

侧柏叶水煎液对耳廓炎症和腹腔炎症模型小鼠的抗炎作用

李 丽^{1*}, 苗文静², 王 青³(1. 济宁医学院基础医学教研室, 山东日照 276826; 2. 日照市妇幼保健院检验科, 山东日照 276826; 3. 日照市人民医院, 山东日照 276826)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3515-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.21

摘要 目的: 研究侧柏叶水煎液对耳廓炎症和腹腔炎症模型小鼠的抗炎作用。方法: 将小鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照(阿司匹林 0.25 g/L)组和侧柏叶高、中、低剂量[1、0.5、0.25 g(生药)/L]组, 依次记为 A、B、C、D、E、F 组, 每组 10 只, 连续 ig 给药 5 d。除 A 组外, 其余各组分别复制耳廓炎症模型和腹腔炎症模型。检测耳廓炎症模型小鼠血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1(IL-1)含量, 计算肿胀度和肿胀率; 检测腹腔炎症模型小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-1、酸敏感离子通道 1a(ASIC_{1a})含量和腹腔灌洗液中蛋白质浓度(ΔA)。结果: 耳廓炎症模型中, 与 A 组比较, B 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 含量增加; 与 B 组比较, C、D、E、F 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 含量减少, 肿胀度和肿胀率降低; 与 C 组比较, E、F 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 含量、肿胀度和肿胀率增加; 以上差异有统计学意义($P < 0.05$)。腹腔炎症模型中, 与 A 组比较, B 组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-1、ASIC_{1a} 含量和 ΔA 均增加; 与 B 组比较, C、D、E、F 组小鼠 TNF- α 、IL-1、ASIC_{1a} 含量和 ΔA 降低; 以上差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 侧柏叶水煎液对耳廓炎症和腹腔炎症模型小鼠有抗急性炎症作用, 其机制可能与降低 TNF- α 、IL-1 及 ASIC_{1a} 有关。

关键词 侧柏叶; 耳廓炎症; 腹腔炎症; 急性炎症; 酸敏感离子通道 1a; 小鼠

Anti-inflammation Effects of Cacumen Biotae Water Decoction on Mice with Auricle and Abdominal Inflammation

LI Li¹, MIAO Wen-jing², WANG Qing³(1. Basic Medical Science Department, Jining Medical University, Shandong Rizhao 276826, China; 2. Dept. of Clinical Laboratories, Rizhao Maternal and Child Health Hospital, Shandong Rizhao 276826, China; 3. People's Hospital of Rizhao, Shandong Rizhao 276826, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-inflammation effects of cacumen biotae water decoction on mice with auricle and abdominal inflammation. METHODS: Mice were randomized into a normal control group, a model group, a positive control group (0.25 g/L aspirin) and cacumen biotae high-dose, medium-dose and low-dose [1, 0.5 and 0.25 g (medicinal materials)/L] groups, respectively marked as groups A, B, C, D, E and F, with 10 mice in each group. The mice were given drugs ig for 5 consecutive days. The models of auricle and abdominal inflammation were established for all groups except the normal control group. The contents of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 1 (IL-1) in the serum of mice with auricle inflammation were determined, and the swelling degree and swelling rate were calculated. The contents of TNF- α , IL-1 and acid-sensing ion channels 1a (ASIC_{1a}) in the liver tissues of mice with abdominal inflammation and the concentration of proteins in the peritoneal lavage fluid (ΔA) thereof were detected. RESULTS: For mouse models of auricle inflammation, the contents of TNF- α and IL-1 in serum in group B were higher than in group A; the swelling degree and swelling rate and the contents of TNF- α and IL-1 in groups C, D, E and F were lower than in group B, and those of group E and F were higher than in group C. There were statistical differences ($P < 0.05$). For mouse models of abdominal inflammation, the contents of TNF- α , IL-1 and ASIC_{1a} in liver tissues and ΔA in group B were higher than in group A; the contents of TNF- α , IL-1 and ASIC_{1a} as well as ΔA in groups C, D, E and F were lower than in group B. There were statistical differences ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Cacumen biotae water decoction has anti-effect on acute auricle and abdominal inflammation by a mechanism which may be related to decreasing TNF- α , IL-1 and ASIC_{1a}.

