

## 奇士乐对佐剂性关节炎大鼠的免疫调节作用

姜 辉<sup>1</sup>, 李 俊<sup>1</sup>, 胡成穆<sup>1</sup>, 陈纪军<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究中药复方奇士乐对佐剂性关节炎(AA)大鼠的免疫调节作用。方法 以弗氏完全佐剂(FCA)制备AA大鼠模型,奇士乐灌胃(ig)给药治疗AA大鼠,以雷公藤多苷片ig给药作阳性对照。四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)检测刀豆蛋白A(ConA)、脂多糖(LPS)诱导的AA大鼠脾淋巴细胞增殖反应;放免法测定白细胞介素(IL)-1、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)的含量。结果 奇士乐能明显抑制AA大鼠继发性足肿胀;上调ConA、

LPS诱导的AA大鼠脾淋巴细胞增殖反应,促进IL-2分泌水平;同时奇士乐还可抑制AA大鼠腹腔巨噬细胞过高的IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6和PGE<sub>2</sub>的分泌。结论 奇士乐对AA大鼠紊乱的免疫功能具有调节作用,其机制可能与调节细胞因子水平有关。

**主题词** 关节炎,实验性/中药疗法;关节炎,实验性/免疫学;细胞因子类;人参/治疗应用;黄芪/治疗应用

**自由词** 佐剂性关节炎;奇士乐

**中图分类号** R 967; R-332; R 457.2; R 684.3; R 282.71; R 392.12

**文献标识码** A **文章编号** 1000-1492(2007)03-0295-04

奇士乐为中药复方制剂,呈淡黄色粉末状,主要含有人参、黄芪等六味药物,其有效成分可通过抑制人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、促进T淋巴细胞转化、增加特异性细胞免疫

2007-03-26 接收

基金项目:国家科技部十五重大科技专项(863)资助项目(编号:2004AA2Z3322)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学药学院,合肥 230032

<sup>2</sup>中国科学院昆明植物研究所,昆明 650204

作者简介:姜 辉,男,26岁,硕士研究生;

李 俊,男,47岁,教授,博士,博士生导师,责任作者, E-mail:lijun@ahmu.edu.cn

理学报,2002,23(8):752-6.

[7] Levick J R, McDonald J N. Ultrastructure of transport pathways in stressed synovium of the knee in anaesthetized rabbits[J]. J Physiol, 1989, 419(2):493-508.

[8] Catterall J B, Cawston T E. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors[J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(1):12-24.

## Study on anti-inflammatory immunological activity effects of total flavonoids of litsea coreana Leve. Var

Zhou Lihua<sup>1,2</sup>, Li Jun<sup>1</sup>, Chen Xiaoyu<sup>1,3</sup>, et al

(<sup>1</sup>School of Pharmacy, <sup>2</sup>School of Nurse, <sup>3</sup>Dept of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To study the anti-inflammatory effect and possible mechanism of total flavonoids of litsea coreana Leve Var. (LCTF) on adjuvant arthritis(AA). **Methods** 0.1 ml of the complete Freund's adjuvant was subcutaneously injected into the the left hind feet pads of the SD rats. 12 days after immunization, total flavonoids extracted from litsea coreana Leve. At the dosage of 66.5、133、266 mg/kg and control drug Tripterygium glycosides 30 mg/kg continuous intragastric injected administration for 12 days. Synoviocytes were derived from explant culture of tissue fragment, transmission electron microscope was used to analyze the morphological alteration of secretory function organell. Radioimmunoassay was used to detect level of IL-1 $\beta$ in secretory peritoneal macrophages and synoviocytes. **Results** LCTF(133、266)mg/kg could recovery secretory function of A, B type synoviocytes. LCTF corrected the high level of IL-1 $\beta$ in secretory peritoneal macrophages and synoviocytes. LCTF has preventive and therapeutic effects on AA rats and could significantly suppress activity of IL-1 $\beta$ . **Conclusion** LCTF has effects of anti-inflammatory in AA rats. The anti-inflammatory mechanism of LCTF in AA rats might be related to inhibitory level of IL-1 $\beta$  from peritoneal macrophages and synoviocytes *in vivo*.

