• 药理与临床 •

不同比例甘草配伍祖师麻抗大鼠佐剂性关节炎的实验研究

张　雯[1, 2, 3]，贡　磊[1, 2, 3]，周玲玲[1]，单进军[1, 2, 3]，陈乐天[1]，许惠琴[1]，狄留庆[1, 2, 3*]

1. 南京中医药大学，江苏 南京　210023
2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心，江苏 南京　210023
3. 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心，江苏 南京　210023

摘　要：目的　观察不同比例甘草配伍祖师麻对大鼠佐剂性关节炎（AA）模型的治疗作用，筛选两者配伍比例，探讨其配伍意义。**方法**　采用足跖皮内注射弗氏完全佐剂制备 AA 模型，将 140 只模型大鼠随机分成 14 组：模型组，雷公藤多苷片组，祖师麻低、中、高剂量组，甘草低、中、高剂量组，祖师麻-甘草（3∶1）低、中、高剂量组，祖师麻-甘草（3∶2）低、中、高剂量组，另取 10 只正常大鼠为对照组，给药组大鼠造模前 2 d 开始 ig 给药，连续给药 31 d，观察各组大鼠体质量变化，计算足肿胀度、关节炎指数（AI），采用 ELISA 法检测大鼠血清炎症细胞因子肿瘤坏死因子-α（TNF-α）和白细胞介素-1β（IL-1β）的水平，观察大鼠膝关节组织病理变化，通过免疫组化法测定大鼠膝关节滑膜组织中血管内皮生长因子（VEGF）、巨噬细胞游走抑制因子（MIF）的表达。**结果**　与模型组比较，祖师麻组、祖师麻甘草配伍组能够明显抑制 AA 大鼠体质量减轻的趋势，对抗 AA 大鼠足肿胀度及 AI 的增加，降低异常升高的血清 TNF-α、IL-1β 水平，改善关节病理组织变化，减少滑膜组织 VEGF、MIF 的表达，其中以祖师麻-甘草（3∶2）配伍组效果最优。**结论**　祖师麻甘草配伍后，对 AA 大鼠各项指标改善作用显著，作用优于单用祖师麻，其最佳配伍比例为祖师麻-甘草（3∶2）。调节血清炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 及滑膜组织 VEGF、MIF 的表达，可能是祖师麻甘草配伍治疗类风湿性关节炎机制之一。

关键词：类风湿性关节炎；祖师麻；甘草；细胞因子；足肿胀；配伍

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2014)10 - 1418 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.013

Effect of different compatibility of *Daphnes Giraldii Cortex* and *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* on adjuvant-induced arthritis in rats

ZHANG Wen[1, 2, 3], GONG Lei[1, 2, 3], ZHOU Ling-ling[1], SHAN Jin-jun[1, 2, 3], CHEN Le-tian[1], XU Hui-qin[1], DI Liu-qing[1, 2, 3]

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China
3. Nanjing Engineering and Technology Research Center of TCM Pellets, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective　To study the therapeutic effects of different compatibility of *Daphnes Giraldii Cortex* (DGC) and *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* (GRR) on rat adjuvant-induced arthritis (AA) model, to screen the compatibility ratios, and to explore the possible mechanism. **Methods**　AA model in SD rats was established, then the arthritic rats were randomly divided into 14 groups such as model, *Tripterygium* Glycosides Tablet (TGT), low-, mid-, high-dose DGC, low-, mid-, high-dose GRR, low-, mid-, high-dose DGC + GRR (3 : 1), and low-, mid-, high-dose DGC + GRR (3 : 2) groups, and 10 normal rats were as control group. The rats in treatment groups were ig administered 2 d before the model establishment, for 31 d. The body weight changes were observed, the paw edema and arthritis index (AI) were calculated, and the contents of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β) in AA rat serum were detected by ELISA. The expression levels of VEGF and MIF were detected with immunohistochemistry. **Results**　DGC + GRR, and DGC significantly inhibited the decrease of body weight, also reduced paw swelling, AI, levels of TNF-α and IL-1β in AA rat serum, joint

收稿日期：2013-10-21

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81273655）；江苏省高校科技成果产业化推进项目（JHB2012-19）

作者简介：张　雯（1988—），女，硕士研究生，研究方向为中药新剂型、新技术应用与评价。

*通信作者　狄留庆，教授，博士生导师。Tel: (025)86798226　E-mail: diliuqing@hotmail.com

damages of AA rats, and levels of VEGF and MIF in the synovial membrane of AA rats, and the DGC + GRR (3 : 2) group had the best effect. The differences were significantly compared with the model group ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** The combined use of DGC and GRR can obviously relieve the arthritis syndrome in AA rats by reducing the expression of serum cytokines as well as inhibiting the joint damage, and its therapeutic effect is better than used separately. Furthermore, the curative effect is the best when the compatibility ratio of DGC and GRR reaches 3 : 2. Reducing TNF-α and IL-1β contents in serum and the levels of VEGF and MIF in synovial membrane may be the mechanism of drug treatment of rheumatoid arthritis.

