

大防风汤治疗 II 型胶原纤维诱导小鼠 类风湿性关节炎的实验研究

王连荣^{1*}, 吴伟康²

(1. 北京市中西医结合医院, 北京 100039; 2. 中山大学 中西医结合研究所, 广州 510080)

[摘要] **目的:**观察大防风汤对于类风湿性关节炎的治疗效果。**方法:**采用 II 型胶原纤维诱导的 NIH 小鼠类风湿性关节炎动物模型,从分子生物学、免疫学、病理学等方面对大防风汤颗粒进行研究。**结果:**模型对照组与给药组相比,发病率较高,足部红肿程度较重,症状持续时间较长,血清 IgG 水平明显增高($P < 0.05$);IL-1, TNF- α 和 IFN- γ 的 mRNA 基因表达水平均较高。**结论:**证明大防风汤对于 II 型胶原纤维诱导的类风湿性关节炎动物模型具有明显的抑制作用,实验结果支持大防风汤在临床上治疗类风湿性关节炎有效的结论。

[关键词] 大防风汤;类风湿性关节炎;动物模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0100-04

Experimental Studies on the Treatment of Type II Collagen Induced Arthritis with Da-Fang-Feng-Tang

WANG Lian-rong^{1*}, WU Wei-kang²

(1. Beijing Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Beijing 100039, China;

2. Institute of Integrated Chinese and Western Medicine in Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:**To observe the effect of Da-Fang-Feng-Tang (DFFT) in treating of Rheumatoid Arthritis (RA). **Methods:** The animal model of type II collagen induced arthritis was used. Granules of the DFFT extract were administered by gastric gavage, studying in genetics, immunology, physiology and clinical. **Results:** The results indicated a higher onset rate, a severer redness and swelling for arthritic limb and a longer time of clinic

manifestation in contract group than treated group, and the IgG level in sera was significantly increased compared contract group to treated group ($P < 0.05$). The gene express of IL-1, TNF- α and IFN- γ were higher in contract group. **Conclusion:** DFFT express obviously suppressive function on model of type II collagen induced arthritis in NIH mouse, and support the belief that DFFT is effective in treating human RA.

[**Key words**] Da-Fang-Feng-Tang; rheumatoid arthritis; animal model

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种原因不明的多发性关节炎,一般为慢性发病,在 10~70 岁之间,发病率为 0.3~0.5%, 女性为男性的 3~4 倍,病情进展缓慢,病程较长,关节强直、变形严重,是严重威胁人类身体健康的一种常见病、多发病。目前常用的药物可分为 3 类:解热镇痛剂、免疫抑制剂和类固醇激素,由于药物副作用严重,引起的肝肾损害、肺纤维化等使病人难以坚持长期服药^[1];另外药物对于人体正常免疫功能的抑制使人体免疫功能大大降低,从而使病人易患各种感染症。外科治疗主要是关节固定和人工关节,但术后感染率高于正常人群的数倍。近来的研究报告表明,一部分中药对于类风湿性关节炎的动物模型具有较好的疗效,并且副作用较低^[2]。大防风汤是治疗类风湿性关节炎验方之一,由 15 味中药组成,有黄芪、苍术、当归、地黄、杜仲、芍药、防风、川芎、人参、附子、羌活、牛膝、大枣、干姜和甘草,其组方中部分中药有报告表明对免疫反应具有调节作用^[3~5],我们采用 II 型胶原诱发 NIH 小鼠关节炎模型,对大防风汤颗粒进行了实验研究,并对其作用机制进行了初步探讨。

1 材料

1.1 实验动物及分组 5 周龄 NIH 雄性小鼠 40 只,体重在 22~25 g 之间,适应性饲养一周后用于实验。4 只为正常对照组,36 只为被免疫组,其中 24 只用于分子生物学和免疫学实验,分为对照组和给药组(各 12 只),另外 12 只用于病理学实验。

1.2 实验用药 大防风汤颗粒剂购于日本 Tmura 汉方制药公司。

1.3 主要试剂 酶联免疫吸附试验(ELISA)用 II 型胶原(bovine type II collagen),Sigma 公司产品;福氏完全佐剂(complete Freud's adjuvant),Gibco 公司产品;福氏不完全左剂(incomplete Freud's adjuvant),Gibco 公司产品;Anti-mouse IgG (whole molecule);Sigma 公司。RT-PCR 实验用 PCR 引物,上海生物工程公司合成。

2 方法

2.1 造模 小鼠初次免疫,腹部皮下注射 100 μg II 型胶原纤维和 100 μg 福氏完全佐剂,3 周后再次免疫,使用 100 μg II 型胶原纤维和 100 μg 福氏不完全佐剂,共追加免疫 3 次。

