

清热除痹方对佐剂性关节炎大鼠的抗炎消肿作用及其对炎症因子的影响

李 静^{1,2}, 刘颖琬¹, 孙维峰¹, 王 静¹, 朱明敏^{1,2} (1. 广州军区广州总医院中医科, 广东 广州 510010; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察清热除痹方对佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)大鼠的抗炎消肿作用及对白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。**方法** 应用弗氏完全佐剂诱导大鼠 AA 模型。实验分清热除痹方高、中、低剂量组(22.4, 11.2, 5.6 g·kg⁻¹), 美洛昔康组(0.746 g·kg⁻¹)、模型组及空白对照组。实验第 11 天开始给药, 连续 10 d。分别于实验第 10 天、第 14 天、第 18 天、第 20 天, 测量关节肿胀程度及关节炎指数。末次给药 24 h 后, 采用酶联免疫试验(ELISA)检测大鼠关节滑膜匀浆中 IL-1 β 、TNF- α 的含量。**结果** 清热除痹方各组在实验第 18 天开始大鼠足肿胀度明显低于模型组 ($P < 0.05$); 第 14 天开始关节炎指数明显低于模型组($P < 0.05$); 与模型组相比, 清热除痹方各组 IL-1 β 、TNF- α 含量明显下降($P < 0.05$), 且各实验结果均有一定的剂量依赖性。**结论** 清热除痹方可明显抑制模型大鼠足肿胀度及关节炎指数, 具有一定抗炎消肿作用。降低关节滑膜匀浆中 IL-1 β 、TNF- α 的含量可能是清热除痹方抗炎消肿作用的机理之一。

关键词: 清热除痹方; 佐剂性关节炎; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0128-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.004

Anti-inflammatory and Swelling-subsiding Action of *Qingre Chubi* Recipe and Its Influence on Inflammatory Cytokines of Adjuvant Arthritis Rats

LI Jing^{1,2}, LIU Yingwan¹, SUN Weifeng¹, WANG Jing¹, ZHU Mingmin^{1,2} (1. Traditional Chinese Medicine Department, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010 Guangdong, China; 2 Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the anti-inflammatory and swelling-subsiding effects of *Qingre Chubi* Recipe(QCR) on adjuvant arthritis(AA) rats and to observe its influence on interleukin 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). **Methods** The AA rat model was induced by intradermal injection of Freund's complete adjuvant(FCA), and then the corresponding drugs of QCR(in the dose of 22.4, 11.2, 5.6 g·kg⁻¹, respectively), Meloxicam(0.746 g·kg⁻¹) were administrated to various medication groups and normal saline was given to the model group for 10 days from experimental day 11. On experimental day 10, 14, 18 and 20, articular swelling and arthritis index were measured. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied for the detection of IL-1 β and TNF- α contents in joint synovium of rats 24 h after the last medication. **Results** Compared with the model group, pedal swelling was much relieved from experimental day 18($P < 0.05$), arthritis index was much reduced from experimental day 14($P < 0.05$), and IL-1 β and TNF- α contents were decreased in QCR groups($P < 0.05$), the effect being dose-dependently. **Conclusion** QCR has anti-inflammation effect through relieving pedal swelling and arthritis index if AA rats, and decreasing IL-1 β and TNF- α content in AA rat joint synovium may be one of its therapeutic mechanisms.

Keywords: *Qingre Chubi* Recipe; Adjuvant arthritis; Inflammatory cytokines

收稿日期: 2013-08-05

作者简介: 李静, 女, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗风湿病。Email: ljingtem@126.com。通讯作者: 孙维峰, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合治疗风湿病。Email: sunwf3@sina.com。

基金项目: 军队中医药研究重大专项(10ZY116)。

清热除痹方为我院中医科的经验方，在临床上用于治疗湿热痹阻型类风湿关节炎、强直性脊柱炎、痛风等疾病，效果显著^[1]。本试验采用弗氏完全佐剂诱导的 SD 大鼠佐剂性关节炎(Adjuvant Arthritis, AA)模型，对清热除痹方的抗炎消肿作用进行药效学评价，并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物 清热除痹方，由寻骨风、青风藤、穿破石、知母、苍术组成，饮片由康美药业股份有限公司提供，用自动煎药机煎成所需浓度的水煎液。美洛昔康，上海勃林格殷格翰药业有限公司，批号：684001。

