

## 秦艽寒热不同配伍药对对风湿热痹类风湿关节炎大鼠 MMP-3、TIMP-1 表达及踝关节病理学改变的影响

马腾茂, 刘 飞, 王 蓉, 孙少伯, 高慧琴\*

甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

**摘要:** **目的** 研究秦艽寒热不同配伍药对对风湿热痹类风湿关节炎(RA)大鼠基质金属蛋白酶-3(MMP-3)和金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)表达的影响,并观察其踝关节病理学改变,探讨药性-病证-疗效之间的关系及中药治疗 RA 的机制。**方法** 将 80 只健康 SD 大鼠随机分为对照组、II 型胶原(CII)组、病证模型组、雷公藤多苷组、秦艽组、秦艽-威灵仙(秦-威)组、秦艽-桑寄生(秦-桑)组和秦艽-防己(秦-防)组 8 组,采用 CII 诱导加风湿热环境因素刺激制备风湿热痹 RA 大鼠模型,各给药组 ig 给予制备的对应药液。实验中每 3 天测 1 次足跖厚度,计算足跖肿胀度;实验前期、中期、后期各进行 1 次关节炎指数(AI)评分。免疫组化法检测大鼠踝关节 MMP-3 和 TIMP-1 的表达,HE 染色观察踝关节组织的病理学改变。**结果** 与对照组比较,CII 组和病证模型组的足跖肿胀度、AI 评分及 MMP-3 表达量均明显升高,TIMP-1 表达量明显降低,CII 组和病证模型组大鼠关节面毛糙、破损,关节软骨破坏严重,大量肉芽组织增生,伴有大量的炎性细胞浸润和新生血管。经药物治疗后,与病证模型组比较,各给药组足跖肿胀度、AI 和 MMP-3 表达量均有不同程度的降低,其中秦-防组降低最为显著;TIMP-1 表达量均有不同程度的升高,其中秦-防组升高最为显著。HE 染色结果显示,各给药组关节软骨破坏面积及破坏程度均有所减轻,炎性细胞及新生血管减少,修复纤维增多,瘢痕组织增多。**结论** 对于风湿热痹 RA,平寒相配效果优于平温、平平相配,实验结果与中医临床“疗热以寒药”的治疗原则是一致的,该配伍治疗风湿热痹 RA 的作用机制可能与其能够降低 MMP-3 表达、升高 TIMP-1 表达、减轻关节软骨破坏以及减少炎性细胞浸润和血管增生有关。

**关键词:** 秦艽;寒热药性;配伍;风湿热痹;类风湿关节炎;基质金属蛋白酶-3;金属蛋白酶组织抑制剂-1;威灵仙;桑寄生;防己

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)09-1812-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.017

## Effect of *Gentianae Macrophyllae Radix* in different combinations on expression of MMP-3, TIMP-1, and ankle pathological changes in wind-damp-heat arthralgia rheumatoid arthritis model rats

MA Teng-mao, LIU Fei, WANG Rong, SUN Shao-bo, GAO Hui-qin

Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

**Abstract: Objective** To observe the effects of *Gentianae Macrophyllae Radix* (Qinjiao) in different combinations on the expression of MMP-3, TIMP-1, and ankle pathological changes in rheumatoid arthritis (RA) model rats, and to explore the relationship between medicinal properties-disease-efficacy and explore the mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of RA. **Methods** Eighty SD rats were randomly divided into blank group, collagen II model group, rheumatic fever model group, tripterygium group, single Qinjiao group, Qinjiao-Weilingxian (*Clematidis Radix* et *Rhizoma*) group, Qinjiao-Sangjisheng (*Taxilli Herba*) group, and Qinjiao-Fangji (*Stephanlae Tetrandrae Radix*) group. Rheumatic fever arthralgia model was induced by collagen II and exposed in rheumatic fever environment. After modeling, each administration group was ig administrated with corresponding drug solution. The paw thickness was observed every 3 d, and swelling was calculated; The arthritis index was scored in the early, middle, and late stages. Rats were sacrificed on day 39. The expression of MMP-3 and TIMP-1 in the ankle joint of rats was detected by immunohistochemistry, and the pathological changes of ankle joint were observed by HE staining. **Results** Compared with the blank

收稿日期: 2016-12-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360648)

作者简介: 马腾茂, 硕士研究生, 研究方向为中药与复方应用研究。E-mail: 834082021@qq.com

\*通信作者 高慧琴, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药基础理论及临床应用研究。E-mail: ghq@gszy.edu.cn

