

胶原诱导性关节炎模型大鼠炎性细胞因子表达及白喉乌头的影响

张俊宇¹, 杜文静¹, 吉鹏¹, 刘青¹, 罗莉¹, 罗德梅²(新疆医科大学第一附属医院, ¹风湿科, ²检验科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000)

文章亮点:

1 类风湿关节炎的治疗有多种方案, 其中植物药物有其价格便宜, 不良反应小的优点, 探寻新的植物药物可能成为使类风湿关节炎疗效获得突破性提高的关键之一。乌头属植物多具有祛风除湿、温经止痛功效, 而对于新疆盛产的白喉乌头治疗类风湿关节炎的机制目前尚未有报道。

2 实验通过建立病理改变、炎性细胞因子水平的表达与人类类风湿关节炎相似的胶原诱导性关节炎模型大鼠模型, 采用免疫组织化学染色方法观察白喉乌头对胶原诱导性关节炎模型大鼠关节滑膜中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 表达的影响, 初步探讨白喉乌头治疗类风湿关节炎的可能作用机制。

关键词:

实验动物; 骨及关节损伤模型; 白喉乌头; 胶原诱导性关节炎; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1β ; 类风湿关节炎

主题词:

乌头属; 关节炎; 实验性; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1β

基金资助:

新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(XJEDU2013120); 新疆医科大学第一附属医院药学专项(2012YX06)

摘要

背景: 目前治疗类风湿关节炎主要的药物有慢作用抗风湿药、生物制剂及植物药物, 植物药因价格便宜、不良反应小而越来越受到瞩目。

目的: 观察胶原诱导性关节炎模型大鼠滑膜中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 表达及白喉乌头对其表达的影响。

方法: 将45只大鼠随机分为正常对照组8只、造模组37只, 造模组于大鼠足跖及尾根部多点皮内注射牛II型胶原乳剂建立胶原诱导性关节炎大鼠模型。造模成功后, 随机选取24只造模成功大鼠进行后续实验, 将其随机分为模型组、雷公藤组和白喉乌头组, 每组各8只, 每周对3个造模后干预组和正常对照组共4组大鼠进行关节炎评分。经过灌胃给药治疗4周后, 通过免疫组织化学染色检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 在滑膜中的表达。

结果与结论: 与模型组比较, 治疗后白喉乌头组、雷公藤组关节炎评分明显降低($P < 0.05$)。肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 在模型组滑膜中表达明显高于正常对照组($P < 0.05$), 在白喉乌头组、雷公藤组中表达低于模型组($P < 0.05$)。结果证实, 白喉乌头治疗类风湿关节炎的机制可能与其抑制肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 表达有关。

张俊宇, 杜文静, 吉鹏, 刘青, 罗莉, 罗德梅. 胶原诱导性关节炎模型大鼠炎性细胞因子表达及白喉乌头的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(18):2794-2799.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.18.002

Expression of inflammatory cytokines and effect of *Aconitum leucostomum* Worosch. in collagen-induced arthritis rats

Zhang Jun-yu¹, Du Wen-jing¹, Ji Peng¹, Liu Qing¹, Luo Li¹, Luo De-mei² (¹Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: The majority of rheumatoid arthritis treatment is chronic anti-arthritis drugs, biological agents and plant drugs. Among them, plant drugs have been widely concerned due to low cost and few adverse effects.

OBJECTIVE: To observe the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- 1β (IL- 1β) in the synovium of collagen-induced arthritis rats, and explore the effect of *Aconitum leucostomum* Worosch. on the expression.

METHODS: Forty-five rats were randomly divided into normal control group (8 rats) and model group (37 rats). The collagen-induced arthritis model was established with the injection of type II bovine collagen into the end of the tail and paws. After the success of modeling, the 24 successful model rats were randomly selected and

张俊宇, 女, 1987年生, 辽宁省人, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事风湿免疫疾病的诊断与治疗研究。

通讯作者: 罗莉, 硕士, 主任医师, 副教授, 新疆医科大学第一附属医院风湿科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

通讯作者: 罗德梅, 副主任检验师, 新疆医科大学第一附属医院检验科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)18-02794-06

