

# 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型滑膜组织中 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

董小君<sup>1,2</sup>, 王永辉<sup>3</sup>, 侯渊<sup>3</sup>, 张晨曦<sup>3</sup>, 赵乐<sup>1,3</sup>, 周然<sup>3\*</sup>

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 610075;

2. 遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563006;

3. 山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619)

**[摘要]** **目的:**探讨风湿宁对风寒湿痹证胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠模型滑膜组织中 Toll 样受体 4/核转录因子- $\kappa$ B (TLR4/NF- $\kappa$ B)信号通路的影响及相关的作机制。**方法:**SPF 级雌性 Wistar 大鼠随机分为 6 组,分别为正常组,模型组,阳性药组(来氟米特片,2.33 mg·kg<sup>-1</sup>),风湿宁低、中、高剂量组(9.12,18.24,36.48 g·kg<sup>-1</sup>),每组 9 只。除正常组外,其余各组大鼠采用风寒湿外感致病因素刺激,结合牛 II 型胶原乳化剂诱导的方法,制备风寒湿痹证 CIA 大鼠模型。造模成功后,各组大鼠给予相应药物灌胃干预,每日 1 次,连续 4 周。观察药物对大鼠关节肿胀度,酶联免疫吸附测定法(ELISA)血清类风湿因子(RF),环瓜氨酸肽(ACPA),白细胞介素(IL)-1 $\beta$ ,IL-10,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)滑膜组织中 TLR4,髓样分化因子 88(MyD88),NF- $\kappa$ B 酶抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ ),NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达的情况。**结果:**与正常组比较,模型组 CIA 大鼠模型的关节肿胀度明显升高,血清 RF,ACPA,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  含量显著升高,IL-10 含量显著降低,滑膜组织中 TLR4,MyD88,I $\kappa$ B $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );与模型组比较,风湿宁低、中、高剂量组可明显降低风寒湿痹证 CIA 大鼠模型的关节肿胀度与血清 RF,ACPA,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  含量,升高血清 IL-10 水平,下调滑膜组织中 TLR4,MyD88,I $\kappa$ B- $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B mRNA 与蛋白表达量( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。**结论:**风湿宁可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路,从而抑制 IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  的产生,起到治疗 RA 的作用,且其疗效与药物剂量有一定相关性。

**[关键词]** 风湿宁; 胶原诱导性关节炎; 风寒湿痹证; TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0123-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20181033

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1017.008.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-09 11:09

## Effect of Fengshining on TLR4/NF- $\kappa$ B Signal Pathway in Synovial Tissue of Wind-Cold-Dampness Arthralgia Syndrome CIA Rat Model

DONG Xiao-jun<sup>1,2</sup>, WANG Yong-hui<sup>3</sup>, HOU Yuan<sup>3</sup>, ZHANG Chen-xi<sup>3</sup>,  
ZHAO Le<sup>1,3</sup>, ZHOU Ran<sup>3\*</sup>

(1. Basic Medical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563006, China;

3. Basic Medical College of Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Fengshining on wind-cold-dampness arthralgia syndrome CIA rat model in synovial tissue based on Toll-like receptor 4/nuclear factor- $\kappa$ B (TLR4/

**[收稿日期]** 20171229(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81473589)

**[第一作者]** 董小君,在读博士,副教授,从事方剂功效发挥机制及应用研究,E-mail:57229463@qq.com

**[通信作者]** \*周然,博士,教授,博士生导师,从事方剂功效发挥机制及应用研究,Tel:0351-3179745,E-mail:zhou58@sohu.com

NF- $\kappa$ B) signal pathway. **Method:** SPF female Wistar rats were randomly divided into six groups: the blank control group, the model control group, the positive control group ( $2.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), the low, medium and high-dose Fengshining groups ( $9.12, 18.24, 36.48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with nine rats in each group. Except for the blank control group, the rest rats were included into the wind-cold-dampness arthralgia syndrome CIA rat model through the wind-cold-dampness stimulation combing with bovine type II collagen. Each group of rats was given the corresponding drug by gavage once a day for four weeks after the successful modeling. Joint swelling degree of the rats was observed. Serum rheumatoid factors (RF), anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (ACPA), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-10 (IL-10), tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected. TLR4, myeloid differentiation factor88 (MyD88), I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA and protein expressions in synovial tissue were measured. **Result:** Compared with the blank control group, the wind-cold-dampness arthralgia syndrome CIA model group showed significant increase in joint swelling degree and serum RF, ACPA, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  content, and significant reduction in IL-10 content. The mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88, I $\kappa$ B- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B in synovial tissue were significantly increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Compared with the model group, low, medium and high-dose Fengshining groups showed significant decrease in joint swelling degree and serum RF, ACPA, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  content in the wind-cold-dampness arthralgia syndrome CIA rat model, increase in serum IL-10 level, and down-regulation in mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Fengshining may play a role in the treatment of RA by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signal pathway and the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Its efficacy is correlated with drug dose to some extent.

