

引用:尹玲桃,谢湘雄,禹勇军,陈达,杨蕙.基于TNF信号通路探讨三痹颗粒治疗类风湿关节炎模型大鼠的机制[J].中医指导报,2025,31(9):55-60.

基于TNF信号通路探讨三痹颗粒治疗 类风湿关节炎模型大鼠的机制*

尹玲桃¹,谢湘雄¹,禹勇军¹,陈达¹,杨蕙²

(1.娄底市中医医院,湖南 娄底 417000;

2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的:探究三痹颗粒对类风湿关节炎(RA)模型大鼠的影响及可能的作用机制。方法:采用大鼠尾根部真皮下层注射法注射完全弗氏佐剂+卡介苗油乳剂以构建RA模型,随机分为模型对照组、甲氨蝶呤组、三痹颗粒高剂量组、三痹颗粒中剂量组及三痹颗粒低剂量组,另设空白对照组,每组10只。三痹颗粒高、中、低剂量组予三痹颗粒灌胃,剂量分别为5.40 g/kg、2.70 g/kg、1.35 g/kg,3次/d。甲氨蝶呤组给予甲氨蝶呤(0.90 mg/kg)灌胃,2次/周。空白对照组和模型对照组给予蒸馏水(10 mL/kg)灌胃,3次/d。连续给药4周,检测大鼠踝关节肿胀度并进行HE染色观察,酶联免疫吸附试验法(ELISA)试剂盒检测血清肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、IL-17和C反应蛋白(CRP),蛋白印迹法(Western Blotting)检测足趾组织TNF- α 、IL-6、IL-17和CRP蛋白相对表达水平,实时定量聚合酶链式反应(PCR)检测TNF- α mRNA、IL-6 mRNA、IL-17 mRNA和CRP mRNA相对表达水平。结果:与模型组比较,三痹颗粒各剂量组和甲氨蝶呤组踝关节肿胀度降低($P<0.01$),炎症细胞浸润减少。同时,三痹颗粒高剂量组和甲氨蝶呤组TNF- α 蛋白及mRNA相对表达水平降低($P<0.05$),表明TNF信号通路被抑制,其下游炎症因子IL-6、IL-17和CRP的蛋白及mRNA相对表达水平亦明显降低($P<0.05$)。此外,三痹颗粒高剂量组踝关节肿胀度与甲氨蝶呤组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),TNF- α 、IL-17和IL-6的蛋白及mRNA相对表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:三痹颗粒能通过降低TNF- α 表达水平以抑制TNF信号通路,并进一步下调下游炎症因子表达水平,缓解RA发展过程中出现的炎症细胞浸润和踝关节肿胀现象,从而减轻炎症反应。

[关键词] 类风湿关节炎;三痹颗粒;TNF信号通路;炎症反应;炎症因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)09-0055-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.09.009

The Mechanism of Sanbi Granules (三痹颗粒) in Treating Rheumatoid Arthritis Model Rats Based on TNF Signaling Pathway

YIN Lingtao¹, XIE Xiangxiong¹, YU Yongjun¹, CHEN Da¹, YANG Hui²

(1.Loudi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Loudi Hunan 417000, China;

2.The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect and possible mechanisms of Sanbi granules on rheumatoid arthritis (RA) model rats. Method: RA model was established by injecting complete Freund's adjuvant and BCG oil emulsion into the subcutaneous layer of rat tail root using injection method. The rats were randomly divided into model control group, methotrexate group, high dose group of Sanbi granules, medium dose group of Sanbi granules, and low dose group of Sanbi granules, with 10 rats in each group. A blank control group was also established. The high, medium, and low dose groups of Sanbi granules were given 5.40 g/kg, 2.70 g/kg, and 1.35 g/kg of Sanbi granules, respectively, 3 times a day. The methotrexate group was given methotrexate (0.90 mg/kg), twice a week. The blank control group and model control group were given distilled water at a dose of 10 mL/kg,

*基金项目:湖南省中医药管理局项目(B2024158);娄底市科学技术局2024年度临床医疗技术创新专项(娄科发〔2024〕17号);2025年度娄底市哲学社会科学成果评审委员会课题(202535B)

