

祛风舒筋丸对佐剂关节炎大鼠免疫调节及血管内皮生长因子、细胞黏附分子-1 表达的影响

张瑶,屠莹,胡占嵩,陈丽娟

作者单位:天津市胸科医院药剂科,天津 300222

通信作者:陈丽娟,女,主任药师,研究方向为医院药学,E-mail:xkyyxkyy@163.com

摘要:目的 研究祛风舒筋丸对佐剂关节炎大鼠免疫调节作用以及对血管内皮生长因子(VEGF)与细胞黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响。方法 建立弗氏完全佐剂关节炎大鼠模型,检测体外诱导脾淋巴细胞增殖水平,血清细胞因子含量以及滑膜 VEGF、ICAM-1 的表达水平。结果 祛风舒筋丸能显著抑制模型大鼠足趾肿胀,抑制体外诱导的 T、B 淋巴细胞增殖,抑制类风湿因子(RF)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的生成,抑制 VEGF、ICAM-1 的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 祛风舒筋丸具有较强的抗类风湿关节炎作用,其作用机制可能与抑制体外诱导的 T、B 淋巴细胞增殖,抑制 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 等细胞因子生成,抑制 VEGF 和 ICAM-1 的表达水平有关。

关键词:祛风舒筋丸; 类风湿性关节炎; 作用机制

The effect of Qufengshujin pills on immunoregulation and expression of VEGF and ICAM-1 in rats with adjuvant arthritis

ZHANG Yao, TU Ying, HU Zhansong, CHEN Lijuan

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300222, China

Abstract: **Objective** To study the effect of Qufengshujin Pills on immunoregulation and expression of VEGF and ICAM-1 in rats with adjuvant arthritis. **Methods** The models of Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats were established to determine splenic lymphocyte proliferation induced *in vitro*, serum cytokine content and expression of VEGF and ICAM-1 in synovial membrane. **Results** Qufengshujin Pills could significantly inhibit paw edema in rats, inhibit T and B lymphocytes proliferation induced *in vitro*, inhibit the generation of RF, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , inhibit the expression of VEGF and ICAM-1 with statistics significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Qufengshujin Pills has a strong anti-rheumatoid arthritis effect. The mechanism of action may be related to the inhibition of T and B lymphocytes proliferation, cytokine generation of IL-1 β , IL-6 and TNF- α and expression of VEGF and ICAM-1.

Key words: Qufengshujin Pills; Rheumatoid arthritis; Mechanism of action

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)为自身免疫性疾病,全世界发病率约 0.5% ~ 1%,我国发病率约 0.4%,女性的发病率高于男性^[1-2]。该病以关节滑膜慢性炎症以及软骨和骨的破坏为其主要特点^[3],可导致关节畸形和功能丧失,影响病人的生活质量。类风湿性关节炎属于中医理论中“痹症”范畴,发病初期因风寒湿邪侵入经络关节,导致气血不通,故为风寒湿痹型,以祛风散寒,利湿宣痹等功效中药施治^[4]。祛风舒筋丸目前收载于 2015 版《中国药典》^[5],该药由防风、牛膝、秦艽、威灵仙等十八味中药制成,有祛风散寒,除湿活络之功效,用于治疗风寒湿闭阻所致的关节疼痛、屈伸不利、四肢麻木等症状。目前对祛风舒筋丸研究多为质量标准的建立^[6],对其抗类风湿性关节炎的作用机制研究鲜有报道。大鼠弗氏完全佐剂性关节

炎模型的发病机制和特征与临床上的类风湿性关节炎较为接近^[7],本研究自 2016 年 10 月至 2017 年 3 月通过佐剂性关节炎大鼠模型,探究祛风舒筋丸对模型大鼠的免疫调节作用以及对血管内皮生长因子(VEGF)与细胞黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响,为该药用于类风湿性关节炎的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性健康 SD 大鼠,体质量(250 ± 20)g,清洁级动物,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK-(京)-2016-0011。本研究中对大鼠的处理符合动物伦理学标准。

1.2 药物及试剂 祛风舒筋丸(北京宝树堂科技药业有限公司,规格 60 g/100 丸);弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司);白芍总苷胶囊(宁波立华制药有限公司,0.3 g/粒);刀豆蛋白 A(Con A)、脂多糖

