

## 治尙汤联合甲氨蝶呤调节RANKL/OPG通路改善胶原诱导 关节炎大鼠骨破坏的作用机制

马茹<sup>1</sup>, 郭子嘉<sup>2</sup>, 陶庆文<sup>3</sup>, 鄢泽然<sup>3</sup>, 刘振权<sup>4\*</sup>, 徐愿<sup>2,3\*</sup>

(1. 西安市公共卫生中心(西安市应急医疗中心), 西安 710200;

2. 内蒙古医科大学中医学院, 呼和浩特 010110;

3. 中日友好医院中医风湿病科, 免疫炎症性疾病北京市重点实验室, 北京 100029;

4. 北京中医药大学国家体质与治未病研究院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:探究治尙汤联合甲氨蝶呤改善胶原诱导关节炎模型(CIA)大鼠的骨破坏作用及机制。方法:SD雄性大鼠随机分为正常组,模型组,甲氨蝶呤组(1.5 mg·kg<sup>-1</sup>),甲氨蝶呤+治尙汤低(40.8 g·kg<sup>-1</sup>),高(102.0 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组。除正常组外,其余大鼠分别于第1,7天尾部注射浓度为2 g·L<sup>-1</sup>的Ⅱ型胶原乳剂50 μL建立CIA模型;第8天开始连续给药21 d,每7 d检测1次体质量、足趾厚度,进行关节炎指数(AI)评分,酶联免疫吸附测定法检测血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1β(IL-1β)含量,抗酒石酸性磷酸酶染色法检测踝关节破骨细胞的数量,免疫组化(IHC),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测踝关节核转录因子-κB受体活化因子配体(RANKL),骨保护素(OPG)的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠体质量显著降低( $P<0.01$ ),足趾厚度显著增加( $P<0.01$ ),踝关节AI评分显著增加( $P<0.01$ ),血清TNF-α,IL-6,IL-1β含量显著升高( $P<0.01$ ),踝关节破骨细胞数量显著增加( $P<0.01$ ),踝关节RANKL mRNA和蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ),OPG mRNA和蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ),RANKL/OPG显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,甲氨蝶呤+治尙汤低、高剂量可改善大鼠体质量,降低足趾厚度,AI评分,RANKL mRNA和蛋白表达并增加OPG mRNA和蛋白表达,使RANKL/OPG降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),且甲氨蝶呤+治尙汤高剂量效果最好,甲氨蝶呤+治尙汤低剂量次之,甲氨蝶呤再次之。结论:治尙汤联合甲氨蝶呤能更好地改善类风湿关节炎的骨破坏,可能是通过抑制RANKL/OPG通路实现的,本研究为中西医结合方案治疗类风湿关节炎骨破坏提供了实验基础。

**[关键词]** 类风湿关节炎; 治尙汤; 核转录因子-κB受体活化因子配体(RANKL)/骨保护素(OPG)通路; 骨破坏

**[中图分类号]** R22;R242;R285.5;R2-031;R593.22;R255.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0046-09

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220113.1457.005.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-14 9:41

### Mechanism of Zhiwang Decoction Combined with Methotrexate Against Bone Destruction Through Regulating RANKL/OPG Pathway in Rats with Collagen-induced Arthritis

MA Ru<sup>1</sup>, GUO Zi-jia<sup>2</sup>, TAO Qing-wen<sup>3</sup>, YAN Ze-ran<sup>3</sup>, LIU Zhen-quan<sup>4\*</sup>, XU Yuan<sup>2,3\*</sup>

(1. Xi'an Public Health Center (Xi'an Emergency Medical Center), Xi'an 710200, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China;

3. Beijing Key Laboratory of Immune Inflammatory Diseases, Rheumatology Department of TCM, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China;

4. National Institute for TCM Constitution and Preventive Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[收稿日期]** 20210817(026)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81603588);北京市中医药科技发展项目(QN-2020-32)

**[第一作者]** 马茹, 硕士, 从事类风湿关节炎的发病机制研究, Tel:029-86088986, E-mail:mr2019zryhy@163.com

**[通信作者]** \*刘振权, 博士, 教授, 从事中医药治疗男科疾病与作用机制研究, Tel:029-86088986, E-mail:lzqbzy@sina.com

\*徐愿, 博士, 副主任医师, 从事中医药治疗类风湿关节炎临床疗效评价和作用机制研究, Tel:010-84205442, E-mail:xuyuan2004020@163.com