[**Key words**] Fengshining; collagen-induced arthritis; wind-cold-dampness arthralgia syndrome; Toll-like receptor 4/nuclear factor- $\kappa$ B (TLR4/NF- $\kappa$ B) signal pathway

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎为特征的慢性、全身性、自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。疾病早期主要表现为关节疼痛、肿胀,病程日久,关节软骨及骨发生进行性破坏,功能障碍,关节畸形而残疾,给患者、家庭、社会带来了沉重的疾病负担。RA 的发生受遗传、环境、感染等诸多因素影响,关于其发病机制,至今尚未完全阐明。因此,针对 RA 发病机制的研究,以及寻找早期治疗的靶点,是国内外学者和临床工作者不断研究的一项重要课题。近年来有研究表明, Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs), 机体免疫的一类重要跨膜受体,尤其是 TLR2 和 TLR4,可引起核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 的激活<sup>[2]</sup>,参与调控细胞分化和生长、免疫应答、炎症反应、细胞黏附和细胞凋亡所必需的许多细胞因子、黏附因子等基因启动子,启动和调节这些基因的转录,在 RA 的发生发展中发挥着重要作用。风湿宁处方来源于山西省四大名老中医之一白清佐先生,由羌活、独活、麻黄、防风、熟地黄、肉桂等 17 味中药组成,具有祛风散寒除湿,活血通络止痛之功效。自 20 世纪 80 年代,风湿宁胶囊就以医院制剂的形式用来治疗类风湿性疾病,经过多年的临床验证,证实该方有明显改善 RA 患者的症状和体征,延缓并阻止了病情进展,具有良

好的镇痛及抗炎作用<sup>[3]</sup>。课题组前期通过动物实验发现<sup>[4-5]</sup>,风湿宁胶囊具有调节模型大鼠外周血中 Th1/Th2, Th17/Treg 失衡的比例,抑制炎症细胞因子分泌,促进抗炎细胞因子生成,抑制 NF- $\kappa$ B 受体活化因子配体,从而有效缓解大鼠关节软骨及骨质破坏。研究表明, NF- $\kappa$ B 信号途径在 RA 滑膜中异常持续激活,参与了关节炎及骨质破坏。因此,对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的检测,将有助于对 RA 的病变进程以及药物的作用机制进行更为深入的研究。本实验采用风寒湿外感致病因素刺激,结合牛 II 型胶原乳化剂诱导的方法,建立风寒湿痹证胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠模型,观察风湿宁对其滑膜组织中 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关基因和蛋白的影响,探讨其药效作用机制,以期为临床用药和进一步筛选有效方药提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 Wistar 雌性大鼠 65 只,体质量 ( $200 \pm 20$ ) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0011。本实验经过山西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (编号 2017-011),符合实验动物伦理委员会指导原则。

