

复方玄驹胶囊对免疫性关节炎大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 的影响

王远¹ 张会娟¹ 刘蓉¹ 张斌² (1. 青岛市第九人民医院, 山东 青岛 266000; 2. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266000)

摘要:目的 观察复方玄驹胶囊对免疫性关节炎大鼠血清中 TNF- α 与 IL-1 β 表达的影响,并初步探讨其治疗机制。方法 建立 II 型胶原蛋白诱导大鼠免疫性关节炎模型,观察复方玄驹胶囊对实验性大鼠体重增长速度和足肿胀的影响;检测血清 IL-1 β 和 TNF- α 的水平。结果 服用复方玄驹胶囊 28 d 后,模型大鼠体重增长速度明显增加,关节肿胀程度明显减轻 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);模型大鼠血清 TNF- α 与 IL-1 β 水平降低 ($P < 0.01$)。结论 复方玄驹胶囊在免疫性关节炎大鼠中可以下调致炎因子 TNF- α 与 IL-1 β 的水平,提示这可能与该药抑制实验性类风湿性关节炎病情进展密切相关。

关键词: 复方玄驹胶囊; 免疫性关节炎; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素-1 β

中图分类号: R96

文献标志码: A

文章编号: 1673-4610(2015)05-0334-04

Effect of Fufang Xuanju Capsule on Serum TNF- α and IL-1 β of Immunologic Arthritis Rats

WANG Yuan¹, ZHANG Huijuan¹, LIU Rong¹, ZHANG Bin² (1. Qingdao NO. 9 People's Hospital, Qingdao 266000, China; 2. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the therapeutic effect of decoction of Fufang Xuanju capsule on immunologic arthritis and investigate the mechanism of this drug on the disease by determining the expression of serum TNF- α and IL-1 β in synovial tissues of joint. **METHODS** The experimental rat model of type II collagen-induced arthritic (CIA) was established. The growth rate of body weight and the inhibitory effects on paw edema were observed, and serum TNF- α and IL-1 β levels were determined in experimental rats.

RESULTS In the 4-week of administration of Fufang Xuanju capsule, increased weight gain of the model rats was observed with lessened swelling of the joints ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), which resulted in a lower serum TNF- α and IL-1 β in the model rats ($P < 0.01$).

CONCLUSION Decoction of Fufang Xuanju capsule can treat the joint impairment of immunologic arthritis rats and the therapeutic mechanism may be relevant to reducing the content of TNF- α and IL-1 β .

KEY WORDS: Fufang Xuanju capsule; immunologic arthritis; TNF- α ; IL-1 β

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种由自身免疫障碍引致免疫系统攻击关节的长期慢性炎症,主要病理改变为滑膜炎,表现为滑膜增生和炎性细胞浸润,包括炎症期、血管翳形成期和纤维化期,软骨和软骨下骨破坏,最终造成关节畸形和强直,功能丧失^[1]。研究发现,细胞因子、细胞凋亡、原癌基因等多因素在 RA 的发病过程中起着重要作用;其中细胞因子对 RA 影响研究较多,多种细胞因子对 RA 产生相互协同或拮抗的作用,制约或促进病情的发生发展,其中 TNF- α 及 IL-1、IL-6 等炎性因子在发病中起着“中心轴”作用,它们长期作用于滑膜,促进血管翳的形成,对 RA 的骨质破坏产生较大影响^[2-4]。

复方玄驹胶囊由黑蚂蚁、淫羊藿、枸杞子、蛇床子等组成,具有温肾、壮阳、益精、祛风湿等功效,用于肾阳虚,亦用于治疗风湿性关节炎之风湿痹痛、肝肾阴虚之腰膝酸软等症。目前对复方玄驹胶囊的研究主要集中在对前列腺炎和性功能障碍方面的治疗^[5-7],而对其治疗类风湿性关节炎方面的实验研究

较少,有报道复方玄驹胶囊具有免疫调节作用和抗炎的作用^[8]。本研究采用 II 型胶原蛋白诱发大鼠类风湿性关节炎模型(collagen-induced arthritic rats, CIA),观察复方玄驹胶囊对实验性类风湿性关节炎的影响及其对大鼠血清中炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平的调节机理,探讨其治疗类风湿性关节炎的作用机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药物

复方玄驹胶囊为浙江施强制药有限公司产品(批号:20101004),甲氨喋呤(MTX)为上海信宜有限公司产品(批号:036140504)。试验前用 0.9% 的生理盐水溶解后得到不同浓度的供试品溶液待用。

