

类风关合剂治疗类风湿性关节炎的临床及实验研究

许得盛 沈自尹 卢 苇 王文健 蔡定芳 陈伟华

内容提要 雷公藤与补肾益气、祛风活血药组成类风关合剂, 治疗类风湿性关节炎, 治疗后患者的人类白细胞 II 类抗原(HLA-DR⁺)细胞及 CD₄/CD₈比值下降($P < 0.05$), 自身混合淋巴细胞反应(AMLR)水平提高($P < 0.05$)。实验研究显示, 类风关合剂和单味雷公藤均可减轻类风关模型鼠病变关节的肿胀; 合剂在减轻滑膜细胞炎症、软骨细胞纤维变性方面作用较雷公藤强; 而在致免疫器官萎缩及抑制免疫细胞对有丝分裂原的增殖反应方面作用较雷公藤小。提示合剂可能通过改善 T 细胞亚群分布及细胞免疫功能缓解或减轻类风关病症。合剂中补肾益气祛风活血药可提高雷公藤的药效作用, 减轻其副作用。

关键词 类风关合剂 雷公藤 青霉胺 类风湿性关节炎 动物模型 细胞免疫 关节病理

Clinical and Experimental Study of RA Mixture in Treatment of Rheumatoid Arthritis XU De-sheng, SHEN Zi-yin, LU Wei, et al *Visceral Manifestation Lab. of Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)*

The RA mixture is composed of *Tripterygium Wilfordii* (TW) and other Chinese medicinal herbs with effect of expelling Wind, activating blood circulation, invigorating the Kidney and Qi. The authors treated rheumatoid arthritis (RA) patients with RA mixture and compared it with D-penicillamine as control. The two group's therapeutical effect is similar ($P > 0.05$), but the side effect occurring ratio in treatment group was obviously lower than that of control group ($P < 0.01$). After treatment with RA mixture, the patient's human lymphocytic antigen-degenerative reaction (HLA-DR⁺) cell, CD₄/CD₈ ratio reduced and auto-mixed lymphocytic reaction (AMLR) level enhanced ($P < 0.05$). The results of animal experiment showed that swelling of RA model mouse's joint could be reduced by both RA mixture and TW. Comparing with TW, RA mixture had stronger effect in controlling the inflammation of synovial cell and fibroid degeneration of fibrocytes. At the same time, RA mixture had stronger effect in protecting the immune organ from atrophy and protecting functions of cellular immunity. All above suggest that RA mixture reduce the syndroms of RA by improving distribution of T lymphocyte subsets and the functions of cellular immunity. The other Chinese medicinal herbs in the RA mixture could enhance TW's therapeutical effect and reduce it's side effect.

Key words RA mixture, *Tripterygium wilfordii*, D-penicillamine, rheumatoid arthritis, animal model, cellular immunity, joint pathology

近年来雷公藤及其提取物治疗类风湿性关节炎(类风关)屡有报道。该药具明显的免疫抑制作用, 故存在一定副作用。为增强其药效作用, 减轻其副作用, 我们将雷公藤与补肾益气、祛风活血药组成类风关合剂, 与青霉胺作对照, 观察到该合剂疗效与青霉胺相似^{〔1〕}。本

研究从细胞免疫角度研究合剂的作用机制, 还进一步对比观察合剂与雷公藤对类风关模型小鼠病变关节超微结构及免疫系统作用的异同。现将结果报告如下。

临 床 研 究

1 资料 类风关患者 22 例, 其中女 13

例,男 9 例,年龄 32~64 岁,平均 49.7 ± 8.7 岁;病程 2 个月~15 年,平均 4.9 ± 2.2 年;临床分期:早期 18 例,中期 4 例。所有患者均符合美国风湿病学会制定的诊断标准^[2],未用糖皮质激素及其他免疫抑制剂,或停止上述药 2 个月以上。另设健康成年组作检测指标对照,共 16 例,男 6 例,女 10 例,年龄 28~61 岁,平均 48.1 ± 6.9 岁。

