

加味独活寄生汤对胶原诱导性关节炎大鼠 关节滑膜及血清中炎症因子的影响

马卫国^{1*}, 刘慧¹, 孟凤仙¹, 张春艳¹, 陆妍²,
王亚南², 林子超², 王浩², 沈志明²

(1. 北京中医药大学 东方医院, 北京 100078; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**观察加味独活寄生汤对Ⅱ型胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠 IL-6、IL-17 及 TNF- α 表达的影响。**方法:**取雄性 SD 大鼠 90 只,正常组 6 只,其余大鼠尾根部按 0.2 mg/只肌肉注射胶原乳剂制成关节炎大鼠模型,选择造模成功大鼠 30 只,随机等分为模型组,来氟米特组和加味独活寄生汤高、中、低剂量组。来氟米特组按 10 mL·kg⁻¹灌胃给予来氟米特,加味独活寄生汤高、中、低剂量组分别按 44,22,11 g·kg⁻¹灌胃给予加味独活寄生汤,模型组及正常组灌胃相同体积水,每天 1 次,连续 12 周。采用 RT-PCR 法检测关节滑膜 IL-6、IL-17、TNF- α 的 mRNA 表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清 IL-6、IL-17、TNF- α 的质量浓度。统计方法采用单因素方差分析。**结果:**与正常组比较,模型组 IL-6、IL-17、TNF- α 的 mRNA 及蛋白表达显著升高;与模型组比较,各治疗组 IL-6、TNF- α 的 mRNA 及蛋白表达显著降低;加味独活寄生汤组 IL-17 蛋白表达显著降低,基因表达无显著性差异。**结论:**加味独活寄生汤对 CIA 大鼠关节炎具有明显改善作用,其抗炎作用机制可能是通过下调炎症细胞因子 IL-6、IL-17、TNF- α 的表达来实现。

[关键词] 关节炎, 类风湿; 白细胞介素 6; 白细胞介素 17; 肿瘤坏死因子- α ; 加味独活寄生汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0197-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230197

Effects of Jiawei Duhuo Jisheng Tang on Expression Levels of Inflammatory Factors in Knee Joint Synovial and Serum of Type II Collagen-induced Arthritis in Rats

MA Wei-guo^{1*}, LIU Hui¹, MENG Feng-xian¹, ZHANG Chun-yan¹, LU Yan²,
WANG Ya-nan², LIN Zi-chao², WANG Hao², SHEN Zhi-ming²

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effects of Jiawei Duhuo Jisheng Tang on mRNA transcription expression levels of interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) in knee joint synovial and protein expression in serum of type II collagen-induced arthritis in rats. **Method:** A rat model of collagen induced arthritis (CIA) was developed with male SPF sprague-dawley rats, thirty CIA rats were divided randomly into 5 groups, the model group were given distilled water (ig, 10 mL·kg⁻¹), the leflunomide group (ig, 10 mL·kg⁻¹), low, medium and high dosage groups of Jiawei Duhuo Jisheng Tang (ig, 11, 22, 44 g·kg⁻¹), 6 rats each group. Rats in the normal group were given the same dosage of distilled water, all rats received oral administration of corresponding medicines once daily for 12 weeks. Levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were examined by ELISA, mRNA

[收稿日期] 20141008(001)

[基金项目] 北京中医药大学自主选题项目(2013-JYBZZ-JS-093)

[通讯作者] * 马卫国,博士,主治医师,从事风湿病学研究,Tel:13641259136,E-mail:maweiguo1977@163.com

transcription expression levels of IL-6, IL-17, TNF- α were detected by RT-PCR. Statistical methods was employed by variance analysis. **Result:** Compared with the normal group, mRNA and protein expression of IL-6, IL-17, TNF- α increased significantly in the model group. Compared with the model group, mRNA and protein of IL-6, TNF- α in treatment groups was down-regulated, protein expression of IL-17 of Jiawei Duhuo Jisheng Tang decreased significantly and mRNA expression of IL-17 was no significant differences. **Conclusion:** Jiawei Duhuo Jisheng Tang shows a certain therapeutic effect on CIA rats, its anti-inflammatory action mechanism may achieve by reducing expression of IL-6, IL-17 and TNF- α .

