

风湿祛痛胶囊对大鼠胶原诱导性关节炎的影响

王靖霞^{1,2}, 刘春芳², 何莲花², 孙丛丛², 李逸群², 孟昊业³, 彭江³,
荆宇⁴, 苗艳东⁴, 林娜^{1,2*}

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 中国人民解放军总医院骨科研究所, 北京 100853;
4. 通化金马药业集团股份有限公司, 北京 100028)

[摘要] 目的:观察风湿祛痛胶囊对大鼠胶原诱导性关节炎(CIA)的干预作用。方法:SD大鼠随机分为正常组、模型组、风湿祛痛胶囊低、中、高剂量组(0.25,0.5,1 g·kg⁻¹·d⁻¹),对照药甲氨蝶呤组(0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹),除正常组外,其他各组以Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂免疫大鼠建立CIA模型,首次免疫后第1天给药组开始灌胃给药,每天1次,共给药19 d;首次免疫第8天开始观察大鼠关节红肿和畸形症状、评价关节炎临床积分和发病率,第19天取材后,炎症关节进行微计算机断层扫描技术检测和骨计量学分析,同时进行炎症关节组织病理学检查并从滑膜炎、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏等方面进行半定量评分,酶联免疫吸附测定法检测血清白细胞介素-1β(IL-1β),肿瘤坏死因子-α(TNF-α),血管内皮生长因子(VEGF),基质金属蛋白酶-3(MMP-3)和核转录因子-κB受体活化因子配基(RANKL)含量。结果:风湿祛痛胶囊能剂量依赖地改善CIA大鼠炎症关节红、肿和畸形症状;与正常组比较,模型组大鼠炎症关节红、肿和畸形明显临床积分和发病率、关节滑膜炎、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏的病理评分显著升高($P < 0.01$),炎症关节骨密度(BMD),骨体积分数(BV/TV),骨小梁厚度(Tb.Th),骨小梁数量(Tb.N)显著降低($P < 0.01$),骨表面积体积比(BS/BV)和骨小梁分离度(Tb.Sp)显著升高($P < 0.01$),血清IL-1β,TNF-α,VEGF,MMP3和RANKL的含量显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,各风湿祛痛胶囊组红肿、畸形症状明显改善,临床积分和发病率、关节滑膜炎、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏的病理评分均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),BMD,BV/TV,Tb.Th,Tb.N明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),BS/BV和Tb.Sp明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),血清IL-1β,TNF-α,VEGF,MMP-3和RANKL的含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且甲氨蝶呤组与高剂量组的作用相近。结论:风湿祛痛胶囊能有效缓解CIA的临床症状和病情,降低发病率,减轻关节的组织病理学和影像学严重程度,同时抑制血清中的促炎细胞因子含量。

[关键词] 风湿祛痛胶囊; 胶原诱导性关节炎; 病理学; 影像学; 细胞因子

[中图分类号] R289;R289.5;R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0089-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190228

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181030.1809.001.html>

[网络出版时间] 2018-11-02 10:20

Effect of Fengshi Qutong Capsule on Collagen-induced Arthritis of Rats

WANG Jing-xia^{1,2}, LIU Chun-fang², HE Lian-hua², SUN Cong-cong², LI Yi-qun², MENG Hao-ye³,
PENG Jiang³, JING Yu⁴, MIAO Yan-dong⁴, LIN Na^{1,2*}

(1. Chengde Medical University, Chengde 067000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China;

3. Institute of Orthopaedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

4. Tonghua Golden-Horse Group, Beijing 100028, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the intervention effect of Fengshi Qutong capsule on collagen-induced

[收稿日期] 20180904(005)

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20171011)

