

通痹 1 号方对实验性类风湿关节炎大鼠血清 IL-18 与 VEGF 水平的影响

郑宝林, 李婷, 刘奔流, 郭奇虹, 陈君立
(佛山市中医院风湿科, 广东 佛山 528000)

【摘要】 目的 研究通痹 1 号方对实验性类风湿关节炎(RA)大鼠血清白介素(IL)-18 与血管内皮生长因子(VEGF)水平的影响。方法 选取 50 只清洁级 Wistar 大鼠,按随机数表法分为正常组 10 只、实验组 10 只、对照组 10 只与模型组 20 只。模型组、对照组和实验组使用牛Ⅱ型胶原-完全弗氏佐剂法建立 Wistar 大鼠 RA 动物模型。实验组予通痹 1 号方灌胃,对照组予雷公藤多苷灌胃;模型组与正常组均予等体积蒸馏水灌胃。酶联免疫法检测模型组($n=10$)不同时间点(建模后 1 d、7 d 与 14 d)血清 IL-18 的含量;酶联免疫法检测各组大鼠药物干预前后血清 IL-18 与 VEGF 的含量。使用关节炎指数与病理评分法评价各组大鼠药物干预后病理改变情况。结果 药物干预前,模型组 RA 大鼠血清 IL-18 建模后 1 d、7 d、14 d 分别为 (24.68 ± 3.67) pg/mL、 (47.31 ± 4.27) pg/mL、 (70.91 ± 6.13) pg/mL,呈浓度-时间正相关性($y=23.11x+1.40$, $R>0.99$)。药物干预后,实验组和对照组大鼠血清 VEGF [(86.47 ± 5.04) pg/mL vs (101.56 ± 7.36) pg/mL]与 IL-18 [(34.83 ± 2.72) pg/mL vs (42.72 ± 4.22) pg/mL]水平比较,实验组明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。此外,实验组药物干预后大鼠关节炎指数明显低于对照组 [(5.50 ± 0.85) 分 vs (6.60 ± 0.84) 分],差异有统计学意义($P<0.05$);而且实验组大鼠病理学评分亦明显低于对照组 [(1.30 ± 0.48) 分 vs (1.50 ± 0.53) 分],差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 通痹 1 号方能够抑制 RA 大鼠炎症进展与膝关节病变,其作用与减少 RA 大鼠 IL-18 的分泌和 VEGF 的过度表达相关。

【关键词】 大鼠;类风湿关节炎;通痹 1 号;白介素-18;血管内皮生长因子

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)03-0297-03

Effect of Tongbi First Decoration on the serum concentrations of IL-18 and VEGF in rats with rheumatoid arthritis. ZHENG Bao-lin, LI Ting, LIU Ben-liu, GUO Qi-hong, CHEN Jun-li. Department of Rheumatology, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Tongbi First Decoration (TFD) for treating rheumatoid arthritis (RA) on the serum concentrations of interleukin (IL)-18 and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** Fifty SPF Wistar rats were divided into normal group ($n=10$), model group ($n=20$), control group ($n=10$) and test group ($n=10$) by random number table. Rats in model group, control group and test group were treated with bovine II collagen (B II C) and complete Freund's adjuvant (CFA) for establishment of RA rat models. Rats in test group were then treated with TFD, while those in control group were treated with tripterygium glycosides. Rats in model and normal group were treated with isometric distilled water. The serum concentrations of IL-18 at different time points (1 d, 7 d and 14 d after modeling) were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Then the serum concentrations of IL-18 and VEGF before and after medication were tested by ELISA. Arthritis index and pathological score were collected for evaluation of pathological change. **Results** Before medication, the serum concentrations of IL-18 at 1 d, 7 d and 14 d after modeling in model group were (24.68 ± 3.67) pg/mL, (47.31 ± 4.27) pg/mL, (70.91 ± 6.13) pg/mL, showing a positive correlation with time ($y=23.11x+1.40$, $R>0.99$). After medication, the serum concentrations of VEGF and IL-18 were (86.47 ± 5.04) pg/mL, (34.83 ± 2.72) pg/mL in test group, versus (101.56 ± 7.36) pg/mL, (42.72 ± 4.22) pg/mL in the control group ($P<0.05$). Moreover, after medication, the arthritis index and pathological score of test group was significantly lower than those in the control group: (5.50 ± 0.85) vs (6.60 ± 0.84) , (1.30 ± 0.48) vs (1.50 ± 0.53) , $P<0.05$. **Conclusion** Tongbi first decoration could inhibit the inflammatory development and the changing of knee joint in RA rats, which was related to the decrease of the overexpression of IL-18 and VEGF.

