

白芍总苷对胶原性关节炎大鼠滑膜细胞的作用及机制

朱 蕾, 魏 伟*, 郑咏秋

(安徽医科大学 临床药理研究所, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 研究白芍总苷 (TGP)对胶原性关节炎 (CIA)大鼠滑膜细胞的作用及机制。方法 采用鸡 II型胶原诱导大鼠 CIA模型,胶原酶和胰蛋白酶消化法分离培养大鼠滑膜细胞,透射电镜观察滑膜细胞超微结构的变化,MTT法检测滑膜细胞的增殖能力,滑膜细胞培养上清液中 IL-1 活性的测定采用小鼠胸腺细胞增殖法, TNF α 和 PGE $_2$ 含量的测定采用放射免疫测定法。结果 TGP能有效改善 CIA大鼠滑膜细胞超微结构的变化,抑制其过度的增殖反应和产生 IL-1, TNF α 和 PGE $_2$ 的水平。结论 TGP对 CIA大鼠功能亢进的滑膜细胞具有明显的抑制作用,其作用机制可能与其抑制滑膜细胞的过度增殖和分泌能力有关。

关键词: 白芍总苷; 胶原性关节炎; 滑膜细胞; 超微结构

中图分类号: R282.71; R684.3 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)02 - 0166 - 05

Effect and mechanism of action of total glucosides of paeony on synoviocytes from rats with collagen-induced arthritis

ZHU Lei, WEI Wei*, ZHENG Yong-qiu

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, He fei 230032, China)

Abstract: Aim To study the effect and mechanism of action of total glucosides of paeony (TGP) on synoviocytes from rats with collagen-induced arthritis (CIA). **Methods** Chicken type II collagen was used to induce CIA in rats. Synoviocytes were separated by incubation with collagenase and trypsin, and its ultrastructural changes were observed under transmission electron microscope. Synoviocyte proliferation was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, and IL-1 activity in synoviocytes supernatant was measured by thymocyte proliferation assay. TNF α and PGE $_2$ produced by synoviocytes were determined by radioimmunoassay. **Results** TGP was shown to protect CIA rats against the ultrastructural damages of synoviocytes. Meanwhile, TGP also suppressed the excessive synoviocyte proliferation and over-production of IL-1, TNF α and PGE $_2$. **Conclusion** TGP has inhibitory effect on hyperfunctional synoviocytes of CIA rats and its mechanism of action may be related with the inhibition of abnormal proliferation and secretion of synoviocytes.

Key words: total glucosides of paeony; collagen-induced arthritis; synoviocyte; ultrastructure

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为主要特征的自身免疫性疾病,其关节滑膜细胞功能的改变直接影响 RA病理进程。表现为在多种炎性因子的刺激下,关节滑膜类细胞肿瘤样无限增生,对关节软骨、骨造成进行性破坏,最

终导致关节畸形和功能障碍^[1]。因此对关节滑膜细胞的保护在 RA治疗中具有重要意义。

白芍总苷 (total glucosides of paeony, TGP)是从中药白芍 (*Paeonia lactiflora* Pall)中提取的有效部位,其成分包括芍药苷、羟基芍药苷、芍药花苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷等,其中芍药苷是 TGP的主要活性成分。研究表明 TGP具有抗炎、镇痛和免疫调节等作用,能有效改善 RA患者的临床症状和体征。动物实验显示, TGP对大鼠佐剂性关节炎和胶

收稿日期: 2005-04-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271606, 30572356).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 551 - 5161208,

E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

原性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型均有抑制作用,可显著改善关节病理组织学变化,对 T 细胞、B 细胞和腹腔巨噬细胞等多种免疫细胞均呈功能和浓度剂量依赖性的免疫调节作用^[2,3]。为了进一步研究其治疗 RA 的作用机制,本文观察了 TGP 对 CIA 大鼠滑膜细胞超微结构、增殖反应和分泌功能的影响。

材料与方 法

实验动物 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重 (180 ± 20) g; 雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 (20 ± 2) g,均由安徽医科大学实验动物中心提供。

