/直径)分别在左右耳同一部位打下圆耳片,称重,每只鼠左右耳片重量之差值作为耳肿胀度,计算各组肿胀率。

1.5.2 小鼠足趾肿胀率试验 取雄性小鼠 40 只,试验分组与给药同 1.5.1。末次给药 45 min 后,右后足足跖中部皮下注射 0.1 mL 1% 鸡蛋清致炎。于致炎前和致炎后 30 min,60 min,120 min 按容积法测定每鼠右后肢正常足容积,计算足趾肿胀率及

足肿胀抑制率。

1.5.3 体内炎症因子的检测 取雄性小鼠 40 只,随机分为 5 组,8 只/组,分别是空白对照组,阳性对照组(LPS:15 mg/kg)和给药组高剂量组(12 mL/kg)、中剂量组(6 mL/kg)、低剂量组(3 mL/kg),每天灌胃给药 1 次,连续给药 7 d。末次给药 6 h 后,除空白对照组外,各组均以 15 mg/kg 剂量的 LPS 进行腹腔注射,空白对照组腹腔注射等量生理盐水。各组于腹腔注射 LPS 12 h 后,摘眼球采血,分离血清。ELISA 测定小鼠血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 含量。

1.6 统计分析 试验数据录入 SPSS19.0 软件进行分析,结果以平均数 $\pm$ 标准差表示( $\bar{x} \pm SD$ )。各组取平均值后,两两对比,进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

## 2 结果与分析

2.1 对小鼠耳廓肿胀度的影响 由表 1 可知,与空白组相比,阿司匹林组与高、中、低剂量复方杨树花口服液组均能显著抑制二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀( $P < 0.01$ ),且高剂量复方杨树花口服液与阿司匹林效果相似( $P > 0.05$ )。

表 1 复方杨树花口服液对小鼠耳肿胀度的影响( $n=8, \bar{x} \pm SD$ )

Tab 1 Effect of Compound Yangshuhua oral liquid on ear swelling degree of mice( $n=8, \bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	肿胀度/mg
空白对照组		5.31 $\pm$ 1.59 <sup>A</sup>
阿司匹林组	200 mg/kg	2.24 $\pm$ 0.56 <sup>C</sup>
高剂量组	12 mL/kg	2.31 $\pm$ 0.78 <sup>C</sup>
中剂量组	6 mL/kg	4.38 $\pm$ 1.74 <sup>B</sup>
低剂量组	3 mL/kg	4.48 $\pm$ 1.55 <sup>B</sup>

注:同列数据肩标小写字母完全不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),大写字母完全不同表示差异极显著( $P < 0.01$ ),含相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

2.2 对足趾肿胀度的影响 由表 2 可知,与空白对照组相比,复方杨树花口服液三个剂量组在 30 min、60 min、120 min 均能显著抑制 1% 蛋清引起的小鼠足趾肿胀( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。并且在 60 min ~ 120 min 小鼠足趾肿胀度达到峰值。高、中剂量复方杨树花口服液能达到阿司匹林相似

效果( $P > 0.05$ ),但高剂量效果更好。

表 2 复方杨树花口服液对小鼠足趾不同时间段肿胀度的影响( $n=8, \bar{x} \pm SD$ )

Tab 2 Effect of Compound Yangshuhua oral liquid on swelling degree of mouse toe at different time( $n=8, \bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	不同时间段小鼠足趾肿胀度/mm		
		30 min	60 min	120 min
空白对照组		0.26 $\pm$ 0.09 <sup>A</sup>	0.537 $\pm$ 0.18 <sup>A</sup>	0.293 $\pm$ 0.15 <sup>A</sup>
阿司匹林组	200 mg/kg	0.14 $\pm$ 0.05 <sup>Cb</sup>	0.263 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	0.217 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>
高剂量组	12 mL/kg	0.14 $\pm$ 0.07 <sup>Cb</sup>	0.238 $\pm$ 0.08 <sup>Cb</sup>	0.213 $\pm$ 0.09 <sup>bc</sup>
中剂量组	6 mL/kg	0.15 $\pm$ 0.09 <sup>bc</sup>	0.248 $\pm$ 0.17 <sup>cb</sup>	0.231 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>
低剂量组	3 mL/kg	0.16 $\pm$ 0.07 <sup>B</sup>	0.303 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.272 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>

注:同列数据肩标小写字母完全不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),大写字母完全不同表示差异极显著( $P < 0.01$ ),含相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

2.3 对小鼠血清炎症因子的影响 由表 3 可知,与空白对照组相比,LPS 能极显著性提高小鼠血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 的分泌量( $P < 0.01$ ),提前使用高剂量的复方杨树花口服液能极显著性抑制 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 的异常分泌,与空白对照组差异不显著( $P > 0.05$ ),提前使用低剂量的复方杨树花口服液能显著抑制 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 的异常分泌( $P < 0.01$ ),但与空白对照组相比差异仍然显著( $P < 0.01$ )。

