

苗药八角枫水提液对CIA模型大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 水平及滑膜OPG/RANKL/RANK系统的影响^Δ

江 勇^{1*}, 梁子聪^{1,2#}, 陈其宽¹, 覃建锋², 张庆忠², 王 恒²(1. 黔南布依族苗族自治州中医医院骨伤科, 贵州 都匀 558000; 2. 黔南民族医学高等专科学校医学基础部, 贵州 都匀 558000)

中图分类号 R285.5; R593.22 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3401-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.20

摘要 目的: 研究八角枫水提液对Ⅱ型胶原诱发关节炎(CIA)模型大鼠血清白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平以及滑膜骨保护素(OPG)/核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)/核因子 κ B受体活化因子(RANK)系统的影响, 探讨其抗炎风湿关节炎(RA)的可能机制。方法: 将60只雄性SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性组(雷公藤多苷片, 10 mg/kg)和八角枫水提液低、中、高剂量组(5、10、20 g/kg, 按生药量计), 每组10只。除空白组外, 其余各组大鼠均于尾根部注射经弗氏完全佐剂乳化的牛Ⅱ型胶原蛋白以复制CIA模型。造模后第10天, 各给药组大鼠均灌胃相应药物, 空白组和模型组大鼠均灌胃等体积生理盐水, 每天1次, 连续2周。记录各组大鼠的一般情况、关节炎指数(AI)和足跖肿胀度; 采用酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 水平; 采用逆转录聚合酶链反应法检测大鼠滑膜组织中OPG、RANKL、RANK mRNA的表达量; 采用苏木精-伊红染色法观察大鼠踝关节组织病变情况。结果: 八角枫水提液高剂量组有3只大鼠死亡, 阳性组和八角枫水提液中剂量组各有1只大鼠造模失败。造模后, 除空白组外的其余组大鼠均出现不同程度的足底及踝关节肿胀等症状。与空白组比较, 其余组大鼠AI, 足跖肿胀度, 血清中IL-1 β 、TNF- α 水平, 滑膜组织中RANKL、RANK mRNA的表达量均显著升高或增加, OPG mRNA的表达量均显著下降($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠AI(造模后第28天), 足跖肿胀度(造模后第21、28天), 血清中IL-1 β 、TNF- α 水平, 滑膜组织中RANKL、RANK mRNA的表达量均显著下降, OPG mRNA的表达量均显著升高($P < 0.05$), 且八角枫水提液高剂量组的AI、IL-1 β 水平、RANKL mRNA的表达量以及八角枫水提液中、高剂量组RANK mRNA的表达量均显著低于阳性组, 阳性组和八角枫水提液高剂量组的TNF- α 水平均显著低于八角枫水提液低、中剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。空白组大鼠踝关节表面光滑, 滑膜细胞无增生, 且未见炎症细胞浸润; 模型组大鼠关节间隙变窄, 关节软骨退变, 滑膜细胞增生, 局部可见骨质破坏及炎症细胞浸润; 各给药组大鼠上述症状均有不同程度的改善。结论: 八角枫水提液能够减轻CIA模型大鼠的炎症反应、关节软骨退变及骨破坏, 其机制可能与下调血清IL-1 β 、TNF- α 水平, 调节OPG/RANKL/RANK系统平衡有关。

关键词 八角枫; 水提液; 类风湿性关节炎; Ⅱ型胶原诱发关节炎; 炎症因子; 骨保护素; 核因子 κ B受体活化因子配体; 核因子 κ B受体活化因子; 血清; 滑膜组织; 大鼠

Effects of Miao Medicine *Alangium chinense* Water Extract on the Levels of IL-1 β and TNF- α in Serum and OPG/RANKL/RANK System in Synovium of CIA Model Rats

JIANG Yong¹, LIANG Zicong^{1,2}, CHEN Qikuan¹, QIN Jianfeng², ZHANG Qingzhong², WANG Heng²(1. Dept. of Orthopedics, Qiannan Buyi and Miao Autonomous Prefecture Hospital of TCM, Guizhou Duyun 558000, China; 2. Dept. of Basic Medicine, Qiannan Medical College for Nationalities, Guizhou Duyun 558000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Alangium chinense* water extract on the levels of IL-1 β and TNF- α in serum and OPG/RANKL/RANK system in synovium of type II collagen-induced arthritis (CIA) model rats, and to investigate potential mechanism of anti-rheumatoid arthritis (RA). METHODS: Totally 60 male SD rats were randomly divided into blank group, model group, positive group (Tripterysium glycosides tablets, 10 mg/kg), *A. chinense* water extract low-dose, medium-dose and high-dose groups (5, 10, 20 g/kg, by crude drug), with 10 rats in each group. Except for blank group, CIA model was established by giving Bovine type II collagen emulsified with Freund's complete adjuvant via tail. On the tenth day after modeling, medication groups were given the relevant medicine intragastrically, while blank group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day for consecutive 2 weeks. General information, arthritis index (AI) and plantar swelling degree were recorded in each group. The serum levels of IL-1 β and TNF- α were determined by ELISA. The mRNA expression of OPG, RANKL and RANK in synovium were determined by RT-PCR. The pathological changes of the ankle joint were observed by HE staining. RESULTS: Three rats in *A. chinense* water extract high-dose group died, while one in positive

