

独活对大鼠胶原诱导性关节炎的治疗作用

邱明山,陈进春,徐振兴,张怡燕,蒋玉芬,彭海聪

(福建省厦门市中医院,福建 厦门 361009)

摘要 目的:观察不同剂量独活对胶原诱导性关节炎(CIA)的治疗作用。**方法:**选择牛Ⅱ型胶原为免疫原,建立 CIA 模型,选取 30 只造模成功的大鼠随机分为 5 组:独活组[按顺序再分为低剂量($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、中剂量($4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、大剂量($15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组]和甲胺喋呤(B)组、生理盐水(C)组。采用关节炎指数评分(AI)对大鼠关节炎程度进行评分;采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定各组大鼠血清基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、血管内皮生长因子(VEGF),并评估可能的肝肾及胃黏膜副反应。**结果:**AI 评分比较,中、小剂量独活组与生理盐水组差异无统计学意义;大剂量独活组小于生理盐水组($P < 0.05$),独活各剂量组差异无统计学意义;甲胺喋呤组均小于生理盐水组、小、中剂量独活组(分别 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$),而与大剂量独活组比较差异无统计学意义。血清 VEGF 比较,独活各剂量组差异无统计学意义,但均显著低于生理盐水组(按大、中、小分别 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$);甲胺喋呤组显著低于生理盐水组及小剂量独活组(分别 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),但与中、大剂量独活组比较差异无统计学意义。血清 MMP-3 比较,各独活剂量组比较差异无统计学意义;独活小剂量组与生理盐水组差异无统计学意义;独活中、大剂量组均低于生理盐水组(均 $P < 0.05$);甲胺喋呤组低于生理盐水组及小剂量独活组(均 $P < 0.01$),但与中、大剂量独活组比较差异无统计学意义。各组肝功、肾功、血常规及胃病理检查均未见明显异常。**结论:**①独活大剂量能减轻 CIA 炎症,而中低剂量则无此作用;②独活中大剂量能明显降低血清 VEGF、MMP-3 水平;③独活大剂量在短期动物实验中无肝肾功能、血液、胃组织损害。

关键词 独活 关节炎,类风湿 动物实验 大鼠

Effect of Heracleum on collagen induced arthritis in rats QIU Ming-shan*, CHEN Jin-chun, ZHANG Yu-yan, ZHANG Yi-yan, JIANG Yu-fen, PENG Hai-cong. *Affiliated Xiamen TCM Hospital of Fujian TCM University, Xiamen 361001, Fujian, China

ABSTRACT Objective:To observe the therapeutic effectiveness of different doses Heracleum on collagen induced arthritis(CIA) in rats. **Methods:**CIA rat model was established by subcutaneously injecting bovine nasal cartilage II collagen. 30 CIA Rats were randomly divided into three Heracleum(low, medium and high dose, A1 and A2 and A3) treated groups, MTX(Methotrexate, B) treated group, and control(C) group. The arthritic index(AI) of all rats were compared separately, the serum level of MMP-3, VEGF, AST, ALT, BUN, Cr were assayed, and the histology of gastric mucosal were examination. **Result:**In AI score, there was no difference between group A2, group A1 and group C; that in group A3 were less than Group B($P < 0.05$, $P < 0.01$), there was no statistical difference in Heracleum groups. In the serum level of VEGF, all the group A1 and A2 and A3 and B were less than the group C($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), but the differences of group A2 and group A3 and group B were not statistically significant. In the serum level of MMP-3, all the group A2 and A3 and B were less than the group C($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), but the differences of group A2 and group A3 and group B were not statistically significant. In the serum level of AST, ALT, BUN, Cr and the histology of gastric mucosal, all groups showed no obvious abnormalities. **Conclusion:**①High dose of Heracleum can reduce the inflammation of CIA rats, while the low dose does not have this effect. ②Medium and high dose of Heracleum can significantly reduce the serum level of VEGF and MMP-3. ③For High dose of Heracleum, there are no damage of hepatic and renal function, blood and stomach in the short-term animal studies.

