

虎杖大黄素对 RA 大鼠炎症和新生血管形成的影响

王永萍¹, 杨长福¹, 谭芸¹, 王凤洲², 徐昌君¹, 张曼¹, 陈运³, 王和生^{1*}

(1. 贵阳中医学院基础医学院, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550002;
3. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:通过足跖部注射牛Ⅱ型胶原和不完全氟氏佐剂乳化剂,建立类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的胶原诱导型关节炎(collagen induced arthritis, CIA)模型,用相应指标观察虎杖大黄素干预炎症和新生血管形成情况。方法:Wistar大鼠40只随机分为2组,正常组,模型组,模型组采用等量的牛Ⅱ型胶原和不完全氟氏佐剂乳化后在雄性Wistar大鼠足跖部皮内注射0.4 mL(含胶原400 μg),14 d后同样方法于足跖部皮内注射0.1 mL加强,致炎20 d成模后,再将模型组分为模型、虎杖大黄素与醋酸地塞米松组,每组10只,此时虎杖大黄素组0.4 g·L⁻¹虎杖大黄素0.8 mg·kg⁻¹ ig,醋酸地塞米松组用0.75 g·L⁻¹醋酸地塞米松7.5 mg·kg⁻¹ ig,两药各自连用20 d,并用足跖厚度,足爪X射线,足爪大体图片,膝关节滑膜HE染色,ELISA检测大鼠血清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量,免疫组化检测膝关节滑膜TNF-α及CD34表达,观察成模大鼠的2个靶点变化。结果:与正常组比较,模型组类风湿性关节炎大鼠足跖厚度明显增加(P<0.01),大鼠血清TNF-α含量明显升高(P<0.01);给药后,与模型组比较,虎杖大黄素与醋酸地塞米松组明显降低大鼠足跖厚度,血清TNF-α含量(P<0.05, P<0.01);X射线结果显示,模型组大鼠足跖部出现不连续的低密度影,即为溶骨现象,且有明显的软组织肿胀阴影,而正常组、虎杖大黄素组、醋酸地塞米松组未见有不连续的低密度影,即未见溶骨现象,亦未见软组织肿胀阴影;HE染色显示,模型组大鼠膝关节滑膜可见有大量的炎症细胞浸润和大量的血管翳,而正常组未见炎症细胞浸润和血管翳,虎杖大黄素组和醋酸地塞米松组只见少量炎症细胞浸润和少量的血管翳;免疫组化结果显示,模型组膝关节滑膜中的CD34及TNF-α的表达明显增高,虎杖大黄素组和醋酸地塞米松组膝关节滑膜中的CD34及TNF-α的表达明显降低。结论:虎杖大黄素可通过影响炎症和新生血管形成两个靶点干预RA。

[关键词] 类风湿性关节炎; 虎杖; 大黄素; 炎症; 新生血管形成

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0111-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015170111

Effect of Emodin from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* on Inflammation and Neovascularization of RA Rats WANG Yong-ping¹, YANG Chang-fu¹, TAN Yun¹, WANG Feng-zhou², XU Chang-jun¹, ZHANG Man¹, CHEN Yun³, WANG He-sheng^{1*} (1. School of Basic Medical Sciences, Guiyang University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550002, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guiyang University of TCM, Guiyang 550002, China; 3. School of Pharmacy, Guiyang University of TCM, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a collagen-induced arthritis (CIA) model of rheumatoid arthritis (RA) through plantar injection of bovine collagen II and incomplete Freund's Adjuvant, in order to observe the effect of emodin from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* (PCRR) on inflammation and neovascularization with corresponding indicators. **Method:** Wistar rats were randomly divided into 2 groups: the normal group and the model group. The model group was given the same amounts of bovine collagen II and incomplete Freund's adjuvant and then intradermally injected with 0.4 mL (containing 400 μg of collagen) of solution through plantar region. After 14 days, the same method (0.1 mL) was adopted for the plantar intradermal injection of additionally 0.1 mL of solution to induce inflammation and establish the model 20 days later. After the modeling, the model group was divided into the model subgroup, the emodin from PCRR subgroup and the dexamethasone acetate subgroup, with

