

· 实验研究 ·

新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠疗效及滑膜 fas、fasL 及 bcl-2 表达的影响*

刘 健¹ 张皖东¹ 陈光亮² 胡 闻³ 韩明向¹

内容提要 目的 观察新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠疗效及对病变滑膜 fas、fasL、bcl-2 表达的影响。方法 采用弗氏完全佐剂造模,设立正常组、模型组、甲氨喋呤(MTX)组、雷公藤(TPT)组和新风胶囊(XFC)组,记录各组大鼠的关节炎指数及体重变化,检测 fas、fasL、bcl-2 在局部关节滑膜组织中的表达。结果:与治疗前比较,XFC组、TPT组及MTX组治疗后大鼠的关节炎指数显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。XFC组给药前后体重增加值与正常组比较,差异无显著性($P > 0.05$);TPT组及MTX组给药前后体重增加值显著低于正常组和XFC组($P < 0.01$)。与模型组比较,XFC组 fasL 表达显著增加($P < 0.05$),bcl-2、fas 表达均有所减少,但差异无显著性($P > 0.05$);XFC组上述数据与MTX组、TPT组比较差异无显著性($P > 0.05$)。结论:XFC与MTX、TPT一样能降低佐剂性关节炎模型大鼠的关节炎指数,XFC在增加模型大鼠的体重方面优于MTX和TPT;XFC可能通过促进 fasL 的表达、抑制 bcl-2 的表达,促进增生滑膜细胞的凋亡,达到抑制滑膜增生的目的。

关键词 新风胶囊 佐剂性关节炎 基因表达

Therapeutic Effect of Xinfeng Capsule in Treating Adjuvant Arthritis in Rats and Its Effect on fas, fasL and bcl-2 Expression in Synovial Membrane LIU Jian, ZHANG Wan-dong, CHEN Guang-liang, et al *The First Affiliated Hospital of Anhui TCM College, Hefei (230031)*

Objective: To observe the therapeutic effect of Xinfeng Capsule (XFC) in treating adjuvant arthritis of rats and its effect on fas, fasL and bcl-2 expression in synovial membrane. **Methods:** Rats were randomly divided into the normal group, the model group, the methotrexate (MTX) group, the TPT group and the XFC group. Except for the rats in the normal group, animals were modelled to adjuvant arthritis with Freund's complete adjuvant, and the latter three groups were treated with MTX, Tripterygium wilfordii polysaccharide (TPT) and XFC respectively. The arthritis index (AI), change of body weight (BW) of rats were recorded, and the expressions of fas, fasL and bcl-2 in rats' synovial membrane were determined. **Results:** Compared with before treatment, the AI in the three treated groups was lowered significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The BW increment in the XFC group after treatment was insignificantly different to that in the normal group ($P > 0.05$), while it was significantly lower in the other two treated groups than that in the normal group and the XFC group ($P < 0.01$). Compared with the model group, fasL expression was increased in the XFC group significantly ($P < 0.05$), but bcl-2 expression decreased, fas expression showed insignificant difference ($P > 0.05$). Comparison of the three gene expressions between the three treated groups showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** XFC could decrease AI in rats with adjuvant arthritis in the same way as MTX and TPT, it effected better in increasing BW than the latter two. The effect of XFC might be performed by its action in enhancing fasL expression, inhibiting bcl-2 expression and promoting apoptosis of proliferated synovial membranous cell so as to restrain hyperplasia of synovial membrane.

Key words Xinfeng Capsule, adjuvant arthritis, gene expression

* 本课题为卫生部优秀青年科研基金项目(No. 9926)

1. 安徽中医学院第一附属医院(合肥 230031) 2. 安徽中医学院 3. 安徽省立医院

类风湿性关节炎(RA)是一种以关节滑膜慢性炎症为特征的自身免疫性疾病⁽¹⁾。研究表明,RA的中医基本病机为气血不足、脾虚湿盛、痰瘀互结⁽²⁾,采用益气健脾、化痰通络法治疗取得良好疗效⁽³⁾。在此基础上我们研制出具有上述功效的中药制剂——新风胶囊(XFC),应用于临床取得满意疗效⁽⁴⁾。为了进一步探讨其作用机制,我们观察了该药对佐剂性关节炎大鼠滑膜 fas、fasL 及 bcl-2 表达的影响,现将研究结果报告如下。

材料与方 法

1 动物 雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重(200±20)g,随机分为 5 组:正常组,模型组,甲氨喋呤(MTX)组,雷公藤(TPT)组,XFC 组。每组 10 只。

