

基于“得温痛减”理论探讨二仙丸改善胶原诱导型关节炎模型大鼠关节疼痛的机制研究

南楠^{1,2}, 刘琦^{1,2}, 濮薇^{1,2}, 刘杨^{1,2}, 郝慧琴^{1,2*}

1. 山西中医药大学 中西医结合基础实验室, 山西 晋中 030619

2. 山西省中医药交叉创新工程中心, 山西 晋中 030619

摘要: **目的** 探究二仙丸基于“得温痛减”治疗类风湿关节炎疼痛的疗效和作用机制。**方法** 构建胶原诱导型关节炎(CIA)模型大鼠并 ig 给予低、高剂量(0.45、0.90 g·kg⁻¹)二仙丸和雷公藤多苷片(阳性药, 9.45 mg·kg⁻¹)治疗, 观察对体质量、关节外观、关节炎评分的影响; 进行足底机械疼痛阈值、足底热痛潜伏时间测定; Micro-CT 检测踝关节影像学变化; ELISA 检测血清炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-10、IL-4 水平; 进行踝关节苏木精-伊红(HE)染色、Masson 染色; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测组织中 TRPV1、CGRP 基因转录的变化; 采用 Western blotting 检测关节和脊髓中降钙素基因相关肽(CGRP)、瞬时受体电位香草酸亚型 1(TRPV1)及 c-fos 蛋白的表达; 免疫荧光染色检测脊髓组织 c-fos 蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比, CIA 大鼠均体质量降低($P < 0.01$), 关节炎评分显著升高($P < 0.01$); 足爪发生红肿, 机械撤退阈值和热痛潜伏时间均降低($P < 0.01$), 滑膜增生、骨表面粗糙侵蚀; 血清炎症因子(IL-1 β 、IL-6)增加、抑炎因子(IL-10、IL-4)减少($P < 0.01$); 踝关节中 TRPV1 和 CGRP 蛋白表达量均显著增加($P < 0.01$); 脊髓 CGRP 基因转录水平和 CGRP、c-fos 蛋白表达量显著升高($P < 0.01$), TRPV1 蛋白表达呈升高趋势; 脊髓背角处的 c-fos 荧光强度明显增强。与模型组比较, 二仙丸高剂量组大鼠体质量显著增加($P < 0.01$), 关节炎评分显著降低($P < 0.01$); 关节肿胀、滑膜增生减轻, 并且蓝色胶原纤维沉积明显减轻; 机械撤退阈值和热痛潜伏时间均显著增加($P < 0.01$); 血清炎症因子释放减少、抑炎因子增加($P < 0.01$); 关节和脊髓中 CGRP、TRPV1、c-fos 蛋白表达降低($P < 0.05$ 、0.01); 脊髓 CGRP 基因转录水平显著降低($P < 0.01$); c-fos 荧光强度明显降低。**结论** 二仙丸能有效改善 CIA 大鼠关节炎炎症和疼痛阈值, 可能与抑制 TRPV1 减轻痛觉敏化有关, 为中医“得温痛减”理论提供科学参考。

关键词: 二仙丸; 类风湿关节炎; 疼痛; 得温痛减; 瞬时受体电位香草酸亚型 1

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)06-1948-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.06.008

Based on theory of "warming alleviates pain", exploring mechanism of Erxian Pills in improving joint pain in collagen-induced arthritis model rats

NAN Nan^{1,2}, LIU Qi^{1,2}, PU Wei^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, HAO Huiqin^{1,2}

1. Basic Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Shanxi Provincial Traditional Chinese Medicine Cross-Innovation Engineering Center, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective To investigate the efficacy and mechanism of Erxian Pill (EXP) in treating pain of rheumatoid arthritis based on the principle of "decreased pain upon warmth". **Methods** A collagen-induced arthritis (CIA) rat model was established, and rats were administered low- and high- dose Erxian Pills (0.45 and 0.90 g·kg⁻¹, respectively) or tripterygium glycosides tablets (positive control, 9.45 mg·kg⁻¹) via oral gavage. Body weight, joint appearance, and arthritis scores were assessed. Mechanical withdrawal threshold and thermal pain latency in the hindpaws were measured. Micro-CT was used to evaluate ankle joint imaging changes. Serum levels of inflammatory cytokines—interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, and IL-4—were detected by ELISA. Hematoxylin-eosin (HE) and

收稿日期: 2026-01-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82405534); 博士科研启动基金资助项目(2023BK16, 2023BKS19); 山西省中管局科研课题计划项目(2022ZYCY269); 中西医结合治疗风湿免疫病重点实验室(zyyjys2024021); 山西省经方扶阳重点实验室(202104010910011)

