

宽筋藤对类风湿性关节炎模型大鼠踝关节组织病理学的影响

曾聪彦*, 吴凤荣, 戴卫波, 高玉桥, 梅全喜

广州中医药大学附属中山中医院, 中山 528400

摘要: 为了观察宽筋藤对弗氏完全佐剂(CFA)诱导的佐剂性关节炎(AA)大鼠踝关节组织病理改变的影响, 除正常组外, 其余各组大鼠足跖皮内注射CFA致AA大鼠模型, 将模型大鼠随机分成模型组、宽筋藤高剂量组、宽筋藤中剂量组、宽筋藤低剂量组、阳性药物组, 灌胃给药20 d, 观察各组大鼠继发侧足爪肿胀度及踝关节滑膜、软骨、关节腔、周围软组织炎症反应等组织病理改变情况, 进行综合评分。实验结果表明, 与模型组比较, 宽筋藤能减轻AA大鼠关节肿胀程度, 并显著抑制炎症细胞的浸润和滑膜增生以及血管翳的形成, 减轻软骨及骨质损伤程度($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验证明, 宽筋藤可显著改善AA大鼠踝关节组织病理改变。

关键词: 宽筋藤; 佐剂性关节炎; 组织病理学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.028

Effects of *Caulis Tinosporae sinensis* on Histopathology of Ankle Tissue in Rheumatoid Arthritis Rats

ZENG Cong-yan*, WU Feng-rong, DAI Wei-bo, GAO Yu-qiao, MEI Quan-xi

Zhongshan Hospital of TCM Affiliated University of TCM of Guangzhou, Zhongshan 528400, China

Abstract: The objective of study was to observe the effect of *Caulis Tinosporae sinensis* on pathological changes of ankle tissue in rats with adjuvant arthritis (AA) which are induced by Freund's complete adjuvant (CFA). Except for the normal control group, all rats were injected CFA through plantar subcutaneous injection to induce the AA. Rats with AA were randomly divided into five groups: model group, high-, middle- and low-dose *Caulis Tinosporae sinensis* group, positive control group. The rats in each group were respectively treated with corresponding medicine for 20 days. Secondary foot claw degree of swelling was examined by vlume method. The ankle tissue was examined under microscope to evaluate the pathological changes of synovium, cartilage and articular cavity as well as soft tissue inflammation. The experimental results showed that *Caulis Tinosporae sinensis* can reduce secondary foot claw degree of swelling and significantly inhibit the hyperplasia of synovial membrane and the infiltration of inflammatory cells and the formation of pannus, and reduce cartilage injury as compared with the model group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). Finally, it was concluded that *Caulis Tinosporae sinensis* can significantly inhibit pathological changes of ankle tissue in rats with AA.

Key words: *Caulis tinosporae sinensis*; adjuvant arthritis; histopathology

宽筋藤为防己科植物中华青牛胆 *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr. 的干燥茎藤, 具有舒筋活络, 祛风止痛的功效, 主治风湿痹痛, 筋脉拘挛, 屈伸不利, 跌打损伤^[1], 为广东、广西、云南民间习用地产药材。前期研究发现宽筋藤具有明显的抗炎镇痛作用^[2], 对风湿关节骨痛、骨性关节炎、腰腿疼痛等症状有较为明显疗效^[3]。本研究通过建立CFA诱导的AA大鼠模型, 观察宽筋藤对AA大鼠踝关节组

织病理改变的影响, 探讨宽筋藤抗类风湿关节炎的作用机理, 为其临床治疗类风湿提供科学实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠, 雄性, 体重 170 ± 20 g, 由广东省实验动物中心提供[动物合格证号: SCXK(粤)2013-0034]。

1.2 主要药品与试剂

宽筋藤[亳州市毫广中药饮片有限公司, 批号: 20131201, 经中山市中医院梅全喜教授鉴定为 *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr. 的干燥茎藤]; 卡介苗

