

# 苗药四大血对大鼠佐剂性关节炎作用的研究

吴宁<sup>1\*</sup>, 曾佳<sup>1</sup>, 王时敏<sup>1</sup>, 莫晓川<sup>1</sup>, 田振华<sup>2</sup>

(1. 贵阳医学院, 贵阳 550004; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

**[摘要]** **目的:**探讨苗医验方四大血对大鼠佐剂性关节炎的作用及其机制。**方法:**建立类风湿性关节炎动物模型-佐剂性关节炎大鼠(adjuvant arthritis, AA),设立空白组、模型对照组、四大血高、中、低剂量组(按生药计分别是40, 20, 10 g·kg<sup>-1</sup>)、阳性对照组(雷公藤多苷片)。测量各组大鼠右后足跖肿胀度;大鼠滑膜细胞原代培养,取3代的传代培养细胞做实验。蛋白免疫印迹法(Western-blotting)检测各组大鼠滑膜细胞B细胞淋巴瘤/白血病2(Bcl-2)、Bcl-2相关x蛋白(Bax)蛋白质表达水平。**结果:**四大血有效抑制AA大鼠右足跖肿胀( $P < 0.05$ ),且下调Bcl-2表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )、上调Bax表达( $P < 0.01$ ),降低Bcl-2/Bax表达比值。**结论:**四大血拮抗AA病情发展,其作用机制可能与促进滑膜细胞凋亡,抑制滑膜细胞过度增生密切相关。

**[关键词]** 苗药四大血; 佐剂性关节炎; 凋亡因子; 作用机制

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0120-04

**[doi]** 10.11653/syjf2014020120

## Effects of Miao National Herbs Sidaxue on Rheumatoid Arthritis in Rats

WU Ning<sup>1\*</sup>, ZENG Jia<sup>1</sup>, WANG Shi-min<sup>1</sup>, MO Xiao-chuan<sup>1</sup>, TIAN Zhen-hua<sup>2</sup>

(1. Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the effects of traditional Miao national herbs Sidaxue on rheumatoid arthritis and its mechanism. **Method:** An animal model of adjuvant arthritis (AA) was established, rats were divided into blank control group, model control group, high dose Sidaxue treatment group, middle dose Sidaxue treatment group, low dose Sidaxue treatment groups, positive control group (glucosidorum tripterygll totorum control group). The rat paw edemas of rats was measured; Synovial cells were primarily cultured, and the 3<sup>rd</sup> generations of subculture cell were adopted for experiment. Western-blotting method was adopted to detect the protein expression level of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax). **Result:** Miao national herbs Sidaxue could inhibit the swelling of paw ( $P < 0.05$ ); decrease the protein expression of Bcl-2 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), increase the protein expression of Bax in Arthritis rats' synoviocyte ( $P < 0.01$ ), and decrease the rate of Bcl-2/Bax. **Conclusion:** Miao national herbs Sidaxue can antagonize the development of AA, the mechanism of which may be related to promoting apoptosis of synoviocyte.

**[Key words]** Miao national herbs Sidaxue; rheumatoid arthritis; cytokines; mechanism

四大血是在苗医药调研的基础上,经整理发现的广泛流传于黔北、川南、渝南苗族地区的一个通气

散血的代表方,用于治疗风湿疼痛,血瘀损伤等气阻血瘀引起的各种病症<sup>[1]</sup>。本方组方简单,药源丰富,在传统苗医中应用范围广、历史长,特别是在风湿类疾病的治疗中应用较广<sup>[2]</sup>,但其使用仍是处于经验用药阶段,目前尚未见针对本方作用机制的研究。本实验以类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)动物模型-佐剂性关节炎大鼠(adjuvant arthritis, AA)为研究对象,从分子水平研究药物作用

**[收稿日期]** 20130706(006)

**[基金项目]** 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2010]2216)

**[通讯作者]** \* 吴宁,副教授,硕士生导师,从事贵州特色药材作用机制的研究, Tel: 13765080008, E-mail: 1638210715@qq.com

前后佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜细胞凋亡调节因子 Bcl-2 和 Bax 表达量比值的变化,探讨四大血治疗类风湿性关节炎的可能作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康清洁级 SD 大鼠 60 只,体重 180 ~ 220 g,雌雄各半,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供。合格证号 SCXK(渝)2007-005。