稿件接受: 2015-02-19

http://www.crter.org

Zhang Jun-yu, Studying for master's degree, Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Luo Li, Master, Chief physician, Associate professor, Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Luo De-mei, Associate chief technician, Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2015-02-19

divided into model group (8 rats), *Tripterygium wolfprdii polyglycoside* group (8 rats) and *Aconitum leucostomum* Worosch. group (8 rats). The arthritis index of the rats in the three intervention groups and one control group were evaluated weekly. After treated by intragastric administration for 4 weeks (*Tripterygium wolfprdii polyglycoside* group and *Aconitum leucostomum* Worosch. group were taken by the corresponding drug solution, model group and normal control group were taken by the same volume of physiological saline), the expressions of TNF- α and IL-1 β in the synovium were tested by immunohistochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, the arthritis index of mice in *Tripterygium wolfprdii polyglycoside* group and *Aconitum leucostomum* Worosch. group was decreased significantly after treatment ($P < 0.05$). The expression levels of TNF- α and IL-1 β in the synovium of model group were significantly higher than those of the normal control group ($P < 0.05$). After treatment with *Aconitum leucostomum* Worosch. and *Tripterygium wolfprdii polyglycoside*, the expression levels of TNF- α and IL-1 β in the synovium was decreased compared with the model group ($P < 0.05$). Experimental findings indicated that, the mechanism that *Aconitum leucostomum* Worosch. treats rheumatoid arthritis is related to the inhibition of TNF- α and IL-1 β .

Subject headings: *Aconitum leucostomum* Worosch.; Arthritis; Experimental; Tumor Necrosis Factor- α ; Interleukin-1 β

Funding: grants from Scientific Research Plan Key Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region for Colleges and Universities, No. XJEDU2013120; Specific Funds for Pharmacy of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, No. 2012YX06

Zhang JY, Du WJ, Ji P, Liu Q, Luo L, Luo DM. Expression of inflammatory cytokines and effect of *Aconitum leucostomum* Worosch. in collagen-induced arthritis rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(18):2794-2799.

0 引言 Introduction

类风湿关节炎主要的病理表现是滑膜组织增生、炎症细胞浸润及血管翳形成, 并出现软骨和骨的破坏, 最终可导致关节畸形和功能丧失^[1-2], 一般女性多发, 发病高峰在45-50岁之间, 病程反复、不易治愈、致残率高, 未经正规治疗的类风湿关节炎患者会出现关节畸形甚至功能丧失, 由此带来严重的社会问题和经济负担^[3]。因此, 通过研究类风湿关节炎机制来寻找迅速、有效的治疗药物显得十分重要。类风湿关节炎的发病机制复杂, 大量研究显示免疫反应在类风湿关节炎发病中起着重要作用^[4-5], 入侵抗原被滑膜细胞吞噬、加工、处理后, 将抗原信息传递给并激活T淋巴细胞, 使之释放出多种细胞因子、生长因子及各种递质, 最终导致了滑膜炎及血管翳的生成, 进而出现关节畸形及功能丧失。其中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)对类风湿关节炎炎症的发生发展起关键作用^[6-7]。研究表明肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素1 β 在炎症滑膜中高度表达, 促进关节滑膜细胞瘤样增生侵袭软骨下骨组织形成血管翳并参与诱导RANKL依赖的破骨细胞的生成^[8], 大样本多中心临床实验证明, 通过抗肿瘤坏死因子 α 或抗白细胞介素1 β 治疗, 减少其表达, 对治疗类风湿关节炎有确切疗效^[9-12]。

目前多种药物被用于治疗类风湿关节炎, 主要包括慢作用抗风湿药、生物制剂及植物药等。但是慢作用抗风湿药不良反应较多且需要长期用药, 使得部分患者不能耐受、治疗依从性差; 生物制剂起效迅速可缓解病情, 但因其价格昂贵且易并发感染目前尚无法广泛应用, 且有部分患者即使正规足疗程使用慢作用抗风湿药物及生物制剂症状仍不能缓解。因此研究者需要积极探索新的治疗药物, 使得类风湿关节炎的治疗更加有显著疗效并尽量减少不良反应。植物药物有其价格便宜, 不良反应轻的优点, 用于类

风湿关节炎的治疗越来越受到重视。近几十年来已有多种植物药物如雷公藤多甙、白芍总苷等被用于临床类风湿关节炎治疗, 并取得一定成效^[13], 这提示探寻新的植物药物可能成为治疗类风湿关节炎疗效获得突破性提高的关键之一。新疆地大物博, 有丰富的植物资源, 且应用植物药治疗类风湿关节炎的历史悠久, 经验丰富。乌头入药最早记载于《神农本草经》, 乌头属植物多具有祛风除湿、温经止痛功效, 目前常用的种类主要有川乌、关白附、雪上一枝蒿等, 而对于新疆盛产的白喉乌头(*Aconitum leucostomum* Worosch.)治疗类风湿关节炎的机制目前尚未有报道。白喉乌头为毛茛科(*Ranunculaceae*)乌头属植物, 为新疆特产药材, 因其具有祛风除湿、温经止痛的功效而常被哈萨克医用于治疗风寒湿痹等疾患^[14], 那么, 白喉乌头是否通过影响肿瘤坏死因子 α 或白细胞介素1 β 表达而发挥作用呢?

