

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.19.017

麝香乌龙丸对佐剂关节炎大鼠垂体组织形态及 ACTH、 β -EP 表达的影响

张娟¹, 王志文^{*}, 陈志全², 孟凡双¹, 赵艳梅¹, 项南², 李怡良², 李臣杰², 丁春菊²

(1. 河北联合大学中医学院, 河北省唐山市建设南路 57 号, 063000; 2. 河北联合大学附属医院)

基金项目: 河北省中医药管理局 2013 年度省级中医药类重大医学科科研项目资助 (zyzd2013017)

摘要 **目的** 探讨麝香乌龙丸对类风湿关节炎 (RA) 大鼠的镇痛作用及可能机制。 **方法** 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组和麝香乌龙丸低、中、高剂量组, 每组各 12 只。除正常组外其余大鼠均注射完全弗氏佐剂造模, 于造模第 15 天起, 麝香乌龙丸低、中、高剂量组分别给予麝香乌龙丸 0.3、0.6、1.2 g/(kg·d), 正常组与模型组灌胃等容量生理盐水, 每日 1 次, 连续给药 2 周。2 周后处死取材, HE 染色后在光镜下观察垂体组织形态, 免疫组化法检测垂体促肾上腺皮质激素 (ACTH)、 β -内啡肽 (β -EP) 的表达。 **结果** 光镜下观察各组垂体组织形态均无明显改变。模型组和麝香乌龙丸低、中、高剂量组 ACTH 与 β -EP 表达均明显高于正常组 ($P < 0.01$)。麝香乌龙丸中、高剂量组 ACTH 表达明显低于模型组和麝香乌龙丸低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。麝香乌龙丸低、中、高剂量组 β -EP 表达均明显高于模型组 ($P < 0.01$)。麝香乌龙丸中、高剂量组 β -EP 表达均明显高于麝香乌龙丸低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 麝香乌龙丸可调节 RA 大鼠垂体 ACTH、 β -EP 的表达, 这可能是该药治疗 RA 疼痛的机制之一。

关键词 麝香乌龙丸; 类风湿关节炎; 促肾上腺皮质激素; β -内啡肽

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节病变为主的慢性、全身免疫性疾病。西药可有效缓解关节疼痛, 但不良反应较多^[1], 中医药对缓解关节疼痛有良好的作用, 且副作用小^[2]。麝香乌龙丸是河北联合大学附属医院自主研发的院内制剂, 前期研究已证实该药具有明显的抗炎、镇痛作用^[3-5]。本实验通过建立佐剂性关节炎 (AA) 大鼠模型, 观察麝香乌龙丸对垂体促肾上腺皮质激素 (ACTH)、 β -内啡肽 (β -EP) 表达的影响, 对其镇痛机制进行相关探讨。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性健康 Wistar 大鼠 60 只, 体重 (180 ± 20) g, 实验动物许可证号: SCXK (豫) 2005-0001, 饲养于河北联合大学实验动物中心。

1.2 药物

麝香乌龙丸 (河北联合大学附属医院提供, 批准文号: 冀药制字 Z20051581, 规格: 每 10 丸

重 1 g, 每瓶 300 粒), 主要由人工麝香 (0.60%)、制川乌 (45.3%)、地龙 (16.7%)、全蝎 (12.4%)、黑豆 (9.4%) 等组成。将其与生理盐水配制成 120 mg/ml 的混悬液备用。

1.3 主要试剂与仪器

完全弗氏佐剂 (CFA) 购自美国 Sigma 公司 (批号 045K8910); 兔抗鼠 ACTH 一抗 (批号 bs-0043R)、兔抗鼠 β -EP 一抗 (批号 bs-1195R)、免疫组化试剂盒 (批号 SP-0023) 均购自北京博奥森生物科技有限公司。石蜡组织切片机 (CRM-440 型), 日本樱花医疗集团有限公司; 光学显微镜 (BX50 型), 日本 Olympus 公司。

1.4 动物分组与造模

60 只 Wistar 大鼠根据随机数字表分为正常组、模型组和麝香乌龙丸低、中、高剂量组, 每组各 12 只。正常组不作处理, 其余 48 只参照文献 [6-7] 造模: 用乙醚使大鼠轻度麻醉, 将其右后足跖底部常规酒精皮肤消毒, 使用 1 ml 注射器于每只造模大鼠消毒部位皮下注射 CFA 0.1 ml, 注射第 1~3 天注射足出现明显红肿, 至 12~14 天肿胀加重并开

* 通讯作者: wangzhiwen_1955@163.com, 15383055698

始出现左后足及前足红肿, 可视为造模成功。

1.5 给药方法

于造模后第 15 天起开始, 麝香乌龙丸低、中、高剂量组分别灌胃麝香乌龙丸 0.3、0.6、1.2 g/(kg·d), 分别相当于成人用药剂量的 3、6、12 倍, 正常组与模型组灌胃等体积生理盐水, 每日 1 次, 连续给药 2 周。

