

温阳通络方抗胶原诱导性关节炎小鼠滑膜新生血管形成的机制研究*

殷世云, 吴晶金

(云南省中医医院, 云南 昆明 650021)

摘要: **目的** 探讨温阳通络方对抗胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)小鼠滑膜新生血管形成的作用机制。**方法** 复制胶原诱导性关节炎小鼠,随机分为甲氨蝶呤组、模型组、空白对照组、温阳通络方高、中、低剂量组,每组 5 只。测量足趾容积,采用 HE 染色、免疫组化、Western blot 检测滑膜组织中 Ang-2、VEGF 蛋白表达情况。**结果** 造模前(0 d)、造模 35 d,各组 DBA/1 小鼠足趾容积差异无统计学意义;造模 48 d,各组足趾容积与空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。空白组、甲氨蝶呤组、温阳通络方高、中、低剂量组与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。空白组、模型组、温阳通络方低、中剂量组与甲氨蝶呤组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),温阳通络高剂量组与甲氨蝶呤组比较,差异无统计学意义。模型组滑膜组织 HE 染色提示有大量淋巴细胞浸润及滑膜细胞增生;甲氨蝶呤组、温阳通络方高、中、低剂量组仅有少量淋巴细胞,未见明显滑膜细胞增生。模型组小鼠滑膜组织中有大量 Ang-2、VEGF 蛋白表达,而甲氨蝶呤组、温阳通络方高、中、低剂量组中 Ang-2、VEGF 蛋白表达明显减少($P<0.01$)。Western blot 检测,空白组、甲氨蝶呤组、温阳通络方高、中、低剂量组 Ang-2、VEGF 蛋白表达水平均较模型组明显降低。**结论** 温阳通络方能抗胶原诱导性关节炎小鼠滑膜组织新生血管形成,进而减轻滑膜炎。

关键词: 温阳通络方;胶原诱导性关节炎;滑膜新生血管形成;类风湿关节炎

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)02-0007-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.02.002

Study on the Mechanism of Wenyang Tongluo Recipe against Synovial Neovascularization in Collagen induced Arthritis Mice

YIN Shiyun, WU Jingjin

(Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the mechanism of Wenyang Tongluo Recipe against synovial neovascularization in mice with collagen-induced arthritis (CIA). **Methods** The mice with CIA were randomly divided into methotrexate group, model group, blank control group, Wenyang Tongluo Recipe of high, middle and low dose groups, with 5 mice in each group. Measuring toe volume, HE staining and the expressions of Ang-2 and VEGF in synovium were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** There were no significant differences in toe volume of DBA/1 mice in each group before treatment (0 d) and on 35 d, while significant differences in toe volume when compared with the blank control group on 48 d ($P<0.01$). Compared with the model group, the blank group, methotrexate group, Wenyang Tongluo Recipe of high, middle and low dose groups had significant differences ($P<0.01$). There was no difference in methotrexate group and high dose group. HE staining of synovium tissues in model group showed a lot of lymphocyte infiltration and synovium proliferation, while methotrexate group, Wenyang Tongluo Recipe of high, middle and low dose groups showed only a small amount of lymphocyte, and no obvious synovium proliferation. There were a lot of Ang-2 and VEGF protein expressions in model group, and the expression levels of Ang-2 and VEGF decreased in methotrexate group, Wenyang Tongluo Recipe of high, middle and low dose groups ($P<0.01$). Western blot showed that the levels of Ang-2 and VEGF in blank group,

收稿日期: 2019-10-15

* 基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(81560770)

第一作者简介: 殷世云(1987-),男,住院医师,研究方向: 中西医结合风湿病的防治与研究。

△通信作者: 吴晶金, E-mail: wujingjin2013@126.com

methotrexate group, Wenyang Tongluo Recipe of high, middle and low dose groups were significantly lower than those in model group. **Conclusion** Wenyang Tongluo Recipe could prevent the formation of new blood vessels in synovium of collagen-induced arthritis mice, thus reduce synovitis.

