

白芍总苷对葡萄膜炎模型大鼠的保护作用^Δ

吴伟*, 何梅凤#, 郭泽莉, 黄祥坤, 钟建文(中山大学中山眼科中心, 广州 510060)

中图分类号 R285;R332 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-0994-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.12

摘要 目的:研究白芍总苷对葡萄膜炎模型大鼠的保护作用。方法:于大鼠足底部注射伤寒杆菌内毒素(LPS)200 μg以复制大鼠葡萄膜炎模型。32只SD大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(对容生理盐水)组、白芍总苷(4.8 g/kg,每隔6 h给药1次,共3次)组、醋酸泼尼松(0.05 g/kg,给药1次)组,复制模型前1 h开始灌胃给药。用裂隙灯显微镜观察大鼠临床改变,通过病理学检查观察大鼠眼部组织学改变。结果:正常对照组未见炎症发生;与正常对照组比较,模型组炎症临床评分升高,差异有统计学意义($P<0.05$),大鼠虹膜、睫状体、视网膜与玻璃体腔炎症细胞浸润程度明显加剧;与模型组比较,白芍总苷组炎症临床评分降低,差异有统计学意义($P<0.05$),大鼠虹膜、睫状体、视网膜与玻璃体腔炎症细胞浸润程度明显改善。结论:白芍总苷对LPS诱导的葡萄膜炎大鼠有一定保护作用。

关键词 白芍总苷;葡萄膜炎;动物模型;治疗

Protective Effects of Total Glucosides of Paeony on Uveitis Model Rats

WU Wei, HE Mei-feng, GUO Ze-li, HUANG Xiang-kun, ZHONG Jian-wen (Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the protective effect of total glucosides of paeony (TGP) on uveitis model rats. **METHODS:** Uveitis model was induced by LPS 200 μg via vola of SD rats. 32 SD rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), TGP group (4.8 g/kg, every 6 h, total of 3 times) and prednisone acetate group (50 mg/kg, once). They were given relevant medicines 1 h before modeling. Slit lamp and histology were used to detect the change of ocular tissues at different time points after the induction. **RESULTS:** No uveitis was found in normal control group. Compared with normal control group, clinical score of model group increased significantly; there was statistical significance ($P<0.05$). The infiltration of inflammatory cells into iris, ciliary body, retina, and vitreous body were aggravated; compared with model group, clinical score of TGP group decreased significantly ($P<0.05$), while the infiltration of inflammatory cells into iris, ciliary body, retina, and vitreous body were improved significantly. **CONCLUSIONS:** TGP is effective for LPS-induced uveitis.

KEYWORDS Total glucosides of paeony; Uveitis; Animal model; Treatment

葡萄膜炎是眼科常见的致盲眼病之一,病因和致病机制复杂,主要与自身免疫有关,其治疗以糖皮质激素和环孢素、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、他克莫司等免疫抑制剂为主,但此类药物往往因毒副作用大而使有些患者不能耐受,给临床治疗带来极大的困难。因此,亟需开发新的安全有效药物治疗葡萄膜炎。白芍总苷是我国传统中药白芍根中提取的有效成分,广泛应用于类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、干燥综合征、特发性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、慢性荨麻疹等多种疾病的治疗^[1-3],在炎症免疫性疾病中发挥了重要作用。本研究通过内毒素(LPS)诱导的葡萄膜炎模型大鼠,初步探讨白芍总苷对葡萄膜炎模型大鼠的保护作用,以期葡萄膜炎的临床治疗提供一种新的选择。

1 材料

1.1 仪器

Axioplan 2型荧光显微镜(德国Zeiss公司);SL-D7/DC-3

Δ基金项目:广东省医院药学研究基金(No. 2012LS06)

*副主任药师。研究方向:医院药学。E-mail:zocww@163.com

#通信作者:副主任药师。研究方向:眼科药理学。E-mail:zochmf@163.com

型裂隙灯数码图像处理系统(日本Topcon公司)。

1.2 内毒素与药品

伤寒杆菌(LPS,美国Sigma公司,批号:032M4002V);白芍总苷胶囊(宁波立华制药有限公司,批号:120312,规格:0.3 g/粒);醋酸泼尼松片(天津药业焦作有限公司,批号:12040411,规格:5 mg/片)。

1.3 动物

SPF级SD大鼠32只,♀♂兼用,体质量200~220 g,由南方医科大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(粤)2011-0015]。

