

# 黄芪桂枝五物汤对 CIA 模型大鼠关节滑膜细胞凋亡的影响

刘佳维<sup>1</sup>, 王永辉<sup>1</sup>, 李艳彦<sup>2\*</sup>, 张永刚<sup>2</sup>, 赵乐<sup>3</sup>, 张若楠<sup>1</sup>  
(1. 山西中医学院 基础医学院, 太原 030024; 2. 山西医科大学 药学院,  
太原 030001; 3. 成都中医药大学, 成都 611137)

**[摘要]** **目的:** 研究黄芪桂枝五物汤(HGW)对胶原诱导型关节炎(CIA)模型大鼠关节滑膜细胞凋亡的影响,并探讨其作用机制。**方法:** 选用 SD 大鼠 72 只,随机分为正常组,模型组,HGW 低、中、高剂量组,Tofacitinib(TFN)组,HGW 低、中、高剂量组药物剂量分别为 16,32,64 g·kg<sup>-1</sup>,相当于临床常人用量的 3,6,12 倍,TFN 给药剂量为 15 mg·kg<sup>-1</sup>,正常组、模型组每日给予 10 mL·kg<sup>-1</sup> 蒸馏水。以牛 II 型胶原加弗氏完全佐剂建立 CIA 大鼠模型,经 HGW 治疗 4 周后光镜下观察各组大鼠踝关节病理形态;通过流式细胞术检测白细胞介素(IL)-4,IL-10 含量,免疫组化法检测 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达,DNA 断裂的原位末端标记法(TUNEL)染色检测滑膜细胞的凋亡。**结果:** 与正常组比较,模型组,HGW 低、中、高剂量组,TFN 组大鼠滑膜中 Bcl-2 蛋白表达增多( $P < 0.05$ ),模型组 Bax 蛋白表达减少( $P < 0.05$ );与模型组比较,HGW 高剂量组,TFN 组大鼠滑膜中 Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增多( $P < 0.05$ )。滑膜细胞凋亡可见,与正常组比较,模型组,HGW 低、中、高剂量组,TFN 组滑膜细胞增多,凋亡率下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,HGW 低、中、高剂量组,TFN 组大鼠滑膜细胞凋亡率上升( $P < 0.05$ );与 HGW 低剂量组比较,HGW 高剂量组滑膜细胞凋亡率显著上升( $P < 0.01$ );与 HGW-M 组比较,HGW 高剂量组滑膜细胞凋亡率上升( $P < 0.05$ )。**结论:** 黄芪桂枝五物汤可以促进 RA 大鼠异常亢进的滑膜细胞凋亡。

**[关键词]** 类风湿性关节炎; 黄芪桂枝五物汤; 滑膜细胞; 凋亡; 胶原诱导型关节炎

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0171-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140171

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1404.068.html>

**[网络出版时间]** 2017-04-27 14:04

## Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on Joint Synovial Cell Apoptosis in CIA Rat Models

LIU Jia-wei<sup>1</sup>, WANG Yong-hui<sup>1</sup>, LI Yan-yan<sup>2\*</sup>, ZHANG Yong-gang<sup>2</sup>, ZHAO Le<sup>3</sup>, ZHANG Ruo-nan<sup>1</sup>  
(1. College of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Taiyuan 030024, China; 2. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;  
3. Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Huangqi Guizhi Wuwutang (HGW) on joint synovial cell apoptosis in rat models with collagen induced arthritis (CIA), and explore its mechanism of action. **Method:** The 72 SD rats were randomly divided into 6 groups: normal group (N), model group (CIA), HGW low, medium and high dose groups (HGW-L, M, H), and Tofacitinib group (TFN). The drug doses were 16, 32, 64 g·mL<sup>-1</sup> respectively in HGW-L, HGW-M, HGW-H (16, 32, 64 g·kg<sup>-1</sup>) groups equivalent to 3, 6, 12 times of the dosage for clinical common people; the drug dose of TFN was 15 mg·kg<sup>-1</sup>; 10 mL·kg<sup>-1</sup> distilled water was given daily in normal group and model group. Bovine type II collagen and Freund's complete adjuvant (FCA) were used to build collagen-induced arthritis rat models, and the ankle pathological morphology in rats was observed under