作者简介: 南楠, 讲师, 研究方向为中西医结合防治风湿免疫性疾病。E-mail: nannan@sxtcm.edu.cn

*通信作者: 郝慧琴, 女, 教授, 研究方向为中西医结合防治风湿免疫性疾病。E-mail: hhq@sxtcm.edu.cn

Masson staining were performed on ankle joints. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analyzed transcriptional changes of TRPV1 and CGRP genes in tissues. Western blotting examined protein expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP), transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1), and c-fos in joints and spinal cord. Immunofluorescence staining assessed c-fos protein expression in spinal cord tissue. **Results** Compared with the control group, CIA rats showed reduced body weight ($P < 0.01$), significantly elevated arthritis scores ($P < 0.01$), redness and swelling of paws, decreased mechanical withdrawal threshold and thermal pain latency ($P < 0.01$), synovial hyperplasia, and roughened bone surfaces with erosion. Serum pro-inflammatory factors (IL-1 β , IL-6) increased while anti-inflammatory factors (IL-10, IL-4) decreased ($P < 0.01$). Expression of TRPV1 and CGRP proteins in the ankle joints was significantly upregulated ($P < 0.01$). In the spinal cord, CGRP gene transcription and CGRP and c-fos protein expression were markedly elevated ($P < 0.01$), while TRPV1 protein expression showed an increasing trend. Fluorescence intensity of c-fos in the dorsal horn of the spinal cord was significantly enhanced. Compared with the model group, rats treated with high-dose Erxian Pills exhibited significant increases in body weight ($P < 0.01$) and marked reductions in arthritis scores ($P < 0.01$). Joint swelling and synovial hyperplasia were alleviated, and blue collagen fiber deposition was notably reduced. Mechanical withdrawal threshold and thermal pain latency were significantly improved ($P < 0.01$). Serum inflammatory factor release decreased, while anti-inflammatory factors increased ($P < 0.01$). Protein expression of CGRP, TRPV1, and c-fos in both joints and spinal cord was downregulated ($P < 0.05, 0.01$). CGRP gene transcription in the spinal cord was significantly reduced ($P < 0.01$), and c-fos fluorescence intensity was markedly decreased. **Conclusion** Erxian Pills effectively ameliorate joint inflammation and pain thresholds in CIA rats, likely through suppression of TRPV1-mediated pain sensitization, providing scientific support for the TCM theory that “warmth reduces pain”.

Key words: Erxian Pill; rheumatoid arthritis; pain; warming alleviates pain; transient receptor potential vanilloid 1

类风湿关节炎 (RA) 是一种慢性、免疫介导的全身性滑膜关节炎性疾病, 发病时间长, 损害性大, 全世界 0.25%~1.00% 的人口受到该病的影响^[1]。关节疼痛及压痛是该病最重要的症状之一, 并贯穿疾病进展的整个过程^[2]。目前对于 RA 疼痛的治疗主要以非甾体类抗炎药为主, 但该类药物的胃肠道不良反应较大, 患者耐受性差, 亟待寻找传统医药理论和方法为 RA 疼痛的缓解和治疗提供新的思路和借鉴。

中医认为 RA 属于痹证范畴, 《素问·痹论》记载: “风寒湿三气杂至, 合而为痹……寒气胜者为痛痹”, 《素问·举痛论》中提到 “寒气入经而稽迟, 泣而不行, 客于脉外则血少, 客于脉中则气不通, 故卒然而痛……得炅则痛立止; 因重中于寒, 则痛久矣……热气至则痛上矣”, 表明寒邪是导致 RA 疼痛发生的关键因素。因此, 温阳散寒是治疗关节疼痛的主要治则治法。二仙丸源于山西名医傅山先生的学术思想, 由黑木耳、苍术、生川乌、生草乌、杜仲、牛膝、升麻、神曲 8 味药物组成, 是已上市的中药丸剂, 具有暖骨却寒、定痛止麻的功效, 在临床使用上取得了较好的疗效, 是温阳散寒、止痛除痹的传统经典方剂。方中生川乌、生草乌均是散寒止痛的常用药物^[3-4], 前期研究也证实二仙丸能有效改善关节炎症^[5], 但其止痛的疗效和作用机制尚不清楚。

瞬时受体电位香草酸亚型 1 (TRPV1) 通道是一种热敏离子通道, 即辣椒素受体, 对痛觉的激活和抑制至关重要^[6]。其在脊髓背根神经节的感觉神经元合成并表达于轴突的中枢端和外周端, 被激活后将疼痛信号转导至脊髓背角, 诱导背根神经节中降钙素基因相关肽 (CGRP) 的合成和表达^[7], 导致疼痛的发生。并且 TRPV1 还是参与炎症性疼痛的关键离子通道, 白细胞介素 (IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 等可通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路增强 TRPV1 的敏感性^[8]。因此, 推测二仙丸可能通过 TRPV1 发挥止痛作用。

本研究拟采用胶原诱导型关节炎 (CIA) 模型大鼠, ig 给予不同剂量的二仙丸, 观察大鼠关节炎症及疼痛的改善情况, 以及对 TRPV1 的影响, 以明确二仙丸改善关节疼痛的作用机制。

1 材料

1.1 动物

30 只 SD 雄性大鼠, 体质量 (200 \pm 20) g, 购自北京华阜康生物科技有限公司, 实验动物许可证号 SCXK-(京)2019-0008。饲养于山西中医药大学 SPF 级动物饲养中心, 大鼠可以自由获得饮食饮水, 环境保持在室温 22~26 °C, 湿度 40%~60%, 12 h/12 h 光照交替状态。本实验方案经山西中医药大学动物实验伦理委员会审查批准, 伦理号 AWE202209129。

