

本文引用: 贺守第, 孙晨霞, 廖威权, 廖康汉, 朱辉军, 黄胜光, 张剑勇, 谭宁. 冬凌草及冬凌草甲素对类风湿关节炎血瘀证小鼠炎症模型的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 1984-1990.

冬凌草及冬凌草甲素对类风湿关节炎血瘀证 小鼠炎症模型的影响

贺守第^{1,2}, 孙晨霞¹, 廖威权², 廖康汉¹, 朱辉军¹, 黄胜光¹, 张剑勇^{2*}, 谭宁^{1*}

1. 华中科技大学协和深圳医院中医风湿科, 广东 深圳 518000; 2. 广州中医药大学第四临床医院风湿科, 广东 深圳 518000

[摘要] 目的 研究中药冬凌草(*Rabdosia Rubescens*, RR)及其主要活性成分冬凌草甲素(Oridonin, ORI)对类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)血瘀证小鼠炎症模型的炎症影响,为RA血瘀证提供新的治疗药物。方法 将C57BL/6雌性小鼠随机分为对照组(Control组)、模型组(Model组)、低浓度RR组(L-RR组)、高浓度RR组(H-RR组)、低浓度ORI组(L-ORI组)、高浓度ORI组(H-ORI组),每组6只。除Control组外,其余5组小鼠双侧后肢足垫内注射1次10 μL乳化的完全弗氏佐剂,背部皮下注射0.1 mg/kg盐酸肾上腺素注射液2 h后,置于4℃冷水中游泳5 min,1次/d,连续7 d。L-RR组、H-RR组灌胃240、480 mg/(kg·d)的RR溶液,L-ORI组、H-ORI组腹腔注射20、40 mg/(kg·d)的ORI溶液,1次/d,连续14 d。每3天测量小鼠后足足掌的厚度;治疗14 d后,称量小鼠体质量,评估关节炎指数评分,ELISA法检测足趾血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1β和IL-6浓度,HE染色、番红固绿染色检测踝关节组织破坏程度。结果 各组间体质量差异均无统计学意义($P>0.05$)。与Control组比较,Model组关节肿胀、关节炎细胞浸润、滑膜增生、软骨被破坏,后足足掌厚度、关节炎指数评分及TNF-α、IL-6、IL-1β、VEGFA浓度均增加($P<0.05$)。与Model组比较,L-RR组、H-RR组、L-ORI组、H-ORI组关节肿胀症状减轻;H-RR组、L-ORI组、H-ORI组第22天后足足掌厚度降低($P<0.05$);H-RR组、H-ORI组的关节炎指数评分降低($P<0.05$);H-RR组、L-ORI组、H-ORI组TNF-α、IL-6、IL-1β浓度降低($P<0.05$);H-RR组、L-ORI组、H-ORI组VEGFA浓度降低($P<0.05$);L-RR组、H-RR组、L-ORI组、H-ORI组的踝关节组织中炎症细胞浸润、滑膜增生及软骨破坏均减少。结论 RR、ORI可改善血瘀证RA小鼠模型关节肿胀、后足足掌厚度,降低关节炎指数评分及炎症因子TNF-α、IL-6、IL-1β和VEGFA的浓度,并能减少踝关节组织中炎症细胞浸润、滑膜增生及软骨破坏,说明RR及其主要活性成分ORI具有治疗RA血瘀证炎症模型的作用,VEGFA可能作为RA血瘀证疗效评估的指标。

[关键词] 冬凌草;冬凌草甲素;类风湿关节炎;血瘀证;炎症

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.007

Effects of *Rabdosia Rubescens* and oridonin on the inflammatory model of rheumatoid arthritis with blood stasis pattern in mice

HE Shoudi^{1,2}, SUN Chenxia¹, LIAO Weiquan², LIAO Kanghan¹, ZHU Huijun¹, HUANG Shengguang¹,
ZHANG Jianyong^{2*}, TAN Ning^{1*}

1. Rheumatology Department of Chinese Medicine, Shenzhen Hospital Collaborating with Huazhong University of Science and

[收稿日期]2024-04-22

[基金项目]广东省中医药管理局项目(20241255);深圳市科技创新计划面上项目(JCYJ20230807115913027);深圳市医疗卫生三名工程项目(SZZYSM202311003);深圳市南山区卫生健康系统科技重大项目(NSZD2024013);深圳市南山区科技项目(NS2021106,NS2021065)。

