

文章编号:1001-6880(2016)9-1377-07

# 黄芩苷对 LPS 诱导的家兔乳腺炎的保护作用

文月玲,张于,姚学萍\*,沈留红,余树民,曹随忠\*

四川农业大学动物医学院,成都 611130

**摘要:**研究黄芩苷对 LPS 诱导的家兔乳腺炎性损伤的保护作用。分娩 7~10 d 的 50 只健康新西兰泌乳家兔随机分为 LPS 模型组(LPS,0.25 mg/kg · BW)、黄芩苷 75 mg/kg · BW 组、黄芩苷 150 mg/kg · BW 组、黄芩苷 300 mg/kg · BW 组和 DEX 组(0.5 mg/kg · BW)。通过乳头管灌注 LPS,黄芩苷和 DEX 分别在灌注 LPS 前 48、24、1 h 和灌注后 8、32、56 h 耳缘静脉注射给药。灌注 LPS 前 50 h、灌注后 6、12、24、48 h 和 72 h 测量家兔直肠温度,采集家兔耳缘静脉血;灌注 LPS 前 50 h、灌注后 12、24 h 和 72 h 摘取乳腺组织。采集的样品进行下列检测:(1)制作病理组织学切片观察乳腺的病理组织学变化;(2)检测血清中 LDH、ALP、MPO 和 NAG 的活性变化;(3)ELISA 检测血清中促炎细胞因子 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量。结果显示,与 LPS 模型组比较,注射黄芩苷各组:(1)乳腺组织的炎性损伤减轻;(2)血清中 LDH、ALP、MPO 和 NAG 活性降低,其中黄芩苷 300 mg/kg · BW 组抑制血清中酶活性升高效果最好;(3)血清中促炎细胞因子 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平降低,其中在 6 h 时血清中 TNF- $\alpha$  水平显著低于 LPS 模型组( $P < 0.05$ );72 h 时,血清中 IL-1 水平显著低于 LPS 模型组( $P < 0.05$ )。结果表明,黄芩苷能够有效减轻乳腺组织的炎性损伤,300 mg/kg · BW 保护作用最好。

**关键词:**乳腺炎动物模型;黄芩苷;家兔;脂多糖;抗炎作用

中图分类号:S823.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.9.007

## Protective Effect of Baicalin on LPS Induced Inflammatory Responses in Rabbit Mammary Gland Tissue

WEN Yue-ling, ZHANG Yu, YAO Xue-ping\*, SHEN Liu-hong, YU Shu-min, CAO Sui-zhong\*

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate protective effect of baicalin on LPS induced rabbit mastitis. Fifty healthy rabbits after parturition 7~10 d were divided into five groups randomly, including mastitis model control group (LPS, 0.25 mg/kg · BW), baicalin groups with the dose 75, 150 and 300 mg/kg · BW respectively, and dexamethasone (DEX) group with dose of 0.5 mg/kg · BW DEX. LPS was respectively infused into the fourth mammary glands of rabbit via the teat duct. In the baicalin and DEX groups, baicalin and DEX were injected through the auricular veins at 48 h, 24 h, 1 h before LPS infusion and after 8 h, 32 h, 56 h respectively. The rectal temperature was measured and the auricular veins blood were collected 50 h before, and 6, 12, 24, 48, 72 h after LPS infusion respectively. The following indexes at different time point were determined: (1) The pathological change of rabbit mammary gland tissues. (2) The activities of ALP, LDH, myeloperoxidase (MPO) and N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) in serum. (3) The levels of TNF- $\alpha$ , interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6) in serum were measured by ELISA. The results showed that: (1) Baicalin could reduce the histopathological damage. (2) Baicalin could reduce the activities of ALP, LDH, MPO and NAG. Baicalin group (300 mg/kg · BW) had the best effect of decreasing in the activities of ALP, LDH, MPO and NAG. (3) Baicalin could reduce the level of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 in serum. The level of TNF- $\alpha$  in serum was significantly lower than model control group in 6 h ( $P < 0.05$ ). The level of IL-1 in serum was significantly lower than model control group in 72 h ( $P < 0.05$ ). The results demonstrated that baicalin can reduce the histopathological damage and relief body symptom. The highest potent protective effect of baicalin on LPS induced rabbit mastitis was showed at the dose of 300 mg/kg · BW.

**Key words:** mastitis model of animal; baicalin; rabbit; LPS; anti-inflammatory activity

收稿日期:2016-04-25 接受日期:2016-07-22

基金项目:四川省科技支撑计划(2013NZ0032);四川农业大学学

科建设双支计划(3570806)

