

环氧化酶-2与家兔UA及鸡矢藤提取物的干预作用

吕心蕊, 许哲昊, 马颖, 陈春燕, 周兰兰

摘要 目的 观察尿酸盐结晶(MSU)诱导家兔急性尿酸性关节炎(UA)与环氧化酶-2(COX-2)关系及鸡矢藤提取物(EPS)的干预作用。方法 采用注射无菌MSU液诱导制备家兔急性UA模型,检测指标:家兔膝关节肿胀度;关节灌洗液中性粒细胞数量及关节腔灌洗液前列腺素E₂(PGE₂)含量;关节滑膜组织病理组织学;RT-PCR法检测滑膜组织COX-2 mRNA表达。EPS采用灌胃给药,连续1周,观察药物的干预作用。结果 UA模型家兔关节明显肿胀,滑膜组织内可见大量炎性细胞浸润,伴有增生样改变,关节灌洗液内PGE₂含量升高,滑膜组织COX-2 mRNA表达上调($P < 0.01$);EPS能显著有效地改善UA家兔关节的炎性肿胀程度,降低组织炎性细胞浸润,改善滑膜增生样改变,降低关节灌洗液中PGE₂的生成,下调滑膜组织COX-2 mRNA的表达($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 MSU可激活COX-2表达,引发PGE₂含量升高与组织炎症,促进家兔急性UA模型形成;EPS可抑制滑膜细胞COX-2 mRNA表达,减少滑膜液PGE₂生成,减轻炎性细胞浸润,显示对家兔急性UA干预作用良好。

关键词 鸡矢藤提取物; UA; 环氧化酶-2

中图分类号 R 961.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1504-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.019

尿酸是嘌呤代谢的终产物,血中的尿酸盐浓度达到饱和后即可析出晶体。尿酸性关节炎(urate arthritis, UA)又称痛风性关节炎是由尿酸盐结晶(monosodium urate crystal, MSU)沉积于关节腔所致的关节病^[1-2],其发病与体内嘌呤代谢及尿酸排泄紊乱密切相关,一般可导致急性发作性关节炎、慢性痛风石性关节炎,后期还会形成高尿酸性肾脏疾病,重者出现关节功能丧失、致残和肾衰,对人类健康有很大危害。目前UA的治疗仍以选用秋水仙碱等抗

炎药物为主,有些疗效,但由于副作用较大而临床应用受限。

鸡矢藤为多年生草质藤本,其有效成分^[3]具有镇痛、祛风、消食、活血、消肿等丰富的药理作用。该课题组长期和前期的研究^[4]显示,鸡矢藤提取物(extracts of *paederia scandens*, EPS)可改善大鼠UA的肿胀及炎症改变,其机制与抑制关节腔的高炎症性免疫反应密切相关。为阐明环氧化酶(cyclooxygenase, COX)-2与UA发病的关系,并进一步研究EPS抗UA的作用及机制,该研究采用MSU诱导和复制了家兔急性UA模型,观察EPS对UA家兔炎症性反应的干预作用。

1 材料与方法

1.1 主要药品 EPS购自南京康健生物工程技术有限公司,棕黄色粉末;MSU购自美国Sigma公司;萘普生(naproxen, NAP)购自广东百澳药业有限公司。

1.2 实验动物 白色大耳兔,雄性,体重1.5~3.0 kg,自由饮水、进食,饲养室温(22±2)℃,购自肥东县长临河医药科技公司,许可证号:SCXK(皖)2007-001。

1.3 方法

1.3.1 注射用MSU液的制备 配制800 mg MSU和5 ml的1 mol/L NaOH加入155 ml双蒸水中,煮沸,配制1 mol/L HCL用于调节pH值至7.2左右,溶液呈乳白色,离心后收集得到的晶体,冷藏保存。MSU使用前在180℃高压灭菌2 h,采用无菌PBS溶液配成20 mg/ml溶液,经超声破碎处理后使用^[1,4]。使用前MSU液需经检验溶液内的内毒素含量,低于0.062 5 Eu/ml内毒素单位时,才准予使用。

1.3.2 实验设计及家兔UA模型的制备 雄性家兔36只,适应性喂养3 d后,随机分组,每组6只:对照组、UA模型组^[5-6]、EPS干预组(2 230、1 150、575 mg/kg),阳性对照NAP组(12.5 mg/kg)。UA模型组和对照组用药方式采用灌胃给药,其中对照组给予等量生理盐水,连续给药1周,每天1次。

