

塞隆骨提取物对牛 型胶原诱导的小鼠关节炎的治疗作用及机制研究

赵晓辉^{1,2}, 岳会兰^{1,2}, 梅丽娟¹, 邵 赞¹, 陶燕铎¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

中国图书分类号: R-332; R 282.74; R 329.24; R 392.12; R 593.220.531; R 977.6

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2008)03-0395-05

摘要:目的 了解塞隆骨水提物(SLGB)对胶原诱导的小鼠关节炎的治疗作用及治疗机制。方法 利用牛 型胶原诱导 DBA/1小鼠类风湿性关节炎模型即 CIA。SLGB口服给药观察小鼠关节炎指数的变化情况,体外培养关节炎小鼠脾细胞及巨噬细胞,ELISA法测定 L-12、L-2、IFN-、TNF- 几种细胞因子。RT-PCR测定 SLGB对关节炎小鼠巨噬细胞 L-1、L-6、NOS mRNA表达的影响。结果 SLGB能明显的抑制牛 型胶原诱导关节炎的发生,能够减轻关节炎的各种症状。SLGB在加抗原和不加抗原的情况下都能够明显的抑制关节炎小鼠脾细胞的增殖同时发现 SLGB能够抑制 L-2、IFN-、L-12p40、TNF- 细胞因子的产生。还能够抑制小鼠腹腔巨噬细胞 L-1、L-6及 NOS mRNA的表达。这可能是 SLGB在小鼠关节炎中表现治疗效果的分子基础。结论 SLGB对小鼠关节炎有很好的治疗效果,其作用机制主要是通过抑制巨噬细胞及脾细胞产生炎性细胞因子和抑制炎性细胞因子 mRNA的表达来达到治疗类风湿性关节炎的作用。

关键词:类风湿性关节炎;细胞因子;胶原;RT-PCR

塞隆 (*Myospalax fontanieri*)骨是高原特有动物高原鼯鼠的全骨风干品。是我国建国以来第一个国家级一类动物药材,其性微温、味辛咸,入肝肾经,主要功能为驱风除湿、散寒、舒筋活络、强筋健骨及增强机体抵抗力等。据报道^[1,2],塞隆骨具有抗炎镇痛作用并能 1:1替代虎骨,塞隆风湿酒试验和细胞染色体畸变试验结果均呈阴性。塞隆骨的药用价值已经受到了众多医药工作者的关注,尤其是对于风湿、类风湿性关节炎的治疗作用成为研究者关注的焦点。本实验室一直在进行塞隆骨治疗类风湿

性关节炎的研究工作。前期的药效学实验已经充分证明塞隆骨对类风湿性关节炎有非常好的治疗预防效果,且具有镇痛、抗凝血等作用。为了进一步研究塞隆骨,为其深层次开发利用提供理论依据,本实验室对塞隆骨的作用机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 动物 实验全部采用 SPF级 DBA/1小鼠, 6~8 wk龄。体重 20~25 g,分为 5组,每组 10只,购自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 受试药物及实验材料 受试药物:名称:塞隆骨水提物(SLGB);配制方法:试验前用生理盐水稀释至所需浓度后使用。试剂: 型牛胶原:购自日本胶原研究协会;Sigma胎牛血清(FBS): Invitrogen公司产品;CFA(弗氏完全佐剂): Sigma公司产品,ELISA用抗体 L-12、L-2、IFN-、TNF-: BD Pharmingen公司产品;RNA酶抑制剂:购于深圳华美公司,批号:2711910;IgG抗体测定试剂盒:BD Pharmingen公司产品;L-1、L-6、NOS引物按照 Genbank提供的序列,计算机设计,GAPDH参考文献,北京赛百胜公司合成;ConA、LPS均为美国 Sigma产品。主要仪器:酶标仪:美国 Thermo,产品型号:Multiskan MK3;二氧化碳培养箱:美国 REVCO 产品型号:3 000 T;高速冷冻离心机:德国 SIGMA,产品型号:3-18K型;高速冷冻离心机:德国 SIGMA 产品型号:3-18K型;ERICOMPinc PCR仪:美国;Pharmacia Biotech Ultraspec 3000紫外分光光度计:英国;二氧化碳培养箱:美国 REVCO 产品型号:3 000 T。

