

雷公藤甲素治疗类风湿关节炎的作用机制及安全性分析

范文强¹, 吕书龙², 马 玲¹, 吴 洁¹, 付冬冬¹, 王培山^{3*}, 李 利¹, 梁 舒¹

1. 新乡市中心医院 风湿免疫科, 河南 新乡 453000

2. 新乡市中医院 风湿科, 河南 新乡 453000

3. 新乡市中心医院, 河南 新乡 453000

摘要: **目的** 探讨雷公藤甲素治疗类风湿关节炎的作用机制, 并分析安全性。**方法** 将 60 只大鼠随机分为对照组、模型组、甲氨蝶呤 (0.4 mg/kg) 组和雷公藤甲素低、中、高剂量 (0.1、0.2、0.4 mg/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠以 II 型胶原诱导类风湿关节炎模型。待造模成功后, 从第 3 周开始, 各组分别 ig 给药, 每天 1 次, 连续 4 周。比较各组大鼠足爪肿胀情况, 采用流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺和 CD4⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞 (Treg) 百分比, 检测血清中白细胞介素-10 (IL-10)、IL-17、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、转化生长因子- β (TGF- β)、血管内皮生长因子 (VEGF)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平, 镜下观察踝关节组织病理形态, 并采用免疫组化法检测组织 IL-10、IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 、TGF- β 表达水平。**结果** 病理切片显示模型组大鼠踝关节内滑膜细胞显著增生, 有单核细胞、淋巴细胞等大量炎性细胞浸润、新生毛细血管, 骨小梁变细, 软骨表面侵蚀严重。其余各组组织内病变程度较模型组明显减轻。给药后, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠关节肿胀度和关节炎指数较给药前明显减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组 CD4⁺Foxp3⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁺Treg 均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠血清 IL-10、TGF- β 水平升高, IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 水平降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠踝关节组织 IL-10、TGF- β 表达明显增多, IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 表达明显减少 ($P < 0.05$)。与对照组或模型组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组血清 ALT、AST 水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。甲氨蝶呤组与雷公藤甲素高剂量组比较前述各项指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 雷公藤甲素能够明显改善 II 型胶原诱导类风湿关节炎大鼠的关节肿胀情况, 作用机制与促进 IL-10、TGF- β 表达, 增加 Treg 细胞比例, 抑制 IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 表达有关, 并且无明显肝毒性。

关键词: 雷公藤甲素; 类风湿关节炎; 免疫调节; 炎性因子; 血管内皮生长因子; 肝毒性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)16-3866-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.019

Mechanism and safety of triptolide in treatment of rheumatoid arthritis

FAN Wen-qiang¹, LV Shu-long², MA Ling¹, WU Jie¹, FU Dong-dong¹, WANG Pei-shan³, LI Li¹, LIANG Shu¹

1. Department of Rheumatology and Immunology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China

2. Department of Rheumatology, Xinxiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinxiang 453000, China

3. Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of triptolide in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) and analyze its safety. **Methods** A total of 60 rats were randomly divided into control group, model group, methotrexate (MTX) group and triptolide (TP) low, medium and high dose groups with 10 rats in each group. In addition to the control group, the rats in the other groups were established type II collagen-induced RA model. After the successful establishment of the model, rats in MTX group were given 0.4 mg/kg MTX by gavage from the 3rd week. Rats in TP high, middle, and low dose groups were given 0.1, 0.2, and 0.4 mg/kg TP by gavage. Rats in control group and model group were given equal volume distilled water once a day for 4 weeks. The paw swelling of rats in each group was compared. The percentage of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺Foxp3⁺ Treg was detected by flow cytometry. The levels of IL-10, IL-17, TNF- α , VEGF, IFN- γ , TGF- β , ALT, and AST in the serum were detected. The pathological morphology of ankle joint was observed under microscope. The expression levels of IL-10, IL-17, TNF- α , VEGF, IFN- γ , and TGF- β were detected by

