

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.001

大蒜素对贝赫切特病的治疗作用及机制探讨*

钟建桥¹, 先德海², 廖勇梅¹

(1. 泸州医学院附属医院皮肤科, 四川泸州 646000, 2. 泸州医学院解剖教研室, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨大蒜素对实验性贝赫切特病(BD)的治疗作用及机制。方法 构建 BD 模型鼠, 将其分为实验组、阳性对照组和阴性对照组, 分别鼻饲注入大蒜素、秋水仙碱和生理盐水。肉眼观察治疗前后皮损的变化, ELISA 法检测治疗前后血清 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-4 和化学比色法检测总抗氧化力(T-AOC)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)。结果 模型小鼠背、腹、阴部出现溃疡, IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 MDA 升高, T-AOC、SOD 和 GSH-PX 下降。治疗 20 d 后实验组和阳性对照组小鼠溃疡基本愈合; 30 d 后实验组仅 2 只复发, 阳性对照组有 6 只复发, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后实验组 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-4 较治疗前降低($P < 0.01$), 与阳性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 实验组 T-AOC、SOD 和 GSH-PX 较治疗前升高, MDA 下降($P < 0.01$), 与阳性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 大蒜素是治疗实验性 BD 的有效药物, 可能是通过抑制炎症因子、阻止氧化应激而作用。

关键词: 贝赫切特综合征; 大蒜素; 免疫反应; 氧化应激

中图分类号: R758.69

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)32-4273-03

To investigate the treatment and mechanism of allicin on Behcet's disease*

Zhong Jianqiao¹, Xian Dehai², Liao Yongmei¹

(1. Department of Dermatology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Human Anatomy, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To explore the therapeutic effect and the mechanism of allicin on experimental Behcet's disease (BD). **Methods** BD models were established. Then, model mice were randomly divided into experimental group, positive control group and negative control group, with respectively nasogastric infusion allicin, colchicine and saline respectively. Before and after treatment, the changes of the skin lesions were visually observed. Cytokines of IFN- γ , TNF- α and IL-4 in serum were detected by ELISA analysis, while the markers of T-AOC, MDA, SOD and GSH-PX by chemical colorimetric methods. **Results** After modeling, ulcers appeared on the back, abdomen and genital of model mice with IFN- γ , TNF- α , IL-4 and MDA elevation, while T-AOC, SOD and GSH-PX decrease. Twenty days of treatment later, ulcer on mice in the experimental group and positive control group healed. After 30 days, only two mice in the experimental group recurred, while 6 mice in the positive control group, which showed a significant difference between two groups ($P < 0.05$). After treatment, IFN- γ , TNF- α and IL-4 levels in the experimental group were markedly lower than pretreatment ($P < 0.01$), but no significant difference compared with the positive control group ($P > 0.05$). Meanwhile, T-AOC, SOD and GSH-PX levels in the experimental group were significantly higher than those in the pretreatment, but MDA was lower ($P < 0.01$). In comparison with the positive control group, levels of those markers in the experimental group changed remarkably ($P < 0.05$). **Conclusion** Allicin is an effective drug in the treatment of experimental BD. The therapeutic mechanism of allicin may be the inhibition of inflammatory mediators and prevention of oxidative stress.

Key words: Behcet syndrome; allicin; immune response; oxidative stress

贝赫切特病(Behcet's disease, BD)是一种慢性炎症性多系统血管炎,可累及皮肤黏膜、眼部等多个系统,迄今为止无满意疗法。尽管 BD 的确切机制不清,但大多认为与遗传、感染、免疫及氧化应激等有关,而免疫紊乱和氧化应激在其发病中起了重要作用^[1-2]。大蒜素来源于大蒜,具有调节免疫、抗氧化、抗感染等作用,为 BD 的治疗带来新希望^[3]。尽管大蒜素已被广泛应用于多种疾病,但在 BD 中的治疗研究目前尚未见报道。本研究通过构建 BD 动物模型来观察大蒜素的治疗效果,同时检测血清中免疫炎症因子 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-4 和氧化应激相关指标总抗氧化力(T-