**[Abstract] Objective:** To explore the effect and mechanism of Zhiwang decoction combined with methotrexate (MTX) against bone destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA). **Method:** Male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, an MTX group ( $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and low- ( $40.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and high- ( $102.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) combination groups (MTX+ Zhiwang decoction). The CIA model was induced in rats except for those in the normal group by tail injection of  $50 \mu\text{L}$  of  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  type II collagen on the 1st and 7th days. From the 8th day, the rats were treated correspondingly for 21 days. The body weight, toe thickness, and arthritis index (AI) were measured every seven days. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of inflammatory factors in the serum, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Tartrate-resistant acid phosphatase staining was used to detect the number of osteoclasts in the ankle joint. The expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in ankle tissues was detected by immunohistochemistry (IHC), real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR), and Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed decreased body weight ( $P < 0.01$ ), increased toe thickness and AI score ( $P < 0.01$ ), up-regulated serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  ( $P < 0.01$ ), elevated number of osteoclasts ( $P < 0.01$ ), increased mRNA and protein expression of RANKL ( $P < 0.01$ ), reduced mRNA and protein expression of OPG ( $P < 0.05$ ), and increased RANKL/OPG ratio ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the high-dose combination group showed increased body weight, decreased toe thickness and AI score, reduced mRNA and protein expression of RANKL, up-regulated mRNA and protein expression of OPG, and declining RANKL/OPG ratio ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The therapeutic effect was optimal in the high-dose combination group, followed by the low-dose combination group and the MTX group. **Conclusion:** Zhiwang decoction combined with MTX can improve bone destruction induced by rheumatoid arthritis, which may be achieved by inhibiting the RANKL/OPG pathway. This study provides an experimental basis for the treatment of bone destruction induced by rheumatoid arthritis with integrated traditional Chinese and western medicine.

**[Keywords]** rheumatoid arthritis; Zhiwang decoction; receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) pathway; bone destruction

类风湿关节炎(RA)是一种以滑膜增生、血管翳形成、骨及软骨破坏为主要特征的常见免疫疾病,以手足小关节为主要受累部位,致残率高,RA骨破坏是本病预后差的主要原因,骨破坏在RA早期即可出现,且为不可逆的病理变化。服用西药抑制骨破坏效果仍不理想,且长时间用药增加感染、肿瘤、肝肾损害、血液系统受累风险,且治疗费用昂贵,给患者家庭和社会带来了沉重的负担<sup>[2]</sup>,如甲氨蝶呤是治疗RA的“锚定药”,一项研究纳入709例RA患者,给予甲氨蝶呤治疗104周后,影像学评分平均增加了10.4分,放射学虽较空白组稍有缓解,但仍持续进展<sup>[3]</sup>。延缓骨破坏是RA治疗中最具挑战的目标之一,也是近些年来RA机制研究和靶向药物研发的热点<sup>[4]</sup>。阐明RA骨破坏持续进展的途径对于更好地理解RA的病理机制和设计新的方法来治愈这种严重的关节疾病是非常有意义的。

全国首批名老中医焦树德教授创立了以治尪汤为基础的系列方剂治疗本病,并且取得了较为满

意的疗效<sup>[5-7]</sup>。但是,采用中西医结合方案治疗骨破坏是否具有协同增效作用,并且其机制尚不明确,还需进一步探究。

RA骨破坏与核转录因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )受体活化因子配体(RANKL)/骨保护素(OPG)通路失调有密切的相关性<sup>[8]</sup>。RANKL由成骨细胞、软骨细胞等合成分泌,通过结合破骨细胞唯一靶受体NF- $\kappa\text{B}$ 受体活化因子(RANK),诱导破骨前体细胞分化形成破骨细胞、激发破骨细胞活性。OPG是被认为具有骨保护作用的标志物,通过竞争性作用于RANKL,从而抑制破骨细胞发挥骨破坏功能。在这一过程中,RANKL/OPG非常重要,反映着骨破坏的情况<sup>[9-10]</sup>。

目前治尪汤联合甲氨蝶呤治疗RA及其抗骨破坏的作用机制还未知。因此开展了本实验进行研究,以期为中西医结合方案治疗RA骨破坏提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD雄性大鼠,50只,8~9周龄,

体质量(280±20)g,由北京斯贝福生物有限公司提供,许可证号SYXK(京)2016-0043。于中日友好医院临床研究所实验动物中心屏障系统中饲养。温度(23±2)°C,湿度(65±5)%。本实验经过中日友好医院实验动物伦理委员会审查批准(伦理编号180112),实验操作及过程严格执行伦理委员会的相关规定。

**1.2 药品与试剂** 治尪汤由川续断15 g(批号19037704),熟地黄20 g(批号19007731),补骨脂15 g(批号19057756),骨碎补18 g(批号19067798),制附片9 g(批号19007988),淫羊藿10 g(批号19007602),白芍15 g(批号19007734),赤芍10 g(批号19017673),桂枝10 g(批号19007609),独活10 g(批号19077864),防风10 g(批号19017331),威灵仙15 g(批号19007133),地鳖虫10 g(批号19038003),麻黄6 g(批号19017712),川牛膝12 g(批号19027632),苍术10 g(批号19027508),知母12 g(批号19017116),伸筋草20 g(批号19027341)组成,共含生药227 g。治尪汤方中药材均购自北京同仁堂药材有限责任公司,所有药材经中日友好医院副主任药师赫军鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》标准。将各药材混合后加入4倍体积双蒸水浸泡30 min,煎2次,每次煎30 min,去渣过滤混合,60 °C水浴中浓缩至含生药3.4 g·mL<sup>-1</sup>和8.5 g·mL<sup>-1</sup>,使用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液将甲氨蝶呤配置成质量浓度为0.125 g·L<sup>-1</sup>甲氨蝶呤混悬药液,4 °C储存备用。

