

黄芪桂枝五物汤抗类风湿性关节炎的作用机制

林婉娜¹, 苏慧琳¹, 李慧敏¹, 彭东辉², 洪菲惠², 曾元宁¹, 沈志滨¹, 王秋红^{1,2*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广东省中药饮片规范化炮制工程技术研究中心, 广州 510006;
2. 黑龙江中医药大学教育部北药基础与应用研究重点实验室 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础
研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 基于黄芪桂枝五物汤治疗类风湿性关节炎的临床应用, 通过药理学研究, 揭示其作用机制。方法: 采用大鼠尾部注射牛Ⅱ型胶原及弗氏佐剂建立胶原诱导性(CIA)模型, 给予不同浓度的黄芪桂枝五物汤治疗。实验分为正常组、模型组、甲氨蝶呤($0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、黄芪桂枝五物汤低、高剂量($5.13, 20.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组, 连续灌胃给药4周。通过观察大鼠关节肿胀程度、记录大鼠体质量、测定足肿胀度、关节炎指数评分及苏木素-伊红(HE)染色检测大鼠踝关节病理形态变化明确黄芪桂枝五物汤对类风湿性关节炎的治疗作用; 利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清中白细胞介素- 1β (IL- 1β)、IL-6、IL-10及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达水平, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠膝关节滑膜组织核转录因子- κ B(NF- κ B)通路相关蛋白表达水平, 以明确黄芪桂枝五物汤治疗类风湿性关节炎的作用机制。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠第29天起体质量显著下降($P < 0.01$), 第15天起足肿胀度及关节炎指数评分显著升高($P < 0.01$), 踝关节形态功能受损, 血清炎症因子IL- 1β , IL-6, TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$), 抗炎因子IL-10水平显著下降($P < 0.01$), 膝关节滑膜NF- κ B通路相关蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪桂枝五物汤低、高剂量组体质量显著升高($P < 0.01$), 大鼠足肿胀度与关节炎指数评分明显下降($P < 0.05, P < 0.01$), 踝关节功能形态明显好转, 血清炎症因子IL- 1β , IL-6, TNF- α 显著下降($P < 0.01$), 抗炎因子IL-10水平显著升高($P < 0.01$), 膝关节滑膜NF- κ B通路相关蛋白表达水平明显下降($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 黄芪桂枝五物汤可通过负性调控NF- κ B信号通路, 从而缓解CIA大鼠体内炎症反应, 显著缓解关节炎症状。

[关键词] 类风湿关节炎; 黄芪桂枝五物汤; 核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路; 胶原诱导性(CIA)大鼠; 抗炎

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R284; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0009-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220607

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220114.1038.001.html>

[网络出版日期] 2022-01-14 16:09

Therapeutic Mechanism of Huangqi Guizhi Wuwutang on Rheumatoid Arthritis

LIN Wan-na¹, SU Hui-lin¹, LI Hui-min¹, PENG Dong-hui², HONG Fei-hui², ZENG Yuan-ning¹,
SHEN Zhi-bin¹, WANG Qiu-hong^{1,2*}

(1. *Guangdong Engineering Technology Research Center for Standardized Processing of Chinese Herbal Decoction Pieces, School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China*; 2. *Heilongjiang Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Bases and Natural Medicines, Key Laboratory of Northern Medicine Foundation and Application, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Heilongjiang 150040, China*)

[Abstract] **Objective:** To reveal the mechanism of action of Huangqi Guizhi Wuwutang in the treatment of rheumatoid arthritis by pharmacological research based on its clinical application. **Method:** The

[收稿日期] 2021-10-27

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1707100); 国家自然科学基金项目(81773904); 广东省重点领域研发计划项目(2020B11111120002)

