

黄连解毒汤调控炎性免疫抗类风湿性关节炎机制

揭珊珊¹, 孙慧娟¹, 刘建鑫¹, 朱鏐变², 曾辉³, 马雅奎^{1*}

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 北京 100015;

3. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038)

[摘要] 目的:观察黄连解毒汤对胶原诱导性关节炎(CIA)模型小鼠病理改变及免疫损伤的影响,探讨黄连解毒汤抗类风湿性关节炎的可能机制。方法:24只DBA/1小鼠,随机分为正常组、模型组、甲氨喋呤组和黄连解毒汤组,每组6只,采用Ⅱ型胶原诱导建立CIA小鼠模型,给药组给予黄连解毒汤水煎液(5 g·kg⁻¹)和甲氨喋呤(0.5 mg·kg⁻¹)干预,观察小鼠关节肿胀症状,每3 d进行关节炎指数评分,评分达到峰值后取材;流式细胞仪检测外周血粒细胞、单核细胞、T淋巴细胞;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测关节炎因子表达;微计算机断层扫描技术(Micro-CT)扫描踝关节;苏木素-伊红(HE)染色检测关节组织病理改变。结果:与正常组比较,模型组小鼠关节肿胀,关节炎指数评分明显升高($P<0.05$);外周血粒细胞比例明显升高($P<0.05$),单核细胞、T淋巴细胞比例明显降低($P<0.05$),中性粒细胞淋巴细胞比例(NLR)显著升高($P<0.01$);关节组织炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6表达升高($P<0.01$);Micro-CT可见踝关节明显骨质破坏,病理可见到关节周围组织存在大量的炎性细胞浸润、滑膜增生。与模型组比较,黄连解毒汤组小鼠关节肿胀症状明显减轻,关节炎指数评分明显降低($P<0.05$);外周血T淋巴细胞比例升高,NLR显著降低($P<0.01$);关节中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达显著下降($P<0.01$);骨破坏及关节组织病理损伤情况明显改善。结论:Ⅱ型胶原导致CIA小鼠全身和关节局部炎性免疫损伤,黄连解毒汤干预减轻炎性免疫损伤,并且对关节局部的作用更为显著,从而抑制CIA小鼠关节病变和骨破坏。

[关键词] 类风湿性关节炎; 黄连解毒汤; 胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠; 炎性免疫

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0028-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221336

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220507.1134.001.html>

[网络出版日期] 2022-05-07 16:45

Huanglian Jiedutang Regulates Inflammatory Immunity to Relieve Rheumatoid Arthritis

JIE Shanshan¹, SUN Huijuan¹, LIU Jianxin¹, ZHU Liuluan², ZENG Hui³, MA Yaluan^{1*}

(1. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences,

Beijing 100700, China; 2. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital,

Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3. Beijing Shijitan Hospital,

Capital Medical University, Beijing 100038, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Huanglian Jiedutang on pathological and immune damage in collagen-induced arthritis (CIA) model mice, and to explore the possible mechanism of Huanglian Jiedutang in relieving rheumatoid arthritis. **Method:** Twenty-four DBA/1 mice were randomly divided into normal group, model group, methotrexate group and Huanglian Jiedutang group, with six mice in each group. The CIA mice model were established using type II collagen induction. The administration groups were respectively treated with Huanglian Jiedutang (5 g·kg⁻¹) and methotrexate (0.5 mg·kg⁻¹). The joint swelling

[收稿日期] 2022-03-10

[基金项目] 中国中医科学院自主选题研究项目(YZ-202016)