【Key words】 Rat; Rheumatoid arthritis (RA); Tongbi first decoration; Interleukin-18 (IL-18); Vascular endothelial growth factor (VEGF)

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是临床常见的慢性自身免疫性疾病,由于其对患者关节造成严重功能障碍,具有致残性的特点,故而严重影响患者的生活质量与临床结局^[1]。RA的发病机理尚未阐明,目前研究主要以炎症机制与受累关节病理损伤为主要突破口,改善炎症发生进展与逆转病理改变是治疗

RA的重点手段^[2]。通痹 1 号方是课题组的临床验方,前期临床研究表明,其能改善类风湿关节炎患者的临床症状,具有除痹止痛的作用^[3]。为此,通过研究通痹 1 号方对胶原诱导的关节炎模型的作用,探讨其在改善滑膜血管增生等病理变化的作用与机理,为中医药治疗 RA 提供基础研究依据。

基金项目:2014 年广东省公益研究与能力建设专项资金项目(编号:20140212)

通讯作者:郑宝林。E-mail:voa2000@163.com

1 材料与方法

1.1 动物与分组 清洁级 Wistar 大鼠, 50 只, 雌性, 体质量(200.00±20.00) g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2013-0020, 适应喂养 1 周, 饲养条件: 温度为 25℃, 湿度为 70%。适应喂养后, 随机分为正常组、实验组与对照组, 每组 10 只, 模型组 20 只。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂: 完全弗氏佐剂(购自美国 Sigma 公司, 配方型号: F5881); 牛 II 型胶原(购自美国 Sigma 公司); 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、白介素(interleukin, IL)-18 酶联免疫试剂盒(购自上海信帆生物科技有限公司); 雷公藤多苷片由湖南协力药业有限公司生产, 国药准字 243020138, 规格: 10 mg/片; 通痹 1 号方水煎液由佛山市中医院制剂室生产。主要仪器: 全波长多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司; 高速离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 动物造模 模型组、实验组与对照组的 Wistar 大鼠采用 5% 水合氯醛 0.8 mL/100 g 进行腹腔麻醉, 参考《药理学实验方法》^[4], 采用牛 II 型胶原混合物(含有 1 mg/mL 浓度牛 II 型胶原的完全弗氏佐剂混合物)进行诱导: 第 1 天在大鼠左足足底皮下注射 0.1 mL 牛 II 型胶原混合物, 压迫注射部位; 第 7 天在尾根部注射 0.1 mL 牛 II 型胶原混合物, 压迫注射部位, 从而完成造模。其中, 评价造模成功方法是前肢或对侧肢体或尾部出现红肿或炎性结节。而正常组则给予等体积生理盐水注射。

1.4 治疗干预 造模成功后第 1 天, 实验组按照 2 mL/kg 剂量的通痹 1 号方定容至 6 mL 水溶液分两次灌胃; 对照组按照 1 mg/kg 剂量的雷公藤多苷定容至 6 mL 水溶液分两次灌胃; 模型组与正常组均予等体积蒸馏水分两次灌胃。灌胃时间为上午 9:00 与下午 5:00, 连续治疗 14 d。实验期间常规饲养, 自由饮食。

