

不同大鼠模型探讨连翘挥发油解热、抗炎作用

罗林, 袁岸, 党珏, 赵梦杰, 李芸霞*

成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室 中药资源系
统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137

摘要: 观察连翘挥发油对不同大鼠模型的作用, 探讨其解热、抗炎的作用机理。采用干酵母皮下注射和脂多糖腹腔注射建立大鼠发热模型评价连翘挥发油的解热作用, 采用右后足皮下注射角叉菜胶、鸡蛋清建立大鼠足肿胀模型以及建立大鼠棉球肉芽肿模型评价其的抗炎作用。发现连翘挥发油可抑制脂多糖和干酵母所致发热, 降低角叉菜胶和鸡蛋清所诱导的大鼠足肿胀, 与模型组对比均有明显差异 ($P < 0.05$); 且可显著抑制肉芽组织的增生, 与模型组对比有明显差异 ($P < 0.01$)。结果表明连翘挥发油具有明显的解热、抗炎作用, 为对其清热解毒作用作进一步的研究提供了一定的理论依据。

关键词: 连翘挥发油; 清热解热; 解热; 抗炎

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.2.006

Antipyretic and Anti-inflammatory Effects of *Forsythia suspense* Volatile Oil in Different Rats Models

LUO Lin, YUAN An, DANG Jue, ZHAO Meng-jie, LI Yun-xia*

School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization for Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, National Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

Abstract: To investigate the effects of volatile oil of *Forsythia suspense* (VOFF) on different rat models, and explore the mechanism of its anti-inflammatory and antipyretic effects. Two rat fever models were established by subcutaneously injection of dry yeast and intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) to evaluate the antipyretic effect of VOFF, respectively. Rats cotton ball granuloma model, rats foot swelling model induced by subcutaneous injection of carrageenan or fresh egg white at the right posterior foot were used to evaluate the anti-inflammatory effects. VOFF can significantly inhibit LPS and dry yeast induced fever, reduce carrageenan and fresh egg white induced rat paw edema, compared with the model group ($P < 0.05$). It can also significantly inhibit the proliferation of granulation tissue, compared with the model group ($P < 0.01$). The results showed that VOFF had obvious antipyretic and anti-inflammatory effects, which provided a theoretical basis for further research on heat clearing and detoxifying function.

Key words: volatile oil of *Forsythia suspense*; heat clearing and detoxifying; antipyretic; anti-inflammatory

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。秋季果实初熟尚带绿色时采收, 除去杂质, 晒干, 习称“青翘”; 果实熟透时采收, 晒干, 除去杂质, 习称“老翘”^[1]。传统医学认为, 连翘苦寒, 归心、肺、小肠经, 功能清热解毒、消肿散结、疏散风热。中医认为, 清热解毒之“毒”为火热壅盛所致的“热毒”或“火毒”, 主要为温热病及

热毒炽盛症。现代医学研究认为, 清热解毒中药所解之“毒”包括细菌、病毒、内毒素等“外源性之毒”和氧自由基、细胞因子等“内源性之毒”^[2,3]。连翘为典型的清热解毒药, 可用于温热病的各个阶段。现在药理研究表明其具有抗炎、抗病原微生物、解热镇痛、镇吐、保肝等作用。

连翘的果实中含有丰富的挥发油, 青翘中的挥发油含量达 2% 左右。作为传统中医药中重要的清热解毒药, 其挥发油的应用一直没有得到重视。《中国药典》2015 年版中, 收载有连翘挥发油入药的有 29 例, 但其作用的机理并未得到有效的阐述。本

收稿日期: 2016-11-01 接受日期: 2017-06-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373943, 81573583); 四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项计划(2016TD0006, 2017TD0001)

* 通信作者 E-mail: lyxcdutcm@126.com

研究旨在观察连翘挥发油对不同大鼠模型的解热和抗炎作用^[4-8],进而探讨其作用机理。

1 仪器与材料

1.1 仪器

电子分析天平(BP-211D型,德国Sartorius),台式高速离心机(TG16-WS型,长沙湘仪离心机有限公司),电子体温计(常山县亿思达电子有限公司),足趾容积测试仪PV-200(成都泰盟软件有限公司)。

