

[药 理]

# 寒痹方对佐剂型关节炎大鼠的治疗作用

张世玲<sup>1</sup>, 张世梅<sup>2</sup>, 李 娟<sup>1</sup>, 卢 军<sup>1</sup>, 照日格图<sup>3</sup>, 程路峰<sup>4\*</sup>  
(1. 新疆医科大学附属中医医院药学部, 新疆 乌鲁木齐 830002; 2. 伊犁州友谊医院药剂科, 新疆 伊犁 835000; 3. 新疆医科大学附属中医医院风湿科, 新疆 乌鲁木齐 830002; 4. 新疆医科大学基础医学院药理学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** **目的** 研究寒痹方(黄芪、制川乌、全蝎、蜈蚣、地龙)对佐剂型类风湿性关节炎(RA)大鼠的治疗作用,并探讨其机制。**方法** 建立佐剂型大鼠 RA 模型后,大鼠分为正常组,模型组,地塞米松阳性组,宝光风湿液(羌活、独活、川芎等)阳性组,寒痹方低,高剂量组,测量大鼠足跖容积和肿胀度。ELISA 法检测血清白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ );四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定淋巴细胞的增殖能力;HE 染色检查关节滑膜组织病理学变化;免疫组化法检测滑膜组织中白介素-17 (IL-17)和 TNF- $\alpha$  的表达。**结果** 寒痹方可显著缓解 RA 大鼠的足跖肿胀。与模型组相比,寒痹方可显著缓解 RA 大鼠的滑膜腔炎症,下调血清及滑膜组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达,抑制淋巴细胞增殖。以上指标在低、高剂量寒痹方组之间无统计学差异,寒痹方整体效果与宝光风湿液相当,但不及地塞米松。**结论** 寒痹方具有较强的抗 RA 作用,其机制可能与抑制淋巴细胞增殖以及降低炎性细胞因子的分泌有关。

**关键词:** 寒痹方; 佐剂型关节炎; 白介素-1 $\beta$ ; 肿瘤坏死因子- $\alpha$   
**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0445-06  
**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.001

## Therapeutic effects of Hanbi Formula on adjuvant-induced arthritis rats

ZHANG Shi-ling<sup>1</sup>, ZHANG Shi-mei<sup>2</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, LU Jun<sup>1</sup>, Zhao-ri-ge-tu<sup>3</sup>, CHENG Lu-feng<sup>4\*</sup>  
(1. Department of Pharmacy, Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China; 2. Department of Pharmacy, Yili Friendship Hospital, Yili 835000, China; 3. Department of Rheumatism, Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China; 4. Department of Pharmacology, School of Preclinical Medicine of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To research the therapeutic effects of Hanbi Formula (*Astragali Radix*, *Aconiti Radix cocta*, *Scorpio*, *Scolopendrap* and *Pheretima*) on adjuvant-induced arthritis rats (RA) and its mechanism of action. **METHODS** RA rat models were established by using Freund's adjuvant, and then the rats were divided into six groups, namely control group, model group, dexamethasone positive group, Baoguang Fengshi Liquid (*Notopterygii Rhizoma et Radix*, *Radix angelicae pubescentis*, *Chuanxiong Rhizoma*, etc.) positive group, and low, high doses of Hanbi Formula groups. The volume and swelling of toes were measured. The interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) of serum were detected by ELISA; the proliferative capacity of lymphocytes was tested by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method; synovial tissue was histopathologically examined with HE staining. Finally, the expressions of interleukin-17 (IL-17) and TNF- $\alpha$  in synovial tissue were determined by immunohistochemical assays. **RESULTS** Hanbi Formula could significantly relieve toe swelling of RA rats. Compared with the model group, Hanbi Formula could significantly alleviate synovitis in rats with RA, down-regulate the expressins of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum and synovial tissue, and inhibit lymphocyte proliferation. There were no significant differences in above indices between low-dose and high-dose Hanbi Formula groups, which was quite with

收稿日期: 2016-10-24  
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360491)  
作者简介: 张世玲(1985—),女(回族),硕士,从事医院药学相关研究。E-mail: zsl0709@163.net  
\* 通信作者: 程路峰(1975—),男,教授,从事心血管和免疫药理学相关研究。Tel: 13899847273, E-mail: lewis\_clf@163.com

Baoguang Fengshi Liquid, but less than dexamethasone. **CONCLUSION** Hanbi Formula possesses an obvious function of anti-RA, and its mechanism may be related to the inhibition of lymphocyte proliferation and reducing secretion of inflammatory cytokines.