1.5 观察指标与检验方法 模型组在造模后 1 d, 造模成功当天、造模成功后 7 d 随机选择组内 8~10 只大鼠检测血清 IL-18 含量水平。另外各组分别在造模成功当天(即药物干预前)与药物干预后当天采用 ELISA 法检测 IL-18 含量水平。其中, 采用 5% 水合氯醛 0.8 mL/100 g 进行腹腔麻醉; 抽取腹主动脉血, 静置 0.5 h 后离心, 取上清液备测, 检测步骤按照试剂盒说明书进行。常规 10% 福尔马林固定 2 h, 梯度酒精脱水后予二甲苯透明, 常规石蜡包埋切片, 苏木精-伊红法染色, 光镜下观察关节滑膜增生、炎性细胞浸润、软骨骨质破坏及关节周围组织水肿等病理学变化并进行评分。评分标准: 0 分, 关节具有正常的结构, 如关节间隙、软骨、骨和滑膜组织等; 1 分, 关节组织中有纤毛形成和轻度的关节炎, 并有滑膜增生, 血管数量增加, 以及小的炎性细胞灶, 无软骨和骨的侵蚀破坏; 2 分, 关节有软骨的侵蚀破坏, 有中度的关

节炎症, 有大量炎细胞浸润, 滑膜增生和血管翳形成较严重, 无骨破坏, 关节结构无破坏; 3 分, 有严重的血管翳形成, 广泛的软骨侵蚀破坏, 可见骨、关节结构破坏^[5]。

1.6 统计学方法 应用 SPSS20.0 软件进行统计学分析, SigmaPlot12.0 进行图表绘制。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 线性关系采用拟合曲线比较, 组间差异采用 Oneway ANOVA 检验, 两两比较采用 LSD 检验。线性关系以 $R>0.99$ 表示存在正比例关系, 检验结果以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 大鼠血清 IL-18 的表达情况 RA 大鼠造模后 1 d 血清 IL-18 浓度为(24.68±3.67) pg/mL, 造模成功当天血清 IL-18 浓度为(47.31±4.27) pg/mL, 而造模成功后 7 d 血清 IL-18 浓度为(70.91±6.13) pg/mL, 经拟合线性关系, 得出: $y=23.11x+1.40$, $R=0.9998>0.99$, 提示造模成功前后 7 d, 大鼠 IL-18 血清浓度呈时间正比趋势上升, 见图 1。

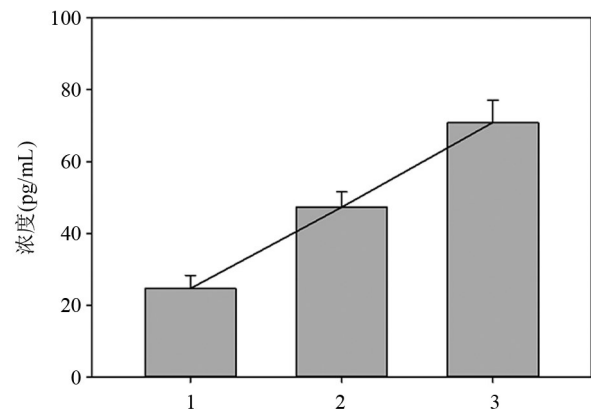


图 1 RA 大鼠血清 IL-18 的表达情况

注: 1, 造模后 1 d; 2, 造模成功当天; 3, 造模成功后 7 d。

2.2 各组大鼠干预前后血清 VEGF 和 IL-18 水平比较 干预前, 模型组大鼠血清 VEGF 与 IL-18 水平明显高于正常组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。干预前, 实验组、对照组及模型组血清 VEGF 与 IL-18 水平比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 提示具有可比性。干预后, 实验组与对照组血清 VEGF 与 IL-18 水平均明显低于模型组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。而实验组大鼠血清 VEGF 与 IL-18 水平明显低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠血清 VEGF 和 IL-18 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	VEGF (pg/mL)		IL-18 (pg/mL)	
		干预前	干预后	干预前	干预后
正常组	10	59.62±6.64	60.81±6.77	15.33±2.26	16.03±2.32
模型组	20	128.44±6.80	156.07±5.90 ^b	52.89±4.81	96.80±7.92 ^b
实验组	10	126.90±5.85	86.47±5.04 ^{a,b}	51.22±4.00	34.83±2.72 ^{a,b}
对照组	10	126.40±5.57	101.56±7.36 ^a	52.57±4.61	42.72±4.22 ^{a,b}
F 值		0.31	351.35	0.39	387.99
P 值		0.74	0.00	0.68	0.00

