

· 基础研究 ·

雷公藤甲素对类风湿关节炎滑膜新生血管中血管内皮生长因子, 白细胞介素-6 抑制机理的探讨

王伟东, 陈如平, 肖鲁伟, 王昌兴, 成锋

(浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005)

摘要 目的:了解雷公藤甲素对类风湿关节炎中血管内皮生长因子、白细胞介素-6 的影响, 探讨雷公藤对类风湿关节炎患者滑膜新生血管的抑制机理。**方法:**应用免疫组化技术检测血管内皮生长因子、白细胞介素-6 在 AA 大鼠踝关节滑膜组织中的表达, 并观察了雷公藤对其的影响。**结果:**雷公藤组可见少量的血管内皮生长因子阳性细胞, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。大鼠滑膜关节腔滑液中白细胞介素-6 水平检测中, 实验显示对照组滑膜组织中白细胞介素-6 的水平明显高于空白组和雷公藤组 ($P < 0.01$)。**结论:**雷公藤甲素能降低滑膜组织血管内皮生长因子、白细胞介素-6 的表达水平, 抑制血管生成。

关键词 雷公藤内脂 关节炎, 类风湿 血管内皮生长因子类 白细胞介素类 动物实验

Inhibitory mechanism of Triptolide on the expression of VEGF, IL-6 in rheumatoid arthritis synovial membrane newborn blood vessel WANG Wei-dong*, CHEN Ru-ping, XIAO Lu-wei, WANG Chang-xing, CHENG Feng. *The affiliated No. 2 hospital of Zhejiang TCM university, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and inhibitory mechanisms of Triptolide on VEGF, IL-6 in rheumatoid arthritis synovial membrane newborn blood vessel. **Methods:** Use immunohistochemical techniques to detect expression of VEGF, IL-6 in the AA rats in the organization of the synovial organization, and to observe the effects of tripterygium wilfordii on the expression of VEGF, IL-6. **Results:** VEGF positive cells were visible in the tripterygium wilfordii group, there was significant difference ($P < 0.01$) compared with the experimental group. In the rat synovial articular cavity synovial fluid IL-6 level detection, IL-6 level in the experimental group synovial organization is significantly higher than the level of blank and tripterygium wilfordii group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Triptolide can reduce the expression of VEGF and IL-6 in synovial organizations and inhibit angiogenesis.

Key words Triptolide; Rheumatoid arthritis; Angiogenesis; Immunohistochemistry

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以关节组织慢性炎症性病变为主要表现的全身免疫性疾病。RA 发生发展的一个重要病理生理过程是血管翳的形成, 它侵蚀和破坏邻近关节软骨和骨组织, 造成骨与关节的破坏。在促进新生血管形成的因子中, 血管内皮生长因子 (VEGF)、白细胞介素-6 (IL-6) 的作用最为突出^[1]。雷公藤作为非甾体抗炎剂和免疫抑制剂, 主要集中在其抗炎、抗氧化作用方面^[2]。本实验采用佐剂性关节炎 (Adjuvant Arthritis, AA) 模型观察雷公藤甲素 (Triptolide, TP) 对 RA 踝关节滑膜组织中 VEGF 和 IL-6 的影响, 以揭示其与抑制血管生成作用之间的内在联系。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 50 只, 清洁

级, 8 周龄, 实验初始体重 180 ~ 220 g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供。

1.2 实验试剂及仪器 选用雷公藤甲素和弗氏完全佐剂 (上海华东医药有限公司)。Krumdieck 组织切片 (北京硕林科技有限公司), Leica2025 石蜡切片机 (德国 Leica 公司), 生物组织自动包埋机 (日本樱花公司), Olympus BX50 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), 电子恒温水箱, CS-15R 台式离心机, WellscanMK2 酶标仪, 恒温培养箱, 病理组织包埋机, YL3-A 型迴转式切片机等 (浙江中医药大学动物实验中心)。