2.2 给药 从初次免疫开始治疗组每天 ig 给大防风汤 2.2 mg,0.4 mL/只,连续 12 周,对照组代以同量的生理盐水。

2.2 观察项目

2.3.1 动物模型一般项目的观察 包括发病率、发病时间、发病程度和症状持续时间。

2.3.2 免疫对小鼠体重的影响 初次免疫和免疫后 3 周、6 周、9 周、12 周分别量体重。

2.3.3 分子生物学的测定 初次免疫后 12 周,脱颈处死小鼠,无菌取脾脏。取 100 mg 脾脏组织放入液氮保存,用于脾脏淋巴细胞 mRNA 的提取。脾脏淋巴细胞 mRNA 提取后,检测 mRNA 的纯度,符合要求,经 RT-PCR 法放大合成细胞因子特异性的 cDNA,经电泳测定 cDNA 的量来得知细胞因子 mRNA 的量。产物于 1.5%~2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 5 V/cm,上样量 15 μL 。计算机凝胶电像仪摄片,对照组与大防风汤组进行比较。

2.3.4 免疫学的测定 对照组与大防风汤组小鼠尾部每周采血 1 次,共 12 次,采血的样品经 1 500 rpm 10 min 离心后,提取血清,利用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法测定血清中 IgG 的水平。

2.3.5 病理检查 在发病时、发病后的第 1、第 2 和第 4 周分别取发病的肢体做病理学的检查。采用 HE 染色观察肿胀关节的病理表现,包括关节的滑膜、软骨和骨的炎性感染及破坏程度。观察小鼠发症时脾脏的病理变化,并与正常脾脏进行比较。对照组和给药组的小鼠在免疫后 12 周处死,取出脾脏和肝脏称重,脾脏经氯化氨处理后,进行细胞计数比较。

2.3.6 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 统计软件对资料进行 t 检验分析。

3 结果

3.1 发病情况 NIH 小鼠关节炎从初次免疫至 12 周, 发病率约 20%, 发病时间在免疫后 3 周至 10 周之间, 小鼠足部红肿明显, 症状持续时间 4 周, 对照组与治疗组相比, 发病率较高, 可达 25%, 且足部红肿程度较重, 症状持续时间较长。

3.2 免疫对体重的影响 对照组与给药组在初次免疫和免疫后 3, 6, 9, 12 周的体重比较, 无显著性差异。

3.3 血清中 IgG 的水平 根据 NIH 小鼠免疫后每周取血测定血清中 IgG 水平的结果, IgG 水平在免疫后 4~6 周明显上升, 并伴随追加免疫次数增加而升高, 至 12 周形成一个高峰。12 周血清中 IgG 的水平大防风汤组与对照组相比有显著的降低 ($P < 0.05$), 结果见表 1。

表 1 NIH 鼠初次免疫后 12 周血清中 IgG 的水平 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

周	对照组	给药组
1	0.054 ± 0.011	0.052 ± 0.012
2	0.064 ± 0.011	0.054 ± 0.011
3	0.11 ± 0.010	0.056 ± 0.013 ¹⁾
4	0.162 ± 0.024	0.059 ± 0.010 ¹⁾
5	0.165 ± 0.024	0.064 ± 0.015 ¹⁾
6	0.165 ± 0.028	0.064 ± 0.011 ¹⁾
7	0.177 ± 0.023	0.16 ± 0.017 ¹⁾
8	0.22 ± 0.023	0.22 ± 0.021
9	0.364 ± 0.022	0.22 ± 0.018 ¹⁾
10	0.384 ± 0.035	0.236 ± 0.020 ¹⁾
11	0.432 ± 0.024	0.288 ± 0.021 ¹⁾
12	0.616 ± 0.038	0.336 ± 0.031 ¹⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$

3.4 IL-1, TNF- α , INF-r, IL-6 的 mRNA 表达水平 对照组与大防风汤组随机各取 4 个脾脏淋巴细胞样本检测, 结果显示对照组与给药组相比, IL-1, TNF- α 和 INF- γ 的 mRNA 基因表达水平较高 (图 1~3), IL-6 的 mRNA 基因表达水平在两组中均未明显表达。

3.5 病理学检查 造模小鼠发病后第 2 周, 关节滑膜内有大量的炎性细胞浸润, 多为 T 淋巴细胞, 也可见浆细胞及单核细胞浸润, 滑膜增生肥厚, 甚至可以形成乳头状突起, 炎症可经过滑膜与关节的接合处浸润关节下软骨 (图 4), 后期可使关节塌陷。大量的炎性渗出积于关节腔内可直接破坏关节面, 并使关节纤维化、机化甚至僵直。造模小鼠 (免疫后第 8 周时) 与正常小鼠脾脏的病理切片显示, 造模小鼠脾

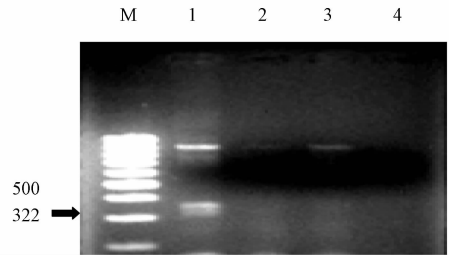


图 1 各组脾淋巴细胞 IL-1 mRNA 电泳图
1, 2 泳道为对照组; 3, 4 泳道为大防风汤组 (下同)

