

八角茴香复方对脂多糖诱导急性肺炎模型大鼠的抗炎作用*

张孟丽¹ 吴芳芳^{1△} 谭桅恩¹ 林浩² 李太平² 何艳梅² 欧敏¹ 王喜军^{2△}

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 西南濒危药材资源开发国家工程实验室, 广西南宁 530023; 2. 黑龙江中医药大学, 国家中医方证代谢组学研究中心, 黑龙江哈尔滨 150040)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-745X(2023)06-0951-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-745X.2023.06.003

【摘要】 目的 研究八角茴香复方对脂多糖(LPS)诱导的大鼠急性肺炎模型的抗炎作用。**方法** 取48只大鼠随机分为6组, 分别为对照组、模型组、阳性对照组及复方低、中、高剂量组, 灌胃给药2 d, 末次给药1 h后使用鼻腔滴入法制备急性肺炎模型, 继续给药3 d后腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉。采用ELISA试剂盒检测各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)含量的变化; 血液分析仪检测血液白细胞种类和数量, 并对BALF的炎性细胞进行分类和计数; 通过中性粒细胞/淋巴粒细胞比值(NLR)评估肺炎预后价值; HE染色观察肺组织形态学变化。**结果** 八角茴香复方对LPS诱导的大鼠急性肺损伤具有较好的抗炎作用, 可降低大鼠BALF及血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达, 降低炎性细胞的种类和数量。**结论** 八角茴香复方对LPS诱导的大鼠急性肺炎模型具有抗炎作用, 其机制可能通过降低IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达来实现的。

【关键词】 急性肺炎 八角茴香复方 化学成分 炎性因子 大鼠

Anti-inflammatory Effects of Compound Star Anise on Pneumonia Model Induced by Lipopolysaccharide

Zhang Mengli, Wu Fangfang, Tan Zhien, Lin Hao, Li Taiping, He Yanmei, Ou Min, Wang Xijun. National Engineering Laboratory for the Development of Southwestern Endangered Medicinal Materials, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Guangxi, Nanning 530023, China.

【Abstract】 Objective: To study the anti-inflammatory effect of Compound Star Anise on lipopolysaccharide (LPS) induced acute pneumonia in rats. **Methods:** A total of 48 rats were randomly divided into 6 groups: normal control group, model group, positive control group, and Compound Star Anise low-dose group, medium-dose group, high dose group. The drug was pre-administered for two days, and LPS was injected into the nasal 1 h after the last administration to prepare the acute pneumonia model. Then the animals were sacrificed by 2% sodium pentobarbital intraperitoneal after 3 days of dosing later. The level changes of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6(IL-6) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats in each group were detected by ELISA kit; hematology analyzer was used to detect the type and number of white blood cells, and the inflammatory cells in BALF were classified and counted; evaluation of the prognostic value of pneumonia was conducted by the neutrophil/lymphocyte ratio(NLR); HE staining was applied to observe the morphological changes of lung tissue. **Results:** The pre-administration of Compound Star Anise had a strong protective effect on LPS-induced lung injury in rats, which reduced the inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and TNF- α in rats' BALF, reduced the type and number of inflammatory cells. **Conclusion:** The anti-inflammatory protective effect of Compound Star Anise on LPS-induced acute pneumonia in rats may be related to the down-expression of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and TNF- α .

【Key words】 Acute pneumonia; Compound Star Anise; Chemical composition; Inflammatory factors; Rats

急性肺炎是一种常见的由病毒或细菌引起的急性

呼吸道感染性疾病, 细菌、呼吸道病毒和真菌感染是肺炎的主要病因。其发病机制复杂, 发病迅速、病情严重, 严重者可诱发心血管衰竭, 甚至危及生命^[1]。中医将急性肺炎纳入疫病范畴, 尉犁谦所著《时疫科》中明确记载, 肺炎属于中医学风温肺热疾病, 是由风热之邪