group and one in *A. chinense* water extract medium-dose group failed to establish the model. After modeling, other groups suffered from different degree swelling of plantar and ankle joints. Compared with blank group, AI, plantar swelling degree, serum levels of IL-1 β and TNF- α , mRNA expression

^Δ 基金项目: 贵州省科技计划项目(No. 黔科合基础[2017]1170)

* 主治医师, 硕士。研究方向: 骨与关节疾病的基础及临床。电话: 0854-8222462。E-mail: jiangyong558000@163.com

通信作者: 主治医师, 讲师, 硕士。研究方向: 骨与关节疾病的基础及临床。电话: 0854-8280496。E-mail: 5304602@qq.com

amount of RANKL and RANK in synovium were increased significantly, while mRNA expression amount of OPG was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, AI (28 d after modeling), plantar swelling degree (21, 28 d after modeling), serum levels of IL-1 β and TNF- α , mRNA expression amount of RANKL and RANK in synovium were decreased significantly, while mRNA expression amount of OPG was increased significantly ($P<0.05$). AI, serum level of IL-1 β and mRNA expression amount of RANKL in *A. chinense* water extract high-dose group as well as mRNA expression amount of RANK in *A. chinense* water extract medium-dose and high-dose groups were all significantly lower than positive group. Serum levels of TNF- α in positive group and *A. chinense* water extract high-dose group were significantly lower than *A. chinense* water extract low-dose and medium-dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). In blank group, the surface of the ankle joint was smooth, the synovial cells did not proliferate, and no inflammatory cell infiltration was observed. In model group, articular space became narrow, articular cartilage degenerated, synovial cells proliferated, local bone destruction and inflammatory cell infiltration were observed. The above symptoms of medication groups were improved to varying degrees. CONCLUSIONS: *A. chinense* water extract can relieve the arthritis reaction, degeneration of articular cartilage and bone destruction in CIA model rats, the mechanism of which may be related to reduce the serum levels of IL-1 β and TNF- α , and regulate OPG/RANKL/RANK system.

KEYWORDS *Alangium chinense*; Water extract; Rheumatoid arthritis; Type II collagen-induced arthritis; Inflammatory factor; OPG; RANKL; RANK; Serum; Synovium; Rats

八角枫[*Alangium* (Lour.) Harms.]又名白龙须、八角金盘等,收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003年版),为贵州地区苗族特色药^[1]。八角枫广泛分布于贵州各地,以野生为主,四季皆可采挖,具有祛风通络、散瘀镇痛等作用,是当地少数民族治疗风湿疼痛、关节麻木、瘫痪、劳损腰痛、跌打损伤等疾病的常用药物^[1]。

类风湿关节炎(RA)是一种系统性的慢性自身免疫性疾病,其特征是全身多关节炎症反应、渐进性关节软骨退变及骨破坏。有研究报道称,以八角枫水煎液熏洗可明显改善RA患者的临床症状及体征^[2]。近年来有研究发现,骨保护素(OPG)/核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)/核因子 κ B受体活化因子(RANK)系统与RA发展进程中的关节软骨退变及骨破坏密切相关^[3]。鉴于此,本研究通过建立II型胶原诱发关节炎(CIA)大鼠模型,初步探讨八角枫水提液对其血清白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平以及滑膜OPG/RANKL/RANK系统的影响,以期八角枫治疗RA提供基础实验依据。

1 材料

1.1 仪器

ASP300S型全封闭式组织脱水机、RM2265型全自动轮转式切片机、DM750型光学显微镜(德国Leica公司);Multiskan GO型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);5427R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);DDIL-5型恒温箱(上海安亭科学仪器厂);Jeldoc2000型凝胶影像分析仪(美国Bio-Rad公司);TPersonal型聚合酶链反应(PCR)仪(德国Biometra公司)。

