

刺三甲醇提物对AA大鼠血清中炎症因子含量的影响^Δ

罗伦才^{1*}, 童妍², 季小平¹, 李列平¹, 王利平¹(1.凉山彝族自治州第二人民医院制剂室, 四川西昌 615000; 2.西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4779-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.09

摘要 目的: 研究彝药刺三甲醇提物对佐剂性关节炎(AA)大鼠血清中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-10、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和前列腺素E₂(PGE₂)含量的影响。方法: 将60只大鼠随机均分为正常对照组(蒸馏水)、模型组(蒸馏水)、阳性对照(尼美舒利, 0.03 g/kg)组和刺三甲高、中、低剂量[7、3.5、1.75 g(生药)/kg]组, 除正常对照组外, 其余各组大鼠均于右后足趾部sc弗氏完全佐剂(0.1 ml)复制AA大鼠模型, 致炎后, 各组大鼠ig相应药物, 每天1次。30 d后测定大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、NO、PGE₂含量, 并观察大鼠踝关节病理形态学变化。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂含量升高, IL-10含量降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 刺三甲高剂量组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂含量降低, IL-10含量升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。病理结果显示, 刺三甲组部分切片滑膜细胞轻度增生、纤维组织轻度增生、炎细胞不同程度浸润、巨噬细胞有轻度增生; 正常对照组无此变化。结论: 彝药刺三甲醇提物对AA模型大鼠有明显的抗炎作用, 其作用机制可能与降低炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂的含量, 升高抗炎因子IL-10的含量有关。

关键词 刺三甲; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子 α ; 前列腺素E₂; 佐剂性关节炎; 大鼠

Effect of *Acanthopanax trifo-liatus* Alcohol Extract on the Contents of Inflammatory Factors in Serum of Adjuvant-induced Arthritis Rat

LUO Lun-cai¹, TONG Yan², JI Xiao-ping¹, LI Lie-ping¹, WANG Li-ping¹(1. Drug Manufacturing Laboratory, the Second People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Sichuan Xichang 615000, China; 2. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of Yi medicine *Acanthopanax trifo-liatus* alcohol extract on the contents of IL-1 β , IL-6, IL-10, NO, TNF- α and PGE₂ in serum of adjuvant-induced arthritis (AA) rats. METHODS: 60 SD rats were randomly divided into normal control group (distilled water), model group (distilled water), positive control group (nimesulide, 0.03 g/kg), *A. trifo-liatus* high-dose, medium-dose and low-dose groups [7, 3.5, 1.75 g (medicinal material)/kg]. Except for normal control group, other groups were given 0.1 ml Freund's complete adjuvant on posterior right toe to induce AA model. After modeling, those groups were given relevant medicine intragastrically, once a day. The contents of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , NO, PGE₂ in rat serum were measured 30 days later. The pathological morphology of the rat ankle was also observed. RESULTS: Compared with normal control group, the contents of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO and PGE₂ in serum increased in model group while the content of IL-10 decreased, with statistical significance ($P < 0.01$); compared with model group, the contents of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO and PGE₂ in serum decreased in *A. trifo-liatus* high-dose groups while the content of IL-10 decreased, with statistical significance ($P < 0.05$). The pathology results showed that part of the slice synoviocytes mild thickening, fibrous tissue mild hyperplasia, inflammatory cells infiltration at varying degrees, macrophages mild hyperplasia in *A. trifo-liatus* groups. Those changes were not found in normal control group. CONCLUSIONS: *A. trifo-liatus* alcohol extract has an obvious anti-inflammatory action to AA model rat, by a mechanism of decreasing the contents of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO and PGE₂, and increasing the content of IL-10.

KEYWORDS *Acanthopanax trifo-liatus*; Interleukin; TNF- α ; PGE₂; Adjuvant-induced arthritis; Rats

炎性细胞因子网络在类风湿性关节炎(RA)的发病过程中起着核心作用^[1], 众多细胞因子直接或间接参与与关节的炎症反应以及滑膜软骨的破坏, 而其中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等起主要作用。刺三甲为五加科植物白芍 *Acanthopanax trifo-liatus* (L.) Merr. 的根或根皮, 系凉山彝医习用药材, 彝药名“包其络赛”, 味苦、辛, 性凉, 有清热解毒、祛风利湿、舒筋活血的功效, 民间用于治疗感冒高热、风湿性