1.2 试剂

TNF- α 试剂盒和 IL-1 β 试剂盒:上海宝曼生物科技有限公司;酸可溶性牛源性 II 型胶原蛋白(Collagen II C II from bovine nasal septum),美国 Sigma

作者简介:王远,主管药师,研究方向:临床药理学, Tel: 18561856955, E-mail: 1030981109@qq.com 通讯作者:张斌,中药学硕士,研究方向:中药新制剂与新剂型, Tel: 18661803280, E-mail: zhangbin0993@sina.com

公司产品; 弗氏不完全佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant ,FIA) 美国 Sigma 公司产品。

1.3 动物

实验用雄性 SD 大鼠 60 只 6~8 周龄, 购于青岛市药物检验所实验动物中心, 在实验条件下适应性饲养 1 周。

1.4 仪器

宝特 XL800 酶标仪 美国 BioTeK 公司; AB1352S 十万分之一电子天平, METT LER TOLEDO; 高速离心机 德国 Thermo Scientific Heraeus 公司。

2 方法

2.1 大鼠 RA 模型的制备

参考文献^[9-10]方法 在无菌条件下 将酸可溶性 CII 用 0.1 mol/mL 的冰醋酸在冰浴中充分溶解后用弗氏不完全佐剂配成 1 mg/mL 的乳剂, 置 4 °C 冰箱中保存待用。除空白对照组外 其余每只大鼠右后足跖皮内注射 0.25 mL CII 致炎。各组动物于致炎后第 4 天开始 观察并记录对侧后肢及双侧前肢关节肿胀情况 采用关节炎分数评分法计算关节炎指数(Arthritisindex AI)。

2.2 AI 评分^[11-12]

AI 标准分级如下: 0 分, 无红肿; 1 分, 小趾关节稍红肿, 有轻微炎症出现; 2 分, 趾关节及足趾肿胀, 中度炎症; 3 分, 踝关节以下的足爪肿胀, 轻度功能障碍; 4 分, 关节重度肿胀, 严重功能障碍。以致炎后第 18 天对侧后肢及双侧前肢 AI 之和 ≥ 6 作为模型制备成功的标准。

2.2 实验分组与给药^[11]

取雄性 SD 大鼠 60 只(200 \pm 20) g, 依照随机表法分为 6 组: 空白对照组 模型对照组 给药组根据“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值”表和参考文献^[8]分为高、中、低剂量组和阳性药对照组 每组 10 只。C II 致炎当天给药 高、中、低给药组每天分别以灌胃给药方式给予复方玄驹胶囊 1 000, 750, 500 μ g/kg, 共给药 4 周, 阳性药组每周灌胃给 MTX 750 μ g/kg 模型对照组致炎后给予等量生理盐

水 空白对照组用生理盐水作为致炎物质。以右后足为观察对象, 从致炎后第 4 天开始每天记录各组动物右后足的发病率, 并于第 8, 14, 20, 28 天记录右后足体积的肿胀度, 第 28 天大鼠腹主动脉取血, 提取血清, 冷藏待测。

2.3 检测指标

2.3.1 检测给药前与给药 28 d 后体重增长速度与右后足足肿胀度, 足跖关节肿胀度采用跖围法测量。

2.3.2 采用 ELISA 法按照试剂盒说明书检测血清中 TNF- α 与 IL-1 β 浓度。

2.4 统计学处理

所有实验结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS17.0 统计软件进行处理, 各组大鼠足跖肿胀度和血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平均数比较进行单因素方差分析 $P < 0.05$ 认为组间有显著性差异。

3 结果

3.1 对 C II 诱导大鼠体重增长速度的影响

28 d 后, 与模型对照组相比, 高、中、低剂量组与阳性对照组体重增长速度相对加快, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 高、中剂量组及阳性对照组尤为显著, 高、中、低剂量组与阳性对照组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 见表 1)。

3.2 对 C II 诱导大鼠右侧后肢足肿胀度的影响

由表 2 可知, 致炎前后的第 8 天左右, 与空白对照组比较, 各组大鼠右后足跖肿胀度未出现显著性差异($P > 0.05$), 致炎后第 14 天, 模型对照组与空白对照组相比, 大鼠足跖肿胀度产生显著性差异($P < 0.05$), 说明造模成功。治疗 20 d 后, 复方玄驹胶囊高、中剂量组及阳性对照组与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$), 治疗 4 周后复方玄驹胶囊高、中及阳性对照组差异更为显著($P < 0.01$), 低剂量组亦有显著性差异($P < 0.05$)。与阳性对照组相比较, 复方玄驹胶囊高、中、低剂量组无显著性差异($P > 0.05$)。说明, 复方玄驹胶囊与 MTX 均可降低 RA 大鼠的足肿胀度。

