

丰城鸡血藤抗类风湿性关节炎活性部位的筛选

程玉瑶¹, 金 晨², 陈 康¹, 项 沁¹, 曹光照¹, 张 凌^{1*}

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 鉴定丰城鸡血藤各提取物化学结构, 筛选该药物抗类风湿性关节炎的活性部位并探讨其作用机制。**方法** 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS, 分别在正离子扫描模式下对各提取物中化学成分进行定性分析。建立 II 型胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠模型, 记录大鼠体重变化趋势、足趾容积变化、关节炎指数, 测定大鼠胸腺、脾脏指数, 炎症因子 TNF- α 、IL-6、CRP 和免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 水平。**结果** 与模型组比较, 三氯甲烷部位和乙酸乙酯部位给药组大鼠体重增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 足趾肿胀度、关节炎指数、免疫器官指数、炎症因子和免疫球蛋白水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且均优于正丁醇部位给药组。**结论** 丰城鸡血藤三氯甲烷部位和乙酸乙酯部位有良好的抗类风湿性关节炎作用, 其作用可能与降低血清炎症因子 TNF- α 、IL-6、CRP 水平有关。

关键词: 丰城鸡血藤; 类风湿性关节炎; 活性部位; 免疫球蛋白; 炎症因子

中图分类号: R282; R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)06-1984-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.040

丰城鸡血藤 *Callerya Nitida Benth* var. *Hirsutissima*. Z. Wei 为豆科崖豆藤属植物的干燥藤茎, 其作为传统中药具有活血补血、舒经活络之功效, 主要活性成分为黄酮类化合物。余湾湾等^[1]利用硅胶柱色谱、反相硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和制备液相色谱等各种色谱技术对丰城鸡血藤进行化学成分分离和纯化, 从乙醇部位中分离鉴定了 9 个异黄酮类化合物。何玉琴等^[2]对丰城鸡血藤正丁醇和石油醚部位进行分离, 得到 12 个黄酮类化合物。这类化合物在文献中被报道具有广泛的治疗作用, 包括抗氧化、抗炎、抗菌、抗血栓、抗肿瘤、抗病毒和预防心脏疾病^[3-6]。IL-6 作为炎症通路的重要介质之一, 主要通过诱导肝细胞合成多种急性反应蛋白 (如 CRP) 和诱导炎症因子 (如 TNF- α) 的产生, 增强其炎症破坏作用, 介导类风湿性关节炎滑膜炎^[7]。黄酮类化合物能够降低大鼠血清中 CRP^[8]、IL-6、TNF- α 水平^[9]。

UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术是目前药学领域应用最广泛的技术, 具有高效、快速、高灵敏度和高分离度等特点, 可以同时检测多个化合物^[10], 通过二级质谱的裂解规律结合文献对比推测出化合物的结构。课题组拟通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析和鉴定出丰城鸡血藤三氯甲烷部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位中的主要化学结构, 并观察其对胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠的影响, 对比不同部位化合物的差别, 筛选出丰城鸡血藤抗类风湿性关节炎的活性部位, 初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物 丰城鸡血藤采于江西省丰城市铁道乡, 经鉴定为正品。70% 乙醇提取后依次用三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 即得三氯甲烷部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位。甲氨蝶呤片 (上海上药信谊药厂有限公司); 牛源性 II 型胶原、不完全弗氏佐剂 (IFA) (美国 Chondrex 公司); 水合氯醛 (上海麦克林生化科技股份有限公司); IL-6、TNF- α 、CRP 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 动物 SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~200 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。

1.3 仪器 AB SCIEX TripleTOF5600 型质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); YLS-7B 型足趾容积测量仪 (济南益延科技发展有限公司); 全波长扫描式酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); 匀浆机 (德国 Fluko 公司)。

2 方法

2.1 供试品制备 将采集到的新鲜丰城鸡血藤切片晒干, 取丰城鸡血藤药材 20 kg, 70% 乙醇连续加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 将提取物依次萃取得丰城鸡血藤三氯甲烷部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 临用时用 0.5% CMC-Na 溶液配制成 25 mg/kg 溶液。精密称取三氯甲烷部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位浸膏

收稿日期: 2021-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81460595, 81960697)

作者简介: 程玉瑶 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药分析研究。Tel: (0791) 87118731, E-mail: 1287236165@qq.com

