

益气通痹合剂抗胶原诱导的关节炎大鼠关节滑膜血管新生作用的研究

梁虹, 周玮, 张育*, 薛永骥, 沈维干, 高娜, 高波, 张学增
(扬州大学医学院, 江苏扬州 225001)

[摘要] 目的: 探讨益气通痹合剂抗风湿的作用及其机制。方法: 以 II 型胶原加完全弗氏佐剂诱导的关节炎(CIA)大鼠为类风湿性关节炎模型, 通过对关节滑膜病理改变、大鼠右后足关节影像学评估及对血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-1、2、3、9(MMPs)在不同处理大鼠血清中的表达, 探讨该制剂的治疗效果。结果: 益气通痹合剂组的滑膜组织新生血管明显减少, 与模型组比较差异显著($P < 0.05$), 关节影像学有改善; 模型组大鼠血清 VEGF、MMPs 活性表达明显升高, 益气通痹合剂组起下调作用。结论: 益气通痹合剂能改善模型大鼠的病理学及影像学改变, 并通过下调大鼠血清中 VEGF、MMPs 的表达而抑制 CIA 大鼠关节滑膜的血管新生功能。

[关键词] 益气通痹合剂; 关节炎; 类风湿; 抗 CD31 单抗; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0063-04

The Effect of Yiqi Tongbi Mixture on Angiogenesis of Synovial Membrane in CIA Rats

LIANG Hong, ZHOU Wei, ZHANG Yu*, XUE Yongji, SHANG Wei-gan, GAO Na, GAO Bo, ZHANG Xue-zhen
(Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Yiqi Tongbi Mixture on anti-rheumatoid in arthritic rats. **Methods:** Arthritis of rat induced by type II collage and complete Freund's adjuvant was used as rheumatoid arthritis model. The therapeutic effect of Yiqi Tongbi Mixture was observed by investigating CIA rats' joint pathological changes, right metapedes radiology and the active expression of VEGF, matrixmetalloproteinase-1, 2, 3, 9(MMPs) in serum.

[收稿日期] 2008-07-04

[通讯作者] * 张育, Tel: (0514) 87978805; Fax: (0514) 87341733; E-mail: yzyy10182001@ yahoo.com.cn

Results: 1. The new vessels in membrana synovialis of Yiqi Tongbi Mixture-treated rats were all conspicuously decreased compared with model group ($P < 0.05$); 2. The radiology change of joint in treated group were improved. 3. The active expression of VEGF and MMPs in serum of model group was obviously stepped up, while the expression of Yiqi Tongbi Mixture-treated group was down-regulated. **Conclusion:** Yiqi Tongbi Mixture can improve CIA rats' joint pathological changes and radiological changes, and to restrain the angiogenesis of CIA rats' membrana synovialis by decreasing the expression of VEGF and MMPs in serum.

[**Key words**] Yiqi Tongbi Mixture; arthritis; rheumatoid; CD31; VEGF; MMPs

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见以关节症状为主的慢性炎症性疾病。在我国患病率为 0.32% ~ 0.36%。RA 主要病理特点是在炎症刺激下, 关节滑膜细胞增生, 衬里层增厚, 多种炎细胞浸润, 滑膜细胞合成 TNF- α 、IL-1 等多种细胞因子促进滑膜成纤维细胞增殖和微血管新生而形成血管翳, 后者从滑膜边缘逐渐扩展覆盖于关节软骨表面, 一方面中断了关节的营养, 另一方面通过分泌一些酶导致软骨和骨质的破坏, 最终导致关节畸形和功能丧失。

本研究采用益气通痹合剂治疗用 II 型胶原和完全弗氏佐剂 (CFA) 构建 CIA 大鼠模型, 6 周后通过对关节滑膜病理改变、大鼠右后足关节影像学评估及对血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶-1、2、3、9 (MMPs) 在不同处理大鼠血清中的表达, 探讨益气通痹合剂的治疗效果。

1 实验材料

1.1 实验动物 30 只 4 周龄雌性 SD 大白鼠, 体重 (180 \pm 20) g, 购自南京医科大学实验动物中心 (合格证号: 苏动质字第 97001 号)。

1.2 药物 益气通痹合剂由麻黄 6 g, 黄芪 20 g, 桂枝 10 g, 制川草乌 6 g, 细辛 3 g, 白芍 10 g, 桃红 10 g, 秦艽 10 g, 红花 6 g, 白芷 10 g, 炙甘草 10 g, 生姜 3 g 等组成。经过水煎、提取、浓缩而成, 每 mL 含生药 4g。

