

杨梅素对佐剂性 关节炎小鼠滑膜炎的影响

舒雪莲,陶红⁺,曾昕,张晶,胡芳丽,丁虹^{*}
(武汉大学药学院教育部重点实验室,湖北武汉 430071)

摘要:目的:探讨杨梅素对佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)小鼠的原发性关节滑膜病理以及血液炎症因子的影响。方法:将弗氏佐剂造模成功的小鼠,随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组、杨梅素高剂量组 5 mg/kg、低剂量组 1 mg/kg。于致炎 12 d 后,杨梅素组每天灌胃给予相应剂量杨梅素,阳性对照组给予地塞米松,正常组、模型组给予等体积生理盐水。每隔 4 d 测量小鼠的体重、足体积并评价关节炎指数,于第 30 d 处死小鼠后取胸腺、脾称重计算脏器指数,取关节苏木-伊红(HE)染色法观察滑膜病理,酶联免疫(ELISA)法测量血清炎症因子水平。结果:与正常组相比,模型组小鼠的关节肿胀率显著增加,胸腺、脾指数增加,血清炎症因子显著增加,且具有统计学意义($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$),滑膜增生严重并伴有大量炎症细胞浸润;与模型组相比杨梅素高、低组小鼠关节肿胀率显著下降,胸腺指数下降,血清炎症因子质量浓度降低,具有统计学意义($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$),脾指数下降不明显,滑膜无明显增生,炎症浸润程度也减轻。结论:杨梅素具有改善类风湿性关节炎发病过程中炎症反应的作用,其机制可能与抑制免疫器官功能亢进以及炎症因子的质量浓度,改善滑膜病变有关。

关键词:杨梅素,类风湿性关节炎,滑膜病理,炎症因子

Effects of myricetin on synovitis of mice with adjuvant arthritis

SHU Xue-lian, TAO Hong⁺, ZENG Xin, ZHANG Jing, HU Fang-li, DING Hong^{*}

(Key laboratory of the ministry of education, school of pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Objective: To explore the effects of myricetin on pathology of synovialis and inflammatory factors of mice with adjuvant arthritis. Methods: Mice induced by Freund's complete adjuvant were randomly divided into five groups: normal, model, high dose myricetin, low dose myricetin, positive control (Dexamethasone). The myricetin group was given myricetin by ig 12 days after inducing. The weight and foot volume was measured every 4 days, arthritis index was evaluated after measuring foot volume. Execute mice at the 30th day, thymus and spleen were weighted to count organ index, took the knee joint for pathological examination using hematoxylin-eosin staining. Inflammatory factors were measured using ELISA kits. Results: The degree of swelling, thymus and spleen index, inflammatory factors were all increased in the model group compared with the normal group ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). The degree of swelling, thymus index, inflammatory factors were all decreased in the myricetin groups compared with the model group ($p < 0.05$ or $p < 0.01$), inflammatory cells infiltration of synovialis was significantly slighter than model group. Conclusion: Myricetin can inhibit the immune organs and decreased the levels of inflammatory factors, that may be related to myricetin's effect on inhibiting rheumatoid arthritis.

Key words: Myricetin; rheumatoid arthritis; pathology of synovialis; inflammatory factors

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)17-0340-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.17.058

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜及软骨病变为主要临床表现的自身免疫性疾病,患者关节往往发生畸变并伴随一定的功能障碍,好发于手、足等小关节,是一种高发性疾病,

在我国发病率约为 0.4%^[1-2]。RA 的发病机制^[3-4]非常复杂,目前主要观点是大量免疫细胞(如滑膜 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞等),免疫因子(如 TNF- α , IL- β 等)的参与造成关节滑膜炎,从而促发类风湿性关

收稿日期: 2016-03-03 + 并列第一作者

作者简介: 舒雪莲(1995-),女,本科,研究方向:药学, E-mail: 15871476150@163.com。

陶红(1995-),女,本科,研究方向:药学, E-mail: 13277939131@163.com。

* 通讯作者: 丁虹(1965-),女,博士,教授,研究方向:神经药理学,炎症性肠病, E-mail: dinghong1106@whu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(81273127)。

