

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0089-08

松节方配伍对滑膜细胞增殖及抗炎镇痛作用的研究

梅小利,吴思澜,涂如霞,莫宗成,王敏,王天文,张莉,黄崇刚*

重庆市中药研究院 国家中医药管理局中药药理三级实验室,重庆 400065

摘要:本研究旨在通过研究松节方及拆方对滑膜细胞增殖及抗炎镇痛的作用来探讨其配伍规律。通过制备大鼠含药血清,将大鼠骨关节滑膜细胞传代培养后,分别加入药物血清常规培养,CCK-8试剂盒检测其细胞存活率;采用二甲苯诱导的小鼠耳肿胀模型、醋酸诱导的小鼠疼痛模型,观察松节方及拆方的体内抗炎镇痛活性。结果表明松节方及拆方能明显降低滑膜细胞的OD值,不同程度减轻上述疼痛模型的炎症及疼痛症状。说明松节方及拆方对滑膜细胞增殖有明显的抑制作用,有较好的抗炎镇痛作用,拆方分析显示松节方全方效果最佳,初步验证了松节方组方的科学性和合理性。

关键词:松节方;配比;滑膜细胞;抗炎;镇痛

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.012

Experimental Study on the Proliferation of Synovial Cells and the Anti-inflammatory and Analgesic Effects of the Compatibility Relations on SongJieFang

MEI Xiao-li, WU Si-lan, TU Ru-xia, MO Zong-cheng, WANG Min,
WANG Tian-wen, ZHANG Li, HUANG Chong-gang*

Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chinese Medicine

Management Bureau of the three grade Laboratory, Chongqing 400065, China

Abstract: The aim of this study was to explore the regularity of recipe composition by observing the proliferation of synovial cells, anti-inflammatory and analgesic effects of SongJieFang (SJF) and its demolitions. Three artificially induced models were used to evaluate the effects. The rat joint synovial cells were cultured with rat serum containing either the diluent of drug or in combination or THHT. The synovial cell vitality was detected using a CCK-8 kit. There were Murine Ear Edema Model induced by xylene and Murine Pain Model induced by acetic acid, the anti-inflammatory and analgesic activities were observed. The results showed that the SJF and its demolitions significantly reduced the vitality of synovial cells, could reduce the inflammation and pain of the above model. It is suggested that the SJF and its demolitions had significantly inhibitory effects on the synovial cell proliferation and anti-inflammatory analgesic action in rats. The original formula (SJF) worked best. These result confirmed the rationality and scientific level of SJF.

Key words: SongJieFang; compositions; synovial cells; anti-inflammatory; analgesic

关节炎是一种由多种因素引起关节炎性病变的慢性疾病,以关节红肿、热、痛和功能障碍为主要表现,其发病率高,致病机制复杂,最常见的是骨关节炎和类风湿性关节炎。中医将之归属于属痹证范畴,临床分型主要分为风寒湿痹、风湿热痹、淤血阻络等型。其病理特征为大量炎性细胞在滑膜的浸润和在滑液的渗出,导致滑膜增生,血管翳形成,最终

造成关节软骨破坏^[1],因此滑膜细胞在关节炎疾病治疗中具有重要意义。松节方载于《外台秘要》,具有散寒祛风除湿、通经活络之功效,善治风寒湿痹。前期实验证实松节方全方具有较好的抗炎、镇痛等作用,为了阐明松节方的配伍规律,本文试观察该方及其拆方对体外滑膜细胞增殖及体内抗炎镇痛的影响,进一步解释松节方的组方原理。

1 材料

1.1 动物

KM 小鼠, SPF 级, 雌雄各半, 18 ~ 22 g; SD 大

收稿日期:2018-04-27 接受日期:2018-08-23

基金项目:重庆市科委基本业务费项目(2015cste-jbky-01908);重
庆市社会民生科技创新专项项目(cstc2016shmszx
00007)

*通信作者 Tel:86-23-89029152;E-mail:hcg2091@163.com

鼠, SPF 级, 雌雄各半, 180~220 g, 均由重庆市中药研究院实验动物研究所提供, 实验动物生产许可证证号: SCXK(渝)2012-0006。动物实验在重庆市中药研究院中药药理三级实验室进行。

