

益肾蠲痹丸对 II 型胶原致关节炎大鼠踝关节组织病理改变的影响及其机制研究

王晶晶, 刘 静*, 裴天仙, 郭景玥, 郭传敏, 杨 东, 张宗鹏, 申秀萍*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: **目的** 观察益肾蠲痹丸对 II 型胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠的治疗作用及对踝关节组织病理改变的影响, 并探讨益肾蠲痹丸治疗类风湿性关节炎 (RA) 与血管内皮生长因子 (VEGF) 的相关性。 **方法** 通过建立 CIA 大鼠模型, 观察益肾蠲痹丸对 CIA 大鼠足肿胀的治疗作用, 对踝关节局部组织病理形态损伤的治疗作用, 用免疫组化方法检测滑膜组织中 VEGF 的表达水平, 利用基因芯片技术测定外周血淋巴细胞、肝组织中的 VEGF 的基因表达情况。 **结果** 益肾蠲痹丸高、中、低剂量组大鼠踝关节肿胀程度明显减轻, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。益肾蠲痹丸高、中、低剂量组与模型组比较, 滑膜细胞增生减轻, 滑膜组织充血水肿明显减轻, 血管增生和浸润炎细胞数量减少, 血管翳形成显著减少, 纤维组织形成减少, 软骨与骨组织破坏程度减轻。益肾蠲痹丸高、中剂量组与模型组比较滑膜组织中 VEGF 表达明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), 低剂量组滑膜组织中 VEGF 表达亦有下降趋势。益肾蠲痹丸高、中剂量组能显著下调肝组织中 VEGF-B 基因的表达 (fold change > 1.5)。 **结论** 益肾蠲痹丸对 CIA 大鼠有显著治疗作用, 能明显减轻大鼠踝关节肿胀程度, 显著抑制 CIA 大鼠组织病理改变, 能显著下调滑膜组织中 VEGF 的表达和肝组织中 VEGF-B 基因的表达, 从而减少肝组织、滑膜组织中 VEGF 的量, 抑制滑膜组织中血管翳的形成, 减少对关节软骨和骨组织的破坏。

关键词: 益肾蠲痹丸; II 型胶原诱导性关节炎; 血管内皮生长因子; 基因芯片; 血管翳

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)17-3064-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.017

Study on effects of Yishen Juanbi Pill on histopathologic changes in ankle joint of type II collagen induced arthritis in rats and its mechanism

WANG Jing-jing, LIU Jing, PEI Tian-xian, GUO Jing-yue, GUO Chuan-min, YANG Dong, ZHANG Zong-peng, SHEN Xiu-ping

New Drug Assessment Co., Ltd., Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** To observe the therapeutical effect of Yishen Juanbi Pill (YJP) on type II collagen induced arthritis (CIA) in rats and the histopathologic changes in ankle joint and to explore its possible mechanism on rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The therapeutical effect of YJP on CIA rat paw swelling and the histopathologic morphology of the local tissue of ankle joint were observed by the type II CIA rat model. The expression of VEGF of the synovial membrane was assayed by the immunohistochemical method. The changes in VEGF gene expression of peripheral lymphocytes and hepatic tissue were analyzed with gene chip after the treatment with YJP. **Results** The decreased swelling degrees of foot of rats in low-, mid-, and high-dose YJP groups were increased obviously than that of the model group ($P < 0.05, 0.01, \text{and } 0.001$). As compared with the model group, YJP could produce the decreases in hyperplasia of synovial cells, congestion and dropsy of synovium, hyperplasia of blood vessel, infiltration of inflammatory cell, formation of pannus, fiber texture, and cartilage and bone damages. Expression of VEGF in synovial cells was clearly inhibited by YJP in the high- and mid-dose groups compared to the control group ($P < 0.05, 0.01$). YJP in the high- and mid-dose groups significantly reduced the hyperactivity of VEGF-B gene expression in hepatic tissues (fold change > 1.5). **Conclusion** YJP can significantly inhibit joint swelling. YJP can significantly down-regulate the VEGF-B gene expression, thereby inhibit the formation of synovial tissue pannus and reduce cartilage and bone damages. **Key words:** Yishen Juanbi Pill; type II collagen induced arthritis; vascular endothelial cell growth factor; gene chip; pannus

