

# 青风藤醇洗脱液与青藤碱治疗关节炎大鼠比较研究

徐佳<sup>1</sup>, 姚瑶<sup>2</sup>, 葛卫红<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>南京中医药大学中西医结合鼓楼临床医学院; <sup>2</sup>南京大学医学院附属鼓楼医院, 南京 210008

**摘要:** 观察青风藤大孔树脂 95% 乙醇洗脱物对大鼠胶原诱导性关节炎 (CIA) 体内相关炎症因子的表达, 比较青风藤醇洗脱物与青藤碱单体对类风湿性关节炎的疗效。建立大鼠 CIA 模型进行关节评分, 持续给药, 抽取各组大鼠血样样本, ELISA 法测定各组大鼠血清中 IL-17、RANKL、OPG 水平。青藤碱能够提高 OPG 水平, 而青风藤 95% 乙醇洗脱物对 RANKL、IL-17 分泌的抑制作用优于青藤碱, 提示青风藤 95% 乙醇洗脱物中可能存在其他青藤碱类似物, 亦能发挥抗炎抗骨破坏的作用, 青风藤 95% 乙醇洗脱物成分分析和具体机制仍有待进一步研究。

**关键词:** 青风藤醇洗脱物; 青藤碱; 核因子  $\kappa$ B 配位体受体活化剂; 可溶性蛋白骨保护素; 白细胞介素-17

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.027

## A Comparative Study of *Sinomenium acutum* Ethanol Eluent and Sinomenine Treat Arthritis in Rats

XU Jia<sup>1</sup>, YAO Yao<sup>2</sup>, GE Wei-hong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Drum Tower Medical College of Chinese and Western Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine; <sup>2</sup>Department of Pharmacy, the Affiliated Drum Tower Hospital to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effect of macroporous resin 95% ethanol eluent of *Sinomenium acutum* on the expression of inflammatory in collagen-induced arthritis (CIA) rat, and to compare the effect of *S. acutum* alcohol eluent and sinomenine on rheumatoid arthritis of rats. The CIA rat model was established. The joint score, continued administration, drawn blood samples of rats were estimated and then the IL-17, RANKL, OPG levels were measured in serum by ELISA. Sinomenine can increase OPG levels, but the inhibitory effect of macroporous resin 95% ethanol eluent of *S. acutum* on secretion of RANKL and IL-17 was better than sinomenine. It suggested that there might be some other sinomenine analogues in the 95% ethanol eluent of *S. acutum* which also played a role of anti-inflammatory and anti-bone destruction. The composition analysis of 95% ethanol eluent of *S. acutum* and specific mechanism need to be carried out in future.

**Key words:** *Sinomenium acutum* alcohol eluent; sinomenine; RANKL; OPG; IL-17

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种临床常见的以侵犯滑膜关节为主的炎性自身免疫疾病<sup>[1]</sup>, 其发病机制复杂, 可能与遗传、环境及感染等因素相关。现代免疫学认为, RA 属于炎症性自身免疫性疾病, 而以细胞因子为靶点的免疫治疗, 已成为 RA 疾病治疗切入点。青藤碱 (sinomenine, SIN) 是从中药青风藤中提取的单体生物碱, 具有抗炎、镇痛、免疫调节等作用, 临床治疗 RA 有效, 可以一定程度地缓解炎症和抑制骨破坏。近年来对青藤碱的

研究较多<sup>[2,3]</sup>, 而青风藤醇洗脱物与青藤碱单体对 RA 治疗作用的比较却鲜见报导。笔者在本实验考察青风藤 95% 醇洗脱物对 RA 大鼠体内核因子  $\kappa$ B (nuclear factor, NF- $\kappa$ B) 配位体受体活化剂 (receptor or activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL) 和可溶性蛋白骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 及白细胞介素 17 (interleukin-17, IL-17) 的影响, 以及与青藤碱单体对胶原诱导关节炎大鼠治疗作用的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级健康 Sprague-Dawley (SD) 大

鼠 40 只,雌性,体重 150 ~ 170 g,由南京鼓楼医院动物研究所提供,合格证号:SCFK(沪 2012-0006)。动物饲养在 SPF 级动物房,所有实验均严格按照实验动物有关条例进行。适应性喂养 3 d 后开始实验。