1.2 药材

羌活、独活、油松节均购自重庆市中药材专业市场, 经我院中药博物馆鉴定: 所购羌活为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang(N), 独活为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens Maxim. f. biserrata* Shan et Yuan(A) 的干燥根, 油松节为松科植物油松 *Pinus tabulac formis* Carr. (P) 的干燥瘤状节或分枝节。

实验样品提取: 参考文献方法^[2], 称取羌活、独活、油松节药材, 分别加 10 倍量 75% 乙醇浸泡 0.5 h, 回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 过滤, 减压回收乙醇, 即得提取物流浸膏。药材提取物流浸膏用正己烷萃取后得到正己烷部分 (Hexane extract; HE), 余下水部分再用乙酸乙酯萃取得到乙酸乙酯部分 (Ethyl acetate extract; EE), 余下水部分再用正丁醇萃取后得到正丁醇部分 (N-butanol extract; NE) 和水部分 (Water extract; WE)。

组方配比: 根据前期实验结果, 本次实验采用羌活水部位 (N-WE)、独活乙酸乙酯部位 (A-EE)、松节正己烷部位 (P-HE) 进行组方, 选取 3 个配比进行研究: 配比 1: 生药含量比为 1:1:1; 配比 2: 生药含量比为 1:1:1.2; 配比 3: 生药含量比为 1:1:1.5。各配伍组合中各组成药生药浓度与全方中各相应生药浓度相同。

1.3 对照品及试剂

昆明山海棠片 (THHT), 滇虹药业集团玉溪生物制药有限公司, 批号: 20140502; II 型胶原酶购自 Sigma; 胎牛血清购自赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司; DMEM、PBS 溶液购自 GE Healthcare Life Sciences; 0.25% Trypsin-EDTA (胰酶)、Pen Strep (100 ×) 双抗、CCK-8 检测试剂盒购自 Gen-view Scientific Inc; 冰醋酸, 重庆川东化工 (集团) 有限公司化学试剂厂, 批号: 20110301; 二甲苯, 重庆川东化工 (集团) 有限公司化学试剂厂, 批号: 20091020。

1.4 主要仪器

IX71 倒置荧光显微镜, 日本 OLYMPUS 有限公司; CO₂ 培养箱, Thermo Fisher Scientific; ST-360 酶标仪, 上海科华试验系统有限公司。

2 实验方法

2.1 组方中各单味药有效部位筛选研究

2.1.1 对滑膜细胞增殖的影响

将 SD 大鼠随机分为空白对照组、羌活正己烷部位 (N-HE) 组、羌活乙酸乙酯部位 (N-EE) 组、羌活正丁醇部位 (N-NE) 组、羌活水部位 (N-WE) 组、独活正己烷部位 (A-HE) 组、独活乙酸乙酯部位 (A-EE) 组、独活正丁醇部位 (A-NE) 组、独活水部位 (A-WE) 组、松节正己烷部位 (P-HE) 组、松节乙酸乙酯部位 (P-EE) 组、松节正丁醇部位 (P-NE) 组、松节水部位 (P-WE) 组、THHT 组, 每组 5 只, 按组别给予相应药物, 空白对照组给予纯化水, 给药体积为 1 mL/100 g 体重, 给药一次。给药前禁食不禁水 12 小时, 给药后 1 小时用 45 mg/kg 的戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉取血, 分离血清, 同组混合以消除个体差异, 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌, 56 ℃ 水浴灭活 30 min, -80 ℃ 保存备用。

