

· 药理 ·

# 蒙古族药忠伦阿汤对 CIA 大鼠 MMP-3, MMP-9 表达的影响

邹晓慧<sup>1</sup>, 董秋梅<sup>2\*</sup>, 陈琨<sup>2</sup>, 吴昊<sup>1</sup>, 那仁满都拉<sup>3</sup>, 张锁<sup>2</sup>, 吕新亮<sup>4</sup>

(1. 内蒙古医科大学 研究生学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学 中医学院, 呼和浩特 010110;  
3. 内蒙古自治区医院, 呼和浩特 010020; 4. 内蒙古武警总队医院, 呼和浩特 010020)

**[摘要]** 目的: 观察忠伦阿汤的有效成分对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠的基质金属蛋白酶-3(MMP-3), MMP-9 的影响, 探讨其治疗类风湿关节炎(RA)的作用机制。方法: 采用 II 型胶原诱导建立关节炎大鼠模型, 并设正常组, 模型组, 雷公藤多苷片组(9.45 mg·kg<sup>-1</sup>), 忠伦阿汤高、中、低剂量组(5.4, 2.7, 1.35 g·kg<sup>-1</sup>), 连续给药 4 周, 苏木素-伊红(HE)观察滑膜组织的组织病理形态, 酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血清 MMP-3 与 MMP-9 的含量; 免疫组化与蛋白质免疫印迹(Western blot)检测滑膜组织 MMP-3 与 MMP-9 的表达。结果: 模型组血清 MMP-3 及 MMP-9 的含量显著高于正常组( $P < 0.01$ ); 各用药组 MMP-3 和 MMP-9 表达较模型组均有不同程度的降低( $P < 0.01$ ), 忠伦阿汤高剂量组与雷公藤多苷片组比较无显著差异; 免疫组化结果显示 MMP-3, MMP-9 阳性表达模型组较正常组明显升高( $P < 0.01$ ), 雷公藤多苷片组及忠伦阿汤高剂量组较模型组 MMP-3, MMP-9 蛋白表达明显降低, 有统计学意义( $P < 0.05$ ), Western blot 分析结果表明用药组 MMP-3, MMP-9 的蛋白表达明显低于模型组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 忠伦阿汤能明显减少 CIA 大鼠血清中 MMP-3 及 MMP-9 水平, 降低滑膜组织的表达, 可能是其治疗 RA 的作用机制。

**[关键词]** 蒙古族药忠伦阿汤; II 型胶原诱导性关节炎; 类风湿性关节炎; 金属基质蛋白酶-3; 金属基质蛋白酶-9

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0106-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016070106

## Effect of Mongolian Medicine Zhonglun'e Tang on MMP-3, MMP-9 Expressions in Rats with Collagen Induced Arthritis

ZOU Xiao-hui<sup>1</sup>, DONG Qiu-mei<sup>2\*</sup>, CHEN Kun<sup>2</sup>, WU Hao<sup>1</sup>, NA-REN Man-du-la<sup>3</sup>,  
ZHANG Suo<sup>2</sup>, LYU Xin-liang<sup>4</sup>

(1. Graduate School, Inner Mongolia Medical Univeristy, Hohhot 010110, China;  
2. Traditional Chinese Medicine School, Inner Mongolia Medical Univeristy, Hohhot 010110, China;  
3. Inner Mongolia Autonomous Region Hospital, Hohhot 010020 China;  
4. Armed Police Corps Hospital in Inner Mongolia, Hohhot 010020, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Mongolia medicine Zhonglun'e Tang on the expressions of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and MMP-9 in rats with collagen induced arthritis (CIA) and to study its treatment mechanism for rheumatoid arthritis (RA). **Method:** arthritis rat models were established by using type II collagen. The rats were divided into normal group, model group, tripterygium wilfordii polycoride tablets group (9.45 mg·kg<sup>-1</sup>), Mongolian medicine Zhonglun'e Tang high dose (5.4 g·kg<sup>-1</sup>), medium dose (2.7 g·kg<sup>-1</sup>) and low dose (1.35 g·kg<sup>-1</sup>) groups. The drugs were given for 4 weeks, and then HE staining was used to observe the histopathologic morphology of synovial tissues. MMP-3 and MMP-9 levels in the serum of rats were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of MMP-3 and MMP-9 in the synovial tissues were