1.6 观察指标及方法

于给药 2 周后断头处死全部实验动物, 剪开头部皮肤, 打开脑腔, 取出垂体, 标本立即用新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定 12~24 h。①取垂体, 进行常规脱水、石蜡包埋后切片, 用于苏木素—伊红 (HE) 染色法, 光镜下观察垂体组织形态的改变。②免疫组织化学检测垂体 β -EP、ACTH 表达。采用链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶连结法 (SP 法), 具体操作过程按照试剂盒说明书进行。每张切片随机选取 10 个视野, 测定每个视野中阳性细胞率, 取其平均值进行统计分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 各组间比较方差齐者用 LSD 法检验, 方差不齐用 Dunnett T3 法检验。

2 结果

2.1 各组大鼠垂体 HE 染色比较

光镜下清楚可见 HE 染色后大鼠垂体远侧部 (垂体前叶), 中间部及神经部 (垂体后叶)。各组大鼠垂体 HE 染色未见明显差异。

2.2 各组大鼠垂体 β -EP、ACTH 表达比较

表 1 各组大鼠垂体 ACTH、 β -EP 表达比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ACTH	β -EP
正常组	12	40.23 $\pm$ 3.43	30.84 $\pm$ 2.19
模型组	12	56.82 $\pm$ 3.97*	39.72 $\pm$ 2.66*
麝香乌龙丸低剂量组	12	53.14 $\pm$ 4.16*	43.55 $\pm$ 3.59* Δ
麝香乌龙丸中剂量组	12	50.14 $\pm$ 3.39* $\Delta\Delta$	46.69 $\pm$ 3.62* $\Delta\Delta$
麝香乌龙丸高剂量组	12	46.87 $\pm$ 3.31* $\Delta\Delta$	49.47 $\pm$ 3.17* $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与麝香乌龙丸低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

镜下可见大鼠 β -EP、ACTH 细胞阳性物质位于胞浆和 (或) 胞核, 呈卵圆形、三角形及多角形, 核周细胞质中可见阳性颗粒, 染色深、排列紧密, 胞质呈棕黄色。表 1 示, 模型组和麝香乌龙丸低、中、高剂量组 ACTH 与 β -EP 表达均明显高于正常组 ($P < 0.01$)。麝香乌龙丸中、高剂量组 ACTH 表达明显低于模型组和麝香乌龙丸低剂量组

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 麝香乌龙丸低、中、高剂量组 β -EP 表达均明显高于模型组 ($P < 0.01$)。麝香乌龙丸中、高剂量组 β -EP 表达均明显高于麝香乌龙丸低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

RA 属中医学“痹证”、“历节病”等范畴。中医学认为本病多由风、寒、湿邪痹阻而成, 《素问·痹论》曰“风寒湿三气杂至, 合而为痹”。邪气滞留肢体筋脉、关节, 经脉闭阻, 不通则痛, 而外邪侵袭机体, 又可因人体的禀赋不同而有寒热转化。麝香圆见于宋代《普济本事方》^[8] 中, 云: “凡是历节及不测疼痛, 一、二服便瘥。”麝香乌龙丸由“麝香圆”开发研制而成, 全方以麝香内透骨髓, 外彻皮肤, 开经络之壅遏, 为君药; 制川乌温阳散寒, 祛风除湿, 为臣药; 地龙、全蝎搜剔络中之风寒湿邪, 发挥通经透络之功效, 且二者药性善走, 可引川乌直达病所, 为佐药; 黑豆健脾益肾, 为使药, 全方共奏温经通络、补肾强骨、行血祛瘀、除湿止痛之功。

目前对 RA 的关节疼痛机理还不十分清楚, 但考虑与下列因素有关: 早期可能由于肌肉痉挛, 局部缺血, 细胞代谢及破坏产物 (组织胺、前列腺素 E_2 等) 的积聚所致; 活动期可由关节内压升高的压迫, 刺激神经末梢引起; 晚期疼痛主要因纤维组织炎症, 刺激神经丛或神经根引起疼痛。此外, RA 疼痛还与患者的精神状态、对疼痛的耐受性有关^[9]。

β -EP 可通过兴奋中脑导水管周围灰质, 激活脑干下行抑制系统, 调节脊髓背角和三叉神经脊束核对伤害刺激的感受程度^[10]。此外, 研究发现 β -EP 可与外周系统中的阿片受体相互作用从而抑制炎症疼痛^[11]。有研究显示, ACTH 可使脑内 5-羟色胺 (5-HT) 代谢产物 5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 增多, 5-HT 更新率加速, 5-HT 含量升高, 从而抑制疼痛^[12]。小鼠腹腔注射 ACTH 后可明显升高痛阈, 且这种镇痛作用存在有量效关系^[13]。

本研究结果显示, 模型组脑垂体内 ACTH、 β -EP 的阳性表达均高于正常组 ($P < 0.01$), 说明炎症性疼痛使 ACTH、 β -EP 的消耗增多, 促使体内合成与释放更多的 ACTH、 β -EP 来对抗疼痛, 使痛与镇痛维持在一个较高的水平, 这是机体对外周伤害性刺激自身的适应性调整。麝香乌龙丸干预后, 垂体 β -EP 的阳性表达较模型组明显升高, 表明麝香乌龙丸可进一步升高 AA 大鼠 β -EP 的表达水平, 从而增大机体的镇痛力度。ACTH 在麝香乌龙丸