KEYWORDS Cacumen biotae; Auricle inflammation; Abdominal inflammation; Acute inflammation; Acid-sensing ion channels; Mouse

急性炎症为较常见的病理过程, 其常伴随多种疾病, 并对多种疾病的发生和演变产生重要影响。随着人们对安全、高效药物需求的增长, 天然药物在抗炎方面的研究已备受关注。侧柏叶为柏科植物的嫩枝叶, 呈鳞片状, 质地松脆, 气微香, 味苦涩。古籍记载侧柏叶有凉血止血、生发乌发、止咳喘的功效^[1], 但目前鲜有侧柏叶抗炎作用的研究。

急性炎症由致炎因子引起, 其起病急骤、维持时间较短, 以渗出性病变为特征。细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素-1(IL-1)等在急性炎症发病过程中发挥了重要调节作用^[2]。酸敏感离子通道(ASIC_s)为非电压门控的高度通透的 Na⁺ 离子通道, 酸敏感离子通道 1a(ASIC_{1a})是 ASIC_s 的一种亚型, 均由细胞外酸化激活^[3-4]。急性炎症时常伴有组织酸化, ASIC_{1a} 易被激活。已有研究表明, 在氟氏完全佐剂诱导的小鼠

* 讲师, 硕士。研究方向: 生理学。E-mail: tyvm80@163.com

关节炎模型中,关节软骨 ASIC_{1a}表达明显增加^[6]。因此在本研究中,首先通过小鼠耳部涂抹二甲苯及腹腔注射0.6%醋酸制备小鼠耳廓炎症及腹腔炎症模型,观察侧柏叶水煎液能否减轻耳部肿胀及增加腹腔血管通透性,以期探讨其抗急性炎症作用;然后检测侧柏叶水煎液对急性耳部炎症时血清 TNF- α 、IL-1 水平及急性腹腔炎症时肝组织 TNF- α 、IL-1 及 ASIC_{1a}含量的影响,以期探讨其抗急性炎症的相关机制。

1 材料

1.1 仪器

DNM-9602 自动酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);UV-6000 紫外分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司);GT10-1 高速离心机(北京时代北利离心机有限公司);RE-5299 旋转蒸发器(上海锦屹仪器设备有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

新鲜侧柏叶取自济宁医学院校内中药种植园,摘除大的枝干,只留针尖叶,经笔者鉴别为真品;阿司匹林片(神威药业有限公司,批号:1309072,规格:每片 25 mg);TNF- α 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号:20140211)、IL-1 ELISA 试剂盒(批号:20140322)及 ASIC_{1a} ELISA 试剂盒(批号:20140331)均为美国 R&D Systems 公司进口分装。

1.3 动物

健康成年昆明种小鼠 120 只,♀ ♂ 不拘,体质量 22~25 g,由山东大学实验动物中心提供,合格证号为 SCXK(鲁)2008-0007。所有动物实验操作已获动物伦理会批准。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 侧柏叶水煎液 取新鲜侧柏叶 200 g,用剪刀剪为 5 cm 左右的细小枝叶,按质量比 1:7 的比例加水煎煮 3 次,每次 1.5 h。合并煎液,用抽滤装置滤过,滤液用旋转蒸发器于 60 °C 下浓缩成清膏,按 1 g(生药)/L 放冷,置于 4 °C 冰箱贮存。

