

蕲蛇蛇毒对胶原诱导性关节炎大鼠血管生成的影响

陶方方, 汪丽佩, 储利胜*, 曲铁兵, 李琳
(浙江中医药大学, 杭州 310053)

[摘要] **目的:** 研究蕲蛇蛇毒对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠血管生成的影响及其机制。**方法:** 采用牛Ⅱ型胶原($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导大鼠 CIA 模型。建模 21 d 后, 实验分正常组、模型组、美洛昔康组($0.72\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig)、蕲蛇蛇毒低、中、高剂量组($0.1, 0.33, 1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip), 每天 1 次, 连续治疗 21 d。采用 HE 染色对大鼠踝关节滑膜组织进行病理学评分, 免疫组化法检测滑膜微血管密度和血管内皮细胞生长因子(VEGF)的蛋白表达, ELISA 法检测血清中血管生成素 1(Ang-1)的含量。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠踝关节滑膜病理评分和微血管密度显著增加($P < 0.01$), 滑膜组织 VEGF 表达量及血清 Ang-1 含量亦显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 蕲蛇蛇毒中、高剂量能显著降低大鼠踝关节滑膜的病理评分($P < 0.05$, $P < 0.01$), 蕲蛇蛇毒高剂量能明显降低滑膜微血管密度、VEGF 表达和血清 Ang-1 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** 蛇毒能减轻 CIA 大鼠的关节病理损伤和血管新生, 其机制可能与降低 VEGF 表达和减少 Ang-1 含量有关。

[关键词] 蕲蛇蛇毒; 胶原诱导性关节炎; 血管生成; 血管内皮生长因子; 血管生成素 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0168-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140168

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1342.020.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 13:42

Effect of *Agkistrodon acutus* Venom on Angiogenesis in Rats with Collagen-induced Arthritis

TAO Fang-fang, WANG Li-pei, CHU Li-sheng*, QU Tie-bing, LI Lin
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of *Agkistrodon acutus* venom on angiogenesis in collagen-induced arthritis (CIA) rats. **Method:** CIA was induced in Lewis rats with bovine type II collagen ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). After induction of CIA for 21 d, rats were randomly divided into six groups: normal group, CIA model group, meloxicam group ($0.72\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig), *A. acutus* venom groups ($0.1, 0.33, 1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip). After treatment once a day for 21 d. The histopathological score was monitored by HE staining in ankle joint synovial tissues, and the microvessel density (MVD) was detected by Von Willebrand factor (vWF) immunostaining. Vascular endothelia growth factor (VEGF) expression and the serum level of angiopoietin 1 (Ang-1) were examined by immunohistochemistry and ELISA respectively. **Result:** Compared with the normal group, histopathological score and MVD significantly increased in CIA model group, as well as the VEGF expression and the serum level of Ang-1 ($P < 0.01$). Compared with CIA model group, histopathological score was significantly decreased by treatment with medium and high dose of *A. acutus* venom ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Moreover, the MVD, the VEGF expression and the serum level of Ang-1 were significantly reduced by high dose of *A. acutus* venom ($P < 0.01$). **Conclusion:** These results suggest that *A. acutus* venom effectively alleviate the pathological damage and

[收稿日期] 20140306(019)

[基金项目] 浙江省重点科技创新团队计划项目(2009R50042)

[第一作者] 陶方方, 博士, 讲师, 从事分子免疫学研究, Tel:0571-86613613, E-mail:gracetaotao@gmail.com

[通讯作者] * 储利胜, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理学研究, Tel:0571-86613744, E-mail:chulisheng@21cn.com

angiogenesis, and its mechanism might be partly related to the decreasing expression of VEGF in ankle joint synovial tissues and the content of Ang-1 in serum.