收稿日期: 2019-04-25

*通信作者 王培山 (1966—), 男, 河南新乡人, 硕士, 主任医师, 研究方向为风湿疼痛。E-mail: ccff-218000@163.com

immunohistochemistry. **Results** Pathological sections showed that synovial cells were proliferated significantly in the ankle joint of rats in the model group, with infiltration of a large number of inflammatory cells such as monocytes and lymphocytes, new capillaries, thinning of bone trabeculae and serious erosion of cartilage surface. The degree of pathological changes in other groups was significantly less than that in model group. After treatment, the degree of joint swelling and arthritis index in MTX and TP groups were significantly decreased compared with those before treatment ($P < 0.05$). Compared with model group, $CD4^+Foxp3^+$ Treg and $CD4^+CD25^+$ Treg were increased in MTX group and TP all dose groups ($P < 0.05$). Compared with the model group, the serum levels of IL-10, TGF- β in MTX and TP all dose groups were increased, while the levels of IL-17, TNF- α , VEGF and IFN- γ were decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the expressions of IL-10 and TGF- β in ankle joint tissue of rats in MTX and TP all dose groups were increased significantly, while the expressions of IL-17, TNF- α , VEGF and IFN- γ were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with control group or model group, there was no significant difference in serum ALT and AST levels between MTX group and TP all dose groups ($P > 0.05$). There was no significant difference between MTX group and TP high dose group ($P > 0.05$). **Conclusion** TP is effective in treating type II collagen-induced arthritis in rats, which can significantly improve joint swelling. Its mechanism is related to promoting the expression of IL-10 and TGF- β , increasing the proportion of Treg cells, inhibiting the expression of IL-17, TNF- α , VEGF and IFN- γ , and has no obvious hepatotoxicity.

Key words: triptolide; rheumatoid arthritis; immunoregulation; inflammatory factors; vascular endothelial growth factor; hepatotoxicity

类风湿关节炎 (RA) 是一种慢性、系统性自身免疫性疾病, 主要表现为关节疼痛、肿胀、僵硬、畸形和功能不全等, 致残率高, 不仅影响患者生活质量, 还加重家庭负担^[1]。近年来 RA 发病率有逐年升高趋势, 有报道^[2]称我国 RA 发病率约为 0.015%。RA 患者基本病理特点包括滑膜炎与血管生成^[3], 一方面滑膜血管增生, 并分泌大量细胞因子, 引起滑膜组织增厚, 破坏软骨和骨结构完整, 并侵犯骨关节周围软组织, 从而导致关节畸形, 另一方面血管生成增多, 侵犯人体各器官, 如肺、心、眼、脾和皮下组织等, 随着病程延长, 会引起相关脏器功能障碍。目前治疗药物主要有非甾体抗炎药、改善病情的抗风湿药、糖皮质激素等, 但均有使用局限性, 存在相当一部分患者无法耐受药物不良反应, 影响了治疗作用的发挥^[4]; 生物制剂效果确切, 不良反应少, 但价格昂贵, 不能广泛用于临床。雷公藤是治疗关节肿痛的传统中药, 具有活血化瘀、去湿止痛的作用, 含有雷公藤甲素、雷公藤红素等多种有效成分^[5-6]。本研究中, 通过动物实验, 探讨雷公藤甲素治疗 RA 的作用机制和毒副作用, 为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物及饲养环境

雄性 Wistar 大鼠 60 只, 清洁级, 8 周龄, 体重 (200 $\pm$ 20) g, 购于上海西普尔实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (沪) 2008-0016, 常规适应性饲养 1 周。

1.2 主要药物与试剂

雷公藤甲素 (20 mg/瓶, 质量分数 >98%) 购

于成都格利普生物科技有限公司; 牛 II 型胶原 (5 mg/瓶)、弗氏完全佐剂 (10 mL/瓶) 购于美国 Sigma 公司; 甲氨蝶呤 (20 mg/瓶, 批号 100138-201505) 购于上海邦景实业有限公司; 抗鼠 $CD4^+Foxp3^+$ Treg、 $CD4^+CD25^+$ Treg 缓冲试剂盒、白细胞介素 10 (IL-10)、IL-17、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、转化生长因子- β (TGF- β)、血管内皮生长因子 (VEGF) ELISA 检测试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司, 磷酸缓冲液 (PBS) 购于 Solarbio 公司。

1.3 主要仪器

流式细胞仪购于上海泽权仪器设备有限公司; 高速冷冻离心机购于上海安亭科技仪器厂; 自动酶标仪购于美国雷杜公司; 石蜡切片机购于德国 LEICA 公司。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

