

## 两个厂家的雷公藤多苷片对CIA模型大鼠干预作用比较

刘立玲<sup>1,2</sup>, 苏晓慧<sup>2</sup>, 田雅格<sup>2</sup>, 樊媛芳<sup>2</sup>, 王洪锋<sup>3</sup>, 潘伟红<sup>4</sup>,  
王学英<sup>4</sup>, 彭华军<sup>3</sup>, 徐颖<sup>2</sup>, 孔祥英<sup>2</sup>, 曹炜<sup>1\*</sup>, 林娜<sup>2\*</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;  
3. 湖南千金协力药业有限公司, 湖南 株洲 412000; 4. 浙江得恩德制药有限公司, 浙江 绍兴 312000)

**[摘要]** 目的:观察并比较湖南千金协力(QJ)和浙江得恩德(DED)两个厂家的雷公藤多苷(TG)片口服后对II型胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠的药效及多脏器的干预作用。方法:72只SD大鼠随机分为正常组,模型组,千金协力TG片临床2倍,6倍等效剂量组(QJ-TG 0.018,0.054 g·kg<sup>-1</sup>),得恩德TG片临床2倍,6倍等效剂量组(DED-TG 0.018,0.054 g·kg<sup>-1</sup>)。首次免疫后当天开始灌胃给药,每天1次。二次免疫后观察大鼠关节红肿和畸形症状,评价关节炎临床积分,分别在第21,42天取材,进行炎症关节组织病理学检查;血清酶学方法检测大鼠血清中碱性磷酸酶(ALP),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),谷氨酰转氨酶(GGT),总胆红素(TBIL),肌酐(CRE)和尿素(UREA)含量;评估大鼠附睾精子畸形率及睾丸与卵巢组织的损伤程度。结果:两个厂家TG片均能改善CIA模型大鼠炎症关节红、肿和畸形症状,降低临床积分,抑制关节滑膜炎、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏的病理改变。其中,QJ-TG 0.018,0.054 g·kg<sup>-1</sup>组和DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup>组与模型组比较,有统计学差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),DED-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup>组与模型组比较未见明显变化;两个厂家相同剂量TG比较,DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup>组在第12和18 d比QJ-TG同剂量组对临床积分的抑制作用明显( $P < 0.05$ )。除DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup>组能明显升高白细胞数和脾脏指数外,两个厂家TG片对CIA模型大鼠的体质量、其他脏器指数、消化系统、肝肾功能和肝肾病理均无明显影响,却能不同程度增加CIA雄性大鼠精子畸形率,对睾丸曲细精管造成显著损伤,其严重度随剂量和时间增加而增加,而同等剂量下DED-TG的雄性生殖毒性大于QJ-TG。DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup>组和QJ-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup>组除可见卵巢组织中血管分布减少,黄体体积缩小外,未见其他毒性作用。结论:两个厂家TG片2倍和6倍临床等效剂量口服均能延缓大鼠CIA的发病,降低关节炎临床积分,改善关节病理改变,并有一定程度的雄性生殖毒性。高剂量DED-TG比QJ-TG的毒-效作用更明显。

**[关键词]** 湖南千金协力雷公藤多苷片;浙江得恩德雷公藤多苷片;类风湿性关节炎;胶原诱导性关节炎大鼠模型;药效;毒性  
**[中图分类号]** R285.5;R364.5;R339.2;R331.3;R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0084-09  
**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191437  
**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190401.1612.020.html>  
**[网络出版时间]** 2019-04-03 8:37

### Comparison of Effect on Tripterygium Glycosides Tablet from Two Different Manufacturers in CIA Rats

LIU Li-ling<sup>1,2</sup>, SU Xiao-hui<sup>2</sup>, TIAN Ya-ge<sup>2</sup>, FAN Yuan-fang<sup>2</sup>, WANG Hong-feng<sup>3</sup>, PAN Wei-hong<sup>4</sup>,  
WANG Xue-ying<sup>4</sup>, PENG Hua-jun<sup>3</sup>, XU Ying<sup>2</sup>, KONG Xiang-ying<sup>2</sup>, CAO Wei<sup>1\*</sup>, LIN Na<sup>2\*</sup>

(1. Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100053, China;  
2. Institute of Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China; 3. Hunan Qianjin Xieli Pharmaceutical Limited Company, Zhuzhou 412000, China;  
4. Zhejiang Deende Pharmaceutical Limited Company, Shaoxing 312000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the effects and multi-organ intervention of tripterygium glycosides