[Key words] *Agkistrodon acutus* venom; collagen-induced arthritis; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; angiopoietin 1

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以滑膜层的增生、炎症和血管生成作为特征的渐进性自身免疫性疾病。RA 主要表现为关节滑膜慢性炎症、血管翳形成, 关节软骨破坏, 最终导致关节畸形、功能丧失。滑膜血管翳形成是 RA 最重要的病理表现, 在 RA 的侵蚀和破坏过程中发挥重要作用^[1-2]。RA 血管新生是多种因素共同作用的结果, 其中血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 和血管生成素-1 (Ang 1) 在 RA 的血管生成中发挥重要作用^[2-4]。在前期实验中发现, 蕲蛇蛇毒对胶原诱导性关节炎大鼠经腹腔注射给药后, 能够明显减轻踝关节滑膜炎症 (待发表), 但对血管生成方面的影响未见文献报道。因此本实验将从抗血管生成角度探讨蕲蛇蛇毒对类风湿性关节炎的治疗作用及机制。

1 材料

1.1 动物 48 只雌性 SPF 级 Lewis 大鼠 (8~9 周龄, 体重 (150 ± 10) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号 SCXK (京) 2006-0009, 饲养在浙江中医药大学实验动物中心, 自由饮食进水。

1.2 试剂与药品 牛 II 型胶原 (C II, 批号 20022)、完全弗氏佐剂 (CFA, 批号 7001)、不完全弗氏佐剂 (IFA, 批号 7002), 美国 Chondrex 公司; 兔抗大鼠第 VIII 因子 (vWF, 批号 ABE68, millipore 公司); 兔抗 VEGF 抗体 (批号 sc-507, Santa cruz 公司); 血管生成素-1 (Ang-1) 和 ELISA 试剂盒 (批号 JP27745, IBL 公司); 蕲蛇 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒冻干粉 (黄山市蛇类科学研究所, 并经浙江中医药大学中药鉴定教研室陈锡林教授鉴定); 莫可比 (美洛昔康片 7.5 mg, 批号 284177, 上海勃林格殷格翰药业有限公司)。

1.3 仪器 YLS-7A 足跖容积测量仪 (山东省仪器科学院设备站), 麦克奥迪 BA210 生物显微镜 (北京中仪光科科技发展有限公司), 550 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模 将 C II 10 mg, 与 0.05 mol·L⁻¹ 冰醋酸溶液 5 mL 混匀, 配成 2 g·L⁻¹ 溶液, 置 4 °C 冰箱中过夜。取 4 g·L⁻¹ 的 CFA, 冰浴中与含有 C II 的冰醋酸

等体积混合, 充分乳化后制成 C II 终质量浓度为 1 g·L⁻¹ 的乳化液作为第 1 次免疫注射剂。同方法取 IFA 与含有 C II 的冰醋酸等体积混合, 制成 C II 为 1 g·L⁻¹ 的乳化液作为第 2 次免疫注射剂。大鼠麻醉后用微量注射器于尾根部皮内 3~4 点, 注射第 1 次免疫乳剂每只 0.2 mL, 7 d 后在相同部位注射第 2 次免疫乳剂每只 0.15 mL 加强免疫。正常组同法同部位注射等量生理盐水。建模时间 21 d。

2.2 分组与给药 除正常组外, 造模成功后分模型组、美洛昔康组、蛇毒低、中、高剂量组, 每组 8 只。各组于造模成功后第 1 天开始给药, 蛇毒低、中、高剂量组各 0.1, 0.33, 1 mg·kg⁻¹, ip, 美洛昔康组 0.72 mg·kg⁻¹, ig, 正常组和模型组等容量生理盐水 ip, 每天 1 次, 连续 21 d。

2.3 滑膜病理学检测及评分 对左足踝关节进行固定、脱钙、石蜡包埋、切片后进行 HE 染色。参照 Takyangi 等^[5] 标准, 采用双盲法进行关节病理损伤程度评分: 根据滑膜细胞增生、滑膜下层炎症细胞浸润和血管生成 3 项指标, 每项按轻、中、重程度分别评为 0~3 分, 3 项指标总和为该大鼠关节炎组织总病理学评分。

