青藤碱对佐剂性关节炎大鼠血清及关节液细胞因子的影响

杨德森¹, 刘芳², 曾繁典³, 陈汇³ (1. 湖北中医学院药学院药理教研室, 武汉 430061; 2. 武汉中联药业有限公司, 武汉 430023; 3. 华中科技大学同济医学院药理系, 武汉 430030)

摘要:目的 观察青藤碱对佐剂性关节炎的治疗作用和对血清及关节液细胞因子系列 (IL-1, TNF, IL-4 及 IL-10), 进一步探讨其治疗类风湿性关节炎的可能作用机制。方法 制备大鼠佐剂性关节炎模型, 观察青藤碱的作用。结果 青藤碱显著抑制大鼠佐剂性关节炎继发病变; 该药使佐剂性关节炎大鼠血清及关节液内 IL-1, TNF 水平显著降低, IL-4 及 IL-10 水平显著增高。结论 青藤碱能下调致炎因子 (IL-1, TNF), 上调抗炎因子 (IL-4 及 IL-10) 是其治疗类风湿性关节炎的机理之一。

关键词: 青藤碱; 炎症; 大鼠; 细胞因子

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7693(2006)04-0274-04

作者简介: 杨德森 (1973 -), 男, 武汉市人, 硕士研究生, 讲师。毕业于华中科技大学同济医学院药理学专业, 主要从事中药药理及毒理方面的研究。通讯地址: 武汉市江岸区武汉铁塔厂退休办杨育林转杨德森收, 邮编: 430011; Tel: (027) 82317431, 13554416288。E-mail: zyp0112@sina.com

Effect of sinomenine on cytokine in serum and joint fluid of adjuvant arthritis rats

YANG De-sen¹, LIU Fang², ZENG Fan-dian³, CHEN Hui¹ (1. Department of Pharmacology, Hubei College of Tradition Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 2. Wuhan Zhonglian Pharmaceutical Co., Ltd. Wuhan 430023, China; 3. Department of Pharmacology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discuss the effect of sinomenine on the levels of IL-1, TNF, IL-4, IL-10 of adjuvant arthritis rats. **METHODS** The rat models, namely, Freund's adjuvant arthritis were set up. The anti-inflammatory effect of sinomenine was assessed in the treatment of the rat models. **RESULTS** Sinomenine was shown to exert a dramatic inhibitory effect on secondary reaction of Freund's adjuvant arthritis of rats. It inhibit the activity of IL-1, TNF and significantly decreased levels of IL-4, IL-10 in serum and in joint fluid of adjuvant arthritis rats. **CONCLUSION** Sinomenine has a remarkable treatment effect on RA. Its down-regulating the levels of IL-1, TNF and up-regulating IL-4, IL-10 may be one of the mechanism to cure RA.

KEY WORDS: sinomenine; inflammatory; rat; cytokine

青藤碱 (sinomenine, SIN) 为防己科植物青藤 (*Sinomenium scutum* et Wils.) 及毛青藤 (*Sinomenium scutum* Rehd. et Wils.) 的干燥藤茎中提取的一种生物碱单体^[1], 其结构类似于吗啡。青藤碱具有抗心率失常、镇痛、免疫抑制等多种药理作用, 在临床上应用于治疗类风湿关节炎, 有独特疗效^[2], 目前, 探讨青藤碱这种疗效的药理学机制的研究还不够深入。大鼠佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 是研究类风湿性关节炎 (RA) 的重要模型^[3], 本研究采用 AA 大鼠动物模型, 观察了该药对 AA 大鼠血清及关节液细胞因子系列 (IL-1, TNF, IL-4 及 IL-10) 的影响, 进一步探讨其治疗 RA 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

青藤碱片, 白云山正清制药股份有限公司, 批号: 020118; 泼尼松, 仙居制药有限公司, 批号: 030142; 将上述供试品分别用 1% CMC-Na 溶液配制成混悬溶液备用。IL-1、TNF、IL-4 及 IL-10 放免试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免研究所提供。

