

# 基于VEGF通路探讨断藤益母汤抑制胶原诱导型关节炎小鼠血管翳形成的作用

钱凯<sup>1</sup>, 曾丽盈<sup>1</sup>, 郑雪霞<sup>1</sup>, 许舒迪<sup>1</sup>, 刘丹凯<sup>1</sup>, 詹静怡<sup>1</sup>, 叶棠明<sup>1</sup>, 廖发杰<sup>1</sup>,  
刘敏莹<sup>2</sup>, 林昌松<sup>2\*</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

**[摘要]** 目的:探讨断藤益母汤抑制胶原诱导型关节炎(CIA)小鼠血管翳形成的机制。方法:SPF级DBA/1雄性小鼠24只,随机分为4组,分别是空白组(NC组),模型组(CIA组),甲氨蝶呤组(MTX组),断藤益母汤组(DTYM组),每组6只。除正常组外,其余组小鼠进行造模。二次免疫起,给予灌胃等体积溶媒,MTX( $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和DTYM( $15.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),给药35 d。观察小鼠一般情况、关节炎指数;取材后进行膝、踝关节微型计算机断层摄影(micro CT)扫描,苏木素-伊红(HE)和番红-固绿染色观察病理改变,免疫组化检测血小板-内皮细胞黏附分子-1(CD31),血管内皮生长因子- $\alpha$ (VEGF- $\alpha$ ),血管内皮生长因子受体2(VEGFR2),磷酸化(p)-VEGFR2的表达。结果:与NC组比较,CIA组小鼠踝关节红肿明显,关节炎指数评分显著上升( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),膝、踝关节关节面明显破损,软骨厚度降低,膝、踝关节micro CT骨破坏评分明显升高( $P<0.01$ ),滑膜中CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, p-VEGFR2积分吸光度显著升高( $P<0.01$ );与CIA组比较,DTYM组踝关节红肿程度明显减轻,给药3周后小鼠关节炎指数评分明显下降( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),膝、踝关节关节面更完整,软骨厚度增加,膝、踝关节micro CT骨破坏评分均明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),滑膜中CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, p-VEGFR2积分吸光度显著降低( $P<0.01$ )。结论:断藤益母汤可能是通过调控VEGF通路抑制CIA小鼠血管翳的形成。

**[关键词]** 断藤益母汤; 胶原诱导型关节炎; 血管翳; 血管内皮生长因子(VEGF)信号通路; 血小板-内皮细胞黏附分子-1(CD31)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)20-0063-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211707

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210729.1117.002.html>

[网络出版日期] 2021-07-29 16:50

## Inhibitory Effect of Duanteng Yimu Decoction on Pannus Formation in Mice with Collagen-induced Arthritis Based on VEGF Pathway

QIAN Kai<sup>1</sup>, ZENG Li-ying<sup>1</sup>, ZHENG Xue-xia<sup>1</sup>, XU Shu-di<sup>1</sup>, LIU Dan-kai<sup>1</sup>, ZHAN Jing-yi<sup>1</sup>,  
YE Tang-ming<sup>1</sup>, LIAO Fa-jie<sup>1</sup>, LIU Min-ying<sup>2</sup>, LIN Chang-song<sup>2\*</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of Duanteng Yimu decoction (DTYM) in the inhibition of pannus formation in collagen-induced arthritis (CIA) mice. **Method:** Twenty-four SPF-grade DBA/1 male mice were randomly divided into the following four groups: a blank group (NC group), a model group (CIA group), a methotrexate group (MTX group), and a DTYM group, with six mice in each group. The mice, except for those in the NC group, were modeled. From the second immunization, the medium, MTX

[收稿日期] 20210414(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774262);广东省自然科学基金项目(2017A030311009)

[第一作者] 钱凯,博士,住院医师,从事中医临床基础及风湿病研究,E-mail:13724051203@163.com

[通信作者] \*林昌松,硕士,主任医师,博士生导师,从事风湿病中医药研究,E-mail:13802772276@163.com

(1 mg·kg<sup>-1</sup>), and DTYM (15.4 g·kg<sup>-1</sup>) were administered at an equal volume by gavage for 35 days. Mice were observed for general condition and the arthritis index. The knee and ankle joints were scanned by microcomputed tomography (micro CT). Hematoxylin-eosin (HE) and safranin O/fast green staining were performed to observe pathological changes. Immunohistochemistry was performed to detect the expression of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), vascular endothelial growth factor- $\alpha$  (VEGF- $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), and phosphorylated(p)-VEGFR2. **Result:** Compared with the NC group, the CIA group showed red and swollen ankle joints, increased arthritis index scores ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), manifest injury in the knee and ankle joints, reduced cartilage thickness, elevated Micro CT bone destruction scores of knee and ankle joints ( $P<0.01$ ), and up-regulated absorbance values of synovial CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, and p-VEGFR2 ( $P<0.01$ ). Compared with the CIA group, the DTYM group showed relieved ankle joint redness and swelling, reduced arthritis index scores of mice three weeks after administration ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), intact joint surfaces of the knee and ankle joints, thickened cartilage, declining Micro CT bone destruction scores in both the knee and ankle joints ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and lowered absorbance values of CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, and p-VEGFR2 in the synovium ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** DTYM can inhibit the pannus formation in CIA mice presumably by regulating the VEGF pathway.