[通信作者]*张剑勇,男,博士,博士研究生导师,主任医师,E-mail:13823396319@163.com;谭宁,女,硕士,硕士研究生导师,主任医师,E-mail:tanning317@126163.com。

Technology, Shenzhen, Guangdong 518000, China; 2. Rheumatology Department, The Fourth Clinical Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518000, China

[Abstract] Objective To study the effects of Chinese medicine *Rabdosia Rubescens* (RR) and its main active ingredient oridonin (ORI) on inflammation in a mouse model of rheumatoid arthritis (RA) with blood stasis pattern, and provide new therapeutic drugs for the treatment of this disease. **Methods** The C57BL/6 female mice were randomized into Control group, Model group, low concentration RR (L-RR) group, high concentration RR (H-RR) group, low concentration ORI (L-ORI) group, and high concentration ORI (H-ORI) group, with six mice in each group. Except for Control group, the other five groups were injected with 10 μ l of emulsified complete Freund's adjuvant into the foot pads of bilateral hind limbs once. Two hours after the subcutaneous injection of adrenaline hydrochloride 0.1 mg/kg on the back, they were placed in cold water at 4°C for five minutes, once a day, for seven consecutive days. L-RR and H-RR groups were treated with RR solution at the doses of 240 mg/(kg·d) and 480 mg/(kg·d) respectively by gavage, while L-ORI and H-ORI groups were intraperitoneally injected with ORI solution at the doses of 20 mg/(kg·d) and 40 mg/(kg·d) respectively, once a day, for 14 consecutive days. The thickness of the hind paws of mice was examined every 3 days. After 14-day treatment, the body mass was measured and the arthritis index score was evaluated. Besides, ELISA was used to check the concentrations of vascular endothelial growth factor A (VEGFA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) in the toes of mice, while HE staining and safranin-fast green staining to assess the degree of the ankle joint tissue damage. **Results** There was no statistically significant difference in body mass among the six groups ($P>0.05$). Compared with Control group, Model group showed joint swelling, infiltration of inflammatory cells in the joints, synovial hyperplasia, and cartilage destruction with increases in the thickness of the hind paws, arthritis index score, as well as the concentrations of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and VEGFA ($P<0.05$). Compared with Model group, L-RR, H-RR, L-ORI, and H-ORI groups showed alleviated joint swelling; H-RR, L-ORI, and H-ORI groups had decreased hind paw thickness after 22 days ($P<0.05$); H-RR and H-ORI groups had reduced arthritis index scores ($P<0.05$); H-RR, L-ORI, and H-ORI groups had lower concentrations of TNF- α , IL-6, and IL-1 β ($P<0.05$); H-RR, L-ORI, and H-ORI groups had lower VEGFA concentration ($P<0.05$); L-RR, H-RR, L-ORI, and H-ORI groups all had reduced inflammatory cell infiltration, synovial hyperplasia, and cartilage destruction in the ankle joint tissue. **Conclusion** For a mouse model of RA with blood stasis pattern, RR and ORI can alleviate the joint swelling, decrease the hind paw thickness, lower the arthritis index scores and the concentrations of inflammatory factors including TNF- α , IL-6, IL-1 β , and VEGFA, and reduce the inflammatory cell infiltration, synovial hyperplasia, and cartilage destruction in the ankle joint tissue. This indicates that RR and its main active ingredient ORI have therapeutic effects on the inflammatory model of RA with blood stasis pattern, and VEGFA may serve as an indicator for evaluating the efficacy of treatments for RA with blood stasis pattern.

[Keywords] *Rabdosia Rubescens*; oridonin; rheumatoid arthritis; blood stasis pattern; inflammation

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性对称性关节滑膜炎为临床特征的自身免疫性疾病。RA的早期症状包括全身乏力、关节肿胀、压痛以及晨僵,后期导致软骨破坏、关节畸形,甚至可引起心脏、肾脏、肺脏、消化道、肝脏、皮肤和神经系统损伤^[1]。RA在全世界的患病率为0.5%~1%^[2]。RA病理机制是在多因素下造成免疫紊乱,刺激关节腔成纤维样滑膜细胞类肿瘤样增殖、血管翳形成,导致软骨破坏和骨侵蚀,伴随促炎细胞因子过度产生,进一步促进疾病进展^[3]。RA在中国古籍中被记载为“骨痹”“鹤膝风”“历节”等,而近代中医大家将RA归属于“尪痹”范畴。正虚、邪侵和痰瘀是RA的主要病因病机。血瘀在RA发病过程中是主要致病因素,又是主要病机,贯穿于整个疾病的始终。

