

防己黄芪汤对胶原诱导性关节炎小鼠的影响

贾庆运^{1,2,3,4} 王拥军^{1,2,4,5} 梁倩倩^{1,2,4} 施杞^{1,2,4△}

[摘要] 目的:观察防己黄芪汤对Ⅱ型胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠的影响。方法:6~7周龄的DBA/1J小鼠适应性喂养1周后随机分为4组造模,对照组、模型组、甲氨蝶呤组、防己黄芪汤组各10只小鼠。除对照组外,其余小鼠给予牛属Ⅱ型胶原+完全弗氏佐剂进行CIA小鼠第一次免疫,第21天给予牛属Ⅱ型胶原+不完全弗氏佐剂进行加强免疫,次日各组开始给药20 d,每5 d观察小鼠体质量、关节炎指数、足掌厚度、受累肢体数目。结果:与模型组相比,防己黄芪汤组和甲氨蝶呤组对CIA小鼠关节炎指数、足掌肿胀有显著改善作用,差异有统计学意义($P < 0.05$);对CIA小鼠体质量及受累肢体数目的影响,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:防己黄芪汤对CIA小鼠的关节炎症和肿胀有显著改善作用,是治疗类风湿性关节炎的潜在有效方剂。

[关键词] 防己黄芪汤;类风湿性关节炎;CIA小鼠;关节炎指数

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)05-0006-04

Effect of Fangji Huangqi Decoction on Arthritis Mice Induced by Collagen

JIA Qingyun^{1,2,3,4} WANG Yongjun^{1,2,4,5} LIANG Qianqian^{1,2,4} SHI Qi^{1,2,4 △}

¹ Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China;

² Institute of Spine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China;

³ Shandong Rizhao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rizhao 276800, Shandong China;

⁵ Key Laboratory of Physique Theory and Therapy, Shanghai 200120, China;

⁴ School of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China.

Abstracts Objective: To explore the effect of Fangji Huangqi decoction(FJHQD)on arthritis mice induced by type Ⅱ collagen. **Methods:** Six to seven weeks old DBA/1J mice were fed for one week, and then they were randomly divided into four groups; normal control group, model group, methotrexate group, and FJHQD group, 10 mice in each group. The model of collagen induced arthritis(CIA)was established except mice in the normal control group, by the injection of Bovine collagen type Ⅱ and complete Freund's adjuvant for the first immunization. On the day 21th, the mice were received the booster injection by Bovine collagen type Ⅱ and incomplete Freund's adjuvant, and the next day the mice were received administration of corresponding medicines once daily for 20 days. The mice body weight, arthritis index, foot thickness and number of involved limbs were observed every 5 days after treatment. **Results:** Compared with CIA model group, the FJHQD group and methotrexate group have significant improvement on the arthritis index and foot thickness, there were no difference between the weight and the number of involved limbs. **Conclusion:** FJHQD is effective for improving the inflammation and swelling of the joints of the CIA mice, which is an potential effective prescription used for treating rheumatoid arthritis.

Keywords: Fangji Huangqi decoction; rheumatoid arthritis; collagen induced arthritis mice; arthritis index

基金项目:国家自然科学基金重大国际合作项目(81220108027)

国家自然科学基金重点项目(81330085)

¹ 上海中医药大学附属龙华医院(上海,200032)

² 上海中医药大学脊柱病研究所

³ 山东省日照市中医医院

⁴ 上海筋骨理论与治法教育部重点实验室

⁵ 上海中医药大学康复医学院

△通信作者 E-mail: shiqi@hotmail.com

胶原诱导性关节炎(Collagen-induced Arthritis, CIA)是最常用的类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)的动物模型,其在临床症状和病理表现方面与类风湿性关节炎极为相似或相同(诸如关节滑膜增生、关节翳形成和软骨破坏等),因此,CIA是研究RA较为理想和常用的动物模型^[1-4]。防己黄芪汤首见于《金匱要略》,是治疗“风湿水肿”的代表方剂,临床上广泛用于治疗类风湿性关节炎、骨折术后肿胀、强直性脊柱炎等疾病^[5-7],其消除关节肢体肿胀的作用尤为显著^[8-10]。为探讨防己黄芪汤对类风湿性关节炎关节

肿胀的疗效,本研究以胶原诱导性关节炎小鼠为 RA 模型,通过观察防己黄芪汤对 CIA 小鼠的改善情况,进一步为临床应用本方提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 DBA/1J 小鼠,40 只,6~7 周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于上海中医药大学实验动物中心。