通信作者:杨蕙,女,副研究员,研究方向为中药药理

3 times a day. After continuous administration for 4 weeks, the swelling degree of the ankle joint in rats was detected and HE staining was implemented. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used to measure serum tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), and C-reactive protein (CRP). Western blotting analysis was used to measure the protein relative expression levels of TNF- α , IL-6, IL-17, and CRP in toe tissue. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to measure the relative expression levels of TNF- α mRNA, IL-6 mRNA, IL-17 mRNA, and CRP mRNA. Results: Compared with the model control group, the ankle joint swelling degree was reduced in high, medium, and low dose groups of Sanbi granules and methotrexate group ($P < 0.01$), and the inflammatory cell infiltration was reduced. At the same time, the TNF- α protein and TNF- α mRNA relative expression levels reduced in the high-dose group of Sanbi granules and methotrexate group ($P < 0.05$), indicating that the TNF signaling pathway was inhibited. The protein and mRNA relative expression levels of downstream inflammatory factors IL-6, IL-17, and CRP were also significantly reduced ($P < 0.05$). In addition, compared with the methotrexate group, there was no statistically significant difference in ankle joint swelling and protein and mRNA relative expression levels of TNF- α , IL-17 and IL-6 in high-dose group of Sanbi granules ($P > 0.05$). Conclusion: Sanbi granules can inhibit the TNF signaling pathway by reducing the expression level of TNF- α , and further down-regulate the expression level of downstream inflammatory factors, alleviate the inflammatory cell infiltration and ankle joint swelling that occur during the development of RA, and reduce the inflammatory response.

[Keywords] rheumatoid arthritis; Sanbi granules; TNF signaling pathway; inflammatory response; inflammatory factors

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的慢性自身免疫性疾病,在中医中多被归为“痹证”,发病原因与风寒湿邪侵袭、气血不畅等密切相关^[1-2]。研究^[3]表明,炎症细胞浸润、滑膜增生及骨破坏是RA的典型病理特征。当RA发生时,成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)被激活并释放血管内皮生长因子以诱导血管生成,致使滑膜细胞异常增殖^[4-5]。同时,血管数目增多提高了其向病变部位提供氧气和营养的能力,并且可以募集更多的炎症细胞以维持慢性炎症微环境^[6]。当炎症细胞数量增多,病变部位C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-17和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等促炎症因子水平将显著上调,干扰成骨细胞和破骨细胞的分化及功能,导致骨丢失^[6-7]。这些反应的累积,促使RA在临床上呈现出关节疼痛和肿胀等症状,随着病情发展还可能有关节强直、畸形甚至功能丧失,严重影响患者生活^[8]。目前甲氨蝶呤常用于治疗RA,但其被证实可能对机体产生副作用,影响治疗效果^[8-9]。相比于甲氨蝶呤等西药,中药在RA的治疗中则具有治疗效果好、副作用较小等优势^[10]。因此,可从传统中药库中挖掘治疗RA的有效方剂,为RA治疗提供新的药物选择。

三痹颗粒为娄底市中医医院自行研制的临床验方,由三痹汤化裁而来,以黄芪、人参、续断、防风、生地黄等16味中药为组方,具有益气活血、除湿通络、补益肝肾功效,多用于治疗RA、骨性关节炎等疾病^[10-11]。过往研究^[12-13]已证实三痹汤对于类风湿关节炎具有良好治疗效果,可缓解关节肿胀,改善滑膜组织病理损伤,减少炎症细胞浸润,降低血清TNF- α 、IL-1 β 以及IL-6水平。三痹颗粒对RA的治疗具有多成分、多靶点、多通路特点^[10]。其中,关键靶点TNF参与构成的TNF- α 信号通路

是细胞因子经典通路之一,对多种炎症因子表达具有促进作用,同时亦影响骨细胞功能,因此可作为RA治疗的关键路径^[14-15]。在此基础上,本研究通过注射完全弗氏佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)+卡介苗油乳剂构建RA大鼠模型,观察灌服三痹颗粒后RA模型大鼠踝关节肿胀度和关节组织炎症细胞浸润情况,并检测TNF- α 及IL-6等炎症因子表达水平以验证三痹颗粒是否通过TNF信号通路对RA大鼠炎症反应产生影响,以期三痹颗粒临床应用提供参考依据。

1 材 料

1.1 药物与试剂 三痹颗粒(娄底市中医医院自制,批号:240327,药准制号:湘药制备字Z20230774000);甲氨蝶呤片(通化茂祥制药有限公司,批号:231101);CFA(SIGMA公司,批号:JM-01495R);卡介苗(美国BD公司,批号:231141);大鼠TNF- α 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:JM-01587)、大鼠IL-17 ELISA试剂盒(批号:JM-01495R)、大鼠IL-6 ELISA试剂盒(批号:JM-01597R)、大鼠CRP ELISA试剂盒(批号:JM-01488R)均购自晶美生物工程有限公司。TNF- α 抗体(批号:AWA46292)、IL-6抗体(批号:AWA46788)、IL-17抗体(批号:AWA58209)均购自Abiowell公司;CRP抗体(Proteintech公司,批号:66250-1-Ig)。

