

瘀血痹片对大鼠胶原诱导性关节炎的干预作用及抗炎机制

袁蓓^{1,2}, 苏晓慧², 郭婉怡², 汪倩^{1,2}, 刘春芳², 韩岚^{1*}, 林娜^{2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察瘀血痹片对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠的干预作用并探索抗炎相关机制。方法: 建立大鼠CIA模型, 给药组和阳性药组分别灌胃给予低、中、高剂量瘀血痹片(0.1, 0.2, 0.4 g·kg⁻¹)和甲氨蝶呤(0.4 mg·kg⁻¹), 每3 d检测发病率、机械痛敏阈值及冷刺激痛敏; 给药30 d后取材, 外周血检测血小板计数(PLT)及纤维蛋白原(FIB)含量; 苏木素-伊红染色法分析CIA大鼠关节组织病理变化; 免疫组化法(IHC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测CIA大鼠关节组织中白细胞介素(IL)-1 β , IL-8, 核转录因子- κ B(NF- κ B) p65, 磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65), 大鼠肉瘤(Ras)及Raf-1蛋白表达情况。此外, 采用10 μ g·L⁻¹的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(RA-FLS), 转移小室法检测RA-FLS迁移及侵袭能力。Western blot检测RA-FLS中Ras, Raf-1, p-NF- κ B p65蛋白表达水平。结果: 与正常组比较, CIA模型组发病率升高, 机械痛阈值明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 冷刺激反应评分显著增高($P < 0.01$), 外周血中PLT和FIB含量, 大鼠关节组织病理评分, RA-FLS迁移和侵袭细胞个数及炎性相关因子的表达水平均显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 瘀血痹片低、中、高剂量组均能降低CIA大鼠发病率, 提高其机械痛阈值并降低冷刺激痛敏反应评分($P < 0.05$, $P < 0.01$); 降低CIA大鼠外周血中PLT和FIB含量($P < 0.05$, $P < 0.01$), 改善关节滑膜增生、骨及软骨破坏等病理变化($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并抑制RA-FLS的迁移及侵袭。此外, 瘀血痹片低、中、高剂量组均能不同程度地显著抑制CIA大鼠关节组织中IL-1 β , IL-8, Ras, Raf-1和p-NF- κ B p65的含量, 以及RA-FLS细胞中Ras, Raf-1及p-NF- κ B p65等蛋白表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 瘀血痹片具有降低大鼠CIA发病率、关节炎临床症状和改善关节组织病理变化、抑制滑膜生成等作用, 并且这一作用可能与其对Ras/Raf-1/NF- κ B信号通路的抑制有关。

[关键词] 类风湿性关节炎(RA); 瘀血痹片; 成纤维样滑膜细胞(FLS); 炎症因子; Ras/Raf-1/核转录因子- κ B(NF- κ B)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0052-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211007

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210331.0941.001.html>

[网络出版日期] 2021-3-31 11:27

Effect and Mechanism of Yuxuebi Tablet Against Collagen-Induced Arthritis of Rats

YUAN Bei^{1,2}, SU Xiao-hui², GUO Wan-yi², WANG Qian^{1,2}, LIU Chun-fang², HAN Lan^{1*}, LIN Na^{2*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the intervention effect of Yuxuebi tablet (YXB) on collagen-induced arthritis (CIA) in rats and its anti-inflammatory mechanism. **Method:** Following CIA modeling, the rats in the drug administration groups were separately treated with intragastric administration of YXB (0.1, 0.2, and 0.4 g·kg⁻¹) and methotrexate (MTX, 0.4 mg·kg⁻¹), once a day. The incidence of CIA, mechanical pain threshold (MPT) and cold pain threshold (CPT) were evaluated once every three days. After continuous administration for 30 days, the peripheral blood of rats was collected for the determination of platelet (PLT) count and fibrinogen (FIB) content. The hematoxylin-eosin (HE) staining was conducted to analyze the pathological changes in joint

[收稿日期] 20210305(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09731002); 中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20190316, 20200326)

[第一作者] 袁蓓, 在读硕士, 从事抗炎中药药理研究, E-mail: peipeixyx@163.com

[通信作者] * 韩岚, 博士, 教授, 从事中药药理研究, E-mail: hanlan56@ahtcm.edu.cn;

* 林娜, 博士, 研究员, 从事抗炎中药药理研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: linna888@163.com

tissues. The protein expression levels of interleukin (IL)- 1β , IL-8, nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) p65, phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B) p65, Ras, and Raf-1 in joint tissues of CIA rats were detected by immunohistochemistry (IHC) and Western blot. The rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA-FLS) were induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α , $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) *in vitro* and then subjected to transwell migration/invasion assay, followed by the detection of protein expression levels of Ras, Raf-1, and p-NF- κ B p65 in RA-FLS by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the model group exhibited an increased incidence of CIA, significantly decreased MPT ($P<0.05, P<0.01$), elevated CPT ($P<0.01$) and PLT and FIB in the peripheral blood, worsened histopathological score of joints, enhanced RA-FLS migration and invasion, and up-regulated inflammatory factors ($P<0.01$). The comparison with the model group revealed that YXB at different doses obviously reduced the incidence of CIA, increased MPT, down-regulated CPT and PLT and FIB in the peripheral blood ($P<0.05, P<0.01$), ameliorated the pathological changes like synovial hyperplasia and bone and cartilage destruction ($P<0.05, P<0.01$), and inhibited RA-FLS migration and invasion. Besides, the low-, medium-, and high-dose YXB reversed the IL- 1β , IL-8, Ras, Raf-1, and p-NF- κ B p65 expression in joint tissues of CIA rats to different extents, as well as the protein expression of Ras, Raf-1 and p-NF- κ B p65 in RA-FLS ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** YXB reduces the incidence of CIA, ameliorates the clinical symptoms of RA and the pathological changes in joint tissues, and inhibits the formation of synovium, which may be attributed to its inhibition against Ras/Raf-1/NF- κ B signaling pathway.

