DOI:10.16016/j.1000-5404.201509066

羌活二黄汤对大鼠佐剂性关节炎的疗效及其机制

乾 灿[1],王 勇[1],匡 梅[2],吴 红[1],王 恒[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院中西医结合科[1];药学系药理学教研室[2])

[**摘要**] **目的** 观察羌活二黄汤对佐剂型关节炎大鼠的治疗效果,并从 Treg/Th17 细胞角度探讨其作用机制。**方法** 选取雄性 SD 大鼠,常规建立佐剂型关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠模型,造模成功后设正常对照组,模型组,甲氨蝶呤组,中药(羌活二黄汤)高剂量组(18 g/kg)、中剂量组(9 g/kg)及低剂量组(4.5 g/kg)。于关节肿胀第 1 天开始定时灌胃给药,在 4 周内连续观察各组大鼠关节炎指数评分的变化,4 周后处死大鼠,留取踝关节作常规苏木精-伊红(HE)染色,CCK-8 检测脾淋巴细胞增殖,流式细胞术检测大鼠脾淋巴细胞 Treg/Th17 的百分比。**结果** 与模型组比较,甲氨蝶呤组、中药高剂量组能够降低大鼠关节炎指数评分[24 d(1.33±1.56),28 d(0.17±0.28),$P<0.01$;24 d(3.00±1.33),28 d(0.67±0.67),$P<0.01$],明显抑制脾淋巴细胞的增殖[24 h(0.25±0.03),48 h(0.25±0.03),72 h(0.27±0.01),$P<0.01$;24 h(0.26±0.03),48 h(0.25±0.03),72 h(0.27±0.01),$P<0.01$],减轻大鼠踝关节滑膜组织炎症。与正常对照组比较,模型组脾淋巴细胞 Treg 百分比降低[(5.75±0.46)%,$P<0.01$],而 Th17 百分比明显增高[(1.84±0.45)%,$P<0.01$],呈失衡状态。经高剂量中药干预后,大鼠脾淋巴细胞 Treg 百分比明显上升[(11.19±2.01)%,$P<0.01$],Th17 百分比下降[(0.98±0.35)%,$P<0.05$]。与模型组相比,中药中、低剂量组无明显治疗效应($P>0.05$)。**结论** 18 g/kg 羌活二黄汤对大鼠佐剂性关节炎具有一定的治疗效果。其机制可能与纠正 $CD4^+$T 淋巴细胞亚群 Treg/Th17 的失衡有关。

[**关键词**] 羌活二黄汤;佐剂型关节炎;脾淋巴细胞;Th17;Treg
[**中图法分类号**] R322.21; R289.5; R684.305 [**文献标志码**] A

Efficacy and mechanism of Qianghuo Erhuang Decoction in treatment of adjuvant-induced arthritis in rats

Qian Can[1], Wang Yong[1], Kuang Mei[2], Wu Hong[1], Wang Heng[1] ([1]Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital, [2]Department of Phamarcology, Faculty of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the efficacy of Qianghuo Erhuang Decoction (QED, a set prescription of traditional Chinese herbs) in the treatment of adjuvant-induced arthritis in rats and explore the mechanism by its effect on Treg/Th17 cells. **Methods** Male SD rats were induced to adjuvant arthritis (AA) model. There were 6 groups of rats in this study, including normal control group (oral taking of normal saline), AA group (normal saline), AA + methotrexate group (MTX, 0.4 mg/kg per week), AA + high-, moderate- and low-dose QED groups (daily dose: 4.5, 9 and 18 g/kg, respectively). From the first day of joints swelling, the rats were given with corresponding agents through oral taking or intragastric injection. The changes of arthritis index score were observed during the following 4 consecutive weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate joint histological changes. The proliferation of splenic lymphocytes was detected *ex vivo* by CCK-8 assay, and the percentages of T helper 17 (Th17) and T regulatory (Treg) cells in the spleen were measured by flow cytometry. **Results** The arthritis index score was significantly decreased in

[**通信作者**] 王 勇,E-mail: wangyongjhy@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151229.1537.006.html(2015-12-29)

the MTX group (24 d: 1.33 ± 1.56, 28 d: 0.17 ± 0.28, $P<0.01$) and high-dose QED group (24 d: 3.00 ± 1.33, 28 d: 0.67 ± 0.67, $P<0.01$) than the AA group, and significant inhibited proliferation of splenic lymphocytes (the MTX group 24 h: 0.25 ± 0.03, 48 h: 0.25 ± 0.03; 72 h: 0.27 ± 0.01, $P<0.01$; the high-dose QED group 24 h: 0.26 ± 0.03, 48 h: 0.25 ± 0.03, 72 h: 0.27 ± 0.01, $P<0.01$) and amelioration of synovial tissue inflammation were observed in the 2 groups. Compared with the normal control, the percentage of Treg cells [(5.75 ± 0.46)%, $P<0.01$] was decreased, while that of Th17 cells [(1.84 ± 0.45)%, $P<0.01$] was increased, and their ratio was in an imbalanced state. High-dose QED resulted in an increase of percentage of Treg cells [(11.19 ± 2.01)%, $P<0.01$] and an decrease of percentage of Th17 cells [(0.98 ± 0.35)%, $P<0.05$]. The moderate- and low-dose QED had no therapeutic effect when compared with the AA group ($P>0.05$). **Conclusion** High dose of QED (18 g/kg) exerts certain therapeutic effect for AA, which might be due to its correcting the imbalance of $CD4^+$ T lymphocytes subsets, Treg/Th17.

