

秦艽不同配伍对风湿痹证模型大鼠血清炎症因子水平的影响

高慧琴^{1*} 吴国泰^{1,2} 孙少伯¹ 张志红¹

(1. 甘肃中医学院药理学系, 甘肃省兰州市城关区定西东路 35 号, 730000;

2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室)

* 通讯作者: gaohuiqin6208@yahoo.com.cn, (0931)8765520

[摘要] 目的 观察秦艽不同配伍药对风寒湿痹和风湿热痹模型大鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 1(IL-1 β)水平的影响,并探讨其治疗痹证的作用机制。方法 将 128 只 Wistar 大鼠随机分为风寒湿痹和风湿热痹两大组,每组再分为空白组、模型组、雷公藤组、单味秦艽组、秦艽桑寄生组、秦艽防己组、秦艽威灵仙组、秦艽羌活组,每组 8 只。采用佐剂诱导加外界施以“风寒湿”和“风湿热”致病因素制备风寒湿痹与风湿热痹大鼠模型,并自造模第 1 天起各给药组给予制备的相应药液 10 ml/kg 灌胃,空白组和模型组给予等量生理盐水,每日 1 次,连续 25 天。测定各组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平。结果 风寒湿痹和风湿热痹模型组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平均高于空白组($P < 0.01$)。风寒湿痹和风湿热痹中各给药组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 较模型组均有不同程度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。风寒湿痹模型中,秦艽羌活组、秦艽威灵仙组、秦艽桑寄生组大鼠的 TNF- α 、IL-1 β 水平下降更明显($P < 0.01$);秦艽羌活组、秦艽威灵仙组、秦艽桑寄生组大鼠的 TNF- α 水平低于秦艽防己组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。风湿热痹模型中,秦艽防己组、秦艽桑寄生组、秦艽羌活组大鼠的 TNF- α 、IL-1 β 水平下降更明显($P < 0.01$);秦艽防己组大鼠的 IL-1 β 水平低于秦艽威灵仙组($P < 0.05$)。结论 秦艽配伍羌活、威灵仙、桑寄生降低风寒湿痹模型大鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平效果明显,秦艽配伍防己降低风湿热痹模型大鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平效果明显。

[关键词] 秦艽;药对;风寒湿痹;风湿热痹;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素-1 β

Effects of Qinjiao in Different Combinations on the Content of Serum Inflammatory Cytokines in Wind-Damp Arthralgia Model Rats

GAO Huiqin¹, WU Guotai^{1,2}, SUN Shaobo¹, ZHANG Zhihong¹

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Gansu Province 730000; 2. Gansu Provincial Key Laboratory of TCM Pharmacology and Toxicology)

ABSTRACT Objective To observe the effects and mechanism of Qinjiao (*Radix Gentianae macrophyllae*) in different combinations on the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in wind-cold-damp or wind-damp-heat arthralgia model rats. **Methods** Totally 128 Wistar rats were randomized into two major groups, i. e. the wind-cold-damp arthralgia group and wind-damp-heat arthralgia group, and then each group was further divided into the blank group, model group, Tripterygium group, single Qinjiao group, Qinjiao-Sangjisheng (*Herba Taxilli*) group, Qinjiao-Fangji (*Radix Stephaniae Tetrandrae*) group, Qinjiao-Weilingxian (*Radix et Rhizoma Clematidis*) group and Qinjiao-Qianghuo (*Rhizoma et Radix Notopterygii*) group, with 8 in each. Wind-cold-damp arthralgia or wind-damp-heat arthralgia models were induced in all groups except for the blank groups by adjuvant and being exposed in wind-cold-heat or wind-damp-heat environment, respectively. From the 1st day of modeling, each administration group was gavaged with 10 ml/kg corresponding drug solution and the blank and model groups were given equivalent normal saline once daily for 25 consecutive days. The serum levels of TNF- α and IL-1 β were detected. **Results** The serum levels of TNF- α and IL-1 β in the wind-cold-damp arthralgia group and wind-damp-heat arthralgia group were significantly higher than those in the blank group ($P < 0.01$). The serum levels of TNF- α and IL-1 β in all administration groups were significantly decreased in varying degrees ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially in the Qinjiao-Qianghuo group, Qinjiao-Weilingxian group and Qinjiao-Sangjisheng group of the wind-cold-damp arthralgia models ($P < 0.01$). The TNF- α levels in the Qinjiao-Qianghuo group, Qinjiao-Weilingxian group and Qinjiao-Sangjisheng group were significantly lower than that in the Qinjiao-Fangji group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The serum levels of TNF- α and IL-1 β were significantly decreased in the Qinjiao-Fangji group, Qinjiao-Sangjisheng group and Qinjiao-Qianghuo group of wind-damp-heat arthralgia models ($P < 0.01$). The IL-1 β level in the Qinjiao-Fangji group was significantly lower than that in the Qinjiao-Weilingxian group ($P < 0.05$). **Conclusion** The combinations of Qinjiao-Qianghuo, Qinjiao-Weilingxian and Qinjiao-Sangjisheng can obviously decrease the serum levels of TNF- α and IL-1 β in the wind-cold-damp arthralgia model rats and the combination of Qinjiao-Fangji can obviously decrease the serum levels of TNF- α and IL-1 β in the wind-damp-heat arthralgia model rats.