[第一作者] 林婉娜, 在读硕士, 从事中药药效物质基础及活性研究, E-mail: 1053782081@qq.com

[通信作者] * 王秋红, 博士, 教授, 从事中药炮制、中药药效物质基础及活性研究、新药研发, E-mail: qhwang668@sina.com

collagen-induced arthritis (CIA) rat model was established by injecting bovine type II collagen and Freund's adjuvant at the tail, and was treated with different concentrations of Huangqi Guizhi Wuwutang. The rats were randomly divided into blank group, model group, methotrexate ($0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and Huangqi Guizhi Wuwutang low- and high-dose ($5.13, 20.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) groups, with continuous intragastric administration for 4 weeks. The degree of joint swelling, weight, degree of foot swelling and arthritis index score were determined and the pathological changes of ankle joints were detected by hematoxylin and eosin (HE) staining to observe the therapeutic effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on rheumatoid arthritis. In addition, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot were used to measure the expression of interleukin 1β (IL- 1β), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and the expression of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) pathway related proteins in synovial tissue, respectively to clarify the molecular mechanism of Huangqi Guizhi Wuwutang in the treatment of rheumatoid arthritis. **Result:** Compared with the conditions in blank group, the body weight and IL-10 level were decreased ($P < 0.01$), and the degree of foot swelling and arthritis index score, the levels of IL- 1β , IL-6 and TNF- α , and the expression of NF- κ B pathway related proteins were increased ($P < 0.01$,) in the model group, with impaired morphology and function of the ankle joint. Additionally, compared with the model group, Huangqi Guizhi Wuwutang low- and high-dose groups had increased body weight of rats and IL-10 level ($P < 0.01$), and reduced degree of foot swelling and arthritis index score ($P < 0.05, P < 0.01$), levels of IL- 1β , IL-6 and TNF- α ($P < 0.01$) and expression of NF- κ B pathway related proteins ($P < 0.05, P < 0.01$), with improved function and morphology of the ankle joint. **Conclusion:** Huangqi Guizhi Wuwutang can significantly alleviate joint inflammatory injury by down-regulating NF- κ B pathway and reducing the inflammatory response in CIA rats.

[Keywords] rheumatoid arthritis; Huangqi Guizhi Wuwutang; nuclear factor kappa-B (NF- κ B) pathway; collagen-induced arthritis (CIA) rat; anti-inflammatory

类风湿关节炎(RA)是一种慢性自身免疫性疾病,是指由持续性关节滑膜炎、全身炎症以及自身类风湿因子抗体产生等原因引起的破坏性、对称性关节病变,该疾病伴有关节疼痛、麻木甚至肿胀、畸形等^[1-2]。研究指出类风湿关节炎所有病理机制都与持续性的滑膜炎有关,而促炎因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的炎症反应则是引起滑膜炎的关键因素^[3]。有研究表明,核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路的激活是促炎因子过度表达的主要原因,也与类风湿关节炎炎症的的发生密切相关^[4-5]。黄芪桂枝五物汤出自张仲景《金匮要略》,组方中君为黄芪,益气固表,臣为桂枝,散风寒而温经通阳,黄芪合桂枝,以益气通阳,佐为白芍,养血敛阴,佐使为姜枣,和中调营卫,全方旨在温通阳气,调畅营血^[6],具有益气温经、和血通痹之功效;在临床上主要用于治疗神经炎、类风湿性关节炎、产后身痛、冠心病等多种内科疾病^[7-8]。黄芪桂枝五物汤中具有黄芪甲苷、苯甲酰芍药内酯苷、没食子酸等多种有效抗炎成分^[9],在临床和实验研究均显示该方能显著改善类风湿关节炎的临床症状^[10-12]。

本研究基于NF- κ B信号通路这一类风湿关

炎主要病理机制,通过建立经典胶原诱导性(CIA)动物模型并给予黄芪桂枝五物汤进行干预,通过干预后CIA大鼠关节炎症状、血清炎症因子白细胞介素- 1β (IL- 1β)、IL-6、TNF- α 和抗炎因子IL-10及NF- κ B通路相关蛋白的表达情况,揭示黄芪桂枝五物汤治疗RA的分子作用机制。

1 材料

1.1 动物 5~6周龄SPF级SD雄性大鼠50只,购于广东省医学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2018-0002。所有动物均常规饲养于广东省医学实验动物中心SPF级实验室,本实验通过广东省医学实验动物中心实验动物伦理委员会审查,编号为C202112-04,适应性喂养7d后开展实验。

1.2 药物和试剂 黄芪桂枝五物汤由黄芪、桂枝、白芍、大枣(圻晖药业有限公司,批号分别为2009271、2009272、2009273、2009274),生姜(广州清平中药材市场)5味药材组成,均经广东药科大学刘基柱教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》项下性状规范;甲氨蝶呤片(上海上药信谊药厂有限公司,批号036200301);牛II型胶原溶液(美国Chondrex公司,货号20022);完全弗氏佐剂(CFA)、

