

黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制

黄明进^{1,2,3*}, 罗春丽¹, 郭刚², 邱德文², 王文全³

(1. 贵州大学农学院, 贵阳 550025; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002;
3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 研究黑骨藤对类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的防治作用及其作用的分子机制。方法: 将 Wister 雄性大鼠 70 只分成 7 组, sc Freund's 完全佐剂(空白组除外)建立佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)动物模型, 观察黑骨藤提取物低、中、高剂量(20, 50, 100 mg·kg⁻¹)对 AA 大鼠足肿胀、体重、器官指数及血清与炎性组织液中白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量水平的影响。结果: 黑骨藤能有效抑制 AA 大鼠足肿胀, 降低胸腺指数, 下调 AA 大鼠血清与炎性组织液中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的含量水平。造模第 12 d 后, 黑骨藤高、中剂量组较模型组大鼠足跖肿胀度有极显著差异($P < 0.01$); 模型组胸腺指数平均为 1.50%, 黑骨藤高剂量组为 1.12%, 两者差异极显著($P < 0.01$); 黑骨藤高剂量组 AA 大鼠血清与炎性组织液中 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 3 项指标与模型组比较差异均显著($P < 0.05$)。结论: 黑骨藤具有良好的抗 RA 作用, 其作用机制可能与调节免疫器官功能及促炎细胞因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的含量水平有关。

[关键词] 黑骨藤; 类风湿性关节炎; 细胞因子; 分子机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0174-04

Effects and Molecular Mechanism of *Periploca forrestii* Against Rheumatoid Arthritis

HUANG Ming-jin^{1,2,3*}, LUO Chun-li¹, GUO Gang², QIU De-wen², WANG Wen-quan³

(1. Agriculture College of Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

3. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-arthritic effects and the possible molecular mechanism of *Periploca forrestii* against rheumatoid arthritis (RA). **Method:** After establishing Freund's adjuvant arthritis (AA) rat model, the *P. forrestii*'s anti-arthritic effects and molecular mechanism against RA were studied through observing the changes of paw swelling, body weight, viscera index and levels of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) after medication. **Result:** *P. forrestii* could effectively inhibits articular swelling, decrease thymus index and regulate down the content of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the serum and inflammatory tissue soak of AA rats. After 12 days, there were significant differences ($P < 0.01$) in paw swelling of AA rat between *P. forrestii* group and model group; the thymus index of model group was 1.50%, and *P. forrestii* group was 1.12%, there were significant difference between the two ($P < 0.01$); the content of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum and inflammatory tissue fluid all reduced in *P. forrestii* group, they were significant ($P < 0.05$) compared with model. **Conclusion:** *P. forrestii* has good anti-arthritic effects and the possible mechanism may be related to its down regulation of IL-1 β , IL-6 and TNF- α .

[Key words] *Periploca forrestii*; rheumatoid arthritis; cytokine; molecular mechanism

[收稿日期] 20100315(004)

[通讯作者] * 黄明进, 中药学博士, 主要研究方向: 中药(民族药)资源及品质评价, Tel: 0851-3855894, E-mail: hmjtem@163.com.

黑骨藤为萝藦科杠柳属植物西南杠柳 *Periploca forrestii* Schltr. 的全株。其味苦、辛,性温,有小毒;有祛风除湿,活血消痈之功;主治风湿痹痛,闭经,乳痈,跌打损伤,骨折等症^[1]。黑骨藤亦为少数民族用药,在《中华本草苗药卷》中收录为苗药,苗族药名为蛙莽塞(贵州黔南州)、锐松怪(贵州铜仁地区)和嘎八又踪(贵州黔东南州)^[2]。以黑骨藤为主的复方制剂在临床上多用于治疗风湿(rheumatism)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等各种痹病,如黑骨藤追风活络胶囊,临床报道其治疗痹病的有效率为91.5%^[3],但关于黑骨藤治疗风湿、类风湿性关节炎等痹证的实验研究尚未见有报道。对此,我们初步开展了一些相关试验,本文将报道黑骨藤对RA的防治作用及其分子免疫机制研究的实验结果。

