

· 药理 ·

## 二四汤对牛Ⅱ型胶原诱导大鼠类风湿关节炎的干预机制

马天越<sup>1</sup>, 方宜梅<sup>2</sup>, 郭甘霖<sup>3</sup>, 杨家熙<sup>1</sup>, 杨斌<sup>3</sup>, 杨怡坤<sup>3</sup>, 寇秋爱<sup>3\*</sup>

(1. 北京中医药大学研究生院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078;  
3. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

**[摘要]** 目的:采用含牛Ⅱ型胶原的完全弗氏佐剂乳化液免疫诱导方法建立大鼠类风湿关节炎(RA)模型,观察二四汤的干预作用,并从抑制炎症反应及关节滑膜血管新生的病理方面探讨其作用机制。方法:采用含牛Ⅱ型胶原的完全弗氏佐剂乳化液免疫诱导方法建立大鼠RA模型。雄性SD大鼠随机分为空白组,RA模型组,甲氨蝶呤( $1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组及二四汤高、中、低剂量( $30, 15, 7.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组,每组8只。除空白组外,各组大鼠在强化免疫诱导RA后开始每天灌胃1次,共28 d。模型组、空白组均给予同体积生理盐水干预。给药结束后,通过关节肿胀体积变化率和指数分析各组大鼠关节肿胀程度。采用小动物超声影像系统检测各组大鼠右侧下肢膝关节滑膜增生程度评分与增生面积;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠血清中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 和白细胞介素(IL)- $1\beta$ 水平;苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠关节滑膜病理改变;免疫组化法检测大鼠关节滑膜组织CD31与血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)表达变化。结果:与空白组比较,模型组大鼠关节肿胀体积的变化率和指数显著增加,血清TNF- $\alpha$ 和IL- $1\beta$ 水平显著升高( $P<0.01$ ),超声显示右侧下肢关节滑膜区域面积及滑膜增生评分显著增加( $P<0.01$ ),大鼠关节滑膜组织也出现显著病理性改变,而CD31与VEGFR2表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,二四汤中、高剂量组大鼠关节滑膜组织病理变化明显改善,关节肿胀体积的变化率和指数明显降低( $P<0.05$ ),关节滑膜组织CD31与VEGFR2表达也出现一定程度下降( $P<0.05, P<0.01$ ),二四汤高剂量组大鼠血清TNF- $\alpha$ 和IL- $1\beta$ 水平明显降低( $P<0.05$ ),右侧下肢膝关节滑膜增生程度评分与增生面积明显下降( $P<0.05$ ),二四汤中剂量组大鼠仅表现为血清TNF- $\alpha$ 水平及关节滑膜增生面积明显下降( $P<0.05$ )。结论:二四汤能够通过抑制牛Ⅱ型胶原诱导RA大鼠关节血管新生而减少RA滑膜炎与增生,达到减轻RA关节损伤的作用,这为其临床应用提供重要参考。

**[关键词]** 二四汤; 类风湿关节炎; 血管新生; 滑膜炎症

**[中图分类号]** R2-0;R285;R33;R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0038-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220538

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220105.1142.002.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-05 19:51

### Mechanisms of Ersi Decoction on Rheumatoid Arthritis Rats Induced by Bovine Type II Collagen-solution

MA Tian-yue<sup>1</sup>, FANG Yi-mei<sup>2</sup>, GUO Gan-lin<sup>3</sup>, YANG Jia-xi<sup>1</sup>, YANG Bin<sup>3</sup>, YANG Yi-kun<sup>3</sup>, KOU Qiu-ai<sup>3\*</sup>

(1. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe that effect of Ersi decoction on rats with rheumatoid arthritis (RA) induced by using the complete Freund's adjuvant emulsion containing bovine type II collagen and elucidate underlying mechanisms involving to inhibit inflammation and joint synovial angiogenesis. **Method:** The rat model of RA was established by immune induction with complete Freund's adjuvant emulsion containing bovine

**[收稿日期]** 20211022(016)

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2018YFC1706805);中国中医科学院优势病种医院制剂新药研发专项(ZZ15-XY-PT-07)

**[第一作者]** 马天越,在读硕士,从事中医药防治风湿免疫疾病研究,E-mail:707739313@qq.com

**[通信作者]** \*寇秋爱,硕士,主任医师,从事风湿病的临床与基础研究工作,E-mail:kouqiuai@163.com

type II collagen. All male SD rats were randomly divided into blank group, RA model group, methotrexate group ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and low-, medium- and high-dose group ( $30, 15, 7.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) of Ersi decoction, with 8 rats in each group. Except the blank group, rats in the methotrexate group and Ersi decoction groups were given corresponding doses of methotrexate and Ersi decoction after establishment of RA induced by strengthen immunity, respectively, and those in the model group and blank group received normal saline of equivalent volume, once a day for 28 days. After the administration, the degree of joint swelling of rats in each group was analyzed by joint swelling volume and index. The small animal ultrasound imaging system was used to detect the score and area of synovial hyperplasia of knee joint in right lower limb of rats and hematoxylin-eosin (HE) staining to observe the histomorphological changes in joint synovium of rats. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunohistochemistry was employed to analyze the expression of CD31 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in joint synovium. **Result:** Compared with the blank group, the model group demonstrated significant increase in joint swelling volume and index, inflammatory cytokines including TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  in serum, the score and area of synovial hyperplasia of knee joint in right lower limb, obvious pathological changes in the synovium and the expression of CD31 and VEGFR2 in joint synovium. Medium and high-dose Ersi decoction significantly alleviated the pathological changes of synovium tissue, attenuated joint swelling volume and index and decreased the expression of CD31 and VEGFR2 in joint synovium as compared with the model group. Moreover, high-dose Ersi decoction showed significantly lower levels of TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  in serum, and the score and area of synovial hyperplasia of knee joint in right lower limb. But medium-dose Ersi decoction only showed lower levels of TNF- $\alpha$  and area of synovial hyperplasia of knee joint. **Conclusion:** Ersi decoction could reduce synovial inflammation and hyperplasia through inhibiting synovial angiogenesis in rats with RA induced by bovine type II collagen for achieving the effect of reducing RA joint damage, which provides an important reference for anti-RA of Ersi decoction in clinical application.

