

## ·实验研究·

本文引用:林也,戴宗顺,张婷,张逢,胡胜涛,张二兵,宋厚盼,陈聪,蔡雄,廖菁.基于“以方测证”的类风湿关节炎风寒湿痹证动物模型的构建研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(5):668-672.

## 基于“以方测证”的类风湿关节炎风寒湿痹证 动物模型的构建研究

林也<sup>1</sup>,戴宗顺<sup>2</sup>,张婷<sup>1</sup>,张逢<sup>1</sup>,胡胜涛<sup>1</sup>,张二兵<sup>1</sup>,宋厚盼<sup>2</sup>,陈聪<sup>2</sup>,蔡雄<sup>1\*</sup>,廖菁<sup>2\*</sup>  
(1.湖南中医药大学中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室(培育基地),湖南长沙410208;  
2.湖南中医药大学中医方证转化医学研究湖南省重点实验室,湖南长沙410208)

**〔摘要〕**目的 基于以方测证理论建立与类风湿关节炎(RA)病变特征、发病机制相符的中医“痹证”动物模型。方法 将40只雄性SD大鼠随机分为空白组、风寒湿痹证模型组、风寒湿痹证模型+乌头汤组(乌头汤组)、风寒湿痹证模型+四妙丸组(四妙丸组),每组10只大鼠。空白组大鼠无任何干预措施,余各组大鼠均先予以风寒湿环境刺激14d,再诱导建立佐剂性关节炎(AIA)大鼠模型,同时乌头汤组与四妙丸组分别给予乌头汤和四妙丸灌胃治疗,直至实验结束。记录各组大鼠发病时间和发病率;动态检测大鼠足肿胀体积和评价关节炎指数积分;HE染色观察大鼠踝关节病理变化;CT检测大鼠骨关节破坏情况。结果 与风寒湿痹证模型组比较,乌头汤明显延迟大鼠发病时间并降低其发病率,显著减轻大鼠关节肿胀率及关节炎指数评分,明显抑制滑膜组织增生及骨破坏程度( $P<0.01$ ),而四妙丸组大鼠病变程度与风寒湿痹证模型组无明显差别( $P>0.05$ )。结论 基于以方测证思路,成功复制了与RA病变特征和发病机制相符的RA风寒湿痹证结合大鼠模型,为系统深入研究治疗RA方证对应分子机制奠定了基础。

**〔关键词〕** 类风湿关节炎;风湿痹证;方证对应;佐剂性关节炎;乌头汤;四妙丸

**〔中图分类号〕**R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.05.003

### Construction of Animal Model of Rheumatoid Arthritis with Wind Cold Dampness Arthralgia Syndrome Based on the Theory of "Testing Syndrome by Formula"

LIN Ye<sup>1</sup>, DAI Zongshun<sup>2</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, HU Shengtao<sup>1</sup>, ZHANG Erbing<sup>1</sup>, SONG Houpan<sup>2</sup>,  
CHEN Cong<sup>2</sup>, CAI Xiong<sup>1\*</sup>, LIAO Jing<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Innovation and Applied Research in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Translational Research in TCM Formulas and Zheng, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To establish an animal model of "arthralgia syndrome" in traditional Chinese medicine (TCM) based on the theory of testing syndrome by formula, which was consistent with the pathological characteristics and pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** 40 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into the blank group, the wind cold dampness arthralgia syndrome model group, wind cold dampness arthralgia syndrome model+Wutou Decoction group, wind cold dampness arthralgia syndrome model+Simiao Pill group, with 10 rats in each group. There was no intervention in the blank group, the rats in other groups were stimulated by wind, cold and wet environment for 14 days, and then induced to establish adjuvant arthritis (AIA)

**〔收稿日期〕**2020-12-22

**〔基金项目〕**国家自然科学基金项目(81703920);湖南省“芙蓉学者奖励计划”项目(湘教通[2020]58号);湖南省自然科学基金项目(2018JJ2293, 2019JJ40225);湖南省121创新人才培养工程项目(湘人社函[2019]192号);湖南省“刘良院士专家工作站”项目(湘科协通[2020]34号);湖南省高校创新平台开放基金项目(17K069);湖南省中医药科研计划项目(201909);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科项目(校行科学[2018]3号)。

