

· 博士之窗 ·

小柴胡汤及其药群配伍对角叉菜胶诱导大鼠胸膜炎模型细胞因子的影响

孙明瑜 谢 鸣 张 娜 伊丽索 王守勇

摘要 目的 探讨小柴胡汤(柴胡、黄芩、半夏、生姜、人参、甘草和大枣)及其药群配伍的抗炎作用,并探讨其可能作用机制。方法 在大鼠胸腔内注射 1% 角叉菜胶 0.2ml 诱发胸膜炎模型。中药各组分别给予小柴胡汤不同药群配伍的中药灌胃(分别按如下组成和剂量:柴芩 3.5g/kg,姜夏 3g/kg,参草枣 4.5g/kg,柴芩+姜夏 6.5g/kg,柴芩+参草枣 8g/kg,姜夏+参草枣 7.5g/kg,全方 11g/kg),正常组和模型组给予等体积的蒸馏水灌胃。连续给药 5 天,在末次给药后 2h 造模,造模 12h 后检测胸腔渗出液体积、渗出液中白细胞计数、髓过氧化物酶(MPO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及血清白细胞介素-8(IL-8)含量。结果 与模型组比较,小柴胡汤及其药群配伍各组大鼠胸腔渗出液体积、渗出液中白细胞数量、MPO 和 TNF- α 含量以及血清 IL-8 含量均显著降低($P < 0.05$)。柴芩组、姜夏组、全方组胸膜炎胸腔渗出液中 IL-1 β 含量显著降低($P < 0.01$)。结论 小柴胡汤及其药群配伍均有显著的抗炎作用,对胸膜炎有一定的防治作用,其中柴芩组、全方组、姜夏组和参草枣组作用较优。其作用机制可能与小柴胡汤及其药群配伍通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 等细胞因子的升高,抑制白细胞活化、浸润游走等环节有关。

关键词 小柴胡汤 药群配伍 胸膜炎 角叉菜胶 细胞因子

Effect of Xiaochaihu Decoction and Different Herbal Formulations of Its Components on Cytokines of Carrageenan Induced Pleuritis in Rats SUN Ming-yu, XIE Ming, ZHANG Na, et al *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)*

Objective To explore the anti-inflammatory effect and possible mechanism of Xiaochaihu Decoction (XCHD) and the different herbal formulations of its components. **Methods** Rat model of pleuritis was established by thoracic injecting 0.2 ml of 1% carrageenan. Rats in the treated groups were medicated with XCHD (11g/kg) and the different herbal formulations of its components respectively as follows: thorowax root-scutellaria root (A, 3.5 g/kg), fresh ginger-pinellia tuber (B, 3 g/kg), ginseng-licorice root-jujube (C, 4.5 g/kg), A+B (6.5 g/kg), A+C (8 g/kg) and B+C (7.5 g/kg), and those in the normal group and the model group were given equal volume of instilled water, by way of gastrogavage for successive 5 days. Modeling was performed 2 hrs after the last medication. The amount of pleurorrhea, and leucocyte (WBC), marrow peroxidase (MPO), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in pleurorrhea, and serum level of interleukin-8 (IL-8) were measured 12 hrs after modeling. **Results** As compared with the model group, all the parameters measured were lower in all the treated group ($P < 0.05$), and IL-1 β content in pleurorrhea in the XCHD group and Group A, B and C were significantly lower ($P < 0.01$). **Conclusion** XCHD and the different herbal formulations have obvious anti-inflammatory effect, showing certain preventive and therapeutic effect on pleuritis. Among the different formulations, the XCHD, A, B and C had better effects. The effects might be related to inhibiting the increase of cytokines as TNF- α , IL-1 β , and IL-8 to suppress the activation, infiltration and wandering of leucocytes.

Key words Xiaochaihu decoction; formulation of drugs group; pleurisy; carrageenan; cytokine

作者单位 北京中医药大学方剂学学科(北京 100029)

通讯作者:孙明瑜,现在复旦大学药学院(上海 200032),Tel:021-50270038,13671961442,Fax:021-50804270,E-mail:mysun248@hotmail.

