

桂枝芍药知母汤对胶原诱导性关节炎小鼠软骨破坏及 JAK2/STAT3 信号通路的影响

李楠¹, 杨海芯¹, 曾珊², 马庆宇¹, 陈家旭^{1*}

(1. 暨南大学 中医学院, 广州 510632;

2. 暨南大学附属第一医院, 广州 510632)

[摘要] 目的:研究桂枝芍药知母汤在胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠软骨破坏中的作用及其作用机制。方法:取 SPF 级 DBA/1 小鼠 36 只,随机分组为正常组、模型组、甲氨蝶呤组(MTX)、桂枝芍药知母汤低、中、高剂量组 6 组。除正常组外,其余 5 组小鼠采用二次免疫法构建 CIA 模型,并在小鼠开始出现后肢肿胀当天分别予生理盐水,MTX(1.5 mg·kg⁻¹,每周 2 次)和桂枝芍药知母汤低、中、高剂量(6.3、12.6、25.2 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,共给药 4 周。观察并记录各组小鼠足肿胀度变化,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、MMP-3、MMP-9、MMP-13 含量,苏木素-伊红(HE)染色观察踝关节病理改变,番红固绿染色法观察软骨破坏,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠踝关节酪氨酸激酶 2(JAK2)/转录激活因子 3(STAT3)信号通路蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组足肿胀度,血清 MMP-1、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 含量和踝关节磷酸化(p)-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 的表达水平均显著上升($P<0.01$),关节破坏加重。与模型组比较,MTX 组和桂枝芍药知母汤低、中、高剂量组明显减轻小鼠足肿胀度($P<0.05$, $P<0.01$),明显降低小鼠血清 MMP-1、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 含量($P<0.05$, $P<0.01$),关节病理破坏减轻,明显降低踝关节 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:桂枝芍药知母汤能减轻 CIA 小鼠的关节肿胀程度,抑制 MMP-1、MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 的表达,改善关节软骨破坏,其作用机制与 JAK2/STAT3 信号通路有关。

[关键词] 桂枝芍药知母汤; 类风湿性关节炎; 软骨破坏; 胶原诱导性关节炎; 酪氨酸激酶 2(JAK2)/转录激活因子 3(STAT3)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0052-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221403

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220708.1114.003.html>

[网络出版日期] 2022-07-11 10:31

Effect of Guizhi Shaoyao Zhimutang on Cartilage Destruction and JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Mice with Collagen-induced Arthritis

LI Nan¹, YANG Haixin¹, ZENG Shan², MA Qingyu¹, CHEN Jiayu^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Guizhi Shaoyao Zhimutang (GSZMD) on cartilage destruction in mice with collagen-induced arthritis (CIA) and its mechanism. **Method:** Thirty-six DBA/1 mice in SPF grades were randomly divided into 6 groups, namely, the normal group, the model group, the methotrexate (MTX) group, the low-dose GSZMD group, the medium-dose GSZMD group, and the high-dose GSZMD group. Except the normal group, mice in the other 5 groups were used to establish the model of CIA by secondary immunization. The mice were given normal saline, MTX (1.5 mg·kg⁻¹, 2 times a week), and low,

[收稿日期] 2022-05-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81904077,81901650,82274390);广州市科技计划项目(202102020046)

