

◆实验研究论著◆

温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠 VEGF 表达的影响

孙炜¹, 李志轩²

1. 浙江省中西医结合医院, 浙江 杭州 310003; 2. 河南中医学院, 河南 郑州 450000

[摘要] 目的: 研究中药温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响, 探讨温化蠲痹方治疗胶原诱导性关节炎(CIA)的作用机制。方法: 健康雄性大鼠随机分为造模组(60只)、正常对照组(简称正常组, 10只), 造模组采用牛型胶原(BC)乳剂于大鼠尾根部及颈背部多点注射, 建立CIA模型。造模成功后, 选取30只造模成功大鼠随机分为模型组(10只)、甲氨喋呤(MTX)组(10只)、温化蠲痹方组(简称中药组, 10只)。给药30天后, 运用免疫组化法检测大鼠滑膜VEGF水平, 观察各组大鼠足趾肿胀度。结果: 与正常组比较, 模型组、中药组和MTX组大鼠足趾肿胀明显, 差异均有非常显著性意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组和MTX组大鼠足趾肿胀明显减轻, 差异均有显著性意义($P < 0.01$); 中药组与MTX组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$); 与治疗前比较, 中药组和MTX组大鼠足趾肿胀明显减轻, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组大鼠滑膜VEGF表达水平明显升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组和MTX组大鼠滑膜VEGF表达水平明显降低($P < 0.01$), 中药组与MTX组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。结论: 降低CIA大鼠滑膜VEGF水平可能是中药温化蠲痹方治疗CIA的作用机制之一。

[关键词] 温化蠲痹方; 胶原诱导性关节炎(CIA); 滑膜; 血管内皮生长因子(VEGF)

[中图分类号] R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2014)03-0184-04

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性破坏性关节病变为特征的全身性自身免疫病, 表现为关节滑膜的慢性炎症、增生, 血管翳形成, 主要侵犯关节软骨、软骨下骨、韧带和肌腱等, 造成关节软骨、骨和关节囊破坏, 最终导致关节畸形和功能丧失。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是RA炎症过程中主要的破坏性细胞因子, 抑制VEGF活性对控制RA病情进展非常重要^[1]。研究表明, 中药温化蠲痹方治疗RA具有满意临床疗效^[2], 笔者进行了中药温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎(collagen-inducing arthritis, CIA)大鼠滑膜VEGF影响的研究。报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性Wistar大鼠60只, 体重(110±10)g, SPF级, 浙江中医药大学动物实验中心提供。合格证号: SYXK(浙)2008-00115。

1.2 实验材料 温化蠲痹方(由防风、威灵仙、蜈蚣、白芥子、全蝎、白芷、僵蚕、忍冬藤、丹参、炒白术等组成)由浙江省中西医结合医院制剂室煎药完成(含生药1g/mL); 甲氨喋呤片(MTX, 上海信谊制药有限公司, 批号: 100703); 牛型胶原(Chondrex公司, 批号: 2002-1); 不完全弗氏佐剂(Chondrex公司, 批号: 702); 冰醋酸(杭州化学试剂有限公司, 批号: 20100924); 大鼠VEGF抗体(美国

[收稿日期] 2013-11-11

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(编号: LY12H29008)

[作者简介] 孙炜(1983-), 女, 医学硕士, 医师, 研究方向: 中医药治疗内分泌及风湿免疫疾病。

[通讯作者] 李志轩, E-mail: 992994137@qq.com。

santa cruz 公司);二抗(辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG 抗体,联科生物,目录号 RAG007);蛋白质 Marker,联科生物;DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒,产品编号:P0203。

1.3 模型建立与分组 在无菌条件下,用 0.1 mol/L 冰醋酸在冰浴中充分溶解牛型胶原(bovine collagen type II, BC II),浓度为 4 mg/mL,置于 4℃ 冰箱过夜后,与弗氏不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)等体积混合、振荡乳化,制成 BC II 乳剂,浓度为 2 mg/mL,置 4℃ 冰箱保存备用。造模参照文献^[3]的造模方法,于造模组大鼠尾部皮内注射进行初次免疫,总量 0.5 mL。正常组注射 0.5 mL 生理盐水。于初次免疫 2 周后同前法进行二次免疫,总量 0.3 mL。60 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组 10 只(简称正常组)和造模组,造模组大鼠建立 CIA 模型。把造模成功的 45 只(成功率 75%)大鼠,选取 30 只随机分为 3 组,模型组、温化薏痹方组(简称中药组)、MTX 组各 10 只。