1.3 实验方法

1.3.1 造模及给药 小鼠关节炎模型建立: DBA/1, 6~8 wk龄,小鼠,随机分为 5组(模型对照组、阳性药对照组 MTX 1 mg·kg⁻¹、SLGB高、中、低剂量组),每组 8只小鼠。分别于小鼠尾根部皮下注射佐剂与胶原的乳化物 0.025 ml(含胶原 125 μg),3 wk后进行攻击,于尾根部皮下注射佐剂与胶原的乳化物 0.025 ml(含胶原 125 μg)。1 wk后开始发病,给药剂量分别为 0.09、0.18、0.36 g·kg⁻¹ 3个剂量组,每天 1次。口服给药,连续给药 2

收稿日期:2007-10-11,修回日期:2007-12-10

基金项目:科技部重大基础研究前期研究专项资助(No 061Z041B01)

作者简介:赵晓辉(1979-),男,硕士生,研究方向:天然药物化学,

Tel: 0971-6117264, E-mail: hizhaoxh@163.com;

陶燕铎(1963-),男,研究员,研究方向:天然产物开发与研

究,通讯作者, Tel: 0971-6117264, E-mail: tyd@nwipb.ac.cn

wk^[3]。

1.3.2 小鼠关节炎评分 小鼠造模后 10 d 全部发病,同时观察关节肿胀情况,3~4 d 评分一次(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)。最高为 12 分。每 4 天评分 1 次,进行分级记录。

1.3.3 SLG-B 对胶原诱导的关节炎小鼠脾细胞体外增殖的影响 关节炎模型建立同上,实验分为 5 组(模型对照组、阳性对照组、SLG-B 给药组 0.09、0.18、0.36 g·kg⁻¹),连续给药 1 wk,常规分离脾细胞。用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液将细胞浓度调成 4 × 10⁹ · L⁻¹。于 96 孔板中每孔加入 100 μl 的细胞悬液,100 μl 的抗原,对照加 100 μl 的培养液,总体积 200 μl。每实验组设 3 个复孔。细胞于含 5% CO₂ 的 37 培养箱中培养,培养结束前 8 h 每孔加入 25 μl ³H 胸腺嘧啶核苷酸。继续培养至实验结束,然后将培养板冻存于 -20 冰箱^[4];测定时将冻融的细胞用细胞收集仪收集至玻璃纤维膜上,加入闪烁液后于 计数仪上读取参入细胞 DNA 的 ³H 胸腺嘧啶核苷酸量,以 cpm 值代表细胞增殖的情况。

1.3.4 SLG-B 对关节炎小鼠炎性细胞因子的影响 关节炎模型建立同上,实验分为 5 组(模型对照组、阳性对照组、SLG-B 给药组 0.09、0.18、0.36 g·kg⁻¹),连续给药 1 wk。关节炎小鼠脾细胞分离同 1.3.3 项,脾细胞悬液 5 × 10⁵ 孔加或不加抗原(100 mg·L⁻¹)刺激,3 复孔,于含体积分数为 0.05 CO₂ 的 37 培养箱中培养 24~72 h,收上清。用细胞因子 ELISA 检测试剂盒(Pharmingen 产品)检测 L-2、IFN、L-12。

腹腔巨噬细胞分离:实验前 3 d 小鼠腹腔注射体积分数为 0.1 的巯基乙酸液(TG),实验当天断头处死小鼠,用 PBS(含 FBS 体积分数为 0.02)洗出腹腔渗出液,离心,用含体积分数为 0.02 FBS 的 PBS 洗 1 遍后,重悬在含体积分数为 0.1 FBS 的 RPMI 1640 培养液。以 2 × 10⁵ cells·well⁻¹ 加入 96 孔平板,加入 LPS 及 IFN- 刺激,加或不加抗原培养过夜,收集上清,用细胞因子 ELISA 检测试剂盒(Pharmingen 产品)检测 L-2、IFN、L-12、TNF- 的含量^[5,6]。

1.3.5 血清抗型胶原抗体测定 致炎后 d 44,小鼠摘眼球取血,室温放置后离心取血清(5 000 r·min⁻¹, 5 min),进行 C 特异性抗体检测。用 PBS 将 C 稀释(100 mg·L⁻¹),96 孔酶标板每孔加入

