

# 槐耳清膏对 LPS 致小鼠炎症反应的调节作用\*

刘超 张腾元 朱日明 高鑫蕊 高慧婕<sup>△</sup>

(济宁医学院药学院,日照 276826)

**摘要** 目的 制备脂多糖(LPS)致炎小鼠模型,观察槐耳清膏对小鼠炎症反应的调节作用。方法 ICR 小鼠随机分为正常对照组、LPS 组、槐耳清膏低剂量组(4mg/kg)、中剂量组(6mg/kg)和高剂量组(8mg/kg),每组 10 只。6d 后测定小鼠脾脏指数,HE 染色观察小鼠肺脏组织的病理变化;ELISA 检测小鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达,RT-qPCR 检测小鼠脾脏 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 的变化。结果 与正常对照组相比,LPS 组小鼠的脾脏指数(5.09 $\pm$ 0.80)和 IL-6[(52.22 $\pm$ 8.41)pg/ml]、TNF- $\alpha$ [(56.40 $\pm$ 5.97)pg/ml]、IL-6 mRNA(3.16 $\pm$ 0.89)和 TNF- $\alpha$  mRNA(3.02 $\pm$ 0.84)表达水平均显著升高,小鼠肺部炎症反应增加,说明 LPS 致炎症模型制备成功;与 LPS 组相比,高剂量槐耳清膏干预后的脾脏指数(3.62 $\pm$ 0.69)和 IL-6[(37.65 $\pm$ 6.35)pg/ml]、TNF- $\alpha$ [(34.94 $\pm$ 5.12)pg/ml]、IL-6 mRNA(1.32 $\pm$ 0.15)和 TNF- $\alpha$  mRNA(1.29 $\pm$ 0.19)均有显著的降低(均  $P < 0.05$ )。结论 槐耳清膏可抵抗由 LPS 所致小鼠炎症,降低炎症性细胞因子的表达,有良好的抗炎效果。

**关键词** 槐耳清膏;LPS;炎症;IL-6;TNF- $\alpha$

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2020)12-389-04

## Experimental study on anti-inflammatory activity of *Huaier* cream in mice with LPS induced inflammation

LIU Chao, ZHANG Tengyuan, ZHU Riming, GAO Xinxin, GAO Huijie<sup>△</sup>

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

**Abstract: Objective** To observe the protective effect of *Huaier* cream in mouse with lipopolysaccharide (LPS) induced inflammation and to explore the mechanism of anti-inflammatory activity of *Huaier* cream at the level of cytokines. **Methods** ICR mice were randomly divided into control group, LPS group, *Huaier* cream high, middle and low dose (8, 6 and 4 mg/kg) group. After 6 days, the spleen index were analyzed and the inflammatory changes of lung tissues in each group were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining techniques. The expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in peripheral blood was detected by ELISA. RT-qPCR was used to detect the changes of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expression in mouse spleen. **Results** Compared with control group, LPS-treated mice showed significant increase in the spleen index (5.09 $\pm$ 0.80), IL-6 [(52.22 $\pm$ 8.41)pg/ml], TNF- $\alpha$  [(56.40 $\pm$ 5.97)pg/ml], IL-6 mRNA (3.16 $\pm$ 0.89) and TNF- $\alpha$  mRNA (3.02 $\pm$ 0.84), and inflammatory changes of lung tissues in mouse. Compared with LPS model group, the *Huaier* cream significantly decreased the spleen index (3.62 $\pm$ 0.69), IL-6 [(37.65 $\pm$ 6.35)pg/ml], TNF- $\alpha$  [(34.94 $\pm$ 5.12)pg/ml], IL-6 mRNA (1.32 $\pm$ 0.15) and TNF- $\alpha$  mRNA (1.29 $\pm$ 0.19), and inflammatory changes of lung tissues in mouse. **Conclusion** *Huaier* cream exhibits good anti-inflammatory effect in mouse with LPS induced inflammation.