Key words Heracleum; Collagen induced arthritis

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是以关节滑膜炎为主要表现的自身免疫性疾病,属中医“痹证”范畴。独活为伞形科植物重齿毛当归的干燥根,

是中医临床常用于治疗痹证的中药。为探讨其对滑膜炎性关节炎的疗效及作用机理,我们以Ⅱ型胶原诱导性关节炎(Collagen induced arthritis CIA)作为模型,研究不同剂量独活对Ⅱ型胶原诱导性关节炎大鼠的疗效,并探索其可能机制,为临床上用于治疗 RA 提供实验依据。

基金项目:福建省厦门市卫生局青年创新课题基金资助项目:

厦卫科教中医[2007]479号

通讯作者:陈进春 E-mail:cjc06@sohu.com

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,健康状况良好,体重(240 ± 20) g。大鼠及全价颗粒饲料均购自上海中科院动物中心。

1.2 实验药物 独活(农本方颗粒,培力(南宁)药业有限公司),甲胺喋呤(每片 2.5 mg,上海医药(集团)有限公司信谊制药总厂),注射用水。

1.3 实验试剂 牛Ⅱ型胶原(美国 Chondrex),液体石蜡(上海大场化工厂),羊毛脂(上海油脂三厂),99%冰醋酸液(上海试剂厂),以上为造模所用的试剂。基质金属蛋白酶-3(MMP-3)、血管内皮生长因子 VEGF(上海富莼科芯提供)。

1.4 造模方法 50 只 SD 大鼠于厦门大学医学院动物中心适应性喂养 10 d 后。随机选出 6 只为正常对照组(正常组)。其余 44 只参照《药理学实验指南——新药发现和药理学评价》^[1]及文献^[2]的方法造模。具体方法为:在无菌条件下,用 0.1 mol · L⁻¹冰醋酸充分溶解牛Ⅱ型胶原(BCⅡ),浓度为 4 mg · mL⁻¹,置 4℃冰箱过夜后,与弗氏完全佐剂(Freunds complete adjuvant,CFA)等体积混合、振荡乳化。制成稳定的Ⅱ型胶原乳剂(即每 0.5 mL 含 1 mg CⅡ)。置 4℃冰箱保存备用。注射方法:于大鼠颈、背部 5 个部位行皮内注射,总量 0.5 mL,含 1 mL BCⅡ型胶原。第 7 天后同法 0.5 mL 加强注射。

1.5 分组及给药方法 初次免疫后第 21 d,通过观察大鼠四肢关节肿胀情况,分别对 40 只 SD 大鼠进行关节炎指数(AI)评分(标准见后)。AI > 4 分被认为造模成功。选取 30 只按性别匹配随机分为 5 组,独活组[按顺序分为低剂量(1.5 g · kg⁻¹)组、中剂量(4.5 g · kg⁻¹)组和大剂量(15 g · kg⁻¹)组]、甲胺喋呤(B)组和生理盐水(C)组,每组 6 只。A1-3 组独活粉剂与温水配成相应浓度的混悬液,每只 2 mL · d⁻¹,甲胺喋呤组(B)组,按 2.5 mg · kg⁻¹剂量(研粉生理盐水混均)每周灌胃 1 次,共 4 次,其余时间每天以生理盐水灌胃 1 次,每次为 2 mL;生理盐水(C)组,每天以生理盐水 2 mL 灌胃 1 次。30 天后处死动物,收集动物胃、血清和关节滑膜进行相关指标观察。

1.6 观察指标及观察方法

1.6.1 一般情况 造模及药物治疗前后观察大鼠体毛色泽,神志,四肢活动,饮食变化。

1.6.2 足趾容积 致炎前用足趾容积测量仪测大鼠双后足趾容积,初次免疫后 21 d 起,7 d 测 1 次,以足

趾容积改变作为观察指标。

1.6.3 关节炎指数(Arthritis index AI) 记录实验大鼠继发性关节炎的发生及严重程度,分 5 级:0 级,无红肿;1 级,足小趾关节红肿;2 级,趾关节、足跖部均红肿;3 级,踝关节以下均红肿;4 级,包括踝关节,全部红肿。初次免疫后 21 d 起,每 7 d 评分 1 次。