**[收稿日期]** 20161202(015)

**[基金项目]** 山西省基础研究项目(2014011047-1)

**[第一作者]** 刘佳维,在读硕士,从事方证相关物质基础研究,Tel:18434379369,E-mail:276511682@qq.com

**[通讯作者]** \*李艳彦,医学博士,教授,从事方证相关物质基础研究,Tel:1393158720,E-mail:liyy1002@163.com

light microscope after 4 weeks treatment by HGW. Then the contents of IL-10 and IL-4 were detected by flow cytometry. The protein expression levels of Bcl-2 and Bax were detected by immunohistochemistry, and terminal dextrynucleotidyl transferase (TdT) -mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was used to detect the apoptosis of synovial cells. **Result:** As compared with normal group, the protein expression levels of Bcl-2 in synovium were increased in model group, HGW-L, M, H groups and TFN group ( $P < 0.05$ ); the protein expression levels of Bax were reduced in model group ( $P < 0.05$ ). As compared with model group, Bcl-2 protein expression levels were decreased in HGW-H group and TFN group, while Bax protein expressions were increased ( $P < 0.05$ ). Apoptosis of synovial cells was visible, and as compared with normal group, synovial cells were increased in model group, HGW-L, M, H groups and TFN group, with a decreased apoptosis rate ( $P < 0.05$ ). As compared with model group, the apoptosis rate of synovial cells was increased in HGW-L, M, in H groups and TFN group ( $P < 0.05$ ). As compared with HGW-L group, apoptosis rate of synovial cells was significantly increased in HGW-H group ( $P < 0.01$ ); as compared with HGW-M group, apoptosis rate of synovial cells was increased in HGW-H group ( $P < 0.05$ ). **Result:** Huangqi Guizhi Wuwutang can promote the apoptosis of synovial cells with abnormal hyperfunction in RA rats.

[**Key words**] rheumatoid arthritis; Huangqi Guizhi Wuwutang; synovial cells; apoptosis; collagen induced arthritis (CIA)

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)<sup>[1]</sup>是以关节滑膜增生、关节软骨及骨组织破坏为主要表现的慢性系统性免疫性疾病。RA 以滑膜炎<sup>[2]</sup>为主要病理特征,好发于关节,多为对称性,并有软组织肿胀,皮下类风湿结节,血沉增快等全身性病理特征。其中过度增殖的滑膜细胞与炎性细胞及小血管形成血管翳覆盖在软骨面上,影响软骨的营养摄取,更为重要的是滑膜细胞联合炎性细胞分泌多种蛋白酶胶原酶等,对软骨、骨质、进行降解,严重可导致关节功能完全丧失。RA 的常用治疗方法<sup>[3]</sup>包括药物治疗、自体造血干细胞移植、激素、生物制剂、外科手术,副作用大。临床研究发现黄芪桂枝五物汤对 RA 有良好的治疗作用<sup>[4-5]</sup>。前期实验研究发现黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎具有治疗作用,可以有效缓解大鼠关节软骨及骨质破坏<sup>[6]</sup>。有文献报道本方具有较好的抗炎、免疫调节、促进微循环等药理作用,对治疗 RA 有良好的疗效<sup>[7-9]</sup>。黄芪桂枝五物汤为中医经典名方,有益气温经,和血通痹之效,但关于本方治疗 RA 的作用机制尚不清楚。胶原诱导型关节炎(CIA)大鼠模型为目前国内外学者公认的较为成熟的 RA 动物模型<sup>[10]</sup>,本实验通过建立 CIA 大鼠模型,观察黄芪桂枝五物汤对大鼠滑膜细胞凋亡的影响,探讨其可能的作用机制,以期为临床研究提供依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 82 只,体重(180 ± 20)g,来源于北京维通利华实验动物技术有限公

