

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.20.002

文章编号: 1005-8982(2017)20-0006-05

芍药甘草附子汤对类风湿关节炎大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 表达的影响

谢传美,袁国华

(川北医学院附属医院 风湿科,四川 南充 637000)

摘要:目的 探讨芍药甘草附子汤(PGAD)对类风湿关节炎(RA)大鼠下丘脑室旁核神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、白介素 1 β (IL-1 β)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达的影响。**方法** 选取 48 只健康 Wistar 大鼠,随机分 3 组,每组 16 只,分别为对照组、模型组及药物干预组。由 II 型胶原酶诱导关节炎大鼠,采用大鼠关节炎评分法和足爪肿胀评分法评价其模型是否复制成功;30mg/kg PGAD 灌胃;免疫荧光和 Western blot 检测下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 的表达。**结果** 3 组大鼠关节炎评分、足爪肿胀评分、下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 表达比较,模型组和药物干预组较对照组升高($P < 0.05$),药物干预组较模型组下降($P < 0.05$)。**结论** PGAD 对 RA 大鼠有治疗、保护作用,其机制可能与抑制下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 表达有关。

关键词: 芍药甘草附子汤;类风湿关节炎;下丘脑室旁核;一氧化氮合酶;白介素 1 β ;肿瘤坏死因子 α
中图分类号: R392 **文献标识码:** A

Effect of PGAD on nNOS, IL-1 β and TNF- α expressions in hypothalamic paraventricular nuclei of rats with rheumatoid arthritis

Chuan-mei Xie, Guo-hua Yuan

(Department of Rheumatology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College,
Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Peony and Glycyrrhiza and Aconite Decoction (PGAD) on the expressions of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), IL-1 β and TNF- α in the hypothalamic paraventricular nuclei of the rats with rheumatoid arthritis. **Methods** Forty-eight healthy Wistar rats were randomly divided into control group, model group and PGAD-intervention group with 16 in each group. The arthritis rat model was induced by type II collagenase and evaluated by arthritis score and paw swelling score. The arthritis rats in the PGAD intervention group were given 30 mg/kg PGAD by gavage. Immunofluorescence and Western blot were used to detect the nNOS, IL-1 β and TNF- α expressions in the hypothalamic paraventricular nuclei. **Results** The arthritis score, the paw swelling score, and the expressions of nNOS, IL-1 β and TNF- α in the hypothalamic paraventricular nuclei were significantly higher in the model and PGAD-intervention groups than in the control group ($P < 0.05$). but significantly lower in the PGAD intervention group than in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** PGAD has therapeutic and protective effect on the rats with rheumatoid arthritis, which may be related to the inhibition of nNOS, IL-1 β and TNF- α expressions in the hypothalamic paraventricular nuclei.

Keywords: Peony and Glycyrrhiza and Aconite Decoction; rheumatoid arthritis; hypothalamic paraventricular nucleus; nNOS; IL-1 β ; TNF- α

收稿日期:2016-05-26

[通信作者] 袁国华, E-mail: ghuayuan1996@yahoo.com; Tel: 13990799112

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性对称性多关节炎表现为主要特征的全身性自身免疫性疾病^[1]。最新研究发现,RA 患者糖皮质激素严重缺乏,已经证实糖皮质激素严重缺乏是RA 的一个重要发病机制^[2-3]。近年来,RA 在神经内分泌免疫学方面的发病机制研究越来越受到关注,下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis,HPAA)功能在 RA 发病中发挥重要作用^[4]。下丘脑的室旁核(paraventricular nucleus of hypothalamus,PVN)是调节 HPAA 的主要核团^[5]。研究发现,芍药甘草附子汤(paeoniae and glycyrrhizae and aconiti decoction,PGAD)能有效缓解 RA 的症状,控制病情的快速发展,临床疗效较好,是一种治疗 RA 的手段^[6]。但是 PGAD 预防与治疗 RA 的具体机制尚未报道。本研究通过观察 PGAD 是否通过血脑屏障,进而影响下丘脑室旁核内神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase,nNOS)、白介素 1 β (Interleukin-1 β ,IL-1 β)及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)表达,探讨 PGAD 是否通过影响 PVN 区 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 的表达对 RA 起治疗、保护的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

