

三痹汤对佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜病理改变的影响及其机制研究

张春芳¹ 纪德凤² 祁永校² 姜昕² 孙 焱²

(1.黑龙江中医药大学附属第一医院,黑龙江哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 目的:观察三痹汤对佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜组织内的病理变化及关节滑膜组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、调节活化蛋白(RANTES)、转化生长因子- β (TGF- β)、白介素-17(IL-17)表达的影响,探讨其作用机制。方法:采用随机数字表法将所有大鼠分为空白对照组、模型对照组、三痹汤高剂量组、三痹汤中剂量组、雷公藤对照组,每组 12 只,除空白对照组外余 4 组均用弗式完全佐剂诱导佐剂性关节炎大鼠模型。造模后 8d 开始灌胃给予相应药物或生理盐水,连续给药 21d。于实验期间每周对各组大鼠进行关节炎评分;治疗结束后处死大鼠,取双侧膝关节滑膜组织,光镜下观察关节滑膜病理变化,免疫组化检测关节滑膜 TNF- α 、MCP-1、RANTES、TGF- β 、IL-17 的表达。结果:与空白对照组比较,造模后各组大鼠关节滑膜组织炎性改变严重,经三痹汤或雷公藤治疗后,病理改变明显改善。与模型对照组比较,三痹汤高剂量组原发足于第 3 周后、继发足于第 2 周后关节炎评分明显减少($P<0.05$);与雷公藤对照组比较,三痹汤高剂量组于第 2 周时继发足关节炎评分明显降低($P<0.05$)。与空白对照组比较,各组大鼠滑膜 TNF- α 、MCP-1、RANTES、TGF- β 和 IL-17 表达明显增加($P<0.05$);与模型对照组比较,三痹汤中、高剂量和雷公藤能下调滑膜组织中 TNF- α 、MCP-1、RANTES、IL-17 表达,上调 TGF- β 表达,差异均具有统计学意义($P<0.05$);与雷公藤对照组比较,三痹汤中剂量组 MCP-1 表达明显增高($P<0.05$),TGF- β 、IL-17 表达明显降低($P<0.05$),三痹汤高剂量组 RANTES、IL-17 表达明显降低($P<0.05$)。结论:三痹汤通过下调关节滑膜 TNF- α 、MCP-1、RANTES、IL-17 表达,上调 TGF- β 表达,从而抑制细胞炎性因子,减轻关节肿胀及滑膜细胞增生,进而延缓关节损伤。

关键词 三痹汤 佐剂性关节炎 TNF- α MCP-1 RANTES TGF- β IL-17 病理学

中图分类号 R684.305 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)09-0075-04

类风湿性关节炎(RA)是一种慢性、进行性、迁延性的自身免疫性疾病,发病以小关节对称性疼痛、肿大、变形为特征,多数患者可有永久性骨质破坏,并可出现关节外损伤。对于 RA 的发病机制目前仍未明确,而细胞因子是公认的关节炎损伤的重要介质^[1]。前期研究表明,三痹汤能降低佐剂性关节炎(AA)大鼠关节滑膜内的基质金属蛋白酶-3(MMP-3)及明胶酶-B、血清 CXCR3 及 CXCR4 mRNA 的水平,抑制关节炎,减轻足肿胀^[2-3]。本研究观察三痹汤对 AA 大鼠膝关节滑膜组织病理改变的影响,并从细胞因子角度探索其治疗机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 雌性清洁 Wistar 大鼠 60 只,6~8 周龄,体重(180 \pm 20)g,购于黑龙江中医药大学实验动物中心,合格证为黑动字第 P00102005,在通风、温度适宜的动物室内常规饲养。

1.2 药品与试剂 三痹汤药物组成:川续断、杜仲、防风、肉桂、细辛、人参、白茯苓、当归、白芍、甘草各 30g,秦艽、生地黄、川芎、川独活各 15g,黄芪、川牛膝各 30g,上述中药材均购于黑龙江中医药大学附属第一医院;注射用弗氏完全佐剂(FCA),美国 Sigma 公司;雷公藤多苷片,黄石飞云制药有限公司;Rabbit Anti-TNF alpha、Rabbit Anti-MCP1、Rabbit Anti-RANTES、Rabbit Anti-TGF beta1、Rabbit Anti-IL-17,北京博奥森生物技术有限公司;二抗试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司;10% EDTA 脱钙液,Biotopped 公司。