**KEY WORDS:** Hanbi Formula; adjuvant arthritis; interleukin- $1\beta$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一类以慢性炎性、对称性和系统性为表现的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。RA 的病因和机制尚不清楚, 目前也还没有根治的方法<sup>[2]</sup>, 临床多使用大剂量非甾体抗炎药对症治疗<sup>[3]</sup>, 但不良反应较多, 严重的胃肠反应更是给 RA 的治疗带来诸多困扰<sup>[4]</sup>。RA 在中医理论中属“痹证”范畴, 中医治疗多以益气养血、散寒除湿、祛风止痛为主。实践表明, 中药复方的多途径、多环节、多靶点作用能够发挥更好的调节 RA 的作用, 显著改善患者的生存质量<sup>[5-6]</sup>。寒痹方是一种有效的抗寒中医药方, 具有中医理论的抗“痹证”作用<sup>[7]</sup>, 故本研究建立佐剂型 RA 大鼠模型, 探究其抗 RA 作用, 为相关研究提供有效的实验依据。

## 1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF 级昆明小鼠 20 只, 雌雄各半, 体质量 18 ~ 22 g, 购于新疆维吾尔自治区实验动物研究中心 (许可证号 SCXK [新] 2011-0003)。雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体质量 (160  $\pm$  20) g, 购自新疆医科大学动物中心 (AAALAC 认证, 许可证号 65000700000087)。

1.2 主要试剂 卡介苗 (北京生物制品研究所, 批号 20150504); 液体石蜡 (天津市北辰方正试剂厂, 批号 20151218); Freund's 完全佐剂是卡介苗和液体石蜡按 10 mg : 1 mL 的比例配制而成。刀豆蛋白 ConA (Sigma 公司, 批号 052K684); 脂多糖 (Sigma 公司, 批号 637A061); 宝光风湿液 (羌活、独活、川芎、红花、鹿角胶、鳖甲胶, 四川宝光药业股份有限公司, 批号 060801); 醋酸地塞米松片 (天津药业集团新郑股份有限公司, 批号 110720); 大鼠淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物制品科技有限责任公司, 批号 20151014); IL- $1\beta$ 、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (Bender MedSystem 公司); 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 兔抗鼠 IL-17 抗体 (一抗)、兔抗鼠 TNF- $\alpha$  抗体 (一抗)、兔二步法检测试剂盒 (二抗) (北京博奥森生物公司)。

## 2 方法

2.1 寒痹方浸膏的制备 取等量黄芪、制川乌、

全蝎、蜈蚣、地龙药材, 粉碎后加 10 倍的水浸泡 12 h, 煎煮 60 min, 纱布过滤后加入 8 倍水, 煎煮 30 min 后合并滤液, 浸膏得率为 24.25%。寒痹方临床拟用量为 124.5 g 生药, 采用水提取法提取浸膏, 1 g 浸膏相当于 4.12 g 生药。

2.2 佐剂型 RA 模型的建立 取 60 只 Wistar 大鼠, 随机取出 10 只作为正常组, 其余大鼠建立佐剂型 RA 模型<sup>[8]</sup>。操作简述如下: 致炎前以容积法测量大鼠左、右后足跖容积。除正常组外, 各大鼠于左后足跖腱膜下注射 Freund's 完全佐剂, 注射体积为 0.1 mL/只。致炎 7 d 后, 测定足跖容积, 根据足跖肿胀程度不同随机分为 5 组, 即为模型组, 地塞米松组, 宝光风湿液组和寒痹方低、高剂量组, 其中寒痹方低剂量组给药量为 1.0 g/kg 寒痹方浸液 (相当于人体给药量的 1/30), 寒痹方高剂量组给药量为 2.0 g/kg 寒痹方浸液 (相当于人体给药量的 1/15)。

2.3 寒痹方对大鼠足跖容积及足跖肿胀度的影响

RA 大鼠模型建立成功以后, 给药组每天灌胃相应药物, 正常组和模型组给予等量的生理盐水, 每天 1 次, 连续 35 d。隔天测量每组大鼠左后足跖容积并计算足跖肿胀度, 计算公式为肿胀度 = 致炎后足跖容积 - 致炎前足跖容积。

