



茵连痛风颗粒对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用研究

刘静, 徐熠, 吴铁军, 黄瑾

Anti-inflammatory and analgesic study of Yinlian Tongfeng granules on adjuvant arthritis rats

LIU Jing, XU Yi, WU Tiejun, HUANG Jin

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202103005>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

类风湿性关节炎的治疗药物研究进展

Research progress on therapeutic drugs for rheumatoid arthritis

药学实践杂志. 2019, 37(6): 485-490 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.002

著草总倍半萜内酯对类风湿性关节炎模型大鼠保护作用的实验研究

Protective effect of total sesquiterpene lactone from *Achillea sibirica* on rheumatoid arthritis rats

药学实践杂志. 2018, 36(6): 529-532 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.06.011

基于网络药理学对茵连痛风颗粒抗炎镇痛作用的机制研究

Anti-inflammatory and analgesic activity analysis of Yinlian Tongfeng granules based on network Pharmacology

药学实践杂志. 2021, 39(3): 226-231, 254 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202007014

痛风颗粒各有效部位群对关节炎大鼠的抗炎镇痛作用研究

Study on the anti-inflammatory and analgesic effects of active fractions of Tongfeng granule on arthritis rats

药学实践杂志. 2020, 38(6): 528-532 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202007015

肿瘤坏死因子及其受体在类风湿性关节炎中的研究进展

Research progress of TNF- α and its receptors in rheumatoid arthritis

药学实践杂志. 2017, 35(4): 289-293 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.001

苦参碱衍生物抗关节炎作用研究

Anti-arthritis effects of matrine derivative in rats

药学实践杂志. 2019, 37(3): 241-245 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.010



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

茵连痛风颗粒对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用研究

刘 静, 徐 熠, 吴铁军, 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 考察茵连痛风颗粒对佐剂性关节炎大鼠的缓解作用。方法 建立弗氏完全佐剂模型, 48只大鼠随机分为正常组、模型组、茵连痛风颗粒高、中、低剂量组(15.4、7.7、3.8 g/kg), 用药物干预后, 测定大鼠关节炎指数、踝关节肿胀率、甲醛致痛分值, 用ELISA检测IL-4、IL-10、前动力蛋白(PK1, PK2)含量。观察大鼠足趾肉垫病理变化。结果 与模型组比较, 茵连痛风颗粒组可显著抑制大鼠踝关节肿胀, 降低甲醛致痛反应($P<0.01$), 明显升高抑炎因子IL-4、IL-10含量($P<0.01$), 降低PK1、PK2含量($P<0.01$); 缓解足趾水肿和淋巴细胞浸润。结论 茵连痛风颗粒对佐剂性关节炎具有明显抑制作用, 暗示其对类风湿性关节炎具有一定的治疗前景。

[关键词] 茵连痛风颗粒; 佐剂性关节炎; 类风湿性关节炎; 细胞因子

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-2024(2022)05-0442-04

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202103005

Anti-inflammatory and analgesic study of Yinlian Tongfeng granules on adjuvant arthritis rats

LIU Jing, XU Yi, WU Tiejun, HUANG Jin (Department of Pharmacy, Affiliated Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relieving effect of Yinlian Tongfeng granules on adjuvant arthritis rats. **Methods** A complete Freund adjuvant model was built for this study. 48 rats were randomly divided into control group, model group, Yinlian Tongfeng granules high, medium and low dose group (15.4g/kg, 7.7g/kg, 3.8g/kg). After the drug intervention, arthritis index, ankle swelling rate, formaldehyde induced pain score were recorded. Elisa method was used to detect IL-4, IL-10 and the content of PK1, PK2. The pathological changes of toe pad in rats were observed. **Results** Compared with the model control group, Yinlian Tongfeng granules groups significantly inhibited the ankle swelling, reduced the pain reaction caused by formaldehyde ($P<0.01$), significantly increased the content of anti-inflammatory factors IL-4 and IL-10 ($P<0.01$), and decreased the content of PK1 and PK2 ($P<0.01$). Toe edema and lymphocyte infiltration were alleviated. **Conclusion** Yinlian Tongfeng granules have a significant inhibitory effect on adjuvant arthritis, suggesting that it has a potential therapeutic application for rheumatoid arthritis.

