

了主要作用并参与肿瘤的形成和转移。应用化学致癌剂对小鼠结肠诱导建立损伤和炎症模型,当除去结肠上皮细胞中特异的 I K 后,由于 I B 不能降解而导致 NF- B 活化受限,最终引起肿瘤发生率下降。因此,半边旗提取物 5F 在体外引起非小细胞肺癌细胞凋亡可能是与抑制 NF- B 活性有关。

参考文献:

[1] 邓亦峰,梁念慈. 半边旗中二萜类化合物的超临界 CO<sub>2</sub>萃取及 HPLC-MS 分析 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 145-148.  
 [2] 张晓,崔燎,田中信寿,等. 半边旗有效成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药理学杂志, 1997, 32(1): 37-38.  
 [3] 刘义,吴科锋,李立,等. 半边旗提取物 5F 对非小细胞肺癌 NCF-H460 细胞生长的抑制作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(1): 9-12.  
 [4] 李立,吕应年,刘义,等. 半边旗提取物 5F 诱导 HepG2 细胞凋亡与 p53 活化及血管内皮生长因子抑制有关 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 241-245.  
 [5] Li J H, He C W, Liang N C, et al. Effects of antitumor compounds isolated from *Pteris semipinnata* L. on DNA topoisomerases and cell cycle of HL-60 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, 20: 541-545.  
 [6] Chen G G, Liang N C, Lee J F, et al. Over-expression of Bcl-2 against *Pteris semipinnata* L.-induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway [J]. *Apoptosis*, 2004, 9: 619-627.  
 [7] Liu Z, Ng E K, Liang N, et al. Cell death induced by *Pteris semipinnata* L. is associated with p53 and oxidant stress in gastric cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579: 1477-1487.  
 [8] 何太平,陈杰,莫丽儿,等. 半边旗二萜类化合物 5F 对人大转移卵巢癌细胞系 HO-8910 PM NF- B (p65)、Smad3 蛋白和 NF- B (p65)、ETS-1 mRNA 表达的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 545-548.

[9] Guseva N V, Taghiyev A F, Sturm M T, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated activation of mitochondria-associated nuclear factor-kappaB in prostatic carcinoma cell lines [J]. *Mole Cancer Res*, 2004, 2: 574-584.  
 [10] Yang J, Amiri K I, Burke J R, et al. BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 950-960.  
 [11] Kim J S, Lee J M, Chwae Y J, et al. Cisplatin-induced apoptosis in Hep3B cells: mitochondria-dependent and independent pathways [J]. *Biochem Pharm*, 2004, 67: 1459-1468.  
 [12] Olivier S, Robe P, Bours V. Can NF-kappaB be a target for novel and efficient anti-cancer agents? [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72: 1054-1068.  
 [13] Sharma V, Hupp C D, Tepe J J. Enhancement of chemotherapeutic efficacy by small molecule inhibition of NF-kappaB and checkpoint kinases [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14: 1061-1074.  
 [14] Kawakami S M, Ito M, Kawakami S. Induced apogamous sporophytes in *Pteris dispar* and *P. semipinnata*, and the meiotic behavior in their sporocytes [J]. *J Plant Res*, 1996, 109: 369-373.  
 [15] Kim H J, Hawke N, Baldwin A S. NF-kappaB and I K as therapeutic targets in cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 738-747.  
 [16] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression [J]. *Nature*, 2006, 441: 431-436.  
 [17] Radhakrishnan S K, Kamalakaran S. Pro-apoptotic role of NF-kappaB: implications for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1766: 53-62.  
 [18] Chen L F, Greene W C. Shaping the nuclear action of NF-kappaB [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 17(5): 392-401.  
 [19] Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs [J]. *Nat Rev Canc*, 2005, 5: 297-309.