冬凌草(*Rabdosia Rubescens*, RR)是一种现代中药,为唇形科香茶菜属碎米苣的全草,全草为民间常用草药,RR收载于《中华人民共和国药典》2010年版、2015年版、2020年版^[4-6]。RR味苦、甘,性微寒,具有清热解毒、活血止痛的功效,主治咽喉肿痛、扁桃体炎、感冒、关节风湿痛、蛇虫咬伤。目前,RR主要用于治疗肿瘤、病毒感染,在关节肿痛、RA中的治疗报道较少。冬凌草甲素(Oridonin, ORI)是RR的主要活性成分,具有较强的抗炎、抗肿瘤功效^[7]。RA西医治疗主要以抗炎、抑制免疫为主。目前,治疗RA的大多数药物来源于抗肿瘤药,而RR具有活血化瘀的功效,RR、ORI具有抗炎、抗肿瘤作用。因此,本研究建立RA血瘀证炎症小鼠模型,初步探究RR及主要活性成分ORI对RA血瘀证炎症小鼠模型的影响,为RR及ORI治疗RA提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

36只6~7周龄雌性C57BL/6小鼠,体质量16~20g,购自广东省医学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(粤)2022-0002。小鼠在标准条件下,于深圳大学SPF级动物房饲养及实验。本研究获得深圳大学医学部伦理委员会根据动物实验控制和监督委员会的批准(伦理号:A202200953)。

1.2 主要试剂

RR片(中国河南省安阳市华安药业有限公司,国药准字号:Z41020054,批号:130289);ORI(中国上海阿拉丁公司,批号:1910218);完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant,CFA)(美国Chondrex公司,批号:210370);白细胞介素(interleukin,IL)-1 β (批号:EK0394)、IL-6(批号:EK1093)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)(批号:EK0527)、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A,VEGFA)(批号:AR1103)ELISA试剂盒均购自武汉博士德生物公司;改良番红O-固绿软骨染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1371)。

1.3 主要仪器

全波长多功能酶标仪、低温离心机、-80℃超低温冰箱(美国Therm Fisher公司,型号:A51119500C、75002430、88600V);显微镜(日本尼康公司,型号:LV150N)。

1.4 动物分组

将36只小鼠随机分为6组,对照组(Control组)、模型组(Model组)、低浓度RR组(L-RR组)、高浓度RR组(H-RR组)、低浓度ORI组(L-ORI组)、高浓度ORI组(H-ORI组),每组6只。

1.5 RA血瘀证炎症小鼠模型建立

采用CFA作为C57BL/6小鼠关节炎诱导剂。使用5mL注射器反复抽吸CFA,直到CFA完全乳化后,形成油包水状态。造模的第0天,在Model组、L-RR组、H-RR组、L-ORI组和H-ORI组动物的左、右后肢足垫内皮下各注射1次0.01mL完全乳化的CFA,Control组注射等体积的空气。注射CFA同时进行RA血瘀证炎症小鼠模型的造模^[8],以盐酸肾上腺素注射液0.1mg/kg剂量注射于Model组、L-RR组、H-RR组、L-ORI组和H-ORI组小鼠背部皮下,2h后置于4℃冷水中游泳5min,1次/d,

连续7d。

1.6 药物干预治疗

L-RR组、H-RR组:根据人类每天的口服剂量及人与小鼠的体表面积比值进行换算^[9],小鼠的口服剂量浓度为0.0026 \times 2g/20g=487.5mg/kg。L-RR组、H-RR组小鼠分别灌胃240、480mg/(kg \cdot d)RR溶液(溶于灭菌注射用水,每天分2次灌胃),共14d。L-ORI组、H-ORI组:ORI的剂量、用法参考文献[10],L-ORI组、H-ORI组分别腹腔注射10、20mg/(kg \cdot d)的ORI(将ORI溶于浓度低于0.1%的DMSO中,1次/d),共14d。Control组和Model组不做任何处理。

