

## 山茱萸-白芍酒炙配伍前后通过调节 OPG/RANKL/RANK 信号通路抗类风湿性关节炎药效机制研究

郑寅涛, 曹 岗\*, 吴 鑫\*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

**摘要:**目的 探讨山茱萸-白芍酒炙配伍前后对类风湿性关节炎小鼠关节评分、足趾红肿度、胫骨关节与踝关节损伤度及膝关节滑膜组织中骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 受体激活因子配体 (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)/NF- $\kappa$ B 受体激活因子 (receptor activator of NF- $\kappa$ B, RANK) 信号通路的影响。方法 尾根部 sc 牛 II 型胶原和完全弗氏佐剂的混合乳状液建立类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 小鼠模型。将 DBA/1 雄性小鼠按照体质量分布随机分为 9 组, 即对照组、模型组、来氟米特阳性药组、生山茱萸组、酒山茱萸组、生白芍组、酒白芍组、生山茱萸-生白芍配伍组、酒山茱萸-酒白芍配伍组, 每组 8 只。除对照组外, 首次免疫造模 7 d 后进行第 2 次加强免疫, 第 30 天造模完成后, 各给药组第 31 天起每天 ig 相应剂量的 75%乙醇提取物无菌水溶液, 阳性药组给予来氟米特无菌水溶液 (6 mg/kg), 对照组、模型组小鼠 ig 相应体积的无菌水, 连续给药 30 d。显微镜下观察小鼠踝关节 HE 病理变化, 断层扫描 (Micro-CT) 观察小鼠胫骨关节及踝关节损伤程度, RT-qPCR 法测定膝关节滑膜组织中 OPG、RANKL、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)、酪氨酸蛋白激酶 (sarcoma, Src)、核因子-p65 (nuclear factor-p65, P65) 基因表达水平及 Western blotting 法测定 OPG、RANKL、RANK、TRAF6、Src、磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (phosphorylation inhibitory  $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ )、磷酸化 P65 (p-P65) 蛋白的表达。结果 与对照组相比, 模型组小鼠踝关节组织有明显的滑膜成纤维细胞及破骨细胞等炎性浸润, 足趾关节及踝关节发生变形, OPG 蛋白和基因表达水平明显降低 ( $P < 0.001$ ), RANKL、TRAF6、Src、P65 基因表达水平及 RANKL、RANK、TRAF6、Src、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-P65/P65 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 山茱萸和白芍酒炙配伍前后各组小鼠踝关节炎及损伤均有改善的趋势, OPG 蛋白和基因表达水平升高, RANKL、TRAF6、Src、P65 基因表达水平及 RANKL、RANK、TRAF6、Src、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-P65/P65 蛋白表达水平降低, 且酒山茱萸-酒白芍配伍组改善效果最为明显 ( $P < 0.001$ ), 生山茱萸-生白芍配伍组和酒山茱萸组次之, 生白芍组、酒白芍组和生山茱萸组虽有一定改善作用, 但关节炎评分相对较高。结论 山茱萸和白芍酒炙配伍前后均可一定程度上改善小鼠膝关节及踝关节损伤, 其中二者的酒炙品配伍或生品配伍抗 RA 效果更佳, 可能是通过调控 OPG/RANKL/RANK 信号通路来发挥抗 RA 的作用。

**关键词:** 山茱萸; 白芍; 酒炙; 配伍; 类风湿性关节炎; OPG/RANKL/RANK 信号通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)10-3084-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.019

## Anti-rheumatoid arthritis efficacy and mechanism of *Corni Fructus-Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing based on OPG/RANKL/RANK pathway

ZHENG Yin-tao, CAO Gang, WU Xin

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of *Shanzhuyu* (*Corni Fructus*)-*Baishao* (*Paeoniae Radix Alba*) herbal pair with wine before and after processing on joint scores, toe swelling degree, tibial articular and ankle joint injury degree, and osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)/receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) pathway of knee synovial tissue

收稿日期: 2021-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773900)

作者简介: 郑寅涛, 男, 硕士研究生, 主要研究方向为中药物质基础及机制。E-mail: zyt@hznu.edu.cn

\*通信作者: 曹 岗, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药炮制机制研究。E-mail: caogang33@163.com