[第一作者] 揭珊珊,在读硕士,从事中西医结合基础研究,E-mail:jss010210@163.com

[通信作者] *马雅奎,博士,研究员,从事中医药抗炎与免疫药理研究,E-mail:yajuanma@163.com

symptoms of the mice were observed, and the arthritis index was scored every 3 days. Flow cytometry was employed to detect granulocytes, monocytes, and T lymphocytes in peripheral blood. The expression of inflammatory cytokines in joint was determined by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The ankle joint was scanned by micro-computed tomography (Micro-CT), and the histopathological changes were observed through hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** Compared with the normal group, the modeling led to joint swelling, elevated the joint index score ($P<0.05$), increased the proportion of granulocytes ($P<0.05$) and decreased that of monocytes and T lymphocytes ($P<0.01$) in peripheral blood, and raised the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) ($P<0.01$). Further, it up-regulated the expression of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)- 1β , and IL-6 in joint ($P<0.01$). Micro-CT showed obvious bone destruction in the ankle joint, and pathological examination revealed the infiltration of a large number of inflammatory cells and the synovial hyperplasia of joint tissue. Compared with the model group, Huanglian Jiedutang alleviated the symptoms of joint swelling, lowered the score of arthritis index ($P<0.05$), increased the proportion of T lymphocytes and lowered NLR ($P<0.01$). Moreover, it down-regulated the expression levels of TNF- α , IL- 1β , and IL-6 in joint ($P<0.01$) and alleviated the bone destruction and pathological injury of joint tissue. **Conclusion:** Type II collagen caused systemic and local inflammatory immune damage in CIA mice. Huanglian Jiedutang alleviates such injury, especially for that in local joint, thereby inhibiting joint injury and bone destruction in CIA mice.

[Keywords] rheumatoid arthritis; Huanglian Jiedutang; collagen-induced arthritis (CIA) mouse; inflammatory immunity

类风湿性关节炎(RA)是一种慢性自身免疫性疾病,以侵犯关节及周围组织为主,特征为淋巴细胞、粒细胞、单核/巨噬细胞等多种免疫细胞和炎性介质相互作用,免疫紊乱进而导致的机体局部和全身炎性免疫损伤^[1],疾病反复发作,最终导致滑膜、软骨和骨组织的侵蚀与破坏^[2],疾病后期致残率高。因此,RA早期采用药物抑制炎性免疫损伤,是治疗RA的重要环节。

黄连解毒汤源于葛洪《肘后备急方》卷二,由黄连、黄柏、黄芩、栀子4味中药组成,为清热解毒的代表方,用于治各类实热火毒、三焦热盛之证,相当于现代医学的微生物感染引起的多种急性感染性疾病。随着药理研究的深入发现,黄连解毒汤抗炎作用显著,其临床应用也逐渐拓展到血管性疾病、消化系统疾病、皮肤烧伤、脓毒症等疾病的治疗^[3]。目前,临床及实验研究发现,黄连解毒汤可用于治疗RA^[4-5],但其机制尚未进行进一步的深入研究。

课题组前期系列研究表明,黄连解毒汤对机体全身和局部均有免疫调节作用。黄连解毒汤可调控中性粒细胞和单核-巨噬细胞的数量和功能,抑制高脂血症/动脉粥样硬化模型小鼠全身炎症反应和血管、肝脏局部免疫损伤^[6-10]。因此,本研究拟观察黄连解毒汤对胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠关节损伤的改善作用,探讨其抗RA的免疫调节机制。

1 材料

1.1 动物 24只DBA/1(H-2q)雄性8周龄小鼠,体重(20±2)g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号SCXK(沪)2017-0005,实验于中国中医科学院中医基础理论研究所动物房完成,温度20~25℃,湿度40%~60%。实验动物使用许可证号SYXK(京)2021-0017,通过动物福利伦理委员会审查,动物实验伦理审查编号2020-023。

1.2 药物及试剂 黄连解毒汤由黄连9g、黄芩6g、黄柏6g、栀子9g组成,均购于北京同仁堂药店(批号分别为20140208、20140111、109213101、13121901),所有饮片由北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定,黄连解毒汤水煎液制备:称量相应剂量各饮片,加6倍量水浸泡1h,煮沸后改文火煎煮30min,倒出药液,加4倍量水煎20min,两次药液合并,浓缩至60mL,含黄连解毒汤生药质量浓度为0.5g·mL⁻¹;甲氨喋呤片(通化茂祥制药有限公司,批号210204),溶液制备:将甲氨喋呤溶于0.3%的羧甲基纤维素钠(CMC-Na),充分溶解,配制成0.05g·L⁻¹的甲氨喋呤溶液;鸡II型胶原、完全弗氏佐剂(美国Chondrex公司,货号分别为20011、7015);逆转录试剂盒(日本Takara公司,货号RR047A);TRIzol(北京六合通经贸有限公司,货号9109);PowerUp™ SYBR™ Green 预混液(美国

