

## 麝香乌龙丸对佐剂性关节炎大鼠滑膜病理形态及血管内皮生长因子、内皮抑素表达的影响

王志文\*, 丁春菊, 张爱国, 黄秀江, 李臣杰, 徐涛, 陈守中, 王鹏飞, 易永泽, 于荣霞  
(河北联合大学, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的: 观察麝香乌龙丸对佐剂性关节炎(AA)大鼠滑膜组织病变和血管内皮生长因子(VEGF)及内皮抑素(ES)的影响, 探讨其作用机制。方法: 建立大鼠 AA 模型, 麝香乌龙丸低、高剂量(丸药  $1, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), ig 1 周后, 观察滑膜组织病理形态学变化, 免疫组化法检测各组大鼠滑膜组织中 VEGF, ES 的表达, 以关节滑膜病理形态积分, VEGF, ES 阳性细胞率, 计算 VEGF/ES 比值。结果: 麝香乌龙丸低、高剂量组均能减轻大鼠关节滑膜的病理积分, 与模型组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 低、高剂量组之间差异无统计学意义。麝香乌龙丸低、高剂量组均可降低大鼠滑膜 VEGF 含量, 提高 ES 含量, 降低 VEGF/ES 比值, 与模型组比较差异显著 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 麝香乌龙丸低、高剂量组之间无统计学差异。结论: 麝香乌龙丸可抑制 AA 大鼠炎症发展, 其机制可能与麝香乌龙丸调控 VEGF/ES 的失衡而抑制滑膜组织血管生成相关。

**[关键词]** 麝香乌龙丸; 类风湿性关节炎; 佐剂性关节炎; 血管内皮生长因子; 内皮抑素

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0241-04

## Effect of Shexiang Wulong Pill on Pathomorphology and Vascular Endothelial Growth Factor, Endostatin of Synovium in Rats with Adjuvant Arthritis

WANG Zhi-wen\*, DING Chun-ju, ZHANG Ai-guo, HUANG Xiu-jiang, LI Chen-jie,  
XU Tao, CHEN Shou-zhong, WANG Peng-fei, YI Yong-ze, YU Rong-xia  
(Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Shexiang Wulong pill on pathomorphology and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin (ES) of synovium tissue in the rats with adjuvant arthritis (AA), and investigate Shexiang Wulong pill treatment for the rheumatoid arthritis whether concerns with the adjustment to the imbalance of VEGF/ES. **Method:** The rats with adjuvant arthritis model was established. Shexiang Wulong pill fills pill low dose and high dose ( $1, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) were given orally. One week later, the structure changes of synovium tissue were observed, and the expression of VEGF and ES in synovium tissue was determined by immunohistochemical test. **Result:** The Shexiang Wulong pill low, high dose group both could reduce the pathological synovium integral, both dose group compared with model group had difference ( $P < 0.05$ ); the low dose group had no statistical difference with the high dose group. Compared with the model group, the low and high dose groups also could reduce the expression of VEGF, increase the expression of ES and reduce the ratio of VEGF/ES in synovium tissue ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The low dose group had no statistical difference with the high dose group. **Conclusion:** The Shexiang Wulong pill can attenuate the degree of chronic inflammation and angiogenesis in synovium of AA rats. The mechanism might be associated with the adjustment to the imbalance of VEGF/ES in

**[收稿日期]** 2011-05-26

**[通讯作者]** \* 王志文, 教授, 硕士生导师, 从事中医药防治风湿免疫疾病的研究, Tel: 13903250783; 0315-3726325, E-mail: wangzhiwen\_1955@163.com

synovium of AA rats.

[Key words] Shexiang Wulong pill; rheumatoid arthritis; adjuvant arthritis; vascular endothelial growth factor; endostatin

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性全身性自身免疫性疾病。RA 的主要病理变化为关节滑膜的慢性炎症, 细胞浸润, 滑膜血管翳形成, 软骨与骨组织的侵蚀, 导致关节畸形, 功能丧失。RA 属于血管增生性疾病, 其发病机制与血管生成调控因子的失衡, 尤其是血管内皮生长因子 (VEGF) 与内皮抑素 (ES) 的失衡密切相关。麝香乌龙丸是在挖掘宋·许叔微《普济本事方》“麝香圆”的基础上, 以中医理论为指导, 经多年临床应用和反复制剂工艺研究制成的纯中药制剂, 具有温经活络、行血祛瘀、消肿止痛、补肝益肾之功效。本实验通过建立大鼠佐剂性关节炎 (AA) 模型, 观察麝香乌龙丸对关节滑膜组织病理形态学及 VEGF, ES 表达的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级健康 Wistar 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 (180 ± 20) g, 2 ~ 3 月龄, 合格证号 SCXK (豫) 2005-0001, 室温分笼饲养, 按顿供给标准饲料, 自由饮水由河北联合大学实验动物中心提供。

