

秦艽醇提物对胶原诱导性关节炎大鼠血清抗-CCP 及 TNF- α 的影响

王钢¹, 王丽琴^{2*}, 王佳¹, 王涛¹, 刘卓²

(1. 甘肃中医学院附属医院风湿骨病科, 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院, 兰州 730000)

【摘要】 目的: 研究大叶秦艽醇提取物对胶原诱导性关节炎大鼠的防治作用, 并初步探讨其作用机制。方法: 随机将 96 只大鼠分为正常组、模型组、白芍组及秦艽组。除正常组外, 余各组用胶原乳液多点皮内注射建立关节炎模型。模型建立后第 9 天开始秦艽组以秦艽乙醇提取物 900 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 白芍组给予白芍总苷胶囊内容物 108 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 模型组给予蒸馏水 0.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃。造模后 14, 21, 28 d 观察各组大鼠一般情况、关节肿胀程度、ELISA 法检测血清抗环瓜氨酸肽 (CCP) 抗体及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平。结果: 模型组大鼠的踝关节及足趾关节肿胀明显且血清中抗-CCP 抗体及 TNF- α 水平明显升高, 秦艽组及白芍组与模型组比较关节肿胀程度明显减轻, 血清中抗-CCP 抗体及 TNF- α 水平明显降低, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 免疫后 28 d 秦艽组与白芍组比较, 大鼠关节肿胀程度明显减轻且 TNF- α 表达降低明显有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 大叶秦艽醇提取物能够在早期抑制胶原诱导性关节炎大鼠血清中抗-CCP 抗体及 TNF- α 水平, 减轻关节肿胀程度, 改善滑膜炎症状, 保护关节, 体现治疗早期类风湿关节炎 (RA) 的优势。

【关键词】 大叶秦艽醇提取物; 胶原诱导性关节炎大鼠; 抗-CCP 抗体; 肿瘤坏死因子- α

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2013)19-0302-04

【doi】 10.11653/syfy2013190302

Effect of Alcohol Extractive from *Gentianae Macrophyllae Radix* on Serum Anti-CCP and TNF- α in Collagen Induced Arthritis Rats

WANG Gang¹, WANG Li-qin^{2*}, WANG Jia¹, WANG Tao¹, LIU Zhuo²

(1. Gansu College of Traditional Chinese Medicine (TCM) Hospital, Rheumatism Bone Disease Families, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

【收稿日期】 20121011(018)

【基金项目】 甘肃省中医药管理局基金项目(GZK-2010-3)

【第一作者】 王钢, 硕士生导师, 主任医师, 从事中医药对骨关节疾病及风湿免疫系统疾病的研究, Tel: 13519317314, E-mail: wanggangyisheng@sina.com

【通讯作者】 * 王丽琴, 在读硕士, 从事中医药对骨关节疾病及风湿免疫系统疾病的研究, Tel: 15002694294, E-mail: wlq6644@163.com

[3] 薛晓彤, 李遼, 赵静. 糖尿病肾病辨证分型与客观指标研究概述[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(12): 923.

[4] 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1239.

[5] 高双荣, 孙翠英, 郑燕飞, 等. 糖肾清对 DN 模型大鼠肾组织形态学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 156.

[6] 王辉, 李伟, 崔书克, 等. 虎杖总蒽醌对糖尿病肾病早期大鼠肾脏的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 17(4): 169.

[7] 李敏州, 高彦彬, 马鸣飞, 等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 344.

[8] 邹琦, 郑祥雄. 雷帕霉素对糖尿病肾病大鼠肾脏保护

作用的实验研究[J]. 福建医药杂志, 2012(5): 39.

[9] 刘月娇, 徐雷雷, 柳东, 等. 海参磷脂型二十碳五烯酸对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肾脏功能改善作用的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 331.

[10] 罗静, 沈慧平, 王韶军, 等. 益气养阴活血通络方对糖尿病肾病大鼠肾脏的作用研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(8): 707.

[11] 于文平, 秦艾琳. 糖尿病肾病的病因病机探讨[J]. 吉林中医药, 1999, 19(5): 49.

[12] 黄波, 刘学政, 庞东渤. 不同途径注射链脲佐菌素致大鼠糖尿病模型的研究[J]. 锦州: 医学院学报, 2003, 24(1): 19.