1.2 药物与主要试剂

牛II型胶原(批号240021、货号20022)、完全弗氏佐剂(批号230035、货号7001)、不完全弗氏佐剂(批号230165、货号7002),购自美国Chondrex公司;二仙丸(太原大宁堂药业有限公司,国药准字Z14021204,规格:每盒10g×6袋,批号230502);雷公藤多苷片(宿州亿帆药业有限公司,批号220103);IL-1 β ELISA试剂盒(货号MM-0047、批号202404)、IL-6ELISA试剂盒(货号MM-0190、批号202404)、IL-10ELISA试剂盒(货号MM-0195、批号202404)、IL-4ELISA试剂盒(货号MM-0191、批号202404),购自江苏酶免实业有限公司;苏木精-伊红(HE)染色液(北京雷根生物技术有限公司,货号DH0006);Masson三色染色液(赛维尔生物科技有限公司,货号G1006);CGRP一抗(货号AB139264、批号1090751-2)、c-fos一抗(货号AB208942、批号1076295-1),Abcam公司;TRPV1一抗(万类生物科技有限公司,货号WL02734、批号T11112734)。

1.3 仪器设备

NC12775-99 Von Frey 纤维丝(中国玉研仪器公司);BMJ-1B 组织包埋机、RM2235 石蜡切片机,德国Leica公司;ECLIPSE Ni-U 正置荧光显微镜(日本Nikon公司);IRIS PET/CT 小动物micro-CT(法国Inviscan公司);SLO-BIO 酶标仪(美国Molecular Devices公司);T100PCR 荧光定量PCR仪、C1000 基因扩增仪、HOOD-II凝胶成像分析仪、Mini PROTEAN®Tetra 电泳槽、Trans-Blot®SD Cell 转膜仪、ChemiDoc TM Imaging System 化学发光成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组、给药

随机选取6只大鼠作为对照组,其他大鼠构建CIA模型,将牛II型胶原和完全弗氏佐剂(1:1)在冰上避光匀浆形成乳化剂,按照每只0.1mL注射到大鼠尾根部上1cm左右的皮内。14d后,在尾根部避开破损皮肤,再次注射牛II型胶原和不完全弗氏佐剂(1:1)的乳化液0.1mL^[9]。7d后,随机分成模型组、雷公藤多苷(阳性药,9.45mg·kg⁻¹)和二仙丸低、高剂量(0.45、0.90g·kg⁻¹)组,每组6只,并ig给予对应药物,对照组和模型组给予0.9%氯化钠溶液,每天1次,共治疗4周。

2.2 体质量、关节炎评分、痛阈检测及取材

实验结束后,称体质量,大鼠足爪拍照观察外

观。根据参考文献报道^[10]描述方法对大鼠足爪肿胀程度进行关节炎指数评分。足底机械疼痛阈值测定:按从小到大的顺序,采用不同克数的Von Frey纤维丝依次刺激大鼠后爪足底皮肤,使纤维丝弯曲成“C”或“S”型并维持5s,如大鼠出现缩足、舔足、叫喊等阳性反应,5次试验中出现3次阳性反应,每次间隔至少5min,则认为该克数纤维丝诱发大鼠疼痛的结果为阳性,表现为阳性的最大克数即为大鼠机械撤退阈值。足底热痛潜伏时间:打开热板仪,将热板温度调至55℃,大鼠放在智能热板仪上,保证大鼠后爪足底接触热板,按下计时开关,大鼠足底受到热刺激,出现舔后爪、后爪轻弹、跳跃、发声等逃避动作时,再次按下计时开关,停止计时,记录数据,连续测定3次,取平均值作为热痛阈值,每次试验之间间隔5min。实验结束后,大鼠麻醉、腹主动脉取血并获得血清,置于-80℃冰箱保存备用,取L4-6对应的背根神经节以及左侧足爪液氮速冻后冻存备用,右侧足爪置于4%多聚甲醛的组织固定液,用于后续脱钙、切片、染色。取L4-6脊髓,分成2段,1段置于-80℃冰箱保存,1段置于4%多聚甲醛的组织固定液。

2.3 Micro-CT 检测踝关节影像学变化

利用小动物Micro-CT扫描各组大鼠踝关节,扫描实验参数:电压80kV,电流1mA,投射次数2000,曝光时间56ms,分辨率60 μ m,连续扫描模式。扫描后的图像进行三维图像重建。

2.4 ELISA 检测炎症因子的变化

将大鼠血清融化后,按照ELISA试剂盒说明书,分别检测IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-4等炎症因子的含量。

2.5 踝关节病理组织染色

将踝关节固定在4%多聚甲醛溶液中48h后,用10%EDTA脱钙液脱钙处理,直至关节能轻松被针扎透。按照脱水、浸蜡、包埋、切片过程制备5 μ m切片。分别按照试剂盒说明书进行HE染色、Masson染色。在光学显微镜下观察大鼠踝关节滑膜炎症和软骨损伤情况。

2.6 免疫荧光染色检测组织c-fos蛋白表达水平

将脊髓组织在4%多聚甲醛溶液中固定后,制备石蜡切片,实验时将切片脱蜡至水,抗原修复、封闭,分别滴加一抗过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次后,滴加二抗室温孵育,PBS洗涤3次后,避光加DAPI染液,避光室温孵育10min,加入抗

