

益气活血法对关节炎大鼠滑膜细胞凋亡及血清细胞因子的影响*

陈利锋, 熊 慧, 刁 波, 赵映前

(广州军区武汉总医院, 湖北武汉 430070)

〔摘 要〕目的: 选用黄芪与川芎嗪注射液配伍 (简称配伍组), 观察“益气活血法”对佐剂性关节炎 (AA) 大鼠滑膜细胞凋亡及血清细胞因子的影响, 探索该治则治法治疗类风湿性关节炎 (RA) 的作用靶点和作用机理。方法: 建立 AA 大鼠模型, 设立正常组、模型组、黄芪组、川芎嗪组、配伍组、甲氨喋呤 (MTX) 及雷公藤多苷 (TPT) 组进行实验研究, 观察益气、活血及配伍后对 AA 大鼠足跖肿胀的影响, 对滑膜细胞凋亡及血清细胞因子浓度的影响, 阐释其作用机制。结果: 配伍组能显著提高滑膜细胞的凋亡率, 与 MTX、TPT 组效果相当; 能显著抑制注射足跖肿胀程度, 并降低大鼠血清中 IL-1、TNF- α 、IL-6 的水平, 上调 IL-4 的浓度, 抑制免疫性炎症, 优于 MTX、TPT。结论: 益气活血法可能通过促进 AA 大鼠滑膜细胞的凋亡, 抑制某些炎性因子的释放, 起到治疗 RA 的作用, 体现了中医治则治法指导下中药复方配伍的优势。

〔关键词〕益气活血法; 佐剂性关节炎大鼠; 细胞凋亡; 细胞因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2010)06—0047—04

类风湿性关节炎 (RA) 发病率、致残率高, 危害性大, 严重影响患者的身心健康, 在祖国医学中属于“痹证”范畴。目前西医治疗主要使用非甾体抗炎药、糖皮质激素和免疫抑制剂, 这些药物服药时间长, 毒副作用大^[1], 而中医药治疗 RA 占明显优势, 疗效肯定, 毒副作用小, 具有控制炎症和免疫调节等多方面的综合作用^[2]。医家们一直认为 RA 的病因病机为本虚标实, 本虚为肝肾阴阳气虚, 标实为风、寒、湿及痰浊致气滞血瘀, 经络不通, 辨证分型各有差异。在此, 我们用“益气活血法”来重点加以治疗, 一方面固护本源, 防邪再犯; 另一方面则可助气行血, 宣通经络, 共奏祛邪扶正之目的。遵循中医学理论, 本实验选用黄芪注射液益气扶正, 川芎嗪注射液活血通络, 二者共奏“益气活血”之功。观察该配伍对 AA 大鼠滑膜细胞凋亡及血清细胞因子的影响, 探索“益气活血法”治疗 RA 的作用靶点和作用机理, 从而为 RA 的治疗提供新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Wistar 大鼠 70 只, 雄性, 体重 200 ~

250g, SPF 级 (广州军区武汉总医院实验动物中心提供)。

1.2 药品、试剂与仪器

黄芪注射液 10mL/支相当生药 20g (黑龙江省珍宝岛制药有限公司生产 批号: 090913), 川芎嗪注射液 2mL/40mg/支 (天津药业 批号: 100308), 甲氨喋呤 (MTX): 每片 2.5mg (上海信谊药厂生产, 批号: 090656)。雷公藤多苷 (TPT): 每片 10mg (黄石飞云制药有限公司 批号: 100656)。完全弗氏佐剂, 美国 GIBCO 公司产品。Annexin V/PI 试剂盒, 苏州生物基因技术有限公司产品。IL-1、TNF- α 、IL-6、IL-4 试剂盒均购于解放军总医院科技开发中心放免所, 批号: 100301。流式细胞仪 (FCM), 型号为 FACS Calibur, 美国 BD 公司出品。美国 Harris 公司超低温冰箱、冷冻离心机、游标卡尺: 0 ~ 150mm, 上海测绘仪器厂。

1.3 分组、造模与给药

将 70 只大鼠适应性喂养 1 周后, 称重标记, 随机分为 7 组, 每组各 10 只。分别为 A: 正常组, B: 模型组, C: 黄芪组, D: 川芎嗪组, E: 配伍组, F: MTX 组, G: TPT 组。实验中, 各组均开

* 收稿日期: 2010—08—13 修回日期: 2010—10—10
作者简介: 陈利锋 (1977 ~), 女, 湖北公安人, 主治医师, 博士研究生在读, 研究方向: 病毒与免疫性疾病。

