

基于抗类风湿关节炎作用评价膜分离技术富集山茱萸抗炎组分的适用性

周 瑞^{1,2}, 唐志书^{1,2*}, 武 婧¹, 谢 培¹, 崔春利¹, 宋忠兴^{1,2}, 刘妍如^{1,2}

1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712083

2. 陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083

摘要: 目的 评价山茱萸水提液(CO)、0.05 μm 无机陶瓷膜微滤液(CO-0.05)及中空 10 K 纤维膜超滤液(CO-10K)对成纤维样滑膜细胞(HFLS)和佐剂性关节炎(AA)大鼠的抗炎作用, 评价膜分离技术富集山茱萸抗炎组分的适用性。方法 制备白细胞介素-1 β (IL-1 β)/肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的HFLS炎症模型, CCK-8和ELISA法分别检测CO、CO-0.05及CO-10K对HFLS活力和分泌炎症细胞因子的影响; 制备AA大鼠模型, SD大鼠分为对照组、模型组、CO(120 mg/kg)组、CO-0.05(120 mg/kg)组、CO-10K(120 mg/kg)组、阳性对照白芍总苷(TGP, 0.125 mg/kg)组, 造模同时ig给药, 共给药23 d。检测各组大鼠足趾肿胀、体质量, ELISA法测定大鼠血清中炎症因子IL-1、IL-6、前列腺素E₂(PGE₂)、TNF- α 水平。结果 CO、CO-0.05及CO-10K均可以显著抑制IL-1 β /TNF- α 诱导的滑膜细胞分泌细胞因子($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 并且能够显著缓解AA大鼠足趾肿胀($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 改善大鼠体质量增长缓慢的情况($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 减少AA大鼠血清中炎症细胞因子的产生($P < 0.001$)。通过山茱萸膜微滤液和膜超滤液对炎症细胞因子产生的抑制率比较, 发现膜超滤液具有更显著的抑制炎症因子产生的作用。结论 CO-0.05和CO-10K均具有显著的抗炎作用, 而中空纤维膜超滤分离技术更适用于山茱萸抗炎组分的富集。

关键词: 山茱萸; 分离; 炎症因子; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α ; 前列腺素E₂

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1182-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.023

Applicability of membrane separation technique for concentrating anti-inflammatory compounds of *Cornus officinalis* Decoction based on anti-rheumatoid arthritis activity

ZHOU Rui^{1,2}, TANG Zhi-shu^{1,2}, WU Jing¹, XIE Pei¹, CUI Chun-li¹, SONG Zhong-xing^{1,2}, LIU Yan-ru^{1,2}

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

2. Shaanxi Research Center on Discovery & Innovation of New Medicine, Xianyang 712083, China

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory effect of *Cornus officinalis* (CO) Decoction and its refined solutions from membrane separation by using 0.05 μm inorganic ceramic membrane (CO-0.05) and 10K polysulfone hollow fiber membrane (CO-10K), and evaluate the applicability of the membrane separation technique for concentrating the anti-inflammatory compounds of *C. officinalis* Decoction. **Methods** Inflammatory model of interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α stimulated human fibroblast-like synoviocytes (HFLS) was prepared. The CCK-8 assay and ELISA were applied to detect the effects of *C. officinalis* Decoction and its refined solutions on the viability of HFLS and the secretion of inflammatory cytokines, respectively. Moreover, the animal model of adjuvant arthritis (AA) was used. The SD rats were divided into six groups: control group, model (AA) group and AA groups intragastrically receiving CO (120 mg/kg), CO-0.05 (120 mg/kg), CO-10K (120 mg/kg) and TGP (0.125 mg/kg) with daily treatments for 23 days. The weight and paw swelling of rats in different groups were detected. The ELISA was used to detect secretion levels of prostaglandin E₂ (PGE₂), IL-1, IL-6, and TNF- α in serum. **Results** The production of vascular endothelial growth