**[Keywords]** Ersi decoction; rheumatoid arthritis; vascular neovascularization; synovial inflammation

类风湿关节炎(RA)是一种原因未明,以慢性非可逆性关节损伤为特征的全身性自身免疫性疾病,主要以进行性、侵蚀性滑膜炎和血管翳的形成成为病理特点。不受控制的活动性RA会导致关节骨破坏、关节畸形及功能障碍、生活质量下降,甚至导致多系统损害<sup>[1]</sup>。血管新生是RA发病的关键过程<sup>[2-3]</sup>,是滑膜组织增生的重要病理基础<sup>[4]</sup>,受促血管内皮生长因子调控与炎症反应的影响<sup>[5]</sup>,诱导免疫失衡,促进RA病程进展。血管内皮细胞生长因子(VEGF)作为直接参与血管新生的重要细胞因子,可与血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)结合诱导软骨细胞凋亡,造成关节侵蚀<sup>[6]</sup>。而近年来RA的治疗方法主要是对自身免疫诱导的炎症反应进行调节,存在很多患者未能达到疗效的情况,能够抑制血管生成的治疗方法也尤其值得关注<sup>[7]</sup>。目前还没有针对RA治疗的特效药物,所用非甾体类抗炎止痛药、糖皮质激素、甲氨蝶呤等改变病情的药物虽然可以在一定程度上缓解症状、延缓病情发展,但停减困难,而且这些药物多系统的毒副作用也限

制使用剂量和疗程<sup>[8]</sup>。

中医药治疗RA的疗效明确,并具有很好的安全性,逐渐成为抗RA药物研究的热点。中医对RA的病机认识以《黄帝内经》“风、寒、湿三气杂至,合而为痹也”为最早论述,后随时间推移与气候变化等,认识逐渐发生改变,认为瘀热也为RA主要病机之一<sup>[9]</sup>,寒湿久郁即可化热伤阴。RA发病也常表现出脾弱正虚的特点,《类证治裁·痹证》记载“诸痹良由营卫先虚”,脾弱而气血难以化生,外邪易于侵袭。有证候研究表明,RA患者多见瘦弱、乏力、纳少便溏等脾虚表现<sup>[10]</sup>;现代医学证实,肠道菌群与RA的发病及病情进展关系密切,而肠道菌群失调多表现为脾虚症状<sup>[11]</sup>,同样说明了RA发病与脾虚的内在联系。课题组在前期反复的临床实践中总结发现,“毒热”与“正虚”是RA的重要病机特点<sup>[12]</sup>,其中又以毒热为核心病机。RA活动期病情呈现红、肿、热、痛等邪毒亢盛的特点,常伴有身热、烦躁等全身症状,《千金要方》指出“热毒流于四肢,历节肿痛”,此为邪滞经脉,郁而成火,化为毒热内闭,热

盛蚀骨。《圣济总录》言：“盖腑脏壅热，复遇风、寒、湿三气至，客搏经络，留而不行，阳遭其阴，故痹然而热闷也”，指出痹证常有“脏腑壅热”的内因，所以治疗应以清解热毒为要。

二四汤由中医经典方四妙勇安汤和四物汤加减化裁而来，针对RA毒热蕴结、气血亏虚的病机特点，具有清热解毒、养血通痹的功效。前期研究显示，二四汤能够有效减轻活动期RA患者临床症状，降低C反应蛋白、血沉等炎症指标，改善关节功能，且无明显不良反应<sup>[12]</sup>。但二四汤对RA的干预机制还有待于进一步的研究。基于上述工作基础，本研究拟通过采用牛Ⅱ型胶原诱导的关节炎(CIA)大鼠为研究对象，运用超声影像关键技术，在二四汤对大鼠RA干预研究的基础上，从抑制炎症反应及关节滑膜血管新生的病理方面探讨其作用机制，为临床应用二四汤治疗RA提供实验依据，也为深入探讨二四汤对RA的干预机制奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 48只雄性SPF级SD大鼠，体质量180~200 g，由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供，合格证号SCXK(京)2019-0010。实验动物在中国中医科学院西苑医院动物实验室分笼饲养，室温22~25℃，空气湿度60%~70%，明/暗周期12 h，动物自由进食和饮水。本实验获中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会批准，编号2019XLC014。

