

白头翁汤及其主要成分对 LPS 诱导内皮细胞分泌 NO、E-selectin 和 IL-8 的影响

胡屹屹^{1*}, 穆祥², 胡元亮³

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 南京 210014; 2. 北京农学院兽医学中医药北京市重点实验室, 北京 102206; 3. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘要: 拟探讨白头翁汤及其主要成分对细菌内毒素(LPS)导致的机体炎症等病理损伤的治疗作用。培养内皮细胞至单层融合状态, 加入内毒素刺激, 3 h 后加入高、中、低 3 种浓度的 8 种药物, 继续培养 21 h 后收集细胞上清液, 用 ELISA 方法测定 NO、E-selectin 和 IL-8 的含量。结果显示, 白头翁汤高剂量组、白头翁素高剂量组和小檗碱高剂量组的 NO 含量极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$), 白头翁汤中剂量组、白头翁素中剂量组、小檗碱中剂量组和秦皮乙素高剂量组显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.05$); 白头翁汤高剂量组和药根碱高剂量组的 E-selectin 含量极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$), 白头翁皂苷 B₁ 高剂量组、小檗碱高剂量组和药根碱中剂量组显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.05$); 秦皮乙素高剂量组的 IL-8 含量极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$), 白头翁汤高剂量组、秦皮甲素高剂量组和中剂量组、秦皮乙素中剂量组显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.05$)。结果提示白头翁汤及其主要成分具有明显的抗细菌内毒素作用, 可在由 NO、E-selectin 和 IL-8 介导的机体炎症等病理损伤过程中发挥治疗作用。

关键词: 白头翁汤; 内毒素; 一氧化氮; E-选择素; 白介素-8

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0145-07

Effects of Pulsatillae Decoction and Its Main Ingredients on LPS-induced NO, E-selectin and IL-8 Secretion of Endothelial Cells

HU Yi-yi^{1*}, MU Xiang², HU Yuan-liang³

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 3. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of the research was to investigate the antiendotoxin of Pulsatillae Decoction (PD), the levels of NO, E-selectin and IL-8 secreted by cultured rat intestinal microvascular endothelial cells were determined after treatment with its active ingredients, namely anemoside B₁, anemonin, berberine, jatrorrhizine, palmatine, aesculin, and esculetin. Endothelial cell was challenged with $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS for 3 h, then treated respectively with PD at three concentrations (1, 5 and $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and its seven ingredients at three concentrations ($1, 5$ and $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). The cells were incubated at 37°C in a cell incubator for 21 hours. The supernatants were collected and the content of NO, E-selectin and IL-8 were analyzed by ELISA kits. The results showed that as compared with LPS control group, the NO contents were significantly decreased in the middle- and high-dose groups of PD, the middle and high-dose groups of Anemonin, the middle- and high-dose groups of Berberine and the high-dose group of Esculetin ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); The

收稿日期: 2011-04-11

作者简介: 胡屹屹(1981-), 男, 南京市雨花区人, 助理研究员, 博士, 主要从事中兽医学和动物药理学研究

* 通讯作者: 胡屹屹, E-mail: huyiyi6073@sina.com; Tel: 025-84391226

E-selectin contents were significantly decreased in the high-dose group of PD, the high-dose group of Anemoside B₄, the high-dose group of Berberine and the middle- and high-dose groups of Jateorhizine ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); The IL-8 contents were significantly decreased in high-dose group of PD, the middle- and high-dose groups of Aesculin and the middle- and high-dose groups of Esculetin ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). It suggested that PD may exert beneficial therapeutic actions on systemic inflammatory response syndrome, multiple organ dysfunction syndrome and immune diseases mediated by NO, E-selectin and IL-8.