* 通信作者: 张 凌 (1962—), 女, 教授, 博士生导师, 从事药物成分分析和质量标准及中药药效与活性成分研究。Tel: (0791) 87118731, E-mail: dw64810@163.com

2 mg, 加甲醇配制成 2 mg/mL 溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 色谱-质谱条件

2.2.1 色谱 Waters C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 程序见表 1; 柱温 30 ℃; 体积流量 0.25 mL/min; 进样量 2 μL。

表 1 洗脱程序

t/min	A 0.1% 甲酸水/%	B 乙腈/%
0	95	5
25	70	30
30	60	40
40	5	95
45	5	95
50	95	5

2.2.2 质谱 离子源为 ESI, 扫描模式为正离子模式; 离子喷雾电压 4.5 kV; 干燥气温度 500 ℃; 气帘 40.00 psi (1 psi=6.895 kPa); 雾化气 GS1 50.00 psi; 辅助加热气 GS2 50.00 psi; 裂解电压 (DP) 100 V; 飞行时间一级质谱质量范围 m/z 100~1 500; 飞行时间二级质谱质量范围 m/z 50~1 200; 碰撞能 (CE) 10 eV; 使用 peakview 软件对数据进行分析。

2.3 模型建立 大鼠适应性喂养 7 d 后, 将 60 只大鼠随机分成空白组、模型组、甲氨蝶呤组 (阳性组) 和丰城鸡血藤三氯甲烷部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组。除空白组外, 均建立 CIA 模型, 将Ⅱ型胶原 (2 mg/mL) 加入等体积不完全弗氏佐剂中, 用匀浆机水浴乳化。取乳化后的混悬剂以 200 μg/只于大鼠尾根部皮下注射。初次免疫 7 d 后加强免疫, 100 μg/只于大鼠尾根部皮下注射。空白组相同位置注射等量生理盐水^[11]。

2.4 给药 初次免疫 14 d 后开始给药, 三氯甲烷部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组给药剂量均为 250 mg/kg, 每天 1 次; 阳性组给予 1 mg/kg 甲氨蝶呤, 每周 1 次; 空白组和模型组给予等量 0.5% CMC-Na 溶液, 每天 1 次, 各组连续灌胃给药 35 d。

2.5 关节炎指数 (AI) 评分 造模前后记录大鼠关节病变程度, 造模后第 14 天开始, 每 7 d 记录 1 次。参照 5 级评分法^[12] (0 分, 无明显肿胀; 1 分, 足趾关节轻微红肿; 2 分, 足趾关节红肿明显; 3 分, 足趾严重肿胀; 4 分, 包括踝关节在内的整个足肿胀) 评价其炎症指数。将大鼠两后肢关节的病变程度累积分, 最高分记为 8 分。

2.6 指标检测 记录造模前和造模 14 d 后大鼠的体质量和足趾肿胀度 (后肢膝关节周长), 每 7 d 记录 1 次。末次给药第 2 天, 取大鼠胸腺和脾脏, 并计算胸腺和脾脏指数。腹主动脉取血, 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min, 分离上层血清, 于-80 ℃下保存。按照试剂盒说明书操作检测血清 IL-6、TNF-α、CRP、IgG、IgM、IgA 水平。

2.7 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, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 丰城鸡血藤提取物成分鉴定 丰城鸡血藤各提取物总离子流图见图 1~3, 并应用 Peakview1.6 软件, 根据化合物分子式、二级质谱碎片信息, 参考质谱裂解规律鉴定推测出化学结构, 见表 2。分别在三氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位中得到 23、29、31 个化合物的准确分子量。其中 3 个部位提取物共同化合物 11 个, 三氯甲烷部位和乙酸乙酯部位提取物共同化合物 4 个, 分别为圆荚草双糖苷、白当归素、澳白檀苷和染料木素。

3.2 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠体质量的影响 如图 4 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠体质量增长趋势减缓 ($P<0.01$); 与模型组比较, 丰城鸡血藤各提取物组大鼠体质量增长趋势都有不同程度的提高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 其中三氯甲烷部位组和乙酸乙酯部位组体质量增长趋势优于正丁醇组。

3.3 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠足肿胀度的影响 如图 5 所示, 与空白组比较, 模型组在造模 14 d 后 (即第 2 次测量时), 足肿胀度增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 丰城鸡血藤各提取物组大鼠足肿胀度均有不同程度的降低 ($P<0.01$), 其中以乙酸乙酯部位组降低最明显。甲氨蝶呤组在给药 28 d 时几乎恢复正常, 无明显肿胀。

