

川芎嗪对胶原性关节炎大鼠血清 IL-1、IL-6、IL-2 水平及关节浸液 NO、PGE₂ 的影响

母传贤¹ 刘国玲² 田 华² 李宜川² 黄一聆²

摘要 **目的** 观察川芎嗪(TMP)对胶原性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠血清及关节液中细胞因子和炎症介质的影响,并进一步探讨其对类风湿关节炎治疗的可能机制。**方法** II型胶原诱导大鼠胶原性关节炎模型,造模成功的36只大鼠随机分为模型组、地塞米松组、TMP 100 mg/kg 组及 TMP 50 mg/kg 组,每组9只。TMP 两组大鼠于造模后第7~35天灌胃给予 TMP 100 和 50 mg/kg,每天用药1次;地塞米松组肌肉注射给予2 mg/kg,每天1次;正常组和模型组静脉注射给予2 mL/kg 生理盐水,每天1次。观察 CIA 大鼠足爪肿胀度,用放免法和硝酸还原法检测 CIA 大鼠血清 IL-1、IL-6 和 IL-2 水平及关节浸液一氧化氮(NO)和前列腺素 E₂(prostaglandin, PGE₂)含量。**结果** 与正常组比较,模型组足爪肿胀度明显增加,关节浸液中 NO 和 PGE₂ 含量明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, TMP 100 mg/kg 组和地塞米松组足爪肿胀均明显抑制,大鼠血清 IL-1 和 IL-6 水平明显降低, IL-2 水平明显上升,关节浸液内 NO、PGE₂ 含量下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$); TMP 50 mg/kg 组足爪肿胀明显抑制($P < 0.01$),其他指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** TMP 100 mg/kg 对大鼠 CIA 有明显抑制作用,其机制可能是抑制 CIA 大鼠内源性细胞因子活性和炎症局部区域相关炎症介质产生,提高抑炎细胞因子含量,诱导炎性细胞因子网络趋于平衡,从而对大鼠 CIA 发挥治疗作用。

关键词 川芎嗪;类风湿关节炎;胶原性关节炎;细胞因子

Effect of Tetramethyl pyrazine on Serum Levels of IL-1 β , IL-6, and IL-2, and NO and PGE₂ in the Synovial Fluid of CIA Rats: an Experimental Research MU Chuan-xian¹, LIU Guo-ling², TIAN Hua², LI Yi-chuan², and HUANG Yi-ling² 1 Department of Clinics, Shangqiu Senior Medical College, Henan (476100), China; 2 Faculty of Basic Medicine, Shangqiu Senior Medical College, Henan (476100), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Tetramethyl pyrazine (TMP) on the cytokines and inflammatory mediators in the serum and the synovial fluid of collagen-induced arthritis (CIA) rats, and further to investigate its possible mechanisms for treating rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Type II CIA rat model was established. Rats in the TMP group were administered with TMP at 50 mg/kg and 100 mg/kg, once daily. Dexamethasone at 2.0 mg/kg was intramuscularly injected to those in the Dexamethasone treated group, once daily. Normal saline at 2 mL/kg was given to those in the normal control group and the model group, once daily. All medication was started from the 7th day, lasting to the 35th day. CIA rats' foot swelling degree was observed. Contents of serum IL-1, IL-6, IL-2, NO and PGE₂ in the synovial fluid were detected by radioimmunoassay and nitrate reduction method. **Results** Compared with the normal group, the foot swelling obviously increased, contents of NO and PGE₂ in the synovial fluid were obviously elevated in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the foot swelling could be obviously inhibited by 100 mg/kg TMP and Dexamethasone; serum levels of IL-1 and IL-6 obviously decreased, serum IL-2 level obviously increased, contents of NO and PGE₂ decreased ($P < 0.01$). TMP 50 mg/kg could obviously inhibit the foot swelling of CIA rats ($P < 0.01$). There was no statistical difference in

基金项目:河南省商丘市 2013 年科技发展计划项目 (No. 135006)

作者单位:1.商丘医学高等专科学校临床系(河南 476100);2.商丘医学高等专科学校基础医学部(河南 476100)

通讯作者:母传贤, Tel: 0370-3251628, E-mail: sqyzmcx@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.02.0214

other indices ($P > 0.05$). **Conclusions** TMP at 100 mg/kg showed obvious inhibition on CIA rats. Its inhibitory effect might be correlated to inhibiting activities of endogenous cytokines and the generation of inflammatory mediators in inflammation local regions, improving contents of anti-inflammation cytokines, and inducing the balance of the inflammatory cytokine network.