甲氨蝶呤化合物(普利莱有限公司,批号M121D031);牛Ⅱ型胶原,不完全弗氏佐剂(美国Chondrex公司,批号分别为160177,160191);RANKL抗体,OPG抗体, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab203061,ab8227,23408-1-AP;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Proteintech公司,货号SA00001-2);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号PC0020);配置胶(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号034A8300);Takara逆转录试剂,基因扩增试剂(宝日医生物技术有限公司,批号分别为AJG1730A,AJG1421A);抗酒石酸酸性磷酸酶染色法(TRAP)染色试剂盒(上海生物科技有限公司,货号PMC-AK04-COS);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(爱必信生物科技有限公司,货号分别为

abs530007,abs530003,abs530002);TRIzol试剂(美国ThermoFisher科技有限公司,批号223407)。

**1.3 仪器** SMP500-18540-JIZP型酶标仪(美国Molecular Devices分子仪器公司);1828型游标卡尺(上海申韩量具有限公司);5804R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Powerpac Universal型电泳仪和转膜仪(美国Bio-Rad公司);2500R型凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);Q5-7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Biosystems公司)。

## 2 方法

**2.1 造模方法** 动物适应性喂养1周后标号,称质量。将质量浓度为2 g·L<sup>-1</sup>的牛Ⅱ型胶原逐滴加至等容积不完全弗氏佐剂中制备得到造模乳剂,使用精密注射器于第1,7天分别于大鼠左侧、右侧尾部皮内注射乳剂50  $\mu$ L。正常组每只动物每次注射50  $\mu$ L生理盐水<sup>[11]</sup>。

**2.2 分组、干预、模型评估** 模型评估与剔除<sup>[11]</sup>:采用关节炎指数(AI)评分评估发病大鼠关节炎情况,初次免疫后每7 d检测1次,观察对象为大鼠双后足,按0~4级进行评分,每只AI $\geq$ 2分为造模成功,剔除模型复制不成功者。评分标准为0分,行动自如、未出现关节红肿情况;1分,足趾出现红色斑点、轻度肿胀;2分,行动变缓、关节部位中度肿胀;3分,行动困难、关节重度肿胀;4分,几乎不再行动、关节严重肿胀。共造模40只,成模36只,各造模组每组9只。剔除后共分为5组,正常组、模型组、甲氨蝶呤组、甲氨蝶呤+治尪汤低、高剂量组,正常组10只,其余组9只。大鼠于第8天开始灌胃给药,甲氨蝶呤给药剂量为1.5 mg·kg<sup>-1</sup>,每周2次,连续3周,治尪汤给药剂量为40.8 g·kg<sup>-1</sup>(等效于临床人的剂量的2倍)和102.0 g·kg<sup>-1</sup>(等效于临床人的剂量的5倍),每天1次,连续21 d。正常组和模型组给予等量的生理盐水。人临床用药为227 g·kg<sup>-1</sup>,即3.24 g·kg<sup>-1</sup>,按体表面积折算,大鼠给药剂量为人给药剂量的6.3倍。根据前期实验研究,大鼠终给药剂量相当于人临床用药的2倍和5倍。

**2.3 实验大鼠体质量监测** 每7 d监测1次大鼠体质量。

**2.4 大鼠足跖厚度检测及关节炎指数评估** 采用游标卡尺每7 d测量1次大鼠双后足的足跖厚度并进行AI评分,最终结果为双后足的平均值。

**2.5 ELISA检测大鼠血清中TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 含量** 采用ELISA检测血清中TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 的含量。具体操作步骤参照试剂盒说明书,使用

ELISA Calc 软件制作标准曲线,以此计算待测样品。

**2.6 TRAP检测大鼠踝关节中的破骨细胞** 踝关节脱钙后,从低浓度向高浓度乙醇梯度脱水,二甲苯透明2次;石蜡浸蜡2次得到组织蜡块。切片得到石蜡切片,切片经脱蜡、水洗后于37℃孵育液中孵育60 min(六偶氮副品红1 mL加到乙酸盐溶液18 mL中,再加入萘酚AS-BI磷酸盐溶液1 mL,再加酒石酸钾钠282 mg,调整pH 5.0),蒸馏水中浸洗3 min,于苏木素染液中复染40 s,自来水水洗10 min明胶封片。显微镜视野下染色红色且细胞核≥3个者为破骨细胞,随机选取6个视野进行统计破骨细胞数量。

**2.7 免疫组化法(IHC)检测大鼠踝关节RANKL, OPG的表达** 切片经脱蜡、水洗后3%过氧化氢封闭30 min;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后滴加RANKL(1:200),OPG(1:200)兔抗大鼠单克隆一抗液体,4℃孵育过夜后PBS冲洗滴加羊抗兔IgG二抗(1:500);DAB显影,苏木素复染,中性树胶封片。显微镜视野下每个样本随机选取6个视野统计RANKL,OPG表达阳性的细胞的平均积分吸光度。

**2.8 Real-time PCR检测大鼠踝关节RANKL, OPG mRNA的表达** 冰冻组织加TRIzol匀浆后加20% TRIzol体积的三氯甲烷,持续振荡3 min后7 700 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径15 cm),吸取上层水相加等体积异丙醇,振荡离心(条件同上)弃上清,加入75%乙醇1 mL清洗管壁后弃上清,室温敞口干燥,用RNase free water溶解沉淀得到总RNA。逆转录条件为37℃,15 min,85℃,5 s。扩增条件为95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火延伸34 s,循环数为45。引物由生工生物工程(上海)股份有

