

# 大黄素对类风湿关节炎模型大鼠的治疗作用及抗炎机制研究

田新玮<sup>1</sup> 郑琦丽<sup>1</sup> 王静<sup>1</sup> 苏敏慧<sup>1</sup> 周文涛<sup>1</sup> 陈昶<sup>2</sup>

(1.新疆医科大学第五附属医院,新疆乌鲁木齐830011;2.滕州市中医医院,山东滕州277500)

**摘要** 目的:观察大黄素对类风湿关节炎模型大鼠的治疗作用,并探索其抗炎机制。方法:选取60只3周龄SD大鼠,采用随机数字表法分为空白对照组、模型组、大黄素低剂量组和大黄素高剂量组。除空白对照组外其余各组采用不完全氟氏佐剂及牛Ⅱ胶原乳化剂制成类风湿关节炎大鼠模型。大黄素低剂量组和高剂量组分别予40 mg/kg和80 mg/kg大黄素灌胃,空白对照组和模型组予等量生理盐水灌胃,每日1次,持续14 d。造模与给药期间每周检测各组大鼠足肿胀度,计算足肿胀率;采用ELISA试剂盒检测治疗后各组大鼠血清炎症因子白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )含量;比较各组大鼠滑膜病理学评分;采用蛋白质印迹检测各组大鼠关节组织中高迁移族转移蛋白1 (HMGB1)及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3)、B淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)及Bcl-2关联X蛋白 (Bax)的表达。结果:造模后各造模组大鼠足肿胀率明显高于空白对照组 ( $P<0.01$ );经大黄素低剂量、中剂量干预后,足肿胀率明显低于同期模型组 ( $P<0.01$ ),高剂量治疗效果明显优于低剂量 ( $P<0.01$ )。与空白对照组比较,模型组大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 含量,滑膜细胞增生评分、炎症评分、血管新生评分及总病理评分, HMGB1、Caspase-3及Bax蛋白表达均显著升高 ( $P<0.01$ ), Bcl-2蛋白表达显著降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,大黄素低、高剂量组大鼠上述指标均有明显改善 ( $P<0.01$ ),高剂量组改善程度明显优于低剂量组 ( $P<0.01$ )。结论:大黄素可以通过降低类风湿关节炎模型大鼠体内炎症反应同时抑制关节组织细胞的凋亡,从而缓解类风湿关节炎症状。

**关键词** 类风湿关节炎;实验性关节炎;大黄素;炎症因子;高迁移族转移蛋白1;实验研究;大鼠

**中图分类号** R684.305 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X (2020) 10-0084-04

**基金项目** 新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项科研项目 (WJWY-201960)

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性全身性自身免疫性疾病,其主要表现为滑膜炎,同时会引起关节细胞坏死等<sup>[1]</sup>。RA可归属于中医学“痹证”范畴,主要由于风、寒、湿邪侵袭,导致气血凝滞,经络痹阻而引起肢体关节病变<sup>[2-3]</sup>。目前治疗RA的药物主要包括非甾体抗炎药、糖皮质激素以及植物药<sup>[4]</sup>。大黄素是中药虎杖的生物活性组分,具有抗肿瘤、抗微生物生长、解痉、止咳和利尿等作用,对RA具有治疗作用<sup>[5-6]</sup>。彭菲菲等<sup>[7]</sup>研究表明,大黄素对体外培养的RA患者成纤维样滑膜细胞增殖及转移有一定的抑制作用。本研究旨在观察大黄素对类风湿关节炎模型大鼠的治疗作用,并探索其治疗机理。

## 1 实验材料

**1.1 实验动物** SPF级3周龄SD大鼠60只,购自广东医学院实验动物中心,粤监证字2004A029号。所有大鼠均在新疆医科大学动物中心实验室饲养,饲养温度20~25℃,相对湿度50%~65%。本实验经

新疆医科大学动物伦理委员会批准同意,审批编号:20180302145。

**1.2 药物与试剂** 大黄素(货号:E8390;纯度>98%)购自北京索莱宝科技有限公司;白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )试剂盒购自美国Sigma公司;B淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)及Bcl-2关联X蛋白 (Bax)抗体购自北京傲锐东源生物科技有限公司;含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3, 货号sc-7272)、高迁移族转移蛋白1 (HMGB1, 货号sc-74085)购自美国Santa Cruz公司;HRP羊抗兔IgG、HRP羊抗鼠IgG等二抗购自美国Thermo公司。