**[Keywords]** Duanteng Yimu decoction; collagen-induced arthritis; pannus; vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway; CD31

类风湿关节炎(RA)是一种常见的以对称性、慢性进行性的多关节炎为主要病变表现的自身免疫性疾病,属于中医“痹症”范畴。RA发病过程漫长,且无法完全治愈。在临床表现分期中的慢性期和临床病理分期的血管翳形成期,均可见明显的血管翳对骨与软骨以及软骨下骨的侵蚀。RA患者的滑膜血管数量和密度增加,是供应滑膜组织的扩张和形成RA滑膜的增生性和侵袭性所必需的,这种病理性血管结构在RA滑膜炎形成过程中起着关键的作用<sup>[1]</sup>。血管翳由新生微血管、增生肥大的滑膜细胞、炎性细胞及机化的纤维素构成,具有类似肿瘤组织的特性,是引起关节病变、软骨破坏的主要病理基础<sup>[2-3]</sup>。

在继承广东省名中医陈纪藩教授的学术思想下,林昌松教授运用经典理论结合临床实践,提出RA的病因病机可能为“风湿瘀阻,筋伤骨损”,拟出祛风湿、强筋骨、通血脉的治法,基于此开展了断藤益母汤(DTYM)的研究。DTYM以南蛇藤、黑骨藤为君药,祛风除湿、消肿止痛;以续断、益母草为佐使,活血利湿、补肝肾、强筋骨;全方祛邪通脉而强筋骨,风湿瘀去则筋骨无所伤。DTYM能显著改善RA患者关节功能及降低炎症指标等临床症状<sup>[4]</sup>,并且能明显抑制成纤维样滑膜细胞增殖、迁移、侵袭、炎症因子的分泌以及诱导其凋亡等方面,能抑制破骨细胞分化以及能起到软骨保护的作用<sup>[5-7]</sup>;中医药防治RA具有多靶点、多通路的优势,但DTYM对

RA中血管翳形成的影响还没有研究。

RA滑膜血管翳中病理性的血管新生组成的新生血管网络,能够在滑膜炎性组织提供一定的氧气,其结构网络的不稳定以及功能失调,并不能恢复组织局部的氧气稳态,故而RA关节滑膜仍是明显的缺氧环境<sup>[8]</sup>。局部缺氧又加重了滑膜病理性增生和血管翳的形成,从而引起恶性循环,这种病理特征与中医“气滞血瘀”的理论有明显相似之处<sup>[3]</sup>。同时DTYM被认为具有通血脉的作用<sup>[9]</sup>,故推测DTYM治疗RA可能与抑制RA血管翳形成有关。为了更加深入全面的阐释DTYM治疗RA的作用机制,本研究采用胶原诱导型关节炎(CIA)小鼠模型,从CIA小鼠足肿、关节苏木素-伊红(HE)病理、骨与软骨的破坏、踝关节中血小板-内皮细胞黏附分子-1(CD31)表达和血管内皮生长因子(VEGF)通路等方面,阐述DTYM抑制CIA模型小鼠血管翳形成的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 24只SPF级DBA/1雄性小鼠,7~8周龄,体质量(18 $\pm$ 2)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0011,动物在广州中医药大学第一附属医院实验动物中心SPF级动物房[实验单位使用许可证号SYXK(粤)2018-0092,动物合格证号1100112011028365]内检疫室适应性饲养7d后开始开展相关实验。本研究获得广州中医药大学第一附属医院伦理委员会审核批

准(伦理编号2020006),按照NIH实验动物护理和使用指南对实验动物进行治疗干预。

**1.2 药物与试剂** DTYM由南蛇藤(广东康美药业股份有限公司,批号180901971);黑骨藤(贵阳市中药材市场,经广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定为萝藦科杠柳属植物黑龙骨 *Periploca forrestii* 的干燥根及茎,标本保存于广州中医药大学药材鉴定室,标本编号20180411001);续断(广东康美药业股份有限公司,批号181203101);益母草(广东康美药业股份有限公司,批号1190201241)组成。所有药材均由广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》标准。注射用甲氨蝶呤(MTX,山西普瑞药业有限公司,批号20170203);牛Ⅱ型胶原,完全弗氏佐剂,不完全弗氏佐剂(美国Chondrex公司,批号分别为180507,18040,180346);番红O,固绿染液(美国Sigma公司,批号分别为S2255,F7258);HE染液(南京森贝伽生物科技有限公司,批号SBJ-0446);二抗(中国碧云天公司,批号A0208);CD31抗体,VEGF- $\alpha$ 抗体,VEGF受体2(VEGFR2),磷酸化(p)-VEGFR2(美国Afinity公司,批号分别为AF6191,AF5131,AF6281,AF3279)。

**1.3 仪器** JJ-12J型脱水机,JB-P5型包埋机, RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);BX53型生物显微镜(日本Olympus公司);5415D型低温超速离心机;5702型常温离心机;3120型微量移液器(德国Eppendorf公司);Milli-Q Academic型超纯水系统(美国Millipore公司);WD-9405D型恒温摇床(北京六一仪器厂);MS105D型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);Skyscan 1172型高分辨率微型计算机断层摄影术(micro-CT)扫描仪(比利时Bruker公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** DTYM的制备:取南蛇藤、黑骨藤、续断、益母草,按照2:1:1:1的临床用药比例投料,放置10倍质量去离子水中浸泡10 min,武火烧开至沸腾,再文火煎煮30 min,然后将药液倒出;再加8倍体积去离子水,武火烧开至沸腾,再文火煎煮30 min。2次药液合并,旋转蒸发器将DTYM水煎液减压浓缩至200 g·L<sup>-1</sup>母液,使用200目尼龙网筛过滤,然后置于-80℃低温冰箱备用,用时稀释。

**2.2 RA小鼠模型(CIA小鼠模型)的制备** CIA模型小鼠制备<sup>[10]</sup>,首次免疫接种,Ⅱ型胶原溶液与完

全弗氏佐剂(CFA)体积1:1完全混合乳化,于小鼠尾部皮下注射混合溶液(含100  $\mu$ gⅡ型胶原)100  $\mu$ L,记为第0天。二次免疫接种,第21天二次免疫接种100  $\mu$ L混合溶液(胶原加不完全弗氏佐剂1:1混合乳化,方法同首次免疫)。接种同首次免疫,但接种部位不同。第21天开始关节评分,每3 d 1次。

