

# 蒙药忠伦阿汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清炎性细胞因子的影响

高自立<sup>1</sup> 董秋梅<sup>2\*</sup> 王 滨<sup>2</sup> 松 林<sup>3</sup> 沈敬华<sup>4</sup>

(1. 内蒙古医学院 2008 级硕士研究生, 内蒙古自治区呼和浩特市金山开发区, 010110;

2. 内蒙古医学院中医学院; 3. 内蒙古医学院蒙医药学院; 4. 内蒙古医学院基础学院)

基金项目: 国家自然科学基金项目(30860383)

\* 通讯作者: d qium@163.com, 13039515668

**[摘要]** 目的 探讨蒙药忠伦阿汤对类风湿关节炎(RA)模型大鼠抗Ⅱ型胶原(CⅡ)抗体及白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )炎性细胞因子的影响。方法 取 Wistar 大鼠 80 只, 随机选取 68 只造模, 其余 12 只作为空白组, 以牛Ⅱ型胶原皮下注射诱导建立胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠模型, 再将造模成功的 62 只大鼠随机分为模型组及忠伦阿汤低、中、高剂量组和雷公藤组各 12 只, 剩余大鼠剔除。忠伦阿汤低、中、高剂量组分别予忠伦阿汤 0.35g/kg、0.7g/kg、1.5g/kg, 雷公藤组予雷公藤多苷片 5mg/kg, 空白组和模型组给予等体积生理盐水, 各组灌胃给药 6 周后, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定抗 CⅡ 抗体、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  的水平。结果 与空白组比较, 模型组血清中抗 CⅡ 抗体、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均明显升高( $P < 0.01$ ), 各药物组均可降低血清抗 CⅡ 抗体及炎性细胞因子的含量, 忠伦阿汤中剂量组、高剂量组与雷公藤组在降低 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  水平方面差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 蒙药忠伦阿汤可能通过调节免疫, 降低血清 IL-1、IL-6 及 TNF- $\alpha$  的含量, 减轻炎性细胞因子对关节炎的刺激作用, 发挥干预类风湿关节炎的作用。

**[关键词]** 忠伦阿汤; 胶原诱导性关节炎; 炎症因子; 抗Ⅱ型胶原抗体

Effect of Zhonglun'e Decoction on the Expression of Inflammatory Cytokines in Rats with Collagen Induced Arthritis

GAO Zili, DONG Qiumei, WANG Bin, SONG Lin, SHEN Jinghua

(Inner Mongolia College of Medicine, Inner Mongolia Autonomous Region 010110)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of Zhonglun'e Decoction a Mongolia medicine, on the expression of anti-CⅡ antibody, interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in rats with collagen induced arthritis (CIA). **Methods** Eighty Wistar rats were randomized into control group ( $n=12$ ) and model group ( $n=68$ ). CIA model was established through subcutaneous injection of type Ⅱ collagen. Sixty selected models were randomized into six groups, i. e. the model group, Zhonglun'e Decoction small-dose group, Zhonglun'e Decoction middle-dose group, Zhonglun'e Decoction large-dose group and tripterygium group, with 12 in each. The Zhonglun'e Decoction small-dose group, middle-dose group and large-dose group were given 0.35g/kg, 0.7g/kg and 1.5g/kg of Zhonglun'e Decoction respectively. The tripterygium group was given 5mg/kg of tripterygium tablet. The control group and model group were given normal saline in the equal amount. The levels of anti-CⅡ antibody, IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after the administration through gastric feeding for 6 weeks. **Results** Comparing with the control group, the levels of anti-CⅡ antibody, IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  was significantly increased in the model group ( $P < 0.01$ ). The levels of anti-CⅡ antibody and inflammatory cytokine were significantly decreased in the treatment groups. Both large-dose and middle-dose of Zhonglun'e Decoction as well as tripterygium tablet could decrease IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  with similar effect. **Conclusion** Zhonglun'e Decoction could treat CIA by regulating immunity and decreasing the content of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ .

**Keywords** Zhonglun'e Decoction; collagen induced arthritis (CIA) model; inflammatory cytokine; anti-CⅡ antibody

蒙药忠伦阿汤, 别名合日呼—5 汤、忠伦—5 汤等, 出自蒙医《四部医典》, 具有清热凉血、舒筋止痛功效, 是蒙医治疗热性黄水病、游痛证、痛风、陈旧热等疾病的常用方剂, 传统蒙医临床应用本方治疗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA), 疗效肯定<sup>[1]</sup>。Ⅱ型胶原蛋白(type Ⅱ collagen, CⅡ)在 RA

的发病机制中起着重要作用<sup>[2]</sup>, 实验研究常以检测该抗体作为造模是否成功的标记, 临床中抗 CⅡ 抗体可作为 RA 的早期诊断指标之一。炎性细胞因子在 RA 整个病理过程中具有重要作用, 我们前期研究表明, 蒙药忠伦阿汤有明显的抗炎镇痛作用, 并能抑制胶原诱导关节炎模型大鼠的足肿胀, 具有较好

的抑制免疫炎症的作用<sup>[3]</sup>,本研究旨在进一步探讨忠伦阿汤在干预胶原诱导性关节炎(CIA)模型大鼠血清中白细胞介素1(IL-1)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半,体重(150 $\pm$ 20)g,合格证号:8806R011,由内蒙古大学动物实验中心提供,适应性饲养 1 周后用于实验。

### 1.2 药物与试剂

忠伦阿汤散,由梔子、诃子、川楝子、苦参、当归按照 1.5:1:1:1.5:1 配伍,研成粗散剂装袋,由内蒙古自治区中蒙医院制剂室提供(批号 Z20081216);牛源性 II 型胶原,10mg/支, Sigma 公司,批号 1000638705;抗 II 型胶原 ELISA 试剂盒,批号 121109,美国 Chondrex 公司提供;弗氏完全佐剂,10ml/支, Sigma 公司提供,批号 098k8729;IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒,北京欣博盛生物科技有限公司提供,批号分别为:R100127a7091a、R100127a8329a、R100127a8255a;雷公藤多苷片,黄石飞云制药有限公司提供(国药准字 Z42021212)。

### 1.3 主要仪器与设备

电子天平(FA-1104)、TDL-5-A 离心机由内蒙古医学院分子生物学实验中心提供;酶标仪(Multi-scan MK3)由内蒙古大学生命科学院实验中心提供。

## 2 方法

### 2.1 动物分组

80 只大鼠,依照均衡随机法与抽签法相结合的方法选取 68 只造模,其余 12 只作为空白组,再将造模成功的 62 只大鼠随机分为模型组、忠伦阿汤高、中、低剂量组和雷公藤组,每组 12 只,多余大鼠剔除。

### 2.2 造模与给药

模型制备参考文献<sup>[4-5]</sup>,将牛源性 II 型胶原溶于 0.1mol/L 冰醋酸中,浓度为 2mg/ml,在 4℃ 下搅拌使之充分溶解乳化(以滴入水中不自动分解扩散为度),置于 4℃ 冰箱中过夜。将同比例的弗氏完全佐剂加入到配置好的牛 II 型胶原混合液中,不断搅拌使其充分溶解乳化。将乳剂在大鼠右后足跖处皮下注射 0.2ml。初次免疫 7 天后加强免疫 1 次,药物同上,在大鼠尾根部皮下注射 0.2ml,免疫 21

天后给药前将大鼠麻醉后行 X 线双下肢摄片,确定造模成功 62 只,成功率 91.2%。

蒙药忠伦阿汤散以沸水清煎 5min,静置后留上清液,装瓶 4℃ 冷藏待用,忠伦阿汤按照低、中、高剂量分别给予含生药 0.35g/kg、0.7g/kg、1.5g/kg;雷公藤多苷片研碎后与蒸馏水配成混悬液给予 5mg/kg,所有药物均灌胃给药,每天 1 次,给药时间为 6 周,空白组和模型组给予等体积的生理盐水灌胃。于初次免疫后 21 天,开始给药,最后 1 次给药后,禁食水 24h,麻醉后断尾法采血,取血 3ml/只,分离血清, -70℃ 保存备用,采血后处死大鼠,取膝关节滑膜及软骨做 HE 常规病理切片。

### 2.3 指标检测

观察大鼠一般情况,显微镜下(400 倍)观察病理组织形态学的变化;采用酶联免疫吸附法测定大鼠外周血清抗 C II 抗体、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  的水平。

### 2.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件分析,计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组间比较采用方差分析,两组间比较采用最小显著性差异  $t$  检验(LSD)。

