

## 伸筋草生物碱对佐剂性关节炎大鼠的抗炎作用及机制研究

刘 静, 年 华, 徐 熠, 吴铁军, 孙祎纯, 邵燕婷\*, 黄 瑾\*

上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 药剂科, 上海 200437

**摘要:** 目的 探讨伸筋草生物碱对完全弗氏佐剂(CFA)诱导大鼠关节炎的治疗作用及机制。方法 健康SD大鼠48只,随机分为6组,每组8只,即对照组、模型组、依托考昔片(阳性药,1 mg/kg)组及伸筋草生物碱低、中、高剂量(30、60、120 mg/kg)组,除对照组外,其余40只大鼠sc 0.1 mL CFA造模,致炎15 d后,连续ig给药30 d。测定大鼠足趾肿胀率、HE染色后观察造模踝关节滑膜病理改变;致炎45 d,ELISA法测定血清中白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平。结果 与模型组比较,依托考昔片及伸筋草生物碱低、中、高剂量组足趾肿胀率均显著下降( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );中、高剂量伸筋草生物碱明显改善滑膜细胞、巨噬细胞、纤维细胞增生与炎症细胞浸润;与模型组比较,依托考昔片及伸筋草生物碱高剂量组大鼠血清TNF- $\alpha$ 水平显著下降( $P < 0.05$ ),依托考昔片及伸筋草生物碱各剂量组IL-1 $\beta$ 水平均显著降低( $P < 0.01$ )。结论 伸筋草生物碱显著抑制CFA诱导关节炎大鼠关节肿胀,改善大鼠踝关节滑膜病变,其作用机制可能与降低体内IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平有关。

**关键词:** 伸筋草生物碱; 类风湿关节炎; 白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ); 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)05-0869-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.05.010

## Anti-inflammatory effect and mechanism of shenjincaoalkaloids on adjuvant arthritis rats

LIU Jing, NIAN Hua, XU Yi, WU Tiejun, SUN Yichun, SHAO Yanting, HUANG Jin

Dept. of Pharmacy, the Affiliated Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China

**Abstract: Objective** To explore the therapeutic effect and mechanism of shenjincao alkaloids (SJA) on arthritis induced by complete freund's adjuvant (CFA) in rats. **Methods** 48 healthy SD rats were randomly divided into 6 groups, 8 in each group, namely control group, model group, Etoncoxib (Positive drug, 1 mg/kg) group, and low-, medium- and high-dose (30, 60, and 120 mg/kg) SJA groups, 40 healthy SD rats were injected with 0.1 mL CFA in addition to control group. The swelling rate of rat toes was measured and the pathological changes of ankle synovial membrane were observed. For 45 days, ELISA assay was used to determine the level of serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Results** Compared with model group, the toe swelling rate of each group was significantly decreased ( $P < 0.05$  and  $0.01$ ), and the levels of synovial cells, macrophages, fibroblast proliferation and inflammatory cell infiltration were also significantly decreased in medium and high doses of SJA groups. Compared with model group, the serum TNF- $\alpha$  level of rats in Etoncoxib and high-dose group of SJA decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and the IL-1 $\beta$  level of rats in Etoncoxib and each dose group of SJA decreased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** SJA can inhibit the CFA induced joint swelling in arthritis rats, improve ankle synovial lesions in rats, and have therapeutic effects on adjuvant arthritis rats. The mechanism may be related to decreasing the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  *in vivo*.

**Key words:** shenjincao alkaloids; adjuvant arthritis; interleukin-1 beta(IL-1 $\beta$ ); tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ )

收稿日期: 2018-08-09

基金项目: 上海市教委预算内项目(2015YSN46); 岳阳中西医结合医院院级基金(2018YJ06)

第一作者: 刘 静(1988-), 女, 药师, 研究方向为临床药学。Tel: (021)65161782-3115 E-mail: liujing411627@163.com

