

· 论著 ·

## 蓍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

王 建<sup>1</sup>, 邱 彦<sup>1</sup>, 李克冉<sup>2</sup>, 朱文君<sup>1</sup>, 董雅芬<sup>1</sup>, 刘河龙<sup>1</sup> (1.上海市浦东新区人民医院药剂科, 上海 201200; 2.南京第三高级中学, 江苏 南京 210001)

**[摘要]** 目的 探讨蓍草总倍半萜内酯对类风湿性关节炎(RA)模型大鼠的抗炎作用,并初步探讨其作用机制。方法 大鼠右后足跖皮下注射弗氏完全佐剂建立佐剂性关节炎大鼠模型,给予不同剂量蓍草总倍半萜内酯和雷公藤多苷药物干预21 d。通过检测大鼠关节肿胀度、关节炎指数和血清白介素(IL)-6、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 水平等指标,观察蓍草总倍半萜内酯片对佐剂性RA大鼠的影响。结果 与模型组比较,蓍草总倍半萜内酯中、高剂量组在14、21、28 d大鼠足跖肿胀度显著低于模型组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),明显抑制了RA大鼠足关节肿胀度。蓍草总倍半萜内酯中、高剂量组在14、21、28 d大鼠关节指数显著低于模型组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较,蓍草总倍半萜内酯低、中、高剂量组均能够显著降低IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),各剂量组的抑制作用呈剂量依赖性。结论 蓍草总倍半萜内酯具有较好的治疗大鼠RA作用,其作用机制可能与下调炎症因子IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平有关。

**[关键词]** 蓍草;倍半萜内酯;类风湿性关节炎

**[中图分类号]** R593

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2018)06-0529-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.06.011

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

WANG Jian<sup>1</sup>, QIU Yan<sup>1</sup>, LI Keran<sup>2</sup>, ZHU Wenjun<sup>1</sup>, DONG Yafen<sup>1</sup>, LIU Helong<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, People's Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201200, China; 2. Nanjing No.3 High school, Nanjing 210001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the anti-inflammatory effect and mechanism of total sesquiterpene lactone from *Achillea sibirica* on rheumatoid arthritis rats. **Methods** An animal model of rheumatoid arthritis was established by the intradermal injection of 0.1 ml Freund's complete adjuvant into the rat right hind limb. Different doses of *Achillea sibirica* sesquiterpene lactone and tripterygium glycosides were administered for 21 days. The degree of toe swelling, arthritis index and the serum levels of interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in all groups were determined. **Results** Compared with model group, the toe swelling degree in middle and high dose *Achillea sibirica* sesquiterpene lactone group was significantly inhibited ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) at day 14, 21 and 28. The arthritis index in the same groups was decreased at day 14, 21 and 28 with statistically significant difference ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The total *Achillea sibirica* sesquiterpene lactone also reduced the serum levels of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The low, middle and high dose group effectively reduced joint inflammation in a dose-dependent manner. **Conclusion** Total sesquiterpene lactone from *Achillea sibirica* exhibited good therapeutic effect on rheumatoid arthritis rats and its mechanism may relate to the down-regulation of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

**[Key words]** *Achillea sibirica*; sesquiterpene lactone; rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因尚未明了的以关节滑膜炎为特征的自身免疫性疾病,以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变为主要临床表现,慢性多发性关节炎、关节软骨和骨质受损滑膜炎持久反复发作,可导致关节内软骨和骨的破坏,关节功能障碍,甚至残废,预后往往

较差,严重危害人类的健康。因此,寻求研发高效低毒的抗RA新药物和新技术是极为重要且紧迫的任务。近年来,中草药以其低毒性、多靶点治疗及廉价的特点越来越受到重视,成为研发治疗RA药物的新热点。

蓍草(*Achillea sibirica*)为菊科(Compositae)植物蓍的全草,其性味苦、辛,性温,效锐,用于治疗风湿疼痛、牙痛、胃痛、健胃、强壮、通经、治痔,外用治毒蛇咬伤、痈疽肿毒、外伤止血等;在临床上主要用于乳蛾咽痛,泄泻痢疾,肠痈腹痛,热淋涩痛,湿热带

**[作者简介]** 王 建,本科,主管药师,Email:11514780@qq.com

**[通讯作者]** 邱 彦,副教授,硕士生导师,研究方向:医院药学、临床药学, Tel: (021)20509290, Email: qiuyan2189@163

下,蛇虫咬伤等<sup>[1]</sup>。近年来的国内外研究表明,薯草在抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗病毒、保肝护肝<sup>[3,4]</sup>及预防糖尿病等方面都具有很好的生物活性,对其抗 RA 方面的研究报道甚少。课题组采用现代化学、药理学、分析化学及生物学等方法对菊科植物薯草进行了系列研究,基本阐明了薯草抗 RA 的药效物质基础,本实验着重对薯草主要活性成分进行作用机制研究,为薯草进一步的新药开发提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SD 雄性大鼠,SPF 级,体重 200~220 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(沪)2013-0016。饲养于室温(23±2)℃,相对湿度 40%~60%,光照时间随自然变化,普通颗粒饲料喂养,自由饮水。

