

· 论著 ·

〔文章编号〕 1007-0893(2020)24-0001-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2020.24.001

活络通痹丸对类风湿性关节炎大鼠 关节保护效应的实验研究

郑宝林 李 婷 梁建亮

(佛山市中医院, 广东 佛山 528000)

〔摘要〕 目的: 探究活络通痹丸对类风湿性关节炎大鼠关节的保护效应作用和机制。方法: 本研究选取了 50 只清洁级 Wistar 大鼠, 将 50 只大鼠根据体质量进行随机分组, 10 只一组分成五组: 正常组、模型组、甲氨喋呤组、活络通痹丸中剂量组和活络通痹丸高剂量组。结果: 和正常组大鼠相比, 模型组大鼠体内的金属蛋白酶 1 (MMP-1), MMP-3、血小板源性生长因子 (PDGF) 水平的表达量明显增高, 与模型组相比, 其余三组用药组的 MMP-1, MMP-3、PDGF 水平的表达量均出现一定程度的降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 活络通痹丸在一定程度上可以对大鼠的关节进行保护, 其中中剂量药物的作用最佳。

〔关键词〕 类风湿性关节炎; 活络通痹丸; 关节保护; 实验动物; 大鼠

〔中图分类号〕 R 285.5 〔文献标识码〕 A

临床上的类风湿性关节炎是以慢性且对称性关节炎为主要特征的一种自身免疫性疾病^[1]。该病是我国劳动力丧失和致残的重大原因之一^[2]。类风湿性关节炎首先出现的病理变化为关节滑膜慢性炎症, 随后相关炎症细胞被浸润, 形成了滑膜的血管翳, 向周围侵蚀, 导致骨质出现破坏, 关节出现畸形且相关功能丧失^[3]。其中骨侵蚀的主要原因是细胞外的基质出现降解, 该过程中发挥着主要作用的是两种酶, 即金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 和金属蛋白酶抑制剂^[4]。除此之外, 多种炎症细胞也参与了该降解过程, 如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素-1、血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 等^[5]。笔者主要对大鼠进行相关的实验研究, 探究活络通痹丸对大鼠类风湿性关节炎的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选取了 50 只清洁级 Wistar 大鼠, 根据体质量进行随机分组, 每组 10 只分成五组, 分别为正常组、模型组、甲氨喋呤组、活络通痹丸中剂量组和活络通痹丸高剂量组。将各组的鼠龄、性别等一般资料进行比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 研究方法

1.2.1 药液制备 活络通痹丸, 鹿角骨 10 g, 制鳖甲

10 g, 川牛膝 15 g, 全当归 20 g, 制乳香、没药各 10 g, 川

芎 10 g, 肉桂心 5 g, 羌活 10 g, 鸡血藤 30 g, 桑枝 30 g, 以上 11 味药部分打粉, 部分提取, 烘干磨粉, 混匀, 加蜜糖、酒制成丸 (佛山市中医院院内制剂, 粤药制字 Z20070495)。

1.2.2 模型制备 除正常组外, 其余每组大鼠的双足注射含有 II 型胶原的弗氏完全佐剂, 第 1 天在大鼠的背部两个部位以及尾根部位一点的皮内进行胶原乳剂的注射, 注射的剂量为 0.1 mL; 除正常组和模型组外, 使用人工气候箱将类风湿性关节炎的病症模型进行制造, 连续进行 11 d; 第 12 天在大鼠的左边后肢的足趾内进行 C II 乳剂的皮内注射, 注射的剂量为 0.1 mL, 并对其进行 2 次免疫注射, 随后造模, 连续进行 1 周。

1.2.3 给药情况 在造模后 1 周, 除模型组外, 各用药组分别连续给药 5 周, 具体用药情况如下, (1) 正常组: 正常喂养; (2) 模型组: 给予 0.9% 氯化钠注射液的注射, 10 mg (1.11 mL) \cdot kg⁻¹, 2 次 \cdot d⁻¹; (3) 甲氨喋呤组: 对该组的大鼠进行西药甲氨喋呤 (山西普德药业有限公司, 国药准字 H14022462) 的注射, 注射的剂量为 10 mg \cdot 周⁻¹; (4) 活络通痹丸中剂量组: 对该组的大鼠进行 0.3 g 活络通痹丸研成粉末并加入 10 mg (1.11 mL) 的 0.9% 氯化钠注射液进行注射, 注射的剂量为 15 mg \cdot 周⁻¹; (4) 活络通痹丸大剂量组: 对该组的大鼠进行 0.3 g 活络通痹丸研成粉末并加入 10 mg (1.11 mL) 的 0.9% 氯化钠注射液进行注射, 注射的剂量为 35 mg \cdot 周⁻¹。在造模及用药前后观察大鼠的一