Key words: rheumatoid arthritis; *Daphnes Giraldii Cortex*; *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma*; cytokine; paw edema; compatibility

祖师麻为瑞香科植物黄瑞香 *Daphne giraldii* Nitsche 的根皮和茎皮，同属植物唐古特瑞香 *D. tangutica* Maxim、凹叶瑞香 *D. retusa* Hemsl、长白瑞香 *D. koreana* Nakai 和同科结香属植物结香 *Edgeworthia chrysantha* Lindl 均可同等入药，能祛风湿、活血止痛，有小毒，用于治疗风湿痹痛、关节炎、类风湿性关节痛，为西部地区民间用药。甘草具有缓急止痛、调和诸药及解毒的功效，中医有“十方九草”之说。现代科学研究表明，甘草可以调节机体免疫功能，甘草皂苷类成分甘草酸具有类糖皮质激素样作用，甘草黄酮也具有较强的抗炎作用[1]。药理实验表明祖师麻提取物具有显著的抗炎作用[2-3]。民间用药经验表明，甘草配伍祖师麻具有良好的增效减毒作用。本课题组前期研究发现，甘草能够显著提高祖师麻主要活性成分瑞香素的生物利用度[4]，但其具体药效机制尚不清楚。

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种病因不明的慢性炎性自身免疫性疾病，表现为释放自身抗体，产生滑膜炎症，形成血管翳并破坏软骨，使得周围关节呈非特异性的对称性炎症[5]，发病机制目前不甚清楚。本实验拟采用大鼠佐剂性关节炎（adjuvant-induced arthritis，AA）模型，以 RA 发病机制中重要炎症细胞因子如肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-1β（IL-1β）、血管内皮生长因子（VEGF）以及巨噬细胞游走抑制因子（MIF）为指标，结合足肿胀度、关节炎指数（arthritis index，AI）和膝关节组织病理变化的检查，对祖师麻甘草配伍比例进行筛选，并探讨其可能的作用机制，以期开发成抗 RA 新药。

1 材料

1.1 药品与试剂

祖师麻（陕西省医药公司，批号 20120812），甘草（安徽省万生中药饮片有限公司，批号 20120901），均经南京中医药大学陈建伟教授鉴定，祖师麻为瑞香科植物黄瑞香 *D. giraldii* Nitsche 的干燥茎皮，甘草为豆科植物光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的根茎；雷公藤多苷片（浙江得恩德制药有限公司，批号 20111016）；卡介苗冻干粉（北京生物制品研究所，批号 20110928）；大鼠 TNF-α ELISA 试剂盒、大鼠 IL-1β ELISA 试剂盒（美国 eBioscience 公司）；兔抗大鼠 VEGF 抗体、兔抗大鼠 MIF 抗体（美国 Abcam 公司）；即用型快速免疫组化 MaxVisionT 试剂盒、DAB 显色试剂，福州迈新生物公司。

1.2 实验动物

SD 雄性大鼠，清洁级，体质量 200～220 g，由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供，实验动物合格证号：SCXK（沪）2012-0002。

1.3 主要仪器

YSL—7B 足趾容积测量仪，济南益延科技发展有限公司；PMT49984 多功能酶标仪，美国 BioTek 公司；TP1020 自动脱水机，德国 LEICA 公司；RM2235 石蜡切片机，德国 LEICA 公司；CS—VI 摊片烤片机，湖北孝感宏业医用仪器有限公司；Tissue-Tek TEL 组织包埋中心，日本 SAKURA 公司；LEICA DM—1000 光学显微镜，德国 LEICA 公司；隔水式电热恒温培养箱，上海市跃进医疗器械一厂；微波炉，TCL 有限公司；MiniSee 图像采集系统；康克新柏图文分析软件。

2 方法

2.1 给药样品液的制备

取祖师麻、甘草饮片及其不同比例配伍组合物祖师麻-甘草（3∶1、3∶2），分别加水煎煮 2 次（10 倍量水，2 h；5 倍量水，1 h），合并滤液，浓缩，即得各提取物；祖师麻提取物含瑞香素 296.38 μg/mL，甘草提取物含甘草酸 1 190.84 μg/mL、甘草苷 621.98 μg/mL，祖师麻-甘草（3∶1）提取物含瑞香素 283.45 μg/mL、甘草酸 563.93 μg/mL、甘草苷 297.35 μg/mL，祖师麻-甘草（3∶2）提取物含瑞香素 275.52 μg/mL、甘草酸 1 094.04 μg/mL、甘草苷 564.17 μg/mL。另取雷公藤多苷片适量，加蒸馏水溶解制备成 937.5 mg/L 溶液，于 4 ℃冰箱保存，备用。

2.2 造模方法[6]

2.2.1 弗氏完全佐剂的制备 取卡介苗冻干粉，80 ℃灭活 30 min 后，与液体石蜡、羊毛脂以 3∶2 比例于研钵内研磨混匀，制备成 10 mg/mL 的混悬液，高压灭菌。

2.2.2 AA 模型的制备 大鼠适应性饲养 3 d 后，取 140 只，于左后足跖皮内注射弗氏完全佐剂 0.1 mL 制备 AA 模型。另取大鼠 10 只，于相同部位，采用相同方法注射 0.1 mL 生理盐水，作为对照组。

2.3 分组及给药

造模大鼠随机分为 14 组，每组各 10 只，即模型组、12 个给药组及阳性对照组，其中给药组分别设祖师麻低、中、高剂量（生药 405、810、1 620 mg/kg）组，甘草低、中、高剂量（生药 270、540、1 080 mg/kg）组，祖师麻-甘草（3∶1）配伍低、中、高剂量 [生药（405＋135）、（810＋270）、（1 620＋540）mg/kg] 组，祖师麻-甘草（3∶2）配伍低、中、高剂量 [生药（405＋270）、（810＋540）、（1 620＋1 080）mg/kg] 组，分别相当于临床拟用剂量的 1、2、4 倍，阳性对照组给予雷公藤多苷片 7.5 mg/kg。以上各组 ig 给予相应剂量药物，给药体积均为 8.0 mL/kg，于造模前 2 d 开始给药，每天给药 1 次，连续给药 31 d。另取 10 只正常大鼠为对照组，模型组与对照组 ig 给予同体积的蒸馏水。