Key words: Pulsatillae Decoction; LPS; NO; E-selectin; IL-8

内毒素 (Lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性杆菌生长或死亡时裂解出来的细胞壁脂多糖成分, 经肠道吸收入血液循环后, 导致炎症级联瀑布反应, 引发多器官功能衰竭甚至机体死亡^[1-3]。清热解毒类中药用于防治感染性疾病在人医和兽医临床都有广泛实践, 并以确切的疗效和较低的毒副残留及抗药性而广受欢迎^[4]。白头翁汤 (Pulsatillae Decoction, PD) 出自张仲景的《伤寒论》, 组方严谨, 仅白头翁、黄连、黄柏、秦皮四味药, 功擅清阳明之湿热, 泄厥阴之郁火, 解血分之热毒, 治湿热之痢疾^[5], 为清热解毒的代表方剂^[6-7]。中药白头翁的根部可以提取到白头翁皂苷 B₄ 和白头翁素^[8], 黄连含小檗碱、药根碱、巴马汀等多种成分^[9], 黄柏主要含有小檗碱和总生物碱^[10], 而秦皮甲素和秦皮乙素则是秦皮中最主要的活性物质^[11]。现代药理学研究证明白头翁汤中的小檗碱、药根碱、巴马汀、白头翁皂苷 B₄、白头翁素、秦皮甲素和秦皮乙素等这些主要的化学成分, 均有显著的杀菌、抗炎、降压、解热、镇痛、抗癌的药理功效。本试验测定了白头翁汤及其成分对 LPS 刺激后内皮细胞分泌 NO、E-selectin 和 IL-8 水平的影响, 旨在探讨白头翁汤抗内毒素的药理机制, 为兽医临床应用其相关成分防治细菌性疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及主要仪器

中药饮片购自北京同仁堂药店。取白头翁 150 g、黄连 60 g、黄柏 120 g、秦皮 120 g 加 10 倍蒸馏水于圆底烧瓶中, 浸泡 1 h 后加热回流 1 h, 趁热用纱布过滤。药渣再分别加 8 倍水和 6 倍水加热回流 1 h。合并 3 次滤液, 减压浓缩成生药浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

LPS(O₅₅:B₅), 购自 Sigma 公司, 批号: L-2880。小檗碱、药根碱、巴马汀、白头翁皂苷 B₄、白头翁素、

秦皮甲素和秦皮乙素, 购自中国药品生物制品鉴定所, 批号: 110713、110732、110733、111766、111768、110740、110741。临用前用维持培养基作倍比稀释。

NO 检测试剂盒, 购自深圳晶美生物工程公司。大鼠 E-selectin 和 IL-8 检测试剂盒, 购自美国 RapidBio 公司。

酶标检测仪 (美国 BIO-RAD 公司, 型号 550) 等。

1.2 细胞的分组处理

原代培养 1 日龄 SD 大鼠肠黏膜微血管内皮细胞, 经纯化与鉴定后, 传代培养用于试验。当内皮细胞长成融合状态的单层时, 进行分组处理。空白对照组, 不加 LPS 和药物; LPS 对照组, LPS 溶解于维持培养基中, 终浓度 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 药物对照组, 7 种白头翁汤单体成分溶解于维持培养基中, 终浓度 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 药物的高、中、低剂量组, 维持培养基中先加入 LPS, 使 LPS 浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3 h 后添加药物, 使药物终浓度分别为 1、5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每浓度重复 5 孔。白头翁汤各剂量组的浓度相应扩大 1 000 倍, 即 1、5、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。各组细胞在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的条件下培养 24 h 后, 收集各孔细胞液, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。

1.3 细胞增殖率的检测

各组细胞吸净上清液后, 在各孔中加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甲基噻唑基四唑 (MTT) $30 \mu\text{L}$ 及维持培养基 $150 \mu\text{L}$, 继续避光培养 4 h 后, 轻轻吸弃孔内液体, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砷 (DMSO), $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 使细胞内结晶充分溶解, 于酶标仪 490 nm 波长处测定各孔的 OD 值。通过以下公式计算出各组的增殖率: 增殖率 (%) = 测定组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.4 NO、E-selectin 和 IL-8 的检测

严格按照试剂盒说明书要求, ELISA 法检测 NO、E-selectin 和 IL-8 的含量。

1.5 数据处理

各项检测指标结果采用“平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”的形式表示,应用统计软件 SPSS 17.0 中的 ANOVA(One way analysis of variance)法进行方差分析,比较 LPS 对照组与空白对照组、药物治疗组之间的差异显著性,比较空白对照组与药物对照组之间的差异显著性。

2 结果

2.1 增殖率的变化

空白对照组的 OD 值为 0.520 ± 0.021 , LPS 对照组的 OD 值为 0.478 ± 0.037 ,两者差异显著($P < 0.05$)。其余各组的 OD 值,与空白对照组相比,都