2 治疗方法 类风关合剂(合剂)组成:雷公藤 30 g 仙灵脾 15 g 生地 15 g 黄芪 15 g 乳香 6 g 没药 6 g 蜈蚣 3 g 威灵仙 30 g 益母草 20 g 鸡血藤 20 g,由上海练塘中药厂加工成糖浆(每 60 ml 含雷公藤 30 g)。每人每日服 3 次,每次 20 ml。连续服药 3 个月。治疗前后各采血检测人外周血人类白细胞 II 类抗原(HLA-DR⁺)细胞、T 淋巴细胞亚群及自身混合淋巴细胞反应。

3 实验室检测方法

3.1 人外周血 HLA-DR⁺细胞 采用免疫组化学 ABC 酶联法。HLA-DR 系美国 Becton Dickinson 公司产品,工作浓度为

1:200。

3.2 人外周血 T 淋巴细胞亚群 采用免疫组化学 ABC 酶联法。CD₄、CD₈和生物素标记的羊抗鼠 IgG 均系美国 Dakopatts 公司产品,工作浓度分别为 1:20, 1:40 和 1:200,ABC 酶联试剂药盒为美国 Becton 公司产品。

3.3 自身混合淋巴细胞反应(AMLR) 参照徐卫东等的方法^[3],略加改进。采用羊红细胞分离 T 细胞和非 T 细胞,用丝裂霉素处理非 T 细胞, PBS 洗净后将 T 细胞与非 T 细胞以 1:2 比例混悬于 10% AB 血清的 RPMI 1640 液, 1×10^5 /ml T 细胞悬液中加 Con A $2.5 \mu\text{g}$,置 37℃, 5%CO₂温箱。分别于第 3、5、7 天取出 200 ml 细胞悬液,加 H³-TDR, 18 h 后收集计数 cpm(采用 LKB 液体闪烁计数仪)。

4 结果

4.1 22 例患者治疗前后 T 淋巴细胞亚群、HLA-DR⁺细胞变化及与健康成年人比较,见表 1。

表 1 类风关合剂对患者 T 淋巴细胞亚群、HLA-DR⁺细胞的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	例数	CD ₄ (%)	CD ₈ (%)	CD ₄ /CD ₈	HLA-DR ⁺ (%)
健康人	16	38.19 ± 2.23	28.13 ± 1.25	1.36 ± 0.07	17.47 ± 4.23
患者	治前	44.39 ± 2.06	23.85 ± 2.52	$1.86 \pm 0.21 \Delta$	$29.52 \pm 4.57 \Delta$
	治后	38.89 ± 2.93	26.02 ± 2.74	$1.49 \pm 0.15^*$	$20.03 \pm 2.20^*$

注:与治疗前比较, * $P < 0.05$; 与健康人比较, $\Delta P < 0.01$

治疗前类风关患者较健康成年人 CD₄⁺细胞增高, CD₈⁺细胞降低,使 CD₄/CD₈比值明显增高($P < 0.01$), HLA-DR⁺细胞比例也明显增高($P < 0.01$)。类风关患者治疗后与治疗前比较, CD₄⁺细胞下降, CD₈⁺细胞增加, CD₄/CD₈比值明显下降($P < 0.05$), HLA-DR⁺细胞也明显下降($P < 0.05$)。从而显示类风关合剂可降低类风关患者 CD₄/CD₈比值和携带 II 类抗原的 HLA-DR⁺细胞比例。

4.2 类风关合剂对类风关患者 AMLR 的影响 见表 2。治疗后与未经治疗的类风关患者 AMLR 第 3 天水平相似;第 3 天后经治疗患者的 AMLR 逐步上升,于第 7 天达高