表 3 复方杨树花口服液对小鼠血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 分泌量的影响( $n=8, \bar{x} \pm SD$ )

Tab 3 Effects of Compound Yangshuhua Oral Liquid on secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in serum of mice( $n=8, \bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	TNF- $\alpha$ /(pg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	IL-1 $\beta$ /(pg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	IL-6 /(pg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )
空白对照组	/	23.65 $\pm$ 2.85 <sup>de</sup>	35.25 $\pm$ 2.92 <sup>de</sup>	10.44 $\pm$ 3.31 <sup>De</sup>
LPS 模型组	15 mg/kg	203.67 $\pm$ 22.57 <sup>A</sup>	190.77 $\pm$ 24.08 <sup>A</sup>	201.42 $\pm$ 105.18 <sup>A</sup>
高剂量组	12 mL/kg	30.96 $\pm$ 3.42 <sup>D</sup>	42.98 $\pm$ 4.09 <sup>D</sup>	13.92 $\pm$ 4.78 <sup>D</sup>
中剂量组	6 mL/kg	60.47 $\pm$ 2.15 <sup>Cd</sup>	60.01 $\pm$ 6.62 <sup>Cd</sup>	46.07 $\pm$ 6.93 <sup>C</sup>
低剂量组	3 mL/kg	106.15 $\pm$ 14.36 <sup>B</sup>	101.51 $\pm$ 23.74 <sup>B</sup>	105.04 $\pm$ 35.57 <sup>B</sup>

注:同列数据肩标小写字母完全不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),大写字母完全不同表示差异极显著( $P < 0.01$ ),含相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论与结论

复方杨树花口服液由苍术、陈皮、厚朴、黄连、黄柏、柴胡、栀子、杨树花组成,主要功效燥湿解毒、芳香醒脾。试验采用二甲苯耳廓涂抹、蛋清足部注射、LPS 腹腔注射的方法建立小鼠炎症模型,以阿司匹林作为西药对照,观察复方杨树花口服液的抗炎作用。用二甲苯进行耳肿胀实验,可增加毛细血管的通透性,使渗入组织的液体增多,小鼠耳朵会出现红肿<sup>[4]</sup>。耳廓肿胀度试验结果表明,阿司匹林能有效预防二甲苯引起的耳廓炎症反应,与王飞等研究相同<sup>[5]</sup>。12 mL/kg 的复方杨树花口服液也可预防炎症反应的发生,但随着药物浓度的降低效果变差。异体蛋白致肿法是制备急性炎症模型的常用方法<sup>[6]</sup>,异体蛋白进入机体后可在短时间内引起组织的急性炎症反应,发生炎症的部位明显肿胀、体积增大,产生红、肿、热、痛等致炎症状<sup>[7]</sup>。足趾肿胀度试验结果表明,注射 0.1 mL 1% 蛋清后,在 60 min ~ 120 min 内小鼠足趾肿胀度达到峰值,30 min 时,阿司匹林与各剂量复方杨树花口服液均能起到良好抗炎作用,但 60 min ~ 120 min 时,阿司匹林与低剂量复方杨树花口服液效果下降,说明阿司匹林在 60 min 后体内药物浓度降低,复方杨树花口服液抗足趾肿胀度需灌胃 6 mL/kg 以上。

小鼠腹腔注射 LPS 建立的小鼠炎症模型具有方便、稳定的特点而被广泛应用,LPS 能引起小鼠巨噬细胞分泌大量的炎症因子到血清中<sup>[8]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种肿瘤坏死因子,能诱导多种炎症因子产生,使细胞凋亡,其表达量的多少可以直接反映炎症的严重程度<sup>[9]</sup>。IL-6 和 IL-1 $\beta$  也是炎症反应的重要指标,过多的表达会引起一系列的炎性损伤<sup>[10]</sup>。有研究发现对脂多糖诱导的急性炎症小鼠模型都有明显的保护效应的药物,多数能明显抑制小鼠血清和肝脏中炎症因子释放,使急性炎症得到有效逆转<sup>[11]</sup>。因此,抑制血清炎症因子释放和脏器巨噬细胞活化是发挥抗炎作用的重要指标<sup>[12]</sup>。血清炎症因子试验发现复方杨树花口服液能显著性降低 LPS 诱导的炎症小鼠血清内 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 含量( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ),可见,复方杨树

