

祛痹方对胶原诱导性关节炎大鼠氧自由基代谢及低氧诱导因子-1 α 水平的影响

赵宏艳¹ 杜中平² 李鸿泓³ 肖 诚⁴ 王 燕⁵
刘梅洁¹ 吕 诚⁶ 李 艳¹ 刘 红¹ 杨金生⁷ 吕爱平⁶ 鞠大宏¹

摘要 目的 观察祛痹方对Ⅱ型胶原诱导的免疫性关节炎模型大鼠氧自由基代谢物超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)及低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α 的影响,探讨祛痹方对类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的治疗作用及其机制。方法 选用 SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只,随机选取 12 只作为空白对照组,其余 60 只采用尾根部皮下注射Ⅱ型胶原与不完全弗氏佐剂的方法诱导制备关节炎模型,免疫 15 天后,将造模大鼠随机分为胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型组、雷公藤多苷治疗组、祛痹方高剂量及低剂量组,每组 15 只,予以灌胃给药,祛痹方高剂量组:6.66 g/(kg·d);祛痹方低剂量组:3.33 g/(kg·d);雷公藤多苷组:9.68 mg/(kg·d);空白对照组和 CIA 模型组大鼠灌服等体积纯净水。每日 1 次,连续 4 周。饲养期间测量大鼠踝关节肿胀度。治疗 4 周后处死动物,采用比色法测定血浆中 SOD、MDA 和 GSH-Px 活性;采用免疫组化法检测大鼠膝关节 HIF-1 α 的表达。结果 (1)与 CIA 模型组比较,祛痹方高剂量组与雷公藤多苷组大鼠关节肿胀度均显著减轻($P < 0.01$, $P < 0.05$),且祛痹方高剂量组关节肿胀度明显轻于雷公藤多苷组($P < 0.05$);(2)与 CIA 模型组比较,雷公藤多苷组及祛痹方高、低剂量组大鼠血浆 GSH-Px 活性明显升高,MDA 活性降低,雷公藤多苷和祛痹方高剂量组大鼠血浆 SOD 活性明显升高(均 $P < 0.05$);(3)与 CIA 模型组比较,祛痹方高剂量组及雷公藤多苷组大鼠膝关节 HIF-1 α 表达水平明显降低($P < 0.05$),祛痹方低剂量组有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 祛痹方可显著减轻 CIA 模型大鼠踝关节肿胀程度,其疗效优于雷公藤多苷。其作用机制可能是通过下调关节 HIF-1 α 表达及调节抗氧化水平,从而达到治疗 CIA 的作用。

关键词 祛痹方;Ⅱ型胶原诱导的免疫性关节炎;超氧化物歧化酶;丙二醛;谷胱甘肽过氧化物酶;低氧诱导因子-1 α

Effect of Qubi Recipe on Changes of Oxygen Free Radical Metabolism and Hypoxia-inducible Factor-1 α in Collagen-induced Arthritis Rats ZHAO Hong-yan¹, DU Zhong-ping², LI Hong-hong³, XIAO Cheng⁴, WANG Yan⁵, LIU Mei-jie¹, LU Cheng⁶, LI Yan¹, LIU Hong¹, YANG Jin-sheng⁷, LU Ai-ping⁶, and JU Da-hong¹ 1 Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700), China; 2 Department of Cardiology, Changping District Shahe Hospital, Beijing (102206), China; 3 Beijing Traditional Chinese Medicine Hospital of Shijingshan District, Beijing (100043), China; 4 Institute of Clinical Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029), China; 5 Department of Pathology, Civil Aviation General Hospital, Beijing (100123), China; 6 Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700), China; 7 Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing

基金项目:重大新药创制科技重大专项(No. 2009ZX09502-019)

作者单位:1.中国中医科学院中医基础理论研究所(北京 100700);2.北京市昌平区沙河医院内科(北京 102206);3.北京市石景山区中医医院(北京 100043);4.中日友好医院临床医学研究所(北京 100029);5.民航总医院病理科(北京 100123);6.中国中医科学院中医临床基础医学研究所(北京 100700);7.中国中医科学院针灸研究所(北京 100700)

通讯作者:鞠大宏, Tel: 010-64014411 转 2564, E-mail: judahong@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.09.1108