1.2 药材、药品与试剂

八角枫药材购自贵州中药材贸易公司(批号:20120322),由贵阳中医学院胡建山教授鉴定为八角枫[*A. (Lour.) Harms.*]的干燥细须根。

雷公藤多苷片(上海复旦复华药业有限公司,批准

文号:国药准字Z31020415,批号:130301,规格:10 mg);弗氏完全佐剂、牛II型胶原蛋白(美国Chondrex公司,批号分别为7002、20022);Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:00374923);SYBR[®] Select Master Mix预混液(美国ABI公司,批号:C0521A);Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒(大连宝生物工程公司,批号:RR036A);OPG、RANKL、RANK、 β -肌动蛋白(β -actin)的mRNA引物序列设计及合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20130305、20130407);苏木精-伊红(HE)染液、乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液、4%多聚甲醛均由黔南民族医学高等专科学校病理学教研室提供;其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

清洁级雄性SD大鼠60只,5周龄,体质量140~180 g,由陆军军医大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(渝)2012-0003]。所有大鼠均适应性饲养1周后开始后续实验。

2 方法

2.1 八角枫水提液的制备

称取八角枫药材适量,烘干、磨粉,加水1 000 mL煎煮3 h,滤过;再加水600 mL煎煮2 h,滤过;合并两次滤液,浓缩,得质量浓度为1 g/mL(按生药量计)的八角枫水提液。

2.2 分组、造模与给药

将60只SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性组(雷公藤多苷片,10 mg/kg,参照Meeh-Rubner公式^[4]换算而得;以蒸馏水为溶剂)和八角枫水提液低、中、高剂量组[5、10、20 g/kg(按生药量计),参考文献[5]的半数致死量(LD₅₀=20 g/kg);以蒸馏水为溶剂],每组10只。取牛II型胶原蛋白适量,溶解在0.05 mol/L醋酸溶液中,配制成质量浓度为2 mg/mL的胶原溶液,于4℃下静置过

夜;次日于冰浴条件下,滴加等体积弗氏完全佐剂,充分振荡乳化后,得质量浓度为1 mg/mL的CIA乳剂。除空白组外,其余各组大鼠均于尾根部注射上述CIA乳剂0.1 mL以复制CIA模型,7 d后同法加强注射1次以延长作用时间^[6]。造模后(即第1次注射后,下同)第7天,计算各组大鼠的关节炎指数(AI),若AI≥4则表示造模成功^[7]。造模后第10天,各给药组大鼠均灌胃相应药物,空白组和模型组大鼠均灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续2周。

2.3 一般情况观察

造模后,观察并记录各组大鼠的毛发、进食饮水、活跃度、行为、大小便及体质量等情况。

2.4 AI的计算

于造模后第7、10、14、21、28天时按AI评分标准^[7]评价各组大鼠的关节炎严重程度:关节无红肿计0分,趾关节红肿计1分,趾关节和足跖肿胀计2分,踝关节以下的足爪肿胀计3分,踝关节在内的全部足爪肿胀计4分。每个关节最高得分为4分,4个关节得分之和即为每只大鼠的AI。

2.5 足跖肿胀度的检测

于造模前及造模后第7、10、14、21、28天时采用排水法以自制足容积测量仪检测各组大鼠踝关节标记处以下部位的体积(*V*),考察其足跖肿胀度的变化情况^[8]。

2.6 血清中IL-1 β 、TNF- α 水平的检测

于造模后第28天,断头处死各组大鼠,取血量适量,以3 000 \times g离心15 min,留取上层血清,采用ELISA法以酶标仪检测各组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 水平,严格按照试剂盒说明书操作。

2.7 滑膜组织中OPG、RANKL、RANK mRNA表达的检测

采用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测各组大鼠滑膜组织中OPG、RANKL、RANK mRNA的表达情况。取各组大鼠左侧踝关节滑膜组织适量,使用Trizol试剂盒并参照其说明书方法提取组织中总RNA,使用逆转录试剂盒并参照其说明书方法获取互补DNA(cDNA),使用PCR仪进行扩增(引物序列见表1),每个样本设置3个复孔。反应体系(20 μ L):cDNA 1 μ L,上、下游引物各0.5 μ L,SYBR[®] Select Master Mix 预混液 10 μ L,无核酶水 8 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C变性 30 s,60 $^{\circ}$ C退火 30 s,72 $^{\circ}$ C延伸 15 s,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C再延伸 10 min。所得产物经琼脂糖凝胶电泳、染色后,于紫外灯下拍照,使用凝胶影像分析仪进行光密度扫描,以目标基因与内参基因(β -actin)的光密度比值来表示目标基因mRNA的表达量。

