

中药痹愈汤对类风湿关节炎骨破坏和修复的实验研究

董宏生^{1*}, 陈 喆¹, 李春红², 胡荫奇², 王玉明¹, 董占斌²

(1. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010;

2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 探讨痹愈汤、甲氨蝶呤(MTX)对SD大鼠类风湿关节炎(RA)骨破坏、修复的作用机制和疗效。方法: 建立II型胶原蛋白诱导的SD大鼠关节炎模型, 将50只SD大鼠随机分为正常组, 模型组, 大剂量、中剂量痹愈汤组, MTX组, 造模后10天, 开始给药, 30天后取双侧踝关节切片进行骨保护素(OPG)mRNA和核刺激因子-KB受体配体(RANKL)mRNA原位杂交实验。结果: 大、中剂量痹愈汤组和MTX组比模型组和正常组明显上调OPG的平均光密度和计数。其中大剂量痹愈汤组优于MTX组和中剂量痹愈汤组。大、中剂量痹愈汤组, MTX组和模型组均比正常组上调RANKL的平均光密度和计数。结论: 中药痹愈汤、MTX通过上调OPG的表达, 提高了OPG/RANKL的比例, 从而竞争性抑制RANK和RANKL的结合, 最终抑制了破骨细胞生成和活化, 延缓关节周围的骨的破坏。

[关键词] 类风湿关节炎; 痹愈汤; 骨破坏; 骨侵蚀

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0080-03

类风湿关节炎(RA)骨破坏是其特征, 破骨细胞是骨侵蚀的主要因素。目前认为核刺激因子-KB受体配体(RANKL)是前体破骨细胞分化、成熟的启动因子, RANKL与受体RANK的相互作用是破骨细胞生成的基本信号。^[1]骨保护素(OPG)可以竞争性方式与RANKL特异性结合, 阻止RANKL与RANK的结合, 抑制破骨细胞的分化和活化, 从而抑制骨吸收。OPG/RANKL表达水平, 可作为决定破骨细胞介导的骨吸收程度的指标。^[2]RA属中医学“痹病”的范畴, 骨质破坏属于“骨痹”范畴。本研究以痹愈汤和甲氨蝶呤(MTX)治疗SD大鼠关节炎模型, 通过对OPG/RANKL表达水平的调节, 抑制RA骨质破坏。

1 材料

1.1 动物 雌性健康SD大鼠, 北京市实验动物中心提供, 动物级别: SPF级。

1.2 药材和主要试剂 RANKL mRNA探针和OPG mRNA探针: 武汉博士德生物有限公司。痹愈汤由骨碎补10g, 青风藤15g, 伸筋草10g, 土贝母15g, 莪术10g组成, 由中国中医科学院望京医院药理室

提供。

2 方法

2.1 造模与给药 雌性健康SD大鼠50只, 体重(146±20g), 鼠龄4~5周。依照随机表法分成5组: 空白组、模型组、大剂量痹愈汤组、中剂量痹愈汤组、MTX组, 每组10只。建立II型胶原蛋白诱导的SD大鼠关节炎模型, 将酸性II型胶原蛋白(collagen, CII)用弗氏完全佐剂配成CII浓度为2.5mg·mL⁻¹的乳剂, 按大鼠在趾皮内注射100μL/只致炎, 正常对照组大鼠注射0.9%生理盐水100μL/只。^[3]造模10d后开始给药, 连续30d。模型组开始每日给予2mL生理盐水/只ig; 中剂量痹愈汤组, 每日大鼠给予中药生药6g·kg⁻¹ig; 大剂量痹愈汤组, 每日大鼠给予中药生药12g·kg⁻¹ig; MTX组每周大鼠按1mg·kg⁻¹ig, 每周1次, 未用药的实验日给予0.9%生理盐水2mLig, 1次/d; 正常组不做任何处理。给药结束后, 取双侧踝关节, 放置在含多聚甲醛和DEPC的固定液固定备用。

2.2 一般情况 SD大鼠体重; 足趾厚度; 踝关节病理(HE染色)。

2.3 OPG/RANKL mRNA原位杂交实验 蜡片脱蜡到水; 加3%双氧水滴在病理组织上; 暴露mRNA核配片断: 3%柠檬酸1mL加浓缩型胃蛋白酶100mL;

[收稿日期] 2009-04-28

[通讯作者] * 董宏生, Tel: (010) 62176649; E-mail: donghongsheng123@163.com

后固定: 1% 多聚甲醛室温 10 min; 预杂交: 每张切片加 200 μ L OPG 或 RANKL 探针杂交液; 滴加封闭液 37 $^{\circ}$ C, 30 min; 滴加生物素化鼠抗地高辛; 滴加 SABC; 滴加生物素化过氧化物酶; DAB 显色, 吹干、以中性树脂胶封片。胞浆被染成棕黄色者为表达阳性, 阴性不显棕色。同时选任意一组织标本, 以预杂交液代替 OPG 或 RANKL 探针, 作为阴性对照。

