

黎药除湿祛风汤对鸡Ⅱ型胶原蛋白诱导关节炎模型大鼠的保护作用研究[△]

张丽^{1*}, 张一云², 符洪², 王开裕¹, 雷玲芳¹, 王春桃^{2#}(1.海南省中医院药学部, 海口 570203; 2.海南省药物研究所, 海口 570216)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3088-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.19

摘要 目的:研究黎药除湿祛风汤对鸡Ⅱ型胶原蛋白诱导关节炎模型大鼠的保护作用。方法:将60只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性组和除湿祛风汤高、中、低剂量组[45.9、22.95、11.48 g(生药)/kg],除正常组外,其余各组大鼠均以鸡Ⅱ型胶原蛋白诱导关节炎模型。建模后,除湿祛风汤各剂量组大鼠ig相应药物,正常组和模型组大鼠ig生理盐水,每天1次,连续给药12 d;阳性组大鼠实验1~3 d ig来氟米特4.5 mg/kg,4~12 d ig来氟米特1.8 mg/kg,每天1次。观察大鼠关节病变程度并进行评分,测定关节肿胀度和血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)和Ⅱ型胶原蛋白抗体水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠关节炎指数评分、关节肿胀度及血清中TNF- α 、IL-1 β 、Ⅱ型胶原蛋白抗体水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,阳性组和除湿祛风汤高剂量组大鼠病理评分显著降低,各给药组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、Ⅱ型胶原蛋白抗体水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:黎药除湿祛风汤对鸡Ⅱ型胶原蛋白诱导模型大鼠具有一定的保护作用。

关键词 黎药;除湿祛风汤;类风湿性关节炎;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素1 β ;大鼠

Study on Protective Effects of Li Medicine Chushi Qufeng Decoction on Arthritis Model Rats Induced by Chicken Type II Collagen

ZHANG Li¹, ZHANG Yiyun², FU Hong², WANG Kaiyu¹, LEI Lingfang¹, WANG Chuntao²(1.Dept. of Pharmacy, Hainan Provincial Hospital of TCM, Haikou 570203, China; 2.Pharmaceutical Institute of Hainan Province, Haikou 570216, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the protective effects of Li medicine Chushi qufeng decoction on arthritis model rats. **METHODS:** 60 rats were randomly divided into normal group, model group, positive group and Chushi qufeng decoction high-dose, medium-dose and low-dose groups [45.9, 22.95, 11.48 g(crude drug)/kg]. Except for normal group, those groups were given chicken type II collagen to induce arthritis model. After modeling, normal group and model group were given normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 12 d; Chushi qufeng decoction groups were given relevant medicine intragastrically; positive group was given leflunomide 4.5 mg/kg on 1st-3rd day and 1.8 mg/kg on 4th-12th day. The degree of joint lesion in rats were scored. The degree of joint swelling was determined as well as the serum levels of TNF- α , IL-1 β and type II collagen antibody. **RESULTS:** Compared with normal group, arthritis index, degree of joint swelling, the serum levels of TNF- α , IL-1 β and type II collagen antibody increased significantly in model group ($P<0.01$). Compared with model group, pathological score of positive group and Chushi qufeng decoction high-dose group decreased significantly, and serum levels of TNF- α , IL-1 β and type II collagen antibody decreased significantly in treatment groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS:** Li medicine Chushi qufeng decoction has certain protective effect on arthritis model rats induced by chicken type II collagen.