峰,其第 5 天、第 7 天水平均明显高于未经治疗患者相应天数的 AMLR 水平,未经治疗患者 AMLR 在第 3 天后逐步下降。

表 2 类风关合剂对患者 AMLR 影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	例数	AMLR(cpm)		
		第 3 天	第 5 天	第 7 天
健康人	16	2663 ± 1976	3250 ± 1842	4671 ± 1871
患者	治前	2617 ± 2251	1789 ± 1757	1513 ± 1346
	治后	2567 ± 2429	$2923 \pm 1895^*$	$3644 \pm 2286^*$

注:与治疗前比较, * $P < 0.05$

实验研究

1 材料和方法

1.1 类风关模型小鼠造模 参照有关文

献⁽⁴⁾取新西兰小黑鼠与昆明小白鼠第 5 代杂交小灰鼠, 体重 33.45 ± 3.74 g, 均为雄性(由上海中医药大学伤骨科研究所提供)。以昆明小白鼠全血 1 ml 作诱导剂注入小灰鼠腹腔。分 3 组分笼饲养, 治疗组 16 只, 雷公藤组 16 只, 对照组 8 只, 另设正常小白鼠组 8 只, 作检测指标对照。

1.2 实验方法 雷公藤: 福建光泽地区出产的带皮根, 水煎浓缩, 含生药 1 g/ml。类风关合剂组成同前, 水煎浓缩, 每毫升含雷公藤 1 g。3 组鼠分别每天灌胃类风关合剂 0.3 ml, 雷公藤煎剂 0.3 ml 和生理盐水, 均喂 14 天。脊椎休克后眶内取血, 无菌条件下取胸腺和脾脏。

2 观察项目

2.1 模型鼠病变关节的外观变化。

2.2 模型鼠病变关节超微结构的电镜观察。取鼠足趾关节滑膜和软骨组织于预冷的 5% 戊二醛溶液中, 放 3 天, 在关节面上滴 5% 戊三醛冷冻固定液进一步固定 24 h, 取下组织块修整为 1 mm^3 , 再经戊二醛-锇酸双重固定后, 梯度酒精脱水, 用环氧树脂 Epon 812 浸透与包埋, 超薄切片, 厚度为 $500 \text{ \AA}$, 经醋酸铀和枸橼酸铝双重染色后, 在 JEOL-JEM-1200 EX 型透视电镜下观察。

2.3 胸腺和脾脏重量指数测定 方法参照左冬梅等的方法⁽⁵⁾。

2.4 胸腺和脾细胞对有丝分裂原的增殖反应 0.1 ml 胸腺细胞($1 \times 10^6/\text{ml}$)加植物血凝素(PHA) $5 \mu\text{g}$, 0.1 ml 脾细胞($1 \times 10^6/\text{ml}$)加美洲商陆(PWM) $5 \mu\text{g}$, 在 37°C , 5% CO_2 饱和湿度培养 48 h, 掺入 ^3H 标记的胸腺嘧啶, 再培养 18 h, 液闪仪计数 cpm。