[收稿日期] 20140812(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460671);贵州省科学技术厅贵阳中医学院联合基金项目(黔科合中药字[2011]LK27043号)

[第一作者] 王永萍,副教授,硕士,从事生物化学与分子生物学研究, Tel:0851-13984123031, E-mail:418950922@qq.com

[通讯作者] *王和生,教授,从事生物化学与分子生物学研究, Tel:0851-13511962401, E-mail:wanghsh0413@126.com

10 in each group. Subsequently, the modin from PCRR subgroup was orally given $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ emodin from PCRR ($0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *ig*), while the dexamethasone acetate subgroup was orally given $0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dexamethasone acetate ($7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *ig*). The two drugs were continuously used separately for 20 d, and the plantar thickness, claw X-ray, claws gross pictures, synovial HE staining of knee joint and ELISA were used for detecting rat serum tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in serum. The immunohistochemistry was used to detect TNF- α and CD34 expressions of knee joint synovium, and the changes in the two targets were observed in modeled rats. **Result:** Compared with the normal group, the model group show significant increases in plantar thickness of RA rats ($P < 0.01$) and TNF- α content in rat serum ($P < 0.01$), after the administration, compared with the model subgroup, the emodin from PCRR subgroup and the dexamethasone acetate subgroup showed notable decreases in plantar thickness and TNF- α content in serum ($P < 0.05$, $P < 0.01$). According to X-ray result, the model subgroup showed discontinuous low-density shadows in plantar region, which were actually notable soft tissue swelling and suggested osteolysis phenomenon, and the normal group, the emodin from PCRR subgroup and the dexamethasone acetate subgroup showed no discontinuous low-density shadows, which suggested no notable soft tissue swelling and osteolysis phenomenon. According to the HE staining, the model subgroup showed plenty of inflammatory cell infiltration and pannus at knee joint synovium, the normal group showed no inflammatory cell infiltration and pannus, and the emodin from PCRR subgroup and the dexamethasone acetate subgroup showed only a little inflammatory cell infiltration and pannus. According to the immunohistochemical result, the model subgroup showed remarkable increases in TNF- α and CD34 expressions at knee joint synovium, whereas the emodin from PCRR subgroup and the dexamethasone acetate subgroup showed significant decreases in TNF- α and CD34 expressions. **Conclusion:** Emodin from PCRR can intervene RA by regulating two targets TNF- α and CD34 for the inflammation and neovascularization.

[**Key words**] rheumatoid arthritis; Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix; emodin; inflammation; neovascularization

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是慢性全身性自身免疫性疾病,多累及关节滑膜^[1-2],特点是慢性、对称性、进行性多关节炎^[3]。世界上 RA 平均患病率约 1%,我国发病率 0.32%~0.36%,致残率较高,发病以青壮年多见,男女之比约为 1:3^[4]。RA 主要病理改变关节滑膜炎和滑膜血管翳(即新生血管形成),炎症致新生血管生成^[5-7],且滑膜血管翳似肿瘤,侵蚀性强,释放炎症因子使关节破坏、强直、功能完全丧失。抑制 RA 滑膜新生血管形成和炎症反应是重要靶点。虎杖大黄素具备干预炎症和抗癌作用^[8],但同时抑制 RA 滑膜新生血管形成和炎症反应未见报道,故用其干预 RA 以说明其通过影响血管新生和炎症反应干预 RA。为研究其影响 RA 滑膜血管新生和炎症信号通路奠定基础。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,雄性,体重 (150 ± 20) g,由湖南实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(湘)2009-0012。

1.2 药物及试剂 虎杖大黄素(陕西慧科公司,批

号 HK20120328),牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司,批号 20021),不完全氟氏佐剂(美国 Chondrex 公司,批号 7002),肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(上海兰基公司,批号 E02T0008),Rabbit Anti-Tumor Necrosis α (武汉博士德公司,批号 BA0131),Rabbit Anti-CD34(武汉博士德公司,批号 BA0532),两步法免疫组化试剂盒(武汉博士德公司,批号 SV-0001)。