[Key words] Yinlian Tongfeng granules; adjuvant arthritis; rheumatoid arthritis; cytokines

类风湿性关节炎(RA)是一种以滑膜关节病变为主的慢性全身性、进行性自身免疫性疾病。疾病最早开始表现是滑膜炎, 继而引发骨损伤及侵蚀, 直至骨关节畸形及功能障碍^[1-2], RA动物模型中广泛

使用的是佐剂性关节炎模型和胶原诱导的关节炎模型。佐剂性关节炎又称弗氏佐剂性关节炎, 是建立免疫性关节炎动物模型的基本方法^[3]。RA发病机制还不明确, 目前缺乏理想的治疗方案。临床上治疗RA主要是非甾体类抗炎药、抗风湿药物及糖皮质激素等^[4], 但往往因为药物的不良反应、价格等因素, 难以坚持长期服药。

茵连痛风颗粒是上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院院内制剂, 由茵陈、连钱草、伸筋草组成, 具有清热利湿、通络的功效。其处方是依据沪上著名夏氏外科传人夏涵教授数年临床经验方制成, 用于治疗痛风性关节炎, 临床具有显著疗效^[5]。本实验通过弗氏完全佐剂诱导大鼠关节炎模型, 观

[基金项目] 上海市教委预算内项目(2015YSN46); 上海市卫计委科研课题-青年项目(20174Y0194); 上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划(ZY(2021-2023)-0203-03); 上海申康医院发展中心临床科技创新项目专项(SHDC12021635); 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划(青年医学人才类-临床药师项目)

[作者简介] 刘 静, 硕士, 主管药师, 研究方向: 临床药学, Email: liujing411627@163.com

[通信作者] 黄 瑾, 博士, 主任药师, 研究方向: 中药活性成分作用机制和临床药学, Email: john70550@163.com

察茵连痛风颗粒对佐剂性关节炎的影响,为茵连痛风颗粒的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

茵连痛风颗粒(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科自制,沪药制字:Z05050342,批号:1811001);塞来昔布胶囊(辉瑞制药有限公司,批号:AN8171);弗氏完全佐剂(Sigma公司);IL-10、IL-4、前动力蛋白(PK1、2)酶联免疫分析试剂盒均购自上海威奥生物科技有限公司。

1.2 动物

SD大鼠,雄性,体重(160±10)g,[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:SCXK(沪)2017-0005]。

1.3 仪器

酶标仪(型号:DNLEY DRAGON Wellscan MK3,公司:Thermo);离心机(型号:TGL-168,公司:上海安亭科学仪器厂);数字显示隔水式电热恒温培养箱(型号:PYX-DHS,公司:上海跃进医疗器械厂);自制刻度软尺。

2 方法

2.1 分组给药和模型建立

将48只SD雄性大鼠适应性饲养1周后,随机分为6组,每组8只。分别为正常组,模型组,塞来昔布阳性组(0.017 g/kg),茵连痛风颗粒高剂量组(15.4 g/kg),茵连痛风颗粒中剂量组(7.7 g/kg),茵连痛风颗粒低剂量组(3.8 g/kg)。除正常组外,其余各组大鼠右后足皮内注射弗氏完全佐剂0.1 ml/足。注射弗氏完全佐剂后第8天,按照如上剂量灌胃给予相应浓度的受试药品,正常组和模型组给予等体积蒸馏水,每天给药1次,连续给药28 d。

模型鉴定:造模后各组大鼠的皮肤肿胀,皮肤温度及踝关节肿胀度与正常组之间是否有统计学差异,是模型成功与否的判定标准。

2.2 实验方法

2.2.1 大鼠一般情况和关节炎症状评分

分别在大鼠给药后7、14、28 d记录大鼠四肢关节病变程度,采用关节炎指数(AI)评分分级法评价大鼠病变程度。关节炎指数分为5级(0~4分):0分,关节无红肿;1分,单个趾关节明显红肿;2分,发红并(或)肿胀关节>1个;3分,整个足及跖关节明显红肿;4分,严重的关节肿胀或畸形。根据未注射佐剂的余下肢体的病变程度累计积分,计算

出AI(各个关节的积分累计起来,即为每只大鼠的AI)。

2.2.2 茵连痛风颗粒对大鼠踝关节肿胀度影响

分别于造模前、给药后1 d、以及每间隔8 d,用刻度软尺测量大鼠右后踝关节周长,并观察各组动物关节病变情况。按照下列公式计算踝关节肿胀率:踝关节肿胀率=(致炎后踝关节周长-致炎前踝关节周长)/致炎前踝关节周长×100%。