Keywords Qinjiao; drug pairs; wind-cold-damp arthralgia; wind-damp-heat arthralgia; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β

秦艽(*Radix Gentianae macrophyllae*)为龙胆科植物秦艽、麻花秦艽、粗茎秦艽或小秦艽的干燥根。主产于甘肃、陕西等地,春、秋二季采挖。秦艽味辛、苦,性平。归胃、肝、胆经。由于秦艽质润不燥,能祛风湿而不伤阴液,古人称之为“风药中之润剂,散药中之补剂”,治疗风湿痹证,无论偏寒偏热、新病久病均可使用,故有风寒湿痹要药之称。本实验以秦艽为基本药,分别与具有祛风湿功效但药性不同的中药进行配伍,组成平—平相配(秦艽+桑寄生),平—寒相配(秦艽+防己),平—温相配(秦艽+威灵仙、秦艽+羌活)的配伍关系,通过秦艽不同配伍药对对风寒湿痹与风湿热痹模型大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平的影响,探讨药性与功效、药性与疗效之间的关系。

1 材料

1.1 实验药物

秦艽、桑寄生、防己、威灵仙、羌活 5 种中药饮片均购自兰州市万民大药房。各组水煎液由甘肃中医学院中药药剂实验室协助提取制备。单味秦艽组:秦艽 300 g,第 1 次加 10 倍量水煎煮 1 h,第 2 次加 8 倍量水煎煮 30 min,药液过滤,合并两次水煎液,浓缩至每毫升药液含生药 1.5 g 的水煎液。其余各实验组按 1:1 的比例分别称取秦艽与桑寄生、秦艽与防己、秦艽与威灵仙、秦艽与羌活各 150 g,按上述操作进行煎煮,作为秦艽桑寄生组、秦艽防己组、秦艽威灵仙组、秦艽羌活组的药液放入冰箱内储存备用。雷公藤多苷片,由黄石飞云制药有限公司生产,国药准字 Z42021212,批号:20100701,规格:10 mg/片。实验时用蒸馏水配制成 0.065% 的药液备用。

1.2 试剂

弗氏完全佐剂,美国 Sigma 公司,批号:20100312,规格:10 ml/瓶;IL-1 β 试剂盒,上海卓康生物科技有限公司,批号:20110418;TNF- α 试剂盒,上海卓康生物科技有限公司,批号:20110427。

1.3 实验动物

健康 Wistar 大鼠 128 只,体重(160 $\pm$ 20)g,清洁级,雄性。由甘肃中医学院实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(甘)2011-0001。

1.4 主要仪器与设备

酶标仪,美国 BIO-BAD 公司生产,型号:伯勒 S680 型;电子天平, Sartorius 公司生产,型号:BP211;离心机,国华电器有限公司生产,型号:HH-6。

2 方法

2.1 动物分组

将 128 只大鼠适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法分为风寒湿痹和风湿热痹两大组,每组再分为空白组、模型组、雷公藤组、单味秦艽组、秦艽桑寄生组、秦艽防己组、秦艽威灵仙组、秦艽羌活组共 8 小组,每小组 8 只。

2.2 造模与给药

风寒湿痹造模方法参照文献[1]并改进,除空白组外,其余各组大鼠在造模的第 1 天,每只大鼠注射弗氏完全佐剂 0.1 ml 于左后足跖皮内 1 次,建立佐剂性关节炎大鼠模型,并将大鼠置于 5~7℃ 冷水中,水深 2 cm,伴以 3 档风力,每日 1 次,每次 20 min,连续 14 天。自造模第 1 天起,各给药组大鼠按 10 ml/kg 灌胃,空白组和模型组给予等量生理盐水灌胃,每日 1 次,连续 25 天。

