

益气补肾活血方对佐剂关节炎大鼠白细胞介素-1 和肿瘤坏死因子- α 的影响

刘淑清^{1*}, 陈湘君²

(1. 上海中医药大学附属普陀医院中医科, 上海 200062;
2. 上海中医药大学附属龙华医院风湿科, 上海 200032)

[摘要] 目的: 探讨益气补肾活血方治疗类风湿关节炎的作用机制。方法: 采用佐剂关节炎(AA)大鼠模型, 以雷公藤多苷作对照, 观察及检测益气补肾活血方对大鼠的关节肿胀度、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1(IL-1)水平的影响。结果: 益气补肾活血方能显著减轻大鼠关节肿胀度, 降低 AA 大鼠细胞因子 TNF- α 和 IL-1 的水平。结论: 益气补肾活血方可抑制与骨破坏密切相关的细胞因子 TNF- α 和 IL-1 的水平, 具有明显的骨保护作用, 可能是该方治疗类风湿关节炎的作用机制之一。

[关键词] 大鼠关节炎模型; 类风湿关节炎; 雷公藤多苷; 益气补肾活血方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)05-0067-03

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是累及周围关节为主的自身免疫性疾病, 约 15% 的 RA 病人在起病的头两年即发生明显的骨质破坏, 而大部分病人随病程的进展也会出现不同程度的关节畸形及骨质侵蚀, 引起关节功能障碍, 严重影响患者生活质量。我们以名老中医陈湘君教授治疗 RA 的经验为依据, 筛选并组成益气补肾活血方, 对佐剂关节炎大鼠进行早期的干预治疗, 观察该复方对早期 RA 外周血中细胞因子的影响, 探讨该复方防治 RA 骨质破坏的作用机理和作用靶点。

1 材料

1.1 药物 益气补肾活血方由生黄芪 30 g, 生白术 10 g, 白芍 30 g, 骨碎补 15 g, 巴戟肉 20 g, 地鳖虫 12 g 组成, 由上海中医药大学附属普陀医院制剂室按既定工艺完成并提供; 雷公藤多苷片, 黄石飞云制药有限公司产品, 批号: 20070601。

1.2 试剂 弗氏完全佐剂(FCA), 美国 Sigma 公司产品, 批号: 047K8710; 白细胞介素-1(IL-1)试剂盒, 批号: 20070613; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒, 由上海拜力生物科技有限公司提供, 批号: 20070722。

1.3 动物 SD 大鼠 40 只, 5 周龄, 雄性, 体重约 (170 \pm 10)g, SPF 级, 由西普尔-必凯实验动物有限公

司提供, 使用许可证: SCXK(沪)2000-0002, 由上海中医药大学附属普陀医院实验动物中心负责饲养。

1.4 仪器 ELISA 酶标仪; 大鼠足体积测量仪, 自行购买零部件组装。

2 方法

2.1 造模方法 采用常规的佐剂关节炎(AA)大鼠造模方法, 于每只大鼠左后足跖皮内注射 0.1 mL 弗氏完全佐剂, 空白对照组注射生理盐水 0.1 mL。

2.2 分组与给药 大鼠按随机数字表分为 4 组: 空白对照组、模型对照组、雷公藤多苷治疗组和益气补肾活血方治疗组。造模第 14 天起开始 ig 给药。空白对照组和模型对照组: 按 10 mL \cdot kg⁻¹ 予以生理盐水 ig, 1 次/d; 雷公藤多苷组: 按 3.6 mg \cdot kg⁻¹ (雷公藤多苷蒸馏水混悬液) ig, 1 次/d; 益气补肾活血方组: 按 4800 mg \cdot kg⁻¹ (常规煎煮并浓缩为生药浓度 480 mg \cdot mL⁻¹) ig, 1 次/d, 每组均给药 50 d。

2.3 检测指标

2.3.1 关节肿胀度 测量大鼠左右后足体积: 以排水法测量足部体积, 造模后第 1, 7, 14, 21, 30, 4, 50 d 测量 1 次。比较各组左右足部体积。

