

毛大丁草抗卵清蛋白诱导的小鼠支气管哮喘作用的活性部位筛选

刘春花^a, 游景瑞^{a,b}, 周坤^{a,b}, 孙佳^c, 陆苑^c, 潘洁^a, 李勇军^a, 王永林^c, 刘亭^{c*}(贵州医科大学, a.省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室/民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, b.药学院, c.贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

摘要: 目的 通过卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的支气管哮喘小鼠模型, 筛选毛大丁草抗哮喘的活性部位。方法 采用 D101 大孔吸附树脂法对毛大丁草 50%乙醇提取物进行分段富集, 依次洗脱得到水、60%乙醇、95%乙醇 3 个洗脱部位。小鼠通过腹腔注射 OVA 致敏、雾化吸入 OVA 激发来复制哮喘动物模型, 在激发阶段连续 6 d 进行灌胃给药治疗。采用行为学评分考察不同部位对哮喘行为学的影响, 利用酶联免疫吸附法测定血清、肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中 IL-5 的浓度和血清免疫球蛋白 IgE 的浓度, 采用 HE 染色对肺组织进行组织病理学评价。结果 模型组小鼠哮喘症状评分升高, 血清中 IgE 和 IL-5 的水平显著升高, BALF 中 IL-5 的水平显著升高; 与模型组比较, 60%乙醇段高剂量组小鼠哮喘症状明显改善, 血清中 IL-5 的水平显著降低, BALF 中 IL-5 的水平也显著降低。结合病理学切片观察, 60%乙醇段治疗的小鼠较之模型组小鼠肺泡间隔增厚程度降低, 血管周围和支气管周围炎症细胞浸润显著减少。结论 毛大丁草 50%乙醇提取物的 60%乙醇洗脱部位为其抗哮喘的活性部位, 其化学成分主要是酚酸类、黄酮类和香豆素类。

关键词: 毛大丁草; 支气管哮喘; 卵清蛋白; 肺泡灌洗液; 活性部位

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)09-1142-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.09.002

引用本文: 刘春花, 游景瑞, 周坤, 等. 毛大丁草抗卵清蛋白诱导的小鼠支气管哮喘作用的活性部位筛选[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(9): 1142-1148.

Screening the Effective Fraction of *Gerbera piloselloides* (Linn.) Cass Against Bronchial Asthma Induced by Ovalbumin in Mice

LIU Chunhua^a, YOU Jingrui^{a,b}, ZHOU Kun^{a,b}, SUN Jia^c, LU Yuan^c, PAN Jie^a, LI Yongjun^a, WANG Yonglin^c, LIU Ting^{c*}[Guizhou Medical University, a.State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM(Ministry of Education), b.School of Pharmacy, c.Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guiyang 550004, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an ovalbumin(OVA)-induced bronchial asthma mouse model and screen the effective fraction of *Gerbera piloselloides* (Linn.) Cass extract against asthma. **METHODS** The 50% ethanol extract of *G. piloselloides* was segmented and enriched by D101 macroporous adsorption resin, obtaining three elution fractions regarding water fraction, 60% ethanol fraction and 95% ethanol fraction. The asthma model was established, after the mice being sensitized with OVA solution by intraperitoneal injections, and the mice being challenged through aerosol inhalation of OVA. Mice were treated with corresponding drugs for 6 consecutive days during the OVA excitation phase. The effect of different fractions on behaviors about asthma symptoms was assessed through recording and calculating behavior score, and the concentration of cytokines IL-5 in serum and bronchoalveolar lavage fluid(BALF) and serum immunoglobulin IgE was measured by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). Additionally, histopathological changes of lung tissue were evaluated with HE staining. **RESULTS** The behavior scores of asthma symptoms and the levels of IgE and IL-5 in serum were significantly raised, and the concentration of IL-5 in BALF was also significantly increased in model group. Compared with model group, the asthma symptoms were significantly improved, and the levels of IgE, IL-5 in serum or BALF were significantly decreased in the mice of 60% ethanol fraction with high-dose group. For histopathological examination, the results showed that the extent of alveolar septal thickening was reduced and the infiltration of inflammatory cells around blood vessels and bronchi was significantly cut down in mice treated with 60% ethanol part relative to mice in the model group. **CONCLUSION** The 60% ethanol fraction of the 50% ethanol extract from *G. piloselloides* is the active fraction on treating asthma, in which the major chemical compounds are phenolic acids, flavonoids and coumarins.

