

中药方剂研究

益肾蠲痹丸对大鼠实验性痹证影响的病理学研究

中国中医研究院基础理论研究所 吕爱平 王安民 曾晓莲

益肾蠲痹丸是老中医朱良春主任医师几十年临床经验的结晶,对顽痹(类风湿性关节炎)有明显疗效^{〔1〕}。为了探讨其治疗机理,我们建立Ⅱ型胶原所致的具有自身免疫反应特征的大鼠关节炎模型,从病理学角度来探讨益肾蠲痹丸治疗痹证的机理。

材料与方法

一、实验动物分组

选用体重90克左右的Wistar大白鼠43只为实验对象。随机分为三组:造模组20只、给药组15只和对照组8只。

(一)造模组:将大白鼠放入冷水中(温度为15℃左右),游泳7分钟,每日1次,连续7天(作为寒湿因素)。然后,取终浓度为1.5毫克/毫升的Ⅱ型胶原粗提物的乳化混合物0.125毫升(制作方法参照文献^{〔2~4〕}并进行改进),于大白鼠尾部、踝部多处皮内注射以免疫动物。每只动物注射一次,含Ⅱ型胶原粗提物约0.18毫克。造模组20只动物分别于免疫注射后第7天、第15天、第30天和第45天,每次5只动物,颈椎脱臼处死,取材检查。

(二)给药组:将15只大鼠,按上组造模法在冷水中游泳及免疫注射。取益肾蠲痹丸(南通市中药厂生产),加水煎制成50%的水煎剂。其中10只动物,于免疫注射15天后,每天灌胃给药1次,每次3毫升,相当于益肾蠲痹丸1.5克,灌胃给药1个月处死;余5只动物于相同时间灌胃,每天1次,每次给蒸馏水3毫升,持续1个月处死,取材检查。

(三)对照组:将8只大鼠按上法在冷水中游泳,不作免疫注射,处死时间同造模组,分4次处死,每次2只动物。

二、取材

取全部动物踝、膝、肘和腕关节组织及脾、胸腺,其中各组中部分动物取左膝关节髌骨及其滑膜组织作

冰冻切片。部分动物取心、肝、肾、十二指肠、空肠、结肠、肺和肾上腺。断尾取血,涂片。横断脾脏,印片。标本制作及染色方法略。

结 果

一、造模动物的外形改变

造模动物毛发失去光泽,懒动,在免疫注射后的第7天和第15天,消瘦明显,体重显著减轻($P < 0.05$),部分动物可见踝关节红肿。

二、关节的病理改变

(一)造模组:造模动物关节病理变化的发展过程大致可分为二个时期,滑膜受损期(免疫注射后第15天以前)和软骨损伤期(免疫注射第15天以后)。

1.滑膜受损期:滑膜受损早期(免疫注射后第7天)主要出现滑膜组织充血、水肿,尤其是脂肪垫组织中纤维素渗出。滑膜细胞轻度增生,排列疏松、不规则。滑膜组织中可见淋巴细胞、单核细胞及少数散在分布的中性粒细胞浸润。关节腔内可见淋巴细胞、单核细胞及少量中性粒细胞。关节周围组织(腱周围组织和纤维囊周围结缔组织)充血、水肿、淋巴细胞浸润,并可见散在的中性粒细胞和肥大细胞。滑膜受损后期(免疫注射后第15天),除上述改变外,滑膜细胞增生、肥大更为明显,滑膜细胞呈多层柱状排列。滑膜组织中血管扩张充血,毛细血管增生,有的小血管壁轻度增厚。

2.软骨损伤期:软骨损伤早期(免疫注射后第30天),关节软骨表面扁平层细胞剥脱,甚至软骨细胞变性、坏死,关节软骨表面缺损。滑膜细胞增生明显,呈柱状或不规则疏松排列,有的甚至沿关节软骨表面贴附生长,贴附的滑膜细胞下方软骨表面扁平层细胞剥脱,软骨细胞变性。此时,滑膜组织充血、水肿有所消退,仅见少量的淋巴细胞浸润,但可见成纤维细胞增生和纤维细胞增生、胶原沉着。软骨损伤后

期(免疫注射后第45天)病变基本与软骨损伤早期相同,但成纤维细胞、纤维细胞更为多见,有的甚至出现骨的损伤,出现软骨下骨细胞变性、坏死。

为了便于判断造模动物的发病情况,参照有关文献^[10]该实验性痹证的诊断条件文献^[11],结合本研究具有时间序列上变化的特点,以滑膜细胞增生或伴有排列不规则,滑膜组织纤维素渗出和/或胶原纤维沉着、淋巴细胞浸润,或关节软骨破坏为主,来判断是否存在II型胶原所致关节炎的标准。只要有一个或一个以上关节出现上述变化,该动物即计为发病例。按这个标准,其发病率为15/30。在所有发病动物的4个关节中,踝关节病变出现率为100%,膝关节病变出现率为93%,腕关节病变出现率为80%,肘关节病变出现率为77%。