荧光淬灭封片剂封片。

2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测脊髓中 TRPV1、CGRP 基因转录的变化

取大鼠脊髓组织提取总 RNA, 以总 RNA 为模板, 加入反转录引物、逆转录酶、缓冲液等试剂, 将 RNA 逆转录为 cDNA。在实时荧光定量 PCR 仪上完成扩增, 反应体系为 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 7.5 μL, cDNA 2.0 μL, Water Nuclease-Free 4.0 μL。扩增程序: 95 °C, 30 s 预变性; 40 个循环: 95 °C, 15 s 变性, 60 °C, 30 s 退火/延伸; 熔解曲线: 65→95 °C, 每升温 0.5 °C, 采集 1 次荧光信号。各基因的特异性引物由武汉赛维尔生物科技有限公司完成, RNA 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	引物序列(5'-3')
GAPDH	F-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
	R-GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT
TRPV1	F-CCTATCATCACTGTCTCAGCTCTGTTC
	R-TCTGGGCTTTGAACTCGCTGT
CGRP	F-TCTCCCCTTCTCTGGTTGTC
	R-CCAGTAGGCGAGCTTCTTCTT

2.8 Western blotting 检测组织中 TRPV1、CGRP、c-fos 蛋白表达变化

取大鼠踝关节、脊髓组织, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上匀浆。离心取上清, 并加入

5×Loading buffer。配制 10%或 12.5%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶, 上样, 进行恒压电泳、转膜、封闭, 孵育一抗和二抗。在蛋白条带上滴加 ECL 发光液显色, 利用化学发光成像系统成像, 使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以内参标准化后比较样本间蛋白表达差异并进行统计学分析。

2.9 统计学方法

统计数据采用 SPSS 20.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。为了评估结果是否具有统计学意义, 当数据遵循正态分布时, 采取单因素方差分析 (ANOVA)。方差齐性检验中, 当 $P < 0.05$, 则数据用 Dunnett^{ttt}3 检验, 当 $P > 0.05$, 则数据用 LSD 检验。当数据不满足正态分布, 则使用非参数检验来分析数据。

3 结果

3.1 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节炎和疼痛的影响

如图 1 所示, 与对照组大鼠相比, 模型组大鼠踝关节和跖趾关节肿胀畸形, 体质量显著低于对照组 ($P < 0.01$), 关节炎评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 二仙丸 0.9 g·kg⁻¹ 组大鼠体质量明显升高 ($P < 0.01$), 二仙丸 0.9 g·kg⁻¹ 组和雷公藤多苷组关节炎评分均显著降低 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 模型组大鼠足底机械撤退阈值、热痛潜伏时间显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 二仙丸和雷公藤多苷均显著升高其机械撤退阈值, 二仙丸 0.9 g·kg⁻¹ 组和雷公藤多苷组热痛潜伏时间显著延长 ($P < 0.01$), 见表 2。



图 1 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节外观的影响

Fig. 1 Effect of Erxian Pill on articular appearance in CIA model rats

表 2 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节炎和疼痛的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Erxian Pill on joint inflammation and pain in CIA model rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/kg	关节炎评分	机械撤退阈值/g	热痛潜伏时间/s
对照	—	483.5±12.10	0	26.00±0.00	5.64±0.17
模型	—	408.5±12.99 ^{##}	11.33±0.42 ^{##}	2.00±0.45 ^{##}	4.32±0.15 ^{##}
二仙丸	0.45	434.8±12.99	10.33±0.80	6.67±0.42 ^{**}	4.90±0.22
	0.90	474.8±12.29 ^{**}	6.00±0.73 ^{**}	9.00±0.45 ^{**}	5.47±0.16 ^{**}
雷公藤多苷	0.009 45	450.7±10.96	7.33±0.67 ^{**}	8.00±0.73 ^{**}	5.17±0.20 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

3.2 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节病理变化的影响

各组大鼠足爪 HE 和 MASSON 染色结果提示, 对照组关节间隙清晰锐利, 细胞排列规律整齐, 滑膜疏松, 无炎症细胞浸润和胶原纤维沉积。模型组大鼠关节腔狭窄、滑膜显著增生, 并伴有大量炎症

细胞浸润, 软骨损伤表现为表面粗糙及局部缺损, 可见明显蓝色胶原纤维沉积, 滑膜纤维化加重。经二仙丸和雷公藤多苷治疗后, 关节形态较模型组明显改善, 滑膜增生及炎症细胞浸润得到有效抑制, 并且蓝色胶原纤维沉积明显减轻、减少。见图 2。

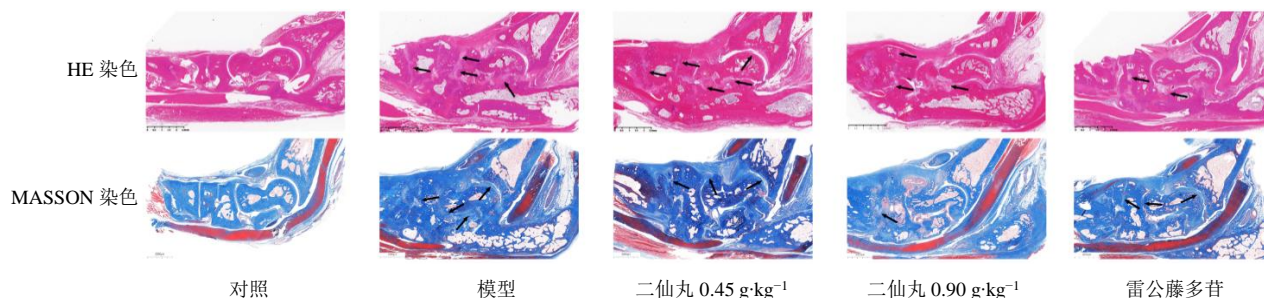


图 2 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节病理变化的影响 (×4)

