

资木瓜多糖对小鼠佐剂性关节炎的作用及其机制

李世刚*, 陈燕

(湖北省三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002)

[摘要] 目的: 建立小鼠佐剂性关节炎(AA)模型, 研究资木瓜多糖(CSPS)对小鼠 AA 病理改变及炎症因子表达的影响。方法: 雄性昆明鼠随机分为正常对照组、模型组、CSPS 高、低剂量(分别为 400, 200 mg·kg⁻¹)组、阳性药醋酸泼尼松(PAT, 5.6 mg·kg⁻¹)组, 每组 10 只。各组均于造模前 1 d 开始给药, 2 次/d, 连续 3 d; 再于造模后第 8 天继续给药, 2 次/d, 连续 16 d。正常对照组、模型组 ig 等体积生理盐水。小鼠足部注射弗氏完全佐剂诱导建立 AA 动物模型, 检测小鼠足爪的肿胀度, 测定脾、胸腺、肝脏的指数, 噻唑蓝(MTT)法检测脾淋巴细胞增殖反应, 酶联免疫(ELISA)法检测脾细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白介素-1 β (IL-1 β), 白介素-4(IL-4)的水平。结果: CSPS 能有效减轻 AA 小鼠的原发性和继发性足肿胀, 抑制免疫脏器指数的升高, 抑制 AA 小鼠的脾淋巴细胞增殖反应, 降低 AA 小鼠脾细胞 TNF- α , IL-1 β 的产生, 提高 IL-4 含量。结论: CSPS 对 AA 具有抑制作用, 其机制可能与抑制淋巴细胞增殖, 减少促炎因子 TNF- α , IL-1 β 释放, 促进抗炎因子 IL-4 表达有关。

[关键词] 资木瓜多糖; 佐剂性关节炎; 炎症

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0159-04

Effect of *Chaenomeles speciosa* Polysaccharide on Adjuvant Arthritis in Mice and Its Mechanisms

LI Shi-gang*, CHEN Yan

(Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of *Chaenomeles speciosa* polysaccharide (CSPS) on the histological changes and the production of inflammatory cytokines in mice with adjuvant arthritis (AA). **Method:** Male mice were randomly divided into normal control group, model group, CSPS high and low dose groups, positive control group ($n = 10$ in each group). Each group was started to give medicine twice daily before model establishing for continue 3 days. After model establishing on the 8th day, medicines were given twice daily for continues 16 days. The CSPS groups were ig given the medicine 400, 200 mg·kg⁻¹ respectively. The positive control group was ig given PAT, 5.6 mg·kg⁻¹. The normal and model groups were ig given normal saline. AA was induced by intradermal injection of complete Freund's adjuvant (CFA) into the right hind footpad of mice. Paw swelling of AA mice was measured with volume meter. The indexes of spleen, thymus and liver were analyzed. *In vitro* proliferation of spleen cells was examined using MTT assay. The tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-4 (IL-4) levels production of spleen lymphocytes were measured by ELISA. **Result:** CSPS significantly inhibited the primary and secondary paw swelling, and decreased immune organs indexes. The spleen lymphocyte proliferation reaction of AA mice was decreased by treatment with CSPS. CSPS markedly reduced TNF- α and IL-1 β levels, and increased IL-4 level in spleen lymphocyte of AA mice. **Conclusion:** CSPS could suppress the arthritis of AA mice. Its active mechanism may be related to inhibition of proliferation of lymphocyte and regulation for inflammatory cytokines.

[Key words] *Chaenomeles speciosa* polysaccharide; adjuvant arthritis; inflammation

[收稿日期] 20101015(001)

[基金项目] 湖北省宜昌市科技局项目(2010A01301-04)

[通讯作者] *李世刚, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药效评价与新药研究, Tel: 0717-8500478, E-mail: fox201@163.com.

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一个累及周围关节为主的多系统性、炎症性的自身免疫疾病,其特征性症状为对称性、周围性多个关节慢性炎症病变。目前,治疗 RA 的药物主要有非甾体类抗炎药、缓解疾病的抗风湿性药物、糖皮质激素及受体拮抗剂等,这些药物由于其毒副作用,临床应用受到限制。中药由于毒副作用小、价格较低等优势,越来越多的学者致力于中药抗炎的研究。