2 实验方法

2.1 实验分组 将 50 只 8 周龄的雄性 Wistar 大鼠以 1 : 2 : 2 的比例随机分为 3 组, 正常空白组 10 只, 对照组和雷公藤甲素治疗组各 20 只。均在相同条件下笼养, 自由摄食, 饮水。室温控制在 18 ~ 22 °C。

2.2 造模及给药 常规无菌操作, 临用前从冰箱取

出弗氏完全佐剂(CFA)。大鼠常规消毒后将其右后肢拉直,用 1 mL 注射器针头于足拓中部皮内注射,每只大鼠注射 0.1 mL CFA。大鼠按组别分笼予以常规饲料喂养,18 d 后模型建立^[3],并观察动物活动情况及足踝肿胀情况。造模后大鼠从第 18 d 起开始给药,具体如下:常规无菌消毒右后足跖,对照组每只大鼠右后腿肌注相同体积的 $9.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠注射液;治疗组每只大鼠右后腿肌注雷公藤甲素 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。整个注射过程持续 14 d,观察大鼠足踝情况。

2.3 标本获取 注射结束后,将给药的大鼠处死,把大鼠仰位固定,酒精消毒,沿踝关节正中纵行切开皮肤,直至暴露出以踝关节为中心约 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 的区域。此时即打开了关节腔,可见由踝关节有一层平滑光亮呈淡黄色的滑膜组织。完整剥离滑膜组织,用刀片完整切下。

2.4 免疫组化指标检测方法 将大鼠滑膜组织,放入 10% 福尔马林固定 2 h,将已固定的标本取出,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,然后石蜡包埋,2~8℃ 暗处保存。图像结果分析采用 MoticMed 7.0 彩色病理图像分析系统。每张片随机选取 5 个视野,利用显微摄像系统在 200 倍视野下摄入图像分析系统,选择免疫组化分析模块,通过灰度调节,区分视野内阳性信号面积进行分析,计算阳性目标总面积与统计场总面积比值,取平均值进行统计分析。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计。各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间比较用单因素方差分析,和对照组的比较采用 Dunnett-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大体标本观察 A 组空白正常组大鼠右后足未见明显肿胀;B 组生理盐水对照组右后足肿胀明显,部分大鼠踝关节有脓性液体渗出,活动度差;C 组雷公藤甲素治疗组右后足肿胀程度较对照组有明显减小,踝关节活动度正常。

3.2 免疫组织化学结果 VEGF 阳性表达主要体现在增生的滑膜衬里层细胞、衬里下层细胞,以及滑膜组织中浸润的炎性细胞,呈棕黄色,以胞浆染色为主,多呈团块状分布。滑膜组织 VEGF 图像分析结果(见图 1),对照组大鼠滑膜血管周围可见大量 VEGF 阳性细胞,呈强阳性重度表达。雷公藤组大鼠的滑膜组织血管周围中可见少量的 VEGF 阳性细胞,VEGF 阳性表

达较对照组有显著减少,表达情况有不同程度的改善。而从表 1 也可以看出,对照组 VEGF 表达水平比空白组高,雷公藤组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),说明雷公藤组均能降低滑膜组织新生血管中 VEGF 的表达。

IL-6 主要存在于滑膜纤维母细胞,各组大鼠滑膜组织中 IL-6 表达情况(如图 2 所示)对照组大鼠 IL-6 水平异常升高,雷公藤组与对照组相比,IL-6 水平有所下降从表 1 也可以看出,空白组与对照组大鼠滑膜组织 IL-6 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),雷公藤组与对照组比较差异也($P < 0.01$),结果显示 RA 对照组滑膜组织中 IL-6 的水平明显高于空白组和雷公藤组,说明雷公藤组能降低 AA 大鼠关节腔滑液 IL-6 水平。