〔收稿日期〕 2020-10-20

〔基金项目〕 广东省中医药局科研项目资助课题 (20181250)

〔作者简介〕 郑宝林, 男, 主任中医师, 主要研究方向是中西医结合治疗风湿性疾病。

般情况，并记录体质量用游标卡尺测量右足跖部厚度，观察药物对大鼠一般情况的影响。

1.2.4 指标检测方法 病理切片：使用 HE 染色剂，将大鼠的踝关节使用 4% 的多聚甲醛进行固定，固定的时间为 1 周，随后使用 10% 的四乙酸乙二胺对其进行脱钙，时间为 6 周，同时需要对其进行脱钙液的更换，平均 2 次·周⁻¹，直至对大鼠的组织进行针刺时，未出现任何的阻力，随后将其进行常规的脱水，并将其硬化，借助石蜡将其制成蜡块，并对其切片、载片；随后使用 HE 染色剂进行染色，使用质量分数为 1% 盐酸乙醇溶液分化，并使用中性树脂封片，最后在显微镜下对大鼠的踝关节组织进行观察，观察其组织形态的变化。

1.2.5 病理改变 按以下标准分 4 个种类进行评分，（1）炎性细胞浸润：无炎性细胞浸润为 0 分，炎性细胞浸润少于 20 个 / 高倍视野（high-power field, HF）为 1 分，20 ~ 50 个 / HF 为 2 分，大于 50 个 / HF 为 3 分；（2）巨噬 A 型细胞增生：无巨噬 A 型细胞增生为 0 分，少于 10 个 / HF 为 1 分，10 ~ 20 个 / HF 为 2 分，大于 20 个 / HF 为 3 分；（3）滑膜增生：滑膜细胞扁平，数量不多为 0 分，滑膜细胞肿胀，密集单层排列为 1 分，滑膜细胞肿胀，密集 2 层排列为 2 分，滑膜细胞肿胀，密集 3 层以上排列为 3 分；（4）纤维组织增生：无纤维组织增生为 0 分，平均增生少于 0.2 个 / HF 为 1 分，平均增生 0.2 ~ 0.4 个 / HF 为 2 分，平均增生大于 0.4 个 / HF 为 3 分。

1.2.6 免疫组织化学法 检测 MMP-1, MMP-3、PDGF 的表达：在各个组鼠的踝关节组织切片中滴入过氧化氢去离子水，质量分数为 3%，将其放入温室内进行孵育，时间为 10 min；再将其放置 0.1 mol·L⁻¹ 的枸橼酸盐缓冲液中，对其进行微波加热，直至出现沸腾，5 min 后将其畸形自然冷却修复；使用 5% 的牛血清蛋白对其进行封液处理，将其放入温室内进行 15 min 的孵育封闭，并滴入 MMP-1, MMP-3、PDGF 一抗，稀释比例为 1:200，温度为 4 °C，放置一夜，随后滴入生物素将其进行标记，为二抗，在 37 °C 的水温中进行 30 min 的复温；随后使用碱性磷酸酶滴入至链霉卵白素的工作液中，在 37 °C 的温度下进行孵育，时间为 15 min；滴入二氨基联苯胺对其进行显色，时间为 3 ~ 15 min，再使用自来水对其进行冲洗；对切片进行常规脱水，再使用中性树脂对其进行封片处理，使用显微镜对其进行观察，当细胞质中出现淡黄棕色以及黄褐色的颗粒着色的细胞为阳性细胞，并对各个组踝关节中的 MMP-1, MMP-3、PDGF 表达的免疫组化染色的积分光密度（integrated optical density, IOD）值进行半定量的测量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 *t* 检验，计数资料用百分比表示，采用 χ^2 检验，*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 五组大鼠踝关节 HE 染色结果及病理改变评分比较

