

• 基础研究 •

祛风止痛胶囊对关节炎模型大鼠抗炎作用及机制的实验研究

张薇¹, 李涛², 李萍³, 王梅³, 高小利³

(1.西安市第五医院风湿科,陕西 西安 710082;2.第四军医大学口腔医院;3.西安交通大学医学院第二附属医院)

【摘要】 目的:研究中药祛风止痛胶囊对关节炎模型大鼠的关节炎症、肿胀、结构破坏的影响,探讨其抗炎作用机制。**方法:**50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组:正常对照组,模型组,祛风止痛胶囊低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常对照组外,其他 4 组应用 II 型胶原-弗氏完全佐剂诱导大鼠关节炎,用祛风止痛胶囊连续灌胃给药 2 周进行治疗,测量大鼠后肢足爪体积,观察大鼠踝关节组织病理学变化,并用 ELISA 方法检测大鼠血清中白细胞介素(IL)-10、肿瘤坏死因子(TNF)-α 的含量。**结果:**与模型组比较,祛风止痛胶囊降低了大鼠后足爪肿胀程度。大鼠踝关节组织病理学变化显示,祛风止痛胶囊减轻滑膜组织的异常增生,炎性细胞浸润呈剂量依赖性的降低;大鼠血清中促炎细胞因子 TNF-α 的水平变化不明显,而抑制炎症的细胞因子 IL-10 水平明显升高。**结论:**中药祛风止痛胶囊通过上调抑制炎症的细胞因子 IL-10 的水平而抑制了大鼠关节炎的滑膜增生和软骨的破坏,提示祛风止痛胶囊可作为类风湿关节炎的治疗药物。

【关键词】 抗风湿药; 类风湿性关节炎; 白细胞介素 10; 肿瘤坏死因子 α; 动物实验

Anti-inflammatory effect of *Qufeng Zhitong* (祛风止痛) capsule on the collagen-induced arthritis rat ZHANG Wei, LI Tao, LI Ping, WANG Mei, GAO Xiao-li. Department of Rheumatism, the 5th Hospital of Xi'an, Xi'an 710082, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective:To investigate the role of anti-inflammatory effect and it's mechansim of *Qufeng Zhitong* capsule on the collagen-induced arthritis rat through the study of arthritis, joint inflammation and joint erosions. **Methods:**Fifty male SD mice were assigned to 5 groups:normal control group, arthritis model group, and *Qufeng Zhitong* capsule treatment group (including low, medium and high doses), each group contains 10 rats. Arthritis were induced by immunization with type II collagen (CII) in complete Freund's adjuvant (CFA). After administered *Qufeng Zhitong* capsule 2 weeks, the volume of back foot of arthritis rat were detected, and the histology changes of the ankle joints of the arthritis rat were studied. The serum levels of IL-10 and TNF-α were measured by ELISA. **Results:**After treated with *Qufeng Zhitong* capsule, the swelling of the paw of the rats were significantly decreased compared with the contrals. Histology study demonstrated that the *Qufeng Zhitong* capsule treatment could reduce the synovium hyperplasia and inflammatory cell infiltration, the inhibitory effects were in accordance with the doses of the drug. The serum levels of pro-inflammatory cytokine of TNF-α in the arthritis rat were not changed significantly, while the serum levels of anti-inflammatory cytokine of IL-10 were elevated significantly after treated with *Qufeng Zhitong* capsule. **Conclusion:***Qufeng Zhitong* capsule can inhibit the synovium hyperplasia and cartilage erosion by stimulating the serum levels of anti-inflammatory cytokine of IL-10 and suggest it can be a candidate of treatment of rheumatoid arthritis.

Key words Antirheumatic agents; Arthritis, rheumatoid; Interleukin - 10; Tumor necrosis factor - alpha; Animal experimentation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(11):848-851 www.zggszz.com

祛风止痛胶囊(*Qufeng Zhitong* Capsule, QFZTC)是根据老鹤草、槲寄生、续断、威灵仙、独活、制草乌、红花组方而成的复方制剂,在临床上用于各种风湿性疾病的治。本文旨在研究 QFZTC 对 II 型胶原-弗氏完全佐剂关节炎模型大鼠的抗炎作用,及其调节致炎因子 TNF-α 与抗炎因子 IL-10 作用的异同,以探索其抗风湿作用的部分机制。