[**Key words**] Qianghuo Erhuang Decoction; adjuvant arthritis; splenic lymphocytes; Th17 cells; Treg cells

Corresponding author: Wang Yong, E-mail: wangyongjhy@126.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种以滑膜炎为病理基础的自身免疫性疾病,主要病理改变为滑膜炎症,滑膜衬里层增生,血管翳形成,关节软骨和骨破坏,最终导致关节结构改变而致畸、致残[1-2]。RA 的发病机制至今尚未明确,遗传和环境因素在 RA 发病中均发挥重要作用,两者共同参与 RA 发病。滑膜 $CD4^+$T 细胞功能异常及 Treg/Th17 失衡是 RA 滑膜炎症的关键因素[3]。前期免疫病理学研究发现,RA 滑膜组织中 $CD4^+$T 细胞在多种炎症性关节炎的发病中占有重要地位[4]。我们在临床实践中发现,羌活二黄汤治疗湿热痹阻型 RA 有效。因此,本研究使用佐剂诱导的大鼠关节炎为模型,观察羌活二黄汤对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用,从 Treg/Th17 的角度进一步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

无特定病原体(SPF)级 SD 大鼠 36 只,体质量(200 ± 20)g,雄性,由第三军医大学实验动物中心提供[生产许可证号:SCXK(军)2012-0009]分笼饲养,室温(18 ± 2)℃,相对湿度 45% ~50%,空气新鲜,通风良好,自由摄食、饮水。

1.2 药物及主要试剂

中药羌活二黄汤组方:羌活 20 g、独活 15 g、秦艽 20 g、薏苡仁 30 g、忍冬藤 30 g、黄芩 20 g、姜黄 10 g、莪术 15 g、川芎 15 g、甘草 15 g,将所有药物置于 5 L 烧杯中,加水 2 L,浸泡 15 min,煮沸,药液尽数倒出,加水煎煮 3 次,将所得药液,蒸馏浓缩,至浓度 18 g/mL,所需中、低剂量加水倍比稀释,4 ℃保存。热杀死结核杆菌(MTB) H37Ra(南方医科大学佟丽教授惠赠),CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒购自中国碧云天生物科技公司,佛波醇乙酯(PMA)购自美国 Sigma 公司,Cell stimulation cocktail 购自美国 eBioscience 公司,Protein inhibition cocktail 购自美国 eBioscience 公司,Anti-Rat CD4-APC 购自美国 eBioscience 公司,Anti-Rat-CD25-FITC 购自美国 Biolegend 公司,Anti-Rat-CD127-PE 购自美国 R&D 公司,Anti-Rat-IL-17-PE 购自美国 R&D 公司。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 佐剂型关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠模型的建立 将 MTB 30 mg 置于研钵中研磨至白色,加入矿物油 6 mL,继续研磨,用注射器连通三通管将佐剂充分乳化,使其浓度为 5 mg/mL。于大鼠尾根部皮下注射 0.2 mL 每只,每天观察记录[5]。关节炎指数评分标准:0 分:正常;1 分:红肿涉及 1 个趾关节;2 分:红肿涉及 2 个以上趾关节或整个足爪轻度红肿;3 分:足爪红肿较重;4 分:足爪重度红肿,缺乏弹性。每只爪的评分相加即得到大鼠关节炎症的总评分。关节总评分大于 1 的大鼠为建模成功[6]。于造模成功第 1 天开始灌胃给药,连续给药 28 d,隔天观察记录其关节炎指数评分及后足掌厚度变化。

1.3.2 实验动物分组及给药方法 造模成功的 30 只雄性 SD 大鼠分为 5 组:①模型组,予生理盐水灌胃 2 mL/100 g;②甲氨蝶呤组,口服甲氨蝶呤,每周 0.4 mg/kg;③中药高剂量组,羌活二黄汤 18 g/(kg·d)煎剂灌胃;④中药中剂量组,羌活二黄汤 9 g/(kg·d)煎剂灌胃;⑤中药低剂量组,羌活二黄汤 4.5 g/(kg·d)煎剂灌胃,每组 6 只。另设正常对照组 6 只。大鼠剂量(g/kg) = 系数(6.25) × 人的剂量(g/kg)。