**Keywords:** *Huaier* cream; LPS; Inflammation; TNF- $\alpha$ ; IL-6

\* [基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2016HL22);山东省高等学校科技计划(J18KA297);国家大学生创新训练计划项目(201810443020)

<sup>△</sup>[通信作者]高慧婕, E-mail:mianyigao@163.com

槐耳, 中药全名为槐栓菌, 学名 *Trametes robinophila* Murr, 属于木耳科真菌, 是一种生长在老龄中国槐树上的高等真菌子实体<sup>[1]</sup>。槐耳是我国传统医学重要的药用真菌<sup>[2]</sup>, 具有“治风, 破血, 益力”功效<sup>[3]</sup>, 民间常用于治疗癌症和炎症<sup>[4]</sup>。槐耳清膏(*Huaier aqueousextract*)是槐耳的提取产物, 其最主要的活性成分为多糖蛋白<sup>[5]</sup>。多项研究证实, 槐耳清膏可明显增强机体细胞免疫应答, 具有免疫调节、抗肿瘤及抗病毒等功能<sup>[6]</sup>。目前, 有关槐耳的研究主要集中于抗肿瘤及其免疫调节活性的研究<sup>[7-9]</sup>, 而对其抗炎活性研究较少。内毒素是革兰阴性菌细胞膜外膜的主要组成成分, 其化学本质为脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)。LPS可诱导机体产生炎症及炎症性细胞因子的释放, 常用于制备脓毒症模型<sup>[10]</sup>。本实验使用LPS构建小鼠脓毒症模型<sup>[11]</sup>, 探讨槐耳清膏对机体的抗炎活性及作用机制, 为槐耳及其复方制剂槐杞黄的临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 实验采用 ICR 健康小鼠, 体质量 243g, 雌雄各半, 由青岛市实验动物和动物实验中心提供, 动物合格证号: SCXK(鲁)2003001001。

**1.1.2 试剂与仪器** 槐耳清膏(启东盖天力药业有限公司赠送), LPS(索莱宝科技有限公司), 反转录试剂盒(Thermo Scientific Fermentas 公司), 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司)。荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)、酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司)、DYY-7C 电泳仪(北京六一公司)、凝胶成像分析仪(Bio-Rad 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及 LPS 致炎模型制备** 50 只 ICR 小鼠饲养一周后, 随机分为 5 组: 正常对照组、LPS 组、槐耳清膏低剂量组(4mg/kg)、中剂量组(6mg/kg)和高剂量组(8mg/kg), 每组 10 只。采用腹腔注射 LPS 制备小鼠致炎模型。采用灌胃给药, 槐耳低、中、高组分别灌服不同浓度的槐耳清膏 0.2ml/只/d, 正常对照组和 LPS 组灌服给予等体积的生理盐水, 共计 7d。第 7 天灌胃后 0.5h, 每组腹腔注射等体积的 LPS 0.2ml(10mg/kg), 正常对照组注射等体积的生理盐水。

**1.2.2 脾脏指数测定** 注射 LPS 6h 后, 称重后处

死小鼠, 分离脾脏, 用滤纸拭去表面残留血液, 立即称重。脾脏指数: 脾脏指数 = 脾脏质量(mg)/体质量(g)<sup>[12]</sup>。

**1.2.3 HE 染色观察 LPS 致炎症模型小鼠肺组织病理形态学的影响** 取小鼠肺组织于 4% 的多聚甲醛中固定, 常规 HE 染色, 切片连续切片, 厚度 4~6 $\mu$ m。镜下观察, 全景扫描。

**1.2.4 外周血 IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平测定** 注射 LPS 6h 后, 取小鼠外周血于室温静置 10min, 2500rpm 离心 20min, 分离血清, 参照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 加入终止液后, 使用多功能酶标仪, 分别测量各个样本内 IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平。

