

青风藤联合黑顺片对胶原性关节炎大鼠疗效的实验研究

欧阳琳¹, 易刚强², 韩远山¹, 李 鑫²

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙, 410007;

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208)

[摘要] 目的: 研究青风藤联合黑顺片对大鼠胶原性关节炎(CIA)的疗效。方法: 将40只雌性SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组、青风藤联合黑顺片组, 每组10只。对除空白组外的其余组大鼠进行生Ⅱ型胶原诱导的CIA模型制备, 初次免疫7d后再次免疫时各组开始灌胃给药, 空白组和模型组予0.9%氯化钠注射液(2ml/只), 阳性对照组予吲哚美辛(1.0g/kg), 青风藤联合黑顺片组予青风藤+黑顺片(1.08g/kg+1.35g/kg)。观察大鼠一般情况, 测取足肿胀度, 采用ELISA法检测血清细胞因子IL-17、IL-23的含量。结果: 与模型组比较, 药物组大鼠体质量增长快, 足肿胀程度减轻, IL-17、IL-23含量降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 青风藤联合黑顺片对大鼠CIA模型具有治疗作用, 其疗效可能是通过降低IL-17和IL-23含量而实现的。

[关键词] 胶原性关节炎; 青风藤; 黑顺片; 足肿胀; IL-17; IL-23

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.11.061

Effect of Sinomenium acutum combined with Radix Aconiti Lateralis Preparata slices in treatment of collagen-induced arthritis in rats: An experimental study

OUYANG Lin¹, YI Gangqiang², HAN Yuanshan¹, LI Xin²

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Sinomenium acutum combined with Radix Aconiti Lateralis Preparata slices in the treatment of collagen-induced arthritis (CIA) in rats. Methods: A total of 40 female Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank group, model group, positive control group, and Sinomenium acutum + Radix Aconiti Lateralis Preparata slices group, with 10 rats in each group. All rats except those in the blank group were used to establish a model of CIA induced by type II collagen, and drugs were given by gavage since re-immunization on day 7 after initial immunization. The rats in the blank group and the model group were given 0.9% sodium chloride injection (2ml for each rat), those in the positive control group were given indometacin (1.0g/kg), and those in the Sinomenium acutum + Radix Aconiti Lateralis Preparata slices group were given Sinomenium acutum (1.08g/kg) and Radix Aconiti Lateralis Preparata slices (1.35g/kg). General status was observed, degree of paw swelling was measured, and ELISA was used to measure the serum levels of interleukin-17 (IL-17) and interleukin-23 (IL-23). Results: Compared with the model group, the drug treatment group had a significantly higher speed of the increase in body weight and significant reductions in the degree of paw swelling and the serum levels of IL-17 and IL-23 ($P < 0.05$). Conclusion: Sinomenium acutum combined with Radix Aconiti Lateralis Preparata slices exerts a therapeutic effect on rats with CIA, possibly by reducing the levels of IL-17 and IL-23.

[Key words] collagen-induced arthritis; Sinomenium acutum; Radix Aconiti Lateralis Preparata slice; paw swelling; interleukin-17; interleukin-23

基金项目: 湖南省中医药管理局项目(编号: 600110977)

第一作者: 欧阳琳, 女, 2015级硕士研究生, 研究方向: 中药学

通讯作者: 易刚强, 男, 副教授, 硕士研究生导师; 研究方向: 中药学, E-mail: ygq8228@163.com

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以慢性侵蚀性关节炎为特征的自身免疫性疾病, 其发病机制复杂, 与机体免疫、遗传、环境等有关。研究发现 IL-17 和 IL-23 对 RA 病情的发展有重要作用, 其病情发展程度与 RA 血清中 IL-17、IL-23 的水平成正相关^[1-2]。青风藤被列入《类风湿关节炎诊断及治疗指南》治疗用药, 功能通经络、祛风湿、利小便, 其主含青藤碱、木兰碱、双青藤碱等, 具有镇痛、抗炎、保护软骨和免疫抑制等药理作用^[3], 临床常用治风湿痹证、关节肿胀、水肿、脚气^[4]。附子具有补火助阳、回阳救逆、祛风除湿、散寒止痛功效, 主治亡阳证、心脾肾阳虚证及风寒湿痹证^[5]。附子炮制成黑顺片后毒性降低, 主含乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱等生物碱和多糖^[6], 主要药理作用有镇痛、抗炎、强心、增强免疫功能^[7]。

