

小柴胡汤对 CFA 大鼠滑膜组织 NF- κ B 信号通路作用的探讨

王丽敏¹, 于静¹, 赵夜雨¹, 张林², 张丽艳², 陈文娜², 谷松², 高明利^{1*}
(1. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110033)

[摘要] **目的:**观察小柴胡汤治疗后弗氏完全佐剂(CFA)大鼠滑膜组织核转录因子(NF)- κ B 信号通路中肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域(TARDD),NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α),I κ B 激酶- α (IKK α),NF- κ B p65 蛋白的表达。**方法:**将 SPF 级健康成年雌性 Wistar 大鼠应用弗氏完全佐剂和牛 II 型胶原制备 CFA 动物模型。根据随机数字表,将大鼠随机分为正常组、模型组、小柴胡汤低、中、高剂量组、雷公藤多苷组。各组于造模后 7 d 开始灌胃给药,正常组及模型组均予注射用水,小柴胡汤低、中、高剂量组(5.94,11.88,23.76 g·kg⁻¹),雷公藤多苷片(0.006 3 g·kg⁻¹),分别 2 mL/次,每天 3 次灌胃,连续给药 28 d 后观察实验大鼠踝关节组织病理学及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 NF- κ B 信号通路中 TARDD,IKK α ,I κ B α ,NF- κ B p65 蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠右后踝关节组织病理评分显著增加($P < 0.01$),NF- κ B 信号通路中 TARDD,IKK α ,I κ B α ,NF- κ B p65 蛋白表达显著增高($P < 0.01$)。与模型组比较,随着小柴胡汤剂量的增加,实验大鼠右后踝关节组织病理评分显著减少($P < 0.01$),在大鼠踝关节组织标本 NF- κ B 信号通路中 TARDD,IKK α ,I κ B α ,NF- κ B p65 关键蛋白的表达上,小柴胡汤低剂量组蛋白表达明显减低($P < 0.05$),而小柴胡汤中剂量组、小柴胡汤高剂量组、雷公藤多苷组蛋白表达显著减低($P < 0.01$)。**结论:**研究显示小柴胡汤随着剂量的增加,可以有效地改善滑膜炎,抑制 NF- κ B 炎症信号通路中关键蛋白的表达,从而阻止炎症而抑制骨侵蚀。

[关键词] 小柴胡汤; 弗氏完全佐剂(CFA)大鼠; 核转录因子(NF)- κ B 信号通路; 肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域(TARDD); NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α); I κ B 激酶- α (IKK α); NF- κ B p65

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0044-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20191401

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190403.1454.006.html>

[网络出版时间] 2019-04-04 16:49

Effect of Xiao Chaihutang on NF- κ B Signaling Pathway in Synovial Tissue of CFA Rats

WANG Li-min¹, YU Jing¹, ZHAO Ye-yu¹, ZHANG Lin², ZHANG Li-yan²,
CHEN Wen-na², GU Song², GAO Ming-li^{1*}

(1. *The Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China*; 2. *Liaoning University of TCM, Shenyang 110033, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of tumor necrosis factor receptor-associated death domain (TARDD), nuclear transcription factor- κ B inhibiting protein α (I κ B α) I κ B kinase- α (IKK α) and nuclear transcription factor (NF)- κ B p65 protein in the NF- κ B signaling pathway of synovial tissues of complete Freund's adjuvant (CFA) rats after treatment with Xiao Chaihutang (XCHT). **Method:** In animal experiments, SPF health adult female Wistar rats were used to prepare the CFA animal model of rats with rheumatoid arthritis with Freund's complete adjuvant and cattle II collagen type. According to the random number table, the rats were randomly divided into the normal group, the model group, the low-dose XCHT group, the medium-dose XCHT

[收稿日期] 20181221(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774246);辽宁省自然科学基金项目(20170540603)

[第一作者] 王丽敏,博士,主任医师,从事中医风湿免疫及经方治疗免疫病方向研究,E-mail:drwmlntcm@163.com

[通信作者] *高明利,硕士,主任医师,从事中西医结合风湿免疫病研究,Tel:024-31961263,E-mail:18102456591@189.cn

group, the high-dose XCHT group, and the Tripterygium glucosides group. The drugs were given at 7 d after the model was built. Both normal group and model group were given water for injection, and low-dose XCHT group ($5.94 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium-dose XCHT group ($11.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), high-dose XCHT group ($23.76 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Tripterygium glucosides group ($0.0063 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) were given corresponding drugs by gavage for three times a day, 2 mL/time. The histopathology of rat ankle joint was observed, and the protein expressions of TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 in the NF- κ B signaling pathway in synovial tissue of CFA rats were detected by Western blot.