没有显著性差异(表 1)。显微观察结果显示,空白对照组细胞,形态呈现典型的铺路石样,结构清晰,形态均一(图 1)。而 LPS 对照组的细胞,数目减少,长宽比值增大,间隙变宽,排列混乱(图 2)。其余各组细胞的形态未见明显异常。

2.2 NO 含量的变化

NO 的含量(表 2),空白对照组极显著低于 LPS 对照组($P < 0.01$);白头翁汤高剂量组、白头翁素高剂量组和小檗碱高剂量组极显著低于 LPS 对照组($P < 0.01$);白头翁汤中剂量组、白头翁素中剂量组、小檗碱中剂量组和秦皮乙素高剂量组显著低于 LPS 对照组($P < 0.05$)。药物对照各组与空白对照组相比无显著差异性。

表 1 各组细胞的增殖率

Table 1 The growth rate of every group

组别 Group	低剂量($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	中剂量($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	高剂量($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	药物对照($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	%
	Low-dose	Middle-dose	High-dose	Drug control	
白头翁汤 PD	-2.65	-1.31	-0.58	1.81	
白头翁皂苷 B ₁	-4.00	-3.46	-1.81	-3.19	
Anemoside B ₁	-3.85	-4.04	-5.15	-2.77	
小檗碱 Berberine	-3.69	-4.92	-4.64	-3.27	
药根碱 Jatrorrhizine	-5.62	-2.46	-3.31	-1.77	
巴马汀 Palmatine	-4.27	-2.27	-3.81	-0.58	
秦皮甲素 Aesculin	-4.88	-3.23	-2.54	0.65	
秦皮乙素 Esculetin	-4.62	-2.35	-1.38	0.42	
LPS 对照组 LPS			-8.04 ^b		
空白对照组 Blank			100		

与空白对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. Blank control group

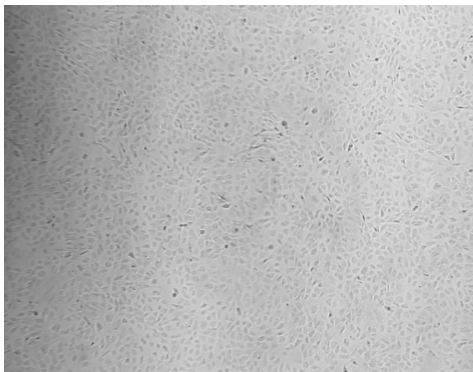


图 1 正常对照组的细胞 (10×10)

Fig. 1 Endothelial cells of blank control group

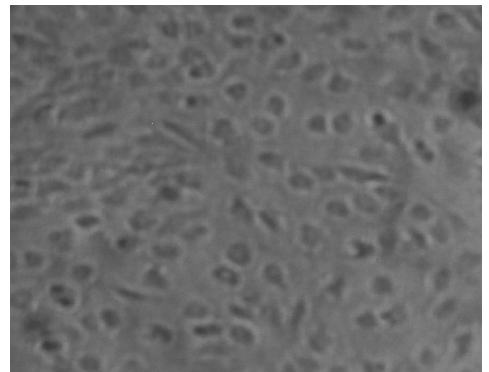


图 2 LPS 对照组的细胞 (10×20)

Fig. 2 Endothelial cells of LPS control group

表 2 各组 NO 的含量

Table 2 The contents of NO in every group

 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	低剂量($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	中剂量($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	高剂量($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	药物对照($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Group	Low-dose	Middle-dose	High-dose	Drug control
白头翁汤 PD	54.80 ± 5.01	49.80 ± 3.41^a	46.08 ± 3.50^b	24.71 ± 1.98
白头翁皂苷 B ₁ Anemoside B ₁	55.98 ± 1.53	54.80 ± 5.21	53.24 ± 4.40	24.22 ± 3.90
白头翁素 Anemonin	52.75 ± 3.41	49.51 ± 4.01^a	46.08 ± 4.11^b	21.47 ± 3.33
小檗碱 Berberine	51.47 ± 4.40	50.29 ± 3.09^a	44.71 ± 3.20^b	23.24 ± 2.31
药根碱 Jatrorrhizine	54.61 ± 4.63	51.47 ± 4.06	51.96 ± 3.41	25.59 ± 2.06
巴马汀 Palmatine	53.92 ± 4.84	55.00 ± 3.82	50.59 ± 2.91	25.59 ± 3.20
秦皮甲素 Aesculin	56.08 ± 6.18	54.51 ± 4.81	52.35 ± 3.93	19.41 ± 3.39
秦皮乙素 Esculetin	53.92 ± 4.08	51.76 ± 3.56	50.10 ± 5.34^a	18.14 ± 4.62
LPS 对照组 LPS			55.39 ± 4.79	
空白对照组 Blank			22.25 ± 2.04^b	