2.2.3 对大鼠甲醛致痛的影响^[6]

末次给药后2 h,于大鼠左足趾皮下注射50 μl 2.5%甲醛,观察1~10 min(第I时相)和10~30 min(第II时相)的行为反应。评分标准:第I时相抬足1次,计1分;第II时相舔足、咬足或抖足1次,计2分。计算30 min内的总得分。

2.2.4 血清炎症指标检测和病理组织观察

末次给药后禁食、禁水12 h,大鼠注射10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)进行麻醉,腹主动脉取血,离心取血清,用ELISA法检测血清中IL-10、IL-4、PK1、PK2含量;各组大鼠取左侧足掌肉垫,福马林固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋、切片和HE染色,病理组织学观察。

2.3 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 茵连痛风颗粒对大鼠一般情况及关节炎指数的影响

造模前各组大鼠毛色光亮,动作敏捷,精神状态和饮食均良好。模型组大鼠在造模后,自主活动减少、足底局部出现红肿,后期整只爪和关节均有不同程度肿胀,最初表现为足部肿胀,而后肿胀向上到达踝关节,肿胀部位皮肤发红,温度升高。随着时间延长,大鼠食欲减退,毛色暗黄,且运动功能逐渐减退。给予茵连痛风颗粒高、中、低剂量组及塞来昔布阳性组大鼠精神状态有所好转,关节肿胀度、食欲等不同程度的缓解。表1结果表明,与模型组比较,给药7、14、28 d后,茵连痛风颗粒高、中剂量组和阳性组大鼠关节炎指数显著降低($P < 0.01$)。

3.2 茵连痛风颗粒对大鼠踝关节肿胀度影响

表2结果显示,与同期正常组比较,模型组在给药第9天时肿胀率达峰值,17d开始,肿胀逐日减轻,给药第9天开始,阳性组和茵连痛风颗粒高剂量组足肿胀与模型组比较,肿胀明显减轻,有显

表 1 茵连痛风颗粒对大鼠关节炎指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量(g/kg)	给药后关节炎指数		
		第7天	第14天	第28天
正常组	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	—	6.37±0.52 ^{##}	9.63±0.74 ^{##}	8.38±0.92 ^{##}
阳性组	0.017	5.63±0.51 ^{**}	6.50±0.93 ^{**}	4.38±0.52 ^{**}
高剂量组	15.4	5.50±0.53 ^{**}	7.13±0.83 ^{**}	4.13±0.64 ^{**}
中剂量组	7.7	5.75±0.46 ^{**}	8.13±0.83 ^{**}	5.63±0.52 ^{**}
低剂量组	3.8	5.88±0.35 [*]	9.13±0.81	8.13±0.74

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与模型组比较; ^{##} $P<0.01$, 与正常组比较。

著统计学差异($P<0.01$); 在给药第 25、28 天, 茵连痛风颗粒中剂组与模型组有显著性差异($P<0.05$), 茵连痛风颗粒低剂组无明显差异。结果显示了茵连痛风颗粒对佐剂性关节炎大鼠原发足踝关节肿胀有剂量依赖性抑制作用。

3.3 茵连痛风颗粒对大鼠甲醛致痛的影响

与模型组比较, 在 I 时相和 II 时相, 阳性组和茵连痛风颗粒高、中、低剂量组可显著降低甲醛致痛分值($P<0.01$), 表明茵连痛风颗粒具有很好的镇痛作用(表 3)。

3.4 茵连痛风颗粒对 IL-4、IL-10、PK1、PK2 的影响

模型组大鼠 IL-10、IL-4 与正常组相比显著降低($P<0.01$), 炎性反应较明显; 茵连痛风颗粒各组 and 阳性组均能升高 IL-10、IL-4 水平。同时, 模型组大鼠 PK1、PK2 水平与正常组相比显著升高($P<0.01$), 阳性组和茵连痛风颗粒各组均能降低两者水平, 与模型组比较有显著差异($P<0.01$), 其中, 茵连痛风颗粒高剂量组更明显(表 4)。

