

桂枝芍药知母汤对 CIA 大鼠关节炎的作用及其机制研究

胡雨峰 俞晶华 奚飞飞

(南京中医药大学, 江苏南京 210023)

摘要 目的:研究桂枝芍药知母汤对 CIA 模型大鼠关节炎反应的治疗作用及其机制。方法:建立 II 型胶原诱导(CIA)动物模型,随机分为模型组、雷公藤多苷片组和桂枝芍药知母汤高、中、低剂量组,另取 10 只正常大鼠作为空白对照组,分别给药后观察各组大鼠关节评分和肿胀度、病理改变评分,并比较各组大鼠滑膜上清液中 IL-1、IL-6 及 IL-17 的表达。结果:模型组大鼠关节评分、左右足体积、造模足关节肿胀度、踝关节病理改变评分均明显高于空白对照组;治疗 16d 后,桂枝芍药知母汤各剂量组大鼠上述指标均明显低于模型组($P<0.01$)。模型组大鼠滑膜上清液中 IL-1、IL-6 及 IL-17 的表达均明显高于空白对照组($P<0.01$),治疗后桂枝芍药知母汤中、高剂量组大鼠上述指标明显低于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:桂枝芍药知母汤可通过调节炎性细胞因子的表达而明显缓解 CIA 模型动物的各种炎症反应。

关键词 桂枝芍药知母汤 类风湿关节炎 关节评分 病理学 SD 大鼠 实验研究

中图分类号 R684.305 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2015)11-0076-04

桂枝芍药知母汤(下简称桂芍知母汤)出自汉·张仲景《金匱要略·中风历节病脉证并治篇》,具有祛风除湿、温经散寒、滋阴清热之功效,主要用于治疗风寒湿痹日久,渐次化热伤阴之证,至今仍为临床上的常用方、基础方,尤多被用于治疗类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)等以关节病变为主的病症。本研究在建立 II 型胶原诱导(Collagen II-induced arthritis, CIA)动物模型的基础上,观察桂芍知母汤对模型动物关节炎的治疗作用及其对血清白介素(Interleukin, IL)-1、IL-6 及 IL-17 表达的影响,为其治疗 RA 的作用及机制进行阐释和解读。

1 实验材料

1.1 实验动物 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重(200g±20)g,由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供,生产许可证:SCXK(沪)2007-0005,实验动物使用许可证:SYXK(苏)2007-0030。

1.2 实验药物 桂芍知母汤,药物组成:桂枝 12g,白芍 9g,甘草 6g,麻黄 12g,生姜 15g,白术 15g,知母 12g,防风 12g,炮附子 10g。药物均购自南京中医药大学百草堂中医门诊部,由南京中医药大学药学院制剂室制备成浓度分别为 1.2、0.6 及 0.3g/mL 的水

煎剂。雷公藤多苷片,10mg/片,由浙江得恩德制药有限公司生产,批号:1108101,研钵研碎后加蒸馏水制成浓度为 0.001g/mL 的混悬液。

1.3 实验试剂 牛 II 型胶原,美国 Sigma,批号:A7906;完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA),美国 Sigma,批号:F5881;IL-1、IL-6 及 IL-17 ELISA 试剂盒,上海韵涵生物科技公司,批号 20111201B;焦碳酸二乙酯(DEPC),美国 Sigma。

1.4 实验仪器和设备 YLS-7B 型大鼠趾体积测量仪,山东省医学科学院设备站;SZ61TRC-ILST 型解剖镜,日本 Olympus;ROTOFIX 32A 型离心机,德国 Hettich;-80℃低温冰箱,日本 Sanyo;Multiskan MK3 型全自动酶标仪,芬兰 Labsystems。

