

布洛芬与双氢青蒿素配伍治疗 大鼠佐剂性关节炎的药效及机制初探

易剑峰*

(宜春学院 美容医学院药物与化妆品研发中心,江西 宜春 336000)

[摘要] 目的:研究布洛芬与双氢青蒿素配伍对类风湿关节炎的治疗效果,初步探讨其配伍机制。方法:选择体重 160 ~ 180 g 的 SD 大鼠随机分为 7 组:正常对照组、模型对照组、甲氨蝶呤对照组、配伍高剂量治疗组、配伍低剂量治疗组、布洛芬治疗组、双氢青蒿素治疗组。采用佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)动物模型,取踝关节进行病理学观察,并运用流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群、酶联免疫法检测血清白介素-4(IL-4)、干扰素- γ (IFN- γ)的水平。结果:配伍组能显著下调外周血 CD₄⁺T 细胞百分比和 CD₄⁺T/CD₈⁺T 比值($P < 0.01$),下调血清 INF- γ 水平($P < 0.01$)、上调 IL-4 水平($P < 0.01$);与布洛芬组比较,双氢青蒿素组上调 IL-4 有明显优势($P < 0.01$),配伍组比单用药物能更有效延缓模型鼠的关节病理损伤。结论:布洛芬与双氢青蒿素配伍能抑制 CD₄⁺T 增殖及促进 Th1/Th2 向右漂移并形成互补,进而增强关节炎治疗效果。

[关键词] 布洛芬;双氢青蒿素;配伍;佐剂性关节炎

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0177-04

Therapeutic Effects of the Combination of Ibuprofen and Dihydroartemisinin on Rat Adjuvant Arthritis and Its Mechanism

YI Jian-feng^{1*}

(Drug and Cosmetic R&D Center, Cosmetology Medical College, Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the therapeutic effects of the combination of ibuprofen and dihydroartemisinin on rheumatoid arthritis in rats, and to explore the compatible mechanism of the drugs. **Method:** Standard Sprague Dawley rats with weight of 160-180 g were randomly divided into 7 groups, including normal group, adjuvant arthritis (AA) model group, methotrexate group, Compatibility high-dose group, Compatibility low-dose group, ibuprofen group, dihydroartemisinin group. We detected T-lymphocyte subsets in peripheral blood by flow cytometry, and measured the levels of INF- γ and IL-4 in serum by ELISA for AA animal model treated by drugs. **Result:** The combination group could significantly reduced the percentage of CD₄⁺T cells and CD₄⁺T/CD₈⁺T ratio in the peripheral blood lymphocytes cells, reduce INF- γ and improve IL-4 in serum. Compared with the ibuprofen group, dihydroartemisinin could significantly improve IL-4 ($P < 0.01$). The combination of the drugs could more effectively delay the joint injury of the model rats compared with those given individual drug. **Conclusion:** The combination of ibuprofen with dihydroartemisinin can suppress proliferation of CD₄⁺T cells, and promote the Th1/Th2 shift towards the Th2 cytokine response, and can complement, thus enhancing the therapeutic effect for arthritis.

[Key words] ibuprofen; dihydroartemisinin; combination; adjuvant arthritis

[收稿日期] 20101010(005)

[基金项目] 863 计划项目(2003AA2Z3514),江西省教育厅科技项目(GJJ08409)

[通讯作者] *易剑峰,硕士,副教授,主要从事类风湿关节炎发病机制与中医药现代化研究, Tel: 0795-3201300, E-mail: rainbowyjf@126.com

类风湿关节炎(RA)是以关节疼痛为主要特征的疾病,本病病情缠绵难愈且致残率高,中医辨证属于痹证范畴,以风寒湿邪伏于肢节脉络而阻滞气血为病,然而由于病位较深,故一般的祛风湿药物效果不佳,而将功能引邪外出的药物与之配伍可以提高药物疗效,青蒿芳香,清热透络、除湿,有引邪外出之功,将青蒿的有效成分青蒿素的衍生物双氢青蒿素配伍祛风湿通络止痛药物能提高药物疗效^[1]。布洛芬具有良好的祛风湿止痛作用,临床常用于风湿、类风湿关节炎的治疗。将布洛芬与双氢青蒿素配伍是否也能产生同样的效果,目前尚无相关实验研究。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,清洁级,6~8 周龄,体重(160~180)g,由南昌大学医学院实验动物中心提供,许可证号 SYXK(赣)2006-0001,本校动物室饲养。