**1.2 药物** 四大血由苗药 nangx dlob ghat(仰嗟嘎)、hsob hxangt(梭向)、ghab jongx bel sob xok(嘎龚布梭学)、vob mongb dlenb(莪蒙梭)等藤本药材以一定比例组成,取药材 2 000 g,加适量水煎煮 3 次,去渣,合并 3 次煎煮液浓缩至 500 mL,所得溶液为实验时的受试药物,该药物质量浓度为  $4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (按生药量计)。质量控制标准为:每制备 500 mL 四大血水煮液,原药材 nangx dlob ghat(仰嗟嘎)不低于 550 g,hsob hxangt(梭向)不低于 600 g,ghab jongx bel sob xok(嘎龚布梭学)不低于 250 g。药材由贵阳中医学院苗医药教研室提供并经教研室田振华副教授鉴定;雷公藤多苷片(黄石飞云制药公司,20080301)。

**1.3 试剂** 弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, CFA, Sigma 公司产品,批号 033K8933),丙烯酰胺(赛兰博,批号 8080),甲叉双丙烯酰胺(Amresco,批号 0172),RPMI 1640(美国 Gibco),胎牛血清(杭州四季青生物工程公司,批号 111029),兔抗大鼠 Bax 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,批号 SC-20067),兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,批号 SC-7382)及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(Santa Cruz 公司,批号 SC-2005)。

**1.4 仪器** 凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司),酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),倒置显微镜(日本 Olympus),容积测量仪(自制)。

## 2 方法

**2.1 构建动物模型** 参照文献[3]构建佐剂性关节炎动物模型。用 75% 乙醇消毒大鼠右后足足跖,将配制好的 CFA 每只 0.1 mL 于右后足垫内皮下注射,诱发佐剂性关节炎。空白组大鼠则注射生理盐水每只 0.1 mL。

**2.2 分组与给药** 分为空白组、模型对照组、四大血低、中、高剂量组和阳性对照组(雷公藤多苷片),每组 10 只(雌雄各 5 只)。给药方案:于造模后第 8 天开始,四大血低、中、高剂量组分别灌胃给予 10, 20, 40  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (按生药量计)四大血,阳性对照组灌胃

给予 40  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  雷公藤多苷片,空白组及模型对照组灌胃给予等容积生理盐水,1 次/d,连续给药 21 d。

**2.3 各组大鼠右后足足跖肿胀程度的测量** 用毛细管放大测量法<sup>[4]</sup>测定足肿胀。分别于造模前 1 d、造模第 8 天(造模 1 周)、造模第 15 天(给药 1 周)、造模第 22 天(给药 2 周)、造模第 29 天(给药 3 周)各相应时间点测右后足足跖肿胀度(肿胀度 = 给药后足足跖体积 - 致炎前足足跖体积)。

**2.4 大鼠膝关节滑膜细胞获得和培养** 按参考文献[5]获得大鼠双侧膝关节滑膜细胞并进行细胞培养。原代细胞长好后,用  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白酶消化细胞,进行传代培养,传代 3 次。用含 15% 胎牛血清的培养液将滑膜细胞数调整到  $1 \times 10^6 / \text{mL}$ ,加入 6 孔板,每孔 3 mL,放入 37 °C 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h 后做蛋白免疫印迹实验。

**2.5 检测大鼠膝关节滑膜细胞 Bax, Bcl-2 蛋白质表达水平** 提取滑膜细胞总蛋白,然后取蛋白质样品 20  $\mu\text{g}$  加上样缓冲液煮沸变性后进行 10% SDS-PAGE;电转移至 PVDF 膜;用含 5% 脱脂奶粉的 TBS (pH 8.0)封闭 2 h;分别加入适量一抗,摇床上室温反应 2 h;洗膜 3 次,每次 20 min;加二抗,室温反应 2 h;洗膜后 ECL 法显影。以  $\beta$ -actin 为内参,条带经 Kodak Digital Science ID Image Analysis Software 及 GDS-1 数字化凝胶成像分析仪扫描,计算吸光度(A)。A 比值 = 目的蛋白 A/ $\beta$ -actin A, A 比值作为目的蛋白表达量的相对含量,实验重复 3 次取平均值。

**2.6 统计学处理** 实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。各组间均值比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 AA 大鼠模型的建立** 致炎各组大鼠和空白组相比,毛色晦暗并轻微脱毛,精神萎靡,食量减少,体重增长缓慢,尾部出现明显结节,双侧后踝关节出现明显肿胀,说明造模成功,模型成功率为 95%。

