

藤茶提取物中二氢杨梅素对大鼠急性痛风性关节炎模型的影响

卢忠英¹, 郁建平², 陈仕学¹, 姚元勇¹ (1. 铜仁学院材料与化学工程学院, 贵州 铜仁 554300; 2. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025)

摘要: 目的 研究藤茶提取物中二氢杨梅素对大鼠急性痛风性关节炎模型中血清 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 的影响, 初步探讨其治疗急性痛风性关节炎的作用机制。方法 采用踝关节腔内注射尿酸钠建立急性痛风性关节炎大鼠模型, 以秋水仙碱为对照, 观察藤茶提取物中二氢杨梅素对各组大鼠的踝关节肿胀度及血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-8 水平的调节作用。结果 模型组关节肿胀度、IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 的水平明显高于空白对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中高剂量的二氢杨梅素能明显抑制急性痛风性关节炎大鼠的踝关节肿胀度, 降低血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-8 的水平。结论 藤茶提取物中二氢杨梅素对急性痛风性关节炎具有良好的治疗作用, 其作用机制与抑制血清 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 的产生有关。

关键词: 藤茶; 二氢杨梅素; 急性痛风性关节炎; 大鼠模型

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)04-0396-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.002

Effect of Dihydromyricetin from *Cany Tea* on Acute Gouty Arthritis Model Rats

LU Zhongying¹, YU Jianping², CHEN Shixue¹, YAO Yuanyong¹ (1. Institute of Material and Chemical Engineering, Tongren University, Tongren 554300, China; 2. College of Life Sciences, Guizhou University, Guizhou 550025, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of dihydromyricetin from *Cany tea* on acute gouty arthritis model joint swelling degree and rats serum of IL-1 β , IL-8, TNF- α , and to explore the action mechanism of the acute gouty arthritis treatment. **METHODS** Establish rats model of acute gouty arthritis by using the ankle articular injection of sodium urate, the control group use the colchicine and observe the regulation of dihydromyricetin from *Cany tea* on rats ankle swelling and serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-8 in each group. **RESULTS** The degree of joint swelling and IL-1 β , IL-8, and TNF- α levels of model group were significantly higher than the normal group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); High and middle dose of dihydromyricetin from *Cany tea* could significantly inhibit acute gouty arthritis in rats ankle swelling and reduce serum TNF- α , IL-1 β and IL-8 level. **CONCLUSION** Dihydromyricetin from *Cany tea* has a good role in the prevention and treatment of acute gouty arthritis, its mechanism of action is the inhibition of serum IL-1 β , IL-8 and TNF- α production.

KEY WORDS: *Cany tea*; dihydromyricetin; acute gouty arthritis; rat model

痛风是由嘌呤代谢障碍引起的一种疾病, 高尿酸血症导致尿酸盐沉积于关节的滑膜、软骨、骨质及关节周围软组织引起的非特异性炎症反应。临床表现为反复性发作的急、慢性关节炎和软组织损伤, 受累关节常出现红、肿、热、痛, 急性痛风性关节炎是痛风典型的表现形式。目前治疗痛风性关节炎的药物(如非甾体类抗炎药)普遍具有骨髓抑制、肝细胞损害、胃肠出血等不良反应, 限制了临床应用^[1]。因此, 从植物中发现能够治疗痛风性关节炎的高效低毒药物具有重要意义。据研究表明: 藤茶的有效成分丰富、药理作用广泛, 民间将藤茶用于治慢性肾炎、感冒、咽喉肿痛等症^[2]。本文基于藤茶的药效作用, 初步探讨其治疗急性痛风性关节炎的作用机制, 为其在临床上的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂与药品

藤茶由贵州江口梵净山云峰野生植物开发有限公司提供。藤茶植株采自贵州省江口县和平镇, 由贵州大学生命科学学院植物教研室廖海民教授鉴定为葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄 [*Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang]。

阳性对照药: 秋水仙碱(云南省玉溪望子隆生物制药有限公司, 国药准字 H53021904, 规格: 0.5 mg·片⁻¹); 尿酸钠(上海源叶生物科技有限公司, 批号: 20120216); 大鼠白细胞介素 IL-1 β 试剂盒、IL-8 试剂盒和肿瘤坏死因子 TNF- α 试剂盒均为上海源叶生物科技有限公司分装 ELISA 检测试剂盒, 批号分别为 H20120624, H20120416, H20120617。