\* 通讯作者 E-mail:suizhongcao@126.com;170802926@qq.com

奶牛乳房炎主要是由病原菌感染引起的乳房炎

症,严重危害奶牛养殖业的健康发展。采用抗生素治疗奶牛乳房炎经常疗效不佳,并导致牛奶中抗生素残留及产生耐药菌株。中药除了可以直接抑制或杀灭病原微生物,它还有着优于抗生素的特点,即中药可以在发挥抗菌消炎作用的同时,提高机体的免疫力<sup>[1]</sup>。黄芩苷提取自中药黄芩的根部,具有多种药理作用,以抗菌消炎、解热镇痛和免疫调控作用尤为突出<sup>[2]</sup>。黄芩苷体内给药可减轻组织的炎性损伤,下调促炎细胞因子水平,并调节免疫细胞分泌细胞因子。郭梦尧<sup>[3]</sup>对实验性金黄色葡萄球菌乳腺炎小鼠腹腔注射黄芩苷后发现,乳腺组织的炎性损伤明显降低,TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  等促炎细胞因子的表达降低,表明黄芩苷在金黄色葡萄球菌性乳腺炎发生中表现出显著的抗炎作用。张进红等<sup>[4]</sup>研究发现,实验性无乳链球菌乳腺炎的小鼠肌肉注射黄芩苷可以抑制无乳链球菌在小鼠体内的增殖,减轻小鼠乳腺的损伤,并通过影响 IL-4 和 IFN- $\gamma$  含量调节 Th1/Th2 细胞的平衡,进而提高小鼠的免疫力。赵永旺<sup>[5]</sup>研究表明,实验性金黄色葡萄球菌乳腺炎的小鼠皮下注射黄芩苷能够调节乳腺组织中 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的分泌,减轻乳腺炎症并缓解全身症状。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌的重要毒力因子,国内外研究证实经小鼠和家兔乳头管灌注 LPS 可以诱发乳腺炎<sup>[6,7]</sup>;对于大肠杆菌引起的急性奶牛乳腺炎,识别 LPS 是乳腺产生免疫应答的最基本环节<sup>[8]</sup>。医学临幊上黄芩苷广泛应用于传染性肝炎、乳腺癌和肺癌等多种疾病的治疗,但目前黄芩苷对奶牛乳腺炎的保护或治疗作用研究还不够深入。本实验首先建立家兔乳头管灌注 LPS 乳腺炎模型,静脉注射不同剂量黄芩苷,从组织病理学变化,体温,血清中 LDH、ALP、MPO 和 NAG 等酶活性以及促炎细胞因子 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平等方面评价黄芩苷对乳腺炎的保护作用,旨在为兽医临幊上应用黄芩和黄芩苷治疗奶牛乳腺炎提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

将怀孕 15 d 左右的 50 只体重 4 kg 左右的健康新西兰家兔随机分为 5 组,包括 LPS 模型组(0.25 mg/kg · BW)、黄芩苷 75 mg/kg · BW 组、黄芩苷 150 mg/kg · BW 组、黄芩苷 300 mg/kg · BW 和地塞米松组(dexamethasone, DEX)(0.5 mg/kg · BW),每组 10 只家兔,分别标记为 S1、S2、S3、S4 和 S5 组。

### 1.2 主要试剂

大肠杆菌脂多糖(*Escherichia coli* O<sub>55</sub>:B<sub>5</sub>)购自美国 Sigma 公司;黄芩苷(货号:SA0016-5,98%)购自索莱宝生物科技有限公司;地塞米松磷酸钠注射液(批号:H12020514)购自天津金耀药业有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(乳酸底物法)、碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒(速率法)购自中生北控生物科技有限公司; $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)测试盒、髓过氧化物酶(MPO)测试盒购自南京建成科技(南京)有限公司;兔肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、兔白介素-1(IL-1)和兔白介素-6(IL-6)ELISA 检测试剂盒购自美国 RD 公司;犬眠宝复合麻醉剂由东北农业大学动物医学院外科教研室研制。

### 1.3 LPS 灌注液的配制及灌注方法

用灭菌生理盐水将 LPS 配制为 1 mg/mL 溶液,-20 ℃避光保存备用。

在分娩后第 7~10 d,实验各组的每只家兔沿第四对乳腺的乳头管插入注射针头,每只乳腺按照 0.125 mg/kg · BW 剂量注入 LPS,共注入 0.25 mg/kg · BW 的 LPS<sup>[6]</sup>。

### 1.4 黄芩苷注射液、DEX 注射液的配制及灌注方法

黄芩苷按照 100 mg/mL 浓度加入灭菌生理盐水,加 1 mol/mL NaOH 调节 pH 值到 7.3~7.4,待黄芩苷全部溶解后,用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,配制成 100 mg/mL 后分装于棕色瓶中,115 ℃灭菌 30 min,冷却后 4 ℃避光保存备用<sup>[3]</sup>。

黄芩苷和 DEX 分别在灌注 LPS 前 48、24、1 h 和灌注 LPS 后 8、32、56 h 耳缘静脉注射给药。

### 1.5 样本采集

采血时间点为灌注 LPS 前 50 h,灌注后 6、12、24、48 h 和 72 h<sup>[6]</sup>,S1~S5 组在每个时间点采血的家兔数量分别为 10 只、9 只、9 只、6 只、3 只和 3 只。耳缘静脉采血,采集到的全血离心分离血清,-20 ℃保存,用于检测血清 LDH、ALP、NAG 和 MPO 活性及 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 水平。

