

葛根及其复方对重症肌无力大鼠肌力恢复和 IL-4 的影响^{*}

杨俊超 姚远友 文颖娟^{**}

(陕西中医学院,陕西 咸阳 712046)

摘 要: **目的** 研究葛根及其复方对重症肌无力大鼠肌力恢复和白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)的影响,并探讨其作用机制。**方法** 将 100 只 lewis 大鼠随机分为 5 组,采用鼠源性 AchR- α 亚基 97-116 肽段免疫大鼠制造重症肌无力模型,分别给予阳性对照组(强的松),葛根组和葛根复方组连续灌胃治疗 4W 后停药,观察大鼠治疗前后的肌力和 IL-4 的变化。**结果** ①治疗前与空白组比较,造模各组大鼠的肌力都有明显减弱;治疗后与模型组比较,强的松组、葛根组和葛根复方组的肌力都有增强;治疗后与强的松比较,葛根组的肌力恢复不及强的松组,葛根复方组的肌力恢复明显强于强的松组。②治疗前造模各组大鼠的 IL-4 含量水平明显高于正常组($P < 0.01$);治疗后与模型组比较,强的松组、葛根组和葛根复方组的 IL-4 水平明显有下降($P < 0.05$);治疗后与强的松组比较,葛根组的 IL-4 水平偏高($P < 0.05$),葛根复方组的 IL-4 水平偏低($P < 0.05$)。**结论** 葛根及其葛根复方可促进重症肌无力大鼠骨骼肌的肌力恢复,降低大鼠的 IL-4 水平,减轻肌无力症状。

关键词: 重症肌无力;葛根方;葛根复方;肌力;白细胞介素-4

中图分类号: R593.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-168X(2014)04-0085-03

重症肌无力是一种主要累及神经肌肉接头突触后膜乙酰胆碱受体,并由其介导的自身免疫性疾病,其发病机制复杂。近来研究发现,重症肌无力患者外周血单个核细胞 IL-4 和穿孔素等细胞因子的 mRNA 表达增高,提示 T 细胞处于活化状态,显示 IL-4 可能是肌无力发病的中心效应分子^[1]。本实验通过葛根及其复方干预实验性重症肌无力大鼠来对比研究葛根及其复方对大鼠肌力恢复和白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)的变化影响,探索葛根及其复方的疗效和作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验药物 葛根方(葛根 20 g),葛根复方(葛根 20 g,黄芪 15 g,丹参 15 g,苍术 15 g,黄柏 15 g,牛膝 15 g,薏仁 15 g)已上药物均购自陕西中医学院附属医院药房,在陕西中医学院附属医院中药房熬制,并按要求浓缩成汤液。大鼠用量为临床用量的 6.25 倍。阳性对照组:强的松,实验时用

0.2% 的羧甲基纤维素钠将其配置成 0.54 mg/mL 混悬液备用。

1.2 实验动物 健康 SPF 级 8 周龄的 Lewis 大鼠 100 只,雌性,体重 160-180g,动物来自西安交通大学医学实验动物中心,许可证编号:SCXK(陕)2013-001。适应性喂养 1 周后随即分组 A 组(正常组),B 组(模型组)、C 组(强的松组)、D 组(葛根组)、E 组(葛根复方组)每组 20 只大鼠。质重测量无统计学差异。

1.3 试剂与仪器 鼠源性 AchR- α 亚基 97-116 肽段序列(the rat of sequence 97-116 of the subunit R97-116),由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。完全弗氏佐剂(Complete freunds'adjuvant CFA),不完全弗氏佐剂(Incomplete freunds'adjuvant IFA),磷酸缓冲液(Phosphate Buffer Solution PBS),强的松(购自陕西中医学院附属医院),0.2% 的羧甲基纤维素钠,水合氯醛,乙醇,生理盐水氨水,酶

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81202642);陕西省教育厅资助项目(2013JK0823);陕西省重点学科建设项目

^{**} 通讯作者:文颖娟(1973-),女,医学博士后,副教授,硕士研究生导师,研究方向:脾胃病证的方药研究。E-mail: wenyuyao2003@163.com

联免疫吸附剂测定试剂盒 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM), 由上海欣软信息科技有限公司提供。

2 方法

2.1 造模 A 组(空白组)除外, B 组(模型组)、C 组(强的松)、D 组(葛根组)、E 组(葛根复方组)均给予两次免疫处理进行造模。将含有 100 μg 肽段的完全弗氏佐剂和 PBS 的混合乳液 200 μL 注入大鼠四足底垫皮内和腰腹部皮下, 采用六点皮下注射。对照组皮下注射等量 PBS, 首次免疫 30 天第二次免疫加强, 将含有 50 μg 肽段的不完全弗氏佐剂和 PBS 混合乳液 200 μL 注入同样六点部位。