**1.2 药物与试剂** 二四汤由金银花30 g，生地黄15 g，白芍15 g，玄参10 g，山慈菇10 g，当归15 g，川芎10 g，党参15 g，青风藤15 g，鹿衔草15 g，蜈蚣2条，甘草10 g组成，药物均由中国中医科学院西苑医院中药房提供，药材经中国中医科学院西苑医院制剂科郑蕊主任医师鉴定。以上药材水煎后浓缩至含生药3.0 g·mL<sup>-1</sup>水煎剂备用。甲氨蝶呤(2.5 mg/片，批号036180802)，购自上海上药信谊药厂有限公司。牛Ⅱ型胶原(北京博蕾德生物科技有限公司，批号150342)；完全弗氏佐剂(CFA，美国Sigma公司，批号9007812)；兔抗大鼠VEGFR2多克隆抗体，兔抗大鼠CD31单克隆抗体(美国Abcam公司，批号分别为ab39542，ab24590)；戊巴比妥钠(北京化学试剂公司，批号020402)；苏木素-伊红(HE)染色液(北京索莱宝生物科技有限公司，批号20190125)；肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ ，白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(北京冬歌博业生物科技有限公司，批号分别为DG20065 D-96T，DG20138D-96T)。

**1.3 仪器** CS5000型动物体质量秤(上海奥豪斯仪器有限公司)；YLS-7B型足趾容积测量仪(上海欣软信息科技有限公司)；T25 Basic型匀浆机[德国艾卡(亚洲)公司]；Visual-Sonics Vevo 2100型分辨率小动物超声成像系统(日本VisualSonics公司)；Nikon 501型光学显微镜(日本Nikon公司)；RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司)；ZKJPJ-1A型展烤片机(天津天利航空机电有限公司)。

## 2 方法

**2.1 CIA大鼠模型的制备** 依据参考文献<sup>[13-14]</sup>方法，将牛Ⅱ型胶原50 mg溶于0.01 mol·L<sup>-1</sup>冰醋酸溶液(pH 3.2)25 mL中，实验前1天配制，4℃冰箱保存过夜备用。初次免疫当日，将上述溶液与完全弗氏佐剂25 mL反复乳化，制成含牛Ⅱ型胶原1.0 g·L<sup>-1</sup>的完全弗氏佐剂乳化液。随后采用1%的戊巴比妥溶液(4.0 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉大鼠，分为5个点(背部3点、尾根部及右后足掌)皮内注射胶原乳化液各0.1 mL，总量0.5 mL。在初次免疫动物1周后进行加强免疫，给予大鼠尾根部皮内注射含有牛Ⅱ型胶原1.0 g·L<sup>-1</sup>的胶原乳化液0.2 mL/只，建立CIA大鼠模型，空白组大鼠在相应的时间点和部位，以相同的方式注射等体积生理盐水。初次免疫后第14天对造模组大鼠进行关节炎指数评分<sup>[15]</sup>，评分 $\geq 4$ 分则为造模成功<sup>[16]</sup>。

**2.2 分组与给药** 除空白组外，所有动物在加强免疫后，按照体质量随机分为模型组，甲氨蝶呤组(1.0 mg·kg<sup>-1</sup>，每周给药1次)，二四汤高、中、低剂量组(30，15，7.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)，每组8只。同时空白组大鼠8只。二四汤全方合计160 g，给药剂量按人体和大鼠体表面积换算法计算所得，以65 kg成年人日服药剂量为标准，计算对应体质量200 g大鼠用药剂量，因此二四汤高、中、低剂量组大鼠分别按照30，15，7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>进行灌胃给药。甲氨蝶呤成人日服药剂量为10 mg，每周1次<sup>[17]</sup>，甲氨蝶呤组大鼠按照1.0 mg·kg<sup>-1</sup>进行给药，每周1次。以上各组大鼠于加强免疫后进行灌胃给药，连续28 d。采用的干预药物均以生理盐水配至所需浓度进行灌胃，给药体积为10 mL·kg<sup>-1</sup>，假手术组和模型组大鼠则给予等体积生理盐水灌胃。

## 2.3 观察指标

**2.3.1 大鼠一般情况** 实验期间，观察与临床RA表现相关情况变化，包括大鼠行为活动，皮毛色泽，精神状态，双侧下肢关节的肿胀程度及活动度的变化。

**2.3.2 关节肿胀度** 依据参考文献[18],分别在实验第1,28,35天时,采用YLS-7B型足趾容积测量仪测定各组大鼠右侧后足爪肿胀体积。将每只大鼠右侧后足踝关节上1.0 cm处做好标记,测量时使该标记与足趾容积测量仪的浴槽水平面齐平,保持静止3 s后通过仪器自动读出大鼠右侧后足体积,实验中每只大鼠右侧后足爪测定3次,最后算出平均值。关节肿胀度计算公式:关节肿胀度=(测量值-造模前所测值)/造模前所测值×100%。

**2.3.3 关节肿胀指数(AI)评分** 分别在实验第28,35天,记录各组大鼠四肢关节部位的病变情况,依据文献方法对各组大鼠按4级评分法进行关节炎指数评分<sup>[15]</sup>。评分方法,0分,无红肿;1分,趾关节红肿;2分,趾关节和足趾肿胀;3分,趾关节以下的足爪肿胀;4分,包括踝关节在内的全部足爪肿胀。根据4个肢体关节的病变程度进行累计积分,1只大鼠AI评分最高为16分。