弗氏不完全佐剂(IFA)(美国Sigma公司,货号分别为F5881、F5506);大鼠IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号分别为MM-0046R1、MM-0190R1、MM-0195R1、MM-0180R),NF- κ B p65一抗(成都正能生物技术有限公司,货号250060);NF- κ B抑制蛋白 α (I κ B α)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠抗体、HRP标记的山羊抗兔抗体、BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为AF1282、AF1186、A0216、A0208、P0012);I κ B β 一抗(武汉博士德生物有限公司,货号PB9292);苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号G1003)。

1.3 仪器 ALLEGRA X-15R型医用离心机(美国Beckman公司);SCIENTZ-48L型新芝冷冻型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技有限公司);Milli-Q advantage A10型超纯水系统(广州皇河科技有限公司);SK-L 180-E型摇床(美国赛洛捷克公司);ME104/02型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Chem Studio PLUS型超敏多功能成像仪(德国Analytikjena公司)。

2 方法

2.1 药物制备 黄芪桂枝五物汤的制备:取黄芪、桂枝、白芍、大枣、生姜,按照3:3:3:4:6的比例投料,加入10倍量的去离子水,浸泡30 min,煮至沸腾后计时3 h,煎煮2次,2次药液合并,用8层纱布过滤,使用旋转蒸发器蒸发浓缩至含生药量2.0 g·mL⁻¹, -20 °C冷藏备用。

致敏胶原乳剂的制备:将牛C II胶原溶液与CFA(或IFA)等比例混合,低温混合使其充分乳化。制得1 g·L⁻¹的致敏胶原乳剂。

2.2 CIA大鼠模型的建立、给药及取材 CIA模型建立:大鼠适应性喂养后,随机挑选10只作为正常组,剩余大鼠建立CIA模型^[13-14]。初次免疫于第1天在大鼠尾根部皮下注射牛C II+CFA 0.2 mL,加强免疫于第8天在大鼠尾根部不同于初次免疫的部位皮下注射牛C II+IFA 0.1 mL。加强免疫后,每周进行关节炎指数AI评分。

给药:初次免疫后的第14天,关节炎指数评分AI \geq 3则造模成功;挑选造模成功的大鼠随机分为模型组、甲氨蝶呤(0.9 mg·kg⁻¹·周⁻¹)组、黄芪桂枝五物汤低剂量(中药低剂量组,5.13 g·kg⁻¹·d⁻¹)组与黄芪

桂枝五物汤高剂量(中药高剂量组,20.52 g·kg⁻¹·d⁻¹)组;连续给药4周。

取材:45 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,室温静置1 h后4 °C、3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径13.5 cm,下同),分离血清,-80 °C保存备用。大鼠60 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠过量麻醉安乐死,仰位固定,剥离膝关节处毛发及肌肉组织,使用齿镊将膝关节上方髌骨提起,从髌韧带向下切割分离至胫骨处打开膝关节腔,可见与髌骨底部连接、延续向上有一层光亮的淡黄色薄膜,此处为大鼠膝关节滑膜^[15],使用镊子将滑膜组织剥离,-80 °C保存备用。大鼠踝关节上下两侧1 cm处使用骨钳断开,保存于4%多聚甲醛中固定备用。

2.3 大鼠体质量、关节足容积检测 每周观察大鼠后足关节形态与肿胀程度,并检测体质量及足容积。

足容积检测:使用导管连接同等大小两个注射器,右侧注射器使用马克笔标注并加水至标注处,以大鼠后足踝关节关节转折部位处为界限并标记,将大鼠足爪浸入至左侧注射器,抽取右侧注射器上升的水至标注处,读取抽取的水体积读数即为大鼠的后侧足容积。大鼠关节肿胀度=(造模后每周足容积-初始足容积)/初始足容积 \times 100%。

2.4 关节炎指数(AI)评分 AI评分标准见表1,以两后足评分累计为总分,总分为8分。

表1 AI评分标准

Table 1 Scoring criteria for AI

评分/分	标准
0	关节正常,无肿胀
1	足趾关节或踝关节轻度肿胀
2	踝关节至跖关节或掌关节轻度肿胀
3	踝关节至跖关节或掌关节中度肿胀
4	全足严重肿胀,关节僵直变形