2 药品、试剂与仪器 (1)XFC:由黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤等组成,每粒胶囊含生药浸出物 0.5g,由安徽中医学院第一附属医院制剂中心提供。(2)MTX 2.5mg/片,由中国信谊药厂生产。(3)雷公藤多甙片:10mg/片,由上海医科大学红旗制药厂生产。(4)卡介苗素 50mg/支,由上海生物制品研究所生产。(5)fas、fasL、bcl-2(SAP)试剂盒由北京中山生物技术公司提供。(6)徕卡 2135 型切片机,德国徕卡公司生产。(7)Olympus BX-50 型显微镜、Olympus PM-20 型显微照相设备,日本奥林巴斯光学工业株式会社生产。

3 实验方法

3.1 造模及给药方法 取冻干卡介苗一支(50mg),80℃、1h 灭活,混入灭菌液体石蜡油和羊毛脂 10ml 中,制成 Freund's 完全佐剂。除正常组外,在每鼠右后足跖皮内注射 Freund's 完全佐剂 0.05ml 致炎⁽⁵⁾,制成佐剂性关节炎(AA)模型。致炎后第 19 天开始给药,剂量相当于临床用量的 6 倍,即 XFC 组将 XFC 去除胶囊壳研成细末,加生理盐水制成混悬液(每毫升含药量为 0.18g),按 1ml/100g 的剂量灌胃,每天 1 次;TPT 组将雷公藤多甙片研成细末,加生理盐水制成混悬液(每毫升含雷公藤多甙 0.6mg),按 1ml/100g 的剂量灌胃,每天 1 次;MTX 组将 MTX 研成细末,加生理盐水制成混悬液(每毫升含 MTX 0.18mg),按 1ml/100g 的剂量灌胃,每周 1 次,未给药的实验日给予生理盐水灌胃,1ml/100g,每天 1 次;正常组及模型组予生理盐水灌胃,1ml/100g,每天 1 次。各组疗程均为 8 天。

3.2 观察项目及检测方法

3.2.1 关节炎指数(AI)的计算 致炎后第 12 天开始观察并记录全身关节病变程度,每 3 天 1 次。

全身病变按 5 级评分法评价,根据未注射佐剂的其余 3 只肢体的病变程度累积计分,计算出指数⁽⁶⁾。标准如下 0 分:无红肿;1 分:小趾关节红肿;2 分:趾关节和足跖肿胀;3 分:踝关节以下的足爪肿胀;4 分:包括踝关节在内的全部足爪肿胀。把各个关节的累积计分起来,即为每只大鼠的指数。

3.2.2 病理标本的观察 取材为各组动物右后踝关节的滑膜及周围组织,大小约 1cm×1cm×2cm。经 Boin's 液固定 1 周后,组织脱水,常规石蜡包埋、切片。作免疫组化染色,观察滑膜中 fas、fasL、bcl-2 的表达情况,采用 SP 方法,具体流程如下:(1)石蜡切片脱蜡和清水冲洗后,微波加热 10min,保温 10min,磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)冲洗 5min;(2)加 50 μ l 的非免疫性动物血清,室温下孵育 10min, PBS 冲洗 5min;(3)加 50 μ l 的第一抗体,室温下孵育 1~2h, PBS 冲洗 5min;(4)加 50 μ l 的生物素标记的第二抗体(通用型),室温下孵育 10min, PBS 冲洗 5min;(5)加 50 μ l 的碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液,室温下孵育 10min, PBS 冲洗 5min;(6)二氨基联苯胺(DAB)染色 1~5s(显微镜下控制),苏木素复染 5s;(7)脱水、透明、封片。

4 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *F* 检验,等级资料采用 *Ridit* 分析。

结 果

1 XFC 对 AA 大鼠关节炎指数的影响 见表 1。造模后 12、15、18d 各组大鼠的关节炎指数无明显差异,给药后(造模后 20、23、26d)3 个给药组大鼠关节炎指数较模型组显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),3 个给药组之间比较,差异无显著性($P > 0.05$)。

2 XFC 对各组大鼠体重的影响 见表 2。造模前各组间体重变化差异无显著性($P > 0.05$);造模后各组大鼠体重较正常组明显减轻($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);给药前后模型组、MTX 组和 TPT 组体重的增加明显低于正常组,差异有显著性($P < 0.01$);XFC 组给药前后体重增加值与正常组比较差异无显著性($P > 0.05$),但显著高于模型组、MTX 组和 TPT 组($P < 0.01$)。