实验通过建立病理改变、炎性细胞因子水平的表达与人类类风湿关节炎相似的胶原诱导性关节炎大鼠模型, 采用免疫组织化学染色方法观察白喉乌头对胶原诱导性关节炎大鼠关节滑膜中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 表达的影响, 初步探讨白喉乌头治疗类风湿关节炎的可能作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物造模实验。

时间及地点: 于2013年11月至2014年3月在新疆医科大学第一附属医院科技楼动物实验中心及病理实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁级健康雌性Wistar大鼠45只, 体重(200 \pm 20) g, 购自新疆医科大学动物实验中心, 动物许可证号: IACUC-20130319012。

中药: 白喉乌头采于新疆, 由新疆医科大学中药学院专业人员鉴定, 取其根茎500 g, 用水浸泡至内无干心, 取出, 加水煮至切开内无白心、口尝微有麻舌感, 取出, 晾晒至六成干后切薄片, 干燥后磨至粉末状, 加蒸馏水配制为质量浓度9 g/L药液。雷公藤多苷片为片剂中成药, 剂量为10 mg/片, 将其磨至粉末状, 加蒸馏水配制为质量浓度0.3 g/L药液。

白喉乌头对胶原诱导性关节炎模型大鼠炎性细胞因子的影响实验主要试剂:

试剂	来源
牛Ⅱ型胶原, 完全弗氏佐剂	Sigma公司
鼠抗肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 抗体	武汉博士德公司
辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠二抗, DAB 显色液	北京中杉公司

方法:

制备胶原诱导性关节炎模型大鼠: 将牛Ⅱ型胶原溶于提前预冷的 0.1 mol/L的冰醋酸中, 终浓度为4 g/L, 4 °C过夜。将溶解于冰醋酸的Ⅱ型胶原加入等体积的完全弗氏佐剂在冰浴条件下使两者充分乳化^[15]。于大鼠足跖及尾根部多点皮内注射牛Ⅱ型胶原乳剂(0.3 mL/只)进行初次免疫, 初次免疫7 d后, 使用上述乳剂于足跖及尾根部再次加强免疫, 初次免疫后每周参照关节炎指数评分标准对造模效果进行关节炎评分(arthritis index, AI)。AI具体操作如下: 大鼠关节炎表现分为5级, 0分=无关节炎症状, 1分=单个爪或趾(指)的红肿, 2分=2个关节受累, 3分=2个以上关节受累, 4分=全部爪及趾均发生严重关节炎, 每只大鼠AI为4只包括趾(指)在内的整个爪评分之和。初次免疫21 d AI \geq 6分及以上的大鼠提示造模成功^[16]。

分组及给药: 45只大鼠适应性饲养1周, 随机选取8只为正常对照组, 对其他37只Wistar建立胶原诱导的关节炎大鼠模型。在造模成功的大鼠中随机选取24只并随机分为模型组、白喉乌头组、雷公藤组继续进行实验, 每组8只。通过药物半数致死量计算出合适药物治疗浓度[白喉乌头45 mg/(kg·d), 雷公藤1 mg/(kg·d)]于初次免疫第21天开始对4组大鼠进行对应药物灌胃给药^[17], 1 mL/(次·d), 持续4周(正常对照组及模型组给予等体积生理盐水灌胃)。

分离标本: 初次免疫7周后, 大鼠称体质量, 体积分数10%水合氯醛3 mL/kg腹腔麻醉, 处死大鼠, 分离双侧膝关节滑膜^[18], 40 g/L多聚甲醛固定, 留取病理及免疫组织化学染色标本。

组织病理学观察各组大鼠滑膜炎细胞浸润: 40 g/L多聚甲醛固定24-48 h后, 常规乙醇梯度脱水, 进行石蜡包埋、切片。并用苏木精-伊红染色, 光学显微镜下进行观察。

免疫组织化学染色检测各组大鼠滑膜中炎性细胞因子的表达: 40 g/L多聚甲醛固定24-48 h后, 常规乙醇梯度脱水, 进行石蜡包埋、切片。切片脱水脱蜡、水化; 磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次, 5 min/次; 滴加体积分数3% H_2O_2 室温

