

梔子总苷对大鼠佐剂性关节炎治疗作用 及部分机制的研究

吴虹¹, 陈尹², 魏伟^{2*}, 宋礼华³

- (1. 安徽中医学院/安徽省中药研究与开发重点实验室/安徽省现代中药重点实验室, 安徽 合肥 230031;
2. 安徽医科大学临床药理研究所, 安徽 合肥 230032;
3. 安徽省安科生物技术股份有限公司, 安徽 合肥 230088)

[摘要] 目的: 观察梔子总苷(TGCJ)对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用和对炎症区域一氧化氮(NO)、一氧化氮合成酶(NOS)及相关炎症介质的影响, 探讨其治疗类风湿性关节炎(RA)的作用机制。方法: 弗氏完全佐剂(FCA)免疫诱导大鼠佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA); SD大鼠随机分为6组: 正常组、模型组、TGCJ 3个剂量组(20, 40, 80 mg·kg⁻¹)和雷公藤多苷(GTW)组; 足爪容积测定法和关节炎评分法观察关节炎的发生情况; 测定大鼠关节滑膜组织中NO、NOS、前列腺素E₂(PGE₂)及白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子(TNF-α)水平。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠关节滑膜组织NO、NOS、PGE₂、IL-1β和TNF-α水平显著升高; 与模型组相比, TGCJ组大鼠佐剂性关节炎继发病变显著受抑制, 关节滑膜组织NO、NOS、PGE₂及炎症细胞因子IL-1β和TNF-α水平显著降低。结论: 抑制关节炎炎症局部炎性细胞因子活性和降低炎症介质含量是梔子总苷发挥治疗类风湿性关节炎作用的重要机制之一。

[关键词] 梔子总苷; 佐剂性关节炎; 炎症介质; 细胞因子

[中图分类号] R971.1; R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0049-04

Effects and Mechanisms of Treating Adjuvant Arthritis by Total Glucosides of Cape Jasmine in Rat

WU Hong¹, Chen Yin², WEI Wei^{2*}, SONG Li-hua³

- (1. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Research and Development of Traditional Medicine in Anhui, Key Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicine in Anhui, Hefei 230031, China;
2. Institute of Clinic Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immunopharmacology in Anhui, Hefei 230032, China;
3. Anhui Anke Biotechnology Co., LTD, Hefei 230088, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-inflammatory mechanism of total glucosides of Cape Jasmine (TGCJ) on rats with adjuvant arthritis. **Methods:** Rats were randomly divided into the normal group, the model group, the GTW group, and the TGCJ groups of small, medium, large dosages (20, 40, 80 mg·kg⁻¹). Except for the normal group, animals were modeled to form adjuvant-induced arthritis with Freund's complete adjuvant. The arthritis index (AI) and the swelling degree of paws were recorded, and the activity of IL-1β, TNF-α and the levels of NO, NOS and PGE₂ in joint synovium of secondary arthritis were determined. **Results:** Compared with the normal group, the levels of NO, NOS,

[收稿日期] 2008-03-17

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金项目(2006KJ087C)

[通讯作者] * 魏伟, Tel: (0551) 5161208; E-mail: dr.ww_2008@yahoo.com.cn

PGE₂ and the activity of IL-1 β and TNF- α in joint synovium of secondary arthritis were increased significantly in the model group. Compared with the model group, TGCJ showed a dramatic inhibitory effect on secondary reaction of adjuvant arthritis, and the levels of NO, NOS, PGE₂ and the activity of IL-1 β and TNF- α in joint synovium of secondary arthritis were significantly decreased. **Conclusions:** TGCJ has a remarkable treatment effect on arthritis. Inhibiting the activity of cytokines and decreasing the level of inflammation media in inflammatory region may be involved in the mechanisms of the therapeutic effects of TGCJ.

