

磷酸川芎嗪片联合甲氨蝶呤干预对胶原诱导关节炎大鼠炎症反应及血液流变的影响

边艳琴^{1,2} 许少华² 郭洪涛² 罗丹² 肖诚³ 吕诚² 赵宏艳⁴ 何小鹏² 吕爱平²

摘要 **目的** 探讨磷酸川芎嗪片联合甲氨蝶呤干预对胶原诱导关节炎大鼠(collagen induced arthritis, CIA)炎症反应及血液流变的影响。**方法** 将 55 只雄性 SD 大鼠按体重分层,随机选取 9 只作为正常对照组,其余 46 只采用牛Ⅱ型胶原诱导法制备大鼠关节炎模型。对成模大鼠(40 只),按足趾肿胀程度分层随机方法分为模型(CIA)组、甲氨蝶呤(MTX)组、磷酸川芎嗪(TMP)组及联用(MTX + TMP)组,每组 10 只。各药物干预组分别给予以下药物灌胃:MTX 组给予 MTX 1.2 mg/kg,每周 1 次,连续 4 周;TMP 组予 TMP 40 mg/kg,每日 1 次,先连续给药 10 天,停药 7 天,再继续给药 10 天;MTX + TMP 组分别给予等剂量两种药物,即在两药都给予时,给予两药的等剂量混合药物;在 MTX 停药时只给予 TMP,则按照 TMP 组方法给药;正常对照组及 CIA 组给予等量生理盐水。分别于给药第 0、4、11、18、26 天检测大鼠脚掌厚度和踝关节直径。4 周后杀鼠取材,观察各组大鼠关节病理变化;采用 ELISA 方法检测各组大鼠血清细胞因子 IL-1 β 、IL-6 及 IL-17A 变化,检测血浆血流变学指标纤维蛋白原(FIB)含量及血小板聚集率(PAg)变化。**结果** 与正常对照组比较,CIA 组大鼠脚掌厚度与踝关节直径明显增加($P < 0.01$),FIB 含量及 PAg 均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);血清 IL-1 β 、IL-6 及 IL-17A 水平亦明显升高($P < 0.01$);关节滑膜出现明显的细胞增生、炎细胞浸润、组织充血水肿,血管翳形成侵入软骨,出现明显的坏死。与 CIA 组比较,各药物干预组大鼠脚掌厚度与踝关节直径均减小($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中 MTX 组效果优于 TMP 组及 MTX + TMP 组($P < 0.05$, $P < 0.01$);MTX 组 FIB 含量降低($P < 0.05$),血清 IL-1 β 、IL-6 水平亦降低($P < 0.05$);TMP 组和 MTX + TMP 组 FIB 含量、血清 IL-1 β 、IL-6 水平降低,且 MTX + TMP 组 FIB 和 IL-6 水平明显低于 MTX 组及 TMP 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);在降低 PAg 和血清 IL-17A 水平方面,TMP 组优于 MTX 组及 MTX + TMP 组;各药物均可显著改善关节病理,联用效果最佳。**结论** TMP 联合 MTX 可以显著改善胶原诱导关节炎大鼠的炎症反应及全血 FIB 含量。

关键词 类风湿关节炎;胶原诱导关节炎;川芎嗪;甲氨蝶呤

Effect of Combination Therapy of Tetramethylpyrazine with Methotrexate on Inflammatory Reactions and Hemorheology in Collagen-induced Arthritis Rats BIAN Yan-qin^{1,2}, XU Shao-hua², GUO Hong-tao², LUO Dan², XIAO Cheng³, LU Cheng², ZHAO Hong-yan⁴, HE Xiao-juan², and LU Ai-ping² 1 E-institute of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203), China; 2 Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700), China; 3 Institute of Clinical Medicine Research, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029), China; 4 Institute of Basic Theory Research, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of combination therapy of tetramethylpyrazine (TMP) with methotrexate (MTX) on collagen induced arthritis (CIA) rats. **Methods** Totally 55 male SD rats were stratified by body weight. Nine of them were randomly recruited as the normal control group. The rest 46 were immunized with type II bovine collagen (C II) for establishing rheumatoid arthritis (RA)

基金项目:国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(No.30825047);中国中医科学院中医临床基础医学研究所自主选题项目(Z0218, Z0252, Z0412);上海市教育委员会 E-研究院建设计划项目(No. E03008)

