

· 药理 ·

## 风湿宁胶囊对类风湿关节炎风寒湿痹动物模型的 关节保护及抗炎作用

冯振宇, 马小娟, 王虹娟, 孟霜, 常剑敏, 赵建平\*  
(山西省中西医结合医院, 太原 030013)

**[摘要]** 目的:从抗炎及关节保护方面探讨风湿宁(FSN)胶囊治疗类风湿性关节炎(RA)的药物作用机制。方法:将 120 只雄性新西兰白兔随机分为正常组、模型组、甲氨蝶呤组、风湿宁低、中、高剂量组,每组 20 只。除正常组外,其余各组建立胶原诱导性关节炎(CIA)加风寒湿刺激的风寒湿痹动物模型,造模成功以后,风湿宁低、中、高剂量组分别按剂量 0.33, 0.66, 1.32 g·kg<sup>-1</sup>给予风湿宁胶囊水溶液,甲氨蝶呤组给予 1.0 mg·kg<sup>-1</sup>的甲氨蝶呤片水溶液,正常组灌胃生理盐水,各组按剂量 4 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃,每日 1 次,连续 7 d。观察风湿宁胶囊对 RA 白兔风寒湿痹模型的一般情况、关节肿胀程度,实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测各组关节滑膜组织炎症因子白细胞介素(IL)-1 $\beta$ , IL-6, 肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  信使核糖核酸(mRNA)的表达量及核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)受体激活剂配体(RANKL)mRNA 的表达量。结果:风湿宁胶囊可明显改善 RA 兔生存状态,减轻 RA 兔后肢膝关节的肿胀,降低膝关节表面温度和关节炎积分,能够显著降低 RA 兔滑膜组织 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , RANKL mRNA 的表达。结论:风湿宁胶囊具有抑制关节滑膜组织中炎症因子和 RANKL 的表达的作用,可有效减轻 RA 的炎症反应和骨质破坏,从而对 RA 取得疗效。

**[关键词]** 风湿宁胶囊; 类风湿性关节炎; 风寒湿痹证; 滑膜组织; 炎症因子; 核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)受体激活剂配体

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0096-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200096

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1031.032.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-31 10:31

## Joint Protection and Anti-inflammatory Effect of Fengshining Capsule on Wind-cold-dampness Rheumatoid Arthritis Model

FENG Zhen-yu, MA Xiao-juan, WANG Hong-juan, MENG Shuang, CHANG Jian-min, ZHAO Jian-ping\*  
(Shanxi Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Taiyuan 030013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the anti-inflammatory and joint protection effect of Fengshining (FSN) capsule in treatment of rheumatoid arthritis (RA) and its action mechanism. **Method:** The 120 male New Zealand white rabbits were randomly divided into normal control group, model group, Methotrexate group, low-dose, middle-dose and high-dose FSN groups, with 20 in each group. The collagen-induced arthritis (CIA) and wind-cold dampness rheumatoid arthritis model were established in the groups, except for the normal control group. Low-dose, middle-dose and high-dose FSN groups were given aqueous solution of 0.33, 0.66, 1.32 g·kg<sup>-1</sup> FSN capsule respectively, the methotrexate group was given aqueous solution of 1.0 mg·kg<sup>-1</sup> methotrexate tablets, while the normal control group and the model group were given saline solution. Each group was intragastrically administrated

**[收稿日期]** 20170424(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81273981)

**[第一作者]** 冯振宇, 硕士, 副主任医师, 从事经方疑难病治疗研究, Tel:15934040918, E-mail:sxfzy@163.com

**[通讯作者]** \* 赵建平, 博士, 主任药师, 从事中药药理与新药临床研究, Tel:0351-2625207, E-mail:467673855@qq.com

with 4 mL·kg<sup>-1</sup> of corresponding medicines, once a day for 7 days. The effect of FSN capsule on general conditions, joint swelling degree of the animal model were observed, and the expressions of inflammatory factor interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  messenger RNA (mRNA) and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) mRNA in RA synovium tissues were detected with Real-time PCR method. **Result:** FSN capsule could improve the living state of RA rabbits significantly, reduce the swelling and arthritis score of stifle, and obviously decrease the expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and RANKL mRNA in RA synovial tissues. **Conclusion:** FSN capsule has the effect in inhibiting the expression of inflammation factor and RANKL in synovial tissues, and could effectively alleviate inflammation and bone damage, so as to show a curative effect on RA.