Thermo公司,货号A25742);流式细胞抗体CD11b-PerCP cy5.5、Ly6G-BV510、FACS裂解液(美国BD公司,货号分别为550993、740157、349202);CD48-PE Cy7(美国BioLegend公司,货号103423);CD3-FITC(美国Invitrogen公司,货号11-0032-82);苏木素(北京九州柏林生物科技有限公司,批号20191119);伊红(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号18091203)。

1.3 仪器 BD FACS Canto II型流式细胞仪(美国BD公司),CFX96 TouchDeepWell型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司),Scope A1型正置显微镜(德国ZEISS公司),RS0800604-0063型微计算机断层扫描(Micro-CT)仪(美国GE Healthcare公司)。

2 方法

2.1 CIA模型制备^[11] 等体积鸡II型胶原溶液与完全弗氏佐剂在冰浴条件下充分混合乳化后,按0.1 mL/只(100 μg/只),于小鼠尾部根部处向背部方向进针1 cm后行皮内散点注射,第21天进行二次免疫,正常组注以等体积生理盐水。造模成功标准^[12]:小鼠关节红肿、活动受限,重者关节变形,病理可见滑膜增生,关节内炎性细胞浸润。本研究采用DBA/1小鼠制备CIA模型的成模率为80%。

2.2 分组及给药 24只DBA/1小鼠随机分为正常组、模型组、甲氨蝶呤组、黄连解毒汤组,每组6只。二次免疫前1周开始给药,按照临床等效剂量,人(70 kg)与小鼠(20 g)体表面积换算,甲氨蝶呤组给予0.5 mg·kg⁻¹甲氨蝶呤溶液,按1次/3 d灌胃给药^[13];黄连解毒汤组给予5 g·kg⁻¹黄连解毒汤水煎液,按1次/d灌胃给药^[8-10]。

2.3 关节指数(AI)评分 观察小鼠关节肿胀程度和活动受限情况,从二次免疫起,每3 d对小鼠关节进行评分^[14]。0分:正常,关节无红肿;1分:足趾关节轻度红肿;2分:足趾关节和足跖肿胀;3分:踝以下足爪红肿;4分:包括踝关节在内的全足均红肿并伴功能障碍;AI=四肢关节评分之和,总分为16分。关节指数评分出现下降后,取材进行检测。

2.4 流式细胞术检测外周血粒细胞(G)、单核细胞(Mo)、T淋巴细胞(T) 取小鼠外周血,应用抗小鼠CD11b-PerCPcy5.5、Ly6G-BV510、CD48-PE Cy7和CD3-FITC抗体标记染色,流式细胞仪检测G、Mo、T。分析各细胞的比例,计算中性粒细胞与淋巴细胞比例(NLR)。

2.5 Real-time PCR检测关节炎症因子mRNA表

达 剥离小鼠踝关节,采用TRIzol法提取关节组织总RNA,根据Takara试剂盒说明书设置逆转录程序,获得cDNA。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,检测关节组织炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6的表达,采用2^{-ΔΔCt}法计算相对表达量。反应体系及参数为50 °C UDG酶激活2 min,95 °C预变性2 min,95 °C变性15 s,60 °C退火60 s,40个循环。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成,序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TNF-α	上游CTGAACCTCGGGGTGATCGG	20
	下游GGCTTGCTCACTCGAATTTTGAGA	23
IL-1β	上游GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	22
	下游TGGATGCTCTCATCAGGACAG	21
IL-6	上游CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	21
	下游AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG	23
GAPDH	上游AGGTCGGTGTGAACGGATTG	21
	下游TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	23

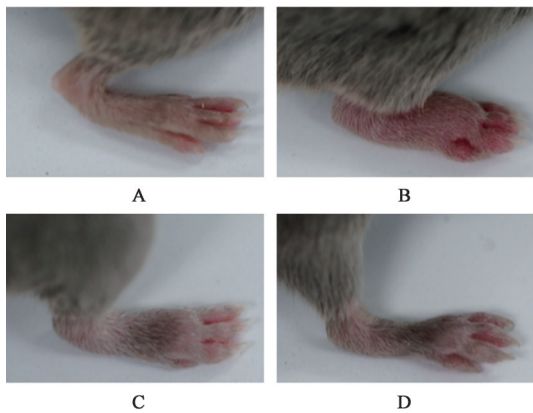
2.6 Micro-CT检测踝关节形态 取小鼠右后肢,4%多聚甲醛固定72 h,采用Micro-CT进行踝关节形态扫描成像,观察关节骨质破坏情况。