吴 鑫, 实验师, 主要从事中药分析研究。E-mail: 1254930977@qq.com

in rheumatoid arthritis mice. **Methods** The emulsion of bovine type II collagen and complete Freund's adjuvant were injected subcutaneously into the tail root of mice to establish the rheumatoid arthritis model. According to the weight distribution, the DBA/1 male mice were randomly divided into nine groups (eight per group). Namely, the control group, the model group, the leflunomide positive drug group, the raw *Corni Fructus* group, the wine-processed *Corni Fructus* group, the raw *Paeoniae Radix Alba* group, the wine-processed *Paeoniae Radix Alba* group, the raw *Corni Fructus* and *Paeoniae Radix Alba* compatibility group, and the wine-processed *Corni Fructus* and *Paeoniae Radix Alba* compatibility group, respectively. The second booster immunization was performed 7 d after the first immunization and then the rheumatoid arthritis model was established on the 30th d. Furthermore, each administration group was given a corresponding dose of 75% ethanol extract sterile aqueous solution, the positive drug group was given a sterile aqueous solution of leflunomide (6 mg/kg), and mice in the control group and model group were given a corresponding volume of sterile water for the following 30 consecutive days. Finally, the pathological changes of HE in the mouse ankle joint were observed under microscope, and the injury degree of the mouse tibial articular and ankle joint were observed by Micro-CT tomography, respectively. Moreover, the *OPG*, *RANKL*, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (*TRAF6*), sarcoma (*Src*), nuclear factor-p65 (*P65*) genes and the *OPG*, *RANKL*, *RANK*, *TRAF6*, *Src*, phosphorylation inhibitory  $\kappa$ Ba (p-I $\kappa$ Ba), p-P65 protein in the synovial tissue of the knee joint were determined by RT-qPCR and Western blotting, respectively. **Results** Compared with the control group, mice in the model group had obvious inflammatory infiltration of fibroblast synovial cells and osteoclasts in ankle joints, deformed knee and ankle joints. In addition, the *OPG* gene levels and protein expression were reduced significantly ( $P < 0.001$ ) while the *RANKL*, *TRAF6*, *Src*, *P65* gene levels and *RANKL*, *RANK*, *TRAF6*, *Src*, p-I $\kappa$ Ba/I $\kappa$ Ba, p-P65/P65 protein expression were significantly increased ( $P < 0.001$ ). Besides, all the groups of *Corni Fructus*-*Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing have a trend of improvement compared with the model group, especially in the wine-processed *Corni Fructus*-*Paeoniae Radix Alba* herbal pair group ( $P < 0.001$ ) followed by the raw *Corni Fructus*-*Paeoniae Radix Alba* herbal pair group and the wine-processed *Corni Fructus* group, and the *OPG* gene level and protein expression increased. Moreover, *RANKL*, *TRAF6*, *Src*, *P65* gene level and *RANKL*, *RANK*, *TRAF6*, *Src*, p-I $\kappa$ Ba/I $\kappa$ Ba, p-P65/P65 protein expression were reduced. In addition, the administration group of the raw *Paeoniae Radix Alba*, wine-processed *Paeoniae Radix Alba*, and raw *Corni Fructus* also showed a significant improvement trend, however, the arthritis score was relatively higher. **Conclusion** *Corni Fructus*-*Paeoniae Radix Alba* herbal pair can reduce the knee and ankle joint injury in rheumatoid arthritis mice through regulating the *OPG*/*RANKL*/*RANK* signaling pathway to play an anti-rheumatoid arthritis effect.

**Key words:** *Corni Fructus*; *Paeoniae Radix Alba*; wine-processed; compatibility; rheumatoid arthritis; *OPG*/*RANKL*/*RANK* pathway

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一类由非细菌感染引起的“非感染性滑膜炎”,属于无菌性炎症疾病,常累及关节肿胀、疼痛,多伴有红细胞沉降率和C反应蛋白增高等。据不完全统计,目前全球约有3.55亿关节炎患者,其中RA在我国大陆的发病率约为0.42%,总患病人数达500万,并且因其致畸、致残风险高,严重影响患者生活质量,已成为世界头号致残性疾病<sup>[1-9]</sup>。目前西医治疗主要使用传统疾病修饰型抗风湿药,首选甲氨蝶呤治疗,其次使用来氟米特或柳氮磺胺吡啶抗炎药等,但常治疗应答不佳,无法根治RA。

中医药在这方面具有独特优势,研究表明多种天然药物中的活性成分,不仅可以有效缓解RA的症状,而且能够在一定程度上延缓疾病的进展。山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,味酸、涩,微温,归肝、肾经;现代药理研究证实山茱萸具有免疫调节、抗

炎作用,对RA具有明显治疗作用<sup>[10]</sup>;白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,味苦、酸,微寒,归肝、脾经,具有缓急止痛功效。白芍总苷胶囊是以白芍为成分的中成药,具有消炎止痛、抑制异常免疫反应及抗RA作用<sup>[11-13]</sup>。中医临床常用山茱萸和白芍配伍治疗关节酸痛、屈伸不利。本研究采用尾根sc完全弗氏佐剂的方法建立小鼠RA模型,通过小鼠踝关节HE染色病理变化、胫骨关节和踝关节Micro-CT断层扫描以及骨保护素 (osteoprotegerin, *OPG*)-核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)受体激活因子配体 (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, *RANKL*)/NF- $\kappa$ B受体激活因子 (receptor activator of NF- $\kappa$ B, *RANK*)-肿瘤坏死因子受体相关因子6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, *TRAF6*)-酪氨酸蛋白激酶 (sarcoma, *Src*)-NF- $\kappa$ B信号通路来探讨山茱萸-白芍酒炙配伍前后抗RA的作用机制<sup>[14-18]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 动物

清洁级健康 DBA/1 小鼠 72 只, 6~7 周龄, 体质量 (18±2) g, 雄性, 饲养环境: 12 h/12 h, 明暗自动切换 (8:30~20:30); 温度控制在 (25±2) °C; 相对湿度控制在 50%~70%。动物实验由浙江中医药大学 GLP 实验动物中心伦理委员会批准 (批准编号 20200713-06)。实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005, 上海斯莱克实验动物有限责任公司; 实验动物使用许可证号 SYXK (浙) 2018-0012, 浙江中医药大学动物实验研究中心。

### 1.2 主要试剂

完全弗氏佐剂 (批号 Lot 200194)、牛 II 型胶原 (批号 Lot 190577), Chondrex 公司; 小鼠 OPG 抗体 (批号 ab73400)、RANKL 抗体 (批号 ab45039)、TRAF6 抗体 (批号 ab33915)、Src 抗体 (批号 ab16885)、NF-κB 抑制蛋白 α (phosphorylation inhibitory κBa, IκBa) 抗体 (批号 ab76429)、核因子-p65 (nuclear factor-p65, P65) 抗体 (批号 ab16502)、磷酸化 IκBa (p-IκBa) 抗体 (批号 ab133462)、磷酸化 P65 (p-P65) 抗体 (批号 ab194726)、β-actin 抗体 (批号 ab8226), Abcam 公司; RANK 抗体 (批号 4845, CST 公司); 羊抗兔 IgG (H+L) 抗体 (批号 31460)、羊抗鼠 IgG (H+L) 抗体 (批号 31431), Thermo Pierce 公司。

