

丹参酮 IIa 对佐剂性关节炎大鼠血清 IL-1、IL-6、TNF- α 水平及滑膜 MMP3/TIMP1 表达的影响*

杨东威¹ 孟彪² 高立珍³ 王熙¹ 指导:赵和平¹

(1 湖北省十堰市中医院 十堰 442012; 2 湖北中医学院 2005 级硕士研究生 武汉 430061;

3 广西中医学院 2006 级硕士研究生 南宁 530001)

摘要: 目的: 观察丹参酮 IIa 对佐剂性关节炎大鼠血清 IL-1、IL-6、TNF- α 水平及滑膜 MMP3/TIMP1 表达的影响。方法: 用 Freund's 完全佐剂复制 AA 大鼠模型, 并设正常组、模型组、丹参酮 IIa 组、来氟米特组、配伍组。用放射免疫法测定 IL-1、IL-6、TNF- α 水平, 应用免疫组化检测滑膜组织中的 MMP3 及 TIMP1 的表达。结果: 模型组的 IL-1、IL-6、TNF- α 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 用药后各组的细胞因子水平较模型组降低 ($P < 0.05$), 配伍组的降低更明显 ($P < 0.01$)。模型组大鼠滑膜组织 MMP3 表达阳性密度显著高于正常对照组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各用药组的 MMP3 表达阳性密度均降低 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组大鼠滑膜组织 TIMP1 的表达阳性密度明显降低 ($P < 0.05$); 各用药组的 TIMP1 表达阳性密度均高于模型组。结论: 丹参酮 IIa 能够明显降低血清 IL-1、IL-6、TNF- α 水平; 减少滑膜组织中 MMP3 的表达, 增加 TIMP1 的表达, 所以可以有效治疗 RA。

关键词: 丹参酮 IIa; 佐剂性关节炎; 基质金属蛋白酶; 白细胞介素 -1; 肿瘤坏死因子

中图分类号: R 684.3

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2007)06-0006-02

近年来的研究表明, 炎性细胞因子和基质金属蛋白酶/组织金属蛋白酶抑制物参与了细胞外基质成分的降解, 其中基质金属蛋白酶是最可能导致不可逆关节结构损伤的重要因素。临床上应用丹参酮 IIa 治疗 RA 取得了较好的疗效。本试验以大鼠佐剂性关节炎 AA 模型为基础, 研究丹参酮 IIa 对 AA 大鼠关节炎的治疗效果, 并检测其对模型鼠血清 IL-1、IL-6、TNF- α 水平及滑膜 MMP3/TIMP1 表达的影响。现报道如下:

1 材料

1.1 实验动物 成熟雄性 Wistar 大鼠 50 只, 体重 180~200g, 由湖北省鄂阳医学院实验动物中心提供。

1.2 药品 来氟米特(国药准字 H20060034, 批号: 060811); 丹参酮 IIa 磺酸钠注射液(国药准字 H31022558, 批号: 060705); 卡介苗(50mg/支, 国药准字 S10820186, 批号: 200612001); 羊毛脂, 中国华亭羊毛脂厂(批号: 060935); 轻质液体石蜡, 江西德成制药有限公司(批号: 061003)。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 试剂 基质金属蛋白酶 3 (MMP3)、组织金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1)、免疫组织化学成套试剂盒, 购于北京中山生物技术有限公司; 白细胞介素 -1 (IL-1)、白细胞介素 -6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 购于中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所。

1.3.2 仪器 容积测量仪, 自制; BH-2 型显微镜, 日本; Olympus 照相显微镜, 日本; HPIAS-1000 图像分析系统, 中国; DP5500 型 γ 计数器, 中国科学院上海原子核研究所仪器厂; LD4-2A 型高速离心机, 北京医用离心机厂; SHANDON 超薄切片, 瑞典。