1.3.3 CCK-8 检测大鼠脾淋巴细胞增殖 连续给药 4 周后处死大鼠,无菌取出脾脏,置于 200 目滤网研

磨,磷酸盐缓冲液冲洗滤网,使单个细胞进入溶液中,将混悬液移至离心管中,3 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,常规制备细胞悬液,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液调整细胞数为 2×10^6/mL。于 96 孔板每孔 100 μL 铺板,37 ℃ 12 h,加入终浓度为 30 ng/mL PMA 100 μL,于上机检测前 4 h 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续培养箱孵育 4 h,用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度值[D(450)],分别检测 24、48、72 h 脾淋巴细胞增殖情况。

1.3.4　踝关节的病理检测　　留取大鼠踝关节,置于盐酸-氯化钠脱钙液 72 ~ 78 h,经脱水后切片,HE 染色,镜下观察拍照[7]。

1.3.5　流式细胞仪检测脾淋巴 Treg、Th17 细胞

Treg 细胞上机样品制备:RPMI1640 培养基重悬细胞,细胞数为 1×10^6/mL,分别设阴性对照、CD4 单标、CD25 单标、CD127 单标、CD4CD25CD127 三标管。将以上 5 个 EP 管中分别加入 PBS、CD4-APC 单抗、CD25-FITC 单抗、CD127-PE 单抗各 1 μL,三标管内各加此 3 种抗体 1 μL,于 4 ℃孵育 1 h,加入流式洗涤液 1 mL 洗涤 1 次,4% 多聚甲醛 200 μL 重悬细胞,上机检测。

Th17 细胞上机样品制备:加入 cell stimulation cocktail(含有 PMA、离子霉素)、protein inhibitor cocktail(含有高尔基体、莫能霉素)各 1 μL,于 37 ℃孵育 16 h。RPMI1640 培养基重悬细胞,细胞数为 1×10^6/mL,分别设阴性对照、CD4 单标、IL-17A 单标、CD4IL-17A 双标管。阴性管、CD4 单标管、双标管内分别加入:PBS、CD4-APC、CD4-APC 各 1 μL,4 ℃避光孵育 1 h。IL-17A 单标管按细胞压积加入 500 μL 4% 多聚甲醛,室温温育 30 min,PBS 洗涤液洗涤 1 次,加入 500 μL 穿膜液,室温温育 30 min,PBS 洗涤 1 次后重悬,加入 IL-17A-PE 1 μL,4 ℃ 1 h,流式洗液洗涤 1 次,4% 多聚甲醛 200 μL 重悬,上机检测。双标管先行表面染色,后行固定穿膜染色,步骤与 IL-17A 单标相同。

1.4　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,方差齐性检验如齐性用 LSD 法,不齐则用校正 Dunnett T3 检验,以 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

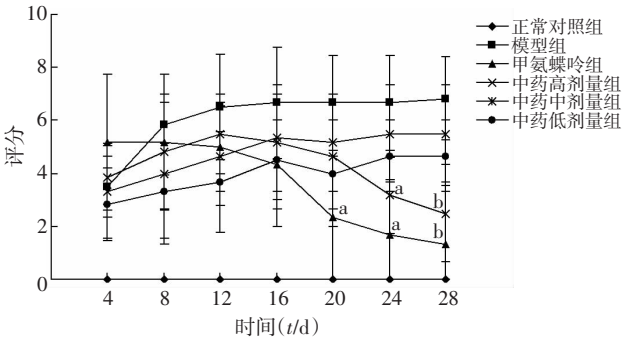
2　结果

2.1　AA 大鼠模型的临床表现

大鼠免疫后 14 ~ 16 d 可发生 AA,造模成功率为 71%,21 d 达炎症高峰。造模 2 周后模型组,甲氨蝶呤组,中药高、中、低剂量组大鼠精神状态不佳,觅食能力差,行动迟缓,后肢跛行,活动量减少,后肢最先发病,出现红、肿、热等炎症表现,踝关节和趾关节均受影响,出现关节肿胀(有的呈对称性)。

2.2　大鼠关节炎指数评分的变化

大鼠关节炎评分是关节炎症程度的衡量标准。在给药后 4、8、12、16、20 d,各治疗组与模型组比较,组间评分差异无统计学意义($P>0.05$)。甲氨蝶呤组、中药高剂量组在给药后 24、28 d 评分明显下降,各组间比较差异有统计学意义($P<0.01$,图 1),表明大鼠关节炎症减轻。

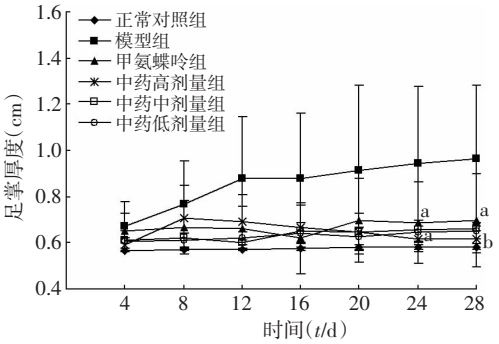


a:$P<0.05$ b:$P<0.01$,与模型组比较

图 1　各组大鼠关节炎评分变化

2.3　大鼠后足掌厚度的变化

造模成功后,大鼠后足足掌肿胀,足掌厚度发生改变。在给药后 4、8、12、16、20 d,各治疗组与模型组比较,足掌厚度差异无统计学意义($P>0.05$)。甲氨蝶呤组、中药高剂量组在给药后 24、28 d 足掌厚度明显变薄,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$,图 2),表明大鼠足掌肿胀减轻,炎症缓解。

