

黔棘茎橐木对佐剂性关节炎大鼠治疗作用及机制探讨

乔为平^{1*}, 乔晓彧², 隋艳华¹, 莫艳珠¹, 蔡晓青¹

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 重庆医科大学, 重庆 400016)

[摘要] 目的: 观察黔棘茎橐木对佐剂性关节炎(AA)大鼠的作用, 并探讨其作用机制。方法: 设正常对照组、模型对照组、阳性药对照组(雷公藤多苷 12 mg·kg⁻¹)、黔棘茎橐木高、中、低剂量组(剂量分别为 3.5, 1.75, 0.88 g·kg⁻¹); 除正常对照组外, 其余各组均采用弗氏完全佐剂足跖 sc 复制 AA 模型; 各组于造模当天 ig 给药, 连续 35 d; 观察该药对 AA 大鼠原发性和继发性踝关节足肿胀及病理形态学影响; 采用硝酸还原法检测各组血清中一氧化氮(NO)含量; 放免法检测各组血清中白介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。结果: 与模型组比较, 黔棘茎橐木高剂量组可抑制 AA 大鼠继发性关节肿胀, 抑制效果随剂量(中、低剂量组)降低而减轻。黔棘茎橐木高剂量组能显著降低 AA 大鼠血清中 IL-1 含量; 高、中剂量组显著降低 AA 大鼠血清中 TNF- α μ g·L⁻¹ 含量; 高、中、低剂量组显著降低 AA 大鼠血清中 NO μ mol·L⁻¹ 含量。病理学观察, 黔棘茎橐木高剂量组大鼠踝关节炎细胞明显减少, 滑膜组织细胞及成纤维细胞增生不明显, 关节软骨破坏较少。结论: 高剂量的黔棘茎橐木可以通过抑制炎症细胞因子, 从而实现对 AA 大鼠的治疗作用。

[关键词] 黔棘茎橐木; 佐剂性关节炎; 一氧化氮; 白介素-1 β ; 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(2011)10-0165-04

Effects of *Aralia echinocaulis* in Guizhou on Adjuvant Arthritis in Rats and Related Mechanism

QIAO Wei-ping^{1*}, QIAO Xiao-Yu², SUI Yan-hua¹, MO Yan-zhu¹, CAI Xiao-qing¹

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

2. Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of *Aralia echinocaulis* Hand-Mazz in Guizhou on adjuvant arthritis in rats and discuss the mechanism. **Method:** Rats were divided into normal control group, model group, positive drug group (tripterygium wilfordii 12 mg·kg⁻¹), *A. echinocaulis* high dosage group, middle dosage group, low dosage group (the dosage 3.5, 1.75, 0.88 g·kg⁻¹) randomly, all rats were made into ovalbumin adjuvant-induced arthritis model in Freund's adjuvant (FCA) except the normal group. The according treatments were given by oral gavage for each group starting from the modeling day, then continuously for 35 days. The effect on rats' primary and secondary adjuvant-induced arthritis were observed. Nitric oxide (NO) content in serum was detected by nitrate reductase method and the interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured with radioimmunoassay (RIA). **Result:** *A. echinocaulis* had obvious inhibition on rats' ankle adjuvant-induced arthritis, the inhibitory effect was decreased with the alleviation of the amount of dosage (middle dosage group, low dosage group). The *A. echinocaulis* high dosage group could decrease the IL-1 level in rat serum significantly. The high and middle dosage group could decrease the TNF- α level significantly. The high, middle and low dosage group could

[收稿日期] 20101123(010)

[基金项目] 贵阳市科学技术计划项目([2009]筑科农合同字第 80009 号); 贵州省卫生厅科学技术基金项目: 黔棘茎橐木对 AA 大鼠 IL-1、TNF- α 影响及机制研究

[通讯作者] * 乔为平, 大学本科, 副主任药师(高级实验师), 研究方向: 中药药理, Tel: 13765171759, E-mail: qxy1989030775885@sina.com

decrease the NO level significantly. From the pathological observation, the rat ankle joint inflammatory cells in *A. echinocaulis* high dosage group decreased obviously, the synovial membrane tissue cells and the fibroblast cells did not increase obviously, the articular cartilages got few failure. **Conclusion:** The high dosage *A. echinocaulis* is effective in the treatment of AA rats by inhibiting the inflammatory cytokines.