作者单位:1.上海高校中医内科学 E-研究院(上海中医药大学)(上海 201203);2.中国中医科学院中医临床基础医学研究所(北京 100700);3.中日友好医院临床医学研究所(北京 100029);4.中国中医科学院中医基础理论研究所(北京 100700)

通讯作者:吕爱平,现在香港浸会大学中医药学院, Tel:010-64014411, E-mail:lap64067611@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.06.0724

model. Forty successfully modeled rats were randomly divided into 4 groups according to swollen toe degree, i.e., the CIA group, the TMP group, the MTX group, and the TMP plus MTX group, 10 in each group. Rats in the MTX group were administered with MTX (1.2 mg/kg), once per week for 4 continuous weeks. Those in the TMP group were administered with 40 mg/kg TMP, once per day for 10 continuous days, and then discontinued for 7 successive days, and continued for another 10 successive days. Rats in the TMP plus MTX group were administered with a mixture of equal dose MTX and TMP, and when MTX was discontinued, TMP was administered according to the way in the TMP group. Equal volume of saline solution was given to rats in the normal control group and the CIA group. Clinical parameters including ankle width (mediolateral diameter) and hindpaw swelling were measured at day 0, 4, 11, 18, and 26 after treatment. Rats were sacrificed 28 days after treatment, their knee joints and ankle joints were collected for pathological analyses. Serum levels of IL-1 β , IL-6, and IL-17A were detected by ELISA. Changes of fibrinogen (FIB) and platelet aggregation rate (PAg) were detected. Results Compared with the normal control group, the ankle width and hindpaw swelling increased significantly ($P < 0.01$), contents of FIB and PAg increased obviously ($P < 0.05$, $P < 0.01$), serum levels of IL-1 β , IL-6, and IL-17 increased remarkably ($P < 0.01$) in the CIA group. Obvious cell proliferation, inflammatory cell infiltration, hyperemia and edema of synovial tissues could be seen. Pannus formed and immersed in cartilages, resulting in necrosis. Compared with the model group, changes of ankle width and hindpaw swelling were all alleviated in each medicated group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Of them, the effect was superior in the MTX group to that of the TMP group and the MTX plus TMP group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Contents of FIB, serum levels of IL-1 β and IL-6 decreased significantly in the MTX group ($P < 0.05$). Contents of FIB, serum levels of IL-1 β and IL-6 decreased significantly in the TMP group and the MTX plus TMP group ($P < 0.05$). Besides, serum levels of FIB and IL-6 were obviously lower in the MTX plus TMP group than in the TMP group and the MTX group ($P < 0.01$). Levels of PAg and IL-17A were more significantly lowered in the TMP group than in the MTX plus TMP group and the MTX group. Pathological changes could be alleviated in each medicated group, with the optimal effect obtained in the MTX plus TMP group. Conclusion Combination of TMP with MTX could significantly ameliorate inflammatory reactions and FIB contents of CIA rats.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; collagen induced arthritis; tetramethylpyrazine; methotrexate

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性、对称性侵害关节和关节周围组织,以关节滑膜病变为主的全身性疾病,是一种存在多基因、多通路、多途径的分子功能网络相互作用的复杂病理过程^[1,2]。该病病程迁延,致残率高达60%以上,是一种严重危害人类健康的自身免疫性疾病。其病因目前尚不明确,主要与遗传、感染、激素、免疫等因素相关^[3]。近来环境因素影响越来越受到瞩目。目前RA的治疗方法主要包括内科药物治疗,如非甾体抗炎药物(nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID)、改善病情的抗风湿药(disease modifying antirheumatic drug, DMARD)、糖皮质激素、生物制剂、基因疗法和植物药及外科手术治疗,也可采取中医针灸等。研究发现,在血小板含量高、血液黏滞度高的RA患者中,临床多种药物治疗效果均不甚理想^[4]。

川芎嗪是从川芎提取物中分离出的一种单体(Ligustrazine, 化学名:四甲基吡嗪、Tetrameth-

ylpyrazine, TMP),属于酰胺类生物碱(分子式: $C_8H_{12}N_2$,目前已由人工合成)。研究发现,川芎嗪具有强烈抑制血小板聚集的作用,对已聚集的血小板有解聚作用,能明显降低全血黏度,具有抗血栓形成、抗自由基、抗氧化、扩张小动脉、降低血管阻力、改善微循环、增加冠状动脉、脑和肾血流量的作用^[5,6],被广泛应用于多种心脑血管缺血性疾病、肾脏疾病、肺动脉高压、肺纤维化、哮喘等呼吸系统疾病的治疗,取得了较好的疗效。目前川芎嗪治疗RA的相关报道甚少。本研究以TMP联合甲氨蝶呤(MTX)对RA经典大鼠模型—胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)模型进行干预,探讨TMP联合MTX治疗RA的药效机制。

