

桂枝芍药知母汤对转基因小鼠胶原诱导性 关节炎 CRP、IL-2 的影响

张琦¹ 吴轰² 江泳¹ 刘薇² 曾升平¹ 冯全生¹ 徐建虎¹ 赵征宇¹

摘要 目的:观察经方桂枝芍药知母汤对 HLA-DR₄ 转基因小鼠胶原诱导性关节炎(CIA)C 反应蛋白(CRP)、白细胞介素 2(IL-2)表达水平的影响,以探讨桂枝芍药知母汤治疗类风湿性关节炎(RA)的作用机理。方法:采用 HLA-DR₄ 转基因小鼠 CIA 动物模型,评价造模后桂枝芍药知母汤早期给药对 CRP、IL-2 的影响。结果:与模型组比较,该方能明显降低 RA 转基因小鼠的 CRP、IL-2($P<0.05$);同时,RA 转基因阴性鼠中药组与转基因阳性鼠中药组比较,CRP 明显降低($P<0.05$)。结论:桂枝芍药知母汤有改善 RA 的病情和症状,抑制 IL-2 和 CRP 分泌的作用,这可能是本方治疗 RA 取得良好疗效的机理之一。

主题词 关节炎/中医药疗法 桂枝芍药知母汤/治疗应用

Effects of Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction on CRP and IL-2 Level in Collagen-induced Arthritis of Transgenic Mice

Zhang Qi¹, Wu Hong², Jiang Yong¹, et al.

(1. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075; 2. Xiangya Medical College, Central South University)

Objective: To observe effects of Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction on C reaction protein (CRP) and interleukin-2 (IL-2) level in collagen-induced arthritis (CIA) of HLA-DR₄ transgenic mice, so as to explore the mechanism of Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction for treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Methods:** Effects of Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction on CRP and IL-2 level in HLA-DR₄ transgenic mice of CIA were investigated at early treatment. **Results:** The recipe could significantly decrease CRP and IL-2 level in transgenic mice of CIA as compared with that in the model group ($P<0.05$); And CRP decreased significantly in Chinese medicine group of RA transgenic negative mice as compared with that of Chinese medicine group of RA transgenic positive mice ($P<0.05$). **Conclusion:** Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction can improve the state of illness and symptoms of RA, inhibit secretion of IL-2 and CRP, which is possibly one of the mechanisms of the recipe in treatment of RA.

Key Words Arthritis/TCM therapy; Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction/therapeutic application

类风湿性关节炎(RA)是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病。滑膜炎反复发作,导致关节内软骨和软骨下骨组织的破坏,关节功能障碍,最终造成关节畸形和强直。

桂枝芍药知母汤(桂枝 12g,白芍 9g,甘草 6g,麻黄 6g,生姜 15g,白术 15g,知母 12g,防风 12g,制附子 6g)出自《金匮要略·中风历节病脉证治》篇,具有祛风除湿、温经散寒、滋阴清热之功效,主治风湿历节,是临床治疗 RA 的常用方。本研究采用 HLA-DR₄ 转基因小鼠胶原性关节炎(CIA)动物模型,观察桂枝芍药知母汤治疗 RA 的作用机理。

1 材料

1.1 动物:实验所用 C₅₇BL/6 及 DBA/1 小鼠购自中国科学院上海分院实验动物中心;昆明种小鼠由中南大学湘雅医学院实验动物部提供。实验用转基因小鼠雌雄各半,4~6 周龄,体重(18±2)g。全部小鼠均在中

南大学生殖与干细胞工程研究所分子遗传学实验室动物饲养室无菌环境下饲养。中南大学生殖与干细胞工程研究所分子遗传学实验室 10 000G 层流动物饲养室,恒温(22±2℃),恒湿(50%~60%),人工昼夜周期(昼:5am~7pm,夜:7pm~5am)。

1.2 药物及试剂:桂枝芍药知母汤按照《中华人民共和国药典》2000 年版一部附录制剂通则合剂的要求制成药液(含原生药 2g/ml)。甲氨喋呤为上海联华制药有限公司生产。牛Ⅱ型胶原蛋白、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂均为 Sigma 公司产品。乙酸由湖南师范大学试剂厂生产。¹²⁵I 标记 C 反应蛋白(CRP)免疫放射分析试剂盒为北京市佳科生物技术公司产品。¹²⁵I 标记白细胞介素 2(IL-2)放射免疫试剂盒为北京市福瑞生物工程公司产品。