## 附子生物碱与甘草活性物质组合抗大鼠佐剂性关节炎的实验研究

杨洁红,张宇燕,万海同\*,朱振洪,李金辉

(浙江中医药大学,浙江 杭州 310053)

**摘要:**目的 观察附子生物碱与甘草活性物质(三萜皂苷和黄酮等)组合对大鼠佐剂性关节炎(AA)模型的抗炎效应,研究两者配伍的抗炎作用机制,探讨两者配伍的意义。方法 设对照组、模型组、附子组(即附子生物碱组)、附子甘草配伍组(即附子生物碱与甘草活性物质配伍组)、雷公藤组,观察各组大鼠足肿胀程度和关节炎指数(AI)变化;检测大鼠血清和关节浸液内细胞因子如白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF-)及前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)水平;用 RT-PCR 检测踝关节组织 IL-1 基因表达;观察踝关节组织病理改变。结果 与对照组比较,AA 模型组大鼠关节肿胀严重,AI 明显升高,血清和关节浸液内 IL-、TNF-、PGE<sub>2</sub>水平显著升高,踝关节组织 IL-1 基因表达明显增加,并发生明显病理改变;与模型组相比,附子组、附子甘草配伍组大鼠关节肿胀得到改善,AI 降低,血清和关节浸液内 IL-1、TNF-、PGE<sub>2</sub>水平降低,踝关节组织 IL-1 基因表达减弱,病理组织改善,且附子甘草配伍组优于附子组。结论 附子生物碱与甘草活性物质配伍组合能有效抗炎,缓解 AA 症状,改善 AA 大鼠免疫功能和组织结构,两者配伍作用优于单用附子生物碱,体现了附子生物碱、甘草活性物质是附子甘草两者配伍抗炎效应的重要物质基础。

**关键词:**附子生物碱;甘草活性物质;佐剂性关节炎;抗炎;细胞因子

**中图分类号:**R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)03-0439-06

收稿日期:2009-06-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30873430,30973933);浙江省自然科学基金资助项目(Y207759);教育部高校博士点基金资助项目(20093322110001)

作者简介:杨洁红(1969—),女,广东揭西人,副教授,医学博士,主要从事方剂配伍研究。

Tel: (0571) 86613711 E-mail: yannoo7376@sina.com

\*通讯作者 万海同

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根加工品,具有回阳救逆、补火助阳、逐风寒湿邪等功效,用于亡阳虚脱,肢冷脉微,阳萎,宫冷,心腹冷痛,虚寒吐泻,阴寒水肿,阳虚外感,寒湿痹痛,阴疽疮疡。临床上广泛用于治疗风湿、类风湿、关节炎等症。附子发挥药效的主要成分为其所含的乌头碱等生物碱类物质(主要为二萜类),具有明显的镇痛、抗炎、对免疫功能的影响、对心血管系统的影响等作用。甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、光果甘草 *G. glabra* L. 或胀果甘草 *G. inflata* Bat. 的根及根茎,是一种常用的重要中药,主要成分为甘草酸等三萜皂苷和甘草苷为主的甘草黄酮,能补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛,具有明显的抗肿瘤、抗氧化作用,在胃溃疡、肝损害、病原微生物和抗变态反应等方面都有明显的药理作用<sup>[1-4]</sup>。

《金匱要略》:“痙湿渴病脉证治第二”,“风湿相搏,骨节疼烦掣痛,不得屈伸,近之则痛剧,汗出短气,小便不利,恶风不欲去衣,或身微肿者,甘草附子汤主之”。甘草附子汤由甘草、附子、白术和桂枝组成,此系风湿表里阳气俱虚证治。方中各药配伍表里同治祛风除湿,尤其甘草意在缓急止痛,又缓附子燥烈有毒之性。在临床附子也常与甘草配伍,甘草不仅能降低附子毒性,还可以增强附子的药效<sup>[5]</sup>。

以往多从临床疗效、单味药或方剂层次上进行中药研究,本实验突破以上研究方法,以主要的药效物质基础为切入点,进行附子生物碱与甘草活性物质组合及其与抗炎效应的相关性研究,探讨抗炎效应的物质基础及机制,从而为临床提供科学依据,为中药复方研究提供新的思路与方法。

大鼠佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)是研究类风湿性关节炎的重要模型<sup>[6]</sup>。本实验采用AA大鼠模型,通过观察附子生物碱及其与甘草活性物质(三萜皂苷和黄酮等)配伍后对大鼠关节炎的治疗作用、对相关炎症介质及基因表达的影响,以及病理学的改变,研究附子生物碱与甘草活性物质配伍对类风湿性关节炎的治疗作用,探讨两者配伍抗炎效应的物质基础及机制。