3.5 病理观察

由图 1 可见, 正常对照组足趾肉垫无炎症细胞浸润, 而模型组可见大量淋巴细胞浸润。塞来昔布

组可见淋巴细胞浸润程度的大幅度降低, 而茵连痛风颗粒高、中、低剂量组均可降低淋巴细胞浸润, 而以茵连痛风颗粒高剂量组最为显著。

4 讨论

类风湿关节炎在中医归属“痹症”范畴, 治疗以祛风除湿、散寒通络、扶正固本、清热解毒为主^[7]。茵连痛风颗粒有茵陈、连钱草、伸筋草三味药材组成。茵陈作为君药, 具有清利湿热、芳香舒脾、透表畅气之效; 臣药连钱草, 取其消石之功, 防止痛风性尿路结石的产生, 具有利湿通淋、清热解毒、散瘀消肿之功效; 佐药伸筋草具有祛风除湿、舒筋活血之效, 为治痹痛拘挛及伤损瘀肿之要药, 配伍茵陈可以增强该复方利湿通络的作用。该方配伍符合中医理论对类风湿性关节炎的认识^[8]。

弗氏佐剂性关节炎动物模型是经典的类风湿性关节炎模型, 与类风湿性关节炎模型的病因、病症更接近。它能较为真实地反映类风湿性关节炎的病理进程, 与痛风性关节炎同属中医“痹证”“白虎历节风”范畴, 而且制备方法简便、易重复。常用于关节炎药物的药效评估^[9]。IL-4、IL-10 细胞因子在类风湿性关节炎患者中, 起到十分重要的作用。这类细胞因子与滑膜炎性反应、增生及关节变形有着密切的关系。PK 信号通路是近年新发现的调节通路, 包括两种结构上关联的小分子肽 PK1 和 PK2 及相应的 G 蛋白偶联受体 PK(PKR1 和 PKR2), PKs 及其受体 PKRs 广泛分布在许多人体组织中。在免疫细胞中参与炎症发生和疼痛传递的重要环节, 如 PK2 参与免疫调节, 诱导骨髓细胞分化为单核细胞系和巨噬细胞系, 并通过激活单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞上的 PKRs, 释放 IL-1、IL-6、TNF- α 等炎性细胞因子, 触发和维持炎性疼痛, 调节免疫炎症反应^[10-11]。研究发现在前动力蛋白信号通路中加入 PKRs 激动剂可以显著降低 IL-

表 2 茵连痛风颗粒对大鼠踝关节肿胀率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	踝关节周长(l/cm)	给药后踝关节肿胀率(%)				
		第1天	第9天	第17天	第25天	第28天
正常组	2.24±0.05	2.77±0.71	3.36±1.87	3.56±4.70	3.94±6.89	4.31±7.95
模型组	2.26±0.06	28.75±6.36 ^{##}	30.09±8.24 ^{##}	26.51±10.43 ^{##}	25.44±12.90 ^{##}	23.31±13.26 ^{##}
阳性组	2.27±0.08	27.00±0.00	22.63±1.77 ^{**}	20.61±1.45 ^{**}	19.33±4.31 ^{**}	18.45±4.67 ^{**}
高剂量	2.22±0.05	27.54±1.03	23.85±1.56 ^{**}	20.01±0.04 ^{**}	18.14±1.52 ^{**}	17.85±2.40 ^{**}
中剂量	2.24±0.06	28.24±0.67	28.68±0.92	25.19±0.88	22.26±1.52 [*]	21.85±2.40 [*]
低剂量	2.28±0.07	29.48±0.21	29.49±2.23	26.05±0.99	25.01±0.32	24.10±0.28

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与模型组比较; ^{##} $P<0.01$, 与正常组比较。

表3 茵连痛风颗粒对大鼠甲醛致痛的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (g/kg)	甲醛致痛分值	
		1 ~ 10 min (I 时相)	10 ~ 30 min (II 时相)
正常组	—	2.38±0.52	1.38±0.52
模型组	—	33.63±1.41 ^{##}	14.88±1.64 ^{##}
阳性组	0.017	11.38±1.06 ^{**}	3.50±0.93 ^{**}
高剂量组	15.4	12.13±0.99 ^{**}	3.25±1.04 ^{**}
中剂量组	7.7	16.00±1.60 ^{**}	5.25±0.89 ^{**}
低剂量组	3.8	19.38±1.19 ^{**}	6.50±1.20 ^{**}

^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较; ^{##} $P < 0.01$, 与正常组比较。

10 和 IL-4 生成^[12]。损伤组织中释放的 PKs 是免疫-炎症反应的一种自分泌或旁分泌的调节剂,能够刺激神经元中 PKRs 而增强伤害性感受器的敏感性,说明 PKs 信号通路在调节伤害性感受阈方面发挥重要功能,因此阻断 PKs 信号通路是目前治疗