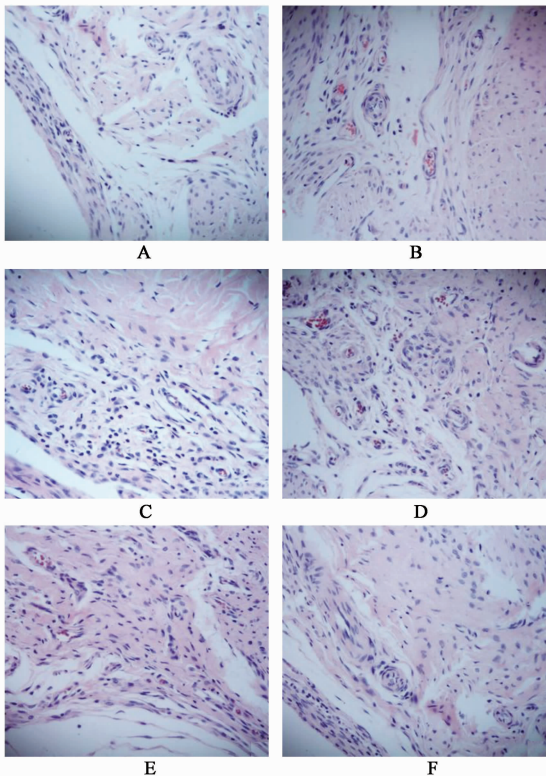
2.4 免疫组化检测 vWF, VEGF 表达 采用 EnVision™ 二步法免疫组织化学法检测 vWF 和 VEGF 表达。采用 vWF 阳性计数微血管密度 (microvessel density, MVD)^[6]。染色切片在 100 倍低倍显微镜下先扫描整个视野, 选择内皮细胞染色最密集的 3 个区域 (hotspot, 即微血管形成最丰富的区域), 然后转至 200 倍显微镜下计数 6 个视野 (每个视野 0.16 mm²) 的微血管数, 取其平均值, 即为每高倍视野的血管数 (MVD)。任何一个胞浆呈棕染的单个内皮细胞或内皮细胞簇, 与周围其他组织有明显界限, 无论有无血管腔, 无论管腔内有无红细胞均定义为一个微血管, 管腔大于 8 个红细胞直径或有明显肌层者不计数在内。VEGF 蛋白表达采用半定量记分法判定^[7]: 按阳性着色程度评分: 0 分无着色; 1 分浅黄色, 略高于背景色; 2 分棕黄色, 明显高于背景色; 3 分棕褐色。按阳性细胞所占比例评分: 0 分阴性; 1 分 < 10%; 2 分 11%~50%; 3 分 51%~75%; 4 分 > 75%。二者乘积为阳性结果。

2.5 ELISA 检测血清 Ang-1 含量 末次给药 1 h 后,大鼠经腹腔麻醉后无菌腹主动脉采血,静置 1 h, 3 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,置于 -80 ℃ 冰箱保存。ELISA 检测具体操作步骤参照试剂盒说明书,450 nm 酶标仪波长下测定吸光度(A)。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件包进行分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One way ANOVA (Student-Newman-Keuls) 进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 蕲蛇蛇毒对大鼠滑膜病理学的影响 正常大鼠关节滑膜由 1~3 层平滑膜细胞组成,无炎症细胞浸润及血管增生,关节结构完整,软骨层表面光滑。CIA 模型大鼠可见滑膜细胞层数增多,炎症细胞浸润,小血管增生。与模型组相比,美洛昔康组和蛇毒中、高剂量组的大鼠踝关节的病理学评分显著降低 ($P < 0.05$)。见图 1,表 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 美洛昔康组(0.72 mg·kg⁻¹ ig);
D. 蕲蛇蛇毒低剂量组(0.1 mg·kg⁻¹ ip);
E. 蕲蛇蛇毒中剂量组(0.33 mg·kg⁻¹ ip);
F. 蕲蛇蛇毒高剂量组(1 mg·kg⁻¹ ip)(图 2~3 同)

图 1 蕲蛇蛇毒对胶原诱导关节炎大鼠踝关节滑膜组织病理学改变的影响(HE, ×400)