节炎,这将为抗关节炎药物的研究提供方向。目前主要治疗手段为:糖皮质激素类药物,非甾体抗炎药以及新型生物制剂如 TNF- α 抑制剂等^[5-6],具有较大毒副作用。中药作为我国传统药物,具有毒副作用小,价格低廉的优点^[7],从中寻找具有良好抗炎作用的药物具有广阔的空间。

杨梅素是杨梅中分离、提纯得到的黄酮类物质^[8],其化学结构见图 1。研究表明,杨梅素具有抗氧化、抗血栓、降血糖、抗肿瘤、肝保护等一系列药理作用^[9-10],但是其抗炎作用鲜少有报道,本研究以佐剂性关节炎小鼠为模型研究杨梅素对于小鼠原发性关节炎的影响,并对其可能的作用机制进行探讨。

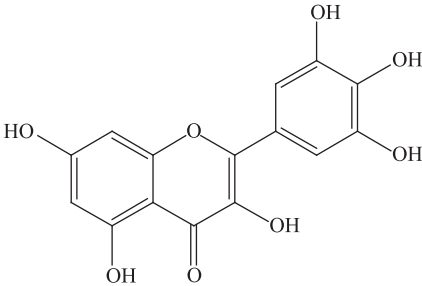


图 1 杨梅素的化学结构
Fig.1 Chemical structure of myricetin

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雌性昆明小鼠 50 只,体重 18~22 g,湖北省实验动物研究中心提供,SPF 级,合格证号:42000600010207;杨梅素 西安天丰生物科技有限公司;地塞米松 广东三才石岐制药股份有限公司;弗氏完全佐剂 美国 Sigma 公司。

PV-200 型动物足趾容积测量仪 成都泰盟科技有限公司;ELISA 试剂盒 联科生物技术有限公司;电子天平 上海上平仪器有限公司;离心机 长沙英泰仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 HM 雌性小鼠按照体重随机分为五组,正常对照组,模型组,杨梅素高、低剂量组,地塞米松组,每组 10 只小鼠。

1.2.2 佐剂性关节炎小鼠造模和评价 除去正常对照组外,按照一般的造模方法^[11]对其余四组左后足皮下注射弗氏完全佐剂进行致炎。于致炎后第 0、16、20、24、28、30 d 称取体重后,用足趾容积测量仪测定每只小鼠左后足容积,并计算足肿胀率。肿胀

率(%)=(足体积-平均足体积)/平均足体积 $\times$ 100
1.2.3 给药方案 于致炎后第 12 d,各组灌胃给予小鼠相应药物,1 次/d,连续两周,杨梅素高剂量为 5 mg/kg,低剂量为 1 mg/kg,地塞米松组剂量为 0.15 mg/kg,正常对照组,模型组灌胃给予等量生理盐水。

1.2.4 关节炎指数的评价 于致炎后第 0、16、20、24、28、30 d 用 5 级评分法^[12]对小鼠进行关节炎指数评分:0 分,无红肿;1 分,关节轻微红肿;2 分,全部足爪及关节轻度红肿;3 分,全部足爪及关节中度红肿;4 分,全部足爪及关节重度红肿伴功能障碍。

1.2.5 免疫脏器指数的测定 于致炎后第 30 d,称量小鼠体重之后,处死小鼠,取出脾、胸腺,生理盐水漂洗后吸干表面水分,分别于电子称上称其湿重,计算脏器指数。脏器指数=器官湿重(g)/体重(g)。

1.2.6 血液炎症因子的测定 于致炎后第 30 d,取小鼠眼球血,置于含肝素的 EP 管中,静置 2 h 后离心分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,测定血清中 TNF- α ,IL- β 的质量浓度。

1.2.7 关节滑膜病理学观察 于致炎后第 30 d,处死小鼠,分离小鼠左足踝关节,10% 甲醛固定。EDTA 脱钙处理,乙醇逐级脱水,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色^[13],光镜下进行病理组织学观察。

