

· 基础研究 ·

蛇肽保健酒对小鼠佐剂性关节炎的影响*

曹娟娟, 和七一, 赵瑛, 张荣春, 魏世蓉, 邹家丽, 邓可宣, 余晓东[△]

(重庆市动物生物学重点实验室/重庆市生物活性物质工程研究中心/重庆师范大学生命科学院 400047)

摘要:目的 研究蛇肽保健酒对小鼠佐剂性关节炎(AA)的影响。方法 将健康雄性昆明种小鼠随机分为 6 组,即对照组、模型组、阳性对照组(1 mg/kg 地塞米松)、酒基组(10 mL/kg)、蛇肽保健酒低剂量组(8.3 mL/kg)和高剂量组(33.2 mL/kg);每隔 7 d 分别测定小鼠右后足趾、踝关节直径和体质量,实验第 34 天处死小鼠,进行脾脏指数、血清循环免疫复合物(CIC)水平的测定。结果 蛇肽保健酒低剂量组对降低 AA 小鼠的血清 CIC 水平效果显著($P < 0.05$),对降低足趾和踝关节肿胀度、脾脏指数效果均极显著($P < 0.01$)。结论 蛇肽保健酒对小鼠佐剂性关节炎具有抑制作用。

关键词:蛇肽保健酒;佐剂性关节炎;脾脏指数;肿胀度;小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3395-03

The effects of venom peptide liquor on adjuvant arthritis in mice*

Cao Juanjuan, He Qiye, Zhao Ying, Zhang Rongchun, Wei Shirong, Zou Jiali, Deng Kexuan, Yu Xiaodong[△]

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology/Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance/College of Biological Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: Objective To investigate effect of the venom peptide liquor on adjuvant arthritis(AA) in mice. **Methods** The male Kunming mice were randomly divided into 6 groups, named as the control group, model group, positive control group(1 mg/kg dexamethason), wine group(10 mL/kg), low dosage of venom peptide liquor group(8.3 mL/kg) and high dosage of venom peptide liquor group(33.2 mL/kg); the right toes, ankle diameter and whole body weight were measured at 7-day intervals; the spleen index, serum level of circulating immune complexes(CIC) were determined after the thirty-fourth day when the mice was put to death. **Results** The level of CIC in AA mice decreased significantly($P < 0.05$), the decrease of spleen index and the reduction of toe and ankle swelling in the low dose group were significant($P < 0.01$). **Conclusion** The venom peptide liquor exhibited apparent inhibitory effect on AA in mice.

Key words: venom peptide liquor; adjuvant arthritis; spleen index; swelling; mice

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性全身性自身免疫性疾病,病理基础为关节滑膜炎,公认的 RA 发病的中心环节是树突状细胞(Dendritic cells, DCS)介导自身反应性 T 细胞的异常活化^[1]。因临床表现复杂多样,加上风湿因子(rheumatoid factor, RF)特异性较差,在其他自身免疫性疾病甚至正常人血清中都检测得到,最终因不能及时治疗而致关节功能障碍,致残率较高,严重危害了人类的身体健康^[2-4]。中国传统医学认为毒蛇及其毒性成分有祛风解毒、镇痛止痛的功效,能治疗风湿痛、四肢麻木、半身不遂等症^[5]。本实验室研制开发的蛇肽保健酒,肽浓度 18 mg/100 mL,乙醇浓度为 35%,具有提高机体免疫能力、增强机体性功能、延缓衰老和抗疲劳等功效^[6]。佐剂性关节炎(adjunctive arthritis, AA)小鼠是目前广泛应用的类风湿性关节炎模型之一。该模型以多发性关节炎为特征,原发病变主要是局部急性炎症反应,并于致炎后一段时间出现继发病变,同时出现以细胞免疫变化为主的免疫功能紊乱^[7]。本研究以 AA 小鼠为模型,研究蛇肽保健酒对 AA 小鼠足趾和踝关节肿胀度、体质量、脾脏指数以及血清循环免疫复合物(CIC)水平的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料 昆明种健康雄性成年小鼠 60 只,体质量(20 ± 2)g;蛇肽保健酒,酒基,弗氏完全佐剂(FCA),地塞米松片,硼酸缓冲液,聚乙二醇;浓缩仪,电子游标卡尺,电子分析天平,酶