Result: With the increase of the dosage of XCHT, the histopathological score of the right posterior ankle joint of the experimental rats was increased. And in the protein expressions of TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 in NF- κ B signaling pathway in Synovial Tissue of CFA rats, compared with the model group, the statistical results of the low-dose XCHT group showed decreased protein expressions ($P < 0.05$) and significant differences. However, the statistical results in the medium-dose XCHT group, the high-dose XCHT group and the tripterygium glucosides group showed decreased protein expression ($P < 0.01$) and significant differences. Compared with the normal group, the histopathological score of the right posterior ankle of the model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the protein expressions of TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 in the NF- κ B signaling pathway were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, with the increase of dose of Xiao Chaihutang, histopathologic score of posterior ankle of experimental rats significantly reduced ($P < 0.01$). In rats ankle tissue samples, TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 key protein expressions in the NF- κ B signaling pathway and protein expressions in low-dose XCHT group were obviously lower ($P < 0.05$), and protein expressions in the medium-dose XCHT group, the high-dose XCHT group and the Tripterygium glucosides group were significantly lower ($P < 0.01$).

Conclusion: This study shows that as the dose of Xiao Chaihutang increases, it could effectively improve synovitis, and suppress the expressions of key proteins in the inflammatory signaling pathway of NF- κ B, thereby preventing inflammation and suppressing bone erosion.

[**Key words**] Xiao Chaihutang; complete Freund's adjuvant (CFA) rats; nuclear transcription factor (NF) - κ B signaling pathway; tumor necrosis factor receptor associated death domain (TARDD); nuclear transcription factor- κ B inhibiting protein α (I κ B α); I κ B kinase- α (IKK α); NF- κ B p65

类风湿关节炎(RA)是一种慢性、炎症性、自身免疫性疾病,主要影响关节,并与针对各种分子的自身抗体(包括自我修饰的抗原表位)相关^[1]。其发病原因及机制目前还没有十分明确,在关节主要的病理表现是滑膜炎。核转录因子 κ B(NF- κ B)信号通路是RA炎症反应的重要信号传导通路,在患者的滑膜中有丰富的表达。

RA属于中医“痹证”范畴,《黄帝内经·素问·直解·痹论》中记载:“痹,闭也,血气凝涩不行也。”^[2]引起痹证病因各异,但病机为气机阻滞,气血运行不畅,与“少阳主骨”功能失调^[3],少阳枢机不利密切相关。小柴胡汤源于《伤寒论》,为六经辨证中少阳病的代表方剂,基于少阳病包括少阳经脉病变,依据经络系统中少阳经脉主骨,可以通过和解少阳枢机指导痹证治疗。文献研究中药复方治疗RA机制在通过基因、细胞因子、通道等的干预,必须依靠客观标准化的中医辨证理论与中药复方的量效关系^[4]。临床研究提示,在小柴胡加味汤治疗活动期RA的

临床观察中已取得良好的疗效^[5]。张莹等^[6]的研究提示小柴胡汤能够降低关节炎大鼠的血清中白细胞介素-23(IL-23),IL-17及IL-27细胞因子水平,另一项研究可以抑制RA大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α),IL-6,IL-10等炎症介质的表达,目前小柴胡汤在RA领域的研究在炎症因子水平^[7]。