**2.3.4 超声影像法检测关节滑膜增生情况<sup>[19-20]</sup>** 实验第35天,大鼠采用1%戊巴比妥(4.0 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉后,取仰卧位固定。Visual-Sonics Vevo 2100型高分辨率小动物超声诊断仪,MS400探头(探头频率为18~38 MHz)行常规B模式下超声检查,探头置于右侧膝关节上方及侧方进行纵向、横向的多切面扫描,选择最佳切面观察滑膜增厚情况,并保留关节影像进行分析。对大鼠右侧膝关节内滑膜增生程度进行分级评价(0~4级),同时采用Vevo Lab分析软件对大鼠右侧膝关节内滑膜增生面积进行测定。

**2.3.5 ELISA检测血清炎症指标** 实验结束后,大鼠采用1%戊巴比妥溶液(4.0 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射进行麻醉。大鼠腹主动脉取血3 mL,常温静置1 h后,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min取上清。-80 °C保存待测。采用ELISA检测血清TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 水平,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

**2.3.6 HE染色观察关节组织病理形态学变化** 实验结束后,全部大鼠麻醉后经腹主动脉取血处死。取大鼠右侧下肢膝关节,去除皮肤与肌肉组织,暴露膝关节腔后,置于10%甲醛溶液中,24 h后更换甲醛溶液,固定保存。随后将关节置于脱钙液中,直至骨组织软化后流水冲洗。经过常规脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,进行切片,每片厚度为4  $\mu$ m。制好的切片用二甲苯、乙醇梯度脱蜡后,分别进行HE染色。染色后的切片再次经过乙醇梯度脱水、二甲苯透明后,采用中性树胶封片,使用光学显微镜观

察大鼠关节组织病理学变化。

**2.3.7 免疫组化法检测关节滑膜组织VEGFR2和CD31表达** 实验结束后,采用SP二步法进行大鼠右侧膝关节原位滑膜CD31及VEGFR2表达的分析。取固定后的关节滑膜组织,石蜡包埋后进行连续切片。在切片上滴加修复液,高压进行抗原修复,待自然冷却至室温,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每次5 min。采用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>滴加切片上去除内源性过氧化物,37 °C孵育20 min后磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每次5 min。随后加入0.3% TritonX-100溶液,静置10 min后PBS冲洗,5%牛血清白蛋白(BSA)封闭20 min,分别加入兔抗大鼠VEGFR2多克隆抗体(1:1 000)及兔抗大鼠CD31单克隆抗体(1:500)后置于湿盒4 °C过夜,PBS冲洗。充分冲洗后,依次滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG溶液进行结合反应,37 °C孵育1 h,PBS洗涤3次,每次5 min。采用DAB显色后苏木素复染,盐酸分化,梯度乙醇脱水,透明后封片,进行镜下观察并拍照。利用Image J图像分析系统进行图像分析,随机选择4个视野对阳性细胞进行平均灰度值测定。

**2.4 统计学分析** 采用SPSS 25.0软件进行统计,各组实验数据经方差齐性检验后,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用两独立样本 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠一般状况的影响** 实验结束时,正常组大鼠毛发呈白色且有光泽,活动自如,反应迅速。模型组大鼠毛发干枯发黄,晦暗无光泽,精神状态差。在实验第21天时双下肢踝关节处出现明显的肿胀,行动迟缓,对刺激反应迟钝。与模型组比较,甲氨蝶呤及二四汤高剂量组大鼠全身症状减轻,精神状况一般。虽然仍出现双下肢关节明显肿胀,但是大鼠活动较好。甲氨蝶呤组大鼠实验过程中死亡2只,考虑为药物毒性作用。

**3.2 对大鼠关节肿胀度的影响** 实验第28天与第35天时,与空白组比较,模型组大鼠右侧下肢关节肿胀度显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,二四汤中、高剂量组及甲氨蝶呤组大鼠右侧下肢关节肿胀度明显下降( $P < 0.05$ )。见表1。

**3.3 对大鼠关节AI的影响** 实验第28天与第35天时,与空白组比较,模型组大鼠AI评分明显增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,二四汤高剂量组及甲氨

表1 二四汤对RA大鼠关节肿胀度和AI评分的影响( $\bar{x}\pm s$ )

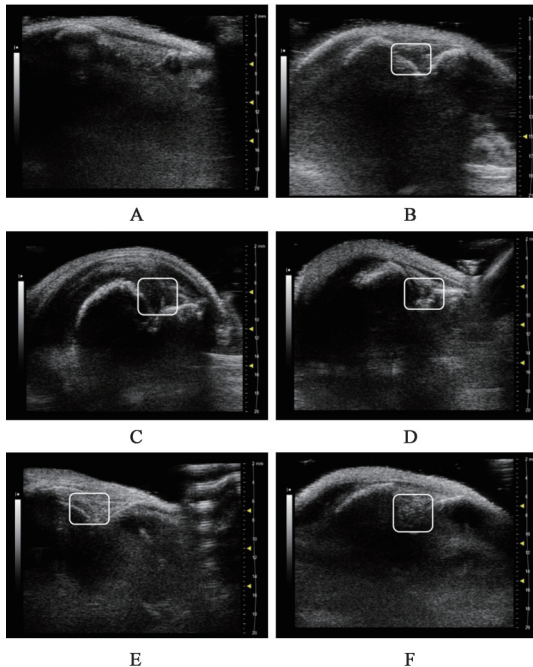
Table 1 Effect of Ersi decoction on in rats with rheumatoid arthritis ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	关节肿胀度/%		AI评分/分	
			第28天	第35天	第28天	第35天
空白	8		1.38±0.74	1.47±0.44	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	8		6.36±2.78 <sup>2)</sup>	8.90±4.76 <sup>2)</sup>	12.71±2.13 <sup>2)</sup>	13.57±2.37 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	6	1.0×10 <sup>-3</sup>	4.43±2.25 <sup>3)</sup>	5.74±2.74 <sup>3)</sup>	10.57±0.98 <sup>3)</sup>	8.86±1.07 <sup>4)</sup>
二四汤	8	7.0	5.65±1.77	8.19±3.49	12.33±2.06	11.67±2.42
	8	15.0	5.16±1.79 <sup>3)</sup>	5.83±1.80 <sup>3)</sup>	12.38±1.92	11.13±1.73 <sup>3)</sup>
	8	30.0	4.60±2.24 <sup>3)</sup>	5.91±2.55 <sup>3)</sup>	10.71±0.95 <sup>3)</sup>	10.29±1.60 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表2~4同)。