标仪。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药方式 将 60 只小鼠随机分为 6 组,即对照组、模型组、酒基组、蛇肽低剂量组和高剂量组、阳性对照组,每组 10 只。除对照组注射生理盐水外,在其他各组小鼠右后足跖皮内注射弗氏完全佐剂(FCA)0.02 mL 诱导炎症发生。造模成功后第 2 天至 34 d,开始对小鼠进行灌胃,每只小鼠每天 1 次,每次 0.2 mL。阳性对照组以 1 mg/kg 地塞米松进行灌胃,酒基组按 10 mL/kg 灌胃,蛇肽保健酒组分别按 8.3 mL/kg(低剂量)、33.2 mL/kg(高剂量)灌胃,对照组和模型组用纯净水对小鼠进行灌胃。

1.2.2 AA 小鼠足趾和踝关节肿胀度的测定 在造模后第 2、10、18、26、34 天用电子游标卡尺测定各组小鼠右后肢足趾和踝关节直径。

1.2.3 小鼠体质量和脾脏指数的测定 在造模后第 2、10、18、26、34 天分别称量小鼠体质量。于末次给药 24 h 后,称量体质量。之后脱颈处死小鼠,剖解剥离脾脏,称取脾脏质量,以脾脏质量比小鼠的质量作为脾脏指数。

1.2.4 CIC 的测定 造模后第 34 天,小鼠眼球取血,离心(3 000 r/min, 10 min)分离血清,血清用 2 倍体积 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH=8.4)稀释备用。测定管与对照管各加稀释血清 30 μL,测定管加入 4.1%聚乙二醇溶液 300 μL,对照管加

* 基金项目:重庆市高校优秀成果转化重点资助项目(jkzh08213)。

作者简介:曹娟娟(1985~),硕士,主要从事动物毒素研究。△ 通讯

表 1 蛇肽酒对 AA 小鼠右后足趾肿胀度的影响 (mm, $\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 10 天	第 18 天	第 26 天	第 34 天
对照组	2.29±0.02	2.29±0.02	2.16±0.04	2.36±0.04	2.44±0.07	2.45±0.01
模型组	2.33±0.02	3.65±0.17 ^c	3.33±0.10 ^c	3.77±0.07 ^c	3.60±0.24 ^c	3.54±0.08 ^c
酒基组	2.32±0.04	3.67±0.14 ^c	3.27±0.10 ^c	3.64±0.06 ^c	3.42±0.11 ^c	3.43±0.07 ^c
蛇肽低剂量组	2.30±0.06	3.50±0.07 ^c	3.28±0.07 ^c	3.63±0.09 ^c	3.12±0.09 ^{bc}	2.92±0.06 ^{bc}
蛇肽高剂量组	2.30±0.06	3.62±0.14 ^c	3.16±0.08 ^c	3.77±0.06 ^c	3.43±0.10 ^c	3.35±0.10 ^c
阳性对照组	2.29±0.09	3.76±0.07 ^c	3.14±0.09 ^c	3.40±0.18 ^{ac}	3.09±0.15 ^{ac}	3.18±0.08 ^{ac}