2.4 观察与检测指标

2.4.1 大鼠一般情况观察 在给药前及给药后第 3、10、17、24、29 天，分别测量各组大鼠体质量。每天观察大鼠体毛色泽的改变，神志及活动状态，饮食变化及关节红肿情况。

2.4.2 大鼠足肿胀度的测量 在大鼠踝关节处作标记，用大鼠足趾容积测量仪分别测量造模前大鼠左右足跖体积，造模后第 1、2、3 天左后足跖体积，造模后第 8、10、12、16、20、24 天右后足跖体积，测量 3 次，取平均值，并计算关节肿胀度。

肿胀度＝造模后足跖体积 / 造模前足跖体积

2.4.3 AI 的计算[7] 造模后第 7 天开始观察并记录全身关节病变程度，每 7 天记录 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：足小趾关节红肿；2 分：趾关节和足跖均肿胀；3 分：踝关节以下的足爪均肿胀；4 分：包括踝关节在内的全部足爪红肿。把各个关节的积分累计起来，即为每只大鼠的 AI。

2.4.4 血清 TNF-α 和 IL-1β 的检测 于末次给药 2 h 后，大鼠麻醉颈总动脉取血，离心 10 min，转速为 3 000 r/min，采集血清并分装，ELISA 法检测血清 TNF-α 和 IL-1β 水平。

2.4.5 病理组织学观察 连续给药 31 d 后，颈动脉取血，并处死大鼠，取其膝关节用 10%福尔马林固定，经过脱钙、脱水、常规石蜡包埋，切片（厚度 4～5 μm）和常规 HE 染色后，检查阅片，具体观察指标包括：炎细胞浸润、滑膜病变、骨质破坏、关节肿胀等病理变化。

2.4.6 滑膜组织 VEGF 和 MIF 的测定 采用免疫组化二步法测定大鼠膝关节滑膜组织中 VEGF 和 MIF 的表达。将病理组织学实验所得石蜡切片脱蜡水化，PBS 冲洗，正常兔血清封闭，滴加 VEGF（1∶200）、MIF（1∶200）抗体孵育，PBS 冲洗，滴加即用型快速免疫组化 MaxVision 二抗，孵育后 PBS 冲洗，滴加显色剂 DAB，自来水冲洗，苏木素复染细胞核，流水冲洗返蓝，梯度乙醇脱水，中性树胶封片。应用免疫组化分析方法，使用康克新柏图文分析软件分析切片，在每只大鼠滑膜组织切片中于 100 倍镜下随机采集 5 个视野图像，分别计算积分吸光度平均值。

2.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 16.0 统计软件对多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 分析，组间比较采用方差分析和两样本均数比较的 t 检验。

3 结果

3.1 不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠一般情况的影响

与对照组相比，大鼠造模 10 d 后，表现出精神倦怠、活动减少、食欲下降、被毛失去光泽且体质量减轻（P＜0.01），其余各组大鼠的活力、毛色、状态均优于模型组。祖师麻组、祖师麻-甘草（3∶1）及祖师麻-甘草（3∶2）配伍组在造模 17 d 后，均可剂量依赖性地缓解 AA 大鼠体质量的减轻，与模型组比较，差异显著（P＜0.05、0.01）。祖师麻-甘草（3∶2）组抑制 AA 大鼠体质量减轻趋势优于祖师麻组及祖师麻-甘草（3∶1）组。结果见表 1。

3.2 不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠足肿胀度的影响

AA 大鼠早期致炎局部发生炎症反应，注射后数小时内足跖注射部位即出现红肿等炎症反应，持续 2～3 d 后逐渐减轻，此为原发性病变，至造模 8

d 后再度肿胀；继发性病变由迟发超敏反应所致，一般出现于致炎后 10 d 左右，表现为造模足跖对侧和前肢的肿胀，炎症呈进行性加重，少数大鼠耳、尾部出现红斑和炎性结节。

与对照组比较，模型组大鼠足肿胀度显著增加（$P<0.01$）。祖师麻组、祖师麻-甘草（3∶1）组、祖师麻-甘草（3∶2）组均能抑制 AA 大鼠足肿胀度的增加，有一定的剂量依赖性。随着祖师麻、甘草剂量增加，其对大鼠足肿胀度的抑制率逐渐增加（$P<0.05$、0.01）。祖师麻甘草合用后，降低足肿胀度趋势大于单用祖师麻组，且祖师麻-甘草（3∶2）组药效优于祖师麻-甘草（3∶1）组。结果见表 2 和 3。