万方数据

小柴胡汤出自东汉张仲景《伤寒杂病论》,由柴胡、黄芩、半夏、生姜、人参、甘草、大枣共 7 味药组成,是中医和解少阳的著名代表方。小柴胡汤主治少阳病证,“胸胁苦满”为少阳证的主证之一。现代临床上常用小柴胡汤治疗包括胸膜炎在内的各种急慢性炎症。药理研究也证实小柴胡汤有很好的抗炎、免疫调节作用。本实验采用角叉菜胶诱导的大鼠胸膜炎模型探讨小柴胡汤及其不同配伍药群的抗炎效用和其可能的作用机理。

材料与方法

1 材料

1.1 药物 中药饮片购自北京同仁堂药店,经北京中医药大学药物鉴定教研室鉴定皆为正品。

1.2 药群配方及其不同药群配方的药液制备 小柴胡汤由柴胡 12g 黄芩 9g 半夏 9g 生姜 9g 人参 9g 甘草 6g 大枣 12g 组成。将小柴胡汤分成柴胡和黄芩(简称柴芩),生姜和半夏(简称姜夏),人参、甘草和大枣(简称参草枣)三组配伍药群,按原方中各药味的剂量配比组成,共组合成 7 个不同配方:柴芩(A)、姜夏(B)、参草枣(C)、柴芩+姜夏(D)、柴芩+参草枣(E)、姜夏+参草枣(F)、全方(G)。各组药液均采用合煎形式,第 1 煎加 7 倍水,第 2 煎加 5 倍水,严格控制煎煮时间,沸腾后,用控温电炉保持微沸 30min,合并两次煎液,脱脂棉过滤,90℃水浴浓缩至 200% 浓度,使每毫升含原药材 2g,4℃保存。

1.3 动物 健康 SD 大鼠,雄性,体重 220~250g,由北京市维通利华实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(京)2002-0003。在室温(22±2)℃环境下饲养,光照 12h(8:00~20:00)。实验前适应环境饲养 1 周。

1.4 试剂 角叉菜胶(λ -Carrageenan, C-1013, type I, Lot 121K1653, Sigma 公司产品),用灭菌生理盐水配制成 1% 的溶液。D-Hank's 液:1 000ml 中含有 KCl 0.4g、KH₂PO₄ 0.06g、NaCl 8.0g、NaHCO₃ 0.35g、Na₂HPO₄·7H₂O 0.06g,除菌过滤。肝素钠注射液,中国常州生化干红制药有限公司产,批号 020725。髓过氧化物酶(MPO)试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-8 试剂盒,由中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所提供。

2 方法

2.1 模型制备 按文献^[1]方法操作。大鼠乙醚轻微麻醉后,在大鼠右前肢下方第 7 至 8 根肋骨间皮

肤和肌肉做一小切口,注射 1% 角叉菜胶溶液 0.2ml 至胸腔,注射时应迅速,以免损伤肺。

2.2 动物分组与处理 大鼠随机分为 9 组:正常(N)组、模型(M)组、小柴胡汤全方(G)组、柴芩(A)组、姜夏(B)组、参草枣(C)组、柴芩+姜夏(D)组、柴芩+参草枣(E)组、姜夏+参草枣(F)组,每组 10 只。模型及各中药组大鼠依法制模,正常组注射 0.2ml 灭菌生理盐水。各中药组(分别按如下剂量:柴芩 3.5g/kg、姜夏 3g/kg、参草枣 4.5g/kg、柴芩+姜夏 6.5g/kg、柴芩+参草枣 8g/kg、姜夏+参草枣 7.5g/kg、全方 11g/kg)在造模前 5 天开始给予中药灌胃,每次 2.0ml/只,每天 1 次,连续给药 5 天。模型组和正常组分别给同体积蒸馏水灌胃。注射角叉菜胶后 12h,大鼠眼眶穿刺取血,处死;用剪刀将肋软骨剪开一小口,从该口向胸腔中注入 1ml Hank's 溶液(含肝素 5U/ml),轻柔按摩胸腔,用试管从胸腔内吸出液体。

2.3 检测指标 (1)胸腔渗出液计量及白细胞计数 精确计量胸腔渗出液;台盼蓝染色后,显微镜下用细胞计数板计数白细胞。(2)MPO 活力测定:胸腔渗出液 3 000rpm/min 离心 10min,取上清液 200 μ l,按 MPO 试剂盒说明书操作,在 722 型分光光度计上测定其光密度值。(3)胸腔渗出液中 TNF- α 、IL-1 β 及血清 IL-8 的含量测定:取胸腔渗出液及血清 100 μ l,按相应的放免试剂盒说明书操作,用 SN-695B 智能放免 γ 测量仪测定。

