

宣发膜原方和雷公藤制剂对大鼠 胶原诱导性关节炎影响的对比研究

贾红伟, 吕爱平, 赵 宁, 鞠大宏, 徐世杰, 王少君, 李 艳, 滕静如, 王安民, 魏 来
(中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

摘要: 探讨宣发膜原方对 CIA 的治疗机理, 为研究 RA 的发病和损伤机理提供实验依据。以 CIA 作为 RA 的动物模型, 对比研究宣发膜原方和雷公藤制剂对 CIA 大鼠免疫指标的影响。宣发膜原方和雷公藤制剂都可以减轻 CIA 大鼠病理损伤, 增加血清中 IFN- γ , 降低 TNF- α 和抗 CII 抗体, 并且雷公藤制剂对 CIA 的治疗效果不如宣发膜原方作用快。宣发膜原法能够减轻 CIA 病理损伤, 调节 CIA 大鼠免疫功能。

关键词: 痹证; 类风湿性关节炎(RA); II型胶原诱导性关节炎(CIA); 宣发膜原方

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2002)04-0021-04

Comparison of Xuanfa Moyuan Preparation and Common Threewinnut Root Treating CIA Rats

JIA Hong-wei, LU Ai-ping, ZHAO Ning, JU Da-hong, XU Shi-jie

(Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100700)

Abstract: To probe the mechanism of Xuanfa Moyuan preparation treating rats collagen- II induced arthritis(CIA) which is similar to human RA, rats were immunized with the complex of collagen- II and complete Freund's adjuvant. The immunological and morphological changes in the rats were observed after the rats were treated with Xuanfa Moyuan preparation common threewinnut root, damages of CIA rats joints were relieved, TNF- α and anti-CII antibody in the serum showed some decrease. But IFN- γ showed some increase. Xuanfa Moyuan preparation could relieve the damages of CIA rat's joints and regulate the immunology activity of CIA rats. And Xuanfa moytan preparation could produces effect more quickly than common threewinnut root.

Key words: Bi syndrome; rheumatoid arthritis(RA); collagen- II induced arthritis(CIA); Xuanfa Moyuan preparation

类风湿性关节炎(RA)是一种常见的自身免疫性疾病,属于中医“痹证”范畴。目前RA在国内外仍属于病因不明,难以防治的一种疾患。所以,探索RA的发病机理及其有效的防治方法,是当前RA研究中的重要课题。

本实验组^[1]曾以CIA作为RA动物模型,研究宣发膜原方治疗CIA机理,取得了一定实验结果。宣发膜原法为吴又可所创立,是用于治疗邪伏膜原所致温病的一种方法。通过对痹证的中医发病理论和现代病因学的学习和探讨,我们认为邪伏膜原是痹证发病机制之一,所以宣发膜原法可以用于治疗痹证。从宣发膜原法代表方达原饮加减的组成来看,“槟榔能消能磨,除伏邪为疏利之药;草果辛烈气雄,

除伏邪盘踞。”二药温燥气烈,故辅以常山、知母寒润之品。清里热兼制温燥之过。刚柔相济。青蒿芳香,清热透络,有引邪外出之功。黄芪,益卫固表,利水退肿,可用于寒湿阻滞于内所引起的肿胀。防风,功能祛风胜湿,止痛。由此可见,达原饮加减方诸药有行气,宣发伏邪之功,并辅以滋阴之品,力可宣痹除湿。

本实验室以往的实验结果显示^[2],宣发膜原法的代表方达原饮对于痹证动物模型CIA有具有免疫抑制和调节作用。为进一步阐明宣发膜原方治疗CIA的机理,本实验相对宣发膜原法和雷公藤治疗CIA进行对比研究。旨在通过对比研究宣发膜原法和雷公藤对CIA的免疫功能和病理形态学的不同影响,分析二者对CIA关节损伤的治疗作用,探讨宣发膜原法对CIA的治疗机理,为研究RA的发病和损伤机理提供实验依据。

1 材料

收稿日期: 2001-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870952)

1.1 动物及分组 由中国医学科学院实验动物研究所繁育厂提供(合格证号:医动字 D01-3008), Wistar 大鼠, 清洁级, 雄性, 体重 100g~120g, 48 只, 随机分为 4 组, 每组 12 只, 即: I 组 正常对照组; II 组 模型对照组; III 组 宣发膜原法治疗 CIA 组; IV 组 雷公藤治疗 CIA 组。其中, I 组大鼠足底假免疫和灌胃时给予生理盐水; II~IV 组大鼠造模后, II 组给予生理盐水灌胃, 其它各组给予药物治疗。

