

# 生品和蜜炙桑白皮对哮喘大鼠血清 NO, LPO, IL-4 和 IFN- $\gamma$ 的影响

隋在云\*, 王爱洁, 李群

(山东省中医药研究院, 济南 250014)

**[摘要]** **目的:**探讨生品和蜜炙桑白皮对哮喘大鼠血清中一氧化氮(NO), 脂质过氧化物(LPO), 白细胞介素-4(IL-4)和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )的影响。**方法:**Wistar大鼠随机分为空白组, 模型组, 阳性药地塞米松 $0.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 生品和蜜炙桑白皮 $1.08, 3.24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组。造模大鼠于实验第1, 7天ip卵蛋白混悬液1 mL致敏, 第15天起雾化吸入1%卵蛋白生理盐水, 激发5 d。从造模之日起开始ig给药, 共20 d。观察大鼠10 min内出现II级哮喘的潜伏期, 肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸粒细胞数(EOS), 血清中NO, LPO, IL-4和IFN- $\gamma$ 的水平。**结果:**与空白组相比, 模型组大鼠哮喘反应的潜伏期显著缩短, BALF中EOS及血清NO, LPO, IL-4含量增加( $P < 0.01$ ), 血清IFN- $\gamma$ 含量减少( $P < 0.001$ )。与模型组相比, 桑白皮蜜炙品、生品 $3.24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组大鼠显著延长哮喘反应的潜伏期、减少BALF中EOS及血清NO, LPO, IL-4含量( $P < 0.05$ )、升高血清IFN- $\gamma$ ( $P < 0.01$ )。桑白皮生品与蜜炙品之间各项指标均无显著差异。**结论:**桑白皮蜜炙品和生品均能明显降低哮喘大鼠BALF中炎性细胞数量, 影响细胞因子水平变化, 从而减轻气道炎症反应, 改善哮喘症状。

**[关键词]** 蜜炙; 桑白皮; 哮喘; 一氧化氮; 脂质过氧化物; 白细胞介素-4; 干扰素- $\gamma$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0095-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015070095

## Effect of Crude and Honeyed Mori Cortex on Serum NO, LPO, IL-4 and IFN- $\gamma$ in Asthmatic Rats

SUI Zai-yun\*, WANG Ai-jie, LI Qun (Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Mori Cortex before and after honey processing on serum nitric oxide (NO), lipid peroxidation (LPO), interleukin-4 (IL-4) and interferon (IFN- $\gamma$ ) of asthmatic rats, to study the anti-asthmatic mechanism of honeyed Mori Cortex. **Method:** Wistar rats were randomly divided into control group, model group, dexamethason  $0.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  group, the crude and honey processed Cortex Mori  $1.08, 3.24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  groups. Asthma rat model was established by sensitization and stimulation with ovalbumin (OVA) conjuncted with  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . The latent period of class II asthma in 10 min, bronchial alveolar lavage fluid (BALF) eosinophil number, the levels of NO, LPO, IL-4 and IFN- $\gamma$  in serum were determined. **Result:** Compared with the control group, the latent phase was significantly shorter, the BALF eosinophil number and the levels of NO, LPO, IL-4 in serum were significantly increased in the model group ( $P < 0.01$ ). The group could also significantly decreased the levels of IFN- $\gamma$  ( $P < 0.001$ ). Compared with the model group, the latent phase was significantly longer, the BALF eosinophil number and the levels of NO, LPO, IL-4 in serum were significantly reduced in honey processed Mori Cortex and crude Mori Cortex  $3.24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  groups ( $P < 0.05$ ). The groups could also significantly increased the levels of IFN- $\gamma$  ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The Mori Cortex before and after honey processing can significantly reduce the number of inflammatory cells in BALF of asthmatic rat and impact the levels of cytokines, thereby improving airway inflammation in asthma and symptoms of bronchial asthma.