KEYWORDS Li medicine; Chushi qufeng decoction; Rheumatoid arthritis; TNF- α ; IL-1 β ; Rat

类风湿性关节炎(RA)是一种慢性、全身性自身免疫性疾病。该病可能的诱因有身体因素(如劳累、关节损伤、感染等),生活环节潮湿,天气变化以及精神方面的疾病、创伤等^[1],病理机制尚未完全阐明。滑膜间充质细胞、基质金属蛋白酶和破骨细胞是RA患者关节破坏的3种主要细胞^[2]。活化的滑膜细胞具有永生性、侵袭性,直接侵蚀关节软骨,释放大量的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)等促炎因子,从而诱发或加速RA的形成^[3-4]。

黎族验方湿祛风汤主要由黄连藤、胆木、雅能树、龙骨枫、渴扑、苏木、松筋藤等18种黎族药材组成,该方由五指山海南黎族民间医药研究协会提供。其具有祛风除湿、通络除痹、治疗风湿关节痛的功效^[5]。因本方为验方,虽然临床应用疗效显著,但无药效学实验依据。因此,在本研究中,作者拟以鸡Ⅱ型胶原蛋白诱导关节炎(CIA)大鼠模型(此模型的发病机制与人RA的发病机制相似),并以来氟米特片为阳性药物,考察湿祛风汤对RA的药效学作用,为传统黎族经验方提供更科学的依据,为未来黎族药物研发奠定实验基础。

1 材料

1.1 仪器

YLS-7C足趾容积测量仪(河南益阳仪器厂);KHB-ST360酶标仪(上海科华仪器厂);DT5-2离心机(北京时代北利离心

[△] 基金项目:海南省中药现代化专项项目(No.2015ZY18)

* 副主任中药师。研究方向:医院药学、中药制剂。电话:0898-66224599。E-mail:1047559396@qq.com

通信作者:副主任药师。研究方向:药品检验、药品质量标准。电话:0898-66832918。E-mail:1721170395@qq.com

机有限公司);AUW220D电子天平(日本岛津公司)。

1.2 药材、药品与试剂

黄连藤、胆木、雅能树、龙骨枫、渴扑、苏木、松筋藤等18种药材均由五指山海南黎族民间医药研究协会采集、提供,经海南大学黄世满教授鉴定均为真品;来氟米特片(苏州长征-欣凯制药有限公司,批号:13070310,规格:10 mg/片;鸡Ⅱ型胶原蛋白(美国Sigma公司);IL-1 β 、Ⅱ型胶原蛋白抗体、TNF- α 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国TSZ公司);水为生理盐水,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康SD大鼠60只,♀,体质量(200 \pm 50)g,购自广东省医学实验动物中心[生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002]。

2 方法

2.1 除湿祛风汤的制备

按方中组成称取相应药材,共计255g。加5倍量水煎煮30min,过滤,收集滤液;滤渣再加5倍量水煎煮30min;合并2次滤液,浓缩至药液体积为110ml,即得。

2.2 动物造模、分组与给药

2.2.1 造模 取50只大鼠于背部sc鸡Ⅱ型胶原蛋白(0.5mg/ml),每只0.9~1.0ml,分5~8点注射,复制CIA型关节炎模型。致炎后7d,再ip相同剂量药物并通过左足底sc鸡Ⅱ型胶原蛋白(0.1ml/只),以加强免疫攻击(此时大鼠可见明显过敏反应,如腹部收缩、背部拱起、左足立即变红)。致炎18d后,大鼠左足明显红肿,提示造模成功。

2.2.2 分组 造模后将造模大鼠随机分为模型组、阳性组和除湿祛风汤高、中、低剂量组,每组10只;另取10只正常大鼠作为正常组。

2.2.3 给药 除湿祛风汤高、中、低剂量组大鼠分别ig除湿祛风汤45.9、22.95、11.48g/kg(给药量按生药计,按体表面积换算,分别为人临床用量的10、5、2.5倍),每天1次,连续12d;阳性组大鼠在实验前3d按4.5 \times 10 $^{-3}$ g/kg(按人体剂量给予负荷剂量50mg算)ig来氟米特片溶液,实验第4~12d按1.8 \times 10 $^{-3}$ g/kg(按人体剂量给予维持剂量每次20mg)ig来氟米特片溶液,每天1次,连续12d;正常组和模型组大鼠按1ml/100gig生理盐水,每天1次,连续12d。