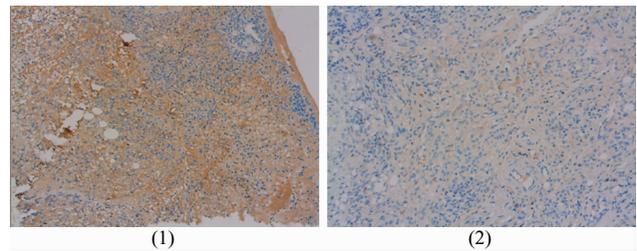


图 1 大鼠滑膜组织 VEGF 免疫染色光镜片 $\times 200$
(1)对照组棕黄色炎性细胞为染色阳性颗粒 (2)雷公藤组棕黄色炎性细胞明显减少

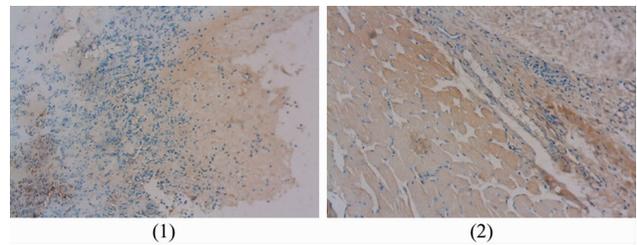


图 2 大鼠滑膜组织中 IL-6 免疫染色光镜片 $\times 200$
(1)对照组 IL-6 水平异常升高 (2)雷公藤组 IL-6 水平有所下降

表 1 各组 AA 大鼠滑膜 VEGF、IL-6 表达水平的比较 $\bar{x} \pm s$

分组	例数	VEGF 表达水平 (%)	IL-6 水平 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
空白组	10	9.06 ± 1.68	124.06 ± 71.68
对照组	20	$17.58 \pm 2.17^{1)}$	$1\ 217.58 \pm 262.17^{1)}$
雷公藤组	20	$11.09 \pm 1.58^{2)}$	$311.09 \pm 63.58^{2)}$

注 1)与空白组比较, $P < 0.05$;2)与对照组比较, $P < 0.05$

4 讨论

类风湿性关节炎主要侵犯关节滑膜,病理变化为滑膜细胞增生、扩张、充血,引起滑膜周围血管壁肥厚、变性等。近年研究表明,通过抑制血管生成可以达到治疗类风湿性关节炎疾病的目的^[4]。关节滑膜增生并形成血管翳是其重要特征,增生的滑膜需要更

多的血供以满足其对氧气和营养物质的需求,因而血管新生在血管翳的形成和维持方面起着关键性作用。

血管内皮生长因子(VEGF)是一种细胞来源广泛的多功能性糖蛋白,是在胚胎血管发育中生成的第一个控制血管生成和发育的因子,被认为是血管生成中最重要因子之一,具有强大的促血管增生和增强血管通透性的功能。它被公认是血管生成中刺激微血管内皮细胞(endothelial cell, EC)分裂、增殖的最主要因素。

VEGF 与 RA 形成机制的研究最早是 Fava RA^[5]提出的。Fava 将 RA 的滑膜组织进行切片和 VEGF 免疫组化染色后发现,在滑膜的衬里层细胞中检测到数目较多的 VEGF 阳性细胞,与其对照的骨关节炎组(osteoarthritis, OA)滑膜全部为阴性结果,进一步检测了 OA 与 RA 关节滑液中 VEGF 的水平,后者明显高于前者,因此推断 VEGF 是 RA 关节滑膜病变有别于 OA 的一个重要特征,在 RA 滑膜血管新生中起关键作用。VEGF 参与了 RA 滑膜组织炎症形成和发展,在 RA 的滑膜组织中 VEGF 通过与其受体的结合促进血管增生,最终导致血管翳形成,侵蚀骨质。从而促进慢性炎症的形成和发展,加重 RA 的临床症状,导致关节畸形和强直。VEGF 在 RA 病人血管增生和骨质破坏中起着至关重要的作用,VEGF 表达量是 RA 骨质破坏的标志物。