2.8 踝关节组织病理学观察

取各组大鼠右侧踝关节组织适量,经4%多聚甲醛溶液中固定2 d,EDTA脱钙液中脱钙10 d后,用大量水清洗,经乙醇(体积分数分别为80%、95%、100%)梯度

脱水、石蜡包埋、切片(厚度5 μ m)后,行HE染色,以中性树脂封片,置于光学显微镜下观察大鼠踝关节组织病变情况。

表1 RT-PCR引物

Tab 1 RT-PCR primer

基因	上游	下游	扩增产物长度, bp
OPG	5'-TCCTGGCACCTACCTAATACAGCA-3'	5'-CTACACTCTCGGCAITTCACCTTTGG-3'	578
RANKL	5'-AGCCTTTCAAGGGCCGTGC-3'	5'-GGGCCACATCGAGCCACGAA-3'	394
RANK	5'-CTGCTCCTCTCATCTCTGTG-3'	5'-CTTCTGGAACCATCTTCTCCTC-3'	316
β -actin	5'-CAATCCATCATGAAGTGTGAC-3'	5'-CCACACAGACTACTGGCGCTC-3'	184

2.9 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。采用Shapiro-Wilk法作正态性检验,Levene法作方差齐性检验。符合正态分布且方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠的一般情况

八角枫水提液高剂量组有3只大鼠死亡,阳性组和八角枫水提液中剂量组各有1只大鼠造模失败,其余大鼠均造模成功。造模后第7天,除空白组外的其余各组大鼠足部均出现绿豆大小的溃疡,并逐渐结痂愈合;造模后第12天,除空白组外的其余各组大鼠足趾均皮肤发红、发热,轻度肿胀;造模后第14天,除空白组外的其余各组大鼠足底及踝关节均肿胀明显,关节僵硬,活动量减少,饮食减少,毛发失去光泽,体质量增长较空白组缓慢,部分大鼠见稀便;造模后第21天,除空白组外的其余各组大鼠足底及踝关节肿胀程度均较模型组明显减轻,活动及食量有所增加,体质量逐渐增加。

3.2 各组大鼠AI比较

与空白组比较,模型组和各给药组大鼠AI均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。造模后第28天,阳性组和八角枫水提液各剂量组大鼠AI均较模型组显著降低,且八角枫水提液高剂量组显著低于阳性组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而其余时间点各给药组大鼠AI与模型组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表2。

表2 各组大鼠AI比较($\bar{x} \pm s$,分)

Tab 2 Comparison of AI of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	<i>n</i>	第7天	第10天	第14天	第21天	第28天
空白组	10	0	0	0	0	0
模型组	10	4.56 \pm 0.97*	5.20 \pm 1.03*	6.00 \pm 0.82*	9.30 \pm 0.82*	9.00 \pm 0.94*
阳性组	9	4.37 \pm 0.92*	5.44 \pm 0.88*	5.78 \pm 0.67*	8.33 \pm 1.00*	7.22 \pm 0.83**
八角枫水提液低剂量组	10	4.44 \pm 0.86*	5.10 \pm 0.99*	5.80 \pm 0.63*	8.10 \pm 0.74*	6.70 \pm 1.00**
八角枫水提液中剂量组	9	4.61 \pm 0.79*	5.11 \pm 0.93*	5.44 \pm 0.53*	7.89 \pm 0.93*	6.67 \pm 1.12**
八角枫水提液高剂量组	7	4.59 \pm 0.86*	5.29 \pm 0.95*	5.29 \pm 0.49*	7.43 \pm 0.97*	6.14 \pm 0.89** ^Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$;与阳性组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. blank group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.01$; vs. positive group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 各组大鼠足跖肿胀度比较

造模后第7天,模型组和各给药组大鼠足跖肿胀度均较空白组显著增加,差异均有统计学意义($P<0.01$);上述各组大鼠足跖肿胀度大多于造模后第14天达到峰值,随后逐渐下降。造模后第21、28天,各给药组大鼠足跖肿胀度均较模型组显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$),但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表3。

表3 各组大鼠足跖肿胀度比较($\bar{x} \pm s, \text{mL}$)

Tab 3 Comparison of plantar swelling degree of rats in each group ($\bar{x} \pm s, \text{mL}$)