(二)给药组:给药动物灌服益肾蠲痹丸水溶液1个月后,在其关节的滑膜组织中淋巴细胞浸润明显减少,炎症减轻,胶原纤维沉着局限于滑膜细胞下。关节软骨细胞缺损部位可见软骨细胞增生、修复。给水动物给水1个月后,其病变与造模组动物在免疫注射后第45天的病变相同。

(三)对照组:对照组动物关节未见任何病理变化。

三、其他脏器及注射局部的改变

造模组和给药组动物心、肝、肾、胸腺、脾、肺、肾上腺、消化道均未见明显变化。注射局部皮下,早期可见大量炎症细胞浸润,后期炎症细胞浸润明显减轻,亦可见纤维母细胞增生及胶原纤维形成。

四、酶类的改变

取动物的脾脏印片及血涂片,染色检查酸性磷酸酶和 α -醋酸萘酚酯酶阳性细胞(%),造模组分4次检查,每次各5次大鼠。免疫注射后第7天平均为 $63.3 \pm 2.69\%$ (均值士标准差,下同);第15天、30天分别平均为 $73.3 \pm 2.54\%$ 、 $73.95 \pm 2.57\%$,较第7天者显著增高($P < 0.001$);免疫注射后第45天,仍保持在较高水平($72.1 \pm 5.7\%$)。给药组于给药后30天检查,平均为 $62.5 \pm 2.12\%$,已恢复到不给免疫注射的对照组水平($61.4 \pm 2.0\%$)。

检查大鼠滑膜组织中的琥珀酸脱氢酶和细胞色素酶的结果表明,造模组轻度降低,给药组未见明显变化。

五、关节滑膜组织荧光抗体检测结果

成为II型胶原所致关节炎模型大鼠的滑膜组织中,用免疫荧光染色法可见黄绿色荧光,表明滑膜组织中有抗体或抗原抗体复合物存在。

讨 论

一、实验性痹证与人类痹证(类风湿性关节炎)的关系

本实验性痹证模型建立的依据是:类风湿性关节炎病人血清、关节腔液中可检出抗II型胶原抗体^[12-13],关节滑膜组织中可检出II型胶原-抗II型胶原抗体复合物^[14]。本实验造成的滑膜细胞增生、滑膜组织中纤维素渗出、胶原纤维沉着、淋巴细胞浸润、软骨细胞扁平层剥脱甚至全层缺损等,从病理形态学方面证明了该实验性痹证与类风湿性关节炎相似。酯酶阳性细胞增加,酸性磷酸酶活性增高,滑膜组织中有抗体存在,从免疫学角度初步证实该模型类似类风湿性关节炎,与免疫有关。运用临床行之有效的益肾蠲痹丸能使滑膜组织炎症减轻,软骨细胞增生、修复,从疗效方面反证了该实验性痹证与人类类风湿性关节炎有相似之处。

二、实验性痹证的发病机理

本实验性痹证发病的可能机制是:II型胶原作为抗原进入动物体内,引起机体对II型胶原的免疫反应,产生抗II型胶原抗体,该抗体随血流到达靶器官,引起激肽系统、纤溶系统等多方面改变,形成渗出性炎症;继之滑膜细胞增生、肥大。滑膜细胞增生、肥大能引起诸方面的改变:(1)吞噬抗原或抗原抗体复合物,激活其本身的IgGFc受体^[15,16]和C₃受体^[17],造成组织损伤;(2)分泌大量的胶原纤维^[18],引起胶原纤维沉着,阻碍滑膜给予软骨的营养,造成关节软骨损伤;(3)滑膜细胞大量增生,贴附关节软骨表面生长,滑液渗入软骨细胞受阻,引起关节软骨细胞变性、坏死^[19]。但是,滑膜细胞贴附软骨表面生长也可能是修复软骨缺损的一种代偿方式。该实验性痹证与人类类风湿性关节炎相似,也显示慢性炎症过程。其原因可能是由于长期的免疫机制存在,滑膜组织炎症介质长期滞留,活动容易使关节受累,纤维素渗出,改变滑膜的抗原性,引起更为复杂的自身免疫反应,导致恶性循环的慢性过程^[19]。本实验还加上了寒湿因素致病,因此更接近于中医“风寒湿三气杂至合而为痹”的痹证理论。

三、益肾蠲痹丸对实验性痹证的作用机理

益肾蠲痹丸是朱良春医师根据数十年的临床实践而总结出来的治疗“顽痹”的有效处方,具有温阳、益肾、壮督、增强机体免疫功能、调整骨质代谢的功效。方中侧重运用虫类搜风之品,以达到抗炎、消肿、止痛之功^[1]。本研究表明,益肾蠲痹丸能使滑膜组织炎症减轻,胶原纤维沉着减少,软骨细胞增生修复,对