2 实验方法

2.1 建立 CIA 模型 将牛 II 型天然胶原溶解于 0.1mol/L 醋酸溶液中,制成 4mg/mL 的溶液,并置于 4℃冰箱过夜。实验当日将含弗氏完全佐剂与 C II 胶原等体积于冰上充分震荡乳化制成 C II 乳剂。用微量注射器于大鼠左后足跖皮内、颈、背、腹、尾根等 5 个部位分别注射 C II 乳剂 0.1mL,总量 0.5mL,并于 14d 后用同等剂量免疫原在相同部位加强免疫一次。通过定期测定各组大鼠的关节炎指数(Arthritic

基金项目:南京中医药大学自然科学基金资助项目(13xzz10);南京中医药大学哲学社会科学基金资助项目(13xsk29);南京中医药大学中医痹病学重点学科开放课题基金项目(BBXK2013104)

Index, AI) 及检测大鼠双后足的肿胀度判断模型建立是否成功。

2.2 分组与给药 取造模成功的大鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只。另取 10 只正常大鼠作为空白对照组。给药方案: 空白对照组与模型组, 给予等容量蒸馏水; 桂芍知母汤高、中、低剂量组, 分别给予桂芍知母汤水煎剂 18g 生药/(kg·d)(浓度 1.2g/mL)、9g 生药/(kg·d)(浓度 0.6g/mL) 以及 4.5g 生药/(kg·d)(浓度 0.3g/mL); 雷公藤多苷片组, 给予雷公藤多苷片混悬液 0.015g/(kg·d)。以上各组均予灌胃给药, 给药体积均为 15mL/(kg·d)。第二次加强免疫后即日开始给药, 连续给药 16d。

2.3 关节评分、双足体积测量及肿胀度计算 关节评分采用 0—4 级关节评分法^[1]。0 分: 脚爪正常或无炎症; 1 分: 趾关节肿胀或轻度发红; 2 分: 趾关节和足跖发红并且肿胀; 3 分: 踝关节以下的整个脚爪全部发红并且肿胀; 4 分: 踝关节严重发红且肿胀, 关节有变形迹象。以第二次加强免疫当天为 d₀, 此后每隔 4d 用大鼠趾体积测量仪测量大鼠左右足跖体积, 检测并记录关节炎指数积分, 以 2 个脚爪的评分之和作为每个大鼠的关节评分, 并按公示计算出其关节肿胀度。

肿胀度 ER (%) = (V_t - V₀) / V₀ × 100% (V₀ 为造模前体积, V_t 为检测时体积)

2.4 样本提取及处理 连续给药 16d 后使用脱颈法处死大鼠。将大鼠仰卧位固定, 70% 酒精消毒, 大腿外旋, 从内侧切开并剥离皮肤, 沿膝关节正中纵线纵向切开直至暴露出以膝关节为中心的约 3cm × 3cm 大小的区域, 用齿镊提起髌骨。沿髌骨上沿约 0.3cm × 0.4cm 处向下切割直至股骨, 再沿髌骨向下分离至胫骨, 此时即可打开膝关节腔, 由髌骨下极向上延续的一层平滑光亮且呈淡黄色的软组织即为滑膜。在解剖镜下以眼科剪小心分离滑膜, 将部分组织分组加入适量生理盐水捣碎, 3000r/min 离心 10min 后取上清液冻于 -80℃ 低温冰箱保存备用。

2.5 病理组织学检查及评分 处死大鼠后, 将大鼠的踝关节

用 10% 福尔马林固定, 经过脱钙、脱水、常规石蜡包埋、切片(厚度约 4~5μm) 和常规 HE 染色后, 由病理专业人员检查阅片。具体观察指征包括关节炎表现、关节滑膜病变、关节骨质破坏等, 主要检查指标包含了炎细胞浸润、血管充血、滑膜肿胀、组织坏死等病理变化, 最终根据病变轻重程度进行评分, 按正常和轻、中、重度异常分别计 0~3 分。