3.2 蕲蛇蛇毒对大鼠滑膜微血管密度的影响

CIA 模型组大鼠滑膜组织 vWF 免疫阳性微血管密

度显著增加;与模型组相比,美洛昔康组和蛇毒高剂量组的微血管密度明显降低 ($P < 0.05$)。见图 2,表 1。

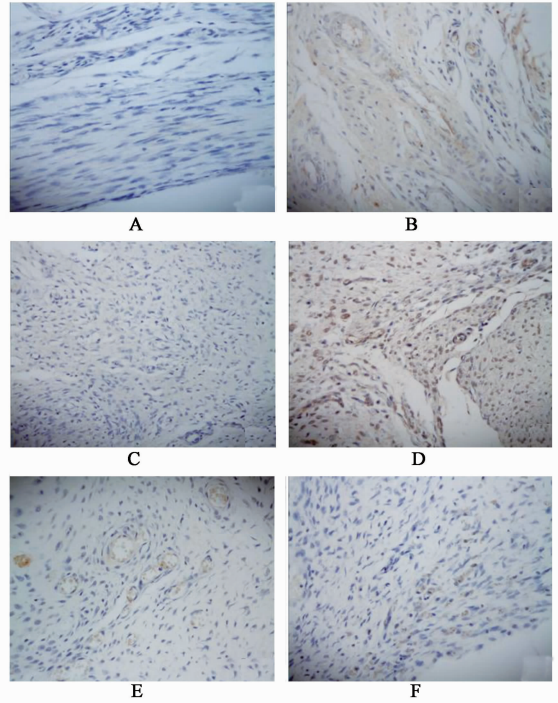


图 2 蕲蛇蛇毒对胶原诱导关节炎大鼠踝关节滑膜组织微血管密度的影响(vWF 免疫组化染色, ×400)

表 1 蕲蛇蛇毒对滑膜病理学评分、微血管计数、VEGF 阳性评分和 Ang-1 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	病理学评分 /分	微血管计数 /个	VEGF 阳性 评分/分	血清 Ang-1 /ng·L ⁻¹
正常	-	0.0 ± 0.0	2.6 ± 1.5	0.4 ± 0.7	1 256.3 ± 26.5
模型	-	7.8 ± 1.3 ¹⁾	11.8 ± 3.0 ¹⁾	8.5 ± 1.7 ¹⁾	1 457.7 ± 25.1 ¹⁾
美洛昔康	0.72	2.3 ± 0.6 ³⁾	7.7 ± 2.6 ³⁾	3.1 ± 0.9 ³⁾	1 374.1 ± 34.6 ³⁾
蕲蛇蛇毒	0.1	7.3 ± 1.4	11.4 ± 2.5	8.4 ± 1.3	1 448.9 ± 43.4
	0.33	5.6 ± 1.7 ²⁾	9.3 ± 3.1	6.5 ± 2.2	1 428.1 ± 25.5
	1	3.1 ± 0.8 ³⁾	8.8 ± 3.4 ²⁾	4.2 ± 1.9 ³⁾	1 420.8 ± 36.0 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 蕲蛇蛇毒对大鼠滑膜中 VEGF 蛋白表达的影响 正常组大鼠可见少量 VEGF 蛋白表达,CIA 模型中 VEGF 蛋白表达明显增加,均表达于细胞浆中。与模型组相比,美洛昔康组和蛇毒高剂量组的大鼠踝关节的 VEGF 蛋白阳性表达量显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3,表 1。

3.4 蕲蛇蛇毒对 RA 大鼠血清 Ang-1 含量的影响

与正常组比较,其余各组血清 Ang-1 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,美洛昔康组和蛇毒高剂量组的大鼠血清 Ang-1 含量显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

