文章编号:1001-6880(2018)1-0109-05

荔枝草提取物治疗慢性咽炎的作用及机制研究

孔庆新[1],东　方[1],李思阳[1],钱　俊[1],曲中原[2*],邹　翔[2],姜　雪[2],李　雪[2]

[1]江苏食品药品职业技术学院,淮安 223001;[2] 哈尔滨商业大学,哈尔滨 150076

摘　要:在荔枝草抗炎有效部位筛选的基础上,研究荔枝草乙酸乙酯部位治疗慢性咽炎的作用及机制,通过氨水刺激建立慢性咽炎大鼠模型,采用不同浓度荔枝草乙酸乙酯提取物灌胃给药治疗,并进行了大鼠一般行为观察、咽部病理学观察以及酶联免疫吸附法(ELISA)检测。结果显示,建立的慢性咽炎大鼠模型符合慢性咽炎动物模型特征,荔枝草乙酸乙酯部位可显著改善咽部的病理形态学表现。对比模型组,治疗组大鼠血清中 IL-1β、IL-6β、ICAM-1、TNF-α、CRP 水平均有不同程度的下降,以高剂量组最为显著。结果表明,荔枝草提取物对慢性咽炎具有治疗作用,其治疗作用与其能调节血液中淋巴细胞及炎症因子水平,并能抑制咽部炎症病理改变的发生有关。

关键词:荔枝草;提取物;慢性咽炎;作用;机制

中图分类号:Q939.9　　**文献标识码**:A　　DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.1.019

Study on the Effect and Mechanism of Extract of *Saluia plebeia* R. Br. on Chronic Pharyngitis

KONG Qing-xin[1], DONG Fang[1], LI Si-yang[1], QIAN Jun[1],
QU Zhong-yuan[2], ZOU Xiang[2], JIANG Xue[2], LI Xue[2]

[1]*Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, Huai' an 223003, China*;
[2]*Harbin University of Commerce, Harbin, 150076, China*

Abstract: In order to provide the reference for the clinical utilization of *Saluia plebeia* R. Br., this paper investigated the anti-chronic pharyngitis activity and mechanism of *Saluia plebeia* R. Br. ethyl acetate extract, based on screening of the anti-inflammatory active fractions from *Saluia plebeia* R. Br. After establishing the chronic pharyngitismodel in rats by ammonia stimulation, this paper explored the praxiology, pharynx pathological observation and double-antibody sandwich ELISA of the model rats which were treated in different dosing of *Saluia plebeia* R. Br. ethyl acetate extract. The model of chronic pharyngitis in ratswas consistent with the chronic pharyngitis features. HE staining sections showed that *Saluia plebeia* R. Br. ethyl acetate extract could significantly improve the pathological morphology of pharynx. Compared with the model group, the levels of IL-β、IL-6β、ICAM-1、TNF-α and CRP in the serum of treatment group rats were decreased in different degrees, with the most significant in the high-dose group. The results indicated that the ethyl acetate extract of *Saluia plebeia* R. Br. owned therapeutic effect on chronic pharyngitis. The therapeutic effect is related to the level of lymphocytes and inflammatory factors in the blood, and improved the level of lymphocytes and inflammatory factors.

Key words: *Saluia plebeia* R. Br.; extract; chronic pharyngitis; effect; mechanism

荔枝草(*Salvia plebeia* R. Br.)为唇形科植物荔枝草的新鲜或干燥全草,别名蛤蟆草、癞肚皮棵荠宁、雪见草、猪婆草等;其适应性强,除了甘肃、新疆、西藏、青海外,全国各地均有分布,是一种宝贵的野生药用植物资源[1]。中医典籍记载,荔枝草苦、辛,性凉,可治"咽喉十八症"(《本草纲目拾遗》),"专治咳嗽,消肺金火胜"(《天宝本草》),"治扁桃体炎、咽炎、支气管炎"(《江西本草选编》)。荔枝草临床主要用于呼吸系统炎症,肾病及腹水造成的肿胀,崩中漏下,便血淋血,血小板缺乏性紫癜等;药理学研究显示荔枝草在抗氧化、抗菌、抗病毒、止咳平喘、护肝保肝方面均有较强的活性[2,3]。

近年来,随着环境污染以及工作压力增大,慢性咽炎的患病率不断增加,已被世界卫生组织列入亚

收稿日期:2017-08-09　　接受日期:2017-11-09

基金项目:淮安市科技计划(工业):淮安特色中药荔枝草治疗慢性咽炎作用机制研究及其系列产品开发(HAG201613)