本实验以 SD 大鼠为研究对象, 将青风藤和黑顺片人用剂量转换成大鼠剂量来确定用药剂量, 探讨二者合用对大鼠胶原型关节炎 (CIA) 的治疗作用, 现报告如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 雌性 SD 大鼠, 体质量 50 ~ 70g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物合格证号为 NO. 11400700346315。饲养环境温度为 23℃, 相对湿度为 55% ~ 65%, 12h 光照周期, 自由进水、进食。适应性喂养 7d 后开始实验。

1.2 药物及试剂 黑顺片 (康美药业股份有限公司, 产地: 四川, 批号: 170650411); 青风藤 (亳州市沪淮药业有限公司, 产地: 江苏, 批号: 1512150652); 吡哆美辛 (山西云鹏制药有限公司, 批号: F171003); 牛 II 型胶原 (IFA, sigma-aldrich 西格玛奥德里奇上海贸易有限公司, 批号: 180382); 不完全弗氏佐剂 (IFA, sigma-aldrich 西格玛奥德里奇上海贸易有限公司, 批号: SLBW2506)。

1.3 主要仪器 游标卡尺 (温岭市华诚商贸有限公司); 分析天平 (梅特勒-托利多 METTLER TOLEDO) 公司; 匀浆机 (德国 IKA T10 basic)。

2 实验方法

2.1 动物分组 将 40 只实验大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组、青风藤联合黑顺片组, 每组 10 只。

2.2 模型制备 参照相关文献^[8]和课题前期研究, 对除空白组外的其余组大鼠行 CIA 模型制备。造模方法: 将牛 II 型胶原提前 1d 放置于 4℃ 冷库中进行解冻, 然后避光震荡过夜, 待充分溶解后, 将 2.0mg/ml 的牛 II 型胶原等量的 IFA 进行混合, 于冰上充分乳化配置成 1mg/ml 乳剂。在大鼠尾根部皮下注射 200μl 的 1mg/ml 乳剂进行初次免疫致敏。致敏 7d 后按上述方法再次注射 200μl 乳剂加强免疫。

2.3 给药方法 在 CIA 模型加强免疫诱导当天开始灌胃给药, 至取材当日。具体给药方法: 空白组与模型组按

2ml/只灌胃 0.9% 氯化钠注射液, 阳性对照组灌胃吡哆美辛 (1.0g/kg 体质量), 青风藤联合黑顺片组灌胃青风藤 + 黑顺片 (1.08g/kg 体质量 + 1.35g/kg 体质量), 每天 1 次, 连续给药 30d。

2.4 观察指标

2.4.1 一般情况 CIA 模型诱导后, 每天观察记录大鼠皮毛色泽、饮食习惯和活动情况、精神状况及大鼠关节炎症状的出现时间。并于初次 CIA 免疫前 (第 0 天) 称量大鼠体质量, 炎症发病后 (第 9 天) 每 3 天 (第 12、15、18、21、24、27、30 天) 称量体质量, 记录数据并观察其变化。

2.4.2 CIA 大鼠足肿胀度测量 用记号笔在每只大鼠的右后足踝关节处永久性标记。于初次 CIA 模型免疫前 (第 0 天) 使用游标卡尺在标记部位测量其足厚度, 炎症发病后 (第 9 天) 每 3 天 (第 12、15、18、21、24、27、30 天) 使用游标卡尺在标记处测量其足厚度, 测量 3 次, 求平均值, 记录数据并观察肿胀度的变化, 同时计算足肿胀率 [足肿胀率 = (右后足肿胀后厚度 - 右后足肿胀前厚度) / 右后足肿胀前厚度 × 100%]。