[ **Key words** ] Fengshining capsule; rheumatoid arthritis; wind-cold-dampness syndrome; synovial tissue; inflammatory factor; receptor activator of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) ligand

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以慢性对称性多关节炎为主要表现的一种异质性、系统性自身免疫病,其发病是遗传因素、环境因素与免疫功能紊乱共同作用的结果,但其病因与发病机制目前尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。大量研究已证实,RA 患者滑膜细胞及滑膜组织中浸润的淋巴细胞、单核/巨噬细胞等通过自分泌或旁分泌的方式产生大量的细胞因子和炎性介质,这些炎症细胞因子通过作用于多种细胞并相互调节形成一个复杂的网络,导致血管翳形成和关节软骨、骨基质的破坏,是 RA 发病的主要生物学机制,其中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  是 RA 发病机制中的关键性炎症因子,在 RA 滑膜增生、软骨/骨破坏和全身炎症反应中发挥作用,并可促使滑膜细胞、纤维母细胞、巨噬细胞等分泌产生多种炎症因子,例如白细胞介素(IL)-1 $\beta$ , IL-6 等,共同作用于 RA 的炎症及关节破坏反应, TNF- $\alpha$  也可在成骨细胞系骨髓干细胞中介导骨破坏的重要因子核转录因子- $\kappa$ B 受体激活剂配体 (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL) 的表达从而间接影响破骨细胞生成<sup>[2-3]</sup>。因此,抑制关节滑膜中炎症细胞的浸润和炎症因子的产生、减少破骨细胞形成、减轻关节滑膜病变和关节软骨破坏,是治疗关节炎的一条重要途径。

RA 属于中医“痹证”范畴,其发病多端,病机复杂,从历代记载痹证的文献和治疗药物看,寒凝络脉乃是痹证致病之关键,中医药治疗 RA 具有整体调节和多靶点治疗的优势,临床常能取得较好疗效。风湿宁 (Fengshining, FSN) 胶囊有祛风散寒、通络止痛之效,是白清佐先生临证 20 余年之验方,对类风湿关节炎有确切疗效<sup>[4]</sup>。前期研究结果已表明 FSN 不仅具有抗炎、镇痛、改善微循环的作用,还能够调节 RA 的免疫功能失衡,诱导过度增殖的滑膜细胞

凋亡,对关节炎模型大鼠的滑膜炎症和骨质破坏均有良好的改善作用<sup>[5]</sup>。本课题组通过复制新西兰白兔 RA 风寒湿痹动物模型,观察不同浓度的风湿宁胶囊对实验性 RA 新西兰大白兔滑膜巨噬细胞相关炎症因子 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  和 RANKL mRNA 表达的影响,探讨本方治疗 RA 的药物作用机制和靶点,为临床应用风湿宁胶囊治疗 RA 提供可靠的实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性新西兰大白兔 120 只,体重 2~3 kg,由山西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(晋)2015-0003,动物实验的开展取得了山西中医学院中西医结合医院医学伦理委员会的批准(编号 SXSZYLL-201506)。所有白兔均单笼饲养,自由饮水,颗粒饲料喂养,适应性喂养 1 周。

**1.2 药物与试剂** 风湿宁胶囊(山西仁源堂药业有限公司,批号 20150617,每粒 0.4 g),甲氨蝶呤片(通化茂祥制药有限公司,批号 20150322,每片 2.5 mg)。葡萄球菌肠毒素 B(SEB),弗氏完全佐剂,免疫级牛 II 型胶原(美国 Sigma 公司,批号分别为 S1126, F0607, 090402);组织 RNA 快速提取试剂盒, DNA 逆转录试剂, PCR 扩增试剂(北京艾德莱生物有限公司,批号分别为 202366AX, 267258AH, 272632AX);内参  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin), IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  特异性引物(武汉金开瑞生物工程有限公司,批号均为 A1618136)。

**1.3 仪器** ABI 7500 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 ABI 公司);Tc-xP 型基因扩增仪, MB-102 型振荡型恒温金属浴(杭州博日科技有限公司); SE250-260 型电泳仪, LAS4000 型生物分子成像仪(美国 GE Healthcare 公司); JXFSTRP-24 型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限