参照文献方法^[3] 进行滑膜细胞培养: 将大鼠脱颈椎处死, 置于 75% 酒精中浸泡 2 分钟, 膝关节酒精局部消毒, 打开关节腔, 分离关节囊滑膜层和纤维层, 取出滑膜组织, 放入含双抗的生理盐水中。将分离的滑膜组织用含双抗的 PBS 液浸泡 5 min 后, 再用 PBS 液漂洗三次放入培养皿中; 用眼科剪将滑膜组织剪碎成 1 × 1 mm 的小块, 加入含 10% 胎牛血清的 II 型胶原酶约 6 mL (胶原酶浓度为 4 mg/mL) 进行消化, 瓶口拧紧放入培养箱中。消化过程每隔 1 h 振摇一次培养瓶, 消化 3 h; 消化完成后, 取出培养瓶, 吹打混匀细胞悬液, 将其转入离心管中, 1 000 rpm 离心 10 分钟, 弃部分含脂肪细胞上清液约 2 mL, 再加入 2 mL DMEM 培养液混匀后, 200 目筛网过滤, 将过滤液转至离心管 1 200 rpm 离心 10 min; 弃上清液, 加 DMEM 培养液 4 mL 吹打混匀细胞沉淀, 然后转入干净的培养瓶中, 另加 1 mL 胎牛血清 (20% 终浓度), 置于培养箱中培养。次日去掉未贴壁的细胞, 2~3 天更换一次培养液, 倒置显微镜下观察细胞生长情况。

取第 3 代对数生长期的滑膜细胞进行实验。将细胞用 0.25% 胰酶消化成单个细胞, 计数。分别在 96 孔板中接种 100 μL 滑膜细胞悬液 (浓度为 2 × 10⁴/mL), 在培养箱中培养 4 h。对细胞进行换液。按组别向培养板加入含 CCK-8 (10% 终浓度) 和含不同药物血清 (10% 终浓度) 的培养液 (每组血清加

6个孔),在培养箱中培养2 h,用酶标仪在450 nm处测定吸光度并根据公式计算细胞存活率。计算公式:

$$\text{细胞存活率} = \frac{(\text{实验孔 OD 值}-\text{空白孔 OD 值})}{(\text{对照孔 OD 值}-\text{空白孔 OD 值})} \times 100\%$$

实验孔为含细胞、CCK 溶液、药物溶液的孔;对照孔为含细胞、CCK 溶液、不含药物溶液的孔;空白对照孔为含 CCK 溶液、不含细胞的孔。

2.1.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响^[4]

将 KM 小鼠随机分组(具体分组同 2.1.1),每组 10 只,按组别给予相应药物,空白对照组给予纯化水,给药体积为 0.2 mL/10 g 体重,给药 1 次。药后 1 小时各给药组给小鼠右耳涂抹二甲苯 0.03 mL/只,20 min 后脱颈处死动物,打孔器打下动物左右耳,精密称取耳片重量,计算耳肿胀率。计算公式如下:

$$\text{肿胀率} = (\text{右耳重量}-\text{左耳重量})/\text{左耳重量} \times 100\%$$

2.1.3 对醋酸致小鼠扭体试验的影响^[5]

将 KM 小鼠随机分组(具体分组同 2.1.1),每组 10 只,按组别给予相应药物,空白对照组给予纯化水,给药体积为 0.2 mL/10 g 体重,给药 1 次。药后 1 h,每只小鼠腹腔注射 0.7% 醋酸溶液 0.2 mL,观察并记录小鼠扭体发作潜伏期(S)并计数 15 min 内小鼠出现的扭体反应(伸展后肢、腹部内凹和臀部抬高)次数。

2.2 组方有效部位配比筛选研究

2.2.1 对滑膜细胞增殖的影响

将 SD 大鼠随机分为空白对照组、配比 1 组、配比 2 组、配比 3 组、THHT 组,每组 5 只,按组别给予相应药物,具体实验方法同 2.1.1。

2.2.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响^[4]

将 KM 小鼠随机分组(具体分组同 2.2.1),每组 10 只,按组别给予相应药物,具体实验方法同 2.1.2。

表 1 羌活、独活、松节不同提取部位对滑膜细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of the different extractions on the proliferation of synovial cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	吸光度值 OD (450nm)	抑制率 Inhibition ratio (%)
空白对照组 Control	-	0.157 ± 0.035	-
羌活正己烷部位 N-HE	1.03	0.131 ± 0.016	16.56
羌活乙酸乙酯部位 N-EE	1.03	$0.126 \pm 0.031^*$	19.75
羌活正丁醇部位 N-NE	1.03	0.130 ± 0.026	17.20
羌活水部位 N-WE	1.03	$0.101 \pm 0.015^{**}$	35.67

2.2.3 对醋酸致小鼠扭体试验的影响^[5]

