

防己水煎液总生物碱对Ⅱ型胶原诱导的大鼠关节炎及其血清中炎症因子的影响

李静, 王蒙, 郭辰, 魏晴, 王秋红, 杨炳友, 匡海学*

(黑龙江中医药大学, 教育部北药基础研究与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**基于防己传统临床用药多为水煎煮,对防己水煎液中总生物碱进行富集,研究其对牛Ⅱ型胶原诱导大鼠关节炎模型(collagen-induced arthritis, CIA)的影响,区别以往对其醇提物的研究,为进一步探索防己水溶性大极性生物碱的抗风湿作用提供依据。**方法:**采用732型阳离子树脂富集防己水煎液中总生物碱。通过足底、尾部、背部皮内注射牛Ⅱ型胶原乳剂,7 d后再加强注射1次,建立CIA大鼠模型。设正常组、模型组、防己水煎液中总生物碱低、中、高剂量组(0.162, 0.324, 0.486 g·kg⁻¹)、雷公藤多苷组(1.5 mg·kg⁻¹)和地塞米松组(10.8 mg·kg⁻¹)分别ig给药,连续给药21 d。观察不同剂量对CIA大鼠关节炎指数、足趾肿胀度的影响,同时测定血清中白介素(IL)-1, IL-1 β , IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,以及观察踝关节组织病理变化。**结果:**与正常组比较,模型组关节炎指数和足趾肿胀度显著升高,血清IL-1, IL-1 β , IL-6和TNF- α 的水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,防己水煎液中总生物碱高、中、低剂量组能够降低关节炎指数和足趾肿胀度,明显降低血清中IL-1, IL-1 β , IL-6和TNF- α 的水平($P < 0.01$),并且减轻滑膜组织的病理损伤。**结论:**防己水煎液总生物碱对于类风湿关节炎有一定的治疗作用,可明显降低血清中炎症因子水平。

[关键词] 防己水煎液; 生物碱; 胶原性关节炎; 酶联免疫吸附试验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0097-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160097

Effects of Total Alkaloid in Water Extraction from Stephaniae Tetrandrae Radix on II Type Collagen-induced Rat Arthritis and Inflammatory Cytokines in Serum LI Jing, WANG Meng, GUO Chen, WEI Qing, WANG Qiu-hong, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue* (Heilongjiang University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Basic and Applied Research in North Medicine, Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of Drug Efficacy Study Material of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of total alkaloids in water extraction from Stephaniae Tetrandrae Radix S. Moore (STRM) on the collagen-induced arthritis (CIA) in order to further explore the anti-rheumatism effects of alkaloidthe water-soluble alkaloids with big polarity. **Method:** The 732 type cation resin was used to enrich total alkaloid in water extraction from STRM. Rat CIA model was established by injection of bovine II collagen type on toes, tail and backside in rats. After 7 days same injection was performed. Alkaloids high, middle, low dose (0.162, 0.324, 0.486 g·kg⁻¹), *Tripterygium wilfordii* glycosides (1.5 mg·kg⁻¹) and dexamethasone (10.8 mg·kg⁻¹) were administrated for 21 days. The arthritis index (AI) and toes swelling degree were observed, the level of interleukin-1 (IL-1), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were assayed and the ankle tissue pathological changes were observed. **Result:** Compared with normal group, AI in model group and toes swelling degree significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, high, middle, low dose group of total alkaloid in water extraction from

[收稿日期] 20141118(008)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531801)

[第一作者] 李静, 硕士, 从事中药药效物质基础研究, E-mail: 18745047200@163.com

[通讯作者] *匡海学, 博士, 教授, Tel: 0451-82193001, E-mail: hxkuang@hotmail.com

STRM could improve AI and toes swelling degree, and significantly decrease the level of IL-1, IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P < 0.01$) in serum, and reduce the pathological synovial tissue damage. **Conclusion:** Total alkaloid in water extraction from STRM has certain therapeutic effect on rheumatoid arthritis, and can significantly decrease the level of inflammatory factors.

[**Key words**] water extraction from *Stephaniae Tetrandrae Radix*; alkaloid; collagen-induced arthritis; enzyme-linked immunosorbent assay

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以炎性滑膜炎为主的全身性慢性自身免疫系统疾病,经常伴有关节滑膜增生、关节软骨、骨组织破坏,严重可导致关节畸形及功能丧失^[1-2]。本文依据匡海学教授提出的“中药一味一性,一药 X 味 Y 性($Y \leq X$)”的中药性味理论新假说和在此基础上进一步提出的与之相应的研究方法,即中药性味可拆分性、可组合性的研究方法,对传统利水中药防己进行性味拆分^[3]。利用 732 型阳离子树脂得到防己水煎液总生物碱,主要为水溶性生物碱,区别于以往研究所围绕的醇提物,能够更客观地反映出临床用药时生物碱类成分对胶原诱导关节炎(CIA)模型作用的影响,从而评价防己水煎液生物碱治疗 RA 的效果。