**1.2.5 RT-qPCR 测定小鼠脾脏组织 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 的含量** 取小鼠脾脏组织 0.1g, Trizol 法提取小鼠总 RNA, 反转录获得 cDNA 后行 RT-qPCR 检测 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平。引物序列参照表 1。

表 1 引物序列

Gene	Primer	Gene sequence(5' to 3')
GAPDH	F	ATTCAACGGCACAGTCAAGG
	R	GCAGAAGGGGCGGAGATGA
TNF- $\alpha$	F	ACCGTCAGCCGATTGCTAT
	R	CCGGACTCCG CAAAGTCTAA
IL-6	F	AGAGACTTCATCCAGTTGCC
	R	CCGGACTTGTGAAGATGGAA

### 1.3 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组数据比较采用 ANOVA 分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 检验, 所有分析采用 SPSS 19.0 统计软件,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 槐耳清膏对 LPS 致小鼠炎症模型脾脏指数的影响

LPS 组脾脏指数较正常对照组均明显升高, 说明 LPS 致炎症模型制备成功。槐耳中、高剂量组的脾脏指数较 LPS 组显著降低( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.2 槐耳清膏对 LPS 致小鼠炎症模型肺脏组织形态学的影响

LPS 组小鼠肺泡内有炎症性细胞的大量浸润, 肺泡壁增厚, 肺泡上皮细胞增生明显(图 1A)。与 LPS 组相比, 槐耳高剂量组肺组织内有少量的炎症性细胞浸润, 肺泡组织及肺泡支气管均无明显变化

(图 1B)。

表 2 5 组小鼠脾脏指数比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组	脾脏指数/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
正常对照组	3.70±0.48
LPS 组	5.09±0.80*
槐耳低剂量组	5.01±1.03
槐耳中剂量组	4.11±0.76**
槐耳高剂量组	3.62±0.69**
F 值	8.37
P	<0.05

注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较, \*\* $P < 0.05$ 。

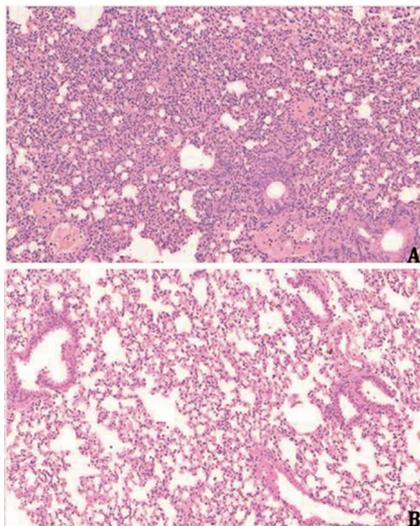


图 1 LPS 组(A)和槐耳高剂量组(B)小鼠肺组织 HE 染色( $\times 100$ )

### 2.3 槐耳清膏对 LPS 致小鼠炎症模型血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 表达的影响

LPS 组小鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达与正常对照组相比显著上升,炎症性细胞因子的表达升高,说明 LPS 致炎小鼠造模成功。槐耳中、高剂量组 IL-6、TNF- $\alpha$  表达较 LPS 组明显降低,而槐耳低剂量组无显著变化。见表 3。

表 3 5 组小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组	IL-6/ $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$	TNF- $\alpha$ / $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$
正常对照组	24.86±4.63	35.30±4.35
LPS 组	52.22±8.41*	56.40±5.97*
槐耳低剂量组	50.79±5.02	53.91±4.74**
槐耳中剂量组	40.70±5.01**	39.51±5.31**
槐耳高剂量组	37.65±6.35**	34.94±5.12**
F 值	33.73	40.91
P	<0.05	<0.05