表 1 治疗前后体重变化情况

组别	n	剂量(μ g/kg)	用药前(g)	用药后(g)	用药前后差值(g)
正常对照组	10	--	258.45 \pm 7.93	366.17 \pm 9.88	107.72 \pm 9.01
模型对照组	10	--	241.54 \pm 8.21	291.33 \pm 7.47	50.79 \pm 5.75 ⁴
高剂量组	10	1 000	248.91 \pm 6.98	327.59 \pm 5.66	78.68 \pm 6.32 ^{2,3}
中剂量组	9	750	252.74 \pm 5.83	325.85 \pm 6.39	73.11 \pm 7.04 ^{1,3}
低剂量组	9	500	246.92 \pm 7.44	311.30 \pm 8.48	64.38 \pm 6.66 ⁴
阳性对照组	10	750	251.64 \pm 7.37	322.24 \pm 6.96	70.60 \pm 5.69 ^{2,3}

注: 模型组与正常组相比较, ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; 复方玄驹胶囊高中低剂量组及阳性对照组与模型对照组相比较, ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$; 复方玄驹胶囊高中低剂量组与阳性对照组相比较, ⁵ $P < 0.05$, ⁶ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠右后足足肿胀度比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	n	致炎前足 周长(cm)	致炎后足周长(cm)			
			8 d	14 d	20 d	28 d
正常对照组	10	2.04 ± 0.05	2.13 ± 0.05	2.22 ± 0.04	2.31 ± 0.05	2.34 ± 0.03
模型对照组	10	1.99 ± 0.03	2.82 ± 0.07	3.56 ± 0.09 ¹	4.07 ± 0.042	4.25 ± 0.05 ²
高剂量组	10	2.00 ± 0.03	2.87 ± 0.05	3.33 ± 0.06	3.58 ± 0.02 ³	3.65 ± 0.07 ⁴
中剂量组	9	2.07 ± 0.07	2.91 ± 0.06	3.41 ± 0.04	3.65 ± 0.05 ³	3.74 ± 0.03 ⁴
低剂量组	9	2.05 ± 0.05	2.88 ± 0.04	3.49 ± 0.07	3.77 ± 0.05	3.91 ± 0.06 ³
阳性对照组	10	2.12 ± 0.06	2.90 ± 0.07	3.35 ± 0.04	3.54 ± 0.04 ³	3.70 ± 0.05 ⁴

注: 模型组与正常组相比较,¹ $P < 0.05$,² $P < 0.01$; 复方玄驹胶囊高中低剂量组及阳性对照组与模型对照组相比较,³ $P < 0.05$,⁴ $P < 0.01$; 复方玄驹胶囊高中低剂量组与阳性对照组相比较,⁵ $P < 0.05$,⁶ $P < 0.01$

3.3 复方玄驹胶囊对大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 的影响

致炎后第 28 天 模型对照组与空白对照组大鼠比较 血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平均有明显升高 ($P < 0.01$) ,说明造模成功; 与模型对照组比较 阳性对照组和高、中剂量复方玄驹胶囊组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平具有显著性差异 ($P < 0.05$) ,且高剂量复方玄驹胶囊组对大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 的抑制作用与 MTX 相当,但低剂量组的作用不明显(见表 3)。

表 3 复方玄驹胶囊对大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	n	剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
正常对照组	10	--	25.37 ± 3.12	23.95 ± 2.62
模型对照组	10	--	114.55 ± 5.42 ²	142.79 ± 5.38 ²
高剂量组	10	1 000	79.56 ± 5.03 ⁴	84.46 ± 5.70 ⁴
中剂量组	9	750	83.91 ± 6.34 ³	94.73 ± 6.08 ⁴
低剂量组	9	500	95.86 ± 6.51	121.97 ± 7.22
阳性对照组	10	750	74.61 ± 5.45 ⁴	79.38 ± 4.38 ⁴

注: 模型组与正常组相比较,¹ $P < 0.05$,² $P < 0.01$; 复方玄驹胶囊高中低剂量组及阳性对照组与模型对照组相比较,³ $P < 0.05$,⁴ $P < 0.01$; 复方玄驹胶囊高中低剂量组与阳性对照组相比较,⁵ $P < 0.05$,⁶ $P < 0.01$

