

万年春酒镇痛、抗炎、抗类风湿性关节炎作用

冯加华¹, 卫克昭¹, 张子旭¹, 吴 欢¹, 屈战果², 章 忱³, 高建平^{1*}

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海雷允上药业有限公司, 上海 201400; 3. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

摘要: **目的** 研究万年春酒镇痛、抗炎、抗类风湿性关节炎的作用。**方法** 分别采用热水刺激诱导小鼠缩尾反应、醋酸致小鼠扭体反应、二甲苯致小鼠耳肿胀法研究万年春酒镇痛、抗炎作用。采用完全弗氏佐剂诱导大鼠类风湿性关节炎模型, II 型胶原诱导小鼠类风湿性关节炎模型, 以鼠足体积或足掌厚度、关节炎评分、关节病理组织学改变为评价指标, 研究万年春酒抗类风湿性关节炎作用。**结果** 2.5、5.0、10.0 mL/kg 万年春酒可提高小鼠热水刺激的痛阈水平, 降低醋酸引起的小鼠扭体次数, 降低二甲苯所致小鼠耳肿胀程度; 在 1.25、2.5、5.0 mL/kg 剂量下可降低完全弗氏佐剂诱导关节炎大鼠治疗后足体积或关节炎评分, 减轻大鼠踝关节病理组织学的改变; 在 5.0、10.0 mL/kg 剂量下小鼠足掌厚度或关节炎评分降低; 在 5.0 mL/kg 剂量下小鼠踝关节骨质损伤、侵蚀或破坏方面有一定改善, 骨质侵蚀程度的病理评分降低。**结论** 万年春酒对小鼠具有一定的镇痛、抗炎作用, 对完全弗氏佐剂诱导的大鼠关节炎和 II 型胶原诱导的小鼠关节炎有一定对抗作用。

关键词: 万年春酒; 镇痛作用; 抗炎作用; 抗类风湿性关节炎作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3502-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.048

万年春酒为上海雷允上药业有限公司研制生产的药酒, 其中含有的中药包括红参、枸杞子、地枫皮、玉竹、锁阳、川牛膝、淫羊藿、丹参、红花、狗脊(制)、白术(麸炒)等, 乙醇体积分数在 40%~50% 间。该药酒的主要功能与主治为补气健脾、益精滋肾、祛风活血、强壮筋骨, 用于气虚脾弱、腰膝酸软、风湿关节痛等。其中含有的地枫皮、川牛膝、淫羊藿、狗脊等中药对治疗关节炎有一定的作用。该药酒目前在临床上作为处方药使用, 使用患者有限, 临床资料少且无相应的实验研究数据为其应用提供参考, 限制了其临床使用, 故本实验对万年春酒的抗炎、镇痛和对类风湿性关节炎的治疗作用的药效学进行实验研究, 为该药酒临床用于关节炎或关节疼痛疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与给药剂量 万年春酒(上海雷允上药业有限公司, 批号 161101); 元胡止痛片(太极集团四川绵阳制药有限公司, 批号 1809005); 阿司匹林肠溶片(德国拜耳公司, 批号 BJ40065); 甲氨蝶呤片、醋酸地塞米松片(上海上药信谊药厂有限公司, 批号 036170502、015180102)。

给药剂量设计依据为万年春酒临床人用剂量(25~50 mL/次), 根据等效剂量换算倍数^[1], 人与小鼠或大鼠的等效剂量按 12 或 6 倍系数计算, 人体质量按 60 kg 计, 得到小鼠等效剂量为 5.0~10.0 mL/kg, 大鼠等效剂量为 2.5~5.0 mL/kg, 以 2 倍等比设定 3 个剂量组, 故小鼠药效

实验低、中、高剂量分别为 2.5、5.0、10.0 mL 药酒/kg, 大鼠药效实验低、中、高剂量分别为 1.25、2.5、5.0 mL 药酒/kg, 给药前将药酒原液稀释到相应剂量给药。同法计算阳性药给药剂量, 或参考相关文献中的剂量设定。

1.2 动物 清洁级 ICR、BALB/c 小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22 g; 清洁级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 180~200 g, 均购于上海斯莱克实验动物有限公司, 动物生产许可证号 SCXK(沪)2012-0002, 饲养于上海中医药大学动物实验中心, 温度 22~24 ℃, 相对湿度(40±5)%, 每天 12 h 光照。

1.3 试剂 冰醋酸、二甲苯(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20160108、F20090218)。不完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司, 批号 SLBR3 879 V); 卡介苗(上海瑞楚生物科技有限公司, 批号 A0318R19021), 将卡介苗(50 mg)和不完全弗氏佐剂(5 mL)混合配制成完全弗氏佐剂, 质量浓度 10 mg/mL; 牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司, 批号 180235), 与完全弗氏佐剂溶液按照 1:1 混合用于实验。