## 1 材料与方

1.1 主要仪器:ARA520 电子天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司;KW65—3A 型高频电刀,北京医用电子仪器厂;LEICA RM2016 切片机、ZMN—7803 型组织包埋机、LEICA 普通光学显微镜,上海徕卡仪器有限公司;Universal 32 高速离心机,德国

Hettich 公司;Tanon EPS100 电泳仪,北京六一仪器厂;PCR 仪,德国 Whatman Biometra 公司;凝胶成像系统,上海天能科技有限公司。

1.2 药品与试剂:附子生物碱、甘草活性物质(三萜皂苷和黄酮等)自行制备提取,其中附子生物碱部位含生物碱 0.63%,甘草活性物质中含甘草酸 78.40%、甘草黄酮 17.51%。通过预实验,附子生物碱的最低有效剂量为 3.77 mg/kg,甘草活性物质配伍用量为 17.79 mg/kg(以附子甘草原药用量 1:1 计算)。雷公藤多苷片,浙江普洛康裕天然药物有限公司,批号 070101。临用时均用生理盐水配制成相应的浓度。弗氏完全佐剂,美国 Sigma 公司产品;白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) ELISA 试剂盒,购自上海晶美生物技术有限公司;Trizol 溶液、DEPC、Olig(dt) 18、RNase Inhibitor(核酶抑制剂)、反转录酶均为上海泽衡生物技术有限公司产品;IL-1、 $\beta$ -actin 引物于上海泽衡生物技术有限公司合成,IL-1 的扩增片段大小(产物长度)810 bp,上游引物 5'-ATGGCAACTGTTCCCTGAACTC-3',下游引物 5'-TTAGGAA GACACGGATTCCAT-3'; $\beta$ -actin 的扩增片段大小 410 bp;上游引物 5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3',下游引物 5'-CTAGAA GCA TTTGCGGTGCA-3'。

1.3 动物:清洁级 SD 大鼠,雄性,50 只,体质量(150 $\pm$ 10)g,在室温为 22~25℃ 条件下饲养。实验动物由浙江中医药大学动物中心供应,实验室符合国家动物实验设施屏障系统标准,动物实验条件合格证:SYXK(浙)2003-0003 号。

1.4 AA 大鼠模型的建立与给药方法:随机从 50 只大鼠中选 10 只作为对照,其余用于模型复制。按照文献方法<sup>[7]</sup>,于大鼠左后足跖皮内注射弗氏完全佐剂 0.1 mL 致炎,致炎后大鼠随机分为 4 组,即模型组、附子组(附子生物碱 3.77 mg/kg)、附甘组即附子甘草配伍组(附子生物碱 3.77 mg/kg、甘草活性物质 17.79 mg/kg)、雷公藤组(雷公藤多苷片,9 mg/kg)。对照组予以生理盐水注射液同法注射。各组动物于致炎后当天分别 ig 给药,对照组和模型组给予等容积的生理盐水,每日 1 次,连续 28 d。注射佐剂前后不同时期进行病情观察,在致炎后 7、14、21、28 d 计算关节炎指数(arthritis index, AI)。

1.5 大鼠足肿胀程度测定:在大鼠踝关节处作标记,根据排水法原理自制测定仪,分别测量造模前和造模后 7、14、21、28 d 大鼠右后足体积 2 次,取平均

值,以致炎前后各组大鼠排水量 (mL) 差值代表右后足跖的肿胀度。

1.6 AI 的计算<sup>[7]</sup>:致炎后第 7 天开始观察并记录全身关节病变程度,每 7 d 记录 1 次。全身病变按 5 级评分法评价,根据未注射佐剂的其余 3 只肢体的病变程度累计积分,计算出 AI。0 分:无红肿;1 分:小趾关节红肿;2 分:趾关节和足跖肿胀;3 分:踝关节以下的足爪肿胀;4 分:包括踝关节在内的全部足爪肿胀。把各个关节的积分累计起来,即为每只大鼠的 AI。