**1.2 药物及试剂** 风湿宁由羌活、独活、青风藤、片

姜黄、威灵仙、麻黄、防风、生姜、熟地黄、肉桂、砂仁、川芎、醋延胡索、川牛膝、三棱、血竭、炙甘草 17 味中药组成,均购自山西太原同仁堂药店,经山西中医药大学实验中心王永辉教授鉴定为正品,符合 2015 年版《中国药典》规定。参照传统水煎煮工艺,加工成煎剂,浓缩至含生药质量浓度为  $3.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。来氟米特片(河北万岁药业有限公司,批号 161003),使用药杵碾碎成粉末,加蒸馏水制备成质量浓度为  $0.197 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  水溶液。牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司,批号 170157),弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司,批号 SLBP9338V),临用前取适量牛 II 型胶原溶液(质量浓度为  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),逐滴加入等体积的弗氏完全佐剂,在冰浴中用匀浆器充分乳化,以滴入水中不扩散为度,配制成  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的牛 II 型胶原乳化剂。大鼠类风湿因子(RF),大鼠环瓜氨酸肽(ACPA),大鼠白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ),大鼠白细胞介素-10(IL-10),大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号分别为 1704202, 1703291, 1704121, 1704121, 1704121); trizol(美国 Ambion 公司,批号 15596026); SYBR Green PCR 试剂盒(美国 KAPA Biosystems 公司,批号 KM4101); 逆转录试剂盒(Takara 公司,批号 639505); TLR4 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc293072); 髓样分化因子(MyD88), NF- $\kappa$ B 酶抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ ), NF- $\kappa$ B p65,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab2064, ab32518, ab16502, ab23547); 山羊抗兔免疫球蛋白(IgG),山羊抗小鼠 IgG, RIPA 组织细胞快速裂解液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海 Bioswamp 公司,批号分别为 PAB160011, PAB160009, PAB180006, PAB180007); PCR 引物序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

**1.3 仪器** LRH-800-GSI 型人工气候箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司); DENLEY DRAGON Wellscan MK3 型酶标仪, Wellwash 4 MK2 型洗板机(美国 Thermo 公司); CFX96 型荧光定量 PCR 仪, Universal Hood II 型凝胶成像系统, Mini Protean 3 Cell 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Tanon-5200 型全自动化学发光分析仪(上海天能科技有限公司); Centrifuge 5424 R 型离心机(德国 Eppendorf 公司); DHG-9023A 型恒温烘箱(上海恒一科学仪器有限公司); XW-80A 型微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司); 足容积测定装置由本课题组自制。

## 2 方法

**2.1 模型制备** 适应性喂养 1 周后,随机选取 10 只大鼠,不做任何处理,常温常湿下喂养,剩余 55 只大鼠进行造模。根据文献[6]报道,结合课题组前期工作以及预实验,造模第 1 天开始,每天将大鼠放在人工气候箱内模拟风寒湿环境[湿度( $90 \pm 2$ )%, 温度( $4 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 风力 3 级]刺激 1 次,每次持续 8 h,连续 2 周;造模第 7 天,于每只大鼠右后肢足爪、尾根、背部 3 点各注射牛 II 型胶原乳化剂 0.1 mL;造模第 14 天,同法免疫加强 1 次,以制备风寒湿痹证 CIA 大鼠模型。造模结束后,结合大鼠精神状态、皮毛光泽度、足掌温度、爪甲形态、色泽、舌象等一般情况,按照 5 级评分法<sup>[7]</sup>对大鼠进行关节炎指数(arthritis index, AI)评定。评分标准为 0 分为脚爪正常或无炎症;1 分为小趾关节轻度发红或肿胀;2 分为小趾关节和足趾肿胀、发红;3 分为踝关节以下的整个脚爪全部肿胀、发红;4 分为踝关节严重肿胀和发红,关节严重变形。将每只大鼠的四肢关节病变程度累积分,计算出 AI,最高为 16 分。以大鼠有精神萎靡、弓背蜷缩、皮毛杂乱枯槁、足掌温度下降、爪甲色白、扪之发凉、舌质淡嫩、舌面水滑等风寒湿证临床表现, AI  $\geq 4$  为造模成功<sup>[8]</sup>。55 只大鼠中 48 只造模成功,造模成功率为 87.27%。

**2.2 分组及给药** 实验第 15 天,在未做任何处理的 10 只正常大鼠中,取 9 只作为正常组;另取 45 只造模成功大鼠,随机分为 5 组,分别为模型组、阳性药组、风湿宁低、中、高剂量组,每组 9 只。风湿宁低、中、高剂量组分别给予风湿宁水煎剂 9.12, 18.24, 36.48  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃;阳性药组给予来氟米特水溶液 2.33  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃;正常组、模型组给予等体积的蒸馏水。每日 1 次,连续 4 周。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 关节肿胀度检测** 于实验第 1 天起,每隔 1 周,采用水容积法测量大鼠踝关节以下(包括踝关节)的体积,按照下列公式计算其关节肿胀度。

$$\text{关节肿胀度} = (\text{造模后容积} - \text{造模前容积}) / \text{造模前容积} \times 100\%$$

**2.3.2 血清 RF, ACPA, IL- $1\beta$ , IL-10 与 TNF- $\alpha$  含量检测** 于末次给药 24 h 后,将各组大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉穿刺取血,分离血清,采用 ELISA 检测,具体步骤按照试剂盒说明书进行。

