

# 秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎大鼠类风湿因子, C-反应蛋白及核转录因子- $\kappa$ B 的影响

苏杉, 王蓉, 赵敏, 吴晨, 高慧琴\*  
(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

**[摘要]** **目的:**观察秦艽不同配伍药对对风寒湿痹型类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)模型大鼠血清类风湿因子(rheumatoid factor, RF), C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)及踝关节核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)的影响。**方法:**选取80只SD大鼠并随机分为正常组, II型胶原组, 风寒湿病证模型组, 雷公藤多苷组, 单味秦艽组, 秦威组(秦艽配伍威灵仙), 秦桑组(秦艽配伍桑寄生), 秦防组(秦艽配伍防己), 每组10只。注射II型胶原乳剂并施加风寒湿刺激制备风寒湿RA大鼠模型。模型建立完成后正常组, II型胶原组, 风寒湿病证模型组给予生理盐水灌胃, 各给药组给予相应药液。实验过程中, 每3d测量一次大鼠左后足跖厚度, 计算足跖肿胀度; 实验第38天对各组大鼠进行关节炎指数(arthritis index, AI)评分; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清RF, CRP含量; 蛋白免疫印迹技术检测踝关节NF- $\kappa$ B的表达; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)技术检测踝关节NF- $\kappa$ B mRNA表达。**结果:**与正常组比较, II型胶原组及风寒湿病证模型组足跖肿胀度, AI评分, 血清RF, CRP水平, 踝关节NF- $\kappa$ B蛋白表达水平及NF- $\kappa$ B mRNA水平显著升高( $P < 0.01$ ); 与风寒湿病证模型组比较, 各中药组足跖肿胀度, AI评分, 血清RF, CRP水平, 踝关节NF- $\kappa$ B蛋白表达水平及NF- $\kappa$ B mRNA水平均有所降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 其中秦威组降低最明显。**结论:**平温相配的秦威组对于风寒湿痹型类风湿关节炎的疗效优于平平相配的秦桑组、平寒相配的秦防组及单味秦艽组, 实验结果与中医“疗寒以热药”的原则基本相符。

**[关键词]** 秦艽; 风寒湿痹; 类风湿关节炎; 类风湿因子; C-反应蛋白; 核转录因子- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0159-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181933

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180712.0939.002.html>

**[网络出版时间]** 2018-07-12 10:55

## Effect of Different Combined Administrations of Gentianae Macrophyllae Radix on Rheumatoid Factor, C-reactive Protein and Nuclear Factor- $\kappa$ B in Rheumatoid Arthritis Rats with Wind-cold-dampness Arthralgia

SU Shan, WANG Rong, ZHAO Min, WU Chen, GAO Hui-qin\*  
(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of differences combined administrations of Gentianae Macrophyllae Radix (GMR) on serum rheumatoid factor (RF), C-reactive protein (CRP) and ankle nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in rheumatoid arthritis (RA) model rats with wind-cold-dampness arthralgia. **Method:** Eighty healthy SD rats were randomly divided into blank control group, collagen II model group, wind-cold-dampness syndrome model group, positive control group, single-taste GMR group, GMR-Clematidis Radix et Rhizoma (CRR) group (GC group), GMR-Taxilli Herba group (GT group), GMR-Stephaniae Tetrandrae Radix group (GS group), with 10 rats in each group. Wind-cold-dampness Arthralgia model rats was induced in each group except