1.2 主要仪器 电子天平(长沙湘平科技有限公司,型号:ES-100E);12号灌胃器[东西仪(北京)科技有限公司];分析天平(上海舜宇恒平科技有限公司,型号:FA2104);酶标仪(北京普朗新技术有限公司,型号:DNM-9606);离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:TDZ5-WS);生物显微镜[奥林巴斯(广州)工业有限公司,型号:CX23LED RFS1C];石蜡包埋机(湖北锦源医疗科技有限公司,型号:JY-BMC);自

动组织脱水机(型号:HP300)、轮转式切片机(型号:MT1)和摊片烤片机(型号:JY-TK6)均购自达科为生物技术股份有限公司;生强玻片扫描影像系统(湖北锦源医疗科技有限公司,型号:SQS-40R);实时荧光定量PCR分析仪(杭州博日科技股份有限公司,型号:FQD-96C);超灵敏多功能成像仪(Cytiva公司,型号:AI800UV);足趾容积测量仪(成都泰盟仪器有限公司,型号:PV-200)。

1.3 实验动物 70只SPF级SD大鼠,240~260 g,8周龄,雌雄各半,购于广东维通利华实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(粤)2022-0063;质量合格证号:44829700032493。于湖南斯莱克景达实验动物有限公司动物房中饲养[使用许可证号:SYXK(湘)2019-0017],温度20~26℃,湿度40%~70%,12 h/12 h明暗交替照明,自由饮食。实验动物的使用经湖南斯莱克景达实验动物有限公司实验动物管理(伦理)委员会审批通过(审批号:SJA202400801-09)。

2 方 法

2.1 RA大鼠模型的建立 参考封桂英等^[16]的方法构建RA大鼠模型。低温环境下CFA、卡介苗溶液[V(CFA):V(卡介苗溶液)=1:1]比例混合,形成CFA+卡介苗油乳剂。固定SD大鼠,在其尾根部经皮下注射CFA+卡介苗油乳剂。于第2周再次进行注射,加强免疫。若大鼠足趾出现红肿,踝关节体积明显增大,则视为造模成功^[17]。

2.2 动物分组及处理 取10只正常SD大鼠作空白对照组,将50只符合要求的RA模型大鼠划分为5组($n=10$):模型对照组、甲氨蝶呤组、三痹颗粒高剂量组、三痹颗粒中剂量组及三痹颗粒低剂量组。三痹颗粒高、中、低剂量组以灌胃方式给予三痹颗粒,剂量分别为5.40 g/kg、2.70 g/kg、1.35 g/kg,3次/d。甲氨蝶呤组以灌胃方式给予甲氨蝶呤(0.90 mg/kg)灌胃,2次/周。空白对照组和模型对照组给予蒸馏水(10 mL/kg)灌胃,3次/d。连续给药4周后,采集各组大鼠血液、足趾及踝关节等组织进行检测。

2.3 大鼠一般情况观察 开始给药后,每周观察大鼠活动、饮食、皮毛、体质量及踝关节肿胀变化。

2.4 踝关节肿胀度 采集大鼠足趾至踝关节完整组织,使用足趾容积测量仪检测踝关节肿胀度。计算公式如下:踝关节肿胀度=(最终肿胀体积 V_1 -最初肿胀体积 V_0)/最终肿胀体积 $V_1 \times 100\%$ 。

2.5 足趾肿胀评分 大鼠足趾肿胀评分通常用于评估关节炎或其他炎症模型的严重程度,具体评分标准如下。0分:无红斑和肿胀的证据;1分:红斑和轻度软组织肿胀局限于跖骨/踝关节;2分:从踝关节到跖骨,红斑和轻度软组织肿胀;3分:红斑和中度软组织肿胀从踝关节延伸到跖骨;4分:明显红斑和严重肿胀(包括踝关节、足底面和脚趾)或四肢强硬。

2.6 HE染色 将踝关节置于4%多聚甲醛固定液中固定48 h,进行HE染色,观察踝关节中炎症细胞浸润情况。

2.7 酶联免疫吸附试验 血液静置分层,3 500 r/min(离心半径15 cm)离心15 min,取上清液即得血清。借助ELISA检测试剂盒检测血清炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-17、CRP水平。