选取健康雌性 Wistar 大鼠 48 只,体重 220~260 g(川北医学院实验动物中心提供),动物饲养室温(20 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度 43%~45%,常规自由摄食、饮水,将动物适应性喂养 1 周后开始进行实验。

1.2 药品与试剂

PGAD 购自广州广修堂医药科技有限公司,含量 \geq 30%。完全弗氏佐剂购自美国 Sigma 公司,nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 一抗购自美国 Abcam 公司,兔抗大鼠抗体购自 Abcam 公司,山羊抗兔购自 Santa Cruz 生物技术公司。

1.3 实验动物分组

SD 大鼠随机分为对照组、模型组及药物干预组(PGAD 30 mg/kg),每组 16 只。

1.4 方法

1.4.1 模型的复制 药物干预组大鼠按照 30 mg/kg 剂量给药^[7]。模型组和药物干预组每只实验大鼠注射完全弗氏佐剂诱导关节炎模型^[8-9]。药物干预组在模型复制过程中即可开始给药,每天灌胃给药,直至取材。模型组和对照组给予等剂量的生理盐水灌胃。

1.4.2 关节观察及评分 关节炎评分规定^[10]:每只 RA 模型大鼠的关节炎最高评分为 8 分。以下情况计为 1 分:①有 1 只耳朵出现结节和红肿;②1 只鼻子出现结节和红肿;③1 只尾巴出现结节和红肿;④1 只足爪出现结节和红肿。

足爪肿胀评分规定^[11]:每只 RA 模型大鼠的足爪肿胀最高评分为 24 分。以下情况计为 1 分:①1 只腕关节或踝关节出现结节和红肿;②每个小关节出现结节和红肿(每只足爪包括 5 只指关节或趾关节)。

1.4.3 取材 在药物干预后第 21 天进行灌注。30% 水合氯醛麻醉,500 ml 生理盐水冲洗,40 g/L 多聚甲醛+0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)pH 值 7.2 灌注固定。灌注完在冰块上小心取下丘脑组织,包埋切片,厚 14 μ m。

1.4.4 免疫荧光法染色 采用免疫荧光法染色检测 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 阳性神经元。将切片从-80 $^{\circ}$ C 冰箱取出,复温 10 min,0.01 mol PBS 冲洗 3 次;30% Triton 打孔 1 h;5%牛血清 37 $^{\circ}$ C 封闭孵育 1 h;加 nNOS1、IL-1 β 及 TNF- α 一抗(1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜,加二抗 1:200,放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱温育 1 h,PBS 冲洗。滴加荧光封片剂,封片。荧光显微镜进行观察拍摄,利用图像分析系统进行分析。

1.4.5 Western blot 检测 实验结束 30 min 后迅速断头处死大鼠,取出脑组织。游离下丘脑室旁核,放置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。4 $^{\circ}$ C 下将 PVN 区切片,裂解分离 PVN 区组织,然后经匀浆液离心,提取 PVN 区总蛋白,离心总蛋白,超声波裂解,从裂解液中分离提取生物化蛋白。组织匀浆后提取蛋白成分变性,蛋白样品通过聚丙烯酰胺凝胶(积层胶浓度 6%,分离胶浓度 10%)电泳 2 h,将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上(湿转 300 mA,1.5 h 或 110 V,1 h)。转膜后置于 3%牛血清蛋白溶液中孵育;加一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline and tween 20,TBST)洗一抗;加二抗(1:1 000)室温孵育 40 min,TBST 洗二抗,发光。采用 NIH Image J 和 Imagine 软件进行图像分析。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较用方差分析,方差齐则两两比较用 SNK- q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