**[收稿日期]** 20180410(027)

**[基金项目]** 国家自然科学基金地区基金项目(81360648)

**[第一作者]** 苏杉, 在读硕士, 从事中药与复方应用研究, E-mail: 747464066@qq.com

**[通信作者]** \*高慧琴, 教授, 硕士生导师, 从事中药基础理论及临床应用研究, E-mail: ghq@gszy.edu.cn

for the blank group; collagen II model group was injected with collagen II and exposed to a wind-cold-dampness environment to prepare the wind-cold-dampness RA model of rats. After the establishment of the model, blank control group, collagen II model group and wind-cold-dampness syndrome model group were given normal saline, and the corresponding liquid medicines were given to each administration group. In the experiment, the thickness of the left posterior metatarsal of rats was measured every 3 days, and the swelling degree of the metatarsal was calculated. The arthritis index (AI) was evaluated on the 38<sup>th</sup> day of the experiment. The serum RF and CRP contents of rats were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of NF- $\kappa$ B in ankle joint was detected by Western blot. The NF- $\kappa$ B mRNA expression in ankle joint was detected by Real-time fluorescence quantitative PCR. **Result:** Compared with the blank group, the swelling degree, AI score of foot, serum RF and CRP levels, of NF- $\kappa$ B protein and mRNA expressions in the ankle joint of collagen II model group and wind-cold-dampness syndrome model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the wind-cold-dampness syndrome model group, the swelling degree, AI score of foot, serum RF and CRP levels, NF- $\kappa$ B protein and mRNA expressions in the ankle joint of the traditional Chinese medicine group were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), especially in GC group. **Conclusion:** The therapeutic effect of mild and warm traditional Chinese medicine (TCM) is better than that of the combined administration of mild and cold TCM or mild TCM drugs for rheumatoid arthritis with wind-cold-dampness arthralgia. The experimental results basically conform to the principle of 'treating cold diseases with hot medicine' in TCM.

**[Key words]** Gentianae Macrophyllae Radix; wind-cold-dampness arthralgia; rheumatoid arthritis; rheumatoid factor; C-reactive protein; nuclear factor kappa B

类风湿关节炎(RA)是一种以关节病变为主要症状的慢性、全身性自身免疫疾病,主要与炎症细胞因子过度表达等相关,使全身关节结构及功能发生改变<sup>[1]</sup>。主要临床症状表现为局部关节疼痛、肿胀、晨僵、关节软骨破坏、贫血等<sup>[2]</sup>,属中医“痹证”。RA的病因尚未明确,缺乏根本的药物治疗,目前治疗该病的理想效果是抑制炎症发展,预防骨质侵蚀或关节破坏,最大程度地改善患者的生活质量。中药功效确切,作用温和,用于治疗RA历史悠久,不良反应小。

秦艽是常用的祛风湿药,性平,具有祛风湿、止痹痛的功效。本研究是在中医理论的指导下,通过前期对秦艽不同寒热配伍的研究,选出温性祛风湿药威灵仙、平性祛风湿药桑寄生、寒性祛风湿药防己与平性祛风湿药秦艽组成平温相配、平平相配、平寒相配的配伍关系<sup>[3-4]</sup>,观察秦艽寒热不同配伍药对风寒湿痹RA模型大鼠血清类风湿因子(RF),C-反应蛋白(CRP)及踝关节核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的影响,通过比较秦艽及其寒热不同配伍药对的疗效,以进一步阐述药性与疗效的关系。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD大鼠,体质量(200±20)g,80只,雌雄皆用,甘肃中医药大学科研实验中心提供,合格证号SCXK(甘)2015-0002。本研究经甘肃

中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号2017-126。

**1.2 药物及试剂** 秦艽、威灵仙、桑寄生、防己饮片,购自兰州惠仁堂大药房,由甘肃中医药大学中药鉴定教研室李成义教授鉴定均为正品,符合2015年版《中国药典》规范;雷公藤多苷片(远大医药黄石飞云制药有限公司,批号20150501);天然牛II型胶原,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京Solarbio公司,批号分别为908E052,20170915);完全弗氏佐剂(CFA,美国Sigma公司,批号SLBS1330V);冰乙酸(天津市富宇精细化工有限公司,批号20150110);RF,CRP酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号分别为MM-20956R1,MM-0081R1);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Immunoway Biotechnology公司,批号B5201);Anti-NF- $\kappa$ B抗体(美国Abcam公司,批号ab32360);HRP标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国Abbkine公司,批号A21020);超敏发光液(美国Millipore公司,批号1518901);SYBR® Green Realtime PCR Master Mix扩增试剂盒,ReverTra Ace® PCR逆转录试剂盒(日本Toyobo公司,批号分别为717000,711000);GAPDH引物,NF- $\kappa$ B引物[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为D829KA6434,1408556118,1408556119]。