司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,本实验经过山西中医学院实验动物伦理委员会批准,符合实验动物伦理委员会指导原则。

**1.2 试剂及药物** 牛 II 型胶原(Bovine Type II Collagen, C II, Chondrex Inc 公司,批号 150497);完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA, 美国 Sigma 公司,批号 F5881);白细胞介素(IL)-4, IL-10 抗体(美国 BD 公司,批号分别为 5034741, 5082707);B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 BA0412, BA0315-1);4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI, 中国碧云天公司,批号 C1002);DNA 断裂的原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(瑞士 Roche Applied Science 公司,批号 12156792910);Tofacitinib (TFN) 试剂盒(美国 MCE 公司,批号 150303)。黄芪桂枝五物汤由黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣 5 味药物组成,其配方颗粒剂由山西中医学院附属医院提供,由北京同仁堂(集团)有限责任公司生产,批号分别为 6101373, 6100403, 6111173, 6116033, 6120033。

**1.3 仪器** FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司), BX53 型生物显微镜(日本奥林巴斯公司), SORVALL SEGENDT 型离心机(美国 Thermo 公司);BD-2000C 型显微免疫组化图像分析系统(北京启航博达科技有限公司);CFM-300E 电脑型落射荧光显微镜(上海长方光学仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 CIA 模型大鼠的建立** 大鼠适应性喂养 1 周后造模,随机分为正常组(12 只)和模型组(70 只)。将牛 II 型胶原与弗氏完全佐剂 1:1 充分乳化,即胶原质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。于模型组每只大鼠右后足爪、背部、尾根三点各注射乳化剂 0.1 mL,7 d 后以 0.1 mL 乳化剂加强免疫 1 次,以免疫加强当天为第 1 天。

**2.2 模型筛选** 从初次免疫第 1 天起,每日观察四肢肿胀情况,按照 0~4 级进行评分<sup>[11]</sup>,四肢评分之和为关节炎指数(arthritis index, AI),AI 越高,说明关节炎程度越严重。初次免疫后第 14 天进行关节炎指数评分,AI $\geq 4$  即为造模成功,共 60 只,AI 评分不足大鼠剔除。

**2.3 分组及给药** 致炎后第 15 天,将模型组随机分为模型组,HGW 低、中、高剂量组及 TFN 组。将黄芪桂枝五物汤配方颗粒常规煎煮并浓缩药物,按  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重灌胃(ig)给药。HGW 低、中、高剂量组药物剂量分别为 16,32,64  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,相当于临床常人用量的 3,6,12 倍,TFN 药物剂量为  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[11]</sup>,空白组、模型组每日给予  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  蒸馏水 ig,疗程均为 4 周。

**2.4 流式细胞术检测 IL-4,IL-10 水平** 4 周后大鼠称取体重,腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,仰位固定,用肝素抗凝管抽取腹主动脉血后放置  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用,将分装好的标本依次加入抗 IL-4 和抗 IL-10,然后依次加入抗凝全血  $30 \text{ }\mu\text{L}$  混匀,置室温孵育 20 min,后加溶血剂  $50 \text{ }\mu\text{L}$ ,充分混匀后室温闭光 5 min 使红细胞充分溶解,置于离心机以  $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,弃上清,用蒸馏水 1 mL 清洗 2 次,弃上清、重悬细胞加入蒸馏水 1 mL,放入流式细胞仪进行测定。

