

宣发膜原法对免疫性关节炎(痹证) 小鼠免疫功能的影响*

吕爱平¹ 刘振丽¹ 张枢明² 王安民¹

内容提要 目的:探讨宣发膜原法对免疫性关节炎(痹证)小鼠免疫功能的影响。方法:运用Ⅱ型胶原免疫所致小鼠关节炎作为中医痹证动物模型,用达原饮作为宣发膜原法的代表方,对痹证小鼠给药前后关节炎发病程度,血清抗Ⅱ型胶原抗体、IgM 型类风湿性因子、淋巴结细胞产生白细胞介素 10(IL-10)和 γ -干扰素(IFN- γ)分别用记分法和免疫酶标法进行了检测。结果:宣发膜原法能推迟小鼠关节炎的发病时间,降低发病率,降低小鼠血清抗Ⅱ型胶原抗体 IgG2a、IgG2b 和 IgG1 水平和 IgG2a + IgG2b 与 IgG1 的比值,降低淋巴细胞产生 IFN- γ 的水平,提高其产生 IL-10 的能力。结论:宣发膜原法不仅能抑制小鼠对Ⅱ型胶原的免疫反应,同时能调节小鼠对Ⅱ型胶原的免疫反应。

关键词 Ⅱ型胶原 免疫 关节炎 宣发膜原法 痹证

Effect of Immune Function Xuanfa Moyuan Principle on Immune Arthritis (Bizhen) in Rats LU Ai-ping, LIU Zhen-li, ZHANG Shu-ming, et al *Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100700)*

Objective: To explore the effect of Xuanfa Moyuan principle (宣发膜原法, XFMYP) on arthritic mice. **Methods:** The type Ⅱ collagen induced arthritis in DBA mice was taken as Bizheng(痹证) animal model. The Dayuanyin (达原饮, DYY) was taken as the representative prescription for XFMYP. The arthritis incidence and arthritis index were tested by scoring system. The anti-C Ⅱ antibody IgG and its subsets, IgM rheumatoid factor, interferon gamma and interleukin 10 produced by lymph node cells were tested by ELISA method. **Results:** XFMYP could delay the onset day of arthritis, decrease the arthritic incidence and index, decrease anti-Ⅱ IgG2a, IgG2b, IgG1 level and the IgG2a + IgG2b/IgG1 ratio in serum, decrease the production of interferon gamma by lymphocytes and increase the production of interleukin 10. **Conclusions:** XFMYP could inhibit the anti-C Ⅱ immune response, and balance the anti-C Ⅱ Th1 and Th2 type immune responses.

Key words type Ⅱ collagen, immune, arthritis, Xuanfa Moyuan principle, Bizheng

痹证的发病学理论人们普遍遵循《素问·痹论》的提法,“风寒湿三气杂致,合而为痹”,杂致是先后不一而致,即时间上侵入有先后之别。因而痹证发病当有伏邪存在。痹证的病位,正如《灵枢·周痹》而言:“…不在脏,而外未发于表”,不在内,不在表,即在半表半里之间,当属于膜原。因此,我们认为邪伏膜原是痹证的病机之一。我们以Ⅱ型胶原免疫所致的具有人类风湿关节炎(RA)诸多特征的关节炎作为动物模型^(1,2),探讨宣发膜原法对关节炎模型小鼠的免疫功能影响。

材料和方法

1 动物 5 周龄健康雄性 DBA 小鼠(瑞典隆德

大学提供),体重(22±2)g,30 只,分为两组,给药组 20 只,对照组 10 只。

2 免疫方法 以适量Ⅱ型胶原(从大鼠软骨肉瘤组织中获得)⁽³⁾,溶于 0.1mol/L 的乙酸中,与等量的不完全弗氏佐剂(DIFCO 产品)充分乳化,两组每只小鼠按 100 μ g Ⅱ型胶原于尾根部皮下注射 1 次。

3 药物组成及给药方法 采用宣发膜原法的方剂达原饮加减。药用常山、槟榔、青蒿、草果、黄芪、赤芍、防风、知母、甘草(按 1:1:1:1:3:1:1:1:1 比例),采用水煎醇沉法,制成干粉后备用。用时用蒸馏水稀释至合适浓度,过滤消毒后,根据预实验结果给药组于免疫当天腹腔注射 0.5ml(每毫升含 2g 生药)药液 1 次。对照组则于免疫当天腹腔注射等量蒸馏水。

4 检测方法

4.1 关节炎指数 按以下标准对动物关节炎程

*国家自然科学基金资助课题(No. 39300169)

1. 中国中医研究院基础理论研究所(北京 100700);2. 中国中医研究院中医杂志社

度记分:红肿涉及一个指关节计 1 分,红肿涉及两个指关节计 2 分,红肿涉及 3 个或 3 个以上指关节或是整个关节计 3 分。每只动物四肢合计最高分为 12 分。免疫后第 20 天起开始记分,每两天记录 1 次。每只动物的关节炎指数以其最高分进行分析。动物只要记 1 分,则计为发病的 1 例。

