

· 药物研究 ·

羟氯喹对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织学的影响

王金荣¹ 韩秀珍² 王宏伟¹ 程佩萱¹ 韩波²

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 武汉 430030 2. 山东省立医院儿科, 济南 250021)

[摘要] 目的 探讨羟氯喹(HCQ)对佐剂性关节炎(AA)大鼠滑膜组织学的影响。方法 将88只Wistar大鼠随机分成5组:A组:正常对照组($n=16$);B组:空白对照组($n=24$);C组:HCQ组($n=16$);D组:泼尼松组($n=16$);E组:萘普生组($n=16$)。给B、C、D、E组大鼠的右足垫皮内注射完全弗氏佐剂(CFA)0.1 mL,建立AA大鼠模型,A组注射0.9%氯化钠溶液0.1 mL。C、D、E组均于接种CFA后第21天开始灌胃给药,均给予萘普生 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,共1个月。C组加用HCQ $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,共5个月,D组加用泼尼松 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,1个月后减为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,再用4个月。动态观测AA大鼠关节形态变化及关节病理改变,并用透射电镜观察滑膜细胞超微结构的改变。结果 注射CFA第4周,HCQ组及泼尼松组大鼠右后肢踝关节左右横径、右后足体积、全身病变评分均明显低于空白对照组,其中以泼尼松组降低更明显,第8周后泼尼松组及HCQ组各指标均明显低于空白对照组,关节病理积分比空白对照组明显减轻($P<0.01$),但泼尼松组及HCQ组间差异无显著性($P>0.05$)。20周后HCQ组滑膜细胞细胞质内容物基本正常,细胞增生、分泌及吞噬活动不明显,与泼尼松组表现一致,与空白对照组及萘普生组相比差异有显著性。结论:HCQ可明显改善AA大鼠滑膜细胞的超微结构,减轻关节的炎性反应,比泼尼松起效慢,但不良反应相对较小。因此,HCQ是较理想的长期治疗关节炎的药物。

[关键词] 羟氯喹;关节炎;类风湿性;关节炎;佐剂性;大鼠;滑膜;超微结构

[中图分类号] R971.1;R593.22

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2004)03-0135-03

Effect of Hydroxychloroquine on Synovial Histology of Adjuvant Arthritis in Rats

WANG Jin-rong¹, HAN Xiu-zhen², WANG Hong-wei¹, CHENG Pei-xuan¹, HAN Bo² (1. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430030, China; 2. Department of Pediatrics, Shandong Provincial Hospital, Jinan Shandong 250021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of hydroxychloroquine(HCQ) on the synovial histology of adjuvant arthritis in rats. **Methods:** Eighty-eight Wistar rats were divided into 5 groups randomly: A, B, C, D, E, with 24 in group B and 16 in each of the other four groups. Group A were the untreated, injected with 0.1 mL sodium chloride injection, adjuvant arthritis(AA) models were firstly induced by intradermal injection with the complete adjuvant in the right footpad to the other four groups. Group B were the controls, no more treated. All the drugs were fed 21 days later. C, D, E groups were all fed with naproxen $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 1 month. Group C were added with HCQ $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 5 months, and the D with prednisone $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 1 month, succeeded with prednisone $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for another 4 months. The therapeutic effects were measured by diameter of right posterior ankle joint from left to right, the volume of right posterior paw, arthral histopathologic change and the ultrastructure of synovium and the calculating scores.

Results: Four weeks later the scores in group D with prednisone were lower than the group C with HCQ, but there were no significant difference between the two groups($P>0.05$), both group scores significantly lower than the control group($P<0.01$). Twenty weeks later, the signs measured and the histopathologic scores of synovium in HCQ group and prednisone group were almost normal, both were significantly improved than the controls and the naproxen group($P<0.01$). There was no difference in HCQ group and prednisone group($P>0.05$), but group C has less side-effects. **Conclusions:** Hydroxychloroquine can improve the ultrastructure of synovial cells, reduce synovial inflammation significantly and with less side-effects comparatively. Hydroxychloroquine is an ideal and effective antirheumatic drug.