[Key words] rheumatoid arthritis (RA); Yuxuebi tablet; fibroblast-like synoviocytes (FLS); inflammatory factors; Ras/Raf-1/nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)

类风湿关节炎(RA)是一种慢性进行性的自身免疫性疾病,以关节滑膜的慢性炎症、软骨侵蚀及骨破坏等为主要病理特征。RA在中医理论中属“痹证”范畴,血瘀是痹证的致病因素和主要病理产物,而属痹证的RA在发生发展的过程中会累及多个关节并伴有持续性疼痛,严重时可致关节畸形,最终关节功能丧失等,严重影响患者的生理、心理及生活质量^[1]。目前已上市的病情改善药物在治疗RA的同时常伴有或多或少的不良反应^[2],不适于患者长期服用。近年来,中药尤其中药复方凭借其疗效佳、药效持久、不良反应少及复发率低等特点和优势,越来越引起RA治疗界的重视并获得患者的认可。

瘀血痹片是由乳香(炙),没药(炙),红花,丹参,香附(炙),川芎,当归,炙黄芪,威灵仙,川牛膝,姜黄11味中药材组成的中成药,功能活血化瘀、通络定痛,主治瘀血阻络所致的痹证。曾有临床报道,瘀血痹片对膝骨关节炎具有良好的治疗效果^[3];近年来有专家通过临床研究发现瘀血痹片单用或联合甲氨蝶呤对RA具有较好的治疗效果,能够降低关节炎症反应,改善患者的关节功能并缓解疼痛,且安全性较好,具有一定的临床推广应用价值^[4-5];实验室的急性实验也证明瘀血痹片具有良好的抗炎镇痛效果^[6]。为了进一步明确瘀血痹片对

RA的干预作用及特点,本研究拟观察瘀血痹片口服灌胃后对大鼠胶原佐剂诱导性关节炎(CIA)发病率、血生化、痛敏和关节组织病理学的影响,以及对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的RA患者成纤维样滑膜细胞(RA-FLS)的迁移和侵袭能力的干预作用,分析瘀血痹片对炎症关节及滑膜细胞中白细胞介素(IL)- 1β , IL-8,大鼠肉瘤(Ras),Raf-1及核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)等炎症介质的影响,为后续瘀血痹片的机制探索提供基础,也为临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,体质量160~170 g;购于北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008,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,温度湿度适宜,本实验通过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,编号为2017-076,适应性饲养3 d后用于实验。

1.2 药物和主要试剂 瘀血痹片(辽宁华润本溪三药有限公司,批号20190312),由乳香(炙),没药(炙),红花,丹参,香附(炙),川芎,当归,炙黄芪,威灵仙,川牛膝,姜黄11味药材组成;甲氨蝶呤片(通化茂祥制药有限公司,批号180702);牛Ⅱ型胶原溶液(Bovine Type II Collagen,美国Chondrex公司,货

号20022);不完全弗氏佐剂(IFA,美国Chondrex公司,货号7002);IL-1 β 抗体,Ras抗体,Raf-1抗体,p65抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Abcam公司,货号分别为ab9722,ab52939,ab137435,ab16502,ab181602);IL-8抗体(美国SAB公司,货号38419);p-NF- κ B p65抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号3033S);兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号PV-9001);苏木素(北京九州柏林生物技术有限公司,批号20191119);伊红(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号18091203);氨水(国药集团化学试剂有限公司,批号20150427);Bradford蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,货号P1510);DMEM培养基(美国Gibco公司,批号8120441);迁移小室(transwell,美国Costar公司,货号3422);基质胶(美国Corning公司,批号354234);结晶紫(大连美仑生物技术有限公司,货号548-62-9)。

1.3 仪器 Von Frey 针刺触觉测量套件(美国Danmic Aesthesio公司);CX31型倒置显微镜(日本Olympus公司);LX-100手掌型离心机(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);PowerpacTM Basic型电泳仪;Mini Trans-Blot Cell型转移电泳槽(美国Bio-Rad公司);TS-1型水平摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Fusion FX6型凝胶成像仪(法国Vilber公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 CIA大鼠模型的建立 将适量牛II型胶原溶液与等体积的不完全弗氏佐剂充分混匀并乳化,每只大鼠于尾根部皮内注射上述乳剂0.2 mL。第1次免疫7 d后,按前述方法进行第2次注射,每只0.1 mL以加强免疫。与正常组比较,模型组大鼠关节出现明显红、肿、畸形等变化即视为制备CIA模型成功^[7]。

2.1.2 分组及给药 SD大鼠随机分为正常组,模型组,瘀血痹片低、中、高剂量组(0.1,0.2,0.4 g·kg⁻¹,1次/d,分别相当于临床等效剂量的0.5,1,2倍)和甲氨蝶呤组(0.4 mg·kg⁻¹,1次/3d,相当于临床等效剂量)。各组大鼠数量分别为正常组10只、模型组11只,甲氨蝶呤组11只,低剂量组7只,中剂量组7只,高剂量组12只。自2次免疫开始,正常组和模型组按体质量灌胃给予0.3%的羧甲基纤维素钠(CMC-Na),给药组按体质量灌胃给予不同剂量的

药物,给药持续30 d。

2.1.3 大鼠关节炎发病率评价 各组大鼠自第1次免疫后,每隔3 d观察大鼠发病情况,同时统计发病率。发病率=每组发病大鼠只数/该组大鼠总只数 \times 100%。

2.1.4 机械刺激痛觉过敏检测 采用Von-Frey针刺触觉测量套件检测CIA大鼠的机械痛敏。测量前,将大鼠置于透明有机玻璃箱中,使其适应实验环境15 min,玻璃箱底部为1 cm \times 1 cm的铁丝网。待大鼠处于安静状态时进行测量,利用Von-Frey纤维由下至上垂直刺激大鼠右后肢足底正中光滑皮肤处,刺激时纤维弯曲成S形并维持2~3 s即可。大鼠受到刺激后若出现抬足、舔足等行为视为阳性反应,反之则为阴性反应,每只大鼠测定3次,每次间隔15 s。最后根据公式计算大鼠机械缩足反射阈值(PWT),50%PWT(g)=[10^(Xf-K δ)]/10 000,Xf为能使大鼠出现阳性反应的最小刺激强度,K为痛觉阈矫正系数(可查表获得), δ 为相邻不同纤维刺激之间的差异,即0.224^[8-9]。

2.1.5 冷刺激痛觉超敏检测 通过丙酮刺激检测CIA大鼠的冷刺激痛觉超敏。测量前,将大鼠置于透明有机玻璃箱中,使其适应实验环境15 min,玻璃箱底部为1 cm \times 1 cm的铁丝网,待大鼠处于安静状态时进行测量。测量时,用注射器将0.2 mL的丙酮快速喷射于大鼠右后肢足底正中光滑皮肤处,观察喷射后30 s内大鼠的应激反应,将大鼠对丙酮刺激的反应分为以下4个等级,没有任何反应者为0分;快速缩回、轻弹或轻踩爪子者为1分;长时间缩回或反复挥动受刺激后足者为2分;反复剧烈甩动并舔舐受刺激后足或四处走动者为3分^[10]。

2.1.6 血小板计数及纤维蛋白原的检测 大鼠麻醉后采取腹主动脉取血,迅速收集于抗凝采血管中,立即进行血小板(PLT)计数及纤维蛋白原(FIB)含量检测。

2.1.7 苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠关节组织病理变化 取大鼠膝关节石蜡切片,二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水,利用苏木素液染核,经盐酸乙醇及氨水分化返蓝后,再利用伊红染液进行染色,之后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,最后利用中性树脂封片并置于显微镜下观察关节组织病理变化,并分别从滑膜增生、软骨及骨破坏两个方面进行评分。

2.1.8 免疫组化(IHC)检测大鼠关节中IL-1 β ,IL-8,Ras,Raf-1的表达 取大鼠膝关节石蜡切片,二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水,抗原修复后滴加0.3%过氧化