1.3 仪器 5810R 型高速冷冻台式离心机(德国 Eppendorf 公司),EIX808IU biotek 型自动酶标读数仪(美国 biotek 公司),YD-335 型病理切片机(浙江益迪公司),KD-BM 型生物组织包埋机(浙江金华科迪仪器公司),F52-8C 型 500X 光机(德国西门子公司),CX40-32J02 型生物显微分析成像仪(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 溶液的配制 虎杖大黄素的配制:取虎杖大黄素配制成 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,并加入一定量的聚山梨醇-80 助溶;胶原溶液配制:将 2 mg 牛 II 型胶原溶于 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸溶液 1 mL 配制成 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胶原溶

液;等量的胶原和不完全氟氏佐剂乳化剂的制备:用注射器两只将等体积的 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胶原溶液和不完全氟氏佐剂于冰上使之乳化,直至取乳化剂一滴滴于盛有蒸馏水的培养皿中不消散者,则为乳化剂制备成功。

2.2 动物分组 所有大鼠随机分为两组:正常组 ($n=10$),造模组 ($n=30$),适应性喂养 24 h。致炎 20 d 后用足爪 X 射线,大体照片,足跖厚度,HE 染色证明成模。然后将造模组分为模型组(不作干预, $n=10$),虎杖大黄素组 ($n=10$),醋酸地塞米松组 ($n=10$)。

2.3 动物模型制备^[9] 参照课题组一直沿用的方法,所有大鼠取胶原和不完全氟氏佐剂乳化剂 0.4 mL (含胶原 $400\text{ }\mu\text{g}$),于造模组大鼠右足跖 *ih* 致炎,致炎 14 d 于造模组大鼠右足跖 *ih* 乳化剂 0.1 mL (含胶原 $100\text{ }\mu\text{g}$) 做加强注射,致炎 20 d 可证明成模。

2.4 给药方法 正常组正常饲养,致炎 20 d 模型组不作药物干预,虎杖大黄素组用 $0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 虎杖大黄素 $0.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$ ^[2],醋酸地塞米松组用 $0.75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松溶液 $7.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$,该后两组均每 2 d 1 次 *ig*,*ig* 体积均为 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,连用 20 d。

2.5 取材 致炎 40 d 从大鼠股静脉取血,并用 $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低速离心 10 min,取血清并保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。并取膝关节滑膜,置于 4% 的多聚甲醛固定,以便于进行免疫组化和 HE 染色检测。

2.6 检测指标 在致炎 20 d,用足爪 X 射线,足爪大体图片,足跖厚度证明模型成立后(在课题组前期实验中已经能较好的说明),用药物虎杖提取物大黄素干预 20 d(每 2 d/1 次),虎杖提取物大黄素对类风湿性关节炎大鼠炎症的影响可用足跖厚度、足爪大体图片、足爪 X 射线、膝关节滑膜 HE 染色,ELISA 及免疫组化检测 TNF- α 的含量来进行观察。滑膜新生血管形成采用了免疫组化检测血管内皮细胞标记物 CD34 的表达来进行观察。X 射线检测采用电压 51 kV,电流 18 mA 的条件,其他测定按试剂说明书进行。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用两样本均数的 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对类风湿性关节炎大鼠足跖厚度的影响 在致炎 40 d 分别测量各组左足跖厚度。在致炎 40 d 或者用药 20 d,模型组足跖厚度较正常组极显著升高 ($P<0.01$),虎杖大黄素组和醋酸地塞米松组相

比模型组,足跖厚度显著降低 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 虎杖大黄素对类风湿性关节炎大鼠左足跖厚度的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