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验,以 $p < 0.05$ 或 $p < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠体重的变化

与正常组相比,模型组小鼠体重略微下降($p < 0.05$)。与模型组相比较,杨梅素高、低组体重显示略微增加,接近正常组小鼠体重($p < 0.01$),地塞米松组体重也有一定程度的增加($p < 0.05$)。结果见表 1。

2.2 小鼠原发性足肿胀率的变化

模型组小鼠原发性足肿胀率随着天数增加而增大,极显著高于正常对照组($p < 0.01$)。与模型组相比较,杨梅素高剂量组足肿胀率从第 28 d 起显示明显降低($p < 0.01$),低剂量组足肿胀率从第 20 d 起显示明显降低($p < 0.05$),地塞米松组足肿胀率从第 20 d 起显著降低($p < 0.01$),16 d 时出现模型组肿胀率低于杨梅素高低剂量组及阳性对照组,可能是由

表 1 实验期间各组小鼠体重的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Changes in weight of mice during the experiment($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	0 d/(g)	16 d/(g)	20 d/(g)	24 d/(g)	28 d/(g)	30 d/(g)
正常对照组	20.332 $\pm$ 1.211	21.148 $\pm$ 1.338	25.855 $\pm$ 1.065	25.127 $\pm$ 0.865	25.400 $\pm$ 0.713	25.875 $\pm$ 1.159
模型组	20.137 $\pm$ 0.899	19.355 $\pm$ 0.472 *	23.835 $\pm$ 1.126 *	23.636 $\pm$ 0.790 *	22.782 $\pm$ 1.380 *	24.705 $\pm$ 1.308
杨梅素高剂量组	19.925 $\pm$ 1.013	20.254 $\pm$ 0.884	25.656 $\pm$ 1.061#	24.450 $\pm$ 1.178	24.790 $\pm$ 0.889	25.190 $\pm$ 0.971
杨梅素低剂量组	20.254 $\pm$ 0.722	20.545 $\pm$ 1.337#	26.655 $\pm$ 1.154##	24.260 $\pm$ 0.762	25.790 $\pm$ 0.781#	26.805 $\pm$ 1.196#
地塞米松组	19.992 $\pm$ 0.874	21.015 $\pm$ 0.552#	25.913 $\pm$ 0.962#	25.254 $\pm$ 1.035#	25.383 $\pm$ 1.077#	26.007 $\pm$ 0.811#

注:与正常对照组相比,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$;与模型组相比# $p < 0.05$,## $p < 0.01$,表 2~表 4 同。

表2 实验期间各组小鼠原发性足肿胀率的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Changes in primaryswelling of foot of mice during the experiment($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	0 d(%)	16 d(%)	20 d(%)	24 d(%)	28 d(%)	30 d(%)
正常对照组	0	0.019 ± 0.643	0.005 ± 1.060	0.028 ± 1.201	0.016 ± 1.446	-0.004 ± 1.675
模型组	0	79.686 ± 1.929 **	90.012 ± 1.801 **	82.251 ± 1.953 **	93.324 ± 2.316 **	104.454 ± 1.805 **
杨梅素高剂量组	0	97.868 ± 1.349	87.868 ± 2.139	81.191 ± 2.085##	79.1393 ± 0.745	51.718 ± 1.116##
杨梅素低剂量组	0	91.045 ± 2.060	84.368 ± 2.485	63.757 ± 1.587	62.903 ± 1.866#	57.854 ± 1.978#
地塞米松组	0	95.182 ± 1.189##	86.061 ± 1.231##	63.523 ± 0.906	69.352 ± 1.462	60.482 ± 1.055##