## 1.2 试药

青风藤干燥藤茎(产于浙江,购于南京药业股份有限公司,批号:101028,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为防己科植物青风藤),正清风痛宁缓释片(主要成分:盐酸青藤碱。购于湖南正清制药有限公司,批号:1107101),天然牛 II 型胶原蛋白(购自美国 Sigma 公司,批号:C-7806),完全弗氏佐剂(购自美国 Sigma 公司,批号:F-5881),不完全弗氏佐剂(购自美国 Sigma 公司,批号:F-5506),IL-17 酶联免疫吸附测定试剂盒(批号:10090913)、RANKL 酶联免疫吸附测定试剂盒(批号:10090909)、OPG 酶联免疫吸附测定试剂盒(批号:10090913),均购于美国 Sigma 公司。所有化学试剂均为色谱纯,实验用水为超纯水。

## 1.3 仪器

ELx800 吸收光酶标仪,美国 BioTek 公司产品;AXIOVERT 40CFL 荧光显微镜,德国 Carl Zeiss 公司产品;-20 °C 低温冰箱(海尔);高速离心机(TG16A-WS)。

## 1.4 动物分组

大鼠适应性喂养 3 d,随机分组,将大鼠分为 4 组,每组 10 只。

## 1.5 试药的制备

青风藤粉碎,12 倍药量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并浓缩液,旋转蒸发至稠浸膏状,每毫升相当于生药 50 g,加入纯化水稀释,制成 2 g/mL 青风藤混悬液。正清风痛宁片研磨,加入适量乙醇,溶解,再加入大量蒸馏水,制成 2 g/mL 青藤碱混悬液。

## 1.6 造模

从 4 组大鼠中任意选 3 组大鼠进行测体重后开始造模,剩余的 1 组作为空白对照组。造模前一天,将溶于醋酸的 II 型胶原蛋白先于 4 °C 低温保存过夜,第二天与弗氏完全佐剂低温条件下等体积乳化。乳化成功后,对模型组大鼠背部及尾部多点行皮下注射,每只大鼠 0.15 mL,进行初次免疫,造模当天记为实验第 1 d。第 14 d 将 II 型胶原蛋白与不完全弗氏佐剂等体积混合,用同样的方法进行第二次免疫<sup>[4]</sup>。对照组大鼠注射等量 0.9% 氯化钠溶液。

## 1.7 关节评分

关节肿胀评分标准:关节处无肿胀,0 分;趾关节微肿,1 分;趾关节及足趾处发生肿胀现象,2 分;踝关节以下的足爪发生肿胀现象,3 分;全部足爪肿胀(包括踝关节),4 分。大鼠最终分数为四肢关节肿胀分数总和,最高分为 16 分。首次免疫注射后每 3 d 称重 1 次,每次固定两名实验员记录关节肿胀评分。

## 1.8 分组与给药

造模第 14d 关节评分,AI > 4 的认定为造模成功。30 只成模大鼠又随机分为胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)模型对照组( $n = 10$ )和青风藤 95% 醇洗脱物组、青藤碱组( $n = 10$ )。开始给药,青风藤组灌胃给予青风藤 95% 乙醇洗脱物 10 mg/kg · d;青藤碱组灌胃给予等当量的青藤碱混悬液;模型组与对照组灌胃等量 0.9% 氯化钠溶液,持续 36 d。

## 1.9 指标检测

最后一次给药结束后,禁食一夜,次日大鼠摘眼球取血,取血量约为 5 mL。血液室温静置 1 h,3000 rpm 离心 10 min。取上层血清,分装于 EP 管中,置-20 °C 冰箱中备用。ELISA 法测定血清中 IL-17、RANKL 以及 OPG 水平,严格按说明操作。

## 1.10 统计学方法

实验结果均以 Mean ± SD 表示。用 SPSS18.0 统计软件分别对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

# 2 实验结果

## 2.1 大鼠关节评分

青风藤醇洗脱物组、青藤碱组与模型组大鼠关节评分均值差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),造模第 21 d 大鼠足肿胀达第一次高峰。模型组大鼠约在第 35 d 足肿胀程度达最高峰,之后肿胀程度居高不下,见图 1。青风藤醇洗脱物治疗组大鼠肿胀程度呈下降趋势。对照组未见发病,见图 2A;第 58 d 模型组大鼠关节评分 10 分,大鼠消瘦且皆蜷缩于角落,畏寒、足肿胀严重,见图 2B;青藤碱组关节评分 7 分,大鼠状态较模型组好,见图 2C;而青风藤醇洗脱物治疗组评分 5 分,大鼠状态较模型组及青藤碱组好,肉眼可见轻度足肿胀,见图 2D;三组大鼠肿胀评分差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