限公司合成。引物序列为,RANKL上游5'-GAGCGAAGACACAGAAGCACTACC-3',下游5'-GGCAGCATTGATGGTGAGGTGAG-3',113 bp;OPG上游5'-AATTGGCTGAGTGTCTGGTGGAC-3',下游5'-TCTCGTCTGGGCTGATCTTCTTCC-3',129 bp;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游5'-GTCCATGCCATCACTGCCACTC-3',下游5'-CGCCTGCTTACCACCTTCTTG-3',109 bp。

**2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠踝关节中RANKL,OPG蛋白的表达** BCA法蛋白定量后,制备12%的分离胶和5%的浓缩胶,上样后80 V电泳2 h,300 mA转膜30 min,5%脱脂奶粉封闭2 h后加一抗,4℃孵育过夜,TBST浸洗3次,每次3 min,加入二抗室温孵育1 h,TBST冲洗3次,每次3 min,ECL发光液显影得到蛋白条带,使用软件Image J分析蛋白的相对表达水平。

**2.10 统计学分析** 实验结果采用SPSS 25.0软件统计,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,方差齐时多组间均数比较采用最小显著性差异(LSD)-*t*法,方差不齐时多组间均数比较采用Tam-hane *T2*法。AI评分采用四分位数表示,采用Kruskal-Wallis H秩和检验。*P*<0.05认为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 甲氨蝶呤联合治尙汤对CIA大鼠体质量的影响** 造模前,各组大鼠体质量差异无统计学意义,具有可比性。造模后,与正常组比较,模型组大鼠体质量明显降低(*P*<0.05,*P*<0.01);与模型组比较,甲氨蝶呤组+治尙汤高剂量组在第21,28天体质量明显升高(*P*<0.05),提示治尙汤高剂量与甲氨蝶呤联合给药对大鼠体质量降低有保护作用。见表1。

表1 甲氨蝶呤联合治尙汤治疗对CIA大鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常	10		286.0±1.9	303.0±5.2	337.1±22.4	363.6±13.1	411.8±21.7
模型	9		283.8±4.7	286.1±17.0 <sup>1)</sup>	284.8±11.7 <sup>1)</sup>	308.6±20.5 <sup>2)</sup>	310.6±26.4 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	9	1.5×10 <sup>-3</sup>	285.5±3.8	290.8±12.7	301.0±19.2	313.9±20.3	355.5±12.5 <sup>3)</sup>
甲氨蝶呤+治尙汤	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +40.8	288.6±4.8	293.9±12.9	301.6±20.2	327.0±19.4	343.1±26.4
	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +102.0	291.4±6.3	301.0±14.8	306.3±15.4	335.1±15.3 <sup>3)</sup>	361.3±38.9 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>*P*<0.05,<sup>2)</sup>*P*<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>*P*<0.05。

**3.2 甲氨蝶呤联合治尙汤对CIA大鼠足跖厚度的影响** 研究结果显示,造模前,各组大鼠足跖厚度

差异无统计学意义,具有可比性。造模后,与正常组比较,模型组大鼠第14,21,28天足跖厚度显著

增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,甲氨蝶呤组+治尪汤高剂量组在第21天足趾厚度明显降低( $P<0.05$ ),

而甲氨蝶呤组与模型组差异无统计学意义。见表2。

表2 甲氨蝶呤联合治尪汤治疗对CIA大鼠足趾厚度的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常	10		4.81±0.14	5.11±0.25	5.32±0.22	5.65±0.36	6.08±0.25
模型	9		4.89±0.17	5.27±0.28	7.73±0.63 <sup>1)</sup>	9.40±1.25 <sup>1)</sup>	9.24±0.71 <sup>1)</sup>
甲氨蝶呤	9	1.5×10 <sup>-3</sup>	4.92±0.13	5.35±0.24	7.37±0.51	9.26±1.27	8.87±1.22
甲氨蝶呤+治尪汤	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +40.8	5.06±0.20	5.26±0.54	7.77±0.69	8.99±1.02	8.40±0.65
	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +102.0	4.82±0.46	5.34±0.15	7.18±0.44	8.73±1.15 <sup>2)</sup>	7.95±1.56

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

3.3 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠踝关节AI评分的影响 造模前,各组大鼠踝关节AI评分差异无统计学意义,具有可比性。造模后,与正常组比较,模型组大鼠第14,21,28天踝关节AI评分显著增加

( $P<0.01$ )。与模型组比较,甲氨蝶呤组+治尪汤高剂量组大鼠第14天AI评分显著降低( $P<0.01$ ),甲氨蝶呤组与模型组比较差异无统计学意义。见表3。

表3 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠AI评分的影响[M(P25,P75)]

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常	10		0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
模型	9		0(0,0)	0(0,0)	4.0(3.4,4.0) <sup>1)</sup>	4.0(4.0,4.0) <sup>1)</sup>	3.5(3.5,4.0) <sup>1)</sup>
甲氨蝶呤	9	1.5×10 <sup>-3</sup>	0(0,0)	0(0,0)	4.0(3.4,4.0)	4.0(3.8,4.0)	3.5(3.5,4.0)
甲氨蝶呤+治尪汤	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +40.8	0(0,0)	0(0,0)	4.0(3.3,4.0)	4.0(3.5,4.0)	3.3(3.3,4.0)
	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +102.0	0(0,0)	0(0,0)	1.3(0.3,3.0) <sup>2)</sup>	3.3(3.3,4.0)	3.0(3.0,3.5)