KEYWORDS: *Gerbera piloselloides*; bronchial asthma; ovalbumin; bronchoalveolar lavage fluid; effective fraction

支气管哮喘是一种由多种细胞, 如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、淋巴细胞和气管上皮细胞等细胞组分参与的常见慢性气道非特异性炎症性呼吸系统疾病, 该炎症通常会出现可逆性呼气流受

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060777, U1812403); 贵州省自然科学基金项目(黔科合基础[2018]1128); 贵州省科学技术厅项目(黔科合支撑[2019]2779 号); 贵州省优秀青年科技人才项目(黔科合平台人才[2021]5619 号); 贵州省普通高等学校科技拔尖人才项目(黔教合 KY 字[2021]033); 中央引导地方科技专项项目(黔科中引地[2018]4006)

作者简介: 刘春花, 女, 博士, 副教授 E-mail: liuch2016@gmc.edu.cn *通信作者: 刘亭, 男, 博士, 教授 E-mail: liuting@gmc.edu.cn

限,致使喘息、气促、胸闷、咳嗽等症状^[1]。哮喘的诱发因素多种多样,目前遗传和环境因素被认为是哮喘发作的2个主要原因。在过去30年里,哮喘患者的发病率和死亡率在全球范围内显著增加,且全世界范围哮喘分布表现为工业化国家的患病率比低收入和中等收入国家高^[2-3]。由于哮喘反复发作,病理机制不明确,难以根除,严重影响患者的身心健康,对社会造成了巨大的经济负担^[4]。

毛大丁草为菊科植物毛大丁草 *Gerbera piloselloides* (Linn.) Cass 的干燥全草,是贵州省少数民族用药。本属植物主要含有香豆素、氰苷、苯乙酮、苯吡啶喃、萜类、黄酮、聚炔烃、甾醇、有机酸等化合物,具有清热解毒、理气和血、止咳化痰、平喘、抗菌的功效^[5]。据《贵阳民间药草》记载,毛大丁草主要治疗伤风咳嗽、哮喘和肺痈等与肺相关的疾病。现代药理学研究表明,毛大丁草具有止咳化痰、平喘的作用^[6-8],且疗效确切,在医药领域具有很好的应用前景,但是其抗支气管哮喘的疗效及活性部位未见报道。课题组前期通过对卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的支气管哮喘小鼠模型研究发现,毛大丁草50%乙醇总提取物具有抗哮喘的活性,但其有效的活性部位需要进一步的筛选。因此,本实验通过D101大孔吸附树脂吸附毛大丁草总提取物,依次用水、60%乙醇、95%乙醇梯度洗脱,回收各部分洗脱液并蒸干至干燥,得不同部位浓缩提取物,通过OVA诱导的支气管哮喘小鼠模型验证各部分抗哮喘的活性,初步筛选出毛大丁草抗支气管哮喘的有效活性部位,以期为进一步指导其活性化学成分分离及活性物质药效基础研究提供试验基础。

1 材料

1.1 动物

SPF级健康昆明小鼠120只,♀,体质量(20±2)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,实验动物生产许可证:SCXK(湘)2014-0011;动物使用许可证号:SYXK(黔)2018-0001。实验动物被置于12h光照/黑暗循环,18~25℃,相对湿度50%~70%的环境中饲养1周后用于实验研究,自由进食和饮水。所有实验方案研究都得到了贵州医科大学动物伦理委员会的批准。

1.2 仪器与试剂

Nexera-i LC-2040C 3D 高效液相色谱(HPLC)系统(日本岛津),配备四元泵、自动进样器、柱箱、

除气器和光电二极管阵列(PDA)检测器;YLS-8B 小动物雾化仪(济南益延科技发展有限公司);Allegra 64R 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司);680 酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司);IMS-20 全自动雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司);CX41 简易偏光显微镜(日本奥林巴斯公司);明美 MC-50 显微成像系统(广州明美光电技术有限公司);EL204 电子天平[梅特勒-托利多(上海)有限公司];KQ-300DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

木犀草素(中国食品药品检定研究院,批号:111520-200504;纯度:96.1%);熊果苷、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷和异紫花前胡内酯(批号分别为 wkq19031511, wkq19010201, wkq19021413, wkq19013012, wkq19013011, wkq19050804)均购自四川省维克奇生物科技有限公司,纯度均≥98%;异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 和芹菜素-7-O-葡萄糖苷(批号分别为 AF7080124, AF8112193, AF9060921, AF9071402)均购自成都埃法生物科技有限公司,纯度均≥98%;OVA(美国 Sigma 公司,批号:SLCB8249);氢氧化铝佐剂(美国 Thermo Fisher 公司,批号:TE267860);地塞米松(北京索莱宝科技有限公司,批号:SD9530-100 mg);IL-5 和 IgE 试剂盒(深圳子科生物科技有限公司,货号分别为 ZK-M4810, ZK-H1264);D101 大孔树脂(上海蓝季科技发展有限公司,批号:180405);其他试剂均为分析级。