灌注 LPS 前 50 h 从 S1~S5 组各随机选择摘取一只家兔第四对乳腺,灌注 LPS 后 12、24 h 和 72 h,S1~S5 组家兔在每个时间点随机选择摘取乳腺组织的家兔数量为 3 只。摘取乳腺时对家兔肌注犬眠宝麻醉,剥离腹部皮肤,分离家兔第四对乳腺,摘取的乳腺组织用 4% 多聚甲醛固定,制作组织病理切

片。为了避免摘取乳腺后的家兔对后续实验的影响, 摘取乳腺后的家兔即被淘汰。

## 1.6 乳腺组织的病理学变化

取适量 4% 多聚甲醛固定的乳腺组织, 石蜡包埋, 切片, H. E 染色, 进行病理组织学观察。

## 1.7 家兔体温变化

在灌注 LPS 前 50 h, 灌注后 6、12、24、48 h 和 72 h 测定家兔直肠的温度。

## 1.8 酶活性及细胞因子水平的检测

采用全自动生化分析仪 PM4000(意大利)测定血清 LDH 和 ALP 的活性。NAG 和 MPO 采用比色法进行测定, 分别测定波长 400 nm、460 nm 的 OD 值, 严格按照试剂盒说明书操作。

血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 采用 ELISA 方法在 Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(美国)上测定, 测定严格按照试剂盒说明书进行操作。

## 1.9 统计学分析

应用 Excel(2013) 软件整理数据, SPSS 20.0 软件对所得数据进行单因素方差分析、*t* 检验, 所有数据均用平均数  $\pm$  标准误(means  $\pm$  S. E. M) 表示。

# 2 结果与分析

## 2.1 黄芩苷对乳头管灌注 LPS 家兔体温的影响

各组家兔在不同时间的体温变化见表 1。S1 组在灌注 LPS 后体温升高, 48 h 体温下降到灌注 LPS 前水平。S2、S3 组在灌注 LPS 后 72 h 内, 体温较 S1 组降低, 6 h 和 12 h 时与 S1 组比较差异显著( $P < 0.05$ )。S4、S5 组在灌注 LPS 后 24 h 内, 体温较 S1 组降低, 6 h 和 12 h 时与 S1 组比较差异显著( $P <$

$0.05$ ), 48 h 和 72 h 时体温较 S1 组升高, 差异不显著( $P > 0.05$ )。

## 2.2 各组家兔乳腺组织的病理学变化

S1 ~ S5 组家兔在灌注 LPS 前, 乳腺组织结构正常, 乳腺腺泡上皮排列整齐, 腺泡腔内可见分泌的乳汁(图 1A)。S1 组灌注 LPS 后 24 h, 乳腺组织病变程度加重, 腺泡腔继续扩张, 腺泡腔内炎性分泌物、中性粒细胞以及脱落的腺上皮细胞增多(图 1B), 灌注 LPS 后 72 h, 乳腺组织病变程度进一步加重, 部分腺泡腔固有结构消失, 腺泡腔及小叶间质分界不明显, 腺泡腔内多量中性粒细胞浸润(图 1G)。S2 组家兔灌注 LPS 后 24 h, 腺泡腔进一步扩张, 腺泡腔内数量不等中性粒细胞浸润, 腺泡壁少量中性粒细胞浸润(图 1C), 灌注 LPS 后 72 h, 乳腺组织病变好转, 腺泡腔轻度扩张, 少量中性粒细胞浸润(图 1H)。S3 组家兔在灌注 LPS 后 24 h, 病变好转, 腺泡腔内见分泌物, 偶见中性粒细胞(图 1D、I)。S4、S5 组家兔在灌注 LPS 后 乳腺结构无明显病理变化, 仅腺泡腔内与腺泡间质内偶见中性粒细胞(图 1E ~ K)。

## 2.3 黄芩苷对乳头管灌注 LPS 家兔血清酶(LDH、ALP、MPO 和 NAG)活性的影响

如表 2 所示, 灌注 LPS 后, S1 组家兔血清中 LDH、ALP、MPO、NAG 活性均升高。S2 ~ S4 组血清中 LDH、ALP、MPO、NAG 活性均降低, 其中 S4 组家兔血清中 MPO、NAG 活性变化趋势与 S5 组相似, 均在灌注 LPS 后 48 h 和 72 h 时与 S1 组比较显著降低( $P < 0.05$ ), 而 S2 和 S3 组黄芩苷对 MPO、NAG 活性的影响不显著( $P > 0.05$ )。