10 min阻断内源酶, PBS洗3次, 每次5 min; 0.01 mol/L柠檬酸盐抗原修复液, 微波热修复抗原10 min, 室温冷却; 蒸馏水、PBS依次洗1次, 各5 min; 加鼠抗肿瘤坏死因子 α 或白细胞介素1 β 抗体(1:100), 置于4 °C冰箱孵育16 h。将湿盒置于室温1 h, 加辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠二抗, 37 °C温箱孵育25 min, PBS洗3次, 5 min/次。新鲜配置的DAB显色液进行显色, 检测滑膜中肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素1的表达。苏木精复染、盐酸乙醇分化、返蓝、脱水、透明、中性树胶封固。在10 \times 40倍镜下照相, 随机选取5个视野, 用Olympus BX52 VIEWER 显微图像采集系统测定阳性单位的积分吸光度值(AI)。

主要观察指标: ①各组大鼠关节炎评分情况: 初次免疫1 d开始每周对各组大鼠进行关节炎评分。②组织病理学观察各组大鼠滑膜炎细胞浸润情况。③免疫组织化学染色检测各组大鼠滑膜中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素1 β 的表达情况。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 19.0统计学软件进行数据处理, 各组之间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 45只大鼠中正常对照组8只, 剩余37只进行胶原免疫诱导造模, 其中26只关节炎评分 \geq 6分, 提示造模成功, 造模成功率约为70%, 与周强等^[19]的研究相符。造模成功的26只大鼠中随机选取24只进行后续实验。纳入实验的4组共32只大鼠实验过程中无感染或死亡, 均进入结果分析。造模流程见图1。

2.2 胶原诱导性关节炎模型大鼠的关节炎评分情况 初次免疫第14天后部分大鼠出现后踝及足跖关节红肿, 第21天上述关节红肿程度加重, 足跖呈鼓槌样, 无法负重。灌胃治疗后模型组、白喉乌头组及雷公藤组关节炎评分有不同程度下降, 灌胃治疗2周后即初次免疫第35天起, 白喉乌头组关节炎评分与胶原诱导性关节炎对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。整个病程中白喉乌头组与雷公藤组差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图2。

2.3 各组大鼠滑膜病理改变情况 正常对照组大鼠滑膜细胞排列清晰, 未见增生, 未见炎性细胞聚集浸润; 模型组的大鼠滑膜细胞增生明显, 排列紊乱, 内可见大量炎性细胞浸润; 白喉乌头组及雷公藤组大鼠滑膜细胞轻度增生, 有少量炎性细胞浸润(图3)。

2.4 炎性细胞因子在胶原诱导性关节炎模型大鼠滑膜中的表达情况 药物治疗4周后通过免疫组织化学染色观察到, 模型组大鼠滑膜肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素1 β 的阳性染色强度明显高于正常对照组($P < 0.05$); 白喉乌头组、雷公藤组上述指标染色强度低于模型组($P < 0.05$); 白喉乌头组上述指标染色强度与雷公藤组相比较差异无显著性意义($P > 0.05$)(表1, 图4)。

