

实验研究

痹痛灵颗粒对肺痹类风湿性关节炎肺组织
IL-17 mRNA 表达的影响

樊任珠 汪悦 徐建亚 桑锋

(南京中医药大学第一临床医学院,江苏省南京市栖霞区仙林大道138号南京中医药大学E3-304室,210046)

摘要 目的:观察痹痛灵颗粒对胶原诱导类风湿性关节炎大鼠肺组织微血管密度及 IL-17 mRNA 表达的影响。方法:建立胶原诱导大鼠类风湿性关节炎模型,通过免疫组化测量微血管密度,实时荧光 PCR 法测量肺组织 IL-17 mRNA 表达量,评价痹痛灵颗粒治疗类风湿性关节炎肺组织血管新生的作用机理。结果:痹痛灵颗粒可降低造模大鼠肺组织微血管密度,下调 IL-17 mRNA 过量表达。结论:痹痛灵颗粒对胶原诱导大鼠类风湿性关节炎肺组织血管新生有一定的治疗作用,其作用机理可能与下调 IL-17 mRNA 高表达有关。

关键词 类风湿性关节炎;痹痛灵颗粒;MVD;IL-17

Effect of Bitongling Granule on IL-17 mRNA Expression in Collagen Introduce Arthritis Rats

Fan Renzhu, Wang Yue, Xu Jianya

(First hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Add.: No. 138 Xianlin Boulevard, Qixia District, Nanjing, Jiangsu Province, Add.: 210046)

Abstract Objective: To investigate effect of Bitongling Granule on microvessel density and IL-17 mRNA expression in collagen introduce arthritis Rats. **Methods:** To establish the collagen introduce arthritis Rat models, determined microvessel density by IHCA, assessed IL-17 mRNA expression in lung tissue by PCR so as to evaluate action mechanism of the Granule on angiogenesis in lung tissue of the model rats. **Methods:** Bitongling Granule can reduce microvessel density and excessive IL-17 mRNA expression. **Conclusion:** Bitongling Granule can treat angiogenesis in lung tissue of collagen introduce arthritis Rats, which may be achieved through reducing IL-17 mRNA expression.

Key Words Rheumatoid arthritis; Bitongling Granule; MVD; IL-17

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种常见的慢性炎症性疾病,多种免疫细胞因子失调可导致微血管新生而形成血管翳^[1]。痹痛灵颗粒为名老中医汪履秋经验方,多年来临床应用于治疗类风湿性关节炎具有显著的临床疗效^[2]。本研究通过建立大鼠胶原诱导性关节炎模型,观察痹痛灵对类风湿性关节炎大鼠肺组织微血管密度及 IL-17 表达的影响,探讨其治疗类风湿性关节炎抗血管新生的作用机理。

1 材料

1.1 动物 Wister 大鼠,清洁级,4~6 周龄,平均体重为(180±15)g(上海斯莱克实验动物责任有限公司)。

1.2 主要仪器 TP 1020 自动脱水机(德国 LEICA 公司),RM2135 型石蜡切片机(德国 LEICA 公司),Tissue-Tek TEL 组织包埋中心(日本 SAKURA 公司产品),Minisee 病理图像采集系统,实时荧光 PCR 定量分析仪(LightCycle Roche 公司)。

1.3 主要试剂 Rabbit anti FⅧ即用型快速免疫组化试剂(福州迈新生物公司 RAB-0070),引物和探针

(上海生工生物工程有限公司);痹痛灵颗粒浸膏(组成:麻黄、桂枝、制川乌、蜈蚣、桃仁等),鸡 II 型胶原(上海本草生物医学工程研究所),雷公藤多苷片(10mg/片,恒生药业有限公司),博来霉素(日本化药株式会社)。

2 方法

2.1 胶原性关节炎的诱发及肺纤维化模型 参考文献^[3-4]进行。

2.2 分组及处理 60 只大鼠随机选取 10 只为正常组,另 50 只造模,共成模 40 只,随机分为 5 组各 8 只。正常组与模型组均给予等容量蒸馏水;痹痛灵高、中、低剂量组分别给予痹痛灵颗粒 14g 生药/kg、7g 生药/kg、3.5g 生药/kg 体重;雷公藤组给予雷公藤多苷片 9mg/kg 体重。各组均于造模第 21 天开始给药,1 次/d,共给药 15d。

2.3 组织标本的采集与处理方法 给药 3 周后将动物处死,留取肺组织标本。

2.4 肺组织病理学检查 光学显微镜下观察肺泡炎和肺纤维化,随机选择 5 个视野,根据 Szapitel^[5]等方法,肺泡炎和纤维化程度各分为 4 级:无肺泡炎(0),轻

度肺炎(1),中度肺炎(2),重度肺炎(3)。

2.5 肺组织血管密度计数(MVD)免疫组化过程^[6]

采用快速免疫组化方法,宁阙图形分析系统下定量观察,血管内皮细胞呈棕色。400倍视野下计数5个视野的数目。

2.6 RealTime-PCR 引物设计 根据 GenBank 发布序列进行引物设计,使上下游引物跨越2个内含子,以排除 DNA 干扰,经 NCBI BLAST 检索无显著同源性序列,内对照为 β -actin, IL-17 Sense primer: tgagagttgacattcgcatctt, Antisense primer: gatacagcctgagtgctctcac, Product size 160。