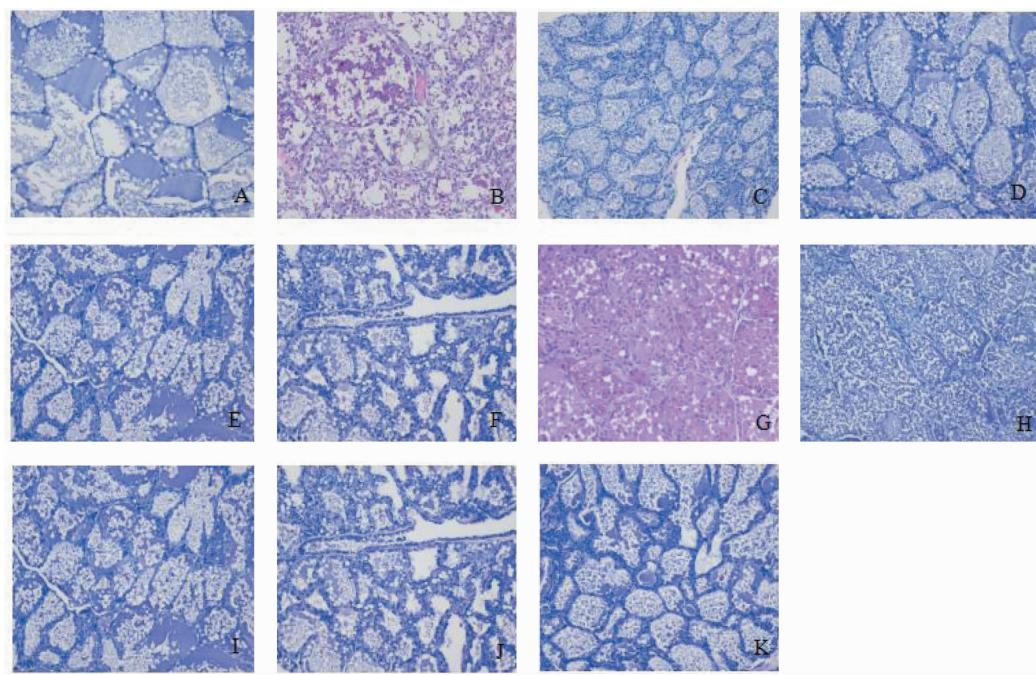
表 1 黄芩苷对乳头管灌注 LPS 家兔体温的影响

Table 1 The effects of baicalin on temperature( °C ) of rabbits infused with LPS via teat duct

组别 Group	灌注 LPS 前 Before infusion LPS	灌注 LPS 后 After infusion LPS				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
S1	$39.15 \pm 0.15^a_A$	$41.21 \pm 0.37^b_B$	$41.01 \pm 0.84^b_B$	$40.02 \pm 0.84^a_A$	$39.51 \pm 0.20^a_A$	$39.19 \pm 0.52^a_A$
S2	$39.48 \pm 0.16^a_A$	$39.66 \pm 0.67^a_A$	$39.75 \pm 0.61^a_A$	$39.54 \pm 0.81^a_A$	$39.40 \pm 0.22^a_A$	$39.37 \pm 0.23^a_A$
S3	$39.70 \pm 0.15^a_A$	$39.50 \pm 1.13^a_A$	$40.00 \pm 0.62^a_A$	$39.60 \pm 0.29^a_A$	$39.43 \pm 0.12^a_A$	$39.25 \pm 0.21^a_A$
S4	$39.55 \pm 0.12^a_A$	$39.53 \pm 0.27^a_A$	$39.78 \pm 0.28^a_A$	$39.38 \pm 0.22^a_A$	$39.50 \pm 0.17^a_A$	$39.60 \pm 0.42^a_A$
S5	$39.75 \pm 0.14^a_A$	$39.62 \pm 0.16^a_A$	$39.86 \pm 0.33^a_A$	$39.83 \pm 0.29^a_A$	$39.83 \pm 0.38^a_A$	$39.65 \pm 0.35^a_A$

注: 同行数字上角标不同小写字母表示各组组内差异显著( $P < 0.05$ ), 相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。同列数字下角标不同大写字母表示同一指标各组间差异显著( $P < 0.05$ ), 相同大写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下表同。

Note: In the same row, values with different lowercase superscripts indicated significant difference within each group ( $P < 0.05$ ), while with same lowercase letters indicated no significant difference ( $P > 0.05$ ). In the same column, values with different uppercase superscripts indicated significant difference between groups ( $P < 0.05$ ), while with same uppercase subscripts indicated no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same as table 2 and table 3.

图 1 家兔乳腺组织病理学变化 (H. E 200 $\times$ )Fig. 1 Histopathological changes of rabbit mammary gland (H. E 200 $\times$ )

注: A:健康乳腺组织;B-F:灌注 LPS 后 24 h 乳腺组织(B:模型对照组;C:黄芩苷 75 mg/kg · BW 组;D:黄芩苷 150 mg/kg · BW 组;E:黄芩苷 300 mg/kg · BW 组;F:DEX 组);G-K:灌注 LPS 后 72h 乳腺组织(G:模型对照组;H:黄芩苷 75 mg/kg · BW 组;I:黄芩苷 150 mg/kg · BW 组;J:黄芩苷 300 mg/kg · BW 组;K:DEX 组)

Note: A: healthy mammary gland; B-F: Changes of mammary gland tissues after infusion of LPS in 24 h [ B: model control group; C: baicalin group (75mg/kg · BW) ; D: baicalin group (150 mg/kg · BW) ; E: baicalin group (300 mg/kg · BW) ; F: DEX group ] ; G-K: Changes of mammary gland tissues after infusion of LPS in 72 h [ G: model control group; H: baicalin group (75 mg/kg · BW) ; I: baicalin group (150 mg/kg · BW) ; J: baicalin group (300 mg/kg · BW) ; K: DEX group ]