表 1 不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠体质量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 1 Effects of different compatibility of DGC and GRR on body weight of AA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg^{-1})	体质量 / g					
		造模前	给药后第 3 天	给药后第 10 天	给药后第 17 天	给药后第 24 天	给药后第 29 天
对照	—	222.90±21.75	255.90±18.32	302.60±27.22	332.90±21.84	370.10±22.15	371.50±23.41
模型	—	228.40±11.74	235.80±15.70	272.80±19.91$^{\#\#}$	292.80±26.42$^{\#\#}$	305.60±52.66$^{\#\#}$	287.40±36.73$^{\#\#}$
雷公藤多苷片	7.5	223.10±16.03	246.80± 8.60	288.20±21.22	324.40±25.52**	356.60±25.57**	368.10±68.36**
祖师麻	405	223.20±14.58	242.80±15.88	281.40±17.24	324.60±23.40*	344.50±20.75*	341.00±22.18**
	810	222.90±17.27	237.60±22.91	284.40±25.18	327.50±24.51**	349.70±31.92**	347.60±31.22**
	1 620	222.00±18.91	245.10±16.27	280.60±18.57	327.40±23.52**	344.20±32.90*	343.30±30.60**
甘草	270	223.00±13.32	249.80±12.60	279.00±11.20	326.00±31.33**	331.40±24.63	330.50±26.16*
	540	219.10±15.63	248.70±16.36	279.00±20.06	320.20±30.28	336.70±37.96	332.40±38.40*
	1 080	220.40±13.10	236.60±18.73	282.40±18.73	322.00±26.88*	344.10±34.22*	344.10±34.22*
祖师麻-甘草	405＋135	220.60±18.28	246.20±20.69	269.90±25.17	310.80±29.84	326.60±32.84	328.70±33.65*
（3∶1）	810＋270	218.20±14.26	242.80±17.66	285.10±20.62	325.50±33.14**	347.90±37.65**	344.60±36.09**
	1 620＋540	222.30±17.49	245.70±14.55	279.10±26.49	325.60±38.20**	348.60±44.40**	349.70±42.23**
祖师麻-甘草	405＋270	219.80±17.35	239.40±18.69	275.70±23.17	326.60±27.60**	342.90±36.73**	344.40±34.99**
（3∶2）	810＋540	226.40±13.41	247.50±18.36	291.90±26.96	327.30±32.06**	365.10±41.31**	362.30±39.26**
	1 620＋1 080	217.30±14.35	242.20±14.77	282.60±23.85	330.90±21.12**	351.40±24.92**	350.50±24.63**

与对照组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$，下表同

$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* model group, same as below

表 2 不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠原发性足肿胀的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 2 Effects of different compatibility of DGC and GRR on primary swelling degree of joints in AA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg^{-1})	足跖肿胀度		
		造模后第 1 天	造模后第 2 天	造模后第 3 天
对照	—	1.05±0.08	1.09±0.08	1.07±0.06
模型	—	1.85±0.16$^{\#\#}$	1.80±0.17$^{\#\#}$	1.86±0.18$^{\#\#}$
雷公藤多苷片	7.5	1.70±0.10*	1.61±0.11*	1.61±0.14**
祖师麻	405	1.85±0.11	1.78±0.16	1.84±0.21
	810	1.72±0.10*	1.65±0.12*	1.65±0.13**
	1 620	1.78±0.24	1.71±0.19	1.75±0.21
甘草	270	1.78±0.14	1.74±0.22	1.79±0.20
	540	1.73±0.09	1.70±0.11	1.74±0.12
	1 080	1.71±0.10*	1.65±0.12*	1.71±0.14*
祖师麻-甘草（3∶1）	405＋135	1.77±0.13	1.70±0.13	1.70±0.16*
	810＋270	1.71±0.19*	1.63±0.15**	1.60±0.26**
	1 620＋540	1.83±0.14	1.77±0.14	1.81±0.17
祖师麻-甘草（3∶2）	405＋270	1.74±0.16	1.70±0.12	1.78±0.08
	810＋540	1.65±0.11**	1.62±0.10**	1.61±0.13**
	1 620＋1 080	1.69±0.12*	1.65±0.14*	1.80±0.22

3.3　不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠 AI 的影响

造模第 7 天开始，多发性 AI 升高，模型组与对照组相比，AI 有显著性差异（$P<0.01$）。祖师麻组、祖师麻-甘草（3∶1）、（3∶2）组，随剂量增加，均有降低 AI 作用（$P<0.05$、0.01）。雷公藤多苷片也能够抑制 AA 大鼠 AI 的增加（$P<0.01$）。祖师麻甘草配伍组优于祖师麻组，祖师麻-甘草（3∶2）组降低 AI 的药效优于（3∶1）组。结果见表 4。

3.4　不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠血清中 TNF-α 和 IL1-β 水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清中 TNF-α 和 IL-1β 水平明显升高（$P<0.01$）。祖师麻组、甘草组、祖师麻-甘草（3∶1）和（3∶2）组及雷公藤多苷片组均能明显降低 AA 大鼠血清中 TNF-α 和 IL-1β

表 3　不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠继发性足肿胀的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 3　Effects of different compatibility of DGC and GRR on secondary swelling degree of joints in AA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg^{-1})	足肿胀度					
		造模后第 8 天	造模后第 10 天	造模后第 12 天	造模后第 16 天	造模后第 20 天	造模后第 24 天
对照	—	1.05±0.05	1.01±0.05	1.03±0.03	1.04±0.04	1.12±0.09	1.11±0.05
模型	—	1.10±0.04$^{\#}$	1.09±0.04$^{\#\#}$	1.22±0.09$^{\#\#}$	1.43±0.25$^{\#\#}$	1.83±0.58$^{\#\#}$	1.94±0.58$^{\#\#}$
雷公藤多苷片	7.5	1.06±0.06*	1.02±0.08**	1.04±0.06**	1.04±0.06**	1.14±0.07**	1.14±0.09**
祖师麻	405	1.10±0.04	1.03±0.05*	1.13±0.04**	1.20±0.05**	1.30±0.14**	1.38±0.20**
	810	1.08±0.03*	1.02±0.05**	1.12±0.05**	1.18±0.05**	1.25±0.09**	1.33±0.17**
	1 620	1.08±0.04	1.00±0.04**	1.10±0.04**	1.17±0.06**	1.25±0.05**	1.27±0.07**
甘草	270	1.02±0.06**	1.03±0.05**	1.12±0.05**	1.19±0.10**	1.28±0.31**	1.32±0.22**
	540	1.05±0.06*	1.03±0.06*	1.15±0.07**	1.28±0.23**	1.39±0.42**	1.40±0.40**
	1 080	1.09±0.08	1.04±0.08*	1.20±0.09	1.22±0.10**	1.26±0.17**	1.32±0.14**
祖师麻-甘草（3∶1）	405＋135	1.05±0.03*	1.05±0.04	1.12±0.06**	1.15±0.12**	1.19±0.17**	1.25±0.17**
	810＋270	1.05±0.06*	1.02±0.03**	1.13±0.04**	1.17±0.07**	1.23±0.10**	1.26±0.08**
	1 620＋540	1.03±0.04**	1.02±0.05**	1.12±0.08**	1.19±0.05**	1.19±0.05**	1.26±0.07**
祖师麻-甘草（3∶2）	405＋270	1.05±0.04*	1.01±0.04**	1.14±0.05**	1.17±0.05**	1.18±0.06**	1.26±0.04**
	810＋540	1.04±0.06**	1.00±0.05**	1.12±0.07**	1.17±0.15**	1.19±0.05**	1.23±0.08**
	1 620＋1 080	1.06±0.02*	1.01±0.06**	1.10±0.07**	1.15±0.08**	1.20±0.08**	1.22±0.06**

