

祛风方对佐剂性关节炎大鼠滑膜白细胞介素-1 β 、 白细胞介素-6 基因表达的影响

施光其^{1*} 陈国会¹ 刘春燕¹ 尹智炜²

(1. 河北省中医院风湿免疫科, 石家庄市中山路 389 号, 050011; 2. 河北医科大学中西医结合研究所)

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目(2010018)

* 通讯作者: shiguangqi@medmail.com.cn, (0311)85990152

[摘要] 目的 观察祛风方对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用及其机制。方法 将 32 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、激素组、中药组, 每组 8 只。大鼠右后足趾皮内注射福氏完全佐剂 0.05ml 致炎; 激素组造模后予强的松片每次 0.25mg 灌胃, 每日 2 次; 中药组造模后予祛风方每次 3ml 灌胃, 每日 2 次。21 天后检测各组大鼠膝关节滑膜白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)的 mRNA 表达水平。结果 正常组、激素组、中药组大鼠膝关节滑膜组织 IL-1 β 、IL-6mRNA 的表达均低于模型组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 正常组、中药组与激素组 3 组之间比较无统计学差异($P > 0.05$)。结论 佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞 IL-1 β 、IL-6mRNA 表达水平是上调的, 激素和祛风方有抑制其转录和表达的作用。

[关键词] 祛风方; 类风湿性关节炎; 佐剂性关节炎; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素-6; 基因表达

Effect of Qufeng Recipe on the Expression of IL-1 β mRNA and IL-6 mRNA in Synovial Tissues of Adjuvant Arthritis Rats

SHI Guangqi¹, CHEN Guohui¹, LIU Chunyan¹, YIN Zhiwei²

(1. Hebei Provincial Hospital of TCM, Shijiazhuang 050011; 2. Institute of Integrated Medicine, Hebei Medical University)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Qufeng Recipe (Recipe for eliminating wind) on adjuvant arthritis (AA) rats and its mechanism. **Methods** Thirty-two Wistar rats were randomized into the normal group, model group, hormone group, and Qufeng Recipe group. The AA rat models were established by injecting intracutaneously Freund's adjuvant 0.05ml into the right hind-paw. By gastrogavage, the hormone group was given prednisone after modeling, 0.25mg each time, twice a day; and the Qufeng Recipe group was administered the decoction of Qufeng Recipe, 3ml each time, twice a day. Twenty-one days later, expression of interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA and interleukin-6 (IL-6) mRNA in synovial tissues of knee joint of all groups was detected. **Results** In comparison with the model group, the IL-1 β mRNA and IL-6 mRNA expression of synovial tissues in the normal group, hormone group, and Qufeng Recipe group was lowered with the statistical difference ($P < 0.05$). There was no statistical difference among the normal group, Qufeng Recipe group, and hormone group ($P > 0.05$). **Conclusion** Expression of IL-1 β mRNA and IL-6 mRNA in synovial tissues in AA rats is up-regulated. Hormone and Qufeng Recipe function to inhibit its transcription and expression.

Key Words Qufeng Recipe (Recipe for eliminating wind); rheumatoid arthritis; adjuvant arthritis; interleukin-1 β (IL-1 β); interleukin-6 (IL-6); gene expression

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性炎症、异常免疫反应和滑液增多为特征的全身性自身免疫性疾病^[1]。RA 的免疫病理损伤涉及细胞免疫和体液免疫等多个环节。近年研究证实^[1-4], 诸多免疫细胞及其所分泌的细胞因子(Cytokines, CK)参与了这一病理过程, 该病的发生可能是 CK 的相互作用失去平衡, 而导致免疫病理损伤所致。本研究通过建立 RA 的病理模型大鼠佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA), 探讨祛风方对 AA 的两个 CK 即白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)mRNA 表达的影响及机理。

1 材料与方法

1.1 动物

32 只 Wistar 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重(200 $\pm$ 20)g。由河北医科大学提供, 动物许可证号: SYXK(冀)2008-0026。

1.2 药物

祛风方由防风、黄芪各 30g, 党参 20g, 柴胡、防己各 15g, 薄荷、桂枝、芍药、知母各 10g 组成, 由河北省中医院制剂室煎制, 0.1g/ml; 福氏完全佐剂, Sigma 公司, 批号: F-5881; 强的松片, 天津太平洋制药有限公司, 批号: 081002d。http://www.cnki.net

1.3 主要试剂和仪器

PCR 微板核酸杂交—ELISA 试剂盒、杂交液由第一军医大学生物学诊断研究中心提供;PCR 仪为上海复华公司产品,550 型酶标仪为 BIO-RAD 公司产品;采用 Primer 软件设计引物,选用 IL-1 β 、IL-6 的特异性序列作为引物与探针,由上海生物工程公司合成。