2.3.2 细胞因子 IL-1 和 TNF- α 检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血清中 IL-1 和 TNF- α 的水平, 严格按照说明书要求操作。

2.4 统计方法 数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS11.5 软件(One way ANOVA)进行多组间

[收稿日期] 2008-08-25

[通讯作者] * 刘淑清, Tel: (021) 62572723-8182

方差分析, 方差齐时用 LSD 法, 方差不齐时用 Tampane's T2 法; 同一组间重复测量比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠左后足体积变化 造模当天各组体积无明显差异, 造模第 7 天开始到实验结束, 模型组左后足体积明显高于空白组 ($P < 0.01$); 给药 40 d 后, 益气补肾活血方组和雷公藤多苷组明显低于模型组

($P < 0.01$); 两治疗组间无显著差异。见表 1。

3.2 大鼠右后足体积变化 与左后足体积变化相似。第 14 天后不同时间点模型组右后足体积明显高于空白组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 给药 30 d 开始, 益气活血方组明显低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 40 d 后雷公藤组明显低于模型组 ($P < 0.01$); 两治疗组间无显著差异。见表 2。

表 1 各组大鼠左后足体积变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (mg·kg ⁻¹)	足体积(mL)/给药后天数(d)						
			0	7	14	21	30	40	50
空白对照组	9	—	0.85 ± 0.08	1.1 ± 0.11 ²⁾	1.33 ± 0.10 ²⁾	1.49 ± 0.08 ²⁾	1.64 ± 0.09 ²⁾	1.74 ± 0.09 ²⁾	1.77 ± 0.08 ²⁾
模型对照组	11	—	0.83 ± 0.28	1.90 ± 0.14	2.05 ± 0.10	2.28 ± 0.13	2.56 ± 0.05	2.66 ± 0.08	2.85 ± 0.10
益气补肾活血方组	10	4 800	0.83 ± 0.02	1.89 ± 0.18	2.08 ± 0.18	2.35 ± 0.09	2.54 ± 0.05	2.50 ± 0.07 ²⁾	2.54 ± 0.05 ²⁾
雷公藤多苷组	10	3.6	0.83 ± 0.30	1.88 ± 0.11	2.05 ± 0.11	2.27 ± 0.10	2.52 ± 0.08	2.51 ± 0.07 ²⁾	2.61 ± 0.07 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, (下同)

表 2 各组大鼠右后足体积变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (mg·kg ⁻¹)	足体积(mL)/给药后天数(d)						
			0	7	14	21	30	40	50
空白对照组	9	—	0.84 ± 0.06	0.99 ± 0.05 ¹⁾	1.34 ± 0.09 ²⁾	1.43 ± 0.07 ²⁾	1.49 ± 0.06 ²⁾	1.52 ± 0.04 ²⁾	1.58 ± 0.08 ²⁾
模型对照组	11	—	0.84 ± 0.03	1.10 ± 0.11	1.52 ± 0.15	1.59 ± 0.15	1.69 ± 0.09	1.78 ± 0.10	1.93 ± 0.08
益气补肾活血方组	10	4 800	0.83 ± 0.02	1.09 ± 0.11	1.50 ± 0.11	1.58 ± 0.08	1.59 ± 0.06 ¹⁾	1.66 ± 0.07 ²⁾	1.79 ± 0.09 ²⁾
雷公藤多苷组	10	3.6	0.83 ± 0.03	1.11 ± 0.12	1.47 ± 0.12	1.61 ± 0.09	1.63 ± 0.07	1.67 ± 0.07 ²⁾	1.81 ± 0.07 ²⁾

3.3 各组大鼠 IL-1 和 TNF-α 的变化 治疗后, 模型组 IL-1 和 TNF-α 明显高于空白组, 益气补肾活血方组和雷公藤多苷组明显低于模型组 ($P < 0.01$); 两治疗组间无显著差异。见表 3。

