

防己黄芪汤对DBA/1小鼠胶原诱导型关节炎及血管新生的影响

何莲花^{1,2}, 栾慧杰^{1,2}, 单宏颖^{1,2}, 杨波^{1,2}, 何娟^{1,2}, 虎义平^{1,2}, 戴嘉婧^{1,2},
万汇娟^{1,2}, 方崇州^{1,2}, 王庆文^{1,2*}

(1. 北京大学深圳医院, 广东深圳 518036;

2. 深圳市炎症与免疫性疾病重点实验室, 广东深圳 518036)

[摘要] 目的: 观察防己黄芪汤对DBA/1小鼠胶原诱导型关节炎(CIA)及血管新生的影响。方法: 将DBA/1小鼠按体重随机分为正常组, CIA组及防己黄芪汤组(5.4 g·kg⁻¹)。CIA组及防己黄芪汤组第1天以牛Ⅱ型胶原和完全弗氏佐剂免疫DBA/1小鼠, 于第21天以牛Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂免疫DBA/1小鼠建立CIA模型, 并于二次免疫当天开始灌胃给药, 每天1次, 共给药28 d。第22天开始观察CIA小鼠的关节红肿等症状并进行关节炎评分, 第49天取材后, 进行组织苏木素-伊红(HE)染色观察CIA小鼠关节滑膜中血管新生情况; 免疫组化检测CIA小鼠关节滑膜中血管内皮细胞标志物血小板内皮细胞黏附分子-1(CD31)及血管内皮生长因子(VEGF)的表达情况; 免疫荧光双染检测CIA小鼠关节滑膜中成熟血管和不成熟血管的情况。同时, 提取大鼠胸主动脉环, 采用VEGF(20 μg·L⁻¹)诱导大鼠胸主动脉环微血管的生长, 加入不同浓度防己黄芪汤(0.25, 0.5, 1 g·L⁻¹)作用后, 显微镜下观察防己黄芪汤对VEGF诱导的大鼠胸主动脉环微血管生长情况并进行拍照统计。结果: 与正常组比较, CIA组小鼠炎症关节红、肿及畸形明显, 临床关节炎评分、发病率、关节滑膜炎、血管新生情况显著升高, 关节滑膜中的血管密度, CD31和VEGF的阳性表达量、不成熟血管的数量均显著升高(P<0.01); 与CIA组比较, 防己黄芪汤组小鼠炎症关节的红、肿及畸形明显改善, 临床关节炎评分、发病率、关节滑膜炎、血管新生情况显著降低, 关节滑膜中的血管密度, CD31和VEGF的阳性表达量、不成熟血管的数量均显著下降(P<0.01)。与正常组比较, VEGF能显著诱导大鼠胸主动脉环微血管的生长(P<0.01); 与VEGF组比较, 防己黄芪汤(0.25, 0.5, 1 g·L⁻¹)可显著抑制大鼠胸主动脉环微血管的生成(P<0.01)。结论: 防己黄芪汤可有效缓解CIA小鼠的临床症状, 降低临床关节炎评分及发病率, 同时具有抑制CIA小鼠关节滑膜中及大鼠胸主动脉环中血管新生的作用。

[关键词] 防己黄芪汤; DBA/1小鼠; 胶原诱导型关节炎; 大鼠胸主动脉环; 血管新生

[中图分类号] R2-0; R289; R33; R364.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)17-0016-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211736

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210707.0851.001.html>

[网络出版日期] 2021-07-07 10:45

Effect of Fangji Huangqitang on DBA/1 Mice Collagen Induced Arthritis and Synovial Angiogenesis

HE Lian-hua^{1,2}, LUAN Hui-jie^{1,2}, SHAN Hong-ying^{1,2}, YANG Bo^{1,2}, HE Juan^{1,2}, HU Yi-ping^{1,2},
DAI Jia-jing^{1,2}, WAN Hui-juan^{1,2}, FANG Chong-zhou^{1,2}, WANG Qing-wen^{1,2*}

(1. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China;

2. The Key Laboratory of Inflammatory and Immunology Diseases, Shenzhen 518036, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Fangji Huangqitang (FJHQT) on collagen induced

[收稿日期] 20210525(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81974253, 81901641); 广东省自然科学基金项目(2019A1515011112); 广东省中医药局科研项目(20211333); 深圳市科创委基础研究重点项目(JCYJ20200109140203849)