1.7 血清和关节浸液的获取与 IL-1、TNF-、PGE<sub>2</sub> 的检测:大鼠致炎给药后 28 d,用 10% 水合氯醛 (0.4 mL/100 g) ip 麻醉,由腹主动脉抽取 4~6 mL 血液,4 000 r/min,离心 10 min,取血清,置 -80 °C 冰箱待测;在大鼠非致炎侧踝关节上方 0.5 cm 处摘取肿胀足爪,纵向切开,放入存有 5 mL 生理盐水的试管中 4 °C 浸泡过夜,离心取上清, -80 °C 保存待测。血清、关节浸液中的 IL-1、TNF-、PGE<sub>2</sub> 的检测采用酶联免疫吸附试验方法 (ELISA),按试剂盒说明书操作。

1.8 大鼠关节滑膜组织中 IL-1 mRNA 表达水平的测定:处死大鼠后,立即取踝关节组织滑膜,投入液氮中保存,备用。用 Trizol 法提取总 RNA,用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法扩增 cDNA,扩增产物经电泳分离后,凝胶成像系统成像,检测

IL-1 mRNA 在各组大鼠踝关节组织中相对表达量的变化。

1.9 大鼠关节组织病理切片:处死大鼠后,切取四肢/掌趾部,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,常规脱钙后,石蜡包埋,切片,片厚约 3~5 μm,经 HE 染色后,光镜下观察。

1.10 统计学处理:各组数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用:模型组于注射佐剂次日呈明显肿胀,注射部位发红、肿、热、痛;逐日加重达高峰,然后逐渐减轻,于第 10 天后出现继发性肿胀。其余各组 (附子组、附子甘草配伍组、雷公藤组) 大鼠的毛色、活力等状况总体优于模型组。

2.2 对 AA 大鼠 AI 的影响:结果见表 1。与模型组比较,附子组、附子甘草配伍组、雷公藤组的关节状况均有明显改善 ( $P < 0.05, 0.01$ ),附子甘草配伍组作用优于附子组 ( $P < 0.05$ )。

2.3 对 AA 大鼠足肿胀程度的影响:结果见表 2。与模型组比较,附子组、附子甘草配伍组、雷公藤组均能不同程度改善关节炎大鼠足肿胀度 ( $P < 0.05, 0.01$ ),且附子甘草配伍组优于附子组 ( $P < 0.05$ )。

2.4 对 AA 大鼠血清和关节浸液内炎症细胞因子的影响:结果见表 3。与对照组比较,模型组大鼠血

表 1 附子甘草配伍对 AA 大鼠 AI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of compatibility of Radix Aconiti Lateralis Preparata and Radix Glycyrrhizae on AI in AA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	AI			
		7 d	14 d	21 d	28 d
模型	-	3.10 ± 0.74	6.20 ± 0.79	7.30 ± 0.62	7.20 ± 0.54
附子	3.77	2.80 ± 0.42	5.00 ± 0.82 *	6.50 ± 0.78	6.10 ± 0.65 *
附子甘草配伍	3.77 + 17.79	2.70 ± 0.48	4.90 ± 0.99 *	6.30 ± 0.54 *	5.01 ± 0.55 **
雷公藤	9	2.60 ± 0.52	4.10 ± 0.88 **	5.40 ± 0.70 **	5.30 ± 0.67 **

与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ ; 与附子组比较:  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group;  $P < 0.05$  vs aconiti group

表 2 附子甘草配伍对 AA 大鼠足肿胀的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of compatibility of Radix Aconiti Lateralis Preparata and Radix Glycyrrhizae on swelling degree of joints in AA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	造模前体积/ mL	足肿胀/mL			
			7 d	14 d	21 d	28 d
模型	-	1.08 ± 0.11	1.05 ± 0.04	0.99 ± 0.05	0.89 ± 0.05	0.87 ± 0.05
附子	3.77	1.08 ± 0.12	1.02 ± 0.03	0.94 ± 0.07 *	0.86 ± 0.04	0.84 ± 0.06 *
附子甘草配伍	3.77 + 17.79	1.07 ± 0.10	1.01 ± 0.03	0.93 ± 0.09 *	0.85 ± 0.03 *	0.80 ± 0.02 *
雷公藤	9	1.06 ± 0.10	1.00 ± 0.05 *	0.91 ± 0.03 **	0.84 ± 0.06 *	0.78 ± 0.03 **

与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ ; 与附子组比较:  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group;  $P < 0.05$  vs aconiti group