1.7 小鼠体质量检测、关节照相

治疗第14天,用精密电子体质量计测量小鼠的体质量,高清相机拍摄小鼠右足关节肿胀照片。

1.8 小鼠后足足掌厚度测量

治疗第0、3、6、9、12、14天,用精密游标卡尺测量小鼠左、右侧后足足掌厚度,求平均值。

1.9 小鼠关节炎指数评分

通过对小鼠后足关节的肿胀评分评估药物的效果。治疗第14天评估小鼠足爪肿胀程度,从红斑和水肿方面评估疾病严重程度。参照SEEUWS等^[11]的关节炎指数评分评估方法,疾病的严重程度通过0~4分来量化。0分:无肿胀迹象;1分:肢体轻度红肿;2分:肢体中度红肿;3分:严重踝关节和跗跖关节受累或肢体轻度扭曲;4分:严重踝关节和全肢体红肿、肿胀或扭曲。关节炎指数评分取每个小鼠后足左、右关节的评分总和的平均值。

1.10 小鼠IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGFA检测

治疗第14天,收集左足踝组织,匀浆机研磨,3000r/min离心10min(离心半径10cm),收集上清液,根据小鼠IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGFA的ELISA试剂盒说明书检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGFA浓度。

1.11 小鼠踝关节病理评估

在治疗的第14天,处理动物后,摘除左踝关节,去掉踝关节表皮和毛,修剪踝关节。将踝关节组织放入4%多聚甲醛固定液中,4℃固定24h。转移至EDTA脱钙液中进行脱钙,每3天更换1次脱钙液,脱钙完全后进行脱水、透明、包埋、切片、脱蜡。进行HE染色及番红固绿染色,显微镜下观察踝关节的软骨破坏及滑膜增生情况,通过滑膜组织病理分级进行评分^[12]。0分:无浸润迹象;1分:微小浸润;2

分:轻微浸润;3分:中度浸润;4分:严重浸润。

1.12 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。若数据服从正态分布,采用“ $\bar{x}\pm s$ ”进行统计描述,两组比较使用独立样本 t 检验,若方差齐,使用 t 检验,方差不齐使用 t' 检验;多组比较,若方差齐,使用 SNK 检验,若方差不齐,使用 Dunnett T3 检验。若数据不服从正态分布,两组比较使用独立样本 Mann-Whitney U 检验;多组比较,使用 Kruskal-Wallis 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RR 及 ORI 对 RA 血瘀证炎症小鼠体质量的影响

各组间体质量比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组小鼠体质量比较 ($\bar{x}\pm s, n=6, g$)

Table 1 Comparison of body mass among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=6, g$)

组别	体质量
Control 组	18.92±1.24
Model 组	18.05±0.56
L-RR 组	18.69±0.44
H-RR 组	18.73±0.79
L-ORI 组	18.54±0.52
H-ORI 组	18.95±0.85

2.2 RR 及 ORI 对 RA 血瘀证炎症小鼠后足足掌厚度的影响

第 7、10、13、16、19、22 天,与 Control 组比较,其余各组后足足掌厚度均增加 ($P < 0.05$)。第 10 天,与 Model 组比较, H-ORI 组后足足掌厚度下降 ($P < 0.05$)。第 16 天,与 Model 组比较, L-ORI 组和 H-ORI 组后足足掌厚度明显下降 ($P < 0.05$)。第 19 天,与 Model 组比较, H-ORI 组后足足掌厚度下降 ($P < 0.05$)。第 22 天,与 Model 组比较, H-RR 组、L-ORI 组、H-ORI 组后足足掌厚度明显下降 ($P < 0.05$)。详见图 1。

2.3 RR 及 ORI 对 RA 血瘀证炎症小鼠关节肿胀的影响

与 Control 组比较, Model 组小鼠整个右踝关节肿胀充血,关节变形。与 Model 组比较, L-RR 组、H-RR 组、L-ORI 组及 H-ORI 组小鼠右踝关节肿胀充血程度减轻,而 H-RR 组、H-ORI 组右踝关节肿胀充血减轻更明显。详见图 2。

2.4 RR 及 ORI 对 RA 血瘀证炎症小鼠关节炎指数评分的影响

与 Control 组比较,其余各组小鼠关节炎指数评分均升高 ($P < 0.05$)。与 Model 组比较, H-RR 组、H-ORI 组小鼠关节炎指数评分均下降 ($P < 0.05$)。详见表 2。