## 3 结果

### 3.1 一般情况

初次免疫 1 周后,部分大鼠踝关节皮肤开始发红轻度肿胀,2 周左右红肿加重,以双侧后足踝关节及爪关节最为明显,足垫增厚,大鼠活动量减少,食欲下降,部分有脱毛现象。皮下注射部位多处出现小溃疡,随后结痂愈合。4 周左右大鼠关节炎病变最严重,活动困难,体重增长缓慢,甚至下降。后关节肿胀有所减轻,部分大鼠出现关节强直,及虹膜炎、皮下结节等关节外病变表现。治疗组与模型组比较症状相对较轻,给药 3 周后足部红肿开始减轻,活动度有不同程度的恢复,脱毛等现象有所好转。雷公藤及忠伦汤高剂量组对改善皮下结节、虹膜炎、体重减轻、摄食减少、脱毛、活动度下降、关节软组织肿胀和僵直等方面均优于忠伦阿汤中、低剂量组。

### 3.2 病理组织形态观察

空白组滑膜组织由 1~2 层滑膜细胞组成,排列整齐,呈扁平形,无炎性细胞浸润,无血管翳形成,关节软骨表面光滑;模型组滑膜细胞增生,达 5~6 层,排列疏散紊乱;有大量炎性细胞浸润、聚集;滑膜下组织血管扩张,可见较多的新生毛细血管;部分滑膜细胞向关节内呈绒毛状增生,排列不整齐,或向软骨面爬行形成血管翳,在血管翳的覆盖下软骨表层可

表 1 各组大鼠血清抗 CⅡ 抗体、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 鼠数 | 抗 CⅡ 抗体(units/ml)           | IL-1(pg/ml)                   | IL-6(pg/ml)                     | TNF- $\alpha$ (pg/ml)           |
|----------|----|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 空白组      | 12 | 4.62 $\pm$ 0.55             | 36.65 $\pm$ 12.96             | 8.12 $\pm$ 13.76                | 74.26 $\pm$ 39.24               |
| 模型组      | 12 | 110.72 $\pm$ 3.46*          | 2109.40 $\pm$ 291.59*         | 2651.71 $\pm$ 466.31*           | 3045.25 $\pm$ 437.16*           |
| 雷公藤组     | 12 | 98.38 $\pm$ 4.88 $\Delta$   | 117.61 $\pm$ 35.71 $\Delta$   | 108.62 $\pm$ 31.71 $\Delta$     | 137.18 $\pm$ 36.98 $\Delta$     |
| 忠伦阿汤低剂量组 | 12 | 99.79 $\pm$ 4.54 $\Delta$   | 228.67 $\pm$ 61.58 $\Delta$ # | 1821.22 $\pm$ 333.60 $\Delta$ # | 1667.92 $\pm$ 277.51 $\Delta$ # |
| 忠伦阿汤中剂量组 | 12 | 88.67 $\pm$ 7.86 $\Delta$ # | 406.15 $\pm$ 82.51 $\Delta$ # | 470.20 $\pm$ 113.97 $\Delta$ #  | 966.79 $\pm$ 121.17 $\Delta$ #  |
| 忠伦阿汤高剂量组 | 12 | 99.94 $\pm$ 4.75 $\Delta$   | 116.77 $\pm$ 35.95 $\Delta$   | 199.72 $\pm$ 35.51 $\Delta$     | 351.43 $\pm$ 116.95 $\Delta$    |

注:与空白组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P<0.01$ ;与雷公藤组比较,# $P<0.01$

见明显的软骨表层组织变性、坏死,软骨细胞出现不同程度的退行性变,可见关节软骨面毛糙凹凸不平、缺损、剥脱。治疗组滑膜细胞轻度增生,为 3~5 层紧密排列,散见少量炎性细胞浸润,血管翳形成减少,仍可见有退行性的软骨组织,软骨退行性变减轻,软骨面较为平整。

### 3.2 各组大鼠血清抗 CⅡ 抗体水平比较

表 1 示,与空白组比较,模型组大鼠血清中抗 CⅡ 抗体水平升高( $P<0.01$ ),且模型组与其他各药物组大鼠血清中抗 CⅡ 抗体水平比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。忠伦阿汤中剂量组与雷公藤组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ ),而忠伦阿汤低、高剂量与雷公藤组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 3.3 各组大鼠血清 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平比较

