

双氢青蒿素对两种类风湿关节炎模型的影响及机制

杜成成¹, 谭余庆², 沈建英², 黄梅¹, 戈方济², 洪坤², 孙建辉², 罗俊^{1*}

(1. 贵州医科大学基础医学院, 贵州 550025; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**研究双氢青蒿素(DHA)对佐剂性关节炎(AIA)和胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠的保护作用,探讨DHA抗炎机制。**方法:**将Wistar大鼠随机分为8组,分别为AIA正常组,AIA模型组,AIA DHA组,AIA甲氨蝶呤组;CIA正常组,CIA模型组,CIA DHA组,CIA甲氨蝶呤组。佐剂性关节炎(AIA)的建立:除正常组外,各组大鼠右后足趾皮内注射0.1 mL弗式完全佐剂;胶原诱导性关节炎(CIA)的大鼠模型的建立:除正常组外,各组大鼠尾部注射1 g·L⁻¹二型胶原乳化剂0.2 mL,并在7 d后,在大鼠相同部位注射相同体积的胶原乳化剂加强免疫。造模成功后,并分别给予DHA(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹)治疗后,并考察DHA抗AIA/CIA大鼠关节炎作用,包括关节炎指数(AI),足趾肿胀度,以及DHA对AIA/CIA大鼠免疫器官指数,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中白细胞介素-6(IL-6)水平和AIA/CIA大鼠踝关节病理切片的影响。体外培养RAW264.7巨噬细胞系,分别以0.5,1,2,4,8 μmol·L⁻¹DHA处理24 h,设立正常,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测DHA对RAW264.7细胞活力的影响;设立正常组,脂多糖(LPS)组,LPS+DHA(0.5,1,2 μmol·L⁻¹)组,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞上清IL-6含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞核内核转录因子-κB p65(NF-κB p65)蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠足趾肿胀度,AI,脾脏指数,IL-6水平显著增高($P < 0.05$, $P < 0.01$),DHA可明显减轻AIA/CIA大鼠的足趾肿胀度($P < 0.05$),降低关节炎评分指数($P < 0.05$),降低AIA大鼠脾脏指数($P < 0.01$)和胸腺指数($P < 0.05$)以及AIA大鼠血清中IL-6水平($P < 0.05$);但是对CIA大鼠脾脏指数并没有降低作用,而对胸腺指数和IL-6水平虽有降低作用但不具有统计学意义。此外DHA能够明显改善AIA/CIA大鼠踝关节病变情况,并能降低病理评分($P < 0.01$)。与正常组比较,DHA 4,8,16 μmol·L⁻¹组对RAW264.7细胞活力明显抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),DHA体外安全用药范围 ≤ 2 μmol·L⁻¹。与正常组比较,LPS模型组IL-6含量明显高于正常组($P < 0.01$),与LPS模型组比较,DHA能够抑制IL-6的产生($P < 0.05$),Western blot结果显示,LPS能够上调RAW264.7细胞核内NF-κB p65水平,而DHA能够抑制p65的入核。**结论:**DHA能够改善类风湿关节炎大鼠踝关节病变情况,其机制可能与抑制NF-κB信号通路有关。

[关键词] 双氢青蒿素; 佐剂性关节炎; 胶原诱导性关节炎; 机制

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)10-0048-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191002

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190206.1440.002.html>

[网络出版时间] 2019-02-12 10:03

Effect and Mechanism of Dihydroartemisinin on Rheumatoid Arthritis Animal Models

DU Cheng-cheng¹, TAN Yu-qing², SHEN Jian-ying², HUANG Mei¹, GE Fang-ji²,
HONG Kun², SUN Jian-hui², LUO Jun^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guizhou 550025, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of dihydroartemisinin (DHA) on adjuvant-induced arthritis (AIA) and collagen-induced arthritis (CIA) in rats, in order to explore its possible mechanism. **Method:** Wistar rats were randomly divided into eight groups, namely AIA control group, AIA model group, AIA DHA group

[收稿日期] 20180921(017)

[基金项目] 国家人力资源和社会保障部留学人员科技活动项目择优项目[人社厅函(2016)176号]

[第一作者] 杜成成,在读硕士,从事药理学方向研究,E-mail:dcc20170215@163.com

[通信作者] *罗俊,博士,教授,从事药理学方向研究,E-mail:724730885@qq.com

and AIA methotrexate group, CIA control group, CIA model group, CIA DHA group and CIA methotrexate group. To establish adjuvant-induced arthritis (AIA) model, rheumatoid arthritis rats were induced through intradermal injection with 0.1 mL Freund's complete adjuvant (FCA) into right postpedes except for the control group. To establish the model of collagen-induced arthritis (CIA), except for control group, the caudal root of rats was immunized subcutaneously with 0.2 mL of emulsion containing $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of Collagen type II (C II). One week later, C II emulsion was injected for the second time. After the rheumatoid arthritis model was successfully established and the administration with DHA ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the anti-inflammatory effect of DHA on AIA/CIA rats was observed, including the arthritis index (AI), paw swelling degree and effect of DHA on immune organ index of AIA/CIA rats. Interleukin (IL) -6 levels in serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and pathological sections of ankle joints of AIA/CIA rats. RAW264.7 macrophage cells were cultured *in vitro* and treated with DHA at various doses ($0.5, 1, 2, 4, 8, 16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24 h, and the cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Lipopolysaccharides (LPS) group, LPS + DHA groups ($0.5, 1, 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and control group were established. The level of IL-6 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression levels of nuclear transcription factor- κB p65 (NF- κB p65) was tested by Western blot. **Result:** Compared with control group, the paw swelling, AI, spleen index and IL-6 levels of model group were significantly increased ($P < 0.01, P < 0.05$). DHA could significantly reduce paw swelling ($P < 0.05$), arthritis score index ($P < 0.05$), and spleen index ($P < 0.01$), thymus index ($P < 0.05$) and serum IL-6 level of AIA rats ($P < 0.05$). But the spleen index of CIA rats was not decreased, while the thymus index and IL-6 level were decreased but not statistically significant. In addition, DHA can significantly improve the pathological changes of ankle, and decrease the pathological score on AIA/CIA rats ($P < 0.01$). Compared with control group, DHA ($4, 8, 16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) groups had a remarkable effect on the cell viability ($P < 0.05, P < 0.01$). The safe medication range of DHA was less than $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The level of IL-6 and the protein expression of NF- κB p65 in LPS group were higher than those of control group. Compared with LPS group, DHA ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) groups could significantly reduce the secretion of IL-6 ($P < 0.05$), and inhibit the expression of NF- κB p65. **Conclusion:** DHA can alleviate the ankle joint lesion on rheumatoid arthritis rats. Its mechanism may be related to NF- κB signal pathway.