**〔作者简介〕**林也,女,在读博士研究生,研究方向:中医药诊疗风湿免疫病。

**〔通讯作者〕**\*廖菁,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:304906848@qq.com;蔡雄,男,教授,博士研究生导师,E-mail:caixiong@hnu.edu.cn。

rat model. At the same time, the wind cold dampness arthralgia syndrome model+Wutou Decoction group, wind cold dampness arthralgia syndrome model+Simiao Pill group were given Wutou Decoction and Simiao Pill by gavage until the end of the experiment. The onset time and incidence rate of rats were recorded. Foot swelling volume and arthritis index score were measured dynamically. HE staining was used to observe the pathological changes of the ankle joint in rats. CT was used to detect the fracture of bone and joint in rats. **Results** Compared with the wind cold dampness arthralgia syndrome model group, Wutou Decoction significantly delayed the onset time of rats and reduce the incidence of a disease, significantly reduce index score, joint swelling rate and arthritis of rats significantly inhibit the synovial tissue and bone damage ( $P<0.01$ ), and the lesion degree of wind cold dampness arthralgia syndrome model+Simiao Pill group and the wind cold dampness arthralgia syndrome model group was no significant difference ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Based on the theory of testing syndrome by formula, we successfully reproduce the characteristics and pathogenesis of RA and pathological changes of RA wind cold dampness arthralgia syndrome in the rat model of combined disease for system in-depth study in the treatment of RA certificate corresponding to molecular mechanism laid a foundation.

[**Keywords**] rheumatoid arthritis; wind cold dampness arthralgia syndrome; correspondence of formula-Zheng; adjuvant-induced arthritis; Wutou Decoction; Simiao Pill

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性侵蚀性关节炎为主要特征的自身免疫性疾病,其临床表现为多关节反复发炎,缠绵难愈,滑膜细胞“类肿瘤生长”,有不死的癌症之称,为临床难治性疾病之一<sup>[1-3]</sup>。流行病学研究<sup>[4-5]</sup>表明,全球发病率为0.5%~1%,我国患病率为0.28%~0.36%,其5年致残率高达30%~50%。目前,RA临床治疗常用药物主要有5类,包括非甾体抗炎药、缓解病情抗风湿药、糖皮质激素、生物制剂及中药制剂治疗<sup>[6]</sup>。尽管RA的有效治疗药物已从非甾体抗炎药逐步发展到现代生物制剂,甚至基因治疗,但这些药物均存在非特异靶向性,毒副作用大,常伴随免疫功能受损,潜在地威胁生命健康,至今仍缺乏理想的治疗药物与方法<sup>[7]</sup>。

中医药治疗自身免疫疾病具有一定的特色和优势,其多组分、多途径、多靶点整合效应能长效控制病情进展<sup>[8]</sup>。辨证论治是中医学治疗疾病的特色与精华。动物模型是研究人类疾病的重要途径之一。因此,基于中医学理论,理解中医“辨证论治”的精髓所在,创建“证候”动物模型是突破中医药重大前沿科学问题的关键难题之一<sup>[9-10]</sup>。RA属于中医学“痹证”中最为常见的临床疾患之一,与中医古籍所记载的“历节”“鹤膝风”“尪痹”等病证相似<sup>[11-12]</sup>。《素问·痹论》中“风寒湿三气杂至合而为痹也”是中医论治“痹证”的理论基础,课题组前期研究<sup>[13]</sup>通过给予大鼠风寒湿刺激再注射含热灭活结核杆菌的完全弗氏佐剂(complete Freund adjuvant, CFA)的方法,明确了风寒湿对佐剂诱导性关节炎(adjuvant-induced arthritis,