1.4 仪器 HH-4 型水浴锅(江苏杰瑞尔电器有限公司); JA5003AL 型天平(上海精天电子仪器有限公司); 0~10 mm 指针式测厚仪(开拓工具国际集团, 分度值 0.01 mm); Biotek Synergy HT 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); YLS-7A 型足跖体积测量仪(山东省医学科学院设备站, 编号 005090074)。

收稿日期: 2020-01-06
作者简介: 冯加华(1994—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。Tel: 17317157205; E-mail: 18317911968@163.com
* 通信作者: 高建平(1970—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为心血管药理。Tel: (021) 51322213, E-mail: zydjip@aliyun.com

2 方法

2.1 镇痛作用研究

2.1.1 小鼠热水缩尾潜伏期（痛阈） 将小鼠尾巴垂直浸入 50 ℃水浴 3 cm 左右深度，检测从水浴中回缩出水面的潜伏期（基础痛阈），10 s 内视为合格，随机分成模型组、元胡止痛片组（1.5 g/kg）及万年春酒低、中、高剂量组（2.5、5.0、10.0 mL/kg），稀释到相应剂量灌胃给药，而模型组给予等体积蒸馏水，容积均为 20 mL/kg，每天 1 次，连续 6 d。末次给药后 30、60、90、120 min，检测小鼠尾巴从 50 ℃水浴中回缩出水面的潜伏期，即为痛阈^[1]。

2.1.2 醋酸致小鼠扭体反应 将小鼠随机分为模型组、阿司匹林组（0.2 g/kg）及万年春酒低、中、高剂量组（2.5、5.0、10.0 mL/kg），灌胃给药，而模型组给予等体积蒸馏水，灌胃体积均为 20 mL/kg，每天 1 次，连续 3 d。末次给药后 1 h，各组小鼠腹腔注射 0.5% 醋酸 0.2 mL，观察 15 min 内出现扭体反应的次数，计算疼痛抑制率^[1]，公式为抑制率=〔（模型组扭体次数均值-药物组扭体次数均值）/模型组扭体次数均值〕×100%。

2.2 抗炎作用研究 小鼠随机分为模型组、阿司匹林组（0.2 g/kg）及万年春酒低、中、高剂量组（2.5、5.0、10.0 mL/kg），灌胃给药，模型组给予等体积蒸馏水，灌胃体积 20 mL/kg，每天 1 次，连续 5 d。末次给药后 1 h，小鼠右耳内廓均匀涂抹 100% 二甲苯 40 μL 致炎，左耳不涂作为对照，1 h 后颈脱椎处死，沿耳廓基线剪下双耳，用直径 8 mm 的打孔器分别在左右耳的同一部位冲下圆形耳片，电子天平称定质量，以两耳片质量差（右耳片质量-左耳片质量）为耳肿胀度，并计算耳肿胀抑制率^[1]，公式为抑制率=〔（模型组肿胀度-药物组肿胀度）/模型组肿胀度〕×100%。

2.3 抗类风湿性关节炎作用研究

2.3.1 完全弗氏佐剂诱导关节炎 造模前，测量大鼠右后踝关节以下部分体积，除正常组外各组于右后足足跖中部注射 0.1 mL 完全弗氏佐剂以诱导关节炎^[2]，1 周后测量右后足踝关节以下部分（同造模前测量位置）的足体积评价模型是否成功。造模大鼠随机分为模型组、醋酸地塞米松组（2 mg/kg）及万年春酒低、中、高剂量组（1.25、2.5、5.0 mL/kg），灌胃给药，每天 1 次，连续 4 周，而正常组、模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水，灌胃体积 10 mL/kg，每 5 d 称量 1 次大鼠体质量，根据其变化调整给药剂量，每 7 d 进行 1 次大鼠关节炎评分，测量右后足踝关节以下足体积。实验结束后，麻醉小鼠并处死，取踝关节固定、脱钙、包埋、切片后行 HE 染色，在光学显微镜下检测关节组织中滑膜细胞增生、细胞侵蚀、血管翳形成、炎症和骨质侵蚀评分。关节炎评分标准^[2-3]为 0 分，无关节炎；1 分，发红或微肿胀；2 分，中度肿胀；3 分，严重肿胀；4 分，严重肿胀且不能负重或有溃烂，出现耳部红斑、尾巴风湿结节情况的，加 1 分。关节病理评分标准^[3]为（1）滑膜细胞增

