

# 加味木防己汤抗大鼠实验性关节炎的研究

陈冬志<sup>1</sup> 孟明<sup>2</sup> 顾立刚<sup>2</sup>

**摘要 目的** 探讨加味木防己汤对大鼠实验性佐剂关节炎(adjuvant arthritis, AA)的作用及其机制。**方法** 应用弗氏完全佐剂注射诱发大鼠产生实验性关节炎,第 18 天开始给予加味木防己汤灌胃,39 天测量 AA 大鼠体重,脾及胸腺指数,足肿胀度。HE 染色观察大鼠踝关节组织病理学变化,ELISA 法测定大鼠血清中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量。**结果** 加味木防己汤能缓解 AA 病情,使足肿胀度下降,体重及脏器指数改善,关节水肿减轻,淋巴细胞浸润明显减少,滑膜增生受抑制。血清 IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  的含量明显下降。**结论** 加味木防己汤对 AA 大鼠的治疗作用,可能与其下调 IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  的含量有关。**关键词** 实验性佐剂关节炎;加味木防己汤;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;白细胞介素-1 $\beta$

**Experimental Study on Anti-arthritis Effect of Jiawei Mufangji Decoction in Rats** CHEN Dong-zhi, MENG Ming, and GU Li-gang *Hebei Provincial Workers' Medical College, Baoding (071000)*

**Abstract Objective** To explore the therapeutic effect of Jiawei Mufangji Decoction (JMD) in treating rats with adjuvant arthritis (AA) and its mechanism. **Methods** AA model rats induced by Freund's complete adjuvant were treated with JMD by gastrogavage starting from 18 days after modeling. On the 39th day, body weight, spleen and thymus index, and swelling degree of paw of the AA rats were measured, pathological changes of the ankle joint tissue were observed using HE staining, and serum levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** JMD could relieve the symptoms of AA rats, decrease the paw swelling, improve the weight and spleen and thymus index, reduce the dropsy of joints and lymphocytes infiltration, inhibit the proliferation of synovium, and obviously lower the serum levels of interleukin-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Conclusion** The therapeutic effect of JMD might be related to its action in down-regulating the serum levels of IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ .

**Key words** adjuvant arthritis; Jiawei Mufangji Decoction; tumor necrosis factor  $\alpha$ ; interleukin-1 $\beta$

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因不明的慢性、炎性、系统性的自身免疫性疾病,病理表现复杂多样,以关节的炎性肿胀、变形、滑膜增生、骨及软骨破坏为主,目前临床尚无理想的治疗方法。佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠的临床、病理表现及免疫学指标与 RA 有许多相似之处,是研究 RA 及筛选评价抗炎免疫药物的较理想动物模型之一<sup>[1]</sup>。中药加味木防己汤是在传统经方基础上研制而成,具有通痹除湿,清热消炎,化痰止痛和扶正补虚之功效。本实验观察了加味木防己汤对 AA 大鼠的治疗作用,并进一步研究其抗 RA 的可能机制。

## 材料与方法

1 动物及分组 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,雄性,体重(160 $\pm$ 20)g,中国药品生物制品检定所实验动物中心提供。许可证号:SCXK11-00-0010。大鼠随机分为 4 组:正常组,AA 模型组(简称 AA 组),AA 雷公藤治疗组(简称雷公藤组),AA 加味木防己汤治疗组(简称木防己汤组),每组 10 只。

2 药物 雷公藤多甙片:100mg/片,湖南省株洲市制药厂生产。加味木防己汤由木防己、桂枝、石膏、红人参、杏仁、薏仁、忍冬藤、玄参 8 味中药组成。冷水浸泡 0.5h 后常规文火煎制两次,混合两次煎剂,浓缩至 3.7g 生药/ml,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

3 试剂及仪器 卡介苗:卫生部北京生物制品研究所产品,批号 200305;白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )定量 ELISA 试剂盒,美国 BIOSURCE 公司产品;酶标仪 550 型,BIORAD 公司产品;离心机 SCR20BA 型,HITACHI 公司产品;显微镜

基金项目:国家中医药管理局科研基金资助项目(No.04-05JP01)

作者单位:1. 河北省职工医学院(河北保定 071000);2. 北京中医药大学病原生物系

通讯作者:孟明, Tel: 13831210992, E-mail: mengming127@163.com

Olympus 产品。

#### 4 实验方法

4.1 AA 大鼠模型的制备 参见文献<sup>[2]</sup>。羊毛脂与石蜡油按 1:2 的比例加热混匀,高压灭菌后 4℃ 保存,使用时加入卡介苗(10mg/ml)配制成弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA),充分混匀乳化后,取 0.1ml 注射于大鼠左后足垫皮内致敏,正常组注射 0.1ml 生理盐水。