3 统计学方法 采用方差分析(ANOVA)后,多组间比较采用 q 检验,用 SPSS 10.0 统计软件处理。

结 果

1 小柴胡汤及其配伍药群对大鼠胸腔渗出液容积及渗出液中白细胞计数的影响 见表 1。大鼠胸腔渗出液容量:与模型(M)组比较,小柴胡汤及其配伍药群(A~G)组显著降低($P<0.01$);各配伍药群(A~G)组间比较,差异均无显著性($P>0.05$)。大鼠胸腔渗出液中的白细胞计数:与模型组比较,各配伍药群组均显著降低($P<0.01$);各配伍药群组之间比较,柴芩(A)组显著低于姜夏(B)组、参草枣(C)组、柴芩+姜夏(D)组、姜夏+参草枣(F)组($P<0.05$),全方(G)组显著低于柴芩+姜夏(D)组($P<0.05$)。

2 小柴胡汤及其配伍药群对大鼠胸膜炎模型胸腔渗出液中 MPO 活力的影响 见表 2。与模型组比较,柴芩(A)组、姜夏(B)组、参草枣(C)组、柴芩+参草枣(E)组、姜夏+参草枣(F)组、全方(G)组大鼠胸腔渗出液 MPO 活力均显著降低($P<0.01$);各

表 1 各组大鼠胸腔渗出液容量及渗出液中
白细胞计数结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胸腔渗出液	
		渗出液容量(ml)	白细胞计数($\times 10^8$ /ml)
N	10	—	—
M	10	4.72 $\pm$ 0.62	1.7640 $\pm$ 0.2778
A	10	2.86 $\pm$ 0.70 *	0.9830 $\pm$ 0.0688 *
B	10	2.95 $\pm$ 0.96 *	1.1140 $\pm$ 0.1064 * $\triangle$
C	10	2.10 $\pm$ 1.43 *	1.1620 $\pm$ 0.1631 * $\triangle$
D	10	3.06 $\pm$ 1.10 *	1.2070 $\pm$ 0.1133 * $\triangle$ $\blacktriangle$
E	10	3.38 $\pm$ 1.75 *	1.1100 $\pm$ 0.1221 *
F	10	3.22 $\pm$ 1.24 *	1.1680 $\pm$ 0.1206 * $\triangle$
G	10	3.01 $\pm$ 1.52 *	1.0478 $\pm$ 0.1298 *

注 与 M 组比较, * $P < 0.01$; 与 A 组比较, $\triangle P < 0.05$; 与 G 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

表 2 各组大鼠胸腔渗出液 MPO 活力测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MPO(U/ml)
N	10	—
M	10	0.250 $\pm$ 0.014
A	10	0.060 $\pm$ 0.023 *
B	10	0.077 $\pm$ 0.028 *
C	10	0.094 $\pm$ 0.023 *
D	10	0.230 $\pm$ 0.025 $\triangle$ $\blacktriangle$
E	10	0.199 $\pm$ 0.040 * $\triangle$ $\blacktriangle$
F	10	0.120 $\pm$ 0.041 * $\triangle$
G	10	0.099 $\pm$ 0.036 *

注 与 M 组比较, * $P < 0.01$; 与 A 组比较, $\triangle P < 0.01$; 与 G 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

配伍药群(A ~ G)组间比较 :柴芩(A)组显著低于柴芩 + 姜夏(D)组、柴芩 + 参草枣(E)组、姜夏 + 参草枣(F)组($P < 0.01$) ;全方(G)组显著低于柴芩 + 姜夏(D)组与柴芩 + 参草枣(E)组($P < 0.01$)。

3 小柴胡汤及其配伍药群对胸膜炎胸腔渗出液 TNF- α 和 IL-1 β 及血清 IL-8 含量的影响 见表 3。大鼠胸膜炎胸腔渗出液 TNF- α 含量 :与模型(M)组比较,小柴胡汤及其各配伍药群(A ~ G)组均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各配伍药群(A ~ G)组之间比较 :全方(G)组显著低于姜夏组(B)、柴芩 + 姜夏(D)组