**1.2 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、黑豆组成。

**1.3 试剂与仪器** 完全弗氏佐剂 (FCA, 美国 Sigma 公司, 批号 045 K8910), VEGF, ES 免疫组化试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司提供, 批号 bs-0279R, bs-0547R)。SHH. W21. 600 三用电热恒温水浴箱 (北京市长安科学仪器厂), BX50 光学显微镜, (日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与造模** 健康 Wistar 大鼠 40 只, 适应性喂养 1 周后, 分别按体重随机分为正常组模型对照组、麝香乌龙丸低剂量组、麝香乌龙丸高剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 大鼠参照文献方法造模<sup>[1]</sup>, 实验开始先将 FCA 振摇混匀, 除正常对照组外, 造模大鼠在乙醚轻度麻醉下, 右后足跖底部皮内注射 10 g·L<sup>-1</sup> FCA 0.1 mL/只, 1 ~ 3 d 后右后足出现原发性肿胀, 12 ~ 14 d 后出现继发性肿胀, 伴鼠尾、耳、前肢及左后肢出现红肿或结节, 四肢活动出现障碍, 视为造模成功。正常组大鼠皮内注射生理盐水 0.1 mL/只。

**2.2 给药** 于造模后 2 周开始给药。低、高剂量给药组分别 ig 麝香乌龙丸 1, 2 g·kg<sup>-1</sup> (生理盐水混悬, 分别相当于成人剂量的 10, 20 倍) 1 次/d, 正常对照组、模型组予等容量生理盐水。连续 1 周。

**2.3 标本采集及处理** 于给药 1 周后断头处死全部实验动物, 取其右后足跖关节, 去皮毛及肌腱组织, 标本立即用新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定, 取滑膜组织, 石蜡包埋后切片, 作 HE 染色及免疫组织化学观察。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 滑膜组织形态学** 关节滑膜病理积分按病变程度分 4 级并按等级记分。0 级: 滑膜组织完整, 细胞排列整齐, 无充血及水肿, 无炎性细胞浸润, 关节软骨完整, 无剥离及坏死, 记 1 分; I 级: 滑膜表层细胞增生, 呈“栅栏”状排列, 见炎性细胞浸润, 滑膜血管充血、水肿, 记 3 分; II 级: 滑膜细胞显著增生, 滑膜内血管增生, 肉芽组织形成, 关节软骨面糜烂, 记 5 分; III 级: 滑膜内肉芽组织纤维化, 关节软骨灶性坏死, 记 7 分。

**2.4.2 滑膜组织免疫组化** VEGF 染色阳性以胞浆和 (或) 胞膜中出现棕黄色颗粒为标准, ES 染色阳性以胞浆中出现棕黄色颗粒为标准, 每张切片随机取 5 个视野 (×200), 分别计算每个视野中的 VEGF 和 ES 阳性细胞数占该区域细胞总数的百分数, 求其平均值。

**2.5 统计学方法** 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析。所有数据使用 SPSS 16.0 进行统计分析, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 AA 大鼠滑膜组织形态学改变的影响** 结果见表 1 和图 1。

表 1 数据显示, 模型组关节滑膜病理积分与正常组相比, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 经 1 周治疗, 麝香乌龙丸低、高剂量组均显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 麝香乌龙丸低、高剂量组之间无统计学差异。

图 1 可见, 正常组滑膜表面光滑, 滑膜细胞单层, 排列整齐, 呈扁平形, 无血管增生, 无纤维化, 无乳头状增生, 未见炎细胞浸润。模型组滑膜表面粗

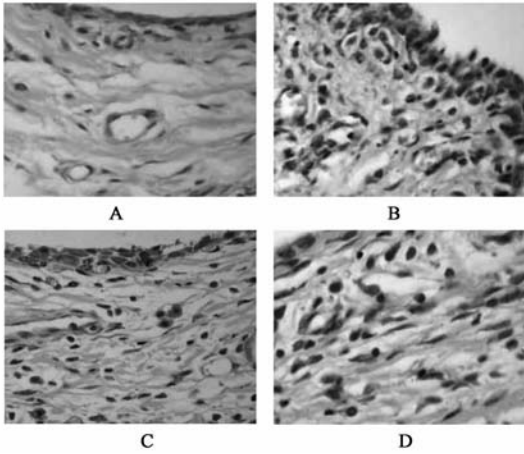
表1 麝香乌龙丸对AA大鼠踝关节滑膜病理形态的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	关节滑膜病变/分
正常	-	1.20 ± 0.42 <sup>2)</sup>
模型	-	5.20 ± 1.23
麝香乌龙丸	1	3.50 ± 1.64 <sup>1)</sup>
	2	3.70 ± 1.71 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表2同)。

