复方夏天无片治疗类风湿关节炎的实验研究

马瑞瑞[1]，余陈欢[2]，于晶晶[3]，吴天进[3]，李慧敏[3]，应振华[3*] (1.青岛大学，山东 青岛 266000；2.中国科学院肿瘤与基础研究所动物实验中心，杭州 310000；3.浙江省人民医院，杭州医学院附属人民医院，杭州医学院风湿免疫病研究所，杭州 310000)

摘要：目的 探讨复方夏天无片对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis，CIA)小鼠的疗效及安全剂量。**方法** 将CIA小鼠随机分为6组：模型组、正常组、阳性(雷公藤 15 mg·kg^{-1})组、复方夏天无片低、中、高剂量(288，864，1 728 mg·kg^{-1})组，每组10只。治疗21 d后，比较各组小鼠的一般情况、关节病理情况。探索复方夏天无片的安全浓度及对TNF-α诱导下的滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synoviocyte，FLS)增殖程度的影响。**结果** 与模型组比较，各给药组小鼠足爪肿胀情况明显减轻，复方夏天无片中、高剂量组关节炎指数显著降低(P<0.05 或 P<0.01)。病理上，复方夏天无片可减少炎性细胞浸润，降低TNF-α表达，抑制破骨细胞形成，且复方夏天无片中、高剂量组优于阳性组。复方夏天无片安全浓度≤200 μg·mL^{-1}，与模型组比较，复方夏天无片高剂量组可明显抑制FLS细胞增殖(P<0.05)。**结论** 复方夏天无片可改善CIA小鼠的一般情况，降低关节炎指数及TNF-α阳性表达，抑制破骨细胞形成及FLS增殖。

关键词：胶原诱导性关节炎；类风湿关节炎；复方夏天无片

中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2021)09-1043-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.09.004

引用本文：马瑞瑞，余陈欢，于晶晶，等. 复方夏天无片治疗类风湿关节炎的实验研究[J]. 中国现代应用药学，2021，38(9)：1043-1048.

Experimental Study of Compound Xiatianwu Tablets Treatment of Rheumatoid Arthritis

MA Ruirui[1], YU Chenhuan[2], YU Jingjing[3], WU Tianjin[3], LI Huimin[3], YING Zhenhua[3*] (*1.Qingdao University, Qingdao 266000, China; 2.Animal Experiment Center, Institute of Cancer and Basic Research, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310000, China; 3.Zhejiang People's Hospital, People's Hospital Affiliated to Hangzhou Medical College, Institute of Rheumatology and Immunology, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the efficacy and safe dose of Compound Xiatianwu tablets in treating collagen-induced arthritis(CIA) of mice. **METHODS** CIA mice were randomly divided into 6 groups: model group, normal group, positive (*Tripterygium wilfordii* 15 mg·kg^{-1}) group, Compound Xiatianwu tablets low, medium, high dose (288, 864, 1 728 mg·kg^{-1}) groups, with 10 mice in each group. After 21 d of treatment, the general condition and joint pathology were compared wtih each group, and the safe concentration of Compound Xiatianwu tablets and its effect on proliferation of TNF-α induced fibroblast-like synoviocyte(FLS) were explored. **RESULTS** Compared with model group, paw swelling of mice in treatment groups was all reduced, and arthritis index of mice in Compound Xiatianwu tablets medium, high dose groups was significantly decreased(P<0.05 or P<0.01). Pathologically, Compound Xiatianwu tablets could reduce inflammatory cells infiltration, decrease the positive expression of TNF-α and inhibit the formation of osteoclasts, and Compound Xiatianwu tablets medium, high dose groups had better effects than positive group. The safe concentration of Compound Xiatianwu tablets was ≤ 200 μg·mL^{-1}. Compared with model group, Compound Xiatianwu tablets high dose group had a good inhibitory effect on proliferation of FLS and there were statistically significant differences(P<0.05). **CONCLUSION** Compound Xiatianwu tablets can improve the general conditions of CIA mice, reduce the arthritis index, decrease the positive expression of TNF-α, inhibite osteoclast formation and FLS proliferation.