[Key words] *Aralia echinocaulis*; adjuvant arthritis; nitric oxide; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以多对称性关节炎为主要临床表现的全身性自身免疫性疾病, 病因不明, 临床表现复杂多样^[1]。佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠的病理表现及免疫学指标与 RA 有许多相似之处, 是研究 RA 及筛选评价抗炎免疫药物的较理想动物模型之一^[2]。目前对 RA 的治疗常采用非甾体类抗炎药、皮质激素、免疫抑制剂及中药雷公藤等, 由于上述药物存在一定的毒副作用, 使临床应用受限制^[3]。

棘茎橐木具祛风除湿、活血止痛、舒筋活络之功效, 我省土家族民间常用来治疗风湿痹痛、腰膝酸软等, 具较好疗效。近年来对橐木属植物药理研究报道逐渐增多, 但主要集中于辽东橐木、太白橐木及黄毛橐木等少数几个品种^[4]。有关黔棘茎橐木的药理作用目前未见报道。本实验首次对黔棘茎橐木对佐剂性关节炎 (AA) 大鼠的相关机制作出评价, 并对其作用机制进行探讨。

1 材料

1.1 药物 黔棘茎橐木由我院生药室副主任药师付志明鉴定为五加科植物棘茎橐木 *Aralia echinocaulis* Hand. -Mazz 根皮。水煎液制备: 黔棘茎橐木根皮加 10 倍水, 煎煮 2 h, 残渣再加 5 倍量水煎煮 1 h, 合并煎液后过滤, 浓缩成含生药 1 g·mL⁻¹ 的煎液, 4℃ 保存。雷公藤多苷片: 上海复旦复华药业有限公司, 批号 20090524。

1.2 动物 Wistar 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 180~200 g, 由贵州贵阳医学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(黔)2002-0001。

1.3 试剂 弗氏完全佐剂, 美国 Sigma 公司生产。¹²⁵I TNF- α , 批号 0090106; ¹²⁵I IL-1 β , 批号 20090909 放免试剂盒均购至解放军总医院科技开发中心放免研究所。NO 酶法检测试剂盒, 批号 20090516, 南京建成科技有限公司。

1.4 仪器 CG-1200 γ 放射计数器, 中国科大创新股份有限公司; 721 可见分光光度计, 上海精密仪器仪表有限公司; MDF-392 超低温冰箱, 日本三洋有限

公司; 台式高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; ALC-210.3 电子天平, 北京艾科勒有限公司; Olympus-BX50 显微镜, 日本; 游标卡尺, 0~200 mm, 上海测绘仪器厂。

2 方法

2.1 动物分组 Wistar 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 (180 \pm 20) g, 随机分为正常对照组、AA 模型组、阳性药对照组 (雷公藤多苷片 12 mg·kg⁻¹)、黔棘茎橐木高、中、低剂量组 (剂量分别为 3.5, 1.75, 0.88 g·kg⁻¹), 依据文献[5]分别为临床 60 kg 成人剂量的 14, 7, 3.5 倍; 每组 10 只, 单性别分笼喂养。

2.2 模型制备 除正常对照组外, 其余各组大鼠均左后足跖 sc 弗氏完全佐剂 0.1 mL 复制 AA 模型。致炎当天各组鼠 ig 给药, 正常对照组和模型对照组予 10 mL·kg⁻¹ 蒸馏水, 1 次/d, 连续 35 d。