收稿日期: 2016-02-02

作者简介: 王晶晶 (1981—), 女, 助理研究员, 主要从事毒性病理研究。E-mail: wangjj8@tjipr.com

*通信作者 申秀萍 (1964—), 女, 研究员, 从事药理毒理研究工作。E-mail: shenxp@tjipr.com

刘 静 (1980—), 女, 副研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: liuj@tjipr.com

类风湿性关节炎(RA)是一种累及关节为主的炎性自身免疫性疾病。其病理变化为关节滑膜细胞增生、炎性细胞浸润、滑膜血管翳形成、软骨及骨组织的侵蚀和破坏^[1]。其中血管翳形成被公认为是RA病理过程的主要环节,血管翳是滑膜组织的炎性增生,其形成可能和血管内皮生长因子(VEGF)的过度表达有关。益肾蠲痹丸是全国名老中医朱良春先生经过50年临床探索的经典名方,临床应用疗效显著^[2-3]。本实验采用II型胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型,观察益肾蠲痹丸对CIA大鼠病变的治疗作用,并探讨该治疗作用与抑制VEGF的相关性。

1 材料

1.1 动物

健康雄性Wistar大鼠70只,SPF级,体质量120~140 g,动物许可证号SCXK(津)2009-0001,由天津市山川红实验动物科技有限公司繁殖提供。适应性饲养1周后用于实验。

1.2 药品

益肾蠲痹丸,批号20100728,江苏清江药业有限公司提供,临用前用蒸馏水配制成所需浓度;阳性对照药吲哚美辛,厦门中药厂提供,批号081201。

1.3 主要试剂

鸡源性II型胶原、弗氏完全佐剂(Sigma),均购于天津市联星生物科技有限公司;分析纯冰乙酸,天津市凯信化学工业有限公司生产;兔抗VEGF购自武汉博士德生物工程有限公司;SP-9001免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;GeneChip3'IVT Express Kit, Affymetrix; Rneasy Mini Kit, Qiagen; TRIzol Reagent, Invitrogen Life Technologies; Nuclease-free Water, Ambion; Bovine Serum Albumin (BSA), Invitrogen Life Technologies; Herring Sperm DNA, Promega Corporation; MES hydrate SigmaUltra, Sigma-Aldrich; MES Sodium Salt, Sigma-Aldrich; EDTA Disodium Salt, Sigma-Aldrich; DMSO, Sigma-Aldrich。

1.4 主要仪器

T2000型电子天平,美国双杰兄弟(集团)有限公司;PL203型电子天平,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;游标卡尺,上海测绘仪器厂;实验室专用超纯水系统,北京中盛茂源科技发展有限公司;OLYMPUS BX51显微镜,日本奥林巴斯光学

株式会社;OLYMPUS DP71显微摄影,日本奥林巴斯光学株式会社;VIP5J-F2樱花全封闭组织脱水机,日本樱花检验仪器株式会社;Leica EG-1150H+C组织石蜡包埋机,德国Leica公司;樱花IVS-410型推拉式切片机,日本大和光机工业株式会社;樱花自动染色装置DRS-2000J-D2,日本樱花检验仪器株式会社;樱花自动封片机Glas-J2,日本樱花检验仪器株式会社;HPX-90502MBE数显电热培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;病理图像采集与分析系统,北京航空航天大学图像中心产品;基因芯片实验平台:本实验所采用的是AffymetrixGeneChip 3000 TG System,具体包括:Scanner 3000 7G4C with Autoloader, Scanner 3000 Workstation, Fluidics Station 450, Hybridization Oven 640; DK型电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;QZX-C空气浴振荡器,哈尔滨市东明医疗仪器厂;Heatblock (CHB-202&HB-202),杭州博日,预热各种试剂;Gel Electrophoresis Unit,北京六一仪器厂;GeneAmp PCR System 9700金版, Applied Biosystems; Centrifuge(5415D), Eppendorf; 磁力架, Invitrogen; 芯片类型: Affymetrix Rat-2.0 microarray; 分析软件: dChip (Dec.2009 version)。