1.3 主要试剂 II 型胶原 (美国 sigma 公司, C9801); 卡介苗 (BCG) (兰州生物制药所, 200621); Rabbit Anti-CD31 (美国 chemicon 公司, 32687); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗、免疫组化染色试剂盒及 DAB 试剂 (北京中杉金桥, 72134); 兔抗 VEGF、兔抗 MMP-1 (BA0199)、MMP-2 (BA1067)、MMP-3 (BA1531)、MMP-9 (BA0531) 一抗 (Santa Cruz 公司)。

1.4 主要仪器 752 紫外光栅分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); BMJ-II 型包埋机 (常州中威

电子仪器厂), RM-2145 石蜡切片机 (LEICA); 垂直电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司); GIS2800 凝胶图像处理系统 (上海天能科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 分组与造模 将 SD 大鼠随机分为 3 组: 空白组、模型组和益气通痹合剂治疗组。自制弗氏完全佐剂 (CFA)。将 II 型胶原溶于 0.1 mol·L⁻¹ 预先配制的乙酸溶液中, 使 II 型胶原 (C II) 浓度为 5 mg·mL⁻¹, 4 °C 过夜, 充分溶解; 然后与已配制的 CFA 等体积于冰浴中混合, 用注射器反复抽吸, 使之充分乳化, 制成稳定的 II 型胶原乳剂。模型组和益气通痹合剂治疗组每只大鼠左足跖 sc 0.1 mL 的 C II 乳剂, 并于造模的第 21 天重复 1 次加强免疫, 空白组 sc 等量生理盐水。

2.2 给药 益气通痹合剂为等效剂量, 40 g·kg⁻¹, 每日 1 次 ig; 空白组及模型组予等量生理盐水 ig, 疗程为 6 周。

2.3 CD31 单抗免疫组化法检测微血管密度 (MVD) 治疗 6 周后处死大鼠, 取其膝关节去皮毛及肌腱组织, 浸泡于 10% 甲醛溶液中固定; 取滑膜组织, 石蜡包埋, 切片后行常规 HE 染色和免疫组织化学染色。结果判断: 用 100 倍光镜扫视整个切片, 寻找高血管密度区, 即“热点”, MVD 用 5 个 200 倍视野下的血管数的平均数表示。

2.5 影像学检测 在用药 6 周后分别对各组动物的右后足关节进行 X 线摄片, 由专业人员应用改良 Sharp 评分法^[1] 进行影像学评估。

2.6 Western Blot 检测相关因子 治疗 6 周后处死大白鼠, 心脏取血, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取血清 -80 °C 冻存待测。

2.6.1 Lowry's 法测定血清蛋白浓度 用牛血清白蛋白配制不同浓度的蛋白标准品, 用紫外光栅分光光度计 530 nm 处测定各管中蛋白标准品溶液的 OD 值, 以蛋白质浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制标

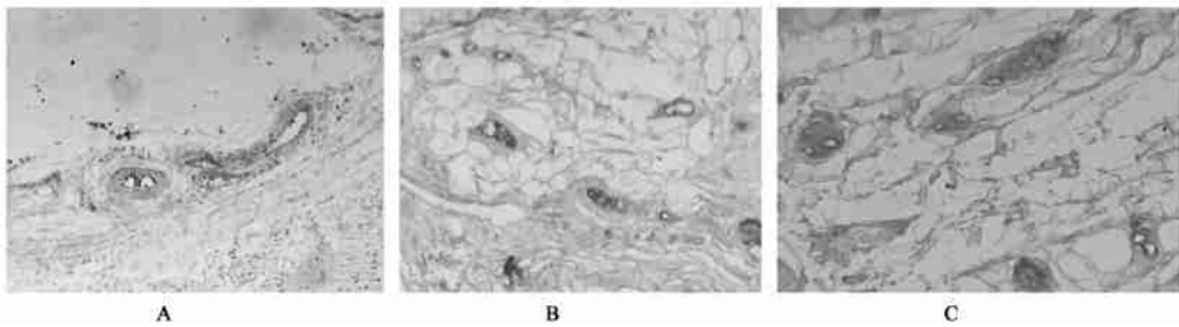


图 1 关节滑膜免疫组织化学染色图

空白组(A): 血管数目不多, 管腔大, 形态成熟, 未见新生血管及血管分支。模型组(B): 血管数多, 可见数枚管腔小、形态幼稚的新生血管, 中央可见成熟血管。益气通痹合剂组(C): 血管数较模型组减少, 形态较成熟, 未见血管分支, 管腔较小。