100 μl 稀释后的抗原,密封酶标板。于 4 冰箱孵育过夜。洗 3 遍后,每孔加入 200 μl 封闭液,室温下封闭 1~2 h。清洗后,每孔加入 100 μl 样品(封闭液稀释)。密封平板,37 ,孵育 1 h。清洗后加入 HRP 连接的抗小鼠 IgG,在室温放置 1 h。底物(TMB)显色 0.5 h 后,加入终止液(1 mol·L⁻¹ H₂SO₄)。于 450 nm、校正 570 nm 处,测定 OD 值。

1.3.6 SLG-B 体内给药对腹腔巨噬细胞细胞因子 L-1、L-6、NOS mRNA 产生的影响 方法:关节炎小鼠经塞隆骨提取物治疗 1 wk 后,收集各组腹腔巨噬细胞于 EP 管中,5 × 10⁶ 每管。加入 1 ml TRzol (Invitrogen)裂解。提取总 RNA 并反转为 cDNA。以 PCR 反应扩增 cDNA,反应的条件如下,95 5 min,接下来 35 个循环,每循环为 95 30 s,55 30 s,72 1 min,最后 72 10 min。

所用引物序列: -actin sense: 5'-GGGAATGGGTCAGAA GGA-3'; anti-sense: 5'-AAGAAGGAA GCTGGAAA-3'; L-1 sense: 5'-CCAAGGATGAGGAGACCCAA GCA-3'; anti-sense: 5'-TCCCCACCA TTGCTGTTTC-3'; L-6 sense: 5'-TTGCTTCTTGGGACTGATGCT-3'; anti-sense: 5'-GTA TCTCTCTGAA GACTCTGG-3'; NOS sense: 5'-AAGTCAAATCCTACCAAAGTGA-3'; anti-sense: 5'-CCATAA TACTGGTTGATGAACT-3'; PCR 产物以质量分数为 0.01 的琼脂糖电泳,EB 染色后拍照。

1.3.7 统计学处理 实验结果以 ̄x±s 表示,两样本均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 SLG-B 对小鼠关节炎发病的影响 SLG-B 给药后能够明显的抑制 CIA 小鼠多发性关节炎的发生,并且高剂量组优于 MTX(1 mg·kg⁻¹)。给药 20 d 后小鼠关节炎症状明显减轻,足肿胀明显减退,小鼠行动灵活,见 Fig 1。

2.2 SLG-B 对胶原诱导的关节炎小鼠脾细胞体外增殖实验 经 SLG-B 治疗 1 wk 的关节炎小鼠脾细胞体外经抗原刺激后的增殖反应与模型对照组相比明显降低。在加或不加抗原的情况下 SLG-B 都表现出了对脾细胞增殖的抑制作用,见 Fig 2。

2.3 SLG-B 体内给药对关节炎小鼠细胞因子产生的影响 SLG-B 各剂量组明显抑制了脾细胞及腹腔巨噬细胞培养上清中细胞因子 L-2、L-12、IFN-、L-6、TNF- 的产量。与模型组比较其抑制作用都有显著性,提示 SLG-B 对关节炎小鼠脾细胞和巨噬细胞免疫功能亢进有明显抑制作用,见 Fig 3。

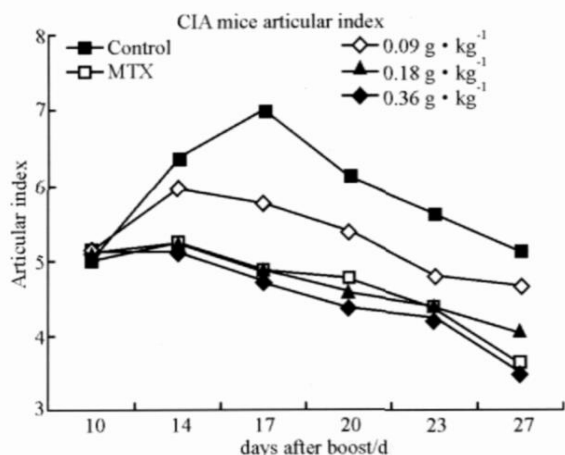


Fig 1 The inhibitory effects of SLG-B on collagen-induced CIA mice (n = 8)