蝶呤组大鼠AI评分明显下降(P<0.05, P<0.01)。同时实验第35天时,与模型组比较,二四汤中剂量组大鼠AI评分明显下降(P<0.05)。见表1。

**3.4 对大鼠关节滑膜增生的影响** 与空白组比较,模型组大鼠右侧下肢关节滑膜增生评分明显升高,同时超声显示关节滑膜区域面积显著增加(P<0.01);与模型组比较,二四汤高剂量组及甲氨蝶呤组大鼠右侧下肢关节滑膜增生评分明显降低,同时超声显示关节滑膜区域面积明显下降(P<0.05, P<0.01),二四汤中剂量组大鼠仅见关节滑膜区域面积明显下降(P<0.05)。见图1,表2。



A. 空白组; B. 模型组; C. 二四汤低剂量组; D. 二四汤中剂量组; E. 二四汤高剂量组; F. 甲氨蝶呤组(图2~4同);框内低回声区域为关节滑膜增生

图1 二四汤对RA大鼠关节滑膜增生的影响

Fig. 1 Effect of Ersi decoction on joint synovial hypertrophy in rats with rheumatoid arthritis

表2 二四汤对RA大鼠关节滑膜增生程度及增生面积的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Effect of Ersi decoction on level and area of joint synovial hypertrophy in rats with rheumatoid arthritis ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	滑膜增生程度评分/分	滑膜增生面积/mm <sup>2</sup>
空白	8		0.00±0.00	0.00±0.00
模型	8		3.63±0.52 <sup>2)</sup>	1.22±0.48 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	6	1.0×10 <sup>-3</sup>	2.50±1.05 <sup>3)</sup>	0.52±0.31 <sup>4)</sup>
二四汤	8	7.0	3.57±0.79	1.11±0.31
	8	15.0	2.83±0.98	0.66±0.41 <sup>3)</sup>
	8	30.0	2.67±0.52 <sup>3)</sup>	0.63±0.33 <sup>3)</sup>

**3.5 对大鼠关节病理结构的影响** 正常组关节结构正常,滑膜大多内衬单层上皮,个别2~3层,细胞排列规则,滑膜内纤维间质排列疏松,无炎性细胞浸润;血管数量少,排列稀疏,为闭锁状态。模型组可见滑膜内衬细胞层次增明显加,呈绒毛状、乳头状肥大,滑膜内可见淋巴细胞、浆细胞,中粒细胞以及巨噬细胞等炎性细胞浸润,间质纤维组织增生;滑膜血管增生、扩张。甲氨蝶呤组可见滑膜内衬细胞层次较模型组减少,呈小绒毛状,滑膜内炎性细胞数目减少,间质纤维组织轻度增生;滑膜血管增生,少量扩张,血管壁周围中等量炎性细胞浸润。二四汤各剂量组可见滑膜内衬细胞层次为3~5层,呈微小绒毛状,滑膜内炎性细胞数目明显减少,间质纤维组织轻度增生;滑膜血管轻度增生,偶见扩张,血管壁周围少量炎性细胞浸润,并且二四汤高、中剂量组效果好于低剂量组。见图2。

**3.6 对大鼠血清炎症因子的影响** 与空白组比较,模型组大鼠血清TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 水平显著升高(P<0.01);与模型组比较,二四汤高剂量组及甲氨蝶呤组大鼠血清TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 水平明显下降(P<0.05, P<0.01);同时二四汤中剂量组大鼠血清TNF- $\alpha$ 水平明显下降(P<0.05)。见表3。

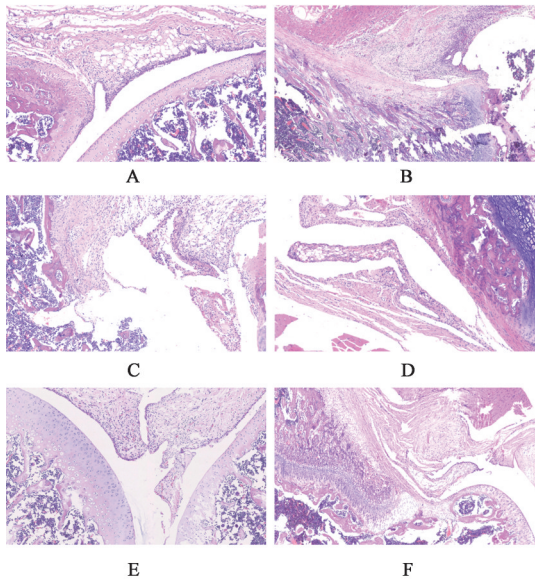


图2 二四汤对RA大鼠关节组织病理形态变化的影响(HE, ×200)  
Fig. 2 Effect of Ersi decoction on pathological structures of joint tissue in rats with rheumatoid arthritis (HE, ×200)