表 2 黄芩苷对乳头管灌注 LPS 家兔血清酶(LDH、ALP、MPO 和 NAG)活性的影响

Table 2 The effects of baicalin on the activity of serum enzymes (LDH、ALP、MPO and NAG) in rabbits infused by LPS via teat duct

	灌注 LPS 前 Before infusion LPS	灌注 LPS 后 After infusion LPS				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
LDH( U/L )	S1	232.01 ± 47.67 <sup>a</sup>	490.62 ± 53.49 <sup>b</sup>	582.90 ± 39.09 <sup>b</sup>	500.18 ± 23.03 <sup>b</sup>	432.35 ± 23.03 <sup>b</sup>
	S2	228.71 ± 49.55 <sup>a</sup>	275.15 ± 15.45 <sup>a</sup>	221.32 ± 51.77 <sup>a</sup>	231.62 ± 41.83 <sup>a</sup>	268.71 ± 13.27 <sup>a</sup>
	S3	266.67 ± 35.18 <sup>ab</sup>	322.16 ± 12.79 <sup>b</sup>	185.84 ± 28.09 <sup>a</sup>	184.18 ± 46.44 <sup>a</sup>	219.86 ± 39.05 <sup>ab</sup>
	S4	288.50 ± 21.42 <sup>b</sup>	278.07 ± 28.37 <sup>b</sup>	192.95 ± 27.87 <sup>a</sup>	169.43 ± 30.81 <sup>a</sup>	180.31 ± 15.08 <sup>a</sup>
	S5	299.83 ± 5.49 <sup>a</sup>	230.41 ± 19.72 <sup>a</sup>	205.22 ± 29.12 <sup>a</sup>	243.83 ± 38.36 <sup>a</sup>	244.43 ± 27.81 <sup>a</sup>
ALP( U/L )	S1	42.29 ± 9.78 <sup>a</sup>	100.73 ± 25.56 <sup>b</sup>	156.82 ± 21.81 <sup>b</sup>	94.79 ± 8.48 <sup>ab</sup>	94.21 ± 8.69 <sup>ab</sup>
	S2	47.57 ± 2.47 <sup>b</sup>	43.71 ± 9.24 <sup>a</sup>	40.80 ± 5.22 <sup>ab</sup>	28.94 ± 1.17 <sup>a</sup>	49.05 ± 7.40 <sup>a</sup>
	S3	45.31 ± 7.35 <sup>b</sup>	36.94 ± 4.71 <sup>ab</sup>	39.48 ± 7.46 <sup>ab</sup>	24.20 ± 8.25 <sup>ab</sup>	21.23 ± 9.21 <sup>a</sup>
	S4	49.67 ± 9.57 <sup>a</sup>	39.66 ± 8.30 <sup>ab</sup>	39.84 ± 3.84 <sup>a</sup>	28.41 ± 6.05 <sup>a</sup>	29.86 ± 6.86 <sup>a</sup>
	S5	46.21 ± 3.44 <sup>a</sup>	48.33 ± 1.48 <sup>a</sup>	34.10 ± 7.07 <sup>a</sup>	33.12 ± 7.17 <sup>a</sup>	39.10 ± 3.61 <sup>a</sup>
MPO( U/L )	S1	198.88 ± 32.44 <sup>a</sup>	469.17 ± 134.52 <sup>b</sup>	766.90 ± 31.74 <sup>c</sup>	903.41 ± 68.74 <sup>d</sup>	931.33 ± 40.35 <sup>d</sup>
	S2	175.14 ± 30.88 <sup>a</sup>	389.21 ± 65.42 <sup>b</sup>	630.11 ± 41.47 <sup>c</sup>	877.24 ± 61.39 <sup>d</sup>	807.02 ± 80.83 <sup>d</sup>
	S3	167.57 ± 26.91 <sup>a</sup>	293.37 ± 29.71 <sup>b</sup>	361.68 ± 41.70 <sup>b</sup>	417.23 ± 65.93 <sup>b</sup>	395.53 ± 41.93 <sup>b</sup>
						195.53 ± 57.58 <sup>a</sup>

	灌注 LPS 前 Before infusion LPS	灌注 LPS 后 After infusion LPS				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
NAG (U/L)	S4	164.37 ± 35.42 <sup>a</sup>	278.98 ± 57.88 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	273.56 ± 51.36 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	214.15 ± 36.97 <sup>ab</sup> <sub>A</sub>	161.93 ± 17.06 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
	S5	155.48 ± 8.91 <sup>a</sup>	288.24 ± 28.76 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	258.88 ± 29.91 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	181.73 ± 19.59 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	158.93 ± 18.99 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
	S1	84.81 ± 1.31 <sup>a</sup>	98.62 ± 4.77 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	91.92 ± 5.77 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	126.15 ± 9.31 <sup>b</sup> <sub>B</sub>	96.35 ± 8.98 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S2	83.38 ± 2.13 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	89.29 ± 7.06 <sup>b</sup> <sub>B</sub>	79.23 ± 2.56 <sup>ab</sup> <sub>AB</sub>	97.54 ± 3.72 <sup>b</sup> <sub>AB</sub>	71.83 ± 1.09 <sup>ab</sup> <sub>AB</sub>
	S3	84.55 ± 8.41 <sup>a</sup>	97.12 ± 4.31 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	85.03 ± 6.71 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	87.5 ± 5.28 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	90.91 ± 3.44 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S4	83.27 ± 3.16 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	52.05 ± 5.05 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	60.85 ± 6.18 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	58.85 ± 2.25 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	44.87 ± 2.58 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
	S5	82.54 ± 5.01 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	62.85 ± 1.56 <sup>ab</sup> <sub>A</sub>	67.57 ± 4.78 <sup>ab</sup> <sub>A</sub>	72.31 ± 1.73 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	59.62 ± 2.02 <sup>ab</sup> <sub>A</sub>
						39.81 ± 5.08 <sup>a</sup> <sub>A</sub>

