

# 金莲花总黄酮解热作用及对 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和 PGE<sub>2</sub> 含量的影响

刘平, 胡楠, 陈光晖, 王迎寒, 刘玉玲, 佟继铭\*

(河北中药研究与开发重点实验室, 承德医学院中药研究所, 河北承德 067000)

**[摘要]** **目的:** 观察金莲花总黄酮(Flavonoids from *Trollius ledebouri* Reichb, FTLR)解热作用。**方法:** 选取连续3天基础体温在38.5~39.0℃的家兔, 随机取6只作为正常对照组, 其余家兔耳缘静脉注射细菌内毒素250 ng·kg<sup>-1</sup>发热模型, 取药后1.5 h体温上升>1℃的家兔30只。按体温分层随机分为发热模型组、FTLR 200, 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>剂量组, 阿司匹林组100 mg·kg<sup>-1</sup>组, 灌胃给药, 发热模型组ig等容积蒸馏水。药后1, 2, 3及4 h分别测体温1次。采用ELISAE法测定血清中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 及脑脊液中PGE<sub>2</sub>表达水平。**结果:** FTLR 200及100 mg·kg<sup>-1</sup>剂量组及阿司匹林组家兔各时间点的平均体温明显均低于模型对照组( $P < 0.01$ ); 50 mg·kg<sup>-1</sup>组家兔药后2~4 h体温低于对照组( $P < 0.05$ ); 各给药组血清中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 及脑脊液中PGE<sub>2</sub>的含量均低于模型对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论:** FTLR有明显的解热作用, 并有明显的剂量依赖关系。其解热作用机制与抑制细菌内毒素引起的TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和PGE<sub>2</sub>等致热因子的合成或释放有关。

**[关键词]** 金莲花总黄酮; 解热; 内毒素; 前列腺素E<sub>2</sub>; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白介素-1 $\beta$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0189-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfix.2014070189

## Antipyretic Effect of Flavonoids from *Trollius ledebouri* Reichb on Endotoxin-induced Fever and Levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and PGE<sub>2</sub> in Rabbits

LIU Ping, HU Nan, CHEN Guang-hui, WANG Ying-han, LIU Yu-ling, TONG Ji-ming\*

(Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Materia Medica, Institute of Chinese Materia Medica of Chengde Medical University, Chengde 067000)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the antipyretic effect of the flavonoids from *Trollius ledebouri* Reichb (FTLR) on fertile rabbits induced by endotoxin and its mechanism. **Method:** The effects of the essential oil of Ligusticum chuanxiong Hor t. on changes of body temperature and hypothalamic content of monoamine neural transmitter were measured in the rabbits following intravenous injection of bacterial endotoxin (ET) The febrile rabbits model was established by ear intravenous injection endotoxin of 250 ng·kg<sup>-1</sup> of body weight, and then the rabbits that the body temperature rises 1℃ were divided into groups randomly: FTLR 200 mg·kg<sup>-1</sup> group, 100 mg·kg<sup>-1</sup> group and 50 mg·kg<sup>-1</sup> group, Aspirin 100 mg·kg<sup>-1</sup> group (positive control), and fever model control group, at the same time. All groups were intragastric given the same volume drugs or distilled water. After treatment measured temperature 1 time each hour and that kept on four hours. The levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in serum and PGE<sub>2</sub> in cerebrospinal fluid were measured by ELISAE assay. **Result:** At each time point, the average body temperature of rabbits in FTLR 200, 100 mg·kg<sup>-1</sup> and aspirin 100 mg·kg<sup>-1</sup> groups were lower than that of the model control group ( $P < 0.01$ ), in FTLR 50 mg·kg<sup>-1</sup> group the average body temperature of rabbits were