2.2 给药 选择造模成功的大鼠, 给予药物治疗。C 组(强的松)给予 5.4 mg/kg/d, D 组(葛根组)给予 2.08 g/kg/d, E 组(葛根复方组)给予 11.46 g/kg/d, 每日给药一次, 连续 4 周, 大鼠灌胃给药体积为 10 mL/kg。

3 指标检测

3.1 体重的观察 初次免疫之后, 每天观察记录大鼠的饮食饮水情况, 每周测量记录两次体重变化情况。

3.2 游泳时间的测定 治疗前后, 给大鼠身体统一负重 15 g 铅块, 采用水迷宫无附着点泳池, 同时开始本能性游泳, 开始记录时间点, 到大鼠肌力困乏, 无力继续游泳要沉入水中时, 记录时间结束点, 两次时间差值, 即为大鼠的无障碍游泳时间。

3.3 IL-4 的检测 治疗前后都采取静脉取血 2 mL, 静置 30 分钟, 3000 rpm 离心 15 min, 取上层血清, -20 ℃ 保存待测。用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定。

3.4 统计学分析 采用统计软件 SPSS13.0 作为统计工具, 实验数据用均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间数据比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为有差异性, 以 $P < 0.01$ 为有显著差异性。

4 结果

4.1 大鼠体重的变化 第一次免疫后, 造模大鼠大概在四周后逐渐出现症状, 活动减少, 叫声低微, 毛发暗淡, 抓持力减弱, 饮食饮水量减少, 体重增加减慢, 尤其在第四周加强免疫后, 与空白组比

较, 造模各组的体重明显增加减缓; 第六周治疗后, 与模型组比较, 治疗组的体重都明显有增加, 模型组出现体重负增长的趋势; 治疗后, 与强的松组比较, 葛根组的大鼠体重增长值低于强的松组, 葛根复方组的大鼠的体重增长值逐渐超过强的松组, 说明葛根组的治疗不及强的松组, 葛根复方组的治疗优越于强的松组。结果见图 1。

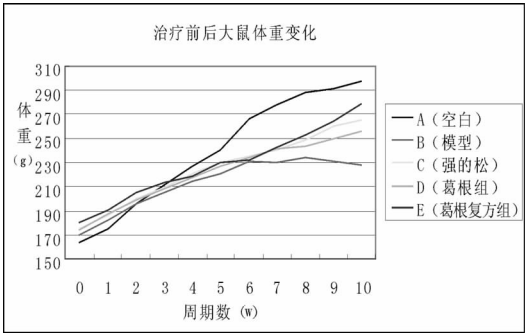


图 1 治疗前后大鼠体重的变化

4.2 游泳时间的测定 在控制单一变量情况下, 游泳时间长短即代表肌力强弱; 从开始游泳到大鼠无力游泳下沉时的时间差值即为游泳时间, 统计计算各组大鼠游泳时间值, 得出结果。治疗前, 与空白组大鼠比较, 各造模组大鼠的游泳时间都少于空白组大鼠, 说明造模有效。治疗后, 与模型组比较, 各组的游泳时间都有增加; 与强的松组比较, 葛根组的游泳时间少于强的松组; 葛根复方组的大鼠游泳时间长于强的松组。说明治疗效果有效, 葛根组治疗不及强的松组, 强的松组治疗不及葛根复方组。结果见表 1。

表 1 治疗前后大鼠的游泳时间均值比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	治疗前 (秒)	治疗后 (秒)
空白组	20	14.42 ± 1.31	15.31 ± 1.34
模型组	20	7.47 ± 1.03 [△]	7.21 ± 0.95
强的松组	20	8.28 ± 0.98 [△]	10.91 ± 0.21 [*]
葛根组	20	7.25 ± 1.13 [△]	9.15 ± 0.73 ^{**●}
葛根复方组	20	7.51 ± 1.24 [△]	12.14 ± 1.08 ^{***●●}

注: 与空白组比较 $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较 $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$; 与阳性组比较 $\bullet P < 0.05$, $\bullet\bullet P < 0.01$, $\bullet\bullet\bullet P < 0.001$ 。

4.3 IL-4 测定 大鼠出现明显的肌无力表现, 确定模型后检测 IL-4 的表达水平, 与空白组比较, 实验造模各组的表达水平显著升高, 说明 IL-4 在肌无力发病过程中有重要的检测意义。治疗后与模型组比较, 强的松组、葛根组和葛根复方组大鼠的血清中 IL-4 含量明显降低; 治疗后与强的松组比较, 葛根组 IL-4 含量高, 葛根复方组 IL-4