*通信作者 E-mail:qiuqiuqu@163.com

天然产物研究与开发

健康状态范畴。本实验选取荔枝草作为研究对象，针对其对慢性咽炎的治疗作用及机制进行研究，明确荔枝草的药效物质基础，为荔枝草在临床上治疗慢性咽炎提供依据。

1 材料与仪器

1.1 试验材料

荔枝草鲜药材：采自江苏淮安（野生、新鲜），经鉴定为唇形科植物荔枝草（Salvia plebeia R. Br.）；慢严舒柠清喉利咽颗粒（桂龙药业有限公司，批号：161131，规格：5 克×18 袋）；wistar 大鼠（健康、雄性 180 g～220 g，由哈尔滨医科大学实验动物中心提供，动物合格证号：SCKK（黑）-2013-001）。

1.2 试药

大鼠白细胞介素 1β（IL-1β）试剂盒、大鼠白细胞介素 6β（IL-6β）试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、大鼠细胞间粘附分子 1（ICAM-1）、大鼠 C-反应蛋白（CRP）试剂盒（北京诚林生物公司）；氨水、95% 乙醇、乙醚、水合氯醛、氯仿、正丁醇、石油醚、乙酸乙酯（国药集团化学试剂有限公司）等均为分析纯。

1.3 仪器与设备

DR200Bn 多功能酶标仪（北京普天新桥技术有限公司）；DHG-9140A 干燥箱（上海一恒科技有限公司）；HH-2 水浴锅（常州市恒久仪器制造有限公司）；LD4-2A 低速离心机（青岛京立离心机有限公司）；XP2002 电子天平（上海越平科学仪器有限公司）；CP24S 分析天平（北京赛多利斯天平有限公司）；RE-52AA 旋转蒸发器（河北亚荣生化仪器厂）；SHB-111 循环水式多用真空泵（上海爱朗仪器有限公司）；98-1-B 电子调温电热套（上海市泰斯特仪器有限公司）。

2 试验方法

2.1 荔枝草乙酸乙酯部位提取液制备

取 200 g 荔枝草，用 95% 的乙醇（2000 mL）加热回流（80 ℃）提取 3 次，合并提取液，浓缩，得流浸膏（107.5 g）。用蒸馏水将流浸膏定容至 200 mL，置 1000 mL 分液漏斗中，分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取。将乙酸乙酯提取液 37 ℃减压浓缩，水浴锅 60 ℃挥干至恒重，得荔枝草乙酸乙酯部位提取物[4]。

2.2 大鼠慢性咽炎模型的建立

选用 wistar 大鼠 48 只，随机分为低剂量组、中剂量组、高剂量组、阳性药物组、模型组、空白对照组等 6 组，每组 8 只。除空白对照组（相同操作喷等量蒸馏水）外，其余组每天用 2.5% 氨水喷大鼠咽部 2 次，每次用喷雾器喷 3 揿，间隔 8 h，连续 16 d。每隔 2 d，用乙醚麻醉 3 只大鼠，观察咽部组织变化情况[5]。

2.3 灌胃给药

造模后第 17 d 起，每日早晚各灌胃给药一次，给药容积为 1 mL/100 g 体重，连续给药 5 d。参照李仪奎[6]《中药药理实验方法学》给药，高剂量组为 10.278 g/kg、中剂量组为 5.139 g/kg、低剂量组为 2.570 g/kg，阳性药（慢严舒柠颗粒）给药浓度为 1.543 g/kg，空白组和模型组按照相同操作给予相应容积的生理盐水。

2.4 大鼠行为学、咽部病理学观察及 ELISA 检测

2.4.1 大鼠一般行为观察

每天给药前后，观察并记录各组动物体重变化、饮食量增减情况；每隔 24 h 用乙醚麻醉大鼠，观察咽部情况（黏膜形态和色泽、口腔分泌物），呼吸时有无杂音。

2.4.2 咽部病理学观察

灌胃给药 5 d 后，眼球取血（静置 10 min，待凝固后，3000 rpm 离心 20 min，血清置 1 mL EP 管中，密封，-20 ℃冷冻保存，4 d 内测定），取血后立即断头，放入 10% 甲醛溶液中固定 48 h，取下咽部黏膜及其下组织做 HE 染色切片观察。