**2.3.3 滑膜组织 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B mRNA 表达检测** 大鼠取血后,沿右后肢膝关节正

中,纵行剪开皮肤,打开关节腔,取出滑膜组织, -80 ℃ 冰箱冻存备测。采用实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测,以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参,其引物序列(5'-3')如下。TLR4 上游引物 TTTTACGAATTCCACC, 下游引物 CTTTTTACAGCCAGCA, 产物长度 136 bp; MyD88 上游引物 GCTACTGCCCAATG, 下游引物 TGCGACGACACCTTT, 产物长度 159 bp; I $\kappa$ B $\alpha$  上游引物 AATACCCTCTCCATC, 下游引物 CAGCACCCAAAGTCAC, 产物长度 190 bp; NF- $\kappa$ B 上游引物 TGTTTCCCCTCATCTT, 下游引物 TCTGTGCTTCTCTCCC, 产物长度 148 bp;  $\beta$ -actin 上游引物 CGTTGACATCCGTAAGAC, 下游引物 TAGGAGCCAGGCAGTA, 产物长度 110 bp。扩增反应条件: 95 ℃ 3 min, 95 ℃ 5 s, 56 ℃ 10 s, 72 ℃ 25 s, 39 个循环; 65 ℃ 5 s, 95 ℃ 50 s。结果分析采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法, 通过  $C_t$  值计算 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量。

**2.3.4 滑膜组织 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白表达检测** 采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测,将滑膜组织剪成细小的碎片,加入 RIPA 组织细胞快速裂解液,匀浆器匀浆直至完全裂解, 4 ℃, 12 000  $\times g$  离心 15 min, 取上清,进行蛋白质定量后贮存于 -80 ℃ 冰箱备用。取蛋白 20  $\mu$ g 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,转移至 PVDF 膜上,用封闭液封闭后,加入一抗, 4 ℃ 孵育过夜。按照 1:1 万稀释 HRP 标记的二抗,与膜室温孵育 1 h。将膜放入暗室中,取 ECL 发光液加在膜的正面,然后置于全自动化学发光分析仪中检测特定蛋白条带吸光度值。选择  $\beta$ -actin 为蛋白内参,通过下列公式计算 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平。

蛋白表达水平 = 特定蛋白灰度值/ $\beta$ -actin 蛋白灰度值

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,在方差齐性的情况下,组间两两比较采用 LSD 检验;在方差不齐的情况下,使用不等方差假设项下的 Tamhane's  $T^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型一般情况的影响

正常组大鼠精神状态良好,活动自如,皮毛白亮、光泽度好,摄食、饮水量正常,体质量增长平稳,爪甲色白,舌质淡红,苔薄白。模型组大鼠精神萎靡,倦怠少动,弓背蜷缩,喜扎堆,皮毛杂乱枯槁,踝关节和

足趾关节肿胀、变形,部分大鼠足面溃烂,甚至萎废不用,摄食、饮水量减少,肛周污秽,小便清长,体质量增长减慢甚至减轻,足掌温度下降,爪甲细长,色淡白,伴有轻度紫绀,扪之发凉,舌质淡嫩,舌面水滑。风湿宁各剂量组大鼠灌服中药水煎液后,精神状态逐渐好转,关节肿胀程度有所减轻,行动迟缓情况得到改善,摄食、饮水量有所增加,体质量逐渐增长,足掌温度较模型组有所上升,舌质淡。其中风湿宁高剂量组整体好转情况优于其他用药组。

**3.2 对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型关节炎指数的影响** 造模结束后,与正常组比较,其余各组大鼠关节炎指数均显著升高( $P < 0.01$ );末次灌胃后,风湿宁各剂量组与来氟米特组大鼠关节炎指数均有不同程度的降低,与模型组比较,有显著性差异( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型关节炎指数的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9$ )