[**Key words**] arthritis; rheumatoid; interleukin-6; interleukin-17; tumor necrosis factor- α ; Jiawei Duhuo Jisheng Tang

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以对称性外周小关节炎为主要表现的慢性系统性自身免疫病,基本病理改变为滑膜炎、软骨及骨的破坏。RA 的病因及发病机制尚未完全明确,但大量研究证实炎性细胞因子在其发病过程中的作用尤为重要。独活寄生汤是治疗 RA 的名方,来源于《备急千金要方》,由独活 9 g,桑寄生、杜仲、牛膝、细辛、秦艽、茯苓、肉桂心、防风、川芎、人参、甘草、当归、芍药、干地黄各 6 g 组成。现代药理研究表明本方具有较好的镇痛、抗炎、调节免疫及促进微循环等药理作用^[1-2],其配方颗粒能有效地抑制胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠滑膜组织的病理改变^[3],但有关该方抗炎机制方面的研究尚不多。本实验在原方基础上加青风藤、透骨草、地鳖虫、女贞子、鹿角胶组成了加味独活寄生汤,观察其对 CIA 大鼠白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 17 (interleukin-17, IL-17) 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 调节作用,揭示本方治疗 RA 的作用机制,为本方临床用于治疗 RA 提供参考。

1 材料

Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司), TC-96/G/H (b) 型梯度 PCR 仪 (博日科技有限公司), HC-3018R 型高速冷冻离心机 (中科中佳公司), AR1140 型动物脏器电子天平 (美国 Ohaus 公司), UV-2000 型紫外分光光度计 (尤尼柯上海仪器有限公司), RT-6000 型酶标仪 (美国 Rayto 公司)。

加味独活寄生汤配方颗粒剂 (北京康仁堂药业有限公司), 来氟米特片 (苏州长征-欣凯制药有限公司, 批号 130126), 完全弗氏佐剂 (美国 Sigma 公司), 酶联免疫吸附试验法试剂盒 (美国 R&D 公司), 牛 II 型胶原 (美国 Chondrex 公司), 目标基因上下游引物 (上海英骏生物技术有限公司)。

SPF 级雄性 SD 大鼠 90 只, 体重 200 ~ 220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001。

2 方法与结果

2.1 造模与分组 取 90 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后造模, 随机选取 6 只作为正常组, 其余 84 只大鼠造模。取牛 II 胶原冻粉 30 mg 溶于 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸 15 mL 中, 4 ℃ 冰箱冷藏过夜。次日与完全弗氏佐剂 15 mL 充分乳化, 得 1 g·L⁻¹ 胶原乳剂。初次免疫时, 于大鼠尾根部皮下按 200 μ L/只注射胶原乳剂, 9 d 后按 100 μ L/只再次尾根部皮下注射, 正常组注射等体积生理盐水。第 16 天进行关节炎指数评分^[4], 选取评分 ≥ 4 分的大鼠 30 只, 随机分为 5 组, 分别为模型组 (每日按 0.01 mL·g⁻¹ 灌胃给水), 来氟米特组 (将药物制成粉剂溶解于水中, 配制成 0.19 g·L⁻¹ 溶液按 0.01 mL·g⁻¹ 灌胃给药) 及加味独活寄生汤高、中、低剂量组 (将配方颗粒常规煎煮并浓缩, 高、中、低剂量组质量浓度分别为 4.4, 2.2, 1.1 g·mL⁻¹, 按 0.01 mL·g⁻¹ 灌胃给药, 分别相当于正常成人用量的 2, 1, 0.5 倍), 正常组处理方法同模型组。标准给药量按体重换算, 中剂量组大鼠用药量 = 正常成人用药量/60 kg $\times$ 5.6, 高、低剂量组为中剂量组的 2, 1/2 倍。

2.2 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 方差齐用 LSD 法, 方差不齐用 Tamhane 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.3 RT-PCR 法检测关节滑膜 IL-6, IL-17, TNF- α 的 mRNA 表达 取大鼠左后肢踝关节滑膜组织 20 μ g, 使用 trizol 试剂提取组织中 RNA, 分别用上述引物进行一步法实时荧光 PCR 反应, 反应体积 25 μ L, 反应体系含样本 RNA 2 μ L, power SYBR green 17.2 μ L, 10 pmol 诱导起始引物和终止扩增反应的引物各 0.8 μ L。IL-6 基因序列上下游引物分别为 5'-