表2 麝香乌龙丸对AA大鼠滑膜组织VEGF, ES及二者比值的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	VEGF /%	ES /%	VEGF/ES
正常	-	5.96 ± 2.25 <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>
模型	-	47.05 ± 6.02 <sup>1)</sup>	10.30 ± 2.82	4.78 ± 0.95
麝香乌龙丸	1	39.89 ± 7.20 <sup>1)</sup>	27.41 ± 5.12 <sup>2)</sup>	1.46 ± 0.10 <sup>2)</sup>
	2	40.44 ± 7.85 <sup>1)</sup>	24.78 ± 6.18 <sup>2)</sup>	1.66 ± 0.12 <sup>2)</sup>



A. 正常组; B. 模型组;  
C. 麝香乌龙丸 1  $g \cdot kg^{-1}$  组;  
D. 麝香乌龙丸 2  $g \cdot kg^{-1}$  组(图2,3同)

图1 麝香乌龙丸对模型大鼠滑膜组织病变的影响(HE, ×200)

糙,明显肿胀、充血、肥厚,滑膜细胞多层,增生活跃,滑膜组织中纤维组织增生,毛细血管增多扩张充血,可见大量炎细胞及纤维母细胞浸润。麝香乌龙丸低剂量组滑膜肿胀、充血程度及滑膜细胞增生较模型组减轻,未见明显炎细胞浸润及血管增生,纤维化不明显。麝香乌龙丸高剂量组滑膜细胞增生较模型组轻,未见明显炎细胞浸润及血管增生,间质多为脂肪组织,纤维化不明显。

3.2 对AA大鼠滑膜组织VEGF,ES及二者比值的影响 结果见表2,图2~3。

表2数据显示,模型组滑膜中VEGF的阳性细胞表达率与正常组相比,差异有显著性( $P < 0.01$ );经1周治疗,麝香乌龙丸低、高剂量组与模型组比较,均能显著降低AA大鼠滑膜组织中VEGF的表达( $P < 0.05$ ),升高ES的表达( $P < 0.01$ ),明显降低VEGF/ES比值( $P < 0.01$ );麝香乌龙丸低、高剂量组之间无统计学差异。

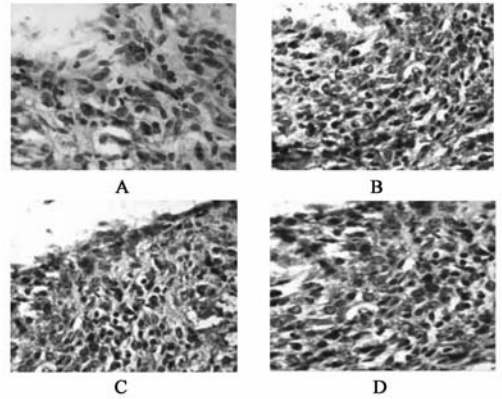


图2 麝香乌龙丸对模型大鼠滑膜组织VEGF表达的影响(免疫组化, ×200)

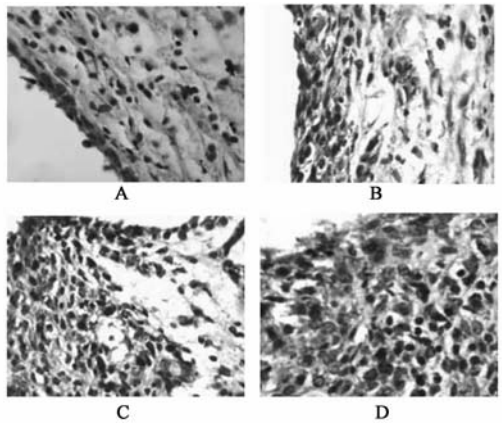


图3 麝香乌龙丸对模型大鼠滑膜组织ES表达的影响(免疫组化, ×200)