将 KM 小鼠随机分组(具体分组同 2.2.1),每组 10 只,按组别给予相应药物,具体实验方法同 2.1.3。

2.3 最佳组方配比研究

2.3.1 对滑膜细胞增殖的影响

将 SD 大鼠随机分为空白对照组、配比 1 组、羌活水部位(N-WE)组、独活乙酸乙酯部位(A-EE)组、松节正己烷部位(P-HE)组、羌活水部位-独活乙酸乙酯部位(N-WE + A-EE)组、羌活水部位-松节正己烷部位(N-WE + P-HE)组、独活乙酸乙酯-松节正己烷部位(A-EE + P-HE)组、THHT 组,每组 5 只,按组别给予相应药物,具体实验方法同 2.1.1。

2.3.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响^[4]

将 KM 小鼠随机分组(具体分组同 2.3.1),每组 10 只,按组别给予相应药物,具体实验方法同 2.1.2。

2.3.3 对醋酸致小鼠扭体试验的影响^[5]

将 KM 小鼠随机分组(具体分组同 2.3.1),每组 10 只,按组别给予相应药物,具体实验方法同 2.1.3。

2.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,组间数据采用 one way-ANOVA。

3 结果

3.1 组方中各单味药有效部位筛选研究

3.1.1 对滑膜细胞增殖的影响

与空白对照组相比,给药后羌活乙酸乙酯部位、羌活水部位、独活乙酸乙酯部位、松节正己烷部位、松节正丁醇部位组 OD 值均显著降低,抑制率为 19.75%、35.67%、29.94%、35.67%、28.03%,能明显抑制滑膜细胞的增殖。见表 1。

续表1(Continued Tab. 1)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	吸光度值 OD (450nm)	抑制率 Inhibition ratio (%)
独活正己烷部位 A-HE	1.03	0.134 ± 0.031	14.65
独活乙酸乙酯部位 A-EE	1.03	0.110 ± 0.020 * *	29.94
独活正丁醇部位 A-NE	1.03	0.138 ± 0.025	12.10
独活水部位 A-WE	1.03	0.146 ± 0.027	7.01
松节正己烷部位 P-HE	1.54	0.101 ± 0.030 * *	35.67
松节乙酸乙酯部位 P-EE	1.54	0.134 ± 0.013	14.65
松节正丁醇部位 P-NE	1.54	0.113 ± 0.043 *	28.03
松节水部位 P-WE	1.54	0.148 ± 0.027	5.73
昆明山海棠 THHT	0.35	0.103 ± 0.013 * *	34.39

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.1.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

与空白对照组相比,给药后羌活水部位、独活正丁醇部位、松节正己烷部位、松节水部位组小鼠耳肿

胀率明显降低,有统计学差异,提示上述部位有明显的抗炎作用。羌活乙酸乙酯部位、独活乙酸乙酯部位组有一定的作用趋势。结果见表2。

表2 羌活、独活、松节不同提取部位对二甲苯致小鼠耳肿胀率的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)Table 2 Effects of the different extractions on ear swelling induced by xylene in mice($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别 Group	剂量 Dose(g/kg)	耳肿胀率 Swelling rate(%)
空白对照组 Control	-	143.75 ± 28.67
羌活正己烷部位 N-HE	2.06	138.69 ± 53.29
羌活乙酸乙酯部位 N-EE	2.06	112.49 ± 46.37
羌活正丁醇部位 N-NE	2.06	159.00 ± 27.69
羌活水部位 N-WE	2.06	90.69 ± 27.82 *
独活正己烷部位 A-HE	2.06	138.85 ± 25.59
独活乙酸乙酯部位 A-EE	2.06	116.61 ± 44.03
独活正丁醇部位 A-NE	2.06	134.51 ± 39.06 *
独活水部位 A-WE	2.06	120.36 ± 41.02
松节正己烷部位 P-HE	3.08	79.72 ± 43.62 * *
松节乙酸乙酯部位 P-EE	3.08	127.07 ± 51.58
松节正丁醇部位 P-NE	3.08	121.58 ± 28.89
松节水部位 P-WE	3.08	104.76 ± 48.12 *
昆明山海棠 THHT	0.69	76.32 ± 33.74 * *