资木瓜 *Chaenomeles sinensis* 是蔷薇科植物贴梗海棠的干燥近成熟果实^[1],具有疏肝止痛、祛风除湿等功能^[2],临床常用于治疗湿痹拘挛、腰膝关节疼痛^[3]等疾病。多糖是资木瓜的主要活性成分之一。研究表明,许多中药多糖具有免疫调节、抗炎、抗病毒、抗氧化等作用^[4]。本研究以佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 小鼠为模型,研究资木瓜多糖对 AA 的治疗作用,并对其机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 动物 雄性昆明种小鼠,体重 18~22 g,同济医学院实验动物中心提供。SPF 级,许可证号 SCXK (鄂)2004-0007。

1.2 药物制备 资木瓜由三峡大学天然产物研究中心提供,经该中心汪璠植教授鉴定为 *C. speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥成熟果实。取资木瓜 500 g,粉碎后经 95% 乙醇脱脂 2 次,每次 2 h,滤渣风干后,按料液比为 1:20 加入蒸馏水,80 °C 下提取 2 次,每次 2 h。提取药液经浓缩、醇沉、Sevage 法除蛋白,真空干燥得到资木瓜多糖 (CSPS,得率为资木瓜干重的 6.57%);苯酚硫酸法检测其纯度为 56.32%。

1.3 试剂 CSPS 以生理盐水配成溶液;醋酸泼尼松片 (PAT) 购自南京白敬宇制药有限公司,批号 20090705,以生理盐水配成混悬液;弗氏完全佐剂 (FCA),批号 CAS9007-81-2,刀豆蛋白 A (ConA),批号 2700803 1 B60854,由 Sigma 公司提供;溴化-3(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑 (MTT),批号 2012/08, RPMI 1640 培养粉,批号 31800-022,由上海玉博生物科技有限公司提供;小牛血清,批号 090514,购自杭州四季青生物工程材料有限公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-4 (IL-4) ELISA 试剂盒,批号分别为 EK0394, EK1405, EK1707,购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器 PV-200 型动物足跖容积测量仪,成都

泰昂科技有限公司产品;CO₂ 培养箱,松下公司产品;BH-2 型倒置显微镜, Olympus 公司产品;TYPE1500-458 型全波长酶标仪,武汉新生福地贸易公司产品。

2 方法

2.1 动物分组 小鼠随机分为正常对照组、模型组、CSPS 高、低剂量组、阳性对照组,每组 10 只。

2.2 AA 小鼠模型的诱导和评价 除正常组外,其他组小鼠右后足皮内各注射 0.1 mL FCA 致炎。在致炎前和致炎后 6, 12, 24, 48, 72 h, 8, 12, 16, 20, 24 d 用足趾容积测量仪测定每只小鼠右后足容积,并计算小鼠足爪肿胀度 (mL) = 致炎后容积 - 致炎前容积。

2.3 给药方案 各组均与造模前 1 d 开始给药,2 次/d,连续 3 d;再于造模后第 8 天继续给药,2 次/d,连续 16 d。CSPS 高低剂量组给药剂量分别为 400, 200 mg·kg⁻¹;阳性对照组给予 PAT 5.6 mg·kg⁻¹;正常对照组、模型组 ig 等体积生理盐水。

2.4 免疫脏器指数的测定 在致炎后第 25 天,称量小鼠体重后,处死小鼠,取出脾、胸腺和肝脏,生理盐水漂洗后用纱布吸干表面水分,分别于电子天平上称质量 (湿质量),并计算脏器指数。

脏器指数 = 器官湿质量 (mg) / 小鼠体重 (g)

2.5 脾淋巴细胞增殖反应测定 致炎后第 25 天,摘眼球放血处死小鼠,无菌分离脾脏。常规制备脾细胞悬液,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液调整小鼠脾细胞密度为 1×10^7 个/mL。96 孔板上,每孔加入 100 μ L 脾细胞悬液 (5×10^6 个/mL) 和 100 μ L 含 ConA (5μ g·mL⁻¹) 的 RPMI1640 完全培养液,各设 3 个复孔,置 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 48 h,终止培养前 6 h,吸弃上清 100 μ L,再加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液 10 μ L,继续培养。终止培养后,取出 96 孔板,离心 (2 000 r·min⁻¹, 10 min)。轻轻吸弃上清,每孔加入二甲基亚砷 100 μ L,充分震荡混匀以溶解甲瓟颗粒。于 30 min 内用酶标仪在 570 nm 处测吸光度 (A)。