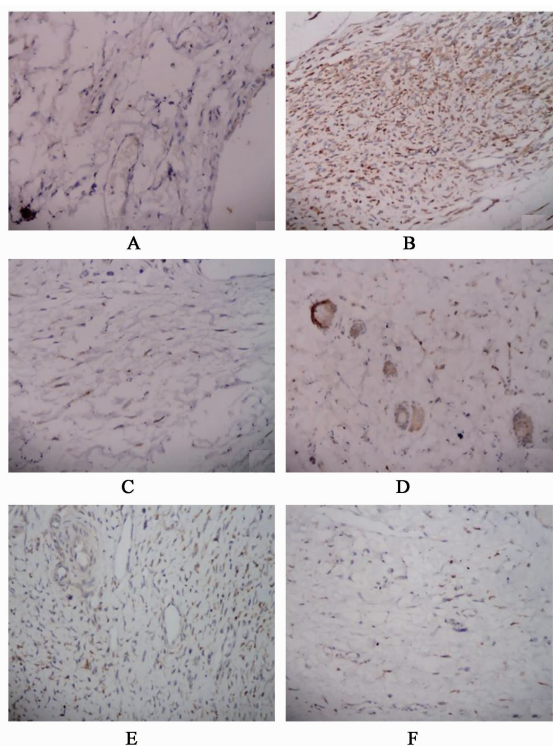


图3 蕲蛇蛇毒对胶原诱导性关节炎大鼠踝关节滑膜组织 VEGF 蛋白表达的影响(免疫组化染色, $\times 400$)

4 讨论

RA 血管新生是多种因素共同作用的结果,新生血管的形成分 3 个步骤:炎性介质激活内皮细胞;蛋白酶降解血管内皮基质;内皮细胞趋化及新生血管发生。因此 RA 的慢性炎症和血管生成有密切关系。Clavel 等^[8]观察了 310 例病程小于 6 个月的早期多发性关节炎患者,发现其血管增生与关节炎的严重程度相符,血清中 VEGF、sFlt-1 和 Ang-1 的含量与患者炎症水平和骨质破坏密切相关。Fukae 等^[9]用多普勒超声和 X 射线观察了 31 例 RA 低活动度病人,阳性滑膜血管质的程度预示了其后续炎症导致的关节损伤程度,说明了滑膜血管质对 RA 病理损伤的重要性。因此有学者提出血管生成抑制剂已经成为 RA 一种潜在的治疗药物^[10]。抗类风湿改善病情药如甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶以及青霉胺都早已被证明具有抗血管作用。本团队在以往的研究中也发现,RA 大鼠踝关节滑膜的病理损伤程度与炎性细胞增生密切相关,而蕲蛇蛇毒的中、高剂量组能降低 RA 大鼠的病理损伤程度,减轻以 TNF- α 为主的炎症介质的激活程度,降低血清中 MMP-9/TIMP-1 的酶解破坏作用(待发表),因此推测蕲蛇蛇毒可能直接或间接减少了血管的新生。

在本研究中,作者首先在踝关节滑膜的病理表

现和微血管密度中发现,蕲蛇蛇毒能显著减少了 CIA 大鼠踝关节滑膜的血管新生。VEGF 是一种特异作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子,在 RA 血管翳的形成、滑膜炎症及骨与软骨的破坏过程中发挥了十分重要的作用^[1-2],是主要的血管新生因子,其能够刺激血管内皮细胞存活、移动、增殖,甚至是 RA 进展的早期因素之一。在血管的成熟过程中,血管生成素(angiopoietins, Ang) 1 负责招募周围的间充质细胞并促进其分化成血管平滑肌细胞,显著地增强了新生血管的血管稳定性。因此 VEGF 介导了内皮细胞的移行和增殖,Ang 促进了血管壁的稳定,协同行动使得新生血管稳定形成^[11]。Ang-1/Tie-2 通路能诱使平滑肌细胞、中性粒细胞、嗜酸粒细胞产生趋化效应,促进间充质细胞向平滑肌细胞转化,并且能诱导血清素、基质金属蛋白酶、纤维蛋白溶酶的分泌。研究发现,Ang-1 和 Tie2 的缺乏会导致微血管显著减少^[12-13]。在本研究中发现,蛇毒高剂量组能显著降低 VEGF 蛋白的表达和血清 Ang-1 的含量。

总之,本实验结果表明,蕲蛇蛇毒可有效降低 CIA 大鼠的踝关节病理评分和血管新生,其作用机制可能与降低踝关节 VEGF 蛋白表达,降低血清中 Ang-1 含量有关。

[参考文献]

- [1] Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog E M. Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(3):153.
- [2] Marrelli A, Cipriani P, Liakouli V, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation? [J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(10):595.
- [3] Szekanecz Z, Besenyi T, Szentpétery A, et al. Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2010, 22(3):299.
- [4] Veselinovic M, Jakovljevic V, Jurisic-Skevin A, et al. Carotid enlargement and serum levels of von Willebrand factor in rheumatoid arthritis: a follow-up study[J]. *Clin Rheumatol*, 2012, 31(12):1727.
- [5] Takyangi H, Juji T, Miyazaki T, et al. Suppression of arthritis bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104:137.
- [6] Pesslerer F, Dai L, Diaz-Torne C, et al. Increased angiogenesis and cellular proliferation as hallmarks of the synovium in chronic septic arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 59(8):1137.