材料与方法

1 动物 清洁级雄性SD大鼠55只,体重(160 $\pm$ 10)g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。合格证号:SCXK(京)2007-004。

饲养于中国中医科学院基础理论研究所动物房, 喂养、造模和观察, 自由饮食饮水。许可证号: SYXK (京) 2010-0032。

2 药物、试剂与仪器 MTX: 每片 2.5 mg, 购自上海医药 (集团) 有限公司信谊制药总厂 (批号: 040603); TMP: 每片 50 mg, 购自燕京药业有限公司 (批号: 090912); II 型胶原 (type II collagen, C II)、不完全弗氏佐剂 (IFA) 均购自美国 Chondrex 公司 (批号: 070347; 080073); 大鼠 IL-1 β 、IL-6 和 IL-17A ELISA 试剂盒, 均购自美国 eBioscience 公司。MK3 型酶标仪 (Thermo 公司); PRECILC2000-4 血凝仪 (北京普利生仪器公司); PA-3210 型血小板聚集仪 (日本 DIC 公司); 组织包埋机、切片机、展片机、烤片机均为 Thermo 公司产品。

3 模型制备 参照文献[7], 制备 CIA 大鼠模型。实验第 1 天取适量牛 II 型胶原, 将其溶于 0.1 mol/L 乙酸, 配成浓度为 2 mg/mL II 型胶原溶液, 4℃过夜。此溶液再与等量不完全弗氏佐剂混合, 充分乳化后以滴加于水中不扩散为度。取乳化后的混合物按 200 μ g II 型胶原/只大鼠, 于尾根部皮下免疫, 1 周后按 100 μ g II 型胶原/只于尾根部皮下加强免疫 1 次。正常对照组以等量生理盐水于尾根部进行皮下假免疫。加强免疫 7 天后, 至少 1 个足趾关节出现发红、肿胀的大鼠, 即判定为造模成功^[8]。

4 分组及给药 按体重随机选取 9 只大鼠作为正常对照组, 其余大鼠全部造模。待造模完成后选取成模大鼠 40 只 (图 1), 按足趾肿胀程度分层随机分为模型 (CIA) 组、甲氨蝶呤 (MTX) 组、磷酸川芎嗪 (TMP) 组和联用 (MTX + TMP) 组, 每组 10 只。加强免疫后 7 天开始给药。MTX 1.2 mg/kg, 每周 1 次 (相当于临床用量 12 mg/w); TMP 40 mg/kg (相当于临床用量的 390 mg/d), 每天 1 次, 先连续给药 10 天, 停药 7 天, 再继续给药 10 天; MTX + TMP 组分别给予等剂量两种药物 (即在两药都给予时, 给予两药的等剂量混合药物; 在 MTX 停药时只给予 TMP, 则按照 TMP 组方法给药)。各药物临用前用生理盐水稀释,

以 10 mL/kg 大鼠体质量的剂量灌胃给药, 共 4 周。正常对照组和 CIA 组给予等量生理盐水。

5 样品采集与处理 于给药后第 28 天, 各组大鼠用 3% 戊巴比妥钠 (2 mL/kg 体重) 剂量腹腔注射麻醉后, 采用腹主动脉取血的方法, 部分取全血用于流变学检测, 另一部分经 2 000 r/min 离心 10 min 后取血清, 用于 ELISA 检测、冰冻保存备用。取双侧膝关节放入多聚甲醛固定进行病理学检测。

6 观察指标及检测方法

6.1 脚掌厚度及踝关节直径测量 于用药开始即第 0、4、11、18、26 天, 采用游标卡尺对大鼠左、右后足脚掌厚度及踝关节直径进行测量并记录。

6.2 血液流变学检测 纤维蛋白原 (FIB) 含量测定采用 Clauss 凝固法原理, 按试剂盒说明书方法在 PRECILC2000-4 血凝仪上测定。血小板聚集率 (PAg) 测定采用 IPA 法检测。

