

黑龙骨茎叶抗类风湿性关节炎作用研究

刘刚, 王瑞鑫, 刘育辰*, 穆开朗, 安兰兰, 周环娟 (贵州中医药大学, 贵阳 550025)

摘要 目的: 研究苗药黑龙骨茎叶对胶原诱导性关节炎 (Collagen-induced Arthritis, CIA) 模型大鼠类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 作用, 探究黑龙骨茎叶抗RA作用的潜在开发利用度。方法: SD大鼠随机选取8只作为正常组, 其余大鼠建立CIA模型。造模成功后随机分为模型组, 黑龙骨茎叶高剂量组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、低剂量组 ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 雷公藤多苷 (TG) 组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组8只。在试验因素干预后, 对各组大鼠AI评分、足趾厚度及病理形态变化进行分析比较。结果: 给药前后, 正常组与模型组比较有极显著差异 ($P < 0.01$), 说明造模成功。给药后, 大鼠左、右足趾厚度测量值显示, 模型组与黑龙骨茎叶高、低剂量组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$); AI评分显示, 黑龙骨茎叶高、低剂量组与模型组相比, 存在显著差异, 组内比较中, 黑龙骨茎叶低剂量组的消肿效果优于高剂量组 ($P < 0.05$)。病理切片结果显示, 与正常组相比, 模型组大鼠滑膜组织内见大量、弥漫性炎性细胞浸润; 与模型组相比, 黑龙骨茎叶低剂量组大鼠滑膜组织内炎性细胞浸润减少。结论: 黑龙骨茎叶表现出了良好的抗RA效果, 具有潜在的抗RA开发利用价值。

关键词: 黑龙骨茎叶; 胶原诱导性关节炎; 类风湿性关节炎; 胶原诱导性关节炎模型大鼠

中图分类号: R932; R96 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)01-0089-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.01.012

Study on the Anti-rheumatoid Arthritis Effect of *Periploca forrestii* Schltr. Stem Leaves

Liu Gang, Wang Ruixin, Liu Yuchen*, Mu Kailang, An Lanlan, Zhou Huanjuan (Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of *Periploca forrestii* Schltr. stem leaves on collagen-induced arthritis (CIA) rats model of rheumatoid arthritis (RA), and to explore the potential exploitation of the anti-RA effect of *Periploca forrestii* Schltr. stem leaves. **Methods:** Eight SD rats were randomly selected as the normal group, and the remaining rats were established as CIA models. After successful modeling, the rats were randomly divided into model groups, *Periploca forrestii* Schltr. stem leaves high-dose ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low-dose ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, tripterygium glycosides (TG) ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, with 8 rats in each group. After the intervention of experimental factors, the AI scores, toe thickness and pathological changes of rats in each group were analyzed and compared. **Results:** Before and after administration, there was a highly significant difference ($P < 0.01$) between the normal group and the model group, indicating successful modeling. After administration, measurements of the thickness of the right and left toes of rats showed significant differences ($P < 0.05$) between

基金项目: 贵州省科技计划项目 (编号 黔科合基础-ZK[2022]一般475号)

作者简介: 刘刚 Tel: (0851) 88233089; E-mail: liugang888_2000@163.com

通信作者: 刘育辰 Tel: (0851) 88233089; E-mail: lyc8564732@163.com

the model group and the high and low dose groups of *Periploca forrestii* Schltr. stem leaves. AI scores showed that there was a significant difference between the high and low dose groups of *Periploca forrestii* Schltr. stem leaves compared with the model group, and in the intra-group comparison, the swelling reduction effect of the low dose group of *Periploca forrestii* Schltr. stem leaves was better than that of the high dose group ($P<0.05$). The pathological section results showed that a large number of diffuse inflammatory cells infiltrated in the synovial tissue of rats in the model group compared with the normal group. Compared with the model group, the inflammatory cells infiltrated in the synovial tissue of rats in the low-dose group of *Periploca forrestii* Schltr. stem leaves were reduced. **Conclusion:** The stem leaves of *Periploca forrestii* Schltr. have shown good anti-RA effects and have potential value for anti-RA development and utilization.