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

3.4 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠血清TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,甲氨蝶呤组、甲氨蝶呤组+治尪汤低剂量组大鼠血清中TNF- $\alpha$ , IL-6含量

明显降低( $P<0.05$ ),甲氨蝶呤组+治尪汤高剂量组大鼠血清中TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 含量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );与甲氨蝶呤组比较,治尪汤高剂量联合组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 含量明显降低( $P<0.05$ )。见表4。

表4 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠血清中TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 含量的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
正常	10		10.00±1.6	40.00±9.18	6.01±1.54
模型	9		90.21±10.41 <sup>1)</sup>	141.37±18.53 <sup>1)</sup>	50.25±10.15 <sup>1)</sup>
甲氨蝶呤	9	1.5×10 <sup>-3</sup>	44.35±18.14 <sup>2)</sup>	103.67±11.72 <sup>2)</sup>	43.96±13.0
甲氨蝶呤+治尪汤	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +40.8	30.17±6.78 <sup>2)</sup>	96.09±10.06 <sup>2)</sup>	38.07±10.36
	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +102.0	20.09±4.76 <sup>3,4)</sup>	80.08±7.86 <sup>3)</sup>	29.07±10.69 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ ;与甲氨蝶呤组比较<sup>4)</sup> $P<0.05$ (表5同)。

3.5 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠踝关节破骨细胞数量的影响 研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠踝关节破骨细胞数量显著增加( $P<0.01$ );与模型组比较,治尪汤低、高剂量联合组大鼠踝关节中

破骨细胞数量减少( $P<0.05, P<0.01$ );与甲氨蝶呤组相比,治尪汤高剂量联合组大鼠踝关节中破骨细胞数量显著减少,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表5,图1。

表5 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠踝关节中破骨细胞数量的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 5 Effect of methotrexate combined with Zhiwang decoction on number of osteoclasts in ankles in CIA rats ( $\bar{x}\pm s$ ) 个

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	破骨细胞数量
正常	10		0
模型	9		39±7 <sup>1)</sup>
甲氨蝶呤	9	1.5×10 <sup>-3</sup>	35±6
甲氨蝶呤+治尪汤	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +40.8	22±5 <sup>2)</sup>
	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +102.0	16±4 <sup>3,4)</sup>

3.6 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠踝关节RANKL, OPG蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠踝关节RANKL蛋白表达显著升高 ( $P<0.01$ ), OPG蛋白表达明显降低 ( $P<0.05$ ), RANKL/OPG值显著升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 甲氨蝶呤+治尪汤低剂量组、高剂量联合组大鼠踝关节中RANKL蛋白表达明显降低, OPG蛋白表达明显升高 ( $P<0.05$ ), RANKL/OPG显著降低 ( $P<0.01$ ); 与甲氨蝶呤组比较, 甲氨蝶呤+治尪汤高剂量组大鼠踝关节中RANKL/OPG明显降低 ( $P<0.05$ )。见表6, 图2, 3。

3.7 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠踝关节RANKL, OPG mRNA表达的影响 与正常组比

较, 模型组大鼠踝关节RANKL mRNA表达显著升高 ( $P<0.01$ ), OPG mRNA表达明显降低 ( $P<0.05$ ), RANKL/OPG值显著升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 甲氨蝶呤+治尪汤高剂量组大鼠踝关节中RANKL mRNA表达明显降低, OPG mRNA表达明显升高 ( $P<0.05$ ), 甲氨蝶呤组、甲氨蝶呤+治尪汤低、高剂量组大鼠踝关节中RANKL/OPG明显降低 ( $P<0.01, P<0.05$ ); 与甲氨蝶呤组比较, 甲氨蝶呤+治尪汤高剂量组大鼠踝关节中RANKL mRNA表达明显降低, OPG mRNA表达明显升高, RANKL/OPG明显降低 ( $P<0.05$ )。见表7。

3.8 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠踝关节RANKL, OPG蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠踝关节中RANKL蛋白表达显著升高, OPG蛋白表达明显降低, RANKL/OPG显著升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与模型组比较, 治尪汤高剂量联合组大鼠踝关节中RANKL蛋白表达明显降低, OPG蛋白表达明显升高 ( $P<0.05$ ), 甲氨蝶呤组、甲氨蝶呤+治尪汤低、高剂量组大鼠踝关节中RANKL/OPG有所降低 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与甲氨蝶呤组比较, 甲氨蝶呤+治尪汤高剂量组大鼠踝关节中RANKL蛋白表达明显降低, OPG蛋白表达明显升高, RANKL/OPG明显降低 ( $P<0.05$ )。见表8, 图4。

