

甘草附子汤治疗佐剂性关节炎模型小鼠的抗滑膜血管生成机制研究[△]

蔡悦^{1*}, 刘晓龙², 郭静³, 张因⁴(1.天津中医药大学第一附属医院风湿科, 天津 300193; 2.天津市第一中心医院肝胆外科, 天津 300192; 3.天津中医药大学第一附属医院药学部, 天津 300193; 4.中国医科大学药学院, 沈阳 110003)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1618-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.07

摘要 目的:考察甘草附子汤通过抗滑膜血管生成途径对佐剂性关节炎(AA)模型小鼠的治疗作用机制。方法:取雄性Balb/c小鼠48只随机分为正常组、模型组、甘草附子汤组和雷公藤多苷组(阳性药物组),每组12只。除正常组外,其余小鼠左后足趾皮内一次性注射弗氏完全佐剂以建立AA模型。造模12d后,正常组、模型组小鼠灌胃相应体积的水,甘草附子汤组(7.8 g/kg,以总生药量计算)和雷公藤多苷组(0.01 g/kg)小鼠灌胃相应药液20 mL/kg,每天1次,连续18 d。观察并记录小鼠关节病变情况,并采用水容积法测量小鼠足肿胀度;采用苏木精-伊红染色法观察小鼠踝关节组织病理学变化;采用免疫荧光法检测小鼠踝关节滑膜组织中血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白表达水平;采用Western blotting法检测小鼠踝关节滑膜组织中核转录因子κB(NF-κB)、锌指转录因子GATA4(GATA4)的蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠足趾明显红肿,足肿胀度显著升高($P<0.05$);踝关节滑膜组织增生,血管翳明显增多,可见大量炎症细胞及关节侵蚀等;滑膜组织中CD31、VEGF、NF-κB、GATA4的蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,甘草附子汤组小鼠足趾红肿现象减轻,足肿胀度显著降低($P<0.05$);踝关节滑膜组织中血管翳有所减少,其他病理症状有所改善;滑膜组织中CD31、VEGF、NF-κB、GATA4的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结论:甘草附子汤可通过下调关节滑膜组织中VEGF、NF-κB、GATA4蛋白的表达,减少滑膜组织中血管翳的形成并有效抑制血管新生,从而对AA模型小鼠发挥防治骨质破坏、保护关节等作用。

关键词 甘草附子汤;类风湿关节炎;佐剂性关节炎;血管新生;血小板-内皮细胞黏附分子;血管内皮生长因子;锌指转录因子GATA4;核因子κB;小鼠

Study on Anti-synovial Angiogenesis Mechanism of Licorice and Aconite Decoction in the Treatment of Adjuvant Arthritis Model Mice

CAI Yue¹, LIU Xiaolong², GUO Jing³, ZHANG Nan⁴(1. Dept. of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China; 2. Dept. of Hepatobiliary Surgery, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; 3. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China; 4. School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the therapeutic effect of Licorice and aconite decoction in the treatment of adjuvant arthritis (AA) model mice through anti-synovial angiogenesis pathway. METHODS: Totally 48 male Balb/c mice were randomly divided into normal group, model group, Licorice and aconite decoction group and tripterygium glycosides group (positive drug group), with 12 mice in each group. Except for normal group, AA model was established by intradermal injection of Freund's complete adjuvant into the left hind toe of mice. 12 d after modeling, normal group and model group were given same volume of water intragastrically; Licorice and aconite decoction group (7.8 g/kg, by total amount of crude drug) and tripterygium glycosides group (0.01 g/kg) were given relevant medicine 20 mL/kg intragastrically, once a day, for consecutive 18 d. The joint lesions of mice were observed and recorded, and the foot swelling degree of mice was measured by water volume method. HE staining was used to observe the pathological change of ankle joint in mice. The protein levels of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were determined by immunofluorescence assay. The protein expressions of nuclear factor κB(NF-κB) and zinc finger transcription factor GATA4 (GATA4) were detected by Western blotting assay. RESULTS: Compared with normal group, ankle joint of model group mice was markedly reddened and swollen, and foot swelling degree increased significantly ($P<0.05$). Synovial tissue of ankle joint proliferated, pannus increased significantly, and a large number of inflammatory cells and joint erosion were observed. The protein expression of CD31, VEGF, NF-κB and GATA4 in synovial tissue