1.3 实验仪器与设备 光学显微镜,日本 Olympus 公司;-80℃低温冰箱,Thermo 牌;微波炉,广东美的环境电器制造有限公司;切片机,美国 AO 公司;BMJ-B 包埋机,常州市中威电子仪器有限公司;电热恒温水浴箱,江苏省金坛市医疗仪器厂。

基金项目:黑龙江博士后科研启动项目(LBH-Q12011)

2 实验方法

2.1 药物制备 三痹汤药液制备:所有中药材用三倍量的水浸泡 1h 后,煎煮 2 次,第 1 次煎 3h,第 2 次煎 2h,2 次煎煮液混合后,煎煮浓缩。雷公藤混悬液制备:将雷公藤多苷片研末,用生理盐水配制成混悬液,1mL 雷公藤混悬液含有雷公藤多苷片 1mg。

2.2 分组与造模 60 只大鼠采用随机数字表法分为空白对照组、模型对照组、三痹汤高剂量组、三痹汤中剂量组、雷公藤对照组,每组 12 只。除空白对照组外,其余各组大鼠制作 AA 模型^[4]:临用前从冰箱取出 FCA,充分振荡、均匀,大鼠常规消毒后将其右后肢拉直,用 1mL 注射器针头于右后足跖中部皮内注射,每只大鼠注射 0.1mL FCA。所有动物造模成功^[5]。

2.3 给药方法 按人、大鼠给药剂量体表面积折算公式计算出给药剂量。于第 0 周时开始造模,造模后第 8 天(第 1 周时)灌胃给药,三痹汤中剂量组给予中药汤液 1.73g/(kg·d),三痹汤高剂量组予中药汤液 3.46g/(kg·d),雷公藤对照组给予雷公藤混悬液 9.45mg/(kg·d),空白对照组和模型对照组灌服同体积生理盐水,各组均连续给药 21d。

2.4 观察指标

2.4.1 关节炎评分 实验期间每周记录各组大鼠后肢踝关节病变程度,对关节炎进行评分。全身病变按大鼠多发性关节炎全身病变 5 级评分记录法进行评分^[6]。0 分:无红肿;1 分:小趾关节红斑或轻度肿胀;2 分:趾关节和趾跖关节中度肿胀;3 分:踝关节以下的足爪肿胀;4 分:包括踝关节在内全部足爪肿胀。累计后肢关节的得分为每只大鼠的评分,最高为 16 分。

2.4.2 光镜观察关节病理变化

造模后 28d 处死大鼠,取双侧膝关节,完整剥离滑膜组织,用刀片完整切下,4%多聚甲醛固定 2h,10%EDTA 脱钙 1 周,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,HE 常规染色,于光学显微镜下观察病理形态学改变。

2.4.3 免疫组化检测关节滑膜 TNF- α 、MCP-1、RANTES、TGF- β 、IL-17 的表达 免疫组化方法的具体步骤按试剂盒操作,由黑龙江中医药大学附属第一医院

病理科协助完成。图像结果分析方法:采用 Image-ProPlus6.0 彩色病理图像分析软件,对每张片进行累积光密度值测定。

2.5 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示;多组间比较用单因素方差分析,多组间的两两比较用 q 检验,检验水准为 $P<0.05$ 。

3 实验结果

3.1 关节及滑膜病理变化 空白对照组大鼠滑膜组织未见增生及血管翳形成,软骨细胞排列整齐,关节面光滑,关节间隙未见异常,无软骨、骨结构的破坏。模型对照组大鼠滑膜及关节组织中有大量炎性细胞浸润,滑膜增生且有大量的血管翳形成,广泛的软骨及骨破坏,关节面粗糙,关节间隙明显变小。三痹汤高剂量组大鼠滑膜可见散在炎性细胞浸润,未见增生,少量血管翳形成,细胞排列尚整齐,软骨及骨破坏较少,关节面尚光滑,关节间隙稍变小。三痹汤中剂量组大鼠滑膜及关节组织中可见炎性细胞浸润,滑膜组织增生,少量血管翳形成,软骨及骨轻度破坏,其中有少数关节软骨的侵蚀破坏,关节面略粗糙,关节间隙稍变小。雷公藤对照组大鼠滑膜轻微增生,少量炎性细胞浸润及血管翳形成,关节软骨及骨变化与三痹汤高剂量组相当。见图 1。