将大鼠随机分成 6 组, 包括对照组、模型组、甲氨蝶呤 (0.4 mg/kg) 组及雷公藤甲素高、中、低剂量 (0.4、0.2、0.1 mg/kg) 组, 每组 10 只。用牛 II 型胶原溶液与完全弗氏佐剂配制成胶原溶液, 制备 RA 模型: 除对照组外, 其余各组大鼠背部皮下、左后足爪等部位注射 0.2 mL 胶原溶液, 适当按压防止外渗, 1 周后再次在相同部位按 0.1 mg/kg 的剂量注射胶原溶液, 加强免疫。对照组大鼠在同样部位注射等体积生理盐水。观察大鼠一般形态, 出现多部位关节肿胀, 即为造模成功。待造模成功后第 3 周开始给药, 甲氨蝶呤组大鼠 ig 给予甲氨蝶呤 0.4 mg/kg, 雷公藤甲素各组分别 ig 给予雷公藤甲素 0.1、

0.2、0.4 mg/kg, 对照组和模型组大鼠 ig 给予等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续 4 周。

2.2 检测指标

2.2.1 肿胀度和关节炎指数测定 观察大鼠造模前后及给药前后足爪肿胀情况, 采用游标卡尺测量左后足足跖厚度(连续测量 3 次取平均值), 计算肿胀度(肿胀度=给药后足跖厚度-给药前足跖厚度或肿胀度=造模后足跖厚度-造模前足跖厚度)。并采用 5 级评分法评定大鼠四肢关节炎指数, 根据足跖肿胀情况分为 0~4 分, 总分 16 分, 分数越高代表肿胀越严重。

2.2.2 外周血分析 在治疗后, 取大鼠眼眶静脉血, 经 EDTA 抗凝处理, 使用 PBS 稀释、洗涤, 分离外周血单个核细胞, 调整细胞悬液中细胞个数为 5×10^6 个/ μL 。取 100 μL 细胞悬液, 使用流式细胞仪检测 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 和 $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ 调节性 T 细胞 (Treg) 比例。

2.2.3 血清生化指标检测 在治疗后, ip 10%水合氯醛将大鼠麻醉, 取腹主动脉血, 分离取血清, 低温保存, 采用 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-10、IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 、TGF- β 水平, 操作按照试剂盒说明进行, 采用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平。

2.2.4 踝关节组织病理形态观察及免疫组化检测 取大鼠双侧踝关节, 用 4%多聚甲醛固定, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 制成组织切片, 厚度约 5 μm , 采用 HE 染色, 光镜下观察踝关节组织病理形态; 采用免疫组化法对踝关节组织 IL-10、IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 、TGF- β 表达水平进行半定量分析, 将阳性比例与染色强度相乘即为等级评分。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用成组 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠治疗前后关节肿胀度和关节炎指数的比较

造模后, 与对照组比较, 其余各组大鼠关节肿胀度和关节炎指数明显增大 ($P < 0.05$), 但各组间关节肿胀度和关节炎指数无明显差异 ($P > 0.05$)。治疗后, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠关节肿胀度和关节炎指数较治疗前明显减少 ($P < 0.05$), 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠关节肿胀度和关节炎指数均低于模型组 ($P < 0.05$), 雷公藤甲素高剂量组大鼠关节肿胀度和关节炎指数与甲氨蝶呤组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 1。

表 1 各组大鼠关节肿胀度和关节炎指数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of joint swelling degree and arthritis index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	关节肿胀度/mm		关节炎指数	
		给药前 (造模后)	给药后	给药前 (造模后)	给药后
对照	—	0	0	0	0
模型	—	1.28 ± 0.23*	1.33 ± 0.25*	7.64 ± 1.26*	7.75 ± 1.28*
甲氨蝶呤	0.4	1.30 ± 0.24*	0.65 ± 0.12* [△]	7.67 ± 1.24*	4.78 ± 0.98* [#]
雷公藤甲素	0.1	1.27 ± 0.22*	0.87 ± 0.19* ^{#△}	7.72 ± 1.19*	5.79 ± 1.13* ^{#△}
	0.2	1.33 ± 0.24*	0.78 ± 0.18* ^{#△}	7.59 ± 1.23*	5.31 ± 1.06* ^{#△}
	0.4	1.29 ± 0.19*	0.67 ± 0.14* [△]	7.70 ± 1.20*	4.75 ± 0.95* [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与甲氨蝶呤组给药后比较: [△] $P < 0.05$; 与同组给药前比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs post-treatment of MTX group; [△] $P < 0.05$ vs pre-treatment of same group