[第一作者] 李楠,博士,讲师,主治医师,从事中医药防治风湿免疫病的研究,E-mail:linandada@126.com

[通信作者] * 陈家旭,博士,教授,博士生导师,从事中医病证规范化研究,E-mail:chenjiayu@hotmail.com

medium, and high-doses GSZMD (6.3, 12.6, 25.2 g·kg⁻¹·d⁻¹) by intragastric administration on the day of the onset of hind limb swelling for 4 weeks. The changes in the degree of foot swelling of mice in each group were observed and recorded. The content of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 in serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes in the ankle joint were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the cartilage destruction was observed by red fast green staining. The protein expression of the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway in ankle joints were detected by Western blot. **Result:** As compared with the normal group, the degree of foot swelling, the content of MMP-1, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 in serum and the expression levels of phosphorylation (p)-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 in ankle joints of the model group were increased ($P<0.01$), and the joint damage was aggravated. As compared with the model group, the degrees of foot swelling of the mice in the MTX group and the low, medium, and high-dose GSZMD group were reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), and the content of MMP-1, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 in serum was decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The pathological joint damage was alleviated, and the expression levels of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 in ankle joints were decreased in the MTX group and GSZMD groups ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** GSZMD can reduce the degree of joint swelling in mice with CIA, inhibit the expressions of MMP-1, MMP-3, MMP-9, and MMP-13, and alleviate the destruction of articular cartilage. Its mechanism is related to the JAK2/STAT3 signaling pathway.

[Keywords] Guizhi Shaoyao Zhimutang; rheumatoid arthritis; cartilage destruction; collagen-induced arthritis (CIA); Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway

类风湿关节炎(RA)是一种常见的以慢性进行性关节炎为特征的难治性自身免疫性疾病,晚期常常造成骨和软骨破坏,导致进行性、不可逆的关节损伤。研究显示RA发病率约为0.5%~1%,可以发生在任何年龄段,患病基数较大^[1]。目前,RA的发病机制仍然不清,且缺乏特异有效的治疗方法,导致绝大多数的RA患者病情反复发作,迁延多年,最终导致关节畸形和功能障碍,给社会带来沉重的负担,这也是造成我国人群丧失劳动力和致残的主要病因之一^[2-3]。因此,开展RA软骨破坏的机制研究,探索有效治疗RA的药物具有重要意义^[4]。

RA属于中医“痹病”“历节”等范畴,汉代张仲景在《金匮要略》中详细记载了其临床表现,并提出祛风除湿、温经散寒为主,清热滋阴为辅的桂枝芍药知母汤以治疗本病。桂枝芍药知母汤由桂枝、附子、麻黄、防风、白术、生姜、芍药、知母、甘草9味药组成,方中麻黄、桂枝祛风通阳,白术、防风祛风除湿,芍药、知母养阴清热,附子温经散寒止痛,生姜、甘草和胃调中。既往研究证实,桂枝芍药知母汤对RA疗效确切^[5-6],可改善RA患者关节压痛、关节肿胀、晨僵严重程度等临床表现,抑制关节炎症、骨破坏,调节RA免疫紊乱^[7-8],但其对于软骨破坏中的作用和其作用机制尚未阐明。基于此,本研究拟通过

体内实验探讨桂枝芍药知母汤对RA小鼠软骨破坏的作用及其作用机制,为其进一步研究开发提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性DBA/1小鼠36只,6~8周龄,体质量(20±2)g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产合格证号SCXK(京)2020-0004。动物饲养于暨南大学实验动物管理中心,饲养环境室温度24~27℃,湿度50%,水食自由,12h交替光照。本动物实验方案经过暨南大学实验动物伦理委员会审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定,批准编号IACUC-20211116-03。

1.2 药物 桂枝芍药知母汤由桂枝12g(批号181001281)、白芍9g(批号181100139)、甘草6g(批号180602261)、麻黄6g(批号180106671)、生姜15g(批号180100547)、白术15g(批号180900409)、知母12g(批号180903191)、防风12g(批号180504811)、炮附子10g(批号180270891)组成。药材购自康美药业股份有限公司,所有药材经暨南大学中医学院邓丽娟副教授定符合2020年版《中华人民共和国药典》相关要求。将各药材混合后加入4倍体积双蒸水浸泡30min,煎2次,每次煎30min,

去渣过滤混合, 60 °C水浴中浓缩至含生药 2 g·mL⁻¹, 用时以生理盐水稀释至所需浓度。甲氨蝶呤片(批号 14202154481), 购自上海上药信谊药厂有限公司, 使用生理盐水将甲氨蝶呤配置成质量浓度为 0.125 g·L⁻¹甲氨蝶呤混悬药液, 4 °C 储存备用。