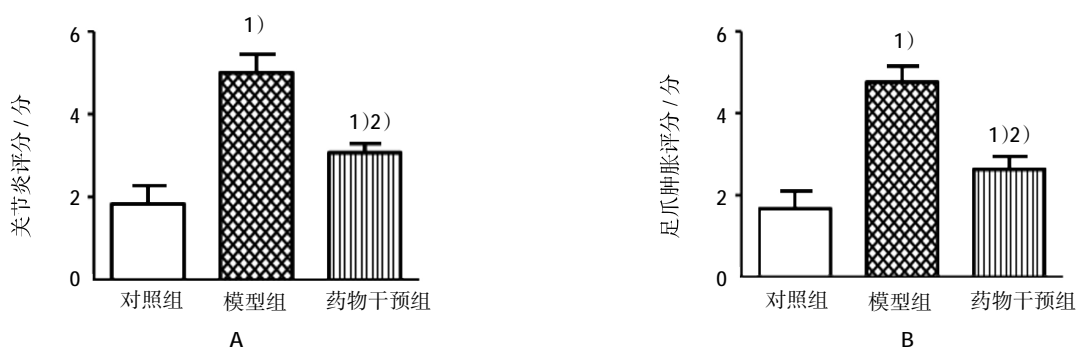
2.1 PGAD 治疗 RA 大鼠的疗效分析

RA 模型大鼠第 17 天出现 RA 症状:四肢、耳朵、鼻子、尾巴出现红肿或结节。对照组、模型组及药物干预组关节炎评分比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=56.341, P=0.000$),进一步两两比较经 SNK- q 检验,模型组和药物干预组关节炎评分高于对照组($q=23.649$ 和 18.219 , 均 $P=0.000$);与模型组比较,药物干预组大鼠关节炎评分降低($q=20.401, P=0.000$)(见图 1A)。第 17 天各组大鼠足爪肿胀评分比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=65.612, P=0.000$),进一步两两比较经 SNK- q 检验,模型组和药物干预组大鼠足爪肿胀评分高于对照组($q=46.469$ 和 21.655 , 均 $P=0.000$);与模型组比较,药物干预组

大鼠的足爪肿胀评分降低($q=36.129, P=0.000$)(见图 1B)。

2.2 PGAD 对 RA 大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 阳性神经元表达的影响

对照组、模型组及药物干预组的大鼠下丘脑室旁核 nNOS 阳性神经元量分别为 34.000、42.000 和 19.000 pg/ml,IL-1 β 阳性神经元量分别为 0.183、0.610 和 0.376 pg/ml,TNF- α 阳性神经元量分别为 0.890、2.343 和 1.776 pg/ml(见图 2)。各组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 阳性神经元量比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=51.712$ 、 55.626 和 71.916 , 均 $P=0.000$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验,模型组和药物干预组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 阳性神经元数量高于



1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与模型组比较, $P < 0.05$

图 1 PDAG 治疗 RA 大鼠的疗效分析 ($n=16, \bar{x} \pm s$)

