

· 方药研究 ·

芎附散对脾虚痹证(类风湿性关节炎) 模型的影响

肖 诚¹ 李 艳² 左铮云³ 徐 彭³ 鞠大宏² 滕静如² 吕爱平² 徐世杰²

(1. 中日友好医院临床医学研究所, 北京市樱花东路2号, 100029; 2. 中国中医科学院基础理论研究所; 3. 江西中医学院)

[摘 要] **目的** 观察芎附散对脾虚基础上诱发痹证(类风湿性关节炎) 小鼠模型的影响。**方法** 选择 DBA 小鼠, 胶原诱导性关节炎(CIA) 作为痹证模型, 以大黄泻下加饥饱失常造成脾虚模型, 在此基础上加以 II 型胶原(C II) 诱发脾虚痹证(类风湿性关节炎) 的模型, 用芎附散及雷公藤多苷进行治疗。观察小鼠体重、关节肿胀程度及病理学改变, 用酶联免疫吸附法测定各组小鼠血清中抗 C II 抗体、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及干扰素- γ (IFN- γ) 含量的变化。**结果** 痹证组、脾虚痹证组动物体重减轻, 关节肿胀加剧, 膝、踝关节病理学改变明显, TNF- α 及 IFN- γ 含量增高, 血清中抗 C II 抗体含量升高, 以脾虚痹证组明显, 与痹证组比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 芎附散能显著减轻上述改变。**结论** 该模型是研究痹证(类风湿性关节炎) 机制较理想的动物模型之一, 芎附散对该模型有明显的治疗作用。

[关键词] 脾虚痹证; 胶原诱导性关节炎; 类风湿性关节炎; 芎附散

Effect of Xiongfú Powder for the Model of Bi Syndrome (Rheumatoid Arthritis) Induced by Spleen Deficiency

XIAO Cheng¹, LI Yan², ZUO Zheng-yun³, et al.

(1. Institute of Clinical Medical Science, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029; 2. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medicinal Sciences; 3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Xiongfú Powder [Powder including Chuanxiong (Rhizoma Ligustici Chuanxiong) and Fuzi (Radix Aconiti Preparata)] on the mice models with rheumatoid arthritis (RA) induced by spleen deficiency. **Methods** The DBA mice were selected as the experimental animals. The models of collagen induced arthritis (CIA) were made by feeding Dahuang (Radix et Rhizoma Rhei) to induce diarrhea and irregular feeding to cause spleen deficiency. They were treated by Xiongfú Powder and Tripterygium Wilfordii polyglyco-sidium (TWP). The body weight, degree of swelling and pathological changes of joints were observed. The quantity changes of collagen antibody II (C II), tumor necrosis factor - α (TNF- α), and interferon - γ (IFN- γ) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** In the Bi syndrome group and Bi syndrome induced by spleen deficiency group, the body weight was lowered, the joint swelling became worse, the pathological changes of knee and ankle joints showed obviously, TNF - α and IFN - γ increased, C II increased, especially in the Bi syndrome induced by spleen deficiency group, compared with the Bi syndrome group, the difference was significant ($P < 0.05$). Xiongfú Powder could relieve the above-mentioned pathological changes obviously. **Conclusion** This is one of the ideal animal models for studying Bi syndrome, rheumatoid arthritis (RA). Xiongfú Powder has an obvious therapeutic effect for this model.

Key Words Bi syndrome induced by spleen deficiency; Collagen induced arthritis II; Rheumatoid arthritis; Xiongfú Powder (Powder including Chuanxiong and Fuzi)

痹证以较高的发病率、致残率严重影响人类的健康, 它几乎包括了现代医学所指的各种关节疾病, 类风湿性关节炎(RA) 亦属其范畴。其病因至今不明, 现代医学认为其是由遗传因素、感染因素、性激素失衡等多种因素所引发^[1]。中医学认为, 痹证是由于人体营卫失调, 感受风寒湿三气合而为痹。古今医家多认为痹证的成因非止一端, 我们对脾虚在痹证(类风湿性关节炎)

发病机制中作用进行了理论探讨, 认为脾胃虚弱(尤其是脾虚) 在痹证的发病和防治中均有着不可忽视的作用^[2,3]。本实验进行了脾虚痹证(类风湿性关节炎) 模型的研究, 同时观察了芎附散对其影响, 现报告如下。

