

祛痹方对Ⅱ型胶原诱导的免疫性关节炎大鼠免疫调节因子的影响

付小卫^{1,2} 赵宏艳² 于 峥² 刘梅洁² 王 莹² 周晟芳² 宋长恒² 鞠大宏^{2*}

(1. 陕西中医学院, 陕西省西安市西咸新区世纪大道, 712046; 2. 中国中医科学院中医基础理论研究所)

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2009ZX09502-019);

“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAI08B01-01)

* 通讯作者: judahong@126.com, (010)64014111 转 2564

[摘要] 目的 探讨祛痹方对Ⅱ型胶原诱导的免疫性关节炎(CIA)大鼠的作用及免疫调节机制。方法 SD大鼠72只随机分为空白对照组12只,模型组、雷公藤多苷组、祛痹方高剂量组、祛痹方低剂量组各15只。除空白对照组外其余各组采用尾根部皮下注射Ⅱ型胶原与不完全弗氏佐剂的方法诱导出CIA模型,造模第15天祛痹方高、低剂量组分别给予祛痹方混悬液6.66g/(kg·d)、3.33g/(kg·d),雷公藤多苷组给予雷公藤多苷混悬液9.68mg/(kg·d),空白对照组和模型组大鼠等体积纯净水,各组每天灌胃1次,连续4周。观察各组大鼠关节病理损伤并进行半定量评分,检测血浆中抗Ⅱ型胶原抗体(COL-2)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)含量。结果 模型组大鼠膝关节病理积分,血浆COL-2、IL-1 β 、IL-6含量较空白对照组明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,祛痹方高剂量组与雷公藤多苷组大鼠关节病理积分,血浆COL-2、IL-1 β 、IL-6含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);祛痹方高剂量组大鼠关节病理积分,血浆COL-2、IL-1 β 水平亦明显低于雷公藤多苷组和祛痹方低剂量组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 高剂量祛痹方显著减轻了CIA大鼠膝关节损伤,其作用机理可能与降低血浆COL-2水平,下调血浆IL-1 β 、IL-6含量有关。

[关键词] 祛痹方; Ⅱ型胶原; 免疫性关节炎; 类风湿性关节炎; 免疫调节因子

Effect of Qubi Formula on the Immunomodulatory Factors in Type II Collagen-Induced Arthritis Rats

FU Xiaowei^{1,2}, ZHAO Hongyan², YU Zheng², LIU Meijie², WANG Ying², ZHOU Shengfang², SONG Changheng², JU Dahong²

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Province 712046; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To study the therapeutic effect and Immunomodulatory mechanism of Qubi Formula (Impediment-Dispelling Formula) for type II collagen-induced arthritis (CIA) in rats. **Methods** Totally 72 SD rats were randomized into the blank control group, model group, tripterygium glycosides group, Qubi Formula high-dose group and Qubi Formula low-dose group, with 12, 15, 15, 15 and 15 in each. The CIA models were induced by subcutaneous injection of collagen type II and incomplete Freund's adjuvant on the tail root of rats in all groups except the blank control group. On the 15th day of modeling, the Qubi Formula high-dose and low-dose groups were gavaged with 6.66g/(kg·d) and 3.33g/(kg·d) Qubi Formula suspension, the tripterygium glycosides group was gavaged with 9.68mg/(kg·d) tripterygium glycosides suspension and the blank control group and model group were gavaged with equal volume of pure water once daily for 4 weeks. The pathological damage of joints in each group was observed and semi-quantitative score was calculated. The contents of anti-type II collagen antibodies (COL-2), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were detected. **Results** Comparing with the blank control group, the score of knee joint pathology and contents of COL-2, IL-1 β and IL-6 were significantly increased in the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Comparing with the model group, the score of knee joint pathology and contents of COL-2, IL-1 β and IL-6 were significantly decreased in the Qubi Formula high-dose group and tripterygium glycosides group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Comparing with the Qubi Formula low-dose group and tripterygium glycosides group, the score of knee joint pathology and contents of COL-2 and IL-1 β were significantly decreased in the Qubi Formula high-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** High-dose Qubi Formula can obviously alleviate knee injury in CIA rats that may be relevant to reducing the COL-2 level and down-regulating the contents of IL-1 β and IL-6.