(LPS)、噻唑蓝(MTT)(美国Sigma公司);RPMI1640培养粉(美国Gibco公司);多聚甲醛、二甲基亚砷(天津光复化学试剂有限公司);0.9%氯化钠注射液(天津百特医疗用品有限公司);风湿因子(RF)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA试剂盒(南京建成科技有限公司);VEGF、ICAM-1免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

试剂配制:将生理盐水和弗氏完全佐剂在临用配制前充分摇匀。取适量生理盐水与弗氏完全佐剂经双注射器充分乳化1 h(经三通接口反复抽推乳化油包水乳剂),配置成10 mL的弗氏完全佐剂生理盐水乳剂。

1.3 实验仪器 超净工作台(天津艾克瑞特实验室设备有限公司);细胞培养箱(美国Thermo Electron公司);酶标仪(美国BIOTEK公司);小型台式冷冻离心机(美国Thermo Scientific公司)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠佐剂性关节炎模型的建立 取雄性健康SD大鼠,体质量(250 ± 20) g,自由饮食、饮水,适应性饲养1周后开始实验。在进行酒精常规消毒左足趾和尾根部后,用微量注射器于每只大鼠左后足足趾皮下注射0.1 mL的弗氏完全佐剂生理盐水乳剂,尾根部多点皮内注射上述乳剂0.1 mL致炎,空白组(随机取10只大鼠)用同样方法于其相应部位注射0.2 mL生理盐水。分别于初次造模第6天和第12天后注射乳剂0.2 mL以加强免疫炎症反应,建立大鼠佐剂性关节炎模型。造模后第12天,按照关节红肿程度进行关节炎指数(Arthritic Index, AI)的评分^[8](评分标准:0分,无关节红肿;1分,关节发红而不肿胀;2分,关节轻度红肿;3分,关节中度红肿;4分,关节重度红肿,不能负重。AI = 四肢关节评分之和。各组评分>4分认为造模成功,AI<4分的大鼠从实验组中剔除)。将造模成功的大鼠采用随机数字表法分为5组,即模型组、白芍总苷胶囊组、祛风舒筋丸低、中、高剂量组,每组10只,共计50只。在造模后的第12天分别测量并记录左后足趾厚度后,灌胃给药。白芍总苷胶囊组给药剂量为0.27 g/kg,祛风舒筋丸低、中、高剂量组(2.16、10.8、21.6 g/kg,相当于临床等效剂量的1、5、10倍),每只大鼠灌胃2 mL,空白组和模型组给予等量生理盐水,共给药18 d。

1.4.2 祛风舒筋丸对佐剂性关节炎大鼠关节肿胀度的影响 在造模前及给药治疗前后观察各组大鼠活动状态变化及关节红肿情况,于造模前、造模

后第12天、造模后第17天、造模后第21天、造模后第25天、造模后第29天用游标卡尺测量左后足趾厚度,比较治疗后各组足趾肿胀程度的变化。计算:肿胀度 = 造模后足趾厚度 - 造模前足趾厚度。

1.4.3 祛风舒筋丸对大鼠脾淋巴细胞增殖的影响

实验第30天,即给药18 d后眼球放血处死大鼠,无菌取脾,制备脾细胞悬液,常规制备单个脾细胞悬液,活细胞大于95%,调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL,加入96孔培养板,每孔加细胞悬液100 μ L,再加入含Con A或LPS的RPMI-1640液100 μ L(Con A的终浓度为5 mg/L,LPS的终浓度为10 mg/L),在37 $^{\circ}$ C,5% CO₂的培养箱中培养48 h,每孔滴加MTT(5 mg/mL)20 μ L后继续培养4 h,去上清液后滴加二甲基亚砷200 μ L,于酶标仪570 nm处比色测定吸光度值。

1.4.4 大鼠血清RF、IL-1 β 、IL-6及TNF- α 的检测 实验第30天眼球放血处死大鼠,将全血以3 000转/分钟离心,取血清,-20 $^{\circ}$ C保存,按照ELISA试剂盒说明书方法测量血清RF、IL-1 β 、IL-6以及TNF- α 的含量。