表 4　不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠 AI 的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 4　Effects of different compatibility of DGC and GRR on AI of AA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg^{-1})	AI			
		造模后第 7 天	造模后第 14 天	造模后第 21 天	造模后第 28 天
对照	—	0	0	0	0
模型	—	2.20±0.63$^{\#\#}$	5.00±2.54$^{\#\#}$	9.00±2.16$^{\#\#}$	9.80±0.63$^{\#\#}$
雷公藤多苷片	7.5	1.20±0.42**	2.40±0.84**	3.80±1.48**	4.20±1.75**
祖师麻	405	1.60±0.52*	3.30±0.95	5.80±1.14**	6.00±1.33**
	810	1.40±0.52**	3.20±1.40	5.20±1.40**	5.80±1.48**
	1 620	1.20±0.42**	2.80±0.92*	4.90±0.88**	5.60±1.26**
甘草	270	1.20±0.42**	3.20±1.40	5.40±2.50**	6.20±2.39**
	540	1.20±0.42**	3.60±1.58	5.80±2.57**	6.40±2.27**
	1 080	1.50±0.71*	4.00±1.63	5.80±2.57**	6.90±2.03**
祖师麻-甘草（3∶1）	405＋135	1.50±0.53*	3.00±0.82*	4.90±2.77**	5.80±3.19**
	810＋270	1.40±0.70*	3.00±1.41*	4.80±1.40**	5.20±1.93**
	1 620＋540	1.20±0.42**	2.60±0.97*	4.60±1.07**	5.20±1.93**
祖师麻-甘草（3∶2）	405＋270	1.20±0.42**	2.90±0.74*	4.40±1.26**	5.60±1.33**
	810＋540	1.10±0.32**	2.60±1.35*	4.20±1.03**	4.60±1.90**
	1 620＋1 080	1.10±0.32**	2.50±0.97**	4.10±1.29**	4.40±1.58**

的量，与模型组比较，差异显著（$P<0.01$）；且祖师麻-甘草（3∶2）中、高剂量组分别与祖师麻中、高剂量组比较，TNF-α、IL-1β 水平均明显降低（$P<0.01$）。提示祖师麻甘草合用能显著降低 AA 大鼠血清中 TNF-α 和 IL-1β 的水平，具有显著的抗炎效果，效果明显优于单用祖师麻，且祖师麻-甘草（3∶2）配伍比例效果优于（3∶1）。结果见表 5。

表 5 不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠血清 TNF-α 和 IL-1β 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 5 Effects of different compatibility of DGC and GRR on levels of TNF-α and IL-1β in serum of AA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg^{-1})	TNF-α / (pg·mL^{-1})	IL-1β / (pg·mL^{-1})
对照	—	12.06±1.26	19.08±1.32
模型	—	54.43±2.99$^{\#\#}$	106.80±2.89$^{\#\#}$
雷公藤多苷片	7.5	15.82±1.02**	34.05±2.34**
祖师麻	405	30.67±1.63**	84.75±2.35**
	810	25.49±0.93**	75.72±2.02**
	1 620	21.51±0.76**	66.76±1.36**
甘草	270	23.66±1.40**	71.09±2.21**
	540	21.84±2.10**	64.94±1.79**
	1 080	17.79±1.74**	58.65±2.10**
祖师麻-甘草（3∶1）	405＋135	21.78±1.05**	67.27±2.41**
	810＋270	20.69±1.56**	60.16±1.28**
	1 620＋540	17.97±2.12**	47.18±1.55**
祖师麻-甘草（3∶2）	405＋270	20.87±0.46**	62.32±1.83**
	810＋540	17.88±2.32$^{**\bullet\bullet}$	51.21±1.51$^{**\bullet\bullet}$
	1 620＋1 080	13.73±1.30$^{**\circ\circ}$	43.57±1.69$^{**\circ\circ}$

与祖师麻中剂量组比较：$^{\bullet\bullet}P<0.01$；与祖师麻高剂量组比较：$^{\circ\circ}P<0.01$

$^{\bullet\bullet}P<0.01$ *vs* DGC mid-dose group; $^{\circ\circ}P<0.01$ *vs* DGC high-dose group