2.3 指标考察

2.3.1 关节炎指数评分 给药当日(1d)开始,观察各组大鼠后肢关节病变程度。采用关节炎指数积分法,参考文献[6]对病变进行评分:0分代表关节无红肿;1分代表关节有红色斑点或轻度肿胀;2分代表关节中度肿胀;3分代表关节严重肿胀;4分代表关节严重肿胀且不能负重;5分代表关节肿胀且变形。关节炎指数评分越高,表示关节炎症状越严重。记录给药第1天(1d)、给药第6天(6d)及第12天(12d)各组大鼠后肢关节病理评分,最后评分为大鼠左、右后足的病理评分之和。

2.3.2 足肿胀度 末次给药1h后,用10%戊巴比妥钠(2ml/只)将大鼠深度麻醉,称体质量(g),用足肿胀度仪测量各组大鼠后足踝关节以下的容积(ml),计算肿胀度[肿胀度=足容积(ml)/体质量(100g)]。

2.3.3 生化指标 在麻醉后大鼠的下腔静脉取血,使用一次性人体静脉血样采集容器收集血液,分离血清,-20℃保存,备用。ELISA法测定血清中抗Ⅱ型胶原蛋白抗体、TNF- α 和IL-1 β 水平,具体操作按相应试剂盒说明书进行。计算药物对炎症因子及抗体的抑制率[抑制率=(模型组指标水平-给药组指标水平)/(模型组指标水平-正常组指标水平) \times 100%]。

2.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用单因素方差分析(若方差齐,行Dunnett-t检验;若方差不齐,则行Dunnett-F3检验);计数资料采用Ridit法进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠关节炎指数评分结果

给药1d时,与模型组比较,各给药组大鼠关节炎指数评分几乎一致,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。给药6d时,模型组大鼠关节炎指数评分升高,其余各组大鼠关节炎指数评分较模型组均有一定抑制,但各组间差无统计学意义($P > 0.05$)。给药12d时,模型组大鼠关节炎指数评分继续升高,其余各组大鼠关节炎指数评分较模型组均有所降低,其中阳性组和除湿祛风汤高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠关节炎指数评分结果见表1。

表1 各组大鼠关节炎指数评分结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Arthritis index of joint in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,g/kg	关节炎指数评分		
		给药1d	给药6d	给药12d
模型组		3.4 \pm 0.55	3.8 \pm 0.45	4.2 \pm 0.84
阳性组	4.5 \times 10 $^{-3}$ 或1.8 \times 10 $^{-3}$	3.2 \pm 0.45	3.0 \pm 0.71	2.6 \pm 0.55**
除湿祛风汤高剂量组	45.9	3.4 \pm 0.55	3.2 \pm 0.84	2.8 \pm 0.45*
除湿祛风汤中剂量组	22.95	3.4 \pm 0.55	3.4 \pm 0.55	3.0 \pm 0.71
除湿祛风汤低剂量组	11.48	3.4 \pm 1.14	3.4 \pm 1.14	3.2 \pm 0.84

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 各组大鼠足肿胀度测定结果

正常组大鼠左、右后足肿胀度一致,属于正常状态。与正常组比较,模型组大鼠左、右后足肿胀度升高($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性组和除湿祛风汤高剂量组大鼠左后足肿胀度降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),右后足肿胀度差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠足肿胀度测定结果见表2。

表2 各组大鼠足肿胀度测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10, ml/100g$)

Tab 2 Degree of foot swelling in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10, ml/100g$)

组别	剂量,g/kg	左后足	右后足
正常组		0.58 \pm 0.07	0.57 \pm 0.07
模型组		1.26 \pm 0.18*	0.83 \pm 0.07*
阳性组	4.5 \times 10 $^{-3}$ 或1.8 \times 10 $^{-3}$	0.88 \pm 0.14**	0.72 \pm 0.09
除湿祛风汤高剂量组	45.9	1.00 \pm 0.14*	0.74 \pm 0.09
除湿祛风汤中剂量组	22.95	1.02 \pm 0.15	0.77 \pm 0.10
除湿祛风汤低剂量组	11.48	1.11 \pm 0.16	0.76 \pm 0.11