**[收稿日期]** 20190312(006)

**[基金项目]** 中国中医科学院中医药“一带一路”合作专项(GH2017-06);北京市自然科学基金项目(7192139)

**[第一作者]** 刘立玲,在读硕士,从事类风湿性关节炎的临床与基础研究,E-mail:1531377175@qq.com

**[通信作者]** \*曹炜,博士,主任医师,从事类风湿性关节炎的临床与基础研究,E-mail:caoweie6636@126.com;

\*林娜,博士,研究员,从事抗炎中药药理研究,E-mail:linna888@163.com

(TG) tablet from Hunan Qianjin Xieli (QJ) and Zhejiang Deende (DED) on type II collagen-induced arthritis (CIA) in rats. **Method:** The 72 SD rats were randomly divided into normal group, model group, QJ TG clinical group 2 times, 6 times equivalent dose group (QJ-TG 0.018, 0.054 g·kg<sup>-1</sup>), derende TG clinical group 2 times, 6 times equivalent dose group (DED-TG 0.018, 0.054 g·kg<sup>-1</sup>). The intragastric administration was started on the day after the first immunization, once a day. After the second immunization, the symptoms such as redness and swelling of joints were observed, and the clinical score of arthritis were evaluated. The materials were taken for pathological examination of the inflammatory joints on the 21<sup>th</sup> and 42<sup>th</sup> day. The concentration of alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), total bilirubin (TBIL), creatinine (CRE) and urea (UREA) in serum were detected by enzymatic assay. The rate of sperm deformity, testicular and ovarian tissue damage in the rat epididymis was assessed. **Result:** TG from two manufacturers attenuated the inflammation, redness, swelling and deformity of joints in CIA rats, reduced the clinical score and incidence of arthritis in CIA rats. Meanwhile, it also exhibited obvious reduction in all pathological features such as joint synovitis, pannus, cartilage erosion and bone destruction. There were significant differences between the QJ-TG high and low dose groups and the DED-TG high dose group compared with the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). There was no significant change in the low dose group of DED-TG compared with the model group. Compared with the same dose of TG in the two manufacturers, the DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> group had a significant inhibitory effect on the clinical scores on the 15th and 18th days than the QJ-TG same dose group ( $P < 0.05$ ). In addition to 0.054 g·kg<sup>-1</sup> dose of DED-TG, the white blood cell count and spleen index were significantly increased. At the same time, two different manufacturers of TG had no effect on body weight, organ index, digestive system, liver and kidney function, liver and kidney pathology of CIA model rats. QJ-TG and DED-TG all significantly increased the rate of male rats sperm malformation and significant damage to testicular seminiferous tubules and the toxicity increased with the increase of dose and time. while the mole reproductive toxicity of DED-TG was higher than that of QJ-TG at the same dose. In the DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> and QJ-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> group, there were only the reduction of vascular distribution in the ovarian tissue and the reduction of the corpus luteum, and no other toxic effects were observed. **Conclusion:** Two manufacturers TG2 times (0.018 g·kg<sup>-1</sup>) and 6 times (0.054 g·kg<sup>-1</sup>) clinical equivalent dose can delay the onset of CIA in rats, reduce the clinical score of arthritis, improve the pathological changes of joints, but have a certain degree of male reproductive toxicity. The high-dose DED-TG is more toxic than the QJ-TG.

[**Key words**] Hunan Qianjin Xieli tripterygium glycosides tablet; Zhejiang Deende tripterygium glycosides tablet; rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis rat model; anti-arthritis effect; toxicity

雷公藤多苷 (TG) 是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 去皮根中提取精制的有效部位混合物,为我国首先研究利用的抗炎免疫调节中药提取物。早在 1984 年就投入临床使用,广泛应用于治疗类风湿关节炎、肾病综合征、白塞综合征、麻风、自身免疫性肝炎及皮肤病等疾病,且疗效显著,是目前临床上使用较多的非甾体类免疫抑制剂。现代药理研究表明,将 TG 片用于类风湿关节炎患者是通过抑制多种炎症因子及炎症通路起免疫调节、抗感染的作用<sup>[1]</sup>,可以显著改善患者生活质量。然而,目前由于不同的厂家其纯化工艺、质量控制标准的差异,TG 在化学成分、抗炎药效方面存在一定的差异<sup>[2]</sup>,且来自临床的应用效果也提示了不同厂家的 TG 片可能具有不尽相同的药效和毒性。目前对于

不同厂家 TG 片的药效和毒性的系统研究较少,为了给临床的合理用药提供参考,本研究选择了临床应用和实验研究应用比较多的两个厂家产品——浙江得恩德和湖南千金协力生产的 TG 片作为研究对象,通过建立诱导性关节炎 (CIA) 大鼠模型,从关节炎临床积分、组织病理学、血液、肝肾、生殖毒性等方面观察对比两个厂家 TG 片对 CIA 大鼠的干预作用,对市售的两个厂家的 TG 片进行药效和毒性评价。

### 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠 72 只,SPF 级,雌雄各 36 只,体质量 150 ~ 170 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SYXK(京)2015-0041。动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心,日光灯照明,空调控温,实验操作符合中国中

医学院中医基础理论研究所实验动物福利伦理审查委员会标准,编号 2018-066。适应性饲养 3 d 后用于实验。

**1.2 试剂与药物** 牛 II 型胶原乙酸溶液 ( $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 不完全弗氏佐剂 (Chondrex 公司, 批号分别为 180302, 180346); 0.3% 羧甲基纤维素钠 (上海申光食用化学有限公司, 批号 20180716); TG 片 (湖南千金协力药业有限公司, 批号 20171001); TG 片 (浙江得恩德制药有限公司, 批号 171118); 苏木素染色液, 伊红染色液 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 ZLI-9610, ZLI-9613); 马松 (Masson) 三色染色液 (北京雷根生物技术有限公司, 批号 1206A18); 血液分析仪质控品 (德国 Simens 公司, 批号 01964346); 生化质控血清、标准品 (北京万泰德瑞诊断技术有限公司, 批号分别为 1130UN, 915UE); 碱性磷酸酶 (ALP), 丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 谷氨酰转移酶 (GGT), 总胆红素 (TBIL), 肌酐 (CRE), 尿素 (UREA) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (北京万泰德瑞诊断技术有限公司, 批号分别为 GG8101A, GG7104A, GG7104B, GG7103A, GG7107A, SG7106B, SG8101B)。

**1.3 仪器** RM2235 型切片机 (德国 Leica 公司); KPJ-1A 型烤片机, BMJ-1B 型生物组织包埋机, BMJ-1B 型生物组织包埋冰冻台 (天津天利航空机电有限公司); BSA224S 型天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); ADVIA2120 型全自动血液分析仪 (德国 Simens 公司); TBA-40FR 型全自动生化分析仪 (日本东芝公司)。

## 2 方法

**2.1 胶原 CIA 模型的制备**<sup>[3]</sup> 取适量牛 II 型胶原乙酸溶液, 与等体积的不完全弗氏佐剂, 在低温状态下使用匀浆器充分混合乳化, 直至滴水不扩散。每只大鼠尾根部皮内注射 0.2 mL (质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。第 7 天用同样方法进行第 2 次免疫, 每只大鼠尾根部皮内注射 0.1 mL。造模后 (即第 1 次注射后) 第 7 天开始计算各组大鼠的关节炎指数 (AI), AI 为四肢肢体关节肿胀评分之和, 若  $\text{AI} \geq 4$  则表示造模成功<sup>[4-5]</sup>。