KEY WORDS Hydroxychloroquine; Rheumatoid arthritis; Adjuvant arthritis; Rats; Synovium; Ultrastructure

类风湿性关节炎(RA)是一种慢性多关节炎,致残率高,目前无特效疗法。羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)作为改善病情的抗风湿类药用于临床,疗效较好,其作用机制尚未完全阐明。笔者在本研究中建立佐剂性关节炎(AA)大鼠模型,观察HCQ对AA大鼠形

态学和组织学改变的影响,评价HCQ的抗炎作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂 6周龄健康Wistar雄性大鼠88只,购于华中科技大学同济医学院实验动物中心。卡介苗(BCG):每支60 mg,兰州生物制品研究所生产。完全弗氏佐剂(CFA):每支10 mL,美国GIBCO公司生产。硫酸羟氯喹:每片100 mg,上海中西药业股份有限公司

[收稿日期] 2003-07-25 **[修回日期]** 2003-08-29

[作者简介] 王金荣(1963-),女,山东临朐人,博士后,主要从事儿科自身免疫性疾病研究。

生产 萘普生 每片 0.1 g 济南永宁制药股份有限公司生产 泼尼松 每片 5 mg 上海信谊制药厂生产。

1.2 分组及造模方法 随机将 88 只 Wistar 大鼠分成 5 组 A 组 :正常对照组 ,16 只 ;B 组 :空白对照组 ,24 只 ;C 组 :HCQ 加萘普生组 ,16 只 ;D 组 :泼尼松加萘普生组 ,16 只 ;E 组 :萘普生组 ,16 只。取 B、C、D、E 组大鼠的右足垫 ,在无茵条件下 ,皮内注射 0.1 mL CFA ,A 组在同一部位 ,同样方法注射 0.9% 氯化钠注射液 0.1 mL。

1.3 给药方法 C、D、E 组均于接种 CFA 后第 21 天开始灌胃给药 ,C 组给予萘普生 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ,共 1 个月 HCQ 4 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ,共 5 个月 ;D 组给予萘普生 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ,共 1 个月 ,泼尼松 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ,1 个月 后减为 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ,再用 4 个月 ,E 组给予萘普生 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ,共 1 个月。

1.4 全身病变评分 0 分 :关节无红肿 ;1 分 :1 个关节红肿 ;2 分 :2 或 3 个关节红肿 ;3 分 :≥ 4 个关节红

肿 ;4 分 :全足肿胀、不能负重 ;伴全身皮疹或尾部结节加 1 分。

1.5 组织病理学及电镜检测 于接种 CFA 后第 3 周分别处死大鼠 A 组 4 只、B 组 8 只 ;第 8、20 周分别处死大鼠 A 组各 6 只 ,其余组各 8 只。在无茵条件下取滑膜组织 ,用 10% 甲醛固定 ,以备做苏木精-伊红染色及免疫组织化学检测。常规光镜下观察组织形态变化 ,并参照文献 [1] 的标准计算关节病理积分 ,0 分 :正常 ;1 分 :滑膜轻度炎症增生 ;2 分 :滑膜中度炎症增生 ;3 分 :滑膜中度炎症增生及轻度软骨及骨改变 ;4 分 :有严重滑膜炎 ,纤维增生 ,软骨及骨破坏。每组每批随机取 1 只大鼠 ,在透射电镜下观察滑膜的超微结构改变。

1.6 统计学方法 用 SPSS 10.0 统计软件包进行处理 ,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠全身病变评分 见表 1。A 组为正常对照组 ,病变评分各周均为 0。

表 1 各组大鼠不同时间的全身病变评分

| 组别 | 第 2 周 | 第 3 周 | 第 4 周 | 第 6 周 | 第 8 周 | 第 12 周 | 第 16 周 | 第 20 周 |
|----|----------|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| A | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| B | 11.8±0.6 | 12.2±0.7 | 10.7±0.9 | 7.5±0.7 | 7.2±0.8 | 5.7±0.5 | 8.7±0.5 | 8.3±0.5 |
| C | 11.7±0.7 | 12.3±0.7 | 9.6±0.7 ^{*1} | 5.3±0.6 ^{*1} | 2.8±0.5 ^{*1} | 1.6±0.7 ^{*1} | 1.8±0.7 ^{*1} | 1.6±0.5 ^{*1} |
| D | 11.7±0.6 | 12.1±0.6 | 2.5±0.5 ^{*1*2} | 3.4±0.6 ^{*1*2} | 2.6±0.7 ^{*1} | 1.6±0.5 ^{*1} | 2.3±0.5 ^{*1} | 2.0±0.8 ^{*1} |
| E | 11.8±0.7 | 12.1±0.7 | 10.6±0.8 | 7.3±0.8 | 7.2±0.8 | 5.8±0.6 | 8.6±0.5 | 8.4±0.5 |

