

二氢青蒿素对大鼠牛Ⅱ型胶原蛋白诱导关节炎模型作用的初步研究

王岩艳[#], 刘怡欣, 谢其冰, 刘 钢[△]

四川大学华西医院 风湿免疫科 (成都 610041)

【摘要】 目的 建立牛Ⅱ型胶原蛋白(BCⅡ)诱导的大鼠关节炎(collagen Ⅱ-induced arthritis, CIA)动物模型, 研究二氢青蒿素对大鼠关节炎的影响。**方法** 选用雄性 Wistar 大鼠, 在模型组($n=19$)大鼠尾根及脊背部皮内注射用弗氏完全佐剂乳化的 BCⅡ 0.3 mg, 第 15 d 以同样的剂量在同样的部位加强免疫 1 次; 正常对照组($n=5$)以生理盐水按同样的方法和剂量注射。第 52 d, 将模型组分为单纯模型组(模型空白组, $n=7$)、二氢青蒿素组[二氢青蒿素 1.5 mL/(kg·d), 1 mL 含 20 mg 二氢青蒿素, 灌胃; $n=12$]。治疗 28 d 后观察大鼠的关节炎表现。**结果** 模型组大鼠关节肿胀明显, 而正常对照组关节无炎性红肿。二氢青蒿素组: 关节肿胀减轻, 组织病理检查见只有少量炎性细胞浸润, 少量纤维结缔组织和毛细血管增生, 关节腔较干净, 没有明显的骨质破坏。治疗 28 d 后, 模型空白组关节炎指数较治疗前和正常对照组增加($P<0.05$); 二氢青蒿素组与治疗前比较差异无统计学意义($P>0.05$), 仍高于正常对照组($P<0.05$)。治疗 28 d 后, 模型空白组病理分级高于正常对照组($P<0.05$), 二氢青蒿素组低于模型空白组($P<0.05$)。**结论** 初步实验表明二氢青蒿素有减轻Ⅱ型胶原诱导的大鼠关节炎病变作用。

【关键词】 胶原性关节炎 Ⅱ型胶原 类风湿关节炎 二氢青蒿素

Effects of Dihydroartemisinin on Collagen Ⅱ-induced Arthritis in Rats Model WANG Yan-yan, LIU Yi-xin, XIE Qi-bing, LIU Gang[△]. *Rheumatologic Department, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

[△] Corresponding author, E-mail: neoliugang@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of dihydroartemisinin on collagen-induced arthritis (CIA) in rats model. **Methods** CIA was induced in Male Wistar rats by intradermal injection of emulsion of 0.3 mg type Ⅱ collagen in Freund's complete adjuvant (CⅡ/FA) at the base of the tail and repeated one times after 15 days. The normal control rats received the injection of the same volume of saline 52 days later, the CIA rats were divided into dihydroartemisinin treated group, saline treated group, in which the rats were subjected to the treatment of dihydroartemisinin 30 mg/(kg·d) or the same volume of saline for 28 days, then the effects of the treatments on arthritis were evaluated. **Results** Compared with the normal rats, the joints of non-treated CIA rats were obviously swollen. After the treatment of dihydroartemisinin, the joints of CIA rats appeared less inflammation cell erosion, less proliferation of fibrous connective tissue and blood capillary, more clear, articular cavity and no bone erosion. **Conclusion** This preliminary study indicated dihydroartemisinin may have the effects to relieve CIA in rats.

