

雷公藤多苷联合来氟米特对佐剂性关节炎大鼠的治疗及机制研究

屈飞^{1*}, 崔艳茹², 徐镜³

(1. 江西中医学院药学院药理学教研室, 南昌 330004; 2. 江西中医学院基础医学院生理学教研室, 南昌 330004; 3. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] **目的:** 研究雷公藤多苷联合来氟米特配伍使用对佐剂性关节炎(AA)大鼠的治疗效果及其可能的作用机制。**方法:** 建立AA大鼠关节炎模型,分为对照组、模型组、来氟米特组、雷公藤多苷组和雷公藤多苷联合来氟米特配伍组;来氟米特 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$,1次/d;雷公藤多苷组:雷公藤多苷 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$,1次/d;配伍组:来氟米特 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$,8 h后,雷公藤多苷 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$,1次/d均于造模后14 d开始给药,连续处理21 d。治疗后,观察AA大鼠足爪肿胀程度及关节炎指数(AI),采用放射免疫法检测血清中白介素- 1β (IL- 1β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达水平,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中干扰素- γ (IFN- γ)、IL-4和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)含量。**结果:**①相较于AA模型组,来氟米特组、雷公藤多苷组和配伍组中大鼠足爪肿胀程度及AI评分均显著下降(P 均 <0.01),其中以配伍组大鼠关节炎症状改善最为明显(P <0.05)。②模型组大鼠血清IL- 1β 、TNF- α 、IL-6和PGE $_2$ 水平明显高于正常对照组(P <0.01),而经过治疗后血清中各细胞因子含量均发生不同程度的下降,且以配伍组降低最为显著(P <0.01 或 P <0.05);③模型组大鼠血清中IFN- γ 表达水平明显高于正常对照组,而IL-4含量明显低于对照组(P <0.01),治疗后各组中AA大鼠血清中IFN- γ 水平显著降低,而IL-4水平明显升高(P <0.05),其中以配伍组变化最为明显(P <0.01)。**结论:** 雷公藤多苷和来氟米特联合使用可显著降低血清中炎症因子水平,减少关节破坏,减轻AA大鼠的关节炎症状。

[关键词] 类风湿关节炎;雷公藤多苷;来氟米特;细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0128-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111202.1023.001 **[网络出版时间]** 2011-12-02 10:23

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111202.1023.001.html>

Study on the Treatment of Tripterygium Wilfordii Polyglycoside Combined with Leflunomide on Rat Adjuvant Arthritis and its Mechanisms

QU Fei^{1*}, CUI Yan-ru², XU Jing³

(1. Department of Pharmacology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China; 2. Department of Physiology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 3. Key Laboratory of Modern Preparation (Jiangxi University of TCM) Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the therapeutic effects and possible mechanism of tripterygium wilfordii polyglycoside (TWP) combined with leflunomide (LEF) on rat adjuvant arthritis (AA). **Method:** The murine collagen-induced arthritis model was established, then the arthritic rats were divided into control group, AA model group, LEF group, TWP group and TWP + LEF group; after treatment, the rats paw edema and arthritis index (AI) were evaluated; the levels of serum interleukin (IL)- 1β , IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were detected by radioimmunoassay method, serum interferon-gamma (IFN- γ), IL-4 and prostaglandin E_2 (PGE $_2$) by ELISA, and serum matrix metalloproteinases (MMP)-9 and MMP-2 by gelatin zymography assay. **Result:**

[收稿日期] 20110713(006)

