

中 药 研 究

骨碎补提取物对Ⅱ型胶原免疫所致关节炎小鼠免疫功能的影响

刘振丽¹ 吕爱平¹ 何孟德²

摘要 本研究探索了骨碎补两个提取物对Ⅱ型胶原免疫所致关节炎小鼠抗Ⅱ型胶原抗体、白细胞介素10及干扰素的影响。结果表明:骨碎补提取物在抑制小鼠对Ⅱ型胶原免疫反应的同时,能调节动物对Ⅱ型胶原的免疫反应。

主题词 关节炎/免疫学 免疫活性/药物作用 骨碎补/药理学

骨碎补具有补肾壮骨之功,主要用于肾虚所致四肢乏力,腰膝酸痛等症。我们以往的研究观察了骨碎补不同提取物对Ⅱ型胶原免疫所致的大鼠关节炎(痹证)动物模型的影响,结果表明:骨碎补3号及4号提取物可推迟关节炎发病,在抑制免疫的同时且有免疫调节作用^[1]。本研究则进一步探讨骨碎补3号和4号提取物对免疫性关节炎小鼠免疫功能的影响。

1 材料与与方法

雄性DBA小鼠,来自瑞典隆德大学。根据文献,Ⅱ型胶原从大鼠软骨肉瘤组织中获得^[2]。骨碎补乙醇提取物按极性分离得到3号和4号提取物,制成Tween-20溶液。免疫方法:取适量Ⅱ型胶原,溶于0.1M乙酸中,与等量的不完全弗氏佐剂(DIFCO产品)充分乳化,Ⅱ型胶原按100μg/只小鼠,于尾根部皮下注射。给药方法:按2g生药/kg体重剂量,于免疫后1周分别腹腔注射,给予骨碎补不同提取物1次,对照组动物给予Tween-20溶液。

检测指标:做4项检测。

关节炎指数:按以下标准对动物关节炎程度记分:红肿涉及1个指关节计1分,红肿涉及2个指关节计2分,红肿涉及3个或3个以上指关节或是整个关节计3分。每只动物四肢合计最高分为12分。免疫后第10天起开始记分,每2天记录1次。

1 中国中医研究院基础理论研究所,北京市东直门内北新仓18号(100700)

2 瑞典隆德大学分子生物学系

收稿日期:1997-01-10;修回日期:1997-05-22

抗Ⅱ型胶原抗体测定:ELISA法。生物素标记的第Ⅰ抗体抗小鼠IgG、IgM为Jackson产品,抗IgG1、IgG2a、IgG2b为Southbinding产品。所测样品为动物免疫后第18天、第32天及第42天的血清。所测样品均双孔重复对比,3个梯度稀释以确保结果准确。抗Ⅱ型胶原抗体IgM按最高OD值一半时稀释倍数的对数值(滴度)来计算。其它抗体用相同型(实验室自制)单克隆抗体作为标准品计算含量。

IgM型类风湿因子的测定:ELISA法,即用单克隆抗Ⅱ型胶原抗体包被酶标板,按前述加样后用生物素标抗小鼠IgM作为第Ⅰ抗体进行检测。

γ-干扰素(IFN-γ)和白细胞介素10(IL-10)的测定(ELISA法):免疫30天后,取腋下、颈部淋巴结,制成单细胞悬液,在24孔板上按10万/孔细胞与失活型胶原(10μg/ml)培养,4天后收集每个动物培养淋巴细胞上清液,待测。用抗IFN-γ抗体(单克隆Jackson产品)包被ELISA板用于测定IFN-γ,用抗IL-10抗体(Southbinding产品)包被ELISA板用于测定IL-10。第Ⅰ抗体分别用生物素标抗小鼠IFN-γ抗体(Jackson产品)和生物素标抗小鼠IL-10IgM(自制)。测定时均用2孔3梯度稀释法,并重复双孔误差不得超过10%,以保证数据可靠。

2 结果

2.1 对关节炎发病的影响:各组10只小鼠中均有5只小鼠出现关节炎。虽然两种骨碎补提取物未能明显降低小鼠Ⅱ型胶原所致关节炎的发病率,但从表1可以看出,能明显推迟关节炎的发病时间。

表1 骨碎补提取物对关节炎发病的影响($\bar{X} \pm S$)