表 1 示,与空白组比较,模型组血清 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  水平明显升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,忠伦阿汤各剂量组、雷公藤组,血清 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  水平明显降低( $P<0.01$ ),忠伦阿汤中、低剂量组与雷公藤组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );而忠伦阿汤高剂量组与雷公藤组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 4 讨论

RA 是一种以关节滑膜慢性炎症为特征的全身免疫性疾病。西医治疗 RA 主要以非甾体抗炎药、慢作用抗风湿药、肾上腺皮质激素及生物制剂等药物为主,用药时间长,副作用较大。蒙医药临床疗效确切,配方制剂保持了天然药性,具有药量小、见效快等优点,但由于一些客观原因,蒙药的开发利用相对较落后。雷公藤疗效确切,临床应用广泛,机制研究已经取得一定进展<sup>[6]</sup>,是治疗 RA 的植物药代表之一。

CIA 动物模型是一种免疫性炎症模型,主要表现为多发性末端关节炎,组织学特点包括关节局部

炎症细胞的大量浸润,增生性滑膜炎,关节软骨及骨组织的破坏,免疫功能变化不仅表现在细胞免疫,而且表现在体液免疫,动物体内存在针对自身 CⅡ 的高滴度 Ig 抗体。抗 CⅡ 抗体可在关节软骨处沉积,并与该处的Ⅱ型胶原形成免疫复合物,导致关节组织损伤和破坏。由于这些特征接近于人类 RA,因此 CIA 模型是筛选和研究治疗 RA 药物的理想模型<sup>[7]</sup>。在 RA 患者血清、关节液或滑膜组织中的多种细胞因子关系密切,构成一个网络系统,参与 RA 整个病理过程,具有促炎、抑炎或刺激、抑制的正负反馈免疫调节作用<sup>[6-8]</sup>。其中 IL-1 具有多重生物学功能,是免疫反应、炎症及组织损伤的主要介质之一,可刺激滑膜细胞生成,活化滑膜细胞及破骨细胞产生金属蛋白酶和胶原酶,从而造成骨与关节的破坏;TNF- $\alpha$  也是 RA 发病机制中居中心地位的促炎性因子,参与整个 RA 的病变过程<sup>[9]</sup>。IL-6 的致病作用与 IL-1、TNF- $\alpha$  不同,它不能直接刺激滑膜成纤维细胞和软骨细胞产生金属蛋白酶和胶原酶,但能诱导肝细胞分泌急性期蛋白并诱导其他细胞因子如 IL-1、IL-2、TNF- $\alpha$  的产生而发挥致病作用。另外,IL-1、TNF- $\alpha$  都能诱导 IL-6 的合成及分泌,而 IL-6 又可放大 IL-1、TNF- $\alpha$  对关节软骨的破坏作用<sup>[10]</sup>,三者之间可相互影响。研究发现 IL-1 和 TNF- $\alpha$  在 RA 患者外周血和滑膜液中均增高,二者可激活血管内皮细胞,增强内皮细胞中黏附分子的表达,使小分子炎性介质增加,从而导致骨及软骨的破坏<sup>[11]</sup>。

本研究结果显示,与空白组比较,模型组血清中抗 CⅡ 抗体明显增高,说明 CIA 大鼠模型复制成功,并且各药物组均能降低抗 CⅡ 抗体水平,表明忠伦阿汤可能具有一定的调节体液免疫功能。与正常组比较,模型组动物血清中 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  水平明显升高,其中 IL-1 升高最显著;经治疗后,各药物均降低了模型大鼠 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量。

忠伦阿汤高剂量组对大鼠血清 IL-1 降低作用最显著( $P < 0.01$ ),而雷公藤组降低大鼠血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  最明显( $P < 0.01$ )。随给药剂量的不同,忠伦阿汤高剂量组疗效优于中、低剂量组,基本趋势是中剂量组又优于低剂量组,但在对 IL-1 的影响方面却是低剂量优于中剂量,其机制尚不明了。各组大鼠全身症状和关节炎表现亦有所不同,雷公藤及忠伦阿汤高剂量组对改善皮下结节、虹膜炎、体重减轻、摄食减少、脱毛、活动度下降、关节软组织肿胀和僵直等方面均优于忠伦阿汤中、低剂量组,可见忠伦阿汤与雷公藤在降低 CIA 大鼠的炎性细胞因子方面作用相近,而且具有较好的镇痛、改善局部血液循环障碍的作用<sup>[12]</sup>,尚未发现有明显的毒副作用。