2.4.3 血清 IL-17、IL-23 含量测定 实验结束后, 用 10% 水合氯醛经腹腔注射麻醉大鼠, 采集大鼠腹主动脉血并保存于真空采血管内, 血液自然凝固 20min 后收取上清液, 依次分批装在 1ml 的 EP 管中并标记。按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清 IL-17、IL-23 的含量。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件, 实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般情况 空白组大鼠精神状态、饮食饮水及活动正常, 毛发光亮, 体质量增长明显; 模型组大鼠精神差, 饮食饮水少, 毛发枯黄无光泽, 体质量增长幅度小, 活动也少; 阳性对照组、青风藤联合黑顺片组的大鼠精神、饮食饮水、毛发光泽度都优于模型组。

3.2 各组大鼠不同时间点足肿胀率比较 CIA 模型大鼠在首次免疫造模后第 9 天开始发病, 始见足小趾关节红肿, 渐至足趾关节红肿明显, 最后踝关节红肿, 于造模第 21 天关节炎症状最严重。与模型组相比, 青风藤联合黑顺片组在第 9、12、15、18、21、24、27、30 天, 阳性对照组在第 12、15、18、21、24、27、30 天, 足肿胀率均明显降低, 差异有统计学意义。(见表 1)

3.3 各组大鼠血清 IL-17、IL-23 比较 与空白组比较, 模型组血清 IL-17、IL-23 水平均升高, 差异有统计学意义, 表明造模成功。与模型组相比, 阳性对照组、青风藤联合黑顺片组的 IL-17、IL-23 降低, 差异具有统计学意义。推测青风藤联合黑顺片是通过降低 IL-17、IL-23 来减少炎症因子的释放, 从而发挥对治疗牛 II 型胶原诱导的 CIA 大鼠模型的治疗作用。(见表 2)

表 1 各组大鼠不同时间点足肿胀率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	只数	剂量	第 9 天	第 12 天	第 15 天	第 18 天	第 21 天	第 24 天	第 27 天	第 30 天
空白组	10	-	5.86 ± 0.94	7.57 ± 0.94	8.62 ± 0.84	9.43 ± 1.07	10.04 ± 1.09	10.72 ± 1.19	11.34 ± 1.17	12.29 ± 1.16
模型组	10	-	6.88 ± 0.55	83.21 ± 5.53	96.67 ± 5.69	112.87 ± 5.19	116.65 ± 5.64	110.35 ± 5.55	105.65 ± 6.10	100.09 ± 5.99
阳性对照组	10	1g/kg	6.40 ± 0.46	23.52 ± 1.58 ^a	25.61 ± 1.81 ^a	27.00 ± 1.81 ^a	28.23 ± 1.82 ^a	29.14 ± 1.67 ^a	30.17 ± 1.99 ^a	31.09 ± 2.07 ^a
青风藤联合黑顺片组	10	1.08g/kg + 1.35g/kg	5.90 ± 0.80 ^a	27.21 ± 2.84 ^a	30.88 ± 3.00 ^a	33.90 ± 3.36 ^a	36.14 ± 3.719 ^a	38.05 ± 4.18 ^a	39.36 ± 4.33 ^a	40.41 ± 29.79 ^a

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠血清 IL-17、IL-23 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量	IL-17(pg/ml)	IL-23(ng/L)
空白组	10	-	73.91 ± 8.79	189.11 ± 2.49
模型组	10	-	118.04 ± 1.64 ^a	238.71 ± 7.57 ^a
阳性对照组	10	1g/kg	81.04 ± 7.28 ^b	188.56 ± 3.67 ^b
青风藤联合黑顺片组	10	1.08g/kg + 1.35g/kg	79.04 ± 8.59 ^b	195.12 ± 8.45 ^b

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

4 讨 论

RA 是一种以慢性侵蚀性关节炎为特征的自身免疫性疾病,其病理为大量炎性细胞浸润,关节滑膜组织增生,微血管新生及血管翳的形成,骨与软骨及周围组织破坏,最终导致关节畸形。CIA 可造成大鼠关节滑膜组织增生,形成血管翳,骨与软骨及破坏,最后关节畸形^[9-10]。RA 属于中医学中“痹证”范畴,与中医古籍记载的“顽痹”“尪痹”“历节”“鹤膝风”等病证相似,历代医家对痹病病因病机认识很多,总体归纳为内因、外因和其他因素三类。内因为正气亏虚、情志失调;外因为外感风、寒、湿、热等六淫之邪,其先侵袭肌腠和经络,后停于关节和筋骨发病。

