

白子菜提取物对急性痛风性关节炎大鼠模型抗炎作用的研究

刘昌盛,陈昉,何颖,李桂元,姚红,童娟*

(广州医科大学附属第一医院,广东 广州 510120)

[摘要] 目的 探讨白子菜提取物对急性痛风性关节炎大鼠模型抗炎作用。**方法** 将72只Wistar大鼠随机分为9组(每组8只):空白组、模型组、秋水仙碱组、白子菜水提取物低、中、高剂量组、白子菜醇提取物低、中、高剂量组。造模5 h后开始连续灌药,7 d后取材,观察各组大鼠关节炎症情况,关节组织单位面积内炎症细胞计数及检测血清白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)浓度。**结果** 中、高剂量白子菜提取物组与秋水仙碱组在足趾炎症情况显著低于模型组($P<0.05$)。在淋巴细胞、中性粒细胞计数方面各药物组显著低于模型组($P<0.05$),各药物组间无明显差异($P>0.05$)。秋水仙碱组TNF- α 表达水平显著低于模型组($P<0.05$)。秋水仙碱组及白子菜醇提取物中剂量组IL-1 β 表达水平显著低于模型组($P<0.05$)。**结论** 秋水仙碱及中剂量白子菜醇提物对急性痛风性关节大鼠模型具有抗炎免疫作用。

[关键词] 白子菜提取物;急性痛风性关节炎;抗炎免疫作用

[中图分类号]R285.5

[文献标识码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.08.007

Anti-inflammatory Effect of *Gynura divaricata* (Linn.) DC. Extract on Rat Models with Acute Gouty Arthritis

LIU Changsheng, CHEN Fang, HE Ying, LI Guiyuan, YAO Hong, TONG Juan*

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

[Abstract] **Objective** To explore the anti-inflammatory of *Gynura divaricata* (Linn.) DC. extract on rat models with acute gouty arthritis. **Methods** Seventy-two Wistar rats were randomly divided into nine groups (eight rats in each group): blank group, model group, colchicines group, ethanol extract of *G. divaricata* groups (high-dose group, middle-dose group and low-dose group), water extract of *G. divaricata* Groups (high-dose group, middle-dose group, low-dose group). After 5 h of modeling, the rats were given medicine continuously. After 7 d of treatment, the inflammatory cells among joint tissue and the concentrations of IL-1 β , TNF- α from serum were observed and determined. **Results** The foot inflammation condition of *G. divaricata* extract groups (high-dose and middle-dose) and colchicines group were significantly lower than that of model group ($P<0.05$). The lymphocytes, neutrophils among joint tissue in the medicine intervention groups were significantly lower than that of model group ($P<0.05$) and there were no significantly difference between each of the two medicine intervention groups ($P>0.05$). The expression of TNF- α in the colchicines group was significantly lower than that in the model group ($P<0.05$). The expression of IL-1 β in *G. divaricata* ethanol-extract groups and colchicines group were significantly lower than that of model group ($P<0.05$). **Conclusion** Colchicines and *G. divaricata* ethanol-extract group of middle-dose show significant anti-inflammatory effect on rat models with acute gouty arthritis.

[Keywords] *Gynura divaricata* (Linn.) DC. extract; acute gouty arthritis; anti-inflammatory and immunity effect

痛风(gout)是一种单钠尿酸盐沉积所致的晶体相关性关节病,属于代谢性风湿病范畴^[1]。白子菜是

菊科植物白子菜 *Gynura divaricata*(L.)DC.的全草。别名白仔菜、白背三七等。分布于我国南方各省区,主

[收稿日期]2015-04-28

[作者简介]刘昌盛,男,学士,技师,从事骨关节病中医药防治研究。

[通讯作者]*童娟,女,博士,主任医师,E-mail:1160739011@qq.com。

产于广西壮族地区,有清热解毒、活血化瘀、祛风消肿之功效^[2]。民间广泛用于高血压、糖尿病、高脂血症、痛风性关节炎等疾病,有“神仙草”之称^[3]。现代研究表明,本品具有降血糖、抗诱变、降血压、降血脂、消炎等作用^[4-9]。本课题组已对白子菜在痛风性关节炎中的临床防治效果进行初步观察,发现其对急性痛风性关节炎具有抗炎止痛的作用。故在此基础上,观察白子菜在痛风性关节炎大鼠模型抗炎免疫作用,以确定白子菜对急性痛风性关节炎的治疗效果及起效成份。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 wistar 大鼠 72 只(中山大学实验动物中心提供,生产许可证号 SCXK(粤)2011-0029,体质量 200~250 g, 饲养于广州医科大学实验动物中心 SPF 级实验室(使用许可证号为 SYXK(粤)2010-0104)。