1.4.5 大鼠滑膜组织VEGF及ICAM-1蛋白表达的检测 实验第30天,即给药18 d后处死大鼠,仰位固定,酒精消毒处理,去皮毛及肌腱组织,打开膝关节腔可见滑膜组织,将其剥离并放入4%多聚甲醛中固定2 h,经梯度酒精逐级脱水,石蜡包埋,按VEGF及ICAM-1免疫组化试剂盒的具体步骤操作。

1.5 统计学方法 实验数据用SPSS 20.0统计软件处理。主要为计量资料,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA) + 两两比较LSD-*t*检验。重复测量资料则行两因素重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 祛风舒筋丸对佐剂性关节炎大鼠关节肿胀度的影响 各实验组于弗氏完全佐剂三次致炎造模后第12天给药,致炎造模后,各组大鼠足趾均明显肿胀。造模后第12、17天祛风舒筋丸高、中剂量组的足趾厚度均与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模后第21、25、29天祛风舒筋丸高、中剂量组的足趾厚度均与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),低剂量组的足趾厚度与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),且高剂量组显示了持续稳定的足趾肿胀抑制作用,效果与白芍总苷组接近,结果见表1。

2.2 祛风舒筋丸对佐剂性关节炎大鼠脾淋巴细胞增殖的影响 本研究分别采用Con A诱导的大鼠T

表 1 祛风舒筋丸对佐剂性关节炎大鼠关节肿胀度的影响/(mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	12 d	17 d	21 d	25 d	29 d
模型组	10	1.44 ± 0.10	1.72 ± 0.06	2.08 ± 0.12	2.25 ± 0.14	2.46 ± 0.17
白芍总苷组	10	1.14 ± 0.11 ^a	1.55 ± 0.11 ^a	1.61 ± 0.25 ^b	1.76 ± 0.13 ^b	1.91 ± 0.18 ^b
祛风舒筋丸低剂量组	10	1.26 ± 0.32	1.63 ± 0.10	1.84 ± 0.11 ^a	1.94 ± 0.18 ^a	2.16 ± 0.14 ^a
祛风舒筋丸中剂量组	10	1.19 ± 0.24 ^a	1.51 ± 0.12 ^a	1.72 ± 0.16 ^b	1.86 ± 0.16 ^b	1.98 ± 0.08 ^b
祛风舒筋丸高剂量组	10	1.04 ± 0.06 ^a	1.48 ± 0.13 ^a	1.65 ± 0.14 ^b	1.73 ± 0.06 ^b	1.88 ± 0.07 ^b
整体分析	HF 系数	0.9362				
组间比较	F 值, P 值	72.664, 0.000				
时间比较	F 值, P 值	239.000, 0.000				
交互作用	F 值, P 值	1.726, 0.055				

注:整体分析为两因素重复测量方差分析。两两组间比较为 LSD-*t* 检验,与模型组比较,^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01

淋巴细胞增殖和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖实验来评价祛风舒筋丸对佐剂性关节炎大鼠脾淋巴细胞增殖的影响和对免疫功能的调节作用。模型组吸光度与空白组相比差异有统计学意义(*P* < 0.01)。与模型组比较,祛风舒筋丸高剂量组和白芍总苷组分别对 Con A 和 LPS 诱导的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖能力有抑制作用,差异有统计学意义(*P* < 0.01),且与白芍总苷组接近;中、低剂量组对淋巴细胞增殖能力亦有一定的抑制作用,差异有统计学意义(*P* < 0.05),结果见表 2。

表 2 祛风舒筋丸对佐剂性关节炎大鼠 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Con A 吸光度 (570 nm)	LPS 吸光度 (570 nm)
空白组	10	0.275 ± 0.049	0.290 ± 0.042
模型组	10	0.424 ± 0.051 ^d	0.472 ± 0.050 ^d
白芍总苷组	10	0.315 ± 0.032 ^b	0.350 ± 0.053 ^b
祛风舒筋丸低剂量组	10	0.354 ± 0.064 ^{ca}	0.389 ± 0.031 ^{ca}
祛风舒筋丸中剂量组	10	0.333 ± 0.044 ^{ca}	0.363 ± 0.037 ^{ca}
祛风舒筋丸高剂量组	10	0.310 ± 0.050 ^b	0.343 ± 0.035 ^b
F 值		10.406	20.696
P 值		0.000	0.000

注:与模型组比较,^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01;与空白组比较,^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01

