

痹祺胶囊治疗胶原诱导型关节炎大鼠的作用机制研究

张冬梅¹, 李宝丽^{2*}

1. 天津市中医药研究院附属医院 糖尿病科, 天津 300131

2. 天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052

摘要: 目的 探究痹祺胶囊对胶原诱导型关节炎 (collagen induced arthritis, CIA) 大鼠中软骨寡聚基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP) 表达的影响。方法 随机选取 10 只 SD 大鼠作为对照组, 其余大鼠建立 CIA 模型, CIA 大鼠随机分为模型组, 痹祺胶囊中、高剂量 (0.6、0.9 g/kg) 组, 甲氨蝶呤 (1.67 mg/kg) 组, 连续给药 4 周, 观察大鼠的一般情况和足肿胀变化, 检测大鼠血清中 COMP 水平、滑膜中 COMP 蛋白表达、软骨中 COMP mRNA 表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 COMP 水平、滑膜中 COMP 蛋白表达、软骨中 COMP mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 COMP 水平、滑膜中 COMP 蛋白表达、软骨中 COMP mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.001$)。结论 痹祺胶囊可能通过下调 COMP 表达, 抑制炎症细胞浸润、滑膜增生和关节软骨破坏, 从而治疗类风湿关节炎。

关键词: 痹祺胶囊; 类风湿关节炎; 软骨寡聚基质蛋白; 胶原诱导型关节炎; 滑膜

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)04-1059-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.019

Study on mechanism of Biqi Capsule in treating collagen induced arthritis rats

ZHANG Dong-mei¹, LI Bao-li²

1. Affiliated Hospital of Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300120, China

2. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Biqi Capsule (痹祺胶囊) on the expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in CIA rats. **Methods** A total of 10 rats were randomly selected as control group, the other rats were used to establish CIA model, CIA rats were randomly divided into model group, low-, medium-dose Biqi Capsule (0.6, 0.9 g/kg) groups and methotrexate (1.67 mg/kg) group. After administration for 4 weeks, the changes of paw swelling in rat were observed; The level of COMP in serum, expression of COMP in synovium and mRNA level of COMP in cartilage were tested. **Results** Compared with control group, level of COMP in serum, expression of COMP in synovium and mRNA level of COMP in cartilage were significantly increased in model group ($P < 0.001$); Compared with model group, level of COMP in serum, expression of COMP in synovium and mRNA level of COMP in cartilage were decreased in treatment groups ($P < 0.001$). **Conclusion** Biqi Capsule may prevent inflammatory infiltration, synoviocyte proliferation, cartilage destruction by inhibiting the expression of COMP, and then treat rheumatoid arthritis.

Key words: Biqi Capsule; rheumatoid arthritis; cartilage oligomeric matrix protein; collagen-induced arthritis; synovium

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫性关节疾病, 其病理特征为炎症细胞浸润、关节滑膜增生, 伴随关节软骨及软骨下骨进行性损伤, 最终导致关节功能障碍, 甚至出现畸形, 因此 RA 的早期诊断治疗至关重要^[1-3]。胶原诱导型关节炎 (collagen induced arthritis, CIA) 动物模型的临床症状和病理表现与 RA 极为相似, 为研

究 RA 常用的动物模型。软骨寡聚基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP) 是一种细胞外基质蛋白, 主要位于肌腱、软骨和软骨周组织。研究表明, COMP 既能用于 RA 的早期诊断, 又能用于判断关节损伤情况^[4]。本研究旨在探讨痹祺胶囊对 CIA 大鼠血清中 COMP 水平、滑膜中 COMP 蛋白表达和软骨中 COMP mRNA 表达的影

收稿日期: 2020-11-10

作者简介: 张冬梅, 医学硕士, 从事风湿免疫、内分泌的临床与药理学研究。E-mail: 13516268238@163.com

*通信作者: 李宝丽, 硕士研究生导师, 主任医师, 从事风湿免疫方向研究。E-mail: li3106@sina.com

响,为痹祺胶囊治疗 RA 的作用机制提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 50 只,4 周龄,体质量(150±10)g,购自天津军事科学院,合格证号 0002257。动物于中国医学科学院生物医学工程研究所,温度 23~25℃,湿度(50±5)%,适应性饲养 1 周。动物实验遵循中国医学科学院生物医学工程研究所实验动物管理规定,符合 3R 原则。