1.3 主要仪器:TDL-5 型离心机,上海安亭科学仪器厂;Beckman LS3801 型液体闪烁计数仪,美国产。

2 方法

2.1 HLA-DR₄ 转基因小鼠模型复制^[1]:C₅₇BL/6×DBA/1 的 HLA-DR₄ 转基因鼠系参照如下方法复制:将人 DR_α、DR_β(D_{w4})cDNA 片段插入 PRC/CMV 质粒中,其酶切位点为 NotI、ApaI(美国康奈尔大学 Jack

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271620)

1 成都中医药大学,四川省成都市十二桥路 37 号(610075)

2 中南大学湘雅医学院

收稿日期:2004-12-07;修回日期:2005-02-28

Sliver 分子医学研究室惠赠)。质粒经扩增、分离、纯化后,用显微注射法混合注入至 C₅₇BL/6×DBA/1F₁ 鼠受精卵原核,移卵至假孕母鼠。产出幼仔,通过对鼠尾 DNA 进行 PCR、Southern 杂交检测出首建鼠,随后用兄妹交配法建立 HLA-DR₄ 转基因鼠系。运用 Northern 杂交、RT-PCR 检测 DR₄ 基因在组织内的表达情况。

2.2 CIA 模型复制^[2]:取牛Ⅱ型胶原蛋白 100mg 溶解于 5ml 乙酸(0.01mol/L),4℃过夜;与等容积的完全弗氏佐剂在冰浴中充分乳化;以 0.1ml/只小鼠腹部、背部和尾根部多点分散皮下注射基础免疫。第 21 天,再将牛Ⅱ型胶原蛋白溶解于 0.01mol/L 乙酸中,并与等容积的不完全弗氏佐剂在冰浴中充分乳化后,以 0.1ml/只加强免疫。

2.3 实验分组及给药方法

2.3.1 分组:将 RA 转基因阳性小鼠 36 只随机均分为模型组(A 组)、桂枝芍药知母汤治疗组(B 组)、西药治疗组(C 组),RA 转基因阴性鼠 36 只相应分为 A'组、B'组、C'组 3 组,每组各 12 只。

2.3.2 给药方法:(1)B 组:在 CIA 模型复制同时,以桂枝芍药知母汤药液灌胃,依据人与小鼠体表面积关系换算所得的剂量扩大 5 倍,每日 1 次,连续 6 周。(2)A 组:灌服与中药组等容积的蒸馏水,每日 1 次,连续 6 周。(3)C 组:在 CIA 模型复制同时,用甲氨喋呤,以人 0.4mg·kg⁻¹·W⁻¹ 浓度依据小鼠的体重表面积的关系换算所得的剂量扩大 10 倍后溶于生理盐水,行腹腔注射,每周 1 次,连续 6 周。实验过程中有小鼠死亡,具体鼠数见表 1、表 2。

2.4 CRP 含量测定:按试剂盒说明书进行。取小鼠血清样本 5μl,加入 500μl 测定液混匀待用;在洁净微量离心管中加入稀释好的被测样品 5μl,依次加入 100μl 测定液及 1 粒抗体包被珠后再加入 100μl ¹²⁵I 标记的抗体,混匀后室温下振荡 30 分钟;用移液器吸去反应液,双蒸水洗珠 3 次,吸干液体后置于伽玛计数器中测定各珠放射性。以 CPM 值为纵坐标,与其相应的 CRP 标准为横坐标,做出标准曲线,未知样品可从标准曲线中读出 CRP 值。最终值乘以 100,以 mg/L 表示。

2.5 IL-2 活性测定:按试剂盒加液程序操作,充分混匀各管,室温下放置 20 分钟,于 4℃ 3500 转/分钟离心 25 分钟,吸弃上清液,在伽玛计数器上测定 CPM 值。由伽玛计数器预置程序读出有关参数、标准曲线及样品浓度。

2.6 统计学方法:结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用统计软件 SPSS 12.0 进行统计学处理,组间差异用 *t* 检验。

3 结果

3.1 桂枝芍药知母汤对转基因小鼠 CRP 的影响:表 1 示,无论转基因阴性鼠还是转基因阳性鼠,其桂枝芍药知母汤治疗组和西药治疗组间差异无显著性;但与模型组比较,二者均有差异,而且在转基因阴性鼠中,其差异较为显著($P < 0.01$)。同时,两类动物对应组相比较,转基因阴性鼠桂枝芍药知母汤治疗组和西药治疗组均低于转基因阳性鼠($P < 0.05$),但模型组间差异无显著性。