**1.3 仪器** RXZ-380A-LED 型改装后的智能人工气候箱(气候箱中装 3 个风扇,控制风速为  $5\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ )(宁波江南仪器厂);数显游标卡尺(上海申韩量具有限公司);GFL3033 型气浴恒温摇床(北京博励行仪器有限公司);Benchmark Plus 型酶标仪,S1000™ Thermal Cycler 型梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);DYY-7C 型电泳仪电源,DYCZ-24DN 型电泳仪及转膜仪(北京六一生物科技有限公司);C300 型凝胶成像仪(美国 Azure Biosystems 公司);7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 大鼠适应性喂养 3 d 后,运用随机数字表法将 80 只大鼠分为正常组,Ⅱ型胶原组,风寒湿病证模型组(Ⅱ型胶原+风寒湿刺激),阳性药组,单味秦艽组,秦艽+威灵仙组(秦威组),秦艽+桑寄生组(秦桑组),秦艽+防己组(秦防组),共 8 组,每组 10 只。

**2.2 胶原乳剂的制备** 精密吸取冰乙酸  $0.3\text{ mL}$  置于  $50\text{ mL}$  量瓶内,加入注射用水定容,得  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  冰乙酸溶液。精密称量天然牛Ⅱ型胶原  $5\text{ mg}$  置于  $25\text{ mL}$  量瓶内,在冰水浴中,用配置好的冰乙酸溶液稀释、定容,得Ⅱ型胶原溶液,于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱内过夜。注射当天,取Ⅱ型胶原溶液  $25\text{ mL}$  与等体积完全弗氏佐剂在冰水浴中充分混匀乳化,得  $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  胶原乳剂。

**2.3 造模** 参考文献[3]方法,于实验第 1 天,除正常组,其余组大鼠在背部两点(背部脊柱两侧)及尾根部一点,剃毛,皮内注射胶原乳剂  $0.1\text{ mL}$ ,共  $0.3\text{ mL}$ 。第 12 天,在大鼠左后足跖皮内注射胶原乳剂  $0.1\text{ mL}$  进行 2 次免疫,正常组在相同部位注射等体积注射用水。从初次注射胶原乳剂第 2 天开始,即实验第 2 天,除正常组及Ⅱ型胶原组,其余组大鼠均采用改装后的智能人工气候箱进行风寒湿痹型 RA 模型的造模。风寒湿环境条件:温度  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,风速  $5\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ,相对湿度  $\geq 95\%$ ,风寒湿刺激时大鼠足跖没入  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  的冰水混合液中。1 次/d,30 min/次,连续 18 d。

**2.4 药液的制备** ①中药药液均由甘肃中医药大学中药药剂实验室协助制备,单味秦艽组:称秦艽  $300\text{ g}$ ,第 1 次加 10 倍量水煎煮 1 h,第 2 次加 8 倍量水煎煮 30 min,过滤药渣后合并两次药液,浓缩至  $180\text{ mL}$ ,即含生药  $1.67\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。秦艽配伍组(秦威组、秦桑组、秦防组)按 1:1 比例分别取秦艽和威灵

仙、秦艽和桑寄生、秦艽和防己各  $150\text{ g}$ ,煎煮方法同上,药液制备完成后放入  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱内储存备用。

②雷公藤多苷液的制备,将雷公藤多苷片碾成粉末状,加适量生理盐水,配制为  $0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的雷公藤多苷混悬液,备用。

**2.5 灌胃给药** 参考文献[5-6],造模结束后,各中药组按  $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  给予相应药液,阳性药组按  $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  给予雷公藤多苷混悬液,其余组给予等量生理盐水,1 次/d,连续 21 d。

## 2.6 观察指标及方法

**2.6.1 测定足跖肿胀度** 游标卡尺测量大鼠左后足跖厚度,每 3 d 测量 1 次,计算大鼠足跖肿胀度,肿胀度 =  $(C_1 - C_0)/C_0$ ,  $C_0$  表示致炎前足跖厚度,  $C_1$  表示致炎后足跖厚度。

**2.6.2 AI 评分** 于实验第 38 天分别对大鼠进行 AI 评分,采用 5 级评分法,正常、无关节炎记 0 分,足趾关节轻度发红或肿胀记 1 分,足趾或踝关节中度肿胀记 2 分,踝关节严重肿胀或踝关节以下全部肿胀记 3 分,整个足爪肿胀或关节严重变形、不能负重记 4 分。每只大鼠 4 只足爪评分之和作为最终的关节炎评分,每只大鼠最高不超过 16 分。

**2.6.3 ELISA 检测大鼠血清 RF,CRP** 末次给药 1 h 后,大鼠股动脉取血  $5\text{ mL}$ ,静置 2 h 后,  $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min,取血清,用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 RF,CRP 含量,具体操作步骤严格按照说明书进行。