与 LPS 对照组相比,^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ 。表 3 同

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. LPS control group. The same as the Table 3

2.3 E-selectin 含量的变化

E-selectin 的含量(表 3),空白对照组极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$);白头翁汤高剂量组和药根碱高剂量组极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$);

白头翁皂苷 B₁ 高剂量组、小檗碱高剂量组和药根碱中剂量组显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.05$)。药物对照组与空白对照组相比无显著性差异。

表 3 各组 E-selectin 的含量

Table 3 The contents of E-selectin in every group

 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	低剂量($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	中剂量($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	高剂量($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	药物对照($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Group	Low-dose	Middle-dose	High-dose	Drug control
白头翁汤 PD	21.62 ± 1.29	20.69 ± 2.20	19.67 ± 1.71^b	17.49 ± 1.99
白头翁皂苷 B ₁ Anemoside B ₁	21.40 ± 2.24	20.96 ± 1.06	20.24 ± 2.33^a	16.69 ± 1.98
白头翁素 Anemonin	22.33 ± 1.49	21.93 ± 1.22	21.36 ± 1.76	18.29 ± 1.62
小檗碱 Berberine	21.36 ± 1.23	20.87 ± 1.94	20.07 ± 2.54^a	16.82 ± 1.81
药根碱 Jatrorrhizine	20.73 ± 1.57	20.42 ± 1.56^a	19.44 ± 1.89^b	16.16 ± 1.91
巴马汀 Palmatine	22.07 ± 1.90	21.36 ± 2.80	20.82 ± 1.87	17.58 ± 2.08
秦皮甲素 Aesculin	23.49 ± 1.75	21.76 ± 1.78	21.40 ± 1.59	16.91 ± 2.16
秦皮乙素 Esculetin	21.67 ± 1.78	21.27 ± 1.09	21.84 ± 3.15	17.84 ± 1.95
LPS 对照组 LPS			22.91 ± 1.97	
空白对照组 Blank			16.56 ± 1.70^b	

2.4 IL-8 含量的变化

IL-8 的含量(表 4),空白对照组极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$);秦皮乙素高剂量组极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$);白头翁汤高剂量组、秦

皮甲素高剂量组和中剂量组、秦皮乙素中剂量组显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.05$)。巴马汀药物对照组显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。

表 4 各组 IL-8 的含量

Table 4 The contents of IL-8 in every group

pg · mL⁻¹

组别 Group	低剂量(1 μg · mL ⁻¹) Low-dose	中剂量(5 μg · mL ⁻¹) Middle-dose	高剂量(10 μg · mL ⁻¹) High-dose	药物对照(10 μg · mL ⁻¹) Drug control
白头翁汤 PD	116.08 ± 6.99	112.38 ± 8.20	110.08 ± 8.03 ^a	84.38 ± 6.24
白头翁皂苷 B ₁ Anemoside B ₁	118.85 ± 11.35	115.62 ± 12.47	116.54 ± 8.47	85.92 ± 5.61
白头翁素 Anemonin	114.54 ± 7.22	116.23 ± 8.01	112.69 ± 8.27	81.15 ± 4.37
小檗碱 Berberine	122.23 ± 7.50	118.38 ± 9.74	113.62 ± 7.43	86.38 ± 6.67
药根碱 Jatrorrhizine	117.62 ± 8.79	113.62 ± 6.00	112.38 ± 7.69	88.69 ± 8.24
巴马汀 Palmatine	122.85 ± 7.70	119.62 ± 10.62	114.69 ± 8.36	93.92 ± 8.65 ^c
秦皮甲素 Aesculin	115.62 ± 9.25	111.46 ± 6.21 ^a	110.85 ± 8.89 ^a	82.69 ± 9.74
秦皮乙素 Esculetin	112.54 ± 7.83	109.92 ± 9.99 ^a	106.54 ± 7.74 ^b	84.08 ± 6.40
LPS 对照组 LPS			121.77 ± 7.86	
空白对照组 Blank			83.46 ± 4.16 ^b	