**2.2 分组及给药** 将 SD 大鼠随机分为 6 组, 即正常组, 模型组, 湖南千金协力 TG (QJ-TG) 组 (2 倍临床等效剂量  $0.018 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 6 倍临床等效剂量  $0.054 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); 浙江得恩德 TG (DED-TG) (2 倍临床等效剂量  $0.018 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 6 倍临床等效剂量  $0.054 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); 于第 1 次免疫后第 0 天开始给药,

每天 1 次, 连续灌胃给药, 持续 21, 42 d; 正常组和模型组灌服 0.3% 羧甲基纤维素钠。基于前期实验基础, 本实验 TG 片剂量选取是按临床人剂量换算成大鼠的 2 倍, 6 倍剂量。

**2.3 取材及组织处理** 于第 1 次免疫后第 21, 42 天取材, 腹主动脉取血, 取得全血、血清, 使用灭菌的器械取下右膝关节、踝关节放在 10% 甲醛中进行固定, 并用 10% 乙二胺四乙酸二钠脱钙液进行脱钙处理, 脱钙完成进行石蜡包埋; 常规切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, Masson 染色; 左膝关节、踝关节于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存。

**2.4 大鼠关节炎临床积分、发病率评价** 观察大鼠的一般情况, 参考文献[6]对大鼠的发病后关节红肿症状进行评分, 每足 4 分, 共 16 分, 评分的依据是关节红肿的程度和范围, 以及关节肿大、变形情况。采用 0~4 分的分级评分, 评分标准, 0 分, 无红斑、肿胀; 1 分, 跗骨或者踝关节, 单一部位的轻微红斑、肿胀; 2 分, 踝关节延伸至跗骨的轻度红斑、肿胀; 3 分, 踝关节蔓延至跗骨的中度红斑、肿胀; 4 分, 踝关节蔓延至跗骨的严重红斑、肿胀, 关节僵直、畸形。同时记录统计大鼠的关节炎发病率, 发病率 = 每组发病只数/每组大鼠总数  $\times 100\%$ 。

**2.5 血常规检测** 用 ADVIA2120 型全自动血液分析仪首先进行开机清洗, 系统清洗和探针清洗, 各最少一次; 进质控品, 根据质控测试结果进行必要的参数调整; 进行样本测试, 充分抗凝, 样本量不少于  $300 \mu\text{L}$ , 选择测试类型和动物种属, 充分混匀样本, 进样; 测试结束后记录整理红细胞计数 (RBC), 白细胞计数 (WBC), 血小板 (PLT), 血红蛋白 (HGB), 单核细胞 (MONO) 和中性细胞数 (NEUT)。

**2.6 ELISA 法检测 ALP, ALT, AST, GGT, TBIL, CRE, UREA 的含量** 血清生化检测 TBA-40FR 型全自动生化分析仪开机, 自动清洗, 检查各试剂瓶是否需要补足; 在仪器主菜单上进行项目参数设置, 校准; 并进行质控检测; 将待测样品放入样品盘中, 在项目菜单中选择实验项目, 依次设定各个样品; 检测各指标的含量。

**2.7 HE 染色观察骨、软骨和滑膜的形态学变化** 将取材的右侧膝、踝关节于 10% 乙二胺四乙酸二钠脱钙处理后进行常规石蜡包埋, 常规切片, 进行 HE 染色。光镜下观察膝关节组织病理改变, 并从炎症细胞浸润、血管翳形成、软骨和骨侵蚀等方面进行半定量分析。所有评分标准<sup>[7-8]</sup>均按 0~5 等级的以下标准, 0 正常, 1 最轻, 2 轻度, 3 中度, 4 明

显,5 严重。

**2.8 Masson 染色观察关节软骨的改变** 将石蜡切片脱蜡至水,用配制好的 Weigert 苏木素染液染色 5 min;酸性乙酸分化液分化;Masson 蓝化液返蓝;蒸馏水洗 1 min;丽春红染色液染色 6 min;提前按蒸馏水-弱酸溶液 2:1 配制弱酸溶液,洗 1 min;磷酸铝溶液洗 1 min,弱酸溶液洗 1 min,苯胺蓝染色液染 1 min,弱酸溶液洗 1 min,脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

### 2.9 生殖系统影响的综合评估

**2.9.1 对附睾精子畸形率的影响** 一侧附睾放入盛有 2 mL 37 °C 预温的生理盐水的 5 mL 离心管中剪碎,制成精子悬液,精子悬液置于 60 °C 水浴箱中孵育 10 min 杀死精子,取 1 滴精子滤液推片,室温自然干燥,甲醇固定 10 min、空气自然干燥,1% 伊红水溶液染色 1.5 h,流水冲洗、晾干,高倍显微镜检验,计数 300 条精子中的畸形精子数。进而将精子畸形率划分为 4 个等级,“-”为畸形率 < 5%,“+”为畸形率在 5% ~ 20% ,“++”为畸形率在 20% ~ 50% ,“+++”为畸形率 > 50% 。