6.3 血清炎症因子检测 参照相关 ELISA 检测试剂盒说明书操作。

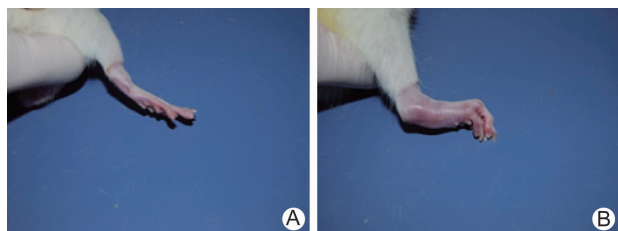
6.4 膝关节病理学观察 取大鼠的踝关节于多聚甲醛固定 36 h 后入 10% EDTA 脱钙, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋、切片, 常规苏木素-伊红 (HE) 染色。光镜下观察滑膜增生、血管翳的生成, 炎细胞浸润, 软骨、骨的病理改变等。

7 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计分析软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠脚掌厚度及踝关节直径比较 (表 1, 2) 与正常对照组比较, CIA 组大鼠脚掌厚度与踝关节直径明显增加 ($P < 0.01$); 与 CIA 组比较, 在给药第 4 天时, 各给药组大鼠脚掌厚度和踝关节直径即出现明显减小 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 第 4、11 天时, MTX 组作用更明显; 在给药第 26 天时, 3 组大鼠脚掌厚度及踝关节直径明显小于 CIA 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2 各组大鼠 FIB 含量及 PAg 水平比较 (表 3) 与正常对照组比较, CIA 组大鼠 FIB 含量及 PAg 值升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 CIA 组比较, MTX 组、TMP 组及 MTX + TMP 组大鼠 FIB 含量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TMP 组 PAg 水平降低 ($P < 0.01$); 与 MTX 组比较, TMP 组 PAg 值降低 ($P < 0.05$), MTX + TMP 组 FIB 含量降低 ($P < 0.01$); 与 TMP 组比较, MTX + TMP 组 FIB 含量降低 ($P < 0.01$)。



注: A 为正常对照组; B 为 CIA 组

图 1 正常组与 CIA 组大鼠关节肿胀情况

表 1 各组大鼠脚掌厚度比较 (cm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	脚掌厚度				
		d ₀	d ₄	d ₁₁	d ₁₈	d ₂₆
正常对照	9	0.59 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.60 ± 0.00	0.60 ± 0.00
CIA	10	0.80 ± 0.03 *	0.90 ± 0.03 *	0.88 ± 0.03 *	0.84 ± 0.03 *	0.78 ± 0.02 *
MTX	10	0.79 ± 0.04	0.79 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.77 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.80 ± 0.03 Δ	0.73 ± 0.03 Δ
TMP	10	0.79 ± 0.04	0.85 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.83 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.81 ± 0.04	0.73 ± 0.03 Δ
MTX + TMP	10	0.80 ± 0.04	0.86 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.82 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.83 ± 0.04	0.74 ± 0.03 Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与 CIA 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 MTX 组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠踝关节直径比较 (cm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	踝关节直径				
		d ₀	d ₄	d ₁₁	d ₁₈	d ₂₆
正常对照	9	0.96 ± 0.01	0.96 ± 0.01	0.99 ± 0.02	0.96 ± 0.01	0.99 ± 0.01
CIA	10	1.09 ± 0.03 *	1.23 ± 0.05 *	1.17 ± 0.03 *	1.09 ± 0.02 *	1.07 ± 0.01 *
MTX	10	1.06 ± 0.03	1.08 ± 0.03 $\Delta\Delta$	1.08 ± 0.03 $\Delta\Delta$	1.01 ± 0.02 $\Delta\Delta$	1.03 ± 0.02 Δ
TMP	10	1.09 ± 0.03	1.19 ± 0.05 $\Delta\Delta$	1.13 ± 0.03 $\Delta\Delta$	1.04 ± 0.02 Δ	1.01 ± 0.02 Δ
MTX + TMP	10	1.08 ± 0.03	1.16 ± 0.04 $\Delta\Delta$	1.13 ± 0.04 $\Delta\Delta$	1.00 ± 0.02 $\Delta\Delta$	0.98 ± 0.02 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与 CIA 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 MTX 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 各组大鼠 FIB 含量及 PAg 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FIB(g/L)	PAg(%)
正常对照	9	2.79 ± 0.27	49.42 ± 2.92
CIA	10	3.10 ± 0.21 *	66.58 ± 3.7 **
MTX	10	2.77 ± 0.39 Δ	65.02 ± 14.03
TMP	10	2.61 ± 0.28 Δ	56.65 ± 8.68 $\Delta\Delta\Delta$
MTX + TMP	10	2.13 ± 0.32 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	64.96 ± 6.56