**2.3 分组及处理方法** 实验分组分别为空白组(NC组),模型组(CIA组),甲氨蝶呤(MTX)组,DTYM组(DTYM组:南蛇藤30 g,黑骨藤15 g,川断15 g,益母草15 g)。以正常小鼠作为空白组,以MTX为阳性药。采用随机数字表法将造模的CIA小鼠随机分为以上4组,每组样本量为6只。各实验组在CIA模型小鼠第2次皮下注射乳化剂免疫后的第2天(即在第1次造模后的第22天)开始给予相应药物的处理,NC组和CIA组给予等体积溶媒,每天灌胃1次,连续给药35 d;根据人与小鼠药理学等效剂量进行换算<sup>[11]</sup>,按照剂量折算表中成人到小鼠换算系数为12.33,DTYM处方为75 g,成人体质量按照60 kg计,用量为1.25 g·kg<sup>-1</sup>,故小鼠用量为15.4 g·kg<sup>-1</sup>。DTYM组灌胃DTYM 15.4 g·kg<sup>-1</sup>,每天1次,连续35 d;MTX组灌胃1 mg·kg<sup>-1</sup> MTX,每3 d 1次,其余2 d灌胃等体积溶媒,如此循环连续灌胃35 d,每只小鼠灌胃体积为20 mL·kg<sup>-1</sup>。

**2.4 关节炎指数(AI)评分** 采用关节炎指数积分评价其关节炎程度。于初次免疫前观察1次,以后每周观察1次足爪肿胀情况,同时对足爪炎症进行评分,采用4分制的评分标准,以0~4分记录,累积得分即为每只小鼠的关节炎指数,每只小鼠最高分为16分。AI的评分方法如下:0分,关节正常,无明显症状;1分,单一趾关节发生炎症红肿;2分,2个以上(包括2个)趾关节发生红肿,但没达到整个脚掌,或整个脚掌轻微红肿;3分,整个脚掌炎症红肿;4分,整个脚掌严重红肿,或踝关节变形、强直。

**2.5 HE染色观察小鼠膝、踝关节病理变化** 石蜡切片脱蜡至水化,Mayer氏苏木素染细胞核,伊红染细胞质,脱水封片,将切片从二甲苯拿出来稍晾干透明后,中性树脂胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

**2.6 番红-固绿染色** 依次将切片放入二甲苯Ⅰ5 min-二甲苯Ⅱ5 min-二甲苯Ⅲ5 min-无水乙醇Ⅰ10 min-无水乙醇Ⅱ5 min-无水乙醇Ⅲ5 min-95%乙醇5 min-90%乙醇5 min-80%乙醇5 min-70%乙醇5 min-流水洗5 min-蒸馏水洗。Safranin 0 stain内浸

染4~10 min,流水清洗。在固绿染色液内浸染1~2 min。1%乙酸分化1 min。分别用95%乙醇、无水乙醇脱水。吹干中性树胶封片。

**2.7 膝踝关节 micro CT扫描** 将膝踝关节整体用4%多聚甲醛固定,采用micro CT分析使用高分辨率的SkyScan-1076 X射线micro CT系统对骨骼架构进行了扫描。扫描参数(分辨率为4  $\mu\text{m}$ ,电压为80 kV,电流为88  $\mu\text{A}$ )。扫描完成后使用CT-vox软件进行三维重建。骨破坏评分采用micro CT分析(膝踝关节侵蚀程度按正中、内侧、外侧3个平面分为0~4分,总分12分)<sup>[12]</sup>。

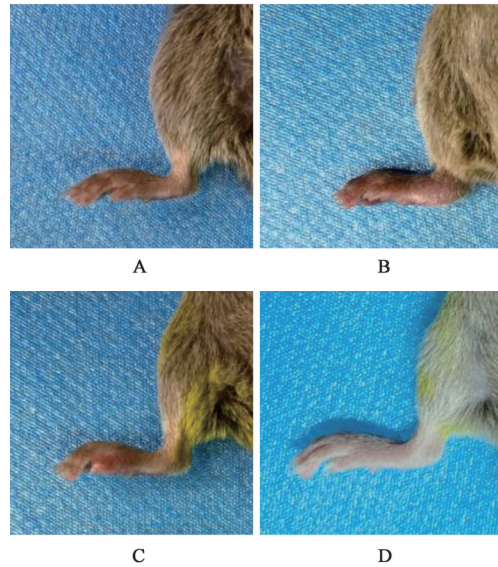
**2.8 免疫组化法检测 CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, p-VEGFR2 的表达** 依次将切片放入二甲苯 I 10 min-二甲苯 I 10 min-无水乙醇 I 10 min-无水乙醇 I 10 min-95%乙醇 5 min-90%乙醇 5 min-80%乙醇 5 min-70%乙醇 5 min-流水洗 5 min-蒸馏水洗。枸橼酸修复 30 min;PBS(1~3缸)洗 3~5 min;3%过氧化氢室温 10 min;PBS(1~3缸)洗 3~5 min;一抗(稀释比例为1:100)4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h;PBS(1~3缸)洗 3~5 min;二抗(稀释比例为1:300)37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;PBS(1~3缸)洗 3~5 min;DAB显色;苏木素复染 3~5 min;盐酸乙醇分化;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,晾干,中性树胶封片。利用数字病理扫描仪进行玻片扫描,在关节部位选取3个视野,利用Image J软件进行积分吸光度/ $\text{mm}^2$ 计算<sup>[13]</sup>,取均数进行统计学分析。