**1.3 主要仪器** BS-124s型电子天平,北京赛多斯仪器系统有限公司;3-5W低温离心机,湖南恒诺离心机有限公司;SG-51正置型金相显微镜,上海光学仪器厂;蛋白电泳及转膜仪,美国Bio-Rad公司;凝胶成像系统,以色列DNR公司;LD-66实验室切片机,长沙益广制药机械公司。

## 2 实验方法

**2.1 分组、造模与给药** 将60只大鼠适应性喂养1周,随机分为空白对照组、模型组、大黄素低剂量组和大黄素高剂量组,每组15只。除空白对照组外,其余各组大鼠采用不完全氟氏佐剂及牛Ⅱ胶原乳化剂制成类风湿关节炎大鼠模型,制作方法及判断造模是否成功参考黄顺等<sup>[8]</sup>的研究。具体操作如下:将乙酸溶液中溶解牛Ⅱ型胶原制成2 g/L的胶原溶液,取400 μg胶原乳化剂注射于大鼠右足跖部皮下以致炎,并于造模第14日用100 μg胶原乳化剂同法注射以加强。炎症表现程度大约在造模20 d左右达到高峰。20 d时通过大鼠足跖相机拍照和X线摄片观察,出现严重红肿、连续低密度影及溶骨现象表明造模成功。本研究所有造模大鼠均造模成功。造模第21日开始,大黄素低剂量组和高剂量组分别予40 mg/kg和80 mg/kg大黄素灌胃,空白对照组和模型组灌胃等量生理盐水,每日灌胃1次,持续14 d。

### 2.2 观察指标

**2.2.1 大鼠足肿胀度检测并计算肿胀率** 用水容积法检测各组大鼠足肿胀度。从造模开始后每周末检测1次共检测5次,同一只大鼠每次检测同一只足。以第1次测得的关节置换水容积为基值,以后每测得的值与之相比得出的比值为关节肿胀率。

**2.2.2 血清炎症因子检测** 末次给药并完成足肿胀度检测后,各组大鼠麻醉,腹主动脉取血分离血清0.5 mL,在低温离心机中以离心半径8 cm,3000 r/min离心15 min,取上清液严格按照ELISA试剂盒说明书检测IL-1β、IL-6和TNF-α含量。

**2.2.3 大鼠滑膜病理学评分** 取血后处死大鼠,取右足踝关节,剪开皮肤,用显微外科手术剪刀和镊子在髌关节的周围剪下滑膜组织(为白色海绵状),清理,修剪,固定于4%多聚甲醛中,关节组织直接冻存。观察各组大鼠滑膜细胞增生、滑膜下层炎症程度及血管生成情况,对大鼠滑膜病理学进行评分。滑膜细胞增生评分:0分,少于3层;1分,3~4层;2分,5~6层;3分,6层以上。炎症程度评分:0分,无淋巴细胞浸润;1分,淋巴细胞聚集;2分,出现炎细胞浸润且形成淋巴滤泡;3分,出现较多炎性细胞且以滤泡增生为主伴生发中心进行性转化。血管生成评分:0分,无新

生血管生成;1分,轻度新生血管生成;2分,中度新生血管生成;3分,重度新生血管生成。以上3项评分总和即为滑膜病理学总评分。

**2.2.4 蛋白质印迹法(Western Blot)检测大鼠关节组织蛋白表达** 使用Western Blot检测HMGB1、Caspase-3、Bcl-2及Bax蛋白。取冻存的大鼠关节组织,剪刀剪碎,胰蛋白酶消化,提取总蛋白,使用半干法将蛋白转移到PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h后加入各需要检测蛋白的一抗、二抗,孵育2 h,以β-actin为内参蛋白,采用显色液显色后行吸光度分析,计算各蛋白相对表达量。

**2.3 统计学方法** 本研究数据分析采用SPSS 22.0统计学软件,作图采用GraphPad Prism 5软件,多组间采用单因素方差分析, $P<0.05$ 则表明数据差异有统计学意义,本研究所有检验均为双侧检验。

## 3 实验结果

**3.1 各组大鼠足肿胀率比较** 实验第1、2周末,各组大鼠足肿胀率比较无统计学差异( $P>0.05$ );实验第3、4、5周末,模型组和大黄素低、高剂量组大鼠足肿胀率显著高于空白对照组( $P<0.01$ );实验第4、5周末大黄素低、高剂量组大鼠足肿胀率显著低于模型组( $P<0.01$ ),且高剂量组明显低于低剂量组( $P<0.01$ )。见表1。