殖评分，0=无增殖；1=轻微增殖，2~4 层滑膜细胞；2=中度增殖，4 层以上滑膜细胞；3=滑膜细胞过度增殖，侵蚀软骨和骨，关节间隙消失；（2）血管翳评分，0=无改变；1=两个部位出现血管翳；2=四个部位出现血管翳，伴有软骨表面侵蚀；3=四个以上部位出现血管翳或二个部位出现大范围血管翳；（3）炎症浸润评分，0=正常；1=轻度炎症，出现 1 个聚集物或少量散在炎性细胞（T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、浆细胞）浸润；2=中度炎症，2 个或 2 个以上的白细胞聚集物；3=重度炎症，炎细胞大量浸润，大量白细胞聚集，分散浸润明显；（4）骨质侵蚀评分，0=正常；1=微量侵蚀，1~2 个小的浅部位；2=少量侵蚀，1~4 个中等大小和深度部位；3=中等侵蚀，5 个以上部位，局部侵蚀到骨皮质；4=重度侵蚀，多重损伤，局部或完全侵蚀到骨皮质；5=广泛损伤，皮质穿透骨长度的 25%。

2.3.2 II 型胶原诱导关节炎 除正常组外，其他各组小鼠尾根部注射 0.07 mL、足跖中部注射 0.03 mL 牛 II 型胶原和完全弗氏佐剂的混合乳剂以诱导关节炎^[4-5]，3 周后再次加强免疫，根据足肿胀情况确定模型是否成功。二次免疫后，小鼠随机分为模型组、甲氨蝶呤组（1 mg/kg）及万年春酒低、中、高剂量组（2.5、5.0、10.0 mL 药酒/kg），灌胃给药，而正常组和模型组小鼠灌胃等体积蒸馏水，给药剂量 20 mL/kg，每天 1 次，连续 30 d，每 7 d 评估小鼠关节炎评分，测量足掌厚度。灌胃给药 30 d 后麻醉处死小鼠，取踝关节，固定、脱钙、包埋、切片后行 HE 染色，在光学显微镜下检测关节组织中滑膜细胞增生、细胞侵蚀、血管翳形成、炎症和骨质侵蚀评分。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验，对于方差不齐者，采用 Dunnett's T₃ 检验；对于非正态分布者，采用秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 镇痛作用

3.1.1 对小鼠热水缩尾潜伏期（痛阈）的影响 与模型组比较，万年春酒各剂量组和元胡止痛片组给药后 90、120 min，痛阈值均升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），中剂量组给药后 30 min 痛阈值升高（ $P<0.05$ ），见表 1。

3.1.2 对醋酸致小鼠扭体反应的影响 与模型组比较，万年春酒各剂量组和阿司匹林组小鼠扭体反应次数降低（ $P<0.01$ ），见表 2。

3.2 抗炎作用 与模型组比较，万年春酒各剂量组和阿司匹林组小鼠耳肿胀度降低（ $P<0.01$ ），见表 3。

3.3 抗类风湿性关节炎作用

3.3.1 完全弗氏佐剂诱导关节炎

3.3.1.1 关节肿胀程度 与正常组比较，模型组大鼠足体积、关节炎评分升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，万年春酒各剂量组大鼠足体积、关节炎评分降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），见表 4~5。

表 1 万年春酒对小鼠热水缩尾潜伏期（痛阈）的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）

组别	剂量/（mL·kg ⁻¹ ）	基础痛阈/s	给药后痛阈/s		
			30 min	60 min	90 min
模型组	—	4.26±0.66	6.15±2.58	7.81±2.36	6.02±1.60
元胡止痛片组	1.5 g/kg	4.58±1.11	6.19±1.71	8.29±2.97	7.92±2.68 [*]
万年春酒低剂量组	2.5	5.24±1.48	6.59±2.67	8.75±2.71	7.96±1.45 ^{**}
万年春酒中剂量组	5.0	4.97±1.22	9.56±3.39 [*]	6.62±1.94	9.38±1.94 ^{**}
万年春酒高剂量组	10.0	5.10±1.36	6.28±1.86	7.31±2.99	8.55±3.49 [*]

注：与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

表 2 万年春酒对醋酸致小鼠扭体反应的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）

组别	剂量/（mL·kg ⁻¹ ）	扭体反应 次数/次	抑制率/ %
模型组	—	23.08±9.18	—
阿司匹林组	0.2 g/kg	12.00±6.18 ^{**}	48.01
万年春酒低剂量组	2.5	12.08±8.60 ^{**}	47.66
万年春酒中剂量组	5.0	11.83±3.90 ^{**}	48.74
万年春酒高剂量组	10.0	7.00±3.29 ^{**}	69.67