1 材料与方

1.1 药物 祛风止痛胶囊由老鹤草、槲寄生、续断、威灵仙、独活、制草乌、红花组方而成,棕褐色粉末,批号:080401,咸阳

步长制药有限公司提供。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠 50 只,体重 160~180 g,西安交通大学医学院实验动物中心提供,合格证号:陕医动证字 08-01。

1.3 主要试剂 弗氏完全佐剂,每支 10 ml, SIGMA 公司产品; II 型胶原,每瓶 1 g,进口分装; IL-10、TNF-α 试剂盒,上海森雄科技实业有限公司产品。

1.4 动物分组 大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分别为正常对照组,模型组,祛风止痛胶囊高、中、低剂量组,动物分组群养,饮自来水,食固体混合饲料(西安交通大学医学院实验动

物中心提供)。

1.5 模型制备 将胶原溶于 0.01 mmol/L 的乙酸中,使最终浓度为 4 mg/ml,4 ℃ 搅拌过夜。将胶原溶液按 1:1 滴加至弗氏完全佐剂中,充分乳化。除正常组,每只大鼠在左后足底部、尾根部、背部分 3 点皮内注射乳化液 0.25 ml,7 d 后用同样方法在右后足底部、尾根部、背部加强注射 1 次^[1]。第 2 次注射 2 周后开始给药,祛风止痛胶囊高、中、低剂量组分别给药量为 1.6、0.8、0.4 g/kg。正常组、模型组灌胃生理盐水 20 ml/kg。均每日 1 次,连续灌胃给药 14 d。

1.6 观察指标

1.6.1 一般情况 造模及给药前后观察大鼠体重、神志和运动状态、饮食变化以及关节红肿情况。

1.6.2 左后足爪肿胀体积 初次免疫第 21 天、灌胃给药 2 周后(第 35 天)根据容积排水法原理在足容积测量仪上测定大鼠左踝关节以下的体积。

1.6.3 血清 IL-10、TNF-α 测定 灌胃给药 2 周后,各组动物麻醉,腹主动脉取血 2 ml,采集血清并分装,ELISA 法检测 IL-10、TNF-α 含量。严格按试剂盒说明操作,在西安交通大学医学院实验中心用酶标仪检测。

1.6.4 组织病理检查 采血后处死大鼠,解剖取股骨头至足爪骨骼,并保持关节完整。置于甲醛固定液中固定至少 24 h,然后脱钙 1 周。脱钙完全后,将整踝关节纵向切为 2 片。石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观测炎症水平及关节破坏情况。

1.7 统计学处理 各组结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 软件进行成组设计定量资料的 *t* 检验和单因素方差分析,采用 LSD 法进行均数间多重比较,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 造模期间动物无死亡,体重均有不同程度的增长,但模型组动物体重增长小于正常对照组。初次免疫 9~10 d,部分大鼠踝关节皮肤开始发红,轻度肿胀;2 周左右,大鼠四肢关节红肿加重,活动量减少,食欲下降。

2.2 大鼠足爪体积 除正常对照组外,其余 4 组大鼠第 1 次注射造模后次日左足明显肿胀,以后逐渐消退;第 2 次注射后,大鼠前后足爪肿胀明显,关节僵硬,活动严重受限。初次免疫第 21 天,造模组、祛风止痛胶囊各剂量组与正常对照组大鼠足爪体积比较见表 1。从表中可看出,造模组及祛风止痛胶囊各剂量组大鼠足爪体积均大于正常大鼠,差异有统计学意义(*P* < 0.001)。造模组及祛风止痛胶囊各剂量组大鼠均符合类风湿性关节炎模型的特征及标准,表明在本次实验中类风湿性关节炎大鼠模型的制备是成功的。

药物灌胃治疗 2 周后,模型组与各治疗组大鼠足爪体积见表 2。经单因素方差分析比较,各组间差异有统计学意义;LSD 法进行均数间的多重比较显示,祛风止痛胶囊高、中、低剂量灌胃治疗 2 周后,与模型组相比,各治疗组大鼠足趾体积均减小,说明各剂量药物均可抑制大鼠足爪肿胀。祛风止痛胶囊高、中、低各剂量组比较差异无统计学意义,说明不同剂量的药物对大鼠足趾肿胀的影响无明显差异。

2.3 组织病理学观察 灌胃给药 2 周后,各组动物踝关节病理学显示,正常对照组滑膜衬里层由 1~2 层滑膜细胞及滑膜下层组成,少量成纤维细胞与血管,无明显炎性细胞浸润。模