与 LPS 对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与空白对照组相比,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. LPS control group; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, vs. blank control group

3 讨论

本试验采用 MTT 法测定内皮细胞的增殖率。凡是活细胞,必然会有能量代谢。细胞在能量代谢的过程中,线粒体可以产生琥珀酸脱氢酶。而琥珀酸脱氢酶可以将 MTT 还原成蓝紫色不溶于水的 Formazan 结晶,形成的结晶量与活细胞数目成正比。用 DMSO 溶解结晶,形成的溶液在最大吸收峰 490 nm 处的 OD 值与增殖的细胞数在一定范围内有良好的线性关系。本试验通过吸光度值考察各组活细胞的数量,间接反映 LPS 的毒性作用以及白头翁汤的保护作用。增殖率试验结果显示,1 μg · mL⁻¹ 的 LPS 对细胞生长起到显著的抑制作用,而药物对照组和治疗组细胞数量没有明显变化,提示白头翁汤及其主要成分具有一定的抗内毒素作用。显微观察结果显示,内皮细胞受 LPS 刺激后,细胞长宽比值增大,间隙变宽,排列混乱,这与程君涛等人的报道结果相符^[12]。药物对照组结果显示,高浓度的 PD 及成分不影响内皮细胞正常的结构和分泌功能,证明药物安全可靠。

巨噬细胞激活后因分泌高水平的 NO 而产生细胞毒作用,LPS 可以诱导体外培养的大鼠巨噬细胞凋亡。NO 还具有神经递质的作用,可以改变小肠的蠕动性和肠液的电解质平衡^[13],这也是临床上

LPS 血症常伴有动物机体腹泻脱水、形体消瘦的原因。本试验证明,PD 及成分白头翁素、小檗碱和秦皮乙素都能显著降低 LPS 诱导的 NO 高水平,以白头翁素和小檗碱效果最为明显,并且呈现一定的量效关系。研究表明,感染和败血症过程与诱导型 NO 合酶关系密切^[14],此外还包括一些慢性炎症,例如肠炎和风湿性关节炎^[15]。内皮细胞强势表达诱导型 NO 合酶,将继发自由基 NO 的大量生成与释放,导致血管过度扩张充血而损伤^[16]。推测 PD 及白头翁素等成分有效降低 NO 分泌量的原因在于抑制了诱导型 NO 合酶的表达量,从而降低机体的水肿反应与腹泻综合征。本研究中,LPS 刺激大鼠小肠微血管内皮细胞后,NO 的分泌量约为静息状态下的 2.5 倍;而简华刚的试验结果显示,LPS 作用于大鼠肺微血管内皮细胞后,NO 的含量升高 8 倍,这可能与不同组织器官的内皮细胞在分泌功能上的异质性有关^[17]。

白细胞进入炎症部位由血管内皮细胞上的黏附分子 E-selectin 和白细胞表面的 L-selectin 相互作用来完成^[18]。黏附过程虽是机体防御反应的重要特征,但会导致内皮细胞机能障碍、渗透性增强以及组织损伤^[19]。本试验证明,PD 及成分白头翁皂苷 B₁、小檗碱和药根碱均能显著抑制内皮细胞分泌 E-selectin,以药根碱效果最为明显,并且呈现一定的

量效关系。除急性炎症外, E-selectin 在慢性炎症、过敏反应以及冠心病中也都有异常的高水平表达, 并且表达量与病情严重程度存在明显正相关^[20]。已有的研究显示, 在体外培养的脑内皮细胞培养液中加入 LPS, E-selectin 分泌量逐渐增加并在 4 h 达到峰值, 在 48 h 恢复正常^[21]。Brostjan 等发现, 培养的猪主动脉内皮细胞在 LPS 刺激后, E-selectin 表达的抑制程度随地塞米松浓度的增加而增大^[22]。在人的活动性炎性肠病(溃疡性结肠炎和克隆氏病)中, 组织中 E-selectin 及血液中的可溶性 E-selectin 水平都显著升高^[23]。PD 及成分药根碱等促使 E-selectin 表达降低, 则导致白细胞与内皮细胞间的黏附减弱, 从而减少白细胞贴壁及渗出, 一定程度上抑制了炎症的发生和发展。