公司); Fresco17 型台式高速冷冻离心机, 1316 型生物安全柜(美国 Thermo 公司); scandrop 250 型超微量紫外分光光度计(德国耶拿公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 120 只雄性新西兰大白兔随机分为分为正常组、模型组、风湿宁低、中、高剂量组、甲氨蝶呤组, 每组 20 只。

**2.2 模型制备** 在新西兰大白兔胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis CIA)的基础上给予风寒湿刺激及葡萄球菌肠毒素 B(staphylococcal enterotoxin B SEB)外涂制备 RA 风寒湿痹动物模型<sup>[6]</sup>。具体方法为用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  冰醋酸溶解 II 型胶原( $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜), 再与完全弗氏佐剂同等体积混合, 并加入卡介苗( $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 于冰浴中充分研磨、乳化, 每只新西兰大白兔在双后肢膝关节髌骨下方, 髌韧带旁穿刺点的部位, 注射胶原  $500 \text{ } \mu\text{g}$  于双膝关节腔内, 7 d 后再注射胶原  $200 \text{ } \mu\text{g}$  作加强免疫。于第 7~9 天, 每只新西兰大白兔膝关节周围及以下均匀涂抹纤维素糊各  $30 \text{ } \mu\text{L}$ (含 SEB  $5 \text{ } \mu\text{g}$ ), 涂抹后再进行风寒湿刺激, 每天刺激 1 次, 每次持续 1 h, 刺激条件为风速  $18 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , 相对湿度 100%, 温度  $7 \sim 10 \text{ }^\circ\text{C}$ , 共刺激 9 d。造模开始后每隔 24 h 观察 1 次, 观察每组新西兰兔的一般情况, 直至造模成功。

**2.3 给药方法** 造模成功以后, 按“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算, 风湿宁用药组低、中、高剂量以 1, 2, 4 倍于临床等效剂量, 给予风湿宁胶囊溶液  $0.33, 0.66, 1.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 甲氨蝶呤组给予  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的甲氨蝶呤片水溶液, 各组按  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重灌胃, 正常组灌胃生理盐水  $10 \text{ mL}$ , 每日 1 次, 连续 7 d。

## 2.4 观察指标及方法

**2.4.1 一般情况** 记录各组兔的体重、精神状态、背毛和活动情况。

**2.4.2 关节炎外观评估** 测量各组兔双侧膝关节周长, 温度, 计算关节肿胀度和关节炎积分(记录为 0~1 分, 即无炎症计 0 分, 轻度红肿计 0.5 分, 中度以上红肿计 1 分, 整个肢体出现功能障碍追加 1 分, 单个肢体的最高积分为 4 分, 分数越低, 炎症越低, 分数越高, 炎症越重), 其中周长与肿胀度取双侧的平均值。

**2.4.3 Real-time PCR 法检测 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , RANKL mRNA 相对表达量** 标本采集: 末次给药 24 h 后处死各组兔并取左膝关节滑膜组织,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$

冷冻保存。提取 RNA: 使用 EASY spin Plus 组织 RNA 快速提取试剂盒, 按照其说明书对兔滑膜组织提取总 RNA。具体方法: 用全自动快速研磨仪将滑膜组织在液氮中研磨成细粉, 然后制作成组织匀浆。将匀浆  $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min, 将裂解物上清全部加到 DNA 清除柱上, 立刻  $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 60 s, 保留滤液(RNA 在滤液中)。在滤液中加入等体积的 70% 乙醇并吹打混匀, 而后加入到 1 个吸附柱中  $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 s, 弃掉废液, 加去蛋白液  $700 \text{ } \mu\text{L}$ , 室温放置 1 min,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 s, 弃掉废液。加入漂洗液  $500 \text{ } \mu\text{L}$  漂洗 2 遍, 将混合物加入 1 个吸附柱中,  $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 s, 弃掉废液。将吸附柱放回空收集管中,  $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min, 尽量除去漂洗液。取出吸附柱, 放入 1 个新的无 RNA 酶离心管中, 打开离心管盖, 待乙醇挥发 5 min, 在吸附膜的中间部位加入无 RNA 酶水(RNase free water)  $50 \text{ } \mu\text{L}$ , 室温放置 1 min, 于转速  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min, 将提取出来的 RNA 标本立刻放入液氮保存, 待逆转录。测定总 RNA 的浓度: 采用超微量紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度及吸光度  $A_{260}/A_{280}$ , 比值介于  $1.8 \sim 2.0$ , 方符合实验要求。逆转录合成 cDNA: 每个样品取总 RNA  $1.5 \text{ } \mu\text{g}$ , 按照反转录试剂说明书操作合成 cDNA。具体方法为总 RNA 与 Oligo(dT)<sub>18</sub> 引物溶液  $1 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $5 \times \text{RT Reaction Mix}$   $4 \text{ } \mu\text{L}$ , TRuE script H<sup>-</sup>R Tase/RI  $1 \text{ } \mu\text{L}$  混合, 加入 RNase free water 定容至  $20 \text{ } \mu\text{L}$ , 轻轻混匀, 瞬时离心, 金属浴  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 40 min,  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 5 min 失活 TRuE script H<sup>-</sup>R Tase。而后将合成好的 cDNA 先放入  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱, 待 PCR 扩增。