3.2 各组大鼠原发足关节炎评分比较 见表 1。

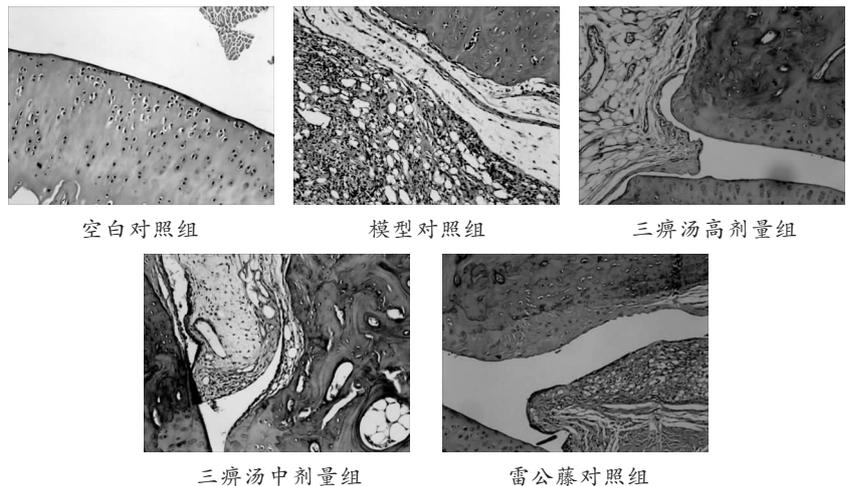


图 1 各组大鼠滑膜组织病理变化(HE 染色,×200)

表 1 各组大鼠实验各时期原发足关节炎评分比较($\bar{x}\pm s$) 分

组别	动物数 (只)	关节炎评分				
		第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
模型对照组	12	1.58±0.51	2.66±0.49	2.41±0.51	2.00±0.60	1.58±0.51
雷公藤对照组	12	1.66±0.49	2.66±0.65	2.16±0.38	1.58±0.51	0.75±0.62*
三痹汤中剂量组	12	1.75±0.45	2.66±0.49	2.33±0.49	1.66±0.49	0.75±0.45*
三痹汤高剂量组	12	1.75±0.45	2.58±0.51	2.25±0.45	1.41±0.66*	0.66±0.49*

注:与模型对照组比较,* $P<0.05$ 。

3.3 各组大鼠继发足关节炎评分比较 见表2。经药物治疗后,各给药组大鼠足关节炎评分均明显降低 ($P<0.05$),三痹汤高剂量组起效较快。

3.4 各组大鼠关节滑膜 TNF- α 、MCP-1、RANTES、TGF- β 、IL-17 累积光密度表达的比较 见表3。

4 讨论

RA 是一种病因病机仍不清楚的自身免疫性疾病,主要累及周身关节,其病理改变是因多种细胞因子分泌、炎症细胞浸润,以致慢性关节滑膜炎损伤和骨质破坏^[1]。TNF- α 是机体免疫细胞被抗原激活后,释放出来的参与机体免疫反应的物质,由 Th1 细胞分泌,TNF- α 与相应受体结合后,促进一系列炎性细胞因子表达,这些分子共同作用于内皮细胞,促进白细胞进入组织,加剧滑膜炎及血管翳的形成^[7-8]。此外,TNF- α 通过聚集活化淋巴细胞,促进滑膜巨噬细胞和成纤维细胞的增生,增强基质金属蛋白酶(MMP)的活性,造成骨和软组织的直接损伤,MMP-3 对滑膜的破坏在前期实验中已得到证实^[2]。MCP-1 由免疫及非免疫细胞分泌,是一种常见的趋化因子,在 AA 大鼠的血清及滑膜中均呈高表达(相关研究结果待发表),滑膜的成纤维细胞在 IL-1、TNF- α 或 IFN- γ 的介导下合成 MCP-1 后,趋化单核及淋巴细胞进入关节滑膜组织内,通过 G 蛋白耦联的胞膜受体与白细胞相互作用,趋化白细胞浸润到组织损伤处,加重关节滑膜的炎性反应^[9-10]。有实验表明,在注射 MCP-1 的兔关节内,发现滑膜上有明显的巨噬细胞浸润,在 RA 患者的滑膜液中检测到高滴度的 MCP-1^[11-13]。RANTES 主要由 T 细胞产生,通过与相应细胞表面的 CC 亚族趋化因子受体结合,吸引 CD4⁺ 及 CD45⁺ T 细胞,趋化单核、巨噬细胞,激活嗜碱、嗜酸粒细胞进入炎症反应部位,导致细胞外基质大量堆积,使关节滑膜增生受损,在免疫应答及炎性反应等方面起重要作用^[14-15]。TGF- β 是双向性、多效性的生长因子^[16],既能抑制炎症反应又能促进炎症形成,参与多种免疫细胞的生长分化,抑制炎性细胞因子活性,减少黏附于内皮细胞的中性粒细胞和 T 细胞^[17]。研究发现 TGF- β 参与调节炎症过程^[16],是有效的免疫抑制因子,有抗炎作用。然而内源性的 TGF- β 刺

