

• 药理 •

防风色原酮提取物对大鼠胶原诱导性关节炎的影响

赵娟, 刘春芳, 林娜*, 樊国琴, 张村, 肖永庆
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究防风色原酮提取物对大鼠胶原诱导性关节炎(collagen II-induced arthritis, CIA)的防治作用及初步机制。方法: II型胶原二次免疫诱导大鼠CIA模型, 初次免疫前3d分别以0.21, 0.42, 0.84 g·kg⁻¹量ig防风色原酮提取物, 动态观察大鼠关节炎积分和发病率; 免疫后35d取材, 观察关节组织病理学和放射影像学变化; 酶联免疫吸附法检测血清抗II型胶原抗体IgG和IgM水平; 放射免疫分析法检测血清中白细胞介素1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)含量。结果: 防风色原酮提取物能降低大鼠关节炎积分和发病率, 抑制血清中IgG和IgM含量, 减轻关节滑膜、软骨和骨的组织病理学变化及X光片的骨破坏程度, 降低血清IL-1β, TNF-α和IL-6水平。结论: 防风色原酮提取物能控制大鼠CIA病情的发展, 其机制可能与对促炎细胞因子的有效抑制有关。

[关键词] 防风色原酮提取物; 胶原诱导性关节炎; 病理学; 影像学; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0052-05

Effect of Chromones from *Saposhnikovia Divaricata* on Collagen-induced Arthritis in Rats

ZHAO Juan, LIU Chunfang, LIN Na*, FAN Guoqin, ZHANG Cun, XIAO Yongqing
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects and mechanism of chromones from *Saposhnikovia divaricata* on collagen-induced arthritis (CIA) in rats. **Method:** Wistar rats were intradermally injected with type II bovine collagen at the base of the tail. Rats were treated daily with oral administration of different doses of chromones from *Saposhnikovia divaricata* from day 3 before the day of the induction of arthritis to day 35. Clinical symptoms as well as clinical scores and incidence were observed. All rats were sacrificed on day 35 after immunization to observe radiologic and histopathologic changes. Antibody to type II collagen was measured by enzyme-linked immunosorbent assay, the serum levels of pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), and IL-6 were determined using radioimmunoassay. **Result:** Treatment with chromones resulted in significant delay of onset of arthritis, as well as significant decrease in arthritis incidence, clinical arthritis severity score, radiographic and histopathological arthritis severity scores. Histopathological examination demonstrated that chromones significantly reduced the inflammatory responses, cartilage damage and bone erosion in the joint tissues. Radiologic changes in the arthritic joints were also significantly reduced in the chromones-treated versus vehicle-treated rats. Chromones inhibited the serum levels of IgG and IgM, TNF-α, IL-1β and IL-6. **Conclusion:** These results suggest that chromones from *Saposhnikovia divaricata* contribute to an amelioration of arthritis severity in CIA and the mechanisms of chromones on RA might be in part, related to the

[收稿日期] 2009-06-12

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672318)

[通讯作者] * 林娜, Tel: (010) 64014411-2869; Fax: (010) 64011692; E-mail: linna888@163.com

inhibited activities of the pro-inflammatory cytokines.

[**Key words**] chromones from *Saposhnikovia divaricata*; CIA; histopathology; radiography; cytokines

防风是解表类中药,具发表祛风、胜湿止痛功效,临床随证配伍治疗类风湿性关节炎具较好效果^[1]。已知防风色原酮及其苷类成分为防风的主要活性成分,我们前期的研究工作证明了以升麻苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷为主的色原酮类成分群具有较强的抗炎消肿及解热镇痛生理活性^[2~3]。本实验拟通过与人类类风湿性关节炎(RA)临床特征最为接近的胶原诱导型关节炎(collagen II-induced arthritis, CIA)大鼠模型,从整体角度研究防风色原酮提取物对 CIA 大鼠的防治作用,并对其疗效机制进行初步的探讨。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠,清洁级,体重(160±10)g。由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供(实验动物使用许可证号:SCXK-(军)2002-001),饲喂于中国中医科学院基础理论研究所实验动物中心。