2.4.3 酶联免疫吸附法（*ELISA*）检测

将-20 ℃冷冻保存的各组血清置室温下复融（避免反复冻融），3000 rpm 离心 5 min，吸取血清，采用 ELISA 法分别测定血清中 IL-1β、IL-6β、TNF-α、ICAM-1、CRP 含量。

2.5 统计学方法

本实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，结果处理采用 SPSS13.0 统计软件，计量资料采用 t 检验进行分析比较。$P<0.05$ 为显著差异，有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 大鼠一般行为观察结果

由表 1 分析，荔枝草乙酸乙酯部位提取物和慢严舒柠清喉利咽颗粒灌胃给药期间，通过大鼠一般行为观察发现，给药 2 d 后，大鼠纳食量均恢复正

天然产物研究与开发

常、兴奋状况好转、躁动情况消失、活动量减少。给药 3 d 后,大鼠饮水频率和饮水量恢复正常,口腔粘液分泌量减少,搔抓口部减少(给药期间模型组较其他组搔抓动作多)。给药 5 d 后,咽部病变有所纠正,但模型组仍呈慢性炎症改变。而在造模及灌胃给药期间,空白组纳食方面、活动情况、饮水情况、口腔分泌物、搔抓口部及咽部情况均无显著变化。

3.2　咽部病理学观察结果

表 1　大鼠一般行为观察结果

Table 1　The results of behavior observation in rats

观察项目 Observation items	造模期间(喷氨水组) Molding period (ammonia spraying group)	灌胃给药期间 During the intragastric administration period			空白组 Blank group
		模型组 Model group	荔枝草提取物组 Salvia plebeian extract group	阳性药组 Positive medicine group	
纳食方面 Food intake	6 d 后为 20 g/d10 d 后为 15 g/d	15 g/d	2 d 后为 25 g/d	2 d 后为 25 g/d	25 g/d
活动情况 Activity	4 d 后增加,1 h 后正常;6 d 后显著增加,2 h 后正常	增加	2 d 后恢复正常	2 d 后恢复正常	无变化
饮水情况 Water intake	3 d 后频率(量)增加;7 d 后频率(量)显著增加	显著增加	3 d 后恢复正常	3 d 后恢复正常	无变化
口腔分泌物 Oral secretion	7 d 后显著增加	显著增加	3 d 后分泌量减少	3 d 后分泌量减少	无异常
搔抓口部 Scratching the mouth	喷氨水后搔抓较频繁,口部有磨蹭动作	搔抓较治疗组更多	3 d 后搔抓减少	3 d 后搔抓减少	未见
咽部情况 Pharyngeal situation	5 d 后充血肿胀,鲜红;12 d 后充血肿胀,暗红;	呈慢性炎症改变	5 d 后有所纠正	4 d 后有所纠正	无变化