本研究设计分为正常组、模型组、小柴胡汤低、中、高剂量组、雷公藤多苷组,实验结束后观察弗氏完全佐剂(CFA)大鼠踝关节组织标本病理改变及NF- κ B炎症信号通路中TNF受体相关死亡结构域(TARDD),NF- κ B抑制物激酶 α (IKK α),NF- κ B抑制蛋白 α (I κ B α),NF- κ B p65蛋白表达,拟通过在炎症信号通路水平上探索小柴胡汤治疗RA的分子机制,为中药方剂治疗RA提供基础实验研究依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雌性Wistar大鼠[辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2015-001],5~6月龄,体质量180~220g,60只,自由

摄食与饮水,均饲养于辽宁中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室 [实验单位使用许可证号 SYYK (辽)2013-0009]。实验室温度控制在 $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 实验室湿度控制在 $45\% \pm 5\%$, 自然光照周期。

1.2 药物与试剂 中药饮片均一次性购买于辽宁中医药大学附属医院药局,由辽宁中医药大学附属医院修树岭中药师鉴定均为正品。小柴胡汤处方由北柴胡 15 g,黄芩片 9 g,人参片 9 g,姜半夏 9 g,炙甘草 9 g,生姜 9 g,大枣 6 g 组成,煎煮浓缩,4 $^\circ\text{C}$ 保存备用;雷公藤多苷片悬液(雷公藤多苷片购于上海复旦复华药业有限公司,批号 160302);牛 II 型胶原,CFA(美国 Chondrex 公司,批号分别为 170157,170126);兔抗 TARDD,IKK α ,I κ B α ,NF- κ B p65, β -肌动蛋白(β -actin)抗体,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 辣根过氧化物酶(HRP)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 3694S,2682S,9242S,8242S,4970S,7074S);十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶配置试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号 37K00130);EnoGeneTM BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南京恩晶生物科技有限公司,批号 E1WP201);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京 Solarbio 公司,批号 G1120)。

1.3 仪器 T10 型组织破碎机(德国 IKA 集团);Mini-Protean tetra 型垂直板电泳装置,Trans-Blot SD 型半干转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Stratos 型台式多功能冷冻高速离心机(德国赛默飞世尔有限公司);MK-20 型干式恒温箱(杭州奥盛仪器有限公司);BL100 型雪花制冰机(上海比朗仪器有限公司);SHZ-88 型水浴恒温振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);F3 型全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统(英国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 大鼠适应性饲养 4 d 后,根据随机数字表分成正常组 10 只,模型组 50 只,参考牛 II 型胶原说明书及 CFA 关节炎大鼠^[8]造模方法,于大鼠右脚跖趾垫处注射,其中正常组 0.2 mL 生理盐水/只,模型组完全弗氏佐剂与牛 II 型胶原蛋白(等体积冰上混匀)乳状注射液 0.2 mL/只。造模 7 d 后,正常组大鼠关节无变化,模型组大鼠右足肿胀明显,活动受限,并见到对侧非注射部位关节肿胀,部分动物耳、尾部出现结节,全部模型造模成功。再将成功造模的大鼠根据体质量分层,根据随机数字表分为 5 组,分别为模型组、小柴胡汤低、中、高剂量组、雷公藤多苷组,实验过程无大鼠死亡。

2.2 药品干预方案 按人与大鼠体表面积比换算给药等效剂量^[9],成人与大鼠的折算系数为 6.3。小柴胡汤药材总质量 66 g,按 70 kg 成人每日 1 付药,雷公藤多苷片按说明书每日正常成人用量 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各组于造模后 7 d 开始灌胃给药,正常组及模型组均予注射用水,小柴胡汤低、中、高剂量组(5.94, 11.88, 23.76 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),雷公藤多苷组(0.006 3 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),分别取 2 mL/次,每天 3 次灌胃。连续给药 28 d,之后处死取材。

2.3 取材 实验结束后取全部实验大鼠去皮去肉的右后踝关节组织样品投入液氮中,尽量剪碎,放入圆底的微量离心管,称质量,将组织于 $-80 ^\circ\text{C}$ 冻存,备用。右后踝关节组织病理标本的制备包括组织的固定、脱钙、脱水、透明、石蜡包埋切片、脱蜡后进行 HE 染色。