表 1 桂枝芍药知母汤对转基因鼠 CRP 的影响(mg/L, $\bar{x} \pm s$)

类别	组别	鼠数	CRP
转基因阴性鼠	B'组	8	0.9375±0.3114*△△
	C'组	8	0.9875±0.2900*△△
	A'组	8	1.6125±0.3871
	B 组	8	1.3411±0.3162△
转基因阳性鼠	C 组	8	1.3500±0.3381△
	A 组	8	1.9375±0.3926

转基因阴性鼠与转基因阳性鼠对应组比较,* $P < 0.05$;与同类模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

3.2 桂枝芍药知母汤对转基因小鼠 IL-2 的影响:表 2 示,无论转基因阴性鼠还是转基因阳性鼠,其桂枝芍药知母汤治疗组和西药治疗组间无差异;但与同类模型组比较,二者的外周血 IL-2 均有所降低,其中转基因阴性鼠桂枝芍药知母汤治疗组和西药治疗组与模型组差异无显著性($P > 0.05$),而转基因阳性鼠桂枝芍药知母汤治疗组和西药治疗组与模型组差异有显著性($P < 0.05$)。

表 2 桂枝芍药知母汤对转基因鼠 IL-2 的影响(mg/L, $\bar{x} \pm s$)

类别	组别	鼠数	IL-2
转基因阴性鼠	B'组	11	1.4768±0.8806
	C'组	10	1.3612±0.6107
	A'组	9	2.0273±1.0146*
	B 组	10	1.6674±0.7606*
转基因阳性鼠	C 组	10	1.6338±0.8445*
	A 组	9	2.5984±1.5725

与同类模型组比较,* $P < 0.05$

4 讨论

RA 是一种全身性疾病,其发病、病程及预后差异较大。严重者可有多种并发症,且病变可持续恶化,造成重度关节功能障碍。一旦关节结构破坏形成,则成为永久性损害。因此,如何合理用药,在疾病早期控制病情的发展和转归,已成为研究热点。目前,西药治疗 RA 尚无特效疗法,且药物副作用较大。故临床医生一直在探索运用中西医结合治疗该病。实践证明^[3~6],桂枝芍药知母汤作为治疗历节病的经方,辨证用于本病,有较好的疗效。为了研究该方治疗 RA 的机理和疗效,

本实验以 HLA-DR₄ 转基因小鼠 CIA 作为模型,观察桂枝芍药知母汤对 CRP、IL-2 表达水平的影响。

现代研究表明,遗传因素在 RA 的发病中起一定的作用,遗传学分析提示,RA 的危险因素 30% 归咎于人类白细胞抗原(HLA)^[8]。李芬、吴轰等^[9,10]以转基因小鼠研究 RA 的易感基因,证实了 HLA-DR₄ 基因与 RA 的病程进展密切相关。CRP 是肝细胞合成的一种急性期蛋白,它能激活补体,增加吞噬细胞的活性,有调理素样作用和其他免疫调控作用。所有能够激活单核细胞释放 IL-2 的因素均可刺激肝细胞生成 CRP,主要包括炎症水平和损伤过程^[11]。在炎症早期 CRP 可以迅速升高,其浓度变化幅度可高达千倍^[12]。虽然 CRP 水平上升的检测对疾病的诊断没有特异性,但它却是炎症过程中一个十分重要的灵敏指标,是判断健康或是疾病的重要提示。由于 CRP 水平不受类固醇激素、药物和血脂的影响,其升高总是与病理变化相随,因此具有极高的诊断价值。本实验结果显示,桂枝芍药知母汤能明显降低转基因小鼠 CRP 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明本方能够缓解 RA 的炎症反应程度。此作用在转基因阴性鼠中尤为突出($P < 0.01$),这就提示 HLA-DR₄ 基因携带使 RA 病情有所加重,给治疗带来了困难,此结果也与李芬、吴轰等^[9]的报道相符。

IL-2 是近年来认识的一种最重要的细胞因子,主要由 T 细胞产生,它最重要的作用是诱导 T 淋巴细胞增殖和分化。T 细胞进入关节内分泌 IL-2,IL-2 与其受体结合后又作用于 T 细胞自身,诱导自身增殖、分化和发挥功能,从而加重关节滑膜的炎性浸润和损伤。不能合成足够量的 IL-2,被认为是抗原特异性 T 细胞无反应性的重要原因。本实验表明,桂枝芍药知母汤能降低转基因阳性鼠 IL-2 水平($P < 0.05$),提示本方具有免疫调节作用。转基因阳性鼠与转基因阴性鼠各对应组间差异无显著性,提示 IL-2 可能与动物的遗传背景无关。而本方和甲氨喋呤都对转基因阴性鼠效果不显,可能与其发病程度不及转基因阳性鼠严重有关。

