

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.05.06

苦郎树枝叶水提物对 LPS 所致发热家兔的解热机制

许立拔^{1,2}, 王冰冰¹, 秦丹¹, 韦安达^{1,2}, 玉焕¹, 吴冰燕¹, 丘芬^{1*}, 谢凤凤^{1*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西壮瑶药重点实验室, 南宁 530200)

[收稿日期] 2023-05-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 05-0045-11 [中图分类号] S859.79

[摘要] 研究苦郎树枝叶水提物的解热作用及其机制。采用耳缘静脉注射脂多糖(LPS, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)复制家兔发热模型, 水提物剂量设定为 1、2 和 4 g/kg , 按 5 mL/kg 单次灌胃给药, 药后检测肛温, 测定血清肝功能和内生致热原指标水平, HE 染色法检测肝组织和下丘脑组织病理学改变, 免疫组化染色法检测肝组织 COX-2 和下丘脑 TLR4、NF- κB 、COX-2 表达水平。结果表明, 水提物各剂量组均可显著降低肛温($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 降低血清 ALT、AST、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 PGE₂ 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 明显减轻肝组织和下丘脑组织病理学损伤, 降低肝组织 COX-2 和下丘脑 TLR4、NF- κB 、COX-2 表达水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。苦郎树枝叶水提物具有良好的解热作用, 其机制可能与增强肝功能、消除血液内生致热原及下调肝组织 COX-2 和下丘脑 TLR4、NF- κB 、COX-2 表达水平有关。

[关键词] 苦郎树; 水提物; LPS; 解热作用; 保护机制

Protective Mechanisms of Water Extract from Branches and Leaves of *Clerodendrum inerme* on Fever Rabbits induced by Lipopolysaccharide

XU Li-ba^{1,2}, WANG Bing-bing¹, QIN Dan¹, WEI An-da^{1,2}, YU Huan¹,WU Bing-yan¹, QIU Fen^{1*}, XIE Feng-feng^{1*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning 530200, China)

Corresponding authors: QIU Fen, E-mail: 407171157@qq.com; XIE Feng-feng, E-mail: 15177143553@163.com

Abstract: Aim to study the antipyretic activity of water extract from branches and leaves of *Clerodendrum inerme* and its mechanisms. Rabbit fever model induced by auricular vein injection of Lipopolysaccharide (LPS, 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and 1 h later, water extract (1, 2 and 4 g/kg) were orally fed with 5 mL/kg once, their rectal temperature

基金项目: 广西壮瑶药重点实验室(桂科基字[2014]32号); 壮瑶药协同创新中心(桂教科研[2013]20号); 广西壮族自治区民族药资源与应用工程研究中心(桂发改高技函[2020]2605号); 广西中医药重点学科壮药学(GZXK-Z-20-64); 广西重点研发计划项目(桂科 AB21196016); 广西科技基地和人才专项(桂科 AD21238031)

作者简介: 许立拔, 硕士, 助理工程师, 主要从事新药研究与开发工作。

通讯作者: 丘芬, E-mail: 407171157@qq.com; 谢凤凤, E-mail: 15177143553@163.com

checked, their liver function and endogenous pyrogen indexes in serum analysed, their liver and hypothalamus histopathologic analysed by HE staining, and their expressoin of liver COX - 2 and hypothalamic TLR4, NF - κ B, COX - 2 analysed by immunohistochemical staining. The results showed that all water extract administration groups could significantly decrease rectal temperature ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), serum AST, ALT, TNF - α , IL - 6, IL - 1 β , PGE₂ level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), their hepatic and hypothalamic histological aberrations obviously alleviated, their expression levels of liver COX - 2 and hypothalamic TLR4, NF - κ B, COX - 2 significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Water extract from branches and leaves of *Clerodendrum inerme* has good antipyretic activity, it may related to improving the hepatic function, decreasing blood endogenous pyrogen, and downregulating the expression of liver COX - 2 and hypothalamic TLR4, NF - κ B, COX - 2.

Key words: *Clerodendrum inerme*; water extract; LPS; antipyretic activity; protective mechanism

发热是养殖业多种畜禽如兔、鸡、狗、猪、羊等,临床上多种疾病的共同症状,发热原因复杂,如气候变化、流感病毒、细菌感染、寄生虫等均是其致病因素,属于中兽医“疫气”“热毒”范畴。发热不及时治疗,恶变快,死亡率高,容易导致畜禽养殖减产^[1]。目前,兽医针对畜禽发热常用的药物为安痛定、扑热息痛和安乃近等,但是,不合理甚至违法使用兽用西药,特别是抗生素滥用,易导致动物源肉类食品药物残留,危害人类健康^[2]。“减抗、限抗和禁抗”是畜禽养殖的政策,而中药及其提取物,具有副作用小、无残留、整体调理、抗菌、抗病毒等特点,未来可替代西药用于畜禽养殖业治疗发热^[3]。

苦郎树为马鞭草科植物苦郎树 *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn 的全草,又名苦蓝盘、许树、假茉莉等,是海边常见的防护林植物之一,耐高温,耐盐碱,资源丰富。有去瘀消肿,除湿杀虫之功效,壮族民间常用于治疗跌打损伤、外伤出血、湿疹疥癣等^[4]。现代研究表明,苦郎树有抑菌、抗炎和解热的功效,枝叶常用作抗菌剂和退热药^[5-6]。但其解热机制尚未见报道,本研究观察苦郎树枝叶水提物对 LPS 所致发热家兔的解热作用及机制,旨在为新解热兽药的开发和应用提供实验和理论依据。

1 材料

1.1 实验动物 新西兰家兔,清洁级,雄性,体重 1.9 ~ 2.3 kg,购自郑州市华兴实验动物养殖场,生产许可证号 SCXK(豫)2019 - 0002,饲养于广西中医药大学实验动物中心标准实验兔房,自由摄食