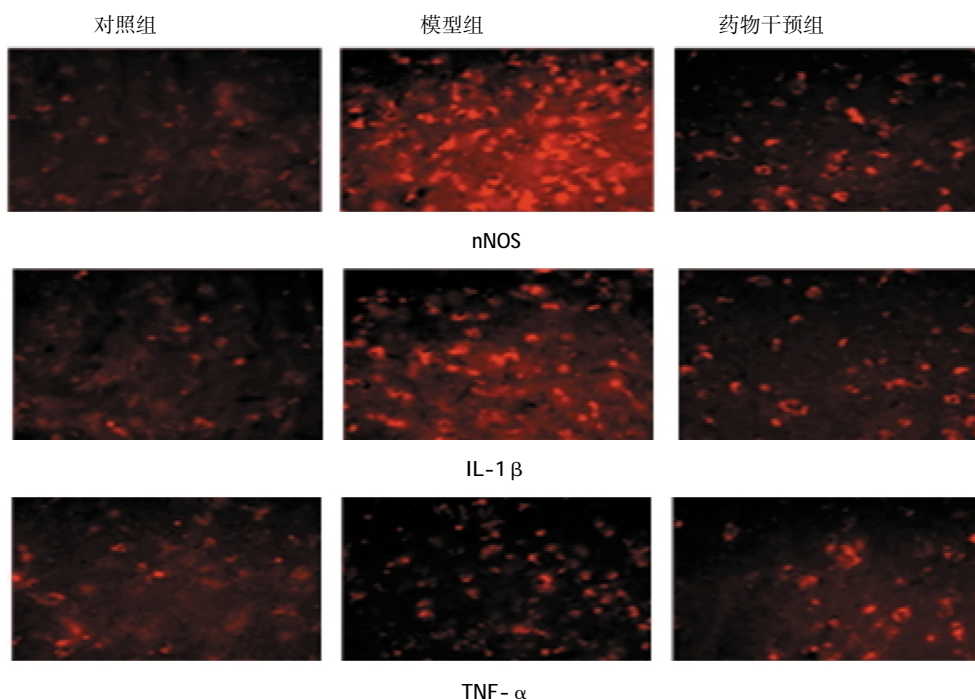


图 2 各组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 阳性神经元的表达 (免疫荧光法 $\times 40$)

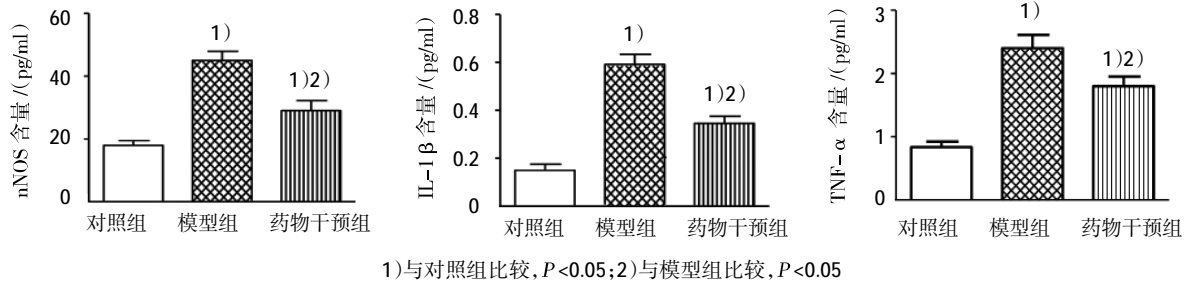


图 3 各组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 阳性神经元表达比较 (n=16, $\bar{x} \pm s$)

对照组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 药物干预组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 阳性神经元数量降低 ($P < 0.05$) (见图 3)。

2.3 PGAD 对 RA 大鼠下丘脑室旁核蛋白表达的影响

对照组、模型组及药物干预组的大鼠下丘脑室旁核 nNOS 的表达量分别为 19.7%、54.3% 和 3.41%, IL-1 β 的表达量分别为 1.75%、28.9% 和 2.06%, TNF- α 的表达量分别为 12.4%、26.7% 和 22.6% (见图 4)。各组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 的表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 31.188, 38.912$ 和 61.523 , 均 $P = 0.000$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, 模型组和药物干预组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及

TNF- α 的表达量高于对照组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 药物干预组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 表达量降低 ($P < 0.05$) (见图 5)。