AIA)大鼠发生发展的影响。本实验基于前期研究基础,运用“以方测证”思路,拟构建具有中医特色的RA风湿寒痹证病证结合动物模型,旨在为RA的基础与临床研究提供实验模型基础。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量(80±10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于湖南中医药大学实验动物中心,许可证号SYXK(湘)2019-0009,温度22~25℃,相对湿度40%~70%,12h:12h昼夜交替。

### 1.2 实验试剂

热灭活结核杆菌H37Ra(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)(美国BD公司,批号6183641);矿物油(美国Sigma Aldrich公司,批号M8410);二甲苯、无水乙醇、异丁醇、正丁醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);EDTA脱钙液(北京索莱宝科技有限公司,批号20181225)。

### 1.3 实验仪器

自动煎药机(北京东华原医疗设备有限责任公司,型号YJD13-GL/YJD20C-GL/YJD30-GL);电子天平(日本岛津公司,型号ATY224);足肿测定仪(意大利UGO公司,型号Basile 37140);玻璃微量注射器(瑞士Hamilton公司,型号250 μL);人工气候造模箱(上海汗诺公司,型号PRX-150B);动物永久标记仪(AIMS公司);高分辨率小动物微型CT(美国PerkinElmerCaliper LS公司,型号Quantum FX Demo);

动物气体麻醉机(美国 Smith 公司,型号 SurgiVet CDS9000)。

## 2 方法

### 2.1 实验药物

按比例取乌头汤(制川乌 6 g,黄芪 9 g,麻黄 9 g,白芍 9 g,甘草 9 g),药材饮片按原方比例混合,蒸馏水浸泡 30 min 后,于自动煎药机中煎煮 1.5 h,滤出药液,以相同体积的蒸馏水重复煎煮 1 次,合并两次药液,减压浓缩为浸膏,按照大鼠与人的剂量换算比例计算,乌头汤给予 4 倍临床等效剂量 15 g/kg。四妙丸(黄柏 9 g,苍术 9 g,牛膝 9 g,薏苡仁 9 g)制备方法同乌头汤,其给药剂量为 12 g/kg。

### 2.2 模型制备及干预方法

大鼠常规适应性喂养 5 d 后,随机分为空白组、风寒湿痹证模型组(风寒湿痹证组)、风寒湿痹证模型+四妙丸组(四妙丸组)、风寒湿痹证模型+乌头汤组(乌头汤组),每组 10 只大鼠。除空白组大鼠正常饲养外,余所有大鼠于实验第 1 天开始置于改良的智能人工气候箱给予风寒湿刺激(风速 5 m/s,温度 0~2 ℃,湿度 90%~95%),每天 1 次,每次 4 h,直至实验结束。并在实验第 15 天,于大鼠尾根部皮下注射 0.1 mL 含 200 μg Mtb 的 CFA 诱导 AIA,同时乌头汤组、四妙丸组分别给予相应剂量的乌头汤和四妙丸灌胃治疗,直至实验第 45 天结束。

### 2.3 观察指标

**2.3.1 大鼠足肿胀体积测量** CFA 注射前,在大鼠的踝关节处作永久性标记,并测量双后足容积基础值。参考文献[14]方法,CFA 注射后的第 6 天开始,每 3 天进行一次足肿胀体积大小测量,动态记录大鼠关节肿胀度。

**2.3.2 大鼠关节炎指数评分** CFA 注射后,每天观

察并记录各组大鼠发病时间以及发生率。参考文献方法<sup>[15]</sup>,采用国际通用 5 级评分法对每只大鼠进行关节炎指数评分。

**2.3.3 大鼠后足 CT 检测** 末次给药后,异氟烷麻醉大鼠,小动物 CT 扫描大鼠后足,评价关节骨破坏程度。

**2.3.4 大鼠踝关节组织病理形态学观察** 实验结束后,麻醉大鼠,剪取大鼠双后足,经 4%多聚甲醛固定 48 h 后,EDTA 脱钙,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(haematoxylin eosin, HE)染色,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜拍照,观察各组大鼠踝关节组织病理形态改变。

### 2.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对实验所得数据进行统计学处理,计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法,方差不齐用 Dunnett's 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