[**Key words**] TGCJ; adjuvant arthritis; inflammatory medium; cytokines

梔子系茜草科植物的成熟果实 Cape Jasmine (*Gardenia jasminoides* Ellis), 能养阴清热、凉血解毒。现代研究已证实梔子提取物具有抗炎、镇痛、解热和利胆作用^[1]。本课题组前期已对梔子总苷(TGCJ, total glucosides of Cape Jasmine) 抗炎镇痛作用进行了研究^[2]。

目前国内外从细胞分子角度阐明 TGCJ 对 RA 治疗作用机制的研究报道尚无。大鼠以注射弗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA) 免疫诱导发生佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA)。AA 作为类似于 RA 的实验动物模型, 与 RA 有许多共同的组织学特征, 在临床表现、病理学和免疫学改变及发病机制方面与人类 RA 有许多相似, 是筛选和研究治疗 RA 药物的较理想动物模型之一^[3]。本研究采用大鼠 AA 模型, 通过观察 TGCJ 对 AA 大鼠关节滑膜组织中相关炎症介质的影响, 进一步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 TGCJ 由安徽中医学院药学院中药化学实验室提供, HPLC 法测得有效单体梔子苷含量为 52.5%, UV 法测得 TGCJ 含量 89.1%; 雷公藤多苷片 (glucosides of tripterygium wifordii hook, GTW) 上海医科大学红旗制药厂, 批号 20040216。上述供试品均用 0.5% CMC-Na 溶液配制成混悬液备用。卡介苗 (BCG) 卫生部上海生物制品所提供, 批号 060321。I¹²⁵-IL-1 β 放免试剂盒、I¹²⁵-TNF- α 放免试剂盒和 I¹²⁵-PGE₂ 放免试剂盒分别由北京北方生物技术研究所、北京邦定泰克生物技术有限公司和苏州大学医学院提供; NO 的硝酸还原酶法检测试剂盒和 NOS 试剂盒均由南京聚力生物医学工程研究所提供。

1.2 动物 SD 大鼠, δ , 体重 (180 \pm 20) g, 购于安徽医科大学实验动物中心, 合格证号: 皖实动准 01 号。

1.3 仪器 MK-500 型足爪仪, 日本 Mukomachi Kiai CD 公司; 752 紫外-可见分光光度计, 惠普上海分公

司。

2 方法

2.1 大鼠 AA 模型的制备与评价 将同一批号的卡介苗 80 $^{\circ}$ C 灭活 1 h, 以高压灭菌的液体石蜡配成 10 g \cdot L⁻¹ 的乳剂, 充分研磨混匀即得 FCA。于每鼠左后足跖皮内注射 FCA 0.1 mL 致炎。在致炎前及致炎后第 7, 14, 17, 21 和 24 天 (即 d 0, d 7, d 14, d 17, d 21 和 d 24) 用足容积测量仪测定大鼠右侧足爪容积, 求出肿胀度 (Δ mL = 致炎后容积 - 致炎前容积), 以观察 AA 大鼠的继发炎症变化情况。同时采用关节评分法 (0~4 级), 得出关节炎指数 (arthritic index, AI), 每肢 AI 最高分数为 4 分, 未注射佐剂的 3 个肢体 AI 之和代表每只大鼠的 AI, 最高值为 12。具体评分标准如下: 0 分: 无红肿; 1 分: 趾关节红肿; 2 分: 趾关节和足趾肿胀; 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。

2.2 实验分组与给药方案 将 SD 大鼠随机分为 6 组: 正常组、AA 模型组、TGCJ (20, 40, 80 mg \cdot kg⁻¹)、GTW (50 mg \cdot kg⁻¹), 致炎后 d 17 给大鼠 ig 药物 (d 17 ~ d 24), 正常组与模型组 ig 等体积溶媒。致炎后 d 24 处死大鼠, 检测各指标。