1.2 主要试剂和仪器 大鼠 CII, Lund 大学赠(纯度达 99.9%); 完全弗氏佐剂, DIBCO 产品; TNF- α 和 IFN- γ 试剂盒, Endogen 公司产品; 酶标仪, Lab-systems, Multiskan Ascent Finland。

2 实验方法

2.1 免疫方法^[2] 将 II 型胶原, 溶于 0.1M 乙酸中, 与等量完全弗氏佐剂充分乳化, 按 100 μ g II 型胶原/足/只大鼠, 于双侧足底皮下注射。

2.2 药物组成及给药方法

2.2.1 宣发膜原法治疗组(药物由中国中医研究院中药研究所谢宗万教授鉴定) 药用常山(*Dichroa febrifuga* Lour.), 槟榔(*Areca catechu* L.), 青蒿(*Artemisia annua* L.), 草果(*Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire), 知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.), 防风(*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.), 黄芪(*Astragalus membranascus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao), 各药比例为 2:2:2:1:1:1:2。采用水煎醇沉法, 制成适合浓度药液(由中国中医研究院基础理论研究所制剂室制成), 于免疫第 7d 按 30g/kg 药量灌胃, 每天一次, 连续 2 周。

2.2.2 雷公藤治疗组 雷公藤多甙片(福建省三明制药厂, 批号: 981101), 用蒸馏水将雷公藤片溶解稀释, 按 20mg/kg/日的药量在第 7d 时给水灌胃, 每天一次, 连续 2 周。

2.3 取材

2.3.1 采用乙醚麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 离心后取血清, -20℃冰冻备用。

2.3.2 取所用动物的踝关节, 福尔马林固定。

2.4 检测指标

2.4.1 关节肿胀程度 从 II 型胶原注射后的第 1d 起, 以游标卡尺测量双后肢踝关节下缘左右径和前后径, 每周一次, 以左右径乘前后径代表踝关节的肿胀程度, 来判断其大体发病程度和治疗效果。

2.4.2 光镜观察 取福尔马林固定的踝关节, 5% 硝酸脱钙, 酒精逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切

片, HE 常规染色。光镜下观察滑膜、软骨、骨的病理改变, 并进行关节病理损伤半定量计分^[4]。

0 分: 正常关节结构;

1 分: 关节组织中有空泡形成和轻度的关节炎, 并有滑膜增生, 血管数量增加, 以及小的炎性细胞灶, 可见软骨的软微破坏, 无骨的侵蚀破坏;

2 分: 关节有明显的软骨的侵蚀破坏, 有大量炎细胞浸润, 血管翳形成, 无骨破坏, 关节结构无破坏;

3 分: 有严重的血管翳形成, 广泛的软骨侵蚀破坏, 可见骨破坏, 关节结构遭破坏。

2.4.3 细胞因子以及抗 II 型胶原抗体含量的测量 (ELISA 法) INF- α 和 IFN- γ 的测定: ELISA 法, 具体依据产品说明。

抗 II 型胶原抗体测定^[5]: 小牛关节软骨 CII 包备酶标板, 加 BSA-PBS 封闭, 滴加待测血清和标准抗体, 加生物素化山羊抗大鼠抗体, 加亲合素化辣根过氧化酶, 滴加显色剂显色, 适时终止显色, 酶标仪上测定(450nm)。

2.5 统计学方法

Student T 法检验。文中表格数据用平均数 \pm 标准差(M \pm S) 表示。

3 结果

3.1 关节肿胀程度的测量和观察 造模后, 各造模动物的踝关节肿胀程度比正常组显著增加($P < 0.01$)。灌药第 7d, 宣发膜原法治疗 CIA 组动物的踝关节肿胀程度与模型组比较有显著减轻($P < 0.01$); 灌药第 14d, 雷公藤治疗组的大鼠踝关节肿胀程度与模型组比较有显著减轻($P < 0.01$)。

3.2 光镜观察 模型组可见明显的滑膜细胞增生, 滑膜组织充血水肿, 毛细血管增生, 血管翳形成, 炎细胞浸润, 明显的软骨表面剥脱。部分关节可见骨性融合或纤维融合现象, 软骨下骨有骨质破坏, 可见破骨细胞, 偶见死骨。