group, the paw edema, AI, and expression of MMP-3 in collage II model group and rheumatic fever model group was significantly higher, the expression of TIMP-1 were significantly lower, the articular surface of two groups was rough and damaged, and the articular cartilage was severely damaged. A large number of granulation tissues proliferated, accompanied by a large number of inflammatory cell infiltration and neovascularization. After treatment, compared with rheumatic fever model group, the paw edema, AI, and expression of MMP-3 in all treatment groups were reduced to varying degrees, in which the Qin-Fang group were lower most significant; The serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in all treatment groups were significantly decreased in varying degrees, especially in the Qin-Fang group; The expression of TIMP-1 was significantly increased in varying degrees, especially in the Qin-Fang group. HE staining results showed that the area of articular cartilage destruction and the degree of destruction were reduced, the inflammatory cells and neovascularization decreased, the number of repair fibers increased, and the scar tissue increased. **Conclusion** For the rheumatic fever arthralgia RA, the combined effect of mild and cold Chinese materia medica (CMM) is better than the combined effect of mild and warm CMM, the combined effect of mild CMMs. Experimental results are consistent with the principles of traditional Chinese medicine clinical treatment of “treating the hot diseases should use the cold medicine”, the mechanism of the compatibility drug relieving rheumatic fever arthralgia RA may be related to its ability, which can reduce the expression of MMP-3, increase the expression of TIMP-1, reduce articular cartilage destruction, and reduce inflammatory cell infiltration and vascular proliferation.

**Key words:** *Gentianae Macrophyllae Radix*; cold-heat nature; compatibility; rheumatic fever arthralgia; rheumatoid arthritis; MMP-3; TIMP-1; *Clematidis Radix et Rhizoma*; *Taxilli Herba*; *Stephanlae Tetrandrae Radix*

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 属于中医“痹症”范畴, 是一种以关节滑膜炎、破坏性关节病变为主要特征的慢性、进行性、侵蚀性自身免疫性疾病。该病机制复杂, 病情缠绵, 致残率较高, 预后不良, 目前尚无良好的根治方法。秦艽 *Gentianae Macrophyllae Radix* 为祛风湿要药, 性平, 具有祛风湿、通络止痛、退虚热、清湿热等功效, 现代研究表明<sup>[1-5]</sup>, 无论是单味秦艽提取物还是其配伍应用, 均对 RA 具有较好的治疗效果。

本研究在中医理论指导下, 以秦艽为基本药, 分别与具有祛风湿功效但寒热药性不同的中药进行配伍, 通过前期大量秦艽药对的研究<sup>[5-7]</sup>及相关文献报道<sup>[8-9]</sup>, 从寒热药性角度筛选出秦艽配伍威灵仙 *Clematidis Radix et Rhizoma*、桑寄生 *Taxilli Herba*、防己 *Stephanlae Tetrandrae Radix* 3 组作用明显、具有代表性的药对, 组成平-温相配 (秦艽+威灵仙)、平-平相配 (秦艽+桑寄生), 平-寒相配 (秦艽+防己) 的配伍关系。本实验以风湿热痹 RA 大鼠为模型, 探讨秦艽寒热不同配伍药对对风湿热痹 RA 模型大鼠踝关节基质金属蛋白酶-3 (MMP-3) 和金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1) 表达及其病理变化的影响, 通过比较秦艽及其寒热不同配伍的治疗效果, 探讨药性-病证-疗效之间的关系。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 80 只, 雌雄皆用, 体质量 (200 $\pm$ 20) g, 由甘肃中医药大学动物实验中心提供, 许可

证号 SCXK (甘) 2015-0002。

### 1.2 药物与试剂

秦艽、威灵仙、桑寄生、防己 4 味中药饮片均购自兰州惠仁堂大药房, 由甘肃中医药大学中药鉴定教研室李成义教授鉴定均为正品。雷公藤多苷片 (远大医药黄石飞云制药有限公司, 批号 20150501); 天然牛 II 型胶原 (CII, 北京 Solarbio 公司, 批号 1122D056); 完全弗氏佐剂 (CFA, 美国 Sigma 公司, 批号 SLBK1731V); 冰醋酸 (质量分数 98.5%, 天津市富宇精细化工有限公司, 批号 20150110); 4%多聚甲醛 (北京 Solarbio 公司, 批号 20160425); 兔抗大鼠 MMP-3 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号 GR132089-1); 兔抗大鼠 TIMP-1 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号 GR138489-1); 链霉亲和素-生物素复合物 (SABC) 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 09L11B)。

### 1.3 仪器

改装后的 RXZ-380A-LED 智能型人工气候箱 (在全自动人工气候箱内加装 3 个风扇, 使其风速达 5 m/s, 用于模拟自然环境中风的刺激), 宁波江南仪器厂; HH-W600S 型恒温水浴锅, 金坛市大地自动化仪器厂; 0~150 mm 数显游标卡尺, 上海申韩量具有限公司; 生物细胞自动脱水机, 湖北亚光医用电子技术有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海跃进医疗器械厂; 生物组织摊烤片机, 湖北亚光医用电子技术有限公司。

## 2 方法

### 2.1 供试药液的制备

各配伍药对水煎液由甘肃中医药大学中药药剂实验室协助制备。秦艽水煎液：取秦艽 300 g，第 1 次加 10 倍量水煎煮 1 h，第 2 次加 8 倍量水煎煮 30 min，药液滤过，合并 2 次水煎液，浓缩为每毫升药液含生药 1.67 g 的单味秦艽水煎液。其余各配伍药对按饮片 1:1 的比例分别称取秦艽与威灵仙、秦艽与桑寄生、秦艽与防己各 150 g，按上述操作进行，制成秦艽-威灵仙（秦-威）、秦艽-桑寄生（秦-桑）、秦艽-防己（秦-防）配伍药对药液，4 ℃ 储存备用。雷公藤多苷溶液制备：将雷公藤多苷片充分碾碎，然后加入适量生理盐水，配成质量浓度为 0.4 mg/mL 的混悬液，备用。