1.2 动物 SD 大鼠，雄性，SPF 级，体质量(200 ± 30) g，动物合格证号：44002100000776，由南方医科大学实验动物中心提供。

1.3 试剂 弗氏完全佐剂，美国 Sigma 公司，批号：9007-81-2。白细胞介素 -1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子 -α (TNF-α)酶联免疫试验(ELISA)试剂盒，武汉博士德生物有限公司，批号分别为：JK2711037，BR24076。

1.4 仪器 JA2003 电子天平，上海天平仪器厂。PYX-250S-B 生化培养箱，广东省正一科技有限公司。

1.5 模型复制、分组及给药 60 只大鼠随机分成 6 组，分别为清热除痹方高、中、低剂量组，美洛昔康组，模型组，空白对照组，每组 10 只。除空白对照组外，各组大鼠于右后足跖皮下注射弗氏完全佐剂 0.1 mL，复制大鼠佐剂性关节炎(AA)模型^[2-3]。模型复制第 11 天开始给药，清热除痹方高、中、低剂量组分别给予清热除痹方 22.4，11.2，5.6 g·kg⁻¹，美洛昔康组给予美洛昔康 0.746 g·kg⁻¹，模型组及空白对照组给予等容积生理盐水。灌胃给药，给药容积为 10 mL·kg⁻¹，每日 1 次，连续给药 10 d。

1.6 抗炎消肿实验 分别于实验第 10 天、第 14 天、第 18 天、第 20 天，用足跖容积法测量并计算大鼠右后足肿胀度^[4]；采用关节炎评分法记录继发性关节炎病变严重程度，计算关节炎指数(Arthritis index, AI)。按 5 级评分法评价^[5]计算出 AI。0 级：无红肿，0 分；1 级：小趾关节稍肿，1 分；2 级：趾关节和足跖肿胀，2 分；3 级：踝关节以下足肿胀，3 分；4 级：包括踝关节在内全部足爪肿胀，4 分；AI = 非致炎侧 3 只肢体关节肿胀积分之和，最高为 12 分。

1.7 炎症因子的测定 末次给药 24 h 后处死动物，取右后足踝关节，分离滑膜，研磨，2500 r·min⁻¹ 离心 15 min，用一次性吸管移取上清液 0.3 mL 冻存，按 ELISA 试剂盒说明操作，检测大鼠滑膜匀浆中 IL-1β、TNF-α 的含量。

1.8 统计学处理方法 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用 SPSS 16.0 for windows 软件进行统计学处理，多组均数比较采用单因素方差分析，重复测量数据采用重复测量方差分析，组间比较方差齐时选择 LSD 法，方差不齐时选择 Dunnett's T3 法；检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 对 AA 模型大鼠足肿胀度的影响 模型大鼠关节肿胀明显，实验第 10 天，模型组大鼠足肿胀度明显高于空白对照组($P < 0.05$)，说明模型复制成功。第 10 天和第 14 天，各治疗组与模型组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。第 18 天，各治疗组大鼠足肿胀度低于模型组($P < 0.05$)，其中，美洛昔康组疗效优于清热除痹方高、中、低剂量组($P < 0.05$)；第 20 天，各治疗组肿胀度均低于模型组($P < 0.05$)，清热除痹方高、中、低剂量组疗效呈剂量依赖关系，高剂量组疗效与美洛昔康组相当($P > 0.05$)，但中、低剂量组疗效弱于美洛昔康组($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 清热除痹方对 AA 模型大鼠足肿胀度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 Effect of QCR on secondary food swelling in AA rats