表 3 各组大鼠血浆 IL-1、TNF-α 水平比较 (pg·mL⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1	TNF-α
空白对照组	9	0.355 ± 0.073 ²⁾	0.329 ± 0.124 ²⁾
模型对照组	11	0.612 ± 0.384	0.809 ± 0.167
益气补肾活血方组	10	0.391 ± 0.137 ²⁾	0.476 ± 0.093 ²⁾
雷公藤多苷组	10	0.406 ± 0.111 ²⁾	0.488 ± 0.192 ²⁾

上述结果提示益气补肾活血方能明显降低与骨破坏密切相关的细胞因子 TNF-α 和 IL-1, 具有明显的骨保护作用。

4 讨论

RA 是一种自身免疫性疾病, 其基本病变为滑膜炎, 可以引起软骨破坏和骨质侵蚀, 最终导致关节畸形和功能障碍。RA 的病因至今仍不清楚。目前已证实破骨细胞的增殖活化在 RA 骨侵蚀的发病机制中起着决定性的作用^[1-2]。

目前认为 IL-1 是参与 RA 进展期关节破坏的典型前炎症细胞因子。在 RA 关节腔损伤机理中, IL-1 的局部生物效应发挥的最为充分, 是对关节软骨破坏力最强的细胞活素^[3]。TNF-α 的产生细胞及效应靶细胞和 IL-1 有很大相似性, 通常同时合成分泌, 在多数情况下表现协同性生物学效应, 在 RA 的炎症反应和骨破坏过程中起关键作用。二者可以刺激滑膜细胞产生高水平的 MMPs, 抑制关节胶原和蛋白多糖合成, 导致细胞外基质的破坏与重建, 加快了 RA 的骨破坏进程。^[4] 还可以促进 RANKL 或 RANK 的表达, 促进破骨细胞的分化, 延长破骨细胞的寿命, 提高破骨细胞的骨吸收能力, 间接参与骨质破坏^[5], 可见 IL-1 和 TNF-α 是 RA 发病中重要的炎症介质, 二者对关节软骨和骨的破坏有部分叠加或协同作用, 参与了 RA 的发病与发展。因此, 抑制参与破骨细胞异常增殖和活化的细胞因子为防治 RA 骨质破坏的关键。

益气补肾活血方由生黄芪、生白术、白芍、骨碎补、巴戟肉、地鳖虫组成, 具有益气补肾、活血通络止

痛之功效。前期实验已证实该方可明显降低 RA 患者的类风湿因子滴度及免疫球蛋白、提升患者低下的补体 C3,起到抑制体液免疫作用^[6]。本研究结果显示益气补肾活血方能显著减轻大鼠关节肿胀度,并且能明显降低与骨破坏密切相关的细胞因子 TNF- α 和 IL-1,具有明显的骨保护作用。这可能是其治疗 RA 的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] Nosaka K, Miyamoto T, Sakai T, *et al.* Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia: overexpression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand on adult T-cell leukemia cells [J]. *Blood*, 2002, 99: 634-640.
- [2] Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts [J]. *Gene*, 2005, 350(1):

1213.

- [3] Vuolteenaho K, Moilanen T, Hamalainen M, *et al.* Regulation of nitric oxide production in osteoarthritic and rheumatoid cartilage, Role of endogenous IL-1 inhibitors [J]. *Scand J Rheumatol*, 2003, 32(1): 192-194.
- [4] ABRAMSON SB, AMIN A. Blocking the effect of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage [J]. *Rheumatol*, 2002, 41(9): 972-980.
- [5] Varsani H, Patel A, Kooyk Y, *et al.* Synovial dendritic cells in juvenile idiopathic arthritis (JIA) express receptor activator of NF- κ B (RANK) [J]. *Rheumatology*, 2003, 42: 583-590.
- [6] 陈湘君, 苏 励, 周时高, 等. 益气温阳为主治疗类风湿性关节炎的临床研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 1994, 21(1): 24.