4.2 抗Ⅱ型胶原抗体测定 采用 ELISA 法。生物素标记的第二抗体抗小鼠 IgG、IgM 为 Jackson 产品,抗 IgG1、IgG2a、IgG2b 为 Southbinding 产品。所测样品为动物免疫后第 21 天及第 46 天的血清。所测样品均双孔重复对比,三个梯度稀释以确保结果准确。抗Ⅱ型胶原抗体 IgM 按最高 OD 值一半时稀释倍数的对数值(滴度)来计算。其他抗体用相同型(实验室自制)单克隆抗体作为标准品计算含量。

4.3 IgM 型类风湿因子的测定 采用 ELISA 法,即用单克隆抗Ⅱ型胶原抗体 IgG 包被酶标板,按前述加样后用生物素标抗小鼠 IgM 作为第二抗体进行检测。

4.4 γ -干扰素(IFN- γ)和白细胞介素 10(IL-10)的测定 采用 ELISA 法。免疫 46 天后,取腋下、颈部淋巴结,制成单细胞悬液,在 24 孔板上按 10 万/孔细胞与失活型胶原(10 μ g/ml)培养,4 天后收集每个动物培养淋巴细胞上清液,待测。用抗 IFN- γ 抗体(单克隆, Jackson 产品),包被 ELISA 板用于测定 IFN- γ ,用抗 IL-10 抗体(Southbinding 产品)包被 ELISA 板用于测定 IL-10。第二抗体分别用生物素标抗小鼠 IFN- γ 抗体(Jackson 产品)和生物素标抗小鼠 IL-10 IgM(自制)。测定时均用二孔三梯度稀释法,并重复双孔误差不得超过 10%,以保证数据可靠。

5 统计学检验 t 检验和卡方检验。

结 果

1 两组关节炎发病率和关节炎指数比较 见表

表 2 两组免疫 21 天后血清抗Ⅱ型胶原抗体比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM(滴度)
		(μg/ml)				
对照	10	441.0 ± 239.2	40.6 ± 11.8	76.2 ± 19.8	31.6 ± 17.6	0.450 ± 0.014
给药	20	191.0 ± 11.7*	40.9 ± 8.6	19.3 ± 11.2*	21.5 ± 10.7	0.450 ± 0.253

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

表 3 两组免疫 46 天后血清抗Ⅱ型胶原抗体比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM(滴度)
		(μg/ml)				
对照	10	604.0 ± 320.9	100.6 ± 54.3	51.6 ± 40.9	25.7 ± 14.4	0.694 ± 0.108
给药	20	372.0 ± 209.1*	47.5 ± 31.6	22.6 ± 15.3	12.8 ± 4.3	0.601 ± 0.413

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

1. 给药组小鼠的关节炎起病时间晚,发病率低,关节炎程度轻。

表 1 两组关节炎发病率和关节炎指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	起病时间(天)	发病率(%)	第 46 天关节炎指数
对照	10	30.0 ± 5.8	40	4.5 ± 1.2
给药	20	39.0 ± 2.1*	25*	1.0 ± 0.5*

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

2 两组免疫 21 天后小鼠血清抗Ⅱ型胶原抗体比较 见表 2。给药组抗Ⅱ型胶原抗体 IgG 和 IgG2a 显著下降,提示宣发膜原法具有免疫抑制作用,但仔细分析代表 Th1/Th2 型免疫反应的(IgG2a + IgG2b)/IgG1 比值来看,对照组为 2.56 ± 0.29 ,而给药组为 1.09 ± 0.22 ,两组比较,差别有显著性意义($P < 0.01$),提示宣发膜原法在免疫抑制的同时,具有免疫调节作用,即使关节炎小鼠物以 Th1 型为主的免疫反应转为 Th2 型免疫反应,从而达到阻止Ⅱ型胶原免疫对关节的破坏作用。

3 两组免疫 46 天后小鼠血清抗Ⅱ型胶原抗体比较 见表 3。给药组小鼠抗Ⅱ型胶原抗体水平下降,提示宣发膜原法具有免疫抑制作用。

4 两组免疫 46 天后小鼠血清 IgM 型类风湿因子比较 给药组小鼠的血清 IgM 型类风湿因子滴度为 1.423 ± 0.201 ,而对照组小鼠血清 IgM 型类风湿因子滴度为 0.546 ± 0.137 ,两组比较,给药组小鼠血清 IgM 型类风湿因子滴度远高于对照组($P < 0.01$)。

5 两组免疫 46 天后淋巴细胞分泌 IFN- γ 和 IL-10 比较 对照组小鼠淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平用滴度计算为 0.609 ± 0.182 ,分泌 IL-10 的水平用滴度计算为 0.234 ± 0.201 ,而给药组小鼠淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平为 0.079 ± 0.012 (与对照组比较, $P < 0.01$),分泌 IL-10 的水平为 0.478 ± 0.279 (与对照组比较, $P < 0.01$),提示:给药组小鼠淋巴结细胞产生 IFN- γ 能力下降,而产生 IL-10 的能力上升。

