

不同柴胡剂量小柴胡汤对 LPS 诱导发热大鼠模型体温及血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响*

曹 峰¹, 唐阿梅^{2**}

(1. 贵阳中医学院 贵阳 550002 ; 2. 贵阳中医学院第一附属医院 贵阳 550003)

摘 要:目的:观察不同柴胡剂量的柴胡汤对 LPS 诱导发热大鼠模型体温及血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响,并探讨其作用机制。方法:50 只 SD 大鼠随机分为 5 组:正常对照组、发热模型组、小柴胡汤(大)组、小柴胡汤(中)组、小柴胡汤(小)组。以 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射 LPS 制作发热模型,造模同时,给予相应的小柴胡汤水煎液或生理盐水。造模后每隔 30 min 测定体温(T_i),连续测量 240 min,计算体温变化值 $\Delta T(\Delta T=T_i-T_0)$ 。最后 1 次测量体温后,取血,酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。结果:小柴胡汤(大)组在 3 h、3.5 h、4 h 此 3 个时间节点有明显降低大鼠体温的效果($P<0.01$ 或 $P<0.05$),这种降温效果在 3.5 h、4 h 两个时间节点优于小柴胡汤(中)组、小柴胡汤(小)组二组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与发热模型组比较,3 组小柴胡汤均可明显降低血清中 IL-1 β 的含量($P<0.05$),其中小柴胡汤(大)组效果显著($P<0.01$)。与发热模型比较,小柴胡汤(大)组可明显降低血清中 IL-6、TNF- α 的含量($P<0.05$)。结论:小柴胡汤具有降低 LPS 诱导发热大鼠模型体温与降低血清中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的功效,在一定范围内与方中柴胡剂量之间呈正相关剂量依赖关系。

关键词:柴胡剂量 小柴胡汤 脂多糖 解热

doi: 10.11842/wst.2014.01.010 中图分类号:R285.5 文献标识码:A

小柴胡汤在仲景原文中多用于治疗发热病证,但在小柴胡汤原方中柴胡剂量为半斤,剂量远大于方中黄芩、人参、炙甘草、生姜(各 3 两)的剂量,而现今文献报道的小柴胡汤中,无论是柴胡的绝对还是相对剂量都比原方的剂量小。本文通过实验研究方法,观察不同柴胡剂量的柴胡汤对脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导大鼠发热模型体温及血清白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis factor- α , TNF- α)的影响,探讨小柴胡汤治疗发热病证的作用机制,并为其临床应用提供理论依据。

收稿日期:2013-02-21

修回日期:2013-03-06

* 贵阳中医学院 2010 年度博士基金项目(2010297):柴胡用量对小柴胡汤功效影响的理论及实验研究,负责人:曹峰。

** 通讯作者:唐阿梅,女,主治医师,主要研究方向:中西医结合防治呼吸系统疾病研究。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200 \pm 20)g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(渝)2012-0005。

1.2 药物与试剂

选用的中药材:北柴胡(伞形科植物 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根)、黄芩(唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根)、党参[桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根]、清半夏[天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎与白矾共煮后干燥而成的炮制加工品]、炙甘草(甘草 *Glycyrrhiza uralensis*

Fisch. 照蜜炙法加工)、生姜(姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc.的新鲜根茎)、大枣(鼠李科植物枣 *Ziziphus jujube* Mill.的干燥成熟果实)。以上除生姜购自农贸市场外,其它实验用中药均购自同仁堂(贵阳)药店,所用中药均由贵阳中医学院生药教研室刘芑教授鉴定为正品。

不同柴胡剂量的柴胡汤分3组:小柴胡汤柴胡大剂量组,药物组成:北柴胡40g、黄芩15g、党参15g、清半夏15g、炙甘草15g、生姜15g、大枣4枚(约10g)组成。用800mL水浸泡1h,煎煮30min,过滤;再加入800mL,煎煮30min,过滤。合并两次煎取滤液,再煎取100mL,并将所得药液用双层纱布过滤,制作成 $1.30\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液;小柴胡汤柴胡中剂量组,药物组成:北柴胡15g,余药药量及煎煮方法同上,制作成 $1.00\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液;小柴胡汤柴胡小剂量组,药物组成:北柴胡6g,余药药量及煎煮方法同上,制作成 $0.91\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液。3组小柴胡汤水煎液均置 4°C 贮存冰箱中备用。小柴胡汤方中只有柴胡剂量变化,其余6味药药量不变。正常对照组为生理盐水组。

IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA(美国R&D公司,产品批号:201211)进口分装试剂盒,由昆明绿盟科技有限公司提供。LPS(*Escherichia coli* endotoxin-in 055:B5,美国Sigma公司,L2880,批号:1010A031),用无菌生理盐水溶解成 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液。