[**Key words**] dihydroartemisinin; adjuvant-induced arthritis; collagen-induced arthritis; mechanism

类风湿性关节炎(RA)是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病,以慢性、对称性、多关节滑膜炎和关节外病变为主要临床表现,是一种全身性自身免疫性疾病。统计表明,RA在全世界均有发病,平均发病率为1%,而我国患病率0.3%~0.4%,仅中国的患者就达1 000多万。RA作为一种全身性炎症疾病,其病因和发病机制至今未明^[1]。目前RA尚不能被根治,随着研究的深入,临床上对RA患者的治疗强调达标治疗及个体化治疗。国内外许多研究结果表明,早期积极治疗能阻止患者关节骨质破坏,降低致残率,所以治疗RA的总原则是进行目标治疗并强调个体化治疗。治疗的主要目标是达到临床缓解,降低RA患者疾病活动度,最终达到临床缓解目标的个体化治疗。目前治疗药物中除了非甾体抗炎药(如布洛芬、阿司匹林)、传统缓解病情的抗风湿药物(甲氨蝶呤、来氟

米特)、糖皮质激素,还包括生物制剂[白细胞介素(IL)-1 β 拮抗剂,IL-6拮抗剂]及靶向小分子治疗药物等,除了应用药物治疗RA,近年来免疫净化治疗、干细胞移植治疗、外科治疗RA已成为一些辅助治疗RA的有效方法^[2]。

青蒿素是从黄花蒿中提取的含有过氧基团的倍半萜内酯(药用植物的生物活性组分)药物。双氢青蒿素(DHA)是青蒿素的衍生物之一,是青蒿素经四氢硼钠还原而成,分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_5$,相对分子质量为284.35,是青蒿素类药物在体内的主要的活性形式之一。研究表明DHA是青蒿素类药物在体内的主要活性代谢产物。DHA及其衍生物除具有抗疟作用外,还可以有效减轻狼疮肾炎动物模型的病理损害,并且与其他治疗关节炎的药物配伍使用,能够增强对AIA大鼠关节炎的治疗效果^[3,4]。

虽然,已经有研究表明青蒿素具有抗RA作用,

但是,少有人对于 DHA 抗 RA 作用作出较系统的报道。因此,本文对 DHA 佐剂性关节炎(AIA)和胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠实验结果进行了比较,探究是否产生同样的疗效。

1 材料

1.1 动物与细胞 SPF 级雌性 Wistar 大鼠 72 只,体质量(160 ± 20) g,6 ~ 7 周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2016-0011。本实验已获得中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理委员会的批准。RAW264.7(中国医学科学院药用植物研究所提供)。

1.2 药物与试剂 DHA(瑞芬思生物有限公司,批号 W-00660914);甲氨蝶呤(MTX,上海信谊药厂有限公司,批号 036170202);完全弗氏佐剂(FCA),不完全弗氏佐剂(FIA)(美国 Sigma 公司,批号分别为 F5881, F5506);牛源 II 型胶原(美国 Chondrex 公司,批号 20022);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号 F20110915);大鼠 IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(欣博盛生物技术有限公司,批号 ERC007);苏木素染色液(北京博瑞捷科技有限公司,批号 DH0001/0405A17);伊红(曙红)(北京化工厂,批号 20150915);噻唑蓝(MTT,北京索莱宝生物科技有限公司,批号 804W0516);十二烷基磺酸钠(SDS,美国 Amresco 公司,批号 2864B34);IL-6 ELISA 试剂盒(美国 Cusabio 公司,批号 CSB-E04639m); β -肌动蛋白(β -actin)抗体,ECL 化学发光显示液,羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗,Lamin B1 抗体(美国 Proteintech 公司,批号分别为 66009-1-Ig, B500024, SA00001-2, 66095-1-Ig);核转录因子(NF)- κ B 抗体(美国 CST 公司,批号 8242)。

1.3 仪器 TP1020 型自动脱水机,EG 1140H 型石蜡包埋机,XL5010 型自动染色机,DM2500 型显微数字照相生物显微镜,DMLB-HC 型自动光学照相生物显微镜,Thermo30015 型多功能扫描酶标仪(德国 Leica 公司);HM 355S 型全自动轮转式切片机(德国 Microm 公司);415D 型离心机(德国 Eppendorf 公司);YLS-7C 型足趾容积测量仪(江苏赛昂斯生物科技有限公司);Tanon5200 型全自动化学发光测定仪,EP3300 型电泳仪及转膜仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模 Wistar 大鼠随机分为 8 组,分别为 AIA 正常组,AIA 模型组,AIA DHA 组,AIA