[第一作者] 何莲花, 博士, 助理研究员, 从事中药抗类风湿关节炎相关研究, E-mail: helianhua126@126.com

[通信作者] *王庆文, 博士, 主任医师, 从事风湿免疫病临床工作, E-mail: wqw_sw@163.com

arthritis (CIA) and synovial angiogenesis in DBA/1 mice. **Method:** DBA/1 mice were randomly divided into normal group, CIA group and FJHQT group. DBA/1 mice in CIA group and FJHQT group were immunized with bovine type II collagen and complete Freund's adjuvant on the first day, and DBA/1 mice were immunized with bovine type II collagen and incomplete Freund's adjuvant on the 21st day to establish CIA model. On the day of the second immunization, the drug was given by gavage once a day for 28 days. On the 22nd day, the arthritis score and other symptoms of CIA mice were observed. On the 49th day, Hematoxylin eosin (HE) staining was carried out to observe the angiogenesis in the synovium of CIA mice, the expression of vascular endothelial cell marker platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the synovium of CIA mice were detected. Immunofluorescence double staining was used to detect the mature and immature vessels in the synovium of CIA mice. And the microvascular growth of the rat thoracic aortic ring was induced by VEGF ($20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The effects of FJHQT ($0.25, 0.5, 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) at different concentrations were observed under microscope. **Result:** Compared with the normal group, the inflammation, joints, red and swelling of the inflammatory joints of the CIA group were significantly increased ($P<0.01$). The scores of clinical arthritis, the incidence rate, synovial inflammation and angiogenesis were significantly increased ($P<0.01$). The density of blood vessels, the positive expression of CD31 and VEGF, the number of immature vessels in synovial membrane were significantly increased ($P<0.01$). And compared with the CIA group, the inflammation, joint swelling, and malformation of the FJHQT group were significantly improved, the clinical arthritis score, incidence rate, synovial inflammation and angiogenesis were significantly reduced ($P<0.01$). The vascular density, the positive expression of CD31 and VEGF, and the number of immature blood vessels in synovial membrane were significantly increased ($P<0.01$). Compared with blank group, VEGF could significantly induce the growth of microvasculature in rat thoracic aortic ring ($P<0.01$). Compared with VEGF group, FJHQT ($0.25, 0.5, 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) could significantly inhibit the formation of microvasculature in rat thoracic aortic ring ($P<0.01$). **Conclusion:** FJHQT can effectively alleviate the clinical symptoms and condition of CIA mice, reduce the clinical arthritis score and incidence rate, and inhibit the synovial angiogenesis of CIA mice joints and VEGF induced microvascular formation in rat thoracic aortic rings.

[**Keywords**] Fangji Huangqitang; DBA/1 mice; collagen induced arthritis; rat thoracic aortic ring; angiogenesis

类风湿关节炎(RA)是一种可导致软骨和骨破坏,甚至残疾的慢性炎症性关节病^[1]。RA的发病率较高,全世界为0.5%~1%^[2]。其特征是关节疼痛、肿胀,严重损害身体功能和生活质量,且RA患者比普通人群更容易发生严重感染、呼吸道疾病、骨质疏松症、心血管疾病、癌症和死亡。近年来,对RA的早期诊断、积极的治疗及对疾病改良的抗风湿药物的扩展治疗已显著改善RA的治疗情况和预后。临床上常见的症状为肌肉骨骼疼痛、肿胀和僵硬,因此熟悉RA的诊断和治疗至关重要。目前治疗RA的药物大都价格昂贵,或不良反应大,因此寻找一种有效、价格低廉且不良反应小的药物是目前的热点和难点。目前中医药在RA中的治疗优势不断凸显。而来源于《金匱要略》的防己黄芪汤在临床上常用于RA的治疗,且具有调节免疫及抗炎等现代药理作用。研究表明防己黄芪汤可有效作用于实

验性RA,但防己黄芪汤在血管新生中作用及在RA中的作用机制不清。因此本研究针对RA中的重要病理环节-滑膜血管新生,采用胶原诱导型关节炎(CIA)小鼠模型及离体大鼠胸主动脉环血管模型,观察防己黄芪汤在其中的干预作用及在血管新生中的作用。

1 材料

1.1 动物 SPF级DBA/1小鼠,雄性,18~20 g,30只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2017-0005。SPF级雄性SD大鼠,体质量180~200 g,3只,购自广东省医学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2018-0002。伦理委员会批号2020-046。

1.2 药物与试剂 防己黄芪汤由防己12 g,黄芪15 g,甘草(炒)6 g,白术9 g,大枣4枚,生姜3片(均购自北京同仁堂)组成;不完全弗氏佐剂(IFA),完

全弗氏佐剂(CFA),牛Ⅱ型胶原(美国 Chondrex 公司,批号分别为 7002, 7001, 20022);血小板内皮细胞黏附分子-1(CD31), 488 山羊抗兔荧光二抗及 594 山羊抗小鼠荧光二抗(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab28364, ab150077, ab150116);血管内皮生长因子(VEGF)抗体及大鼠 VEGF 细胞因子(美国 Proteintech 公司,批号分别为 19003-1-AP, 400-31); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA, 美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 48938);DAPI(美国 AAT Bioquest 公司,批号 17510);兔二步法试剂盒, DAB 显色试剂盒, 苏木素染液, 伊红染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 PV-6001, ZLI-9018, ZLI-9610, ZLI-9613);H-DMEM 培养基, 胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 11965-092, 16000-044);磷酸盐缓冲液(PBS), 青霉素-链霉素溶液(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30256.01B, SV30010);基质胶(美国 Corning 公司,批号 354234);噻唑蓝(MTT, 美国 Sigma 公司,批号 M5655)。