氢阻断内源性过氧化酶,5%BSA室温封闭1 h,分别滴加 IL-1 β (1: 100), IL-8 (1: 200), Ras (1: 600), Raf-1 (1: 500) 抗体 4 °C 孵育过夜,结合山羊抗兔二抗,DAB显色液显色并在显微镜下控制反应,及时用纯水终止反应,利用苏木素液复染细胞核,盐酸乙醇及氨水分化返蓝,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,用中性树胶封片,置于显微镜下观察 IL-1 β , IL-8, Ras 及 Raf-1 阳性表达情况并进行拍照。

2.1.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠关节中 NF- κ B p65 及 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平

大鼠麻醉、腹主动脉取血后,取大鼠左后肢通过研磨制备关节粉末样品,用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白浓度及蛋白定量,加热法进行蛋白变性,制备 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶上样后进行电泳、转膜、封闭,4 °C 过夜孵育 NF- κ B p65 (1: 500) 及 p-NF- κ B p65 (1: 1 000) 一抗,次日用辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔二抗(1: 5 000)室温孵育 2 h,随后按照增强化学发光(ECL)试剂盒所示方法进行显影,显影结果采用 ImageJ 1.48 软件测量条带灰度值。

2.2 体外实验

2.2.1 transwell 迁移实验检测 RA-FLS 细胞的迁移能力

取对数生长期的 RA-FLS 细胞,消化细胞,用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞,调整细胞浓度,使加入小室中的细胞个数为 5×10^4 个。transwell 小室上室中加入细胞 100 μ L 及不同质量浓度的瘀血痹片 (12.5, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 100 μ L, 下室加入含 15% FBS 的 DMEM 培养基 600 μ L (含/不含终质量浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TNF- α)。迁移 7 h 后,常温固定 20 min, 0.1% 结晶紫 37 °C 水浴染色 20 min, PBS 清洗 3 次,将小室倒置于显微镜上,观察迁移到小室下表面的细胞,每孔随机选取 5 个视野拍照并进行计数。

2.2.2 transwell 侵袭实验检测 RA-FLS 细胞的侵袭能力

提前将 Matrigel 于 4 °C 过夜融化,用 DMEM 培养基 1: 8 稀释,40 μ L/孔包被 transwell 小室底部上表面并置于 37 °C 培养箱中凝胶 2~4 h,备用。Matrigel 包被的 transwell 小室加入用 100 μ L 无血清培养基重悬的细胞 5×10^4 个及 100 μ L 不同质量浓度的瘀血痹片 (12.5, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 下室加入 600 μ L 的含 15% FBS 的 DMEM 培养基 (含/不含终浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TNF- α)。侵袭 12 h 后,常温固定 20 min, 0.1% 结晶紫 37 °C 水浴染色 20 min, PBS

清洗 3 次,将小室倒置于显微镜上,观察迁移到小室下表面的细胞,每孔随机选取 5 个视野拍照并进行计数。

2.2.3 Western blot 检测 TNF- α 诱导的 RA-FLS 细胞中 Ras, Raf-1 及 p-NF- κ B p65 蛋白的表达水平

RA-FLS 细胞接种于六孔板中,加入不同质量浓度的瘀血痹片 (12.5, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 1 h 后,加入终质量浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TNF- α (对照组加入等体积培养基),作用 10 min 后收集细胞,用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白浓度及蛋白定量,加热法进行蛋白变性,制备 10% SDS-PAGE 凝胶上样后进行电泳、转膜、封闭,4 °C 过夜孵育 Ras (1: 1 000), Raf-1 (1: 500) 及 p-NF- κ B p65 (1: 1 000) 一抗,次日用 HRP 标记的兔二抗 (1: 5 000) 室温孵育 2 h,随后按照 ECL 试剂盒所示方法进行显影,显影结果采用 ImageJ 1.48 软件测量条带灰度值。

2.3 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 8.0.1 软件进行统计分析,组间差异用 Ordinary one-way ANOVA 进行分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CIA 大鼠发病率的影响

模型组大鼠在首次免疫后第 12 天开始发病,且发病率高达 70% 左右并持续升高,至给药后第 15 天时达到 100%; 甲氨蝶呤组发病稍晚于模型组,给药后 15 d 发病率仅为 10%, 给药 18 d 后上升至 50%, 此后持续上升至给药后 30 d 达 80%; 瘀血痹片低、中、高剂量组大鼠虽与模型组同时发病,但发病率始终明显低于模型组,给药 30 d 后,各剂量组发病率分别为 85.71%, 57.14%, 57.14%, 表明瘀血痹片各剂量均能延缓 CIA 大鼠关节炎病情的发展,其中尤以高剂量瘀血痹片缓解效果为最佳。见表 1。

3.2 对 CIA 大鼠机械痛敏的影响

与正常组比较,模型组机械痛阈值显著降低 ($P < 0.05$),且随时间延长而下降,说明 CIA 大鼠呈现明显的机械刺激痛敏反应。与模型组比较,给药 9 d 后,瘀血痹片各剂量组大鼠机械痛敏阈值明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 给药后 15 d 和 21 d 后瘀血痹片中、高剂量组均可观察到较模型组显著上升的机械痛敏阈值 ($P < 0.05, P < 0.01$); 给药后 27 d 和 30 d,低、中剂量组对 CIA 大鼠的机械痛敏阈值差异无统计学意义,而高剂量的瘀血痹片明显升高 CIA 大鼠的机械痛敏阈值 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 瘀血痹片对 CIA 大鼠关节炎发病率的影响

Table 1 Effect of Yuxuebi table (YXB) on arthritis incidence of CIA rats

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	发病率%										
			3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	27 d	30 d	
正常		11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
模型		13	0	0	0	69.23	100	100	100	100	100	100	100
甲氨蝶呤	0.000 4	10	0	0	0	0	10	50	50	50	50	50	50
瘀血痹片	0.1	7	0	0	0	28.57	57.14	71.42	71.42	71.42	85.71	85.71	
	0.2	7	0	0	0	28.57	57.14	57.14	57.14	57.14	57.14	57.14	
	0.4	14	0	0	0	7.14	35.71	50	57.14	57.14	57.14	57.14	

表 2 瘀血痹片对 CIA 大鼠机械痛敏阈值的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of YXB on mechanical pain threshold in CIA rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	50% 缩足阈值/g							
			0 d	3 d	9 d	15 d	21 d	27 d	30 d	
正常		11	6.22±1.32	10.36±3.57	9.87±3.69	8.68±3.65	9.99±1.79	7.63±2.90	10.42±0.46	
模型		13	6.14±1.40	6.12±1.88	6.00±6.46 ¹⁾	2.00±0.47 ¹⁾	1.66±0.71 ²⁾	1.97±0.50	1.57±0.39 ²⁾	
甲氨蝶呤	0.000 4	10	9.88±3.27	5.53±2.17	2.14±0.58	5.22±3.27	3.13±0.19	5.17±2.69	3.86±0.80	
瘀血痹片	0.1	7	8.50±0.95	5.67±3.86	9.20±3.96 ³⁾	4.70±1.90	5.91±2.26	7.22±2.73	3.70±1.62	
	0.2	7	7.98±2.80	6.79±3.49	12.28±4.21 ⁴⁾	7.48±5.55 ³⁾	7.41±2.92 ³⁾	6.53±3.38	4.84±2.08	
	0.4	14	10.13±2.97	6.35±2.83	12.09±6.67 ⁴⁾	7.69±3.72 ³⁾	12.50±3.20 ⁴⁾	8.26±5.37 ³⁾	7.41±3.69 ³⁾	