KEYWORDS Tetramethyl pyrazine; rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; cytokine

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜为靶器官的自身免疫性疾病,主要表现为免疫调节失衡、关节组织慢性炎症病变。RA 的发病机制涉及细胞因子、遗传、感染等多种因素,其中细胞因子网络失衡在 RA 的发生、炎症迁延、关节的破坏中占有重要的地位^[1]。川芎嗪(Tetramethyl pyrazine, TMP)有抗肿瘤血管生成作用,并能抑制血管内皮细胞的增殖和抗炎作用,但是其机制还不甚清楚^[2,3]。本实验在成功地建立大鼠胶原性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型的基础上,通过检测大鼠血清 IL-1、IL-6 和 IL-2 水平及关节浸液一氧化氮(NO)和前列腺素 E₂(Prostaglandin E₂, PGE₂)含量,探讨 TMP 对 CIA 大鼠治疗的可能机制,为临床使用 TMP 治疗 RA 提供新的实验依据。

材料与方法

1 动物 SD 大鼠 50 只,鼠龄 3 月,雌雄各半,体重(180±20)g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,许可证号:SCXK(鄂)2012-0007。

2 药物、试剂及仪器 磷酸川芎嗪片,无锡市第七制药厂生产,批号:030201;地塞米松盐酸注射液(5 mg/mL)购自河南确山龙渊药业有限公司,批号:10063001。弗氏完全佐剂、鸡Ⅱ型胶原,上海本草生物医学工程所提供;多聚赖氨酸,美国 Sigma 公司生产;冰醋酸,广州化学试剂二厂生产;IL-1、IL-6 和 IL-2 试剂盒,南京建成生物工程研究所提供;NO 试剂盒,RD 公司生产;PGE₂ 试剂盒,购置于解放军总医院科技开发中心放免所。将鸡Ⅱ型胶原 15 mg 溶于 7.5 mL 0.1 mol/L 醋酸中,鸡Ⅱ型胶原浓度为 2 g/L,共 7.5 mL,于 4℃ 过夜充分溶解。次日,与弗氏完全佐剂等体积于冰浴中混合并使之充分乳化,制成稳定乳化剂 15 mL。1 mg/mL Ⅱ型胶原,置 4℃ 冰箱保存备用。EL30 型酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;450 型酶标免疫测定仪,美国 Bio-Rad 公司;大鼠足容积测量仪,自制;METILER AE240 型电子分析天平梅特勒-托利公司;80-2 离心机,上海手术器械厂。

大鼠 50 只,随机分为正常组 10 只和 CIA 模型制作组 40 只。模型制作具体方法:在大鼠的左后肢足跖皮下注射Ⅱ型胶原 0.1 mL 致炎,第 7 天在大鼠尾、背多点皮下注射 0.1 mL 该胶原乳剂作为激发注射。正常对照组在同一部位同样方法注射 0.1 mL 生理盐水。激发注射后发现 36 只大鼠左足红肿明显,体积增大,说明造模成功,成功率为 90%。

4 分组及给药 将造模成功的 36 只大鼠随机分为模型组、地塞米松组及 TMP 100 mg/kg 组及 TMP 50 mg/kg 组,每组 9 只。TMP 两组大鼠于实验第 7~35 天根据文献[5]灌胃给予 TMP 100 和 50 mg/kg(分别相当于临床用药量的 20 和 10 倍),每天用药 1 次;地塞米松治疗组肌肉注射 2 mg/kg,每天 1 次;正常组和模型组静脉注射 2 mL/kg 生理盐水,每天 1 次。