1.3 仪器 BX53 型正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);DMI8 型倒置荧光显微镜及 819 切片刀(德国 Leica 公司);371 型二氧化碳培养箱, HM315 型石蜡切片机(美国 Thermo 公司);Tec 2500 型病理组织漂烘仪(江苏常州郝思琳公司)。

2 方法

2.1 防己黄芪汤药液的制备^[3] 防己黄芪汤由防己 12 g, 黄芪 15 g, 甘草(炒)6 g, 白术 9 g, 大枣 4 枚, 生姜 3 片组成, 根据防己黄芪汤的临床用量(42 g), 并根据小鼠(20 g)与人(70 kg)的体表面积进行换算, 得到小鼠用量剂量为 $5.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。取组成防己黄芪汤的中药 5 剂, 加入 12 倍量的水, 浸泡 30 min 后, 开火煮, 煮沸后继续煎煮 60 min, 用无菌纱布双层过滤, 得到煎液 1; 加 8 倍水到上述药渣中, 重复上面步骤, 得到煎液 2; 将此煎液 1 及 2 混合, 加热浓缩至 $0.54 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 CIA 模型的建立^[4] DBA/1 小鼠适应性饲养 1 周后, 按体质量随机分为 3 组, 分别为正常组, CIA 组和防己黄芪汤组, 每组 10 只。其中 CIA 组和防己黄芪汤组进行造模。取适量完全/不完全弗氏佐剂加至 4 mL 离心管中, 冰浴中匀浆机 $11\ 400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下逐滴将等体积牛Ⅱ型胶原溶液加入佐剂中。待胶原全部加入后, 每乳化 1 min, 停 1 min, 再乳化 1 min, 每管乳化 6~8 次, 以滴加水中不扩散为度, 过程中保持冰浴。第 1 次免疫于尾根注射乳化好的等

体积完全弗氏佐剂及牛Ⅱ型胶原, 每只 0.1 mL, 标记为第 1 天。第 2 次免疫于尾中部注射乳化好的等体积不完全弗氏佐剂及牛Ⅱ型胶原, 每只 0.1 mL, 标记为第 21 天。造模后 DBA/1 小鼠前后四肢中有出现关节肿胀、变形等症状即为造模成功。

2.3 分组和给药 30 只 18~20 g 的 DBA/1 小鼠按体质量随机分为 3 组, 分别为正常组, CIA 组和防己黄芪汤组, 每组 10 只。于第 2 次免疫当天(第 21 天)开始给药, 防己黄芪汤($5.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 为临床等效剂量^[3])按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予灌胃, 正常组及 CIA 组给予 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水灌胃, 各组每天给药, 共给药 28 d, 于第 49 天取材。

2.4 评分和发病率^[4-6] 于第 2 次免疫第 2 天(第 22 天)开始观察 CIA 小鼠发病情况, 采用 16 分制, 结合游标卡尺对 CIA 小鼠发病后关节的红肿及畸形症状进行评分, 前后四肢, 每肢 4 分(0 分: 正常; 1 分: 只红不肿/轻微踝腕关节红肿/指趾关节明显红肿; 2 分: 中度踝腕关节红肿; 3 分: 整个脚掌红肿; 4 分: 多个关节极度红肿甚至畸形。); 同时统计 CIA 小鼠的关节炎发病率, 发病率=每组小鼠发病总只数/每组小鼠总数 $\times 100\%$ 。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色检测小鼠关节滑膜组织病理学变化^[4-6] 取小鼠双后肢, 4% 多聚甲醛固定, 脱钙; 将充分脱钙后的小鼠踝关节按矢状面对半切开, 置于包埋盒中, 流水冲洗过夜; 乙醇逐级脱水; 二甲苯 I 及 II 各 40 min; 将蜡块放在冷冻机上冷冻 30 min, 取出, 制作石蜡切片, 厚度为 $5 \mu\text{m}$ 。苏木素 5 min; 分化和返蓝, 伊红染色 5 min, 中性树胶封片。

2.6 免疫组化检测小鼠关节滑膜中血管内皮及相关标记物^[4-6] 如 2.5 项下步骤进行固定、脱钙、切片及脱蜡。采用微波炉修复; 加入适量的内源性过氧化酶阻断剂, 室温孵育 10 min; 根据组织大小, 滴加适当稀释的一抗(VEGF 1:200, CD31 1:200), 于湿盒中 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜孵育; 滴加适量的反应增强液, 室温孵育 10 min; 滴加适量的增强酶标山羊抗大鼠免疫球蛋白(Ig)G 聚合物, 室温孵育 10 min; DAB 显色。苏木素复染, 脱水机封片。拍照后, 采用 Image Pro Plus 分析积分吸光度 IA。