2.5 HE染色观察踝关节组织病理学变化 大鼠踝关节在4%多聚甲醛中固定24 h,10%乙二胺四乙酸脱钙60 d,梯度乙醇及二甲苯脱水透明,石蜡包埋后切为厚4 mm切片,进行染色后使用中树脂封片,并在光学显微镜下观察其组织病理形态变化。

2.6 ELISA检测大鼠血清中指标含量 取大鼠血清,按照ELISA试剂盒的说明书,测定大鼠血清中的IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠膝关节滑膜组织蛋白的表达水平 取大鼠滑膜组织称

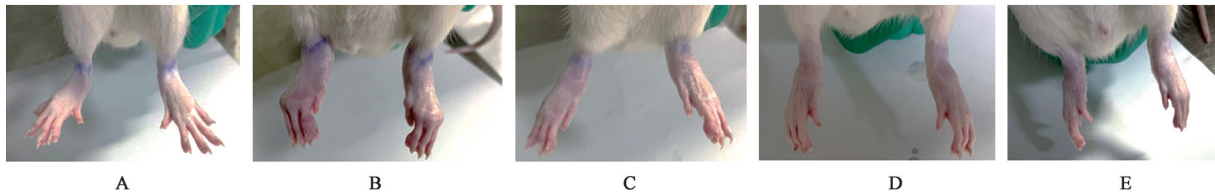
重,置于离心管中,加入RIPA裂解液,使用组织研磨器进行组织研磨,冰上裂解30 min、14 000 r·min⁻¹离心25 min,吸取上清液,BCA测定蛋白浓度,蛋白变性后取40 μg上样量,置于8% SDS-PAGE凝胶中,电泳80~110 V恒压,1.5 h,320 mA恒流3 h转膜,5%脱脂牛奶封闭1 h, TBST洗涤3次,4 °C一抗(1:1 000)孵育过夜, TBST洗涤3次,室温二抗(1:2 000)孵育1 h, TBST洗涤后将膜置于超敏多功能成像仪,加入ECL显影液曝光成像,拍照记录并使用Image J软件进行灰度值的分析对比。

2.8 统计学分析 经Graphpad Prism 7统计软件处

理,实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用t检验进行统计学处理,显著性One-way ANOVA分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CIA大鼠踝关节肿胀的影响 与正常组比较,模型组大鼠踝关节红肿明显,各大鼠关节变形且活动严重受限,部分甚至出现拖行后肢情况。与模型组大鼠比较,甲氨蝶呤组、中药低、高剂量组大鼠踝关节肿胀程度明显减轻,且各大鼠关节活动不受限,行走正常,无拖行后肢的现象。见图1。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 甲氨蝶呤组;D. 中药低剂量组;E. 中药高剂量组(图2和图3同)

图1 黄芪桂枝五物汤对CIA大鼠踝关节肿胀程度的影响

Fig. 1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwu Tang (HGWT) on ankle swelling in CIA rat

3.2 对CIA大鼠体质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠初次免疫第29天体质量显著下降($P<0.01$),虽随着实验进展有缓慢上升趋势,但与正常

组比较仍具有显著性差异($P<0.01$);与模型组比较,甲氨蝶呤组、中药低、高剂量组大鼠体质量显著升高($P<0.01$)。见表2。

表2 黄芪桂枝五物汤对CIA大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of HGWT on weight of CIA rat ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第1天	第8天	第15天	第22天	第29天	第36天	第43天
正常组		205.89±6.13	212.62±6.12	228.81±8.77	257.10±8.62	250.43±8.17	255.84±9.76	266.73±7.11
模型组		206.31±6.71	219.28±10.16	224.62±10.28	250.79±7.36	237.59±8.45 ²⁾	241.76±8.53 ²⁾	254.28±7.40 ²⁾
甲氨蝶呤组	0.9×10 ⁻³	204.52±6.35	215.23±7.20	228.39±7.25	254.77±8.04	250.41±7.41 ⁴⁾	257.69±7.91 ⁴⁾	269.15±10.36 ⁴⁾
中药低剂量组	5.13	203.60±6.66	214.78±7.57	220.82±8.50	249.80±8.86	248.53±5.73 ⁴⁾	253.64±7.28 ⁴⁾	269.89±6.24 ⁴⁾
中药高剂量组	20.52	200.65±6.34	211.15±7.51	224.84±7.12	258.27±8.92	254.03±7.35 ⁴⁾	265.75±8.35 ⁴⁾	283.54±6.97 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3-表6)