**MeSH** Lauraceae; flavones/pharmacology; arthritis, experimental/drug therapy

功能等多种环节、多条途径对艾滋病患者发挥作用<sup>[1]</sup>,在前期研究的基础上,将奇士乐作为治疗艾滋病的药物进行开发。为了进一步研究奇士乐对机体免疫功能的影响,本实验采用弗氏完全佐剂(freund's complete adjuvant, FCA)制备佐剂性关节炎(adjvant arthritis, AA)大鼠模型,观察奇士乐对其免疫调节作用,并对其机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** Sprague-Dawley (SD) 大鼠, ♂, 体重(180 ± 20)g, 普通级, 安徽医科大学实验动物中心提供。

**1.2 药品与试剂** 奇士乐, 中国科学院昆明植物研究所提供, 呈淡黄色粉末状; 医用卡介苗(BCG), 卫生部上海生物制品研究所产品, 批号: 041012; RP-MI-1640 培养粉, 美国 Sigma 公司产品; 小牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司产品, 批号: 041020; 刀豆蛋白 A (ConA)、脂多糖(LPS), 美国 Sigma 公司产品; 雷公藤多苷片(TPT), 上海复旦复华药业有限公司产品, 批号: 040402; 噻唑蓝粉, 美国 Sigma 公司产品; 白细胞介素(IL)-1 试剂盒、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)试剂盒, 解放军总医院科技开发中心放免所产品, 批号: 050826; 前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)试剂盒, 江苏大学血液研究所产品, 批号: 050612; IL-2 试剂盒、IL-6 试剂盒, 北京北方生物技术研究所产品, 批号: 050921。

**1.3 仪器** 电子天平 BP211D, 德国 Sartorius 公司产品; MK-500 型 Volume meter, 山东医学科学院设备站产品; SW-CJ-IF 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司产品; Napco-6100 型细胞培养箱, 美国杜邦公司产品; 多功能显微镜 Olympus 公司产品; 酶标仪 MK3, 荷兰雷勃公司产品。

**1.4 方法** SD 大鼠随机分为正常组、模型组、奇士乐(350、700、1 400 mg/kg)组及阳性药 TPT(40 mg/

kg)组, 每组 10 只。致炎前第 3 天灌胃(intragastrice, ig)给药。将同一批号的 BCG 80℃水浴灭活 1 h, 用灭菌液体石蜡配成 10 g/L 的乳剂, 充分研磨混匀即成 FCA, 使用前摇匀。致炎前用足爪仪测定大鼠右后踝关节以下容积(ml), 然后除正常组外各鼠左后足趾皮内注射 0.1 ml FCA 致炎。致炎后第 12 天开始灌胃给药, 连续 12 d, 并检测非致炎侧(右侧)足肿胀, 每 4 d 1 次, 以致炎前后足容积差为肿胀度<sup>[2]</sup>。于造模后第 28 天股动脉放血处死大鼠, 用 MTT 法检测 ConA、LPS 诱导的 AA 大鼠脾淋巴细胞增殖反应<sup>[3-4]</sup>。脾淋巴细胞检测 IL-2<sup>[5]</sup>, 腹腔巨噬细胞检测 IL-1、IL-6、TNF-α、PGE<sub>2</sub><sup>[6]</sup>, 采用放免法测定, 按试剂盒说明书操作。

**1.5 统计学处理** 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用方差分析。

## 2 结果

**2.1 奇士乐对 AA 大鼠继发性炎症的影响** 结果见表 1, 奇士乐(350、700、1 400 mg/kg) ig 给药对 AA 大鼠继发性炎症有明显的抑制作用。

**2.2 奇士乐对 ConA、LPS 诱导 AA 大鼠脾淋巴细胞增殖反应及 IL-2 生成的影响** 结果见表 2, ConA、LPS 诱导的模型组 AA 大鼠脾淋巴细胞增殖反应低下, 而奇士乐(350、700、1 400 mg/kg) ig 给药对 ConA、LPS 诱导 AA 大鼠脾淋巴细胞增殖反应均有增强作用, 同时奇士乐(700、1 400 mg/kg) ig 给药还能够升高 AA 大鼠低下的 IL-2 水平。

**2.3 奇士乐对 AA 大鼠腹腔巨噬细胞生成 IL-1、IL-6、TNF-α、PGE<sub>2</sub> 的影响** 结果见表 3, 奇士乐(1 400 mg/kg) ig 给药对 AA 大鼠腹腔巨噬细胞产生过高的 IL-1 有明显抑制作用; 奇士乐(350、700、1 400 mg/kg) ig 给药能明显抑制腹腔巨噬细胞过高的 IL-6、TNF-α 生成; 奇士乐(700、1 400 mg/kg) ig 给药对腹腔巨噬细胞 PGE<sub>2</sub> 的生成有抑制作用。