花口服液对 LPS 诱导的小鼠炎症模型有保护效应,但浓度越低,效果越差。

综上所述,试验初步证实复方杨树花具有抗炎的效果,但其分子机制尚不清楚,需要进一步探究。

### 参考文献:

- [1] 冯瑞雪,史瑛,姬中伟,等. 黄酒多肽的多级分离纯化及其对小鼠巨噬细胞免疫调节的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 289-295.  
Feng R X, Shi Y, Ji Zh W, et al. Multi-stage separation and purification of rice wine polypeptide and its effect on immune regulation of mouse macrophages [J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(13): 289-295.
- [2] 姜婷婷,江宇泳,叶永安,等. 健脾化湿解毒方对急性肝损伤小鼠肠屏障功能的影响[J]. 世界中医药, 2021, 16(07): 1090-1094.  
Jiang T T, Jiang Y Y, Ye Y A, et al. Effect of Jianpi Huashi Jiedu Recipe on Intestinal Barrier Function in Mice with Acute Liver Injury [J]. World Traditional Chinese Medicine, 2021, 16(07): 1090-1094.
- [3] 李冲,勾玉婷,蹇宇,等. 荷叶黄酮对 D-半乳糖诱导小鼠肝损伤的改善作用[J/OL]. 食品与发酵工业: 1-16[2021-06-08].  
Li Chong, Gou Yuting, Qian Yu, et al. Ameliorative effect of lotus leaf flavonoids on liver injury induced by D-galactose in mice [J/OL]. Food and Fermentation Industry: 1-16[2021-06-08].
- [4] 伍智慧,冉喆,张晴晴,等. 枸杞多糖对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 宁夏医科大学学报, 2021, 43(04): 364-370.  
Wu Zh H, Ran Zh, Zhang J J, et al. Protective effect of Lycium barbarum polysaccharide on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. Journal of Ningxia Medical University, 2021, 43(04): 364-370.
- [5] 王飞,王军,侯会霞,等. 七情败毒散的药效学试验[J]. 动物医学进展, 2021, 42(02): 71-74.  
Wang F, Wang J, Hou H X, et al. Pharmacodynamic test of Qiqing Baidu Powder [J]. Advances in Animal Medicine, 2021, 42(02): 71-74.
- [6] 王森. 升阳益胃汤治疗脾虚型溃疡性结肠炎的作用机制研究及临床疗效分析[D]. 南京中医药大学, 2018.  
Wang S. Study on the mechanism and clinical efficacy of Shengyang Yiwei Decoction in treating ulcerative colitis due to spleen de-

- ficiency[D]. Nanjing University of Chinese Medicine, 2018.
- [7] 黄春桃, 杨雪, 侯小涛, 等. 海洋中药厚藤水提取物对风湿寒痹证和风湿热痹证大鼠足跖肿的作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(03): 109 - 113.
- Huang Ch T, Yang X, Hou X T, *et al.* Study on the effect of water extract of marine traditional Chinese medicine Houteng on paw edema in rats with rheumatism and rheumatism [J]. Pharmacology and Clinical of Traditional Chinese Medicine, 2021, 37 (03)
- [8] 朱培, 闫东梅, 郑伟. 大黄酚通过抑制巨噬细胞的 TNF -  $\alpha$  从而改善 LPS 诱导的小鼠炎症反应[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(01): 98 - 101.
- Zhu P, Yan D M, Zheng W. Chrysophanol can improve LPS - induced inflammation in mice by inhibiting TNF -  $\alpha$  of macrophages [J]. Chinese journal of laboratory diagnosis, 2021, 25(01): 98 - 101.
- [9] 徐雄良, 刘浪, 刘小均, 等. 一清胶囊抗炎作用实验研究[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(04): 392 - 394.
- Xu X L, Liu L, Liu X J, *et al.* Experimental study on anti - inflammatory effect of Yiqing capsule [J]. Journal of Northwest Pharmacy, 2016, 31(04): 392 - 394.
- [10] 韩超, 王霄, 杨金凯, 等. 丹参多糖缓解免疫性肝损伤的机制[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(09): 1761 - 1765.
- Han Ch, Wang X, Yang J K, *et al.* Mechanism of Salvia miltiorrhiza polysaccharide in relieving immune liver injury [J]. Journal of Veterinary Medicine of China, 2018, 38(09): 1761 - 1765.
- [11] 李青雯, 刘守刚, 林静霞, 等. 靛玉红对角质形成细胞中促炎细胞因子表达水平的影响[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2021, 28(03): 182 - 185.
- Li Q W, Liu Sh G, Lin J X, *et al.* Effect of indirubin on the expression level of pro - inflammatory cytokines in keratinocytes [J]. Journal of dermatology and venereology, 2021, 28(03): 182 - 185.
- [12] 刘卫红, 贾丽超, 张蕾, 等. 当归芍药散含药血清对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症因子及信号通路的影响[J]. 环球中医药, 2020, 13(11): 1853 - 1858.
- Liu W H, Jia L Ch, Zhang L, *et al.* Effects of serum containing Danggui Shaoyao powder on lipopolysaccharide - induced inflammatory factors and signal pathways in RAW 264.7 cells [J]. Global Chinese Medicine, 2020, 13(11): 1853 - 1858.

(编辑:陈希)