

麝香乌龙丸对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织病理形态及 TNF- α , IL-6 表达的影响

陈守中, 袁强, 张爱国, 王鹏飞, 易永泽, 王志文*
(河北联合大学附属医院, 河北唐山 063000)

[摘要] **目的:**观察麝香乌龙丸对佐剂性关节炎(AA)大鼠滑膜组织病理形态及滑膜组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)表达的影响。**方法:**将40只雄性Wistar大鼠随机分为正常组(A)10只,造模组30只。造模组大鼠于右后足跖皮下注射完全弗氏佐剂(CFA)0.1 mL造成AA模型。将造模成功的造模组随机分为模型组(B)、麝香乌龙丸低、高剂量组(C,D, $n=10$), ig给予1.0, 2.0 g·kg⁻¹的麝香乌龙丸,每日1次;A,B组每日ig生理盐水2 mL/只。30 d后,取跖趾关节, HE染色观察滑膜组织病理形态,免疫组化法检测滑膜组织中TNF- α , IL-6的表达。**结果:**麝香乌龙丸低、高剂量组滑膜组织破坏程度较模型组明显减轻;TNF- α , IL-6在麝香乌龙丸低、高剂量组中表达均较模型组显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),麝香乌龙丸低、高剂量组比较无统计学意义。**结论:**麝香乌龙丸能改善AA大鼠滑膜组织病理损害,下调TNF- α , IL-6的表达。

[关键词] 麝香乌龙丸;佐剂性关节炎;类风湿关节炎;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-6

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0234-03

Effect of Shexiang Wulong Wan on the Pathomorphology and Expression of TNF- α and IL-6 in Synovium in the Rats with Adjuvant Arthritis

CHEN Shou-zhong, YUAN Qiang, ZHANG Ai-guo, WANG Peng-fei, YI Yong-ze, WANG Zhi-wen*
(Hebei United University Affiliated Hospital, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Shexiang Wulong Wan (SXWLW) on the pathomorphology and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in synovium rats with adjuvant arthritis. **Method:** Adjuvant arthritis (AA) animal model was reproduced. Forty Wistar male rats were divided randomly into 4 groups. model group, normal group treated with normal saline (NS) of 2 mL every day; SXWLW low dose group treated with 1.0 g·kg⁻¹ every day; SXWLW high dose group treated with 2.0 g·kg⁻¹ every day. At the end of the experiment, toe metatarsal joints were collected for pathological examination. The level of TNF- α and IL-6 was checked by immunohistochemical method. **Result:** SXWLW low dose and high dose groups, compared with the model group, synovial tissue of damage was significantly reduced; the expression of TNF- α and IL-6 in the SXWLW low dose group and high dose group, compared with model group, decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** SXWLW can reduce the expression of TNF- α and IL-6 in the synovial tissue, therefore it could decrease synovial tissue damage.

[Key words] Shexiang Wulong wan; adjuvant arthritis; rheumatoid arthritis; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是免疫介导的慢性炎症性疾病,多种细胞因子参与介导其

炎症和组织损伤。其中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)是与RA发病机制直接相关的

[收稿日期] 20110919(012)

[第一作者] 陈守中, 硕士研究生, 中医师、执业药师, 从事中西医结合治疗风湿免疫疾病的研究, Tel: 0315-3725802, E-mail: hhhczs@163.com

[通讯作者] * 王志文, 教授、主任医师、硕士研究生导师, 从事中西医结合治疗风湿免疫疾病, Tel: 0315-3725802

重要细胞因子^[1]。麝香乌龙丸治疗 RA 疗效良好,能显著减轻受累关节肿胀、疼痛^[2-3]。本研究通过观测麝香乌龙丸对 AA 大鼠跖趾关节滑膜病理形态及 TNF- α ,IL-6 表达的影响,来探讨麝香乌龙丸治疗 RA 的作用机制。

1 材料

1.1 药物 麝香乌龙丸:河北联合大学附属医院研制,由人工麝香、制川乌、地龙、全蝎、黑豆等药物组成,批准文号为冀药制字 Z20051581。

1.2 动物 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重(180 ± 20)g,河北联合大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2005-0001。

1.3 试剂及仪器 完全弗氏佐剂(FCA),美国 Sigma 公司产品;TNF- α ,IL-6 免疫组化试剂盒,北京博奥森生物科技有限公司提供。组织切片机,天津天利航空机电有限公司产品;BX50 型光学显微镜,日本 Olympus 公司产品。

2 方法

2.1 AA 模型建立 40 只大鼠随机留取 10 只作为正常组,其余 30 只接受完全弗氏佐剂(FCA)造模,即在大鼠右后足跖底部皮内注射 FCA 0.1 mL(10 g·L⁻¹)^[4]。至造模第 14 日,出现多发性关节炎,视为造模成功。A 组大鼠以同样方法注射生理盐水 0.1 mL/只作为正常对照。