**2.6.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测踝关节 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达** 取大鼠踝关节部位,每组 3 只,提取踝关节蛋白样本,并检测蛋白浓度,将样本上样至 12% 的 SDS-PAGE 凝胶梳孔中,电泳,转膜,封闭,一抗 NF- $\kappa$ B(1:5 000)中孵育,过夜后,洗膜,二抗孵育,洗膜,ECL 发光显影,凝胶成像仪曝光,拍照,应用 Image J 软件检测条带光密度值,将目的条带灰度值比内参的灰度值,得到目的蛋白的相对表达量。

**2.6.5 Real-time PCR 技术检测踝关节 NF- $\kappa$ B mRNA 表达** 取大鼠踝关节部位,每组 3 只,提取踝关节 RNA 样本。按照说明书运用 trizol 法提取样本总 RNA,微量紫外分光光度计检测样本 RNA 浓度,确保吸光度  $A_{260/280}$  在 1.8~2.0,然后将 RNA 样本采用逆转录试剂盒进行逆转录,反应体系为  $50\text{ }\mu\text{L}$ ,具体步骤按说明书操作。反应参数设置为  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 min,  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min,然后  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。选用 GAPDH 为内参,采用 Master Mix 扩增试剂盒,反应

体系为 20 μL, 具体步骤按说明书操作。反应参数为 95 °C 60 s, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 溶解曲线分析, 进行 40 个循环, 结果以 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 表示。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 计量资料服从正态分布时以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间数据比较运用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 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 RA 大鼠足跖肿胀度的影响** 实验第 18 天, 与正常组比较, 各模型组肿胀度明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 给药后各给药组肿胀度有

所降低; 实验第 36 天, 与病证模型组比较, 各给药组肿胀度均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中秦威组降低最明显, 且秦威组肿胀度明显低于秦防组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.2 对风寒湿痹 RA 大鼠 AI 评分的影响** 与正常组比较, II 型胶原组和病证模型组 AI 评分显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且病证模型组 AI 评分明显高于 II 型胶原组 ( $P < 0.01$ ); 与 II 型胶原组及病证模型组比较, 各给药组 AI 评分明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 且各中药组中秦威组降低最明显; 各给药组间比较, 秦防组 AI 评分明显高于组及秦威组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 秦艽不同配伍对风寒湿痹 RA 大鼠足跖肿胀度及 AI 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of different compatibility of Gentiana Macrophyllae Radix on plantar swelling degree and AI score of rheumatoid arthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	足跖肿胀度			AI 评分/分
		18 d	27 d	36 d	
正常	-	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.05	0
II 型胶原	-	0.43 ± 0.18 <sup>2)</sup>	0.30 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.26 ± 0.10 <sup>2)</sup>	2.36 ± 0.65 <sup>2)</sup>
病证模型	-	0.52 ± 0.26 <sup>2)</sup>	0.37 ± 0.16 <sup>1)</sup>	0.29 ± 0.12 <sup>2)</sup>	3.16 ± 1.04 <sup>2,4)</sup>
雷公藤多苷	0.006	0.42 ± 0.14	0.30 ± 0.08	0.19 ± 0.10 <sup>5)</sup>	1.20 ± 0.24 <sup>4,6)</sup>
单味秦艽	25	0.42 ± 0.14	0.24 ± 0.09	0.18 ± 0.08 <sup>6)</sup>	1.62 ± 0.51 <sup>4,6)</sup>
秦威	25	0.50 ± 0.14	0.20 ± 0.11	0.17 ± 0.12 <sup>6)</sup>	1.22 ± 0.38 <sup>4,6)</sup>
秦桑	25	0.43 ± 0.15	0.21 ± 0.09	0.20 ± 0.06 <sup>5)</sup>	1.54 ± 0.41 <sup>4,6)</sup>
秦防	25	0.46 ± 0.16	0.28 ± 0.11	0.26 ± 0.10 <sup>5,8)</sup>	1.82 ± 0.42 <sup>3,6,7,8)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 II 型胶原组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; 与病证模型组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ ; 与雷公藤多苷组比较<sup>7)</sup>  $P < 0.05$ ; 与秦威组比较<sup>8)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.3 对风寒湿痹 RA 大鼠血清 RF, CRP 的影响** 与正常组比较, II 型胶原组及病证模型组血清 RF 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 II 型胶原组及病证模型组比较, 秦威组血清 RF 含量明显降低 ( $P < 0.01$ ), 且秦威组血清 RF 含量显著低于单味秦艽组及秦防组 ( $P < 0.05$ )。与正常组比较, II 型胶原组及病证模型组血清 CRP 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 II 型胶原组及病证模型组比较, 雷公藤多苷组、单味秦艽组、秦威组、秦桑组 CRP 含量显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中秦威组及雷公藤多苷组 CRP 含量最低, 且雷公藤多苷组 CRP 含量明显低于秦防组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.4 对风寒湿痹 RA 大鼠踝关节 NF-κB 蛋白表达的影响** 与正常组比较, II 型胶原组与病证模型组的 NF-κB 蛋白相对表达量明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 II 型胶原组及病证模型组比较, 雷公藤多苷组、单味秦艽组、秦威组、秦桑组 NF-κB 蛋白相对表达量均