2.3 大鼠血清 RF、IL-1β、IL-6 及 TNF-α 含量的检测 研究证实 RF 以其高敏感性作为临床上类风湿关节炎的损伤程度及病情预后判断的重要指标^[9]。IL-1β、IL-6 及 TNF-α 等细胞炎性因子的表达失衡是 RA 发病的重要因素^[10-11]。实验结果显示与模型组比较,祛风舒筋丸高剂量组和白芍总苷组能极显著降低佐剂性关节炎大鼠血清 RF、IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的含量(*P* < 0.01),祛风舒筋丸中、低剂量组能显著降低佐剂性关节炎大鼠血清 RF、IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的含量(*P* < 0.05),且呈现出明显的剂量依赖性,结果见表 3。

2.4 大鼠滑膜组织 VEGF 和 ICAM-1 表达的检测 本研究采用免疫组化检测大鼠关节滑膜组织中 VEGF 与 ICAM-1 的蛋白表达,实验结果显示与模型组比较,祛风舒筋丸高剂量组和白芍总苷组能极显著降低佐剂性关节炎大鼠滑膜组织 VEGF 与 ICAM-1 蛋白的表达(*P* < 0.01),中、低剂量组能显著降低 VEGF 与 ICAM-1 蛋白的表达(*P* < 0.05),且对表达的抑制作用呈现出明显的剂量依赖性,结果见表 4。

表 3 祛风舒筋丸对佐剂性关节炎大鼠血清 RF、IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的影响/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	RF	IL-1β	IL-6	TNF-α
空白组	10	35.71 ± 5.01	12.78 ± 3.36	99.38 ± 10.09	24.94 ± 2.09
模型组	10	77.11 ± 6.60 ^d	19.00 ± 1.37 ^d	152.95 ± 10.06 ^d	32.47 ± 2.10 ^d
白芍总苷组	10	59.91 ± 8.08 ^b	13.73 ± 1.40 ^b	112.59 ± 9.38 ^{cb}	27.55 ± 0.81 ^{cb}
祛风舒筋丸低剂量组	10	69.88 ± 9.16 ^{ca}	15.38 ± 1.71 ^{ca}	137.88 ± 7.27 ^{ca}	30.46 ± 2.00 ^{ca}
祛风舒筋丸中剂量组	10	63.69 ± 5.59 ^{ca}	14.24 ± 1.21 ^a	126.37 ± 9.53 ^{ca}	28.35 ± 1.11 ^{ca}
祛风舒筋丸高剂量组	10	57.00 ± 6.00 ^b	13.44 ± 0.95 ^b	109.30 ± 5.46 ^{cb}	26.35 ± 0.95 ^b
F 值		42.159	14.917	51.247	29.093
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与模型组比较,^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01;与空白组比较,^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01

表 4 祛风舒筋丸对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织 VEGF 和 ICAM-1 表达的影响/(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF/(%)	ICAM-1/(%)
空白组	10	8.25 ± 0.80	9.13 ± 1.48
模型组	10	16.55 ± 2.01 ^d	18.64 ± 3.15 ^d
白芍总苷组	10	10.03 ± 2.68 ^b	10.76 ± 1.52 ^b
祛风舒筋丸低剂量组	10	13.19 ± 1.29 ^{ca}	15.69 ± 1.92 ^{ca}
祛风舒筋丸中剂量组	10	11.91 ± 1.39 ^{ca}	13.54 ± 1.00 ^{ca}
祛风舒筋丸高剂量组	10	9.91 ± 2.36 ^b	10.83 ± 1.75 ^b
F 值		24.929	35.955
P 值		0.000	0.000

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与空白组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

3 讨论

RA 以关节滑膜慢性炎症为主要表现,病灶中的滑膜细胞持续释放细胞因子,造成增生异常并导致病变^[12]。本研究在造模后期(第 21 ~ 29 天),祛风舒筋丸的中、高剂量组大鼠足跖肿胀均有所减轻,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),高剂量组的效果与白芍总苷组接近,该实验结果符合该动物模型的特点,证实祛风舒筋丸可以相对延缓类风湿关节炎病人症状的后期进展,在提高生活质量方面有着积极的作用。