2.6 滑膜上清液 IL-1、IL-6 及 IL-17 含量检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA), 按照试剂盒使用说明测定组织匀浆上清液中 IL-1、IL-6 及 IL-17 之含量。

2.7 统计学方法 所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 各组间比较采用方差分析和两样本均数比较的 t 检验, 以 P < 0.05 作为具有统计学意义的判定标准。

3 实验结果

3.1 各组大鼠治疗各时期关节炎评分比较 见表 1。

3.2 各组大鼠治疗各时期左右足关节体积比较 见表 2。

3.3 各组大鼠左足(造模足)治疗各时期关节肿胀度比较 见表 3。

表 1 各组大鼠治疗各时期关节炎评分 ($\bar{x} \pm s$) 分

组别	动物数 (只)	给药剂量 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	关节评分				
			d ₀	d ₄	d ₈	d ₁₂	d ₁₆
空白对照组	10	-	0	0	0	0	0
模型组	10	-	3.20±1.72 ^{▲▲}	5.90±1.80 ^{▲▲}	6.20±1.74 ^{▲▲}	6.34±1.57 ^{▲▲}	7.03±1.46 ^{▲▲}
桂芍知母汤高剂量组	10	18	3.31±1.10	4.20±1.67	4.40±1.54 [*]	4.30±1.39 [*]	4.16±1.33 ^{**}
桂芍知母汤中剂量组	10	9	3.18±1.22	4.32±1.20	4.21±1.31 [*]	4.00±1.06 ^{**}	3.94±1.07 ^{**}
桂芍知母汤低剂量组	10	4.5	3.60±1.05	4.01±1.17	4.51±1.09	4.20±1.03 [*]	4.01±1.42 ^{**}
雷公藤多苷片组	10	0.015	3.10±1.74	3.00±1.62 [*]	2.80±1.51 [*]	2.90±1.43 ^{**}	2.62±1.62 ^{**}

注: 与同期空白对照组比较, ▲▲P < 0.01; 与同期模型组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。

表 2 各组大鼠治疗各时期左、右足体积比较 ($\bar{x} \pm s$) mL

组别	动物数 (只)	给药剂量 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	左足体积				
			d ₀	d ₄	d ₈	d ₁₂	d ₁₆
空白对照组	10	-	1.720±0.181	1.810±0.191	1.765±0.197	1.810±0.205	1.865±0.215
模型组	10	-	2.585±0.403 ^{▲▲}	2.660±0.378 ^{▲▲}	2.740±0.354 ^{▲▲}	2.895±0.267 ^{▲▲}	2.985±0.320 ^{▲▲}
桂芍知母汤高剂量组	10	18	2.505±0.411	2.425±0.374	2.390±0.381 [*]	2.285±0.305 ^{**}	2.050±0.277 ^{**}
桂芍知母汤中剂量组	10	9	2.645±0.442	2.470±0.397	2.400±0.364 [*]	2.210±0.311 ^{**}	2.050±0.239 ^{**}
桂芍知母汤低剂量组	10	4.5	2.590±0.284	2.525±0.297	2.440±0.310	2.245±0.312 ^{**}	2.025±0.274 ^{**}
雷公藤多苷片组	10	0.015	2.640±0.277	2.505±0.321	2.410±0.302 [*]	2.330±0.274 ^{**}	2.080±0.237 ^{**}

注: 与同期空白对照组比较, ▲▲P < 0.01, ▲▲▲P < 0.001; 与同期模型组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。