【责任编辑】 邹晓翠

[Abstract] Objective: To study the effect, of big leaf Gentianae Macrophyllae Radix alcohol extract on serum anti-cyclic citrullinifer peptide (CCP) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in collagen induced arthritis rat control. **Method:** Ninety-six rats were randomly divided into: normal group, model group, Paeoniae Alba Radix and Gentianae Macrophyllae Radix group group. In addition to the normal group, each group was given collagen emulsion multipoint to establish arthritis model. After modelling, corresponding drugs was given on day 14, 21 and 28, the general status, and joint swelling degree were observed. ELISA method was used to detect serum anti-CCP antibody and TNF- α level. **Result:** In model rats, ankle and digits joint swelling was obvious and serum anti-CCP antibody and TNF- α level obviously increased, in Gentianae Macrophyllae Radix group and radix paeoniae alba group, compared with model group ankle joint swelling and toes significantly reduced and serum anti-CCP antibody and TNF- α level decreased obviously, there was a statistical significance ($P < 0.05$); after 28 days in Gentianae Macrophyllae Radix group compared with Paeoniae Alba Radix group, joint swelling of rats significantly reduced and TNF- α reduced obviously ($P < 0.05$). **Conclusion:** The big leaf Gentianae Macrophyllae Radix alcohol extract can decrease in collagen induced arthritis rats serum anti-CCP antibody and TNF- α level, reduce joint swelling degree, and improve the synovial inflammation shape.

[Key words] big leaf Gentianae Macrophyllae Radix alcohol extract; collagen induced arthritis rats; anti-cyclic citrullinifer peptide antibody; tumor necrosis factor- α

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病因未明的慢性、全身性、自身免疫性疾病,属中医“痹证”范畴。其主要特征是进行性和破坏性关节病变,常以双手、腕、肘、膝、踝和足关节受累最为常见,呈对称性。其病变发生在滑膜,累及关节软骨、韧带、肌腱及全身组织,引起关节肿胀疼痛,继而软骨破坏、关节间隙变窄,晚期关节强直、畸形,功能活动障碍,最终致残。我国的患病率约为 0.2% ~ 0.4%^[1],因缺乏特异性治疗,所以致残率高,对患者的生理、心理功能、日常生活等带来不良影响,严重影响患者的生活质量。近年来发现抗环瓜氨酸肽 (CCP) 抗体是诊断 RA 的一项良好血清学指标,对早期 RA 具有很高的特异性和敏感性^[2-4],有助于病情判断和活性检测。

大叶秦艽是龙胆科龙胆属植物大叶秦艽的根,具有抗炎、镇痛等作用,能调节中枢神经系统及免疫系统,广泛用于风湿病、心脑血管疾病、肛肠疾病及皮肤病等的治疗。本实验以胶原诱导性关节炎大鼠 (collagen-induced arthritis, CIA) 为模型^[5],证实大叶秦艽醇提物能够抑制 CIA 大鼠关节破坏,减轻关节肿胀程度,改善滑膜炎症状,保护关节。白芍总苷 (TGP) 是中药白芍根中提取的有效组分,已作为一个免疫调节剂用于 RA 的临床治疗^[6]。

1 材料与方

1.1 动物及分组 SPF 级 SD 大鼠 100 只,雌雄各半,体重 (200 ± 20) g,甘肃中医学院 SPF 动物实验中心,动物合格证号 SCXK (甘) 2011-0001。分为正

常组、模型组、白芍总苷胶囊治疗组、秦艽醇提物治疗组,每组 24 只大鼠。各组再随机分为免疫后 14, 21, 28 d 3 个亚组。

1.2 模型建立 将 100 只大鼠随机分出 24 只作为正常对照组,其余制作 CIA 模型,造模成功后再随机分为模型组、白芍总苷胶囊治疗组 (白芍组)、秦艽醇提物治疗组 (秦艽组),每组 24 只大鼠。