【Key words】 Collagen-induced arthritis Type Ⅱ collagen Rheumatoid arthritis Dihydroartemisinin

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是最常见的致残性自身免疫性疾病之一, 世界人群 RA 的患病率达 1%, 病变呈慢性、异质性, 病程持续反复发作。本病主要累及外周小关节, 病变关节滑膜组织持续性增生、炎性细胞浸润, 引起关节软骨和骨的破坏, 导致关节畸形, 引起功能障碍^[1, 2]。

RA 的动物模型为研究 RA 的病因、发病机制和治疗方法提供了有力的工具。Ⅱ型胶原性关节炎与免疫反应密切相关, 早在 1977 年 Trentham 等^[3]就检测到患者的血清及关节滑液中存在Ⅱ型胶原抗体, 并用牛Ⅱ型胶原成功诱导大鼠关节炎模型。研究表明, 青蒿素类衍生物在多种疾病动物模型上具有抗炎和免疫抑制活性的作用, 对各类红斑狼疮以

及过敏性接触性皮炎有一定的疗效。为了研究和获得免疫抑制活性更高的化合物, 一系列经过结构改造后合成的新型青蒿素类化合物相继被报道。但到目前为止, 有关青蒿素类衍生物免疫抑制活性的作用机制尚不完全清楚^[4]。

二氢青蒿素是青蒿素类衍生物中的一种。本实验通过给易感的 Wistar 大鼠皮内注射用弗氏完全佐剂乳化的牛Ⅱ型胶原, 诱导关节炎模型, 随后用二氢青蒿素对关节炎模型进行干预, 观察有无治疗效果, 以期对 RA 提供新的治疗措施。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要制剂

雄性 Wistar 大鼠, 体质量 170~189 g, 8 周龄, 24 只[来源于四川大学实验动物中心, 实验动物生

[#] 现在青岛市妇女儿童医疗保健中心

[△] 通讯作者, E-mail: neoliugang@163.com

产许可证:SCXK(川) 2009-09;实验动物使用许可证:SYXK(川) 2009-45]。一级饲养环境,普通饲料喂养,自由取食,饮水(自来水)。

牛 II 型胶原(collagen from bovine nasal septum, c7806, 5 mg, Sigma 公司);弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, F-5881, 10 mL, Sigma 公司);二氢青蒿素(四川省寄生虫研究所门诊部治疗用药)。

1.2 实验方法

1.2.1 关节炎模型的建立 在无菌条件下,以 0.1 mol/L 醋酸充分溶解牛 II 型胶原(BC II),配制浓度为 2 mg/mL,与等体积的弗氏完全佐剂充分混匀乳化(即每 1 mL 含 1 mg BC II)。免疫方法参考文献^[5]并略加修改:于模型组大鼠尾根部分 3~5 点行皮内注射免疫(0.3 mL/只),首次免疫 14 d 后(即第 15 d)以上述方法和剂量加强免疫;正常对照组以生理盐水按同样的方法和剂量注射。

1.2.2 实验分组与处理 将 24 只大鼠分为 2 组,正常对照组 5 只,模型组 19 只。首次免疫后第 52 d 按照关节炎指数将模型组分为模型空白组(7 只)、二氢青蒿素组(12 只)。按其分组分别进行如下药物干预:正常对照组和模型空白组大鼠均以生理盐水 1.5 mL/(kg·d)灌胃;而二氢青蒿素组以 1.5 mL/(kg·d)(即每 1 mL 含 20 mg 二氢青蒿素)灌胃。

1.2.3 标本的采集 首次免疫后第 52 d 开始给药治疗,治疗 28 d 后(即首次免疫后第 80 d)取材。大鼠以 3%戊巴比妥 1.33 mL/kg 腹腔麻醉,沿后肢正中纵行切开皮肤直至暴露出膝关节,可见膝关节囊和髌骨,从膝关节囊上缘上 1 cm 处剪断下肢,分离剥除肌肉,迅速放入约为 20 倍标本体积的 10%中性福尔马林固定,按照大鼠标号标记固定瓶,左、右肢体分开固定。

1.2.4 脱钙 固定好的膝关节用约 20 倍标本体积的 10%依地酸钠(EDTA)液浸泡,1~2 d 更换液体 1 次,时间 2 周。脱钙完全标准:大头针能刺入标本上下缘骨密质,感觉松软无阻力。