2 方法

2.1 复制模型

参考文献^[4]方法,将LPS溶于生理盐水中,使之终质量浓度为2 g/L,分别在SD大鼠的双后足底部注射50 μl以复制大鼠葡萄膜炎模型。

2.2 分组与给药

32只SD大鼠随机均分为4组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、白芍总苷(4.8 g/kg)组、醋酸泼尼松(0.05 mg/kg)组。于复制模型前ig给药,白芍总苷每隔6 h给药1次,共3次;醋酸泼尼松仅单次给药。

2.3 大鼠眼部临床表现观察

分别于注射LPS 6、12、18、24、36、48 h后,用裂隙灯显微镜观察大鼠眼部临床表现,参照文献^[6]临床评分方法:虹膜充血,0~2分;前房内渗出,0~2分;前房积脓,0~2分;瞳孔缩小,0~2分;总分为8分。

2.4 病理学检查

于注射LPS 18、24、36、48 h后各组随机处死2只大鼠,取眼球作病理检查。盐酸氯胺酮(0.3 ml)和盐酸氯丙嗪(0.3 ml)混合后ip大鼠进行麻醉。沿胸骨两侧剪开胸腔,暴露心脏,心尖部注射0.3 ml肝素钠注射液(1 500 u/ml),用4℃预冷的0.01 mol/L PBS缓慢灌注,直到肝脏变白,再用40 ml/L多聚甲醛溶液灌注固定。小心摘取眼球置40 ml/L多聚甲醛溶液中固定24 h。作常规石蜡包埋切片,HE染色,荧光显微镜观察结果。

2.5 统计学方法

实验数据均采用SPSS13.0进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,以后LSD法进行统计,方差不齐时,各组间两两比较采用Tamhance's T_2 检验。不同时间点测定同一数据采用重复测量方差分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白芍总苷对模型大鼠眼部炎症的影响

正常对照组大鼠未见炎症发生。模型组大鼠注射LPS 6 h开始出现瞳孔缩小,结膜充血,虹膜血管轻度扩张,并表现出畏光;12 h时瞳孔进一步缩小,结膜、虹膜充血加重,瞳孔缘开始出现纤维素样渗出;18 h时炎症进一步加重;24 h时达炎症的高峰,大鼠瞳孔显著缩小,虹膜充血明显,前房纤维素样渗出明显增多,甚至前房积脓。白芍总苷组大鼠注射LPS 6 h结膜轻度充血;12 h时开始出现瞳孔缩小,虹膜轻度充血,并表现出畏光;18~24 h时,瞳孔进一步缩小,虹膜充血明显,瞳孔区靠近虹膜缘处隐约见少量纤维素样渗出,但前房内未见白色积脓。注射LPS 36 h后各组大鼠炎症开始减退。各时间点与模型组比较,白芍总苷组大鼠眼部炎症临床评分降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。大鼠眼部炎症临床评分见表1(正常对照组仅作参考,表中未列出)。

表1 大鼠眼部炎症临床评分($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The clinical score of ocular inflammation in rats

($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	炎症临床评分				总评分
		虹膜充血	前房内渗出	前房积脓	瞳孔缩小	
12 h (n=16)	模型组	1.56±0.51	0.38±0.50	0.00±0.00	1.19±0.40	3.12±0.72
	白芍总苷组	1.06±0.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.94±0.25	2.00±0.37*
	醋酸泼尼松组	1.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.88±0.34	1.81±0.40*
18 h (n=16)	模型组	2.00±0.00	1.63±0.50	1.06±0.57	1.81±0.40	6.5±0.82
	白芍总苷组	1.50±0.52	0.81±0.40	0.00±0.00	1.38±0.50	3.69±0.70*
	醋酸泼尼松组	1.44±0.51	0.69±0.49	0.00±0.00	1.44±0.51	3.56±0.51*
24 h (n=12)	模型组	2.00±0.00	1.67±0.49	1.08±0.51	1.92±0.29	6.67±0.89
	白芍总苷组	1.50±0.52	1.00±0.43	0.00±0.00	1.58±0.51	4.08±0.67*
	醋酸泼尼松组	1.50±0.52	0.92±0.51	0.00±0.00	1.5±0.52	3.92±0.67*

