

# 青鹏软膏治疗大鼠佐剂性关节炎作用初探

李慧敏, 李宝丽\*

(天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052)

**[摘要]** 目的:探讨外用藏药奇正青鹏软膏局部应用治疗大鼠佐剂性关节炎的作用及特点。方法:50 只大鼠随机抽取 10 只作为正常组,其余 40 只注射弗氏完全佐剂造模后分为模型组、青鹏膏高剂量组(1.6 g·kg<sup>-1</sup>)、青鹏膏低剂量组(0.4 g·kg<sup>-1</sup>)。治疗组根据体重分别按 1.6, 0.4 g·kg<sup>-1</sup>剂量将药物涂抹于右后肢踝关节周围,连续用药 4 周。观察青鹏软膏不同剂量对佐剂性关节炎大鼠右后肢肿胀率,血清一氧化氮(NO)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )含量的影响,HE 染色镜下观察大鼠踝关节滑膜病理改变。结果:外用藏药青鹏软膏组与模型组比较,大鼠的足肿胀率明显降低( $P < 0.05$ ),血清 NO 水平显著降低( $P < 0.05$ ),病理研究表明青鹏软膏有效抑制佐剂性关节炎大鼠关节滑膜损伤程度,但对血清 IL-1 $\beta$  水平没有明显影响。结论:青鹏软膏局部外用对大鼠佐剂性关节炎具有治疗作用。

**[关键词]** 青鹏软膏;大鼠佐剂性关节炎;一氧化氮;白介素-1 $\beta$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0228-04

## Experimental Research on Effect of Qingpeng Paste Treating Adjuvant Arthritis in Rats

LI Hui-min, LI Bao-li\*

(Traditional Medicine Department, General Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of local application of Qingpeng Paste for treating adjuvant arthritis (AA) in rats. **Method:** Ten rats was eandomly selected form fifty rats as the normal control, the other rats were used to made the adjuvant arthritis model. The model was induced by injection of Freund's complete adjuvant. Then, the fourty rats were divided into model group, Qingpeng Paste high dose group (1.6 g·kg<sup>-1</sup>) and Qingpeng Paste low dose group (0.4 g·kg<sup>-1</sup>). The influence on swelling of the rear leg, the serum nitric oxide

**[收稿日期]** 20100914(004)

**[第一作者]** 李慧敏, 硕士研究生, 从事中西医结合内科(消化、免疫疾病), Tel:13821756307, E-mail:lihuimin7782195@163.com

**[通讯作者]** \*李宝丽, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事消化、免疫类疾病的中西医结合治疗及实验研究, E-mail:li3106@sina.com

- [2] Aki Osami. A study of bath preparations containing the garlic extract-Vt B1 complex [J]. *Fragrance J*, 1993, 21 (2):47.
- [3] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1991:187.
- [4] 罗丹, 方峰. 大蒜有效成分的药理作用研究进展[J]. *医药导报*, 2004, 23(6):379.
- [5] 宫毓静, 安汝国, 虞慧, 等. 164 种中草药乙醇提取物抗真菌作用研究[J]. *中草药*, 2002, 33(1):42.
- [6] 董小青, 刘丽英, 陈虹, 等. 土槿乙酸抗白色念珠菌的敏感性
- 及作用机理的电镜研究[J]. *天津药学*, 2008, 20 (2):1.
- [7] Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic [J]. *Microbes and Infection*, 1999, 1 (2):125.
- [8] 苏桂兰. 大蒜制剂工艺及质量研究[J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(1):32.
- [9] 张忠义, 邹恒琴, 黄昌全. 超临界流体技术在中药化学成分研究中的应用[J]. *中成药*, 1997, 19(1):45.

[责任编辑 聂淑琴]

(NO) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) level in the adjuvant arthritis rats were observed. HE staining was used to examine the pathological changes in joint synovium of the rat after using Qingpeng Paste locally. **Result:** Qingpeng Paste significantly decreased swelling of joints in AA rats compared with the control ( $P < 0.05$ ). the levels of NO of the rats in Qingpeng Paste groups were significantly decreased compared with the control ( $P < 0.05$ ). However, the level of IL-1 $\beta$  did not change. The pathological changes un the synovium tissues were markedly ameliorated in Qingpeng Paste groups. **Conclusion:** Qingpeng Paste can ameliorate the symptom of adjuvant arthritis in rats.