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81503273);天津市科技计划项目(No.15ZXLCSY00020)

* 主治医师,硕士。研究方向:中医药防治类风湿关节炎。电话:022-27986633。E-mail:caiyue2018@126.com

of mice were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the redness and swelling of ankle joint in mice were alleviated, and the foot swelling degree was significantly reduced in Licorice and aconite decoction group

($P < 0.05$). Pannus in synovial tissue decreased and other pathological symptoms were improved. The protein expression of CD31, VEGF, NF- κ B and GATA4 were decreased significantly in synovial tissue ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Licorice and aconite decoction can decrease the protein expression of VEGF, NF- κ B and GATA4 in synovial tissue, reduce the generation of pannus in synovial tissue and effectively inhibit the angiogenesis in synovial tissue so as to prevent bone destruction and protect joint of AA model mice.

KEYWORDS Licorice and aconite decoction; Rheumatoid arthritis; Adjuvant arthritis; Angiogenesis; CD31; VEGF; GATA4; NF- κ B; Mice

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性、进行性、侵袭性关节炎为主要表现的自身免疫性疾病;其全球患病率为0.5%~1%,临床表现为对称发作的关节肿胀、疼痛和持续晨僵等;其病理特征包括持续性滑膜炎、滑膜增生异常、血管生成和血管翳形成增加等,当血管翳逐渐扩展到关节面和关节软骨时,则会诱导软骨和骨骼被逐渐破坏,最终导致关节畸形^[1]。血管生成已被确定为RA疾病进展的重要标志,并且通常被认为是从急性炎症期到慢性炎症期的“转换”标志^[2]。这是由于血管生成不仅可维持滑膜关节内细胞群的扩张,而且还可进一步增强白细胞向组织中募集,导致炎症加重;而炎症状态的滑膜细胞会产生促血管生成因子,进一步诱导血管生成^[3]。因此,抑制血管生成可能是RA临床治疗一种新思路^[4]。

甘草附子汤收载于东汉张仲景的《伤寒论》,由甘草、附子、白术、桂枝组方而成,具有祛风除湿、温经散寒、温阳补中的功效,临床上用于治疗风湿性和类风湿性关节炎具有较好的效果^[5]。弗氏佐剂关节炎(AA)模型是一种应用广泛的关节炎动物模型,常用于预测药物对RA的临床疗效^[6]。本课题组前期研究发现,甘草附子汤能明显下调AA模型小鼠滑膜组织中基质金属蛋白酶1(MMP-1)和MMP-3的表达,降低其炎症细胞因子水平^[7]。基于此,本研究拟进一步探讨甘草附子汤对AA模型小鼠滑膜组织中血管新生的影响,并通过检测滑膜组织中血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、血管内皮生长因子(VEGF)、锌指转录因子GATA4(GATA4)和核因子 κ B(NF- κ B)的表达水平,探讨甘草附子汤对AA模型小鼠的治疗作用机制,以期为其用于临床治疗RA提供科学的理论依据。

1 材料

1.1 仪器

YLS-7B型足趾容积测量仪(北京吉安得尔科技有限公司);BX-51型荧光显微镜(日本Olympus公司);ESP-300型电泳仪(上海天能科技有限公司);Trans-Blot SD型槽式转膜仪、ChemiDoc MP型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);SW-CJ-2D型超净工作台(无锡易纯净化设备有限公司);HQ96型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);RM2265型切片机(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂

甘草附子汤(组方药材炙甘草、炮附子、白术、桂枝

饮片均购自天津同仁堂药店,经天津中医药大学张坚教授鉴定为真品;制备过程:炙甘草、炮附子、白术、桂枝各15 g,以1.2 L水煎煮1 h,滤过,减压浓缩,以水制成含总生药量约390 mg/mL的药液,4℃保存;雷公藤多苷片(江苏美通制药有限公司,批号:1211242063,规格:10 mg;使用时将其碾碎,以水制成含主药为0.5 mg/mL的混悬液);鼠CD31单克隆抗体、兔VEGF多克隆抗体、兔NF- κ B单克隆抗体、兔GATA4多克隆抗体、兔 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab119341、ab2349、ab109458、ab124265、ab8227);弗氏完全佐剂(美国Sigma公司,批号:100M8725);驴抗小鼠IgG(H+L)Alexa Fluor 488标记二抗、驴抗兔IgG(H+L)Alexa Fluor 488标记二抗(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为CA21202S、A-21206);山羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗(美国CST公司,批号:7074);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、马血清(美国Gibco公司);苏木精-伊红(HE)染料试剂盒、pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)、Triton X-100(北京索莱宝科技有限公司);增强化学发光法(ECL)显色剂(美国Thermo Fisher Scientific公司);十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);水为无菌蒸馏水。

1.3 动物

8周龄Balb/c小鼠,雄性,体质量为(18±2)g,购自北京维通利华实验技术有限公司,动物生产合格证号SCXK(京)2014-0057,清洁级饲养。经天津中医药大学伦理委员会审查批准通过本次动物实验。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

取小鼠48只,随机分为正常组、模型组、甘草附子汤组[7.8 g/kg(以总生药量计算)];剂量根据成人临床日常用量,按照实验动物与人体表面积比换算]和雷公藤多苷组(阳性药物组,0.01 g/kg^[7]),每组12只。除正常组注射等体积生理盐水外,其余组小鼠均于左后足趾皮内一次性注射弗氏完全佐剂50 μ L以建立AA模型^[8]。以小鼠造模侧、对侧和前爪足跖明显肿胀,受累关节畸形,行动不便且体质量明显下降判定为造模成功。造模12 d后,剔除造模失败的小鼠后,正常组、模型组小鼠灌胃水,甘草附子汤组和雷公藤多苷组小鼠灌胃相应药液,

灌胃体积均为20 mL/kg,每天1次,连续18 d。

2.2 小鼠足肿胀情况观察

分别在造模前和给药结束时,观察并记录小鼠关节病变情况,同时采用水容积法测量小鼠右后足跖容积并计算足肿胀度[肿胀度(mL)=给药结束时足跖容积-造模前足跖容积]。

2.3 小鼠踝关节病理学检查

给药结束后,断颈处死小鼠,于无菌环境下取其右踝关节,石蜡包埋,切片(厚度:5 μm),脱水,HE染色,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在显微镜下观察踝关节病理学变化。

2.4 小鼠滑膜组织中CD31、VEGF蛋白表达水平检测

采用免疫组织荧光法检测。于无菌环境下各组取6只小鼠的右踝关节内滑膜组织,石蜡包埋,切片(厚度:5 μm)。参照相应抗体说明书要求,分别将滑膜组织切片与CD31抗体(1:100)或VEGF抗体(1:500)置于含有1%马血清、0.5% Triton X-100的PBS中,于4℃孵育过夜;切片以PBS洗涤后,置于驴抗小鼠二抗(1:500,对应CD31)或驴抗兔二抗(1:500,对应VEGF)中,于37℃避光孵育2 h;以PBS洗涤后,于荧光染色剂DAPI溶液(1:1 000)中避光孵育5 min;PBS洗涤,稀甘油封片。在显微镜下进行拍照,每张切片选取5个不重叠区域,镜下观察,以绿色荧光判断为目标蛋白阳性染色。采用Image-Pro Plus 7.0软件分析CD31蛋白阳性染色的单位面积光密度值(OD/μm²)和VEGF蛋白阳性染色面积占总面积的比值(%),用来表示目标蛋白表达水平。试验重复6次。