$$\text{精子畸形率}/\% = \text{畸形精子数}/300 \times 100\% \text{ [9-10]}$$

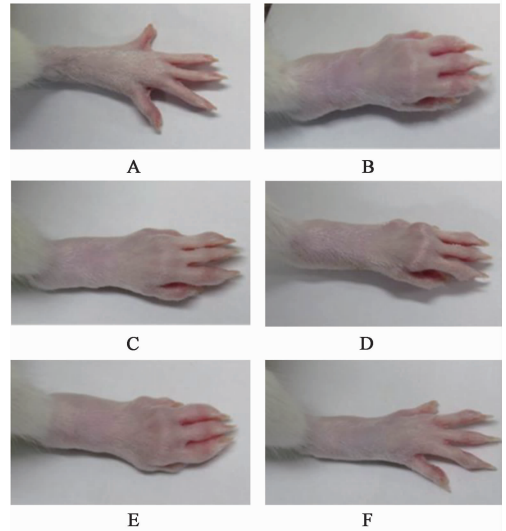
**2.9.2 HE 染色观察睾丸及卵巢的形态学变化** 将取材的一侧睾丸或卵巢于 4% 的多聚甲醛中固定后进行常规石蜡包埋,常规切片,进行 HE 染色<sup>[11]</sup>。光镜下观察睾丸组织病理改变,并记录睾丸中曲细精管病变畸形率<sup>[12]</sup>。进而将睾丸病变比例划分为 4 个等级,“-”为畸形率 < 20% ,“+”为畸形率在 20% ~ 50% ,“++”为畸形率在 50% ~ 90% ,“+++”为畸形率 > 90% 。观察卵巢组织中血管分布、黄体体积及总卵泡数的病理变化。

**2.10 统计学分析** 采用 SPSS 15.0 统计软件分析实验数据,发病率统计采用  $\chi^2$  检验,其他资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计方法采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 两个厂家 TG 片对 CIA 大鼠模型关节炎严重度的影响** 第 1 次免疫后第 9 天,大鼠后足关节开始出现红肿症状,随着时间延长临床积分逐渐升高。第 1 次免疫后第 12 天至 42 天,CIA 模型大鼠关节红肿逐渐明显,关节开始变形,临床积分明显高于正常组,差别具有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,两个厂家 TG 片给药后均对关节红肿、畸形有不同程度的抑制作用,且给药剂量越高效果越明显。其中,QJ-TG 0.018,0.054 g·kg<sup>-1</sup> 组和

DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> 组与模型组比较,对临床积分的抑制作用更明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),QJ-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup> 组只在第 18 天与模型组比较具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 DED-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup> 组则无明显差异。两个厂家相同剂量 TG 比较,DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> 组在第 12 和 18 天比 QJ-TG 同剂量组对临床积分的抑制作用明显,具有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他时间点无统计学差异。见图 1,表 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. QJ-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup> 组;D. QJ-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> 组;E. DED-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup> 组;F. DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> 组(图 2 ~ 3 同)

图 1 两个厂家雷公藤多苷片对 CIA 大鼠炎症关节红肿症状的影响  
Fig. 1 Effect of QJ and DED tripterygium glycosides (TG) tablet on inflammatory erythema and joints welling of CIA rats

### 3.2 两个厂家 TG 片对 CIA 模型大鼠关节组织病理改善作用比较

**3.2.1 对 CIA 大鼠膝关节组织病理学的影响** 图 2 可见,正常组关节结构正常,滑膜细胞无增生,无血管翳形成,关节软骨表面光滑、无剥脱,关节软骨下骨小梁大小、排列正常;模型组关节可见明显的炎性细胞浸润,滑膜细胞异常增生、排列紊乱,同时可见血管翳形成,软骨表层细胞变性、坏死,关节软骨面剥脱,关节腔内有大量的剥脱坏死组织,软骨下骨小梁排列紊乱。与模型组比较两个厂家 TG 片给药后关节组织病理都有改善,组织病理学半定量分析结果显示,QJ-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup> 能明显改善炎症细胞浸润 ( $P < 0.01$ ) 和骨破坏 ( $P < 0.05$ ),QJ-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> 能明显抑制关节的血管翳形成、软骨和骨破坏 ( $P < 0.01$ );DED-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup> 能明显改善骨破坏 ( $P < 0.05$ ),DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> 对

表 1 两个厂家雷公藤多苷片对 CIA 大鼠炎症关节临床积分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effect of QJ and DED TG tablet on arthritis scores of CIA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	6 d	12 d	18 d	24 d
模型	-	0	1.57 ± 0.54 <sup>1)</sup>	4.86 ± 0.40 <sup>2)</sup>	6.50 ± 0.68 <sup>2)</sup>
QJ-TG	0.018	0	0.92 ± 0.38	2.75 ± 0.65 <sup>3)</sup>	5.17 ± 1.33
	0.054	0	0.67 ± 0.36 <sup>3)</sup>	2.25 ± 0.64 <sup>4)</sup>	2.67 ± 1.23 <sup>4)</sup>
DED-TG	0.018	0	1.08 ± 0.29	4.17 ± 0.61	5.33 ± 1.43
	0.054	0	0 <sup>4)</sup>	0.08 ± 0.08 <sup>4,5)</sup>	0.67 ± 0.49 <sup>4)</sup>

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	30 d	36 d	42 d
模型	-	7.13 ± 0.58 <sup>2)</sup>	7.63 ± 0.38 <sup>2)</sup>	8.00 ± 0.57 <sup>2)</sup>
QJ-TG	0.018	6.00 ± 1.39	6.33 ± 1.43	7.00 ± 1.51
	0.054	2.67 ± 1.23 <sup>4)</sup>	2.67 ± 1.23 <sup>4)</sup>	2.83 ± 1.22 <sup>4)</sup>
DED-TG	0.018	6.00 ± 1.37	6.00 ± 1.37	6.33 ± 1.52
	0.054	0.83 ± 0.54 <sup>4)</sup>	1.00 ± 0.52 <sup>4)</sup>	0.83 ± 0.40 <sup>4)</sup>

注: 正常组各时间点均为 0 分, 与正常组同时间点比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组同时间点比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 QJ 组同时间点同剂量组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ 。