2.4 大鼠踝关节组织相关指标检测

2.4.1 HE 染色观察大鼠踝关节组织病理形态学改变 在光学显微镜下,对染色后的踝关节组织标本切片的病理形态观察并进行组织形态学分析。光镜下观察病理组织形态变化的评分标准:0 分为关节具有正常结构,如关节间隙适中,滑膜组织、软骨、骨连续等,无炎性细胞灶;1 分为关节组织有空泡、有纤毛的形成及轻微的炎症,滑膜组织中有增生、中断,而血管数量有所增加,可以见到小的炎性细胞灶,骨及软骨轻微破坏或无破坏;2 分为中度关节的炎症,滑膜增生和血管翳的形成较为严重,可以见到大量的炎性细胞的浸润,关节软骨内有明显侵蚀破坏,但无骨的结构破坏;3 分为可以见到严重血管翳的形成,可以见到广泛软骨侵蚀性破坏,可以见到明显骨侵蚀性破坏。

2.4.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠踝关节组织中 TARDD,IKK α ,I κ B α ,NF- κ B p65 蛋白表达 称取右踝关节组织样品,放入 2 mL 玻璃匀浆器中球状部位上,加入按体质量 5 倍预冷的 RIPA 蛋白裂解液,匀浆,置于冰上充分研混匀,在冰浴中静置 30 min 后,在 $4 ^\circ\text{C}$ 条件下, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清于新预冷的 1.5 mL 离心管中,静置于 $-20 ^\circ\text{C}$ 条件下保存。BCA 法测定蛋白浓度,应用 Western blot 技术,经过灌胶,上样与电泳,转膜,封闭,一抗(1:1 000)孵育,二抗(1:1 000)孵育,成像操作后,利用全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统对所显出的目的条带进行定量分析,计算灰度值。

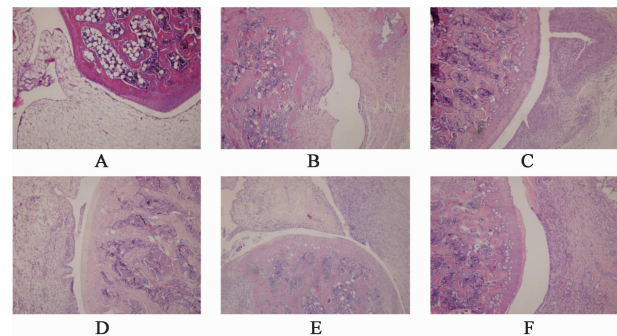
2.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行实验结果的数据统计分析,如果涉及计量的实验数据则

以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,参数统计分析则采用单因素方差分析,若方差齐,组间比较采用最小显著性差异法检验分析;若方差不齐,组间比较采用事后检验法检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CFA 大鼠右后踝组织病理学改变的影响

正常组骨纤维组织排列整齐,软骨表面光滑,滑膜细胞排列有序,滑膜组织内无炎性细胞浸润,关节腔清晰。模型组骨纤维组织结构紊乱,软骨表面不光滑不连续,滑膜细胞大量增殖并且排列紊乱,滑膜组织内大量淋巴细胞浸润,有大量血管翳形成,关节腔增大,其中可见炎症细胞。小柴胡汤低剂量组骨纤维组织排列整齐,软骨表面欠光滑,滑膜细胞排列增生排列紊乱,滑膜组织内有淋巴细胞浸润,有少量血管翳形成,关节腔清晰,其中可见炎症细胞。小柴胡汤中剂量组骨纤维组织排列整齐,软骨表面欠光滑,滑膜细胞排列增生排列紊乱,滑膜组织内有淋巴细胞浸润,偶有血管翳形成,关节腔清晰,其中可见炎症细胞。小柴胡汤高剂量组骨纤维组织排列整齐,软骨表面光滑,滑膜细胞排列有序,滑膜组织内偶有淋巴细胞浸润,偶有血管翳形成,关节腔清晰,其中偶见炎症细胞。雷公藤多苷组骨纤维组织排列整齐,软骨表面欠光滑,滑膜细胞排列增生紊乱,滑膜组织内有淋巴细胞浸润,偶有血管翳形成,关节腔清晰,其中偶见炎症细胞。见图 1~5。



