

复方银花解毒颗粒对干酵母诱导幼鼠发热模型的退热作用研究

储 锦,马星月,秦婷婷,马占强,傅 强,马世平*

中国药科大学 中药学院,南京 211198

摘要 目的:研究复方银花解毒颗粒对干酵母所致幼龄大鼠发热模型的解热作用,为复方银花解毒颗粒的儿童给药剂量提供参考。**方法:**将 SPF 级 3~5 周龄幼年雄性 SD 大鼠分为正常对照组、模型组、布洛芬组、复方银花解毒颗粒低中高三个剂量组(给药剂量分别为 2.5 、 5 、 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。各组灌胃给药,连续 7 天,末次给药 1 h 后皮下注射干酵母混悬液制备发热模型,造模后于不同时间点分别测定肛温。检测血清中 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 含量以及下丘脑内 cAMP 水平。Western blot 检测下丘脑炎症信号相关 COX2 的含量,并检测 NF- κ B 的核转录情况,检测相关 I κ B α 磷酸化水平变化。**结果:**造模后 2~4 h,布洛芬、复方银花解毒颗粒高剂量组(10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)均能抑制发热大鼠体温升高,在 3 h 时体温降低效果显著;造模 3 h 后,与模型组比较,复方银花解毒颗粒低剂量组(2.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)能显著降低 IL-6、IL- 1β 水平;复方银花解毒颗粒中剂量组(5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高剂量组(10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)能显著降低 IL-6、TNF- α 含量。复方银花解毒颗粒高剂量组(10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)下丘脑内 NF- κ B、I κ B α 、COX2 蛋白表达量与模型组相比也显著下降。**结论:**复方银花解毒颗粒能有效降低发热模型幼鼠的体温,降低体内炎症因子水平,其退热机制可能与 cAMP 信号转导通路和 NF κ B 信号通路有关。

关键词 复方银花解毒颗粒;退热作用;幼龄大鼠

中图分类号 R965.1 **文献标志码** A **文章编号** 1673-7806(2020)04-246-05

复方银花解毒颗粒是由青蒿、山银花、荆芥、薄荷、野菊花、大青叶、连翘、鸭跖草、前胡、淡豆豉等中药制成的颗粒剂,能疏风解表、清热解毒。用于感冒引起的发热、头痛、咳嗽等,临床前研究表明,复方银花解毒颗粒对伤寒、副伤寒、变形杆菌和大肠杆菌内毒素所致的发热家兔有解热作用。为了验证该复方对幼龄模型动物的药效作用,本项目以幼龄大鼠为研究对象,采用干酵母混悬液诱导幼龄大鼠发热模型,观察其退热作用,为该产品临床扩大用药人群至儿童提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 3~5 周龄幼年雄性 SD 大鼠 200 只,体重在 50~70 g,由江苏省青龙山实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(浙)2019-0002,实验动物质量合格证号 1907040008。

1.2 药物和试剂

复方银花解毒颗粒(天长亿帆制药有限公司,批号 180911);布洛芬(葵花药业,批号 29180412);干酵母(OXOID 公司,批号 2481359-02);大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素- 1β (IL- 1β)、白介素-6(IL-6)、cAMP ELISA 试剂盒(均为 Elabscience);内参 GAPDH(Proteintech 公司,批号 00078425);一抗核因子 κ B(NF- κ B,批号 8424S)、p-NF- κ B(批号 3033T)购自 Cell Signaling Technology 公司;p-I κ B(万类生物科技公司,批号 H01022495);环氧化酶 2(COX2,Proteintech 公司,批号 00072808);兔二抗(Bioworld,批号 AA01201);ECL 化学发光超敏显色试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号 36208ES60);PMSF(批号 ST505)、RIPA 裂解液(强)(批号 P0013B)、5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(批号 P0015L)、BCA 试剂盒(批号 P0010),均为碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验仪器