1 材料

1.1 动物

清洁级 DBA 小鼠 100 只, 雄性, 体重(18 ± 2) g, 由中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供。在中日友好医院临床医学研究所动物房适应性饲养 3 天后用于正式实验。

1.2 试剂、药物、仪器

Ⅱ型胶原(CⅡ)从大鼠软骨肉瘤组织中获得,经电泳分析,CⅡ纯度达99.9%以上,由瑞典Lund大学提供;中药购于北京同仁堂集团,大黄煎成200%浓缩液备用,芎附散(组成:黄芪15g,白术15g,防风6g,甘草6g,地黄15g,当归10g,川芎10g,柴胡10g,附子10g,桂枝10g),按配方煎成生药浓度0.544g/ml;雷公藤多苷片为福建省三明制药厂产品,批号:981101。肿瘤坏死因子- α TNF- α 、干扰素- γ (IFN- γ)试剂盒为Diacclone公司产品;轮式石蜡切片机(AO公司);酶标仪,Labsystems, Multiskan Ascent Finland 产品。

2 方法

2.1 动物分组及处理

将DBA 小鼠随机分成空白对照组、痹证组、脾虚痹证组、雷公藤组、芎附散组5组,每组20只,实验周期共9周。痹证组:正常饲养2周后,于第3周取CⅡ、乙酸与弗氏完全佐剂(CFA)充分乳化后的混合物,按50 μ g/足于双侧足底部皮下免疫。脾虚痹证组:第1周以大黄煎液25ml $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹灌胃泻下,加饥饱失常法^[4];第2周开始维持饥饱失常到第9周结束;第3周进行免疫,方法同痹证组。芎附散组:在脾虚痹证造模第7周开始以芎附散煎剂17.5g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹灌胃,相当于成人用量10倍,连续3周。雷公藤组:给药时间同芎附散组,以雷公藤多苷片混悬液0.07g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹灌胃。空白对照组:以等量的生理盐水进行足底假免疫。第1~2周及7~9周,空白对照组、痹证组及脾虚痹证组以等量生理盐水灌胃,给药体积为0.3ml/10g体重。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 动物一般情况 包括饮食、精神、毛发、大便等。

2.2.2 动物体重测量 免疫前每天及免疫后每周1次测量小鼠体重,以观察各项处理对体重的影响。

2.2.3 关节肿胀程度测量 以自制容积压力测量器测量双后肢体积,每周1次,以判断其发病程度和治疗效果^[5]。

2.2.4 病理检测 福尔马林固定的膝、踝关节,3%硝

酸脱钙,酒精逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE常规染色。光镜下观察滑膜、软骨及骨的病理改变。

2.2.5 外周血TNF- α IFN- γ 细胞因子及抗CⅡ抗体含量检测 外周血TNF- α IFN- γ 细胞因子含量测定根据操作手册进行,具体流程如下:将已包被有特异抗体的塑料板洗3次;向凹孔内加50 μ l样品稀释液或50 μ l检测血清,室温下孵育1小时,用洗板机洗3次;加50 μ l生物素标记的第二抗体,室温下孵育2小时,用洗板机洗3次;加100 μ l链亲合素标记的辣根过氧化物酶,室温下孵育30分钟,用洗板机洗3次;加100 μ lTMB,室温下孵育20~30分钟;加100 μ l终止液;用酶标仪测量光密度,换算为抗原的含量。抗CⅡ抗体含量的检测参照文献^[6],将小牛关节软骨CⅡ包备酶标板,加BSA-PBS封闭,滴加待测血清和标准抗原,加生物素化山羊抗大鼠抗体,加亲合素化辣根过氧化物酶,滴加显色剂显色,适时终止显色,酶标仪上测定OD值(450nm)。

2.3 统计学方法

采用SPSS 12.0软件,实验结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,正态分布的数据经方差齐性检验确定方差齐同后采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验。

3 结果

3.1 大体观察

痹证组:小鼠经CⅡ-CFA免疫第2天,踝关节肿胀、充血明显,相继出现精神萎靡不振,体重下降,并伴有轻度脱毛和腹泻。脾虚痹证:大黄灌胃造模4小时开始出现泄泻,12小时外观开始有异常改变,包括精神倦怠、纳差、嗜卧、懒动、拱背、扎堆、眼眯。第2天毛发异常,动物易激惹。第4天动物泄泻有所缓解。经CⅡ-CFA免疫后动物嗜卧、懒动、拱背、扎堆直至实验结束。芎附散组:给以芎附散治疗,动物表现渐趋正常,表现为食欲、体重开始增加,关节肿胀程度减轻等。雷公藤组:经治疗后,动物关节肿胀程度明显减轻。