**3.2 各大鼠血清炎症因子比较** 与空白对照组比较,模型组大鼠血清IL-1β、IL-6和TNF-α含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,大黄素低、高剂量组大鼠上述指标显著降低( $P<0.01$ ),高剂量组明显低于低剂量组( $P<0.01$ )。见表2。

表1 各组大鼠实验各时期足肿胀率比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数/只	实验第1周末	实验第2周末	实验第3周末	实验第4周末	实验第5周末
空白对照组	15	1.00±0.01	1.01±0.04	1.03±0.04	1.02±0.01	1.05±0.02
模型组	15	1.00±0.00	1.20±0.10	2.52±0.25**	2.70±0.22**	1.90±0.23**
大黄素低剂量组	15	1.00±0.01	1.18±0.09	2.40±0.18**	1.80±0.10***	1.60±0.10***
大黄素高剂量组	15	1.00±0.01	1.22±0.06	2.54±0.23**	1.50±0.07***△△	1.20±0.06***△△

注:与同时期空白对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与同时期模型组比较,### $P<0.01$ ;与同时期大黄素低剂量组比较,△△ $P<0.01$ 。

表2 各组大鼠血清炎症因子比较( $\bar{x}\pm s$ ) 单位: pg/mL

组别	动物数/只	IL-1β	IL-6	TNF-α
空白对照组	15	28.87±2.64	50.12±8.32	43.21±8.66
模型组	15	147.35±22.55**	318.47±25.78**	288.32±23.25**
大黄素低剂量组	15	74.08±15.90***	274.22±28.49***	175.31±19.47***
大黄素高剂量组	15	48.09±10.04***△△	108.69±18.97***△△	93.55±10.23***△△

注:与空白对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,### $P<0.01$ ;与大黄素低剂量组比较,△△ $P<0.01$ 。

3.3 各组大鼠滑膜病理学评分比较 见表3。

3.4 各组大鼠关节组织HMGB1、Caspase-3、Bcl-2及Bax蛋白表达比较 见图1、表4。

## 4 讨论

类风湿关节炎是一种以滑膜慢性炎症为主的自身免疫性疾病,抗体即类风湿因子会与自身抗原结合形成免疫复合物,这些免疫复合物会导致滑膜增厚、充血、水肿<sup>[9]</sup>。检测大鼠足肿胀度可以在一定程度上反映其类风湿关节炎的严重程度<sup>[10]</sup>。本研究发现,造模前各组大鼠足肿胀率无显著性差异,造模后模型组与给药组大鼠足肿胀率显著高于空白对照组,使用大黄素治疗后,各治疗组大鼠足肿胀率显著低于模型组。说明大黄素可以有效改善类风湿关节炎症状。

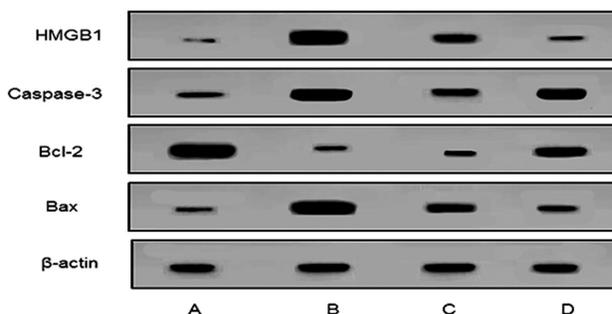
细胞因子主要可分为促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子两种<sup>[11]</sup>。IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 是两种重要的促炎性细胞因子,主要由单核细胞和巨噬细胞等免疫细胞和非免疫细胞等分泌,是炎症的重要介导物质<sup>[12-14]</sup>。本研究结果表明,模型组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6含量显著升高,使用大黄素干预后,大鼠血清上述炎症因子含量显著降低。说明大黄素可以有效降低大鼠体内的炎症反应,这可能因为大黄素可以抑制NF/ $\kappa$ B信号通路,抑制其下游的炎症因子表达从而抑制类风湿关节炎大鼠体内炎症反应。

关节细胞凋亡会加重类风湿关节炎的病情,目前关于凋亡相关基因研究较多,较为常见的是Bcl-2家族和Caspase家族蛋白,其中Bcl-2家族中Bcl-2和Bax这两种蛋白表达量决定细胞是否凋亡<sup>[15-16]</sup>。Bax和Bcl-2表达呈相反趋势,当Bcl-2表达下降时,Bax表达上升,此时会促进细胞的凋亡;当Bcl-2表达升高,而Bax表达降低,则抑制细胞凋亡。本研究结果表明,模型组大鼠关节组织中HMGB1及Caspase-3、Bax蛋白表达显著升高,Bcl-2蛋白表达显著降低,使用大黄素处理后关节组织中HMGB1及Caspase-3、Bax蛋白表达显著降低,Bcl-2蛋白表达显著升高。说明大黄素可以有效降低类风湿关节炎大鼠关节组织细胞的凋亡。