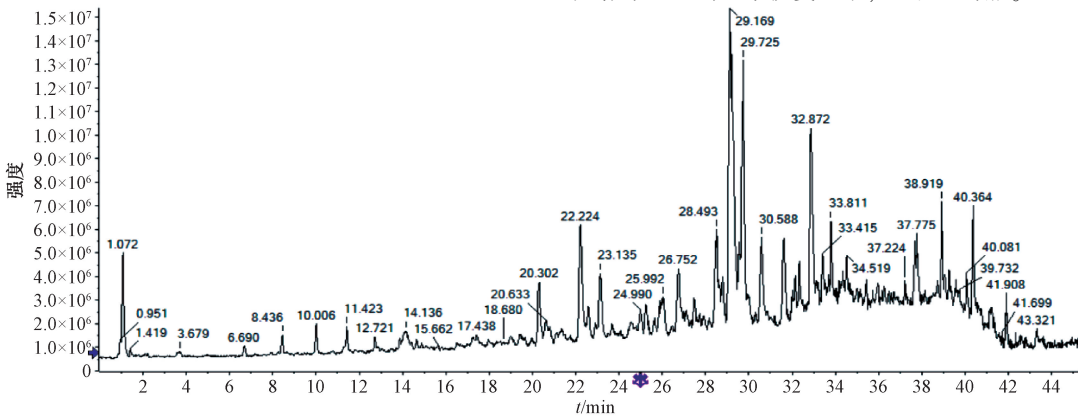


图 1 丰城鸡血藤三氯甲烷提取物总离子流图

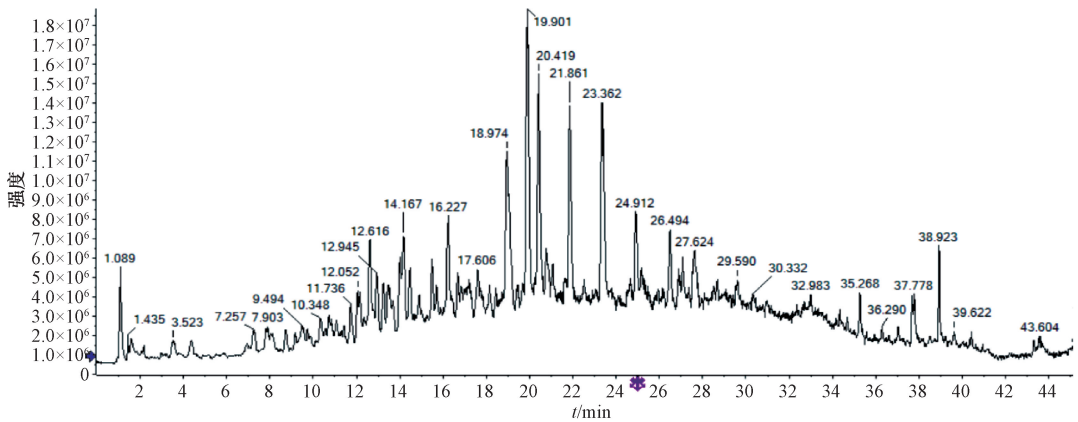


图 2 丰城鸡血藤乙酸乙酯提取物总离子流图

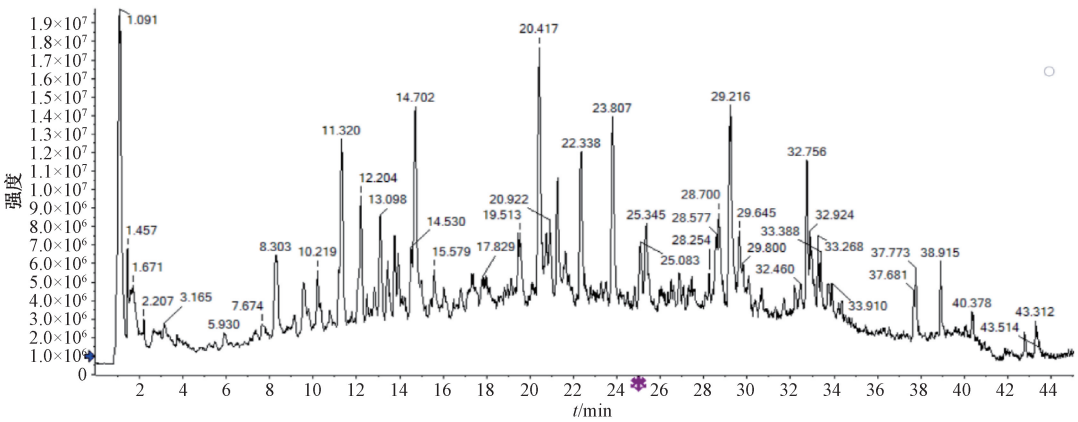


图 3 丰城鸡血藤正丁醇提取物总离子流图

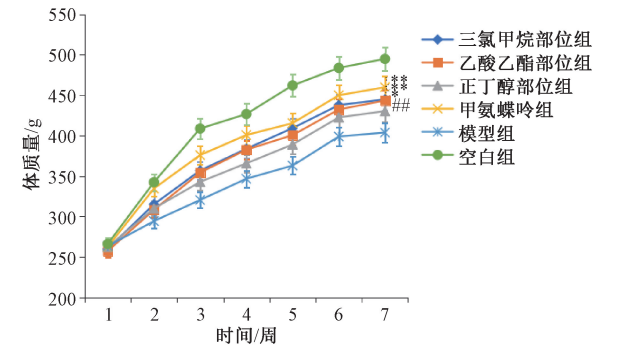
表 2 丰城鸡血藤提取物化学成分

序号	t_R /min	测定值	理论值	误差($\times 10^{-6}$)	碎片离子	分子式	化合物
1	3.60	155.033 6	154.026 6	-1.8	155.910 5,137.023 6,109.028 9	$C_7H_6O_4$	龙胆酸 Δ^*
2	4.92	291.086 1	290.079 0	-0.7	207.063 1,147.043 8,139.038 3,123.044 0	$C_{15}H_{14}O_6$	儿茶素 Δ^*
3	5.51	139.039 1	138.031 7	1.0	139.050 7,121.028 5	$C_7H_6O_3$	4-羟基苯甲酸 Δ
4	8.03	307.080 9	306.074 0	-1.1	307.089 1,201.054 2,161.058 2,147.045 2	$C_{15}H_{14}O_7$	没食子儿茶素 Δ
5	8.53	467.155 1	466.147 5	0.6	305.102 7,179.071 7,147.044 6,139.039 7	$C_{22}H_{26}O_{11}$	3,5,7,4'-四羟基-3'-甲氧基黄烷-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 Δ^*
6	9.45	741.224 3	740.216 4	0.8	595.164 0,433.111 7,271.060 1	$C_{33}H_{40}O_{19}$	丰城鸡血藤异黄酮苷 Δ^{**}
7	11.02	417.117 9	416.110 7	-0.4	255.065 7,207.070 3,199.074 7	$C_{21}H_{20}O_9$	大豆苷 Δ^*
8	11.26	593.186 9	592.179 2	0.7	285.076 6,270.053 0	$C_{28}H_{32}O_{14}$	mncodianin F Δ^{**}
9	11.41	449.107 4	448.100 6	-1.0	287.055 4,269.044 7,241.049 8	$C_{21}H_{20}O_{11}$	山柰酚-3-O-D-吡喃葡萄糖苷 Δ^*