**[Key words]** honey processing; Mori Cortex; asthmatic; nitric oxide; lipid peroxide; interleukin-4; interferon- $\gamma$

**[收稿日期]** 20140709(011)

**[基金项目]** 国家中医药管理局“十二五”中医药行业科研专项(20110700719)

**[通讯作者]** \*隋在云, 研究员, 从事中药药理、毒理研究, Tel: 0531-82949836, E-mail: zy\_505@163.com

生品桑白皮为桑科植物桑的干燥根皮。秋末叶落时至次春发芽前采挖根部,刮去黄棕色粗皮,纵向剖开,剥去根皮,晒干即得<sup>[1]</sup>。蜜炙桑白皮是桑白皮的蜜炙加工炮制品,方法是取炼蜜,加适量开水稀释,淋入桑白皮丝中拌匀,闷润,置炒制容器内,用文火加热,炒制深黄色、不黏手,取出晾凉。每100 kg桑白皮丝,用炼蜜25 kg<sup>[2]</sup>。桑白皮生品和蜜炙品均是临床常用中药且应用广泛,明·《医学入门》首次记载了桑白皮生、熟异用理论,曰:“利水生用,咳嗽蜜蒸或炒”,此后的很多医籍对生、熟异用及炮炙前、后的作用也有明确记载。现代研究证明了桑白皮在利尿、止咳平喘方面生、熟异用的合理性<sup>[3-4]</sup>,但桑白皮蜜炙前、后的化学成分及药理药效变化鲜有研究。本文对桑白皮生品和蜜炙品的平喘作用进行了药效研究和机制探讨,以期桑白皮不同炮制品的临床应用提供科学的理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar大鼠70只,150~200 g,SPF级,雄性,购于山东大学实验动物中心,合格证号SCXK(鲁)2009-0001。

**1.2 药物与试剂** 0.9%氯化钠注射液(山东齐鲁药业有限公司,批号1A11102903),卵清白蛋白(Sigma公司,批号A5253),地塞米松(晨欣药业股份有限公司,批号1205166412),一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20121221),脂质过氧化物(LPO),白细胞介素-4(IL-4)和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) ELISA试剂盒(IBL公司,产品号HG35084, HG01036, HG01683)。

**1.3 药材及辅料** 桑白皮(安徽省亳州市精华制药康普有限公司,产地河南洛阳,批号111211,经山东省中医药研究院李英霞研究员鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* 的干燥根皮),洋槐蜂蜜(济南济泉黄岩蜂产品开发有限公司,批号20110826)。

**1.4 仪器** GB303型电子天平(Mettler-Totado公司),YLS-8A型多功能诱咳引喘仪(山东省医学科学院设备站),xMark型微孔板分光光度计(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 药物配制** 蜜炙桑白皮,山东省中医药研究院中药炮制室提供。以传统外观质量要求和内在质量要求为指标,采用综合质量评分法,优选出的最佳蜜炙工艺为每100 g桑白皮丝取炼蜜25 g,加37.5 g沸水稀释,淋入桑白皮丝中拌匀,闷润60 min,置炒制容器内,240℃炒制18 min取出,晾凉,即得。生

品桑白皮(S3样品)、蜜炙桑白皮(中试Z3样品)提取物,桑白皮粉碎后,分别以10,8倍量水提取2次,合并提取液浓缩至生药0.4 g·mL<sup>-1</sup>,生理盐水稀释至所需浓度。

**2.2 动物分组与给药** 将70只大鼠随机分为空白组、模型组、阳性药(地塞米松0.4 mg·kg<sup>-1</sup>)组、生品桑白皮(1.08, 3.24 g·kg<sup>-1</sup>)组、蜜炙桑白皮(1.08, 3.24 g·kg<sup>-1</sup>),共7组,每组10只。各给药组*ig*给予受试样品,给药体积为20 mL·kg<sup>-1</sup>,空白组、模型组*ig*同体积生理盐水。

**2.3 造模** 造模大鼠于第1,7天*ip*卵蛋白混悬液1 mL(卵蛋白100 mg,氢氧化铝100 mg)致敏。从造模之日起开始给药,第15天,各组在给药1 h后开始激发造模,将大鼠按组交替逐只放入多功能诱咳引喘仪的动物箱内,喷入1%卵蛋白生理盐水,超声雾化吸入激发哮喘。每日1次,共5 d。每次数秒至数分钟,到大鼠开始出现呼吸困难、呛咳、点头呼吸、甚至腹肌痉挛等症状为止。最后1 d,记录大鼠10 min内出现Ⅱ级哮喘(呼吸困难和咳嗽反应)的潜伏期作为统计指标。

**2.4 检测指标** 以10%水合氯醛(10 mL·kg<sup>-1</sup>)*ip*麻醉动物,固定,打开并暴露胸腔,心脏取血4 mL。低温下离心,取血清。按照试剂盒说明书,采用分光光度计法检测血清NO,用酶联免疫吸附测定血清中LPO, IL-4, IFN- $\gamma$ 的含量。