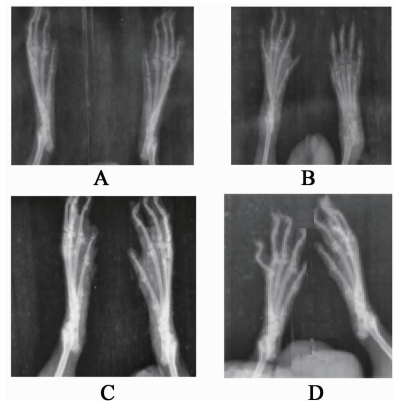
Table 1 Effects of emodin from PCRR on left foot plantar thickness in rheumatoid arthritis rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	足跖厚度/ cm
正常	-	0.36 ± 0.02
模型	-	$0.57\pm 0.02^{1)}$
虎杖大黄素	0.8	$0.44\pm 0.02^{2)}$
醋酸地塞米松	7.5	$0.47\pm 0.02^{3)}$

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

3.2 对类风湿性关节炎大鼠足爪肿胀度的影响 在致炎 40 d 分别测量各组大鼠足背和足掌的大体照片。可见模型组大鼠足背、足掌明显肿胀,正常组未见肿胀,虎杖大黄素组经过虎杖大黄素治疗后肿胀不明显,与醋酸地塞米松组比较无显著差异。

3.3 足爪 X 射线检测 在致炎 40 d 分别对各组大鼠进行 X 射线检测。在致炎 40 d,可见模型组大鼠足跖部出现不连续的低密度影,即为溶骨现象,且有明显的软组织肿胀阴影,而正常组、虎杖大黄素组、醋酸地塞米松组未见有不连续的低密度影,即未见溶骨现象,亦未见软组织肿胀阴影。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 虎杖大黄素 $0.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 醋酸地塞米松 $7.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(图 2~4 同)

图 1 虎杖大黄素对类风湿性关节炎大鼠足爪 X 射线的影响

Fig.1 Effects of Emodin from PCRR on paw X-ray of rheumatoid arthritis rats

3.4 对各组大鼠血清 TNF- α 含量的影响 致炎 40 d 检测各组大鼠血清 TNF- α 含量。在致炎 40 d,模型组大鼠血清 TNF- α 含量与正常组、虎杖大黄素组、醋酸地塞米松组有极显著差异 ($P<0.01$),而正常组、虎杖大黄素组、醋酸地塞米松组间无显著差异。见表 2。

表 2 虎杖大黄素对类风湿性关节炎大鼠血清 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of emodin from PCRR on serum TNF- α in rheumatoid arthritis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	340.36 ± 15.60 ²⁾
模型	-	1 060.11 ± 24.41
虎杖大黄素	0.8	503.11 ± 21.30 ²⁾
醋酸地塞米松	7.5	380.47 ± 12.28 ²⁾

注:与模型组比较²⁾P < 0.01。

3.5 各组大鼠膝关节滑膜的变化 对各组大鼠膝关节滑膜进行 HE 染色,模型组大鼠膝关节滑膜可见有大量的炎症细胞浸润和大量的血管翳,而正常组未见炎症细胞浸润和血管翳,虎杖大黄素组和醋酸地塞米松组只见少量炎症细胞浸润和少量的血管翳。见图 2。

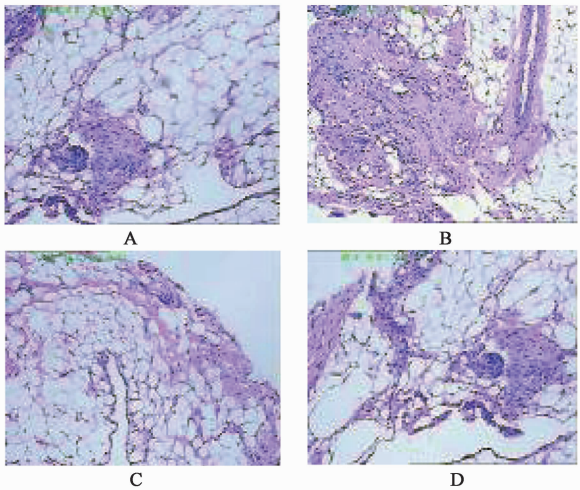


图 2 虎杖大黄素对类风湿性关节炎大鼠膝关节滑膜的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 2 Effects of emodin from PCRR on synovial of knee joint in rheumatoid arthritis rats (HE, $\times 400$)