[第一作者] 王靖霞,在读硕士,从事中药药理研究,E-mail:1476162527@qq.com

[通信作者] *林娜,研究员,博士生导师,从事抗炎中药药理研究,E-mail:linna888@163.com

arthritis (CIA) in rats. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group, model group, low, medium and high-dose Fengshi Qutong capsule groups ($0.25, 0.5, 1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and methotrexate group ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Except for normal group, the other groups were immunized with type II collagen and incomplete Freund's adjuvant to establish a CIA model. On the 1st day after the first immunization, the administration group was given intragastric administration, once a day, for 19 days; on the 8th day after the first immunization, the symptoms of joint swelling and malformation of the rats were observed, and the clinical scores and incidence of arthritis were evaluated. On the 19th day, micro-computed tomography and bone metrology were performed, and histopathological examination of inflammatory joints was performed, and synovial inflammation, vasospasm, cartilage erosion and bone destruction by pathological severity scores, serum interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) were detected by enzyme linked immunosorbent assay. **Result:** Fengshi Qutong capsule could improve the symptoms of inflammatory joint redness, swelling and deformity in CIA rats in a dose-dependent manner. Compared with normal group, clinical score and incidence, joint synovial inflammation, vasospasm, cartilage erosion and pathological score of bone destruction in joint group were significantly increased ($P < 0.01$), bone mineral density (BMD), bone volume/total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N) were significantly decreased ($P < 0.01$), bone surface area/bone volume (BS/BV) and trabecular separation (Tb. Sp) were significantly elevated ($P < 0.01$), and levels of IL-1 β , TNF- α , VEGF, MMP-3 and RANKL in serum were increased ($P < 0.01$); compared with model group, clinical scores and incidence, joint synovial inflammation, vasospasm, cartilage erosion and bone destruction of each drug group were significantly lower ($P < 0.05, P < 0.01$), BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N were significantly elevated ($P < 0.05, P < 0.01$), BS/BV and Tb. Sp were significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$), and levels of serum IL-1 β , TNF- α , VEGF, MMP-3 and RANKL were significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$). And the control drug methotrexate had similar effects to the high-dose group. **Conclusion:** Fengshi Qutong capsule can effectively alleviate the clinical symptoms and conditions of experimental rheumatoid arthritis in rats, reduce the incidence, and relieve the histopathology and imaging severity, while inhibiting the inflammatory cytokines.

[**Key words**] Fengshi Qutong capsule; collagen-induced arthritis; histopathology; radiography; cytokines

类风湿关节炎(RA)是一种慢性进行性的自身免疫性疾病,其病理特征为关节滑膜慢性炎症、血管翳形成、软骨侵蚀及骨破坏,最终导致关节功能丧失^[1-2]。RA的发病率和致残率很高,西医目前尚无特效疗法,中药因具有药效持久、毒副作用少、复发率低等特点和优势,越来越引起RA治疗界的重视和患者的认可。风湿祛痛胶囊是由川黄柏、苍术及多味虫类药组成的中成药,具有燥湿祛风、活血化瘀、通络止痛的功效,临床用治RA等痹病的寒热错杂证。近年的临床研究发现风湿祛痛胶囊结合穴位注射能明显改善RA患者的关节疼痛和肿胀等临床症状,并提高生活质量^[3],也有学者发现其对大鼠佐剂性关节炎(AA)有较好的改善作用,能抑制巨噬细胞吞噬功能、增强机体清除自由基能力等^[4]。然而,迄今尚未见风湿祛痛胶囊对胶原诱导性关节炎(CIA)治疗作用的实验研究报道。本研究拟通过

建立CIA大鼠模型,以甲氨蝶呤为阳性对照药,从关节炎临床积分、发病率、组织病理学、影像学以及血清促炎细胞因子的含量变化等方面观察风湿祛痛胶囊对CIA大鼠的干预作用,为进一步的机制研究提供实验基础,也为临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠60只,SPF级,雄性,体质量160~180g,购自中国食品药品检定研究院,合格证号SCXK(京)2014-0013。动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心,日光灯照明,空调控温,实验操作符合中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物福利伦理审查委员会标准(编号2017-067)。适应性饲养3d后用于实验。

1.2 药物及试剂 风湿祛痛胶囊(通化金马药业集团有限公司,批号20170926),由川黄柏、苍术、威灵仙、鸡血藤、蜂房、乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇、

红花、土鳖虫、醋没药、醋乳香、独活、全蝎、蜈蚣、地龙、羌活、桂枝、姜黄共 19 味药材组成；甲氨蝶呤（上海源叶生物科技有限公司，批号 SN1122RA14）；不完全弗氏佐剂，牛Ⅱ型胶原（CⅡ）（Chondrex. Inc 公司，批号分别为 7002, 20022）；白细胞介素-1 β （IL-1 β ），肿瘤坏死因子- α （TNF- α ），血管内皮生长因子（VEGF），基质金属降解酶（MMP-3），核转录因子- κ B（NF- κ B）受体活化因子配体（RANKL）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（Elabscience 公司，批号分别为 AK0018JAN29023, AK0018JAN29022, AK0018JAN29019, D8A32W2UKA, X154AZ4FEL）；苏木素-伊红染色液（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号分别为 15111830, 15111828）。