10	11.74	477.138 8	476.131 9	-0.7	315.086 7,300.063 3	$C_{23}H_{24}O_{11}$	奥刀拉亭 7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 Δ^*
11	13.04	565.155 6	564.147 9	0.8	427.125 0,391.141 3,295.005 3	$C_{26}H_{28}O_{14}$	圆荚草双糖苷 Δ^{Δ}
12	14.10	181.049 4	180.042 3	-1.0	181.046 8,163.018 3,145.021 5	$C_9H_8O_4$	咖啡酸 Δ^*
13	14.47	433.112 7	432.105 7	-0.6	271.060 7,253.049 8,243.065 4,215.070 4	$C_{21}H_{20}O_{10}$	染料木苷 Δ^*
14	14.84	609.181 7	608.174 1	0.4	447.129 5,285.076 8	$C_{28}H_{32}O_{15}$	biochanin A O-glucosylglucoside Δ^*
15	16.02	463.123 9	462.116 2	0.8	301.071 7,286.043 8	$C_{22}H_{22}O_{11}$	peonidin-3-O- β -galactoside Δ^*
16	16.23	301.070 6	300.063 4	-0.2	301.070 8,286.046 9,269.044 3,229.049 2,153.017 6	$C_{16}H_{12}O_6$	山柰素 Δ^*
17	18.81	335.112 1	334.105 3	-1.3	335.174 4,209.077 4,183.063 5,177.054 1,139.039 0	$C_{17}H_{18}O_7$	白当归素 Δ^{Δ}
18	20.30	431.134 1	430.126 4	0.9	269.081 4,254.057 6,237.054 3,213.090 9	$C_{22}H_{22}O_9$	芒柄花苷 Δ^{Δ^*}
19	20.31	255.065 3	254.057 9	0.3	255.065 6,237.054 7,199.075 5,181.065 0,152.063 0,137.023 6	$C_{15}H_{10}O_4$	大豆黄素 Δ^{Δ^*}
20	20.42	461.144 7	460.137 0	1.0	299.091 1,284.067 4,256.073 0	$C_{23}H_{24}O_{10}$	wistin Δ^*