收稿日期: 2016-08-08 接受日期: 2016-09-29

基金项目: 广东省中山市科技计划(2014A1FC138)

* 通讯作者 Tel: 86-760-89980213; E-mail: zszcy@126.com

(BCG,北京生物制品研究所,批号:201506DG);甲氨蝶呤(上海信谊药厂有限公司,批号:036140901);液体石蜡(广东恒健制药有限公司,批号:140102);0.9% NaCl 注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号:B14012712);甲醛溶液(西陇化工股份有限公司,批号:100920);苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)。

1.3 主要仪器

足容积测量仪(2450型,ALMEMO公司);旋转蒸发仪(上海研承仪器有限公司);SHZ-DC III 循环水式真空泵(上海予华仪器设备有限公司);HS-4型水浴锅(华利达公司);BX-50型显微镜(日本Olympus)。

2 实验方法

2.1 受试药物制备

宽筋藤药材粉碎成粗粉,加8倍量70%乙醇浸泡2h,水浴回流提取3次,每次2h。合并提取液,旋转蒸发仪(65℃)回收乙醇至无醇味,加蒸馏水配制含宽筋藤生药量2g/mL的药液,放入2~10℃冰箱中冷藏备用。

2.2 CFA 的制备

液体石蜡用100 mL小蓝盖广口瓶盛,按液体程序灭菌处理。研钵用报纸包裹,高压灭菌。BCG带包装置于恒温水浴箱中80℃1h进行灭活处理。将灭菌及灭活后的液体石蜡、研钵及BCG于洁净工作台上配制弗氏完全佐剂^[4]。用无菌注射器抽取10 mL液体石蜡加入研钵中,倒入100 mg BCG,顺时针方向研磨,研磨至乳化状态,用10 μL的无菌枪头吸取CFA滴入玻璃杯盛放的清水里出现滴水成珠现象为止,即乳液滴漂浮于水面不扩散。制成CFA中的BCG含量为50 mg/mL。

2.3 AA 模型建立

48只SD大鼠适应性饲养1周后,随机留取8只作为空白对照组,其余40只接受CFA造模,即在酒精擦拭大鼠左后足跖部位消毒后,于左侧足跖肉垫处皮内注射100 μL CFA/只^[5]。至造模15 d,对侧关节出现炎症,视为造模成功;空白对照组大鼠以同样方式注射0.9%氯化钠注射液100 μL/只。

2.4 分组及给药

留取的8只继续作为空白对照组;将40只造模成功大鼠随机分成模型组、甲氨蝶呤组(0.5 mg/kg)、宽筋藤高剂量组(10.8 g/kg)、宽筋藤中剂量组

(4 g/kg)、宽筋藤低剂量组(2.7 g/kg)共5组,宽筋藤各剂量组每天灌胃一次,甲氨蝶呤组则每隔两天灌胃一次,空白对照组和模型组每天灌胃生理盐水(1 mL/100 g)一次,连续灌胃20 d。

2.5 观察指标

2.5.1 一般症状的观察

每天观察并记录动物的体征状态,包括关节、毛色光泽、活动状态、精神状态、饮食状态等方面变化。

2.5.2 继发侧足爪肿胀度

致炎前用足容积测量仪测量每只大鼠右后足的体积(测到踝关节以下部位),从致炎后第15 d起(记D15),每隔5天测量一次(D15、D20、D25、D30、D35)右后足的肿胀体积,求大鼠继发侧足肿胀度($\Delta V = \text{致炎后的足体积} - \text{致炎前的足体积}$)^[6]。

2.5.3 病理组织学检查^[6]