[**Key words**] Qingpeng Paste; adjuvant arthritis in rats; nitric oxide; interleukin-1 $\beta$

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜为靶器官的自身免疫疾病,以免疫调节失常,关节组织慢性炎症性病变为主要特征,临床以受累关节疼痛、肿胀、畸形、功能下降为主。具有病程长、缠绵难愈、致残率高等特点,是一种严重影响人类健康的慢性疾病,其病因及发病机制至今尚不完全清楚,人们称其为不死的癌症。因此,加深对 RA 发病机制的研究,探讨低毒高效、多剂型、多方式的药物治疗具有重大现实意义。青鹏软膏(Qingpeng Paste)是西藏奇正藏药股份有限公司运用藏药理论研制并成功用于临床实践的治疗类风湿性关节炎的外用药,通过实验研究及临床观察,青鹏软膏具有明显的抗炎、消肿、止痛的功效<sup>[1]</sup>。本实验以弗氏完全佐剂诱导关节炎大鼠模型,佐剂性关节炎(adjunct arthritis, AA)大鼠的关节组织病理及免疫学指标与人 RA 有许多相似之处,为目前研究 RA 及筛选评价抗炎免疫药物的较理想动物模型之一。通过观察青鹏软膏外用治疗 AA 的作用,检测其对 AA 大鼠血清中 NO, IL-1 $\beta$  及滑膜病理改变的影响,探讨该药对佐剂性关节炎的治疗作用及特点。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠 50 只,清洁级,雄性,合格证号 SCXK(京)2007-0001。体重(110  $\pm$  10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,适应喂养 3 d 用于实验。

**1.2 试剂及药品** 青鹏软膏(Qingpeng Paste, QP)西藏奇正藏药股份有限公司提供,规格为 20 g/支,生产批号 090809,由棘豆、亚大黄、铁棒锤、诃子、毛诃子、余甘子、安息香、宽筋藤和麝香组成。卡介苗冻干粉购自北京天坛生物制品有限公司;液体石蜡购于天津北大天医化学试剂公司;一氧化氮(NO)检测试剂盒,批号 20100616 南京建成生物工程研究所产品;白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )酶联免疫试剂盒,批号 20100617 美国 R&D 公司生产。

**1.3 仪器** TU-1810 紫外-可见光分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;KHB,ST-360 型酶标仪,上海科学实验仪器有限公司;TL-18M 台式高速冷冻离心机,上海市离心机械有限公司;数显三用恒温水箱,上海康路仪器设备有限公司。

## 2 方法

**2.1 造模与分组** 将 50 大鼠随机抽取 10 只为正常组(N),其余 40 只造模。以高压灭菌的液体石蜡配成含卡介苗 10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>的弗氏完全佐剂(CFA)。尾根部皮内注射 CFA 0.1 mL/只致炎,正常组注射等量液体石蜡。14 d 根据肿胀率随机分为模型组、青鹏软膏高剂量组(1.6 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)、青鹏软膏低剂量组(0.4 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>),每组 12 只,从中选取 10 只进行数据统计。

**2.2 给药** 造模 2 周后开始给药,每日上午 8:00 ~ 9:00,下午 16:00 ~ 17:00 各给药 1 次,用药组根据大鼠体重分别按 1.6, 0.4 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 给药,称取不同剂量药膏涂抹于大鼠右踝关节周围,注意轻轻按摩数下至药物充分吸收。正常组和模型组根据体重予生理盐水,连续给药 28 d。

**2.3 取材** 用药满 2 周时,目内眦眶后取血约 2 mL;分离血清,冻存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中待测。用药满 4 周后,取双后肢关节浸于 10% 甲醛溶液 48 h,剥离滑膜组织。

### 2.4 检测指标

**2.4.1 检测大鼠右后足肿胀率** 用水容积法,于首次免疫当天即检测右后肢容积( $V_n$ ),7 d 后隔日测 1 次( $V_t$ ),直至处死。

$$\text{肿胀率} = \frac{V_t - V_n}{V_n} \times 100\%$$

**2.4.2 测定血清 NO, IL-1 $\beta$  水平** 用硝酸还原酶法检测血清 NO 浓度;采用 ELISA 法检测大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平。

**2.4.3 滑膜组织形态学观察** 剥离切取各组双足踝关节滑膜组织,立即放入 10% 甲醛溶液中,常规

脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,光学显微镜下观察滑膜组织的病理变化,评定关节滑膜病理形态学改变按文献[2]法,按程度分为 1~3 级,标准见表 1。

表 1 关节滑膜病理变化分级标准

关节病理变化	1 级	2 级	3 级
滑膜增生	层次增多	滑膜增厚	绒毛形成
淋巴细胞	弥漫散在	聚集成团	滤泡形成
血管增生	内皮肿胀	管腔闭塞	细胞成团
纤维素渗出	斑点状	彩带状	集团状

**2.5 统计学方法** 用 SPSS13.0 统计软件,计量数据比较采用 *t* 检验;滑膜组织病理形态学病变分析采用秩和检验,以  $P < 0.05$  为有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠右后足肿胀率变化** 用药后 2~4 周青鹏软膏组大鼠足肿胀率明显低于模型组,差异显著 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠足关节肿胀率 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) %

