

热痹康汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清 IL-1 β 及 IL-4 的影响*

★ 刘欢 庞学丰** 吴燕红 唐丽萍 龙朝阳 潘燕 王乾 (广西中医学院附属瑞康医院 南宁 530011)

摘要:目的:观察热痹康汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清白介素-1 β (IL-1 β)及白介素-4(IL-4)的影响,以初步揭示热痹康汤治疗类风湿关节炎的机理,并为其在临床上治疗类风湿关节炎提供实验依据。方法:采用牛Ⅱ型胶原蛋白诱导胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠模型,以甲氨蝶呤作对照,观察热痹康汤对各组大鼠的关节肿胀指数以及血清 IL-1 β 、IL-4 水平的影响。结果:热痹康汤能降低 CIA 大鼠血清 IL-1 β 的水平,升高 IL-4 的水平,作用与甲氨蝶呤相当。结论:热痹康汤能下调 CIA 大鼠血清 IL-1 β 水平、提高 IL-4 的水平,是其治疗类风湿关节炎的作用机理之一。

关键词:热痹康汤;胶原诱导性关节炎;IL-1 β ;IL-4

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Influence on IL-1 β and IL-4 of Collagen Induced Arthritis Rats Serum by Rebikang

LIU Huan, PANG Xue-feng, WU Yan-hong, TANG Li-ping, LONG Zhao-yang, PAN Yan, WANG Qian

Rui kang Hospital attached to Guangxi University of TCM, Wanning 530011

Abstract: Objective To observe the effect of ReBiKang decoction on serum IL-1 β and IL-4 levels in CII-induced arthritis rats, to explore the mechanism of ReBiKang decoction treatment of Rheumatoid Arthritis and to provide a basic experiment for the treatment of Chinese herbal medicine in Rheumatoid Arthritis. Methods: Use Bovine type II collagen to cause to the model of treatment of Rheumatoid Arthritis, compare to methotrexate, observe the change of the index of swelling in rats' articulation, adopt immunology exam each group serum IL-1 β and IL-4 levels in CII-induced arthritis rats. Results: ReBiKang decoction can be significantly reduced joint swelling in rats index, a significant reduction in serum IL-1 β raise the level of IL-4, and the role of methotrexate fairly. Conclusion: ReBiKang decoction include the level of IL-1 β raise the level of IL-4 to experimental arthritis serum, which are the mechanism to treatment of rheumatoid arthritis.

Key words: ReBiKang decoction; experimental arthritis; IL-1 β ; IL-4

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种以侵犯外周关节为主的自身免疫性疾病,以关节滑膜的慢性炎症为主要表现,其发病可能是一种受抗原驱动的“激发-连锁反应”的过程,感染和自身免疫反应是类风湿关节炎发病和病情迁延的中心环节^[1]。虽然目前对 RA 的病因学还不是十分清楚,但活动期的 RA 患者血清中 IL-1 β 水平增高,IL-4 水平降低,提示 IL-1 β 、IL-4 在 RA 的发病过程中起着重要的作用。本研究采用牛Ⅱ型胶原蛋白(type

II Collagen, C II)诱导大鼠关节炎模型(Collagen induced arthritic rats, CIA),观察热痹康汤对大鼠血清 IL-1 β 、IL-4 的调节作用,探讨热痹康汤治疗类风湿关节炎的作用机理。

1 材料与药物

1.1 材料

60 只 Wistar 大鼠,清洁级,动物合格证号:桂医动字第 17014 号。体重 100 $\pm$ 10g,雌性,购于广西中医学院实验动物中心;牛Ⅱ型胶原蛋白、弗氏

* 基金项目:广西中医学院科研课题(P2010037)

** 通讯作者:庞学丰,男,广西博白,学士,主任医师,研究方向:中西医结合治疗风湿免疫疾病。

不完全佐剂购于 Chondrex (美国) 公司; IL-1 β 、IL-4 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验药物