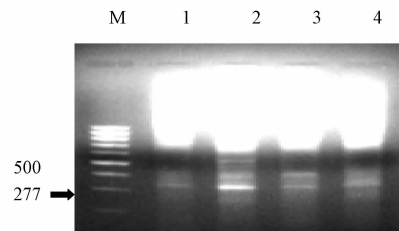


图 2 各组脾淋巴细胞 TNF- α mRNA 电泳图

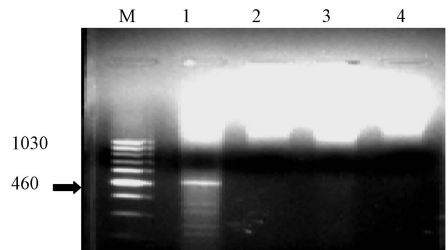


图 3 各组脾淋巴细胞 INF- γ mRNA 电泳图

脏细胞大小不等, 排列紊乱, 可见巨噬细胞、大量的浆细胞和中性粒细胞 (图 5~6)。造模小鼠的脾脏和肝脏的重量之比, 对照组和大防风汤组相比无显著性差异。

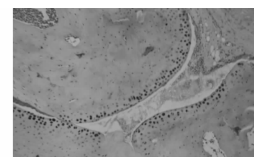


图 4 NIH 小鼠关节炎的病理表现 × 100

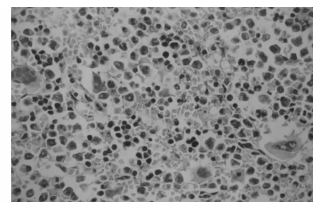


图 5 造模小鼠脾脏 × 400

4 讨论

类风湿性关节炎一般被认为是一种致病原因不

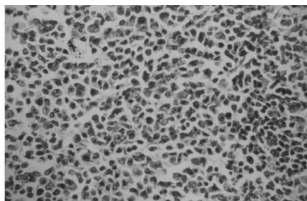


图 6 正常小鼠脾脏 ×400

明的自身免疫性疾病,临床治疗上还没有特殊的治疗方法,多采用对症治疗,因此,选择与人类的类风湿性关节炎非常相近的动物模型是探索新疗法的一种主要途径。风湿性关节炎的动物模型有多种,其中以 II 型胶原纤维诱导的关节炎动物模型是目前公认的比较成熟的模型之一。

类风湿性关节炎属祖国医学“痹证”的范畴,其病因早在《素问·痹论》中就有论述:“风寒湿三气杂至,合而为痹也”,在临床治疗上强调“辨证论治,审病求因,分析邪正相争,主张扶正去邪,重视脾胃生化之源”。来源于《和剂局方》的大防风汤是目前治疗类风湿性关节炎的有效方剂之一,有实验表明,大防风汤治疗类风湿性关节炎的动物模型(II 型胶原纤维诱导的关节炎)具有很好的免疫抑制和免疫调节功能^[6]。

本实验采用 II 型胶原诱导的关节炎动物模型,进行血清中 IgG, 炎性因子 IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ 的 mRNA 检测,并对发病时关节、脾脏进行病理检查。结果表明:治疗后 12 周,大防风汤组 IgG 水平与对照组相比显著降低($P < 0.01$)。IL-1, TNF- α 和 IFN- γ 的 mRNA 基因表达水平,对照组高于大防风汤组。对造模小鼠关节的病理检查显示,滑膜内有

炎性细胞浸润,并形成乳头状突起,关节腔内有炎性渗出物。对照组脾脏重量与大防风汤组相比,未见显著性差异。以上实验结果表明:大防风汤对于 II 型胶原纤维诱导的关节炎动物模型具有明显的免疫抑制作用。这些结果为大防风汤在临床上治疗类风湿性关节炎提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Simms RW, Kwoh CK and Anderson LG. Guidelines for monitoring drug therapy in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis & Rheumatism*, 1996, 39: 723.
- [2] Wakabayashi K, Inoue M and Ogihara Y. The effect of Keishi-bushi-to on collagen-induced arthritis [J]. *Biol. Pharm. Bull*, 1997, 20: 376.
- [3] Yoshida Y, Wang MQ and Liu JN. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular [J]. *International Journal of immunopharmacology*, 1997, 19(7): 359.
- [4] Kim KH, Lee YS and Jung IS. Acidic polysaccharide from *Panax ginseng*, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2 [J]. *Planta Med*, 1998, 64(2): 110.
- [5] Chang JY, Yang TY and Chang CP. The effect of “chihan (hot nature)” Chinese herbs on the secretion of IL-1beta and TNF-alpha by mononuclear cells [J]. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih*, 1996, 12(1): 18.
- [6] LianRong Wang, Naoki Ishiguro and Eiji Yamada. The effect of Da-Fang-Feng-Tang on treatment of type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice [J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 1999, 27(2): 205.