注：与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

表 3 万年春酒对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）

组别	剂量/（mL·kg ⁻¹ ）	肿胀度/mg	肿胀抑制 率/%
模型组	—	12.50±1.45	—
阿司匹林组	0.2 g/kg	6.50±1.88 ^{**}	48.0
万年春酒低剂量组	2.5	7.50±2.84 ^{**}	40.0
万年春酒中剂量组	5.0	7.33±2.61 ^{**}	41.6
万年春酒高剂量组	10.0	5.64±2.54 ^{**}	55.2

注：与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

表 4 万年春酒对完全弗氏佐剂诱导关节炎大鼠足体积的影响（mL， $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）

组别	剂量/（mL·kg ⁻¹ ）	造模前	治疗第 8 天	治疗第 15 天	治疗第 22 天	治疗第 29 天
正常组	—	0.86±0.14	0.85±0.15	0.81±0.18	0.90±0.19	0.97±0.21
模型组	—	0.90±0.15	1.78±0.48 ^{##}	1.76±0.46 ^{##}	1.78±0.37 ^{##}	1.74±0.23 ^{##}
醋酸地塞米松组	2 mg/kg	0.88±0.18	1.23±0.20 ^{**}	1.08±0.26 ^{**}	1.18±0.18 ^{**}	1.33±0.15 ^{**}
万年春酒低剂量组	1.25	0.89±0.14	1.46±0.29	1.25±0.22 ^{**}	1.34±0.16 ^{**}	1.47±0.17 ^{**}
万年春酒中剂量组	2.5	0.88±0.12	1.39±0.29 [*]	1.35±0.31 [*]	1.44±0.26 [*]	1.47±0.27 [*]
万年春酒高剂量组	5.0	0.88±0.16	1.29±0.25 ^{**}	1.18±0.22 ^{**}	1.30±0.17 ^{**}	1.45±0.19 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

表 5 万年春酒对完全弗氏佐剂诱导关节炎大鼠关节炎评分的影响（分， $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）

组别	剂量/（mL·kg ⁻¹ ）	治疗第 8 天	治疗第 15 天	治疗第 22 天	治疗第 29 天
正常组	—	0	0	0	0
模型组	—	3.00±0.95 ^{##}	3.00±0.85 ^{##}	4.17±0.58 ^{##}	4.08±0.51 ^{##}
醋酸地塞米松组	2 mg/kg	1.92±0.67 ^{**}	1.33±0.78 ^{**}	1.75±0.97 ^{**}	2.67±0.78 ^{**}
万年春酒低剂量组	1.25	2.67±0.89	1.83±1.11 [*]	2.92±1.16 ^{**}	2.83±1.27 [*]
万年春酒中剂量组	2.5	2.58±0.90	2.58±0.79	2.92±0.90 ^{**}	2.58±0.90 ^{**}
万年春酒高剂量组	5.0	2.29±1.00	2.07±0.62 ^{**}	3.21±1.25 [*]	2.57±1.16 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

3.3.1.2 踝关节病理组织学 正常组大鼠滑膜细胞覆盖在疏松结缔组织，未见滑膜细胞增生和浸润，关节软骨、骨质、关节腔间隙均正常，无炎细胞浸润；模型组大鼠滑膜细胞增生、血管翳形成、炎细胞浸润、软骨及骨质侵蚀；与模型组比较，万年春酒各剂量组和醋酸地塞米松组滑膜细胞轻度增生，少量血管翳形成、少量软骨及骨质破坏，并且中、高剂量组和醋酸地塞米松组大鼠踝关节软骨及骨