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 CIA 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 MTX 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 TMP 组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

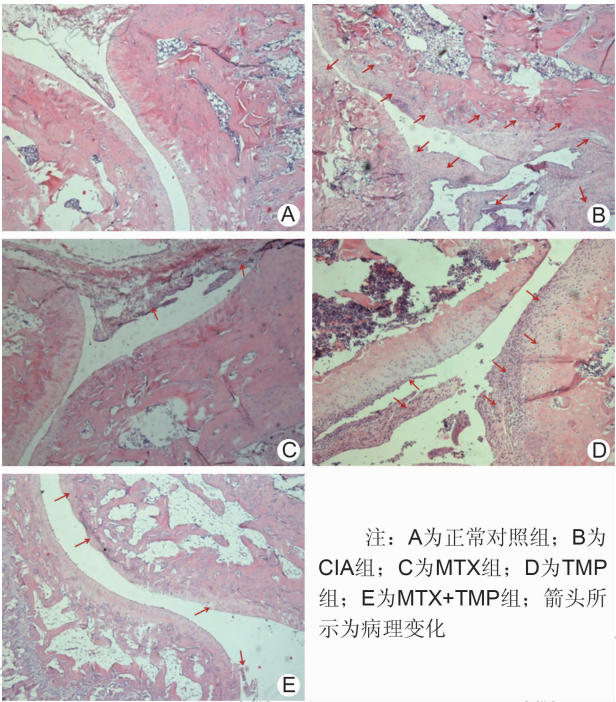
3 各组血清 IL-1 β 、IL-6 及 IL-17A 含量比较 (表 4) 与正常对照组比较,CIA 组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 及 IL-17A 含量均升高($P < 0.01$)。与 CIA 组比较,各给药组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 含量均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);TMP 组大鼠 IL-17A 含量降低($P < 0.05$)。与 MTX 组比较,MTX + TMP 组大鼠血清 IL-1 β 和 IL-6 含量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);TMP 组大鼠 IL-17A 含量降低($P < 0.05$)。与 TMP 组比较,MTX + TMP 组大鼠血清 IL-6 含量降低($P < 0.01$)。

表 4 各组大鼠炎症因子水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-6	IL-17A
正常对照	9	38.00 ± 2.10	64.53 ± 9.27	3.00 ± 0.15
CIA	10	84.33 ± 16.88 *	279.24 ± 29.59 *	5.11 ± 0.48 *
MTX	10	52.89 ± 4.11 Δ	214.16 ± 14.70 Δ	4.78 ± 0.65
TMP	10	49.05 ± 1.50 $\Delta\Delta$	214.68 ± 21.85 Δ	3.67 ± 0.31 $\Delta\Delta$
MTX + TMP	10	42.96 ± 2.79 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	167.85 ± 20.87 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	4.06 ± 0.25

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与 CIA 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 MTX 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 TMP 比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

4 各组大鼠关节病理变化(图 2) 正常对照组关节结构正常,滑膜组织无充血水肿,滑膜细胞无增生现象,无血管翳形成,关节软骨表面光滑平整,无剥脱现象,关节软骨下骨小梁大小、排列正常。CIA 组出现明显的滑膜细胞增生,排列紊乱,并可见炎细胞浸润,滑膜组织充血水肿,并增生形成血管翳浸入软骨或骨组织;软骨表面可见明显的坏死,关节腔内可见大量坏



注: A 为正常对照组; B 为 CIA 组; C 为 MTX 组; D 为 TMP 组; E 为 MTX+TMP 组; 箭头所示为病理变化

图 2 各组大鼠膝关节病理改变 (HE 染色, $\times 100$)

死剥脱的软骨和滑膜组织,关节腔明显变窄。MTX 组、TMP 组及 MTX + TMP 组均见滑膜表面较光滑,滑膜组织充血水肿明显减轻,滑膜细胞增生不明显,炎细胞浸润显著减少,血管增生和血管翳形成大减少,关节腔仅见少量滑膜剥脱组织,关节腔明显变宽。