KEY WORDS: Wenyang Tongluo Recipe; collagen-induced arthritis; synovial neovascularization; rheumatoid arthritis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性、对称性关节炎为主要表现的全身炎性免疫病^[1]。我国患病率约为 0.2%~0.4%^[2],具有较高的致残率,如不及早合理治疗,3 年内关节破坏可达 70%。在欧美国家,RA 年经济负担超过 400 亿欧元,因此开展干预 RA 的研究具有重要战略意义。类风湿关节炎的重要病理特征就是滑膜血管翳,新生血管形成在 RA 进程中扮演重要角色,被认为是疾病由急性向慢性转换的关键环节。本研究旨在以温阳通络方为研究载体,探讨其干预 RA 新生血管形成的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 DBA/1 小鼠 90 只,8 周龄,体质量(18±3)g,购于北京维通利华实验动物有限公司,动物许可证号 SCXK(京):2016-0011。饲养于云南中医药大学第一附属医院中心实验室 SPF 级动物房。实验前先适应性喂养 7 d,自由摄食饮水,动物房温度维持在 22~24 ℃,湿度维持在 65%~70%。

1.2 药品 牛 II 型胶原(C II)购自 sigma 公司;完全弗氏佐剂(CFA)购自 BD 公司;温阳通络方(主要由附片、桂枝、麻黄、薏苡仁、川芎、五加皮、赤芍等 10 余味中药组成),由本院成药房提供。甲氨蝶呤片,通化茂祥制药有限公司(批号:H22022674)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组 按随机数字表法将实验动物随机分为甲氨蝶呤组、模型组、空白对照组、温阳通络方高、中、低剂量组,每组 5 只小鼠。

1.3.2 动物造模 空白对照组小鼠不做处理,其余小鼠均进行造模。实验前 1 d 配制 2 mg/mL 的牛 II 型胶原溶液,置于 4 ℃冷藏过夜。冰浴下与 CFA 按照 1:1 比例充分混匀,制成乳剂。固定小鼠后,在距鼠尾根部 1 cm 处以每只 100 μL 注射。

1.3.3 给药方法 从致炎第 21 天开始给药干预,温阳通络方高、中、低剂量组分别以 8.0、4.0、2.0 g/kg 温阳通络方水溶液每天灌胃,甲氨蝶呤组按 10 mg/kg 每周给予甲氨蝶呤水溶液灌胃 1 次;模型组与空白对照组按 10 mL/kg 每天给予生理盐水灌胃。实验期间均予 SPF 级普通饲料。第 48 天末次灌胃后禁食水,

第 49 天脱臼处死,滑膜组织备测。

1.3.4 滑膜组织的收集 小鼠处死后,仰位固定,置于冰上操作,离断四肢,用冷生理盐水冲洗干净后,沿踝关节上方剪下整个关节囊,一部分常规脱钙包埋,切片备用;一部分新鲜冻存于超低温冰箱。

1.3.5 HE 染色 石蜡切片进行常规脱蜡、水化:二甲苯 I 10 min→二甲苯 II 10 min→无水乙醇 10 min→95%乙醇 5 min→90%乙醇 5 min→80%乙醇 5 min→70%乙醇 5 min→蒸馏水 I 5 min→蒸馏水 II 5 min。蒸馏水洗涤 5 min。苏木素染色 16 min,洗去浮色,1%盐酸酒精分化 2 s(浓盐酸 1 mL 加入 99 mL 的 75%无水乙醇中配制)。自来水返蓝。伊红染色 10 min,自来水终止显色。梯度酒精脱水 10 min,二甲苯透明 30 min,中性树胶封片,普通光学显微镜下拍照观察。

1.3.6 滑膜组织的免疫组化检测 对各组实验动物滑膜组织石蜡标本行病理学常规染色,另取切片做免疫组化检测。取各组标本常规脱蜡、水化,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次,浸入柠檬酸盐缓冲液中,微波加热至沸腾,中档微波处理 10 min,自然冷却,用 0.01 mol/L PBS 清洗 5 min×3 次。3%过氧化氢封闭,避光,室温孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次。5%羊血清室温封闭 1 h。去除多余的封闭液,加一抗稀释液,4 ℃冰箱过夜。次日用 0.01 mol/L PBST 漂洗 5 min×4 次。滴加 PV9000 试剂 I,37 ℃孵育 30 min,0.01 M PBST 漂洗 5 min×3 次,滴加 PV9000 试剂 II,37 ℃孵育 30 min,0.01 mol/L PBST 漂 5 min×4 次;滴加 DAB 显色液,室温避光孵育 5 min。蒸馏水冲洗,终止显色。苏木素复染 2 min;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。每组于高倍镜下随机选取 6 个视野拍照。用 HMIAS-2000 高清晰度彩色病理图像分析系统分析各组小鼠滑膜组织 Ang-2、VEGF 表达。