**[收稿日期]** 20150902(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360571)

**[第一作者]** 邹晓慧, 在读硕士, 从事风湿骨关节疾病的研究, Tel:15247119715, E-mail:707003894@qq.com

**[通讯作者]** \*董秋梅, 教授, 博士生导师, 从事风湿骨关节疾病的研究, Tel:13039515668, E-mail:d.qium@163.com

detected by using immunohistochemistry and Western blot. **Result:** The levels of MMP-3 and MMP-9 in serum of model group were significantly higher than those in normal group ( $P < 0.01$ ); positive expressions of each drug group were lower than those in model group to varying degrees ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference between Zhonglun'e Tang high dose group and tripterygium wilfordii polycoride tablets group. The results of immunohistochemistry method showed that, the expressions of MMP-3 and MMP-9 in mode group were significantly higher than those in normal group ( $P < 0.01$ ), and there was statistically significant difference between Zhonglun'e Tang high dose group, tripterygium wilfordii polycoride tablets group were lower in protein expression of MMP-3 and MMP-9 than those in model group ( $P < 0.05$ ). The results of Western blot showed that the protein expressions of MMP-3 and MMP-9 in the treatment groups group were significantly lower than those in model group, with statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Zhonglun'e Tang could significantly decrease the MMP-3 and MMP-9 levels in serum of CIA rats, and reduce the positive expressions of synovial tissues. This may be the mechanism for treating RA.

[ **Key words** ] Zhonglun'e Tang; type II collagen induced arthritis; rheumatoid arthritis; metalloproteinase-3; metalloproteinase-9

忠伦阿汤,又称忠伦-5 汤、哈日呼汤、五味润僵汤等,首载于《四部医典》,由苦参、桅子、诃子、川楝子和地格达(当药)组成。该方在蒙古族医临床上常用于治疗关节黄水病,如西医病名的风湿热、布病、类风湿关节炎、痛风以及骨伤或脑卒中后关节僵硬、牛皮癣等疾病,效果显著<sup>[1-2]</sup>。前期的研究结果显示,忠伦阿汤有良好的抗炎、镇痛作用,能够明显缓解胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠的足肿胀、红斑结节、巩膜炎等症状,显示了较好的免疫抑制作用<sup>[3]</sup>。对 CIA 大鼠血流变具有明显改善的作用,可有效减缓类风湿关节炎(RA)关节红、肿、热、痛等症状,从而改善局部血液循环障碍,具有一定的活血化瘀作用<sup>[4-6]</sup>。高自立等<sup>[7]</sup>研究显示,蒙古族药忠伦阿汤可通过调节免疫,降低 CIA 大鼠血清及软骨白细胞介素-17(IL-17),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等炎性因子的含量,减缓炎性因子对关节炎的刺激,发挥干预 RA 的作用。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在 RA 病变过程中发挥重要作用,可降解关节骨与软骨中的胶原、蛋白多糖及其他的基质大分子,促进血管翳对软骨的侵袭,从而造成关节的破坏。然而 RA 疾病进程中蒙古族药忠伦阿汤对 MMPs 的作用机制国内尚无报道,本实验通过建立胶原诱导性关节炎大鼠模型,研究蒙古族药忠伦阿汤对模型大鼠血清及滑膜软骨组织中 MMP-3, MMP-9 水平变化的影响,进一步明确药物的作用机制是否与调控 MMP-3, MMP-9 的表达相关,为其临床使用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 84 只,体重(150  $\pm$

20) g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(军)2012-0004。实验室环境:动物分别饲养在笼中,室温为(22  $\pm$  1)  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度为(45  $\pm$  5)%,白天与黑夜交替各 12 h。动物自由进食和进水。

