

本文引用:潘朝旺,王伟,万进军.金荞麦药酒对佐剂性关节炎大鼠氧自由基和免疫功能的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(4):361-364.

金荞麦药酒对佐剂性关节炎大鼠氧自由基和免疫功能的影响

潘朝旺¹,王伟²,万进军¹

(1.鄂州职业大学医学院药理学系,湖北 鄂州 436009;2.鄂州市中心医院药理学部,湖北 鄂州 436009)

[摘要] **目的** 研究金荞麦药酒对佐剂性关节炎模型大鼠的治疗效果,探讨其作用机制。**方法** 将大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组(每天灌胃雷公藤多苷片混悬液 0.03 g/kg),低、中、高剂量金荞麦组(每天灌胃金荞麦药酒 0.54、1.08、2.16 g/kg)。建立佐剂性关节炎模型 12 d 后给药 21 d,观察大鼠左后足跖肿胀体积,检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和足跖软组织 TNF- α 、前列腺素 E₂(PGE₂)、一氧化氮(NO)含量;流式细胞术分析脾脏淋巴细胞凋亡率,免疫组化法检测膝关节滑膜巨噬细胞密度。**结果** 与正常组比较,模型组足跖肿胀体积、血清 TNF- α 、MDA 和足跖软组织 TNF- α 、PGE₂、NO 水平、膝关节滑膜巨噬细胞密度明显升高($P<0.01$),血清 SOD、脾脏淋巴细胞凋亡率明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,金荞麦可明显降低足跖肿胀体积、TNF- α 、PGE₂、NO 水平和膝关节滑膜巨噬细胞密度,升高脾脏淋巴细胞凋亡率($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但 SOD、MDA 无明显变化($P>0.05$)。**结论** 金荞麦药酒治疗类风湿性关节炎的机制可能与调节 TNF- α 、PGE₂、NO 水平、膝关节滑膜巨噬细胞密度、脾脏淋巴细胞凋亡率有关。

[关键词] 佐剂性关节炎;金荞麦药酒;氧自由基;免疫功能;流式细胞术

[中图分类号] R285.5;R593.21

[文献标识码] B

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.04.004

Effects of Fagopyrum Dibotrys Medicinal Liquor on Oxygen Free Radicals and Immune Function in Adjuvant Arthritis Rats

PAN Chaowang¹, WANG Wei², WAN Jinjun¹

(1. Ezhou Polytechnic, Ezhou, Hubei 436009, China; 2. Ezhou Central Hospital, Ezhou, Hubei 436009, China)

[Abstract] **Objective** To study the therapeutic effects of Fagopyrum dibotrys medicinal liquor on adjuvant arthritis rats, and to explore the mechanism. **Methods** The rats were randomly divided into the normal group, model group, positive control group (with oral tripterygium glycosides 0.03 g/kg every day), low, middle and high dose group of fagopyrum dibotrys medicinal liquor. After 12 days of building adjuvant arthritis rat models, the rats were administered for 21 d. The left hind paw swelling volume were observed, and serum TNF- α , SOD, MDA and plantar soft tissue TNF- α , PGE₂, NO were measured. The lymphocyte apoptosis rate was detected by flow cytometry and the synovium macrophages density of knee-joint were also detected by immunohistochemical method. **Results** Compared with the normal group, the left hind paw swelling volume, serum TNF- α , MDA and plantar soft tissue TNF- α , PGE₂, NO, synovium macrophages density of knee-joint significantly increased in model group ($P<0.01$). But the serum SOD and the lymphocyte apoptosis rate significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the left hind paw swelling volume, TNF- α , PGE₂, NO and synovium macrophages density of knee-joint significantly decreased and the lymphocyte apoptosis rate significantly increased in Fagopyrum dibotrys medicinal liquor group ($P<0.05$ or $P<0.01$), but SOD and MDA had no obvious changes ($P>0.05$). **Conclusion** The mechanism of fagopyrum dibotrys medicinal liquor for rheumatoid arthritis maybe related to adjust the TNF- α , PGE₂, NO, lymphocyte apoptosis rate and synovium macrophages density of knee-joint.