2.2 分组 A. 正常对照组 10 只。造模成功的造模组大鼠 30 只随机分成: B. 佐剂性关节炎(AA)模型组, C. 麝香乌龙丸低剂量治疗组, D. 麝香乌龙丸高剂量治疗组,每组 10 只。

2.3 给药 于造模成功后第 1 天开始给药。C 组每日 1 次,按成人每日每千克体重用药量的 10 倍剂量作为大鼠每日每千克体重的等效剂量(1.0 g·kg⁻¹),溶于 2 mL 生理盐水中 ig。D 组每日 1 次,按成人每日每千克体重用药量的 20 倍剂量作为大鼠每日每千克体重的等效剂量(2.0 g·kg⁻¹),溶于

2 mL 生理盐水中 ig。A, B 组灌入等量生理盐水。各组 ig 30 d。

2.4 标本采集及处理 连续给药 30 日后,颈椎脱臼法处死,取双侧完整跖趾关节,置于含多聚甲醛和 DEPC 的固定液中固定 48 h,EDTA 脱钙 15 d,脱水、浸腊、包埋、切片。

2.5 指标检测

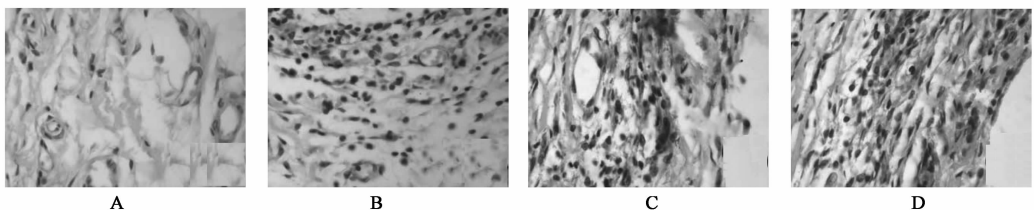
2.5.1 HE 染色,在显微镜下观察大鼠滑膜组织病理形态的改变。

2.5.2 免疫组化法检测大鼠跖趾关节滑膜中 TNF- α ,IL-6 的表达 用软件 Image Pro-Plus 6.0 进行图像分析,在 400 倍光镜下,每张切片随机取 6 个不同的视野,测定每个视野中 TNF- α ,IL-6 的平均吸光度(A)和细胞阳性率,用 6 个视野的平均值作为该关节滑膜阳性细胞的平均吸光度及阳性率。以滑膜组织细胞的胞浆被染成黄褐色为阳性细胞。

2.6 数据处理 运用 SPSS 13.0 统计软件对检测各指标所得数据进行单因素方差分析,进行多组间两两比较,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 滑膜组织病理形态观察 正常组滑膜组织表面薄膜样,光滑半透明,滑膜细胞呈单层整齐排列,扁平形,无血管增生,无纤维化,未见炎细胞浸润。模型组滑膜表面明显肿胀、充血肥厚,肿胀粗糙,滑膜细胞多层,排列不整齐,增生活跃,滑膜组织中毛细血管增多充血,纤维组织增生,有大量炎细胞及纤维母细胞浸润。麝香乌龙丸 1 g·kg⁻¹组滑膜肿胀,充血程度较 B 组明显减轻,可见轻度增生的滑膜细胞,炎细胞浸润、血管增生及纤维化均不明显。麝香乌龙丸 2 g·kg⁻¹组滑膜肿胀,细胞略有增生,滑膜组织无明显充血、水肿,浸润炎细胞及增生毛细血管较 B 组明显减少。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 麝香乌龙丸 1 g·kg⁻¹组; D. 麝香乌龙丸 2 g·kg⁻¹组

图 1 大鼠跖趾关节滑膜组织病理形态观察(HE 染色, ×400)

3.2 免疫组化法测定滑膜组织 TNF- α ,IL-6 的表达

3.2.1 TNF- α 的表达 造模各组与正常组比较,细

胞阳性率均显著升高,有统计学意义($P < 0.01$);平均吸光度,造模各组与正常组比较,均显著升高,有

统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$)。麝香乌龙丸 2 个剂量组与模型组比较,细胞阳性率和 A 均显著降低,有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$)。

表 1 关节滑膜中 TNF- α 的平均吸光度、细胞阳性率 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	A	阳性率/%
正常	-	0.239 \pm 0.027 ¹⁾	6.91 \pm 0.57 ¹⁾
模型	-	0.629 \pm 0.081	39.17 \pm 1.13
麝香乌龙丸	1.0	0.518 \pm 0.108 ²⁾	28.30 \pm 1.20 ¹⁾
	2.0	0.484 \pm 0.087 ¹⁾	27.63 \pm 1.16 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01, ^{2)}$ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2.2 IL-6 的表达 造模各组与正常组比较,细胞阳性率和 A 均显著升高,有统计学意义 ($P < 0.01$); 麝香乌龙丸 2 个剂量组与模型组比较,细胞阳性率和 A 均显著降低,有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 关节滑膜中 IL-6 的平均吸光度、细胞阳性率 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	A	阳性率/%
正常	-	0.326 \pm 0.026 ¹⁾	15.25 \pm 0.96 ¹⁾
模型	-	0.585 \pm 0.009	38.88 \pm 1.46
麝香乌龙丸	1.0	0.449 \pm 0.012 ¹⁾	20.29 \pm 1.34 ¹⁾
	2.0	0.470 \pm 0.021 ¹⁾	19.74 \pm 1.32 ¹⁾

