

祛痹镇痛方对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 IL-1 β 、IL-8、VEGF 表达的影响

余建明¹ 刘喜德¹ 曲丕盛¹ 陶凡¹ 王云卿²

摘要 **目的** 研究中药祛痹镇痛方对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠滑膜白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,探讨祛痹镇痛方治疗 CIA 的作用机制。**方法** 选用健康雄性 Wistar 大鼠,随机分为造模组(50 只)及正常对照组(正常组,10 只),造模组采用牛 II 型胶原(type II collagen of bovine, BC II)乳剂于大鼠尾根部及颈背部多点注射,建立 CIA 模型。造模成功后,选取 30 只造模成功大鼠随机分为模型组(10 只)、甲氨喋呤(methotrexate, MTX)组(10 只)、祛痹镇痛方组(中药组,10 只)。中药组大鼠按 22.9 g/kg 剂量灌胃中药祛痹镇痛方,正常组、模型组灌胃等量生理盐水,每日 1 次,MTX 组按 0.78 mg/kg 剂量灌胃 MTX 混悬液,每周 1 次。给药 30 天后,运用免疫组化法检测大鼠滑膜 IL-1 β 、IL-8、VEGF 水平,并予给药前后进行关节炎指数(arthritis index, AI)评分。**结果** 与模型组及本组治疗前比较,治疗后中药组和 MTX 组大鼠 AI 评分明显降低($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠滑膜 IL-1 β 、IL-8、VEGF 表达水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,中药组和 MTX 组大鼠滑膜 IL-1 β 、IL-8、VEGF 表达水平明显降低($P < 0.01$),中药组和 MTX 组组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 降低 CIA 大鼠滑膜 IL-1 β 、IL-8、VEGF 水平可能是中药祛痹镇痛方治疗 CIA 的作用机制之一。

关键词 祛痹镇痛方;胶原诱导性关节炎;滑膜;白介素-1 β ;白介素-8;血管内皮生长因子

Effects of Qubi Zhentong Recipe on the Expressions of IL-1 β , IL-8, and VEGF in the Synovial of Rats with Collagen-inducing Arthritis YU Jian-ming¹, LIU Xi-de¹, QU Pi-sheng¹, TAO Fan¹, and WANG Yun-qing² 1 Pain Department, Zhejiang Provincial Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Hangzhou (310003), China; 2 Second Clinical Medical College, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310053), China

ABSTRACT **Objective** To research the effects of Qubi Zhentong Recipe (QZR) on the expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-8 (IL-8), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the synovial of rats with collagen-inducing arthritis (CIA), and to discuss its mechanisms of action. **Methods**

Healthy male Wistar rats were recruited and randomly divided into the model group ($n = 50$) and the normal control group ($n = 10$). Rats of the model group were injected with type II collagen of bovine (BC II) emulsion in the tail and nape to establish the CIA model. After successful modeling, 30 successfully modeled rats were selected and randomly divided into three groups, i.e., the model group ($n = 10$), the QZR group ($n = 10$), and the methotrexate (MTX) group ($n = 10$). Rats in the normal control group and the model group were administered with physiological saline by gastrogavage, while those in the QZR group were administered with QZR at 22.9 g/kg by gastrogavage. All medication was performed once daily. The rats in the MTX group were administered with MTX suspension at 0.78 mg/kg by gastrogavage, once per week. After 30-day treatment, the levels of IL-1 β , IL-8, and VEGF in the synovial were detected by immunohistochemical method. The arthritis index (AI) was scored before and after medication. **Results**

After treatment the AI score of the QZR group and the MTX group was obviously lower than that of the

model group ($P < 0.01$). The AI score of the two drug groups were lower than that before treatment ($P < 0.01$). Compared with the normal control group, the expression levels of IL-1 β , IL-8, and VEGF obviously increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of IL-1 β , IL-8, and VEGF were significantly lower in the two drug groups ($P < 0.01$). But there was no statistical difference between the QZR group and the MTX group ($P > 0.05$). Conclusion Decreasing the expression levels of IL-1 β , IL-8, and VEGF in the synovial of CIA rats may be one of the mechanisms for treating CIA by QZR.