2.7 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠关节组织病理形态学变化 小鼠踝关节4%多聚甲醛固定72 h,脱钙、石蜡包埋、切片,关节组织石蜡切片依次放入二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水,HE染色,脱水封片,显微镜下观察关节组织病理学改变。

2.8 统计学分析 应用SPSS 16.0统计软件进行统计分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,重复3次实验。多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对CIA小鼠关节症状及关节指数评分的影响 与正常组比较,模型组小鼠关节红肿变形、活动受限;与模型组比较,甲氨蝶呤和黄连解毒汤给药均能显著缓解关节红肿、变形症状,见图1。与正常组比较,模型组小鼠二次免疫后第6天关节评分开始升高,第9天关节指数评分明显增高,第15天关节指数评分基本达到峰值($P < 0.05$);与模型组比较,甲氨蝶呤和黄连解毒汤干预明显降低小鼠关节指数评分($P < 0.05$),且从第9、12、15天评分看,黄连解毒汤组关节指数评分较甲氨蝶呤组更低,见表2。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 甲氨蝶呤组; D. 黄连解毒汤组 (图2、图3同)

图1 黄连解毒汤对CIA小鼠关节肿胀症状的影响

Fig. 1 Effect of Huanglian Jiedutang on joint swelling in CIA mice

3.2 对CIA小鼠外周血G、Mo、T比例及NLR的影响 与正常组比较,模型组小鼠外周血G比例升高,Mo、T比例明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),NLR显著升高($P<0.01$);与模型组比较,给药后外周血免疫细胞的比例均有不同程度变化,甲氨蝶呤干预降低G比例和NLR($P<0.05$);黄连解毒汤干预后,外周血G比例降低,但差异无统计学意义,T比例明显升高($P<0.05$),NLR显著降低($P<0.01$)。见表3。

3.3 对CIA小鼠关节炎症因子mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠关节炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,甲氨蝶呤组TNF- α 和IL-1 β 的mRNA表达显著降低($P<0.01$),黄连解毒汤组TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的mRNA表达显著降低($P<0.01$)。见表4。

表2 二次免疫后CIA小鼠关节炎指数评分($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Arthritis index score of each group of mice after second immunization ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第0天	第3天	第6天	第9天	第12天	第15天	第18天
正常组		0.00±0.00	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
模型组		0.00±0.00	0.333±0.516 ¹⁾	2.333±1.966 ¹⁾	7.167±4.167 ¹⁾	8.000±3.633 ¹⁾	9.167±2.401 ¹⁾	8.167±1.169 ¹⁾
甲氨蝶呤组	0.000 5	0.00±0.00	0.200±0.447	0.600±0.548	3.800±2.168	5.000±3.391	5.000±3.674 ³⁾	3.600±2.881 ³⁾
黄连解毒汤组	5	0.00±0.00	0.000±0.000 ³⁾	0.000±0.000 ³⁾	1.250±0.479 ³⁾	2.250±1.500 ³⁾	3.250±2.500 ³⁾	3.500±1.732 ³⁾

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4同)

表3 黄连解毒汤对CIA小鼠外周血G、Mo、T比例及NLR的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of Huanglian Jiedutang on proportion of G, Mo, T and NLR in peripheral blood of each group of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	G/%	Mo/%	T/%	NLR
正常组		52.630±4.226	5.122±1.498	19.480±3.294	2.747±0.429
模型组		59.380±4.075 ¹⁾	2.467±1.264 ¹⁾	10.630±1.542 ²⁾	5.701±0.993 ²⁾
甲氨蝶呤组	0.000 5	37.070±11.080 ³⁾	1.999±1.434	12.770±3.260	2.815±1.360 ³⁾
黄连解毒汤组	5	54.408±10.220	2.793±1.865	12.430±0.704 ³⁾	3.964±0.667 ⁴⁾