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	造模 2 周	给药后			
			1 周	给药 2 周	给药 3 周	给药 4 周
正常	-	16 ± 4 <sup>1)</sup>	21 ± 3 <sup>1)</sup>	25 ± 3 <sup>1)</sup>	29 ± 5 <sup>1)</sup>	34 ± 4 <sup>1)</sup>
模型	-	90 ± 16	99 ± 19	95 ± 18	88 ± 15	76 ± 16
青鹏膏	1.6	91 ± 17	92 ± 15	79 ± 13 <sup>1)</sup>	69 ± 12 <sup>1)</sup>	53 ± 13 <sup>1)</sup>
	0.4	91 ± 18	92 ± 18	80 ± 17 <sup>1)</sup>	71 ± 16 <sup>1)</sup>	58 ± 14 <sup>1)</sup>

注:与模型相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$  (表 3 同)。

**3.2 青鹏软膏局部用药对大鼠血清 NO, IL-1 $\beta$  的影响** 用药 2 周后,模型组大鼠血清 NO 水平明显高于正常组 ( $P < 0.05$ ),青鹏软膏高、低剂量组血清 NO 水平均低于模型组 ( $P < 0.05$ );AA 大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平明显高于正常组大鼠 ( $P < 0.05$ )。青鹏软膏高、低剂量组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平与模型组比较无显著性差异。见表 3。

表 3 青鹏软膏对 AA 大鼠血清 NO, IL-1 $\beta$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	33.36 ± 9.28 <sup>1)</sup>	219.84 ± 38.77 <sup>1)</sup>
模型	-	73.76 ± 21.49	357.39 ± 85.94
青鹏膏	1.6	49.01 ± 11.89 <sup>1)</sup>	376.89 ± 86.70
	0.4	50.94 ± 14.31 <sup>1)</sup>	378.18 ± 87.31

**3.3 青鹏软膏局部用药对关节炎大鼠滑膜病理的影响** 用药 4 周后,在光学显微镜下对 AA 大鼠滑

膜病理形态学改变进行分级,统计结果分别为:模型组 2.3 ± 0.67,青鹏软膏 1.6 g·kg<sup>-1</sup>组 1.5 ± 0.71,青鹏软膏 0.4 g·kg<sup>-1</sup>组 1.7 ± 0.82,青鹏软膏治疗组滑膜病变与模型组比较有明显改善 ( $P < 0.05$ )。

RA 对机体的危害很大程度反映在关节病变上。对 AA 大鼠踝关节滑膜切片进行病理学观察,可以直观了解药物的疗效。见图 1。正常组滑膜衬里细胞 1~2 层,细胞排列规则,表面光滑,无炎细胞浸润,少量纤维细胞及血管;模型组如图 1A, B 示:滑膜有不同程度的充血、水肿及大量中性粒细胞、单核细胞等炎性细胞浸润。青鹏软膏治疗组左右肢对比如图 1C~D, E~F 示:右足较左足滑膜炎症反应减弱,增生程度减轻,滑膜组织结构较模型组亦有改善,滑膜细胞呈轻度增生。

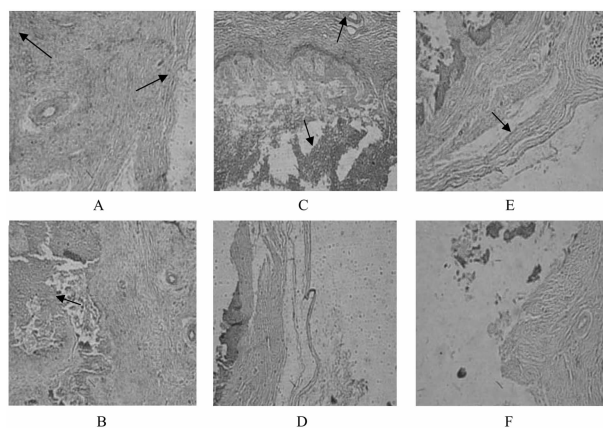


图 1 AA 造模 6 周青鹏软膏治疗 4 周各组大鼠踝关节滑膜病理照片 (HE 染色, ×100)

A. 模型组左足; B. 模型组右足; C. 青鹏软膏 0.4 g·kg<sup>-1</sup>组左足; D. 青鹏软膏 0.4 g·kg<sup>-1</sup>组右足; E. 青鹏软膏 1.6 g·kg<sup>-1</sup>组左足; F. 青鹏软膏 1.6 g·kg<sup>-1</sup>组右足

