

# 青鹏软膏外用对 AA 大鼠滑膜血管新生的影响

李慧敏, 李宝丽\*

(1. 连云港市东方医院 中医科, 江苏 连云港 222000; 2. 天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052)

**[摘要]** **目的:**探讨外用藏药奇正青鹏软膏局部应用对佐剂性关节炎(AA)大鼠滑膜血管新生及软骨破坏的影响及机制。**方法:**50只雄性大鼠随机抽取10只作为空白组,其余40只注射弗氏完全佐剂造模后随机分为模型组、青鹏软膏高、低剂量组(1.6, 0.4 g·kg<sup>-1</sup>),将药物涂抹于右后肢踝关节周围,连续用药4周。为观察该药作用特点,本实验设置用药足与非用药足的自身对照及与模型组的对照,观察该药不同剂量对滑膜病理及血管内皮生长因子(VEGF)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响。**结果:**青鹏软膏高、低剂量显著降低用药足滑膜血管新生的数量,与模型组及非用药足比较有显著性差异;青鹏软膏高剂量显著降低用药足 VEGF, HIF-1 $\alpha$ , iNOS 的表达( $P < 0.05$ ),低剂量显著降低了用药足 VEGF, iNOS 的表达( $P < 0.05$ ),对用药足 HIF-1 $\alpha$  的表达有降低趋势,但与非用药足及模型组比较无显著性差异;青鹏软膏对 MMP-3 表达未见显著影响。**结论:**青鹏软膏局部外用减轻类风湿关节炎滑膜血管新生,对关节软骨有保护作用。

**[关键词]** 青鹏软膏; 佐剂性关节炎; 血管内皮生长因子; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 基质金属蛋白酶-3; 一氧化氮合酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0238-04

## Effect of Qingpeng Past on Synovium Angiogenesis in Rats with Adjuvant Arthritis

Li Hui-min, Li Bao-li\*

(1. Traditional Medicine Department, East Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222000, China; 2. Traditional Medicine Department, General Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of the Qingpeng paste on synovium angiogenesis and cartilage destruction in rats with adjuvant arthritis (AA). **Method:** The rat AA models were induced by injection of Freund's complete adjuvant. Then modeling rats were randomly divided in model group, the Qingpeng paste high-does group and the Qingpeng paste low-does group. The treatment groups were given Qingpeng paste 1.6, 0.4 g·kg<sup>-1</sup> on their right-hindlimb for 4 weeks. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), nitric-oxide synthase (iNOS) were observed. HE staining was used to examine the pathology of synovium on joint. **Result:** Qingpeng paste high-does and low-does significantly decreased the amount of angiogenesis in synovium compared with the left-hindlimb and the control group. Qingpeng paste high-does significantly decreased the expression of VEGF, HIF-1 $\alpha$ , iNOS ( $P < 0.05$ ); low-does significantly decreased the expression of VEGF and iNOS ( $P < 0.05$ ), the expression of HIF-1 $\alpha$  did not change significantly compare with the left-hindlimb and the control group, but the expression of HIF-1 $\alpha$  was decreased. However, the expression of MMP-3 did not decrease significantly in the two groups. **Conclusion:** Qingpeng paste can alleviate the synovium angiogenesis and protect joint cartilage in AA rats.

**[Key words]** Qingpeng paste; adjuvant arthritis rats; vascular endothelial growth factor; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; matrix metalloproteinase-3; nitric-oxide synthase