1.6.4 VEGF、MMP-3 及肝肾功能检测 给药 30 d 大鼠麻醉后经心脏取血,采集血清并分装,检测 VEGF、MMP-3(ELISA,严格按说明书操作)和谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肌酐(Cr)、尿素氮(Bun)、血常规,并做胃病理检查。

1.6.5 病理观察 给药 30 d,麻醉后处死大鼠,切取胃组织,甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察其病理变化。

2 结果

2.1 AI 评分 给药后 30 d,5 个组 AI 经方差分析, $F=3.684,P=0.017<0.05$ 。中、小剂量独活组 AI 小于生理盐水组,但差异无统计学意义;大剂量独活组 AI 小于生理盐水组($P=0.02<0.05$),小、中、大剂量独活组的 AI 呈递减趋势,但差异无统计学意义;甲胺喋呤组 AI 均小于生理盐水组、小、中、大剂量独活组, P 值分别为 0.004,0.014,0.035,0.531,即与生理盐水组、小、中剂量独活组比较差异显著(分别 $P<0.01,0.05,0.05$),而与大剂量独活组比较差异无统计学意义(表 1)。

表 1 不同观察时相各组 AI 评分比较表(分)

组别	只数	21 d	50 d
小剂量独活	6	8.67 ± 2.34	10.67 ± 3.44
中剂量独活	6	8.50 ± 2.18	10.00 ± 2.50
大剂量独活	6	9.00 ± 2.19	7.50 ± 2.43 ¹⁾
甲胺喋呤	6	8.50 ± 1.87	6.50 ± 1.38 ²⁾
生理盐水	6	8.30 ± 2.16	11.50 ± 3.40

注 1)与 C 组比较, $P<0.05$;2)与 C 组比较, $P<0.01$;3)与中、小剂量组比较, $P<0.05$

2.2 血清 VEGF、MMP-3 的测定结果 血清 VEGF 检测结果显示独活各剂量组血清差异不显著,但均显著低于生理盐水组(按大、中、小分别 $P<0.01,P<0.05,P<0.05$);甲胺喋呤组显著低于生理盐水组及小剂量独活组(分别 $P<0.01,P<0.05$),但与中、大剂量独活组比较差异不显著。血清 MMP-3 检测结果显示各独活剂量组比较差异不显著;独活小剂量组与生理盐水组差异不显著;独活中、大剂量组均低于生理盐水组(均 $P<0.05$);甲胺喋呤组低于生理盐水组及小剂

量独活组(均 $P < 0.01$),但与中、大剂量独活组比较无统计学差异(见表 2)。

2.3 血清 AST、ALT、Cr、Bun、血常规、胃病理检查结果 各组别肝功、肾功、血常规及胃病理均未见明显异常。

表 2 各组血清 VEGF、MMP-3 测定结果比较表

组别	只数	VEGF ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	MMP-3 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
小剂量独活	6	$199.00 \pm 38.31^{(1)}$	85.88 ± 10.98
中剂量独活	6	$190.50 \pm 38.31^{(1)}$	$75.92 \pm 13.20^{(1)}$
大剂量独活	6	$189.17 \pm 27.99^{(2)}$	$72.92 \pm 6.85^{(1)}$
甲胺喋呤	6	$157.00 \pm 15.74^{(2)(3)}$	$67.77 \pm 6.55^{(2)}$
生理盐水	6	241.50 ± 39.55	107.06 ± 18.54

注 VEGF:1)与生理盐水组比较, $P < 0.05$;2)与生理盐水组比较, $P < 0.01$;3)与小剂量组比较, $P < 0.05$ 。MMP-3:1)与小剂量组、生理盐水组比较, $P < 0.05$;2)与小剂量组、生理盐水组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