Fig. 2 Effect of Erxian Pill on pathological changes in CIA model rats (×4)

3.3 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节 CT 影像的影响

与对照组相比, 模型组大鼠踝关节 Micro-CT 重建图像表现出明显的骨表面侵蚀, 关节间隙变窄,

关节面粗糙不平, 有大量骨质增生; 与模型组相比, 二仙丸治疗后, 骨表面侵蚀较模型组有所改善, 关节面和间隙也较为平整光滑, 见图 3。

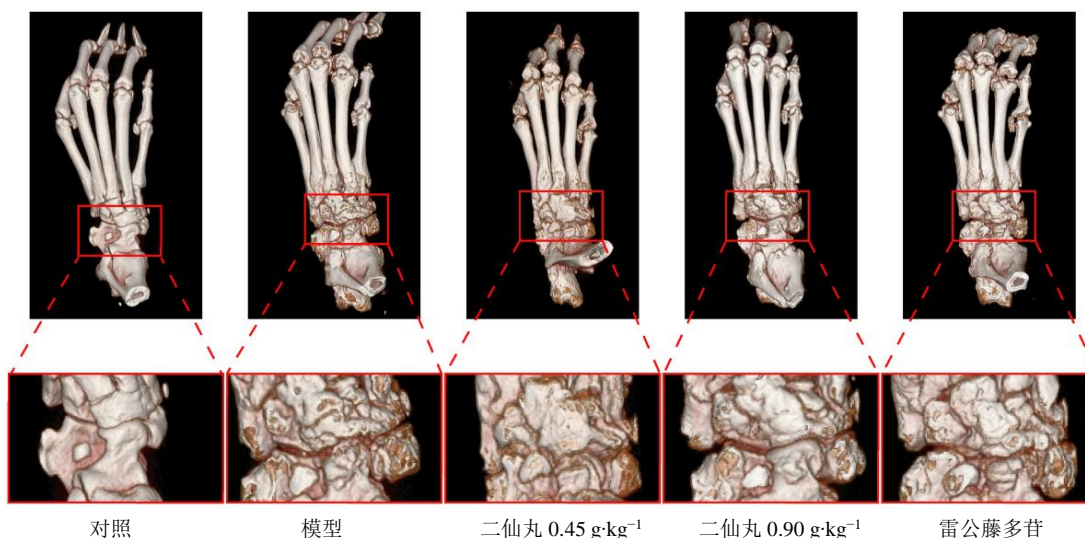


图 3 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节 CT 影像的影响

Fig. 3 Effect of Erxian Pill on CT imaging of joints in CIA model rats

3.4 二仙丸对 CIA 模型大鼠血清炎症因子的影响

与对照组相比, 模型组大鼠血清促炎因子 IL-1 β 和 IL-6 含量升高 ($P < 0.01$), 抑炎因子 IL-4 和 IL-10 含量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 二仙丸 0.45 g·kg⁻¹ 组血清中 IL-6 含量降低 ($P < 0.01$)、IL-4 升高 ($P < 0.01$), 二仙丸 0.9 g·kg⁻¹ 组 IL-1 β 和 IL-6 含量降低 ($P < 0.01$), 抑炎因子 IL-4 和 IL-10 含量升高 ($P < 0.01$); 雷公藤多苷治疗组也表现出

相同的变化趋势, 见表 3。

3.5 二仙丸对 CIA 模型大鼠脊髓 TRPV1、CGRP mRNA 转录的影响

与对照组相比, 模型组 TRPV1 和 CGRP mRNA 转录表现出升高的趋势, CGRP 差异显著 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 经二仙丸治疗后 TRPV1 基因转录呈降低趋势, CGRP 基因转录显著降低 ($P < 0.01$), 结果见表 4。

表 3 二仙丸对 CIA 模型大鼠血清炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Erxian Pill on serum inflammatory factors in CIA model rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	51.10±3.66	87.1±6.48	103.6±2.01	59.64±1.62
模型	—	66.49±2.13 ^{##}	173.6±7.35 ^{##}	74.6±1.42 ^{##}	44.83±1.37 ^{##}
二仙丸	0.45	56.73±2.60	127.7±7.15 ^{**}	83.8±2.39	57.27±2.27 ^{**}
	0.90	43.40±1.48 ^{**}	135.7±8.40 ^{**}	99.9±3.33 ^{**}	59.90±3.05 ^{**}
雷公藤多苷	0.009 45	44.55±1.31 ^{**}	178.3±4.87	89.4±2.75 ^{**}	54.18±1.61 [*]

与对照组比较: ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01。
^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group.

表 4 二仙丸对 CIA 模型大鼠背根神经节 TRPV1、CGRP mRNA 转录的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Erxian Pill on transcription of TRPV1 and CGRP mRNA in dorsal root ganglion of collagen-induced arthritis model rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TRPV1/GAPDH	CGRP/GAPDH
对照	—	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	2.15±0.80	1.43±0.16 ^{##}
二仙丸	0.45	0.69±0.32	0.36±0.06 ^{**}
	0.90	1.00±0.32	0.21±0.09 ^{**}
雷公藤多苷	0.009 45	1.32±0.03	0.95±0.20

与对照组比较: ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01。
^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group.