蒙药忠伦阿汤可能通过影响血清抗 C II、IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的分泌,调整失衡的细胞因子网络,达到治疗 RA 的作用,其作用机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1]宝泉,巴图,吉祥. 蒙药治疗风湿性关节炎 240 例[J]. 中国民族民间医药杂志,2007,13(5):13.
- [2]Corrigall VM, Panayi GS. Autoantigens and immune pathways in rheumatoid arthritis[J]. Crit Rev Immunol, 2002,22(4):281-293.
- [3]李林,高自立,屈爱桃,等. 蒙药忠伦阿汤的抗炎镇痛作用研究及对胶原诱导性关节炎大鼠组肿胀的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):184-186.
- [4]孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:187-191,228-230.
- [5]李宝丽,唐方,庞晓东. II 型胶原诱导性关节炎大鼠模型制备[J]. 中国免疫学杂志,2006,22(4):350-352.
- [6]李鹏,方剑乔. 雷公藤制剂治疗类风湿性关节炎的临床概况[J]. 内蒙古中医药,2008,27(6):70-71.
- [7]Myers LK, Roslongie EF, Cremer MA, et al. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity[J]. Life Sci,1997,61(19):1861-1878.
- [8]沈杰,严晓凌,徐荣. 致炎性细胞因子与类风湿关节炎的相关性研究[J]. 浙江预防医学杂志,2002,14(7):12-13.
- [9]张良,白人骁. 细胞因子与类风湿性关节炎治疗新进展[J]. 中国医药导报,2008,5(11):27-29.
- [10]Jeong JG, Kim JM, Cho H, et al. Effects of IL-1 beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(1):3-7.
- [11]郑琴,朱跃兰,侯秀娟. 类风湿关节炎伴发抑郁症大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的变化及中药干预作用[J]. 中医药学报,2009,5(37):32-34.
- [12]李林. 蒙药忠伦阿汤的药理药效学研究及对胶原诱导性关节炎大鼠血流变的影响[D]. 呼和浩特:内蒙古医学院,2010:12-15.

(收稿日期:2011-10-13;修回日期:2012-01-20)

[编辑:侯建春]

## 第十六次全国特色医疗名医学术交流会暨赴朝鲜考察的通知

本次会议的交流主题是风湿骨病、痛风及疑难杂病。由北京聚医杰医药科学研究院等单位主办,拟定于 2012 年 5 月 21-23 日在辽宁省丹东市召开。欢迎风湿骨病名医及疑难杂病名医、乡村医生、民间中医等报名参会。

1. 会议内容:(1)专家讲座:特邀杨仓良、王英、朱显沛等专家做风湿骨病、疑难病的中医特色疗法经验介绍;江淑安教授作中医基础理论(脏腑学说)及怎样撰写中医学术论文的讲座;(2)学术交流:重点交流中医、中西医结合治疗风湿骨病、痛风及疑难病方面的经验;(3)推选介绍一批风湿骨病、痛风、疑难病名医;(4)会后赴朝鲜参观考察。

2. 会议征文内容:运用中医药、中西医结合及民间疗法治疗各种风湿骨病、痛风、疑难杂病方面的诊疗经验。稿件需打印并附 200 字的作者简介。

3. 相关说明:(1)评选优秀学术论文并颁发证书;(2)颁发国家继续教育学分证书;(3)赠发价值 500 元的会议纪念品及学术资料;(4)交流论文会后安排在有关杂志发表;(5)颁发“中华风湿骨病名医”、“中华疑难病名医”等荣誉证书,并在相关网站宣传;(6)赠治疗风湿骨病的验方秘方。

4. 会议费用:参会报名费 200 元,会务及资料费 950 元。会期食宿统一安排,费用自理。赴朝鲜四天三晚,费用 3800 元/人(含报名及签证费)。

5. 报名方法:将交流论文(无论文者也可报名)、报名费 200 元、2 寸彩照 4 张、作者简介、表彰申请及赴朝报名资料(护照及身份证复印件、工作单位及职务介绍)用快递在 5 月 5 日前寄至:北京 100036-98 信箱,丹东会议会务组李莹莹收。邮编:100036。论文也可发至 Email:100036-98@163.com。会议详情可登陆:www.zgtsyl.com 或 www.ylwsxx.com。联系电话:010-63772051、13366005273、18611127488。5 月 5 日后快递寄发会议报到通知。