1.3 试剂及仪器 牛Ⅱ型胶原、不完全弗氏佐剂、完全弗氏佐剂(Chondrex公司, 批号分别为 20022、7001、7023); 小鼠基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、MMP-3、MMP-9、MMP-13 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒[科鹿(武汉)生物科技有限责任公司, 批号分别为 ELK2543、ELK2187、ELK1263、ELK2539]; 磷酸化 JAK2(p-JAK2)抗体、JAK2 抗体、磷酸化 STAT3(p-STAT3)抗体、STAT3 抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab32101、ab108596、ab267373、ab68153、ab8226); 聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法蛋白定量试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔二抗、RIPA 裂解液、一抗稀释液、二抗稀释液、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术研究, 批号分别为 P0010S、A0208、P0013B、P0256、P0023D、C0105S); 番红固绿染液(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G1053)。

1.4 仪器 PV-200 型足趾容积测量仪(成都泰盟科技有限公司); ELX800 型酶标仪(Biotek Instruments 公司); 164-5050 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); DYCZ-24EN 型水平琼脂糖电泳槽(北京六一生物科技有限公司); CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 CIA 小鼠造模方法 首次免疫接种(第 0 天): 牛Ⅱ型胶原溶液(2 g·L⁻¹溶于 0.05 mol·L⁻¹乙酸)与完全弗氏佐剂(CFA)体积 1:1 完全混合乳化, 于小鼠尾根部皮下注射 100 μ L 混合溶液(含 100 μ g Ⅱ型胶原), 记为第 0 天。二次免疫接种: 第 21 天二次免疫接种 100 μ L 混合溶液(胶原加不完全弗氏佐剂 1:1 混合乳化, 方法同首次免疫)。接种同首次免疫, 但接种部位不同^[9], 小鼠出现后肢关节肿胀视为造模成功。

2.2 分组及干预方法 根据完全随机设计原则, 分为以下几组进行干预, 分别为正常组、模型组、甲氨蝶呤片组、桂枝芍药知母汤低、中、高剂量组。每组 6 只, 给药时间从小鼠开始出现后肢肿胀当天开始, 总共 4 周。甲氨蝶呤片组给予甲氨蝶呤片 1.5 mg·kg⁻¹

每次, 每周灌胃 2 次^[10]。桂枝芍药知母汤低、中、高剂量分别予桂枝芍药知母汤浓缩液灌胃, 剂量分别为 6.3、12.6、25.2 g·kg⁻¹·d⁻¹, 分别相当于临床 0.5、1、2 倍等效剂量, 每天灌胃 1 次。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 关节肿胀体积测定 给药后隔 2 d 使用足趾容积测量仪测量小鼠后肢足和踝关节的体积, 以此作为其关节肿胀的指标。

2.3.2 ELISA 检测小鼠血清 MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13 含量 收集小鼠全血离心备用, 首先根据说明书要求配制标准品, 取出板条, 100 μ L 每孔分别加入标准品、对照孔、实验孔的样品, 封板膜封板, 37 °C 恒温箱内孵育 120 min, 吸弃样品然后每孔内加入生物素标记抗体 100 μ L, 37 °C 孵育 60 min, 吸弃抗体后每孔加入 HRP 100 μ L, 37 °C 恒温孵育 60 min, 吸弃 HRP 再每孔加入 TMB 底物溶液 90 μ L, 37 °C 避光孵育 15~30 min, 后每孔加入终止溶液 50 μ L, 在 5 min 内使用酶标仪检测波长 450 nm 吸光度 A , 然后制作标准曲线计算浓度。

2.3.3 关节病理变化 采用 HE 染色观察踝关节病理改变, 番红固绿染色观察软骨破坏。关节组织固定在中性固定液, 经固定后, 常规石蜡包埋, 4 μ m 切片, 切片常规用二甲苯脱蜡, 经各级乙醇至水洗, 苏木素染色, 自来水冲洗。盐酸乙醇分化 30 s, 自来水或温水浸泡, 再置伊红液 2 min。若为番红固绿染色, 则采用快绿液染色 5 min, 1% 乙酸液快速漂洗 15 s, 0.1% 番红 O 染色 5 min, 95% 乙醇、无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片, 置于显微镜下观察。