### 1.3 药物

山茱萸和白芍饮片购自浙江中医药大学中药饮片有限公司, 经质管部钱敏主任鉴定基原性状符合《中国药典》2020 年版规定。山茱萸和白芍酒炙配伍前后各组 75%乙醇提取物为实验室自制, 山茱萸和白芍酒炙品按照《中国药典》2020 年版各项炮制品项下要求制备, 生品和酒炙品配伍比例为山茱萸-白芍 1:2, 各样品经 75%乙醇浸渍渗漉法提取, 浓缩, 冻干。所得提取物冻干粉分别取适量加蒸馏水溶解, 制得各给药组提取物浓缩液 (生山茱萸给药组生药量 0.53 g/mL、酒山茱萸给药组生药量 0.53 g/mL、生白芍给药组生药量 1.06 g/mL、酒白芍给药组生药量 1.06 g/mL、生山茱萸+生白芍配伍给药组生药量 1.59 g/mL、酒山茱萸+酒白芍配伍给药组生药量 1.59 g/mL)。来氟米特片购自美罗药业股份有限公司, 规格 10 mg/片, 批号 34200302, 用无菌水配制成 0.3 mg/mL 混悬液。

### 1.4 主要仪器

E200 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司);

HistoCore Arcadia H 型石蜡包埋机、RM2255 型全自动转轮式切片机、HI1210 型恒温箱 (Leica 公司); SKYScan1176 型小动物活体 Micro-CT 成像系统 (美国 Bruker 公司); 多重实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司); 1658033 型 Mini-PROTEAN 电泳系统以及 Mini Trans-Blot 转印系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 胶原诱导的 RA 模型建立

将牛 II 型胶原 (2 mg/mL) 醋酸溶液与完全弗氏佐剂 (5 mg/mL) 以 1:1 混合制成乳状液, 备用。将 DBA/1 小鼠置于固定器中对其尾根部进行 sc 配制好的上述混合乳状液 0.1 mL, 首次免疫注射 7 d 后, 在相同部位进行第 2 次加强免疫, sc 上述混合乳状液 0.1 mL, 造模期间小鼠自由饮水。首次免疫注射后第 31 天观察小鼠足趾肿胀情况, 以出现炎性红肿或关节变形为 RA 模型复制成功标志。另取 8 只正常小鼠同法注射相同体积的生理盐水作为对照组。

### 2.2 实验分组及给药

将 RA 模型复制成功的 64 只 DBA/1 雄性小鼠, 按体质量随机分为 8 组, 分别为模型组、来氟米特阳性药 (6 mg/kg) 组、生山茱萸 (S-SZY, 10.6 g/kg) 组、酒山茱萸 (J-SZY, 10.6 g/kg) 组、生白芍 (S-BBS, 21.2 g/kg) 组、酒白芍 (J-BBS, 21.2 g/kg) 组、生山茱萸-生白芍配伍 (S-SZYBS, 31.8 g/kg) 组、酒山茱萸-酒白芍配伍 (J-SZYBS, 31.8 g/kg) 组。各组给药量参照预实验和等效剂量换算确定。首次免疫后第 31 天起, 各组小鼠每天开始 ig 给予相应药物, 连续 30 d。对照组和模型组小鼠每天 ig 生理盐水。山茱萸和白芍酒炙配伍前后各给药组剂量均以生药量计。

### 2.3 HE 染色小鼠踝关节

末次给药后次日牺牲小鼠, 并取左后踝和胫骨关节, 用 4%的多聚甲醛固定, 10% EDTA 溶液进行脱钙, 梯度浓度乙醇脱水后, 石蜡包埋, 切片后进行 HE 染色, 光学显微镜下观察各组小鼠踝和胫骨关节组织病理变化。另取右后膝关节, 钝性剥离膝关节滑膜组织置-80 °C超低温冰箱中保存, 备用。

### 2.4 Micro-CT 观察小鼠胫骨关节和踝关节损伤度

小鼠踝关节和胫骨关节标本采用 SKYScan1176 Micro-CT 设备进行扫描。扫描前, 将样品从 4%多聚甲醛溶液中取出并用磷酸缓冲盐溶

液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗后, 将胫骨关节和踝关节标本置于垂直于扫描轴的直径为 10 mm 的标本管中, 保鲜膜包裹固定于动物床, 加入 70%乙醇作为扫描介质。扫描仪的基本参数: 电压 50 kV, 电流 200  $\mu$ A, 总旋转角 180°, 旋转角增量 0.3°, 厚度 9  $\mu$ m。扫描后, 使用 SKYScan NRecon 软件并利用 Feldkamp 圆锥束算法进行三维重构。骨小梁参数包括骨小梁相对体积 (BV/TV)、骨表面积组织体积比值 (BS/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁分离度 (Tb.Sp)、骨结构模型指数 (structure model index, SMI)。通过分析骨皮质厚度 (Ct.Th)、骨皮质面积 (Ct.Ar), 评估皮质骨结构。以上数据的操作和分析均使用 Custom Analysis 程序 (CTAn, SKYScan) 进行。

### 2.5 RT-qPCR 法检测滑膜组织中 OPG、RANKL、TRAF6、Src、P65 基因表达水平

从 -80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱取出冻存的膝关节滑膜组织, 液氮下研磨成粉, 按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 以  $\beta$ -actin 作为内参。各定量 PCR 引物序列采用 Primer Premier 6.0 和 Beacon designer 7.8 软件进行设计, 序列见表 1。RT-qPCR 扩增体系为 20  $\mu$ L: cDNA 1  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, Power SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 10.0  $\mu$ L, 加无菌蒸馏水 8.0  $\mu$ L 至 20  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 扩增反应 95  $^{\circ}$ C、15 s, 63  $^{\circ}$ C、25 s, 40 个循环; 熔解曲线 55~95  $^{\circ}$ C, 扩增反应在 Quantstudio 多重实时荧光定量 PCR 仪上进行。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法, 比较各组 OPG、RANKL、TRAF6、Src、P65 mRNA 相对表达水平。