**2.5 免疫组化法检测 Bax,Bcl-2 蛋白表达** 4 周后摘取大鼠右踝关节,放置 4% 多聚甲醇固定,踝关节依次进行固定、脱钙、脱水、包埋、切片,切片脱蜡、抗原修复;3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育 15 min;用吸水纸吸干玻片组织周围的液体,用油性笔在组织周围画圈,然后滴加稀释好的一抗(1:100), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  湿盒中孵育过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗切片 3 次,每次 3 min,吸水纸吸干切片后滴加聚合物辅助剂,室温或  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min。PBS 冲洗切片 3 次,每次 2 min,吸水纸擦干切片后滴加辣根过氧化物酶标记二抗免疫球蛋白(Ig)G 多聚体,室温或  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 20~30 min。显色、复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透

明,封片,镜下观察并采集图像,采用 BD-2000C 型显微免疫组化图像分析系统分析相关蛋白表达。

**2.6 TUNEL 法检测滑膜细胞凋亡** 石蜡切片脱蜡后,滴加蛋白酶 K 工作液( $10 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $20 \sim 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  反应  $15 \sim 30 \text{ min}$ ,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。制备 TUNEL 反应混合液,处理组用 TdT  $50 \text{ }\mu\text{L}$  + 荧光素标记的 dUTP 液  $450 \text{ }\mu\text{L}$  混匀;阴性组仅加荧光素标记的 dUTP 液  $50 \text{ }\mu\text{L}$ ,DNase 组先加入 DNase I  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ,在  $15 \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min;吸水纸擦干玻片后加 TUNEL 反应混合液  $50 \text{ }\mu\text{L}$ , $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  避光孵育 60 min。用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。显色、封片后在荧光显微镜下观察采集图像,并于光镜下观察踝关节病理学改变,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

**2.7 统计学方法** 应用 SPSS 20.0 软件行单因素方差分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间均数比较采用 LSD-*t* 方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 黄芪桂枝五物汤对大鼠 IL-4,IL-10 水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠 IL-4,IL-10 水平显著降低( $P < 0.01$ );治疗后各组炎症反应降低,与模型组比较,HGW 高剂量组,TFN 组大鼠 IL-4,IL-10 水平明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),HGW 低、中剂量组之间差异无统计学意义;与 HGW 低剂量组比较,HGW 高剂量组,TFN 组大鼠 IL-4,IL-10 水平明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),HGW 高剂量组,TFN 组之间差异无统计学意义。见表 1。

表 1 黄芪桂枝五物汤对大鼠 IL-4,IL-10 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )  
Table 1 Effects of Huangqi Guizhi Wuwutang on IL-4, IL-10 levels in rats( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-4	IL-10
正常	-	$199.55 \pm 11.24$	$110.13 \pm 6.62$
模型	-	$26.82 \pm 1.91^{2)}$	$48.43 \pm 3.38^{2)}$
TNF	$15 \times 10^{-3}$	$73.23 \pm 6.47^{4,6)}$	$69.75 \pm 3.65^{4,5)}$
黄芪桂枝五物汤	16	$29.91 \pm 1.65$	$50.94 \pm 3.82$
	32	$30.27 \pm 10.12$	$53.43 \pm 9.27$
	64	$125.71 \pm 7.54^{4,6)}$	$66.04 \pm 5.63^{3,5)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;与 HGW 低剂量组比较<sup>5)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup> $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

**3.2 黄芪桂枝五物汤对大鼠 Bcl-2,Bax 蛋白表达的影响** 各组大鼠滑膜组织均可见 Bcl-2,Bax 阳性表达细胞,滑膜细胞核皱缩,细胞质黄染,其中正常

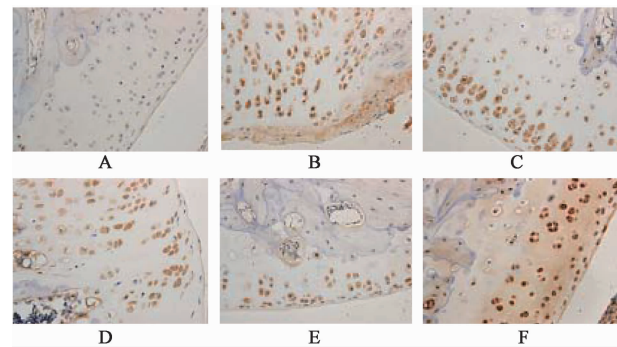
组表达最弱,模型组表达最强。与正常组比较,模型组,HW 低、中、高剂量组,TFN 组大鼠滑膜中 Bcl-2 蛋白表达增多 ( $P < 0.05$ ),模型组 Bax 蛋白表达减少 ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,HW 高剂量组,TFN