3.2 动物体重的测量

表1示,与空白对照组比较,第63天其余各组体

表1 各组小鼠不同时间体重变化比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第1天	第14天	第42天	第63天
空白对照组	20	17.98 $\pm$ 1.20	21.26 $\pm$ 1.04	25.96 $\pm$ 1.00	29.06 $\pm$ 0.94
痹证组	20	17.78 $\pm$ 1.03	21.34 $\pm$ 1.61	24.24 $\pm$ 1.68	27.31 $\pm$ 1.05*
脾虚痹证组	20	17.92 $\pm$ 0.93	20.03 $\pm$ 1.28	22.68 $\pm$ 1.63	25.65 $\pm$ 2.15*
雷公藤组	20	18.14 $\pm$ 1.21	20.68 $\pm$ 1.67	23.12 $\pm$ 1.80	25.64 $\pm$ 1.35*
芎附散组	20	18.00 $\pm$ 1.04	20.46 $\pm$ 1.17	23.11 $\pm$ 0.96	27.60 $\pm$ 1.06▲

与空白对照组比较,* $P<0.01$;与脾虚痹证组比较, $\Delta P<0.05$;与雷公藤组比较,▲ $P<0.01$

表2 各组小鼠不同时间左踝关节肿胀程度变化比较(Pa, x ±s)

组别	鼠数	第1天	第14天	第42天	第63天
空白对照组	20	12.10±1.12	12.35±0.88	12.65±0.67	12.75±0.91
痹证组	20	11.85±1.27	12.10±0.91	18.30±1.42*	18.35±0.99*
脾虚痹证组	20	11.90±1.05	12.58±0.90	18.63±1.64*	18.68±1.63*
雷公藤组	20	11.75±1.12	12.05±0.76	18.50±1.05*	17.70±0.92*△
芎附散组	20	11.95±1.18	12.21±0.92	18.58±1.64*	17.68±0.75*△

与空白对照组比较, * P<0.01;与脾虚痹证组比较, △P<0.05

表3 各组小鼠不同时间右踝关节肿胀程度变化比较(Pa, x ±s)

组别	鼠数	第1天	第14天	第42天	第63天
空白对照组	20	12.00±1.12	12.35±0.81	12.50±0.69	12.55±0.76
痹证组	20	11.90±1.17	12.25±0.79	18.20±1.51*	18.30±0.87*
脾虚痹证组	20	11.95±1.03	12.47±0.84	18.37±1.50*	18.47±1.17*
雷公藤组	20	11.80±1.06	12.15±1.40	18.35±1.14*	17.60±0.82*△
芎附散组	20	12.11±1.15	12.16±0.77	18.53±1.61*	17.79±0.79*△

与空白对照组比较, * P<0.01;与脾虚痹证组比较, △P<0.05

重均显著降低(P<0.01),但以脾虚痹证组降低更为显著;与脾虚痹证组及雷公藤组比较,芎附散组体重增高明显,差异有显著性意义(P<0.01)。

3.3 关节肿胀程度的检测

表2示,第42天和第63天,与空白对照组比较,其余各组左踝关节肿胀明显,差异均有显著性意义(P<0.01);第63天,与脾虚痹组比较,雷公藤组及芎附散组左踝关节肿胀减轻,差异有显著性意义(P<0.05),但仍高于空白对照组。

表3示,第42天和第63天,与空白对照组比较,其余各组右踝关节肿胀明显,差异均有显著性意义(P<0.01);第63天,与脾虚痹组比较,雷公藤组及芎附散组右踝关节肿胀减轻,差异有显著性意义(P<0.05),但仍高于空白对照组。

3.4 病理检测

痹证组:周围软组织伴有大量炎性细胞浸润。关节腔及滑囊内均可见明显的滑膜组织增生,滑膜细胞增生呈乳头状。踝关节各跖骨关节软骨的基质及软骨细胞出现不同程度的退行性,严重处软骨坏死剥脱。变性、坏死剥脱的软骨表面可见由滑膜细胞和毛细血管增生所形成的血管翳。脾虚痹证组:除可见痹证组的病变外,炎症反应更为明显,炎细胞浸润播及周围肌肉组织;软骨的退行性变,滑膜组织的增生及血管翳的形成均较痹证组为明显。雷公藤组及芎附散组:周围软组织水肿及炎细胞浸润明显减轻,增生的滑膜组织内的炎细胞、滑膜细胞及毛细血管数量减少。