表 1 实时定量荧光 PCR 引物及反应条件  
Table 1 Real-time PCR primers and conditions

基因名称	基因序列号	引物序列 (5'→3')	溶解温度/ $^{\circ}$ C
OPG	NM_008764.3	正向: AGTGAGGAGGAAGACATTGTGT 反向: CAAGCAGAATTCGATCTCCAGG	58
RANKL	NM_011613.3	正向: CTGTACGCCAACATTGCTTTC 反向: TGCTAATTTCTTCACCAGCTCG	58
TRAF6	NM_001303273.1	正向: CATGATCAAAGCTGTCCCTCTGG 反向: TGCATCTTTTCATGACAGCCAA	60
Src	NM_009271.3	正向: CCTTTGTGGCCCTCTATGACTA 反向: GCTCTGATCCCGTCTAGTGAT	60
P65	NM_009045.5	正向: GCTCCTTTTCTCAAGCTGATGT 反向: CATCTGTGTCTGGCAAGTACTG	58
$\beta$ -actin	BC138614.1	正向: TGTTACCAACTGGGACGACA 反向: CTGGGTCA TCTTTTCACGGT	58

### 2.6 Western Blotting 法检测滑膜组织 OPG、RANKL、RANK、TRAF6、Src、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-P65/P65 蛋白表达水平

将 -80  $^{\circ}$ C 超低温冷冻保存的各组小鼠膝关节滑膜组织粉碎后, 加入细胞裂解液提取蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳 (蛋白上样量为 60  $\mu$ g), 恒流电转到 PVDF 膜后加入聚山梨酯-三乙醇胺缓冲盐 (tween-triethanolamine buffered saline, T-TBS, 含 5%脱脂奶粉) 避光封闭 1 h 后用 T-TBS 漂洗 3 次, 加入一抗 OPG (1:1000)、RANKL (1:800)、RANK (1:1000)、TRAF6 (1:1500)、Src (1:800)、I $\kappa$ B $\alpha$  (1:800)、p-I $\kappa$ B $\alpha$  (1:1000)、P65 (1:1000)、p-P65 (1:800) 的稀释液, 4  $^{\circ}$ C 恒温过夜。

漂洗 4 次后添加相应羊抗兔 IgG (H+L) 和羊抗鼠 IgG (H+L) 二抗 (1:5000 稀释液), T-TBS (含 2%脱脂奶粉) 漂洗 5 次后加入增强型化学发光试剂 (enhanced chemiluminescence, ECL), 曝光后分析条带相对分子质量及灰度值 (以  $\beta$ -actin 为内参蛋白)。

### 2.7 统计学方法

所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  形式表示, 采用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行数据的处理统计, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及 Tukey's multiple comparisons test 法进行组间比较。P < 0.05、0.01、0.001 表示显著性差异, 具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 症状的影响

如图 1 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠体质量呈下降趋势, 足趾肿胀度(焦距=3.99 mm)和关

节炎症评分显著增加; 与模型组相比, 山茱萸和白芍酒炙配伍前后各组小鼠足趾肿胀度和关节炎评分均有一定缓解, 其中酒山茱萸-酒白芍配伍组改善效果最为明显。

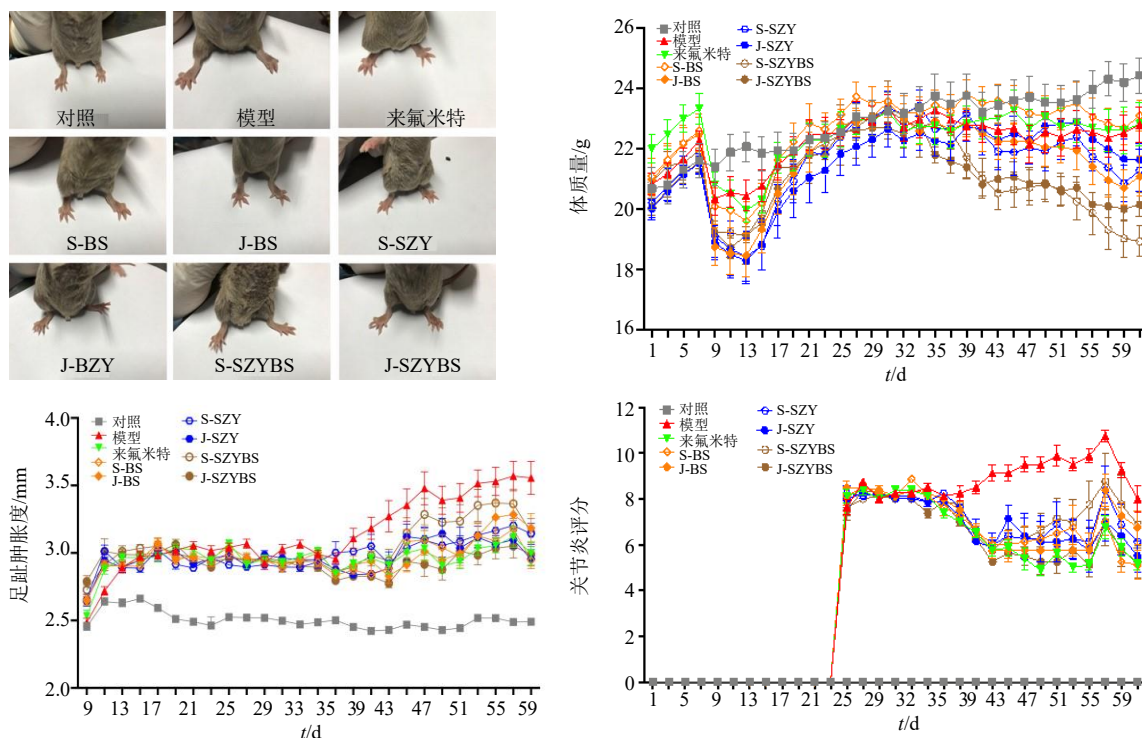


图 1 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠体质量和足趾关节肿胀的影响 (n=8)