4.2 给药方法 致敏后 18 天开始每天上午 8:00-10:00 灌胃给药,正常组和 AA 组给予生理盐水,每天每只大鼠 2ml;雷公藤组每天 20mg/kg;木防己汤组每天 30g/kg;连续给药 21 天,在造模后 14、39 天分别测量大鼠的体重及足跖肿胀度,39 天断头处死大鼠,收集血清,取材脾脏、胸腺、致炎侧踝关节。

#### 4.3 观察项目及检测方法

4.3.1 AA 大鼠的体重、脏器指数、足跖肿胀度的测定 在致炎后 18 天和 39 天分别测量 AA 大鼠的体重和致炎侧足跖肿胀度(容积排水法)<sup>[3]</sup>,并用正常组作对照,致炎 39 天取脾脏和胸腺称量,计算脏器指数(计算公式:脏器指数 = 平均重量/平均体重)。

4.3.2 组织病理学检测 于致炎 39 天断头处死大鼠,立即分离后肢致炎侧病变关节,10% 甲醛固定,EDTA 脱钙,乙醇逐级脱水,常规包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,并进行组织学评价和拍照,同时以相同方法取正常大鼠组相同关节部位作为对照。

4.3.3 大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的测定 大鼠断头取血,无菌 4℃ 静置,4h,离心 1500r/min,10min 分离血清,0.22 $\mu$ m 滤膜过滤,-40℃ 冰箱保存。采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法,测定 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量。

5 统计学方法 采用 SPSS 11.0 版进行统计学分析,组间比较行单因素方差分析(one-way ANOVA),用最小显著差法(least significant difference, LSD)作两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

### 结 果

1 各组大鼠体重、胸腺指数和脾脏指数的变化比较 见表 1。AA 组大鼠从致炎后第 2 周起体重增长缓慢,第 14 天和第 39 天体重明显低于同期饲养的正常组大鼠( $P < 0.01$ ),与雷公藤组接近,而木防己汤组大鼠体重与正常组比较,差异无显著性( $P > 0.05$ )。AA 组大鼠 39 天的胸腺、脾脏指数明显低于正常组( $P < 0.01$ ),木防己汤组大鼠的胸腺指数和脾脏指数,与正常组比较,差异无显著性( $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠体重、胸腺指数及脾脏指数变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	体重(g)		胸腺指数	脾脏指数
		致炎 14 天	致炎 39 天		
正常	10	287.4 $\pm$ 15.3	384.8 $\pm$ 17.2	0.12 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.04
AA	10	262.6 $\pm$ 12.8*	360.5 $\pm$ 12.7*	0.08 $\pm$ 0.03*	0.21 $\pm$ 0.02*
雷公藤	10	259.7 $\pm$ 13.2*	358.7 $\pm$ 13.3*	0.07 $\pm$ 0.03*	0.20 $\pm$ 0.03*
木防己汤	10	285.5 $\pm$ 14.3	383.3 $\pm$ 18.1	0.11 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.04

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$

2 各组大鼠致炎侧踝关节肿胀度比较 见表 2。AA 大鼠致炎后 15h,左足肿胀达高峰,表现为早期的炎症反应,持续 2~3 天逐渐减轻,7~8 天后再度肿胀,继发病变于致炎后 10 天左右出现,表现为对侧和前足肿胀,且进行性加重,大鼠行动不便,体重下降,表现类似人类 RA<sup>[1]</sup>。实验大鼠于致敏后 39 天,用容积排水法测量致炎侧踝关节肿胀度,AA 组明显高于正常组( $P < 0.01$ ),而木防己汤组和雷公藤组则明显低于 AA 组( $P < 0.01$ ),但雷公藤组与木防己汤组间差异无显著性。

表 2 各组大鼠致炎侧踝关节肿胀度比较 ( $\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$ )

组别	n	肿胀度
正常	10	1.8 $\pm$ 0.2
AA	10	3.5 $\pm$ 0.3*
雷公藤	10	2.5 $\pm$ 0.2 $^{\Delta}$
木防己汤	10	2.6 $\pm$ 0.3 $^{\Delta}$

注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与 AA 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

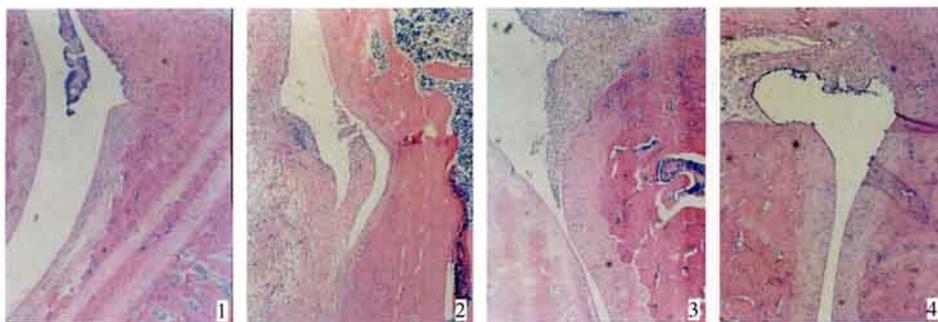
3 各组大鼠踝关节病理变化比较 致炎 39 天,AA 组大鼠关节滑膜增生,呈绒毛状排列紊乱,可向关节腔内突出,部分滑膜剥脱缺失,并有大量炎性细胞浸润,软组织明显水肿。木防己汤组和雷公藤组大鼠关节滑膜增生,只有少许剥脱,组织水肿较轻,并见少量炎细胞浸润,见图 1。

