

雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍对大鼠佐剂性关节炎的免疫学研究*

★ 易剑峰¹ 吕爱平^{2**} (1. 宜春学院美容医学院药妆研发中心 宜春 336000; 2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所 北京 100700)

摘要:目的:从病理及免疫学的角度观察小剂量的雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍对大鼠佐剂性关节炎的影响,探讨能否通过减少雷公藤甲素的用量而降低药物的毒性。方法:将70只雄性SD大鼠随机分为7组(即正常组,模型组,雷公藤甲素高、低剂量组,雷公藤甲素双氢青蒿素高、中、低剂量组)。动物模型用弗氏完全佐剂于SD大鼠右后足跖皮内诱导关节炎发生。给药组治疗1个月后取血并处死动物,取关节进行病理学分析,并运用流式细胞术检测外周血T淋巴细胞亚群、免疫组化染色法检测踝关节软骨上的IL-6、TNF- α 的表达。结果:与模型组相比,雷公藤甲素双氢青蒿素配伍可明显抑制AA大鼠的关节病理损伤,能显著降低外周血CD₄⁺、CD₄⁺/CD₈⁺水平及降低踝关节软骨上的IL-6、TNF- α 的表达($P < 0.01$),且与雷公藤甲素高剂量组比较则无差异($P > 0.05$),优于雷公藤甲素低剂量组($P < 0.05$)。结论:通过与双氢青蒿素配伍可以减少雷公藤甲素的用量。

关键词:雷公藤甲素;双氢青蒿素;配伍;佐剂性关节炎;实验研究;免疫学

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Study on the Immunology of Triptolide and Dihydroartemisinin Compound Treating AA Rats

YI Jian-feng, LU Ai-ping

1. Cosmetology Medical College, Yichun University Yichun 336000

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700

Abstract: Objective: The present study was to explore the effect and the therapeutic mechanism of low dose triptolide and dihydroartemisinin compound on adjuvant-induced arthritis (AA) in rats from the pathological, immunological aspects. Through the study we explore the methods of decreasing triptolide's toxicity. Methods: 70 male SD rats were randomly divided into 7 groups (normal group, model group, triptolide high dose group, triptolide low dose group, triptolide and dihydroartemisinin compound high dose group, dihydroartemisinin compound middle dose group triptolide and dihydroartemisinin compatibility low dose group). Rheumatoid arthritis was induced by Freund's complete adjuvant (CFA) injected into right postpedes in rats. The rats in the model group and normal group were fed with physiological saline, and triptolide groups were fed with triptolide, and triptolide and dihydroartemisinin compound groups were fed with triptolide and dihydroartemisinin compound. After a month, all rats were being execute. The changes of T cell subsets in the serum were assayed by FACS Calibur flow cytometer. TNF- α , IL-6 levels in s cartilage of SD rats were detected with Immunohistochemical method. The pathological change of the knee and ankle joints of SD rats were detected by telescope. Results: Triptolide and dihydroartemisinin compound can significantly improve arthritis degradation. Compared with the AA model group, CD₄⁺ lymphocytes, the ratio of CD₄⁺/CD₈⁺ and the levels of TNF- α , IL-6 in cartilage of the compound groups were decreased. The effect of triptolide and dihydroartemisinin high dose group slightly surpasses Triptolide low dose group, and is similar to triptolide high dose group. Conclusion: through compound dihydroartemisinin we can decrease the dose of triptolide

Key words: Triptolide; Dihydroartemisinin; Compound; AA; Immunology

* 基金项目:国家863计划项目(2003AA2Z3514);江西省教育厅科技项目(GJJ08409)。

** 通讯作者:吕爱平,研究员, Tel: 010-64067611, Email: lap64017611@126.com.

雷公藤甲素(triptolide)是从雷公藤中分离出的活性最高的环氧化二萜内酯化合物,它对类风湿关节炎患者具有很好的疗效,其相关效价比雷公藤总苷高 100~200 倍^[1]。但它应用于临床在发挥药效作用的同时亦有很大的不良反应,其毒副作用主要表现在消化、泌尿、生殖、造血系统及皮肤等方面,且与剂量呈平行关系^[2]。