3.3 对CIA大鼠足趾肿胀度的影响 与正常组比较,模型组大鼠在初次免疫后第8~15天足趾肿胀度逐渐升高,第29天达到峰值($P<0.01$);与模型组比

较,甲氨蝶呤组、中药低、高剂量组大鼠足趾肿胀度上升速度较慢且初次免疫后29 d显著下降($P<0.01$)。见表3。

表3 黄芪桂枝五物汤对CIA大鼠足趾肿胀度的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of HGWT on toe swelling of CIA rat ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第8天	第15天	第22天	第29天	第36天	第43天
正常组		2.20±2.20	2.62±2.14	3.03±1.99	3.03±1.99	3.45±2.55	3.03±1.99
模型组		2.66±2.67	32.62±7.71 ²⁾	56.06±8.61 ²⁾	65.48±7.02 ²⁾	55.03±7.13 ²⁾	59.43±7.90 ²⁾
甲氨蝶呤组	0.9×10 ⁻³	2.63±2.96	33.45±7.75	24.80±8.34 ⁴⁾	25.18±6.05 ⁴⁾	18.77±7.35 ⁴⁾	10.07±6.06 ⁴⁾
中药低剂量组	5.13	2.63±2.96	34.09±7.99	25.86±5.02 ⁴⁾	39.71±7.88 ⁴⁾	25.91±7.34 ⁴⁾	20.33±7.81 ⁴⁾
中药高剂量组	20.52	2.57±2.10	33.69±6.61	29.56±8.35 ⁴⁾	39.29±7.20 ⁴⁾	28.68±9.32 ⁴⁾	21.86±7.61 ⁴⁾

3.4 对CIA大鼠关节炎指数AI的影响 与正常组比较,模型组大鼠在初次免疫后的第8~15天关节炎指数评分显著升高,在第29天达到峰值,后出现下降趋势;与模型组比较,甲氨蝶呤组大鼠关节炎指

数评分在初次免疫后第22天显著下降($P<0.01$);与模型组比较,中药低、高剂量组大鼠关节炎指数评分在初次免疫后第22天均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。见表4。

表4 黄芪桂枝五物汤对CIA大鼠关节炎指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 4 Effect of HGWT on arthritis index of CIA rat ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	关节指数(AI)/分					
		第8天	第15天	第22天	第29天	第36天	第43天
正常组		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组		0.00±0.00	3.80±0.87 ²⁾	5.20±1.83 ²⁾	6.60±1.08 ²⁾	5.80±1.89 ²⁾	5.60±1.69 ²⁾
甲氨蝶呤组	0.9×10 ⁻³	0.00±0.00	3.90±0.94	1.70±1.10 ⁴⁾	2.30±1.42 ⁴⁾	1.80±1.66 ⁴⁾	1.60±1.74 ⁴⁾
中药低剂量组	5.13	0.00±0.00	3.90±0.94	3.30±1.42 ³⁾	3.90±1.64 ⁴⁾	3.30±1.85 ⁴⁾	2.60±2.01 ⁴⁾
中药高剂量组	20.52	0.00±0.00	3.90±1.04	3.50±1.20	4.10±1.70 ⁴⁾	3.10±1.37 ⁴⁾	2.50±1.75 ⁴⁾

3.5 对CIA大鼠血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及IL-10水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平显著升高($P<0.01$),IL-10水平显著降低,差异有显著统计学意义($P<0.01$);与

模型组比较,甲氨蝶呤组、中药低、高剂量组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平显著下降($P<0.01$),IL-10水平出现不同程度的升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。见表5。