3.6 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节和脊髓疼痛相关蛋白表达的影响

结果如图 4、表 5 所示,与对照组相比,模型组踝关节中 TRPV1 和 CGRP 蛋白表达量均显著增加 (*P*<0.01);与模型组比较,二仙丸 0.9 g·kg⁻¹ 组 TRPV1 和 CGRP 蛋白表达量均显著降低 (*P*<0.05、0.01),且二仙丸作用呈一定的剂量相关性。在脊髓中,与对照组比较,模型组 CGRP 蛋白表达量显著升高 (*P*<0.01),TRPV1 蛋白表达呈升高趋势;与模型组比较,二仙丸 0.9 g·kg⁻¹ 组和雷公藤多苷片组中 TRPV1 和 CGRP 表达均显著降低 (*P*<0.01)。研究还对大鼠脊髓中反映神经元活化的 c-fos 蛋白进行检测,结果发现,与对照组相比,模型组 c-fos 蛋白表达显著升高 (*P*<0.05);与模型组比较,经二仙丸和雷公藤多苷片治疗后明显降低 (*P*<0.05、0.01)。

研究还对脊髓腰骶膨大处进行 c-fos 蛋白免疫荧光染色,结果显示,模型组在脊髓背角处的荧光强度明显增强,阳性细胞数量增多;而经过药物治疗组,荧光强度和阳性细胞数量较模型组明显降低。见图 5。

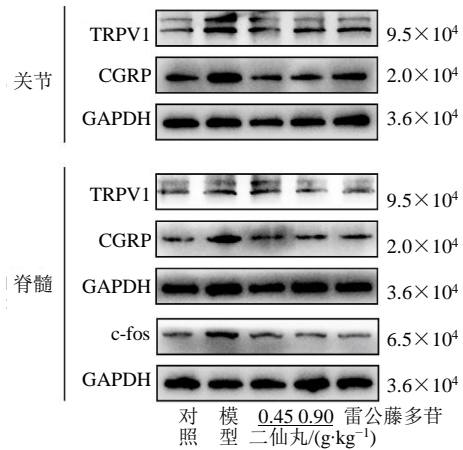


图 4 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节和脊髓疼痛相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Erxian Pill on expression of pain-related proteins in joint and spinal cord of CIA model rats

4 讨论

本研究结果表明,二仙丸能减轻大鼠足爪肿胀程度,降低关节炎评分,升高足底机械疼痛撤退阈值和热痛潜伏时间,抑制血清促炎因子并促进抑炎因子的释放,改善关节滑膜炎症和骨损伤。同时二仙丸能抑制中枢和外周 TRPV1 表达和 CGRP 释放,

表 5 二仙丸对 CIA 模型大鼠关节和脊髓疼痛相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 5 Effect of Erxian Pill on expression of pain-related proteins in joint and spinal cord of CIA model rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	踝关节		脊髓		
		TRPV1	CGRP	TRPV1	CGRP	c-fos
对照	—	0.62±0.09	0.61±0.04	0.72±0.08	0.65±0.05	0.69±0.08
模型	—	1.09±0.07 [#]	1.07±0.06 [#]	1.01±0.06	1.08±0.11 ^{##}	1.14±0.11 [#]
二仙丸	0.45	0.75±0.06	0.80±0.07	0.75±0.04	0.76±0.09	0.76±0.07 [*]
	0.90	0.56±0.13 [*]	0.57±0.08 ^{**}	0.50±0.09 ^{**}	0.65±0.07 ^{**}	0.62±0.07 ^{**}
雷公藤多苷	0.009 45	0.57±0.13 [*]	0.73±0.14	0.40±0.07 ^{**}	0.54±0.05 ^{**}	0.63±0.10 ^{**}

与对照组比较: [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01。

[#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group.

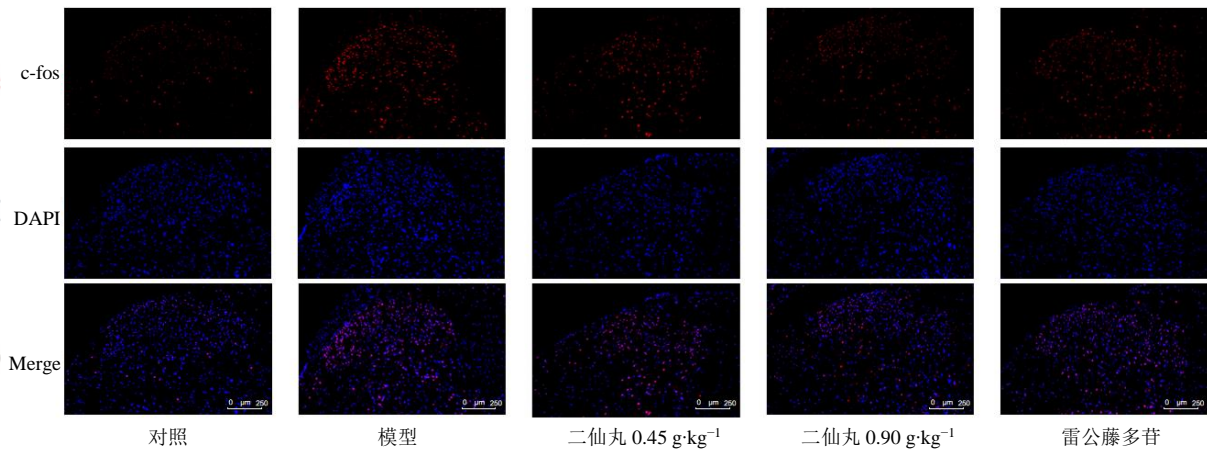


图 5 二仙丸对 CIA 模型大鼠脊髓 c-fos 蛋白表达的影响 (×40)