2.1.2 阿司匹林混悬液 取阿司匹林片于研钵研碎,加蒸馏水溶解稀释成 0.25 g/L 的溶液。

2.2 分组与给药

取小鼠 120 只,分成 2 批,每批各取 60 只分别用于观察侧柏叶水煎液对小鼠耳廓炎症模型和腹腔炎症模型的影响。2 批小鼠均随机分为正常对照组、模型组、阳性对照(阿司匹林 0.25 g/L)组和侧柏叶高、中、低剂量[1、0.5、0.25 g(生药)/L]组,依次记为 A、B、C、D、E、F 组,每组 10 只。前期研究表明,1 g(生药)/L 侧柏叶水煎液与 0.25 g/L 阿司匹林的抗炎效果相似,因此为考察低于 1 g(生药)/L 的侧柏叶水煎液是否也具有较强的抗炎效果,故将 1 g(生药)/L 侧柏叶水煎液经稀释制成 1、0.5、0.25 g(生药)/L。适应性喂养小鼠 3 d 后,连续 ig 相应药物 5 d,给药体积为 0.02 ml/g。

2.3 抗耳廓炎症作用的考察

取“2.2”项下第一批 6 组小鼠,除 A 组小鼠涂抹等量生理盐水外,其余各组小鼠末次给药 30 min 后左耳外耳廓双面涂抹二甲苯 50 μ l 复制炎症模型,右耳不涂作为正常耳对照。左耳耳廓涂抹 1 h 后眼球取血 1 ml,以离心半径 98.5 mm(下同)、3 000 r/min 离心 10 min,取上清按试剂盒操作检测血清中 TNF- α 、IL-1 含量。取血后脱颈椎处死小鼠,用直径 7 mm 的打

孔器在左右耳相同位置打下耳片,于分析天平上称质量并计算肿胀度和肿胀率。肿胀度=致炎后左耳片质量-未致炎右耳片质量;肿胀率=(致炎后左耳片质量-未致炎右耳片质量)/未致炎右耳片质量 \times 100%。

2.4 抗腹腔炎症作用的考察

取“2.2”项下第二批 6 组小鼠,除 A 组小鼠 ip 等量生理盐水外,其余各组小鼠末次给药 30 min 后上腹部和下腹部分两次 ip 0.6% 醋酸溶液,每次给药体积为 0.02 ml/g。60 min 后脱颈椎处死小鼠,剪开腹腔,暴露并用剪刀剪取肝脏,用预冷磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH 7.4,下同)冲洗表面杂质,剪碎。取 100 mg,放入微量手动玻璃匀浆器中,按体积比 1:9 加入 PBS 于冰水中匀浆。吸取匀浆液至离心管,低温 5 000 r/min 离心 5 min,取上清按试剂盒操作检测肝组织中 TNF- α 、IL-1、ASIC_{1a} 含量。与此同时,对各组小鼠用 5 ml 生理盐水分数次灌洗腹腔,收集灌洗液,2 500 r/min 离心 5 min,取上清。由于蛋白质结构中的肽键在远紫外区(200~250 nm)有光吸收的峰值,光吸收强弱在一定范围内与浓度成正比,且波长越短光吸收越强。用 215 nm 和 225 nm 光吸收差值与单一波长测定相比,可减少非蛋白质成分引起的误差,且差值大小与蛋白质浓度呈正相关^[6]。因此,用紫外分光光度计,以生理盐水作为标准液,于 215 nm 和 225 nm 处比色,测定并计算光密度差值($\Delta A=A_{215\text{nm}}-A_{225\text{nm}}$),以此比较各组的蛋白质浓度。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 分析软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过两均数比较的 *t* 检验对结果进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对耳廓炎症的影响

3.1.1 血清中 TNF- α 、IL-1 含量 与 A 组比较,B 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 含量增加;与 B 组比较,C、D、E、F 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 含量减少;与 C 组比较,E、F 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 含量增加,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组耳廓炎症模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 含量的测定结果见表 1。