2.5 小鼠滑膜组织中NF-κB、GATA4蛋白表达水平检测

采用Western blotting法检测。于无菌环境下各组取6只小鼠的右踝关节内滑膜组织,加入5倍体积的裂解液混匀吹打后,置于冰盒中振荡数秒;以12 000 r/min离心5 min,收集上清液,以BCA法测定蛋白含量。取蛋白样品变性处理后,电泳、转膜、5%脱脂牛奶封闭,将PVDF膜分别置于NF-κB抗体(1:1 000)或GATA4抗体(1:1 000)中,4℃过夜;TBST缓冲液洗涤5 min×3次,将PVDF膜放入山羊抗兔标记二抗(1:2 000)中,摇床振荡孵育2 h后,以TBST缓冲液洗膜5 min×4次。ECL显色剂显影,采用凝胶成像仪检测,采用Image Pro Plus 7.0软件进行图像分析,以目标条带与内参β-actin的灰度值比值表示蛋白相对表达量。试验重复6次。

2.6 统计学方法

应用SPSS 17.0软件对试验数据进行分析。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,方差齐则采用LSD-*t*检验进行组间两两比较,方差不齐则采用非参数的秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠足肿胀情况

除正常组外,其余各组小鼠造模侧、对侧和前爪足

跖均有不同程度的红肿,受累关节畸形;甘草附子汤组和雷公藤多苷组小鼠足跖红肿情况较模型组减轻。与正常组比较,模型组小鼠足肿胀度显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,甘草附子汤组和雷公藤多苷组小鼠足肿胀度显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠足肿胀度检测结果见表1(注:正常组小鼠由于体质量增加,足跖体积也随之略有增加)。

表1 各组小鼠足肿胀度检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Detection results of foot swelling degree of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量,g/kg	足肿胀度,mL
正常组	12		0.134 ± 0.003
模型组	8		0.541 ± 0.032*
甘草附子汤组	10	7.8	0.345 ± 0.024#
雷公藤多苷组	9	0.01	0.274 ± 0.019#

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$

3.2 各组小鼠踝关节组织病理学变化

正常组小鼠踝关节软骨、骨组织未见破坏,滑膜衬里层的滑膜细胞排列有序,软骨面均匀光滑,未见炎症细胞浸润,关节结构完整,少见血管翳;模型组小鼠踝关节滑膜组织增生,血管翳明显增多,结缔组织可见大量的炎症细胞,软骨面较为粗糙,关节出现侵蚀;甘草附子汤组和雷公藤多苷组小鼠踝关节滑膜组织中血管翳有所减少,其他病理症状均有不同程度的改善。各组小鼠踝关节组织病理学变化显微图见图1(注:箭头指示位置为血管翳)。

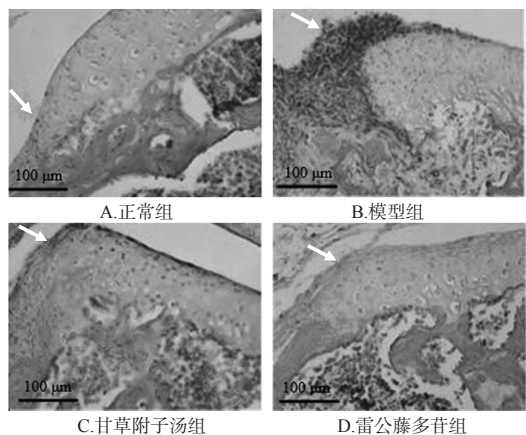


图1 各组小鼠踝关节组织病理学变化显微图(HE染色,×100)

Fig 1 Pathological micrographs of ankle joints of mice in each group (HE staining, ×100)

3.3 各组小鼠滑膜组织中CD31、VEGF蛋白表达水平

与正常组比较,模型组小鼠滑膜组织中CD31、VEGF蛋白阳性染色荧光明显增强,两者表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,甘草附子汤组和雷公藤多苷组小鼠滑膜组织中CD31、VEGF蛋白阳性染色荧光明显减弱,两者表达水平均显

著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);而甘草附子汤组和雷公藤多苷组比较,上述蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠滑膜组织中CD31、VEGF蛋白表达荧光显微图见图2、图3(注:箭头处为目标蛋白的绿色荧光),蛋白表达水平检测结果见表2。