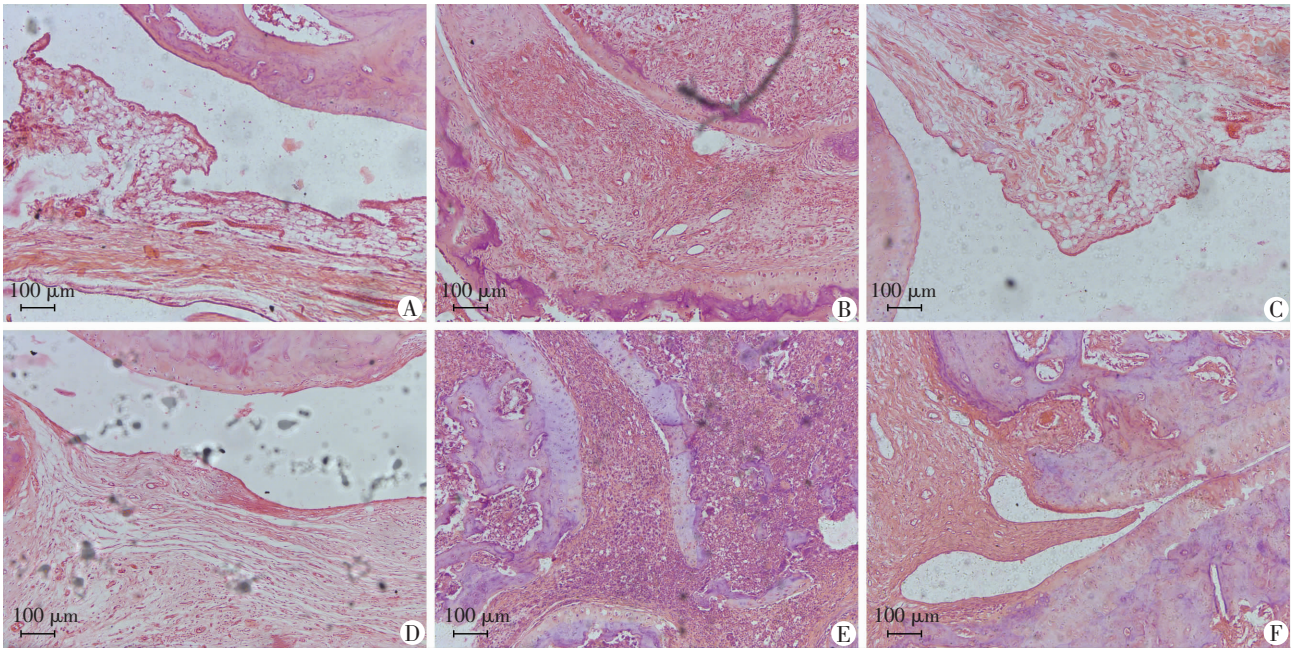


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与模型组比较

图 2　各组大鼠足掌厚度变化

2.4　大鼠后足关节滑膜组织病理观察

正常对照组大鼠关节软骨组织光滑、整齐,滑膜为单层细胞,无增厚;模型组大鼠滑膜组织增厚,关节间隙明显变窄,血管增生,并有大量炎性细胞浸润,软骨及骨组织破坏;甲氨蝶呤组、中药高剂量组大鼠关节滑膜增厚,但较关节炎模型组轻,炎细胞浸润减少,无软骨及骨组织破坏;中药中、低剂量组大鼠关节滑膜增生明显,关节间隙明显变窄,且软骨破坏明显(图 3)。

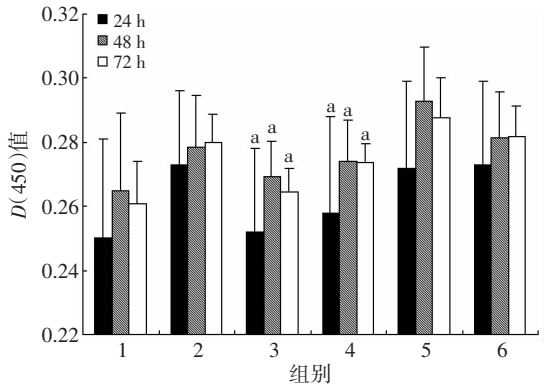


A:正常对照组;B:模型组;C:甲氨蝶呤组;D:中药高剂量组;E:中药中剂量组;F:中药低剂量组

图 3 HE 染色观察大鼠踝关节病理学变化

2.5 大鼠脾淋巴细胞增殖实验

终浓度为 30 ng/mL 的 PMA 刺激 24、48 h 及 72 h 均可促进脾淋巴细胞的增殖。与正常对照组比较,刺激 24、48、72 h,模型组大鼠脾淋巴细胞增殖均明显增高($P<0.01$)。与模型组比较,刺激 24、48、72 h,甲氨蝶呤组及中药高剂量组均能明显抑制脾淋巴细胞的增殖($P<0.01$),而中药中、低剂量组与模型组相比差异无统计学意义($P>0.05$,图 4)。