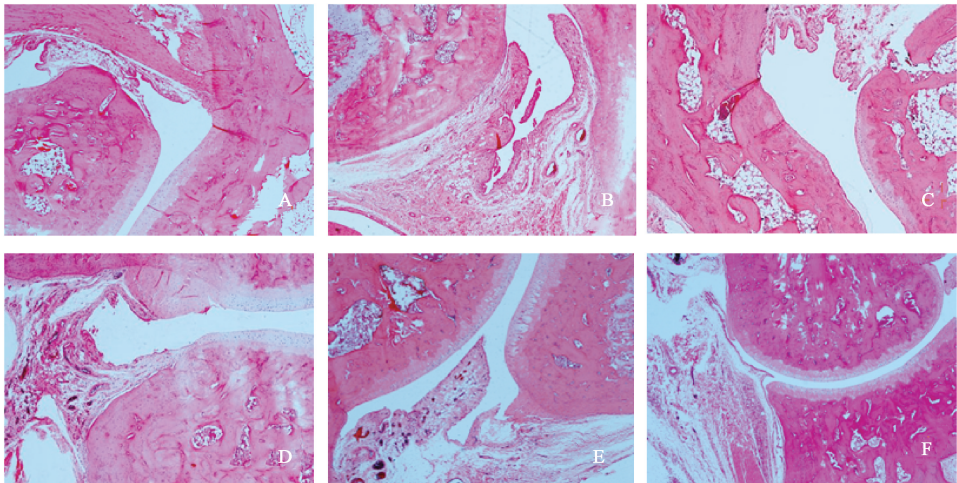
质侵蚀或破坏方面改善更明显，见图 1。

与正常组比较，模型组大鼠踝关节滑膜细胞增生、血管翳、炎细胞浸润、骨质侵蚀程度评分升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，万年春酒中剂量组大鼠踝关节炎细胞浸润、骨质侵蚀程度的病理评分降低（ $P<0.05$ ），醋酸地塞米松组和万年春酒高剂量组大鼠踝关节血管翳、骨质侵蚀程度评分降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），见表 6。

表 6 万年春酒对完全弗氏佐剂诱导关节炎大鼠踝关节病理评分的影响（分， $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

组别	剂量/（mL·kg ⁻¹ ）	滑膜细胞增生程度	血管翳程度	炎细胞浸润程度	骨质侵蚀程度
正常组	—	0	0	0	0
模型组	—	1.67±0.52 ^{##}	2.50±0.55 ^{##}	2.00±0.63 ^{##}	2.17±0.75 ^{##}
醋酸地塞米松组	2 mg/kg	1.00±0.00	1.00±0.00 ^{**}	1.33±0.52	0.83±0.75 [*]
万年春酒低剂量组	1.25	1.33±0.52	1.67±0.52	1.50±0.84	1.33±0.52
万年春酒中剂量组	2.5	1.33±0.52	1.83±0.41	1.17±0.41 [*]	1.00±0.00 [*]
万年春酒高剂量组	5.0	1.00±0.00	1.33±0.52 [*]	1.50±0.55	1.17±0.41 [*]

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为醋酸地塞米松组，D 为万年春酒低剂量组，E 为万年春酒中剂量组，F 为万年春酒高剂量组。

图 1 各组大鼠踝关节病理组织学切片（HE 染色，×50）

3.3.2 II 型胶原诱导关节炎

3.3.2.1 足掌厚度、关节炎评分 治疗第 6 天后，与正常组比较，模型组小鼠足掌厚度、关节炎评分升高（ $P<$

0.01）；与模型组比较，万年春酒中、高剂量组小鼠足掌厚度、关节炎评分降低（ $P<0.01$ ），见表 7~8。

表 7 万年春酒对 II 型胶原诱导关节炎小鼠足掌厚度的影响（mm， $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	造模前	治疗第 6 天	治疗第 13 天	治疗第 20 天	治疗第 27 天
正常组	—	1.91±0.07	1.93±0.06	1.95±0.08	2.00±0.08	2.00±0.08
模型组	—	1.85±0.11	2.82±0.28 ^{##}	2.85±0.17 ^{##}	2.96±0.19 ^{##}	2.83±0.19 ^{##}
甲氨蝶呤组	1 mg/kg	1.85±0.18	2.71±0.30 ^{**}	2.72±0.31	2.80±0.15 [*]	2.69±0.36
万年春酒低剂量组	2.5	1.89±0.10	2.68±0.43	2.68±0.34	2.72±0.33 [*]	2.65±0.31
万年春酒中剂量组	5.0	1.85±0.10	2.50±0.13 ^{**}	2.61±0.20 ^{**}	2.60±0.16 ^{**}	2.66±0.16 [*]
万年春酒高剂量组	10.0	1.85±0.09	2.55±0.16 ^{**}	2.51±0.14 ^{**}	2.65±0.19 ^{**}	2.67±0.17 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

表 8 万年春酒对 II 型胶原诱导关节炎小鼠关节炎评分的影响（分， $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	治疗第 6 天	治疗第 13 天	治疗第 20 天	治疗第 27 天
正常组	—	0	0	0	0
模型组	—	3.58±0.51 ^{##}	3.25±0.45 ^{##}	3.58±0.51 ^{##}	3.08±0.29 ^{##}
甲氨蝶呤组	1 mg/kg	3.08±0.51	3.00±0.60	3.08±0.29 [*]	3.00±0.43
万年春酒低剂量组	2.5	3.08±0.67	2.75±0.62	3.00±0.60 [*]	3.00±0.60
万年春酒中剂量组	5.0	3.17±0.83	2.83±0.39	2.83±0.39 ^{**}	3.17±0.39
万年春酒高剂量组	10.0	2.92±0.79	2.75±0.45	2.83±0.39 ^{**}	3.00±0.00