**PCR 扩增:** 按照 Real-time PCR 试剂说明建立如下反应体系为  $2 \times \text{SYBR qPCR Mix}$   $12.5 \text{ } \mu\text{L}$ , DNA template  $1 \text{ } \mu\text{L}$ , forward primer ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.5 \text{ } \mu\text{L}$ , reverse primer ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.5 \text{ } \mu\text{L}$ , 加入 RNase free water 定容至  $25 \text{ } \mu\text{L}$ , 按照以下条件 PCR 循环  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  3 min,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  34 s, 共 40 个循环, 每个循环的延伸阶段收集荧光信号。为消除实验误差, 以 DEPC 无菌水代替 cDNA 模板作为阴性对照, 每样品 3 个复孔。PCR 引物序列见表 1。

**结果分析:** 制备 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 EB  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 移取扩增后各组样品  $5 \text{ } \mu\text{L}$  于 EP 管中, 加入  $6 \times \text{Loading buffer}$   $1 \text{ } \mu\text{L}$  后混匀, 加入点样孔。电泳仪调节至  $180 \text{ V}$  10 min, 使 RNA 由负极向正极电泳。电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射模式下观察 RNA 电泳结果并拍照。定量分析: 通过分析溶解

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物序列(5'-3')	长度 /pb
$\beta$ -actin	上游 CGGGACATCAAGGAGAAGC	168
	下游 AGGAAGGAGGGCTGGAAGA	
IL-1 $\beta$	上游 GCCGATGGTCCCAATTACAT	120
	下游 ACAAGACCTGCCGAAGCT	
IL-6	上游 CTGAAGACGACCACGATCCA	97
	下游 AAGGACACCCGCACTCCAT	
TNF- $\alpha$	上游 CTCCTACTCCGAACAAGGTCA	138
	下游 CGGTCACCCTTCTCTCCAACCT	
RANKL	上游 ACACCTGAGAGCCGAGAAAG	110
	下游 GAACCTGATGGGATGTTGGT	

曲线, PCR 各样本的峰值基本一致, 无杂峰信号出现, 产物特异度较好, 方符合要求, 以  $\beta$ -actin 基因作为内参, 采用比较  $\Delta\Delta C_t$  法计算倍数变化  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值, 对目的基因进行相对定量, 对比各组的差异。

表 2 风湿宁胶囊对 RA 兔体重、后肢膝关节的直径、表面温度和关节炎积分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 2 Effect of Fengshining capsule on weight, diameter of knee joint, skin temperature and arthritis score of stifle in RA rabbit ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	给药剂量/g·kg <sup>-1</sup>	体重/kg	膝关节直径/cm	膝关节表面温度/°C	关节炎积分/分
正常	-	3.05 ± 0.21	1.70 ± 0.06	34.6 ± 0.6	0.0 ± 0.0
模型	-	2.76 ± 0.18 <sup>2)</sup>	2.48 ± 0.09 <sup>2)</sup>	37.2 ± 0.3 <sup>2)</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>2)</sup>
风湿宁胶囊	0.33	2.89 ± 0.19 <sup>3)</sup>	2.38 ± 0.06 <sup>4,6)</sup>	36.9 ± 0.8 <sup>6)</sup>	2.1 ± 0.4 <sup>4,6)</sup>
	0.66	2.93 ± 0.21 <sup>3)</sup>	2.18 ± 0.08 <sup>2,4,6)</sup>	36.0 ± 0.7 <sup>4,6)</sup>	1.8 ± 0.2 <sup>4,6)</sup>
	1.32	3.00 ± 0.23 <sup>4)</sup>	2.00 ± 0.09 <sup>2,4)</sup>	35.4 ± 0.5 <sup>4,5)</sup>	0.9 ± 0.3 <sup>4)</sup>
甲氨蝶呤	0.001	3.02 ± 0.18 <sup>4)</sup>	1.97 ± 0.06 <sup>4)</sup>	35.0 ± 0.4 <sup>4)</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>4)</sup>