1.3 主要仪器

电脑数字温度计MC-246型(大连欧姆龙有限公司),探测器:热敏电阻,测量范围 $32\sim 42^{\circ}\text{C}$,测量精度: $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$;TDL-5A普通离心机(湖南星科科学仪器有限公司);Bio-TEK ELX808酶标仪(美国BioTeck公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组

70只大鼠在恒温(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度50%~60%的实验室条件下饲养,每日光照12h,自由取食、饮水。适应性喂养3d后,连续3d早晚测量各组大鼠的肛温(测温探头插入肛门2cm)2次,使大鼠得以适应。实验前10h禁食不禁水,间隔30min测肛温2次(2次肛温波动 $>0.3^{\circ}\text{C}$ 者剔除),取2次平均值作为大鼠的基础体温(T_0)。选取体温合格大鼠50只,并随机分为5组:正常对照组、发热模

型组、小柴胡汤(大)组、小柴胡汤(中)组、小柴胡汤(小)组,每组各10只。

2.2 动物给药及处理方法

正常对照组注射同体积生理盐水,各组动物以 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射浓度为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的LPS生理盐水溶液;造模同时,给药组分别灌胃给予相应的小柴胡汤水煎液(大、中、小中药水煎液剂量分别为 $13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $9.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),正常对照组与发热模型组给予同体积生理盐水。造模后,每隔30min测定肛温(T_t),连续测量240min,计算体温变化值 $\Delta T(\Delta T=T_t-T_0)$ 。最后1次测量体温后,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉。在5~10min内腹主动脉采血5mL。室温静置4h左右, 4°C 离心3000rpm,15min。分离血清,放置 -20°C 冰箱内储存备用。严格按试剂盒内操作程序,ELISA法测定血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量。

2.3 统计学处理方法

采用SPSS 17.0 for Windows统计软件包进行统计学处理,各组数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间计量资料相互比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 大鼠腹腔注射 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LPS后不同时间 ΔT 值的影响

大鼠在腹腔注射LPS后,与正常组比较,发热模型组的体温呈逐步升高的趋势,并在3h后出现明显的发热($P<0.01$),并持续至4h。小柴胡汤组(大)组在3~4h此3个时间节点有明显降低大鼠体温的效果($P<0.01$ 或 $P<0.05$),这种降温效果在3.5h、4h两个时间节点优于小柴胡汤(中)组、小柴胡汤(小)组二组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。具体见表1。

3.2 大鼠腹腔注射 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LPS 4h后血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

与发热模型组比较,3组小柴胡汤均可明显降低血清中IL-1 β 的含量($P<0.05$),其中小柴胡汤(大)组降低效果更明显($P<0.01$);与发热模型比较,小柴胡汤(大)组可明显降低血清中IL-6、TNF- α 的含量($P<0.05$),显著降低血清中IL-1 β 的含量($P<0.01$);与正常对照组比较,小柴胡汤(大)组血清中IL-1 β 、TNF- α 的含量无明显差异。与发热模型比较,小柴胡汤(中)组、小柴胡汤(小)组也可降低血

清中 IL-1 β 的含量 ($P<0.05$), 但 3 组血清中 IL-6、TNF- α 的含量差异与发热模型组比较并差异不明显。具体见表 2。

4 讨论

现代临床研究证实, 小柴胡汤多用于治疗发热性病证^[1], 其中以感染性发热较多, 同时对非感染性发热和不明原因发热也具有较好的效果^[2]。实验研究也证实, 小柴胡汤对以肺炎链球菌为感染源、LPS 为发热致热原诱导大鼠发热的抑制效果及对肺炎链球菌感染小鼠的保护作用明显, 发现小柴胡汤有较好的抗感染及解热作用^[3]。前期的实验研究报道显示, LPS 按 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射, 大鼠在注射后 2.5~5.5 h 内体温显著升高; 4 h 达峰值 (38.5 $^{\circ}\text{C}$), 最高增幅为 1.15 $^{\circ}\text{C}$ ^[4]。因此, 本次实验采用 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的 LPS 腹腔注射制作发热模型, 并在大鼠注射后 4 h 体温达峰值时处死取血。实验结果显示, 应用大剂量的柴胡的小柴胡汤可以降低 LPS 诱导大鼠发热模型体温, 效果优于中、小柴胡剂量的小柴胡汤。

LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分, 引起发热反应的原因是致热源作用于体内的巨噬细胞等, 使之产生 IL-1 β ^[5-7]、IL-6^[8]、TNF- α ^[9] 等, 这些细胞因子作用于宿主下丘脑的体温调节中枢, 然后经一系列信号转导, 使产热增多, 促使体温升高发热^[5]。实验结果显示, 应用大剂量柴胡的小柴胡汤可降低血清中 IL-6、TNF- α 含量, 显著降低血清中 IL-1 β 含量, 而其余二组小柴胡汤也可明显降低血清中 IL-1 β 含量, 但二组血清中 IL-6、TNF- α 含量差异与发热模型组比较差异并不明显。因此本研究认为, 应用大剂量的柴胡的小柴胡汤的作用机制可能与降低血清中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量等综合作用有关。

一般认为, 大剂量柴胡入煎剂 12~15 g 时, 可以疏散退热; 中等剂量柴胡入煎剂 6~12 g 时, 长于疏肝解郁; 小剂量柴胡入煎剂 3~6 g 时, 功在升阳举陷。文献调查结果显示, 临床上应用小柴胡汤治疗发热柴胡剂量偏大, 绝大多数剂量在 10~30 g 之间, 符合传统的理论认识^[2]。而柴胡提取液体外抗内毒素的实验结果表明, 柴胡提取液在较高浓度时对

表 1 对大鼠腹腔注射 LPS (20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后不同时间 ΔT 值的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	3.5 h	4 h
正常对照组	0.20 \pm 0.42	0.13 \pm 0.30	0.15 \pm 0.41*	0.30 \pm 0.31	0.33 \pm 0.38	0.22 \pm 0.35**	0.16 \pm 0.20**	0.12 \pm 0.23**
发热模型组	0.35 \pm 0.31	0.40 \pm 0.44	0.46 \pm 0.45 Δ	0.61 \pm 0.60	0.63 \pm 0.54	0.74 \pm 0.30 $\Delta\Delta$	1.03 \pm 0.69 $\Delta\Delta\Delta$	1.11 \pm 0.45 $\Delta\Delta\Delta$
小柴胡汤(大)组	0.22 \pm 0.15	0.18 \pm 0.24	0.17 \pm 0.23	0.32 \pm 0.32	0.53 \pm 0.18	0.40 \pm 0.38*	0.30 \pm 0.33**	0.40 \pm 0.28 $\Delta\Delta\Delta$
小柴胡汤(中)组	0.31 \pm 0.15	0.37 \pm 0.25	0.44 \pm 0.20	0.63 \pm 0.25	0.54 \pm 0.17	0.55 \pm 0.38 Δ	0.68 \pm 0.36 $\Delta\Delta$	0.71 \pm 0.29 $\Delta\Delta\Delta$
小柴胡汤(小)组	0.33 \pm 0.21	0.39 \pm 0.33	0.46 \pm 0.30 Δ	0.63 \pm 0.28	0.58 \pm 0.19	0.59 \pm 0.34 Δ	0.83 \pm 0.34 $\Delta\Delta\Delta$	0.85 \pm 0.34 $\Delta\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与发热模型组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与小柴胡汤(大)组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

表 2 对大鼠腹腔注射 LPS (20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 4 h 后血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	IL-1 β /ng \cdot L $^{-1}$	IL-6/ng \cdot L $^{-1}$	TNF- α /ng \cdot L $^{-1}$
正常对照组	34.56 \pm 14.16**	230.63 \pm 33.93 $\Delta\Delta$	448.09 \pm 125.83**
发热模型组	74.29 \pm 20.86 $\Delta\Delta\Delta$	341.87 \pm 68.26 $\Delta\Delta\Delta$	651.22 \pm 123.22 $\Delta\Delta\Delta$
小柴胡汤(大)组	43.75 \pm 13.34**	284.73 \pm 39.79 $\Delta\Delta$	528.54 \pm 129.55*
小柴胡汤(中)组	53.89 \pm 18.68 $\Delta\Delta$	327.79 \pm 48.60 $\Delta\Delta$	620.98 \pm 110.41 $\Delta\Delta$
小柴胡汤(小)组	56.65 \pm 18.24 $\Delta\Delta\Delta$	331.39 \pm 43.69 $\Delta\Delta\Delta$	634.27 \pm 115.42 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与发热模型组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与小柴胡汤(大)组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