组大鼠滑膜中 Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增多 ( $P < 0.05$ ),HW 低、高剂量组之间差异无统计学意义;与 HW 低剂量组比较,HW 高、中剂量组 Bax 蛋白表达增多 ( $P < 0.05$ )。见表 2,图 1,2。

表 2 黄芪桂枝五物汤对大鼠 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effects of Huangqi Guizhi Wuwutang on Bcl-2 and Bax protein expression levels in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
正常	-	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.01	1.06 ± 0.06
模型	-	0.46 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>1)</sup>	4.56 ± 0.02 <sup>2)</sup>
TNF	15 × 10 <sup>-3</sup>	0.33 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.11 ± 0.04	2.74 ± 0.02 <sup>3)</sup>
黄芪桂枝五物汤	16	0.31 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.17 ± 0.06	1.69 ± 0.03 <sup>4)</sup>
	32	0.28 ± 0.08 <sup>1,3)</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>1,3,5)</sup>	1.35 ± 0.01 <sup>4)</sup>
	64	0.25 ± 0.01 <sup>1,3)</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>1,3,5)</sup>	0.51 ± 0.01 <sup>4)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. TNF 组; D ~ F. 黄芪桂枝五物汤低、中、高剂量组(图 2 同)

图 1 黄芪桂枝五物汤对大鼠 Bcl-2 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on Bcl-2 protein expression in rats (Immunohistochemistry, ×400)

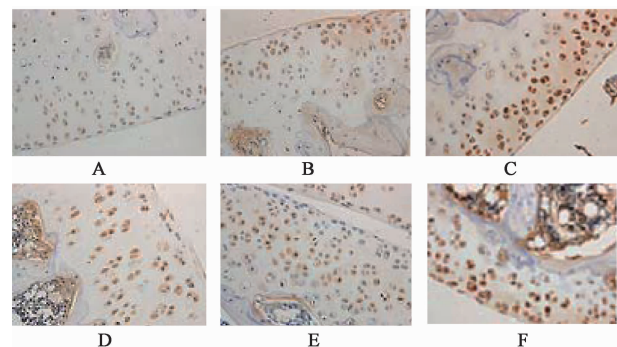


图 2 黄芪桂枝五物汤对大鼠 Bax 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on Bax protein expression in rats (Immunohistochemistry, ×400)

### 3.3 黄芪桂枝五物汤对各组大鼠滑膜凋亡的影响

正常细胞呈浅蓝色;早期凋亡细胞呈亮蓝色;晚期凋亡细胞呈现浅红色;坏死细胞呈红色。正常组滑

膜存在散在凋亡。与正常组比较,模型组,HW 低、中、高剂量组,TFN 组滑膜细胞增多,凋亡率明显下降 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,HW 低、中、高剂量组,TFN 组大鼠滑膜细胞凋亡率明显上升 ( $P < 0.05$ );与 HW 低剂量组比较,HW 中剂量组滑膜细胞凋亡率显著上升 ( $P < 0.01$ ),HW 高剂量组,TFN 组之间差异无统计学意义。见表 3,图 3。