3.4 对CIA小鼠关节骨质破坏的影响 Micro-CT可见,正常组小鼠踝关节骨表面光滑,结构清晰;模型组小鼠踝关节表面粗糙不平,骨破坏严重;甲氨蝶呤和黄连解毒汤给药后,小鼠踝关节骨表面粗糙程度均有不同程度减轻。见图2。

3.5 对CIA小鼠踝关节组织病理损伤的影响 HE染色可见,正常组小鼠踝关节结构完整,无炎性浸润;模型组小鼠关节腔内可见大量炎性细胞浸润,滑膜增生明显,关节软骨结构破坏;甲氨蝶呤组踝关节可见滑膜增生、炎性细胞浸润及关节破坏减轻;黄连解毒汤干预后,踝关节有少量炎性细胞浸润,无明显滑膜增生,关节软骨结构完整。见图3。

4 讨论

RA是临床常见的一种自身免疫病,多表现为手、足关节病变,出现红肿热痛、活动受限、晨僵等,病理表现为慢性滑膜炎,反复发作可进一步累及软骨和骨组织,造成关节破坏。研究发现,在RA关节滑膜组织中,中性粒细胞、T淋巴细胞、单核/巨噬细胞、树突状细胞等免疫细胞均共同参与了RA的免疫病理过程^[1]。RA不仅仅是关节局部的炎性病损,而且是机体免疫系统失调而导致全身慢性炎症^[1,15]。中医学认为RA属“痹证”范畴,临床证型主要分为寒痹和热痹两类,活动期RA属于热痹,治法以清热解毒为主^[16]。黄连解毒汤是清热解毒的经典方剂,方中黄连为君,臣以黄芩黄柏,栀子佐使导热下行,清泻三焦,共奏泻火解毒之效。药理研究发现,黄连解毒汤具有抗炎作用,课题组前期研究发现,黄连解毒汤能调控免疫细胞,调节全身和

表4 黄连解毒汤对CIA小鼠关节组织炎症因子mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Huanglian Jiedutang on mRNA expression levels of inflammatory factors in joints in each group of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常组		1.01±0.13	1.04±0.33	1.01±0.15
模型组		23.05±8.53 ²⁾	311.40±102.90 ²⁾	8.63±2.09 ²⁾
甲氨蝶呤组	0.000 5	2.89±1.00 ⁴⁾	5.24±5.66 ⁴⁾	6.00±2.62
黄连解毒汤组	5	6.81±3.58 ⁴⁾	71.12±86.20 ⁴⁾	1.92±1.19 ⁴⁾

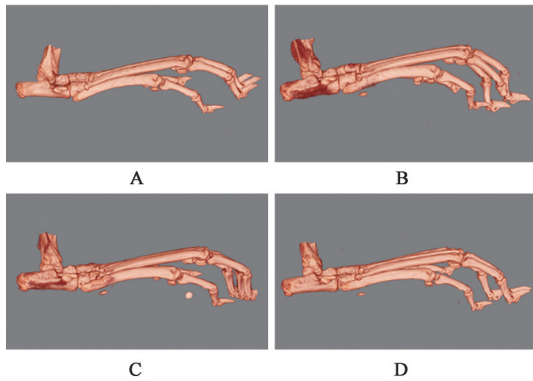


图2 黄连解毒汤对CIA小鼠踝关节骨破坏的影响
Fig. 2 Huanglian Jiedutang on osteodestruction of ankle joint in each group of mice

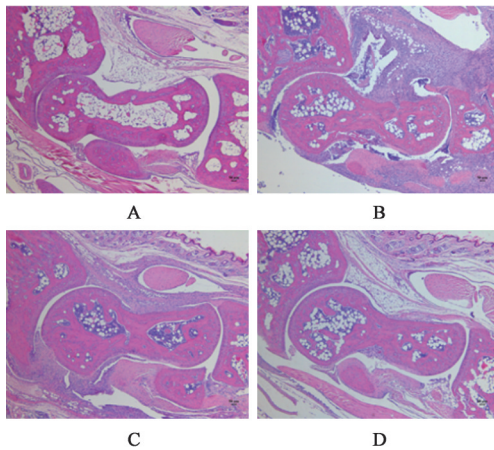


图3 黄连解毒汤对CIA小鼠踝关节组织病理变化的影响(HE, ×50)
Fig. 3 Huanglian Jiedutang on histopathological changes of ankle joint in each group of mice (HE, ×50)