关节炎、类风湿性关节炎、黄疸及跌打损伤等。然而目前关于刺三甲对RA治疗作用的研究报道较少。故笔者选用发病机制与RA大致相同的佐剂性关节炎(AA)大鼠为模型, 研究刺三甲醇提物对AA大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 含量的影响, 初步探讨刺三甲治疗RA可能的作用机制, 为刺三甲治疗RA提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Multiskan Mk3 酶标仪(美国赛默飞世尔仪器有限公司); 转轮式切片机(德国徕卡公司); TSJ-II 全自动封闭式组织脱水机、BMJ-III 包埋机(常州市中威电子仪器有限公司); PHY-III

^Δ 基金项目: 凉山州科技局技术开发与推广应用项目(No. 凉山财建[2013]98号)

* 主任中药师。研究方向: 民族药物的研究、开发及应用。E-mail: llc646589@126.com

病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司);BA400Digital数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

1.2 药品与试剂

尼美舒利胶囊[远大医药(中国)有限公司,批号:H20010751,规格:100 mg/粒];IL-1 β 、IL-6、IL-10、一氧化氮(NO)、前列腺素E₂(PGE₂)、TNF- α 试剂盒[美国Cam公司生产,北京永辉生物科技有限公司进口分装,批号:187XL、Rr0196XL、Rr0201XL、Rr1184XL、Rr0308XL、Rr0359XL]。

1.3 动物与药材

SD大鼠60只,♂,体质量180~220 g,购于简阳达硕动物科技有限公司[合格证号:SCXK(川)2013-24]。刺三甲采于峨眉山,经四川省食品药品学校闵伯清副教授鉴定为五加科植物白芍 *Acanthopanax trifo-liatus*(L.) Merr.的根。

2 方法

2.1 动物分组、模型复制与给药

取药材粉末3 kg,95%乙醇渗滤提取,合并提取液,减压浓缩并回收乙醇得总浸膏160 g,得率为5.33%。将60只SD大鼠随机均分成为正常对照组、模型组、阳性对照(尼美舒利,0.03 g/kg)组和刺三甲高、中、低剂量组[7、3.5、1.75 g(生药)/kg],刺三甲高、中、低剂量分别相当于人日用量的14、7、3.5倍。除正常对照组外每组大鼠均于右后足趾部sc弗氏完全佐剂(0.1 ml,每1 ml含10 mg灭活结核杆菌)复制AA大鼠模型^[2-3]。致炎后立即开始给药,各组大鼠按照设定剂量连续ig相应药物30 d,正常对照组和模型组大鼠ig等体积蒸馏水。

2.2 大鼠足肿胀度的测定

采用足周长法测定每只大鼠致炎前左、右后足足周长(cm),每只测定2次,取其平均值作为致炎前正常足周长。于致炎后6、12、24、36、48、72 h再次测定大鼠右后足足周长,以致炎前后足周长的差值表示其肿胀度(即原发性足肿胀),并分别于致炎后第12、18、24、30天测定左后足(非致炎侧)足周长,同前法计算左后足足趾肿胀度,即表示继发性肿胀。

2.3 大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、NO、PGE₂含量的测定

致炎后30 d,各组大鼠股动脉取血脱臼处死,取致炎大鼠足踝关节。血液经离心后取上清,血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、NO、PGE₂含量测定严格按照相应试剂盒中说明书进行。

2.4 大鼠踝关节病理形态学的观察

取致炎大鼠足踝关节,10%中性甲醛固定,5%硝酸脱钙,不同体积分数乙醇梯度脱水,石蜡包埋切片,以苏木精-伊红(HE)染色。常规光镜下检查,观察滑膜组织有无炎性细胞浸润、关节滑膜组织增生、关节腔隙变窄、软骨及骨组织侵蚀等现象。

2.5 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行处理。数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先用方差分析,再用 q 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 刺三甲醇提取物对AA大鼠足肿胀的影响

3.1.1 刺三甲醇提取物对AA大鼠足肿胀的影响 模型组大鼠右后足明显肿胀,在致炎后12~36 h肿胀度达到峰值;与模型组比较,刺三甲高、中剂量组能有效减轻AA大鼠关节肿胀;与阳性对照组比较,刺三甲各剂量组无明显的差异。刺三甲醇提取物对AA大鼠原发性足肿胀的影响结果见表1。

表1 刺三甲醇提取物对AA大鼠原发性足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of *A. trifo-liatus* alcohol extract on AA induced primary paw swelling of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	致炎不同时间足肿胀度,cm					
	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
模型组	0.49±0.06	0.55±0.07	0.61±0.04	0.62±0.02	0.56±0.07	0.52±0.03
阳性对照组	0.45±0.05	0.47±0.02*	0.49±0.07*	0.49±0.04*	0.44±0.05*	0.42±0.02*
刺三甲高剂量组	0.46±0.01	0.48±0.03	0.50±0.06*	0.50±0.03*	0.45±0.05*	0.42±0.01*
刺三甲中剂量组	0.47±0.08	0.51±0.02	0.52±0.04	0.51±0.03*	0.48±0.06	0.46±0.02
刺三甲低剂量组	0.47±0.04	0.53±0.05	0.54±0.09	0.52±0.07*	0.49±0.04	0.48±0.03