2.3 观察指标 AA 大鼠原发性 (急性) 炎症期反应: 于造模后 1, 2, 3, 4, 5 d 每天上午 8:00 用游标卡尺测量各大鼠左足踝周径 (mm) 并观察各组大鼠左足部红、肿、热、痛 (左足不落地、倦缩) 急性炎症症状; AA 大鼠继发性 (免疫性) 炎症期反应: 于造模后第 7 d 开始每周分别测量各 AA 大鼠左右踝关节周径及正常对照组大鼠踝关节周径, 以此作为正常对照。实验第 35 d, 各组大鼠禁食不禁饮 12 h, 分别称各组大鼠体重后, 股静脉放血处死动物, 收集血液, 分离血清, 采用硝酸还原法检测各组血清中 NO (μ mol·L⁻¹) 含量; 放免法检测各组血清中 IL-1 β 和 TNF- α (μ g·L⁻¹) 含量。

2.4 病理学观察 大鼠处死后立即取致炎足踝关节, 10% 的福尔马林固定后进行脱钙, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下进行组织形态学观察。

2.5 数据统计方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 黔棘茎橐木对 AA 大鼠原发性关节肿胀度的影响 造模后 6 h 大鼠左踝关节即出现红、肿、热等

急性炎症表现,3~5 d 达高峰;7 d 后炎症逐渐减轻,其他肢体渐出现继发性关节肿胀并进行性加重,28

d 后逐渐恢复。造模后 1~5 d 黔棘茎楸木各剂量组 AA 大鼠的踝关节周径有下降趋势,结果见表 1。

表 1 黔棘茎楸木对 AA 大鼠原发性关节肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 正常/mm | 左踝关节周长/mm | | | | |
|-------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d |
| 正常对照 | - | 25.1 ± 1.20 | 25.1 ± 1.20 ²⁾ | 25.3 ± 0.82 ²⁾ | 25.6 ± 0.52 ²⁾ | 25.6 ± 0.52 ²⁾ | 25.7 ± 0.48 ²⁾ |
| 模型对照 | - | 25.5 ± 0.71 | 34.8 ± 0.92 | 35.0 ± 1.05 | 35.5 ± 0.53 | 35.4 ± 1.35 | 35.8 ± 1.48 |
| 雷公藤多苷 | 0.012 | 25.4 ± 0.52 | 33.2 ± 1.81 ²⁾ | 34.2 ± 1.62 | 35.4 ± 0.70 | 35.1 ± 1.37 | 35.3 ± 1.06 |
| 黔棘茎楸木 | 3.5 | 25.6 ± 0.52 | 33.9 ± 1.37 ¹⁾ | 33.8 ± 1.48 ²⁾ | 34.3 ± 1.95 ²⁾ | 34.4 ± 1.08 | 34.2 ± 1.62 ²⁾ |
| | 1.75 | 25.6 ± 0.52 | 33.3 ± 2.89 ²⁾ | 33.8 ± 1.32 ²⁾ | 35.2 ± 1.69 | 34.8 ± 1.32 | 34.9 ± 1.20 ¹⁾ |
| | 0.88 | 25.5 ± 0.53 | 35.0 ± 0.94 | 35.2 ± 1.05 | 35.2 ± 1.03 | 34.8 ± 1.32 | 34.9 ± 1.37 ¹⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01(表 2~3 同)。

3.2 黔棘茎楸木对 AA 大鼠继发性关节肿胀度的影响 造模后第 7~28 d 为 AA 大鼠继发性炎症反应的阶段。在 14,21 d 黔棘茎楸木中、高剂量组对 AA 大鼠的踝关节肿胀有抑制作用,与模型组比较, P < 0.01 或 P < 0.05,结果见表 2。

3.3 黔棘茎楸木对 AA 大鼠血清中 IL-1, TNF- α , NO 含量的影响 表 3 结果表明,黔棘茎楸木高剂量组能显著降低 AA 大鼠血清中 IL-1 含量;高、中剂量组显著降低 AA 大鼠血清中 TNF- α 含量;高、中、低剂量组显著降低 AA 大鼠血清中 NO 含量。