收稿日期: 2018-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81773919); 陕西省科技厅重点研发项目一般项目(2017SF-364); 陕西省科技厅社发攻关课题(2015SF-246); 陕西省中药基础与新药研究重点实验室开放基金(2017KF06)

作者简介: 周 瑞, 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药抗炎免疫活性物质筛选及作用机制研究。Tel: (029)38182205 E-mail: zhouruiswg@126.com

*通信作者 唐志书, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源综合利用研究。Tel: (029)38185060 E-mail: tzs6565@163.com

factor (VEGF) induced by IL-1 β /TNF- α were significantly inhibited with *C. officinalis* Decotion and its refined solutions by membrane separation treatment ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). *C. officinalis* Decotion and the refined solutions significantly ameliorated paw swelling and increased weight gain of AA rats ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and reduced the secretion of TNF- α , PGE₂, IL-1, IL-6 in serum ($P < 0.001$). By comparing the inhibition efficiency of inflammatory cytokines by inorganic ceramic membrane refined solution and polysulfone hollow fiber membrane refined solution, the polysulfone hollow fiber membrane refined solution exhibited better anti-inflammatory activity. **Conclusion** Both of refined solutions of *C. officinalis* Decotion from inorganic ceramic membrane and polysulfone hollow fiber membrane separation exhibited dramatically anti-inflammatory activity. Moreover, the polysulfone hollow fiber membrane was more applicable for concentrating the anti-inflammatory compounds of *C. officinalis* Decotion.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; separation; inflammatory cytokines; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α ; prostaglandin E₂

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种全身性、系统性自身免疫性疾病, 主要表现为滑膜持续侵袭性增生, 最终形成血管翳, 导致关节软骨及骨破坏, 甚至引发残疾, 是一种严重危害人类健康的临床难治疾病^[1]。由于 RA 病理机制十分复杂, 尚未完全揭示, 目前临床上治疗 RA 的策略主要以控制 RA 炎症、保护软骨、防治骨破坏和关节功能丧失为主^[2]。相应的治疗药物主要以非甾体类抗炎药、抗风湿药、免疫抑制剂等为主^[3], 这些药物虽能一定程度缓解 RA 的临床症状, 但是不能从根本上治愈 RA, 且某些免疫抑制剂的毒副作用不容忽视^[4]。因此, 开发低毒副作用的 RA 治疗药物仍迫在眉睫。

近年来研究发现, 正常成纤维样滑膜细胞 (HFLS) 在各种因素下异常活化是启动 RA 发生、促使滑膜持续炎症进展、导致软骨损伤和骨破坏的“元凶”^[5]。研究表明, 炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 在 RA 发病机制中具有非常重要的作用, TNF- α 和 IL-1 β 激活 HFLS, 活化后的 HFLS 又通过分泌炎症细胞因子、基质蛋白酶、生长因子等, 引发持续炎症增生, 最终导致关节软骨降解和损伤^[6-7]。因此, 抑制 IL-6、IL-1、TNF- α 等炎症细胞因子的生成, 可以控制 RA 的病程进展^[8]。此外, 在 RA 疾病进程中, 异常的血管新生是滑膜增生和血管翳形成的病理基础。血管内皮生长因子 (VEGF) 是调节血管新生的重要因子, 能够影响滑膜组织新生血管的形成, 增强血管通透性^[9]。因而, 抑制 VEGF 的生成有助于控制 RA 关节中的血管新生。

膜分离精制技术已广泛地应用到中药的提纯分离中^[10], 用于中药有效成分的富集和粗提物的精制^[11-12]。研究人员通过反萃分散液膜精制黄连中生物碱, 提取率可达到 88%^[13]。山茱萸 *Corni Fructus*