**[收稿日期]** 20131204(011)

**[基金项目]** 河北省科技厅重大项目(07276444Z-3)

**[第一作者]** 刘平, 副主任医师, 从事中药药理与毒理学研究, Tel:0314-2291116, E-mail: liuping18@126.com

**[通讯作者]** \* 佟继铭, 教授, 硕士生导师, 从事中药药理与毒理学研究, Tel:0314-2290076, E-mail: tongjiming@163.com

lower than that of the model control group after treatment 2-4 hours. The expression level of TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$  in serum and PGE<sub>2</sub> in cerebrospinal fluid were significantly lower than that of model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** FTLR has significantly antipyretic effect on ET-induced febris response in rabbits and in a dose-dependent manner. Its mechanism may be related to inhibition expression of TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$  in serum and PGE<sub>2</sub> in cerebrospinal fluid.

[Key words] Flavonoids from *Trollius ledebouri* Reichb; antipyretic effect; endotoxin; PGE<sub>2</sub>; TNF- $\alpha$ ; IL- $\beta$

金莲花(*Trollius ledebouri* Reichb)为毛茛科金莲花属植物金莲花或亚洲金莲花的花。《中药大辞典》“金莲花清热解毒、治上呼吸道感染、扁桃体炎、咽炎、急性中耳炎、急性鼓膜炎、急性淋巴管炎、口疮、疔疮<sup>[1]</sup>。感冒风热证或上呼吸道感染,系因风热邪毒袭肺,热毒内盛引起。金莲花质轻升散,味苦清泄,性寒清热,其治疗感冒风热证或上呼吸道感染恰切病机,故疗效颇著,毒性低、副作用少,在临床广泛应用。FTLR为金莲花主要有效部位,前期研究证明FTLR有显著的抗炎作用<sup>[2]</sup>,体内外抗菌实验均证明FTLR对多种细菌有较强的抑制或杀灭作用<sup>[3]</sup>。本研究旨在观察FTLR的解热作用,及其对发热模型家兔血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素- $1\beta$ (IL- $\beta$ )水平及脑脊液中前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)水平的影响,初步探其讨解热机制,为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 金莲花药材:金莲花药材购于承德市围场县坝上草原,经承德医学院中药研究所赵春颖副研究员鉴定为短瓣金莲花 *Trollius ledebouri* Reichb. 的干燥花或花蕾。样品保存于承德医学院中药研究所。

金莲花总黄酮:含量57%,由承德医学院中药研究所植物化学研究室提供,批号20090414,室温干燥保存。临用时以蒸馏水溶解,NaHCO<sub>3</sub>调pH至7.4。阿司匹林(神威制药有限公司生产,批号20120518);大肠杆菌内毒素(endotoxin, ET, Sigma公司,批号12880);TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ 及PGE<sub>2</sub> ELISA试剂盒(均购自上海索宝生物科技有限公司,批号2011110)。

**1.2 动物** 新西兰家兔 北京市通力实验动物养殖场,许可证号SCXK(京)2005-0003。

**1.3 仪器** MK3酶标仪(美国芬兰雷勃)。

## 2 方法

**2.1 ET溶液的配制** 精密称取ET 5.0  $\mu\text{g}$ 置10 mL棕色量瓶中,加生理盐水溶解,定容至刻度,溶液的质量浓度为500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,临用时新鲜配制。

**2.2 ET诱发家兔发热模型的制备及分组** 新西兰家兔,雌雄各半,体重2.0~2.5 kg,在本实验室环境适应3 d。致热前每日测量直肠温度2次,连续3 d。选取体温38.5~39.0  $^{\circ}\text{C}$ ,实验当日间隔30 min测量体温2次,以2次平均体温为致热前基础体温。随机取6只作为正常对照组,耳缘静脉注射生理盐水0.5  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,其余家兔耳缘静脉注射ET 250  $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ (500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液,0.5  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )致热<sup>[4]</sup>。选取致热后1 h体温上升1  $^{\circ}\text{C}$ 以上家兔30只,按体温分层随机分为5组:FTLR 200, 100, 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组,阿司匹林100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组及模型对照组,每组6只,各组均立即ig相应的药物,给药容积5  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,正常对照组和模型组ig等容积蒸馏水。药后每隔1 h各测体温1次,连续4次。计算各时间点体温变化值:体温变化值( $\Delta T$ ) = 各时点体温( $^{\circ}\text{C}$ ) - 基础体温( $^{\circ}\text{C}$ )