(100700), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Qubi Recipe (QR) on the expression of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in rats with type II collagen- I induced arthritis (CIA), and to explore its therapeutic roles and mechanism. **Methods** Totally 72 male SD rats of SPF grade were recruited. Twelve were randomly selected as the blank control group. The CIA model was established in the rest 60 rats by subcutaneously injecting type II collagen of bovine emulsion from the tail root and induction of incomplete Freund's adjuvant. On day 15 after primary immunization rats were randomly divided into four groups, i.e., the CIA model group, the Tripterygium Glycosides (TG) group (at the daily dose of 9.68 mg/kg body weight), the high dose QR group (at the daily dose of 6.66 g/kg body weight), and the low dose QR group (at the daily dose of 3.33 g/kg body weight), 15 in each group. Corresponding medication was given to rats in all groups by gastrogavage once daily for 4 successive weeks. An equal volume of pure water was given to rats in the blank control group and the CIA model group by gastrogavage, once daily for 4 successive weeks. The swelling degree of the joints was measured. Rats were sacrificed after 4-week treatment. Plasma levels of SOD, MDA, and GSH-Px were measured with colorimetric method. The expression of HIF-1 α was detected by immunohistochemistry. **Results** (1) Compared with the CIA model group, the swelling degree of the joints was significantly alleviated in the TG group and the high dose QR group ($P < 0.01, P < 0.05$), and it was obviously milder in the high dose QR group than in the TG group ($P < 0.05$). (2) Compared with the CIA model group, the activities of GSH-Px could be obviously elevated and activities of MDA lowered in the TG group, the high dose QR group, and the low dose QR group ($P < 0.05$). Plasma activities of SOD could be obviously elevated in the high dose QR group and the TG group ($P < 0.05$). (3) Compared with the CIA model group, the expression of HIF-1 α obviously decreased in the TG group and the high dose QR group ($P < 0.05$), and it showed a decreasing tendency in the low dose QR group with no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusions** QR could markedly alleviate the swelling degree of ankle joints in CIA model rats. Its therapeutic efficacy was superior to that of TG. Its mechanism might be achieved through down-regulating expression of HIF-1 α in the joint, and regulating activities of SOD, MDA and GSH-Px in the plasma.

KEYWORDS Qubi Recipe; type II collagen- I induced immune arthritis; superoxide dismutase; malondialdehyde; glutathione peroxidase; hypoxia-inducible factor-1 α

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种全身性自身免疫性疾病,在我国发病人数为400~500万,本病一旦发病,终身罹患,对患者的生活质量造成严重的影响。中医药对RA的治疗疗效确切,毒副作用少,有其独特的治疗优势。对其机理研究主要集中在对免疫系统的调节作用方面^[1-3]。近年研究发现,RA的发展是在缺氧的微环境中进行,而低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是感受氧信号转导机制中的一个重要的调控因子^[4-6],研究还发现在RA的病理过程中,自由基介导的过氧化损伤亦是加剧病情的一个因素^[7,8]。课题组前期研究发现,祛痹方对胶原诱导性关节炎(collagen- I induced arthritis, CIA)大鼠具有明显的治疗作用^[9],本研究制备II型CIA模型,探讨祛痹方治疗对模型大鼠氧自由基代谢和HIF-1 α 的影响

及其作用机制。

材料与方法

1 动物 选用SPF级SD大鼠,雄性,72只,体重160~200g。由中国药品生物制品检定所提供[动物许可证号:SCXK(京)2009-0017]。在中国中医科学院中医基础理论研究所清洁级动物室饲养,实验动物室许可证号:SYXK(京)2010-0032。适应性饲养1周。

2 药品与试剂 祛痹方(青风藤、威灵仙、续断、怀牛膝、鸡血藤、芍药6味中药)干浸膏粉由中国中医科学院中医基础理论研究所方证中心汪文来副研究员提供,每克干膏粉相当于生药4.02g。成人临床用量为145g生药/天(相当于成人每日服用干粉36.07g),按体表面积折换成大鼠的等效剂量为

13.37 g 生药/(kg · d)[相当于每日服用干粉 3.33 g/(kg · d)]。临用前,用纯净水分别配成 0.333 g/mL 和 0.666 g/mL 2 个浓度的混悬液。雷公藤多苷片:10 mg/片(江苏美通制药有限公司,批号:080717),临用前用纯净水配成 0.968 mg/mL 的混悬液备用。牛Ⅱ型胶原(type II collagen, CⅡ)、不完全弗氏佐剂(incomplete freund's adjuvant, IFA):美国 Chondrex 公司(批号:100028、100106);SOD、MDA 和 GSH-Px 试剂盒:南京建成生物工程研究所(批号:20101230、20110105、20110103);大鼠 HIF-1 α 抗体:美国 Thermo 公司(批号:1164P1109A);二抗:德国 Leica 公司(批号:10338)。