表 1 奇士乐对 AA 大鼠继发性炎症的影响(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(mg/kg)	不同时间的继发性足肿胀(Δml)			
		16 d	20 d	24 d	28 d
正常		0.359 ± 0.058	0.365 ± 0.063	0.377 ± 0.069	0.389 ± 0.061
模型	-	0.513 ± 0.081 <sup>△△</sup>	0.536 ± 0.075 <sup>△△</sup>	0.531 ± 0.081 <sup>△△</sup>	0.492 ± 0.100 <sup>△</sup>
奇士乐	350	0.473 ± 0.052 <sup>*</sup>	0.500 ± 0.039	0.484 ± 0.047	0.465 ± 0.09
	700	0.437 ± 0.065 <sup>**</sup>	0.468 ± 0.065 <sup>*</sup>	0.444 ± 0.077	0.406 ± 0.074 <sup>*</sup>
	1400	0.420 ± 0.067 <sup>**</sup>	0.450 ± 0.050 <sup>**</sup>	0.431 ± 0.092 <sup>*</sup>	0.400 ± 0.081 <sup>*</sup>
TPT	40	0.449 ± 0.065 <sup>**</sup>	0.459 ± 0.080 <sup>*</sup>	0.433 ± 0.069 <sup>*</sup>	0.401 ± 0.055 <sup>*</sup>

与正常组比较: <sup>△△</sup>P < 0.01; 与模型组比较: <sup>\*</sup>P < 0.05, <sup>\*\*</sup>P < 0.01

表2 奇士乐对 AA 大鼠脾淋巴细胞增殖反应及 IL-2 生成的影响 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg)	ConA (OD 值)	LPS (OD 值)	IL-2 ( $\mu\text{g/L}$ )
正常	-	1.388 $\pm$ 0.342	1.337 $\pm$ 0.246	1.448 $\pm$ 0.252
模型	-	0.766 $\pm$ 0.094 $\Delta\Delta$	0.745 $\pm$ 0.199 $\Delta\Delta$	0.567 $\pm$ 0.124 $\Delta\Delta$
奇士乐	350	0.926 $\pm$ 0.143**	0.924 $\pm$ 0.116*	0.642 $\pm$ 0.113
	700	1.036 $\pm$ 0.243**	1.033 $\pm$ 0.187**	0.956 $\pm$ 0.171**
	1400	1.099 $\pm$ 0.189**	1.060 $\pm$ 0.115**	1.126 $\pm$ 0.259**
TPT	40	0.694 $\pm$ 0.151 $\Delta\Delta$	0.711 $\pm$ 0.113 $\Delta\Delta$	1.258 $\pm$ 0.136**

与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与模型组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

表3 奇士乐对 AA 大鼠腹腔巨噬细胞生成 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> 的影响 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mg/kg)	IL-1 ( $\mu\text{g/L}$ )	IL-6 ( $\mu\text{g/L}$ )	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/L}$ )	PGE <sub>2</sub> (ng/L)
正常	-	0.049 $\pm$ 0.017	0.167 $\pm$ 0.044	0.536 $\pm$ 0.202	0.215 $\pm$ 0.064
模型	-	0.094 $\pm$ 0.039 $\Delta\Delta$	0.287 $\pm$ 0.063 $\Delta\Delta$	0.851 $\pm$ 0.169 $\Delta\Delta$	0.386 $\pm$ 0.136 $\Delta\Delta$
奇士乐	350	0.079 $\pm$ 0.035	0.219 $\pm$ 0.069*	0.739 $\pm$ 0.115	0.322 $\pm$ 0.102
	700	0.069 $\pm$ 0.034	0.200 $\pm$ 0.042**	0.681 $\pm$ 0.034*	0.263 $\pm$ 0.068*
	1400	0.059 $\pm$ 0.026*	0.199 $\pm$ 0.053**	0.649 $\pm$ 0.131*	0.238 $\pm$ 0.115*
TPT	40	0.047 $\pm$ 0.015**	0.194 $\pm$ 0.051**	0.638 $\pm$ 0.108**	0.263 $\pm$ 0.096*