**2.5 肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞(EOS)计数的测定** 处死大鼠,分离出完整的气管、支气管和肺组织,结扎右侧主支气管,用接注射器的灌洗器通过左侧支气管向左侧肺叶注入0.9%生理盐水2 mL,缓慢抽吸3次后以负压吸出,重复2次,将灌洗液3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min后,取沉淀,用100  $\mu$ L PBS溶解,取20  $\mu$ L混悬液,加入嗜酸性粒细胞计数液0.38 mL中,静置30 min,于细胞计数板上计数嗜酸性粒细胞,1 h内完成。

**2.6 统计学处理** 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用SPSS 13.0统计软件进行组间*t*检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对哮喘大鼠引喘潜伏期, BALF中EOS和血清NO的影响** 与空白组相比,模型组大鼠哮喘反应的潜伏期显著缩短, BALF中EOS及血清NO含量增加,并具有统计学差异(*P* < 0.01),造模成功。与模型组相比,阳性药组、桑白皮生品组及蜜炙组均有延长卵白蛋白所致大鼠哮喘反应的潜伏期、减少

BALF 中 EOS 及血清 NO 含量的作用 ( $P < 0.05$ )。桑白皮生品与蜜炙品之间 3 项指标均无显著差异。说明桑白皮炮制前后均有减轻气道炎症反应,改善哮喘症状的作用。见表 1。

表 1 生品和蜜炙桑白皮对哮喘大鼠引喘潜伏期,肺泡灌洗液 EOS 和血清 NO 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of crude and honeyed Mori Cortex on latent period of class II asthma, EOS number in BALF and serum NO in asthmatic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | 引喘潜伏期<br>/s             | EOS<br>/×10 <sup>8</sup> /L | NO<br>/μmol·L <sup>-1</sup> |
|-------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白    | -                         | 463 ± 112 <sup>3)</sup> | 0.7 ± 0.5 <sup>2)</sup>     | 75.9 ± 15.4 <sup>3)</sup>   |
| 模型    | -                         | 196 ± 57                | 3.2 ± 1.9                   | 130.5 ± 22.2                |
| 地塞米松  | 4 × 10 <sup>-4</sup>      | 325 ± 86 <sup>3)</sup>  | 1.2 ± 0.6 <sup>2)</sup>     | 89.4 ± 17.1 <sup>3)</sup>   |
| 生品桑白皮 | 1.08                      | 298 ± 98 <sup>1)</sup>  | 1.5 ± 1.0 <sup>1)</sup>     | 93.0 ± 18.9 <sup>3)</sup>   |
|       | 3.24                      | 324 ± 137 <sup>1)</sup> | 1.0 ± 0.6 <sup>2)</sup>     | 91.8 ± 14.7 <sup>3)</sup>   |
| 蜜炙桑白皮 | 1.08                      | 289 ± 83 <sup>2)</sup>  | 1.3 ± 0.8 <sup>2)</sup>     | 93.9 ± 15.0 <sup>3)</sup>   |
|       | 3.24                      | 313 ± 118 <sup>1)</sup> | 0.8 ± 0.5 <sup>2)</sup>     | 87.4 ± 11.2 <sup>3)</sup>   |

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.001$ (表 2 同)。

3.2 对哮喘大鼠血清 LPO, IL-4, IFN- $\gamma$  的影响 与空白组相比,模型组大鼠血清 LPO, IL-4 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), IFN- $\gamma$  显著降低 ( $P < 0.01$ ), 造模成功。与模型组相比,阳性药、桑白皮生品、蜜炙品高剂量组均可降低大鼠血清 LPO, IL-4 含量,升高血清 IFN- $\gamma$ , 均具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。桑白皮生品与蜜炙品之间 3 项指标均无显著差异。见表 2。