[Keywords] adjuvant arthritis; Fagopyrum dibotrys medicinal liquor; oxygen free radicals; immune function; flow cytometry

[收稿日期] 2016-07-21

[基金项目] 湖北省教育厅科学技术研究项目(B2014176)。

[作者简介] 潘朝旺,男,副教授,主要从事中药药理研究, E-mail:455128707@qq.com。

类风湿关节炎(rheumatic arthritis,RA)是一种以关节滑膜炎和关节外病变为主要临床表现的自身免疫性疾病,可导致关节破坏、畸形和残疾。金荞麦具有祛风湿、润肺补肾等功效,在民间,有RA患者将金荞麦泡成药酒服用,效果明显。本实验旨在研究金荞麦药酒对佐剂性关节炎模型大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和足跖软组织 TNF- α 、前列腺素 E2(PGE₂)、一氧化氮(NO)含量、脾脏淋巴细胞凋亡率及膝关节滑膜巨噬细胞密度的影响,探讨其抗RA作用机制。

1 材料与方 法

1.1 动物

8 周龄 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,体质量(200±20) g,SPF 级,由三峡大学实验动物中心提供,使用许可证号:SYXK(鄂)2011-0012。

1.2 药品与试剂

金荞麦药酒,鄂州职业大学医学院制备,乙醇浓度为 42.3%,每毫升药酒相当于金荞麦原药材 0.4 g,该药酒在民间的成人剂量为每天约 6 g(以原生药计),相当于本药酒 15 mL;SOD、MDA、考马斯亮蓝试剂盒(批号:20150315),TNF- α 、PGE₂ ELISA 试剂盒(批号:20150327),上海拜力生物科技有限公司;ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(批号:20150309),天津百浩生物科技有限公司;ED1 单抗(标记巨噬细胞),AEC 显色试剂盒(批号:20150322),武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器

COULTEREPICSXL 流式细胞仪,美国;PV-200 型足容积测定仪,成都泰盟科技有限公司;9602A 酶标仪,南京普朗医用设备有限公司;UV754 紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;HS2046 病理切片机,金华市华速科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 动物造模及分组给药 采用随机数字表法抽取大鼠 10 只,为正常组,其余 70 只建立佐剂性关节炎模型^[1],在无菌条件下向每只大鼠左右后肢足跖部注射完全弗氏佐剂 0.1 mL,12 d 后,观察造模大鼠,同正常组相比,食量减少,体质量增长缓慢,精神不振,两侧后踝关节出现明显肿胀,行动不便,说明造模成功。挑选造模成功的大鼠 50 只随机分为 5 组,即模型组,阳性对照组,金荞麦低、中、高剂量组。每天灌胃雷公藤多苷片混悬液 0.03 g/kg

(相当于成人剂量 3 倍,该药成人剂量为每天 0.11 g)给予阳性对照组,低、中、高剂量金荞麦组每天灌胃不同浓度金荞麦药酒 0.54、1.08、2.16 g/kg(相当于成人剂量 1、2、4 倍),正常组、模型组每天灌胃生理盐水 10 mL/kg。均连续给药 21 d。

1.4.2 足跖肿胀体积测定 观察并记录致炎后第 12、18、25、32 天各组大鼠左后足跖肿胀体积。参照文献[2]采用排水容积法测定大鼠足趾和关节的容积。

1.4.3 测定血清 TNF- α 、SOD、MDA 末次给药 2 h 后,处死大鼠,取血 5 mL,3 500 r/min 离心 10 min,离心半径 6 cm,取上清液按试剂盒说明测定血清中 TNF- α 、SOD、MDA 水平。

1.4.4 足跖软组织 PGE₂、NO、TNF- α 检测 剪下左后足掌,取足跖软组织 100~200 mg,剪碎,放入匀浆器,加 9 倍生理盐水制备匀浆,离心 10 min,取上清液按试剂盒说明测定 PGE₂、NO、TNF- α 含量。