饮水,使用许可证号为 SYXK(桂)2019 - 0001。本研究通过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审查,伦理审核编号为 DW20220827 - 300。检疫观察 7 d 后,用于试验。

1.2 试验药物 苦郎树,采自广东省雷州市附城镇,经广西中医药大学中药鉴定教研室滕建北教授鉴定为马鞭草科植物苦郎树 *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn 的枝叶,自然阴干。

1.3 试剂 脂多糖(批号 0000081275),美国 Sigma 公司;布洛芬混悬液(批号 220620245),上海强生制药有限公司;氯化钠注射液(批号 2111181AD),河南双鹤华利药业有限公司;0.4% 多聚甲醛(批号 21351381),合肥白鲨生物科技有限公司;谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒,批号均为 20221209,南京建成生物工程研究所;白介素 - 1 β (IL - 1 β)、IL - 6、肿瘤坏死因子 α (TNF - α)、前列腺素 E₂(PGE₂)试剂盒,批号分别为 Y13039546、Y15039548、Y14039547 和 Y12039545,武汉华美生物科技有限公司;NF - κ B p65、COX - 2、TLR4 Rabbit IgG 一抗,批号分别为 201338、203319 和 2021617,艾比玛特生物医药(上海)有限公司;山羊抗兔二抗(批号 SP9002),北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 仪器 脱色摇床(型号 HY - 5),上海程捷仪器设备有限公司;热原仪(型号 ZRY - 2D),天津市天大天发科技有限公司;酶标仪(型号 Epoch2),美国 Bio - Tek 公司;电子台秤(型号 MP100K),上海

舜宇恒平科学仪器有限公司;台式冷冻离心机(型号 5810R),德国 Eppendorf 公司;掌上离心机(型号 S1010E),美国 SCLOGEX 公司;组化笔(型号 BC004),北京兰杰柯科技有限公司。

2 方 法

2.1 供试品药液的配制 取苦郎树枝叶,粉碎,过 2 号筛,加入 10 倍量纯净水,煮沸后维持 1 h,过滤,滤液水浴加热浓缩至 4 g/mL(浓度按生药量计),得储存药液,量取 30 mL 储存药液加纯净水至 150 mL,充分混匀,即得 0.8 g/mL 的高剂量药液;同法,倍比稀释获得中、低剂量药液(0.4 g/mL、0.2 g/mL),临用现配。

2.2 造模、分组及给药 使用热原仪筛选家兔,每天检测肛温 2 次,间隔 1 h,剔除肛温值低于 38.0 ℃、高于 39.6 ℃和 2 次温差超过 0.4 ℃的家兔,连续筛选 3 d 均合格纳入正式试验。末次筛选的 2 次肛温均值记为基础体温。除 6 只正常组家兔外,其余家兔按 1 mL/kg 耳缘静脉注射 LPS(4 μg/kg)^[7],1 h 后,选取肛温增长值在 0.8 ℃~3.0 ℃范围内的家兔 30 只^[8],随机分为 5 组,即模型组,布洛芬组(10 mg/kg)^[9],苦郎树枝叶水提物(以下简称苦郎树水提物)低、中、高剂量组(1,2 和 4 g/kg)。正常组和模型组家兔按 5 mL/kg 灌胃纯净水,布洛芬组家兔按 0.5 mL/kg 灌胃布洛芬混悬液,苦郎树水提物各剂量组家兔按 5 mL/kg 灌胃相应浓度水提物药液,单次给药。

2.3 样品采集及指标检测

2.3.1 肛温 药后 3 h 和 6 h 检测肛温 1 次,并计算肛温增长值(即肛温与基础体温差值)。

2.3.2 肝功能指标 药后 6 h,耳缘动脉取不抗凝血,3000 r/min,离心 10 min,分离上清,按试剂盒说明书步骤,检测血清 ALT 和 AST 水平。

2.3.3 内生致热原指标 按试剂盒说明书步骤,ELISA 法检测血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 PGE₂ 水平。

2.3.4 肝组织病理及 COX-2 蛋白表达水平 取材部分肝大叶,4%多聚甲醛固定,HE 染色分析肝组织病理改变。石蜡切片经脱蜡水化,抗原修复,

阻断内源性过氧化氢酶(即使用 3% 过氧化氢避光作用 10 min),滴加山羊血清封闭液室温作用 20 min,去除封闭液,滴加一抗 COX-2(1:1000),4 ℃孵育过夜。滴加二抗(HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体),37 ℃作用 30 min,滴加新鲜 DAB 显色液(1:50),室温显色,使用显微镜控制显色时间,显色出现最佳颜色时,使用蒸馏水洗涤终止显色,苏木素复染细胞核,并使用不同浓度乙醇脱水,中性树胶封片。经免疫组化染色后,观察肝组织 COX-2 表达水平(阳性区域呈棕黄色颗粒分布,阴性区域呈浅色无颗粒分布)。于 400 倍放大倍数下观察 5 个连续视野,拍照,采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件,收集累积光密度(IOD)和累积面积(Areas)数据,并计算平均光密度值(MOD)^[10-11]。
$$MOD = IOD / Areas$$

2.3.5 下丘脑病理及 TLR4, NF-κB p65 和 COX-2 表达水平 取材下丘脑,4%多聚甲醛固定,HE 染色分析下丘脑病理改变。石蜡切片经脱蜡水化,抗原修复,阻断内源性过氧化氢酶(即使用 3% 过氧化氢避光作用 10 min),滴加山羊血清封闭液室温作用 20 min,去除封闭液,滴加一抗 TLR4, NF-κB p65 和 COX-2(1:1000),4 ℃孵育过夜。滴加二抗(HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体),37 ℃作用 30 min,滴加新鲜 DAB 显色液(1:50),室温显色,使用显微镜控制显色时间,显色出现最佳颜色时,使用蒸馏水洗涤终止显色,苏木素复染细胞核,并使用不同浓度乙醇脱水,中性树胶封片。经免疫组化染色后,观察下丘脑 TLR4, NF-κB p65 和 COX-2 表达水平(阳性表达细胞胞浆呈棕褐色深染)。于 200 倍放大倍数下观察 5 个连续视野,拍照,计数下丘脑阳性表达细胞数^[12]。