Keywords: *Periploca forrestii* Schltr. stem leaves; collagen-induced arthritis; rheumatoid arthritis; CIA model rats

苗药黑骨藤为萝藦科杠柳属植物黑龙骨 (*Periploca forrestii* Schltr.) 的干燥根或全株, 具有祛风除湿、通经活络之功效^[1], 主要含有醌类、黄酮类、苯丙素类、三萜类和甾体类等多种类型的化合物^[2-4], 具有良好的抗类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 功效, 其乙醇提取物能显著改善胶原诱导性关节炎 (Collagen-induced Arthritis, CIA) 大鼠模型的足爪肿胀, 降低血清致炎因子水平^[5-7]。RA是一种以关节炎和滑膜组织增生为主要特征的慢性自身免疫性疾病, 可加剧相关致炎因子的产生和组织间细胞浸润, 从而导致软骨和骨的结构破坏^[8-10]。由于发病率高和覆盖人群较广, 给患者及社会带来了沉重的负担。目前, 临床上以黑骨藤为原料的中成药在抗RA疾病方面被广泛地使用, 如黑骨藤追风活络胶囊、黑骨藤伸筋透骨液等。现有研究主要围绕黑龙骨藤茎、根茎等药用部位开展化学成分^[2-4]、药理作用^[5-7]、质量标准^[11]、药代动力学^[12]等方面的研究, 而对黑龙骨茎叶抗RA药理活性研究尚未有报道。本研究拟开展黑龙骨茎叶抗RA作用的药理活性试验, 探讨黑龙骨茎叶对CIA大鼠的治疗作用, 明确黑龙骨茎叶是否同样具有抗RA功效, 以期扩大黑骨藤的药用部位, 充分利用有限的药用植物资源。

1 材料

1.1 动物

SPF级SD大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 由湖南省长沙市天勤生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (湘) 2019-0014。试验期间, 动物室内温度控制在25℃; 相对湿度 (60 ± 10) % RH; 12 h交替照明, 动物自由饮水, 进食, 保持垫料干燥, 适

应性饲养3 d后进行试验。

1.2 试剂及药物

黑龙骨茎叶采自贵阳, 经贵州中医药大学药学院刘育辰教授鉴定为萝藦科 (Asclepiadacea) 杠柳属 (*Periploca*) 植物黑龙骨 (*P. forrestii* Schltr.); 雷公藤多苷片 (批号: 1450003, 贵州汉方药业有限公司); 牛Ⅱ型胶原溶液 (批号: 200297), 弗氏完全佐剂 (批号: 200200), 弗氏不完全佐剂 (批号: 200336) 均购于美国Chondrex公司; EDTA脱钙液 (型号: B0317-11, 四川扬克斯特科技有限公司); 7122苏木素 (美国Thenrmo Fisher公司); 伊红 (美国Thenrmo Fisher公司)。

1.3 仪器

TD5A-WS型离心机 (湖南湘立科学仪器有限公司), JE1002型电子天平 (上海浦春计量仪器有限公司), MNT-150型数显卡尺 (浙江德清信泰电子科技有限公司), MS205DU型十万分之一电子天平 [北京中仪汇丰瑞士梅特勒托利多仪器 (中国) 有限公司], RM2235石蜡切片机 (德国Leica公司), CX22光学显微镜 (日本OLMPUS公司), DM1000徕卡显微成像系统 (德国Leica公司) 等。

2 方法

2.1 供试药物制备

取200 g黑龙骨茎叶粗粉, 用50%乙醇溶液超声 (功率: 400 W, 频率: 40 Hz) 提取3次, 每次30 min, 趁热过滤, 合并滤液减压浓缩并挥干至稠膏状, 得黑龙骨茎叶醇提物14.15 g。