3 仪器 FINESSE ME + 型轮转式切片机、3120061 型烤片机、3120059 型展片机、Histocentre 3 全自动组织包埋机、Ultra Freeze 超低温冰箱、Multiskan Ascent 酶标仪、Multiskan Ascent 洗板机,美国 Thermo 公司产品;Bond Max 全自动免疫组化仪、LEICA CTR6000 显微镜、Qwin 图像分析仪系统,德国 Leica 公司产品;T10 BASIC 手持式分散机,德国 IKA 公司产品;YLS-7B 足趾容积测量仪购自山东省医学科学院设备站。

4 模型制备及动物分组 健康雄性 SD 大鼠 72 只,适应性喂养 1 周后,随机选取 12 只作为空白对照组,其余 60 只参照前期方法造模^[10,11]。具体方法为:取适量 CⅡ 溶液(浓度为 2 mg/mL)逐滴加入至等容积的 IFA 中,CⅡ 终浓度为 1 mg/mL。冰浴中用匀浆器充分乳化,以滴加水中不扩散为度,取乳化后的混合物按 0.2 mL/只(即 200 μ g CⅡ/只),于尾根部皮下注射。7 天后按 0.1 mL/只(即 100 μ g CⅡ/只),于尾根部皮下加强免疫 1 次。免疫 15 天后,将 CIA 大鼠随机分为 4 组:CIA 模型组、雷公藤多苷组、祛痹方高剂量组、祛痹方低剂量组。每组 15 只。

5 给药方法及样本制备 分组后开始灌胃给药,每日 1 次,连续 4 周。各组给药量如下:祛痹方高剂量组:6.66 g/(kg · d);祛痹方低剂量组:3.33 g/(kg · d);雷公藤多苷组:9.68 mg/(kg · d);空白对照组及 CIA 模型组大鼠灌服等体积纯净水。动物戊巴比妥钠麻醉下,腹主动脉取血,2 500 r/min,20 min 离心后取血浆,分装后 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。取膝关节置于 4%多聚甲醛中固定。

6 观察指标及检测方法

6.1 关节肿胀度测量 大鼠第一次免疫前在后肢踝关节上方 0.5 cm 处进行标记,分别于免疫前及

给药结束后用足趾容积测量仪测量踝关节排水体积,计算关节肿胀度。肿胀度 = $(V_t - V_0)/V_0 \times 100\%$ 。其中 V_0 表示造模前的容积, V_t 表示给药结束后的容积。

6.2 血浆 GSH-Px、SOD、MDA 水平测定 采用比色法测定血浆中 GSH-Px、SOD 及 MDA 活性,操作方法按照试剂盒说明书进行。

6.3 关节 HIF-1 α 蛋白表达检测 选用 Bond Max 全自动免疫组化仪对膝关节切片进行免疫组化染色,染色选用 protocol F 程序。应用 Leica-Qwin 图像分析仪系统进行检测。从关节滑膜的一侧通过关节腔直到滑膜的另一侧全部拍摄,计算每块组织中阳性细胞数目占整个滑膜组织及关节软骨总数的百分比,保证所有特异性的染色点均被收集在内,作为阳性表达程度。

7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠关节肿胀度比较(表 1) 与空白对照组比较,CIA 模型组大鼠关节肿胀度明显增加($P < 0.01$);与 CIA 模型组比较,雷公藤多苷组、祛痹方高剂量组大鼠关节肿胀度明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且祛痹方高剂量组大鼠关节肿胀度明显低于雷公藤多苷组($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠关节肿胀度比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	关节肿胀度
空白对照	12	12.14 $\pm$ 3.43
CIA 模型	15	64.05 $\pm$ 11.47 *
雷公藤多苷	15	54.27 $\pm$ 11.72 Δ
祛痹方高剂量	15	44.02 $\pm$ 12.41 $\Delta\Delta\blacktriangle$
祛痹方低剂量	15	59.21 $\pm$ 11.85

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与 CIA 模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与雷公藤多苷组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