1.2 药品 防风色原酮提取物,按照文献方法提取^[4]。用时用蒸馏水配成所需浓度。

1.3 试剂 牛 II 型胶原(CII), Chondrex 公司产品;完全弗氏佐剂 Difco 公司产品;白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-6 放射免疫分析法(RIA)测定试剂盒,中国人民解放军总医院科技开发中心放免所产品;Rabbit Anti-Rat IgM (bsb-0346R)、Rabbit Anti-Rat IgG (bsb-0293R)、streptavidin/HRP (bsb-0437R),北京博奥森生物技术有限公司产品。

1.4 仪器 BMJ-1 生物组织包埋机、QPJ-1C 石蜡切片(天津航空机电公司);111N-101-20G 数显游标卡尺(广陆数字测控股份有限公司);LANMED SOPHIE 乳腺钼靶机(芬兰 Planmed Oy 公司);GC911 放射免疫 γ 计数器(中国科技大学科技实业总公司);Multiskan Ascent 酶标仪(芬兰 Labsystems 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药方法 大鼠按体重随机分为 5 组:正常组、模型组、防风色原酮提取物高(0.84 g·kg⁻¹)、中(0.42 g·kg⁻¹)、低(0.21 g·kg⁻¹)剂量组,每组 12 只。各给药组于免疫前 3 d 至免疫后 35 d ig, 1 次/d,正常组与模型组 ig 等量蒸馏水。

2.2 模型的建立^[5] 取适量牛 CII 溶于 0.1 mol·

L⁻¹醋酸(4℃过夜),加入完全弗氏佐剂,乳化,以 0.1 mL/只(含 100 μ gCII)于尾根部皮下散点注射,第 7 天重复 1 次。正常对照组以等量生理盐水对照处理。

2.3 取材及组织处理 免疫后第 35 d 大鼠颈椎脱臼处死,眼球后静脉丛取血,4℃离心,取血清-20℃保存,待用;取双后肢膝和踝关节 4%多聚甲醛溶液 4℃固定;X 线拍片(侧位),10%乙二胺四乙酸二钠盐溶液脱钙,石蜡包埋,常规切片 5 μ m,HE 染色。

2.4 关节炎积分及发病率评价 自免疫 16 d 开始,每 4 d 进行 1 次临床积分,每足 4 分制,共 16 分。积分标准^[6]:0 分,无红肿;1 分,小趾关节红肿;2 分,趾关节和足跖肿胀;3 分,踝关节以下的足爪肿胀;4 分,包括踝关节在内的全部足爪肿胀。关节炎发生率:以至少有 1 只肢体临床积分 \geq 2 分以上判断为关节炎发生。

2.5 组织病理学计分标准^[7~8] 镜下观察膝、踝关节的滑膜、软骨、骨的病理改变,并进行关节病理损伤计分。炎性细胞浸润:0 分,无炎性细胞;1 分,稀疏散在;2 分,较密集;3 分,大量。血管翳形成:0 分,无形成;1 分,少量存在 < 50%;2 分,血管翳面积 > 50%;3 分,大量存在。关节软骨破坏:0 分,无破坏;1 分,小灶状破坏 < 1/3;2 分,1/2 破坏;3 分,2/3 破坏;4 分,全部破坏。骨侵蚀程度:0 分,无侵蚀;1 分,少量侵蚀 < 50%;2 分,侵蚀面积 > 50%;3 分,大量侵蚀。

2.6 关节 X 光片计分标准^[9~11] 骨侵蚀:0 分,正常;1 分,可疑或有 1 个微小局部病灶;2 分,2 个局部病灶或病灶总表面积 \leq 50%;3 分,3 个以上的病灶或病灶总表面积 > 50%;4 分,关节面完全破坏,或出现骨缩小。关节间隙:0 分,正常;1 分,可疑或有 1 个微小局部病灶;2 分,关节出现狭窄;3 分,关节强直或关节间隙增宽。骨破坏:0 分,正常;1 分,骨质疏松期;2 分,骨质破坏期;3 分,骨质严重破坏期;4 分,强直。