与模型组比较: * $P < 0.05$

vs.model group: * $P < 0.05$

3.2 白芍总苷对模型大鼠眼部病理学的影响

正常对照组未见炎症发生。注射LPS 18 h后模型组大鼠

虹膜睫状体水肿明显,前后房、玻璃体内有炎症细胞浸润,前房内纤维素样渗出明显,视网膜水肿增厚,有炎症细胞浸润,炎症的高峰期持续至24 h。白芍总苷组大鼠眼部炎症较模型组明显减轻,在炎症的高峰期虹膜睫状体水肿明显减轻,仅有少量的炎症细胞浸润,前房有少量的纤维素样渗出,视网膜的浸润细胞明显减少。注射LPS 36 h时各组大鼠眼部炎症开始减退,虹膜睫状体肿胀、炎症细胞浸润、前房纤维素样渗出等炎症表现均较24 h时明显减轻。48 h眼部炎症已基本减退。注射LPS 24 h后大鼠眼前段和后段的病理学改变见图1、图2。

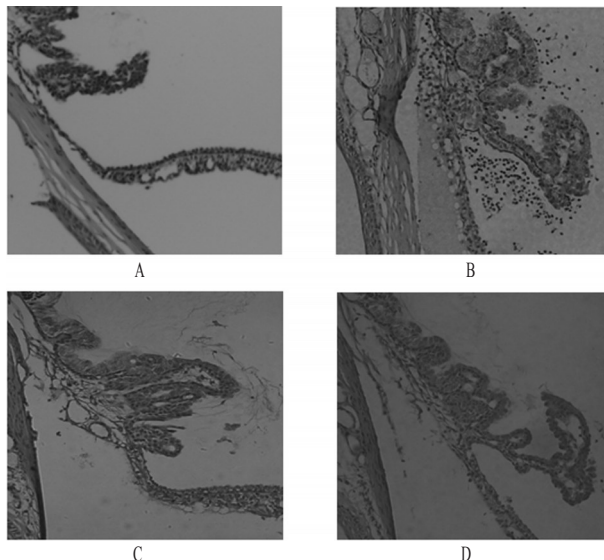


图1 注射LPS 24 h后大鼠眼前段组织病理学改变

A.正常对照组;B.模型组;C.白芍总苷组;D.醋酸泼尼松组

Fig 1 Histopathological change in anterior segment of eye in rats 24 h after injection of LPS for 24 hours

A. normal control group; B. model group; C. TGP group; D. prednisone acetate group

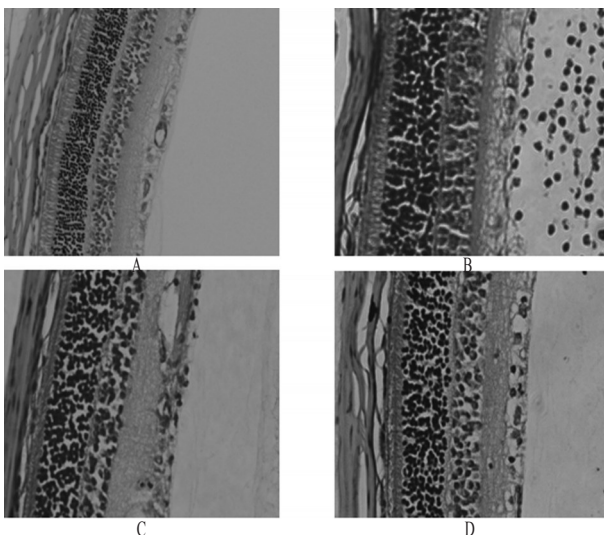


图2 注射LPS 24 h后大鼠眼后段组织病理学改变

A.正常对照组;B.模型组;C.白芍总苷组;D.醋酸泼尼松组

Fig 2 Histopathological change in posterior segment of eye in rats 24 h after injection of LPS

A. normal control group; B. model group; C. TGP group; D. prednisone acetate group

4 讨论

近年研究显示,白芍总苷可通过多种途径发挥抗炎和免疫调节作用。刘国玲等^[6]的研究发现,白芍总苷对类风湿性关节炎模型大鼠炎症有抑制作用,其机制可能与下调NF- κ B/p65蛋白的表达,降低类风湿性关节炎模型大鼠血清中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素(IL)-1 β 的水平有关。刘朝东等^[7]观察了白芍总苷对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠的作用,发现白芍总苷可能通过抑制CD₃⁺T淋巴细胞等炎症细胞的浸润,降低IL-6等促炎症细胞因子的过高表达。谢长江等^[8]研究显示,白芍总苷能降低IL-1、IL-6及TNF- α 水平,减轻脓毒血症模型大鼠的炎症反应及肺组织的损伤程度,降低病死率。此外,白芍总苷能抑制胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞增殖,下调 β 抑制蛋白-2的表达,并能降低血清促炎症细胞因子IL-1 β 、TNF- α 和前列腺素(PG)E₂水平,从而对模型大鼠胶原诱导性关节炎产生抑制作用^[9-12];白芍总苷还能抑制脂多糖诱导的炎症反应及TNF- α 、IL-6过度分泌^[13-14]。由此可见,白芍总苷可以在多个环节影响自身免疫疾病的细胞免疫、体液免疫以及炎症过程,减轻自身免疫性炎症反应。在眼科临床,有学者应用白芍总苷治疗内因性葡萄膜炎发现,它能改善患者细胞与体液免疫异常状况,并有一定的治疗作用^[15]。提示其对缓解葡萄膜炎的炎症反应可能起着一定的作用,具有潜在的应用价值。