### 4 讨论

RA 是免疫炎症性疾病,病程伴随多种免疫活性细胞的活化及细胞因子、炎症介质的参与。特别是血清 IL-1 $\beta$  水平显著升高与 RA 密切相关<sup>[3]</sup>,一方面,过度分泌的 IL-1 $\beta$  引发滑膜炎症反应、软骨基质崩解<sup>[4]</sup>;另一方面,IL-1 $\beta$  还作用于内皮细胞,促进炎细胞聚集,加重关节局部炎症反应<sup>[3]</sup>。说明 IL-1 $\beta$  是使 RA 的炎症应答放大并转化为破坏反应的主要细胞因子<sup>[5]</sup>。本实验中,AA 大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平明显升高,用药 2 周后其与模型组比较无明显改善,提示青鹏软膏可能不能通过降低血清 IL-1 $\beta$  水平治疗大鼠佐剂性关节炎。

研究表明在 RA 初期,NO 异常升高,它一方面

使血管过度扩张,渗出增加,并促进  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}$  等炎症介质释放,加重滑膜炎反应;另一方面增高的 NO 协同各种细胞因子作用于关节软骨<sup>[6]</sup>。两方面协同作用,使病情加重。本实验中,AA 大鼠血清 NO 水平较空白组明显增高,青鹏软膏组血清 NO 水平较模型组显著降低,表明 NO 参与了免疫炎症反应,青鹏软膏局部外用显著降低 AA 大鼠血清 NO 水平,结合滑膜病理改变,提示该药可能通过抑制 NO 的产生,亦或同时减轻血管的扩张渗出及相关炎症介质的释放起到治疗作用。

RA 属于中医“痹症”范畴,其病因机制主要为风寒湿热之邪侵袭关节痹阻筋脉所致,与藏医文献《四部医典》、《医药精华》等记载的寒湿凝滞筋脉所致足、大腿、小腿疼痛肿大,屈伸艰难的“冈巴”、“黄水”等在病因病机、临床表现上甚为相合。奇正青鹏软膏为藏传经典验方,由棘豆、亚大黄、铁棒锤、诃子、余甘子、安息香、宽筋藤和麝香等组成,消肿止痛,活血化瘀,用于治疗痛风,湿痹,冈巴,黄水等疾病。本实验中,青鹏软膏抑制关节肿胀,降低了 AA 大鼠血清 NO 水平,从而一定程度上抑制了细胞因子的促炎效应,这可能是其治疗类风湿关节炎的机制之一;青鹏软膏有活血化瘀、消肿止痛之功效,其亦可能通过减轻局部炎性渗出,改善局部血液循环而显效。

RA 是慢性顽疾,需长期用药,寻找不良反应小、靶向性好,安全有效的药物,成为科研和临床的热点。本研究显示,青鹏软膏可治疗大鼠佐剂性关节炎,疗效确切,为其临床应用提供了药理学依据,同时结合中医经方治疗 RA 的研究进展,如黄金玲等<sup>[7]</sup>、李宝丽等<sup>[8]</sup>在 RA 早期温经通络活血化瘀抑制免疫炎症,方剑乔等<sup>[9]</sup>在 RA 中晚期补肝肾、活血化瘀抑制

骨质破坏,融入中医辨证论治思想,探讨 RA 不同时期青鹏软膏对其治疗效果及机制,为进一步研究多途径、多靶点联合治疗类风湿关节炎提供实验依据。

### [参考文献]

- [1] 王吉波,谢荣爱,姜秀波. 奇正青鹏膏治疗急性痛风性关节炎的临床观察[J]. 中国骨伤,2006,19(12):755.
- [2] 韩宏妮,陈立忠,詹蓓,等. 加味关节康对佐剂性关节炎大鼠免疫性炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(3):78.
- [3] Jeong J G, Kim J M, Cho H, et al. Effects of IL-1 beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun,2004,324(1):3.
- [4] Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, et al. Prostaglandin  $\text{E}_2$  is an enhancer of interleukin-1 beta2induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts [J]. Arthritis Rheum, 2003,48(10):2819.
- [5] Yadav V S, Mishra K P, Singh D P, et al. Immunomodulatory effects of curcumin [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2005, 27(3):485.
- [6] Keuchi M, Takahashi T, Tani T. Localized synovial hypertrophy in the anteromedial compartment of the osteoarthritic knee[J]. Arthroscopy,2005,21(12):1457.
- [7] 黄金玲,龙子江,吴华强,等. 苓桂术苈汤对佐剂性大鼠关节液  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  及  $\text{PGE}_2$  的影响[J]. 中国中医药科技,2004,11(2):75.
- [8] 李宝丽,唐方. 中药复方对类风湿关节炎抗炎作用的实验研究[J]. 中国免疫学杂志,2007,23(8):702.
- [9] 方剑乔,刘金烘,赵天征,等. 独活寄生汤对小鼠胶原性关节炎治疗作用的研究[J]. 中国中医药科技,2000,7(5):289.

[责任编辑 聂淑琴]