2.3 关节滑膜细胞培养上清液中 PGE₂、IL-1 β 、TNF- α 的测定 大鼠致炎后 d 24, 末次给药 4 h 后被处死, 无菌取滑膜组织, 采用胶原酶-胰蛋白酶消化法, 获得原代滑膜细胞^[4]。将 2 \times 10⁸ \cdot L⁻¹ 滑膜细胞的 DMEM 培养液 (含有 5 mg \cdot mL⁻¹ LPS), 加入 24 孔培养板中, 置 37 $^{\circ}$ C 湿度饱和的 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 离心收集上清液, -20 $^{\circ}$ C 保存待测。IL-1 β 、TNF- α 活性和 PGE₂ 含量采用放免法测定, 按试剂盒说明书操作。

2.4 关节滑膜细胞培养上清液中 NO 和 NOS 的测定 用硝酸还原酶特异地将 NO₃⁻ 还原为 NO₂⁻, 再通过其显色深浅反映 NO 浓度的高低。NOS 催化 L-精氨酸生成 NO, NO 与二价铁配合物 (显色剂) 形成有

色物, 在 540 nm 波长处测定其吸收度(A) 值, 即代表 NOS 活性。以上测定均按试剂盒说明书操作。

2.5 统计学处理 各组数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据分析应用 SPSS 11.5 软件处理, 采用 *t* 检验比较组间数据差异。

3 结果

3.1 TGCJ 对 AA 大鼠继发性继发性侧关节肿胀度的影响 AA 大鼠注射 FCA 后注射肢 d1~ d3 表现为急性局部炎症, 然后逐渐减轻, 即急性炎症缓解期(d 7 ~ d 12), 继而因迟发性超敏反应, 表现为对侧和前肢足爪肿胀, 耳、尾部出现炎性结节和红斑。与模型组相比, TGCJ 40, 80 mg·kg⁻¹ 均能明显减轻关节炎

症程度(表 1)。

3.2 TGCJ 对 AA 大鼠继发性关节炎的影响 注射 FCA 致炎后 d 17, 各模型大鼠开始出现全身症状, 表现为未注射 FCA 的其余 3 个肢体关节红肿、变形, 耳及尾部结节, 行动不便。TGCJ 40, 80 mg·kg⁻¹ 在用药 d 5 后(d 21~ d 24) 可明显抑制 AA 大鼠全身继发性关节病变。结果见表 2。

3.3 TGCJ 对 AA 大鼠关节滑膜组织中 PGE₂、IL-1β 和 TNF-α 的影响 与正常组比较, AA 模型组大鼠关节滑膜组织中 PGE₂、IL-1β 和 TNF-α 显著升高, TGCJ 40, 80 mg·kg⁻¹ 能显著降低 AA 大鼠关节滑膜组织中 PGE₂、IL-1β 和 TNF-α 的水平。结果见表 3。

表 1 TGCJ 对 AA 大鼠继发性关节肿胀度(容积)的影响(mL, $\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	d7	d14	d17	d21	d24
正常	-	0.10 ± 0.06	0.09 ± 0.07 ²⁾	0.09 ± 0.09 ²⁾	0.10 ± 0.08 ²⁾	0.11 ± 0.07 ²⁾
AA	-	0.10 ± 0.05	0.62 ± 0.11	0.78 ± 0.12	1.16 ± 0.19	0.96 ± 0.16
TGCJ	20	0.09 ± 0.07	0.60 ± 0.12	0.74 ± 0.14	1.12 ± 0.16	0.90 ± 0.18
	40	0.11 ± 0.04	0.61 ± 0.15	0.69 ± 0.16	1.01 ± 0.02 ¹⁾	0.82 ± 0.07 ¹⁾
	80	0.08 ± 0.09	0.65 ± 0.10	0.67 ± 0.03	0.89 ± 0.15 ²⁾	0.64 ± 0.10 ²⁾
GTW	50	0.12 ± 0.07	0.64 ± 0.17	0.71 ± 0.18	0.79 ± 0.19 ²⁾	0.57 ± 0.13 ²⁾