甲氨蝶呤 (MTX) 为上海医药 (集团) 有限公司信谊制药总厂产品。热痹康汤 (组成: 秦艽 15 g、防风 10 g、桂枝 10 g、威灵仙 10 g、制川乌 10 g、地龙 10 g、桑枝 15 g、葛根 15 g、忍冬藤 15 g、青风藤 15 g、黄柏 20 g、苍术 15 g), 制备后浓度为每毫升汤剂含生药 0.8 g, 由广西中医学院附属瑞康医院制剂室制备提供。

2 方法

2.1 实验动物造模及分组

60 只大鼠适应性喂养 7 天后, 随机选取 10 只为正常对照组, 其余 50 只参照文献^[2]方法造模。在无菌条件下, 用 0.1 mol/L 冰醋酸充分溶解牛 II 型胶原蛋白, 浓度为 4 mg/L, 置 4℃ 冰箱过夜后, 再与等体积弗氏不完全佐剂 (1 mg/mL) 混合、震荡至充分乳化, 制成 C II 乳剂, 置 4℃ 冰箱保存备用。试验时于每只大鼠颈、背部多点皮内注射 0.25 ml 致炎, 于 14 d 后按上述方法和剂量再次免疫。根据大鼠关节炎临床指征评分, 确定免疫成功后 (5 分或以上) 随机分为 5 组: ①模型组 10 只; ②甲氨蝶呤组 10 只; ③热痹康汤高剂量组 10 只; ④热痹康汤中剂量组 10 只。⑤热痹康汤低剂量组 10 只。

2.2 给药方法

正常对照组, 自由饮水; 模型组以生理盐水 2 ml/100g 灌胃, 每日 1 次; 甲氨蝶呤组灌服甲氨蝶呤药液 1 mg/kg (为 60kg 成人临床用药量换算得出), 每只灌服约 0.1 mg, 每周灌服 1 次; 热痹康汤高、中、低剂量组 (高、低剂量组用药剂量分别为正常组用药剂量的 2 倍、0.5 倍), 分别以热痹康汤 (含生药 1.6、0.8、0.4 g/ml) 2 ml/100g, 每日分 2 次灌胃。

3 检测项目及方法

3.1 关节肿胀指数

参考文献^[3]采用 0-4 级关节评分法。0 分: 无关节炎; 1 分: 小趾关节轻度肿胀; 2 分: 小趾关节和足跖肿胀; 3 分: 踝关节以下的足爪肿胀; 4 分: 包括踝关节在内全部关节肿胀; 关节指数积分越高, 关节症状越严重。给药前、治疗后 1 周、2 周、4 周各观察 1 次, 并做好记录。

3.2 IL-1 β 及 IL-4 的检测

造模成功后分组给药, 治疗 28d 后, 将各组大鼠麻醉, 腹主动脉抽血, 分离血清, -20℃ 保存待测。IL-1 β 、IL-4 的测定采用 ELISA 试剂盒, 并按试剂盒说明进行检测。

3.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间用方差分析及 t 检验。采用 SPSS13.0 数据处理软件。

4 结果

4.1 关节肿胀指数观察

治疗第 2 周时, 各组指数低于模型组, 其中甲氨蝶呤、热痹康汤高、中剂量组与模型组有显著性差异 ($P < 0.05$)。治疗第 4 周时, 各组指数低于模型组, 与模型组均有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组关节肿胀指数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	给药前	治疗后 1 周	治疗后 2 周	治疗后 4 周
空白组	10	0	0	0	0
模型组	10	3.54 $\pm$ 0.71	3.62 $\pm$ 0.44	3.64 $\pm$ 0.42	3.16 $\pm$ 0.24
甲氨蝶呤组	10	3.76 $\pm$ 0.31	3.51 $\pm$ 0.43	2.84 $\pm$ 0.94 *	1.64 $\pm$ 0.36 *
热痹康汤高剂量组	10	3.88 $\pm$ 0.57	3.54 $\pm$ 0.49	2.22 $\pm$ 0.52 *	1.24 $\pm$ 0.71 *
热痹康汤中剂量组	10	3.94 $\pm$ 0.67	3.48 $\pm$ 0.26	2.42 $\pm$ 0.72 *	2.21 $\pm$ 0.84 *
热痹康汤低剂量组	10	3.87 $\pm$ 0.46	3.24 $\pm$ 0.45	2.72 $\pm$ 0.61	2.25 $\pm$ 0.42 *