### 2.2 胶原乳剂的制备

精密吸取 98.5%冰醋酸 0.3 mL 于 50 mL 量瓶中，加注射用水定容，摇匀，得到 0.1 mol/L 的醋酸溶液。将 5 mg CII 置于 25 mL 量瓶中，用 0.1 mol/L 醋酸溶液溶解，在冰水浴中定容，摇匀，置于 4 ℃ 冰箱中过夜。注射当天将 25 mL CII 溶液与 CFA 等体积混合，在冰浴中充分搅拌乳化，最终配成质量浓度为 0.1 mg/mL 的 CII 乳剂。

### 2.3 分组

80 只 SD 大鼠适应性饲养 3 d 后，称体质量，用随机数字表法随机分为对照组、CII 组、病证（CII+风湿热）模型组、雷公藤多苷组、秦艽组、秦-威组、秦-桑组、秦-防组，共 8 组，每组 10 只。

### 2.4 风湿热痹 RA 模型复制

参考文献方法<sup>[5]</sup>并改进，实验第 1 天，除对照组外，其余各组大鼠取背部 2 点（背部脊柱 2 侧）、尾根部 1 点，剃毛，皮内注射 0.1 mL CII 乳剂，共 0.3 mL。实验第 12 天，于大鼠左后足跖皮内注射 0.1 mL CII 乳剂进行 2 次免疫，对照组在相同部位注射等量生理盐水。从首次注射 CII 乳剂的第 2 天起，除对照组和 CII 组外，其余各组均使用改造后的人工气候箱进行风湿热痹病证模型造模。所用风湿热环境条件：温度 36~38 ℃，风速 5 m/s，相对湿度≥95%，实验中大鼠足跖没入 37 ℃ 热水中，大鼠全身以 37 ℃ 蒸汽熏蒸，10 min 换气 1 次。每天 1 次，每次 30 min，连续 18 d。

### 2.5 给药

造模结束后，各中药组按 25 g/kg（相当于成人临床日常用量）ig 给予对应的药液，雷公藤多苷组

按 6 mg/kg ig 给予雷公藤多苷溶液，对照组、CII 组及病证模型组 ig 给予等量生理盐水，每天 1 次，连续给药 21 d。

### 2.6 观察指标及测定方法

**2.6.1 大鼠足跖肿胀度测量** 采用游标卡尺测量大鼠左后足跖厚度，从实验前 1 d 开始，每 3 天测量 1 次，计算足跖肿胀度。

肿胀度=(致炎后足跖厚度-致炎前足跖厚度)/致炎前足跖厚度

**2.6.2 大鼠关节炎指数 (AI) 评分** 于实验第 14、26、38 天分别对各组大鼠进行 AI 评分，采用 5 级评分法<sup>[10]</sup>，评分标准如下：正常（无关节炎）为 0 分；足趾关节出现轻度发红或肿胀为 1 分；足趾或踝关节出现中度肿胀为 2 分；踝关节严重肿胀或踝关节以下全部肿胀为 3 分；整个足爪全部肿胀或关节严重变形，不能负重为 4 分。每只大鼠 4 只足爪评分之和作为最终的 AI 评分，每只大鼠 AI 得分最高不超过 16 分。

**2.6.3 免疫组织化学法检测大鼠踝关节 MMP-3、TIMP-1 的表达** 取大鼠左后踝关节部位，4%多聚甲醛固定，5%~10%的 EDTA 脱钙，梯度酒精脱水，二甲苯透明，然后石蜡包埋，切片。切片常规脱蜡至水，3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性酶，0.1 mol/L (pH 6.0) 枸橼酸盐缓冲液微波修复；5% BSA 封闭液封闭；加入 MMP-3 一抗（1:200 稀释），于 4 ℃ 孵育过夜；37 ℃ 复温 30 min，滴加生物素标记二抗；滴加 SABC 试剂，3,3'-二氨基苯联胺（DAB）显色；苏木素轻度复染；脱水，透明，封片，显微镜观察。TIMP-1 操作同上。具体染色步骤严格按说明书进行。结果判定：以细胞质中出现淡黄至褐黄色颗粒状着色者为阳性细胞。用 IPP 6.0 图像分析软件测量踝关节中 MMP-3、TIMP-1 表达的免疫组化染色的吸光度值，计算平均值，进行半定量分析。

**2.6.4 踝关节病理学观察** 处死动物，每组取 2 只大鼠的左后肢踝关节，剔除多余肌肉组织，4%多聚甲醛固定，脱钙，常规石蜡包埋，切片，HE 染色，光镜下观察关节组织形态变化。

### 2.7 统计方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析，计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验。