1.3 仪器 KPJ-1A 型烤片机, QPJ-C 型轮转式切片机, BMJ-1B 型生物组织包埋机, BMJ-1B 型生物组织包埋冰冻台（天津天利航空机电有限公司）；IKA T10 型手持式匀浆机 [艾卡（广州）仪器设备有限公司]，RS0800604-0063 型微计算机断层扫描 Micro-CT 仪（美国 GE Healthcare 公司），MK3 型全自动酶标仪（美国 Thermo 公司）。

2 方法

2.1 制备 CIA 大鼠模型^[5] 将等体积的牛 CⅡ 和不完全弗氏佐剂混合，使用匀浆器在冰浴下进行乳化，直至滴水不扩散。大鼠尾根皮内注射混合液 0.2 mL/只（含 CⅡ 200 μ g），第 7 天时注射 0.1 mL/只激发免疫。

2.2 分组和给药 实验前将大鼠按体质量随机分为正常组，模型组，风湿祛痛胶囊低、中、高剂量组（0.25, 0.5, 1 g·kg⁻¹·d⁻¹，分别相当于临床剂量的 0.5, 1, 2 倍）^[4]，甲氨蝶呤组（0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹）^[6]，每组 10 只。大鼠造模第 2 天开始按体质量灌胃给药，每天 1 次，连续给药 19 d，正常组和模型组灌胃同等条件下的蒸馏水。

2.3 大鼠关节炎临床积分、发病率评价 观察大鼠一般情况，参考文献 [7] 对大鼠发病后关节红肿症状进行评分，采用 80 分制，前后四肢，每肢 20 分，踝腕关节和足中段 0~4 分（特别肿 4 分，很肿 3 分，肿 2 分，微肿 1 分，不肿 0 分）；跖趾关节 0~12 分（每个跖趾关节肿 1 分，不肿 0 分，共 12 跖趾关节）^[7]，同时记录统计大鼠关节炎发病率，发病率 = 每组大鼠发病只数/每组大鼠总数 \times 100%。

2.4 ELISA 检测血清因子水平 大鼠麻醉后于腹主动脉取血，采用 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min，取上清，-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。ELISA 检测 IL-1 β ，TNF- α ，

VEGF，MMP-3 和 RANKL 含量，具体操作参考试剂盒说明书，在 450 nm 波长处检测吸光度 A。

2.5 炎症关节组织病理学观察和半定量评分分析

取大鼠双后肢，4% 多聚甲醛固定 72 h，10% 乙二胺四乙酸二钠脱钙 30 d，脱水、透明、石蜡包埋，5 μ m 切片、苏木素-伊红（HE）染色，显微镜观察关节组织病理变化，并对炎性细胞浸润、血管翳形成、软骨侵蚀和骨破坏程度进行病理计分。根据炎性细胞浸润，血管翳，软骨侵蚀和骨破坏进行组织学分析。所有评分均基于 0~5 等级的以下标准，0 = 正常，1 = 最轻，2 = 轻度，3 = 中度，4 = 明显，5 = 严重^[8-9]。

2.6 微计算机断层扫描技术（Micro-CT）扫描大鼠膝关节 取大鼠膝关节，4% 多聚甲醛固定 72 h，对大鼠膝关节进行 Micro-CT 扫描（分辨率 25 μ m，单次时长 72 min）；并采用 GEHC Microviw 进行三维重建和数据分析。对膝关节骨密度（BMD），骨体积分数（BV/TV），骨小梁厚度（Tb. Th），骨小梁数量（Tb. N），骨表面积体积比（BS/BV）和骨小梁分离度（Tb. Sp）进行分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 15.0 统计软件，发病率统计采用 χ^2 检验，其他资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，统计方法采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 炎症关节红肿、畸形症状观察 大鼠前足和后足关节在造模第 9 天出现红肿症状，第 13 天达到较高水平并继续发病，造模第 18 天时，与正常组相比，模型组大鼠关节红肿明显、甚至变形；与模型组相比，风湿祛痛胶囊各给药组关节红肿、畸形有不同程度的消退或减弱，且给药剂量越高作用越明显，甲氨蝶呤组关节红肿和畸形症状也明显减弱。见图 1。