2 方法

2.1 Freund's 完全佐剂的制备^[1] 将液体石蜡和羊毛脂 (2:1) 共热至 70℃ 下振荡, 高压灭菌。然后每毫升加入卡介苗 7.5mg 充分研磨混合均匀, 制成 Freund's 完全佐剂。

2.2 分组及造模 将 50 只大鼠随机分成 5 组, 正常对照组 (10 只); 模型组 (10 只); 来氟米特组 (10 只); 丹参酮 IIa 组 (10 只); 来氟米特 + 丹参酮 IIa 组 (配伍组, 10 只)。除正常组外, 每组大鼠右后足皮内注射 Freund's 完全佐剂 0.1mL, 正常对照组在同一部位、同样方法注射 0.1mL 生理盐水。

2.3 给药剂量及方式 来氟米特组于接种后第 19 天始灌胃给来氟米特, 20mg/(kg·d), 共 14 d; 丹参酮 IIa 组: 尾静脉注射丹参酮 IIa 磺酸钠注射液 8.3mg/(kg·d), 共 14d; 配伍组: 灌胃给予来氟米特 20mg/(kg·d), 并尾静脉注射丹参酮 IIa 磺酸钠注射液 8.3mg/(kg·d), 共 14d。

2.4 标本采集及处理 给药结束后 3d, 大鼠眼眶后静脉采血, 3 500r/min 离心 15min, 吸取上清液, -70℃ 冰冻备用。组织标本的采集: 采血后将大鼠处死, 立即摘取左侧的踝关节, 用 4% 多聚甲醛固定 24h 后, 将组织浸入 10% 的 EDTA 溶液中脱钙 20d, 常规梯度脱水、浸蜡、包埋、切片后行 HE 染色和免疫组织化学染色。

2.5 指标测定

2.5.1 IL-1、IL-6、TNF- α 测定 采用放射免疫法 (RIA)。取聚丙烯试管依次编号为总计数管 (T)、非特异性结合管 (NSB)、零标准管 (S₀)、标准管 (S₁₋₅)、样品管 (U), 严格按说明书的加液程序, 依次加入缓冲液、零标准液、标准液、样品以及 ¹²⁵I-IL-1、¹²⁵I-IL-6、¹²⁵I-TNF- α 和 IL-1、IL-6、TNF- α 的抗血清各 0.1mL, 各管充分混匀, 4℃ 温育 24h 以上, 再按程序加入免疫分离剂 0.5mL, 充分混匀, 室温放置 20min, 3 500r/min 离心 25min, 吸弃上清液, 测各管沉淀部分的放射性计数, 由自动 γ 计数器预先编制程序, 直接给出有关参数、标准曲线及样品浓度。

2.5.2 病理学观察 组织标本光镜下观察关节滑膜增生、炎性细胞浸润以及软骨骨质破坏及关节周围组织水肿等病理学变化。并根据文献^[2], 进行半定量评分。评分标准: 0 分: 关节具有正常的结构, 如关节间隙、软骨、骨和滑膜组织等; 1 分:

* 湖北省 2006 年度中医药中西医结合科研课题 (序号: 41)

关节组织中有纤毛形成和轻度的关节炎，并有滑膜增生，血管数量增加，以及小的炎性细胞灶，无软骨和骨的侵蚀破坏；2分：关节有软骨的侵蚀破坏，有中度的关节炎，有大量炎细胞浸润，滑膜增生和血管翳形成较严重，无骨破坏，关节结构无破坏；3分：有严重的血管翳形成，广泛的软骨侵蚀破坏，可见骨破坏，关节结构破坏。