KEYWORDS: collagen induced arthritis; rheumatoid arthritis; Compound Xiatianwu tablets

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis，RA)是一种可引起多个器官受累的弥漫性、慢性系统性自身免疫病。RA影响全球0.5%~1%的人口，多发生于老年人，女性患病风险高。RA造成关节结构破坏与功能障碍，使患者活动受限，日常生活受到影响，严重降低患者及其家人的生活质量，一旦确诊，应尽早治疗[1-2]。传统的免疫抑制剂如甲氨蝶呤一直是治疗RA的基础用药，但其带来的不良反应也不容小觑，近些年来，虽然随着生物靶向药物的开发应用，RA 的临床缓解率得到明显提

基金项目：浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY429)

作者简介：马瑞瑞，女，硕士，住院医师　Tel:18463726461　E-mail: 1360112149@qq.com　*通信作者：应振华，男，主任医师　Tel: 13989897128　E-mail: 13706712139@126.com

高，但仍不能有效阻止疾病进展，甚至有部分患者对生物制剂的治疗并不敏感[3]。因此，探索新的安全有效的药物，寻求新的有效治疗手段具有非常重要的意义。天然药物因其来源广、不良反应小、安全性高，具有多途径、多靶点起效的特点，在治疗发病机制复杂的疾病方面显现出独特优势，逐渐获得越来越多的关注。罂粟科紫堇属夏天无是延胡索亚属植物伏生紫堇的块茎，是中国传统的中药材，收载于中国药典 2015 年版(一部)，其味甘，微辛，性温，可行气活血、通络止痛[4]。根据现代药理学研究，夏天无主要有效成分为包含原阿片碱、普鲁托品、延胡索乙素等生物碱在内的夏天无总碱[5]。复方夏天无片以夏天无为主药，佐以麝香、三七、全蝎、当归、牛膝等 33 味中药研制而成，具有驱风逐湿、舒筋活络、行血止痛之功效[6]。目前临床研究已证实复方夏天无片对 RA 具有改善作用[7]，但尚无相关前期实验研究支持。因此，本实验采用胶原诱导关节炎小鼠研究复方夏天无片对 RA 的治疗作用，为其在临床中推广使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞 SPF 级 BALB/c 小鼠(6~8 周龄)，60 只，体质量(20±2)g，购自浙江省医学科学院实验动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK(浙)2019-0001，雌雄不拘。人滑膜成纤维细胞(fibroblast- like synoviocyte，FLS，武汉谷歌生物有限公司)。

1.1.2 药物与试剂 完全弗氏佐剂(批号：SLCB3232)和不完全弗氏佐剂(批号：SLCB0103)均购自美国 Sigma 公司；牛 II 型胶原(BIIC，美国 Chondrex 公司，批号：190201)；TNF-α(美国 Peprotech 公司，批号：641525E1319)；醋酸(国药集团化学试剂有限公司，批号：180719)；雷公藤多苷片(浙江得恩德制药股份有限公司，批号：1811132B；规格：每片 10 mg)；复方夏天无片(浙江康恩贝制药股份有限公司，批号：190603；规格：每片 0.32 g)；TRAP 染色试剂盒(南京建成生物工程研究所，批号：D023-1-1)。

1.2 方法

1.2.1 RA 小鼠模型的制备

1.2.1.1 造模剂的配制 依据 Chondrex 公司的 BIIC 说明书配制造模剂，流程：将 5 mL 0.05 mol·L^{-1} 醋酸水与 10 mg BIIC 完全混合，配制成 BIIC 醋酸溶液，BIIC 浓度为 2 mg·mL^{-1}，置于 4 ℃冰箱过夜；将 5 mL BIIC 醋酸溶液与 5 mL 完全弗氏佐剂混匀，在 4 ℃下充分搅拌使其乳化，配制成乳化液后，BIIC 浓度为 1 mg·mL^{-1}，将此乳化液标记为造模剂 a(用于初次免疫)；将 5 mL BIIC 醋酸溶液与 5 mL 不完全弗氏佐剂以同样方法配制成 BIIC 浓度为 1 mg·mL^{-1} 的乳化液，标记为造模剂 b(用于二次免疫)。