5 CIA 大鼠足爪肿胀度测量 用足容积测定仪分别于实验 7、14、18、22、26、30 天测量各组大鼠左足爪肿胀度。

6 血清细胞因子测定 实验第 36 天向所有大鼠腹腔内注射 3% 巴比妥那 0.3~0.4 mL 麻醉。剪开大鼠腹腔,10 mL 注射器心脏取血,室温静置 1 h,3 000 r/min,离心 15 min,吸取上层血清。用放射分析测定法(按试剂盒说明书进行操作)测定大鼠血清中 IL-1、IL-6 和 IL-2 含量。

7 关节浸液 NO 和 PGE₂ 测定 大鼠 3% 巴比妥那麻醉处死后,迅速在左足摘取肿胀足爪,纵向切开足爪组织,放入冷生理盐水中,于 4℃ 浸泡过夜,离心取上清液过滤除菌。NO 含量测定采用硝酸还原法, PGE₂ 含量测定采用放免法,均按试剂盒说明进行操作。

8 统计学方法 采用 SPSS 11.6 统计软件进行分析,全部数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析和显著性检验。方差齐时,各组间两两比较采用 LSD 检验;方差不齐时,各组间两两比较采用 Tamhance's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 CIA 大鼠足爪肿胀度比较(表 1) 实验

表 1 各组 CIA 大鼠足爪肿胀度比较 (mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	足爪肿胀度					
		7 天	14 天	18 天	22 天	26 天	30 天
正常	10	0.058 ± 0.054	0.069 ± 0.077	0.089 ± 0.020	0.101 ± 0.018	0.130 ± 0.023	0.147 ± 0.059
模型	9	0.183 ± 0.034	0.187 ± 0.038 *	0.243 ± 0.069 *	0.288 ± 0.096 *	0.369 ± 0.062 *	0.396 ± 0.081 *
地塞米松	9	0.184 ± 0.074	0.152 ± 0.048 Δ	0.216 ± 0.058 Δ	0.209 ± 0.053	0.221 ± 0.053 Δ	0.235 ± 0.072 Δ
TMP 50 mg/kg	9	0.182 ± 0.052	0.131 ± 0.012 Δ	0.189 ± 0.034 Δ	0.215 ± 0.072 Δ	0.215 ± 0.053 Δ	0.231 ± 0.049 Δ
TMP 100 mg/kg	9	0.183 ± 0.039	0.141 ± 0.029 Δ	0.179 ± 0.036 Δ	0.189 ± 0.031 Δ	0.211 ± 0.052 Δ	0.220 ± 0.051 Δ

注:与正常组同期比较,* $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.01$;下表同

表 2 各组 CIA 大鼠血清 IL-1、IL-6 和 IL-2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)
正常	10	0.128 4 ± 0.015 3	0.148 7 ± 0.023 2	2.897 9 ± 0.179 8
模型	9	0.200 0 ± 0.026 3 *	0.189 8 ± 0.032 4 *	2.683 1 ± 0.069 1 *
地塞米松	9	0.148 8 ± 0.036 9 Δ	0.155 2 ± 0.022 9 Δ	2.896 1 ± 0.151 9 Δ
TMP 50 mg/kg	9	0.147 9 ± 0.027 9	0.157 6 ± 0.036 8	2.834 6 ± 0.076 4
TMP 100 mg/kg	9	0.148 7 ± 0.035 7 Δ	0.155 6 ± 0.033 1 Δ	2.885 9 ± 0.146 2 Δ

