

风湿宁胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞超微结构及细胞凋亡相关基因表达的影响

马艳苗^{1,2} 王永辉² 李艳彦² 高丽² 周然^{2*}

(1. 湖北中医药大学研究生处, 湖北省武汉市洪山区黄家湖西路特 1 号, 430065;

2. 山西中医学院)

基金项目: 国家科技重大专项资助项目(2010ZX09102-210)

* 通讯作者: zhouran58@sohu.com, (0351)2272276

[摘要] 目的 探讨风湿宁胶囊治疗类风湿关节炎(RA)的作用机制。方法 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、雷公藤多苷片组、风湿宁低剂量组、风湿宁中剂量组、风湿宁高剂量组各 10 只, 除正常对照组外其余各组建立胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠模型, 雷公藤多苷片组给予雷公藤多苷片 0.03 g/(kg·d), 风湿宁低、中、高剂量组分别给予风湿宁胶囊 0.33、0.66、1.32 g/(kg·d), 正常对照组和模型组给予蒸馏水, 各组按 20 ml/kg 体重灌胃, 每天 1 次, 连续 4 周。透射电镜观察大鼠滑膜细胞超微结构, RT-PCR 检测凋亡相关基因 caspase 3 mRNA、caspase 9 mRNA 的表达水平。结果 电镜下风湿宁低、中、高剂量组大鼠的滑膜细胞超微结构均较模型组有不同程度的改善, 尤以风湿宁中剂量组效果明显。雷公藤多苷片组及风湿宁低、中剂量组 caspase 3 mRNA 的表达较模型组上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 风湿宁中、高剂量组及雷公藤多苷片组 caspase 9 mRNA 表达较模型组上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 风湿宁胶囊治疗 RA 机制可能与改善大鼠滑膜细胞的超微结构、上调凋亡相关基因 caspase 3 mRNA、caspase 9 mRNA 有关。

[关键词] 类风湿关节炎; 风湿宁胶囊; 胶原诱导性关节炎; 超微结构; 凋亡相关基因

Effects of Fengshining Capsule on the Ultrastructure of Synovial Cells and the Expressions of Apoptosis-Related Genes in Arthritic Rats Induced by Collagen

MA Yanmiao^{1,2}, WANG Yonghui², LI Yanyan², GAO Li², ZHOU Ran²

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Province 430065; 2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the mechanism of Fengshining Capsule (FSN) for rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Sixty SD rats were randomized into the normal control group, model group, Tripterygium glycosides tablet (TGT) group, low-dose FSN group, middle-dose FSN group and high-dose FSN group, with 10 in each. The rat models with collagen-induced arthritis (CIA) were established in the five groups except the normal control group. The TGT group was given 0.03 g/(kg·d) TGT. The low-dose, middle-dose and high-dose FSN groups were given 0.33 g/(kg·d), 0.66 g/(kg·d) and 1.32 g/(kg·d) FSN capsule respectively. The distilled water was given to the normal control group and model group. Each group was intragastrically administrated with 20ml/kg of corresponding medicine, once daily for 4 weeks. The ultrastructure of synovial cells was observed with transmission electron microscopy and the expressions of caspase-3 and caspase-9 mRNA were detected with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. **Results** Comparing with the model group, the ultrastructure of synovial cells was improved in the FSN groups, especially in the middle-dose FSN group. Comparing with the model group, the expression of caspase-3 mRNA was significantly increased in the TGT group, low-dose FSN group and middle-dose FSN group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the model group, the expression of caspase-9 mRNA was significantly increased in the TGT group, high-dose FSN group and middle-dose FSN group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of FSN capsule for RA may be relevant to improving the ultrastructure of synovial cells and increasing the apoptosis-related genes caspase-3 mRNA and caspase-9 mRNA.