## 3 结果

### 3.1 对风湿热痹 RA 大鼠足跖肿胀度的影响

由表 1 可知，实验第 17 天 CII 组和病证模型组

肿胀度较对照组明显升高 ( $P < 0.01$ )。给药后各给药组足跖肿胀度逐渐降低;第 37 天时,与病证模型组比较,各给药组足跖肿胀度均明显降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),其中秦-防组降低最明显,且秦-防组肿胀度明显低于秦-桑组 ( $P < 0.05$ )。各中药组足跖肿胀度趋势为秦-防组 < 秦-威组 < 秦-苕组 < 秦-桑组。

### 3.2 对风湿热痹 RA 大鼠 AI 评分的影响

由表 2 可知,实验第 14 天,CII 组和病证模型

组 AI 评分明显升高,且病证模型的 AI 评分均明显高于 CII 组 ( $P < 0.01$ ),提示造模成功。之后 CII 组和病证模型组 AI 评分随着时间推移先升高后降低,给药组 AI 评分则随着给药时间的增加而不断降低,至第 38 天,与病证模型组比较,秦-防组、秦-苕组及秦-桑组 AI 评分明显降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),且秦-防组 AI 评分明显低于秦-威组和雷公藤多苷组 ( $P < 0.05$ )。各中药组 AI 评分趋势为秦-防组 < 秦-苕组 < 秦-桑组 < 秦-威组。

表 1 各组大鼠足跖肿胀度比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Comparison on paw thickness of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 肿胀度           |               |                |
|-------|---------------|---------------|----------------|
|       | 第 17 天        | 第 28 天        | 第 37 天         |
| 对照    | 0.11 ± 0.06   | 0.14 ± 0.06   | 0.14 ± 0.07    |
| CII   | 0.92 ± 0.26** | 0.73 ± 0.22** | 0.63 ± 0.19**  |
| 病证模型  | 1.05 ± 0.23** | 0.94 ± 0.17** | 0.81 ± 0.14*** |
| 雷公藤多苷 | 1.00 ± 0.28** | 0.83 ± 0.27   | 0.56 ± 0.17▲▲  |
| 秦-苕   | 0.88 ± 0.20** | 0.70 ± 0.21▲▲ | 0.53 ± 0.14▲▲  |
| 秦-威   | 0.89 ± 0.28** | 0.70 ± 0.21▲▲ | 0.53 ± 0.14▲▲  |
| 秦-桑   | 1.03 ± 0.16** | 0.83 ± 0.20   | 0.64 ± 0.17▲   |
| 秦-防   | 0.92 ± 0.16** | 0.66 ± 0.15▲▲ | 0.49 ± 0.10▲▲▲ |

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 CII 组比较: # $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.01$ ; 与病证模型组比较: ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$ ; 与秦-桑组比较: ● $P < 0.05$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.01$  vs collagen II group; ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$  vs wind-damp-heat arthralgia model group; ● $P < 0.05$  vs Qinjiao-Sangjisheng group

表 2 各组大鼠 AI 评分比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Comparison on AI of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | AI 评分          |                |                 |
|-------|----------------|----------------|-----------------|
|       | 第 14 天         | 第 26 天         | 第 38 天          |
| 对照    | 0              | 0              | 0               |
| CII   | 4.52 ± 0.28**  | 5.21 ± 2.38**  | 4.29 ± 2.36**   |
| 病证模型  | 5.21 ± 0.69*** | 5.59 ± 2.25**  | 4.44 ± 2.46**   |
| 雷公藤多苷 | 5.39 ± 0.45**  | 4.90 ± 1.05    | 3.64 ± 0.78     |
| 秦-苕   | 5.17 ± 0.44**  | 4.01 ± 0.48▲   | 2.48 ± 0.64▲▲   |
| 秦-威   | 5.29 ± 0.52**  | 4.41 ± 0.83    | 3.64 ± 0.61     |
| 秦-桑   | 5.30 ± 0.41**  | 4.05 ± 0.54▲   | 2.61 ± 0.83▲    |
| 秦-防   | 5.49 ± 0.34**  | 3.55 ± 0.56▲▲▲ | 2.01 ± 0.43▲▲▲★ |

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 CII 组比较: \*\*\* $P < 0.01$ ; 与病证模型组比较: ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$ ; 与雷公藤多苷组比较: ★ $P < 0.05$ ; 与秦-威组比较: \* $P < 0.05$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; \*\*\* $P < 0.01$  vs collagen II group; ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$  vs wind-damp-heat arthralgia model group; ★ $P < 0.05$  vs tripterygium group; \* $P < 0.05$  vs Qinjiao-Weilingxian group

### 3.3 对风湿热痹 RA 大鼠踝关节 MMP-3 和 TIMP-1 蛋白表达的影响

各组 MMP-3 和 TIMP-1 免疫组化染色结果见图 1,大鼠踝关节 MMP-3 和 TIMP-1 阳性表达产物呈明显的棕黄色颗粒状。对照组基本未见 MMP-3 表达;CII 组部分出现 MMP-3 表达;病证模型组出现大量