AOC)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)以探讨大蒜素的治疗机制,为 BD 临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 动物为 4~5 周大小的健康雄性 ICR 小鼠,共 40 只,平均体质量约 25 g,由泸州医学院实验动物中心提供; I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)购自武汉病毒研究所;大蒜素(江苏正大清江制药有限公司);秋水仙碱片(云南植物药业有限公司)。UV-1800pc 紫外分光光度计(Mapada)、MODER-680 酶标测试仪(Bio-Rad,美国)、低温冰箱、超净工作台和电热恒温鼓风干

燥箱等。IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、T-AOC、MDA、SOD 和 GSH-PX 试剂盒均购自美国 Millipore 试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 构建 BD 动物模型 选取 40 只健康雄性 ICR 小鼠,分为两组:模型组 30 只、健康对照组 10 只。参照文献[4]用针刺破小鼠耳垂,然后注入 I 型 HSV 1.0 \times 10⁶ U/mL,10 d 1 次,共 2 次,16 周后模型组小鼠均造模成功。健康对照组不作任何处理。造模期间密切观察皮损的变化,并进行摄像。小鼠在室温 20~22 $^{\circ}$ C、12 h 循环光照(每天早晨 8:00 开始)条件下进行喂养。

1.2.2 药物配制、实验分组与治疗 (1)药物配制:将 20 mg/片的大蒜素以生理盐水稀释配制成浓度为 25 μ g/mL;秋水仙碱片(1 mg/片)以生理盐水稀释浓度为 2 μ g/mL。(2)分组:将造模成功的 BD 模型小鼠分为实验组、阳性对照组和阴性对照组,每组各 10 只,分别注入大蒜素、秋水仙碱和生理盐水。(3)治疗方法:实验组每只以 1 mL/d 的剂量(即 25 μ g)经鼻饲管注入大蒜素溶液,每天 1 次,连续 20 d;应用相同方法对阳性对照组每只注入秋水仙碱 1 mL/d(即 2 μ g),阴性对照组每只注入相同量(1 mL/d)的生理盐水。

1.2.3 指标检测 肉眼观察治疗前后鼠皮损变化:分别观察治疗前、治疗结束后以及继续喂养 10 d 后鼠、皮损的变化及复发情况。细胞因子和氧化应激指标:治疗前和治疗 20 d 后分别抽取小鼠晨起空腹静脉血。采用 ELISA 法检测血清中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 的水平,酶标测试仪 450 nm 处读数。化学比色法检测 T-AOC 和 MDA、SOD、GSH-PX 水平,分光光度计 420~630 nm 读数。均严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 BD 动物模型鉴定 经典模型诊断标准包括主要症状和次要症状。主要症状为口腔、生殖器、皮肤的溃疡和眼部损害。次要症状有关节炎、胃十二指肠溃疡和神经系统损害。病理组织变化为真皮层大量以淋巴细胞为主的炎症细胞聚集在血管周围。BD 样小鼠至少要出现一种主要症状和一种次要症状或病理组织变化。如达到上述标准可认为 BD 动物造模成功。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组样本间比较采用 t 检验,多组样本间比较采用方差分析 χ^2 检验。计数资料采用率表示,两组样本复发率比较采用 Fisher 确切概率法。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肉眼观察动物模型的 BD 样症状和组织病理表现 模型组在注射 HSV-1 16 周后 30 只小鼠背部、腹部和外阴处出现大小不一深在溃疡,伴少许渗液或结痂,同时出现不同程度的四肢活动受限(关节炎)。在真皮层可见大量炎症细胞(以淋巴细胞为主)围绕血管周围聚集。而健康对照组皮肤和外阴黏膜未见任何皮损,小鼠活动良好,组织病理表现正常。根据 BD 经典模型诊断标准,本实验已成功构建 BD 动物模型 30 只,见图 1、2。

2.2 大蒜素等治疗 20 d 后鼠皮损肉眼变化和 30 d 后复发情况 治疗 20 d 后,实验组和阳性对照组溃疡完全愈合,可见粉红色新鲜瘢痕及皮肤生长。阴性对照组而部分溃疡增大、加深,伴脓性分泌物。治疗 30 d 后实验组 2 只小鼠背部可见一浅小溃疡;阳性对照组 6 只小鼠背腹部可见散在深浅不一溃