为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的成熟干燥果肉, 主要化学成分为环烯醚萜苷、皂苷、齐墩果酸等, 其中环烯醚萜苷为山茱萸的主要活性成分^[14], 药理研究表明山茱萸具有显著的抗炎、免疫调节及抗 RA 作用^[15]。本课题组前期以指标性成分透过率和高分子截留率为指标, 通过响应面法对山茱萸水提液 (CO) 的无机陶瓷膜微滤工艺和中空纤维膜超滤工艺进行了优化^[16-17]。但对于无机陶瓷膜微滤工艺和中空纤维膜超滤工艺富集山茱萸抗炎组分的适应性尚未研究。因此, 本实验通过研究不同膜分离技术得到的山茱萸无机陶瓷膜微滤液 (CO-0.05) 和中空纤维膜超滤液 (CO-10K) 对 HFLS 增殖、IL-1 β /TNF- α 诱导的炎症细胞因子产生及对佐剂性关节炎 (AA) 大鼠的影响, 在细胞水平和动物水平上评价膜分离技术富集山茱萸水提液抗炎组分的适用性。

1 材料

1.1 细胞

HFLS 购买自上海冠导生物工程有限公司。

1.2 动物

清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (160 $\pm$ 20) g, 保持通风和光照良好, 维持温度在 18~22 $^{\circ}$ C, 相对湿度在 40%~60%, 适应性喂养 1 周。动物由西安交通大学医学部实验动物中心提供, 实验动物许可证号 SCXK (陕) 2012-003。

1.3 药品

按照课题组前期已建立的方法^[16-17]制备 CO、CO-0.05 及 CO-10K, 其中山茱萸总苷质量分数分别为 64.12%、57.64%、55.8%。以马钱苷和莫诺苷含量作为山茱萸总苷的相对含量, 分别配制含不同质量浓度山茱萸总苷的 CO、CO-0.05 及 CO-10K 进行研究^[18]; 帕夫林白芍总苷 (TGP) 胶囊 (批号 160408, 宁波立华制药有限公司)。

1.4 试剂

弗氏完全佐剂(美国 R&D Systems 公司); 大鼠 IL-6、前列腺素 E₂ (PGE₂)、IL-1、TNF- α ELISA 试剂盒及人源 VEGF、TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒(欣博盛生物有限公司); 青-链霉素(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(FBS, BI 公司); 二甲基亚砜(DMSO, 美国 Gibco 公司); DMEM 培养液(美国 HyClone 公司); 胰蛋白酶(美国 Sun-Shine 公司); TNF- α 、IL-1 β (美国 R&D Systems 公司);

1.5 仪器

SW-CJ-IF 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); METTLER AE100 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂); CENTRIFUGE TDL-5 离心机(上海安亭科学仪器厂); Thermo 热点 Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 HFLS 培养

将 HFLS 接种于含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 DMEM 细胞培养液中, 隔天换液, 2~3 d 待细胞 80% 融合后, 胰蛋白酶消化, 按 1:2 传代。

2.2 CCK-8 法测定 HFLS 活力

HFLS 按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 在倒置显微镜下观察细胞的生长状态, 分别加入含 20、70、120、170、220 $\mu\text{g/mL}$ 山茱萸总苷的 CO、CO-0.05、CO-10K, 每组 6 个复孔。孵育 24 h 后倒置显微镜下观察细胞生长状态。每孔均加入 10 μL CCK-8, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO₂ 的培养箱中 1 h, 通过酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)值, 实验重复 3 次, 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 ELISA 法检测 HFLS 分泌细胞因子水平

将 HFLS 按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养 12 h 后, 弃去上清液, 分别加入山茱萸总苷质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 CO、CO-0.05、CO-10K 及 TGP 20 $\mu\text{g/mL}$ 孵育 2 h, 每组 6 个复孔。加入 10 ng/mL 的 IL-1 β 或 TNF- α 刺激 24 h 后, 用 ELISA 试剂盒检测上清液中 VEGF、TNF- α 、IL-6 水平, 实验重复 3 次。

2.4 各组大鼠足趾肿胀、体质量检测

取 36 只适应性饲养合格的 SD 大鼠, 随机分成 6 组, 每组 6 只, 依次为对照组、模型组、CO (120 mg/kg) 组^[19]、CO-0.05 (120 mg/kg) 组、CO-10K (120 mg/kg) 组、TGP 组 (0.125 mg/kg, 相当于人