2.8 蛋白印迹法(Western blotting) 充分研磨裂解足趾组织,测定蛋白质浓度并定量稀释。使用10%十二烷基硫酸钠

(SDS)凝胶分离蛋白质,并电转印至PVDF膜上。PVDF膜在室温下封闭2 h,后与一抗[TNF- α 抗体、IL-6抗体、IL-17抗体、CRP抗体,稀释倍数均为V(抗体):V(TBST)=1:5 000]在4℃下孵育过夜。PVDF膜洗涤3次后与二抗一起孵育1 h。以 β -actin作为标准化对照,使用ImageJ软件对图像进行定量及分析。

2.9 实时定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 借助qPCR技术测定足趾组织中TNF- α mRNA、IL-6 mRNA、IL-17 mRNA及CRP mRNA水平,结果标准化为 β -actin表达水平。引物序列见表1。

表1 用于实时荧光定量PCR的引物序列

目的基因	序列(5'-3')	扩增产物片段长度/bp
CRP	上游引物:CTCTATGCCACGCTGATGT	20
	下游引物:ATTTCAGGCCACCTACTGC	20
IL-6	上游引物:AGCCAGAGTCATTACAGCA	20
	下游引物:TGGTCTTGGTCTTAGCCAC	20
IL-17	上游引物:TCAGACTACCTCAACCGTTCCA	22
	下游引物:GTGCCTCCCAGATCACAGAAG	21
TNF- α	上游引物:GGCGTGTTCATCCGTTCTC	19
	下游引物:CTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT	22
β -actin	上游引物:TCAGGTCATCACTATCGGAAT	22
	下游引物:AAAGAAAGGGTGTAAACGCA	21

2.10 统计学方法 使用SPSS 26.0软件,计量资料以“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较先进行方差齐性和正态性比较,方差齐且符合正态性时采用单因素方差分析,不符合正态性时采用Nonparametric T检验,符合正态性但方差不齐时采用Tamhane's T2检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 大鼠一般情况 空白对照组大鼠外观体征、行为活动、饮食及排泄物均正常。模型对照组大鼠存在精神萎靡、活动减少、运动迟缓、瘸腿跛行、啃咬肿胀脚趾的现象。持续给药后,与模型对照组比较,甲氨蝶呤组与三痹颗粒高、中、低剂量组大鼠精神状态、外观活动均有明显好转。

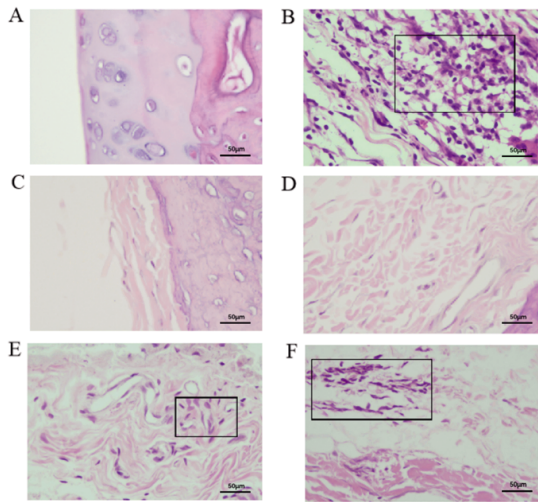
3.2 踝关节肿胀度与足趾肿胀评分 与模型对照组比较,甲氨蝶呤组与三痹颗粒高、中、低剂量组大鼠踝关节肿胀度显著降低($P < 0.01$),甲氨蝶呤组与三痹颗粒高剂量组足趾肿胀评分显著降低($P < 0.01$)。三痹颗粒高剂量组踝关节肿胀度和足趾肿胀评分与甲氨蝶呤组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。(见表2)

表2 各组大鼠踝关节肿胀度与足趾肿胀评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	肿胀度/%	足趾肿胀评分/分
空白对照组	10		0.17 \pm 0.08	0.50 \pm 0.53
模型对照组	10		0.47 \pm 0.08 ^{bf}	3.20 \pm 0.79 ^b
甲氨蝶呤组	10	0.90 mg/kg	0.21 \pm 0.10 ^c	1.50 \pm 0.71 ^{ad}
三痹颗粒高剂量组	10	5.40 g/kg	0.20 \pm 0.14 ^e	1.60 \pm 0.70 ^d
三痹颗粒中剂量组	10	2.70 g/kg	0.30 \pm 0.07 ^{ace}	2.50 \pm 0.71 ^{bf}
三痹颗粒低剂量组	10	1.35 g/kg	0.34 \pm 0.06 ^{hdf}	3.00 \pm 0.67 ^{bf}
F			14.936	22.595
P			0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.001$;与模型对照组比较,^c $P < 0.001$,^d $P < 0.01$;与甲氨蝶呤组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$ 。