表 1 造模后 21 d 各组大鼠足爪体积 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Increment of paw volume on the 21st day of

rheumatoid arthritis model in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	足趾体积 (ml)
正常对照组	10	1.75±0.24
模型组	10	2.37±0.26 ^a
祛风止痛胶囊高剂量组	10	2.36±0.20 ^b
祛风止痛胶囊中剂量组	10	2.48±0.33 ^c
祛风止痛胶囊低剂量组	10	2.29±0.17 ^d

注:与正常对照组比较,^a *t* = -5.631, ^b *t* = -6.208, ^c *t* = -5.730, ^d *t* = -5.900, *P* < 0.001

Note: compared with normal control group, ^a *t* = -5.631, ^b *t* = -6.208, ^c *t* = -5.730, ^d *t* = -5.900, *P* < 0.001

表 2 祛风止痛胶囊对关节炎模型大鼠足爪体积的影响

($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effects of Qufeng Zhitong capsule on paw volume of

rheumatoid arthritis model in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	药物剂量(g/kg)	足趾体积 (ml)
模型组	0	3.27±0.28
祛风止痛胶囊高剂量组	1.6	2.67±0.28 ^a
祛风止痛胶囊中剂量组	0.8	2.70±0.31 ^b
祛风止痛胶囊低剂量组	0.4	2.87±0.18 ^c

注:各组间进行比较,*F* = 10.624, *P* < 0.05; 与模型组比较,^a *P* = 0.000 < 0.001, ^b *P* = 0.000 < 0.001, ^c *P* = 0.002 < 0.05; 各剂量组两两比较, *P* 均 > 0.05

Note: compared each other, *F* = 10.624, *P* < 0.05; compared with model group, ^a *P* = 0.000 < 0.001, ^b *P* = 0.000 < 0.001, ^c *P* = 0.002 < 0.05; compared between each doses group, *P* > 0.05

型组关节病理切片可见增生性滑膜炎,滑膜组织炎性细胞浸润,大量淋巴细胞等炎性细胞浸润,滑膜异常增生,有显著的血管、滑膜成纤维细胞和内皮细胞增殖,形成大量肉芽组织,增生的纤维组织、肉芽组织突入关节间隙并伴有大量炎性细胞浸润,增生的滑膜组织与软骨连接融合,软骨面损伤,关节软骨变薄。祛风止痛胶囊高、中剂量组滑膜炎性病理改变较模型组明显减轻,滑膜细胞层增生程度减小,关节腔内炎性细胞浸润明显减少,关节软骨破坏程度减轻,关节软骨表面光滑,骨小梁结构与正常对照组接近。祛风止痛胶囊低剂量组病改变较模型组有所减轻,但病变减轻程度不及高、中剂量组。祛风止痛胶囊减轻踝关节的变形破坏、滑膜组织的异常增生、炎性细胞浸润呈剂量依赖性降低(见图 1-5)。

2.4 大鼠血清 IL-10、TNF-α 含量检测 见表 3。初次免疫后 5 周,即灌胃给药 2 周后,模型组与正常对照组相比,IL-10 水平降低,而致炎细胞因子 TNF-α 水平升高。祛风止痛胶囊灌胃给药 2 周后,模型组与各剂量治疗组大鼠血清 IL-10 水平差异有统计学意义;与模型组相比各剂量治疗组大鼠血清 IL-10 水平均升高;各组间 IL-10 水平差异均有统计学意义,IL-10 水平随剂量增加而升高。祛风止痛胶囊治疗组与模型组大鼠血清 TNF-α 含量差异无统计学意义,各剂量治疗组与模型组相比无明显差异,各剂量组间血清 TNF-α 含量亦无明显差异。