分组	鼠数 (只)	起病时间 (天)	关节炎指数
3号提取物	10	32±1.6*	4.7±1.3
4号提取物	10	39±2.0*	3.1±0.71
对照	10	28±3.5	4.4±1.2

* 与对照组比较 $P < 0.01$

2.2 免疫后 46 天骨碎补提取物对关节炎小鼠抗Ⅱ型胶原抗体的影响: IgG1 属于 Th2 型反应抗体, 具有抗Ⅱ型胶原免疫性关节炎损伤的作用, IgG2b 属于 Th1 型反应抗体, 直接参与Ⅱ型胶原免疫性关节炎组织破坏^[3], 从表 2 可以看出, 骨碎补 3 号提取物提高 IgG1 含量, 3 号和 4 号均能降低 IgG2b 含量。

表 2 骨碎补提取物对关节炎小鼠抗Ⅱ型胶原抗体的影响($\bar{X} \pm S$)

项目	鼠数(只)	3 号提取物	4 号提取物	对照组
IgM($\mu\text{g/ml}$)	10	0.46 $\pm$ 0.27	0.41 $\pm$ 0.40	0.66 $\pm$ 0.13
IgG1($\mu\text{g/ml}$)	10	96.20 $\pm$ 52.61	41.11 $\pm$ 27.82	51.41 $\pm$ 16.32
IgG2a($\mu\text{g/ml}$)	10	73.68 $\pm$ 20.82	67.07 $\pm$ 47.60	71.56 $\pm$ 20.47
IgG2b($\mu\text{g/ml}$)	10	49.22 $\pm$ 13.10*	53.17 $\pm$ 28.90*	100.02 $\pm$ 26.80

* 与对照组比较 $P < 0.01$

2.3 骨碎补提取物对 IgM 型类风湿因子的影响: 从表 3 结果看出, 3 号及 4 号提取物均能提高 IgM 型类风湿因子滴度。

表 3 骨碎补提取物对 IgM 型类风湿因子的影响($\bar{X} \pm S$)

分组	鼠数(只)	IgM 类风湿因子(滴度)
3 号提取物	10	0.72 $\pm$ 0.21*
4 号提取物	10	0.74 $\pm$ 0.19*
对 照	10	0.53 $\pm$ 0.18

* 与对照组比较 $P < 0.05$

2.4 骨碎补提取物对 IFN- γ 和 IL-10 的影响: 从表 4 可以看出, 3 号及 4 号提取物均能显著降低关节炎小鼠淋巴结细胞分泌 IFN- γ 能力, 4 号具有提高关节炎小鼠淋巴结细胞分泌 IL-10 能力的趋势。

表 4 骨碎补提取物对 IFN- γ 和 IL-10 的影响($\bar{X} \pm S$)

分组	鼠数(只)	IFN- γ (滴度)	IL-10(滴度)
3 号提取物	10	0.46 $\pm$ 0.088*	0.25 $\pm$ 0.21
4 号提取物	10	0.30 $\pm$ 0.077*	0.32 $\pm$ 0.32
对 照	10	0.65 $\pm$ 0.13	0.25 $\pm$ 0.091

* 与对照组比较 $P < 0.05$

3 讨论

Ⅱ型胶原免疫所致的关节炎是一种广泛用于自身免疫疾病研究的自身免疫病动物模型, 其机理研究正是世界攻克自身免疫病发病机制的重点内容之一, 因为其发病与 MHC 相关、关节病变与人类风湿性关节炎相关、与性激素相关, 因此被认为是更适合类风湿性

关节炎(痹证)研究的动物模型^[2]。在我国, 该模型已被用于中医理论和中药开发的实验研究^[4,5]。

我们以前的实验表明, 骨碎补 3 号及 4 号提取物能推迟 DA 大鼠Ⅱ型胶原所致关节炎发病时间, 减低发病率, 并在一定程度上调节抗Ⅱ型胶原抗体的滴度^[1]。本研究则用 DBA 小鼠, 同时给药途径由原来连续 10 天灌胃改为腹腔 1 次注射, 以便更有效地判断骨碎补提取物的作用。结果表明: 骨碎补 3 号及 4 号提取物腹腔注射虽然未能显著降低关节炎发病率, 和减轻关节炎程度, 但可明显推迟关节炎的发病时间, 提示一次腹腔注射骨碎补提取物能在某些环节上调节小鼠对Ⅱ型胶原的免疫反应性质, 从而推迟发病。