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

3.3.2.2 踝关节病理组织学 正常组小鼠踝关节正常，未见有炎细胞浸润，关节软骨正常，关节囊覆盖纤薄滑膜细胞；模型组小鼠踝关节充血，炎细胞轻度、大量或重度浸润，关节滑膜细胞轻度或中度增生，关节软骨中度破坏；大面积血管翳形成，关节间隙减小，骨质损伤或破坏或侵蚀；与模型组比较，各给药组小鼠踝关节炎细胞浸润、滑膜细胞

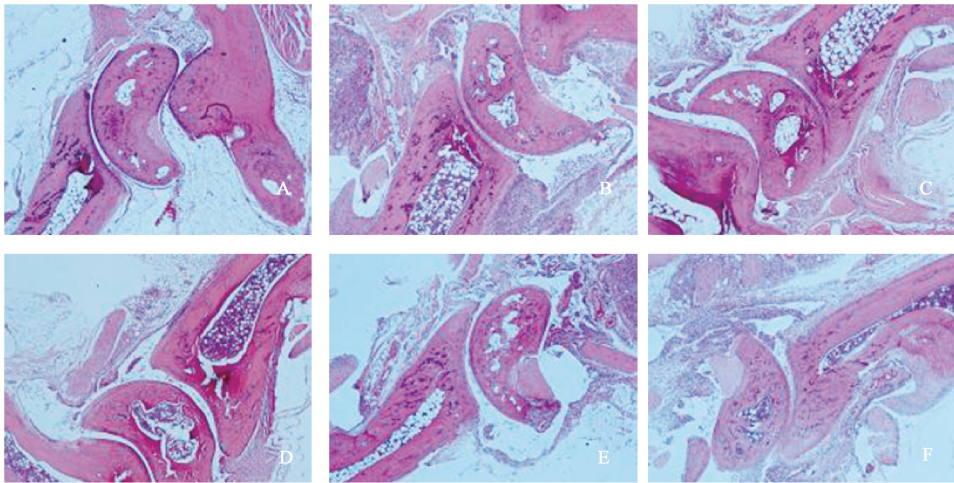
的增生、血管翳形成无明显改善，而在骨质损伤、侵蚀或破坏方面，万年春酒中剂量组有一定改善作用，见图 2。

与正常组比较，模型组小鼠踝关节滑膜细胞增生、血管翳、炎细胞浸润、骨质侵蚀程度评分均升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，万年春酒中剂量组小鼠踝关节骨质侵蚀程度评分降低（ $P<0.05$ ），见表 9。

表 9 万年春酒对 II 型胶原诱导关节炎小鼠踝关节病理评分的影响（分， $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	滑膜细胞增生程度	血管翳程度	炎细胞浸润程度	骨质侵蚀程度
正常组	—	0	0	0	0
模型组	—	2.50±0.55 ^{##}	2.50±0.84 ^{##}	2.50±0.84 ^{##}	4.50±0.84 ^{##}
甲氨蝶呤组	1 mg/kg	2.33±0.82	2.67±0.82	2.33±1.03	4.17±1.60
万年春酒低剂量组	2.5	2.33±0.52	2.67±0.52	2.50±0.55	4.00±0.89
万年春酒中剂量组	5.0	1.83±0.41	1.83±0.41	2.17±0.41	2.67±1.03 [*]
万年春酒高剂量组	10.0	2.00±0.00	2.83±0.41	2.67±0.52	3.50±0.55

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为甲氨蝶呤组，D 为万年春酒低剂量组，E 为万年春酒中剂量组，F 为万年春酒高剂量组。

图 2 各组小鼠踝关节病理组织学切片（HE 染色，×50）

4 讨论

万年春酒处方中，含有地枫皮、川牛膝、淫羊藿、狗脊等多种对关节炎的防治有很好效果的中药。处方中的地枫皮具有祛风除湿，行气止痛等功效，在治疗跌打损伤和风湿关节痛等方面具有良好功效^[6]，在临床应用中，将其制成药酒在治疗关节炎、四肢关节酸痛等方面获得了成功案例^[7]。川牛膝具有抗炎、抗超敏反应、抗痛风性关节炎等作用^[8]。临床用于治疗风湿痹痛以四肢大关节肿痛疗效佳^[9]。另外狗脊具有明显的镇痛和抗炎作用^[10]，淫羊藿是中医治疗筋骨萎软、风湿痹痛等疾病的常用中药，现代研究中关于该药及其有效成分在镇痛、抗炎、治疗类风湿性关节炎、骨性关节炎等方面的药效研究非常多见^[11]。以上中药的组成及其研究基础为该药酒用于关节痛的治疗提供了重要的依据。