### 1.2 药品与试剂

薯草总倍半萜内酯(总倍半萜内酯原料由第二军医大学药学院药剂学教研室制备);雷公藤多苷片(批号:20140604,湖南千金协力药业有限公司);弗氏完全佐剂(批号:SLBH7316V,美国 Sigma 公司);白介素 6(IL-6)Elisa 试剂盒(批号:20151102,美国 R&D 公司);白介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )Elisa 试剂盒(批号:20151113,美国 R&D 公司);肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )Elisa 试剂盒(批号:20151021,美国 R&D 公司)。

### 1.3 仪器

离心机(型号:L-420,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);酶标仪(Multiskan Mk3 型,赛默飞世尔仪器有限公司);光学显微镜(型号:DM750,日本 Olympus 公司);切片机(型号:RM2135,德国 LEICA 公司);足趾容积测量仪(型号:YLS-7B,济南益延科技发展有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 薯草总倍半萜内酯的制备

薯草经第二军医大学药学院生药学教研室张汉明教授鉴定为菊科薯属植物薯草(*Achillea sibirica*),原药材 10 kg,粉碎成 20 目粗粉,水蒸气蒸馏,得到挥发油,备用;水蒸气蒸馏残渣以 10 倍去离子水回流提取 2 次,每次 2 h;合并提取液,过滤,上清液浓缩,过滤,通过大孔吸附树脂柱(日本三菱 HP-20 苯乙烯型大孔吸附树脂)( $\Phi$ :h=1:10);先后以 10 倍柱体积量去离子水洗脱,除去水溶性杂质;用 10 倍柱体积量的 20% 乙醇水溶液洗脱、10 倍柱体积量的 50% 乙醇洗脱,收集 50% 乙醇洗脱液,树脂

柱继续以 95% 乙醇洗脱干净;取 50% 乙醇洗脱液,低温浓缩至干,与挥发油部分合并,得到薯草总倍半萜内酯原料。

### 2.2 动物分组

健康成年 SD 大鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只,分别为正常对照组、模型组、阳性对照组(雷公藤多苷 20 mg/kg)以及薯草总倍半萜内酯低、中、高剂量组(125、250、500 mg/kg)。

### 2.3 模型的建立及给药

除正常对照组外,其余各组每只受试大鼠右后足跖皮下注射弗氏完全佐剂 0.1 ml,制备 RA 模型<sup>[5]</sup>大鼠。建模当天为 0 d,建模后 7 d 开始灌胃给药,每天给药 1 次,连续给药 21 d,正常对照组和模型组给予等量的生理盐水。

### 2.4 观察检测指标

#### 2.4.1 足跖肿胀度测量<sup>[6]</sup>

于致炎前(0 d)及致炎后 7、14、21、28 d(即每周)测定大鼠原发侧足趾容积 1 次。计算其足跖肿胀度,肿胀度=致炎后足趾容积-致炎前足趾容积。

#### 2.4.2 大鼠多发性关节炎指数<sup>[7]</sup>

分别于致炎后 7、14、21、28 d 观察记录大鼠关节病变程度,全身关节病变按 5 级评分法评价,计算多发性关节炎指数。评分标准:0 分,无红肿;1 分,1 个或 1 个以上趾关节红肿;2 分,整个足爪红肿;3 分,踝关节以下红肿;4 分,包括踝关节在内的全部足爪红肿。各个关节的累积计分即为每只大鼠的关节炎指数,最高为 12 分。

#### 2.4.3 血清 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量测定<sup>[8]</sup>

末次给药后 1 h,用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉采血,分离血清,按照 Elisa 试剂盒操作说明检测血清中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平。

### 2.5 统计学处理

实验数据使用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量资料,实验数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,符合正态分布采用 One-way ANOVA 比较组间差异显著性;非正态分布资料采用 Mann-Whitney U 秩和检验进行比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 对 RA 大鼠足跖肿胀度的影响

造模后,模型组大鼠右后踝关节肿胀明显,随实验时间延长逐渐减轻。给予不同剂量薯草总倍半萜内酯和雷公藤多苷治疗后,大鼠右后踝关节原发性病变都有不同程度好转。与模型组比较,薯草总倍半萜内酯低剂量组大鼠足跖肿胀度在 21、28 d 显著