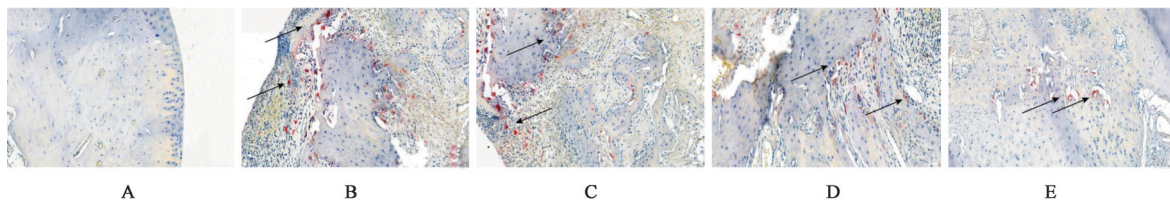


图1 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠踝关节中破骨细胞的影响 (TRAP, ×200)

Fig. 1 Effect of methotrexate combined with Zhiwang decoction on osteoclasts in ankles in CIA rats (TRAP, ×200)

表6 甲氨蝶呤联合治尪汤对CIA大鼠踝关节RANKL, OPG蛋白, RANKL/OPG的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 6 Effect of methotrexate combined with Zhiwang decoction on RANKL, OPG, RANKL/OPG of ankle joints in CIA rats ( $\bar{x}\pm s$ )

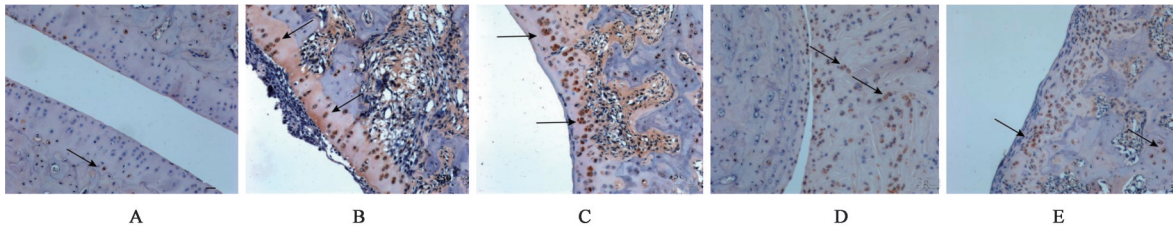
组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	RANKL	OPG	RANKL/OPG
正常	10		30.11±7.6	33.05±13.36	1.00±0.00
模型	9		295.08±8.43 <sup>2)</sup>	45.67±4.63 <sup>1)</sup>	6.46±1.73 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	9	1.5×10 <sup>-3</sup>	169.04±16.04	63.79±12.06 <sup>3)</sup>	2.65±0.75 <sup>3)</sup>
甲氨蝶呤+治尪汤	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +40.8	122.12±7.68 <sup>3)</sup>	86.00±22.37 <sup>3)</sup>	2.42±0.68 <sup>4)</sup>
	9	1.5×10 <sup>-3</sup> +102.0	83.35±8.56 <sup>3)</sup>	92.62±23.04 <sup>3)</sup>	0.90±0.16 <sup>4,5)</sup>

注: 与正常组比较<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> $P<0.01$ ; 与甲氨蝶呤组比较<sup>5)</sup> $P<0.05$ (表7, 8同)。

#### 4 讨论

RA是最常见的风湿病之一, 其致残率高达50.3%, 寻找能够改善炎症、延缓骨破坏的有效中西

医结合治疗方案, 是目前研究的热点<sup>[12]</sup>。RA炎症与骨破坏相辅相成, 相互促进, 加速着疾病的发生发展。TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 等相关炎症因子的释放,



箭头所指棕色区域为抗体阳性表达(图3同)

图2 甲氨蝶呤联合治尙汤对CIA大鼠踝关节RANKL蛋白表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 2 Effect of methotrexate combined with Zhiwang decoction on RANKL protein of ankle joints in CIA rats (IHC, ×200)

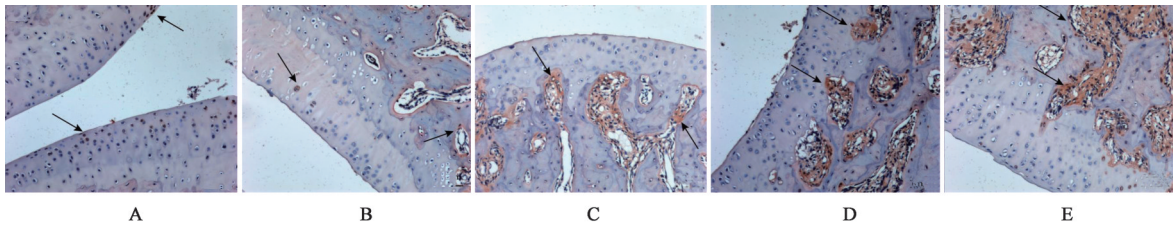


图3 甲氨蝶呤联合治尙汤对CIA大鼠踝关节OPG蛋白表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 3 Effect of methotrexate combined with Zhiwang decoction on OPG protein of ankle joints in CIA rats (IHC, ×200)