1.4 动物分组与处理

32 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为 4 组,每组 8 只。模型组:参照文献[5]制备模型,大鼠右后足趾皮内注射福氏完全佐剂 0.05ml 致炎;激素组:造模后,强的松片每次 0.25mg(加生理盐水至 3ml)灌胃,每日 2 次;中药组:造模后,祛风方每次 3ml 灌胃,每日 2 次;正常组:不造模,正常饲养。各组均在 21 天后经眼眶静脉取血后处死,切开每只大鼠右膝关节囊,切取关节滑膜组织 10mg,超低温冷藏。

1.5 基因扩增

RNA 提取:从超低温冰箱中取出冻存的关节滑液,4℃,5000r/m 离心 10min,弃上清,收集细胞成分,加入 500 μ l 裂解液,0℃ 匀浆;分别加入 50 μ l 的 2.0M NaAC(pH4.0),500 μ l 水饱和酚,100 μ l 氯仿/异戊醇(49:1),用力混匀,冰浴 15min。4℃,12000r/m 离心 20min,分离上层水相,加入等体积异丙醇,混匀,-20℃ 放置 2h,4℃,12000r/m 离心 15min,去上清,加 2 倍体积 70% 乙醇洗涤沉淀,4℃,12000r/m 离心 15min,去上清,风干,加入 20 μ l DEPC 水溶解。取 4 μ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性;OD260/OD280 鉴定其纯度,取比值为 1.7~2.0 的样品进行反转录反应,按列顺序加入反转录试剂和样品:5 $\times$ buffer、dNTP(10mM)、RNasin(30U/ μ l)、AMV(5U/ μ l)、随机引物(100ng/ μ l)、样品 RNA、三蒸水,加至终体积 20 μ l,混匀,置 42℃ 水浴 30min,95℃ 5min,以灭活反转录酶,置 -20℃ 备用。之后进行 PCR 反应,并将反应产物 10 μ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析结果并照相。

用 Tanon-4100 凝胶图像分析系统对 PCR 产物电泳照片进行分析,分别计算 IL-1 β 、IL-6 各个样品中待检测 mRNA 相对于内参 mRNA 的表达水平,即 $R = (\text{IL-1}\beta \text{ 或 IL-6 灰度} \times \text{像素}) / (\beta\text{-actin 或 GAPDH 灰度} \times \text{像素})$ 。

1.6 统计学方法

采用 stata8.0 统计软件处理,计量数据用均数 $\pm$ 标准差表示,采用单因素方差分析。

2 结果

以提取的 RNA 作为逆转录反应的模板,IL-1 β 、IL-6mRNA 最终扩增出的片段与设计的 IL-1 β 、IL-6mRNA 扩增片段长度相一致。

图 1、图 2、表 1 示,各组大鼠膝关节滑膜组织 IL-1 β 、IL-6mRNA 的表达,正常组、激素组、中药组均低于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);正常组、中药组与激素组 3 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

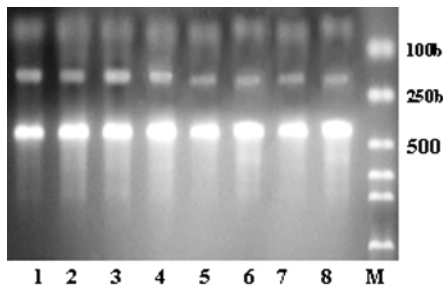


图 1 各组大鼠膝关节滑膜组织 IL-1 β mRNA 的表达
注:M:位点;1,2:正常组;3,4:模型组;5,6:激素组;7,8:中药组

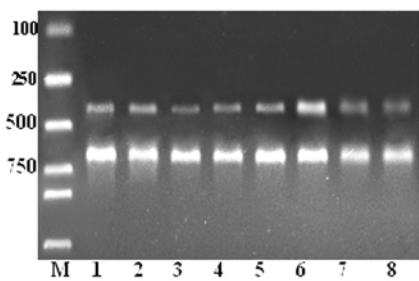


图 2 各组大鼠膝关节滑膜组织 IL-6 mRNA 的表达
注:M:位点;1,2:正常组;3,4:模型组;5,6:激素组;7,8:中药组

表 1 各组大鼠膝关节滑膜组织 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β	IL-6
正常组	8	0.4165 $\pm$ 0.0324*	0.3503 $\pm$ 0.0603*
模型组	8	0.5303 $\pm$ 0.6547	0.5940 $\pm$ 0.0468
激素组	8	0.4403 $\pm$ 0.3986*	0.4979 $\pm$ 0.4952*
中药组	8	0.4601 $\pm$ 0.0402*	0.5099 $\pm$ 0.0663*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

祛风方为河北省中医院的经验方,具有祛风除湿、清热散寒、健脾益气之功能。该方以《金匱要略》桂枝芍药知母汤为基础,在长期临床实践过程中化裁而来。前期临床研究表明^[6],本方可以有效改善 RA 患者的晨僵、握力、20 米行速、疼痛指数、肿胀指数、功能指数,控制病情,使用安全,未发现毒副作用。