4 讨论

RA 从现代医学角度讲,是一种病因未明的慢性、以炎性滑膜炎为主的系统性自身免疫疾病,至今尚无根治办法。研究表明,多种炎性细胞及其分泌的炎性细胞因子在 RA 的发病机制中所起的作用越来越重视,其中 TNF- α 及 IL-1、IL-6 等炎性因子在发病中起着“中心轴”作用,它们长期作用于滑膜、促进血管翳的形成,导致了 RA 的骨质破坏^[2-4]。

RA 从中医学角度讲属于“痹症”范畴,其基本

病机为风、湿、寒、热、痰等邪气滞留肢体肌肉、筋脉、关节等部位,导致经络阻闭,不通则痛^[13]。中医药在防治 RA 上以辨证论治为主,扶正与祛邪同步进行,多层次、多环节、多途径调节机体免疫功能,阻止病情进展,扶正以补肝肾、强筋骨为主;祛邪以活血化瘀、舒筋通络为主。调补肝肾具有改善内分泌功能的作用,增强下丘脑—垂体—性腺轴功能,促进性激素分泌,促进骨增长,抑制免疫炎症反应;补肾壮骨药能对成骨细胞与破骨细胞的活性进行调节,促进骨钙吸收,增加骨密度,修复被侵袭和破坏的关节软骨和骨质,改善关节功能^[14]。活血化瘀药能抑制组织异常增生,阻止 RA 滑膜血管增生及血管翳形成;同时可以通过增加纤溶酶活性促进纤维蛋白溶解、抑纤凝,阻止滑膜炎进一步发展^[15]。

复方玄驹胶囊由黑蚂蚁、淫羊藿、枸杞子、蛇床子等药物组成,方中以黑蚂蚁为君药,具有扶正固本、补肾壮阳、养血荣筋、祛瘀通络的功效,治疗类风湿性关节炎的疗效确切^[14-17],淫羊藿有补肾阳、强筋骨、驱风湿的功效,能够增强机体免疫功能,促进骨增长^[18]。方中以枸杞子、蛇床子为佐药,枸杞子味甘性平,能滋补肝肾、坚筋骨,可用于腰膝酸软;蛇床子味辛苦、性温,有温肾壮阳散寒之效。诸药配伍,共奏温补肾阳、驱风散寒之效,从扶正与祛邪两方面达到标本同治的效果^[8]。

实验结果表明,复方玄驹胶囊对 II 型胶原蛋白诱导 RA 大鼠关节炎与损伤有明显治疗作用,在本实验条件下,1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量的复方玄驹胶囊疗效与 MTX 相当,而体重增长速度则是复方玄驹胶囊优于 MTX,但无显著性差异 ($P < 0.05$)。其可能机制为:复方玄驹胶囊具有扶正和祛邪的功效,可明显抑制 TNF- α 和 IL-1 β 分泌,同时对调节机体免疫系统,达到缓解和控制 RA 病情。

参考文献

- [1] 周大兵. 类风湿性关节炎滑膜组织中 IL-17 和 IL-10 的表达及意义[D]. 天津医科大学, 2014.
- [2] Gerald W. Pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. J Clinical, 2004, 3: 26-31.
- [3] 蒋明, 林孝义, 朱立平, 等. 中华风湿病学[M]. 第一版. 华夏出版社, 2004: 197.
- [4] 林文棠, 朱平. 临床免疫学[M]. 西安: 四军医大学出版社, 2002: 25-26.
- [5] 陈文军, 吕敏, 刘文彪, 等. 复方玄驹胶囊治疗Ⅲ型前列腺炎相关性功能障碍的临床研究[J]. 中国性科学, 2014, 05(23): 6-8.
- [6] 葛晓东. 复方玄驹胶囊治疗慢性前列腺炎疗效观察[J]. 陕西中医, 2013, 12(33): 1600-1601.
- [7] 曹鑫. 复方玄驹胶囊治疗肾虚型男性性欲低下的疗效观察[D]. 广州中医药大学, 2014.
- [8] 贾伟, 薛京, 王永新, 等. 复方玄驹胶囊免疫调节和抗炎作用的研究[J]. 中草药, 2003, 02(34): 62-65.
- [9] 林红, 贺永怀, 黎燕, 等. II型胶原蛋白与弗氏完全佐剂大鼠关节炎模型的建立和比较[J]. 中国实验动物学报, 1999, 07(1): 32.
- [10] 朱江, 高欣, 谢文利, 等. 京尼平苷对类风湿性关节炎大鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 09(30): 708-711.
- [11] 余方流, 董群. 桂枝芍药知母汤对免疫性关节炎大鼠 TNF- α 与 RANKL 表达的影响[J]. 皖南医学院学报, 2008, 05(27): 324-327.
- [12] 汪煌, 史晓林. 独活寄生汤对 CIA 大鼠滑膜 IL-1 β 、IL-8 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2014, 06(21): 622-623, 634.
- [13] 周仲瑛. 中医内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 464.
- [14] 龙渊, 文继红, 张瑞荔. 类风湿性关节炎的中医药防治思路[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 01(32): 7-9.
- [14] 彭代平. 桂枝附子汤治疗类风湿性关节炎的临床及实验研究[D]. 云南中医学院, 2014.
- [15] 麦燕琼. 药用蚂蚁治疗类风湿性关节炎[A]. 中华中医药学会风湿病分会. 中华中医药学会风湿病分会 2010 年学术会论文集[C]. 中华中医药学会风湿病分会, 2010: 2.
- [16] 李丽, 张剑宇, 龚红. 蚂蚁治疗类风湿性关节炎的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 04: 49.
- [17] 吴春雷. 蚂蚁类风湿灵治疗类风湿性关节炎 97 例观察[J]. 武警医学, 1996, 03: 169-170.
- [18] 侯家玉, 方泰惠. 中药药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 240-242.