MTX 组,CIA 正常组,CIA 模型组,CIA DHA 组,CIA MTX 组,每组 9 只。AIA 模型的建立:除正常组外,将其余各组大鼠右后足趾皮内注射 FCA 0.1 mL 致炎^[5],正常组相同部位注射生理盐水溶液,给药第 1 天设为 D1,DHA 组在大鼠致炎 10 d 后按 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹连续灌胃给药 19 d^[6],每天 1 次;甲氨蝶呤组按 0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药^[7],每周 2 次,于 D19 给药后次日对大鼠进行后续处理。CIA 模型的建立:乳化剂制备,等体积的 2 g·L⁻¹牛源 II 型胶原溶液与等体积的 FCA 充分乳化,即胶原质量浓度为 1 g·L⁻¹,除正常组外,于每只大鼠尾部注射胶原乳化剂 0.2 mL,正常组大鼠于相同部位注射 0.2 mL 生理盐水溶液。7 d 后,在大鼠相同部位注射 0.2 mL 胶原与 FIA 混合的乳化剂,加强免疫^[8]。DHA 组在大鼠 D1(初次免疫第 15 天)至 D25 连续按 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药^[6],每天 1 次;MTX 组按 0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药^[7],每周 2 次,于 D25 给药后次日对大鼠进行后续处理。2 种模型均持续到给药结束。

2.2 大鼠关节肿胀度的测定 AIA 大鼠关节肿胀度的测定:分别在致炎前测量大鼠右后足容积作为基值,造模后每 4 d 测 1 次大鼠足爪容积,以大鼠致炎前后的足爪容积差值为肿胀度。CIA 大鼠关节肿胀度的测定:方法同 2.1 项 AIA 大鼠,并在 CII 乳剂加强免疫后分别于 D1,8,15,22,25 测其足趾容积。

2.3 大鼠 AI 的测定 AIA 大鼠从 D1 后每 6 d 进行 1 次 AI 测定,观察每组大鼠的致炎侧的原发病变,并计算大鼠 AI。CIA 大鼠从 D1 开始每 4 d 进行 1 次 AI 测定,每只大鼠足爪的 AI 测定标准如下^[9]:0 分,无红肿;1 分,趾关节红肿;2 分,趾关节和足趾肿胀;3 分,踝关节以下的足爪肿胀;4 分,包括踝关节在内的全部足爪肿胀。

2.4 大鼠脾脏、胸腺指数的测定 处死大鼠后,取出脾脏、胸腺并称质量,计算脾脏、胸腺指数。脾脏/胸腺指数^[10] = (脾脏质量/胸腺质量)/体质量 × 10³。

2.5 ELISA 检测大鼠血清 IL-6 水平 方法按试剂盒说明程序进行,最后在酶标仪 450 nm 处读取其吸光度 A。

2.6 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠踝关节病理学变化 处死大鼠后,分离右足踝关节部位,用 10% 甲醛溶液固定,用 10% EDTA 溶液 4 ℃ 浸泡 30 d 脱钙,石蜡包埋,切片,HE 染色,并进行拍照分析。根据 HE 染色,采用以下量表评估关节炎的程

度:0 分,滑膜及软骨正常;1 分,滑膜细胞肥大和细胞浸润;2 分,滑膜增厚及软骨侵蚀;3 分,滑膜明显增厚软骨增生严重侵蚀;4 分,关节完整性和强直性消失。

2.7 细胞培养及活力检测 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,放置在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,取对数期细胞用于实验。RAW264.7 细胞悬液接种 96 孔板,细胞数为 1 × 10⁴ 个/mL,每孔 100 μL,设置调零孔,空白组(细胞 + 培养基),DHA 组(将 DHA 溶于 DMSO 浓度为 512 μmol·L⁻¹,再稀释为实验所需浓度),给药浓度为 0.5,1,2,4,8,16 μmol·L⁻¹,每组 6 个复孔,24 h 后吸取上清液 100 μL,在每孔中加入 20 μL 终质量浓度为 0.5 mg·L⁻¹ MTT 的培养基,继续培养 4 h,每孔加入 SDS 100 μL 过夜,在酶标仪 570 nm 处测量各孔的 A。

2.8 ELISA 检测细胞因子 IL-6 含量 RAW264.7 细胞悬液接种 96 孔板,细胞数为 1 × 10⁵ 个/mL,每孔 100 μL,贴壁 6 h 后,同时加入不同浓度的 DHA (0.5,1,2 μmol·L⁻¹) 和 1 g·L⁻¹ LPS 共同作用细胞^[11-12],设为调零孔,空白组,LPS 组,LPS + DHA 组,每组 4 个复孔,24 h 后用 ELISA 试剂盒检测上清,所有操作均按照试剂盒说明书进行。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 NF-κB 蛋白表达 RAW264.7 细胞悬液接种 6 孔板,细胞数为 1 × 10⁶ 个/mL,每孔 1 mL,同时加入不同浓度的