1 材料

1.1 药物与试剂 防己水煎液总生物碱(黑龙江中医药大学中药化学实验室制备),弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司,批号 038K8726),牛 II 型胶原(美国 Sigma 公司,批号 140034),白介素(IL)-1, IL-1 β , IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(北京城林生物科技有限公司,批号 201407);雷公藤多苷片(黄石飞云制药有限公司,批号 20131001)。醋酸地塞米松片天津(天津柏海药业有限责任公司,批号 130904)。

1.2 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,由黑龙江中医药大学安全评价中心提供,动物合格证号 SCXK(黑)2013-0001。

1.3 仪器 ACS-型电子秤(上海精密科学仪器有限公司),BSA224S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),7140 型爪肿测量仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),TDL-4 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),Victor X3 型酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

2 方法

2.1 牛 II 型胶原诱导关节炎模型制备 将牛 II 型胶原溶解于 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸中,质量浓度为 2 g·L⁻¹ 共 7.5 mL,至 4 ℃ 冰箱中过夜。冰浴中滴加弗

氏完全佐剂(等体积),使之充分乳化,制成含牛 II 型胶原 1 g·L⁻¹ 的乳化剂 15 mL,至 4 ℃ 冰箱保存备用。于大鼠左后足底、尾部、背部皮下注射乳化液 0.1 mL,7 d 后同样方法再加强注射 1 次,正常组同样方法注射 0.1 mL 生理盐水^[4]。

2.2 分组及给药剂量的确定 用关节炎指数(arthritis index, AI)作为标准,判断 CIA 模型造模成功与否。初次免疫后第 10 天将造模成功的大鼠(模型成功率 92.3%, 60/65)随机分为 6 组,每组 10 只。分别为正常组,模型组,防己水煎液总生物碱高、中、低剂量组(0.486, 0.324, 0.162 g·kg⁻¹),雷公藤多苷组(1.5 mg·kg⁻¹),地塞米松组(10.8 mg·kg⁻¹)分别 ig 给药,给药剂量参考 2010 年版《中国药典》折算比例后确定,正常组、模型组给予生理盐水。给药体积均为 10 mL·kg⁻¹,给药时间 21 d。

2.3 评价指标

2.3.1 足跖容积的测量 造模成功后给药前 1 天,测量各组大鼠左后足跖容积及体重,均无统计学差异。在 ig 给药的 21 d 内,分别于 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 d 测量左后足跖容积^[4]。

2.3.2 关节炎指数 评分标准:0 分,正常;1 分,踝关节出现红斑和轻微肿胀;2 分,踝关节到趾关节或掌关节出现红斑和轻微肿胀;3 分,踝关节到跖趾关节或掌关节出现红斑和中度肿胀;4 分,踝关节到趾关节出现红斑和重度肿胀。最大评分为 16 分^[5]。

2.3.3 血清炎症因子测定 ig 给药 21 d 后,大鼠腹主动脉取血分离血清。血清中 IL-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平测定采用酶联免疫吸附试验法(ELISA),具体操作按说明书进行^[6]。

2.3.4 关节组织病理变化 试验结束后,处死大鼠,将左侧踝关节剥除皮肤后放入 10% 甲醛溶液中固定,乙二胺四乙酸二钠脱钙,常规石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下($\times 100$)观察关节滑膜的病理变化^[7]。

2.4 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,采用 t 检验,单因素方差分析方法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CIA 大鼠足跖肿胀度的影响 通过对足跖肿胀度、关节炎指数数据分析,结果表明:注射牛 II 型胶原后出现足红肿明显、体积增大,关节炎指数升高,同时结合给药 21 d 内模型组与正常组比较存在极显著差异($P < 0.01$),进一步说明 CIA 大鼠模型制作成功。经总生物碱高、中、低剂量组灌胃治疗 21 d,分别与模型组比较,在给药 9 d 后,防己总生

物碱高剂量组足跖容积显著降低($P < 0.05$);给药 18 d 后,总生物碱高、中、低剂量组足跖容积和关节炎指数均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),见表 1。

3.2 对 CIA 大鼠血清炎症因子的影响 血清中 IL-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平模型组与正常组相比显著升高($P < 0.01$),防己总生物碱高、中、低剂量组与模型组相比,血清中 IL-1, IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 水平均显著降低($P < 0.01$),见表 2。