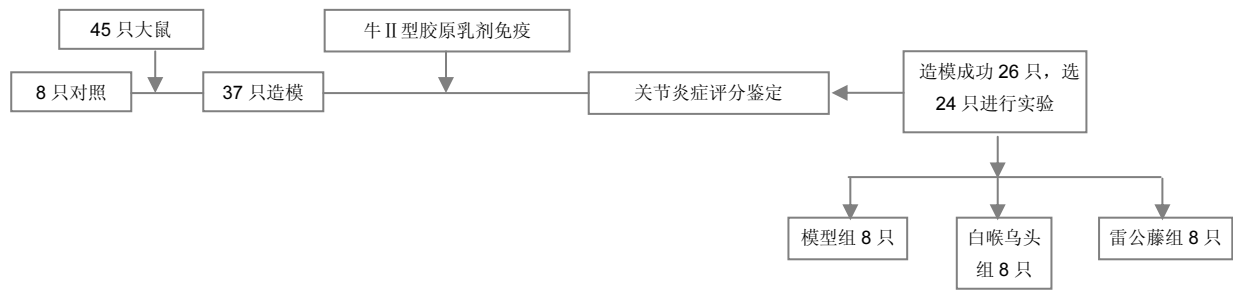


图1 胶原诱导性关节炎大鼠模型的建模流程图

Figure 1 Flow chart of establishing collagen-induced arthritis models

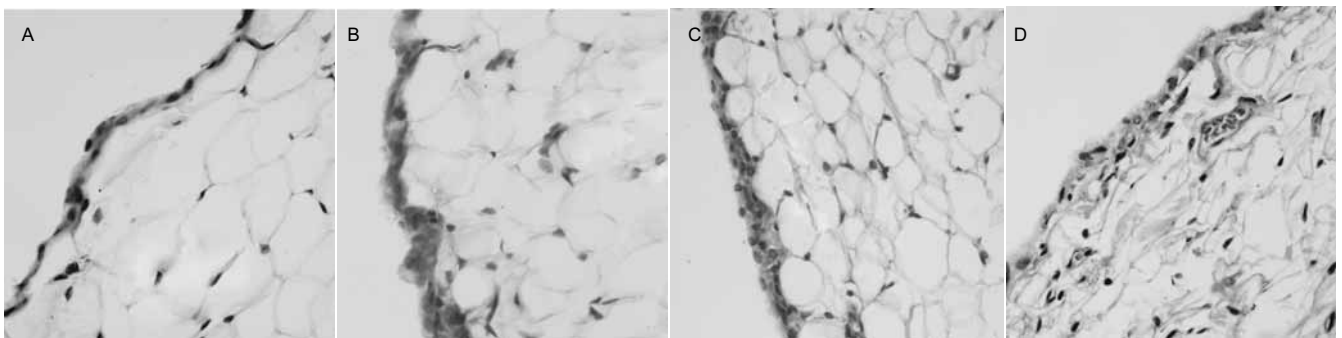


图3 胶原诱导性关节炎模型大鼠滑膜病理改变情况(苏木精-伊红染色, ×400)

Figure 3 Pathological changes of the synovium in collagen-induced arthritis models (hematoxylin-eosin staining, ×400)

图注: 图中A为正常对照组, 滑膜细胞排列清晰, 未见增生及炎细胞浸润; B为模型组滑膜细胞增生明显, 排列紊乱, 内可见大量炎性细胞浸润; C为白喉乌头组, D为雷公藤组, 其2组滑膜细胞轻度增生, 有少量炎性细胞浸润。

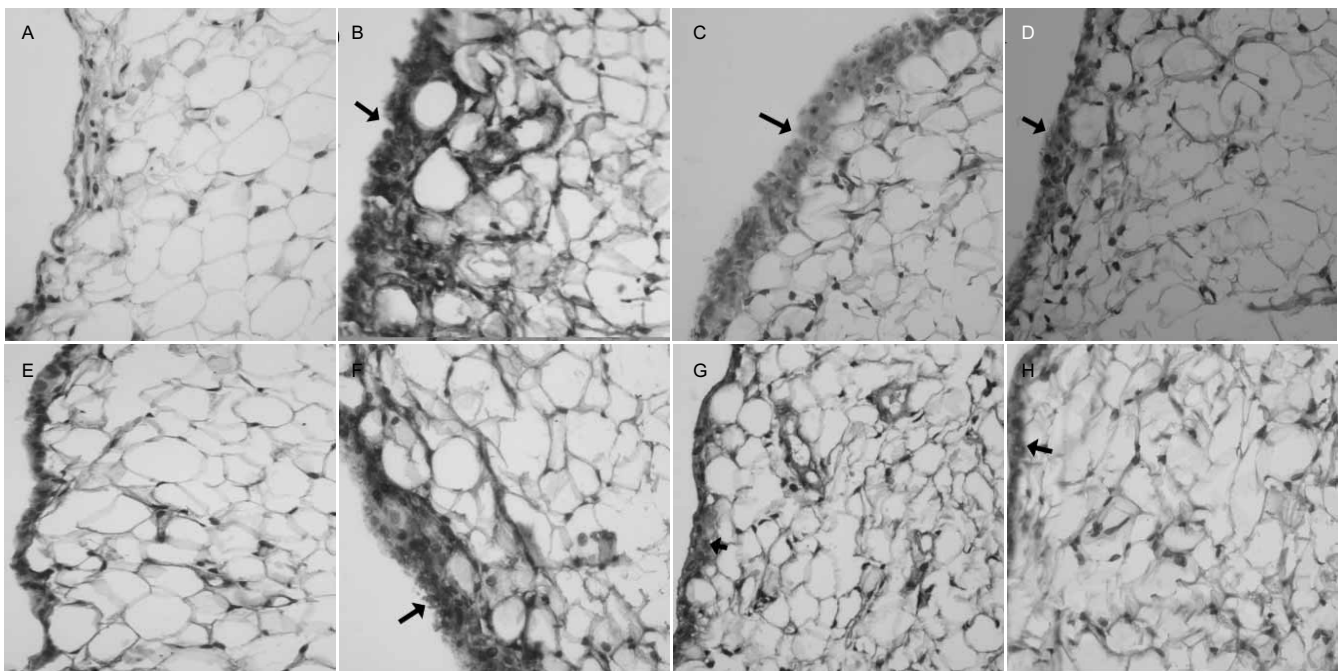


图4 胶原诱导性关节炎模型大鼠滑膜组织中肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 的表达情况(免疫组织化学染色, ×400)