2.5.3 免疫组化染色步骤 (1)石蜡切片脱蜡至水。(2)3% H₂O₂ 室温孵育 15 min，以消除内源性过氧化物酶的活性。(3)蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5min。(4)正常山羊血清工作液封闭，室温孵育 10min。(5)倾去血清，滴加 1:100 稀释的一抗，正常组用 PBS 代替一抗作阴性对照。37℃ 孵育 30 min。(6)PBS 冲洗，5min× 3 次。(7)滴加生物素标记二抗工作液，37℃ 孵育 15min。(8)PBS 冲洗，5min× 3 次。(9)滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，37℃ 孵育 15min。(10) PBS 冲洗，5min× 3 次。(11) DAB 显色，显微镜下观察。(12) 苏木精复染细胞核，封片。用 HPIAS-1000 图像分析系统进行检测。随机检测 5 个高倍视野(× 400)，计算每个视野的阳性面积比，取其平均值。阳性面积比为每个视野阳性面积占整个视野面积的百分率，即阳性反应细胞密度(简称阳性密度)。

2.6 统计学方法 所有数据以均数± 标准差表示，应用 SPSS 14.0 软件做统计分析。不同组间用方差分析，组间两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠血清细胞因子 IL-1、IL-6、TNF-α 水平的比较 模型组大鼠血清 IL-1 水平为(1.56± 0.15) μg/mL，显著高于正常对照组(0.51± 0.18) μg/mL，差异有显著性(P<0.01)；来氟米特组、丹参酮 IIa 组及配伍组的 IL-1 水平均较模型组减少(P<0.01)，配伍组的 IL-1 水平为(0.46± 0.14) μg/L，差异最明显。TNF-α 及 IL-6 的结果与 IL-1 类似。结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清细胞因子 IL-1、IL-6、TNF-α 水平的比较 (X̄± S) μg/mL

| 组别 | n | IL-1 | TNF-α | IL-6 |
|-----------|----|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 正常组 | 10 | 0.51± 0.18 | 0.88± 0.14 | 70.24± 48.48 |
| 模型组 | 10 | 1.56± 0.15* | 1.47± 0.15* | 140.08± 49.77* |
| 来氟米特组 | 10 | 0.87± 0.11 [△] | 0.97± 0.20 [△] | 110.28± 42.10 [△] |
| 丹参酮 IIa 组 | 10 | 0.70± 0.13 [△] | 0.94± 0.18 [△] | 122.54± 48.30 [△] |
| 配伍组 | 10 | 0.46± 0.14 [△] | 0.88± 0.23 [△] | 86.40± 40.03 [△] |

注：与正常组比较，*P<0.01；与模型组比较，[△]P<0.01。

3.2 各组大鼠踝关节光镜下病理变化 正常组：双侧踝关节组织学结构正常；模型组：滑膜有不同程度的充血、水肿及炎细胞浸润，有的滑膜增生向关节腔内突出，出现较明显的关节软骨破坏、纤维化，有的还出现多核巨细胞浸润；各用药组光镜下的病理改变较模型组减轻(滑膜组织增生减轻，炎细胞浸润减少，血管翳形成减轻)。病理积分见表 2。

表 2 各组大鼠踝关节光镜下病理变化 (X̄± S)

| 组别 | n | MMP3 阳性密度 | TIMP-1 阳性密度 | 病理积分 |
|-----------|----|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常组 | 10 | 0.26± 0.12 | 0.68± 0.23 | 0.13± 0.37 |
| 模型组 | 10 | 0.84± 0.24** | 0.36± 0.18* | 1.88± 0.34** |
| 来氟米特组 | 10 | 0.66± 0.15** [△] | 0.42± 0.17* | 1.44± 0.52* [△] |
| 丹参酮 IIa 组 | 10 | 0.65± 0.17** [△] | 0.47± 0.15* [△] | 1.35± 0.57* [△] |
| 配伍组 | 10 | 0.46± 0.19* ^{△△} | 0.52± 0.11* | 0.82± 0.61* [△] |

注：与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01；与模型组比较，[△]P<0.05，^{△△}P<0.01。

3.3 各组大鼠滑膜组织 MMP3 和 TIMP1 免疫组化的结果 正常对照组大鼠的滑膜组织中仅见少量的 MMP3 阳性细胞表达(0.26± 0.12)；模型组大鼠滑膜细胞层及滑膜下层的