为了探讨骨碎补作用的可能环节, 我们对 3 号及 4 号提取物对关节炎小鼠抗Ⅱ型胶原抗体滴度、IgM 型类风湿因子及 IFN- γ 、IL-10 的影响进行观察。已经知道, Ⅱ型胶原所致关节炎是一种以 Th1 反应为主的免疫反应, 而 Th2 反应则能缓解此种病变^[3], IgG2a、IgG2b 均属于 TH1 反应的主要抗体类型, 而 IgG1 则属于 Th2 反应的主要抗体类型^[6]。我们的结果表明 3 号及 4 号提取物均能降低抗Ⅱ型胶原抗体 IgG2b, 从而降低 Th1 反应水平。就细胞因子而言, IFN- γ 是 Th1 反应的代表性细胞因子, 直接参与关节软骨等组织的损伤^[7], 而 IL-10 是 Th2 反应的一种细胞因子, 能缓解关节炎病情, 早期给予 IL-10 能降低Ⅱ型胶原所致关节炎发病率^[8]。我们的结果表明: 3 号及 4 号提取物能显著降低关节炎动物 IFN- γ 水平, 但对 IL-10 的影响不大。

类风湿因子是一种对自身 IgG Fc 段产生的抗体, 其意义本身多是说明具有自身免疫的存在, 其在发病中的作用一直不十分清楚。或与抗体形成免疫复合物, 沉积局部, 激活补体系统, 破坏组织; 也有人认为类风湿因子或许能中和自身抗体, 起到阻止自身免疫的作用。应该看到, 自身 IgG 分子能产生许多克隆的抗自身 IgG 抗体, 因而有一大类类风湿因子产生, 可以认为, 他们肯定会有不同的作用。我们的结果表明, 4 号能提高关节炎小鼠血清 IgM 型类风湿因子水平。由于我们所指的是抗自身Ⅱ型胶原抗体 IgG 的 IgM 型类风湿因子, 受到诸如抗Ⅱ型胶原抗体 IgG 的特性、IgM 的特异性结合点是该 IgG 的 Fc 段还是 Fab 段的许多因素影响, 因而其作用机理有待于进一步阐明。

4 参考文献

- 1 刘振丽, 等. 骨碎补提取物对Ⅱ型胶原免疫所致关节炎大鼠影响的实验研究. 中国中药杂志 1997; (增刊).
- 2 Holmdahl R, et al Type II collagen autoimmunity in

- animals and provocations leading arthritis. Immunological Review 1990;(118):193.
- 3 Mosmann TR, et al: The expanding universe of T-cell subsets; Th1, Th2 and more. Immunology Today 1996; 17:138.
- 4 吕爱平,等. 肾虚痹证(类风湿关节炎)发病机理研究. 中医杂志 1995;36:492.
- 5 Mosmann TR, et al: Th1 and Th2 cells; different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol 1989;7:145.
- 6 吕爱平,等. 益肾蠲痹丸对大鼠实验性痹证影响的病理学研究. 中医杂志 1988;29(6):49.
- 7 Boissier MC, et al. Biphasic effect of interferon gamma in murine collagen induced arthritis. Eur J Immunol 1995;25: 1184.
- 8 Walmsley M, et al. Interleukin 10 inhibition of the progression of established collagen induced arthritis. Arthritis Rheum 1996;39(3):495.

注:本课题为国家自然科学基金资助项目(39400174)

辨证治疗功能性胃潴留 36 例疗效分析

王凤春* 盖成安*

我院自 1991 年 2 月至 1997 年 4 月,应用中医辨证分型治疗功能性胃潴留 36 例,收到满意效果,现报道如下。

1 临床资料

本组 36 例,其中男 24 例,女 12 例;年龄 26 岁~62 岁,病程半个月至 3 个月不等。以呕吐,上腹胀满,胃张力弱,胃蠕动小于 2 次/分,潴留液 200ml 以上为其诊断指标。病例均经钡餐透视。其中中焦虚寒、宿食内积型 20 例,潴留兼胃炎者 5 例,兼胃下垂者 3 例;脾湿胃困、痰饮内停型 16 例,潴留兼胃炎、兼胃下垂各 3 例。

