

·论著·

黑骨藤追风活络胶囊调节 mPGES-1 改善 胶原诱导性关节炎的作用研究

罗进芳^{1,2}, 何 吉^{2,3}, 乐 岚³, 何 康³, 黄勇其^{1,2}, 姚血明⁴, 黄 聪^{1,2,4}

[1. 贵州中医药大学基础医学院药理学教研室, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州省高等学校中药(民族药)药性与效应研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025;

4. 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科, 贵州 贵阳 550025]

摘要:目的 研究黑骨藤追风活络胶囊(HZC)调节 mPGES-1 干预类风湿关节炎的作用机制。方法 随机选取 24 只 SD 大鼠并分为正常组、模型组、HZC 组、甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)组,造模成功后对大鼠进行灌胃给药,除正常组外,其余三组采用牛Ⅱ型胶原和完全弗氏佐剂混合乳化剂构建胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型,大鼠分别给予生理盐水、MTX 和 HZC 灌胃,共给药 21 d。比较各组足肿胀、脾指数、微粒体前列腺素 E2 合酶-1(microsomal prostaglandin E synthase 1, mPGES-1)的表达情况。结果 与正常组大鼠比较,模型组大鼠足肿胀程度明显且伴随着关节变形肿大,HZC 组和 MTX 组大鼠未见明显足肿胀和关节变形。模型组给药第 14、21 天足肿胀厚度高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),而 HZC 组和 MTX 组给药后第 14、21 天足肿胀厚度低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。模型组脾指数高于正常组、HZC 组、MTX 组,差异有统计学意义($P<0.05$);与正常组比较,模型组大鼠关节滑膜组织 mPGES-1 蛋白表达上升($P<0.05$),而与模型组比较,HZC 组和 MTX 组 mPGES-1 蛋白表达下调($P<0.05$)。结论 HZC 能通过干预 mPGES-1 的表达情况而改善 CIA 大鼠的炎症反应,起到治疗作用。

关键词:黑骨藤追风活络胶囊;胶原诱导性关节炎;mPGES-1

中图分类号:R593

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2024.20.009

文章编号:1006-1959(2024)20-0057-05

Study on the Effect of Heiguteng Zhuifeng Huoluo Capsule in Regulating mPGES-1 to Improve Collagen-induced Arthritis

LUO Jinfang^{1,2}, HE Ji^{2,3}, LE Lan³, HE Kang³, HUANG Yongqi^{1,2}, YAO Xueming⁴, HUANG Cong^{1,2,4}

[1. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Guizhou University
of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. Key Laboratory on the Property & Effect of Chinese Medicine (Ethnic Medicine), Guiyang 550025, Guizhou, China;

3. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China;

4. Department of Rheumatism and Immunology, the Second Affiliated Hospital of Guizhou University
of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China]

Abstract: Objective To study the mechanisms of Heiguteng Zhuifeng Huoluo capsule (HZC) on collagen-induced arthritis (CIA) rats by regulating mPGES-1. Methods A total of 24 SD rats were randomly selected and divided into normal group, model group, HZC group and methotrexate (MTX) group. After the model was successfully established, the rats were given intragastric administration. Except for normal group, collagen-induced arthritis (CIA) model were constructed with bovine type II collagen and complete Freund's adjuvant mixed emulsifier. Rats were given normal saline, MTX and HZC by gavage for 21 days. The foot swelling, spleen index and the expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1) in each group were compared. Results Compared with the normal group, the degree of foot swelling in the model group was obvious and accompanied by joint deformation and swelling, while there was no obvious foot swelling and joint deformation in the HZC group and MTX group. The thickness of foot swelling in the model group was higher than that in the normal group on the 14th and 21st days after administration, and the difference was

基金项目:1.贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(编号:QZYY-2021-012);2.贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目(编号:贵中医 TD 合字[2022]004 号);3.贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础-ZK[2022]一般 477;黔科合基础-ZK[2021]一般 537)