3 XFC 对病变大鼠滑膜中 fas、fasL、bcl-2 表达的影响 见表 3。与模型组比较,3 个给药组 fasL 的表达显著增加($P < 0.05$),bcl-2、fas 的表达有所减少,但差异无显著性($P > 0.05$);与 MTX 组、TPT 组比较,XFC 组上述指标变化差异均无显著性($P > 0.05$)。

表 1 XFC 对 AA 大鼠的关节炎指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	关节炎指数					
		致炎后 12d	15d	18d	20d	23d	26d
模型	10	3.9±0.7	6.1±1.4	7.9±1.0	8.7±1.2	9.1±1.3	8.6±1.6
XFC	10	3.7±1.3	6.1±2.0	8.2±1.9	7.4±1.7*	5.9±1.3**	4.8±1.0**
MTX	10	3.8±0.9	5.8±1.0	7.7±1.3	6.9±1.1**	5.6±1.1**	4.7±0.5**
TPT	10	3.7±1.1	5.9±1.6	8.1±1.7	7.3±1.6*	6.1±1.5**	5.1±1.3**

注:与模型组同期比较,*P<0.05,**P<0.01

表 2 XFC 对大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)					给药前后 体重差值
		造模前	造模后 18d	20d	23d	26d	
正常	10	200.5±14.8	248.5±14.6	258.0±16.9	266.0±18.2	280.5±18.5	32.5±5.4
模型	10	199.5±12.6	228.5±12.5*	235.0±12.5**	239.0±13.9**	246.5±13.3**	18.0±4.8**
XFC	10	199.5±14.4	229.0±19.6*	237.0±23.0*	248.5±23.1*	259.0±21.8*	30.0±5.3 [△] ▲○
MTX	10	199.0±14.7	231.5±17.2*	238.0±18.7*	240.5±17.6**	249.0±16.8**	17.0±5.9**
TPT	10	201.5±15.3	227.5±17.8**	232.0±17.7**	234.0±19.0**	244.0±19.1**	16.5±2.4**

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,[△]P<0.05;与 MTX 组比较,[▲]P<0.01;与 TPT 组比较,[○]P<0.05

表 3 XFC 对病变大鼠滑膜中 fas, fasL, bcl-2 表达的影响

组别	n	fas					fas L					bcl-2				
		-	+	++	+++	u 值	-	+	++	+++	u 值	-	+	++	+++	u 值
正常	10	10	0	0	0	0.100	10	0	0	0	0.180	10	0	0	0	0.190
模型	10	0	2	4	4	0.424**	9	0	1	0	0.215	0	7	3	0	0.603**
XFC	10	0	4	4	2	0.398*	0	5	3	2	0.458* [△]	3	5	1	1	0.436*
MTX	10	0	2	6	2	0.416*	0	6	4	0	0.500* [△]	4	6	0	0	0.454*
TPT	10	0	4	5	1	0.390*	0	5	4	1	0.473* [△]	2	7	0	1	0.489*

注:在免疫组化病理切片上取 4 个高倍视野,每个视野数 100 个滑膜细胞,阳性细胞数在 20%~30% 为+,31%~40% 为 ++,40% 以上为+++;阳性强度:细胞浆着色,淡黄色为+,棕黄色为 ++,棕褐色为+++。与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,[△]P<0.05

讨 论

有研究表明类风湿性关节炎的发生与滑膜的异常增生、凋亡的减少有关⁽¹⁾。fas 是细胞表面的蛋白受体分子,分布于多种组织细胞,少量以可溶性形式存在于血浆中。细胞表面 fas 通过与其天然配体(fasL)结合诱导细胞凋亡⁽⁷⁾。fas 参与清除机体中被外来微生物感染的细胞和机体不再需要的细胞,在损伤组织附近细胞的 fas 表达量往往大幅度增高。fas 凋亡途径需要信号给予者即 fasL 和信号接受与传递者即 fas 的同时存在,相邻细胞通过各自膜表面的 fas 和 fasL 的结合而相互诱导凋亡。fas 和 fasL 结合后,可以诱导多种细胞蛋白的酪氨酸和丝氨酸(或)苏氨酸磷酸化,并引起细胞内 Ca²⁺ 浓度升高,从而引起 DNA 降解和细胞凋亡⁽⁸⁾。bcl-2 位于细胞内氧自由基产生的细胞器,如线粒体、内质网、核膜等,是与细胞凋亡密切相关的基因,被证实可以通过调节抗氧化途径阻止一系列氧化应激诱导的细胞凋亡⁽⁹⁾。