电子体温计(山东尚农电子科技有限公司);SN3001 全波长多功能酶标仪(Thermo 公司);全自动数码凝胶/化学发光图像分析系统、EPS 600 电泳

作者简介 储锦,女,在读硕士生 E-mail: chujintiffany@foxmail.com
* 通讯作者 马世平,男,教授 E-mail: spma@cpu.edu.cn
收稿日期 2020-04-10 修回日期 2020-05-25

仪(均上海天能科技有限公司);TE124S 精密电子天平(Sartorius 公司)。

1.4 模型制备与分组给药

将 SPF 级 3~5 周龄幼年雄性 SD 大鼠,适应性喂养 3 天,每日早中晚各一次对幼鼠进行测量肛温,每次测温前电子体温计探头涂上凡士林,插入幼鼠直肠 2.5 cm(在体温计 2.5 cm 用黑色记号笔标记,确保每次插入深度一致),待读数稳定后记录体温值,连续测量 3 天,选取体温为 36.5 °C~38.5 °C、且连续体温变化小于 0.3 °C 的动物用于实验^[1]。

将筛选合格的幼鼠随机分成空白对照组、模型组、布洛芬组(0.6 g·kg⁻¹)以及复方银花解毒颗粒低中高剂量组(2.5、5、10 g·kg⁻¹)。

第一批幼鼠每组 12 只,用于体温检测。第二批幼鼠每组 8 只,用于机制研究,在药效显著时取血及下丘脑。连续灌胃给药 7 天阿,空白和模型组给予同体积生理盐水。

实验开始前,禁食不禁水 6 h,于实验当天早上检测体温 3 次,取均值为基础体温,末次给药 1 h 后各组动物以 10 mL·kg⁻¹ 剂量皮下注射质量浓度为 200 mg·L⁻¹ 的干酵母混悬液;空白对照组皮下注射等体积生理盐水^[1]。

1.5 肛温测试、标本的采集及检测

第一批动物造模后 0.5、1、2、3、4、6 h 分别测定肛温,记录数据,与基础体温比较,计算体温变化值(Δ°C)(测定体温-基础体温)。在第二批动物造模后选择药效显著的时间点,从动物腹主动脉取血,处死后取下丘脑。ELISA 检测该时间点血清中内生致热源 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量。试剂盒检测下丘脑体温调节介质 cAMP 含量。

1.6 Western blot 检测信号通路相关蛋白表达

Western blot 检测下丘脑炎症信号相关 COX2 的含量,并检测 NF-κB 的核转录情况及 IκBα 磷酸化水平变化。根据所提下丘脑组织的重量,取所需量的 RIPA 裂解液。在使用前加入苯甲基磺酰氟(PMSF),配成裂解缓冲液。按比例加入裂解缓冲液于匀浆器中研磨至组织裂解。收集组织匀浆于离心管中,4 °C 放置 30 min,充分裂解后,离心(12 000 r·min⁻¹,4 °C)30 min,收集上清液。取 2 μL 上清液用于检测蛋白的浓度,其余上清液中加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,于 100 °C 沸水浴中加热 10 min 使蛋白完全变性。室温冷却,样品制备结束进行制胶和 SDS-PAGE 电泳。参照 marker 将目的蛋白所在凝胶切下,采用湿法转膜,室温封闭 2 h。封闭结束后,取出 PVDF 膜,用 TBST 洗涤 1 次。将 PVDF 膜蛋白面朝下放入

TBST 稀释的一抗中,4 °C 孵育 12 h 后,将 PVDF 膜转移至 TBST 中洗涤 3 次。然后在二抗中 37 °C 轻轻摇晃孵育 2 h, TBST 洗涤 2 次。在 PVDF 膜上加入 ECL 化学发光超敏显色剂,在全自动数码凝胶/化学发光图像分析系统中显影并采集图像。使用 Image J 图像分析软件对采集到的图像进行灰度分析。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件,单因素方差分析统计各项数据。*P*<0.05 为具有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 对干酵母致幼鼠发热体温变化的影响