3.2 各组大鼠踝关节组织病理观察

光镜下显示, 对照组大鼠踝关节组织内无病变。模型组大鼠踝关节内滑膜细胞显著增生, 有单核细胞、淋巴细胞等大量炎性细胞浸润、新生毛细血管, 骨小梁变细, 软骨表面侵蚀严重。其余各组踝关节内滑膜细胞增生不显著, 可见部分炎性细胞

浸润和较少新生毛细血管, 病变程度较模型组减轻, 见图 1。

3.3 各组大鼠外周血 $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 和 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Treg}$ 比例的比较

与对照组比较, 其余各组大鼠外周血 $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+\text{Treg}$ 和 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Treg}$ 比例均降低 ($P <$

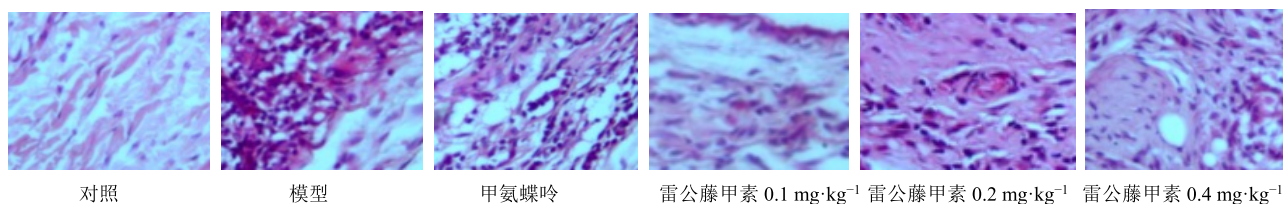


图 1 各组大鼠踝关节组织 HE 染色 (×100)

Fig. 1 HE staining of ankle joint tissues in rats of each group (× 100)

0.05); 与模型组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠外周血 CD4⁺Foxp3⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁺Treg 比例均升高 ($P < 0.05$); 与甲氨蝶呤组比较, 雷公藤甲素高剂量组 CD4⁺Foxp3⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁺Treg 比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 2。

3.4 各组大鼠血清各项指标水平的比较

与对照组比较, 模型组大鼠血清 IL-10、TGF- β 水平明显降低, IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠血清 IL-10、TGF- β 水平升高, IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 水平降低 ($P < 0.05$); 与甲氨蝶呤组比较, 雷公藤甲素高剂量组大鼠血清各项指标水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 3。

表 3 各组大鼠血清 IL-10、IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 、TGF- β 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Comparison of serum levels of IL-10, IL-17, TNF- α , VEGF, IFN- γ , and TGF- β in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	IL-17/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	VEGF/(ng·mL ⁻¹)	IFN- γ /(ng·mL ⁻¹)	TGF- β /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	59.36 ± 14.92	32.59 ± 8.32	22.31 ± 5.72	12.36 ± 3.08	207.62 ± 35.88	634.72 ± 98.37
模型	—	34.78 ± 9.64 [*]	56.78 ± 14.30 [*]	89.77 ± 16.86 [*]	37.78 ± 8.29 [*]	386.24 ± 49.52 [*]	403.18 ± 65.22 [*]
甲氨蝶呤	0.4	55.83 ± 13.71 ^{*#}	37.27 ± 10.16 ^{*#}	35.28 ± 8.34 ^{*#}	15.83 ± 4.22 ^{*#}	230.37 ± 38.59 ^{*#}	594.96 ± 87.45 ^{*#}
雷公藤甲素	0.1	39.60 ± 11.50 ^{*#△}	48.79 ± 13.42 ^{*#△}	62.41 ± 14.27 ^{*#△}	21.97 ± 6.13 ^{*#△}	328.70 ± 44.28 ^{*#△}	482.38 ± 70.20 ^{*#△}
	0.2	45.76 ± 12.69 ^{*#△}	44.65 ± 12.83 ^{*#△}	53.58 ± 11.69 ^{*#△}	19.06 ± 5.66 ^{*#△}	285.68 ± 42.31 ^{*#△}	523.29 ± 72.35 ^{*#△}
	0.4	53.38 ± 13.05 ^{*#}	38.27 ± 10.79 ^{*#}	37.60 ± 8.94 ^{*#}	14.49 ± 4.24 ^{*#}	235.16 ± 36.07 ^{*#}	587.79 ± 86.04 ^{*#}

