

and fasciocutaneous free flaps for the reconstruction of the extensive composite scalp and cranium defects[J]. J Craniofac Surg, 2018, 29(7):1947-1951.

13 Takayama Y, Yokoo S, Makiguchi T, et al. Motor nerve preservation and muscle atrophy after pectoralis major musculocutaneous flap surgery for oromandibular reconstruction [J]. J Craniofac Surg, 2016, 27(8):2055-2060.

14 张志愿,俞光岩. 口腔颌面外科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2019:325.

15 李丽楚,王舒婷. 舌癌转移复发相关基因分子的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2013, 6(5):505-508.

[收稿日期 2020-05-08][本文编辑 余军 吕文娟]

本文引用格式

李帅,王晓萌,韦毅,等. 舌癌切除同期行股前外侧皮瓣解剖修复术对患者语音功能恢复的效果研究[J]. 中国临床新医学, 2020, 13(8):782-786.

课题研究 · 论著

独活寄生汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清中炎症因子的影响

袁玉影, 李浩, 张正午, 李欣然, 贾园园, 官杰

基金项目: 2018年黑龙江省大学生创新创业项目(编号:201811230003)

作者单位: 161006 黑龙江, 齐齐哈尔医学院

作者简介: 袁玉影(1997-), 女, 在读本科生, 研究方向: 临床医学. E-mail: 2027412380@qq.com

通讯作者: 官杰(1967-), 女, 医学硕士, 教授, 研究方向: 肿瘤免疫疾病. E-mail: g.susan@163.com

[摘要] **目的** 探讨独活寄生汤对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠血清中白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-17(IL-17)、白细胞介素-37(IL-37)及干扰素- γ (IFN- γ)水平的影响。**方法** 选择雄性Wistar大鼠60只, 随机选取6只大鼠设为正常组, 其余54只通过注射完全弗氏佐剂构建CIA模型。选择造模成功的大鼠30只, 随机分为阳性对照组、塞来昔布组(以0.05 g/ml予塞来昔布干预)和独活寄生汤高、中、低浓度组(分别以4.40 g/ml、2.20 g/ml和1.10 g/ml独活寄生汤干预)。比较各组大鼠在干预后血清中IL-17、IFN- γ 、IL-10和IL-37的水平。**结果** 与正常组比较, 阳性对照组IL-17、IFN- γ 水平显著升高($P < 0.05$)。与阳性对照组比较, 塞来昔布组和独活寄生汤中浓度组IL-10、IL-37水平升高, IL-17、IFN- γ 水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 但阳性对照组与独活寄生汤高浓度组和低浓度组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 独活寄生汤对CIA大鼠关节炎具有明显改善作用, 其抗炎作用机制可能通过降低促炎因子IL-17、IFN- γ 水平和升高抑炎因子IL-10、IL-37水平来实现。

[关键词] 独活寄生汤; 胶原诱导性关节炎; 大鼠; 炎症因子

[中图分类号] R 332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2020)08-0786-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.08.11

Effects of Duhuo Jisheng decoction on inflammatory factors in serum of collagen-induced arthritis rats

YUAN Yu-ying, LI Hao, ZHANG Zheng-wu, et al. Qiqihar Medical College, Heilongjiang 161006, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Duhuo Jisheng decoction on the levels of interleukin-10(IL-10), interleukin-17(IL-17), interleukin-37(IL-37) and interferon gamma(IFN- γ) in the serum of collagen-induced arthritis(CIA) rats. **Methods** Sixty male Wistar rats were selected, among which six rats were randomly selected as the normal group, and the other 54 rats were injected with complete Freund's adjuvant(CFA) to construct a CIA model. Thirty CIA model rats were selected and randomly divided into positive control group, celecoxib group(intervened with celecoxib at 0.05 g/ml) and high-, medium-, and low-dose Duhuo Jisheng decoction groups(intervened with Duhuo Jisheng decoction at 4.40 g/ml, 2.20 g/ml and 1.10 g/ml respectively). The serum levels of IL-17,