1.2 动物

Wistar 雄性大鼠, 体重 (180 ± 20) g, 华中科技大学同济医学院实验动物学部提供, 合格证号: 19-050。

1.3 AA 大鼠模型的建立与给药方法^[4]

取大鼠 72 只, 将每鼠右后跖皮内注射 Freund's 完全佐剂 0.1 mL 致炎, 致炎后大鼠随机分为 5 组, 即正常对照组、模型对照组、泼尼松组及 3 个不同剂量的青藤碱组, 每组 12 只。各组动物按表 1 所示剂量于致炎后第 8 日给药, 每日 1 次, 连续 21 d。注射佐剂前及以后逐日用无弹性的软皮尺测量大鼠左后踝关节周径。

1.4 关节炎指数 (arthritis index, AI) 的计算^[4]

大鼠致炎后第 12 天开始观察并记录全身关节病变程度, 每 4 d 1 次, 全身病变按 5 级分法评价, 根据未注射佐剂的其余 3 只肢体的病变程度累计积分, 计算出 AI。0 分: 无红肿; 1 分: 小趾关节红肿; 2 分: 趾关节和足趾肿胀; 3 分: 踝关节以下的足爪肿胀; 4 分: 包括踝关节在内的全部足爪肿胀。

把各个关节的积分累计起来, 即为每只大鼠的 AI。

1.5 血清、关节浸液的获取与 IL-1, TNF, IL-4 及 IL-10 的检测 致炎后第 28 天, 各组大鼠断头取血, 离心取血清, -20℃ 保存待测; 大鼠处死后, 在非致炎侧踝关节上方 0.5 cm 处摘取肿胀足爪, 纵向切开, 放入存有 5 mL 生理盐水的浸泡过夜, 离心取上清, -20℃ 保存待测。血清、关节浸液中的 IL-1, TNF, IL-4 及 IL-10 活性的测定采用放免法, 按试剂盒说明书操作。

1.6 统计学处理 各组数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较组间数据差异, 采用方差分析。

2 结果

2.1 对大鼠佐剂性关节炎的影响

从致炎后 12 d 起, 青藤碱低、中、高剂量组大鼠左后足跖肿胀度显著低于模型组 ($P < 0.05$), 同时关节炎指数较之显著下降 ($P < 0.05$), 中、高剂量组大鼠左足跖肿胀度和关节炎指数与泼尼松组近似, 无统计学差异。表明青藤碱能显著抑制大鼠佐剂性关节炎的继发病变。见表 1, 2。

2.2 青藤碱对 AA 大鼠血清、关节浸液的与 IL-1、TNF、IL-4 及 IL-10 的影响

与正常对照组相比, 模型组的 AA 大鼠血清及关节浸液内 IL-1 β 、TNF α 显著升高 ($P < 0.05$), 而 IL-4 及 IL-10 水平显著降低 ($P < 0.05$)。青藤碱片低、中、高剂量组大鼠血清及关节浸液内 IL-1、TNF 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$), IL-4 及 IL-10 水平显著高于模型组 ($P < 0.05$), 而与泼尼松组无显著统计学差异。见表 3, 4。

3 讨论

现代医学认为, 大鼠佐剂性关节炎是一种迟发型超敏反应, 亦可能属于自身免疫性疾病。其继发病变一般出现于致炎后 10 d 左右, 主要表现为多发性关节炎, 病理组织学特征可见滑膜充血水肿增生、单核巨噬细胞浸润、纤维素沉着、关节软骨破坏等。这些组织病理学改变和其发病机制与人的 RA 很相似, 故多将其作为研究 RA 的模型^[5]。

研究表明, 在类风湿性关节的发病过程中, 细胞因子网络的失调占有重要的地位, 其中 IL-1、TNF 是关节炎发病的

表 1 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠左后足跖继发性肿胀的影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of sinomenine on degree of swelling of left-hand paws of adjuvant arthritis rats (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	致炎后不同时间 (d) 左足爪肿胀度 (cm)					
		8d	12d	16d	20d	24d	28d
模型组	生理盐水	0.10 ± 0.09	0.62 ± 0.06	0.96 ± 0.11	1.22 ± 0.09	1.06 ± 0.07	0.98 ± 0.13
青藤碱低剂量组	30	0.09 ± 0.08	0.48 ± 0.09*	0.59 ± 0.07***	0.72 ± 0.07***	0.61 ± 0.08***	0.51 ± 0.08***
青藤碱中剂量组	60	0.09 ± 0.08	0.39 ± 0.10***	0.44 ± 0.08***	0.58 ± 0.10***	0.52 ± 0.11***	0.41 ± 0.10***
青藤碱高剂量组	120	0.09 ± 0.08	0.29 ± 0.10***	0.36 ± 0.08***	0.47 ± 0.08***	0.45 ± 0.09***	0.38 ± 0.10***
泼尼松组	40	0.07 ± 0.08	0.19 ± 0.11***	0.35 ± 0.10***	0.44 ± 0.09***	0.41 ± 0.08***	0.35 ± 0.07***