2 方法

2.1 毛大丁草不同提取段的制备

毛大丁草购自贵州省都匀市,经贵州医科大学药学院张旭副教授鉴定为 *Gerbera piloselloides* (Linn.) Cass 干燥全草,药材存放于贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室。将毛大丁草药材粉碎,采用10倍50%乙醇提取3次,每次提取2h,提取液经滤纸过滤,减压回收乙醇,60℃水浴蒸干至干燥,得浓缩总提取物。浸膏加适量水溶解,用D101大孔吸附树脂吸附,依次用水、60%乙醇、95%乙醇梯度洗脱,收集各部分洗脱液并减压回收乙醇,60℃水浴蒸干至干燥,得不同部位浓缩提取物(水洗脱部位收率为12.60%,60%乙醇洗脱部位收率为5.23%,95%乙醇洗脱部位收率为0.13%)。

2.2 溶液的配制

分别精密称取11种对照品适量,置于10mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,分别得熊果苷

1 001.6 mg·L⁻¹、绿原酸 993.7 mg·L⁻¹、新绿原酸 981.8 mg·L⁻¹、隐绿原酸 959.0 mg·L⁻¹、木犀草苷 1 003.6 mg·L⁻¹、异绿原酸 A 980.0 mg·L⁻¹、异绿原酸 B 991.8 mg·L⁻¹、异绿原酸 C 1 009.4 mg·L⁻¹、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷 991.8 mg·L⁻¹、异紫花前胡内酯 976.1 mg·L⁻¹和木犀草素 972.5 mg·L⁻¹的对照品储备液。分别精密量取上述 11 种对照品储备液 1 mL，置同一个 25 mL 量瓶中，加 50%甲醇稀释至刻度，摇匀，得混合对照品溶液，绿原酸 39.748 8 mg·L⁻¹、新绿原酸 39.513 6 mg·L⁻¹、隐绿原酸 39.592 0 mg·L⁻¹、木犀草苷 40.140 8 mg·L⁻¹、异绿原酸 A 39.200 0 mg·L⁻¹、异绿原酸 B 39.670 4 mg·L⁻¹、异绿原酸 C 40.376 0 mg·L⁻¹、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷 39.670 4 mg·L⁻¹、异紫花前胡内酯 39.043 2 mg·L⁻¹、木犀草素 38.901 3 mg·L⁻¹、熊果苷 40.062 4 mg·L⁻¹，然后用 50%甲醇稀释，-20 °C 贮存备用。

2.3 HPLC 色谱条件

色谱柱为 ACE Excel C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)，柱温 40 °C。流动相为 A(乙腈)和 B(0.1%磷酸水溶液)，流速为 1.0 mL·min⁻¹。梯度洗脱：0~6 min, 97.5%→95%B；6~10 min, 95%→90%B；10~30 min, 90%→85%B；30~45 min, 85%→82%B；45~60 min, 82%B；60~70 min, 82%→72%B；70~75 min, 72%→52%B；75~80 min, 52%→0%B。检测波长 280 nm，进样量 10 μL。上述条件分析毛大丁草 50%乙醇提取物及其不同洗脱段。色谱数据处理采用 Labsolutions 软件(5.90 版)。

2.4 分组及给药方法

实验小鼠按随机分组的方法分成正常对照组，哮喘模型组，水段低、中、高剂量组(提取物浓度为 1.26, 2.52, 5.04 g·kg⁻¹)，60%乙醇段低、中、高剂量组(提取物浓度为 0.52, 1.05, 2.09 g·kg⁻¹)，95%乙醇段低、中、高剂量组(提取物浓度为 0.013, 0.026, 0.052 g·kg⁻¹)和地塞米松(浓度为 1 g·kg⁻¹)治疗组。除正常对照组外，其余各组制作小鼠哮喘模型，在实验的 0, 7, 14 d，小鼠通过腹腔内注射 0.1 mL 致敏液(包含 25 μg OVA 和 2 mg 氢氧化铝佐剂)进行致敏，正常对照组小鼠用生理盐水代替，注射方式、注射部位和剂量相同。第 21~26 天，将小鼠放入封闭的喷雾仪中用 20 g·L⁻¹ OVA 溶液进行激发，激发量为 1 mL·min⁻¹，激发时间为 20 min，正常对照组激发时以生理盐水代替激发溶液。第 21 天开始，连续

6 d，雾化前 30 min，各给药治疗组分别灌胃相应的药物。正常对照组灌胃给予同剂量的水。最后 1 次激发 24 h 后进行相关指标的检测。哮喘模型的建立和治疗时间见图 1。