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 各组大鼠血清中炎症因子测定结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性组和除湿祛风汤高、中剂量大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);除湿祛风汤低剂量组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平测定结果见表3。

3.4 各组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体含量测定结果

正常组比较,模型组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体含量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性组和除湿祛风汤高、中剂量组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体含量显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);除湿祛风汤低剂量组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋

白抗体含量差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体含量测定结果见表4。

表3 各组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Serum levels of TNF- α and IL-1 β in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TNF- α		IL-1 β	
	含量,pg/ml	抑制率,%	含量,pg/ml	抑制率,%
正常组	37.42 \pm 4.75		8.24 \pm 0.37	
模型组	72.42 \pm 2.56*	0	11.63 \pm 1.05*	0
阳性组	48.39 \pm 10.07 [#]	68.7	8.97 \pm 0.68 ^{##}	78.5
除湿祛风汤高剂量组	47.18 \pm 3.75 ^{##}	72.1	9.11 \pm 0.33 ^{##}	74.3
除湿祛风汤中剂量组	57.74 \pm 13.84	41.9	9.20 \pm 0.78 ^{##}	71.7
除湿祛风汤低剂量组	58.39 \pm 12.35	40.1	10.19 \pm 0.89	42.5

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

Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

表4 各组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Serum content of type II collagen antibody in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	Ⅱ型胶原蛋白抗体,pg/ml	抑制率,%
正常组		8.37 \pm 0.73	
模型组		12.96 \pm 1.33*	
阳性组	4.5 \times 10 ⁻³ 或1.8 \times 10 ⁻³	10.16 \pm 0.69 ^{##}	61.0
除湿祛风汤高剂量组	45.9	10.71 \pm 0.86 [#]	49.0
除湿祛风汤中剂量组	22.95	10.90 \pm 0.58	44.8
除湿祛风汤低剂量组	11.48	13.06 \pm 2.96	0

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

Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

4 讨论

目前,常用的关节炎动物模型主要有Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型(CIA型)和完全弗氏佐剂诱导的佐剂性关节炎动物模型(AA型)两种。CIA模型^[2]在病理学的诱因及变化上与人RA更为相似,更适合作为关节炎模型^[3],故在本实验中笔者用此模型进行RA的研究。造模后,可见成模大鼠关节严重红肿、变形,无法正常利用关节站立,提示造模成功。在此模型中,Ⅱ型胶原蛋白诱导产生的免疫失衡是导致软骨损伤的诱因,因此大鼠体内的Ⅱ型胶原蛋白抗体含量与RA症状呈正相关。本实验结果显示,模型组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体含量显著增加,表明造模成功;除湿祛风汤高、中剂量组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体含量显著减少,表明用药后关节炎症状得到改善;然而除湿祛风汤低剂量组大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体水平与模型组接近,表明此剂量下无治疗作用。

来氟米特片作为一种免疫调节剂,是当前应用于类风湿性关节炎较广泛的药物,具有疗效好、起效快、不良反应较轻的优点^[7]。其机制为抑制嘧啶合成途径,从而抑制淋巴细胞活化增殖能力^[8],降低免疫球蛋白、炎性因子释放等,因此笔者在本实验中以其为阳性对照药。

TNF- α 是一种促炎因子,主要通过巨噬细胞表达,具有刺激免疫细胞转化、诱发新生血管生成的作用,其与软骨结构的破坏相关^[9]。因此,市面上开发出了一系列针对TNF- α 的单抗抑制剂^[9],旨在通过抗体结合从而降低血清中TNF- α 水平,缓解关节炎性反应,然而却存在潜在的感染及肿瘤风险^[10]。而针对IL-1的抑制剂主要通过拮抗作用降低IL-1水平,IL-1Ra是IL-1的受体拮抗剂^[11],注射外源IL-1Ra便能明显减轻关节软骨破