## 2.4 黄芩苷对乳头管灌注 LPS 家兔血清中促炎细胞因子(TNF-α、IL-1 和 IL-6)水平的影响

如表 3 所示,灌注 LPS 后,S1 组血清中 TNF-α、IL-1 和 IL-6 水平均发生了变化,其中 TNF-α 和 IL-6 水平先升高后降低,IL-1 水平先降低后升高。S2 ~ S4 组在灌注 LPS 后,黄芩苷对 TNF-α 和 IL-1 水平

的升高起到了一定的抑制作用,对 IL-6 升高的抑制效果不明显。S5 组黄芩苷对血清中 TNF-α、IL-1 和 IL-6 水平升高的抑制效果明显,TNF-α 水平和 IL-1 水平分别在 48、72 h 较 S1 组降低,且差异显著( $P < 0.05$ )。

表 3 黄芩苷对乳头管灌注 LPS 家兔血清中促炎细胞因子(TNF-α、IL-1 和 IL-6)水平的影响

Table 3 The effects of baicalin on the level of pro-inflammatory cytokines (TNF-α、IL-1 and IL-6) in rabbits infused by LPS via teat duct

	灌注 LPS 前 Before infusion LPS	灌注 LPS 后 After infusion LPS				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
TNF-α(ng/mL)	S1	63.83 ± 8.83 <sup>a</sup>	75.67 ± 9.37 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	70.94 ± 4.87 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	66.31 ± 6.69 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	63.80 ± 6.42 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S2	63.89 ± 5.71 <sup>a</sup>	61.78 ± 2.95 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	58.19 ± 2.32 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	68.38 ± 3.39 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	66.24 ± 1.87 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S3	69.31 ± 6.54 <sup>a</sup>	61.99 ± 4.39 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	72.68 ± 7.97 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	68.81 ± 4.48 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	60.39 ± 5.08 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S4	64.33 ± 4.39 <sup>a</sup>	63.25 ± 8.18 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	61.17 ± 5.01 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	64.46 ± 5.85 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	64.45 ± 8.85 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S5	64.21 ± 5.62 <sup>bc</sup>	55.33 ± 7.79 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	69.73 ± 1.16 <sup>c</sup> <sub>A</sub>	60.01 ± 7.53 <sup>bc</sup> <sub>A</sub>	43.80 ± 4.14 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
						49.06 ± 4.05 <sup>ab</sup> <sub>A</sub>
IL-1(pg/mL)	S1	691.29 ± 48.69 <sup>a</sup>	680.75 ± 28.41 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	565.47 ± 39.26 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	593.85 ± 39.85 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	679.23 ± 34.62 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S2	663.20 ± 14.86 <sup>a</sup>	644.99 ± 31.48 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	643.56 ± 39.96 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	580.99 ± 51.41 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	623.69 ± 17.87 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S3	664.01 ± 26.25 <sup>a</sup>	590.58 ± 18.49 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	619.42 ± 36.71 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	648.41 ± 29.04 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	648.03 ± 35.20 <sup>a</sup> <sub>B</sub>
	S4	628.65 ± 35.64 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	629.67 ± 15.72 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	615.01 ± 10.28 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	520.99 ± 11.08 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	586.68 ± 21.05 <sup>ab</sup> <sub>AB</sub>
	S5	634.86 ± 19.99 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	600.49 ± 28.37 <sup>ab</sup> <sub>A</sub>	639.09 ± 32.89 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	486.25 ± 11.43 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	450.56 ± 34.17 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
						527.60 ± 5.89 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
IL-6(pg/mL)	S1	675.75 ± 16.47 <sup>a</sup>	686.68 ± 11.95 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	753.16 ± 34.54 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	754.86 ± 26.49 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	717.37 ± 39.75 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
	S2	641.76 ± 20.54 <sup>a</sup>	665.76 ± 10.12 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	676.32 ± 39.32 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	675.26 ± 13.84 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	681.28 ± 23.19 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
	S3	745.95 ± 37.88 <sup>a</sup>	656.39 ± 23.20 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	799.15 ± 42.68 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	740.06 ± 27.56 <sup>a</sup> <sub>AB</sub>	755.43 ± 18.83 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
	S4	770.12 ± 41.12 <sup>a</sup>	829.91 ± 47.02 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	810.01 ± 53.21 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	847.69 ± 23.73 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	769.74 ± 21.67 <sup>a</sup> <sub>A</sub>
	S5	707.78 ± 20.59 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	501.71 ± 37.42 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	486.41 ± 36.95 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	636.74 ± 27.52 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	624.18 ± 33.33 <sup>b</sup> <sub>A</sub>
						464.81 ± 15.32 <sup>a</sup> <sub>A</sub>