[基金项目] 973中医药专项(2010CB530603);江西中医学院博士科研启动基金和江西中医学院重点学科基金

[通讯作者] * 屈飞,副教授,博士,从事中药药理学研究, Tel:0791-7118919, E-mail: quf0917@163.com

① Compared with AA model group, the hind paw swelling and AI in LEF group, TWP group and TWP + LEF group were significantly decreased ($P < 0.01$), especially in TWP + LEF group ($P < 0.05$). ② The levels of serum IL-1 β , TNF- α , IL-6, and PGE₂ were notably higher in AA model group than control group (all $P < 0.01$), which was significantly decreased in three treatment groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and their serum concentration was lower in TWP + LEF group than both LEF and TWP group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). ③ Compared with control group, the increase of serum IFN- γ and decrease of serum IL-4 was observed in model group ($P < 0.01$). But the significant down-graduated expression of IFN- γ and up-graduated expression of IL-4 were found after treatment, particularly in TWP + LEF group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The combined use of TWP and LEF can significantly relieve the arthritis syndrome in AA rats by reducing the expression of serum cytokines, as well as inhibiting joint damage, and its therapeutic effect is better than used separately.

[**Key words**] rheumatoid arthritis; tripterygium wilfordii polyglycoside; leflunomide; cytokine

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)为一种慢性自身免疫性疾病,表现为多关节进行性炎症,严重时可伴有关节结构破坏及功能障碍^[1]。西医治疗 RA 虽然针对性强,但往往药物作用单一,难以完全阻止关节病变进一步发展,且不良反应多,治疗后易复发;如何有效应用中西药联合治疗类风湿关节炎已成为我国 RA 治疗中的一个重要研究方向。本文中通过建立佐剂性关节炎(AA)大鼠模型,观察中药治剂雷公藤多苷(tripterygium wilfordii polyglycoside, TWP)联合西药来氟米特(leflunomide, LEF)对大鼠炎症的治疗效果,探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 成年雄性 Wistar 大鼠,体重 180 ~ 200 g,由江西中医学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(赣)2005-0001。

1.2 试剂 雷公藤多苷片购自江苏美通制药有限公司(国药准字 Z32021007);来氟米特购自苏州长征欣凯制药有限公司(国药准字 H20000550);完全弗氏佐剂购自 Sigma 公司;白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒均购于中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所;IFN- γ 、IL-4、前列腺素 E₂(PGE₂) ELISA 试剂盒均购于北京中杉生物技术有限公司。

1.3 仪器 Thermo Multiskan MK3 多功能酶标仪(美国赛默飞世尔);TGL-16 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠 AA 模型的建立 Wistar 大鼠左后足跖皮下注射 100 μ L 弗氏完全佐剂,注射后第 1 天大鼠足跖注射部位即可出现轻微红肿等炎症反应,2 ~ 3 d 后肿胀开始减退,至造模后 14 d 左右,大鼠非注射足爪亦开始充血肿胀,炎症呈进行性加重,部分大

鼠耳、尾甚至可出现红斑和炎性结节。作为正常对照组大鼠则于相同部位,采用相同手法注射 100 μ L 生理盐水。

2.2 分组 所建立的 AA 模型鼠随机分为 4 组(10 只/组),均于造模后 14 d 开始给药,连续处理 21 d。来氟米特组:来氟米特 20 mg \cdot kg⁻¹ ig,1 次/d;雷公藤多苷组:雷公藤多苷 20 mg \cdot kg⁻¹ ig,1 次/d;配伍组:来氟米特 20 mg \cdot kg⁻¹ ig,8 h 后,雷公藤多苷 20 mg \cdot kg⁻¹ ig,1 次/d;模型组:不用药,正常饲料喂养。治疗结束后 3 d,大鼠眼眶后静脉丛采血,3 000 r \cdot min⁻¹离心 20 min,吸取上层血清,分装, -70 $^{\circ}$ C 保存备用,脱颈椎处死全部大鼠。

2.3 大鼠关节情况检测 分别于给药当天,8,16,24 d,用排水法测量大鼠左足足爪肿胀容积,重复 3 次,求平均值。并按 5 级评分法对肢体情况进行评价,0 分表示关节正常,1 分表示关节轻度红肿,2 分表示关节甚至整个足爪中度肿胀,3 分表示足爪肿胀严重,4 分表示足爪重度红肿,关节变形,不能负重。通过 4 只肢体的病变程度累积积分计算关节炎指数(AI)。