如图 1 所示,与空白对照组比较,模型幼龄大鼠造模后 3、4、6 h 体温显著升高(*P*<0.001, *P*<0.01, *P*<0.001),造模 3 h 时模型幼鼠体温达到最高。与模型组相比,布洛芬组在 3 h 时体温降低显著(*P*<0.05);复方银花解毒颗粒低剂量组、中剂量组在造模后 3 h 体温有降低趋势、但是没有统计学差异;复方银花解毒颗粒高剂量组在造模后 2、3 h 体温明显降低,具有统计学意义(*P*<0.01、*P*<0.001)。

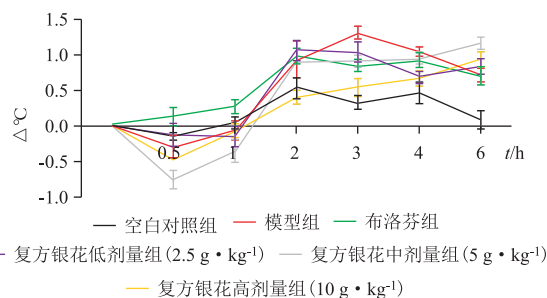


图 1 各时间点发热幼鼠体温变化曲线(*n*=12)

2.2 对干酵母致热幼鼠血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量的影响

如图 2 所示,与空白对照组比较,模型组 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量均显著升高(*P*<0.01、*P*<0.01、*P*<0.001)。与模型组比较,布洛芬组可降低血清中各炎症因子的水平,其中 IL-6 水平的降低具统计学意义。与模型组比较,复方银花解毒颗粒低剂量组能显著降低 IL-6、IL-1β 含量(*P*<0.01、*P*<0.01);复方银花解毒颗粒之中剂量组、高剂量组可降低 IL-6、TNF-α 含量,具有统计学差异(*P*<0.05、*P*<0.05)。

2.3 对下丘脑 cAMP 含量的影响

如图 3 所示,与空白对照组比较,模型组下丘脑内 cAMP 含量显著升高(*P*<0.001)。布洛芬组、复方银花解毒颗粒低剂量组、高剂量组均能显著降低幼鼠下丘脑内 cAMP 含量(*P*<0.001、*P*<0.001)。

2.4 对下丘脑 NF-κB、IκBα、COX2 蛋白表达的影响

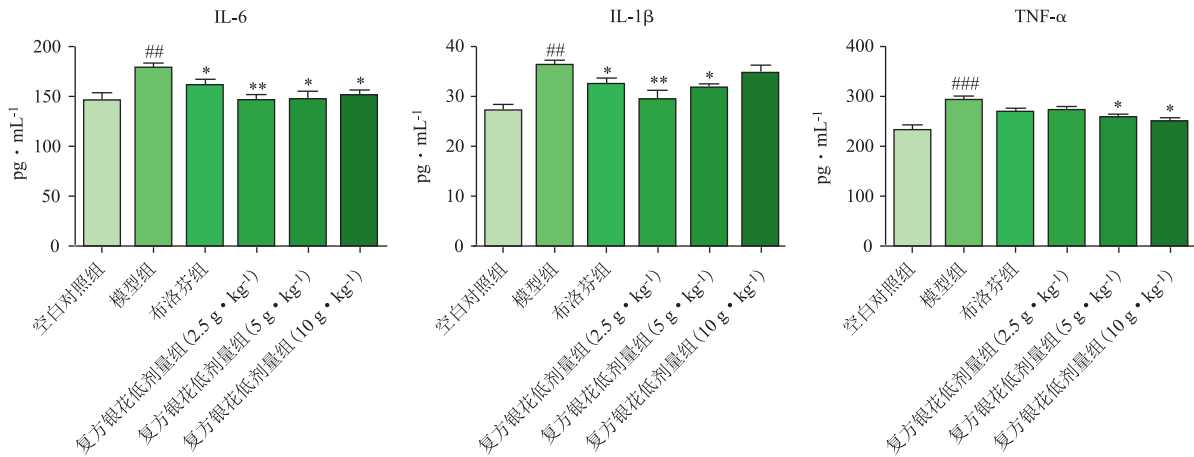


图2 对幼鼠血清内 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量的影响

注:与空白对照组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ ($n=6\sim 8$)