## 3 讨论与结论

LPS 诱发乳腺急性炎症时,炎性细胞产生 IL-1、IL-6 和 TNF-α 等促炎细胞因子,而这些促炎细胞因子作用于机体下丘脑的体温调节中枢,促使体温升

高。炎性细胞还分泌一系列的化学物质,如组胺、氧自由基等,从而使得乳腺微血管通透性增强,血乳屏障遭到破坏,进而使血液成分渗入乳腺中,包括 LDH、ALP、MPO、NAG 等酶。LDH 主要存在于细胞质内,当乳腺发生炎性损伤时,LDH 透过微血管穿过受损

的血乳屏障进入到乳汁中<sup>[9]</sup>。血清中 LDH 活性的变化是细胞结构损坏的结果,其活性增强反映了白细胞聚集的炎症过程和乳腺组织的损害程度<sup>[10]</sup>。有研究证实,当机体发生乳房炎时,乳汁中的 ALP 活性高于正常乳汁<sup>[11]</sup>。MPO 是中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞释放的嗜天青颗粒的主要成分,是中性粒细胞的标志酶,具有吞噬和溶解病原菌的重要作用<sup>[12]</sup>。NAG 是可靠的炎症指标,在机体发生炎症反应时,NAG 活性会上升,同时 NAG 活性与乳腺上皮细胞受损程度成正比<sup>[13]</sup>。杨德英等<sup>[11]</sup>研究表明,LDH、ALP、MPO 和 NAG 等四种酶可以作为奶牛乳腺炎的诊断指标。在本实验中,家兔灌注 LPS 后其乳腺组织炎性损伤明显,乳腺腺泡腔内充满炎性细胞,乳腺腺泡固有结构瓦解,家兔体温升高以及血清酶活性升高,结果与曹随忠等<sup>[6]</sup>研究结果一致,表明对家兔乳头管灌注 LPS 造成乳腺急性炎性损伤。

黄芩苷具有清热解毒、抗炎、利胆等多种药理作用。黄芩苷体内给药可减轻组织的炎性损伤,下调促炎细胞因子水平,并调节免疫细胞分泌细胞因子。郭梦尧等<sup>[3]</sup>研究发现,黄芩苷能抑制金黄色葡萄球菌外毒素诱发的 T 淋巴细胞增殖,降低促炎细胞因子 IL-1、IL-6 以及 TNF- $\alpha$  的水平。Chung 等<sup>[14]</sup>研究表明黄芩苷能抑制 IL-1 $\beta$  的合成。黄芩苷通过抑制下丘脑促前列腺素合成酶及 cAMP 的合成及释放降低体温,还可通过组织钙离子内流来抑制内源性致热原的产生发挥解热作用<sup>[15]</sup>。徐珊等<sup>[16]</sup>和李倩楠<sup>[17]</sup>研究发现,黄芩苷对酵母性发热大鼠模型有明显的解热作用,其作用机制可能与减少外周和下丘脑的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的含量有关。本实验中,三组不同剂量的黄芩苷都能不同程度地抑制家兔体温的升高,显著降低血清中 LDH、ALP、MPO 和 NAG 的活性,300 mg/kg · BW 黄芩苷组对血清中酶活性升高抑制效果最好。

机体先天免疫系统中,感染免疫应答的一个关键环节就是上调促炎细胞因子<sup>[18]</sup>。在众多细胞因子中,IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  被认为是机体针对各种感染所产生的主要炎性介质,它们可促进炎症细胞的聚集、活化和炎症介质的释放,可以直接刺激发热中枢。已有研究证明,LPS 引发的复杂病理过程的重要机制之一是炎症介质的大量释放及继之的级联反应,并造成微循环障碍、组织细胞缺氧,导致全身炎症失控。LPS 能够刺激动物机体的免疫细胞产生包

括 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  在内的众多具有生物活性的促炎细胞因子,这些促炎细胞因子相互作用、相互影响,共同调节和控制乳腺炎症的发展<sup>[19]</sup>。李晓蕾等<sup>[20]</sup>研究发现,奶牛发生乳腺炎后,其血清中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平随炎症程度的加剧逐渐升高。本研究采用 ELISA 方法检测了黄芩苷对 LPS 诱导的家兔血清中 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌水平的影响,结果表明黄芩苷抑制 LPS 介导的三种细胞因子水平的升高,其中对于 IL-1 的抑制效果最好。

本实验结果显示,黄芩苷减轻 LPS 诱导家兔乳腺组织的病理变化,抑制家兔体温的升高,降低血清中 LDH、ALP、MPO 和 NAG 的活性,减少血清中 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达,表明黄芩苷对 LPS 诱导的家兔乳腺组织损伤有保护作用。