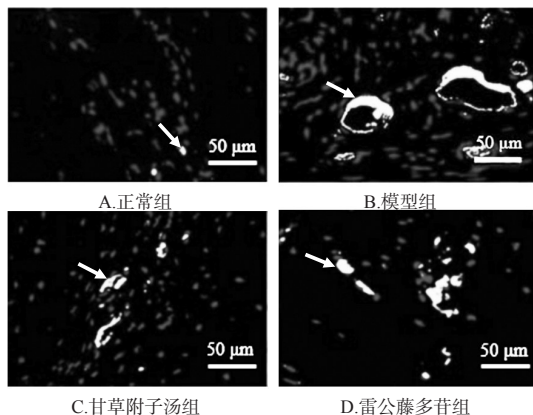


图2 各组小鼠滑膜组织中CD31蛋白表达荧光显微图(DAPI染色,×200)

Fig 2 Fluorescence micrographs of CD31 protein expression in synovial tissue of mice in each group (DAPI staining, ×200)

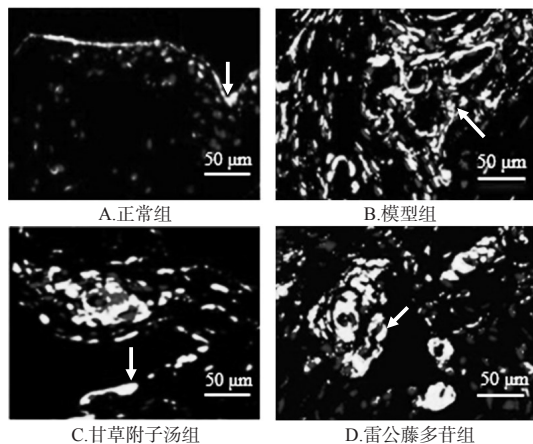


图3 各组小鼠滑膜组织VEGF蛋白表达荧光显微图(DAPI染色,×200)

Fig 3 Fluorescence micrographs of VEGF protein expression in synovial tissue of mice in each group (DAPI staining, ×200)

表2 各组小鼠滑膜组织中各目标蛋白表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Detection results of object protein expression levels in synovial tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量,g/kg	CD31,OD/ μm^2	VEGF,%	NF- κ B/ β -actin	GATA4/ β -actin
正常组		0.51±0.03	5.82±1.31	0.998±0.089	1.003±0.416
模型组		5.46±0.14 [*]	48.65±2.69 [*]	2.343±0.342 [*]	2.898±0.554 [*]
甘草附子汤组	7.8	1.96±0.04 [#]	22.95±2.34 [#]	1.459±0.362 [#]	1.236±0.368 [#]
雷公藤多苷组	0.01	2.89±0.35 [#]	26.71±2.16 [#]	1.354±0.248 [#]	1.563±0.217 [#]

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. normal group, ^{*} $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

3.4 各组小鼠滑膜组织中NF- κ B、GATA4的蛋白表达水平

与正常组比较,模型组小鼠滑膜组织中NF- κ B、GATA4的蛋白表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,甘草附子汤组和雷公藤多苷组小鼠滑膜组织中NF- κ B、GATA4的蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);而甘草附子汤组与雷公藤多苷组比较,上述蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠滑膜组织中NF- κ B、GATA4的蛋白电泳图见图4,蛋白表达水平检测结果见表2。

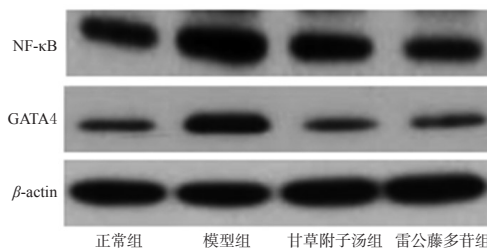


图4 各组小鼠滑膜组织中NF- κ B、GATA4蛋白电泳图
Fig 4 Electrophoresis of protein expression of NF- κ B and GATA4 in synovial tissues of mice in each group