基金项目: 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合 KY 字 2013184); 贵州省普通高等学校特色重点实验室建设项目(黔发合 K 字 (2011) 005)

作者简介: 卢忠英, 女, 硕士, 讲师 Tel: 18385873315 E-mail: 912643749@qq.com

1.2 动物

SD 系, 60 只 SPF 级大鼠, ♂, 体质量为(200±20)g, 由重庆腾鑫生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK(渝)2012-005, 实验前在实验室正常饲养 1 周, 在整个实验过程中自由饮水和颗粒饲料喂养。

2 方法

2.1 藤茶提取物中二氢杨梅素制备

取藤茶 200 g, 以 1:20 料液比加热煮沸, 再继续温火煎煮 30 min, 趁热抽滤。滤渣按上述步骤再次煎煮 30 min, 合并 2 次滤液, 减压浓缩至浸膏状, 用无水乙醇溶解浸膏抽滤, 所得滤液减压浓缩至浸膏状, 倒出, 使乙醇挥发干, 放入恒温箱中 60℃干燥。干燥后得到的物质置于索式提取器, 加入丙酮回流提取 2 次, 每次 30 min。合并提取液, 浓缩至小体积后, 加水, 静置, 析出大量白色晶体, 过滤。将所得晶体多次加水重结晶, 过滤后放置恒温烘箱 45℃干燥, 即得黄白色针状结晶, 经红外鉴定此物质即为二氢杨梅素, 采用 HPLC 测定其纯度为 93.1%。

2.2 尿酸钠晶体制备^[3]

无菌条件下将 5 mL 1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 和 500 mg 尿酸钠加入到 155 mL 去热源的灭菌注射用水中, 煮沸, 使尿酸钠完全溶解, 自然降温并搅拌, 滴入 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 至 pH 7.0, 溶液呈乳白色后, 立即 3 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 将上清液反复离心至晶体不再析出, 最后于 4℃冷却 1 h 后离心, 收集晶体于无菌管, 4℃保存。取 500 mg 尿酸钠结晶加 18 mL 生理盐水, 再加 2 mL 吐温 80, 加热搅拌, 配成 20 mL 尿酸钠溶液, 装瓶备用。

2.3 动物分组、给药及造模

将 60 只 SPF 大鼠, 按体质量分级随机分 6 组: 正常对照组、模型组、阳性对照组(秋水仙碱组)、二氢杨梅素高、中、低剂量组, 每组 10 只, 称重

并编号。其中二氢杨梅素高、中、低剂量分别为 0.04, 0.02, 0.01 g·kg⁻¹, 秋水仙碱为 0.04 g·kg⁻¹, 正常对照组、模型组给同体积生理盐水, 用药剂量根据人用药量与实验动物用药量的换算公式计算^[4]。以上 6 组每天灌胃给药 1 次, 连续 7 d。于实验的第 5 天灌胃给药前, 将模型组、秋水仙碱组、二氢杨梅素高、中、低剂量组按照 McCartyDJ 经典方法开始造模^[5-6]: 以碘酒、乙醇消毒局部, 用 1 mL 灭菌注射针在大鼠右侧距小腿(踝)关节背侧, 从 45° 方向插入至胫骨肌腱内侧, 感觉有脱空感后, 将 0.2 mL 2.50%尿酸钠溶液注入到关节腔。正常对照组注射 0.2 mL 生理盐水。

2.4 检测项目

2.4.1 观察大鼠踝关节肿胀度的变化 根据文献[7]观察大鼠踝关节肿胀度的变化, 造模后 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h, 采用傅线法测量右后肢小腿踝关节同一部位周径, 测 3 次, 取均值。

2.4.2 血液分析 造模 72 h 后股动脉取血, 凝固后, 低温, 3 500 r·min⁻¹ 离心 12 min 以分离血清, 送贵州大学校医院测定 IL-1β、IL-8 和 TNF-α 水平, IL-1β、IL-8、TNF-α 检测均采用 ELISA 法严格按照试剂说明书进行操作。

2.5 统计分析

实验数据用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 二氢杨梅素对大鼠踝关肿胀度的变化情况

在造模 72 h 内, 模型组的肿胀度(周径)与空白对照组比较明显增大; 阳性对照组、二氢杨梅素高、中剂量组在各时间段均能抑制大鼠踝关节的肿胀度, 与模型组比较有显著性差异(*P*<0.05 或 *P*<0.01), 结果见表 1。