表 1 各组耳廓炎症模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Contents results of TNF- α and IL-1 in serum in all groups of mice with auricle inflammation ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TNF- α , pg/ml	IL-1, pg/ml
A 组	107.7 \pm 7.9	69.3 \pm 11.5
B 组	229.4 \pm 8.6*	132.5 \pm 13.1*
C 组	149.6 \pm 6.9 [#]	100.7 \pm 7.4 [#]
D 组	150.5 \pm 7.5 [#]	99.8 \pm 8.3 [#]
E 组	173.9 \pm 5.8 ^{#a}	111.3 \pm 6.7 ^{#a}
F 组	186.2 \pm 7.1 ^{#a}	120.6 \pm 6.5 ^{#a}

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,[#] $P < 0.05$;与 C 组比较,^a $P < 0.05$

Note: vs. group A, * $P < 0.05$; vs. group B, [#] $P < 0.05$; vs. group C, ^a $P < 0.05$

3.1.2 肿胀度及肿胀率 与 B 组比较,C、D、E、F 组小鼠的耳廓肿胀度和肿胀率降低;与 C 组比较,E、F 组小鼠的耳廓肿胀度增加,D、E、F 组小鼠的耳廓肿胀率增加,以上差异均有统计

学意义($P < 0.05$)。各组小鼠耳廓肿胀度和肿胀率的测定结果见表2。

表2 各组小鼠耳廓肿胀度和肿胀率的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Results of swelling degree and swelling rates in all groups of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肿胀度,mg	肿胀率,%
B组	7.9 ± 3.1	39.7 ± 13.6
C组	0.50 ± 0.2*	8.6 ± 7.7*
D组	0.58 ± 0.3*	10.5 ± 8.5**
E组	1.23 ± 0.6**	18.4 ± 7.6**
F组	2.62 ± 1.3**	23.2 ± 11.7**

注:与B组比较,* $P < 0.05$;与C组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. group B, * $P < 0.05$; vs. group C, # $P < 0.05$

3.2 对腹腔炎症的影响

与A组比较,B组小鼠肝组织中TNF- α 、IL-1、ASIC_{1a}含量和 ΔA 均增加;与B组比较,C、D、E、F组小鼠TNF- α 、IL-1、ASIC_{1a}含量和 ΔA 降低;与C组比较,F组小鼠肝组织中TNF- α 、IL-1、ASIC_{1a}含量和 ΔA 均增加,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组腹腔炎症模型小鼠肝组织中TNF- α 、IL-1、ASIC_{1a}含量和 ΔA 的测定结果见表3。

表3 各组腹腔炎症模型小鼠肝组织中TNF- α 、IL-1、ASIC_{1a}含量和 ΔA 的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Contents of TNF- α , IL-1 and ASIC_{1a} in liver tissues as well as ΔA in all groups of mice with abdominal inflammation ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IL-1,pg/g	TNF- α ,pg/g	ASIC _{1a} ,pg/g	$\Delta A, \times 10^{-2}$
A组	77.6 ± 21.2	58.2 ± 11.7	24.4 ± 9.9	0.2 ± 0.1
B组	273.7 ± 24.3*	107.5 ± 10.9*	78.5 ± 8.8*	2.3 ± 0.5*
C组	171.5 ± 27.3#	75.8 ± 14.2#	36.9 ± 9.4#	1.3 ± 0.4#
D组	165.4 ± 25.7#	74.6 ± 13.3#	33.6 ± 7.9#	1.4 ± 0.3#
E组	184.6 ± 19.9#	87.7 ± 11.6#	45.7 ± 10.3#	1.6 ± 0.3#
F组	242.8 ± 26.9 ^Δ	90.2 ± 12.6 ^Δ	56.2 ± 11.1 ^Δ	1.7 ± 0.4 ^Δ

注:与A组比较,* $P < 0.05$;与B组比较,# $P < 0.05$;与C组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. group A, * $P < 0.05$; vs. group B, # $P < 0.05$; vs. group C, ^Δ $P < 0.05$