表3 实验期间各组小鼠原发性关节炎指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Changes in primaryarthritis index of mice during the experiment($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	0 d(分)	16 d(分)	20 d(分)	24 d(分)	28 d(分)	30 d(分)
正常对照组	0	0	0	0	0	0
模型组	0	2.8 ± 0.6 **	3.2 ± 0.4 **	2.9 ± 0.5 **	3.3 ± 0.9 **	3.7 ± 0.5 **
杨梅素高剂量组	0	3.5 ± 0.3	3.2 ± 0.8	2.9 ± 0.9##	2.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2##
杨梅素低剂量组	0	3.2 ± 0.8	3.0 ± 1.0	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.7#	2.1 ± 0.6#
地塞米松组	0	3.4 ± 0.3##	3.1 ± 0.4	2.3 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.2##

于作用初期杨梅素促进免疫,后期显示出明显的抑制免疫作用。结果见表2。

2.3 小鼠原发性关节炎指数的变化

模型组小鼠原发性关节炎指数随着天数增加而增大,显著高于正常对照组($p < 0.01$)。与模型组相比较,杨梅素高组关节炎指数从第24 d起显示出明显降低($p < 0.01$),低剂量组关节炎指数从第28 d起显示出明显降低($p < 0.05$),地塞米松组关节炎指数从第20 d起显著降低($p < 0.01$)。结果见表3。

2.4 小鼠免疫脏器指数

模型组小鼠胸腺指数、脾指数均增大,高于正常对照组($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$)。杨梅素高、低剂量治疗组显著降低胸腺指数($p < 0.01$),但结果提示所用剂量可能对于脏器组织有所损伤;低剂量组脾指数有所下降。阳性对照组地塞米松过分的抑制了免疫脏器的生长,与正常组比较胸腺指数和脾指数显著降低($p < 0.01$)。结果见表4。

表4 各组小鼠胸腺、脾脏指数($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Thymus and spleen index of mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	胸腺指数	脾指数
正常组	0.0025 ± 0.0002	0.0027 ± 0.0003
模型组	0.0032 ± 0.0002 **	0.0034 ± 0.0003 *
杨梅素高剂量组	0.0020 ± 0.0003##	0.0033 ± 0.0005
杨梅素低剂量组	0.0020 ± 0.0005#	0.0029 ± 0.0005
地塞米松组	0.0018 ± 0.0002#	0.0033 ± 0.0008##

2.5 小鼠足关节病理切片观察

正常组小鼠滑膜表面光滑,无组织增生,未见炎症细胞浸润,软骨完整。模型组滑膜表面粗糙,滑膜细胞增生严重,有大量炎症细胞浸润,软骨破坏严重。杨梅素高剂量组与模型组相比,滑膜表面光滑,无明显组织增生,炎症细胞浸润较轻,软骨结构清晰。杨梅素低剂量组与模型组相比,滑膜增生、炎症细胞浸润、软骨破坏程度均降低。地塞米松组与模型组相比,无明显组织增生,炎症细胞浸润较轻,软