2 方法

2.1 CIA大鼠模型的制备

将鸡源性II型胶原溶于0.1 mol/L冰醋酸中,质量浓度为2 mg/mL,在2~8℃下搅拌使之充分溶解,置于2~8℃冰箱中过夜。

70只Wistar大鼠中随机挑选60只,以备CIA造模。造模具体如下:溶解于冰醋酸的II型胶原溶液加入等体积的弗氏完全佐剂,在冰浴条件下使二者充分乳化(以乳化液滴入水中不扩散为度),II型胶原最终质量浓度为1 mg/mL。在大鼠背部、尾部多点皮内注射,每只大鼠0.5 mL。初次免疫7 d后加强免疫,在鼠背部、尾部、右后足趾多点皮内注射0.5 mL乳剂。

2.2 动物分组及给药

将造模前所剩余的10只Wistar大鼠作为对照组。于再次免疫后第4天测量对照组及模型组大鼠左后足踝关节(注射足对侧)宽度,模型组大鼠体质量减轻、左侧足踝关节肿胀、踝关节宽度>0.69 cm的认为是造模成功大鼠,挑选CIA造模成功的50只Wistar大鼠随机分为益肾蠲痹丸高、中、低剂量(生药4、2、1 g/kg)组及吲哚美辛组(配成混

悬液, 2 mg/kg)、模型组, 每组 10 只大鼠。Wistar 大鼠初次免疫后第 12 天开始 ig 给药。对照组及模型组 ig 给予同体积生理盐水。每日给药 1 次, 每次 10 mL/kg, 持续给药 3 周。

2.3 观察指标及测定

2.3.1 一般情况观察 每天观察各组大鼠大体形态, 包括体毛、神志、活动、体质量等。

2.3.2 关节肿胀度测定 从加强免疫后第 4 天起(给药第 0 天), 用游标卡尺测每只大鼠左后足踝关节宽度, 每周 2 次, 连续测量 6 次, 以左后足踝关节宽度作为肿胀度观察指标。

2.3.3 关节组织病理形态学改变 实验结束后处死大鼠, 取所有动物的左后足踝关节, 福尔马林固定, 5%硝酸脱钙、酒精逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, HE 常规染色。光镜下观察滑膜、软骨、骨的病理改变。

2.3.4 滑膜 VEGF 免疫组织化学染色及图像分析 石蜡包埋切片, 常规脱蜡至水; PBS 冲洗 3 min×2 次, 滴加新鲜配制的 3% H₂O₂, 室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性; PBS 冲洗 3 min×3 次, 将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸钠盐缓冲液中, 放入微波炉中高火加热至沸腾, 冷却至室温, 然后再蒸煮 1 次, 冷却至室温; PBS 冲洗 3 min×3 次, 滴加正常山羊血清封闭液, 37 °C 温箱中孵育 15 min, 甩去多余液体, 勿洗; 滴加适当比例稀释的一抗, 置湿盒内于 4 °C 冰箱中保存过夜; 4 °C 过夜后需在 37 °C 温箱中复温 30 min, PBS 冲洗 3 min×3 次; 滴加二抗, 37 °C 温箱中孵育 15 min, PBS 冲洗 3 min×3 次; 滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37 °C 温箱中孵育 15 min, PBS 冲洗 3 min×3 次; DAB 显色 5~10 min, 在显微镜下掌握染色程度; 显色后自来水充分冲洗, 苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片。免疫组织化学染色结果以细胞清晰、棕色着色为阳性, 无棕色着色为阴性。对各组大鼠滑膜组织中 VEGF 的表达强度进行定量分析, 其方法是每只动物左后踝关节滑膜组织 400 倍镜下随机选取 5 个视野, 经计算机摄像系统采集后, 运用北京航空航天大学图像中心病理图像采集与分析系统对信号强度进行分析, 计算单位面积内吸光度值, 结果取平均值。

2.3.5 血液淋巴细胞、肝组织中 VEGF 基因表达的测定 于末次给药后 1 h, 各组大鼠麻醉后腹主动脉取血, EDTA (2K⁺) 抗凝, 用淋巴细胞分离液分

离淋巴细胞后, 保存于液氮中; 打开腹腔(取血后)立即取肝脏, 液氮冷冻保存。按操作常规进行, 抽提总 RNA; 检测纯化总 RNA; 纯化测定标记 cRNA; cRNA 样品片段化和芯片杂交; 芯片洗涤扫描。对照组, 模型组, 益肾蠲痹丸高、中剂量组随机选取 5 只动物的淋巴细胞、肝组织进行 VEGF 基因芯片分析, 观察各组淋巴细胞、肝组织中 VEGF 基因表达情况。