2017-06-21 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:06043095);安徽省科技攻关计划项目(编号:07010300179)

作者单位:安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

作者简介:吕心蕊,女,硕士研究生;

周兰兰,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: lanzhou@aliyun.com

UA 模型的制备采用 Coderre 经典方法并做适当改进,在第 7 天灌胃给药 1 h 后进行。采用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉给药麻醉动物,剃刀剃除兔腿膝关节处毛发,局部消毒,把膝关节弯成 L 型,分别从关节侧面和正中用注射器向兔膝关节腔注射 MSU 溶液 0.4 ml(25 mg/ml)和多粘菌素 0.1 ml。除对照组外,所有组别动物按上法制备模型,对照组注射等量 PBS 液于关节腔。分别于注射前及注射后不同节点量取关节的肿胀度,关节肿胀度值 = 造模后兔后肢关节的周径 - 造模前兔后肢关节的周径。

1.3.3 家兔关节滑膜液中前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂) 含量的测定及中性粒细胞计数 各组家兔于造模 12 h 后处死。消毒膝关节后用手刀切开膝关节囊,用配制好的灌洗液灌洗关节,灌洗液为 25 units/ml 肝素 PBS 和 3 mmol/L 乙二胺四乙酸的混合溶液,关节灌洗液收集待用。低温 2 500 r/min 离心 10 min,采用分光光度计法测量灌洗液中的 PGE₂ 量^[7],量取 0.1 ml 上清液,加入 0.5 ml 的 0.5 mol/L 氢氧化钾 - 甲醇液,50 °C 异构化 20 min。用甲醇稀释,离心后取上清液在 278 nm 波长处测光密度(optical density, OD) 值,以相应媒介为空白对照。

取离心后灌洗液的沉淀细胞用于计数中性粒细胞数目,沉淀细胞中加入 1 ml PBS 液,25 °C 下 1 400 r/min 离心 5 min,清洗,加入 1 ml PBS 调制成悬浮细胞液,调节细胞浓度至 2 × 10⁶ /ml,采用瑞氏染色法涂片,在显微镜下观察并对进行细胞计数。

1.3.4 急性 UA 家兔滑膜病理组织学观察 取滑膜组织,部分置于 10% 多聚甲醛中固定,另一部分迅速保存于液氮中,用于后续实验。固定好的滑膜组织依次进行包埋,切片等处理,HE 染色,在显微镜下观察滑膜组织病理学变化。

1.3.5 RT-PCR 法检测家兔关节滑膜组织 COX-2 mRNA 的表达 关节滑膜组织总 RNA 提取按 TRIzol 试剂盒步骤进行,按试剂盒说明书进行操作逆转录操作。参照文献^[8]设计所需引物,内参采用 β-actin 引物、内参序列及扩增片段具体见表 1。将 PCR 反应液加入反转录结束后的 PCR 反应管中,轻轻混匀。94 °C、2 min,循环 1 次;94 °C、60 s,59 °C、60 s,72 °C、1 min,循环 35 次;72 °C、5 min,循环 1 次。

琼脂糖凝胶电泳浓度为 2%,电泳产物条带信号灰度结果分析采用凝胶成像系统进行,所得结果

表 1 RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 表达
所用引物及对对照的碱基对序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
COX-2	F: AATCGTTCUAGGAACTTACAGGGGAGAAGG	434
	R: CGTCTACAGTTCAGTGGAGCGGCCTTTCAG	
β-actin	F: TACGCCTCTGGCCGCACCAC	564
	R: TCCAGGGAGGAGGAGGACGC	