Keywords rheumatoid arthritis; Fengshining Capsule; collagen-induced arthritis; ultrastructure; apoptosis-related gene

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节肿痛、畸形为主要表现的慢性系统性自身免疫性疾病,其主要病理学特点为关节滑膜增生,衬里层增厚和多种炎细胞浸润^[1-2]。滑膜是 RA 的主

要攻击对象,易受到外界刺激导致滑膜细胞信号转导异常,表现为滑膜增生,关节软骨及骨组织破坏,久之会引起关节间隙狭窄,肢体活动受限^[3-4]。研究显示,风湿宁胶囊能显著减轻寒湿兼瘀血阻络型

RA的主要症状和体征积分,治疗效果显著^[5]。本实验建立胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠模型,观察风湿宁胶囊对大鼠滑膜细胞超微结构及细胞凋亡相关基因表达的影响,探讨其可能的作用机制,以期为临床研究提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

风湿宁胶囊山西仁源堂药业有限公司提供,批号:20110329;雷公藤多苷片,上海复旦复华药业有限公司,批号:Z31020415;弗氏完全佐剂,Sigma公司,批号:F5881;牛Ⅱ型胶原,Chondrex公司,批号:100258;Trizol试剂,美国GIBCO公司,批号:15596026;RNA逆转录试剂盒,MBI Fermentas公司,批号:K1652;SYBR Premix Ex Taq试剂盒,豪夫迈·罗氏公司,批号:04913850 001;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 实验动物

SPF级SD大鼠60只,雄性,体质量(180±20)g,动物许可证号:SCXK(军)2007-004,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

1.3 实验仪器

JEM-1011透射电子显微镜,日本电子株式会社;JY96-ⅡN超声波细胞粉碎机宁波新芝生物科技股份有限公司;TGL-16高速台式冷冻离心机、TGL-16W微量高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;TL988 Real-time PCR仪,西安天隆科技有限公司;Cary 50紫外可见分光光度计,Varian公司。

2 方法

2.1 动物分组与造模

采用随机数字表法将大鼠分为6组:正常对照组、模型组、雷公藤多苷片组、风湿宁低剂量组、风湿宁中剂量组、风湿宁高剂量组各10只。将Ⅱ型胶原醋酸溶液4℃过夜后,按1:1的比例加至弗氏完全佐剂中,充分乳化。除正常对照组外,其余各组大鼠足跖、背部、尾根3点共注射乳化剂0.3ml,正常对照组大鼠于相同部位3点各注射生理盐水0.1ml。7d后所有造模大鼠以0.1ml乳化剂加强免疫1次^[6]。

2.2 给药方法

雷公藤多苷片组给予雷公藤多苷片0.03g/(kg·d),风湿宁低、中、高剂量组分别给予风湿宁胶囊0.33、0.66、1.32g/(kg·d),正常对照组和模

型组给予蒸馏水,各组按20ml/kg体重灌胃,每天1次,连续4周。

2.3 电镜生物制样

取大鼠右膝关节滑膜组织,以2%戊二醛固定液固定2h,缓冲液冲洗3次,用1%锇酸固定2h,丙酮逐级脱水,每级15min,丙酮与包埋剂(1:1)混合液室温浸透3h,环氧树脂618包埋、超薄切片、铀铅双染色后,透射电镜下观察。

2.4 RT-PCR检测凋亡相关基因caspase 3、caspase 9表达

用Trizol提取滑膜细胞mRNA,紫外分光光度计测定A260nm和A280nm吸光度,吸光度260/280在1.8~2.0之间为合格。按照逆转录试剂盒说明将RNA逆转录成cDNA。根据GeneBank提供的caspase 3、caspase 9、 β -actin核苷酸序列设计和合成引物。PCR反应条件:94℃预变性10min;94℃15s,60℃60s,45个循环结束。读取CT(cycle threshold)值,首先计算各样本测定基因XCT与内对照基因Beta-actin CT的差值,即 $\Delta CT = CT(X) - CT(\beta\text{-actin})$,再用各实验组样本的 ΔCT 减去正常对照组样本的 ΔCT ,得到 $\Delta\Delta CT$,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算^[7],表示实验组测定基因X表达相对正常对照组样本X表达的变化倍数。