架分笼饲养，自由摄食，自然光照，定期清洁、消毒。除正常对照组 A 外，剩余 60 只大鼠造模。选取大鼠的右足垫，在无菌条件下，皮内注射 0.1mL 弗氏完全佐剂，复制 AA 大鼠模型。A 组在同一部位，同样方法注射 0.1mL 生理盐水。造模后第 8 天开始给药，各组的给药量相当于临床用量的 5 倍。具体给药方法如下：①A、B 组给予 0.9% 氯化钠溶液灌胃，0.09g/kg，每日 1 次。②C 组给予黄芪注射液灌胃，20g/kg，每日 1 次。③D 组给予川芎嗪注射液灌胃，0.04g/kg，每日 1 次。④E 组给予黄芪注射液 10g/kg + 川芎嗪注射液 0.02g/kg 灌胃，每日 1 次。⑤F 组将 MTX 研成细末，加 0.9% 氯化钠溶液，配置成混悬液，按 0.001g/kg 的剂量灌胃，每周 1 次。⑥G 组将 TPT 研成细末，加 0.9% 氯化钠溶液，配置成混悬液，按 0.01g/kg 的剂量灌胃，每日 1 次。未用药的实验日给予 0.9% 氯化钠溶液灌胃，0.09g/kg，每日 1 次^[3]。7 日为 1 个观察周期，共观察 3 周，于末次给药 24h 后，对大鼠进行处理。

1.4 大鼠足跖肿胀程度测量

造模前以 0~150mm 游标卡尺于每只大鼠右后足跖中后 1/3 处测量其厚度，造模后密切观察足跖肿胀情况，并定期测量各大鼠右后足跖厚度，探讨益气活血法对大鼠足跖肿胀的影响。

1.5 滑膜细胞凋亡检测

麻醉断头处死各组大鼠后，剥离切取右后足跖关节滑膜，用网搓法分离滑膜细胞；将细胞分别收集到试管，用 PBS 缓冲液洗 2 次，1 000r/min 离心 5min，弃上清液，再悬浮沉淀的细胞；取 50uL 细胞悬液（细胞数 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^{10}$ ）加入各组试管中，同时各试管中加 1μL Annexin V - FITC 试剂及 5uL PI（0.25g/L）溶液，4℃下避光反应；10min 后加冷缓冲液 400μL，30min 内上流式细胞仪检测。

1.6 细胞因子（IL-1、TNF-α、IL-6、IL-4）的测定

各组大鼠断头取血 4~5mL 血液，4 000r/min，离心 10min，取血清，置于 -80℃ 保存。取放免试剂盒，操作过程严格按试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计分析软件进行计算。计量资料采用 *t* 检验，计数资料采用 χ^2 检验，*P*≤0.05 被认为差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 益气活血法对 AA 大鼠足肿胀的影响

各组大鼠造模后第 7 天，大鼠右侧致炎足的原发性肿胀达到高峰，给药 1 周后，右后足跖肿胀开始减轻，以后随着用药时间的延长，其肿胀厚度逐渐缩小，其结果见表 1。

表 1 对 AA 大鼠右后足跖肿胀的影响/cm

造模天数 组别	0	7	14	21	28
A	3.74 ± 0.23	3.83 ± 0.22	3.85 ± 0.19	3.86 ± 0.24	3.89 ± 0.20
B	3.73 ± 0.22	7.50 ± 0.45	7.52 ± 0.38	7.15 ± 0.48	6.50 ± 0.33
C	3.75 ± 0.25	7.52 ± 0.41	6.82 ± 0.44 ^Δ	6.25 ± 0.23 ^Δ	6.02 ± 0.26 ^Δ
D	3.68 ± 0.21	7.48 ± 0.51	6.58 ± 0.53 ^{Δ☆◇}	6.15 ± 0.48 ^{Δ☆◇}	5.76 ± 0.47 ^{Δ☆◇}
E	3.64 ± 0.25	7.44 ± 0.59	6.55 ± 0.45 ^{Δ☆◇}	6.05 ± 0.27 ^{Δ☆◇}	5.70 ± 0.33 ^{Δ☆◇}
F	3.79 ± 0.27	7.55 ± 0.35	6.87 ± 0.54 ^Δ	6.25 ± 0.30 ^Δ	6.05 ± 0.19 ^Δ
G	3.71 ± 0.24	7.45 ± 0.44	6.88 ± 0.52 ^Δ	6.27 ± 0.28 ^Δ	6.06 ± 0.21 ^Δ