3.3 大鼠踝关节HE染色结果 模型对照组大鼠踝关节存在大量炎症细胞浸润。与模型对照组比较,甲氨蝶呤组和三痹颗粒高剂量组大鼠踝关节炎症细胞浸润明显减少,三痹颗粒中、低剂量组炎症细胞浸润减少。(见图1)



注:A.空白对照组;B.模型对照组;C.甲氨蝶呤组;D.三痹颗粒高剂量组;E.三痹颗粒中剂量组;F.三痹颗粒低剂量组。黑色框表示炎症细胞浸润区域。

图1 RA大鼠踝关节HE染色图(×400)

3.4 大鼠血清中炎症因子表达水平 与模型对照组比较,甲氨蝶呤组大鼠血清TNF-α、IL-6、CRP和IL-17水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);三痹颗粒高剂量组TNF-α、IL-17、CRP和IL-6水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);三痹颗粒中、低剂量组IL-17水平显著降低($P<0.01$)。三痹颗粒高、中剂量组TNF-α、IL-6、IL-17和CRP水平与甲氨蝶呤组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);三痹颗粒低剂量组TNF-α、IL-6和IL-17水平与甲氨蝶呤组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。(见表3)

表3 各组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-17 及 CRP 水平比较 ($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	n	给药剂量	TNF-α	IL-6	IL-17	CRP
空白对照组	10		153.67±24.48	14.54±5.00	12.76±4.08	72.84±37.40
模型对照组	10		189.67±19.40 ^b	22.75±4.68 ^a	19.41±1.85 ^b	204.19±90.44 ^b
甲氨蝶呤组	10	0.90 mg/kg	169.15±22.15 ^c	15.76±4.08 ^c	15.97±2.55 ^d	97.24±41.55 ^c
三痹颗粒高剂量组	10	5.40 g/kg	158.35±12.61 ^d	16.40±2.60 ^c	16.00±2.09 ^d	97.10±20.19 ^d
三痹颗粒中剂量组	10	2.70 g/kg	173.32±18.96 ^a	19.45±2.22	17.14±1.44 ^d	151.36±18.85 ^b
三痹颗粒低剂量组	10	1.35 g/kg	186.98±13.30 ^b	21.14±3.66	18.03±1.26 ^d	180.07±18.37 ^c
F			5.932	7.230	8.921	13.352
P			0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与甲氨蝶呤组比较,^e $P<0.05$ 。

3.5 大鼠足趾组织中炎症因子的蛋白相对表达水平 与模型对照组比较,甲氨蝶呤组大鼠足趾组织TNF-α、IL-6、IL-17和CRP蛋白相对表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);三痹颗粒高、中剂量组TNF-α、IL-6、IL-17和CRP蛋白相对表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);三痹颗粒低剂量组TNF-α、CRP和IL-6蛋白相对表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见表4、图2)

表4 大鼠足趾组织中 TNF-α、IL-6、IL-17 及 CRP 蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	TNF-α	IL-6	IL-17	CRP
空白对照组	10		0.24±0.05	0.12±0.02	0.16±0.02	0.22±0.08
模型对照组	10		1.00±0.13 ^b	1.00±0.05 ^b	1.00±0.08 ^b	1.00±0.10 ^b
甲氨蝶呤组	10	0.90 mg/kg	0.39±0.00 ^{ac}	0.30±0.06 ^{ad}	0.35±0.17 ^{ad}	0.48±0.03 ^{ad}
三痹颗粒高剂量组	10	5.40 g/kg	0.42±0.03 ^{bd}	0.38±0.07 ^{bd}	0.53±0.08 ^{bde}	0.60±0.08 ^{bde}
三痹颗粒中剂量组	10	2.70 g/kg	0.72±0.06 ^{bde}	0.68±0.06 ^{bdf}	0.80±0.08 ^{bef}	0.81±0.02 ^{bdf}
三痹颗粒低剂量组	10	1.35 g/kg	0.87±0.02 ^{bce}	0.71±0.15 ^{bdf}	0.99±0.07 ^{bf}	0.81±0.01 ^{bce}
F			69.092	48.501	44.460	60.946
P			0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与甲氨蝶呤组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$ 。