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较; ^c: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2 蛇肽酒对 AA 小鼠右后踝关节肿胀度的影响 (mm, $\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 10 天	第 18 天	第 26 天	第 34 天
对照组	3.41±0.09	3.35±0.10	3.26±0.03	3.51±0.08	3.35±0.02	3.29±0.08
模型组	3.35±0.04	4.24±0.10 ^c	4.12±0.12 ^c	4.43±0.09 ^c	4.21±0.10 ^c	4.25±0.07 ^c
酒基组	3.52±0.05	4.31±0.08 ^c	3.95±0.10 ^c	4.38±0.09 ^c	3.92±0.09 ^a	3.88±0.10 ^b
蛇肽低剂量组	3.43±0.07	4.32±0.07 ^c	4.04±0.07 ^c	4.43±0.10 ^c	3.97±0.06 ^a	3.82±0.08 ^b
蛇肽高剂量组	3.51±0.05	4.26±0.03 ^c	3.90±0.06 ^c	4.32±0.06 ^c	4.02±0.06 ^a	4.00±0.07 ^a
阳性对照组	3.50±0.05	4.40±0.05 ^c	3.96±0.11 ^c	4.07±0.11 ^a	3.93±0.03 ^a	3.90±0.12 ^a

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较; ^c: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 3 蛇肽酒对 AA 小鼠体重的影响 (g, $\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 10 天	第 18 天	第 26 天	第 34 天
对照组	18.92±0.59	20.79±0.63	27.93±1.16	32.98±0.97	36.55±1.18	37.62±1.20
模型组	19.00±0.30	20.43±0.43	27.34±0.73	32.44±1.71	34.74±2.04	35.93±2.31
酒基组	20.08±0.35	21.40±0.31	26.22±0.88	31.99±1.36	35.56±1.21	36.81±1.11
蛇肽低剂量组	19.50±0.70	20.86±0.39	26.74±1.27	34.21±1.56	38.16±1.61 ^a	39.80±1.83 ^a
蛇肽高剂量组	19.33±0.49	20.82±0.47	25.82±1.04	32.50±0.97	36.27±1.04	37.68±1.38
阳性对照组	19.42±0.47	21.00±0.56	26.23±0.99	28.95±1.93	33.68±1.43	33.33±0.67

^a: $P < 0.05$, 与阳性对照组比较。

入上述硼酸缓冲液 300 μ L, 混匀后 4℃ 放置 1 h。用酶标仪以 495 nm 波长测定各管吸光度 (A) 值, 检测结果表示为测定管 A_{495nm} - 对照管 A_{495nm} 。

1.3 统计学处理 数据分析采用 SPSS17.0 统计分析软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 蛇肽保健酒对 AA 小鼠右后足趾肿胀度的影响 由表 1 可见, 从造模后第 2 天开始, 其他各组小鼠右后足趾肿胀度显著高于对照组 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 从给药后第 17 天即造模后第 18 天开始, 阳性对照组小鼠足趾肿胀明显降低 ($P < 0.05$); 从造模后第 26 天开始, 蛇肽低剂量组小鼠足趾肿胀度显著降低 ($P < 0.01$); 酒基组与蛇肽高剂量组均无显著变化。

2.2 蛇肽保健酒对 AA 小鼠右后踝关节肿胀度的影响 由表 2 可见, 从造模后第 2 天开始, 其他各组小鼠右后踝关节肿胀度显著高于对照组 ($P < 0.01$)。在造模后第 18 天, 阳性对照组小鼠踝关节肿胀度显著降低 ($P < 0.05$); 造模后第 26 天, 蛇肽低剂量组、蛇肽高剂量组、酒基组和阳性对照组小鼠踝关节肿胀度均显著降低 ($P < 0.05$); 造模后第 34 天, 阳性对照组、蛇肽高剂量组小鼠踝关节肿胀度均显著降低 ($P < 0.05$), 蛇肽低剂量组和酒基组小鼠踝关节肿胀度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 蛇肽保健酒对 AA 小鼠体质量的影响 由表 3 可见, 从造模第 18 天开始, 与对照组比较, 阳性对照组体质量增加缓慢, 但未呈现显著性差异; 但蛇肽低剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 第 26 天和第 34 天时, 阳性对照组与蛇肽低剂量