减轻( $P<0.05, P<0.01$ ); 薏苡总倍半萜内酯中、高剂量组在14、21、28 d大鼠足跖肿胀度显著低于模型组( $P<0.05, P<0.01$ )。实验结果说明薏苡总倍

半萜内酯对 RA 大鼠原发性足肿胀有较好的治疗作用。结果见表1。

表1 薏苡总倍半萜内酯对 RA 大鼠足跖肿胀度的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	不同时间足跖肿胀度(V/ml)			
		7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	—	0.02±0.01	0.03±0.01	0.05±0.02	0.04±0.01
模型组	—	1.14±0.19**	0.97±0.17**	0.69±0.13**	0.46±0.15**
雷公藤多苷组	20	1.15±0.20	0.66±0.14 <sup>#</sup>	0.49±0.11 <sup>#</sup>	0.18±0.07 <sup>#</sup>
低剂量组	125	1.14±0.17	0.92±0.16	0.56±0.10 <sup>#</sup>	0.31±0.07 <sup>#</sup>
中剂量组	250	1.16±0.14	0.81±0.12 <sup>#</sup>	0.53±0.10 <sup>#</sup>	0.28±0.10 <sup>#</sup>
高剂量组	500	1.15±0.19	0.72±0.13 <sup>#</sup>	0.51±0.08 <sup>#</sup>	0.24±0.09 <sup>#</sup>

\*\*  $P<0.01$ ,与正常对照组比较; <sup>#</sup>  $P<0.05$ , <sup>#</sup>  $P<0.01$ ,与模型组比较

### 3.2 对大鼠关节指数的影响

致炎后,与正常对照组比较,模型组、薏苡总倍半萜内酯和雷公藤多苷各药物组大鼠关节指数明显升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,薏苡总倍半萜内酯低剂量组大鼠关节指数在21、28 d明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ); 薏苡总倍半萜内酯中、高剂量组在14、21、28 d大鼠关节指数明显低于模型组( $P<0.05, P<0.01$ ),其中以高剂量效果更为显著。说明薏苡总倍半萜内酯能够减轻大鼠关节炎症状。结果见表2。

### 3.3 对大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的

### 影响

与正常对照组比较,模型大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平显著升高,有显著性差异( $P<0.01$ ),说明造模后大鼠炎症反应明显。与模型组比较,薏苡总倍半萜内酯低剂量组 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平显著降低( $P<0.05, P<0.01$ ); 薏苡总倍半萜内酯中、高剂量组 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平显著低于模型组( $P<0.01$ ),降低程度呈剂量依赖性。提示薏苡总倍半萜内酯对 RA 模型大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的升高有抑制作用。结果见表3。

表2 薏苡总倍半萜内酯对大鼠关节指数的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	不同时间关节炎指数			
		7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	—	4.10±1.20**	6.50±1.18**	8.90±1.10**	6.80±1.14**
雷公藤多苷组	20	4.00±0.82	5.10±0.99 <sup>#</sup>	5.90±1.20 <sup>#</sup>	4.70±1.06 <sup>#</sup>
低剂量组	125	4.10±0.74	6.10±0.74	7.10±1.45 <sup>#</sup>	5.60±0.97 <sup>#</sup>
中剂量组	250	4.20±1.03	5.30±0.95 <sup>#</sup>	6.70±0.95 <sup>#</sup>	5.10±0.99 <sup>#</sup>
高剂量组	500	4.10±0.88	5.20±0.79 <sup>#</sup>	6.10±0.99 <sup>#</sup>	4.80±0.79 <sup>#</sup>

\*\*  $P<0.01$ ,与正常对照组比较; <sup>#</sup>  $P<0.05$ , <sup>#</sup>  $P<0.01$ ,与模型组比较

表3 薏苡总倍半萜内酯对大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	IL-6 (pg/ml)	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
正常对照组	-	50.28±7.81	36.33±7.21	111.20±12.17
模型组	-	93.17±10.54**	71.19±9.15**	214.20±28.50**
雷公藤多苷组	20	60.63±6.75 <sup>#</sup>	48.22±8.06 <sup>#</sup>	130.64±11.80 <sup>#</sup>
低剂量组	125	80.52±7.81 <sup>#</sup>	60.97±5.16 <sup>#</sup>	178.33±12.34 <sup>#</sup>
中剂量组	250	72.89±7.32 <sup>#</sup>	53.66±5.81 <sup>#</sup>	164.98±12.69 <sup>#</sup>
高剂量组	500	68.99±10.67 <sup>#</sup>	50.68±5.53 <sup>#</sup>	152.80±11.34 <sup>#</sup>