After administration of SLG-B two weeks, mice articular index was markedly inhibited. The therapeutic effect SLG-B high dose group of was better than that of MTX group

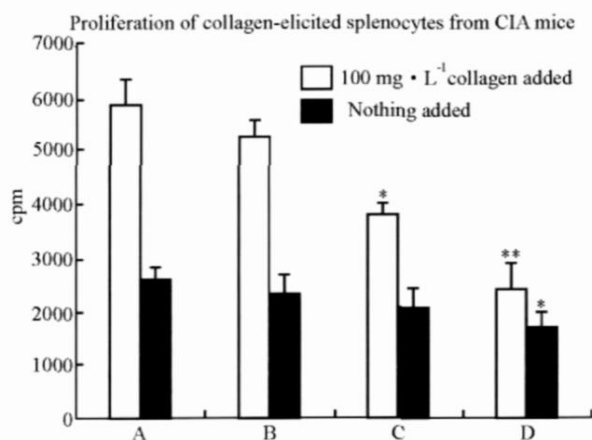


Fig 2 Effects of SLG-B on proliferation of collagen-induced splenocytes from CIA mice

A. Control; B. SLG-B 0.09 g · kg⁻¹; C. SLG-B 0.18 g · kg⁻¹; D. SLG-B 0.36 g · kg⁻¹. After administration of SLG-B one week, splenocytes cells of CIA mice were incubated with 100 mg · L⁻¹ collagen or nothing for 72 h. Cultures were pulsed with [³H] thymidine for the final 12 h. n = 8, * P < 0.05, ** P < 0.01 vs vehicle control

2.4 SLG-B体内给药对关节炎小鼠血清中特异性抗体产生的影响 SLG-B口服给药对关节炎小鼠脾血清中特异性抗 CII抗体的产生没有影响。说明 SLG-B对小鼠关节炎的治疗不是通过 B淋巴细胞发挥作用起效的,对体液免疫没有明显影响,见 Tab 1。

Tab 1 The effect of SLG-B on anti-collagen IgG antibody of mice serum (n = 8)

Group	Dose/g · kg ⁻¹	OD value
Control	Distilled water	0.134 ± 0.003
SLG-B	0.09	0.145 ± 0.021
SLG-B	0.18	0.165 ± 0.033
SLG-B	0.36	0.159 ± 0.012

2.5 SLG-B体内给药对腹腔巨噬细胞细胞因子 L-1、L-6、iNOS mRNA 产生的影响 SLG-B体内给药能抑制腹腔巨噬细胞 L-1、L-6及 iNOS mRNA 的表达。0.18、0.36 g · kg⁻¹给药组电泳条带明显被抑制,说明 SLG-B能够从 mRNA 水平抑制上述几种炎症因子的表达,从而抑制巨噬细胞产生上述 3种炎症因子,见 Fig 4。

3 讨论

通过对塞隆骨提取物的实验研究中发现 SLG-B具有很强的免疫抑制作用。在 CIA小鼠关节炎模型上,SLG-B能够明显抑制小鼠关节炎的发病,减轻 CIA小鼠的相关症状,显示其有较好的抗炎作用。与模型组比较 SLG-B各剂量组明显的降低了 CIA小鼠发病指数的评分,治疗组小鼠足肿胀等症状明显减轻。在脾细胞及腹腔巨噬细胞炎症细胞因子的测定中同 SLG-B一样,表现出了对细胞因子产量的明显抑制。不同剂量的 SLG-B都可以抑制脾细胞产生 L-2、IFN-、L-12 (P < 0.05 或 P < 0.01),并能明显的抑制脾细胞的体外增殖,说明塞隆骨提取物能够抑制机体细胞免疫功能的亢进。同时观察了 SLG-B对 CIA小鼠炎症细胞因子 TNF- 产生的抑制作用,结果发现 SLG-B可以明显抑制关节炎小鼠腹腔巨噬细胞产生 TNF- (P < 0.05 或 P < 0.01),说明 SLG-B抗 CIA小鼠关节炎的作用可能与对抗上述炎症介质作用有关。为了深入研究塞隆骨提取物的免疫作用机制,我们应用 RT-PCR 技术研究了胶原性小鼠关节炎模型 L-1、L-6、iNOS mRNA 表达的影响。结果显示:SLG-B各剂量组给药 1wk均能明显抑制关节炎小鼠腹腔巨噬细胞 L-1、L-6、iNOS mRNA 表达。这一试验结果说明 SLG-B能够抑制胶原型关节炎小鼠腹腔巨噬细胞 L-1、L-6、iNOS mRNA 表达而抑制炎症介质的产生。这可能是 SLG治疗类风湿性关节炎的主要分子免疫抑制机制之一。我们的实验还发现 SLG-B治疗组对 CIA小鼠血清中 IgG抗体的产生没有明显作用。说明 SLG-B在对类风湿性关节炎起效过程中其作用靶点可能与 B淋巴细胞无关。