1.2 药物和试剂 双氢青蒿素(北京万辉药业集团,批号 070711),布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司,批号 070822),弗氏完全佐剂(Gibco 公司),IL-4,INF- γ ELISA 检测试剂盒(南京建成生物工程有限公司),CD3, CD4, CD8 单克隆抗体(Caltag 公司)。

1.3 仪器 Multiskan MK3 酶标仪(Thembo LabSystems),FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将实验大鼠随机分为 7 组,每组 10 只,分别为正常组、模型组、甲氨蝶呤组(1 mg·kg⁻¹甲氨蝶呤)、配伍高剂量组(5.6 mg·kg⁻¹双氢青蒿素 + 50 mg·kg⁻¹布洛芬,简称青蒿 + 布洛芬)、配伍低剂量组(2.8 mg·kg⁻¹双氢青蒿素 + 50 mg·kg⁻¹布洛芬)、布洛芬组(50 mg·kg⁻¹布洛芬)、双氢青蒿素组(5.6 mg·kg⁻¹双氢青蒿素)。造模 2 周后开始给药,按 10 mL·kg⁻¹ig,1 日 1 次(甲氨蝶呤组每周 2 次),连续给药 28 d;正常和模型组给予同体积的蒸馏水。所有动物在给药结束后处死。

2.2 造模 每只取 0.1 mL 弗氏完全佐剂于 SD 大鼠右后足跖皮内诱导关节炎发生,正常组足底假免疫时给予同体积的生理盐水。

2.3 检测指标

2.3.1 踝关节病理切片及观察 处死后取所有动物的踝关节,福尔马林固定,EDTA 脱钙,乙醇逐级

脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE 常规染色。光镜下观察滑膜、软骨、骨的病理改变。

2.3.2 关节肿胀比

按下列公式求出关节肿胀比。
关节肿胀比 = 治疗后关节周长 - 治疗前关节周长 / 治疗前关节周长

2.3.3 外周血 T 淋巴细胞亚群水平测定 动物处死时眼球取血,加肝素抗凝,分别取血 50 μ L 与 5 μ L CD4 单克隆抗体和 5 μ L CD8 单克隆抗体的离心管中震匀,4 $^{\circ}$ C 下保存 30 min;加入适量红细胞溶解液,1 000 r·min⁻¹离心 1.5 min,弃其上清;加入适量生理盐水以 1 000 r·min⁻¹,离心 1.5 min,反复几次,以试管底部不见红色为度,过滤后上流式细胞仪检测。

2.3.4 血清 IL-4, INF- γ 水平测定 动物处死时眼球取血,3 000 r·min⁻¹离心 30 min 后取血清。按照 ELISA 试剂盒测定说明书操作测定血清中 IL-4, INF- γ 含量。

2.4 统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 关节病理观察 较之模型组,配伍组关节病理状况有明显减轻,光镜下可见滑膜细胞增生减轻,滑膜组织充血水肿明显减轻,血管增生和浸润炎细胞数量减少,血管翳形成显著减少,关节软骨面可见扁平层剥脱,剥脱软骨面较平整;配伍组整体病理状况要优于单用药物组,与甲氨蝶呤组相似;双氢青蒿素组滑膜组织充血水肿及炎细胞浸润现象改善不如布洛芬组,但对关节损伤改善两组相似,且均不如配伍组。

3.2 关节肿胀比 由表 1 可见,与正常组相比,模型组关节肿胀比明显增高,布洛芬与双氢青蒿素配伍能有效减弱关节炎模型动物的关节肿胀比,而布洛芬与 5.6 mg·kg⁻¹双氢青蒿素配伍明显优于单用布洛芬。

3.3 大鼠外周血 T 细胞亚群 见表 2,与正常组相比,模型组外周血 CD₄⁺T、CD₄⁺T/CD₈⁺T 明显增高,而 CD₃⁺T、CD₈⁺T 无明显变化;布洛芬与双氢青蒿素配伍能提高模型鼠 CD₄⁺T 的比例,进而提高 CD₄⁺T/CD₈⁺T 的比值,各用药组间比较无明显差别。