表 1 防己总生物碱对 CIA 大鼠足跖容积的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect on CIA rats toes swelling degree of total alkaloids from STRM ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	足跖容积/mL					关节炎指数
		3 d	9 d	15 d	18 d	21 d	
正常	-	1.82 ± 0.12	1.82 ± 0.12	1.84 ± 0.13	1.85 ± 0.12	1.85 ± 0.12	-
模型	-	2.40 ± 0.19 ¹⁾	2.45 ± 0.19 ¹⁾	2.47 ± 0.19 ¹⁾	2.48 ± 0.19 ¹⁾	2.48 ± 0.19 ¹⁾	9.17 ± 0.75
STRM 总生物碱	0.162	2.31 ± 0.20	2.28 ± 0.18	2.26 ± 0.17	2.24 ± 0.16 ²⁾	2.23 ± 0.16 ²⁾	6.33 ± 0.82 ³⁾
	0.324	2.29 ± 0.16	2.25 ± 0.17	2.23 ± 0.15 ²⁾	2.23 ± 0.15 ²⁾	2.22 ± 0.14 ²⁾	6.17 ± 0.69 ³⁾
	0.486	2.30 ± 0.20	2.22 ± 0.16 ²⁾	2.21 ± 0.14 ²⁾	2.20 ± 0.14 ²⁾	2.18 ± 0.12 ³⁾	6.00 ± 0.58 ³⁾
雷公藤多苷	0.001 5	2.32 ± 0.16	2.21 ± 0.14 ²⁾	2.20 ± 0.14 ²⁾	2.18 ± 0.12 ³⁾	2.18 ± 0.12 ³⁾	5.83 ± 0.41 ³⁾
地塞米松	0.010 8	2.28 ± 0.17	2.20 ± 0.14 ²⁾	2.26 ± 0.14 ³⁾	2.15 ± 0.13 ³⁾	2.14 ± 0.13 ³⁾	6.00 ± 0.63 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 防己总生物碱对 CIA 大鼠血清中炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect on inflammatory cytokines of CIA rat in serum of total alkaloids from STRM ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1/ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	22.45 ± 0.01	31.28 ± 0.99	19.31 ± 1.48	25.51 ± 1.55
模型	-	27.74 ± 0.22 ¹⁾	58.23 ± 2.45 ¹⁾	73.13 ± 1.15 ¹⁾	70.57 ± 2.82 ¹⁾
STRM 总生物碱	0.162	25.52 ± 0.57 ³⁾	49.25 ± 3.19 ³⁾	57.74 ± 3.62 ³⁾	59.22 ± 2.03 ³⁾
	0.324	25.02 ± 0.28 ³⁾	45.96 ± 2.49 ³⁾	41.52 ± 2.43 ³⁾	50.10 ± 2.24 ³⁾
	0.486	24.37 ± 0.18 ³⁾	43.11 ± 1.29 ³⁾	32.94 ± 1.06 ³⁾	41.85 ± 3.85 ³⁾
雷公藤多苷	0.001 5	24.64 ± 0.23 ³⁾	41.14 ± 1.81 ³⁾	24.95 ± 1.94 ³⁾	37.89 ± 3.31 ³⁾
地塞米松	0.010 8	24.52 ± 0.34 ³⁾	41.36 ± 2.85 ³⁾	24.25 ± 1.78 ³⁾	37.20 ± 1.73 ³⁾

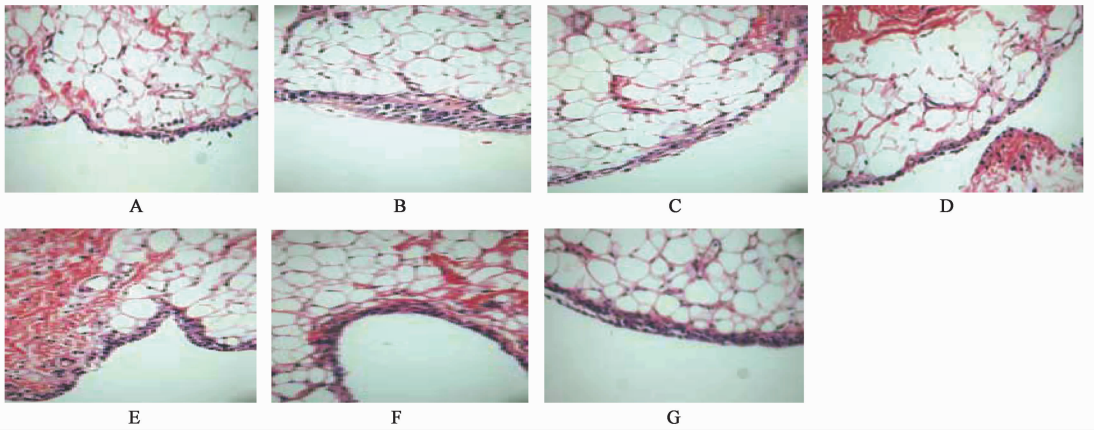
3.3 对 CIA 大鼠关节组织病理改变的影响 正常组滑膜是由一层排列紧密整齐的扁平细胞构成,组织未有增生和炎症症状。与正常组比较,模型组滑膜细胞则多表现为由多层排列紊乱变性的细胞构成,组织出现增生增厚和炎症症状。与模型组比较,总生物碱高、中、低剂量组滑膜细胞增生增厚减轻、炎症症状减弱,见图 1。