表5 黄芪桂枝五物汤对CIA大鼠血清炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 5 Effect of HGWT on inflammatory factors levels of CIA rat ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-10
正常组		226.75±7.91	170.82±2.32	619.64±7.32	224.66±2.33
模型组		367.91±10.57 ²⁾	231.83±3.65 ²⁾	714.21±11.24 ²⁾	106.16±2.86 ²⁾
甲氨蝶呤组	0.9×10 ⁻³	264.25±3.63 ⁴⁾	177.87±2.50 ⁴⁾	621.50±5.62 ⁴⁾	213.97±2.16 ⁴⁾
中药低剂量组	5.13	235.47±8.68 ⁴⁾	186.81±2.56 ⁴⁾	626.71±7.33 ⁴⁾	217.33±2.83 ⁴⁾
中药高剂量组	20.52	271.60±8.208 ⁴⁾	185.45±3.01 ⁴⁾	623.29±6.68 ⁴⁾	212.04±2.85 ⁴⁾

3.6 对CIA大鼠踝关节组织病理形态的影响 与正常组比较,模型组踝关节组织中可见大量骨组织坏死溶解,被大面积增生的结缔组织取代,损伤侵袭至松质骨,伴有较多新生血管及大量散在的淋巴

细胞、中性粒细胞与巨噬细胞浸润。与模型组比较,甲氨蝶呤组、中药低、高剂量组关节软骨表面较为光滑,软骨表面结缔组织增生程度减轻,有少量淋巴细胞点状浸润。见图2。

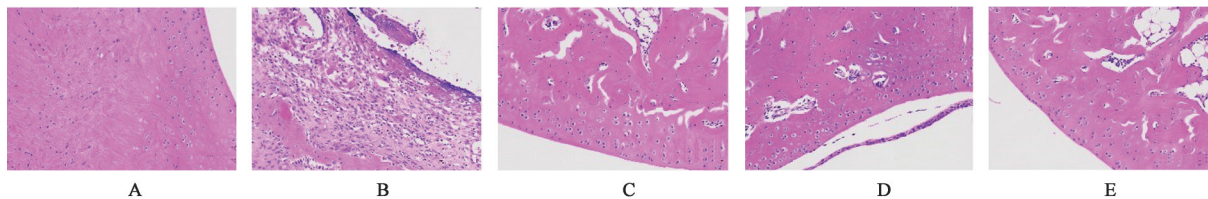


图2 黄芪桂枝五物汤对CIA大鼠踝关节组织病理形态的影响(HE, ×200)
Fig. 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on histopathological morphology of ankle joint in CIA rats (HE, ×200)

3.7 对CIA大鼠膝关节滑膜IKK α 、NF- κ B p65、I κ B α 、I κ B β 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠膝关节滑膜组织IKK α 、NF- κ B p65、I κ B α 、I κ B β 蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,甲氨蝶呤组,中药低、高剂量组大鼠膝关节滑膜组织IKK α 、NF- κ B p65、I κ B α 、I κ B β 蛋白表达量明显

降低($P<0.05$, $P<0.01$),而中药低剂量组IKK α 、NF- κ B p65、I κ B α 、I κ B β 蛋白表达量降低优于甲氨蝶呤组。见表6和图3。

4 讨论

类风湿关节炎是一种涉及多系统的慢性免疫性疾病,主要表现为持续性关节滑膜增生,大量血

表6 黄芪桂枝五物汤对膝关节滑膜IKK α 、NF- κ B p65、I κ B α 、I κ B β 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of HGWT on relative expressions of IKK α , NF- κ B p65, I κ B α , I κ B β proteins in synovial tissues of CIA rat ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IKK α /GAPDH	NF- κ B p65/GAPDH	I κ B α /GAPDH	I κ B β /GAPDH
正常组		0.37±0.20	0.15±0.10	0.64±0.14	0.21±0.07
模型组		1.27±0.13 ²⁾	1.70±0.01 ²⁾	1.44±0.04 ²⁾	1.39±0.13 ²⁾
甲氨蝶呤组	0.9×10 ⁻³	0.69±0.27 ³⁾	1.05±0.25	0.81±0.12 ⁴⁾	0.70±0.11 ⁴⁾
中药低剂量组	5.13	0.13±0.03 ⁴⁾	0.57±0.41 ⁴⁾	0.57±0.30 ⁴⁾	0.56±0.27 ⁴⁾
中药高剂量组	20.52	0.19±0.07 ⁴⁾	0.76±0.04 ⁴⁾	0.83±0.21 ⁴⁾	0.68±0.18 ⁴⁾