2.6 脾细胞 TNF- α , IL-1 β , IL-4 的诱生与检测 同 2.5 项制备脾细胞悬液。24 孔培养板上,每孔加 0.5 mL 脾细胞悬液 (5×10^6 个/mL), 0.5 mL ConA (终质量浓度为 5 mg·L⁻¹), 置 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 24 h,离心 (2 000 r·min⁻¹, 10 min),收集上清, -20 °C 保存。按 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α ,

IL-1 β ,IL-4 含量。

2.7 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件包,运用单因素方差分析对所有实验数据进行多组间两两比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 CSPS 对 AA 小鼠原发性足肿胀的影响 各组均于造模前 1 d 开始 ig 给药,2 次/d,连续 3 d。于

致炎前和致炎后 6,12,24,48,72 h 测每只小鼠右后足容积,计算足肿胀度,进行方差分析。注射 FCA 后,小鼠右后足立即出现了局部炎症反应,致炎后 24 h 右足肿胀度达峰值,而后逐渐减轻。CSPS 对 AA 小鼠原发性肿胀有抑制作用,且能明显降低达峰时肿胀度,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 CSPS 对 AA 小鼠原发性足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

ΔmL

组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	足肿胀				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
模型	-	0.171 \pm 0.035	0.153 \pm 0.030	0.198 \pm 0.041	0.147 \pm 0.040	0.140 \pm 0.043
CSPS	400	0.145 \pm 0.044	0.148 \pm 0.055	0.160 \pm 0.039 ¹⁾	0.141 \pm 0.040	0.138 \pm 0.047
	200	0.142 \pm 0.040	0.122 \pm 0.046	0.136 \pm 0.056 ¹⁾	0.128 \pm 0.044	0.134 \pm 0.036
PAT	5.6	0.093 \pm 0.021 ¹⁾	0.080 \pm 0.022 ¹⁾	0.139 \pm 0.038 ¹⁾	0.130 \pm 0.037	0.133 \pm 0.032

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 CSPS 对 AA 小鼠继发性足肿胀的影响 各组于造模后第 8 d 继续给药,连续 16 d。于造模后第 8,12,16,20,24 d 测小鼠右后足容积,计算足肿胀

度,进行方差分析。结果显示,CSPS 从第 20 d 开始发挥疗效,可明显抑制 AA 小鼠的继发性足肿胀,在致炎后 24 d,有较好的治疗作用。结果见表 2。

表 2 CSPS 对 AA 小鼠继发性足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	足肿胀/ ΔmL				
		8 d	12 d	16 d	20 d	24 d
模型	-	0.177 \pm 0.052	0.179 \pm 0.436	0.167 \pm 0.041	0.193 \pm 0.049	0.182 \pm 0.042
CSPS	400	0.191 \pm 0.043	0.167 \pm 0.041	0.168 \pm 0.052	0.202 \pm 0.046	0.148 \pm 0.038 ¹⁾
	200	0.144 \pm 0.030	0.179 \pm 0.032	0.150 \pm 0.044	0.139 \pm 0.048 ¹⁾	0.113 \pm 0.027 ¹⁾
PAT	5.6	0.184 \pm 0.033	0.139 \pm 0.025 ¹⁾	0.115 \pm 0.029 ¹⁾	0.101 \pm 0.026 ¹⁾	0.101 \pm 0.025 ¹⁾

3.3 CSPS 对 AA 小鼠免疫脏器指数的影响 AA 模型小鼠的胸腺指数和脾指数明显高于正常对照组,肝指数也有所增加。CSPS 治疗组与 AA 模型组比较,胸腺和脾指数明显降低($P < 0.05$),肝指数也

有下降。阳性药 PAT 作为免疫抑制药,过分抑制了 AA 小鼠免疫脏器的增长,与正常对照组比较,胸腺指数和脾指数显著降低($P < 0.05$),而 CSPS 组小鼠脏器指数与正常组比较无显著性差异。

表 3 CSPS 对 AA 小鼠免疫脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$mg \cdot g^{-1}$

组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	脾指数	胸腺指数	肝指数
正常	-	33.73 \pm 5.33 ¹⁾	20.34 \pm 3.28 ¹⁾	492.78 \pm 90.12
模型	-	44.68 \pm 16.74 ³⁾	27.90 \pm 7.62 ³⁾	532.37 \pm 66.59
CSPS	400	28.44 \pm 7.27 ²⁾	20.28 \pm 8.37 ¹⁾	510.85 \pm 95.72
	200	34.68 \pm 5.41 ¹⁾	19.26 \pm 5.70 ¹⁾	517.62 \pm 76.37
PAT	5.6	16.83 \pm 4.53 ^{4,2)}	10.95 \pm 4.18 ^{3,2)}	485.82 \pm 97.72