表7 甲氨蝶呤联合治尙汤对CIA大鼠踝关节RANKL, OPG mRNA及RANKL/OPG的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of methotrexate combined with Zhiwang decoction on RANKL, OPG mRNA and RANKL/OPG of ankle joints in CIA rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	RANKL mRNA	OPG mRNA	RANKL/OPG
正常		1.00±0.06	1.00±0.08	1.00±0.07
模型		2.81±0.81 <sup>2)</sup>	0.47±0.23 <sup>1)</sup>	5.99±0.90 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	1.5×10 <sup>-3</sup>	2.55±0.74	0.98±0.32	2.60±0.41 <sup>3)</sup>
甲氨蝶呤+治尙汤	1.5×10 <sup>-3</sup> +40.8	2.17±0.68	1.09±0.36	1.99±0.52 <sup>3)</sup>
	1.5×10 <sup>-3</sup> +102.0	1.56±0.16 <sup>3,5)</sup>	1.81±0.57 <sup>3,5)</sup>	0.86±0.29 <sup>4,5)</sup>

表8 甲氨蝶呤联合治尙汤对CIA大鼠踝关节RANKL, OPG蛋白表达, RANKL/OPG的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of methotrexate combined with Zhiwang decoction on expression of RANKL, OPG, RANKL/OPG of ankle joints in CIA rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	RANKL/β-actin	OPG/β-actin	RANKL/OPG
正常组		1.00±0.17	1.00±0.02	1.00±0.11
模型		2.73±0.30 <sup>2)</sup>	0.43±0.10 <sup>1)</sup>	6.35±0.39 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	1.5×10 <sup>-3</sup>	2.46±0.40	0.98±0.32	2.51±0.67 <sup>3)</sup>
甲氨蝶呤+治尙汤	1.5×10 <sup>-3</sup> +40.8	2.28±0.26	1.09±0.29	2.30±0.53 <sup>3)</sup>
	1.5×10 <sup>-3</sup> +102.0	1.54±0.08 <sup>3,5)</sup>	1.75±0.34 <sup>3,5)</sup>	0.88±0.27 <sup>4,5)</sup>

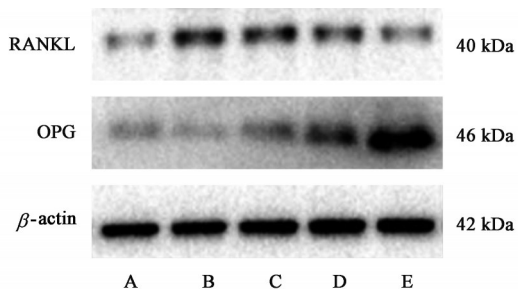


图4 CIA大鼠踝关节中RANKL, OPG蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of RANKL and OPG proteins in ankle of CIA rats

可使RANKL分泌增加,而OPG含量并未增加,一方面,RANKL增加破骨细胞数量并刺激破骨细胞成熟和分化,另一方面,TNF-α等也可直接增强破骨细胞活性,这就使得破骨细胞数量增多、活性增强,进而成骨细胞/破骨细胞轴失衡,骨破坏持续进展<sup>[13-14]</sup>。不难看出,RANKL/OPG通路失调对于RA骨破坏起到了关键作用。究其本质,学者们普遍认为,在RANKL/OPG通路中,RANKL和OPG始终是调控着破骨细胞-成骨细胞轴平衡和维持骨稳态过

程的重要因子,RANKL/OPG失调是RA骨稳态失衡的重要评估标准<sup>[15]</sup>。RANKL通过刺激破骨前体细胞分化成为破骨细胞并与破骨细胞上的RANK受体结合两条途径协同加速骨破坏,而OPG通过与RANKL竞争性结合,抑制以上2个途径,在这一过程中,RANKL/OPG非常重要,反映着骨破坏的情况<sup>[15]</sup>。

本病属中医“尪痹”范畴,课题组认为RA骨破坏因先天禀赋不足,肾气亏虚,外感风寒湿热邪气而为病,或因伏邪于内,感而后发。焦树德教授创立治尪汤治疗RA,该方包括川续断、补骨脂、熟地黄、骨碎补、制附片、淫羊藿、白芍、赤芍、桂枝、独活、防风、麻黄、威灵仙、苍术、知母、伸筋草、川牛膝、土鳖虫,具有补肾、强壮筋骨、通经活络、祛寒化湿的功效,自1980年运用于临床,取得了较好的疗效<sup>[18]</sup>。

课题组前期运用CIA模型发现治尪汤具有抗炎、抗骨破坏的作用,但其作用机制还未可知。为了优化处方、提高疗效,需要进一步探索不同剂量治尪汤的安全性和效果,寻找安全有效的最优方案。此外,在目前中西医结合治疗的背景下,还需要探索治尪汤与甲氨蝶呤联合使用是否能够达到增效减毒作用,作用机制上是否具有互补性。

本研究发现,治尪汤联合甲氨蝶呤可以显著改善大鼠大体情况,提示中西医结合治疗可以减轻毒副作用。本实验结果显示,治尪汤高剂量联合组大鼠体质量在第21,28天体质量显著升高,而甲氨蝶呤组与模型组比较无差异,提示治尪汤与甲氨蝶呤联合给药对大鼠体质量降低有保护作用。由此可看出,治尪汤安全性好,有利于大鼠体质量的恢复。