(收稿日期: 2015-04-20)

(上接第 330 页)

3 讨论

蛋黄油中主要含脂肪类物质, 极性低, 本文选择了二氯甲烷-甲醇(1:2)作为溶解溶剂, 相对于无水乙醇溶解效果好。流动相选择以甲醇为流动相 A, 以甲醇-异丙醇-正己烷(10:70:20)为流动相 B, 进行梯度洗脱, 目的是使胆固醇与蛋黄油中高含量的低极性成分能更好分离并检测, 而低极性的成分又能成功洗脱出来, 其出峰时间约 20 min, 不会对色谱柱造成污染, 测定结果准确、重现性好, HPLC 色谱图见图 3。本文选择的流动相不昂贵, 较乙腈-异丙醇系统经济, 对生产制造企业原料质量标准的制订及应用具有积极作用。

胆固醇对照品溶液及样品溶液的最大吸收波长一致, 均为 205 nm, 溶剂在该波长处虽有吸收, 但是不影响样品的检测, 故选择检测波长为 205 nm。

已有文献报道过的如食品中胆固醇含量测定, 一般均经皂化萃取后定容测定。本文作者曾对蛋黄油皂化萃取后定容测定进行过研究, 测定结果偏低, 回收率较低, 而且前处理繁琐, 见“2.10”项下及表 3。故本文方法采用二氯甲烷-甲醇(1:2)直接溶解样品后经流动相梯度洗脱分离测定, 准确度高, 工作效率高, 方法适用性强。

参考文献

- [1] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准, 2009 年版[S]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2010: 50-51.
- [2] 王春林, 唐汉钧. 蛋黄油医用价值研究近况[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(6): 100-102.
- [3] 严建业, 王璐, 李顺祥, 等. 蛋黄油的现代研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(3): 106-110.
- [4] 食品中胆固醇的测定-高效液相色谱法[S]. GB/T 22220-2008.
- [5] 胆固醇. 欧洲药典 7.0 版[S]. 1680-1681.
- [6] 丁卓平, 王明华, 刘振华, 等. 食品中胆固醇含量测定方法的研究与比较[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 130-135.
- [7] 房文宁, 王爱国, 傅金奎. 不同组织样中胆固醇含量测定方法的优化[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(5): 48-50.
- [8] 张旭, 胡艳, 蒋桂韬. 蛋黄中胆固醇含量测定方法的研究[J]. 检测分析, 2011(12): 35-38.
- [9] 陈静, 刘昌勇, 杜红岩, 等. 反相高效液相色谱法测定不同品种鸡蛋中胆固醇的含量[J]. 营养学报, 2011, 33(3): 323-324.
- [10] 刘佳娣, 许书军, 徐春祥, 等. 双波长分光光度法测定废弃油脂中胆固醇的含量[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(18): 9871-9873.
- [11] 其布勒哈斯, 李红, 徐向峰, 等. RP-HPLC 法测定食品中胆固醇含量的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(1): 276-279.
- [12] 廖连英, 韩飞, 赵质创, 等. 食用植物油中胆固醇含量的快速测定[J]. 化学分析计量, 2012, 21(2): 32-33.

(收稿日期: 2015-02-04)