表 2 黔棘茎楸木对 AA 大鼠继发性关节肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | /g·kg ⁻¹ | 正常/mm | 右踝关节周长/mm | | | | |
|-------|---------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|
| | | | 7 d | 14 d | 21 d | 28 d | 35 d |
| 正常对照 | - | 25.5 ± 0.85 | 26.0 ± 0.67 ²⁾ | 24.8 ± 0.79 ²⁾ | 23.8 ± 1.23 ²⁾ | 24.7 ± 0.48 | 24.5 ± 0.53 |
| 模型对照 | - | 25.5 ± 0.53 | 26.7 ± 0.68 | 25.8 ± 0.63 | 25.0 ± 0.67 | 25.0 ± 0.67 | 24.8 ± 0.63 |
| 雷公藤多苷 | 0.012 | 25.6 ± 0.52 | 26.5 ± 0.53 | 25.4 ± 0.52 ¹⁾ | 24.4 ± 0.52 ²⁾ | 24.7 ± 0.48 | 24.8 ± 0.42 |
| 黔棘茎楸木 | 3.5 | 25.5 ± 0.53 | 26.1 ± 0.74 ¹⁾ | 25.0 ± 1.05 ²⁾ | 24.4 ± 0.52 ²⁾ | 24.6 ± 0.52 ²⁾ | 24.5 ± 0.53 |
| | 1.75 | 25.5 ± 0.53 | 26.3 ± 0.68 | 25.2 ± 0.63 ²⁾ | 24.4 ± 0.83 ¹⁾ | 24.7 ± 0.48 | 24.8 ± 0.53 |
| | 0.88 | 25.6 ± 0.52 | 26.4 ± 0.70 | 25.4 ± 0.52 ¹⁾ | 24.6 ± 0.70 | 25.0 ± 0.82 | 24.8 ± 0.79 |

表 3 黔棘茎楸木对 AA 大鼠血清内炎症细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | /g·kg ⁻¹ | IL-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | TNF- α / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-------|---------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| 正常对照 | - | 1.13 ± 0.43 ¹⁾ | 26.70 ± 5.14 | 26.52 ± 11.29 ²⁾ |
| 模型对照 | - | 1.36 ± 0.18 | 38.58 ± 26.30 | 38.42 ± 9.06 |
| 雷公藤多苷 | 0.012 | 1.20 ± 0.19 | 32.63 ± 13.45 | 33.03 ± 11.87 |
| 黔棘茎楸木 | 3.5 | 1.20 ± 0.20 ¹⁾ | 18.59 ± 8.00 ²⁾ | 29.34 ± 13.53 ¹⁾ |
| | 1.75 | 1.37 ± 0.18 | 23.74 ± 6.78 ¹⁾ | 31.70 ± 10.34 ¹⁾ |
| | 0.88 | 1.33 ± 0.23 | 27.45 ± 5.44 | 29.38 ± 15.42 ¹⁾ |

3.4 大鼠踝关节组织病理学观察 图 1 结果表明,正常组大鼠踝关节组织结构正常;模型组大鼠踝关节滑膜组织可见充血、增生及炎症细胞浸润,并伴有肉芽组织及肉芽形成;雷公藤多苷组和黔产棘茎楸

木高剂量组大鼠踝关节炎症细胞明显减少,滑膜组织细胞及成纤维细胞增生不明显,关节软骨破坏较少;黔棘茎楸木中、低剂量组大鼠踝关节可见不同程度的轻、中度慢性炎症及少量炎性细胞浸润,但未见

血管翳形成。

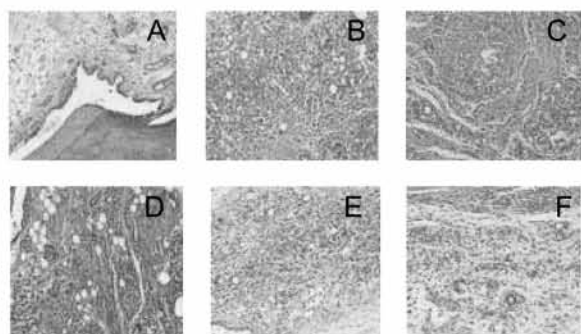


图 1 大鼠踝关节组织病理学变化(HE 染色, ×200)