2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠踝关节 p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达 提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 制备 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 上样后 80 V 电泳 2 h, 300 mA 转膜 30 min, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后加一抗(1:500), 4 °C 孵育过夜, TBST 浸洗 3 次, 每次 3 min, 加入二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)冲洗 3 次, 每次 3 min, 使用 ECL 发光液于凝胶成像分析系统曝光, 采集图像, 应用凝胶图形分析软件 Image Lab 3.0 分析各条带灰度值。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之样本均数比较采用 t 检验, 多组间比较方差齐时采用单因素方差分析, 组间多重比较采用最小显著性差异法(LSD)- t 检验, 方差不齐时采用近似 F 检验 Welch

法,组间两两比较采用Dunnett's T3法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CIA小鼠关节足肿胀度的影响 首次免疫后11~13 d,部分造模小鼠双侧踝关节开始出现关节

红肿,加强免疫后大部分小鼠发病,严重者出现关节活动受限,在病情后期部分小鼠踝关节出现强直样改变。与模型组比较,桂枝芍药知母汤组和MTX组小鼠关节红肿有改善明显,关节活动较正常,足肿体积明显下降($P<0.05, P<0.01$)。见表1。

表1 桂枝芍药知母汤对CIA小鼠足肿胀体积的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第1天	第4天	第7天	第10天	第13天
正常组		0.47±0.10	0.62±0.23	0.72±0.26	0.82±0.27	0.82±0.31
模型组		4.77±0.41 ¹⁾	4.15±0.85 ¹⁾	4.47±0.43 ¹⁾	4.63±0.55 ¹⁾	4.85±0.49 ¹⁾
甲氨蝶呤组	0.001 5	4.13±0.78	4.13±0.68	4.30±0.82	3.90±1.34	3.65±1.00
桂枝芍药知母汤低剂量组	6.3	3.63±1.03	3.98±0.84	4.17±0.68	4.00±1.79	3.78±1.71
桂枝芍药知母汤中剂量组	12.6	4.00±0.91	3.63±1.31	3.97±0.89	3.23±1.51	2.82±1.70 ²⁾
桂枝芍药知母汤高剂量组	25.2	4.07±0.77	3.40±1.26	3.67±0.52 ²⁾	2.93±1.11 ³⁾	2.67±1.51 ³⁾
组别	剂量/g·kg ⁻¹	第16天	第19天	第22天	第25天	第28天
正常组		0.83±0.41	0.83±0.31	0.92±0.41	0.90±0.46	0.93±0.52
模型组		4.67±0.41 ¹⁾	4.50±0.66 ¹⁾	4.33±0.53 ¹⁾	4.30±0.46 ¹⁾	4.32±0.45 ¹⁾
甲氨蝶呤组	0.001 5	3.03±1.32 ²⁾	2.83±1.42 ²⁾	2.65±1.41 ²⁾	2.62±1.34 ²⁾	2.38±1.13 ³⁾
桂枝芍药知母汤低剂量组	6.3	3.62±1.50	3.63±1.50	3.52±1.48	3.45±1.41	3.52±0.45 ²⁾
桂枝芍药知母汤中剂量组	12.6	2.78±1.56 ²⁾	2.47±1.61 ²⁾	2.42±1.56 ²⁾	2.38±1.50 ²⁾	2.25±1.25 ³⁾
桂枝芍药知母汤高剂量组	25.2	2.50±1.22 ³⁾	2.00±0.89 ³⁾	1.87±0.77 ³⁾	1.80±0.75 ³⁾	1.67±0.82 ³⁾

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

3.2 对CIA小鼠MMP-1、MMP-3、MMP-9和MMP-13表达的影响 与正常组比较,模型组MMP-1、MMP-3、MMP-9和MMP-13表达显著上升($P<$

0.01);与模型组比较,甲氨蝶呤组和桂枝芍药知母汤低、中、高剂量组MMP-1、MMP-3、MMP-9和MMP-13表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