**1.2 药物及试剂** 蒙古族药忠伦阿汤(内蒙古国际蒙医院制剂中心研制并提供,批号 20081216),雷公藤多苷片(上海复旦复华药业有限公司,批号 31020415),牛 II 型胶原(批号 110M7002V)和不完全弗氏佐剂(批号 SLBG5293V)均购自美国 Sigma 公司, MMP-3 和 MMP-9 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司,批号 201409);免疫组化 SP 试剂盒(批号 1408259710), DAB 试剂盒(批号 1411140031),胃酶抗原修复液(批号 141104421D)均购于福州迈新生物技术开发有限公司。Anti-MMP-3 抗体(批号 ab52915), Anti-MMP-9 抗体(批号 ab37867)均购自英国 Abcam 公司;组织蛋白抽提试剂盒(批号 CW0891), Anti-Rabbit IgG(H + L)和 Anti-Mouse IgG(H + L)荧光二抗(批号分别为 926-32210, 926-32211)均购于美国 LI-COR 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 CW0014), SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于碧云天公司(批号 POO12A)。

**1.3 仪器** ASP200S 自动组织脱水机, KH-BL 型石蜡包埋机和 CX21 型光学显微镜(均购于 Olympus 公司); SF325 型切片机, H11220 型烤片机和 CT15ER 型高速冷冻离心机(日本日立公司); DYY-8C 型电泳仪(北京六一仪器厂), TS-1 型脱色摇床(海门市麒麟医用仪器厂), odyssey CLx 型红外激光

成像系统(美国 LI-COR 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 采用随机数字表法将大鼠随机分为 6 组,分别为正常组,模型组,雷公藤多苷片组( $9.45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),忠伦阿汤高剂量组( $5.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),忠伦阿汤中剂量组( $2.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),忠伦阿汤低剂量组( $1.35 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组 10 只。

**2.2 CIA 大鼠模型的建立和给药** 将牛源性 II 型胶原溶于  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸中,在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下搅拌使之充分溶解,置  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱过夜。取不完全弗氏佐剂等剂量加入牛源性 II 型胶原混合液(1:1),放置在冰上不断搅拌,直至完全融合,作为抗原乳剂<sup>[3]</sup>。第 1 次免疫于大鼠(除正常组外)尾根部 1 cm 处,皮下注射 II 型胶原乳剂 0.2 mL/只,正常组与模型组 *ig* 等体积生理盐水,每日 1 次,连续 4 周。1 周后以同样的方法进行第 2 次加强免疫,剂量减半为 0.1 mL/只。于初次致炎后 10 d 开始 *ig* 给药,连续 4 周,于实验 28 d 末次给药结束后 2 h 对大鼠进行相应处理。

**2.3 样本采集及处理血清** 给药结束后,10% 水合氯醛  $0.8\sim 1.5 \text{ mL/只}$  于腹腔麻醉注射,心脏取血,常规制备血清,  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  保存待测。组织标本:采血后将大鼠处死,切取大鼠左侧膝关节,将部分组用 4% 多聚甲醛固定 24 h,20% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙(每天更换新鲜 EDTA 溶液)40 d,以注射器针头刺组织,轻松刺穿为度。常规梯度脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片后行苏木素-伊红(HE)及免疫组织化学染色。其余新鲜组织于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存用于蛋白质免疫印迹(Western blot)检测。

## 2.4 指标测定

**2.4.1 大鼠血清对 MMP-3, MMP-9 含量的测定** 按照试剂盒说明书,采用双抗体夹心法测定大鼠血清 MMP-3, MMP-9 含量。

**2.4.2 大鼠软骨及滑膜 HE 染色及免疫组织化学染色** HE 染色:显微镜下(400 倍)观察病理组织形态学的变化。免疫组化(SP 法):操作步骤按照说明书进行,采用 HPIAS-1000 图像分析系统进行检测。随机检查 5 个高倍视野( $\times 400$ ),每个视野计数 100 个细胞,不着色计为 0 分,淡黄色计为 1 分,黄色计为 2 分,棕褐色计为 3 分。按染色阳性细胞所占百分比:着色阳性细胞占计数细胞  $< 5\%$  计为 0 分,  $5\% \sim 25\%$  计为 1 分,  $26\% \sim 50\%$  计为 2 分,  $50\% \sim 75\%$  计为 3 分,  $> 75\%$  计为 4 分。将二者评分之和作为最终评判标准。