含量低,说明强的松、葛根组、葛根复方组的治疗都有效果,葛根组疗效低于强的松组,葛根复方组疗效高于强的松组。结果见表 2。

表 2 治疗前后大鼠血清中 IL-4 表达
水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	例数	治疗前 IL-4	治疗后 IL-4
空白组	20	12.21 ± 1.41	13.42 ± 0.93
模型组	20	32.24 ± 2.31 [△]	30.63 ± 1.22
强的松组	20	34.41. ± 2.01 [△]	18.85 ± 2.02 [*]
葛根组	20	33.37. ± 1.09 [△]	22.67 ± 3.24 ^{**●}
葛根复方组	20	35.18 ± 2.09 [△]	15.54 ± 3.12 ^{***●●}

注:与空白组比较[△] $P < 0.01$;与模型组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.05$
^{***} $P < 0.05$;与阳性组比较[●] $P < 0.05$,^{●●} $P < 0.05$ 。

5 讨论

重症肌无力的发病机理目前还不是完全明确,西医认为是一种神经肌肉接头(NMJ)传递性功能障碍所引起的自身免疫性疾病,这种疾病病变部位主要在 NMJ 处突触后膜上乙酰胆碱受体(AChR),表现为 NMJ 突触后膜上的 AChR 自身抗体介导的特异性自身免疫疾病,由于抗体阻断了这种神经肌肉的信号传递,产生了部分或全部骨骼肌易疲劳,呈波动性肌无力,具体活动后加重、休息后减轻和晨轻暮重等症[2]。

肌力的检查是目前最简单直接反应肌无力症状轻重的指标。由于受体处神经信号的阻断,神经冲动信号的传递呈显著衰减的变化,产生了一系列的骨骼肌易疲劳的外在表现,这种表现更具代表性和直观性,所以肌力测试已广泛应用于肌无力的检测,且相关的检测方法已比较成熟客观,种类也比较多。本实验采用大型无边缘、无着力点、无借力物体、无外界干扰的水迷宫游泳池,控制时间为单一变量,使时间和大鼠的肌力成正比关系,比较客观的反映出肌力的大小,使操作简便,干扰性少,数据准确。IL-4 又名 B 细胞生长因子,可促进 B 细胞增殖,产生免疫球蛋白,在抗体合成及其类型转换过程中必不可少。IL-4 被认为是 MG 发病的中心效应分子。故常用血清 IL-4 水平来评价 MG 严重程度,伴随 IL-4 水平的升高,肌无力临床症状表现加重,两者呈正相关的变化[3]。

中医认为肌无力的发病机理主要是脾胃虚弱,气机不运,水湿停滞,久而蕴热;血虚不行,瘀

血阻滞,出现了虚实夹杂的病机[4]。针对这种复杂的虚实夹杂的病机应选用益气健脾,清热利湿,活血化瘀等治法来辨证论治。本课题选择葛根、黄芪、丹参、苍术、黄柏、牛膝、薏仁配伍成方来治疗,以益气升阳,活血利湿。葛根既可以生发脾气,布散津液,又可以输肌促进肌肉的运动;黄芪补益中焦脾胃之气,助葛根生发脾胃之气;丹参针对血瘀阻滞,湿热蕴结,有活血祛瘀生新之功,又有清热凉血之妙[5];黄柏、苍术、牛膝、薏仁,取四妙散之意,黄柏其性沉降,苦以燥湿,寒以清热,配伍苍术,燥湿健脾。牛膝可强筋骨、活血利水针对足痿软无力甚是有效,再配伍薏仁渗利湿热,舒筋缓急[6]。全方可为攻补兼施,升降相合,标本兼治,益气健脾,清热利湿,活血祛瘀。

本课题从中医角度探讨了重症肌无力的患病机理和发病机制,采用鼠源性肽段阻断剂最大限度的制造出相似于大鼠自身发病机能的肌无力模型,并选取了现代临床普遍应用的指标检测中药复方的疗效,最终取得了较好的效果。实验证明葛根复方的配伍对重症肌无力的症状改善效果明显,并且与强的松对照,显示葛根复方的治疗更具有优越性。并选取葛根单方作为中药对照组,显示出葛根单味疗效不及复方组,同时也证明葛根是有疗效的,但需要配伍治疗疗效才更显著。这将为进一步探讨葛根复方治疗重症肌无力的机制提供思路,并为筛选治疗重症肌无力的有效方药提供指导。

参考文献

[1]王拥军,卢德宏,崔丽英.现代神经病学进展[M].北京:科学技术文献出版社,1999:229.
[2]滕永亮.重症肌无力的治疗进展[J].中国实用内科杂志,2009,29(12):1150.
[3]涂来慧.重症肌无力[M].上海:人民军医出版社,2007:485-493.
[4]周仲英.中医内科学[M].北京:中国中医药出版社,2009:8.
[5]文颖娟,周永学,王江.基于“线粒体-肌肉-脾”探讨脾胃失调与重症肌无力发病的关系[J].现代中药,2013,33(5):25-28
[6]邓中甲,方剂学[M].北京:中国中医药出版社,2011.

(收稿日期:2014-07-08 编辑:文颖娟)