2.5 模型鼠血清 IgG 用单向免疫扩散法。

3 结果

3.1 类风关合剂和雷公藤对模型鼠病变关节作用的比较

3.1.1 外观变化 诱导剂注射 24 h 起, 模型鼠的四肢关节肿胀, 踝关节和中节趾间关

节尤明显。以后未经治疗的对照组鼠病变关节颜色逐渐变深, 部分挛缩。治疗组和雷公藤组鼠病变关节肿胀逐渐消退。显示两者均可减轻模型鼠病变关节的炎症反应。

3.1.2 超微结构观察 滑膜细胞: 对照组模型鼠病变关节中见滑膜细胞增生, 胞内溶酶体明显增多, 粗面和滑面内质网扩张, 核壁不明显。雷公藤组模型鼠的滑膜细胞内溶酶体减少, 粗面内质网减少, 核壁可见, 轻度浓染。与对照组相比, 雷公藤组鼠的滑膜细胞炎症减轻。治疗组模型鼠滑膜细胞中溶酶体更少, 线粒体发达, 细胞核壁浓染, 核仁着壁。显示类风关合剂比雷公藤减轻滑膜炎症的作用更明显。软骨细胞: 对照组模型鼠病变关节切片中未见有软骨细胞陷窝, 可见软骨细胞基质纤维化, 细胞器和胞浆明显减少, 核固缩, 核周池不明显, 呈现软骨细胞纤维化变性。雷公藤组的切片中软骨细胞陷窝存在, 细胞外形稍完整, 基质纤维化减轻, 核周池也不明显, 呈现软骨细胞灶性纤维化变性。治疗组的切片中可见软骨细胞较完整, 基质纤维化不明显, 核周池存在, 呈现软骨细胞基本正常。显示类风关合剂在减轻模型鼠软骨纤维化变性方面比雷公藤作用明显。

3.2 类风关合剂与雷公藤对模型鼠免疫系统作用比较

3.2.1 胸腺和脾脏重量指数 见表 3。类风关模型鼠与正常小鼠比较, 胸腺和脾脏明显增生肿大。雷公藤和类风关合剂均可明显抑制或减轻模型鼠胸腺和脾脏肿大, 其中合剂抑制作用及致萎缩作用较雷公藤为轻。

表 3 各组模型鼠胸腺和脾脏重量指数比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	鼠数	胸腺指数	脾脏指数
正 常	8	0.4579 ± 0.1225	6.9328 ± 1.0044
对 照	8	$0.6582 \pm 0.2918^{**}$	$14.8974 \pm 3.3925^{**}$
雷公藤	16	$0.3774 \pm 0.0779^{*\Delta\Delta}$	$7.0704 \pm 2.8192^{*\Delta\Delta}$
治 疗	16	$0.4794 \pm 0.1425^{\Delta\Delta\Delta}$	$8.0565 \pm 2.2177^{\Delta\Delta}$

注: 与正常组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与雷公藤组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

3.2.2 胸腺细胞和脾细胞对有丝分裂原的增殖反应 结果见表 4。

表 4 各组模型鼠胸腺和脾细胞对有丝分裂原的反应比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	鼠数	胸腺细胞对 PHA 反应 (cpm)	脾脏细胞对 PWM 反应 (cpm)
正常	8	5054 $\pm$ 487	4644 $\pm$ 391
对照	8	3010 $\pm$ 702 *	2693 $\pm$ 469 *
雷公藤	16	1290 $\pm$ 468 $\Delta\Delta$	1236 $\pm$ 346 $\Delta\Delta$
治疗	16	2569 $\pm$ 824 $\Delta\Delta\Delta$	1654 $\pm$ 426 $\Delta\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与雷公藤组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

类风湿模型鼠胸腺和脾细胞对有丝分裂原的增殖反应能力较正常鼠明显低下。雷公藤使模型鼠已低下的胸腺和脾细胞的转化能力更为低下, 呈现过强的免疫抑制作用。与雷公藤相比, 类风湿合剂对模型鼠胸腺和脾细胞转化能力的抑制明显减轻。

3.2.3 血清 IgG 正常组血清 IgG(mg/ml) 为 29.92 ± 3.01 , 对照组为 49.56 ± 9.81 , 明显高于正常组($P < 0.01$)。雷公藤组为 24.50 ± 5.91 , 低于正常组($P < 0.05$)和对照组($P < 0.001$)。治疗组为 30.12 ± 3.26 , 低于对照组($P < 0.001$), 高于雷公藤组($P < 0.05$), 显示雷公藤强力抑制 IgG 产生, 类风湿合剂抑制 IgG 作用较雷公藤小。

讨 论

雷公藤的应用提高了中药治疗类风湿的疗效, 也产生不少副作用。我们将其与祛风活血、补肾益气药合用, 疗效与现常用的青霉胺相似, 特别在缓解关节疼痛、肿胀, 晨僵方面起效快, 作用明显, 可能是乳香、没药、蜈蚣等祛风活血药具一定镇痛、抗炎等作用, 增强了雷公藤的药效作用^①, 而且合剂副作用明显少于青霉胺^①。可能与黄芪、生地、仙灵脾等补肾益气药有一定的增强或改善免疫、消化、内分泌等系统功能的作用有关。