2.4 数据统计 采用 SPSS17.0 软件统计实验数据,表示为 $\bar{x} \pm s$ 。多组间计量数据进行 One-Way ANOVA 分析,两组间(方差齐)进行 LSD 分析或方差不齐进行 Dunnett's T3 分析。当 $P < 0.05$,则认为具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 苦郎树水提物对家兔肛温的影响 经 LPS 耳

缘静脉注射 1 h 后,除正常组外,其余各组肛温升温均值超过 1 ℃,与正常组比较,各组肛温值均显著升高($P<0.01$),药后 3 h、6 h,布洛芬组和苦郎树水提取物各剂量组肛温值均不同程度降低,其中中剂量组与正常组差异不具显著性($P>0.05$)。与模型组相比,药后 3 h、6 h,布洛芬组和苦郎树水提取物各剂量组肛温值均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果详见表 1。

表 1 苦郎树水提取物对家兔肛温的影响($n=6,^{\circ}\text{C}$)

Tab 1 Effects of water extract from *Clerodendrum inerme* on rabbit rectal temperature

组别 Group	基础体温 Basal body temperature	药前肛温 Rectal temperature before administration	药后肛温 Rectal temperature after administration	
			3 h	6 h
正常组 Control group	39.12 ± 0.36	39.10 ± 0.21	39.10 ± 0.40	39.10 ± 0.32
模型组 Model group	38.90 ± 0.15	40.88 ± 0.53 **	40.80 ± 0.40 **	40.65 ± 0.54 **
布洛芬 Ibuprofen group	39.01 ± 0.33	40.80 ± 0.60 **	39.87 ± 0.59 *▲▲	39.78 ± 0.54 *▲▲
低剂量组 Low - dose group	38.94 ± 0.33	40.83 ± 0.50 **	40.00 ± 0.54 **▲	39.95 ± 0.66 **▲
中剂量组 Middle - dose group	38.95 ± 0.15	40.90 ± 0.59 **	39.73 ± 0.55▲▲	39.67 ± 0.66▲▲
高剂量组 High - dose group	39.05 ± 0.20	40.85 ± 0.50 **	39.95 ± 0.68 *▲	39.77 ± 0.38 *▲▲

注:与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$
Note: Compared with the Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with the Model group, ▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

3.2 苦郎树水提取物对家兔肝功能指标血清 AST 和 ALT 水平的影响 药后 6 h,与正常组相比,各组血清 AST 和 ALT 水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组相比,布洛芬组和苦郎树水提取物各剂量组血清 AST 和 ALT 水平均有不同程度降低,其中苦郎树水提取物各剂量组血清 AST 和 ALT 水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果详见表 2。

表 2 苦郎树水提取物对家兔血清 AST 和 ALT 水平的影响($n=6$)

Tab 2 Effects of water extract from *Clerodendrum inerme* on AST and ALT level in rabbit serum

组别 Group	谷草转氨酶(U/L) Aspartate aminotransferase (AST)	谷丙转氨酶(U/L) Alanine amiotransferase (ALT)
正常组 Control group	41.38 ± 10.88	30.85 ± 4.07
模型组 Model group	82.16 ± 9.97 **	68.95 ± 8.64 **
布洛芬 Ibuprofen group	72.62 ± 12.20 **	58.52 ± 12.96 **
低剂量组 Low - dose group	66.38 ± 9.58 **▲	47.90 ± 9.91 **▲▲
中剂量组 Middle - dose group	60.71 ± 13.56 *▲▲	46.58 ± 5.26 **▲▲
高剂量组 High - dose group	62.60 ± 16.86 **▲	42.50 ± 12.71 *▲▲

注:与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$
Note: Compared with the Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with the Model group, ▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

3.3 苦郎树水提物对家兔内生致热原指标血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 PGE₂ 水平的影响 与正常组相比,各组血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 PGE₂ 水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组相比,除苦郎

树水提物低、中剂量组血清 TNF-α 水平差异不具显著性($P>0.05$)外,布洛芬组和苦郎树水提物各剂量组血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 PGE₂ 均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果详见表 3。

表 3 苦郎树水提物对家兔血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 PGE₂ 水平的影响 (n=6)

Tab 3 Effects of water extract from <i>Clerodendrum inerme</i> on IL-1β, IL-6, TNF-α, and PGE ₂ in rabbit serum				
组别 Group	前列腺素 E ₂ (pg/mL) Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	白介素-1β (pg/mL) Interleukin-1β (IL-1β)	白介素-6 (pg/mL) Interleukin-6 (IL-6)	肿瘤坏死因子 α (pg/mL) Tumor necrosis factor-α (TNF-α)
正常组 Control group	159.16 ± 52.44	70.81 ± 3.67	39.58 ± 4.23	41.78 ± 11.00
模型组 Model group	375.13 ± 66.47 **	151.02 ± 9.81 **	104.76 ± 6.84 **	82.67 ± 3.70 **
布洛芬 Ibuprofen group	261.23 ± 41.14 **▲▲	109.67 ± 12.09 **▲▲	79.83 ± 18.65 **▲▲	69.10 ± 7.36 **▲▲
低剂量组 Low-dose group	258.63 ± 64.57 **▲▲	129.10 ± 5.93 **▲▲	88.14 ± 12.56 **▲	75.37 ± 4.30 **
中剂量组 Middle-dose group	282.76 ± 46.17 **▲▲	126.31 ± 3.29 **▲▲	86.10 ± 16.17 **▲	75.30 ± 5.98 **
高剂量组 High-dose group	237.94 ± 69.92 *▲▲	125.03 ± 5.59 **▲▲	72.28 ± 10.47 **▲▲	70.60 ± 4.98 **▲▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$
Note: Compared with the Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with the Model group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$