作者简介:罗进芳(1989.10-),女,贵州黔西人,博士,讲师,主要从事中药抗炎免疫药理研究

通讯作者:黄聪(1982.8-),男,贵州盘州人,博士,硕士生导师,副教授,主要从事中药抗炎免疫药理研究

statistically significant ($P<0.05$), while the thickness of foot swelling in the HZC group and MTX group was lower than that in the model group on the 14th and 21st days after administration, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The spleen index of the model group was higher than that of the normal group, the HZC group and the MTX group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the normal group, the expression of mPGES-1 protein in synovial tissue of rats in the model group increased ($P<0.05$), while compared with the model group, the expression of mPGES-1 protein in HZC group and MTX group decreased ($P<0.05$). Conclusion HZC can significantly improve the inflammatory response of CIA rats by interfering with the expression of mPGES-1, and play a therapeutic role.

Key words: Heiguteng Zhuifeng Huoluo capsule; Collagen-induced arthritis; mPGES-1

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性关节炎和病理性血管增生为主要病理特征的自身免疫病,可发生于任何年龄段^[1,2]。目前,临床上治疗 RA 药物有糖皮质激素、抗风湿药、非甾体抗炎药、生物制剂和植物药等,以及特定靶标治疗,即共刺激调节剂或靶向合成药如 JAK 抑制剂,其多着眼于调节先天免疫和适应性免疫,但存在价格高昂、不良反应多等缺点^[5,6]。且大多数药物治疗目标都是缓解症状或尽量达到低级疾病活动度^[7],但药物副作用大^[8]。RA 属中医学“痹证”范畴,古代医家根据病情特点,有“鼓椎风”“鹤膝风”“骨痹”等描述^[9]。《金匱要略·中风历节病》篇指出:“寸口脉沉而弱,沉即主骨,弱即主筋,沉即为肾,弱即为肝……”肝肾亏损、气血亏虚,易造成外邪侵袭,这是历节病发生的内在因素^[10];《黄帝内经》中指出“风寒湿三气杂至,合而为痹也”;《素问·举痛论》:“寒气客于脉外则脉寒,脉寒则蜷缩,蜷缩则脉绌急,绌急则外引小络,故猝然而痛”^[11]。黑骨藤追风活络胶囊(Heiguteng Zhuifeng Huoluo capsule, HZC)主要成分为黑骨藤、

青风藤、追风伞,其中黑骨藤作为君药,为萝藦科杠柳属植物黑龙骨的干燥根或全株,又名“黑骨头、黑龙骨、柳叶过山龙、飞仙藤”,苦、辛,性温,有小毒,主治风湿性关节痛、跌打损伤等,与结石草、银杏称为苗药三珍宝,是目前发现的草藤科类治疗风湿类疾病的有效药物^[12]。现代药理学研究表明^[13],黑骨藤富含皂苷、挥发油等有机物,故有抗炎、镇痛等功效。而黑骨藤追风活络胶囊的功效为活血通络、祛风除湿^[14],但该胶囊是否可以通过调节 mPGES-1 蛋白改善 RA 疾病状态尚不完全清楚。本研究以胶原诱导大鼠类风湿性关节炎模型为研究对象,基于 mPGES-1 蛋白初步研究 HZC 对 RA 的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 24 只,体重 160~180 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2019-0008]。大鼠分笼饲养,自由摄食和饮水,经过贵州中医药大学动物伦理委员会批准进行实验。