小儿黄龙颗粒对记忆障碍模型小鼠学习记忆功能的影响

吕珊珊, 唐桂英, 杨超, 周年华, 陈成, 陈晓雪, 陈犁, 谯志文*
(重庆希尔安药业有限公司, 重庆 401121)

[摘要] **目的:**观察小儿黄龙颗粒对记忆获得障碍模型、记忆巩固不良模型及记忆再现缺失模型小鼠学习记忆功能的影响。**方法:**采用跳台法和避暗法观察小儿黄龙颗粒对东莨菪碱、利血平、氯霉素和乙醇分别造成记忆障碍模型小鼠学习记忆能力的影响。**结果:**小儿黄龙颗粒高、中剂量能延长东莨菪碱造模小鼠、利血平造模小鼠、氯霉素造模小鼠、乙醇造模小鼠的潜伏期,减少错误次数,降低错误率,具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**小儿黄龙颗粒对记忆获得障碍模型、记忆巩固不良模型及记忆再现缺失模型小鼠的学习记忆功能有改善作用,能促进和巩固学习记忆,为临床用于改善 ADHD 患者的学习记忆功能提供了药理学依据。

[关键词] 小儿黄龙颗粒; 记忆获得障碍; 记忆巩固不良; 记忆再现缺失

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0172-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140172

The Improving Effect of Pediatric Huanglong Granule on Mouse Models with Memory Dysfunction

LV Shan-shan, TANG Gui-ying, YANG Chao, ZHOU Nian-hua, CHEN Cheng,
CHEN Xiao-xue, CHEN Li, QIAO Zhi-wen*
(Chongqing Healn Pharmaceutical Co., Ltd, Chongqing 401121, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Pediatric Huanglong granule on the mouse models of

[收稿日期] 20131217(008)

[第一作者] 吕珊珊,本科,从事药学研究,Tel:13908327566,E-mail:33657849@qq.com

[通讯作者] * 谯志文,本科,从事中药学研究,Tel:023-67893740

- [7] 王雯,陈森洲,王险峰,等. HIF-1 α 、VEGF 在 CIA 大鼠模型中的表达与意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6):563.
- [8] Clavel G, Bessis N, Lemeiter D, et al. Angiogenesis markers (VEGF, soluble receptor of VEGF and angiopoietin-1) in very early arthritis and their association with inflammation and joint destruction[J]. Clin Immunol, 2007, 124(2):158.
- [9] Fukae J, Isobe M, Kitano A, et al. Positive synovial vascularity in patients with low disease activity indicates smouldering inflammation leading to joint damage in rheumatoid arthritis; time-integrated joint inflammation estimated by synovial vascularity in each finger joint [J]. Rheumatology (Oxford), 2013, 52(3):523.
- [10] Thairu N, Kiriakidis S, Dawson P, et al. Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis in 2011; learning the lessons of the colorectal cancer experience [J]. Angiogenesis, 2011, 14(3):223.
- [11] Schroeder M, Viezens L, Fuhrhop I, et al. Angiogenic growth factors in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatol Int, 2013, 33(2):523.
- [12] Raatz Y, Ibrahim S, Feldmann M, et al. Gene expression profiling and functional analysis of angiogenic markers in murine collagen induced arthritis [J]. Arthritis Research Therapy, 2012, 14:R169.
- [13] Hashiramoto A, Sakai C, Yoshida K, et al. Angiopoietin 1 directly induces destruction of the rheumatoid joint by cooperative, but independent, signaling via ERK/MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt [J]. Arthritis Rheumatology, 2007, 56:2170.

[责任编辑 聂淑琴]