表3 二四汤对RA大鼠血清TNF-α和IL-1β水平的影响(̄x±s)

Table 3 Effect of Ersi decoction on serum levels of TNF-α and IL-1β in rats with rheumatoid arthritis (̄x±s) ng·L<sup>-1</sup>

组别	n	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	TNF-α	IL-1β
空白	8		26.25±18.76	48.78±10.22
模型	8		426.36±118.45 <sup>2)</sup>	388.41±105.18 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	6	1.0×10 <sup>-3</sup>	237.82±88.74 <sup>4)</sup>	209.37±95.42 <sup>4)</sup>
二四汤	8	7.0	394.23±124.25	365.15±130.68
	8	15.0	269.30±98.16 <sup>3)</sup>	338.54±108.72
	8	30.0	255.41±102.37 <sup>3)</sup>	215.32±89.65 <sup>3)</sup>

3.7 对大鼠关节滑膜组织 VEGFR2 和 CD31 表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠关节滑膜组织 VEGFR2 和 CD31 表达显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,二四汤中、高剂量组及甲氨蝶呤组大鼠关节滑膜组织 VEGFR2 和 CD31 表达明显下降 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见图 3,4,表 4。

#### 4 讨论

类风湿关节炎是最常见的全身免疫性关节炎疾病,其特征是关节滑膜炎和类风湿血管炎。关节滑膜炎与血管翳形成是 RA 病理生理学的核心,二者共同参与了 RA 关节侵蚀<sup>[21]</sup>。研究显示,RA 炎症过程中源于淋巴细胞与巨噬细胞的 TNF-α 过度表达是一个关键的炎症级联反应,并继发性导致许多细胞因子如 IL-1 的过度产生,驱动持续的滑膜炎和关节破坏。CIA 是目前常用的 RA 大鼠模型<sup>[22]</sup>。多个研究证实,CIA 大鼠模型的发病机制、临

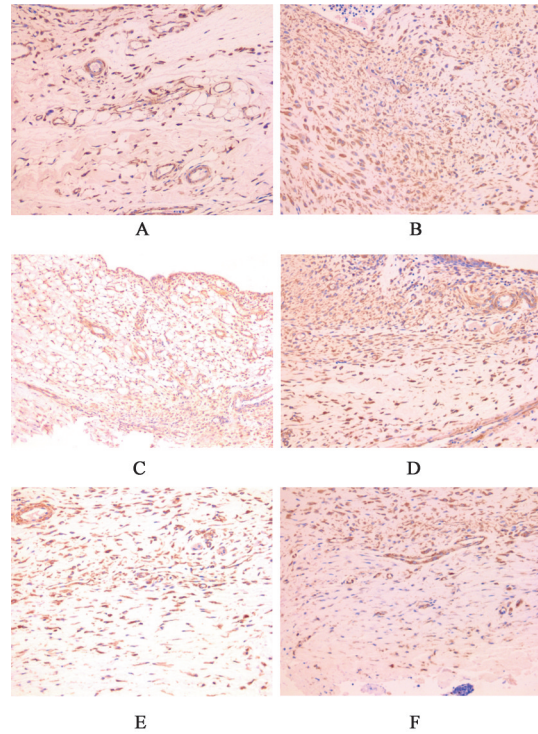


图3 二四汤对RA大鼠关节滑膜组织CD31表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Ersi decoction on expression of CD31 in joint synovial tissue of rats with rheumatoid arthritis (IHC, ×400)

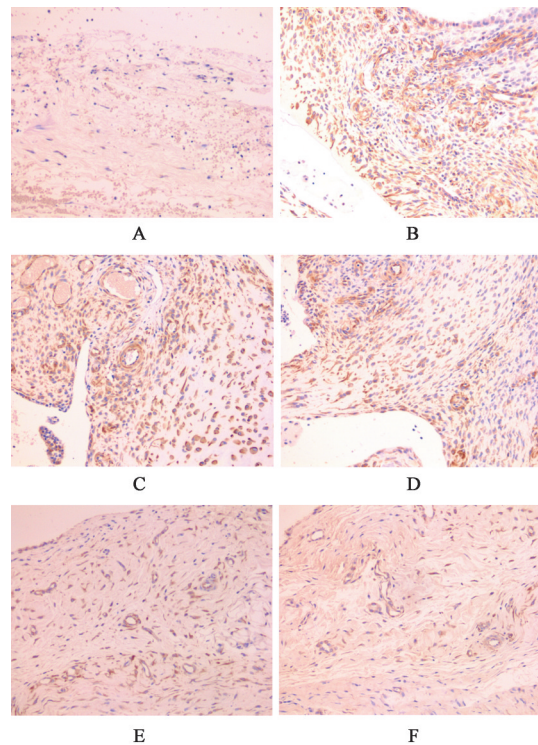


图4 二四汤对RA大鼠关节滑膜组织VEGFR2表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Ersi decoction on expression of VEGFR2 in joint synovial tissue of rats with rheumatoid arthritis (IHC, ×400)