MMP-3 表达;各给药组 MMP-3 表达量均明显低于病证模型组,秦-苕配伍组 MMP-3 表达量要低于秦-苕组与雷公藤多苷组,配伍组中秦-防组 MMP-3 表达量低于秦-威组和秦-桑组。对照组 TIMP-1 蛋白正常表达;CII 组出现少量 TIMP-1 表达;病证模型组几乎没有 TIMP-1 表达;各给药组 TIMP-1 表达量

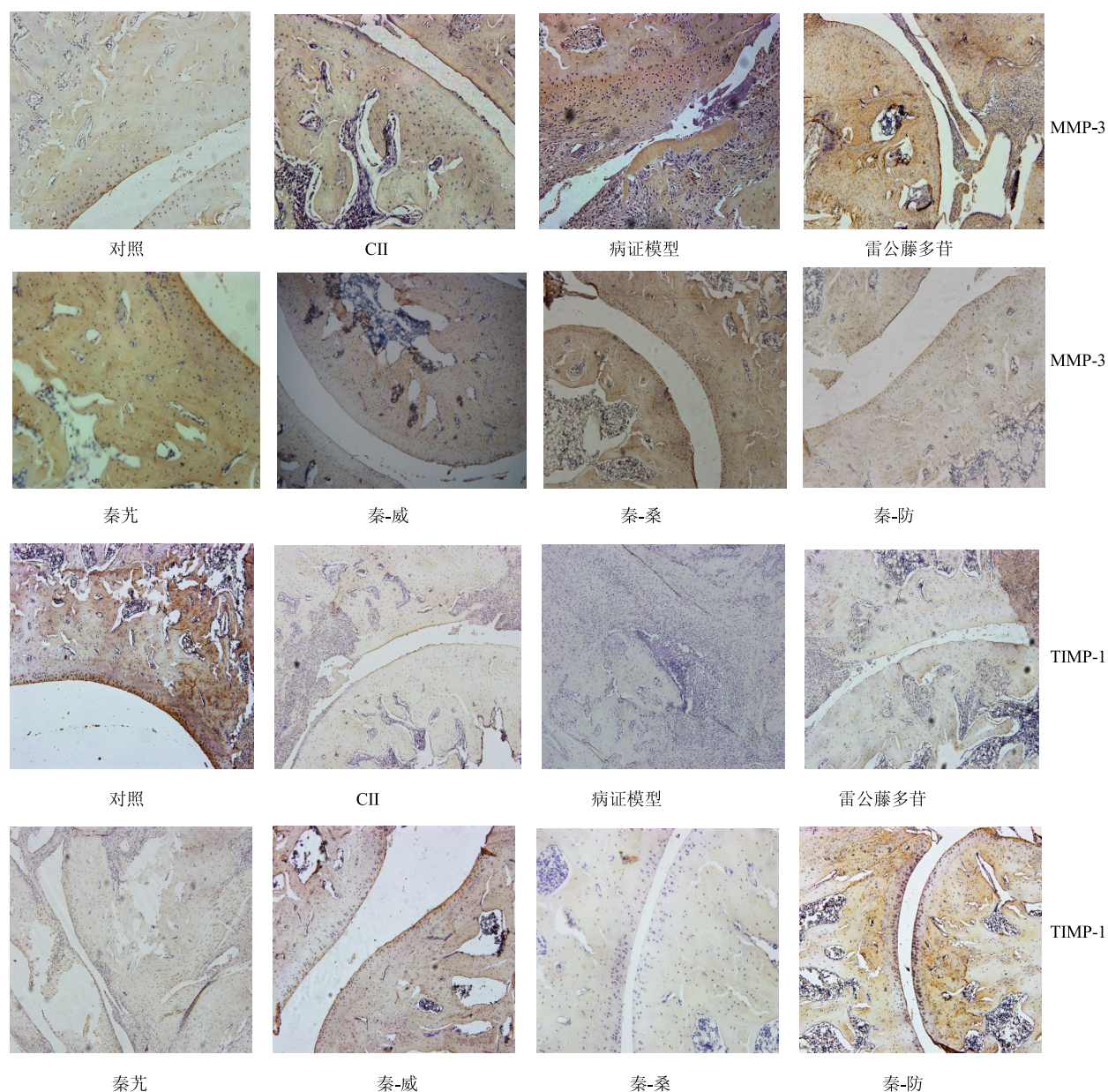


图 1 各组大鼠踝关节 MMP-3 和 TIMP-1 免疫组化染色结果 (10×10)

Fig. 1 Expression of MMP-3 and TIMP-1 protein in ankle joint of each group (10 × 10)

均高于病证模型组, 其中秦-防组出现大量 TIMP-1 表达, 且表达量高于其他给药组。

各组大鼠踝关节 MMP-3 的积分吸光度值见表 3。与对照组比较, CII 组和病证模型组 MMP-3 表达量明显升高 ( $P < 0.01$ ), 且病证模型组 MMP-3 表达量高于 CII 组 ( $P < 0.05$ ); 与病证模型组比较, 各给药组 MMP-3 表达量均明显下降 ( $P < 0.01$ ), 其中秦-防组下降较为明显; 给药组之间比较, 各中药组 MMP-3 表达量均明显低于雷公藤多苷组 ( $P < 0.01$ ), 且秦-防组表达量明显低于其他中药组 ( $P < 0.01$ )。各中药组 MMP-3 表达量趋势为秦-防组 < 秦-