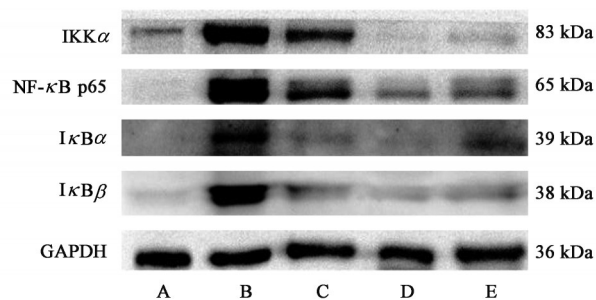


图3 各组大鼠膝关节滑膜IKK α 、NF- κ B p65、I κ B α 、I κ B β 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of IKK α , NF- κ B p65, I κ B α , I κ B β proteins expression in each group rats

管翳的生成以及炎症细胞浸润滑膜组织等。若不及时治疗,将导致骨和软骨的渐行性破坏,引发关节损伤、畸形以及其他的心血管并发症^[16],且具有极高的致残率。目前西医主要使用抗炎抗风湿药物、生物免疫抑制剂治疗RA,虽能改善疼痛症状,但价格昂贵,单一使用无法有效控制RA的疾病进展^[17],且都具有严重的胃肠道反应、心血管损伤等毒副作用^[18]。类风湿关节炎在中医学上属“痹症”范畴;《黄帝内经·素问》痹论篇有云:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。”《黄帝内经·灵枢·百病始生篇六十六》亦谓“风雨寒热不得虚,邪不能独伤人。”均表明RA的病因与体亏虚,外感风寒湿邪;RA关键病机为病虚邪实,日久致脏腑功能衰退,气血循环受阻,痹阻经络,侵袭关节,使关节肿胀,强直,变形^[19-21]。黄芪桂枝五物汤出自张仲景《金匮要略》,具有益气温经、和血通痹之功效。现代药理学研究表明,黄芪桂枝五物汤具有抗炎、抗氧化、免疫抑制等作用^[22],可用于预防和治疗类风湿关节炎、糖尿病周围神经病变、脑卒中后遗症等多种内科疾病^[23]。本次研究结果显示,CIA大鼠足关节出现明显红肿、变形的情况,踝关节病理切片也可观察到关节滑膜增生、炎症细胞大量浸润、血管翳生成、关节软骨出现破坏的现象,显示CIA模型造模成功;黄芪桂枝五物汤给药干预1周后,大鼠关节停止肿

胀且肿胀度明显减小,关节炎指数显著下降,临床使用剂量是本次研究缓解关节肿胀及炎症的最佳有效浓度。提示黄芪桂枝五物汤可单独使用或作为辅助用药,有效缓解类风湿关节炎的临床症状。

炎症细胞因子在一定程度上调节先天和适应性免疫反应,对滑膜炎的产生及RA的发展具有关键作用;而NF- κ B与促炎细胞因子的产生、免疫细胞的转移以及骨吸收密切相关,是RA的关键治疗靶点之一^[24]。关节中巨噬细胞在炎症状态下,I κ B蛋白降解,NF- κ B被释放并转移到细胞核中,调控炎症因子基因表达,促炎细胞因子分泌显著增加,引发炎症级联反应,而促炎细胞因子的产生能反过来激活IKK、I κ B、NF- κ B p65,进一步激活NF- κ B通路的表达,诱导大量炎症细胞浸润滑膜组织,导致滑膜炎、血管翳生成及滑膜的过度增殖,加快类风湿关节炎的病理发展进程^[5,25]。本实验研究结果显示,CIA大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 促炎因子显著上升,IL-10抗炎因子显著下降,膝关节滑膜NF- κ B通路及下游JAK2/STAT3通路相关蛋白表达量显著上升,显示造模成功;黄芪桂枝五物汤给药干预后,大鼠血清中促炎因子水平显著下降,抗炎因子水平显著上升;同时,膝关节滑膜NF- κ B通路相关蛋白表达量显著下降,且低剂量组优于甲氨蝶呤组。提示黄芪桂枝五物汤可通过抑制NF- κ B通路及其下游相关靶基因的表达治疗类风湿关节炎。

综上所述,黄芪桂枝五物汤能显著改善CIA大鼠关节炎症状,缓解关节病变进程以及体内炎症反应,其作用机制可能与抑制NF- κ B通路激活有关。本研究初步验证了黄芪桂枝五物汤治疗RA的作用及机制,为黄芪桂枝五物汤应用于RA的临床治疗提供可靠的科学理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] LEE D M, WEINBLATT M E. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2001, 358(9285): 903-911.