2.7 免疫荧光法检测小鼠关节滑膜中不成熟血管^[4] 进行固定、脱钙、切片、脱蜡及抗原修复后, 用 5% 正常马血清(PBS 稀释)室温封闭 20 min, 倾去多余液体, 勿洗; 滴加适当稀释的一抗(CD31 1:50, α -SMA 1:300), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加适量荧光二抗, 室温孵育 1 h, 注意避光。将抗小鼠

(CD31)及抗兔(α -SMA)免疫荧光二抗(1:400)混匀后适当滴加到切片组织中;封片,并避光保存。

2.8 大鼠胸主动脉环的提取和培养^[7] 用基质胶与H-DMEM等量混合,包被48孔板备用;颈椎脱臼处死大鼠,置于于75%乙醇中10 min,打开大鼠胸腔,剥离大鼠胸主动脉并取出放于含双抗PBS中,将胸主动脉中的血液冲洗干净,无菌PBS洗2~3次;将胸主动脉切成长度为1~1.5 mm的大鼠胸主动脉环,将此长度的大鼠胸主动脉环垂直放置于基质胶包被的48孔板中,并加入基质胶与H-DMEM 1:1等量混合后的液体50 μ L/孔,并于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育30 min,使基质胶凝固;加入含10% FBS,90% H-DMEM,1%双抗培养基,VEGF 20 μ g \cdot L⁻¹及各浓度防己黄芪汤(0.25,0.5,1 g \cdot L⁻¹);48 h后开始观察,并每隔24 h显微镜下观察1次,于大鼠胸主动脉环

开始长出微血管时进行拍照,每3 d换液1次;选取大鼠胸主动脉环微血管平均生长水平最好的1 d,采用Image-Pro Plus分析处理实验图片。

2.9 统计学方法 采用SPSS 16.0软件进行分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CIA小鼠发病率及关节炎评分的影响 正常组小鼠的关节正常,关节无红肿及畸形,关节炎发病率为0,关节炎评分为0;与正常组比较,CIA组小鼠于免疫第22天(即二次免疫后第2天)开始发病,并持续发病,于第28天发病率达到100%,关节炎临床评分显著升高($P < 0.01$);与CIA组比较,防己黄芪汤组于第24天开始发病,发病率明显下降,关节炎临床评分明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表1。

表1 防己黄芪汤对CIA小鼠关节炎临床评分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Fangji Huangqitang on clinical score of arthritis in CIA mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	22 d	24 d	26 d	28 d	30 d	32 d	34 d
正常		0	0	0	0	0	0	0
CIA		0	0.333 \pm 0.452 ²⁾	1.417 \pm 1.129 ²⁾	2.333 \pm 1.982 ²⁾	3.083 \pm 1.887 ²⁾	2.183 \pm 2.087 ²⁾	3.917 \pm 2.464 ²⁾
防己黄芪汤	5.4	0	0.167 \pm 1.373 ³⁾	1.083 \pm 1.013 ³⁾	1.900 \pm 1.456 ³⁾	2.167 \pm 1.286 ³⁾	2.300 \pm 2.157 ³⁾	3.126 \pm 2.248 ³⁾
组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	36 d	38 d	40 d	42 d	44 d	46 d	48 d
正常		0	0	0	0	0	0	0
CIA		4.167 \pm 2.801 ²⁾	4.343 \pm 2.750 ²⁾	5.250 \pm 2.686 ²⁾	5.750 \pm 2.908 ²⁾	5.583 \pm 2.043 ²⁾	6.125 \pm 2.997 ²⁾	6.438 \pm 3.004 ²⁾
防己黄芪汤	5.4	3.548 \pm 3.287 ³⁾	4.417 \pm 3.360	4.667 \pm 3.484 ³⁾	4.750 \pm 3.486 ⁴⁾	4.583 \pm 3.505 ⁴⁾	4.250 \pm 3.288 ⁴⁾	3.333 \pm 2.576 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$;与CIA组比较³⁾ $P < 0.05, ^{4)}$ $P < 0.01$ (表2~3同)。

3.2 对CIA小鼠关节组织病理学的影响 HE染色结果显示:正常组关节结构正常,关节腔无滑膜细胞增生及血管翳生成,关节软骨表面光滑;与正常组比较,CIA组于关节结构改变,关节腔内可见大量

滑膜细胞增生及血管翳生成,关节软骨表面凹凸不平($P < 0.01$);与CIA组比较,防己黄芪汤组关节结构正常,关节腔内未见明显滑膜细胞增生及血管翳生产,关节软骨表明光滑($P < 0.01$)。见表2,图1。