威组 < 秦-桑组 < 秦艽组。

由表 3 可知, 与对照组比较, CII 组和病证模型组 TIMP-1 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.01$ ), 且病证模型组低于 CII 组; 与病证模型组比较, 各给药组 TIMP-1 蛋白表达量均有不同程度的升高, 其中雷公藤多苷组、秦-威组、秦-防组升高较为明显 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 给药组之间比较, 秦-防组 TIMP-1 表达量明显高于雷公藤多苷组、秦艽组及秦-桑组 ( $P < 0.01$ ), 秦-威组亦高于雷公藤多苷组、秦艽组及秦-桑组 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。各中药组 TIMP-1 表达量趋势为秦-防组 > 秦-威组 > 秦艽组 > 秦-桑组。

表 3 各组大鼠踝关节 MMP-3 和 TIMP-1 蛋白表达半定量结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Expression of MMP-3 and TIMP-1 protein in ankle joint of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | MMP-3                  | TIMP-1                   |
|-------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| 对照    | —                        | 97.77 ± 6.87           | 184.60 ± 15.26           |
| CII   | —                        | 173.05 ± 7.66**        | 113.85 ± 18.57**         |
| 病证模型  | —                        | 185.05 ± 6.35**#       | 111.15 ± 21.10**         |
| 雷公藤多苷 | 0.006                    | 152.47 ± 7.48▲▲        | 131.95 ± 9.98▲           |
| 秦艽    | 25                       | 132.10 ± 11.48▲▲◆◆     | 122.38 ± 12.04           |
| 秦-威   | 25                       | 127.85 ± 5.69▲▲◆◆      | 151.83 ± 18.13▲▲◆◆△△     |
| 秦-桑   | 25                       | 131.82 ± 15.69▲▲◆◆     | 114.03 ± 13.06**         |
| 秦-防   | 25                       | 97.95 ± 8.31▲▲◆◆△△◆◆●● | 163.42 ± 11.98▲▲◆◆△△◆◆●● |

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 CII 组比较: # $P < 0.05$ ; 与病证模型组比较: ▲ $P < 0.01$ ; 与雷公藤多苷组比较: ◆◆ $P < 0.01$ ; 与秦艽组比较:

△△ $P < 0.01$ ; 与秦-威组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与秦-桑组比较: ●● $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs collagen II group; ▲ $P < 0.01$  vs rheumatic fever arthralgia model group; ◆◆ $P < 0.01$  vs tripterygium group;

△△ $P < 0.01$  vs Qinjiao group; \*\* $P < 0.01$  vs Qinjiao-Weilingxian group; ●● $P < 0.01$  vs Qinjiao-Sangjisheng group

### 3.4 对风湿热痹 RA 大鼠踝关节病理形态的影响

由图 2 可以看出, 对照组关节面光滑, 潮线清晰, 软骨细胞排列整齐, 未见炎性细胞浸润; CII 组一侧关节软骨破坏严重, 肉芽组织增生, 炎性细胞较多, 关节腔内大量炎性浸出物, 滑膜增生深入关节腔内; 病证模型组在 CII 组情况的基础上, 关节大面积破坏, 大量肉芽组织增生, 大量炎性细胞浸润, 肉芽组织血管丰富, 血管扩张; 雷公藤多苷组关节面基本完整, 但粗糙, 部分软骨破坏, 软骨表面附有血管翳, 部分绒毛深入腔内, 少量炎性细胞浸润; 秦艽组关节软骨破坏, 肉芽组织增生, 修复纤维增多, 少量炎性细胞浸润, 血管明显减少; 秦-威组部分软骨破坏, 炎性细胞明显减少, 血管减

少, 绒毛减少, 部分纤维修复成瘢痕组织; 秦-桑组双侧关节软骨均有小面积破坏, 偶见绒毛, 肉芽组织中血管减少, 炎性细胞稍多; 秦-防组小面积关节软骨破坏, 炎性细胞明显减少, 肉芽组织中血管减少, 肉芽老化, 纤维增多, 存在大面积纤维修复后的瘢痕组织。

### 4 讨论

基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一类以  $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  为辅助因子的蛋白酶家族, 能够降解细胞外基质 (ECM)。RA 患者的血清和滑膜组织中都可以检测到较高水平的 MMPs, MMPs 被认为在 RA 的软骨基质降解中起重要作用<sup>[11-12]</sup>。MMP-3 又称间质溶素, 属于 MMPs 中基质降解酶的一种, 主要分解