第 14 天后,与正常组比较,模型组足爪肿胀度明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,TMP 50、100 mg/kg 组和地塞米松组足爪肿胀明显抑制,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2 各组 CIA 大鼠血清 IL-1、IL-6 和 IL-2 水平比较(表 2) 与正常组比较,模型组大鼠血清 IL-1 和 IL-6 水平明显增高,IL-2 水平明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,TMP 100 mg/kg 组及地塞米松组治疗后大鼠血清 IL-1 和 IL-6 水平明显降低,IL-2 水平明显上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),TMP 50 mg/kg 组与模型组血清 IL-1 和 IL-6 及 IL-2 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 各组 CIA 大鼠关节浸液内 NO 和 PGE₂ 含量比较(表 3) 与正常组比较,模型组大鼠关节浸液中 NO 和 PGE₂ 含量明显增高($P < 0.01$);与模型组比较,TMP 100 mg/kg 组和地塞米松组治疗后关节浸液内 NO、PGE₂ 含量下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);TMP 50 mg/kg 组与模型组比较,关节浸液内 NO 和 PGE₂ 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠关节浸液内 NO 和 PGE₂ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO(μ mol/mL)	PGE ₂ (pg/mL)
正常	10	18.79 ± 7.69	8.69 ± 6.38
模型	9	51.24 ± 7.36 *	31.59 ± 9.76 *
地塞米松	9	29.46 ± 11.34 Δ	16.23 ± 2.18 Δ
TMP 50 mg/kg	9	27.54 ± 12.41	15.59 ± 3.38
TMP 100 mg/kg	9	28.89 ± 12.11 Δ	16.12 ± 2.14 Δ

讨 论

TMP 是中药川芎的有效成分之一,属酰胺类生物碱,化学结构为四甲基吡嗪,具有活血化瘀、理气、扩张

动脉、抑制血小板聚集、防止血栓形成、改善微循环等作用^[6]。目前已广泛应用于临床,是现代中西医结合治疗 RA 的常用药,但其作用机制尚不十分明确^[5]。

RA 是一种病因不明的自身免疫性疾病,病因及发病机制至今尚不清楚^[7],但越来越多的证据表明,细胞因子在 RA 的病理过程中发挥着重要作用^[8],更是在 RA 的发病过程中具有促炎、抑炎或刺激、抑制的正负反馈的免疫调控作用,它们之间的失衡可能是导致 RA 迁延不愈的原因之一^[9]。目前认为与 RA 相关的 IL-1、TNF- α 、IL-6 等为促炎性细胞因子,具有多种促炎作用,可刺激胶原酶和前列腺素 E 的产生,导致软骨和骨骼损害^[10]。IL-1 可诱导 RA 关节滑膜细胞增殖,刺激滑膜细胞产生蛋白激酶,增强 TNF- α 和 IL-6 的效应。IL-2、IL-10 为免疫调节因子,可减少致病性促炎性细胞因子和趋化因子,抑制 IL-1、TNF- α 和 IL-6 产生,IL-2 还能够抑制基质金属蛋白酶表达从而产生对软骨细胞的保护作用^[11,12]。本实验结果显示:TMP 高剂量对促炎性细胞因子有一定的下调(抑制)作用,对抑炎细胞因子有一定的上调(刺激)作用,TMP 50 mg/kg 对 CIA 大鼠关节浸液内 NO 和 PGE₂ 含量无明显影响,证实 TMP 通过调节的细胞免疫紊乱从而对 CIA 大鼠发挥治疗作用。

NO 是内源性左旋精氨酸(L-Arg)在一氧化氮合成酶(NOS)催化下生成。一定量的 NO 对维持正常的血管张力、抗血小板凝聚,并作为一种神经递质都极为重要,但高水平的 NO 往往引起细胞和组织的损害^[13]。作为一种重要炎症介质 NO 损害关节的机制是促进 PGE₂ 产生和促炎性细胞因子的释放,导致血管过度扩张、渗出增多^[14]。本实验发现 CIA 大鼠关节浸液中 NO 和 PGE₂ 含量明显增高;TMP

100 mg/kg 治疗后 CIA 大鼠关节浸液中 NO 和 PGE₂ 水平显著低下。提示 TMP 可通过抑制关节浸液 NO 和 PGE₂ 产生,减轻局部炎症,改善关节肿胀等症状。

综上所述,TMP 治疗 CIA 大鼠的机制可能是内源性细胞因子(IL-1 和 IL-6)活性和炎症局部区域相关炎症介质(NO 和 PGE₂)产生,同时提高抑炎细胞因子(IL-2)含量,诱导炎性细胞因子网络趋于平衡,从而对 CIA 大鼠发挥治疗作用。