A. 正常组; B. 模型组; C. 雷公藤多苷 0.012 g·kg⁻¹组; D. 黔棘茎楸木 3.5 g·kg⁻¹组; E. 黔棘茎楸木 1.75 g·kg⁻¹组; F. 黔棘茎楸木 0.88 g·kg⁻¹组

4 结论

早在唐初我国就以楸木根、根白皮及叶入药;《中药大辞典》载其祛风除湿、活血化瘀,主治风湿痹痛、跌打损伤等;《贵阳民间草药》亦载其清热解毒、凉血止血。民间认为其具祛风除湿、行气活血、消肿、清热解毒之功效。现代药理研究证实,辽东楸木可抑制大鼠足肿胀及肉芽肿,并抵抗 AA 大鼠的炎症反应^[4]。我省民间多采用棘茎楸木来治疗风湿性关节炎及腰腿痛、无名肿毒等,且疗效确切。但目前对其药理研究却少有报道,本实验拟通过黔棘茎楸木对大鼠 AA 模型的药效学观察,探讨其作用机理。

大鼠 AA 是一种免疫性炎症模型,其组织学特点包括滑膜增生,单核细胞浸润、关节软骨及骨组织破坏,与人类 RA 很近似,是筛选和研究治疗 RA 药物的常规模型。AA 大鼠足踝关节肿胀分为原发性反应期和继发性反应期,前者主要为炎症反应,后者则由免疫功能紊乱所致^[6]。目前研究认为,在 RA 发病过程中,NO 作为一种重要的炎症递质直接参与炎症反应和关节损伤过程。NO 的异常增高,可导致血管过度扩张,渗出增加,促使 PGE₂, TNF- α , IL-1 等炎症递质的释放^[7]; IL-1 能促进滑膜细胞和淋巴细

胞的增殖和分化,促进滑膜细胞和软骨细胞合成并释放(PGE₂)和胶原酶,造成关节损伤;TNF- α 在活动性 RA 中能提高血小板的活性和聚积,促进成纤维细胞释放细胞黏附分子,而研究证实,细胞黏附分子在 RA 的发病中起着重要作用^[8]。从我们的研究结果发现,黔棘茎楸木能明显抑制 AA 大鼠原发性及继发性踝关节肿胀,降低血清中 NO, TNF- α , IL-1 等致炎细胞因子的产生;病理组织学观察亦证实,黔棘茎楸木对 AA 大鼠的滑膜增生及关节软骨的炎症和破坏均有不同程度的减轻及改善作用。其对 AA 大鼠的治疗作用,可能是通过抑制上述炎性细胞因子的分泌,控制滑膜炎、增生及软骨和骨质破坏而实现的。通过我们的实验研究,表明黔棘茎楸木对 AA 大鼠踝关节炎具有明显的改善作用,在此研究基础上,我们将进一步去研究黔产棘茎楸木的药物毒副作用,为开发新的抗 RA 单体药奠定实验基础。

[参考文献]

- [1] 王银山. 类风湿性关节炎的研究进展[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(10): 131.
- [2] 陈冬志, 孟民明, 顾立刚. 加味木防己汤抗大鼠实验性关节炎的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(8): 727.
- [3] 蔡辉, 郑召岭, 商玮, 等. 姜黄素对佐剂性关节炎大鼠血清 TNF- α , IL-1 β 和免疫器官质量的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(9): 1803.
- [4] 王忠壮, 胡晋红. 楸木属植物的生物学研究及应用[M]. 北京: 第二军医大学出版社, 2001: 149.
- [5] 李仪奎, 金若敏, 王钦茂, 等. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 38.
- [6] 金涌, 李俊, 张运芳, 等. 阿克他利对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用及部分机制研究[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(6): 680.
- [7] 陈芳芳, 沈楠, 雷均涛, 等. 一口钟提取物治疗大鼠佐剂性关节炎研究[J]. 医药导报, 2009, 18(8): 992.
- [8] 张良, 白人骁. 细胞因子与类风湿性关节炎治疗新进展[J]. 中国医药导报, 2008, 5(11): 27.

[责任编辑 聂淑琴]