

制附子对类风湿关节炎抗炎作用的实验研究

刘建磊,李宝丽*

(天津医科大学总医院中医科,天津 300052)

[摘要] 目的:探讨制附子治疗大鼠佐剂性关节炎的作用及初步机制。方法:从 60 只大鼠中随机选 10 只作为正常组,其余 50 只注射弗氏完全佐剂造模后分为附子 4 周组、4 周模型组、附子 2 周组及 2 周模型组,治疗组按 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量给予制附子 ig 给药,每日 1 次,连续给药 2 周和 4 周,观察用药组 2 周和 4 周时大鼠足肿胀率,血清一氧化氮(NO)、白介素-1 β (IL-1 β)水平及滑膜组织病理学变化。结果:附子用药组与模型组相比,大鼠足肿胀率明显降低($P < 0.05$);滑膜组织病理结构显著改善($P < 0.05$);用药 2 周时,血清 NO、IL-1 β 水平较模型组显著性降低($P < 0.05$),用药 4 周时,接近正常水平。结论:制附子可能通过降低血清 NO、IL-1 β 水平、从而调控相关细胞因子的表达从而起到抗炎和消除关节肿胀的作用,改善滑膜组织病理学变化。

[关键词] 制附子;佐剂性关节炎大鼠;一氧化氮;白介素-1 β

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0184-04

Experimental Treatment of Rheumatoid Arthritis by Aconiti Lateralis Radix Praeparata

LIU Jian-lei, LI Bao-li*

(Department of Traditional Chinese Medicine, General Hospital Affiliated to Tianjin
Medical University, Tianjin 300052, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and preliminary mechanism of the Aconiti Lateralis Radix Praeparata for treating adjuvant arthritis (AA) in rats. **Method:** Ten rats was randomly selected from sixty rats as

[收稿日期] 20110321(009)

[第一作者] 刘建磊,在读研究生,从事中西医结合免疫学研究,Tel:13752445282;E-mail:ljl1106@126.com

[通讯作者] *李宝丽,主任医师,硕士生导师,Tel:022-60362435;E-mail:li3106@sina.com

的保护因子和攻击因子存在一定的联系,这还需要我们进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 周来兴,周小荣,辜宝珠,等. 消化性溃疡中医诊治的思路与方法[J]. 中国医药学报,2004,19(1):52.
- [2] 时昭红,张介眉,刘浩,等. 促愈汤干预胃溃疡患者胃泌素及胃黏膜血管内皮生长因子的表达[J]. 中国临床康复,2006,10(31):81.
- [3] 时昭红,张介眉,周慧芳,等. 促愈颗粒对大鼠乙酸胃溃疡愈合质量的影响[J],世界华人消化杂志. 2007,15(15):1713.
- [4] Okabe S. Chronicity of acetic and unclear in the rat[J] Stomach. Am J Dig Dis,1972,17:619.

- [5] 孙凤蓬,宋于刚,覃汉荣. 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和 G/D 细胞的变化[J]. 世界华人消化杂志,2004,12(2):363.
- [6] 严海密,李运科. 慢性胃病中一氧化氮的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,1999,7(4):355.
- [7] 徐璐,陶尚敏. 神经降压素抗实验性胃溃疡作用初步探讨[J]. 中国行为医学科学,2005,9,14(9):775.
- [8] Brzozowski T, Konturek P C, Zwirska-Korcza K, et al. Hahn EG. Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage[J]. J Pineal Res,2005,39:375.

[责任编辑 聂淑琴]

the normal control, the other rats were used to made the AA model. The model was induced by Freund's complete adjuvant (CFA), then the rats were divided into drug treatment 4 weeks, model control of drug treatment 4 weeks, Drug treatment 2 weeks and model control of drug treatment 2 weeks. In the drug treatment group the Aconiti Lateralis Radix Praeparata was given intragastrically $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, once daily. The rats were treated for 2 and 4 weeks respectively. The influence on swelling rate, serum nitric oxide (NO) and interleukin- 1β (IL- 1β) level were observed after treatment for 2 weeks and 4 weeks. The synovial histopathology was observed under optical microscope too. **Result:** Drug treatment significantly decreased swelling rate of joints in AA rats and the pathology of synovial tissues was markedly ameliorated compared with that in the control ($P < 0.05$). After administration for 2 weeks, the levels of serum NO and IL- 1β of the rats in drugs groups were significantly decreased compared with those in the control ($P < 0.05$). Continuous administration for 4 weeks, the levels of the targets reached to near the normal level. **Conclusion:** All the results demonstrate that the Aconiti Lateralis Radix Praeparata may play anti-inflammatory and immune-regulatory roles in AA rats through inhibiting the levels of serum NO and IL- 1β , adjusting related cytokines expression, then eliminating the joint swelling and improving synovitis pathologically.