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 3~5,8,9 同)。

3.3 对 CIA 大鼠冷刺激痛觉超敏的影响 与正常组比较,模型组大鼠冷刺激痛敏反应评分在给药 6 d 后显著升高(P<0.01)。经瘀血痹片干预后,各剂量组评分开始下降;与模型组比较,给药 12 d 后,与模型组比较,瘀血痹片高剂量明显降低 CIA 大鼠冷刺

激痛敏反应评分(P<0.05);给药 18 d 和 24 d 后,瘀血痹片中、高剂量组均明显降低冷刺激痛敏反应评分(P<0.05, P<0.01);给药 30 d 后,瘀血痹片高剂量组对反应评分仍有明显的降低作用(P<0.05)。见表 3。

表 3 瘀血痹片对 CIA 大鼠冷刺激痛敏反应的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of YXB on cold stimulation-induced hyperalgesia in CIA rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	冷刺激痛敏反应评分/分					
			0 d	6 d	12 d	18 d	24 d	30 d
正常		11	1.04±0.30	1.22±0.70	1.36±0.72	0.90±0.41	0.53±0.34	0.58±0.28
模型		13	1.08±0.37	2.37±0.48 ²⁾	2.38±0.60 ²⁾	2.57±0.48 ²⁾	2.46±0.62 ²⁾	2.00±0.25 ²⁾
甲氨蝶呤	0.000 4	10	1.20±0.31	1.53±0.87 ³⁾	1.24±0.75 ⁴⁾	1.67±0.67 ³⁾	1.37±0.80 ⁴⁾	1.25±0.49
瘀血痹片	0.1	7	1.43±0.34	1.33±0.62	1.38±0.49 ³⁾	1.67±0.47	1.44±0.42 ³⁾	1.40±0.50
	0.2	7	1.10±0.39	0.89±0.60 ⁴⁾	1.57±0.43	1.62±0.58 ³⁾	1.38±0.90 ⁴⁾	1.38±0.92
	0.4	14	1.21±0.35	1.61±0.66	1.52±0.61 ³⁾	1.64±0.50 ⁴⁾	1.21±0.92 ⁴⁾	0.81±1.01 ³⁾

3.4 对 CIA 大鼠血小板计数和纤维蛋白原的影响

与正常组比较,CIA 模型组大鼠血液中 PLT 计数及 FIB 含量均显著升高(P<0.01);与模型组比较,给予不同剂量的瘀血痹片干预后,PLT 计数及 FIB 含量均有下降,其中瘀血痹片高剂量组可明显降低异常升高的 PLT 和 FIB(P<0.05, P<0.01);甲氨蝶呤组

组的 PLT 和 FIB 差异无统计学意义。见表 4。

3.5 对 CIA 大鼠关节组织病理的影响 与正常组

比较,模型组滑膜增生、骨及软骨破坏评分均显著升高(P<0.01);与模型组比较,瘀血痹片低剂量组滑膜增生、软骨及骨破坏评分有所降低,但差异无统计学意义;瘀血痹片中、高剂量组明显抑制滑膜增

表 4 瘀血痹片对 CIA 大鼠血小板计数及纤维蛋白原含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of YXB on platelet count and fibrinogen content in CIA rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	FIB/g·L ⁻¹	PLT/×10 ⁹ 个/L
正常		10	2.23±0.26	1 114.56±89.95
模型		10	3.21±0.39 ²⁾	1 529.00±287.59 ²⁾
甲氨蝶呤	0.000 4	9	3.09±0.38	1 498.86±231.78
瘀血痹片	0.1	7	2.97±0.45	1 247.33±94.22
	0.2	5	3.02±0.21	1 253.80±168.74
	0.4	13	2.39±0.30 ⁴⁾	1 178.43±82.12 ³⁾

生的同时也能降低软骨及骨破坏程度 ($P<0.05$, $P<0.01$); 甲氨蝶呤组病理评分显著降低 ($P<0.01$)。见表 5。

表 5 瘀血痹片对 CIA 大鼠组织病理学半定量积分的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of YXB on pathological semi-quantitative score in CIA rats ($\bar{x}\pm s$)

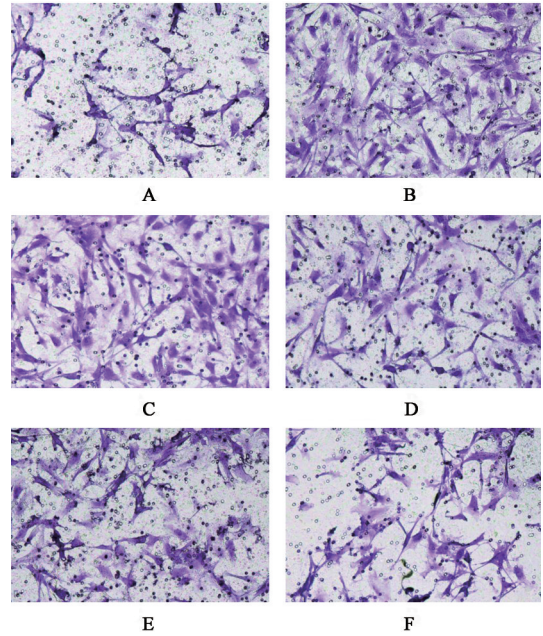
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	滑膜增生	骨及软骨破坏
正常		11	0	0
模型		13	2.70±0.45 ²⁾	2.50±0.50 ²⁾
甲氨蝶呤	0.000 4	10	1.20±0.87 ⁴⁾	1.10±1.04 ⁴⁾
瘀血痹片	0.1	7	2.20±0.87	2.10±0.83
	0.2	7	1.80±0.98 ³⁾	1.60±0.66 ³⁾
	0.4	14	1.44±0.61 ⁴⁾	1.31±0.58 ⁴⁾

3.6 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 细胞迁移和侵袭能力的影响

3.6.1 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 细胞迁移能力的影响 与正常组比较, TNF- α 组 RA-FLS 细胞迁移至下室的细胞数目显著增多 ($P<0.01$); 与 TNF- α 组比较, 瘀血痹片 12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹ 组细胞迁移数目均显著减少 ($P<0.01$), 其中瘀血痹片 100 mg·L⁻¹ 组细胞的迁移数目接近正常组。见图 1, 表 6。