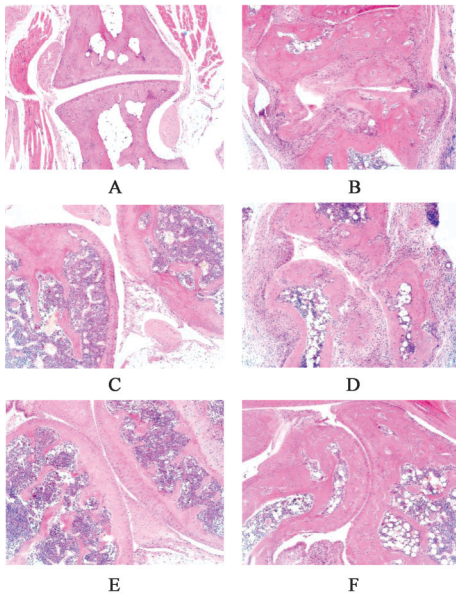
表2 桂枝芍药知母汤对CIA小鼠MMP-1、MMP-3、MMP-9和MMP-13表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-1	MMP-3	MMP-9	MMP-13
正常组		141.22±34.19	324.92±25.99	502.32±49.73	283.44±29.45
模型组		672.88±67.77 ¹⁾	1 041.73±99.82 ¹⁾	1 249.20±81.32 ¹⁾	422.41±34.67 ¹⁾
甲氨蝶呤组	0.001 5	590.82±22.93 ²⁾	873.91±54.51 ³⁾	987.23±93.47 ³⁾	358.03±37.55 ²⁾
桂枝芍药知母汤低剂量组	6.3	587.23±30.26 ²⁾	801.39±76.22 ³⁾	902.21±45.89 ³⁾	334.36±35.76 ²⁾
桂枝芍药知母汤中剂量组	12.6	348.45±25.76 ³⁾	698.12±48.21 ³⁾	872.33±39.42 ³⁾	301.82±56.83 ³⁾
桂枝芍药知母汤高剂量组	25.2	235.93±29.01 ³⁾	532.23±39.87 ³⁾	678.48±45.98 ³⁾	268.96±39.01 ³⁾

3.3 对CIA小鼠踝关节病理改变的影响 正常组小鼠踝关节结构完整,滑膜上皮未见增生,未见炎症细胞浸润,关节软骨面光滑平整,软骨基质为均匀的红色,软骨细胞的数量正常,潮线完整。模型组小鼠踝关节结构紊乱,滑膜炎症细胞浸润明显,血管翳形成,部分滑膜向软骨内侵袭,软骨基质中番红色明显减少,部分有软骨缺损,潮线模糊不清晰。桂枝芍药知母汤高剂量组及甲氨蝶呤组小鼠

关节病理改变较模型组轻微,无明显关节破坏。见图1和图2。

3.4 对JAK2/STAT3信号通路的影响 与正常组比较,模型组p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3表达显著上升($P<0.01$);与模型组比较,甲氨蝶呤组和桂枝芍药知母汤低、中、高剂量组均可明显下调p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3的表达水平($P<0.05, P<0.01$)。见图3、表3。



注:A.正常组;B.模型组;C.甲氨蝶呤组;D.桂枝芍药知母汤低剂量组;E.桂枝芍药知母汤中剂量组;F.桂枝芍药知母汤高剂量组(图2和图3同)

图1 桂枝芍药知母汤对CIA小鼠踝关节病理改变的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of GSZMT on pathological changes of ankle joint in CIA mice (HE, ×100)

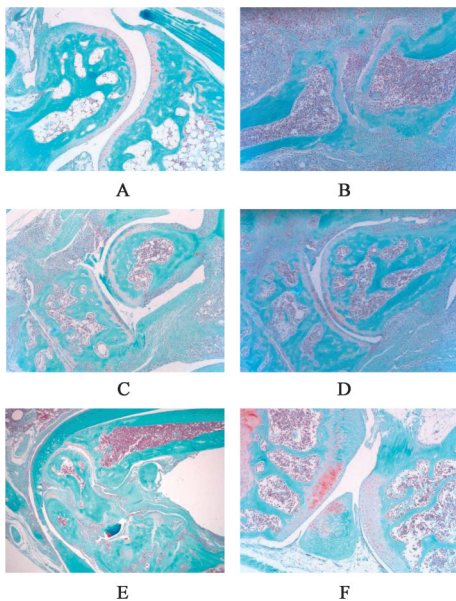


图2 桂枝芍药知母汤对CIA小鼠踝关节病理改变的影响(番红固绿, ×100)