3.2 炎症关节临床积分和发病率

3.2.1 对大鼠临床积分的影响 正常组关节正常，临床积分均为 0；与正常组比较模型组在免疫后第 9, 11, 13, 15, 17, 18 天随着造模时间延长临床积分逐渐升高，免疫第 18 天积分最高；与模型组相比，风湿祛痛胶囊各给药组自造模后第 9~18 天临床积分均降低，且除第 9 天外其他时间点均有显著性差异（ $P < 0.05$, $P < 0.01$ ），甲氨蝶呤组临床积分自造模后第 13 d 开始也明显降低（ $P < 0.05$, $P < 0.01$ ）。见表 1。

3.2.2 对大鼠发病率的影响 正常组大鼠发病率为 0，模型组大鼠在免疫后第 9 天开始发病，发病率逐渐升高，第 12 天已达到 100%；风湿祛痛胶囊低、中剂量组和甲氨蝶呤组与模型组同时发病，但是



A. 正常组; B. 模型组; C. 甲氨蝶呤组; D. 风湿祛痛胶囊低剂量组; E. 风湿祛痛胶囊中剂量组; F. 风湿祛痛胶囊高剂量组(图 2, 3 同)

图 1 风湿祛痛胶囊对 CIA 大鼠炎症关节红肿症状的影响

Fig. 1 Effect of Fengshi Qutong capsule on inflammatory erythema and joints swelling of CIA rats

表 1 风湿祛痛胶囊对 CIA 大鼠炎症关节临床积分的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Fengshi Qutong capsule on arthritis scores of CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	9 d	11 d	13 d	15 d	17 d	18 d
正常	-	0	0	0	0	0	0
模型	-	5.00 ± 4.86 ¹⁾	29.33 ± 13.65 ¹⁾	36.00 ± 12.07 ¹⁾	40.83 ± 12.01 ¹⁾	45.17 ± 8.08 ¹⁾	48.00 ± 7.75 ¹⁾
甲氨蝶呤	0.000 2	0.67 ± 1.63	16.67 ± 6.35	22.50 ± 4.72 ²⁾	25.83 ± 5.19 ²⁾	25.17 ± 3.92 ³⁾	26.83 ± 4.12 ³⁾
风湿祛痛胶囊	0.25	2.50 ± 3.56	22.50 ± 8.62	29.83 ± 8.13	35.83 ± 5.78	37.33 ± 2.94 ²⁾	37.83 ± 2.71 ²⁾
	0.5	1.50 ± 1.97	19.00 ± 10.94	25.83 ± 7.57	28.50 ± 6.19 ²⁾	31.17 ± 6.21 ³⁾	34.67 ± 5.01 ³⁾
	1	0.67 ± 1.63	15.50 ± 5.79 ²⁾	22.33 ± 8.41 ²⁾	22.83 ± 6.79 ³⁾	21.33 ± 6.35 ³⁾	22.83 ± 6.71 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 ~ 5 同)。

表 2 风湿祛痛胶囊对 CIA 大鼠关节炎发病率的影响(n = 10)

Table 2 Effect of Fengshi Qutong capsule on arthritis incidence of CIA rats(n = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	9 d	11 d	13 d	15 d	17 d	18 d
正常	-	0	0	0	0	0	0
模型	-	50	100 ¹⁾	100 ¹⁾	100 ¹⁾	100 ¹⁾	100 ¹⁾
甲氨蝶呤	0.000 2	0	40 ²⁾	40 ²⁾	50 ²⁾	50 ²⁾	50 ²⁾
风湿祛痛胶囊	0.25	30	60	80	80	80	80
	0.5	10	50 ²⁾	60	70	70	70
	1	0	30 ³⁾	40 ²⁾	50 ²⁾	50 ²⁾	50 ²⁾