CIA 大鼠的关节组织病理学及血中免疫学变化与人类 RA 相似,为一种典型的免疫性关节炎模型,是研究 RA 的理想模型之一。RA 以慢性滑膜增生为特点,主要表现为滑膜衬里层细胞增生、炎性细胞浸润以及滑膜下层血管生成,进而导致关节组织包括肌腱、关节囊、软骨和骨的进行性和不可逆性破坏,而这些关节组织的破坏与结缔组织细胞间质的降解以至溶解有密切关系。在 RA 早期,增生的滑膜组织向关节软骨面生长,并侵蚀关节软骨形成血管翳。血管翳含有大量成纤维细胞,可释放 MMP-3 引起骨组织的破坏。王晓霞等^[3]认为在患者血清中 MMP-3 高水平存在可作为反映病情活动的指标。血管内皮生长因子(VEGF),是一种细胞来源广泛的功能性糖蛋白,它具有强大的促血管增生和增强血管通透性的功能,VEGF 具有两项重要的生理功能:①促进血管内皮细胞的有丝分裂,从而促进新生血管的形成;②增强血管的通透性,促进血管内物质的渗出,从而促进炎症的形成和发展。它可能与其他生物因子一起构成一个复杂的网络,共同促进炎症的发展,促使滑膜血管翳形成,在 RA 的病理过程中发挥重要作用。Paleolog^[4]认为 VEGF 在 RA 的滑膜血管翳的形成过程中可能起关键作用,它是联系各种炎性因子的枢纽,直接促进滑膜组织新生血管形成,增强血管通透性,引起 RA 滑膜组织生物行为的改变。Maeno^[5]等检测了一组青少年多关节性 RA 的外周血 VEGF 水平,并与患者的关节受累范

围,病情进行相关分析后发现:VEGF 值越高,受累的关节数目越多,关节病变越重。所以 VEGF 可以作为反映 RA 病情程度的一项指标。

中药独活,伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根。主产于四川、湖北、安徽等地。现代药理研究认为独活有抗炎、镇痛及镇静作用;对血小板聚集有抑制作用;并有降压作用,但不持久;所含香柑内酯、花椒毒素等有光敏及抗肿瘤作用。中药学对其药性论述:味辛、苦,性微温;具有祛风除湿、通痹止痛的功效;主要用于治疗风寒湿痹,腰膝疼痛,少阴伏风头痛等病症;内服煎汤常用剂量为 3~10 g。《神农本草经》将其列为上品,主风寒所击,金疮止痛,奔豚,痼瘕,女子疝瘕,久服轻身耐老。天津中医学院王士福教授认为独活“不但有疏风散湿之功,若用至 60 g 既有镇痛之神效又无副作用”。但对其剂量与疗效相关性及其可能副作用至今仍未有实验予以论证。

我们的研究发现独活大剂量(相当于每 50 kg 100 g 的成人量)能有效抑制 CIA 大鼠足肿胀、降低关节炎指数 AI,而 AI 是反映关节炎程度和判断药物作用简单且有效的指标,说明其具有良好的抗 RA 作用;中大剂量(相当于 30~100 g 50 kg 的成人量)亦能明显降低血清 VEGF、MMP-3 水平,且无明显的肝肾功、血常规、胃组织损害,但一般剂量(相当每 50 kg 10 g 的成人量)独活抗炎并不明显。

4 参考文献

- [1] Vogel HG, Vogel WH. 药理实验指南—新药发现和药理学评价[M]. 杜冠华,李学军,张永祥,等译. 北京:科学出版社,2001:577-589.
- [2] 汤文璐,李俊,徐叔云,等. II 型胶原蛋白与弗氏完全佐剂大鼠关节炎模型的建立和比较[J]. 中国实验动物学报,1997(1):1-6.
- [3] 王晓霞,李小峰,王来远,等. 类风湿关节炎血清基质金属蛋白酶-3 水平及其影响因素的探讨[J]. 中华风湿病学杂志,2004,8(1):16-19.
- [4] Paleolog EM. Angiogenesis: a critical process in the pathogenesis of RA: a role for VEGF? [J]. Br J Rheumatol, 1996,35(10):917-919.
- [5] Maeno N, Takei S, Imanaka H. Increased circulating vascular endothelial growth factor is correlated with disease activity in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 1999,26(10):2244-2248.

(2011-07-21 收稿 2011-10-08 修回)