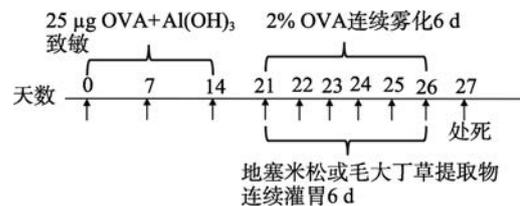


图 1 小鼠支气管哮喘模型的建立

Fig. 1 Establishment of bronchial asthma model in mice

2.5 行为学指标

第 26 天雾化结束后，观察 10 min 内小鼠抓鼻、挠痒及哮喘发作症状等哮喘行为学指标并评分^[9]：无抓鼻或挠痒动作计 0 分，抓鼻或挠痒出现 1~3 次计 1 分，4~6 次计 2 分，≥7 次计 3 分。

2.6 收集血液和肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)

小鼠在末次激发 24 h 后被麻醉。眼眶静脉丛取血，静置后，4 °C 离心(3 000 r·min⁻¹)10 min，分离血清，血清储存在-80 °C 用于 IgE 和 IL-5 水平检测。小鼠取血后麻醉处死，每组随机取 3 只小鼠打开胸腔，气管插管，用预冷(提前放在冰箱 4 °C 冷却)的 PBS 对肺进行支气管肺泡灌洗 2 次，每次 0.5 mL，2 次共回收约 0.8 mL 灌洗液(80%回收率)。灌洗液 2 500 r·min⁻¹、4 °C 离心 5 min，取上清，-80 °C 冻存，用于检测 IL-5。

2.7 IgE 和 IL-5 水平检测

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒测定血清中 IgE、IL-5 和 BALF 中 IL-5 的浓度，操作均按照相应试剂盒说明进行。

2.8 肺组织病理切片制作

将新鲜小鼠肺置于 10%甲醛中固定后切成 0.2~0.5 cm 的薄片，采用 70%~100%乙醇梯度脱水、二甲苯透明处理、石蜡包埋，制成厚约 3 μm 的薄片。二甲苯脱蜡，苏木精-伊红(HE)染色，脱水，透明，干燥，封片，显微镜下观察肺组织切片的病理学变化。具体评分标准如下：0=无浸润；1=肺泡间隔炎性浸润，肺泡间隔未增厚，病变程度<25%；2=炎症浸润明显，肺泡间隔轻度增厚，病变程度 25%~50%；3=炎症浸润明显，肺泡间隔明显增加，病变程度 50%~75%；4=纤维化，病变程度>75%。

2.9 统计学方法

所有数据采用 GraphPad Prism 5、SPSS 22.0 软件进行统计,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析中的 Dunnett's *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HPLC 分析

毛大丁草 50%乙醇提取物水段、60%乙醇段、95%乙醇段的 HPLC 图见图 2。通过对照品溶液和 60%乙醇段色谱图分析,分离出熊果苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷、异绿原酸 C、异紫花前胡内酯和木犀草素这 11 个成分,结果见图 3。

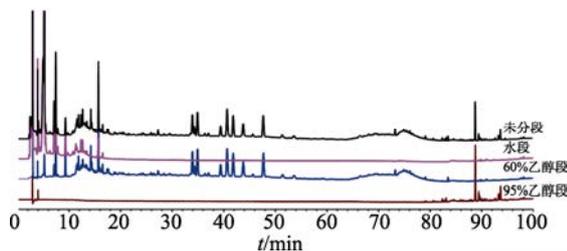


图 2 毛大丁草不同洗脱段色谱图

Fig. 2 Chromatogram of different extraction segments of *G. piloselloides*

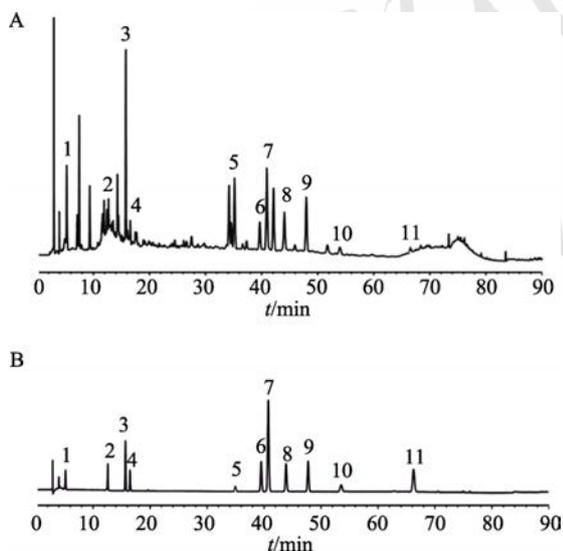


图 3 毛大丁草 60%乙醇段和对照品溶液色谱图

A-60%乙醇段; B-对照品; 1-熊果苷; 2-新绿原酸 A; 3-绿原酸 B; 4-隐绿原酸; 5-木犀草苷; 6-异绿原酸 B; 7-异绿原酸 A; 8-芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷; 9-异绿原酸 C; 10-异紫花前胡内酯; 11-木犀草素。

Fig. 3 Chromatogram of 60% ethanol segment of *G. piloselloides* and reference substance solution

A-60% ethanol segment; B-the reference substance; 1-arbutin; 2-neochlorogenic acid A; 3-chlorogenic acid B; 4-cryptochlorogenic acid; 5-luteoloside; 6-iso-chlorogenic acid B; 7-iso-chlorogenic acid A; 8-apigenin-7-*O*-glucopyranoside; 9-iso-chlorogenic acid C; 10-marmesin; 11-luteolin.