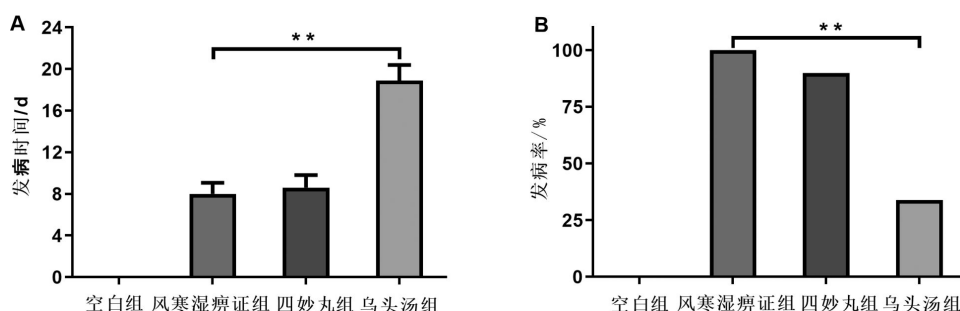
## 3 实验结果

### 3.1 大鼠发病时间及发病率情况

与风寒湿痹证组比较,乌头汤组大鼠发病时间显著延迟( $P < 0.01$ ),同时其发病率也明显降低( $P < 0.01$ );而四妙丸治疗后大鼠发病时间和发病率并没有得到改善。见图 1。

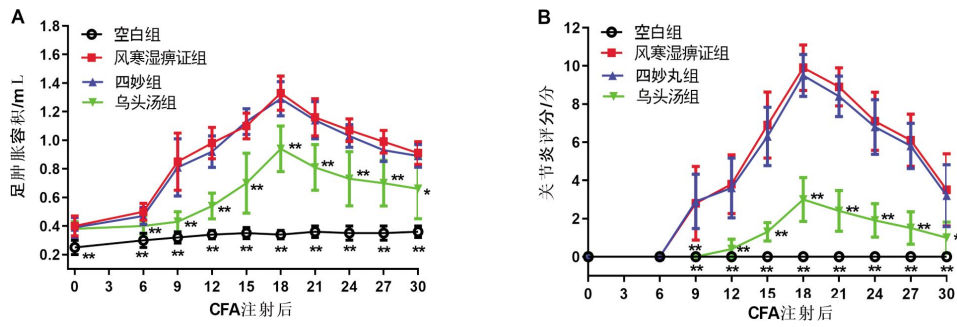
### 3.2 大鼠足肿胀容积及关节评分评价

风寒湿痹证组较空白组大鼠足肿胀体积与关节炎评分显著增加( $P < 0.01$ );给予四妙丸治疗后,大鼠足趾部炎症损伤并没有得到改善,大鼠足肿胀体积与关节炎评分和风寒湿痹证组接近( $P > 0.05$ );而给予乌头汤治疗后,与风寒湿痹证组比较,大鼠足肿胀容积( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )和关节炎评分显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 2。



注:与风寒湿痹证组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

图 1 各组大鼠发病时间及发病率

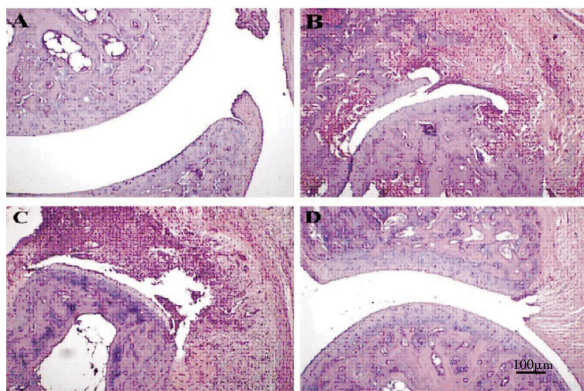


注: A 足肿胀增加容积; B 关节炎评分; 与风寒湿痹证组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01