1.2 动物

SD雄性大鼠,体重200~240g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供,动物合格证号:SCXK(川)2013-15。

1.3 药物与试剂

青翘(批号:1506009),购自四川新荷花中药饮片股份有限公司;阿司匹林肠溶片(批号:国药准字H53021845,云南白药集团股份有限公司);醋酸地塞米松片(批号:国药准字H33020822,浙江仙琚制药股份有限公司);吐温-80(批号:20140426,天津市科密欧化学试剂有限公司);脂多糖(批号:Lot#044M4004V, sigma);角叉菜胶(批号:Lot#021M0038V, Sigma-Aldrich Co. LLC.);生理盐水,高活性干酵母(产品标准:GB/T20886,安琪酵母股份有限公司)。

2 实验方法

2.1 供试品的制备

连翘挥发油的提取按照2015版《中华人民共和国药典》第四部“挥发油测定法”中甲法制备,得淡黄色澄明油状液体,收得率1.8%,加入少量无水硫酸钠脱水,放入冰箱冷藏(0~4℃)待用。

连翘挥发油临用前用0.5%吐温-80助溶,配制成每mL吐温-80溶液中含连翘挥发油0.024mL的浓度;醋酸地塞米松片、阿司匹林肠溶片用研钵研成粉末,用生理盐水分别配制成0.5mg/mL和10mg/mL的混悬液备用。

2.2 皮下注射干酵母致大鼠发热模型

分别对大鼠测3次体温,淘汰温差高于0.5℃的大鼠,选出40只大鼠分为4组,每组10只,取2次体温的平均值作为实验前正常体温。除空白组外,其余3组分别于大鼠背部皮下注射20%酵母混悬液(10mL/kg),于造模后1、2、3、4、5h测体温,当体温升高0.8℃左右(即造模后5h左右)时开始灌

胃给药10mL/kg;正常对照组给予生理盐水,模型组给予0.5%吐温-80溶液,阳性对照组给予阿司匹林,给药组给予连翘挥发油。测量6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、10h体温,计算体温变化值。

2.3 腹腔注射脂多糖(LPS)致大鼠发热模型

分别对大鼠测3次体温,淘汰温差高于0.5℃的大鼠,选出40只大鼠分为4组,每组10只,取2次体温的平均值作为实验前正常体温。除空白组外,其余3组分别于大鼠腹腔注射10mL/kg脂多糖(LPS)溶液(2μg/mL),于造模前半小时灌胃给药10mL/kg;正常对照组给予生理盐水,模型组给予0.5%吐温-80溶液,阳性对照组给予阿司匹林,给药组给予连翘挥发油。造模后半小时开始测量大鼠肛温,给药后0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5h测量体温,计算体温变化值。

2.4 角叉菜胶致大鼠足肿胀模型

选出40只雄性大鼠分为4组,每组10只,实验前分别测量3次足趾体积取平均值作为正常足趾体积。分别于大鼠右后足注射1%(w/v)新鲜配制的角叉菜胶0.1mL,于造模前0.5h灌胃给药10mL/kg;模型组给予0.5%吐温-80溶液,阳性对照组醋酸地塞米松,给药组连翘挥发油。测量给药后0、0.5、1、2、3、4h右后足体积。计算各组大鼠致炎前后右后足容积变化值,以足肿胀率表示药物的抗炎效应。

$$\text{足肿胀率} = \frac{\text{造模后足肿胀度} - \text{正常足趾体积}}{\text{正常足趾体积}} \times 100\%$$