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(82003932); 中央引导地方科技创新基地建设类项目(桂科ZY21195044); 广西重点研发计划(桂科AB20159029); 广西科技计划项目(AD18126013)

△通信作者(电子邮箱: wfftn@163.com; xijunw@sina.com)

所导致的肺瘀症^[2]。脂多糖(LPS)是一种内毒素,在机体内可以诱发炎症细胞浸润、炎症因子释放及肺泡上皮细胞死亡,进而诱导急性支气管肺炎模型,已被公认是诱导急性肺炎模型的主要药物^[3-4]。每年因肺炎死亡者数以万计,研究肺炎发病机制可为疾病预防、药物干预和新药研发奠定基础。

八角茴香复方是由八角茴香、板蓝根和甘草组成,板蓝根具有清热、解毒、凉血及利咽的功效,具有较好的抗菌抗病毒和提高免疫力等药理活性^[5-7];八角茴香是一种药食同源的常用香料,具有抗菌、抗病毒和氧化的特性,长期在我国的中医药领域中得到应用^[8-9]。八角茴香果实中提取的莽草酸是磷酸奥司他韦(达菲)的关键成分,是世界卫生组织推荐用于防治高致病性禽流感H5N1亚型的唯一特效药物前体;甘草性甘味平,具有补脾益气、润肺止咳、缓急止痛、缓和药性的功效^[10-11]。基于以上研究,本实验设计了LPS诱导的急性肺炎大鼠模型,揭示八角茴香复方从降低炎症因子的细胞数量和表达角度治疗急性肺炎的作用机制,以期为新药开发及临床应用提供依据与新的思路。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠(8~9周),体质量200~220 g,购自广西医科大学实验动物中心,合格证号SCXK(桂)2020-0003。大鼠自由进食和饮水,室温(25±2)℃,相对湿度50%,昼夜光照12 h交换。适应性饲养1周后进行实验,所有动物实验均严格按照实验动物管理法规的规定和总则建议进行(伦理审批号2020-12-001)。

1.2 试剂与仪器 全自动模块式动物血液体液分析仪[Sysmex XN-1000,希森美康医用电子(上海)有限公司],Tecan infinite M200 Pro多功能酶标仪,生物组织包埋机-冷冻机(TB-718L,泰维科技实业股份有限公司)。LPS(批号0000081275,美国Sigma公司),八角茴香、板蓝根和甘草(批号20190301,广西仙荣中药科技有限公司),醋酸地塞米松片(批号2101142,安徽金太阳生化药业有限公司)。IL-1β试剂盒(货号H002-1-1),TNF-α试剂盒(货号H052-1-1),IL-6试剂盒(货号H007-1-1),均为南京建成生物工程研究所产品。其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 八角茴香复方的提取 按照1:1:1的比例称取八角茴香、甘草、板蓝根药材,煎煮3次,第1次加15倍水,煎煮1.5 h,第二次加10倍水,煎煮1 h,3次8倍量煎煮1 h,合并滤液,过滤,浓缩至稠浸膏,称重,置真空干燥箱55℃干燥5 h,取出迅速称重,再在上述温度干燥1 h,取出迅速称重,依次循环,连续2次重量不超过0.1 g,出粉率为30.21%。

1.4 造模与给药 取48只大鼠随机分为6组,每组8只,分别为空白组、模型组、阳性对照组(醋酸地塞米松片,

安徽金太阳生化药业有限公司,批号2101142,5 mg/kg)及复方制剂低(1.6 g/kg)、中(4.8 g/kg)、高剂量组(9.6 g/kg)。除空白组和模型组给予相同体积的生理盐水外,其他各组连续灌胃给药2 d。末次给药1 h后,腹腔注射2%戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉,10 min后见尾根、后肢、睫毛反射均消失,呼吸缓慢均匀为深度麻醉。麻醉后仰位于45°的平板上,用镊子牵拉大鼠的舌,移液枪吸取5 mg/kg的LPS 80 μL,滴于大鼠口腔咽后壁,并马上捏住大鼠的鼻子。20 s后,松开舌及鼻,并出现轻微气管啰音即为造模成功。造模后继续给药3 d。