药品与试剂 TGP 由安徽医科大学临床药理研究所化学室提供,雷公藤多苷 (glucosides of Tripterygium wilfordii, GTW) 购自上海复旦复华药业有限公司 (批号 040110),上述两种药物实验时均以 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成所需浓度的悬液。卡介苗,上海生物制品研究所产品;鸡 II 型胶原 (C II),上海本草生物医学研究所产品;胶原酶 IA、胰蛋白酶、刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和 MTT 均为 Sigma 公司产品;¹²⁵I-TNF α 放射性免疫 (radioimmunoassay, RIA) 试剂盒购自苏州大学医学院;¹²⁵I-PGE₂ RIA 试剂盒购自北京邦定泰克生物技术有限公司。

CIA 模型的建立^[4] 将 C II 溶于 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸中,在 4 °C 下搅拌使之充分溶解,质量浓度为 2 g·L⁻¹,置 4 °C 冰箱过夜,再将灭活的卡介苗置于液体石蜡中,配成 0.5 g·L⁻¹ 的完全弗氏佐剂,将二者等体积混合、乳化,制成 C II 乳剂。将该乳剂于大鼠的右后足趾皮内注射 0.1 mL 致炎, d 7 尾根部近三分之一处和背部 3 ~ 5 点皮内注射该乳剂 0.1 mL 作为激发注射。

实验分组与给药 将 SD 大鼠随机分为 6 组:正常对照组, CIA 模型组, TGP 25, 50 和 100 mg·kg⁻¹ 组和阳性对照组 (GTW 40 mg·kg⁻¹)。各用药组于致炎后 d 14 ~ d 28 灌胃给药, qd, 正常对照组和 CIA 模型组灌胃等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠。d 36 处死大鼠,检测各项指标。

滑膜细胞超微结构的观察 取大鼠膝关节滑膜组织,以 4% 戊二醛 Millonig's 缓冲液预固定,1% 锇酸固定液固定,不同浓度乙醇逐级脱水,环氧丙烷过渡, Epon 812 浸泡、包埋,定位后行超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双染色后,透射电镜观察滑膜细胞超微结构并摄片。

滑膜细胞的分离培养^[5] 无菌取大鼠膝关节滑膜组织,用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 D-Hanks 液反复洗 3 次后剪成 1 ~ 2 mm³ 小块,将其置于含有 RPMI-1640 培养液 2 mL 和 0.4 g·L⁻¹ 胶原酶 IA 2 mL 的 25 cm² 培养瓶中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中消化 2 h。取未黏附细胞移至离心管中,离心 (500 × g, 10 min),弃上清液,再加入 0.25 g·L⁻¹ 胰蛋白酶 4 mL, 37 °C、5% CO₂ 作用 30 min 后, 200 目尼龙网过滤,离心 (500 × g, 10 min),在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,弃去未黏附细胞,此时的贴壁细胞为原代滑膜细胞。

滑膜细胞增殖反应的检测 用含 15% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液制备滑膜细胞悬液 (2 × 10⁶ · L⁻¹), 加至 96 孔培养板,每孔 100 μ L,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,贴壁后换新的培养液 100 μ L,继续培养 66 h 后,每孔加 5 g·L⁻¹ MTT 10 μ L,再培养 6 h,吸弃上清液,加入二甲基亚砷 120 μ L,振荡 30 s,于酶标仪 490 nm 处读取每孔 A 值,结果以 3 个复孔的均值表示。

滑膜细胞上清液的制备 用含有 5 mg·L⁻¹ LPS 的 RPMI-1640 培养液配制滑膜细胞悬液 (1 × 10⁶ · L⁻¹), 加至 24 孔培养板,每孔 1 mL,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,收集上清液, - 20 °C 保存待测。

IL-1 活性测定^[4] 采用小鼠胸腺细胞增殖法。C57BL/6J 小鼠处死后无菌取胸腺,用 RPMI-1640 培养液制成 2 × 10¹⁰ · L⁻¹ 细胞悬液。在 96 孔培养板上,每孔加入胸腺细胞悬液 50 μ L (各设 3 个复孔)、滑膜细胞上清液 100 μ L 和 Con A (终质量浓度 5 mg·L⁻¹) 50 μ L,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h。终止培养前 2 h,每孔加 5 g·L⁻¹ MTT 10 μ L。培养结束后离心 (500 × g, 10 min),弃上清液,每孔加入二甲基亚砷 120 μ L,振荡 30 s,于酶标仪 490 nm 处读取每孔 A 值,结果以 3 个复孔的均值表示。