[**Key words**] Aconiti Lateralis Radix Praeparata; adjuvant arthritis rats; nitric oxide; interleukin- 1β

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎为特征的自身免疫性疾病, 病变呈持续、反复发作的过程, 最终导致关节畸形和功能丧失, 严重威胁了人类的健康。由于其病因及发病机制尚未完全清楚, 至今仍无良好的治疗方法。制附子温经通络, 是治疗类风湿疾病的重要药物之一, 本实验以弗氏完全佐剂所诱导的佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠模型为基础, 通过动态观察制附子对 AA 大鼠足肿胀率及滑膜组织病理改变的影响, 检测血清一氧化氮 (NO)、白介素- 1β (IL- 1β) 水平的变化, 以期探讨该药治疗大鼠佐剂性关节炎的初步机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 60 只, 雄性, 体重 (110 ± 10) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2007-0001, 适应性饲养 1 周后用于实验。

1.2 试剂及药品 卡介苗冻干粉购自北京天坛生物制品有限公司; 液体石蜡购于天津北大天医化学试剂公司; 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所产品; 白介素- 1β (IL- 1β) 酶联免疫试剂盒, 美国 R&D 公司生产; 制附子粉, 顺天堂药厂股份有限公司产品, 加入蒸馏水配制成生药质量浓度为 $0.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 生产批号 051217。

1.3 仪器 TU-1810 紫外-可见分光光度计, 北京; KHB, ST-360 型酶标仪, 上海科学实验仪器有限公司; TL-18M 台式高速冷冻离心机, 上海; HZS-H 恒

温水浴箱, 上海。

2 方法

2.1 造模方法与动物分组 从 60 只大鼠中随机选 10 只作为正常对照组 (N), 其余用于造模。将同一批号的卡介苗 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭活 1 h, 与高压灭菌的液体石蜡配成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乳剂, 充分研磨混匀即得 CFA。于大鼠尾根部皮内注射 0.1 mL 致炎, 正常组注射等量生理盐水。14 d 时根据肿胀率随机分为制附子用药 4 周组, 4 周模型组, 用药 2 周组及 2 周模型组, 每组 10 只。

2.2 给药方法 分组后制附子按 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量连续 ig 给药, 每日 1 次, 药量相当于人体用量的 10 倍; 正常及模型对照组用同等量生理盐水 ig, 连续用药 2 周和 4 周。

2.3 取材 给药满 2 周时, 采用内眦眶后取血约 2 mL , 并处死用药 2 周组及 2 周模型组大鼠, 满 4 周时处死其余大鼠, 留取血清, 取右足踝关节, 立即浸于 10% 甲醛溶液中, 48 h 后剥离滑膜组织, 常规脱水, 包埋, 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察滑膜组织的病理变化, 进行病理学评分。

2.4 检测指标

2.4.1 检测 AA 大鼠关节肿胀率 用水容积法, 于首次免疫当天即检测右足关节肿胀率, 分组后隔日测 1 次, 直至处死。以第 1 天测得的关节置换水容积为基值, (测得值 - 基值) / 基值即为关节肿胀率。

2.4.2 测定血清 NO 浓度 按照试剂盒说明书, 用硝酸还原酶法检测血清 NO 浓度。

2.4.3 测定血清 IL-1 β 浓度 采用 ELISA 法检测血清 IL-1 β 水平,方法按试剂盒说明程序进行,最后在酶标仪 450 nm 处读取 A 值。

2.4.4 滑膜病理学评分^[1-2] 按滑膜细胞增生、滑膜下层炎症程度及血管生成情况评分。滑膜细胞增生评分:少于 3 层为 0 分,3~4 层为 1 分,5~6 层为 2 分,6 层以上为 3 分。炎症程度评分:无淋巴细胞浸润为 0 分,淋巴细胞聚集为 1 分,弥漫分布形成淋巴滤泡为 2 分,形成淋巴滤泡伴生发中心为 3 分。血管生成评分:无新生血管生成成为 0 分,轻度新生血管生成成为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分。以上 3 项评分累计总和即为病理学总评分。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验;多样本均数的比较采用方差分析;半定量资料两组间比较采用秩和检验;两变量关系用直线相关分析。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况描述 造模 50 只大鼠,40 只出现关节炎症状,成模率为 80%。注射佐剂 10 d 左右模型组大鼠出现关节明显肿胀,14~30 d 病变最为严重,多累及前爪和耳廓,精神萎靡,毛色晦暗,体重下降,行走困难;用药组大鼠的毛色、活力等状况均优于模型组。