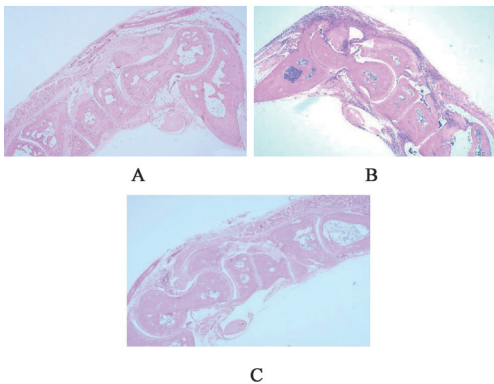
表2 防己黄芪汤对CIA小鼠关节组织病理学,VEGF及CD31表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Fangji Huangqitang on joint histopathology, VEGF and CD31 expression of CIA mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	组织学评分/分	VEGF($\times 10^3$)	CD31($\times 10^3$)
正常		0	481.45 \pm 12.36	465.48 \pm 9.64
CIA		2.986 \pm 0.653 ²⁾	1 131.35 \pm 10.58 ²⁾	1 236.51 \pm 14.65 ²⁾
防己黄芪汤	5.4	0.568 \pm 0.738 ⁴⁾	562.15 \pm 13.65 ⁴⁾	651.85 \pm 13.85 ⁴⁾

3.3 对CIA小鼠关节组织中VEGF及CD31表达的影响 正常组可见极少数VEGF及CD31阳性染色;与正常组比较,CIA组VEGF及CD31阳性染色明显增多,且IA显著升高($P < 0.01$);与CIA组比较,防己黄芪汤组VEGF及CD31阳性染色明显减少,且IA显著降低($P < 0.01$)。见图2,3,表3。

3.4 对CIA小鼠关节滑膜组织中的血管新生的影响 与正常组比较,CIA组可见大量未成熟血管(CD31⁺ α -SMA⁻)($P < 0.01$);与CIA组比较,防己黄芪汤组未成熟血管(CD31⁺ α -SMA⁻)明显减少,而成熟血管(CD31⁺ α -SMA⁺)数量无明显变化。见图4,表3。



A. 正常组; B. CIA组; C. 防己黄芪汤组(图2~4同)
图1 防己黄芪汤对CIA小鼠踝关节组织病理学的影响(HE, ×400)
Fig. 1 Effect of Fangji Huangqitang on of ankle joint in CIA mice (HE, ×400)

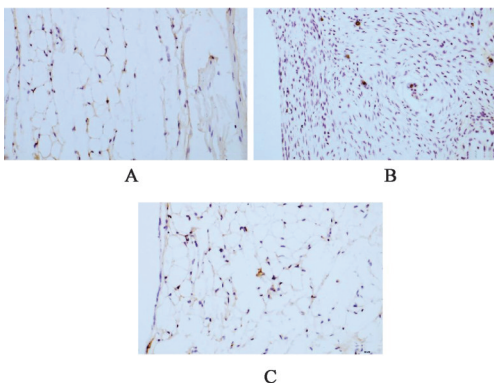


图2 防己黄芪汤对CIA小鼠关节组织中VEGF表达的影响(免疫组化, ×400)
Fig. 2 Effect of Fangji Huangqitang on VEGF expression in joint tissue of CIA mice(IHC, ×400)

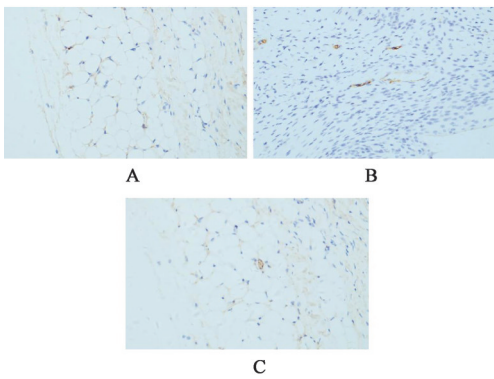


图3 防己黄芪汤对CIA小鼠关节组织中CD31表达的影响(免疫组化, ×400)
Fig. 3 Effect of Fangji Huangqitang on CD31 expression in joint tissue of CIA mice(IHC, ×400)

3.5 对VEGF诱导的大鼠胸主动脉环微血管生成的影响 药物作用9 d后,与正常组比较,VEGF组大鼠动脉环周围微血管数目、长度及面积显著增加($P<0.01$),说明VEGF诱导可显著增加动脉环周围

微血管形成能力;与VEGF组比较,防己黄芪汤各剂量组动脉环周围微血管数目、长度及面积明显减少($P<0.05, P<0.01$),表明在防己黄芪汤能显著抑制动脉环周围微血管形成能力。见图5,表4。