TNF α 和 PGE₂ 含量测定 取滑膜细胞上清液,采用放射免疫测定法,按¹²⁵I-TNF α RIA 试剂盒和¹²⁵I-PGE₂ RIA 试剂盒说明书进行。

统计学处理 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间差异的比较。

结 果

1 TGP 对 CIA 大鼠滑膜细胞超微结构的影响

透射电镜观察显示,与正常对照组相比, CIA 大鼠滑膜细胞数量增多,功能活跃。其中 A 型滑膜细

胞内可见致密体、高尔基体、线粒体和空泡显著增多,同时高尔基体变小并严重卷曲,线粒体肿胀、嵴突破坏或消失;B型滑膜细胞内粗面内质网异常丰富并呈池状扩张,成群的核糖体散布于其周围,线粒体和致密体数量也增加。TGP (50和100 mg·kg⁻¹)和GTW (40 mg·kg⁻¹)治疗可使滑膜细胞数量接近正常,并有效减轻上述超微结构的病理损害,表现为:高尔基体数量减少,结构清晰、完整,轻度卷曲;线粒体肿胀不明显,嵴突完整;粗面内质网略有扩张,但数量减少;同时中间纤维丝、致密体、空泡的数量均降低。尤以TGP 100 mg·kg⁻¹作用最为明显,细胞结构基本恢复正常。见图1。

2 TGP对CIA大鼠滑膜细胞增殖反应的影响

与正常对照组相比,CIA大鼠滑膜细胞的增殖反应明显增强,TGP (50和100 mg·kg⁻¹)和GTW (40 mg·kg⁻¹)处理可使CIA大鼠滑膜细胞的增殖反应显著降低。见图2。

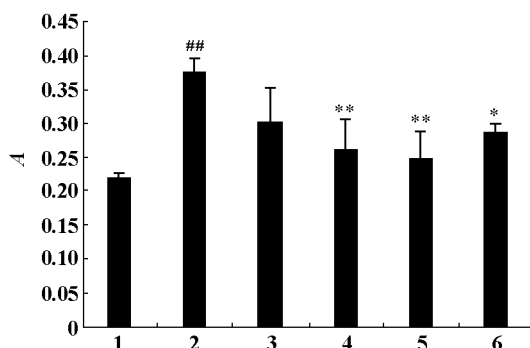


Figure 2 Effects of TGP on synoviocytes proliferation of CIA rats (MTT assay). 1: Normal; 2: Model; 3: TGP 25 mg·kg⁻¹; 4: TGP 50 mg·kg⁻¹; 5: TGP 100 mg·kg⁻¹; 6: GTW 40 mg·kg⁻¹. CIA model was induced in rats immunized with chicken type II collagen in Freund's complete adjuvant. TGP (25, 50, 100 mg·kg⁻¹) and GTW (40 mg·kg⁻¹) were given intragastrically to CIA rats from day 14 to 28 after immunization. Synoviocytes were isolated from knees of rats on day 36, and their proliferation was measured by MTT assay after 72 h incubation. n = 4, $\bar{x} \pm s$. ## P < 0.01 vs group 1; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs group 2