体用量 10 倍)。于每只大鼠左后足趾内注射 0.1 mL 的弗氏完全佐剂, 致炎, 对照组大鼠左后足趾内注射同体积的生理盐水。于造模当天按大鼠体质量 10 mL/kg ig 给药, 对照组与模型组 ig 等量生理盐水, 连续给药 23 d。用自制的测量绳分别于造模后第 1、3、5、7、12、18、23 天测量大鼠左后足趾同一位置的周长, 作为肿胀度, 分别测 3 次, 取平均值。分别于造模后第 1、3、5、7、12、18、23 天测量各组大鼠体质量。

2.5 ELISA 法测定 AA 大鼠血清中细胞因子

各组大鼠第 23 天给药结束后, 禁食 1 夜, 于第 24 天腹腔静脉取血 5 mL, 血液常温静置 1 h 后, 在 3 000 r/min 离心 10 min。吸取上层血清, 分装在 2 mL 的 EP 管内, 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用。按照 ELISA 试剂盒操作方法测定血清中炎症因子 IL-1、IL-6、PGE₂ 及 TNF- α 含量。

2.6 统计学方法

数据通过 Grap Pad Prism 5.0 进行统计分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素两均数比较采用 *t* 检验, 多均数的比较采用方差分析 (ANOVA)。

3 结果

3.1 CO、CO-0.05、CO-10K 对 HFLS 活力的影响

结果如表 1 所示, 与对照组比较, 含山茱萸总苷 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 CO、CO-0.05 及 CO-10K 对 HFLS 增殖无明显影响。随着质量浓度的增大, CO、CO-0.05 及 CO-10K 对 HFLS 的增殖表现出显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈现质量浓度依赖性。

3.2 CO、CO-0.05、CO-10K 对 IL-1 β /TNF- α 诱导的 HFLS 分泌炎症细胞因子的影响

进一步研究含山茱萸总苷 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 CO、CO-0.05、CO-10K 对 IL-1 β 诱导的 HFLS 分泌 TNF- α 、IL-6、VEGF 的影响。结果如表 2 所示, 与对照组比较, CO 对 TNF- α 、IL-6 的抑制作用不明显, 对 VEGF 有显著的抑制作用 ($P < 0.05$); CO-0.05、CO-10K 对 IL-6、VEGF 有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), CO-10K 对 TNF- α 有显著的抑制作用 ($P < 0.001$)。

同时研究了含山茱萸总苷 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 CO、CO-0.05、CO-10K 对 TNF- α 诱导的 HFLS 分泌 IL-6、VEGF 的影响, 结果如表 3 所示, 与对照组比较, CO、CO-0.05、CO-10K 对 IL-6、VEGF 的分泌具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

表 1 CO、CO-0.05、CO-10K 对 HFLS 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Effect of CO, CO-0.05, and CO-10K on cell viability of HFLS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞活力/%	组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞活力/%	组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞活力/%
对照	—	100.00 $\pm$ 3.50	对照	—	99.68 $\pm$ 7.49	对照	—	100.90 $\pm$ 3.50
CO	20	103.92 $\pm$ 5.66	CO-0.05	20	88.20 $\pm$ 4.55	CO-10K	20	92.74 $\pm$ 4.92
	70	93.98 $\pm$ 6.79		70	80.96 $\pm$ 12.25		70	74.94 $\pm$ 12.64*
	120	81.11 $\pm$ 8.32*		120	66.25 $\pm$ 11.57*		120	51.03 $\pm$ 9.19***
	170	64.65 $\pm$ 6.61**		170	53.15 $\pm$ 6.85**		170	44.14 $\pm$ 4.19***
	220	50.65 $\pm$ 4.48***		220	46.69 $\pm$ 4.82***		220	36.48 $\pm$ 1.72***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group表 2 CO、CO-0.05、CO-10K 对 IL-1 β 诱导的 HFLS 分泌炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Effect of CO, CO-0.05, and CO-10K on production of inflammatory cytokines in IL-1 β stimulated HFLS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	TNF- $\alpha/(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	VEGF/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	12.10 $\pm$ 4.32	239.30 $\pm$ 0.23	32.89 $\pm$ 3.29
IL-1 β	0.01	110.39 $\pm$ 10.02###	349.70 $\pm$ 7.45###	83.84 $\pm$ 6.11###
CO+IL-1 β	20+0.01	98.62 $\pm$ 11.74	332.72 $\pm$ 1.87	67.60 $\pm$ 4.14*
CO-0.05+IL-1 β	20+0.01	96.91 $\pm$ 5.12	307.36 $\pm$ 4.97**	58.51 $\pm$ 0.98**
CO-10K+IL-1 β	20+0.01	27.64 $\pm$ 7.57***	279.19 $\pm$ 14.93**	47.14 $\pm$ 1.16**
TGP+IL-1 β	20+0.01	16.14 $\pm$ 2.42***	327.38 $\pm$ 2.91*	57.26 $\pm$ 5.58**