Keywords Qubi Formula; type II collagen; autoimmune arthritis; rheumatoid arthritis; immunomodulatory factor

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是造成我国人群丧失劳动力与致残的主要病因之一^[1], 深入探索该病的病因及发病机理, 寻找有效的治疗

方法, 改善生存质量是人类共同目标。在RA的发病过程中, 异常的T细胞免疫反应、滑膜细胞免疫反应以及细胞因子的自分泌和旁分泌作用等均起

着重要作用^[2-5]。本实验从免疫调节作用的角度,探讨祛痹方对Ⅱ型胶原诱导的免疫性关节炎(CIA)的作用机制。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF级SD大鼠72只,雄性,体重160~200g,由中国药品生物制品检定所提供,动物许可证号:SCXK(京)2009-0017,在中国中医科学院中医基础理论研究所清洁级动物室喂养,实验动物室许可证号:SYXK(京)2010-0032。

1.2 药品与试剂

祛痹方组成:青风藤15g,威灵仙15g,鸡血藤15g,白芍15g,牛膝15g,续断10g,甘草10g等,干浸膏粉由中国中医科学院中医基础理论研究所方证中心汪文来副研究员提供,每克干膏粉相当于生药4.02g。成人每天临床用量为145g生药(相当于成人每日服用干粉36.07g),按体表面积折换成大鼠的等效剂量为13.37g/(kg·d),相当于每日服用干粉3.33g/(kg·d),临用前用纯净水分别配成0.333g/ml和0.666g/ml两个浓度的混悬液。雷公藤多苷片:10mg/片,江苏美通制药有限公司,批号:080717,临用前用纯净水配成0.968mg/ml的混悬液。牛Ⅱ型胶原、不完全弗氏佐剂(IFA)、大鼠抗Ⅱ型胶原抗体(COL-2)试剂盒:美国Chondrex公司产品,批号分别为100028、100106、062110;大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)试剂盒:美国eBioscience公司产品,批号分别为61361010、61945021。

1.3 主要仪器

Finesse ME+型轮转式切片机、3120061型烤片机、3120059型展片机、Histocentre 3全自动组织包埋机、UltraFreeze超低温冰箱、Multiskan Ascent酶标仪、Multiskan Ascent洗板机:美国Thermo公司产品;Bond max全自动免疫组化仪、CTR6000显微镜、Qwin图像分析仪系统:德国Leica公司产品;T10 Basic手持式分散机:德国IKA公司产品。

1.4 造模方法

参考文献^[6-7]方法:取适量牛Ⅱ型胶原溶液(浓度为2mg/ml)逐滴加入至等容积的IFA中,Ⅱ型胶原终浓度为1mg/ml。冰浴中用匀浆器充分乳化,以滴加水中不扩散为度,取乳化后的混合物按0.2ml/只,即每只200 μ gⅡ型胶原,于尾根部皮下注射。7天后按0.1ml/只,即每只100 μ gⅡ型胶

原,于尾根部皮下加强免疫1次,10天后即可诱导出CIA模型。

1.5 动物分组及给药

72只SD大鼠适应性喂养1周后,用Excel随机函数“rand”法将大鼠分为空白对照组12只,模型组、雷公藤多苷组、祛痹方高剂量组、祛痹方低剂量组各15只。造模第15天开始灌胃给药,祛痹方高、低剂量组分别给予祛痹方混悬液6.66g/(kg·d)、3.33g/(kg·d),雷公藤多苷组给予雷公藤多苷混悬液9.68mg/(kg·d),空白对照组和模型组大鼠灌服等体积纯净水。各组每天灌胃1次,连续4周。