疡;阴性对照组部分溃疡缩小,部分出现新溃疡。治疗 30 d 后实验组复发率为 20%(2/10),阳性对照组为 60%(6/10),两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 大蒜素等治疗前后鼠血清中 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-4 水平变化 造模后模型组 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-4 表达水平较健康对照组明显升高($P<0.01$),见表 1。治疗后实验组和阳性对照组 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-4 表达水平均下降,较治疗前差异有统计学意义($P<0.01$),但两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后阴性对照组 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 表达水平略有下降,但与治疗前比较差异均无统计学意义($P>0.05$);治疗后实验组和阳性对照组分别与阴性对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图 3。

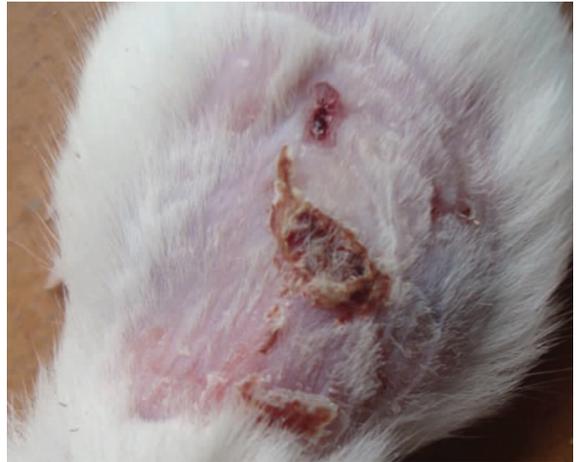


图 1 造模 16 周后模型鼠肉眼表现

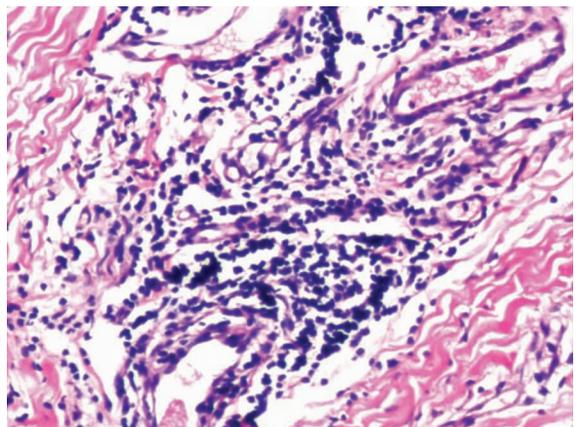


图 2 造模 16 周后模型鼠组织病理表现($\times 200$)

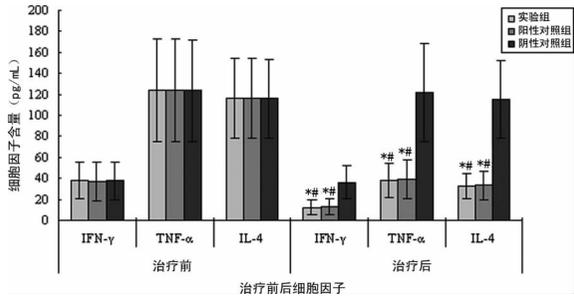
表 1 模型组与健康对照组血清细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	n	IFN- γ	TNF- α	IL-4
模型组	30	37.51 \pm 18.03	123.83 \pm 48.88	116.15 \pm 37.99
健康对照组	30	4.63 \pm 1.89	15.07 \pm 5.23	13.21 \pm 5.05
t		5.71*	6.96*	8.47*

*: $P<0.01$,与健康对照组比较。

2.4 各组治疗前后鼠血清中 T-AOC、MDA、SOD 和 GSH-PX 表达水平变化 造模后模型组 T-AOC、SOD 和 GSH-PX 表达水平较健康对照组降低($P<0.05$),而 MDA 较健康正常对照组升高($P<0.05$),见表 2。治疗后实验组 T-AOC、SOD 和