1.2.5 观察指标

1.2.5.1 关节的 X 线摄影检查 在药物干预前将正常大鼠及模型组大鼠后肢关节在口腔科专用的小型 X 线摄像机上进行放射学检查。

1.2.5.2 关节炎指数评分^[6] 在药物干预前和干预后(即处死大鼠前)分别对大鼠的关节炎观察评分,评定依据关节红肿程度和范围以及关节肿大变形情况。关节炎病变程度通常采用关节评分法:0

分,没有关节受累;1 分,一个关节或一个关节区受累(出现关节红肿);2 分,两个关节或两个关节区受累;3 分,两个以上关节区受累;4 分,整个肢体受累。4 个肢体评分相加得到每只大鼠在 0~16 范围的关节炎总分。不同的关节分区为趾骨关节、跗骨间关节、踝关节。

1.2.5.3 关节炎的病理判断^[7,8] 关节经过固定脱钙,石蜡包埋,切片后行 HE 染色,显微镜下关节病理按照 Masakazu 分级法分为 5 级:0 级,无关节炎;I 级,纤维素渗出为主伴滑膜内皮细胞层次增多及少量小圆细胞浸润;II 级,滑膜上皮增生,肉芽形成,成纤维细胞和毛细血管增生明显;III 级,肉芽组织增生明显,破坏关节软骨和骨组织;IV 级,关节软骨和骨被严重破坏或由纤维结缔组织替代,伴随关节腔的狭窄,纤维关节强直。

1.3 统计学方法

采用 *t* 检验和秩和检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况观察

模型组大鼠体质量增加、毛发光泽较正常对照组差,模型组初次注射 BC II 后第 3~5 d 注射部位针眼处出现小溃疡,第 7~10 d 可自愈。随着模型的发展,初次免疫后第 20 d 左右小关节开始出现轻度肿胀伴红肿,第 25 d 部分大鼠关节炎明显且不能负重,50 d 左右关节炎达到高峰,部分关节呈急性炎症表现,表面皮肤充血粉红发亮,活动受限。关节炎呈对称性,以后肢更明显。二氢青蒿素干预后,大鼠关节炎有不同程度减轻;而模型空白组无改善。

2.2 后肢关节 X 线变化

正常对照组大鼠软组织无肿胀阴影,踝关节、足跖趾关节及趾间关节间隙清晰可见,骨质边缘清晰(图 1A)。模型组大鼠见软组织肿胀影,踝关节呈膨胀性破坏,足跖趾关节及趾间小关节间隙变窄模糊不清,骨质破坏边缘不清(图 1B)。

2.3 关节炎指数评分

正常对照组前后肢关节无红肿,指/趾细长,掌背/足背肌腱清晰可见;药物干预前模型组前后肢外露部分的关节包括指/趾间关节、掌指/跖趾关节、腕关节、踝关节明显红肿增粗,可见梭型肿胀,前掌及足背增厚,活动受限。药物干预后,二氢青蒿素组大鼠关节炎有不同程度的减轻;而模型空白组无改善。3 组大鼠药物干预前后的关节炎指数评分见表 1。模型空白组大鼠关节炎指数评分随时间延长而增加

($P<0.05$);而二氢青蒿素组治疗后关节炎指数评分较治疗前虽有所增加,但差异无统计学意义。

图 1 大鼠后肢 X 线检查

Fig 1 X ray examinations of hind limbs

A: Normal control group; B: Non-treated CIA group

2.4 组织病理检查

正常对照组大鼠关节前滑膜细胞仅有 1~2 层,无增生,滑膜下未见炎性细胞浸润,无血管增生,关

表 1 药物干预前后各组大鼠关节炎指数变化($\bar{x}\pm s$)
Table 1 The arthritis score change in the three groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Before treatment	After treatment
Normal control	5	1.30±0.60	1.40±0.90
Non-treated CIA	7	6.60±0.89 *	9.70±1.16 *·△
Dihydroartemisinin treated CIA	12	7.18±3.56 *	9.00±1.87 *

CIA: Collagen-induced arthritis. * $P<0.05$, vs. normal control group; △ $P<0.05$, vs. before treatment