表 2 各组大鼠外周血 CD4⁺Foxp3⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁺Treg 比例的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of CD4⁺Foxp3⁺Treg and CD4⁺CD25⁺Treg ratios in peripheral blood of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg/%	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg/%
对照	—	9.27 ± 0.43	4.60 ± 0.56
模型	—	4.36 ± 0.28 [*]	2.64 ± 0.30 [*]
甲氨蝶呤	0.4	7.95 ± 0.33 ^{*#}	4.24 ± 0.45 ^{*#}
雷公藤甲素	0.1	6.20 ± 0.22 ^{*#△}	3.22 ± 0.38 ^{*#△}
	0.2	7.04 ± 0.27 ^{*#△}	3.69 ± 0.33 ^{*#△}
	0.4	7.89 ± 0.36 ^{*#}	3.26 ± 0.47 ^{*#}

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与甲氨蝶呤组比较: [△] $P < 0.05$, 下同

^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs post-treatment of MTX group, same as below

3.5 各组大鼠踝关节组织 IL-10、IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 、TGF- β 表达的比较

与模型组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠踝关节组织 IL-10、TGF- β 表达明显增多, IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 表达明显减少 ($P < 0.05$); 与甲氨蝶呤组比较, 雷公藤甲素高剂量组大鼠踝关节组织 IL-10、IL-17、TNF- α 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 4。

3.6 各组大鼠血清 ALT、AST 水平的比较

与对照组或模型组比较, 甲氨蝶呤组、雷公藤

甲素各剂量组大鼠血清 ALT、AST 水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 5。

4 讨论

中医将 RA 归为“痹症”范畴, 认为是因寒湿外邪侵袭机体, 使体内气血失调、脏腑亏损, 日久则气血不畅, 寒湿凝滞, 引起关节肿胀、疼痛等症状^[7]。有学者^[8]认为 RA 患者的预后与体内正气强弱密切相关, 治疗时需从整体出发, 以扶正祛邪为基本原则。雷公藤是治疗 RA 的首选中药材, 明朝医家兰茂在《滇南本草》首次说明了雷公藤的功效,

表 4 各组大鼠踝关节组织 IL-10、IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 、TGF- β 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Comparison of IL-10, IL-17, TNF- α , VEGF, IFN- γ , and TGF- β expression in ankle joint tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-10	IL-17	TNF- α	VEGF	IFN- γ	TGF- β
对照	—	0	0	0	0	0	0
模型	—	0.88±0.13*	7.53±1.28*	6.69±1.23*	3.49±0.73*	6.33±1.15*	2.39±0.64*
甲氨蝶呤	0.4	1.72±0.35*#	3.05±0.62*#	4.07±0.81*#	1.30±0.35*#	2.76±0.45*#	7.50±1.37*#
雷公藤甲素	0.1	1.20±0.16*# Δ	5.25±0.97*# Δ	5.81±1.17*# Δ	2.25±0.56*# Δ	3.98±0.68*# Δ	5.27±0.84*# Δ
	0.2	1.32±0.17*# Δ	4.63±0.74*# Δ	5.30±0.99*# Δ	1.86±0.40*# Δ	3.42±0.51*# Δ	6.97±1.12*# Δ
	0.4	1.68±0.33*#	3.11±0.59*#	4.15±0.84*#	1.28±0.32*#	2.81±0.47*#	7.62±1.44*#

表 5 各组大鼠血清 ALT、AST 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Comparison of serum levels of ALT and AST in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	—	40.48±9.33	157.31±26.96
模型	—	42.39±9.67	155.68±27.42
甲氨蝶呤	0.4	41.68±9.05	160.74±28.92
雷公藤甲素	0.1	42.42±10.80	158.22±25.76
	0.2	41.71±9.40	153.28±27.13
	0.4	41.86±10.21	154.62±29.44