续表 2

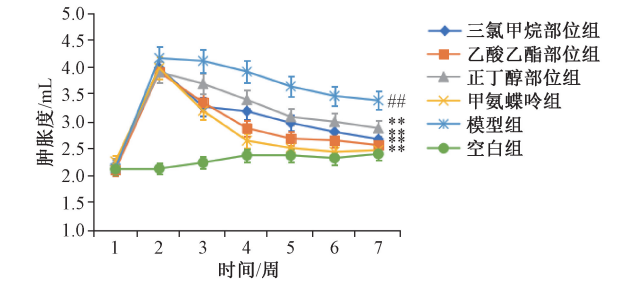
序号	t _R /min	测定值	理论值	误差(×10 ⁻⁶)	碎片离子	分子式	化合物
21	20.42	299.091 4	298.084 1	0.1	299.091 5,284.068 3,256.073 2	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	3',7-dimethoxy-3-hydroxyflavone ^{△★}
22	20.81	461.144 0	460.137 0	-0.4	299.091 8,284.068 0	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	7-羟基-6,4'-二甲氧基异黄酮-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 [▲]
23	20.88	287.055 1	286.047 7	0.4	287.055 8,269.044 7,241.049 3,213.053 1,153.019 1	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素 ^{▲△★}
24	21.30	289.070 9	288.063 4	0.9	289.068 7,163.035 9,153.017 2,145.026 8,117.033 1	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone ^{▲△★}
25	23.25	315.086 7	314.079 0	1.3	315.086 5,300.063 6,299.056 1	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	3,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone [★]
26	23.68	579.170 4	578.163 6	-0.8	447.129 2,285.076 3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	澳白檀苷 ^{▲△}
27	24.91	447.128 8	446.121 3	0.6	285.075 5,229.085 4,153.009 8	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	印度黄檀苷 ^{△★}
28	24.98	271.060 1	270.052 8	0.1	243.084 3,215.073 9,153.063 4,141.074 8,115.064 8	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	染料木素 ^{▲△}
29	25.00	273.075 5	272.068 5	-0.9	273.073 9,153.018 4,147.044 0,137.024 1	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素 ^{▲△★}
30	25.23	447.128 6	446.121 3	0.0	285.076 5,270.051 9,253.049 1	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	biochanin-7-O-glucoside [▲]
31	25.64	317.102 3	316.094 7	0.9	317.102 5,167.069 9,163.039 6,134.037 4,123.045 1	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	5,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone ^{▲★}
32	28.49	283.060 2	282.052 8	0.4	283.059 8,253.049 3,225.054 3	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	毛蕊异黄酮 ^{▲★}
33	28.65	257.080 8	256.073 6	-0.2	257.082 1,147.044 5,137.024 3,119.050 0	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	异甘草素 ^{▲△★}
34	29.13	269.080 9	268.073 6	0.4	269.080 1,253.048 8,225.054 3,197.059 3,181.064 2,169.064 5,118.041 4	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	刺芒柄花素 ^{▲△★}
35	29.72	299.091 4	298.084 1	0.0	299.089 5,283.059 0,267.064 1,255.064 4,238.061 8	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	7-hydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone [▲]
36	30.01	301.070 9	300.063 4	0.8	299.054 1,284.036 7,255.065 5,239.034 1	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	红车轴草素 [▲]
37	31.62	271.096 6	270.089 2	0.5	161.069 7,147.044 2,137.060 4,123.044 5	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	c7-羟基-6-甲氧基二氢黄酮 ^{▲★}
38	32.87	285.076 0	284.068 5	1.0	285.075 7,270.052 0,257.080 8,242.057 2,229.085 9,213.054 7	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	鹰嘴豆芽素 A ^{▲△★}
39	33.80	283.096 7	282.089 2	0.8	283.097 6,268.073 4,240.078 6,208.051 5,118.041 2	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	4',7-二甲氧基异黄酮 ^{▲△★}
40	39.54	425.377 7	424.370 5	-0.3	425.212 7,407.364 0,257.227 0,229.194 1,149.134 9,135.117 2,107.087 2	C ₃₀ H ₄₈ O	羽扇豆酮 ^{▲△★}
41	40.51	413.378 0	412.370 5	0.5	395.366 4,353.082 2,255.208 9,213.279 0,145.028 4	C ₂₉ H ₄₈ O	豆腐醇 ^{▲★}