**2.9 统计学分析** 所有数据用SPSS 20.0统计软件处理,定量资料均满足正态分布,所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示;两组间比较使用*t*检验,多组样本间比较采用One-way ANOVA法,若方差齐性则使用Bonferroni分析,方差不齐使用Tamhane's *T*<sub>2</sub>。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对CIA小鼠踝关节肿胀的影响** 与NC组比较,而CIA组踝关节红肿明显,各小鼠关节活动度严重受限。与CIA组比较,而DTYM组和MTX组踝关节红肿均不明显,且各小鼠关节活动度基本正常,能够正常行走正常饮食。见图1。

**3.2 对CIA小鼠关节炎指数的影响** 与NC组比较,CIA组小鼠AI评分在二次免疫后30 d(即初次免疫后51 d)达到最高峰,而后评分有下降趋势。与CIA组比较,二次免疫后21 d(即初次免疫后42 d)MTX组小鼠AI评分明显下降( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。与CIA组比较,二次免疫后24 d(即初次免疫后



A. NC组;B. CIA组;C. MTX组;D. DTYM组(图2~5同)

图1 DTYM对CIA小鼠踝关节肿胀程度的影响

Fig. 1 Effect of DTYM on ankle swelling in CIA mice

45 d)后的DTYM组小鼠AI评分显著下降( $P<0.01$ ),此后随着时间的推移,DTYM组和MTX组小鼠AI均下降的更加明显,而DTYM组关节炎指数评分下降的更加稳定。见表1。

### 3.3 对CIA小鼠膝、踝关节病理HE染色的影响

与NC组比较,CIA组小鼠膝、踝关节结构明显紊乱,关节囊内弥漫炎症细胞浸润明显,并且关节内炎性滑膜有明显向骨组织侵袭的迹象,关节表面不完整有明显缺损,关节破坏明显。与CIA组比较,DTYM组和MTX组膝、踝关节关节面结构则相对完整,有少量滑膜增生的迹象,可见少量炎症细胞的浸润。见图2。

### 3.4 对CIA小鼠膝、踝关节番红-固绿染色的影响

与NC组比较,CIA组小鼠膝、踝关节结构紊乱,骨的完整性丢失,滑膜向软骨内侵袭,红色软骨基质明显减少,关节软骨面粗糙,钙化软骨层与软骨下骨之间的黏合线受到明显破坏,有部分滑膜侵袭到透明软骨与钙化软骨之间的潮线位置;与CIA组比较,DTYM组和MTX组小鼠膝、踝关节关节面相对完整,有部分软骨面较为粗糙,关节两侧潮线和黏合线位置完整。见图3。

### 3.5 对CIA小鼠关节骨质破坏的影响

与NC组比较,CIA组小鼠膝、踝关节骨质侵蚀明显,破坏严重,关节各处骨骼表面粗糙,凹凸不平,关节完整性破坏明显,膝、踝关节骨破坏评分显著升高( $P<0.01$ );与CIA组比较,MTX组和DTYM组骨质破坏程度均明显减轻,同时显示MTX组和DTYM组膝、踝关

表1 DTYM对CIA小鼠关节炎指数评分的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 1 Effect of DTYM on arthritis index score of CIA mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	21 d	24 d	27 d	30 d	33 d	36 d	39 d
NC		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
CIA		1.00±1.67	3.00±2.83 <sup>1)</sup>	6.17±2.64 <sup>2)</sup>	7.83±2.04 <sup>2)</sup>	10.17±3.31 <sup>2)</sup>	11.67±1.63 <sup>2)</sup>	12.33±1.75 <sup>2)</sup>
MTX	0.001	0.67±1.21	2.83±1.47	4.33±2.58	6.67±2.80	10.33±2.34	11.00±1.79	10.83±1.47
DTYM	15.4	0.83±1.33	1.67±1.21	3.66±1.75	5.33±2.33	9.50±2.17	11.67±1.03	11.33±1.03

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	42 d	45 d	48 d	51 d	54 d	57 d
NC		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
CIA		13.67±1.37 <sup>2)</sup>	14.17±0.98 <sup>2)</sup>	14.5±1.22 <sup>2)</sup>	14.83±0.98 <sup>2)</sup>	13.17±1.94 <sup>2)</sup>	12.00±2.28 <sup>2)</sup>
MTX	0.001	10.50±1.52 <sup>3)</sup>	9.33±2.07 <sup>4)</sup>	7.00±2.53 <sup>4)</sup>	6.00±2.45 <sup>4)</sup>	5.67±2.16 <sup>4)</sup>	5.00±2.00 <sup>4)</sup>
DTYM	15.4	11.50±2.51	10.17±2.56 <sup>4)</sup>	9.17±1.83 <sup>4)</sup>	7.33±1.50 <sup>4)</sup>	5.83±1.47 <sup>4)</sup>	3.17±1.17 <sup>4)</sup>

注:与NC组比较<sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01;与CIA组比较<sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01(表2,3同)。

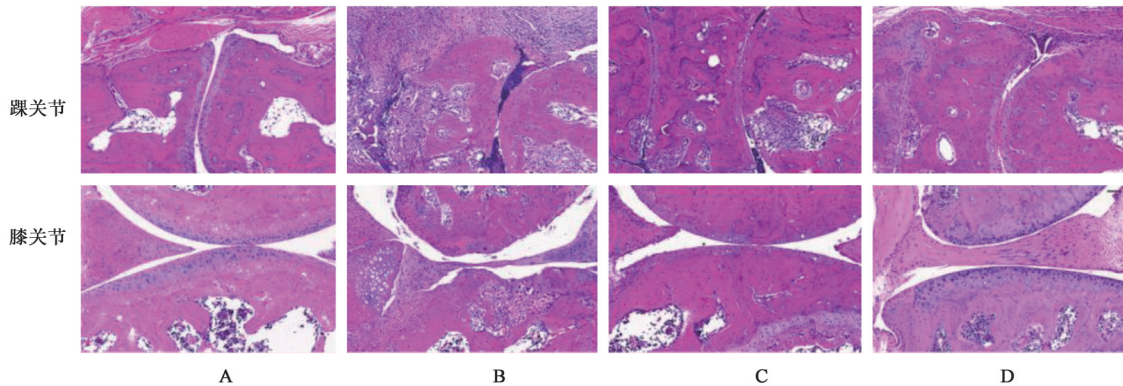


图2 DTYM对CIA小鼠膝、踝关节组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of DTYM on histopathology of knee and ankle joint in CIA mice (HE, ×200)