细菌内毒素有较强的破坏作用,但当浓度降低时,抗内毒素作用明显减弱^[10]。本实验结果显示,小柴胡汤可以降低 LPS 诱导大鼠发热模型的体温,柴胡剂量最大的小柴胡汤在 LPS 体温达峰值时,降温效果优于小柴胡汤(中)组、小柴胡汤(小)组二组。据此可以认为,小柴胡汤具有降低 LPS 诱导大鼠发热模型体温与降低血清中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的功效。在一定的剂量范围内,小柴胡汤的这些功效与柴胡剂量呈正相关。从药性理论阐述,这与中医经典文献《素问·阴阳应象大论》所述“味厚则泄,薄则通”的理论相符合,味苦的柴胡若大剂量应用,则味厚苦能清泻的作用增强;若小剂量的应用,则气味俱薄,“气薄则发泄”,轻清走上,有较好的升阳举陷的作用^[11],故补中益气汤中的柴胡用量宜小剂量配伍。本实验研究为临床应用大剂量柴胡的小柴胡汤治疗发热性疾病提供了一定的实验依据,但不同柴胡剂量的小柴胡汤治疗发热病证作用机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 赵裕沛,王兴华.小柴胡汤临床应用近况.甘肃中医,2006,19(12):42~44.
- 2 张玲玲,史欣德.小柴胡汤治疗发热的调查分析.辽宁中医学院学报,2003,5(4):311~313.
- 3 钱妍,吴整军.小柴胡汤抗感染与解热作用的实验研究.中华医院感染学杂志,2008,18(4):567~578.
- 4 孙明瑜,谢鸣,高琳.小柴胡汤合煎液与分煎液对不同剂量 LPS 诱导的大鼠发热模型的影响.上海中医药杂志,2003,37(10):44~47.
- 5 Heida J G, Moshé S L, Quentin J. The role of interleukin-1 β in febrile seizures. *Brain Dev*, 2009, 31(5):388~393.
- 6 Nur B G, Sahinturk D, Coskun M, et al. Single nucleotide polymorphism and production of IL-1 β and IL-10 cytokines in febrile seizures. *Neuropediatrics*, 2012, 43(4):197~199.
- 7 Yu H M, Liu W H, He X H, et al. IL-1 β : an important cytokine associated with febrile seizures? *Neurosci Bull*, 2012, 28(3):306~307.
- 8 Dzhndoian Z T, Martirosian N G. The role of aldosterone and IL-6 in the pathogenesis of inflammation in familial Mediterranean fever. *Georgian Med News*, 2012, 20(6):44~48.
- 9 Dundar M, Kiraz A, Balta B, et al. The role of TNF- α and PAI-1 gene polymorphisms in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol*, 2013, 23(1):140~145.
- 10 刘萍,杨芳寅,周素文,等.中药柴胡抗细菌内毒素的实验研究.中成药,2002,24(8):627~628.
- 11 曹峰,陈静,赵博,等.不同柴胡用量的小柴胡汤对正常小鼠胃排空和小肠推进功能的影响.内蒙古中医药,2012,31(18):31~32.

Effect of Xiao-Chai-Hu Decoction with Different Doses of Bupleurum on Body Temperature and Content of IL-1 β , IL-6, TNF- α in Serum Induced by LPS among Fever Rat Models

Cao Feng¹, Tang Amei²

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China)

Abstract: This study was aimed to observe the effect of Xiao-Chai-Hu Decoction (XCHD) with different doses of Bupleurum on body temperature and content of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum among fever rat models induced by lipopolysaccharide (LPS) in order to and investigate its action mechanism. A total of 50 rats were randomly divided into 5 groups, including the normal control group, fever model group, XCHD group (high-dose), XCHD group (middle-dose), and XCHD group (low-dose). The fever rat model was established by intraperitoneal injection of LPS (20 μ g/kg). At the same time, all rats were given corresponding XCHD or saline solution by gavage. The body temperature of rats (T_t) was measured every 30 min for 240 min after the injection of LPS. Change values of body temperature $\Delta T(\Delta T=T_t-T_0)$ were calculated. After the last measurement of body temperature, blood was taken for the detection of IL-1 β , IL-6 and TNF- α level in serum with ELISA. The results showed that the body temperature of XCHD group (high-dose) was obviously decreased at the time point of 3 h, 3.5 h, 4 h ($P < 0.01$, or $P < 0.05$). This temperature reducing effect at the time point of 3.5 h and 4 h was better than the XCHD group (middle-dose) and XCHD group (low-dose, $P < 0.01$, or $P < 0.05$). Compared with the fever model group, all three XCHD groups can

obviously reduce the IL-1 β level ($P < 0.05$). Among them, the XCHD group (high-dose) had obvious effect ($P < 0.01$). Compared with the fever model group, the XCHD group (high-dose) can obviously reduce contents of IL-6 and TNF- α in serum ($P < 0.05$). It was concluded that XCHD can reduce fever induced by LPS in rats and decrease contents of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum. This effect has a positive dose-effect relationship with the dose of Bupleurum in a certain range.

Keywords: Dose of Bupleurum, *Xiao-Chai-Hu* Decoction, lipopolysaccharide, antifebrile

(责任编辑 张丰丰 张志华, 责任译审 王 晶)