CCCTGACTGGCTAAAGGACA-3'和 5'-CAGTACAGC-CGCCTTCTAGG-3';IL-17 基因序列上下游引物分别为 5'-TACAACCTCCTTGCAGCTCC-3'和 5'-GGATCT-TCATGAGGTGTCAGTC-3';TNF- α 基因序列上下游引物分别为 5'-GGATCTCAAAGACAACCAAC-3'和 5'-ACAGAGCAATGACTCCAAAG-3';看家基因 GAPDH 基因序列上下游引物分别是:5'-CCCATC-TATGAGGGTTACGC-3'和 5'-TTTAATGTCACG-CACGATTTTC-3'。反应条件为 42℃ 灭活 5 min,95℃ 变性 10 s,95℃ 退火 5 s,60℃ 延伸 34 s,共 40 个

循环。反应结束后进行熔解曲线分析,以鉴定聚合酶链反应 (polymerase chain reaction,PCR) 产物的特异性,使用 SDS 软件分析 PCR 过程各检测样本的循环阈值,见表 1。结果显示与正常组比较,模型组大鼠关节滑膜组织 IL-6,IL-17 及 TNF- α 的 mRNA 表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,来氟米特组和加味独活寄生汤高、中、低剂量组滑膜 IL-6, TNF- α 的 mRNA 表达明显降低($P<0.01$),来氟米特组 IL-17 的 mRNA 表达显著降低($P<0.01$),高、中、低剂量组未见明显降低。

表 1 加味独活寄生汤对大鼠关节滑膜 IL-6,IL-17,TNF- α mRNA 表达量的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-6/次/min	IL-17/次/min	TNF- α /次/min
正常	-	119.60 $\pm$ 13.50	112.17 $\pm$ 14.62	107.46 $\pm$ 17.02
模型	-	514.38 $\pm$ 22.73 ²⁾	516.21 $\pm$ 13.24 ²⁾	704.32 $\pm$ 48.39 ²⁾
来氟米特	0.19 $\times 10^{-3}$	193.29 $\pm$ 22.70 ⁴⁾	343.07 $\pm$ 18.39 ⁴⁾	272.68 $\pm$ 25.89 ⁴⁾
加味独活寄生汤	4.4	309.72 $\pm$ 12.46 ⁴⁾	481.42 $\pm$ 35.69	318.07 $\pm$ 15.36 ⁴⁾
	2.2	381.70 $\pm$ 24.34 ⁴⁾	496.11 $\pm$ 64.39	353.84 $\pm$ 25.25 ⁴⁾
	1.1	418.81 $\pm$ 19.36 ⁴⁾	511.97 $\pm$ 23.79	521.96 $\pm$ 32.42 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;(表 2 同)。

2.4 对血清 IL-6,IL-17,TNF- α 含量的影响 给药 12 周时处死大鼠,10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血 2 mL,于 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液液氮冻存,测定前将标本室温复融混匀,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定大鼠血清 IL-6,IL-17 及 TNF- α 水平,按照试剂盒说明书要求操作,见表 2。结果与

正常组比较,模型组血清 IL-6,IL-17,TNF- α 质量浓度明显升高($P<0.01$);与模型组比较,来氟米特组和加味独活寄生汤高、低剂量组血清 IL-6,IL-17,TNF- α 含量明显降低($P<0.01$);中剂量组血清 IL-6,TNF- α 含量明显降低($P<0.01$),IL-17 亦降低,但与模型组比较无显著性差异。

表 2 加味独活寄生汤对大鼠血清中 IL-6,IL-17,TNF- α 含量的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-17/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	36.11 $\pm$ 3.59	6.89 $\pm$ 1.82	96.97 $\pm$ 15.93
模型	-	51.95 $\pm$ 7.22 ²⁾	14.83 $\pm$ 2.01 ²⁾	380.64 $\pm$ 62.27 ²⁾
来氟米特	0.19 $\times 10^{-3}$	38.43 $\pm$ 3.30 ⁴⁾	5.96 $\pm$ 3.36 ⁴⁾	119.58 $\pm$ 9.16 ⁴⁾
加味独活寄生汤	4.4	38.50 $\pm$ 6.13 ⁴⁾	3.35 $\pm$ 1.06 ⁴⁾	145.16 $\pm$ 80.06 ⁴⁾
加味独活	2.2	39.24 $\pm$ 4.43 ⁴⁾	9.93 $\pm$ 4.16	165.15 $\pm$ 80.06 ⁴⁾
	1.1	38.43 $\pm$ 3.02 ⁴⁾	3.22 $\pm$ 1.07 ⁴⁾	85.63 $\pm$ 26.38 ⁴⁾