2.4 统计方法

所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 软件进行统计分析。采用 *t* 检验和方差分析。基因芯片检测数据采用 dChip (Dec.2009 version) 分析软件的 lower bound fold change 方法分析, 表达差异 1.5 倍以上的数据判断为此基因的表达在模型组和对照组之间、给药组和模型组之间有较大的差异。

3 结果

3.1 一般情况

大鼠注射 II 型胶原后次日, 出现倦怠, 食欲减退, 足部肿胀、发红, 活动不便, 活动量减少, 灵活性变差的情况, 约持续 3 d 以后, 造模大鼠的活动度逐步恢复, 足部肿胀的情况也有不同程度好转。再次免疫后, 大鼠又出现足部红肿、活动不便, 肿胀部位可侵及足垫、全足, 注射部位形成多处小溃疡, 随后结痂愈合。给药 3 周后, 模型组大鼠体质量增长迟缓, 或毛发脱落, 或耳部、尾巴出现红色结节, 四肢关节红肿明显加重, 以双侧后足踝关节最为严重, 活动明显受限; 益肾蠲痹丸高剂量组和吲哚美辛组大鼠出现的症状较轻, 足部红肿减轻, 反应较灵敏, 活动度有不同程度的恢复, 脱毛现象有所好转; 益肾蠲痹丸中、低剂量组整体情况较益肾蠲痹丸高剂量组差, 但明显好于模型组; 对照组大鼠状态良好, 毛发光泽, 体质量增加, 动作自如, 反应灵敏。

3.2 对 CIA 大鼠足肿胀程度的影响

由表 1 可见, 与对照组比较, 模型组大鼠左后足踝关节在加强免疫后第 4 天(给药第 0 天)即出现明显的肿胀, 在第 14 天达到肿胀高峰, 出现严重的踝关节及趾关节肿胀变形, 踝关节宽度显著的增加。加强免疫后第 5 天开始给药, 从给药后第 3 天开始到持续给药后 21 d, 益肾蠲痹丸各剂量组和吲哚美辛组左后足踝关节宽度均显著低于模型组, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 结果显示益肾蠲痹丸对 CIA 大鼠的踝关节肿胀有显著的抑制作用。

表 1 益肾蠲痹丸对 CIA 大鼠左后足踝关节宽度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of YJP on diameter of left hind ankle of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂 量/ (g·kg ⁻¹)	基础阈值/cm	给药后不同时间左后足踝关节宽度/cm					
			3 d	6 d	10 d	13 d	17 d	21 d
对照	—	0.61±0.02	0.62±0.02	0.63±0.03	0.65±0.02	0.64±0.03	0.67±0.02	0.68±0.02
模型	—	0.72±0.05 ^{▲▲▲}	0.79±0.05 ^{▲▲▲}	0.81±0.06 ^{▲▲▲}	0.85±0.06 ^{▲▲▲}	0.85±0.05 ^{▲▲▲}	0.86±0.05 ^{▲▲▲}	0.85±0.03 ^{▲▲▲}
吲哚美辛	0.002	0.71±0.04	0.67±0.03 ^{***}	0.66±0.04 ^{***}	0.66±0.03 ^{***}	0.68±0.03 ^{***}	0.69±0.03 ^{***}	0.69±0.03 ^{***}
益肾蠲痹丸	4	0.71±0.03	0.71±0.04 ^{***}	0.71±0.05 ^{***}	0.73±0.06 ^{***}	0.73±0.06 ^{***}	0.75±0.04 ^{***}	0.74±0.04 ^{***}
	2	0.71±0.03	0.72±0.03 ^{***}	0.72±0.05 ^{***}	0.73±0.06 ^{***}	0.76±0.02 ^{***}	0.77±0.06 ^{***}	0.77±0.06 ^{***}
	1	0.72±0.03	0.74±0.06 [*]	0.73±0.06 ^{**}	0.75±0.08 ^{**}	0.76±0.04 ^{***}	0.78±0.05 ^{***}	0.78±0.05 ^{**}