2.5 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行数据处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用One-way ANOVA检验。

3 结果

3.1 各组大鼠滑膜细胞超微结构的比较

透射电镜下观察到,正常对照组大鼠滑膜细胞的A型细胞呈圆形或卵圆形,细胞染色质分布较均匀;B型细胞呈梭形,细胞质中有中间纤维或成束状,胞质中有较丰富的粗面内质网。与正常对照组比较,模型组大鼠的A型细胞核形状不规则,核周间隙明显扩张,核膜畸形凹陷,核异染色质凝集成高电子密度的块状,分布不均匀,胞质变性坏死,形成大小不一、形态不规则的膜性碎片或不同电子密度的块状结构;B型细胞各种细胞器数量增加,粗面内质网囊腔扩张;间质胶原纤维融合变性或解聚,形成新的不规则的片层状结构。雷公藤多苷组A型细胞细胞核卵圆形,部分粗面内质网囊腔扩张;B型细胞核膜结构完整,未出现核周间隙的扩张,仅有部分细胞核膜有不同程度的凹陷。与模型组比较,风湿

宁低、中、高剂量组对滑膜细胞成分有较好的恢复作用且能够抑制间质胶原纤维的异常增生,表现为 A 型细胞形态结构较完整,胞质中可见较多的初级溶酶体和一些吞噬小体,以及散在的核糖核蛋白体;B 型细胞细胞核形态基本正常,核染色质分布较均匀,尚存在轻微的粗面内质网囊腔扩张,其中尤以风湿宁中剂量组作用最为明显,大鼠滑膜细胞基本结构恢复正常。

3.2 各组大鼠滑膜细胞 caspase 3 mRNA、caspase 9 mRNA 的比较

表 1 示,与正常对照组比较,模型组 caspase 3 mRNA、caspase 9 mRNA 的表达明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);雷公藤多苷片组及风湿宁低、中剂量组 caspase 3 mRNA 的表达较模型组明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);风湿宁中、高剂量组及雷公藤多苷片组 caspase 9 mRNA 表达较模型组上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。风湿宁低剂量组大鼠 caspase 9 mRNA 明显低于雷公藤多苷片组和风湿宁中、高剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠滑膜细胞 caspase 3 mRNA、caspase 9 mRNA 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	caspase 3 mRNA	caspase 9 mRNA
正常对照组	10	0.99 ± 0.16	0.96 ± 0.08
模型组	10	0.43 ± 0.21*	0.34 ± 0.04**
雷公藤多苷片组	10	0.97 ± 0.03△	0.80 ± 0.08△
风湿宁低剂量组	10	1.19 ± 0.12△△	0.44 ± 0.29**▲
风湿宁中剂量组	10	1.27 ± 0.12△△	1.11 ± 0.03△△#
风湿宁高剂量组	10	0.87 ± 0.33	1.10 ± 0.07△△#

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与雷公藤多苷片组比较,▲ $P < 0.05$;与风湿宁低剂量组比较,# $P < 0.01$

4 讨论

RA 属于中医学中“痹证”、“历节”、“尪痹”、“骨痹”等证的范畴。《素问·痹论》提出“所谓痹者,各以其时,重感于风寒湿之气也”。痹证多因寒邪、风寒或寒湿之邪侵袭人体,临床多表现为关节肿胀、疼痛酸困、麻木、屈伸不利,病久则瘀阻经络而成痹证^[8]。现代医学认为,RA 是一种以滑膜增生和滑膜组织中炎细胞浸润为主要特征的慢性炎症性疾病^[9-10],常存在软骨缺失和骨侵蚀,并最终可能导致永久性的关节功能障碍^[11]。