坏。在本实验中发现黎药处方能显著地抑制TNF- α 、IL-1 β 水平,表明该方具有较强的调节体内免疫功能,可能通过恢复体内各免疫系统之间拮抗作用而发挥作用,尤其针对IL-1 β 的作用非常明显,达到阈值的给药剂量(在低剂量与中剂量之间)便能非常显著地抑制IL-1 β 产生,能够直接保护关节软骨及抑制后续炎症的发展。从对TNF- α 及IL-1 β 的作用效果来看,本黎药处方中剂量在降低关节炎损害的同时,又无过多增加感染及肿瘤的风险,是一种风险较低的RA药物。

关节滑膜、软骨及骨损伤是关节炎3个不同程度的损伤等级,Ⅱ型胶原蛋白作为软骨标志物,其中有许多抗原表位能够诱发产生抗体,活化的B淋巴细胞产生的Ⅱ型胶原蛋白抗体是软骨破坏的一个重要因素^[12],其可被IL-1系列所刺激活化。在实验中,模型组血清内的Ⅱ型胶原蛋白抗体含量明显升高,而黎药的高、中剂量均能明显地抑制大鼠血清中Ⅱ型胶原蛋白抗体含量,与来氟米特片除湿祛风汤的药效作用在同一水平。这表明该方通过抑制IL-1 β 的产生能很好地减少Ⅱ型胶原蛋白的体内含量,有助于维持关节软骨组织的稳定。

综上,虽目前尚不得知本黎药处方是否具有恢复骨关节、软骨及滑膜组织再生的作用,需要更进一步研究确定,但本研究可证实此黎药处方是一种优良的、能够明确抑制RA发展的民族药方。

参考文献

- [1] 郑希龙,甘炳春,孙伟,等.“材”类黎药资源的传统利用[J].世界科学技术:中医药现代化,2004,16(2):313.
- [2] 赵宏艳,王燕,肖诚,等.不同品系、不同性别对大鼠CIA发病情况的比较研究[J].中国中医基础医学杂志,2010,16(9):761.
- [3] 潘磊,杜文喜,卢建华.胶原诱导性和佐剂性大鼠关节炎模型的比较[J].山西中医学院学报,2013,14(4):12.
- [4] 宋珊珊,张玲玲,魏伟.实验性关节炎动物模型建立及病理机制研究进展[J].中国药理学通报,2011,27(12):1648.
- [5] Irarrazabal CE, Williams CK, Ely MA, et al. Activator protein-contributes to high NaCl-induced increase in tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein transactivating activity[J]. J Biol Chem, 2008, 285(5):2554.
- [6] 何国雄,梁清华,杨波,等.胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织醛缩酶A表达及痹肿消汤的干预效应[J].中国临床摘要,2006,10(47):103.
- [7] Smolen JS, Kalden JR, Scott DL, et al. Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: a double-blind, randomised, multicentre trial[J]. Lancet, 1999, 353(23):259.
- [8] 王军,祖比亚,覃学勇.来氟米特临床应用进展[J].现代生物医学进展,2010,10(23):4585.
- [9] 张晶,钟武,李松. TNF- α 抑制剂的研究进展[J].中国药物化学杂志,2010,20(4):310.
- [10] Jackie N, Paul E. Aspects of TNF inhibitor therapy in rheumatoid arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2010, 20(3):325.
- [11] 汪洁,岳野,成文翔,等.类风湿性关节炎与IL-1/IL-1Ra平衡关系的研究进展[J].中国当代医药,2015,9(12):30.
- [12] Kim WU, Yoo WH, Park W. IgG antibodies to type II collagen reflect inflammatory activity in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2000, 27(3):575.

(收稿日期:2016-03-04 修回日期:2016-05-16)

(编辑:林 静)