**2.2 家兔脑脊液中PGE<sub>2</sub>的测定** 测量体温后,腹腔注射10%水合氯醛2  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 麻醉家兔,经枕骨大孔间隙穿刺抽取脑脊液,3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离出上清液置于-80  $^{\circ}\text{C}$ 保存<sup>[5]</sup>。按试剂盒说明书的方法测定PGE<sub>2</sub>水平。

**2.3 家兔血清中TNF- $\alpha$ 和IL- $1\beta$ 的测定** 取脑脊液后,腹主动脉取血,离心分离血浆,-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存。按试剂盒说明书操作步骤检测血清IL- $1\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的含量。

**2.4 统计分析** 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用SPSS 17.0统计软件,采用单因素方差分析对各组间差异进行比较分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对发热家兔体温的影响** FTLR 200及100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组及阿司匹林组家兔药后各时间点体温平均升高值均显著低于模型对照组( $P < 0.01$ );50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组家兔药后2~4 h体温明显低于模型对照组( $P < 0.01$ );提示FTLR对ET诱发家兔发热有明显的解热作用。

**3.2 对发热家兔血清中TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ 及脑脊液中PGE<sub>2</sub>含量的影响** FTLR各给药组家兔血清中TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ 的含量及脑脊液中PGE<sub>2</sub>含量均显著低于模型对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),见表2。

表 1 FTLR 对发热家兔体温的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	基础体温 /℃	$\Delta T/^\circ\text{C}$				
			致热 1 h	药后 1 h	药后 2 h	药后 3 h	药后 4 h
正常对照	-	39.02 ± 0.29	0.26 ± 0.14	0.21 ± 0.10	0.25 ± 0.11	0.36 ± 0.12	0.37 ± 0.21
模型对照	-	38.92 ± 0.28	1.08 ± 0.24	1.31 ± 0.31	1.47 ± 0.35	1.52 ± 0.31	1.61 ± 0.44
FTLR	200	38.83 ± 0.26	1.16 ± 0.22 <sup>1)</sup>	0.32 ± 0.17 <sup>2)</sup>	0.28 ± 0.16 <sup>2)</sup>	0.21 ± 0.11 <sup>2)</sup>	0.11 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	100	38.69 ± 0.23	1.21 ± 0.31 <sup>1)</sup>	0.37 ± 0.19 <sup>1)</sup>	0.28 ± 0.17 <sup>2)</sup>	0.24 ± 0.13 <sup>2)</sup>	0.23 ± 0.17 <sup>2)</sup>
	50	39.01 ± 0.26	1.12 ± 0.19	0.97 ± 0.35	0.56 ± 0.24 <sup>2)</sup>	0.41 ± 0.19 <sup>2)</sup>	0.44 ± 0.21 <sup>2)</sup>
阿司匹林	100	38.87 ± 0.30	1.23 ± 0.28 <sup>1)</sup>	0.21 ± 0.19 <sup>2)</sup>	0.14 ± 0.12 <sup>2)</sup>	0.19 ± 0.11 <sup>2)</sup>	0.24 ± 0.17 <sup>2)</sup>