IL-8 是 1987 年首先在受 LPS 刺激的猪单核细胞培养液上清中分离提纯的一种碱基肝素结合蛋白^[24]。现已知 IL-8 生物学功能无种属特异性, 除具有特异性使中性粒细胞渗出血管游走到炎症组织表达黏附分子外, 还显示出促进血管生成的活性^[25], 对 T 淋巴细胞有趋化性并能刺激嗜碱性粒细胞。本试验提示, PD 及成分秦皮甲素和秦皮乙素均能显著抑制内皮细胞分泌 IL-8, 以秦皮乙素效果最为明显, 并且呈现一定的量效关系。IL-8 能与感染过程中多形核中性粒细胞表面特异性受体结合, 导致细胞变形反应、脱颗粒反应、呼吸爆发, 释放溶酶体和超氧阴离子, 从而促进炎症反应^[26]。某些与中性粒细胞积聚有关的炎症和呼吸系统疾病中, IL-8 水平往往升高, 如炎症性结肠炎、慢性支气管炎、败血症休克等^[27]。有研究证实, LPS 可刺激人的皮肤内皮细胞释放 IL-6 和 IL-8^[28]。Wolff 等的试验表明, 炎症反应时内皮细胞可分泌 IL-8 并使白细胞趋化引起炎症症状^[29]。LPS 和炎症因子是通过直接促进 NF- κ B 的活化, 启动 IL-8 mRNA 的高效表达和蛋白分泌^[30]。

LPS 可以促进内皮细胞释放的介质包括多种炎症因子、趋化因子、黏附因子、促凝因子和血小板活化因子等, 它们的相互作用是炎症反应、凝血转归与免疫应答的关键步骤^[31]。至今, 对 LPS 诱发的机体多项病理损伤和综合征仍无特效对因治疗手段, 抗生素虽然能够控制细菌感染, 但有增加 LPS 血症的危险; LPS 抗体作用微弱, 由于细菌的血清型较多, 抗原复杂, 很难推广一种在不同地区都有效的疫苗^[32]。本试验证明, 白头翁汤具有一定的抗

LPS 药理作用, 又以小檗碱和秦皮乙素效果最佳, 机理可能在于维护机体炎症反应平衡、开启内源性细胞的保护功能和抑制炎症因子过度释放等。本研究可为兽医临床使用白头翁汤及其主要成分防治细菌性疾病, 尤其是大肠杆菌病和肠炎提供理论依据。同时对白头翁汤及其主要成分制剂的系列开发, 以及中药单体的筛选与成分方剂的构建也具有重要的借鉴意义。

参考文献:

- [1] MOTAWI T K, DAWISH H A, ABD E L, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on endotoxin-induced cardiac stress in rats: A possible mechanism of protection [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011, 25 (2):84-94.
- [2] HAN J H, MCKENZIE H C, MCCUTCHEON L J, et al. Glucose and insulin dynamics associated with continuous rate infusion of dextrose solution or dextrose solution and insulin in healthy and endotoxin-exposed horses [J]. *Am J Vet Res*, 2011, 72(4): 522-529.
- [3] ROH E, LEE H S, KWAK J A, et al. MD-2 as the Target of nonlipid chalcone in the inhibition of endotoxin LPS-induced TLR4 activity [J]. *J Infect Dis*, 2011, 203(7):1012-1020.
- [4] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:664-670.
- [5] 谢 鸣. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 134.
- [6] 王瑞锋, 王 雪. 白头翁汤的药理作用与临床应用 [J]. *中医学报*, 2010, 25(147):270-271.
- [7] 陆树文, 刘红菊, 赵 伟, 等. 白头翁汤治疗炎症性肠病的分子机制研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2011, 27(1):106-109.
- [8] CHENG L, ZHANG M, ZHANG P, et al. Silver complexation and tandem mass spectrometry for differentiation of triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 3783-3790.
- [9] CHEN J, ZHAO H, WANG X, et al. Analysis of major alkaloids in *Rhizoma coptidis* by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight mass spectrometry with different background electrolytes [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29: 2135-2147.
- [10] CHAN C O, CHU C C, MOK D K, et al. Analysis of berberine and total alkaloid content in cortex phel-