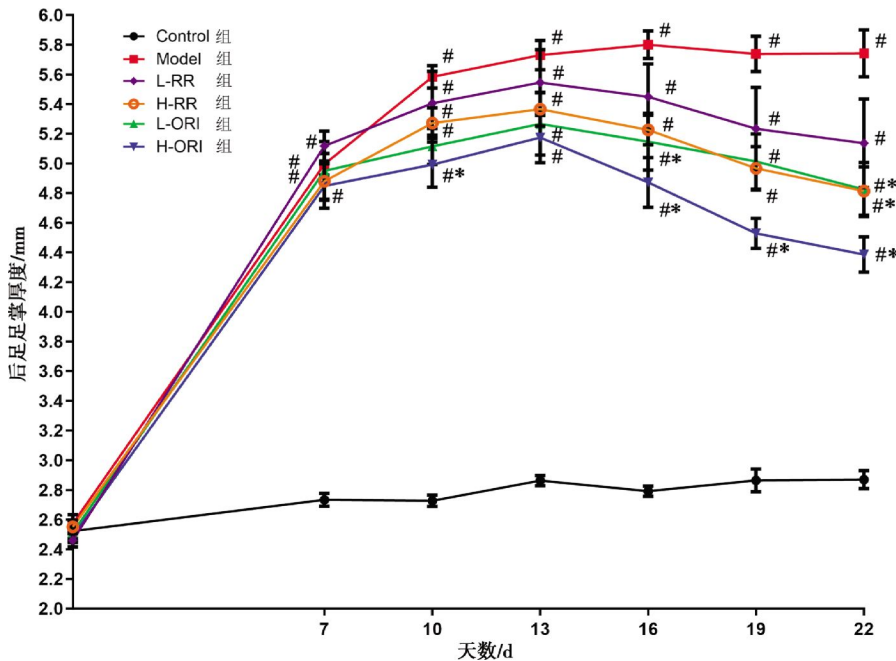


图 1 各组小鼠后足足掌厚度比较 ($\bar{x}\pm s, n=6, mm$)

Fig.1 Comparison of hind paw thickness among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=6, mm$)

注:与 Control 组比较, $^{\#}P < 0.05$;与 Model 组比较, $^{*}P < 0.05$ 。

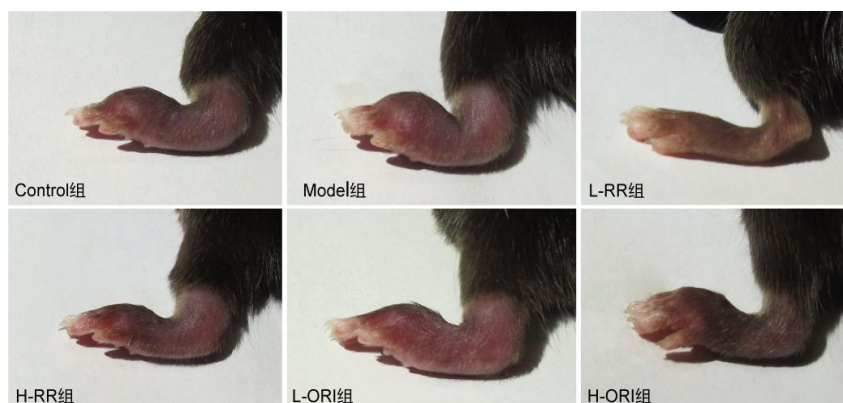


图 2 各组小鼠踝关节照片

Fig.2 Comparison of ankle joint photographs among different groups of mice

表 2 各组小鼠关节炎指数评分比较($\bar{x}\pm s, n=6$, 分)Table 2 Comparison of arthritis index scores among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$, points)

组别	关节炎指数评分
Control 组	0.00±0.00
Model 组	7.00±0.63 ^{##}
L-RR 组	6.67±0.81 ^{##}
H-RR 组	5.67±0.52 ^{##*}
L-ORI 组	6.17±0.75 ^{##}
H-ORI 组	5.50±0.55 ^{##*}