与对照组比较: ^{▲▲▲} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下同

^{▲▲▲} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below

3.3 对 CIA 大鼠踝关节组织病理改变的影响

主要观察各组动物左后足踝关节的滑膜水肿程度、炎性细胞浸润程度、滑膜增生程度、血管翳生成程度及软骨、骨组织破坏程度, 结果见图 1。对照组: 关节表面覆薄层透明软骨, 细胞排列整齐, 关节面光滑平整, 无剥脱现象; 关节囊由结缔组织构成, 囊腔光滑, 表面覆有 1~2 层滑膜细胞, 滑膜组织无充血水肿, 滑膜细胞无增生现象, 无血管翳形成, 关节软骨下骨小梁粗细、排列正常。模型组: 所有动物踝关节滑膜细胞有轻到重度不同程度的增生且呈多层状, 并且排列紊乱呈短绒毛状或指突状伸入关节腔内, 滑膜间质有少量到多量炎细胞浸润、滑膜细胞下纤维组织及毛细血管增生(血管翳形成), 滑膜囊内和(或)关节腔内有少量坏死物; 增生的滑膜组织覆盖在关节软骨表面, 软骨层破坏, 被纤维结缔组织替代; 骨组

织破坏, 骨小梁间填充纤维结缔组织, 部分形成类骨质, 严重者关节面粘连, 关节腔消失。吲哚美辛组: 滑膜细胞增生和滑膜组织充血水肿减轻, 浸润炎细胞明显减少, 血管增生和血管翳形成减少, 极少量关节软骨表面破坏。益肾蠲痹丸高剂量组: 滑膜细胞轻度增生, 浸润炎细胞数量明显减少, 血管翳形成显著减少, 少量关节软骨表面破坏。益肾蠲痹丸中剂量组: 滑膜细胞增生明显减轻, 血管翳形成减少, 增生的滑膜组织形成绒毛状, 伸向关节腔并覆盖在软骨表面, 部分关节软骨面及软骨下组织破坏。益肾蠲痹丸低剂量组: 滑膜细胞增生有所改善, 血管翳形成减少, 大部分关节软骨及软骨下骨组织破坏, 被纤维结缔组织替代。上述结果表明, 益肾蠲痹丸高、中、低剂量组对 CIA 大鼠模型具有显著的治疗作用, 且有一定的剂量相关性。

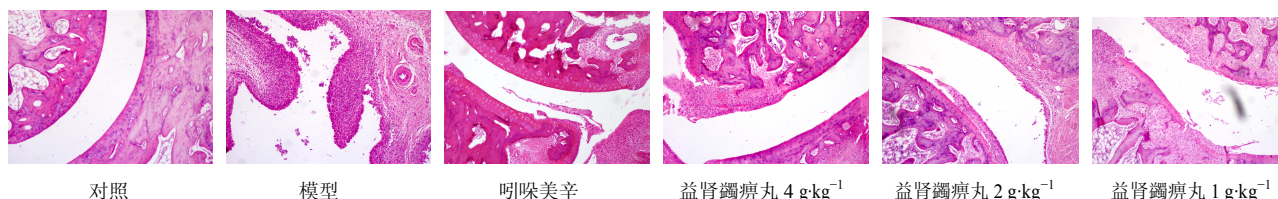


图 1 各组大鼠左后足踝关节组织病理观察

Fig. 1 Pathological observation of left hind-paw ankle of rats in each group

3.4 滑膜 VEGF 免疫组织化学染色及图像分析

由表 2 和图 2 可见, 与对照组相比, 模型组滑膜组织中 VEGF 的表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 益肾蠲痹丸高、中剂量组滑膜组织中 VEGF 的表达明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 益肾蠲痹丸低剂量组与模型组比较虽没有统计学意义, 但亦有下降趋势; 上述结果表明, 益肾蠲痹丸高、中、低剂量组对 CIA 大鼠模型具有显著的治疗作用, 且有一定的剂量相关性。

表 2 益肾蠲痹丸对 CIA 大鼠左后足踝关节滑膜 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of YJP on expression of VEGF in left hind ankle synovial tissue of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	给药 21 d 滑膜 VEGF/%
对照	—	2.178±0.736
模型	—	6.278±1.887 ^{▲▲▲}
益肾蠲痹丸	4	3.241±0.688 ^{**}
	2	3.803±1.344 [*]
	1	4.449±1.674