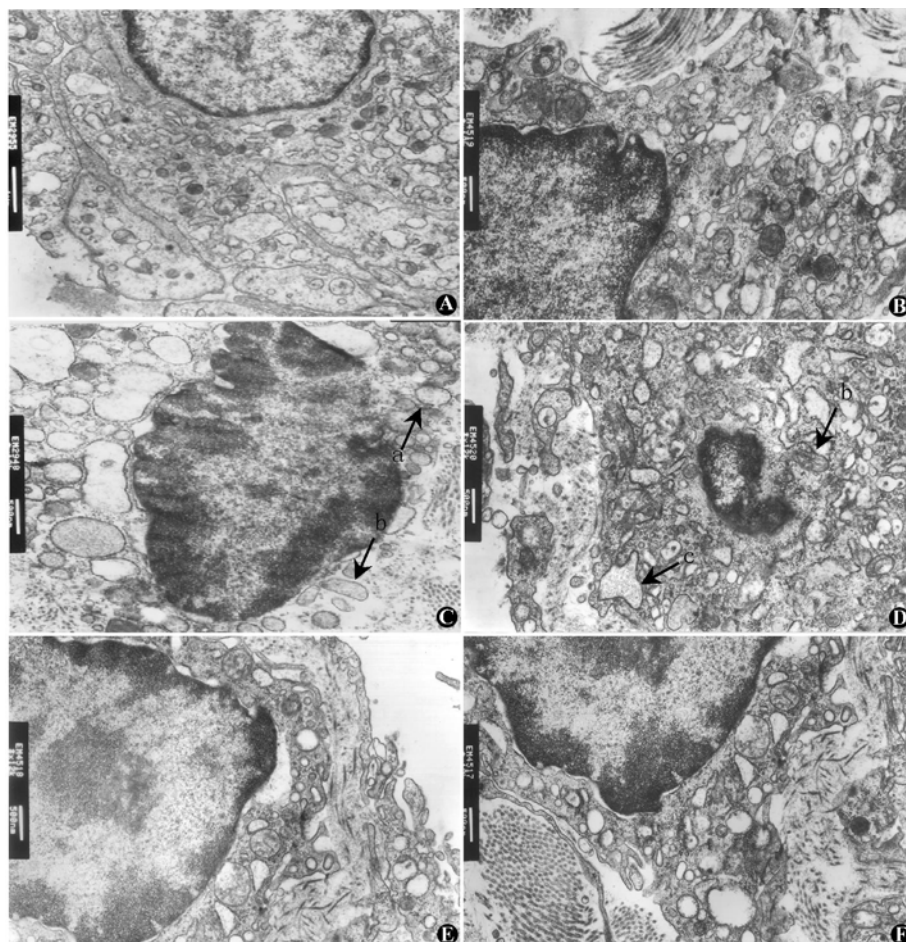


Figure 1 Effects of glucosides of paeony (TGP) on ultrastructure of synoviocytes. A: Type A synoviocyte in normal rats; B: Type B synoviocyte in normal rats; C: Type A synoviocyte in CIA rats; Golgi bodies (a) reduced in size and curled, mitochondria (b) swelled with ridges decreasing; D: Type B synoviocyte in CIA rats; rough endoplasmic reticulum (RER, c) and mitochondria increased and dilated; E: Type A synoviocyte in CIA rats treated with TGP 100 mg·kg⁻¹; shows almost normal ultrastructure; F: Type B synoviocyte in CIA rats treated with TGP 100 mg·kg⁻¹; shows almost normal ultrastructure. Magnification ×12 000

3 TGP对 CIA大鼠滑膜细胞产生 IL-1, TNF α 和 PGE $_2$ 的影响

与正常对照组相比, CIA 大鼠滑膜细胞产生 IL-1, TNF α 和 PGE $_2$ 的水平均明显升高, TGP(50 和 100 mg \cdot kg $^{-1}$)和 GTW(40 mg \cdot kg $^{-1}$)各给药组 CIA 大鼠滑膜细胞培养上清液中 IL-1, TNF α 和 PGE $_2$ 水平明显降低,提示 TGP 和 GTW 对 CIA 大鼠滑膜细胞亢进的分泌功能有显著抑制作用。见图 3。