注:与 Control 组比较, ^{##} $P<0.01$;与 Model 组比较, ^{*} $P<0.05$ 。

2.5 RR 及 ORI 对 RA 血瘀证炎症小鼠关节炎因子的影响

与 Control 组比较,其余各组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度均升高($P<0.05$)。与 Model 组比较,H-RR 组、L-ORI 组、H-ORI 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度均下降($P<0.05$)。与 L-RR 组比较,H-RR 组、L-ORI 组 IL-1 β 浓度均下降($P<0.05$),H-ORI 组 IL-1 β 、IL-6 浓度均下降($P<0.05$)。与 H-RR 组比较,H-ORI 组 IL-1 β 浓度下降($P<0.05$)。与 L-ORI 组比较,H-ORI 组 IL-1 β 浓度下降($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 各组小鼠炎症因子浓度比较($\bar{x}\pm s, n=6$, pg/mL)Table 3 Comparison of concentrations of inflammatory factors among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$, pg/mL)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Control 组	33.96±7.39	30.03±4.00	62.80±25.60
Model 组	258.58±19.01 ^{##}	204.99±51.83 ^{##}	434.09±83.14 ^{##}
L-RR 组	185.29±45.29 ^{##}	139.96±23.90 ^{##}	376.31±63.91 ^{##}
H-RR 组	163.09±29.03 ^{##**}	87.12±10.52 ^{##*Δ}	263.92±25.21 ^{##*}
L-ORI 组	158.04±48.11 ^{##*}	85.81±6.68 ^{##*Δ}	289.33±60.21 ^{##*}
H-ORI 组	131.50±32.02 ^{##**}	52.86±6.51 ^{##**$\Delta$$\Delta$$\Delta$$\Delta$}	234.50±28.35 ^{##*Δ}

注:与 Control 组比较, ^{##} $P<0.01$;与 Model 组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与 L-RR 组比较, ^{Δ} $P<0.05$, ^{Δ} $P<0.01$;与 H-RR 组比较, ^{Δ} $P<0.05$;与 L-ORI 组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

2.6 RR 及 ORI 对 RA 血瘀证炎症小鼠关节 VEGFA 的影响

与 Control 组比较,其余各组 VEGFA 浓度均升高($P<0.05$)。与 Model 组比较,H-RR 组、L-ORI 组、H-ORI 组 VEGFA 浓度均下降 ($P<0.05$)。与 L-RR 组比较,H-RR 组、L-ORI 组、H-ORI 组 VEGFA 浓度均下降 ($P<0.05$)。与 H-RR 组比较,H-ORI 组 VEGFA 浓度下降 ($P<0.05$)。与 L-ORI 组比较,H-ORI 组 VEGFA 浓度下降($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 各组小鼠关节 VEGFA 浓度比较($\bar{x}\pm s, n=6$, pg/mL)Table 4 Comparison of VEGFA concentrations in joints among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$, pg/mL)

组别	VEGFA
Control 组	59.31±14.35
Model 组	434.29±90.06 ^{##}
L-RR 组	365.43±36.38 ^{##}
H-RR 组	252.03±33.31 ^{##*$\Delta$$\Delta$}
L-ORI 组	244.14±28.28 ^{##*$\Delta$$\Delta$}
H-ORI 组	183.50±21.45 ^{##**$\Delta$$\Delta$$\Delta$$\Delta$}

注:与 Control 组比较, ^{##} $P<0.01$;与 Model 组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与 L-RR 组比较, ^{Δ} $P<0.01$;与 H-RR 组比较, ^{Δ} $P<0.05$;与 L-ORI 组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

2.7 RR 及 ORI 对 RA 血瘀证炎症小鼠踝关节的影响

与 Control 组比较,Model 组关节腔内大量炎症细胞浸润、滑膜增生、关节软骨变薄。治疗后,L-RR 组、H-RR 组、L-ORI 组、H-ORI 组关节腔内仍可见炎症细胞浸润、滑膜增生、软骨破坏。与 Model 组比较,各组炎症程度、滑膜增生、软骨破坏减少,以 H-RR 组、H-ORI 组改善较明显。

与 Control 组比较,其余各组滑膜组织病理评分均升高($P<0.05$)。与 Model 组比较,H-RR 组、L-ORI

组、H-ORI 组滑膜组织病理评分均下降 ($P<0.05$)。与 L-RR 组比较,H-ORI 组滑膜组织病理评分下降 ($P<0.05$)。详见图 3。

3 讨论

RA 以关节肿胀、畸形为主要表现,归属于中医学“尪痹”范畴,血瘀证是尪痹常见证候之一^[13]。活血化瘀法是 RA 中医治疗的主要方法,血瘀证作为常见的中医症候,目前已有相关成熟的动物模型,而 RA 血瘀证模型也有报道。李茜等^[8]通过在雌性 SD 大鼠的 II 型胶原诱导关节炎模型基础上,结合小剂量长期注射盐酸肾上腺素和 4 ℃冷水应激的方法,成功建立 RA 血瘀证动物模型,并将足趾肿胀度、关