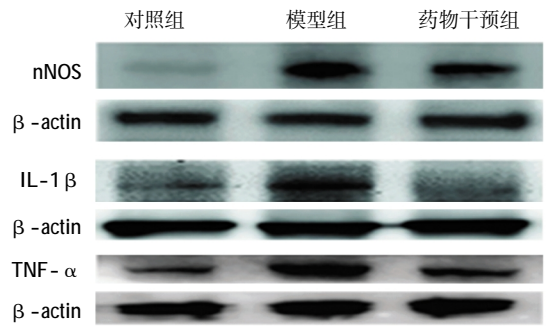


图 4 各组大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 蛋白的表达

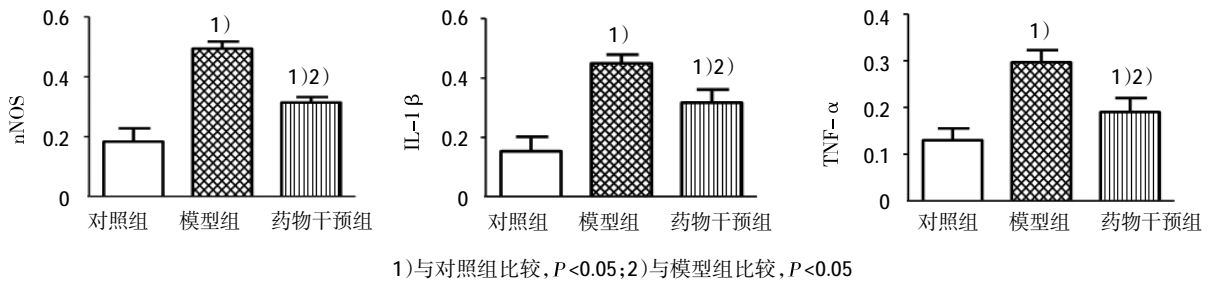


图 5 各组 RA 大鼠下丘脑室旁核 nNOS、IL-1 β 及 TNF- α 蛋白表达的比较 (n=16, $\bar{x} \pm s$)

3 讨论

RA 属于“痹证”范畴, 中医认为风、寒、湿、热诸邪是 RA 发生、发展的外部条件, 而诸虚内存, 正气不足是其发病的内因。现代医学主要以药物治疗为主, 如非甾体抗炎药、改变病情的抗风湿药、糖皮质激素等, 目的在于减轻疼痛、控制病情进展。由于服药时间长, 毒副作用大, 患者往往难以接受。芍药甘草附子汤出自《伤寒论》, 见于 68 条。发汗, 病不解, 反恶寒者, 虚故也, 芍药甘草附子汤主之。由芍药、炙甘草、炮附子 3 味药组成。该中药可以改善 RA 症状, 毒副作用较小, 易长期坚持服用, 但其具体机制

尚不明确。

下丘脑室旁核具有中枢调控与整合作用, 是机体神经 - 内分泌 - 免疫系统联系的枢纽。研究发现, nNOS 是一种同工酶, 存在于内皮细胞、巨噬细胞、神经吞噬细胞及神经细胞中。nNOS 存在于神经元中, 在不同脑区呈选择性分布。在 PVN 中存在较多的神经元型 nNOS 阳性神经元, 大鼠脑室内注入 nNOS 的抑制剂后, 能促进室旁核释放因子的合成及促肾上腺皮质激素的释放, 因此 nNOS 可能对 HPA 起抑制调节作用^[2]。本研究发现复制模型后第 21 天, 模型组大鼠 RA 症状较对照组明显; 与对照组比较, 模型组 PVN 区 nNOS 阳性神经元水平与蛋白的表

达增多,因此 RA 大鼠 PVN 区 nNOS 功能处于活跃状态。经 PGAD 治疗后,与模型组比较,药物干预组足肿胀度低于模型组,具有治疗、保护作用,同时 PVN 区 nNOS 阳性神经元水平与蛋白的表达降低。因此,本研究推测 PGAD 对 RA 具有治疗、保护作用与 PVN 区 nNOS 水平变化有关。

RA 是一种伴有炎症细胞浸润和骨质侵蚀的滑膜组织增生性疾病。滑膜组织的增生、炎症反应及自身免疫反应相互作用、相互联系,共同推动病情进展^[13-14]。在炎症部位、关节积液及滑膜组织中,可检测到多种细胞因子。许多细胞因子被公认为是 RA 炎症及关节损伤的重要分子,该细胞因子参与 RA 的整个病理过程^[15]。根据细胞来源不同,将细胞因子分为 2 大类,一类包括 IL-2、IL-4、IL-10 等主要由 T 细胞产生的淋巴因子;另一类包括 IL-1、IL-6、TNF- α 等主要由单核/巨噬细胞产生的单核因子。PGAD 治疗 RA 大鼠后,TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平降低,表明 PGAD 对 RA 的作用机制与抑制 TNF- α 和 IL-1 β 水平密切相关。

本研究发现,RA 大鼠 PVN 区 nNOS、TNF- α 及 IL-1 β 含量较对照组升高。PGAD 灌胃治疗后,大鼠 PVN 区 nNOS、TNF- α 及 IL-1 β 含量降低,提示降低 PVN 区 nNOS、TNF- α 及 IL-1 β 水平能影响 PGAD 治疗 RA 的疗效。