3.2 小鼠哮喘行为学变化

在激发过程中,水段高剂量组死亡 2 只,60%乙醇段高剂量组、95%乙醇段低剂量组和地塞米松治疗组分别死亡 1 只。通过对其行为学评价发现,哮喘模型组行为学综合评分显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)。与哮喘模型组相比,除了 95%乙醇洗脱段中剂量对哮喘症状的改善作用具有显著性差异,其他剂量对哮喘症状的改善虽然没有显著性差异,但是也具有降低的趋势;在毛大丁草 60%乙醇段低、中、高剂量组中,哮喘行为学综合评分显著低于哮喘模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明 60%乙醇洗脱段作用最明显,可能是毛大丁草抗哮喘的主要活性部位。结果见表 1。

表 1 毛大丁草不同洗脱段对小鼠哮喘行为的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of different extraction segments of *G. piloselloides* on the asthmatic behavior in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	综合评分
正常对照组 ($n=10$)	0.20±0.42
哮喘模型组 ($n=10$)	1.20±1.03 ¹⁾
水段低剂量组 ($n=10$)	1.60±0.52
水段中剂量组 ($n=10$)	0.80±0.92
水段高剂量组 ($n=8$)	0.75±0.71
60%乙醇段低剂量组 ($n=10$)	0.30±0.48 ²⁾
60%乙醇段中剂量组 ($n=10$)	0.40±0.52 ²⁾
60%乙醇段高剂量组 ($n=9$)	0.11±0.33 ³⁾
95%乙醇段低剂量组 ($n=9$)	0.89±0.78
95%乙醇段中剂量组 ($n=10$)	0.40±0.52 ²⁾
95%乙醇段高剂量组 ($n=10$)	0.50±0.53
地塞米松治疗组 ($n=9$)	0.56±0.53

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与哮喘模型组比较,²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with asthma model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

3.3 毛大丁草不同洗脱段对血清和 BALF 中 IL-5 和免疫球蛋白 IgE 水平的影响

血液中 IgE 免疫球蛋白产生的增加是过敏性哮喘的一个显著特征。与正常对照组相比,OVA 诱导的小鼠的 OVA 特异性免疫球蛋白 IgE 水平显著升高。与哮喘模型组相比,各组小鼠 IgE 水平有所下降,见图 4。

使用酶联免疫吸附试验进一步评价毛大丁草提取物对 OVA 诱导引起的 Th2 细胞因子 IL-5 在血清和 BALF 中表达水平的影响。与正常对照组相比,在 OVA 刺激后,IL-5 水平显著升高。与哮喘模型组相比,给予 95%乙醇洗脱段、60%乙醇洗脱

段和地塞米松后，血清中细胞因子 IL-5 明显降低 ($P<0.01$)，而在 BALF 中，仅 60%乙醇洗脱段高剂量组，95%乙醇洗脱高剂量组和地塞米松组差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，见图 5~6。

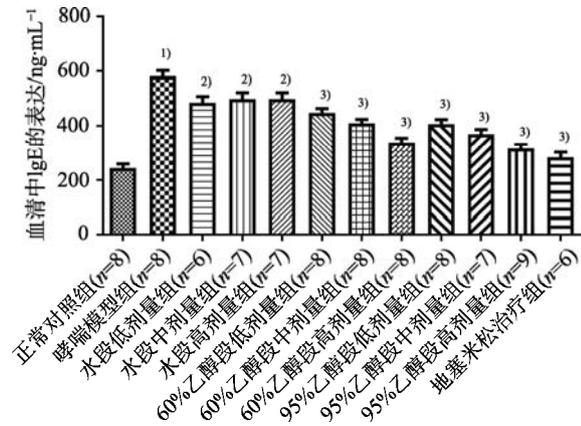


图 4 毛大丁草不同洗脱段对免疫球蛋白 IgE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)
与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与哮喘模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 4 Effects of different elution segments of *G. piloselloides* on the level of immunoglobulin IgE ($\bar{x} \pm s$)
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with asthma model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