3.5 外周血抗 CⅡ抗体、TNF-α及 IFN-γ含量测定

表4示,与空白对照组比较,其余各组抗 CⅡ抗体含量明显升高(P<0.01),差异有显著性意义;与脾虚

痹证组比较,痹证组、雷公藤组及芎附散组降低,差异有显著性意义(P<0.05)。

表4 各组小鼠血清中抗 CⅡ抗体、TNF-α及 IFN-γ含量比较(OD 值, x ±s)

组别	鼠数	抗 CⅡ抗体	TNF-α	IFN-γ
空白对照组	8	0.097±0.022	0.069±0.008	0.051±0.006
痹证组	8	0.931±0.086**△	0.092±0.020*	0.066±0.01*
脾虚痹证组	8	1.122±0.226**	0.103±0.03**	0.068±0.01**
雷公藤组	8	0.839±0.284**△	0.074±0.005△	0.059±0.004*△
芎附散组	8	0.854±0.261**△	0.074±0.010△	0.053±0.006△▲

与空白对照组比较, * P<0.05, ** P<0.01;与脾虚痹证组比较, △P<0.05, ▲P<0.01;与雷公藤组比较, ▲P<0.05

与空白对照组比较,痹证组及脾虚痹证组 TNF-α含量升高,以脾虚痹证组明显,差异均有显著性意义(P<0.05或 P<0.01);与脾虚痹证组比较,雷公藤组及芎附散组含量降低,差异有显著性意义(P<0.05)。

与空白对照组比较,痹证组、脾虚痹证组及雷公藤组 IFN-γ含量升高,差异均有显著性意义(P<0.05或 P<0.01);与脾虚痹证组比较,雷公藤组及芎附散组含量降低,差异均有显著性意义(P<0.05或 P<0.01)。芎附散组较雷公藤组 IFN-γ浓度低,差异有显著性意义(P<0.05)。

4 讨论

痹证(类风湿性关节炎) 的模型有多种,1977年由 Trentham 等建立的胶原诱导性关节炎(CIA) 模型^[7]目前被认为是一种比较理想的 RA 动物模型。中医药关于 RA 的实验研究所选用的动物模型,按其造模方法是否联系此病的中医病因学说,可以分为两大类。一是造模方法与中医病因学说无关——疾病模型:如 CIA 模型、佐剂性关节炎(AA) 模型、转基因小鼠模型、移植

(滑膜移植、关节软骨移植)模型、6-磷酸葡萄糖异构酶诱导的关节炎模型^[9,10]等,其中以前两种模型较为常见。另一种是造模方法联系中医病因病机学说——病证结合模型。在AA或CIA基础上,给以风、寒、湿等环境因素或使动物合并肾虚等模拟的发病条件进行造模则属于病证结合模型。例如,切除卵巢所致肾虚可明显加重CIA小鼠关节局部病理改变及全身免疫损伤程度的研究以及外界寒湿因素能加重CIA关节局部病变的研究^[8]等均属此类。

陈小野^[4]认为,脾虚痹证组前期大黄泻下加饥饱失常所导致DBA小鼠脾虚模型造模成功,观察第63天体重我们可以发现,脾虚痹证组较痹证组下降明显,表明体重为脾虚证较好的一个观察指标。空白对照组各时间段关节体积自身前后对照差异无显著性意义。经CⅡ-CFA免疫造模后,各组动物与空白对照组比较,踝关节肿胀程度和血清中抗CⅡ抗体含量均显著增加,据此可佐证痹证及脾虚痹证组模型造模成功。虽然,在关节肿胀程度方面脾虚痹证组与痹证组间比较差异无显著性意义,但血清中抗CⅡ抗体含量升高以脾虚痹证组最为明显。结合光镜下观察发现脾虚痹证组关节病变重于痹证组,我们判断脾虚可加重痹证(类风湿性关节炎)的发病。其机制可能是脾虚时可造成机体黏膜免疫系统受损,导致动物黏膜免疫功能下降,外来有害的微生物在黏膜的附着和入侵机会增多,摄取未被降解的抗原能力增强,出现由外来蛋白引起的可能有害的免疫反应机率增大。同时,黏膜免疫系统中下调全身免疫应答的T细胞数量减少,相对上调机体整体免疫系统功能,对外源性CⅡ-CFA所致的免疫应答相对增强,从而最终导致病变的加剧^[10]。