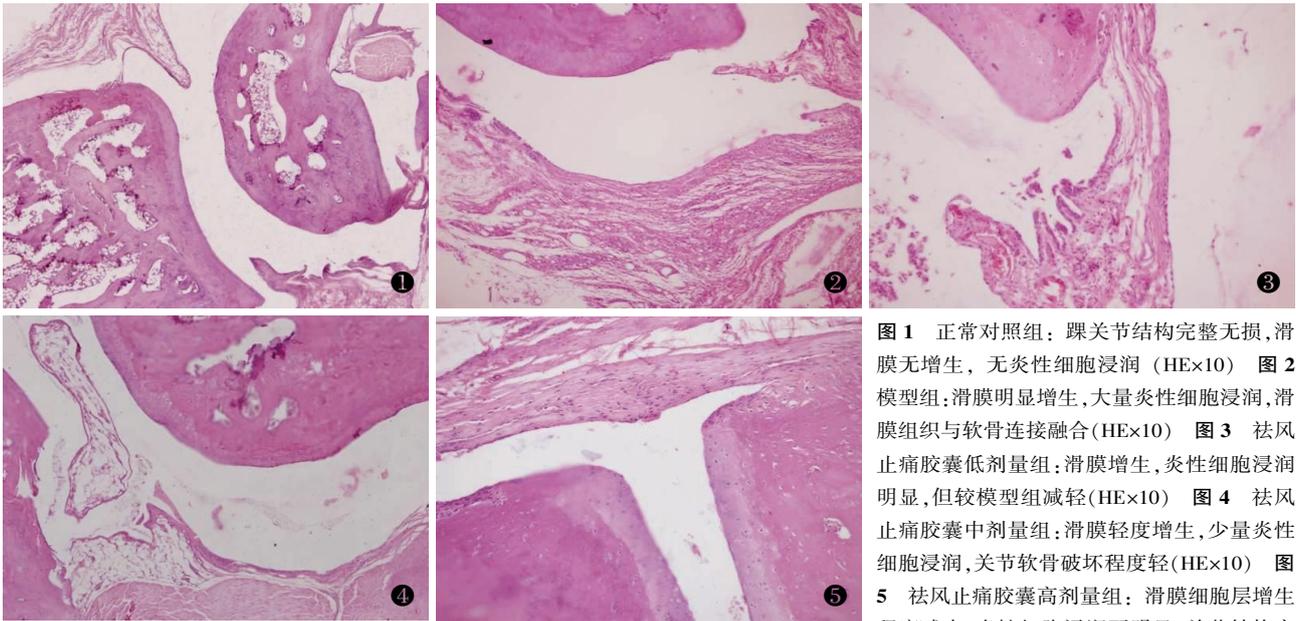


图 1 正常对照组:踝关节结构完整无损,滑膜无增生,无炎性细胞浸润(HE×10) 图 2 模型组:滑膜明显增生,大量炎性细胞浸润,滑膜组织与软骨连接融合(HE×10) 图 3 祛风止痛胶囊低剂量组:滑膜增生,炎性细胞浸润明显,但较模型组减轻(HE×10) 图 4 祛风止痛胶囊中剂量组:滑膜轻度增生,少量炎性细胞浸润,关节软骨破坏程度轻(HE×10) 图 5 祛风止痛胶囊高剂量组:滑膜细胞层增生程度减小,炎性细胞浸润不明显,关节结构完

整,无明显软骨破坏(HE×10)

Fig.1 Normal group: complete articular surface of normal ankle joint, no synovial proliferation and infiltration by mononuclear cells (HE×10) Fig.2 Model group: synovial obviously proliferation and intense infiltration by mononuclear cells, cartilage and bone erosion (HE×10) Fig.3 Qufeng Zhitong capsule low-dose group: synovial proliferation and intense infiltration by mononuclear cells decreased than model group (HE×10) Fig.4 Qufeng Zhitong middle-dose group: Synovial lightly proliferation and less synovial infiltration of mononuclear cells, cartilage and bone erosion lightly(HE×10) Fig.5 Qufeng Zhitong high-dose group: complete articular surface, less synovial proliferation and synovial infiltration of mononuclear cells(HE×10)

表 3 祛风止痛胶囊给药 2 周后对关节炎模型大鼠 IL-10、TNF-α 的影响(̄x±s)

Tab.3 Effects of Qufeng Zhitong capsule on the level of IL-10, TNF-α in serum of rheumatoid arthritis model rats(̄x±s)

组别	药物剂量(g/kg)	IL-10(pg/ml)	TNF-α(pg/ml)
正常对照组	-	2.94±0.35	0.195±0.016
模型组	0	1.47±0.42 ^a	0.245±0.035 ^b
祛风止痛胶囊高剂量组	1.6	5.85±0.59 ^c	0.234±0.030
祛风止痛胶囊中剂量组	0.8	4.08±0.79 ^d	0.237±0.023
祛风止痛胶囊低剂量组	0.4	3.25±0.48 ^e	0.230±0.016