Fig. 2 Effect of GSZMT on pathological changes of ankle joint in CIA mice (red solid green, ×100)

4 讨论

RA的基本病理改变为滑膜炎、血管翳形成,并逐渐出现关节软骨和骨破坏,最终可能导致关节畸形和功能丧失,确切发病机制不明^[11]。研究表明,RA的骨侵蚀多出现在起病后2年,因此,RA发病开

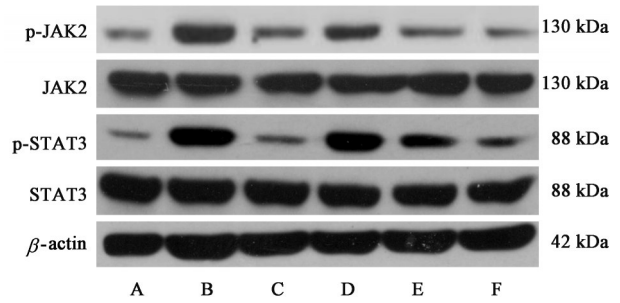


图3 各组p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of p-JAK2, JAK2, p-STAT3 and STAT3 protein expression

始2年内是阻止关节发生不可逆损害的关键时期^[12-13],但很多患者在发现时骨侵蚀已经开始,错过了治疗的关键时期,因此,阻断软骨、骨破坏进程已成为RA治疗的重要目标之一。

中医学虽没有“RA”的病名,但据其表现当属于中医“历节”“痹病”等范畴。经过多年临床实践,中医学在RA防治方面积累了丰富的经验。桂枝芍药知母汤记载于《金匱要略》,是有效治疗RA的经典名方,临床应用广泛,全方以桂枝、附子、麻黄等温热药为主,阴阳并调、表里并治,汗、温、利法俱备,共奏祛风除湿、温经散寒为主,清热滋阴为辅的功效^[14-15],使风寒湿邪俱去,经络得通,痹痛得以缓解。多年的临床实践和实验研究证实,桂枝芍药知母汤治疗RA具有其独特优势^[16-17]。桂枝芍药知母汤可显著改善RA患者的临床症状,降低炎症指标如血沉、C-反应蛋白表达,减轻关节炎活动程度,提高患者的生存质量^[6,18],但其对于RA软骨破坏的机制暂不明确。研究表明,与模型组比较,甲氨蝶呤组及桂枝芍药知母汤各剂量组,在减少CIA小鼠足肿胀度,下调软骨破坏关键指标MMP-1、MMP-3、MMP-9和MMP-13均有良好的效果。笔者还发现,桂枝芍药知母汤高剂量组疗效明显优于桂枝芍药知母汤低、中剂量组,提示本方治疗RA呈剂量依赖性。在病理改变上,经治疗后,用药组滑膜增生减少,炎性细胞浸润程度较轻,血管翳结构形成少,关节面较完整,番红固绿染色中软骨表面较光滑,软骨基质中番红的染色比较均匀,软骨细胞的数量较正常,软骨破坏较轻,提示桂枝芍药知母汤对CIA小鼠软骨破坏具有显著的治疗效果。甲氨蝶呤是常用治疗RA的抗风湿慢作用药,本次研究发现,甲氨蝶呤治疗CIA小鼠4周的效果与桂枝芍药知母汤低剂量组效果相当。