3.6.2 对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 细胞侵袭能力的影响 与正常组比较, TNF- α 组诱导迁移至下室的 RA-FLS 细胞数目显著增多 ($P<0.01$), 表明 TNF- α 诱导可显著增强 RA-FLS 细胞的侵袭能力。与 TNF- α 组比较, 瘀血痹片 12.5 mg·L⁻¹ 组对 RA-FLS 细胞的侵袭能力差异无统计学意义; 瘀血痹片 25, 50, 100 mg·L⁻¹ 组侵袭细胞数目均显著减少 ($P<0.01$)。见图 2, 表 7。

3.7 对 CIA 大鼠关节中 IL-1 β 和 IL-8 表达水平的影响 与正常组比较, 模型组 IL-1 β 和 IL-8 的表达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 瘀血痹片中、高剂



A. 正常组; B. TNF- α 组; C. 瘀血痹片 12.5 mg·L⁻¹ 组; D. 瘀血痹片 25 mg·L⁻¹ 组; E. 瘀血痹片 50 mg·L⁻¹ 组; F. 瘀血痹片 100 mg·L⁻¹ 组 (图 2, 8 同)

图 1 瘀血痹片对 TNF- α 诱导 RA-FLS 细胞迁移能力的影响 (结晶紫, ×200)

Fig. 1 Effect of YXB on migration of RA-FLS cell induced by TNF- α (crystal violet, ×200)

表 6 瘀血痹片对 TNF- α 诱导 RA-FLS 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Table 6 Effect of YXB on migration of RA-FLS cell induced by TNF- α ($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞迁移数目/个
正常		60.00±2.68
TNF- α		150.60±8.48 ²⁾
瘀血痹片	12.5	131.40±9.16 ⁴⁾
	25	103.40±6.68 ⁴⁾
	50	92.80±5.42 ⁴⁾
	100	78.40±6.15 ⁴⁾

注: 与正常组比较 ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 TNF- α 组比较 ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表 7, 10 同)。

量组可显著降低 CIA 大鼠关节组织中 IL-1 β 和 IL-8 的表达 ($P<0.01$), 其中瘀血痹片高剂量组与正常组相近; 甲氨蝶呤组可显著降低 IL-8 的表达 ($P<0.01$)。见图 3, 4, 表 8。

3.8 对 CIA 大鼠关节组织中 Ras/Raf-1/NF- κ B 蛋白表达的影响 免疫组化检测结果显示, 与正常组比较, 模型组 Ras 及 Raf-1 的表达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 瘀血痹片中、高剂量组均可降低关节组织滑膜中 Ras, Raf-1 的表达 ($P<0.01$); 甲氨蝶

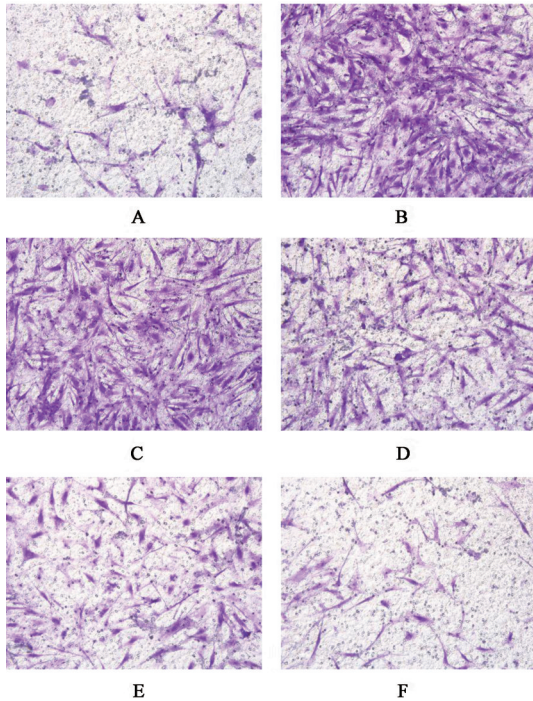


图2 瘀血痹片对TNF- α 诱导RA-FLS细胞侵袭能力的影响(结晶紫, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of YXB on invasion of RA-FLS cell induced by TNF- α (crystal violet, $\times 200$)

表7 瘀血痹片对TNF- α 诱导RA-FLS细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 7 Effect of YXB on invasion of RA-FLS cell induced by TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞侵袭数目/个
正常		79.75 \pm 3.49
TNF- α		118.60 \pm 6.15 ²⁾
瘀血痹片	12.5	112.00 \pm 3.85
	25	103.80 \pm 4.75 ⁴⁾
	50	90.60 \pm 4.72 ⁴⁾
	100	76.60 \pm 4.63 ⁴⁾

呤组能显著降低 Ras 及 Raf-1 的表达 ($P < 0.01$)。见图 5, 6, 表 9。Western blot 结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠关节组织中 NF- κ B p65 和 p-NF- κ B p65 蛋白的表达显著升高 ($P < 0.01$); 经瘀血痹片低、中剂量干预后 NF- κ B p65 及 p-NF- κ B p65 蛋白表达差异无统计学意义, 而瘀血痹片高剂量可明显抑制 NF- κ B p65 及 p-NF- κ B p65 蛋白的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 甲氨蝶呤组也可显著抑制 p-NF- κ B p65 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 但对 NF- κ B p65 作用差异无统计学意义。见图 7, 表 9。

3.9 对 TNF- α 诱导 RA-FLS 细胞中 Ras/Raf-1/NF- κ B 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组

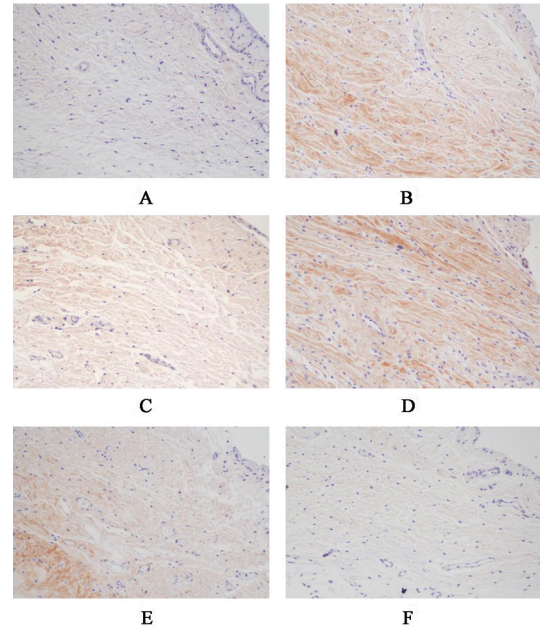


图3 瘀血痹片对CIA大鼠关节组织中IL-1 β 表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of YXB on expression of IL-1 β in CIA rats (IHC, $\times 200$)