用 COX-2/β-actin 电泳条带信号灰度值之比表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。数据中计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,膝关节肿胀度的分析采用重复测量的方差分析,余均用单因素方差分析,多重两两间比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSU 诱导家兔急性 UA 模型关节肿胀度的变化及 EPS 的干预作用 统计分析结果显示,所有组别家兔的关节肿胀度在各组内造模前后不同时间均差异有统计学意义 [$F_{\text{组别}} = 3.064, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 65.587, P < 0.01$]。与对照组比较,MSU 诱导的 UA 模型组,在造模后不同时间点的关节肿胀度均呈现显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。2 230 mg/kg EPS 干预组及 NAP 组与 UA 模型组比较,在造模后各时间点关节肿胀度均呈显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 1 150 mg/kg EPS 干预组与 UA 模型组比较,除造模后 2 h 外其他节点的关节肿胀度均显著明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 MSU 诱导家兔急性 UA 关节液中性粒细胞数目的变化及 EPS 的干预作用 UA 模型组与对照组相比,关节灌洗液液中的中性粒细胞数目升高明显,差异有统计学意义 ($F = 19.91, P < 0.01$)。与 UA 模型组数据相比,2 300 mg/kg EPS 干预组和 NAP 组中性粒细胞数量减少明显,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 1 150 mg/kg EPS 干预组细胞数量也显著减少 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 MSU 诱导家兔急性 UA 关节滑膜组织前列腺素 E₂ 含量的变化及 EPS 的干预作用 UA 模型组与对照组相比,家兔关节灌洗液中 PGE₂ 含量(采用比色法在 OD₂₇₈ 检测含量,表示为 PGE₂/OD₂₇₈) 增加明显 ($P < 0.01$)。EPS 和 NAP 干预用药后 PGE₂ 含量较 UA 模型组有显著减少,差异有统计学意义 ($F = 117.9, P < 0.01$)。见表 3。

表2 MSU 诱导家兔急性 UA 关节肿胀度的变化及 EPS 的干预作用 (n=6 $\bar{x} \pm s$)

组别	关节肿胀度 (cm)				
	0 h	2 h	6 h	9 h	12 h
对照	10.56 ± 0.44	10.64 ± 0.48	10.76 ± 0.44	10.7 ± 0.42	10.59 ± 0.44
UA 模型	10.75 ± 0.27	11.20 ± 0.36*	11.77 ± 0.39*	12.23 ± 0.20*	12.13 ± 0.20*
EPS 干预 (mg/kg)					
2 300	10.64 ± 0.42	11.05 ± 0.41 ^{##}	11.50 ± 0.28 ^{##}	11.54 ± 0.19 ^{##}	11.34 ± 0.31
1 150	10.53 ± 0.31	11.04 ± 0.35	11.52 ± 0.31 [#]	11.87 ± 0.30 [#]	11.58 ± 0.40 [#]
575	10.61 ± 0.27	11.15 ± 0.47	11.77 ± 0.35	12.20 ± 0.31	11.92 ± 0.27
NAP (12.5 mg/kg)	10.56 ± 0.31	11.01 ± 0.42 ^{##}	11.37 ± 0.49 ^{##}	11.57 ± 0.38 ^{##}	11.22 ± 0.36 ^{##}

与对照组比较: * P < 0.05; 与 UA 模型组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01