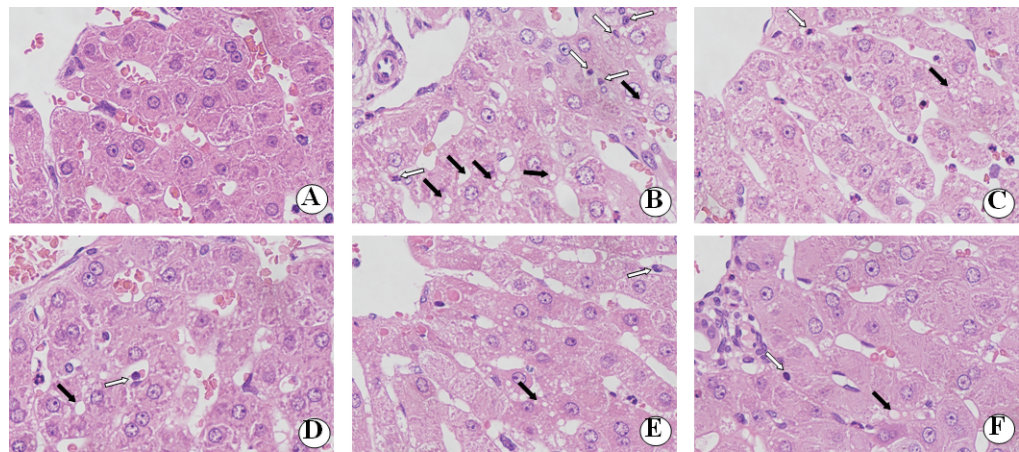
3.4 苦郎树水提物对家兔肝组织病理及 COX-2 蛋白表达水平的影响 HE 染色后,光镜下可见正常组肝细胞排列有序,呈规则放射状,轮廓清晰,胞浆色泽均匀,核大而圆居中,染色清晰;模型组肝细胞排列紊乱,轮廓不清晰,胞浆淡染,色泽不均匀,大量肝细胞气球样变,大量细胞核染色质碎裂、固缩或消失;与模型组比较,布洛芬组和苦郎树水提物各剂量组肝组织损伤明显减轻,排列明显有序,胞浆色泽较为均匀,气球样变数目明显减少,细胞核染色质浓缩或核固缩数量明显减少,其中以中、高剂量组改善最为明显。免疫组化染色后,正常组肝细胞胞浆呈浅黄色,色泽均匀,仅少量阳性表达;模型组肝细胞胞浆阳性表达区域大,颜色深,呈片状分布,布洛芬组和苦郎树水提物各剂量组肝细胞胞浆阳性表达面积及程度明显减少,以广泛表达为主,颜色明显变浅。与正常组比较,各组肝组织 MOD 值均显著增加($P<0.01$);与模型组比较,布洛芬组和苦郎树水提物各剂量组肝组织 MOD 值均不同程度降低,其中布洛芬组和苦郎树水提物中、

高剂量组差异具有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果详见图 1、图 2 和表 4。

表 4 苦郎树水提物对家兔肝组织 COX-2 表达水平的影响 (n=6)

Table 4 Effects of water extract from <i>Clerodendrum inerme</i> on COX-2 expression in rabbit liver	
组别 Group	环氧合酶-2 平均光密度 COX-2 MOD value
正常组 Control group	0.108 ± 0.036
模型组 Model group	0.256 ± 0.029 * *
布洛芬 Ibuprofen group	0.178 ± 0.018 **▲▲
低剂量组 Low-dose group	0.222 ± 0.013 **
中剂量组 Middle-dose group	0.215 ± 0.043 **▲
高剂量组 High-dose group	0.211 ± 0.023 **▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$
Note: Compared with the Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with the Model group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$



注:黑色箭头指示肝脏气球样变;白色箭头指示肝细胞核固缩

A: 正常组;B: 模型组;C: 布洛芬组;D: 低剂量组;E: 中剂量组;F: 高剂量组;下同

A: Control group; B: Model group; C: Ibuprofen group; D: Low - dose group; E: Middle - dose group; F: High - dose group; The same as below

图 1 家兔肝组织病理学改变 HE 染色检测结果 (400 ×)