1.3.7 滑膜组织 Western blot 检测 取各组动物滑膜组织迅速称重,每 100 mg 样本加入预冷的 8 倍体积蛋白裂解液 RIPA(含蛋白酶抑制剂:0.4 mM PMSF,1 mM Iodo,1 μM Pepstatin A)匀浆 30 min。提取液 4 ℃下 12 000 r/min 离心 30 min 后取上清,BCA

法蛋白定量;PBS 调至等体积,加 5×SDS 上样缓冲液,沸水浴 5 min;SDS-PAGE 凝胶电泳,每孔上样 20 μg,配胶,将膜于转移液(含甲醇 15%)中平衡 10 min,80 V 转膜 120 min 后将膜取出,置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 1 h。取出膜,对应一抗 1:1 000 稀释,4 ℃过夜;TBST 洗 3 次,每次 5 min;荧光二抗 1:10 000 稀释,室温结合 1 h;分别用 TBST 和 PBS 各洗 3 次,每次 10 min。使用 ODYSSEY 红外双色激光成像系统对 Ang-2、VEGF 相对表达量进行分析,相关抗体购自美国 BD 公司。

1.4 数据处理 采用 IBM SPSS Statistics 25.0 统计软件包进行数据处理,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行

统计描述,组间数据比较采用方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 温阳通络方对 DBA/1 小鼠及踝关节肿胀度的影响 造模前(0 d)、造模 35 d,各组 DBA/1 小鼠足趾容积差异无统计学意义;造模 48 d,各组足趾容积与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。空白组、甲氨蝶呤组、温阳通络方低、中、高剂量组与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。空白组、模型组、温阳通络方低、中剂量组与甲氨蝶呤组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),温阳通络高剂量组与甲氨蝶呤组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 温阳通络方对 CIA 小鼠踝关节肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量	0 d	35 d	48 d
空白对照组	—	146.20±4.21	149.60±4.83	153.80±3.42 ^{△△▲▲}
模型组	—	156.00±5.79	158.00±6.82	352.40±6.73 ^{**▲▲}
甲氨蝶呤组	10 mg/kg	156.60±10.26	158.00±9.35	210.20±6.06 ^{**△△}
温阳通络方低剂量组	2.0 g/kg	155.00±3.93	157.40±2.07	323.80±43.75 ^{**△△▲▲}
温阳通络方中剂量组	4.0 g/kg	148.80±10.71	151.60±11.28	255.20±21.37 ^{**△△▲▲}
温阳通络方高剂量组	8.0 g/kg	162.00±9.67	164.60±9.04	194.60±15.90 ^{**△△}

注:与空白对照组同期比较,^{**} $P < 0.01$;与模型组同期比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与甲氨蝶呤组同期比较,^{▲▲} $P < 0.01$ 。