图2 各组大鼠足容积和关节炎评分

### 3.3 大鼠关节组织病理观察

空白组大鼠关节腔光滑完整,周围未见炎性细胞浸润;风寒湿痹证组大鼠关节腔隙明显狭窄,伴有大量炎性细胞浸润,血管翳生成;给予四妙丸治疗后,大鼠关节腔隙狭窄未见明显好转;而给予乌头汤治后,大鼠关节腔隙增宽,炎症细胞浸润程度明显减轻。见图3。

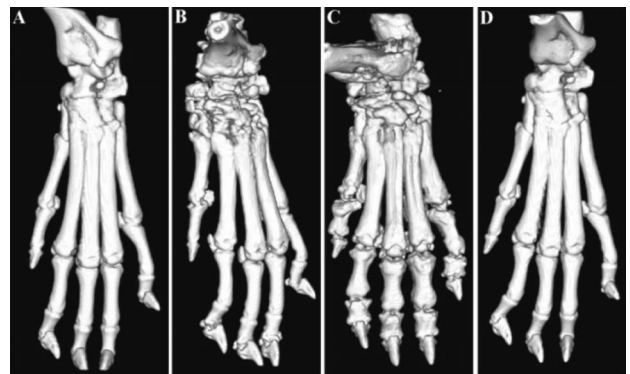


注: A.空白组; B.风寒湿痹证组; C.四妙丸组; D.乌头汤组

图3 大鼠关节组织病理学(HE, ×200)

### 3.4 大鼠关节骨破坏情况

空白组(图4A)大鼠足趾关节软骨表面光滑完整;风寒湿痹证组(图4B)大鼠足趾关节软骨表面粗糙,关节严重变形;给予四妙丸治疗后(图4C),大鼠骨破坏情况未见明显好转;而给予乌头汤治后(图4D),大鼠关节结构较完整,关节软骨表面较光滑。见图4。



注: A.空白组; B.风寒湿痹证组; C.四妙丸组; D.乌头汤组

图4 大鼠关节骨破坏情况

## 4 讨论

RA 是一种以慢性侵蚀性关节炎为主要特征的自身免疫性疾病,属于中医学“痹证”中最为常见的临床疾患之一,与中医古籍所记载的“历节”“鹤膝风”“尪痹”等病证相似<sup>[11-12]</sup>。近年来,中医药或中西医结合治疗 RA 愈来愈受到临床医生的重视,中医

药辨证论治、整体调节的作用特点,不仅可以改善患者症状,提高患者生活质量,而且可显著降低化学药物引起的毒副作用及耐药性,具有一定的特色和优势。动物模型是研究人类疾病的重要途径之一。构建符合中医证候特点的 RA 动物模型是现阶段中医药研究的重要载体,亦是促进中医药现代化的关键。课题组前期研究<sup>[13]</sup>,采用改良的智能人工气候箱,选择雄性 SD 大鼠 AIA 模型,研究风寒湿对 RA(痹证)发生发展的作用。首先对风寒湿刺激条件进行了优选,确定了“风速 5 m/s、温度 0~2 °C、相对湿度 90%~95%”。风寒湿入侵机体发生疾病应该是一个长期的过程,可能是长期居住或工作在潮湿、阴冷、气候易变环境,从而在具有特定遗传背景的个体诱发了 RA。因此,采用给予雄性 SD 大鼠风寒湿刺激 14 天再诱导建立 AIA 的方案。本研究在前期研究基础上运用以方测证的方法,结合病理学与放射学等实验室方法进一步评价 RA 风寒湿痹证模型建立的成功与否。

乌头汤素以温经祛寒、除湿止痛之效著称,首见于张仲景《金匱要略·中风历节病脉证并治》:“病历节,不可屈伸,疼痛,乌头汤主之”。原方由麻黄、芍药、黄芪、甘草(炙)各三两,川乌五枚组成,共奏温经

散寒、除湿止痛之效。研究表明,乌头汤可显著改善寒湿型 RA 患者关节肿胀、晨僵等症状,延缓关节骨破坏,改善患者生活质量<sup>[16-17]</sup>。四妙丸是治疗湿热痹证的经典方,载于清代张秉成的《成方便读》,原方由黄柏、薏苡仁、苍术、牛膝各八两,水泛为丸而成。四妙丸可显著缓解 RA 患者关节症状,抑制关节炎症,促进关节功能的恢复,改善实验室各项指标,达到控制病情活动<sup>[18]</sup>。研究采用乌头汤作为 RA 风湿寒痹证病证结合动物模型的“方证对应”论证方剂,以四妙丸作为“非方证对应”的论证方剂,具备一定的理论和临床依据。