1.2 试剂及药物

牛Ⅱ型胶原(Bovine Type II Collagen)(Chondrex Inc 公司,20021),完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant)(Chondrex Inc 公司,CAT7009),不完全弗氏佐剂(Incomplete Freund's Adjuvant)(Chondrex Inc 公司,CAT7002),甲氨蝶呤(上海东方药品科技实业有限公司,货号 100138),防己黄芪汤(药物组成:防己 12 g,黄芪 15 g,白术 9 g,甘草 6 g)。所有中药均购自上海中医药大学附属龙华医院中药房。

1.3 仪器

匀浆机,电子天平,游标卡尺,制冰机等。

1.4 方法

1.4.1 药物制备 将小鼠(20 g)与人(60 kg)的常规中药用量进行换算(换算系数 9.01),则小鼠所服中药复方(42 g)煎剂浓度为 1.26 g/mL,取上述中药 5 剂,加 12 倍水(2 520 mL),浸泡 30 min,煮沸后继续煎煮 30 min,即刻以消毒纱布 2 层过滤得煎液 1;所余药渣再加 8 倍水(1 680 mL),重复以上步骤得煎液 2;将煎液 1 与煎液 2 混合,于通风橱中加热浓缩至 167 mL,得防己黄芪汤煎剂,−80 ℃ 冰箱保存。取甲氨蝶呤 3 mg 溶解于 30 mL 生理盐水中,制成甲氨蝶呤溶液,浓度为 0.1 mg/mL。

1.4.2 CIA 小鼠模型的建立 6~7 周龄的 DBA/1J 小鼠适应性喂养 1 周后随机分组造模,每组 10 只小鼠,除 10 只正常对照组外,其余 30 只小鼠造模。将 10 mg 牛Ⅱ型胶原溶于 0.01 mol/L 的醋酸溶液 5 mL,4 ℃ 摇床过夜,取 5 mL 含 2 mg/mL 的完全弗氏佐剂等体积混合,20 mL 注射器连接装置 4 ℃ 来回抽吸 2 000 次充分乳化,制得抗原乳剂,并置 4 ℃ 冰箱保存备用。首次免疫于小鼠尾根部皮下注射Ⅱ型胶原乳剂 0.1 mL,造模第 21 天取 0.1 mL Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂混合的乳剂加强免疫 1 次;正常组同法注射等体积生理盐水。

1.4.3 动物分组及给药 30 只小鼠第 2 次免疫后随机分成 3 组,每组 10 只小鼠。第 2 次免疫后第 1 天开始给药,防己黄芪汤组给予 0.1 mL 中药灌胃,甲氨蝶呤组给予 0.1 mL 甲氨蝶呤溶液,正常对照组和模型组给予 0.1 mL 生理盐水灌胃,各组连续给药 20 d。

1.4.4 指标检测 体质量:小鼠于造模第 0,5,10,15,20,25,30,35 及 40 天测体质量。

关节炎指数:小鼠给药后第 0,5,10,15 及 20 天关

节炎症指数评分,评分标准^[11,12]:0 分,没有明显的关节红肿;1 分,踝关节或趾关节轻度红肿;2 分,从趾关节到踝关节轻度红肿;3 分,从趾关节到踝关节中度红肿;4 分,严重的踝关节到整个足掌的红肿。每只小鼠最高评分 16 分。

足掌厚度:小鼠给药后第 0,5,10,15 及 20 天选取肿胀的足掌测肿胀的厚度,用游标卡尺选取肿胀最甚处测量。

受累足掌数:小鼠给药后第 0,5,10,15 及 20 天记录小鼠受累足掌数,每只小鼠最高评分 4 分。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件,统计结果采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 防己黄芪汤对 CIA 小鼠体质量的影响

与正常对照组相比,各造模组小鼠体质量均有不同程度的降低,治疗后各组体质量均较模型组降低减少,各组间体质量差异无统计学意义($P = 0.171 > 0.05$),见图 1。

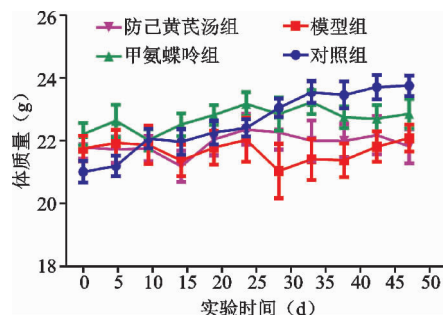


图 1 防己黄芪汤对 CIA 小鼠体质量的影响

2.2 防己黄芪汤对 CIA 小鼠关节炎指数的影响

第 2 次免疫后第 2 天开始,模型组小鼠开始炎症反应期,前后足踝关节开始红肿,关节炎指数明显增加,治疗 20 d 后,与模型组相比防己黄芪汤组和甲氨蝶呤组显著降低小鼠关节炎指数(防己黄芪汤组与模型组比较, $P = 0.046 < 0.05$;甲氨蝶呤组与模型组比较, $P = 0.014 < 0.05$),见图 2。