2.2 温阳通络方对 DBA/1 小鼠滑膜组织炎症的影响 模型组滑膜组织 HE 染色提示有大量淋巴细胞浸润及

滑膜细胞增生;甲氨蝶呤组、温阳通络方高、中、低剂量组仅有少量淋巴细胞,未见明显滑膜细胞增生,见图 1。

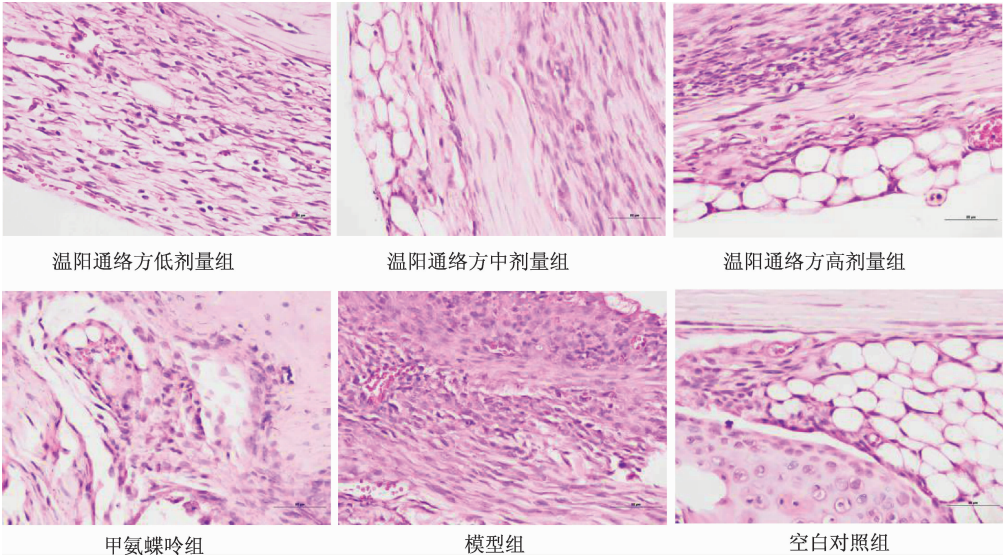


图 1 DBA/1 小鼠滑膜组织 HE 染色(×400)

2.3 温阳通络方对 DBA/1 小鼠滑膜新生血管的影响 免疫组化 DAB 染色,阳性反应呈棕黄色,模型组 DBA/1 小鼠滑膜组织中有大量 Ang-2 蛋白表达,甲

氨蝶呤组、温阳通络方高、中、低剂量组中 Ang-2 蛋白表达水平明显减少($P < 0.01$),见图 2。

2.4 温阳通络方对 DBA/1 小鼠滑膜新生血管的影响

免疫组化 DAB 染色，阳性反应呈棕黄色，模型组 DBA/1 小鼠滑膜组织中有大量 VEGF 蛋白表达，甲氨蝶呤组、温阳通络方高、中、低剂量组中 VEGF 蛋白表达水平明显减少($P<0.01$)，见图 3。

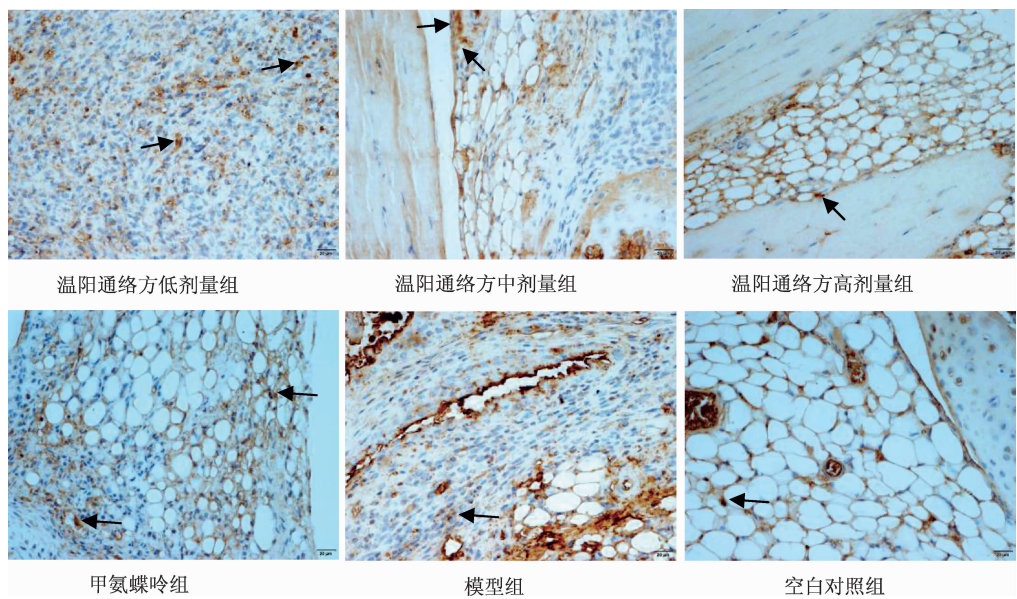


图 2 DBA/1 小鼠滑膜组织 Ang-2 免疫组化染色(×400)