表 3 黄芪桂枝五物汤对各组大鼠滑膜凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

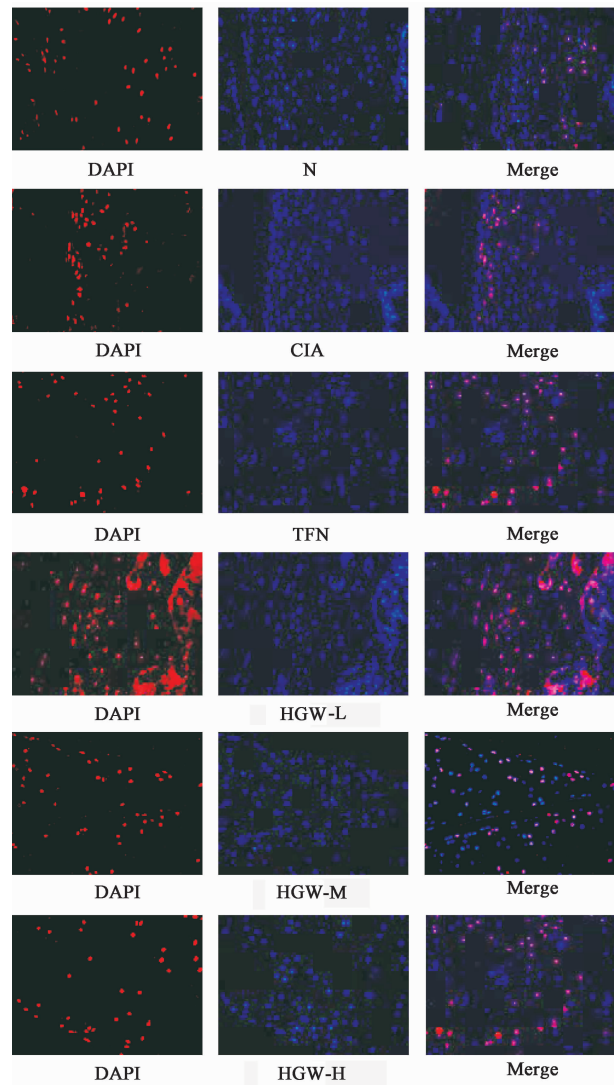
Table 3 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on apoptosis rate of synovial cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	凋亡率/%
正常	-	36.49 ± 1.96
模型	-	26.51 ± 1.29 <sup>1)</sup>
TNF	15 × 10 <sup>-3</sup>	29.22 ± 0.45 <sup>1,3)</sup>
黄芪桂枝五物汤	16	30.18 ± 0.38 <sup>1,3)</sup>
	32	33.47 ± 1.17 <sup>1,3,6)</sup>
	64	31.52 ± 0.58 <sup>1,3)</sup>

## 4 讨论

RA 属于中医学“筋痹”、“骨痹”范畴,一般认为痹证多由正气不足,感受风、寒、湿、热之邪所致,常呈慢性进行性过程,正虚邪恋,日久入络,致关节肿大而为痹,黄芪桂枝五物汤具有益气和血通痹之效,方中黄芪性温补益正气;桂枝通阳行痹;白芍和营理血;生姜、大枣和营卫,补中气,五药相和,既走阳分以通阳益气,又走阴分,和营行痹,既可走经脉、肌肉、肌节通阳气,又可养阴血、调畅营卫,为中医经典名方。

RA 以滑膜炎为主要病理特征,可能是滑膜细胞和炎症浸润细胞数量增加及凋亡相对减少,即细



N. 正常组; CIA. 胶原诱导型关节炎模型组; TFN. 托法替尼组; HGW-L. 黄芪桂枝五物汤 16 g·kg<sup>-1</sup> 组; HGW-M. 黄芪桂枝五物汤 32 g·kg<sup>-1</sup> 组; HGW-H. 黄芪桂枝五物汤 64 g·kg<sup>-1</sup> 组。DAPI. 核酸和染色体复染; Merge. 重叠

图 3 黄芪桂枝五物汤对滑膜细胞凋亡的影响 (TUNEL, ×400)