a:$P<0.01$,与模型组比较

1:正常对照组;2:模型组;3:甲氨蝶呤组;4:中药高剂量组;5:中药中剂量组;6:中药低剂量组

图 4 CCK-8 检测大鼠脾淋巴细胞 24、48、72 h 增殖水平

2.6 流式细胞仪检测大鼠脾淋巴细胞 Treg/Th17 的百分比

Treg/Th17 细胞失衡是类风湿关节炎发生及炎症轻重的重要原因。与正常对照组比较,模型组大鼠脾淋巴细胞 Treg 百分比降低($P<0.01$),Th17 百分比则明显增高($P<0.01$)。与模型组比较,甲氨蝶呤及中药高剂量组 Treg 细胞百分比明显增加($P<0.01$),Th17 细胞百分比则明显下降($P<0.05$);而中药中、低剂量组与模型组比较,Treg、Th17 细胞百分比差异均无统计学意义($P>0.05$,表 1,图 5、6)。

表 1 各治疗组对 Treg、Th17 细胞百分比的影响

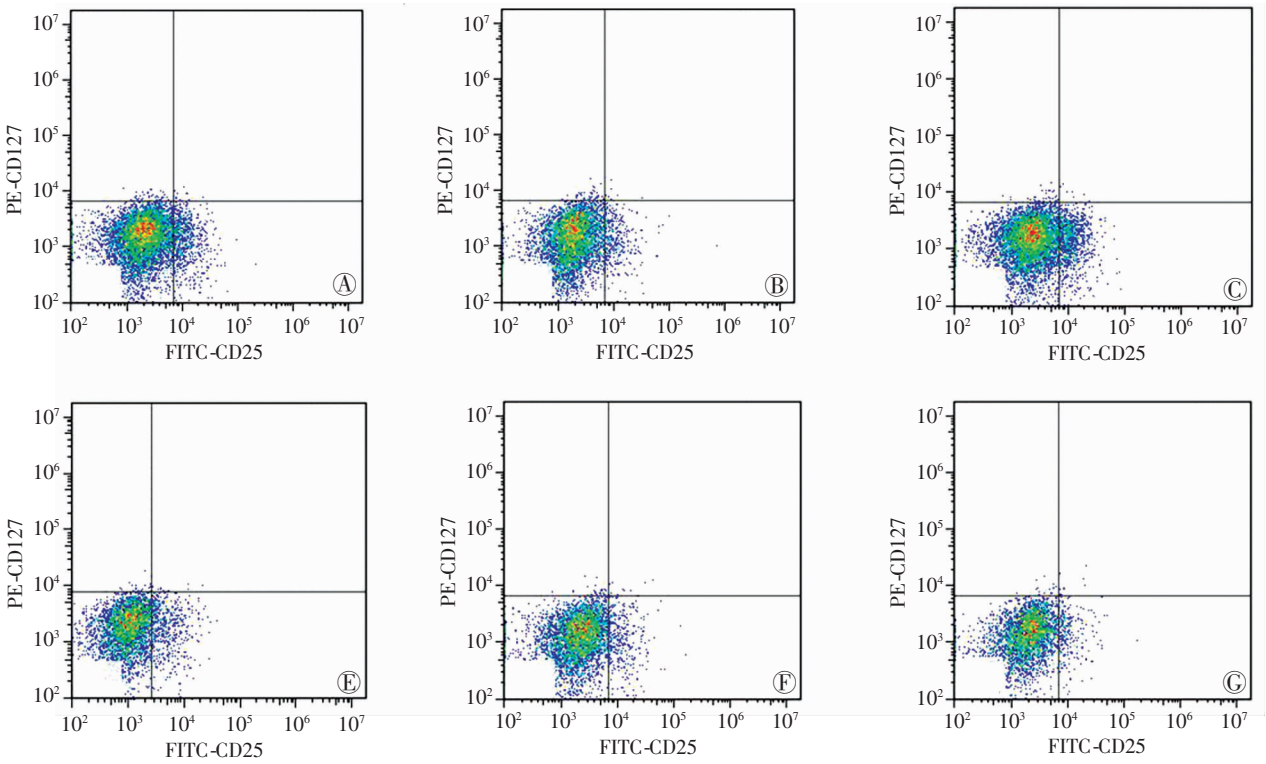
[$n=6$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	Treg	Th17
正常对照组	9.20±0.58	0.67±0.11
模型组	5.75±0.46^{c}	1.84±0.45^{c}
甲氨蝶呤组	11.27±2.29^{b}	0.83±0.22^{a}
中药高剂量组	11.19±2.01^{b}	0.98±0.18^{a}
中药中剂量组	6.61±0.96	1.64±0.78
中药低剂量组	6.58±0.70	1.91±0.45
P 值(方差齐性检验)	0.056	0.062