注:与对照组比较,^at=8.470, P=0.000; ^bt=-4.113, P=0.001。IL-10 水平,各剂量治疗组及模型组组间比较, F=96.471, P<0.01; 与模型组比较,各剂量治疗组 P 均=0.000 <0.01; 祛风止痛胶囊高剂量组与中剂量组比较, P=0.000<0.01; 高剂量组与低剂量组比较, P=0.000<0.01; 中剂量组与低剂量组比较, P=0.003<0.01。TNF-α 水平,各剂量治疗组及模型组组间比较, F=0.552, P=0.65>0.05; 与模型组比较, ^cP=0.369>0.05, ^dP=0.512>0.05, ^eP=0.223>0.05; 高剂量组与中剂量组比较, P=0.805>0.05, 高剂量组与低剂量组比较, P=0.743>0.05, 中剂量组与低剂量组比较, P=0.566>0.05

Note: compared with normal control group, ^at=8.470, P=0.000; ^bt=-4.113, P=0.001. Level of IL-10, group comparison of each dose group of Qufeng Zhitong capsule and model group, F=96.471, P<0.01; each dose group of Qufeng Zhitong capsule vs model group, P=0.000<0.01; Qufeng Zhitong capsule high dose group vs middle dose group, P=0.000<0.01; high dose group vs low dose group, P=0.000<0.01; middle dose group vs low dose group, P=0.000<0.01. Level of TNF-α, group comparison of each dose group of Qufeng Zhitong capsule and model group, F=0.552, P=0.65 >

0.05; compared with model group, ^cP=0.369 >0.05, ^dP=0.512 >0.05, ^eP=0.223 >0.05; high dose group vs middle dose group, P=0.805 >0.05; high dose group vs low dose group, P=0.743 >0.05; middle dose group vs low dose group, P=0.566 >0.05

3 讨论

类风湿关节炎(rheumatoid Arthritis, RA)是以关节组织慢性炎症性病变为主要表现的自身免疫病。RA 的治疗药物主要为控制症状药(非甾体抗炎药)及控制病情药(DMARDs), 不良反应大,疗效有限,目前仍缺乏低毒有效的药物。本研究用 II 型胶原-弗氏完全佐剂诱导大鼠关节炎模型, 用祛风止痛胶囊连续灌胃给药 2 周进行治疗, 结果表明, 祛风止痛胶囊对大鼠关节炎具有抑制作用, 能明显降低大鼠关节红肿、足爪肿胀体积; 病理切片显示滑膜细胞增生减少, 滑膜组织充血水肿减轻, 软骨破坏明显减轻, 临床表现、组织病理学反应的结果一致, 提示祛风止痛胶囊治疗 RA 有效。

RA 关节的破坏与细胞因子的表达异常有关, 促炎性细胞因子和抑炎性细胞因子的失衡是造成 RA 病变的基础之一^[1-2]。其中常见的促炎性细胞因子包括 IL-1、TNF-α, 抑炎性细胞因子主要有 IL-4、IL-10 等。研究证实, RA 患者外周血和关节滑膜液中 IL-1 和 TNF-α 增高^[3], 它们在关节炎、骨质破坏等病变发展中起主要作用。本实验结果显示, 关节炎大鼠血清 TNF-α 含量与正常组比明显升高, 与以前研究结果一致^[4-5]。经中药祛风止痛胶囊治疗后, 血清 TNF-α 水平无明显差异, 提示该药可能对 TNF-α 的产生无明显抑制作用, 推测该药作用机制可能不在此环节, 尚有待进一步研究, 也可能与用药时间短有关。RA 患者血循环中的 IL-10 较正常人明显低^[6], IL-4

· 骨伤论坛 ·

早期成年人股骨头缺血性坏死延误诊断 35 例分析

柳红岩, 管明, 吕军

(珲春矿业(集团)公司总医院骨科, 吉林 珲春 133300)

关键词 股骨头坏死; 成年人; 诊断

Delay diagnosed analysis of early adult avascular necrosis of femoral head in 35 cases LIU Hong-yan, GUAN Ming, LÜ

Jun. Hunchun Mining Group Corporation General Hospital Orthopedic, Hunchun 133300, Jilin, China

Key words Femur head necrosis; Adult; Diagnosis

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(11): 851-852 www.zggszz.com