Fig. 3 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on apoptosis of synovial cells (TUNEL, ×400)

胞凋亡程度不及增殖程度所致。细胞凋亡是在一定的生理或病理条件下,细胞接受某种信号的触发后遵循自身的程序,最后裂解为凋亡小体。正常机体内部都存在着凋亡现象以保持机体内环境平衡。在受到外来刺激和机体内环境改变时,细胞的凋亡会发生异常改变。Bcl-2<sup>[12]</sup> 家族蛋白主要在细胞凋亡的线粒体途径即凋亡的细胞内通路起作用。Bcl-2, Bax 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抑凋亡和促凋亡分子。在细胞凋亡过程中, Bcl-2 在凋亡相关因子激活下,易位到细胞内的线粒体膜上,破坏细胞线粒体的完整性,释放线粒体内的促凋亡因子,经过细

胞信号转导活化上游的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 蛋白,并产生级联反应激活下游的 Caspase 蛋白,使凋亡信号转导途径逐步放大,最终导致凋亡发生。Bax 是 Bcl-2 活性的主要调控因子,也是 Bcl-2 家族中研究最广泛的促凋亡蛋白。Bax<sup>[13]</sup> 主要通过 Bcl-2 形成异源二聚体来调控细胞的凋亡过程。当细胞内 Bcl-2 增多时,大量 Bcl-2 与 Bax 结合,形成的异源二聚体,减少细胞凋亡的发生;当细胞内 Bax 含量较多时, Bax 除了与 Bcl-2 形成异源二聚体外,大量的 Bax 自身形成的同源二聚体,使细胞凋亡现象增强。

本实验结果表明,大鼠关节的滑膜细胞呈肿瘤样增生,与正常组比较,模型组大鼠滑膜组织增生明显,滑膜细胞的凋亡率下降,说明 RA 大鼠的滑膜增生和滑膜细胞凋亡减少密切相关。TUNEL 结果显示,荧光显微镜下模型组大鼠滑膜细胞数凋亡减少, HWF 组, TFN 组大鼠滑膜细胞数凋亡增多,与正常组比较,模型组, HGW 低、中、高剂量组, TFN 组滑膜细胞增多,凋亡率显著下降;与模型组比较, HGW 低、中、高剂量组, TFN 组大鼠滑膜细胞凋亡率上升。免疫组化结果显示,与正常组比较,模型组, HGW 低、中、高剂量组, TFN 组大鼠滑膜中 Bcl-2 蛋白表达增多,模型组 Bax 蛋白表达减少,与模型组比较, HGW 高剂量组, TFN 组大鼠滑膜中 Bcl-2 蛋白表达减少, Bax 蛋白表达增多。RA 大鼠在进行 HGW 治疗后,滑膜的增生减少,滑膜细胞的凋亡率上升,其中 HGW 高剂量组的滑膜增生程度较轻,滑膜细胞的凋亡率最高,说明 HGW 可以较好抑制大鼠滑膜的增生,其机制与增加大鼠滑膜细胞凋亡率有关。研究发现 RA 发病的主要相关细胞为 Th1, Th2 细胞亚群<sup>[14]</sup>, Th2 主要分泌 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 等, IL-4, IL-10 是 Th2 细胞产生的抗炎因子,在 RA 的病理过程中均可抑制促炎因子 (TNF- $\alpha$ , IL-2) 的表达,减少主要组织相容性复合体 (MHC)<sup>[13]</sup> 及前列腺素 E<sub>2</sub> 的产生,抑制 Th1 细胞反应,在健康人体中 Th1/Th2 型细胞处于平衡状态,类风湿性关节炎患者表现出 Th1 亚群优势。实验发现,与正常组比较,模型组大鼠 IL-4, IL-10 含量降低;与模型组比较, HGW 高剂量组, TFN 组大鼠 IL-4, IL-10 含量升高;与 HGW 低剂量组比较, HGW 高剂量组, TFN 组大鼠 IL-4, IL-10 含量升高。模型组大鼠 IL-4, IL-10 因子水平下降,会使 T 细胞免疫清除能力下降,促炎因子 (TNF- $\alpha$ , IL-2) 表达水平升高,直接破坏滑膜细胞的细胞膜,加重炎症损伤,导致滑膜细胞的坏死,而非增加