表 2 生品和蜜炙桑白皮对哮喘大鼠血清 LPO, IL-4, IFN- $\gamma$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of crude and honeyed Mori Cortex on serum LPO, IL-4 and IFN- $\gamma$  in asthmatic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | LPO<br>/nmol·L <sup>-1</sup> | IL-4<br>/ng·L <sup>-1</sup> | IFN- $\gamma$<br>/ng·L <sup>-1</sup> |
|-------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 空白    | -                         | 4.4 ± 2.2 <sup>3)</sup>      | 14.2 ± 4.4 <sup>2)</sup>    | 51.0 ± 8.9 <sup>3)</sup>             |
| 模型    | -                         | 10.4 ± 3.2                   | 21.4 ± 5.6                  | 33.1 ± 5.4                           |
| 地塞米松  | 4 × 10 <sup>-4</sup>      | 6.3 ± 1.5 <sup>2)</sup>      | 14.1 ± 3.8 <sup>2)</sup>    | 43.3 ± 10.0 <sup>1)</sup>            |
| 生品桑白皮 | 1.08                      | 8.8 ± 1.5                    | 20.9 ± 4.0                  | 38.3 ± 6.8                           |
|       | 3.24                      | 7.2 ± 3.3 <sup>1)</sup>      | 16.0 ± 4.2 <sup>1)</sup>    | 42.5 ± 4.1 <sup>2)</sup>             |
| 蜜炙桑白皮 | 1.08                      | 8.3 ± 2.3                    | 16.2 ± 4.3 <sup>1)</sup>    | 39.6 ± 5.4 <sup>1)</sup>             |
|       | 3.24                      | 6.9 ± 2.7 <sup>1)</sup>      | 14.7 ± 5.1 <sup>1)</sup>    | 44.8 ± 6.2 <sup>3)</sup>             |

#### 4 讨论

桑白皮具有泻肺平喘、利水消肿的功效,生品性

寒,泻肺行水之力较强,多用于水肿尿少,肺热痰多的咳喘。蜜炙之后寒泻之性缓和,偏于润肺止咳,多用于肺虚咳喘。

现代研究也证明桑白皮生熟异用及炮制对桑白皮药理作用的影响。《中药临床生用与制用》归纳指出“桑白皮饮片分为生、炒、蜜炙 3 种:生药味甘性寒,以泻肺平喘力胜,多用于水肿溲少,如五皮散;炒药味甘,性寒偏平,以降气平喘力胜,多用于水饮停肺,如桑白皮散;蜜炙药味甘,性寒偏润,以润肺清热,止咳平喘力强,多用于肺热咳喘,如泻白散”<sup>[5]</sup>。本试验结果显示生品和蜜炙桑白皮均能延长卵白蛋白所致大鼠哮喘反应的潜伏期、减少肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数及血清 NO 含量;提示桑白皮炮制前后均有减轻气道炎症反应,改善哮喘症状的作用。这与文献报道相符。

支气管哮喘是一种由变应原、细菌、病毒和物理因素等诱发的气道炎症慢性气道变态反应性疾病。大量炎性细胞浸润气道黏膜上皮组织中,在气道炎症的发生及发展过程中起重要作用<sup>[6-7]</sup>。EOS 是引起气道炎症和支气管高反应性的关键炎性细胞,是哮喘发病中的主要效应细胞。研究认为 EOS 表面有大量的低亲和力 IgE 受体,可通过 IgE 介导激活而释放气道上皮毒性物质,炎性介质、细胞因子和活性氧参与气道变应性炎症的调节。EOS 释放白三烯(LT)致支气管强烈收缩,从而导致哮喘不可逆的肺功能损伤及气道的结构改变,即气道的重建,这种组织学上的变化可能导致不可逆的气道阻力增加和黏液栓形成,从而阻塞气道<sup>[8-9]</sup>。通过 EOS 计数,可知道其在参与气道炎症反应中的数量变化。

NO 对哮喘具有双重作用,一方面可以调节气道平滑肌张力,另一方面 NO 过多生成对机体有害,可引起哮喘患者气道充血,加重血浆渗漏,造成肺上皮细胞及组织损伤,引起气道高反应性,进而加重气道组织损伤。且 NO 所致的环磷酸鸟苷升高可导致肥大细胞脱颗粒,释放大量介质,从而导致和(或)加重哮喘<sup>[10]</sup>。文献报道<sup>[11]</sup>,哮喘时会产生大量的 NO,通过继发性诱导产生毒性自由基和炎性介质,加重哮喘炎症。因此,抑制 NO 的生成对哮喘的改善有着重要的作用。LPO 是饱和脂肪酸在氧自由基作用下形成的细胞毒性过氧化物。氧自由基和 LPO 能破坏生物膜和损害细胞的功能,对免疫有抑制作用,可增加血小板的聚集性,使体内细胞受损。文献报道<sup>[12]</sup>支气管哮喘患儿在治疗前血清 LPO 水平非常显著地高于正常儿组。因此,测定血清 LPO 可作