有不同程度降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中秦威组降低最显著 ( $P < 0.01$ ), 且秦威组明显低于单味秦艽组 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 表 3。

**3.5 对风寒湿痹 RA 大鼠踝关节 NF-κB mRNA 表达的影响** 与正常组比较, II 型胶原组和病证模型组踝关节 NF-κB mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且病证模型组 NF-κB mRNA 表达明显高于 II 型胶原组 ( $P < 0.01$ ); 与 II 型胶原组比较, 雷公藤多苷组、单味秦艽组、秦威组、秦桑组 NF-κB mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与病证模型组比较, 各给药组 NF-κB mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.01$ ), 且各中药组中秦威组 NF-κB mRNA 表达最低。各给药组间比较, 单味秦艽组 NF-κB mRNA 表达明显高于雷公藤多苷组 ( $P < 0.05$ ); 秦桑组 NF-κB mRNA 表达明显高于雷公藤多苷组、单味秦艽组及秦威组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 秦防组 NF-κB mRNA 表达明显高于雷公藤多苷组、单味秦艽组、秦威组及秦桑组

表 2 秦艽不同配伍对风寒湿痹 RA 大鼠血清 RF, CRP 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of different compatibility of Gentiana Macrophyllae Radix on serum RF and CRP contents in rheumatoid arthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	RF/U·L <sup>-1</sup>	CRP/μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	30.08 ± 8.40	1 073.19 ± 204.24
Ⅱ型胶原	-	45.49 ± 12.69 <sup>1)</sup>	1 707.75 ± 581.94 <sup>1)</sup>
病证模型	-	45.90 ± 10.09 <sup>1)</sup>	1 727.58 ± 471.02 <sup>1)</sup>
雷公藤多苷	0.006	38.69 ± 9.13	1 156.48 ± 270.83 <sup>3,5)</sup>
单味秦艽	2	43.34 ± 6.34	1 323.71 ± 370.24 <sup>4)</sup>
秦威	25	34.35 ± 5.51 <sup>3,5,7)</sup>	1 283.39 ± 419.89 <sup>4)</sup>
秦桑	25	41.78 ± 8.56	1 286.04 ± 252.15 <sup>4)</sup>
秦防	25	44.52 ± 10.32 <sup>8)</sup>	1 581.50 ± 448.85 <sup>6)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与Ⅱ型胶原组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与病证模型组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ ;与雷公藤多苷组比较<sup>6)</sup>  $P < 0.05$ ;与单味秦艽组比较<sup>7)</sup>  $P < 0.05$ ;与秦威组比较<sup>8)</sup>  $P < 0.05$ 。

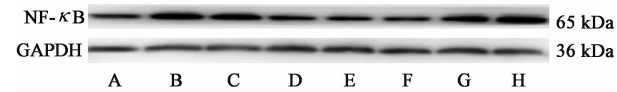


图 1 各组大鼠踝关节 NF-κB 蛋白表达条带  
Fig. 1 Expression of NF-κB protein in rats of each group