A. 正常组; B. 模型组; C. 小柴胡汤低剂量组; D. 小柴胡汤中剂量组; E. 小柴胡汤高剂量组; F. 雷公藤多苷组(图 2~6 同)

图 1 小柴胡汤对 CFA 大鼠右后踝组织病理学改变的影响 (HE, $\times 40$)

Fig. 1 Effect of Xiao Chaihutang on histopathological changes in right posterior ankle tissue of CFA rats (HE, $\times 40$)

3.2 对 CFA 大鼠踝关节组织病理评分的影响

与正常组比较,模型组、小柴胡汤低、中、高剂量组、雷公藤多苷组病理评分显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,小柴胡汤低、中、高剂量组、雷公藤多苷组病理评分显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

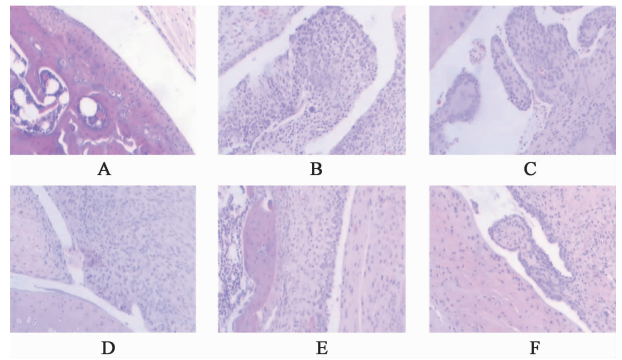


图 2 小柴胡汤对 CFA 大鼠右后踝组织滑膜炎病理学改变的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of Xiao Chaihutang on pathological changes of synovitis in right posterior ankle tissue of CFA rats (HE, $\times 100$)

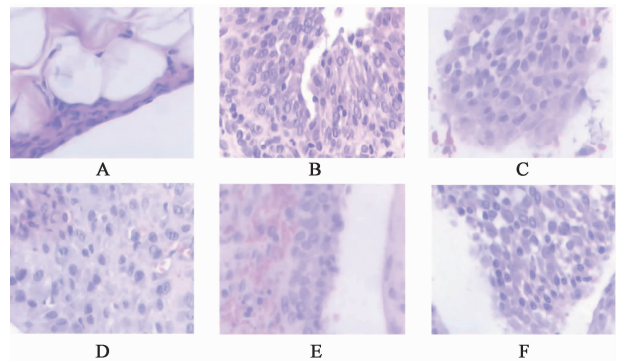


图 3 小柴胡汤对 CFA 大鼠右后踝组织滑膜炎病理学改变的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Xiao Chaihutang on pathological changes of synovitis in right posterior ankle tissue of CFA rats (HE, $\times 400$)

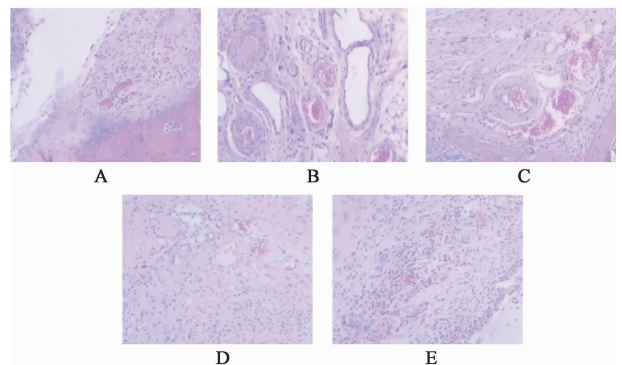


图 4 小柴胡汤对 CFA 大鼠右后踝组织血管翳病理学改变的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 4 Effect of Xiao Chaihutang on pathological changes of pannus in right posterior ankle tissue of CFA rats (HE, $\times 100$)

3.3 对 CFA 大鼠踝关节组织中 TARDD, IKK α ,

IK β , NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 TARDD, IKK α , IK β , NF- κ B p65 蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,小柴胡汤低剂量组 TARDD, IKK α , IK β , NF- κ B p65 蛋白表达明显