风湿热痹造模方法参照文献[1]并改进,除空白组外,其余各组大鼠在造模的第 1 天,每只大鼠注射弗氏完全佐剂 0.1 ml 于左后足跖皮内 1 次,建立佐剂性关节炎大鼠模型,并将大鼠置于 36~38℃ 热水中,水深 2 cm,伴以 3 档风力,同时给予 37℃ 水浴恒温热蒸汽熏蒸,每日 1 次,每次 20 min,连续 14 天。自造模第 1 天起,各给药组大鼠按 10 ml/kg 灌胃,空白组和模型组给予等量生理盐水灌胃,每日 1 次,连续 25 天。

2.3 观察指标及方法

①大鼠一般状况观察;②大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平测定:第 25 天末次给药后 1 h,股动脉取血 5 ml,静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 20 min,分离血清,-80℃ 保存备用。用 ELISA 试剂盒测定大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 的水平,具体操作按说明书步骤进行。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况比较

在整个实验中,风寒湿痹和风湿热痹中空白组大鼠精神状态良好、毛发光滑有光泽、活动自如、体重增加快;各模型组大鼠左后足跖致炎后肿胀明显,活动减少,毛色泛黄而无光泽、精神不振、体重增长缓慢,个别大鼠左后肢足跖及踝关节出现溃烂、脱毛

现象。治疗 25 天后雷公藤组及各中药组上述症状均明显缓解,但模型组基本无变化。

3.2 秦艽不同配伍对风寒湿痹模型大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响

表 1 示,与空白组比较,模型组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,除单味秦艽组 IL-1 β 变化不明显外,其余各给药组 TNF- α 、IL-1 β 水平均有不同程度的降低,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与单味秦艽组比较,秦艽羌活组、秦艽威灵仙组、秦艽桑寄生组 TNF- α 、IL-1 β 水平下降更明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与雷公藤组比较,秦艽羌活组、秦艽威灵仙组、秦艽桑寄生组 TNF- α 、IL-1 β 水平差异无统计学意义($P>0.05$),单味秦艽组和秦艽防己组 TNF- α 、IL-1 β 水平高于雷公藤组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与秦艽防己组比较,秦艽羌活组、秦艽威灵仙组、秦艽桑寄生组 TNF- α 水平差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 风寒湿痹模型中各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平比较(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-1 β
空白组	8	29.86 $\pm$ 8.97	131.17 $\pm$ 23.45
模型组	8	90.25 $\pm$ 21.38*	366.73 $\pm$ 113.27*
雷公藤组	8	36.87 $\pm$ 11.34 $\Delta\Delta$	179.36 $\pm$ 57.44 $\Delta\Delta$
单味秦艽组	8	66.83 $\pm$ 17.73 $\Delta\Delta\Delta$	313.92 $\pm$ 102.00 $\Delta\Delta$
秦艽桑寄生组	8	48.05 $\pm$ 14.28 $\Delta\Delta\Delta\bullet$	211.39 $\pm$ 52.44 $\Delta\Delta\Delta$
秦艽防己组	8	69.68 $\pm$ 22.08 $\Delta\Delta\Delta$	273.62 $\pm$ 184.32 Δ
秦艽威灵仙组	8	47.54 $\pm$ 18.49 $\Delta\Delta\Delta\bullet$	204.80 $\pm$ 49.99 $\Delta\Delta\Delta$
秦艽羌活组	8	41.94 $\pm$ 13.34 $\Delta\Delta\Delta\#\bullet\bullet$	182.81 $\pm$ 38.38 $\Delta\Delta\Delta\#\bullet$

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与单味秦艽组比较, $\#$ $P<0.05$, $\#\#$ $P<0.01$;与雷公藤组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与秦艽防己组比较, $\bullet$ $P<0.05$, $\bullet\bullet$ $P<0.01$

3.3 秦艽不同配伍对风湿热痹模型大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响

表 2 示,与空白组比较,模型组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,除单味秦艽组外其余各给药组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平均有不同程度的降低,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与单味秦艽组比较,秦艽防己组、秦艽桑寄生组、秦艽羌活组 TNF- α 、IL-1 β 水平下降更加明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与雷公藤组比较,秦艽防己组、秦艽威灵仙组、秦艽桑寄生组、秦艽羌活组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平差异无统计学意义($P>0.05$),单味秦艽组大鼠 TNF- α 、