组别	n	造模前	第7天	第10天	第14天	第21天	第28天
空白组	10	1.88±0.09	2.01±0.08	2.07±0.12	2.13±0.14	2.20±0.14	2.22±0.13
模型组	10	1.79±0.12	3.18±0.26 [*]	3.27±0.35 [*]	3.37±0.32 [*]	3.28±0.33 [*]	3.17±0.30 [*]
阳性组	9	1.92±0.13	3.08±0.26 [*]	3.12±0.30 [*]	3.19±0.28 [*]	3.00±0.30 ^{**}	2.91±0.29 ^{**}
八角枫水提液低剂量组	10	1.87±0.13	3.13±0.22 [*]	3.26±0.29 [*]	3.33±0.31 [*]	3.14±0.30 ^{**}	3.00±0.25 ^{**}
八角枫水提液中剂量组	9	1.83±0.09	3.19±0.23 [*]	3.19±0.35 [*]	3.20±0.31 [*]	2.90±0.26 ^{**}	2.78±0.21 ^{**}
八角枫水提液高剂量组	7	1.85±0.11	3.17±0.27 [*]	3.19±0.31 [*]	3.17±0.28 [*]	2.84±0.37 ^{**}	2.76±0.31 ^{**}

注:与空白组比较,^{*} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$

Note:vs. blank group, ^{*} $P<0.01$;vs. model group, ^{*} $P<0.05$

3.4 各组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 水平比较

与空白组比较,模型组和各给药组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 水平均显著下降,且八角枫水提液高剂量组大鼠血清中IL-1 β 水平显著低于阳性组,阳性组和八角枫水提液高剂量组大鼠血清中TNF- α 水平均显著低于其低、中剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$);其余各给药组组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表4。

表4 各组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

Tab 4 Comparison of the serum levels of IL-1 β and TNF- α of rats in each group ($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

组别	n	IL-1 β	TNF- α
空白组	10	8.78±1.59	9.76±2.52
模型组	10	37.27±2.92 [*]	60.16±11.28 [*]
阳性组	9	23.03±4.06 ^{**}	42.69±10.20 ^{**}
八角枫水提液低剂量组	10	24.56±2.89 ^{**}	51.80±10.80 ^{**Δ}
八角枫水提液中剂量组	9	21.85±3.13 ^{**}	46.58±10.73 ^{**Δ}
八角枫水提液高剂量组	7	19.57±1.96 ^{**Δ}	42.41±11.36 ^{**}

注:与空白组比较,^{*} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与阳性组比较,^{**} $P<0.05$;与八角枫水提液高剂量组比较, ^{Δ} $P<0.05$

Note:vs. blank group, ^{*} $P<0.01$;vs. model group, ^{*} $P<0.05$;vs. positive group, ^{Δ} $P<0.05$;vs. *A. chinense* water extract high-dose group, ^{\square} $P<0.05$

3.5 各组大鼠滑膜组织中OPG、RANKL、RANK mRNA的表达量比较

与空白组比较,模型组和各给药组大鼠滑膜组织中OPG mRNA的表达量均显著降低,RANKL、RANK mRNA的表达量均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠滑膜组织中OPG mRNA的表达量均显著升高,RANKL、RANK mRNA的

表达量均显著降低,且八角枫水提液高剂量组大鼠滑膜组织中RANKL mRNA以及其中、高剂量组大鼠滑膜组织中RANK mRNA的表达量均显著低于阳性组,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见图1、表5。

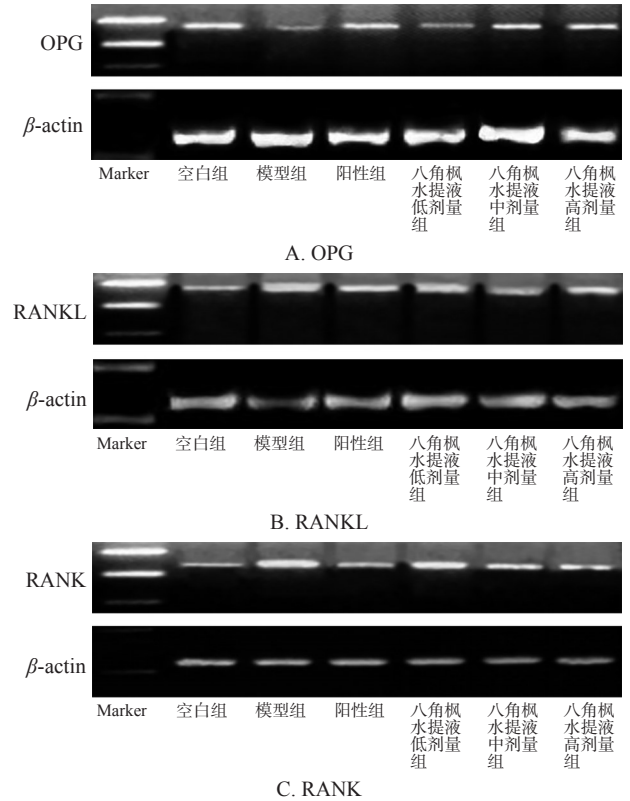


图1 各组大鼠滑膜组织中OPG、RANKL、RANK mRNA表达的电泳图

Fig 1 Electrophorograms of mRNA expression of OPG, RANKL and RANK in synovium of rats in each group