注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较, \*\* $P < 0.05$ 。

### 2.4 槐耳清膏对 LPS 致小鼠炎症模型脾脏组织 IL-6、TNF- $\alpha$ mRNA 表达的影响

LPS 组小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达较正常对照组均显著上升,提示 LPS 致小鼠脾脏炎症。与 LPS 组相比,槐耳高剂量组 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达均有所下降,而中、低剂量组无明显变化, ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 5 组小鼠脾脏 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-6
正常对照组	1.04±0.11	1.05±0.12
LPS 组	3.02±0.84*	3.16±0.89*
槐耳低剂量组	2.29±0.88	2.64±0.22
槐耳中剂量组	1.44±0.25**	1.42±0.21**
槐耳高剂量组	1.29±0.19**	1.32±0.15**
F 值	21.24	46.87
P	<0.05	<0.05

注:与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较, \*\* $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

炎症是机体对刺激的一种防御反应,但过度炎症反应与许多疾病密切相关,比如心血管系统疾病<sup>[13]</sup>、癌症<sup>[14]</sup>等,因此对炎症的监测和控制对多种疾病意义重大<sup>[15]</sup>。其中,由细菌等生物病原体引起的炎症又称感染性炎症;LPS 为革兰氏阴性细菌细胞壁的一种成分,可以激活机体产生 IL-6、TNF- $\alpha$  等大量炎症因子,从而导致机体出现发热、毛细血管通透性增加和中性粒细胞浸润等多种炎症反应。本实验采用腹腔注射 LPS 法制备小鼠炎症模型,结果显示 LPS 模型组小鼠出现了行动迟缓、精神不振等现象,同时检测发现血清及脾脏组织中炎症性细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达显著增加,LPS 模型组小鼠肺脏出现大量中性粒细胞浸润,炎症反应明显,这也与既往文献报道一致<sup>[16-17]</sup>,说明 LPS 致脓毒症模型小鼠制备成功。

槐耳是我国古代医学重要的药用真菌,具有“治风,破血,益力”的功效<sup>[3,18]</sup>。现代医学观点,“治风,破血”即为消炎,“益力”可以理解为增强免疫力。槐耳是一味不可多得的抗炎中药,其抗炎活性和相关抗炎机制,值得深入研究。目前对槐耳及其复方制剂的研究主要集中于其抗肿瘤活性及调节免疫作用,而对其最传统的抗炎活性研究尚少。因此,本实验重点研究槐耳的抗炎活性。

TNF- $\alpha$  是一类由活化的巨噬细胞和 NK 细胞释放的促炎性细胞因子,参与局部炎症和内皮细胞的活化。急性炎症时,炎症局部产生的 TNF- $\alpha$  可提高中性粒细胞的吞噬活性,促进白细胞分

化<sup>[19-21]</sup>。IL-6 也是多效性的炎症性细胞因子,是形成炎性介质网络的关键成分,在炎症反应中起重要作用。IL-6 不仅参与炎症反应,而且直接导致炎症的发生,同时也通过促进其他炎症因子的释放间接导致炎症,激活中性粒细胞,因此,IL-6 既是炎症反应的重要介质,也是促进炎症的始动因素<sup>[22]</sup>。本文结果显示,槐耳中、高剂量组小鼠外周血血清及脾脏组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平均显著降低,提示较高浓度的槐耳清膏可以下调体内 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达,其机制可能是槐耳清膏可以有效地减少由 LPS 所致炎症引发的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的过度释放,清除体内的炎症介质,减少炎症的渗出,促进炎症吸收,抑制 LPS 所致炎症。

综上所述,槐耳清膏对 LPS 致小鼠炎症模型有很好的抗炎活性,可能通过抑制炎症性细胞因子的过度释放,减轻机体炎症性细胞浸润来降低机体炎症反应,为治疗与炎症密切相关的肿瘤、心血管疾病等提供了新的治疗思路。

#### 参考文献:

[1] 邓叔群. 中国的真菌[M]. 北京: 科技出版社, 1963: 515-516.

[2] 程若川, 王建忠. 槐耳的研制及临床应用[J]. 昆明医学院学报, 2003, 24(1): 101-103.

[3] 李时珍. 本草纲目(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1712.

[4] 刘学军, 杜娟. 槐耳清膏对荷瘤小鼠瘤细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(2): 60-61.