表 3 附子甘草配伍对 AA 大鼠血清和关节浸液内炎症细胞因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 3 Effects of compatibility of Radix Aconiti Lateralis Preparata and Radix Glycyrrhizae on levels of cytokine in serum and joint fluids of AA rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	血清各炎症细胞因子/(pg · mL <sup>-1</sup> )			关节浸液各炎症细胞因子/(pg · mL <sup>-1</sup> )		
		IL-1	TNF	PGE <sub>2</sub>	IL-1	TNF	PGE <sub>2</sub>
对照	-	67.19 ± 0.16	10.98 ± 3.70	8.31 ± 2.40	233.42 ± 64.37	30.91 ± 6.32	25.80 ± 7.50
模型	-	171.76 ± 12.15	37.84 ± 3.31	26.14 ± 3.00	739.42 ± 76.50	80.09 ± 6.08	66.27 ± 6.72
附子	3.77	141.63 ± 16.56**	29.10 ± 3.13*	20.72 ± 3.11*	603.84 ± 67.60*	68.80 ± 5.09**	52.82 ± 6.38**
附子甘草配伍	3.77 + 17.79	122.43 ± 14.28**	23.59 ± 3.09**	14.99 ± 2.71**	468.56 ± 60.95**	56.73 ± 6.89**	40.31 ± 5.28**
雷公藤	9	106.87 ± 17.74**	20.60 ± 3.03**	11.66 ± 3.26**	414.36 ± 63.67**	54.00 ± 7.33**	34.65 ± 6.79**

与对照组比较:  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ ; 与附子组比较:  $P < 0.05$

$P < 0.01$  vs control group; \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group;  $P < 0.05$  vs aconiti group

清、关节浸液内 IL-1、TNF、PGE<sub>2</sub> 水平均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 附子组、附子甘草配伍组、雷公藤组 IL-1、TNF、PGE<sub>2</sub> 水平均明显降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 且附子甘草配伍组效果优于附子组 ( $P < 0.05, 0.01$ )。说明附子生物碱与甘草活性部位配伍能显著地降低 AA 大鼠血清和关节浸液内炎症细胞因子的水平, 具有显著的抗炎作用。

2.5 对 AA 大鼠关节滑膜组织中 IL-1 mRNA 基因表达的影响: 大鼠踝关节组织滑膜经 Trizol 一步法抽提总 RNA, RT-PCR 扩增, 电泳分离后成像, 用图像分析软件分析凝胶图像以检测显色条带的灰度值, 与内参  $\beta$ -actin 之比值即表示 IL-1 mRNA 表达水平。结果见表 4, 模型组比对照组表达明显增加 ( $P < 0.01$ ), 附子组、附子甘草配伍组比模型组表达明显减弱 ( $P < 0.01$ ), 且附子甘草配伍组优于附子组 ( $P < 0.05$ )。

2.6 对关节组织病理的影响: 大鼠四肢/掌趾经固定、脱钙、石蜡包埋、切片后 HE 染色, 光镜下观察发现: 对照组关节滑膜细胞结构完整, 排列整齐, 细胞下为疏松结缔组织, 无炎症细胞, 关节软骨完整、

光滑、软骨下骨组织清晰; 模型组关节滑膜细胞增生严重, 滑膜细胞下的结缔组织因胶原纤维增生而变得致密, 滑膜内大量淋巴细胞浸润, 成纤维细胞增生; 附子组、附子甘草配伍组病理得到明显改善, 见轻度结缔组织增生, 少量淋巴细胞浸润, 雷公藤组滑膜表面有 1~2 层滑膜细胞覆盖, 浅层有少量淋巴细胞浸润和胶原纤维增生。见图 1。

表 4 附子甘草配伍对 AA 大鼠踝关节滑膜组织中 IL-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 4 Effects of compatibility of Radix Aconiti Lateralis Preparata and Radix Glycyrrhizae on IL-1 mRNA expression in ankle joints tissue of AA rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(mg · kg <sup>-1</sup> )	IL-1 mRNA
对照	-	0.915 ± 0.151
模型	-	1.679 ± 0.114
附子	3.77	1.348 ± 0.183**
附子甘草配伍	3.77 + 17.79	1.005 ± 0.161**
雷公藤	9	1.070 ± 0.122**