1.2.1.2 胶原诱导型 RA 小鼠模型的制备 初次免疫：小鼠皮下注射造模剂 a，分别注射于背部、尾根部及任一后足掌，每只 0.2 mL；正常组以同样的方法注射生理盐水，每只 0.2 mL。二次免疫：小鼠初次免疫 7 d 后皮下注射造模剂 b，分别注射于背部、尾根部及同一后足掌，每只 0.2 mL，目的是加强免疫效果；正常组以同样的方法注射生理盐水，每只 0.2 mL。14 d 后再次注射造模剂 b 加强免疫。

1.2.2 分组及给药 将 BALB/c 小鼠采用随机数字表法随机分为 6 组：正常组、模型组、阳性组(雷公藤，15 mg·kg^{-1}，以雷公藤多苷含量计)、复方夏天无片低、中、高剂量组，每组 10 只。根据小鼠体质量计算药物给药量，低、中、高剂量比例为 1∶3∶6；其中，低剂量为临床用药的等效剂量，设定复方夏天无片低剂量为 288 mg·kg^{-1}，则相应中、高剂量分别为 864，1 728 mg·kg^{-1}。采用灌胃给药的方式，灌胃体积 0.04 mL·g^{-1}，每天 1 次，造模第 22 天开始连续给药 21 d。

1.2.3 关节的观察与关节炎程度的评估 从二次免疫后小鼠开始，每天观察大鼠足部是否出现关节炎症状。关节炎症状出现后，遵照下述小鼠关节炎评分标准：0 分，无关节炎症(无红肿)；1 分，有红色斑点或轻度肿胀；2 分，关节中度肿胀；3 分，关节重度肿胀；4 分，关节僵直甚至畸形，严重功能障碍。

根据未注射胶原的 3 个关节的病变程度累计积分，最高为 12 分。盲评标准下实施操作，至少 1 个足爪包括踝关节全部红肿，则认为关节炎诱导成功。

1.2.4 组织标本病理学处理及观察 实验结束后，颈椎脱臼处死小鼠，取小鼠的左后侧踝关节，去除皮毛及肌肉，使用 PBS 清洗 2 遍后浸泡于 4%多聚甲醛溶液中固定，随后取踝关节的关节切面行 HE 染色：分离后肢的踝关节组织，置于 10%福尔马林缓冲液中固定 48 h，随后置于 15%乙二胺四乙酸(EDTA)中脱钙 3 周，隔 3 d 换液 1 次，

常规石蜡包埋、石蜡切片，5 μm 矢状切片、并用苏木精染色，光镜观察滑膜炎情况。TRAP 染色：采用 TRAP 染色试剂盒，按照说明书流程染色。用甲基绿复染 2 min，甘油封片，显微镜下观察和计数破骨细胞数目，并以 Image J 软件分析每单位体积表面破骨细胞数目，测量胫骨生长板厚度。TNF-α 免疫组织化学染色：将小鼠踝关节组织切片进行 10%福尔马林缓冲液固定，封闭后孵育相应的一抗 TNF-α过夜，次日复温 1 h 后，滴加通用型二抗，DAB 显色，显色后封片，于 100 倍显微镜下拍照，使用 Image Pro-plus 软件分析，以正常组平均光密度值为基准，根据阳性细胞的染色面积和强度对 TNF-α进行半定量分析。