关节腔内见少量剥脱的坏死组织,软骨表面较光滑,见图 2。

3.3.2 组织病理学半定量计分分析 与正常组相

发病率均低于模型组,在第 18 天风湿祛痛胶囊低、中剂量组和甲氨蝶呤组发病率分别为 90%、80%、60%,风湿祛痛胶囊高剂量组大鼠发病晚于模型组,且在第 18 天时,发病率为 50%。见表 2。

3.3 炎症关节组织病理学观察和半定量分析

3.3.1 组织病理学观察

正常组关节结构正常,滑膜细胞无增生,无血管翳形成,关节软骨表面光滑、无剥脱,关节软骨下骨小梁大小、排列正常;模型组可见明显的滑膜细胞增生、排列紊乱,并可见炎性细胞浸润,血管翳形成,软骨表层细胞变性、坏死,关节软骨面剥脱,关节腔内有大量的剥脱坏死组织,软骨下骨小梁排列紊乱;风湿祛痛胶囊低剂量组滑膜细胞增生明显,炎细胞浸润减少,血管增生和血管翳形成受到抑制;风湿祛痛胶囊中剂量组滑膜细胞轻度增生,关节腔内未见剥脱的坏死组织,软骨表面较光滑,软骨细胞变形坏死;风湿祛痛胶囊高剂量组未见明显滑膜细胞增生,关节腔内未见剥脱的坏死组织,软骨表面较光滑;甲氨蝶呤组滑膜细胞稍有增生,

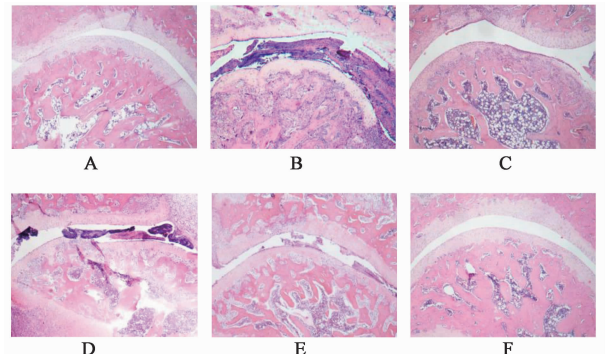


图 2 风湿祛痛胶囊对 CIA 大鼠踝关节组织病理学改变的影响(HE, ×40)

Fig. 2 Effect of Fengshi Qutong capsule on histopathological changes in ankle joints of CIA rats(HE, ×40)

比,模型组炎性细胞浸润、血管翳形成、软骨侵蚀和

骨破坏程度计分均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 风湿祛痛胶囊低剂量组炎性细胞浸润、血管翳、软骨侵蚀、骨破坏计分均较模型组降低, 但无统计学差异, 风湿祛痛胶囊中剂量组和风湿祛痛胶囊

高剂量组炎性细胞浸润、血管翳、软骨侵蚀、骨破坏程度计分均较模型组均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 甲氨蝶呤组病理计分也明显降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 风湿祛痛胶囊对 CIA 大鼠踝关节组织病理学半定量积分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	炎性细胞浸润	血管翳	软骨侵蚀	骨破坏
正常	-	0	0	0	0
模型	-	$3.09 \pm 1.30^{1)}$	$2.91 \pm 1.22^{1)}$	$2.27 \pm 1.10^{1)}$	$3.00 \pm 1.41^{1)}$
甲氨蝶呤	0.000 2	$1.58 \pm 0.51^{3)}$	$1.50 \pm 0.52^{3)}$	$1.00 \pm 0.60^{3)}$	$1.50 \pm 0.67^{3)}$
风湿祛痛胶囊	0.25	2.50 ± 0.97	2.20 ± 0.42	2.10 ± 0.99	2.90 ± 0.99
	0.5	$1.67 \pm 0.78^{3)}$	$1.75 \pm 0.45^{3)}$	$1.25 \pm 0.45^{3)}$	$1.75 \pm 0.75^{2)}$
	1	$1.42 \pm 0.51^{3)}$	$1.45 \pm 0.52^{3)}$	$0.92 \pm 0.67^{3)}$	$1.58 \pm 0.79^{3)}$

3.4 炎症关节影像学观察和骨计量学分析

3.4.1 影像学观察 正常组膝关节表面光滑、外形完整; 模型组表面凹凸不平、外形不完整; 与模型组相比, 风湿祛痛胶囊低、中、高剂量组膝关节表面稍粗糙、关节外形较完整, 且给药剂量越高关节表面越光滑、外形也越完整, 甲氨蝶呤组膝关节表面也比较光滑、完整。见图 3。