节炎指数、类风湿因子、TNF- α 、血栓素 A2、超敏 C 反应蛋白、红细胞沉降率、关节病理作为评估 RA 血瘀证模型的量化指标。本研究参考其方法建立 RA 血瘀证小鼠炎症模型,Model 组足趾肿胀、关节评分、关节肿胀程度、炎症因子、关节病理量化指标结果均与李茜等建立的模型一致,而关节红肿疼痛体现了血瘀证“瘀血阻滞,不通则痛”的病机,细胞因子升高、关节病理滑膜炎损伤,体现了“因炎致瘀”的血瘀理论^[14]。从多方面证明,初步建立 RA 血瘀证炎症模型。

本研究使用不同浓度 RR 治疗 RA 血瘀证炎症模型,2015 年版《中华人民共和国药典》记载 RR 具有清热解毒、活血止痛的功效^[5]。现代研究发现,RR

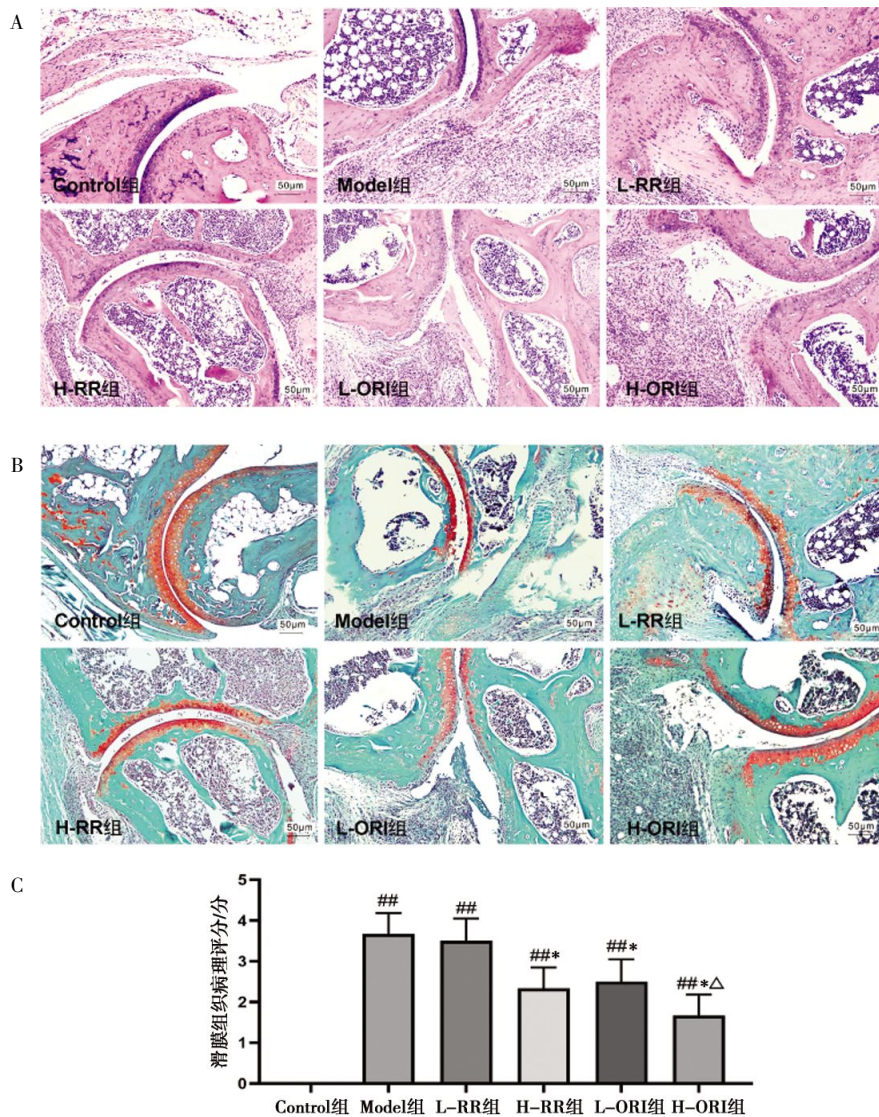


图 3 各组小鼠关节病理评估

Fig.3 Pathological evaluation of joints in each group of mice

注:A.各组小鼠关节 HE 染色($\times 40$);B.各组小鼠关节番红固绿染色($\times 40$);C.各组小鼠关节滑膜组织病理评分,与 Control 组比较,## $P<0.01$;与 Model 组比较,* $P<0.05$;与 L-RR 组比较, $\Delta P<0.05$ 。