2.2 CIA大鼠模型建立

在冰浴条件下, 用匀浆机将牛Ⅱ型胶原溶液与弗氏完全佐剂等体积充分乳化 (将乳剂滴于水面

上成团不散开即为充分乳化)，配成胶原乳剂，现配现用。大鼠适应性饲养3 d后，用固定器固定，剃除尾根部的毛，初次免疫尾根部皮内注射0.2 mL胶原乳剂。初次免疫7 d后，同样的方法配制，牛Ⅱ型胶原溶液与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化制

成胶原乳剂，尾根部皮内注射0.1 mL胶原乳剂（避开初次免疫注射点）。正常组注射生理盐水。初次免疫18 d后，大鼠关节炎指数（AI）≥ 4分为造模成功，AI评分标准如表1所示。AI=四肢关节炎指数评分之和，最高16分。

表1 AI评分标准

AI 值	5 级评分
0	正常
1	踝关节轻微肿胀
2	踝关节到趾关节轻微肿胀
3	踝关节到趾关节中度肿胀
4	踝关节到趾关节重度肿胀

2.3 分组及给药

初次免疫18 d后，将造模成功的大鼠随机分为黑龙骨茎叶低剂量组（25 mg · kg⁻¹）、高剂量组（100 mg · kg⁻¹），雷公藤多苷（TG）组（10 mg · kg⁻¹），正常组和模型组，每组8只。

各药物组药物均用生理盐水分散，正常组和模型组给予生理盐水溶液，各组动物的给药体积均为10 mL · kg⁻¹，灌胃给予相应药物1次 · d⁻¹，连续灌胃28 d，试验饲养大鼠时间轴如图1所示。

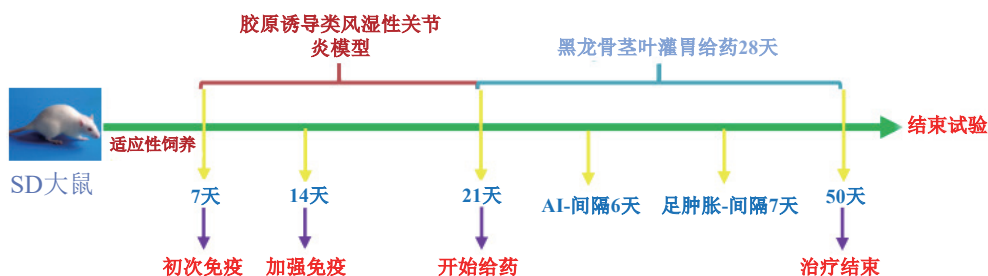


图1 黑龙骨茎叶抗类风湿关节炎饲养大鼠时间轴

2.4 AI值评分和足趾厚度测量

给药第一天记第0 d；间隔6 d，评分一次；间隔7 d，测量大鼠左、右后足足趾厚度一次。测量足趾厚度时，左、右后足足趾厚度各平行测3次，取平均值。

2.5 滑膜病理变化观察

给药28 d后，禁食12 h以上，不禁水，脱颈处死后，去除左后足踝关节皮毛，用动物骨剪取下踝关节，用4%多聚甲醛中性固定液固定，常规脱钙后包埋组织块于石蜡中，切成5 μm厚的薄片，脱蜡后伊红染色，显微镜下观察组织病理学变化。

2.6 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行分析，数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，进行单因素方差分析，方差齐性时，各组间两两比较采用LSD检验，方差不齐性时，各组间两两比较采用Tamhance's T2检验，以P < 0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黑龙骨茎叶提取物对CIA大鼠足趾厚度的影响