目前, 成年人股骨头缺血性坏死(avascular necrosis of femoral head, ANFH)是骨科常见病和疑难病, 近来呈逐渐上升趋势^[1], 同时其致残率高而严重地危害着人们的身心健康。对成年 ANFH 患者早期发现、早期诊断、早期治疗以降低致残率、提高治愈率。在骨科临床工作中做到早发现、早诊断、早治疗, 采取有效的治疗措施制止或预防坏死的进展, 促进血管再生和再骨化, 防止股骨头变形、塌陷是非常重要的。自 1999 年 1 月至 2005 年 12 月共接诊 237 例成年 ANFH 病例, 现对 35 例早期误诊的成年 ANFH 病例进行分析。

1 临床资料

35 例成年 ANFH 患者均属于晚期且经 X 线片得到确诊。35 例中男 17 例, 女 18 例; 年龄 26~74 岁, 平均 46.36 岁; 发病后就诊至确诊时间 5~36 个月, 平均 14.92 个月。左侧 14

例, 右侧 8 例, 双侧 13 例。早期在不同级别的医院均按其他疾病接受治疗, 症状及体征加重或无明显好转, 摄骨盆正位 X 线片发现股骨头有不同程度的坏死而得到确诊。根据 Ficat-Arlet 分期: III 期 29 例, IV 期 6 例。按被误诊的疾病分为: 风湿症 12 例, 坐骨神经痛 12 例, 骨关节炎 4 例, 腰椎间盘突出症 4 例, 髋关节结核、股骨头发育不良、产后风湿各 1 例。接诊医院: 三级甲等医院 4 例, 二级甲等医院 25 例, 一级或个体诊所 6 例。35 例中有明显饮酒史 9 例均为男性, 有服用激素病史 3 例, 其他 23 无明显诱因。

2 诊断方法

35 例临床上都有明显的疼痛、跛行; 检查时“4”字试验及内旋伸腿试验明显阳性; “八”字下蹲试验阳性; 其他关节功能不同程度受限。35 例均通过 X 线片得到确诊。29 例 III 期病例

和 IL-10 可下调抗原递呈细胞功能, 抑制 Th1 增生, 抑制 IL-1、TNF- α 和其他炎症细胞因子的功能和生成, 抑制基质金属蛋白酶的生成^[7], 从而抑制 RA 关节炎症, 控制或阻止软骨及骨的破坏。我们的研究表明, 初次免疫后 5 周, 即灌胃给药 2 周后, 关节炎大鼠血清 IL-10 含量与正常对照组比较降低, 祛风止痛胶囊各组与模型组比较血清 IL-10 的水平升高, 提示该药在炎性关节病中具有增强保护性因子的显著作用, 由此推测该药治疗和改善关节病变的机制可能与其上调保护性因子 IL-10 的含量有关。

中药治疗 RA 的作用机制比较复杂, 可以通过多环节、多靶点的途径发挥疗效, 抑制免疫反应, 调节 T 细胞亚群, 调节致炎或抑炎的细胞因子、酶蛋白、基因的表达水平及平衡等^[8]。祛风止痛胶囊的治疗作用主要通过免疫抑制和抗炎作用实现。我们的研究提示其可能通过上调外周血中抑制炎症的细胞因子 IL-10 的水平而抑制了炎性细胞浸润、滑膜组织增生和血管翳形成, 减轻软骨和骨破坏, 从而发挥疗效, 而且证实了祛风止痛胶囊以剂量依赖的方式抑制炎症和保护软骨受损。

参考文献

[1] 程惠丽. Th1/Th2 细胞因子平衡与类风湿关节炎的研究进展. 吉

林医学, 2006, 3(27): 334-336.

[2] McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol, 2007, 7: 429-442.

[3] Breedveld FC. New insights in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. J Rheumatol Suppl, 1998, 25: 3-7.

[4] 熊国林, 黄海潇, 谢玲, 等. 类风湿性关节炎大鼠模型的制备. 解放军医学杂志, 2007, 32(2): 121-123.

[5] 李兴琴, 杨德华, 钱玉中, 等. 胶原性关节炎大鼠血清中炎症细胞因子的表达. 河北医药, 2006, 28(3): 166-167.

[6] Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, et al. Reduced expression of the regulatory CD4+ T Cell subsets related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. J Arthritis Rheum, 2000, 43: 617-627.

[7] Joosten LA, Lubberts E, Durez P, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis: Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. Arthritis Rheum, 1997, 40: 249-260.

[8] 姜旭光, 姜明霞, 孙永显, 等. 用胶原性关节炎模型探讨中药治疗类风湿性关节炎作用机制的研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(12): 62-65.

(收稿日期: 2009-08-07 本文编辑: 连智华)