3.5 不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠关节组织病理改变的影响

大鼠膝关节经固定、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，无炎症细胞浸润，关节软骨完整、光滑、软骨下骨组织结构清晰；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，滑膜内多量淋巴细胞浸润，成纤维细胞增生，关节肿胀，腔内见蛋白性液体渗出、局部关节软骨细胞肿胀，脱落；雷公藤多苷片组滑膜表面光滑，有较少炎细胞覆盖，浅层偶见少量淋巴细胞浸润和胶原纤维增生，关节腔软骨光滑平坦；祖师麻组关节滑膜中度增生，间质可见炎细胞浸润，局部间皮细胞脱落；甘草组，间质可见较多炎细胞浸润，血管增生，关节腔软骨局部细胞肿胀；祖师麻-甘草（3∶1）组关节滑膜上皮增生，滑膜间皮轻度增多，间皮增生呈上皮样，间质可见个别炎细胞浸润；祖师麻-甘草（3∶2）组关节表面及关节腔软骨表面光滑，未见明显炎细胞浸润，表面间皮 1～2 层。见图 1。

与祖师麻组比较，祖师麻甘草配伍组大鼠关节组织病理得到明显改善，只有轻度结缔组织增生，及少量淋巴细胞浸润。且祖师麻-甘草（3∶2）组药效优于祖师麻-甘草（3∶1）组。

3.6 不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠滑膜组织 VEGF 和 MIF 表达的影响

3.6.1 光镜下免疫组织学观察 对照组关节滑膜组织未见炎细胞浸润，滑膜表面间皮完整，血管轻度增生，VEGF 弱表达，MIF 中度表达；模型组关节滑膜有多量炎细胞浸润，血管及间皮显著增生，间皮水肿，局部间皮脱落，VEGF 呈高度表达，MIF 重度表达；雷公藤多苷片组滑膜组织未见明显炎细胞浸润，血管轻度增生，滑膜表面间皮完整，VEGF 轻度表达，MIF 中度表达；祖师麻中剂量组滑膜少量炎细胞浸润，血管中度增生，表面间皮完整，VEGF 呈中度表达，MIF 高度表达；甘草中剂量组滑膜表面较多炎细胞浸润，血管显著增生，表面间皮增生，VEGF 呈中等偏高表达，MIF 高度表达；祖师麻-甘草（3∶1）组滑膜组织少量炎细胞浸润，血管轻度增生，VEGF 中度表达，MIF 高表达；祖师麻-甘草（3∶2）组偶见炎细胞浸润，血管轻度增生，滑膜表面间皮完整，VEGF 轻度表达，MIF 中度表达。见图 2、3。