节软骨表面光滑,关节软骨及软骨下骨质无破坏,关节间隙正常。与正常对照组相比,模型空白组膝关节滑膜上皮细胞水肿,明显增生有 3~7 层,并且形成许多小绒毛状突起伸向关节腔。滑膜下组织见大量炎性细胞(淋巴细胞)浸润,纤维结缔组织和血管增生,取代正常的滑膜下脂肪组织,毛细血管增生形成的血管翳破坏关节软骨及软骨下骨质,关节腔变窄,关节结构被破坏。二氢青蒿素组上述病变均不同程度减轻,主要表现在炎性细胞减少,少量纤维结缔组织和毛细血管增生,关节腔较干净,没有骨质破坏。见图 2。由表 2 可见,3 组大鼠关节炎的病理

图 2 二氢青蒿素对大鼠 CIA 的作用。HE ×100

Fig 2 Effects of dihydroartemisinin on joint pathology in rats with CIA. HE ×100

A: Normal joints, it shows no evidence of arthritis in normal control rats; B,C: Arthritic joints of non-treated CIA rats, histologic sections show marked synovial hyperplasia, inflammatory cell infiltration, pannus invasion, and bone and cartilage destruction; D: Joints of dihydroartemisinin-treated CIA rats show nearly normal joint surfaces, and bone and cartilage structure, and there is a few sign of synovial inflammation

表 2 正常对照组、模型空白组、二氢青蒿素组大鼠后肢膝关节病理分级〔例数(%)〕

Table 2 Histologic score findings in the hind knee of normal control, CIA non-trated and dihydroartemisinin-treated rats with CIA [case (%)]

Group	n *	Histologic score					
		0	I	II	III	IV	
Normal control	10	4 (40)	3 (30)	2 (20)	1 (10)	0 (0)	
Non-treated CIA #	14	1 (7.1)	3 (21.4)	1 (7.1)	5 (35.5)	4 (28.4)	
Dihydroartemisinin-treated CIA #·△	24	1 (4.2)	9 (37.5)	10 (42.0)	2 (8.4)	2 (8.4)	

CIA: Collagen-induced arthritis. * Values are the hind knee number (one rat has two) and the samples was taken at the 80 days. # $P<0.05$, vs. normal control group; △ $P<0.05$, vs. non-treated CIA group

分级差异有统计学意义($P<0.05$),其中模型空白组、二氢青蒿素组与正常对照组比较,关节炎病理分级更高($P<0.05$),二氢青蒿素组与模型空白组比较,病理分级则有所下降($P<0.05$)。

3 讨论

RA 是一种慢性致残性疾病,主要通过滑膜组织的过度异常增殖、大量炎性细胞的浸润、血管翳生成,对软骨、骨和韧带等关节结构进行性破坏,病变还可以引发关节外脏器病变。在整个病程中出现滑

膜组织增生、炎症、自身免疫等病理生理过程,且它们之间相互作用、相互关联,贯穿于 RA 的发病机制之中,形成了一个错综复杂的网络。胶原蛋白诱导的关节炎(CIA)模型的建立为深入认识 RA 的发病机制提供了重要的手段,也为新的治疗药物的研究开发提供了载体。

本实验通过弗氏完全佐剂乳化的牛Ⅱ型胶原免疫接种易感的 Wistar 雄性大鼠,诱导关节炎模型成功。从大鼠的关节红肿及变形现象以及其后的关节 X 片、组织病理切片可以看到,大鼠关节炎症明显,关节滑膜增生,滑膜细胞由正常的 1 层增加到 3~7 层,同时有较多单个核细胞浸润,并且出现关节软骨及软骨下骨的侵蚀破坏。大鼠的关节表现与人类的 RA 非常相似,符合科学研究的疾病模型要求。

青蒿素是我国科研工作者在 1971 年从菊科植物黄花蒿叶中提取分离到的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物。二氢青蒿素是在青蒿素基础上又开发的衍生物,由于其毒副作用小,已经广泛应用于疟疾的治疗;并且它们还具有抗孕、抗纤维化、抗血吸虫、抗弓形虫、抗心律失常和肿瘤细胞毒性等作用^[9]。李茵等^[10]还发现二氢青蒿素可以显著下调 K562 细胞的血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达,并能抑制其诱导的血管新生,从而有抗血管生成的作用。