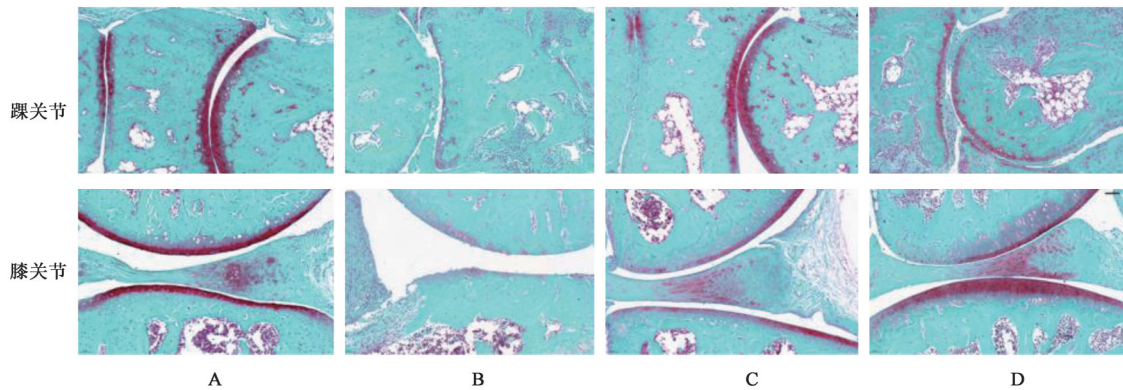


图3 DTYM对CIA小鼠膝、踝关节组织病理学的影响(番红-固绿, ×200)

Fig. 3 Effect of DTYM on histopathology of knee and ankle joints in CIA mice (saffron - solid green, ×200)

节骨破坏评分均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见图4,表2。

**3.6 对CIA小鼠踝关节CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, p-VEGFR2表达的影响** 与NC组比较, CIA组关节结构被严重破坏, 在滑膜血管翳侵袭处CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, p-VEGFR2的表达明显, 积分吸光度均显著升高( $P<0.01$ ); 与CIA组比较, MTX组关节面正常, 在滑膜与骨质附着处存在少量棕色区

域, CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, p-VEGFR2积分吸光度均显著降低( $P<0.01$ ); 与CIA组比较, DTYM组关节面完整, 有少量滑膜增生, 部分存在滑膜血管翳侵袭, 在侵袭处可见少量棕色区域, CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, p-VEGFR2积分吸光度均显著降低, 差异有显著统计意义( $P<0.01$ )。提示DTYM能明显抑制滑膜血管翳中VEGF通路的激活。见图5,表3。

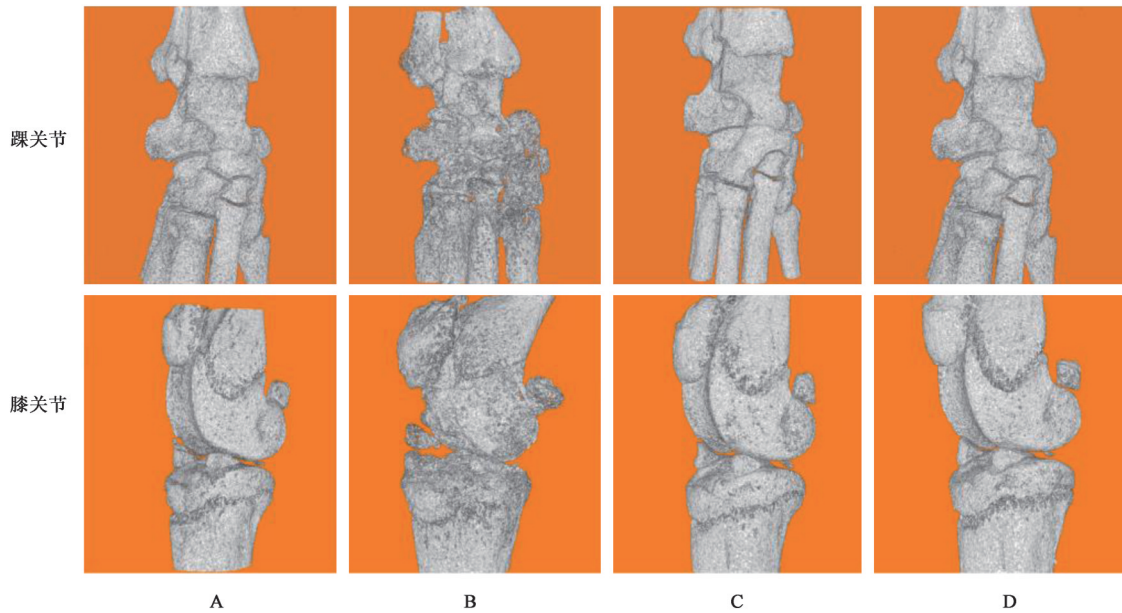


图 4 使用 Skyscan CT-vox 软件通过显微计算机断层扫描(micro-CT)分析了关节侵蚀

Fig. 4 Joint erosion was analyzed by micro computerized tomography (micro-CT) using Skyscan CT-vox software

表 2 DTYM 对 CIA 小鼠关节 micro CT 骨破坏评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 2 Effect of DTYM on micro CT bone destruction score of joint in CIA mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ) 分