准曲线。各样本蛋白含量测定步骤同蛋白标准品的测定, 根据标准曲线可得出相应蛋白浓度。

2.6.2 Western Blot 测定 将稀释的血清样品与上样缓冲液混合煮沸变性(100 °C 5 min), 将变性蛋白上样电泳, 加入抗体孵育; DAB 显色。采用 4.4 版本 Quantity One 软件(BIO-RAD) 分析各条带灰度面积值, 该系统能半定量分析电泳凝胶条带。以目的蛋白条带灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值作为相应目的蛋白的表达量指标。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 10.0 及 Excel 2003 统计软件进行统计学处理。P < 0.05 为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 MVD 检测结果 见图 1, 图 2。空白组、模型组及益气通痹合剂组的 MVD 分别为 7.667 ± 2.309 , 23.667 ± 1.582 , 15.889 ± 1.17 条 $\cdot \text{hpf}^{-1}$, 提示益气通痹合剂治疗可以抑制 CIA 大鼠关节滑膜的 MVD (P < 0.05)。

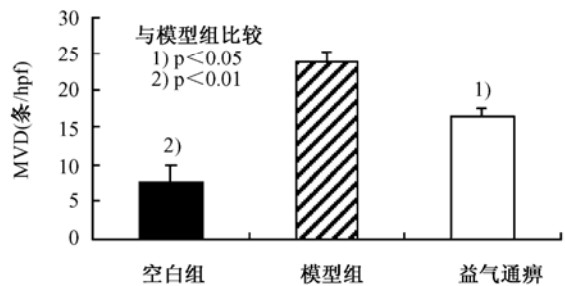


图 2 各组微血管密度

3.2 关节 X 线影像学改变 结果见图 3。治疗后 3 组的 X 线积分分别为 0.000 ± 0.000 , 3.600 ± 0.548 , 1.400 ± 0.548 以模型组最高, 益气通痹合剂组有好转, 局部软组织肿胀有减轻, 关节间隙、骨质疏松的情况有改善, 但其 X 线积分仍高于对照组, 各组之间均有统计学差异 (P < 0.05)。

3.3 Western Blot 检测相关因子结果 MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-9 及 VEGF 的表达见图 4 和表 1。造模后大鼠体内 MMP1, 2, 3, 9 和 VEGF 均有不同程度



图 3 各组 X 线影像学结果

空白组(A): 未见软组织肿胀, 关节面光滑, 无关节破坏。模型组(B): 可见膝关节面密度增高, 关节间隙变窄, 骨质缺损, 软组织肿胀明显。益气通痹合剂组(C): 可见膝关节面光滑, 无关节腔狭窄, 局部软组织轻度肿胀, 较模型组明显好转。