局部免疫反应^[6-10]。近年来临床与实验研究证明黄连解毒汤对于RA具有治疗作用^[4-5]。

新近研究发现, NLR升高与RA发病率相关, 并可以作为潜在的诊断标准^[1, 15]。目前, 中性粒细胞和T淋巴细胞在RA中的重要作用已成为共识。RA患者外周血中性粒细胞数量增多^[2], 活化的中性粒

细胞释放的中性粒细胞胞外杀菌网络(NETs)含量与RA病变的严重程度相关^[17]; 研究发现, 中性粒细胞通过多种机制参与了RA的病变^[18]。首先, 活动期RA患者关节滑液的免疫细胞中, 中性粒细胞占比可高达90%; 血管翳/软骨界面, 也有大量活化的中性粒细胞浸润^[15]。其次, 活化的中性粒细胞可释放能够降解细胞外基质多种蛋白酶^[19], 产生呼吸爆发式(respiratory burst)活性氧簇(ROS)^[20], 合成释放TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等多种炎症因子, 导致RA的滑膜炎反应以及骨破坏。且中性粒细胞自身分泌的炎性介质和趋化因子, 可进一步募集更多的中性粒细胞和其他免疫细胞进入炎症部位^[19]。研究还发现, 患者外周血T比例降低, 推测与大量的T迁移到病变的关节组织, 参与关节免疫损伤有关^[21]。循环系统和关节腔中的T过度活化、活化的T功能紊乱、Th1/Th2细胞失衡、调节性T细胞异常等免疫应答是RA的关键因素^[22]。趋化到病变关节组织的T细胞接受关节滑膜组织的纤维细胞样滑膜细胞以MHC II类分子依赖的方式递呈修饰后自身的抗原, 活化T细胞, 促进B细胞生成自身抗体, 形成免疫复合物, 沉积在关节组织, 进一步促进免疫反应, 参与滑膜炎反应^[23]。Th1、Th2细胞分泌TNF- α 、IL-6等炎症因子促进破骨细胞形成, 参与骨与软骨的破坏, 加剧RA病理损伤^[24]。

本研究采用DBA/1小鼠制备CIA模型, 是研究RA的金标准体内模型^[25], 小鼠关节存在与RA相似的滑膜病理改变和骨质破坏。与文献报道基本一致^[26], 本研究中DBA/1小鼠制备的CIA模型成模率为80%, 模型小鼠二次免疫后逐渐出现关节红肿变形, 活动障碍, 2周后关节炎指数评分达到峰值, 出现关节滑膜损伤和骨破坏, 说明CIA模型的制备成功。研究中发现, CIA模型小鼠外周血G比例升高, 其中绝大多数为中性粒细胞, T、Mo比例明显下降, NLR显著升高, 提示模型小鼠存在系统免疫紊乱。损伤的关节组织中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6高表达, 这些炎症因子可促进关节软骨细胞、成纤维细胞和滑膜细胞产生胶原酶, 加速关节滑膜炎症和骨侵蚀^[1, 15], 关节局部损伤在病理和Micro-CT中也得到验证。

本研究中, 黄连解毒汤可下调CIA小鼠外周血G比例, 虽差异无统计学意义, 但显著提高了T比例, 从而降低NLR, 纠正系统免疫炎症损伤。黄连解毒汤还显著降低TNF- α 、IL-1 β 、IL-6表达, 不仅减少了关节炎性损伤, 而且抑制关节骨破坏, 明显减

轻了关节病理损伤。

既往研究多集中于RA的T细胞等继发性免疫,本研究将继发性免疫和固有免疫结合在一起探讨RA病变和损伤,通过外周血固有和继发性免疫细胞、关节局部炎症因子的变化,发现黄连解毒汤可以通过调控CIA小鼠全身及关节局部免疫,且对关节局部的改善作用更为显著,减少了炎性免疫损伤,从而抑制RA发生发展。本研究尚未对B细胞及其产生的特异性抗体进行研究,后续仍需进行相关的机制研究,为进一步开展临床研究及合理扩大黄连解毒汤抗炎应用提供实验基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] JUTLEY G, RAZA K, BUCKLEY C D. New pathogenic insights into rheumatoid arthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2015, 27(3): 249-255.