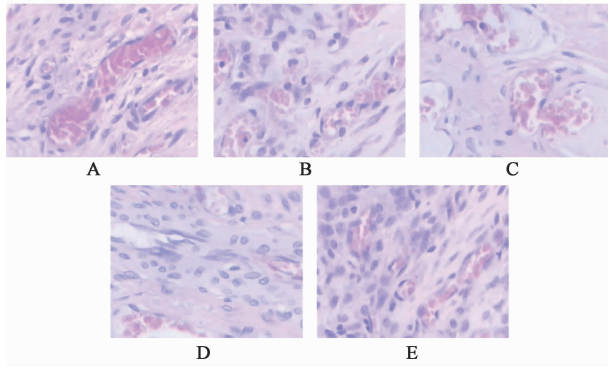


图 5 小柴胡汤对 CFA 大鼠右后踝组织血管翳病理学改变的影响 (HE, ×400)

Fig. 5 Effect of Xiao Chaihutang on pathological changes of pannus in right posterior ankle tissue of CFA rats (HE, ×400)

表 1 小柴胡汤对 CFA 大鼠踝关节组织病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Xiao Chaihutang on pathological score of ankle joint in CFA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	病理评分/分
正常	-	0
模型	-	2.90 ± 0.32 ¹⁾
小柴胡汤	5.94	2.10 ± 0.32 ³⁾
	11.88	1.60 ± 0.52 ³⁾
	23.76	0.70 ± 0.48 ³⁾
雷公藤多苷	0.006 3	1.20 ± 0.42 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 同)。

表 2 小柴胡汤对 CFA 大鼠踝关节组织 TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Xiao Chaihutang on expression of TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 protein in ankle tissues of CFA rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TARDD/ β -actin	IKK α / β -actin	I κ B α / β -actin	NF- κ B p65/ β -actin
正常	-	0.33 ± 0.15	0.14 ± 0.04	0.52 ± 0.09	0.21 ± 0.07
模型	-	0.86 ± 0.07 ¹⁾	0.59 ± 0.05 ¹⁾	0.93 ± 0.09 ¹⁾	1.00 ± 0.13 ¹⁾
小柴胡汤	5.94	0.72 ± 0.07 ²⁾	0.44 ± 0.13 ²⁾	0.77 ± 0.07 ²⁾	0.86 ± 0.09 ²⁾
	11.88	0.51 ± 0.08 ³⁾	0.26 ± 0.11 ³⁾	0.59 ± 0.07 ³⁾	0.60 ± 0.09 ³⁾
	23.76	0.32 ± 0.07 ³⁾	0.16 ± 0.06 ³⁾	0.39 ± 0.06 ³⁾	0.34 ± 0.08 ³⁾
雷公藤多苷	0.006 3	0.36 ± 0.16 ³⁾	0.19 ± 0.02 ³⁾	0.44 ± 0.07 ³⁾	0.58 ± 0.11 ³⁾

在 MMP-3, MMP-9, MMP-13 的表达诱导下, NF- κ B 的激活被发现也是必不可少的^[13-14]。NF- κ B 的激活需要 TNF- α 调节血管内皮细胞中血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 的表达诱导新生血管的生成^[15]。NF- κ B 信号通路是调控炎症信号通路中最为重要之一,其能够促进炎症细胞因子 TNF- α , IL-6, IL-1 和 IL-17 等的生成,然后这些炎症细胞因子又反过来进一步激活 NF- κ B 信号通路。NF- κ B

降低 ($P < 0.05$), 而小柴胡汤中、高剂量组、雷公藤多苷组 TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。见图 6 及表 2。

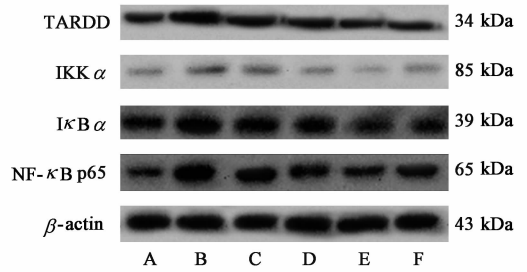


图 6 大鼠踝关节组织中 TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 protein expression in ankle tissues of rats