中医学认为,RA 属于历节范畴,为本虚标实之证,在《金匮要略》中就明确指出历节之本虚为肝肾气血不足,筋骨不健;其标实为风、寒、湿、热侵袭,以及后世提出的痰浊血瘀。现代研究发现,HLA-DR₄ 作为 RA 的易感基因,对启动该病的发生与发展有重要作用^[13]。那么《金匮要略》所提出的肝肾不足,与现代医学认为的 HLA-DR₄ 基因之间是否有某种内在的联系呢?这还有待于进行深入地研究。

RA 的治疗一直是困扰医学界的一个难题,甲氨

喋呤是目前比较公认的治疗 RA 的药物。本实验结果显示,桂枝芍药知母汤治疗 RA 的疗效和甲氨喋呤相仿,在一定程度上抑制了 IL-2 和 CRP 的分泌,对改善 RA 的病情和症状有着积极作用,而且作为中药复方,本方副作用小,值得继续研究和开发。

参考文献

- 1 刘德培.转基因动物.见:卢圣祚主编.现代分子生物学实验技术.北京:高等教育出版社,1993:518~811.
- 2 Stasiuk LM, Abehsira-Amar O, Fournier C. Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: cytokine gene activation following immunization with type II collagen. Cell Immunol, 1996, 173(2): 269~275.
- 3 杨中杰.桂枝芍药知母汤加减治疗急性期类风湿性关节炎 280 例.河南中医,1999,14(2):46~47.
- 4 穆传军,林本全,王绍臣,等.桂枝芍药知母汤加减治疗类风湿性关节炎 95 例.山西中医,2000,16(4):30.
- 5 田河水,李向录.桂枝芍药知母汤治疗类风湿性关节炎 136 例疗效观察.中国中医基础医学杂志,2002,8(8):63.
- 6 梁广和.桂枝芍药知母汤加减治疗类风湿性关节炎.湖北中医杂志,2002,24(2):17~18.
- 7 蒋明,朱立平,林孝义主编.风湿病学(上册).北京:科学技术出版社,1996:815~838.
- 8 刘嘉玲,鲍春德主编.风湿病疑难问题.北京:人民卫生出版社,2004:118.
- 9 李芬,吴轰,邓军卫,等.以转基因动物模型研究类风湿性关节炎的易感基因.中华风湿病学杂志,1999,3(2):75~79.
- 10 吴轰,高洁生,黎明,等. HLA-DR₄ 等位基因与类风湿性关节炎疗效的关系.中华风湿病学杂志,2001,5(4):213~215.
- 11 朱骏.C-反应蛋白的测定及临床意义.安徽卫生职业技术学院学报,2003,2(4):45~47.
- 12 杨振修.C-反应蛋白的检测.上海医学检验杂志,1999,14(5):261.

《黄帝内经》纪录片征订启事

《黄帝内经》是一部全面记录中华民族生息繁衍、医学发展的经典巨著。《黄帝内经》纪录片以故事化的方式,全面系统地介绍了《黄帝内经》的全部内容。医史篇 8 张碟 160 元;医理篇 11 张碟 198 元;养生篇 11 张碟 198 元。内容丰富、生动、形象,它记录了中国历史上与养生有关的孔子、孙思邈、陶弘景等名家名医;记录了针灸、推拿、艾灸等诊疗技术;记录了祖国各地的风土民情和水、酒、茶、饮食、起居与人体健康的历史故事。电话:(010)64014111-3041,13911381299.联系人:浦战兵,地址:北京市东城区东直门内南小街 16 号中医杂志社医海林音像书店,邮编:100700

出书立传 中医古籍出版社帮您忙

《中国当代医疗百科专家专著》系列丛书出版登记表(回执)

姓名		地址		邮编		传真	
电话		手机		书稿寄出时间		订购册数	
内容简介				是否请领导(专家)题词			
				是否参加科技著作大赛或展览			

注:请按此表格内容自制表格寄回,以提前安排出版事宜。

地址:北京市水碓子邮局 43 号信箱,邮编:100026

电话:(010)64008810,64014411-3219(长期有效)