1.2.5 细胞处理及观察 采用MTT法测定细胞增殖活性。选取对数生长期 FLS，用 0.25%胰蛋白酶消化后，以含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液制成细胞密度为 1×10^5 ·mL^{-1} 的单细胞悬液，接种于 96 孔板中，每孔 100 μL。将培养板置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，弃原培养液，PBS 冲洗细胞，将试验分为空白组(空白 DMEM 高糖培养液)、模型组(加入终质量浓度为 20 ng·mL^{-1} 的 TNF-α溶液)、阳性组(阳性对照，加入终质量浓度为 100 μg·mL^{-1} 的雷公藤多苷与 20 ng·mL^{-1} TNF-α 的混合液)及复方夏天无片不同质量浓度组(加入终质量浓度为 100，140，180 μg·mL^{-1} 提取物与 20 ng·mL^{-1} TNF-α的混合液)(不同质量浓度组复方夏天无片是由康恩贝企业提供的中药复方水提物，将之浓缩减压干燥至浸膏并溶于无血清培养基中配置)，将以上各质量组，经滤膜过滤，灭菌后，每孔放置 200 μL，每个质量浓度设置 5 个复孔。培养 48 h 后，每孔加入 5 mg·mL^{-1} MTT 溶液 10 μL，继续培养 4 h 后，弃孔内上清，加入 DMSO 溶剂，每孔 150 μL，37 ℃恒温摇床中震荡 10 min，使沉淀充分溶解后，置于酶标仪上测定 490 nm 波长的吸光度(*OD*)值，计算细胞增殖率。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组数据比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

小鼠在一次免疫后 5~7 d 出现双下肢关节的轻度红肿，此时进行二次免疫，14 d 后再次加强免疫，加强免疫后红肿进一步加重，部分小鼠踝关节充血发亮。正常组小鼠关节屈伸度、活动度可，未见红肿异常；模型组小鼠精神萎靡，少动嗜睡，行动迟缓，饮食减少，踝、足掌关节出现明显的红肿、充血，活动度减退，部分伴有皮下红斑，部分甚至出现踝、掌关节僵硬，不能活动，且压痛明显；造模第 22 天开始，连续给药 21 d，复方夏天无片组和阳性组足爪肿胀情况均较模型组减轻，其中复方夏天无片中、高剂量组小鼠足掌关节肿胀情况较阳性组减轻明显。结果见图 1。

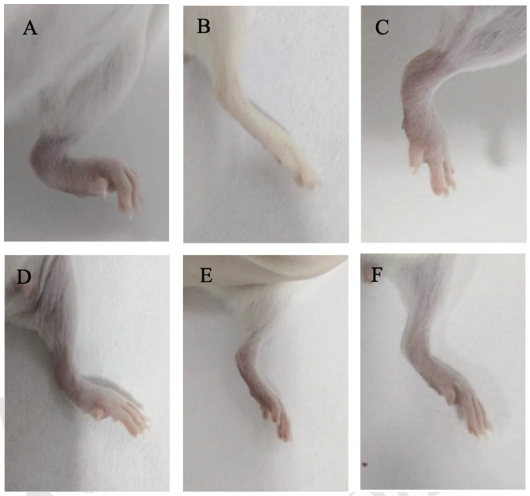

图 1 小鼠下肢肿胀观察

A–模型组；B–正常组；C–阳性组；D–复方夏天无片低剂量组；E–复方夏天无片中剂量组；F–复方夏天无片高剂量组。

Fig. 1 Observation of lower limb swelling in mice

A–model group; B–normal group; C–positive group; D–Compound Xiatianwu tablets low dose group; E–Compound Xiatianwu tablets medium dose group; F–Compound Xiatianwu tablets high dose group.

2.2 关节炎指数评分

在药物治疗 21 d 后，对各组小鼠的关节炎指数进行评估，结果见表 1。正常组小鼠关节炎指数为 0，模型组小鼠为 8.12，阳性组较模型组有所下降，但无显著性差别，而复方夏天无片中、高剂量组关节炎指数均明显降低，且与模型组相比差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 小鼠关节炎指数评分

Tab. 1 Arthritis index score of mice

组别	关节炎评分(第 42 天)
正常组	0
模型组	8.12±0.33
阳性组	6.73±0.71
复方夏天无片低剂量组	7.67±0.9
复方夏天无片中剂量组	6.41±0.78[1)]
复方夏天无片高剂量组	5.89±0.44[2)]

注：与模型组比较，[1)]$P<0.05$，[2)]$P<0.01$。

Note: Compared with the model group, [1)]$P<0.05$, [2)]$P<0.01$.