- lodendri by near infrared spectroscopy (NIRS) compared with high-performance liquid chromatography coupled with ultra-visible spectrometric detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 592: 121-131.
- [11] SHI Z, ZHU X, ZHANG H. Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration for the analysis of aesculin and aesculetin in Cortex fraxini by HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44: 867-873.
- [12] 程君涛,袁建成. 内毒素对人脐静脉内皮细胞形态和功能的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2001, 17(3): 155-158.
- [13] IZZO A A, MASCOLO N, CAPASSO F. Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport [J]. *Dig Dis Sci*, 1998, 43: 5-20.
- [14] WONG J M, BILLIAR T R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation [J]. *Adv Pharmacol*, 1995, 34: 155-170.
- [15] BOUGHTON N K, EVANS S M, HAWKEY C J, et al. Nitric oxide synthase activity in uncreative colitis and Crohn's disease [J]. *Lancet*, 1993, 342: 338-340.
- [16] WONG J M, BILLIAR T R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation [J]. *Adv Pharmacol*, 1995, 34: 155-170.
- [17] 简华刚,周继红. 内毒素对体外培养大鼠肺微血管内皮细胞的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12(8): 457-459.
- [18] LUSH C W, CEPINSKAS G, KVIETYS P R. LPS tolerance in human endothelial cells reduced PMN adhesion, E-selectin, and NF-kappaB mobilization [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278(3): 853-861.
- [19] PRESSNER K T, MAY A E, WOHN K D, et al. Molecular adhesion receptors and proteolytic cascade in vascular remodeling [J]. *Thromb Hemost*, 1997, 78(1): 88.
- [20] KAGI M K, JOLLER-JEMELKA H, WUTHRICH B. Soluble E-selectin correlates with disease activity in cyclosporine A-treated patients with atopic dermatitis [J]. *Allergy*, 1999, 54: 57.
- [21] WONG D, DOROVINI-ZIS K. Regulation by cytokines and lipopolysaccharide of E-selectin expression by human brain microvessel endothelial cells in primary culture [J]. *J Neuropathol Exp Neuro*, 1996, 55(2): 225.
- [22] BROSTJAN C, ANRATHER J, CSIZMADIA V, et al. Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF-kappa B and not ATF/c-Jun [J]. *J Immunol*, 1997, 158: 3836-3844.
- [23] BHATTI M, CHAPMAN P, PETERS M, et al. Visualising E-selectin in the detection and evaluation of inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 1998, 43: 40.
- [24] GIMBRONE M A, OBIN M S, BROCK A F, et al. Endothelial interleukin-8: A novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions [J]. *Science*, 1989, 246: 1601.
- [25] HARADA A, SEKIDO N, AKAHOSHI T, et al. Essential involvement of interleukin (IL-8) in acute inflammation [J]. *J Leukon Biol*, 1994, 56: 559.
- [26] SCAPINI P, LAPINET-VERA J A, GASPERINI S, et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines [J]. *Immunol Rev*, 2000, 177: 195.
- [27] HARDAWAY R M. A review of septic shock [J]. *Am Surg*, 2000, 66(1): 22.
- [28] NEUMULLER J, DUNKY A, BURTSCHER H, et al. Interaction of monocytes from patients with psoriatic arthritis with cultured microvascular endothelial cells [J]. *Clin Immunol*, 2001, 98(1): 143.
- [29] WOLFF B, BUNSE A, MIDDLETON J, et al. Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin-8 in Weibel-Paladebodies [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(9): 1757-1762.
- [30] MUKAIDA N, MAHE Y, MATSUSHIMA K, et al. Cooperative interaction of nuclear factor-kB and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(34): 21128-21133.
- [31] SWERLICK R A, LAWLEY T J. Role of microvascular endothelial cells in inflammation [J]. *J Invest Dermatol*, 1993, 100: 111-115.
- [32] 张含飞,张金龙,王振华. 抗内毒素药物的研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2008, 1: 57-60.