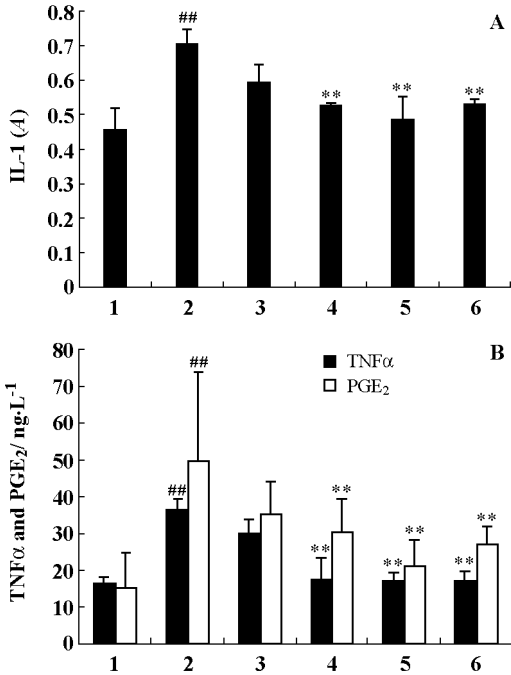


Figure 3 Effects of TGP on IL-1 (A), TNF α and PGE $_2$ (B) production by synoviocytes from CIA rats. 1: Normal; 2: Model; 3: TGP 25 mg \cdot kg $^{-1}$; 4: TGP 50 mg \cdot kg $^{-1}$; 5: TGP 100 mg \cdot kg $^{-1}$; 6: GTW 40 mg \cdot kg $^{-1}$. CIA model was induced in rats immunized with chicken type II collagen in Freund's complete adjuvant. TGP (25, 50, 100 mg \cdot kg $^{-1}$) and GTW (40 mg \cdot kg $^{-1}$) were given intragastrically to CIA rats from day 14 to 28 after immunization. Synoviocytes were isolated from knees of rats on day 36. After 48 h incubation, IL-1, TNF α and PGE $_2$ in synoviocytes supernatants were measured. $n = 3 \sim 4$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs group 1; ^{**} $P < 0.01$ vs group 2

讨论

大鼠 CIA 模型是兼有体液免疫和细胞免疫变化的慢性系统性免疫性炎症,其病理过程及实验室指标与人类 RA 类似,是筛选和研究治疗 RA 药物的较理想的实验动物模型^[6]。本实验在成功建立大鼠 CIA 模型的基础上,观察发现 TGP 能够减轻 CIA 大鼠的关节肿胀、疼痛和多发性关节炎程度,这

与文献^[4]报道相一致。在此基础上,进一步研究结果显示, TGP 能够显著改善 CIA 大鼠滑膜细胞超微结构的损害,降低其过度的增殖反应,且对 IL-1, TNF α 和 PGE $_2$ 的产生有明显的抑制作用。表明 TGP 对 CIA 大鼠功能亢进的滑膜细胞具有明显的抑制作用。

正常滑膜仅有 1~2 层滑膜细胞,并发挥多种生理功能。而在 RA 时,滑膜细胞可增生达 3~7 层,并分泌高水平促炎性细胞因子、化学趋化因子、基质蛋白降解酶等,相互作用,持续刺激滑膜细胞,导致滑膜细胞信号转导异常,进一步产生过量的炎症介质和降解酶等,其功能在于过度增殖、刺激炎症和破坏关节。因此,在 RA 关节损坏和组织重构中,滑膜细胞既是靶细胞,也通过多种途径成为参与者,其功能的改变在疾病的进程中起着至关重要的作用^[7,8]。根据滑膜细胞的超微结构特征可将其分为 A 和 B 两型: A 型滑膜细胞形似巨噬细胞,细胞器以吞噬相为主要特征,包括发达的高尔基体和大小不同的吞噬小泡; B 型滑膜细胞形似成纤维细胞,细胞器以蛋白分泌相为主要特征,包括丰富的粗面内质网,少量的空泡和线粒体^[5,9]。其中高尔基体主要参与细胞的分泌活动,线粒体为细胞的增殖代谢提供能量,而粗面内质网则具有分泌蛋白质等功能。本文的超微结构研究发现,在 CIA 大鼠滑膜细胞中,上述 3 种具特定功能的细胞器的数量明显增加,且形态、结构均发生异常变化,提示滑膜细胞处于亢进的代谢、分泌及增生状态。而 TGP(50 和 100 mg \cdot kg $^{-1}$)可有效减轻 CIA 大鼠滑膜细胞超微结构的病理损伤,改善各细胞器结构和功能的变化,从而使亢进的滑膜细胞功能趋于正常。

本实验还观察到,正常大鼠滑膜细胞的增殖率较低,而 CIA 大鼠滑膜细胞的增殖反应明显增高, TGP(50 和 100 mg \cdot kg $^{-1}$)治疗对 CIA 大鼠滑膜细胞增殖有明显抑制作用,提示抑制滑膜细胞的过度增殖可能是 TGP 发挥其对关节滑膜保护作用的机制之一。