与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与 IL-1 β 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs IL-1 β group表 3 CO、CO-0.05、CO-10K 对 TNF- α 诱导的 HFLS 分泌炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effect of CO, CO-0.05, and CO-10K on production of inflammatory cytokines in TNF- α stimulated HFLS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	VEGF/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	239.30 $\pm$ 0.23	62.40 $\pm$ 4.09
TNF- α	0.01	349.70 $\pm$ 7.45###	137.19 $\pm$ 5.53###
CO+TNF- α	20+0.01	332.72 $\pm$ 1.87*	47.69 $\pm$ 2.50**
CO-0.05+TNF- α	20+0.01	307.36 $\pm$ 4.97**	35.60 $\pm$ 5.35***
CO-10K+TNF- α	20+0.01	279.19 $\pm$ 14.93***	22.20 $\pm$ 2.76***
TGP+TNF- α	20+0.01	327.38 $\pm$ 2.91*	38.48 $\pm$ 1.18**

与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与 TNF- α 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs TNF- α group

3.3 CO、CO-0.05、CO-10K 对 AA 大鼠关节肿胀及体质量的影响

构建 AA 大鼠模型, 观察大鼠整体行为改变, 结果发现对照组大鼠在整个实验过程中左后足趾各

关节无红肿, 行动灵活。模型组大鼠在造模后第 3 天出现左后足趾关节皮肤充血肿胀, 在造模后第 5 天炎症反应最为明显, 在造模后第 12 天关节肿胀达到高峰, 出现皮肤紧绷, 皮肤表面充血发亮, 无法行动等症状。CO、CO-0.05、CO-10K、TGP 组大鼠均于造模后第 3 天开始出现与模型组相同的关节症状, 但程度与模型组相比较轻。各组大鼠足趾肿胀图片见图 1, 大鼠足趾肿胀统计结果见表 4。造模前各组大鼠足趾肿胀度没有明显差别, 造模后第 5 天

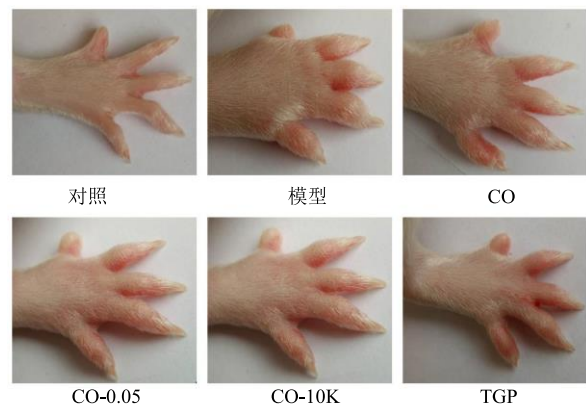


图 1 大鼠足趾肿胀图片

Fig. 1 Images of rats paw swelling

起模型组大鼠足趾肿胀度显著高于对照组 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且在第 12 天达到高峰, 之后有所下降, 直到第 23 天模型组大鼠足趾肿胀度仍高于对照组。与模型组比较, CO、CO-0.05、CO-10K、TGP 组大鼠足趾肿胀度于造模第 5 天出现差异, 均低于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 说明 CO、CO-0.05、CO-10K、TGP 能显著减轻 AA 模型大鼠足趾肿胀, CO-10K 治疗效果最为明显。