**3.2 对 RA 模型大鼠原发、继发病变关节外观变化的观察** 模型大鼠在右后足足跖皮内注射 CFA,1 周内,右后足足跖相继出现局部皮肤变红肿胀、皮肤变厚,继而全脚掌肿胀充血、足趾关节处肿胀,最终整个足部明显肿胀,并累及右后足踝部,行动时右后足抬离地面不能活动;致炎后 2 周左右,左后踝关节最先出现肿胀,继而足掌红肿并逐渐累及足趾,活动不灵便。相对模型对照组,药物组给予四大血、阳性对照组给予药物雷公藤多苷片灌胃 3 周后,大鼠左右足症状出现较为明显的好转,关节肿胀度减轻,充血

红肿相应减退。

**3.3 对RA模型大鼠右后足跖肿胀度变化的影响** 各组大鼠造模后,右后肢明显红肿;各给药组动物给药后红肿均逐渐减轻。当连续给药3

周后,各给药组大鼠足肿胀度均较模型对照组有所减小,其中四大血中、高剂量组及阳性对照组与模型对照组比较,差异显著( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 四大血对佐剂性关节炎大鼠右后足跖肿胀程度的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	造模后1周	给药1周	给药2周	给药3周
模型对照	-	9	1.26 ± 0.37	1.17 ± 0.51	1.08 ± 0.36	1.07 ± 0.34
雷公藤多苷片	0.04	9	1.19 ± 0.42	1.02 ± 0.51	0.87 ± 0.34	0.71 ± 0.26 <sup>1)</sup>
四大血	10	9	0.97 ± 0.39	0.87 ± 0.54	0.82 ± 0.31	0.79 ± 0.36
	20	9	1.52 ± 0.48	1.07 ± 0.36	0.89 ± 0.19	0.81 ± 0.17 <sup>1)</sup>
	40	8	1.17 ± 0.54	0.90 ± 0.45	0.76 ± 0.5	0.67 ± 0.42 <sup>1)</sup>

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

**3.4 大鼠滑膜细胞形态学观察、细胞得率及细胞活力** 倒置显微镜下可见24 h后,80%以上细胞基本贴壁,细胞形态完整,分散度好。48 h后可见细胞生长,细胞饱满呈长梭形,两极胞突细长,末端多与邻近细胞连接并交织成网状,排列整齐,细胞界限清晰,细胞核呈卵圆形位于细胞中央。培养9 d细胞长满培养瓶传代培养。细胞得率 $2 \times 10^6$ ,细胞存活率为90%。见图1。

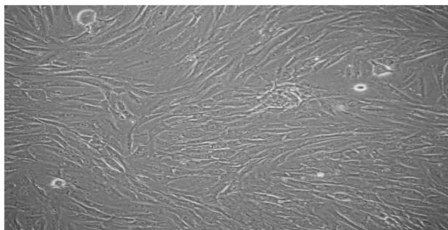


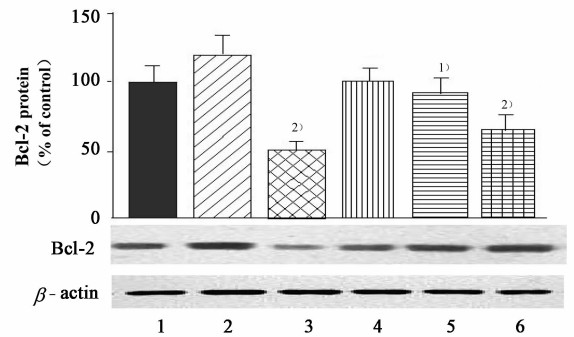
图1 大鼠滑膜细胞形态( $\times 200$ )

**3.5 对RA模型大鼠膝关节滑膜细胞 Bcl-2, Bax 蛋白质表达水平的影响** 与空白组相比,模型对照组蛋白表达差异没有统计学意义。与模型对照组相比,阳性对照组蛋白表达降低( $P < 0.01$ );与模型对照组相比,四大血中剂量组蛋白表达量降低( $P < 0.05$ ),高剂量组显著降低( $P < 0.01$ )。见图2。

Bax:与空白组相比,模型对照组蛋白表达降低明显( $P < 0.01$ )。与模型对照组相比,阳性对照组蛋白表达增加( $P < 0.01$ );与模型对照组相比,四大血低、中、高剂量组蛋白表达增加( $P < 0.01$ ),且有药物浓度依赖性。见图3。

#### 4 讨论

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为特征的全身性自身免疫性疾病,属于中医“痹证”范畴,其病因机制主要为风寒湿热之邪侵袭关节,痹阻筋脉所致,与藏医文献《四



1. 模型组;2. 空白对照组;3. 雷公藤多苷片 $40 mg \cdot kg^{-1}$ 组;4~6. 依次为四大血10,20,40  $g \cdot kg^{-1}$ 组与模型对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;四大血各剂量组间比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ (图3同)