2.4 ELISA 法测定血清中的 IL- $1\beta$  和 TNF- $\alpha$  实验结束后, 收集大鼠血液, 离心得到血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作测定 IL- $1\beta$  和 TNF- $\alpha$ 。

2.5 MTT 法检测淋巴细胞增殖 无菌取出脾脏, 制备脾细胞悬液, 将细胞调整至  $5 \times 10^5$  /mL, 每孔加入 100 mL 细胞到 96 孔板中, ConA、LPS、正常对照及给药大鼠各 5 个复孔, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 48 h。每孔加入 100 mL MTT 液, 然后孵育 2 h, 最后于酶标仪 450、650 nm (参考波长) 处进行双波长测定。

2.6 大鼠关节滑膜组织形态学观察 实验结束后, 取实验大鼠左后肢, 10% 甲醛溶液中固定标本 48 h, 脱钙处理, 脱钙后洗涤, 过夜, 然后乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 修样, 常规切片, 然后烤片 12 h, 最后用苏木素-伊红 (HE) 染色并封片。参考文献 [9] 进行关节滑膜评分。

2.7 免疫组化法检测滑膜组织中 IL-17 和 TNF-α

采用 SP 免疫组化法，以细胞质中出现淡黄至褐黄色颗粒状着色者为阳性细胞。每张切片随机选取 5 个视野（×200）计算阳性细胞数，并对染色强度进行评价，标准为阳性细胞数≤10% 为 0 分，11%～30% 为 1 分，31%～50% 为 2 分，51%～70% 为 3 分，71% 以上为 4 分。按阳性细胞的着色强度计分，与背景一致的浅黄色或无着色为 0 分，浅棕黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分，最后进行统计定量。

2.8 统计学处理 数据资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理。多组间比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 认为有统计学差异。

表 1 寒痹方对 RA 模型足跖容积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 1 Effect of Hanbi Formula on toe volume in RA model ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 足跖容积/mL        |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|         | 0 d            | 7 d             | 14 d            | 21 d            | 28 d            | 35 d            |
| 正常组     | 1.60 ± 0.12    | 1.66 ± 0.09     | 1.60 ± 0.10     | 1.61 ± 0.11     | 1.81 ± 0.14     | 1.80 ± 0.12     |
| 模型组     | 3.76 ± 0.42 ** | 4.33 ± 0.67 **  | 4.54 ± 0.74 **  | 4.64 ± 0.74 **  | 4.94 ± 1.16 **  | 4.91 ± 0.94 **  |
| 地塞米松组   | 3.64 ± 0.43    | 2.25 ± 0.22 ##  | 2.47 ± 0.31 ##  | 2.47 ± 0.31 ##  | 2.60 ± 0.24 ##  | 2.69 ± 0.25 ##  |
| 宝光风湿液组  | 3.72 ± 0.63    | 4.13 ± 0.68     | 4.01 ± 0.81 #   | 3.72 ± 0.52 #   | 3.68 ± 0.65 #   | 3.53 ± 0.58 #   |
| 寒痹方低剂量组 | 3.42 ± 0.43    | 4.01 ± 0.47 &&  | 4.06 ± 0.91 &&  | 3.85 ± 0.82 #&& | 3.91 ± 0.62 #&& | 3.82 ± 0.60 #&& |
| 寒痹方高剂量组 | 3.43 ± 0.51    | 3.84 ± 0.54 #&& | 3.94 ± 0.95 #&& | 3.92 ± 0.75 #&& | 3.99 ± 0.67 #&& | 3.85 ± 0.52 #&& |