**2.4.3 大鼠膝关节 MMP-3, MMP-9 Western blot 蛋白浓度测定** 称量 2 mg 组织置于匀浆器中球状部位,用干净的剪刀将组织块尽量剪并研磨后加入预冷的  $10\text{ }\mu\text{L}$  裂解液(含终浓度为  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PMSF)裂解组织进行匀浆,然后置于冰上,5 min 后再碾 2~3 min 后再置于冰上,重复几次使组织尽量碾碎。最后于冰上静置 20 min 后收集裂解的组织液,在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下,  $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}$  离心 20 min,收集上清分装组织于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱内保存。使用 BCA 定量试剂盒监测蛋白浓度。常规电泳、转膜、封闭后结合相应的 MMP-3, MMP-9 兔抗人单克隆抗体(1:1 000 稀释),内参  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin),  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜,次日 TBST 洗膜,结合相应的辣根过氧化物酶标荧光二抗(1:15 000 稀释)孵育 1 h, TBST 及 TBS 洗膜,将 PVDF 膜放于红外激光成像系统内扫描,用软件分析系统反应 MMP-3, MMP-9 蛋白表达水平,以  $\beta$ -actin 蛋白的表达量进行校正。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,多样本均数间两两比较采用 LSD 和 S-N-K 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 CIA 大鼠血清 MMP-3 和 MMP-9 含量的影响** 造模后大鼠血清 MMP-3, MMP-9 含量较正常组明显上升( $P < 0.01$ );与模型组比较,雷公藤多苷片组治疗效果显著( $P < 0.01$ ),忠伦阿汤组 MMP-3, MMP-9 含量下降明显( $P < 0.01$ ),忠伦阿汤高、中剂量组、雷公藤多苷片组差异无显著性。见表 1。

表 1 忠伦阿汤对 CIA 大鼠血清 MMP-3 和 MMP-9 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

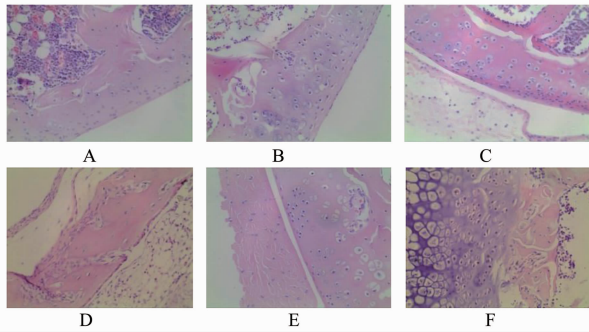
Table 1 Effect of Zhonglun'e Tang on serum expression of MMP-3 and MMP-9 on CIA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	MMP-3/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	MMP-9/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	$32.05 \pm 1.60$	$0.94 \pm 0.25$
模型	-	$78.29 \pm 0.83^{1)}$	$2.57 \pm 0.31^{1)}$
雷公藤多苷片	9.45	$43.50 \pm 1.60^{2)}$	$1.30 \pm 0.18^{2)}$
忠伦阿汤	5.4	$45.98 \pm 0.56^{2)}$	$1.42 \pm 0.32^{2)}$
	2.7	$48.99 \pm 0.66^{2)}$	$1.66 \pm 1.60^{2)}$
	1.35	$58.99 \pm 0.68^{2)}$	$1.87 \pm 0.20^{2)}$