组别	剂量 /g·kg	肿胀度 /mL			
		10 d	14 d	18 d	20 d
高剂量组	22.4	0.833 ± 0.10 [*]	0.815 ± 0.08	0.532 ± 0.18 ^{#△}	0.126 ± 0.14 [*]
中剂量组	11.2	0.812 ± 0.19 [*]	0.788 ± 0.21	0.515 ± 0.13 ^{#△}	0.138 ± 0.09 ^{#△}
低剂量组	5.6	0.829 ± 0.13 [*]	0.839 ± 0.15	0.582 ± 0.11 ^{#△}	0.240 ± 0.15 ^{#△}
美洛昔康组	0.746	0.814 ± 0.15 [*]	0.788 ± 0.11	0.408 ± 0.11 [#]	0.106 ± 0.16 [*]
模型组		0.829 ± 0.09 [*]	0.819 ± 0.18	0.677 ± 0.14	0.419 ± 0.08
空白对照组		0.011 ± 0.10	0.010 ± 0.17	0.008 ± 0.13	0.021 ± 0.13

注：与空白对照组比较，^{*} $P < 0.05$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$ ；与美洛昔康组比，[△] $P < 0.05$ 。

2.2 对 AA 模型大鼠 AI 的影响 实验第 10 天，各治疗组 AI 与模型组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。第 14 天、第 18 天、第 20 天，各治疗组 AI 均明显低于模型组($P < 0.05$)；第 20 天，美洛昔康组疗效优清热除痹方中、低剂量组，但与高剂量组比较差异无统计学意义($P < 0.05$)，提示清热除痹方能明显减轻继发性关节炎病变程度，见表 2。

表 2 清热除痹方对 AA 模型大鼠 AI 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /g·kg	AI / 分			
		10 d	14 d	18 d	20 d
高剂量组	22.4	9.03 ± 1.41	8.20 ± 1.52*	6.85 ± 1.46*	5.93 ± 1.26*
中剂量组	11.2	9.02 ± 1.25	8.15 ± 1.26*	6.83 ± 1.27*	6.21 ± 1.07**
低剂量组	5.6	8.98 ± 1.14	8.26 ± 1.66*	7.13 ± 1.52*	6.67 ± 1.42**
美洛昔康组	0.746	9.02 ± 1.20	8.09 ± 1.34*	6.28 ± 1.29*	5.41 ± 1.15*
模型组		8.95 ± 1.29	9.26 ± 1.54	8.19 ± 0.99	7.68 ± 1.14

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ；与美洛昔康组比较，** $P < 0.05$ 。

2.3 对 AA 模型大鼠炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的影响 与空白对照组比较，模型组大鼠滑膜中 IL-1 β 、TNF- α 水平大幅升高($P < 0.05$)；与模型组比较，各治疗组 IL-1 β 、TNF- α 含量明显下降($P < 0.05$)。清热除痹方高、中、低剂量组对 IL-1 β 、TNF- α 作用呈剂量依赖关系，高剂量组作用与美洛昔康组相当($P > 0.05$)，见表 3。

表 3 清热除痹方对 AA 模型大鼠滑膜炎症因子的影响($\bar{x}\pm s$, $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=10$)

组别	剂量 /g·kg	IL-1 β	TNF- α
高剂量组	22.4	62.76 ± 20.83 [#]	19.31 ± 7.83 [#]
中剂量组	11.2	69.98 ± 18.39 ^{#△}	25.93 ± 5.81 ^{#△}
低剂量组	5.6	80.54 ± 19.82 ^{#△}	26.46 ± 7.44 ^{#△}
美洛昔康组	0.746	57.62 ± 20.76 [#]	15.57 ± 5.12 [#]
模型组		94.36 ± 24.18*	44.32 ± 6.56*
空白对照组		21.28 ± 10.16	7.06 ± 1.89