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.1.3 对醋酸致小鼠扭体试验的影响

与空白对照组相比,给药后羌活水部位、独活乙酸乙酯部位、独活正丁醇部位、独活水部位、松节正己烷部位、松节正丁醇部位组能明显减少小鼠扭体次数,有统计学差异,提示上述部位有明显的镇痛作用,对潜伏期作用不明显。结果见表3。

3.2 组方有效部位配比筛选研究

3.2.1 对滑膜细胞增殖的影响

与空白对照组相比,给药后配比1、2、3组OD值均显著降低,能明显抑制滑膜细胞的增殖,抑制率为28.86%、18.79%、24.16%。配比1组作用强于配比2、3组。结果见表4。

表3 羌活、独活、松节不同提取部位对醋酸致小鼠扭体潜伏期及扭体次数的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)
Table 3 Effects of the different extractions on pain model induced by acetic acid in mice($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	潜伏期 Latent time (min)	扭体次数 Twisting (number)
空白对照组 Control	-	307.88 ± 110.29	12.88 ± 5.08
羌活正己烷部位 N-HE	2.06	222.50 ± 61.52	16.00 ± 5.26
羌活乙酸乙酯部位 N-EE	2.06	241.38 ± 50.39	10.13 ± 4.97
羌活正丁醇部位 N-NE	2.06	271.75 ± 42.67	11.75 ± 6.58
羌活水部位 N-WE	2.06	303.88 ± 34.40	9.00 ± 5.50*
独活正己烷部位 A-HE	2.06	261.00 ± 45.82	11.63 ± 2.56
独活乙酸乙酯部位 A-EE	2.06	334.88 ± 68.44	6.88 ± 2.70**
独活正丁醇部位 A-NE	2.06	363.50 ± 92.81	8.25 ± 4.23*
独活水部位 A-WE	2.06	340.88 ± 64.28	7.88 ± 4.36*
松节正己烷部位 P-HE	3.08	217.38 ± 47.71	3.63 ± 2.83**
松节乙酸乙酯部位 P-EE	3.08	240.38 ± 35.63	9.38 ± 3.38
松节正丁醇部位 P-NE	3.08	297.25 ± 146.68	6.63 ± 4.34**
松节水部位 P-WE	3.08	377.38 ± 219.59	9.25 ± 4.37
昆明山海棠 THHT	0.69	216.32 ± 67.82	4.43 ± 3.26**

注:与空白对照组比较, * P<0.05, ** P<0.01。

Note: Compared with control group, * P<0.05, ** P<0.01.

表4 羌活、独活、松节有效部位不同配比对滑膜细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)
Table 4 Effects of the different compositions on the proliferation of synovial cells($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	吸光度值 OD (450nm)	抑制率 Inhibition ratio (%)
空白对照组 Control	-	0.149 ± 0.026	-
配比 1 Compositions 1	3.08	0.106 ± 0.019**	28.86
配比 2 Compositions 2	3.29	0.121 ± 0.024*	18.79
配比 3 Compositions 3	3.60	0.113 ± 0.033*	24.16
昆明山海棠 THHT	0.35	0.111 ± 0.017**	25.50

注:与空白对照组比较, * P<0.05, ** P<0.01。

Note: Compared with control group, * P<0.05, ** P<0.01.

3.2.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

明显的抗炎作用。配比 1 组作用强于配比 2、3 组。

见表 5。

耳肿胀率均明显降低,有统计学差异,提示各配比有

表5 羌活、独活、松节有效部位不同配比对二甲苯致小鼠耳肿胀率的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)
Table 5 Effects of the different compositions on ear swelling induced by xylene in mice($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	耳肿胀率 Swelling rate (%)
空白对照组 Control	-	175.48 ± 55.82
配比 1 Compositions 1	6.17	84.08 ± 59.17**
配比 2 Compositions 2	6.58	104.38 ± 63.29*
配比 3 Compositions 3	7.19	115.99 ± 76.61*
昆明山海棠 THHT	0.69	102.43 ± 58.67*

注:与空白对照组比较, * P<0.05, ** P<0.01。

Note: Compared with control group, * P<0.05, ** P<0.01.