VEGF 在 RA 的滑膜血管翳的形成过程中可能起关键作用,它是联系各种炎症因子的枢纽,直接促进滑膜组织新生血管形成,并增强血管的通透性。近期有研究证明,RA 关节炎发病早期滑膜有较高水平的 VEGF 表达,VEGF 的表达水平与 AA 大鼠关节炎指数积分具有明显相关性,因此 VEGF 可能是 RA 早期发病过程中的一个重要信号分子,它通过促进血管增生,增加血管通透性,加速了滑膜血管的生成;另外,它可能与其他炎症细胞因子形成复杂的信号网络,共同促进慢性炎症的形成和发展^[6]。

IL-6 在 RA 中的作用,尚不如 VEGF 明确。一般认为,IL-6 是细胞因子中一种多效应的细胞因子,对细胞的生长分化或基因表达都有影响。IL-6 作为 RA 中主要的炎症介质,起分解细胞因子的作用,是引起关节破坏和炎症发生的重要因子。IL-6 主要由活化的核细胞产生,能促进 B 细胞产生免疫球蛋白 IgG、IgM 及合成类风湿因子。Campo 等^[7]在 RA 动物模型胶原性关节炎(CIA)小鼠血清中也检测出高浓度的 IL-6,因此可以说 IL-6 是 RA 滑膜炎症及关节损伤的

重要介质之一。

在 RA 中,IL-6 的致病作用与 VEGF 不同,它不能直接刺激滑膜纤维母细胞和软骨细胞产生前列腺素 E2 和胶原酶,而是诱导其他细胞因子如 IL-1 与 TNF- α 的产生和释放^[8]。这些生长因子诱导滑膜增生,局部缺氧引起内皮细胞活化,生长因子表达增加,胶原酶、基质金属蛋白酶等降解血管基底膜和基质,内皮细胞增殖,内皮细胞黏附和向血管外迁移,血管形成和血管成熟,最终促进血管翳的形成,从而增强炎症的破坏作用。

本实验通过药理、病理、免疫组织化学检测等方法,从整体、炎性细胞因子、组织形态、蛋白等水平,以 AA 大鼠为实验模型,研究雷公藤甲素对类风湿性关节炎滑膜新生血管的抑制机制,探讨证实了雷公藤多途径、多环节、多靶点的整体调节机制。结果表明:雷公藤甲素可明显降低滑膜组织中 VEGF 的表达,下调 AA 大鼠关节腔滑液 IL-6 水平表达,抑制大鼠滑膜中新生血管的生成,抑制滑膜细胞的增殖,表现了对滑膜和软骨组织的保护作用。鉴于血管翳是高度血管化的,抑制 RA 中血管新生的方法,将会成为未来治疗 RA 的有效策略。

5 参考文献

- [1] Roccaro AM, Russo F, Cirulli T, et al. Antiangiogenesis for rheumatoid arthritis [J]. *Curr Drugs Targets Inflammation Allergy*, 2005, 4(1): 27 - 30.
- [2] 水光兴, 万毅刚, 蒋春明, 等. 雷公藤及其活性成分药理学和药理学研究的若干进展 [J]. *中国中医药杂志*, 2010, 35(4): 515 - 520.
- [3] 黄慧琴. 雷公藤内酯醇对大鼠佐剂性关节炎的影响 [J]. *福建医药杂志*, 2008, 30(1): 87 - 89.
- [4] Saidenberg KN, Cohen SM, Bessis N, et al. Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation [J]. *Joint Bone Spine*, 2004, 71(1): 9 - 13.
- [5] Fava RA, Olsen NJ, SPeneer-Green G, et al. Vascula Permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue [J]. *J ExP Med* 1994, 180(1): 341 - 346.
- [6] Kang HY, Shim D, Kang SS, et al. Protein kinase B inhibit endostatin-induced apoptosis in HUVECs [J]. *J Biochem MolBiol*, 2006, 39(7): 97 - 104.
- [7] Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Differential effect of molecular mass hyaluronan on lipopolysacch a-ride-induced damage in chondrocytes [J]. *Innate Immun*, 2010, 16(1): 48 - 63.
- [8] Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy [J]. *Science*, 2007, 317(5838): 617 - 619.