Fig. 1 Effects of *Corni Fructus-Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing on body weight and toe joint swelling in RA mice (n = 8)

#### 3.2 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠踝关节组织的病理影响

HE 染色实验结果见图 2。对照组小鼠踝关节软骨组织成骨细胞及骨细胞排列整齐规则, 结构完整, 滑膜表面光滑未见增生, 无破骨细胞等炎性浸润; 模型组有明显滑膜成纤维细胞及破骨细胞等炎性浸润, 滑膜组织细胞排列不规则, 增生肿胀明显。与模型组相比, 来氟米特阳性对照组及山茱萸和白芍酒炙配伍各给药组小鼠踝关节滑膜组织增生和破骨细胞浸润显著改善; 其中酒炙品配伍组和生品配伍组对踝关节软骨损伤的缓解作用更强。

#### 3.3 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠踝关节和胫骨关节 Micro-CT 变化影响

如图 3、4 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠三维成像显示, 皮质骨变薄、骨量相对减少、骨小梁松散且结构呈“杆状”变化; 与模型组相比, 山茱萸和白芍酒炙配伍前后各组均可有效减轻踝关节骨

面破坏; 明显升高胫骨关节骨小梁及皮质骨骨密度, 且骨小梁微结构改善。其中, 山茱萸酒炙品效果优于生品组, 酒炙品配伍组和生品配伍组对踝关节软骨损伤的缓解作用更强。

#### 3.4 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠膝关节滑膜组织 OPG、RANKL、TRAF6、Src、P65 基因表达的影响

由图 5 可以看出, 与对照组相比, 模型组小鼠膝关节滑膜组织 OPG mRNA 表达明显降低 (P<0.001), RANKL、TRAF6、Src、P65 mRNA 表达显著升高 (P<0.001); 与模型组相比, 山茱萸和白芍酒炙配伍前后各组小鼠膝关节滑膜组织 OPG mRNA 表达升高, RANKL、TRAF6、Src、P65 mRNA 表达降低。其中, 酒山茱萸-酒白芍配伍组改善效果最为明显 (P<0.001), 生山茱萸-生白芍配伍组和酒山茱萸组次之 (P<0.05、0.001), 生白芍组、酒白芍组和生山茱萸给药组也有一定改善作用 (P<



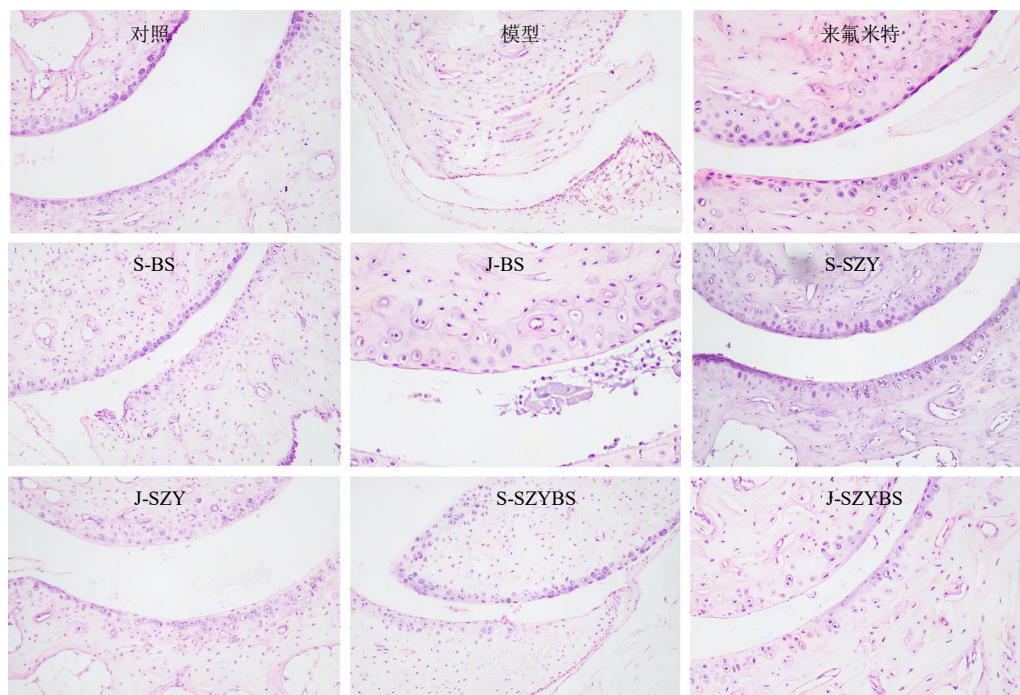


图2 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠踝关节滑膜组织 HE 染色图 (×10)

Fig. 2 HE staining of *Corni Fructus-Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing on RA mice (× 10)