淋巴细胞转化实验是采用体外刺激物(Con A 等)刺激淋巴细胞,使其体积增大,蛋白与核酸合成增加并转化为具有分裂能力的淋巴母细胞。淋巴细胞转化率可用来判断药物对机体的细胞免疫调节作用^[13]。RA 作为一种自身免疫性疾病,始于致病抗原被 T 细胞所识别和激活,继而引发 T 细胞增殖和 B 细胞的活化增殖,导致滑膜新生血管形成,产生细胞因子^[14]。实验研究显示祛风舒筋丸可以显著抑制佐剂性关节炎大鼠 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖,且作用有剂量依赖性,说明祛风舒筋丸可通过抑制 T 淋巴和 B 淋巴细胞增殖从而抑制模型大鼠的细胞免疫功能。

在 RA 的发病过程中,病人体内 CD₄⁺ T 细胞被抗原呈递细胞呈递的抗原活化^[15],启动特异性免疫应答,T 辅助细胞 1(Th1)主要介导了 RA 的特异性自身免疫性,并使多种炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等增多^[16]。TNF- α 和 IL-1 β 在发病中起促炎作用的细胞因子,常同时合成和分泌,可进一步破坏关节软骨,造成关节畸形,而 IL-6 是通过增强 TNF- α 、IL-1 β 的免疫反应起作用,因此阻断 TNF- α 或 IL-1 β 活性可延缓相关关节炎症状的发生^[16-18]。

实验结果显示祛风舒筋丸高、中剂量组和白芍总苷组均能显著降低佐剂性关节炎大鼠血清 RF、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的含量,表明祛风舒筋丸可能通过抑制 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 等细胞因子生成的机制达到调节免疫,控制病情进展的目的。

RA 属于血管增生性疾病,其基本病理变化为滑膜炎和血管翳的形成,其中包括多种细胞因子、抗原抗体及粘附分子参与^[19]。VEGF 为目前已知作用最强,特异性最高的血管生长因子^[20],可以特异性地促进血管内皮细胞增殖与迁移,促进血管翳的形成。ICAM-1 可导致滑膜细胞的移行增生,在细胞激活过程中提供辅助刺激因子,使白细胞停滞在炎症局部^[21]。因此关节滑膜组织中 VEGF 与 ICAM-1 的表达水平可以反映炎症的变化程度。研究发现祛风舒筋丸高、中、低剂量组均能显著降低 VEGF 与 ICAM-1 蛋白的表达,且对表达的抑制作用呈现出明显的剂量依赖性,推测该药可能通过抑制 VEGF 和 ICAM-1 的表达,从而阻断滑膜血管新生和血管翳形成,阻止巨噬细胞和淋巴细胞向局部移行,抑制关节滑膜慢性炎症的产生。

综上所述,祛风舒筋丸抗类风湿关节炎作用机制可能与抑制 T 淋巴和 B 淋巴细胞增殖调节细胞免疫,抑制 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 等细胞因子生成,抑制 VEGF 和 ICAM-1 的表达阻断滑膜血管新生,抑制炎症细胞浸润与渗出有关。

参考文献

- [1] 胡长玲,林兵,郑剑创. 抗风湿性关节炎的天然药物及其作用机制研究进展[J]. 中草药,2011,42(7):1435-1440.
- [2] 刘雪涛,李庆. 类风湿性关节炎治疗药物进展[J]. 现代生物医学进展,2015,15(6):1171-1173.
- [3] CHAPOVAL SP. Semaphorin 4A as novel regulator and promising therapeutic target in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2015,17(1):313.
- [4] 赵玲,胡耀华,柳润辉,等. 中药治疗类风湿性关节炎及临床应用的研究进展[J]. 药事实践杂志,2011,29(6):416-420.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:947.
- [6] 孙楠,胡景莲. 祛风舒筋丸的质量控制研究[J]. 药物评价研究,2013,36(3):193-194.
- [7] 李培培,解国雄,宋珊珊,等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(5):453-457.
- [8] 张威,徐红梅,任娜,等. 八角枫对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用及毒性[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版),2012,35(6):832-836.
- [9] 丁菊芳. 抗环瓜氨酸肽抗体(抗-CCP)与类风湿因子(RF)联合检测对类风湿性关节炎的诊断意义[J]. 甘肃医药,2014,33(3):212-214.