IFN- γ , IL-10 and IL-37 were compared among the groups after intervention. **Results** Compared with those in the normal group, the levels of IL-17 and IFN- γ in the positive control group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in the positive control group, the levels of IL-10 and IL-37 increased, and the levels of IL-17 and IFN- γ decreased in the celecoxib group and the medium-dose Duhuo Jisheng decoction group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); However, there were no significant differences between the positive control group and the high- and low- dose Duhuo Jisheng decoction groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Duhuo Jisheng decoction has significant improvement on arthritis in CIA rats, and its anti-inflammatory mechanism may be achieved by reducing the levels of pro-inflammatory factors of IL-17 and IFN- γ , and increasing the levels of anti-inflammatory factors of IL-10 and IL-37.

[Key words] Duhuo Jisheng decoction; Collagen-induced arthritis; Rats; Inflammatory factors

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节病变引起肢体畸形, 特别是以关节滑膜组织慢性炎症、滑膜增生病变及大量淋巴细胞、巨噬细胞浸润为主要特征的慢性、全身性、反复发作的自身免疫性疾病^[1], 其发生、发展与炎症因子, 如白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)、白细胞介素-37 (interleukin-37, IL-37) 及干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 等密切相关。独活寄生汤是治疗 RA 的名方, 来源于《备急千金要方》, 由中药独活、桑寄生、杜仲、牛膝、细辛、秦艽、茯苓、肉桂心、防风、川穹、人参、甘草、当归、芍药、干地黄 15 味中药组成, 具有祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血之功, 其应用于临床治疗 RA 的疗效显著^[2-4]。大鼠胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 是一种免疫性炎症, 是临床研究 RA 的经典动物模型。2018-05 ~ 2019-05 本课题组开展实验研究, 旨在研究独活寄生汤对 CIA 大鼠血清 IL-10、IL-17、IL-37 及 IFN- γ 的调节作用, 探讨独活寄生汤治疗 RA 的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 Wistar 大鼠 60 只, 体重 (250 \pm 10) g, 雄性, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 合格证号 SCXK (辽) 2015-0001。

1.2 试剂与器材 独活寄生汤配方颗粒剂 (8050861)、塞来昔布 (AN8170 X41713) 购自齐齐哈尔中医医院。鸡 II 型胶原 (chicken type II collagen, C II; JM-181105KE16)、IL-10 (JM-01602R2)、IL-17 (JM-01495R2)、IL-37 (JM-02057R2)、IFN- γ (JM-181105KE8) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自江苏晶美生物科技有限公司。完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA; albr3877v) 购自 Sigma (美国) 公司。RT-6000 型酶标仪 (美国 Rayto 公司)。MODEL550 台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的构建及筛选 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机选取 6 只大鼠设为正常组, 其余 54 只参考陈彩娥等^[5]的研究方法进行 CIA 模型构建: (1) 抗原制备。将 0.5 mg C II 溶于 0.25 ml 0.1 mol/L 的醋酸中, 在 4 $^{\circ}$ C 下搅拌使之充分溶解, 浓度为 2 g/L, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜; 加入等体积 CFA, 乳化, 制成 C II 乳剂 (终浓度为 1 g/L)。 (2) 造模。初次免疫时于大鼠左后足跖部皮内注射胶原乳剂 200 μ l/只以致炎, 9 d 后按 100 μ l/只左足跖皮内注射 6 d。正常组同法注射生理盐水 15 d。从初次免疫第 1 天起, 每天观察小鼠足部肿胀情况, 予第 16 天进行关节炎指数 (Arthritis Index, AI) 评分^[6]: 0 分, 正常; 1 分, 明显可见的腕/踝关节轻度肿胀或少数几个指关节受累; 2 分, 中度的腕/踝关节肿胀, 仅局限于单个腕/踝关节, 不累及其他指间关节; 3 分, 腕/踝关节肿胀严重, 累及足爪; 4 分, 整个足爪肿胀, 累及多个关节 (见图 1)。AI 评分达到 4 分证明造模成功。本研究大鼠中, AI 评分为 4 分 46 只, 3 分 5 只, 2 分 2 只, 1 分 1 只。