3.1.1 黑龙骨茎叶提取物对CIA大鼠左后足足趾厚度的影响

给药前，与模型组比较，各药物组无显著性

差异，正常组有极显著差异 ($P < 0.01$) 且给药 28 d 后仍有极显著性差异 ($P < 0.01$)，说明造模成功且模型相对稳定；在模型组与黑龙骨茎叶高、低剂量组的比较中，黑龙骨茎叶高、低剂量组均与模型组有显著差异，见表 2、图 2。给药约 7 d 后，

黑龙骨茎叶低、高剂量组与模型组大鼠左后足足趾厚度相比有明显的减少，在连续给药后期，黑龙骨茎叶低、高剂量组与 TG 组作用相当，甚至优于 TG 阳性对照组。

表 2 黑龙骨茎叶提取物对 CIA 大鼠左后足足趾厚度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	不同时间大鼠足趾厚度 / mm				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	—	$6.06 \pm 0.44^{**}$	$5.57 \pm 0.54^{**}$	$5.22 \pm 0.29^{**}$	$5.02 \pm 0.39^{**}$	$4.78 \pm 0.31^{**}$
模型组	—	9.71 ± 0.68	8.16 ± 0.40	8.52 ± 0.47	7.76 ± 0.66	8.37 ± 0.84
TG 组	10	8.82 ± 0.49	8.06 ± 0.50	$7.46 \pm 0.69^*$	$6.94 \pm 0.84^*$	$6.94 \pm 0.47^*$
黑龙骨茎叶 (低)	25	9.63 ± 0.47	$7.64 \pm 0.50^*$	$6.99 \pm 0.41^*$	$6.85 \pm 0.54^*$	$6.59 \pm 0.66^{**}$
黑龙骨茎叶 (高)	100	9.45 ± 0.75	8.11 ± 0.61	$6.53 \pm 0.70^*$	$6.71 \pm 0.36^*$	$7.09 \pm 0.32^*$