表 1 二氢杨梅素对急性痛风性关节炎模型大鼠踝关节肿胀度的影响(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of dihydromyricetin on anklejoint edema in gouty arthritis rats(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ g·kg ⁻¹	肿胀度/ cm						
		0 h	4 h	8 h	12 h	24h	48h	72h
空白对照组	—	2.383±0.100	2.410±0.057	2.381±0.058	2.379±0.047	2.336±0.067	2.338±0.057	2.365±0.034
模型组	—	2.343±0.124	2.689±0.080 ¹⁾	2.869±0.057 ¹⁾	3.051±0.073 ¹⁾	3.023±0.034 ¹⁾	3.006±0.020 ¹⁾	2.934±0.034 ¹⁾
阳性对照组	0.04	2.317±0.109	2.501±0.130 ³⁾	2.704±0.050 ³⁾	2.872±0.033 ³⁾	2.843±0.028 ³⁾	2.790±0.018 ³⁾	2.602±0.049 ³⁾
二氢杨梅素								
高剂量	0.04	2.351±0.113	2.505±0.076 ³⁾	2.697±0.083 ³⁾	2.882±0.043 ³⁾	2.850±0.029 ³⁾	2.803±0.020 ³⁾	2.596±0.032 ³⁾
中剂量	0.02	2.341±0.098	2.538±0.072 ²⁾	2.759±0.067 ³⁾	2.899±0.025 ³⁾	2.893±0.027 ³⁾	2.813±0.029 ³⁾	2.645±0.047 ³⁾
低剂量	0.01	2.312±0.139	2.613±0.023 ²⁾	2.838±0.051	3.021±0.063	2.985±0.049 ²⁾	2.962±0.041 ³⁾	2.846±0.037 ³⁾

注: 与空白组相比, ¹⁾*P*<0.01; 与模型组相比, ²⁾*P*<0.05, ³⁾*P*<0.01。

Note: Compared with blank control group, ¹⁾*P*<0.01; compared with model group, ²⁾*P*<0.05, ³⁾*P*<0.01.

3.2 二氢杨梅素对大鼠血清中 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 水平的影响

各组动物造模后其血清中 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 含量均明显升高($P<0.01$); 和模型组相比较, 二氢杨梅素高、中剂量组在各时间段大鼠血清中 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 含量明显降低($P<0.01$), 结果见表 2。

表 2 二氢杨梅素对模型大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-8 含量的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tad. 2 Effects of the dihydromyricetin on serum IL-1 β 、TNF- α and IL-8 level in model rats($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	IL-1 β / ng·L ⁻¹	TNF- α / ng·L ⁻¹	IL-8/ng·L ⁻¹
空白对照组	—	12.35 $\pm$ 0.40 ³⁾	138.6 $\pm$ 11.03	439.1 $\pm$ 16.78
模型组	—	23.59 $\pm$ 0.41 ¹³⁾	223.1 $\pm$ 16.50 ¹³⁾	534.0 $\pm$ 33.84 ¹³⁾
阳性对照组	0.04	13.70 $\pm$ 0.42 ²⁾	146.8 $\pm$ 12.31 ²⁾	448.7 $\pm$ 11.25 ²⁾
二氢杨梅素				
高剂量	0.04	14.04 $\pm$ 0.21 ²⁾	151.5 $\pm$ 9.55 ²⁾	450.4 $\pm$ 11.54 ²⁾
中剂量	0.02	14.11 $\pm$ 0.24 ²⁾	155.5 $\pm$ 9.64 ²⁾	456.7 $\pm$ 8.92 ²⁾
低剂量	0.01	21.08 $\pm$ 0.94 ^{2) 3)}	199.8 $\pm$ 8.97 ^{2) 3)}	526.6 $\pm$ 9.43 ³⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与阳性对照组比较, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$; compared with positive control group, ³⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