1.2 主要药物与试剂 本研究所用药物与试剂见表 1。

表 1 主要药物与试剂

药物名称	生产厂商	货号/批号
黑骨藤活络胶囊	国药集团同济堂(贵州)制药有限公司	国药准字 Z20025279
甲氨蝶呤	北京索莱宝科技有限公司	517B021
完全弗氏佐剂	Chondrex 公司	210154
牛 II 型胶原	Chondrex 公司	20022
β -actin 抗体	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778
RIPA 裂解液	北京索莱宝科技有限公司	20210911
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	北京索莱宝科技有限公司	P1200-1/P1200-2
电转液	北京索莱宝科技有限公司	D1060
5×Tris-电泳缓冲液	北京索莱宝科技有限公司	T1070
彩虹 180 广谱蛋白 marker	北京索莱宝科技有限公司	PR1910
抗体稀释液	广州硕普生物科技有限公司	BL506A
10×TBST 缓冲液	广州硕普生物科技有限公司	BL315B
高效 Western 封闭液	上海积福生命科技有限公司	GF1815
5×蛋白上样缓冲液	北京康润诚业生物科技有限公司	E153-10

1.3 主要仪器 电子天平（上海然浩电子有限公司，型号：JCS-51001C）、高压灭菌锅（美国 ZEALWAY，型号：GI54T）、游标卡尺（武汉芯泰科技有限公司，型号：JS119F150）、高速冷冻离心机（赛默飞世尔科技公司，型号：Sorvall Legend Micro 21R）、超灵敏多功能化学发光成像系统曝光机（美国 Bio-Rad，型号：ChemiDocTM）、酶标仪（北京新风机电技术公司，型号：Infinite M200）、电泳仪（北京鸿涛基业科技发展有限公司，型号：HT-Zy02）、正置白光拍照显微镜（Nikon，型号：Eclipse Ci-L）、切片机（德国 feica，型号：RM2265）。

1.4 分组、造模及给药方法 将 24 只大鼠随机分为 4 个组：正常组、模型组、MTX 组、HZA 组，每组 6 只。除正常组外，其余组均构建胶原诱导性关节炎模型（采用二次免疫法）。胶原的配置：往研钵（灭菌处理后）中加入弗氏佐剂 2.5 ml，边研磨边缓慢加入同体积的牛Ⅱ型胶原，使混合物充分乳化，研至滴入水中呈圆形不散（进行冰浴操作），胶原即配置完成。除正常组在其尾根部注射 0.1 ml 生理盐水外，其余的大鼠均在尾根部注射 0.1 ml 充分乳化好的弗氏佐剂和牛Ⅱ型胶原混合物。第 1 次免疫反应结束后第 7 天

进行第 2 次加强免疫反应并标记，并称重。第 2 次免疫后，次日开始给药，给药方法：HZA 组根据体重按照 1 ml/0.1 kg (243 mg/kg) 进行灌胃给药，1 次/d，正常组与模型组用生理盐水进行灌胃治疗，给药组用黑骨藤追风活络胶囊配置的药液灌胃，HZA 给药量按照人服用量折算成大鼠给药剂量，MTX 组用 MTX 灌胃给药，剂量为 1 mg/kg，各组均连续给药 21 d。

1.5 足趾部肿胀测量 在大鼠造模后用游标卡尺测量大鼠后足足趾的肿胀数值，分别于给药前、给药后第 7、14、21 天对关节肿胀程度进行记录，共 4 次。

1.6 脾指数测量 在给药结束后，麻醉大鼠，取其血液，处死大鼠，开腹解剖取大鼠脾脏，分别在分析天平上进行称重，并记录，装入 EP 管中，在零下 20℃ 下保存。脾脏指数=脾脏质量(mg)/大鼠体质量(g)。

1.7 Western Blot 法检测大鼠关节滑膜组织 mPGES-1 蛋白的表达 取大鼠滑膜组织加入液氮捣碎后，再加入 RIPA 裂解液，待裂解完成后以 14 000 rpm/min 离心 15 min，取上清液进行蛋白定量后加入蛋白上样缓冲液煮沸，并于-20℃ 保存。后期按照表 2 中 Western blot 详细步骤检测 mPGES-1 蛋白表达。最后用 ImageJ 软件进行结果分析。