新风胶囊以整体调节为基本原则,采用益气健脾、化湿通络治法,方中重用黄芪、薏苡仁为君药,黄芪益气健脾、补中固表,具有良好的调节免疫作用,能够促进巨噬细胞的吞噬功能,诱生内源性干扰素,促进淋巴细胞转化,增强网状内皮细胞的吞噬功能,发挥机体

的防御功能,对免疫抑制剂造成的免疫功能低下有明显的保护作用。能明显对抗组胺和 5-羟色胺引起的大鼠毛细血管通透性增加,抑制角叉菜胶引起的大鼠足跖肿胀。而且有持久的镇痛、清除关节积液、肿胀的作用^(10,11)。薏苡仁健脾利湿、舒筋除痹,可以缓解关节肌肉的挛缩疼痛,无论寒证、热证都可应用,薏苡仁的水提取物对大鼠有镇痛作用,薏苡仁的浸出物能抑制中性粒细胞产生活性氧,并显著地抑制中性粒细胞、淋巴细胞膜的甲基转移酶、磷脂酶 A₂ 和前列腺素 E₂ 的分泌⁽¹²⁾。雷公藤、蜈蚣为臣药,雷公藤具有祛风除湿、通经活络、消肿止痛之功,可明显抑制病变关节的肿胀、毛细血管通透性和肉芽肿,并具有免疫抑制作用;雷公藤及其总甙、总生物碱和雷公藤乙酸乙酯提取物均有明显的抗炎作用,表现对角叉菜胶、蛋清性大鼠足肿及大鼠佐剂性关节炎和棉球肉芽增生均有明显的抑制作用^(10,11)。蜈蚣祛风止痉、通络止痛、攻毒散结,可以通过改善微循环,促进病变部位的新陈代谢而起到良好的镇痛作用。

方中药物都具有不同程度的抗炎镇痛消肿作用。新风胶囊与 MTX、TPT 一样能明显降低 AA 大鼠的关节炎指数,但由于该药配方中黄芪能保护胃粘膜,抑制雷公藤的胃肠道不良反应,故本组 AA 大鼠整体功能优于其他两组,具体表现在体重增加,这一结果与临

床研究结果相符⁽⁴⁾。

XFC 组大鼠的 fas、fasL 基因表达增加、bcl-2 基因表达减少,从而促进其滑膜细胞凋亡,这些可能是该药抑制滑膜细胞增生、降低关节炎指数、消除肿胀的一个因素,其作用机理尚需进一步探讨。

参 考 文 献

1. 蒋 明,朱立平,林孝义. 风湿病学(上册). 北京:科学出版社,1995:815—819.
2. 刘 健,韩明向,崔宜武,等. 类风湿性关节炎中医证候学研究. 中国中医基础医学杂志 1995;(11):35—37.
3. 刘 健. 健脾化湿通络法治疗历节病 45 例临床研究. 安徽中医临床杂志 1999;(6):380—382.
4. 刘 健. 新风胶囊治疗类风湿性关节炎的临床研究. 中国中西医结合急救杂志 2001;(4):202.
5. 徐叔云,卞如濂,陈 修. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京:人

- 民卫生出版社,1991:719—725.
6. 张钧田. 现代药理实验方法. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:1383.
7. 郭 磊. 细胞凋亡在自身免疫发病机制中的作用. 国外医学免疫学分册 1999;22(1):17—21.
8. 郑 勇,袁 泉. 细胞凋亡基因 fas 的研究进展. 国外医学免疫学分册 1996;(3):131—135.
9. 王新玲,李月影,侯彩香,等. 自由基、细胞凋亡与衰老关系的研究进展. 中国老年学杂志 1999;(4):252—253.
10. 黄泰康. 常用中药成分与药理手册. 北京:中国医药科技出版社,1998:1576.
11. 郭虎占,董泽宏,余 靖. 中药现代研究与应用(第 5 卷). 北京:学苑出版社,1998:4492—4506.
12. 《中华本草》编委会. 中华本草. 第 9 卷. 上海:上海科学技术出版社,1998:144.