表4 二四汤对RA大鼠关节滑膜组织VEGFR2和CD31表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 4 Effect of Ersi decoction on VEGFR2 and CD31 of joint synovial tissue in rats with rheumatoid arthritis ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	VEGFR2	CD31
空白		248.1±25.3	221.7±32.2
模型		754.5±127.8 <sup>2)</sup>	685.5±86.1 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	1.0×10 <sup>-3</sup>	452.7±81.3 <sup>4)</sup>	436.0±97.2 <sup>4)</sup>
二四汤	7.0	687.0±103.7	614.5±92.8
	15.0	557.4±96.8 <sup>3)</sup>	544.3±88.6 <sup>3)</sup>
	30.0	496.5±83.8 <sup>4)</sup>	502.6±75.2 <sup>4)</sup>

床表现、病理改变特点及免疫学相关指标与人RA有很多的相似性<sup>[23-24]</sup>。本研究结果显示CIA模型大鼠关节肿胀明显, AI明显增加;同时血清中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 水平升高, 关节组织病理也显示滑膜内可见炎性细胞浸润, 间质纤维组织增生, 滑膜血管增生、扩张, 充分说明本研究CIA模型的可靠性。此外, 临床研究证实与传统的临床和放射学方法相比, 使用超声检测RA关节滑膜炎和骨侵蚀的灵敏度较高<sup>[25]</sup>。在本研究中在国内首次采用高分辨率小动物超声影像显示CIA模型大鼠关节滑膜明显增生, 这不仅为RA的实验研究提供一个可视化评价方法, 而且进一步有助于RA机制和治疗效果的研究。

目前研究认为, 滑膜血管新生形成特征性的血管翳是RA的关键病理环节, 能促进炎症细胞浸润导致滑膜增生、炎症及进行性骨和软骨破坏。同时M1巨噬细胞产生TNF和IL-1 $\beta$ 等促炎因子也可激活常驻组织巨噬细胞与滑膜组织纤维细胞分泌VEGF作用于VEGFR2, 增加内皮细胞的存活, 增殖和迁移, 促进滑膜血管新生, 维持或加快血管翳的形成, 形成正反馈调节作用, 促进RA发展<sup>[26-27]</sup>。本研究显示RA大鼠同时存在血清炎症因子水平升高及关节滑膜组织中VEGFR2与血管特异性标志物CD31表达明显增加。因此对关节滑膜血管新生及炎症的抑制是干预RA病理发展的重要环节之一。

类风湿关节炎属中医“痹证”范畴, 本研究团队经过多年的临床研究, 认识到RA属于本虚标实之证, 本虚气血亏虚, 标实为毒热灼伤筋脉。热盛成毒不仅仅单纯表现在RA活动期炎症反应方面, 而且由炎症反应引起的关节滑膜血管异常增生也体现出了“毒热灼伤筋脉”的病机变化特点<sup>[28]</sup>。经过反复临床实践总结出的、具有清热解毒、养血通痹功效的二四汤在前期治疗RA临床观察中具有良好

的疗效<sup>[12,29]</sup>。二四汤由经典名方四妙勇安汤与四物汤化裁而成。研究显示, 四妙勇安汤联合西药治疗RA效果显著, 其机制可能为通过影响氧化应激生物过程干预急性期的炎症反应, 缓解RA患者症状<sup>[30]</sup>;而临床观察显示四物汤合六味地黄汤治疗RA具有较好疗效<sup>[31]</sup>, 四物汤加味的有效成分可通过减轻炎症、抗氧化、抑制破骨细胞活性等, 发挥对RA的治疗作用<sup>[32]</sup>。二四汤以金银花为君药, 清气分之热, 解血分之毒;玄参滋阴凉血, 解毒散结;当归、生地黄养血活血, 益阴清热, 化瘀散结, 以治其毒热瘀血之标, 并养血以补内伤之虚损;川芎活血行气止痛, 其性辛温香燥, 走而不守, 既能行散, 又入血分, 增强除痹止痛, 活血养血之力;加白芍、党参, 以养气血、敛阴津、补虚损;用祛风湿水肿之青风藤、鹿衔草祛邪通络;以山慈菇、蜈蚣通化顽痰闭阻;甘草生用, 助君药金银花清热解毒之功, 且调和诸药。全方清养相合, 毒瘀并祛, 共奏清热解毒, 通络调血, 扶正祛瘀之功, 正切合RA毒热蕴结、正虚邪实的病机特点。

本研究结果显示, 中药复方二四汤能够明显降低CIA大鼠关节肿胀程度及肿胀指数, 改善大鼠关节滑膜组织病理变化。在超声影像方面关节滑膜增生程度评分与增生面积下降也提示二四汤可以抑制RA大鼠滑膜增生, 从而减轻RA关节损伤。同时二四汤对RA大鼠炎症反应的抑制以及滑膜组织CD31与VEGFR2表达的下调, 进一步说明二四汤不仅能够一定程度上通过降低炎症反应而抑制关节滑膜血管新生, 而且还可以直接促使VEGFR2表达下降而阻断VEGF血管新生通路, 达到抑制血管翳形成、滑膜增生, 减缓RA病理发展的作用。

综上所述, 二四汤能够通过抑制CIA大鼠关节血管新生而减少RA滑膜炎症与增生, 达到减轻RA关节损伤的作用, 但是对RA关节血管新生抑制深入机制还有待于进一步的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] LIN Y J, ANZAGHE M, SCHÜLKE S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis[J]. Cells, 2020, 9(4): 880.
- [2] ELSHABRAWY H A, CHEN Z, VOLIN M V, et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. Angiogenesis, 2015, 18(4): 433-448.
- [3] LEBLOND A, ALLANORE Y, AVOUAC J. Targeting synovial neoangiogenesis in rheumatoid arthritis[J].

