

· 论著 ·

苦参碱衍生物抗关节炎作用研究

解方园¹, 王甜甜², 许维恒², 辛宝¹, 周许薇¹, 张国庆¹ (1. 海军军医大学附属东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438; 2. 海军军医大学药学院生化药学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究苦参碱衍生物 M19 对二型胶原诱导性大鼠关节炎(CIA)的治疗作用。方法 将 60 只大鼠随机分为 6 组, 分别为空白组, 模型组, 吡罗美辛治疗组, M19 低、中、高剂量(2.5、5、10 mg/kg)组。采用二型胶原诱导建立关节炎模型, 分别对大鼠足趾肿胀和体重进行测定并对关节炎进行评分, HE 染色观察大鼠关节软骨及滑膜组织病理变化, Micro-CT 观察大鼠骨关节组织损伤情况。结果 苦参碱衍生物 M19 各剂量组均能不同程度降低大鼠关节炎足趾肿胀程度, 增加体重, 抑制大鼠关节炎性细胞浸润和滑膜增生, 并对骨组织具有一定的保护作用。结论 苦参碱衍生物 M19 对二型胶原诱导的关节炎具有一定的治疗作用。

[关键词] 苦参碱衍生物; 类风湿性关节炎; 二型胶原; 大鼠

[中图分类号] R593.22; R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2019)03-0241-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.010

Anti-arthritis effects of matrine derivative in rats

XIE Fangyuan¹, WANG Tiantian², XU Weiheng², XIN Bao¹, ZHOU Xuwei¹, ZHANG Guoqing¹ (1. Department of Pharmacy, Shanghai Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the therapeutic effects of matrine derivative M19 on type II collagen-induced arthritis (CIA) in rats. **Methods** Sixty rats were randomly divided into six groups: blank group, model group, indomethacin treatment group, M19 low, medium and high dose groups (2.5, 5, 10 mg/kg). The paw swelling, arthritis index (AI) and body weight were measured for CIA rats. The histopathological changes of joints and synovial tissue were observed by HE staining. The bone destruction was observed with micro-CT. **Results** Matrine derivative M19 reduced the paw swelling, increased body weight, inhibited inflammatory cell infiltration, ameliorated synovial tissue and bone destruction in CIA rats. **Conclusion** Matrine derivative M19 has the certain therapeutic effects on CIA.

[Key words] matrine derivative; rheumatoid arthritis; type II collagen; rats

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种发病率较高且难以治愈的自身免疫性疾病,病理特征主要表现为滑膜细胞异常增殖和炎症细胞浸润,形成侵袭性血管翳,侵蚀软骨,导致关节破坏和骨质疏松,具有很高的致残率^[1-2]。除此之外,RA还会引起系统性器官损伤,涉及心脏、肺、肾和动脉等^[3-4]。目前,关于RA的发病机制尚不明确,认为该病是一种T淋巴细胞、滑膜成纤维细胞、树突状细胞以及巨噬细胞共同参与的病理过程^[5]。另外,对于RA的治疗仍然缺乏有效、可靠和低毒的治疗策略。临床上常用于缓解关节炎患者炎症反应的药

物有糖皮质激素(如地塞米松)、缓解病症的抗风湿性药物(如甲氨蝶呤)、非甾体抗炎药(如布洛芬)等,但是长时间使用这些药物会产生严重的副反应,如胃肠道溃疡、骨髓抑制、心脏疾病等^[6]。

苦参碱是豆科槐属植物苦参等中草药的活性成分,临床上主要用于急/慢性肝病的治疗,除此之外,还具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节以及抗病毒等药理活性,但因活性不强限制了其应用^[7-10]。苦参碱衍生物 M19 是 13-甲氨基-18-硫代苦参碱(图 1),研究发现 M19 的抗炎作用显著优于苦参碱,在肝纤维化、内毒素休克、脓毒症以及肿瘤治疗方面均体现出良好的活性,具有广阔的研究和应用空间^[11-15]。但是, M19 在大鼠 CIA 的治疗方面缺少相关的数据支撑,因此,本研究将针对 M19 抗大鼠 CIA 作用进行探索,为 M19 在 RA 治疗方面提供证据。