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

**3.2 对 CIA 大鼠滑膜组织病理学的影响** 镜下可见,正常组滑膜组织由 1~2 层滑膜细胞组成,排列

整齐,未见炎性细胞的浸润及纤维组织的渗出,关节软骨分布均匀,无剥脱。模型组滑膜细胞增生,可达 3~6 层以上,排列疏散、紊乱;关节腔内见大量炎性细胞浸润,滑膜细胞排列不整齐,或形成血管翳,软骨表面损伤。忠伦阿汤各剂量组和雷公藤多苷片组对 CIA 大鼠组织病理学有不同程度的改善,滑膜细胞的增生明显减少,可见少许软骨细胞的散在分布,血管翳形成减少。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 雷公藤多苷片组; D. 忠伦阿汤 5.4 g·kg<sup>-1</sup> 组; E. 忠伦阿汤 2.7 g·kg<sup>-1</sup> 组; F. 忠伦阿汤 1.35 g·kg<sup>-1</sup> 组 (图 2~4 同)  
图 1 忠伦阿汤对 CIA 大鼠滑膜组织病理学的影响 (HE, ×400)  
Fig.1 Effect of Zhonglun'e Tang on synovial tissue pathology on CIA rats (HE, ×400)

**3.3 对 CIA 大鼠滑膜关节 MMP-3, MMP-9 表达的影响** MMP-3, MMP-9 均定位于细胞浆,阳性细胞的胞浆呈棕黄色。与正常组比较,模型组大鼠阳性表达 MMP-3, MMP-9 显著高于正常组,有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,忠伦阿汤高、中、低剂量组大鼠 MMP-3, MMP-9 阳性表达明显低于模型组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2, 图 2, 3。

表 2 忠伦阿汤对 CIA 大鼠滑膜 MMP-3, MMP-9 阳性表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 2 Effect of Zhonglun'e Tang on positive expression of MMP-3 and MMP-9 on CIA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MMP-3	MMP-9
正常	-	1.30 ± 1.05	2.70 ± 0.94
模型	-	9.80 ± 2.69 <sup>1)</sup>	9.70 ± 1.63 <sup>1)</sup>
雷公藤多苷片	9.45	2.40 ± 0.90 <sup>2)</sup>	3.70 ± 1.41 <sup>2)</sup>
忠伦阿汤	5.4	2.50 ± 0.70 <sup>2)</sup>	4.20 ± 1.03 <sup>2)</sup>
	2.7	8.60 ± 2.06 <sup>2)</sup>	7.70 ± 2.11 <sup>2)</sup>
	1.35	9.40 ± 2.01 <sup>2)</sup>	8.20 ± 1.68 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 同)。

**3.4 对 CIA 大鼠 MMP-3, MMP-9 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组 MMP-3, MMP-9 的蛋白

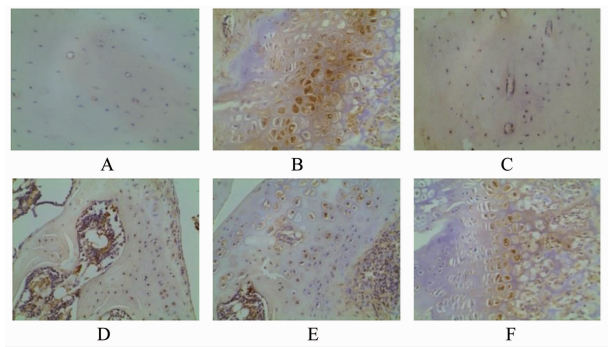


图 2 忠伦阿汤对 CIA 大鼠滑膜关节 MMP-3 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)  
Fig.2 Effect of Zhonglun'e Tang on MMP-3 protein of synovial joints on CIA rats (IHC, ×400)

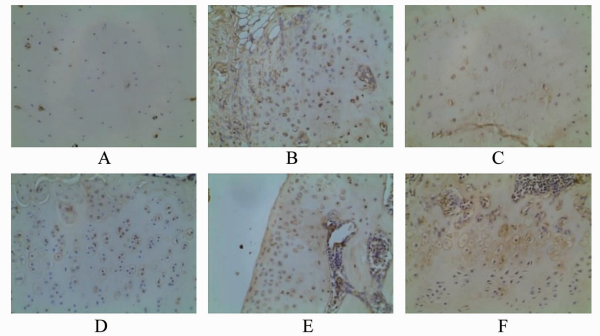


图 3 忠伦阿汤对 CIA 大鼠滑膜关节 MMP-9 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)  
Fig.3 Effect of Zhonglun'e Tang on MMP-9 protein of synovial joints on CIA rats (IHC, ×400)