1 材料

1.1 动物 Wister大鼠,70只,雄性,体重160~200g,清洁级,由解放军军事医学科学院动物中心提供,生产许可证号SCXK(军)2002-001。

1.2 试药 黑骨藤(由贵阳中医学院刘芄教授鉴定为西南杠柳 *Periploca forrestii* Schltr. 的全株)60%乙醇提取物,提取率32.1%。用蒸馏水溶解(加表面活性剂增容);雷公藤多苷片(黄石飞云制药有限公司,批号040701),人日用量为1~1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹,按人60kg体重折算为小鼠等效剂量,用蒸馏水配制;地塞米松(天津天药药业股份有限公司,批号20050102,规格0.75 mg/片),人日用量为0.75~3.00 mg·d⁻¹,按人60kg体重折算为小鼠等效剂量,用蒸馏水配制。

1.3 仪器与试剂 γ 放射免疫计数器(GC-1200,上海),半自动生化仪(EOS880,意大利),低速冷冻离心机(KDL-2044),低温冰箱(DW-FL90),1/万电子分析天平,旋涡混合器(XH-B型),大鼠足容积测量仪(自制)。Freund's完全佐剂(Sigma公司生产,批号076K8905),大鼠白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白介素-6(interleukin 6, IL-6)及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)定量试剂盒(Sigma公司生产,批号分别063k8530, 060813, S20063093)。

2 方法

2.1 动物分组 Wister大鼠70只,随机分为7组,即空白对照组、模型组、地塞米松组、雷公藤多苷片组、黑骨藤醇提取物(高、中、低剂量)组,每组各

10只。

2.2 造模与给药 类风湿性关节炎(AA)大鼠模型的制作,参照文献[4]方法,除空白组外,其余各组大鼠左后足趾sc Freund's完全佐剂0.1 mL,诱导AA大鼠模型。ig给药,按成人体重(60 kg)折算,地塞米松0.125 mg·kg⁻¹(相当于人体用量的10倍);雷公藤多苷片10 mg·kg⁻¹(相当于人体用量的10倍);黑骨藤醇提取物ig高、中、低剂量分别为100, 50, 20 mg·kg⁻¹;正常组和模型组ig等体积的生理盐水,以上各组给药体积相等。造模前连续给药3 d,每天1次,造模后每天给药2次,连续给药21 d。

2.3 足肿胀度的测量 用自制的大鼠足容积测量仪测定足肿胀,分别于造模后第4, 8, 12, 16, 21天测量左足容积,记录结果,计算足肿胀度。

$$S = (BV - AV) / AV \times 100\%$$

S为足肿胀度%, BV为注射佐剂后的容积, AV为注射佐剂前的容积

2.4 大鼠体重的测定 造模前测定大鼠体重(电子天平称重),记录结果,于佐剂免疫后每隔5 d称重1次,记录结果,统计各组大鼠体重变化。

2.5 大鼠脏器指数测算 最后1次给药后,处死大鼠,称体重,取出胸腺、肾上腺、肾、脾等脏器,用电子天平称质量,记录结果,计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{脏器湿质量}}{\text{体重}} \times 100\%$$

2.6 血清和组织液中IL-1 β , IL-6, TNF- α 的含量测定 血清的制备,造模第21天,末次给药1 h后,股动脉取血,放置,离心,取上清液,在-20℃下保存待测;关节液的提取,处死大鼠后,在致炎侧关节上方0.5 cm处取出肿胀部分,纵向切开,放入5 mL生理盐水的试管中4℃浸泡过夜,离心,取上清液,在-20℃下保存待测。IL-1 β , IL-6和TNF- α 的含量采用放免法(RIA Kit)测定,按照试剂盒说明书操作。