KEYWORDS Qubi Zhentong Recipe; collagen induced arthritis; synovial; interleukin-1 β ; interleukin-8; vascular endothelial growth factor

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以慢性破坏性关节病变为特征的全身性自身免疫病, 表现为关节滑膜的慢性炎症、增生, 血管翳形成, 主要侵犯关节软骨、软骨下骨、韧带和肌腱等, 造成关节软骨、骨和关节囊破坏, 最终导致关节畸形和功能丧失。白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-8 (interleukin-8, IL-8)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是 RA 炎症过程中主要的破坏性细胞因子, 抑制 IL-1 β 、IL-8、VEGF 活性对控制 RA 病情进展非常重要^[1-3]。临床中应用我院疼痛科中药经验方祛痹镇痛方治疗 RA 取得一定疗效, 为进一步探讨其作用机制, 进行了中药祛痹镇痛方对胶原诱导性关节炎 (collagen-inducing arthritis, CIA) 大鼠滑膜 IL-1 β 、IL-8、VEGF 影响的研究。

材料与方

1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 (110 \pm 10)g, SPF 级, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 动物合格证号: SYXK(浙) 2003-0003。

2 药物、试剂及仪器 祛痹镇痛方 (全蝎 9 g 麝虫 10 g 蜈蚣 6 g 蜈蚣 1 条 桃仁 10 g 红花 6 g 乳香 6 g 牛膝 10 g 豨莶草 12 g 寻骨风 10 g) 由浙江省中西医结合医院制剂室煎药完成 (含生药 1 g/mL); 甲氨喋呤 (methotrexate, MTX) (上海信谊制药有限公司, 批号: 100703, 规格: 2.5 mg); 牛 II 型胶原 (type II collagen of bovine, BC II, 美国 Chondrex 公司, 批号: 2002-1); 不完全弗氏佐剂 (incom2p lete Freund's adjuvant, IFA, 美国 Chondrex 公司, 批号: 7002); 冰醋酸 (杭州化学试剂有限公司, 批号: 20100924); 大鼠 IL-1 β 、IL-8、VEGF 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒 (美国 Vector 公司); YLS-7B 足趾容积测量仪 (山东医学科学院设备厂)。

3 模型建立与分组 CIA 模型是用同源或异源

性 II 型胶原免疫动物而引发的一种慢性、多发性关节炎, 是一种免疫性炎症模型。多发性的末端关节炎是该模型的主要临床表现。病理变化为增生性滑膜炎, 关节软骨破坏、骨侵蚀、关节腔内炎性细胞浸润。在无菌条件下, 用 0.1 mol/L 冰醋酸在冰浴中充分溶解 BC II, 浓度为 4 mg/mL, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜后, 与 IFA 等体积混合、振荡乳化, 制成 BC II 乳剂, 浓度为 2 mg/mL, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。模型的制备参照《药理学实验指南——新药发现和药理学评价》^[4] 及相关文献^[5] 的造模方法 (稍有改良), 于造模组大鼠尾根部及颈背部 5 个部位进行皮内注射, 每只大鼠注射 0.5 mL BC II 乳剂, 含 1 mg BC II 型胶原, 14 天后加强免疫 1 次, 尾根部皮内注射 BC II 1 mg。正常组注射 0.5 mL 生理盐水。60 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组 (正常组, 10 只) 和造模组 (50 只), 造模组大鼠建立 CIA 模型。造模成功后, 选取造模成功大鼠 30 只随机分为: 模型组、祛痹镇痛方组 (中药组) 和 MTX 组, 每组 10 只。

4 模型成功判定标准 致炎前, 用足趾容积测量仪测量每只大鼠左后足足趾容积, 作为致炎前足趾基础容积。每周进行关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分。于首次注射 BC II 乳剂后 18 天, 根据 AI 评分进行模型成功评判^[6]。AI 标准分级如下: 0 分: 无红肿; 1 分: 趾关节稍肿, 足爪或足垫单个区域炎症; 2 分: 关节轻度红肿, 足爪和足垫或踝关节 2 个区域以上的炎症; 3 分: 关节中度红肿, 轻度功能障碍; 4 分: 关节重度红肿, 僵直甚至畸形, 严重功能障碍。AI > 4 分, 单侧左足外踝以下隆起的体积 > 1.6 mL 为造模成功。

5 给药方法 于造模成功后开始给药, 用药剂量按照实验动物与人体体表面积比等效剂量换算比例^[7], 根据大鼠的体重进行计算, 临床成人中药用量为 3.2 g/(kg \cdot d), 则中药组大鼠按 22.9 g/kg 剂量灌胃中药祛痹镇痛方, 正常组、模型组灌胃等量生理盐

水,均每日 1 次;MTX 组大鼠按 0.78 mg/kg 剂量灌胃 MTX 混悬液,每周 1 次。连续用药 30 天。

6 标本制备 大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉致死。仰位固定,常规碘酒、酒精消毒。沿膝关节正中纵行切开皮肤直至暴露出以膝关节为中心约 3 cm × 3 cm 的区域,沿髌骨上缘约 0.3 ~ 0.4 cm 处向下切割至股骨,再分别沿髌骨两侧向下分离至胫骨,此时即打开了膝关节腔。由髌骨下极向下延续有一层平滑光亮呈淡黄色的滑膜组织。用眼科直镊钝性分离关节囊的滑膜层和纤维层,完整剥离滑膜组织,然后以眼科镊轻轻夹住其边缘,用消毒的手术刀完整切取滑膜组织,约 7 ~ 10 mg。