注: 与正常组比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ; 与甲氨蝶呤组比<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

3.2 风湿宁胶囊对 RA 兔关节滑膜组织 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , RANKL mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组滑膜组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , RANKL mRNA 明显增高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与模型组比较, 风湿宁中、高剂量组、甲氨蝶呤组 RA 兔滑膜组织 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , RANKL mRNA 表达明显降低

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间多样本均数比较采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 两两比较采用最小显著差 (LSD) 检验, 方差不齐则使用非参数 Kruskal-Wallis (K-W) 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

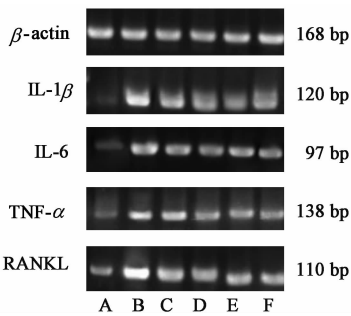
3.1 风湿宁胶囊对 RA 兔体重、后膝关节直径、表面温度和关节炎积分的影响 与正常组比较, 模型组的体重明显降低 ( $P < 0.01$ ), 后肢膝关节的直径、表面温度和关节炎积分明显增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 风湿宁中、高剂量组和甲氨蝶呤组兔的后肢膝关节的直径、表面温度和关节炎积分明显降低 ( $P < 0.01$ ), 各治疗组体重均有降低趋势, 在风湿宁各组呈剂量依赖性关系 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与甲氨蝶呤组比较, 风湿宁高剂量组兔的体重、后肢膝关节的直径、关节炎积分无明显差异。见表 2。

( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与甲氨蝶呤组比较, 风湿宁高剂量组在降低 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  mRNA 表达方面, 差异性显著 ( $P < 0.05$ )。结果说明风湿宁胶囊有降低滑膜促炎细胞因子表达的效果, 抑制骨组织 RANKL 表达量, 能够有效防治 RA 骨质破坏从而减轻 RA 兔炎症反应, 使关节损伤逐渐减轻。见表 3, 图 1。

表 3 风湿宁胶囊对 RA 兔的滑膜组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  和 RANKL mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 3 Effect of Fengshining capsule on expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and RANKL mRNA in RA synovium tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	给药剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	RANKL
正常	-	6.23 ± 1.40	9.50 ± 4.37	1.15 ± 0.63	15.46 ± 5.87
模型	-	12.67 ± 1.76 <sup>2)</sup>	17.42 ± 8.29 <sup>2)</sup>	7.28 ± 2.83 <sup>2)</sup>	21.85 ± 6.33 <sup>1)</sup>
风湿宁胶囊	0.33	11.05 ± 3.68 <sup>3)</sup>	13.61 ± 10.80 <sup>3)</sup>	6.79 ± 3.18	19.13 ± 7.65
	0.66	10.48 ± 2.77 <sup>4)</sup>	11.97 ± 9.41 <sup>3)</sup>	5.17 ± 2.25 <sup>4,6)</sup>	16.65 ± 6.32 <sup>3)</sup>
	1.32	7.69 ± 2.16 <sup>4,5)</sup>	10.34 ± 4.02 <sup>4)</sup>	5.22 ± 1.68 <sup>4,6)</sup>	16.22 ± 4.59 <sup>3)</sup>
甲氨蝶呤	0.001	9.46 ± 3.40 <sup>4)</sup>	11.52 ± 2.83 <sup>3)</sup>	3.10 ± 2.10	15.47 ± 4.43 <sup>3)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 风湿宁低剂量组; D. 风湿宁中剂量组; E. 风湿宁高剂量组; F. 甲氨蝶呤组