1.2 药品与试剂

甲氨蝶呤(2.5 mg/片,批号 20100302)购自上海医药有限公司信谊制药总厂;痹祺胶囊(国药准字 Z10910026,批号 311345,规格 0.3 g/粒)购自天津达仁堂京万红药业有限公司;牛 II 型冻干胶原、不完全弗式佐剂,购自美国 Chondrex 公司;COMP ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司;DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥有限公司;qRT-RCR 试剂和 COMP、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物序列均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 仪器

YLS-7B 足趾容积测量仪(济南益延科技发展有限公司);XSP-300 型双目显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);DG5032 型酶联免疫检测仪(南京市华东电子团体医疗装备有限责任公司);CFX96 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);恒温离心机(江苏省盐城市凯特实验仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

牛 II 型冻干胶原溶于乙酸,按 1:1 与不完全弗式佐剂混匀制成乳剂。随机选取 10 只 SD 大鼠作为对照组,其余大鼠尾根部 sc 0.2 mL 乳剂,第 2 周再次注射 0.1 mL 乳剂,对照组注射等体积生理盐水。第 3 周将造模大鼠按足肿胀程度随机分为模型组,痹祺胶囊中、高剂量(0.6、0.9 g/kg,相当于临床剂量的 10、15 倍)组,甲氨蝶呤(1.67 mg/kg,相当于临床剂量的 10 倍)组,每组 10 只。痹祺胶囊溶于生理盐水分别配制成质量浓度为 0.06、0.09 g/mL 的溶液,甲氨蝶呤溶于生理盐水配制成质量浓度为 0.167 mg/mL 的溶液。痹祺胶囊组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积生理盐水,1 次/d;甲氨蝶呤组 ig 相应药物,1 次/周,连续 4 周。用足趾容积测定仪测定大鼠后足体积,每 2 天 1 次,计算大

鼠足肿胀率。

足肿胀率=(隔日大鼠后足体积-第 1 天大鼠后足体积)/第 1 天大鼠后足体积

2.2 痹祺胶囊对 RA 大鼠血清 COMP 水平的影响

各组大鼠脱颈椎处死,腹主动脉取血后分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 COMP 水平。

2.3 痹祺胶囊对 RA 大鼠滑膜 COMP 蛋白表达的影响

取各组大鼠左侧踝关节,按照 SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒说明书进行切片显色后,苏木素复染,脱水、透明、中性树胶封片,于显微镜下观察滑膜 COMP 阳性细胞并拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析阳性蛋白含量变化。

2.4 痹祺胶囊对 RA 大鼠软骨中 COMP mRNA 表达的影响

取各组大鼠左侧踝关节,按照 Trizol 试剂说明书提取大鼠软骨总 RNA,测定其质量浓度后,逆转录合成 cDNA,进行 qRT-RCR 分析。引物序列:COMP 上游引物为 5'-GAGA ACTTTGCCGTTGAA-GC-3',下游引物为 5'-GCTTCCTGTAGGTGGCAA-TG-3';GAPDH 上游引物为 5'-CAGGGCTGCCTTC-TCTTGTG-3',下游引物为 5'-GATGGTGATGGGT-TTCCCGT-3'。qRT-RCR 程序:94℃、4 min,94℃、30 s,58℃、30 s,72℃、30 s,35 次循环后延伸 7 min。

2.5 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多样本均数的比较采用单因素方差分析,两变量关系采用直线相关分析。

3 结果

3.1 痹祺胶囊对 RA 大鼠一般情况的影响

模型组大鼠精神萎靡、毛色晦黯、体质量增长迟缓、饮食减少、行动迟缓;各给药组大鼠精神状态、体质量、毛色、饮食、行走步态均较模型组有所缓解。

3.2 痹祺胶囊对 RA 大鼠足肿胀率的影响

如图 1 所示,造模 2 周内,模型组大鼠足肿胀率升高,第 15~23 天给药组大鼠足肿胀率降低,第 24 天给药组较模型组大鼠足肿胀率降低。

3.3 痹祺胶囊对 RA 大鼠血清 COMP 水平的影响

如表 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 COMP 水平显著升高($P < 0.001$);与模型组