($P < 0.05$), BS/BV, Tb. Sp 明显降低 ($P < 0.05$), 风湿祛痛胶囊的中、高剂量组 BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N 均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), BS/BV, Tb. Sp 显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 甲氨蝶呤组 BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N 显著升高显著降低 ($P < 0.01$), 甲氨蝶呤组 BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N 显著升高 ($P < 0.01$), BS/BV, Tb. Sp 显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

3.5 血清 IL-1 β , TNF α , VEGF, MMP3 及 RANKL 含量 与正常组相比, 模型组血清 IL-1 β , TNF α , VEGF, MMP-3 和 RANKL 含量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 风湿祛痛胶囊低剂量组 TNF- α , VEGF 含量均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 中剂量组和高剂量组 IL-1 β , TNF- α , VEGF, MMP-3 和 RANKL 含量均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 甲氨蝶呤组各因子的含量也明显降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

4 讨论

风湿祛痛胶囊是临床治疗 RA 的中成药, 方中君药苍术和川黄柏清热、燥湿、健脾; 威灵仙、鸡血藤、蜂房、乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇为臣药能协助君药以燥湿散寒、祛风通络; 红花、土虫、乳香、没药活血化瘀, 羌活、独活祛散寒湿, 地龙、全蝎、蜈蚣虫蚁搜剔内伏骨骱之风寒湿邪, 均为佐药; 桂枝温经通脉、姜黄调气和血, 为使; 全方合力共奏燥湿祛风、活血化瘀、通络止痛之功。由于目前该方的临床和实验研究报道甚少, 有关 RA 治疗特点、机制及功效内涵等均不清楚, 因而在一定程度上影响了临床的合理应用。作为和 AA 一样成熟的 RA 动物模型, CIA

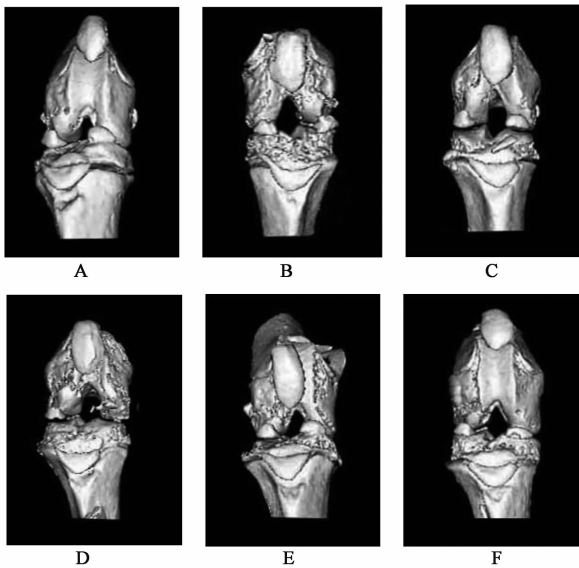


图 3 风湿祛痛胶囊对 CIA 大鼠膝关节影像学改变的影响 (Micro-CT)

Fig. 3 Effect of Fengshi Qutong capsule on imageological changes in knee joints of CIA rats (Micro-CT)

3.4.2 骨计量学分析 与正常组相比, 模型组 BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N 显著降低 ($P < 0.01$), BS/BV, Tb. Sp 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 风湿祛痛胶囊低剂量组 BMD 和 Tb. Th 均明显升高