Fig 1 Histopathological changes in rabbits liver by HE staining

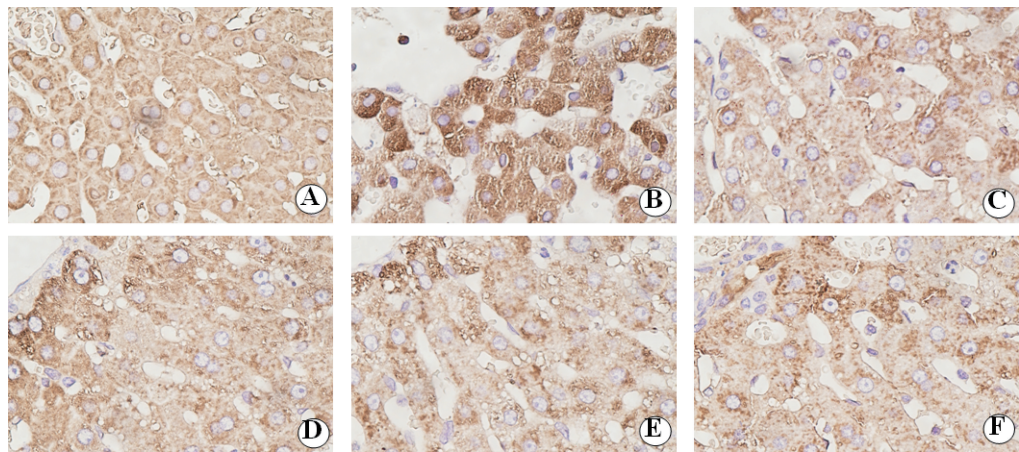


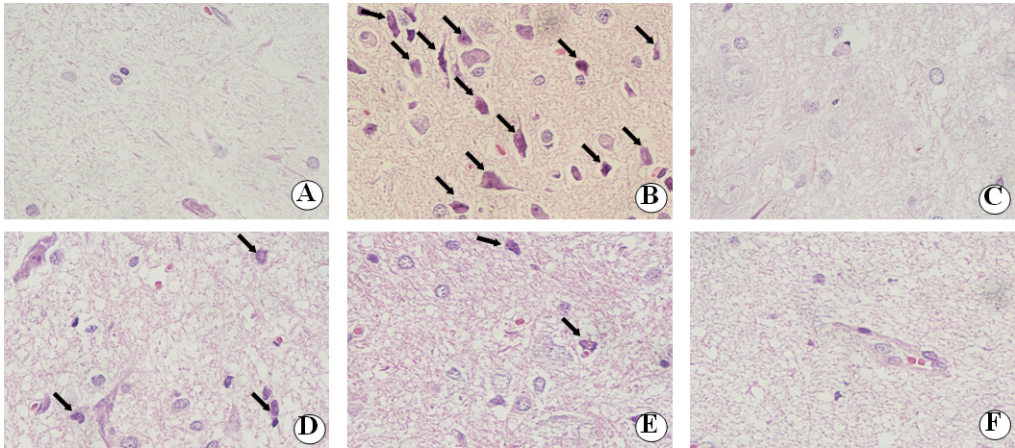
图 2 家兔肝组织 COX - 2 表达水平免疫组化染色检测结果

Fig 2 COX - 2 expression in rabbits liver by immunohistochemical staining

3.5 苦郎树水提取物对家兔下丘脑病理及 NF - κ B p65、COX - 2 和 TLR4 表达水平的影响 HE 染色后,正常组下丘脑神经元排列紧密,分布均匀有序,偶见神经细胞胞浆深染;模型组下丘脑神经细胞胞浆深染数目多,提示神经元异常数目增多;与模型组比较,布洛芬组和苦郎树水提取物各剂量组下丘脑神经细胞胞浆深染数目明显减少,异常神经元数目明显减少。免疫组化染色后,正常组下丘脑仅少量神经细胞阳性表达,颜色浅,程度低;模型组下丘脑阳性表达的神经细胞数目明显增加,颜色深染,程度高,布洛芬组和苦郎树水提取物各剂量组下丘脑阳

性表达的神经细胞数目明显减少,颜色变浅,程度降低。与正常组比较,除苦郎树水提取物低剂量组下丘脑 COX - 2 阳性表达的神经细胞数目差异不具显著性外($P > 0.05$),各组下丘脑 NF - κ B p65 和 COX - 2 阳性表达的神经细胞数目均显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而各组下丘脑 TLR4 阳性表达的神经细胞数目除模型组显著增加外($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),布洛芬组和苦郎树水提取物各剂量组差异均不具显著性($P > 0.05$);与模型组比较,除苦郎树水提取物低剂量组下丘脑 COX - 2 和低、中剂量组下丘脑 TLR4 阳性表达的神经细胞数

目差异不具显著性外 ($P > 0.05$), 布洛芬组和苦郎树水提物各剂量组下丘脑 NF- κ B p65、COX-2 和 TLR4 阳性表达的神经细胞数目均显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果详见图 3 ~ 图 6 和表 5。



注:黑色箭头指示神经细胞胞浆深染

图 3 家兔下丘脑病理学改变 HE 染色检测结果 (400 ×)

Fig 3 Histopathological changes in rabbits hypothalamus by HE staining

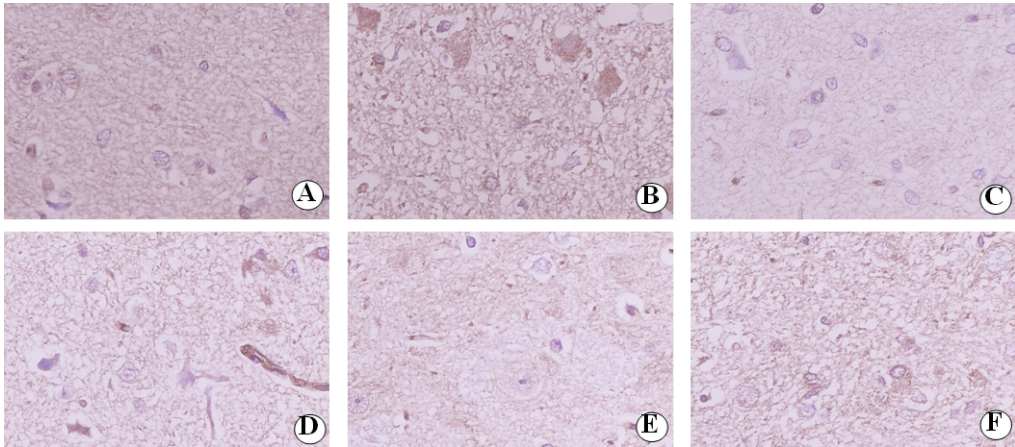


图 4 家兔下丘脑 NF- κ B p65 表达水平免疫组化染色检测结果

Fig. 4 NF- κ B p65 expression in rabbits hypothalamus by immunohistochemical staining