表 2 Western blot 详细步骤

内容	操作
提蛋白	在黄铜罐中加入大鼠爪子和少量液氮，捶打至粉末，用预冷药匙将粉末装于 EP 管中，加入 500 μl 的 RIPA 裂解液，放冰上 60 min，将其放入离心机中离心 15 min；取上清液 300 μl 进行 BCA 法测定蛋白含量，定量后加入蛋白上样缓冲液与蛋白样品混匀后煮沸，保存至-20℃冰箱
制胶	将洁净的玻璃板固定在固定架上，按照制胶试剂盒说明书制备下层胶并注入玻璃板中至距顶部 1.5 cm 时用水封闭，待其凝固后吸干水分，再根据说明书制备好上层胶后注入凝有下胶的玻璃板中并迅速插入梳子待其凝固
上样	将玻璃板固定于电泳槽中，两板间加入电泳液后取出梳子，在对应孔中加入蛋白样品及 Marker
电泳	加入电泳液后，将调至电压 80 V 电泳 30 min 后，而后调整电压 120 V 电泳约 60 min
转膜	裁剪下适宜大小的 PVDF 膜并放入甲醇中活化 2 min，按照由下至上黑孔板→海绵→滤纸→凝胶→PVDF 膜→滤纸→海绵→白孔板的顺序固定并安装好电转装置，并在电泳槽内放入冰袋，快速加入电转液至 2/3 处
电转	冰水浴中 400 mA 电转 1.5 h
封闭	快速封闭液 160 转震荡封闭 25 min
孵育	一抗 4℃孵育过夜后，再放入装有冰袋的泡沫箱中避光 120 转震荡孵育 40 min
洗涤	回收一抗，用适量 1×TBST 180 转震荡洗涤 7 次，5 min/次
孵育	对应二抗室温 120 转震荡孵育 1 h
洗涤	回收二抗，用适量 1×TBST 180 转震荡洗涤 7 次，5 min/次
显影	按照说明书配制显影液，用移液枪吸取显影液冲洗 PVDF 膜约 8 次，在发光仪上曝光观察条带情况

1.8 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析，计量数据资料服从正态分布用($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，若为方差齐的组

间比较，则用 LSD 法；若为方差不齐的组间比较，则用 Tamhane 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HZC 对 CIA 大鼠足肿胀度的影响 与正常组大鼠比较,模型组大鼠足肿胀程度明显且伴随着关节变形肿大,HZC 组和 MTX 组大鼠未见明显足肿胀和关节变形,见图 1。模型组给药后第 14、21 天足肿胀厚度高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),而 HZC 组和 MTX 组给药后第 14、21 天足肿胀厚度低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

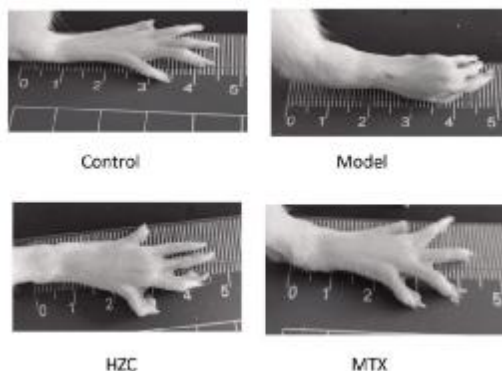


图 1 HZC 对 RA 大鼠足肿胀的影响

表 3 各组大鼠足肿胀情况比较($\bar{x}\pm s$,mm)

组别	n	给药前	给药后第 7 天	给药后第 14 天	给药后第 21 天
正常组	6	6.52±0.71	6.19±0.80	6.18±0.27	6.59±0.32
模型组	6	6.92±0.24	7.42±1.32	8.88±1.49 ^a	9.61±1.83 ^a
HZC 组	6	6.72±0.15	6.42±0.81	7.30±1.55 ^b	8.00±2.17 ^b
MTX 组	6	6.58±0.42	7.06±1.42	7.02±1.84 ^b	6.78±1.42 ^b