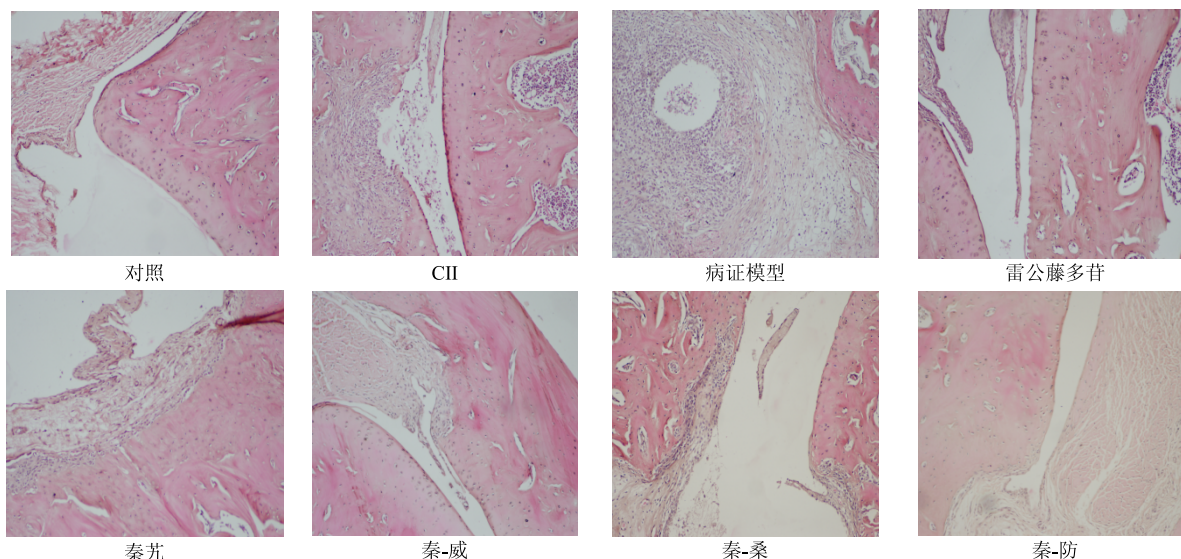


图 2 各组大鼠踝关节 HE 染色结果 (10×10)

Fig. 2 Results of HE staining of ankle joint in each group (10 × 10)

蛋白多糖<sup>[13]</sup>,可以降解 IV 型胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白、蛋白多糖核心蛋白和 IX 型胶原等一系列 ECM 大分子,还可作用于胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、结缔组织生长因子 (CTGF)、E-钙黏素等非 ECM 底物<sup>[14]</sup>。同时, MMP-3 还能激活其他种类的 MMPs<sup>[15]</sup>。MMP-3 被认为是 RA 关节损伤的主要介质之一,是导致关节软骨降解最重要、最关键的蛋白酶<sup>[16]</sup>;同时 MMP-3 也是系统性的炎症标志物,可作为 RA 病情损害和预后的指标,也是评价抗 RA 药物疗效的重要指标<sup>[17-18]</sup>。

TIMP 是 MMPs 的特异性抑制剂,是 ECM 代谢调节中与 MMPs 对应的负调节剂。TIMP 能够以 1:1 的比例与 MMPs 形成 MMP-TIMP 复合物,从而阻断 MMP 与底物结合,抑制 MMP 的活性,TIMP 对 MMP 产生的基质降解起着重要的平衡作用<sup>[19]</sup>。TIMP-1 由巨噬细胞和结缔组织细胞产生,广泛存在于组织和体液中,能够结合抑制 MMP-3 活性及血管增殖<sup>[20]</sup>,在类风湿关节炎中,降解 ECM 的 MMP-3 过度升高,而内源性抑制物 TIMP-1 不足,从而导致 MMP-3/TIMP-1 平衡被打破,这种平衡的破坏被认为在关节软骨和骨破坏中起核心作用<sup>[13]</sup>。大量实验研究证明<sup>[21-23]</sup>,抑制 MMP-3 的过度表达,升高 TIMP-1 的表达,对于减轻关节软骨破坏、缓解 RA 症状及治疗 RA 具有一定的积极作用。

实验结果显示,与对照组比较,CII 组及病证模型组大鼠足跖肿胀度、AI 评分及 MMP-3 表达量均明显升高,TIMP-1 表达量明显降低,踝关节软骨破坏严重,肉芽组织增生,并伴有较多的炎性细胞浸润和新生血管;且病证模型组各项指标均重于 CII 组,提示造模基本成功,风湿热痹 RA 模型病情比单纯的 RA 模型严重。治疗后,与病证模型组比较,各给药组大鼠足跖肿胀度、AI 评分、MMP-3 表达量均明显降低,TIMP-1 表达量均有所升高;其中秦-防组足跖肿胀度降低明显,秦-威组次之;秦-防组 AI 评分降低明显,秦-桑组次之;秦-防组 MMP-3 表达最少,秦-威组次之;秦-防组 TIMP 升高最为明显,秦-威组次之。HE 染色结果显示,各给药组关节软骨破坏较轻,炎性细胞及新生血管减少,瘢痕组织增多,其中秦-防组改善较好,秦-桑组仍存在较多的炎性细胞,改善较差。以上实验结果表明,秦-防组(平寒相配)的治疗效果较为突出,平寒相配改善风湿热痹 RA 的机制可能与其能够降低关节内 MMP-3 表达、升