1.6 观察指标及方法

将大鼠用戊巴比妥钠(45mg/kg)腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,2500r/min,20min离心后取血浆,分装后-80℃冰冻备用。取膝关节在4%多聚甲醛中固定备用。

1.6.1 关节损伤半定量分析 膝关节用4%多聚甲醛固定1周后,10%EDTA脱钙,乙醇逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,常规HE染色。光镜下观察滑膜、软骨、骨的病理改变,并进行关节病理损伤半定量分析^[6]。0分:关节结构正常,关节间隙均匀,软骨、骨无损伤,滑膜组织无炎症、增生等;1分:关节结构基本正常,有滑膜增生,血管数量增加,可见少量炎细胞浸润,软骨表层轻度破坏;2分:关节软骨有明显的侵蚀破坏,血管翳形成,炎细胞浸润明显,无骨破坏,关节间隙基本正常;3分:大量的血管翳形成,可见广泛的软骨的侵蚀破坏,可见骨破坏,关节结构遭破坏。

1.6.2 COL-2、IL-1 β 、IL-6含量的测定 采用酶联免疫吸附方法(ELISA)测定血浆中COL-2、IL-1 β 、IL-6含量,操作方法按照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件分析,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法。

2 结果

2.1 各组大鼠膝关节病理光镜结果

图1示,空白对照组关节结构正常,滑膜组织无充血水肿,滑膜细胞无增生现象,无血管翳形成,关节软骨表面光滑平整,无剥脱现象,关节软骨下骨小梁大小、排列正常。模型组可见明显的滑膜细胞增生,排列紊乱,滑膜组织充血水肿,毛细血管增生,并可见炎细胞浸润;增生的滑膜组织形成绒毛状,可伸

向关节腔深处,或向软骨面爬行形成血管翳;在血管翳覆盖下的软骨表层可见明显的组织变性、坏死;关节软骨面剥脱,可见关节腔内有脱剥的关节软骨及滑膜组织。雷公藤多苷组滑膜细胞增生略有减轻,滑膜组织充血水肿减轻,血管增生和浸润炎细胞数量减少,血管翳形成减少;关节软骨面可见扁平层剥脱,剥脱软骨面较平整。祛痹方高剂量组滑膜细胞增生减轻,滑膜组织充血水肿明显减轻,血管增生和浸润炎细胞数量减少,血管翳形成显著减少;关节软骨面可见少量扁平层剥脱,剥脱软骨面平整。祛痹方低剂量组滑膜细胞增生略有减轻,血管翳形成稍有减少;可见明显的软骨表层组织的变性、坏死;关节软骨面剥脱,可见关节腔内有脱剥的关节软骨及滑膜组织。

2.2 各组大鼠膝关节病理积分比较

表 1 示,模型组大鼠膝关节病理积分较空白对照组明显升高($P<0.01$);与模型组比较,祛痹方高剂量组与雷公藤多苷组大鼠关节病理积分明显降低,但仍高于空白对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);祛痹方高剂量组大鼠关节病理积分亦明显低于雷公藤多苷组和祛痹方低剂量组($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠膝关节病理积分变化(分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	病理积分
空白对照组	12	0.17±0.25
模型组	15	2.57±0.42*
雷公藤多苷组	15	2.17±0.41*▲▼
祛痹方高剂量组	15	1.83±0.49*▲▲
祛痹方低剂量组	15	2.27±0.59*▼

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与祛痹方高剂量组比较,▼ $P<0.05$

2.3 各组大鼠血浆 COL-2、IL-1 β 、IL-6 含量比较

表 2 示,与空白对照组比较,模型组大鼠血浆 COL-2、IL-1 β 、IL-6 含量水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);雷公藤多苷组和祛痹方高剂量组大鼠血浆 COL-2、IL-1 β 、IL-6 含量水平较模型组明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);祛痹方高剂量组大鼠血浆 COL-2、IL-1 β 水平明显低于雷公藤多苷组和祛痹方低剂量组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