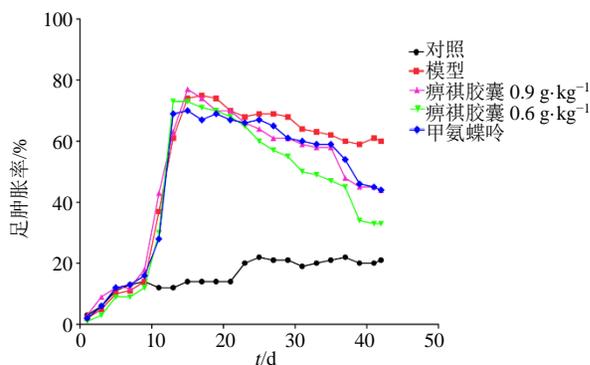


图1 痹祺胶囊对 RA 大鼠足肿胀率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 1 Effect of Biqi Capsule on paw swelling rate of RA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表1 痹祺胶囊对 RA 大鼠血清 COMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 1 Effect of Biqi Capsule on COMP level in serum of RA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	COMP/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	0.75 ± 0.12
模型	—	2.13 ± 0.27***
痹祺胶囊	0.9	1.28 ± 0.30###
	0.6	1.10 ± 0.20###
甲氨蝶呤	0.001 67	1.09 ± 0.23###

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$, 下表同
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group, same as below table

比较, 各给药组大鼠血清中 COMP 水平显著降低 ($P < 0.001$)。

3.4 痹祺胶囊对 RA 大鼠滑膜 COMP 蛋白表达的影响

如图2和表2所示, 对照组滑膜未见 COMP 表达; 与对照组比较, 模型组滑膜可见大量阳性细胞, COMP 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组

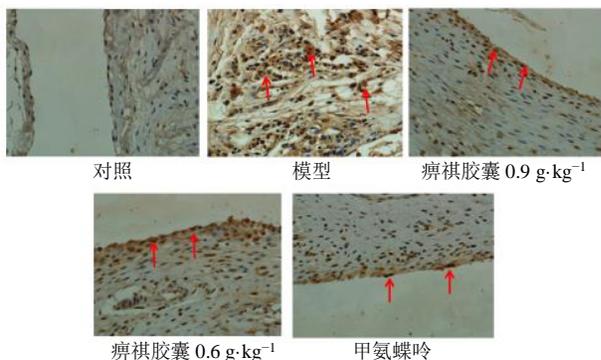


图2 痹祺胶囊对 RA 大鼠滑膜中 COMP 蛋白表达的影响 (×400)
Fig. 2 Effect of Biqi Capsule on COMP expression in synovium of RA rats (×400)

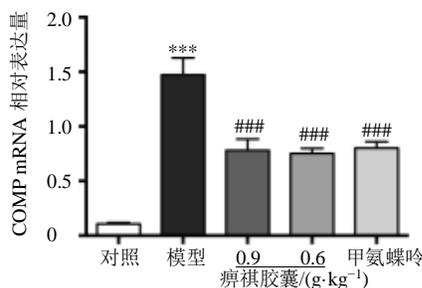
表2 痹祺胶囊对 RA 大鼠滑膜 COMP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 2 Effect of Biqi Capsule on COMP expression in synovium of RA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	COMP 表达量
对照	—	29.02 ± 3.04
模型	—	92.18 ± 1.13***
痹祺胶囊	0.9	65.92 ± 0.72###
	0.6	65.59 ± 0.98###
甲氨蝶呤	0.00167	65.72 ± 0.49###

比较, 各给药组滑膜可见部分阳性细胞, COMP 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$)。

3.5 痹祺胶囊对 RA 大鼠软骨中 COMP mRNA 表达的影响

如图3所示, 与对照组比较, 模型组大鼠软骨中 COMP mRNA 表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠软骨中 COMP mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$)。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group

图3 痹祺胶囊对 RA 大鼠软骨中 COMP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 3 Effect of Biqi Capsule on COMP mRNA expression in cartilage of RA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表2 痹祺胶囊对 RA 大鼠软骨中 COMP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 2 Effect of Biqi Capsule on COMP mRNA expression in cartilage of RA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

4 讨论

RA 是一种不可逆转的自身免疫性疾病, 其治疗原则为抗炎、镇痛、抑制关节破坏。目前临床上用于治疗 RA 的药物多为非甾体抗炎药、皮质类固醇、抗风湿药、生物制剂等, 具有骨丢失、肝衰竭、呼吸衰竭等不良反应^[5-6]。甲氨蝶呤是 RA 治疗的首选药物, 可选择性作用于细胞 S 期, 干扰细胞 DNA 的合成, 抑制滑膜细胞增殖, 发挥抗炎作用, 并可阻止滑膜侵袭软骨及骨, 延缓 RA 的病程进展^[7]。然而, 长期服用甲氨蝶呤具有肝毒性、肿瘤抑制等严重不良反应, 可致胎儿畸形^[8]。因此开发一种不良反应小、便于长期服用的药物对治疗 RA 有重要意义。