2.3 关节组织病理学观察

正常组的关节组织中未见明显的异常炎性细胞浸润；模型组和复方夏天无片低剂量组均可见明显的炎性细胞浸润(白色箭头所指)，中剂量和高剂量组可以在一定程度上改善关节组织中炎性细胞浸润的情况，且效果略优于阳性组。结果见图 2。

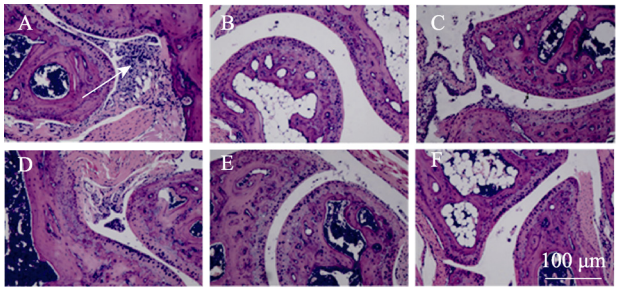

图 2 小鼠踝关节 HE 染色(100×)

A–模型组；B–正常组；C–阳性组；D–复方夏天无片低剂量组；E–复方夏天无片中剂量组；F–复方夏天无片高剂量组。

Fig. 2 HE staining of mouse ankle joint(100×)

A–model group; B–normal group; C–positive group; D–Compound Xiatianwu tablets low dose group; E–Compound Xiatianwu tablets medium dose group; F–Compound Xiatianwu tablets high dose group.

TRAP 染色结果见图 3，可见模型组破骨细胞(白色箭头所指)活跃，导致骨质破坏加重，复方夏天无片高剂量组具有较好的抑制破骨细胞形成的作用，效果优于阳性组。

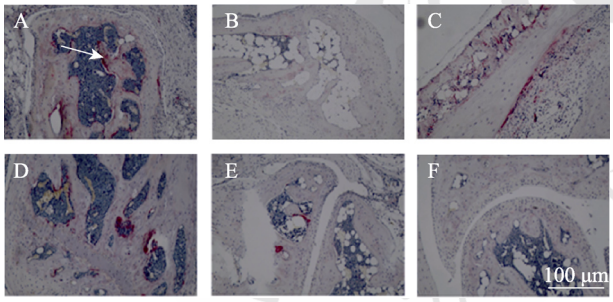

图 3 小鼠踝关节 TRAP 染色(100×)

A–模型组；B–正常组；C–阳性组；D–复方夏天无片低剂量组；E–复方夏天无片中剂量组；F–复方夏天无片高剂量组。

Fig. 3 TRAP staining of mouse ankle joint(100×)

A–model group; B–normal group; C–positive group; D–Compound Xiatianwu tablets low dose group; E–Compound Xiatianwu tablets medium dose group; F–Compound Xiatianwu tablets high dose group.

TNF-α免疫组化染色见图 4 和表 2。模型组关节腔隙 TNF-α阳性细胞(黑色箭头所指)表达丰富，与 HE 染色的炎性细胞浸润情况一致，经复方夏天无片干预后，关节腔内的阳性表达显著降低，且中、高剂量组效果优于阳性组。各组 TNF-α平均相对光密度提示，与正常组比较，模型组 TNF-α阳性表达显著升高(P<0.01)，与模型组比较，各给药组 TNF-α阳性表达显著下降(P<0.01)。

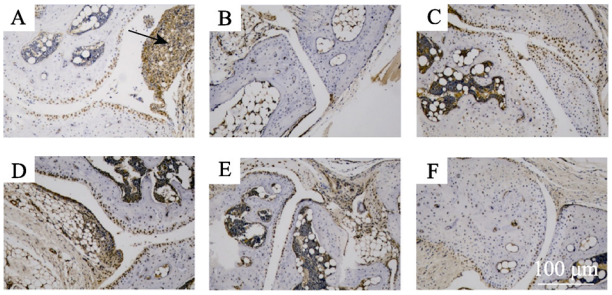

图 4 小鼠踝关节 TNF-α免疫组化染色(100×)