\*通信作者: 黄 瑾, 男, 副主任药师, 研究方向为医院药学、临床药学。E-mail: john70550@163.com

邵燕婷, 女, 研究实习生, 研究方向为实验动物学。E-mail: ytshao529@163.com

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属中医学“痹证”范畴,以关节疼痛、僵硬、变形甚至活动受限等功能障碍为主要表现,临床主要分为风寒湿痹、风湿热痹、淤血阻络等型;西医属一种慢性自身免疫性疾病。目前在临床上以非甾体抗炎药和免疫抑制药缓解临床症状和控制病情为主,但这些药物长期服用均可导致胃肠道和肝肾功能损伤的毒副作用<sup>[1]</sup>,毒副作用相对较低的中药治疗RA,具有副作用小的优势。伸筋草 *Lycopodium clavatum* L. 又名舒筋草、石松、狮子草、绿毛伸筋、小伸筋等,临床应用历史悠久,疗效确切,全国大部分地区盛产。伸筋草味苦、性辛、温,归肝、脾、肾三经,具有祛风散寒、除湿消肿、舒筋活络之功效,临床主要用于风寒湿痹、关节肿痛、筋脉拘急、跌打损伤。现代药理研究表明,伸筋草具有抗炎镇痛、调节免疫、治疗矽肺等作用<sup>[2-3]</sup>。因此,阐明伸筋草镇痛作用的外周和脊髓机理,不仅对石松科药材的临床用药有所启发,而且对痛症研究亦有一定的指导意义,具有重要的基础与临床研究价值。本文就伸筋草生物碱对佐剂性关节炎大鼠的抗炎作用及机制进行探讨。

## 1 材料

### 1.1 动物

50只健康SD大鼠,雄性,SPF级,体质量(170±10)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号为SCXE(沪)2017-0005。

### 1.2 药物及主要试剂

伸筋草药材经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院徐玲玲主任药师鉴定,为石松科植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥全草。伸筋草生物碱由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药学部提取并进行质量分析,利用树脂柱分离伸筋草总生物碱,以伸筋草中总生物碱为指标,苦参碱作为对照品,采用酸性染料比色法,测定提取物中总生物碱的质量分数为56.07%。

依托考昔片(安康信),杭州默沙东制药有限公司,批号M026145,规格60 mg;完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA),Sigma公司,批号SLBK7817V;大鼠白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA试剂盒,上海威奥生物科技有限公司,货号分别为ER0128、ER0155。

### 1.3 主要仪器

酶标仪,型号DENLEY DRAGON Wellscan MK 3,分析软件为Ascent software for Multiskan,芬

兰 Thermo;数字显示隔水式电热恒温培养箱,型号PYX-DHS,规格4002×500,上海跃进医疗器械厂;离心机,型号TGL-168,上海安亭科学仪器厂;移液枪,规格20~200  $\mu$ L, Thermo labsystems;漩涡混合器,型号XW-80A,上海青浦沪西仪器厂。

## 2 方法

### 2.1 大鼠RA模型的建立

SD大鼠常规条件下饲养,自由饮水,普通饮食,适应性喂养5 d后,参照文献<sup>[4]</sup>,取40只大鼠,采用CFA诱导法复制类风湿关节炎大鼠模型,即取CFA每支10 mL,在冰浴下与卡介苗混合,配制含卡介苗10 mg/mL的水包油乳剂,对大鼠sc予以每只0.1 mL于左足趾。另取8只大鼠,每只sc生理盐水0.1 mL于左足趾,作为对照组。

### 2.2 分组和干预方法

造模当天记为致炎第1天,致炎15 d后,再将40只大鼠随机分为5组,每组8只,即模型组,依托考昔片(阳性药,1 mg/kg)组,伸筋草生物碱低、中、高剂量(30、60、120 mg/kg)组,药物用蒸馏水制成溶液ig给药,对照组给予等体积蒸馏水。从致炎15 d(分组日)开始,每天ig给药,连续30 d。

### 2.3 大鼠足趾肿胀情况测量<sup>[5]</sup>

于致炎前及致炎后15、25、35、45 d,采用大鼠足趾肿胀仪测量大鼠左后足膝关节以下足趾体积,记录结果,计算足趾肿胀率。

足趾肿胀率=(致炎后足趾体积-致炎前足趾体积)/致炎前足趾体积

### 2.4 取材及指标检测

末次给药后禁食禁水12 h, ip 10%水合氯醛0.3 mL/100 g。每只腹主动脉取血并处死大鼠,离断大鼠注射侧足髌关节,取包含踝关节的足部。

致炎侧足踝关节用10倍体积10%中性甲醛溶液固定,不同浓度梯度乙醇逐级脱水,石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察大鼠踝关节滑膜病理变化<sup>[6]</sup>。

血液经3 000 r/min离心10 min后取上清液备用,采用ELISA试剂盒测定各组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6水平。

### 2.5 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠足趾肿胀情况

致炎15 d后,模型组足趾肿胀率均明显升高,

与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。在致炎 25、35、45 d,与模型组比较,依托考昔片及伸筋草生物碱低、中、高剂量组足趾肿胀率均明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05, 0.01$ )。结果见表 1。