注:同模型组比较,* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001

Note: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 vs the model

表 2 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠关节炎指数的影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of sinomenine on arthritis index of adjuvant arthritis rats (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	致炎后不同时间 (d) 的 AI					
		8d	12d	16d	20d	24d	28d
模型组	生理盐水	3.90 ± 0.79	6.20 ± 1.09	7.90 ± 0.93	8.90 ± 1.12	9.20 ± 1.07	8.70 ± 1.13
青藤碱低剂量组	30	4.20 ± 0.78	5.20 ± 1.06	5.50 ± 1.07*	5.40 ± 1.06***	5.40 ± 1.10***	5.10 ± 1.08***
青藤碱中剂量组	60	3.90 ± 0.66	4.90 ± 0.94	5.30 ± 1.01*	5.10 ± 1.10***	4.90 ± 1.08***	4.70 ± 1.08***
青藤碱高剂量组	120	3.80 ± 0.68	5.10 ± 1.11	4.90 ± 1.08*	4.70 ± 1.12***	4.40 ± 1.11***	4.10 ± 1.09***
泼尼松组	40	3.90 ± 0.78	5.20 ± 1.12	4.80 ± 1.12*	4.60 ± 1.09***	4.30 ± 1.08***	3.90 ± 1.07***

注:同模型组比较,* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001

Note: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 vs the model

表 3 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠血清细胞因子水平的影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of sinomenine on the level of cytokine in serum of adjuvant arthritis rats (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β		TNF α		IL-4		IL-10	
	含量 (pg/mL)		含量 (pg/mL)		含量 (pg/mL)		含量 (pg/mL)	
正常组	170.22 ± 11.03		107.14 ± 30.65		146.91 ± 30.65		816.91 ± 22.65	
模型组	469.13 ± 17.00**		298.67 ± 30.12**		93.86 ± 24.32*		563.16 ± 33.12*	
青藤碱低剂量组	373.12 ± 12.10*#		211.32 ± 27.66*#		194.11 ± 22.36*#		1014.34 ± 22.16*#	
青藤碱中剂量组	311.71 ± 16.20*#		191.17 ± 26.36*#		233.27 ± 24.16*#		1263.27 ± 37.23*#	
青藤碱高剂量组	283.55 ± 15.23*#		172.32 ± 24.23*#		271.44 ± 26.13*#		1574.24 ± 64.33*#	
泼尼松组	251.04 ± 17.38*#		137.45 ± 21.60*#		287.32 ± 19.81*#		1331.15 ± 114.23*#	

注:同正常组比较,* P<0.05,** P<0.01;同模型组比较,# P<0.05,## P<0.01

Note: * P<0.05, ** P<0.01 vs Normal; # P<0.05, ## P<0.01 vs the model

表 4 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠关节浸液内细胞因子水平的影响 (n=12, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of sinomenine on the level of cytokine in joint fluid of adjuvant arthritis rats (n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β		TNF α		IL-4		IL-10	
	含量 (pg/mL)		含量 (pg/mL)		含量 (pg/mL)		含量 (pg/mL)	
正常组	52.28 ± 12.17		207.14 ± 30.65		101.33 ± 21.45		532.71 ± 32.15	
模型组	144.83 ± 19.00**		439.67 ± 32.32**		79.31 ± 22.24*		321.34 ± 23.22*	
青藤碱低剂量组	110.32 ± 19.30*#		361.12 ± 18.76*#		161.44 ± 22.15*#		714.32 ± 96.09*#	
青藤碱中剂量组	95.72 ± 18.20*#		301.07 ± 21.36*#		181.27 ± 31.26*#		924.31 ± 101.26*#	
青藤碱高剂量组	87.15 ± 15.23*#		272.42 ± 31.13*#		242.21 ± 21.31*#		1132.13 ± 24.17*#	
泼尼松组	81.04 ± 10.88*#		267.05 ± 22.60*#		284.13 ± 19.30*#		1211.42 ± 131.15*#	