1.4.5 检测脾脏淋巴细胞凋亡 按文献方法^[3],取大鼠脾脏,称质量,生理盐水冲洗,加磷酸盐缓冲液研磨,过 100 目筛,1 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液,向沉淀中加适量红细胞裂解液,静置 5~6 min,再 1 000 r/min 离心 10 min,用加入 10%胎牛血清 1 640 完全培养液重悬细胞,调整细胞浓度 2×10^6 个/mL,取上述液体 0.1 mL 按 ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书操作,流式细胞仪检测分析。

1.4.6 膝关节滑膜 ED1 免疫组化染色及巨噬细胞计数 取大鼠右后肢膝关节,暴露膝关节,用手术剪沿髌骨周围将整块滑膜剪成条状,固定,石蜡包埋切片,SP 染色法进行 ED1 免疫组化染色,AEC 显色,显微镜下观察滑膜衬里层 ED1 阳性细胞分布密度(细胞数/mm²滑膜)。

1.5 数据统计

数据用 SPSS 17.0 软件进行统计处理,各实验组数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 *T* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对足跖肿胀体积的影响

造模 12 d 后,与正常组比较,模型组肿胀明显($P < 0.01$),提示造模成功;造模 18、25、32 d 后,除金荞麦低剂量组外,各给药组与模型组比较,足跖肿胀体积明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。阳性对照组、金荞麦中、高剂量组从造模 25 d 开始,与造模 12 d 比较,足跖肿胀体积明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表1 金荞麦药酒对大鼠足跖肿胀体积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	不同时间足跖肿胀体积(mL)			
	12 d	18 d	25 d	32 d
正常组	1.24±0.07**	1.26±0.07**	1.27±0.08**	1.29±0.08**
模型组	1.57±0.10	1.60±0.09	1.62±0.10	1.59±0.11
阳性对照组	1.56±0.09	1.50±0.10*	1.45±0.09**▲	1.43±0.08**▲▲
金荞麦低剂量组	1.58±0.09	1.55±0.09	1.53±0.09	1.53±0.10
金荞麦中剂量组	1.57±0.10	1.52±0.09	1.49±0.08**▲	1.48±0.09**▲
金荞麦高剂量组	1.57±0.10	1.49±0.10*	1.45±0.07**▲	1.42±0.07**▲▲

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与造模 12 d 比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

2.2 对血清 TNF- α 、SOD、MDA 的影响

与正常组比较,模型组 TNF- α 、MDA 水平明显升高($P<0.01$),SOD 水平明显降低($P<0.01$);与模型组 TNF- α 比较,阳性对照组和金荞麦高、中剂量组明显下调($P<0.01$),金荞麦低剂量组下调不明显;与模型组 SOD、MDA 比较,各给药组无明显差异。见表 2。

表2 金荞麦药酒对大鼠血清 TNF- α 、SOD、MDA 的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	TNF- α (pg/mL)	SOD		MDA	
		(U/mg)	(nmol/mg)	(nmol/mg)	(nmol/mg)
正常组	265.5±79.50**	208.7±13.48**	14.54±0.54**		
模型组	394.3±121.1	137.3±12.65	21.44±0.98		
阳性对照组	285.4±95.42**	122.4±13.83	21.93±0.87		
金荞麦低剂量组	359.3±119.6	126.9±13.71	20.51±0.84		
金荞麦中剂量组	307.9±86.45**	133.1±16.35	22.22±0.91		
金荞麦高剂量组	288.7±86.22**	124.3±15.62	21.22±0.76		

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.3 对足跖软组织 PGE₂、NO、TNF- α 的影响

与正常组比较,模型组 PGE₂、NO、TNF- α 明显升高($P<0.01$);与模型组比较,除金荞麦低剂量组外,阳性对照组和金荞麦高、中剂量组 PGE₂、NO、TNF- α 明显下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见表 3。