2.7 数据统计方法 采用Office Excel 2003软件进行数据统计。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用t检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对AA大鼠足肿胀度的影响 结果见表1。注射佐剂后,模型组AA大鼠足肿胀逐渐增加,于造模后第12天到达高峰,之后开始下降,与空白对照组比较有显著差异($P < 0.01$)。地塞米松组、雷公藤多苷片组和黑骨藤各剂量组与模型组比较差异显著($P < 0.05$),但黑骨藤组与雷公藤多苷组的差异不

表 1 黑骨藤对造模后大鼠足跖肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肿胀度/%				
		第 4 天	第 8 天	第 12 天	第 16 天	第 21 天
空白对照	-	0.045 ± 0.017	0.110 ± 0.064	0.160 ± 0.082	0.224 ± 0.098	0.250 ± 0.108
模型对照	-	1.138 ± 0.210 ³⁾	1.068 ± 0.201 ³⁾	1.208 ± 0.200 ³⁾	1.098 ± 0.204 ³⁾	1.130 ± 0.186 ³⁾
地塞米松	0.125	0.789 ± 0.230 ²⁾	0.681 ± 0.238 ²⁾	0.791 ± 0.217 ²⁾	0.682 ± 0.220 ²⁾	0.520 ± 0.224 ²⁾
雷公藤多苷	10.00	1.092 ± 0.086	0.906 ± 0.086 ¹⁾	0.794 ± 0.103 ²⁾	0.701 ± 0.109 ²⁾	0.640 ± 0.202 ²⁾
黑骨藤	100.00	0.986 ± 0.082 ¹⁾	0.802 ± 0.096 ²⁾	0.803 ± 0.102 ²⁾	0.760 ± 0.109 ²⁾	0.604 ± 0.192 ²⁾
	50.00	1.034 ± 0.168	0.846 ± 0.166 ¹⁾	0.869 ± 0.174 ²⁾	0.788 ± 0.134 ²⁾	0.643 ± 0.185 ²⁾
	20.00	1.108 ± 0.194	1.061 ± 0.180	0.948 ± 0.198 ²⁾	0.898 ± 0.186 ²⁾	0.850 ± 0.286 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与空白组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

显著,而较地塞米松组有显著差异($P < 0.05$)。

3.2 对 AA 大鼠体重的影响 从表 2 可知,模型组和地塞米松组于注射佐剂第 8 天后与空白组大鼠体重对照,差异极显著($P < 0.01$),注射佐剂后大鼠的体重发生了变化,先正常生长,后体重开始下降,第

15 天体重下降到最低,第 21 天体重又开始增加,地塞米松组体重变化极其显著;雷公藤多苷组、黑骨藤各剂量组与模型组大鼠体重比较,于第 8 天后有显著差异,且各组大鼠的活动、进食正常,体重增加,较空白组没有显著性差异。

表 2 黑骨藤对 AA 大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 2 天	第 8 天	第 15 天	第 21 天
空白对照	-	176.2 ± 4.20	241.2 ± 7.30	251.1 ± 9.38	276.9 ± 11.33
模型对照	-	172.0 ± 5.60	229.6 ± 8.65 ³⁾	203.3 ± 10.20 ³⁾	232.5 ± 12.10 ³⁾
地塞米松	0.125	173.1 ± 4.20	170.6 ± 3.50 ^{2,3)}	154.6 ± 5.10 ^{2,3)}	181.2 ± 7.60 ^{2,3)}
雷公藤多苷	10.00	179.5 ± 6.70	238.8 ± 9.32 ¹⁾	246.2 ± 8.87 ²⁾	258.1 ± 9.86 ^{2,3)}
黑骨藤	100.00	172.4 ± 5.80	240.4 ± 10.02 ¹⁾	248.3 ± 9.32 ²⁾	268.1 ± 11.8 ²⁾
	50.00	170.5 ± 6.45	243.5 ± 11.38 ²⁾	252.3 ± 8.76 ²⁾	279.4 ± 13.62 ²⁾
	20.00	176.4 ± 6.00	248.7 ± 13.4 ²⁾	254.8 ± 10.58 ²⁾	284.8 ± 12.08 ²⁾