3.2.3 对醋酸致小鼠扭体试验的影响

与空白对照组相比,给药后配比1、2、3组均能明显减少小鼠扭体次数,配比1、3组能延长小鼠扭

体潜伏期,有统计学差异,提示上述各组配比均有明显的镇痛作用。配比1组作用强于配比2、3组。见表6。

表6 羌活、独活、松节有效部位不同配比对醋酸致小鼠扭体潜伏期及扭体次数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 Effects of the different compositions on pain model induced by acetic acid in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	潜伏期 Latent time (min)	扭体次数 Twisting (number)
空白对照组 Control	-	255.1 ± 32.2	17.20 ± 5.67
配比1 Compositions 1	6.17	356.2 ± 154.7	8.00 ± 5.46 * *
配比2 Compositions 2	6.58	248.4 ± 87.6	10.57 ± 5.19 * *
配比3 Compositions 3	7.19	339.5 ± 190.5	10.10 ± 5.84 * *
昆明山海棠 THHT	0.69	291.6 ± 72.6	8.86 ± 5.15 * *

注:与空白对照组比较, * * $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * * $P < 0.01$.

3.3 最佳组方配比拆方研究

3.3.1 对滑膜细胞增殖的影响

与空白对照组相比,给药后配比1组、单味药提取部位及提取部位的两两配对组OD值均明显降低,抑制率为27.11%、17.47%、15.06%、15.66%、

18.07%、19.88%、19.28%,能明显抑制滑膜细胞的增殖。配比1组作用强于配比中的单味药提取部位及提取部位的两两配对,且强于昆明山海棠。见表7。

表7 最佳组方配比及其拆方对滑膜细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effects of the optimal ratio and its removal on the proliferation of synovial cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	吸光度值 OD (450nm)	抑制率 Inhibition ratio (%)
空白对照组 Control	-	0.166 ± 0.027	-
配比1 Compositions 1	3.08	0.121 ± 0.026 * *	27.11
羌活水部位 N-WE	1.03	0.137 ± 0.021 * *	17.47
独活乙酸乙酯部位 A-EE	1.03	0.141 ± 0.023 *	15.06
松节正己烷部位 P-HE	1.03	0.140 ± 0.020 *	15.66
羌活水部位-独活乙酸乙酯部位 N-WE + A-EE	2.06	0.136 ± 0.033 *	18.07
羌活水部位-松节正己烷部位 N-WE + P-HE	2.06	0.133 ± 0.024 * *	19.88
独活乙酸乙酯-松节正己烷部位 A-EE + P-HE	2.06	0.134 ± 0.029 * *	19.28
昆明山海棠 THHT	0.35	0.122 ± 0.024 * *	26.51

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$.

3.3.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

与空白对照组相比,给药后配比1组、单味药提取部位及提取部位的两两配对组小鼠耳肿胀率均明显降低,有统计学差异,提示上述各组有明显的抗炎作用。结果显示,配比1组作用强于配比中的单味药提取部位及提取部位的两两配对,且强于昆明山海棠。见表8。

3.3.3 对醋酸致小鼠扭体试验的影响

与空白对照组相比,给药后配比1组、单味药提取部位及提取部位的两两配对组均能明显减少小鼠

扭体次数;给药后配比1组、单味药提取部位组及独活-松节组均能明显延长小鼠扭体潜伏期,有统计学差异,结果提示上述各组有明显的镇痛作用,配比1组作用明显强于配比中的单味药提取部位及提取部位的两两配对,且强于昆明山海棠。见表9。

4 讨论

关节炎归属于风湿学科疾病,中医将之归属于属痹证范畴,临床分型主要分为风寒湿痹、风湿热痹、淤血阻络等型。近年来,对关节炎的研究

表8 最佳组方配比及其拆方对二甲苯致小鼠耳肿胀率的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 8 Effects of the optimal ratio and its removal on ear swelling induced by xylene in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	耳肿胀率 Swelling rate (%)
空白对照组 Control	-	175.05 ± 45.08
配比 1 Compositions 1	6.17	90.11 ± 28.73 * *
羌活水部位 N-WE	2.06	137.57 ± 32.12 *
独活乙酸乙酯部位 A-EE	2.06	134.30 ± 37.10 *
松节正己烷部位 P-HE	2.06	129.24 ± 32.71 *
羌活水部位-独活乙酸乙酯部位 N-WE + A-EE	4.12	131.75 ± 22.73 * *
羌活水部位-松节正己烷部位 N-WE + P-HE	4.12	130.25 ± 46.23 *
独活乙酸乙酯-松节正己烷部位 A-EE + P-HE	4.12	122.45 ± 38.57 * *
昆明山海棠 THHT	0.69	110.56 ± 37.58 * *