软骨破坏被认为是导致RA患者全身性骨丢失及关节局部骨破坏的主要原因^[19-20]。MMPs是一组

表3 桂枝芍药知母汤对CIA小鼠p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of GSZMT on p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 expression of CIA mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-JAK2 /β-actin	JAK2 /β-actin	p-JAK2 /JAK2	p-STAT3 /β-actin	STAT3 /β-actin	p-STAT3 /STAT3
正常组		1.00±0.12	1.00±0.08	1.00±0.02 ³⁾	1.00±0.23	1.00±0.13	1.00±0.10 ³⁾
模型组		4.63±0.32 ¹⁾	1.04±0.21	4.56±1.02 ¹⁾	5.14±1.05 ¹⁾	1.02±0.09	5.01±1.17 ¹⁾
甲氨蝶呤组	0.001 5	1.39±0.18 ³⁾	0.98±0.17	1.44±0.43 ³⁾	1.31±0.34 ³⁾	1.02±0.12	1.25±0.52 ³⁾
桂枝芍药知母汤低剂量组	6.3	3.01±1.02 ²⁾	1.10±0.25	2.93±1.21 ²⁾	3.43±1.04 ²⁾	1.04±0.17	3.32±1.26 ²⁾
桂枝芍药知母汤中剂量组	12.6	2.05±0.98 ³⁾	1.01±0.19	2.08±0.84 ³⁾	2.54±0.68 ³⁾	1.05±0.09	2.43±0.77 ³⁾
桂枝芍药知母汤高剂量组	25.2	1.21±0.53 ³⁾	0.99±0.21	1.22±0.75 ³⁾	1.62±0.53 ³⁾	1.10±0.23	1.45±0.63 ³⁾

在结构上具有极大同源性、能降解细胞外基质蛋白的内啡肽的总称,在RA关节软骨中破坏起着重要作用。一方面,MMPs直接降解软骨,它首先破坏蛋白多糖的结构,使胶原暴露并与其接触,同时正反馈性增强MMPs的活性,引起蛋白多糖的进一步破坏,使破损的胶原裂解。通过这一过程,胶原链的结构遭到破坏,导致不可逆的软骨变性^[21-22]。另一方面,MMPs在形成血管翳方面也有重要作用,RA软骨的破坏主要集中在与增殖滑膜血管翳连接处^[23-24],增殖的滑膜细胞可以通过细胞接触直接侵蚀软骨,也可以在炎症因子等的作用下,通过活化的滑膜细胞及软骨细胞本身分泌产生如MMPs等的降解酶来使软骨变性^[25-26]。因此,抑制MMPs分泌在防治RA软骨破坏中有重要作用。

另外发现,桂枝芍药知母汤抑制RA软骨破坏的作用机制与JAK2/STAT3信号通路密切相关。在RA发病过程中,细胞因子、趋化因子等可与细胞表面受体结合,促使受体蛋白胞内段分子构象发生改变,触发JAK2激酶信号,活化的JAK2激酶磷酸化STAT3,磷酸化的STAT3二聚化并转位核内,发生核转位,启动下游相关基因,引发级联放大的炎症反应,促进MMPs基因表达分泌增加,导致软骨凋亡细胞增加及炎性滑膜组织的抗凋亡性^[27-29]。基于JAK/STAT信号通路在RA的重要作用,JAK抑制剂也已经成功地并入了RA的治疗,并在临床上得到广泛应用^[30-32]。

综上所述,桂枝芍药知母汤能减轻CIA小鼠的关节肿胀程度,抑制MMP-1、MMP-3、MMP-9和MMP-13的表达,改善关节软骨破坏,呈剂量依赖性。桂枝芍药知母汤治疗RA的作用机制与JAK2/STAT3信号通路有关,但更加明确的作用及其深入的作用机制还需要进一步的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HUANG J, FU X, CHEN X, et al. Promising therapeutic targets for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 686155.
- [2] SMOLEN J S, ALETAHA D, BARTON A, et al. Rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18001.
- [3] IYER P, LEE Y C. Why It Hurts: The mechanisms of pain in rheumatoid arthritis [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2021, 47(2): 229-244.
- [4] WANG Y, CHEN S, DU K, et al. Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114368.
- [5] 中华中医药学会风湿病分会. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(20): 1794-1800.
- [6] 世界中医药学会联合会, 中华中医药学会. 国际中医临床实践指南-类风湿关节炎 (2019-10-11) [J]. *世界中医药*, 2020, 15(20): 3160-3168.
- [7] YE J, LI R, HU Z, et al. Efficacy and safety of Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction in the treatment of rheumatoid arthritis: A protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(9): e24416.
- [8] DAILY J W, ZHANG T, CAO S, et al. Efficacy and Safety of GuiZhi-ShaoYao-ZhiMu decoction for treating rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *J Altern Complement Med*, 2017, 23(10): 756-770.
- [9] LI N, GONG Z, LI X, et al. Betulinic acid inhibits the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 186-193.
- [10] FAN J, LUO J, YAN C, et al. Methotrexate, combined with cyclophosphamide attenuates murine collagen induced arthritis by modulating the expression level of Breg and DCs [J]. *Mol Immunol*, 2017, 90: 106-117.
- [11] KOMATSU N, TAKAYANAGI H. Mechanisms of