[作者简介] 解方园, 硕士, 药师, Tel: (021) 81875580, Email: xiefangyuan2013@163.com

[通讯作者] 张国庆, 主任药师, Tel: (021) 81875571, Email: gqzhang@smmu.edu.cn

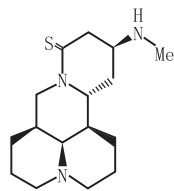


图1 苦参碱衍生物 M19 的化学结构式

1 材料与方法

1.1 材料

牛Ⅱ型胶原(Chondrex 公司);弗氏不完全佐剂 IFA, 10%福尔马林中性缓冲溶液(Sigma 公司);乙酸、吡啶美辛(国药集团化学试剂有限公司);苦参碱衍生物 M19(第二军医大学药学院有机化学教研室)。

1.2 实验动物

Wistar 大鼠,雄性,体重 200 g 左右,购自上海斯莱克实验动物有限公司。实验动物在实验前适应性饲养 1 周,室温(25±2)℃,相对湿度 40%~60%,自由进食及饮水。所有操作均严格按照《第二军医大学实验动物管理指南》执行。

1.3 胶原乳剂的配制

用预冷的 10 mmol/L 乙酸溶液溶解牛Ⅱ型胶原(溶解极慢,可 4℃ 冷藏过夜溶解),配成浓度为 2 mg/ml 的胶原溶液。胶原乳剂配制过程需将该胶原溶液与等体积的 IFA 混合,混匀过程中将胶原溶液逐滴加入 IFA 中,每加入 1 滴用匀浆器中速混合,直至加入全部胶原溶液,提高匀浆速度直至乳剂变为白色。整个过程需要在冰上进行操作,防止胶原变性。将乳剂吸入注射器内,由针尖滴一滴至水中,如 30 s 内乳剂不扩散即表示乳剂配制成功。

1.4 实验分组、建立模型及给药

将 60 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组,分别为空白组,模型组,吡啶美辛治疗组, M19 低、中、高剂量组(2.5、5、10 mg/kg),每组 10 只。采用Ⅱ型胶原诱导建立 RA 模型,模型建立过程中,除空白组外,其余各组均需进行 2 次免疫。初次免疫于大鼠距尾部 1.5 cm 处皮内注射 200 μl 胶原乳剂,7 d 后,以相同剂量胶原乳剂进行二次免疫。二次免疫后 7 d 开始给药, M19 低、中、高剂量组分别给予 2.5、5、10 mg/kg 的 M19 溶液灌胃,连续给药 28 d,吡啶美辛治疗组灌胃给药剂量为 2.5 mg/kg,空白组和模型组给予等体积的生理盐水灌胃。

1.5 足趾肿胀容积测定

在大鼠左、右后足趾同一位置进行标记,于二次

免疫后 7 d 开始测量足趾容积,每只测量 3 次取平均值,每隔 3 d 测量 1 次,分别记为 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 d。

1.6 足部炎症评价

以大鼠关节炎指数(AI)为指标评价大鼠足部炎症情况。AI 评分按大鼠多发性关节炎全身病变 5 级评分法进行评分,每 3 d 一次。0 分:无红肿;1 分:小趾关节红斑或轻度肿胀;2 分:指关节和趾跖关节中度肿胀;3 分:踝关节以下的足爪肿胀;4 分:包括踝关节在内的全部足爪肿胀。

1.7 体重测定

各组大鼠分别于二次免疫后 7 d 开始记录体重,观察大鼠体重变化。

1.8 组织病理学检查

初次免疫后第 44 天处死大鼠,取左、右踝关节于 10%福尔马林中性缓冲溶液中固定 7 d;以 10%乙二胺四乙酸脱钙液脱钙 30 d,每周换液 1 次;脱钙后,关节以双蒸水浸洗 2~3 h,每 10 min 更换一次,而后行石蜡包埋切片(厚度 5 μm),HE 染色,于光学显微镜下观察组织病理学变化。

1.9 影像学检查

初次免疫后第 44 天,取各组大鼠麻醉后,对大鼠后肢拍摄 X 线正、侧位片。拍摄条件为 50 kV, 0.08 s。

2 结果

2.1 一般观察

模型大鼠于二次致敏后 7 d 开始出现关节炎症状,主要表现为渐行性踝关节和足趾肿胀,后期出现畸形和强直。发病大鼠无法负重,行动迟缓,进食减少,体重增长缓慢。

2.2 M19 对Ⅱ型胶原诱导性关节炎足趾肿胀及关节炎评分的影响

如图 2 所示,与空白组相比,模型组大鼠足趾肿胀程度显著增加;与模型组相比,阳性药吡啶美辛组大鼠足趾肿胀程度显著降低, M19 各组同样可以缓解 CIA 大鼠足趾肿胀,并且随着剂量的增加,治疗效果逐渐增强。足趾肿胀容积测定结果显示,与模型组相比, M19 中、高剂量组自 12 d 开始显著降低大鼠足趾肿胀($P<0.01$),低剂量组在 15、27、30 d 时显著降低足趾肿胀($P<0.05$,图 3)。关节炎评分结果与足趾肿胀测定结果趋势一致(图 4)。综上所述表明:苦参碱衍生物 M19 能够降低 CIA 大鼠足趾肿胀程度,并呈一定的量效关系。