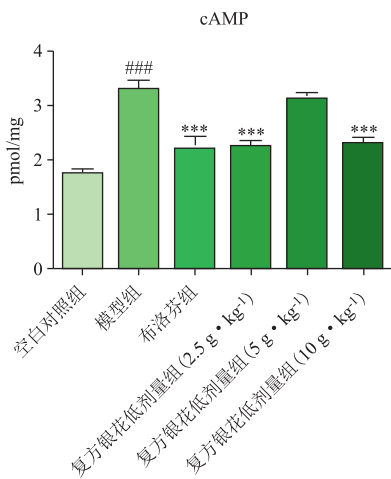


图3 对下丘脑内 cAMP 含量的影响

注:与空白对照组相比,### $P<0.001$;与模型组相比,*** $P<0.001$ ($n=8$)

如图4所示,与空白对照组比较,模型组下丘脑内 NF-κB、IκBα、COX2 含量均显著升高,具有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.01$)。与模型组比较,布洛芬组能够显著降低下丘脑内 NF-κB、IκBα、COX2 含量($P<0.05$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.05$)。复方银花解毒颗粒组高剂量下丘脑内 NF-κB、IκBα、COX2 蛋白表达量与模型组相比也显著下降($P<0.001$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

3 讨论

复方银花解毒颗粒以“银翘散”为基础化裁而来,方中以山银花、连翘为君药:山银花味甘性寒,气味芳香,具有清热解毒之功,善治温病发热等病证;连翘苦而微寒,轻清上浮;两药既能解表透邪,又能清热解毒。臣药用荆芥、薄荷、豆豉疏散解表:荆芥虽属辛温之品,但温而不燥伍入辛凉清解剂中,可以加强解表透邪之力,方中用此药,凉而又辛;薄荷辛凉,疏散风热而利咽喉;豆豉辛甘微苦弱寒,宣散表邪;共助君药开皮毛而散热于外。佐药为

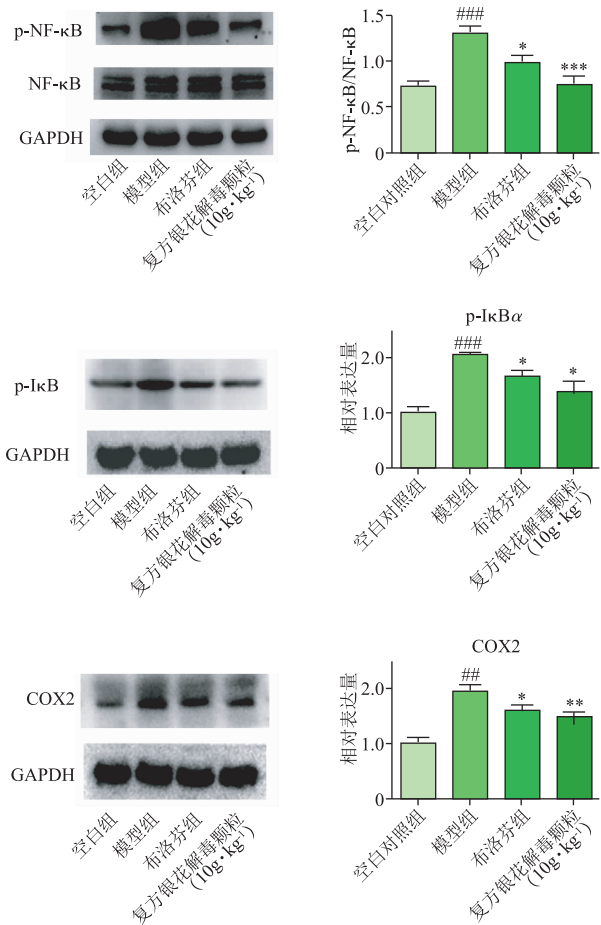


图4 对下丘脑内 NF-κB、IκBα、COX2 含量的影响

注:与空白对照组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ ($n=3$)