参 考 文 献

- [1] 高俊,丁真奇.细胞因子在类风湿性关节炎中作用的研究现状[J].医学综述,2006,12(5):289-291.
- [2] 徐晓玉,严鹏科,陈刚,等.川芎嗪对小鼠肺癌血管生长和 VEGF 表达抑制[J].中国药理学通报,2004,20(2):151-154.
- [3] 王一凡,韦登明.雷公藤内酯醇治疗类风湿性关节炎分子机制的研究进展[J].中华风湿病学杂志,2005,9(10):628-630.
- [4] 李宜川,刘国玲,沈永杰,等.雷公藤内酯醇对大鼠胶原性关节炎和免疫功能的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2012,26(4):540-545.
- [5] 陈刚,徐晓玉,叶兰,等.川芎嗪对大鼠胶原性关节炎滑膜 VEG 及 VEGF mRNA 表达的影响[J].中国药理学通报,2006,22(10):1199-1202.
- [6] 吕红斌,徐大启,胡建中,等.川芎嗪关节腔内注射治疗兔

骨关节炎模型的研究[J].中国医师杂志,2007,9(9):1163-1165.

- [7] 中华医学会风湿病学分会.类风湿关节炎诊治指南(草案)[J].中华风湿病杂志,2003,7(4):250-254.
- [8] Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(2):151-160.
- [9] 何涛,杜瀛琨,蓝伦礼,等.中药对类风湿性关节炎相关细胞因子影响的研究概况[J].云南中医中药杂志,2009,30(3):59-61.
- [10] Feldman M, Breman FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rev Immunol, 1996, 14:397-440.
- [11] 张青,陈学曼,解海霞,等.磷酸川芎嗪对大鼠佐剂性关节炎血清中细胞因子 TNF- α 、IL-4 和 IL-10 的影响[J].牡丹江医学院学报,2010,31(6):13-15.
- [12] 涂胜豪,盛冬云,胡永红,等.雷公藤内酯醇对胶原诱导性关节炎大鼠外周血清和关节腔中细胞因子水平的干预[J].中国临床康复,2006,10(39):183-185.
- [13] 祁传才,于宝云,王伟卓.附桂骨痛胶囊对膝关节骨性关节炎 NO 及 iNOS 影响的实验研究[J].陕西中医学院学报,2007,30(4):65-67.
- [14] 夏丽娟,陈飞虎,任斌,等.重组人内抑素对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞增殖及产生细胞因子的影响[J].中国药理学通报,2007,23(1):59-63.

(收稿:2013-02-27 修回:2013-11-20)

2014 全国中西医结合皮肤性病学术年会征文通知

经中国中西医结合学会批准,中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会定于 2014 年 4 月 10 ~ 14 日在江西南昌前湖迎宾馆召开 2014 全国中西医结合皮肤性病学术年会。此次会议将发扬历年年会的优良传统,注重中西医结合治疗皮肤病的新方法及新的研究进展等方面的学术交流,内容密切联系临床,切合皮肤科医师的实际需求,会议将邀请知名专家做特邀演讲,阐述皮肤科相关领域的最新研究进展,创造形式多样、内容充实、紧张热烈、活跃互动的学术交流形式,以达到全国皮肤科中医、西医、中西医结合医师共同展现才华、获取知识和信息、增强友谊和情感的目的,拟参加会议者请仔细阅读本通知并按规定的时间和要求投稿。

征文要求 (1)投稿内容:皮肤科各种基础研究论文、皮肤科临床诊断和治疗等方面的论文、典型与疑难病例等;(2)投稿方式:中文全文和 400 字以内的中文摘要,请通过电子邮件投稿,E-mail: pfkxh@126.com。来稿请注明 2014 会议征文;(3)会议交流形式:特邀讲演、大会发言、分会发言、书面交流。

截稿日期 2014 年 3 月 5 日

联系方式 上海市凤阳路 415 号上海长征医院《中国真菌学杂志》编辑部,邮编:200003;E-mail: pfkxh@126.com

联系人 朱和平 电话:021-81885501,手机:13671816152