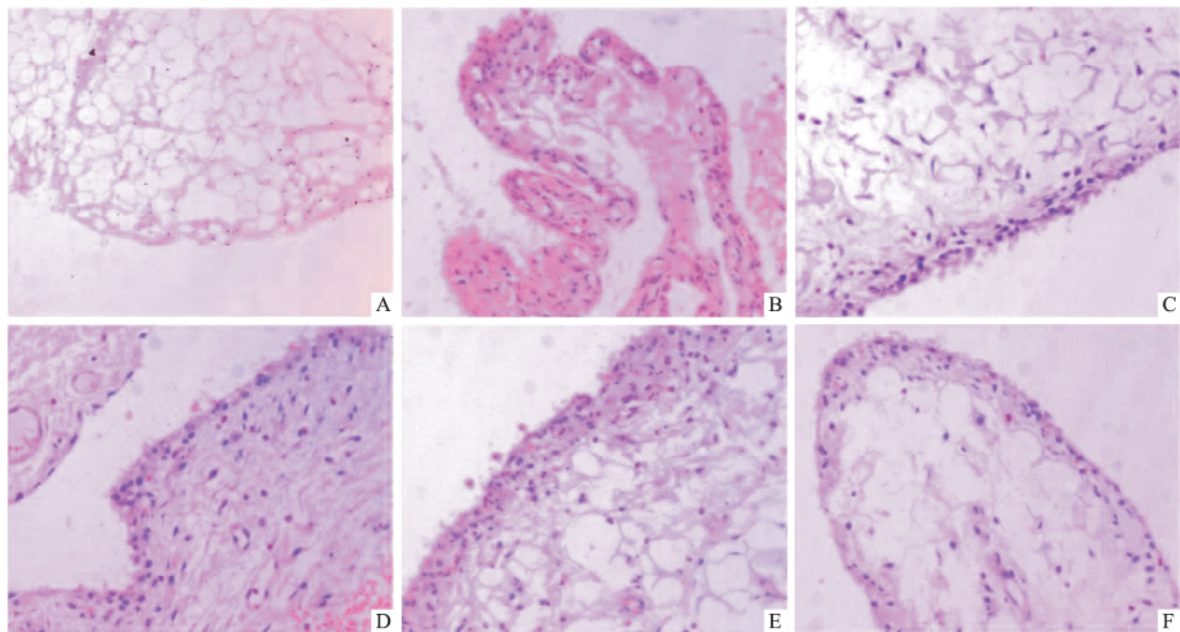


图1 MSU 诱导家兔急性 UA 关节滑膜病理组织学及 EPS 的干预作用 HE × 200

A: 对照组; B: UA 模型组; C: 2 300 mg/kg EPS 干预组; D: 1 150 mg/kg EPS 干预组; E: 575 mg/kg EPS 干预组; F: NAP 组 (12.5 mg/kg)

2.4 MSU 诱导家兔急性 UA 关节滑膜病理组织学变化及 EPS 的干预作用 家兔关节滑膜组织经 HE 染色的结果见图 1, UA 模型组关节滑膜组织有明显炎症样表现, 可见组织表面充血、水肿, 大量炎性细胞浸润其中, 且有增生改变; 而对照组的滑膜组织及

细胞未见明显异常; EPS 各干预组和 NAP 组病理情况较 UA 模型组比较, 其关节炎症及组织充血有不同程度减轻, 见少量散在的炎性细胞浸润, 组织增生样改变亦有程度不同的减轻。

表3 EPS 对 MSU 致家兔急性 GA 关节液中中性粒细胞计数和 PGE₂ 含量的影响 (n=6 $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数 (10 ⁶ /ml)	PGE ₂ /OD ₂₇₈
对照	0.82 ± 0.23	1.40 ± 0.02
UA 模型	3.91 ± 1.02*	2.58 ± 0.01*
EPS 干预 (mg/kg)		
2 300	1.65 ± 0.44 ^{##}	1.95 ± 0.04 ^{##}
1 150	2.61 ± 0.65 ^{##}	2.14 ± 0.04 [#]
575	3.08 ± 0.70	2.36 ± 0.03
NAP (12.5 mg/kg)	1.54 ± 0.38 ^{##}	1.85 ± 0.02 ^{##}

与对照组比较: * P < 0.05; 与 UA 模型组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P <

0.01

2.5 MSU 诱导家兔急性 UA 关节滑膜组织 COX-2 mRNA 表达及 EPS 的干预作用 逆转录后的凝胶电泳图片见图 2, UA 模型组滑膜组织 COX-2 mRNA 表达较对照组有显著上调 (P < 0.01), 而经 2 300 mg/kg EPS 干预组、1 150 mg/kg EPS 干预组和 NAP 组干预后 COX-2 mRNA 表达明显下调 (P < 0.01, P < 0.05)。

3 讨论

MSU 晶体注射诱导急性 UA 的发病特点表现为关节肿胀明显, 炎性反应强, 与临床 UA 的症状极为相似^[9-10], 该模型制备方法具有快速、简单、成功率

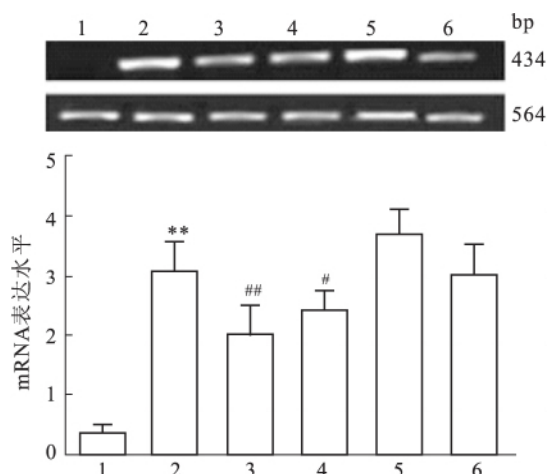


图2 EPS对MSU致家兔急性GA关节滑膜组织COX-2 mRNA表达的影响

1: 对照组; 2: UA模型组; 3: 2 300 mg/kg EPS干预组; 4: 1 150 mg/kg EPS干预组; 5: 575 mg/kg EPS干预组; 6: NAP组(12.5 mg/kg); 与对照组比较: * $P < 0.01$; 与UA模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