2.5 鸡蛋清致大鼠足肿胀模型

选出40只雄性大鼠分为4组,每组10只,实验前分别测量3次足趾体积取平均值作为正常足趾体积。分别于大鼠右后足注射10%(v/v)新鲜鸡蛋清0.1mL,于造模前0.5h灌胃给药10mL/kg;模型组给予0.5%吐温-80溶液,阳性对照组醋酸地塞米松,给药组连翘挥发油。测量给药后0、0.5、1、2、3、4h右后足体积。计算各组大鼠致炎前后右后足容积变化值,以足肿胀率表示药物的抗炎效应。

$$\text{足肿胀率} = \frac{\text{造模后足肿胀度} - \text{正常足趾体积}}{\text{正常足趾体积}} \times 100\%$$

2.6 大鼠棉球肉芽肿慢性炎症模型

将30只雄性SD大鼠按体重随机分组,各组大鼠均以10%水合氯醛3mL/kg腹腔注射麻醉,剪去腹部被毛,用75%酒精消毒,无菌条件下剪开下腹部正中皮肤,切口0.5~1cm,血管钳扩充皮下组

织,向左侧腹股沟皮下植入 20 mg 无菌干燥棉球,缝合切口。术后第二天起灌胃给药 10 mL/kg,每天 1 次,连续 7 d;模型组给予 0.5% 吐温-80 溶液,给药组连翘挥发油,阳性对照组醋酸地塞米松。每天喷适量碘伏于伤口外部消毒。于第 9 d 取血后处死大鼠,将棉球连同周围结缔组织一起取出,剔除脂肪组织剥离出棉球,于 60 °C 烘干后称重。用此重量减去原棉球重量作为肉芽组织的重量,计算各组肉芽组织增生抑制百分率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{模型组均值} - \text{给药组均值}}{\text{模型组均值}} \times 100\%$$

2.7 数据分析

数据采用 SPSS 20.0 统计软件分析。各组数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,两两比较用 *t* 检验,多组比较用单因素方差分析进行统计。

3 实验结果

3.1 连翘挥发油对干酵母致大鼠发热模型的作用

连翘挥发油对干酵母致大鼠发热模型的作用见图 2 所示,造模后大鼠的体温小幅下降之后上升明显,并在造模后 5 h 左右升温超过 0.8 °C;给药后,与模型组比较,连翘挥发油对大鼠体温升高有抑制趋势($P < 0.01$);但其作用尚不及阿司匹林组的作用强,两组对比有显著性差异($P < 0.01$)。

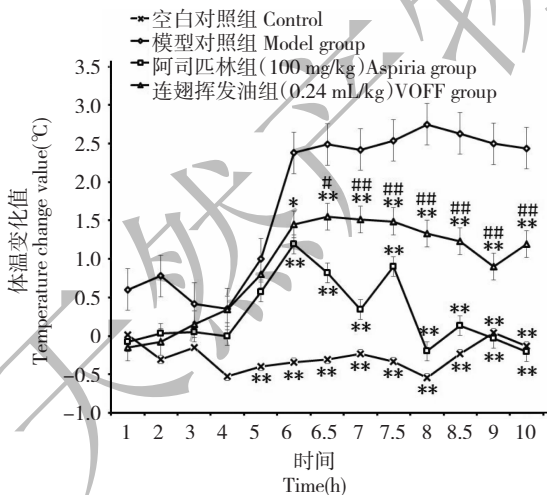


图 1 连翘挥发油对干酵母致大鼠发热模型的作用

Fig. 1 Effects of VOFF on the heat of rats induced by dry yeast

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与阿司匹林组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with Aspirin group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.2 连翘挥发油对脂多糖 (LPS) 致大鼠发热模型的作用

连翘挥发油对脂多糖 (LPS) 致大鼠发热模型的作用见图 3 所示,注射了 LPS 后,大鼠的体温上升呈现明显的二相热,并在造模后 4 h 左右达到峰值;与模型组比较,连翘挥发油对大鼠体温升高有抑制趋势($P < 0.05$);但是连翘挥发油的起效不及阿司匹林快($P < 0.05$)。

