

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.05.015

新风胶囊对佐剂关节炎大鼠滑膜组织缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子的影响

张晓军^{1,2}, 刘健^{*}, 万磊³, 孙玥², 王芳², 齐亚军², 黄传兵³

(1. 湖北中医药大学, 湖北省武汉市黄家湖路 1 号, 430065; 2. 安徽中医药大学; 3. 安徽中医药大学第一附属医院)

基金项目: 国家中医药管理局中医药重点学科中医痹病学建设项目 (国中医药发 [2009] 30 号); 安徽省科技厅科研计划项目 (09020304046); 安徽省卫生厅中医药科研项目 (2009ZY05); 安徽中医学院科技创新团队项目 (2010TD005)

摘要 **目的** 探讨新风胶囊治疗类风湿关节炎抗血管新生的可能作用机制。 **方法** 50 只 SD 大鼠随机为正常对照组、模型对照组、甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组、新风胶囊组, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余各组均采用弗氏完全佐剂建立佐剂关节炎大鼠模型。造模后第 19 天, 新风胶囊组给予新风胶囊溶液 2.4 g/kg 灌胃, 雷公藤多苷片组给予雷公藤多苷片溶液 10 mg/kg 灌胃, 均每天 1 次; 甲氨蝶呤组给予甲氨蝶呤溶液 3 mg/kg 灌胃, 每周 1 次; 正常对照组、模型对照组给予 1.0 g/kg 生理盐水灌胃, 每天 1 次, 各组均灌胃 30 天。比较各组大鼠足跖肿胀度、关节炎指数及滑膜组织缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 并进行滑膜微血管密度 (MVD) 计数。 **结果** 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠足跖肿胀度、关节炎指数升高, 滑膜组织 MVD 计数、VEGF、HIF-1 α 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组及新风胶囊组大鼠足跖肿胀度、关节炎指数降低, 滑膜组织 MVD 计数、VEGF、HIF-1 α 表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 并且新风胶囊组 HIF-1 α 较甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组降低明显, VEGF 较甲氨蝶呤组降低明显 ($P < 0.05$)。 **结论** 新风胶囊通过降低大鼠滑膜组织 VEGF、HIF-1 α 的表达发挥抑制滑膜血管新生的作用。

关键词 类风湿关节炎; 新风胶囊; 血管新生; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的特征性病理改变为滑膜组织炎症反应、滑膜细胞增生, 血管翳形成, 血管翳侵犯关节软骨, 从而造成关节畸形和功能障碍。RA 病理改变导致滑膜细胞出现类肿瘤样生长, 从而进一步加重血管新生形成^[1]。研究发现, 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 不但在 RA 发病中起重要的作用, 而且在滑膜血管新生中发挥作用^[2-3]。本研究通过复制佐剂关节炎 (AA) 大鼠模型, 从 HIF-1 α 、血管内皮生长因子 (VEGF) 角度探讨新风胶囊抗 AA 大鼠滑膜血管生成的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 50 只, 6~8 周龄, 体重 200~220 g, 由安徽省实验动物中心提供, 实验动物许

可证号: SYXK (皖) 2012-0004。

1.2 试剂与药品

弗氏完全佐剂 (FCA): 美国 Sigma 公司, 批号: 103K8604; HIF-1 α 检测试剂盒: 美国 Bio-world 生物技术公司, 批号: BS1361; VEGF 检测试剂盒: 美国 Santa Cruz 生物技术公司, 批号: sc-398; 微血管密度 (MVD) 检测试剂盒: 美国 Santa Cruz 生物技术公司, 批号: sc-400。

新风胶囊: 安徽中医药大学第一附属医院院内制剂, 0.4 g/粒, 安徽中医药大学第一附属医院制剂中心提供, 由黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤组成, 批号 2011050701。甲氨蝶呤: 2.5 mg/片, 上海信谊制药总厂生产, 批号 2011102503。雷公藤多苷片: 10 mg/片, 上海红旗制药厂生产, 批号 2010120404。

1.3 仪器与设备

病理切片机: 德国 Leica 公司, 型号:

* 通讯作者: liujianahzy@126.com, (0551) 62838582

KMI135; 光镜: 德国 Leica 公司, 型号: DMLB; 显微摄像系统: 日本 Olympus 公司, 型号: BX51T-32000-2; 电泳仪: 美国 Amersham 公司, 型号: EPS-301; 凝胶图像分析仪: 美国 Bio-Rad 公司, 型号: Gel Doc XR。