MMP3 阳性密度(0.84± 0.24)，明显高于正常对照组，有显著性差异(P<0.01)；丹参酮 IIa 组的 MMP3 阳性密度为(0.65± 0.17)，与模型组比较，差异有显著性；配伍组的 MMP3 阳性密度低于丹参酮 IIa 组。模型组大鼠滑膜组织 TIMP1 的表达阳性密度为(0.36± 0.18)，与正常对照组(0.68± 0.23)比较明显降低，差异有显著性(P<0.05)。各用药组的 TIMP1 表达阳性密度均明显高于模型组(P<0.05)。配伍组 TIMP1 阳性密度为(0.52± 0.11)，比来氟米特组、丹参酮 IIa 组升高明显。结果见表 2。

3.4 IL-1、病理积分与 MMP3 的相关性分析 (1)IL-1 与 MMP3 水平之间成正相关(r=0.9049, P=0.0001)；(2)病理积分与 MMP3 水平之间成正相关(r=0.8959, P=0.0001)。这说明 MMP3 在 RA 的软骨破坏中起着重要的作用，IL-1 是 MMP3 的重要调节因素。丹参酮 IIa 通过影响 IL-1 的分泌，减少了 IL-1 对滑膜和软骨的刺激，使 MMP3 对细胞外基质的降解减轻，从而减弱了 RA 的软骨破坏。

4 讨论

类风湿性关节炎属于中医“痹证”范畴，近年来的研究表明，IL-1、IL-6、TNF-α 及 MMP3/TIMP1 参与了痹证的发病。丹参酮 IIa 是传统中药丹参的提取物，临床应用于治疗 RA 取得了较好疗效，丹参酮 IIa 对血清 IL-1、IL-6、TNF-α 水平及滑膜 MMP3/TIMP1 表达的影响，至今国内尚未见报道。IL-1 是 RA 组织损伤的重要介质^[9]。实验研究证明，丹参酮 IIa 有抑制血小板聚集功能，可以改善微循环障碍及降低血液黏滞度。本实验结果显示，模型组大鼠血清细胞因子 IL-1 显著升高，表明 IL-1 在 AA 发病中起着一定的作用。丹参酮 IIa 组的 IL-1 水平较模型组明显降低，说明丹参酮 IIa 能够对 IL-1 的分泌有一定的抑制作用。

TNF-α 能引起骨质吸收，可刺激软骨内蛋白多糖的吸收和抑制培养软骨的蛋白多糖合成而导致软骨降解；刺激胶原酶和前列腺素的合成^[9]，且能使滑膜细胞、巨噬细胞、纤维母细胞和软骨细胞产生 IL-1 和 TNF-α，加重组织损伤。本实验结果显示，丹参酮 IIa 组的大鼠血清 IL-6、TNF-α 水平较模型组降低。推测丹参酮 IIa 通过降低细胞因子水平，减轻了机体炎症反应，抑制了骨破坏。

MMP3 是引起 RA 关节软骨破坏的一个重要原因^[9]。在正常情况下，软骨组织中金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP)之间存在着一精细的平衡。但在 RA，由于 IL-1、TNF-α 等细胞因子的作用，使这种平衡遭到破坏，导致软骨基质的降解。近年有报告，RA 滑膜和软骨都有高表达的 MMP3，而 TIMP 增加甚少，本实验结果表明，模型组的滑膜细胞的 MMP3 表达明显高于正常对照组，TIMP1 的表达显著低于正常对照组；丹参酮 IIa 组与模型组比较，MMP3 的表达减少，TIMP1 的表达增加。推测丹参酮 IIa 通过降低细胞因子水平，减轻了细胞因子对滑膜细胞和软骨细胞的刺激，从而减少滑膜组织中 MMP3 的分泌，调节了 MMP3/TIMP1 的失衡，减轻了骨破坏。配伍组疗效优于丹参酮 IIa 组和来氟米特组，说明中药有效成分和西药配伍应用在实验性关节炎中有增效作用。