**[收稿日期]** 20110810(006)

**[第一作者]** 李慧敏, 硕士, 住院医师, 从事中西医结合消化、免疫疾病治疗研究, Tel: 18260388107, E-mail: lihuimin7782195@163.com

**[通讯作者]** \* 李宝丽, 硕士生导师, 主任医师, 从事消化、免疫类疾病的中西医治疗研究, E-mail: li3106@sina.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种严重危及人类健康的致残性关节炎。以关节滑膜为主要病变部位,初期主要表现为滑膜的炎性增生,随着滑膜炎性增生的进行性加剧,滑膜局部缺血缺氧,诱发滑膜血管新生,新生的血管及增生肥大的滑膜细胞、炎细胞及纤维组织构成侵袭性的血管翳,侵袭关节软骨,造成关节的损伤,功能障碍。因此血管生成是 RA 关节破坏发生发展的重要环节之一。控制甚至是抑制滑膜的血管新生,可以改善 RA 的病情。青鹏软膏(Qingpeng paste)为藏传经典外用方剂,具有清热解毒、活血化痰、祛风除湿、消肿止痛的功效。本实验以弗氏完全佐剂诱导佐剂性关节炎大鼠模型,通过观测滑膜血管新生的情况及检测滑膜血管新生相关因子血管内皮生长因子(VEGF)、缺氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )及软骨破坏相关因子基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,试图探讨该药对关节炎大鼠滑膜血管新生及软骨破坏的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠 50 只,清洁级,雄性,许可证号 SCXK(京)2007-0001。体重(110 $\pm$ 10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,适应喂养 3 d 用于实验。

**1.2 试剂及药品** 青鹏软膏(Qingpeng Paste, QP) 西藏奇正藏药股份有限公司提供,规格为 20 g/支,生产批号 090809,由棘豆、亚大黄、铁棒锤、诃子、毛诃子、余甘子、安息香、宽筋藤和麝香组成。卡介苗冻干粉(北京天坛生物制品有限公司),兔抗 VEGF 多克隆抗体(美国 Abcam 公司产品,批号 39250),兔抗 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体(武汉博士德公司产品,批号 BA0912),二抗试剂盒(pv-6001,北京中杉生物制品有限公司,批号 K106814F),DAB 显色剂(北京中杉生物制品有限公司,批号,673767A),兔抗 MMP-3 多克隆抗体(武汉博士德公司,批号 BA1531),兔抗 iNOS 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 N6351)。

**1.3 仪器** 台式干燥箱(南通设备仪器厂),Olympus, BX-50 显微镜(日本)。

## 2 方法

**2.1 造模与分组** 50 大鼠随机抽取 10 只为空白组(N),其余 40 只造模。液体石蜡配成含卡介苗 10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>的弗氏完全佐剂(CFA)。尾根部皮内注射 CFA 0.1 mL/只致炎,空白组注射等量液体石蜡。14 d 随机分为模型组、青鹏软膏高、低剂量组(1.6, 0.4 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>),每组 12 只,从中选取 10 只进行数据

统计。

**2.2 给药 造模** 14 d 后开始给药,每日 8:00~9:00,16:00~17:00 各给药 1 次,根据大鼠体重分别按 1.6,0.4 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 给药,涂抹于大鼠右后肢踝关节周围,注意轻轻按摩数下至药物充分吸收。空白组和模型组予生理盐水,连续给药 28 d。

**2.3 取材** 用药 4 周后,分离关节滑膜及软骨组织,10% 中性甲醛固定 48 h,石蜡包埋,切片。

**2.4 滑膜染色** 切片分别行苏木素-伊红(HE)染色及 pv-6001 法免疫组织化学染色,以检测关节病理改变及 VEGF, HIF-1, MMP-3, iNOS 的表达。

## 2.5 观察指标

**2.5.1 滑膜血管生成的评分**<sup>[1]</sup> 半定量评分法,每组选取 5 个检体,在低倍视野下( $\times$ 100),随机观察 10 个视野,取其视野内小血管均值,0 分为正常,未见血管新生;1 分为轻度,少于 3 个小血管;2 分为中度,4~6 个小血管;3 分为重度,多于 7 个小血管。