1.4 模型制备与分组

将 50 只大鼠采用随机数字表法分为正常对照组、模型对照组、新风胶囊组、甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组, 每组 10 只。除正常对照组外, 向其余 4 组大鼠右足跖皮内注射 FCA 0.1 ml 致炎, 复制成 AA 大鼠模型^[4], 致炎后第 19 天开始给药, 按照实验动物与人体体表面积比等效剂量换算比例^[5] (相当于临床成人等效剂量 8 倍), 新风胶囊组给予新风胶囊溶液 (浓度 0.24 g/ml) 2.4 g/kg 灌胃, 雷公藤多苷片组给予雷公藤多苷片溶液 (浓度 1 mg/ml) 10 mg/kg 灌胃, 均每天 1 次; 甲氨蝶呤组给予甲氨蝶呤溶液 (浓度 0.3 mg/ml) 3 mg/kg 灌胃, 每周 1 次; 正常对照组、模型对照组给予生理盐水 1.0 g/kg 灌胃, 每天 1 次。各组均灌胃 30 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 足跖肿胀度、关节炎指数的测算^[6] 足跖肿胀度: 给药前肿胀度 = $V_{t1} - V_{n1} / V_{n1} \times 100\%$, 给药后肿胀度 = $V_{t2} - V_{n2} / V_{n2} \times 100\%$, V_{t1} 、 V_{t2} 分别代表给药前后足容积, V_{n1} 、 V_{n2} 分别代表致炎前后足容积。关节炎指数: 0 分 = 无红肿, 1 分 = 小趾关节红肿, 2 分 = 趾关节和足跖肿胀, 3 分 = 踝关节以下足爪肿胀, 于致炎 12 天和给药后各评分 1 次。

1.5.2 滑膜 MVD 测定 将各组大鼠无菌取双膝关节滑膜, 常规制备石蜡包埋切片, 行 SABC 法染色。采用山羊抗鼠 MVD 多克隆抗体标记血管内皮细胞 (一抗浓度稀释比例 1: 200), DAB 染色、苏木精复染、脱水、透明、封片, 显微镜下观察各组血管新生情况。在 $\times 100$ 倍的视野下计数 3 个微血管密集区的微血管数, 取其平均值表示 MVD^[7]。

1.5.3 滑膜组织 HIF-1 α 、VEGF 表达的检测 采用免疫组织化学技术, 参照链霉抗生物素蛋白-过氧化物 (SP) 法进行操作。一抗 HIF-1 α (兔抗鼠)、VEGF (兔抗鼠) 用抗体稀释液按照 1: 100 稀释。每组切片中选用 2 张设为用阴性对照 (0.01M PBS 液代替一抗进行染色)。采用平均积分光密度 (MOD) 表示 HIF-1 α 、VEGF 的相对表达量; $MOD = \text{累计光密度值 (IOD)} / \text{有效测量区域面积 (Area)}$ 。MOD 值越大, 阳性反应越强, 表示蛋白表达量越高。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件分析数据, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立 t 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠足跖肿胀度、关节炎指数的比较

表 1 示, 与正常对照组同时时间点比较, 模型对照组、甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组及新风胶囊组足跖肿胀度、关节炎指数均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组给药后比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组及新风胶囊组足跖肿胀度、关节炎指数均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各治疗组之间足跖肿胀度、关节炎指数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠滑膜 MVD 计数比较

表 2 示, 模型对照组大鼠滑膜 MVD 明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组及新风胶囊组 MVD 明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠滑膜组织 HIF-1 α 、VEGF 表达比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠滑膜组织 HIF-1 α 、VEGF 表达量升高 ($P < 0.01$); 甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组大鼠滑膜组织 HIF-1 α 表达量亦较正常对照组升高 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤多苷片组及新风胶囊组 HIF-1 α 、VEGF 表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 并且新风胶囊组 HIF-1 α 较甲氨蝶呤

表 1 各组大鼠足跖肿胀度及关节炎指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	足跖肿胀度 (%)		关节炎指数 (分)	
		给药前	给药后	致炎 12 天	给药后
正常对照组	10	2.34 $\pm$ 0.73	7.76 $\pm$ 2.78	0.08 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.05
模型对照组	10	45.94 $\pm$ 6.70*	21.25 $\pm$ 6.86*	1.11 $\pm$ 0.24*	7.08 $\pm$ 1.24*
甲氨蝶呤组	10	47.03 $\pm$ 5.14*	17.38 $\pm$ 4.56* Δ	1.09 $\pm$ 0.16*	4.55 $\pm$ 1.16* $\Delta\Delta$
雷公藤多苷片组	10	45.62 $\pm$ 6.07*	16.29 $\pm$ 3.43* Δ	1.17 $\pm$ 0.25*	4.07 $\pm$ 1.03* $\Delta\Delta$
新风胶囊组	10	46.79 $\pm$ 4.45*	15.28 $\pm$ 3.65* $\Delta\Delta$	1.15 $\pm$ 0.14*	4.16 $\pm$ 1.21* $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组同时时间点比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组大鼠滑膜 MVD、HIF-1 α 、VEGF 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MVD (个)	HIF-1 α (MOD)	VEGF (MOD)
正常对照组	10	0.97 $\pm$ 0.24	1.03 $\pm$ 0.14	1.24 $\pm$ 0.24
模型对照组	10	3.03 $\pm$ 0.82 [*]	3.17 $\pm$ 0.93 [*]	3.12 $\pm$ 0.78 [*]
甲氨蝶呤组	10	1.61 $\pm$ 0.19 Δ	2.21 $\pm$ 0.20 ^{*Δ}	1.89 $\pm$ 0.13 $\Delta\Delta$
雷公藤多苷片组	10	1.32 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta$	2.25 $\pm$ 0.16 ^{*Δ}	1.16 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$
新风胶囊组	10	1.45 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$	1.52 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	1.03 $\pm$ 0.13 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与新风胶囊组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