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ (下同)。



A. 正常组；B. 模型组；C. TG 组；D. 黑龙骨茎叶低剂量组；E. 黑龙骨茎叶高剂量组。

图 2 黑龙骨茎叶部位对 CIA 大鼠左后足足趾厚度的影响

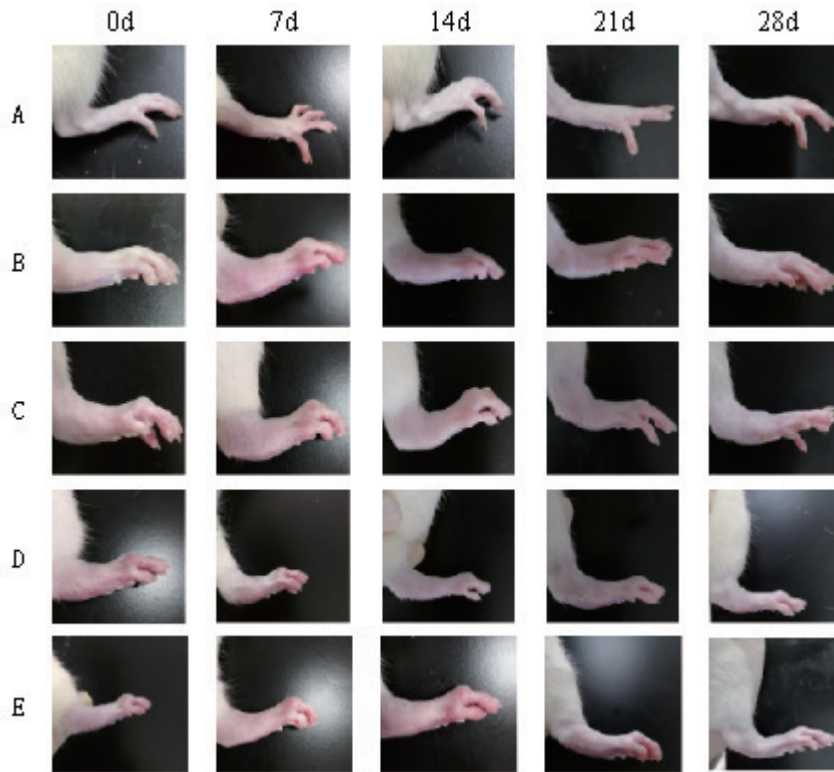
3.1.2 黑龙骨茎叶提取物对CIA大鼠右后足足趾厚度的影响

给药前，与模型组比较，各药物组无显著性

差异；给药28 d后，与模型组比较，TG组和黑龙骨茎叶高、低剂量组有显著性差异 ($P < 0.01$)，见表3、图3。

表3 黑龙骨茎叶对 CIA 大鼠右后足足趾厚度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	不同时间大鼠足趾厚度 / mm				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	—	$6.31 \pm 0.29^{**}$	$5.20 \pm 0.29^{**}$	$5.30 \pm 0.39^{**}$	$4.75 \pm 0.65^{**}$	$5.10 \pm 0.24^{**}$
模型组	—	9.79 ± 0.68	8.44 ± 0.45	7.94 ± 0.44	8.08 ± 0.84	8.14 ± 0.94
TG 组	10	9.40 ± 0.54	8.03 ± 0.36	$6.86 \pm 0.46^{**}$	$6.98 \pm 0.70^*$	$6.74 \pm 0.43^{**}$
黑龙骨茎叶(低)	25	9.85 ± 0.52	8.45 ± 0.55	$6.49 \pm 0.72^*$	$6.93 \pm 0.57^{**}$	$7.28 \pm 0.28^{**}$
黑龙骨茎叶(高)	100	9.67 ± 0.50	7.95 ± 0.52	$6.65 \pm 0.48^*$	$6.26 \pm 0.44^{**}$	$6.89 \pm 0.69^{**}$



A. 正常组；B. 模型组；C. TG 组；D. 黑龙骨茎叶低剂量组；E. 黑龙骨茎叶高剂量组。

图3 黑龙骨茎叶对 CIA 大鼠右后足足趾厚度的影响

3.2 黑龙骨茎叶提取物对CIA大鼠AI值的影响

给药前，与模型组比较，各药物组无显著性差异；给药后，TG组、黑龙骨茎叶高剂量组与低

剂量组在与模型组的对比中，存在显著差异。黑龙骨茎叶高剂量组与低剂量组的组内比较中，低剂量组的消肿效果优于高剂量组 ($P < 0.05$)，见图4。

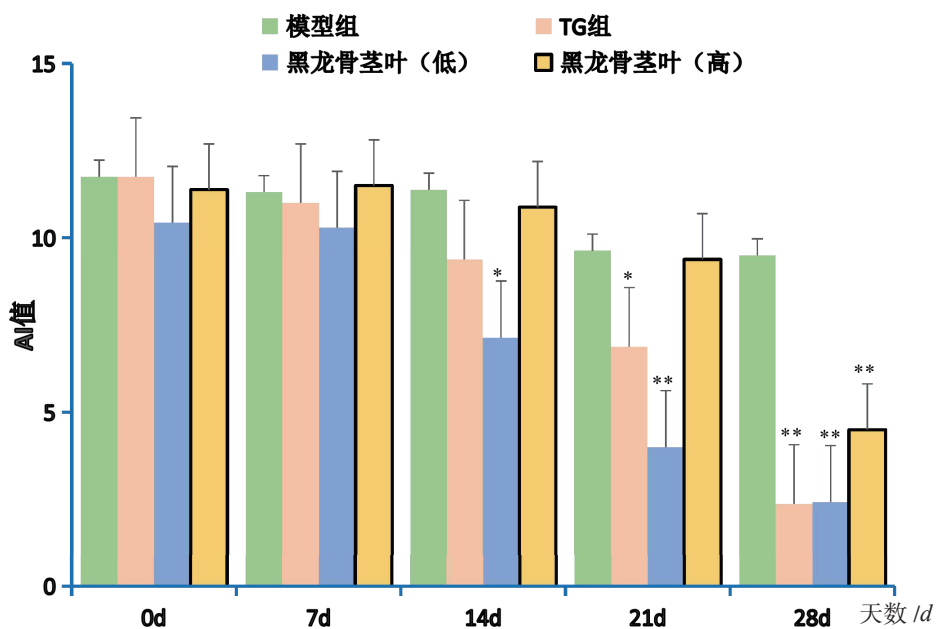
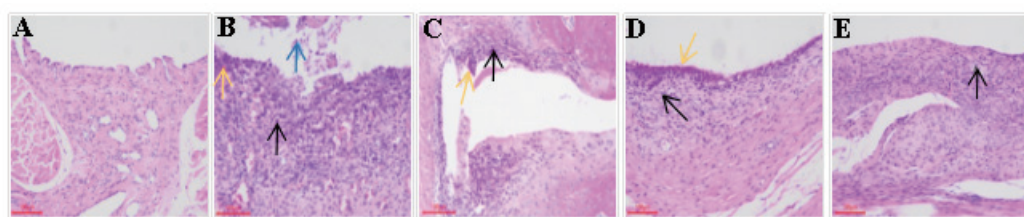