参 考 文 献:

- [1] TAKESHITA M, KUNO A, SUZUKI K, et al. Alteration of matrix metalloproteinase-3 O-glycan structure as a biomarker for disease activity of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 112.
- [2] RAZAVI H, RIETHER D, HARCKEN C, et al. Discovery of a potent and dissociated non-steroidal glucocorticoid receptor agonist containing an alkyl carbinol pharmacophore [J]. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24(8): 1934-1940.
- [3] JUHÁSZ P, ÁDÁM MESTER, BIRÓ A J, et al. Clinical and radiological dissociation of anti-TNF plus methotrexate treatment in early rheumatoid arthritis in routine care: results from the ABRA study [J]. *Molecular Biochemical Parasitology*, 2014, 15(2): 169-178.
- [4] 高骏,刘旭光,黄迪君,等. HPA 在艾灸调控类风湿性关节炎大鼠滑膜组织 NF- κ B 信号通路中的作用 [J]. *针刺研究*, 2010, 35(3): 198-203.
- [5] VALENTINO R, SAVASTANO S, TOMMASELLI A P, et al. Hormonal pattern in women affected by rheumatoid arthritis [J]. *J Endocrinol Invest*, 1993, 16(8): 619-624.
- [6] SECA S, KIRCH S, CABRITA A S, et al. Evaluation of the effect of acupuncture on hand pain, functional deficits and health-related quality of life in patients with rheumatoid arthritis—a study protocol for a multicenter, double-blind, randomized clinical trial [J]. *J Integr Med*, 2016, 14(3): 219-227.
- [7] FENG Z, XU J, HE G, et al. The efficacy and safety of the combination of total glucosides of peony and leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis: a systemic review and meta-analysis [J]. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 2016(2): 1-8.
- [8] SAHU R P, REZANIA S, OCANA J A, et al. Topical application of a platelet activating factor receptor agonist suppresses phorbol ester-induced acute and chronic inflammation and has cancer chemopreventive activity in mouse skin [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): DOI: 10.1371/journal.pone.0111608.
- [9] BHALEKAR M R, UPADHAYA P G, NALAWADE S D, et al. Anti-rheumatic activity of chloroquine-SLN gel on wistar rats using complete freund's adjuvant (CFA) model [J]. *Indian Journal of Rheumatology*, 2015, 10(2): 58-64.
- [10] KOTHAVADE P S, BULANI V D, NAGMOTI D M, et al. Therapeutic effect of saponin rich fraction of *Achyranthes aspera* Linn. on adjuvant-induced arthritis in sprague-dawley rats [J]. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 2014, 2015 (8): 844-853.
- [11] TATEISHI N, KANEDA Y, KAKUTANI S, et al. Dietary supplementation with arachidonic acid increases arachidonic acid content in paw, but does not affect arthritis severity or prostaglandin E2, content in rat adjuvant-induced arthritis model [J]. *Lipids in Health Disease*, 2015, 14(1): 1-10.
- [12] VASCONCELOS A S, OLIVEIRA I C M, VIDAL L T M, et al. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus [J]. *Fundamental Clinical Pharmacology*, 2015, 29(4): 394-403.
- [13] BRENNAN-BOURDON L M, de LA CRUZ-MOSSO U, REYES-CASTILLO Z, et al. MIF and TNF- α serum levels in rheumatoid arthritis patients treated with disease-modifying antirheumatic drugs: a cross-sectional study [J]. *Immunopharmacology Immunotoxicology*, 2015, 37(2): 1-7.
- [14] WANG M, WANG B, MA Z, et al. Detection of the novel IL-1 family cytokines by QAH-IL1F-1 assay in rheumatoid arthritis [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2016, 62(4): 31-34.
- [15] YASUKAWA K, KASAHARA Y. Effects of flavonoids from french marigold (florets of *Tagetes patula* L.) on acute inflammation model [J]. *International Journal of Inflammation*, 2013, DOI: org/10.1155/2013/309493.

(童颖丹 编辑)