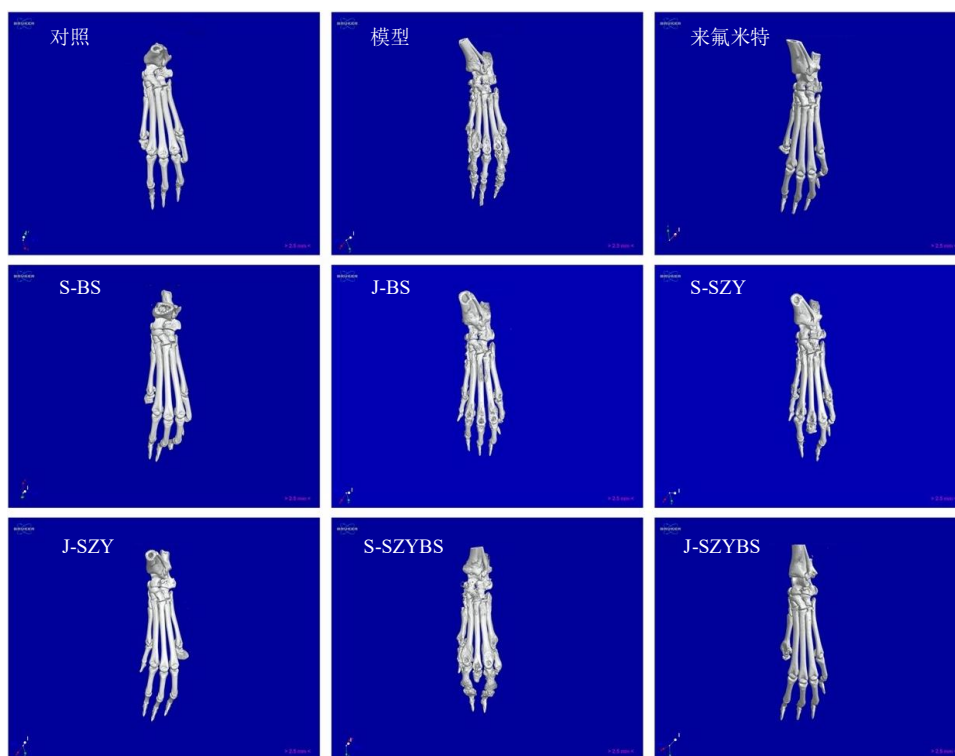


图3 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠足趾关节及踝关节 Micro-CT 变化影响

Fig. 3 Effects of *Corni Fructus-Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing on Micro-CT changes of toe joint and ankle joint in RA mice

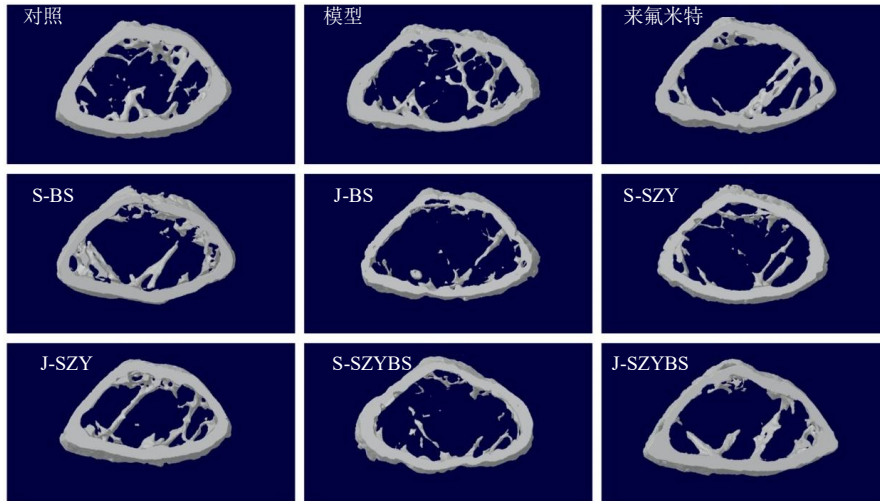
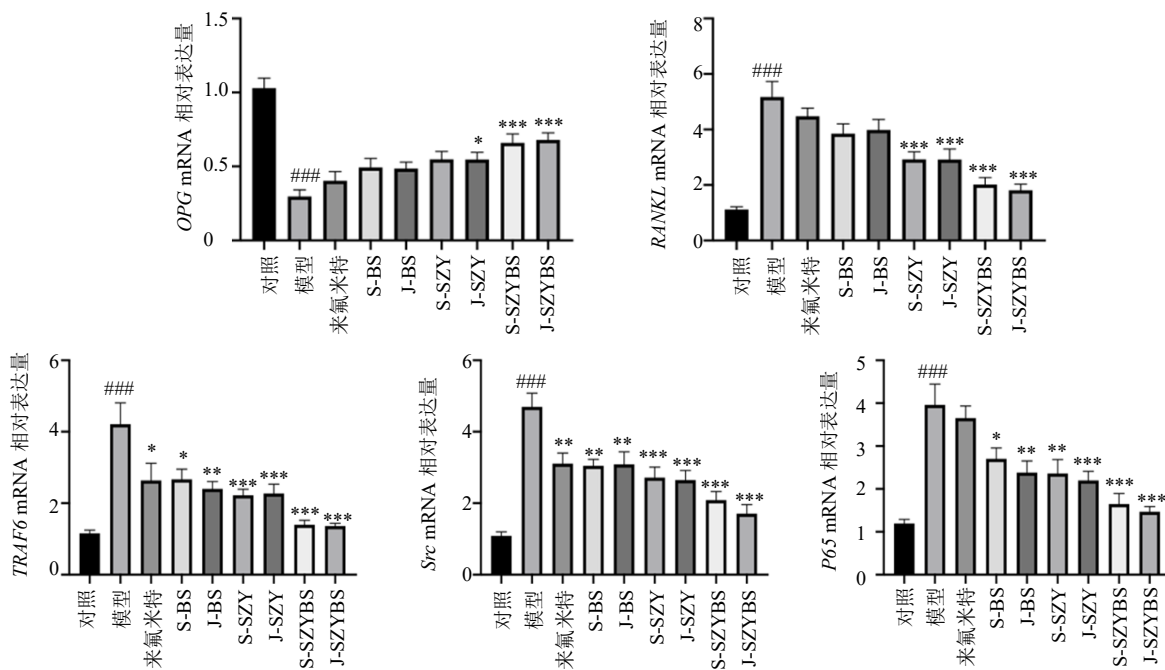