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表9 最佳组方配比及其拆方对醋酸致小鼠扭体潜伏期及扭体次数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 9 Effects of the optimal ratio and its removal on pain model induced by acetic acid in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	潜伏期 Latent time (min)	扭体次数 Twisting (number)
空白对照组 Control	-	233.50 ± 20.59	22.00 ± 5.88
配比 1 Compositions 1	6.17	316.50 ± 101.87 *	9.88 ± 5.64 * *
羌活水部位 N-WE	2.06	282.75 ± 64.57 * *	11.50 ± 7.45 * *
独活乙酸乙酯部位 A-EE	2.06	316.75 ± 58.05 * *	11.88 ± 5.51 * *
松节正己烷部位 P-HE	2.06	315.63 ± 73.79 * *	10.88 ± 5.25 * *
羌活水部位-独活乙酸乙酯部位 N-WE + A-EE	4.12	221.88 ± 43.20	11.63 ± 6.59 *
羌活水部位-松节正己烷部位 N-WE + P-HE	4.12	259.13 ± 63.77	11.13 ± 5.62 *
独活乙酸乙酯-松节正己烷部位 A-EE + P-HE	4.12	315.00 ± 219.34	10.25 ± 5.52 * *
昆明山海棠 THHT	0.69	302.77 ± 76.39 * *	10.23 ± 6.34 * *

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

发展迅速,但因其发病机制复杂,至今尚无特效疗法,仍停留于对炎症及后遗症的综合治疗。西药目前的一线用药仍是非甾体类抗炎免疫药,但存在副作用大、作用单一及有较多禁忌症等缺点^[6]。中药治疗关节炎具有独特优势,目前中药抗关节炎作用研究已成热点,研究发现常见有效成分有苷类、生物碱、黄酮及萜类等,中药复方的效果同样显著,但缺乏相对明确的产生药理作用的物质基础^[6]。目前常见中成药集中在治疗寒湿痹阻、淤血阻络等方面,多为大复方,大多辛热燥烈,作用较猛,且药物组成多含附子、乌头、马钱子等有较强毒性的药材;以单味药入药的有雷公藤、昆明山海棠等,有明显的生殖毒性。松节方属古典经方,方中松节舒筋利关节、强

筋骨,独活、羌活祛风通痹止痛,三药互相配伍,以达到散寒祛风除湿、通经活络之目的,善治风寒湿痹(包括西医的风湿性关节炎、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等)。针对目前中药研究现状,研究其对关节炎的作用物质基础,有助于发现新的治疗药物。

既往研究表明,在关节炎早期,即已出现了持续的慢性滑膜炎,随着疾病的进一步发展,滑膜始终参与其病理过程,滑膜炎严重程度与功能障碍及残疾程度密切相关。提示在关节炎的关节损坏和组织重构中,滑膜细胞既是靶细胞,也通过多种途径成为参与者,其功能的改变在疾病的进程中起着至关重要的作用^[7,8]。因此,我们采用体外滑膜细胞增殖试验对松节方单味药的有效部位及其配比进行了研

究,研究结果显示,羌活水部位、独活乙酸乙酯部位、松节正己烷部位、组方有效部位配比1、2、3均能不同程度的抑制骨关节滑膜细胞增殖,单味药作用略微弱于昆明山海棠。同时配比1拆方研究结果显示,配比1抑制骨关节滑膜细胞增殖作用明显强于配比中的单味药提取部位及提取部位的两两配对,且强于昆明山海棠,两两配伍之间作用未见明显差异。说明松节方可通过抑制骨关节滑膜细胞增殖来达到对关节的保护作用,全方抑制关节滑膜细胞增殖作用明显强于其拆方组合。