表7 瘀血痹片对TNF- α 诱导RA-FLS细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

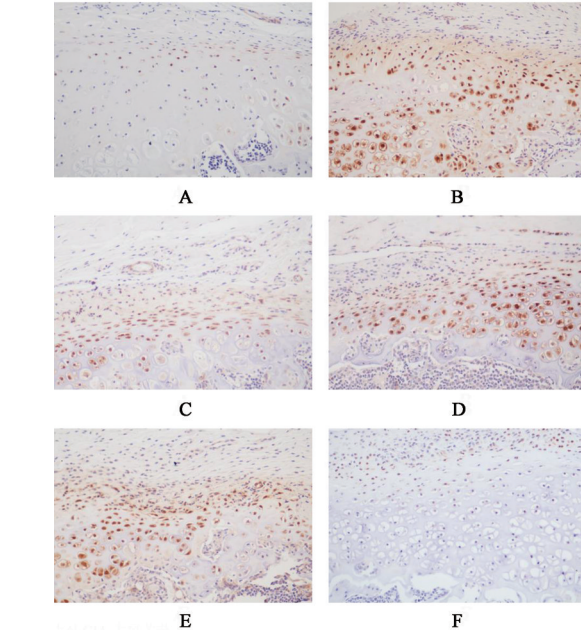


图4 瘀血痹片对CIA大鼠关节组织中IL-8表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of YXB on expression of IL-8 in CIA rats (IHC, $\times 200$)

Ras, Raf-1 和 p-NF- κ B p65 的表达显著升高 ($P < 0.01$), 表明 TNF- α 诱导可显著激活 RA-FLS 中 Ras/Raf-1/NF- κ B 等蛋白的表达; 与模型组比较, 瘀血痹片低剂量组对 Ra, Raf-1 及 p-NF- κ B p65 的表达差异

表 8 瘀血痹片对 CIA 大鼠关节组织中 IL-8 及 IL-1 β 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of YXB on expression of IL-8 and IL-1 β in CIA rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-8	IL-1 β
正常		1.88±0.26	4.61±0.63
模型		15.82±0.24 ²⁾	21.90±0.91 ²⁾
甲氨蝶呤	0.000 4	6.87±0.35 ⁴⁾	17.21±1.21
瘀血痹片	0.1	15.26±0.41 ³⁾	20.94±0.09
	0.2	5.54±0.36 ⁴⁾	13.58±0.97 ⁴⁾
	0.4	2.02±0.10 ⁴⁾	4.71±0.52 ⁴⁾

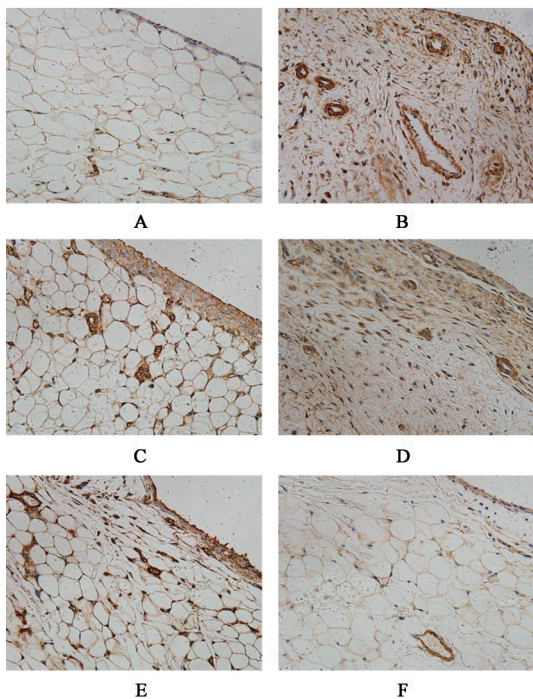


图 5 瘀血痹片对 CIA 大鼠关节组织中 Ras 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of YXB on expression of ras in CIA rats (IHC, ×400)

无统计学意义,而中、高剂量组显著降低 Ras 和 Raf-1

表 9 瘀血痹片对 CIA 大鼠关节组织中 Ras, Raf-1, NF- κ B p65 及 p-NF- κ B p65 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of YXB on expression of Ras, Raf-1, NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 in CIA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ras	Raf-1	p-NF- κ B p65/GAPDH	NF- κ B p65/GAPDH
正常		4.24±0.57	4.65±0.72	1.00±0.05	1.00±0.03
模型		24.27±0.40 ²⁾	25.64±0.52 ²⁾	4.00±0.51 ²⁾	6.15±2.52 ²⁾
甲氨蝶呤	0.000 4	15.98±0.42 ⁴⁾	5.38±0.85 ⁴⁾	2.51±0.12 ⁴⁾	4.19±1.67
瘀血痹片	0.1	22.31±0.61 ⁴⁾	24.13±0.41 ⁴⁾	3.92±0.97	6.16±3.54
	0.2	16.81±0.56 ⁴⁾	15.82±0.80 ⁴⁾	3.75±0.09	5.60±2.06
	0.4	4.16±0.26 ⁴⁾	5.06±0.41 ⁴⁾	0.92±0.24 ⁴⁾	2.04±0.82 ³⁾

4 讨论

本研究所选择的 CIA 模型是目前较为公认的

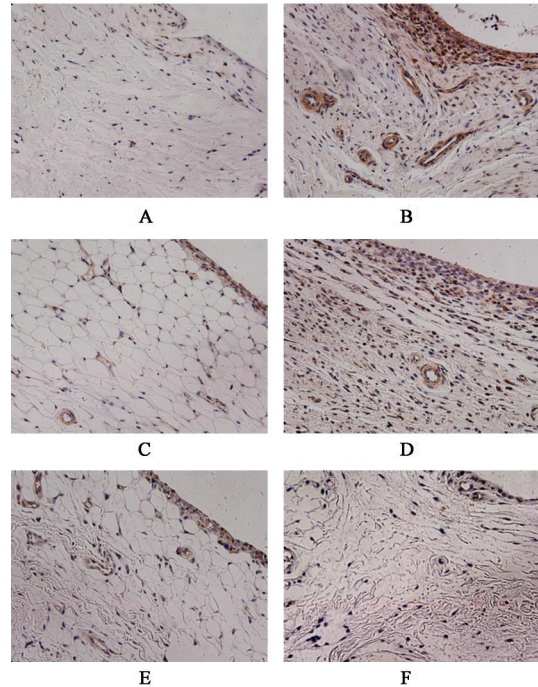


图 6 瘀血痹片对 CIA 大鼠关节组织中 Raf-1 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 6 Effect of YXB on expression of Raf-1 in CIA rats (IHC, ×400)

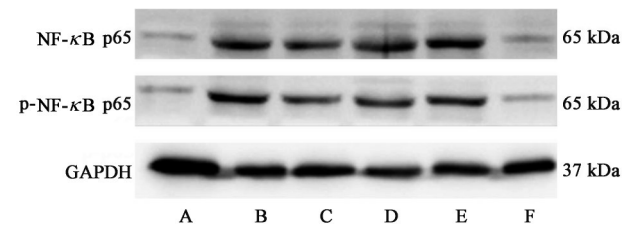


图 7 各组大鼠关节组织中 NF- κ B p65 及 p-NF- κ B p65 表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of NF- κ B p65 and p-NF- κ B p65 expression in each group rats