DHA(0.5,1,2 μmol·L⁻¹) 和 1 g·L⁻¹ LPS 共同作用细胞 30 min 后,根据试剂盒提取胞核蛋白,检测细胞核内 NF-κB p65 蛋白表达情况,采用 BCA 蛋白定量法检测各组细胞胞核浓度,100 °C 灭活蛋白 5 min,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭 1 h,孵育 NF-κB p65 单克隆抗体(1:1 000),ECL 显色,曝光。采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,所有实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DHA 对 AIA 大鼠/CIA 大鼠足趾肿胀度的影响 与正常组比较,各组 AIA 大鼠在造模 10 h 后足趾急速肿胀,18 h 左右达到高峰,4 d 后足趾肿胀降低,12 d 后足趾肿胀程度达到最低($P < 0.01$);与正常组比较,模型组大鼠足趾肿胀度显著升高($P < 0.01$),并且各造模组组间大鼠足趾肿胀度无统计学意义,表明造模成功。与模型组比较,在给药 19 d 后,DHA 组大鼠在给药 19 d 后足趾肿胀度明显降低($P < 0.05$)。见表 1。CIA 大鼠在初次免疫 10 d 后,部分大鼠足趾开始肿胀,初次免疫 14 d 后,造模大鼠基本上全部成模。与模型组比较,在给药 22 d 后,DHA 组大鼠足趾肿胀度明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 DHA 对 AIA 大鼠足趾肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1 Effect of DHA on paw volume in AIA rats($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	D1	D3	D7	D11	D15	D19
正常	-	97.68 ± 38.71	101.66 ± 48.64	113.30 ± 82.74	142.30 ± 93.20	262.30 ± 38.86	276.51 ± 63.97
模型	-	709.30 ± 196.36 ²⁾	646.67 ± 161.90 ²⁾	812.11 ± 188.59 ²⁾	912.10 ± 200.50 ²⁾	1 069.50 ± 164.65 ²⁾	1 107.20 ± 215.79 ²⁾
DHA	30	717.18 ± 223.19	496.72 ± 165.21	620.50 ± 194.89	752.45 ± 234.07	963.56 ± 253.61	887.44 ± 234.89 ³⁾
MTX	0.5	712.40 ± 115.67	620.60 ± 129.40	631.10 ± 49.74	669.90 ± 153.41 ⁴⁾	792.40 ± 140.74 ⁴⁾	826.00 ± 203.89 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~8 同)。

表 2 DHA 对 CIA 大鼠足趾肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Effect of DHA on paw volume in CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	D1	D8	D15	D22	D25
正常	-	84.62 ± 34.15	92.14 ± 60.21	102.19 ± 46.81	121.47 ± 78.74	142.19 ± 56.79
模型	-	1 129.32 ± 572.10 ²⁾	1 512.98 ± 477.19 ²⁾	1 430.21 ± 455.31 ²⁾	1 221.76 ± 314.49 ²⁾	1 070.97 ± 271.20 ²⁾
DHA	30	1 405.98 ± 840.91	1 268.32 ± 665.82	1 048.87 ± 555.44	811.76 ± 444.54 ³⁾	725.87 ± 359.96 ³⁾
MTX	0.5	1 163.33 ± 486.82	1 141.89 ± 520.73	918.44 ± 474.24 ³⁾	743.76 ± 388.61 ³⁾	710.87 ± 281.44 ³⁾

3.2 DHA 对 AIA 大鼠/CIA 大鼠 AI 的影响 与正常组比较,AIA 大鼠在致炎后,其关节红肿程度显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,给药 13 d 后,DHA 组可降低关节炎大鼠的 AI($P < 0.05$),给药 19 d 后,DHA 组可显著降低关节炎大鼠的 AI($P < 0.01$)。见表 3。而在 CIA 大鼠模型中,DHA 在给药 17 d 后,能够明显的降低 CIA 大鼠 AI($P < 0.05$)。见表 4。

3.3 DHA 对 AIA 大鼠/CIA 大鼠免疫器官指数的

表 4 DHA 对 CIA 大鼠关节炎指数评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 4 Effect of DHA on arthritis scores in CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	D1	D5	D9	D13	D17	D21	D25
正常	-	0	0	0	0	0	0	0
模型	-	7.78 ± 4.29 ²⁾	9.33 ± 4.06 ²⁾	10.88 ± 4.34 ²⁾	11.33 ± 3.81 ²⁾	13.25 ± 2.86 ²⁾	12.88 ± 3.68 ²⁾	12.63 ± 4.03 ²⁾
DHA	30	8.22 ± 2.77	9.11 ± 3.44	8.67 ± 4.84	8.78 ± 5.09	8.22 ± 5.14 ³⁾	8.00 ± 5.10 ³⁾	7.33 ± 5.36 ³⁾
MTX	0.5	9.78 ± 3.23	9.67 ± 2.96	9.33 ± 3.87	8.88 ± 3.95	8.22 ± 4.44 ³⁾	7.11 ± 5.01 ³⁾	6.55 ± 5.13 ³⁾

影响 在 AIA 模型中,与正常组比较,模型组大鼠脾脏指数显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,DHA 组脾脏指数和胸腺指数显著降低($P < 0.05$);甲氨蝶呤组脾脏指数显著降低($P < 0.01$)。而在 CIA 模型中,DHA 对大鼠脾脏指数并没有降低作用,胸腺指数也没有较大变化。见表 5。

表 5 DHA 对 AIA 大鼠/CIA 大鼠免疫器官指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 5 Effect of DHA on immune organs index in AIA rats/CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	AIA 大鼠		CIA 大鼠	
		脾脏指数	胸腺指数	脾脏指数	胸腺指数
正常	-	3.60 ± 0.17	2.04 ± 0.39	2.78 ± 0.51	1.55 ± 0.26
模型	-	4.94 ± 0.54 ²⁾	2.02 ± 0.50	3.97 ± 0.18 ²⁾	2.24 ± 0.7 ¹⁾
DHA	30	3.74 ± 0.54 ⁴⁾	1.67 ± 0.27 ³⁾	4.33 ± 0.66	1.95 ± 0.47
MTX	0.5	4.05 ± 0.59 ⁴⁾	2.20 ± 0.41	3.59 ± 0.23 ⁴⁾	1.76 ± 0.44