组别	动物数 (只)	给药剂量 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	右足体积				
			d ₀	d ₄	d ₈	d ₁₂	d ₁₆
空白对照组	10	-	1.620±0.165	1.650±0.163	1.680±0.155	1.730±0.169	1.790±0.166
模型组	10	-	1.750±0.167 [*]	1.860±0.211 ^{▲▲}	1.910±0.217 ^{▲▲}	1.970±0.196 ^{▲▲}	1.985±0.176 ^{▲▲}
桂芍知母汤高剂量组	10	18	1.760±0.158	1.700±0.165	1.660±0.131 ^{**}	1.625±0.130 ^{**}	1.555±0.182 ^{**}
桂芍知母汤中剂量组	10	9	1.840±0.178	1.765±0.192	1.705±0.182 [*]	1.680±0.192 ^{**}	1.660±0.223 ^{**}
桂芍知母汤低剂量组	10	4.5	1.915±0.290	1.790±0.227	1.700±0.222 [*]	1.700±0.255 [*]	1.660±0.184 ^{**}
雷公藤多苷片组	10	0.015	1.795±0.334	1.715±0.275	1.665±0.131 [*]	1.615±0.225 ^{**}	1.595±0.136 ^{**}

注: 与同期空白对照组比较, ▲▲P < 0.01, ▲▲▲P < 0.001; 与同期模型组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。

3.4 各组大鼠治疗后踝关节病理评分比较 见表4

3.5 各组大鼠治疗后滑膜组织上清液 IL-1、IL-6 及 IL-17 表达比较 见表5。

4 讨论

RA 是一种以关节和关节周围组织的非感染性炎症为主的异质性、系统性、慢性自身免疫性疾病。现代中医学者一般将 RA 归属于“痹证”范畴,但因其病情顽固,迁延难愈,且疼痛遍历周身多个关节的特点,又有别于一般的痹证,是痹证中的特殊类型,尤其与《金匱要略·中风历节病脉证并治篇》中提及的“历节”相似,所谓:“病历节,不可屈伸”,“诸肢节疼痛,身体羸羸,脚肿如脱”。而桂芍知母汤正是医圣张仲景为风湿历节所设,全方仅用药物九味,却配伍精妙,药少效宏,具有寒温并用、温散而不伤阴、养阴而不碍阳等特点,是当代医家用以治疗 RA 的常用方、基础方。

RA 的主要表现包括双手、腕和足关节的对称性多关节炎,亦可累及膝、髌等关节,并可伴发诸多关节外表现。在其关节表现中,肿胀和变形是较为典型的症状。本研究所采用的 CIA 模型所引发的炎症反应为多发性外周关节炎(以双足,踝、膝关节为主),关节局部可红肿和畸形,病理变化为增生性滑膜炎,关节软骨破坏以及骨侵蚀,血管翳形成和炎性细胞浸润,其临床表现、实验室指标与免疫及病理学改变方面均接近人类 RA,故在 CIA 大鼠模型的基础上通过药物干预并定期观察大鼠关节评分变化,双足体积、肿胀度趋势及膝关节病理改变可了解药物对于关节炎的治疗作用。

炎性细胞因子的异常表达在 RA 的炎症反应中起到了重要的作用,被认为是 RA 炎症及关节损伤的重要介质^[2]。这其中,IL-1、IL-6 及 IL-17 的表达与 RA 的发病均有密切关联。Arend^[3]发现,无论是在动物模型还是患者体内,IL-1 受体都是重要的抗炎因子,在动物模型中发现,IL-1 受体缺乏使得症状得以加重。有实验证明,滑膜液中的 IL-6 含量可反映局部前炎症变化,尤其是破坏性的病变^[4]。Veldhoen 等^[5]报道,IL-6 和转化生长因子-β(TGF-β)发挥协同作用时,可诱导 Th17 细胞合成并分泌 IL-17,而 IL-17 又能刺激滑膜成纤维细胞分泌 IL-6,造成炎