图 4 黑龙江龙茎叶对 CIA 大鼠 AI 值的影响

3.3 黑龙江龙茎叶对 CIA 大鼠滑膜组织病理变化的影响

病理学检查 (HE 染色, $\times 100$) 结果见图 5: 正常组无明显病理学变化; 模型组大鼠滑膜组织内见大量、弥漫性炎性细胞浸润 (黑箭头), 滑膜衬里细胞增生, 约 3~4 层 (黄箭头), 关节腔内有炎性细胞 (蓝箭头); TG 组大鼠滑膜组织内见局灶

性少量炎性细胞浸润 (黑箭头), 滑膜衬里细胞或中度结缔组织增生 (黄箭头); 黑龙江龙茎叶高剂量组大鼠滑膜组织内散在较多炎性细胞浸润 (黑箭头), 滑膜衬里细胞增生 (黄箭头); 黑龙江龙茎叶低剂量组大鼠滑膜组织内见局灶性少量炎性细胞浸润 (黑箭头)。



A. 正常组; B. 模型组; C. TG 组; D. 黑龙江龙茎叶高剂量组; E. 黑龙江龙茎叶低剂量组; Bar=100 μm 。

图 5 黑龙江龙茎叶对 CIA 大鼠滑膜组织病理变化的影响

4 讨论

CIA 模型是免疫性炎症模型, 通过抗原刺激引起机体免疫反应, 引起关节炎的产生和抗人源化 (CH) 抗体的形成, 呈现持续加重的发展趋势^[13-14], 更加符合人体患类风湿性关节炎的病理特征。其中包括关节发红和肿胀、滑膜过度形成、炎症性细胞浸润、泛孔形成、关节软骨和骨破坏等^[15-17], 与 RA 的临床症状吻合度较好, 是抗 RA 药物研究和筛

选的理想模型。本次研究显示, 通过对黑龙江龙茎叶高、低剂量组与正常组、模型组、TG 组的数据对比, 发现黑龙江龙茎叶具有缓解足趾肿胀、降低关节炎评分、改善组织病理学变化的作用, 可初步得出黑龙江龙茎叶具有良好的抗 RA 活性。但同时, 在黑龙江龙茎叶高、低剂量组的对比中, 发现低剂量组实际效果优于高剂量组。由此猜想, 黑龙江龙药材里面存在杠柳毒苷等成分, 茎叶作为黑龙江龙植株的一部

分,其中可能也含有杠柳毒苷成分,高剂量组由于剂量过高和杠柳毒苷导致在使用中产生副作用^[3,18-21],使得CIA大鼠未能达到预期的治疗效果。

综上所述,黑龙骨茎叶高、低剂量组具有良好的体内抗RA活性,可降低CIA大鼠足趾肿胀和关节炎评分,并且能有效改善RA疾病组织病理变化,这些指标初步证实了作者的猜想,黑龙骨茎叶有望成为黑龙骨藤茎有效替代品,具有潜在的开发利用价值。