造模方法:牛Ⅱ型胶原蛋白 20 mg 溶于 10 mL 浓度为 0.1 mol·L⁻¹ 的冰乙酸中,4 ℃ 过夜,冰浴下与等体积量弗氏完全佐剂充分乳化 (最终Ⅱ型胶原质量浓度为 1 g·L⁻¹)。造模组大鼠用 10% 水合氯醛 0.003 mL·g⁻¹ 腹腔麻醉,麻醉成功后在大鼠背部、尾根部及右后足趾部多点皮内注射该乳化剂 0.4 mL (6~8 点/只),10 d 后腹腔内注射上述乳剂 0.2 mL 加强免疫。正常组大鼠皮内多点注射等量生理盐水。**1.3 药物及用药方法** 大叶秦艽提取工艺^[7],甘肃中医学院附属医院药剂室,60% 乙醇加热、回流提取 3 次 (每次 1 h),每次加溶剂 6 倍量。再将所得醇提液用旋转蒸发仪回收乙醇且浓缩为每毫升含生药 0.5 g,根据实验大鼠与人的体表面积系数换算,确定大鼠每日服药剂量 900 mg·kg⁻¹·d⁻¹,即 1.9 mL。4 ℃ 冰箱保存备用。

白芍总苷胶囊,规格为 0.3 g (含芍药苷不少于 104 mg),宁波丽华制药有限公司,批号 H20055058,根据实验大鼠与人的体表面积系数换算,确定大鼠每日服药剂量 108 mg·kg⁻¹,取胶囊内容物加蒸馏水 2 mL 配置成混悬液。

用药方法:正常组 普通饲养,自动饮水,不做任何处理;模型组 造模,蒸馏水 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;白芍组:白芍总苷胶囊内容物 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;秦艽组:秦艽醇提物 $1.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃(依据人与动物体表面积换算的等效剂量)。均在造模后第 9 天开始灌胃给药。

1.4 大鼠一般形态及关节肿胀度的观察 造模前后观察大鼠的体重、体毛的色泽改变、神志及活动状态、食量的增减变化及关节红肿情况。并于造模前 1 d 及造模后 7, 14, 21, 28 d 用特制的足趾容积测量仪测量右后足爪的容积,在大鼠足部踝骨关节突出部位划一条线作为标记,放入足容积测量仪装置管内,使水面与踝骨上的标记相平,测量出体积,即为所测大鼠足趾的体积,每只每次测量重复 3 次。观察造模后不同时间大鼠足爪容积的变化,并计算其肿胀度(肿胀度 = 致炎后容积 - 致炎前容积)。

1.5 标本采集及检测 免疫后 14, 21, 28 d 大鼠心脏取血, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$

保存。同时以正常大鼠的血清为对照。ELISA 法检测大鼠血清抗环瓜氨酸肽抗体(抗-CCP 抗体)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平。具体操作严格按试剂盒说明。

2 结果及分析

2.1 一般情况观察 模型组大鼠经胶原乳化剂致敏、加强免疫后,精神状态、饮食情况、活动能力明显降低,免疫 5 d 后肉眼观察,模型大鼠足趾和踝关节开始出现肿胀,7 d 后肿胀明显,并日渐加重,部分大鼠右后足出现足趾变形。造模后 9 d 开始给药,14 d 后白芍组及秦艽组大鼠上述症状明显缓解。

2.2 大鼠后足趾肿胀度的比较 与正常组比较,模型组、白芍组及秦艽组大鼠后足关节肿胀明显,有显著的统计学意义($P < 0.01$),说明造模成功。随着免疫时间的延长,模型组大鼠关节肿胀呈明显递增趋势($P < 0.05$)。给药后 1, 2, 3 周白芍组、秦艽组大鼠关节肿胀减轻,与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 秦艽醇提物对大鼠右后足关节肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 24$)

组别	剂量 $/\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	造模前	7 d	造模后		
				14 d(给药 1 周)	21 d(给药 2 周)	28 d(给药 3 周)
正常	-	0.80 ± 0.07	0.81 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.85 ± 0.05	0.85 ± 0.05
模型	-	0.81 ± 0.06	$1.06 \pm 0.09^{1)}$	$1.19 \pm 0.07^{3)}$	$1.33 \pm 0.14^{3)}$	$1.37 \pm 0.13^{3)}$
白芍	2	0.80 ± 0.08	$1.06 \pm 0.07^{3)}$	$1.07 \pm 0.04^{3)}$	$1.05 \pm 0.03^{3)}$	$1.00 \pm 0.04^{2,3)}$
秦艽	1.9	0.81 ± 0.07	$1.06 \pm 0.08^{2)}$	$1.06 \pm 0.05^{3)}$	$1.04 \pm 0.02^{2)}$	$0.98 \pm 0.03^{2,3)}$