(下转第 12 页)

死率高,预后极差。为进一步提高对本病的认识,现将我院自 2000 年以来收治的 13 例高白细胞急性白血病并发的急性呼吸窘迫综合征诊治过程分析如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料 13 例病人中,男性 8 例,女性 5 例;年龄 9~62 岁,平均年龄 42 岁。9 例为急性非淋巴细胞白血病,其中 M₂ 2 例、M₃ 3 例、M₄ 1 例、M₅ 3 例,另外 4 例为急性淋巴细胞白血病,均为 L₂ 型。入院时白细胞最低为 108× 10⁹/L,最高为 320× 10⁹/L,平均为 180× 10⁹/L。诱发因素:感染 5 例,DIC 2 例,化疗 6 例。

1.2 诊断标准 急性白血病诊断依据参考《血液病诊断及疗效标准》(第二版)^[1]。ARDS 的诊断符合 2000 年中华医学会提出的 ARDS 的诊断标准^[2]。

1.3 临床表现 13 例患者均在原发病基础上,突然出现进行性加重的呼吸困难,吸氧后症状未能改善,病情进一步恶化,表现为胸闷气急、鼻翼煽动、口唇紫绀、呼吸急促,频率为 36~42 次/min,严重者出现意识模糊(1 例)。全部病例两肺均可闻及干湿罗音。

1.4 实验室及器械检查 13 例患者入院时血常规 WBC 108~320× 10⁹/L, Hb 48~100g/L, PLT 10~75× 10⁹/L, 外周血幼稚细胞 46%~94%;骨髓穿刺涂片增生均极度活跃,原始细胞+幼稚细胞占 62%~98%。并发 ARDS 时测定动脉血气 pH< 7.3, PaO₂< 6.52kPa (49mmHg), PaCO₂≥8.5 kPa (63.8mmHg), PaO₂/FIO₂≤ 200 mmHg。全胸片示两肺纹理增粗、紊乱、有浸润阴影。

1.5 治疗方法 13 例患者均给予化疗,急非淋以 HA 或 DA 方案化疗, M₃ 予维甲酸+三氧化二砷治疗, 急淋以 DOLP (DNR、VCR、L-ASP、强的松) 化疗。化疗过程中均静滴 NaHCO₃ 碱化尿液、口服别嘌呤醇降低尿酸。全部病例并发 ARDS 后均给予第三代头孢菌素加丁胺卡那抗感染, 其中 5 例严重感染者换用泰能+万古霉素控制感染。同时作中心静脉置管以监测中心静脉压,控制输液速度,应用利尿剂和肾上腺皮质激素减轻肺间质水肿。所有患者均予呼气末加压吸氧治疗,严重者给予机械通气,同时配合支持治疗。

1.6 转归 13 例中有 8 例患者经抢救治疗后症状渐渐缓解,体温下降,血气指标恢复正常,继续完成联合治疗,外周血细胞明显下降。另 5 例在 ARDS 诊断明确后 24~32h 内死于呼吸衰竭。

2 讨论

目前认为高白细胞急性白血病并发 ARDS 可能有以下几个原因:(1)白血病本身可引起 ARDS,由于白血病细胞明显增多,且细胞变形能力差,血液黏度增加,血流减慢,可引起血管机械性阻塞,造成微循环阻滞。同时细胞在肺内大量