图2 关节炎大鼠的后爪照片

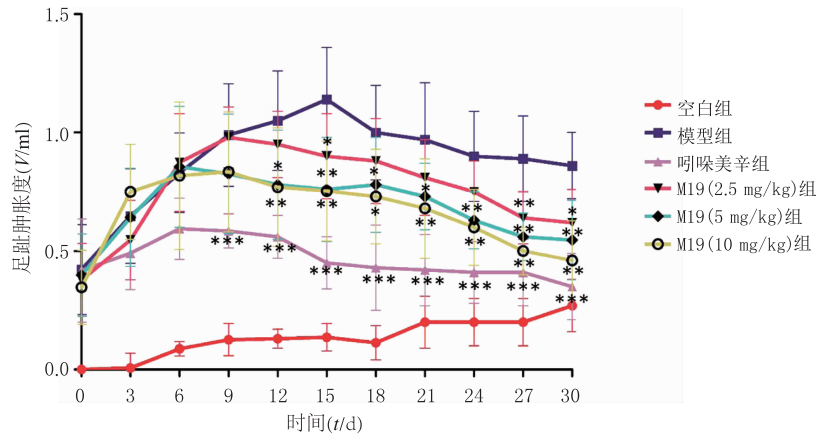


图3 苦参碱衍生物 M19 对关节炎大鼠足趾肿胀度的影响 ($n=10$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$,与模型组比较

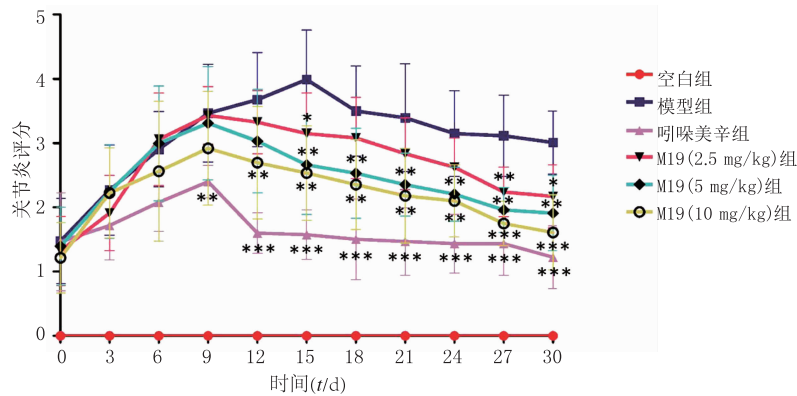


图4 苦参碱衍生物 M19 对大鼠关节炎评分的影响 ($n=10$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$,与模型组比较

2.3 M19 对关节炎大鼠体重的影响

如图5所示,与空白组相比,模型组大鼠的体重显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,吲哚美辛组大鼠体重自第9天开始显著增加($P<0.05$),M19

高剂量组自第15天开始显著增加($P<0.05$),M19低、中剂量组虽然均有增加,但无统计学意义。结果表明苦参碱衍生物 M19 高剂量(10 mg/kg)能够增加 CIA 大鼠体重。

2.4 M19 对关节炎大鼠病理组织学变化的影响

大鼠踝关节 HE 染色结果显示(图 6),空白组大鼠关节软骨表面光滑、完整,滑膜细胞排列整齐,无炎症细胞浸润。模型组大鼠关节滑膜表面出现大量炎症细胞浸润,出现血管翳,关节软

骨被侵蚀破坏。吲哚美辛组大鼠关节表面光滑、完整,炎症细胞浸润减少,出现较少的血管翳。M19 各剂量组均能够不同程度地减少大鼠关节组织增生和炎症细胞浸润,抑制软骨侵蚀和血管翳形成。