于末次给药1 h后,颈椎脱臼处死大鼠,取其踝关节置10%甲醛溶液固定,纵向沿中间切开成两半,放入脱钙剂中。脱钙后常规石蜡包埋,切片厚5 μm,经HE染色后,用常规显微光镜检查大鼠踝关节组织病理切片,从滑膜细胞增殖、炎性细胞浸润、细胞侵蚀、骨质侵蚀、血管翳形成进行分项评分^[7]。滑膜组织细胞增殖的评分细则:0分为无滑膜细胞增殖;1分为2~4层滑膜细胞,轻微增殖;2分为4层以上滑膜细胞,中度增殖,3分为滑膜细胞过度增殖,侵蚀软骨和骨,关节间隙消失。炎性细胞浸润评分细则:0分为正常;1分为轻度炎性细胞浸润,可见少数分散的白细胞浸润;2分为中度炎性细胞浸润,可见2个或2个以上的白细胞聚集物;3分为重度炎性细胞浸润,可见白细胞融合、分散浸润明显。血管翳形成评分细则:0分为无血管翳生成;1分为有两个部位出现血管翳;2分为有四个部位出现血管翳;3分为有四个以上部位出现血管翳。骨质侵蚀评分细则:0分为正常;1分为有小量骨质侵蚀,可见到1~2个小小的浅部位;2分为有少量的骨质侵蚀,可见到1~4个中等大小和深度部位凹陷;3分为有中等侵蚀,可见到5个以上部位局部侵蚀到骨的皮质;4分为有重度的骨侵蚀,可见局部或者完全的侵蚀到骨皮质。分值越高表示损伤越严重,反之表示损伤轻。

2.6 统计学处理

使用SPSS19.0统计分析软件对实验结果进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 或0.01有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般症状

注射 CFA 侧的大鼠足跖部位开始出现肿胀,行动不便,饮食减少等症状。3~5 d 内肿胀持续,第 5~8 d 大部分大鼠致炎侧足掌逐渐消肿,第 11~15 d 致炎的大鼠陆续出现继发四肢及全身的局部炎症,第 15 d 时,较严重的 AA 大鼠现出四肢关节僵硬,尾部及耳部出现红点结节,个别大鼠生殖器也出现炎

症,AA 大鼠整体毛色枯燥黯淡,行动障碍,体重明显减轻,表明动物模型制作成功。经宽筋藤治疗后的大鼠在关节肿胀、灵活性、毛色、饮食等方面均有所改善。

3.2 对继发侧关节肿胀度的影响

实验结果表明,与模型组比较,甲氨蝶呤组在 D30 和 D35 组分别有极显著和显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),宽筋藤各组虽均无显著性差异,但关节肿胀度都有减轻的趋势。见表 1。

表 1 宽筋藤对继发侧关节肿胀度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 The effects of *Caulis tinosporae sinensis* on secondary foot claw degree of swelling ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别 Group	继发侧足爪肿胀度 Secondary foot claw degree of swelling				
	D15	D20	D25	D30	D35
模型组 Model	0.47 ± 0.43	0.86 ± 0.52	0.80 ± 0.52	0.91 ± 0.63	0.84 ± 0.68
阳性组 Positive control	0.37 ± 0.28	0.61 ± 0.49	0.42 ± 0.28	0.24 ± 0.26 **	0.38 ± 0.21 *
高剂量组 High-dose	0.55 ± 0.44	0.85 ± 0.49	0.73 ± 0.36	0.51 ± 0.32	0.51 ± 0.30
中剂量组 Middle-dose	0.36 ± 0.33	0.73 ± 0.55	0.92 ± 0.71	0.80 ± 0.49	0.78 ± 0.38
低剂量组 Low-dose	0.33 ± 0.40	0.50 ± 0.43	0.67 ± 0.57	0.66 ± 0.47	0.61 ± 0.45

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ 。

Note:compared with model group,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$.