滑膜细胞的凋亡。治疗组 IL-4,IL-10 水平上升预示着 Th2 上调,抑制 Th1 细胞反应,说明 HGW 可以调整 Th 亚型细胞的平衡,对类风湿性关节炎患者临床症状的缓解起促进作用。

综上所述,黄芪桂枝五物汤能促进 RA 大鼠异常亢进的滑膜细胞的凋亡,可能与改善 Th1/Th2<sup>[15]</sup>的平衡相关,可抑制 Bcl-2,促进 Bax 的蛋白表达,调节 Bax/Bcl-2 来发挥对 RA 滑膜细胞的促凋亡作用,为黄芪桂枝五物汤治疗 RA 提供实验依据。

[参考文献]

[ 1 ] 池里群,周彬,高文远,等. 治疗类风湿性关节炎常用药物的研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(15): 2851-2858.

[ 2 ] 曾小峰,朱松林,谭爱春,等. 我国类风湿关节炎疾病负担和生存质量研究的系统评价[J]. 中国循证医学杂志,2013,13(3):300-307.

[ 3 ] 陈腊霞,王燕燕. 中医药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 中国药房,2013,24(15):1420-1422.

[ 4 ] 张荒生,王艺苑. 黄芪桂枝五物汤加味治疗类风湿关节炎临床疗效观察[J]. 湖北中医杂志,2013,35(2): 18-20.

[ 5 ] 赵光智. 黄芪桂枝五物汤加味治疗类风湿性关节炎疗效观察[J]. 山西中医,2010,26(3):22.

[ 6 ] 赵乐. 黄芪桂枝五物汤防治阳虚寒凝骨关节炎的实验研究[D]. 太原:山西中医学院,2015.

[ 7 ] 李艳彦,王永辉,张永刚,等. 黄芪桂枝五物汤不同给药途径对冻伤模型大鼠的影响及其作用机制[J]. 中西医结合学报,2010,8(2):181-185.

[ 8 ] 霍介格,胡莹,杨杰,等. 黄芪桂枝五物汤对化疗致大鼠周围神经损伤的作用[J]. 中医杂志,2012,53(23):2031-2034.

[ 9 ] 杨琼,冯玫. 黄芪桂枝五物汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清中白细胞介素-20 的影响[J]. 中国药物与临床,2012,12(7):881-883.

[ 10 ] González C, Abello P, Cepeda R, et al. Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis [J]. Eur Cytokine Netw,2007,18(3):127-135.

[ 11 ] Milici A J, Kudlacz E M, Audoly L, et al. Cartilage preservation by inhibition of Janus kinase 3 in two rodent models of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2008,10(1):R14.

[ 12 ] 张贝贝,刘文洪,李俊峰,等. 铁皮石斛多糖对高糖诱导的血管内皮细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2015,31(1):64-70.

[ 13 ] 董忠典,周芬娜,王慧. MHC 基因的遗传变异及其与鱼类抗病性研究进展[J]. 水生态学杂志,2011,32(2):7-10.

[ 14 ] 杜文静,董竞成,蔡萃,等. 淫羊藿苷对哮喘小鼠肺内嗜酸性粒细胞凋亡和 Bcl-2、Bax 基因蛋白表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(9): 1248-1250.

[ 15 ] 彭小青,李夏雨,王玮,等. Th1/Th2 细胞炎性因子在大鼠溃疡性结肠炎治疗模型中的表达 [J]. 中南大学学报:医学版,2013,38(10):1023-1028.

[责任编辑 张丰丰]