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

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

3.1.2 刺三甲醇提取物对AA所致大鼠继发性足肿胀的影响 模型组大鼠发生继发性足肿胀,且随着致炎时间延长,继发性足肿胀越明显。与模型组比较,致炎24、30 d后刺三甲高、中剂量组大鼠继发性足肿胀受到抑制($P < 0.05$);与阳性对照组比较,刺三甲各剂量组无明显差异。刺三甲醇提取物对AA所致大鼠继发性足肿胀的影响见表2。

表2 刺三甲醇提取物对AA大鼠继发性足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effects of *A. trifo-liatus* alcohol extract on AA induced secondary paw swelling of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	致炎不同时间足肿胀度值,cm			
	12 d	18 d	24 d	30 d
模型组	0.22±0.07	0.27±0.05	0.29±0.04	0.31±0.06
阳性对照组	0.16±0.06	0.18±0.01*	0.18±0.03*	0.19±0.05*
刺三甲高剂量组	0.18±0.02	0.19±0.03	0.19±0.04*	0.22±0.02*
刺三甲中剂量组	0.22±0.02	0.23±0.04	0.25±0.02	0.25±0.03
刺三甲低剂量组	0.24±0.05	0.25±0.05	0.26±0.06	0.26±0.04

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

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

3.2 刺三甲醇提取物对AA大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、NO、PGE₂含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂含量升高,IL-10含量降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和刺三甲高、中、剂量组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂含量增加,IL-10含量降低($P < 0.05$),结果见表3。

表3 刺三甲醇提取物对AA大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、NO、PGE₂含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Effects of *A. trifo-liatus* alcohol extract on the serum contents of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , NO and PGE₂ in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IL-1 β ,ng/L	IL-6,ng/L	IL-10,pg/ml	TNF- α ,ng/L	NO, μ mol/L	PGE ₂ ,ng/L
正常对照组	8.57±0.87	10.06±1.60	114.88±16.04	162.24±11.01	25.20±2.34	225.00±30.38
模型组	10.99±0.75**	15.43±2.34**	79.79±8.85*	202.32±6.50**	39.51±4.62**	384.87±44.72**
阳性对照组	9.14±0.64*	12.22±2.79*	87.38±9.79*	182.86±10.37*	29.68±3.11*	284.18±12.44*
刺三甲高剂量组	8.91±0.59*	12.79±2.32*	83.69±19.45*	185.51±16.15*	28.38±3.05*	267.74±41.12*
刺三甲中剂量组	8.57±0.88*	12.23±2.12*	89.46±12.32*	184.39±14.21*	27.44±4.45*	272.12±39.42*
刺三甲低剂量组	9.28±0.81	14.54±2.42	80.31±6.18	188.28±19.47	35.29±6.11	322.26±79.35

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$

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

3.3 刺三甲醇提取物对AA大鼠踝关节病理形态学的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠组织滑膜细胞增厚、新生血管和纤维母细胞样细胞增生形成纤维组织、巨噬细胞增生明显、滑膜组织血管扩张充血、间质大量炎细胞浸润;与模型组比较,阳性对照组及刺三甲各剂量组大鼠组织部分切片滑膜细胞轻度增生、纤维组织轻度增厚、炎细胞不同程度浸润、巨噬细胞也有轻度增生。刺三甲醇提取物对AA大鼠踝关节病理形态学的影响见图1。

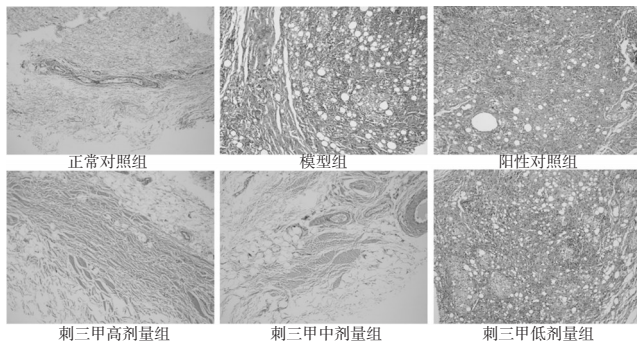


图1 刺三甲醇提取物对AA大鼠踝关节病理形态学的影响($\times 200$)