青蒿、大青叶、野菊、鸭跖草:青蒿苦寒清热,芳香透邪;大青叶味苦性寒,清热凉血,尤擅长于清解时祛之热毒;野菊花味苦辛性微寒,清热解毒;鸭跖草味甘性寒,清热解毒,而尤以解热见长。使药前胡辛苦,宣散风热,肃肺化痰。诸多中药合用具有辛凉解表、清热解毒之功。现代药理学研究表明,本品具有

较好的抗病毒、抗菌、解热、镇痛和抗炎作用。方中含多样青蒿化学成分,包括倍半萜、二萜、黄酮类等。其中倍半萜类是青蒿发挥作用的主要有效成分,具有多种药理作用,尤显解热抗炎等^[2]。已有研究表明,青蒿中多个成分均能降低酵母引起的大鼠体温异常升高,有解热作用^[3]。山银花主要活性成分之一为绿原酸,有抗菌、抗炎、抗病毒等作用^[4]。荆芥主要成分为挥发油及黄酮类化合物,可以祛风解表,有解热、抗炎镇痛等作用^[5,6]。

cAMP 是重要的发热中枢介质,研究表明,下丘脑内 cAMP 的浓度随着体温的升高而升高,与体温呈正相关^[7]。IL-6、IL-1 β 、TNF- α 是研究明确的炎症因子,多项研究表明,在体温异常升高时,上述炎症因子水平也呈现上升趋势^[8-10]。

本研究发现,模型组体温在造模后 3 h 升高最明显,此时复方银花解毒颗粒高剂量组降低体温效果也极显著,表明该颗粒剂有解热的功效。在对比模型组血清中炎症因子水平后发现,复方银花解毒颗粒能显著降低 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量。复方银花解毒颗粒也可显著减少幼鼠下丘脑内 cAMP 含量,提示该颗粒剂具有解热功效。其作用机制与降低脑内 cAMP 水平、降低各种炎症因子水平有关,并且高剂量组效果最明显。

在本研究中,复方银花解毒颗粒之中剂量组对发热幼鼠下丘脑内 cAMP 含量有降低趋势,但是没有显著性差异,其原因可能是中剂量组降低体温作用较弱,与模型组相比没有显著性差异,从而导致 cAMP 含量没有显著降低;另外,中药发挥作用的机制复杂,在幼龄大鼠体内可能较难表现出剂量依赖性。复方银花解毒颗粒中、高剂量组有降低血清 IL-1 β 含量的趋势,但是没有统计学差异,其可能的原因是幼鼠体内的 IL-1 β 因子对低剂量组更敏感,中高剂量抑制 IL-1 β 效果没有低剂量组好,其确切作用机制有待深入研究。

NF- κ B 是一种可诱导的真核转录因子,在调控众多参与免疫和炎症反应的基因表达中起着关键作用^[11]。在正常情况下,NF- κ B 与其抑制性蛋白 I κ Bs 结合形成异三聚体而失去活性^[12]。当细胞受外界炎症因子刺激后,NF- κ B 的抑制蛋白(I κ B α)可发生磷酸化并降解,NF- κ B 从 NF- κ B/I κ B α 复合物中解离出来,发生了活化并入核,诱导相关炎症基因的表达^[13]。进入细胞核后,NF- κ B 可以调节几个基因,其中包括 COX2。COX 是产生前列腺素(PGs)的关键酶,会引起一系列的炎症反应^[14]。有研究表明,干酵母皮下注射引起大鼠发热后,可激活 NF- κ B p65 并入核起到转

录作用,促进下丘脑 COX2 mRNA 表达增加^[8]。

本研究发现,复方银花解毒颗粒以及布洛芬均可以通过抑制 NF- κ B 的活化减少其入核,抑制 COX2 活性,从而减少炎症物质的产生,发挥解热作用。同时也可以通过减少 I κ B α 的磷酸化、抑制 NF- κ B 激活,从而发挥解热、抗炎效果。