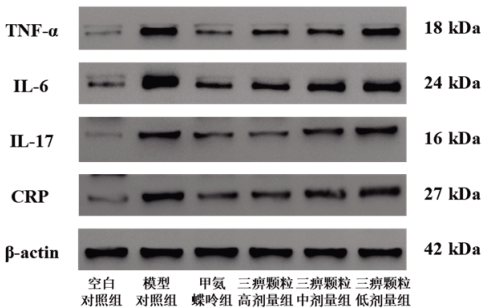


图2 大鼠足趾组织中 TNF-α、IL-6、IL-17 及 CRP 蛋白条带图

3.6 大鼠足趾组织中炎症因子mRNA相对表达水平 与模型对照组比较,甲氨蝶呤组大鼠足趾组织中TNF-α mRNA、IL-6 mRNA、IL-17 mRNA和CRP mRNA相对表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);三痹颗粒高剂量组TNF-α mRNA、IL-6 mRNA、IL-17 mRNA和CRP mRNA相对表达水平显著降低($P<0.01$);三痹颗粒中剂量组IL-17 mRNA相对表达水平显著降低($P<0.01$);三痹颗粒低剂量组TNF-α mRNA、IL-17 mRNA相对表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。三痹颗粒高剂量组TNF-α mRNA、IL-6 mRNA、IL-17 mRNA及CRP mRNA相对表达水平与甲氨蝶呤组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);三痹颗粒中、低剂量组TNF-α mRNA、IL-6 mRNA和IL-17 mRNA相对表达水平与甲氨蝶呤组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表5)

表5 大鼠足趾组织中 TNF-α mRNA、IL-6 mRNA、IL-17 mRNA 及 CRP mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	TNF-α	IL-6	IL-17	CRP
空白对照组	10		0.01±0.01	0.15±0.14	0.26±0.18	0.10±0.02
模型对照组	10		1.00±0.44 ^b	1.00±0.53 ^b	1.00±0.34 ^b	1.00±0.13 ^b
甲氨蝶呤组	10	0.90 mg/kg	0.33±0.14 ^{bc}	0.25±0.19 ^c	0.43±0.36 ^d	0.52±0.37 ^{bd}
三痹颗粒高剂量组	10	5.40 g/kg	0.29±0.39 ^{bd}	0.39±0.19 ^d	0.44±0.19 ^d	0.46±0.16 ^{bd}
三痹颗粒中剂量组	10	2.70 g/kg	0.70±0.83 ^b	0.55±0.36 ^a	0.60±0.47 ^{ad}	0.86±0.27 ^{bc}
三痹颗粒低剂量组	10	1.35 g/kg	0.77±0.86 ^{bc}	0.55±0.42 ^a	0.61±0.25 ^{ad}	0.86±0.25 ^{bf}
F			4.495	8.019	6.482	21.152
P			0.002	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与甲氨蝶呤组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$ 。

4 讨论

RA作为一种慢性自身免疫性疾病,受多种因素影响,呈现出炎症反应、血管生成和骨破坏等特征^[18]。本研究所构建的RA模型大鼠踝关节肿胀度同正常大鼠相比显著升高,同相关文献中建立的RA模型大鼠观察结果一致,证实其是关节炎症的重要表现^[19]。作为RA常用治疗药物,甲氨蝶呤的使用则存在一定副作用^[8-9]。因此,亟需寻找合适药物以建立RA治疗新方案。

同化学药物相比,中药药性温和、价格低、副作用小,具有使用优势。在中药制剂领域,三痹汤已被证实对RA具有良好治疗效果,可减少炎症细胞浸润,缓解病理损伤^[12-13]。其组方中的独活、秦艽、防风等具有镇痛消炎作用,续断、杜仲、黄芪、人参、甘草可以提高机体非特异性免疫力,当归、川芎则具有改善血液微循环的能力^[20]。课题组前期研究已经证实所研制的三痹颗粒(化裁自三痹汤)可有效改善RA患者临床症状^[10]。在本研究中,RA模型大鼠灌服三痹颗粒后精神状态、外观活动及踝关节肿胀程度明显好转,关节组织中炎症细胞浸润现象也得到了减轻。这一结果亦符合张春芳等^[10-11]的研究结论,即三痹颗粒对于关节炎症具有一定的治疗作用。