表 3 秦艽不同配伍对风寒湿痹 RA 大鼠踝关节 NF-κB 蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of different compatibility of Gentiana Macrophyllae Radix on relative expression of NF-κB protein in ankle joint of rheumatoid arthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NF-κB/GAPDH
正常	-	1.55 ± 0.04
Ⅱ型胶原	-	3.11 ± 0.06 <sup>1)</sup>
病证模型	-	3.16 ± 0.04 <sup>1)</sup>
雷公藤多苷	0.006	1.74 ± 0.01 <sup>3,5)</sup>
单味秦艽	25	1.79 ± 0.03 <sup>3,5)</sup>
秦威	25	1.51 ± 0.04 <sup>3,5,6)</sup>
秦桑	25	1.99 ± 0.11 <sup>2,4)</sup>
秦防	25	2.42 ± 0.16

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与Ⅱ型胶原组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与病证模型组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ ;与单味秦艽组比较<sup>6)</sup>  $P < 0.05$ 。

( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4。

#### 4 讨论

RA 是一种常见疾病,不仅侵犯关节滑膜、软

表 4 秦艽不同配伍对风寒湿痹 RA 大鼠踝关节 NF-κB mRNA 表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of different compatibility of Gentiana Macrophyllae Radix on NF-κB mRNA expression in ankle joint of rheumatoid arthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NF-κB
正常	-	1.00
Ⅱ型胶原	-	63.18 ± 1.32 <sup>1)</sup>
病证模型	-	119.91 ± 19.99 <sup>1,2)</sup>
雷公藤多苷	0.006	4.82 ± 0.14 <sup>2,3)</sup>
单味秦艽	25	22.12 ± 4.44 <sup>2,3,4)</sup>
秦威	25	14.51 ± 1.08 <sup>2,3)</sup>
秦桑	25	36.95 ± 2.62 <sup>2,3,5,6,8)</sup>
秦防	25	54.82 ± 5.61 <sup>3,5,7,8,9)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与Ⅱ型胶原组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与病证模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与雷公藤多苷组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ ;与单味秦艽组比较<sup>6)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>7)</sup>  $P < 0.01$ ;与秦威组比较<sup>8)</sup>  $P < 0.01$ ;与秦桑组比较<sup>9)</sup>  $P < 0.05$ 。

骨、韧带和肌肉,还可能影响心、肺等脏器功能<sup>[7]</sup>,目前临床主要靠症状表现、影像和血清 RF 水平等诊断 RA。RF 是临床常用于 RA 检测的指标之一,常沉积在关节液和关节滑膜中,激活补体系统,产生具有生物活性的物质,吸引中性粒细胞进入关节腔中,中性粒细胞释放水解酶,造成组织损害,高滴度的 RF 对于 RA 的诊断具有十分重要的意义,且 RF 的水平对于判断疾病的预后具有重要作用,RF 阳性 RA 患者更有可能有进展性、侵蚀性关节炎伴有关节功能丧失,也更可能有关节外表现,当 RA 成功治疗后,RF 滴度趋于下降<sup>[8-10]</sup>。CRP 是一种免疫调节因子,机体有炎症或组织损伤时含量升高。RA 的发生及发展与 CRP 有关,CRP 可作为 RA 诊断的一个指标,RA 患者 CRP 含量升高,且与 RA 的病变活动呈正相关。研究发现 CRP 在 RA 的诊断中具有较高敏感性,部分 RF 阴性患者通过 CRP 检测可避免漏诊<sup>[11-12]</sup>。NF-κB 在 RA 病变滑膜组织中大量表达,是一种广泛存在的核转录因子。以 NF-κB p65/p50 二聚体的状态存在于细胞内,静息状态时,NF-κB 与抑制蛋白(I-κB)结合<sup>[13]</sup>。外源性的信号刺激激活后,I-κB 被降解,NF-κB 与 I-κB 解离,从胞浆易位到核内,提高特定基因的转录水平<sup>[14]</sup>。NF-κB 活化后可以增强肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-1β(IL-1β),白细胞介素-6(IL-6),黏附分子,环氧合酶-2(COX-2)等多种炎症基因的转录水平。由 NF-κB 调节的产物如 TNF-α 等又可以活化

NF- $\kappa$ B<sup>[15]</sup>。研究发现,NF- $\kappa$ B 还可导致滑膜肥厚增生,加重关节破坏<sup>[16]</sup>。抑制 NF- $\kappa$ B 通路的活性可以改善 RA 的病情,研究发现具有补肾健骨、祛风通络的金乌健骨汤可使 RA 滑膜成纤维细胞凋亡,并降低 NF- $\kappa$ B p65 等的水平<sup>[17]</sup>。