3.6 膝关节滑膜免疫组织化学检测 CD34 表达情况 对各组膝关节滑膜采取免疫组织化学技术检测 CD34 表达,正常组未见血管内皮细胞标记物 CD34 的表达,醋酸地塞米松组可见少量的 CD34 表达,虎杖大黄素组也可见少量 CD34 表达,而模型组可见血管内皮细胞标记物 CD34 的表达明显增强。结合 CD34 作为血管内皮细胞的标记物,可说明虎杖大黄素可抑制新生血管形成。见图 3。

3.7 膝关节滑膜免疫组织化学检测 TNF- α 表达情况 对各组膝关节滑膜采取免疫组织化学技术检测 TNF- α 表达,正常和醋酸地塞米松组有少量 TNF- α 表达,模型组可见 TNF- α 表达增强,虎杖大黄素组有一定的 TNF- α 表达。而 TNF- α 作为代表炎症

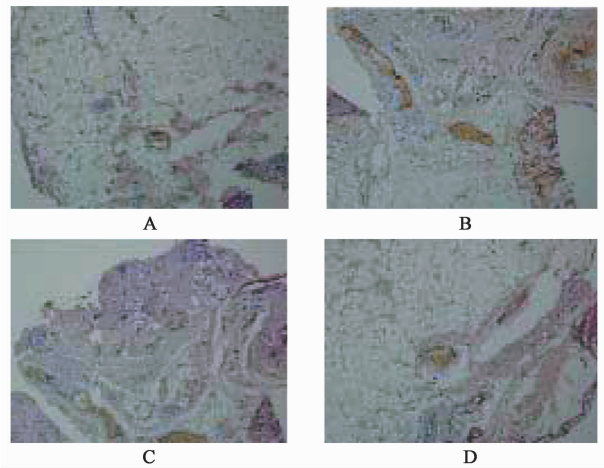


图 3 虎杖大黄素对类风湿性关节炎大鼠膝关节滑膜 CD34 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 Effects of emodin from PCRR on synovial CD34 of knee joint in rheumatoid arthritis rats (Immunohistochemistry, $\times 400$)

反应的重要细胞因子,可说明虎杖大黄素显著抑制炎症反应。见图 4。

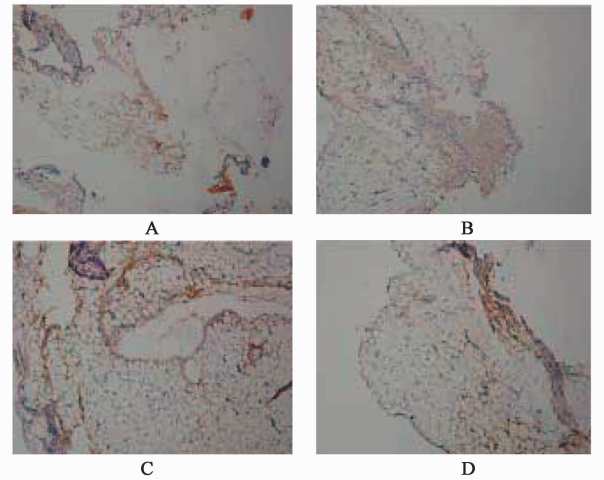


图 4 虎杖大黄素对类风湿性关节炎大鼠膝关节滑膜 TNF- α 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 4 Effects of emodin from PCRR on synovial TNF- α of knee joint of rheumatoid arthritis rats (Immunohistochemistry, $\times 400$)

4 讨论

本课题组首次采用虎杖大黄素治疗类风湿性关节炎,且虎杖大黄素同时干预炎症和新生血管形成而治疗类风湿性关节炎尚未见报道,前期查阅大黄素用于治疗其他疾病的文献,参考了其采用的剂量,结合前期预试验的效果,故实验中虎杖大黄素采用了前期实验效果较好的一个剂量,同时采用较为明确的指标观察虎杖大黄素的抗炎和抗新生血管形成作用,说明其是否通过炎症和新生血管形成 2 个靶点治疗类风湿性关节炎。