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	踝关节	膝关节
NC		0.00±0.00	0.00±0.00
CIA		8.67±1.21 <sup>2)</sup>	6.67±1.21 <sup>2)</sup>
MTX	0.001	3.83±1.94 <sup>4)</sup>	2.67±1.03 <sup>3)</sup>
DTYM	15.4	3.67±1.63 <sup>3)</sup>	2.17±1.17 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

在诱导型关节炎模型的多种方法中,佐剂性关节炎(AA)模型造模操作方法简单,但是病程时间过短,病变具有一定的自限性,在病理生理学特点上与人类 RA 还存在较大差距<sup>[14]</sup>。而 CIA 小鼠模型是 RA 研究中有效的动物模型,该模型起病慢、病程长,这最符合 RA 的特性<sup>[15]</sup>。CIA 小鼠动物模型与人类 RA 的病理变化高度相似,能模拟出 RA 的主要病理特征,例如 CIA 小鼠模型也存在关节受累、滑膜增生、血管翳产生、骨和软骨破坏等病理变化<sup>[16]</sup>。所以本研究选择 DBA/1 小鼠构建 CIA 模型来进行实验。一般 CIA 造模后,在初次免疫 42~56 d 时(即二次免疫后 21~35 d),CIA 的发病率为 90%~100%<sup>[10]</sup>。而 DBA/1 小鼠关节炎在很长一段时间内发病,在初次免疫后 40~50 d(即二次免疫后 19~29 d)达到发病高峰<sup>[17]</sup>。在本研究中,CIA 组小鼠关节红肿明显,造模成功率 100%,并且在初次免疫后

51 d(即二次免疫后 30 d)达到发病高峰,符合以往 CIA 模型研究的描述。本研究表明,DTYM 能显著降低 CIA 小鼠动物模型的关节炎指数评分,具有治疗 RA 的效果,而这与本课题组的前期研究结果相符<sup>[18]</sup>。

HE 染色结果显示,DTYM 组能保护 CIA 模型小鼠膝、踝关节关节面结构的完整性,关节内无明显滑膜与血管翳的生成,但可见少量炎症细胞浸润。该方法可观察关节结构形态、滑膜炎侵袭程度以及炎症程度,也可以在一定程度上评价骨破坏的程度,但在反应关节软骨结构上仍然具有一定的局限性,并不能清晰的反应软骨的各层结构。故而本研究结合番红-固绿染色来验证 DTYM 在抑制软骨破坏上的作用<sup>[19]</sup>。番红-固绿染色最关键的环节之一就是分色,嗜碱性的软骨与碱性的染料番红结合呈红色,而软骨下骨与嗜酸性染料的固绿结合呈绿色,这样将软骨组织与骨组织形成鲜明对比而被清晰的区分<sup>[20]</sup>。番红-固绿染色结果显示,DTYM 组能明显抑制 CIA 模型软骨面和红色软骨基质的破坏,关节两侧潮线和黏合线位置完整。而后进一步通过 micro CT 扫描并进行三维重建分析,结果显示 DTYM 干预后 CIA 小鼠骨破坏评分明显降低。本研究通过 HE 染色、番红-固绿染色以及 micro CT 扫描重建,评估了 DTYM 对 CIA 模型小鼠关节骨质破坏的作用。通过关节组织病理的方法和 micro CT 检测 CIA 小鼠动物模型的关节受损情况,结果显示 DTYM 治疗后关节软骨更为完整,未见明显骨质破

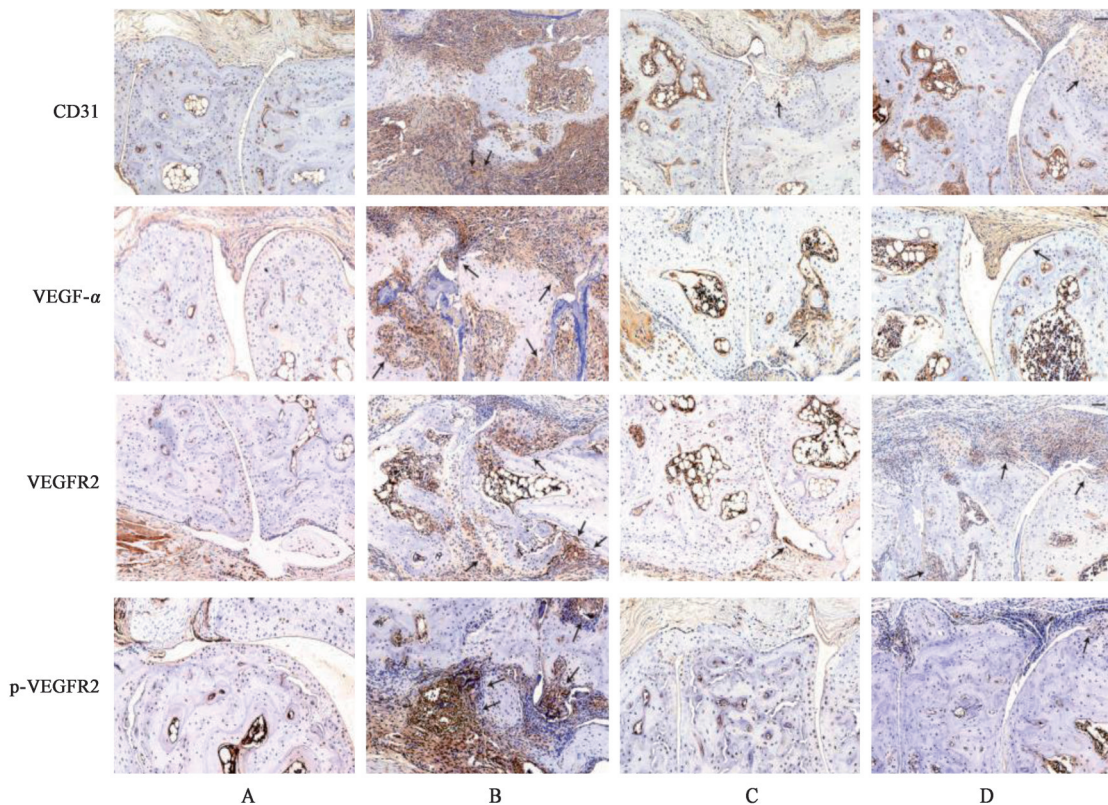


图5 DTYM对CIA小鼠踝关节CD31,VEGF- $\alpha$ ,VEGFR2,p-VEGFR2表达的影响(免疫组化, $\times 200$ )