对于 RA 的中药治疗,常用药有当归、桂枝、白芍、甘草、牛膝、黄芪、秦艽、雷公藤、桑寄生、防己等,主要治疗方法为温经、散寒、通络<sup>[18]</sup>。现代药理学研究发现秦艽、雷公藤、桑寄生、防己均具有抗炎、镇痛、免疫抑制等作用<sup>[19-23]</sup>。高祥祥等<sup>[24]</sup>给予尿酸钠痛风大鼠模型以秦艽的醇提物,发现 $1.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的秦艽醇提物可以改善大鼠关节肿胀,其作用机制可能与降低血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, 前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 及基质金属蛋白酶-3 (MMP-3) 有关。JIA 等<sup>[25]</sup>分别给二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀模型和角叉菜胶诱导的大鼠足趾肿胀模型灌胃 0.6, 0.3, 0.15  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的大叶秦艽或麻花秦艽的 75% 乙醇提物,发现该醇提物可改善耳廓肿胀及足趾肿胀程度,作用机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 的转录活性及 NF- $\kappa$ B 家族中的 p65, p50 二聚体的核移位有关。秦艽、威灵仙及桑寄生具有抑制小鼠脾脏淋巴细胞及胸腺淋巴细胞增殖的作用,且对 COX-1 及 COX-2 有不同程度的抑制作用<sup>[23]</sup>。苗明三等<sup>[26]</sup>研究发现威灵仙可以降低大鼠的足趾肿胀程度,还可显著降低小鼠的耳肿胀程度,升高小鼠的痛阈值,威灵仙外用也有抗炎、镇痛作用。有研究发现威灵仙根茎的皂苷提取物对兔软骨细胞具有保护作用,其机制可能是通过防止线粒体损害及抑制含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3) 的活化方式抑制 NO 诱导的细胞凋亡<sup>[27]</sup>。桑寄生可以降低二甲苯所致的小鼠耳肿胀度,具有显著的抗炎作用,且对于小鼠疼痛的抑制率 > 50%<sup>[28]</sup>。防己中含有的粉防己碱具有广谱抗炎效果,抗炎机制复杂,涉及炎症发生的各个环节。潘昉等<sup>[29]</sup>研究发现粉防己碱可以降低 II 型胶原模型大鼠关节腔及血清中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  的含量,从而治疗胶原诱导性关节炎。

结果显示,与正常组比较,II 型胶原组和病证模型组足趾肿胀度, AI 评分, RF, CRP 含量, 踝关节 NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达量及踝关节 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量明显升高,且病证模型组高于 II 型胶原组,认为 II 型胶原 + 风寒湿刺激模型比单纯 II 型胶原模型病情严重。经药物治疗后,各给药组足趾肿胀度, AI 评分, RF, CRP 含量、踝关节 NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达量及踝关节 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量均有不同程度降低,

其中秦威组降低最明显,均优于其他中药组。综上所述,平温相配的秦威组可以有效降低风寒湿痹 RA 模型大鼠足趾肿胀度, AI 评分, RF, CRP 含量、踝关节 NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达量及踝关节 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量,具有较好的治疗效果,优于平平相配的秦桑组、平寒相配的秦防组及单味秦艽组,提示对于寒性疾病,应给予热性药物治疗会取得更好的治疗效果,与中医“疗寒以热药”治疗原则基本相符。该治疗机制可能与中药发挥各自的抗炎镇痛作用,降低血清中 RF, CRP 及关节中 NF- $\kappa$ B 蛋白含量有关。实验中还发现,平平相配比单味秦艽的治疗效果好,可能与药物配合应用扩大治疗面有关,其机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 熊江华,李艳. 中药复方对类风湿性关节炎干预机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 230-234.
- [2] 于天一,孔庆喜,陈丽姝,等. 类风湿关节炎的病理机制浅析[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(1): 98-102.
- [3] 高慧琴,吴国泰,孙少伯,等. 秦艽不同配伍对风湿痹证模型大鼠血清炎症因子水平的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(9): 785-788.
- [4] 高慧琴,吴国泰. 秦艽不同配伍的抗炎镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 182-183.
- [5] 马腾茂,刘飞,王蓉,等. 秦艽寒热不同配伍药对风湿热痹类风湿关节炎大鼠 MMP-3、TIMP-1 表达及踝关节病理学改变的影响[J]. 中草药, 2017, 48(9): 1812-1819.
- [6] 马腾茂,刘飞,王蓉,等. 秦艽不同配伍对风湿热痹模型大鼠足趾及血清类风湿因子 C-反应蛋白的影响[J]. 解放军药学报, 2017, 33(1): 17-20, 25.
- [7] 张华东. 对类风湿关节炎发病机制的认识[N]. 中国中医药报, 2003-03-03.
- [8] 梁双吟,庄祥龙,吴宝花. 三种血清指标在类风湿关节炎中的诊断意义[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(7): 972-973.
- [9] 许建荣. 风湿病影像学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2007: 35-36.
- [10] 王吉波,吕振华. 类风湿关节炎[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 74.
- [11] 彭宇生,王鹏. 类风湿性关节炎患者 CRP 和免疫球蛋白的检测分析[J]. 泸州医学院学报, 2006, 29(4): 367-368.
- [12] 刘发河,曾海莲,郑小江,等. 抗 CCP、RF、CRP、ASO 对类风湿关节炎的诊断意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(8): 583-585.