2.7 酶联免疫吸附法检测血清抗 CII 抗体 IgG, IgM 含量^[12] 牛 CII 包备酶标板,加 BSA-PBS 封闭,滴加待测血清和标准抗体,加生物素化山羊抗大鼠抗体,

加亲合素化辣根过氧化酶,滴加显色剂显色,适时终止显色,酶标仪上检测(450 nm)读取吸光度 A 值。

2.8 RIA 法检测血清中 IL-1 β , TNF- α , IL-6 含量 操作步骤按试剂盒说明书进行。

2.9 统计方法 采用 SPSS15.0 统计软件;发病率统计采用 χ^2 检验,计分采用非参数(Kruskal-Wallis test)检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CIA 大鼠关节炎积分和发病率的影响 正常组大鼠关节无红肿变形。模型组大鼠关节肿胀在免疫后 10 d 开始出现,24 d 红肿明显加重,达 4.67 分,28 d 部分可见关节变形。发病率自免疫后 20 d 起一直维持在 87.9% 的高水平。防风色原酮提取物大,中,小各剂量组均能明显降低关节炎积分和发病率(图 1)。

3.2 对 CIA 大鼠血清抗 CII 抗体含量的影响 表 1 可见 CIA 大鼠血清中抗 CII 抗体 IgG, IgM 含量比正常明显升高,防风色原酮提取物各剂量组均能降低大鼠血清中抗 CII 抗体 IgG, IgM 含量,并呈现较好的量效关系。

表 1 防风色原酮提取物对 CIA 大鼠血清抗 CII 抗体 IgG, IgM 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	A ₄₅₀	
		IgG	IgM
正常	—	0.045 ± 0.009 ³⁾	0.183 ± 0.010 ³⁾
模型	—	0.639 ± 0.058	0.361 ± 0.030
防风色原酮提取物	0.84	0.202 ± 0.068 ³⁾	0.238 ± 0.023 ²⁾
	0.42	0.359 ± 0.095 ¹⁾	0.150 ± 0.059 ¹⁾
	0.21	0.408 ± 0.133	0.300 ± 0.070

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表 2~4 同)

3.3 对 CIA 大鼠病理形态学的影响 图 2 显示,正常组大鼠踝关节软骨表面光滑,关节腔干净,关节结构正常;模型组关节内大量滑膜细胞增生,炎性细胞浸润,血管翳形成,软骨表面剥脱,关节腔内可见大量坏死组织,软骨下骨组织破坏严重。与模型组比