4 讨论

4.1 侧柏叶水煎液抗急性耳廓及腹腔炎症的作用

急性炎症是由致炎因子导致的,以渗出性病变为特征,起病急骤、维持时间较短的病理变化^[7]。二甲苯和醋酸都是化学类的致炎因子,因此在本研究中,小鼠左耳涂抹二甲苯导致左耳毛细血管渗出增加,从而引起左耳明显肿胀;小鼠腹腔注射0.6%醋酸后毛细血管通透性增加,血浆蛋白渗出到毛细血管外。因此与A组相比,B、C、D、E、F组小鼠腹腔灌洗液 ΔA 值明显增大,提示本研究建模成功。与B组相比,C、D、E、F组小鼠左耳肿胀度和肿胀率明显降低,腹腔灌洗液 ΔA 值明显降低,提示侧柏叶水煎液和阿司匹林有明显降低急性炎症导致的毛细

血管通透性增加的作用,且侧柏叶水煎液浓度越高,其抗炎作用越明显。

4.2 侧柏叶水煎液抗急性炎症作用的相关机制

急性炎症时,致炎因子可以刺激机体合成和分泌细胞因子,从而引起毛细血管渗出、组织肿胀、低血压、发热等不良作用^[8]。而TNF- α 是众多细胞因子中最早出现的一种,其可以刺激IL等其他细胞因子的合成与释放,进而引起细胞损伤^[9]。Dorofeeva NA等^[10]研究发现,在分离的海马神经元中ASIC_{1a}表达在致炎后明显增加,非甾体类消炎药能明显降低ASIC_{1a}的表达,提示ASIC_{1a}与炎症的发生也密切相关。本研究显示,在二甲苯和醋酸诱导的小鼠急性炎症模型中,其血清TNF- α 和IL-1含量明显增加,肝组织TNF- α 、IL-1和ASIC_{1a}含量明显增加,提示二甲苯导致的耳廓肿胀、醋酸引起的腹腔血管通透性增加和肝脏的肿胀可能与TNF- α 、IL-1和ASIC_{1a}等因素有关。而侧柏叶水煎液能明显降低由二甲苯所致的血清TNF- α 和IL-1含量的增加以及醋酸所致的肝组织TNF- α 、IL-1和ASIC_{1a}含量的增加,提示侧柏叶水煎液的抗炎作用与降低TNF- α 、IL-1和ASIC_{1a}等有关。

参考文献

- [1] 曹雨诞,曾祥丽,单鸣秋,等.侧柏叶的研究进展[J].江苏中医药,2008,40(2):86.
- [2] 张莉,哈木拉提·吾甫尔.细胞因子在神经-内分泌-免疫网络中的调节机制[J].免疫学杂志,2006,22(3):128.
- [3] 李丽.酸敏感离子通道在中枢化学感受器呼吸调节中的作用[J].中国病理生理杂志,2014,30(8):1400.
- [4] 蒋莉娅.酸敏感离子通道表达的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2011,20(16):2069.
- [5] 林梅英,陈飞虎,葛金芳,等.鬼针草总黄酮对急性炎症的保护作用及可能机制的研究[J].中国临床药理学与治疗学,2013,18(6):614.
- [6] 陈钧辉.生物化学实验[M].4版.北京:科学出版社,2008.
- [7] 李玉林.病理学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013.
- [8] 崔岩,栗红蕊,孙高洁,等.利拉鲁肽对肥胖大鼠体质量、血脂水平和下丘脑炎症通路的影响研究[J].中国药房,2014,25(17):1571.
- [9] 方剑乔,刘芳,邵晓梅.电针对角叉菜胶致炎大鼠的抗炎效应及对白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 的影响[J].针刺研究,2007,32(4):224.
- [10] Dorofeeva NA, Barygin OI, Staruschenko A, et al. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(1): 429.

(收稿日期:2014-11-20 修回日期:2015-01-30)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