3 讨论

CIA 大鼠是目前应用较广泛、成熟的整体动物实验模型,在体征、发病机制、病理改变及实验室指标等方面与人类 RA 相似^[5]。研究证实 RA 的发生与辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17,Th17)的分化密切相关。IL-17 是 Th17 产生的最重要的细胞因子,是一种强有力的炎症细胞因子,可诱导多种促炎

症因子的产生,如 IL-6,TNF- α ,IL-1 β 等,这些炎症因子均可导致组织的炎症^[6]。同时,IL-17 还可与 TNF- α ,IL-1 β 等细胞因子协同作用,从而放大了其炎症效应^[7]。TNF- α 是 RA 滑膜炎症反应的关键性细胞因子,具有多种炎性和免疫反应活性,几乎参与 RA 炎症反应的所有环节^[8],在 RA 滑膜炎及骨和软骨的破坏中起着非常重要的作用。IL-6 是 RA 滑膜

炎症及关节损伤的重要介质之一,能诱导其他炎性因子包括 IL-17 发挥致病作用^[9]。IL-6 对 RA 的致病作用主要在于增加 IL-1 和 TNF- α 的效应,被认为是 TNF- α 某些生物效应的放大因子。IL-6 的水平在 RA 病人的关节液和血浆中均明显上升,并且与病情的变化有关^[10]。说明在 RA 炎症过程中,上述 3 种炎症因子相互诱导,协同作用,将炎症作用增强放大。

研究显示加味独活寄生汤对 CIA 关节炎大鼠关节炎症具有明显改善作用^[11]。本文研究表明加味独活寄生汤能下调 CIA 大鼠 IL-6, TNF- α 的 mRNA 及蛋白表达,血清 IL-17 蛋白表达亦显著性降低,提示加味独活寄生汤治疗 RA 的分子机制可能是通过下调多种炎性相关细胞因子表达来抑制免疫炎性反应,以达到保护或缓解 RA 关节病理损伤的作用。

[参考文献]

[1] 段泾云. 独活寄生汤抗炎免疫药理作用研究[J]. 中成药,1988,10(5):28.

[2] 朱自平. 独活寄生汤对微循环的影响[J]. 中成药,1991,13(3):26.

[3] 王爱武,刘娅,林晓燕,等. 独活寄生汤及其配方颗粒对胶原诱导型关节炎大鼠滑膜组织病理学变化的影响[J]. 中国中医药科技,2010,17(3):202.

[4] Shou J, Bull C M, Li L, et al. Identification of blood

biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen arthritis model[J]. Arthritis Res Ther,2006,8(1):28.

[5] Bajtner E, Nandakumar K S, Holmdahl R, et al. Chronic development of collagen-induced arthritis is associated with arthritogenic antibodies against specific epitopes on type II collagen [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(5):1148.

[6] Chabaud M, Durand J M, Buchs N, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium [J]. Arthritis Rheum,1999, 42(5):963.

[7] Onishi R M, Gaffen S L. Interleukin-17 and its target genes;mechanisms of interleukin-17 function in disease [J]. Immunology,2010,129(3):311.

[8] 蒋明,朱立平,林孝义,等. 中华风湿病学[M]. 北京:华夏出版社,2004:771.

[9] Nakahara H, Song J, Sugimoto M, et al. Anti-interleukin-6 receptor anti-body therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum,2003,48(6):1521.

[10] 傅德杰,王智勇. 以 Th17 细胞为靶点治疗类风湿性关节炎研究进展[J]. 免疫学杂志,2011,27(9):812.

[11] 马卫国,刘慧,张春艳,等. 加味独活寄生汤对胶原诱导性关节炎大鼠关节炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):155.

[责任编辑 刘德文]

《中国医药导报》杂志
欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的医药卫生期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、美国化学文摘(CA)收录期刊、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库收录期刊,所刊登的文章被万方数据、中国知网、中文科技期刊数据库全文收录。每期定价 20 元,全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设专家论坛、综述、论著、实验研究、药理与毒理、临床研究、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、病例报告、医疗器械、中医中药、生物医药、药品检验、制剂与技术、药师与临床、不良反应监测、药物经济学、调查研究、护理研究、教育研究、科研管理、法规与标准、卫生研究、医疗管理、产业与市场、医药监管、工作探讨等栏目。是广大医药卫生科研、教育、医护、药事、经营管理人员了解医药研究进展、发展动态,展示医药科研成果,学习先进经验,探讨工作难题,交流和提高业务学术水平的得力助手,也是发表医药学术论文的阵地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025
投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533
传真:010-59679056 投稿信箱:yydb@vip.163.com
网址:www.yiyaodaobao.com.cn