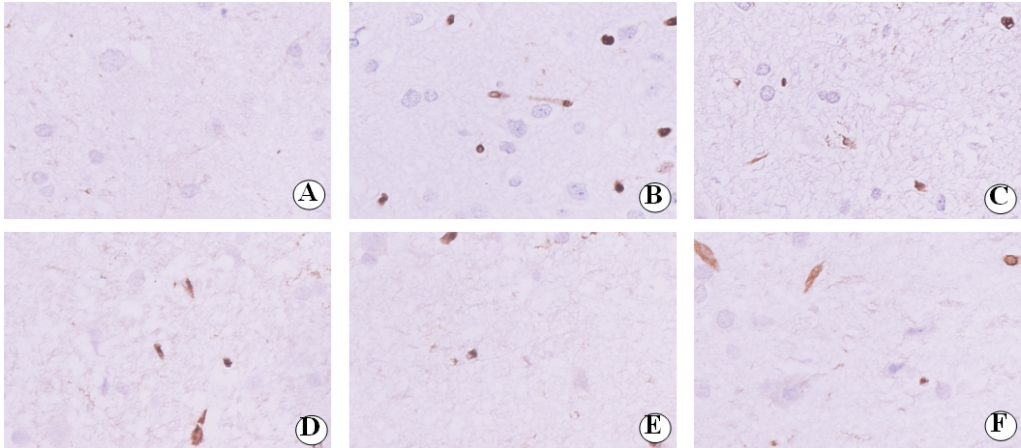


图 5 家兔下丘脑 COX-2 表达水平免疫组化染色检测结果

Fig 5 COX-2 expression in rabbits hypothalamus by immunohistochemical staining

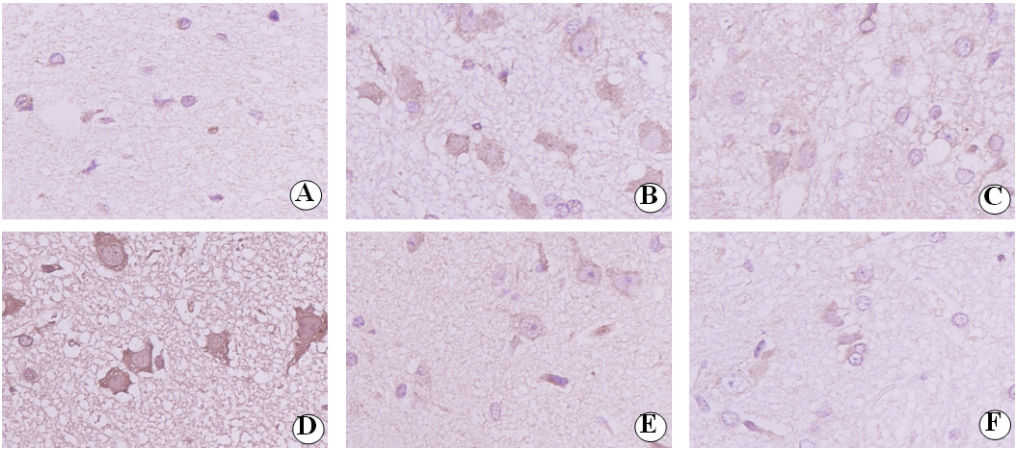


图 6 家兔下丘脑 TLR4 表达水平免疫组化染色检测结果

Fig. 6 TLR4 expression in rabbits hypothalamus by immunohistochemical staining

表 5 苦郎树水提取物对家兔下丘脑 NF-κB p65、COX-2 和 TLR4 表达水平的影响 (n=6)

Tab 5 Effects of water extract from *Clerodendrum inerme* on NF-κB p65, COX-2, and TLR4 expression in rabbit hypothalamus

组别 Group	NF-κB p65 阳性细胞数 Number of NF-κB p65-positive cells	COX-2 阳性细胞数 Number of COX-2-positive cells	TLR4 阳性细胞数 Number of TLR4-positive cells
正常组 Control group	16.9 ± 1.1	21.1 ± 4.2	40.6 ± 10.1
模型组 Model group	78.8 ± 9.0 **	65.0 ± 3.8 **	69.7 ± 14.2 *
布洛芬 Ibuprofen group	35.9 ± 3.0 **▲▲	40.5 ± 6.1 **▲▲	37.4 ± 4.2 ▲
低剂量组 Low-dose group	47.2 ± 9.5 **▲▲	45.9 ± 13.9 #	58.8 ± 4.1
中剂量组 Middle-dose group	47.3 ± 5.8 **▲▲	34.3 ± 3.6 **▲▲	45.6 ± 6.9
高剂量组 High-dose group	31.8 ± 6.5 *▲▲	42.6 ± 8.5 **▲▲	34.3 ± 7.0 ▲▲

注:与正常组比较, * P<0.05, # P<0.01; 与模型组比较, ▲ P<0.05, ▲▲ P<0.01
Note: Compared with the Control group, * P<0.05, ** P<0.01; Compared with the Model group, ▲ P<0.05, ▲▲ P<0.01

4 讨论与结论

发热症是畜禽业常见的一种临床症状,而解热是治疗发热症的关键。因畜禽饲养环境复杂,易受细菌、病毒和寄生虫感染,特别以革兰阴性菌感染最为常见。脂多糖(LPS)由革兰阴性菌菌壁释放,其可激活单核细胞等释放内源性致热炎症因子,而内生致热原因子的蓄积,刺激和/或损伤体温调控

中枢下丘脑,导致体温调控异常,机体体温异常升高^[13]。除了引起发热,LPS 可通过启动炎症反应,引起机体多组织器官损伤,其中肝脏作为机体解毒的重要器官,LPS 引起的肝细胞损伤和肝功能受破坏,急性肝损伤是 LPS 致热的关键环节^[14]。结合畜禽发热,常因细菌感染和肝易损伤等病因特点和临床症状,辩证论治,苦郎树枝叶的抗菌、退热和保