图 4 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠胫骨关节 Micro-CT 变化影响

Fig. 4 Effects of *Corni Fructus-Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing on Micro-CT changes of tibial articular in RA mice



与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 图 6 同  
### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as fig. 6

图 5 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠膝关节滑膜组织中相关基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 5 Effects of *Corni Fructus-Paeoniae Radix Alba* herbal pair with wine before and after processing on expression of related genes in synovial tissues of knee joint in RA mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

0.05、0.01、0.001)。

### 3.5 山茱萸和白芍酒炙配伍前后对 RA 小鼠膝关节滑膜组织 OPG、RANKL、RANK、TRAF6、Src、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-P65/P65 蛋白表达的影响

由图 6 可以看出,与对照组相比,模型组小鼠

膝关节滑膜组织 OPG 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.001$ ), RANKL、RANK、TRAF6、Src、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-P65/P65 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比,山茱萸和白芍酒炙配伍前后小鼠膝关节滑膜组织 OPG 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.001$ ),

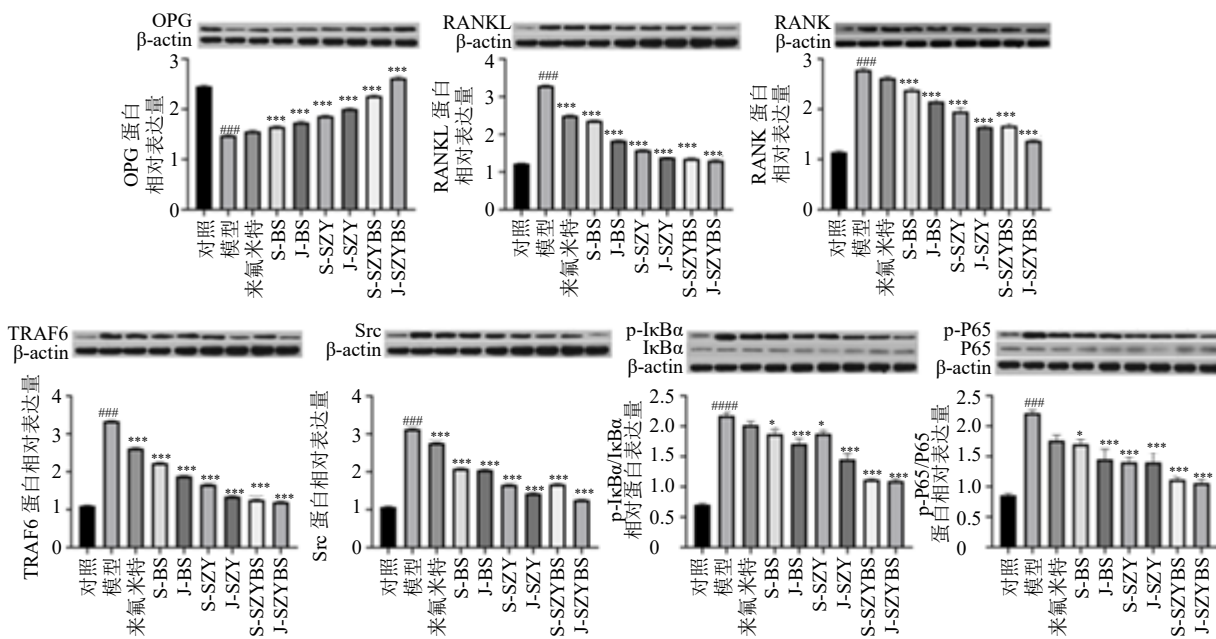


图 6 山茱萸和白芍酒炙配伍前后小鼠膝关节滑膜组织中相关蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Protein expressions of *Cornus Officinalis-Radix Paeoniae Alba* herbal pair on CIA mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

RANKL、RANK、TRAF6、Src、p-IκBα/IκBα、p-P65/P65 蛋白表达明显降低。酒山茱萸-酒白芍配伍组改善效果最为明显 ( $P < 0.001$ )，生山茱萸-生白芍配伍组和酒山茱萸给药组次之 ( $P < 0.001$ )，生白芍组、酒白芍组和生山茱萸组也有一定改善作用 ( $P < 0.05、0.001$ )。

#### 4 讨论

RA 是临床常见的系统性、炎症性、自身免疫性疾病，属于非细菌感染引起的“非感染性滑膜炎”，主要表现为慢性、肿胀、疼痛、血管翳形成以及不可逆的关节畸形和功能丧失，并与早逝和社会经济负担有关，是常见的高致残率疑难杂病之一。据不完全统计，我国 RA 发病率约为 0.5%，总患病人群超过 500 万，且逐年递增，任何年龄段都可以发病，已严重危害患者的生命健康，临床急需疗效确切且安全性高的药物。

目前常用化学药物有昔布非甾类抗炎药、改善病情的抗风湿药（甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、羟氯喹）、生物制剂（依那西普、阿那白滞素、利妥昔单抗、阿巴西普）、糖皮质激素类（泼尼松）等，但抗 RA 疗效并不十分理想，且大多易引起不良反应，常使患者难以忍受。然而来源于中药的天然活性成分具备毒性低，不良反应少等优点，在治疗 RA 方面显示其独特优势。因此，寻求安全、有效、经济的抗