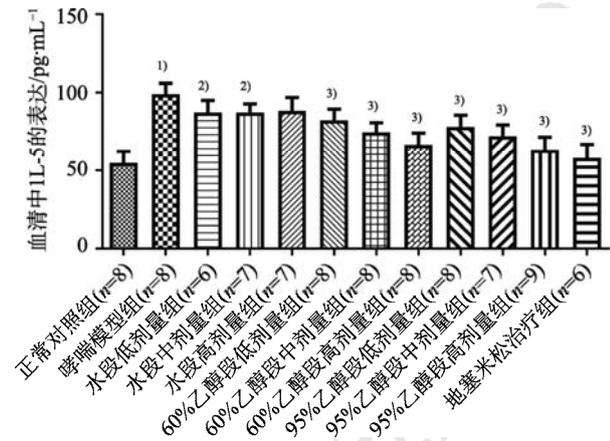


图 5 毛大丁草不同洗脱段对血清中 IL-5 水平的的影响 ($\bar{x} \pm s$)
与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与哮喘模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 5 Effects of different elution segments of *G. piloselloides* on the level of IL-5 in plasma ($\bar{x} \pm s$)
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with asthma model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.4 小鼠肺组织病理变化

由于高剂量改善哮喘的作用最明显，因此采用 HE 染色，通过光学显微镜观察，评估毛大丁草不同洗脱段高剂量组对小鼠肺组织的影响。正常组小鼠肺组织切片可见正常支气管肺泡结构，灶性炎细胞浸润。相比于正常对照组，哮喘模型组的肺组织明显受损，肺泡间隔增厚，血管周围和

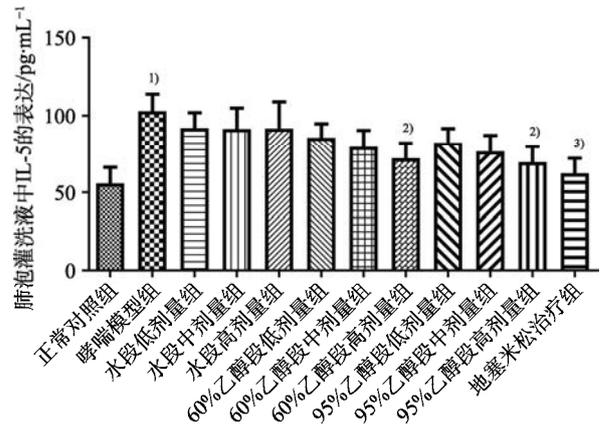


图 6 毛大丁草不同洗脱段对肺泡灌洗液中 IL-5 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与哮喘模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 6 Effects of different elution segments of *G. piloselloides* on the level of IL-5 in BALF ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with asthma model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

支气管细支气管周围见炎症细胞明显浸润。与哮喘模型组相比，毛大丁草 60%洗脱段治疗的小鼠肺泡间隔增厚程度降低，血管周围和支气管细支气管周围炎症细胞浸润显著减少，病理评分结果也显示，60%乙醇洗脱段对肺组织的改善作用最强。结果见图 7。

4 讨论

哮喘已经成为一个全球性的健康问题^[9]。临床治疗哮喘的常用药物包括糖皮质激素、 β -受体激动剂、茶碱类及白三烯受体拮抗剂等，可在一定程度上缓解哮喘症状，但长期或大量服用存在一定的不良反应和局限性，因此寻找一种安全可靠的治疗方法很迫切^[10]。中药作为中国的传统用药，历史悠久，在哮喘的防治过程中具有重要优势，中药及民族药物是新药创制的重要来源。因此，进一步从有效的中药和民族药中筛选出有效部位，明确其主要化学成分，为中药、民族药创新药物的研制提供一定的参考依据，具有重要的科学意义。

毛大丁草作为西南地区少数民族常用药，研究报道其叶醇提物对小鼠具有明显的镇咳、祛痰作用^[6]，其根水煎剂和醇提物对小鼠都具有镇咳、祛痰作用^[7-8]。课题组前期也复制了 OVA 诱导的支气管哮喘模型，并给予毛大丁草 50%乙醇提取物后，显示其具有明显的抗哮喘作用。本研究采用 D101 大孔吸附树脂对 50%乙醇提取毛大丁草总提取物进行不同部位分段，分别采用水、60%乙醇和 95%乙醇进行洗脱分段，制备不同极性的洗脱段，