本研究选用大鼠葡萄膜炎模型,以ig给药方式探讨了白芍总苷对葡萄膜炎的保护作用。结果发现,白芍总苷对模型大鼠的临床症状、疾病进程、病理进程均有不同程度减轻,其主要原因可能与白芍总苷的抗炎及免疫调节有关,但尚需进一步研究验证。同时,白芍总苷不良反应少,并且还有肝脏保护作用,有良好的耐受性^[16-17]。因此,对于因自身免疫原因而反复发作,迁延不愈,需长期规范用药才能控制的葡萄膜炎,以及不宜应用强效免疫抑制剂或激素治疗的葡萄膜炎患者,白芍总苷将是一种较为理想的药物。

参考文献

[1] 张源潮,孙红胜,潘正论,等.白芍总苷在风湿免疫病中的研究进展[J].世界临床药物,2010,31(8):449.
[2] 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.
[3] 贾瑜,雷山川,陈元,等.白芍总苷胶囊对慢性荨麻疹T细胞免疫平衡的影响[J].中国药房,2012,23(24):2240.
[4] 马翠萍,杨培增,钟晖,等.汉防己碱对实验性葡萄膜炎的抑制作用[J].中山大学学报:医学科学版,2003,24(1):74-76.
[5] Hoekzema R, Murray PI, Haren MAC, et al. Analysis of interleukin-6 in endotoxin induced uveitis[J]. *Invest Oph-*

thalmol Vis Sci, 1991, 32(1):88.

[6] 刘国玲,李宜川,沈永杰.白芍总糖苷对RA大鼠足爪组织中NF- κ B/p65蛋白表达的抑制作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(11):1082.
[7] 刘朝东,王洪志,韦超.白芍总苷对慢性非细菌性前列腺炎大鼠CD₃⁺T淋巴细胞及IL-6的影响研究[J].中国药房,2009,20(12):891.
[8] 谢长江,谢富华,张珊珊,等.白芍总苷对脓毒症大鼠模型的抗炎作用研究[J].新医学,2012,43(8):576.
[9] 吴华勋,陈镜宇,汪庆童,等.白芍总苷对胶原性关节炎大鼠滑膜 β 抑制蛋白的影响与其抑制滑膜细胞增殖的关系[J].中国药理学通报,2012,28(7):934.
[10] Chang Y, Wei W, Zhang L, et al. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on synoviocytes activities in rat collagen-induced arthritis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121(1):43.
[11] Wang QT, Zhang LL, Wu HX, et al. The expression change of beta-arrestins in fibroblast-like synoviocytes from rats with collagen-induced arthritis and the effect of total glucosides of paeony[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(2):511.
[12] 常景芝,王琛,陈剑,等.白芍总苷对大鼠胶原性关节炎足爪组织基质金属蛋白酶9及血清中炎症细胞因子IL- β 及TNF- α 表达的影响[J].时珍国医国药,2012,23(9):2187.
[13] Cao W, Zhang W, Liu J, et al. Paeoniflorin improves survival in LPS-challenged mice through the suppression of TNF-alpha and IL-1beta release and augmentation of IL-10 production[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(2):172.
[14] Liu DF, Wei W, Song LH. Protective effect of paeoniflorin on immunological liver injury induced by bacillus calmetteguerin plus lipopolysaccharide: modulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 mRNA[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(4):332.
[15] 张铭端,黄叔仁,陈敏珠.白芍总苷对内因性葡萄膜炎患者的免疫调节作用[J].中华眼底病杂志,1994,10(3):146.
[16] 贺焯,范佳妮,余灵瑛.白芍总苷对急性肝损伤小鼠的保护作用[J].中外医学研究,2010,8(17):71
[17] 王云萍.白芍总苷联合免疫抑制剂治疗类风湿关节炎对肝功能的影响[J].基层医学论坛,2012,16(13):1644.

(收稿日期:2013-08-23 修回日期:2013-10-26)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