痹祺胶囊是治疗 RA 的常用中药制剂, 由三七、

马钱子、党参、白术、丹参、川芎、甘草等药物组成，全方具有散寒除湿、活血通络的功效，经多年临床使用证实对 RA 有确切疗效。痹祺胶囊对 CIA 大鼠后足肿胀度、关节炎指数和疼痛有明显改善作用，可抑制 CIA 大鼠的原发性、继发性损害，可通过下调白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 表达，上调骨保护素表达，干预慢性滑膜炎、血管翳形成、软骨及骨的破坏^[9-12]。现代药理学研究表明，马钱子可抑制成纤维样滑膜细胞的增殖，丹参可促进成纤维样滑膜细胞凋亡并抑制其侵袭，从而抑制滑膜增生及血管翳的形成^[13]。

COMP 是 RA 诊断和预后的标志物。RA 早期患者血清中 COMP 水平升高，滑膜 COMP 表达水平可用于观察软骨破坏及关节疾病预后^[14]。Carlsen 等^[15]发现 COMP 诱导的关节炎模型依赖于由 T 细胞识别、呈递分子的相容性复合体，而 T 细胞可促进炎症因子及基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 产生，破坏软骨代谢。本研究结果显示，模型组血清中 COMP 水平、滑膜中 COMP 表达均显著升高，提示 CIA 模型成功建立。研究发现，RA 患者血清中 COMP 水平与疾病活动评分和软骨破坏显著相关^[16]。本研究结果显示，模型组大鼠软骨中 COMP mRNA 表达显著升高，提示 COMP 可能通过诱导 MMPs 的产生从而破坏软骨；各剂量痹祺胶囊组血清中 COMP 水平、滑膜中 COMP 表达和软骨中 COMP mRNA 水平均显著降低，与甲氨蝶呤疗效相当。

综上所述，痹祺胶囊可能通过下调血清中 COMP 水平、滑膜和软骨中 COMP 表达，抑制炎症浸润、滑膜增生和关节破坏，从而发挥保护关节软骨的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sokka T, Kautiainen H, Toloza S, et al. QUEST-RA: Quantitative clinical assessment of patients with rheumatoid arthritis seen in standard rheumatology care in 15 countries [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(11): 1491-1496.
- [2] Aletaha D, Neogi T, Silman A J, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [3] McInnes I B, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [4] Andersson M L E, Svensson B, Petersson I F, et al. Early increase in serum-COMP is associated with joint damage progression over the first five years in patients with rheumatoid arthritis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2013, 14: 229.
- [5] Baschant U, Lane N E, Tuckermann J. The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(11): 645-655.
- [6] Albrecht K, Müller-Ladner U. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2010, 28(5): 95-101.
- [7] Brown P M, Pratt A G, Isaacs J D. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(12): 731-742.
- [8] Abbasi M, Mousavi M J, Jamalzahi S, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10018-10031.
- [9] 谭洪发, 荣晓凤, 徐艳明, 等. 痹祺胶囊对 CIA 大鼠 OPG/RANKL 表达的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(10): 878-883.
- [10] 边新群, 刘维. 痹祺胶囊治疗类风湿性关节炎的药理学实验研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(12): 773-774.
- [11] 郑双融, 李宝丽. 痹祺胶囊对 II 型胶原诱导性关节炎大鼠滑膜增殖及血清 IL-18、TNF- α 水平的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(8): 3330-3333.
- [12] 夏璇, 王焕锐, 吕媛, 等. 痹祺胶囊治疗膝骨关节炎的临床疗效及影像学评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(13): 3518-3522.
- [13] 方芳, 陈海波, 马凤森, 等. 马钱子生物碱组分对类风湿性关节炎滑膜细胞增殖作用的比较研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2013, 37(1): 1-4.
- [14] Ahrman E, Lorenzo P, Holmgren K, et al. Novel cartilage oligomeric matrix protein (COMP) neoepitopes identified in synovial fluids from patients with joint diseases using affinity chromatography and mass spectrometry [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(30): 20908-20916.
- [15] Carlsen S, Nandakumar K S, Bäcklund J, et al. Cartilage oligomeric matrix protein induction of chronic arthritis in mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(7): 2000-2011.
- [16] Algergawy S A, El-Sabour M A, Osman A S, et al. Early diagnostic and prognostic values of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and cartilage oligomeric matrix protein in rheumatoid arthritis [J]. *Egypt J Immunol*, 2013, 20(2): 11-20.

[责任编辑 李亚楠]