1.5 ELISA测定肺泡灌洗液(BALF)中炎症因子的水平 各组大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉,手术分离颈部气管进行插管,暴露胸腔,右肺叶结扎,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)灌洗左肺,灌洗3次,每次1 mL,每次均静止平衡30 s,合并灌洗液,取1 mL离心(1 000 r/min, 10 min),取上清液-20℃冻存。按照ELISA试剂盒说明书操作,测定IL-6、IL-1β和TNF-α的含量。在取BALF之前,暴露胸腔,腹主动脉取血2 mL, BALF用PBS稀释5倍,使用希森美康血液分析仪检测血液和BALF中白细胞计数(WBC)。

1.6 肺部的病理学观察 大鼠麻醉后,将结扎后的右肺用PBS经右心室灌注冲洗,然后用10%甲醛溶液灌注固定,制作石蜡切片,切片前将包埋好的组织样本置于-20℃冷冻,待组织达适当硬度即可切片,切片厚度为3 μm,切面整齐无气泡,苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织病理学变化。通过显微镜拍照,Leica Application Suite图像系统采集样本相关部位。

1.7 统计学处理 所有实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用SPASS单因素方差分析,LSD-*t*进行分析,采用Graphpad prism 5软件进行作图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组BALF中炎症因子表达的比较 见表1。与空白组比较,模型组的IL-6含量显著升高($P < 0.05$),与模型组相比,复方给药后IL-6含量显著下降($P < 0.05$),且与空白组无显著性差异($P > 0.05$)。与空白组比较,模型组的TNF-α含量极显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,复方给药后TNF-α含量极显著下降($P < 0.01$),且与空白组无显著差异性($P > 0.05$)。与空白组比较,模型组的IL-1β含量极显著升高($P < 0.05$),与模型组比较,复方给药后IL-1β含量极显著下降($P < 0.05$),且与空白组无显著性差异($P > 0.05$)。即在造模成功后,给药组的IL-6、TNF-α和IL-1β的含量表达下降。

2.2 各组血液中白细胞总数和分类计数比较 见表2。空白组、模型组、阳性对照组和各复方给药组血液中的白细胞总数、淋巴细胞百分比(LYMPH)、中性粒细胞百分比(NEUT)和嗜酸性粒细胞百分比(E0)相

表1 各组BALF中的炎性因子表达比较(ng/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-6	IL-1 β	TNF- α
空白组	8	264.96 $\pm$ 34.87	2.98 $\pm$ 0.83	24.97 $\pm$ 5.48
模型组	8	352.11 $\pm$ 21.03 [△]	4.89 $\pm$ 0.84 ^{△△}	35.76 $\pm$ 1.53 ^{△△}
复方低剂量组	8	331.11 $\pm$ 54.20	2.97 $\pm$ 0.84 ^{**}	30.59 $\pm$ 3.98
复方中剂量组	8	327.28 $\pm$ 61.30	3.41 $\pm$ 0.29	29.44 $\pm$ 3.96
复方高剂量组	8	286.64 $\pm$ 56.25 [*]	3.53 $\pm$ 0.13	26.81 $\pm$ 1.77 ^{**}
阳性对照组	8	304.50 $\pm$ 65.52	2.76 $\pm$ 0.33 ^{**}	33.93 $\pm$ 3.21