3.3 各组大鼠踝关节病理改变

佐剂性关节炎大鼠踝关节组织损伤的病理图见图 1。正常大鼠关节纤维性滑膜上皮细胞排列整齐,滑膜上皮细胞脂肪性细胞(1~2 层)排列整齐;AA 模型大鼠关节滑膜上皮复层增生,间质水肿,炎

性细胞浸润,滑膜上皮复层上皮绒毛状增生,伴炎细胞浸润;严重者关节软骨层破坏,血管翳形成侵蚀软骨层组织,且破骨细胞增多,侵蚀、溶解全层骨组织;而甲氨蝶呤组、宽筋藤各剂量组 AA 大鼠的病理状况较模型组均有所减轻。

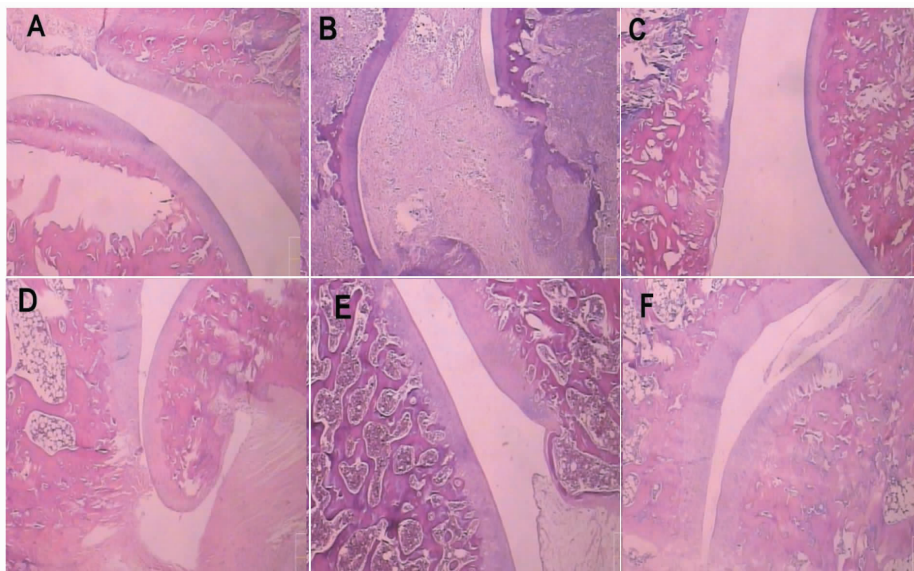


图 1 正常组(A)、模型组(B)、阳性组(C)、高剂量组(D)、中剂量组(E)及低剂量组(F)大鼠踝关节组织病理学变化(HE 染色,100×)

Fig. 1 Ankle joint histopathological changes in rats of normal group (A), model group (B), positive control group (C), high-dose group (D), middle-dose group (E) and low-dose group (F) (HE staining, 100×)

3.4 各组大鼠踝关节组织病理改变程度评分比较

踝关节组织病理评分结果表明,与模型组比较,甲氨蝶呤组、宽筋藤高、中剂量对踝关节滑膜细胞增殖抑制作用显著($P < 0.01$);在抑制细胞侵蚀的病理上,甲氨蝶呤组、宽筋藤中剂量组有显著抑制作用

显著($P < 0.05$);在抑制血管翳形成方面,各给药组都有明显抑制效果($P < 0.01$);炎性细胞浸润及骨侵蚀方面,各给药组均有显著抑制作用($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠踝关节病变程度评分($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 The ankle joint histopathological scores assessment on AA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	踝关节病变程度评分 Ankle joint histopathological scores				
	滑膜细胞增殖	细胞侵蚀	血管翳形成	炎性细胞浸润	骨侵蚀
模型组 Model	2.17 ± 0.98	2.00 ± 1.10	2.00 ± 1.09	2.17 ± 0.98	2.17 ± 1.17
阳性组 Positive control	0.67 ± 0.52 **	0.83 ± 0.98 *	0.17 ± 0.41 **	0.83 ± 0.41 *	0.17 ± 0.41 **
高剂量组 High-dose	0.83 ± 0.41 **	1.00 ± 0.63	0.83 ± 0.41 **	1.17 ± 0.41 *	0.50 ± 0.55 *
中剂量组 Middle-dose	0.83 ± 0.75 **	0.83 ± 0.75 *	0.33 ± 0.52 **	1.00 ± 0.63 *	0.33 ± 0.52 *
低剂量组 Low-dose	1.33 ± 0.52	1.17 ± 0.75	0.67 ± 0.52 **	1.33 ± 0.52 *	0.50 ± 0.54 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: compared with model group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