4 讨论

在 RA 整个疾病发展过程中, 骨质丢失都有不同程度的进展, 并且与疾病的严重程度及是否得到及时的治疗有关, 可能会导致关节畸形和骨折^[10]。RA 主要病理改变为关节滑膜细胞的异常增生。在 RA 的炎性环境中产生一种具有高度侵入性的成纤维样滑膜细胞表型, 被认为是 RA 联合破坏的主要效应器, 而 NF- κ B 的激活有诱导 RA 成纤维样滑膜细胞破坏的潜力^[11]。研究首次证明 NF- κ B 介导转录激活的基质金属蛋白酶-1 (MMP-1), 提出了一种 NF- κ B 介导的类风湿性关节炎软骨降解的机制^[12]。

还能够直接作用于叉头样转录因子 3 (FOXP3), 来调控调节性 T 淋巴细胞 (Treg) 发育。由此得出 NF- κ B 信号通路在维持慢性的炎症过程中发挥了重要的作用^[16]。实验研究表明, 用 siRNA 敲弱 IKK α 或 IKK β 的细胞研究证明损失的 IKK 亚基抑制 I κ B α 磷酸化, 延迟 I κ B 退化; IKK α 控制 NF- κ B p65 的磷酸化的通路可能控制 DNA 结合活性或从 I κ B 的释放; IKK α 的减少显著降低了由 TNF 诱导的 NF- κ B

激活, 针对 IKK α 的抑制产生抗炎的作用^[17]。TRADD 是已经确定一个 34 kDa 的蛋白, 可以与已知的重组人 1 型肿瘤坏死因子受体 (TNFR1) 的胞内区域相互作用, 对于介导程序性细胞死亡至关重要, TRADD 的过度表达导致 2 种主要的 TNF 诱导的反应, 即 NF- κ B 的凋亡和活化^[18]。

调控与 RA 相关的炎性细胞因子及炎症信号通路, 控制其炎症, 为控制疾病进展的根本。目前 RA 患者的治疗主要以非甾体类抗炎药 (NSAIDs) 及慢作用抗风湿药 (DMARDs) 为主, 且大多数需要终身服药维持治疗。近几年 RA 的治疗向生物调节剂转向, 但是传统的 DMARDs 单药或联合治疗, 仍然是首先的治疗方法^[19], 现代研究 RA 是一种多因素疾病, 其致病机制仍知之甚少, 遗传和环境风险因素之间的相关性免疫系统仍然是进一步调查的一个伟大挑战。

小柴胡汤以柴胡为君药, 轻清升散而宣发病邪; 以黄芩片为佐药, 清少阳之蕴热, 与柴胡相伍而和解少阳; 臣以姜半夏, 燥湿下气, 配伍生姜、黄芩片而成辛开苦降之势; 配伍人参片、大枣、炙甘草扶助正气、补益营卫而驱邪。纵观全方具有扶正祛邪、疏利枢机、宣达上下, 祛除风寒湿热之邪之效。现代研究小柴胡汤调理气机、调整阴阳治疗痹证, 对机体免疫功能具有双向调节作用^[20-21]。在免疫疾病方面, 小柴胡汤可以调节机体的免疫功能^[22], 提高天然免疫能力^[23]。现代文献研究, 小柴胡汤对 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及炎性细胞因子有一定的作用, 可以双向调节机体的免疫功能。现代研究表明, 小柴胡汤具有免疫调节、抗炎、抗肝损害等作用^[24]。现代研究得出黄芩中提取的黄芩苷具有较大的解热、抗炎活性, 可以有效控制大鼠足趾肿胀率^[25]。根据研究表明, 针对病情活动的 RA 患者, 雷公藤制剂单药治疗不低于甲氨蝶呤单药治疗, 雷公藤制剂与甲氨蝶呤联合治疗优于甲氨蝶呤单药治疗, 说明具有抑制免疫、抗炎等作用, 可以有效控制 RA 病情, 所以选为阳性药^[26]。