3.5 对血液淋巴细胞、肝组织中 VEGF 基因表达的影响

由表 3 可见, 益肾蠲痹丸高、中剂量组能明显

下调肝组织中 VEGF-B 基因表达 (fold change > 1.5)。而血液淋巴细胞与肝组织中其他 VEGF 基因表达未见明显改变。

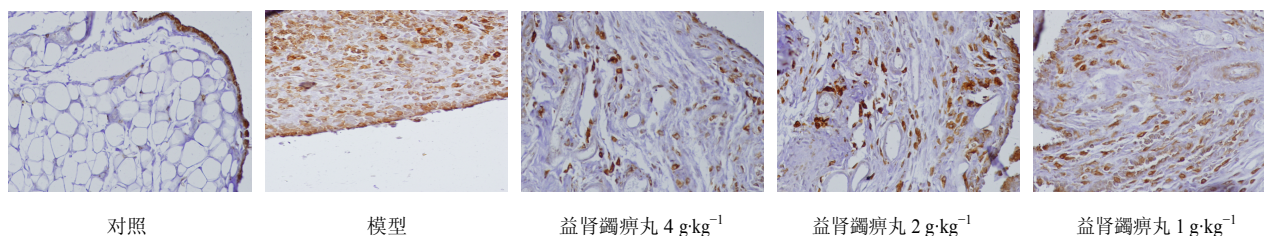


图 2 各组大鼠左后足滑膜组织 VEGF 免疫组化染色结果

Fig. 2 Immunohistochemical staining pictures of VEGF in left hind ankle synovial tissue of rats in each group

表 3 益肾蠲痹丸对 CIA 大鼠血液淋巴细胞、肝组织中 VEGF 基因表达的影响

Table 3 Effect of YJP on expression of VEGF in blood lymphocytes and hepatic tissue of CIA rats

Gene ID	gene	血液淋巴细胞 VEGF fold change			肝脏 VEGF fold change		
		模型/对照	药物高剂量/模型	药物中剂量/模型	模型/对照	药物高剂量/模型	药物中剂量/模型
1380854_at	VEGF-B	-1.08	1.15	1.04	2.20	-2.02	-1.67
1373807_at	VEGF-A	1.33	-1.36	1.02	1.08	-1.31	-1.24
1370081_a_at	VEGF-A	-1.05	1.41	-1.13	-1.03	-1.06	1.18
1368463_at	VEGF-C	-1.31	-1.03	-1.09	1.03	-1.20	-1.31

4 讨论

CIA 模型是一种免疫性炎症模型,其临床表现、病理组织学和免疫学(细胞免疫和体液免疫两方面)方面和人类 RA 最为相似,主要表现为多发性末端关节炎,关节局部红肿,病理变化表现为增生性滑膜炎、关节软骨破坏、关节腔内有大量炎性细胞浸润,以及各种免疫指标的改变,被认为是筛选和研究治疗 RA 药物较理想的动物模型^[4-5]。

中医认为 RA 属“痹证”范畴,为“本虚标实”证,且为“顽痹”。肝肾亏损是导致本病发生的根本原因,外感风寒湿热之邪是引起本病的外因,而经络痹阻、气血不畅是其基本的病理特征。因其病变在骨,骨为肾所主,故应益肾壮督治其本,蠲痹通络治其标。益肾蠲痹丸为传统中药复方,由淫羊藿、延胡索、当归、全蝎、蜈蚣等 18 味药材组成,本方所用益肾壮督之品,使药力得以加强,药效得以延长,妙用虫药,强调“虫蚁搜剔,钻透剔邪”的特性,使浊去凝开,气通血和,经行络畅,伏邪得除,尤适用于久治不愈之顽痹及 RA^[6]。