与对照组比较:  $P < 0.01$

与模型组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与附子组比较:  $P < 0.05$

$P < 0.01$  vs control group; \*\*  $P < 0.01$  vs model group

$P < 0.05$  vs aconiti group

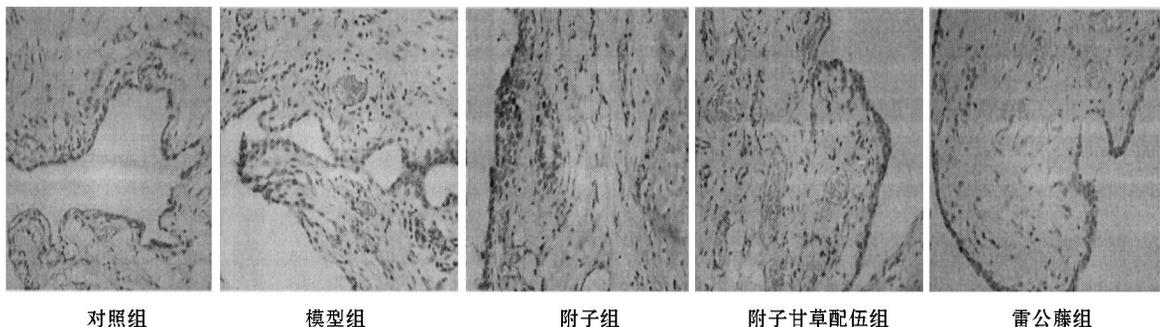


图 1 附子甘草配伍对 AA 大鼠关节组织病理的影响

Fig. 1 Effects of compatibility of Radix Aconiti Lateralis Preparata and Radix Glycyrrhizae on pathological changes of joint tissue of AA rats

### 3 讨论

在祖国医学典籍中,类风湿性关节炎(RA)属于痹证,相当于“骨痹”、“历节病”。其内因多为气血营卫亏虚,外因则多责之于风寒湿热诸邪,而气候变化、居住环境、以及过劳、体虚则常是重要的诱发因素。现代医学认为,RA是一种以关节滑膜炎为主要病理表现的慢性、系统性和破坏性的自身免疫性关节疾病。临床表现复杂多样,早期可有红、肿、热、痛和关节功能障碍。晚期关节可出现不同程度的强直和畸形,并有骨腐蚀和骨骼肌的萎缩,严重影响日常生活和工作,是一种致残率较高的疾病,严重危害了人类的身体健康。

RA是一个多基因、多因素参与的病理过程。作为RA的生理标志,各种细胞因子、趋化因子、蛋白酶等受到广泛关注,它们在RA的发病机制研究、早期鉴别诊断、药物治疗机制和药物疗效监测等方面发挥着重要作用。细胞因子网络失调与RA发病及病程进展关系密切,炎症细胞因子如IL-1、TNF- $\alpha$ 及PGE<sub>2</sub>在RA发病机制和滑膜的保护中起到关键作用<sup>[8]</sup>。RA中的滑膜细胞、淋巴细胞、巨噬细胞处于高度活化状态,可合成IL-1与TNF- $\alpha$ 等多种炎症细胞因子。释放入关节滑膜液及血液中的细胞因子IL-1与TNF- $\alpha$ 有许多相似的生物学活性,在RA中主要参与以下病理过程:激活血管内皮细胞,增强内皮细胞黏附分子的表达,在关节炎时,血液中的白细胞通过与黏附分子相互作用被汇集到关节腔;刺激结缔组织细胞和多形核细胞产生前列腺素等小分子炎症递质;通过刺激滑膜细胞和软骨细胞,破坏骨细胞,并产生胶原酶和其他中性蛋白酶,释放骨钙等导致骨和软骨的破坏<sup>[9,10]</sup>。在RA的病程进展中,滑膜细胞合成释放IL-1、TNF- $\alpha$ 等细胞因子,刺激滑膜及炎症细胞产生和释放前列腺素,而PGE<sub>2</sub>可增加毛细血管通透性,引起炎症反应性水肿、渗出、充血等,并引起软骨下骨质吸收破坏,刺激滑膜血管翳形成,从而加重滑膜炎及RA的活动性,因此,降低病变组织PGE<sub>2</sub>的量是药物改善临床症状的重要原因。