造模前各组大鼠体质量没有明显差别。造模后第 5 天起模型组大鼠体质量显著低于对照组 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型组比较, CO、CO-0.05、CO-10K、TGP 组大鼠于造模第 5 天起体质量显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且呈上升趋势, 结果见表 5。

3.4 CO、CO-0.05、CO-10K 对 AA 大鼠血清中炎症细胞因子分泌的影响

由表 6 可知, 与对照组比较, 模型组大鼠血清

表 4 CO、CO-0.05、CO-10K 对 AA 大鼠足趾肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Table 4 Effect of CO, CO-0.05, and CO-10K on paw swelling of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	左后足趾肿胀度/cm						
		1 d	3 d	5 d	7 d	12 d	18 d	23 d
对照	—	1.24±0.04	1.34±0.04	1.48±0.08	1.50±0.07	1.41±0.09	1.49±0.02	1.47±0.09
模型	—	1.36±0.03 [#]	1.42±0.03	1.78±0.02 ^{##}	2.13±0.05 ^{###}	2.57±0.04 ^{###}	2.30±0.03 ^{###}	1.84±0.01 ^{###}
CO	120.000	1.22±0.03 ^{**}	1.38±0.05	1.69±0.02 ^{**}	2.03±0.05 ^{**}	2.44±0.06 [*]	2.10±0.05 ^{**}	1.78±0.08
CO-0.05	120.000	1.22±0.06 [*]	1.27±0.02	1.64±0.04 [*]	1.82±0.02 [*]	2.01±0.06 ^{***}	1.84±0.04 ^{***}	1.77±0.13
CO-10K	120.000	1.08±0.06 ^{**}	1.30±0.04 [*]	1.52±0.14 [*]	1.74±0.04 [*]	1.92±0.06 ^{***}	1.71±0.10 ^{***}	1.68±0.12
TGP	0.125	1.11±0.04 ^{**}	1.22±0.04 ^{**}	1.58±0.09 [*]	1.78±0.04 [*]	1.83±0.05 ^{***}	1.74±0.01 ^{***}	1.62±0.04 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

表 5 CO、CO-0.05、CO-10K 对 AA 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Table 5 Effect of CO, CO-0.05, and CO-10K on body weight of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g							
		1 d	3 d	5 d	7 d	12 d	18 d	23 d	
对照	—	158.00±4.58	177.00±1.73	203.00±4.35	217.00±3.46	254.00±4.58	283.00±4.58	343.00±6.55	
模型	—	154.00±6.24	138.00±11.53 ^{##}	127.00±7.54 ^{###}	156.00±3.60 ^{###}	187.00±7.00 ^{###}	224.00±4.58 ^{###}	259.00±1.73 ^{###}	
CO	120.000	162.00±4.35	145.00±3.46	158.00±5.56 ^{**}	170.00±7.54 [*]	192.00±2.00	241.00±8.88 [*]	283.00±6.00 ^{**}	
CO-0.05	120.000	155.00±7.00	141.00±1.73	162.00±3.46 ^{**}	182.00±2.64 ^{***}	206.00±6.08 [*]	265.00±9.64 ^{**}	310.00±5.56 ^{***}	
CO-10K	120.000	154.00±4.00	139.00±5.00	170.00±4.58 ^{**}	191.00±6.92 ^{**}	214.00±5.56 ^{**}	271.00±10.40 ^{**}	301.00±9.85 ^{**}	
TGP	0.125	158.00±4.35	130.00±6.55	184.00±6.55 ^{***}	209.00±9.64 ^{***}	249.00±1.73 ^{***}	265.00±3.46 ^{**}	297.00±3.46 ^{***}	