表3 各组大鼠治疗各时期左足(造模足)关节肿胀度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	给药剂量($g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)	关节肿胀度(%)				
			d ₀	d ₄	d ₈	d ₁₂	d ₁₆
模型组	10	-	69.2±32.8	70.1±32.5	79.4±32.6	89.6±29.7	95.8±34.9
桂芍知母汤高剂量组	10	18	48.9±21.4	44.2±19.9 [*]	41.7±20.7 ^{**}	35.9±16.5 ^{**}	21.7±12.5 ^{**}
桂芍知母汤中剂量组	10	9	53.2±19.2	43.2±17.0 [*]	35.9±14.5 ^{**}	28.1±11.4 ^{**}	20.7±08.5 ^{**}
桂芍知母汤低剂量组	10	4.5	57.5±16.9	53.4±13.0	46.8±14.9 [*]	36.0±14.4 ^{**}	22.6±11.5 ^{**}
雷公藤多苷片组	10	0.015	61.5±18.0	52.9±16.9	47.2±17.1 [*]	42.4±16.3 ^{**}	27.0±13.1 ^{**}

注:与同期模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

表4 给药后各组大鼠踝关节病理改变评分统计表($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	给药剂量($g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)	病理评分
空白对照组	10	-	-
模型组	10	-	13.5±1.581
桂芍知母汤高剂量组	10	18	1.3±2.767 ^{**}
桂芍知母汤中剂量组	10	9	3.2±2.820 ^{**}
桂芍知母汤低剂量组	10	4.5	5.3±3.164 ^{**}
雷公藤多苷片组	10	0.015	0.8±1.687 ^{**}

注:与模型组比较,**P<0.01。

表5 各组大鼠治疗后滑膜组织上清液 IL-1、IL-6、IL-17 含量比较($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组别	动物数(只)	给药剂量($g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)	IL-1	IL-6	IL-17
空白对照组	10	-	37.772±15.755	86.978±18.295	6.353±2.505
模型组	10	-	88.447±49.774 ^{▲▲}	119.224±24.585 ^{▲▲}	20.902±9.134 ^{▲▲}
桂芍知母汤高剂量组	10	18	48.498±7.433 [*]	90.755±21.542 [*]	10.093±6.172 ^{**}
桂芍知母汤中剂量组	10	9	50.523±10.053 [*]	85.882±22.451 ^{**}	10.066±6.184 ^{**}
桂芍知母汤低剂量组	10	4.5	69.184±33.720	103.954±23.501	16.112±9.984
雷公藤多苷片组	10	0.015	39.633±6.766 [*]	76.257±2.974 ^{**}	11.785±7.342 [*]

注:与空白对照组比较,▲▲P<0.01;与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

症的进展。而 Chabaud 等^[6]发现,IL-17 能通过滑膜细胞使得基质金属蛋白酶-1(MMP-1)的表达水平升高 5 倍,而在抗 IL-17 抗体作用下,MMP-1 的表达水平降低 50%,显示了 IL-17 在 RA 损伤中的作用。IL-17 致炎的主要途径为促进 T 细胞激活并刺激上皮细胞、成纤维细胞产生大量炎性细胞因子如 IL-6、动脉粥样硬化和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等而引起炎症^[7]。

本研究我们发现,自 d₀起,模型组的关节评分、左右足体积及肿胀度一直保持上升趋势,而桂芍知母汤各剂量组相关指标则持续下降,直至 d₁₆;同时在病理评分方面,桂芍知母汤各剂量组均远低于模型组,显示桂芍知母汤可缓解模型动物关节肿胀、变形等症状并改善关节病理变化,对模型动物的关节炎症有较为明显的治疗效果;而桂芍知母汤高、中剂量可明显减少模型动物滑膜上清液中 IL-1、IL-6 及 IL-17 的含量,提示桂芍知母汤可通过调节 IL-1、IL-6 及 IL-17 的表达而起到缓解关节炎反应的作用。

(下转第 82 页)

染),建立了病证结合的肾阳虚外感模型,通过整体的外观状况、生理状态、自主活动、被动负重游泳等指标,结合趾温、肛温动态监测,感染病毒后死亡率比较,肺组织病理改变综合评价,较好地模拟了临床肾阳虚外感的病证状态。