急性痛风性关节炎的主要发病原因是高尿酸血症及其导致关节局部的尿酸钠晶体的析出, 致使大量炎性细胞浸润, 促使关节出现剧烈疼痛、红肿和功能障碍等症状^[7-8]。临床上对痛风病的药物治疗也倍受关注。据现有资料, 藤茶有效成分为黄酮类物质, 其中以二氢杨梅素(3,5,7,3',4',5'-六羟基-2,3-双氢黄酮醇, dihydromyricetin, DMY) 含量最高。何桂霞等实验表明^[9-10], 藤茶中二氢杨梅素的含量为 38.17%~38.54%。藤茶有消炎、止咳、祛痰、镇痛、抗氧化、护肝、降血糖, 降血脂、抗高血压、降尿酸、抗菌、抗癌等药理作用^[11-16], 藤茶资源丰富, 二氢杨梅素含量高, 本实验主要探讨藤茶提取物中二氢杨梅素对大鼠急性痛风性关节炎模型的影响, 观察 IL-1 β , IL-8, TNF- α 水平的变化情况, IL-1 β , IL-8, TNF- α 作为炎症趋化因子和激活因子, 在痛风性关节炎的发生、发展过程中起重要作用, 损害关节软骨及骨质, 造成关节功能障碍^[17-18]。IL-1 β 、TNF- α 是前炎症网链中的一级细胞因子, IL-8 是由 IL-1 β 、TNF- α 诱导的二级前炎症细胞因子, IL-8 属于趋化因子中的

一种, 能够诱导白细胞和其他类型的体细胞的定向迁移和活化, 通过免疫组化和原位杂交技术, 能检测到每个急性炎症反应中都存在 IL-8 因子^[19]。尿酸盐结晶可直接刺激滑膜及周围软组织中单核细胞, 产生 TNF- α 、IL-1 β 因子, 加重关节损伤, 抑制关节组织中的 TNF- α 、IL-1 β 因子的产生和降低关节组织中的 TNF- α 、IL-1 β 水平, 是有效治疗痛风性关节炎的重要环节^[20]。

本实验采用目前公认的建模方法, 在踝关节腔内注射尿酸钠晶体造模后, 结果显示, 尿酸钠晶体刺激大鼠踝关节形成尿酸钠性滑膜炎而使急性痛风发作, 大鼠踝关节肿胀度明显增大, 二氢杨梅素能明显抑制急性痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度, 降低血清 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 的水平, 是其治疗急性痛风性关节炎的机制之一。

REFERENCES

- [1] MARTIN W J, HERST P M, CHINA E W, et al. Sesquiterpene dialdehydes inhibit MUS crystal-induced superoxide production by infiltrating neutrophils in an *in vivo* model of gouty inflammation [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(5): 616-621.
- [2] QIN L L. Research advance in chemical components and pharmacological actions of Rattan Tea [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2008, 42(6): 94-96.
- [3] CAO YY, GUO R X. Establishment of rat gout model induced by urate [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2011, 25(1): 32-33.
- [4] 郝光荣. 实验动物学[M] 第2版. 上海: 第二军医大学出版社, 2004: 26.
- [5] MCCARTY D J, NIRROSIC Z, DERISER D A, et al. Crystal and arthritis [J]. Dis Mon, 1994, 40(2): 255-299.
- [6] CODERRE T J, WALL P D. Anke joint urate arthritis in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freud's adjuvant [J]. Pain, 1987, 28(3): 379-393.
- [7] JIANG F P, FU X C, BAI H B. Mice acute toxicity of siegesbeckia and its effect on mouse acute gouty arthritis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(12): 1289-1291.
- [8] HUANG S Z, HU P, MA G X. Study on anti-gout effects of Fubitong capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(3): 290-293.
- [9] HE G X, PEI G, ZHOU T D, et al. Determination of dihydromyricetin in ampelopsis grossedetala by TLC-scaner [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2000, 17(4): 276-277.
- [10] HE G X, PEI L, YANG W L, et al. Determination of dihydromyricetin in different parts of Ampelopsis grossedentata in different seasons by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2004, 26(3): 17-20.
- [11] 钟正贤, 周桂芬. 藤茶总黄酮药理作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(4): 224-225.
- [12] 熊大胜, 朱金桃, 刘朝阳. 显齿蛇葡萄幼嫩茎叶提取物抑菌