SLG-B对巨噬细胞所表现出的特有的免疫抑制活性应是它治疗类风湿性关节炎的主要机制。SLG-B能够明显抑制巨噬细胞产生的多种炎症因子,表现出了强大的免疫抑制活性。它对小鼠关节炎巨噬细胞因子、L-1、L-6、TNF-、iNOS所表现出的抑制作用是其治疗作用的主要机制。越来越多的研究表明,活动性关节炎与巨噬细胞 L-1、L-6和 TNF- 明显相关,在 RA发病过程中的重要作用,而

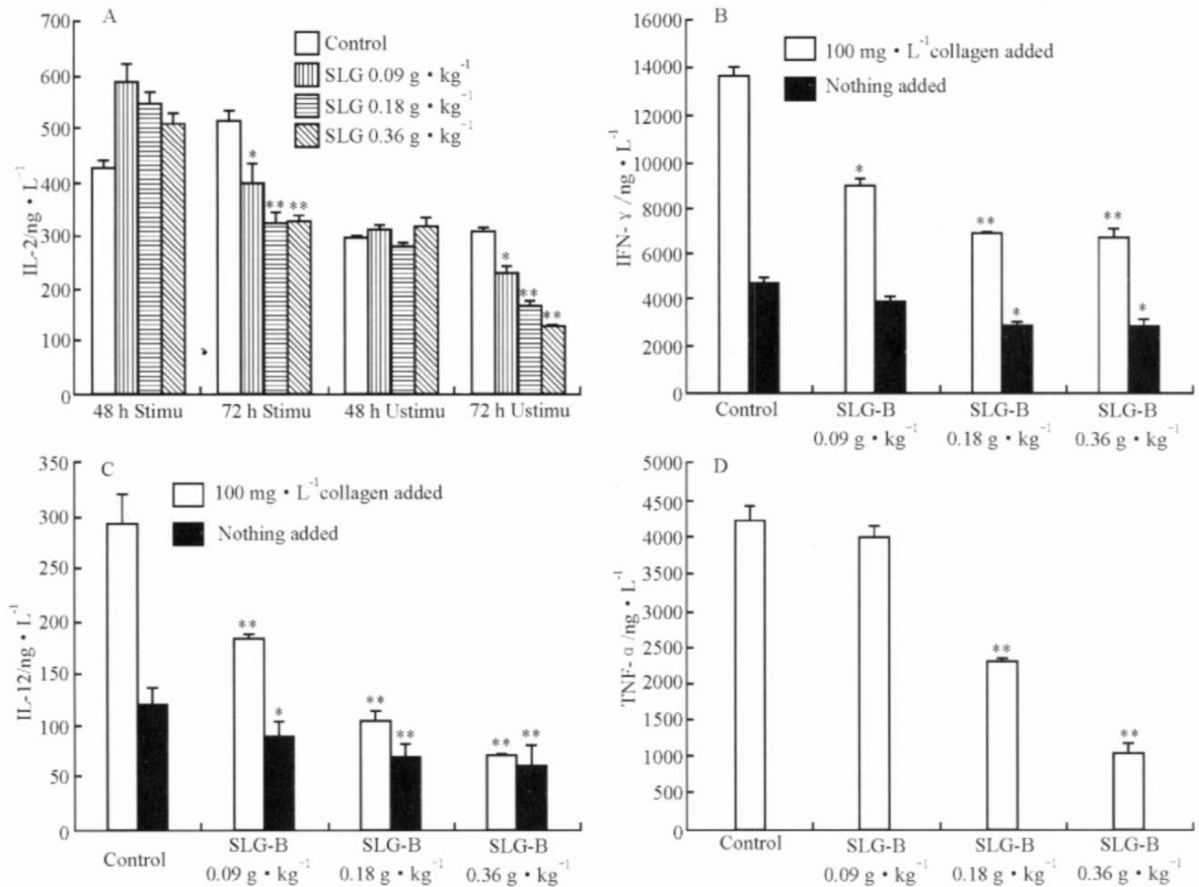


Fig 3 Effects of SLG on cytokine production of CIA mice

After administration of SLG-B one week, splenocytes cells of CIA mice were incubated with 100 mg · L⁻¹ collagen or nothing for 48, 72 h. Culture supernatants were collected and analyzed by ELISA for levels of L-2. 48 h Culture supernatants were collected and analyzed by ELISA for levels of IFN-γ, IL-12. n=8, * P < 0.05, ** P < 0.01 vs vehicle control A: Production of L-2; B: Production of IFN-γ; C: Production of IL-12; D: Production of TNF-α

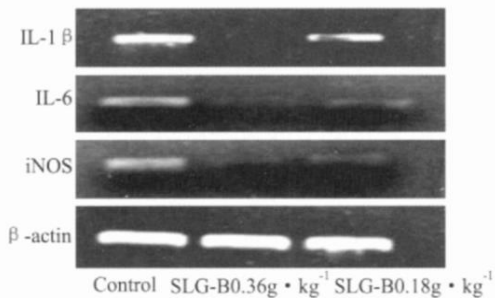


Fig 4 The effects of SLG-B on IL-1, IL-6, iNOS mRNA expressions after administration one week

与 T 细胞相关性不显著。NO 的作用也受到关注，NO 可以促进 M 释放 L-1、TNF-α，形成恶性循环而增加 RA 的临床症状，并且影响纤维母细胞样滑膜细胞诱导产生基质金属蛋白酶 (MMPs)，加重关节损伤，因此，抑制 NOS 合成，减少 NO 可以减轻关节损伤^[6, 7]。

参考文献:

[1] 海平. 塞隆骨抗炎作用的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2000; 524 - 6
 [1] Hai P. Experimental Study on Anti-inflammatory effect of sai long

bone [J]. Liaoning J Trad Chin Med, 2000; 523 - 6
 [2] 魏立新, 张宝琛, 杜玉枝. 塞隆骨和虎骨的羟脯氨酸含量分析比较 [J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23 (3): 9 - 12