炎症因子介导炎症反应,对于RA患者来说,炎症因子表达水平升高是诱导其发生自身免疫、炎症增强和关节破坏的重要因素^[21]。课题组通过网络药理学研究发现,TNF是三痹颗粒治疗RA的关键靶点,其与肿瘤坏死因子受体(TNFR)共同构成TNF- α 信号通路^[10,14]。TNFR识别并结合TNF- α 分子后构象改变,暴露多个结合位点。这些位点同适配蛋白结合形成信号传导复合物进而激活下游信号通路,促进IL-6、IL-17等炎症因子表达^[22]。同时,该通路还被证实参与调节成骨细胞及破骨细胞功能^[15]。故而推测三痹颗粒治疗RA的作用机制与TNF信号通路相关。经检测,RA模型大鼠体内TNF- α 表达水平显著高于正常大鼠,而灌服三痹颗粒后RA模型大鼠血液及组织中的TNF- α 表达水平呈现出剂量依赖性降低趋势。这将减弱TNF- α 信号通路作用,抑制IL-6、IL-7等下游炎症因子的表达。本研究结果中三痹颗粒各剂量组大鼠体内IL-6、IL-7和CRP表达水平的降低也在一定程度上证实了这一点。研究^[23-25]表明,IL-6在RA疾病发生发展过程中发挥着重要作用,其一方面与破骨细胞、成骨细胞和滑膜成纤维细胞等多种细胞发生相互作用进而触发中性粒细胞朝关节迁移,引导急性炎症转变为慢性炎症;另一方面还影响B细胞和T细胞的活化及分化,诱导适应性免疫反应增强,进而维持慢性炎症和关节退化,促进RA病程发展。IL-7则多富集于RA患者的单核细胞和滑液巨噬细胞中,通过激活巨噬细胞和内皮细胞分泌IL-8和Ang-1来促进血管生成,同时借助STAT 5信号通路直接抑制关节炎部位破骨细胞分化^[26-28]。CRP是炎症典型指标,通常于肝脏中合成并受TNF- α 和IL-6等炎症因子调节,与RA等慢性炎症性疾病相关联^[29-31]。因此,当上述炎症因子表达被抑制时,引起的临床症状和病理变化将会得到改善。这不仅为三痹颗粒各剂量组RA模型大鼠的关节肿胀程度及病理变化提供了解释,同时也从分子角度说明三痹颗粒或通过影响TNF

信号通路来抑制炎症因子表达并最终阻碍RA的持续发展。

综上所述,本研究结果表明三痹颗粒可减轻RA模型大鼠炎症反应。其通过降低TNF- α 表达水平以抑制TNF信号通路,进而下调RA模型大鼠体内IL-6、IL-17和CRP表达,有效缓解RA发展过程中出现的炎症细胞浸润和踝关节肿胀现象。这有利于改善RA患者预后,为RA临床治疗提供新的可行方案。

参考文献

- [1] BROWN P, PRATT A G, HYRICH K L. Therapeutic advances in rheumatoid arthritis[J]. BMJ, 2024, 384: e070856.
- [2] 李李, 项微微, 何生, 等. 当归补血汤合桂枝汤联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎临床研究[J]. 浙江中医杂志, 2024, 59(11): 997-998.
- [3] LUO S S, LI H, LIU J J, et al. Andrographolide ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in complete Freund's adjuvant-induced arthritis[J]. Chem Biol Interact, 2020, 319: 108984.
- [4] SHEN Q Y, DU Y Z. A comprehensive review of advanced drug delivery systems for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Int J Pharm, 2023, 635: 122698.
- [5] RAO Q, ZHAO X, WU F H, et al. Alcohol extracts from *Anemone flaccida* Fr. Schmidt treat rheumatoid arthritis via inhibition of synovial hyperplasia and angiogenesis[J]. Mol Med Rep, 2023, 27(4): 88.
- [6] CHADHA S, BEHL T, BUNGAU S, et al. Mechanistic insights into the role of pyroptosis in rheumatoid arthritis[J]. Curr Res Transl Med, 2020, 68(4): 151-158.
- [7] BERARDI S, CORRADO A, MARUOTTI N, et al. Osteoblast role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(3): 2843-2852.
- [8] 秦天楠, 艾元飘, 张艳坤, 等. 风湿痹痛贴治疗类风湿关节炎风寒湿痹证的临床研究[J]. 云南中医中药杂志, 2024, 45(11): 38-40.
- [9] SINGH P K, STAN R C. Rheumatoid arthritis autoantibodies benefit from inflammation temperatures[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 129: 111690.
- [10] 邹滔, 谢湘雄, 禹勇军, 等. 三痹颗粒治疗类风湿性关节炎的临床观察及网络药理学研究[J]. 医学信息, 2024, 37(4): 14-20.
- [11] 张春芳, 宋诚挚, 韩嘉琳, 等. 基于TLR4/MAPKs/NF- κ B炎症信号通路探讨三痹颗粒对II型胶原性关节炎大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(7): 519-526.
- [12] 陈礼荣, 刘亚, 杨惠琴. 三痹汤联合甲氨蝶呤、来氟米特治疗类风湿性关节炎风寒湿痹证的疗效及作用机制[J]. 中药材, 2024, 47(3): 756-760.
- [13] 周晶. 基于STAT3/ROR γ t信号通路探讨三痹汤治疗类风湿关节炎的作用机制[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学,