Fig 1 Effects of *A. trifoliatus* alcohol extract on the pathological morphology of synovial tissue joint in rats ($\times 200$)

4 讨论

细胞免疫、免疫复合物所介导的炎症反应在各种风湿性疾病,尤其是RA病理过程中起主导作用。AA是目前广泛应用的RA模型之一。在本实验中,sc弗氏完全佐剂6h后大鼠右后足明显发红发肿,并伴有发热现象,约24h后达到高峰,表现为典型的急性炎症反应,同时大鼠因足部肿胀而导致活动量明显减少;12d后逐渐出现非致炎侧及前肢的关节和足跖肿胀、体质量下降、皮色无光、痛觉过敏等症状,并于致炎后24d左右,继发性病变达到高峰,踝关节组织病理形态学检查也显示大鼠局部关节产生明显的滑膜炎反应,为RA早期典型病变。上述现象与文献[4]报道基本一致,表明本实验AA大鼠模型复制成功。

在RA发病及病理进展过程中,众多细胞因子直接或间接参与关节的炎症反应以及滑膜软骨的破坏,其中IL-1 β 、IL-6、IL-10等起主要作用。其中IL-6可能参与慢性炎症自身发展的病理生理^[5]。在RA滑膜液中的IL-6可反映局部前炎症变化,特别是破坏性病变;另外,IL-6可调节B淋巴细胞功能,与抗体及类风湿因子的产生有关^[6];IL-6还可下调成纤维细胞表达I型胶原,增加胶原酶和基质溶解酶的产生,导致基质退化和成纤维细胞的过度生长,从而侵蚀软骨和骨骼^[7]。IL-1 β 被称为前炎症细胞因子,主要由单核-巨噬细胞产生,介导天然免疫,是启动固有性免疫应答反应的关键,其可调节多种细胞因子、细胞黏附分子、免疫调节分子及前炎症介质的表达,在RA的骨侵蚀及软骨破坏中发挥着重要作用。IL-10为一种抗炎因子^[8-9]。PGE₂是炎症介质,有增加发炎的效应,与炎症症状如局部充

血、水肿及疼痛等密切相关,并在免疫调节中起重要作用。NO不仅仅是一个重要的炎症介质,还是一种自由基,能与过量的活性氧反应,产生更具细胞毒性的亚硝酸盐阴离子,并与活性氧协同破坏软骨蛋白多糖,干扰软骨细胞与细胞外基质之间的相互作用,上调基质金属蛋白酶表达从而诱导加重软骨损伤。TNF- α 是一种主要的免疫调节和前炎症因子,在RA的病理过程中具有重要作用,可刺激滑膜细胞和软骨细胞合成PGE₂和胶原酶,引起骨和软骨的吸收破坏,促进成纤维细胞增殖^[10]。

本实验结果显示,刺三甲高、中剂量可明显降低AA大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂的含量,升高IL-10的含量。这提示刺三甲醇提取物可能通过减少血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NO、PGE₂等炎症因子的释放,或者阻碍其致炎作用,从而减轻滑膜组织的炎症反应和组织破坏;并且可使IL-10的含量增加,更好地发挥抗炎作用,从而阻碍或延缓AA大鼠的病理进程。但关于刺三甲对AA大鼠炎症信号转导网络影响的分子机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 高俊,丁真奇.细胞因子在类风湿关节炎中作用的研究现状[J].医学综述,2006,12(5):289.
- [2] 徐淑云,卞如濂,陈修,等.药理实验方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,1992:524-544、933-944.
- [3] 郝光荣.实验动物学[M].2版.上海:第二军医大学出版社,2002:276.
- [4] Hegen M, Keith JC, Collins M, et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(11):1 505.
- [5] 王迪华.中药联合穴位注射对30例输卵管性不孕症患者血清IL-6、TNF- α 的影响观察[J].陕西中医,2009,30(3):264.
- [6] 蒋明,David Yu,林孝义,等.中华风湿病学[M].北京:华夏出版社,2004:16、201.
- [7] 李芹,寿涛,林俊,等.类风湿关节炎患者IL-10的检测及意义[J].云南医药,2001,22(5):393.
- [8] 章婷婷,何天有,王念宏.铺灸对佐剂型关节炎大鼠白细胞介素-1和肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-10的影响[J].中国中医药信息杂志,2009,16(11):23.
- [9] 钟建桥,先德海,陈德宇.寻常痤疮患者血清和皮损中SP、IL-1、IL-6的研究[J].陕西医学杂志,2007,36(4):484.
- [10] Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, et al. Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1 and IL-10 to T cell mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(4):582.

(收稿日期:2015-08-19 修回日期:2015-10-02)

(编辑:林 静)