注 :与 B 组比较 ,^{*1} *P* < 0.05 ;与 C 组比较 ,^{*2} *P* < 0.01

皮内注射 CFA 后约 2 周出现多发性关节炎、皮疹、耳及尾部炎性结节。第 4 周各治疗组右后踝关节肿胀较空白对照组明显减轻 (*P* < 0.01) ;第 8 周 C、D 组踝关节肿胀减轻 ,以 D 组更明显。B、E 组各有 5 只大鼠 (62.5%) 在第 10 周左右表现右后足多关节畸形 ;C 组无畸形 ;D 组有 1 只大鼠 (12.5%) 出现关节畸形。

2.2 AA 大鼠滑膜病理学改变及关节病理积分 见表 2。

表 2 各组大鼠不同时间的关节病理积分 分 $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 第 3 周 | | 第 8 周 | | 第 20 周 | |
|----|-------|-----------------------|-------|-------------------------|--------|-------------------------|
| | 只 | 积分 | 只 | 积分 | 只 | 积分 |
| A | 4 | 0.0±0.0 | 6 | 0.0±0.0 | 6 | 0.0±0.0 |
| B | 8 | 3.0±0.6 ^{*1} | 8 | 3.2±0.6 ^{*1} | 8 | 2.0±0.8 ^{*1} |
| C | 8 | 0.0±0.0 | 8 | 2.2±0.7 ^{*1*2} | 8 | 0.9±0.6 ^{*1*2} |
| D | 8 | 0.0±0.0 | 8 | 1.6±0.6 ^{*1*3} | 8 | 1.0±0.6 ^{*1*2} |
| E | 8 | 0.0±0.0 | 8 | 3.2±0.5 ^{*1} | 8 | 2.0±0.8 ^{*1} |

注 :与 A 组比较 ,^{*1} *P* < 0.01 ;与 B 组比较 ,^{*2} *P* < 0.05 ,^{*3} *P* < 0.01

2.3 不同时间大鼠滑膜超微结构的改变 第 3 周时 ,B 组可见巨噬细胞样细胞 (MLS) 吞噬体多 ,溶酶体大量增生 ,细胞质突起长短不一 ,胞核大染色质丰富 ;成纤

维细胞样细胞 (FLS) 增生明显 ,粗面内质网丰富 ,成群的核糖体 ,高尔基体发达 ,线粒体数目增多 ,体腔膨胀 ,细胞核增大。

第 8 周时 ,B 组可见 MLS 细胞质溶酶体进一步增多 ,细胞质增多 ,吞噬活动仍活跃 ;FLS 进一步增生 ,粗面内质网异常丰富 ,末端多扩大成池 ,核糖体、高尔基体发达。线粒体数目更多 ,但基质减少呈空泡化。C 组与 D 组可见 :A、B 型滑膜细胞细胞质较少 ,细胞质内容物如线粒体、粗面内质网及溶酶体等明显减少 ,细胞增生、吞噬及分泌活动减弱。

第 20 周时 ,B 组和 E 组可见滑膜细胞处于较活跃的吞噬、分泌及增生状态。C 组与 D 组滑膜细胞细胞质内容物基本正常 ,增生、分泌及吞噬活动不明显。

3 讨论

AA 是一种发病机制和病理特征与人类 RA 极为相似的免疫性动物关节炎模型^[2]。本实验 72 只大鼠接种 CFA 后 ,AA 的发病率为 100.0% ,表明模型稳定 ,适合于研究 RA 的发病机制及评价抗关节炎药物的作用^[3]。

目前治疗 RA 最常用的药物有非甾体类抗炎药

(NSAID) 如萘普生, 只能减轻症状, 而不能缩短病程; 泼尼松等糖皮质激素类药物可明显抑制 RA 的滑膜炎症, 但是由于抑制生长发育、骨质疏松等严重不良反应, 临床难以长期有效的应用。近十几年来, 国外许多风湿病专家尝试早期及联合应用缓解病情的抗风湿药 (DMARDs), 如甲氨蝶呤、HCQ 等治疗 RA^[4], 取得较好的疗效。在所用 DMARDs 中, HCQ 毒性最小, 没有骨髓抑制和增加感染的不良反应, 长期耐受性及安全性好^[5]。