A–模型组；B–正常组；C–阳性组；D–复方夏天无片低剂量组；E–复方夏天无片中剂量组；F–复方夏天无片高剂量组。

Fig. 4 Immunohistochemical staining of TNF-α in ankle joint mice(100×)

A–model group; B–normal group; C–positive group; D-Compound Xiatianwu tablets low dose group; E–Compound Xiatianwu tablets medium dose group; F–Compound Xiatianwu tablets high dose group.

表 2 复方夏天无片对小鼠踝关节 TNF-α的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

Tab. 2 Effect of Compound Xiatianwu tablets on the expression of TNF-α in ankle joint of mice($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	*OD* 值
正常组	1.0±0.1
模型组	5.4±0.4[2)]
阳性组	1.5±0.2[1)]
复方夏天无片低剂量组	3.7±0.4[1)]
复方夏天无片中剂量组	2.2±0.2[1)]
复方夏天无片高剂量组	1.4±0.2[1)]

注：与模型组比较，[1)]P<0.01；与正常组比较，[2)]P<0.01。

Note: Compared with the model group, [1)]P<0.01; compared with normal group, [2)]P<0.01。

2.4 细胞观察

设置复方夏天无片浓度梯度，采用 MTT 法检测不同浓度梯度复方夏天无片对 HFLS 成纤维细胞的抑制率，试验重复 3 次，分析得出浓度梯度在 160，180，200，220，240 μg·mL^{-1}时的细胞抑制率分别为(7.81±2.33)%，(9.55±3.82)%，(9.46±3.12)%，(18.41±4.21)%，(23.21±3.91)%，选取抑制率<10%的最高剂量为药物的安全有效浓度，可知复方夏天无片的安全浓度范围为≤200 μg·mL^{-1}。TNF-α可诱导 FLS 细胞增殖，细胞本身无明显形态变化，经给予复方夏天无片后，细胞增殖效应随着药物浓度的提高而降低。实验发现，TNF-α诱导浓度在 1，5，10，20，50 ng·mL^{-1}时，细胞增殖率分别为(2.31±0.28)%，(10.81±3.33)%，(46.51±6.20)%，(65.33±9.12)%，(49.50±8.21)%。通过以上数据可知 TNF-α的有效诱导浓度为 20 ng·mL^{-1}；同样，通过试验检测复方夏天无片对

TNF-α诱导下的细胞增殖率，可见模型组(20 ng·mL^{-1})的细胞增殖率为(51.42±11.22)%，阳性组(100 μg·mL^{-1})细胞增殖率为(32.71±4.33)%，复方夏天无片组(100，140，180 μg·mL^{-1})细胞增殖率分别为(48.30±9.71)%，(40.33±8.85)%，(30.44±7.34)%，其中 180 μg·mL^{-1} 复方夏天无片组与模型组比较，差异具有统计学意义(P<0.05)。