如表 1 的结果显示，正常组大鼠的关节软骨排列正常，未见损伤，关节面平滑、完整，关节腔内无炎性液体渗出；模型组大鼠关节腔内有大量炎性液体渗出，关节腔被炎性液体浸润，大鼠关节面极为粗糙，同时伴随着关节腔滑膜严重组织增生，滑膜附近血管呈现扩张状态，形成血管翳；活络通痹丸中剂量组大鼠在实验之后，其关节腔面完整，关节腔内炎性物质显著减少，毛细血管和绒毛减少，纤维增多变为瘢痕，滑膜组织显著增加、变厚；活络通痹丸高剂量组大鼠关节腔内肉芽组织老化，胶原增生；甲氨蝶呤大鼠关节腔内软骨组织结构较为紊乱，血管丰富，并出现一定程度上的扩张，关节腔内炎性物质相对减少，差异具有统计学意义（*P* < 0.05），但活络通痹丸中剂量组的效果更为明显，差异具有统计学意义（*P* < 0.01）。

表 1 五组大鼠滑膜组织病理改变评分比较（*n* = 10, $\bar{x} \pm s$, 分）

组别	炎性细胞浸润	巨噬 A 型细胞增生	润膜增生	纤维组织增生
正常组	0.84 ± 0.47	0.65 ± 0.22	0.59 ± 0.13	1.50 ± 0.56
模型组	2.42 ± 0.61	2.82 ± 1.21	2.05 ± 0.87	2.74 ± 0.65
甲氨蝶呤组	1.86 ± 0.32 ^a	1.78 ± 0.24 ^a	1.38 ± 1.05 ^a	1.99 ± 0.42 ^a
活络通痹丸中剂量组	1.63 ± 0.26 ^b	1.48 ± 0.37 ^b	1.17 ± 0.32 ^b	1.58 ± 0.61 ^b
活络通痹丸高剂量组	1.80 ± 0.28 ^a	1.60 ± 0.36 ^a	1.33 ± 0.44 ^a	1.66 ± 0.64 ^a

与模型组比较，^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01

2.2 五组大鼠的 MMP-1, MMP-3、PDGF 蛋白表达密度的差异

如表 2 结果显示，和正常组大鼠相比，模型组大鼠体内的 MMP-1, MMP-3、PDGF 水平的表达量明显增高，差异具有统计学意义（*P* < 0.05）；与模型组相比，其余三组用药组的 MMP-1, MMP-3、PDGF 水平的表达量均出现一定程度的降低，降低程度最高的为活络通痹丸中剂量组的大鼠，且同甲氨蝶呤组相比，差异具有统计学意义（*P* < 0.01）。

表 2 五组大鼠 MMP-1, MMP-3、PDGF 含量比较

（*n* = 10, $\bar{x} \pm s$, IOD）

组别	MMP-1	MMP-3	PDGF
正常组	185.72 ± 21.59	180.97 ± 17.65	14.40 ± 2.58
模型组	345.22 ± 54.89 ^c	327.65 ± 47.33 ^c	25.74 ± 4.91 ^c
甲氨蝶呤组	246.35 ± 35.48 ^d	257.89 ± 29.58 ^d	20.96 ± 3.56 ^d
活络通痹丸中剂量组	210.77 ± 19.54 ^{de}	218.64 ± 17.28 ^{de}	16.89 ± 2.64 ^{de}
活络通痹丸高剂量组	238.16 ± 20.49 ^d	249.66 ± 14.25 ^d	19.41 ± 3.12 ^d

与正常组比较，^c*P* < 0.05；与模型组比较，^d*P* < 0.05；与甲氨蝶呤组比较，^e*P* < 0.01

注：MMP—金属蛋白酶；PDGF—血小板源性生长因子

3 讨论

在苏杉等^[6]学者的相关实验中显示，MMP-1, MMP-3、

PDGF 蛋白表达量在大鼠的疾病模型组和病症组显著升高,表明炎症的发生程度与该蛋白的表达水平呈现正相关。本研究结果与该实验存在一定的一致性。本实验结果显示,给药后,与模型组大鼠相比较,其关节腔面完整,关节腔内炎性物质显著减少,毛细血管和绒毛减少,纤维增多变为瘢痕,滑膜组织显著增加、变厚;活络通痹丸高剂量组大鼠关节腔内肉芽组织老化,胶原增生。且中剂量组的大鼠改善效果更好,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