3.2 AA 大鼠关节肿胀率 见表 1,制附子用药组关节肿胀率较模型组显著降低 (*P* < 0.05)。

表 1 制附子对 AA 大鼠右足关节肿胀率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模 14 d	用药 2 周	用药 4 周
正常	-	0.19 ± 0.04 ¹⁾	0.24 ± 0.05 ¹⁾	0.29 ± 0.06 ¹⁾
4 周模型	-	0.69 ± 0.14	0.78 ± 0.16	0.65 ± 0.13
4 周附子	0.2	0.72 ± 0.15	0.53 ± 0.12 ¹⁾	0.41 ± 0.09 ¹⁾
2 周附子	0.2	0.71 ± 0.11	0.55 ± 0.11 ¹⁾	-
2 周模型	-	0.72 ± 0.14	0.79 ± 0.17	-

注:与模型组相比¹⁾*P* < 0.05。

3.3 AA 大鼠血清 NO 的变化 模型组 AA 大鼠血清 NO 水平较正常显著升高 (*P* < 0.05),用药组可明显下调血清 NO 水平 (*P* < 0.05);用药 4 周时血清 NO 的含量接近正常水平,模型组大鼠 NO 也有降低的趋势,但始终高于正常组,见表 2。

3.4 AA 大鼠血清 IL-1 β 的变化 模型组 AA 大鼠血清 IL-1 β 水平较正常显著升高 (*P* < 0.05),用药组可

明显下调血清 IL-1 β 水平 (*P* < 0.05);用药 4 周时血清 IL-1 β 的含量降低到接近正常水平,模型组大鼠 IL-1 β 也有降低的趋势,但始终高于正常组,见表 3。

表 2 各组大鼠用药 2,4 周血清 NO 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
		2 周	4 周
正常	-	33.36 ± 9.28	32.87 ± 9.18
4 周模型	-	73.76 ± 16.49 ²⁾	63.12 ± 10.83 ²⁾
4 周附子	0.2	49.84 ± 12.78 ¹⁾	35.86 ± 9.74 ¹⁾
2 周附子	0.2	51.47 ± 11.67 ¹⁾	-
2 周模型	-	72.97 ± 15.91 ²⁾	-

注:与同期模型组相比¹⁾*P* < 0.05;与正常组相比²⁾*P* < 0.05 (表 3 同)。

表 3 各组大鼠用药 2,4 周血清 IL-1 β 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	
		2 周	4 周
正常	-	219.84 ± 38.77	217.94 ± 39.47
4 周模型	-	357.79 ± 65.54 ²⁾	266.45 ± 47.91 ²⁾
4 周附子	0.2	288.37 ± 49.83 ¹⁾	231.83 ± 45.97 ¹⁾
2 周附子	0.2	286.65 ± 51.24 ¹⁾	-
2 周模型	-	355.98 ± 69.83 ²⁾	-

3.5 血清 NO 与 IL-1 β 相关性分析 AA 大鼠血清 NO 水平与 IL-1 β 水平呈正相关 (*r* = 0.417, *P* < 0.05),见图 1。

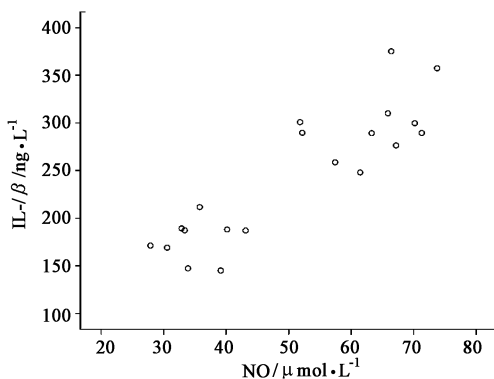


图 1 NO 与 IL-1 β 的散点图

3.6 滑膜组织病理学变化 正常组大鼠滑膜细胞结构完整,排列整齐,无炎症细胞浸润及血管新生;模型组关节滑膜明显增厚,滑膜内大量淋巴细胞、中性粒细胞浸润,有不同程度的血管新生。用药组滑膜组织结构较模型组显著改善 (*P* < 0.05),滑膜细胞轻度增生,滑膜下层及血管周围未见大量淋巴细胞浸润。4 周附子组血管新生改善明显 (*P* < 0.05),见表 4。