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$ ；与美洛昔康组比，[△] $P < 0.05$ 。

3 讨论

以关节疼痛为主证的疾病属中医“痹证”范畴。清·尤在泾在《金匱翼·热痹》中有专论：“热痹者，闭热于内也，……脏腑经络先有蓄热而复感风寒湿邪客气，热为寒郁，气不得通，久之寒亦化热。”湿热痹证既有关节肌肉疼痛、肿胀、酸楚等“痹证”表现，又可伴随发热、恶热、身重、胸闷、多汗、口干、纳呆、舌红、苔腻等“湿热证”表现。关节疼痛属湿热痹证者，起病多急骤，发作时关节局部红肿热痛明显。广州军区广州总医院中医科根据岭南潮湿炎热特点，研制出清热除痹方，并已获得国家发明专利授权(专利号：201110416472.1)。该方由寻骨风、青风藤、穿破石、苍术和知母 5 味药物组成。寻骨风为马兜铃科多年生攀援草本植物绵毛马

兜铃的根茎，性味苦、平，归肝经，祛风湿、通经络、止痛，为君药。青风藤，性味苦、辛、寒，归肝、脾经，祛风湿、通经络、利小便；穿破石，性味淡、微苦、凉，祛风利湿、活血通经，共为臣药。苍术性味辛、苦、温，归脾、胃经，燥湿健脾、祛风湿；知母性味苦、甘、寒，归肺、胃、肾经，清热泻火、滋阴润燥，苍术和知母，一除湿，一清热，配合君臣除湿热之痹痛，为佐药。全方共奏清热化湿，通络除痹之功效。寻骨风所含生物碱对大鼠关节炎有明显消肿作用，其注射液有镇痛、抗炎、解热作用，煎剂对风湿性、类风湿关节炎有较好的止痛、消肿、改善关节功能的作用^[6]；青风藤中有效成分青藤碱可降低血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平，抑制自身免疫反应，调节外周血单核细胞 IL-1 β 、IL-8 mRNA 表达^[7]，能显著提高小鼠对热刺激的痛阈，并有明显的抗炎作用；穿破石具有明显的保肝降酶作用，对风湿性关节炎伴肝损害者尤宜^[8]。对 166 例湿热痹证患者的临床应用证明，该方总有效率达到 93.78 %^[9]。

大鼠佐剂性关节炎以多发性关节炎为特征，为一种典型的免疫性炎症模型，是研究关节炎药物的常用模型^[10]。本研究结果表明，清热除痹方各剂量组均可明显抑制模型大鼠足肿胀度及关节炎指数，其高剂量组的治疗作用与美洛昔康组相当。IL-1 β 、TNF- α 是关节炎发病的重要炎症介质，在血清、关节液、滑膜中均可检出^[11-13]。有研究^[14]证实，在类风湿关节炎、强直性脊柱炎等疾病的患者关节液中 IL-1 β 、TNF- α 均有较高表达，IL-1 β 、TNF- α 对炎症导致的关节软骨有破坏作用。本研究结果表明，模型大鼠滑膜中 IL-1 β 、TNF- α 的含量升高，清热除痹方各剂量组均可抑制 IL-1 β 及 TNF- α 的表达，清热除痹方高剂量组作用与美洛昔康相仿。可见，清热除痹方可明显抑制模型大鼠足肿胀度及关节炎指数，具有一定抗炎消肿作用。降低关节滑膜匀浆中 IL-1 β 、TNF- α 的含量可能是清热除痹方抗炎消肿作用的机理之一。

参考文献：

[1] 孙维峰, 张娴娟, 接力刚, 等. 清热除痹方治疗湿热痹阻型风湿病的临床疗效及安全性评价[C]. 广州军区中医药专业委员会第八次学术会议论文汇编. 广州军区中医药专业委员会, 2013.
[2] 李培培, 解国雄, 宋珊珊, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(5): 453-457.
[3] 辛增辉, 季春, 肖丹, 等. 湿热痹颗粒镇痛抗炎作用的实验研究