\*\*  $P<0.01$ ,与正常对照组比较; <sup>#</sup>  $P<0.05$ , <sup>#</sup>  $P<0.01$ ,与模型组比较

#### 4 讨论

目前对 RA 致病原因尚未完全明确,但 RA 症状、关节损伤程度和病理过程与炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的水平密切相关已被公认。促炎症细胞因子主要由内源性免疫细胞和 Th1 细胞分泌, TNF- $\alpha$  属于 TNF 超家族,是 RA 的重要促炎症细胞因子,主要来自于单核巨噬细胞、NK 细胞以及激活的 T 淋巴细胞, TNF- $\alpha$  在细胞因子相互作用网络中居于中心地位,是 RA 发生和持续的一个关键性因子<sup>[9]</sup>。

IL-1 $\beta$  主要由单核/巨噬细胞分泌产生,它通过调节多种细胞因子、细胞黏附分子、免疫调节分子及前炎症介质的表达,在 RA 滑膜肥大、白细胞浸润、骨侵蚀和软骨破坏中发挥重要作用。IL-6 由体内巨噬细胞、B 细胞、T 细胞等多种细胞分泌,可通过巨噬细胞间接激活成纤维细胞,成纤维细胞释放的血管内皮生长因子促进血管翳的形成,诱导肝脏合成急性期蛋白,活化破骨细胞导致骨吸收增加,最终导致骨质侵蚀及关节间隙狭窄。IL-6 是 RA 病程进展的一个重要介质,在炎症反应过程中发挥重要作用,随着疾病活动度的增强,IL-6 的水平也逐渐升高<sup>[10]</sup>。

本研究采用大鼠佐剂性关节炎模型考察薏苡总倍半萜内酯片治疗 RA 的药效学作用,佐剂性关节炎是研究 RA 的常用动物模型,是由一种免疫制剂刺激形成的免疫亢进性关节炎,其病理学改变与临床上人的 RA 极其相似。

本实验通过佐剂诱导 RA 大鼠模型,与正常对照组比较,模型大鼠足跖肿胀度、关节指数以及血清炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平均显著升高,说明 RA 模型建立成功。给予薏苡总倍半萜内酯治疗

后,薏苡总倍半萜内酯中、高剂量组显著降低大鼠关节指数,明显抑制大鼠足跖肿胀度;且显著降低大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平。实验结果显示,薏苡总倍半萜内酯对佐剂性 RA 大鼠有较好的治疗作用。薏苡总倍半萜内酯治疗 RA 的机制可能与抑制炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的分泌有关。本研究将为薏苡总倍半萜内酯治疗 RA 的临床应用奠定实验基础。

#### 【参考文献】

- [1] 梁睿姝,熊礼燕,李玲,等.气相色谱-质谱联用法测定薏苡中的脂溶性成分[J].药学实践杂志,2016,34(6):526-529.
- [2] 于盼盼.欧薏苡中倍半萜内酯化合物抑制人肺肿瘤细胞增殖活性及作用机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2014.
- [3] 洪振丰,陈艳华,李天骄.薏苡提取物防治肝纤维化大鼠脂质过氧化作用的实验研究[J].福建中医学院学报,2005,15(6):23-25.
- [4] 洪振丰,陈艳华,周建衡,等.薏苡提取物预防慢性肝损伤、肝纤维化的实验研究[J].癌变·畸变·突变,2007,19(1):16-18.
- [5] 宋珊珊,张玲玲,魏伟.实验性关节炎动物模型建立及病理机制研究进展[J].中国药理学通报,2011,27(12):1648-1653.
- [6] 赵勤,王乐乐,魏立鹏,等.麻花秦苕醇提取物对佐剂性关节炎大鼠的影响[J].中药药理与临床,2015,31(1):145-147.
- [7] 杨晓军,苗文丽,裴林,等.天星健骨方对佐剂性关节炎大鼠关节指数的影响[J].中医临床研究,2012,4(2):5-6.
- [8] 王霆钧,邱扬凌,蔡嘉莉,等.姜黄素衍生物 FM0807 对佐剂性类风湿性关节炎模型大鼠疗效观察[J].中国现代医生,2016,54(11):20-22.
- [9] 魏志萍,洪芬芳,杨树龙.中药治疗类风湿性关节炎的机制研究进展[J].中国老年学杂志,2017,37(7):1808-1812.
- [10] 谢则金,王厚照,林一.CD62p、IL-6 和 hs-CRP 检测在类风湿性关节炎中的临床价值[J].检验医学,2017,32(11):966-969.

〔收稿日期〕 2018-03-30 〔修回日期〕 2018-05-11

〔本文编辑〕 李睿旻