GSH-PX 表达水平升高,MDA 下降,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.01$);而阳性对照组治疗前后比较仅 SOD 和 GSH-PX 升高明显($P<0.05$),其余指标及阴性对照组与治疗前比较无明显变化($P>0.05$);治疗后实验组 T-AOC、SOD 和 GSH-PX 表达水平较阳性对照组和阴性对照组升高,MDA 降低($P<0.05$),尤以 T-AOC、MDA 差异有统计学意义($P<0.01$);治疗后阳性对照组与阴性对照组两组间比较,其氧化相关指标表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4。



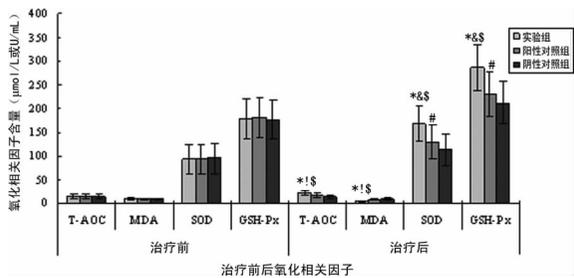
*: $P<0.01$, 与治疗前相应细胞因子比较; #: $P<0.01$, 与阴性对照组同时时间点相应细胞因子比较。

图 3 治疗前后同组、治疗后各组间 IFN-γ、TNF-α 和 IL-4 表达水平比较

表 2 模型组与健康对照组血清氧化物水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T-AOC ($\mu\text{mol/mL}$)	MDA ($\mu\text{mol/mL}$)	SOD (U/mL)
模型组	30	13.61 ± 4.71	8.37 ± 2.09	93.36 ± 30.46
健康对照组	10	18.31 ± 5.06	5.65 ± 1.37	127.65 ± 35.53
t		-2.68*	3.83**	-2.96**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, 与健康对照组比较。



*: $P<0.01$, #: $P<0.05$, 与治疗前相应指标比较;! : $P<0.01$, & : $P<0.05$, 与阳性对照组同时时间点相应指标比较; § : $P<0.01$, 与阴性对照组各指标比较。

图 4 治疗前后同组、治疗后各组间 T-AOC、MDA、SOD 和 GSH-PX 表达水平比较

3 讨论

BD 是一种以血管炎为基本病变的免疫性疾病,可累及全身多系统器官,若治疗不及时可发生致命性的脏器损害。尽管一些传统药物对 BD 有一定疗效,但难以治愈,停药后易复发,长期使用可能会导致严重不良反应^[5]。而近年来采用的 TNF-α 抑制剂等生物制剂虽然治疗 BD 有效,但因其潜在不良反应或昂贵的费用而应用受限^[6]。大蒜素为大蒜的一种活性成分,来源丰富,价廉低廉无不良反应,具有抗氧化、调节免疫等多种药理作用,尤其在防治心血管损伤的相关研究较多^[3,7]。故在大蒜素广泛用于治疗心血管等疾病等安全有效的

启示下,笔者推测大蒜素亦可治疗属血管炎性疾病的 BD,基于这一理论基础本研究对大蒜素在 BD 中的治疗作用及机制进行了探讨^[8]。

为观察大蒜素对 BD 的疗效,笔者成功构建了 BD 动物模型,然后予以大蒜素等治疗,结果发现大蒜素和秋水仙碱均能有效促进小鼠溃疡愈合和新鲜皮肤生长。尤其在治疗 30 d 后,且实验组复发率仅为 20%,而阳性对照组较实验组却有 3 倍的复发率,差异十分明显。初步说明大蒜素具有促进 BD 溃疡愈合,减少复发的作用。