## 2.5.2 免疫组织化学染色结果判定及评分

<sup>[2]</sup>

HIF-1 $\alpha$ , VEGF 阳性表达主要为滑膜细胞及血管内皮细胞胞质呈棕黄色或棕褐色颗粒状, MMP-3, iNOS 阳性细胞为软骨细胞胞浆呈棕色颗粒状,根据阳性细胞的比率和染色强度进行评分。先按阳性细胞的比例将无, 1%~25%, 26%~50%, 51%~75%, 76%~100% 分别计为 0~4 分,再按染色强度将无、弱、中、强分别计为 0~3 分,最后将两部分得分相乘为滑膜总评分。

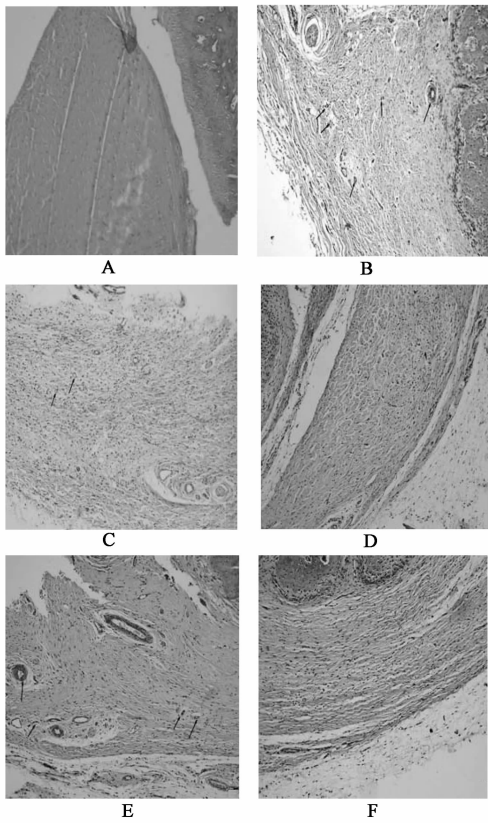
**2.6 统计学处理** 所有数据处理均采用 SPSS 13.0 统计软件包进行。正态分布资料用  $\bar{x} \pm s$  表示;多组间均数的比较采用单因素方差分析;半定量资料两组间比较采用 Mann-Whitney 秩和检验;对两组数据间的相关性进行 Spearman 等级相关分析。检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

**3.1 AA 大鼠滑膜血管新生情况** 空白组大鼠滑膜衬里下层可见散在血管,血管评分为 0,模型组大鼠滑膜下层血管增生及新生血管形成,并见血管翳呈肿瘤样侵袭性生长突向关节腔软骨。青鹏软膏高、低剂量组大鼠用药足滑膜炎性增生及血管新生较非用药足和模型组均有明显改善(图 1),滑膜血管半定量评分结果比较有明显的降低趋势。见表 1。

## 3.2 滑膜 VEGF 表达情况及其与血管生成的关系

空白组大鼠滑膜组织 VEGF 有少量表达;AA 模型组滑膜 VEGF 表达增强,与空白组比较有显著性差异( $P < 0.05$ );青鹏软膏低、高剂量组用药足滑膜 VEGF 表达较非用药足及模型组明显减少( $P <$



A. 正常组; B. 模型组; C. 青鹏软膏 0.4 g·kg<sup>-1</sup> 剂量非用药足;  
D. 青鹏软膏 0.4 g·kg<sup>-1</sup> 剂量用药足;  
E. 青鹏软膏 1.6 g·kg<sup>-1</sup> 剂量非用药足;  
F. 青鹏软膏 1.6 g·kg<sup>-1</sup> 剂量用药足

图 1 青鹏软膏治疗 4 周大鼠踝关节滑膜病理照片 (HE 染色, ×100)

表 1 滑膜血管半定量评分比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) 分

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	用药足	自身对照
空白	-	0	0
模型	-	2.64 ± 0.80	2.64 ± 0.85
青鹏软膏	1.6	1.60 ± 0.60 <sup>1,2)</sup>	2.20 ± 0.70
	0.4	1.80 ± 0.50 <sup>1,2)</sup>	2.40 ± 0.80