2 治疗方法

中焦虚寒、宿食内积型:症见脘腹胀满,中上腹明显胃型,脘部胀痛,食欲不振,嗳气,朝食暮吐、呕吐宿食不化,吐后暂舒,神疲乏力,面色少华、消瘦,大便秘结,舌淡苔厚腻,脉细无力。治以健脾温中,消积降逆,药用丁香透膈散加减:人参 15g,白术 10g,丁香 10g,木香 8g,砂仁 10g,神曲 12g,麦芽 12g,吴萸 8g,枳实 10g,旋复花 10g,代赭石 30g。每日 1 剂,早晚空腹服。

脾湿胃困、痰饮内停型:症见脘腹痞满,不思饮食,烦渴欲饮,饮即吐出,逆气,呕吐恶心,胃部有振水声,怠惰嗜卧,身重痛,小便不利,大便不通,面色萎黄。舌淡苔白腻,脉弦细或濡。治以运脾除湿,温阳化饮和胃降逆。药用旋复代赭石汤合胃苓汤加减:人参 10g,白术 10g,苍术 10g,猪苓 10g,茯苓 10g,桂枝 10g,生姜 10g,半夏 9g,旋复花 10g,代赭石 30g。每日 1 剂,早晚空腹服。

3 治疗结果

疗效标准:呕吐止,脘腹胀满消除,胃张力增强,胃蠕动次数 2~3 次/分,无潴留者为痊愈;呕吐止,脘腹胀满消除,胃张力正常,胃蠕动次数大于 2 次/分,潴留

少量者为显效;呕吐消失,潴留液 200ml 以下者为有效;呕吐暂止,痞满不除,胃张力差,胃蠕动次数少于 2 次/分,潴留液多 200ml 以上者为无效。治疗后,痊愈 25 例(69%),显效 9 例(25%),有效 1 例(3%),无效 1 例(3%),总有效率 97%。疗程最短 9 日,最长 30 日。

4 典型病例

马某某,男,40 岁,1995 年 10 月 6 日患者呕吐,上腹胀痛入院,症见脘腹满胀。上腹胃型明显,压痛拒按,不能饮食,3 天来日呕吐 3~4 次,吐后稍舒,5 日无大便。神疲乏力,面萎黄憔悴,痛苦面容,舌淡苔白厚腻。患者饮食无常,饥饱无度,一周前因食生冷而发生腹胀呕吐。经钡餐透视,胃体膨大,蠕动乏力,胃蠕动少于 2 次/分,胃残留量甚多。证为中焦虚寒,宿食内积,治以健脾温中,消积导滞,和胃降逆,药用丁香透膈散加减:人参 12g,白术 10g,丁香 8g,木香 10g,砂仁 10g,白蔻 9g,神曲 12g,麦芽 12g,吴萸 8g,枳实 10g,旋复花 10g,代赭石 30g。每日 1 剂,早晚空腹服。3 剂药后,呕吐止,脘腹胀满减轻,仍痞闷不欲食,大便不通,守方再服 3 剂,腹满消失,大便得通,腹平软,可少进饮食,舌苔白厚。原方加减,又继服 4 剂,诸症悉除。后以砂半理中汤调治半月,钡餐复查,胃张力增强,蠕动波每 5 分钟 3 次,胃内无潴留,1 年来未复发。

5 讨论

本病多因饮食不节,饥饱无常,嗜食生冷,或忧愁思虑,过度安逸少动,导致脾胃损伤,脾虚胃弱,运化失职,不能升降清浊,宿食水饮停于胃内发生潴留而致呕吐。本组分为二型:一为脾虚中焦有寒,一为脾虚湿困痰饮内停。但皆因脾胃虚弱使然,故治疗均在健脾益胃基础上,前者温中消积导滞,后者温阳化饮,又同加理气之品以开启胃气,促进胃体蠕动,同用镇逆之药以助胃气下行,此皆标本同治之法。使脾胃健,宿食消,痰饮散,胃气复,浊阴下行,潴留自去,诸证自除。

* 山东省高唐县中医院(252800)

收稿日期:1997-06-26