4 讨论

血管生成是指从现有的血管中形成新的血管。在RA的发生发展中,新生血管可以通过将炎症细胞输送到炎症部位来维持慢性炎症状态,并为增生的发炎组织提供营养和氧气;内皮表面积增加同时也为细胞因子,黏附分子和其他物质的产生创造了巨大的能力炎症刺激,同时滑膜中新血管的增殖使这种组织的侵袭支持滑膜主动渗入软骨,导致软骨的腐蚀和破坏;这种血管生成表型由几种促血管生成分子促进,其中最有效的是VEGF^[8]。虽然血管生成被认为是细胞浸润形成和维持的关键事件类风湿关节炎滑膜血管生成是否应被认为是关节炎的一个特异性特征尚不清楚一种疾病或一种常见的炎症驱动的过程。然而生物疗法的出现作为抗肿瘤坏死因子的阻滞剂,提示炎症反应有其不一般的特点但与炎症发生的组织的特异性有关,并指出组织内的基质细胞在确定炎症发生的部位和特定的特征慢性炎症,如RA。RA关节滑膜衬里的扩张以及随后由软骨和骨骼的血管网侵袭,必须增加滑膜的血管供应,以应付对氧气和营养的需求增加;新血管的形成被称为“血管生成”,现在被认为是RA血管形成和维持的关键环节;这种血管紧张是高度血管化的,提示靶向血管可能是RA未来有效的治疗策略^[9]。尽管许多促血管生成因子在滑膜中表达在RA中,VEGF是一种有效的促血管生成细胞因子在RA的血管生成过程中起重要作用。研究发现,与正常人比较,在RA患者关节滑膜中的以CD31⁺/α-SMA⁺标记的成熟血管没有变化,而CD31⁺/α-SMA⁺标记的未成熟血管明显增多^[10]。

主动脉环测定是评价血管生成和抗血管生成因子的一种有效工具:从主动脉环生长出来的血管招募平滑肌细胞和周细胞与内皮细胞管相结合,这意味着他们在解剖学与体内新生血管相似。体外主动脉环血管生成测定已被证明非常可靠,可重复使用;大鼠或小鼠主动脉环解剖并在胶原或纤维蛋白基质中培养,会自发地产生赘肉分支微血管。动脉环实验在技术上操作简单,材料简单易得,为研究血管提供了自然环境,可直接观察血管生成情况^[11]。动脉环实验体系包含血管新生微环境中的平滑肌细胞、周细胞和支持血管新生的基质等,具

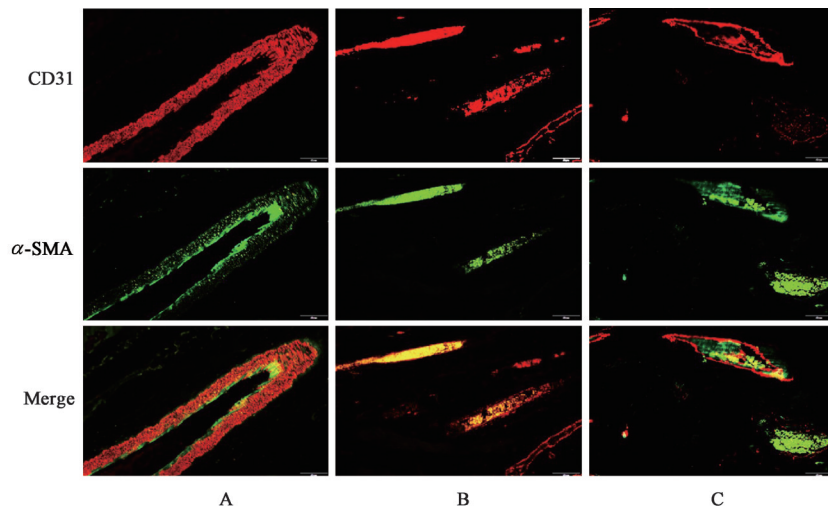
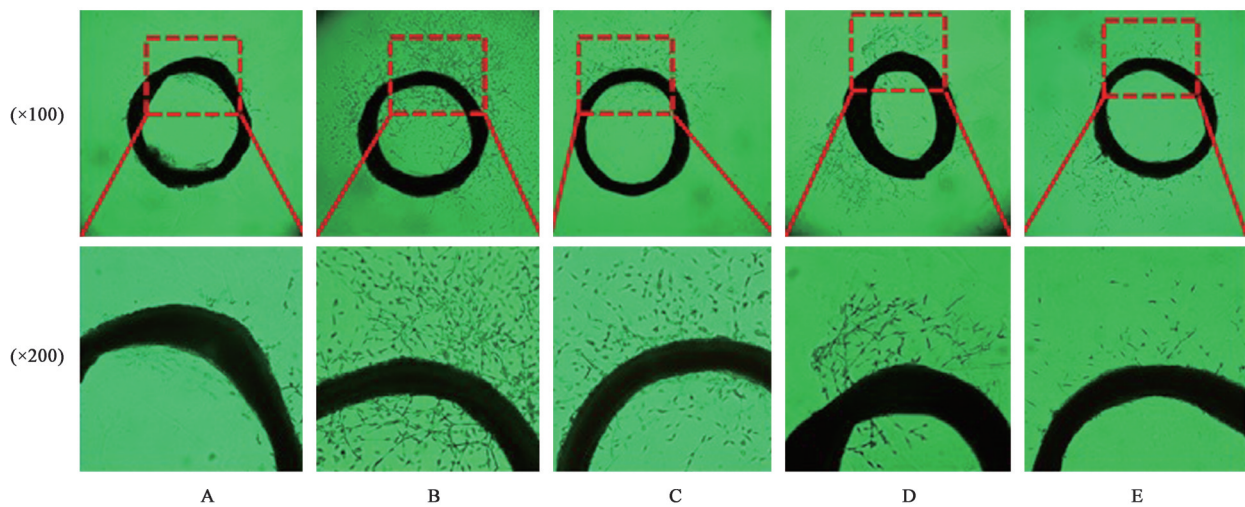