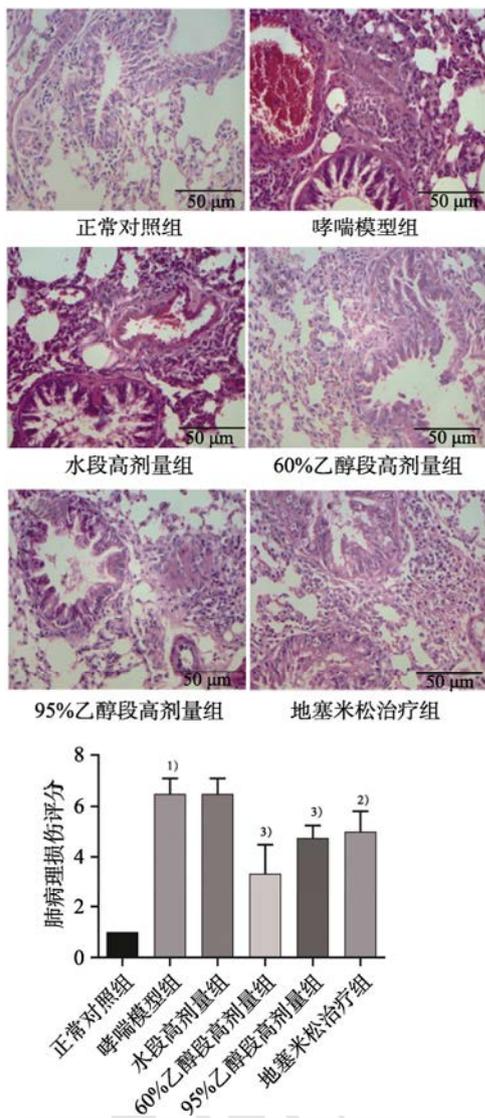


图7 毛大丁草不同洗脱段高剂量对OVA诱导的哮喘小鼠肺组织病理学的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)(HE, 400 \times)
与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与哮喘模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 7 Effects of different elution segments of *G. piloselloides* at high doses on lung histopathology in OVA-induced asthmatic mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)(HE, 400 \times)
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with asthma model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

利用 HPLC 分析各洗脱段的化学成分, 结果显示毛大丁草提取物水段、60%乙醇段和 95%乙醇段之间分段效果较好, 各部分含有的化学成分不相同, 可以作为毛大丁草抗支气管哮喘活性部位筛选的依据。

建立符合人类哮喘疾病特征的动物模型对于研究药物的作用机制和新药开发等至关重要。常用于建立哮喘模型的动物有小鼠、大鼠和豚鼠等, 虽然豚鼠是最早和最经典的哮喘模型动物, 但豚鼠敏感性高, 个体反应差异大, 价格也比小鼠贵,

而小鼠具有免疫遗传背景清楚、建立模型比较稳定、实验成本相对较低的特点, 因此, 近年来, 小鼠成为哮喘动物模型建立过程中较多被选用的动物^[11-12]。OVA 是一种常用的过敏原, 它易获得, 免疫原性较强, 可诱导一种稳定、可重复的过敏性支气管炎, 常与佐剂(氢氧化铝)联合使用产生 Th2 免疫应答^[13], 故本研究选择小鼠建立 OVA 诱导的哮喘模型。

临床上哮喘主要有喘息、咳嗽和哮鸣音等症状, 小鼠不易观察到咳嗽和哮鸣音等症状, 但是 OVA 致敏和激发后小鼠通常表现出呼吸急促、抓耳挠腮、点头状喘息、躁动不安、前肢缩抬等明显的症状^[14], 因此本研究选取抓鼻、挠痒、喘息等容易量化的指标作为哮喘行为学评价标准。研究发现, 哮喘模型组小鼠的哮喘综合评分显著高于正常对照组, 给予毛大丁草不同洗脱部位各剂量组中, 除了水洗脱段低剂量组, 其余各组均对哮喘症状具有一定的改善趋势, 60%乙醇洗脱部位的作用较明显, 提示该部位是毛大丁草抗哮喘的主要活性部位。

过敏性哮喘的发生是体内 Th1/Th2 平衡失调所致^[15]。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF- β 等 I 型细胞因子, 对哮喘有保护作用。Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-13、IL-33、TNF- α 等 II 型细胞因子, 促进抗体的产生, 介导体液免疫应答。IgE 是一种分泌型免疫球蛋白, 是引起 I 型变态反应的主要抗体, 正常情况下 IgE 低表达, 当过敏原进入易感者体内, 会导致大量 IgE 吸附于嗜酸性粒细胞表面, 使机体处于致敏状态, 引起哮喘^[15]。IL-5 是主要的嗜酸性粒细胞特异性生长因子, 能够诱导嗜酸性粒细胞的分化、成熟、激活, 但募集至气道的嗜酸性粒细胞又能分泌 IL-5, 导致气道慢性炎症, 可以看出 IL-5 能加剧嗜酸性粒细胞的不良反应^[16]。由于 IL-5 在促进 IgE 的生成方面发挥重要作用, 可导致肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱蛋白颗粒引起炎症反应, 本研究结果发现, OVA 诱导的小鼠体内 IL-5 和 IgE 的水平显著高于正常组, 而口服给药毛大丁草不同洗脱部位后, 哮喘模型小鼠体内 Th2 相关细胞因子 IL-5 明显降低, 相应地导致特异性免疫球蛋白 IgE 的水平也降低, 其中以 60%乙醇洗脱部位和 95%乙醇洗脱部位更显著, 表明毛大丁草 60%乙醇洗脱部位和 95%乙醇洗脱部位对 Th2 细胞分化具有抑制作用, 能改