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。下同。

比,差异有统计学意义($P<0.05$)。模型组的WBC、NEUT和EO均高于空白组、阳性组和各复方给药组($P<0.05$)。各复方给药组、阳性对照组与模型组的WBC相比较,经LSD- t 检验具有显著差异($P<0.05$),各复方给药组、阳性对照组的WBC降低($P<0.05$)。复方低剂量组、阳性对照组与模型组的LYMPH相比较,差异有统计学意义($P<0.05$),复方低剂量组、阳性对照组的LYMPH降低。复方低、中剂量组、阳性对照组与模型组的NEUT相比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。复方中剂量组、阳性对照组与模型组的EO相比较,经LSD- t 检验具有显著差异,其中阳性对照具有极显著差异($P<0.01$)。各给药组的单核细胞百分比(MONO)均与模型组差异无统计学意义($P>0.05$)。

表2 各组血液中白细胞总数和分类计数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	WBC($\times 10^9/L$)	LYMPH(%)	BASO(%)	NEUT(%)	EO(%)	MONO(%)	NLR
空白组	8	5.71 $\pm$ 0.29 [*]	73.62 $\pm$ 3.73	-	15.44 $\pm$ 4.42 ^{**}	1.20 $\pm$ 0.11 [*]	5.88 $\pm$ 1.27	1.38
模型组	8	7.28 $\pm$ 0.27 [△]	74.92 $\pm$ 7.09	0.22 $\pm$ 0.06	26.94 $\pm$ 9.61 ^{△△}	1.66 $\pm$ 0.39 [△]	7.26 $\pm$ 1.26	2.22
复方低剂量组	8	5.16 $\pm$ 0.43 [*]	70.02 $\pm$ 3.84 [*]	-	15.20 $\pm$ 6.44 ^{**}	1.51 $\pm$ 0.25	5.44 $\pm$ 1.00	1.67
复方中剂量组	8	5.00 $\pm$ 0.95 [*]	70.82 $\pm$ 1.17	-	12.94 $\pm$ 1.43 ^{**}	0.99 $\pm$ 0.18 [*]	5.14 $\pm$ 1.02	1.37
复方高剂量组	8	4.84 $\pm$ 1.04 [*]	71.49 $\pm$ 3.37	-	16.50 $\pm$ 2.41	1.39 $\pm$ 0.42	6.69 $\pm$ 1.69	1.68
阳性对照组	8	5.29 $\pm$ 2.16 [*]	69.80 $\pm$ 4.56 [*]	-	16.01 $\pm$ 1.74 ^{**}	0.62 $\pm$ 0.08 ^{**△△}	2.24 $\pm$ 1.33 ^{**△△}	3.30

2.3 各组BALF中免疫细胞总数和分类计数比较 见表3。空白组、模型组、阳性对照组和复方低、中、高剂量组BALF中的免疫细胞总数相比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。各复方给药组极显著降低了BALF中免疫细胞数量,改善了急性肺炎的支气管损伤。其中,单个核细胞体液比、多核细胞体液比差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 各组肺组织病理变化 HE染色结果显示,对照组中的肺泡结构完整,轮廓清晰,未见出血及炎性细胞浸润。模型组的大鼠肺部组织发生病变,细胞核固缩,部分释放到肺泡腔中,细胞膜被破坏,肺泡壁单薄,形状大小不一,肺泡腔破损。八角复方给药组改善了肺泡壁增厚,缓解了炎性细胞增生,管腔内渗减少。阳性

表3 各组BALF中免疫细胞总数和分类计数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	WBC-BF($10^6/L$)	MN(%)	PMN(%)
空白组	8	142.4 $\pm$ 20.01 ^{**}	57.54 $\pm$ 6.59	42.38 $\pm$ 6.62
模型组	8	233.8 $\pm$ 27.22 ^{△△}	58.84 $\pm$ 5.86	46.11 $\pm$ 6.58
复方低剂量组	8	163.2 $\pm$ 28.74 ^{**}	52.88 $\pm$ 6.57	45.30 $\pm$ 7.92
复方中剂量组	8	140.4 $\pm$ 11.83 ^{**}	56.86 $\pm$ 5.82	43.14 $\pm$ 5.82
复方高剂量组	8	141.14 $\pm$ 20.30 ^{**}	56.53 $\pm$ 6.84	43.47 $\pm$ 6.84
阳性对照组	8	144.63 $\pm$ 18.01 ^{**}	58.28 $\pm$ 2.61	43.67 $\pm$ 4.54