本研究表明小柴胡汤改善了 CFA 大鼠滑膜的炎症, 与抑制 NF- κ B 炎症信号通路中 TARDD, IKK α , I κ B α , NF- κ B p65 关键蛋白的表达有关, 从而抑制其介导的免疫反应, 缓解甚至阻止炎症, 达到抑制骨侵蚀的治疗目的, 是小柴胡汤治疗 RA 的可能的关键作用机制之一, 为 RA 的治疗提供基础实验依据。

[参考文献]

- [1] Smolen J S, Aletaha D, Barton A, et al. Rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4:18001.
- [2] 高士宗. 素问直解[M]. 成建军, 刘娟, 李玉清, 校注. 北京: 中国医药科技出版社, 2014:157-158.
- [3] 王丽敏, 张丽艳, 谷松. 从“少阳主骨”解析痹证发病机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(12): 130-132.
- [4] 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): 230-233.
- [5] 张莹, 周小莉, 戴敏, 等. 小柴胡汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清中 IL-17、IL-23 及 IL-27 的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(13): 1391-1394.
- [6] 张莹, 周小莉, 邵勤, 等. 小柴胡汤对胶原诱导性关节炎大鼠的抗炎作用及机制探讨[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(9): 781-785.
- [7] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994:205-208.
- [8] 朱玉芳, 裴银辉, 周芳媛, 等. Wistar 大鼠福氏佐剂性类风湿关节炎动物模型研究[J]. 华北理工大学学报: 医学版, 2016, 18(5): 337-340.
- [9] Scott D L. Prognostic factors in early rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology (Oxford), 2000, 39(1): 24-29.
- [10] Makarov S S. NF-kappaB in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction [J]. Arthritis Res, 2001, 3(4): 200-206.
- [11] Vincenti M P, Coon C I, Brinckerhoff C E. Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(11): 1987-1994.
- [12] Bondeson J, Brennan F, Foxwell B, et al. Effective adenoviral transfer of IkappaB alpha into human fibroblasts and chondrosarcoma cells reveals that the induction of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines is nuclear factor-kappaB dependent[J]. J Rheumatol, 2000, 27(9): 2078-2089.
- [13] Bond M, Fabunmi R P, Baker A H, et al. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B[J]. FEBS Lett, 1998, 435(1): 29-34.
- [14] Yoshida S, Ono M, Shono T, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis[J]. Mol Cell Biol, 1997,

- 17(7):4015-4023.
- [15] Elinav E, Nowarski R, Thaiss C A, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(11):759-771.
- [16] Adli M, Merkhofer E, Cogswell P, et al. IKK α and IKK β each function to regulate NF- κ B activation in the TNF-induced/canonical pathway [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9428.
- [17] Hsu H, XIONG J, Goeddel D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation [J]. *Cell*, 1995, 81(4):495-504.
- [18] 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: 2016 update [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(6):960-977.
- [19] Bellucci E, Terenzi R, La Paglia G M, et al. One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2016, 34(5):793-801.
- [20] 王丽敏, 张丽艳, 谷松. 解析小柴胡汤“和法”调节自身免疫性疾病机制 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(1):218-221.
- [21] 唐小云, 刘开蕾, 杨美荣. 小柴胡汤对免疫抑制小鼠淋巴细胞共刺激分子的免疫调节作用 [J]. *热带医学杂志*, 2010, 10(9):1049-1050.
- [22] 张军能, 张轶. 小柴胡颗粒抗肺癌的机制研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2010, 30(6):46-48.
- [23] 柴小梅, 李英, 秦雪梅. 小柴胡汤临床应用与药理作用研究进展 [J]. *山西中医学院学报*, 2007, 8(3):59-60.
- [24] 李延萍, 谢微香. 小柴胡加味汤治疗类风湿关节炎活动 100 例疗效观察 [J]. *中国中医急症*, 2014, 23(5):920-921.
- [25] 苏青, 吴婷婷, 黄雅兰, 等. 黄芩提取物制备过程中化学成分及药效的变化规律分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14):1-6.
- [26] LV Q W, ZHANG W, SHI Q, et al. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): a randomised, controlled clinical trial [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(6):1078-1086.

[责任编辑 周冰冰]