3.3 对 AA 大鼠各脏器指数的影响 从表 3 可知,地塞米松对胸腺、肾上腺有显著抑制作用,较模型组差异极显著($P < 0.01$),胸腺出现极度萎缩;黑骨藤

大、中剂量组也能降低胸腺指数,与模型组比较有显著差异($P < 0.01$),但不及地塞米松组,而雷公藤多苷片和黑骨藤组的肾脏、脾脏指数较空白组高。

表 3 黑骨藤对 AA 大鼠各脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	脏器指数/%			
		胸腺	肾上腺	肾脏	脾脏
空白对照	-	1.39 ± 0.22	0.12 ± 0.027	5.97 ± 0.34	2.51 ± 0.37
模型对照	-	1.50 ± 0.19	0.16 ± 0.038	6.89 ± 0.35 ³⁾	3.14 ± 0.25 ³⁾
地塞米松	0.125	0.23 ± 0.12 ^{2,3)}	0.15 ± 0.019	11.16 ± 0.80 ^{2,3)}	1.41 ± 0.16 ^{2,3)}
雷公藤多苷	10.00	1.61 ± 0.46	0.19 ± 0.052 ³⁾	7.55 ± 0.62 ^{2,3)}	2.86 ± 0.41
黑骨藤	100.00	1.12 ± 0.13 ^{2,3)}	0.20 ± 0.037 ^{1,3)}	8.03 ± 0.78 ^{2,3)}	2.78 ± 0.31 ¹⁾
	50.00	1.35 ± 0.25 ²⁾	0.18 ± 0.126	7.94 ± 0.50 ^{2,3)}	2.97 ± 0.22 ³⁾
	20.00	1.47 ± 0.28	0.17 ± 0.073	7.71 ± 0.39 ^{2,3)}	3.14 ± 0.28 ³⁾

3.4 对 AA 大鼠血清组织液中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 含量的影响 从表 4 可见,地塞米松降低了 AA 大鼠血清和组织液中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的含量水平,与模型组比较有极显著差异($P < 0.01$);雷公藤多苷片组、黑骨藤高剂量和中剂量组与模型组比较也

有显著性差异($P < 0.05$),表明雷公藤多苷与黑骨藤高、中剂量也均有不同程度的降低血清和组织液中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的含量水平,但雷公藤多苷与黑骨藤组之间的差异没有显著性。

表4 黑骨藤对AA大鼠血清和组织液中IL-1 β ,IL-6,TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血清			组织液		
		IL-1 β / μ g·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF- α / μ g·L ⁻¹	IL-1 β / μ g·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF- α / μ g·L ⁻¹
空白对照	-	0.459 \pm 0.147	125.62 \pm 24.29	0.411 \pm 0.086	0.260 \pm 0.151	105.59 \pm 20.31	0.210 \pm 0.084
模型对照	-	0.838 \pm 0.203 ³⁾	221.52 \pm 67.04 ³⁾	0.738 \pm 0.325 ³⁾	0.640 \pm 0.197 ³⁾	201.48 \pm 63.10 ³⁾	0.548 \pm 0.315 ³⁾
地塞米松	0.125	0.528 \pm 0.175 ²⁾	154.31 \pm 33.16 ¹⁾	0.409 \pm 0.141 ²⁾	0.326 \pm 0.169 ²⁾	134.29 \pm 30.21 ²⁾	0.216 \pm 0.121 ²⁾
雷公藤多苷	10.00	0.638 \pm 0.194 ¹⁾	162.73 \pm 49.12 ¹⁾	0.486 \pm 0.118 ¹⁾	0.434 \pm 0.192 ¹⁾	142.72 \pm 45.15 ¹⁾	0.285 \pm 0.118 ¹⁾
黑骨藤	100.00	0.621 \pm 0.171 ¹⁾	154.69 \pm 41.71 ¹⁾	0.429 \pm 0.132 ¹⁾	0.420 \pm 0.168 ¹⁾	134.71 \pm 37.57 ¹⁾	0.231 \pm 0.129 ²⁾
	50.00	0.651 \pm 0.181 ¹⁾	171.49 \pm 56.08	0.436 \pm 0.156 ¹⁾	0.449 \pm 0.180 ¹⁾	151.52 \pm 52.08	0.237 \pm 0.148 ¹⁾
	20.00	0.755 \pm 0.184	204.11 \pm 57.70	0.721 \pm 0.239	0.560 \pm 0.186	185.16 \pm 48.97	0.519 \pm 0.243