表3 各组大鼠滑膜病理学评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) 单位:分

组别	动物数/只	滑膜细胞增生评分	炎症程度评分	血管新生评分	总分
空白对照组	15	0.15 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.01
模型组	15	2.28 $\pm$ 0.47**	1.69 $\pm$ 0.57**	2.25 $\pm$ 0.75**	7.59 $\pm$ 1.25**
大黄素低剂量组	15	1.78 $\pm$ 0.25***	1.45 $\pm$ 0.21***	1.83 $\pm$ 0.18***	4.32 $\pm$ 0.87***
大黄素高剂量组	15	1.02 $\pm$ 0.11*** $\Delta\Delta$	1.10 $\pm$ 0.17*** $\Delta\Delta$	1.16 $\pm$ 0.22*** $\Delta\Delta$	3.14 $\pm$ 0.65*** $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较,\*\* $P$ <0.01;与模型组比较,\*\*\* $P$ <0.01;与大黄素低剂量组比较, $\Delta\Delta P$ <0.01。



A-空白对照组;B-模型组;C-大黄素低剂量组;D-大黄素高剂量组

图1 各组大鼠关节组织HMGB1、Caspase-3、Bcl-2及Bax蛋白表达比较

表4 各组大鼠关节组织HMGB1、Caspase-3、Bcl-2及Bax蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数/只	HMGB1/ $\beta$ -actin灰度值	Caspase-3/ $\beta$ -actin灰度值	Bcl-2/ $\beta$ -actin灰度值	Bax/ $\beta$ -actin灰度值
空白对照组	15	0.35 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.08	1.87 $\pm$ 0.21	0.42 $\pm$ 0.09
模型组	15	1.80 $\pm$ 0.20**	1.70 $\pm$ 0.18**	0.35 $\pm$ 0.06**	1.40 $\pm$ 0.14**
大黄素低剂量组	15	1.20 $\pm$ 0.10***	1.00 $\pm$ 0.12***	0.51 $\pm$ 0.08***	1.00 $\pm$ 0.15***
大黄素高剂量组	15	0.70 $\pm$ 0.09*** $\Delta\Delta$	0.81 $\pm$ 0.07*** $\Delta\Delta$	1.20 $\pm$ 0.11*** $\Delta\Delta$	0.80 $\pm$ 0.07*** $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较,\*\* $P$ <0.01;与模型组比较,\*\*\* $P$ <0.01;与大黄素低剂量组比较, $\Delta\Delta P$ <0.01。

综上,大黄素可以通过降低类风湿关节炎大鼠体内炎症反应同时抑制关节组织细胞的凋亡,以缓解类风湿关节炎症状。在后续的实验中将进一步增加大黄素的浓度梯度,并探讨不同浓度大黄素通过相关信号通路对类风湿关节炎大鼠体内炎症反应影响的作用机制。

## 参考文献

- [1] MCCONKEY B, DAVIES P, CROCKSON R A, et al. Dapsone in rheumatoid arthritis[J].Rheumatology, 1976, 15 (3): 230.
- [2] 刘蔚翔,施雨,陈进春.柴胡桂枝汤治疗类风湿关节炎初探[J].中华中医药杂志, 2018, 33 (1): 148.
- [3] 赵莉,崔玲,刘新兵,等.薏苡仁汤加味联合针灸治疗类风湿性关节炎风寒湿痹证临床研究[J].陕西中医, 2018, 39 (6): 766.
- [4] 田东林,潘磊,高国卫,等.类风湿关节炎治疗研究进展[J].辽宁中医药大学学报, 2013, 15 (11): 137.
- [5] 黄星昱,郭盛,朱邵晴,等.虎杖不同组织器官中二苯乙烯类及蒽醌类资源性化学成分的分析与评价[J].中国现代中药, 2017, 19 (12): 1688.