Figure 4 Expression of tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β in the synovium of collagen-induced arthritis rats (immunohistochemical staining, ×400)

图注: 图中A-D, E-H分别为肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 在各组大鼠滑膜中表达情况。图中A, E为正常对照组, 未见肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 阳性表达; B, F为模型组, 滑膜可见大量褐色肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 阳性表达物; C, G为白喉乌头组, D, H为雷公藤组, 此4组可见滑膜少量肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 阳性表达物。箭头所指为肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 阳性表达物。

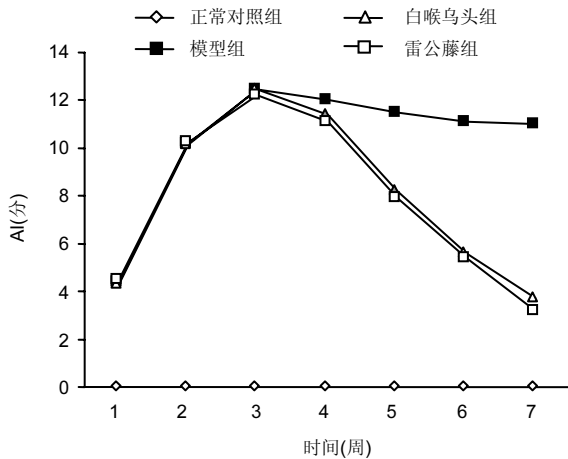


图2 胶原诱导性关节炎(CIA)模型大鼠关节炎评分情况

Figure 2 Scores of collagen-induced arthritis models

图注: 组间数据比较采用单因素方差分析, 建模后第5, 6, 7周关节炎评分(AI)白喉乌头组及雷公藤组与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

类风湿关节炎是一种不明病因导致的以自身免疫性侵蚀性多关节炎为表现的慢性系统性疾病, 其主要的病理表现是滑膜组织增生、炎症细胞浸润及血管翳形成, 并出现软骨和骨的破坏, 最终可导致关节畸形和功能丧失, 病程反复、致残率高。近年来为探求安全、有效、经济的治疗方案, 人们将焦点聚于植物药物的研究。白喉乌头主要分布于中国新疆北疆地区, 为新疆特色药材, 尤其为哈萨克医所常用。其根供药用^[20], 具有祛风散寒、止痛消肿、痛经活络的功效, 主要用于治疗类风湿关节炎、肋间神经痛、腰腿冷痛、心腹冷痛等新疆地区常见病, 在治疗风寒湿类病痛方面具有独特优势, 但其治疗类风湿关节炎的机制目前尚未有相关报道。实验建立了病理改变、炎症细胞因子水平的表达与人类类风湿关节炎相似的胶原诱导性关节炎大鼠模型, 旨在通过观察白喉乌头对大鼠滑膜肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 表达的影响, 探索其对治疗类风湿关节炎的机制, 为其治疗类风湿关节炎提供实验室依据。

近几十年来已有多种植物药物如雷公藤多甙、白芍总苷等被用于临床类风湿关节炎治疗, 并取得确切成效。有研究对207例活动性类风湿关节炎患者按照国际通行标准进行了严格的前瞻性、随机、对照临床研究^[21], 证实了对于活动性类风湿关节炎, 单用雷公藤多甙的疗效不亚于单用甲氨蝶呤。2014年欧洲风湿病学会联合会(EULAR)已将雷公藤纳入治疗类风湿关节炎标准指南之一, 更加使应用植物药物治疗类风湿关节炎获得世界瞩目。雷公藤多甙的主要活性成分为生物碱^[22-23], 表现出较强的抗炎及免疫抑制活性^[24], 这与白喉乌头的主要成分相似, 故实验选择雷公藤为治疗阳性对照组。实验结果显示, 经白喉乌头治疗后胶原诱导性关节炎模型大鼠的关节炎症状缓解情况、滑膜病理变化情况、滑膜肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 表达均与雷公藤组无明显差异, 表明白喉乌头在类风湿关节炎的治疗上有确切疗效。