松节方由松节、独活、羌活组成,现代药理研究显示三药均有明显的抗炎、镇痛作用。本实验通过小鼠耳肿胀、小鼠扭体试验,针对松节方单味药的有效部位及其配比进行了研究,研究结果显示,羌活水部位、独活乙酸乙酯部位、松节正己烷部位、组方有效部位配比1、2、3均能不同程度的抑制二甲苯所致的小鼠耳部肿胀,减少醋酸所致小鼠扭体次数,延长小鼠扭体潜伏期,单味药作用略微弱于昆明山海棠。同时配比1拆方研究结果显示,配比1抗炎镇痛作用明显强于配比中的单味药提取部位及提取部位的两两配对,且强于昆明山海棠,两两配伍之间作用未见明显差异。结果说明松节方有明显的抗炎、镇痛作用,全方抗炎镇痛作用明显强于其拆方组合。

本实验结果表明,松节方的最佳配伍方案为羌活水提物、独活乙酸乙酯部位、松节正己烷部位按生药含量1:1:1的比例进行配伍。松节方全方在抑制关节滑膜细胞增殖及抗炎镇痛作用方面明显强于其拆方组合,两两配伍之间作用未见明显差异,初步说明本方中各药味组成为相互协同而起作用,其配伍规律及作用机理还有待进一步验证。

(上接第63页)

- 19 Yuan YY(袁园园), Zhou YB(周玉碧), Sun J(孙菁), et al. Determination and principal component analysis of mineral elements based on ICP-OES in *Nitrariaborowskii* fruits from different regions[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42: 2334-2338.
- 20 Yu RT(于瑞涛), Tao YD(陶燕铎), Zhang HG(张怀刚), et al. Determination of five elements in different organs of *Saussurea medusa Maxim.*[J]. *Chin J Anal Lab*(分析试验室), 2010, 29: 354-356.
- 21 Yang RM(杨若明), Lan YF(蓝叶芬), Lan WC(蓝翁驰),

参考文献

- 1 ACR: Pathology and Clinical Stratified Treatment of Rheumatoid Arthritis[S]. USA, 2015
- 2 Xie HY(谢惠艳), Wang YH(王英豪), Wang RR(王蓉蓉), et al. Optimization of extraction technology for codecocation of notopterygii rhizoma et radix and Angelicae Pubescens Radix by orthogonal test[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(12): 10-13.
- 3 Yuan Q(袁琴), Kan WB(阚卫兵), Song PF(宋朋飞), et al. Primary culture of rats synovioocytes with knee of osteoarthritis[J]. *Prog Mod Biomed*(现代生物医学进展), 2012, 12: 253-255.
- 4 Chen Q(陈奇). Research Methodology of TCM Pharmacology: Version 2(中药药理研究方法学: 第2版)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 347.
- 5 Chen Q(陈奇). Research Methodology of TCM Pharmacology: Version 2(中药药理研究方法学: 第2版)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 350.
- 6 Chi LQ(迟里群), Zhou B(周彬), Gao WY(高文远), et al. Research progress of drugs commonly used to anti-rheumatoid arthritis[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2014, 39: 2851-2858.
- 7 Sun LX(孙丽霞), Zhou LL(周玲玲), Yuan DP(袁冬平), et al. The impact of bitongling granules on proliferation and secretory function of rat's synovial cells[J]. *J Nanjing Univ TCM*(南京中医药大学学报), 2012, 28: 461-463.
- 8 Wu GW(吴广文), Chen J(陈俊), Ye JX(叶锦霞), et al. Effects of tougu xiaotong capsule medicated serum on the expression of uPA system and inflammatory factors in osteoarthritis synovial cells[J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*(中国组织工程研究), 2015, 19: 6005-6009.
- et al. Determination of the elements of two Tibetan medicine snow lotus[J]. *J Cen Univ National; Nat Sci Ed*(中央民族大学学报: 自科版), 2005, 14: 120-123.
- 22 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). *Pharmacopoeia of People's Republic of China: Vol I*(中华人民共和国药典: 第一部)[M]. China Medical Science Press, 2010.
- 23 Gu YZ(古元梓), Ren Y(任媛), Zheng MY(郑敏燕), et al. Determination and analysis of mineral elements in *Saussurea medusa Maxim.*[J]. *Chem & Bioengin*(化学与生物工程), 2011, 28(11): 89-92.