关节疼痛是各种关节炎性疾病最主要的表现，是导致患者关节活动受限甚至功能丧失的主要原因，缓解疼痛是最为主要的治疗措施，可以改善患者关节的活动受限以及关节功能的退变^[12]。故本研究对万年春酒的镇痛作用进行了评价。采用热刺激造模法和化学刺激法制备 2 种常用的检测镇痛作用效果的疼痛模型，以刺激开始至出现反应的潜伏期（痛阈）或固定时间内疼痛反应的次数作为疼痛的定量指标评价药效^[1]。结果显示，万年春酒各剂量组在给药后对这物理刺激和化学刺激两种疼痛反应均有抑制作用，2.5~10.0 mL/kg 万年春酒可提高小鼠对热刺激反应的阈值，抑制醋酸致小鼠扭体反应，抑制率约为 47.66%~69.67%，提示镇痛效果显著，有效剂量相当于临床人用量 12.5~50.0 mL/次。本研究可提示该药酒对于关节疼痛的缓解具有应用价值。

关节及其周围组织的炎症反应是各种关节炎的共性，是关节疼痛、肿胀以及功能障碍等的直接诱因，因此临床上对各种类型的关节炎抗炎治疗是主要治疗措施之一。本研究采用化学物质二甲苯刺激小鼠耳廓产生急性炎性肿胀，通过肿胀程度和肿胀抑制率评价受试药物的抗炎作用。实

验结果表明，2.5~10.0 mL/kg 万年春酒可抑制二甲苯致小鼠的耳肿胀，表明其具有一定的抗炎作用，有效剂量相当于临床人用量 12.5~50.0 mL/次。本实验结果可提示万年春酒在消除急性炎症方面效果明显，可以为临床该药酒用于关节炎治疗提供实验依据。

类风湿性关节炎属于一种免疫性疾病，以对称性多关节炎为主要表现，关节处多有类风湿皮下结节、关节变形以及关节组织病理组织学的异常，常表现为炎细胞浸润、关节滑膜细胞增生、关节软骨破坏、关节间隙减小、骨质损伤等^[13]。本实验选择了公认的两个模型^[5]，弗氏佐剂诱导和Ⅱ型胶原诱导模型，通过关节肿胀百分率、关节炎评分、关节病理组织学等^[1-2]评价药物作用。本研究结果显示，从灌胃给药治疗第 8 天开始，1.25~5.0 mL/kg 万年春酒降低了关节肿胀的体积和/或关节炎评分，对关节的病理组织学的异常有改善作用；在Ⅱ型胶原诱导关节炎模型实验中，从灌胃给药治疗第 6 天开始，5.0~10.0 mL/kg 万年春酒降低了足掌厚度和/或关节炎评分，5.0 mL/kg 万年春酒对关节的病理组织学的异常有改善作用。实验结果提示万年春酒有抗类风湿性关节炎作用，可以作为该药酒用于缓解风湿关节痛的关节肿胀、变形和病理组织学异常的参考依据，有效剂量相当于临床人用量 25.0~50.0 mL/次。

综上所述，本实验结果可提示万年春酒具有镇痛和抗炎作用，对类风湿性关节炎的关节炎症和关节病理组织学改变有缓解作用，为其临床治疗关节炎症性疾病提供实验依据。

参考文献：

[1] 魏 伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71; 742-774.
[2] 陈 琦, 张伯礼. 中药药效研究方法学[M]. 1 版. 北京: 人民卫生出版社., 2016: 404-405; 550-552.
[3] 李培培, 解国雄, 宋珊珊, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(5): 453-457.
[4] 邢聪聪, 孙广臣, 鲍春梅, 等. BALB/c 小鼠胶原诱导关节

炎模型的建立方法及特征分析[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 209-213.

[5] 任妮娜, 凌 益, 姚血明, 等. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(10): 62-67.

[6] 孟小暇, 王满莲, 梁惠凌. 喀斯特地区药用植物地枫皮的研究进展[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(1): 13-19.

[7] 姚小琴. 地枫皮酒治疗风湿性关节炎 11 例[J]. 浙江中西医结合杂志, 1996, 6(3): 178.

[8] 尚风琴. 怀牛膝与川牛膝功能活性成分的比较研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2016.

[9] 叶品良, 彭 娟, 刘 娟. 川牛膝研究概况[J]. 中医药学报, 2007, 35(2): 51-53.