炎症浸润、血管翳形成、软骨破坏和骨破坏的抑制作用与模型组相比, 均具显著的统计学差异

表 2 两个厂家 TG 对 CIA 大鼠膝关节组织病理学半定量积分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effect of QJ and DED TG tablet on histopathological changes in knee joints of CIA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	炎性细胞浸润	血管翳	软骨破坏	骨破坏
模型	-	3.00 ± 0.37 <sup>2)</sup>	2.83 ± 0.31 <sup>2)</sup>	2.33 ± 0.21 <sup>2)</sup>	2.33 ± 0.21 <sup>2)</sup>
QJ-TG	0.018	1.40 ± 0.40 <sup>4)</sup>	2.00 ± 0.63	2.40 ± 0.24	1.60 ± 0.24 <sup>3)</sup>
	0.054	1.40 ± 0.60	0.80 ± 0.37 <sup>4)</sup>	1.20 ± 0.37 <sup>4)</sup>	1.20 ± 0.20 <sup>4)</sup>
DED-TG	0.018	2.67 ± 0.61	2.17 ± 0.60	1.67 ± 0.42	1.50 ± 0.22 <sup>3)</sup>
	0.054	0.67 ± 0.21 <sup>4)</sup>	0.83 ± 0.31 <sup>4)</sup>	1.00 ± 0.26 <sup>4)</sup>	1.00 ± 0.36 <sup>4)</sup>

注: 正常组各项病理学半定量积分均为 0; 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 3.2.2 对 CIA 大鼠关节软骨基质和胶原纤维的影响

正常组软骨基质和胶原纤维呈蓝色, 着色均匀, 向钙化层方向蓝色逐渐加深, 潮线清晰, 软骨和软骨下骨边界清晰, 软骨下骨的密质骨和骨小梁呈蓝色, 骨胶原呈红色; 模型组关节软骨表面粗糙, 缺失, 表层软骨变性失染, 纤维化明显, 潮线附近有大量火焰状突起的红染, 骨小梁失染, 软骨和软骨下骨边界不清晰; 与模型组比较, 两个厂家 TG 片给药后组关节

( $P < 0.01$ )。两个厂家相同剂量 TG 对 CIA 大鼠关节组织病理学半定量积分的改善作用无统计学差异。见表 2。

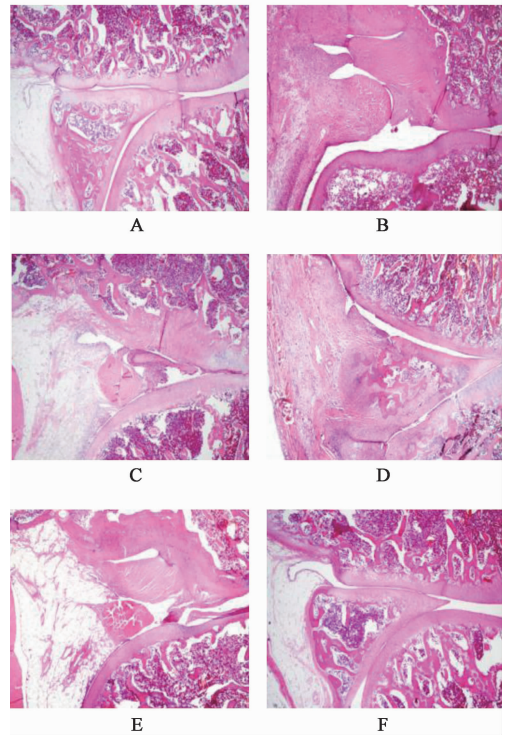


图 2 两个厂家 TG 片对 CIA 大鼠膝关节组织病理学的影响 (HE, × 40)

Fig. 2 Effect of QJ and DED TG on histopathological changes in knee joints of CIA rats (HE, × 40)

软骨形态都有改善, QJ-TG 和 DEQ-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup> 组关节软骨表面较光滑, 着色均匀, 少量纤维化, 潮线附近有少量火焰状突起的红染; QJ-TG 和 DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> 组关节软骨表面较光滑, 着色均匀, 未见纤维化。见图 3。

### 3.3 两个厂家 TG 片对 CIA 模型大鼠各个系统的影响作用比较

#### 3.3.1 对大鼠一般情况、血液和脏器系数的影响

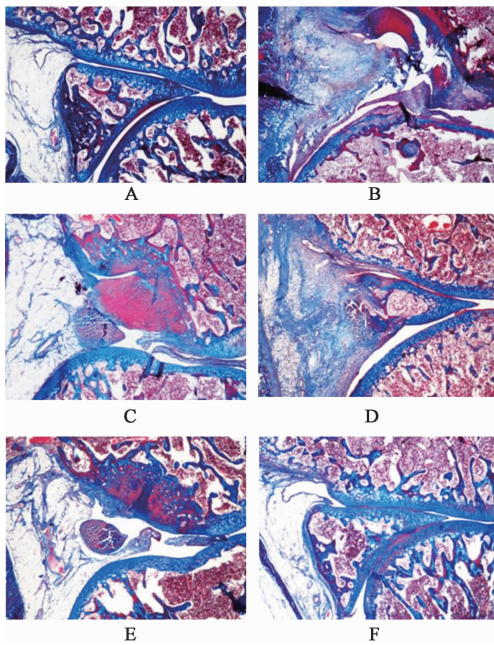


图 3 两个厂家 TG 片对 CIA 大鼠膝关节软骨形态学的影响 (Masson, ×40)  
Fig.3 Effects of QJ and DED TG tablet on morphology in knee joints cartilage of CIA rats (Masson, ×40)