为了探索安全、高效、毒小的用药,我们选用较小剂量的雷公藤甲素与低毒的青蒿素衍生物双氢青蒿素配伍,拟从病理及免疫学的角度观察其对大鼠佐剂性关节炎(AA)的影响。

1 实验材料和方法

1.1 动物及药物

雄性 SD 大鼠,清洁级,6~8 周龄,体重(160~180)g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。雷公藤甲素(国家中药固体制剂中心药物分析室提供,纯度达 99.9% 以上),双氢青蒿素(北京万辉药业集团,批号:030707),雷公藤甲素双氢青蒿素(按比例自配),各受试药按剂量以蒸馏水溶解制成混悬液。 CD_4 、 CD_8 单克隆抗(CD_4 、 CD_8 由 PE 标记, Caltag 公司产品), IL-6、TNF- α 免疫组化试剂盒(sigma 公司产品)。

1.2 佐剂的制备

分别取羊毛脂与液体石蜡 7、14 ml 于 70℃ 水浴中充分混匀,高压灭菌(121℃, 1.1 kg/cm², 30 min)制成弗氏不完全佐剂(FIA),4℃ 冰箱保存。临用时将同一批号的 BCG7 支置于 70℃ 水浴中灭活 1 h,后置于研钵中,然后逐滴加入 FIA 充分研磨,研磨充分后,再以注射器推吸乳化约 1 h,配制成弗氏完全佐剂(CFA),含 BCG 20 mg/ml。

1.3 分组及给药

将实验大鼠随机分为 7 组,每组 10 只,分别为空白对照组、模型组、雷公藤甲素高剂量(8.2 μ g/kg 雷公藤甲素)、雷公藤甲素低剂量(4.1 μ g/kg 雷公藤甲素)、雷公藤甲素双氢青蒿素高剂量组(4.1 μ g/kg 雷公藤甲素,11.2 mg/kg 双氢青蒿素)、雷公藤甲素双氢青蒿素中剂量组(4.1 μ g/kg 雷公藤甲素,5.6 mg/kg 双氢青蒿素)、雷公藤甲素双氢青蒿素低剂量组(4.1 μ g/kg 雷公藤甲素,2.8 mg/kg 双氢青蒿素)。造模 2 周后开始给药,每组按 1 ml/100g 灌胃,一日一次,连续给药 28 d;正常和模型组给予同体积的生理盐水。

1.4 造模

每只取 0.1 ml 弗氏完全佐剂于 SD 大鼠右后足

跖皮内诱导关节炎发生。正常组足底假免疫时给予同体积的生理盐水。

1.5 主要仪器

冰冻切片机(LAIKA 型号:CM1850),Leica 图象分析仪(Leica microsystem Wetzlar GmbH, 型号:090-134.713-000),流式细胞仪(美国 Coulter 公司,型号:EPICS(XL))。

1.6 检测指标

1.6.1 踝关节病理观察 取所有动物的踝关节,福尔马林固定,EDTA 脱钙,酒精逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE 常规染色。光镜下观察滑膜、软骨、骨的病理改变。

1.6.2 T 淋巴细胞亚群水平测定 大鼠眼球取血,加肝素抗凝,分别取血 50 μ l 与 5 μ l CD_4 单克隆抗体和 5 μ l CD_8 单克隆抗体的离心管中震匀,4℃ 下保存 30 min;加入适量红细胞溶解液,1 000 r/min 离心 1.5 min,弃其上清;加入适量生理盐水以 1 000 r/min,离心 1.5 min,反复几次,以试管底部不见红色为度,过滤后上流式细胞仪检测。