- 2023.
- [14] 黄丹梅,刘雅清,李丹彤,等.C/EBP β 介导NPHP1敲低的肾小管上皮细胞TNF- α 通路下游炎症因子的表达[J].南方医科大学学报,2024,44(1):156-165.
- [15] OSTA B, BENEDETTI G, MIOSSEC P. Classical and paradoxical effects of TNF- α on bone homeostasis[J]. Front Immunol,2014,5:48.
- [16] 封桂英,宋鸿儒,郭明,等.卡介苗含量对成功建立C57BL/6小鼠CIA模型的影响[J].中国免疫学杂志,2014,30(3):378-382.
- [17] 邓文雯,肖智,姜如.透骨血竭散对类风湿性关节炎模型大鼠炎症因子的影响[J].陕西中医,2023,44(7):868-872.
- [18] WANG Y, CHEN S J, DU K Z, et al. Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis[J]. J Ethnopharmacol, 2021,279:114368.
- [19] JIANG X M, CHEN P, NIU W X, et al. Preparation and evaluation of dissolving tofacitinib microneedles for effective management of rheumatoid arthritis[J]. Eur J Pharm Sci,2023,188:106518.
- [20] 郭玉岩,李春成,单常芮,等.三痹汤历史沿革及现代应用进展[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(10):155-158.
- [21] ZHANG L, TAN M, MAO J, et al. Natural compound library screening to identify berberine as a treatment for rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol,2024,43(3):959-969.
- [22] LO C H. TNF receptors: Structure-function relationships and therapeutic targeting strategies[J]. Biochim Biophys Acta BBA Biomembr,2025,1867(1):184394.
- [23] FAN C F, LI J, LI Y X, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α regulates the interleukin-6 production by B cells in rheumatoid arthritis[J]. Clin Transl Immunology, 2023,12(5):e1447.
- [24] DAO T N P, ONIKANNI S A, FADAKA A O, et al. In silico identification of compounds from Piper sarmentosum Roxb leaf fractionated extract inhibit interleukin-6 to prevent rheumatoid arthritis[J]. Front Pharmacol,2024,15:1358037.
- [25] KISHIMOTO T, KANG S J. IL-6 revisited: From rheumatoid arthritis to CAR T cell therapy and COVID-19[J]. Annu Rev Immunol,2022,40:323-348.
- [26] MEYER A, PARMAR P J, SHAHRARA S. Significance of IL-7 and IL-7R in RA and autoimmunity [J]. Autoimmun Rev,2022,21(7):103120.
- [27] WINER H, RODRIGUES G O L, HIXON J A, et al. IL-7: Comprehensive review[J]. Cytokine, 2022,160:156049.
- [28] XU H Y, CAI L, LI Z J, et al. Dual effect of IL-7/IL-7R signalling on the osteoimmunological system: A potential therapeutic target for rheumatoid arthritis [J]. Immunology,2021,164(1):161-172.
- [29] KASHER M, FREIDIN M B, WILLIAMS F M K, et al. GlycA and CRP are genetically correlated: Insight into the genetic architecture of inflammation[J]. Biomolecules, 2024,14(5):563.
- [30] YUAN J Q, XIONG X Q, ZHANG B, et al. Genetically predicted C-reactive protein mediates the association between rheumatoid arthritis and atlantoaxial subluxation[J]. Front Endocrinol, 2022,13:1054206.
- [31] PUGLISI M J, FERNANDEZ M L. Modulation of C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , and adiponectin by diet, exercise, and weight loss[J]. J Nutr,2008,138(12):2293-2296.

(收稿日期:2025-01-16 编辑:罗英姣)