参考文献:

- [1] 邱德文,杜江.中华本草(苗药卷)[M].贵阳:贵州科技出版,2005:526-527.
- [2] 朱欣婷.黑骨藤的化学成分研究[D].贵阳:贵州大学,2007.
- [3] 安兰兰,刘育辰,刘刚,等.苗药黑骨藤研究进展及其质量标志物的预测分析[J].中华中医药学刊,2021,39(1):136-141.
- [4] 刘育辰,金文渊,刘刚,等.苗药黑骨藤石油醚部位化学成分研究[J].中药材,2018,41(7):1622-1625.
- [5] Wang Q, Yao X, Ling Y, et al. Investigation of the Mechanism of *Periploca forrestii* against Rheumatoid Arthritis with Network Pharmacology-based Analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 19(2): 2993374.
- [6] Liu Y, Li M, He Q, et al. *Periploca forrestii* Saponin Ameliorates Murine CFA-induced Arthritis by Suppressing Cytokine Production[J]. Mediators Inflamm, 2016, 25(12): 7941684.
- [7] Chen L, Li J, Ke X, et al. The Therapeutic Effects of *Periploca forrestii* Schltr. Stem Extracts on Collagen-induced Arthritis by Inhibiting the Activation of Src/NF- κ B Signaling Pathway in Rats[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 39(4): 12-19.
- [8] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid Arthritis[J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [9] Ngian GS. Rheumatoid Arthritis[J]. Aust Fam Physician, 2010, 39(9): 626-628.
- [10] McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [11] 祝清灿,邹良梅,孙宜春,等.黑骨藤药材质量标准提升研究[J].亚太传统医药,2022,18(11):38-41.
- [12] 王朴,蒙文莎,黄勇,等.微透析结合UPLC-MS/MS研究黑骨藤中3个指标成分在大鼠体内的药代动力学[J].中国中药杂志,2022,47(23):6333-6339.
- [13] Winkler A, Sun W, De S, et al. The Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4 Inhibitor PF-06650833 Blocks Inflammation in Preclinical Models of Rheumatic Disease and in Humans Enrolled in a Randomized Clinical Trial[J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73(12): 2206-2218.
- [14] Rosloniec EF, Whittington K, Proslovsky A, et al. Collagen-Induced Arthritis Mouse Model[J]. Curr Protoc, 2021, 1(12): e313.
- [15] Poutoglidou F, Pourzitaki C, Dardalas I, et al. The Use of Collagen-Induced Arthritis Animal Model on Studying Bone Metabolism[J]. Calcif Tissue Int, 2020, 107(2): 109-120.
- [16] Miyoshi M, Liu S. Collagen-Induced Arthritis Models[J]. Methods Mol Biol, 2018, 79(5): 3-7.
- [17] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced Arthritis[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1269-75.
- [18] Chen L, Tang S, Li X, et al. A Review on Traditional Usages, Chemical Constituents and Pharmacological Activities of *Periploca forrestii* Schltr[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 43(7): 113892.
- [19] Chen L, Li J, Ke X, et al. Chemical Profiling and the Potential Active Constituents Responsible for Wound Healing in *Periploca forrestii* Schltr[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 40(15): 230-241.
- [20] 刘育辰,刘刚,张树芬,等.苗药黑骨藤部分理化指标及杠柳毒苷含量的测定[J].贵州农业科学,2015,43(2):130-132,136.
- [21] 刘育辰,金文渊,刘刚,等.苗药黑骨藤石油醚部位化学成分研究[J].中药材,2018,41(7):1622-1625.

(收稿日期 2023年8月5日 编辑 王雅雯)