为进一步探讨大蒜素对 BD 的治疗作用机制,本实验又对涉及 BD 发生、发展的重要免疫炎症介质和氧化应激指标进行了研究。通过检测治疗前后相关指标的表达水平发现:造模后小鼠 IFN-γ、TNF-α、IL-4 及 MDA 水平明显升高,而 T-AOC、SOD 和 GSH-PX 显著下降,符合 BD 的发病过程^[9-10]。经大蒜素等治疗后,大蒜素和秋水仙碱能明显降低 IFN-γ、TNF-α 和 IL-4 表达,减轻炎症介质的释放。同时大蒜素能显著增强 T-AOC、SOD 和 GSH-PX 表达,减少 MDA 产生,较秋水仙碱能更好地上调 SOD、GSH-PX 活性、增强抗氧化能力、减少氧化物形成。这可能与大蒜素本身具有抗感染、抗氧化和免疫调节作用,而秋水仙碱仅有免疫抑制而无抗氧化作用等有关;同时由于大蒜素具有抗氧化作用,可阻止氧化应激损伤,秋水仙碱无此作用则使氧化应激状态持续存在,导致损害进一步加重或反复发作,这也解释了为什么大蒜素与秋水仙碱疗效相当,但复发率较低的原因。本实验再次证实大蒜素具有抗氧化应激损伤、减少 ROS 产生、抑制炎症介质释放的作用,这与国内外较多报道结果相一致^[11-12]。此外,在实验中发现秋水仙碱可使 SOD 和 GSH-PX 表达有所升高,但与生理盐水比较差异无统计学意义($P>0.05$),可能与秋水仙碱抑制免疫炎症介质释放导致 SOD 和 GSH-PX 破坏暂时减少,使之一过性升高有关。

综上所述,本研究发现大蒜素对实验性 BD 具有治疗作用,且复发率低于秋水仙碱。其作用机制可能是通过抑制 BD 发病中的一些重要炎症介质的分泌和释放,同时增强抗氧化力、减少氧化物形成,最终阻止 BD 组织细胞损伤。本实验为初步探索,有待进一步临床实验和大样本病例对照实验以证实。

参考文献:

- [1] Kapsimali VD, Kanakis MA, Vaiopoulos GA, et al. Etiopathogenesis of Behcet's disease with emphasis on the role of immunological aberrations [J]. Clin Rheumatol, 2010, 29(11): 1211-1216.
- [2] Bozkart M, Yuüksel H, Em S, et al. Serum prolidase enzyme activity and oxidative status in patients with Behcet's disease [J]. Redox Rep, 2014, 19(2): 59-64.
- [3] Capasso A. Antioxidant action and therapeutic efficacy of allium sativum L [J]. Molecules, 2013, 18(1): 690-700.
- [4] Bang DS, Choi BS, Kwon HJ, et al. Rebamipide affects the efficiency of colchicine for the herpes simplex virus-induced inflammation in a Behcet's disease mouse model [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 598(1/3): 112-117. (下转第 4279 页)