RA 中药具有重大社会和经济效益。

RANKL (tumor necrosis factor ligand superfamily member 11, TNFSF11) 作为关键的旁分泌系统的独立配体，主要来源于骨髓基质细胞、软骨细胞、成骨细胞和骨细胞，参与破骨细胞的分化形成，易使成骨细胞与破骨细胞间的平衡被打破，造成骨形成受损、骨吸收增加，进而导致关节周围骨量减少、骨侵蚀和骨损伤。RANK (tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A, TNFRSF11A) 和 OPG (tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B, TNFRSF11B) 是 RANKL 的主要受体，其中来源于树突状细胞、破骨细胞前体细胞及成熟的破骨细胞的 RANK 常表达于破骨细胞膜表面，主要参与调控下游破骨细胞形成的信号通路，然而来源于骨髓基质细胞、B 淋巴细胞和树突状细胞的 OPG 作为 RANKL 的可溶性诱饵受体能够抑制 RANKL 介导破骨细胞的过度分化、生成，血清中 OPG 水平与骨硬化及骨质疏松症密切相关，也可一定程度上反映机体骨量。此外，TRAF6 作为 NF-κB 信号通路中的主要信号传导分子，可介导 RANKL 信号通路，进一步作用于 Src 激活 IκB 磷酸激酶 (IκB kinase, IKK) 产生大量促炎细胞因子，最终加重疾病炎症程度。由此可以看出 OPG-RANKL-RANK-TRAF6-Src-NF-κB 信号通路对成骨细胞与破骨细胞



动态平衡及炎症调控起着十分重要的作用。

中药炮制与配伍是中医临床辨证用药的特色，但在配伍中探讨中药炮制机制的研究鲜有报道，导致临床组方饮片炮制品的选择缺乏科学理论依据，制约中药炮制和方剂学的发展。山茱萸与白芍抗 RA 效应为临床所验证。本研究通过对 RA 小鼠踝关节 HE 病理及踝关节和胫骨关节 Micro-CT 分析可知，山茱萸和白芍经酒炙配伍前后均具有明显的抗 RA 小鼠踝关节滑膜组织增生和破骨细胞生成等炎性浸润的作用。这部分研究为后续探讨山茱萸和白芍酒炙配伍治疗 RA 的作用机制奠定药效基础。此外，山茱萸和白芍酒炙配伍前后各组小鼠膝关节滑膜组织 OPG mRNA 和蛋白表达升高，RANKL、TRAF6、Src、P65 mRNA 和蛋白表达降低，且酒山茱萸-白芍配伍组改善效果最为明显 ( $P < 0.001$ )。

综上所述，山茱萸和白芍经酒炙配伍治疗胶原合并完全弗氏佐剂所致小鼠 RA 的疗效确切，并通过调控 OPG/RANKL/RANK 信号通路来发挥治疗 RA 的作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] McDonald M M, Khoo W H, Ng P Y, et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption [J]. *Cell*, 2021, 184(7): 1940.
- [2] Roberts J L, Liu G L, Paglia D N, et al. Deletion of Wnt5a in osteoclasts results in bone loss through decreased bone formation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1463(1): 45-59.
- [3] Nava-Valdivia C A, Saldaña-Cruz A M, Corona-Sanchez E G, et al. Polymorphism rs2073618 of the *TNFRSF11B* (*OPG*) gene and bone mineral density in Mexican women with rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 7680434.
- [4] Arandjelovic S, Perry J S A, Lucas C D, et al. A noncanonical role for the engulfment gene *ELMO1* in neutrophils that promotes inflammatory arthritis [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(2): 141-151.
- [5] Zhang M, Zhang P, Liu Y S, et al. RSPO3-LGR4 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells via ERK/FGF signalling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42841.
- [6] Sobacchi C, Menale C, Villa A. The RANKL-RANK axis: A bone to *Thymus* round trip [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 629.
- [7] Luo J, Yang Z F, Ma Y, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption [J]. *Nat Med*, 2016, 22(5): 539-546.
- [8] Fang Q H, Zhou C, Nandakumar K S. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 3830212.
- [9] Cao X. RANKL-RANK signaling regulates osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 35.
- [10] Hu J, Wu X, Cao G, et al. Analysis of the influence of processing of stir-baking with glycyrrhizae on the main components of *Euodiae Fructus* by high-performance liquid chromatography with diode array detector [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(21): 1853-1858.
- [11] Zheng Z Y, Cao G, Wu X, et al. Ultra-performance liquid chromatography coupled with high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis of the impact of bran-processing on the chemical profile of *Radix Paeoniae Alba* (Baishao) [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(8): 776-779.
- [12] Fang X H, Wu X, Cao G, et al. Analysis of the influence of processing of bran stir-baking on the main components of *Paeoniae Radix Alba-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* herbal pair by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2015, 24(4): 231-235.
- [13] Wu X, Cao G, Li Q L, et al. Quantitative evaluation main of the components in *Paeoniae Radix Alba-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* herbal pair by high-performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(2): 239-246.
- [14] Wu X, Shou Q Y, Chen C W, et al. An herbal formula attenuates collagen-induced arthritis via inhibition of JAK2-STAT3 signaling and regulation of Th17 cells in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44242-44254.
- [15] Ye X S, He J, Xu J K, et al. Undescribed morroniside-like secoiridoid diglycosides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from *Corni Fructus* [J]. *Phytochemistry*, 2020, 171: 112232.
- [16] Remuzgo-Martínez S, Genre F, Castañeda S, et al. Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 and C-Src tyrosine kinase genes are down-regulated in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10525.
- [17] Oz B, Yildirim A, Yolbas S, et al. Resveratrol inhibits Src tyrosine kinase, STAT3, and Wnt signaling pathway in collagen induced arthritis model [J]. *Biofactors*, 2019, 45(1): 69-74.
- [18] Weyand C M, Goronzy J J. The immunology of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(1): 10-18.

[责任编辑 潘明佳]