注：C、D、E、F、G 与 B 比较，Δ*P*<0.05；C、D、E 分别与 F、G 比较，☆*P*<0.05，◇*P*<0.05。

表 1 显示，各用药组均能抑制注射足跖肿胀程度，与模型组比较差异有意义（*P*<0.05），川芎嗪组及配伍组优于 MTX、TPT 组（*P*<0.05），黄

芪组与 MTX、TPT 组比较无显著性差异（*P*>0.05），疗效低于配伍组。

2.2 益气活血法对 AA 大鼠滑膜细胞凋亡的影响

表2 各组大鼠滑膜细胞凋亡率

组别	例数	滑膜细胞凋亡率/%
A	10	38.36 ± 5.51
B	10	2.08 ± 0.42 [▲]
C	10	14.34 ± 2.92 ^{▲▲★◆}
D	10	25.85 ± 2.14 ^{▲▲★◆}
E	10	34.11 ± 1.07 ^{▲#☆☆◇}
F	10	32.50 ± 4.56 ^{▲#}
G	10	33.30 ± 3.44 ^{▲#}

注: C、D、E、F、G 与 B 比较, $\Delta P < 0.01$; B、C、D 与 A 比较, $\blacktriangle P < 0.01$, E、F、G 与 A 比较 $\#P < 0.05$; C、D 与 F 比较, $\star P < 0.01$, E 与 F 比较, $\star P > 0.05$ 。C、D 与 G 比较, $\blacklozenge P < 0.01$, E 与 G 比较, $\diamond P > 0.05$ 。

见表2。实验结果表明:与模型组比较,其余各组的凋亡率数值差异有显著性意义($P < 0.01$);与正常组比较,黄芪组和川芎嗪组差异有显著性意义($P < 0.01$);配伍组、MTX 和 TPT 组有差异($P < 0.05$);与 MTX、TPT 组比较,黄芪组和川芎嗪组差异有显著性意义($P < 0.01$),配伍组无差异($P > 0.05$),说明配伍组疗效优于单药组,与 MTX、TPT 效果相当。

2.3 益气活血法对 AA 大鼠血清细胞因子的影响 (结果见表3)

表3显示:模型组大鼠血清细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- α 明显高于正常组,而 IL-4 明显低于正常组($P < 0.01$)。与模型组比较,配伍组和川芎嗪组 IL-1、IL-6、TNF- α 明显降低,IL-4 明显升高($P < 0.01$);TPT 组 IL-6、TNF- α 明

表3 对 AA 大鼠血清细胞因子的影响

组别	IL-1/ (pg/mL)	TNF- α / (ng/mL)	IL-6/ (pg/mL)	IL-4/ (ng/mL)
A	19.78 ± 1.95 [▲]	0.78 ± 0.15 [▲]	37.03 ± 4.04 [▲]	1.34 ± 0.27 [▲]
B	36.05 ± 2.96	2.11 ± 0.20	60.75 ± 6.29	0.39 ± 0.08
C	35.55 ± 3.22	1.29 ± 0.23 ^{▲◇}	57.75 ± 4.93 [◆]	0.60 ± 0.08 [▲]
D	30.10 ± 3.67 ^{▲★◆}	1.24 ± 0.18 ^{▲◇}	47.01 ± 2.58 ^{▲★◆}	1.00 ± 0.22 ^{▲★◆}
E	20.45 ± 1.98 ^{▲★◆}	0.94 ± 0.19 ^{▲☆}	41.94 ± 5.01 ^{▲★}	1.28 ± 0.21 ^{。▲★◆}
F	36.55 ± 3.02	1.25 ± 0.19 [▲]	58.85 ± 4.03	0.58 ± 0.09 [▲]
G	36.45 ± 3.13	0.97 ± 0.15 [▲]	41.55 ± 5.95 [▲]	0.60 ± 0.07 [▲]

注: A、C、D、E、F、G 与 B 比较, $\blacktriangle P < 0.01$; C、D、E 与 F 比较, $\star P < 0.05$, $\star P < 0.01$ 。
C、D、E 与 G 比较, $\diamond P < 0.05$, $\blacklozenge P < 0.01$ 。

显降低,IL-4 明显升高($P < 0.01$);黄芪组和 MTX 组 TNF- α 明显降低、IL-4 明显升高($P < 0.01$)。与 MTX 组比较,配伍组 IL-1、IL-6 明显降低,IL-4 明显升高($P < 0.01$),TNF- α 降低($P < 0.05$),说明配伍组疗效优于 MTX 组。与 TPT 组比较,配伍组 IL-1 明显降低,IL-4 明显升高($P < 0.01$),说明配伍组疗效优于 TPT 组。配伍组较单药组亦有明显差异,疗效高于单药组。

3 讨论

类风湿关节炎是一种慢性自身免疫性疾病,其发病除与免疫功能失调有关外,滑膜细胞凋亡机制障碍也是其发病原因之一^[4],细胞因子网络调节

异常则是 RA 等慢性炎性关节病的共同免疫病理机制和效应^[5]。因而,通过对 AA 大鼠滑膜细胞凋亡及血清中细胞因子浓度的检测,可作为探讨益气活血法治疗 RA 作用机制的客观指标,为进一步阐发中药配伍、治则、治法的治疗原理及优势,提供新的依据。