Fig. 5 Effect of Erxian Pill on protein expression of c-fos in spinal cord of CIA model rats (×40)

减少神经元活化,从而减轻关节疼痛及痛觉敏化的发生。

一方面,在 RA 疾病早期,关节疼痛的发生与炎症因子网络失衡密切相关^[9],关节局部存在促炎因子如 IL-1β、肿瘤坏死因子-α、IL-6 等的过度表达和释放^[10],激活伤害性感受神经纤维上的 TRPV1 受体,导致疼痛的产生^[11-12]。TRPV1 对多种有害刺激(如热、低 pH、炎症因子等)敏感,在炎症疼痛的痛觉传导中起重要作用^[13]。团队前期研究中发现二仙丸加减方能有效治疗能有效减少 IL-1β、IL-6 等促炎因子,增加 IL-4、IL-10 抑炎因子,其机制可能与抑制 NOD 样受体蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体的活化有关,调控细胞焦亡途径^[3, 14]。此外,还有研究发现二仙丸中乳香、没药的活性成分如 β-乳香酸,可通过抑制 p38-MAPK 激酶活性来减少促炎因子的产生,促进抗炎因子的产生,减轻关节炎反应^[15];乳香酸还能与 TLR4 结合,下调 MAPK p38/NF-κB 通路活性,进而抑制滑膜成纤维细胞分泌炎症因子^[16]。本研究也发现,二仙丸能有效抑制

血清促炎因子并促进抑炎因子的释放,调节炎症因子平衡,能减轻炎症相关疼痛的发生。

另一方面,当 RA 病程持续进展,关节疼痛的发生就不单纯与炎症相关,持续的炎症刺激 TRPV1 受体,导致伤害感受器过度兴奋,导致痛觉敏化的形成^[17]。现代药理学研究证实,大量辛味中药的活性成分如姜辣素、吴茱萸碱等可通过结合 TRPV1 引发短暂痛觉后诱导通道脱敏,从而达到持久镇痛效果^[18]。二仙丸中川乌、草乌的有效成分也可通过类似机制,抑制痛觉敏化的发生^[19],研究发现川乌通过刺激 TRPV1 通道诱导钙离子内流产生短暂热痛敏化后继而引发通道脱敏,从而降低痛觉神经元的兴奋性,在局部产生温热效应后抑制疼痛信号传导^[20],草乌甲素也能抑制 TRPV1 受体功能进而抑制脊髓神经元凋亡进而减轻大鼠神经病理性疼痛^[21]。本研究表明二仙丸治疗后抑制了 TRPV1 在感觉神经元中的表达和中枢神经元的活化,从而降低伤害性刺激的传入,减轻疼痛及中枢敏化的发生。后续仍需要开展利用 TRPV1 过表达动物模型或利用