本实验研究结果从“以方测证”的角度分析,运用乌头汤治疗风寒湿痹证模型组后,大鼠发病时间和发病率明显降低( $P<0.01$ );其关节肿胀度及关节炎评分显著减轻( $P<0.01$ ),并且其关节组织病理表现明显改善,证明该方有效。另外,运用四妙丸治疗风寒湿痹证模型组后,大鼠足肿胀体积与关节炎评分和风寒湿痹证组接近( $P>0.05$ ),表明无疗效,从反证角度认为风寒湿痹证也是成功的。综合本文所有结果,初步认为 RA 风湿寒痹病证结合动物模型的造模是成功的,为后续中医药治疗 RA 的药效机制研究及中药抗 RA 新药的开发研究提供新的载体。

## 参考文献

- [1] FIRESTEIN G S, MCINNES I B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Immunity*, 2017, 46(2): 183-196.
- [2] SMOLEN J S, ALETAHA D, BARTON A, et al. Rheumatoid arthritis[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4: 18001.
- [3] MCHUGH J. Rheumatoid arthritis: IFN $\gamma$  drives synovial tissue remodelling[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2018, 14(2): 63.
- [4] CONN D L, TILIAKOS A, BAO G B, et al. Correction to: Effect of daily low dose prednisone, divided or single daily dose, in the treatment of African Americans with early rheumatoid arthritis[J]. *Clinical Rheumatology*, 2018, 37(4): 1139.
- [5] ONUORA S. Rheumatoid arthritis: Higher disease risk in children of women with RA[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2018, 14(2): 62.
- [6] O'DELL J R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2004, 350(25): 2591-2602.
- [7] MUELLER R B, HASLER P. Rheumatoid arthritis from pathogenesis to therapeutic strategies[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(8): 2562.
- [8] YU H H, ZENG R, LIN Y, et al. Kadsura heteroclita stem suppresses the onset and progression of adjuvant-induced arthritis in rats[J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152876.
- [9] 郑文科, 鄢丹, 张晓滕, 等. 中医药重大科学问题和工程技术难题[J]. *中医杂志*, 2019, 60(12): 991-1000.
- [10] 韩立伟, 果德安, 刘菊妍, 等. 2020 年度中医药重大科学问题及工程技术难题[J]. *中医杂志*, 2020, 61(19): 1671-1678.
- [11] 魏艳霞, 李鑫, 林也, 等. 类风湿关节炎病证结合动物模型研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(10): 1485-1488.
- [12] 龚雪, 汪元. 类风湿关节炎中医病因病机研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2020, 9(6): 62-65.
- [13] 李鑫, 魏艳霞, 林也, 等. 风寒湿外邪对痹证(佐剂性关节炎)发生发展的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(12): 1496-1501.
- [14] 林也, 廖菁, 戴宗顺, 等. 风寒湿外邪作用于 EPO 影响痹证(类风湿关节炎)的发生[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(3): 345-349.
- [15] 魏艳霞. 类风湿关节炎风寒湿痹证结合动物模型的建立及乌头汤药效作用研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [16] 兰维娅, 唐芳, 马武开, 等. 乌头汤联合常规西药治疗类风湿关节炎随机对照试验的 Meta 分析[J]. *风湿病与关节炎*, 2019, 8(1): 36-40, 45.
- [17] 林也, 李鑫, 徐智慧, 等. 乌头汤联合化学药物治疗类风湿关节炎有效性及安全性的 Meta 分析[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(11): 2685-2689.
- [18] 陈慧, 庞学丰, 李玉玲, 等. 基于网络药理学探讨四妙丸治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. *风湿病与关节炎*, 2019, 8(8): 30-35.

(本文编辑 苏维)