表 3 各组大鼠胸腔渗出液 TNF- α 和 IL-1 β
及血清 IL-8 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胸腔渗出液		血清 IL-8(ng/L)
		TNF- α (μ g/L)	IL-1 β (μ g/L)	
N	8	—	—	0.2317 $\pm$ 0.0264
M	8	1.5418 $\pm$ 0.2678	0.1450 $\pm$ 0.0302 $\square$	0.3442 $\pm$ 0.0803
A	8	0.9788 $\pm$ 0.2765 **	0.0851 $\pm$ 0.0372 **	0.1577 $\pm$ 0.0296 **
B	8	1.2062 $\pm$ 0.1971 ** $\blacktriangle$	0.0770 $\pm$ 0.0195 **	0.1712 $\pm$ 0.0476 **
C	8	1.0613 $\pm$ 0.2052 **	0.1075 $\pm$ 0.0198 * $\square$	0.2150 $\pm$ 0.0715 **
D	8	1.2850 $\pm$ 0.2364 * $\triangle$ $\blacktriangle$	0.1188 $\pm$ 0.0491 $\triangle$	0.2263 $\pm$ 0.0872 ** $\triangle$
E	8	1.0578 $\pm$ 0.3664 **	0.1200 $\pm$ 0.0346 $\triangle$ $\square$	0.1837 $\pm$ 0.0838 **
F	8	1.0510 $\pm$ 0.1817 **	0.1178 $\pm$ 0.0164 $\triangle$ $\square$	0.2600 $\pm$ 0.0237 ** $\triangle$ $\square$
G	8	0.9067 $\pm$ 0.2437 **	0.1000 $\pm$ 0.0200 **	0.2249 $\pm$ 0.0584 ** $\triangle$

注 与 M 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 A 组比较, $\triangle P < 0.05$; 与 G 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 B 组比较, $\square P < 0.05$

($P < 0.05$)。大鼠胸腔渗出液 IL-1 β 含量 :与模型(M)组比较,小柴胡汤及其药群配方(A ~ G)组均呈不同程度降低,其中柴芩(A)组、姜夏(B)组、参草枣(C)组、全方(G)组降低差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各配伍药群组间比较 :柴芩(A)组显著低于柴芩 + 姜夏(D)组、柴芩 + 参草枣(E)组、姜夏 + 参草枣(F)组($P < 0.05$),姜夏(B)组显著低于参草枣(C)组、柴芩 + 姜夏(D)组、柴芩 + 参草枣(E)组、姜夏 + 参草枣(F)组($P < 0.05$)。血清 IL-8 含量 :与正常(N)组比较,模型(M)组明显增高;与模型组比较,小柴胡汤及其药群配伍(A ~ G)各组大鼠血清 IL-8 含量均显著降低($P < 0.01$);各配伍药群组间比较,柴芩(A)组显著低于柴芩 + 姜夏(D)组、姜夏 + 参草枣(E)组和全方(G)组($P < 0.05$)。

讨 论

角叉菜胶诱导的大鼠胸膜炎模型是经典的急性炎症模型,该模型在炎症早期(炎症 1h)与组胺、白三烯、血小板活化因子、前列腺素的释放有关^[2],在炎症的延迟期(1h 后)就出现中性粒细胞的浸润^[3,4],白细胞趋化因子的产生和释放^[5]及其由中性粒细胞诱导的自由基和氧化剂损伤继而引起的组织损伤甚至坏死^[6]。针对有关角叉菜胶诱导的大鼠胸膜炎的发病机制,本实验就小柴胡汤及其配伍药群对大鼠胸腔渗出液的计量、白细胞计数、MPO 活性以及对炎症细胞因子的影响等作了相关研究。

有研究表明大鼠胸腔注射 1% 角叉菜胶溶液 0.2ml 12h 后胸腔渗出液体积和白细胞数量达到高峰,且以中性粒细胞渗出为主,48h 时有所下降,72h 仅有极少量渗出液。MPO 为白细胞颗粒抗原成分之一,其活性可反映白细胞活化程度,在炎症发展阶段逐渐升高,12h 达高峰,随后下降^[7,8]。本实验观察到大鼠胸腔注射角叉菜胶 12h 取材时胸腔渗出液平均高达 4ml 左右,渗出液中有大量白细胞的聚集,渗出液中 MPO 活力显著增高,表明胸膜炎模型诱导成功,该模型大鼠胸腔中有大量中性粒细胞被激活。小柴胡汤及其药群配伍各组渗出液和渗出液中的白细胞数,除柴芩 + 姜夏组外的各药群配伍组 MPO 活性均显著降低,表明小柴胡汤及其各配伍药群组均能抑制角叉菜胶诱导的白细胞浸润游走和活化,对抗炎性渗出和胸膜炎具有显著的防治作用,其中以柴芩、全方、姜夏和参草枣组抗渗出和抑制白细胞游走作用较优。