与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与模型组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

AA 是筛选抗炎免疫药物的常用模型,其组织病理学改变和发病机制与人类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 类似,按其病程分为原发性反应期和继发性反应期。在继发性反应中主要是免疫功能紊乱造成的免疫性炎症的表现<sup>[7]</sup>,以继发性足肿胀和多发性关节炎为主要指标。本实验研究表明奇士乐各剂量组 ig 给药对 AA 大鼠继发性足肿胀有明显的抑制作用。提示奇士乐对 AA 大鼠可能具有免疫调节作用。

淋巴细胞是体内的免疫活性细胞,淋巴细胞的增殖和分化是机体免疫应答过程的一个重要阶段<sup>[8]</sup>,因此,检测淋巴细胞增殖水平是细胞免疫研究的一种常用方法。本实验结果表明,ConA、LPS 诱导的 AA 模型组大鼠脾淋巴细胞增殖反应明显低于正常组,与文献报道一致<sup>[9]</sup>,而奇士乐各剂量组 ig 给药均可明显提高 AA 大鼠低下的脾淋巴细胞增殖反应,提示奇士乐对 AA 大鼠的细胞免疫功能具有调节作用,而 TPT 对 ConA、LPS 诱导 AA 大鼠脾淋巴细胞增殖反应有抑制作用,与文献报道相符<sup>[10-11]</sup>,提示奇士乐与 TPT 对 AA 模型大鼠的免疫调节机制可能不同。

IL-2 在机体的免疫应答中起着重要的作用,不仅可以促进 B 淋巴细胞的生长和分化,促进 T 细胞的杀伤作用,增强自然杀伤细胞的活性,还可以通过增加 Fas/FasL 和细胞凋亡信号传递物质 AP-1 的表

达,促进细胞凋亡,从而参与免疫耐受的发生<sup>[12]</sup>。本实验结果表明 AA 模型组大鼠脾淋巴细胞分泌的 IL-2 明显低于正常组,而奇士乐中剂量和大剂量组能够明显升高 AA 大鼠过低 IL-2 水平。

巨噬细胞分泌的细胞因子如 IL-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 等在 RA 的发病过程中也起着重要作用<sup>[13-14]</sup>,IL-1 在免疫与炎症反应中有复杂的放大效应,能活化淋巴细胞,刺激 B 细胞产生抗体增加,还能促进纤维母细胞增生,诱导 PGE<sub>2</sub> 胶原酶的产生,引起关节炎及软骨组织的破坏<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$  可协助炎性细胞迁徙,增强内皮细胞表达黏附分子,促进滑膜细胞增殖和血管翳形成,介导关节滑膜发生持久性的炎症反应,并刺激软骨吸收及骨破坏<sup>[16]</sup>。IL-1 与 TNF- $\alpha$  不仅直接介导关节损伤及全身炎症反应,还可相互诱生,启动并刺激滑膜细胞和中性粒细胞产生 PGE<sub>2</sub> 等炎性介质。PGE<sub>2</sub> 能选择性抑制抑制性 T 细胞 (Ts) 功能,导致 B 细胞功能亢进,分泌过多的抗体,引起组织器官损伤。局部高浓度的 PGE<sub>2</sub> 也可导致软骨基质崩解、软骨吸收和骨破坏<sup>[17]</sup>。同时,在炎症反应时,巨噬细胞释放的 IL-1、TNF- $\alpha$  使 IL-6 分泌增加,IL-6 不仅能促进活化的 B 细胞增殖;参与 T 淋巴细胞的分化和活化,诱导效应 T 细胞引起组织损伤,还能增强 IL-1 和 TNF- $\alpha$  的效应<sup>[18]</sup>。通过实验我们发现,模型组 AA 大鼠腹腔巨噬细胞分泌的 IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6、PGE<sub>2</sub> 的含量均明显高于正常组,奇士乐大剂量组对 AA 大鼠腹腔巨噬细胞产生过高的 IL-1 有明显抑制作用;奇士乐各

剂量组均能明显抑制腹腔巨噬细胞过高的 IL-6、TNF- $\alpha$  生成;而奇士乐中剂量和大剂量 ig 给药对腹腔巨噬细胞 PGE<sub>2</sub> 的生成有抑制作用,提示奇士乐可通过抑制巨噬细胞分泌促炎性细胞因子,抑制细胞因子的促炎效应,从而对 AA 发挥治疗作用。