图 1 大鼠 CIA 模型构建成功示意图

1.3.2 药物干预 从 46 只造模成功的大鼠中选择 30 只, 采用随机数字表法将其随机分为阳性对照组、塞来昔布组、独活寄生汤高浓度组、独活寄生汤中浓度组、独活寄生汤低浓度组, 每组 6 只。塞来昔

布组给予塞来昔布干预治疗,将药物溶于蒸馏水中,质量浓度为 0.05 g/ml,每日按 0.01 ml/g 灌胃给药。独活寄生汤高、中、低浓度组的药浓度分别为 4.40、2.20、1.10 g/ml,按 0.01 ml/g 灌胃给药(分别相当于正常成人用量的 2、1、0.5 倍),正常组及阳性对照组每日给予相同体积的生理盐水。每组喂药 1 次/d,持续 30 d^[7]。

1.3.3 免疫指标检测 在干预处理 30 d 后,心脏采血 2 ml,5 000 r/min 离心 5 min,取血清冻存备用。测定前将标本室温复融混匀,采用双抗体夹心亲和素-生物素复合 ELISA 法(avidin biotin complex-ELISA,ABC-ELISA)测定大鼠血清 IL-17、IFN- γ 、IL-10、IL-37 水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 各组大鼠血清炎症因子表达水平比较 [$(\bar{x} \pm s)$, pg/ml]

组别	例数	IL-17	IFN- γ	IL-10	IL-37
正常组	6	22.62 \pm 3.15 ^{#ac}	44.17 \pm 3.19 ^{#ac}	14.46 \pm 3.24 ^{Ab}	16.12 \pm 3.00 ^{Ab}
阳性对照组	6	32.30 \pm 4.93 ^{Ab}	61.85 \pm 4.76 ^{Ab}	13.78 \pm 3.78 ^{Ab}	15.09 \pm 2.88 ^{Ab}
塞来昔布组	6	22.63 \pm 3.30 ^{ac}	45.06 \pm 3.87 ^{ac}	25.04 \pm 2.94 ^{ac}	37.52 \pm 2.10 ^{ac}
独活寄生汤高浓度组	6	30.79 \pm 4.43 ^b	52.64 \pm 4.03	16.78 \pm 4.53 ^b	21.66 \pm 3.57 ^b
独活寄生汤中浓度组	6	22.63 \pm 3.03 ^c	47.37 \pm 3.44	21.82 \pm 3.43 ^c	33.76 \pm 3.18 ^c
独活寄生汤低浓度组	6	29.85 \pm 3.18	53.58 \pm 4.19	15.37 \pm 3.42	19.16 \pm 2.89
<i>F</i>	-	9.210	17.034	9.373	60.829
<i>P</i>	-	0.0003	0.0007	0.006	0.0009

注:与阳性对照组比较,[#] $P < 0.05$;与塞来昔布组比较,^A $P < 0.05$;与独活寄生汤高浓度组比较,^a $P < 0.05$;与独活寄生汤中浓度组比较,^b $P < 0.05$;与独活寄生汤低浓度组比较,^c $P < 0.05$