骨结构轻微损伤。结果见图2。

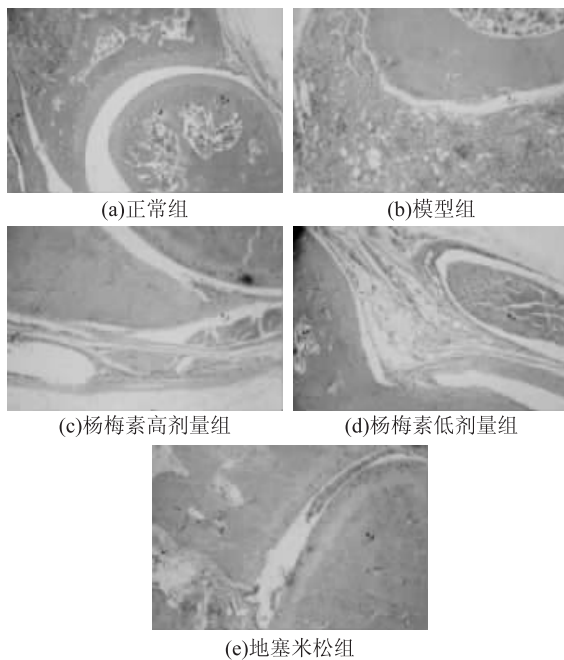


图2 各组小鼠关节滑膜病理切片观察

Fig.2 Observation of pathological section of synovium of joint

2.6 杨梅素对小鼠血液炎症因子的影响

模型组小鼠 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-}\beta$ 的质量浓度明显高于正常对照组。杨梅素高、低剂量治疗组显著减少 $\text{IL-}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 的质量浓度($p < 0.01$),但无明显的剂量依赖作用,可能是由于杨梅素的免疫调节作用符合倒“U”型曲线,地塞米松组显著减少 $\text{IL-}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 的质量浓度($p < 0.01$)。结果见表5。

3 结论与讨论

类风湿性关节炎(RA)是一种以全身慢性,进行性炎症为特征的免疫性疾病。RA的典型病理特征是关节滑膜炎以及组织持续性增生,关节软骨破坏^[14],而AA小鼠模型与RA患者在关节肿胀等组织病理学及血液变化方面具有相似性,常被作为研究

表5 各组小鼠血清炎症因子的质量浓度($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 5 Content of inflammatory factors of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TNF- α (pg·L ⁻¹)	IL- β (pg·L ⁻¹)
正常组	175.5 $\pm$ 38.3	58.7 $\pm$ 18.7
模型组	545.5 $\pm$ 65.9**	265.1 $\pm$ 56.1**
杨梅素高剂量组	470.5 $\pm$ 28.5##	120.8 $\pm$ 21.1##
杨梅素低剂量组	416.5 $\pm$ 36.3##	119.8 $\pm$ 35.2##
地塞米松组	393.5 $\pm$ 37.3##	189.8 $\pm$ 30.1##

注:与正常对照组相比,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$;与模型组相比# $p < 0.05$,## $p < 0.01$ 。

类风湿性关节炎的模型之一^[15-16]。

杨梅素作为一种天然的活性成分,现代药理学研究证明其具有抗炎、镇痛、抗肿瘤等一系列药理活性,显示出潜在的利用价值^[17]。杨梅素的抗炎作用目前在抗类风湿性关节炎方面的报道较少,有一定的研究意义。实验结果表明,模型组小鼠体重略微下降,关节肿胀严重,而杨梅素高、低剂量组小鼠的关节肿胀程度虽然于16 d肿胀有所加剧但后期均明显改善,且低剂量要略微优于高剂量,可能是由于本实验剂量设计不是非常合理,杨梅素作为一种黄酮类物质的可能具有双向免疫调节作用^[18],即其量效关系呈现一种倒“U”型曲线,并且其在作用初期可能会促进免疫,后期显示出明显的抑制免疫作用,但结果仍然可以说明杨梅素对AA小鼠关节炎症有一定的治疗作用。

RA的发生目前一直认为的是抗原激活免疫细胞,释放出一系列炎症因子。RA患者血清中TNF- α 、IL- β 质量浓度会显著增加,说明TNF- α 、IL- β 作为炎症因子介质在RA的发病过程中起着重要的作用^[19-20]。研究表明,通过抗TNF- α 、IL- β ,可以抑制炎症细胞,减少滑膜细胞浸润,继而减轻软骨破坏^[21]。本实验中,杨梅素高、低剂量组小鼠血清中TNF- α 、IL- β 质量浓度较模型组显著降低,小剂量即显示良好效果,说明杨梅素小剂量即能发挥良好的抑制炎症因子的作用,增大剂量抑制作用减弱。滑膜炎炎症细胞浸润程度减轻,几乎无增生,软骨完整性增加。说明杨梅素可能通过抑制炎症因子,改善了滑膜炎炎症,但其作用于TNF- α 、IL- β 的具体机制尚需进一步研究。本实验同时发现,模型组小鼠胸腺重量显著上升,杨梅素高、低剂量组小鼠胸腺的重量下降但低于正常组水平,原因可能是由于实验所选择的杨梅素剂量过分抑制了胸腺的功能造成组织损伤,需要进一步探索其他剂量下是否有此影响。而免疫器官质量的变化可作为免疫药理学机制的初步指标^[22],提示杨梅素可能通过免疫调节来实现对AA小鼠的治疗作用。