肝等药效活性^[15-16],为苦郎树枝叶水提物用于畜禽发热治疗提供了理论依据。

家兔对 LPS 致发热极为敏感,发热症状和生物学反应和人类临床发热类似,家兔发热模型,具有发热快、稳定、持久等特点,可以用于新药解热作用研究^[7]。本研究发现,模型组家兔经静脉注射 LPS 后,7 h 内肛温均持续高温,血清内生致热原因子,如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE₂ 水平均升高,肝组织和下丘脑组织均发生不同程度的损伤,肝功能指标 AST 和 ALT 水平升高,肝组织 COX-2 和下丘脑 TLR4、NF- κ B p65、COX-2 表达水平上调,说明 LPS 所致家兔发热模型复制成功。

发热,以体温异常升高,超出正常范围为特征,发热持久,机体能量消耗过大,组织器官代谢负荷加重,易导致多组织器官功能失常,甚至衰竭^[17]。发热持久导致畜禽多组织器官衰竭,是畜禽死亡的主要原因,故发热以退热为要。本研究发现,经苦郎树枝叶水提物干预后,药后 3 h、6 h,家兔肛温值显著降低,说明苦郎树枝叶水提物有一定的解热效果。

肝脏是机体最大的氧化代谢和脂肪合成器官,调节脂质和碳水化合物等物质的代谢和合成,同时也是最主要的解毒排毒器官。发热与肝功能关系密切,发热严重持久,易发生肝衰竭,加速畜禽的死亡^[18]。肝功能指标和组织病理学检查是评价肝损伤的主要方法,肝损伤严重可导致肝功能指标,如 AST 和 ALT 水平的升高,组织病理学检查可观察到肝细胞和细胞核的损伤。本研究发现,经苦郎树枝叶水提物干预后,药后 6 h,家兔肝功能指标血清 AST 和 ALT 显著降低,肝组织病理损伤明显减轻,说明苦郎树枝叶水提物有一定的护肝作用,可以拮抗 LPS 对肝组织的损伤,避免肝衰竭的发生。

内生致热原指标是评价发热严重程度和预测发热预后的重要指标,血清内生致热原指标水平一定程度反映药物的治疗效果^[19]。本研究发现,经苦郎树枝叶水提物干预后,药后 6 h,家兔内生致热原指标血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE₂ 显著降低,说明苦郎树枝叶水提物有一定的清除体内内生

致热原作用。

Toll 样受体 4 (TLR4) 主要在大脑小胶质细胞中表达,其可特异性识别 LPS, LPS 是其配体之一,结合后可促进其激活,而核因子 κ B (NF- κ B) 是其下游通路,TLR4 可介导下游 NF- κ B 的磷酸化活化^[20]。何自标等^[21] 研究发现, LPS 可上调家兔下丘脑 TLR4、IL-1 β 和 IL-6 等表达水平,下丘脑是 LPS 损伤的敏感部位。体温调控中枢下丘脑受炎症因子的刺激和/或损伤,是导致体温异常升高的重要原因,而 NF- κ B 信号通路被激活是炎症反应的中央信号传导途径,TLR4/NF- κ B 的激活增加炎症因子、黏附分子、趋化因子等的表达,诱导多种内生致热原的分泌和释放,如其下游蛋白 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等^[22]。正常组织中,COX-2 呈极低表达,但其受 NF- κ B 调控,在炎症环境下,NF- κ B 可转移至细胞核与 COX-2 基因启动子相结合,致使其呈高表达,产生大量 PGE₂、白三烯等内生致热原,引起发热^[23]。因此,抑制 TLR4、NF- κ B、COX-2 等信号通路被认为是防治下丘脑损伤治疗发热的关键分子靶点。本研究发现,经苦郎树枝叶水提物干预后,药后 6 h,家兔下丘脑神经元异常数目明显减少,下调下丘脑 TLR4、NF- κ B、COX-2 等表达水平,说明苦郎树枝叶水提物有一定的调节下丘脑神经-内分泌免疫网络,保护机体体温中枢和抑制内生致热原分泌的作用。

综上所述,苦郎树枝叶水提物有明显的解热作用,其机制可能与增强肝功能、消除血液内生致热原及下调肝组织 COX-2 和下丘脑 TLR4、NF- κ B、COX-2 表达水平有关,具有开发为解热兽药的前景。但其作用物质基础尚不明确,更多相关机制有待进一步深入研究,尚有很多研究空间需要深入和明确。

参考文献:

[1] 邓锐涵,周紫冲,杨艳艳,等. 金苓蓝口服液对鸡风热犯肺证的疗效研究[J]. 中国兽药杂志,2021,55(2):46-52.

Deng R H, Zhou Z C, Yang Y Y, *et al.* Study on the effect of jinjinlan oral liquid on chicken syndrome of wind-heat invading