组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 蛇肽保健酒对 AA 小鼠脾脏指数的影响 造模后第 34 天, 测定各组小鼠脾脏指数, 结果显示: 与对照组 (2.90±0.22) 比较, 模型组小鼠的脾脏指数 (4.49±0.08) 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组 (4.49±0.08) 小鼠相比, 阳性对照组 (3.10±0.76) 的脾脏指数显著降低 ($P < 0.05$); 酒基组 (2.35±0.10)、蛇肽低剂量组 (2.60±0.19) 和蛇肽高剂量组 (3.03±0.35) 的脾脏指数均降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 蛇肽保健酒对 AA 小鼠血清 CIC 水平的影响 造模后第 34 天, 测定各组小鼠血清 CIC 指数, 结果显示模型组 (2.38±1.22) 小鼠血清 CIC 指数显著高于对照组 (0.52±0.10) ($P < 0.05$); 与模型组相比, 蛇肽低剂量组 (0.65±0.14) 和阳性对照组 (0.37±0.09) 的小鼠血清 CIC 指数均显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

3.1 蛇肽保健酒对 AA 小鼠踝关节和右后足趾肿胀度的影响 有研究发现眼镜蛇毒素低、中、高剂量 (2、10、50 μ g/kg) 对大鼠右足踝关节肿胀均无显著的抑制作用^[8]。然而本研究发现: 在足趾肿胀方面, 阳性对照组效果显著, 蛇肽低剂量组效果极显著。在踝关节肿胀方面, 阳性对照组有显著抑制效果, 但蛇肽低剂量组效果极显著, 效果强于阳性对照组。从而说明蛇肽保健酒可明显减轻关节炎外在症状, 可出现受累关节肿胀减轻, 防止组织局部组织损伤, 对关节损伤有修复效应^[9]。但同时, 酒基组小鼠踝关节肿胀度也有显著性降低。分析其原因: 乙醇可以通过增强先天免疫系统细胞的功能来调节免疫反应, 无论是人或是实验动物, 低浓度乙醇均可能提高其免疫功

能^[10-13],从而进一步减轻踝关节肿胀。研究结果提示:地塞米松起效快,但蛇肽保健酒效果更为明显,且蛇肽含量对抑制肿胀影响较大。

3.2 蛇肽保健酒对 AA 小鼠体质量的影响 与对照组相比较,模型组与阳性对照组小鼠体质量均有下降趋势,且实验过程中发现阳性对照组小鼠不活跃,毛色暗淡,可见地塞米松在治疗关节炎的同时对机体也造成了一定的损伤,不良反应较大。

3.3 蛇肽保健酒对 AA 小鼠脾脏指数的影响 脾脏作为体内最大的淋巴器官,具有储血、调节血量和参与免疫等重要功能。类风湿性关节炎病例的一个特征就是脾脏肿大^[14]。蛇肽高、低剂量组小鼠脾脏肿大均显著减轻,效果与地塞米松组相当。同时酒基对降低脾脏肿胀也有效果,且与蛇肽低、高剂量组结果相似。

3.4 蛇肽保健酒对 AA 小鼠 CIC 的影响 CIC 是 RA 的一个重要检测指标^[9]。本研究发现:仅蛇肽低剂量组与阳性对照组小鼠 CIC 显著降低,并恢复为正常水平。提示蛇肽酒与地塞米松均对调节 AA 小鼠体液免疫发挥作用。

综合以上 5 个测量指标,低剂量蛇肽酒与地塞米松均对 AA 小鼠佐剂性关节炎具有显著的治疗效果,但低剂量蛇肽酒治疗效果更好,且未见不良反应。蛇肽酒对佐剂性关节炎的最佳治疗剂量及其他功效有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 余克强,罗仁.青藤碱对类风湿关节炎患者外周血单核源性树突状细胞趋化因子分泌和受体表达的影响[J].南方医科大学学报,2009,29(4):635-637,641.
- [2] 刘彦虹,卢秀敏.类风湿关节炎自身抗体类风湿因子与抗瓜氨酸化蛋白抗体关系的研究进展[J].国际检验医学杂志,2011,32(9):973-975.
- [3] 王勇,方勇飞,周新,等.青藤碱对佐剂性关节炎大鼠腹腔

巨噬细胞表达细胞因子的影响[J].中华风湿病学杂志,2003,7(7):415-419.