表达显著增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,忠伦阿汤各剂量组 MMP-3, MMP-9 蛋白表达有不同程度的下降 ( $P < 0.05$ ); 忠伦阿汤低剂量组 MMP-3 蛋白表达明显高于忠伦阿汤高、中剂量组及雷公藤多苷片组; 与雷公藤多苷片组比较,忠伦阿汤用药组 MMP-9 蛋白表达没有显著区别,差异无统计学意义。见表 3, 图 4。

表 3 忠伦阿汤对 CIA 大鼠 MMP-3, MMP-9 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 3 Effect of Zhonglun'e Tang on expression of MMP-3 and MMP-9 on CIA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MMP-3/ $\beta$ -actin	MMP-9/ $\beta$ -actin
正常	-	0.45 ± 0.11	0.06 ± 0.00
模型	-	0.99 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.26 ± 0.09 <sup>1)</sup>
雷公藤多苷片	9.45	0.63 ± 0.23 <sup>2)</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>2)</sup>
忠伦阿汤	5.4	0.43 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>2)</sup>
	2.7	0.40 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>2)</sup>
	1.35	0.79 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.15 ± 0.00 <sup>2)</sup>

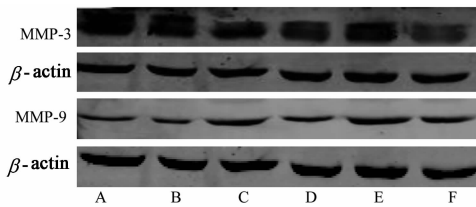


图 4 忠伦阿汤对 CIA 大鼠 MMP-3, MMP-9 蛋白的影响

Fig. 4 Effect of Zhonglun'e Tang on MMP-3 and MMP-9 on CIA rats

#### 4 讨论

MMPs 是一组含有金属离子锌、钙并广泛存在于各结缔组织,可降解细胞外基质 (ECM) 所有蛋白成分的蛋白酶超家族,其活化被认为是 ECM 降解的限速环节。IL-1, IL-2 及 TNF- $\alpha$  等炎性细胞因子可直接或间接促进滑膜软骨细胞合成并释放前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 和胶原酶,尤其 IL-1 可诱导合成过量的 MMPs,促使纤维母细胞的增厚及骨破坏、骨吸收的改变,致使机体关节的损害<sup>[8]</sup>。MMPs 参与多种生理病理过程,如新生血管生成、胚胎的形成等<sup>[9]</sup>。

MMP-3 与 MMP-9 是 MMPs 家族中的重要成员,二者均可降解软骨中的 II 型胶原,造成骨破坏,在类风湿性关节炎的病变过程中起着重要作用。RA 早期,大量成纤维细胞、软骨细胞分泌 MMP-3 使得关节滑膜液和血液中 MMP-3 明显升高,促进血管翳的形成,侵蚀关节软骨,破坏骨组织。MMP-3 不仅直接参与软骨降解,其活性主要表现为核心蛋白、软骨连结蛋白纤维结合素及 IV, VII, IX, XI 型胶原的降解,还能够将自身酶原形式转化为活性酶,激活 MMP 家族其他成员的酶原并引起链式反应,加重软骨破坏及血管翳的形成<sup>[10-11]</sup>。Tian 等<sup>[12]</sup>对 RA 滑膜细胞的研究提示 P13K-Akt 可能刺激诱导炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  产生 MMP-3 参与机体炎症反应,表明 MMP-3 可受炎性因子的诱导分泌,作为降解软骨和骨基质的重要成分,造成关节的损伤。孔卓等<sup>[13]</sup>通过对血清 MMP-3 检测,显示 RA 患者血清 MMP-3 的水平明显升高,与临床常用的检测指标相同,这与本实验的结果一致。国外研究者发现,RA 病人外周血清中的 MMP-3, MMP-9 比较正常组明显增多,且与活动性相关<sup>[14-15]</sup>。Abd-Allah 等<sup>[16]</sup>从基因水平上研究发现, MMP-3 的单倍体不仅能预测关节损伤,而且与损伤进展密切相关,由此可从基因蛋白水平证实 RA 与 MMP-3 的关联性。明胶酶-B 作为 MMPs 家族分子量最大的酶,是除 MMP-2 外,唯一能降解细胞外基质和基底膜 IV 胶原三螺旋结构的酶,可破坏基底膜的完整性。在体内 MMP-9 能降解任何细