1.2 主要药品及试剂

白子菜采自广州番禺区莲花山下农田,经南方医科大学中药鉴定教研室陈兴兴鉴定为菊科土三七属植物白子菜 *Gynura Divaricata* (L.) DC. 的地上部分,晒干备用。白子菜水提取液用 8 倍量水提取 2 次,第一次 2 h,第二次 1.5 h,滤过合并两次滤液浓缩至 0.5、0.25、0.125 g/mL 三种浓度备用,白子菜醇提取液用 8 倍量 75%乙醇提取 2 次,第一次 2 h,第二次 1.5 h。合并两次滤液浓缩至 1、0.5、0.25 g/mL 三种浓度备用。秋水仙碱(批号 20131101,广东彼迪药业有限公司生产)。尿酸钠(美国 sigma 公司,批号:U2875-5G);白介素-1β (interleukin-1 β, IL-1 β)、肿瘤坏死因子-α (tumour necrosis factor-α, TNF-α)酶联免疫吸附反应(ELISA)试剂盒(美国 RayBio 公司)。

1.3 主要仪器

TL4 型偏振光高倍显微镜,日本 OLYMPUS 公司生产;5810R 型高速冷冻离心机,德国 EPPN-DORF 公司生产;DG5033A 型酶标仪,上海精密科学仪器有限公司生产;9700 型聚合酶链反应扩增仪,美国 ABI 公司生产;7500H 型 qPCR 仪,美国 IN-VITROGEN 公司生产;BL-2000 医学图像分析系统,成都泰盟软件有限公司生产。

2 方法

2.1 尿酸钠结晶及尿酸钠溶液制备

根据 Coderre 记载方法改进^[10]。具体过程:无菌条件下将 800 mg 尿酸钠和 155 mL 生理盐水、1 mol/L 的 NaOH 溶液 5 mL 混合,置于烧瓶中加热煮沸至尿酸钠完全溶解,停止加热后迅速小滴滴入 1 mol/L 的无菌盐酸,出现不溶白色絮状沉淀即可终止滴加,自然降至室温后于 4 ℃、3 000 r/min 离心至晶体不再析出后,弃上清,将晶体混悬于无菌缓冲液中配成所需浓度,置于 4 ℃冰箱保存备用,停止加热后保持无菌操作。镜下可见大量单个骨针状结晶。

2.2 造模、分组及给药方法

wistar 大鼠 72 只先分为空白组及造模组,造模组参照改良后的 Cdoerre 大鼠动物模型造模方法进行造模^[10]。大鼠腹腔注射水合氯醛(30 mg/kg)麻醉,选受试大鼠左侧踝关节背侧,常规消毒后,用 5 号注射针与胫骨成 45°方向刺入左侧踝关节,除空白组予 0.1 mL 无菌缓冲液外,其他 8 组予 0.1 mL 尿酸钠溶液(50 mg/mL)注入到踝关节腔,形成急性痛风性关节炎模型。造模成功后按体重随机分为模型组,秋水仙碱组,白子菜水提取物低剂、中、高剂量组,白子菜醇提取物低、中、高剂量组。根据人、大鼠药物剂量换算公式^[11],予秋水仙碱溶液 0.2 mg/(kg·d)白子菜水提取物低剂量组 2.5 g/(kg·d)、白子菜水提取物中剂量组 5 g/(kg·d)、白子菜水提取物高剂量组 10 g/(kg·d)、白子菜醇提取物低剂量组 5 g/(kg·d)、白子菜醇提取物中剂量组 10 g/(kg·d)、白子菜醇提取物高剂量组 20 g/(kg·d)。造模 5 h 后各组予相应浓度药物 20 mL/kg 初次灌胃,空白组及模型组予 20 mL/kg 灭菌水灌胃,其后每天 1 次,共 7 次。