滑膜组织和关节腔内的 A、B 型滑膜细胞是 RA 关节损伤的最终效应细胞^[12]。巨噬细胞样细胞(macrophage like cells, A 型细胞)对外有防御功

能,对内可以消化体内新陈代谢中衰老死亡的细胞成分;成纤维细胞样细胞(fibroblast like cells, B 型细胞)含有较多的粗面内质网和一定数量的线粒体,主要合成、分泌滑膜结缔组织胶原纤维,并为细胞活动提供能量^[13]。在透射电镜下我们可以看到,模型组大鼠滑膜细胞的基本结构出现异常改变,线粒体、粗面内质网等各种细胞器肿胀,间质胶原纤维融合变性或解聚,形成了很多新的形状不规则的片层状结构,提示滑膜细胞处于亢进的增生状态。而风湿宁中、高剂量组对 CIA 大鼠的滑膜细胞病理状态有明显的治疗作用,能够下调粗面内质网胶原蛋白的分泌,抑制胶原纤维的增生。

凋亡是细胞死亡进程中的一种生理形式,对于多细胞动物的发展及组织自我平衡具有重要的作用。凋亡早期 caspase 9 裂解并激活 caspase 3 等效应 caspase,分解大量的细胞底物,最终诱发细胞死亡^[14-15]。研究发现,升高 RA 大鼠的 caspase 3 水平可以促进增生的滑膜细胞凋亡^[16]。本实验结果显示,模型组大鼠的 caspase 3 mRNA、caspase 9 mRNA 水平明显降低,风湿宁中剂量组对 CIA 大鼠处于增殖状态的滑膜细胞有显著的促凋亡作用,从而扭转 RA 的病理状态。该结果与透射电镜下观察到的滑膜 A 型细胞、B 型细胞细胞器超微结构改变一致。

综上所述,风湿宁胶囊促进 RA 亢进的滑膜细胞凋亡可能与改善 CIA 大鼠滑膜 A 型、B 型细胞的超微结构和上调滑膜细胞中 caspase 3 mRNA、caspase 9 mRNA 的表达有关,这将为风湿宁胶囊治疗 RA 提供实验依据。

参考文献

- [1]李春,王秀茹,唐熠达,等.全国多中心类风湿关节炎冠心病危险因素的前瞻性研究[J].北京大学学报(医学版),2012,44(2):176-181.
- [2]许金鑫,张育,张学增,等.金雀异黄素抗Ⅱ型胶原诱导型关节炎大鼠滑膜血管新生的研究[J].中西医结合学报,2011,9(2):186-193.
- [3]Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment[J]. Genes Cancer, 2011, 2(5):523-537.
- [4]Baier A, Meinekel I, Gay S, et al. Apoptosis in rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2003, 15(3):274-279.
- [5]赵建平,刘光珍,王裕颐.风湿宁胶囊治疗类风湿关节炎疗效观察[J].山西中医,1999,15(6):8-10.

(下转第 335 页)