- lung [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(2): 46–52.
- [2] 王晓通, 张晓彤, 谢晓程, 等. 分子印迹技术在兽用抗生素残留分析中的应用进展[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(9): 50–56.
- Wang X T, Zhang X T, Xie X C, *et al.* Application progress of molecular imprinting technology in analysis of veterinary antibiotic residues [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(9): 50–56.
- [3] 顾进华, 刘自扬, 苏富琴, 等. 以临床价值为导向的兽用中药药学研究思路[J]. 中国兽药杂志, 2022, 56(12): 62–68.
- Gu J H, Liu Z Y, Su F Q, *et al.* Pharmaceutical research of veterinary Chinese medicine based on clinical value [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2022, 56(12): 62–68.
- [4] 朱华, 戴忠华. 中国壮药图鉴(下)[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2020: 151.
- Zhu H, Dai Z H. Chinese Zhuang medicine Illustrated Handbook (II) [M]. Nanning: Guangxi Science & Technology Publishing House Co., Ltd, 2020: 151.
- [5] Gopal N, Sengottuvelu S. Hepatoprotective activity of *Clerodendrum inerme* against CCl₄ induced hepatic injury in rats [J]. Fitoterapia, 2008, 79(1): 24–26.
- [6] 南海函, 张 偲, 吴 军. 许树化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(4): 492–494.
- Nan H H, Zhang S, Wu J. Chemical constituents from *Clerodendrum inerme* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(4): 492–494.
- [7] 吕邵娃, 武印奇, 李英鹏, 等. 白虎汤不同相态对发热模型家兔血清中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平的影响[J]. 国际药理学研究杂志, 2020, 47(10): 870–875.
- Lv S W, Wu Y Q, Li Y P, *et al.* Effects of different phase Baihu decoction on the serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 level in fever model rabbits [J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2020, 47(10): 870–875.
- [8] Ahmad S, Rehman T, Abbasi WM. In vivo evaluation of antipyretic effects of some homeopathic ultra-high dilutions on Baker's yeast-induced fever on Similia principle [J]. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 2018, 9(3): 177–182.
- [9] Jia L L, Li R, Ma J, *et al.* Effects of Bai-Hu decoction on fever induced by lipopolysaccharide [J]. Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2013, 29(3): 128–132.
- [10] 赵粉琴, 赵 艳, 刘洁颖, 等. 左归丸对早衰和初大鼠下丘脑-垂体-卵巢 FSHR、LHR 和 ER 表达的影响[J]. 中医学报, 2022, 50(9): 25–31.
- Zhao F Q, Zhao Y, Liu J Y, *et al.* Effects of Zuogui pill on expressions of FSHR, LHR and ER of HPO in pof rats and early-aging rats [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2022, 50(9): 25–31.
- [11] 湛园园, 田丽萍, 王金辉, 等. 籽瓜皮提取物对肝纤维化小鼠肝组织细胞因子表达的影响[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2016, 34(6): 739–745.
- Zhan Y Y, Tian L P, Wang J H, *et al.* Effect of extract of seed melon on the hepatic expressions of cytokines in mice with hepatic fibrosis [J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2016, 34(6): 739–745.
- [12] 刘 丽, 左艳丽, 李占涛, 等. 宁神安脏饮对失眠大鼠模型行为学和下丘脑 GABA 及 GLU 表达的影响[J]. 宁夏医学杂志, 2023, 45(1): 21–25.
- Liu L, Zuo Y L, Li Z T, *et al.* Effects of Ningshen Anzang Yin on behavior and expression of GABA and GLU in hypothalamus of insomnia rat model [J]. Ningxia Medical Journal, 2023, 45(1): 21–25.
- [13] Xie F F, Xu L B, Zhu H, *et al.* The Potential Antipyretic Mechanism of Ellagic Acid with Brain Metabolomics Using Rats with Yeast-Induced Fever [J]. Molecules, 2022, 27(2465): 1–15.
- [14] Li P Z, Zhang Z, Gong J P, *et al.* S-Adenosylmethionine attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by downregulating the Toll-like receptor 4 signal in Kupffer cells [J]. Hepatology international, 2014, 8(2): 275–284.
- [15] Prasad V, Srivastava S, Varsha, *et al.* Two basic proteins isolated from *Clerodendrum inerme* Gaertn. are inducers of systemic antiviral resistance in susceptible plants [J]. Plant Science, 1995, 110(1): 73–82.
- [16] 南海函, 尹 浩, 张 偲. 许树中苯乙醇苷类化合物的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(6): 1008–1011.
- Nan H H, Yin H, Zhang S, *et al.* Phenylethanoid glycosides from *Clerodendrum inerme* [J]. Natural product research and development, 2008, 20(6): 1008–1011.
- [17] 曹 婧. 动物发热性疾病病理及处理[J]. 现代畜牧科技, 2023, 98(7): 112–114.
- Cao J. Pathology and Management of Febrile Diseases in Animals [J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2023, 98(7): 112–114.
- [18] 于紫微. 乙型肝炎患者感染性发热与肝功能衰竭的相关性分析[J]. 中国医药指南, 2020, 18(16): 142–143.
- Yu Z W. Analysis of the correlation between infectious fever and liver failure in patients with Hepatitis B [J]. Guide of China Medicine, 2020, 18(16): 142–143.

[19] 赵婵娟. 清温消热饮对小鼠 LPS 致炎模型血清中炎性因子的影响[J]. 中国兽药杂志,2017,51(1):41-45.

Zhao C J. Effect of a Traditional Chinese prescription drug qingwen xiaore yin on serum inflammatory factors in LPS - induced inflammatory model [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(1): 41-45.

[20] 蒋国风,颜春鲁,安方玉,等. 黄芪汤基于 miR-93 和 miR-140-5p 介导的 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路对 ~ (12) C ~ (6+) 辐射下丘脑损伤的防护机制[J]. 中华中医药杂志,2023,38(2): 805-810.

Jiang G F, Yan C L, An F Y, *et al.* Protective mechanism of Huangqi Decoction based on the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway mediated by miR-93 and miR-140-5p on hypothalamic injury caused by 12C6 + radiation [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2023, 38(2): 805-810.

[21] 何自标,兰瑞霞,陈晨,等. 脂多糖对母兔下丘脑、卵巢、输卵管中 TLR4 及其相关细胞因子表达的影响[J]. 畜牧兽医学报,2014,45(6):910-917.

He Z B, Lan R X, Chen C, *et al.* Effect of LPS on the expression of TLR4 and related cytokines in oviduct, ovary and hypothalamus of rabbits [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2014, 45(6): 910-917.

[22] Baker R G, Hayden M S, Ghosh S. NF-κappaB, inflammation, and metabolic disease [J]. Cell metabolism, 2011, 13(1): 11-22.

[23] 黄梅,颜景颖. 基于 NF-κB/COX-2 信号通路探讨芍药内酯苷对溃疡性结肠炎模型大鼠的影响[J]. 中医学报,2022, 37(2): 365-370.

Huang M, Yan J Y. Effect of Albiflorin on Ulcerative Colitis Model Rats Based on NF-κB/COX-2 Signaling Pathway [J]. Acta Chinese Medicine, 2022, 37(2): 365-370.

(编辑:陈希)