表1 各组大鼠肺炎程度比较

组别	剂量(g/kg)	例数	肺炎程度分级
正常组	0	10	0
模型组	0	8	2.0 ± 0.6
痹痛灵高剂量组	14	8	1.0 ± 0.4*
痹痛灵中剂量组	7	8	1.2 ± 0.2*
痹痛灵低剂量组	3.5	8	1.3 ± 0.6*
雷公藤多苷片组	0.009	8	1.2 ± 0.4*

注:各给药组与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠肺组织 MVD 的相对数量

组别	剂量(g/kg)	例数	MVD
正常组	0	10	4.2 ± 1.6
模型组	0	8	16.8 ± 1.2
痹痛灵高剂量组	14	8	6.2 ± 1.4*
痹痛灵中剂量组	7	8	7.4 ± 1.6*
痹痛灵低剂量组	3.5	8	8.4 ± 1.2*
雷公藤多苷片组	0.009	8	6.4 ± 1.0*

注:各给药组与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠肺组织 IL-17 mRNA 基因的相对含量($\bar{x} \pm s$)

2 ^{-$\Delta\Delta$Ct} 值	组别	鼠数(n)	β -actin Ct 值	IL-17 Ct 值
正常组	10	13.135 ± 4.353	27.420 ± 3.011	1
模型组	8	11.266 ± 3.287	23.940 ± 2.914	2.971 ± 1.324*
痹痛灵高剂量组	8	11.263 ± 3.214	26.943 ± 2.681	0.128 ± 0.022 Δ
痹痛灵中剂量组	8	12.278 ± 3.354	24.340 ± 2.907	1.571 ± 0.016 Δ
痹痛灵低剂量组	8	13.514 ± 5.443	24.442 ± 4.631	3.448 ± 0.101
雷公藤多苷片组	8	12.89 ± 2.465	27.880 ± 4.632	0.206 ± 0.024 Δ

注:*模型组与正常细胞组;IL-17 在肺组织中表达 $\geq 1/2$ 倍,基因表达增高。 Δ 痹痛灵高、中剂量组与模型组;IL-17 在肺组织中表达 ≤ 2 倍,基因表达降低。 Δ 雷公藤多苷片组与模型组;IL-17 在肺组织中表达 ≤ 2 倍,基因表达降低。

2.7 统计学方法 所有数值变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,15.0 统计软件处理。RealTime-PCR 实验采用比较 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析。

3 结果

3.1 各组大鼠肺炎同程度比较 见表1。各给药组肺炎都有不同程度减轻,与模型组比较,统计差异有显著性。

3.2 各组大鼠肺组织 MVD 的相对数量 见表2。各
万方数据

给药组动物 MVD 均低于模型组,且以痹痛灵高、中剂量组和雷公藤多苷片组效果较为显著,与模型组比较,差异有显著性。

3.3 各组大鼠肺组织膜组织 IL-17 mRNA 的相对含量 见表3。痹痛灵高中剂量组和雷公藤多苷片组比模型组 IL-17 在肺组织中表达 ≥ 2 倍,基因表达降低。

4 讨论

RA 主要病理变化为滑膜血管新生、细胞增殖,多种细胞因子参与了这一过程。病变的血管新生主要取决于促血管生长因子和抑制血管生长因子间的平衡^[7]。本实验结果显示 CIA 大鼠肺组织病理过程中 MVD 和细胞因子 IL-17 mRNA 水平增高,RA 的血管新生有多种细胞因子参与,IL-17 是前细胞因子主要由活化的记忆性 CD₄⁺T 淋巴细胞分泌,是一种血管生成调节因子,刺激血管内皮细胞迁移和血管素形成,并上调多种血管形成因子表达,有促血管生成作用^[8]。IL-17 还与其他炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 TNF- α 、IL-1 β 等产生协同作用,可诱导滑膜细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF),导致血管新生,关节破坏加重^[9]。

痹痛灵主要用散寒祛湿,祛瘀通络法治疗 RA,用于临床疗效确切。方中麻黄可散寒通滞、发汗解表,桂枝可温通经脉、发汗解肌。麻黄、桂枝配伍具有协同作用。川乌、蜈蚣药理研究均有解热、镇痛作用。桃仁可活血祛瘀。本研究表明痹痛灵能明显下调模型大鼠肺组织中 MVD 和 IL-17 mRNA 相对含量,从而可能发挥抗血管新生等作用治疗类风湿关节炎肺部病变。

参考文献

- [1]徐育冬,靳洪涛.类风湿关节炎与促血管新生的细胞因子.中华风湿病学杂志,2007,10(11):633-635.
- [2]江星.痹痛灵治疗类风湿性关节炎寒湿痹阻证临床观察.河南中医,2008,28(10):33-35.
- [3]汤文璐,李俊,徐淑云,等.Ⅱ型胶原性关节炎动物模型的研究概况.中国药理学报,1998,14:495-498.
- [4]胡静,刘旭凌.经鼻滴入博莱霉素致小鼠肺纤维化模型的建立及其病理演变.中国实验动物学报 2009,5(17):351-353.
- [5]Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. Am Rev Respir Dis, 1979, 120:893-897.
- [6]Waidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. Am J pathol, 1995, 147:9-19.
- [7]Nagashima M, Asano G, Yoshino S. Imbalance in production between vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatology, 2000, 27(10):2339.
- [8]Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. Blood, 2003, 101(7):735-738.
- [9]王峰,黄安斌. IL-17 在类风湿性关节炎中的作用. 国际骨科学杂志, 2006, 5(27):301-306.

(2011-03-09 收稿)◎