表3 金荞麦药酒对大鼠足跖软组织 PGE₂、NO、

TNF- α 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	TNF- α 的影响		
	PGE ₂ (pg/mL)	NO(μ mol/mL)	TNF- α (pg/mL)
正常组	11.27±4.25**	24.59±8.22**	28.30±8.64**
模型组	30.58±12.36	49.55±15.36	56.41±16.33
阳性对照组	16.44±7.32**	32.06±12.52**	35.66±14.50**
金荞麦低剂量组	25.19±11.30	43.25±14.88	44.17±15.85*
金荞麦中剂量组	19.65±8.03*	35.12±17.33*	38.33±14.20**
金荞麦高剂量组	15.26±6.48**	30.53±13.42**	36.23±12.87**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.4 对大鼠脾脏淋巴细胞凋亡的影响

与正常组比较,模型组脾脏淋巴细胞凋亡率明显

降低($P<0.01$);与模型组比较,各剂量金荞麦组和阳性对照组脾脏淋巴细胞凋亡率明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 4。

2.5 对大鼠膝关节滑膜巨噬细胞的影响

与正常组比较,模型组巨噬细胞密度明显升高($P<0.01$);与模型组比较,各剂量金荞麦组和阳性对照组巨噬细胞密度明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 4。

表4 金荞麦药酒对大鼠脾脏淋巴细胞凋亡、膝关节滑膜

巨噬细胞的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	巨噬细胞的影响	
		脾淋巴细胞 凋亡率(%)	巨噬细胞 (个/mm ²)
正常组	生理盐水	22.85±4.13**	7.30±3.40**
模型组	生理盐水	16.52±2.21	75.3±36.4
阳性对照组	0.03	20.98±1.94**	25.1±12.3**
金荞麦低剂量组	0.56	19.15±2.02*	42.3±21.3*
金荞麦中剂量组	1.08	19.49±1.64*	35.2±19.6*
金荞麦高剂量组	2.06	21.13±2.24**	23.5±11.2**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3 讨论

常用 RA 动物模型较多^[4],本研究采用的是佐剂性关节炎动物模型。佐剂性关节炎大鼠病理变化与人体 RA 相似,是较公认的免疫性关节炎模型。

以 TNF- α 为代表的炎性因子在 RA 发病中占重要地位,在 RA 活动期或进展期呈高 RNA 的表达,而提高 Bmal1 和 Cry1 的表达^[5-6]。另外,RA 血管翳的形成与 TNF- α 有关,在滑膜组织细胞,TNF- α 可刺激滑膜组织滑膜细胞核软骨细胞中 IL-6、PGE₂、胶原酶和基质金属蛋白酶的合成,促进生长因子释放,引起 RA 患者免疫功能紊乱,局部炎症反应加剧,骨与软骨基质不可逆破坏,以及血管翳形成;同时使破骨细胞减少糖蛋白合成,增加糖蛋白降解,并产生胶原酶和其他中性蛋白酶,释放骨钙等,从而导致骨和软骨破坏。此外,TNF- α 作为促炎因子可激活内皮细胞、单核-巨噬细胞、T 细胞并产生趋化因子,诱导和募集更多的炎性细胞浸润,通过多环节、多途径引起局部关节骨与软骨炎症破坏。抗 TNF- α 单抗目前已经应用于治疗 RA 患者,效果良好。研究表明^[7],发生 RA 患者外周血中 TNF- α 水平明显高于正常人,有望成为 RA 活动的评价指标之一。

RA 患者体内 SOD 水平明显低于健康人,SOD 与 MDA 是相互对立的氧自由基相关因子,SOD 具

有清除体内氧自由基的作用,消除炎症,保护关节免受伤害,而MDA作用刚好相反。当机体SOD浓度偏低时,MDA会升高,过量的超氧阴离子就会引起疾病。本研究表明,模型组大鼠血清SOD水平明显低于正常组,MDA明显高于正常组;但各给药组包括阳性对照组与模型组比较,血清SOD和MDA没有明显差异,提示金荞麦药酒不是通过影响SOD和MDA来实现治疗RA的,因此,寻找和选择相关的阳性药物将是我们的后续研究任务之一。