表5 各组大鼠滑膜组织中OPG、RANKL、RANK mRNA的表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Comparison of mRNA expression amount of OPG, RANKL and RANK in synovium of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OPG mRNA	RANKL mRNA	RANK mRNA
空白组	10	0.076 7±0.005 3	0.165 6±0.038 3	0.007 6±0.001 5
模型组	10	0.033 5±0.008 1 [*]	0.453 2±0.016 2 [*]	0.019 6±0.004 2 [*]
阳性组	9	0.054 4±0.006 2 ^{**}	0.351 2±0.046 0 ^{**}	0.015 6±0.002 5 ^{**}
八角枫水提液低剂量组	10	0.046 6±0.008 4 ^{**}	0.368 9±0.039 1 ^{**}	0.016 4±0.002 8 ^{**}
八角枫水提液中剂量组	9	0.048 1±0.008 1 ^{**}	0.354 4±0.041 4 ^{**}	0.012 0±0.003 1 ^{**Δ}
八角枫水提液高剂量组	7	0.051 9±0.006 6 ^{**}	0.310 8±0.054 7 ^{**Δ}	0.012 0±0.002 7 ^{**Δ}

注:与空白组比较,^{*} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与阳性组比较, ^{Δ} $P<0.05$

Note:vs. blank group, ^{*} $P<0.01$;vs. model group, ^{*} $P<0.05$;vs. positive group, ^{Δ} $P<0.05$

3.6 各组大鼠踝关节组织病变情况

空白组大鼠踝关节表面光滑,滑膜细胞无增生,周围未见炎症细胞浸润。模型组大鼠关节间隙变窄,关节软骨退变,局部可见骨质破坏,滑膜表面粗糙,滑膜细胞

增生、层次紊乱,滑膜及周围软组织可见大量炎症细胞浸润,以淋巴细胞、巨噬细胞浸润为主,可见丰富的血管翳形成,纤维母细胞和脂肪细胞增生活跃。与模型组比较,各给药组大鼠关节软骨退变、骨破坏及滑膜细胞增生明显减轻,血管翳形成较少,炎症细胞数量减少,仅见少量纤维母细胞及脂肪细胞增生,详见图2。

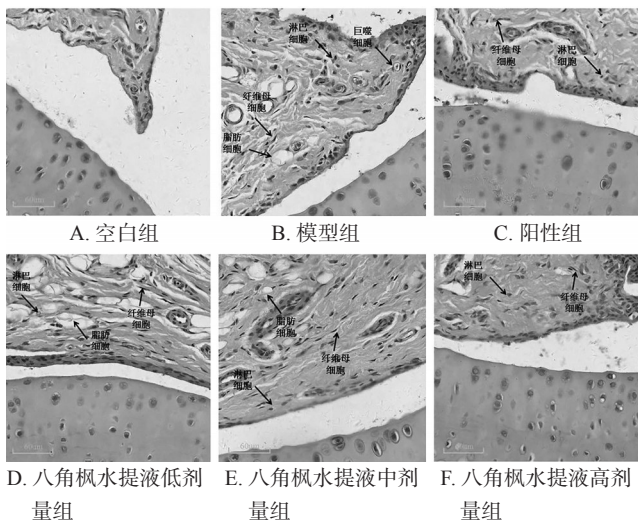


图2 各组大鼠踝关节组织病理学观察显微图(HE染色,×200)

Fig 2 Micrographs of pathological observation in ankle joint of rats in each group (HE staining, ×200)

4 讨论

RA的病因十分复杂,发病机制尚不明确,其主要病理特征为关节滑膜慢性炎症增生、关节软骨及骨进行性退变和破坏,常表现出全身多关节肿痛、变形、功能障碍等临床症状^[9]。RA属中医“痹症”范畴,又称“鹤膝风”“历节风”等,中医认为其是由内、外因相合所致,其中禀赋不足、劳逸过度、饮食内伤等为内因,风、寒、湿、热等邪气侵袭为外因^[10]。《素问·痹论》中提到:“饮食自倍、脾胃乃伤……淫气忧思,痹聚在心”“风寒湿三气杂至,合而为痹也。其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为著痹也”,阐释了RA内外病因相合而为“痹”的观点^[11]。在以往的中医临床实践中,许多中药(如雷公藤、清风藤、马钱子、猪倭草等)被用以治疗RA,获得了较好的临床疗效,其中雷公藤多苷、青藤碱等中药单体抗RA的作用机制较为明确,已成为临床公认的治疗RA的常用药物^[12],故本研究选用雷公藤多苷作为阳性对照药物。