2.3 观测指标

2.3.1 急性关节炎症状观测 根据 Coderre 炎症指数及功能障碍指数分级评定标准^[10]设定,炎症指数评定:0 级,正常;1 级,左后足关节皮肤红斑,轻度肿胀,骨性标志可见;2 级,左后足关节明显红肿,骨性标志消失,但肿胀局限于关节部位;3 级,左后足关节以外肢体肿胀。功能障碍指数评定:0 级,正常步态,四足均匀着地;1 级,左后足着地减轻,足趾未展开,轻度跛行;2 级,左后足屈起,趾背着地,明显跛行;3 级,左后足完全离地,呈三足步态。足肿胀度评定:用足容积测量仪测量,精确到 0.1 mL。

以上指标在造模前、造模后5 h及其后每天灌胃前评估,共7次。

2.3.2 大鼠关节组织单位面积炎症细胞计数 末次灌胃3 h后水合氯醛30 mg/kg腹腔麻醉取材,取下关节组织后,10%甲醛固定48 h,脱钙剂脱钙72 h,逐级乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡,石蜡包埋,常规切片4 μm,HE染色。在光学显微镜400倍镜下选取炎症细胞最密集区域,依托BL-2000医学图像分析系统定量观察关节软组织及关节腔内炎症细胞聚集情况,计数单个镜下视野内淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞及浆细胞数。

2.3.3 大鼠血清IL-1β、TNF-α表达检测 末次灌胃3 h后水合氯醛30 mg/kg腹腔麻醉下抽取上腔静脉血4 mL,静置2 h,4 ℃下3 000 r/min离心15 min,留取血清,严格按照ELISA试剂盒说明书操作检测并计算IL-1β、TNF-α浓度。

2.4 统计方法

采用SPSS 18统计软件包进行数据统计分析。检测数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。满足正态分布的计量资料组间比较采用One-Way ANOVA检验,总体分布非正态分布的两组等级资料采用Wilcoxon秩和检

验,多组等级资料比较采用Kruskal-Wallis H检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠炎症指数、功能障碍指数、足肿胀度比较

造模后第一天各大鼠炎症指数、功能障碍指数、足肿胀度均显著高于空白组($P < 0.05$),而各造模组间无明显差异($P > 0.05$),提示造模成功。关节活动情况变化总体趋势为:造模后24~48 h大鼠关节炎症指数、功能障碍指数及足肿胀度达高峰,出现明显的造模关节局部皮肤发红、皮温升高、关节肿胀、运动障碍,并且致炎症状在达高峰后逐渐下降。炎症指数方面,造模第七天模型组显著高于空白组、白子菜醇提取物高剂量组、白子菜水提取物高剂量组及秋水仙碱组($P < 0.05$)并且这四组间无显著性差异($P > 0.05$)。功能障碍指数方面,造模第七天各组间均无显著性差异($P > 0.05$)。而足肿胀度方面,造模第七天模型组显著高于白子菜醇提取物高剂量组($P < 0.05$),其余各组与空白组、模型组间均无显著性差异($P > 0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠炎症指数、功能障碍及足趾肿胀度变化比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	造模第一天			造模第七天		
	炎症指数	功能障碍	足趾肿胀度(mL)	炎症指数	功能障碍	足趾肿胀度(mL)
空白组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.038±0.052	0.00±0.00 [#]	0.00±0.00	0.013±0.035
模型组	2.00±0.76*	1.88±0.84*	0.344±0.155*	1.25±0.71*	0.00±0.00	0.181±0.107
秋水仙碱组	2.00±0.76*	1.63±0.93*	0.263±0.103*	0.56±0.73 [#]	0.00±0.00	0.056±0.209
醇提低剂量组	2.00±0.76*	1.75±1.04*	0.325±0.125*	1.00±0.76*	0.00±0.00	0.138±0.103
醇提中剂量组	1.88±0.83*	1.50±1.07*	0.250±0.116*	0.81±0.75*	0.00±0.00	0.063±0.166
醇提高剂量组	1.88±0.64*	1.50±0.53*	0.231±0.059*	0.25±0.46 [#]	0.00±0.00	0.000±0.056 [#]
水提低剂量组	1.88±0.53*	1.88±0.64*	0.338±0.119*	0.88±0.83*	0.00±0.00	0.131±0.162
水提中剂量组	1.88±0.64*	1.50±1.07*	0.313±0.190*	0.94±0.78*	0.00±0.00	0.056±0.199
水提高剂量组	1.88±0.64*	1.63±0.74*	0.231±0.070*	0.56±0.50 [#]	0.00±0.00	0.044±0.090