(收稿 2001-10-08 修回 2001-12-21)

中药配合体外受精及胚胎移植治疗不孕症 2 例

连 方¹ 张 宁² 张建伟² 王 哲¹ 张 萌¹ 王希波² 孙振高² 李海仙²

本院应用中药配合第一代试管婴儿技术——体外受精及胚胎移植治疗了 2 例不孕症患者获得成功,现报道如下。

例 1 患者某,28 岁,住院号:97543。2001 年 11 月 30 日就诊。患者未避孕未再孕 4 年 2 个月,既往月经规律,5~6/28~32 天,1997 年 10 月孕 40 余天时行人工流产术。2001 年 11 月 9 日子宫输卵管造影(HSG)示双侧输卵管积水。妇科检查示双侧附件增厚。中医诊断:不孕症(肾虚型);西医诊断:不育(由于输卵管阻塞)。患者采用控制性超排卵方案,于 2001 年 11 月 30 日(月经周期 21 天)肌肉注射促性腺激素释放激素类似物达菲林(Pharma Biotech-Signes-France 生产,批号 K007)1.875mg,同时口服二仙调经助孕方(仙茅 12g 仙灵脾 12g 杜仲 12g 等),水煎服,每天 1 剂。于月经周期第 3 天(2001 年 12 月 10 日)开始口服二至调经助孕方(当归 12g 女贞子 15g 旱莲草 15g 山萸肉 12g 等),水煎服,每天 1 剂,同时肌肉注射高纯度卵泡刺激素(FSH-HP,瑞士雪兰诺公司产品,批号 19323051)75U,每天 2 次及尿促性素(HMG,丽珠集团丽宝生物化学制药有限公司产品,批号 010802A)150U/d,随后根据 B 超监测卵泡发育情况及内分泌水平调整促卵泡发育药物的用量,至月经周期 14 天,B 超示双侧卵巢成熟卵泡(平均直径 1.8cm 以上),予四物汤加味,水煎服,每天 1 剂。于人绒毛膜促性腺激素(HCG)注射 36h 后行 B 超下经阴穿刺取卵术,共取出 15 个卵子,取卵后口服二仙调经助孕方,配合黄体酮肌肉注射,取卵后 72h 移入宫腔 3 个优质胚胎。患者于胚胎移植后给予中药参芪寿胎丸配合黄体酮 60mg/d 以支持黄体,连用 14 天,2002 年 1 月 10 日验尿 HCG 阳性。

例 2 患者某,27 岁,住院号:97533。2001 年 12 月 12 日

就诊。患者未避孕未怀孕 2 年余,既往月经不规律,10 天/3~6 个月,2000 年 11 月临床诊断为多囊卵巢综合征(PCOS)。用一般促排卵药无效。于 2001 年 12 月 12 日(月经周期第 2 天)采用促排卵方案,肌肉注射达菲林 1.875mg,周期第 3 天开始口服二至调经助孕方,同时肌肉注射 HMG 150U/d,月经周期 11 天,因 B 超示双侧卵巢成熟卵泡均已达 5 个,于当晚 9:00 肌肉注射 HCG 10000U,同时口服桃红四物汤加味,于 HCG 注射 36h 后行 B 超下经阴穿刺取卵术,取卵后口服二仙调经助孕方,配合黄体酮肌肉注射,取卵后 72h 移入宫腔 3 个优质胚胎。患者于胚胎移植后给予中药参芪寿胎丸配合黄体酮 60mg/d 以支持黄体,连用 14 天,2002 年 1 月 12 日尿妊娠试验阳性。

讨 论 FSH、HMG 及达菲林是控制性超排卵常用的药物,目前很多资料表明,达菲林可以取消内生促黄体生成素(LH)升高或过早出现内生 LH 峰,不论长方案或短方案都是这样,从而提高卵泡募集数及获卵率。于卵泡早期应用 FSH 及 HMG 可刺激一群不成熟卵泡生长,从而获得更多的优势卵泡应用于体外受精(IVF)中。我们近几年的研究证实二至调经助孕方可以调整黄体不健引起的不孕症,具有提高血清孕酮水平及子宫内膜雌孕激素受体的作用。我们观察的这 2 例 IVF-ET 受精率分别为 100% 和 93.3%,卵裂率分别为 100% 和 92.3%。胚胎质量优良,特别是第 2 例患者的胚胎有 7 个胚胎属于一级胚胎。影响胚胎质量的因素有很多,其中临床用药恰当与否以及体外培养环境的好坏等都是重要因素。中医药在调整女性内分泌方面有独到之处,且效果显著,随着生殖助孕技术的不断深入研究,探讨中医药在此新领域中的应用将对发展中医药研究起到重要作用。

(收稿 2002-01-21 修回 2002-04-12)

万方数据