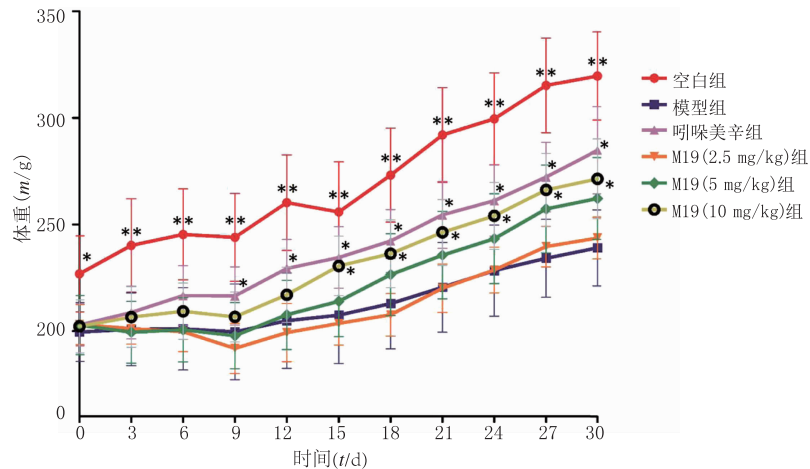


图 5 苦参碱衍生物 M19 对关节炎大鼠体重变化的影响($n=10$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较

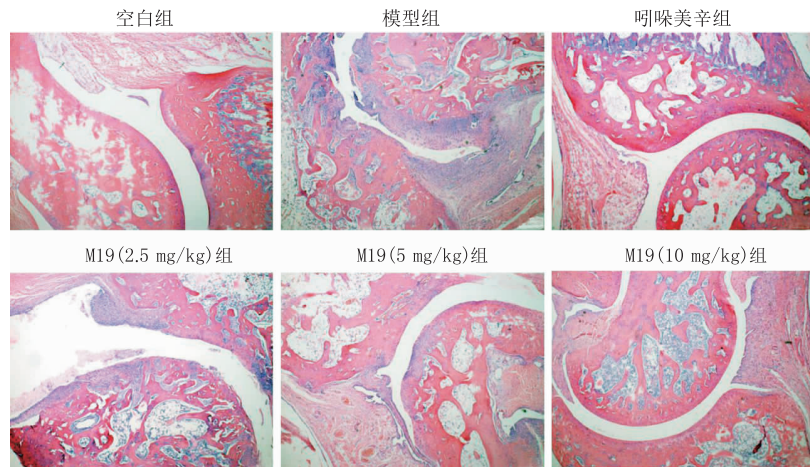


图 6 苦参碱衍生物 M19 对关节炎大鼠病理组织学变化的影响($40\times$)

2.5 M19 对关节炎大鼠骨组织损伤的影响

经 Micro-CT 系统扫描及三维重建获得大鼠后爪 CT 图像(图 7),结果显示,空白组大鼠骨关节间隙清晰,形状规则,排列整齐有序,骨质坚韧完整。模型组大鼠出现明显的组织破坏、关节间隙模糊、狭窄,形成大量的椭圆形或圆形骨赘,骨质侵蚀,关节完整性被破坏。与模型组大鼠相比,吲哚美辛组大鼠关节破坏程度明显改善,关节间隙较为清晰,骨赘减少,骨质侵蚀程度也得到较大改善。M19 各剂量组均能够不同程度地减少大鼠骨关节的破坏,减少骨赘形成,缓解骨质侵蚀状况。

3 讨论

RA 是一种以关节滑膜慢性炎症为主要病理表

现的慢性、系统性自身免疫性关节疾病,在我国 RA 的发病率较高。滑膜炎持久反复发作,可导致关节内软骨和骨的破坏,关节功能障碍,甚至残废。CIA 是一种免疫性炎症,主要表现为关节局部炎症细胞大量浸润、滑膜增生,关节软骨和骨组织破坏,其症状及病理学改变与人 RA 极其相似,是研究 RA 的良好动物模型^[1-2]。

前期筛选发现,M19 作为苦参碱的衍生物,较苦参碱具有更强的抗炎作用。本研究主要针对 M19 对 CIA 大鼠的保护作用进行探索。足趾肿胀是关节炎最直接的外在表现,是常见的评估指标。本实验研究发现不同剂量的 M19 均能够抑制关节炎大鼠的足趾肿胀程度,并且对肿胀疼痛引起的体重增加缓慢具有一定的缓解作用。Micro-CT 结果显