动物的动态生理指标虽然比较简单,但能直接和准确地反映机体健康状态,再结合肺指数、死亡率等客观的金指标能快速地判断出模型的状态及药物干预的大体效果;另外,这种整体动态的生理、病理指标评价也较符合中医“证候”的特点(动态的、疾病阶段性的、外观症状为主的描述表征)。但目前有关中医证候、中药复方的药效评价常局限于某个指标或某几个指标的判断,有时会根据实验的设计或部分有显著性差异的结果来判断,容易导致以偏概全或片面的结论。我们采用的 PLS 统计分析,目的是将相关的药效指标进行标准化处理,然后采用数学建模,综合起来进行比较分析(类似于综合测评模式),可更客观地评价复合病证动物模型及中药复方的整体疗效。

本实验使用 SIMCA-P 软件中的 PLS 来处理药理学数据,通过得分图可以看出空白对照组及肾阳虚外感组在二维图上区分很明显,说明肾阳虚外感模型制备较好。VIP 图中可以看出死亡率、肛温、肺指数等指标对综合药效结果的影响是最大的,这与药理学分析判断方法一致。各给药组综合药效得分及比较图可以看出麻黄细辛附子汤低、中、高剂量组相对于其他给药组表现出了更好的治疗效果,其中麻黄细辛附子汤中剂量组治

疗效果尤佳。中剂量相当于临床的等效剂量,这也提示麻黄细辛附子汤使用时要注意选择合适的剂量范围。本实验结果表明,使用 PLS 来分析处理药理学数据简便可靠,能较好地反映证候特征及中药复方的整体调控作用,避免某一个或几个指标评价容易引起片面结论的弊端,为中医临床上辨证选方、辨病用药提供了更客观的实验依据。

参考文献

- [1] 李世宏,梁纪兰,杨锐乐,等.中药抗流感病毒研究进展.中兽医医药杂志,2007,26(5):26
- [2] 杨勇.肾阳虚外感小鼠模型建立及麻黄细辛附子汤干预研究.济南:山东中医药大学,2012
- [3] 王惠文,吴载斌.偏最小二乘回归的线性与非线性方法.北京:国防工业出版社,2006:9
- [4] 陈素红,吕圭源,范景,等.海马不同提取物对雌二醇致肾阳虚小鼠的影响.中草药,2009(2):258
- [5] 刘培民,张鸿彩,包培蓉.升降散抗流感病毒实验研究.山东中医药大学学报,2001,25(1):43
- [6] 闫怀士,李京培.艾灸抗小鼠流感病毒性肺炎的实验研究.上海针灸杂志,2006,25(7):43
- [7] 钟南山.从 SARS 到 H7N9——中医药治疗的启发.第十届国际络病学大会会议报告

第一作者:侯衍豹(1990—),男,硕士研究生,从事中药及复方药理和毒理研究。595044561@qq.com
通讯作者:杨勇,博士,副教授,硕士研究生导师。yy7204@163.com

收稿日期:2015-06-08

编辑:吴宁

(上接第 78 页)

参考文献

- [1] 张均田.现代药理学实验方法.北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:1383
- [2] Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, et al. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. Clin Immunol, 1999, 163:491
- [3] Arend W. Cytokine imbalance in hepathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin 1 receptor antagonist. Arthritis Rheum, 2001, 30: 1
- [4] Carter SD, Barnes A, Gilmore WH. Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 69(2-4):201
- [5] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports the enovo differentiation of IL-17-producing T cells.

Immunity, 2006, 24(2):179

- [6] Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, et al. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. Cytokine, 2000, 12(7):1092
- [7] Komiyama Y, Nakae S, Mataka T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunol, 2006, 177(1):566

第一作者:胡雨峰(1985—),男,博士,讲师,中医内科学专业,风湿免疫病研究方向。

通讯作者:奚飞飞,博士,助理研究员。xifeifei@163.com

收稿日期:2015-08-27

编辑:吴宁