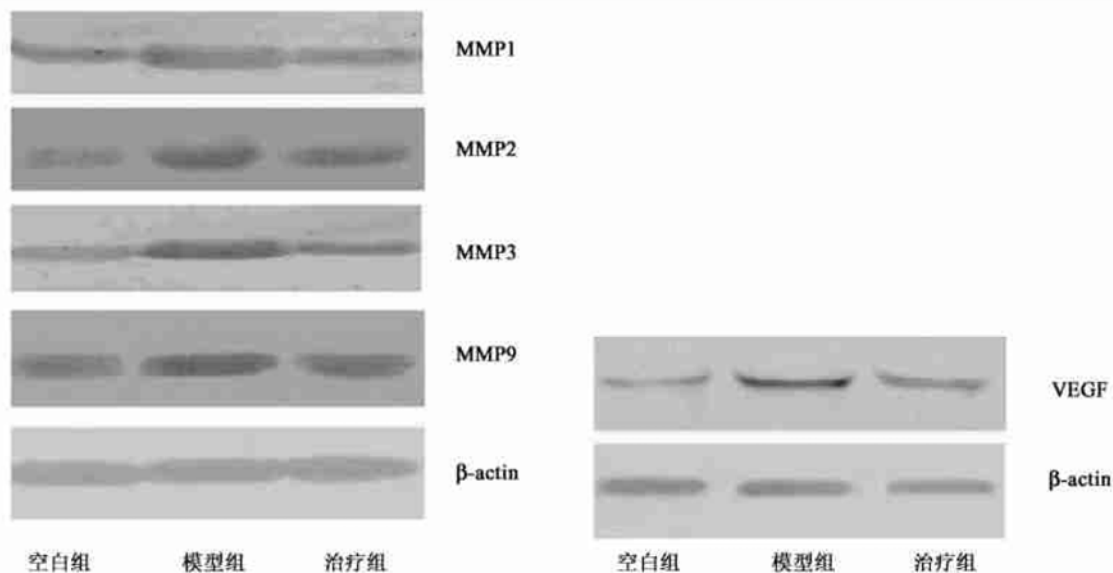


图 4 各组 Western Blot 检测图

表 1 各组 MMPs 及 VEGF 相对表达量的比较 (n= 10)

| 组别 | MMP1/ β -actin | MMP2/ β -actin | MMP3/ β -actin | MMP9/ β -actin | VEGF/ β -actin |
|---------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 空白组 | 0.6943 \pm 0.0115 ¹⁾ | 0.6428 \pm 0.0339 ¹⁾ | 0.5738 \pm 0.0524 ¹⁾ | 0.5833 \pm 0.0603 ¹⁾ | 0.6787 \pm 0.0301 ¹⁾ |
| 模型组 | 0.9698 \pm 0.0131 | 0.8515 \pm 0.0363 | 0.8997 \pm 0.0124 | 0.9000 \pm 0.0100 | 0.9476 \pm 0.0022 |
| 益气通痹合剂组 | 0.8409 \pm 0.1227 ¹⁾ | 0.7518 \pm 0.0167 ¹⁾ | 0.7493 \pm 0.0098 ¹⁾ | 0.7714 \pm 0.0289 ¹⁾ | 0.8257 \pm 0.0245 ¹⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05

的表达增加,其相对表达量均高于空白对照组 (P < 0.05),而益气通痹合剂治疗可下调 MMP1, 2, 3, 9 和 VEGF 的表达 (P < 0.05),但仍未能达到正常水平。

4 讨论

类风湿性关节炎是一种常见的全身进行性、可致残的慢性炎症性疾病,与多种免疫因素失调有关。关节软骨表面血管新生是 RA 病理过程的中心环节。细胞因子网络失调与 RA 发病及病程进展关系密切,血管生成相关细胞因子 VEGF MMPs 是血管新生相关因子的主要成员^[2-3],其中炎症介质激活内皮细胞、蛋白酶降解血管内皮基质、内皮细胞趋化及新血管生成构成了 RA 血管新生的基本过程^[4]。

在祖国医学中类风湿性关节炎属“痹证”范畴,根据 RA 的中医发病机制,我们选用了益气通痹合剂进行治疗,并探讨其作用机制,方中以黄芪为君药,益气固表,桂枝散寒而温经通痹,白芍养血缓急止痛而通血痹,麻黄辛温散寒通痹,三药共为臣药,川草乌、秦艽、细辛、白芷祛风通络止痛,桃仁、红花活血化瘀止痛,共为佐药;炙甘草、生姜调和诸药,是为使药,全方能起益气通痹,祛风通络活血止痛之功效。

本研究建立了类风湿性关节炎大鼠模型,并观

察了益气通痹合剂的治疗作用。结果显示,益气通痹合剂可以抑制模型动物滑膜组织中血管新生、血管翳的形成,从而阻止关节软骨和骨组织的破坏。分析其抑制滑膜组织中血管新生的作用是通过下调 VEGF、MMPs 等细胞因子而实现的。

[参考文献]

[1] van der Heijde D. How to read radiographs according to the sharp/ van der heijde method[J]. J Rheumatol, 2000, 21 (7): 261-263.

[2] Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50 (6): 1761-1769.

[3] Simonetti O, Lucarini G, Goteri G, et al. VEGF is likely a key factor in the link between inflammation and angiogenesis in psoriasis: results of an immunohistochemical study[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2006, 19 (4): 751-60.

[4] Nagashima M, Asano G, Yoshino S. Imbalance in Production Between Vascular Endothelial Growth Factor and Endostatin in Patients with Rheumatoid Arthritis[J]. The Journal of Rheumatology, 2000, 27 (10): 2339- 2342.