表2 各组大鼠实验各时期继发足关节炎评分比较($\bar{x}\pm s$) 分

组别	动物数(只)	关节炎评分				
		第0周	第1周	第2周	第3周	第4周
模型对照组	12	0	0.75±0.45	1.16±0.57	1.50±0.52	0.58±0.51
雷公藤对照组	12	0	0.66±0.49	1.16±0.38	0.58±0.51*	0.33±0.49
三痹汤中剂量组	12	0	0.58±0.51	1.08±0.28	0.75±0.45*	0.25±0.45
三痹汤高剂量组	12	0	0.41±0.51	0.75±0.45**	0.58±0.51*	0.16±0.38*

注:与模型对照组比较,* $P<0.05$;与雷公藤对照组比较,# $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠滑膜 TNF- α 、MCP-1、RANTES、TGF- β 、IL-17 累积光密度表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	TNF- α	MCP-1	RANTES	TGF- β	IL-17
空白对照组	12	1086.75±162.17	1586.83±127.54	1028.66±153.46	767.66±186.86	1162.25±184.06
模型对照组	12	24744.25±3862.52 Δ	29263.83±1601.36 Δ	11172.08±958.72 Δ	5299.16±373.48 Δ	29708.±1952.83 Δ
雷公藤对照组	12	15895.83±1490.13 Δ	9155.16±752.25 Δ	7089.58±303.23 Δ	10362.75±1386.21 Δ	7900.41±684.00 Δ
三痹汤中剂量组	12	17330.75±1354.18 Δ	14204.0±1339.57 Δ	7483.50±485.04 Δ	7979.17±708.02 Δ	6938.08±500.39 Δ
三痹汤高剂量组	12	14638.66±904.80 Δ	8925.91±793.81 Δ	5435.41±483.43 Δ	15312.75±1387.76 Δ	4935.00±502.00 Δ

注:与空白对照组比较, $\Delta P<0.05$;与模型对照组比较,* $P<0.05$;与雷公藤对照组比较,# $P<0.05$ 。

激细胞外基质分泌,趋化单核巨噬细胞和成纤维细胞,促进血管形成,对于 RA 的滑膜增生、炎性浸润及纤维化等过程起致病作用^[18]。IL-17 主要由 Th17、Th1 细胞产生,是前沿性致炎细胞因子,能刺激成纤维细胞分泌 IL-6、IL-8 及 TNF- α 等炎性细胞因子,诱导滑膜及软骨细胞表达 MMP-1,促进软骨蛋白多糖及胶原降解,抑制软骨细胞合成基质,刺激破骨细胞的生长,导致骨关节破坏^[19]。IL-17 还能刺激血管内皮细胞迁移以及血管索形成,促进滑膜新生血管,形成血管翳,导致关节滑膜增生损伤^[20-21],KOHNO M 等^[22]发现在 RA 患者关节滑膜及滑膜液中有大量的 IL-17 表达,前期研究证实 IL-17 在 AA 大鼠血清中亦呈高表达(相关研究结果待发表)。

RA 属中医痹证范畴,又称“顽痹”“历节风”等。本病乃风寒湿邪痹着日久,导致肝肾不足、气血两虚而成虚实夹杂之证。三痹汤出于《妇人大全良方》,功能益气活血、补肾散寒、祛风除湿,主治肝肾气血不足,风寒湿邪侵袭而成痹者。方中熟地、牛膝、杜仲补益肝肾,四物汤和营卫养血,四君子汤益气扶脾以祛邪扶正,细辛、独活通肾气、祛风寒,防风、秦艽祛风湿,肉桂胜寒,诸药合用共奏补肝肾、调气血、祛风湿、止痹痛之功。

本研究结果显示,与空白对照组比较,造模后各组大鼠的关节滑膜有不同程度的炎性细胞浸润、滑膜增生及血管翳形成,软骨及骨破坏,细胞因子 TNF- α 、MCP-1、RANTES、TGF- β 和 IL-17 在滑膜中呈高表达,提示模型制备成功。与模型对照组比较,三痹汤高剂量组原发足于实验第3周后,继发足于第2周后关节炎评分减少,三痹汤中、高剂