7 主要观察指标

7.1 AI 评分 于第 18 天造模成功后及用药结束后进行 AI 评分(评分标准如前述)。

7.2 大鼠滑膜 IL-1β、IL-8、VEGF 水平检测 将所有大鼠左侧滑膜用 4% 多聚甲醛固定。石蜡包埋切片,脱蜡、水化。行免疫组化检验的切片 60 °C 烤箱过夜,以防脱片。二甲苯 I 30 min、二甲苯 II 20 min,无水乙醇、95%、75%、50% 乙醇各 10 min,蒸馏水洗 5 min。以磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,每次 5 min,3.0 g/L 过氧化氢 - 甲醇溶液 37 °C 温育 15 min。纯化水冲洗,PBS 浸泡 5 min。抗原修复:将切片置于 0.1 mol/L 且 pH = 6.0 的枸橼酸液修复液中,沸水浴 15 min。自然冷却 30 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min。血清封闭,室温 45 min,甩去多余液体,IL-1β、IL-8、VEGF 一抗按 1:20 稀释,4 °C 孵育过夜。阴性对照用 PBS 代替一抗。PBS-T 洗 3 次,每次 5 min。分别滴加生物素化的二抗,按 1:500 稀释,37 °C 温育 60 min。PBS-T 洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色、脱水,透明中性树胶封片,光镜下观察结果。图像分析:随机选取 5 个高倍视野(×200),计算每个视野的阳性面积比,取其平均值。阳性面积比为每个视野阳性目标面积占整个统计面积的百分率。

8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠治疗前后 AI 评分比较(表 1) 与正常组大鼠比较,模型组大鼠 AI 评分明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);治疗前模型组、中药组与 MTX 组大鼠 AI 评分比较,差异无统计学意义($P >$

0.05);与本组治疗前比较,治疗后中药组与 MTX 组大鼠 AI 评分明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),MTX 组与中药组两组组间比较,AI 评分差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠治疗前后 AI 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后
正常	10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	10	5.60 ± 1.16*	5.90 ± 1.74*
中药	10	5.40 ± 0.94	2.40 ± 1.92 ^{△△}
MTX	10	5.30 ± 1.23	2.00 ± 1.67 ^{△△}

注:与正常组同期比较,* $P < 0.01$;与本组治疗前比较,[△] $P < 0.01$;与模型组同期比较,^{△△} $P < 0.01$

2 各组药物对 CIA 大鼠 IL-1β、IL-8 及 VEGF 表达的影响比较(表 2) 与正常组比较,模型组大鼠滑膜 IL-1β、IL-8、VEGF 水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,中药组和 MTX 组大鼠滑膜 IL-1β、IL-8、VEGF 水平明显降低($P < 0.01$),中药组和 MTX 组组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组药物对 CIA 大鼠 IL-1β、IL-8 及 VEGF 表达的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1β 阳性 面积比	IL-8 阳性 面积比	VEGF 阳性 面积比
正常	10	3.21 ± 0.56	4.21 ± 0.78	4.56 ± 0.87
模型	10	14.70 ± 3.01*	18.63 ± 2.56*	19.32 ± 2.31*
中药	10	10.02 ± 2.11 [△]	12.20 ± 2.31 [△]	12.36 ± 2.47 [△]
MTX	10	9.65 ± 1.58 [△]	11.55 ± 1.87 [△]	11.56 ± 2.01 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

讨 论

II 型胶原诱导的关节炎模型是 Trentham DE 等^[8]于 1977 年创立。由于在主要组织相容性复合物、性别、关节局部病变、collagen II (C II) 自身免疫等方面与 RA 有很多相似之处,所以 CIA 模型成为目前比较公认的 RA 动物模型^[9]。在实验中,造模后第 21 天,造模组大鼠关节肿胀明显,通过足趾容积评估及 AI 评分测量后,提示 CIA 模型制备成功。

RA 属于中医学“痹证”范畴。本虚标实、寒热错杂、痰瘀痹阻为 RA 基本病因病机。据此拟经验祛痹镇痛方,主要由全蝎、蜈蚣、麝虫、蛻螂虫、桃仁、红花、牛膝、乳香、豨莶草、寻骨风等药组成。现代药理研究表明^[10],全蝎的主要有效成分为蝎毒,蜈蚣的化学成分主要含组织胺样物质及溶血性蛋白质,麝虫含有多种纤溶活性蛋白组分,蛻螂虫含氨基酸和多肽类成