表 3 两个厂家 TG 片对 CIA 大鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effect of QJ and DED TG tablet on body weight changes of CIA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	6 d	12 d	18 d	24 d
正常	-	32.35 ± 2.62	55.80 ± 5.52	74.04 ± 10.39	78.58 ± 20.72
模型	-	32.61 ± 2.63	47.37 ± 5.40	46.46 ± 4.95	36.15 ± 8.45
QJ-TG	0.018	31.18 ± 2.45	46.68 ± 6.34	53.63 ± 10.95	54.38 ± 15.75
	0.054	28.88 ± 3.47	46.66 ± 6.28	47.61 ± 9.96	31.62 ± 15.67
DED-TG	0.018	30.23 ± 2.73	41.49 ± 3.97	36.68 ± 6.39	19.37 ± 8.93
	0.054	30.07 ± 2.98	50.93 ± 4.68	55.23 ± 7.95	24.33 ± 6.11

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	30 d	36 d	42 d
正常	-	96.58 ± 20.89	118.30 ± 24.12	129.20 ± 24.10
模型	-	49.80 ± 9.64	68.26 ± 11.25	80.56 ± 13.01
QJ-TG	0.018	64.07 ± 17.48	79.70 ± 19.51	89.67 ± 21.31
	0.054	40.72 ± 16.49	66.15 ± 17.51	80.00 ± 18.98
DED-TG	0.018	36.47 ± 9.08	57.27 ± 13.52	73.67 ± 16.59
	0.054	39.27 ± 8.97	62.03 ± 8.90	75.35 ± 10.05

含量未见明显异常。见表 6。肝肾组织切片 HE 染色结果显示,给予两个厂家 TG 片干预以后,肝脏细胞结构和形态未见异常,肾组织结构、肾小球和肾小管等未见异常。

**3.3.3 对 CIA 大鼠生殖系统的影响** 对雄性 CIA 大鼠睾丸病变及精子畸形率的影响 正常大鼠未见睾丸病变和精子畸形, CIA 雄性大鼠可见免疫 21 d

大鼠第 1 次免疫之后每 3 d 对其进行称质量,与正常组比较, CIA 模型大鼠体质量变化增加缓慢; TG 片给药后对 CIA 模型大鼠的体质量变化影响不大,两个厂家同等剂量 TG 对 CIA 模型大鼠体质量变化影响无明显差别。见表 3。取材后进行血液常规检测,结果显示 CIA 模型大鼠与正常组比较血常规指标 RBC, WBC, PLT, HGB, MONO 和 NEUT 等均无明显变化。TG 片给药后,可见 DED-TG  $0.054 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组明显升高白细胞数 ( $P < 0.01$ ), 其他未见明显变化,见表 4。取材时对各组大鼠的心脏、肝脏、肺脏、肾脏进行肉眼观察,并统计脏器指数,可见 DED-TG  $0.054 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  明显升高脾脏指数 ( $P < 0.01$ ), 其他给药组均未见对明显改变,见表 5。

**3.3.2 对大鼠消化系统和肝肾系统的影响** 与模型组比较两个厂家 TG 片给药干预后大鼠饮食和排便未见明显异常,且 TG 片给药组大鼠胃组织 HE 染色结果显示未见出血等损伤。取材后进行肝肾功能检测,结果显示 ALT, AST, GGT, TBIL, CRE, UREA

起,可见轻度的精子畸形率; QJ-TG 和 DED-TG  $0.018, 0.054 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组给药 21 d 和 42 d 后,均可出现比模型组更高的精子畸形率,以及一定程度的睾丸损伤,表现为曲细精管内各级生精细胞排列紊乱,间质细胞损伤,曲细精管体积减小,曲细精管间隙增大,管腔空虚,有的无管腔。且随剂量的增大毒性作用增强,42 d 毒性作用均强于 21 d; 两个厂家

的 TG 相比,DED-TG 的睾丸病变程度及精子畸形率比同剂量的 QJ-TG 高,见表 7。对雌性 CIA 大鼠卵巢中血管分布及黄体体积的影响正常组,模型组,QJ-TG 和 DED-TG 0.018 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组雌性大鼠的卵巢中血

管丰富,QJ-TG 和 DED-TG 0.054 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组在给药 21 d 和 42 d 时卵巢中血管散在,呈现减少趋势,且黄体体积减少,边界不清晰,两个厂家比较无明显差异。除此以外,尚未观察到其他异常变化。

表 4 两个厂家 TG 片对 CIA 模型大鼠血常规的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 4 Effect of QJ and DED TG tablet on serum indexes of liver and kidney of CIA rats( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	RBC( $\times 10^{12}$ )/L	HGB/g·L <sup>-1</sup>	PLT( $\times 10^9$ )/L	WBC( $\times 10^9$ )/L	NEUT/%	MONO/%
正常	-	8.54 ± 0.13	14.82 ± 0.22	1 019 ± 65.82	6.67 ± 1.48	17.77 ± 1.25	1.62 ± 0.47
模型	-	8.19 ± 0.16	14.13 ± 0.22	1 106 ± 73.46	4.17 ± 0.32	23.40 ± 1.67	1.38 ± 0.28
QJ-TG	0.018	8.14 ± 0.17	14.18 ± 0.32	1 219 ± 63.89	4.99 ± 0.37	26.53 ± 2.07	1.92 ± 0.36
	0.054	8.51 ± 0.11	14.35 ± 0.20	1 320 ± 92.04	6.45 ± 0.83	28.50 ± 3.82	2.70 ± 0.74
DED-TG	0.018	8.32 ± 0.27	14.44 ± 0.20	840 ± 29.00	6.40 ± 0.76	24.06 ± 2.27	2.40 ± 0.75
	0.054	8.06 ± 0.30	13.47 ± 0.41	1 463 ± 104.00	9.39 ± 1.61 <sup>4)</sup>	25.92 ± 4.44	2.17 ± 0.43