CIA诱导关节炎动物模型的病理特征为关节滑膜慢性炎症增生、关节软骨及骨侵蚀破坏,与RA发病过程类似^[13]。相关文献报道,初次免疫和加强免疫注射CIA乳剂后,模型小鼠会出现Th1/Th2亚群失衡,免疫系统中的T细胞和B细胞被活化,并分泌TNF- α 、IL-1 β 、IL-17等炎症细胞因子,诱导RANKL表达,抑制OPG合成,刺激滑膜纤维母细胞增生,促进破骨细胞成熟,引起滑膜

增生、关节软骨退变及骨破坏等病理学变化^[14]。因此,CIA模型常作为RA病因病机研究的一种可靠的动物模型。本研究结果显示,与空白组比较,模型组大鼠AI和足跖肿胀度均显著升高或增加,血清中IL-1 β 、TNF- α 水平以及滑膜组织中RANKL、RANK mRNA的表达量均显著升高,滑膜组织中OPG mRNA的表达量显著降低;同时,其踝关节组织病理学观察可见关节间隙变窄、关节软骨退变,局部可见骨质破坏、滑膜表面粗糙、滑膜细胞增生,滑膜及周围软组织可见大量炎症细胞浸润及丰富血管翳形成,并伴有纤维母细胞和脂肪细胞增生活跃,提示造模成功。

八角枫系八角枫科八角枫属植物,因其叶有八个角,故名为八角枫,是贵州地区苗族常用的抗RA药材之一^[15]。相关临床研究显示,以八角枫水煎液熏洗能够缓解RA患者关节疼痛症状,并降低其血清中IL-6水平^[2,16]。赵堂娇等^[17]应用以八角枫为主的中药复方治疗早期RA患者,临床有效率可达91.67%。此外,张威^[18]通过热板法、扭体法、耳肿胀等实验证实,八角枫水提液具有镇痛、抗炎的作用。本研究结果显示,不同剂量的八角枫水提液均可不同程度地降低大鼠AI,减轻其足跖肿胀度,并对其血清中IL-1 β 、TNF- α 具有明显的下调作用。TNF- α 、IL-1 β 是公认的参与RA发病过程的重要致炎因子。其中,TNF- α 参与了RA的多种致病机制,包括激活内皮细胞、诱导细胞因子释放及破骨细胞活化等,导致炎症反应的持续发生,并造成软骨与骨的渐进性破坏;IL-1 β 能通过激活单核巨噬细胞以及T细胞、B细胞参与RA炎症过程,同时可抑制关节软骨及骨的修复^[19-20]。两者共同诱导RANKL表达,后者通过与破骨前体细胞表面的受体RANK结合来促进破骨细胞生成;而OPG是RANKL的诱骗受体,可抑制RANKL对破骨细胞生成的促进作用,RANKL/OPG表达水平的平衡是影响破骨细胞分化及其功能的重要调节因素^[21-22]。因此,调节OPG/RANKL/RANK系统可能成为防治RA骨侵蚀的主要措施^[23]。本研究结果显示,与模型组比较,阳性组和八角枫水提液各剂量组大鼠滑膜组织中RANK、RANKL mRNA的表达量均显著降低,OPG mRNA的表达量均显著升高,且八角枫水提液高剂量组大鼠滑膜组织中RANKL mRNA以及八角枫水提液中、高剂量组大鼠滑膜组织中RANK mRNA的表达量均显著低于阳性组。这提示八角枫水提液可通过下调RANK、RANKL mRNA及上调OPG mRNA的表达来发挥对OPG/RANKL/RANK系统的调节作用,且其高剂量组的作用强于阳性组。

另外,有临床研究指出,长期过量服用八角枫可致人死亡^[24]。实验研究也证明,八角枫具有神经毒性,可引起实验动物死亡^[25]。在本研究实验过程中,八角枫高剂量组(20 g/kg)中有3只大鼠死亡,其在灌胃后均出现呼吸减弱、抽搐、四肢瘫软等症状;而中剂量组(10 g/kg)