注: 与模型组比较, ^a $P<0.05$; 与干预前比较, ^b $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠病理学评分比较 干预前,实验组、对照组与模型组关节炎指数与病理学评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。干预后,实验组与对照组关节炎指数明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。干预后各组大鼠 HE 染色病理结果见图2。正常组大鼠膝关节滑膜细胞排列均匀,没有出现增生病变,淋巴细胞、浆细胞浸润表现不明显。模型组大鼠滑膜细胞出现明显增生病变,排列较紊乱,可见炎性细胞浸润。实验组大鼠滑膜细胞没有出现明显增生病变,排列稍紊乱,可见少量炎性细胞浸润。对照组大鼠滑膜细胞偶尔出现明显增生病变,排列较紊乱,可见少-中量炎性细胞浸润。模型组大鼠病理学评分明显高于正常组,提示牛 II 型胶原诱导的

关节炎大鼠模型成功造模。药物干预后,实验组与对照组大鼠病理学评分明显低于模型组,而且,实验组大鼠病理学评分明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表2 各组大鼠关节炎指数和病理学评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	关节炎指数(分)		病理学评分(分)	
		干预前	干预后	干预前	干预后
正常组	10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	20	8.20±0.79	9.10±0.74 ^b	2.30±0.48	2.60±0.52
实验组	10	8.00±0.82	5.50±0.85 ^{ab}	2.50±0.53	1.30±0.48 ^{ab}
对照组	10	8.10±1.10	6.60±0.84 ^{ab}	2.40±0.52	1.50±0.53 ^{ab}
F值		0.12	51.62	0.39	18.90
P值		0.89	0.00	0.68	0.00

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与干预前比较,^b $P<0.05$ 。

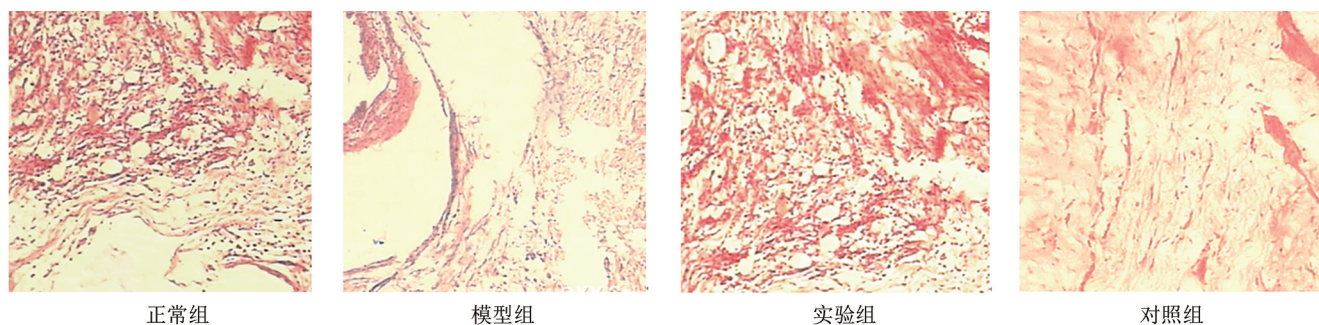


图2 干预后各组大鼠 HE 染色病理结果($\times 400$)