表 4 风湿祛痛胶囊对 CIA 大鼠膝关节骨计量学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Fengshi Qutong capsule on histomorphometric analysis in knee joints of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BMD /mg·cm ⁻¹	BV/TV /×10 ⁻² %	Tb. Sp /×10 ⁻² mm	Tb. Th /×10 ⁻² mm	Tb. N /1·mm ⁻¹	BS/BV /1·mm ⁻¹
正常	-	543.84 ± 48.32	58.92 ± 8.16	19.43 ± 4.95	16.43 ± 6.02	3.92 ± 1.16	15.29 ± 7.18
模型	-	224.98 ± 47.70 ¹⁾	25.75 ± 5.76 ¹⁾	50.34 ± 9.22 ¹⁾	6.39 ± 1.87 ¹⁾	2.29 ± 0.95 ¹⁾	31.92 ± 4.81 ¹⁾
甲氨蝶呤	0.000 2	327.84 ± 70.17 ³⁾	36.78 ± 8.64 ³⁾	31.60 ± 7.59 ³⁾	12.34 ± 5.04 ³⁾	3.64 ± 0.54 ³⁾	26.04 ± 4.81 ³⁾
风湿祛痛胶囊	0.25	279.89 ± 57.51 ²⁾	29.85 ± 7.07	39.30 ± 11.15 ²⁾	8.40 ± 2.26 ²⁾	2.91 ± 0.84	28.34 ± 5.67
	0.5	310.45 ± 62.97 ³⁾	33.54 ± 7.69 ²⁾	35.32 ± 10.32 ³⁾	10.35 ± 3.39 ³⁾	3.33 ± 1.12 ²⁾	27.07 ± 4.16 ²⁾
	1	345.70 ± 38.77 ³⁾	37.06 ± 9.36 ³⁾	31.90 ± 9.14 ³⁾	13.20 ± 4.83 ³⁾	3.58 ± 1.12 ³⁾	25.39 ± 4.53 ³⁾

表 5 风湿祛痛胶囊对 CIA 大鼠血清 IL-1β, TNF-α, VEGF, MMP3, RANKL 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Fengshi Qutong capsule on IL-1β, TNF-α, VEGF, MMP3, RANKL in serum of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-1β /ng·L ⁻¹	TNFα /ng·L ⁻¹	VEGF /ng·L ⁻¹	MMP3 /ng·L ⁻¹	RANKL /ng·L ⁻¹
正常	-	103.64 ± 13.54	166.47 ± 26.61	113.66 ± 26.81	29.72 ± 3.80	25.81 ± 6.63
模型	-	253.77 ± 29.25 ¹⁾	514.53 ± 28.53 ¹⁾	267.44 ± 32.78 ¹⁾	61.58 ± 5.80 ¹⁾	50.33 ± 10.15 ¹⁾
甲氨蝶呤	0.000 2	200.92 ± 14.05 ³⁾	302.86 ± 51.90 ³⁾	188.14 ± 40.45 ³⁾	47.37 ± 7.22 ³⁾	32.38 ± 6.04 ³⁾
风湿祛痛胶囊	0.25	229.66 ± 15.91	434.52 ± 36.10 ³⁾	226.86 ± 28.16 ²⁾	54.78 ± 5.92	43.72 ± 7.69
	0.5	215.08 ± 18.72 ²⁾	325.50 ± 45.62 ³⁾	180.63 ± 36.70 ³⁾	51.28 ± 7.77 ²⁾	39.71 ± 5.42 ²⁾
	1	191.08 ± 25.60 ³⁾	279.94 ± 38.52 ³⁾	138.74 ± 25.55 ³⁾	46.40 ± 8.00 ³⁾	29.68 ± 5.92 ³⁾

在中医药研究中应用非常广泛。它是一种由 II 型异种蛋白与 IFA 共同诱导而成的免疫性炎症模型,在病理、组织学、免疫学特征以及发病机制等方面均与人类 RA 极为相似,是研究人类 RA 机制及治疗等方面有价值的实验工具^[9-12]。本研究通过复制 CIA 大鼠模型,比较具体地描述了大鼠 CIA 的整体和关节局部的免疫炎症反应特征,以及风湿祛痛胶囊的干预作用。

实验结果显示, CIA 模型大鼠关节红肿甚至变形、临床积分显著升高、发病率达 100%, 组织病理学和影像学观察结果显示节腔内有明显炎症表现、大量血管翳形成、关节软骨侵蚀、骨破坏严重,说明 CIA 模型成功。风湿祛痛胶囊治疗后能剂量依赖地改善 CIA 大鼠的关节红、肿、畸形等临床症状,降低临床积分和发病率,抑制关节滑膜炎、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏等组织病理学改变程度,改善炎症关节表面骨破坏等影像学改变程度,升高炎症关节 BMD, BV/TV, Tb. Th, Tb. N, 同时降低 BS/BV 和 Tb. Sp, 有效治疗大鼠 CIA, 且高剂量组风湿祛痛胶囊(2 倍临床等效剂量)与甲氨蝶呤的作用相近。