注:与正常组同期比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组同期比较²⁾ $P < 0.05$;与本组前一时点比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

2.3 血清抗-CCP 抗体及 TNF- α 测定 免疫后 14, 21, 28 d 模型组抗-CCP 抗体及 TNF- α 表达逐渐升高,明显高于正常组($P < 0.01$),白芍组及秦艽组与模型组比较出现了下降趋势,具有统计学意义($P < 0.05$),且给药 3 周后秦艽组与白芍组比较 TNF- α 表达降低明显有统计学意义($P < 0.05$)。提示秦艽对胶原诱导性关节炎大鼠血清抗-CCP 抗体及 TNF- α 表达有明显降低作用。见表 2, 3。

表 2 秦艽醇提物对大鼠血清抗-CCP 抗体的影响($\bar{x} \pm s, n = 24$)

组别	剂量 $/\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		
		14 d (给药 1 周)	21 d (给药 2 周)	28 d (给药 3 周)
正常	-	1.08 ± 0.14	1.07 ± 0.41	1.08 ± 0.96
模型	-	$15.40 \pm 3.11^{1)}$	17.04 ± 1.44	18.41 ± 1.03
白芍	2	$12.92 \pm 2.13^{2)}$	$11.93 \pm 1.56^{2)}$	$9.82 \pm 1.10^{2)}$
秦艽	1.9	$12.72 \pm 2.40^{2)}$	$11.84 \pm 1.76^{2)}$	$9.02 \pm 0.91^{2)}$

2.4 大鼠踝关节 X 射线改变 给药 3 周后正常组大鼠 X 射线关节面清晰,骨质结构完整;模型组可见关节软组织肿胀、骨质破坏。秦艽组关节周围软

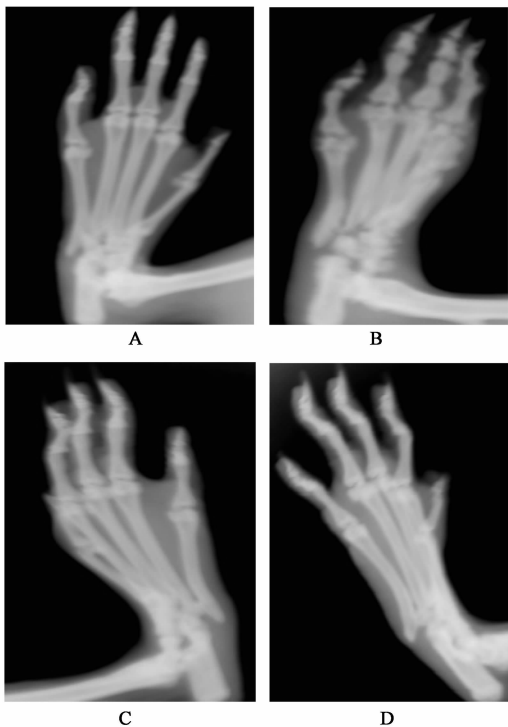
表 3 秦艽醇提物对大鼠血清 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 24$)

组别	剂量 $/\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		
		14 d (给药 1 周)	21 d (给药 2 周)	28 d (给药 3 周)
正常	-	12.94 ± 0.90	12.92 ± 0.68	12.93 ± 0.20
模型	-	$33.31 \pm 4.51^{1)}$	$41.32 \pm 3.25^{1)}$	$45.40 \pm 1.83^{1)}$
白芍	2	$29.63 \pm 2.03^{2)}$	$26.91 \pm 1.16^{2)}$	$19.70 \pm 0.73^{2,3)}$
秦艽	1.9	$29.15 \pm 2.14^{2)}$	$25.85 \pm 1.25^{2)}$	$16.81 \pm 0.84^{2,3)}$