注:与相应时间点模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

表 2 FTLR 对发热家兔血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  及脑脊液中 PGE<sub>2</sub> 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	PGE <sub>2</sub>
正常对照	-	243.25 ± 21.31 <sup>4)</sup>	223.3 ± 14.39 <sup>4)</sup>	14.62 ± 2.24 <sup>4)</sup>
模型对照	-	678.24 ± 41.32 <sup>4)</sup>	305.6 ± 15.32	24.32 ± 2.83
FTLR	200	313.25 ± 35.62 <sup>2,3)</sup>	251.84 ± 19.63 <sup>2)</sup>	17.24 ± 2.32 <sup>2,3)</sup>
	100	298.78 ± 36.51 <sup>2,3)</sup>	254.76 ± 24.12 <sup>2,3)</sup>	17.98 ± 2.36 <sup>2)</sup>
	50	498.27 ± 39.43 <sup>2,4)</sup>	286.96 ± 16.61 <sup>1,4)</sup>	20.12 ± 3.32 <sup>4)</sup>
阿司匹林	100	303.91 ± 38.62 <sup>2)</sup>	254.62 ± 22.14 <sup>2,3)</sup>	17.54 ± 2.51 <sup>2,3)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与正常对照组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

ET 是 G-菌细胞壁产生的脂多糖类物质,ET 作为外源性致热原诱发的发热模型为经典的炎性发热模型,是筛选解热药物、探讨解热机制常用的模型<sup>[5-7]</sup>。

传统医学认为,金莲花质轻升散,味苦清泄,性寒清热,用于治疗感冒风热证或扁桃体炎,咽炎,急性中耳炎等。前期体内外抗菌试验证明,金莲花的主要有效部位 FTLR 对 13 个细菌标准菌株和 10 个临床菌株均有显著的抑制作用;FTLR 明显降低金黄色葡萄球菌感染小鼠的死亡率;同时 FTLR 可明显抑制组胺引起的毛细血管扩张、角叉菜胶引起的大鼠足跖肿胀度和棉球肉芽肿。本实验结果显示,FTLR 可明显降低 ET 引起发热模型家兔的体温,且有一定的剂量依赖关系。FTLR 可降低发热家兔血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  的含量,和脑脊液中 PGE<sub>2</sub> 的含量<sup>[8-10]</sup>。提示 FTLR 可抑制 ET 诱发的内生致热源 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  等的产生或释放,进而抑制 PGE<sub>2</sub> 的产生和释放,降低异常升高的体温调定点,减少产热,增加散热,使体温恢复正常。由此分析,抑病原菌和抗炎症,减少 IL-1, TNF- $\alpha$  等内生致热原的产生是 FTLR 的解热作用的药理学基础。至于 FTLR 抑制 ET 诱发内生致热原的生产的机制有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册) [M]. 上海:人民出版社, 1997. 1398.
- [2] 刘平,刘玉玲,佟继铭. 金莲花总黄酮抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 196.
- [3] 刘平,陈光晖,邓淑华,等. 金莲花总黄酮抗菌作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 207.
- [4] 杨金蓉,李祖伦,胡荣,等. 川芎挥发油解热作用及其对家兔下丘脑 5-HT、DA 含量的影响[J]. 中药药理与临床, 2002, 19(2): 17.
- [5] 刘聪,杨林,方芳,等. 柴黄颗粒对内毒素致热新西兰兔脑脊液中发热介质的影响[J]. 儿科药理学杂志, 2012, 18(5): 13.
- [6] 李倩楠,葛晓群. 黄芩苷及黄芩复方制剂解热机制研究进展[J]. 国际药理学研究杂志, 2008, 35(5): 342.
- [7] 左泽平,王志斌,高阳,等. 柴胡注射液对 LPS 发热家兔的解热机制的研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(4): 57.
- [8] 屈飞,崔艳茹,徐镜,等. 麻杏石甘汤解热作用量效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 184.
- [9] D inarello CA. In fection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens; some concepts have changed[J]. J Endot Res, 2004, 10(4): 201.
- [10] 谢新华,董军. 细胞因子与发热机制研究进展[J]. 广东医学, 2005, 26(8): 1156.

[责任编辑 聂淑琴]