组、雷公藤多苷片组降低明显, VEGF 较甲氨蝶呤组降低明显 ($P < 0.05$)。

3 讨论

RA 表现为关节软骨和骨质破坏, 最终导致关节畸形。滑膜血管新生是 RA 滑膜的重要特征之一, RA 滑膜血管新生机制与 HIF-1 α 、VEGF 的表达有关^[8]。HIF-1 α 是调节氧稳态的转录因子, VEGF 具有促进血管内皮细胞分裂的作用, VEGF、HIF-1 α 过表达会诱发血管形成及血管通透性增加。有研究发现^[9], RA 大鼠模型滑膜 HIF-1 α 表达与滑膜增生评分呈正相关, 滑膜增生加剧滑膜组织尤其是滑膜衬里层缺氧状态, 进一步促进 HIF-1 α 表达及滑膜增生。VEGF 是 HIF-1 α 下游靶基因, VEGF 在血管新生中发挥重要作用。VEGF 可直接促进滑膜血管翳形成、加重滑膜炎症及骨与关节软骨的破坏。研究发现^[10], 通过对肿瘤内皮细胞敲除 HIF-1 α 基因后, 抑制了 VEGF 的表达及实体瘤血管生长, 说明 HIF-1 α 、VEGF 共调控血管发生。本研究发现, AA 大鼠中 HIF-1 α 、VEGF 明显升高, 同时 MVD 计数随之上调, 说明 HIF-1 α 通过上调 VEGF 表达, 导致血管 MVD 升高, 促进血管新生生成。

临床对于 RA 治疗主要采用免疫抑制剂和抗炎治疗, 其中甲氨蝶呤具有明显抑制 RA 关节破坏; 雷公藤多苷片具有免疫调节作用, 不但具有抗炎止痛的作用, 还能抑制血管炎的进展。因此, 本研究采用甲氨蝶呤和雷公藤多苷片做为对照。RA 中医病机呈现本虚标实、脾虚湿盛的特征, 因此, 我们采用具有健脾化湿通络功效的中药新风胶囊应用于临床, 前期研究^[11-13]发现, 新风胶囊具有显著的改善关节炎症、改善血管等作用; 可以调节免疫功能, 降低炎性细胞因子, 降低血小板活化等作用; 能明显下调血清 VEGF 表达, 降低关节炎大鼠炎性细胞因子表达。方中黄芪具有益气固表、利水消肿、健脾除痹之功, 黄芪皂苷、黄芪多糖能降低关节肿胀、减少关节液和血清炎性细胞因子, 黄芪提

取物可抑制血管生成作用^[14]。薏苡仁具有健脾化湿之功, 含薏苡仁酯、薏苡素, 具有镇痛、降低机体的炎症反应, 同时薏苡仁可下调 VEGF 的表达^[15-16]。蜈蚣具有明显的抗炎镇痛作用^[17]。雷公藤含有雷公藤碱、雷公藤次碱、雷公藤碱乙等, 雷公藤有降低毛细血管通透性、抑制炎症浸润渗出、抗栓塞以及降低 VEGF 表达的作用^[18]。本研究表明确, 经新风胶囊治疗后, AA 大鼠足跖肿胀度、关节炎指数等均明显降低; 滑膜组织 HIF-1 α 及 VEGF 表达均明显下降, 提示新风胶囊改善 AA 大鼠关节炎炎症及抑制滑膜血管新生的机制可能是通过降低 HIF-1 α 、VEGF 的异常表达而实现的, 也是新风胶囊治疗 RA 重要机制之一。