IL-1 β 水平高于雷公藤组($P<0.01$);秦艽防己组与秦艽威灵仙组比较,IL-1 β 水平差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 风湿热痹模型中各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平比较(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-1 β
空白组	8	17.87 $\pm$ 3.00	117.73 $\pm$ 21.48
模型组	8	53.82 $\pm$ 18.80*	268.64 $\pm$ 90.58*
雷公藤组	8	22.94 $\pm$ 7.26 $\Delta\Delta$	148.07 $\pm$ 40.18 $\Delta\Delta$
单味秦艽组	8	47.08 $\pm$ 13.47 Δ	229.90 $\pm$ 52.37 Δ
秦艽桑寄生组	8	29.28 $\pm$ 11.38 $\Delta\Delta\Delta\#\bullet$	155.97 $\pm$ 46.16 $\Delta\Delta\Delta\#$
秦艽防己组	8	23.82 $\pm$ 9.31 $\Delta\Delta\Delta\#\bullet$	144.27 $\pm$ 32.66 $\Delta\Delta\Delta\#\bullet$
秦艽威灵仙组	8	36.05 $\pm$ 13.84 Δ	200.35 $\pm$ 64.08 Δ
秦艽羌活组	8	30.42 $\pm$ 15.60 $\Delta\Delta\Delta\#\bullet$	172.74 $\pm$ 40.27 $\Delta\Delta\Delta\#$

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与单味秦艽组比较, $\#$ $P<0.05$, $\#\#$ $P<0.01$;与雷公藤组比较, Δ $P<0.01$;与秦艽威灵仙组比较, $\bullet$ $P<0.05$

4 讨论

中医认为“风寒湿三气杂至,合而为痹也”。痹证是由于风寒湿等外邪侵袭人体,闭阻经络,气血运行不畅所致的以关节、肌肉、筋骨疼痛、酸楚、肿胀、麻木、关节屈伸不利,甚至僵硬、畸形,或累及脏腑等为主要表现的一类病证的总称^[2]。痹者,阻塞不通之意,其病以反复发作和渐进性为特点,临床表现为病情重、病程长、缠绵难愈三大特点^[3]。目前类风湿关节炎(RA)动物模型有很多,如佐剂诱导的关节炎、卵蛋白诱导的关节炎、Ⅱ型胶原诱导的关节炎、多聚糖蛋白诱导的关节炎模型等。其中佐剂性关节炎模型与人 RA 在发病机制、临床表现、病理、免疫等方面有着相似或相近的特点,且弗氏完全佐剂的操作简便易行、造模周期较短、重复性好、可同时获得大量模型动物,对 RA 的基础研究十分适宜^[4]。因此,本研究选用了佐剂性关节炎模型作为实验的动物模型,并参照文献^[1],通过外界施以“风寒湿”和“风湿热”的致病因素制作了风寒湿痹与风湿热痹两类病证结合动物模型。

细胞因子(CK)具有调节细胞的生长和分化,调节免疫,参与炎症的作用,现已公认是 RA 炎症和关节损伤的重要介质。其中 TNF- α 、IL-1 β 的异常表达和失调是 RA 的典型特征之一,是与 RA 发病直接相关的重要细胞因子^[5-6]。TNF- α 和 IL-1 β 作为炎症指标,在活动性 RA 中参与三种主要病理过程:一是刺激滑膜纤维母细胞产生前列腺素 E2 等小分子炎症介质;二是激活血管内皮细胞,促进内皮

黏附渗透导致局部炎症;三是抑制糖蛋白合成,增加糖蛋白降解,并产生中性蛋白酶,释放骨钙等,从而导致骨和软骨的破坏^[7]。因此,在 RA 的治疗中,有效降低 TNF- α 和 IL-1 β 的水平能对 RA 的疗效及预后起积极作用。

本研究在中医理论指导下,以秦艽为基本药,分别与具有祛风湿功效但寒热药性不同的中药进行配伍,通过前期大量秦艽药对抗炎镇痛作用的研究^[8-9],筛选出秦艽配伍桑寄生、防己、威灵仙、羌活四组作用明显、具有代表性的药对,组成平—平相配(秦艽+桑寄生),平—寒相配(秦艽+防己),平—温相配(秦艽+威灵仙、秦艽+羌活)的配伍关系进一步研究。本研究结果表明,在风寒湿痹和风湿热痹模型大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 均明显增加,各给药组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 有不同程度降低。其中,风寒湿痹模型中,秦艽羌活组、秦艽威灵仙组、秦艽桑寄生组大鼠的 TNF- α 、IL-1 β 水平下降更加明显($P<0.01$);秦艽羌活组、秦艽威灵仙组、秦艽桑寄生组大鼠的 TNF- α 水平低于秦艽防己组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明在风寒湿的环境下,平—温相配的作用优于平—寒相配。风湿热痹模型中,秦艽防己组、秦艽桑寄生组、秦艽羌活组大鼠的 TNF- α 、IL-1 β 水平下降更加明显($P<0.01$);秦艽防己组大鼠的 IL-1 β 水平低于秦艽威灵仙组($P<0.05$),说明在风湿热的环境下,平—寒相配的作用优于平—温相配。本实验结果与中医临床“疗寒以热药,疗热以寒药”的治疗原则是基本符合的。其次,本实验还