讨 论

RA 的病因和发病机制至今尚不清楚,大量证据表明炎症因子的过度表达在 RA 的滑膜炎及骨破坏中具有重要作用,是 RA 病变持续存在、迁移进展的关键因素^[9]。近年研究发现,血小板数量和活性与 RA 患者的炎症反应密切相关^[10],被认为可以作为判断 RA 病情活动与否及疗效的参考^[11]。血小板数量增多与活性增强是导致血液瘀滞、凝固和流动缓慢的重要因素。FIB 和 PAg 是判断血小板激活引起血液流变性异常的重要指标。

血瘀证是指因血行不畅或血液瘀滞所致的一系列证候群,是一组多系统组织细胞病理改变在整体表征上的归类描述^[12],具体可以表现在血液流变学异常、微循环障碍、高黏滞血症、血栓形成、结缔组织增生等^[13]。RA 属中医学“痹证”范畴,临床表现为疼痛、肿胀、局部结节及舌脉瘀滞等现象归属于中医学的血瘀证。本实验采用经典的 CIA 大鼠模型为载体进行研究,发现模型组动物的 FIB 和 PAg 均高于正常对照组,表明在 CIA 大鼠模型中存在类似传统中医的血瘀证。

川芎是具有代表性的活血化瘀中药之一。川芎嗪是从川芎中分离出的一种酰胺类生物碱。现代研究发现,它能够通过调节 SDF-1/CXCR4 之间的平衡,抑制血管再生和血栓的形成^[14];能通过下调内毒素(LPS)诱导的 LXR-RXR 通路诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,抑制炎症反应的发生^[15];通过与血小板表面 GP II b/III a 结合,减少 GP II b/III a 暴露而抑制血小板聚集^[16]。本研究发现, TMP 能显著降低 FIB 含量和 PAg,且 TMP 与 MTX 联用之后,降低 FIB 含量作用更显著。但是,在本实验中没有发现 MTX 具有降低 PAg 的作用, MTX + TMP 组也无显著的抑制 PAg 的作用,其原因可能是两药联合之后产生新的作用机制,而并非两药作用简单的叠加。

急慢性的滑膜炎反应是 RA 发生、发展过程中最主要的原因,其中, IL-1 β 和 IL-6 被公认是在 RA 发病中起至关重要的细胞因子^[17,18]。IL-1 β 主要是引起局部炎症反应,使关节软骨和骨吸收增加,并妨碍软骨重建^[19,20]。IL-1 β 还可以刺激巨噬细胞来激活破骨细胞的前体细胞,促使它分化为破骨细胞^[21]。IL-6 异常

表达和失调是 RA 的典型特征。IL-6 对 RA 的致病作用与 IL-1 β 不同,它能够通过刺激嗜中性粒细胞迁移、破骨细胞成熟和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)刺激血管翳形成,促进滑膜炎和关节的破坏^[22]。IL-6 还是最重要的炎症-诱导性凝血的细胞因子,它通过诱导血管紧张素 III 型受体和 C 反应蛋白直接抑制血管内皮细胞的 iNOS,导致内皮血管损伤,促进免疫黏附及微血栓形成^[23,24]。本研究发现, TMP、MTX 以及二者联用均可以显著降低 IL-1 β 和 IL-6 的表达,且联用效果优于单用 TMP 和 MTX。这表明联用可以显著抑制 CIA 大鼠的关节炎症反应,这与病理结果一致。

IL-17A 是近年来研究发现的又一新的细胞因子,为同源二聚体蛋白,主要由 Th17 细胞分泌。其主要生物学功能是促进炎症反应,与许多炎症反应和自身免疫性疾病的发生发展有关。IL-17A 可以诱导软骨、滑膜细胞、巨噬细胞和骨细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 与 IL-6 等促炎症细胞因子,这些促炎症因子导致 RA 突然发作并能通过 IL-17A 诱导的 IL-6 促进 Th17 细胞数量的增加,从而形成正反馈效应,维持疾病的慢性炎症状态^[25]。IL-17A 还可与其他细胞因子,如 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 等协同作用,募集炎性细胞,使中性粒细胞、未成熟的树突状细胞、T 细胞在关节滑液中聚集,进一步扩大炎症反应,并使滑膜细胞生长加快^[26],从而放大了其炎症效应。本研究发现 TMP 可以显著的抑制 IL-17A 的分泌, MTX 和 MTX + TMP 也有降低其分泌的作用,但与 CIA 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。这可能是因为两药联用并非简单的药物作用叠加。对于两药联用的剂量,还需要进一步的摸索。