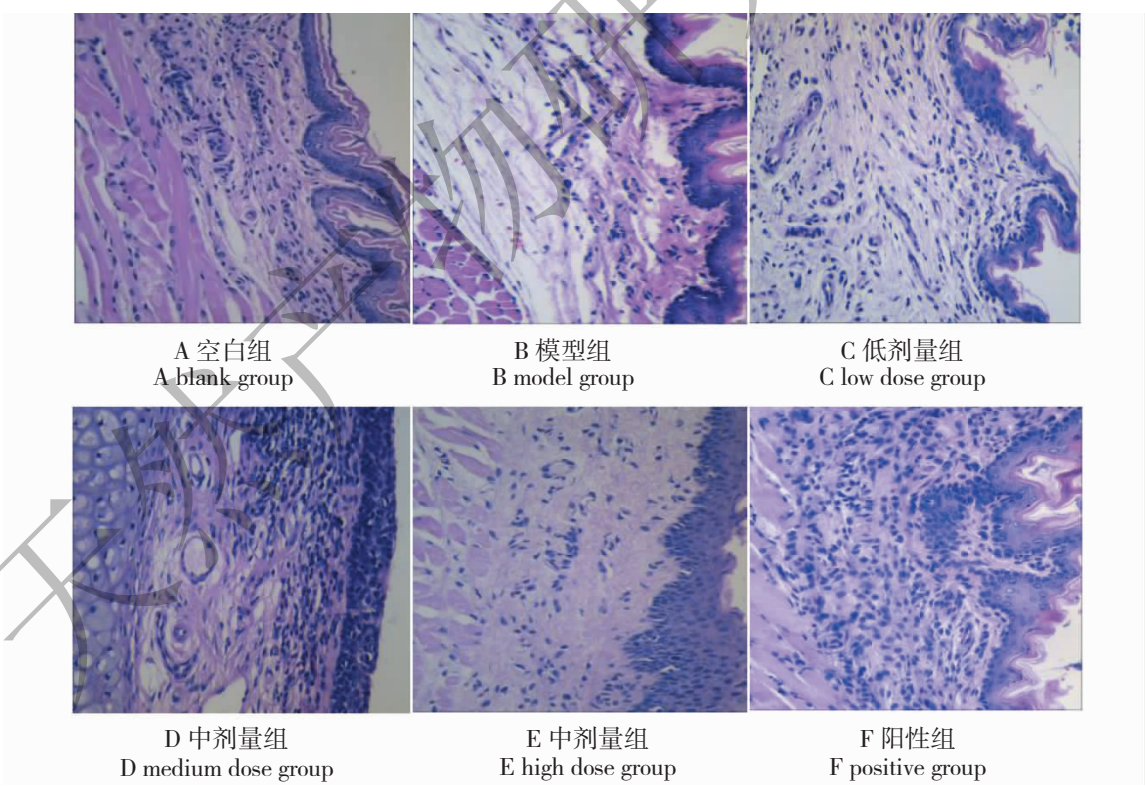

图 1　咽部黏膜及组织 HE 染色切片

Fig. 1　The images of HE staining sections of pharyngeal mucosa and tissues

由图 1 分析,①空白组:黏膜上皮层未发生角化;固有层多为致密结缔组织,内有少量血管;黏膜下层为疏松结缔组织,内部的腺体结构正常;外膜结缔组织未发生炎性改变。②模型组:黏膜上皮层角

天津中医研究与开发

化,顶端突起,增生显著;固有层结缔组织较疏松,内部毛细管明显扩张,炎性细胞大量浸润,纤维组织可见增生;黏膜下层腺体增生、萎缩、肿大情况严重,腺体周围毛细管扩张、数目增多;外膜层未发生炎性改变。③低、中剂量组:黏膜上皮层发生角化,顶端突起,增生较明显;固有层结缔组织中炎细胞浸润分散存在;黏膜下层少量存在腺体增生、萎缩、肿大现象,毛细管扩张;外膜层未发现明显炎性改变。④阳性药、高剂量组:咽部黏膜上皮未角化,黏膜较平整,轻度上皮增生;固有层结缔组织致密,毛细管数目较模型组明显减少,未观察到血管扩张或肿胀情况,炎细胞浸润零星分布,未见明显纤维增生;黏膜下层中腺体未见显著增生、萎缩、肿大现象,其周围毛细管数较空白组稍增多。

表 2 荔枝草乙酸乙酯提取物对大鼠血清中 ICAM-1、IL-1β、IL-6β、TNF-α、CRP 的影响($\bar{x} \pm s$,n=8)

Table 2 Effect of ethyl acetate extract of Saluia plebeia R. Br. on IL-1β, IL-6β, and TNF-α in serum of rats(ng/L)($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别 Group	ICAM-1 (ng/L)	IL-1β (ng/L)	IL-6β (ng/L)	TNF-α (ng/L)	CRP (μg/L)
空白组(blank group)	29.06 ± 1.42	14.38 ± 8.33	29.06 ± 1.42	119.46 ± 17.60	512.05 ± 14.36
模型组(model group)	48.93 ± 1.38*	15.49 ± 3.47*	48.93 ± 1.38*	202.38 ± 50.78*	711.15 ± 18.69*
低剂量组(low dose group)	39.60 ± 1.01#	14.43 ± 2.36#	39.60 ± 1.01#	177.62 ± 17.86#	583.16 ± 49.02#
中剂量组(Medium dose group)	37.57 ± 1.19#	13.03 ± 0.53#	37.57 ± 1.19#	149.34 ± 15.24#	561.05 ± 17.59#
高剂量组(high dose group)	33.04 ± 1.21#^	12.89 ± 2.25#^	33.04 ± 1.21#^	130.36 ± 7.01#^	530.85 ± 19.35#^
阳性组(positive group)	32.92 ± 3.38	12.05 ± 0.36	32.92 ± 3.38	153.23 ± 36.75	540.93 ± 20.54

注:* 与空白组比较 $P<0.05$;#与模型组比较 $P<0.05$;^与阳性药比较 $P<0.05$。

Note: * Comparison with blank group $P<0.05$, #Comparison with model group $P<0.05$, ^Comparison with positive drug $P<0.05$.