4 讨论

在临床上,RA常采用非甾体类抗炎药、慢作用抗风湿药、生物制剂等进行治疗,这类药虽可暂时缓解患者关节的肿痛,但不能有效抑制关节的破坏及控制病情进展,且可能引发药物性肝硬化或肝炎、胃肠道反应、骨髓抑制、继发感染等不良反应^[9]。本研究采用的阳性对照药雷公藤多苷片是目前公认的治疗RA的抗炎和免疫调节类中药制剂,对肾炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等难治性或顽固性疾病疗效显著^[10]。该药起效快、疗效确切^[11],但长期使用可导致肝毒性并影响男性生殖功能^[12]。因此,研究者正努力寻找疗效确切、副作用较少的RA治疗药物。RA属中医学“痹证”“尪痹”等病证范畴,为风寒湿侵入筋骨关节,营卫不利,气血凝滞,以筋骨剧痛拒按、不得屈伸为特征。甘草附子汤为治疗痹证的经典方剂,在临床上有很长的应用历史,也有用于治疗RA的报道^[13]。考虑到AA模型的临床表现、病理学特征和发病机制等方面与RA有许多相似之处^[14],因此本研究以该模型来研究甘草附子汤治疗RA的可能作用机制。本实验结果显示,采用甘草附子汤干预治疗AA模型小鼠可明显减轻其足肿胀情况,减少其滑膜增生、炎症细胞浸润,有改善其踝关节病理变化的作用。

在RA患者中,循环的白细胞会过度迁移到发炎的关节中迫使新血管形成,从而为肥大关节提供足够的营养和氧气^[15]。因此,血管生成现在已被认为是RA患者病灶组织中血管翳形成和维持的重要标志^[16]。VEGF可通过其受体特异性作用于内皮细胞,增强后者的增殖、迁移,从而促进血管腔的形成^[17]。已有研究证实,RA患

者血清和滑膜组织中 VEGF 水平较健康者明显升高,且其水平与疾病严重程度呈正相关^[18]。基于滑膜血管生成对 RA 发病过程的影响,抑制新血管的形成可能会有效控制滑膜炎并抑制关节受损。CD31 为血管内皮细胞特异性标志物之一,对其进行荧光标记可用于判断机体的血管生成情况^[19]。本实验结果显示,AA 模型小鼠滑膜组织中 CD31 和 VEGF 蛋白表达水平较正常组均显著升高,而给予甘草附子汤干预治疗后上述蛋白表达水平均显著降低;同时结合小鼠滑膜组织的病理学观察结果可知,甘草附子汤可减少小鼠滑膜增生和血管翳的形成,其可能是通过调节 VEGF 来影响血管生成,从而抑制模型小鼠的疾病发生和发展进程。

NF- κ B 是一种具有促进基因转录功能的蛋白质,参与关节炎等病理过程^[20]。已有研究证实,NF- κ B 在 RA 患者的滑膜组织中广泛表达,NF- κ B 的激活可能加剧炎症反应,促使免疫细胞产生促炎分子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8,并且刺激滑膜样成纤维细胞分泌 VEGF,共同发挥促血管生成作用^[21]。本实验结果显示,甘草附子汤可显著降低 AA 模型小鼠滑膜组织中 NF- κ B 的过表达水平,提示其可通过下调 NF- κ B 从而抑制血管生成。

GATA4 是 GATA 锌指转录因子家族的成员,研究显示,心肌细胞中过表达的 GATA4 可通过促进 VEGF 分泌来诱导血管生成^[22]。Jia W 等^[23]研究发现,RA 患者滑膜中存在高水平的 GATA4,其可通过调节滑膜组织中成纤维细胞样滑膜细胞分泌 VEGF 以促进血管生成;抑制 GATA4 的表达可有效减轻或减少胶原诱导的 RA 模型大鼠的滑膜炎、关节受损和血管生成,并伴随着 VEGF 水平的降低。此外,GATA4 可激活 NF- κ B 通路,影响 IL-6、IL-8、趋化因子 CXCL1 的表达,从而促进机体的炎症和衰老进程^[24]。本实验结果显示,AA 模型小鼠滑膜组织中 GATA4 蛋白表达水平显著升高;而给予甘草附子汤干预治疗后可显著降低该蛋白表达水平,表明该汤剂能通过下调 GATA4 的表达从而发挥改善 AA 炎症状态的作用。