注：与正常组比较，\*\**P* < 0.01；与模型组比较，#*P* < 0.05，##*P* < 0.01；与地塞米松组比较，&&*P* < 0.01

表 2 寒痹方对 RA 模型足跖肿胀度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 2 Effect of Hanbi Formula on toe swelling in RA model ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 肿胀度/mL         |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|         | 0 d            | 7 d             | 14 d            | 21 d            | 28 d            | 35 d            |
| 正常组     | 0.03 ± 0.02    | 0.03 ± 0.12     | 0.09 ± 0.07     | 0.03 ± 0.11     | 0.04 ± 0.12     | 0.04 ± 0.16     |
| 模型组     | 1.58 ± 0.41 ** | 2.15 ± 0.40 **  | 2.71 ± 0.66 **  | 2.93 ± 0.77 **  | 2.94 ± 0.73 **  | 3.32 ± 1.26 **  |
| 地塞米松组   | 1.39 ± 0.20    | 0.53 ± 0.43 ##  | 0.64 ± 0.24 ##  | 0.86 ± 0.32 ##  | 0.78 ± 0.32 ##  | 0.90 ± 0.57 ##  |
| 宝光风湿液组  | 1.52 ± 0.50    | 2.12 ± 0.58     | 2.53 ± 0.62     | 2.49 ± 0.76     | 2.50 ± 0.75     | 2.76 ± 0.94     |
| 寒痹方低剂量组 | 1.64 ± 0.52    | 1.68 ± 0.55 #&& | 2.25 ± 0.37 #&& | 2.31 ± 0.12 #&& | 2.37 ± 0.49 #&& | 2.44 ± 1.18 #&& |
| 寒痹方高剂量组 | 1.64 ± 0.42    | 1.76 ± 0.48 #&& | 2.17 ± 0.49 #&& | 2.13 ± 0.28 #&& | 2.14 ± 0.88 #&& | 2.06 ± 0.13 #&& |

注：与正常组比较，\*\**P* < 0.01；与模型组比较，#*P* < 0.05，##*P* < 0.01；与地塞米松组比较，&&*P* < 0.01

3.2 寒痹方对 RA 模型血清 IL-1β 和 TNF-α 的影响 由表 3 可知，与模型组相比，给药组均能显著降低 IL-1β 和 TNF-α 表达（*P* < 0.01）；与地塞米松组相比，寒痹方组降低佐剂 RA IL-1β 和 TNF-α 表达的作用较弱（*P* < 0.05，*P* < 0.01）；寒痹方组与宝光风湿液组对于血清 IL-1β 和 TNF-α 表达的作用相当。

3.3 寒痹方对 RA 大鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响 由表 4 可知，阳性对照组（地塞米松组、宝光风湿液组）由于其显著的抗风湿作用，淋巴细胞

3 结果

3.1 寒痹方对 RA 模型关节肿胀的影响 大鼠注射 Freund's 佐剂后 1～3 d 内表现为急性局部炎症，后逐渐减轻，随后出现继发性反应，表现为对侧和前肢足爪肿胀，耳、尾部出现炎性结节和红斑。如表 1 所示，与模型组相比，寒痹方高剂量组于 7 d 开始至实验结束减少足跖容积程度明显（*P* < 0.05）；寒痹方低剂量组于 21 d 开始至实验结束减少足跖容积程度明显（*P* < 0.05）。而在整个过程中，寒痹方低、高剂量组对于足跖容积的影响无明显差异（*P* > 0.05）。寒痹方与宝光风湿液组缓解大鼠 RA 作用相当，但不及地塞米松。如表 2 所示，宝光风湿液组对大鼠足趾肿胀度的影响与各组之间无明显差异（*P* > 0.05），其他跟足跖容积的变化相似。

表 3 血清中 IL-1β、TNF-α 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab. 3 Expressions of IL-1β and TNF-α in serum ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | IL-1β/(pg·mL <sup>-1</sup> ) | TNF-α/(pg·mL <sup>-1</sup> ) |
|---------|------------------------------|------------------------------|
| 正常组     | 215.28 ± 36.19               | 402.43 ± 133.19              |
| 模型组     | 451.96 ± 37.50 **            | 825.88 ± 61.15 **            |
| 地塞米松组   | 328.40 ± 58.35 ##            | 548.82 ± 81.42 ##            |
| 宝光风湿液组  | 362.46 ± 47.51 ##            | 591.60 ± 114.42 ##           |
| 寒痹方低剂量组 | 379.57 ± 49.30 ##&           | 678.58 ± 94.11 ##&           |
| 寒痹方高剂量组 | 393.42 ± 61.07 ##&           | 702.53 ± 91.06 ##&&          |