2 各组大鼠血浆 GSH-Px、SOD 及 MDA 活性比较(表 2) 与空白对照组比较,模型组大鼠血浆 GSH-Px、SOD 活性明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),MDA 活性明显升高($P < 0.01$)。与 CIA 模型组比较,雷公藤多苷和祛痹方高、低剂量组大鼠血浆 GSH-Px 活性明显升高,MDA 活性明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);雷公藤多苷和祛痹方高剂量组大鼠血浆 SOD 活性明显升高($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠血浆 GSH-Px、SOD 及 MDA 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH-PX (U/mL)	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)
空白对照	12	1 336.35 ± 355.16	200.40 ± 41.59	3.50 ± 0.59
CIA 模型	15	984.93 ± 333.84 *	162.31 ± 25.48 **	4.41 ± 1.10 **
雷公藤多苷	15	1 464.00 ± 285.53 $\Delta\Delta$	205.04 ± 33.53 $\Delta\Delta$	3.68 ± 0.57 $\Delta\Delta$
祛痹方高剂量	15	1 483.95 ± 355.90 $\Delta\Delta$	201.44 ± 32.11 $\Delta\Delta$	3.35 ± 0.59 $\Delta\Delta$
祛痹方低剂量	15	1 491.75 ± 383.16 $\Delta\Delta$	182.85 ± 38.41	3.88 ± 0.53 Δ

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 CIA 模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠膝关节 HIF-1 α 蛋白表达水平比较 (表 3,图 1) 与空白对照组比较,CIA 模型组 HIF-1 α 蛋白表达量明显升高($P < 0.01$);与 CIA 模型组比较,雷公藤多苷组和祛痹方高剂量组 HIF-1 α 表达水平明显降低($P < 0.01$),且祛痹方高剂量组大鼠 HIF-1 α 水平较雷公藤多苷组明显下降($P < 0.05$);祛痹方低剂量组 HIF-1 α 蛋白表达量有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠膝关节 HIF-1 α 蛋白表达水平比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α
空白对照	12	0.35 ± 0.04
CIA 模型	15	1.97 ± 0.33 *
雷公藤多苷	15	1.51 ± 0.31 Δ
祛痹方高剂量	15	1.38 ± 0.36 $\Delta\Delta$
祛痹方低剂量	15	1.76 ± 0.43

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与 CIA 模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与雷公藤多苷组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

讨 论

关于痹证的病因病机,清代以前基本上多以“风寒湿三气杂至,合而为痹”。现代多数中医医家认同本病

为“正虚外感”这一病机。课题组借鉴古今医家治疗经验,并结合现代研究成果,使用具有调节免疫功能及细胞因子、改善血流变学指标、消除免疫复合物的中药,研制了祛痹方。其药物组成主要为青风藤、威灵仙、续断、怀牛膝、鸡血藤、芍药。君药青风藤,其功效为祛风湿、通经络、利小便。臣药威灵仙,功效祛风湿、通络止痛,为治疗风湿痹痛的要药;续断主要功用为祛风湿、补肝肾、强筋骨。佐药怀牛膝,主要补肝肾、强筋骨、活血通经、利水通淋、引火(血)下行;鸡血藤主要功效行血补血、舒筋活络,可使经脉通畅,脉络通和,在方中与威灵仙配伍,可治疗风湿痹痛,肢体麻木;芍药养血敛阴、柔肝止痛。各药合用主要功效为补肝肾、祛风湿、活血化瘀。本实验结果显示,应用雷公藤多苷及高剂量祛痹方后,大鼠关节肿胀度明显降低,且高剂量祛痹方组大鼠关节肿胀度明显轻于雷公藤多苷组,提示祛痹方对 RA 具有较好的治疗作用。

RA 滑膜炎症组织为一个慢性缺氧的环境。有研究表明,在缺氧条件下,生物体内自由基代谢紊乱,其浓度升高,机体抗氧化系统遭到破坏,而 RA 局部炎症病变与自由基增多及机体清除自由基能力下降有密切关系^[7,8]。SOD 能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤;MDA 可以间接地反映机体细胞受自由基攻击的严重程度;GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶,它能特异性催化 GSH 对过氧化氢的还原反应,从而保护细胞膜结构和功能完整^[12]。本实验研究表明,应用雷公藤多苷和高剂量祛痹方后,RA 大鼠血浆 GSH-Px 及 SOD 活性明显升高,MDA 活性明显下降,从而防止 H₂O₂ 破坏关节、滑膜的正常结构与功能。