笔者选择可以使 AA 模型大鼠急性期减轻疼痛的萘普生短期应用 (1 个月), 分别结合 HCQ 和泼尼松治疗, 对比观察 HCQ 与泼尼松对 AA 模型大鼠的治疗作用。结果表明: 口服 HCQ 明显抑制滑膜细胞增生、分泌及吞噬作用, 抑制滑膜炎性渗出及血管增生, 减轻局部组织水肿。长时间 (17 周) 应用 HCQ 能很好地减轻关节肿胀, 抑制滑膜炎性渗出及滑膜细胞增生, 减少血管翳形成, 降低关节病理积分。与泼尼松相比, HCQ 起

效较慢, 但作用持久, 长期应用效果良好。

[参考文献]

- [1] Hom J T, Estridge T, Cole H, et al. Effects of various anti-T cell receptor antibodies on the development of type II collagen-induced arthritis in mice [J]. *Immunol Invest*, 1993, 22(4): 257-265.
- [2] Hadler N M. A pathogenetic model for erosive synovitis: lessons from animal arthritides [J]. *Arthritis Rheum*, 1976, 19(2): 256-266.
- [3] Lussier A, De Medicis R, Tetreault L. Adjuvant arthritis: influence of the adjuvant volume and composition on the established arthritis [J]. *Int J Tissue React*, 1984, 6(2): 105-110.
- [4] Bresnihan B. Treating early rheumatoid arthritis in the younger patient [J]. *J Rheumatol*, 2001, 28(Suppl 62): 4-9.
- [5] Tsakonas E, Fitzgerald A A, Fitzcharles M A, et al. Consequences of delayed therapy with second-line agents in rheumatoid arthritis: a 3 year follow up on the hydroxychloroquine in early rheumatoid arthritis (HERA) study [J]. *J Rheumatol*, 2000, 27(3): 623-629.

复方天麻口服液对偏头痛小鼠的作用

吕金胜¹, 高全杰², 封永勇³, 向明凤¹

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所药学部, 重庆 400042; 2. 第三军医大学新桥医院急救部, 重庆 400037; 3. 贵阳中医学院, 550002)

[摘要] 目的: 观察复方天麻口服液对偏头痛小鼠的作用。方法: 昆明种小鼠 90 只, 随机分为 6 组, 每组 15 只。第 1 组为假手术组, 皮下注射等体积的 0.9% 氯化钠注射液, 第 6 组为正常对照组, 不做皮下注射, 第 2~5 组制成偏头痛模型 (小鼠皮下注射利血平 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 14 d, 并脑室注射血凝块 $2 \mu\text{g}$) 后, 第 2 组给予 0.9% 氯化钠注射液, 第 3~5 组分别给予复方天麻口服液 2.25, 4.50, 9.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 均灌胃给药 3 d。采用热板法和扭体法测痛阈, 取血测凝血时间, 取脑匀浆测神经递质含量。结果: 复方天麻口服液能延长凝血时间, 提高痛阈, 调节 5-羟色胺 (5-HT) 的过度降低, 抑制脑内炎性刺激物的升高。结论: 复方天麻口服液能治疗利血平所致小鼠偏头痛。

[关键词] 天麻口服液, 复方, 偏头痛, 小鼠

[中图分类号] R286, R285.1 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2004)03-0137-03

Effect of the Compound *Tianma* Oral Solution on the Migraine Model in Mice

LÜ Jin-sheng¹, GAO Quan-jie², FENG Yong-yong³, XIANG Ming-feng¹ (1. Department of Pharmacy, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, the Third Military University, Chongqing 400042, China; 2. First-aid Station, Xinqiao Hospital, the Third Military University, Chongqing 400037, China; 3. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT Objective: To survey the effect of compound *tianma* oral solution on the migraine model in mice. **Methods:** 90 mice of the *kunming* species were randomly divided into 6 groups, with 15 animals in each. Mice of group 1 underwent sham operation. Those of group 6 served as normal control. A migraine model was set up for each mouse of group 2 to group 5 as follows. The animals were given each a daily hypodermic injection of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of reserpine for 14 consecutive days as well as an injection of $2 \mu\text{L}$ of blood clot into the cerebral ventricles. Thereafter, gastrogavage was used to administer 0.9% sodium chloride injection to each animal of group 2, 2.25, 4.50, 9.00 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of compound *tianma* oral solution to each of the mice of group 3, group 4 and group 5, respectively, for 3 consecutive days. Pain threshold was determined by the hot plate method and the writhing method. Blood was taken for the determination of coagulation time while brain homogenate was prepared for the assay of 5-HT, 5-HIAA and histamine. **Results:** Compound *tianma* oral solution was shown to prolong coagulation time, elevate pain threshold, prevent excessive decrease in 5-HT and