注：与正常组比较，\*\**P* < 0.01；与模型组比较，##*P* < 0.01；与地塞米松组比较，&*P* < 0.05，&&*P* < 0.01

表 4 寒痹方对 RA 模型脾脏淋巴细胞增殖反应的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Tab. 4 Effect of Hanbi Formula on spleen lymphocyte proliferative response in RA model ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别      | $D_{450}$                |                          |
|---------|--------------------------|--------------------------|
|         | ConA                     | LPS                      |
| 正常组     | 0.292 8 $\pm$ 0.005 3    | 0.274 5 $\pm$ 0.006 0    |
| 模型组     | 0.327 5 $\pm$ 0.034 2 ** | 0.300 5 $\pm$ 0.025 8 ** |
| 地塞米松组   | 0.296 3 $\pm$ 0.013 8 ## | 0.274 7 $\pm$ 0.011 6 ## |
| 宝光风湿液组  | 0.274 0 $\pm$ 0.013 4 #  | 0.253 6 $\pm$ 0.015 7 #  |
| 寒痹方低剂量组 | 0.295 0 $\pm$ 0.008 4 #& | 0.277 0 $\pm$ 0.010 1 #& |
| 寒痹方高剂量组 | 0.314 0 $\pm$ 0.063 7 #& | 0.283 1 $\pm$ 0.047 8 #& |

注：与正常组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与地塞米松组比较，& $P < 0.05$

增殖率降低，与模型组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；寒痹方低、高剂量组淋巴细胞增殖也有所降低，与模型组差异显著 ( $P < 0.05$ )，但不及地塞米松组 ( $P < 0.05$ )，寒痹方低、高剂量组之间差异不明显 ( $P > 0.05$ )。

3.4 寒痹方处理 RA 大鼠关节滑膜组织病理学变化 各组大鼠关节滑膜组织病理学检测和关节滑膜分级结果见图 1 和表 5。正常组大鼠可见清晰的关节腔，滑膜组织无病理变化，滑膜层由滑膜细胞

组成并有序排列着，炎症级别为 0 级；模型组大鼠滑膜组织炎症级别为Ⅲ级，基质层厚度明显增厚，滑膜下层胶原纤维结构改变，有以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润。地塞米松组为Ⅰ级，宝光风湿液组为Ⅱ级，寒痹方低、高剂量组均为Ⅱ级。病理检测结果可知，寒痹方可以显著缓解 RA 大鼠的滑膜腔炎症症状。

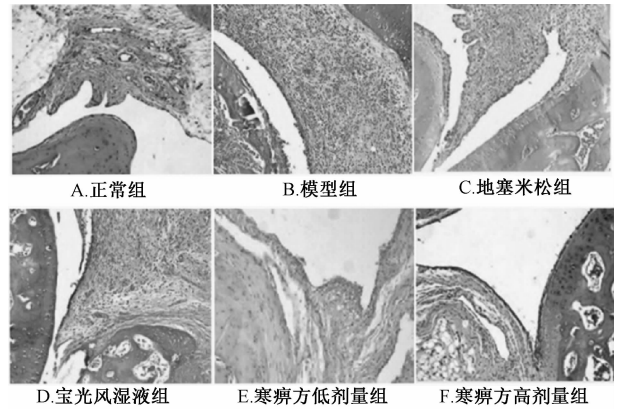


图 1 滑膜组织病理学检查 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Histopathology detection of synovial tissue (HE,  $\times 200$ )

表 5 滑膜分级 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 5 Rating of synovialis ( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目   | 正常组             | 模型组             | 地塞米松组           | 宝光风湿液组          | 寒痹方低剂量组         | 寒痹方高剂量组         |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 滑膜评分 | 0.80 $\pm$ 0.17 | 7.25 $\pm$ 1.50 | 2.67 $\pm$ 0.52 | 4.67 $\pm$ 0.82 | 5.83 $\pm$ 0.75 | 6.00 $\pm$ 1.10 |
| 滑膜分级 | 0 级             | Ⅲ级              | Ⅰ级              | Ⅱ级              | Ⅱ级              | Ⅱ级              |