Fig. 5 Effect of DTYM on CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2, p-VEGFR2 expression of ankle joint of CIA mice (IHC,  $\times 200$ )

表3 DTYM对CIA小鼠踝关节CD31,VEGF- $\alpha$ ,VEGFR2,p-VEGFR2积分吸光度的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of DTYM on CD31, VEGF- $\alpha$ , VEGFR2 and p-VEGFR2 absorbance of integral absorbance of CIA mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	CD31	VEGF- $\alpha$	VEGFR2	p-VEGFR2
NC		0.583 $\pm$ 0.080	0.473 $\pm$ 0.197	0.379 $\pm$ 0.113	0.730 $\pm$ 0.099
CIA		1.331 $\pm$ 0.098 <sup>2)</sup>	1.287 $\pm$ 0.128 <sup>2)</sup>	0.909 $\pm$ 0.055 <sup>2)</sup>	2.089 $\pm$ 0.353 <sup>2)</sup>
MTX	0.001	0.615 $\pm$ 0.081 <sup>4)</sup>	0.589 $\pm$ 0.147 <sup>4)</sup>	0.519 $\pm$ 0.070 <sup>4)</sup>	0.985 $\pm$ 0.227 <sup>4)</sup>
DTYM	15.4	0.868 $\pm$ 0.090 <sup>4)</sup>	0.728 $\pm$ 0.111 <sup>4)</sup>	0.468 $\pm$ 0.159 <sup>4)</sup>	0.933 $\pm$ 0.263 <sup>4)</sup>

坏,血管翳形成被明显抑制。

CD31由6个胞外免疫球蛋白超家族结构域、一个较短的跨膜区域和一个较长的含有潜在翻译后修饰位点的118个氨基酸的细胞质尾组成。CD31是一种介导白细胞和血小板/内皮细胞黏附和内皮细胞迁移的六域分子,是免疫球蛋白超家族的一员构成内皮细胞间连接的主要蛋白质,CD31在血小板和大多数白细胞以及内皮细胞上表达,可用于显示内皮细胞的存在<sup>[21]</sup>,这可以帮助评估血管生成的程度。本实验中发现CIA组小鼠踝关节滑膜组织中存在明显的由CD31标记的血管样形态生成,而DTYM组在滑膜与骨质附着处有少量滑膜侵袭,但无CD31的表达,说明DTYM不仅能明显抑制滑膜炎的形成,也能明显抑制滑膜组织中的血管生成,从而能抑制血管翳的形成。血管新生是一个复杂

的调控过程,其受到很多因素的影响,其中直接参与血管形成的最强有力促血管生成因子是VEGF<sup>[22]</sup>。缺氧条件以及炎症细胞因子能够诱导VEGF- $\alpha$ 分泌;可以结合和激活血管内皮生长因子受体1(VEGFR1)和VEGFR2,调节生理和病理性血管生成<sup>[23]</sup>。VEGF结合VEGFR2后,激活VEGFR2在酪氨酸位点处的自身磷酸化,从而介导血管生成等生物效应<sup>[24]</sup>。VEGF- $\alpha$ 及其同源受体VEGFR2在血管生成中起着核心作用<sup>[25]</sup>。本研究实验结果显示,DTYM能明显抑制CIA小鼠踝关节中VEGF- $\alpha$ 的表达,同时能够显著下调VEGFR2的表达,并且抑制VEGFR2的磷酸化。

针对RA血管生成的疗法目前研究较多是使用抗癌疗法以及阻断血管生成促炎因子的疗法,包括VEGF抑制剂、紫杉醇、喜树碱和FTY720<sup>[26]</sup>。尽管

中医药以RA血管翳血管新生为研究靶标的相关研究起步较晚,但也已经取得了一定进展<sup>[27-29]</sup>。雷公藤多苷干预治疗可有效改善CIA大鼠关节炎症状与抑制微血管新生、下调VEGF及其VEGFR2表达水平有关<sup>[30]</sup>。雷公藤多苷片对CIA大鼠关节滑膜组织的血管新生和体外人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的管形成有抑制作用,且这一作用可能与其调节炎症关节滑膜中失衡的缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )/促血管生成素-1(Ang-1)轴有关<sup>[31]</sup>。甘草附子汤可通过下调关节滑膜组织中VEGF,核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),锌指转录因子GATA4(GATA4)的表达,减少滑膜组织中血管翳的形成并有效抑制血管新生,从而对AA小鼠发挥防治骨质破坏、保护关节等作用<sup>[32]</sup>。新风胶囊由黄芪、薏苡仁、雷公藤、蜈蚣组成,其能通过调节磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,HIF-1 $\alpha$ 表达改善AA滑膜血管新生<sup>[33]</sup>。同时研究表明风湿祛痛胶囊对VEGF诱导的HUVEC增殖、迁移、黏附、侵袭和管形成具有抑制作用,而这一作用可能和风湿祛痛胶囊对HUVEC中VEGFR2的磷酸化、蛋白和mRNA表达的有效抑制有关<sup>[34]</sup>。故而从血管翳角度来研究中医药防治RA能为中医药的应用提供科学基础。

综上所述,DTYM能够显著改善CIA小鼠足肿症状,减轻关节病变程度,减轻膝、踝关节骨质和软骨的破坏程度,并且能显著抑制关节炎血管翳形成;其作用机制可能与抑制VEGF信号通路激活有关。本研究初步阐明了DTYM在抑制CIA小鼠血管翳的作用和机制,为进一步拓展其在临床上的应用以及深入研究奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] LEBLOND A, ALLANORE Y, AVOUAC J. Targeting synovial neoangiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(6):594-601.