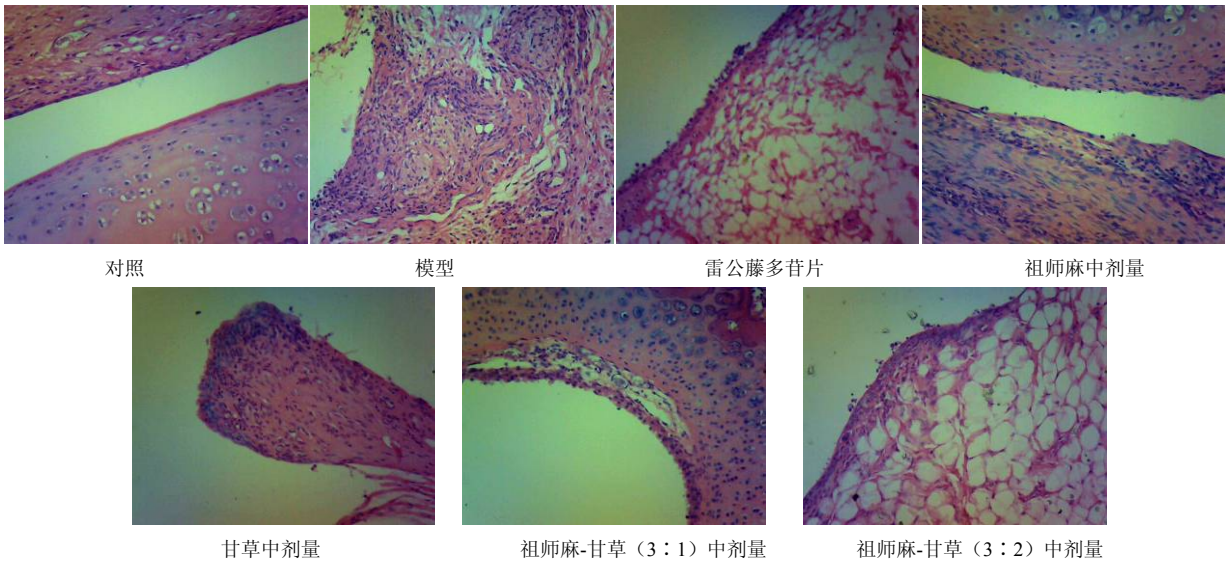

图 1　各组 AA 大鼠滑膜组织病理组织学观察结果

Fig. 1　Pathological observation of synovial membraneof AA rats in each group

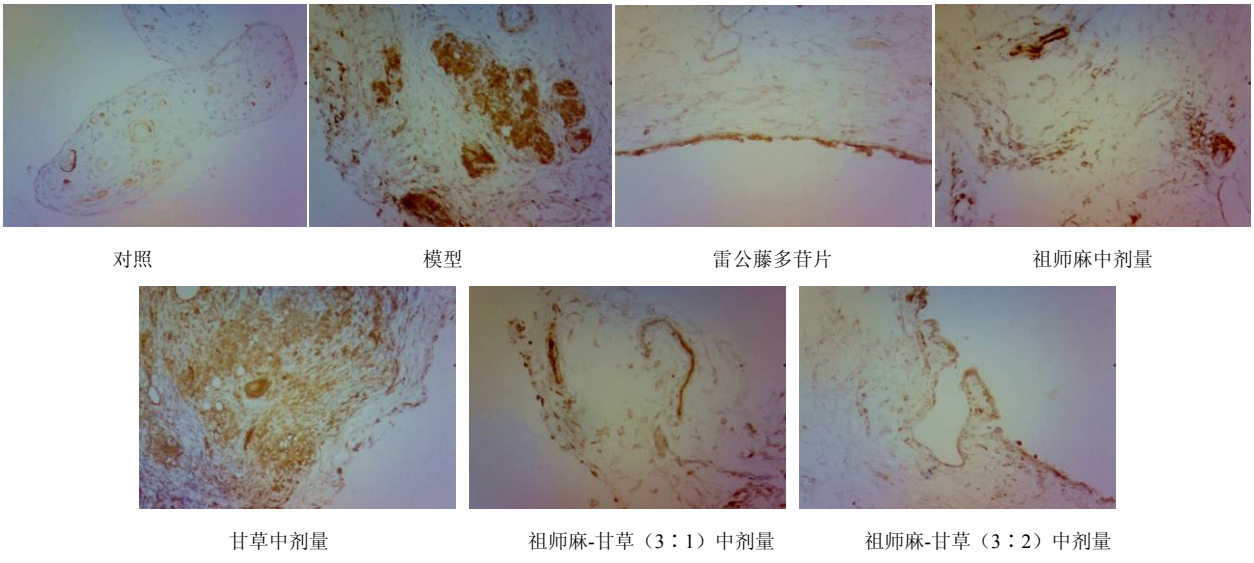

图 2　各组 AA 大鼠滑膜组织 VEGF 免疫组化染色结果

Fig. 2　Immunohistochemical straining detection of VEGF in synovial membrane of AA rats in each group

3.6.2　不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠滑膜组织 VEGF、MIF 表达的影响　与对照组比较，模型组大鼠滑膜组织中 VEGF、MIF 积分吸光度值显著增高（$P<0.01$）；与模型组比较，祖师麻甘草（3∶1）、（3∶2）配伍组中 VEGF、MIF 积分吸光度值显著降低（$P<0.01$），降低程度优于祖师麻单味药组，且祖师麻甘草（3∶2）配伍组与祖师麻组比较，VEGF 明显降低（$P<0.05$），提示甘草配伍祖师麻后，能明显增强祖师麻降低炎症滑膜组织总 VEGF、MIF 表达的药效。结果见表 6。

4　讨论

RA 是一种发病机制未明、以关节炎症为主的慢性自身免疫性疾病，其主要病变是滑膜炎、软骨破坏、血管增生及血管翳形成，其中细胞因子的异常产生在 RA 关节软骨和骨破坏中起至关重要的作用[8]。

研究表明，TNF-α、IL-1β 能够启动与维持 RA 炎症免疫反应，在 RA 发病中起着关键作用。TNF-α、IL-1β 通过刺激滑膜细胞与软骨细胞中胶原酶、白细胞介素 6（IL-6）、前列腺素 E_2（PGE_2）和基质金属蛋白酶（MMPs）的合成及释放[9]，参与多种

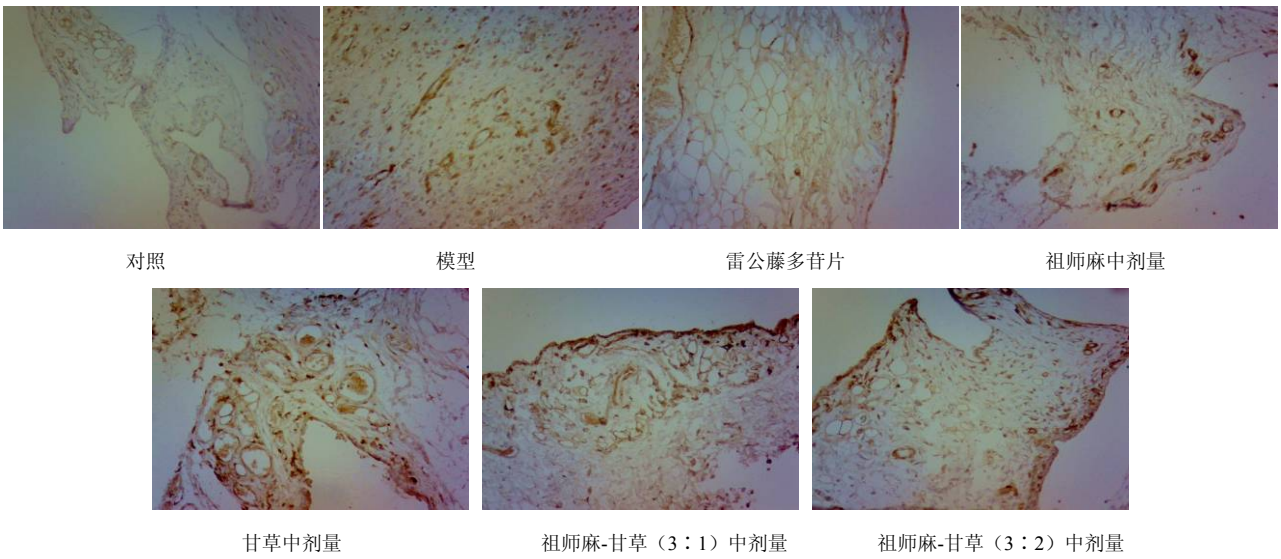

图 3 各组 AA 大鼠滑膜组织 MIF 免疫组化染色结果

Fig. 3 Immunohistochemical straining detection of MIF in synovial membrane of AA rats in each group