其可入十二经络,有活血化瘀、消肿散结、清热解毒的作用,现代药理研究证实^[9],雷公藤含有 80 种以上有效成分,其中雷公藤甲素是最主要的免疫抑制与抗炎成分^[10]。雷公藤多苷片是临床常用的 RA 治疗药,雷公藤甲素相比于雷公藤多苷,生化稳定性更好,药物活性更强,相关效价高达 100 倍以上^[11]。因此在本研究中,选择雷公藤甲素治疗 RA 大鼠,分析其作用机制,实验结果显示,治疗后,甲氨蝶呤组、雷公藤甲素各剂量组大鼠关节肿胀度和关节炎指数较治疗前明显减少 ($P < 0.05$),说明雷公藤甲素具有改善 RA 症状的作用,效果显著。

近年来有研究^[12]发现 Treg 的表达异常与 RA 发生发展有关,多数学者认为, Treg 细胞可以抑制 T 细胞增殖能力,抑制 RA 患者的免疫反应。研究发现,活动期 RA 患者外周血中 Treg 细胞数量减少,且存在功能缺陷,可导致破骨细胞活性增强,引起全身骨质破坏。本研究中,模型组 CD4⁺Foxp3⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁺Treg 明显少于对照组 ($P < 0.05$),与文献报道^[13]相符;雷公藤甲素各剂量组 CD4⁺Foxp3⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁺Treg 与模型组比较

均明显升高 ($P < 0.05$),提示雷公藤甲素能够上调 Treg 的表达,发挥免疫抑制作用。

IL-10 是一类抗炎细胞因子,主要是通过抑制炎性细胞因子分泌来终止炎症反应,不仅能抑制破骨细胞前体分化,还直接抑制破骨细胞的生成,防止骨质丢失,并促进胶原蛋白合成,修复关节周围组织损伤^[14]。IL-17 是由 Th17 细胞分泌的促炎细胞因子,能够激活 T 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等,引起和加重骨吸收过程,刺激滑膜细胞增生,导致软骨破坏,Shahrara 等^[15]发现 RA 患者外周血 IL-17 水平明显高于正常健康人群。TNF- α 是 RA 发病过程中主要的促炎细胞因子,能够诱导活化滑膜细胞,使黏附分子表达增加,导致滑膜增生,并诱导骨吸收,促进软骨吸收,导致骨与软骨破坏^[16]。TGF- β 是一种多功能生长因子,主要由 T 淋巴细胞和成纤维细胞合成分泌,能够促进 Treg 形成,抑制炎症反应和自身免疫^[17],本次模型组大鼠血清中 TGF- β 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$),说明 TGF- β 减少会引起免疫功能紊乱,引起滑膜炎,导致 RA 发生。IFN- γ 具有广泛的免疫调节作用,由 Th1 细胞分泌,通过激活抗原递呈细胞,参与 T 细胞介导的免疫应答过程,在 RA 患者中 IFN- γ 大量表达,活化 NK 细胞,分泌炎性因子,引起 RA,并且激活 B 细胞和树突状细胞,加重 RA 炎症反应^[18]。本研究发现。与模型组比较,雷公藤甲素各剂量组大鼠血清 IL-10、TGF- β 水平升高,IL-17、TNF- α 、IFN- γ 水平降低 ($P < 0.05$),雷公藤甲素各剂量组大鼠踝关节组织 IL-10、TGF- β 表达明显增多,IL-17、TNF- α 、IFN- γ 表达明显减少 ($P < 0.05$),说明雷公藤甲素能够调节抗炎因子与促炎因子的表达平衡,从而发挥抗炎作用。

RA 的基本病理改变包括滑膜炎与血管生成,

血管生成是一个复杂过程,多种细胞因子的分泌刺激内皮细胞增生,促进血管生成,使血管通透性增加,持续加重滑膜炎,并且形成血管翳,侵蚀和破坏关节周围组织^[19-20]。VEGF 是最强的促血管生成因子,能够促进内皮细胞分裂增殖,还能增加血管通透性。本研究还发现模型组大鼠关节组织内有大量新生血管形成,与李娜等^[21]研究结果一致。而且与模型组比较,雷公藤甲素各剂量组血清和关节内 VEGF、IFN- γ 表达明显减少 ($P < 0.05$),说明雷公藤甲素能够抑制 VEGF 表达,阻止新生血管生成,减少对关节周围组织的损伤。本研究中,雷公藤甲素各剂量组血清 ALT、AST 水平与对照组或模型组比较差异不显著 ($P > 0.05$),说明在治疗期内无明显肝脏毒性。由于本研究治疗时间短,仅有 4 周,下步研究还需要进行更长期的治疗,观察药物安全性。