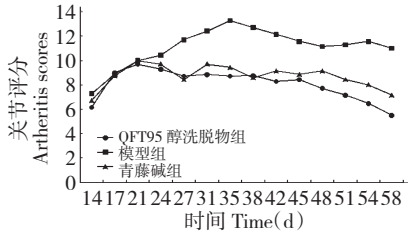


图 1 3 组大鼠不同时间足肿胀评分

Fig. 1 The articular swelling scores of 3 groups of rats at different time points

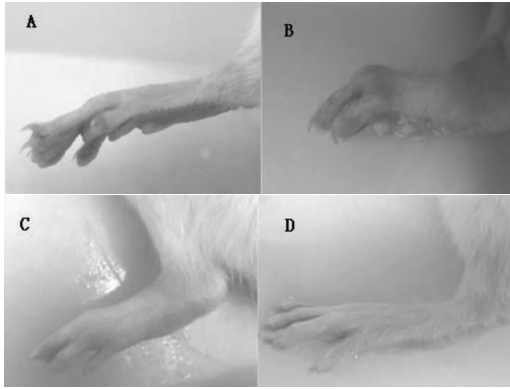


图 2 第 58 d 对照组 (A)、模型组 (B)、青藤碱组 (C) 及青风藤醇洗脱物组 (D) 大鼠关节肿胀情况

Fig. 2 The articular swelling of rats of control group (A), model group (B), sinomenine group (C) and *S. acutum* alcohol eluent group (D) on the 58<sup>th</sup> day

表 1 各组大鼠血清 IL-17、RANKL、OPG 水平 (pg/mL, Mean ± SD)

Table 1 Serum level of IL-17, RANKL and OPG in different groups of rats (pg/mL, Mean ± SD)

组别 Group	n	IL-17	RANKL	OPG
青风藤醇洗脱物 <i>S. acutum</i> alcohol eluent	10	391.29 ± 95.11 <sup>*#</sup>	166.39 ± 14.52 <sup>*#</sup>	53.51 ± 7.22 <sup>*</sup>
青藤碱 Sinomenine	10	544.79 ± 81.23	238.53 ± 47.82	67.52 ± 6.65 <sup>*</sup>
模型 Model	10	574.53 ± 72.37	202.16 ± 20.16	38.14 ± 8.03
对照 Control	10	221.05 ± 82.76 <sup>*</sup>	126.76 ± 37.85 <sup>*</sup>	67.20 ± 5.58 <sup>*</sup>

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与青藤碱组比较, #  $P < 0.05$ 。

Note: Compare with model group, \*  $P < 0.05$ ; Compare with sinomenine group, #  $P < 0.05$ .

RANKL 的分泌, 提高 OPG 的水平, 青藤碱对 IL-17、RANKL 的作用不显著, 却能显著提高 OPG 水平。

IL-17 是促进 RA 关节骨破坏的重要细胞炎症因子 IL-17 促进 RA 中骨破坏的机制可能与它诱导了 RANKL 和 MMPs 的表达, 并且还能直接刺激破骨细胞的分化与活化有关<sup>[6]</sup>。IL-17 作用于成骨细胞增加 RANK 配体的表达, 后者刺激破骨细胞前体发育为成熟的破骨细胞, 也可以直接刺激成熟的破骨

## 2.2 各组大鼠血清 IL-17、RANKL、OPG 测定

青风藤醇洗脱物组 IL-17、RANKL 水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 但未能降低到对照组水平, 青藤碱组 IL-17、RANKL, 与模型组无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 青风藤醇洗脱物组 RANKL 水平显著低于青藤碱组 ( $P < 0.05$ )。青藤碱组和青风藤醇洗脱物组 OPG 水平显著高于模型组 ( $P < 0.05$ ), 其中青藤碱组 OPG 水平与正常组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