[2] 李香斌,连金饶,林娜,等. 类风湿关节炎滑膜血管生成和血管翳[J]. *医学综述*, 2010, 16(1):7-9.

[3] 陈永,余培佳,宣亚男,等. 以类风湿关节炎为例解读肢体痹病的现代医学实质[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(4):493-496.

[4] 林昌松,梁江,刘凤震,等. 断藤益母汤治疗类风湿关节炎的临床疗效观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(6):632-637.

[5] 王强,韩隆胤,魏赓权,等. 断藤益母汤对类风湿关节

炎成纤维样滑膜细胞MEKK2及CIA小鼠关节炎的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7):31-41.

[6] 蔡叙东,林昌松,潘东梅,等. 断藤益母汤对破骨细胞RANKL信号通路及MMP-9的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12):68-73.

[7] 潘东梅,王强,蔡叙东,等. 断藤益母汤抑制PI3K/AKT通路诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5):2051-2055.

[8] TAYLOR P C, SIVAKUMAR B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2005, 17(3):293-298.

[9] 刘敏莹,徐强,刘小宝,等. 林昌松运用“祛风湿,通血脉,强筋骨”之法辨治类风湿关节炎经验[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(1):178-181.

[10] MIYOSHI M, LIU S. Collagen-Induced Arthritis Models [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1868:3-7.

[11] 陈修,许叔云,卞如濂. 药理实验方法学[M]. 人民卫生出版社, 2001:202-204.

[12] NAJM A, MASSON F M, PREUSS P, et al. MicroRNA-17-5p reduces inflammation and bone erosions in mice with collagen-induced arthritis and directly targets the JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(12):2030-2039.

[13] VAN KUIJK A W, WIJBRANDTS C A, VINKENOOG M, et al. TWEAK and its receptor Fn14 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared to psoriatic arthritis and its response to tumour necrosis factor blockade [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(1):301-304.

[14] 夏晴,纪羽婷,刘海亮,等. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11):107-113.

[15] CANNON G W, MCCALL S, COLE B C, et al. Effects of indomethacin, cyclosporin, cyclophosphamide, and placebo on collagen-induced arthritis of mice [J]. *Agents Actions*, 1990, 29(3/4):315-323.

[16] 任妮娜,凌益,姚血明,等. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2019, 8(10):62-67.

[17] BRAND D D, LATHAM K A, ROSLONIEC E F. Collagen-induced arthritis [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5):1269-1275.

[18] 韩隆胤,魏赓权,潘东梅,等. 断藤益母汤对胶原诱导性关节炎小鼠的治疗作用及对血清IL-1 $\beta$ 和MMP-1表达影响[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(2):33-37.

[19] 黄云梅,陈文列,黄美雅,等. 多种特殊染色法在骨关节炎组织形态学研究中的应用比较[J]. *中国比较医*

- 学杂志,2011,21(5):45-48.
- [20] 黄磊涛,赖琦,李帆,等. 人腰椎小关节软骨不同染色方法的差异比较[J]. 中国组织工程研究,2017,21(24):3784-3789.
- [21] LIU L, SHI G P. CD31: beyond a marker for endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94 (1) : 3-5.
- [22] 邓秋狄. 扁蒴藤素抑制类风湿关节炎滑膜血管新生及其机制研究[D]. 广州:南方医科大学,2015.
- [23] SHIBUYA M. VEGF-VEGFR signals in health and disease[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014, 22(1) : 1-9.
- [24] OTROCK Z K, MAKAREM J A, SHAMSEDDINE A I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 38(3) : 258-268.
- [25] ZHAO Y, ADJEI A A. Targeting angiogenesis in cancer therapy: moving beyond vascular endothelial growth factor [J]. *Oncologist*, 2015, 20(6) : 660-673.
- [26] MARUOTTI N, CANTATORE F P, RIBATTI D. Putative effects of potentially anti-angiogenic drugs in rheumatic diseases [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70 (2) : 135-140.
- [27] 王金凤,荆雪宁,刘文辉,等. 中药治疗类风湿关节炎抗滑膜血管新生作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(8):133-136.
- [28] 世界中医药学会联合会,中华中医药学会. 国际中医临床实践指南 类风湿关节炎(2019-10-11)[J]. 世界中医药,2020,15(20):3160-3168.
- [29] 孙莹,邱新萍,孙颂歌. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在类风湿关节炎中的表达[J]. 世界中医药,2019,14(3):761-765.
- [30] 张莉,高峰,滕凤猛,等. 雷公藤多甙对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织微血管新生的影响[J]. 临床和实验医学杂志,2015,14(21):1766-1768.
- [31] 王靖霞,刘春芳,李逸群,等. 雷公藤多苷片抑制实验性类风湿关节炎血管新生的作用研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(16):3441-3447.
- [32] 蔡悦,刘晓龙,郭静,等. 甘草附子汤治疗佐剂性关节炎模型小鼠的抗滑膜血管生成机制研究[J]. 中国药房,2019,30(12):1618-1623.
- [33] 张晓军,刘健,万磊,等. 基于PI3K/AKT/mTOR通路、HIF-1 $\alpha$ 、ES观察新风胶囊对佐剂关节炎大鼠滑膜血管新生的影响[J]. 中国免疫学杂志,2017,33(4):533-536.
- [34] 李逸群,何莲花,刘春芳,等. 风湿祛痛胶囊对VEGF诱导的人脐静脉内皮细胞功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(5):119-125.

[责任编辑 周冰冰]