的表达 ($P<0.01$), 差异有显著统计学意义, 高剂量组 p-NF- κ B p65 的表达 ($P<0.01$), 差异有显著统计学意义。见图 8, 表 10。

研究 RA 的理想模型, 在临床症状、组织病理学改变、细胞免疫及体液免疫变化等方面均与临床的

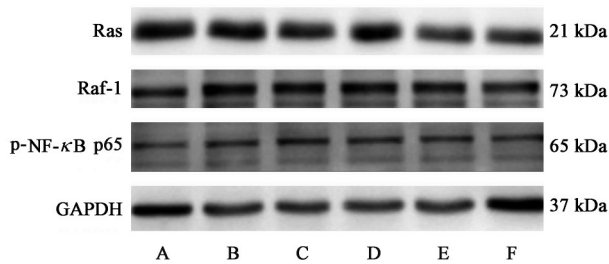


图 8 各组 RA-FLS 中 Ras/Raf-1/NF-κB 相关蛋白表达电泳
Fig. 8 Electrophoresis of Ras/Raf-1/NF-κB expression in each groups RA-FLS

RA 患者极为相似^[11-12],且成模快捷有效,因此广泛应用于 RA 发病机制及其治疗手段等方面的研究^[13-16]。本研究通过此模型开展研究,主要是为了

评价瘀血痹片口服对 RA 发生发展的影响,并针对滑膜炎探索初步的作用机制。由于 TNF-α 等炎症因子的刺激会提高 RA-FLS 的迁移及侵袭能力^[17],而 RA-FLS 过度活化的迁移和侵袭能力是 RA 滑膜增生和侵袭性血管翳形成的基础,在 RA 软骨和骨质破坏中起着至关重要的作用^[18],因此本研究除了整体动物实验外,尚增加了体外的 RA 患者成纤维样滑膜细胞的相关研究。另外,由于甲氨蝶呤目前是 RA 治疗的一线药物以及病情改善的锚定药,对 RA 炎症及骨破坏等方面具有明确的药效^[19-20],因此本实验选择甲氨蝶呤作为阳性对照药,与临床等效剂量的瘀血痹片同步对比观察。

表 10 瘀血痹片对 TNF-α 诱导 RA-FLS 中 Ras/Raf-1/NF-κB 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of YXB on expression of Ras/Raf-1/NF-κB in RA-FLS induced by TNF-α ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Ras/GAPDH	Raf-1/GAPDH	p-NF-κB p65/GAPDH
正常		1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
TNF-α		1.17±0.01 ²⁾	1.60±0.01 ²⁾	1.27±0.01 ²⁾
瘀血痹片	12.5	1.12±0.01 ⁴⁾	1.69±0.01 ⁴⁾	1.73±0.01
	25	1.16±0.01	1.73±0.01	1.47±0.01
	50	0.94±0.01 ⁴⁾	1.47±0.01 ⁴⁾	1.46±0.01
	100	0.59±0.01 ⁴⁾	0.80±0.01 ⁴⁾	1.00±0.01 ⁴⁾

研究结果显示,与正常组大鼠比较,用胶原诱导后的大鼠出现关节红肿、变形,15 d 时发病率达到 100%,组织病理学也可观察到大鼠的炎性关节有滑膜增生、关节软骨侵蚀、骨破坏等异常改变,提示了大鼠 CIA 模型复制成功。灌胃给予瘀血痹片后,可观察到给药组大鼠的关节炎评分降低,组织病理改变减轻,高剂量的效果与甲氨蝶呤给药组效果相近,提示了较高剂量的瘀血痹片在对 RA 发病及病情改善方面能达到 RA 临床锚定药的水平。

已知关节疼痛是 RA 病程中的突出特征,部分 RA 患者在关节红肿等症状缓解后,疼痛仍是影响其功能恢复及生活质量的主要因素。临床上 RA 患者炎性疼痛常常表现为无意识的持续性疼痛、关节触碰或活动触发引起的机械性刺激疼痛^[21],甚至部分患者存在神经病理性疼痛。针对以上临床特点,本实验采用 Von-Frey 纤维丝机械刺激和丙酮冷刺激的方法对实验动物不同时间点的机械痛阈值和冷刺激反应评分进行测量,发现瘀血痹片在改善 CIA 大鼠关节红、肿症状的同时也能显著缓解炎症刺激所引起的疼痛。实验观察到瘀血痹片 3 个剂量均能不同程度地升高 CIA 大鼠的机械痛敏阈值,抑

制冷刺激痛敏反应,且作用更稳定而持续。相比之下,甲氨蝶呤的镇痛作用要更弱,对于 CIA 的纤维丝机械刺激,甲氨蝶呤几乎没有作用,其对丙酮冷刺激反应虽有一定抑制作用,但药效持续时间短,不及瘀血痹片。由于 RA 属中医“痹证”范畴,血瘀作为“痹证”的主要病理产物,表现为血循环障碍及凝血纤溶系统平衡失调等,因此 PLT 计数和纤维蛋白原常常作为痹证治疗药物活血化瘀功效评估的观察指标^[22]。本研究对 CIA 大鼠血液中的 PLT 计数和 FIB 含量进行检测,发现瘀血痹片能显著抑制由胶原诱导后异常升高的 PLT 计数和 FIB 含量,且作用效果明显优于甲氨蝶呤。

研究发现,促炎因子如 TNF-α, IL-1β 和 IL-8 等在 RA 的发生发展中起关键作用,其能通过改变细胞内的信号传导途径,引起磷酸化酶联反应,降低伤害神经元的动作电位阈值,最终导致疼痛敏感性增强^[23-24]。此外,IL-1β 和 IL-8 等炎症因子具有激活血小板,影响其黏附、聚集及释放等功能的作用^[25]。雒宏等^[26]证实 RA 患者血小板中 IL-1β 的表达水平显著升高,并且两者呈正相关。本研究观察到瘀血痹片能剂量依赖性的降低 CIA 大鼠关节组织中 IL-

IL-1 β , IL-8的表达,体外细胞实验也证实瘀血痹片显著抑制TNF- α 诱导体外RA-FLS的迁移和侵袭,提示了瘀血痹片对炎症细胞因子的抑制作用可能是其缓解CIA大鼠炎症反应和疼痛等症状的原因之一。