4 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的含量比较 见表 3。致炎 39 天,AA 组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的含量均明显高于正常组( $P < 0.01$ ),而木防己汤组和雷公藤组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的含量,与 AA 组比较明显下降( $P < 0.01$ ),但雷公藤组与木防己汤组间差异无显著性。

表 3 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-1 $\beta$ (ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
正常	10	0.26 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.03
AA	10	0.42 $\pm$ 0.03*	0.92 $\pm$ 0.02*
雷公藤	10	0.27 $\pm$ 0.03 $^{\Delta}$	0.49 $\pm$ 0.03 $^{\Delta}$
木防己汤	10	0.28 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$	0.52 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$

注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与 AA 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$



注:1 为正常组;2 为 AA 组;3 为雷公藤组;4 为木防己汤组

图 1 各组大鼠踝关节病理变化(HE 染色 ×40)

### 讨 论

近年研究证明:细胞因子网络失调与 RA 发病及病程进展密切相关,其中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  起着主导作用<sup>[4]</sup>。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  是强有力的致炎反应细胞因子,来源于 RA 关节部位浸润、活化的单核巨噬细胞和关节滑膜细胞,它们在 RA 病变中可协助炎性细胞迁徙,增强内皮细胞表达黏附分子,促进滑膜细胞增殖和血管翳形成,介导关节滑膜发生持久性的炎症反应,并刺激软骨吸收及骨破坏<sup>[5,6]</sup>。国内外研究已证实 RA 患者滑膜细胞过度分泌细胞因子及炎症介质,导致外周血及关节滑液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的含量及活性均增高<sup>[7,8]</sup>。本实验采用 AA 大鼠模型,重现了大鼠关节肿胀、体重及脏器指数变化,关节病理学改变,并测定 AA 大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的含量,结果表明:AA 大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的含量均明显高于正常大鼠,与文献<sup>[2]</sup>相符。

中药加味木防己汤是在传统经方基础上研制而成,由木防己、石膏、桂枝、红人参、杏仁、薏苡仁、忍冬藤、玄参 8 味中药组成,具有通痹除湿,清热消炎,化痰止痛和扶正补虚之功效。本实验结果表明,加味木防己汤能使 AA 大鼠足肿胀度下降,体重及脏器指数改善,关节水肿减轻,淋巴细胞浸润明显减少,滑膜增生受抑制。同时降低血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的生成量,使高调节的滑膜细胞分泌功能恢复正常,并且各项指标均与阳性药雷公藤治疗组大鼠接近。提示加味木防己汤能缓解病情,其对 AA 大鼠的治疗作用,与抑制滑膜细胞过度分泌细胞因子及炎症介质有关。

雷公藤多甙具有免疫抑制和抗炎作用,是目前常用的治疗 RA 的药物,但毒副作用很大,患者难以耐受。实验中观察到加味木防己汤治疗组大鼠平均体重及脏器指数均高于雷公藤治疗组,而且其进食量、外观

毛色及活动状态均优于雷公藤组大鼠。可能与其抑制关节滑膜细胞过度分泌细胞因子有关。

### 参 考 文 献

- 1 Jacobson PB, Borgan SJ, Wilcox DM, et al. A new spin on an old model: *In vivo* evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat. *Arthr Rheum* 1999;42(10):2060—2073.
- 2 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. *中国实验临床免疫学杂志* 1995;7(3):13. Ma DL, Li J, Chen MZ, et al. Inducement of adjuvant arthritis rats and study of their disordered immune function. *Chin J Exp Clin Immunol* 1995;7(3):13.
- 3 林红,贺永怀,黎燕,等. II 型胶原蛋白与弗氏佐剂大鼠关节炎的建立和比较. *中国实验动物学报* 1999;7(1):1—6. Lin H, He YH, Li Y, et al. Rheumatoid arthritis model in rat induced by type II collagen and Freund's complete adjuvant. *Chin J Exp Anim* 1999;7(1):1—6.
- 4 Gravalles EM, Goldring SR. Cellular mechanism and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2000;43(10):2143—2151.
- 5 Isomaki P, Luukkainen R, Toivanen P, et al. The presence of interleukin-1 $\beta$  in rheumatoid synovium and anti-inflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 1996; 39 (10) : 1693—1702.
- 6 Camussi G, Lapia E. The future role of anti-tumor necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* 1998;55:613—620.
- 7 Molving J. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E<sub>2</sub> shows stable interindividual differences. *Scand J Immunol* 1998;27(6):705.
- 8 Atend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 1990;33:305.

(收稿:2005-02-16 修回:2005-05-10)