高,维持时间较长的优点^[1]。本实验的研究结果显示,在家兔关节腔注射无菌MSU溶液造模后,关节外观呈现明显肿胀,且可持续至造模后12 h;根据滑膜组织学特点,若关节表面有充血、水肿,伴有炎细胞浸润,且有增生样改变,即说明成功复制了UA模型。EPS干预处理后,UA家兔关节肿胀度有不同程度的降低,炎性病理变化也得到改善,增生样改变也明显减轻,说明EPS药物应用对急性UA模型的关节炎性病变更具有良好的干预作用。

MSU注射致急性UA模型的基础是MSU结晶在关节腔内沉积脱落,MSU与关节滑液中免疫球蛋白IgG结合,被吞噬细胞吞噬,释放多种活性物质和炎症介质^[9]。研究^[10]显示关节腔内前列腺素(prostaglandin, PGs)类物质的合成、释放和积聚是诱发UA发病的重要因素之一。PGs的积聚诱发关节滑膜发生炎性改变,局部血管扩张增加通透性,引发红、肿、热、痛样症状。除致炎作用外,PGs的重要亚型PGE还参与骨质吸收及对软骨基质的破坏。MSU沉积会同时诱导细胞环氧酶和PGs合成同步增加^[10],且COX-2的合成会在细胞因子肿瘤坏死因子- α 和白介素1 β 等诱导下进一步增多,继而形成相互作用,逐级放大炎症反应的复杂网络体系,提示COX表达和活性的增强与促进PGE₂合成增加的级联效应,在UA发生和发展中起着关键作用^[11-12]。

本研究结果显示,MSU诱导UA模型组家兔在

关节发生肿胀的同时,关节腔中性粒细胞数目明显升高,滑膜液和滑膜组织PGE₂和COX-2 mRNA水平均有明显上调,这与国外文献^[13-14]报道一致,提示MSU刺激后发生炎症性改变,PGE₂和COX-2表达水平的升高与UA的发病关系密切。应用EPS干预可明显阻止中性粒细胞在关节腔中的聚集,下调滑膜组织内PGE₂水平,抑制滑膜组织中COX-2 mRNA的表达。提示EPS可能通过抑制关节滑膜组织COX-2的激活,减少PGE₂的合成与释放,进而阻止炎症细胞因子的恶性循环这条作用途径,表现出对急性UA显示出良好的干预作用。

参考文献

- [1] Shi Y, Muesi A D, Ng G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity [J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 203-17.
- [2] Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Evil humors take their toll as innate immunity makes gouty joints TREM-ble [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(2): 383-6.
- [3] Yan H, Ma Y, Liu M, et al. The dual actions of *Paederia scandens* extract as a hypouricemic agent: xanthine oxidase inhibitory activity and uricosuric effect [J]. Planta Med, 2008, 74(11): 1345-50.
- [4] Ma Y, Zhou L L, Yan H Y, et al. Effects of extracts from *Paederia scandens* (Lour.) Merrill (Rubiaceae) on MSU crystal-induced rats gouty arthritis [J]. Am J Chin Med, 2009, 37(4): 669-83.
- [5] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant [J]. Pain, 1987, 28(3): 379-93.
- [6] McCarty D J, Holander J L. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid [J]. Ann Intern Med, 1961, 54: 452-60.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 1版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 370.
- [8] Hashitani H, Yanai Y, Shirasawa N, et al. Interaction between spontaneous and neurally mediated regulation of smooth muscle tone in the rabbit corpus cavernosum [J]. J Physiol, 2005, 569(Pt 3): 723-35.
- [9] Pineda C, Fuentes-Gómez A J, Hernández-Díaz C, et al. Animal model of acute gout reproduces the inflammatory and ultrasonographic joint changes of human gout [J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17: 37.
- [10] Pouliot M, James M J, McColl S R, et al. Monosodium urate microcrystals induce cyclooxygenase-2 in human monocytes [J]. Blood, 1998, 91(5): 1769-76.
- [11] Murakami Y, Kohsaka H. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as an inflammation amplifier [J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2009, 32(4): 242-8.