芎附散出自许叔微《普济本事方》,用治“脾胃虚弱,卫气不能湿分肉,为风、寒、湿所着”之五种痹证。痹证之因于脾胃虚弱,卫表不固者,自当补益脾胃,益卫固表。故痹证之因于脾胃虚者,此方甚是适合。经芎附散治疗后,可以显著减轻脾虚痹证小鼠踝关节肿胀。光镜下观察该组关节滑膜组织的炎症反应缓解,滑膜组织增生减少。另外,小鼠血清中抗CⅡ抗体含量降低。其机制可能为芎附散能修复黏膜免疫系统的损伤,上调机体黏膜免疫功能有关。芎附散作为一个补益脾胃,益卫固表的方子,不仅可以抑制脾虚痹证的发病,同时还可以增加动物体重,这也是该类治疗药不同于雷公藤的特点之一。本研究也进一步反证脾虚可以加重痹证的发病。

痹证的发生,主要由风、寒、湿、热之邪乘虚侵袭人体,引起气血运行不畅,经络阻滞;或病久痰浊瘀血,阻

于经隧,深入关节筋脉。一般多以正气虚衰为内因;风寒湿热之邪为外因。痹为闭阻不通之意,故治则以宣通为主,或温经散寒、祛风除湿,或除湿通络、祛风散寒,使气血流通,营卫复常,则痹证可逐渐痊愈。雷公藤苦,辛,凉,大毒,归肝、脾、肺经,通过祛风除湿,活血通络止痛治疗痹证。芎附散由川芎、附子等组成,为祛寒散瘀之剂。其中川芎性味辛,温,归肝、胆、心包经,功能活血行气,祛风止痛。附子性味辛、甘,大热,有毒,归心、肾、脾经,能补火助阳,散寒止痛。雷公藤与芎附散均可通过温经散寒、养血通络、活血祛瘀、除湿止痛达到治疗痹证的效果。

参考文献

- [1]蒋明, David Yu, 林孝义, 等. 中华风湿病学. 北京: 华夏出版社, 2004; 697~706.
- [2]徐世杰. 从脾胃论治痹证新解. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(增刊): 112~113.
- [3]肖诚, 徐世杰, 鞠大宏, 等. 从黏膜免疫探讨脾虚痹证(类风湿性关节炎)发生机理. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(7): 1~2.
- [4]陈小野. 实用中医证候动物模型学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993; 148, 175.
- [5]徐世杰, 肖诚, 周桂琴, 等. 实验性脾虚痹证的黏膜免疫学机制研究. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(12): 35~38.
- [6]Yoshino S, Quattrocchi E, Weiner HL. Suppression of antigen-induced arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen. Arthritis Rheum, 1995, 38(8): 1092~1096.
- [7]Trentham DE, Townes AS, Kang AH, et al. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. J Exp Med, 1977, 146(3): 857~868.
- [8]徐世杰, 吕爱平, 王安民, 等. 卵巢切除所致肾虚对免疫性关节炎小鼠血清骨钙素和肿瘤坏死因子的影响. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(1): 37~39.
- [9]Matsumoto I, Staub A, Benoist C, et al. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. Science, 1999, 286(5445): 1732~1735.
- [10]吕爱平. 类风湿性关节炎中西医结合应用基础研究. 北京: 中医古籍出版社, 1999; 28~31.

(收稿日期: 2007-03-01; 修回日期: 2007-05-20)

汇编《当代名医临证医案医论》征文通知

医案医论是医家的实践记录,既能反映医者的临证思路与方法,更是启迪后学的好教材、好资料。为研究、探讨当前我国医务人员的临证医案医论,以科学发展观,推动学术领域的发展与繁荣交流,我们将汇编《当代名医临证医案医论》。现征文如下:欢迎临床各科医案医论,包括个案分析、典型病例、经验论述/论著、带徒经验、笔谈、讲座等论文。拟于2008年4月在上海召开“聚杰杯首届特色医疗名医学术研讨会”,欢迎具有特色诊疗技术的医务人员投稿/题材不限。

来稿处理方法请见华夏医药网(<http://www.huaxia120.com>),录用论文将按照《著作权法》发放稿酬(会稿除外)。截稿日期:2007年12月30日。来稿请寄:南京市商埠街27号,南京聚杰医药信息科技中心刘凤国收,邮编:210011;请注明“医案”、“会议”字样。电话:(025)82038887,58820656。