参考文献

- [1] Rabquer BJ, Koch AE. NK4 therapy: a new approach to target angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(5): 119.
- [2] Hot A, Zrioual S, Lenief V, et al. IL-17 and tumour necrosis factor α combination induces a HIF-1 α -dependent invasive phenotype in synoviocytes [J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(8): 1393-1401.
- [3] Hu F, Shi L, Mu R, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α and interleukin 33 form a regulatory circuit to perpetuate the inflammation in rheumatoid arthritis [J]. PLoS One, 2013, 8(8): 72650.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 919-921.
- [5] 刘昌孝, 孙瑞元. 药物评价实验设计与统计学基础 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999: 84-90.
- [6] 张钧田. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 首都医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1383.
- [7] 张育, 周玮, 顾健, 等. 沙利度胺及氨甲蝶呤抗 CIA 大鼠滑膜血管新生及其作用机制的研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2008, 12(5): 23-27.
- [8] Melinte R, Jung I, Georgescu L, et al. VEGF and CD31 expression in arthritic synovium and cartilage of human knee joints [J]. Rom J Morphol Embryol, 2012, 53(4): 911-915.
- [9] Li G, Zhang Y, Qian Y, et al. Interleukin-17A promotes

rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- κ B/HIF-1 α pathway [J]. Mol Immunol, 2013, 53(3): 227-236.

[10] Westra J, Brouwer E, Bouwman E, et al. Role for CaMKII inhibition in rheumatoid arthritis: effects on HIF-1-induced VEGF production by rheumatoid synovial fibroblasts [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1173: 706-711.

[11] 刘健, 范海霞, 杨梅云. 新风胶囊对类风湿性关节炎患者的疗效及肺功能、生活质量的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(10): 2061-2063.

[12] 万磊, 刘健. 名中医刘健治疗类风湿性关节炎经验撷菁 [J]. 中国临床保健杂志, 2009, 12(6): 613-614.

[13] 刘健, 纵瑞凯, 余学芳, 等. 类风湿关节炎活动期患者血小板参数、P-选择素和血小板超微结构的变化及新风胶囊对其的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23

(12): 10901-10903.

[14] Wang D, Zhuang Y, Tian Y, et al. Study of the effects of total flavonoids of Astragalus on atherosclerosis formation and potential mechanisms [J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 2012: 282383. doi: 10.1155/2012/282383.

[15] Wang L, Sun J, Yi Q, et al. Protective effect of polyphenols extract of adlay (Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) on hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats [J]. Molecules, 2012, 17(8): 8886-8897.

[16] 刘文超. 薏苡仁治疗类风湿关节炎 [J]. 中医杂志, 2008, 49(3): 247-248.

[17] 廖满林, 廖穗波. 应用蜈蚣治疗咳嗽 [J]. 中医杂志, 2000, 41(6): 381.

[18] Wan L, Liu J, Huang CB, et al. Effect of tripterygium glycosides on pulmonary function in adjuvant arthritis rats [J]. J Chin Med Assoc, 2013, 76(12): 715-723.

Effects of *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) on Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Vascular Endothelial Growth Factor in Synovial Tissue of Rats With Adjuvant Arthritis

ZHANG Xiaojun^{1,2}, LIU Jian³, WAN Lei³, SUN Yue², WANG Fang², QI Yajun², HUANG Chuanbing³

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Province 430065; 2. Anhui University of Chinese Medicine; 3. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the possible antiangiogenic mechanism of *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) for rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Fifty SD rats were randomized into the normal control group, model control group, Methotrexate group, Tripterygium Glycosides Tablets group and *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) group, with 10 in each. The adjuvant arthritis rat models were established with Freund's complete adjuvant. After modeling, the *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) group was gavaged with 2.4 mg/kg *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) solution once daily. The Tripterygium Glycosides Tablets group was gavaged with 10 mg/kg Tripterygium Glycosides Tablets solution once daily. The Methotrexate group was gavaged with 3 mg/kg Methotrexate solution once weekly. The normal control group and model control group were gavaged with 1.0 mg/kg normal saline once daily. The intragastric administration lasted for 30 days. The plantar swelling degree and arthritic index was measured. The expressions of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were observed. The synovial microvessel density (MVD) was counted. **Results** Comparing with the normal control group, the plantar swelling degree, arthritic index, MVD, VEGF expression and HIF-1 α expression was significantly increased in the model control group ($P < 0.01$). Comparing with the model control group, the plantar swelling degree, arthritic index, MVD, VEGF expression and HIF-1 α expression was significantly decreased in the Methotrexate group, Tripterygium Glycosides Tablets group and *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), especially HIF-1 α expression in the *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) group as compared with the Methotrexate group and Tripterygium Glycosides Tablets group and VEGF expression in the *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) group as compared with the Methotrexate group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Xinfeng Capsules* (新风胶囊) has an antiangiogenic effect by reducing the expressions of VEGF and HIF-1 α in synovial tissue.

Keywords rheumatoid arthritis; *Xinfeng Capsules* (新风胶囊); angiogenesis; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor

(收稿日期: 2013-09-22; 修回日期: 2014-01-06)

[编辑: 邓媛]