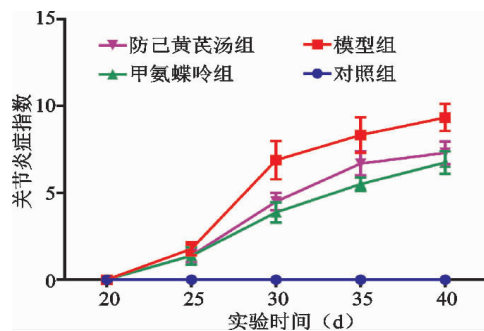


图 2 防己黄芪汤对 CIA 小鼠关节炎指数的影响

2.3 防己黄芪汤对 CIA 小鼠足掌肿胀厚度的影响

第 2 次免疫后,与对照组相比各模型组小鼠出现不同程度足掌肿胀,治疗 20 d 后,与模型组相比防己黄芪汤组和甲氨蝶呤组显著降低小鼠足掌的肿胀厚度

(防己黄芪汤组与模型组比较, $P=0.001<0.05$; 甲氨

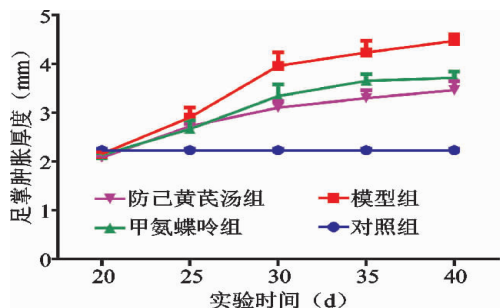


图3 防己黄芪汤对 CIA 小鼠足掌肿胀厚度的影响

蝶呤组与模型组比较, $P=0.001<0.05$), 见图 3-5。

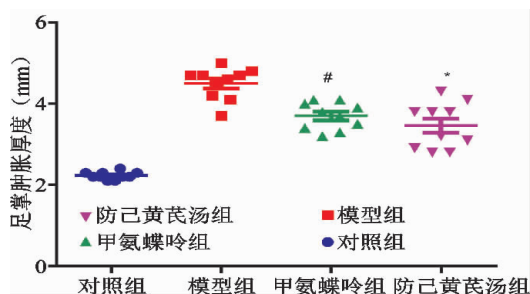


图4 治疗第 20 天, 防己黄芪汤对 CIA 小鼠足掌肿胀厚度的影响

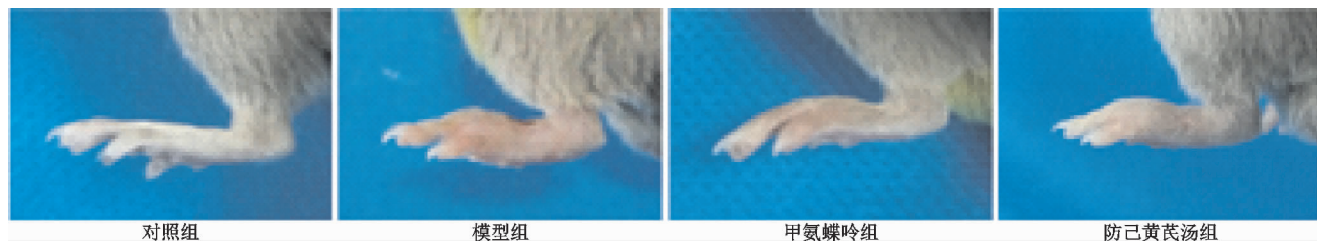


图5 治疗第 20 天, 防己黄芪汤对 CIA 小鼠足掌肿胀厚度影响的代表性图片

2.4 防己黄芪汤对 CIA 小鼠受累肢体数的影响

第 2 次免疫后, 与对照组相比各模型组小鼠出现肢体的肿胀; 与模型组相比, 各组间小鼠受累肢体数轻度减少, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 6。