4 讨论

RA是一种严重影响人类健康的慢性自身免疫性疾病。AA大鼠的关节组织病理学及血中变化与人的RA相似,为一种典型的免疫性炎症模型,是筛选和研究治疗RA药物常用的模型之一。雷公藤多苷片是一类用于治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的中成药制剂,具有较强的抗炎及免疫抑制作用,它能拮抗和抑制炎症介质的释放及实验性炎症及关节炎的反应程度,抑制IL-1的分泌^[5-6],故本试验选取该制剂作为中药阳性对照药物。

模型组注射佐剂后,足肿胀开始持续增加,关节结变大,说明已成功造模;黑骨藤各剂量组的AA大鼠进食情况较好,表现较活跃,一周后足肿胀得到了不同程度的减轻,这初步证明了黑骨藤对RA具有一定的防治作用,并呈现量效关系。胸腺、脾脏等是机体主要的免疫器官,其相对质量的变化,即脏器指数,在免疫评价中占有重要地位,它们是反映动物机体免疫功能的最基本和最常规的指标之一,已被广泛用于评价机体的免疫状态,该实验研究结果认为黑骨藤能显著降低胸腺指数,提高肾脏、脾脏指数,提示黑骨藤可能通过调节免疫器官功能来提高抗类风湿性关节炎作用能力,其作用与雷公藤多苷没有显著性差异,但不及地塞米松,地塞米松对AA大鼠的体重有较大的影响,在第15d,体重降到最小,胸腺极度萎缩,表现出较强的免疫抑制作用。同时,在实验中也观察到了黑骨藤大剂量组AA大鼠的肾、肝脏出现异常肿大现象,提示黑骨藤可能具有肝肾毒性作用,今后将进一步做毒性实验研究证明。

IL-1 β ,IL-6和TNF- α 细胞因子在类风湿性关节炎患者中大量存在,它们共同参与了炎症、免疫反应,其作用广泛,在形成RA的炎症、黏附、新生血管

生成过程中起着重要作用,因此,抑制这些炎症介质的产生,对减轻炎症反应、改善RA患者症状有重要意义^[7]。该实验结果初步证明了黑骨藤能有效降低AA大鼠血清、组织液中IL-1 β ,IL-6和TNF- α 含量水平,提示黑骨藤可能通过调节机体免疫器官的功能,降低促炎细胞因子的产生,从而减轻AA大鼠足肿胀炎症反应来发挥抗RA的作用。

该研究结果为黑骨藤用于治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病提供了实验依据,同时证实了在抗炎和免疫抑制方面,黑骨藤是一味具有开发利用情景的民族药。

[参考文献]

- [1] 中华本草编委会. 中华本草. 第6卷[M]. 上海:上海科技出版社,1999:379.
- [2] 邱德文,杜江. 中华本草. 苗药卷[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:457.
- [3] 王和鸣,葛继荣,陈治英. 黑骨藤追风活络胶囊治疗痹病的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,1999,7(2):12.
- [4] 刘建文. 药理实验方法学——新技术与新方法[M]. 北京:化学工业出版社,2003:6.
- [5] 潘华新,王培训,周联,等. 两种雷公藤多苷片抗炎及免疫抑制作用的对比研究[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(3):306
- [6] 郑晓娟,刘霞. 不同剂量的雷公藤多苷片在预防过敏性紫癜肾损害方面的疗效比较[J]. 世界中西医结合杂志,2009,4(3):205
- [7] 李晓玉,李俊. 免疫药理学新论[M]. 北京:人民卫生出版社,2004,20.

[责任编辑 聂淑琴]