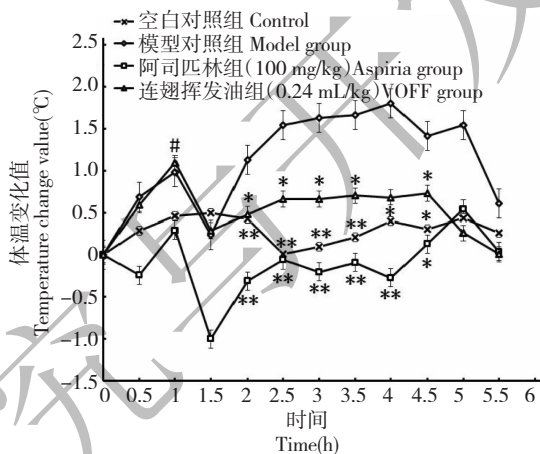


图 2 连翘挥发油对 LPS 致大鼠发热模型的作用

Fig. 2 Effect of VOFF on LPS induced fever in rats

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与阿司匹林组比, # $P < 0.05$

Note: compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with Aspirin group, # $P < 0.05$

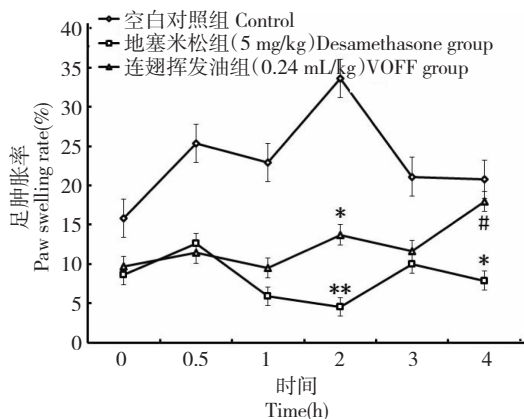


图 3 连翘挥发油对羧叉菜胶致大鼠足肿胀模型的作用

Fig. 3 Effect of VOFF on rats paw edema induced by carrageenan

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与地塞米松组比, # $P < 0.05$

Note: compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with dexamethasone group, # $P < 0.05$

3.3 连翘挥发油对角叉菜胶致大鼠足肿胀模型的作用

连翘挥发油对角叉菜胶致大鼠足肿胀模型的作用见图4所示,模型组大鼠在造模后足趾肿胀明显,于造模后2 h左右肿胀度达峰;与模型组比较,连翘挥发油对大鼠足趾肿胀程度有明显的减轻($P < 0.05$);造模后4 h,连翘挥发油的药效不及地塞米松($P < 0.05$)。

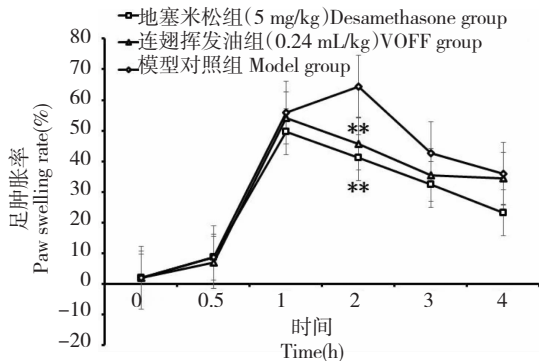


图4 连翘挥发油对鸡蛋清致大鼠足肿胀模型的作用

Fig. 4 Effect of VOFF on rats foot edema induced by egg white

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:Compared with model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.4 连翘挥发油对鸡蛋清致大鼠足肿胀模型的作用

连翘挥发油对鸡蛋清致大鼠足肿胀模型的作用

表1 连翘挥发油对大鼠棉球肉芽肿的作用

Table 1 Effect of VOFF on rats cotton ball granuloma

	肉芽肿干重 Weight of granuloma	肉芽肿抑制率 Granuloma inhibition rate (%)
模型对照组 Model group	40.39 ± 10.40	-
地塞米松组 Dexamethasone group (5 mg/kg)	16.67 ± 3.92 **	58.73
连翘挥发油组 VOFF group (0.24 mL/kg)	29.76 ± 9.66 * * #	26.32