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 HZC 对 CIA 大鼠脾指数的影响 模型组脾指数高于正常组、HZC 组、MTX 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

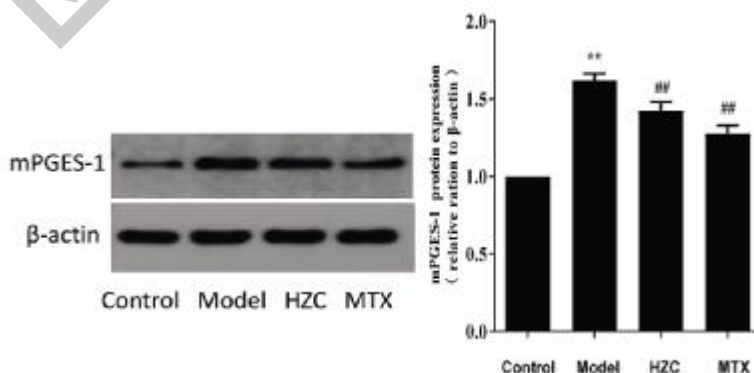
2.3 Western blot 测量大鼠关节滑膜组织 mPGES-1

蛋白表达 与正常组比较,模型组大鼠关节滑膜组织 mPGES-1 蛋白表达上升($P<0.05$);与模型组比较,HZC 组和 MTX 组 mPGES-1 蛋白表达下调($P<0.05$),见图 2。

表 4 各组大鼠脾指数比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	脾指数
正常组	6	2.19±0.41 ^b
模型组	6	2.74±0.26 ^a
HZC 组	6	2.15±0.33 ^b
MTX 组	6	2.36±0.56 ^b

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。



注:与正常组比较,^{**} $P<0.05$,与模型组比较,^{##} $P<0.05$ 。

图 2 HZC 对 RA 大鼠滑膜 mPGES-1 蛋白表达的影响

3 讨论

本实验采用的是牛Ⅱ型胶原诱导 CIA 大鼠模型,其各项特征与人类 RA 非常相似,因此是筛选和研究治疗 RA 药物的理想动物模型。RA 是一种严重影响人类健康的慢性炎症性自身免疫性疾病,也是结缔组织中炎性关节损害最常见的疾病之一^[15]。临床研究中,甲氨蝶呤(MTX)对类风湿性关节炎患者具有肯定的治疗作用^[16],故本试验选取 MTX 作为阳性对照药物。大鼠造膜成功后,大鼠足趾肿胀,足垫增厚变肿胀;H2C 组和 MTX 组足肿胀得到减轻,这初步证明了 H2C 对 RA 具有一定的抗炎和治疗作用。脾脏是机体的免疫器官^[17],脾脏指数可以反映动物机体免疫功能,目前已被广泛用于评价实验动物的免疫状态。该实验研究结果发现,H2C 对大鼠的脾指数有影响作用,与模型组比较,其可改善脾指数,表明 H2C 对 CIA 大鼠有一定保护作用。

mPGES-1 是 3 种前列腺素 E₂ 合酶之一,能被致炎因子诱导而大量表达,在多种炎症疾病中,如关节炎的病理生理过程中发挥着重要作用。在炎症中,mPGES-1 是催化 PGE₂ 生物合成的终端酶,目前有研究认为抑制 mPGES-1 是控制 RA 的重要手段之一^[18-20]。本实验结果初步证明,H2C 能有效降低 RA 大鼠滑膜组织 mPGES-1 蛋白表达,提示 H2C 可能通过抑制 mPGES-1 蛋白的高表达以减轻 CIA 大鼠足肿胀炎症反应,进而发挥抗 RA 的作用。

综上所述,H2C 对 RA 大鼠滑膜组织中高表达的蛋白具有明显抑制作用。

参考文献:

[1]王鑫,马芳,周彩云,等.房定亚教授中西医结合治疗类风湿性关节炎临证经验[J].中国中西医结合杂志,2022,42(9):1140-1142.
[2]雷超,张强,王志飞,等.复方夏天无片治疗类风湿性关节炎的临床综合评价[J].中草药,2022,53(21):6810-6819.
[3]叶华,苏茵,李茹,等.早期类风湿性关节炎分类标准的全国多中心临床验证[J].中华风湿病学杂志,2014,18(12):802-805.
[4]van Delft MAM,Huizinga TWJ.An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis[J].J Autoimmun,2020,110:102392.
[5]赵越,晏菁遥,黄闰月,等.近十年治疗类风湿性关节炎文献的中医证候分布与遣方用药规律分析[J].中华中医药学刊,2019,37(9):2168-2177.
[6]Siegel P,Tencza M,Apodaca B,et al.Effectiveness of Occupational Therapy Interventions for Adults With Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review[J].Am J Occup Ther,2017,71(1):

7101180050p1-7101180050p11.

[7]England BR,Yun H,Chen L,et al.Influence of Multimorbidity on New Treatment Initiation and Achieving Target Disease Activity Thresholds in Active Rheumatoid Arthritis: A Cohort Study Using the Rheumatology Informatics System for Effectiveness Registry [J].Arthritis Care Res (Hoboken),2023,75(2):231-239.
[8]Voulgari PV.Emerging drugs for rheumatoid arthritis[J].Expert Opin Emerg Drugs,2008,13(1):175-196.
[9]朱铭,王伟杰.从五脏痹的心痹探讨类风湿性关节炎的心脏损害诊治[J].浙江临床医学,2021,23(5):747-748.
[10]熊玉萍,郑婵娟.浅析《金匱要略》之中风病[J].中医学,2023,12(8):2165-2169.
[11]祁建华,张会择,杨斐,等.基于《黄帝内经》中“气象医学观”探讨类风湿性关节炎的发病规律[J].中医临床研究,2020,12(19):51-53.
[12]刘杨,姜珊珊,陈向云,等.黑骨藤追风活络胶囊对类风湿性关节炎大鼠 PI3K/AKT/HIF-1 α 通路的作用[J].中国免疫学杂志,2019,35(18):2206-2212.
[13]安兰兰,刘育辰,刘刚,等.苗药黑骨藤研究进展及其质量标志物的预测分析[J].中华中医药学刊,2021,39(1):136-141.
[14]刘卓枫,梁江,陈大琳,等.黑骨藤追风活络胶囊联合枸橼酸托法替布治疗寒痹证类风湿性关节炎短期疗效达标预测模型的建立研究[J].风湿病与关节炎,2022,11(5):10-15.
[15]陈朴阳,刘涛,范凯健.类风湿性关节炎的生物标志物及其测定[J].医学信息,2020,33(15):37-39,43.
[16]卓勤,魏璐.甲氨蝶呤联合防己黄芪汤治疗类风湿性关节炎的效果及对患者生活质量的影响[J].医学信息,2021,34(24):150-153.
[17]潘杭,朱向情,何洁,等.骨髓间充质干细胞对衰老猕猴胸腺及脾脏结构和功能的影响[J].中国组织工程研究,2023,27(19):2953-2959.
[18]Wang Q,Li Y,Wu M,et al.Targeting microsomal prostaglandin E synthase 1 to develop drugs treating the inflammatory diseases [J].Am J Transl Res,2021,13(1):391-419.
[19]Yasmen N,Sluter MN,Li L,et al.Transient inhibition of microsomal prostaglandin E synthase -1 after status epilepticus blunts brain inflammation and is neuroprotective [J].Mol Brain,2023,16(1):14.
[20]Babaoglu ZY,Kilic D.Virtual screening, molecular simulations and bioassays: Discovering novel microsomal prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) inhibitors[J].Comput Biol Med,2023,155:106616.

收稿日期:2023-09-19;修回日期:2023-10-12

编辑/杜帆