本实验中,发现 CIA 模型大鼠中 FIB 含量及 PAg 都显著高于正常对照组,但是对红细胞的压积却没有影响(数据未提供),可能是跟笔者选择单纯的 CIA 大鼠模型而不是典型的血瘀型关节炎模型有关。脚掌厚度和踝关节直径的结果显示 MTX 效果是最佳的,这与炎症因子检测结果不一致,可能与 TMP 使用剂量不是最佳有关。进一步的研究,需要考虑选择更加合适的动物模型以及选择多个剂量的联合筛选方法。

参 考 文 献

- [1] Cooles FA, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2011, 23(3): 233 - 240.

- [2] Chang M, Rowland CM, Garcia VE, et al. A large-scale rheumatoid arthritis genetic study identifies association at chromosome 9q33.2 [J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(6): e1000107.
- [3] 姜良勇. 类风湿性关节炎发病的免疫学机制[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1998, 14(3): 233-235.
- [4] 查青林, 何羿婷, 卢毓雄, 等. 血小板数量与中西医结合治疗类风湿关节炎疗效关系的探讨[J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(1): 29-32.
- [5] 刘艳凯, 刘圣君, 张玉平, 等. 川芎嗪、当归注射液对急性微循环障碍大鼠血小板功能和器官血流量的影响[J]. *中国医学物理学杂志*, 2005, 22(5): 660-662.
- [6] 杨文辉, 龚国清, 周怡, 等. 川芎嗪体内抗血栓活性及机制探究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(3): 241-245.
- [7] 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): 1505-1515.
- [8] Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, et al. Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis [J]. *Immunology*, 1988, 65(2): 305-310.
- [9] Miossee P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2004, 16(3): 218-222.
- [10] Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production [J]. *Science*, 2010, 327(5965): 580-583.
- [11] Zha QL, He YT, Lu Y, et al. Relationship between platelet counts and cartilage erosion in 436 cases of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Chem Acta*, 2006, 371(1-2): 194-195.
- [12] 王阶, 姚魁武. 血瘀证证候实质研究进展与思考[J]. *中国医药学报*, 2003, 18(8): 490-493.
- [13] 陈可冀, 李连达, 翁维良, 等. 血瘀证与活血化瘀研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3(1): 1-2.
- [14] Cai XX, Chen Z, Pan XK, et al. Inhibition of angiogenesis, fibrosis and thrombosis by tetramethylpyrazine: mechanisms contributing to the SDF-1/CXCR4 axis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88176.
- [15] Pu QH, He JL, Wu MJ, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of tetramethylpyrazine inhibition on lipopolysaccharide-induced microglial activation [J]. *Life Sci*, 2015, 121(1): 46-56.
- [16] Sheu JR, Kan YC, Hung WC, et al. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of tetramethylpyrazine in human platelets [J]. *Thromb Res*, 1997, 88(3): 259-270.
- [17] Bingham CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation [J]. *J Rheumatol Suppl*, 2002, 65: 3-9.
- [18] Kim GW, Lee NR, Pi RH, et al. IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present, and future [J]. *Arch Pharm Res*, 2015 (Epub).
- [19] Abramson SB, Amin A. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41(9): 972-980.
- [20] Dayer JM. Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2002, 20(5 Suppl 27): S14-S20.
- [21] Seckinger P, Kaufmann MT, Dayer JM. An interleukin-1 inhibitor affects both cell-associated interleukin-1 induced T cell proliferation and PGE2/collagenase production by human dermal fibroblasts and synovial cells [J]. *Immunobiology*, 1990, 180(4-5): 316-327.
- [22] Srirangan S, Choy EH. The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2010, 2(5): 247-256.
- [23] Choi G, Schultz MJ, Levi M, et al. The relationship between inflammation and the coagulation system [J]. *Swiss Med Wkly*, 2006, 136(9-10): 139-144.
- [24] Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor [J]. *Circ Res*, 2004, 94(4): 534-541.
- [25] Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction [J]. *Immunity*, 2008, 29(4): 628-636.
- [26] Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases [J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(3): 515-519.

(收稿: 2014-03-07 修回: 2015-03-13)