- [2] 杨丽,刘荣华,黄四碧,等. 类风湿性关节炎的发病机制及治疗药物研究进展[J]. 中国药房, 2021, 32(17):2154-2159.
- [3] SCOTT D L, WOLFE F, HUIZINGA T W. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [4] ILCHOVSKA D D, BARROW D M. An Overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions [J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(2): 102741.
- [5] DUAN W, LI H. Combination of NF- κ B targeted siRNA and methotrexate in a hybrid nanocarrier towards the effective treatment in rheumatoid arthritis [J]. J Nanobiotechnology, 2018, 16(1):58.
- [6] 周聪,喻嵘,谭艳,等. 血痹病机与黄芪桂枝五物汤的理论探讨[J]. 中国医药导报, 2020, 17(9): 127-129, 133.
- [7] 苏也滔,徐京育. 黄芪桂枝五物汤的临床研究进展[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(24):171.
- [8] 冯鑫,常钰甜,高艳霞. 黄芪桂枝五物汤的临床应用举隅[J]. 中国民间疗法, 2021, 29(8): 113-115.
- [9] 韩迪,王姗姗,唐嵩媛,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的黄芪桂枝五物汤基准样品化学成分分析及表征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, doi: 10.13422/j.cnki. syfjx. 20212154.
- [10] 刘佳维,王永辉,李艳彦,等. 黄芪桂枝五物汤对类风湿关节炎CIA模型大鼠JAK-STAT信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(4): 811-814.
- [11] 蔡鑫,唐芳,马武开,等. 基于网络药理学研究黄芪桂枝五物汤治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(2): 28-33.
- [12] 卢雯雯,裴一婧,范小芬,等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap-MS和网络药理学探索黄芪桂枝五物汤治疗类风湿关节炎的作用机制及实验验证[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(24): 6454-6464.
- [13] HOLMDAHL R, VINGSBO C, MALMSTRÖM V, et al. Chronicity of arthritis induced with homologous type II collagen (C II) in rats is associated with anti-C II B-cell activation[J]. J Autoimmun, 1994, 7(6): 739-752.
- [14] TRENTHAM D E, TOWNES A S, KANG A H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis [J]. J Exp Med, 1977, 146(3): 857-868.
- [15] 邓超,孔立红. 一种快速取大鼠膝关节滑膜的方法[J]. 实验动物科学, 2019, 36(2): 76-77.
- [16] MCINNES I B, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [17] SCHNITZER T J. Update on guidelines for the treatment of chronic musculoskeletal pain [J]. Clin Rheumatol, 2006, 25(Suppl 1): S22-29.
- [18] MATHEWS A L, COLESKA A, BURNS P B, et al. Evolution of patient decision-making regarding medical treatment of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2016, 68(3): 318-324.
- [19] 何静,汪悦. 类风湿关节炎中医证候的系统生物学研究现状[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4145-4147.
- [20] 刘婷,张斗胜. 抗风湿性关节炎的中药及作用机制研究进展[J]. 药学研究, 2020, 39(1): 44-48.
- [21] 王林,李贞玉,周彩云. 活动期类风湿关节炎中医证型与凝血/纤溶指标的相关性研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(17): 2643-2647.
- [22] LV Z M, SHEN J Y, GAO X J, et al. Herbal formula Huangqi Guizhi Wuwutang attenuates paclitaxel-related neurotoxicity via inhibition of inflammation and oxidative stress[J]. Chin Med, 2021, 1: 76.
- [23] 高艳奎,柳荣,朱向东,等. 黄芪桂枝五物汤的临床应用及量效探讨[J]. 中医研究, 2019, 32(8): 74-77.
- [24] XU N, WANG Y, ZHAO S, et al. Naltrexone (NTX) relieves inflammation in the collagen-induced- arthritis (CIA) rat models through regulating TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 79: 106056.
- [25] WANG Q, ZHOU X, YANG L, et al. The natural compound notopterin binds and targets JAK2/3 to ameliorate inflammation and arthritis[J]. Cell Reports, 2020, 32(11): 108158.

[责任编辑 周冰冰]