表 5 两个厂家 TG 片对 CIA 大鼠脏器系数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 5 Effect of QJ and DED TG on body weight changes of CIA rats( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肝脏	心脏	脾脏	肺脏	肾脏	胸腺
正常	-	2.33 ± 0.06	0.39 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.76 ± 0.10	0.67 ± 0.02	0.24 ± 0.03
模型	-	2.40 ± 0.12	0.38 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.89 ± 0.11	0.72 ± 0.01	0.25 ± 0.04
QJ-TG	0.018	2.48 ± 0.10	0.40 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.70 ± 0.04	0.70 ± 0.02	0.22 ± 0.02
	0.054	2.55 ± 0.13	0.44 ± 0.04	0.28 ± 0.02	1.04 ± 0.17	0.69 ± 0.02	0.25 ± 0.03
DED-TG	0.018	2.75 ± 0.19	0.39 ± 0.02	0.29 ± 0.03	1.22 ± 0.20	0.72 ± 0.05	0.27 ± 0.02
	0.054	2.43 ± 0.07	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.04 <sup>4)</sup>	1.33 ± 0.12	0.69 ± 0.03	0.27 ± 0.03

表 6 两个厂家 TG 片对 CIA 模型大鼠肝肾功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 6 Effect of QJ and DED TG tablet on serum indexes of liver and kidney of CIA rats( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ALP/U·L <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	GGT/U·L <sup>-1</sup>
正常	-	87.17 ± 3.59	43.17 ± 1.17	95.67 ± 3.87	1.10 ± 0.21
模型	-	117.40 ± 11.26	43.43 ± 2.13	120.70 ± 4.31	1.30 ± 0.23
QJ-TG	0.018	108.50 ± 15.61	46.50 ± 2.49	128.80 ± 5.83	1.26 ± 0.20
	0.054	148.80 ± 5.33	49.33 ± 3.06	121.00 ± 14.18	1.98 ± 0.29
DED-TG	0.018	162.00 ± 38.12	46.50 ± 2.72	123.30 ± 9.84	1.45 ± 0.53
	0.054	140.00 ± 23.23	48.67 ± 4.61	120.00 ± 10.10	1.90 ± 0.36

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TBIL/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	CREA/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	UREA/mmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	0.99 ± 0.15	69.17 ± 3.77	6.42 ± 0.37
模型	-	0.97 ± 0.24	65.71 ± 6.41	7.17 ± 0.51
QJ-TG	0.018	1.07 ± 0.19	59.50 ± 2.55	6.83 ± 0.38
	0.054	0.82 ± 0.14	57.67 ± 2.58	6.67 ± 0.35
DED-TG	0.018	0.70 ± 0.23	57.75 ± 3.22	6.33 ± 0.61
	0.054	1.23 ± 0.24	58.67 ± 2.50	6.85 ± 0.42

表 7 两个厂家 TG 片对 CIA 大鼠睾丸病变比例及精子畸形率的影响

Table 7 Effect of QJ and DED TG tablet on testicular lesion rate and sperm malformation rate and sperm malformation rate

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	睾丸病变比例分级		精子畸形率分级	
		21 d	42 d	21 d	42 d
正常	-	-	-	-	-
模型	-	-	-	+	+
QJ-TG	0.018	-	+	+	+
	0.054	+	+++	+	++
DED-TG	0.018	+	++	+	+++
	0.054	+++	+++	++	+++

#### 4 讨论

目前报道具有抗风湿药物(DMARDs)的中药以 TG,雷公藤甲素等为有效成分的雷公藤代表制剂雷公藤多苷(甙)片是 RA 临床最常用的中成药,曾被 WHO 认定为治疗关节炎的“中国首创植物新药”,目前经 CFDA 批准生产雷公藤多苷的厂家有 12 家,由于不同的生产工艺以及不同的质量标准导致了不同厂家生产的雷公藤多苷片存在不同程度的药效和毒性差异,给临床的用药带来了很大的麻烦。本研究通过复制 CIA 大鼠模型,以湖南千金协力药业有限公司生产的 TG 片和浙江得恩德制药有限公司生产的 TG 片为研究对象,选择临床的等倍剂量进行观察比较,结果显示,在成功复制 CIA 大鼠模型的基础上,两个不同厂家 TG 片均能一定程度改善 CIA 大鼠的关节红、肿、畸形等临床症状,降低临床积分,抑制关节滑膜炎、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏等组织病理学改变。QJ-TG 2 倍临床等效剂量组比 DED-TG 2 倍临床等效剂量组在发送临床积分方面药效略好,但二者比较未见明显差别。DED-TG 6 倍临床等效剂量组在抑制炎症关节红、肿和畸形症状,降低临床积分病理优于 QJ-TG 6 倍临床等效剂量组,在改善关节滑膜炎、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏等组织病理学改变方面与 QJ-TG 6 倍临床等效剂量作用相当,无统计学差异。

随着学术界对中药不良反应的重视,TG 治疗 RA 的负面报道也不断增多<sup>[13-14]</sup>。据报道,TG 对消化道、生殖系统、血液、肝脏、肾脏等均具有一定的毒性和不良反应<sup>[15-17]</sup>。TG 引起的急性肝损伤主要表现为似急性病毒性肝炎或无黄疸型肝炎,多数患者有单项 ALT,AST 升高症状<sup>[18]</sup>。肾损害多为急性肾损害,呈现急性肾衰竭,过量用药时发生率尤高。血