Table 1 Effect of Fengshining on arthritis index in wind-cold-dampness syndrome CIA rat model( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	造模前	造模结束后	末次灌胃后
正常	-	0	0	0
模型	-	0	5.33 ± 1.58 <sup>2)</sup>	9.11 ± 1.27 <sup>2)</sup>
来氟米特	2.33 × 10 <sup>-3</sup>	0	5.44 ± 1.51	3.89 ± 0.78 <sup>4)</sup>
风湿宁	9.12	0	5.44 ± 1.42	4.89 ± 0.93 <sup>4)</sup>
	18.24	0	5.22 ± 1.09	3.78 ± 1.39 <sup>4)</sup>
	36.48	0	5.33 ± 1.12	3.22 ± 1.09 <sup>4)</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>  $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

#### 3.3 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型关节肿胀度的影响

模型组大鼠关节肿胀度,于造模后第 1 周起,即呈上升趋势,并持续到第 6 周,与正常组同时段比较,有明显差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );实验第 3 周起,来氟米特组大鼠关节肿胀度较模型组显著降低( $P < 0.01$ );实验第 4 周起,风湿宁低、中、高剂量组大鼠关节肿胀度较模型组显著降低( $P < 0.01$ );在整个实验周期中,风湿宁中、高剂量组大鼠关节肿胀度,与来氟米特组比较,差异无统计学意义。见表 2。

#### 3.4 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型血清 RF, ACPA, IL-1 $\beta$ , IL-10 与 TNF- $\alpha$ 水平的影响

模型组大鼠血清 RF, ACPA, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  水平较正常组显著升高( $P < 0.01$ ),血清 IL-10 水平显著下降( $P <$

表 2 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型关节肿胀度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
正常	-	12.45 ± 6.13	17.65 ± 6.87	24.84 ± 8.29	29.50 ± 8.78	31.56 ± 11.78	32.75 ± 13.34
模型	-	23.79 ± 11.80 <sup>1)</sup>	51.38 ± 17.38 <sup>2)</sup>	79.21 ± 12.71 <sup>2)</sup>	88.19 ± 13.40 <sup>2)</sup>	90.52 ± 14.26 <sup>2)</sup>	93.64 ± 13.26 <sup>2)</sup>
来氟米特	2.33 × 10 <sup>-3</sup>	22.13 ± 8.77	50.07 ± 14.56	60.01 ± 15.32 <sup>4)</sup>	52.31 ± 11.07 <sup>4)</sup>	50.32 ± 15.93 <sup>4)</sup>	49.57 ± 11.26 <sup>4)</sup>
风湿宁	9.12	22.73 ± 9.47	53.86 ± 10.61	73.52 ± 10.24	61.65 ± 11.40 <sup>4)</sup>	58.31 ± 13.18 <sup>4)</sup>	52.45 ± 10.07 <sup>4)</sup>
	18.24	23.15 ± 8.88	51.67 ± 9.03	70.57 ± 11.54	57.71 ± 9.66 <sup>4)</sup>	50.67 ± 13.35 <sup>4)</sup>	44.77 ± 16.80 <sup>4)</sup>
	36.48	23.03 ± 9.42	51.55 ± 9.75	68.03 ± 13.16	51.79 ± 9.89 <sup>4)</sup>	47.30 ± 16.99 <sup>4)</sup>	42.05 ± 15.91 <sup>4)</sup>

0.01); 风湿宁各剂量组可不同程度的提高大鼠血清 IL-10 水平, 降低血清 RF, ACPA, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  水平, 与模型组比较, 有明显差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型血清 RF, ACPA, IL-1 $\beta$ , IL-10 与 TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	RF/ $\mu$ g·L <sup>-1</sup>	ACPA/ $\mu$ g·L <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ / $ng$ ·L <sup>-1</sup>	IL-10/ $ng$ ·L <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$ / $ng$ ·L <sup>-1</sup>
正常	-	257.88 ± 39.91	70.18 ± 13.82	40.41 ± 23.59	57.59 ± 22.08	21.47 ± 10.66
模型	-	451.05 ± 105.34 <sup>2)</sup>	146.27 ± 41.24 <sup>2)</sup>	117.91 ± 26.91 <sup>2)</sup>	20.25 ± 12.15 <sup>2)</sup>	36.45 ± 8.27 <sup>2)</sup>
来氟米特	2.33 × 10 <sup>-3</sup>	356.57 ± 62.75 <sup>4)</sup>	88.59 ± 26.60 <sup>4)</sup>	69.83 ± 31.59 <sup>4)</sup>	40.60 ± 16.55 <sup>3)</sup>	24.95 ± 10.91 <sup>3)</sup>
风湿宁	9.12	404.23 ± 57.27	99.78 ± 33.58 <sup>4)</sup>	84.59 ± 39.29 <sup>3)</sup>	34.04 ± 15.82	26.67 ± 13.33
	18.24	379.30 ± 66.73 <sup>3)</sup>	92.65 ± 22.25 <sup>4)</sup>	79.79 ± 42.11 <sup>3)</sup>	38.86 ± 15.57 <sup>3)</sup>	23.39 ± 11.55 <sup>3)</sup>
	36.48	320.19 ± 55.04 <sup>4)</sup>	83.31 ± 27.77 <sup>4)</sup>	57.91 ± 39.30 <sup>4)</sup>	41.90 ± 14.63 <sup>4)</sup>	22.13 ± 9.58 <sup>4)</sup>