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下同

^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below

表 6 CO-0.05、CO-10K 对 AA 大鼠血清中炎症细胞因子分泌水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 6 Effect of *C. officinalis* Decoction and its refined solutions on production of inflammatory cytokines of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-1/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	135.10±0.98	39.16±1.05	86.56±1.87	189.70±1.03
模型	—	167.70±1.05 ^{###}	53.27±1.66 ^{###}	126.62±1.88 ^{###}	199.08±4.15 ^{###}
CO	120.000	139.10±3.24 ^{***}	42.78±1.09 ^{***}	102.28±3.65 ^{***}	175.20±1.78 ^{***}
CO-0.05	120.000	132.00±7.07 ^{***}	37.24±1.42 ^{***}	78.70±0.63 ^{***}	174.70±0.89 ^{***}
CO-10K	120.000	121.26±5.92 ^{***}	31.48±1.47 ^{***}	66.98±1.00 ^{***}	167.36±0.27 ^{***}
TGP	0.125	126.48±4.08 ^{***}	35.47±1.46 ^{***}	80.00±5.56 ^{***}	163.33±5.03 ^{***}

中炎症因子 IL-1、IL-6、PGE₂、TNF- α 水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, CO、CO-0.05、CO-10K 均能不同程度地降低大鼠血清中炎症因子 PGE₂、IL-6、TNF- α 、IL-1 的水平 ($P<0.001$), CO-10K 的效果最为明显。

4 讨论

由于中药提取物的化学成分非常复杂, 通常含有无机盐、生物碱、酮类、蛋白质及多糖等, 而膜分离技术在中药提取液的分离、纯化、有效成分的富集及中药废弃物资源化循环利用等方面^[20-22]具有高效、节能、环保等优势。因此, 该技术已被广泛应用于中药提取液的精制。

山茱萸已被证实具有抗炎及抗 RA 的作用^[19]。课题组前期对 CO 的膜精制工艺进行了优化, 通过不同膜分离技术制备得 CO-0.05 和 CO-10K^[16-17]。在此基础上, 本研究分别在细胞水平和动物水平上评价不同膜分离技术用于富集山茱萸抗炎组分的适用性。HFLS 增殖和分泌炎症细胞因子在 RA 病理进展中发挥重要的作用^[6], 因而抑制 HFLS 分泌炎症因子成为评价药物抗炎及抗 RA 作用的重要机制^[8]。本研究通过 CCK-8 测定了含有不同质量浓度山茱萸总苷的 CO、CO-0.05 和 CO-10K 对 HFLS 增殖的影响, 得出含山茱萸总苷 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 CO、CO-0.05 和 CO-10K 对 HFLS 的增殖无明显影响, 在此质量浓度条件下进行进一步的抗炎研究。

研究发现 CO、CO-0.05 和 CO-10K 能显著抑制 IL-1 β 产生炎症细胞因子 TNF- α 、VEGF、IL-6。CO、CO-0.05、CO-10K 及 TGP 对 IL-1 β /TNF- α 诱导产生的炎症细胞因子 IL-6、VEGF 具有明显的抑制活性。与 CO-0.05 相比, CO-10K 对 IL-1 β /TNF- α 诱导的细胞因子分泌抑制作用更明显。

为了进一步验证 CO-10K 的抗炎及抗 RA 作用, 本研究建立了关节炎大鼠模型, 研究了 CO、CO-0.05、CO-10K 及 TGP 对关节炎大鼠的治疗作用, 结果发现 CO、CO-0.05、CO-10K 及 TGP 均能够改善 AA 大鼠足趾肿胀, 使 AA 大鼠体质量增长, 抑制血清中炎症因子水平, 且 CO-10K 作用效果最好。由以上结果推测, CO-10K 具有更强的抗炎作用, 因此, 初步说明膜超滤制备工艺与膜微滤制备工艺相比, 更适用于富集 CO 的抗炎组分。