注:与空白组比较 * $P < 0.05$;与模型组比较 # $P < 0.05$ 。

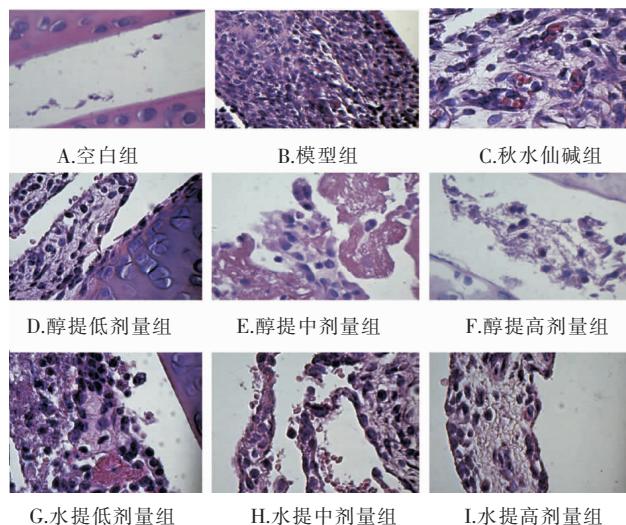
3.2 各组大鼠关节组织单位面积炎症细胞计数

淋巴细胞方面,模型组及水提低剂量组显著高于空白组($P < 0.05$),而其他各组均显著低于模型组($P < 0.05$)。肥大细胞计数方面,水提中剂量组显著高于空白组($P < 0.05$)。结果见表2。常规HE染色病理切片显微镜检发现,模型组单位面积可见大量淋巴细胞浸润,而中性粒细胞则较少,白子菜水提及醇提中、高剂量治疗组相对于低剂量组炎症

细胞数量明显减少。见图1。

3.3 各组大鼠血清IL-1β、TNF-α浓度比较

模型组大鼠血清IL-1β、TNF-α浓度均显著高于空白组($P < 0.05$);醇中组及秋水仙碱组中大鼠血清IL-1β浓度显著低于模型组($P < 0.05$),秋水仙碱组大鼠血清TNF-α浓度显著低于模型组($P < 0.05$)。其余各组分别与模型组及空白组比较无显著性差异($P > 0.05$)。结果见表2。

图1 各组大鼠关节组织改变病理学光镜图(HE, $\times 400$)

4 讨论

痛风性关节炎是一个复杂的慢性炎性组织反应,与机体抗炎免疫密切相关。免疫系统主要分为天然免疫和适应性免疫两大类。其中急性痛风性关节炎是以 IL-1 β 为核心的天然免疫为主导作用,适应性免疫则因能够产生免疫记忆效应,在炎症的持续阶段起主导作用。痛风性关节炎急性发作初期,首先是激发天然免疫使得单核细胞进入组织炎症部位,逐渐发展成为成熟的巨噬细胞吞噬 MSU 晶体并募集中性粒细胞,单核/巨噬细胞直接合成和分泌炎性因子如 IL-1 β 、TNF- α 等,其中 IL-1 β 是一个公认的重要的巨噬细胞衍生的细胞因子,是最重要的炎症

表2 各组大鼠关节组织单位面积炎症细胞计数、血清 IL-1 β 、TNF- α 浓度比较 ($(\bar{x} \pm s, n=8)$)