1.6.3 关节 IL-6、TNF- α 水平测定 将经 EDTA 脱钙的踝关节冰冻切片,按照免疫组化试剂盒说明书进行做免疫组化。经免疫组织化学染色,观察踝关节软骨上的 IL-6、TNF- α 表达,用图像分析仪计数,每张切片取 6 个区域,基本保证所有被染上的特异性点都收集在内,又避免重复计数。特异性点面积与所取区域面积比值为我们所要的数值。

1.7 统计分析 试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 药物对 AA 大鼠踝关节病理影响

经治疗后,各用药组关节病理较之模型组均有明显减轻,光镜下可见滑膜细胞增生减轻,滑膜组织充血水肿明显减轻,血管增生和浸润炎细胞数量减少,血管翳形成显著减少;关节软骨面可见扁平层剥脱,剥脱软骨面较平整,软骨下骨的骨小梁大小、排列正常。雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍各剂量组总体情况与雷公藤甲素高剂量组相当。

2.2 药物对 AA 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响

如表 1 所示,模型组外周血 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 表达水平明显低于正常组,雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍能够明显地升高 AA 大鼠外周血 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 水平,且与雷公藤甲素高组比较无显著性差异,高、中剂量组明显优于雷公藤甲素低剂量组;

CD₄⁺ 各组间比较则无明显差异。

表1 大鼠外周血 T 细胞亚群比较 (%)

组别	n	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
正常组	10	31.80 ± 5.84 **	11.58 ± 3.71	2.81 ± 0.44 **
模型组	10	22.09 ± 5.71	10.99 ± 3.09	1.93 ± 0.56
雷公藤甲素高组	10	32.15 ± 5.80 ***	12.70 ± 4.28	2.69 ± 0.53 ***
雷公藤甲素低组	10	24.85 ± 4.01	11.05 ± 2.99	2.07 ± 0.43
高剂量组	10	31.97 ± 5.59 ***	11.03 ± 5.10	2.77 ± 0.57 ***
中剂量组	10	31.71.42 ± 4.67 ***	11.16 ± 3.77	2.69 ± 0.49 ***
低剂量组	10	29.42 ± 5.94 **	11.34 ± 3.52	2.57 ± 0.38 **

注: * 与模型组比较 $P < 0.05$ ** 与模型组比较 $P < 0.01$; # 与雷公藤甲素低剂量组比较 $P < 0.05$ 。

2.3 药物对 AA 大鼠踝关节局部 IL-6、TNF-α 的表达的影响

如表 2 所示,模型组大鼠关节局部 IL-6、TNF-α 表达明显高于正常组,雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍能显著抑制 IL-6、TNF-α 的关节表达。对于 IL-6,各用药组与雷公藤甲素高剂量组比较无明显差异,同时显著优于雷公藤甲素低组;对于 TNF-α,高、中剂量组与雷公藤甲素高组比较无明显差异,所有剂量组均显著优于雷公藤甲素低剂量组。

表2 大鼠踝关节 IL-6、TNF-α 的表达

组别	n	IL-6	TNF-α
正常组	10	0.026 ± 0.009 **	0.017 ± 0.005 **
模型组	10	0.054 ± 0.012	0.041 ± 0.007
雷甲素对照高组	10	0.027 ± 0.007 ***	0.021 ± 0.007 ***
雷甲素对照低组	10	0.047 ± 0.012	0.039 ± 0.009
高剂量组	10	0.032 ± 0.009 ***	0.024 ± 0.006 ***
中剂量组	10	0.033 ± 0.006 ***	0.026 ± 0.007 ***
低剂量组	10	0.037 ± 0.011 ***	0.031 ± 0.008 ***

注: ** 与模型组比较 $P < 0.01$; ▲ 与雷甲素高剂量组比较 $P < 0.05$; # 与雷公藤甲素低剂量组比较 $P < 0.05$, ## 与雷公藤甲素低剂量组比较 $P < 0.01$ 。