具有抗癌、抗炎作用^[10,15]。本研究结果发现,低浓度的RR能改善关节肿胀、关节病理的改变,高浓度的RR能降低炎症因子的浓度,说明RR的疗效与剂量有关。TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等是RA的主要炎症因子^[16-18]。VEGFA是RA血管翳形成的关键因素^[19]。炎症能诱导机体组织损伤、充血、渗出或细胞形态结构变化,炎症因子能激活凝血系统,促进血小板聚集,促进血栓形成,与中医学“因炎致瘀”理论相契合^[13]。本研究结果发现,RR能抑制炎症因子、VEGFA的表达。因此,从炎症方面论证了RR治疗RA血瘀证的理论。而血管翳的形成是RA软骨和关节破坏的主要原因^[20]。在本研究中,RA血瘀证动物模型VEGFA浓度明显上升,同时表现为血瘀的状态,而使用RR及ORI治疗后,RA血瘀证小鼠模型的血瘀症状改善,同时VEGFA浓度也不同程度下降。因此,推测VEGFA可以作为RA血瘀证模型判定的指标。为进一步探究RR的功效,同时使用RR的主要活性成分ORI治疗RA血瘀证炎症模型,本研究结果发现,低、高浓度的ORI均能改善RA血瘀证模型的关节肿胀、炎症因子、关节病理,且高浓度的ORI效果更明显,与RR结果相似。因此,推断RR改善RA血瘀证模型的主要成分可能是ORI,而ORI结果进一步支持RR能治疗RA血瘀证的猜测。

综上所述,本研究从关节肿胀、关节病理、炎症因子、血管内皮细胞因子等方面证明RR、ORI治疗RA血瘀证炎症模型有效,表明RR及其活性成分ORI可能成为治疗RA血瘀证的潜在药物,VEGFA可能作为RA血瘀证的一个疗效观察指标。

参考文献

- [1] ANDREA, DI MATTEO, JOAN M, et al. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2023, 402(25): 2019–2033.
- [2] BROCK J, BASU N, SCHLACHETZKI J C M, et al. Immune mechanisms of depression in rheumatoid arthritis[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2023, 19(12): 790–804.
- [3] JANG S, KWON E J, LEE J J. Rheumatoid arthritis: Pathogenic roles of diverse immune cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 905.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 106.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 115.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 119.
- [7] LI X, ZHANG C T, MA W, et al. Oridonin: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and toxicity[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 645824.
- [8] 李 茜, 梁晓东, 曹永仓, 等. 类风湿关节炎血瘀证大鼠模型的制备及评价[J]. *山东中医药大学学报*, 2017, 41(5): 476–481.
- [9] 章元沛. 药理学实验[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 208.
- [10] HE H B, JIANG H, CHEN Y, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2550.
- [11] SEEUWS S, JACQUES P, VAN PRAET J, et al. A multiparameter approach to monitor disease activity in collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2010, 12(4): R160.
- [12] ZHAO X H, JIANG S R, DONG Q, et al. Anti-rheumatoid arthritis effects of iridoid glucosides from *Lamiophlomis rotata* (Benth.) kudo on adjuvant-induced arthritis in rats by OPG/RANKL/NF- κ B signaling pathways[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 266: 113402.
- [13] 刘蔚翔, 姜 泉. 中西医治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(12): 7251–7257.
- [14] 马晓娟, 殷惠军, 陈可冀. 血瘀证与炎症相关性的研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(7): 669–672.
- [15] 李晓娅, 单尚然. 冬凌草生物活性、临床应用及产品开发研究进展[J]. *大众科技*, 2023, 25(4): 66–69.
- [16] NYGAARD G, FIRESTEIN G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2020, 16(6): 316–333.
- [17] HAN P, LIU X Y, HE J, et al. Overview of mechanisms and novel therapies on rheumatoid arthritis from a cellular perspective[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1461756.
- [18] KONDO N, KURODA T, KOBAYASHI D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 10922.
- [19] TAYLOR P C. VEGF and imaging of vessels in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Research*, 2002, 4(Suppl 3): S99–S107.
- [20] ELSHABRAWY H A, CHEN Z L, VOLIN M V, et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(4): 433–448.

(本文编辑 周 旦)