3.4 DHA 对 AIA 大鼠/CIA 大鼠血清 IL-6 水平的影响 与模型组比较,DHA 能够降低 AIA 大鼠血清中 IL-6 的含量($P < 0.01$);而在 CIA 模型中,DHA 虽然能够降低大鼠血清中 IL-6 的含量,但与模型组比较,并没有统计学意义。见表 6。

3.5 DHA 对 AIA 大鼠/CIA 大鼠踝关节骨组织软骨细胞病理学影响 AIA 大鼠病理观察可见,正常组关节面完整,关节滑膜腔组织内未见炎性细胞。模型组关节滑膜腔组织内与正常组比较有大量炎性

表 3 DHA 对 AIA 大鼠关节炎指数评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Effect of DHA on arthritis scores in AIA rats($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	D1	D7	D13	D19
正常	-	0	0	0	0
模型	-	3.50 ± 71.00 ²⁾	3.81 ± 0.63 ²⁾	3.90 ± 0.56 ²⁾	4.00 ²⁾
DHA	30	3.50 ± 0.84	3.60 ± 0.45	3.30 ± 0.67 ³⁾	3.21 ± 0.61 ⁴⁾
MTX	0.5	3.60 ± 0.52	3.60 ± 0.51	3.30 ± 0.48 ³⁾	2.80 ± 0.87 ⁴⁾

表 6 DHA 对 AIA 大鼠/CIA 大鼠血清 IL-6 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

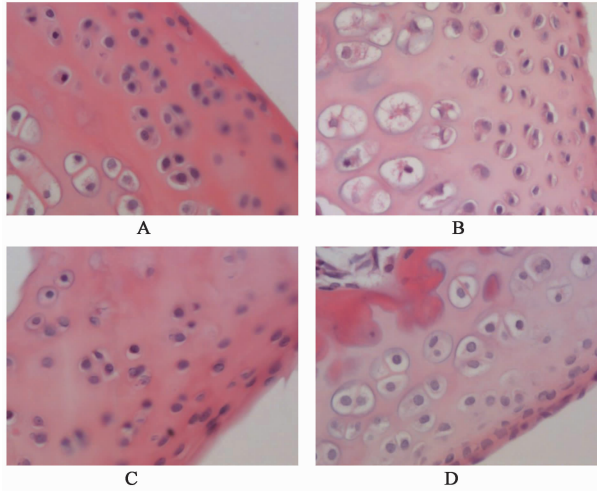
Table 6 Effect of DHA on IL-6 level in AIA rats/CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	AIA 大鼠	CIA 大鼠
正常	-	25.80 ± 14.17	2.80 ± 1.29
模型	-	134.00 ± 80.89 ²⁾	51.24 ± 17.27 ²⁾
DHA	30	59.24 ± 24.05 ³⁾	18.03 ± 21.13
MTX	0.5	54.91 ± 26.17 ⁴⁾	42.53 ± 29.65

细胞浸润,细胞有明显增多、增大,且软骨膜增厚;成熟软骨细胞异常多见,表现为细胞个体肥大,细胞无核,或核似蜘蛛样,结构异常;关节骨膜细胞增多,关节髓腔细胞早幼细胞明显增多,髓腔出血,有炎症的产生。MTX 组关节髓腔出血多见,异常细胞增生减少,关节滑膜腔组织内炎性细胞浸润与模型组相比明显减轻。DHA 组关节滑膜腔组织内炎性细胞与模型组相比明显减轻,且关节骨髓腔异常细胞增生减少,滑膜增厚不明显。见图 1。

CIA 大鼠病理观察可见,正常组大鼠踝关节未见有软骨组织增生、变性,膜组织未见有增厚,未见有炎症水肿,结构正常。模型组大鼠踝关节软骨组织有增生、增大,软骨细胞变性,有部分软骨细胞消失、变小。膜组织有明显增厚,间质有水肿、炎症,渗

出以中性分叶核及嗜酸性细胞为主,并有淋巴细胞浸润。DHA 组大鼠踝关节软骨、膜组织病变与模型组相比,有不同程度改善。见图 2。此外,对关节炎大鼠踝关节作了病理评分,结果表明 DHA 能够降低 RA 大鼠的病理评分($P < 0.01$)。见表 7。



A. 正常组; B. 模型组; C. DHA 组; D. MTX 组(图 2 同)

图 1 DHA 对 AIA 大鼠踝关节骨组织软骨细胞病理学影响(HE, $\times 200$)

Fig.1 Effect of DHA on histological change of ankle in AIA rats (HE, $\times 200$)

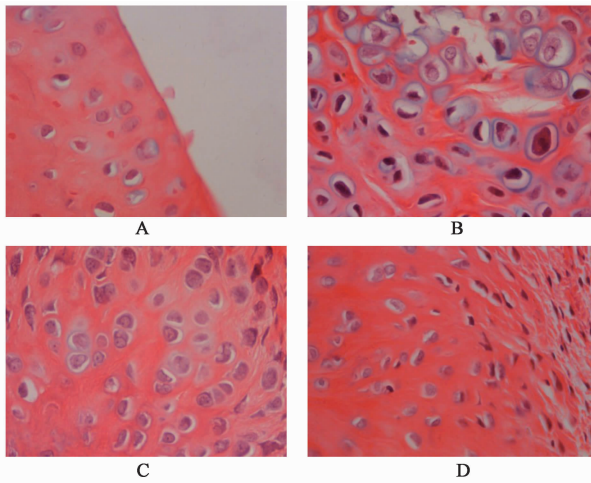


图 2 DHA 对 CIA 大鼠踝关节骨组织软骨细胞病理学的影响(HE, $\times 200$)

Fig.2 Effect of DHA on histological change of ankle in CIA rats (HE, $\times 200$)