成。与 RA 相关的细胞因子众多。其中 IL-1 和 TNF- α 是 RA 致病机制中居中心地位的促炎症细胞因子,参与 RA 发生发展的全过程。IL-6 则主要诱导免疫球蛋白的产生和急性期蛋白的形成,是影响 RA 病程进展的重要细胞因子。同时值得注意的是 IL-1 β ,其为 IL-1 的主要分泌形式,是一种调节蛋白,其在正常生理条件下含量非常低,但是在 RA 疾病状态下,它的含量会显著增高。IL-1 β 在炎症和自身免疫性疾病中发挥着重要作用,特别是在 RA 致病过程中作为介导炎症痛敏,造成软骨损伤的重要细胞因子^[8-10]。

4 讨论

RA 是一种慢性系统性自身免疫性疾病,是危及人类健康的主要疾病之一,严重者可导致关节畸形、强直和功能丧失等严重后果。主要病理特征为关节滑膜炎性细胞浸润,关节滑膜组织增生,血管翳生

风湿在中医论述中类于历节风,多为痹证范畴。《金匱要略·中风历节病脉证并治》又名白虎风、痛



A. 正常组; B. 模型组; C. 雷公藤多苷 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 地塞米松组 $10.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; E. STRM 生物碱 $0.162 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; F. STRM 生物碱 $0.324 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; G. STRM 生物碱 $0.486 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图1 各组 CIA 大鼠关节滑膜组织病理学观察(HE, $\times 100$)

Fig. 1 Histopathologic observation on synovial tissue in CIA rats of each group(HE, $\times 100$)

风,多以风寒湿邪侵袭人体,壅塞经络,凝滞关节,积久化热,气血郁滞所致。早在《千金要方》中就出现临床将防己用于治疗风湿的记载,防己汤:“治风历节,风湿热痹,关节红肿疼痛者”,之后的多篇医书均提及防己的抗风湿作用。

防己味苦性寒,功效利水消肿,祛风止痛^[11],传统用药多为水煎煮。依据匡海学教授提出的“中药性味可拆分性”将防己水煎液总生物碱拆分开来,进行 CIA 大鼠关节炎和血清中 4 种炎症因子研究,探索了防己水煎煮时,所进入药液的水溶性生物碱类成分的治疗作用。本文同时设立了中药阳性对照组和西洋药阳性对照组,实验结果表明防己水煎液总生物碱可明显降低血清中 IL-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平,改善关节炎指数和关节肿胀度,关节组织病理切片亦更为直观的观察到的治疗作用。提示防己水煎液总生物碱具有一定的抗炎作用,对治疗类风湿关节炎有疗效。

[参考文献]

[1] 李宝丽,唐方,庞晓东. II 型胶原诱导关节炎大鼠模型制备[J],中国免疫学杂志,2006,22(4):350-352.
[2] 梁秀军,孙同友. 穿山龙总皂苷对胶原性关节炎大鼠炎症细胞因子的影响[J]. 时珍国医国药,2013,24(3):522-524.

[3] 匡海学,王艳宏,王秋红,等. 基于中药性味可拆分性和可组合性的中药性味理论研究新模式[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2011,13(1):25-29.
[4] 张天齐,玄玲玲,姜仁涛,等. 雷公藤叶组分 TZT-5 对大鼠关节炎的抑制作用[J]. 中草药,2013,44(12):1628-1634.
[5] 魏伟,吴希美. 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:750-751.
[6] Wang J G, Xu W D, Zhai W T, et al. Disorders in angiogenesis and redox pathways are main factors contributing to the progression of rheumatoid arthritis: a comparative proteomics study [J]. Arthritis Rheum, 2012,64(4):993-1004.
[7] 陈华,何晓瑾,徐桂华. 桂枝芍药知母汤对 II 型胶原关节炎大鼠踝关节组织病理改变的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2012,18(5):555-559.
[8] Feldmann M, Brennan F M, Foxwell B M, et al. The role of TNF alpha and IL-1 in the rheumatoid arthritis [J]. Curr Dir Automimmun, 2001, 3:188-199.
[9] Jae-Gyum Jeong. Effect of IL-1 β on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts [J]. BBRC, 2004, 324(1):3-7.
[10] 张文华,江建平. 白介素-1 β 在炎症痛中的作用及其机制[J]. 生命科学,2010,22(3):291-295.
[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:139.

[责任编辑 聂淑琴]