综上所述,甘草附子汤可通过下调关节滑膜组织中 VEGF、NF- κ B、GATA4 蛋白的表达,减少滑膜组织中血管翳的形成并有效抑制血管新生,从而对 AA 模型小鼠发挥防治骨质破坏、保护关节等作用。然而,甘草附子汤中有效成分较多,可能通过多途径、多靶点发挥作用,因此下一步可考虑采用网络药理学等方法,从其免疫网络调节效应等角度出发,更深层次地挖掘甘草附子汤对 RA 的治疗作用机制,为该方剂的临床应用提供理论依据。

参考文献

[1] 高远,李永吉.类风湿性关节炎发病机制及中药靶向治疗的研究进展[J].中国药房,2016,27(35):5030-5034.
[2] KOCH AE, DISTLER O. Vasculopathy and disordered an-

giogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9 (Suppl 2): S3.

[3] MARRELLI A, CIPRIANI P, LIAKOULI V, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation[J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(10): 595-598.
[4] MARACLE CX, TAS SW. Inhibitors of angiogenesis: ready for prime time[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2014, 28(4): 637-649.
[5] 唐萍,蔡娇芬,华有福,等.防己黄芪汤合甘草附子汤临床应用举隅[J].江西中医药,2017,48(7):21-23.
[6] 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.
[7] 蔡悦,梁红玉,王建立,等.甘草附子汤对佐剂性关节炎小鼠的治疗作用[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(14):142-146.
[8] 车萍,季旭明,梁粟,等.独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用及血清中 5-HTP, 5-HIAA 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(19):170-173.
[9] 李忠民.抗类风湿疾病药物不良反应研究进展[J].黑龙江医药,2018,31(5):985-987.
[10] 姚骥如,孙莹,罗顺葵,等.雷公藤多苷的临床应用进展[J].中国新药与临床杂志,2010,2(3):179-182.
[11] 董文哲,刘健,忻凌,等.基于数据挖掘研究单味雷公藤联合中药对类风湿关节炎患者免疫炎症肝肾功能的影响[J].中国中药杂志,2018. DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.2018.0927.002.
[12] 马凤富,李海松,赵宗江,等.雷公藤多苷诱导生精障碍大鼠模型的建立[J].中华男科学杂志,2015,21(2):179-184.
[13] 邓伟.甘草附子汤治疗膝骨关节炎的临床研究[J].中药材,2008,31(7):1107-1110.
[14] SUKE SG, NEGI H, MEDIRATTA PK, et al. Anti-arthritis and anti-inflammatory activity of combined pioglitazone and prednisolone on adjuvant-induced arthritis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 718(1/2/3): 57-62.
[15] ELSHABRAWY HA, CHEN Z, VOLIN MV, et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(4): 433-448.
[16] YANG X, QIU P, CHEN B, et al. KIAA1199 as a potential diagnostic biomarker of rheumatoid arthritis related to angiogenesis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015. DOI: 10.1186/s13075-015-0637-y.
[17] CAO D, HOU M, GUAN YS, et al. Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications[J]. *BMC Cancer*, 2009. DOI:10.1186/1471-2407-9-432.
[18] ZHANG J, LI C, ZHENG Y, et al. Inhibition of angiogenesis by arsenic trioxide via TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF functional module in rheumatoid arthritis[J]. *Oncotarget*,

西咪替丁对低剂量率照射比格犬肝细胞凋亡的影响及其机制研究^Δ

王庆蓉*, 何颖#, 赵忆宁, 沈先荣, 刘玉明, 李珂娴, 罗群, 陈伟, 侯登勇(海军军医大学海军医学研究所防护医学研究室, 上海 200433)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1623-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.08