讨 论

痹证的发病学理论人们普遍遵循《素问·痹论》的提法：“风寒湿三气杂致，合而为痹”。其中的杂致，鲜有人详究。相杂者，不一也。杂致即先后不一而致，也就是说，风寒湿之邪，在时间上侵入有先后之别，而三者相合才能致使人体发生痹证。先期所致者伏而不发，符合中医学关于感而即发者为新感，感而不即发为伏邪的发病学理论。《灵枢·贼风》所论，恰好作为最好的注脚，其曰“此皆有所伤于湿气，藏于血脉之中，分肉之间，久而不去。……其开而遇风寒，则血气凝滞，与故邪相袭，则为寒痹。”其中之湿气，被称为故邪，即后世之伏邪。

邪伏之所，就此言我们认为当属膜原。膜原之说始于《内经》，发扬于明代吴又可，后代有阐发。人体中的膜样组织大都可归入中医膜原的概念之下。膜原在中医学中属半表半里之位，而痹证的病位，如《灵枢·周痹》言“内不在脏，而外未发于表”。不在表、不在脏，则在半表半里之间。结合现代医学类风湿性关节炎(RA)的发病，首先侵犯滑膜，而滑膜为人体中膜样组织，应相当于膜原的范畴。因此，我们认为伏邪发于膜原，为中医学有关痹证的发病学理论，并选用达原饮作为宣发膜原法的代表方。

痹证范围很广，我们以目前较常用的Ⅱ型胶原免疫所致小鼠关节炎作为动物模型，因其具有与人RA相似的遗传性特征和相似的病理变化⁽⁴⁾，观察了宣发膜原法对关节炎模型小鼠的影响。结果表明：宣发膜原法能推迟关节炎的发病时间，降低Ⅱ型胶原所致关节炎的发病率。

从抗Ⅱ型胶原抗体来看，宣发膜原法主要抑制机体对Ⅱ型胶原的体液免疫反应，使抗Ⅱ型胶原抗体IgG及其亚型下降。由于IgG2a和IgG2b均属于Th1型反应的抗体亚型，IgG1则属于Th2型反应的抗体亚型，而类风湿性关节炎属于Th1型免疫反应⁽⁵⁾，因此(IgG2a+IgG2b)/IgG1比值在一定程度上能反应Th1和Th2型反应水平⁽⁶⁾。本结果表明，宣发膜原法能使代表Th1/Th2型反应的(IgG2a+IgG2b)/IgG1比值下降，说明宣发膜原法同时具有免疫调节作用，即将该关节炎以Th1型反应为主的T细胞反应转为以Th2为主的免疫反应，从而有效地控制Ⅱ型胶原免疫对关节的破坏作用。

为了探讨宣发膜原法作用的可能环节，我们观察

了其对关节炎模型小鼠淋巴细胞IFN- γ 、IL-10的影响。已知IFN- γ 是Th1反应的代表性细胞因子，直接参与关节软骨等组织的损伤⁽⁷⁾，而IL-10是Th2反应的一种细胞因子，能缓解关节炎病情，早期给予IL-10能降低Ⅱ型胶原所致关节炎发病率⁽⁸⁾。本结果表明：宣发膜原法能显著降低关节炎小鼠IFN- γ 水平，提高IL-10水平。

类风湿因子是一种对自身IgG Fc段产生的抗体，其意义本身只说明具有自身免疫的存在，其在发病中的作用一直不十分清楚。本结果表明，宣发膜原法能提高关节炎模型小鼠血清IgM型类风湿因子水平。由于我们所指的是抗自身抗Ⅱ型胶原抗体IgG的IgM型类风湿因子，受到诸如抗Ⅱ型胶原抗体IgG的特性、IgM的特异性结合点是该IgG的Fc段还是Fab段的许多因素影响，因而其作用机理有待于进一步阐明。

宣发膜原法虽能抑制机体对Ⅱ型胶原的免疫反应，并能调节机体对Ⅱ型胶原的免疫反应，但其深入的机制和所用药物的有效成分、给予方式和次数等，均值得今后进一步探索。

参 考 文 献

1. 吕爱平, 王安民, 曾晓莲. 益肾调痹丸对大鼠实验性痹证影响的病理学研究. 中医杂志 1988; 29(6): 49—51.
2. 吕爱平, 艾景录, 王安民, 等. 肾虚痹证发病机理研究. 中医杂志 1995; 36(8): 492—493.
3. Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, et al. Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis. Immunology 1988; 65: 305—311.
4. Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, et al. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading arthritis. Immunological Review 1990; 118: 193—232.
5. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today 1996; 17: 138—146.
6. Mosmann TR, Coffman RI. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol 1989; 7: 145—173.
7. Boissier MC, Chiochia G, Bessis N, et al. Biphasic effect of interferon gamma in murine collagen induced arthritis. Eur J Immunol 1995; 25: 1184—1190.
8. Walmsley M, Katsikis PD, Abney E, et al. Interleukin 10 inhibition of the progression of established collagen induced arthritis. Arthritis Rheum 1996; 39: 495—503.

(收稿: 1996-12-18 修回: 1997-08-08)