表 1 双氢青蒿素 + 布洛芬联合给药 28d 对佐剂性关节炎大鼠关节肿胀比的影响

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	关节肿胀比
正常	-	10	0.030 ± 0.009 ²⁾
模型	-	10	0.972 ± 0.148
甲氨蝶呤	1	9	0.362 ± 0.052 ^{2,6)}
青蒿素 + 布洛芬	5.6 + 50	10	0.209 ± 0.053 ^{2,6,3)}
	2.8 + 50	10	0.243 ± 0.052 ^{2,6)}
布洛芬	50	10	0.306 ± 0.045 ^{2,6)}
双氢青蒿素	5.6	10	0.755 ± 0.093 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与布洛芬组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与双氢青蒿素组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$,甲氨蝶呤组大鼠每周给药 2 次,其余各组每天给药 1 次(表 2~3 同)。

表 2 双氢青蒿素 + 布洛芬联合给药 28d 对佐剂性关节炎大鼠外周血 T 细胞亚群的影响

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	CD ₃ ⁺ T/%	CD ₄ ⁺ T/%	CD ₈ ⁺ T/%	CD ₄ ⁺ T/CD ₈ ⁺ T
正常	-	10	44.65 ± 3.79	31.80 ± 3.84 ²⁾	16.58 ± 3.71	1.93 ± 0.36 ²⁾
模型	-	10	47.11 ± 5.71	43.09 ± 4.37	16.01 ± 3.09	2.81 ± 0.44
甲氨蝶呤	1	9	44.19 ± 5.02	33.07 ± 4.71 ²⁾	15.84 ± 4.01	2.01 ± 0.49 ²⁾
青蒿 + 布洛芬	5.6 + 50	10	45.45 ± 4.35	34.15 ± 5.80 ²⁾	16.26 ± 4.28	2.06 ± 0.53 ²⁾
	2.8 + 50	10	45.14 ± 4.67	34.71 ± 4.67 ²⁾	16.21 ± 3.77	2.16 ± 0.49 ¹⁾
布洛芬	50	10	45.76 ± 5.07	37.47 ± 5.59 ¹⁾	15.81 ± 4.80	2.38 ± 0.57 ¹⁾
双氢青蒿素	5.6	10	45.30 ± 5.11	36.92 ± 5.14 ¹⁾	16.14 ± 3.51	2.27 ± 0.48 ¹⁾

表 3 双氢青蒿素 + 布洛芬联合给药对佐剂性关节炎大鼠血清 IL-4, IFN-γ 的影响

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	IFN-γ	IL-4
正常	-	10	13.61 ± 1.19 ²⁾	57.17 ± 3.75 ²⁾
模型	-	10	20.42 ± 2.12	21.41 ± 2.77
甲氨蝶呤	1	9	13.59 ± 1.38 ^{2,5)}	24.33 ± 3.71
青蒿素 + 布洛芬	5.6 + 50	10	14.70 ± 1.77 ²⁾	45.21 ± 4.44 ^{2,4,5)}
	2.8 + 50	10	15.07 ± 1.98 ²⁾	42.56 ± 3.81 ^{2,4)}
布洛芬	50	10	15.65 ± 2.05 ²⁾	26.21 ± 4.88 ¹⁾
双氢青蒿素	5.6	10	16.27 ± 2.11 ²⁾	40.04 ± 4.56 ^{2,4)}

4 讨论

现代医学认为 RA 是一种以滑膜炎症并关节软骨破坏为主要特征的自身免疫性疾病,相关免疫细胞功能出现紊乱是其主要病理特点。佐剂性关节炎具有人类类风湿关节炎相似的病理特点,是研究 RA 理想的动物模型。本实验结果显示双氢青蒿素与布洛芬配伍能发挥各自的优势,提高治疗效果。T 淋巴细胞尤其是 CD₄⁺ T 细胞对 RA 病理发展具有十分关键的作用,本实验也证实了这点。关节炎模型鼠外周血 CD₄⁺ T 异常增殖,导致 CD₄⁺ T/CD₈⁺ T 细胞比例失衡,双氢青蒿素和布洛芬均能通过下调 CD₄⁺ T