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与挥发油组比较,## $P < 0.01$ 。

Note:compared with model group,** $P < 0.01$;compared with dexamethasone group,## $P < 0.01$ 。

4 讨论

本研究通过建立不同的大鼠病理模型,考察了连翘挥发油针对不同因素引起的发热和炎症的药理作用,进而探讨其作用机理。该组试验的目的在于筛选合适的模型进行代谢组学的研究,所以在课题组已有数据及预实验和相关文献的基础上,选择单一剂量的连翘挥发油(0.24 mL/kg)开展试验。

阿司匹林常用于筛选解热药物,其主要是通过

见图5所示,模型组大鼠在造模后足趾肿胀明显,于造模后0.5 h左右肿胀度迅速达峰;与模型组比较,连翘挥发油对大鼠足趾肿胀程度有明显的减轻($P < 0.05$),具有统计学意义。

3.5 连翘挥发油对大鼠棉球肉芽肿的作用

连翘挥发油对大鼠棉球肉芽肿的影响见图6所示,与模型组比较,连翘挥发油有明显的抑制大鼠棉球肉芽肿的作用($P < 0.01$);但其作用尚没有地塞米松组的作用强,两组对比有显著性差异($P < 0.01$)。

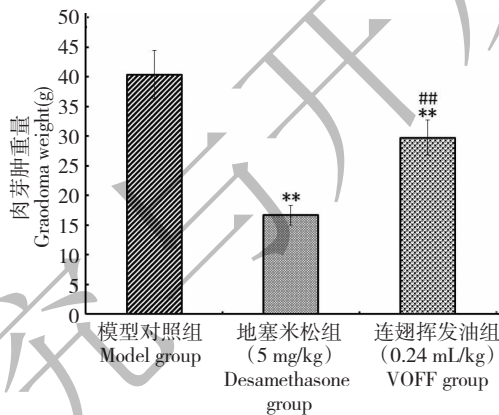


图5 连翘挥发油对大鼠棉球肉芽肿的作用

Fig. 5 Effect of VOFF on rats cotton ball granuloma

注:与模型组比较** $P < 0.01$;与地塞米松组比较,## $P < 0.01$

Note:compared with model group,** $P < 0.01$;compared with dexamethasone group,## $P < 0.01$

抑制 COX-2 的活性,减少下丘脑 PG 的生成而发挥解热作用。干酵母和脂多糖(LPS)致热原理都是刺激细胞产生内源性致热源,从而作用于下丘脑体温调节中枢,引起发热介质的释放导致机体发热^[9-16]。连翘挥发油在试验中,与阳性药物有相同的作用趋势,推测其作用机制可能是抑制了内源性致热源的释放以及 COX-2 的活性,进而降低 PG 水平,减弱了对下丘脑体温调节中枢的刺激。

地塞米松有很强的抗炎作用,常用来筛选抗炎

药物。在炎症的早期,能降低毛细血管的通透性,同时减少各种炎症因子的释放,以减轻渗出和水肿;在炎症后期,其作用主要是抑制毛细血管和纤维母细胞的增生及肉芽组织增生。大鼠足肿胀属于急性炎症模型,鸡蛋清和角叉菜胶都可以使致炎局部的 PG 合成增加,诱发水肿^[17-21]。试验结果均表明,连翘挥发油在致炎后 1~3 h 之间作用明显,推测其主要的的作用机制应该是抑制 PG 的生成。而且从大鼠肉芽肿急性炎症模型试验结果可看出,连翘挥发油有明显的抑制肉芽增生的作用,推测其可能具有抑制巨噬细胞及其衍生细胞聚集的作用^[22]。