已知促炎细胞因子如 IL-1β 和 TNF-α 在 RA 的炎症过程中发挥重要作用^[13], VEGF 参与 RA 的血

管新生过程^[14], 降解细胞外基质的金属蛋白酶如 MMP-3 等被认为是软骨损伤的关键酶^[15-16], RANKL 则参与破骨细胞分化成熟并最终介导 RA 骨破坏^[17], 因此, 笔者进一步检测了大鼠血清相关促炎因子的含量。结果显示, 风湿祛痛胶囊明显降低 CIA 大鼠血清炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 水平, 和在 AA 大鼠上观察到的一样^[3], 这可能是其减轻 RA 动物炎症反应的原因之一。此外, 风湿祛痛胶囊也能降低 CIA 大鼠血清 VEGF, MMP-3 和 RANKL 的含量, 这些都初步地解释了其抑制血管翳形成、降低软骨降解和关节骨破坏的作用。

总之, 本研究通过 CIA 动物实验证明了风湿祛痛胶囊能有效抑制实验性大鼠 RA。具体地, 风湿祛痛胶囊能改善 CIA 的关节炎临床症状、延缓病情并降低关节组织病理学和影像学严重程度, 同时对血清中 IL-1β, TNF-α, VEGF, MMP-3 和 RANKL 等因子的含量也有一定负调节作用。相关研究结果为进一步的机制研究提供实验基础。

[参考文献]

[1] 郭炜, 刘春芳, 林娜. 类风湿性关节炎滑膜血管新生与中医药[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):

- 308-312.
- [2] 张春华. 甲氨蝶呤与来氟米特治疗类风湿性关节炎的临床疗效和安全性研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(4):511-513.
- [3] 姚晖. 风湿祛痛胶囊结合穴位注射治疗类风湿性关节炎的临床研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(1):52-54.
- [4] 孙璠璠, 李萍, 朱志杰, 等. 风湿祛痛胶囊对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用及机制[J]. 世界中医药, 2015, 10(12):1918-1921, 1925.
- [5] Bevaart L, Vervoordeldonk M J, Tak P P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis; how does it relate to rheumatoid arthritis? [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(8):2192-2205.
- [6] LIU C, YANG Y, SUN D, et al. Total saponin from *Anemone flaccida* Fr. schmidt prevents bone destruction in experimental rheumatoid arthritis via inhibiting osteoclastogenesis[J]. Rejuvenation Res, 2015, 18(6):528-542.
- [7] Remmers E F, Joe B, Griffiths M M, et al. Modulation of multiple experimental arthritis models by collagen-induced arthritis quantitative trait loci isolated in congenic rat lines; different effects of non-major histocompatibility complex quantitative trait loci in males and females [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(8):2225-2234.
- [8] ZHANG Y, BAI M, ZHANG B, et al. Uncovering pharmacological mechanisms of wu-tou decoction acting on rheumatoid arthritis through systems approaches: drug-target prediction, network analysis and experimental validation[J]. Sci Rep, 2015, 5:9463.
- [9] Bendele A, Mcabee T, Sennello G, et al. Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis; comparison of efficacy in animal models with human clinical data[J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(3):498-506.
- [10] 李培培, 解国雄, 宋珊珊, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(5):453-457.
- [11] Hegen M, Keith J C, Collins M, et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2007, 67(11):1505-1515.
- [12] 孙佳蕾, 武平, 陈白露, 等. 类风湿关节炎动物模型在中医研究中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(4):444-447.
- [13] 王志中, 王勇, 牟方祥, 等. 血小板、TNF- α 及 IL-1 β 与活动期类风湿关节炎的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5):469-472.
- [14] 任海霞, 肖诚, 李梢, 等. 类风湿性关节炎中的血管生成相关因子研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007(4):315-318.
- [15] 赵志玲. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与类风湿性关节炎的研究进展[J]. 解放军药理学学报, 2005(1):54-56.
- [16] Okada Y, Nagase H, Harris E D. Matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 from rheumatoid synovial cells are sufficient to destroy joints[J]. J Rheumatol, 1987;41-42.
- [17] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. Rankl-rank signaling in osteoclastogenesis and bone disease [J]. Trends Mol Med, 2006, 12(1):17-25.

[责任编辑 全燕]