 [2] Wei L X, Zhang B S, Du Y Z. The Analysis of hydroxyproline in sai longgu and hugu bone [J]. Amino Acids Biotech Reso, 2001, 23 (3) 9 - 12
 [3] 周茹, 杨以阜, 左建平. 型胶原诱导的小鼠关节炎动物模型的建立及影响因素 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22 (12): 1532 - 5.
 [3] Zhou R, Yang Y F, Zuo J P. Establishment and influencing factors of type collagen induced murine arthritis model [J]. Chin Pharmacol Bull, 2006, 22 (12): 1532 - 5.
 [4] Zhu Y N, Zhao W M, Yang Y F, et al. Periplocoside E, an effective compound from Periplocoside Bge, inhibited T cell activation in vitro and in vivo [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316 (2): 662 - 9.
 [5] Fu Y F, Wang J X, Zhao Y, et al. S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase inactivation curtails ovalbumin-induced immune responses [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316 (3): 1229 - 37.
 [6] 夏丽娟, 陈飞虎, 任斌, 等. 重组人内抑素对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞增殖及产生细胞因子的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23 (1): 59 - 63.
 [6] Xia L J, Chen F H, Ren B, et al. Effect of recombinant human endostatin on proliferation and cytokines production of synoviocytes from adjuvant arthritis rats in vivo [J]. Chin Pharmacol Bull, 2007, 23 (1): 59 - 63.