表4 AA大鼠滑膜病理评分($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	总分	滑膜增生/分	炎症/分	血管新生/分
4周模型	-	7.61 ± 1.53	2.35 ± 0.81	2.58 ± 0.65	2.78 ± 0.79
4周附子	0.2	4.32 ± 1.35 ¹⁾	1.78 ± 0.25 ¹⁾	1.47 ± 0.21 ¹⁾	1.83 ± 0.18 ²⁾
2周附子	0.2	4.28 ± 1.12 ¹⁾	1.53 ± 0.22 ¹⁾	1.43 ± 0.19 ¹⁾	2.05 ± 0.57 ²⁾
2周模型	-	7.24 ± 1.28	2.28 ± 0.47	2.61 ± 0.53	2.25 ± 0.74

注:与同期模型组相比¹⁾ $P < 0.05$;与4周附子组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

慢性滑膜炎是RA的主要病理变化,IL-1 β 在RA的炎症反应和组织损伤中发挥着重要作用。IL-1 β 主要由单核细胞和巨噬细胞分泌,在关节组织中,由滑膜细胞、软骨细胞分泌,过量分泌的IL-1 β 可以刺激滑液和软骨细胞合成并释放PGE₂和胶原酶,引起滑膜炎反应、软骨基质崩解^[3];引起关节软骨的破坏。另外,IL-1 β 还可以作用于内皮细胞,促进嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞的聚集,加重关节局部炎症反应^[4]。本实验结果显示制附子可通过抑制IL-1 β 分泌,降低相关炎症因子释放,进而起到抗炎作用。结合滑膜病理变化提示制附子可通过抗炎效应,减缓滑膜及软骨组织的破坏。

NO是在一氧化氮合成酶(iNOS)催化下生成的反应性极强的自由基,体内NO的异常升高,可导致血管过度扩张,渗出增加。同时还可促进IL-1 β ,PGE₂,TNF- α 等炎症介质细胞因子的释放,加重炎症反应。而细胞因子如IL-1 β ,TNF- α 等还可诱导iNOS的合成^[5],增加体内NO含量水平,二者相互促进,形成恶性循环。另外研究表明,在佐剂诱导的大鼠关节炎中,NO的诱导生成有可能发生在IL-1 β 响应之前^[6]。在本实验中用药组可持续降低血清NO水平,提示制附子可通过抑制NO的产生,减轻血管的扩张和渗出,同时亦可减少血清IL-1 β 释放,打破正反馈效应,降低炎症反应。

相关分析表明,AA大鼠血清NO水平与IL-1 β 水平呈显著正相关。上面论述及研究证实,NO是公认的炎症反应指标,其与炎症细胞因子IL-1 β 表现的相关性,进一步说明AA大鼠是免疫炎症反应的关节炎模型,二者相互作用,在RA的致病过程中相互影响。实验结果提示制附子可发挥抗炎作用,减

少滑膜炎性细胞的浸润,降低AA大鼠关节肿胀率、血管新生及软骨破坏程度,改善关节病变。

RA属于中医“痹证”范畴,风寒湿邪侵袭,痰湿瘀阻经络是其主要病因机制。《神农本草经疏》:“附子,药性大热而善走,故亦善除风寒湿三邪,三邪祛则诸证自瘳矣。”本实验结果证明,制附子具有抑制炎症细胞因子,减缓类风湿关节炎免疫介导炎症反应的作用,为单味中药多靶点治疗类风湿关节炎提供了实验依据。

[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): R825.
- [2] 王雯, 陈森洲, 王险峰, 等. HIF-1 α , VEGF在CIA大鼠模型中的表达与意义[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(6): 563.
- [3] Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, et al. Prostaglandin E₂ is an enhancer of interleukin-1 beta 2 induced expression of membrane-associated prostaglandin synthase in rheumatoid synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(10): 2189.
- [4] Jeong J G, Kim J M, Cho H, et al. Effects of IL-1 beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(1): 3.
- [5] Raji L. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2006, 8(12): 30.
- [6] Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, et al. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 1996, 23(2): 230.

[责任编辑 聂淑琴]