3 讨论

3.1 RA 是一种以慢性滑膜炎为特点的系统性自身免疫病,往往伴随着关节外器官受累,常导致关节畸形及功能丧失^[8]。有研究^[9]表明 IL-17、IFN- γ 、IL-10、IL-37 的异常表达在 RA 发病中起重要作用。IL-17 主要由辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17,Th17)产生,在 RA 的发生发展过程中起着关键作用,可导致血管新生、滑膜增生和软骨破坏^[10]。IL-17 能够上调 IFN- γ 等炎症因子的基因表达,并且促进局部关节炎症的进展和扩大。IFN- γ 主要由活化的辅助性 T 细胞 1(T helper cell 1,Th1)和自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)产生,其作为免疫刺激因子能够促进 CD4⁺ T 细胞分化成 Th1,增加 Th1 型细胞因子,如白细胞介素-2(interleukin-2,IL-2)的产生^[11]。有实

2 结果

2.1 正常组与模型组大鼠的一般情况比较 正常组大鼠皮毛光滑,活动自如,精神状态良好,能正常饮水觅食,体重增加。阳性对照组大鼠皮毛失去光泽,左后肢足趾部明显肿胀伴活动受限,精神萎靡,进食、饮水减少,体重减轻。经过塞来昔布治疗后,大鼠精神恢复一般,左足垫厚度变薄。经过独活寄生汤治疗以后,精神状态恢复较好,左后肢足垫厚度变薄,活动受限程度减轻。

2.2 各组大鼠血清炎症因子表达水平比较 与正常组比较,阳性对照组血清 IL-10、IL-37 水平有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),IL-17、IFN- γ 水平显著升高($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,塞来昔布组和独活寄生汤中浓度组 IL-10、IL-37 水平升高,IL-17、IFN- γ 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);但阳性对照组与独活寄生汤高浓度组和低浓度组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

验^[12]研究表明,血清及滑膜中 IFN- γ 降低,有利于抑制滑膜部位的免疫反应,从而缓解 RA 的症状。IL-10 是由单核巨噬细胞和辅助性 T 细胞 2(T helper cell 2,Th2)分泌的具有抗炎作用的细胞因子,能通过抑制核因子 NF- κ B 而下调 Th1 释放 IFN- γ ,还能抑制 Th17 释放 IL-17 等促炎因子,从而控制 RA 的病情^[13]。IL-10 还能减少单核巨噬细胞的抗原提呈和炎症介质的释放。IL-37 属于白细胞介素-1(interleukin-1,IL-1)家族的抑炎因子,其在 CIA 大鼠血清中高表达,炎症反应越重,IL-37 表达越高^[14]。

3.2 塞来昔布是一种临床用来治疗 RA 的常用药物,疗效理想。本研究结果显示,与阳性对照组比较,塞来昔布组 IL-10、IL-37 水平显著升高($P < 0.05$),IL-17、IFN- γ 水平显著降低,干预后大鼠的足爪活动

功能得到改善。据《备急千金要方》记载,独活寄生汤具有祛风除湿、活血通络的作用,能够抑制毛细血管的通透性,减少组织肿胀,缓解疼痛。本研究结果显示,与正常组相比,阳性对照组 IL-17 及 IFN- γ 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),IL-10、IL-37 水平有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),进一步证实关节炎的发生与 IL-17 和 IFN- γ 异常升高密切相关,这与宋光和裘红梅^[15] 研究结果相似。与阳性对照组相比,给予独活寄生汤干预后,大鼠 IL-17 及 IFN- γ 水平明显下降,IL-10、IL-37 水平明显升高,提示独活寄生汤能通过促进 IL-10 的分泌,下调抗原提呈细胞的功能,抑制基质金属蛋白酶来减少血清中 IL-17 和 IFN- γ 的浓度,从而起到延缓 RA 的作用;另外,还能通过促进 IL-37 的分泌,抑制促炎症因子信号转导通路 STATs 的磷酸化,从而发挥抑制炎症的作用,减少关节红肿热痛,减轻疼痛^[16]。本研究结果还提示,中浓度独活寄生汤对 CIA 大鼠在血清炎症因子方面的干预效果与塞来昔布相近,具有较好的抑炎效果。