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

4.2 血清 IL-1 β 、IL-4 测定 治疗 4 周后各给药组与模型组相比, IL-1 β 水平降低, IL-4 水平升高, 都有显著性差异 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 血清 IL-1 β 、IL-4 测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IL-1 β /pg $\cdot$ ml ⁻¹	IL-4/pg $\cdot$ ml ⁻¹
空白组	59.06 $\pm$ 40.56	19.72 $\pm$ 8.14
模型组	486.45 $\pm$ 103.42	27.95 $\pm$ 14.52
甲氨蝶呤组	256.86 $\pm$ 86.45 *	49.72 $\pm$ 21.64 *
热痹康汤高剂量组	126.44 $\pm$ 90.13 *	158.44 $\pm$ 46.38 *
热痹康汤中剂量组	261.89 $\pm$ 57.23 *	67.79 $\pm$ 26.74 *
热痹康汤低剂量组	301.19 $\pm$ 25.36 *	45.87 $\pm$ 35.64 *

注: 与模型组比较, * $P < 0.01$ 。

5 讨论

类风湿关节炎是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性结缔组织疾病, 滑膜炎可反复发作, 导致关节软骨及骨质破坏, 最终导致关节畸形及功能障碍, 目前尚无理想的根治方法, 化学合成的药物毒副作用大, 患者常难坚持。中医药对 RA 的研究有着悠久的历史, 且副作用小、疗效显著, 已被越来越多的患者接受。近年来, 中医药防治 RA 的实验研究也取得了一定的成果, 从而为中医药防治本病提供了基础和依据。

其发病机理比较复杂, 近年来, 人们研究发现炎症性细胞因子广泛参与 RA 病理变化的各个阶段。对其进行深入的研究, 一方面可以通过对该病发病机制的认识来了解疾病的发生、发展及预后, 更重要的是可以对该病的生物学治疗提供理论依据。通过阻断主要细胞因子或细胞因子信号传递的主要环节来研究新的治疗药物是当前 RA 药物治疗的热点。IL-1 β 是一种具有广泛生物学活性的促炎性细胞因子, 可以调节多种细胞因子、细胞粘附分子、免疫调

节分子和前炎性介质的表达,在多种疾病的发生发展中发挥着重要作用^[4]。已有研究发现 IL-1 β 基因多态性影响疾病对治疗的反应^[5,6]。IL-1 β 是参与 RA 滑膜炎症和软骨、骨破坏的主要炎性介质,血清 IL-1 的水平与 RA 的活动性及组织形态学特征密切相关^[7],而 IL-1 β 基因启动子区-511 位点 C-T 多态性能影响 IL-1 β 的分泌量,进而影响 RA 病情及预后^[8],因此可将 IL-1 β 基因作为研究 RA 患者对药物反应个体差异的遗传候选基因之一。

IL-4 作为 Th2 型细胞因子,选择性的激活 STAT6,使 Th0 向 Th2 极化,分泌 IL-4 等 Th2 细胞因子,形成自身正反馈调节。Aarvak 等^[9]发现 RA 患者滑膜中 Th2 克隆在 IL-12 和 IL-4 单抗的作用下转化为 Th0/Th1 型,而 Th0/Th1 克隆在 IL-4 与 IL-12 单抗作用下稳定不变。此外,IL-4 可以对抗 IFN- γ 和 IL-17,而且 IL-4 和 IL-12 单抗可引发 Th1/Th2 在多克隆 T 细胞中的平衡,这可能是由于记忆 CD8 + T 细胞的增多和记忆 CD4 + T 细胞的减少。IL-4 对胶原诱导的关节炎 (Collagen-induced Arthritis, CIA) 的进展起抑制作用,在 Th1/Th2 (Th, helper T cell, 辅助 T 细胞) 平衡中,诱导 Th2 细胞因子转换,调节 Th1 细胞因子表达^[10-13],而 IL-4 对 CIA 的保护作用,可能与阻止促进 CIA 进展的细胞致炎因子和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的表达有关,Lubbers 等^[14]认为局部 IL-4 治疗可阻止关节损伤和骨侵蚀,这种保护作用与破骨样细胞形成因子 IL-17、IL-6、IL-12 以及关节炎骨蛋白整合素下调有关。