药物组和八角茴香复方给药组均不同程度地抑制了该病变。见图1。

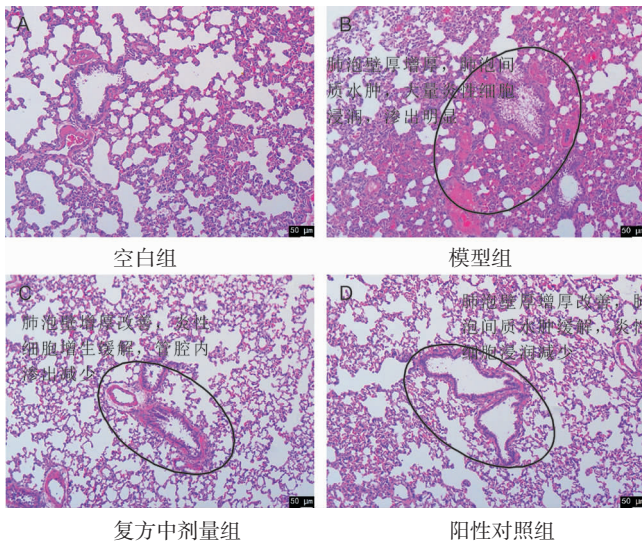


图1 各组大鼠肺组织病理变化观察(HE染色,100倍)

3 讨论

基础及临床研究均表明多种单味或复方中药制剂具有广谱抗菌效应。中医学认为感染性疾病是机体正气虚损、邪毒内侵所致,常以清热解毒、祛邪扶正为治疗原则^[12]。西医对于急性肺炎患者,临床上一般采用抗生素治疗,对免疫低下人群的抗感染治疗具有重要作用^[13],但抗生素具有副作用大、依赖性强和抗药性等问题,细菌耐药已经成为严重的公共卫生问题,而且其发展速度远远超过抗菌药物研制。中药在抗菌的同时可延缓耐药性的产生,有利于患者免疫力的提高,在感染性疾病治疗中获得肯定疗效^[14-15]。本项目在中药研究大发展的背景下,采用八角茴香、板蓝根和甘草3味药组成复方,在前人找出作用靶点的基础上,以脂多糖诱导的急性肺炎大鼠为对象,通过生化方法探究该复方对急性肺炎的干预作用。

本实验采用生化分析的方法,首次研究八角茴香复方对脂多糖诱导急性肺炎模型的干预作用。所采用的3种中药材具有抗菌、抗炎及免疫调节作用,可使肺炎模型大鼠BALF中的IL-6、TNF- α 和IL-1 β 表达下

(下转第991页)

- mission, and vaccine resistance [J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(1):1-11.
- [8] CAO Y, YISIMAY A, JIAN F, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection[J]. *Nature*, 2022, 608(7923):593-602.
- [9] FAN Y, LI X, ZHANG L, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant: recent progress and future perspectives[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):141.
- [10] MOHSIN M, MAHMUD S. Omicron SARS-CoV-2 variant of concern: A review on its transmissibility, immune evasion, reinfection, and severity [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(19):e29165.
- [11] Kozlov M. How does Omicron spread so fast A high viral load isn't the answer [J/OL]. (2022-01-01) [2023-01-10]. <http://https://www.nature.com/articles/d41586-022-00129-z#correction-0>
- [12] RATHINSAMY M, KANDHASAMY S. An exploratory study on the propagation of SARS-CoV-2 variants: Omicron is the most predominant variant [J]. *J Med Virol*, 2022, 94(6):2414-2421.
- [13] MEO SA, MEO AS, AL-JASSIR FF, et al. Omicron SARS-CoV-2 new variant: global prevalence and biological and clinical characteristics [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(24):8012-8018.
- [14] TAGARRO A, COAY ON, PWREZ-VILLENA A, et al. Features of COVID-19 in children during the Omicron wave compared with previous waves in Madrid, Spain [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2022, 41(5):e249-e251.
- [15] BUTT AA, DARGHAM SR, LOKA S, et al. Coronavirus disease 2019 disease severity in children infected with the Omicron variant [J]. *Clin Infect Dis*, 2022, 75(1):e361-e367.