3.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测结果

由表 2 分析,与正常组相比,大鼠血清中 ICAM-1、IL-1β、IL-6β、TNF-α 和 CRP 的浓度均显著上升($P<0.05$),说明大鼠造模成功。与模型组比较,高、中、低剂量组大鼠血清中的 ICAM-1、IL-1β、IL-6β、TNF-α 和 CRP 浓度均有下降($P<0.05$),说明不同浓度的荔枝草乙酸乙酯提取物均有效降低了大鼠体内的炎性因子表达。与低剂量组相比较,高剂量组 ICAM-1、IL-6β、TNF-α 和 CRP 浓度均下降明显($P<0.05$),说明高剂量组效果优于低剂量组。与阳性药相比,高剂量组 TNF-α 和 CRP 浓度下降明显($P<0.05$),说明高剂量组比阳性药效果更为显著;与阳性药相比,ICAM-1、IL-1β 和 IL-6β 无明显差异性($P>0.05$),说明高剂量组与阳性药效接近。

4 讨论

慢性咽炎是临床常见病、多发病,为咽部黏膜、黏膜下及淋巴组织的慢性炎症;该病患病周期性长,患病原因多样,较难治愈。江苏、安徽等地民间常用荔枝草泡茶饮用治疗咽炎,疗效显著[1]。据此,本实验选用低浓度(2.5%)的氨水作为诱因,对大鼠咽部进行长期喷雾刺激来进行造模[6,7]。使用氨水喷雾刺激咽部黏膜局部,可使毛细管充血肿胀,反复刺激使暂时性黏膜损伤变成慢性炎症,这与慢性咽炎的发病原因相符。

试验中,造模 3 d 后,大鼠开始出现搔抓口部,喷氨水后躁动不安,频频饮水现象。7 d 后,普通观察可见黏液分泌量显著增加,黏液较清稀,咽部轻度充血红肿,纳食量显著减少,饮水量显著增加。造模 10 d 后,上述表现均非常显著,且咽部黏膜破损严重,组织有溃疡产生,毛细血管出现点状出血,与《中药新药治疗慢性咽炎的临床研究指导原则》诊断标准相近,符合慢性咽炎动物模型的特征[8],说明大鼠慢性咽炎造模成功。

经不同浓度荔枝草乙酸乙酯提取物给药治疗,比较模型组观察。一般行为方面:大鼠搔抓口部活动减少,饮水量不同程度下降,进食量增加,体重增加,自发活动增多,空腔分泌黏液量减少,呼吸过程的杂音消失。咽部病理学方面:咽部粘膜破损情况恢复较好,黏膜上皮增生、腺体分泌情况改善,炎性细胞密集性浸润及纤维组织增生较少;肌肉层与外膜层炎性改变不同程度减轻。

内皮细胞和白细胞损害或激活的重要标志之一是 ICAM-1 细胞的表达增高,IL-1β 是炎症情况下一种重要的细胞因子和多肽调节因子,IL-6β 可调节免疫应答、参与机体内炎症反应。炎症发生时,IL-1β 和 L-6β 表达水平均会有所升高。CRP 是机体受到炎性刺激时产生的一种急性相蛋白,当有炎症侵入时明显浓度上升[9-11]。ELISA 双抗夹心检测法具有高度的特异性和灵敏度,结果真实可靠;该法研究显示:所建立的慢性咽炎模型是成功的。荔枝草乙酸乙酯提取部位可以有效地抑制炎性反应的发生,减

天然产物研究与开发

轻黏膜充血,减少炎性细胞浸润及黏液分泌,这与其抑制炎性反应,显著降低 IL-β、IL-6β、ICAM-1、TNF-α、CRP 的表达有关,荔枝草乙酸乙酯部位可显著改善咽部的病理形态学表现(复层鳞状上皮、结缔组织趋于正常)。治疗组大鼠血清中 IL-β、IL-6β、ICAM-1、TNF-α 及 CRP 水平均有不同程度的下降,以高剂量组最为显著。因此,荔枝草乙酸乙酯提取物能显著改善大鼠的慢性咽炎症状,表明荔枝草可以作为慢性咽炎的治疗药物。

参考文献

1 Kong QX(孔庆新),Li SY(李思阳),Liu K(刘凯),*et al.* Extraction and analysis of Plantago asiatica in *Salvia plebeia* R. Br[J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学),2014,42:304-306.