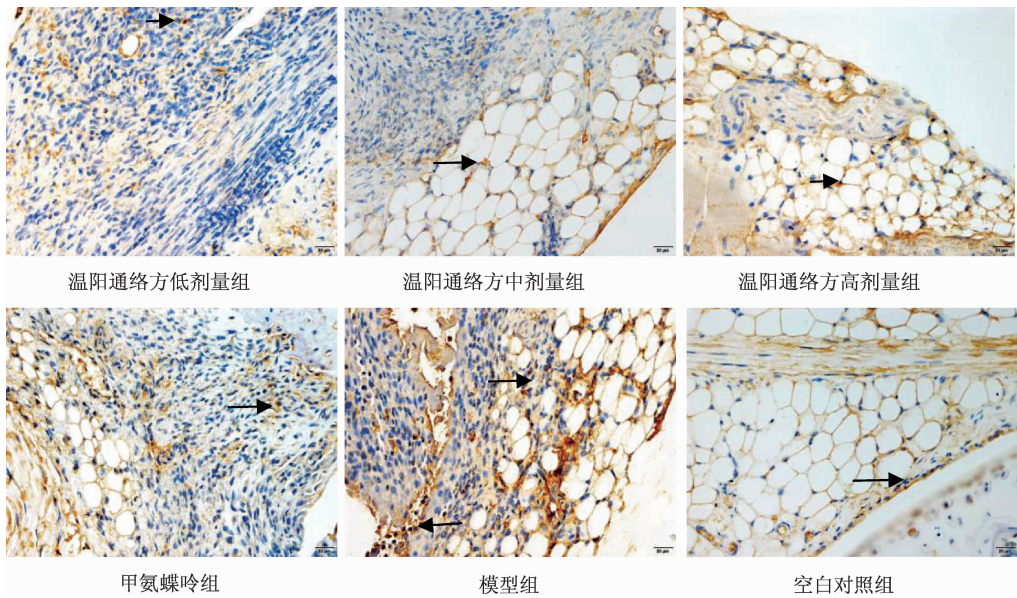


图 3 DBA/1 小鼠滑膜组织 VEGF 免疫组化染色(×400)

2.5 温阳通络方对小鼠滑膜组织 Ang-2、VEGF 蛋白表达水平的影响 空白组、模型组、甲氨蝶呤组、温阳通络方高、中、低剂量组 Ang-2、VEGF 蛋白表达水平较模型组明显降低，见图 4。

3 讨论

温阳通络方是云南省名老中医吴生元教授基于类风湿关节炎“阳虚络痹”理论总结出的效验方，已开发为院内制剂在中医医疗集团 50 余家单位使用 10 余年，该方主要由附片、桂枝、麻黄、薏苡仁、川芎、五

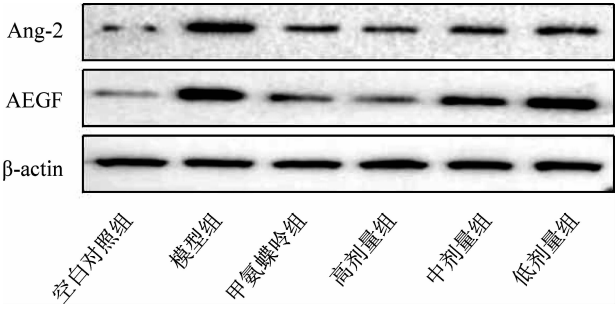


图 4 温阳通络方对小鼠滑膜 Ang-2、VEGF 蛋白表达水平的影响

加皮、赤芍等 10 余味中药组成,具有温经通络、散寒止痛之功,主治类风湿关节炎寒湿痹阻或风寒湿痹证。《中藏经》有:“阳者生之本,阴者死之基,阴宜长损,阳宜长益,顺阳者生,逆阳者死”“阳化气,阴成形”,阳气周流,自然百病不作。阳衰阴长,风寒湿乘虚侵袭,具体表现在有形阴邪积聚——即大量滑膜新生血管形成。因此,阳虚邪乘,络脉痹阻可能是滑膜新生血管形成的病机所在。前期临床研究显示,温阳通络方能改善 RA 患者证候积分及 DAS28、CDAI、SDAI 等评分^[3-6],总有效率 93.57%;实验研究显示其具有抗炎、镇痛、调节免疫等作用^[7-12]。