为判定治疗结果的指标之一。

哮喘是以肥大细胞反应,嗜酸性粒细胞浸润为主的慢性气道炎性反应性疾病;T淋巴细胞的2种亚型Th1, Th2的失衡与哮喘的发作密切相关, Th2细胞过度表达可导致哮喘发作,因此Th1, Th2的比值也成为相关实验研究判定治疗结果的指标之一<sup>[13]</sup>;IFN- $\gamma$ , IL-4分别是Th1和Th2细胞的特征性细胞因子<sup>[14]</sup>。IL-4对IgE合成起正调节作用, IFN- $\gamma$ 则起负调节作用, IL-4可抑制IFN- $\gamma$ 的产生, IFN- $\gamma$ 可下调IL-4受体基因的表达, IFN- $\gamma$ 和IL-4失衡是哮喘的一个重要特征,也是哮喘发病的主要机制之一<sup>[15-16]</sup>。它们作为一种重要的趋化因子,对引起哮喘发作的各种效应细胞如嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、T细胞及IgE均有较强的趋化作用,可趋化嗜酸性粒细胞向气道聚集后,嗜酸性粒细胞可释放炎性递质白三烯、血小板活化因子等,造成气道细胞组织的炎性损伤,又直接导致气道痉挛,并最终可导致气道反应性的增高。因此,检测IL-4和IFN- $\gamma$ 的含量,可知道活化的肥大细胞和免疫调节的活力。

本试验结果显示生品和蜜炙桑白皮均可降低血清LPO, IL-4含量,升高血清IFN- $\gamma$ ,提示清除细胞毒性过氧化物,调节免疫,增强抗病毒能力可能是桑白皮平喘作用的药理机制,且生品与蜜炙品平喘作用未表现出显著差异。

#### [参考文献]

[1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:280-281.  
[2] 龚千峰,贾天柱,孙秀梅,等. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003:243-244.  
[3] 徐宝林,张文娟,孙静芸. 桑白皮提取物平喘、利尿作用的研究[J]. 中成药, 2005, 27(9):758-760.  
[4] 李崧,王澈,贾天柱,等. 炮制对桑白皮止咳平喘利尿作用的影响[J]. 中成药, 2004, 26(6):471-473.

[5] 陆拯. 中药临床生用与制用[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983:149-151.  
[6] Walsh G M. Targeting eosinophils in asthma: current and future state of cytokine and chemokine-directed monoclonal therapy [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2010, 6(5):701-704.  
[7] Kim H Y, DeKruyff R H, Umetsu D T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity [J]. Nat Immunol, 2010, 11(7):577-584.  
[8] Cruz-Villalón G, Pérez-giraldo C. Effect of allicin on the production of polysaccharide intercellular adhesin in Staphylococcus epidermidis [J]. J Appl Microbiol, 2011, 110(3):723-725.  
[9] 崔艳红. 白三烯E4的检测在哮喘患者中的临床意义[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(1):20.  
[10] 李大军,苑惠清,刘红旭. 清肺平喘汤治疗支气管哮喘热哮证临床疗效及对NO, ET影响的研究[J]. 中国中医急症, 2009, 18(11):1773-1774.  
[11] Yan H, Deshpande D A, Misior A M, et al. Antimitogenic effects of 13-agonists and PGE<sub>2</sub> on airway smooth muscle are PKA dependent [J]. FASEB J, 2011, 25(1):389-397.  
[12] 薛洁,徐倩. 支气管哮喘患儿治疗前后血清SOD, IL-6, LPO和GSH-Px检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(2):137-138.  
[13] 胡国华,林鸣,畅亦杰. 中西医结合治疗对哮喘儿童Th1/Th2细胞因子影响的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24):3386-3388.  
[14] Gavala M, Bashir H, Gern J E. Virus/allergen interactions in asthma [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2013, 13(3):298-307.  
[15] 陈杰,袁岳沙,黄虎翔,等. 中医治疗哮喘患儿对炎性细胞因子的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4):885-886.  
[16] 蔡兴俊,黄奕江,付姣,等. 乌司他丁对哮喘小鼠BALF中细胞因子及EOS的影响[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(14):2245-2247.

[责任编辑 聂淑琴]