# 乌鸡白凤丸临床拓展应用研究进展

何进德<sup>1</sup> 吴挺超<sup>2</sup> 何茗芪<sup>2</sup>

(1.眉山市彭山区中医医院,四川眉山620800;2.成都中医药大学附属医院,四川成都610072)

**摘要** 乌鸡白凤丸是临床常用的中成药,除被广泛用于多种妇科病证外,还被用于其他多种疾病,如:男科、消化科、内分泌代谢科、血液科、呼吸科、皮肤黏膜科、肾病科、神经内科和骨科疾病。目前报道的针对乌鸡白凤丸的临床试验普遍研究设计质量较差,大部分研究存在样本量少、随机方法不明、盲法缺失等问题,若要更好地评价乌鸡白凤丸的临床效用,未来还需要有更多高质量的循证医学证据支撑。

**关键词** 乌鸡白凤丸;治疗应用;综述

**中图分类号** R289.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2020)10-0087-04

乌鸡白凤丸是常用的中成药,出自明代《寿世保元》所载“乌鸡丸”<sup>[1]</sup>。2015版《中国药典》收录的乌鸡白凤丸由乌鸡、鹿角胶、醋鳖甲、煅牡蛎、桑螵蛸等二十味中药组成<sup>[2]</sup>,其被誉为“妇科圣药”,常用于月经不调、崩漏带下、经期腹痛等妇科病证。除了人们熟知的妇科应用,该中成药还被报道用于男科、消化科、内分泌科等诸多疾病领域。本研究对中国知网、万方数据知识服务平台、维普数据库、中国生物医学文献数据库和PubMed数据库进行了检索,检索日期从各数据库建库起至2020年5月,现将乌鸡白

凤丸的临床拓展应用报道概述如下。

## 1 男科疾病

1.1 慢性前列腺炎 蒋孝红等<sup>[3]</sup>将64例慢性前列腺炎肾虚夹瘀证患者随机分为实验组(乌鸡白凤丸治疗)和对照组(常规治疗),疗程2个月。结果显示实验组治愈率56.25%,总有效率84.37%,对照组治愈率18.75%,总有效率68.75%,2组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。张凤梧<sup>[4]</sup>采用乌鸡白凤丸治疗100例慢性前列腺炎患者,疗程3个月。结果提示显效率39%,有效率50%,其中21例不育者精

- [6] 潘书涵,王永萍,王茂林,等.基于TNF- $\alpha$ -HIF-1 $\alpha$ -iNOS-NO信号通路探讨虎杖大黄素干预类风湿关节炎的作用研究[J].中药药理与临床,2019,35(4):62.
- [7] 彭菲菲,徐艳明,谭洪发,等.大黄素对类风湿关节炎滑膜细胞增殖及转移的抑制作用[J].免疫学杂志,2017,33(1):34.
- [8] 黄顺,林清华,王祖庆,等.甘草附子汤对类风湿关节炎大鼠ASIC3和HIF-1 $\alpha$ 表达的影响[J].中医药导报,2018,24(18):11.
- [9] 姚晓阳,蒋秀娣,马晨芸,等.抗氨甲酰化蛋白抗体检测对类风湿关节炎诊治的临床价值[J].中华检验医学杂志,2018,41(1):77.
- [10] 赵桂芝,徐攀,浦锦宝,等.白术醇提物对佐剂性关节炎大鼠足跖肿胀度和炎性细胞因子的影响[J].浙江中医药大学学报,2017,41(1):32.
- [11] 张静.BISAP评分联合促炎/抗炎细胞因子检测对重症急性胰腺炎预后的评估价值[J].解放军医药杂志,2016,28(2):62.
- [12] 范晓蕾,刘中华,岳涛,等.血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-17表达水平在阿达木单抗治疗活动性类风湿关节炎中的疗效预测作用[J].中国医科大学学报,2018,47(6):556.
- [13] FENG S F, YU H H, YU Y, et al. Levels of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A, and TNF- $\alpha$  in aqueous humour of patients with diabetic retinopathy[J]. J Diabetes Res, 2018: 1.
- [14] 董继泉,何坚,柳维林.芍药苷对大鼠颈椎间盘纤维环细胞炎症模型IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 表达的影响[J].亚太传统医药,2018,14(6):8.
- [15] 李娅,张睿智,杨华林,等.高压氧预处理对急性减压所致的大鼠肺组织细胞凋亡及Bcl-2/Bax表达的影响[J].现代生物医学进展,2017,17(3):401.
- [16] 吴振起,杨璐,敏娜,等.清燥救肺汤及其拆方对肺炎支原体感染小鼠Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白的影响[J].中草药,2018,49(2):389.

**第一作者:**田新玮(1984—),女,医学硕士,主治医师,研究方向为中西医结合治疗风湿免疫性疾病。280433012@qq.com

收稿日期:2020-04-01

编辑:吴宁