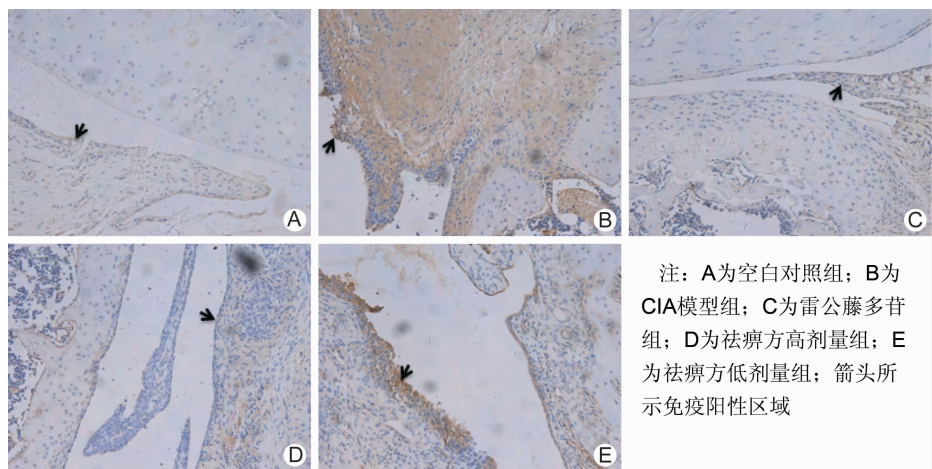


图 1 各组大鼠膝关节 HIF-1 α 蛋白表达 (免疫组化, $\times 200$)

在缺氧环境中, HIF-1 的表达亦增加并导致其下游大约 50 种基因表达上调约 3 倍, 其中包括有 IL-1 β 、TNF- α , 从而加重炎症反应^[13,14]。对于 HIF-1 的研究亦显示, HIF-1 α 在滑膜的衬里细胞、基质细胞等细胞中均有表达, 当氧含量 <3% 时, HIF-1 α 及 HIF-1 目标基因表达增加, HIF-1 升高后大量堆积并转移至核内, 参与调节转录 VEGF 等功能蛋白, 导致关节腔血管生成因子的表达增高, 促使大量血管新生, 促进血管翳生成, 加重关节损伤^[4-6]。本实验结果显示, 应用雷公藤多苷和高剂量祛痹方后, 大鼠 HIF-1 α 水平明显降低, 提示祛痹方改善 RA 的缺氧环境可能是其治疗本病的一个靶点。

综上, 本实验结果显示, 祛痹方可显著减轻 CIA 模型大鼠踝关节肿胀度, 其作用机制可能为通过下调关节 HIF-1 α 表达及调节抗氧化水平, 从而达到治疗 CIA 的作用。

参 考 文 献

- [1] 郭丽丽, 周勇, 王旭丹, 等. 山茱萸总苷抗类风湿关节炎免疫作用机理的初步研究[J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(3): 197-199.
- [2] 张佳红, 王晋平, 王慧娟. 三七总皂苷调整类风湿关节炎免疫相关内环境失衡状态的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(7): 589-592.
- [3] 赵宏艳, 王燕, 于峥, 等. 益肾蠲痹丸对肾虚证与脾虚证 CIA 大鼠免疫因子的调节作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(3): 261-263.
- [4] Brucker PU, Izzo NJ, Chu CR. Tonic activation of hypoxia-inducible factor 1 α in avascular articular cartilage and implications for metabolic homeostasis[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(10): 3181-3191.
- [5] 王雯, 陈森洲, 徐雅娟, 等. 低氧诱导因子-1 α 在大鼠胶

原诱导性关节炎中的表达及与血管生成的关系[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(16): 2298-2300.

- [6] Li GQ, Liu D, Zhang Y, et al. Anti-invasive effects of celastrol in hypoxia-induced fibroblast-like synoviocyte through suppressing of HIF-1 α /CXCR4 signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(4): 1028-1036.
- [7] 万方, 郭景珍, 左铮云, 等. 海蛇提取物对胶原诱导性关节炎大鼠血清 SOD、T-AOC 和 MDA 含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(9): 1160-1162.
- [8] Karaman A, Binici DN, Melikoglu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis [J]. Mutat Res, 2011, 721(1): 1-5.
- [9] 付小卫, 赵宏艳, 于峥, 等. 祛痹方对 II 型胶原诱导的免疫性关节炎大鼠免疫调节因子的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(20): 1770-1773.
- [10] Zhao H, Li J, He X, et al. The protective effect of Yishen Juanbi Pill in arthritic rats with castration-induced kidney deficiency [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012: 102641.
- [11] 赵宏艳, 王燕, 肖诚, 等. 不同品系、不同性别对大鼠 CIA 发病情况的比较研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(9): 761-764.
- [12] 方允中, 李文杰主编. 自由基与酶: 基础理论及其在生物学和医学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 92.
- [13] Losso JN, Bawadi HA. Hypoxia inducible factor pathways as targets for functional foods [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(10): 3751-3768.
- [14] Hellwig-Bürgel T, Stieh DP, Wagner AE, et al. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions [J]. J Interferon Cytokine Res, 2005, 25(6): 297-310.

(收稿: 2013-5-17 修回: 2014-06-08)