分组	淋巴细胞(个/400倍镜)	中性粒细胞(个/400倍镜)	肥大细胞(个/400倍镜)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
空白组	0.75±1.04 [#]	0.38±0.74 [#]	0.00±0.00	259.9±106.2	225.0±71.4
模型组	56.75±25.25*	1.25±1.75*	0.25±0.46	422.3±99.5*	317.9±70.3*
秋水仙碱组	10.13±6.85 [#]	0.38±0.74 [#]	0.25±0.46	281.5±98.8 [#]	237.1±69.3 [#]
醇提低剂量组	11.13±7.49 [#]	0.13±0.35 [#]	0.38±0.74	361.1±110.1	265.1±46.8
醇提中剂量组	7.75±6.07 [#]	0.38±1.06 [#]	0.5±1.41	307.3±107.9 [#]	252.9±69.6
醇提高剂量组	6.38±5.78 [#]	0.00±0.00 [#]	0.00±0.00	323.5±79.4	276.6±88.5
水提低剂量组	14.75±10.00 ^{*#}	0.38±0.74 [#]	0.25±0.46	366.1±88.9	275.6±59.1
水提中剂量组	9.50±7.71 [#]	0.25±0.46 [#]	0.88±1.36 [*]	344.7±117.8	250.8±66.4
水提高剂量组	8.00±4.72 [#]	0.50±0.76 [#]	0.00±0.00	350.8±99.4	282.2±80.5

注:与空白组比较 * $P<0.05$;与模型组比较 # $P<0.05$ 。

细胞因子之一,大量 IL-1 β 聚集有确切的致炎作用。除巨噬细胞外,许多类型的细胞均可产生 IL-1 β ,包括肥大细胞、树突状细胞和中性粒细胞。中性粒细胞的活化在“痛风性关节炎急性发作的二期”延续反应中起重要作用,其浸润程度与急性炎症程度正相关,IL-1 β 的激活释放往往紧随其后。在关节,IL-1 β 以自分泌方式刺激其他细胞因子的合成,其中包括 TNF- α 。而淋巴细胞则在启动和维持免疫炎症反应方面起重要作用,故在急性痛风性关节炎后期扮演重要角色,是评估炎症消退水平的重要指标^[12]。故本研究选取密切相关的淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞及 IL-1 β 、TNF- α 作为观测指标探讨。

研究结果显示,中、高剂量白子菜提取物与秋水仙碱对缓解急性痛风性关节炎大鼠炎症情况同样有效,从所得数据看,随着提取物剂量的增加,各观察指标改善程度越大,在研究中对各造模组大鼠关节组织病理切片用 400 倍镜进行观察,单位面积均可

见大量淋巴细胞浸润,而中性粒细胞则较少,提示造模第 7 天时大鼠模型处于急性痛风性关节炎后期。研究结果显示白子菜醇提、水提中高剂量及秋水仙碱组均能显著抑制急性痛风性关节炎大鼠模型局部淋巴细胞、中性粒细胞相关炎症反应,可认为白子菜醇提、水提中高剂量及秋水仙碱药物组对急性痛风性关节炎大鼠模型的急性炎症均有明确抗炎免疫作用。在对急性痛风性关节炎大鼠模型血清 IL-1 β 、TNF- α 表达的研究结果显示模型组显著高于空白组,提示急性痛风性关节炎存在上述因子相关的系统性炎症。同时本研究结果显示,醇中组及秋水仙碱组中血清 IL-1 β 浓度均显著低于模型组,提示中剂量白子菜醇提物秋水仙碱同样能有效抑制炎症相关因子 IL-1 β 的表达,其浓度差异性结果提示药物性、疗效与药物成分有相关性, TNF- α 浓度在秋水仙碱组显著低于模型组,提示秋水仙碱能有效抑制 TNF- α 的表达,各白子菜提取物组(下转第 81 页)

性。基于此条件,只须搜索和比照案例数据进行修正,即获诊疗的直接证据。但是,这在哲学上存在伪命题问题,它犯了一个对非线性动态过程的认知错误:生命的不可逆和不可重复性,使得任何关于生命的判断都是一个全新命题,你无法在生命(疾病)过程之外找到任何直接证据。如果我们了解生命的过程差异与描述边界,那么我们只能引入相似性参考机制,而不使用直接证据的说法。医疗判断,永远不是生命事实的本身,这也导致我们不能排斥医学智能路线的多种可能。当前行得通的途径应该有两条:一条是案例搜索路线,即新兴的大数据路线,从数据搜索和解析中寻求答案。这实际上是在追寻案例对象和案例记录人的思路。利用现有案例资料,为待解决的临床问题划定一个一个的假定边界,再整合为对问题的围剿态势。而实际上,当前患者疾病是一个自主过程,既有案例是另外一个自主过程,人工智能的研发变成了如何去拟合这两个自主过程。