图4 防己黄芪汤对CIA小鼠关节滑膜组织中的血管新生的影响(正置显微镜,×400)

Fig. 4 Effect of Fangji Huangqitang on angiogenesis in synovial tissue of CIA mic (fluorescent microscopy, ×400)

表3 防己黄芪汤对CIA小鼠关节滑膜组织中的血管新生的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\text{CD31}^+/\alpha\text{-SMA}^-$	$\text{CD31}^+/\alpha\text{-SMA}^+$	所有血管 mm^2
正常		0	14.36 ± 4.85	14.36 ± 4.85
CIA		$21.35 \pm 6.35^{2)}$	13.16 ± 5.18	$34.51 \pm 5.36^{2)}$
防己黄芪汤	5.4	$6.12 \pm 5.24^{4)}$	15.24 ± 7.68	$21.35 \pm 6.35^{4)}$



A. 正常组; B. VEGF组; C~E. VEGF+防己黄芪汤0.25, 0.5, 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图5 防己黄芪汤对大鼠胸主动脉环微血管生成情况的影响(倒置显微镜)

Fig. 5 Effect of Fangji Huangqitang on microangiogenesis of rats thoracic aortic ring (inverted microscope)

有体内刺激血管新生的微环境。将动脉环放在含有基质胶的体外三维环境中,动脉环经过一段时间的培养,可以模拟微血管向外生长的过程。通过用软件测定各实验组动脉环向外新生的微血管数目及长度即可判断微血管生长的状况。此动脉环模型可用来确定组织在离体的条件下,待测药物对血管新生的影响。大鼠/小鼠动脉环实验被广泛用于

疾病的血管新生研究,如肿瘤中的血管新生,如RA中的血管新生^[12]。

RA属于中医“痹证”范畴,中医认为痹证的病因是风寒湿邪侵犯人体,留滞肌肉经络,从而导致气血闭阻,从而在临床上表现为肌肉、筋骨、关节发生疼痛、麻木、重着、屈伸不利,甚或关节肿大灼热等。防己黄芪汤所治诸证皆为湿热下注所致。方

表4 对VEGF诱导的大鼠胸主动脉环微血管生成的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 4 Effect of Fangji Huangqitang on VEGF induced microvascular formation in rat thoracic aortic rings ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	分支数目/个	长度/ $\mu\text{m}\cdot\text{mm}^2$	面积/ $\mu\text{m}\cdot\text{mm}^2$
正常		52.00±10.70	537.83±111.17	2 151.30±444.80
VEGF	2×10 ⁻⁵	182.00±14.09 ²⁾	1 252.00±107.34 ²⁾	4 708.01±637.81 ²⁾
VEGF+防己黄芪汤	2×10 ⁻⁵ +0.25	122.25±16.95 ⁴⁾	972.12±110.69 ³⁾	3 431.28±626.37 ³⁾
	2×10 ⁻⁵ +0.5	98.00±20.56 ⁴⁾	927.28±77.85 ³⁾	3 394.68±285.05 ³⁾
	2×10 ⁻⁵ +1	79.00±12.88 ⁴⁾	710.00±81.15 ⁴⁾	2 407.08±275.14 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与VEGF组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01。

中以防己和黄芪共为君药,白术为臣药,甘草(炒)、生姜、大枣共为佐使药。其中防己具有祛风利水之力,黄芪具有补气固表,兼可行水之功,臣以白术健脾益气燥湿,既可助防己祛湿行水之力,又可增黄芪益气固表之功。生姜、大枣调和营卫,助力黄芪益气固表之效。甘草调和诸药,故为佐使之用。防己黄芪汤单方或合用在临床上用于RA且确有良效^[13-22]。防己黄芪汤对CIA小鼠的关节炎症和肿胀有显著改善作用,防己黄芪汤可降低CIA小鼠的体质量、关节炎指数、足掌肿胀厚度及肢体数^[3]。另外,防己黄芪汤具有抑制细胞增殖,减少细胞侵袭的作用,同时还可抑制新生血管的生成^[23]。这些研究结果提示,防己黄芪汤可能通过抑制滑膜血管新生从而起到干预RA的作用。而本实验结果显示防己黄芪汤能抑制CIA小鼠的发病以及血管新生,然其具体机制有待进一步研究。