### 3.2 踝关节滑膜病理观察

踝关节滑膜 HE 染色病理显示,对照组大鼠细胞排列整齐,未见滑膜细胞、巨噬细胞增生,未见间

质炎细胞浸润,踝关节软骨表面光滑,滑膜组织结构无破坏。模型组大鼠有大量炎症细胞浸润踝关节软骨组织,结构遭到破坏,滑膜组织增生变形、细胞排列紊乱。与模型组比较,伸筋草生物碱低剂量组踝关节滑膜病变等症状无明显改变;中、高剂量组滑膜细胞、纤维细胞轻度增生,巨噬细胞可见增多,炎症细胞浸润散在。结果见图 1。

表 1 伸筋草对注射 CFA 大鼠足趾肿胀情况的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effects of SJA on foot swelling condition of CFA-induced rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	足趾肿胀率/%				
		造模前	造模后 15 d	造模后 25 d	造模后 35 d	造模后 45d
对照	—	1.79±0.12	7.14±1.02	8.64±1.35	12.27±1.52	9.77±0.82
模型	—	1.71±0.16	74.0±8.21 <sup>##</sup>	78.19±1.13 <sup>##</sup>	73.66±1.45 <sup>##</sup>	61.78±1.55 <sup>##</sup>
依托考昔片	1	1.71±0.06	73.6±1.45	43.49±1.43 <sup>**</sup>	35.52±2.24 <sup>**</sup>	27.76±2.18 <sup>**</sup>
伸筋草生物碱	120	1.71±0.16	74.5±1.34	56.10±1.10 <sup>**</sup>	53.22±0.71 <sup>**</sup>	49.80±0.50 <sup>*</sup>
	60	1.70±0.13	76.0±1.08	57.22±0.73 <sup>**</sup>	57.67±0.90 <sup>*</sup>	49.51±0.61 <sup>*</sup>
	30	1.70±0.10	74.9±1.51	56.88±0.80 <sup>**</sup>	52.63±0.90 <sup>**</sup>	49.22±0.67 <sup>*</sup>

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

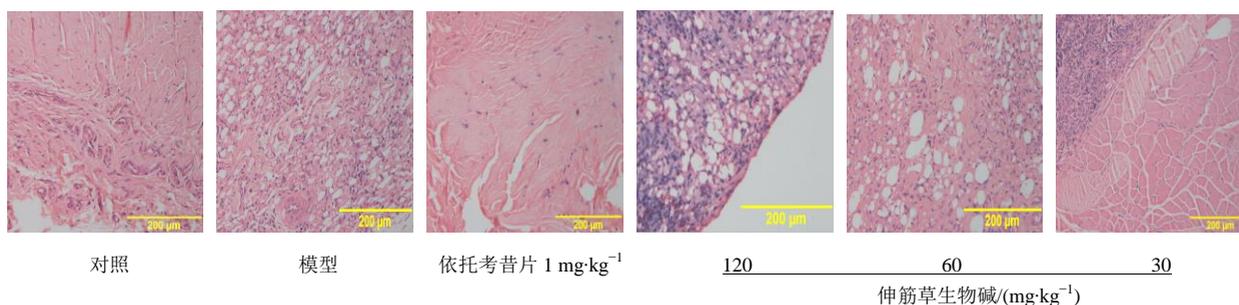


图 1 各组大鼠踝关节滑膜切片

Fig. 1 Synovial sections of ankle joint of rats in each group

### 3.3 大鼠血清中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平

与对照组比较,模型组大鼠 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,依托考昔片及伸筋草生物碱高剂量组 TNF- $\alpha$  水平显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,依托考昔片及伸筋草生物碱各剂量组 IL-1 $\beta$  水平均显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果见表 2。

### 4 讨论

目前对类风湿性关节炎的治疗研究取得了比较大的进展,新药和新疗法更是层出不穷,但由于该病其发病机制复杂,至今世界上尚无特效疗法,目前的治疗仍是对于临床症状的对症处理。临床的一线用药仍是非甾体类抗炎药,但该类药物存在

表 2 伸筋草生物碱对 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effects of SJA on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  level of CFA-induced rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-1 $\beta$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	44.72±4.91	826.12±58.42
模型	—	66.12±4.80 <sup>##</sup>	1337.56±123.89 <sup>##</sup>
依托考昔	1	52.27±4.78 <sup>*</sup>	892.23±512.39 <sup>**</sup>
伸筋草生物碱	120	50.53±22.64 <sup>*</sup>	967.55±78.95 <sup>**</sup>
	60	58.53±21.87	988.72±72.66 <sup>**</sup>
	30	67.22±6.20	1007.38±57.42 <sup>**</sup>