注: ▲为三氯甲烷提取物中鉴定出的化合物, △为乙酸乙酯提取物中鉴定出的化合物, ★为正丁醇提取物中鉴定出的化合物。



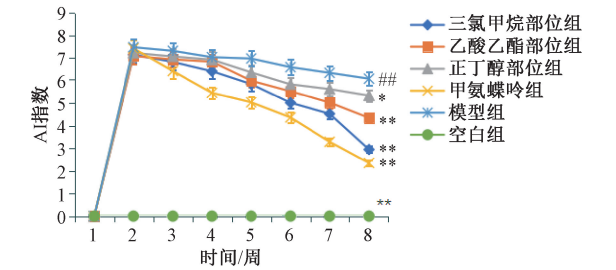
注: 与空白组比较, ###*P*<0.01; 与模型组比较, **P*<0.05, ***P*<0.01。
图 4 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

3.4 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠关节炎指数的影响 如图 6 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠 AI 评分升高 (*P*<0.01), 在初次免疫后第 14 天达到顶峰 (即第 2 次测量); 与模型组比较, 丰城鸡血藤各提取物组大鼠关节炎指数评分均降低 (*P*<0.01)。



注: 与空白组比较, ***P*<0.01; 与模型组比较, ***P*<0.01。
图 5 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠足肿胀度的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

3.5 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠免疫器官的影响 如表 3 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠胸腺和脾脏指数均升高 (*P*<0.01); 与模型组比较, 正丁醇部位组大鼠胸腺指数和脾脏指数无明显变化 (*P*>0.05), 三氯甲烷部位组和乙酸乙酯部位组大鼠胸腺和脾脏指数均降低 (*P*<0.05, *P*<0.01)。结果表明, 丰城鸡血藤三氯甲烷部位和乙酸乙酯部位抗类风湿性关节炎作用可能与免疫系统有关。



注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01。

图 6 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠关节炎指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

表 3 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠胸腺和脾脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组别	胸腺指数	脾脏指数
空白组	0.96±0.87	2.62±1.06
模型组	1.29±0.77 ^{##}	3.46±0.90 ^{##}
甲氨蝶呤组	1.03±0.60 ^{**}	2.71±0.57 ^{**}
三氯甲烷部位组	0.92±0.80 ^{**}	2.94±0.98 ^{**}
乙酸乙酯部位组	1.08±1.23 [*]	2.92±0.92 ^{**}
正丁醇部位组	1.20±0.99	3.23±1.09

注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01。

3.6 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠血清 TNF-α、IL-6、CRP 水平的影响 如表 4 所示，与空白组比较，模型组大鼠血清 TNF-α、IL-6、CRP 水平升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，甲氨蝶呤组、三氯甲烷部位组和乙酸乙酯部位组大鼠血清 TNF-α、IL-6、CRP 水平均降低 (*P*<0.05, *P*<0.01)，正丁醇部位组 IL-6 水平降低 (*P*<0.01)，TNF-α、CRP 水平无明显变化 (*P*>0.05)。

表 4 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠血清 TNF-α、IL-6、CRP 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组别	TNF-α/ (pg·mL ⁻¹)	IL-6/ (pg·mL ⁻¹)	CRP/ (ng·mL ⁻¹)
空白组	151.51±10.33	106.00±9.29	280.95±15.20
模型组	290.77±17.12 ^{##}	227.62±19.62 ^{##}	408.85±13.59 ^{##}
甲氨蝶呤组	196.02±17.99 ^{**}	132.34±14.45 ^{**}	310.87±8.48 ^{**}
三氯甲烷部位组	223.47±7.46 ^{**}	140.98±8.02 ^{**}	336.37±21.54 ^{**}
乙酸乙酯部位组	255.97±11.64 ^{**}	174.46±15.01 ^{**}	354.69±6.71 [*]
正丁醇部位组	280.68±7.44	193.97±9.85 ^{**}	398.75±9.17