3.5 对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型滑膜组织 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量的影响 与正常组比较, 模型组大鼠滑膜组织中 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B mRNA 表达均明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 来氟米特组 TLR4, MyD88

mRNA 表达与风湿宁低剂量组 TLR4 mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 来氟米特组和风湿宁各剂量组 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ); 风湿宁高剂量组与低、中剂量组之间比较有显著差异 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型滑膜组织 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TLR4/ $\beta$ -actin	MyD88/ $\beta$ -actin	I $\kappa$ B- $\alpha$ / $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin
正常	-	1.000 ± 0	1.000 ± 0	1.000 ± 0	1.000 ± 0
模型	-	1.363 ± 0.161 <sup>1)</sup>	2.002 ± 0.241 <sup>2)</sup>	1.461 ± 0.141 <sup>2)</sup>	1.566 ± 0.152 <sup>2)</sup>
来氟米特	2.33 × 10 <sup>-3</sup>	0.851 ± 0.061 <sup>4)</sup>	0.791 ± 0.094 <sup>4)</sup>	0.939 ± 0.149 <sup>4)</sup>	0.904 ± 0.192 <sup>4)</sup>
风湿宁	9.12	0.812 ± 0.062 <sup>4)</sup>	0.875 ± 0.179 <sup>4)</sup>	1.079 ± 0.071 <sup>4)</sup>	0.944 ± 0.168 <sup>4)</sup>
	18.24	0.877 ± 0.115 <sup>4)</sup>	0.946 ± 0.163 <sup>4)</sup>	0.948 ± 0.199 <sup>4)</sup>	1.032 ± 0.086 <sup>4)</sup>
	36.48	0.168 ± 0.022 <sup>4)</sup>	0.297 ± 0.053 <sup>4)</sup>	0.353 ± 0.039 <sup>4)</sup>	0.240 ± 0.028 <sup>4)</sup>

3.6 对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型滑膜组织 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠滑膜组织中 MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B

蛋白的表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 TLR4 蛋白的表达未见明显改变; 与模型组比较, 来氟米特组和风湿宁各剂量组 MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B 蛋白的表达明显降

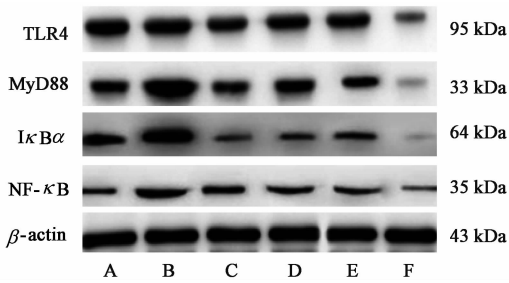
低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 风湿宁高剂量组 TLR4 蛋白表达水平极显著降低 ( $P < 0.01$ ); 风湿宁各剂量组