综上所述,复方银花解毒颗粒对幼鼠发热模型有较好的解热抗炎作用,使得异常升高的体温恢复正常,可显著降低模型动物体内炎症因子水平,其机制可能与 cAMP 信号转导通路和 NF- κ B 信号通路有关。

参考文献

- [1] 岳枫,靳冉,段娟娟,等. 金蓝颗粒解热抗炎作用实验研究[J]. 中医学报,2018,33(9):107-11.
- [2] 李海波,秦大鹏,葛雯,等. 青蒿化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2019,50(14):3461-70.
- [3] 李兰芳,郭淑英,张畅斌,等. 青蒿有效部位及其成分的解热作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(12):65-7.
- [4] 陈丽娜. 山银花的抗菌作用初步研究[J]. 临床医学工程,2009,16(10):46-7.
- [5] 黄晓巍,刘玥欣,刘轶蕾,等. 荆芥化学成分及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药,2017,37(8):817-9.
- [6] 张丽,张敏,孙娥,等. 荆芥内酯聚乳酸乙醇酸纳米粒的抗炎、镇痛及解热作用[J]. 中国药科大学学报,2008(5):433-6.
- [7] 焦平,钟振环,王海燕,等. 小儿退热解毒颗粒对发热大鼠下丘脑中 PGE₂ 及 cAMP 含量的影响[J]. 中国中医急症,2007(7):842-3.
- [8] 周蓓,陈誉丹,冯莉婷,等. 石膏粳米汤对干酵母致热大鼠解热抗炎及核因子- κ Bp65、环氧合酶-2 表达的影响[J]. 科学技术与工程,2018,18(26):165-70.
- [9] 庞淑婉,李宏,穆轶,等. 清热消炎颗粒解热作用及对血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 PGE₂ 影响的初步研究[J]. 天津医科大学学报,2015,21(6):488-90.
- [10] 李洁,杨萍,李绍强,等. 复方柴芩退热颗粒对发热大鼠模型退热作用的研究[J]. 新中医,2017(10):29-33.
- [11] Charalambous MP, Lightfoot T, Speirs V, et al. Expression of COX-2, NF- κ B-p65, NF- κ B-p50 and IKK α in malignant and adjacent normal human colorectal tissue[J]. *Brit J Cancer*, 2009, 101(1): 106-15.
- [12] 满晓华,李兆申,屠振兴,等. 大黄素对急性胰腺炎大鼠胰腺核因子- κ B 活化的影响[J]. 中华消化杂志,2005(10):586-9.
- [13] Basak S, Kim H, Kearns JD, et al. A fourth I κ B protein within the NF- κ B signaling module [J]. *Cell*, 2006, 128(2): 369-81.

Study on the Antipyretic Effect of Compound Yinhua Jiedu Granules on Dry Yeast Induced Fever in Juvenile Rats

CHU Jin, MA Xingyue, QIN Tingting, MA Zhanqiang, FU Qiang, MA Shiping*

College of Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198

ABSTRACT **Objective:** To study the antipyretic effect of Compound Yinhua Jiedu Granules on the dry yeast febrile model of juvenile rats, and to provide dosage reference of Compound Yinhua Jiedu Granules for children. **Methods:** The male juvenile SD rats were divided into six groups: normal control group, model group, Ibuprofen group, and Compound Yinhua Jiedu Granules low, medium and high dose groups [the doses were 2.5, 5 and 10 g·kg⁻¹, respectively]. Rats in each group were given the drugs by gavage according to corresponding doses for 7 days. At 1h after the last administration, dry yeast suspensions were subcutaneously injected to prepare the heating model, and anal temperatures were measured at different time points. Levels of serum IL-1, IL-6 and TNF- α , and hypothalamus cAMP were measured. Western blot was used to detect the content of COX2 related to the inflammatory signal, the nuclear transcription of NF- κ B and the phosphorylation level of I κ B α in the hypothalamus. **Results:** After 2–4 hours of yeast injection, Ibuprofen and Compound Yinhua Jiedu Granules at highdose (10 g·kg⁻¹) inhibited the temperature rise of febrile rats, which was significant at 3 h. At 3 hours after yeast injection, compared with the model group, low dose of Compound Yinhua Jiedu Granules (2.5 g·kg⁻¹) significantly reduced the levels of IL-1 and IL-6. The contents of IL-6 and TNF- α were significantly reduced in the medium dose group (5 g·kg⁻¹) and the high dose group (10 g·kg⁻¹). Compared with the model group, the expression of hypothalamus NF- κ B, I κ B α and COX2 proteins in the Compound Yinhua Jiedu Granules high dose group (10 g·kg⁻¹) also decreased significantly. **Conclusion:** Compound Yinhua Jiedu Granules can effectively reduce the body temperature of the febrile juvenile rats and reduce the levels of inflammatory factors *in vivo*, its antipyretic mechanism may be related to the cAMP and NF κ B signaling pathways.