3.6 DHA 对 RAW264.7 细胞活力的影响 与空白组比较, $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞活力有所下降($P < 0.05$), 当 DHA 为 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与正常组比较, 细胞活力显著下降($P < 0.01$), DHA 的安全浓度在 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 8。

表 7 DHA 对 RA 大鼠踝关节病理评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 7 Effect of DHA on histological damage score of ankle in AIA rats/CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	AIA 大鼠	CIA 大鼠
正常	-	0	0
模型	-	$7.25 \pm 0.50^{2)}$	$5.25 \pm 0.50^{2)}$
DHA	30	$4.50 \pm 1.29^{4)}$	$3.00 \pm 0.82^{4)}$
MTX	0.5	$4.00 \pm 1.41^{4)}$	$3.00 \pm 0.82^{4)}$

表 8 DHA 对 RAW264.7 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 8 Effect of DHA on viability of RAW264.7 cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A
空白	-	1.11 ± 0.03
DHA	0.5	1.18 ± 0.05
	1	1.11 ± 0.04
	2	1.12 ± 0.05
	4	$1.04 \pm 0.04^{1)}$
	8	$0.93 \pm 0.01^{2)}$
	16	$0.83 \pm 0.02^{2)}$

3.7 DHA 对 LPS 所致 RAW264.7 细胞 IL-6 表达量的影响 与空白组比较, LPS 组 IL-6 释放量显著升高($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, DHA $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组能够抑制 IL-6 释放量($P < 0.05$)。见表 9。

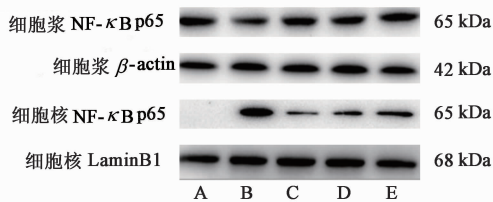
表 9 DHA 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 IL-6 表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 9 Effect of IL-6 expression after intervention of DHA on RAW264.7 cells stimulated by LPS($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	0.51 ± 0.21
LPS	-	$104.11 \pm 5.48^{2)}$
DHA	0.5	$93.82 \pm 7.89^{3)}$
	1	98.93 ± 16.89
	2	119.10 ± 16.50

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 LPS 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 10 同)。

3.8 DHA 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NF- κ B p65 表达的影响 与空白组比较, LPS 组细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达显著上调($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, DHA($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能显著抑制 NF- κ B p65 入核($P < 0.01$), 胞浆中 NF- κ B p65 表达明显上调($P < 0.05$)。见图 3, 表 10。



A. 空白组; B. LPS 组; C. DHA 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. DHA 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. DHA 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 3 各组 RAW264.7 细胞 NF- κ B p65 表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of NF- κ B p65 protein expression of RAW264.7 cells

表 10 DHA 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NF- κ B p65 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of NF- κ B p65 protein expression after intervention of DHA on RAW264.7 cells stimulated by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞核 NF- κ B p65 /LaminB1	细胞浆 NF- κ B p65 / β -actin
空白	-	0.10 \pm 0.07	0.99 \pm 0.07
LPS	-	1.16 \pm 0.10 ²⁾	0.54 \pm 0.09 ²⁾
DHA	0.5	0.82 \pm 0.06 ⁴⁾	0.98 \pm 0.12 ³⁾
	1	0.93 \pm 0.38	0.83 \pm 0.24 ³⁾
	2	0.99 \pm 0.23	0.85 \pm 0.15 ³⁾

4 讨论

RA 是一种以慢性、进行性、侵袭性关节炎为主要表现的全身性自身免疫病,如果不经过正规治疗,病情会逐渐发展,最终表现为骨质的破坏与关节的畸形,并且具有很高的致残率。RA 也是由 T, B 淋巴细胞参与的、以损害滑膜、软骨和骨的系统性自身免疫疾病,其病因未明。研究表明 RA 发病与遗传因素,环境因素,炎症因素等有关。

MTX 虽然是一种细胞毒药物,但从 20 世纪 50 年代开始,MTX 被试用于治疗 RA,并取得良好疗效。现成为传统缓解病情抗风湿药物的一种,是治疗 RA 的一线药,并且作为治疗 RA 的首选药已被写入我国新出台的 RA 诊治指南。MTX 主要通过抑制体内二氢叶酸还原酶干扰胸腺嘧啶合成,减少了细胞中炎症因子的释放,从而改善关节症状和减缓骨质破坏。在 RA 治疗方面,虽然有许多新药出现,但 MTX 单用或联合治疗方案仍得到广泛认可^[13]。

AIA 大鼠模型与 CIA 大鼠模型是研究 RA 经典的动物模型,研究表明,AIA 模型制备方法简单易行,在临床表现、病理学及免疫学上与人 RA 有很多相似之处,因此被普遍应用于 RA 相关研究。但 AIA 缺乏了慢性病理过程,并与 RA 的病变过程有

所不同。如果只用 AIA 模型研究 RA,局限性较大,还需应用其他模型从多个方面综合考虑。目前,CIA 是公认的 RA 最佳模型,并在免疫学、治疗效果评价及药物筛选等方面的研究中,CIA 模型为 RA 的研究提供了极大帮助^[14]。