IL-1 具有广泛的生物学活性,低浓度时主要在炎症的局部起作用,对中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞

有激活、趋化作用,并诱导 IL-6、TNF 等多种细胞因子分泌,上调黏附分子-1(ICAM-1)、VCAM-1 在内皮细胞的表达。增加中性粒细胞、嗜酸性粒细胞的游走^[9]。TNF- α 可通过下列途径引起肺损伤:与肺组织中 TNF- α 受体结合,溶酶体受损,酶外泄引起肺损伤;刺激血管内皮细胞,使肺血管内皮细胞表面细胞间 ICAM-1 表达和上调,导致 ICAM-1 与白细胞黏附,并随着血液渗出跨越内皮迁移到炎症部位,发生炎症反应,引起肺损伤和胸膜炎。炎症可刺激单核巨噬细胞合成和释放 IL-8^[10,11]。IL-8 是一种招募中性粒细胞渗出到炎症部位的主要趋化因子,IL-8 与中性多核白细胞表达特异性受体结合后,导致细胞变形、脱颗粒反应、呼吸爆发、释放溶酶体和过氧化物,从而促进炎症反应,引起肺组织损伤。注射 IL-1 β + IL-8 或 IL-6 + IL-8 抗血清就能够抑制角叉菜胶引起的反应^[12]。IL-1 β 、TNF、IL-8 等细胞因子相互作用、相互诱生,共同在炎症反应调节中发挥重要的作用,既可通过自分泌方式使其生成和释放进一步增加,也可通过旁分泌方式作用邻近细胞激发引起介质释放,从而加大炎症反应^[9,13,14]。

小柴胡汤及其配伍药群均能降低角叉菜胶诱导的胸膜炎大鼠 IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 升高,表明小柴胡汤及其配伍药群可能通过抑制细胞因子的释放来减轻炎症反应。但不同的配伍药群对 3 个细胞因子的作用却并不一致,提示不同的配伍药群的作用机制可能并不相同。

参 考 文 献

- 1 Cuzzocrea S, Mazzon E, Calabro G, et al. Inducible nitric oxide synthase knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(5):1859—1866.
- 2 Cuzzocrea S, Sautebin L, Costantino G, et al. Regulation of prostaglandin production by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase in carrageenan-induced pleurisy. *Life Sci* 1999;65(12):1297—1304.
- 3 Vinegar R, Truax JF, Selph JL, et al. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Fed*

Proc 1982;41(9):2588—2595.

- 4 Vinegar R, Truax JF, Selph JL, et al. Development of carrageenan pleurisy in the rat: effects of colchicine on inhibition of cell mobilization. *Proc Soc Exp Biol Med* 1981;168(1):24—32.
- 5 Utsunomiya I, Nagai S, Oh-ishi S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. *Eur J Pharmacol* 1994;252(2):213—218.
- 6 Vinegar R, Truax JF, Selph JL. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. *Fed Proc* 1976;35(13):2447—2456.
- 7 李平, 卢韵碧, 周汉良, 等. 大鼠角叉菜胶胸膜炎渗出白细胞磷脂酶 D 活性的变化. *中国药理学通报* 2000;16(1):39—42.
Li P, Lu YB, Zhou HL, et al. Changes of phospholipase D activity of exudate leukocytes in rat carrageenan-induced pleurisy. *Chin Pharm Bull* 2000;16(1):39—42.
- 8 Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Meth* 1994;14:157—167.
- 9 Oh-ishi S. Analysis of chemical mediators involved in acute inflammatory reaction with the rat pleurisy model. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1997;110(2):59—68.
- 10 Mulligan MS, Vaporciyan AA, Miyasaka M, et al. Tumor necrosis factor alpha regulates in vivo intrapulmonary expression of ICAM-1. *Am J Pathol* 1993;142(6):1739—1749.
- 11 Folkesson GZ, Matthay MA, Hebert CA, et al. Acid aspiration induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8 dependent mechanisms. *J Clin Invest* 1995;96:107—114.
- 12 Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, et al. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1992;107(3):660—664.
- 13 Frode TS, Souza GE, Calixto JB. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine* 2001;13(3):162—168.
- 14 Utsunomiya I, Nagai S, Oh-ishi S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. *J Immunol* 1991;147(6):1803—1809.

(收稿 2003-10-28 修回 2004-03-20)