[5] 庄毅. 真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制[J]. 中国肿瘤, 1999, 8(12): 540-543.

[6] 李立新, 叶胜龙, 王艳红, 等. 槐耳浸膏的实验研究及临床应用进展[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(2): 110-113.

[7] 汪卫, 于健宁, 陶筱娟. 槐杞黄颗粒对 MRL/Lpr 狼疮脾小鼠 Th17 细胞的影响及机制研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(9): 739-743, 746.

[8] 唐亦非, 朱晓骏, 黄凌鹰, 等. 槐耳颗粒联合索拉非尼治疗晚期肝癌的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(7): 1732-1735. DOI: 10. 7501/j. issn. 1674-5515. 2018. 07. 039.

[9] 张洪梅, 史晓斌, 马维维, 等. 槐耳增强免疫作用机制研究及其临床应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(7): 216-220. DOI: 10. 13194/j. issn. 1673-842x. 2017. 07. 061.

[10] Broxmeyer HE, Sherry B, Lu L, et al. Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory proteins 1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor

cells[J]. J Exp Med, 1989, 170(5): 1583-1594. DOI: 10. 1084/ jem. 170. 5. 1583.

[11] 王凤, 温桃群, 徐锋, 等. 薄荷酮对内毒素致炎症模型小鼠的保护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(2): 227-234. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1978. 2017. 02. 017.

[12] 李晓, 高慧婕, 朱桐林, 等. 阿胶对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠的免疫保护作用[J]. 济宁医学院学报, 2019, 42(6): 385-389. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2019. 06. 002.

[13] 迟小青, 钟家蓉. Toll 样受体 4 在心肌疾病发病机制中的作用研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2012, 27(13): 1022-1024. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-515x. 2012. 13. 018.

[14] 张微峰, 胡容. NF- $\kappa$ B 在炎症相关癌症中的双重作用[J]. 药物生物技术, 2015, 22(1): 74-77. DOI: 10. 19526/j. cnki. 1005-8915. 2015. 01. 016.

[15] 杨艳丽, 于露, 李春霞, 等. IL-16 在炎症性肠病模型小鼠结肠组织的表达及意义[J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(6): 393-395, 399. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2018. 06. 004.

[16] 吴颖, 孙冰, 肖静, 等. 三七皂苷 R1 对 LPS 诱导的小鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 179-184. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1978. 2013. 02. 08.

[17] 陆杨, 胡冬梅, 文爱东, 等. 女贞总苷对急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 588-589. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1978. 2016. 04. 029.

[18] 高慧婕, 李春霞, 刘树玲, 等. 人参皂甙 Rg3 联合槐耳颗粒对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(6): 399-402. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2014. 06. 005.

[19] 鲍毅梅, 宋晓平. 天灸对佐剂性关节炎大鼠 IL-2、胸腺、脾指数的影响[J]. 新疆中医药, 2007, 25(3): 9-10.

[20] 蔡淑女, 方军, 蔡昀芳. 不同麻醉方式对肝癌患者围手术期免疫功能的影响[J]. 中华全科医学, 2014, 12(10): 1543-1544, 1590. DOI: 10. 16766/j. cnki. issn. 1674-4152. 2014. 10. 071.

[21] 赵进军, 欧阳晴晴, 王然, 等. 人 II 型肿瘤坏死因子受体与抗体融合蛋白治疗类风湿性关节炎疗效[J]. 中国临床研究, 2016, 29(1): 62-64. DOI: 10. 13429/j. cnki. cjr. 2016. 01. 018.

[22] Fernando MR, Giembycz MA, McKay DM. Bidirectional crosstalk via IL-6, PGE2 and PGD2 between murine myofibroblasts and alternatively activated macrophages enhances anti-inflammatory phenotype in both cells[J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(5): 899-912. DOI: 10. 1111/ bph. 13409.

(收稿日期 2020-07-09)

(本文编辑:石俊强)