2.4 图像选取位置的确定 采用美国 MIS2000SP 图像分析仪对病理切片进行分析, 在 400 倍光镜下采集踝关节胫距关节关节面, 每一个关节面取 3 个不同的视野, 使用图像分析软件搜集每个视野中光密度和阳性细胞计数。以 3 视野阳性细胞数的平均值作为该踝关节阳性细胞个数; 以 3 视野阳性细胞平均 OD 值, 作为该踝关节阳性细胞的平均光密度。

2.5 统计学分析 应用 SPSS 12.0 统计处理, 用单因素方差分析, 组间比较用 *t* 检验。

3 结果

3.1 一般情况 大鼠左后足跖皮内注射次日, 动物行动不便。逐渐出现左后足红、肿、热急性炎症表现, 持续 3 d 后, 该肢体炎症渐消退。7 d 后, 除左后足关节炎再次出现并加重外, 其他肢体亦渐出现关节炎, 表现为多个关节程度不同的红、肿、热及功能障碍, 造模成功, II 型胶原蛋白诱导的 SD 大鼠关节炎模型成功率为 50% ~ 80%, 模型组成模为 8 只, 大、中剂量痹愈汤组都是 8 只, MTX 治疗组 7 只。经药物灌胃治疗后, 关节炎症状逐渐减低, 模型组关节炎无明显改变。

3.2 造模前、后各组跖趾厚度 见表 1。

表 1 各组跖趾厚度(mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g·kg ⁻¹)	造模前	造模后				
				7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
正常组	10	—	4.45 ± 0.24	4.55 ± 0.25 ²⁾	4.62 ± 0.20 ²⁾	4.65 ± 0.29 ²⁾	4.67 ± 0.24 ¹⁾	4.69 ± 0.27 ¹⁾
模型组	8	—	4.62 ± 0.15	6.76 ± 0.99	6.81 ± 0.52	7.11 ± 0.75	6.42 ± 0.83	6.89 ± 0.33
大剂量痹愈汤组	8	12	4.66 ± 0.29	6.55 ± 1.32	6.50 ± 0.31	6.90 ± 1.10	5.17 ± 1.07 ¹⁾	4.85 ± 0.76 ¹⁾
中剂量痹愈汤组	8	6	4.65 ± 0.34	6.63 ± 0.82	6.88 ± 0.62	7.01 ± 0.58	5.08 ± 0.34 ¹⁾	4.79 ± 0.86 ¹⁾
甲氨蝶呤组	7	0.001	4.63 ± 0.32	6.64 ± 1.45	6.70 ± 0.42	6.99 ± 0.84	5.10 ± 0.67 ¹⁾	4.86 ± 0.78 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(表 2 同)

造模前各组大鼠跖趾厚度之间无显著性差异; 造模后第 7~ 21 天, 模型组大鼠跖趾厚度大于正常对照组, 具有显著性差异 (*P* < 0.01); 试验第 28 天~ 结束, 大、中剂量痹愈汤组 MTX 组大鼠跖趾厚度低于模型组, 差异具有显著性。 (*P* < 0.05); 试验第 28 天~ 结束, 大、中剂量痹愈汤组 MTX 组、正常组大鼠跖趾厚度之间无显著性差异。

3.3 踝关节病理改变观察(HE 染色切片) 正常组关节结构正常, 滑膜组织无充血水肿, 滑膜细胞无增生现象, 无血管翳形成。关节软骨表面光滑平整, 无剥脱现象, 关节软骨下骨小梁面积大小、排列正常。模型组可见明显的滑膜细胞增生, 排列紊乱, 可见数层排列不规则的滑膜细胞, 滑膜组织充血水肿, 毛细血管增生, 并可见炎细胞浸润; 增生的滑膜组织形成绒毛状, 可伸向关节腔深处, 或向软骨爬行形成血管翳; 在血管翳覆盖下的软骨表层可见明显的软骨表

层组织的变性、坏死, 关节软骨面剥脱; 软骨下骨的骨小梁面积大小无改变、排列正常。治疗组滑膜细胞增生减轻, 滑膜组织充血水肿明显减轻, 血管增生和浸润炎细胞数量减少, 血管翳形成显著减少; 关节软骨面可见扁平层剥脱, 剥脱软骨面较平整。

3.5 OPG 平均光密度和计数 见表 2。

表 2 OPG 平均光密度和阳性细胞计数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g·kg ⁻¹)	平均光密度	阳性细胞 计数(个)
正常组	10	—	0.278 ± 0.014 ²⁾	11.31 ± 3.4
模型组	8	—	0.148 ± 0.070	14.35 ± 2.91
大剂量痹愈汤组	8	12	0.268 ± 0.027 ²⁾	29.75 ± 7.30 ²⁾
中剂量痹愈汤组	8	6	0.299 ± 0.032 ²⁾	36.95 ± 6.40 ²⁾
甲氨蝶呤组	7	0.001	0.266 ± 0.010 ²⁾	24.80 ± 8.72 ²⁾