胞外基质成分,如明胶及各型胶原(包括 IV, VII 型等)、纤维连接蛋白、蛋白多糖及小分子蛋白等细胞外基质,直接或是间接参与胚胎发育、组织模型重塑、创伤修复、肿瘤、炎症等多种生理、病理等过程<sup>[17]</sup>。近几年的报道发现,VEGF-A 可从血管中催化出促进血管新生的中性粒细胞,而通过 MMP-9 降解出的 VBM 和 ECM 则可帮助此类细胞到达创区促进血管的新生<sup>[18]</sup>。李飞等<sup>[19]</sup>及 Krishnamurthy 等<sup>[20]</sup>总结发现 MMP-9 的表达异常会导致动脉疾病的发生。有学者发现<sup>[21]</sup>,在 MMP-9 的作用下,细胞外基质的降解破坏了肌纤维的完整性,使得炎性细胞趁机侵入机体,肌纤维出现坏死及吞噬等一系列病理现象。滑膜为 MMP-9 产生的部位,RA 患者关节滑液与血清中均可见 MMP-9 的上升,已有研究表明 RA 患者的血清 MMP-9 显著升高,并在病变发展过程中发挥重要作用,可作为检测病情活动的监测指标之一<sup>[22]</sup>。Kim 等<sup>[23]</sup>研究发现 MMP-9 和 uPA 可通过未知的机制参与激活 pro-MMP-13 使其在关节炎疾病中产生作用。姚仁敏等<sup>[24]</sup>实验表明桂芍知母汤可降低血清中 CIA 大鼠 MMP-9 的水平,缓解关节局部的炎症,具有一定的治疗作用。

本研究结果显示模型组大鼠血清、关节滑膜软骨表达的 MMP-3, MMP-9 水平远高于正常组,提示 RA 的发病机制与二者密切相关,经忠伦阿汤治疗后各组大鼠 MMP-3, MMP-9 水平有明显改变。血清含量测定表明忠伦阿汤高、中剂量组表达水平均有所下降,其中尤以雷公藤多苷片组最为明显。

免疫组化及 Western blot 检测显示各药物组 MMP-3, MMP-9 的表达水平均降低,雷公藤多苷片组药效最为显著,滑膜增生情况最轻,阳性表达较弱,蒙古族药组次之,提示两种药物都能影响大鼠血清、滑膜软骨的表达水平。另外,与 MMP-9 比较, MMP-3 高剂量组治疗后其阳性表达下降更为显著,表明大剂量蒙古族药忠伦阿汤在调控 CIA 大鼠关节滑膜软骨水平方面干预作用更强。本实验还发现正常大鼠体内 MMP-9 的蛋白表达明显低于 MMP-3, 忠伦阿汤治疗组 MMP-9 无明显差异,而同等条件的治疗下, MMP-3 蛋白表达明显高于 MMP-9, 可以推测在炎症的刺激下,关节滑膜产生过量的 MMP-3 降解 ECM。

综上所述,高剂量的蒙古族药忠伦阿汤能够明显降低 CIA 大鼠血清的含量,减少大鼠滑膜软骨的阳性表达,可能是其对关节具有良好治疗作用的分子机制之一,但该药如何影响 MMP-3, MMP-9 的表