脾脏和胸腺是机体内的重要免疫器官,免疫器官指数的高低在一定程度上反映机体免疫水平的强弱,即胸腺指数和脾脏指数可以反映机体的免疫水平及状态^[15]。胸腺对机体免疫功能的建立及其免疫能力丧失后免疫调控功能的恢复具有重要作用,胸腺产生的大量胸腺细胞在 T 细胞不足时可作为 T 淋巴细胞的后备,完成其免疫调控功能,成熟的胸腺细胞还可以随血液到达机体的外周器官协助 B 淋巴细胞发挥细胞免疫功能。脾脏是机体体积较大的免疫器官,对各类肿瘤细胞、有害微生物等均具有一定的过滤作用,机体的特异性免疫反应大都发生在脾脏^[16]。免疫器官在 RA 中起着重要作用,因此很多学者在研究药物抗 RA 时,会考察药物对 RA 大鼠免疫器官指数的影响。但是,在青蒿素衍生物抗 RA 的报道中,对青蒿素衍生物是否影响 RA 免疫器官指数的研究比较少。

而本实验研究发现,DHA 能够抑制 AIA 大鼠的脾脏指数和胸腺指数,AIA 模型组胸腺指数与正常组没有差异,这可能是 AIA 模型侵犯脾脏多一点^[17]。但是 DHA 组胸腺指数明显降低,这可能是由于大量成熟后的 T 细胞迁移到脾脏和增生的滑膜中,或者是胸腺功能受到抑制,培育成熟的 T 细胞能力下降^[18]。但是对于 CIA 大鼠,DHA 组与模型组脾脏指数均有所上升,DHA 对脾脏指数并没有抑制作用,可能因脾脏的免疫清除功能增强和清除量增加导致脾脏增重,脾脏指数升高;而对于 CIA 大鼠胸腺指数 DHA 组虽有所下降,但是没有统计学意义。

NF- κ B 是一种重要的转录因子,在正常情况下与 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B α)形成二聚体存在于细胞浆中,当其被激活后会进入到细胞核内^[19],诱导大量炎症细胞因子产生如肿瘤坏死因子- α (TNF- α),IL-1 β ,而炎症因子的上调又可正反馈调节 NF- κ B 的活化,然后激活 NF- κ B,这种恶性循环形成持久、放大的炎症反应,导致 RA 滑膜增生、血管生成、软骨破坏和骨的侵蚀,最终机体发生炎症病理损伤。研究证实,在 RA 患者关节滑膜和关节炎动物模型中,NF- κ B 均处于高度活化状态,活化的 NF- κ B 不仅可以诱导炎症介质的产生,还能够募集它们参与局部

炎性反应,而目前研究认为炎性介质的持续作用是 RA 病变加重的主要原因,因此推断 NF- κ B 可能在 RA 发病中起关键作用^[20]。此外,还有研究表明,RA 滑膜中 RAW264.7 细胞受 LPS 的刺激可使激活 NF- κ B,从而上调一些炎症介质如环氧合酶-2 (COX-2)的表达,引起组织炎性细胞浸润、滑膜异常增生、软骨破坏,最终导致关节疼痛、肿胀、变形。NF- κ B 还可上调基质金属蛋白酶(MMPs),导致软骨的破坏和骨的侵蚀^[21-22]。因此,阐明 NF- κ B 对 RA 的调控作用对找到新靶点治疗 RA 具有重要作用。本研究发现,LPS 能够诱导 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 核易位增加,而经 DHA 干预后,NF- κ B 核易位明显被抑制。

IL-6 是一种多效性前炎症细胞因子,具有多种生物活性,以自分泌,旁分泌,内分泌 3 种形式对不同器官产生不同效应,包括介导炎症反应,免疫反应等。IL-6 通过促进 T 细胞和 B 细胞的特异性分化,所以在获得性免疫中有着重要作用。IL-6 能够诱导活化的 B 细胞分化为免疫球蛋白,重要的是 IL-6 可以诱导 T 细胞分化为特定功能的谱系,并在转化生长因子- β (TGF- β)存在时,IL-6 能够上调信号传导及转录激活因子(STAT)3 介导的维甲酸孤儿受体 γ t(ROR γ t),而促进 CD4⁺幼稚 T 细胞分化为 Th17 细胞,但抑制调节性 T 细胞(Treg)功能。Th17 细胞/Treg 细胞之间的平衡失调能破坏机体的免疫耐受,这与多种自身免疫性疾病和慢性炎症性疾病的发展密切相关^[23-24]。

研究表明 IL-6/IL-6R 在 RA 中发挥重要作用,RA 患者 IL-6 及 IL-6R 的浓度升高,并且 IL-6/IL-6R 的水平与疾病活性及疾病活性相关的替代物(类风湿因子,C 反应蛋白)相关,与临床表现同样相关(如 X 射线改变,受累关节数量,晨僵的持续时间)。对此,IL-6 可解释 RA 的许多临床症状。改变病情的风湿药的临床疗效与 IL-6 血清水平有关。在 RA 患者血清 IL-6/IL-6R 浓度明显升高,且其升高水平与患者疾病活性及关节破坏程度相关。并且 IL-6 是某些炎性因子生物效应的放大因子,这些因子可放大对关节滑膜和软骨的损伤。因此抑制 IL-6/IL-6R 水平可控制 RA 患者的症状并可限制病情的发展^[25-27]。

DHA 能够抑制 AIA 大鼠血清中的 IL-6 含量,而对 CIA 大鼠血清中 IL-6 含量虽有抑制作用,但是效果并不明显,与模型组比较没有统计学意义。之前也有研究报道证实 DHA 能协同雷公藤甲素降低

AIA 大鼠踝关节 IL-6 水平^[28],这可能是 DHA 在 AIA 模型中体现了更强的免疫抑制作用,这点在免疫器官指数方面也有所体现。

此外,有研究发现青蒿琥酯能够有效的改善 CIA 大鼠症状,这种作用体现在给药 10 d 后,大鼠足肿胀和 AI 就明显降低,并具有统计学意义^[29];还有研究表明在单用 DHA 抗 AIA 大鼠时,DHA 并不能阻止 AIA 大鼠关节病理进展^[28]。而本研究发现 DHA 能降低两种关节炎大鼠的足肿胀度和 AI,但是作用比较缓慢,在给药 17 d 后,才具有统计学意义,并且,从病理评分结果可以看出 DHA 能够明显的抑制 AIA 大鼠和 CIA 大鼠关节炎进展。