图2 四大血对大鼠佐剂性关节炎滑膜细胞 Bcl-2 蛋白相对表达水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

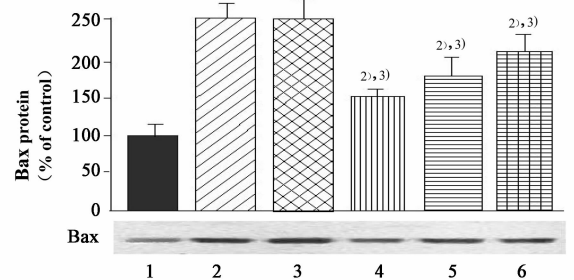


图3 四大血对大鼠佐剂性关节炎滑膜细胞 Bax 蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

部医典》、《医药精华》等记载的寒湿凝滞筋脉所致足、大腿、小腿疼痛肿大,屈伸艰难的“冈巴”、“黄水”等在病因病机、临床表现上甚为相合<sup>[6]</sup>,临床表现为受累关节疼痛、肿胀、功能下降,最终导致关节畸形和功能丧失,严重威胁人类健康<sup>[7]</sup>。病变呈持续、反复发作的过程,是临床上常见病、多发病、顽固难治疾病,但目前尚无比较理想的治疗药物<sup>[8]</sup>。本

实验结果显示:与模型对照组相比,药物组明显降低佐剂性关节炎大鼠左右足跖肿胀,以中、高剂量组效果最为明显,提示四大血有抗炎作用,能够减轻原发和继发炎症,与缓解 RA 症状有相关性。

RA 典型的病理特征在于滑膜组织的炎性增生,目前研究发现 RA 关节滑膜组织的异常增生与细胞凋亡异常密切相关,滑膜细胞凋亡的相对不足导致滑膜细胞过度增生<sup>[9]</sup>。在 RA 滑膜细胞凋亡相关的分子中,Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族中一对凋亡相关基因,在细胞凋亡的调控中起重要作用。Bcl-2 表达的蛋白质是抑制细胞凋亡的关键信号蛋白。Bax 作为 Bcl-2 的同源体,其作用是拮抗 Bcl-2,促进细胞凋亡<sup>[10]</sup>,Bcl-2/Bax 的比值是影响细胞凋亡的关键,表示抗凋亡与促凋亡两种作用的对比,决定细胞是否发生凋亡<sup>[11]</sup>(比值增加,抑制凋亡;比值降低,促进凋亡)。本实验中:与模型对照组相比,中、高剂量组 Bcl-2 蛋白表达下调;低、中、高剂量组 Bax 蛋白表达上调且有药物浓度依赖性。提示四大血可能通过改变 Bcl-2、Bax 蛋白的表达,导致 Bcl-2/Bax 降低,加速了细胞凋亡速度,进而减少了滑膜细胞的增生肿胀,减缓 RA 关节肿胀的症状。

本实验提示苗医验方四大血对大鼠佐剂性关节炎具有比较明显的缓解症状作用,并初步探讨四大血的作用机制,为四大血的临床应用提供科学依据,并为四大血的新药开发打下基础。

#### [参考文献]

[1] 田振华,谢达莎,包雪爱,等.苗医验方“四大血”抗炎、镇痛作用研究[J].中国民族医药杂志,2012,18(8):45.

- [2] 曾定伦,熊传渠,王毅刚,等.苗药方“四大血”形性特征与适应症范围[J].中国民族医药杂志,2004,S1:153.
- [3] 赵太平,邱佰房,徐玉东,等.雷公藤治疗大鼠类风湿性关节炎的效果及其免疫机制[J].广东医学,2011,32(2):2641.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:913.
- [5] 孙贵才,徐轶尔,谢晶日,等.四种不同处理方法体外培养大鼠滑膜细胞[J].中国组织工程研究,2012,16(7):1193.
- [6] 李慧敏,李宝丽.青鹏软膏治疗大鼠佐剂性关节炎作用初探[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):228.
- [7] 龙渊,文继红,张瑞荔.类风湿性关节炎的中医药防治思路[J].云南中医中药杂志,2011,32(1):7.
- [8] 刘建磊,李宝丽.制附子对类风湿性关节炎抗炎作用的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):184.
- [9] Guido Marcucci, Wendy Stock, Guwei Dai, et al. Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia; pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity[J]. J Clin Oncol,2005,23(15):3404.
- [10] Konopleva M, Tari A M, Estrov Z. Liposomal Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabioside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins[J]. Blood,2000,95(12):3929.
- [11] 李连琨,黄云峰,谢早红,等.黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):188.

[责任编辑 聂淑琴]