一条是思维仿真路线,继发于原生的数学模拟路线,但不再使用数学公式作为主要算法,而是建立语义描述模型。医生头脑中都有一个知识框架,源于

(上接第29页)表达量较模型组低,但无明显差异,提示白子菜提取物存在抑制 TNF- α 表达的机制,但与秋水仙碱不全相同。在抗炎免疫作用的机制方面,IL-1 β 与 TNF- α 表达量变化的不同步均提示同种药物对两者的抑制机制亦存在差异,但其机制在本研究中未能阐明,有待进一步研究探讨。

通过本次研究得出,白子菜醇提及水提中高剂量药物组对急性痛风性关节炎大鼠模型有抗炎作用,能够不同程度加速急性痛风性关节炎症状缓解进程,白子菜醇提及水提药物剂量高低与作用效果具有相关性,此研究为药物有效成分的筛选提供思路。

参考文献:

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 原发性痛风诊断和治疗指南 [J]. 中华风湿病学杂志,2011,15(6):410~413.
- [2] 汪泓江,梁呈元,卓敏,等.Gynura 属 3 个野生蔬菜营养成分的比较及评价[J].中国野生植物资源,2004,23(5):48~49.
- [3] 洗寒梅,周蓉,韦乃球. 壮药神仙草的性状及民间应用[J]. 亚太传统医药,2007,3(9):29~30.

经验传承、标准规范等,个人进行重建。如果换成电脑,则知识框架与人脑相仿,框架按思维的语义网络模型建构,大范围整合成语义的系统性关联,使其能够围绕任何医疗对象、追随医生完成临床过程。人工智能的思维仿真,既能形成一条追随医生思路的自主路线,又能在追随中形成一条语义描述病患的自主过程。

当前,AlphaGo 春风化雨,正催生中国人工智能的第二个繁荣期。科凌力智能不能取得体量上的优势,只能继续继承朱文锋教授学术思想^[3],依托近 20 年的语义知识库积累,借互联网+的东风,在临床思维仿真的路线上高歌猛进,直逼临床医疗。

参考文献:

- [1] 朱文锋.中医数字辩证机研究技术报告(医理部分) [J].湖南中医学院学报,1980,3(1):3~5.
- [2] 李科威. 疾病模型与中西医诊断原理 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(1):28~30.
- [3] 朱文锋.创立以证素为核心的辨证新体系[J].湖南中医学院学报, 1996, 16(1):75~77.

(本文编辑 杨瑛)

- [4] 胡勇,李维林,林厚文,等.白背三七地上部分的化学成分[J].中国天然药物,2006,4(2):156~158.
- [5] 洗寒梅,陈勇,唐林.白子菜药材薄层色谱鉴别的实验研究[J],辽宁中医杂志,2008,35(2):259~260.
- [6] 洗寒梅,周蓉,韦乃球.壮药神仙草的性状及民间应用[J].亚太传统医药,2007,3(9):29~30.
- [7] 韦乃球,洗寒梅,杨柯,等.白子菜对 HepG2 细胞胰岛素抵抗改善作用的实验研究[J].时珍国医国药,2011,22(6):1 395~1 396.
- [8] 黄开珍,郝永靖,曾春晖,等.白子菜水提物对自发性高血压大鼠降血压作用的实验研究[J].中成药,2009,31(10):1 505~1 508.
- [9] 童娟,李东晓,李晓娟.白子菜提取物对高脂血症模型大鼠的降血脂作用[J].江西中医学院学报,2012,24(5):70~72.
- [10] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. Pain,1987, 28(3): 379~393.
- [11] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1 069~1 072.
- [12] Malawista SE, de Boisfleury AC, Naccache PH. Inflammatory gout: observations over a half-century [J]. FASEB J, 2011, 25(12):4 073~4 078.

(本文编辑 杨瑛)