摘要 目的:研究西咪替丁对低剂量率照射比格犬肝细胞凋亡的影响及其机制。方法:将健康雄性比格犬随机分为正常对照组、模型对照组、阳性药物组(香菇多糖, 21.33 mg/kg)和西咪替丁低、中、高剂量组(5.33、10.67、21.33 mg/kg), 每组4只。除正常对照组外, 其余各组比格犬均予⁶⁰Co-γ射线(剂量率:0.040 8 mGy/min)累积照射23 d, 各给药组于每日照射前口服相应药物1次。停止照射24 h后, 采用TUNEL法检测各组比格犬肝细胞凋亡情况, 并计算凋亡细胞百分比; 采用免疫组化法检测其肝组织中凋亡相关蛋白[Bax、Bcl-2、胱天蛋白酶3(Caspase-3)、p53]的表达水平。结果:与正常对照组比较, 模型对照组比格犬肝组织中凋亡细胞以及Bax、Caspase-3、p53阳性细胞均明显增加, 凋亡细胞百分比以及Bax、Caspase-3、p53蛋白表达水平均显著升高; Bcl-2阳性细胞明显减少, 其蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较, 各给药组比格犬肝组织中上述阳性细胞均有不同程度的变化, 其中各给药组凋亡细胞百分比和p53蛋白表达水平, 阳性药物组和西咪替丁低、高剂量组Bax蛋白表达水平以及西咪替丁各剂量组Caspase-3蛋白表达水平均显著降低; 西咪替丁各剂量组Bcl-2蛋白表达水平均显著升高; 且西咪替丁中、高剂量组凋亡细胞百分比以及西咪替丁各剂量组Caspase-3蛋白表达水平均显著低于阳性对照组, 西咪替丁低剂量组p53蛋白表达水平显著高于阳性药物组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:西咪替丁可抑制低剂量率照射所致的比格犬肝细胞凋亡, 对其具有一定的辐射保护作用。这种作用可能与上调Bcl-2蛋白的表达, 下调Bax、Caspase-3、p53蛋白的表达有关。

关键词 西咪替丁; 低剂量率辐射; 肝脏; 肝细胞凋亡; 凋亡相关蛋白; 比格犬; 防辐射; 机制

Effects of Cimetidine on Low Dose Rate Irradiation-induced Liver Cell Apoptosis in Beagle Dogs and Its Mechanism

WANG Qingrong, HE Ying, ZHAO Yining, SHEN Xianrong, LIU Yuming, LI Kexian, LUO Qun, CHEN Wei, HOU Dengyong (Dept. of Radiation Protection Medicine, Naval Medical Research Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of cimetidine on low dose rate irradiation-induced liver cell apoptosis in Beagle dogs. METHODS: Healthy male Beagle dogs were randomly divided into normal control group, model control group, positive drug group (lentinan, 21.33 mg/kg) and cimetidine low-dose, medium-dose and high-dose groups (5.33, 10.67, 21.33 mg/kg), with 4 Beagle dogs each. Except for normal control group, other groups were given ⁶⁰Co-γ accumulative irradiation (dosage rate:

2017, 8(43):73529-73546.

- [19] 李静平, 顾雯, 倪艺榕, 等. 人参皂苷 Rg3 对糖尿病大鼠难愈创面表皮细胞及血管新生的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(4):551-556.
- [20] MAIJER KI, NOORT AR, DE HAIR MJ, et al. Nuclear factor-κB-inducing kinase is expressed in synovial endothelial cells in patients with early arthritis and correlates with markers of inflammation: a prospective Cohort study [J]. *J Rheumatol*, 2015, 42(9):1573-1581.
- [21] NOORT AR, VAN ZOEST KP, WEIJERS EM, et al. NF-

kappaB-inducing kinase is a key regulator of inflammation-induced and tumour-associated angiogenesis[J]. *J Pathol*, 2014, 234(3):375-385.

- [22] HEINEKE J, AUGER-MESSIER M, XU J, et al. Cardiac myocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11):3198-3210.
- [23] JIA W, WU W, YANG D, et al. GATA4 regulates angiogenesis and persistence of inflammation in rheumatoid arthritis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):503-518.
- [24] SU CM, HUANG CY, TANG CH. Characteristics of resistin in rheumatoid arthritis angiogenesis[J]. *Biomark Med*, 2016, 10(6):651-660.

Δ 基金项目: 国家科技重大专项(No.2014ZX09J14103-07B)

* 高级实验师。研究方向: 辐射防护医学。E-mail: qingrongw@126.com

通信作者: 副研究员。研究方向: 辐射防护医学。E-mail: ying-he_hys@163.com

(收稿日期: 2018-12-14 修回日期: 2019-05-06)

(编辑: 段思怡)