3 讨论

类风湿关节炎在中医学中属于痹证范畴,其发病机理认为是外邪(风寒湿)入络、伏邪逆攻入肢节脉络的络病,因此,通畅络脉,祛湿除热,是治疗类风湿性关节炎的治疗大法。雷公藤,味辛苦,性凉(或寒),入肝、脾二经,行十一经络,功能清热解毒杀虫,祛风除湿,舒筋活血通络,消肿止痛;青蒿芳香,清热透络、除湿,有引邪外出之功,使深伏阴分之邪透出阴分而解,两药配伍,使络脉通畅,伏邪得除。

现代医学认为类风湿关节炎是一种自身免疫性疾病,调解免疫异常是其治疗的关键。据报道青蒿素及青蒿素衍生物对动物体液免疫和细胞免疫均有明显的抑制作用,在临床上用于红斑狼疮等自身免疫性疾病的治疗,获得了一定的疗效^[3]。

T 细胞功能异常是本病的关键。通过对 T 细胞亚群的观察,我们发现类风湿关节炎动物模型中 CD₄⁺ 总数与健康对照组比较差别不大,差异主要是

CD₄⁺/CD₈⁺ 比例失衡,这点与相关文献表述一致^[4]。雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍能通过升高 AA 大鼠外周血 CD₄⁺ 水平而达到提升 CD₄⁺/CD₈⁺ 的比值,维持它们之间的动态平衡,使免疫反应趋于稳定。这表明,双氢青蒿素能协同雷公藤甲素对 T 淋巴细胞亚群产生非选择性非平衡性的抑制作用,使存在的各免疫细胞亚群之间的病理性紊乱恢复平衡,从而阻止关节病理进展。

TNF-α 在类风湿关节炎的病理过程中居中心地位, TNF-α 能诱导其它细胞产生更加广的致炎物质,通过刺激滑膜细胞和软骨细胞,使破骨细胞减少糖蛋白合成,增加糖蛋白降解,并产生胶原酶和其它中性蛋白酶,释放骨钙等,从而导致骨和软骨的破坏, TNF-α 还可直接诱导 RA 患者滑膜巨噬细胞和单核破骨细胞分化成破骨细胞^[5]。IL-6 则主要是与 TNF-α 起协同作用,它能增强 IL-1 和 TNF-α 的效应,还能促进肝脏合成急性期蛋白以及促进类风湿因子的合成,从而增强炎症过程,加重关节病变^[6]。本实验显示雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍能明显降低 AA 大鼠 TNF-α、IL-6 的踝关节表达,从而达到抑制关节炎症、阻止关节破坏的作用。

综上,雷公藤甲素与双氢青蒿素配伍能有效阻止 AA 大鼠的关节损伤,其效果与大剂量的雷公藤甲素相当,这表明通过配伍可以减少雷公藤甲素的用量,从而降低其毒副作用。但我们在先前的研究中发现单用双氢青蒿素并不能有效阻止 AA 大鼠关节的病理进展,因此在配伍中双氢青蒿素起什么作用以及如何起作用还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 刘明星,董 静,杨亚江,等. 雷公藤甲素研究进展[J]. 中国中药杂志,2005,30(3):170.
- [2] 袁晓英. 雷公藤多甙治疗类风湿性关节炎剂量与副作用的相关性分析[J]. 中国临床康复,2002,6(12):1808.
- [3] 易剑峰,王珏,林色奇,等. 青蒿素及其衍生物免疫调节研究概况[J]. 江西中医学院学报,2006,18(1):69-71.
- [4] Duke O, Panayi GS, Janossy G, et al. Analysis of T cell subsets in the peripheral blood and synovial fluid of patients with RA by means of monoclonal antibodies[J]. Ann Rheum Dis, 1983, 43:357.
- [5] Matsuno H, Yudo H, Katayama R, et al. The role of TNF-α in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis(RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera[J], Rheumatology(Oxford), 2002, 41(3):329-337.
- [6] Yoshizaki K, Nishimoto N, Mihara M, et al. Therapy of rheumatoid Arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody [J]. Springer Semin Immunopathol, 1998, 20(2):247-259.

(收稿日期:2008-09-03)