中、高组剂量表达较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 推测可能是由于麝香乌龙丸可刺激肾上腺增强其激素分泌功能, 从而负反馈减少了垂体对 ACTH 的分泌与释放, 这与之之前实验研究^[4] 麝香乌龙丸可明显增高 AA 大鼠血清皮质醇含量, 降低血浆 ACTH 含量报道相互印证。

参考文献

- [1] 李瑞昌. 中西医结合治疗类风湿关节炎的系统评价 [J]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [2] 郭明阳, 刘德芳, 杨敏, 等. 重剂速效热痹饮治疗难治性类风湿关节 24 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2013, 54 (15): 1308-1311.
- [3] 王志文, 韩炳生, 贾秀荣, 等. 麝香乌龙丸治疗类风湿性关节炎 150 例疗效观察 [J]. 四川中医, 2000, 18 (4): 18-19.
- [4] 王志文, 张爱国, 袁强, 等. 麝香乌龙丸抗炎及镇痛药理研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18 (3): 584-586.
- [5] 高润成, 王志文, 袁强, 等. 麝香乌龙丸对兔膝关节炎软骨组织形态及 p38MAPK, Caspase-3 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (11): 228-231.
- [6] 许赤多, 戴冽, 汤美安. 大鼠佐剂性关节炎的诱导及观察指标比较 [J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18 (2): 140-

141.

- [7] 薛盟举. 类风湿关节炎的中医实验动物模型及评价 [J]. 中医杂志, 2012, 53 (17): 1512-1515.
- [8] 许叔微. 普济本事方 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 41.
- [9] 翟亚莉. 老年类风湿关节炎患者心理护理浅谈 [J]. 内蒙古中医药, 2011, 30 (2): 153-154.
- [10] Herman BH, Goldstein A. Antinociception and paralysis induce by intrathecal dynorphin A [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1985, 232 (1): 27-32.
- [11] Mousa SA, Shakibaei M, Sitte N, et al. Subcellular pathways of β -endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain [J]. Endocrinology, 2004, 145 (3): 1331-1341.
- [12] 张松, 郭建荣, 张励才. 5-羟色胺 1A 受体与疼痛关系研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17 (10): 627-630.
- [13] 黎海蒂. 促肾上腺皮质激素的痛调制作用研究 [J]. 国外医学 (生理、病理科学与临床分册), 1994, 14 (3): 154-156.
- [14] 张爱国, 王志文, 袁强, 等. 麝香乌龙丸对佐剂性关节炎大鼠激素水平的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28 (15): 1280-1281.

Effects of Shexiang Wulong Pills on the Tissue Morphology of Pituitary Gland and Expressions of ACTH and β -EP in Adjuvant Arthritis Rats

ZHANG Juan¹, WANG Zhiwen¹, CHEN Zhiquan², MENG Fanshuang¹, ZHAO Yanmei¹, XIANG Nan², LI Yiliang², LI Chenjie², DING Chunju²

(1. Hebei United University, Hebei Province 063000; 2. The Affiliated Hospital of Hebei United University)

ABSTRACT Objective To research the analgesic effect and possible mechanism of Shexiang Wulong Pills for rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Sixty Wistar rats were randomized into the normal group, model group and low-dose, middle-dose and high-dose Shexiang Wulong Pills groups, with 12 in each. All rats were injected with complete Freund's adjuvant for modeling except rats in the normal group. From the 15th day of modeling, the low-dose, middle-dose and high-dose Shexiang Wulong Pills groups were gavaged with 0.3, 0.6 and 1.2 g/(kg · d) Shexiang Wulong Pills once daily for 2 weeks. The normal group and model group were gavaged with equal volume of normal saline once daily for 2 weeks. The rats were sacrificed 2 weeks later. The tissue morphology of pituitary was observed under light microscope after HE staining. The expressions of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and β -endorphin (β -EP) in the pituitary were detected with immunohistochemistry. **Results** The tissue morphology of pituitary was not significantly changed. Comparing with the normal group, the expressions of ACTH and β -EP were significantly increased in the model group and low-dose, middle-dose and high-dose Shexiang Wulong Pills groups ($P < 0.01$). Comparing with the model group and low-dose Shexiang Wulong Pills group, the ACTH expression was significantly decreased in the middle-dose and high-dose Shexiang Wulong Pills groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the model group, the β -EP expression was significantly increased in the low-dose, middle-dose and high-dose Shexiang Wulong Pills groups ($P < 0.01$). Comparing with the low-dose Shexiang Wulong Pills group, the β -EP expression was significantly increased in the middle-dose and high-dose Shexiang Wulong Pills groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Shexiang Wulong Pills can regulate the expressions of ACTH and β -EP in the pituitary of RA rats, which may be one of the mechanisms of analgesia.

Keywords Shexiang Wulong Pills; rheumatoid arthritis; adrenocorticotrophic hormone; β -endorphin

(收稿日期: 2013-11-22; 修回日期: 2014-02-01)

[编辑: 王利芬]