本研究选用了 5 个常用的经典动物模型考察了连翘挥发油的抗炎、解热作用,并对其作用机理进行了探讨,充分体现了其多途径、多靶点的整体作用特点,为后续对连翘挥发油的药代动力学研究及代谢组学研究提供了理论支撑。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I.
- 2 Li MZ(李鸣真), Ye WY(叶望云), Lu FE(陆付耳). Study on the essence of Chinese medicine "clearing away heat and toxic materials" [J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med* (浙江中西医结合杂志), 2000, 10: 449-451.
- 3 Lu FE(陆付耳), Li MZ(李鸣真), Ye WY(叶望云). The ideas and methods of detoxification treatment [J]. *Chin J Integr Trad West Med* (中国中西医结合杂志), 2004, 24: 1124-1126.
- 4 Xiao HM(肖会敏), Wang SW(王四旺), Wang JB(王剑波), et al. Research progress of the component analysis of forsythia essential oil and its pharmacological actions [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19: 2047-2048.
- 5 Xiao HM(肖会敏), He Y(何悦), Wang SW(王四旺), et al. Component analysis of forsythia essential oil and study on their anti-viral activity [J]. *Chin Med Hera* (中国医药导报), 2011, 8(8): 31-33.
- 6 Xiao HM(肖会敏), He Y(何悦), Wang SW(王四旺), et al. *In vitro* experimental study of Forsythia volatile oil [J]. *Nei Mongol J Tradit Chin Med* (内蒙古中医药), 2011, 15: 99-100.
- 7 Guo J(郭际), Shen YJ(沈映君), Xie YH(解宇环). Experimental study on the anti-inflammatory effect of volatile oil

of *Fructus Forsythiae* [J]. *Sichuan J Physiol Sci* (四川生理学报), 2005, 27: 136-137.

- 8 Wei XY(魏希颖), Zhou XX(周晓霞), Ma HB(马海波). The effect essential oil of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl. (FSV) on fungi *in vitro* growth and oxidation [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 96-98.
- 9 Zuo ZP(左泽平), Wang ZB(王志斌), Guo YD(郭玉东), et al. Fever process and characteristics in commonly used rat fever models [J]. *Chin J Compar Med* (中国比较医学杂志), 2012, 22(2): 52-57.
- 10 Lu F(卢芳), Dong PL(董培良), Chen PP(陈平平), et al. The exploration and evaluation of the best modeling method of three kinds of fever syndrome models [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 2009, 28: 114-116.
- 11 Ni LJ(倪力军), Wu KF(邬科芳), Shi WZ(史万忠), et al. Chinese medicine antipyretic anti-inflammatory efficacy of volatile components research [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2007, 29: 1217-1221.
- 12 Ni LJ(倪力军), Zeng XH(曾晓虹), Shi WZ(史万忠), et al. Spectralmarker construction for evaluating antipyretic effects of 4 herbs [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2007, 29: 227-231.
- 13 Luo FL(罗福玲), Zhao HG(赵恒光), Zhang Z(章卓), et al. Antifebrile effect of tetrandrine on LPS-induced febris response in rats [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, 32: 1304-1308.
- 14 Li DX(李东晓), Yang W(杨薇), Lei L(雷玲), et al. Endotoxin induced fever model in the study of antipyretic pharmacological evaluation of the quality of traditional Chinese Medicine [J]. *Pharm Clin Chin Mater Clin Med* (中药药理与临床), 2011, 27: 101-103.
- 15 Zhu ZZ, Ma KJ, Ran X, et al. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133: 1126-1131.
- 16 Ma KJ, Zhu ZZ, Yu CH, et al. Analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activities of the ethanol extract from *Desmodium caudatum* [J]. *Pharm Biol*, 2011, 49: 403-407.
- 17 Hu YF(胡杨凡), Li HS(李胜华). Study on the anti-inflammatory effect and mechanism of *l. macranthoides* volatile organic compounds [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 2012, 23: 3031-3033.
- 18 Xiao BQ(肖百全), Zhu SX(朱少璇), Yang W(杨伟), et al. Study on the model of rat foot swelling induced by LPS and its mechanism [J]. *Chin Prac Med* (中国实用医药), 2008, 3(23): 63-65.