尼莫地平对癫痫大鼠海马突触后致密物 95 表达的影响

王 佩, 王维平, 王海祥, 王晓鹏, 刘瑞春, 胡华伟, 范月辉

(河北医科大学第二医院神经内科, 河北 石家庄 050000)

中国图书分类号: R-332; R 322.81; R 338.64; R 341;
R 342.22; R 742.102.3; R 971.6; R 977.6

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2008)03-0399-04

摘要:目的 探讨尼莫地平(nimodipin, NM)对戊四氮(Pentylenetetrazol, PTZ)点燃癫痫大鼠空间学习记忆能力及海马突触后致密物 95 (postsynaptic density 95, PSD-95) 表达的影响。方法 动物分为正常对照组、PTZ组和 NM 组, 采用 PTZ 慢性点燃癫痫模型, 应用 Morris 水迷宫观察各组大鼠空间学习记忆能力, Western blot 及反转录多聚酶链反应(RT-PCR)方法检测各组大鼠海马 PSD-95 蛋白和 PSD-95 mRNA 的表达。结果 PTZ 致病组大鼠空间学习记忆能力受损, 其

海马 PSD-95 蛋白水平及 PSD-95 mRNA 表达较对照组明显减少 ($P < 0.05$); 与 PTZ 组比较, NM 组大鼠空间学习记忆能力好转, 其海马 PSD-95 蛋白水平及 PSD-95 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$)。结论 PTZ 点燃癫痫大鼠存在空间学习记忆受损, 可能与 PSD-95 表达减少有关; NM 可以提高 PSD-95 的表达, 改善癫痫大鼠的学习记忆能力。

关键词: 尼莫地平; 癫痫; 空间学习记忆; 突触后致密物 95

癫痫是常见的神经科综合征, 临床发现 30% ~ 40% 的癫痫患者除癫痫发作外, 常伴有学习记忆力减退等认知功能受损的表现, 严重影响了患者的生存质量。癫痫与认知功能损害的关系已被人们广泛重视, 并已成为现代癫痫病研究的热点之一, 但癫痫对认知功能损害的机制还不清楚。文献表明, 钙超载在这个功能紊乱过程中起着重要的作用。电生理研究发现, 细胞膜上至少有三类电压依赖性钙门控通道, 即 L、N 及 T 型, 尼莫地平为双氢吡啶类钙

收稿日期: 2007-10-31, 修回日期: 2007-12-24

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (No C2007000852); 河北省科技攻关项目 (No 07276101D-21)

作者简介: 王 佩 (1971-), 女, 博士生, 副主任医师, 研究方向: 癫痫, E-mail: w_z_h_01@163.com;
王维平 (1959-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 癫痫, 通讯作者, E-mail: ldh_wwp_lcy@163.com

[7] Stefanovic-Racic M, Stadler J, et al Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes[J]. *J Rheumatol*, 1994, 21: 1892-8.

[8] Sakurai H, Kohsaka H, Liu M F, et al Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96: 2357-63.

The effects of *Myospha lax fontanieri* extracts on cattle type collagen-induced arthritis

ZHAO Xiao-hui^{1,2}, YUE Hui-lan^{1,2}, MEI Li-juan¹, SHAO Yun¹, TAO Yan-duo¹

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: **Aim** To investigate the therapeutic effects and mechanisms of *Myospha lax fontanieri* extracts (SLG-B) on cattle type collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. **Methods** The collagen-induced arthritis (CIA) model was established to research on the preventive effects and cure RA for SLG-B protein, the cell culture technology was used to study the influence of effects of cytotoxicity and influences of T and M cell proliferation and the concentrations of L-1, L-6, L-12p40, IFN- and TNF- were detected by ELISA. Through RT-PCR the inhibitory effect on L-1, L-6 and NOS mRNA gene expression was detected. **Results** The results showed that SLG-B had the good effect of prevention and cure on CIA and could inhibit

joints of the forepart affect swell. SLG-B could suppress the proliferation of T lymphocytes stimulated with ConA. They all had the inhibitory effect on L-2, IFN-, L-12 and TNF- produced in cultured T cell and peritoneal macrophages in CIA mice. It had the inhibitory effect on L-1, L-6 and NOS mRNA gene expression in peritoneal macrophages of CIA mice *in vivo*. **Conclusions** SLG-B has good therapeutic effect on collagen-induced arthritis, the main mechanisms of which are related to its decrease of cytokine production and inhibition of mRNA expression of inflammatory cytokines. **Key words:** rheumatoid arthritis; inhibition of cytokines; collagen; RT-PCR