[2] WRIGHT H L, MOOTS R J, EDWARDS S W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(10): 593-601.

[3] 董颖,刘保光,许二平. 黄连解毒汤抗炎作用与临床应用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(12): 245-250.

[4] 郭璐露. 黄连解毒汤联合来氟米特治疗类风湿性关节炎41例临床观察[J]. *湖南中医杂志*, 2020, 36(1): 30-32.

[5] 刘忠第,姜森,谭勇,等. 类风湿关节炎寒热方证对应的网络药理学研究策略[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(9): 3191-3195.

[6] 孙慧娟,朱鏖,李蕊. 黄连解毒汤含药血清调控中性粒细胞功能的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(2): 212-217.

[7] 李彤,韩俊燕,王蓓蓓,等. 黄连解毒汤调控单核、巨噬细胞及泡沫细胞分化的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(9): 1096-1102.

[8] 陈冰,孔雅娴,李玉梅,等. 黄连解毒汤对ApoE基因敲除小鼠单核细胞发育的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(1): 99-103.

[9] 马雅鑫,李彤,王蓓蓓,等. 黄连解毒汤对高脂血症小鼠肝脏保护作用的观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(8): 1107-1111.

[10] 马雅鑫,王蓓蓓,韩俊燕,等. 黄连解毒汤对高脂饮食ApoE^{-/-}小鼠全身和主动脉血管局部免疫反应影响的研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(11): 1520-1525.

[11] 张玲玲,刘云洁,童彤,等. DBA/1小鼠胶原性关节炎模型建立方法及评价指标[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(8): 1108-1111.

[12] 杨亚旭,邵丽娟,黄小丽,等. 类风湿关节炎常用动物

造模方法的研究进展及评价标准比较[J]. *风湿病与关节炎*, 2015, 4(4): 62-66.

[13] 袁蓓,苏晓慧,郭婉怡,等. 瘀血痹片对大鼠胶原诱导性关节炎的干预作用及抗炎机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(11): 52-62.

[14] 刘立玲,田雅格,苏晓慧,等. 雷公藤多苷片和雷公藤片对CIA模型大鼠干预的量毒效比较研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(16): 3502-3511.

[15] ERRE G L, PALIOGIANNIS P, CASTAGNA F, et al. Meta-analysis of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratio in rheumatoid arthritis[J]. *Eur J Clin Invest*, 2019, 49(1): e13037.

[16] 王鑫,周彩云,马芳,等. 房定亚运用专方治疗风湿病经验[J]. *上海中医药杂志*, 2012, 46(3): 1-3.

[17] CROIA C, BURSI R, SUTERA D, et al. One year in review 2019: Pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37(3): 347-357.

[18] RHYS H I, DELL ACCIO F, PITZALIS C, et al. Neutrophil microvesicles from healthy control and rheumatoid arthritis patients prevent the inflammatory activation of macrophages[J]. *EBioMedicine*, 2018, 29: 60-69.

[19] CIZ M, DENEV P, KRATCHANOVA M, et al. Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, doi: 10.1155/2012/181295.

[20] MITTAL M, SIDDIQUI M R, TRAN K, et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury[J]. *Antioxid Redox Sign*, 2014, 20(7): 1126-1167.

[21] 王克军. 类风湿关节炎患者外周血CD4 T细胞关节局部趋化机制[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(18): 5259-5261.

[22] YANY S, ZHANG X, CHEN J, et al. Induced, but not natural, regulatory T cells retain phenotype and function following exposure to inflamed synovial fibroblasts[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(44): eabb0606.

[23] TESTA D, CALVACCHI S, PETRELLI F, et al. One year in review 2021: Pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2021, 39(3): 445-452.

[24] 杨林,吕丹,沈小芳,等. 细胞因子对类风湿性关节炎骨平衡的调节作用[J]. *生命科学*, 2019, 31(1): 35-43.

[25] 李利青,张逢,彭馥芝,等. 类风湿关节炎实验性动物模型研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(11): 1492-1497.

[26] 谢小倩,万志杰,武小晗,等. 类风湿性关节炎实验动物模型研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(80): 118-119.

[责任编辑 孙丛丛]