3.5 寒痹方对 RA 大鼠滑膜组织 IL-17 和 TNF- $\alpha$  表达的影响 由图 2 ~ 3 可知，不同组之间，IL-17 和 TNF- $\alpha$  表达的变化趋势基本一致，相比正常组，模型组中 IL-17 和 TNF- $\alpha$  表达明显增强，定性统计显示差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 4)；阳性对照组相比模型组，IL-17 和 TNF- $\alpha$  表达明显下降 ( $P < 0.01$ )；寒痹方两个剂量组的 IL-17 和 TNF- $\alpha$  表达也显著降低 ( $P < 0.01$ )，其下降程度不及地塞米松组 ( $P < 0.01$ )。

4 讨论

RA 是一种以关节滑膜慢性炎症为特征的自身免疫性疾病，其免疫功能的失调主要体现在细胞免疫与体液免疫的失衡<sup>[10]</sup>。研究表明，滑膜组织中细胞因子的产生在 RA 病变中起重要作用<sup>[11]</sup>。细胞因子网络的复杂作用是使 RA 病变持续、迁延的关键因素<sup>[12]</sup>，其可分为两类，一类由 T 淋巴细胞产生，另一类主要是由单核/巨噬细胞产生，包括 IL-1、TNF、IL-5、IL-18、IL-15、IL-6、IL-12 和

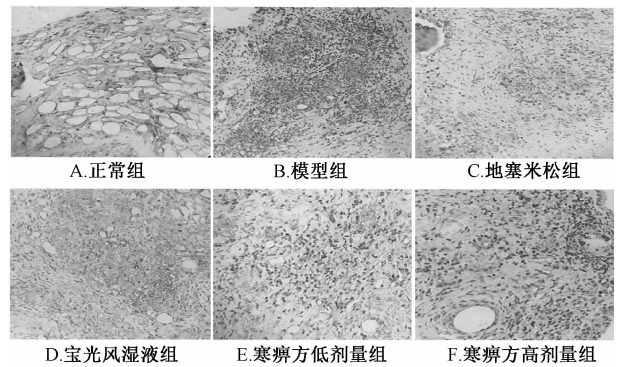


图 2 滑膜组织 IL-17 免疫组化结果 ( $\times 200$ )

Fig. 2 Immunohistochemical results of IL-17 in synovial tissue ( $\times 200$ )

IL-17 等。其中，IL-1 $\beta$  在 RA 的关节腔中高表达，在 RA 的早期，其可协助其它细胞迁徙和刺激内皮细胞，进一步加重或放大炎症<sup>[13]</sup>。因此，通过抑制 IL-1 $\beta$  的产生是治疗 RA 的途径之一。TNF- $\alpha$  与 IL-1 被称为“姊妹细胞因子”，TNF- $\alpha$  以自分泌方

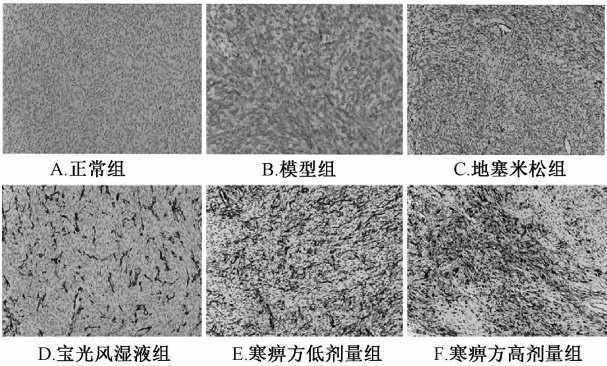
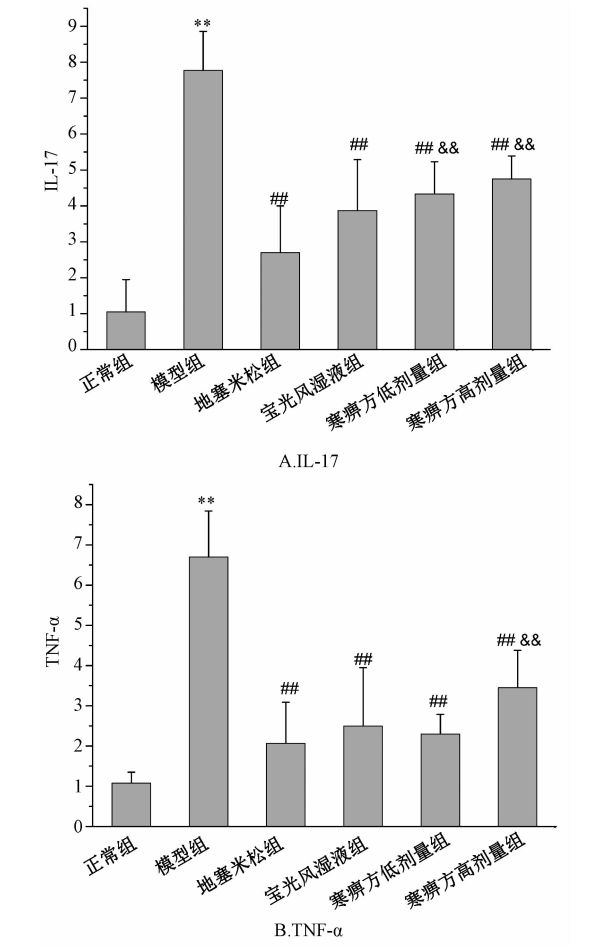