表1 胶原诱导性关节炎模型大鼠滑膜中肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Expression of tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β in the synovium of collagen-induced arthritis rats

组别	滑膜表达细胞因子积分吸光度值	
	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 1β
正常对照组	0.29 \pm 0.11	2.93 \pm 0.77
模型组	0.73 \pm 0.13 ^a	12.91 \pm 0.11 ^a
雷公藤组	0.53 \pm 0.09 ^b	6.14 \pm 0.13 ^b
白喉乌头组	0.56 \pm 0.11 ^b	6.35 \pm 0.32 ^b

表注: 与正常组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

类风湿关节炎患者体内免疫异常活化, 激活多种炎症递质并导致炎症级联反应^[25], 发病过程中炎症细胞因子、抑炎细胞因子平衡失调, 最终导致了滑膜炎及血管翳的生成, 进而出现关节畸形及功能丧失。其中, 肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 是参与类风湿关节炎滑膜炎及关节破坏的重要炎症细胞因子, 肿瘤坏死因子 α 通过旁分泌和自分泌的形式调节细胞和体液免疫, 在分子水平上通过结合受体TNFR1和TNFR2调控细胞的增殖、分化和凋亡。过量的肿瘤坏死因子 α 不仅使其信号通路发生异常, 还可以和包括白细胞介素 1β 在内的其他促炎性细胞因子参与诱导RANKL依赖的破骨细胞的生成^[6], 刺激滑膜成纤维细胞和软骨细胞产生降解软骨的金属蛋白酶、前列腺素E等多种炎症递质, 导致类风湿关节炎患者滑膜中炎症细胞持久招募、活化、滞留, 促进关节滑膜细胞瘤样增生侵袭软骨下骨组织形成血管翳并最终导致关节和软骨的破坏, 而这一结果将会继续推动和维持由趋化因子、细胞因子和生长因子组成的复杂网络的恶性循环^[26]。白细胞介素 1β 主要由单核细胞及巨噬细胞分泌^[27], 它与肿瘤坏死因子 α 相互依赖相互影响, 参与诱导细胞因子、活化破骨细胞、促进金属蛋白酶的生成及参与血管翳的生成^[28-30], 但二者作用并不完全相同, 肿瘤坏死因子 α 比白细胞介素 1β 有更强的炎症作用, 而白细胞介素 1β 比肿瘤坏死因子 α 有更强的刺激金属蛋白酶产生而加重骨破坏的作用^[31]。大量研究表明肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 在炎症滑膜中高度表达, 通过抗肿瘤坏死因子 α 或抗白细胞介素 1β 治疗, 减少其表达, 对治疗类风湿关节炎有确切疗效。病理结果显示白喉乌头可以减轻胶原诱导性关节炎大鼠滑膜炎性细胞浸润, 免疫组织化学染色结果显示白喉乌头胶原诱导性关节炎大鼠膝关节滑膜中肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 表达均有抑制作用, 表明白喉乌头可能通过减少炎症细胞浸润, 降低炎症细胞因子表达水平, 使亢进的免疫反应减弱, 调节免疫系统, 从而抑制滑膜炎、阻止关节破坏, 达到治疗类风湿关节炎的目的。

综上所述, 白喉乌头可以降低滑膜中肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 表达的水平, 这可能是其抑制类风湿关节炎滑膜炎, 阻止关节破的重要机制。实验初步为白喉乌头治疗类风湿关节炎提供了实验室依据, 但类风湿关节炎