实验性痹证有较好的疗效。

本研究得到窦志良、李晓禾、李昆、陈红宾、蔡洪斌、谢崇琴、王乃琪等同志的大力支持和帮助，特此致谢。

参 考 文 献

- (1) 朱良春, 等. 益肾调痹丸对顽痹(类风湿性关节炎) 200 例疗效观察. 北京中医学院学报 1985; 3:21
- (2) Seyer JM, et al. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. J Clin Invest 1977; 59:241
- (3) Miller EL. Structure studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. Biochem 1972; 11:4903
- (4) 黄国强, 等. 人 II 型胶原的提取与纯化. 卫生研究 1986; 2:11
- (5) 张进玉, 等. 类风湿关节炎诊断指标的探讨. 中华骨伤杂志 1986; 6:27
- (6) Gardner DL. Articular tissues: Gross and microscope pathology. In: The pathology of rheumatoid arthritis. Edward Arnold. 1972:7
- (7) Heymer H, et al. Rheumatoid joint pathology revisited. Curr Pathol 1979; 77:73
- (8) Steffen C, et al. Antigenicity of collagen and its application in the serological investigation of rheumatoid arthritis. Int Arch Allergy Appl Immunol 1963; 22:33
- (9) Michael D, et al. The incidence and antigenic specificity of antibodies against denatured human collagen in rheumatoid arthritis. Clin Immunopathol 1974; 18:384
- (10) Andropoulos NA, et al. Characterization of antibodies to the native human collagens and to their component chains in the sera and the joint fluids of patient with rheumatoid arthritis. Immunochem 1976; 13:709
- (11) Andropoulos NA, et al. Antibodies to native and denatured collagen in sera of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1976; 19:613
- (12) Clague RB, et al. Serum antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1983; 42:537
- (13) 徐卫东, 等. 类风湿性关节炎患者体液免疫反应的观察. 中国人民解放军军医进修学院学报 1985; 9:517
- (14) Roy BC, et al. Intra-articular collagen antibody complexes. Arthritis Rheum 1984; 27(4) suppl:73
- (15) Theofilopoulos AN, et al. Evidence for the presence of receptors of C_3 and IgG Fc on synovial cells. Arthritis Rheum 1980; 23:1
- (16) Dayer JM, et al. Interreactions among rheumatoid synovial cells and monocyte-macrophages. J Immunol 1980; 124:4
- (17) Edwards JCW, et al. Membrane properties and esterase activity of synovial cells. Ann Rheum Dis 1982; 41:282
- (18) Salter RB, et al. The pathological changes in articular cartilage associated with persistent joint deformity. In: Studies of rheumatoid arthritis. Proceedings of the 3rd Canadian Conference on Research in the Rheumatoid Disease. University of Toronto Press 1965:33
- (19) Glynn LE. The chronicity of inflammatory and its significance in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1968; 19:197

灯心草点治法治疗胃肠型感冒 150 例

黑龙江省牡丹江市中医院 张 玉 璞

胃肠型感冒是季节多发病, 我院自 1983 ~ 1987 年用灯心草点治法治疗本病 150 例, 均收到满意的效果, 现介绍如下。

一、临床资料

本组 150 例, 男 85 例, 女 65 例, 最小 10 岁, 最大 60 岁。发病天数 1 天 37 例, 2 ~ 4 天 113 例。临床症状以发热、恶心、呕吐、腹泻为主。

二、治疗方法

选胸背反应点, 其形如丘疹样, 稍突出于皮肤表面, 多为暗红、浅红、灰暗色, 压之不退色。常规消毒后, 用针柄压丘疹上, 使之凹陷, 并将灯心草浸油(香油成豆油)点燃, 迅速点血脉上随即离开, 点处有粟米状伤痕。治疗期间嘱患者不要洗浴, 注意清洁, 以防感染。

三、治疗结果

症状体征完全消失评为治愈者 147 例, 治疗后症状体征无明显改变评为无效者 3 例。治愈者中, 经治疗 1 次治愈 135 例, 两次者 12 例。

四、典型病例

王××, 男, 57 岁, 1987 年 9 月 5 日初诊。

患者于当晚 8 时出现发热、恶心、呕吐、四肢痠疼, 舌苔黄腻, 脉滑数, 体温: 38.1℃。诊断为胃肠型感冒。用灯心草点治法治疗 1 次, 症状体征全部消失而告痊愈。

五、体会

本法通过对体表血疗反应点的点关刺激, 达到调整机体气血, 提高抗病力, 因此而驱邪外达, 从而起到治疗作用。