注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01。

3.7 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 水平的影响 如表 5 所示，与空白组比较，模型组大鼠血清 IgG、IgM、IgA 水平均升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，甲氨蝶呤组和丰城鸡血藤各提取物组大鼠血清 IgG、IgM、IgA 水平均降低 (*P*<0.05, *P*<0.01)。

4 讨论

类风湿关节炎是一种炎症性自身免疫疾病，其主要病理特点为关节结构破坏和大量炎性细胞浸润、分泌^[13]。该病发病机制复杂，有研究发现，滑膜中的炎症反应导致周

表 5 丰城鸡血藤提取物对 CIA 大鼠血清 IgG、IgM、IgA 水平的影响 (ng/mL, $\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组别	IgG	IgM	IgA
空白组	13.75±3.92	6.49±1.05	37.07±8.89
模型组	25.48±5.08 ^{##}	19.46±1.48 ^{##}	183.61±14.93 ^{##}
甲氨蝶呤组	15.73±2.33 ^{**}	8.53±0.84 ^{**}	59.47±10.47 ^{**}
三氯甲烷部位组	17.82±3.79 ^{**}	9.04±1.36 ^{**}	82.10±4.79 ^{**}
乙酸乙酯部位组	20.94±1.76 ^{**}	14.77±2.77 ^{**}	126.52±8.67 ^{**}
正丁醇部位组	23.80±2.49 ^{**}	17.93±5.76 [*]	143.36±17.06 ^{**}

注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01。

围炎症细胞的内流以及局部细胞的激活，释放的细胞因子在慢性炎症反应中起着关键作用^[14]。在分子水平，IL-6^[15]、IL-17^[16]、TNF-α^[17]、CRP^[18]等细胞因子导致的免疫损害，是引起类风湿性关节炎的关键因素^[19]。

本研究发现，丰城鸡血藤三氯甲烷提取物和乙酸乙酯提取物均能降低 CIA 大鼠足趾肿胀度、炎症因子 TNF-α、CRP、IL-6 和免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 水平，从而达到治疗类风湿性关节炎的作用。推测丰城鸡血藤三氯甲烷提取物和乙酸乙酯提取物抗关节炎的作用机制可能与其有效下调血清相关炎症因子水平有关。表明了丰城鸡血藤抗类风湿性关节炎的活性部位为三氯甲烷部位和乙酸乙酯部位。其物质基础不仅与共有化合物圆荚草双糖苷、白当归素、澳白檀苷和染料木素有关，更值得一提的是丰城鸡血藤各提取物中丰富的化学成分和各成分相互作用的关系在抗关节炎中起着重要的作用。后续实验将着手于筛选丰城鸡血藤抗关节炎的药效物质基础，研究含量、疗效与副作用的关系。

参考文献:

[1] 余弯弯, 金 晨, 张 凌, 等. 丰城鸡血藤异黄酮及黄酮类化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2363-2366.

[2] 何玉琴, 金 晨, 张 凌, 等. 丰城鸡血藤化学成分分离及鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 51-56.

[3] Danciu C, Avram S, Pavel I Z, et al. Main isoflavones found in dietary sources as natural anti-inflammatory agents[J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19(7): 841-853.

[4] 郝 悦, 焦安妮, 于 敏, 等. 30 种黄酮抑制黄嘌呤氧化酶活性的筛选[J]. 中成药, 2019, 41(1): 55-59.

[5] Hughes S D, Ketheesan N, Haleagrahara N. The therapeutic potential of plant flavonoids on rheumatoid arthritis[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(17): 3601-3613.

[6] 蒋 红, 何 雯, 张 晨. 维药异叶青兰总黄酮对血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌细胞肥大的影响[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(8): 594-600.

[7] 李 伟. 类风湿性关节炎患者血清血管内皮生长因子与炎症因子的表达水平及相关性分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2014, 36(8): 919-921.