和低剂量组(5 g/kg)均无大鼠出现上述症状或死亡。这提示与八角枫水提液高剂量组比较,其低、中剂量组的效果差异不大,而安全性更高。但该结论仍需进一步的毒理实验来证实。

综上所述,八角枫水提液能够减轻CIA模型大鼠的炎症反应、关节软骨退变及骨破坏,其机制可能与下调血清IL-1 β 、TNF- α 水平,调节OPG/RANKL/RANK系统平衡有关。但八角枫水提液对其他炎症因子及信号通路的影响尚需进一步探讨;此外,八角枫虽可治疗RA,但仍有患者误服致死的案例报道,故其安全用药剂量有待进一步明确,其相关用药知识也还需广泛普及。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 2003年版. 贵阳:贵州科技出版社,2003:11.

[2] 蒲明,苏仁强,王丽,等. 八角枫根煎液熏洗配合腰腿痹通胶囊口服治疗类风湿关节炎临床观察[J]. 湖北中医杂志,2016,38(5):11-13.

[3] 尚辰,杨滨州,张育,等. Gen对类风湿关节炎RA患者BM-MSCs中RANK/RANKL/OPG系统的影响[J]. 实用临床医药杂志,2014,18(9):6-10.

[4] 张子新,余陆娇,张立敏,等. 法舒地尔对糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠心脏结构和功能的影响[J]. 中国循环杂志,2013,28(5):384-387.

[5] 张长银,张礼俊,胡永良,等. 小鼠急性八角枫中毒的病理学观察[J]. 法医学杂志,2009,25(5):329-331.

[6] ZIMMERMAN DH, TAYLOR P, BENDELE A, et al. CEL-2000: a therapeutic vaccine for rheumatoid arthritis arrests disease development and alters serum cytokine/chemokine patterns in the bovine collagen type II induced arthritis in the DBA mouse model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(4):412-421.

[7] CUZZOCREA S, MCDONALD MC, MOTA-FILIPPE H, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen induced arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(2):320-328.

[8] 徐艳明,荣晓凤,谭洪发,等. 痹祺胶囊对类风湿关节炎CIA大鼠JAK-STAT信号通路的影响[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(12):1072-1076.

[9] MCINNES IB, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23):2205-2219.

[10] 叶霖,王友莲. 类风湿关节炎的中西医发病机制综述[J].

江西医药,2017,52(1):88-91.

[11] 张锦花,殷海波,石白. 类风湿关节炎的病因病机与治疗研究进展[J]. 风湿病与关节炎,2013,2(7):62-66.

[12] 胡长玲,林兵,郑承剑,等. 抗类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.

[13] 吴晶金. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. 风湿病与关节炎,2016,5(12):70-73.

[14] 张晨晨,金镭,陈慧慧,等. 桂枝附子汤对CIA大鼠滑膜组织中MAPK信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):130-134.

[15] 刘毅,徐蕊婷,赵波,等. 苗药八角枫的药学研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2012,29(1):57-60,64.

[16] 苏仁强,蒲明,王丽,等. 八角枫根煎液熏洗配合腰腿痹通胶囊口服对类风湿关节炎患者血清中白介素-6水平的影响[J]. 湖北中医杂志,2016,38(6):10-12.

[17] 赵堂娇,李秀芹. 复方雷公藤煎剂治疗早期类风湿性关节炎36例[J]. 中国民间疗法,2009,17(2):34.

[18] 张威. 八角枫治疗类风湿性关节炎有效部位的筛选[D]. 合肥:合肥工业大学,2012:30.

[19] 王志中,王勇,牟方祥,等. 血小板、TNF- α 及IL-1 β 与活动期类风湿关节炎的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5):469-472.

[20] 刘俊栋,刘海霞,邱世华,等. TNF- α /IL-1 α 机制对破骨细胞形成和活化的影响[J]. 中国兽医学报,2013,33(6):882-885.

[21] GEUSENS P. The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis[J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2012, 4(4):225-233.

[22] XU S, WANG Y, LU J, et al. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-induced osteoporosis[J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(11):3397-3403.

[23] 徐胜前,徐建华. 类风湿关节炎骨破坏的机制和治疗措施研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(18):8403-8407.

[24] 张昌华,王登文,许小明,等. 八角枫中毒死亡1例[J]. 法医学杂志,2008,24(2):155-156.

[25] 邢欢欢,周堃,杨艳,等. 八角枫根中1个新的生物碱及其细胞毒活性研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(2):303-306.

(收稿日期:2018-02-04 修回日期:2018-08-28)
(编辑:张元媛)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