综上,小剂量杨梅素即可较好改善类风湿性关节炎炎性反应,降低关节炎指数,在AA小鼠滑膜炎炎症病理学改善过程中,发挥了抑制炎症因子浸润以及下调免疫调节的作用,证明了杨梅素确实对RA具有一定的治疗效果,但其最优作用剂量还需进一步的探索。

参考文献

[1] 王志文,丁春菊,张爱国.麝香乌龙丸对佐剂性关节炎大鼠滑膜病理形态及血管内皮生长因子、内皮抑制素表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):241-244.

[2] Quan L D, Thiele Gffrey M, Tian J. The development of novel therapies for rheumatoid arthritis [J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2009, 18(7): 723-738.

[3] 周静,张弦,钱海兵.类风湿性关节炎发病机制的研究进展[J].贵阳中医学院学报,2014,36(5):44-46.

[4] 缪怡,胡朝英,钱柳,等.类风湿性关节炎免疫学研究进展[J].上海交通大学学报,2011,31(7):1035-1038.

[5] 刘雪涛,李庆.类风湿性关节炎治疗药物进展[J].现代生物医学进展,2015,15(6):1171-1173.

[6] Campbell J, Lowe D, Sleeman MA. Developing the next generation of monoclonal antibodies for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. British Journal of pharmacology, 2011, 162(7): 1470-1484.

[7] 李世刚,陈燕.资本瓜多糖对小鼠佐剂性关节炎的作用及其机制[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):159-162.

[8] Voskresensky O N, Levitsky A P. QSAR aspects of flavonoids as a plentiful source of new drugs [J]. Current Medicinal Chemistry, 2002, 9(14): 1367-1383.

[9] 唐霖,张莉静,王明谦.杨梅中活性成分杨梅素的研究进展[J].中成药,2006,28(1):121-122.

[10] 林国钊,谢燕,李国文.杨梅素的药理活性研究进展[J].天津药学,2008,20(5):57-59.

[11] 熊国林,黄海潇,谢玲,等.类风湿性关节炎大鼠模型的制备[J].解放军医学杂志,2007,32(2):211-123.

[12] 戴敏,魏伟,汪倪萍,等.木瓜苕对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用[J].中国药理学通报,2003,19(3):340-344.

[13] 崔宁,杨娉婷,赵丽娟,等.三氧化二砷在类风湿性关节炎治疗中作用机制的探讨[J].中华风湿病学杂志,2006,10(7):393-397.

[14] Sweeney S E, Firestein G S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36: 372-378.

[15] 刘琼,王晨瑶,方剑乔.类风湿性关节炎动物模型的研究进展[J].医学综述,2006,12(5):313-316.

[16] 张玲玲,沈玉先,魏伟.类风湿性关节炎动物模型与临床的关系[J].中国药理学通报,2002,18(5):60-63.

[17] 林国钊,谢燕,李国文.杨梅素的研究进展[J].国际药学研究杂志,2012,39(6):483-487.

[18] 谢鹏,张敏红.黄酮类化合物对动物免疫功能的影响[J].动物营养学报,2005,17(3):17-20.

[19] 李巧霞,丛斌,单保恩.T细胞与类风湿性关节炎[J].国际免疫学杂志,2011,34(1):1-5.

[20] Yoshimatsu H, Okazaki F, Leiri I, et al. Mechanism of the 24-hour rhythm of tumor necrosis factor- α formed by onset of rheumatoid arthritis [J]. Chronobiol Int, 2014, 31(4): 564-571.

[21] 张义洪,刘志敏,熊凌霄.类风湿性关节炎发病机制及其治疗方法研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2005,21(z1): 88-90.

[22] 曾阳,鲍敏,马继雄,等.翁布总黄酮对佐剂性关节炎大鼠的免疫调节机制[J].中国药理学通报,2011,27(4):504-507.