3 讨论

RA 发病机制十分复杂，与多种遗传和外在因素(感染、生活方式、个人习惯、职业暴露)有关，最具特征性的病理改变是关节炎性浸润，滑膜细胞肿瘤样增生，软骨和骨破坏。研究证实，TNF-α、IL-6 和 IL-33 等促炎细胞因子的升高在 RA 的发生发展中起着关键作用。尤其是 TNF-α，近年来越来越多的证据表明其在 RA 炎症进展和组织破坏中发挥着不容忽视的关键作用[8-10]。TNF-α作为主要的促炎性细胞因子，与其受体相结合后，除了可刺激滑膜和内皮细胞成纤维生长因子促进一系列趋化因子的生成，进一步放大加重炎症反应外[11]，更重要的是其还能通过激活 RANK、TRAF6、NF-κB 等通路或促进 RANKL 的表达直接或间接影响到破骨细胞[12]。破骨细胞是体内唯一具有骨吸收能力的细胞，在生理状况下，破骨细胞与成骨细胞处于动态平衡的状态，破骨细胞诱导骨小梁和骨皮质表面产生沟槽及隧道，随后成骨细胞通过产生新的骨基质对这些沟槽与隧道进行填充。而在病理状况下，骨的平衡状态被打破，破骨细胞异常活跃，一则通过整合素和细胞外基质蛋白相互作用发挥其骨吸收功能；二则通过其皱褶缘质子泵泌酸，使骨质脱钙；此外还能分泌基质金属蛋白酶降解周围骨基质，最终导致骨量减少，诱发关节骨缺损。本实验发现，模型组小鼠关节腔隙 TNF-α阳性细胞表达丰富，破骨细胞异常活跃，骨质破坏严重，经夏天无复方治疗后可显著降低 TNF-α阳性细胞表达、抑制破骨细胞形成，且效果优于雷公藤阳性对照组。

此外，还通过细胞试验确定了夏天无复方对 TNF-α诱导下 FLS 增殖的影响。FLS 位于滑膜衬里层，在各种因素作用下活化并增殖，引发关节炎及骨与软骨的破坏，在 RA 的整个发病过程中起着不容忽视的重要作用[13]。关节局部大量炎性细胞浸润，活化滑膜组织中 CD4$^+$T 细胞、巨噬细胞，产生大量炎性因子，作用于 FLS，引发炎症反应[14]。FLS 长期处于炎症状态，进一步造成局部骨及关节下软骨组织的破坏[15]。此外有研究表明，体内多种信号通路可直接或间接参与 RA-FLS 细胞增殖的调控，促进 RA 的发生发展。如 Wnt1 可通过调控 FLS 中纤连蛋白表达，诱导 FLS 组织异常增殖，加剧炎症发生，而阻断 Wnt 信号通路，则会抑制 FLS 增殖，同时可减少炎症因子的分泌[16]；此外，Li 等[17]在研究中发现，通过影响 JNK-MAPK，p38 和 NF-κB 通路可对 TNF-α诱导下的 FLS 进行调节，从而参与 RA 滑膜炎的发生发展。由于活化增殖后的 FLS，不仅可向关节软骨表面迁移和侵袭，活化破骨细胞，侵蚀关节软骨及骨[18]，还可通过分泌多种炎症介质(如促炎细胞因子、基质金属蛋白酶及组织蛋白酶等)作用于信号传导的多种途径间接降解关节骨与软骨组织[19]。因此，对 RA-FLS 的有效控制对缓解 RA 患者的临床症状以及改善预后可能具有一定的帮助[20]。本实验发现，与 TNF-α诱导组相比较，复方夏天无片组的成纤维样滑膜细胞增殖率下降，且药物剂量越高，细胞增殖率下降的越为明显，说明复方夏天无片可抑制 TNF-α诱导下成纤维样滑膜细胞的增殖，但其具体抑制作用通路还有待进一步实验明确。此外，雷公藤多苷片为临床治疗 RA 的常用复方中药，在本研究中作为阳性组，发现其对“小鼠关节肿胀程度”方面无显著疗效，但在改善小鼠关节炎症状态(包括破骨细胞增殖、TNF-α表达等)方面具有一定的抑制作用，可能与其作用起效时间、药效剂量、疗程及在小鼠体内生物利用度等因素有一定关系[21-22]，有待进一步观察。

综上，本次研究采用经典的胶原诱导方式成功建造 CIA 小鼠模型，在此基础上研究了复方夏天无片治疗类风湿关节炎的起效方式。结果显示，复方夏天无片可改善 CIA 小鼠的一般情况及关节炎症状、降低其关节炎指数、减少炎性细胞浸润及炎性因子 TNF-α阳性表达、抑制破骨细胞形成及 FLS 增殖，并以 MTT 法观察了不同浓度复方夏天无片对 FLS 的影响，筛选出合适药物浓度，但药物具体的影响作用通路以及基因靶点的寻找还有待进行更深一步的实验研究。本研究为该药进行开发研制、更好地应用于临床提供了一定的前期实验基础。

REFERENCES

[1] IMRAN M Y, SAIRA KHAN E A, AHMAD N M, et al.