图 1 风湿宁胶囊对 RA 兔滑膜组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  和 RANKL mRNA 表达的影响

Fig.1 Effect of Fengshining capsule on expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and RANKL mRNA in RA synovium tissue

#### 4 讨论

类风湿关节炎是以慢性、对称性、多关节受累为主要临床表现的全身性免疫性疾病,病变主要累及滑膜组织,主要病理特点是滑膜细胞增生、增厚,多种炎性细胞浸润,血管翳形成,继而引起软骨和骨组织的破坏,最终导致关节畸形和功能丧失。近年来研究发现,多种炎性细胞因子如 IL-1 $\beta$ , 干扰素 (IFN)- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-17, TNF- $\alpha$  等参与了 RA 的整个病理过程,此类细胞因子对于骨膜内微血管新生和 T, B 淋巴细胞的激活分化及生长起着至关重要的作用,是导致软骨和骨损伤,介导 RA 发生与发展的重要因素<sup>[7]</sup>。因此,抑制和阻断这类细胞因子及其受体是研究治疗 RA 药物的一个重要方向。

IL-1 和 TNF- $\alpha$ , IL-6 炎性因子在 RA 发病中起着“中心罪犯作用”<sup>[8]</sup>。IL-1 和 TNF- $\alpha$  能激活血管内皮细胞,增强内皮细胞黏附分子的表达,并可刺激滑膜细胞和软骨细胞产生基质金属酶、胶原酶,抑制软骨多糖蛋白合成,加速氨基糖的降解,引起骨和软骨的吸收破坏<sup>[9]</sup>; TNF- $\alpha$  和 IL-1 都可以诱导滑膜巨噬细胞、成纤维细胞和软骨细胞产生 IL-6,在急性反应期,IL-6 可刺激肝细胞产生急性期蛋白如 C 型反应性蛋白 (CRP),纤维蛋白原, $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶,血清淀粉样蛋白 A,而且它可以同时抑制白蛋白的产生<sup>[10]</sup>,还可增强纤维蛋白溶酶激活因子的产生,促进其抑制因子、金属蛋白酶组织抑制因子的形成<sup>[11]</sup>,尽管类风湿关节炎的病因尚未明确,但已证实,IL-6 在其病理过程中起着重要作用。破骨细胞 (OC) 作为骨吸收的主要功能细胞,是骨质破坏中的关键细胞,研究表明破骨细胞大量形成和激活与 RA 关节软骨及骨破坏密切相关<sup>[12]</sup>,在破骨细胞的分化、成熟和产生活性的不同时期均受多种因素的

影响,RANKL 是其中关键性的因子之一<sup>[13]</sup>,其活性的高低决定破骨细胞介导的骨质破坏程度,是炎性关节疾病骨质破坏过程中最重要的因素<sup>[14]</sup>。

风湿宁胶囊由羌活、独活、青风藤、威灵仙、片姜黄、防风、川芎、麻黄、肉桂、三棱、血竭、延胡索、川牛膝、熟地黄、砂仁、生姜和甘草等 17 味中药组成。自 1980 年代开始风湿宁胶囊就以医院制剂的形式用来治疗类风湿性疾病,经过多年的临床应用证明其可明显改善患者症状、体征、延缓或阻止病情进展,且抗炎作用良好。前期临床研究表明,风湿宁胶囊可明显改善类风湿关节炎患者主要临床症状,有效率可达 90.8%<sup>[4]</sup>,方中羌活与独活可祛一身之风寒湿邪,是为君药;威灵仙与青风藤合用可祛风除湿,通络止痛,是为臣药;血竭和三棱可活血行气止痛,防风、麻黄与生姜可发汗散湿,促使邪从汗解,川牛膝强筋骨、补肝肾,熟地养血和营,砂仁醒脾理气,甘草调和诸药,诸药联用可共奏祛风散寒、除湿通络和活血止痛之功。