3.4 血清 IL-4, IFN-γ 由表 3 可见,与正常组相比,模型组血清 IFN-γ 表达明显增高,而 IL-4 则明显降低;布洛芬与双氢青蒿素配伍能下调模型鼠血清 IFN-γ 水平,上调 IL-4 表达,有利于恢复 IL-4/IFN-γ 平衡,配伍组对 IFN-γ 的调节与单用药物组无统计学差别;调节 IL-4 配伍组比单用布洛芬有优势,同时双氢青蒿素较布洛芬调节 IL-4 亦表现出优势,而配伍高剂量组调节 IL-4 优于单用双氢青蒿素,提示双氢青蒿素能弥补布洛芬上调 IL-4 的不足。

纠正比例失衡,但配伍组相比单用布洛芬或双氢青蒿素并无明显优势,这提示两药配伍机制与下调 CD₄⁺ T 数目无明显关系。CD₄⁺ T 按其功能可分为 Th1, Th2 亚群, Th1 主要介导机体细胞免疫, Th2 主要介导体液免疫, INF-γ 主要由 Th1 分泌, IL-4 主要是 Th2 分泌,正常情况下, Th1, Th2 功能相互抑制且处于动态平衡中,但在 RA 中,由于免疫系统紊乱, Th1/Th2 功能出现失衡。本研究显示布洛芬和双氢青蒿素均可以在一定程度上抑制模型动物出现的 Th1/Th2 偏移,其中双氢青蒿素对 Th2 的调节明显优于布洛芬,提示两药配伍能在调节 Th1/Th2 方面

形成补充,从而提高治疗效果。

动物和临床实验显示青蒿素及其衍生物具有良好的治疗 RA 功效^[2],双氢青蒿素是青蒿素类药物在体内的代谢物,具有一定的代表性。布洛芬是一种常用的非甾体抗炎药,它能够通过抑制环氧酶活性而抑制前列腺素(PG₂)的合成。局部高水平的前列腺素 E₂(PGE₂)是 RA 关节肿胀疼痛的重要因素,并且滑膜成纤维细胞和软骨细胞亦能在 TNF- α , IL-1 等细胞因子的刺激下产生 PGE₂,参与骨和软骨的破坏^[3-4],而局部免疫复合物和游离的胶原等分解产物刺激 TNF- α , IL-1 的合成,形成恶性循环。布洛芬能够通过抑制 PGE₂ 生成缓解关节炎症,并有助于延缓关节骨和软骨破坏。另一方面,研究发现 PGE₂ 能够提高 Th2 型细胞因子的产生,并具有抑制 NF-AT, AP-1, NF- κ B 和 JAK 信号的作用^[5],布洛芬能抑制 PGE₂ 合成,限制 Th2 的恢复。

RA 在祖国医学中属于痹证范畴,其发病机理认为是外邪(风寒湿)入侵人体、并伏于肢节脉络而阻滞气血为病,因此,通畅络脉,祛风湿,是治疗类风湿性关节炎的治疗大法,但由于邪伏骨节之间,一般的药物很难使之透解,这就使得此病缠绵难愈。青蒿芳香,清热透络、除湿,有引邪外出之功,使深伏阴分之邪透出阴分而解,布洛芬功能消炎镇痛,按中医理论应是祛风湿活血通络止痛,两药配伍能使络脉通

畅,伏邪得除。本研究提示将西药纳入中医理论体系进行配伍有利于提高药物的疗效,这有助于拓宽类风湿性关节炎的治疗和药物研发思路。

[参考文献]

- [1] 易剑峰,吕爱平.雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍对大鼠佐剂性关节炎的免疫学研究[J].江西中医学院学报,2008,20(6):49.
- [2] 潘蕾,崔向军.青蒿素及其衍生物对类风湿关节炎作用的国外研究进展[J].国际中医中药杂志,2007,29(6):345.
- [3] Woolard M D, Wilson J Y, Hensley L L, et al. Francisella tularensis-Infected macrophages release prostaglandin E₂ that blocks T cell proliferation and promotes a Th2-like response[J]. J Immunol, 2007, 178(4):2065.
- [4] Harris S G, Padilla J, Koumas L, et al. Prostaglandins as modulators of immunity[J]. Trends Immunol, 2002, 23(3):144.
- [5] Kolenko V, Rayman P, Roy B, et al. Down-regulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E₂ and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: Impact on interleukin-2 receptor signaling pathway[J]. Blood, 1999, 93(7):2308.

[责任编辑 聂淑琴]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 [www. syfjxzz. com](http://www.syfjxzz.com) 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约第 7 条:投稿及缴费。