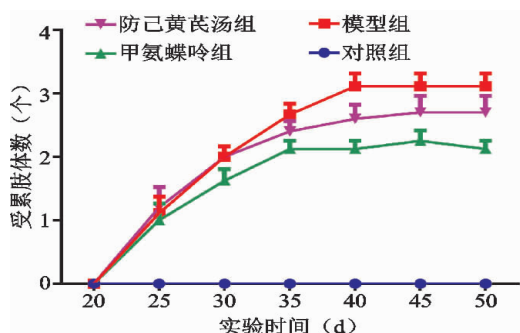


图6 防己黄芪汤对 CIA 小鼠受累肢体数的影响

3 讨论

防己黄芪汤方首见于《金匮要略》, 原文曰: “风湿, 脉浮、身重, 汗出恶风者, 防己黄芪汤主之。” “风水, 脉浮身重, 汗出恶风者, 防己黄芪汤主之。腹痛加芍药。” 防己黄芪汤是治疗风寒湿痹证中湿痹的有效方剂。此方历代多用于水证、汗证、痛痹、伤湿等, 现代研究表明, 防己黄芪汤对于治疗各种疾病导致的肢体肿胀、腹水、水肿疗效颇佳^[13-18]。同时防己黄芪汤对于治疗骨性关节炎、类风湿性关节炎、骨折术后水肿等也有良好的疗效^[5-7, 10, 19-22]。

类风湿性关节炎是以对称性多关节滑膜炎为主要表现的慢性、进行性、系统性自身免疫疾病, 其主要的病理表现为外周小关节滑膜的炎症, 继而导致关节软骨、骨的破坏, 最终导致关节的强直、畸形等功能障碍^[23], 因此控制关节炎滑膜的炎症是治疗 RA 的关键^[24, 25]。胶原诱导性关节炎小鼠模型 (CIA 模型) 是

目前应用较广泛和成熟的动物实验模型, 其在外在体征、发病机制、病理改变及实验室指标等方面与人类类风湿关节炎 (RA) 相似, 是目前最适合用于研究人类 RA 的动物模型^[12]。因此, 通过观察防己黄芪汤对 CIA 模型体质量、关节炎指数、足掌肿胀厚度、受累肢体数的影响, 从而验证防己黄芪汤对 CIA 小鼠关节炎症的治疗作用。

本研究表明, 防己黄芪汤可有效减轻 CIA 小鼠的肿胀厚度, 降低关节炎指数, 从而发挥其抗炎作用, 同时防己黄芪汤对 CIA 小鼠的体质量和受累肢体数无明显的影响。综上所述, 防己黄芪汤可有效缓解 CIA 小鼠的关节炎症, 是治疗 RA 的有效方剂。

参考文献

- [1] Cho YG, Cho ML, Min SY, et al. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis [J]. Autoimmun Rev, 2007, 7(1): 65-70.
- [2] Durie FH, Fava RA, Noelle RJ. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1994, 73(1): 11-18.
- [3] Hegen M, Keith JC, Jr, Collins M, et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(11): 1505-1515.
- [4] Marcinska K, Szczepanik M. Mechanisms involved in the regulation of immune response in animal model of rheumatoid arthritis in mice (CIA) [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2010, 64: 372-385.
- [5] 陈桂香. 防己黄芪汤合独活寄生汤加减治疗类风湿性关节炎 32 例疗效观察 [J]. 中医药导报, 2012, 18(4): 58-59.
- [6] 陈笑媚, 温天燕, 陈远林, 等. 乌头汤合防己黄芪汤对活动期强直性脊柱炎患者血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 的影响 [J].