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常对照组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.4 CSPS 对 AA 小鼠脾淋巴细胞增殖及脾细胞生成 TNF- α , IL-1 β , IL-4 含量的影响 结果分析显示 (表 4),AA 模型组小鼠对 ConA 诱导的脾淋巴细胞

增殖反应明显高于正常对照组,经 CSPS 治疗后,脾淋巴细胞增殖反应明显降低。模型组 AA 小鼠脾细胞培养液中 TNF- α , IL-1 β 的含量明显高于正常对照

组。与模型组比较,CSPS 高、低剂量组 TNF- α , IL-1 β 含量均明显降低;与正常对照组比较,无显著差异。模型组 AA 小鼠脾细胞培养液中 IL-4 含量略低于正常对照组,经 CSPS 治疗后,IL-4 含量显著提高。

表 4 CSPS 对 AA 小鼠脾淋巴细胞增殖及生成 TNF- α , IL-1 β , IL-4 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	A	TNF- α / ng·L ⁻¹	IL-1 β / ng·L ⁻¹	IL-4/ ng·L ⁻¹
正常	-	0.34 ± 0.05 ²⁾	67.52 ± 21.88 ²⁾	106.50 ± 28.83 ²⁾	40.18 ± 14.67
模型	-	0.63 ± 0.11	122.32 ± 35.28	184.28 ± 51.61	34.25 ± 8.52
CSPS	400	0.33 ± 0.03 ²⁾	80.08 ± 10.04 ²⁾	116.29 ± 22.05 ²⁾	52.10 ± 18.41 ¹⁾
	200	0.36 ± 0.12 ²⁾	95.24 ± 21.02 ¹⁾	119.22 ± 35.00 ²⁾	47.07 ± 15.41
PAT	5.6	0.17 ± 0.04 ²⁾	77.92 ± 23.01 ²⁾	131.03 ± 39.95	56.60 ± 17.78 ²⁾

4 讨论

小鼠 AA 模型是研究类风湿性关节炎 (RA) 的理想动物模型。AA 原发性病变表现为早期致炎局部的急性炎症反应,致炎后第 10 ~ 16 天出现继发性病变,是以多发性关节炎为特征病变的全身性迟发性超敏反应^[5]。本实验足肿胀情况结果表明,CSPS 对佐剂性关节炎具有明显的治疗作用。在此基础上,我们对 CSPS 治疗 AA 的机制进行了初步探讨。

淋巴细胞是体内重要的免疫活性细胞,检测其增殖水平对评价细胞免疫功能具有重要意义。本研究结果显示 CSPS 对 AA 小鼠过高的脾淋巴细胞增殖反应有下调作用,CSPS 对 AA 小鼠的治疗作用可能与其改善 AA 小鼠异常的细胞免疫功能有关。

研究表明,在 RA 发病过程中,促炎细胞因子 (IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-2 等) 和抗炎细胞因子 (IL-4, IL-10, TGF- β 等) 的不平衡占有重要地位,其中 IL-1 和 TNF- α 参与多种病理学过程,在发病机制中尤为重要^[6-7]。IL-4 能够抑制 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 的活性,控制炎症反应。实验结果显示,CSPS 可抑制 TNF- α , IL-1 β 的产生,促进 IL-4 的表达,调节促炎和抗炎因子的水平,从而恢复细胞因子的网络平衡,

这可能是 CSPS 的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 杨兴海,柳蔚,钱京萍. 资木瓜乙醇提取物对胃肠道平滑肌的实验研究[J]. 四川中医,2004,22(3):19.
- [2] 湖北省中医药研究院医史文献研究室. 本草纲目精要[M]. 广州:广东科技出版社,2000:314.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2005:154.
- [4] 陈新霞,顾呈华,杨明晶,等. 三七多糖对小鼠免疫功能调节的研究[J]. 江苏预防医学,2007,18(3):10.
- [5] Jacobson P B, Borgan S J, Wilcox D M, et al. A new spin on an old model; *in vivo* evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat [J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(10):2060.
- [6] Brennan F M, Maini R N, Feldmann M. Role of proinflammatory cytokines in rheumatoid arthritis [J]. Springer Semin Immuno Pathol, 1998, 20(1):133.
- [7] 戴生明,单玲玲,韩星海. 类风湿关节炎骨侵蚀的发生机制[J]. 中华风湿病学杂志,2002,6(3):201.

[责任编辑 聂淑琴]