RA 滑膜血管翳富集大量炎症细胞及因子,同时也阻断了关节软骨营养吸收,在关节病变的发生发展中发挥重要作用。因此,抗滑膜新生血管形成可能是 RA 治疗的新思路^[13-16]。其他学者研究发现 RA 滑膜纤维母细胞以及吞噬样细胞能够较高水平的表达 VEGF^[17-20],该因子是滑膜血管翳形成过程中的重要调节因子,而 Ang-2 对血管新生具有双重作用,当滑膜中 VEGF 含量丰富时,Ang-2 抑制 Tie-2 受体磷酸化,促进血管的新生和增生^[21-22]。

本次研究提示温阳通络方能抑制胶原诱导性关节炎小鼠滑膜新生血管形成,其作用可能与下调滑膜组织 Ang-2、VEGF 蛋白表达水平有关,进而减轻血管翳形成,有关作用机制还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4): 265-270.
- [2] 陈灏珠. 实用内科学 [M]. 12 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 2548-2557.
- [3] 李兆福, 刘维超, 彭江云, 等. 薏苡颗粒联合甲氨蝶呤片治疗活动性类风湿关节炎 140 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2014, 55(18): 1566-1570.
- [4] 狄朋桃, 李兆福, 刘维超, 等. 温阳通络法治疗类风湿关节炎 412 例临床观察 [J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(5): 36-38.
- [5] 李兆福, 彭江云, 杨会军, 等. 薏苡颗粒治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎 60 例临床观察[J]. 中国中医药科技, 2014, 21(3): 291-292.
- [6] 肖勇洪. 温阳除湿方对 DBA/1 小鼠胶原性关节炎 Treg 细胞调控机制的研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.
- [7] 万春平, 彭江云, 李兆福, 等. 薏苡颗粒对胶原诱导性小鼠关节炎的抑制作用及机制研究 [J]. 中药材, 2013, 36(9): 1505-1507.
- [8] 吴晶金, 彭江云, 万春平, 等. 薏苡颗粒对胶原诱导性关节炎模型大鼠滑膜炎症的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(5): 16-19.
- [9] 万春平, 彭江云, 李玲玉, 等. 薏苡颗粒抗炎作用及机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 117-121.
- [10] 李玲玉. 温阳通络方对 DBA/1 小鼠胶原性关节炎 Th17 细胞调控机制的研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2014.
- [11] 肖勇洪. 温阳除湿方对 DBA/1 小鼠胶原性关节炎 Treg 细胞调控机制的研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.
- [12] 于明宇. 薏苡颗粒通过 Th1/Th17 细胞介导免疫抑制效应作用机制研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2015.
- [13] 李兆福. 温阳散寒除湿法治疗类风湿关节炎的临床疗效及作用机制研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2014.
- [14] 马武开, 李蓉, 徐晖, 等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜血管新生的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4571-4575.
- [15] 王靖霞, 刘春芳, 李逸群, 等. 雷公藤多苷片抑制实验性类风湿关节炎血管新生的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3441-3447.
- [16] 丁明辉. 温经通络法治疗类风湿关节炎的预后分析及对滑膜血管新生的干预机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [17] 孙明慧, 吴虹, 卜妍红, 等. 介导缺氧诱导因子-1 α 表达的相关信号通路在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(9): 1197-1202.
- [18] 舒庆雪. Syndecan-2 与 VEGF 在类风湿关节炎血管新生过程中的相关性[D]. 泸州: 西南医科大学, 2019.
- [19] 鲍晓, 何成松. 沉默 TLR4 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖和侵袭的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2019, 54(2): 187-190.
- [20] 郭津含, 万浩强, 邹小停, 等. 滑膜血管新生在类风湿关节炎早期诊断及治疗中的应用 [J]. 现代医用影像学, 2018, 27(7): 2249-2251.
- [21] 王鑫铭. 血管紧张素 II 2 型受体及其信号对类风湿关节炎异常活化的滑膜巨噬细胞的调控作用[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- [22] 刘小平, 赵旭颖, 侯秀娟, 等. 芍甘附子汤加味通过 HIF-VEGF-ANG 轴诱导人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4013-4016.