表 1 大鼠踝关节肿胀程度($\bar{x} \pm s$, 单位: cm^2)

组别	动物 (只)	给药前	给药 7d	给药 14d
I	11	0.55 \pm 0.038	0.53 \pm 0.059	0.54 \pm 0.052
II	12	0.74 \pm 0.048	0.72 \pm 0.052	0.80 \pm 0.122
III	12	0.68 \pm 0.069	0.61 \pm 0.064*	0.63 \pm 0.051*
IV	12	0.75 \pm 0.069	0.70 \pm 0.071	0.67 \pm 0.062*

注: 与模型对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

治疗 14d 后, 各治疗组中滑膜细胞增生减轻, 滑膜组织充血水肿明显减轻, 浸润的炎细胞和血管翳形成显著减少, 软骨破坏明显减轻, 未见软骨下骨破

坏。宣发膜原法治疗组较雷公藤组明显减轻。

表 2 大鼠踝关节病理损伤半定量计分

组别	I	II	III	IV
计分	0.1 ± 0.32	2 ± 0.67	0.9 ± 0.57*	1.3 ± 0.48*

关节病理损伤半定量计分结果表明:各治疗组动物关节损伤明显减轻,与模型相比较有显著性差异,其中以宣发膜原法治疗组最为显著($P < 0.01$)。

3.3 细胞因子和抗 CII 抗体含量测定

各治疗组动物血清 TNF- α 较模型组动物有所降低,IFN- γ 则有所升高。

各治疗组动物血清中抗 CII 抗体较模型组动物有所降低。

表 3 大鼠血清 IFN- γ 、TNF- α 、抗 CII 抗体[△]含量
($\bar{x} \pm s$, 单位: pg/ml)

组别	动物 (只)	IFN 浓度	TNF 浓度	抗 CII 抗体
I	10	8.76 ± 11.11	6.99 ± 3.71	0.66 ± 0.13
II	10	4.65 ± 7.06	16.33 ± 20.28	0.89 ± 0.25
III	6	14.35 ± 6.04	11.51 ± 8.75	0.89 ± 0.007
IV	10	13.07 ± 9.54	1.82 ± 3.53*	0.91 ± 0.03

注 1: [△]单位, OD 值。

4 讨论

宣发膜原法为明代吴又可所创,用于治疗邪伏膜原所致的温病。本实验组通过对痹证的中医发病理论和现代病因学的探讨,认为痹证发病符合伏邪致病的特点^[6]。故痹证与温病,异病可以同治,可用宣发膜原法治疗痹证^[7]。从现代临床来看,有报道从伏邪理论入手来治疗免疫失调性疾病,取得相当疗效;而且有研究表明^[8],宣发膜原法具有免疫抑制和免疫调节的作用,可以用来治疗痹证。本实验旨在通过对比研究宣发膜原法和雷公藤对 CIA 的不同影响,分析 CIA 关节损伤机理,为 RA 的研究提供进一步的实验依据。

4.1 对 CIA 大鼠踝关节损伤的影响 结果表明:宣发膜原法和雷公藤对 CIA 的关节损伤有治疗作用,可以抑制 CIA 大鼠关节滑膜组织的炎细胞浸润、血管增生和血管翳的形成,减少滑膜组织增生,减轻关节软骨和骨的损伤,缓解踝关节的肿胀程度。其中以宣发膜原法治疗组显著,且宣发膜原法治疗组见效快于雷公藤治疗组。

4.2 对 CIA 大鼠血清细胞因子含量的影响 在本

实验中:各治疗组 TNF- α 的含量比模型对照组的均有所降低,这与抗 TNF- α 抗体被用于 RA 治疗的报道相一致^[9]。其中尤以雷公藤治疗 CIA 组效果显著。表明雷公藤对于 TNF- α 的影响优于宣发膜原法。由于细胞因子并不能直接造成关节软骨基质的降解,所以这有可能是通过对细胞因子的影响,间接影响关节滑膜细胞对蛋白酶类的分泌来减轻对关节损伤的^[10],或者通过减少刺激软骨内蛋白多糖的吸收和抑制软骨的蛋白多糖合成而减少对软骨的降解^[11],从而达到治疗目的。另一方面,通过对细胞因子的调节^[10],还可以减少炎细胞的浸润,减轻关节软组织水肿等炎症反应,减轻了关节炎的症状。