图3 滑膜组织 TNF-α 免疫组化结果 ( ×200 )  
Fig.3 Immunohistochemical results of TNF-α in synovial tissue ( ×200 )



注：与正常组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，### $P < 0.01$ ；与地塞米松组比较，&& $P < 0.01$

图4 滑膜组织 IL-17 和 TNF-α 免疫组化结果  
Fig.4 Immunohistochemical results of IL-17 and TNF-α in synovial tissue

式刺激巨噬细胞增加自身的产生，同时促进对方的合成。在 RA 中，TNF-α 的高表达可引起局部关节

组织的破坏，血清中 TNF-α 水平的升高可能提示疾病的严重性<sup>[14]</sup>。在动物模型中，TNF-α 过表达可致小鼠发生严重关节炎，抑制或阻断 TNF-α 活性的药物可以明显改善 RA 临床症状<sup>[15]</sup>。另外，IL-17 还可以与 TNF-α、IL-1β 发挥协同作用，放大炎症反应<sup>[16]</sup>。

佐剂诱导建立大鼠 RA 模型能够模拟人类 RA 的发病过程，故利用 Ferund's 完全佐剂可以系统地探究寒痹方对 RA 大鼠的治疗作用及可能的机制。结果表明，寒痹方可以显著缓解佐剂致 RA 大鼠的足跖容积和肿胀度，中、高剂量寒痹方组之间差异不明显，尽管该作用不及地塞米松组，但与宝光风湿液作用相当。已有研究表明，中药具有较强的抗 RA 作用，如内服马钱子、雷公藤、青风藤等可明显治疗 RA<sup>[17-18]</sup>，就其机制而言，许多中药抗 RA 的作用主要与抑制相关细胞因子的表达有关<sup>[19-20]</sup>。故本实验着眼于 RA 大鼠的炎症细胞因子，在细胞和分子水平初步探究寒痹方缓解 RA 的作用机制。结果显示，寒痹方可显著缓解 RA 大鼠的滑膜腔炎症症状，降低关节滑膜炎炎症分级。进一步研究发现，寒痹方可以抑制 RA 大鼠血清中 IL-1β 和 TNF-α 的表达、抑制 ConA 和 LPS 诱导的大鼠淋巴细胞的增殖反应，并下调滑膜组织 IL-17 和 TNF-α 表达，低、高剂量组之间没有表现出差异性。以上结论说明，寒痹方具有较强的抗 RA 作用，作用程度与宝光风湿液相当，其机制可能与降低炎症因子的释放、调节脾脏功能以及提高机体免疫功能有关。

综上所述，寒痹方用于治疗 RA 较安全，其机制可能与抑制血清 IL-1β、TNF-α，减少淋巴细胞增殖，以及下调滑膜组织中 IL-17 和 TNF-α 表达有关，该研究可为临床应用寒痹方治疗 RA 提供了有效的实验依据。

参考文献：

[ 1 ] Coiffier G, Bouvard B, Chopin F, *et al.* Common bone turnover markers in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: A literature review[J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(3): 239-241.

[ 2 ] Walsh D A, McWilliams D F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(10): 581-592.

[ 3 ] Deane K D. Can rheumatoid arthritis be prevented? [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2013, 27(4): 87-92.

[ 4 ] Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Nam J L, *et al.* Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for

management of rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(3): 529-535.