## 参考文献

- 1 Liu YX (刘延鑫), Sun Y (孙宇), Liu XF (刘学芳), et al. Research progress on mastitis treatment of Chinese Herbal Medicine in dairy cows. *Chin Anim Husbandry Vet Med* (中国畜牧兽医), 2011, 38:177-180.
- 2 Zou Y (邹颖), Hao JP (郝建平), Liu XL (刘晓伶), et al. Baicalin improves dss-induced colitis in mice via the TLRs/MyD88 signaling pathway. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:952-956.
- 3 Guo MY (郭梦尧). The effect and regulation mechanism of baicalin on the mastitis of *Staphylococcus aureus* infection in mice. Jilin:Jilin University (吉林大学), MSc. 2014.
- 4 Zhang JH (张进红), Lun YX (伦艳霞). Protective effect of baicalin on *S. agalactiae* induced mastitis in BALB/c mice. *Chin Dairy Cattle* (中国奶牛), 2009, 10:45-49.
- 5 Zhao YW (赵永旺). Mechanism of mastitis and curative effect of baicalin on mastitis. Baoding:Hebei Agricultural University (河北农业大学), MSc. 2006.
- 6 Cao SZ (曹随忠), Yang DY (杨德英), Yu SM (余树民), et al. Establishment of experimental rabbit mastitis model via teat duct infusion with lipopolysaccharide. *Chin J Vet Med* (中国兽医杂志), 2010, 11:26-27.
- 7 Persson Y, Larsen T, Nyman AK. Variation in udder health indicators at different stages of lactation in goats with no udder infection. *Small Ruminant Res*, 2014, 116:51-56.
- 8 Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, et al. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 3128-3137.
- 9 Le Roux Y, Laurent F, Moussaoui F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet Res*, 2003,

- 34:629-645.
- 10 Zhao XS (赵兴绪). Veterinary Obstetrics (Fourth Edition). Beijing: China Agricultural Press, 2016.
- 11 Yang DY (杨德英). Effects of bovine mastitis on activities of milk enzymes, contents of acute phase proteins and as potential indicator of cow's subclinical mastitis. Yaan: Sichuan Agricultural University (四川农业大学), MSc. 2009.
- 12 Guo CM (郭昌明), Zhang NS (张乃生), Zhou CF (周昌芳), et al. Study on the myeloperoxidase detecting recessive mastitis. *Progr Vet Med* (动物医学进展), 2006, 27(6):54-57.
- 13 Lehmann M, Wellnitz O, Bruckmaier RM. Concomitant lipopolysaccharide-induced transfer of blood-derived components including immunoglobulins into milk. *J Dairy Sci*, 2013, 96:889-896.
- 14 Chung CP, Park JB, Bea KH. Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on human gingival fibroblasts. *Planta Med*, 1995, 61:150-151.
- 15 Zhang LY (张丽亚), Dong L (董琳), Chen XF (陈小芳), et al. The *in vitro* study of baicalin against respiratory syncytial virus infection effect. *Zhejiang Clin Med J* (浙江临床医学), 2008, 10:1528-1530.
- 16 Xu S (徐珊), Meng QG (孟庆刚), Song LL (宋琳莉), et al. Comparison of relieving fever function about withdraws of radix scutellariae from different originates. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2009, 27:1176-1181.
- 17 Li QN (李倩楠), Ge XQ (葛晓群). Effect of baicalin on antipyresis and influence on cytokine. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35:1068-1072.
- 18 Annika W, Allen TW, Thomas L, et al. *Staphylococcus aureus* lipotechoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells: Implications for early diagnosis of mastitis. *Immunol Immunopathol*, 2006, 109(12):79-83.
- 19 Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002, 7:135-146.
- 20 Li XL (李晓蕾), Zhang Y (张宇), Liu BJ (刘本军), et al. Research of related cytokines in serum of different extents of cow mastitis. *Chin J Vet Med* (中国兽医杂志), 2011, 10(10):7-9.

(上接第 1389 页)

- 21 Du CP, Tan R, Hou XY. Fyn kinases play a critical role in neuronal apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation or amyloid- $\beta$  peptide treatment. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18:754-761.
- 22 Suzuki O, Abe M. Cell surface N-glycosylation and sialylation regulate galectin-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma. *Oncol Rep*, 2008, 19:743-748.
- 23 Oredipe OA, Furber-Harris PM, Laniyan I, et al. Enhanced proliferation of functionally competent bone marrow cells in different strains of mice treated with swainsonine. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3:445-455.
- 24 Portt L, Norman G, Clapp C, et al. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813:238-259.
- 25 Li W, Huang Y, Zhao X, et al. Swainsonine induces caprine luteal cells apoptosis via mitochondrial-mediated caspase-dependent pathway. *J Biochem Mol Toxicol*, 2014, 28:456-464.
- 26 Bai L, Wang S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Ann Rev Med*, 2014, 65:139-155.
- 27 Monsalve DM, Merced T, Fernández IF, et al. Human VRK2 modulates apoptosis by interaction with Bcl-xL and regulation of BAX gene expression. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e513.
- 28 de Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*, 2012, 34:200-211.