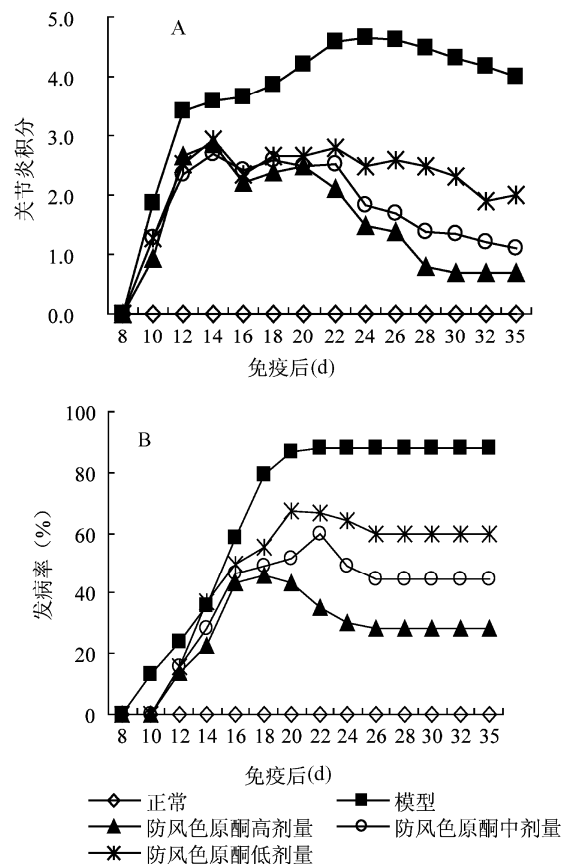


图 1 防风色原酮提取物对 CIA 大鼠关节炎积分(A)及发病率(B)的影响

较,防风色原酮提取物高剂量组大鼠关节滑膜细胞增生明显减轻,浸润的炎细胞和血管翳形成也显著减少,软骨表面光滑,未见软骨下骨破坏。炎性细胞浸润,血管翳形成,软骨和骨破坏各部分的组织病理计分结果见表 2,防风色原酮提取物各给药组均可降低 CIA 大鼠关节组织病理学改变,其中,高,中剂量组具统计学意义。

3.4 对 CIA 大鼠 X 光片的影响 正常对照组大鼠踝关节面光滑,关节间隙清晰;模型组大鼠踝关节的关节面呈虫蚀样破坏,边缘性骨质侵蚀,伴骨质增生反应,骨端增生粗大,关节间隙狭窄或增宽,关节相互融合甚至骨性强直;相比于模型组,防风色原酮提取物高剂量组大鼠关节面较光滑,关节间隙较清晰,

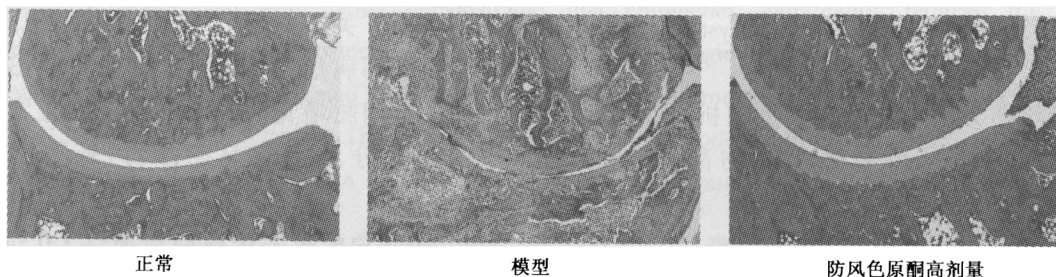


图 2 防风色原酮提取物对 CIA 大鼠踝关节组织病理学改变的影响 (HE × 50)

中剂量组关节面破坏和边缘性骨质侵蚀明显减轻, 关节间隙变化改善。X 线计分结果表明(表 3) 防风提取物高、中剂量能显著抑制 CIA 大鼠关节骨侵蚀、关节间隙改变及骨破坏等级程度。

3.5 对 CIA 大鼠血清中促炎细胞因子含量的影响
表 4 看出, 模型组血清中 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 含量比正常组的显著升高; 而防风色原酮提取物高、中剂量组能使升高的 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 含量显著降低。

表 2 防风色原酮提取物对 CIA 大鼠关节组织病理学改变计分的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	病变计分				总分
		炎性细胞浸润	血管翳形成	软骨破坏	骨侵蚀程度	
模型	—	3.88 ± 0.39	3.65 ± 0.43	3.60 ± 0.36	3.65 ± 0.41	14.78 ± 1.59
防风色原酮提取物	0.84	0.71 ± 0.18 ²⁾	0.55 ± 0.15 ²⁾	0.76 ± 0.18 ²⁾	0.58 ± 0.23 ²⁾	2.60 ± 0.74 ²⁾
	0.42	1.21 ± 0.25 ¹⁾	1.10 ± 0.17 ¹⁾	1.42 ± 0.31	0.98 ± 0.35 ¹⁾	4.71 ± 1.08 ¹⁾
	0.21	2.14 ± 0.45	1.65 ± 0.19	2.00 ± 0.46	1.73 ± 0.31	7.52 ± 1.41