1.4 模型成功判定标准 致炎前,用足趾容积测量仪测量每只大鼠左后足足趾容积,作为致炎前足趾基础容积。每周进行关节炎指数(arthritis index, AI)评分。于首次注射 BC II 乳剂后 21 天,根据关节炎指数(arthritis index, AI)评分进行模型成功评判^[4]。

1.5 给药方法 于造模成功后开始给药,中药组大鼠按 22.9 g/(kg·d)剂量(临床成人等效剂量 10 倍)灌胃中药温化薏痹方,正常组、模型组灌胃等量生理盐水,均每天 1 次;MTX 组大鼠按 0.78 mg/(kg·w)剂量(临床成人等效剂量的 10 倍)灌胃 MTX 混悬液,每周 1 次。连续用药 30 天。

1.6 处理

1.6.1 外周血采集 眼眶取血 2 mL,静置 2 h,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为外周血检测标本,-20℃ 保存备用。

1.6.2 方法 大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉致死,仰位固定,常规碘酒、酒精消毒。沿膝关节正中纵行切开皮肤直至暴露出膝关节为中心约 3 cm×3 cm 的区域,以有齿镊提起髌骨,沿髌骨上缘约 0.3~0.4 cm 处向下切割至股骨,再分别沿髌骨两侧向下分离胫骨,此时即打开了膝关节腔,可见有髌骨下缘向上延续有一层平滑光亮成淡黄色的滑膜组织。完整剥离滑膜组织,最后以眼科镊轻轻夹住其游离

端,用刀片完整切下。每只大鼠采集左右两侧膝关节滑膜组织并用 4% 多聚甲醛固定。

1.7 观测指标

1.7.1 足趾肿胀度 运用足趾容积测量仪测量各组大鼠左后足足趾容积,观测足趾肿胀度。测量位置:以无毛区为标记线,即测量标记线以下的足趾容积(mL);测量时间:第 21 天(造模成功)、第 35 天(造模成功后 2 周)、第 49 天(造模成功后 4 周),记录数据。

1.7.2 免疫组化法检测大鼠滑膜 VEGF 表达 将所有大鼠左侧滑膜用 4% 多聚甲醛固定。石蜡包埋切片,脱蜡、水化。行免疫组化检验的切片 60℃ 烤箱过夜,以防脱片。二甲苯 I 30 min、二甲苯 II 20 min,无水乙醇、95% 乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇各 10 min,蒸馏水洗 5 min。以磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,每次 5 min,3.0 g/L 过氧化氢-甲醇溶液 37℃ 温育 15 min。纯化水冲洗,PBS 浸泡 5 min。抗原修复:将切片至于 0.1 mol/L 且 pH=6.0 的枸橼酸液修复液中,沸水浴 15 min。自然冷却 30 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min。血清封闭,室温,45 min,甩去多余液体,VEGF 一抗按 1:20 稀释,4℃ 孵育过夜。阴性对照用 PBS 代替一抗。PBS-T 洗 3 次,每次 5 min。分别滴加生物素化的二抗,按 1:500 稀释,37℃ 温育 60 min。PBS-T 洗 3 次,每次 5 min。DAB 显色、脱水,透明中性树胶封片,光镜下观察结果。图像分析:随机选取 5 个高倍视野($\times 200$),计算每个视野的阳性面积比,取其平均值。阳性面积比为每个视野阳性目标面积占整个统计面积的百分率。

1.8 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠足趾肿胀度比较 见表 1。与正常组比较,在第 21 天、第 35 天、第 49 天,模型组、中药组和 MTX 组大鼠足趾肿胀明显,与正常组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$);与模型组比较,在第 21 天,中药组和 MTX 组大鼠足趾肿胀度均无显著差异($P > 0.05$);在第 35 天、第 49 天,中药组和 MTX 组大鼠足趾肿胀度明显减轻,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$);而中药组与 MTX 组比较,差

异无显著性意义($P > 0.05$)。与治疗前比较,在第35天、第49天,中药组和MTX组大鼠足趾肿胀度明显减轻,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠足趾肿胀度比较($\bar{x} \pm s$) mL