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与模型组比较;c:$P<0.01$,与正常对照组比较

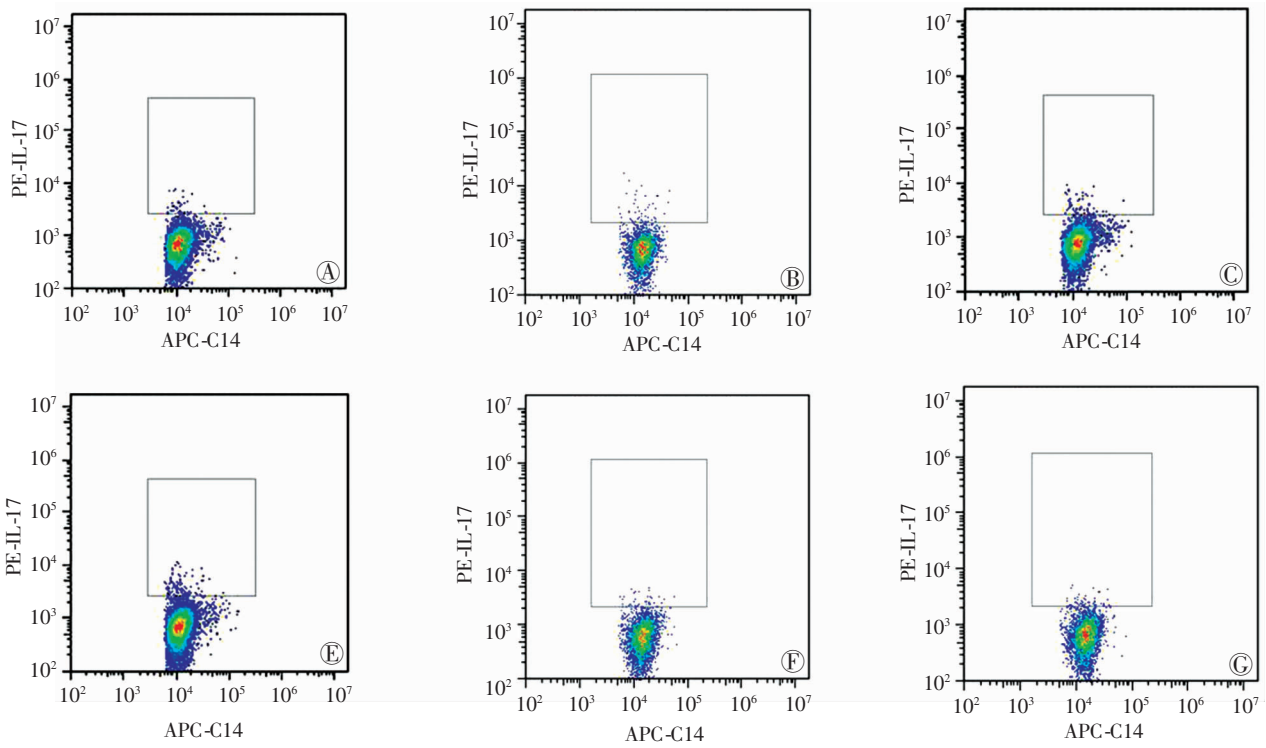
3 讨论

中医认为 RA 属于“痹证”范畴,由风寒湿邪客于关节,气血痹阻,导致以小关节疼痛、肿胀、晨僵为特点的疾病。它既有外因,又有内因,外因感受风寒湿热之邪,邪侵机体,留于关节;内因气血不足,肝肾亏损,外



A:正常对照组;B:模型组;C:甲氨蝶呤组;D:中药高剂量组;E:中药中剂量组;F:中药低剂量组

图 5 流式细胞仪检测脾淋巴 Treg 细胞百分比



A:正常对照组;B:模型组;C:甲氨蝶呤组;D:中药高剂量组;E:中药中剂量组;F:中药低剂量组

图 6 流式细胞仪检测脾淋巴 Th17 细胞百分比

邪乘虚而入。其病因病机中医古代文献中多有论述,如《素问·痹论》云:“风寒湿三气杂至,合而为痹”。本方由羌活、独活、秦艽、薏苡仁、忍冬藤、黄芩、姜黄、莪术、川芎、甘草组成,全方奏祛湿清热,活血通痹之功,治疗风湿热痹,现代研究表明,类风湿关节炎急性活动期多为中医证型的风湿热痹[8]。本方中羌活具有解热、镇痛、抗炎、调节免疫系统等功效[9];独活具有抗炎、镇痛、抗肿瘤等药理作用[10];忍冬藤具有抗肿瘤、解热镇痛、抑制免疫的作用[11];黄芩具有抗菌抗病毒、解热镇痛、免疫调节的作用[12];川芎具有镇静、镇痛的药理作用[13];莪术与姜黄均为姜科姜黄属中药材,成分相似均具有抗炎镇痛、抗肿瘤的作用[14]。全方配伍,共同发挥抗炎镇痛、免疫调节的作用,对急性活动期的 RA 具有较好的疗效。