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

表 2 TGCJ 对 AA 大鼠继发性关节炎的影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	关节炎指数				
		d7	d14	d17	d21	d24
正常	-	2.52 ± 1.01	2.85 ± 0.87 ¹⁾	3.14 ± 0.89 ²⁾	2.95 ± 0.58 ²⁾	2.69 ± 1.13 ²⁾
AA	-	3.72 ± 2.67	6.12 ± 2.01	8.45 ± 1.32	10.41 ± 4.89	9.04 ± 3.46
TGCJ	20	3.12 ± 2.34	7.35 ± 3.07	7.61 ± 2.21	7.68 ± 1.87	7.05 ± 2.09
	40	3.42 ± 1.25	6.57 ± 3.27	6.59 ± 1.99	7.02 ± 3.96 ¹⁾	6.66 ± 2.24 ¹⁾
	80	3.64 ± 1.89	6.51 ± 2.86	6.54 ± 1.19	6.87 ± 3.03 ¹⁾	6.47 ± 2.76 ²⁾
GTW	50	3.28 ± 3.11	6.31 ± 2.79	6.46 ± 2.47	6.59 ± 2.77 ¹⁾	6.52 ± 2.48 ²⁾

表 3 TGCJ 对 AA 大鼠关节滑膜组织中 PGE₂、IL-1β 和 TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	PGE ₂ (ng/10 ⁵ cells)	IL-1β(pg·mL ⁻¹)	TNF-α(pg/10 ⁵ cells)
正常组	-	8.09 ± 6.71 ²⁾	53.12 ± 21.34 ²⁾	210.78 ± 28.71 ²⁾
AA	-	24.34 ± 11.32	141.37 ± 19.97	400.89 ± 33.01
TGCJ	20	15.65 ± 9.79	112.05 ± 25.38	347.52 ± 38.27
	40	13.28 ± 5.37 ¹⁾	97.64 ± 21.36 ¹⁾	296.31 ± 45.87 ¹⁾
	80	11.89 ± 8.99 ²⁾	88.25 ± 15.42 ²⁾	253.18 ± 29.76 ²⁾
GTW	50	12.04 ± 9.36 ²⁾	92.17 ± 20.11 ²⁾	268.92 ± 39.89 ²⁾

表 4 TGCJ 对 AA 大鼠关节滑膜组织中 NO 与 NOS 水平的影响($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	NO(μmol·L ⁻¹)	NOS(U·L ⁻¹)
正常组	-	14.5 ± 9.6 ²⁾	1 097 ± 611 ²⁾
AA	-	62.1 ± 12.4	6 013 ± 792
TGCJ	20	52.3 ± 10.8	5 357 ± 1 487
	40	41.5 ± 11.9 ¹⁾	3 176 ± 985 ²⁾
	80	26.4 ± 12.5 ²⁾	968 ± 368 ²⁾
GTW	50	30.2 ± 13.7 ²⁾	1 017 ± 328 ²⁾

3.4 TGCJ 对 AA 大鼠关节滑膜组织中 NO 与 NOS 的影响 与正常组比较,模型组大鼠关节滑膜组织中 NO 与 NOS 水平显著升高,TGCJ 40, 80 mg·kg⁻¹ 的 NO 与 NOS 水平显著低于模型组。结果见表 4。

4 讨论

RA 是一种慢性、炎性、系统性的自身免疫性疾病。许多研究已经表明 T 细胞在 RA 的病理机制及病程进展中起重要作用,T 细胞亚群中辅助 T 细胞的 Th1、Th2、Th3 间相互作用,比例失调并伴有 Th1 型炎性细胞因子分泌增加^[5]。本实验结果表明:AA 大鼠关节滑膜组织 IL-1 β 和 TNF- α 等 Th1 型炎性细胞因子分泌水平增高。