RA与淋巴细胞、巨噬细胞、滑膜细胞等功能改变有关。滑膜组织的多种细胞释放各种细胞因子进入滑膜液及血液中,通过介导细胞间的相互作用引起一系列组织损伤酶的释放,促进滑膜细胞、滑膜成纤维细胞的增殖和滑膜微血管的增生,这是导致关节破坏的重要因素,也是导致关节内黏连和后期关节畸变的关键因素<sup>[11]</sup>。大鼠AA病理学特点包括

滑膜细胞过度增生、增厚,单核巨噬细胞浸润,关节软骨及骨的破坏。

本实验研究表明,与对照组相比,AA模型组大鼠的关节肿胀、疼痛和变形等均较明显,血清和关节浸液内细胞因子IL-1、TNF- $\alpha$ 及PGE<sub>2</sub>水平均显著升高,AA大鼠踝关节组织中IL-1基因明显增强,有明显的滑膜细胞增生、增厚,滑膜细胞下结缔组织增生,淋巴细胞大量浸润,关节面软骨破坏明显,并有局灶性脱落,体现明显的类似于RA的临床症状。

附子生物碱与甘草活性物质组合炎症性关节的肿胀程度能得到有效地缓解,对关节炎性症状有显著改善作用,血清和关节浸液内细胞因子水平显著降低,踝关节组织中IL-1基因表达减弱,病理明显改善,滑膜细胞增生减少,偶见少量淋巴细胞浸润,没有明显的关节面软骨破坏或局灶性脱落。且其作用显著优于单用附子生物碱。

本实验从改善RA病变局部炎症、调节细胞免疫状态、组织基因表达及病理改变等方面,对附子生物碱与甘草活性物质(三萜皂苷和黄酮等)配伍前后疗效进行比较,研究附子生物碱与甘草活性物质配伍的意义,结果附子生物碱与甘草活性物质配伍对AA具有显著治疗作用,改善各项病理生化指标,且附子生物碱与甘草活性物质配伍后作用优于单用附子生物碱,从组分合和的角度阐述了附子生物碱与甘草活性物质配伍后治疗类风湿性关节炎的机制,表明附子生物碱与甘草活性物质是附子与甘草配伍抗炎症的重要物质基础,充分体现了附子与甘草配伍即中医配伍理论的显著意义,为临床两者的配伍应用提供了可靠的实验依据。同时本实验从研究有效部位的角度出发,探讨中医药配伍的意义和机制,也为中医复方的研究和新药的开发提供了新的思路与方法。

#### 参考文献:

- [1] 姜薇,尚明,马爱英,等.甘草黄酮对S<sub>180</sub>、H<sub>22</sub>荷瘤小鼠红细胞膜和肿瘤细胞膜Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase及Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>-ATPase活性的影响[J].中华临床医学杂志,2005,6(5):1-3.
- [2] 管燕,谢强敏.甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用[J].中草药,2009,40(8):1254-1259.
- [3] 王淑斌,杜凤香,冯亚宏.浅谈甘草的药理作用[J].中国医学杂志,2004,2(6):319-320.
- [4] 柯文娟,刘新月,陈燕,等.甘草次酸对K562细胞增殖抑制作用及其机制研究[J].中草药,2008,39(5):714-718.
- [5] 王亭,徐敬海.附子甘草配伍研究进展[J].中草药,2009,40(8):1332-1334.
- [6] 邵传森,朱圣禾.临床疾病与免疫[M].北京:人民卫生出版社,2002.

- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [8] Linkhoff A K. Biological agents for rheumatoid arthritis targeting both physical function and structural damage [J]. *Drugs*, 2004, 64(12): 67-83.
- [9] 蔡青, 孟济明. IL-1 和 TNF 与类风湿性关节炎 [J]. 上海免疫学杂志, 1998, 18(1): 62-63.
- [10] 乌兰. 类风湿关节炎病人血清细胞因子水平以及与炎症指标的相关性 [J]. 中华风湿病学杂志, 1997, 1(1): 28-30.
- [11] Yamanishi Y, Firestein G S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of synoviocytes [J]. *Rheum Arthritis*, 2001, 27(2): 355-368.