有研究者报道青蒿素和它的衍生物有强力的免疫抑制活性。通过对一个新的水溶性青蒿素衍生物的体内与体外实验,发现它对 T 淋巴细胞有抑制作用,强力抑制对伴刀豆球蛋白 A 引起的脾淋巴细胞增殖和混合淋巴细胞反应,体外实验中细胞毒性低。在卵蛋白免疫小鼠中,口服青蒿素衍生物显示剂量依赖性的针对卵蛋白的 T 细胞增殖反应,通过 T 细胞抑制抗卵蛋白抗体导致的白介素 2 与干扰素 γ 的产生。研究显示青蒿素衍生物抑制 CD3⁺ 细胞 T 细胞受体与 CD28 分子介导的幼稚 T 细胞增殖与白介素 2 和干扰素 γ 的产生;对有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)磷酸化有突出的抑制作用,达到对 Ras 系统活化的抑制。研究结果显示青蒿素衍生物具有成为治疗 T 细胞介导的免疫性疾病的药物的潜力^[11]。本研究采用二氢青蒿素对 CIA 模型进行干预治疗。研究中观察到二氢青蒿素可抑制关节炎的炎性反应、减轻关节炎的骨质破坏,与未予治疗的模型空白组相比,二氢青蒿素组关节炎病变好转,关节

炎病理分级评分下降($P<0.05$)。

本研究首次报道了二氢青蒿素对牛Ⅱ型胶原蛋白诱导的大鼠关节炎有一定的治疗作用,但该实验仅为一个初步结果。今后还需要加大实验规模,增加不同治疗药物剂量的分组,增加关节病理的免疫组化检查,以便证实二氢青蒿素对 CIA 的确切治疗作用及其治疗关节炎的作用机制。

参 考 文 献

- 1 Bansback NJ, Regier DA, Ara R, *et al.* An overview of economic evaluations for drugs used in rheumatoid arthritis: focus on tumour necrosis factor-alpha antagonists. *Drugs*, 2005;65(4):473-496.
- 2 Haringman JJ, Ludikhuijsen J, Tak PP. Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Ann Rheum Dis*, 2004; 63(10):1186-1194.
- 3 Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 1977;146(3):857-868.
- 4 Wang JX, Tang W, Shi LP, *et al.* Investigation of the immunosuppressive activity of artemether on T-cell activation and proliferation. *Br J Pharmacol*, 2007;150(5):652-661.
- 5 Sims NA, Green JR, Glatt M, *et al.* Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2004;50(7):2338-2346.
- 6 Cuzzocrea S, McDonald MC, Mota-Filipe H, *et al.* Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2000;43(2):320-328.
- 7 Wang CR, Chen SY, Wu CL, *et al.* Prophylactic adenovirus-mediated human kallistatin gene therapy suppresses rat arthritis by inhibiting angiogenesis and inflammation. *Arthritis Rheum*, 2005;52(4):1319-1324.
- 8 Takeshita M, Sugita T, Takata I. Pathological evaluation of effect of anti-rheumatic drugs on type II collagen-induced arthritis in Lewis rats. *Exp Anim*, 1997;46(2):165-169.
- 9 徐振海. 青蒿素药物作用研究简介. *安徽预防医学杂志*, 2004; 10(3):181-183.
- 10 李茵, 周慧君. 二氢青蒿素抑制 K562 细胞血管内皮生长因子的表达. *药学报*, 2005;40(11):1041-1045.
- 11 Wang JX, Tang W, Yang ZS, *et al.* Suppressive effect of a novel water-soluble artemisinin derivative SM905 on T cell activation and proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Pharmacol*, 2007;564(1-3):211-218.

(2012-04-16 收稿, 2012-08-30 修回)

编辑 余琳