综上所述,CIA 大鼠血清中 IL-17 和 IFN- γ 浓度逐渐上升,IL-10 和 IL-37 的浓度逐渐下降。独活寄生汤能通过抑制促炎因子 IL-17、IFN- γ 释放,提升抑炎因子 IL-10、IL-37 的表达水平而抑制炎症反应,从而达到缓解 RA 病情的目的,这为研究 RA 的诊治提供了参考。

参考文献

- Gao YP, Liang J, Zhong GY, et al. Triterpenoids from *coluria longifolia*[J]. *Nat Prod Res*, 2017,31(3):294-298.
- 杨新玲,宋晓莉.独活寄生汤治疗类风湿性关节炎68例[J].*陕西中医*,2010,31(4):439-440.
- 吴广文,褚剑锋,许惠凤,等.独活寄生汤的药理作用及其在治疗骨性关节炎中的应用[J].*中医正骨*,2012,24(1):37-39.
- 王飞天,钱文年.独活寄生汤加减联合甲氨蝶呤片治疗类风湿性

- 关节炎的临床观察[J].*甘肃医药*,2017,36(10):848-850.
- 陈彩娥,崔向军,郑可,等.胶原诱导型大鼠类风湿性关节炎模型的制备[J].*泰山医学院学报*,2012,33(12):821-823.
 - 易剑峰,汤响林.芍药苷对胶原诱导型关节炎大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J].*中国药理学与毒理学杂志*,2013,27(4):668-672.
 - 马卫国,刘慧,孟凤仙,等.加味独活寄生汤对胶原诱导性关节炎大鼠关节滑膜及血清中炎症因子的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2014,20(23):197-200.
 - 杜联峰,陈昆涛,丁立珉,等.重组 hIL-10 联合 MTX 对 AA 大鼠 IL-1 β 、TNF- α 含量变化和影像学变化研究[J].*中国免疫学杂志*,2016,32(5):624-628.
 - Liu Y, Ho RC, Mak A. The role of interleukin (IL)-17 in anxiety and depression of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Int J Rheum Dis*,2012,15(2):183-187.
 - 余纳,蔡小燕,林小军,等.薏贝素对胶原诱导性关节炎大鼠 IL-6 和 IL-17A 的影响[J].*新医学*,2016,47(8):515-520.
 - 包喜文,李振英,吴霞,等.黑骨藤追风活络胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠 IL-1 β 、IFN- γ 、IL-15 的影响[J].*中国中医急症*,2018,27(2):293-295,308.
 - 曹炜,姜泉,吴振宇,等.风湿清对 II 型胶原诱发类风湿性关节炎大鼠白细胞介素 4、 γ -干扰素及趋化因子的影响[J].*中国中西医结合杂志*,2009,29(12):1114-1116.
 - 王芝琴.桂枝芍药知母汤对 CIA 大鼠外周血 TNF- α IL-17 和 IL-10 的影响[J].*浙江临床医学*,2015,17(10):1694-1696.
 - 母传贤,刘国玲.昆明山海棠对 CIA 大鼠足爪组织 MMP-13 蛋白表达及血清和足爪组织中 IL-12、IL-23 和 IL-37 水平的影响[J].*中国病理生理杂志*,2015,31(11):2090-2095.
 - 宋光,裘红梅.胶原性关节炎大鼠血清中 TNF- α 、IL-17 及 IL-10 水平分析[J].*大连医科大学学报*,2012,34(5):492-494.
 - 安香珍,杨红霞,邢燕军,等.五联疗法对类风湿关节炎患者血清 IL-37、IFN- γ 、CD-62p、CD-41 水平的影响[J].*现代中西医结合杂志*,2016,25(28):3095-3097.

[收稿日期 2019-10-18][本文编辑 余军 吕文娟]

本文引用格式

袁玉影,李浩,张正午,等.独活寄生汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清中炎症因子的影响[J].*中国临床新医学*,2020,13(8):786-789.