Ras/Raf-1作为介导炎症反应、促进炎症因子产生的关键通路,参与了RA滑膜细胞的活化和关节的破坏。研究发现,Ras在RA患者的滑膜组织及体外培养的RA-FLS细胞中均高表达,而沉默其表达能显著缓解CIA炎症反应和关节破坏的同时,也能降低IL-1 β 及IL-8的表达^[27-28]。此外,Ras的过度活化会激活Raf,而Raf-1激酶的升高也与RA患者关节滑膜增生、骨质破坏等病理改变呈正相关^[29]。WILLIAMS等^[30]研究证实Ras/Raf-1信号通路的激活会诱导下游通路NF- κ B的激活,而NF- κ B被激活后又可引发下游炎症反应因子如IL-1 β ,IL-8等表达增加,进而导致滑膜增生,加重关节的破坏^[31];故抑制NF- κ B的激活可诱导滑膜细胞凋亡及抑制滑膜血管新生,达到预防RA关节破坏的作用^[32]。为进一步探索瘀血痹片抑制大鼠CIA的炎症机制,本研究采用IHC和Western blot对炎症关节组织以及体外滑膜细胞中的Ras/Raf-1/NF- κ B信号分子的表达水平进行了检测。结果表明,瘀血痹片不仅能够剂量依赖性的抑制CIA大鼠关节组织中Ras,Raf-1,降低NF- κ B p65及p-NF- κ B p65蛋白的表达,同时也能有效降低RA-FLS细胞中Ras,Raf-1及p-NF- κ B p65等蛋白表达水平,提示了瘀血痹片对前述炎症因子产生的抑制作用可能与Ras/Raf-1/NF- κ B通路的负调节有关,确切机制有待后续进一步的探索。

综上,本研究通过CIA大鼠整体模型和体外滑膜细胞证明了瘀血痹片对实验性RA的抑制作用并揭示了初步抗炎机制。由研究结果可知,瘀血痹片能明显降低大鼠CIA发病率,改善CIA的关节炎临床症状,延缓病情发展,抑制滑膜增生并降低关节组织病理学严重度;瘀血痹片对Ras/Raf-1/NF- κ B信号通路的调控以及对IL-1 β 和IL-8等炎症因子的抑制在抗RA炎症的过程中发挥了重要的作用。相关研究结果有利于解析瘀血痹片活血化瘀、通络定痛的功效科学内涵,并指导临床合理用药。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SIMON L S, TAYLOR P C, CHOY E H, et al. The Jak/STAT pathway: a focus on pain in rheumatoid arthritis

[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2021, 51(1):278-284.

- [2] 韩润霞,杨晶,张天生,等. 类风湿性关节炎临床药物应用概况[J]. *山西中医学院学报*, 2012, 13(1): 67-69.
- [3] 覃剑,程维,罗锴,等. 瘀血痹片治疗血瘀型膝关节炎疗效观察[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(8): 1570-1572.
- [4] 方志远,李华,柏立群,等. 瘀血痹片联合甲氨蝶呤治疗对类风湿性关节炎患者Lysholm、VAS和ADL评分及血清IL-1、TNF- α 、ICMAM-1水平影响[J]. *中国药师*, 2019, 22(11):2062-2065.
- [5] 高敏,陈丽,李特,等. 瘀血痹片治疗类风湿关节炎临床观察[J]. *现代诊断与治疗*, 2015, 26(3):678-679.
- [6] 李汝卓,潘韬文,李斌,等. 瘀血痹片抗炎镇痛药效作用研究[J]. *吉林医药学院学报*, 2020, 41(4): 268-270.
- [7] ZHANG Q, PENG W, WEI S J, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction possesses anti-arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats via suppression of inflammatory reactions, inhibition of invasion & migration and induction of apoptosis in synovial fibroblasts [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109367.
- [8] BIBER K, TSUDA M, TOZAKI-SAITOH H, et al. Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development [J]. *EMBO J*, 2011, 30(9):1864-1873.
- [9] YALCIN I, BOHREN Y, WALTISPERGER E, et al. A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain [J]. *Biol Psychiatry*, 2011, 70(10):946-953.
- [10] LI D, LEE J H, CHOI C W, et al. The analgesic effect of venlafaxine and its mechanism on oxaliplatin-induced neuropathic pain in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7):1652-1664.
- [11] 潘磊,杜文喜,卢建华. 胶原诱导性和佐剂性大鼠关节炎模型比较[J]. *山西中医学院学报*, 2013, 14(4):12-14.
- [12] 于坤,徐枝芳,余楠楠,等. 佐剂性和胶原诱导性关节炎模型比较分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(1):106-109.
- [13] 冯振宇,马小娟,王虹娟,等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(20):96-101.
- [14] 刘春芳,何莲花,王靖霞,等. 风湿祛痛胶囊对类风湿关节炎滑膜Akt和MAPK信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(13):35-40.
- [15] 王靖霞,刘春芳,李逸群,等. 雷公藤多苷片抑制实验

- 性类风湿关节炎血管新生的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3441-3447.
- [16] 刘立玲, 田雅格, 苏晓慧, 等. 雷公藤多苷片和雷公藤片对CIA模型大鼠干预的量毒效比较研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3502-3511.
- [17] BARTOK B, FIRESTEIN G S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.
- [18] XING R, JIN Y, SUN L, et al. Interleukin-21 induces migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 184(2): 147-158.
- [19] 蔡萧君, 李宇, 胡杨, 等. 基于血液代谢组学技术的甲氨蝶呤抗类风湿性关节炎作用机制研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 242-248.
- [20] 赵文志. 艾拉莫德联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎患者的疗效及安全性分析[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(4): 617-619.
- [21] ZHANG A, LEE Y C. Mechanisms for joint pain in rheumatoid arthritis (RA): from cytokines to central sensitization [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2018, 16(5): 603-610.
- [22] 罗亚敏, 任小巧, 宋慧荣, 等. 藏药如意珍宝丸对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(6): 757-759.
- [23] ZHANG Y, REN G, GUO M, et al. Synergistic effects of interleukin-1beta and interleukin-17A antibodies on collagen-induced arthritis mouse model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(2): 199-205.
- [24] 许冰馨, 范凯健, 王婷玉. 类风湿关节炎疼痛机制的研究进展[J]. 中南药学, 2020, 18(9): 1513-1516.
- [25] 吴彩凤. 差异基因白介素-8在冠心病血瘀证发病过程中的作用研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [26] 雒宏, 陈雁飞. 类风湿关节炎患者白细胞介素 1β 与血小板活化的关系[J]. 临床荟萃, 2015, 30(8): 903-905.
- [27] HUBER L C, DISTLER O, TARNER I, et al. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(6): 669-675.
- [28] DE LAUNAY D, VREIJLING J, HARTKAMP L M, et al. Silencing the expression of Ras family GTPase homologues decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(6): 3010-3024.
- [29] AHN J K, HWANG J W, BAE E K, et al. The role of Raf kinase inhibitor protein in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes invasiveness and cytokine and matrix metalloproteinase expression [J]. *Inflammation*, 2012, 35(2): 474-483.
- [30] WILLIAMS R, ZOU X, HOYLE G W. Tachykinin-1 receptor stimulates proinflammatory gene expression in lung epithelial cells through activation of NF-kappaB via a G(q)-dependent pathway [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292(2): 430-437.
- [31] 刘婧, 黄征, 张根红. 针刺调控NF- κ B信号通路改善类风湿关节炎患者的症状及其机制研究[J]. 针刺研究, 2020, 45(11): 914-919.
- [32] XIA Z B, MENG F R, FANG Y X, et al. Inhibition of NF-kappaB signaling pathway induces apoptosis and suppresses proliferation and angiogenesis of human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(23): e10920.

[责任编辑 周冰冰]