KEY WORDS Compound Yinhua Jiedu Granules; Antipyretic effect; The juvenile rats

· 资讯概览 ·

江苏省药学会召开第九次会员代表大会

2020年8月22日上午,江苏省药学会在南京双门楼宾馆隆重召开第九次会员代表大会,来自全省13个市药领域的432名代表参加了大会。

中国药学会理事长孙咸泽莅临大会指导,江苏省药品监督管理局局长王越、副局长姜伟,江苏省科协副主席冯少东到会致辞祝贺。江苏省药学会第八届理事会名誉理事长李全林、毛季琳、吴晓明在主席台就座。第八届理事会理事长胡晓抒,副理事长姚新中、王广基、李继、刘晓梅、袁东海、王勇出席大会,副理事长兼秘书长胡琰主持大会。

大会在雄壮的国歌声中开幕。孙咸泽代表中国药学会对代表大会的召开表示热烈的祝贺,充分肯定了第八届理事会近7年来所做的工作,为促进我省医药事业繁荣和发展做出了贡献。

冯少东致辞指出,省药学会在以往连续17年被省科协评为先进省级学会的基础上,2013年以来在八届理事会的带领下,连续6年荣获省科协颁发的省级综合示范学会,2019年又荣获学术特色学会奖,学会的各项工作在省科协系统省级学会中名列前茅,成绩突出。

王越对学会近年来服务全省广大会员、服务药品监管事业所做的工作深表赞许,并对学会今后的工作提出三点希望:一是深化科研与生产相结合;二是深化科研与公众需求相结合;三是深化科研与自身建设相结合。

胡晓抒作第八届理事会工作报告。在习近平新时代中

国特色社会主义思想指引下,学会在党的组织建设、学术工作、承接政府转移职能、药学科普宣传、信息化推广应用、学会自身建设等六个方面都取得了较好成绩和进步。他系统地总结学会7年来所做的工作,并对今后5年的工作提出规划建议。

马传学监事做了江苏省药学会第一届监事会工作报告。

胡琰作第八届理事会财务报告,就修改《江苏省药学会章程》和本届大会筹备情况及理事会候选人作了说明。

代表们审议通过了第八届理事会工作报告、监事会工作报告、财务报告、江苏省药学会章程、会费标准及管理方法、代表大会选举办法等。经过无记名现场投票,选举产生由173名理事组成的第九届理事会,选举产生了有7名监事组成的第二届监事会。

在召开的第九届一次理事会上,经投票选举产生57名常务理事,胡晓抒当选为理事长,王广基、季勇、刘晓梅、胡琰、任晋生、王勇、肖伟、曹龙祥、顾民、王善春、吕爱锋、朱建华当选为副理事长,张玫当选为秘书长。

在召开的监事会二届一次会议上,姚新中当选为监事长。

闭幕式上,新当选的理事长胡晓抒发表热情洋溢的讲话,代表新一届理事会向各位代表表示衷心的感谢和崇高的敬意。本次大会的召开是我省药学界一次具有里程碑意义的大事,对于促进我省医药事业加快发展必将起到重要作用。第九次会员代表大会完成了各项议程,取得圆满成功。