综上所述,采用雷公藤甲素能够明显改善 II 型胶原诱导关节炎大鼠关节肿胀情况,作用机制与促进 IL-10、TGF- β 表达,增加 Treg 细胞比例,抑制 IL-17、TNF- α 、VEGF、IFN- γ 表达有关,并且短期内无明显肝毒性。

参考文献

- [1] Smolen J S, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: Strategies, opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(5): 276-289.
- [2] 魏 蕾, 姜林娣. 类风湿关节炎病因和发病机制研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(9): 1548-1551.
- [3] 杜 欢, 许 霞. 近 5 年来类风湿关节炎发病机制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(10): 77-80.
- [4] 胡晓敏, 宗 英, 余珊珊, 等. 类风湿关节炎治疗药物的研发进展及趋势 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(1): 36-43.
- [5] 管咏梅, 陶 玲, 肖 芳, 等. 雷公藤在临床治疗类风湿性关节炎中的用药规律探析 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(1): 64-68.
- [6] 董文哲, 刘 健, 忻 凌, 等. 雷公藤不同剂型改善类风湿关节炎患者免疫炎症指标的数据挖掘分析 [J]. 免疫学杂志, 2018, 34(10): 894-899.
- [7] 马潇苒, 李无阴. 中药治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7(10): 66-70.
- [8] 陈晓俊, 王健英, 金素安, 等. 中药影响类风湿性关节炎信号通路的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2016,

- 34(7): 1735-1739.
- [9] 李 萍. 雷公藤炮制后在临床中的应用 [J]. 中国医药指南, 2019, 17(4): 160.
- [10] 李瀚旻, 兰少波, 常明向. 雷公藤甲素脂质体透皮制剂对 II 型胶原诱发的关节炎的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 199-202.
- [11] Lyu Q W, Zhang W, Shi Q, *et al.* Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): arandomised, controlled clinical trial [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(6): 1078-1086.
- [12] Felcenloben I, Piasecki T, Miller J, *et al.* Adoptively transferred Tregs accumulate in a site-specific manner and ameliorate signs of less advanced collagen-induced arthritis progress in rats [J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(3): 215-228.
- [13] Lavielle M, Mulleman D, Goupille P, *et al.* Repeated decrease of CD4⁺ T-cell counts in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment [J]. *Arth Res Ther*, 2016, 18(1): 253.
- [14] 蔡 辉, 张群燕, 郭郡浩, 等. 类风湿关节炎患者外周血血浆中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 的表达及临床意义 [J]. 中华中医药学刊, 2017(3): 9-11.
- [15] Shahrara S, Pickens S R, Dorfleitner A, *et al.* IL-17 Induces monocyte migration in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol*, 2016, 182(6): 3884-3891.
- [16] Manfredi A A, Baldini M, Camera M, *et al.* Anti-TNF α agents curb platelet activation in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(8): 635-644.
- [17] Xu X, Zheng L, Bian Q, *et al.* Aberrant activation of TGF- β in subchondral bone at the onset of rheumatoid arthritis joint destruction [J]. *J Bone Min Res*, 2015, 30(11): 2033-2043.
- [18] 李 伟, 王佳怡, 肖春媛, 等. 类风湿关节炎患者血清和关节液增加体外培养健康人 PBMC 中 Th1/Tc1 比例的研究 [J]. 现代免疫学, 2018, 38(1): 13-18.
- [19] 苏 江, 朱 静, 程 佳, 等. 不同时期类风湿关节炎患者血清炎症因子的变化及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(9): 2252-2254.
- [20] 蔡 辉, 常文静, 商 玮. 血管新生在类风湿关节炎中的作用 [J]. 安徽医药, 2015, 19(3): 417-421.
- [21] 李 娜, 崔 娟. 雷公藤多苷联合环磷酰胺对类风湿关节炎患者血清 VEGF、VEGFR2 表达水平的影响 [J]. 慢性病学杂志, 2017, 18(1): 72-74.