RA 病因及发病机制尚不明确, 但病理改变的靶器官以关节滑膜为主, 同时伴随着全身免疫系统的活化。青风藤是防己科植物青藤及毛青藤的干燥藤茎<sup>[5]</sup>, 具有祛风湿、通经络等作用, 临床主要用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮等免疫系统疾病。因而, 如何借助现代药理实验, 明确青风藤抗风湿治疗 RA 活性及作用机制成为进一步研究的问题。近年来对青藤碱的研究较多, 而青风藤醇洗脱物与青藤碱单体对 RA 治疗作用的比较却鲜见报导。本研究应用胶原诱导性关节炎模型探讨青风藤的醇洗脱物与其有效单体在大鼠体内药效的差异。实验结果提示, 青风藤 95% 醇洗脱物与青藤碱均能有效缓解胶原诱导的关节炎肿胀, 并且能够恢复关节功能, 同时青风藤 95% 醇洗脱物能够有效降低 IL-17、

细胞发挥作用。因此, IL-17 对炎症部位的持续性细胞浸润和诱导骨破坏具有一定的作用, 是骨质吸收和骨质破坏的主要细胞因子之一<sup>[7]</sup>。Yan LC 等的研究表明, 青藤碱低剂量时不能发挥其抗炎作用, 反而青藤碱的一类衍生物能够显著抑制 TH17 的表达, 从而减少 IL-6、TNF- $\alpha$  的分泌, 调节免疫。这与本研究结果类似, 同时推测青风藤醇提取物中可能存在与青藤碱结构类似的衍生物, 能够发挥调节免疫

的作用,有待进一步研究<sup>[8]</sup>。

目前认为 RANKL 和 OPG 也是 RA 中的关键调节因子,活化的 T 淋巴细胞表达 RANKL 可能为 RA 中免疫系统与骨代谢提供联系。活化的 T 淋巴细胞通过 RANKL 介导滑膜巨噬细胞向破骨细胞(osteoclast, OC)分化,引起骨丢失<sup>[9,10]</sup>。本研究显示,青藤碱与青风藤 95% 醇洗脱物均能有效提高 OPG 水平,青风藤 95% 醇洗脱物能够显著抑制 RANKL 的分泌。本研究提示青风藤 95% 醇洗脱物和青藤碱均能通过改善 RANKL/OPG 的比值有效抑制骨破坏,青风藤 95% 醇洗脱物的作用可能更为显著。

总之,青风藤醇洗脱液可抑制大鼠胶原诱导的关节炎炎症反应。由此可见,青藤碱能够提高 OPG 水平,而青风藤 95% 醇洗脱物对 RANKL、IL-17 分泌的抑制作用优于青藤碱,提示青风藤 95% 醇洗脱物中可能存在其他青藤碱类似物,亦能发挥抗炎抗骨破坏的作用,青风藤 95% 醇洗脱物成分分析和具体作用仍有待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Scoot DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- 2 Zhang YL(张永立), Ouyang GL(欧阳桂林), Xiao LB(肖涟波). Cellular and molecular mechanisms of *Sinomenine* treatment of rheumatoid arthritis. *J Chin Integr Med*(中西医结合学报), 2009, 7: 775-778.
- 3 Yu KQ(余克强), Luo R(罗仁). *Sinomenine* on patients with rheumatoid arthritis in peripheral blood monocytes derived dendritic cells and secreted chemokine receptor expression. *J South Med Univ*(南方医科大学学报), 2009, 29: 635-641.
- 4 Brang DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1269-1275.
- 5 Zhao XX, Peng C, Zhang H, et al. *Sinomenium acutum*; a review of chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Pharm Biol*, 2012; 50: 1053-1061.
- 6 Ju JH, Cho ML, Jun JY, et al. Oral administration of type-II collagen suppresses IL-17 associated RANKL expression of CD4+ T cells in collagen-induced arthritis. *Immunol Lett*, 2008, 117: 16-25.
- 7 Schett G, Middleton S, Bolon B, et al. Additive bone protective effects of anabolic treatment when used in conjunction with RANKL and tumor necrosis factor inhibition in two rat arthritis model. *Arthritis Rheum*, 2005, 52: 1604-1611.
- 8 Yan LC, Bi EG, Lou YT, et al. Novel *sinomenine* derivative 1032 improves immune suppression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 391: 1093-1098.
- 9 Maruotti N, Grano M, Colucci I, et al. Osteoclastogenesis and arthritis. *Clin Exp Med*, 2011, 11: 137-145.
- 10 Smith HS, Smith AR, Seidner P. Painful rheumatoid arthritis. *Pain Physician*, 2011, 14: 427-445.