NO是生物体内反应性极强的自由基,可通过精氨酸依赖的途径由活化的巨噬细胞合成和分泌,是一种效应分子,兼有第二信使和神经递质作用,具有广泛的生理作用。NO对免疫系统有双重作用,低水平时能够参与免疫应答的信息传递,而高水平时可引起细胞毒性作用,造成组织损伤,导致关节发生不同程度的病变。NO可促进巨噬细胞合成释放IL-1、TNF- α 等细胞因子,导致滑膜及炎性细胞产生和释放前列腺素增多。已经有研究表明,RA患者NO水平明显高于正常人,并且可能参与了RA的病变过程,与本实验的结果基本相符。

PGE₂是花生四烯酸的代谢产物之一,也是机体组织中普遍存在的炎症介质之一,在RA病理过程中起着非常重要的作用。PGE₂可促进类风湿滑膜成纤维细胞的分裂增殖,促成微血管新生;另外,PGE₂作为炎性因子,使血管通透性增加,引起组织水肿,在滑膜炎和血管翳的形成过程中全程参与,通过使用选择性COX-2抑制剂、减少PGE₂生成抗炎药已经成为治疗RA的常规用药之一^[8-9]。

在RA患者病变关节滑膜内,多种细胞出现异常增殖或凋亡^[10],其中巨噬细胞数量明显增多。其不仅与关节疼痛数、压痛数、血沉、C反应蛋白等反映RA病情程度的指标呈明显的正相关,还与X线关节破坏的侵蚀积分和狭窄积分呈明显的正相关,可能与其释放TNF- α 、IL-1、IL-6等炎性因子有关,这些炎性因子在触发滑膜细胞激活导致关节受损和诱导炎症过程中起重要作用^[11]。本实验同时显示,RA大鼠脾淋巴细胞凋亡率较正常大鼠明显降低,可能与RA是一种免疫性疾病有关,其机制有待进一步

研究。

综上所述,金荞麦药酒可降低佐剂性关节炎大鼠足跖肿胀体积,降低血清TNF- α 和足跖软组织TNF- α 、PGE₂、NO水平,调节膝关节滑膜巨噬细胞密度和脾脏淋巴细胞凋亡率,为其用于RA的治疗提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 车 萍,季旭明,梁 粟,等.独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用及血清中5-HTP,5-HIAA的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(19):170-173.
- [2] 田宇光,丁 立,秦斯民.雷氏消风祛湿巴布剂对大鼠佐剂性关节炎血清IL-1 β 、PGE₂水平的影响[J].南京中医药大学学报,2014,30(4):357-359.
- [3] 付晓倩,郑德华,魏玉香,等.长波紫外线联合补骨脂素诱导人脾脏淋巴细胞凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(6):826-828.
- [4] 李艳玲,祁 芳,许 明,等.常用类风湿关节炎动物模型研究概况及展望[J].湖南中医药大学学报,2015,35(4):63-66.
- [5] Becker T, Humpeler S, Baarsen L. The influence of TNF- α on the expression of genes of the molecular clock in the synovial tissue[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(1): A37-A38.
- [6] Yoshida K, Hashiramoto A, Okano T, et al. TNF- α modulates expression of the circadian clock gene Per2 in rheumatoid synovial cells[J]. Scand J Rheumatol, 2013, 42(4): 276-280.
- [7] 邓 琳,周金军,孙 婷.活动期类风湿关节炎患者血清IL-33和TNF- α 变化的临床意义研究[J].南通大学学报(医学版),2016,36(1):46-49.
- [8] 梁 江,马武开,刘正奇,等.黑骨藤乙醇提取物影响人类类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及COX-2、PGE-2表达的研究[J].时珍国医国药,2015,26(1):24-27.
- [9] Mc Cormack PL, Celecoxib. A review of its use for its use for symptomatic relief in the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis [J]. Drugs, 2011, 71(18): 2457.
- [10] Chen S, Yang Y, Feng H, et al. Baicalein inhibits interleukin1 β -induced proliferation of human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Inflammation, 2014, 37(1):163-169.
- [11] Rho YH, Chung CP, OeseR A, et al. Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2009, 61(11): 1580-1585.

(本文编辑 杨 瑛)