尿素氮(BUN)是人体蛋白质代谢的主要终末产物,常用作肾小球滤过功能的诊断指标<sup>[19]</sup>。同时,临床研究报道 TG 可致男性精子生成障碍及畸形,精子质量下降、睾丸炎等<sup>[9-11]</sup>;致育龄期女性月经紊乱、闭经,卵子质量下降、卵巢早衰等<sup>[12,20-21]</sup>。然而,目前的实验研究多关注 TG 对正常动物生殖系统的影响,未见对疾病模型动物生殖系统作用的研究。针对这一现状,为了更合理更客观评价二个不同厂家雷公藤多苷的药效和毒性作用,本研究制备和临床 RA 患者最接近的病理表现的经典 RA 动物模型-CIA 大鼠模型,在观察分别采用 2 倍和 6 倍临床等效剂量的 QJ-TG 和 DED-TG 的药效的基础上,进一步观察了两个品种对 CIA 大鼠各脏器的影响作用。我们首先比较观察了大鼠体质量、脏器指数,血常规,同时采用血清酶学方法检测大鼠血清中 ALP,ALT,AST,GGT,TBIL,CRE 和 UREA 的含量。结果显示两个厂家 TG 对 CIA 模型大鼠的体质量、其他脏器指数、消化系统、肝肾功及肝肾病理都无明显影响。然而,QJ-TG 和 DED-TG 2 倍临床等效剂量组和 6 倍临床等效剂量组在给药 21,42 d 均能一定程度增加 CIA 大鼠精子畸形率,损伤睾丸内曲细精管,使各级生精细胞排列紊乱,损伤间质细胞,并随剂量和时间的增加,毒性作用增强;且 DED 的雄性生殖毒性作用比同等剂量的 QJ 严重。QJ-TG 和 DED-TG 6 倍临床等效剂量组在给药 21,42 d 时可致雌性 CIA 大鼠卵巢中血管散在,呈现减少趋势,且黄体体积减小,边界不清晰,综之,两个厂家 TG 对 CIA 大鼠的生殖损害雄性比雌性明显。

总之,本研究借用 CIA 大鼠模型,对湖南千金协力药业和浙江得恩德两个厂家的 TG 片的效-毒作用进行初步的比较研究,发现 2 倍和 6 倍临床等效剂量 TG 口服均能抑制 CIA 的发病和疾病严重度,并有一定的雄性生殖毒性,其中高剂量 DED-TG 比 QJ-TG 的毒效作用明显,总体上未观察到两个厂家 TG 片对 CIA 大鼠各脏器明显的不良作用。相关结论有待进一步更系统、全面和深入的研究确证。

#### [参考文献]

[1] 姜海平,张艳艳.雷公藤多苷治疗类风湿关节炎的抗炎机制研究[J].亚太传统医药,2017,13(21):57-58.  
[2] 林兵,杨海跃,刘志宏,等.不同厂家雷公藤多苷片指纹图谱及体内抗炎药效、毒性比较研究[J].中国药师,2019,22(2):206-210,230.  
[3] Bevaart L, Vervoordeldonk M J, Tak P P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how

- does it relate to rheumatoid arthritis? [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8):2192-2205.
- [ 4 ] Cuzzocrea S, Mconald M C, Mota-Filipe H, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen induced arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 (2):320-328.
- [ 5 ] 马帅,佟继铭,梅爱敏,等. 赤菴根总皂苷对 CIA 模型大鼠的治疗作用及对 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(4):70-74.
- [ 6 ] YI J K, Kim H J, YU D H, et al. Regulation of inflammatory responses and fibroblast-like synovioocyte apoptosis by calcineurin-binding protein 1 in mice with collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64 (7):2191-2200.
- [ 7 ] ZHANG Y, BAI M, ZHANG B, et al. Uncovering pharmacological mechanisms of wu-tou decoction acting on rheumatoid arthritis through systems approaches: drug-target prediction, network analysis and experimental validation [J]. *Sci Rep*, 2015, doi: 10.1038/srep09463.
- [ 8 ] Bendele A, Mcabee T, Sennello G, et al. Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data[J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(3):498-506.
- [ 9 ] 郭玉萍,李恩中,张由婧,等. 有氧运动对雄性大鼠生精功能的影响及其睾丸 iTRAQ 定量蛋白组学分析[J]. *中华男科学杂志*, 2017, 23(9):776-781.
- [ 10 ] 刘丹薇,潘卫,徐国宾,等. 1-磷酸鞘氨醇对雄性小鼠生殖毒性损害的拮抗作用[J]. *贵阳医学院学报*, 2016, 41(5):515-519.
- [ 11 ] 王桂玲,任春娥,王丽. 雷公藤多甙对雌性大鼠不良反应的实验研究[J]. *河北医药*, 2009, 31(4):416-418.
- [ 12 ] 王启新,陈则华,罗晓捷,等. 肉苁蓉不同提取部位改善肾阳虚大鼠性能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(22):95-101.
- [ 13 ] 李金洋,李军,王君明,等. 雷公藤多苷致肝毒及其减毒的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(17):4359-4361.
- [ 14 ] 杨冬梅,刘俊. 雷公藤多苷临床应用及不良反应的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(20):2185-2190.
- [ 15 ] 罗岚,江振洲,张陆勇. 雷公藤多苷肝毒性发生机制及减毒相关研究进展[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(10):1504-1509.
- [ 16 ] 刘宁,张友文,张丹,等. 双环醇对雷公藤多苷诱导小鼠肝损伤的保护作用研究[J]. *中国药物警戒*, 2016, 13(7):385-388.
- [ 17 ] 赵小梅,刘歆颖,续畅,等. 基于 LC-MS 代谢组学的雷公藤多苷致肝毒性生物标志物的初步筛查[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(19):3851-3858.
- [ 18 ] 何欣,赵兴华,欧阳五庆. 雷公藤多苷纳米乳体外肝肾的细胞毒性[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2010, 24(6):476-480.
- [ 19 ] 张茜,金若敏. 中药肝肾毒性及肝肾功能检测指标的研究概况[J]. *中国中医药信息杂志*, 2011, 18(8):105-107.
- [ 20 ] 谷春霞,陶学谦,葛秦生,等. 雷公藤多甙片所致闭经原因的探讨[J]. *中国医学科学院学报*, 1989, 11(2):151-153.
- [ 21 ] 张婷婷,马晓莉. 雷公藤多苷致卵巢早衰 1 例[J]. *解放军医学院学报*, 2017, 38(12):1167-1168.

[责任编辑 孙丛丛]