[8] 赵绿英, 刘玉玲, 李金兰, 等. 染料木素对大鼠食饵性高脂血症 PON1 及 CRP 的影响[J]. 中国药理学通报, 2012,

[9] Zaragoz C, Villaescusa L, Monserrat J, et al. Potential therapeutic anti-inflammatory and immunomodulatory effects of dihydroflavones, flavones, and flavonols[J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 1017.

[10] 彭荣越. 浅谈液质联用技术在中药质量控制中的应用[J]. 国际感染病学 (电子版), 2018, 7(4): 84-85.

[11] Wang X, He X, Zhang C F, et al. Anti-arthritic effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 887-893.

[12] 冯悦, 钟萌, 罗见春, 等. ¹⁸F-FDG PET/CT 技术监测雷公藤甲素对类风湿关节炎模型大鼠关节损伤的改善作用[J]. 中国药房, 2018, 29(22): 3059-3062.

[13] 张晓攀, 李艳贞, 李珊珊, 等. 类风湿性关节炎治疗药物研究进展[J]. 药物评价研究, 2018, 41(10): 1906-1910.

[14] Neumann E, Frommer K, Diller M, et al. Rheumatoide arthritis [J]. *Z Rheumatol*, 2018, 77(9): 769-775.

[15] Pandolfi F, Franza L, Carusi V, et al. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5238.

[16] van Hamburg J P, Tas S W. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2018, 87: 69-81.

[17] Lee Y H, Bae S C. Associations between PTPRC rs10919563 A/G and FCGR2A R131H polymorphisms and responsiveness to TNF blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis [J]. *Rheumatol Int*, 2016, 36(6): 837-844.

[18] Scherer H U, Hupl T, Burmester G R. The etiology of rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102400.

[19] 周静, 张弦, 钱海兵. 类风湿性关节炎发病机制的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(5): 44-47.

体外培育牛黄对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用

任敕宏¹, 李勇¹, 陈海¹, 陈吉军², 李红燕¹, 谢倩¹, 马荣¹, 李金秀¹, 王建^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川成都 611137; 2. 武汉天鹏医药有限公司, 湖北武汉 430000)

摘要: **目的** 观察体外培育牛黄对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用。**方法** 采用改良线栓法制备短暂大脑中动脉阻塞 (tMCAO) 模型, 大鼠随机分为假手术组、模型组、溶剂组、尼莫地平组及体外培育牛黄 0.20、0.10、0.05 g/kg 组, 每组 12 只。术后 72 h, 评价神经功能和脑梗死体积, HE 染色观察脑组织病理损伤情况, ELISA 法检测大鼠血清 VEGF、Ang-1、bFGF 水平, 分子对接预测其可能机制, Western blot、免疫组化 (IHC) 法检测 p-PI3K、p-Akt、caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达, RT-qPCR 法检测 *PI3K*、*Akt*、*caspase-3*、*Bax*、*Bcl-2* mRNA 表达。**结果** 与溶剂组比较, 体外培育牛黄各剂量组大鼠神经功能评分、脑梗死率降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 海马区神经元与皮层的病理损伤改善, 血清 VEGF、Ang-1 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。牛黄主要成分与 PI3K、Akt、caspase-3 的对接得分大于 100 分, 契合良好。体外培育牛黄能升高 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 降低 caspase-3、Bax 蛋白及 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 体外培育牛黄可能通过激活 PI3K/Akt 通路对脑缺血再灌注损伤大鼠起到神经保护作用。

关键词: 体外培育牛黄; 脑缺血再灌注; PI3K/Akt 信号通路; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)06-1989-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.041

脑卒中是目前人类主要的致残和致死原因^[1], 分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中, 其中缺血性脑卒中约占全部脑卒中的 80%^[2]。目前, 在《AHA/ASA 急性缺血性卒中

早期管理指南》中推荐静脉溶栓作为治疗缺血性脑卒中首选方案, 但受到溶栓 4.5 h 时间窗的限制, 且溶栓后会

现脑缺血再灌注损伤^[3]。所以, 研发新药物以应对脑缺血

收稿日期: 2021-09-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873023)

作者简介: 任敕宏 (1996—), 男, 硕士生, 从事中药不良反应与合理用药研究。Tel: 18382048134, E-mail: 1253515239@qq.com

* 通信作者: 王建 (1959—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药不良反应与合理用药研究。Tel: 13881880101, E-mail: jianwang08@163.com

网络出版日期: 2022-04-26

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220426.1528.004.html>