因此对患有类风湿性关节炎关节炎的大鼠,实施活络通痹丸,可以对大鼠的相关蛋白酶进行下调,从而起到保护大鼠关节的作用,具有一定的临床价值。

[参考文献]

(1) 郑宝林,李婷,刘奔流,等. 通痹 1 号方对实验性类风湿

关节炎大鼠血清 IL-18 与 VEGF 水平的影响 (J). 海南医学, 2018, 29(3): 297-299.
(2) 范伏元,贺选玲,赵四林. 通痹汤治疗类风湿性关节炎的实验研究 (J). 湖南中医学院学报, 2016, 26(1): 22-25.
(3) 包东桥,徐斌,林超,等. 基于 NF- κ B、RANK 探讨七味通痹口服液对类风湿关节炎大鼠的影响 (J). 南京中医药大学学报, 2018, 33(3): 26-29.
(4) 陶黎,刘梅洁,薛欣,等. 益肾通痹丸对肾虚胶原诱导性关节炎大鼠踝关节骨质破坏的影响 (J). 中医杂志, 2018, 59(5): 420-426.
(5) 邢洁,姜萍. 和痹方对类风湿关节炎大鼠 $\alpha 7nAChR$, STAT3 蛋白表达及 TNF- α , IL-6, IL-17 表达的影响 (J). 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 730-733.
(6) 苏杉,王蓉. 秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎模型大鼠关节保护作用及其机制 (J). 中国临床药理学杂志, 2018, 34(21): 2542-2545.

(文章编号) 1007-0893(2020)24-0003-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2020.24.002

辐射干预后 C6 胶质瘤干细胞 wnt5a 阳性表达的实验研究

丁银秀^{1,2} 刘平² 程莹莹² 刘印明² 冯利强²

(1. 宁夏回族自治区医学科学研究所, 宁夏 银川 750000; 2. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏 银川 750006)

[摘要] 目的: 探讨 C6 胶质瘤干细胞 (C6 GSCs) 的辐射干预后 wnt5a 分子阳性表达的情况。方法: BrdU 掺入实验明确细胞增殖情况; 共聚焦显微镜观察 wnt5a 的细胞定位; 蛋白电泳测定 wnt5a 蛋白表达水平。结果: 条件培养基的作用下, C6 GSCs 数量达到 98% 以上; 辐射干预后, 0.3 Gy 组促进了 C6 GSCs 的增殖和分化能力; 3.0 Gy 组细胞的增殖和分化能力下降; wnt5a 在细胞核、胞浆和突起上均有表达, 0.3 Gy 组与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 蛋白电泳灰度统计分析上述结果一致。结论: 一定范围内的低剂量电离辐射刺激对 C6 GSCs 的增殖、分化具有促进作用, 且 wnt5a 分子在 C6 GSCs 上呈阳性表达, 提示 wnt 分子可能参与介导 C6 GSCs 电离辐射的刺激效应。

[关键词] C6 胶质瘤干细胞; BrdU 掺入实验; 低剂量电离辐射技术

[中图分类号] R 739 [文献标识码] A

Experimental Study on the Positive Expression of wnt5a in C6 Glioma Stem Cells after Radiation Intervention

DING Yin-xiu^{1,2}, LIU ping², CHENG Ying-ying², LIU Yin-ming², FENG Li-qiang²

(1. Ningxia Hui Autonomous Region Institute of Medical Sciences, Ningxia Yinchuan 750000; 2. School of Basic Medicine of Ningxia Medical University, Ningxia Yinchuan 750006)

[Abstract] Objective To investigate the positive expression of wnt5a molecules after radiation intervention of C6 glioma stem cells (C6 GSCs). Methods BrdU incorporation experiment to clarify the cell proliferation; confocal microscopy to observe the cell location of wnt5a; protein electrophoresis to determine the level of wnt5a protein expression. Results Under the effect

[收稿日期] 2020 - 09 - 22

[基金项目] 国家自然科学基金地区项目资助课题 (31760279, 81360062); 宁夏自然科学基金项目资助课题 (2018AAC03207)

[作者简介] 丁银秀, 女, 副教授, 主要研究方向是干细胞定向诱导分化与神经精神疾病调控机制。