注:与模型组比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与自身对照足比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 2 ~ 5 同)。

0.05)。AA 大鼠滑膜层 VEGF 表达评分与滑膜血管生成评分呈显著正相关 ( $r = 0.842, P < 0.05$ )。

表 4 实验大鼠软骨 iNOS, MMP-3 表达的免疫组织化学评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) 分

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	iNOS		MMP-3	
		自身对照	用药足	自身对照	用药足
空白	-	-	1.10 ± 0.56 <sup>1)</sup>	-	0.90 ± 0.56 <sup>1)</sup>
模型	-	-	6.80 ± 2.85	-	5.60 ± 2.98
青鹏软膏	1.6	6.30 ± 3.02	4.20 ± 1.75 <sup>1,2)</sup>	5.20 ± 2.25	4.30 ± 2.16
	0.4	6.50 ± 2.75	4.30 ± 1.63 <sup>1,2)</sup>	5.40 ± 2.22	4.40 ± 2.06

见表 2。

表 2 大鼠滑膜 VEGF 表达的免疫组织化学评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	VEGF	
		自身对照	用药足
空白	-	-	1.20 ± 0.42 <sup>1)</sup>
模型	-	-	8.40 ± 2.75
青鹏软膏	1.6	7.80 ± 3.42	5.10 ± 2.37 <sup>1,2)</sup>
	0.4	8.00 ± 2.90	5.30 ± 2.54 <sup>1,2)</sup>

### 3.3 滑膜 HIF-1 $\alpha$ 的表达及其与血管生成的关系

空白组大鼠滑膜未见 HIF-1 $\alpha$  表达; AA 模型组滑膜、血管内皮细胞 HIF-1 $\alpha$  表达增强,与空白组比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ );青鹏软膏高剂量组用药足 HIF-1 $\alpha$  表达较非用药足及模型组显著减少 ( $P < 0.05$ ),青鹏软膏低剂量组用药足 HIF-1 $\alpha$  表达较非用药足及模型组有减少趋势,但无统计学差异。AA 大鼠滑膜 HIF-1 $\alpha$  表达评分与血管生成评分呈正相关 ( $r = 0.857, P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 实验大鼠滑膜 HIF-1 $\alpha$  表达的免疫组织化学评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	HIF-1 $\alpha$ /分	
		自身对照	用药足
空白	-	-	0
模型	-	-	7.70 ± 3.26
青鹏软膏	1.6	7.50 ± 3.24	4.90 ± 2.07 <sup>1,2)</sup>
	0.4	7.40 ± 3.27	5.20 ± 2.03

### 3.4 实验大鼠关节软骨 iNOS, MMP-3 表达

空白组大鼠关节软骨有少量 iNOS 表达; AA 模型组软骨表层及软骨缺损处为强阳性表达,青鹏软膏高、低剂量组用药足关节软骨 iNOS 表达减少,与非用药足及模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。空白组大鼠关节软骨仅有少量 MMP-3 蛋白表达; AA 模型组大鼠关节软骨 MMP-3 阳性染色细胞数量多而密集,染色呈深棕黄色,免疫组织化学评分与正常组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ );青鹏软膏高、低剂量组用药足 MMP-3 表达较非用药足及模型组有减少趋势,但均无统计学差异。见表 4。

## 4 讨论

VEGF<sup>[3]</sup>是一种特异作用于血管内皮细胞的新生血管形成标记因子。多种生长因子及炎症因子对其表达有上调作用。本研究显示,AA 模型组大鼠滑膜 VEGF 表达较空白组显著增强,与滑膜血管生成评分呈显著正相关。青鹏软膏高、低剂量显著降低了用药足滑膜 VEGF 的表达,高剂量有优于低剂量的趋势;滑膜新生血管半定量观测发现用药足滑膜血管新生明显减少,提示该药可能通过阻断 VEGF 与特异性受体结合,抑制内皮细胞分化、生长,迁移减少了新生血管的形成或同时减轻其他因子对 VEGF 的上调而抑制了局部 VEGF 的表达。