示, M19 能够减少局部炎症引起的骨质侵蚀和破坏, 对关节炎的发病进程具有缓解和抑制作用。病理学检查发现, M19 能够减少炎症细胞浸润, 抑制滑膜细

胞增生, 从而降低软骨和其他骨组织的破坏程度。综上所述结果表明, M19 可抑制大鼠关节炎反应、关节周围骨丢失以及关节侵蚀, 具有潜在的应用价值。

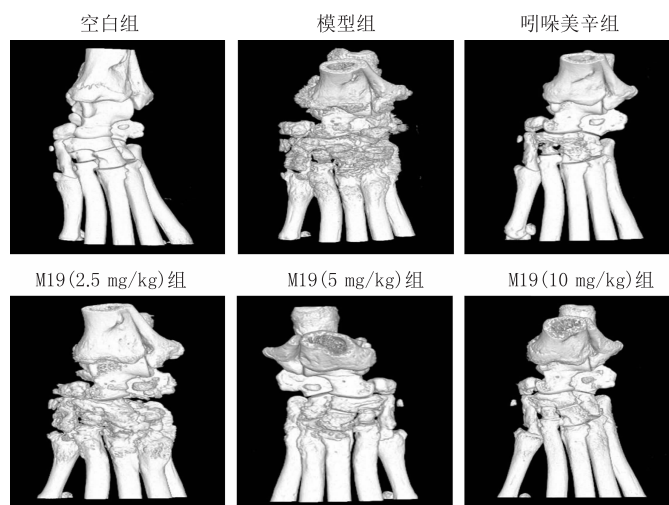


图7 经 Micro-CT 系统扫描及三维重建的关节炎大鼠后爪照片

关节组织炎症是淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞以及滑膜成纤维细胞综合作用的结果。M19 作用广泛, 不仅具有显著的抗炎作用, 还具有一定的免疫调节活性, 除此之外, 还能抑制破骨细胞的生成^[16-17]。至此, M19 抑制关节炎发展的具体作用环节和主要作用靶细胞尚不清楚, 值得进一步研究。

【参考文献】

- [1] UHLIG T, MOE R H, KVIEN T K. The burden of disease in rheumatoid arthritis [J]. *Pharmacoeconomics*, 2014, 32(9): 841-851.
- [2] BARTOK B, FIRESTEIN G S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.
- [3] KIM S C, SOLOMON D H, LIU J, et al. Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis: initiating disease-modifying antirheumatic drugs [J]. *Am J Med*, 2015, 128(5): 539. e7-17.
- [4] LIU H M, WANG K J. Therapeutic effect of Captopril on rheumatoid arthritis in rats [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(12): 996-999.
- [5] 周静, 张弦, 钱海兵. 类风湿性关节炎发病机制的研究进展[J]. *贵阳中医学院学报*, 2014, 36(5): 44-47.
- [6] 梁燕, 邹豪. 类风湿性关节炎药物治疗研究进展[J]. *海军医学杂志*, 2014, 35(4): 332-333.
- [7] LIU N, KAN Q C, ZHANG X J, et al. Upregulation of immunomodulatory molecules by matrine treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(3): 470-476.
- [8] SUN N, WANG Z W, WU C H, et al. Antiviral activity and underlying molecular mechanisms of matrine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus *in vitro* [J]. *Res Vet Sci*, 2014, 96(2): 323-327.
- [9] WANG Y, ZHANG S, LIU J, et al. Matrine inhibits the invasive and migratory properties of human hepatocellular carcinoma by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1): 911-919.
- [10] KAN Q C, LV P, ZHANG X J, et al. Matrine protects neuroaxon from CNS inflammation-induced injury [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(1): 124-130.
- [11] HU H, WANG S, ZHANG C, et al. Synthesis and *in vitro* inhibitory activity of matrine derivatives towards pro-inflammatory cytokines [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(24): 7537-7539.
- [12] XU W H, HU H G, TIAN Y, et al. Bioactive compound reveals a novel function for ribosomal protein S5 in hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis [J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 648-660.
- [13] XU J, WANG K Q, XU W H, et al. The matrine derivative MASM prolongs survival, attenuates inflammation, and reduces organ injury in murine established lethal sepsis [J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(11): 1762-1772.
- [14] LIU Y, QI Y, BAI Z H, et al. A novel matrine derivative inhibits differentiated human hepatoma cells and hepatic cancer stem-like cells by suppressing PI3K/AKT signaling pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(1): 120-132.
- [15] 倪晨旭, 齐阳, 许维恒, 等. 苦参碱衍生物 M19 对于肿瘤细胞转移的抑制作用[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(21): 3341-3344.
- [16] CHEN X, ZHI X, CAO L, et al. Matrine derivative MASM uncovers a novel function for ribosomal protein S5 in osteoclastogenesis and postmenopausal osteoporosis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(9): e3037.
- [17] XU J, QI Y, XU W H, et al. Matrine derivative MASM suppresses LPS-induced phenotypic and functional maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36: 59-66.

【收稿日期】 2018-11-08 【修回日期】 2018-12-19

【本文编辑】 李睿旻