- Autoimmun Rev, 2017, 16(6):594-601.
- [ 4 ] WANG Y, WU H, DENG R. Angiogenesis as a potential treatment strategy for rheumatoid arthritis[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 910:174500.
- [ 5 ] BALOGH E, BINIECKA M, FEARON U, et al. Angiogenesis in inflammatory arthritis [J]. Isr Med Assoc J, 2019, 21(5):345-352.
- [ 6 ] 周建林,方洪松,彭昊,等. 血管内皮生长因子和缺氧诱导因子对软骨细胞凋亡的作用[J]. 中国组织工程研究, 2015(29):4705-4709.
- [ 7 ] LEBLOND A, ALLANORE Y, AVOUAC J. Targeting synovial neoangiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(6):594-601.
- [ 8 ] SMOLEN J S, ALETAHA D, MCINNES I B. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2016, 388(10055):2023-2038.
- [ 9 ] 周学平,陈岩,李国春,等. 从瘀热探讨类风湿关节炎病机演变规律的临床流行病学调查分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(9):1222-1224.
- [ 10 ] 汪悦,王建,巩勋,等. 1602例类风湿关节炎患者中医证候分布特点的多中心横断面调查[J]. 中医杂志, 2018, 59(11):963-967.
- [ 11 ] 方勇飞,刘晓飞. 肠道菌群失调与类风湿关节炎发病及疾病进展的相关性[J]. 西部医学, 2017, 29(11):1485-1487, 1491.
- [ 12 ] 方宜梅,寇秋爱. 二四汤治疗女性类风湿关节炎活动期[J]. 中医杂志, 2018, 59(13):1160-1162.
- [ 13 ] MIYOSHI M, LIU S. Collagen-induced arthritis models[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1868:3-7.
- [ 14 ] GAO Q, QIN H, ZHU L, et al. Celastrol attenuates collagen-induced arthritis via inhibiting oxidative stress in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 84:106527.
- [ 15 ] CUZZOCREA S, MCDONALD M C, MOTA-FILIPE H, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(2):320-328.
- [ 16 ] MILICI A J, KUDLACZ E M, AUDOLY L, et al. Cartilage preservation by inhibition of Janus kinase 3 in two rodent models of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(1):R14.
- [ 17 ] BROWN P M, PRATT A G, ISAACS J D. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(12):731-742.
- [ 18 ] 熊丽,杜肖,陈宝忠,等. 脊痛宁胶囊对风寒湿痹型类风湿关节炎大鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1):140-145.
- [ 19 ] XU H, BOUTA E M, WOOD R W, et al. Utilization of longitudinal ultrasound to quantify joint soft-tissue changes in a mouse model of posttraumatic osteoarthritis[J]. Bone Res, 2017, 5:17012.
- [ 20 ] CLAVEL G, MARCHIOL-FOURNIGAULT C, RENAULT G, et al. Ultrasound and doppler micro-imaging in a model of rheumatoid arthritis in mice[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(12):1765-1772.
- [ 21 ] WEYAND C M, GORONZY J J. The immunology of rheumatoid arthritis [J]. Nat Immunol, 2021, 22(1):10-18.
- [ 22 ] 于坤,徐枝芳,余楠楠,等. 佐剂性和胶原诱导性关节炎模型比较分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(1):106-109.
- [ 23 ] ERLANDSSON H H, LILJESTRÖM M, KLARESKOG L. Characteristics of synovial fluid effusion in collagen-induced arthritis (CIA) in the DA rat, a comparison of histology and antibody reactivities in an experimental chronic arthritis model and rheumatoid arthritis (RA) [J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107(3):480-484.
- [ 24 ] MIYOSHI M, LIU S. Collagen-induced arthritis models[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1868:3-7.
- [ 25 ] BROWN A K, QUINN M A, KARIM Z, et al. Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: evidence from an imaging study may explain structural progression [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(12):3761-3773.
- [ 26 ] LI Y, LIU Y, WANG C, et al. Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1 $\alpha$ /VEGF axis [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 126:1-14.
- [ 27 ] SZEKANECZ Z, BESENYEI T, SZENTPÉTERY A, et al. Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2010, 22(3):299-306.
- [ 28 ] 牛坤旭. 二四汤治疗女性类风湿关节炎临床研究 [D]. 北京:中国中医科学院, 2020.
- [ 29 ] 寇秋爱,房定亚. 类风湿冲剂治疗急性期类风湿性关节炎 34 例的临床疗效观察 [J]. 中医杂志, 1995(9):537-539.
- [ 30 ] 李院魏,高骥,李双印. 联合 GEO 数据库使用网络药理学探讨四妙勇安汤治疗类风湿关节炎的作用机制 [J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(5):19-23, 39.
- [ 31 ] 杲东,卜寿山. 六味地黄汤合四物汤治疗类风湿关节炎临床研究 [J]. 中医学报, 2017, 32(6):1079-1081.
- [ 32 ] 赵晶晶,郑福增,周子朋,等. 基于网络药理学和分子对接探讨桃红四物汤治疗类风湿关节炎的作用机制 [J]. 世界中医药, 2021, 16(12):1792-1796.

[责任编辑 孙丛丛]