发现剂量相同情况下,配伍组的疗效优于单味药,各配伍组的疗效与药物本身作用强弱有一定关系。在风寒湿与风湿热二种不同环境中,秦艽配羌活组(平—温相配)均显现出较好的抗炎、调节免疫作用,其作用机制有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1]肖长虹,顾为望,李留洋,等.类风湿性关节炎风寒湿痹与风湿热痹动物模型的研究[J].中医杂志,1996,37(8):492-496.
- [2]冯兴华.痹证的概念与病机[J].首都医药,2001,8(9):52-53.
- [3]朱旭阳.浅谈痹证的发病机制与治则治法[J].黑龙江医学,2010,34(11):865-866.
- [4]冯芳,丁志建,刘俊.佐剂性关节炎大鼠模型的实验研究[J].天津药学,2004,16(2):1-4.
- [5]罗永忠,刘桂成.类风湿性关节炎患者云克治疗前后血清 IL-1B 和 TNF 水平的观察[J].放射免疫学杂志,2004,17(6):454-455.
- [6]扶琼,石咏中,罗卉,等.RA 患者 PBMC 内 MAPK 途径的活化及 99Tc-亚甲基二磷酸盐对其的影响[J].中华风湿病学杂志,2006,10(3):149-153.
- [7]姚茹冰,蔡辉.核因子-KB 与类风湿关节炎相关性的研究进展[J].医学研究生学报,2006,19(3):267-270.
- [8]高慧琴,吴国泰.秦艽不同配伍的抗炎镇痛作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):182-183.
- [9]张志红,高慧琴,吴国泰.秦艽不同配伍对小鼠耳肿胀及毛细血管通透性的影响[J].甘肃中医学院学报,2011,28(5):4-6.

(收稿日期:2012-10-23;修回日期:2013-02-25)

[编辑:邓媛]

第 21 次全国特色医疗名医学学术会暨海参崴考察的通知

本次会议交流的主题为中医、中西医结合特色疗法治疗各种皮肤病及疑难杂症。会议由北京聚医杰医药科学研究院会同有关学会联合主办,拟定于 7 月 9 日—12 日在黑龙江省哈尔滨市召开。欢迎各级中医皮肤病名医及疑难杂症名医、乡村医生、民间中医等报名参会。

1. 会议内容:(1)专家讲座:特邀中医皮肤病、疑难病专家作特色疗法的学术讲座;(2)学术交流:重点交流中医、中西医结合治疗各种皮肤病、疑难病及常见病的经验;(3)中医专利培训:特邀中医专利研究专家张来祥主任作中医知识产权保护及申请专利方法的培训;(4)评选表彰在中医皮肤病、疑难病等方面的特色医疗名医;(5)成立皮肤病研究专家委员会;(6)会后组织赴俄罗斯海参崴参观考察。2. 征文要求:运用中医药、中西医结合特色疗法治疗各种皮肤病、疑难杂症及常见病多发病的经验。稿件需打印,并附 200 字以内作者简介。3. 有关说明:(1)评选优秀论文;(2)颁发继续教育学分证书;(3)颁发会议纪念品及学术资料;(4)入选论文会后安排在相关杂志上发表;(5)赠送《实用中医验方 100 首》等资料;(6)参会费用:报名费 200 元,会务费 950 元,食宿及参观考察费用自理。4. 会议报名:参会报名注册费 200 元、交流论文(无论文者也可报名)、2 寸彩照 4 张、作者简介、表彰申请及赴海参崴报名资料(护照复印件、2 寸白底彩照 4 张)请于 6 月 25 日前用快递寄至北京 100036-98 信箱,哈尔滨会议会务组叶续宗收,邮编:100036,论文也可发 E-mail:13366005273@163.com,联系电话:010-63772051、13366005273、18600893817。

欢迎登录 www.zgtsyl.com、www.ylwsxx.com 查询。