(下转第1512页)

function in infants with milk allergy. **Methods** The infants(37 cases) with milk protein allergy were randomly divided into control group(18 cases) and observational group(19 cases) . The infants in observational group were treated with free amino acid-based formula and bifidobaeterium tetravaccine table for three months , while those in control group received extensively hydrolyzed protein formula and bifidobaeterium tetravaccine table for three months. The proliferation of peripheral blood T lymphocytes , levels of interleukin(IL) -17 and IL-10 , and the ratio of Th17 and Treg were measured in both groups before and after intervention of free amino acid-based formula recipients. **Results** There were no significant difference in T lymphocytes proliferation , IL-17 , and IL-10 levels , and the ratio of Th17 and Treg between two groups. After intervention , the proliferation of T lymphocytes and the levels of IL-17 and Th17 were significantly decreased , and IL-10 and Treg levels were obviously increased in both groups. Moreover , the free amino acid-based formula to improve CD4⁺ T lymphocyte immune function was significantly better than that of extensively hydrolyzed protein formula($P < 0.05$) . **Conclusion** Amino acid-based formula can significantly improve the disequilibrium between Treg and Th17 in infants with milk allergy , and the effect is better than that of extensively hydrolyzed protein formula.

Key words amino acid-based formula; food allergies; Th17 cells; Treg cells

(上接第 1507 页)

- [12] Li S , Sun Z , Zhang Y , et al. COX-2/mPGES-1/PGE₂ cascade activation mediates uric acid-induced mesangial cell proliferation [J]. *Oncotarget* , 2017 8(6) : 10185 - 98.
- [13] Pouliot M , James M J , McColl S R , et al. Monosodium urate microcrystals induce cyclooxygenase-2 in human monocytes [J].

Blood , 1998 91(5) : 1769 - 76.

- [14] Getting S J , Christian H C , Flower R J , et al. Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotrophic hormone efficacy in gouty arthritis [J]. *Arthritis Rheum* , 2002 46(10) : 2765 - 75.

Role of COX-2 on monosodium urate induced acute gouty arthritis in rabbits and intervention effect of extracts of *paederia scandens*

Lv Xinrui , Xu Zhehao , Ma Ying , et al

(*Dept of Pharmacology Anhui Medical University Hefei 230032*)

Abstract Objective To study the role of cyclooxygenase (COX) -2 on monosodium urate induced acute urate arthritis (UA) in rabbits and the intervention effect of extracts of *paederia scandens*(EPS) . **Methods** UA model was prepared by injecting monosodium urate crystals(MSU) into rabbit's joint. Joint sizes were measured with vernier caliper at different time , leukocyte infiltration in synovial fluids were analyzed. HE staining was used to study the histopathology of articular synovial tissue , prostaglandin E₂(PGE₂) level was measured by ultraviolet spectrophotometry , COX-2 mRNA levels were monitored by RT-PCR. Treatment groups received different doses of EPS daily for 7 days. **Results** Joints of UA rabbit showed significant swelling , synovial membrane tissue presented inflammatory cell infiltration , hyperplasia like change , PGE₂ content in the joint effusion increased and the mRNA expression of COX-2 up-regulated($P < 0.01$) . Intervention of EPS significantly inhibited joint swelling of rabbits , improved the histopathologic changes , reduced the content of PGE₂ in synovial fluid , and suppressed the COX-2 mRNA expression in synovium of UA rabbits($P < 0.01$, $P < 0.05$) . **Conclusion** MSU could activate the expression of COX-2 mRNA , increase the content of PGE₂ and inflammation , and promote the formation of acute UA model in rabbits. EPS possess anti-urthritis effects , its mechanism may be related to the inhibition of leukocyte infiltration , reducing the content of PGE₂ , down-regulating the mRNA expression for COX-2 in UA joints , thus reducing COX-2-mediated inflammatory injury.

Key words extracts of *paederia scandens*; urthritis; cyclooxygenase-2