4 讨论

RA 主要的病理基础是滑膜的炎症和关节外其他组织的血管炎。有研究认为, TNF- α 和 IL-6 在激活滑膜细胞引起关节受损及诱导炎症过程中起重要作用^[5]。TNF- α 通过激活内皮细胞、促进炎症因子合成和释放等方式参与 RA 的发病进程^[6]。IL-6 能增强 TNF- α 的效应,故被认为是 TNF- α 的某些效应的放大因子。RA 患者血清和病变关节滑液中 TNF- α 和 IL-6 的含量明显增高,经治疗后, TNF- α 和 IL-6 的表达水平随同其关节炎活动指数的改善而下降,使用抗 TNF- α 单抗或 IL-6 单抗治疗 RA,可以使滑膜炎症和软骨破坏得以控制^[7]。

RA 属中医痹症范畴,又称“骨痹”、“历节痹”、“尪痹”等。《内经》曰:“风寒湿三气杂至,合而为痹”;“风雨寒热,不得虚,不能独伤人”。《圣济总录》云:“(痹)其证上下左右,无所留止,随其所至,气血不通是也。”元·朱丹溪认为:“四肢百节走痛……大率有痰、风湿、风热、血虚。”故 RA 以正虚为本,外感邪气为标,痰瘀互结,病情复杂。麝香乌龙丸是在宋·许叔微《普济本事方》“麝香园”的基础上研制而成。君药麝香“通关窍,开经络,透肌骨,安心神;尤善利骨髓之伏痰”;臣药制川乌“除寒湿,行经散风,助阳退阴”、地龙“除风湿痰结,破血结”、全蝎“引风药达病

所,入降药暖肾气,痰症惊癇,无乎不疗”;佐使药黑豆“补肾镇心,祛风活血,兼解百毒”,共奏温经活络、行血祛瘀、化痰消肿,祛风止痛、补肾强骨之效。

近年药理研究发现,麝香水溶性蛋白(SX17, SX26)可以下调脂多糖(LPS)刺激巨噬细胞分泌的 TNF- α 和 IL-6,可能抑制巨噬细胞介导的炎症^[8]。制川乌可以通过抑制 T 淋巴细胞及其亚群,从而抑制 TNF- α 和 IL-6 的分泌^[9]。制川乌还可以通过其温热作用使血液和淋巴循环加快,带走瘀滞的 TNF- α 和 IL-6 等炎性介质^[10]。在 RA 的治疗中通常配伍全蝎、地龙等虫类中药效果更加显著^[11]。

在本实验中,麝香乌龙丸能使 AA 大鼠滑膜组织的病理形态得到改善,明显降低 TNF- α , IL-6 的表达水平,说明麝香乌龙丸治疗 RA 可能是通过下调 TNF- α , IL-6 的表达水平而实现的。

[参考文献]

- [1] 付钰. 中药大血藤对佐剂性关节炎大鼠血清 TNF- α , IL-6 的影响[J]. 现代医院, 2007, 7 (9): 37.
- [2] 王志文, 韩炳生, 贾秀荣, 等. 麝香乌龙丸治疗类风湿性关节炎 150 例疗效观察[J]. 四川中医, 2000, 18 (4): 18.
- [3] 王志文, 张爱国, 袁强, 等. 麝香乌龙丸抗炎及镇痛药理研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18 (3): 584.
- [4] 李仪奎, 王钦茂. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 305.
- [5] Rho Y H, Chung C P, Deser A, et al. Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2009, 61 (11): 1580.
- [6] 陆意. 类风湿关节炎发病机制的研究进展[J]. 国外医学: 免疫学分册, 2001, 24 (5): 256.
- [7] 周广宇, 郭嘉隆, 毕黎琦, 等. 关节炎患者血清及关节液白细胞介素 6 表达水平分析[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2004, 30 (5): 772.
- [8] 张亚兰, 罗燕, 刘春兰. 中药麝香抗肿瘤研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30 (4): 191.
- [9] 汪沪双. 乌头碱抗风湿作用的药效学研究概述[J]. 基层中药杂志, 1996, 10 (3): 45.
- [10] 李文兰, 王艳萍, 范玉奇. 中药乌头的实验研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2006, 22 (4): 13.
- [11] 李孟, 王宗柱. 虫类药物治类风湿性关节炎的研究进展[J]. 陕西中医函授, 2002 (2): 37.

[责任编辑 聂淑琴]