(收稿日期 2023-01-12)

(上接第953页)

降,同时降低肺炎模型大鼠血液和BLAF中白细胞的种类和数量。NLR是肺炎严重程度的标志物之一,有助于判断细菌感染肺部的预后作用^[16]。本实验NLR结果显示八角茴香复方对肺炎的干预效果明显,HE染色可看出具有一定的临床价值。地塞米松作为一种内固醇皮质激素,具有很好的免疫抑制作用,但在本实验中地塞米松在一定程度上使血液中中性粒细胞的数量升高、淋巴细胞数量减少,致使NLR数值增高,从实验数据上来看,地塞米松并不适用该类型急性肺炎模型。通过实验进一步证明,八角茴香复对方对脂多糖诱导的急性肺炎具有明显的改善作用,有力地支持了中医整体性的原则,期待进一步探究八角茴香复方对肺炎的药效物质基础和代谢学分析,为八角茴香二次开发提供有力的研究支撑。

参 考 文 献

- [1] CORRALES-MEDINA VF, MUSHER DM, SVETLANA S, et al. Acute pneumonia and the cardiovascular system [J]. *Lancet (London, England)*, 2013, 381(9865):495-505.
- [2] 秦玉龙. 民国时期中医函授教材中的急性肺炎[J]. *中医文献杂志*, 2020, 38(6):19-21.
- [3] 成果, 曾亚华, 廖瑛, 等. 脂多糖诱导大鼠吸入性肺炎动物模型的建立[J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 20(5):4.
- [4] 张亚平, 张广平, 苏萍, 等. 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(7):7.
- [5] High-speed homogenization coupled with microwave-assisted extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the direct determination of alkaloids and flavonoids in fresh *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(16):4841-4848.
- [6] GAI QY, JIAO J, LUO M, et al. Establishment of hairy root cultures by agrobacterium rhizogenes mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities [J]. *Plos One*, 2015, 10(3):e0119022.
- [7] 颜宝红, 常育. 板蓝根水提取物对放射性肺炎小鼠模型治疗作用的研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2016, 35(10):833-837.
- [8] PATRA JK, DSA G, BOSE S, et al. Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance [J]. *Phytotherapy Research*, 2020, 34(6):1248-1267.
- [9] 王琴, 郑锡康, 蒋林, 等. 基于GC/MS指纹图谱的八角茴香质量评价研究[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(8):240-244.
- [10] 刘萍. 甘草功效和临床用量的本草考证[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(1):73-77.
- [11] 王若宁. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展[J]. *中草药*, 2019, 50(23):5876-5886.
- [12] 胡居息. 以清热解毒法为主治疗感染性疾病的体会[J]. *四川中医*, 1987, 6(8):13-14.
- [13] 蔡少华, 姚汉德, 杨剑军, 等. 5种抗生素对肺炎大鼠淋巴细胞功能的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2000, 10(2):11-12.
- [14] 章德林, 汤丹丰, 郑琴, 等. 具有抗感染作用的中药分类研究[J]. *中草药*, 2015, 46(24):3771-3778.
- [15] 江珍玉, 吕林, 游可, 等. 中药注射剂治疗呼吸机相关性肺炎疗效的网络Meta分析[J]. *中草药*, 2021, 52(11):3353-3361.
- [16] 卢水焕, 刘学员, 朱中权. 中性粒细胞/淋巴细胞比值在细菌性肺炎中的应用进展[J]. *中国医药导报*, 2020, 535(5):41-43, 51.

(收稿日期 2022-12-28)