高 TIMP-1 表达、减轻关节软骨破坏、减少炎性细胞浸润及血管增生等有关。

综合实验结果来看,秦艽防己配伍(平寒相配)能够明显减少风湿热痹 RA 大鼠踝关节 MMP-3 表达、增加其 TIMP-1 表达,明显改善风湿热痹 RA 大鼠的足跖肿胀、关节炎症及踝关节病理变化。该配伍治疗效果突出,疗效优于秦-威组(平温相配)、秦-桑组(平平相配)及秦艽组,说明对于风湿热痹,平寒相配效果较佳,体现了“热证-寒药-疗效佳”的辨证关系,实验结果与中医临床“疗热以寒药”的治疗原则是相符合的。此外,本实验中秦-威组(平温相配)亦表现出良好的疗效,究其原因:一方面得益于平温相配具有良好的祛邪作用,风湿热痹形成的外因除热邪之外,还有风、湿二邪。对于风邪,温性本身具有发散的作用,温属阳,阳主升,有助于风邪的祛除。对于湿邪,治湿不可远离温,温者湿才能化,而且温属阳,阳气是气机气化的根本动力,而气机气化正常,津液就会正常运动而不滞留。另一方面,抑或是中药寒热药性突出的药作用强于平性药,其机制有待进一步研究。秦-桑组(平平相配)对风湿热痹 RA 的治疗效果不甚理想,属于秦艽配伍组中效果较差的一组,可能与桑寄生药性过于平和,祛邪扶正之力徐缓,需长期服用有关。

#### 参考文献

- [1] 王 钢,王丽琴,王 佳,等.秦艽醇提物对胶原诱导性关节炎大鼠血清抗-CCP 及 TNF- $\alpha$  的影响 [J].中国实验方剂学杂志,2013,19(19):302-305.
- [2] 靳皓文,俞发荣.甘肃秦艽提取物抗类风湿性关节炎作用及其机制探究 [J].甘肃科技纵横,2006,35(2):225-226.
- [3] 李昌勤,张 倩,康文艺.大秦艽汤临床应用概述 [J].中成药,2010,32(6):1029-1032.
- [4] 聂安政,林志健,王 雨,等.秦艽化学成分及药理作用研究进展 [J].中草药,2017,48(3):597-608.
- [5] 高慧琴,吴国泰,孙少伯,等.秦艽不同配伍对风湿痹证模型大鼠血清炎症因子水平的影响 [J].中医杂志,2013,54(9):785-788.
- [6] 高慧琴,吴国泰.秦艽不同配伍的抗炎镇痛作用 [J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):182-183.
- [7] 张志红,高慧琴,吴国泰.秦艽不同配伍对小鼠耳肿胀及毛细血管通透性的影响 [J].甘肃中医学院学报,2011,28(5):4-6.
- [8] 郭 齐,李献平,王 蕊,等.中医治疗类风湿性关节炎的药物探讨 [J].世界中医药,2010,5(2):136-137.
- [9] 吕毅斌,李 立,王志飞,等.中药治疗类风湿性关节

- 炎、痛风及骨性关节炎用药规律研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(5): 833-836.
- [10] 张钧田. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [11] Kashiwagi M. Adenovirus-delivered TIMP-1 in the rheumatoid arthritis mouse model [J]. *Arthritis Res Ther*, 2001, 4(1): 1-3.
- [12] 张育, 顾健. 基质金属蛋白酶及组织金属蛋白酶抑制剂与类风湿性关节炎 [J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(7): 418-421.
- [13] 于孟学. 风湿科主治医生 1053 问 [M]. 第 3 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2010.
- [14] Harris E D, Budd J R C, Firestein G S, *et al*. 凯利风湿病学 [M]. 左晓霞, 陶立坚, 高洁生, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [15] 蒋明, David Y, 林孝义, 等. 中华风湿病学 [M]. 北京: 华夏出版社, 2004.
- [16] Xie D L, Hui F, Meyers R, *et al*. Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments is associated with several proteinases: Stromelysin plays a major role in chondrolysis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 311(2): 205-212.
- [17] Tchvetverikov I, Lard L R, de Groot J, *et al*. Matrix metalloproteinases-3, -8, -9 as markers of disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62(11): 1094-1099.
- [18] 米存东, 张素洁, 赵钺, 等. 血清基质金属蛋白酶-3 检测在类风湿关节炎中的临床意义 [J]. 广西医学, 2011, 33(7): 793-797.
- [19] 董晓蕾, 张群燕, 蔡辉. 基质金属蛋白酶 3 在类风湿关节炎中的表达及调控 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(1): 57-59.
- [20] Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, *et al*. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59(6): 455-461.
- [21] 孟彪. 丹参酮 IIa 对佐剂性关节炎大鼠血清 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  水平及滑膜 MMP3/TIMP1 表达的影响 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2008.
- [22] 刘洋. 痹愈汤对类风湿性关节炎骨侵蚀治疗机制的实验研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2007.
- [23] 张娟, 李娟, 赵毅, 等. 青藤碱对类风湿关节炎患者成纤维样滑膜细胞增殖及基质金属蛋白酶-3 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(3): 23-25.