淤积,可对肺局部微血管侵蚀,与肺泡细胞竞争性耗氧,氧张力降低,肺严重低氧血症,可引起血管内皮损伤,这些因素可致 ARDS^[3]。(2)白血病患者在化疗后,由于化学药物的刺激,肺毛细血管和肺泡膜通透性可增加;另外,化疗时大量白血病细胞被破坏,释放出大量酶素及促凝物质,导致肺泡内皮及血管内皮损伤^[4]和血栓形成,增加肺血管阻力及通透性,引起间质性肺水肿。本组就有 6 例在化疗后出现 ARDS。(3)白血病并发感染、DIC 常可引起 ARDS。由于大量的白血病细胞浸润破坏,黏膜屏障破坏,细胞、体液免疫功能损伤,易发生各种感染。在此基础上,频繁地进行联合化疗则进一步损害其免疫功能,导致中性粒细胞缺乏,极易导致严重感染、感染中毒症,尤其是肺部感染^[5]。细菌内毒素导致的感染性休克可使血中前列腺素浓度增加,其中血栓素 A₂ 有强烈的小血小板凝集作用,对血管和平滑肌有收缩作用,并使肺血管阻力增加,通透性改变而致间质性肺水肿。肺部感染时,中性分叶核亦集聚于肺内诱发 ARDS^[6]。本组有 5 例感染、2 例 DIC 导致 ARDS。

现对于 ARDS 的治疗尚缺乏有效的方法,病死率很高,尤其是高白细胞急性白血病相关性 ARDS 预后极差。本组就有 5 例在 ARDS 确诊后 24~32h 内死亡。因此及时诊断并予以合理处理成为本病治疗成败的关键。本病的早期诊断主要决定于临床医生对 ARDS 的警觉性和严密的临床观察,动脉血气分析及摄胸片进行监护。通过本组 8 例高白细胞急性白血病并发 ARDS 成功的抢救,我们的体会是积极治疗原发病;选用高效广谱抗生素,充分消除感染灶,纠正 DIC;控制体液量,应用利尿剂及肾上腺皮质激素,减轻肺间质水肿;及早纠正低氧血症以及加强支持治疗是非常必要的,但早期诊断仍是降低 ARDS 病死率的重要措施。

参考文献

[1]张东华,肖毅,邓金牛,等.恶性血液病并发急性呼吸窘迫综合征 29 例临床分析[J].内科急危重症杂志,2004,10(2): 87~88

[2]Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, et al. Acute respiratory distress in adults[J].The Lancet, 1967,290(7511): 319~323

[3]Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome [J].Ann Intern Med,2004,141(6): 460~470

[4]曾宾,魏菊荣.高白细胞急性白血病 50 例分析[J].临床内科杂志, 2000,17(4): 241~242

[5]张之南,沈悝.血液病诊断及疗效标准[M].第 2 版.北京:科学技术出版社,1998.184~214

[6]钱桂生.急性呼吸窘迫综合征的发病机制和诊断[J].诊断学理论与实践,2006,5(2): 101~103

[7]谢凤玲,孙守金.亚砷酸治疗急性早幼粒细胞白血病并发高白细胞淤积综合征[J].白血病·淋巴瘤,2002,11(3): 171~172

[8]陆凤娟,高怡瑾,翟晓文,等.儿童白血病、淋巴瘤并发呼吸窘迫综合征的诊断和治疗[J].临床儿科杂志,2003,21(4): 219~220

[9]钱红兰,俞康,张君丽,等.高白细胞急性白血病并发急性呼吸窘迫综合征 8 例分析[J].浙江临床医学,2001,3(3): 167~168

(收稿日期: 2007-03-21)

(上接第 7 页)

参考文献

[1]徐叔云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社, 1991.723

[2]Kenneth W. Adolph: human genome methods [M].New York CRC Press, 1998.224

[3]Pettipher ER,Higgs GA,Henderson B.I.Induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial

joint [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1986,83: 8 749~8 753

[4]Cole AA, Kuettner KE.MMP-8 (neutrophil collagenase) mRNA and aggrecanase cleavage products are present in normal and osteoarthritic human articular cartilage [J].Acta Orthop Scand, 1995,66: 98~102

[5]蒋明,朱立平,林孝义.风湿病学[M].北京:科学出版社,1995.314

(收稿日期: 2007-04-20)