图2,3可见:正常组滑膜中VEGF阳性细胞表达,胞浆和(或)胞膜可见少量棕黄色颗粒;模型组VEGF阳性细胞表达较正常组明显增高;麝香乌龙丸低剂量组VEGF阳性表达较模型组显著降低;麝香乌龙丸高剂量组VEGF阳性表达较模型组降低。正常组滑膜中ES未见阳性细胞表达;模型组滑膜中可见低量表达。麝香乌龙丸低剂量组ES阳性表达率较模型组明显升高;麝香乌龙丸高剂量组ES阳性表达较模型组升高。

#### 4 讨论

近年研究发现,血管新生形成血管翳导致关节软骨和骨的破坏,造成关节重构,是 RA 的关键过程<sup>[2]</sup>。RA 有显著的血管增生,滑膜炎中最早观察到的现象之一即是新生血管形成。

血管生成受血管生成促进因子和血管生成抑制因子的共同调控,VEGF 和 ES 分别是目前已发现的作用最强、特异性最高的血管生成促进因子和抑制因子,因此,二者生成与消除的平衡在 RA 发病过程中起着重要作用。VEGF 可以特异性地促进血管前体细胞形成血管,促进血管内皮细胞增殖与迁移,提高血管通透性,促进 RA 血管翳的形成。有试验证实,向关节腔注射 VEGF 抗体及其受体拮抗药可明显减轻类风湿关节炎症状,有效抑制滑膜血管翳的形成<sup>[3]</sup>,提示在 RA 患者治疗中应用抗血管内皮生长因子的治疗,可以有效阻止滑膜血管翳的形成,为 RA 患者治疗提供一种新的治疗思路。近年发现的 ES 是一种强效的内源性血管生成抑制因子,特异性地作用于过度增生的血管内皮细胞,可以通过抑制新生血管内皮细胞黏附、迁移和增殖,诱导其凋亡,有效地抑制血管新生。夏丽娟等<sup>[4]</sup>研究发现重组人 ES 可显著抑制佐剂性关节炎大鼠滑膜组织中 VEGF 的表达及新生血管生成。综上所述,破坏新生血管的形成可有效逆转 RA 的病情。

类风湿关节炎属中医痹症范畴,又称“骨痹”、“历节病”、“白虎病”、“顽痹”等。痹作为病证的名称,首见于《内经》,《素问·痹论篇》曰:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。”痹症在临床上可以分为风寒湿痹、风湿热痹、痰瘀痹阻、肝肾两虚 4 种证型,其病因病机多认为以肝肾、气血亏虚为本,风寒湿邪外袭、痰瘀凝滞为标,治疗以补益正气,祛风除湿,活血散寒为原则。麝香乌龙丸出自古代秘方,称之“治白虎历节,诸风疼痛,游走无定,状如虎啮,昼静夜剧,及一切手足不测疼痛。”本方对于缓解关节疼痛、晨僵、

消除关节肿胀、恢复关节功能等方面有显著疗效。临床用于治疗 RA 取得良好疗效<sup>[5]</sup>。药理研究也证明该药具有明显的抗炎及镇痛作用<sup>[6]</sup>。

在本实验中,麝香乌龙丸低、高剂量组关节滑膜病理积分均明显下降,提示麝香乌龙丸能显著改善 AA 大鼠关节滑膜病理形态改变。麝香乌龙丸低、高剂量组均能明显降低 AA 大鼠滑膜组织中 VEGF 含量,升高 ES 含量,从而降低 VEGF/ES 比值;提示麝香乌龙丸抑制 AA 大鼠关节滑膜炎病变的机制之一可能是通过抑制 VEGF 的表达,升高 ES 的表达,调控二者生成与消除的失衡达到抑制滑膜血管新生。

#### [参考文献]

- [1] 许亦多,戴冽,汤美安.大鼠佐剂性关节炎的诱导及观察指标比较[J].中国免疫学杂志,2002,18(2):140.
- [2] XI Z D, ZHANG D Q. Clinical values and mechanism of angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. For Med Sci (Sect Int Med) (国外医学:内科学分册), 2006, 33(7):301.
- [3] Grosios K, Wood J, Esser R, et al. Angiogenesis inhibition by the novel VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, PTK787/ZK222584, causes significant anti-artritic effects in models of rheumatoid arthritis [J]. Inflamm Res, 2004, 53(4):133.
- [4] 夏丽娟,陈飞虎,黄学应,等.重组人内抑素对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织血管内皮生长因子表达的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2006,11(7):760.
- [5] 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.
- [6] 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.

[责任编辑 何伟]