RA 的基本病理改变是血管翳,主要由新生微血管、增生肥大的滑膜细胞、炎性细胞及机化的纤维组织构成,是 RA 病情进展的关键,最终导致关

节畸形和功能废用。而大量的新生血管则是血管翳的重要特征和形成因素,新生血管提供氧和营养物质给高度增生的滑膜组织,促使滑膜细胞肿瘤样增殖,并为炎性细胞进入骨组织结构中提供途径^[7-8]。其中 VEGF 在促进血管生成和迁延侵入起重要作用,VEGF 家族中主要包括:VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、胎盘生长因子;VEGF-A 能加强微血管通透性,VEGF-B 具有促进内皮细胞增生的作用,VEGF-C 可选择性诱导淋巴管的增生^[9]。研究发现 VEGF 在滑膜组织的巨噬样滑膜衬里细胞、血管平滑肌细胞、梭形衬里内层细胞都有表达^[10-11];VEGF 可特异性地与滑膜成纤维样细胞结合,促进滑膜细胞有丝分裂,亦是有效的单核细胞和淋巴细胞趋化因子,能诱导炎症细胞进入关节滑膜,而渗出的巨噬细胞被炎症因子激活后能分泌更多的 VEGF,从而将滑膜炎症反应正反馈放大^[12];同时 VEGF 与滑膜内血管内皮细胞结合,一方面促进血管的生成,另一方面强有力地使血管通透性增高,促进金属蛋白酶和间质胶原酶的分泌,直接参与关节软骨和骨的破坏,VEGF 的过度表达可能是导致 RA 滑膜血管翳形成、滑膜炎性持续存在并导致软骨破坏的关键因子^[13]。

因阳性药吲哚美辛抗炎作用机制明确,是环氧化酶抑制剂,所以未检测吲哚美辛组滑膜、肝组织及血液淋巴细胞中的 VEGF。由实验结果可知,模型组大鼠左后足踝关节组织病理学观察发现滑膜细胞重度增生、大量血管增生及炎性细胞浸润形成血管翳,软骨组织、骨组织严重破坏,重者关节面粘连,关节腔消失;同时检测到模型组大鼠滑膜组织中 VEGF 蛋白表达和肝组织中 VEGF-B 基因表达显著高于对照组,提示 VEGF 在滑膜细胞增生及血管翳形成中发挥重要作用。而益肾蠲痹丸高、中剂量组治疗 3 周后发现:益肾蠲痹丸能够明显下调滑膜组织中 VEGF 蛋白表达和肝组织中 VEGF-B 基因表达,从而有效减少 VEGF 的生成,来抑制滑膜组织增生和血管新生,减少血管翳的形成,阻止关节软骨组织、骨组织的破坏,且高剂量组治疗效果明显好于中、低剂量组,有一定的剂量相关性。因此益肾蠲痹丸是目前治疗早期 RA 较为理想的中成药,可以改善患者的症状,控制病情的进展,减少骨关节的进行性破坏,在一定程度上保护关节、改善关节功能。

参考文献

- [1] Alamanos Y, Drosos A A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(3): 130-136.
- [2] 郭会卿. 益肾蠲痹丸治疗顽痹 150 例疗效观察 [J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(10): 2039-2040.
- [3] 张波, 张继平, 周少雄, 等. 益肾蠲痹丸对类风湿性关节炎患者抗 CCP 抗体及 AKA 抗体的影响 [J]. *广东医学*, 2009, 30(1): 137-140.
- [4] 薛盟举. 类风湿关节炎的中医实验动物模型及评价 [J]. *中西医结合研究*, 2011, 3(1): 31-33.
- [5] Myers L K, Rosloniec E F, Cremer M A, *et al.* Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity [J]. *Life Sci*, 1997, 61(19): 1861-1878.
- [6] 朱良春. 益肾蠲痹丸 [J]. *中国社区医师*, 1990(1): 20.
- [7] Shiozawa S, Shiozawa K, Fujita T. Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction [J]. *Arthritis Rheumatol*, 1983, 26(4): 472-478.
- [8] FitzGerald O, Soden M, Yanni G, *et al.* Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 1991, 50(11): 792-796.
- [9] 蔡克波, 沈泽民. VEGF 家族及其受体与新生血管生成 [J]. *医学综述*, 2002, 8(2): 70-72.
- [10] Nagashima M, Yoshino S, Ishiwata T, *et al.* Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 1995, 22(9): 1624-1630.
- [11] Fava R A, Olsen N J, Spencer-Green G, *et al.* Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue [J]. *J Exp Med*, 1994, 180(1): 341-346.
- [12] Koch A E, Harlow L A, Haines G K, *et al.* Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol*, 1994, 152(8): 4149-4156.
- [13] 王娅南, 徐芳, 李玉兰. VEGF 与 endoglin 在 CIA 大鼠滑膜组织中表达增高 [J]. *基础医学与临床*, 2011, 31(9): 1011-1014.