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

副作用大,用药禁忌症多的缺点。中药治疗关节炎具有独特优势,目前已成为热点,主要是富含苷类、生物碱、黄酮及萜类的中药材,研究发现这类药材具有抗炎镇痛、免疫调节作用,但由于中药化学成分多样,药理活性广泛,缺乏明确的药效物质基础研究,中药治疗类风湿性关节炎的机制仍不清晰。本文就中药伸筋草的抗炎镇痛作用进行了初步研究。

伸筋草临床主要用于风寒湿痹、关节肿痛、筋脉拘急、跌打损伤。李艳杰等<sup>[7]</sup>研究发现,伸筋草水煎液和伸筋草配方颗粒均具有明显的镇痛、抗感染等药理活性。敖鹏等<sup>[8]</sup>研究发现,伸筋草氯仿提取物可以明显降低佐剂性关节炎大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6含量;张东军等<sup>[9]</sup>报道伸筋草乙醇提取物具有显著的抗炎、镇痛药理作用,其中以氯仿提取部位作用最强。因此,对于伸筋草生物碱的研究既有利于开发毒副作用小、疗效显著的抗类风湿药物,同时也能推动中医药的发展。

本研究结果显示,伸筋草生物碱显著抑制CFA诱导关节炎大鼠关节肿胀,改善大鼠踝关节滑膜病变,明显降低大鼠血清IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平。TNF- $\alpha$ 是一种破坏性促炎性细胞因子,在RA滑膜炎及骨质破坏中发挥着重要作用。TNF- $\alpha$ 还可以诱导RA滑膜细胞分泌多种炎症细胞因子(如IL-1 $\beta$ 、IL-6)、环氧化酶和胶原酶等,因此抑制TNF- $\alpha$ 可能是治疗RA的潜在靶点<sup>[10]</sup>。IL-1 $\beta$ 为一种致炎细胞因子,广泛参与了人体组织破坏、水肿形成等多种病理损伤过程。本实验结果初步证明了伸筋草可以有效降低类风湿性关节炎模型大鼠血清中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的含量,提示伸筋草可能是通过降低促炎症细胞因子的产生,减轻类风湿性关节炎模型大鼠关节组织的损伤<sup>[11]</sup>。尽管发现了伸筋草生物碱能对部分炎症起调控作用,从而发挥其抗炎效应。但

针对点状模式的细胞因子网络,并不能全面解释其对RA复杂炎症反应过程的作用。通过以上探索研究,可为后续发掘中药伸筋草对RA的治疗机制打下基础。

#### 参考文献

- [1] 蔡卓亚,周自桂,李萍,等.伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(2):297-304.
- [2] Blair H A, Deeks E D. Abatacept: a review in rheumatoid arthritis [J]. Drugs, 2017, 77(11): 1221-1233.
- [3] 蔡卓亚,周自桂,李萍,等.伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(2):297-304.
- [3] 吴晶金.类风湿关节炎动物模型研究进展[J].风湿病与关节炎,2016,5(12):70-73.
- [4] 韦婷,王天虹,曾勇,等.藏族药五味甘露药浴散加减方对佐剂性关节炎大鼠药效血清NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1, EGF的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,10(22):133-137.
- [5] 车萍,季旭明,梁粟,等.独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用及血清中5-HTP, 5-HIAA的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(19):170-173.
- [6] 李艳杰,王丽娜.伸筋草配方颗粒的药理等效性实验研究[J].长春中医药大学学报,2014,30(3):403-404.
- [7] 敖鹏,周忠光,韩玉生.伸筋草氯仿提取物对佐剂性关节炎大鼠血清RF、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6含量的影响[J].中医药信息,2013,30(3):129-131.
- [8] 张东军,边晓燕,尹丽颖.伸筋草乙醇提取物对佐剂性关节炎大鼠治疗作用的实验研究[J].中医药学报,2010,38(4):41-42.
- [9] Bustamante M F, Garcia-Carbonell R, Whisenant K D, et al. Fi-broblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 110.
- [10] 杨娟,左芳,魏志成,等.翼首草总苷对佐剂性关节炎大鼠药效及作用机制的研究[J].中药新药与临床药理,2016,27(6):788-794.