善过敏反应症状。

炎症细胞浸润肺组织是哮喘发生、发展的一个重要指标,肺部浸润的炎性细胞以嗜酸性细胞为主,本实验结果也发现哮喘小鼠的肺组织明显受损,给予毛大丁草不同洗脱段后,60%乙醇洗脱部位和95%乙醇洗脱部位的小鼠肺组织受损程度有所减轻,其中60%乙醇洗脱部位效果更好;给予水段小鼠肺组织损伤情况没有改善。这些结果均提示毛大丁草抗支气管哮喘的主要活性部位为60%乙醇洗脱部位。结合HPLC化学成分分析结果,表明在毛大丁草50%乙醇总提取物60%乙醇洗脱部位中主要含酚酸类、黄酮类和香豆素类,这些成分具有明显的抗炎活性,提示绿原酸、木犀草苷、异紫花前胡内酯等这些成分可能是其发挥疗效的主要活性成分。

综上所述,本研究利用OVA诱导的小鼠支气管哮喘模型评价了毛大丁草不同部位样品的生物活性,筛选出毛大丁草抗支气管哮喘的有效部位,为后续的药效物质基础和作用机制研究奠定了坚实的基础,也为毛大丁草的进一步开发利用提供参考数据。

REFERENCES

- [1] LI X H, YAN Y J, LIN C Y, et al. Efficacy of cetirizine combined with budesonide on children with bronchial asthma and its effects on levels of serum TGF- β 1, MCP-1 and SDF-1[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2020, 37(16): 1998-2001.
- [2] SILVEIRA J S, ANTUNES G L, KAIBER D B, et al. Autophagy induces eosinophil extracellular traps formation and allergic airway inflammation in a murine asthma model[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 267-280.
- [3] YANG Q J, YANG C, TONG J B, et al. Clinical medication regularity in treatment of bronchial asthma with Chinese medicinal in recent 30 years: a data mining study[J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*(北京中医药大学学报), 2019, 42(8): 697-704.
- [4] ZHOU L, CHONG M M W, LITTMAN D R. Plasticity of CD4+T cell lineage differentiation[J]. *Immunity*, 2009, 30(5): 646-655.
- [5] ZHANG B X, WANG J J, LEI Q Y, et al. Advance in chemical constituents and pharmacological activities of *Gerbera piloselloides*[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*(南京中医药大学学报), 2019, 35(3): 351-355.
- [6] 遵义医学院药理学组. 毛大丁草镇咳、祛痰作用的实验研究[J]. *医药科技资料*, 1977(1): 31-33.
- [7] LU C F, GUO M X, LIU B, et al. Study on the antitussive and expectorant effect of *Gerbera piloselloides* on mice[J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*(云南中医中药杂志), 2012, 33(10): 57-58, 1.
- [8] GUO M X, HU Y T, LU C F, et al. Effect of *Gerbera piloselloides* decoction on preventing cough, eliminating phlegm and relieving asthma on mice[J]. *J Dali Univ*(大理学院学报), 2013, 12(6): 1-4.
- [9] DALDEGAN M B, TEIXEIRA M M, TALVANI A. Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2005, 38(9): 1359-1365.
- [10] 谭福厚. 低剂量糖皮质激素联合茶碱治疗老年哮喘患者的效果及安全性分析[J]. *临床合理用药杂志*, 2020, 13(32): 46-47.
- [11] TIAN D Y, FU Z, ZHANG Y, et al. A modified method in establishing mouse asthma model[J]. *Chongqing Med Univ*(重庆医科大学学报), 2005, 30(4): 601-603.
- [12] 郑凌霄, 于芬芳, 刘曼曼, 等. 哮喘小鼠动物模型的建立与评价[J]. *热带病与寄生虫学*, 2017, 15(4): 244-247.
- [13] DAUBEUF F, FROSSARD N. Eosinophils and the ovalbumin mouse model of asthma[J]. *Methods Mol Biol*, 2014(1178): 283-293.
- [14] WANG W L, LUO X M, ZHANG Q, et al. *Bifidobacterium infantis* relieves allergic asthma in mice by regulating Th1/Th2[J]. *Med Sci Monit*, 2020(26): e920583.
- [15] 杨潇, 沈金花. 支气管哮喘发病机制的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(64): 34.
- [16] DOLGIN E. Anti-IL-5 biologics carve out severe-asthma niche[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1075-1076.

收稿日期: 2021-08-11
(本文责编: 陈怡心)