TRPV1 激动剂评价二仙丸作用的验证实验,进一步明确二仙丸镇痛的物质基础和作用机制,为后续临床应用和新药开发提供实验室基础。

二仙丸能有效减轻 CIA 模型大鼠关节滑膜炎和痛觉敏化的发生,其机制可能与调节炎症因子平衡和抑制 TRPV1 表达有关,这一研究也为“得温痛减”中医理论提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵清玉, 何莲花, 严倩倩, 等. 类风湿关节炎相关间质性肺病药物治疗现状和研究热点的可视化分析 [J]. 中草药, 2025, 56(10): 3626-3636.
Zhao Q Y, He L H, Yan Q Q, et al. Visual analysis of treatment status and research hotspots concerning medications treatment for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(10): 3626-3636.
- [2] Cao Y T, Fan D P, Yin Y Q. Pain mechanism in rheumatoid arthritis: From cytokines to central sensitization [J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020: 2076328.
- [3] 高安祺. 基于量-效-时探究不同川乌剂量加味乌头汤在阳虚寒凝型痛性糖尿病周围神经病变中的应用 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
Gao A Q. Exploring the application of modified aconite decoction with different doses of monkshood in painful diabetic peripheral neuropathy of yang deficiency and cold coagulation type based on dose-effect-time [J]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2022.
- [4] 肖登, 王建丁, 赵多明, 等. 复方川草乌合剂镇痛抗炎作用的实验研究 [J]. 西部中医药, 2024, 37(9): 16-20.
Xiao D, Wang J D, Zhao D M, et al. Experimental study on the analgesic and anti-inflammatory effects of compound Chuancaowu mixture [J]. West J Tradit Chin Med, 2024, 37(9): 16-20.
- [5] 李思源, 徐烨, 王瑜茹, 等. 二仙丸加减方对胶原诱导型关节炎大鼠关节炎症反应的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2025, 45(4): 440-446.
Li S Y, Xu Y, Wang Y R, et al. Effects of modified Erxian Pill on joint inflammation in collagen-induced arthritis rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2025, 45(4): 440-446.
- [6] 程旭韬. 瞬时受体电位香草酸亚型 1 受体介导疼痛的机制和治疗应用研究进展 [J]. 中国临床新医学, 2022, 15(2): 171-175.
Cheng X T. Research progress on the mechanism of transient receptor potential vanilloid 1 receptor mediating pain and the therapeutic application [J]. Chin J New Clin Med, 2022, 15(2): 171-175.
- [7] Fattori V, Zaninelli T H, Ferraz C R, et al. Maresin 2 is an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil and monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1 and TRPA1 activation, and CGRP release [J]. Neuropharmacology, 2022, 216: 109189.
- [8] 艾琳, 韩奕, 季然, 等. 疼痛治疗及镇痛靶点的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(7): 484-494.
Ai L, Han Y, Ji R, et al. Research progress in pain treatment and analgesic targets [J]. Chin J Pain Med, 2023, 29(7): 484-494.
- [9] Liu Q, Nan N, Li W F, et al. The temporal changes in ankle joint pathology, pain and secondary osteoporosis in collagen-induced arthritis rats [J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 9795-9804.
- [10] Peng J N, Lu X R, Xie K L, et al. Dynamic alterations in the gut microbiota of collagen-induced arthritis rats following the prolonged administration of total glucosides of paeony [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 204.
- [11] Schönenberger K A, Schüpfer A C, Gloy V L, et al. Effect of anti-inflammatory diets on pain in rheumatoid arthritis: A systematic review and Meta-analysis [J]. Nutrients, 2021, 13(12): 4221.
- [12] Sun W H, Dai S P. Tackling pain associated with rheumatoid arthritis: Proton-sensing receptors // *Advances in Pain Research: Mechanisms and Modulation of Chronic Pain* [M]. Singapore: Springer Singapore, 2018: 49-64.
- [13] Schaible H G, Ebersberger A, Von Banchet G S. Mechanisms of pain in arthritis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 966: 343-354.
- [14] Lee G I, Neumeister M W. Pain pathways and physiology [J]. Clin Plast Surg, 2020, 47(2): 173-180.
- [15] 吕传宝, 于莎莎, 李航兵, 等. 辣椒辣素对大鼠炎症痛作用及脊髓 TRPV1 表达的影响 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2024, 58(1): 1-4.
Lü C B, Yu S S, Li H B, et al. Effect of capsaicin on inflammatory pain and spinal TRPV1 expression in rats [J]. J Harbin Med Univ, 2024, 58(1): 1-4.
- [16] 李思源, 王瑜茹, 徐烨, 等. 二仙丸加减方含药血清抑制巨噬细胞焦亡的物质基础和作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(19): 4029-4037.
Li S Y, Wang Y R, Xu Y, et al. Material basis and action mechanism of drug-containing serum of Modified Erxian Pill inhibiting macrophage pyroptosis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2025, 29(19): 4029-4037.

- [17] Altmann A, Fischer L, Schubert-Zsilavecz M, et al. Boswellic acids activate p42 MAPK and p38 MAPK and stimulate Ca²⁺ mobilization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(1): 185-190.
- [18] Franco-Trepat E, Alonso-Pérez A, Guillán-Fresco M, et al. β boswellic acid blocks articular innate immune responses: An *in silico* and *in vitro* approach to traditional medicine [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2): 371.
- [19] Sarzi-Puttini P, Zen M, Arru F, et al. Residual pain in rheumatoid arthritis: Is it a real problem [J]. *Autoimmun Rev*, 2023, 22(11): 103423.
- [20] 刘琰, 刘维, 格桑玉珍, 等. 辛味药治疗类风湿性关节炎的作用机制 [J/OL]. *中医学报*, 1-11. [2026-01-10]. <https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20240912.1057.026>.
- Liu Y, Liu W, Gesang Y Z, et al. Mechanism of action of pungent herbs in the treatment of rheumatoid arthritis [J/OL]. *J Tradit Chin Med*, 1-11. [2026-01-10]. <https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20240912.1057.026>.
- [21] Lee J, Bae Y, Kim N J, et al. Anti-rheumatic, and analgesic effects by the parent tuberous roots of *Aconitum jaluense* in adjuvant induced arthritis rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 114518.
- [22] Wang C, Sun D N, Liu C F, et al. Mother root of *Aconitum carmichaelii Debeaux* exerts antinociceptive effect in complete freund's adjuvant-induced mice: Roles of dynorphin/kappa-opioid system and transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel [J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 284.
- [23] 魏建忠, 王云, 寇士顺. 草乌甲素通过调节 TRPV1 受体功能减轻神经病理性疼痛大鼠疼痛的机制 [J]. *河北医学*, 2020, 26(11): 1765-1770.
- [24] Wei J Z, Wang Y, Kou S S. Mechanisms of bulleyaconitine a relieving pain in rats with neuropathic pain by regulating TRPV1 receptor function [J]. *Hebei Med*, 2020, 26(11): 1765-1770.

[责任编辑 兰新新]