达,需待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 斯琴高娃,董秋梅. 甲氨蝶呤联合蒙药忠伦阿汤治疗类风湿性关节炎的疗效观察[J]. 环球中医药,2014,7(5):385-387.
- [2] 于满柱,巴虎山. 蒙药润僵汤熏洗治疗四肢骨折外固定后关节僵直[J]. 中国民族医药杂志,2002,8(4):11-13.
- [3] 李林,高自立,屈爱桃. 蒙药忠伦阿汤的抗炎镇痛作用及对胶原诱导性关节炎大鼠足肿胀的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):184-186.
- [4] 斯琴高娃,董秋梅. 蒙药忠伦阿汤熏蒸治疗脑卒中后张志痉挛临床观察[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(6):152-154.
- [5] 刘晶晶,董秋梅,杨巧芳,等. 蒙药忠伦阿汤对胶原诱导性关节炎大鼠白细胞介素17的影响[J]. 中国实验诊断学,2013,17(4):616-620.
- [6] 李林,董秋梅,王滨. 蒙药忠伦阿汤对胶原诱导性关节炎大鼠血液流变性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):230-231.
- [7] 高自立,董秋梅,王滨,等. 蒙药忠伦阿汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清炎性细胞因子的影响[J]. 中医杂志,2012,53(7):599-602.
- [8] 王银山. 类风湿性关节炎的研究进展[J]. 中国现代医药杂志,2008,10(10):131-134.
- [9] Rath T, Roderfeld M, Graf J, et al. Matrix metalloproteinases inflammatory bowel disease from basic research to clinical signify cance [J]. Z Gastroenterol, 2009,47(8):758-769.
- [10] Huang J, Xie B, Li Q, et al. Infliximab reduces CD147, MMP-3 and MMP-9 expression in peripheral blood monocytes in patients with active rheumatoid arthritis [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 698(1/3):429-434.
- [11] Suzuki K, Enghild J, Morodomi T, et al. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase3 (stromelysin) [J]. Biochemistry, 1990,29(44):10261-10270.
- [12] Tian J, Chen J W, Gao J S, et al. Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced IL-1 beta, MMP-3 production in human Rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI2kinase/Akt pathway [J]. Rheumatol Int, 2013,33(7):1829-1835.
- [13] 孔卓,吴俊,张海文,等. 血清金属基质蛋白酶-3与类风湿性关节炎的相关性研究[J]. 标记免疫分析与临床,2014,21(6):636-639.
- [14] Huang J, Xie B, Li Q, et al. Infliximab reduces CD147, MMP-3, and MM-9 expression in peripheral blood monocytes in patients with active rheumatoid arthritis [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 698(1/3):429-434.
- [15] Yamanaks H, Matsuda Y, Tanaka M, et al. Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2000,43(4):852-858.
- [16] Abd-Allah S H, Shalaby S M, Pasha H F, et al. Variation of matrix metalloproteinase 1 and 3 haplotype and their serum levels in patients with rheumatoid and osteoarthritis [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2012, 16(1):15-20.
- [17] Woessner J. Martrix metalloproteinase and their inhibitor in connective tissue remodeling [J]. FASEB J, 1991, 5(8):2145-2154.
- [18] Christofferson G, Vagesjo E, Vandooren J, et al. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9 delivering neutrophilSubset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue [J]. Blood, 2012, 120(23):4653-4662.
- [19] 李飞,牛田,刘志刚,等. MMP-2及MMP-9与主动脉疾病相关性的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015,15(18):3577-3580.
- [20] Krishnamurthy V K, Evans A N, Wansapura J P, et al. Asymmetric cell-matrix and biomechanical abnormalities in elastin insufficiency induced aortopathy [J]. Ann Biomed Eng, 2014,42(10):2014-2028.
- [21] Choi Y C, Daiakas M C. Expression of matrix metalloproteinases in themuscie of patients with inflammatory Myopathies [J]. Neurology, 2000, 54(1):647-654.
- [22] 李守勇,陈维霞,孙阳类. 风湿性关节炎患者血清中sCRI和MMP-2、MMP-9水平的检测及其临床意义 [J]. 中国实用医刊, 2012,39(24):68-70.
- [23] Kim K S, Lee Y A, Choi H M, et al. Implication of MMP-9 and urpkinase plasminogen activator (uPA) in the activation of pro-matrix metalloplloproteinase (MMP)-13 [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(10):3069-3075.
- [24] 姚仁敏,张杰. 桂芍知母汤对胶原诱导性关节炎模型大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、MMP-2及MMP-9的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013,15(4):52-54.

[责任编辑 周冰冰]