的发生发展是多种因素共同作用, 各个信号途径相互联系、相互影响的结果, 故仍需开展更多的实验室及临床实验对其治疗类风湿关节炎的作用机制及疗效进行进一步研究。

致谢: 感谢新疆医科大学第一附属医院临床医学院实验动物研究中心及病理实验室。

作者贡献: 罗莉负责课题设计及指导。罗德梅负责实验指导及实验动物模型制备。张俊宇负责实验动物模型制备、实验动物给药、关节炎评分、组织学检测。杜文静负责实验动物模型制备、实验动物给药及关节炎评分。吉鹏负责实验动物给药及关节炎评分。刘青负责实验动物模型制备。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验获得所在单位的伦理委员会批注, 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 类风湿关节炎-是一种不明病因导致的以自身免疫性侵蚀性多关节炎为表现的慢性系统性疾病, 其主要的病理表现是滑膜组织增生、炎症细胞浸润及血管翳形成, 并出现软骨和骨的破坏, 最终可导致关节畸形和功能丧失。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E3. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2014;48-49:26-30.
- [2] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW, et al. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2010;376(9746):1094-1108.
- [3] 叶伟胜, 张铁良. 类风湿关节炎流行病学进展[J]. 国际骨科学杂志, 2009, 3(3):144-147.
- [4] endas-Baum R, Wallenstein GV, Koncz T, et al. Evaluating the efficacy of sequential biologic therapies for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to tumor necrosis factor- α inhibitors. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(1):25-28.
- [5] Schleinitz N, Vély F, Harlé JR, et al. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology.* 2010;131(4):451-458.
- [6] Ohta S, Harigai M, Tanaka M, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) converting enzyme contributes to production of TNF-alpha in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001;28(8):1756-1763
- [7] Abramson SB, Amin A. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. *Rheumatology.* 2002;41(9):972-980.
- [8] Zwerina J, Redlich K, Schett G, et al. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:716-729.
- [9] Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008;117(2):244-279.
- [10] Le Loët X, Nordström D, Rodriguez M. Effect of anakinra on functional status in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant therapy with traditional disease modifying antirheumatic drugs: evidence from the omega trial. *J Rheumatol.* 2008;35(8):1538-1544.
- [11] Voulgari, Paraskevi V, Drosos, et al. Adalimumab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Exp Opin Biol Ther.* 2014; 14(4):549-561.
- [12] Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for rheumatoid arthritis. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;140(2):195-204.
- [13] 吴沅峰, 刘维. 中成药治疗类风湿关节炎的实验研究近况[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(11):1846-1849.
- [14] 徐新, 巴哈尔古丽·黄尔汗. 哈萨克药志(第一卷)[M]. 北京: 民族出版社, 2009.
- [15] Han W, Xiong Y, Li Y, et al. Anti-arthritis effects of clemastininoside (AR-6) on PI3K/Akt signaling pathway and TNF- α associated with collagen-induced arthritis. *Pharm Biol.* 2013;51(1):13-22.
- [16] Cuzzocrea S, McDonald MC, Mota-Filipe H. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheuma.* 2000;43(2):320-328.
- [17] 刘悦, 蔡冬梅, 哈木拉提, 等. 哈药白喉乌头对小鼠的急性毒性实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2011, (7):694-696.
- [18] 应晓君, 冯君. 甲氨蝶呤对CIA大鼠滑膜IL-1 β 、IL-8、VEGF表达的影响[J]. 哈尔滨医药, 2013, (3):170-172.
- [19] 周强, 吕厚山, 栗占国. 胶原诱导的关节炎动物模型研究现状及进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(4):227-231.
- [20] 吾买尔夏提, 魏岩. 新疆药用乌头的民族植物学[J]. 中国野生植物资源杂志, 2004, (4):29-30.
- [21] Lv QW, Zhang FC. Comparison of Tripterygium wilfordii Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): a randomised, controlled clinical trial. 2014. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204807.
- [22] 薛蕾, 闫德友. 雷公藤化学成分、生物活性及其资源利用概述[J]. 青海农林科技, 2013, (4):24-28.
- [23] 赵翡翠, 雷蕊, 聂继红. 分光光度法测定新疆不同产地白喉乌头不同部位总生物碱的含量[J]. 中药材, 2013, (9):1406-1408.
- [24] Chen BJ. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Leuk Lymphoma.* 2001;42(3): 253-265.
- [25] 谢希, 陈进伟, 彭佑铭. 抗肿瘤坏死因子 α 治疗类风湿关节炎致感染风险的Meta分析[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, (7): 722-736.
- [26] 黄蓓, 汪庆童, 刘亢亢, 等. 类风湿关节炎发生发展中TNF- α 信号通路与CD4+T细胞的关系[J]. 中国药理学通报, 2013, (7): 900-903.
- [27] Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20(27):1-13.
- [28] Fox SW, Fuller K, Chambers TJ. Activation of osteoclasts by interleukin-1: divergent responsiveness in osteoclasts formed in vivo and in vitro. *J Cell Physiol.* 2000;184(3):334-340.
- [29] Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis and Rheumatism.* 2005;52(1):128-135.
- [30] Coxon A, Bolon B, Estrada J, et al. Inhibition of interleukin-1 but not tumor necrosis factor suppresses neovascularization in rat models of corneal angiogenesis and adjuvant arthritis. *Arthritis Rheuma.* 2002;46(10):2604-2612.
- [31] 王志中, 王勇, 方勇飞, 等. 血小板、与活动期类风湿关节炎的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5):469-472.