组间比较有明显差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5, 图 1。

表 5 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型滑膜组织 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Fengshining on TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B protein expression in synovial tissue of wind-cold-dampness syndrome CIA rat model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TLR4/ $\beta$ -actin	MyD88/ $\beta$ -actin	I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin
正常	-	1.081 $\pm$ 0.072	0.921 $\pm$ 0.135	0.903 $\pm$ 0.045	0.548 $\pm$ 0.054
模型	-	1.087 $\pm$ 0.189	1.237 $\pm$ 0.205 <sup>2)</sup>	1.122 $\pm$ 0.162 <sup>2)</sup>	0.789 $\pm$ 0.171 <sup>2)</sup>
来氟米特	2.33 $\times$ 10 <sup>-3</sup>	1.040 $\pm$ 0.050	0.878 $\pm$ 0.151 <sup>4)</sup>	0.569 $\pm$ 0.095 <sup>4)</sup>	0.624 $\pm$ 0.141 <sup>3)</sup>
风湿宁	9.12	1.062 $\pm$ 0.075	0.906 $\pm$ 0.143 <sup>4)</sup>	0.602 $\pm$ 0.075 <sup>4)</sup>	0.593 $\pm$ 0.080 <sup>4)</sup>
	18.24	1.077 $\pm$ 0.064	0.893 $\pm$ 0.169 <sup>4)</sup>	0.651 $\pm$ 0.080 <sup>4)</sup>	0.585 $\pm$ 0.077 <sup>4)</sup>
	36.48	0.488 $\pm$ 0.093 <sup>4)</sup>	0.241 $\pm$ 0.074 <sup>4)</sup>	0.174 $\pm$ 0.028 <sup>4)</sup>	0.414 $\pm$ 0.134 <sup>4)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 来氟米特组; D. 风湿宁低剂量组; E. 风湿宁中剂量组; F. 风湿宁高剂量组

图 1 各组大鼠滑膜组织 TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达电泳

Fig. 1 Expression of TLR4, MyD88, I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B protein in each group rat

#### 4 讨论

近年来有研究表明, TLRs/NF- $\kappa$ B 信号通路在 RA 的发病中具有关键作用<sup>[9]</sup>。TLRs 通过与各自的配体相结合形成二聚体复合物, 从而招募 MyD88 接头样蛋白 (Mal) 和 Toll 样受体相关蛋白 (TRAM) 到受体的胞内段, 分别结合 MyD88 和诱导 IFN- $\beta$  含 TIR 结构域蛋白 (TRIF)。MyD88 再募集并激活 IL-1R 相关激酶 (IRAK) 家族中的 IRAK1 和 IRAK4, 随后与 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 结合, 将信号传递给 TRAF6。TRIF 可直接募集 TRAF6, 还可募集受体相互作用蛋白 1 (RIP1) 协助 TRAF6 激活 NF- $\kappa$ B 激酶抑制剂 (IKK)。MyD88 与 TRIF 介导的 2 条信号途径是 TLRs 主要的 NF- $\kappa$ B 激活机制。除 TLR3 外, MyD88 依赖性信号通路存在于所有 TLR 信号中。TLR4 较特殊, 可同时介导这 2 条通路<sup>[10]</sup>。在细胞未受刺激的情况下, NF- $\kappa$ B 位于胞质中, 与 I $\kappa$ B 形成复合物, 处于静息状态。当细胞接受刺激时, I $\kappa$ B 被 IKK 磷酸化 (p), 从而释放 NF- $\kappa$ B。由此

NF- $\kappa$ B 进入细胞核, 与不同基因的启动区结合, 引起下游 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$  等炎症因子的转录表达。产生炎症细胞因子后, 进而再次激活 NF- $\kappa$ B, 导致最初的炎症信号进一步放大, 产生级联反应, 形成正反馈循环, 使得炎症反应和结构破坏得以持续发展<sup>[11]</sup>。Kim 等<sup>[12]</sup> 研究发现, 胶原诱导的 DBA/1J 小鼠 CIA 模型滑膜组织中, TLR4, MyD88, TRIF, p-I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B1 (p50), RelA (p65) 等蛋白表达量均上调, 血清 IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子水平均上升, 进一步证实了 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路与 RA 的发病密切相关。

中医学在治疗 RA 上强调“治未病”以及“辨证论治”的诊疗特点, 且奏效频频、优势突显, 在改善患者生活质量、缓解疼痛、减少致残率、减轻药物副作用等方面具有重要的临床价值和现实意义。中医学将 RA 归属于“痹证”、“历节”、“鹤膝风”等病范畴。早在《黄帝内经》,《素问·痹论》篇中就提及, “痹之安生·风寒湿三气杂至, 合而为痹也<sup>[13]</sup>。”中医学认为, 风、寒、湿等外邪是痹证发生的主要病因, 且与患者的禀赋、饮食、情志、营卫失调等密切相关<sup>[14]</sup>。正虚卫外不固, 邪气乘虚而入, 滞留机体, 痹阻经络, 不通则痛, 为痹证发生的基本病机。针对此病因病机, 课题组以 CIA 模型为基础, 结合风寒湿外感致病因素刺激, 建立风寒湿痹证 CIA 大鼠模型, 并给予不同剂量风湿宁水煎液灌胃治疗。通过观察大鼠精神状态、足掌温度、爪甲、舌象等一般情况的变化, 进行 AI 评分及关节肿胀度测量, 评价中医病证结合 CIA 大鼠模型的建立; 以血清 RF, ACPA 含量的检测, 作为诊断 RA 的特异性指标<sup>[15]</sup>; 以血清 IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  细胞因子水平, 评价动物炎症反应轻重程度; 以滑膜组织中 TLR4, MyD88,