炎性疼痛的新策略^[11]。然而,关于 PK 信号通路在中药镇痛方面的研究报道较少,其干预中药镇痛的具体机制有待进一步研究证实。本实验结果显示,茵连痛风颗粒可明显减轻 RA 大鼠足踝关节肿胀,按照人和大鼠之间的体表面积换算成大鼠的给药中剂量,并设置高、中、低 3 个剂量组。以高剂量组改善最为明显,并呈现剂量依赖性。同时,病理结果显示,茵连痛风颗粒高中低剂量组均可降低淋巴细胞浸润,以茵连痛风颗粒高剂量组最为显著。其作用机制可能是通过 PK 信号通路抑制 PK1、PK2 分泌,以及促进细胞因子 IL-4、IL-10 等分泌达到抗类风湿性关节炎的作用。为茵连痛风颗粒作用机制的阐明打下了基础。这些研究结果表明,茵连痛风颗粒对佐剂关节炎具有明显抑制作用,暗示其对类风湿性关节炎的治疗前景,作用机制有待进一步研究。

表4 茵连痛风颗粒对大鼠血清 IL-4、IL-10、PK1、PK2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (g/kg)	IL-4	IL-10	PK1	PK2
正常组	—	79.49±4.38	97.07±2.97	491.76±8.56	926.24±25.38
模型组	—	59.89±3.45 ^{##}	20.99±2.78 ^{##}	706.31±67.83 ^{##}	1455.40±147.81 ^{##}
阳性组	0.017	139.69±13.78 ^{**}	98.94±6.72 ^{**}	567.10±20.58 ^{**}	1099.60±63.63 ^{**}
高剂量组	15.4	101.45±7.05 ^{**}	90.36±5.43 ^{**}	365.49±27.65 ^{**}	656.07±194.68 ^{**}
中剂量组	7.7	95.60±4.52 ^{**}	82.75±8.49 ^{**}	433.91±22.29 ^{**}	866.73±21.57 ^{**}
低剂量组	3.8	72.50±3.09 ^{**}	78.15±5.47 ^{**}	529.20±12.79 ^{**}	1015.51±18.36 ^{**}

^{**} $P < 0.01$, 与模型组比较; ^{##} $P < 0.01$, 与正常组比较。

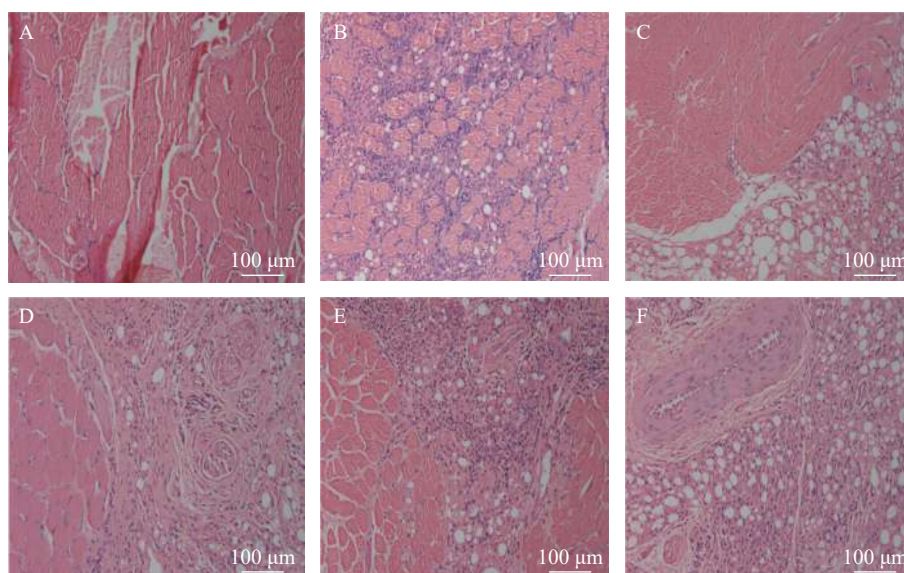


图1 大鼠足趾肉垫病理切片 HE 染色 ($\times 200$)

A. 正常组; B. 模型组; C. 阳性组; D. 高剂量组; E. 中剂量组; F. 低剂量组

(下转第 476 页)