综上所述,通过制备 AA 大鼠模型,我们发现奇士乐对继发性足肿胀具有治疗作用,其机制可能与促进淋巴细胞增殖反应和调节细胞因子生成水平有关,提示奇士乐具有免疫调节作用。

### 参考文献

- [1] 田春洪,张震. 治疗 HIV/AIDS 中药的用药规律探讨[J]. 云南中医中药杂志,2005,26(6):13-4.
- [2] Mitchell D, Tynl K. Nitric oxide release in rat skeletal muscle capillary[J]. *Am J Physiol*,1996,270(5):1696-703.
- [3] 梁君山,陈敏珠,徐叔云. 白芍总甙对大鼠佐剂性关节炎及其免疫功能的影响[J]. 中国药理与毒理杂志,1990,4(4):258.
- [4] 金涌,李俊,樊美珍,等. 虫草多糖体外对佐剂性关节炎大鼠免疫功能的影响[J]. 安徽医科大学学报,2000,35(1):20-1.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:1421-38.
- [6] 金涌,李俊,丁长海,等. 来氟米特对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用及部分机制研究[J]. 中国药理学通报,2000,17(1):62-5.
- [7] 汤文璐,李俊,徐叔云. 丹皮总甙的抗炎免疫作用及部分机制研究[J]. 中国药理学通报,2002,18(6):656-60.
- [8] 朱新华,梁先念,蒋永革,等. 四逆汤免疫调节活性的实验研究[J]. 中国实验临床免疫学杂志,1996,8(2):44-7.
- [9] 方鉴,张永祥,茹祥斌,等. 佐剂性关节炎大鼠免疫功能的实验研究[J]. 中国免疫学杂志,2000,10(16):9-12.
- [10] 力弘,贾永锋,李端. 雷公藤多甙的抗炎和免疫抑制作用[J]. 上海医科大学学报,2000,27(6):502-5.
- [11] 刘必全,胡勇,张建华,等. 黄蜀葵花总黄酮对大鼠佐剂性关节炎的防治作用[J]. 中国临床康复,2006,35(10):35-7.
- [12] 邓友平,冯璞. Fas 和 Fas L 在细胞凋亡中的作用[J]. 国外医学·免疫学分册,1997,20(4):213-8.
- [13] Smith M D, Slavotinek J, Au V, et al. Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression[J]. *Rheumatology*, 2001,40(9):965-77.
- [14] 陈琳,程文明,胡成穆,等. 豹皮樟总黄酮抗炎作用及部分机制研究[J]. 安徽医科大学学报,2004,39(6):439-42.
- [15] 骆云鹏. 细胞因子在类风湿关节炎发病机理中的作用[J]. 重庆医药,1992,21(3):73-4.
- [16] Camussi G, Lapia E. The future role of anti-tumor necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Drugs*,1998,55(5):613-20.
- [17] 路秀英. 免疫细胞、细胞因子及其抑制物在类风湿性关节炎发生发展中的作用[J]. 国外医学·免疫学分册,1993,16(4):183.
- [18] Field M. Interleukin-6 in the synovial membrane in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatol Int*,1991,11(2):45-7.

## Immunomodulatory effects of Qishile on adjuvant arthritis rats

Jiang Hui, Li Jun, Hu Chengmu, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To observe the immunomodulatory effects of traditional Chinese medicine prescription Qishile on adjuvant arthritis (AA) rats. **Methods** AA model was induced by injection of Freund's complete adjuvant. Qishile was given intragastrically (ig), triperygium glycosides was used as the positive control. Splenic lymphocyte proliferation induced by ConA or LPS was assessed with MTT method and IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> contents were assayed with radio-immunity method. **Results** Qishile had significant inhibitory effect on secondary hindpaw swelling of AA rats. Moreover it increased splenic lymphocyte proliferation induced by ConA or LPS and IL-2 production of splenic lymphocyte. Meanwhile it reduced IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> contents in peritoneal macrophage of AA rats. **Conclusion** Qishile has an immunomodulatory effect on AA rats, which may be related to adjusting the production of cytokine.

**MeSH** arthritis, experimental/drug therapy; arthritis, experimental/immunology; cytokines GINSENG/therapeutic use; astragalus membranaceus//therapeutic use

**Free words** adjuvant arthritis; qishile