- [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(2): 123-126.
- [4] 陈建双, 于海荣, 张玉玲, 等. 赤芍根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠血清细胞因子的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23 (5): 1097-1098.
- [5] 姚血明, 陆道敏, 龙小琴, 等. 姜酚对胶原诱导性关节炎的抗炎作用及其机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(1): 47-51.
- [6] 申庆亮, 唐启令, 郑凌云. 寻骨风镇痛消炎有效部位研究[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(3): 173-174.
- [7] 王勇, 钟兵, 方勇飞, 等. 青藤碱对类风湿关节炎患者炎性细胞因子及抗环瓜氨酸肽抗体的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27 (15): 1573-1575.
- [8] 王永中, 郑良朴, 王瑞国, 等. 穿破石对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤保护作用实验观察[J]. 福建中医药, 2004, 35(5): 44-46.
- [9] 接力刚, 孙维峰, 徐伟, 等. 清热除痹汤对华南基层部队士兵湿热痹型关节痛的疗效观察[J]. 华南国防医学杂志, 2014, 28(1): 23.
- [10] 林月泉, 孙备, 杨士友, 等. 牛膝引药作用对双氯芬酸钠抗佐剂型关节炎大鼠的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 5: 408-411.
- [11] Strand V, Kavanaugh AF. The role of interleukin-1 in bone restoration in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology, 2004, 43 (13): 220-226.
- [12] Campas-Moya C. Golimumab: A novel anti-TNF- α human monoclonal antibody for rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis[J]. Drugs Today(Barc), 2010, 46(1): 13-22.
- [13] 王红权, 陈龙全. 白细胞介素家族在类风湿关节炎中的表达意义[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(12): 1113-1115.
- [14] Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM, et al. Anti-TNF therapy: where have we got to in 2005[J]. Autoimmune, 2005, 25(suppl): 26-28.
- (编辑: 梁进权)

白藜芦醇诱导鼻咽癌 CNE-1 细胞凋亡及其分子机制

赵 青, 谭宇蕙, 吴映雅, 张广献, 杜标炎, 肖建勇(广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 探讨白藜芦醇诱导鼻咽癌 CNE-1 细胞凋亡及其分子机制。方法 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力; 活细胞染色法(PI)流式细胞仪分析细胞周期和 PI-AnnexinV 双染色法流式细胞仪检测细胞凋亡; 免疫印迹检测蛋白表达水平。结果 MTT 结果表明白藜芦醇呈浓度和时间依赖性抑制鼻咽癌 CNE-1 细胞活力, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); PI 单染流式细胞仪分析表明白藜芦醇引起 S 期的 CNE-1 比例明显增多, 相应免疫印迹结果显示细胞周期蛋白 Cyclin E 和 Cyclin A 显著下调, 呈药物浓度依赖; PI-Annexin V 双染流式细胞仪分析表明白藜芦醇呈药物浓度依赖诱导 CNE-1 细胞凋亡; 免疫印迹分析显示抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 而促凋亡蛋白 Bax 表达上调。结论 白藜芦醇能抑制鼻咽癌 CNE-1 细胞的增殖, 使其阻滞在 S 期, 并可能通过线粒体介导的凋亡通路诱导其凋亡。

关键词: 白藜芦醇; 鼻咽癌; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)02-0131-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.005

Studied on Resveratrol in Inducing apoptosis of Nasopharyngeal Carcinoma CNE -1 Cells and Its Molecular Mechanism

ZHAO Qing, TAN Yuhui, WU Yingya, ZHANG Guangxian, DU Biaoyan, XIAO Jianyong (School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To elucidate the effects of resveratrol on inducing apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells and its molecular mechanism. **Methods** The viability of CNE-1 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay, cell cycle profile was analyzed by PI single-staining flow cytometer and apoptosis of CNE-1 cells was analyzed by PI-AnnexinV double-staining flow cytometer. The expression level of target proteins was examined by immunoblotting method. **Results** Resveratrol significantly inhibited the viability of CNE-1 cells in

收稿日期: 2013-12-07

作者简介: 赵青, 女, 硕士研究生。研究方向: 中西医结合肿瘤防治。Email: green-666@163.com。通讯作者: 肖建勇, 讲师, 博士, 研究方向: 中西医结合基础及肿瘤药理学。Email: jianyongxiao@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81274145); 广东省中医药局科研基金(20121227); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20124425120012)。