RA 关节腔的滑膜细胞大量增殖,滑液量增加,形成局部缺氧环境。RA 患者关节腔滑液中氧分压和疾病严重程度(滑膜病理学评分)呈负相关<sup>[4]</sup>。低氧可促进 HIF-1 $\alpha$  表达, HIF-1 $\alpha$  通过与靶基因结合,调节血管收缩并促进红细胞生成,加速血管形成<sup>[5]</sup>。本实验中,AA 大鼠滑膜 HIF-1 $\alpha$  表达增加,且与滑膜血管生成评分呈显著正相关。青鹏软膏高剂量外用,显著降低了用药足滑膜 HIF-1 $\alpha$  的表达,提示青鹏软膏通过有效成分透皮,降低血管通透性,改善血液循环,减轻局部缺氧,抑制 HIF-1 $\alpha$  表达;或同时通过抗炎作用,减轻滑膜炎症和增生,改善关节局部缺氧状态而降低了 HIF-1 $\alpha$  表达。

正常情况下 iNOS 无活性,在炎症介质刺激下活化,慢而持久地产生大量 NO<sup>[6]</sup>。本实验中,AA 大鼠 iNOS 表达显著增高。青鹏软膏外用,滑膜下软骨 iNOS 表达较非用药足及模型足显著减少。提示青鹏软膏局部外用,可能直接抑制了 iNOS 的表达亦或一定程度上阻断了上游因子对 iNOS 的刺激,减缓了 RA 对关节软骨的破坏作用。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一组锌离子依赖性的蛋白水解酶,是细胞外基质(ECM)降解及重构的重要介质<sup>[7]</sup>。MMPs 的异常表达可促进 RA 的发生发展,其中以 MMP-3 最为重要,被认为是导致软骨降解的最重要的酶。本实验中,青鹏软膏高、低剂量对软骨细胞 MMP-3 的表达无显著影响。提示:MMP-3 可能不是青鹏软膏抑制 AA 大鼠软骨破坏的

靶点。

RA 是一种以小关节滑膜炎为特征的自身免疫性顽疾。血管生成是 RA 关节破坏发生发展的重要环节之一。阻断或改善滑膜的血管新生可以改善病情。因此本实验应用具有活血化瘀、消肿止痛作用的外用药,前期实验结果表明,改药具有明显的抗炎作用<sup>[8]</sup>,本实验提示:该药局部外用通过降低血管生成重要因子表达,抑制滑膜的血管新生,在此基础上减轻血管翳对关节软骨的破坏,对关节软骨有一定的保护作用。青鹏软膏局部外用抑制 RA 局部血管新生,保护关节软骨。

## [参考文献]

- [1] Tsubaki T, Arita N, Kawakami T, et al. Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4):825.
- [2] Krajewska M, Krajewski S, Epstein J I, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers [J]. *Am J Pathol*, 1996, 148(5):1567.
- [3] Rueda B, Gonzalez-Gay M A, Lopez-Nevot M A, et al. Analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) functional variants in rheumatoid arthritis [J]. *Hum Immunol*, 2005, 66(8):864.
- [4] Gaber T, Dziurla R, Tripirnaeher R, et al. Hypoxia inducible factor(HIF) in rheumatology: low O<sub>2</sub>! See what HIF can do! [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(7):971.
- [5] 曲伟栋. 低氧条件下 HIF-1 促进血管生成作用的研究进展 [J]. *口腔医学研究*, 2009, 25(2):234.
- [6] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床 [M]. 北京:人民军医出版社, 1999:20.
- [7] Mix Kimberlee S K S, Sporn Michael B M B, Brinckerhoff Constance E C E, et al. Novel inhibitors of matrix metalloproteinase gene expression as potential therapies for arthritis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, (427):129.
- [8] 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.

[责任编辑 聂淑琴]