## 刺五加叶皂苷 B 对急性心肌梗死大鼠的保护作用

梁启明, 曲绍春, 于晓风, 徐华丽, 韩冬, 睢大箎\*

(吉林大学药学院 药理教研室, 吉林 长春 130021)

**摘要:**目的 研究刺五加叶皂苷 B (ciwujianoside B) 对大鼠急性心肌梗死的影响及其机制。方法 通过结扎大鼠左冠状动脉前降支制备急性心肌梗死模型; 观测以下指标: 左室收缩压 (LVSP)、左室舒张末期压 (LVEDP)、左室压最大上升/下降速率 ( $\pm dp/dt_{max}$ )、动脉收缩压 (SBP)、动脉舒张压 (DBP)、平均动脉压 (MAP)、心率 (HR)、心肌梗死范围 (MIS); 肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 活性; 游离脂肪酸 (FFA) 及乳酸 (LA) 水平; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 及白细胞介素-6 (IL-6) 水平。结果 与模型组比较, 刺五加叶皂苷 B 可显著升高急性心肌梗死大鼠 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 、HR、SBP ( $P < 0.05$ ), 降低 LVEDP ( $P < 0.05$ ), 对 DBP、MAP 的增加不显著; 刺五加叶皂苷 B 可明显缩小 MIS, 降低血清 CK、LDH、AST 活性及 MDA、FFA、LA、TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 提高 SOD、GSH-Px 活性 ( $P < 0.05$ )。结论 刺五加叶皂苷 B 对大鼠急性心肌梗死具有明显保护作用, 可能与其增强抗氧化酶活性, 减少自由基损伤, 纠正 FFA 代谢紊乱及 LA 堆积, 抑制炎症反应等机制有关。

**关键词:** 刺五加叶皂苷 B; 心肌梗死; 自由基; 炎症

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)03-0444-04

刺五加叶皂苷系从五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 叶中提取分离的含 16 种活性成分的总皂苷, 其中 13 种为邵春杰等<sup>[1,2]</sup>发现的化合物, 命名为刺五加苷 (ciwujianoside)-A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub>、B、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 和 E。其中刺五加叶皂苷 B (ciwujianoside B) 是一种单体成分, 分子式为 C<sub>58</sub>H<sub>92</sub>O<sub>25</sub>·3H<sub>2</sub>O, 相对分子质量为 1 242, 化学名称为 3-氧-吡喃鼠李糖基-(1-2)-吡喃阿拉伯糖基-30-去甲齐墩果-12, 20(29)-二烯-28-酸-28-氧-吡喃鼠李糖基-(1-4)-吡喃葡萄糖基-(1-6)-吡喃葡萄糖基酯。前期研究表明刺五加叶皂苷可减少梗死面积及梗死后心室重构的发生, 对心肌缺血有明显的保护作用<sup>[3-6]</sup>。但具体发挥作用的单体成分还难以确定。已有研究显示刺五加叶皂苷 B 对心室肌细胞膜 ATP 敏感性钾通道有开放作用<sup>[7]</sup>, 对异丙肾上腺素导致的大鼠急性心肌缺血有保护作用<sup>[8]</sup>。本实验通过结扎左冠状动脉前降支建立大鼠急性心肌梗

死模型, 观察刺五加叶皂苷 B 对急性心肌梗死的保护作用并探讨相关作用机制。

### 1 材料

1.1 药品与试剂: 刺五加叶皂苷 B 由吉林大学药学院天然药物化学研究室提供, 白色粉末, 实验时以蒸馏水配制, 经过 0.22  $\mu$ m 孔径滤膜滤过除菌后使用; 氯化硝基四氮唑蓝 (NB-T) 购自上海前进试剂厂; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、游离脂肪酸 (FFA)、乳酸 (LA) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 放免试剂盒购自中国人民解放军总医院东亚免疫技术研究所。

1.2 实验动物: Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体质量 220~250 g, 动物合格证号: SCXK(吉)2003-0001, 由吉林大学实验动物中心提供。

### 2 方法

2.1 模型制备: 急性心肌梗死造模方法参照文献方法<sup>[9]</sup>。具体如下: 将大鼠乙醚麻醉, 仰位固定, 自左

收稿日期: 2009-06-05

基金项目: 吉林省中医管理局科研基金重点课题 (98A17)

作者简介: 梁启明 (1981—), 女, 吉林省长春市人, 博士, 主要从事心血管药理学研究。

Tel: (0431) 85619705 E-mail: lqm19810719@yahoo.com.cn

\*通讯作者 睢大箎