近来认为细胞免疫异常是导致类风湿发病的主要原因^⑥, 常表现为(1)携带 HLA-DR

抗原的细胞增多, 引起 T 辅助细胞分泌大量淋巴因子, 导致多克隆 B 细胞活化, 产生过多自身抗体, 已发现该类细胞增多与类风湿活动有关。(2) CD_4^+ 细胞增多, CD_8^+ 细胞减少, CD_4/CD_8 比值上升, 反映机体免疫内环境异常。(3) 自身混合淋巴细胞反应(AMLR)低下, AMLR 反映 T 细胞对自身抗原的识别和反应能力^⑦。针对自身抗原, 先是 Th 细胞激活, 后是 Ts 细胞活化, 尤后者功能的提高可抑制过多抗体产生, 诱导机体对自身变性衰老细胞的清除, 从而维持自身内环境稳定, 因而 AMLR 是免疫调节的极重要机制, 本研究观察治疗前类风湿患者 AMLR 水平从第 3 天后呈下降趋势, 侧重反映了 Ts 细胞对自身抗原的反应能力较差。经类风湿合剂治疗, 类风湿患者 HLA-DR⁺ 细胞下降, 部分阻断了免疫反应的起始过程, CD_4^+ 细胞减少, CD_8^+ 细胞增多, CD_4/CD_8 比值下降, 从而纠正 T 细胞亚群分布紊乱, 有助于恢复免疫稳定状态; AMLR 呈上升趋势, 至第 7 天达高峰, 趋向健康人水平, 显示患者 T 细胞对自身抗原的识别和应答能力得以提高, 有助于抑制过多抗体产生, 加速清除变性细胞。上述可能就是类风湿合剂治疗类风湿有效的免疫学机理。

滑膜的炎症、渗出, 软骨的纤维化变性是导致类风湿患者关节肿胀、僵硬、变形的主要过程。虽然外观显示雷公藤和类风湿合剂均可减轻模型鼠病变关节的肿胀, 超微观察显示两者通过减少溶酶体, 保护细胞核等结构, 减轻滑膜细胞炎症, 通过保护线粒体等细胞器及基质纤维, 减轻软骨细胞纤维化变性, 类风湿合剂作用较单味雷公藤更明显。而在致免疫器官萎缩, 抑制免疫细胞对有丝分裂原的应答能力方面, 雷公藤作用远较类风湿合剂显著。因而推测合剂中祛风活血、补肾益气药增强雷公藤药效作用, 减轻其副作用的途径可能就是这些药可抑制或减轻雷公藤过强的免疫抑制作用, 从而起到免疫抑制及一定的免疫调节作用, 有

(下转第 23 页)

等治疗无相关性,脑出血血肿量大于 40 ml 者在病后 8 周以上才能完全或近完全吸收⁽⁵⁾。西药中目前尚未发现成熟理想的消除颅内血肿的药物。所以笔者选择了中西医结合的治疗方法,以弥补上述不足。经临床对比观察,采用中西医结合治疗有助于患者颅内血肿吸收和脑水肿的尽快消除,减轻患者神经功能的缺损程度。患者康复预后优于单纯西医保守治疗,两组间经统计学处理存在着显著差异。在本观察中有 1 例出血量达 80 ml 的重型脑出血患者,经 4 周中西医结合治疗(服中药 24 剂),血肿量仅剩近 15 ml,脑水肿基本消失,半年后患者的生活、劳动能力基本正常。显然,这与颅内血肿早期快速消除有着密切关系。本研究两组病死率明显低于文献报道⁽³⁾,可能与病例选择有关(即入院 3 日内死亡者不计入本研究)。