综上所述,DHA 降低能够 CIA 和 AIA 模型大鼠踝关节肿胀程度和 AI,改善两种类风湿关节炎模型大鼠踝关节病变情况,可能通过抑制 NF- κ B 活化,从而抑制炎症反应。

[参考文献]

- [1] Abdelnasser A M, Rasker J J, Valkenburg H A. Epidemiological and clinical aspects relating to the variability of rheumatoid arthritis [J]. *Semin Arthritis Rheu*, 1997, 27(2): 123-140.
- [2] 达明莲,邓肇达,鲁锦玥,等. 甲氨蝶呤与 Th17/Treg 细胞平衡对类风湿关节炎的作用机制研究[J]. *医学综述*, 2017, 23(15): 3046-3050.
- [3] 刘跃亮,罗进勇,张彦,等. DHA 对人骨肉瘤细胞株 143B 增殖和凋亡的作用[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(12): 1719-1723.
- [4] 易剑峰. 布洛芬与 DHA 配伍治疗大鼠佐剂性关节炎的药效及机制初探[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(9): 177-180.
- [5] JIANG J, QIU J, YANG L, et al. Therapeutic effects of astragalus polysaccharides on inflammation and synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *Int J Rheumatic Dis*, 2010, 13(4): 396-405.
- [6] 王岩艳,刘怡欣,谢其冰,等. 二氢青蒿素对大鼠牛 II 型胶原蛋白诱导关节炎模型作用的初步研究[J]. *四川大学学报:医学版*, 2012, 43(6): 851-854.
- [7] LI X, GU L, LAN Y, et al. Aconitine: A potential novel treatment for systemic lupus erythematosus [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 133(3): 115-121.
- [8] JIANG P, FANG F F, LI X Q, et al. Matrine exerts a strong anti-arthritis effect on type II collagen-induced arthritis in rats by inhibiting inflammatory responses [J]. *Int J Mol*, 2016, 17(9): 1410.
- [9] 林兵. 豆豉姜抗类风湿性关节炎物质基础及作用机制研究[D]. 上海:第二军医大学, 2014.

- [10] WANG X, HE X, ZHANG C F, et al. Anti-arthritis effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 887.
- [11] FU Y, ZHOU E, WEI Z, et al. Glycyrrhizin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by reducing TLR4 recruitment into lipid rafts in RAW264.7 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840 (6): 1755-1764.
- [12] 季律, 魏盼, 王臻, 等. 麻黄-甘草药对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的体外抗炎作用分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(18): 92-97.
- [13] 达明莲, 邓肇达, 鲁锦玥, 等. 甲氨蝶呤与 Th17/Treg 细胞平衡对类风湿关节炎的作用机制研究[J]. *医学综述*, 2017, 23(15): 3046-3050.
- [14] 陈哲, 郭艳幸. 类风湿关节炎实验动物模型研究综述[J]. *风湿病与关节炎*, 2015, 4(12): 67-70.
- [15] 徐麒麟, 康波, 姜冬梅, 等. 亚精胺对鼠免疫器官指数及炎症因子表达的影响[J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(2): 200-205.
- [16] 王勇, 司丽芳, 李相能, 等. 银杏叶提取物增强大鼠脾脏和胸腺的免疫功能[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(6): 792-795.
- [17] 潘磊, 杜文喜, 卢建华. 胶原诱导性和佐剂性大鼠关节炎模型的比较[J]. *山西中医学院学报*, 2013, 14(4): 12-14.
- [18] 强宇靖, 罗奎元, 马腾茂, 等. 气候因素对 II 型胶原蛋白所致类风湿关节炎模型大鼠关节炎、免疫脏器指数及组织形态的影响[J]. *甘肃中医学院学报*, 2016, 33(2): 7-11.
- [19] 刘思思, 李琦, 孙立东, 等. 参莲提取物对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10): 85-91.
- [20] 王晨, 程艳杰. NF- κ B 在类风湿性关节炎中的作用及调控机制[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(18): 2600-2603.
- [21] Park J W, Kwon C K, Kim J H, et al. Rhododendron albumBlume inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells through the down regulation of NF- κ B signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(4): 987-994.
- [22] CHOU L W, WANG J, CHANG P L, et al. Hyaluronan modulates accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinase-3 in the synovium of rat adjuvant-induced arthritis model[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(3): R90-R90.
- [23] Venkatesha S H, Dudics S, Acharya B, et al. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(1): 887-906.
- [24] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(7): 1830-1835.
- [25] 展俊平, 孟庆良, 孟婉婷, 等. 补阳还五汤对类风湿关节炎小鼠 MPO, NE mRNA 表达及 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(24): 158-163.
- [26] Cronstein B N. Interleukin-6-a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis [J]. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2007, 65(1): S11-S15.
- [27] 苗平, 陆梅生, 张冬青. IL-6/IL-6 受体与类风湿关节炎关联性研究新进展[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(4): 355-360.
- [28] 易剑峰, 吕爱平. 雷公藤甲素与 DHA 配伍对大鼠佐剂性关节炎的免疫学研究[J]. *江西中医药大学学报*, 2008, 20(6): 49-51.
- [29] LI Y, WANG S, WANG Y, et al. Inhibitory effect of the antimalarial agent artesunate on collagen-induced arthritis in rats through nuclear factor kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *Transl Res*, 2013, 161(2): 89-98.

[责任编辑 周冰冰]