RA 的多种治疗方案中,糖皮质激素不可或缺,

糖皮质激素通过抑制膜磷类释放花生四烯酸而减少前列腺素与白三烯等炎性介质的合成;降低炎症部位中性粒细胞移动、聚积、黏附及其酶的释放和炎症介质的产生(如白介素系列);直接抑制成纤维细胞的增生与分泌功能,使结缔组织的基质合成抑制;稳定溶酶体膜减少其酶的释放等。糖皮质激素的免疫抑制作用有:使淋巴组织萎缩;干扰免疫过程的识别与增殖时相,明显抑制细胞免疫;阻断细胞间交通抑制免疫的连锁反应^[7]。在本研究中,模型组滑膜的 IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA 的基因表达在上调,提示 RA 早期 IL-1 β 、IL-6 转录增强,滑膜对 IL-1 β 、IL-6 反应的敏感性亦可能增强。IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA 的表达水平具有协同性,推测 IL-1 β 、IL-6 在炎症部位具有相互促进作用,可能是 RA 部分发病机制。RA 早期病程中,IL-1 增加内皮细胞间黏附分子的表达;诱导中性细胞、单核细胞和淋巴细胞的趋化,诱导 IL-6 的合成参与免疫调节过程^[8],刺激成纤维样细胞的增生。RA 关节腔损伤机理中,IL-1 的局部生物效应发挥充分^[9],IL-1 进一步诱导成纤维细胞和软骨的前列腺素 E₂、胶原酶的产生,增强破骨细胞活性,促进关节软骨和骨破坏。

本研究结果提示,祛风方治疗 RA 的可能机制是:IL-1 β 、IL-6 的转录和表达受到抑制,使 IL-1 β 、IL-6 的基因表达下调,从而抑制 RA 滑膜炎以及阻断关节软骨基质的降解和破坏。其更深层次机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Gay S, Gay RE, Koopman WJ. Molecular and cellular

mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? [J]. Ann Rheum Dis, 1993, 52(Suppl 1):39-47.

[2] Kuryliszyn-Moskal A. Cytokines and soluble CD4 and CD8 molecules in rheumatoid arthritis: relationship to systematic vasculitis and microvascular capillaroscopic abnormalities[J]. Clin Rheumatol, 1998, 17(6):489-493.

[3] Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T. Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(2):221-228.

[4] Mangge H, Kenzian H, Callist JS, et al. Serum Cytokines in juvenile rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(2):211-223.

[5] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991:305-306.

[6] 施光其, 陈国会, 孙仁. 加减桂枝芍药知母汤合益肾除湿丸治疗类风湿性关节炎 38 例[J]. 新中医, 2009, 41(4):70-71.

[7] 刘嘉玲, 鲍春德. 风湿病疑难问题[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:458.

[8] Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, et al. Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process[J]. J Rheumatol, 1995, 43(Suppl):109-114.

[9] Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1990, 33(3):305-315.

(收稿日期:2010-12-06;修回日期:2011-03-21)

[编辑:崔京艳]

(上接第 1137 页)

整的作用。但随着再灌注时间的延长,损伤继续加重,大量产生的 OFR 引发 GSH-Px 的消耗增加。QH 组大鼠肝组织 GSH-Px 活力呈递增趋势,表明羌活醇提取物可以提高 HIRI 模型大鼠肝组织的 GSH-Px 活力而保护肝脏。

值得注意的是, I45R60 时点 DS 组大鼠肝组织 GSH-Px 活力低于模型组,而 QH 组大鼠肝组织 GSH-Px 活力高于 DS 组,但不能说明羌活醇提取物比丹参更能提高大鼠肝组织 GSH-Px 活力,表明羌活醇提取物可提高 HIRI 模型大鼠肝脏组织的 GSH-Px 活力。

总之,本研究结果提示,羌活醇提取物可提高 HIRI 模型大鼠肝组织 GSH-Px 活力,增强对 OFR 的清除能力,保护细胞膜的完整性,抵抗脂质过氧化损伤,从而发挥保肝作用,亦即针对 HIRI 的瘀血、

湿阻、津停之病机,发挥泄热散瘀、温通血脉、活血利水之功效,使肝胆气机畅利达到抗御不良刺激损害的作用。从中医角度来看,羌活可能在本实验中除发挥泄热祛湿功效之外,尚奏其温通效应而温通血脉,活血利水,以对抗 HIRI。通过本研究可以初步确定,羌活同样具有保肝作用,但中药不同提取物的化学成分复杂,其保肝效果的作用机制,有待进一步研究。

参考文献

[1] 李秋,雷正明. HIRI 的药物预处理[J]. 国外医学外科学分册, 2004, 31(4):231-234.

[2] 俞科贤,魏全嘉,任世存. 中药预处理对动物模型 HIRI 的防护作用[J]. 青海医学院学报, 2008, 29(2):126.

[3] 王生兰,王丽华,李先加,等. 九味牛黄散对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响[J]. 青海医学院学报, 2005, 26(2):106.

[4] 谷雨,谷巍,于淑莲. 丹参药理作用的研究进展[J]. 人参研究, 2007, 20(1):25-27.

(收稿日期:2010-11-17;修回日期:2011-03-10)

[编辑:侯建春]