综上, 本研究结果表明 CO 经超滤膜精制后, 抗炎作用明显增强, 主要原因可能是由于超滤膜工艺的指标性成分透过率更高。但由于中药成分多样

性和药理作用的复杂性, 因此, 膜分离技术富集山茱萸抗炎组分的工艺还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Calabresi E, Petrelli F F, Bonifacio A, *et al.* One year in review 2018: Pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(1): 175-184.
- [2] 魏志萍, 洪芬芳, 杨树龙. 中药治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(12): 5477-5481.
- [3] 池里群, 周彬, 高文远, 等. 治疗类风湿性关节炎常用药物的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(15): 2851-2858.
- [4] Jagpal A, Curtis J R. Gastrointestinal perforations with piologics in patients with rheumatoid arthritis: Implications for clinicians [J]. *Drug Safety*, 2018: doi: 10.1007/s40264-018-0639-1.
- [5] Bartok B, Firestein G S. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.
- [6] Ganesan R, Rasool M. Fibroblast-like synoviocytes-dependent effector molecules as a critical mediator for rheumatoid arthritis: Current status and future directions [J]. *Inter Rev Immunol*, 2017, 36(1): 20-30.
- [7] Kaneko S, Kondo Y, Yokosawa M, *et al.* Rheumatoid arthritis and cytokines [J]. *J Clin Med*, 2016, 74(6): 913-918.
- [8] Meng Q L, Du X Z, Wang H L, *et al.* Astragalus polysaccharides inhibits cell growth and pro-inflammatory response in IL-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes by enhancement of autophagy via PI3K/AKT/mTOR inhibition [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(9): 1138-1146.
- [9] Rebrov B, Komarova E, Blagodarenko A, *et al.* AB0196 Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(2): 1115-1116.
- [10] 岑琴, 周丽莉, 礼彤. 膜分离技术及其在中药领域中的应用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(1): 77-80.
- [11] 陈伟平. 膜分离技术分离昆明山海棠根提取液总生物碱 [J]. *中药材*, 2014, 37(7): 1287-1289.
- [12] 刘红波, 唐志书, 宋忠兴, 等. 膜分离技术对沙棘籽油精制的初步研究 [J]. *膜科学与技术*, 2017, 37(2): 124-130.
- [13] 欧阳丽, 何鼎胜, 苏孝礼, 等. 反萃分散液膜分离提取黄连中生物碱研究 [J]. *分析化学*, 2009, 37(3): 346-346.
- [14] 叶贤胜, 赫军, 张佳琳, 等. 山茱萸的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(24): 4605-4609.
- [15] 杨明明, 袁晓旭, 赵桂琴, 等. 山茱萸化学成分和药理

- 作用的研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2016, 33(5): 398-400.
- [16] 武 婧, 唐志书, 古 川, 等. 无机陶瓷膜微滤精制山茱萸水提液的工艺研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(9): 943-946.
- [17] 武 婧, 唐志书, 宋忠兴, 等. 山茱萸水提液超滤工艺优化研究 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3338-3343.
- [18] 武 婧. 膜分离技术富集山茱萸抗风湿组分的适用性研究与评价 [D]. 西安: 陕西中医药大学, 2016.
- [19] 李建民. 山茱萸总甙抗类风湿性关节炎分子免疫机理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2001.
- [20] 宋 逍, 段 玺, 赵 鹏, 等. 膜分离技术应用于柴黄口服液的纯化分离工艺研究 [J]. 吉林中医药, 2017, 37(2): 183-187.
- [21] 张可人, 张依人, 彭买姣, 等. 陶瓷膜分离技术精制古汉养生精提取液的工艺研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(8): 875-878.
- [22] 朱华旭, 唐志书, 段金廛, 等. 基于资源循环经济的中药脉络宁注射液废弃物资源化循环利用中的共性关键问题 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(12): 1672-1687.