组织肿胀,无骨质疏松、骨质破坏和新骨形成,与白芍组表现无明显差异,秦艽组和白芍组大鼠踝关节 X 射线表现均好于模型组。见图 1。

3 讨论

RA 是一种自身免疫病,它的基本病理改变为关节滑膜慢性炎症形成侵袭性血管翳,破坏软骨、骨与周围组织,慢性炎症是 RA 的显著特征。RA 对人体危害严重,至今未有有效、安全的抗类风湿药物。应用 II 型胶原蛋白混合弗氏佐剂诱导的胶原诱导性



A. 正常组;B. 模型组;C. 白芍组;D. 秦艽组

图1 4组大鼠踝关节X射线改变情况

关节炎模型是研究人类RA的理想模型^[8-9]。该模型除了具有RA的急性病变外,还有一定的慢性病变特征。造模大鼠后肢肿胀于致敏后1周后出现,3周病变最为严重,少数可累及前肢。肿胀可持续3~7周,最终导致关节的僵硬变形。关节病理特征上,也与人类RA相似^[10]。

大叶秦艽是龙胆科龙胆属植物大叶秦艽的根,为1977~2010年版《中国药典》规定的中药秦艽药材来源之一,主要分布分布在甘肃、宁夏、陕西、青海等地区,具有祛风湿、止痹痛、退虚热、清湿热等功效,传统用于风湿痹痛、筋脉拘挛、骨节酸痛、中风手足不遂及骨蒸潮热、小儿疳积、发热、湿热黄疸等病症^[11]。现代研究表明,秦艽主要含有生物碱、环烯醚萜苷、甾醇苷和其他成分。具有抗炎、镇痛、镇静、解热及保肝等作用,能调节中枢神经系统及免疫系统,广泛用于风湿病、心脑血管疾病、肛肠疾病及皮肤病等的治疗。中医临床用其治疗风湿痹证有着悠久的历史和丰富的经验。

以往的研究表明,TNF- α 是RA发病机制中居中心地位的促炎症细胞因子,参与RA的发生发展过程^[12-13]。抗CCP抗体是临床用于诊断早期类风湿关节炎的特异性指标^[2,4]。本研究选用CIA模型,观察了秦艽对模型大鼠关节组织的影响,结果表明,秦艽对于改善实验性关节炎大鼠的一般病变情

况包括精神状态及活动能力有一定的作用,且能够在早期抑制大鼠血清抗-CCP抗体及TNF- α 表达的升高,缓解了关节的肿胀程度,改善滑膜炎症状,抑制CIA大鼠踝关节破坏,保护关节^[5]。说明了藏药大叶秦艽发挥了抗炎、调节免疫的作用,为临床用藏药大叶秦艽治疗RA提供了可靠的实验依据,体现治疗早期RA的优势。

[参考文献]

[1] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4): 265.

[2] Lee A, Beck C, Hall M. Rheumatoid factor and anti-ccp autoantibodies in rheumatoid arthritis a review [J]. Clin Lab Sci, 2008, 21(1): 15.

[3] Nell V, Machold K, Stamm T, et al. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64: 1731.

[4] Suzuki K, Sawada T, Murakami A, et al. High diagnostic performance of elisa detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis [J]. Scand J Rheumatol, 2003, 32: 197.

[5] 刘曦, 邵福灵, 刘爱京. 胶原诱导型关节炎模型大鼠血浆血管内皮生长因子与肿瘤坏死因子 α 表达及反应停的干预效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(14): 26.

[6] 马丽, 李作孝. 白芍总苷的免疫调节功能及其临床应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 16(17): 24.

[7] 白莎, 倪健, 孔慧, 等. 秦艽的提取工艺研究[J]. 中成药, 2005, 27(9): 1074.

[8] 熊国林, 黄海潇, 谢玲. 类风湿性关节炎大鼠模型的制备[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(2): 121.

[9] 王安宇, 梁清华, 李春燕, 等. 胶原诱导性关节炎大鼠滑膜基因表达谱的cDNA微阵列研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2005, 9(1): 31.

[10] NISHIKAWA M, MYOJI A, TOMITA T, et al. Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen activated protein kinase inhibitor FR167653 [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(9): 2670.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 253.

[12] PETROVIC-RACKOV L. Cytokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. Med Pregl, 2005, 58(56): 245.

[13] 屈飞, 崔艳茹, 徐镜. 雷公藤多苷联合来氟米特对佐剂性关节炎大鼠的治疗及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 128.

[责任编辑 邹晓翠]