表 3 防风色原酮提取物对 CIA 大鼠关节 X 光片计分的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	病变计分			总分
		骨侵蚀	关节间隙	骨破坏	
模型	—	2.55 ± 0.21	2.40 ± 0.18	2.50 ± 0.15	7.45 ± 0.54
防风色原酮提取物	0.84	0.85 ± 0.17 ²⁾	1.00 ± 0.21 ²⁾	0.80 ± 0.17 ²⁾	2.65 ± 0.55 ²⁾
	0.42	1.15 ± 0.22 ¹⁾	1.50 ± 0.25 ¹⁾	1.35 ± 0.23 ¹⁾	4.00 ± 0.70 ¹⁾
	0.21	1.75 ± 0.17	2.00 ± 0.18	1.85 ± 0.16	5.60 ± 0.51

表 4 防风色原酮提取物对 CIA 大鼠血清中促炎细胞因子含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	IL-1 β (Pg·mL ⁻¹)	IL-6(Pg·mL ⁻¹)	TNF- α (Pg·mL ⁻¹)
正常	—	91.25 ± 20.00 ²⁾	83.59 ± 28.71 ²⁾	2 201.09 ± 400.62 ³⁾
模型	—	211.11 ± 70.11	171.09 ± 44.79	3 351.23 ± 53
防风色原酮提取物	0.84	122.36 ± 20.01 ¹⁾	94.12 ± 10.07 ¹⁾	2 722.06 ± 420.68 ²⁾
	0.42	154.01 ± 50.04 ¹⁾	107.03 ± 36.71 ¹⁾	2 678.43 ± 350.86 ¹⁾
	0.21	157.56 ± 30.57	125.21 ± 28.98 ¹⁾	2 517.95 ± 270.54

4 讨论

RA 是一种以慢性、对称性关节滑膜炎为主的致残率较高的自身免疫性疾病, 属于中医“痹证”范畴。防风是临床治疗包括 RA 在内的各类痹证的常用药之一。现代药理研究表明^[13-14], 防风提取物具有较好的抗炎、镇痛、解热作用, 可抑制大鼠佐剂性关节炎。已知防风色原酮及其苷类化合物是防风的主要活性成分, 究竟这些防风色原酮类成分有否抗 RA 的作用? 机制如何? 相关研究尚未见报道。

CIA 模型是目前国际惯用的较理想的 RA 动物模型, 其临床表现、病理学、免疫学改变和病理机制与人类 RA 相似^[15]。我们采用 CII sc 的方法, 观察到经二次胶原免疫的大鼠普遍出现关节红肿、变形、跛

行甚至功能丧失等关节炎临床症状, 发病率近 88%; 免疫 35 d 血清抗 CII 抗体 IgG, IgM 水平显著升高, 炎症关节观察到滑膜组织炎细胞浸润严重、血管增生和血管翳形成、软骨破坏等组织病理形态方面的变化, X 光片也可见关节边缘性骨质侵蚀, 关节面呈虫蚀样破坏, 关节间隙狭窄或增宽, 甚至关节僵直等现象, 与国外所报道的实验性 CIA 动物模型的体征和病理特点相符^[16]。

防风色原酮提取物的预防性给药, 能明显降低 CIA 大鼠的关节炎积分和发病率, 0.42~ 0.84 g·kg⁻¹ 的防风色原酮提取物除能显著改善 CIA 大鼠关节炎性细胞浸润、血管翳形成、软骨和骨破坏等组织病理学改变外, 对 X 线的关节和骨侵蚀也有一定的抑制

作用,反映了防风色原酮提取物能从滑膜炎症、软骨侵蚀、骨破坏病理环节对 RA 表现出较好的治疗作用。并且防风色原酮提取物能降低 CIA 大鼠血清中 IgG 和 IgM 含量,抑制机体对 CII 的体液免疫反应,从而有效地控制 CII 免疫对关节的破坏作用,延缓大鼠 CIA 病情的发生发展。

IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 是重要的促炎细胞因子。IL-1 β 和 TNF- α 在 RA 炎症中起核心作用,参与刺激滑膜成纤维细胞和血管内皮细胞增殖,增加内皮细胞黏附分子表达,促使中性粒细胞在滑膜腔内聚集,刺激滑膜细胞和中性粒细胞产生前列腺素等炎性介质,还能刺激软骨细胞和破骨细胞减少糖蛋白合成,增加糖蛋白降解,并产生胶原酶及其他中性蛋白酸类,从而导致 RA 滑膜、软骨和软骨下骨的破坏;IL-6 能增强 IL-1 β 和 TNF- α 在 RA 中的某些生物效应,还参与调节滑膜成纤维细胞的增殖,与其它促炎细胞因子一起联合介导了 RA 炎症组织损伤。本研究中,我们观察到 0.42~0.84 g·kg⁻¹ 的防风色原酮提取物能明显抑制 CIA 大鼠血清的 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 水平,0.21 g·kg⁻¹ 剂量对 CIA 大鼠血清升高的 IL-6 水平也有较好的抑制作用,推测这可能是防风色原酮提取物抗 RA 的作用机理之一。

[参考文献]

[1] 呼加法. 中西医结合治疗类风湿性关节炎 69 例疗效观察[J]. 中华医药杂志, 2007, 7(6): 115-116.
[2] 肖永庆, 李 丽, 杨 滨, 等. 防风化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 117-119.
[3] 薛宝云, 李 文, 李 丽, 等. 防风色原酮苷类成分的药理活性研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5): 297-299.
[4] 张 村, 肖永庆, 李 丽, 等. 防风色原酮成分群的分离制备及其含量分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2761-2764.
[5] Cai X, Zhou H, Wong YF, *et al.* Suppression of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by QzFGJS, a preparation from an anti-arthritic Chinese herbal formula[J]. J Ethnopharmacol, 2007, (110): 39-48.

[6] Kim SH, Evans CH, Kim S, *et al.* Gene therapy for established murine collagen-induced arthritis by local and systemic adenovirus-mediated delivery of interleukin-4[J]. Arthritis Res, 2000, 2: 293-302.
[7] Matthys P, Hatse S, Vermeire K, *et al.* AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN γ receptor deficient mice[J]. Immunol, 2001, 167: 4686-4692.
[8] Magari K, Nishigaki F, Sasakawa T, *et al.* Anti-arthritic properties of FK506 on collagen-induced arthritis in rats[J]. Inflamm Res, 2003, 52: 524-529.
[9] Van der Heijde DM. Radiographic imaging: 'the gold standard' for assessment of disease progression in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology, 2000, 39 suppl 1: 9-16.
[10] Van der Heijde DM, van Riel PL, Nuvér-Zwart IH, *et al.* Effects of hydroxychloroquine and sulphasalazine on progression of joint damage in rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 1989, 1(8646): 1036-1038.
[11] 陈光星, 董 娟, 周伟生, 等. 胶原诱导型关节炎大鼠的关节影像学特点[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(4): 244-250.
[12] E. Westman, D. D. Thi Ngoc, L. Klareskog, *et al.* Suppressive effects of a quinoxaline analogue (Rob 803) on pathogenic immune mechanisms in collagen-induced arthritis[J]. British Society for Immunology, 2008, 152: 192-199.
[13] 王成章, 张崇禧. 防风国内外研究进展[J]. 人参研究, 2008, (1): 35-41.
[14] Emi Okuyama, Tetsuya hasegawa, Takamitsu Matsushita, *et al.* Analgesic components of Saposhnikovia Root (Saposhnikovia divaricata)[J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(2): 154.
[15] Nagase H, Okada Y. Proteinase and matrix degradation. In: Kelly WN, Ruddy S, Harris EDJr, Sledge CB, editors. Textbook of rheumatology[J]. Philadelphia: WS Saunders Company, 1996, 323-41.
[16] Luross JA, Williams NA. The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis[J]. Immunology, 2001, 103: 407-416.