中医学认为,脑出血是由于肝肾亏损、肝阳暴涨、气血逆乱、瘀血阻滞所致。选用以大黄、丹参、山萸肉、何首乌、石菖蒲、牛膝等组成复方,以补肾活血为主兼平肝潜阳、通腑理气、逐痰降逆。方中的活血化瘀药物,经现代药理学证实,具有改善微循环障碍、降低毛细血管通透性、增强吞噬细胞功能、加速纤维蛋白溶解的作用^(6,7)。能促使侧支循环的建立,改善脑细胞缺血缺氧状态,从而可加快颅内血肿的吸收和脑水肿的消除。其中何首乌、丹参、三七、山萸肉等药物,又能提高超氧化物歧化酶(SOD)的活性,抑制过氧化脂质

(LPO)的产生^(8~10),减轻脑出血急性期神经细胞的损伤。上述中药与降颅压作用确切的西药合用,相辅相成,提高了疗效。笔者认为,这是脑出血早期康复的有效治疗方法之一,值得深入研究。

参 考 文 献

1. 1986 年全国第二次脑血管病学术会议,对脑卒中临床研究工作的建议. 中华神经精神科杂志 1988; 21(1): 57.
2. 多田明, CT による脳内血腫量の測定. 脳神経外科 1981; 9: 251.
3. 刘之荣, 吴志英, 段德新, 等. 脑出血患者的临床与死亡原因分析. 临床神经病学杂志 1993; 脑血管病研究进展专刊: 157.
4. 张雪林, 黄其流, 陈燕萍. 脑出血 CT 改变与预后. 中风与神经疾病杂志 1989; 6(1): 15.
5. 唐北沙, 杨期东, 杨 欢, 等. 脑出血的动态 CT 扫描观察. 临床神经病学杂志 1993; 脑血管病研究进展专刊: 382.
6. 李春越. 血瘀症及活血化瘀方药研究进展. 中西医结合杂志 1988; 8(5): 317—320.
7. 王合森, 赵习德. 脑出血急性期的活血化瘀治疗研究概况. 中西医结合杂志 1990; 10(11): 694—696.
8. 郭肇铮, 卢泳才, 刘小青, 等. 白首乌抗自由基损伤的研究. 中西医结合杂志 1988; 8(5): 282—284.
9. 金 鸣. 活血化瘀与自由基损伤. 中草药 1993; 24(5): 269.
10. 董而博, 冯兰飞, 高国丽, 等. 三七对大鼠 LPO 及 SOD 的影响. 中草药 1990; 21(4): 26.

(收稿: 1995—02—20 修回: 1995—08—29)

(上接第 17 页)

助于稳定和减轻病情。同时这些药本身就具有一定的抗炎、镇痛、促进组织血液循环的作用。

参 考 文 献

1. 卢 苇, 许得盛, 王文健, 等. 类风关合剂治疗类风湿关节炎 22 例. 上海中医药杂志 1993; 9: 26.
2. 戴自英. 实用内科学. 上册. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 790.
3. 徐卫东, 李 岩, 刘成贵. 类风湿关节炎患者细胞免疫反应异常的初步观察. 中华内科杂志 1990; 29(5): 296.

4. 王绪辉, 朱显华, 闵熙敬, 等. 痹证一类风湿性关节炎的实验动物模型研究. 中西医结合杂志 1990; 11(基础理论研究特集): 149.
5. 左冬梅, 张绍伦. 东北雷公藤对小鼠细胞免疫功能的抑制作用. 白求恩医科大学学报 1986; 12(5): 394.
6. 苑道学. 关于类风湿性关节炎的病因、发病机制及治疗的新观点. 国外医学·免疫学分册 1990; 3: 209.
7. Weksler ME, Moody CE Jr, Kozak RW. The autologous mixed lymphocyte reaction. Adv Immunol 1981; 31: 271.

(收稿: 1994—12—30 修回: 1995—10—19)