RA 主要病理特征为血管翳形成,滑膜组织增生增厚,骨及软骨破坏。由 MTB 诱导的 SD 大鼠关节炎模型与临床 RA 特征相近,此种模型在发病初期发生的关节足掌炎性肿胀及在耳部、尾部出现的炎性结节与临床 RA 病症及类风湿结节类似。SD 大鼠被免疫之后,其体内的炎症反应程度、血常规的变化均与 临床上活动期 RA 患者一致。同时,相应的 T 细胞亚 群的比值变化,TNF-α、IL-1 和 IL-6 水平均与临床 RA 保持一致。此外,此种模型的滑膜增厚增生,血管翳形成等的关节病变与临床 RA 具有相似性。基于以上特点,由 MTB 诱导的 SD 大鼠关节炎模型为目前较公认的 RA 动物模型[5]。传统中药由于疗效好,副作用小而受到广泛的关注,本实验的病理结果显示:模型组大鼠关节面不平整,软骨破坏,滑膜增生,更严重的可关节融合,而中药高剂量羌活二黄汤对佐剂性关节炎具有较好的治疗效果,滑膜虽增厚,但关节面完整,保护软骨免受破坏。

研究显示,滑膜 $CD4^+$ T 细胞被自身抗原或细胞因子刺激活化后,分化为不同的功能亚群,如促炎性的 Th1、Th17 细胞;抑炎性的调节性 T 细胞(但在 RA 中有功能缺陷)等,这些 $CD4^+$ T 细胞与单核细胞、滑膜细胞通过细胞因子和直接接触相互作用,形成复杂的功能网络,释放 IL-1、TNF-α、IL-17 等促炎性细胞因子,引起滑膜细胞增殖和骨质破坏[15-16]。因此,RA 滑膜组织中 $CD4^+$ T 细胞呈弥漫性浸润,并在特定遗传背景和炎症微环境下,呈现功能异常,是诱发并加重 RA 滑膜炎症的中心环节[17]。本研究结果显示,甲氨蝶呤及中药高剂量均能明显抑制大鼠脾淋巴细胞的增殖。这表明中药羌活二黄汤有可能通过抑制淋巴细胞的增殖而治疗 RA。

Th17 细胞是由初始 $CD4^+$ T 细胞在转化生长因子 β 和 IL-6 共同作用下分化的[18]。Th17 细胞主要分泌 IL-17A,还能分泌 IL-17F、IL-21、IL-22 等细胞因子,参与 RA 发病的多个环节。IL-17A 是一种重要的致炎因子,与关节软骨的破坏,血管增生、血管翳形成密切相关[19]。Treg 细胞一类能够对自身 T 淋巴细胞活化和增殖起负控作用的 $CD4^+$ T 细胞亚群,在维持自身免疫耐受,防止免疫性疾病的发生,抗移植物排斥及肿瘤免疫的过程中发挥重要作用。通过直接接触、释放抑制性细胞因子(如 IL-35)或颗粒酶途径杀伤 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞 B 细胞和单核细胞,抑制自身免疫病的发生[20]。在 RA 患者中,Th17 过表达,Treg 相对不足,二者呈失衡状态,功能异常,与 RA 活动及炎症严重程度密切相关。目前,从 Th17/Treg 平衡的角度探索 RA 的发病机制及治疗方法较多,如 Astry 等[20]提出,雷公藤红素能直接或间接的抑制 Th17 细胞的产生,减少 IL-17A 等炎性细胞因子的释放,从而减轻对关节滑膜的损伤。Jhun 等[21]提出,红参提取物可以从转录因子水平上调节 Th17/Treg 的平衡,进而达到对 RA 的治疗和干预。甲氨蝶呤目前为首选的治疗 RA 的改变病程抗风湿药,临床研究表明单用或联用生物制剂治疗 RA,可上调患者外周血 Treg 细胞比值,下调 Th17 细胞比值水平,因此,纠正 Treg/Th17 失衡是治疗 RA 的关键之一[22-23]。本实验结果表明,模型组大鼠脾淋巴 Th17 细胞百分比明显升高,而 Treg 细胞则明显降低。经中药治疗后,其 Treg 细胞百分比明显升高,Th17 细胞百分比则明显下降,与甲氨蝶呤相似,提示本方可能从纠正 Treg/Th17 失衡的角度来治疗 RA。