从以上指标的检测来看,如通过足跖厚度、足爪大体图片、足爪 X 射线检测,虎杖大黄素治疗类风湿性关节炎疗效是肯定的,而且通过膝关节滑膜 HE 染色、免疫组织化学等检测确实发现虎杖大黄素通过抗炎和抗新生血管形成两大靶点治疗类风湿性关节炎。

但采用什么样的指标能较直观的观察这样的靶点,比如炎症这个靶点来看:针对 RA 是一种以关节滑膜炎为特征的慢性自身免疫性疾病,其病变主要在滑膜,如实验中由于足跖皮内注射胶原,启动了自身免疫反应,使滑膜细胞迅速增殖,各种炎症细胞对滑膜的浸润加强,分泌产生炎症介质介导了 RA 炎症组织损伤^[10]。实验中发现对于炎症这个靶点,宜采用足跖厚度、足爪大体照片、足爪 X 射线检测。且 TNF- α 的释放对滑膜炎症的发展、关节软骨基质的崩解和骨破坏具有重要作用^[11-12],故对血清中最重要的炎症因子 TNF- α 定量检测,膝关节滑膜 TNF- α 免疫组织化学检测,可较客观的说明类风湿性关节炎中炎症这个靶点。

而至于新生血管形成这一重要靶点,宜采用膝关节滑膜 HE 染色(观察新生血管形成)、免疫组织化学检测血管内皮细胞标记物 CD34,亦较能直观的观察新生血管形成这一重要靶点。因为新生血管形成促进了炎症因子的表达,两者同时作用导致了骨质的破坏,甚至关节的畸形,对于这样的病理改变,宜采取足爪大体图片及足爪 X 射线检测来进行衡量。

综上所述,实验确实说明采用相应的指标可更直观的观察炎症和新生血管形成两个重要的靶点,也说明了虎杖大黄素治疗类风湿性关节炎的疗效是明确的,而且确实也是通过炎症和新生血管形成这两个重要的靶点来治疗 RA 的。为以后继续进行 RA 和虎杖大黄素在炎症和新生血管形成信号通路的研究奠定一定基础。

[参考文献]

- [1] 张凯,廖丽翔,邓子辉,等. 类风湿关节炎患者疾病活动期和缓解期血清瘦素水平变化的意义[J]. 军医进修学院学报,2010,31(11):1122-1124.
- [2] 李玉梅,陈永强,樊天佑,等. 羌活地黄汤对佐剂性类风湿性关节炎大鼠血清 TNF- α , IL-1 β , IL-6 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2014,22(2):12-14.
- [3] 封桂英,郭明,宋鸿儒,等. 以 Th17/Treg 为靶点治疗类风湿性关节炎的研究概述[J]. 时珍国医国药,2013,24(4):911-913.
- [4] 涂燕华,孙连娜. 姜黄素与类风湿性关节炎的相关实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):310-314.
- [5] 张义浜,刘志敏,熊凌霜. 类风湿关节炎发病机制及其治疗方法研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(s1):88-90.
- [6] 达古拉. VEGF 在类风湿性关节炎血管形成中的作用及其相关研究进展[J]. 医学综述,2012,18(5):644-648.
- [7] 郭炜,刘春芳,林娜. 类风湿性关节炎滑膜血管新生与中医药[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):308-312.
- [8] 裴莲花,吴学,金光洙. 虎杖化学成分及药理作用研究现状[J]. 延边大学医学学报,2006,29(2):147-149.
- [9] 王永萍,杨长福,谭芸,等. Wistar 大鼠 CIA 模型构建、评价及用药时间的选择[J]. 中药药理与临床,2014,30(2):182-184.
- [10] 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.
- [11] 杨奕樱,乔为平,乔晓彧. 黔棘茎穗木水煎液对佐剂性关节炎大鼠 PGE₂ 的影响及影像学观察[J]. 实用医学杂志,2013,29(10):1578-1580.
- [12] 李小心,徐亮. 类风湿性关节炎缓解后的维持治疗研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2014,19(1):116-120.

[责任编辑 周冰冰]