4 讨论与结论

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以累及周围关节为主的多因素慢性炎症性疾病。现代医学认为RA的主要发病机制是免疫紊乱,其主要病理变化主要体现在四肢关节组织病理的改变,其病理特主要表现为关节肿胀,关节滑膜细胞增生,滑膜组织充血水肿,粒细胞和单核巨噬细胞等炎性细胞浸润,相继关节内肉芽组织微血管新生形成血管翳,侵蚀关节软骨和软骨下骨,导致关节软骨细胞出现不同程度的退行性变,严重处软骨坏死、脱落,造成关节破坏、畸形和功能丧失^[8]。本研究采用CFA诱导的AA大鼠模型,其组织病理学改变就包括关节滑膜的细胞增生和以粒细胞、淋巴细胞浸润为主的滑膜炎并有血管翳形成,关节软骨和骨组织破坏导致关节纤维性强直,这些组织病理学特点与人类RA非常相似,且该模型制作方法简单,目前已成为公认的反映RA发病机制较理想动物实验模型^[9,10]。

本实验结果显示,与正常组比较,模型组病变最重,多数大鼠关节有不同程度的肿胀,踝关节组织有程度不等的病理改变,宽筋藤各剂量组大鼠继发侧关节肿胀程度有减轻的趋势;并明显改善AA大鼠踝关节组织病理损害,表现为减轻大鼠踝关节滑膜细胞增生、炎性细胞浸润、血管翳形成,使关节软骨破坏较轻、纤维化不严重,周围软组织炎症反应较

少,提示宽筋藤能有效地抑制关节滑膜细胞增殖,滑膜组织水肿,炎性细胞浸润,血管翳形成,骨侵蚀,从而减轻关节滑膜炎反应以及关节软骨的损伤,保护关节。由此可看出,宽筋藤对类风湿关节炎能显现良好的治疗作用。

参考文献

- Guangdong Food and Drugs Administration (广东省食品药品监督管理局编著). Standard of Traditional Chinese Medicine of Guangdong, Vol. 1 (广东省中药材标准). Guangdong: Guangdong Science and Technology Press, 2004. 183.
- Wu FR (吴凤荣), Zeng CY (曾聪彦), Dai WB (戴卫波), et al. Analgesia and anti-inflammation effects of *Caulis Tinosporae sinensis* aqueous extract. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2016, 34: 1775-1777.
- Wu FR (吴凤荣), Zeng CY (曾聪彦), Dai WB (戴卫波), et al. Research progress on pharmacological effects and clinical applications of *Caulis Tinosporae sinensis*. *China License Pharm* (中国执业药师), 2014, 11: 37-40.
- Chang Y (常艳), Qin Q (秦琼), Wu YJ (吴育晶), et al. Immunomodulatory effects of TACI-Ig on T cell responses in rats with adjuvant-induced arthritis. *Acta Univ Med Anhui* (安徽医科大学学报), 2014, 49: 935-940.
- Chang Y, Wu Y, Wei W, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis via attenuating inflammatory responses. *Rheumatology*, 2011, 50: 862-870.
- Li PP (李培培), Xie GX (解国雄), Song SS (宋珊珊), et al. Clinical manifestations and the main evaluation method on

adjuvant-induced arthritis model in rats. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2012, 28: 453-457.

- 7 Wang D, Chang Y, Wei W, *et al.* Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2011, 163: 225-234.
- 8 Jing Y (荆云), Du YK (杜瀛琨), Xu LY (许立跃), *et al.* Effects of Tongbi Zhitong capsule on histopathology of ankle tissue in adjuvant arthritis rats. *J Shanxi Coll Tradit Chin*

Med (陕西中医学院学报), 2008, 31: 64-65.