热痹康汤是庞学丰主任医师治疗湿热型活动期类风湿关节炎的经验方,由秦艽、防风、桂枝、威灵仙、制川乌、地龙、桑枝、葛根、忍冬藤、青风藤、黄柏、苍术组成,具有清热利湿、除痹止痛功效。临床应用热痹康胶囊治疗湿热型类风湿关节炎患者,发现能明显降低患者的血沉、C 反应蛋白、类风湿因子、免疫球蛋白,能明显改善患者的晨僵、关节疼痛、关节肿胀、关节压痛及关节功能,长期应用发现疗效肯定,无明显毒副作用,且具有免疫调节作用^[15]。

本实验采用热痹康汤和甲氨蝶呤进行对照研究,治疗后血清 IL-1 β 水平和关节肿胀指数呈相应降低,血清 IL-4 水平相应升高,关节炎的症状逐渐减轻,两者与模型组比较,均有显著性差异 ($P < 0.01$),其作用与甲氨蝶呤相当。结果提示热痹康汤能减轻胶原诱导性关节炎大鼠关节肿胀指数,降低 IL-1 β 水平,升高 IL-4 水平,从而减轻关节滑膜的炎症,抑制关节滑膜增殖,是其治疗类风湿关节炎的作

用机理之一。

参考文献

- [1] 施桂英. 关节炎概要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 226 - 278.
- [2] 邓安梅, 仲人前, 陈孙孝, 等. 关节炎中 B7/CD28/CTLA-4 共刺激途径的实验研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(8): 412 - 414.
- [3] Larson p. Homologous. Type II collagen induced arthritis in rats [J]. Arthritis Rheum, 1990, 3(5): 693 - 697.
- [4] Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases [M]. Clin Exp Rheumatol, 2002, 20(Suppl27): S1 - 13.
- [5] Lehtimäki T, Laaksonen R, Janatuinen T, et al. Inter-leukin-1 β genotype modulates the improvement of coronary artery reactivity by lipid-lowering therapy with pravastatin: a placebo-controlled positron emission tomography study in young healthy men [J]. Pharmacogenetics, 2003, 13(10): 633 - 639.
- [6] Yu YW, Chen TJ, Hong CJ, et al. Association study of the interleukin-1 beta (C-511T) genetic polymorphism with major depressive disorder, associated symptomatology, and antidepressant response [J]. Neuropsychopharmacology, 2003, 28(6): 1182 - 1185.
- [7] Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology, 2003, 42(suppl2): 3 - 10.
- [8] 潘云峰, 张晓, 尹培达, 等. IL-1 基因多态性对类风湿关节炎病情及 IL-1 蛋白表达影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(10): 987 - 990.
- [9] Aarvak T, Chabaud M, Kallberg E, et al. Change in the Th1/Th2 phenotype of memory T-cell clones from rheumatoid arthritis synovium. [J]. J Immunol, 1999, 163: 1 - 9.
- [10] Lochmüller H, Jani A, Huard J, et al. Emergence of early region 1-containing replication competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants during multiple passages in 293 cells [J]. Hum Gene Ther. 1994, 5: 1485 - 1491.
- [11] Joosten LA, Lubberts E, Durez P, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis; protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction [J]. Arthritis Rheum. 1997, 40: 249 - 260.
- [12] Peleman R, Wu J, Fasgias C, et al. Recombinant interleukin-4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells [J]. J Exp Med, 1989, 170: 1751 - 1756.
- [13] Allen JB, Wong HL, Costa GL, et al. Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis [J]. J Immunol, 1993, 151: 4344 - 4351.
- [14] Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, et al. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-7 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion [J]. J Clin Invest, 2000, 105: 1697 - 1710.
- [15] 庞学丰, 蒙宇华. 热痹康胶囊治疗湿热型类风湿关节炎 86 例疗效观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2003, 20(2): 106 - 108.

(收稿日期: 2011-11-16)