基于 RA 正气虚衰、气滞血瘀与痰湿互结的病机我们创立了祛痹方,该方君药青风藤,具有祛风湿、通经络、利小便之功效;臣药威灵仙,祛风湿,通

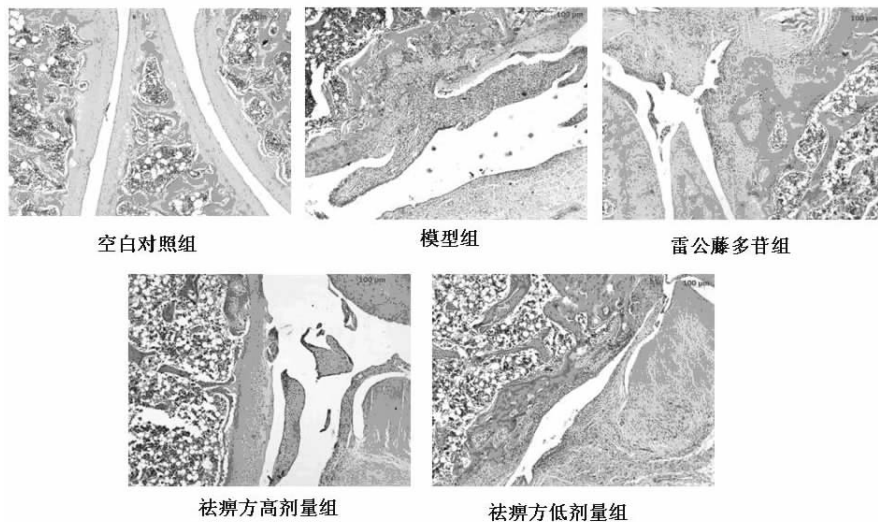


图 1 各组大鼠膝关节 HE 染色结果(200×)

表 2 各组大鼠血浆 COL-2、IL-1 β 、IL-6 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	COL-2($\mu\text{gIgG/ml}$)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6(pg/ml)
空白对照组	12	23.9±4.03	109.48±9.74	65.79±10.25
模型组	15	62.16±5.43**	132.49±15.71**	77.89±13.69*
雷公藤多苷组	15	55.95±7.67**▲▼	121.29±14.18*▲▼	67.23±11.14▲
祛痹方高剂量组	15	50.68±7.00**▲▲	110.89±11.93▲▲	66.93±11.91▲
祛痹方低剂量组	15	58.05±6.69**▼▼	123.19±14.55*▼	70.20±11.07

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与祛痹方高剂量组比较,▼ $P<0.05$,▼▼ $P<0.01$ 。

络止痛,为治疗风湿痹痛的要药;续断功用为祛风湿,补肝肾,强筋骨,对痹证日久、伤及肝肾、腰膝酸软、筋骨无力者尤佳;佐药怀牛膝补肝肾,强筋骨,活血通经,利水通淋,引火(血)下行;鸡血藤行血补血,舒筋活络,可使经脉通畅,脉络通和,在本方中与威灵仙配伍,可治疗风湿痹痛,肢体麻木;白芍养血敛阴,柔肝止痛;使药甘草调和诸药。诸药合用共奏祛风湿,活血化瘀,祛痰湿。本实验结果表明,模型组大鼠膝关节可见较明显的滑膜细胞增生,并可见炎细胞浸润;增生的滑膜组织形成血管翳;在血管翳覆盖下的软骨表层可见明显的变性、坏死;关节腔可见内有脱剥的关节软骨及滑膜组织。经雷公藤多苷和祛痹方治疗后,大鼠膝关节损伤有不同程度的改善,其中高剂量祛痹方病理损伤程度要轻于雷公藤多苷。