- 今日药学,2015,25(7):491-493.
- [7] 张巍琼,李东云,吴洋. 吴洋教授运用防己黄芪汤治疗风湿病验案举隅[J]. 风湿病与关节炎,2014,3(3):46-48.
- [8] 段建辉,王健,李光辉,等. 桃红四物汤合防己黄芪汤治疗下肢骨折术后肿胀 94 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志,2013,29(9):79-80.
- [9] 王腾腾,陈岩,李金龙,等. 防己黄芪汤通过促进淋巴管生成及回流功能改善关节肿胀的研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(5):1961-1965.
- [10] 杨冬. 骨伤后期肢体肿胀行血府逐瘀汤合防己黄芪汤加减治疗的疗效观察[J]. 当代医学,2015,21(23):150-151.
- [11] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis[J]. Nat Protoc,2007,2(5):1269-1275.
- [12] Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, et al. Collagen-induced arthritis[J]. Curr Protoc Immunol,2010,15(5):1-25.
- [13] 藏明德. 防己黄芪汤加减用于治疗心源性水肿的观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2016,4(33):142.
- [14] 何彪,白鹏飞,周涛,等. 防己黄芪汤合五皮饮加味治疗肝硬化腹水 30 例临床观察[J]. 河北中医,2014,36(10):1487-1488.
- [15] 李晶洁,邢铁艳. 防己黄芪汤加减治疗乳腺癌术后患肢水肿的疗效观察[J]. 陕西中医,2016,37(7):806-807.
- [16] 陆海霞. 防己黄芪汤治疗原发性肾病综合征水肿期疗效观察[J]. 内蒙古中医药,2016(14):38-39.
- [17] 罗东,张家衡,柯有力. 防己黄芪汤对兔肺缺血再灌注后肺水肿的保护作用[J]. 吉林中医药,2014,34(8):829-831.
- [18] 吴晓娟,刘阳阳,张飞龙. 猪苓汤合防己黄芪汤治疗肝硬化腹水临床研究[J]. 河南中医,2015,35(11):2664-2666.
- [19] 曾维铨. 防己黄芪汤合防风补骨方治疗膝关节骨性关节炎 35 例[J]. 现代中医药,2016,36(2):31-32.
- [20] 费宝国. 血府逐瘀汤合防己黄芪汤加减治疗骨伤后期肢体肿胀 102 例[J]. 陕西中医,2013,34(7):843.
- [21] 华英. 防己黄芪汤合四物汤治疗老年性类风湿性关节炎的体会[J]. 浙江中医杂志,2015,50(4):300.
- [22] 梁洪宾,李金松. 四妙散合防己黄芪汤加减治疗膝关节滑膜炎疗效观察[J]. 山西中医,2015,31(12):38-39.
- [23] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet,2010,376(9746):1094-1108.
- [24] Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, et al. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Research & Therapy,2017,19(1):110.
- [25] Neumann E, Lefevre S, Zimmermann B, et al. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts[J]. Trends Mol Med,2010,16(10):458-468.

(收稿日期:2017-09-03)

(上接第 5 页)

- [17] Yang J, Zhou Q, Wang Y, et al. Effect of high glucose on PKC and MMPs/TIMPs in human mesangial cells[J]. Journal of Central South University, 2009, 34(5):425-431.
- [18] Cholas R, Hsu HP, Spector M. Collagen scaffolds incorporating select therapeutic agents to facilitate a reparative response in a standardized hemiresection defect in the rat spinal cord[J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(19-20):2158-2172.
- [19] Badner A, Vawda R, Laliberte A, et al. Early intravenous delivery of human brain stromal cells modulates systemic inflammation and leads to vasoprotection in traumatic spinal cord injury[J]. Stem Cells Translational Medicine, 2016, 5(8):911-1003.
- [20] Nd HE, Zou Y. Reinduced Wnt signaling limits regenerative potential of sensory axons in the spinal cord following conditioning lesion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(36):14663-14668.
- [21] Vilariño-Feltre G, Martínez-Ramos C, Monleón-de-la-Fuente A, et al. Schwann-cell cylinders grown inside hyaluronic-acid tubular scaffolds with gradient porosity[J]. Acta Biomaterialia, 2016, 30:199-211.
- [22] Xu T, Yang MK, Sheng WB, et al. Role of telomerase reverse transcriptase in glial scar formation after spinal cord injury in rats[J]. Neurochem Res, 2013, 38(9):1914-1920.
- [23] Hu R, Zhou J, Luo C, et al. Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury[J]. J Neurosurg Spine, 2010, 13(2):169-180.
- [24] Zhang YK, Liu JT, Peng ZW, et al. Different TLR4 expression and microglia/macrophage activation induced by hemorrhage in the rat spinal cord after compressive injury[J]. J Neuroinflammation, 2013, 10(1):881.
- [25] 张文贤,吕江宏,白登彦,等. 中药银杏叶提取物联合腺病毒介导神经生长素-3 基因的神经干细胞移植治疗急性脊髓损伤的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(5):16-18.
- [26] 李东哲. 川芎嗪对大鼠急性脊髓损伤后微血管及胶原成分的影响[D]. 长沙:中南大学, 2014.
- [27] 俞天虹,潘华阳. 补阳还五汤及其拆方对脑缺血大鼠神经功能及血管生成的影响[J]. 中国脑血管病杂志, 2017, 14(2):87-93.
- [28] 邱文. SublyticC5b-9 诱导 GMCs 增殖和 ECM 分泌的机制研究[D]. 南京:南京医科大学, 2009.

(收稿日期:2017-10-14)