组别	n	21天	35天	49天
正常组	10	1.278±0.531	1.208±0.617	1.252±0.884
模型组	10	4.875±0.726 ^①	4.592±1.125 ^①	4.968±0.872 ^①
中药组	10	4.557±0.847 ^①	3.268±1.024 ^{①②③}	2.476±0.785 ^{①②③}
MTX组	10	4.707±0.618 ^①	3.046±0.985 ^{①②③}	2.672±0.631 ^{①②③}

与正常组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.01$;与治疗前比较,③ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠 VEGF 表达影响的比较 见表2。与正常组比较,模型组大鼠滑膜 VEGF 水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,中药组和 MTX 组大鼠滑膜 VEGF 水平均降低($P < 0.01$),中药组与 MTX 组比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表2 各组大鼠 VEGF 表达影响的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF 阳性面积
正常组	10	4.50±0.86
模型组	10	19.31±2.30 ^①
中药组	10	12.37±2.46 ^②
MTX组	10	11.55±2.03 ^②

与正常组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.01$

3 讨论

型胶原诱导的关节炎模型是 Trentham DE 等^[5]于1977年创立。由于在主要组织相容性复合物、性别、关节局部病变、collagen (C) 自身免疫等方面与 RA 有很多相似之处,所以 CIA 模型成为目前比较公认的 RA 动物模型^[6]。在实验中,造模后第21天,造模组大鼠关节肿胀明显,通过足趾容积评估及 AI 评分测量后,提示 CIA 模型制备成功。

RA 属于中医学痹证的范畴,其基本病因病机为本虚标实、寒热错杂、痰瘀痹阻。据此确立温化蠲痹法,包括了温阳、化热、化湿、化痰及化瘀治法,拟温化蠲痹方治疗 RA^[7]。现代药理研究表明,防风主要含有挥发油烯类和多糖类成分^[8],白芷主要含有香豆素类和挥发油成分。全蝎的主要有效成分为蝎毒,蜈蚣的化学成分主要含组织胺样物质及溶血性蛋白质,白芥子能抑制浆膜、滑膜微血管的渗出,改善浆膜壁的微循环,使积液重吸收^[9]。忍冬藤主要含黄酮类忍冬苷和绿原酸成分,以上药物均具有解

热、镇痛、抗炎和调节免疫等作用。威灵仙主要成分为威灵仙总皂苷,能促进和维持软骨细胞合成型胶原和蛋白多糖,帮助其合成代谢,抑制白细胞介素-1(IL-1) β 等细胞因子,有效阻止 IL-1 β 及其下游分子对软骨损伤效应^[10]。僵蚕对凝血酶-纤维蛋白原反应有直接抑制作用,具有抗血栓、抗凝等作用。丹参的主要作用是抗炎、增强免疫和促进组织修复和再生。全方具有镇痛、抗炎、抗凝和调节免疫等作用。

RA 致病过程中伴随多种免疫活性细胞活化及细胞因子、炎症介质的共同参与,VEGF 是血管生成的主要因子,在 RA 滑膜病理性血管新生中起关键作用^[11],其能够促进炎症滑膜组织新生血管形成及血管内物质外渗,加重滑膜组织炎症和血管翳形成,加重 RA 的临床症状,导致关节畸形和强直。

本实验结果表明,CIA 大鼠滑膜 VEGF 表达水平升高,给予温化蠲痹方治疗后,滑膜 VEGF 表达水平下降。说明本方能减少 VEGF 的合成而抑制炎症细胞浸润,减少关节炎的发生和逆转疾病的发展。这可能是温化蠲痹方治疗 CIA 的作用机制之一,其治疗 CIA 的其他机制尚需深入研究。

[参考文献]

- [1] Taylor PC. Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy[J]. Rheumatology, 2005, 44(6): 721-728.
- [2] 刘喜德,张金禄,叶丽江,等. 温化蠲痹方对类风湿关节炎患者外周血 TNF- α 及 IL-1 β 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(9): 787-790.
- [3] H.G.沃格尔, W.H.沃格尔. 药理学实验指南—新药发现和药理学评价[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 577-589.
- [4] Carter RA, Campbell IK, O'Donnell K, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint involvement and alters B cell trafficking[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128(1): 44-51.
- [5] Feng H, Yamaki K, Takano H, et al. Suppression of Th1 and Th2 immune responses in mice by sinomenine an alkaloid extracted from the Chinese medicinal plant Sinomenium acutum[J]. Planta Medica, 2006, 72(15): 1383-1388.
- [6] Chie O, Yoriaki K, Yoji M, et al. Resistance to collagen-induced arthritis in SHPS-1 mutant mice[J].

- Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371 (3): 561- 566.
- [7] 刘喜德, 刘风云, 陈滢, 等. 温化蠲痹方对 CIA 大鼠外周血 Th1/Th2 细胞平衡的影响[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(1): 10- 12.
- [8] 李文, 李丽, 是元艳, 等. 防风有效部位的药理作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6): 29- 31.
- [9] 李小莉, 张迎庆, 黄通华. 白芥子提取物的抗炎镇痛作用研究[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(6): 28- 30.
- [10] 李特, 李运曼, 刘丽芳, 等. 威灵仙总皂苷抗类风湿性关节炎的作用机制[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40 (2): 157- 160.
- [11] Sone H, Kawakami Y. Neutralization of vascular endothelial growth factor prevents collagen2 induced arthritis and ameliorates established disease in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281(2): 562- 568.

(责任编辑: 马力)

补肾中药对去势大鼠肾组织中 BMP-4 的调控作用

牛煜¹, 郑洪新²

1. 广东药学院附属第一医院, 广东 广州 510000; 2. 辽宁中医药大学基础医学院, 辽宁 沈阳 110032

[摘要] 目的: 研究补肾中药对去势大鼠肾组织中骨形成蛋白-4 (BMP-4) 的 mRNA 表达的影响。方法: 将雌性大鼠随机分为 7 组。低剂量组给予补肾中药复方, 每天 0.7 g/kg; 中剂量组给予补肾中药复方, 每天 2.1 g/kg; 高剂量组给予补肾中药复方, 每天 6.3 g/kg; 骨疏康组给予骨疏康颗粒, 每天 2.1 g/kg; 牡蛎碳酸钙组给予牡蛎碳酸钙咀嚼片, 每天 0.006 3 g/kg。每天灌胃 1 次, 各组给药容积为 100g 体重 / mL。正常组、模型组每天灌同体积的生理盐水。灌胃 12 周后取材并进行指标检测: 用 RT-PCR 法和 Western 法检测大鼠肾组织中 BMP-4 的 mRNA 和蛋白表达。结果: 大鼠肾组织可以在基因、蛋白水平表达 BMP-4, 绝经后骨质疏松症的发生与肾组织中 BMP-4 的 mRNA 表达的变化有关。结论: 补肾中药可明显上调肾中 BMP-4 的蛋白表达, 这可能是其防治绝经后骨质疏松症的机制之一。

[关键词] 绝经; 骨质疏松症; 补肾中药; 骨形成蛋白-4 (BMP-4)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 03-0187-03

绝经后骨质疏松症是一种慢性进行性疾病, 其特点是长期骨吸收超过骨形成, 从而导致骨量减少, 骨微结构破坏, 骨强度降低, 骨折危险性增加^[1]。随着世界人口的不断老龄化, 绝经后骨质疏松症将成为困扰全球的健康问题。因此探讨该病症的病理及疗效机制, 具有很好的实用价值。本研究将通过观察去势大鼠骨形成蛋白-4 (BMP-4) 在肾中表达的变化, 初步探讨肾组织中 BMP-4 在绝经后骨质疏松发病过程中的意义。

1 材料

1.1 动物 雌性未交配 Wistar 大鼠 105 只, 体重 250~280 g。

1.2 试剂 RNA PCR Kit (AMV) TRIzol (Bio Basic Inc.), Ver.2.1 试剂盒, DNA Marker, CaBP-28K 引物 (TaKaRa 公司), Tris (BBI 公司), DEPC, 溴化乙锭等

1.3 仪器 PCR 扩增仪 (德国), 核酸蛋白分析仪 (美国), 凝胶电泳成像分析系统 (美国)。

[收稿日期] 2013-10-11

[作者简介] 牛煜 (1971-), 女, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向: 中医妇科。