既往研究发现, COL-2 可以直接与软骨内的胶原结合,以嗜中性粒细胞弹性蛋白酶降解关节软骨,导致关节软骨的破坏^[8-9]。本实验结果表明,空白对照组大鼠血浆中含有少量的 COL-2,表明在正常 SD 大鼠体内存在对自身 II 型胶原抗原的低反应性,当给予 II 型胶原抗原免疫时,就可以打破这种低免疫应答反应状态,诱导关节炎的发生。CIA 大鼠血浆中 II 型胶原抗体显著增高,表明 COL-2 在 CIA 的发病过程中起着重要的作用。雷公藤多苷组和祛痹方高剂量组大鼠血浆 COL-2 水平较模型组明显降低,说明雷公藤多苷和祛痹方高剂量对 CIA 有较好的治疗作用。而与雷公藤多苷组比较,祛痹方高剂量组 COL-2 含量降低更加明显。

细胞因子特别是 IL-1,在 RA 的发生发展过程中起着重要作用^[10-11]。在 RA 发病中,IL-6 也是一种重要的炎性因子,且 IL-6 水平增高与疾病的活动程度呈正相关^[12-13]。本实验结果显示,模型组大鼠外周血浆中 IL-1 β 、IL-6 含量明显升高,而雷公藤多苷和高剂量祛痹方可降低外周血浆中 IL-1 β 、IL-6 含量,提示高剂量祛痹方同雷公藤多苷均对 CIA 大鼠外周血浆中 IL-1 β 、IL-6 含量有抑制的作用,其中高剂量祛痹方对 IL-1 β 的抑制作用较雷公藤多苷效果更显著。

综上,祛痹方可以显著减轻 CIA 大鼠关节损伤程度,对 CIA 大鼠具有明显的改善作用,其效果优于雷公藤多苷。其作用机理可能是通过降低血浆中抗 II 型胶原抗体水平,减少免疫复合物的形成,抑制 CIA 大鼠异常的自身免疫反应,并通过下调血浆中

IL-1、IL-6 的含量,调节机体免疫状态,减少骨破坏,从而达到治疗 RA 的作用。

参考文献

- [1]张乃峥. 临床风湿病学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999: 118-120.
- [2]Lagana B, Vinciguerra M, D'Amelio R. Modulation of T-cell co-stimulation in rheumatoid arthritis: clinical experience with abatacept[J]. Clin Drug Investig, 2009, 29 (3):185-202.
- [3]Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis[J]. Semin Immunopathol, 2010,32(1): 43-53.
- [4]Paquet J, Goebel JC, Delaunay C, et al. Cytokines profiling by multiplex analysis in experimental arthritis: which pathophysiological relevance for articular versus systemic mediators? [J]. Arthritis Res Ther, 2012,14 (2):60.
- [5]Akhavani MA, Madden L, Buyschaert I, et al. Hypoxia upregulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2009,11 (3):64.
- [6]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):761-764.
- [7]鞠大宏,赵红艳,王燕,等. 不同时间去势对大鼠 CIA 发病情况的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(8): 658-667.
- [8]Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease [J]. Pathophysiology, 2005,12 (3):167-181.
- [9]Mewar D, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review [J]. Biomed Pharmacother, 2006, 60 (10):648-655.
- [10]高骏,周海燕,刘旭光,等. 艾灸对实验性 RA 大鼠血浆 Th1/Th2 细胞因子平衡影响的实验研究[J]. 成都中医药大学学报,2008,31(1):22-24.
- [11]高自立,董秋梅,王滨,等. 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[J]. 中医杂志, 2012,53(7):599-602.
- [12]Nakahara H, Song J, Sugimoto M, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum,2003,48(6):1521-1529.
- [13]De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(11): 3551-3563.

(收稿日期:2013-01-21;修回日期:2013-07-03)

[编辑:邓媛]