3 讨论

RA 的临床表现主要是关节红肿热痛、活动不利、僵硬受限,继而关节畸形和功能障碍,为一种致残率较高的自身免疫性疾病。研究认为,RA 患者炎症反应持续进展的病理机制与 Toll 样受体通路相关,作为固有和获得性免疫的信号受体,其能促进炎症细胞因子的表达,在受到外界刺激的作用下,免疫稳态会失去平衡从而介导 RA 炎症的发生发展^[6]。研究还表明,VEGF 在滑膜血管中高度表达,是维持其生物稳态的重要因子^[7]。RA 滑膜中主要由巨噬细胞和成纤维样细胞分泌 VEGF,其过度表达是 RA 滑膜血管炎症持续发展并导致软骨破坏的重要因素。由此可见,Toll 样细胞通路调节炎症反应与 VEGF 的过度表达是 RA 患者迁延难愈与恶化的重要机理,通过抑制 Toll 样细胞通路相关因子的分泌与 VEGF 的过度表达有助于防治 RA。

本研究结果表明,大鼠造模后 IL-18 血清水平呈时间上升趋势。IL-18 是 Toll 样细胞信号的下游促炎因子,在滑膜巨噬细胞中高度表达。研究认为,Toll 受体能够有效识别外来刺激因素而被活化,从而激活核转录因子介导 IL-18 的分泌增加^[8]。结合本研究结果,RA 大鼠的炎症反应随着时间的增加而进展,体现在 IL-18 的分泌增加从而促进炎症的发展。另外,研究显示,IL-18 656G/T 点突变是 RA 易感性的危险因素,故降低 IL-18 的分泌对防治 RA 具有重要作用^[9]。本研究结果还表明,通痹 1 号方能够显著减少 RA 大鼠模型血清 IL-18 的浓度水平,同时还能显著降低 RA 大鼠关节炎指数,有显著抑炎作用。本研究结果则表明,通

痹 1 号方能够显著改善 RA 大鼠病理学评分,改善甚至逆转滑膜增生、炎性细胞浸润等病理改变,能够显著降低 RA 大鼠 VEGF 血清水平,故而具有抑制 RA 局部病变进展的作用。

综上所述,通痹 1 号方能够抑制 RA 大鼠炎症进展与膝关节病变,其作用与减少 RA 大鼠 IL-18 的分泌和 VEGF 的过度表达相关。

参考文献

- [1] Sawaguchi Y, Hirata K, Suzuki R, et al. Suppression of murine collagen-induced arthritis by vaccination of synovial vascular endothelial cells [J]. Life Sci, 2013, 92(23): 1125-1130.
- [2] 王娟,刘瑞洪,肖红波,等. 类风湿关节炎大鼠血清 Th1/Th2 水平及意义[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(2): 246-247
- [3] 郑宝林,张小娟,余俊文,等. 通痹 1 号丸治疗类风湿性关节炎 60 例的临床观察[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(22): 3350-3351.
- [4] 朱玉芳,裴银辉,周芳媛,等. Wistar 大鼠福氏佐剂性类风湿关节炎动物模型研究[J]. 华北理工大学学报(医学版), 2016, 18(5): 337-340.
- [5] 张卫东,王丕敏,韩润霞,等. 火针治疗类风湿关节炎大鼠疗效及安全性评价[J]. 中国针灸, 2013, 33(4): 334-338.
- [6] 熊丽,杜肖,陈宝忠,等. 脊痛宁胶囊对风寒湿痹型类风湿关节炎大鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 140-145.
- [7] 胡伟锋,王昌兴. 雷公藤内酯醇对类风湿关节炎大鼠的治疗作用及其网络药理学研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(12): 1408-1413.
- [8] 郑加田,朱凯,孙红胜,等. IL-18 和 MCP-1 基因多态性与类风湿关节炎易感性关系的 Meta 分析[J]. 山东大学学报(医学版), 2014, 52(6): 98-104.
- [9] 陈小文,易金萍,刘志强,等. IL-18 基因启动子区-656G/T 基因多态性与类风湿关节炎和哮喘的关系[J]. 广东医学, 2013, 34(21): 3290-3292.

(收稿日期:2017-08-01)