治尪汤联合甲氨蝶呤可以显著改善CIA大鼠关节炎情况,提示中西医结合治疗可以增强疗效。治尪汤高剂量联合组大鼠第14天AI评分降低,提示联合用药比单用西药具有更好的抗炎效果;与模型组相比,治尪汤低剂量联合组、治尪汤高剂量联合组大鼠血清中TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$ 含量显著降低,与甲氨蝶呤组比较,治尪汤高剂量联合组血清中TNF- $\alpha$ ,IL-6含量显著降低。这些研究结果说明了治尪汤与甲氨蝶呤联合具有增效的效果。

治尪汤联合甲氨蝶呤可以显著改善CIA关节炎大鼠骨破坏情况,机制是抑制RANKL/OPG通路。TRAP染色结果显示,甲氨蝶呤组大鼠踝关节骨破坏情况较模型组虽有所改善,但差异无统计学意义,而治尪汤低剂量联合组、治尪汤高剂量联合

组大鼠踝关节破骨细胞数量减少,骨破坏情况明显减轻;免疫组化结果显示,联合用药可使大鼠踝关节中RANKL蛋白表达显著降低,OPG蛋白表达显著升高,RANKL/OPG值降低,与单用甲氨蝶呤比较具有显著差异。同时,Western blot和Real-time PCR结果提示,甲氨蝶呤组大鼠较模型组大鼠踝关节中RANKL mRNA及蛋白表达有所降低,OPG mRNA及蛋白表达有所升高,RANKL/OPG值变化差异无统计学意义,而治尪汤低剂量联合组、治尪汤高剂量联合组大鼠踝关节中RANKL mRNA及蛋白表达显著降低,OPG mRNA及蛋白表达显著升高,RANKL/OPG值降低,差异具有统计学意义。可以看出,治尪汤是通过下调RANKL且上调OPG mRNA及蛋白的表达,进而抑制破骨细胞的生成,从而发挥抗炎抗骨破坏的作用。

综上所述,本研究探索治尪汤联合甲氨蝶呤的中西医结合用药方案,发现高剂量治尪汤对甲氨蝶呤的治疗具有增效减毒的效果,治尪汤是通过抑制RANKL/OPG通路,进而抑制破骨细胞的生成,从而发挥抗炎抗骨破坏的作用。本研究为优化治尪汤临床治疗方案、提高临床疗效提供了实验基础,为中医补肾壮骨法的科学内涵提供了实验基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4): 265-270.
- [2] 曹芝艳,于泓. 类风湿关节炎治疗研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59(21): 108-111.
- [3] SMOLEN J S, ALETAHA D, MCINNES I B. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [4] SPARKS J A. Rheumatoid arthritis[J]. Ann Intern Med, 2019, 170(1): ITC1-ITC16.
- [5] 马茹,陈冬雪,鄢泽然,等. 补肾祛寒治尪汤联合甲氨蝶呤对大鼠胶原诱导关节炎模型的抗炎作用研究[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(4): 85-91.
- [6] 徐愿,阎小萍,肖诚,等. 补肾祛寒治尪汤对胶原诱导关节炎大鼠抗炎与抗骨破坏的作用及对Wnt/ $\beta$ -catenin通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(4): 289-295.
- [7] 何春晓,陈光耀,徐愿,等. 补肾祛寒治尪汤联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎系统综述[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(12): 1643-1647.
- [8] TANAKA S. RANKL is a therapeutic target of bone

- destruction in rheumatoid arthritis [J]. *F1000Res*, 2019, doi: 10.12688/f1000research.17296.1.
- [9] TANAKA S, TANAKA Y. RANKL as a therapeutic target of rheumatoid arthritis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1):106-112.
- [10] YAN M, SU J, LI Y. Rheumatoid arthritis-associated bone erosions: evolving insights and promising therapeutic strategies[J]. *Biosci Trends*, 2020, 14(5): 342-348.
- [11] ZHAO H, XU H, QIAO S, et al. Boldine isolated from *Litsea cubeba* inhibits bone resorption by suppressing the osteoclast differentiation in collagen-induced arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 51:114-123.
- [12] ZHOU Y, WANG X, AN Y, et al. Disability and health-related quality of life in Chinese patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study [J]. *Int J Rheum Dis*, 2018, 21(9):1709-1715.
- [13] WANG T, HE C. TNF- $\alpha$  and IL-6: the link between immune and bone system[J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(3):213-227.
- [14] KIKUTA J, ISHII M. Bone imaging: osteoclast and osteoblast dynamics [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1763:1-9.
- [15] TU Y, WANG K, TAN L, et al. Dolichosin A, a coumestan isolated from *Glycine tabacina*, inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammation in SW982 human synovial cells and suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis: from network pharmacology to experimental pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258:112855.
- [16] YANG H, LIU W, ZHOU X, et al. The association between RANK, RANKL and OPG gene polymorphisms and the risk of rheumatoid arthritis: a case-controlled study and Meta-analysis [J]. *Biosci Rep*, 2019, doi:10.1042/BSR20182356.
- [17] 徐愿,陶庆文,王艳,等. 基于伏邪学说辨治类风湿关节炎[J]. *北京中医药大学学报*, 2018, 41(3): 181-185.
- [18] 王建明,张艳珍,马骁,等. 补肾清化治尪汤联合甲氨喋呤治疗类风湿关节炎湿热伤肾证的疗效[J]. *中日友好医院学报*, 2018, 32(2):67-70.

[责任编辑 王鑫]