2.4 血清 IL-1 β , IL-6, TNF- α 含量检测 分别将 0.1 mL 的缓冲液、标准液、血清样品、¹²⁵I-IL-1 β , ¹²⁵I-IL-6, ¹²⁵I-TNF- α 和 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的抗血清加入编号为总计数管(T)、非特异性结合管(NSB)、零标准管(S₀)、标准管(S_{1,5})、样品管(U)的聚丙烯试管中,充分混匀,4 $^{\circ}$ C 温育 24 h 后,加入 0.5 mL 免疫分离剂,充分混匀,室温放置 20 min,3 500 r \cdot min⁻¹ 4 $^{\circ}$ C,离心 25 min,弃尽上清,通过检测各管沉淀部分的放射性计数,得到各血清样品的浓度。

2.5 检测血清中 IFN- γ , IL-4, PGE₂ 水平检测 用 ELISA 酶联免疫吸附法,分别检测血清中 IFN- γ , IL-4 和 PGE₂ 含量,操作均严格按照试剂盒说明进行。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件处理数据, 所得计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠足爪肿胀程度比较 AA 模型大鼠

表 1 各组间大鼠左足肿胀程度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

mL

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	0 d	8 d	16 d	24 d
正常对照	-	1.32 ± 0.49	1.41 ± 0.35	1.45 ± 0.20	1.53 ± 0.25
模型	-	1.75 ± 0.38 ¹⁾	2.18 ± 0.29 ¹⁾	2.37 ± 0.27 ¹⁾	2.54 ± 0.42 ¹⁾
来氟米特	20	1.73 ± 0.23	1.88 ± 0.74 ²⁾	1.74 ± 0.32 ²⁾	1.59 ± 0.47 ²⁾
雷公藤多苷	20	1.71 ± 0.17	1.75 ± 1.03 ²⁾	1.68 ± 0.48 ²⁾	1.48 ± 0.33 ²⁾
雷公藤多苷 + 来氟米特	40	1.74 ± 0.45	1.72 ± 0.82 ²⁾	1.56 ± 0.31 ²⁾	1.35 ± 0.57 ^{2,3)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与来氟米特组或雷公藤多苷组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 4 同)。

3.2 各组大鼠关节炎指数比较 治疗前,各治疗组与模型组间关节炎指数(AI)无明显差异;药物治疗后,各治疗组 AI 指数较 AA 模型组显著下降($P <$

左足出现明显肿胀。LEF、雷公藤多苷单独用药或两者配伍给药均能明显减轻大鼠的左足爪肿胀,与模型组比较差异均有显著性($P < 0.01$),给药后 24 d,配伍组大鼠左足爪肿胀程度均明显低于来氟米特组和雷公藤多苷组($P < 0.05$)。见表 1。

0.01),且在给药后 8,16,24 d,配伍组关节炎指数均明显低于来氟米特组和雷公藤多苷组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组间大鼠关节炎指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

AI

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	0 d	8 d	16 d	24 d
模型	-	7.4 ± 0.9	8.2 ± 1.2	9.1 ± 2.3	8.7 ± 2.9
来氟米特	20	7.5 ± 1.1	5.6 ± 2.1 ²⁾	4.8 ± 1.8 ²⁾	4.3 ± 2.3 ²⁾
雷公藤多苷	20	7.8 ± 0.7	5.3 ± 1.3 ²⁾	4.5 ± 1.5 ²⁾	4.1 ± 0.8 ²⁾
雷公藤多苷 + 来氟米特	40	7.4 ± 1.1	4.8 ± 0.7 ^{2,3)}	3.6 ± 1.2 ^{2,3)}	3.1 ± 1.0 ^{2,3)}

3.3 各组大鼠血清 IL-1, IL-6 和 TNF-α 含量比较

AA 模型组大鼠血清中 IL-1, IL-6, TNF-α 水平较对照组升高($P < 0.01$);与模型组比较,来氟米特组、雷公藤多苷组和配伍组大鼠血清中 IL-1, IL-6, TNF-α 水平均明显下降($P < 0.01$),其中配伍组细胞因子下降最为明显,组间比较有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 各组大鼠血清 PGE₂, IFN-γ 和 IL-4 水平比较