Depression in rheumatoid arthritis and its relation to disease activity[J]. Pak J Med Sci, 2015, 31(2): 393-397.
[2] VAN DEN BEMT B J, ZWIKKER H E, VAN DEN ENDE C H. Medication adherence in patients with rheumatoid arthritis: A critical appraisal of the existing literature[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2012, 8(4): 337-351.
[3] MIOSSEC P. Rheumatoid arthritis: Still a chronic disease[J]. Lancet, 2013, 381(9870): 884-886.
[4] HUANG Q L, ZHANG W J, LI Y, et al. Alkaloid constituents from *Corydalis decumbens*[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2017, 48(5): 563-567.
[5] 王振中, 彭国平. 超临界 CO_2 萃取技术提取夏天无成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 585-586.
[6] 徐卫国, 靳利军. 复方夏天无片的临床应用简述[J]. 中国药业, 2008, 17(18): 63.
[7] YU S Y, YU Z A. Clinical observation of compound Xiatianwu tablets in treatment of 120 cases with active rheumatoid arthritis[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(6): 899-901.
[8] LI J, YAN H, CHEN H, et al. The pathogenesis of rheumatoid arthritis is associated with milk or egg allergy[J]. N Am J Med Sci, 2016, 8(1): 40-46.
[9] MCINNES I B, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205-2219.
[10] KASHIWAKURA J, YANAGISAWA M, LEE H, et al. Interleukin-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 production in cultured human synovium-derived mast cells[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2013, 161(Suppl 2): 32-36.
[11] MAINZ E R, SERAFIN D S, NGUYEN T T, et al. Single cell chemical cytometry of Akt activity in rheumatoid arthritis and normal fibroblast-like synoviocytes in response to tumor necrosis factor A[J]. Anal Chem, 2016, 88(15): 7786-7792.
[12] 张琴, 陈进伟, 凌光辉. 炎症因子调控类风湿关节炎骨侵蚀的分子机制[J]. 中华风湿病学杂志, 2014, 18(7): 494-497.
[13] BOTTINI N, FIRESTEIN G S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors[J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(1): 24-33.
[14] SKAPENKO A, LIPSKY P E, SCHULZE-KOOPS H. T cell activation as starter and motor of rheumatic inflammation[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006(305): 195-211.
[15] MORAND E F, LEECH M. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis[J]. Front Biosci, 2005, 10(1-3): 12-22.
[16] SUN J L, YAN P, CHEN Y Z, et al. MicroRNA-26b inhibits cell proliferation and cytokine secretion in human RASF cells via the Wnt/GSK-3β/β-catenin pathway[J]. Diagn Pathol, 2015, 10(1): 72. Doi:10.1186/s13000-015-0309-X.
[17] LI N, XU Q, LIU Q, et al. Leonurine attenuates fibroblast-like synoviocyte-mediated synovial inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology: Oxford, 2017, 56(8): 1417-1427.
[18] BARTOK B, FIRESTEIN G S. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis[J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 233-255.
[19] TURNER J D, FILER A. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2015, 27(2): 175-182.
[20] YANG L, GUO J, NIU J Y. Suppression of malignant signaling and behavior of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis by interleukin 6 receptor mimotope[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(10): 1212-1217.
[21] LIN N, JIANG Q, LIU W, et al. Clinical practice guideline for *Tripterygium* Glycosides/*Tripterygium wilfordii* Tablets in treatment of rheumatoid arthritis[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(17): 4149-4153.
[22] BESSIS N, DECKER P, ASSIER E, et al. Arthritis models: Usefulness and interpretation[J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(4): 469-486.

收稿日期：2020-09-04
(本文责编：曹粤锋)

http://www.chinamed.com