量和雷公藤均能下调滑膜 TNF- α 、MCP-1、RANTES、IL-17 的表达,上调 TGF- β 的表达。提示三痹汤在治疗 AA 大鼠时,通过抑制炎症细胞因子,减轻足肿胀及关节炎评分。TGF- β 为双向调节细胞因子,在 FCA 刺激下,模型对照组大鼠滑膜中 TGF- β 高表达,三痹汤治疗后,其呈现更高表达状态,而此时 AA 大鼠关节肿胀减轻,关节炎评分减少,说明 TGF- β 抑制炎症发展,与 Szekanecz Z 研究发现一致^[6]。

综上,三痹汤可能通过下调关节滑膜 TNF- α 、MCP-1、RANTES、IL-17 的表达,上调 TGF- β 的表达,抑制关节滑膜炎性细胞浸润,减轻足肿胀,进而缓解关节滑膜炎,延缓关节软骨及骨质破坏,扶正祛邪,使其恢复气血调和、阴平阳秘的状态。下一步,我们拟采用血清药理学方法阐述三痹汤治疗 RA 的作用机制。

参考文献

- [1] PARADOWSKA - GORYCKA A, GRZYBOWS KA - KOWALCZYK A, WOJTECKA-LUKASIK E, et al. IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Scand J Immunol, 2010, 71(3): 134.
- [2] 张春芳, 容蕊, 汪洋, 等. 三痹汤对实验性关节炎大鼠关节滑膜 MMP-3 及明胶酶-B 的影响[J]. 中医药信息, 2010, 27(4): 50.
- [3] 张春芳, 汪洋, 王炎炎, 等. 三痹颗粒对 CIA 模型大鼠血清 CXCR3、CXCR4 mRNA 的影响[J]. 中医药学报, 2014, 42(4): 58.
- [4] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 723.
- [5] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 305.
- [6] BOIARDI L, MACCHIONI P, MELICONI R, et al. Relationship between serum RANTES levels and radiological progression in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate[J]. Clin Exp Rheumatol, 1999, 17(4): 419.
- [7] CLARK I A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2007, 18(3-4): 335.
- [8] TRACEY D, KLARESKOG L, SASSO E H, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review [J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(2): 244.
- [9] KOCH A E. Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62(Suppl 2): ii60.
- [10] 储永良, 黄清春. 血管内皮生长因子及其受体与类风湿关节炎的相关性 [J]. 中华风湿病学杂志, 2005, 9(6): 359.
- [11] SZEKANECZ Z, KIM J, KOCH A E. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis [J]. Semin Immunol, 2003, 15(1): 15.
- [12] RUDOLPH E H, WOODS J M. Chemokine expression and regulation of angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(5): 613.
- [13] HARINGMAN J J, TAK P P. Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(3): 93.
- [14] 朱平, 王彦宏, 樊春梅, 等. 趋化因子受体 CCR5 及其配体在类风湿关节炎患者滑液及滑膜中的表达 [J]. 中华医学杂志, 2001, 81(17): 1038.
- [15] HOSAKA S, AKAHOSHI T, WADA C, et al. Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Immunol, 1994, 97(3): 451.
- [16] SZEKANECZ Z, HAINES G K, HARLOW L A, et al. Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1995, 76(2): 187.
- [17] 郑毅, 任建, 施海燕, 等. 类风湿关节炎中转化生长因子 β 1 和细胞间粘附分子的变化 [J]. 中华风湿病学杂志, 1998, 2(1): 21.
- [18] 戴冽. 转化生长因子 β 与类风湿性关节炎 [J]. 国外医学 (内科学分册), 1999, 26(5): 214.
- [19] LI X, YUAN F L, LU W G, et al. The role of interleukin-17 in mediating joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 397(2): 131.
- [20] NUMASAKI M, FUKUSHI J, ONO M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth [J]. Blood, 2003, 101(7): 2620.
- [21] HONORATI M C, NERI S, CATTINI L, et al. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts [J]. Osteoarthr Cartil, 2006, 14(4): 345.
- [22] KOHNO M, TSUTSUMI A, MATSUI H, et al. Interleukin-17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis [J]. Mod Rheumatol, 2008, 18(1): 15.

第一作者: 张春芳 (1972—), 女, 医学博士, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事临床急诊工作。1009177746@qq.com

收稿日期: 2016-05-06

编辑: 吴宁