本实验结果显示,与模型组相比,青风藤联合黑顺片组大鼠的精神、饮食、毛发光泽度较优,模型大鼠足肿胀程度减轻,大鼠血清中 IL-17、IL-23 含量降低。结果证实青风藤联合黑顺片能很好地控制 RA 病情,其疗效可能是通过降低 IL-17、IL-23 的含量实现的。

参考文献

[1] Abu Al Fadl EM, Fattouh M, Allam AA. High IL-23 level is a

marker of disease activity in rheumatoid arthritis[J]. Egypt J Immunol, 2013, 20(3): 85-92.

[2] Guo YY, Wang NZ, Zhao S, et al. Increased interleukin-23 is associated with increased disease activity in patients with rheumatoid arthritis[J]. Chin Med, 2013, 126(51): 850-854.

[3] 蔡强, 向莹, 岳涛. 基于网路药理学方法预测青风藤药理机制[J]. 现代中医药, 2019, 39(2): 108-112.

[4] 钟赣生. 中药学[M]. 9 版. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 181-182.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 177.

[6] 王超群, 翟宏炎, 王晓华. RP-HPLC 法测定黑顺片中 6 种酯型生物碱的含量[J]. 化学分析计量, 2015, 24(2): 62-65.

[7] 邓晓红, 黄建华, 董竞成. 附子药理作用的分子机制研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(1): 121-124.

[8] 孙丽华, 张志伟, 张华健, 等. 滑膜炎颗粒对 II 型胶原关节炎模型的治疗作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(6): 740-743, 745.

[9] Liu D, Cao T, Wang N, et al. IL-25 attenuates rheumatoid arthritis through suppression of Th17 immune responses in an IL-13 dependent manner[J]. Sci Rep, 2016, 6(4): 36002.

[10] Van Holten J, Reedquist K, Sattone - Roche P, et al. Treatment with recombinant interferon-β reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(3): 239-249.

(收稿日期: 2019-04-18)

(上接第 113 页)

[5] 曹桂红, 陈华国, 赵超, 等. 黑骨藤药材薄层色谱检测方法研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2009, 27(4): 98-101.

[6] 吴剑锋. 天然药物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 363.

[7] 李萍. 生药学[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 66.

[8] 匡学海. 中药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 256-260.

[9] 甘秀海, 周欣, 赵超, 等. 黑骨藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 广东化工, 2012, 39(9): 20-21.

[10] 陈庆, 靳风云, 陈华国. 黑骨藤研究概况[C]. 全国苗医药学术研讨会专辑, 2003: 224.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部 2015 版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 41, 269, 299.

[12] 张贵军. 中药鉴定学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 145, 219, 381.

[13] 陈银芳, 徐群志, 魏惠珍, 等. Kedde 比色法测定复方雷公藤片中总内酯[J]. 中草药, 2008, 39(2): 222.

[14] 贵州省食品药品监督管理局. 关于废止《贵州省中药材、民族药材质量标准(2003 年版)》部分质量标准的通知[EB/OL]. 2015-07-16/2018-07-16. http://www.gzhfda.gov.cn/read_Article_17_8172_9272492158.shtml.

[15] 李雪峰, 刘育辰, 刘刚, 等. 苗药黑骨藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(4): 908.

[16] 贵州省食品药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准修订工作正式启动[EB/OL]. 2015-07-18/2018-07-16. http://www.gzhfda.gov.cn/read_Article_35_8198.shtml.

[17] 贵州省食品药品监督管理局. 省食品药品监督管理局召开地方中药材中药饮片质量标准制(修)订工作推进会[EB/OL]. 2018-05-07/2018-07-16. http://www.gzhfda.gov.cn/read_Article_35_16602.shtml. (收稿日期: 2018-12-12)