有趣的是,我们发现,羌活二黄汤高剂量(18 g/kg)具有较好的治疗作用,可明显抑制大鼠脾淋巴细胞的增殖(24、48、72 h),减轻足掌肿胀、关节炎症,降低关节炎指数评分,增加活动度,降低关节炎指数评分,而中剂量(9 g/kg)、低剂量(4.5 g/kg)则无此类效果,说明羌活二黄汤的剂量对治疗效果有至关重要的影响。本研究发现,高剂量的羌活二黄汤与阳性对照药 MTX 功效无统计学差异,表明中药方剂治疗 RA 有效,但副作用本研究未作比较,我们想下一步作更深入的药理学及药动学方面研究,期望今后在临床中推广应用。

综上所述,高剂量的羌活二黄汤具对大鼠佐剂性关节炎具有较好的治疗作用,可以降低关节炎指数,减轻关节足掌的肿胀及炎症,其作用机制可能与抑制脾淋巴细胞的增殖及调节 Treg/Th17 细胞的平衡相关。

志谢 衷心感谢第三军医大学药学院药理学教研室陈晓红主任、周红教授的关心和支持及教研室其他老师、同学的指导和帮助

参考文献:

[1] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003, 423(6937): 356 – 361. DOI: 10.1038/nature01661

[2] Yamanishi Y, Firestein G S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2001, 27(2): 355 – 371. DOI: 10.1016/S0889-857X(05)70206-4

[3] Zhu L, Ji F, Wang Y, *et al*. Synovial autoreactive T cells in rheumatoid arthritis resist IDO-mediated inhibition[J]. J Immunol, 2006, 177(11): 8226 – 8233.

[4] Moon D O, Kim M O, Choi Y H, *et al*. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1β-induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(5): 605 – 610. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.02.011

[5] 陈佩虹, 陈育尧, 林晓春, 等. 热杀死结核分支杆菌H37Ra诱导的SD大鼠佐剂性关节炎模型研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(1): 129 – 133.

[6] Huang G, Xu Z, Huang Y, *et al*. Curcumin protects against collagen-induced arthritis *via* suppression of BAFF production [J]. J Clin Immunol, 2013, 33(3): 550 – 557. DOI: 10.1007/s10875-012-9839-0

[7] 曹颖. 临床病理检验常用骨组织脱钙液效果的比较[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23): 2399 – 2400.

[8] 王志中, 方勇飞, 罗彦, 等. 322例湿热痹阻型及寒湿痹阻型类风湿关节炎中医证型的客观化研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4): 466 – 470.

[9] 李云霞, 高春华, 沙明. 中药羌活化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医学院学报, 2004, 6(1): 22 – 23.

[10] 周刚, 马宝花. 中药独活的研究进展[J]. 中国当代医药, 2012, 19(16): 15 – 16.

[11] 鲁思爱. 忍冬藤的化学成分及其药理应用研究进展[J]. 临沂大学学报, 2012, 34(3): 132 – 134.

[12] 李敏, 杨瑞芳. 黄芩药理学研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(1): 137 – 138.

[13] 张翠英, 章洪, 戚琼华. 川芎的有效成分及药理研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(10): 2264 – 2266.

[14] 成晓静, 刘华钢, 赖茂祥. 莪术的化学成分及药理作用研究概况[J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(1): 79 – 82.

[15] Sarkar S, Fox D A. Targeting IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2010, 36(2): 345 – 366. DOI: 10.1016/j.rdc.2010.02.006

[16] Chen Z, Lin F, Gao Y, *et al*. FOXP3 and RORγt: transcriptional regulation of Treg and Th17[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(5): 536 – 542. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.11.008

[17] Veldhoen M, Hocking R J, Atkins C J, *et al*. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells[J]. Immunity, 2006, 24(2): 179 – 189. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.01.001

[18] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, *et al*. Functional specialization of interleukin-17 family members[J]. Immunity, 2011, 34(2): 149 – 162. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.02.012

[19] 章婷婷, 骆春艳, 王嘉军. Th17/Treg失衡在类风湿性关节炎发病机制中的研究[J]. 海南医学, 2013, 24(20): 3035 – 3038.

[20] Astry B, Venkatesha S H, Laurence A, *et al*. Celastrol, a Chinese herbal compound, controls autoimmune inflammation by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells in the target organ[J]. Clin Immunol, 2015, 157(2): 228 – 238. DOI: 10.1016/j.clim.2015.01.011

[21] Jhun J, Lee J, Byun J K, *et al*. Red ginseng extract ameliorates autoimmune arthritis *via* regulation of STAT3 pathway, Th17/Treg balance, and osteoclastogenesis in mice and human[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 351856. DOI: 10.1155/2014/351856

[22] Lina C, Conghua W, Nan L, *et al*. Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th1/Th2, Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Clin Immunol, 2011, 31(4): 596 – 605. DOI: 10.1007/s10875-011-9542-6

[23] Guggino G, Giardina A, Ferrante A, *et al*. The *in vitro* addition of methotrexate and/or methylprednisolone determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Int, 2015, 35(1): 171 – 175. DOI: 10.1007/s00296-014-3030-2

(**收稿**:2015-09-12;**修回**:2015-10-23)

(编辑 王小寒)