《素问·痹论篇》指出“风、寒、湿三气杂至,合而为痹”,风寒湿痹证是痹证中最常见的证型,依据此理论,课题组采用筛选和研究治疗类风湿性关节炎药物常用的 CIA 模型,在 CIA 模型基础上给予风寒湿刺激及 SEB 外涂制备能模拟人类 RA 的患病条件、临床症状、病理学改变等方面的 RA 风寒湿痹动物模型,通过实验观察风湿宁胶囊对治疗前后 RA 动物模型的一般情况、关节炎指数 (AI) 及膝关节组织病理学改变等情况,结果显示,风湿宁胶囊可明显改善 RA 模型生存状态,增高体重,降低后肢直径、表面温度和关节炎积分,改善滑膜组织炎症浸润等病理改变<sup>[15]</sup>,提示风湿宁胶囊在减轻关节损害和保护滑膜组织方面可发挥良好的作用。本课题进一步观察了风湿宁胶囊 RA 兔对关节滑膜组织炎症因子 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  和 RANKL mRNA 表达的影响,结果发现造模后 RA 兔滑膜组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , RANKL mRNA 的表达量均比正常组明显增高,说明 RA 风寒湿痹动物模型关节滑膜组织有明显的炎性反应,存在大量的炎性因子浸润,且造成了骨质破坏。风湿宁中剂量组、高剂量组和甲氨蝶呤组可降低 RA 兔滑膜组织 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , RANKL mRNA 的表达量,且风湿宁高剂量组在降低 IL-6, RANKL mRNA 表达方面与较甲氨蝶呤作用更为显著,实验结果表面风湿宁胶囊可通过降低关节滑膜组织炎症因子的表达及抑制骨组织 RANKL 的表达,来有效减轻 RA 兔滑膜组织的炎症反应,从而防

治骨质破坏,发挥保护关节、治疗RA的作用。

RA患者滑膜组织和滑膜液中多种免疫细胞如T细胞、巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞等及细胞因子、生长因子、黏附分子,如TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, 干扰素(IFN)- $\gamma$ , 转化生长因子(TGF)- $\beta$ , 粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF), 单核细胞趋化蛋白(MCP)-1, IL-10和前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)等形成的网络效应与RA的发生发展密切相关,因此需要进一步从调节形成RA的免疫网络效应出发,在更深层次上阐明风湿宁胶囊的作用机制,这对于更好地治疗RA有着重要的意义。

[参考文献]

[1] 魏雪敏,梅轶芳,张志毅. 白细胞介素-17在类风湿关节炎发病机制和治疗中的研究进展[J]. 中华内科杂志, 2012, 51(6): 492-494.

[2] Yoshimatsu H, Okazaki F, Ieiri I, et al. Mechanism of the 24 hour rhythm of tumor necrosis factor-alpha formed by onset of rheumatoid arthritis [J]. Chronobiol Int, 2014, 31(4): 564-571.

[3] WEI S, Kitaura H, ZHOU P, et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 282-290.

[4] 赵建平,刘光珍,王裕颐. 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): 8-10.

[5] 马艳苗,王永辉,李艳彦,等. 风湿宁胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞超微结构及细胞凋亡相关基因表达的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(4): 326-335.

[6] 肖长虹,顾为望,李留洋,等. 类风湿性关节炎风寒湿痹与风湿热痹动物模型的研究[J]. 中医杂志, 1996, 37(8): 492-496.

[7] 尹俊滨,高飞,张瀚文,等. 治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(21): 4172-4174.

[8] 林文棠,朱平. 临床免疫学[M]. 西安:第四军医大学出版社, 2002: 25-26.

[9] Dayer J M. Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra[J]. Clin Exp Rheumatol, 2004, 20(5 Suppl 27): S20-S24.

[10] Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine [J]. Arthritis Res, 2002, 4(3): 233-242.

[11] Miranda-Carús M E, Balsa A, Benito-Miguel M, et al. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate [J]. J Immunol, 2004, 173(2): 1463-1476.

[12] Yousef A, Sabiha A, Teruhisa H. TNF receptor type 1 regulates RANK ligand expression by stromal cells and modulates osteoclastogenesis [J]. J Cell Biochem, 2004, 93(5): 980-989.

[13] 周学平,周玲玲,陈晨,等. 清络通痹颗粒干预类风湿关节炎破骨细胞分化相关因子分泌的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(2): 202-208.

[14] Page G, Miossec P. RANK and ANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(8): 2307-2312.

[15] 冯振宇,马小娟,孟霜,等. 风湿宁胶囊对RA兔滑膜组织病理学的影响[J]. 中药材, 2016, 12(39): 2867-2869.

[责任编辑 邹晓翠]