黄芪既可双补脾肾,又能固卫实表,有邪祛邪,无邪扶正,较之人参等有补虚之功而无致邪之弊。黄芪注射液是由中药黄芪中提取的有效成分精制而成,具有补气升阳、益卫固表、托毒生肌、利水消肿之功^[6]。川芎嗪系从川芎中分离提纯的一种生物碱单体,是川芎的主要活血成分之一,广泛

用于治疗气血瘀滞之癥瘕积聚。有研究显示它可显著抑制 T 细胞活化和增殖, 达到治疗 RA 的效用^[7]。二者联合用药治疗 RA 是有一定的理论及临床基础的, 也是符合祖国医学益气活血的治疗原则的。

IL-1 与 TNF- α 主要源于巨噬细胞与 Th1 细胞, 是促进免疫性炎症的主要细胞因子。IL-6 在 RA 的病理过程中, 主要是与 TNF- α 起协同作用, 其水平的高低与疾病的活动程度相关。所以, IL-6 也是 RA 病程进展的一个重要病理因子。IL-4 源于 Th2 细胞, 是抑制免疫性炎症的主要细胞因子。实验结果已表明, 黄芪合川芎嗪注射液并用能显著抑制注射足跖肿胀程度, 能显著提高滑膜细胞的凋亡率, 并能降低大鼠血清中 IL-1、TNF- α 、IL-6 的水平, 上调 IL-4 的浓度, 抑制免疫性炎症, 恢复异常的免疫调节功能, 且疗效优于单纯的黄芪组与川芎嗪组, 与 MTX、TPT 组效果相当, 甚至优于 MTX、TPT, 揭示了益气活血法治疗 RA 的作用机制, 进一步扩大和丰富了 RA 中医治则、治法的系列研究, 为临床应用提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 杨豪, 乔卫平, 郑福增. 马钱子及其制剂治疗类风湿关节炎研究进展 [J]. 中医正骨, 2007, 19 (4): 71-73.

[2] 王伟钢. 类风湿关节炎中医药治疗概况 [J]. 继续医学教育, 2006, 20 (19): 74-77.

[3] 贺石林. 中医科研设计与统计方法 [M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1989: 54.

[4] 王勇, 章敏, 金伟伟, 等. 热痹颗粒对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞凋亡及 T 细胞亚群的影响 [J]. 医学研究杂志, 2009, 38 (5): 105-107.

[5] 张奉春. 类风湿关节炎基础与临床研究进展 [J]. 中华医学信息导报, 2007, 22 (3): 21-22.

[6] 徐建生, 杨兴易, 陈德昌, 等. 黄芪抑制心肺复苏后大鼠肝细胞凋亡的实验研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2005, 14 (4): 294-296.

[7] 张涛, 赵蕊, 柳朝阳, 等. 川芎嗪对 T 淋巴细胞活化增殖的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29 (13): 1658-1659.

(编辑: 迟 越)

The Influence of the Therapy for Nourishing Qi and Activating Circulation on Synovial Cell Apoptosis and Serum Cytokines in Rheumatoid Arthritis Rats

CHEN Li-feng, XIONG Hui, DIAO Bo, ZHAO Ying-qian
(Guangzhou Military Hospital in Wuhan, Wuhan Hubei 430070, China)

[ABSTRACT] Objective: To observe the effect of Astragalus root and Chuanxiong rhizome used in combination (called combination treatment group) on synovial cell apoptosis and serum cytokines in Rheumatoid Arthritis Rats and explore the mechanism of the therapy for nourishing qi and activating circulation in treating RA. Methods: AA rat model was established. The rats were divided into seven groups: normal, model, Astragalus root treatment, Chuanxiong rhizome treatment, combination treatment, MTX treatment and TPT treatment. Observe the influence and mechanism of the therapy for nourishing qi and activating circulation to the swelling of vola pedis, synovial cell apoptosis ratio and density of serum cytokines in AA rats. Results: Combination treatment group could distinctly recede the swelling of vola pedis, heighten synovial cell apoptosis ratio and decrease the content of IL-1、TNF- α and IL-6 in serum, but the content of IL-4 in serum was increased, rather and even superior to MTX and TPT. Conclusion: The mechanism of the therapy for nourishing qi and activating circulation in treating RA could be to restrain inflammation cytokines and decreasing the synovial cell apoptosis of AA rats, which reflect the advantages of Chinese medicine prescription. under the direction of the treatment principles and methods of TCM.

[KEY WORDS] the therapy for nourishing qi and activating circulation; rheumatoid arthritis rats; cell apoptosis; cytokines