RA 是免疫介导的炎症性疾病,细胞因子网络失调与 RA 发病及病程进展密切相关。滑膜细胞、软骨细胞、巨噬细胞等可分泌多种高水平的细胞因子和炎症介质,参与 RA 关节损伤的病理进程。RA 患者滑膜细胞的分裂、增殖加快也与滑膜中 IL-1, TNF α 等促炎性细胞因子的水平升高密切相关^[10]。有文献^[11]报道,在 RA 发病时,滑膜细胞核染色体的 IL-1, TNF α , IL-6, IL-8 等细胞因子的 mRNA 迅速

增加,进而合成多种细胞因子。在众多细胞因子中, IL-1 和 TNF α 被认为在 RA 发病机制中起主导作用,他们相互作用,诱导更多的细胞因子和炎症介质产生;协助炎症细胞迁徙至关节腔;刺激滑膜成纤维细胞增殖,形成特征性血管翳;促进滑膜细胞产生 PGE₂和胶原酶,加快骨质吸收,最终导致关节组织的破坏。PGE₂也是 RA 病理机制中的重要炎症介质,具有明显的致痛与致炎作用,高浓度的 PGE₂还能使骨组织的吸收、破坏增加^[12-14]。本研究结果显示, CIA 大鼠滑膜细胞分泌 IL-1, TNF α 和 PGE₂水平显著升高, TGP(50 和 100 mg·kg⁻¹)对 CIA 大鼠滑膜细胞亢进的分泌功能有明显改善作用。该结果与透射电镜观察到的滑膜细胞中高尔基体、线粒体和粗面内质网等相应细胞器的形态结构改变相一致。提示 TGP 对滑膜细胞中具有特定功能细胞器的形态的改善作用可能是其减轻滑膜细胞增殖、分泌功能的病理学基础, TGP 对滑膜细胞的抑制作用可能与其下调滑膜细胞异常升高的分泌细胞因子和炎症介质的功能有关。

本文研究结果表明,关节滑膜细胞是 TGP 发挥作用的主要靶细胞之一。TGP 可通过抑制关节炎大鼠滑膜细胞亢进的代谢、增殖和分泌功能来发挥其治疗作用,这为临床使用 TGP 治疗 RA 提供了新的实验依据。

References

- [1] Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis [J]. Cell, 1996, 85: 307 - 310.
- [2] Zhou Q, Li ZG. Pharmaceutical effects of total glucosides of peony and its application in autoimmune disease [J]. Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志), 2003, 22: 687 - 691.
- [3] Chen Q, Wei W. Effects and mechanisms of glucosides of *Chaenomeles speciosa* on collagen-induced arthritis in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3: 593 - 608.
- [4] Zhu L, Wei W, Zheng YQ, et al. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on joint damage in rat collagen-induced arthritis [J]. Inflamm Res, 2005, 54: 211 - 220.
- [5] Dai M, Wei W, Shen YX, et al. Glucosides of *Chaenomeles speciosa* remit rat adjuvant arthritis by inhibiting synoviocyte activities [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 1161 - 1166.
- [6] Myers LK, Rosloniec EF, Crèmer MA, et al. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity [J]. Life Sci, 1997, 61: 1861 - 1878.
- [7] Hui A, Kulkarni GV, Hunter WL, et al. Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40: 1073 - 1084.
- [8] Tolboom TC, Pieteman E, van der Laan WH, et al. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10 [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61: 975 - 980.
- [9] John E, Graham H. Lecture Notes in Rheumatology [M]. London: Blackwell Scientific Publication, 1985: 29 - 38.
- [10] Gitter BD, Labus JM, Lees SL, et al. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha [J]. Immunology, 1989, 66: 196 - 200.
- [11] van den Berg WB, Joosten LA, van de Loo FA. TNF alpha and IL-1 beta are separate targets in chronic arthritis [J]. Clin Exp Rheumatol, 1999, 17: S105 - 114.
- [12] Iwakura Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13: 341 - 455.
- [13] Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts [J]. J Exp Med, 1985, 162: 2163 - 2168.
- [14] McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. J Clin Invest, 2002, 110: 651 - 658.