注:同正常组比较,* P<0.05,** P<0.01;同模型组比较,# P<0.05,## P<0.01

Note: * P<0.05, ** P<0.01 vs Normal; # P<0.05, ## P<0.01 vs the model

重要炎症介质, IL-1 和 TNF在 RA中主要参与以下病理过程:①激活血管内皮细胞,增强内皮细胞黏附分子的表达,在关节炎时,血液中的白细胞正是通过与黏附分子相互作用被汇集到关节腔;②刺激结缔组织细胞和多形核细胞产生前列腺素等小分子炎症递质;③通过刺激滑膜细胞和软骨细胞,破坏骨细胞,并产生胶原酶和其他中性蛋白酶,释放骨钙等,

导致骨和软骨的破坏^[6-7]。而 IL-4, IL-10是发挥抗炎作用的细胞因子,其中 IL-4由活化的 Th2细胞产生,作用主要表现为:①促进巨噬细胞黏附到血管内皮细胞上,然后逸出血管,沿趋化梯度移动到炎症部位;②抑制巨噬细胞分泌 IL-4, IL-6和 TNF,促进 IL-1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra)的产生,从而对抗 IL-1的作用。③通过促进 Th2

细胞扩增,抑制 Th1 细胞介导的免疫应答,从而抑制 RA 患者体内异常的免疫反应^[8]。IL-10 是细胞因子合成的抑制因子。IL-10 能抑制人单核细胞、中性粒细胞等产生细胞因子^[9];还能改善 AA 大鼠的病情,降低血清及关节液内炎症细胞因子含量,明显抑制免疫细胞炎性细胞因子的产生,发挥抗炎作用^[10];促进具有抗炎性递质作用的 IL-1ra 的产生,并与其呈现协同作用^[11]。

本实验结果表明,与正常组相比,模型大鼠血清及关节浸液中 IL-1, TNF α 显著升高,而 IL-4, IL-10 显著降低,提示 AA 大鼠病变过程中细胞因子网络平衡失调。而青藤碱能显著抑制大鼠佐剂性关节炎继发病变,该药使佐剂性关节炎大鼠血清及关节浸液内 IL-1, TNF 水平显著降低,而使 IL-4 及 IL-10 水平显著增高,从而抑制细胞因子的促炎效应,增强细胞因子的抗炎效应,这可能是青藤碱治疗 RA 的机理之一。

参考文献

- [1] 霍海如. 青藤碱镇痛和抗炎作用机理的作用 [J]. 西安医科大学学报, 1989, 4(4): 346-349.
- [2] 余建强, 黄宇明. 正清风痛宁治疗风湿病 695 例临床总结 [J]. 湖南中医杂志, 1994, 10(2): 18-20.
- [3] 邵传森, 朱圣禾. 临床疾病与免疫 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 178-179.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 919-921.
- [5] 马东来. 卡芬尼对大鼠佐剂性关节炎治疗作用的免疫机制 [J]. 中国免疫学杂志, 1992, 8(2): 114.
- [6] 路秀英. 免疫细胞、细胞因子及其抑制物在类风湿性关节炎发生发展中的作用 [J]. 国外医学·免疫学分册, 1993, 16(4): 183.
- [7] 乌兰. 类风湿关节炎病人血清细胞因子水平以及与炎症指标的相关性 [J]. 中华风湿病学杂志, 1997, 1(1): 28-30.
- [8] 王彤钢, 陈慰峰. 白细胞介素 4 生物学功能研究进展 [J]. 国外医学·免疫学分册, 1994, (1): 13-16.
- [9] Sironi M, Hempel L. Divergent effects of interleukin 0 on cytokine production by mononuclear phagocytes and endothelial cells [J]. Eur J Immunol, 1993, 23: 2693.
- [10] 范祖森, 曹荣华, 孙汶和, 等. IL-10 对大鼠佐剂性关节炎的治疗及免疫机理探讨 [J]. 山东医科大学学报, 1996, 34(3): 194-197.
- [11] 王莹洁, 刘钟. 白细胞介素 10 的生物学性质 [J]. 国外医学·免疫学分册, 1996, (3): 95-98.

收稿日期: 2005-11-08