分,桃仁含有苦杏仁苷,红花含有红花黄色素等,三萜皂苷是牛膝主要成分,以上药物均具有解热、镇痛、抗炎和调节免疫等作用。乳香^[11]、豨莶草^[12]、寻骨风^[13]亦具有抗炎、镇痛作用。因此祛痹镇痛方具有镇痛、抗炎、解热和调节免疫等作用。

RA 致病过程中伴随多种免疫活性细胞活化及细胞因子、炎症介质的共同参与,IL-1 β 是 RA 炎症过程的主要破坏因子,而血液中的 IL-1 主要为单核细胞和巨噬细胞产生的 IL-1 β 。IL-1 β 可能刺激滑膜细胞与软骨细胞,合成前列腺素 E2 (dinoprostone prostinE2, PGE2) 和胶原酶,刺激血管扩张渗出,促进破骨细胞的溶骨作用,造成关节破坏。对 CIA 大鼠的研究发现,中药治疗后可使大鼠血清 IL-1 β 的表达下降^[14]。IL-8 是一种 WBC 趋化因子,通过 IL-1 刺激单核、巨噬细胞、成纤维细胞产生,其生物学效应有趋化中性粒细胞至炎症局部,增强其他中性粒细胞的功能,如表达黏附分子,产生氧自由基,释放溶酶体酶。对于 RA 患者,IL-8 通过招募中性粒细胞至急性炎症滑膜部位并增加该细胞的活性而增强其破坏作用。VEGF 是血管生成的主要因子,在 RA 滑膜病理性血管新生中起关键作用^[15],其能够促进炎症滑膜组织新生血管形成及血管内物质外渗,加重滑膜组织炎症和血管翳形成,加重 RA 的临床症状,导致关节畸形和强直。

本实验结果表明: CIA 大鼠滑膜 IL-1 β 、IL-8、VEGF 表达水平升高,给予祛痹镇痛方治疗后,滑膜 IL-1 β 、IL-8、VEGF 表达水平下降。说明本方能减少 IL-1 β 、IL-8、VEGF 的合成而抑制炎症细胞浸润,减少关节炎的发生和逆转疾病的发展。阻断 IL-1 β 、IL-8、VEGF 所介导的一系列炎症反应,这可能是祛痹镇痛方治疗 CIA 的作用机制之一,其治疗 CIA 的其他机制尚需深入研究。

参 考 文 献

- [1] Abramson SB, Amin A. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41(9): 972-980.
- [2] 杨小翠,王永堂,刘玉泉. 白细胞介素-8 的临床意义 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2002, 9(4): 7.
- [3] Taylor PC. Serum vascular markers and vascular

imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy [J]. *Rheumatology*, 2005, 44(6): 721-728.

- [4] 沃格尔 HG, 沃格尔 WH. 药理学实验指南——新药发现和药理学评价 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 577-589.
- [5] Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis [J]. *J Exp Med*, 1977, 146(3): 857-868.
- [6] Carter RA, Campbell IK, O'Donnell K, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint involvement and alters B cell trafficking [J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 128(1): 44-51.
- [7] 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 468.
- [8] Feng H, Yamaki K, Takano H, et al. Suppression of Th1 and Th2 immune responses in mice by sinomenine, an alkaloid extracted from the Chinese medicinal plant *Sinomenium acutum* [J]. *Planta Med*, 2006, 72(15): 1383-1388.
- [9] Chie O, Yoriaki K, Yoji M, et al. Resistance to collagen-induced arthritis in SHPS-1 mutant mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(3): 561-566.
- [10] 刘喜德, 万力生. 类风湿关节炎的诊断与治疗 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 246-288.
- [11] 郭辉, 张玲. 乳香中化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *食品与药品*, 2007, 9(5): 50-52.
- [12] 张超, 吴素香, 楼招欢, 等. 豨莶草化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. *安徽医药*, 2011, 15(3): 274-276.
- [13] 申庆亮, 唐启令, 郑凌云, 等. 寻骨风镇痛消炎作用有效部位研究 [J]. *时珍国医国药*, 1999, 10(3): 173-174.
- [14] 张佩蓉, 狄洪震. 山苍子根煎剂对 CIA 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平影响 [J]. *中国血液流变学杂志*, 2008, 18(3): 328-331.
- [15] Sone H, Kawakami Y. Neutralization of vascular endothelial growth factor prevents collagen 2 induced arthritis and ameliorates established disease in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281(2): 562-568.

(收稿: 2012-06-26 修回: 2012-09-29)