- 作用的研究[J]. 食品科学, 2000, 21(2): 48-51.
- [13] XU J J, YAO M J, XU G. Study on antioxidant activities of dihydromyricetin [J]. Food Sci(食品科学), 2007, 28(9): 43-45.
- [14] LI G Z, LU Z Y, XU J Y, et al. Effect of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* on reducing serum uric acid in hyperuricemia model mice [J]. J Mount Agric Biol(山地农业生物学报), 2014, 33(4): 40-42.
- [15] CHEN Y Q, NI D J. Study on the hypolipidemic effect of flavones and dihydromyricetin from Tengcha [J]. J Tea Sci(茶叶科学), 2007, 27(3): 221-225.
- [16] OU X H, LV L Y. Anti-hepatofibrosis effects of Tengcha extract from *ampelopsis grossedentata* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(3): 132-134.
- [17] YANG Y X, CHU Y, ZU L. The therapeutic studies of Tongfengshu powder on inflammation stimulated by uric acid [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2003, 18(4): 244-246.
- [18] YU J, LI W, GAO M L. Experimental Study on the efficacy of GA Rats' Serum Cytokines IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 by Bizhongxiaosan [J]. Guangming J Chin Med(光明中医), 2011, 26(6): 1125-1126.
- [19] HUANG J Q, SUN W J, ZHU M Z, et al. Experimental study of quercetin in the treatment of acute gouty arthritis rats [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2012, 27(2): 135-138.
- [20] CHEN C J, SHI Y, HEARN A, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals [J]. J Clin Invest, 2006, 116(8): 2262-2271.

收稿日期: 2014-09-27

HEK293 细胞的传代、建库与高效表达重组 HPV16-E6E7 腺病毒的研究

吴洁¹, 李剑波¹, 高孟¹, 金素凤², 潘海桦², 陈刚¹, 姜云水¹, 庄昉成^{1*} (1.浙江省医学科学院病毒病研究所, 杭州 310013; 2.浙江普康生物技术股份有限公司, 杭州 310053)

摘要: 目的 对 HEK293 细胞进行三级细胞库的建立, 并高效表达重组的 HPV16-E6E7 腺病毒。方法 进行 HEK293 细胞传代培养, 并建立三级细胞库, 按中国药典 2010 年版 III 部要求进行常规检验; 培养重组 HPV16-E6E7 腺病毒, 测定滴度, 插入目的基因以及基因组酶切图谱鉴定。结果 HEK293 细胞传代符合其生长形态, 建立的三级细胞库和不同细胞库之间的传代数, 细胞浓度和装量均符合疫苗基质制备的要求; 能高效表达重组 HPV16-E6E7 腺病毒, 种子滴度 $>3.0 \times 10^9$ IU·mL⁻¹; 表达的目的基因和目的蛋白稳定。结论 建立的 HEK293 三级细胞库符合疫苗用细胞基质的要求。

关键词: HEK293; 细胞库; HPV16; 重组腺病毒; 高效表达

中图分类号: R963

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)04-0399-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.003

Study on HEK293 Cell to Passage, Establish Cell Banks, and Highly Efficiency Express a Recombinant HPV16-E6E7 Adenovirus Vector

WU Jie¹, LI Jianbo¹, GAO Meng¹, JIN Sufeng², PAN Haihua², CHEN Gang¹, JIANG Yunshui¹, ZHUANG Fangcheng^{1*} (1. Institute of Viral Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2. Zhejiang Pukang Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study on HEK293 cell to passage, establish 3-level cell banks, and by that to highly efficiency express a recombinant HPV16-E6E7 adenovirus vector. **METHODS** HEK293 cell passaged and established 3-level cell banks. And general inspected according to the requirements of Chinese Pharmacopeia III 2010. By the HEK293 to propagate a recombinant HPV16-E6E7 adenovirus vector, identified its titer, inserted target gene and genome macrorestriction. **RESULTS** HEK293 cell met the growthform of its description; the limited passages, concentration of cells, and install quantity of 3-level cell banks were all conformed to requirements of vaccine substrates; the expressed recombinant HPV16-E6E7 adenovirus titer was more than 3.0×10^9 IU·mL⁻¹; the expressed inserted target gene and genome macrorestriction map were stable. **CONCLUSION** HEK293 cell and its 3-level cell banks established are all conformed to the requirements of vaccine substrates.

KEY WORDS: HEK293; cell bank; HPV16; recombinant adenovirus; highly efficiency expression

基金项目: 浙江省科技计划项目(2008F3022); 杭州市科技局重大科技创新项目(20112313A37)

作者简介: 吴洁, 女, 实验师 Tel: (0571)89890275 E-mail: wujie1998@126.com *通信作者: 庄昉成, 男, 硕士, 研究员 Tel: (0571)88861601 E-mail: fc Zhuang@163.com