床医师用药调查等更加深入广泛的研究提供了一定的基础。

参考文献

- [1]徐劲松,徐文冲,霍志毅,等.加味葛根芩连汤治疗湿热型急性腹泻疗效观察[J].黑龙江中医药,2009,(2):14—15.
- [2]王淑琴,杨新成.葛根芩连微丸治疗急性腹泻52例疗效观察[J].中国煤炭工业医学杂志,1999,2(6):633.
- [3]王广芳.葛根芩连汤加味治疗细菌性痢疾42例[J].中国中医急症,2004,13(1):52—53.
- [4]于思强.葛根芩连汤加味治疗急性菌痢39例[J].时珍国医国药,1999,10(6):451.
- [5]蓝常青.葛根芩连汤加味治疗急性感染性肠炎临床观察[J].深圳中西医结合杂志,2005,(4):238—239.
- [6]朱薇,贾满仓.复方葛根芩连汤治疗急性菌痢32例临床观察[J].河南中医,2006,26(3):30—31.
- [7]张继玉,庄长安,张敬银,等.复方葛根芩连汤加减治疗急性菌痢74例[J].安徽中医临床杂志,2003,15(4):309—310.
- [8]龙洁儿,欧阳博文.加味葛根芩连汤治疗急性肠炎疗效观察[J].新中医,2010,42(6):24—25.
- [9]苏东平,宋俊建.葛根芩连汤加减治疗慢性泄泻43例疗效分析[J].中国社区医师,2008,24(12):53—54.
- [10]何培芸.葛根芩连汤加味治疗泄泻的体会[J].辽宁中医学院学报,2006,8(1):54.
- [11]陈军林,高建民,王滔,等.加味葛根芩连汤治疗婴幼儿诺沃克样病毒腹泻114例[J].中国中西医结合杂志,2005,25(6):488.
- [12]宋桂华,杨晓霞.加味葛根芩连汤治疗小儿鼠伤寒沙门氏菌肠炎[J].河南中医,2001,21(1):62—63.
- [13]王颖.葛根芩连汤治疗小儿湿热泄泻[J].山东中医杂志,2007,26(2):121.
- [14]孙小琴,姜润林.葛根芩连汤治疗轮状病毒肠炎85例观察[J].实用中医药杂志,2010,26(4):236.
- [15]韦汉才.葛根芩连汤加味治疗小儿轮状病毒肠炎疗效观察[J].中国实用医药,2010,5(5):133.
- [16]王妙玲.葛根芩连汤加减治疗婴幼儿病毒性肠炎128例[J].浙江中西医结合杂志,2008,18(8):522—523.
- [17]国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2010:1146.
- [18]崔向微,张贵君,李慧,等.“葛根芩连汤”两种配伍比例的化学药效组分比较分析[J].中成药,2009,31(2):263—266.
- [19]刘宇政,章军,王跃生,等.葛根芩连汤剂量相关问题探讨[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):216—218.
- (收稿日期:2012-05-25;修回日期:2012-08-22)
- [编辑:王利芬]
- (上接第328页)
- [6]樊国琴,刘春芳,赵娟,等.道地和非道地苍术对类风湿性关节炎大鼠病情及促炎细胞因子和炎症介质的影响[J].中国中药杂志,2010,35(20):2731—2735.
- [7]Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR [J]. Nucl Acids Res, 2001,29(9):45.
- [8]薛琨英.类风湿关节炎的中医研究[J].光明中医,2011,26(5):1078—1080.
- [9]Lebre MC, Jongbloed SL, Tas SW, et al. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP-dendritic cells with distinct cytokine profiles[J]. Am J Pathol,2008, 172(4):940—950.
- [10]Kaneko K, Miyabe Y, Takayasu A, et al. Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(5): 158.
- [11]Scian R, Barrionuevo P, Giambartolomei GH, et al. Potential role of fibroblast-like synoviocytes in joint damage induced by Brucella abortus infection through production and induction of matrix metalloproteinases[J]. Infect Immun,2011,79(9):3619—3632.
- [12]Kiener HP, Watts GF, Cui Y, et al. Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture[J]. Arthritis Rheum,2010, 62(3):742—752.
- [13]罗磊,胡玲,何璐,等.艾灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜细胞超微结构的影响[J].针刺研究,2011,36(2): 105—109.
- [14]Cagnol S, Mansour A, Van OE, et al. Raf-1 activation prevents caspase 9 processing downstream of apoptosome formation[J]. J Signal Transduct,2011:834—948.
- [15]戴冽,李婷,朱浪静,等.海藻多糖对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响及机制研究[J].中国中西医结合杂志,2011,31(7):961—966.
- [16]李文珠,李迎,罗芳洪,等.诱骗受体 DcR3 对佐剂型关节炎大鼠模型的作用分析[J].免疫学杂志,2008,24(1): 23—28.
- (收稿日期:2012-05-25;修回日期:2012-11-14)