综上,防己黄芪汤在浓度为5.4 g·kg⁻¹时,能抑制CIA小鼠的发病率及临床关节炎评分,抑制CIA小鼠关节滑膜中的血管新生,防己黄芪汤在质量浓度为0.25~1 g·L⁻¹时可抑制VEGF诱导的离体大鼠动脉环血管新生,提示防己黄芪汤可通过抑制血管新生作用于RA,这为其抑制RA血管新生提供了直接依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SMOLEN J S, ALETAHA D, MCINNES I B. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2016, 388 (10055): 2023-2038.

[2] SMOLEN J S, ALETAHA D, BARTON A, et al. Rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4:18001.

[3] 贾庆运,王拥军,梁倩倩,等. 防己黄芪汤对胶原诱导性关节炎小鼠的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018,26(5):6-9.

[4] HE L H, QIN Q X, HE J, et al. ErMiao San inhibits angiogenesis in rheumatoid arthritis by suppressing JAK/STAT signaling pathways [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, doi: 10.1155/2020/4381212.

[5] 刘春芳,王靖霞,何莲花,等. 风湿祛痛胶囊对II型胶原诱导性关节炎大鼠滑膜血管新生的影响[J]. 中国中药杂志,2019,44(7):1457-1463.

[6] 王靖霞,刘春芳,何莲花,等. 风湿祛痛胶囊对大鼠胶原诱导性关节炎的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019,25(2):89-95.

[7] HE L H, LIU C F, SUN C C, et al. Wu-Tou Decoction inhibits angiogenesis in experimental arthritis by targeting VEGFR2 signaling pathway [J]. Rejuvenation Res, 2018, 21(5):442-455.

[8] KOCH A E. Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(6):951-962.

[9] PALEOLOG E M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res, 2002, 4(3):81-90.

[10] IZQUIERDO E, CANETE J D, CELIS R, et al. Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy [J]. PLoS One, 2009, 4(12):e8131.

[11] THIDUS P M, HOUSTON M E. Vitamin E status does not affect the responses to exercise training and acute exercise in female rats [J]. J Nutr, 1993, 123:834-840.

[12] AI-SALAH O S A, KIT-LAM C, MAJID A M S A, et al. Anti-angiogenic quassinoid-rich fraction from Eurycoma longifolia modulates endothelial cell function [J]. Microvasc Res, 2013, 90:30-39.

[13] 崔昕. 防己黄芪汤对类风湿性关节炎的疗效[J]. 国外医学:中医中药分册, 1996, 18(5):569-574.

[14] 陈桂香. 防己黄芪汤合独活寄生汤加减治疗类风湿性关节炎32例疗效观察[J]. 中医药导报, 2012, 18(4):58-59.

[15] 张爱民. 防己黄芪汤合独活寄生汤加减治疗类风湿性关节炎疗效观察[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(3):19.

- [16] 万里伟,王燕君,兰凌凌,等. 防己黄芪汤合独活寄生汤治疗类风湿性关节炎临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育,2020,18(3):71-72.
- [17] 曾维铨. 防己黄芪汤合防风补骨方治疗膝关节骨性关节炎35例[J]. 现代中医药,2016,36(2):31-32.
- [18] 陈月. 防己黄芪汤合雷公藤片治疗类风湿性关节炎的疗效观察[J]. 四川中医,2008,doi: 10.3969/j.issn.1000-3649.2008.01.045.
- [19] 华英. 防己黄芪汤合四物汤治疗老年性类风湿性关节炎的体会[J]. 浙江中医杂志,2015,50(4):300.
- [20] 王绪辉,周重建,闵熙敬,等. 防己黄芪汤提取物治疗活动期类风湿性关节炎的临床药效评估[J]. 中医杂志,1993,3:156-158.
- [21] 杨晓凌,刘欢,陈亮,等. 防己黄芪汤与非布司他对脾虚湿阻型痛风性关节炎的疗效[J]. 中国继续医学教育,2018,10(25):142-144.
- [22] 史晓,陈建军. 风1号合防己黄芪汤治疗类风湿性关节炎46例[J]. 南京中医药大学学报,1998,1:55.
- [23] GUO Y, FAN Y, PEI X. Fangjihuangqi decoction inhibits MDA - MB - 231 cell invasion *in vitro* and decreases tumor growth and metastasis in triple - negative breast cancer xenografts tumor zebrafish model[J]. Cancer Med,2020,9(7):2564-2578.

[责任编辑 孙丛丛]