NO 是一种重要的神经递质,作为体内广泛存在的信号分子和细胞毒性因子,作用于多个系统和器官,对协调体内代谢起着重要作用。其对免疫系统有双重作用,低水平的 NO 可参与免疫应答的信号转导,而高水平 NO 却发挥细胞毒性作用,介导免疫损伤^[6]。NO 可促进巨噬细胞合成释放 IL-1, TNF- α 等炎性细胞因子,导致滑膜和炎性细胞产生和释放前列腺素增多。而 PGE₂ 是关节炎发病的重要炎症介质,能选择性抑制 Ts 细胞功能,导致 B 细胞功能亢进,分泌过多的抗体,引起组织器官损伤,这是形成 RA 的重要原因。

NOS 作为生物体内 NO 合成的限速酶,对 NO 的合成及其生物功能的发挥起着重要作用。已确定有神经元型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱生型(iNOS)三种。前两种被称为原生性 NOS,而 iNOS 在正常软骨组织中无表达,在炎性细胞因子如 IL-1, TNF- α 和 IFN 等刺激下才诱生。这种诱生受到多种转录因子的调控,其中之一是通过激活核转录因子(NF- κ B)来实现的,炎症初期 NF- κ B 活化,上调 iNOS 基因的表达,NO 生成增多,iNOS 有与前炎因子等共同增强 NF- κ B 的活性,使 NF- κ B 的炎性蛋白靶基因大量表达,促进了炎症发展^[7]。

栀子属清热解毒药,临床主要用于治疗黄疸和关节扭伤。前期药效学实验已揭示栀子总苷既可抑制炎症早期的水肿和渗出,又可抑制炎症晚期的组织增生和肉芽组织的生成;同时对化学物质引起的扭体反应有抑制作用,明显升高小鼠对热板刺激的痛阈,且其抗炎镇痛作用呈剂量相关趋势。本实验中 AA 大鼠关节滑膜组织中 NO 与 NOS 水平比正常高,可能是由于炎症关节局部高浓度炎性细胞因子

刺激滑膜细胞和软骨细胞,使其 iNOS 表达增加,NO 产生增加。提示 AA 大鼠的多发性关节病变局部的细胞因子活性增强,与 NO 水平异常升高有关,表明 AA 大鼠的多发性关节病变与滑膜组织细胞 NO 的代谢异常有关,因此抑制 NO 的产生必然使关节组织损伤得到一定的缓解,起到治疗作用。本实验结果表明,栀子总苷显著抑制大鼠 AA 继发性病变,AA 大鼠关节滑膜组织中 NO、NOS、PGE₂、IL-1 β 及 TNF- α 水平明显降低,提示栀子总苷对 RA 的治疗作用与其抑制炎症病变部位炎性细胞因子活性和降低炎症介质含量有关,其中栀子总苷使 NO 和 NOS 水平下降是其抗 RA 的重要作用机制。至于栀子总苷对 NOS 水平的下调是否通过激活 NF- κ B 来实现,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 朱江,蔡德海,芮菁. 栀子的抗炎镇痛作用[J]. 中草药, 2000, 31(3): 198-200.
- [2] 吴虹,宋礼华,魏伟. 栀子总苷的抗炎镇痛作用研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(7): 31-32.
- [3] Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, *et al.* Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats[J]. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 1997, 273(4): 1550-1556.
- [4] Li W, Zhang YQ, Liu XP, *et al.* Regular expression of discoidin domain receptor 2 in the improved adjuvant-induced animal model for rheumatoid arthritis[J]. *Clin Med Sci J*, 2005, 20(2): 133-137.
- [5] Aarvak T, Chabaud M, Thoen J, *et al.* Changes in the Th1 or Th2 cytokine dominance in the synovium of rheumatoid arthritis (RA): a kinetic study of the th subsets in one unusual RA patient[J]. *Rheumatology*, 2000, 39(5): 513-522.
- [6] Presle N, Cipolletta C. Cartilage protection by nitric oxide synthase inhibitors after intraarticular injection of interleukin1beta in rat [J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(10): 2094-2098.
- [7] Nishiya T, Uehara T, Kaneko M, *et al.* Involvement of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) signaling in the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in rat C6 glioma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275(2): 268-273.