表 6 不同比例甘草配伍祖师麻对 AA 大鼠滑膜组织 VEGF、MIF 积分吸光度值的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 10$）

Table 6 Effects of different compatibility of DGC and GR on VEGF and MIF in synovial membrane of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg^{-1})	VEGF / (×10^9)	MIF / (×10^9)
对照	—	2.14±0.39	2.91±0.81
模型	—	4.63±0.11$^{\#\#}$	4.22±0.19$^{\#\#}$
雷公藤多苷片	7.5	3.41±0.50**	3.32±0.73**
祖师麻中剂量	810	4.24±0.15**	3.91±0.23*
甘草中剂量	540	4.48±0.19	4.10±0.30
祖师麻-甘草（3∶1）中剂量	810＋270	4.13±0.36**	3.85±0.21**
祖师麻-甘草（3∶2）中剂量	810＋540	3.89±0.33$^{**\bullet}$	3.62±0.30**

与祖师麻中剂量组比较：$^{\bullet}P<0.05$

$^{\bullet}P < 0.05$ *vs* DGC mid-dose group

病理过程，引起 RA 患者局部炎症反应加剧，免疫功能紊乱，造成骨与软骨不可逆性破坏，以及血管翳的形成[10-11]。因此，降低 TNF-α、IL-1β 异常增高的水平，可以缓解 RA 病情的发展。

血管新生是 RA 慢性增生性滑膜炎和血管翳形成不可或缺的一部分，其中，VEGF 是 RA 血管新生的主要因子，能够促进新血管分化和生成，并且可以促使血管内物质的外渗，加重滑膜组织炎症和血管翳的形成，对关节炎的发生和发展起着重要作用。因此可以通过抑制 VEGF 的表达，达到缓解滑膜炎症、减轻关节肿胀、延缓骨破坏的目的[12]。近来研究发现，MIF 是 RA 发病过程中的始动因素[13]，能够活化巨噬细胞，抑制其游走移动，增强其在炎症局部的浸润、聚集，并诱导巨噬细胞和活化的 T 细胞分泌大量细胞因子，如 TNF-α、IL-1β、IL-6、NO 等，诱导产生环氧化酶途径的中间产物如花生四烯酸、PGE_2，上调 MMPs 的表达，极大地促进炎症和免疫反应。故 MIF 可以作为评估 RA 疾病活动情况和治疗效果的指标。

本实验结果显示，祖师麻组、甘草组及祖师麻甘草配伍组可明显抑制 AA 大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 水平异常升高，并且降低滑膜组织中 VEGF、MIF 的表达，祖师麻甘草配伍组药效优于祖师麻组和甘草组。由此推测祖师麻与甘草，在治疗 RA 时所表现的抗炎作用，可能是通过调节 TNF-α、IL-1β、VEGF 及 MIF 等细胞因子的产生而抑制炎性细胞浸润、滑膜组织增生和血管翳的形成，减轻软骨和骨破坏，从而发挥疗效。因此，将祖师麻与甘草配伍使用治疗 RA，可以发挥协同增效作用，且祖师麻-甘草（3∶2）是其最佳配伍比例，这体现了祖师麻

与甘草配伍即中医药配伍理论的意义，为临床两者的配伍应用提供了可靠的实验依据，同时也为中药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] Tanaka S, Sakata Y, Morimoto K, *et al*. Influence of natural and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1 [J]. *Planta Med*, 2001, 67(2): 108-113.

[2] 章丹丹, 潘一峰, 凌 霜, 等. 祖师麻醋酸乙酯提取物体外抗炎作用及其机制 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1169-1173.

[3] 王宇华, 许惠琴, 狄留庆, 等. 祖师麻提取物的镇痛与抗炎作用研究 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1697-1700.

[4] 陈乐天, 狄留庆, 刘 卉, 等. 甘草提取物对瑞香素大鼠体内药代动力学特征的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(7): 935-938.

[5] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356-361.

[6] Salk A, Stobaugh D J, Deepak P, *et al*. Ischaemic colitis in rheumatoid arthritis patients receiving tumour necrosis factor-α inhibitors: an analysis of reports to the US FDA Adverse Event Reporting System [J]. *Drug Saf*, 2013, 36(5): 329-335.

[7] 魏 伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.

[8] 邵传森, 朱圣禾. 临床疾病与免疫 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.

[9] Sung M S, Lee E G, Jeon H S, *et al*. Quercetin inhibits IL-1β-induced proliferation and production of MMPs, COX-2, and PGE2 by rheumatoid synovial fibroblast [J]. *Inflammation*, 2012, 35(4): 1585-1594.

[10] Moelants E A, Mortier A, Van Damme J, *et al*. ReGRlation of TNF-α with a focus on rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(6): 393-401.

[11] Kitaura H, Kimura K, Ishida M, *et al*. Immunological reaction in TNF-α-mediated osteoclast formation and bone resorption *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, doi: 10.1155/2013/181849.

[12] Hu W, Xia L J, Chen F H, *et al*. Recombinant human endostatin inhibits adjuvant arthritis by down-reGRlating VEGF expression and suppression of TNF-α, IL-1β production [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(8): 827-835.

[13] Zhang B, Shen M, Xu M, *et al*. Role of macrophage migration inhibitory factor in the proliferation of smooth muscle cell in pulmonary hypertension [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, doi: 10.1155/2012/840737.