I $\kappa$ B $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B 基因与蛋白的表达,探讨风湿宁治疗 RA 的药效作用机制。

实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠关节肿胀度与血清 RF,ACPA,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  水平明显升高,血清 IL-10 水平明显下降,滑膜组织中 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路表达显著上调。与模型组比较,风湿宁中、高剂量组大鼠灌胃治疗 4 周后,关节肿胀度与血清 RF,ACPA,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  水平显著下降,血清 IL-10 水平显著上升,滑膜组织中 TLR4,MyD88,I $\kappa$ B $\alpha$ ,NF- $\kappa$ B mRNA 与蛋白表达均显著下调,其中,风湿宁高剂量组下调程度尤其显著。

综上所述,本研究证实了风湿宁能有效治疗 RA,减轻临床症状,其作用机制之一,可能是通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路,从而抑制 IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$  的产生,起到抗炎与镇痛的作用。同时,对风湿宁低、中、高不同剂量组的疗效比较显示,随着剂量的增加,对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的抑制作用及疗效均相应增强,说明风湿宁的疗效与药物剂量有一定相关性。本研究为更全面地阐释风湿宁的药效作用机制,以及进一步寻找中药治疗 RA 的作用靶点研究提供了客观的实验依据。

#### [参考文献]

[1] 沈丕安. 类风湿关节炎中医临床诊疗[M]. 北京:人民军医出版社,2015:1.  
[2] 王圆圆,姚茹冰,蔡辉. TLR2、TLR4 与类风湿关节炎[J]. 安徽医药,2015,19(6):1201-1204.  
[3] 赵建平,刘光珍,王裕颀. 风湿宁胶囊治疗类风湿性关节炎疗效观察[J]. 山西中医,1999,15(6):8-9.  
[4] 马艳苗,李艳彦,王永辉,等. 风湿宁胶囊对活性氧介导的 T 细胞活化和滑膜凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(11):1552-1556.  
[5] 张晓园,王永辉,李艳彦,等. 风湿宁胶囊对寒湿闭阻

型类风湿关节炎模型大鼠作用机制研究[J]. 山西中医,2016,32(5):54-56.

[6] 李艳玲,祁芳,许明,等. 常用类风湿关节炎动物模型研究概况及展望[J]. 湖南中医药大学学报,2015,35(4):63-66.  
[7] YI J K, Kim H J, YU D H, et al. Regulation of inflammatory responses and fibroblast-like synoviocyte apoptosis by calcineurin-binding protein 1 in mice with collagen-induced arthritis[J]. Arthritis Rheum,2012,64(7):2191-2200.  
[8] 刘佳维,王永辉,李艳彦,等. 黄芪桂枝五物汤对 CIA 模型大鼠关节滑膜细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14):171-176.  
[9] XU D,JIANGY, YANG L, et al. Long noncoding RNAs expression profile and functional networks in rheumatoid arthritis[J]. Oncotarget,2017,8(56):95280-95292.  
[10] 黄文林,朱孝峰. 信号转导与疾病[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2012:453-454.  
[11] LIANG J, CHANG B, HUANG M, et al. Oxymatrine prevents synovial inflammation and migration via blocking NF- $\kappa$ B activation in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 55: 105-111.  
[12] Kim S H, Bang J, Son C N, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates murine autoimmune arthritis through regulation of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Korean J Intern Med,2016:1-10.  
[13] 王洪图. 内经选读[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:116.  
[14] 周仲英,周学平. 从瘀热论治内科难治病[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:416-417.  
[15] 王惠萱. 临床疾病检验项目选择与应用[M]. 北京:人民军医出版社,2010:226.

[责任编辑 周冰冰]