表 4 显示,AA 模型组大鼠血清中 PGE₂ 和 IFN-γ 水平相较于对照组明显升高,血清中 IL-4 水平降低($P < 0.01$);LEF、雷公藤多苷单独用药或两者配伍均可显著减少 AA 模型大鼠血清中 PGE₂ 和 IFN-γ 水平,而升高 IL-4 水平($P < 0.05$),其中以配伍组最明显,组间比较有统计学意义($P < 0.01$)。

表 3 各组间大鼠血清 IL-1, IL-6, TNF-α 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

μg·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1	IL-6	TNF-α
正常对照	-	0.49 ± 0.14	65.42 ± 16.25	0.93 ± 0.14
模型	-	1.37 ± 0.42 ¹⁾	132.34 ± 25.66 ¹⁾	2.56 ± 1.36 ¹⁾
来氟米特	20	0.57 ± 0.18 ²⁾	109.40 ± 18.27 ²⁾	1.59 ± 0.28 ²⁾
雷公藤多苷	20	0.68 ± 0.30 ²⁾	122.74 ± 20.54 ²⁾	1.82 ± 0.43 ²⁾
雷公藤多苷 + 来氟米特	40	0.42 ± 0.11 ^{2,3)}	78.29 ± 17.02 ^{2,3)}	1.29 ± 0.22 ^{2,3)}

表 4 各组间大鼠血清 PGE₂, IFN-γ, IL-4 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PGE ₂ /A	IFN-γ / ng·L ⁻¹	IL-4 / ng·L ⁻¹
正常对照	-	0.382 ± 0.024	56.41 ± 4.89	35.12 ± 3.69
模型	-	0.750 ± 0.036 ¹⁾	87.75 ± 9.16 ¹⁾	16.28 ± 2.94 ¹⁾
来氟米特	20	0.563 ± 0.018 ²⁾	72.55 ± 7.49 ²⁾	18.25 ± 1.86
雷公藤多苷	20	0.548 ± 0.102 ²⁾	79.20 ± 8.23 ²⁾	20.86 ± 3.43 ²⁾
雷公藤多苷 + 来氟米特	40	0.429 ± 0.061 ^{2,3)}	68.48 ± 6.43 ^{2,3)}	24.55 ± 1.80 ^{2,3)}

4 讨论

中医将 RA 归属于“痹证”范畴,是在素体营卫失调的基础上,感受风、寒、湿、热等外邪,致使经络痹阻,气血不畅,引起以关节筋骨疼痛、麻木、屈伸不利,甚至关节肿大变形为主要表现的病证^[3]。雷公藤多苷可迅速改善 RA 患者症状、缓解病情,但其易导致恶心、呕吐、腹痛、腹泻、白细胞减少、血小板降低和肝肾功能损害等不良反应,从而限制了其临床应用。来氟米特为目前 RA 治疗中较常见的一种免疫抑制剂,具有一定治疗效果,但其起效慢,不良反应明显,患者往往难以长期坚持服用。我们提出如果将雷公藤多苷与来氟米特联合使用,可能将使两者用量减少,将能减轻来氟米特和雷公藤多苷的副作用。因此,本研究建立 AA 大鼠模型,观察雷公藤多苷与来氟米特配伍使用对于大鼠关节炎的治疗效果,并探讨其作用机制。

本研究发现模型组大鼠均出现了明显的关节充血肿胀($P < 0.01$)。经过治疗后,AA 模型大鼠足爪肿胀程度与关节炎指数明显降低($P < 0.01$),配伍组治疗效果作用最好($P < 0.05$),提示联合配伍用药对于 RA 的抗炎和症状缓解作用显著,但其具体作用机制仍需进一步研究。