- [4] 陈骏,李文胜,罗兴菊,等.复方蚂蚁酒对大鼠佐剂性关节炎的防治作用及其机制[J].中国医药导报,2013,10(10):12-13,16.
- [5] 刘岱岳,刘鹤华.蛇与蛇毒[N].中国中医药报,2004-03-03.
- [6] 张春荣,余晓东,和七一,等.“蛇毒活性酒”功效的动物实验研究[J].检验医学与临床,2010,7(14):1416-1418.
- [7] 孙晓迪,李银清,赵雨,等.鹿筋胶原对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用[J].中国中药杂志,2009,34(23):3135-3138.
- [8] 张黎明,陈志龙,赵杰,等.眼镜蛇毒素抗类风湿性关节炎实验研究[J].药学实践杂志,2000,18(4):209-211.
- [9] 杨晓军,苗文丽,裴林,等.天星健骨方对佐剂性关节炎大鼠关节指数的影响[J].中医临床研究,2012,4(2):5-6.
- [10] Goral J, Karavitis J, Kovacs EJ. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system[J]. Alcohol,2008,42(4):237-247.
- [11] Mendenhall CL, Theus SA, Roselle GA, et al. Biphasic in vivo immune function after low- versus high-dose alcohol consumption [J]. Alcohol,1997,14(3):255-260.
- [12] Romeo J, Warnberg J, Nova E, et al. Changes in the immune system after moderate beer consumption [J]. Ann Nutr Metab,2007,51(4):359-366.
- [13] Romeo J, Warnberg J, Diaz LE, et al. Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults [J]. J Physiol Biochem,2007,63(2):153-159.
- [14] 文浩平,和七一,邓疆渝,等.五步蛇毒素对大鼠佐剂性关节炎的影响[J].毒理学杂志,2010,24(4):306-308.

(收稿日期:2013-05-26 修回日期:2013-06-10)

(上接第 3394 页)

- [2] Watts P, Grant MH. Cryopreservation of rat hepatocyte monolayer cultures[J]. Hum Exp Toxicol,1996,15(1):30-37.
- [3] Novicki DL, Irons GP, Strom SC, et al. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes[J]. In Vitro,1982,18(4):393-399.
- [4] 杨景山.医学细胞化学与细胞生物技术[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1990:430-441.
- [5] Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, et al. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue [J]. Theriogenology,2004,61(6):1101-1114.
- [6] Cuello C, Sanchez-Osorio J, Alminana C, et al. Effect of the cryoprotectant concentration on the in vitro embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts[J]. Cryobiology,2008,56(3):189-194.
- [7] Chesné C, Guillouzo A. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes: a critical evaluation of freezing and thawing

conditions[J]. Cryobiology,1988,25(4):323-330.

- [8] Li Y, Lu RH, Luo GF, et al. Effects of different cryoprotectants on the viability and biological characteristics of porcine preadipocyte[J]. Cryobiology,2006,53(2):240-247.
- [9] Diener B, Oesch F. Cryopreserved and hypothermically stored rat liver parenchymal cells as metabolizing system in the Salmonella mutagenicity assay [J]. Mutat Res,1995,335(3):309-316.
- [10] 于丽敏.二甲基亚砜与甘油两种冻存保护液对细胞保护作用的比较[J].大连医科大学学报,1995,17(1):6-7.
- [11] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].4版.西安:世界图书出版公司,2001:44.
- [12] 鄂征.组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1994:54-55.
- [13] 王亨,韩超,邱昌伟,等.体外培养奶牛乳腺上皮细胞的形态学观察[J].中国兽医杂志,2007,43(6):15-17.

(收稿日期:2013-05-03 修回日期:2013-06-07)