- who are asymptomatic and subjects with patellofemoral pain syndrome[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003(414): 172-182.
- [2] Fulkerson JP, Arendt EA. Anterior knee pain in females [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2000(372): 69-73.
- [3] Lankhorst NE, Bierma-Zeinstra SM, van Middelkoop M. Risk factors for patellofemoral pain syndrome; a systematic review[J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2012, 42(2): 81-94.
- [4] Earl JE, Vetter CS. Patellofemoral pain[J]. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 2007, 18(3): 439-458.
- [5] Crossley K, Bennell K, Green S, et al. A systematic review of physical interventions for patellofemoral pain syndrome [J]. *Clin J Sport Med*, 2001, 11(2): 103-110.
- [6] Fulkerson JP. Diagnosis and treatment of patients with patellofemoral pain[J]. *Am J Sports Med*, 2002, 30(3): 447-456.
- [7] Murphy SB, Kijewski Weiner DS, Cook AJ, et al. Computed tomography in the measurement of femoral anteversion[J]. *Orthopedics*, 1978, 1(4): 299-306.
- [8] Abel MF, Sutherland DH, Wenger DR, et al. Evaluation of CT scans and 3-D reformatted images for quantitative assessment of the hip[J]. *J Pediatr Orthop*, 1994, 14(1): 48-53.
- [9] Arima J, Whiteside LA, McCarthy DS, et al. Femoral rotational alignment, based on the anteroposterior axis, in total knee arthroplasty in a valgus knee; a technical note [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1997, 77(9): 1331-1334.
- [10] Lin YF, Jan MH, Lin DH, et al. Different effects of femoral and tibial rotation on the different measurements of patella tilting; An axial computed tomography study[J]. *J Orthop Surg Res*, 2008, 3: 5.
- [11] Gigante A, Bevilacqua C, Bonetti M, et al. Increased external tibial torsion in Osgood-Schlatter disease[J]. *Acta Orthopaedica*, 2003, 74(4): 431-436.
- [12] Sasaki T, Yagi T. Subluxation of the patella[J]. *International orthopaedics*, 1986, 10(2): 115-120.
- [13] Bennell KL, Bartram S, Crossley K, et al. Outcome measures in patellofemoral pain syndrome; test retest reliability and inter-relationships[J]. *Phys Ther Sport*, 2000, 1: 34-41.
- [14] Haim A, Yaniv M, Dekel S, et al. Patellofemoral pain syndrome; validity of clinical and radiological features [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 451: 223-228.
- [15] 杨滨, 谭洪波, 杨柳, 等. 髌骨横轴-股骨通髌线角在评估髌股关节排列紊乱中的作用[J]. *中华骨科杂志*, 2009, 29(2): 108-111.
- [16] Dejour H, Walch G, Nove-Josserand L, et al. Factors of patellar instability; an anatomic radiographic study [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1994, 2(1): 19-26.
- [17] 隋金颇, 葛帮荣, 杨文锋, 等. 膝关节参数在膝前疼痛中的意义[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(9): 1633-1640.
- [18] Li G, Papannagari R, Nha KW, et al. The coupled motion of the femur and patella during in vivo weightbearing knee flexion[J]. *J Biomech Eng*, 2007, 129(6): 937-943.
- [19] Salsich GB, Perman WH. Patellofemoral joint contact area is influenced by tibiofemoral rotation alignment in individuals who have patellofemoral pain[J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2007, 37(9): 521.
- [20] Collado H, Fredericson M. Patellofemoral pain syndrome [J]. *Clin Sports Med*, 2010, 29(3): 379-398.
- [21] 吴尧平. 复发性髌骨脱位的股骨髌部的旋转畸形[J]. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8(5): 464-466.
- [22] 孙铁铮, 吕厚山, 倪磊, 等. 膝关节骨关节炎患者胫骨扭转角度的异常及临床意义[J/CD]. *中华关节外科杂志: 电子版*, 2007, 1(4): 230-233.
- [23] Csintalan RP, Schulz MM, Woo J, et al. Gender differences in patellofemoral joint biomechanics [J]. *Clin Orthop*, 2002(402): 260-269.
- [24] Lee TQ, Yang BY, Sandusky MD, et al. The effects of tibial rotation on the patellofemoral joint; assessment of the changes in in situ strain in the peripatellar retinaculum and the patellofemoral contact pressures and areas [J]. *J Rehabil Res Dev*, 2001, 38(5): 463-469.

(收稿日期: 2014-03-15 修回日期: 2014-06-20)

(上接第 4275 页)

- [5] Fresko I, Yazici H. Treatment strategies for Behcet's disease [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2009, 9(18): 3211-3219.
- [6] Davatchi F, Moghimi N, Mousavi M, et al. Treatment of Behcet's disease [J]. *Chronic Dis J*, 2013, 1(1): 42-54.
- [7] Chan JY, Yuen AC, Chan RY, et al. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of alliin [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(5): 637-646.
- [8] 林创辉, 潘少奕. 大蒜素联合拜阿司匹林治疗冠心病心绞痛的应用[J]. *中外健康文摘*, 2012, 9(26): 449-450.
- [9] Zhou ZY, Chen SL, Shen N. Cytokines and Behcet's disease [J]. *Autoimmun Rev*, 2012, 11(10): 699-704.
- [10] Onur E, Kabaroglu C, Inanir I, et al. Oxidative stress impairs endothelial nitric oxide levels in Behcet's disease [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2011, 30(3): 217-220.
- [11] Chen W, Qi J, Feng F, et al. Neuroprotective effect of alliin against traumatic brain injury via Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway-mediated anti-inflammatory and anti-oxidative activities [J]. *Neurochem Int*, 2014, 68: 28-37.
- [12] Horev-Azaria L, Eliav S, Izgov N, et al. Alliin up-regulates cellular glutathione level in vascular endothelial cells [J]. *Eur J Nutr*, 2009, 48(2): 67-74.

(收稿日期: 2014-01-20 修回日期: 2014-04-22)