现代研究表明,RA 发生机制是由于患者体内细胞因子网络自身调节系统被破坏,细胞因子异常产生及功能紊乱所引起^[4]。在细胞因子网络中 IL-1, TNF- α 起着重要的作用。IL-1 和 TNF- α 主要由单核细胞、巨噬细胞合成,均可通过刺激滑膜组织中滑膜细胞与软骨细胞中 IL-6、前列腺素 E₂、胶原酶和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的合成释放,引起 RA 患者免疫功能紊乱,局部炎症反应加剧,骨与软骨基质不可逆性破坏,以及血管翳形成^[5,6]。本研究发现模型组 AA 大鼠血清中细胞因子 IL-1, TNF- α , IL-6 和 PGE₂ 含量均显著高于正常对照组大鼠(均 $P < 0.01$),证明细胞因子网络失衡在类风湿关节炎的病程发展中发挥重要作用。AA 大鼠经过治疗后,细胞因子水平明显降低,其中以配伍组下降最明显($P < 0.01, P < 0.05$),表明雷公藤多苷、来氟米特均可通过降低细胞因子水平,且两者联合应用效果更加明显。

研究发现,RA 的发生发展与相互拮抗、相互调节的 T 细胞亚群辅助性 T 细胞(Th)1 和 Th2 之间平衡失调,Th1/Th2 比值升高,Th1 来源细胞因子减少,Th2 来源细胞因子增多密切相关。促炎细胞因

子 IFN- γ 和抗炎因子 IL-4 分别为 Th1 和 Th2 细胞分泌,可有效反映体内 Th1/Th2 细胞平衡状态及 RA 病程进展情况,且对于评价 RA 患者的预后有一定意义^[7]。本研究发现 AA 模型大鼠血清中 IFN- γ 的表达水平明显升高,而 IL-4 的含量明显降低($P < 0.01$),提示 AA 大鼠血清中 Th1/Th2 处于失衡状况。在经来氟米特或雷公藤多苷单独或联合治疗后,AA 大鼠血清中 IFN- γ 水平显著降低($P < 0.05$),而血清中 IL-4 含量明显升高,提示来氟米特及雷公藤多苷均可调节恢复 AA 大鼠 Th1/Th2 的平衡趋势,且两者配伍使用效果更好。

总之,来氟米特与雷公藤多苷联合使用可通过减少炎症因子分泌、调节 Th1/Th2 平衡治疗 RA,其疗效好、副作用小,值得临床推广使用。

[参考文献]

- [1] Sokka T, Envalds M, Pincus T. Treatment of rheumatoid arthritis: a global perspective on the use of antirheumatic drugs [J]. *Mod Rheumatol*, 2008, 18 (3): 228.
- [2] 李宝丽,唐方. 中药复方对类风湿关节炎抗炎作用的实验研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23 (8):702.
- [3] 涂胜豪,陈哲. 雷公藤治疗类风湿关节炎的现状和存在的问题[J]. *中西医结合研究*, 2009, 1 (1):42.
- [4] Sandler C, Lindstedt K A, Joutsiniemi S, et al. Selective activation of mast cells in rheumatoid synovial tissue results in production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-1Ra [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56 (6): 230.
- [5] Sethi G, Sung B, Aggarwal B. Nuclear factor- $\{\kappa\}$ B activation: from bench to bedside [J]. *Exp Biol Med*, 2008, 2 (331): 21.
- [6] Li L, Lee H H, Bell J J, et al. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2 [J]. *Immunity*, 2004, 20 (4): 429.
- [7] Ghadimi D, Vrese de M, Heller K J, et al. Lactic acid bacteria enhance autophagic ability of mononuclear phagocytes by increasing Th1 autophagy-promoting cytokine (IFN- γ) and nitric oxide (NO) levels and reducing Th2 autophagy-restraining cytokines (IL-4 and IL-13) in response to Mycobacterium tuberculosis antigen [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10 (10): 1153.

[责任编辑 聂淑琴]