- 9 Zhou JH (周金黄). *Pharmacology Progress* (药理学进展). Beijing: People's Medical Publishing House, 1982. 176, 197.
- 10 Zhao XH (赵欣华). Influences of Bitongling granule on rheumatoid arthritis rats. *Gansu J Tradit Chin Med* (甘肃中医), 2009, 22: 62-63.

(上接第 124 页)

- 11 Bian MH (边名鸿), Zuo Y (左勇), Zong XY (宗绪岩), *et al.* Research on the dynamics model of Coptis extraction. *J Sichuan Univ Sci Eng, Nat Sci* (四川理工学院学报, 自科版), 2012, 4: 26-29.
- 12 Liu WM (刘伟民). Studies on the preparation of Semen Cassiae Prescription granules and kinetics of extraction process. Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), MSc. 2010.
- 13 Zhao P (赵平), Song XJ (宋学娟), Zhang YP (张月萍), *et al.* Extraction kinetics of grape seed procyanidins. *Food Sci* (食品科学), 2010, 1: 110-112.

- 14 Li D (李冬), Li WH (李稳宏), Lian YY (廉媛媛), *et al.* Kinetics on the extraction of total flavonoids from infructescence of *Platycarya strobilacea* Sieb. et Zucc. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 689-692.
- 15 Wang W (王维), Dai XY (戴晓燕). Kinetics on extraction of iridoid glycosides from *Ajuga Decumbens*. *Chin J MAP* (中国现代应用学), 2012, 9: 808-811.
- 16 Liu P (刘沛), Liu CZ (刘翠哲). Influence of pH Value of the solution on the extraction of active components from *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Chin Pharm* (中国药房), 2011, 11: 1017-1019.

(上接第 134 页)

- 14 Wu JR (吴嘉瑞), Zhang B (张冰), Zhang GM (张光敏). A review on pharmacological action of *Phellodendri amurensis* Cortex. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2009, 5: 160-162.
- 15 Ren WQ (任卫琼), Ouyang R (欧阳荣), Chen YC (陈迎春), *et al.* Comparison of the *in vitro* release characteristics of berberine hydrochloride in YSS liposome gel and ointment. *Herald Med* (医药导报), 2015, 34: 1519-1521.
- 16 Ren Y (任焯), Xu H (徐辉), Ge ZY (葛争艳), *et al.* Content determination of berberine hydrochloride in Jiangtang Xiaozhi Tablets by HPLC. *China Pharm* (中国药房), 2015,

26: 2530-2532.

- 17 Qian W (钱伟), Wang MZ (汪明志). Determination of berberine hydrochloride in Chuangshu lotion by HPLC. *Hebei J Tradit Chin Med* (河北中医), 2012, 34: 272-279.
- 18 Gao Y (高源). Study on grading specifications and quality evaluation of *Phellodendron chinense* and its pieces. Chengdu: Chengdu university of TCM (成都中医药大学), MSc. 2010.
- 19 Xu S (徐珊), Zhang F (张凡), Liu PP (刘蓬蓬), *et al.* HPLC fingerprint analysis among different processed products of *Phellodendri chinensis* Cortex. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21: 10-13.

(上接第 146 页)

- 19 Roberfroid MB, Cumps J, Devogelaer JR. Dietary chicory inulin increases whole-body bone mineral density in growing male rats. *J Nutr*, 2002, 132: 3599-3602.
- 20 Verghese M, Rao DR, Chawan CB, *et al.* Dietary inulin suppresses azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colon tumors at the promotion stage in young Fisher 344 rats. *J Nu-*

tr, 2002, 132: 2809-2813.

- 21 Fujihara K, Suzuki H, Sato A, *et al.* Carotid artery plaque and LDL-to-HDL cholesterol ratio predict atherosclerotic status in coronary arteries in asymptomatic patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscl Thrombosis*, 2013, 20: 452-464.