[10] 赵敏杰, 鞠成国, 林桂梅, 等. 狗脊不同炮制品的抗炎作用及其机制研究[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1990-1993.

[11] 卢 芳, 张 凯, 刘树民. 基于抗风湿作用的淫羊藿拆分组分筛选研究[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(1): 105-110.

[12] 郭金婉, 张建中, 赵序利. 关节痛的病因研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(12): 881-885.

[13] 郭惠芳, 高丽霞. 2016 年风湿免疫病主要临床研究进展[J]. 临床荟萃, 2017, 32(2): 146-151.

艾柱挥发油和燃烧产物成分 GC-MS 分析及抗氧化活性比较

陈如一, 史悦悦, 张晓熙, 赵鑫钰, 夏道宗*
(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** GC-MS 分析艾柱挥发油和燃烧产物成分及抗氧化活性比较。**方法** 通过超临界二氧化碳萃取设备提取艾柱挥发油, 特定装置收集艾柱燃烧产物, 采用 GC-MS 对艾柱挥发油和燃烧产物中的化学成分进行分析; 通过自由基清除 (DPPH、ABTS⁺) 和总抗氧化能力 (FRAP 法) 测定比较两者的体外抗氧化活性。**结果** 从艾柱挥发油中鉴定出 34 种挥发性成分, 其中主要成分是 γ -谷甾醇 (7.67%)、 α -生育酚 (6.30%)、乙酸羽扇醇酯 (5.10%)、亚油酸 (5.10%) 等; 从艾柱燃烧产物中亦鉴定出 34 种成分, 主要成分是苯酚 (3.01%)、3-呋喃甲醇 (2.77%)、邻苯二甲酸二丁酯 (2.41%)、豆甾醇 (2.18%) 等。艾柱挥发油和燃烧产物对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值分别为 1 127、85.6 $\mu\text{g/mL}$, 对 ABTS⁺ 自由基的平均 IC₅₀ 值分别为 327.2、81.9 $\mu\text{g/mL}$, FRAP 均值分别为 0.278 4、0.802 mmol/L FeSO₄。**结论** 艾柱挥发油和燃烧产物在成分组成上存在较大差异, 艾柱燃烧产物的抗氧化活性明显优于艾柱挥发油。**关键词:** 艾柱; 挥发油; 燃烧产物; 抗氧化活性
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3507-06
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.049

艾叶为菊科蒿属植物艾 *Artemisia argyi* Lévi. et Vant. 的干燥叶, 为 2020 年版《中国药典》一部所收录的中药材。艾叶性温, 味辛、苦, 归肝、脾、肾经, 具有温经止血、散寒止痛、理气安胎等功效^[1]。艾柱是由艾叶加工的艾绒填充而成的柱状物, 常用于中医药养生保健。研究表明, 艾柱含挥发油、黄酮、萜类及多糖等成分, 具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化等多种药理作用^[2-3]。艾灸疗法是传统针灸的重要组成部分, 是一种由经络调节、温热效应、燃烧产物的成分共同作用的综合效应。艾柱的燃烧产物较为复杂, 文献报道其成分差异较大, 除了与燃烧原材料有关外, 还与燃烧装置、测定方法等有关^[4]。

氧化应激是机体或细胞内氧化/抗氧化平衡失调的病理状态, 在多种疾病的发生发展中起着重要作用^[5]。目前有关

艾叶抗氧化功能的文献报道较多^[6], 但关于其加工产品艾柱的研究很少。郭太虎等^[7]研究发现艾灸可使 *D*-半乳糖所致衰老大鼠脑组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性升高, 丙二醛 (MDA) 水平下降, 提示艾灸具有较好的抗氧化效果。因此, 本研究主要对艾柱挥发油和燃烧产物成分进行 GC-MS 分析, 并通过自由基清除法和总抗氧化能力测定法比较其抗氧化活性, 以期为深入分析艾柱及艾灸作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 7890-5977A 型气相色谱-质谱仪 (美国 Agilent 公司); Concentrator Plus 真空浓缩仪、移液枪 (德国 Eppendorf 公司); HA120-50-01 超临界萃取装置 (中国南通华安公司); Synergy H1 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); RE52CS-1 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); SHB-

收稿日期: 2020-02-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673656, 82074085); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划 (2018R410032)

作者简介: 陈如一 (1996—), 男, 硕士生, 从事中药药理学研究。Tel: 15700068486, E-mail: 498996135@qq.com

* 通信作者: 夏道宗 (1978—), 男, 博士, 教授, 从事中药药理学研究。Tel: (0571) 61768535, E-mail: xiadaozong@zcmu.edu.cn

网络出版日期: 2020-12-01

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20201201.1416.004.html>