[5] 朱洁宜, 吴鑫宇, 周海纯, 等. 中医药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *中医药信息*, 2015, 24(1): 115-117.

[6] 徐 晖, 黄 颖. 中药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2015, 36(1): 88-90.

[7] 吴金莲. 寒痹方治寒性关节炎[J]. *家庭医药*, 2012(5): 26-26.

[8] 王贵霞. 类风湿性关节炎动物模型制备与发病机理的探讨[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.

[9] 陈宁杰. 晚期膝 OA 滑膜炎的 MRI 厚度分级、滑膜病理学评分、膝关节疼痛及功能评分的相关性研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.

[10] Boissier M C, Assier E, Falgarone G, *et al.* Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm [J]. *Joint Bone Spine*, 2008, 75 (4): 373-375.

[11] 高 薇, 鲁 静. 炎性细胞因子与类风湿关节炎[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 17(4): 450-455.

[12] 张军芳, 蒋飞霞, 张 宜, 等. 细胞因子与类风湿关节炎的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(4): 735-738.

[13] Pope R M, Shahrara S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(4): 252-256.

[14] Murdaca G, Spano F, Puppo F. Use of leflunomide plus TNF- $\alpha$  inhibitors in rheumatoid arthritis[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2013, 12(6): 801-804.

[15] Solomon D H, Curtis J R, Saag K G, *et al.* Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: comparing TNF- $\alpha$  blockade with nonbiologic DMARDs [J]. *Am J Med*, 2013, 26 (8): 1154-1168.

[16] Ouyang W, Kolls J K, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation[J]. *Immunity*, 2008, 28(4): 454-467.

[17] 王 振, 周子朋, 郑福增. 马钱子制剂治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2012, 5(2): 62-64.

[18] 王金凤. 青藤碱治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2014, 10(26): 161-163.

[19] Calmon-Hamaty F, Audo R, Combe B, *et al.* Targeting the Fas/FasL system in rheumatoid arthritis therapy: promising or risky? [J]. *Cytokine*, 2014, 153(3): 1711-1732.

[20] Heo R, Park J S, Jang H J, *et al.* Hyaluronan nanoparticles bearing  $\gamma$ -secretase inhibitor: *In vivo* therapeutic effects on rheumatoid arthritis[J]. *J Control Release*, 2014, 192 (1): 2105-2119.

# 苜蓿素对哮喘小鼠肺泡巨噬细胞 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路的抑制作用

殷玉婷<sup>1</sup>, 刘丽丽<sup>2</sup>, 刘利艳<sup>3</sup>

(1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学科技学院, 江西 南昌 330004; 3. 江西省肿瘤医院药剂科, 江西 南昌 330029)

**摘要:** **目的** 观察苜蓿素对低剂量脂多糖 (LPS) 诱导的哮喘小鼠气道炎症的抑制作用。**方法** 采用低剂量 LPS + 卵白蛋白 (OVA) 建立 BALB/c 小鼠哮喘气道炎症反应模型, 随机分为哮喘模型组、苜蓿素组、地塞米松 (阳性药) 组, 另设空白对照组。ELISA 法对小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 炎症介质 NO、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 水平进行检测; HE 染色观察小鼠肺组织病理情况; RT-PCR 法和 Western blot 法对小鼠肺泡巨噬细胞的 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88)、核因子  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) mRNA 及蛋白表达进行检测。**结果** 苜蓿素可显著降低哮喘小鼠 BALF 液中 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平, 有效改善哮喘小鼠肺部炎症, 显著下调肺泡巨噬细胞的 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白相对表达量。**结论** 苜蓿素对哮喘小鼠气道炎症有抑制作用, 其机制可能与干预 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路有关。

**关键词:** 苜蓿素; 哮喘; 气道炎症; 抗炎; 肺泡巨噬细胞; TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0450-05

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.002

**收稿日期:** 2016-09-29

**基金项目:** 江西省自然 (青年) 科学基金计划 (20142BAB215059); 江西省百人远航工程资助项目 (201501); 江西省普通本科高校中青年教师发展计划访问学者专项资金 (2016)

**作者简介:** 殷玉婷 (1979—), 女, 博士, 副教授, 从事天然药物有效成分的药理学研究。Tel: 18607917679, E-mail: sandel@163.com