3.6 RANKL 平均光密度和计数 见表 3。

表 3 RANKL 平均光密度和阳性细胞计数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g·kg ⁻¹)	平均光密度	阳性细胞 计数(个)
正常组	10	—	0.508 ± 0.123	22.58 ± 3.96
模型组	8	—	0.646 ± 0.046 ¹⁾	33.11 ± 5.89 ¹⁾
大剂量痹愈汤组	8	12	0.686 ± 0.046 ¹⁾	31.71 ± 7.63 ¹⁾
中剂量痹愈汤组	8	6	0.728 ± 0.055 ¹⁾	28.57 ± 6.61 ¹⁾
甲氨蝶呤组	7	0.001	0.626 ± 0.053 ¹⁾	31.17 ± 6.35 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.05

4 讨论

受累关节边缘的骨质侵蚀是 RA 的特点之一,骨质遭到破坏,则意味着其病理改变进入不可逆期,因此延缓甚至阻断 RA 病人的骨质侵蚀成为 RA 治疗的重要靶标之一。

虽然有多种激素、细胞因子参与了前体破骨细胞向活化的破骨细胞分化过程调节,但目前认为 RANKL 是前体破骨细胞分化、成熟的启动因子。RANKL 主要生理功能之一可以促进破骨细胞分化、刺激破骨细胞活化和提高破骨细胞存活,抑制破骨细胞凋亡。^[4] 在体外用证实 RA 滑膜细胞表达 RANKL 的 mRNA 就是诱导破骨前体细胞分化的细胞因子。在正常条件下,成纤维样滑膜细胞 RANKL 表达量低,而在 RA 疾病条件下, RANKL 表达量增高。这些作用出现于 RANKL 与它的受体 RANK 结合时,并最后表现为对骨的吸收。^[5] OPG 以竞争性的方式、高亲和力与 RANKL 特异性结合,阻止 RANKL 与 RANK 的结合,抑制破骨细胞的分化和活化并提高破骨细胞凋亡,从而抑制骨吸收,在骨代谢调节中起着关键性作用。在 RA 关节中可见表达不足^[6]。OPG 阻止骨侵蚀的效应在不同的实验性关节炎模型中已得到描述。对佐剂型关节炎模型小鼠使用 OPG 阻滞的实验发现^[7],疾病的早期给予 OPG 治疗后,治疗组较未治疗组关节滑膜破骨细胞数目明显减少,关节骨和软骨破坏也显著减轻。而 OPG 和 RANKL 表达水平,可作为决定破骨细胞介导的骨吸收程度的指标,是炎性关节疾病骨质破坏过程中重要的因素。

RA 骨侵蚀属于骨痹范畴,中药痹愈汤通过补肝肾、强筋骨、清热除湿、活血通络的治疗方法(骨碎补为君药,青风藤、伸筋草为臣药,土贝母、莪术为佐

药),使肝肾得补,筋骨得强,瘀祛络通而痹病愈。

在 SD 大鼠造膜后软骨局部侵蚀(HE 染色切片和正常组比较)。给予大、中剂量痹愈汤, MTX 治疗,能够显著减缓关节骨侵蚀和滑膜的炎症表现,并且上调 OPG 在软骨细胞中的表达(和模型组比较)。SD 大鼠造膜后软骨侵蚀处 RANKL 异常表达上调,(和正常组比较)。MTX 治疗后软骨细胞中的表达 RANKL 表达均未见明显降低。

综上所述,本实验在 mRNA 水平观察大、中剂量痹愈汤 MTX 对破骨细胞代谢调控的影响,上调 OPG 的表达,提高了 OPG/RANKL 的比例,从而竞争性抑制 RANK 和 RANKL 的结合,最终抑制了破骨细胞生成和活化,从而抑制异常有功能的成熟破骨细胞形成,延缓骨矿密度丢失,因而延缓了由于关节周围的局部骨吸收损害关节功能,同时也减缓软骨由于失去了支撑而进一步加剧的软骨破坏。从而抑制骨吸收,达到治疗 RA 缓解骨侵蚀的目的。

[参考文献]

- [1] 奚正德,张冬青. 关节炎症骨侵蚀和骨保护蛋白的作用[J]. 科技进展, 2004, 26(6): 324-327.
- [2] 戴生明. 破骨细胞的分化与激活及其在关节炎骨质破坏中的作用[J]. 中华风湿病学杂志, 2004, 8(5): 312-314.
- [3] 马东来,李俊,陈敏珠,等. 大鼠佐剂性关节炎的诱导及其免疫异常研究[J]. 中国实验临床免疫杂志, 1995, 7(3): 13-17.
- [4] Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43: 250-258.
- [5] Danks L, Sabokbar A, Gundle R, et al. Synovial macrophage osteoclast differentiation in inflammatory arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61: 916-921.
- [6] Gough A, Sambrook P, Devlin J, et al. Osteoclast activation is the principal mechanism leading to secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol, 1998, 25: 1282-1289.
- [7] Saidenberg-Kermanch, Coherr Solalm, Bessis N, et al. Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation[J]. Joint Bone Spine, 2004, 71: 9-13.