- [13] May M J, Ghosh S. Signal transduction through NF- $\kappa$ B [J]. *J Immunol Today*, 1998, 19: 80-88.
- [14] Wakamatsu K, Nanki T, Miyasaka N, et al. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor-kappa B nuclear translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cells [J]. *Arthritis Res*, 2005, 7 (6): R1348-R1359.
- [15] Makarov S S. NF- $\kappa$ B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation hyperplasia and tissue destruction [J]. *Arthritis Res*, 2001, 3 (4): 200-206.
- [16] Seetharaman R, Mora A L, Nabozny G, et al. Essential role of T cell NF-kappaB activation in collagen-induced arthritis [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (3): 1577-1583.
- [17] 宁乔怡, 周静, 李东晓, 等. 苗族药金乌健骨汤对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 NF- $\kappa$ Bp65, IKK- $\alpha$  及 IKK- $\beta$  表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (7): 154-159.
- [18] 王颖, 郑炜, 刘小平, 等. 基于中医传承辅助平台的中医药治疗类风湿关节炎的用药规律分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22 (23): 181-186.
- [19] 穆祯强, 于洋, 高昊, 等. 龙胆属秦艽组植物的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34 (16): 2012-2017.
- [20] 柳清, 汪永忠, 姜辉, 等. 基于 GC-TOF-MS 研究威灵仙总皂苷对佐剂性关节炎大鼠血清代谢谱的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41 (12): 2321-2328.
- [21] 管俊, 崔瑛. 桑寄生药理作用及临床应用研究进展 [J]. *河北中医*, 2017, 39 (3): 460-463.
- [22] 王蓉, 马腾茂, 刘飞, 等. 防己的药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (4): 634-639.
- [23] 龙启才, 邱建波. 威灵仙、秦艽、桑寄生醇提物体外对淋巴细胞和环氧酶的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2004, 20 (4): 26-27.
- [24] 高祥祥, 王海峰, 张红. 秦艽对尿酸钠痛风模型大鼠的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31 (4): 141-144.
- [25] JIA N, LI Y, WU Y, et al. Comparison of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Gentiana macrophylla* Pall. and *Gentiana straminea* Maxim. and identification of their active constituents [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144 (3): 638-645.
- [26] 苗明三, 于舒雁, 魏荣瑞. 不同品种威灵仙外用抗炎镇痛作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25 (8): 1836-1839.
- [27] WU W, GAO X, XU X, et al. Saponin-rich fraction from *Clematis chinensis* Osbeck roots protects rabbit chondrocytes against nitric oxide-induced apoptosis via preventing mitochondria impairment and caspase-3 activation [J]. *Cytotechnology*, 2013, 65 (2): 287-295.
- [28] 官清, 张珩. 祛风湿单味中药抗炎和镇痛作用分析 [J]. *临床合理用药杂志*, 2012, 5 (19): 6-7.
- [29] 潘昉, 祝丽华, 王倩, 等. 汉防己甲素对胶原诱导的关节炎大鼠关节腔液中与外周血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的调节 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11 (21): 1689-1691.

[责任编辑 周冰冰]