- joint destruction in rheumatoid arthritis-immune cell-fibroblast-bone interactions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(7):415-429.
- [12] OSTROWSKA M, MAŚLIŃSKI W, PROCHOREC-SOBIESZEK M, et al. Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis [J]. *Reumatologia*, 2018, 56(2): 111-120.
- [13] GUO Q, WANG Y, XU D, et al. Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 15.
- [14] 辛小红, 张星平, 巴哈尔, 等. 由桂枝芍药知母汤管窥张仲景对《素问·痹论》之发展 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(8):2725-2727.
- [15] 覃艺, 曾海蓉, 王琳, 等. 经方桂枝芍药知母汤物质基准的 HPLC 指纹图谱及清除 DPPH 谱效关系的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(14):3042-3048.
- [16] 张青, 徐月, 彭伟, 等. 分子对接结合网络药理学研究桂枝芍药知母汤治疗类风湿关节炎的分子作用机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(18):4673-4684.
- [17] 嵇辉, 杨增敏, 陈其义. 桂枝芍药知母汤对类风湿性关节炎患者实验室指标和免疫功能的影响 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(20):3097-3100.
- [18] GUO Q, MAO X, ZHANG Y, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction attenuates rheumatoid arthritis partially by reversing inflammation-immune system imbalance [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 165.
- [19] TATEIWA D, YOSHIKAWA H, KAITO T. Cartilage and bone destruction in arthritis: Pathogenesis and treatment strategy: A literature review [J]. *Cells*, 2019, 8(8):818.
- [20] ITOH Y. Metalloproteinases in rheumatoid arthritis: Potential therapeutic targets to improve current therapies [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148: 327-338.
- [21] PAP T, KORB-PAP A. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis-two unequal siblings [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(10): 606-615.
- [22] SHERWOOD J C, BERTRAND J, ELDRIDGE S E, et al. Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair [J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19(8): 1172-1177.
- [23] WANG M, ZHOU Y, HUANG W, et al. Association between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) protein level and the risk of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: A Meta-analysis [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 54(2):e10366.
- [24] MALEMUD C J. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165:33-40.
- [25] 范凯健, 许颖, 王婷玉. 软骨细胞在类风湿性关节炎中的研究进展 [J]. *实用药物与临床*, 2017, 20(7): 848-851.
- [26] ANDREEV D, KACHLER K, SCHETT G, et al. Rheumatoid arthritis and osteoimmunology: The adverse impact of a deregulated immune system on bone metabolism [J]. *Bone*, 2022, 162:116468.
- [27] YAMAOKA K. Janus kinase inhibitors for rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 32:29-33.
- [28] MCINNES I B, SCHETT G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10086):2328-2337.
- [29] MALEMUD C J. Matrix metalloproteinases and synovial joint pathology [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148:305-325.
- [30] SMOLEN J S, LANDEWÉ R, BIJLSMA J, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(6):685-699.
- [31] RICHEZ C, TRUCHETET M E. What value do JAK inhibitors have in treating rheumatoid arthritis? [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(15):1789-1792.
- [32] HARRINGTON R, AL NOKHATHA S A, CONWAY R. JAK inhibitors in rheumatoid arthritis: An evidence-based review on the emerging clinical data [J]. *J Inflamm Res*, 2020, 13:519-531.

[责任编辑 周冰冰]