2 Ding P(丁平),Tian YQ(田友清). Study Progress on the Chinese *Salvia plebeia* R. Br[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学),2008,36:4133-4144.

3 Yu F(喻樊). Pharmacodynamic study on the expectorant , cough-relieving and anti-inflammation effect of Herba Salviae Plebeia[J]. *Strait Pharm J*(海峡药学),2009,21(10):31-33.

4 Jang HH,Cho SY,Kim MJ,*et al.* Anti-inflammatory effects of Salvia plebeia R. Br extract *in vitro* and in ovalbumin-induced mouse model[J]. *Biol Res*,2016,49(1):39-41.

5 Xu LL(徐兰兰),Zou K(邹坤),Wang YZ(汪鋆植),*et al.* Experimental study on the treatment of acute pharyngitis with extract of Tupistra chinensis Bak[J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*(江苏中医药),2008,40(8):78-79.

6 Li YK(李仪奎). Experimental Methodology of Traditional Chinese Medicine Pharmacology(中药药理实验方法学)[J]. Shanghai:Shanghai Scienceand Technology Publishing House,2006:13-18.

7 Peng SL(彭顺林),Zhong Q(钟渠),Xiong DJ(熊大经),*et al.* Study on animal models of chronic pharyngitis[J]. *J Chengdu Univer TCM*(成都中医药大学学报),1999,22(1):51-53.

8 Deng KB(邓可斌),Lei XX(雷西熙),Tian B(田波),*et al.* Effect of pharyngeal acupuncture on pathomorphology in an animal model of chronic pharyngitis: an experimental study[J]. *Hunan J Tradit Chin Med*(湖南中医杂志),2017,33:180-182.

9 Li N(李娜),Yang FW(杨丰文),Lu ZY(陆中英),*et al.* Lanqin oral liquid for the treatment of chronic pharyngitis: systematic review and Meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2017,42:1489-1494.

10 Jones EY,Stuart DI,Waiker NPC,*et al.* Stracture of tumor necrosis factor[J]. *Nature*,1989,338:220-225.

11 Wang HQ(王宏强),Chou CF(仇成风),Deng ZW(邓紫薇),*et al.* Effects of Diallyl Disulfide on SD Rat Articular Cartilage Cell Induced by IL-1β[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2017,29:1498-1503.

(上接第 88 页)

9 Schulz H, Quilitzsch R, Kruger H. Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme,origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy[J]. *J Molecul Struct*,2003,661:299-306.

10 Wang YH(王玉华),Yuan JR(袁久荣). Application of infrared spectroscopy in Materia Medica identification[J]. *Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai*(上海中医药大学学报),2004,18(1):62-64.

11 Pikal MJ,Rigsbee D,Roy ML. Solid state stability of proteins III:Calorimetric (DSC) and spectroscopic (FTIR) characterization of thermal denaturation in freeze dried human growth hormone (hGH)[J]. *J Pharmacol Sci*,2008,97:5122-5131.

12 Zhang F(张芳),Zhang YQ(张永清),Yu X(于晓),*et al.* Analysis of IR spectra on the buds of different germplasm resources of *Lonicera japonica*[J]. *Chin Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2012,18(9):83-86.

13 Tu YS(涂瑶生),Bi XL(毕晓黎),Tan ZS(谭志灿),*et al.* Study on different formula granules of processed Pinelliae Rhizoma by FTIR[J]. *Acad Guangdong Coll Pharm*(广东药学院学报),2013,29:266-270.

14 Sun SQ(孙素琴),Zhou Q(周群),Yu JY(郁鉴源), *et al.* The latest development of the research on Chinese medicine by molecular vibrational spectroscopy[J]. *Spectrosc Spect Anal*(光谱学与光谱分析),2000,20:199-202.

15 Gong HY(龚海燕),Wang LL(王琳琳),Luo X(罗晓),*et al.*. Studies of Donglingcao tablets from different manufacturers by infrared derivative spectra and clustering analysis[J]. *Chin Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2014,20(3):66-70.

16 Xie BS(谢培山). Study on the feasibility of application of chromatographic fingerprint identification to herbal medication[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2000,22:391-396.

17 Sun SQ(孙素琴),Zhou Q(周群),Qin Z(秦竹). Traditional Chinese medicine (TCM) two-dimensional correlation infrared spectrum set(中药二维相关红外光谱集)[M]. Beijing:Chemical Industry Press,2003:428.

天然产物研究与开发