而 IFN- γ 量的变化与肿瘤坏死因子相反,各治疗组中有大量增加,雷公藤组和宣发膜原组无显著差别。IFN- γ 在治疗组中增加可能是因为^[9]:RA 的滑膜细胞有肿瘤样细胞增殖倾向,IFN- γ 可以阻止细胞株从 G₀ 期进入 G₁ 期,抑制滑膜细胞的增殖,减少血管翳的形成,从而减少了相关细胞因子和蛋白酶类的分泌;而且 IFN- γ 能抑制破骨细胞的活性,可以减少关节软骨下骨的破坏;另外,IFN- γ 可以抑制 Th2 细胞增殖,下调体液免疫反应,降低机体对自身 CII 的免疫反应,减少 TNF- α 的分泌^[12,13],抑制失控的细胞因子网络的进一步恶化,达到治疗 CIA 的作用。

4.3 对 CIA 大鼠血清中抗 CII 抗体的影响 从实验结果可以看出,正常 Wistar 大鼠血清中即含有较高水平的抗 CII 抗体,表明在正常 Wistar 大鼠体内可能存在对自身 CII 抗原的耐受。给予进一步 CII 抗原免疫时,可以打破耐受状态,诱导关节炎的发生。CIA 大鼠血清中抗 CII 抗体显著高于正常组($P < 0.05$),表明抗 CII 抗体在 CIA 的发病过程中起着一定的作用。但与模型对照组动物相比,各治疗组不能有效地降低血清中抗 CII 抗体的含量。这可能是因为宣发膜原法和雷公藤在短期内不能有效地降低抗 CII 抗体,需要长期治疗来观察;或者抗 CII 抗体只是在 CIA 发病中起始动因素作用,在疾病发展过程中或关节损伤过程中不起主要作用,宣发膜原法和雷公藤的作用靶点不是抗 CII 抗体,所以宣发膜原法和雷公藤治疗 CIA 虽然有效,抗 CII 抗体却不显著降低。

另外,综上所述可以看出,雷公藤对 CIA 的治疗效果不如宣发膜原法作用快,这表明二者对 CIA 的治疗作用,可能是通过不同的途径,作用不同的靶

点. 所以二者的起效时间不同。但二者对 CIA 大鼠血清 TNF- α JFN- γ 以及抗 CII 抗体的影响有相似的倾向, 这有可能是二者对 CIA 同病异治的作用机理所在。如果能够证实这一点, 对于 RA 发病机理和治疗的研究可能会提供有益的启示。

参考文献:

- [1] 吕爱平. 类风湿性关节炎中西医结合应用基础研究 [M]. 北京, 中医古籍出版社, 1999. 208.
- [2] Trentham D. E, et al. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis [J]. J Exp Med 1977, 14: 857.
- [3] 王斌. 大鼠滑膜细胞的分离及培养 [J]. 中国药理学通报, 1994, 10(1): 73-74.
- [4] Kenneth W. Adolph: human genome methods [M]. U. S. A, CRC Press, 1998. 224.
- [5] Lu A (吕爱平) et al: The effect of anti-CII antibody on type II collagen induced arthritis [J]. Eur J Immunol, 1997, In press.
- [6] 贾红伟, 徐世杰, 吴萍, 等. 伏邪致痹初探 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001. 3: 11.
- [7] 贾红伟, 鞠大宏, 吴萍, 等. 宣发膜原法治疗痹证的理

论探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2001. 7(8): 1.

- [8] 吕爱平, 徐世杰, 吴萍, 等. 宣发膜原法对免疫性小鼠免疫特性影响的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, (12): 28.
- [9] Di Giovine, F. S. , et al: interleukin 1 as a mediator of crystal arthritis stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced crystal-induced IL-1 [J]. Immunol. 1987, 138: 3213.
- [10] Stains NA, N Harper: oral tolerance in the control of experimental models of autoimmune disease [J]. Z Rheumatol, 1995, 54: 145.
- [11] Nakajima H et al: the effect of treatment with interferon gamma on type II collagen induced arthritis [J]. Clin Exp Immunol, 1990, 81: 441.
- [12] SHAKHOV, A. N. et al: interferon gamma enhances tumor necrosis factor alpha production by inhibiting early phase interleukin 10 transcription. Eur [J]. Cytokine Netw, 1996, 7: 741-750.
- [13] Thomas, HSG et al: suppression of collagen induced arthritis by oral administration of type II collagen: changes in immune and arthritic responses mediated by active peripheral suppression [J]. Autoimmunity, 1993, 16: 189.