

• 实验研究 •

基于核因子- κ B 受体活化因子受体/骨保护素探讨复方雷公藤外敷剂改善 II 型胶原诱导型关节炎模型大鼠骨破坏

程增玉¹ 姜雯¹ 徐浩东² 李达¹ 王一燃¹ 唐晓颇^{1△}

[摘要] **目的:**观察复方雷公藤外敷剂对 II 型胶原诱导型关节炎模型大鼠的骨形态学影响,探讨其可能的作用机制。**方法:**将 50 只雌性 SD 大鼠随机分为正常组(NOR 组)、模型组(CIA 组)、复方雷公藤外敷剂组(TWE 组)、雷公藤多苷组(TWG 组)、扶他林乳胶剂组(VOT 组),每组 10 只。除 NOR 组外,对其余大鼠进行尾根部皮下注射 II 型胶原诱导,7 d 后加强免疫造模。TWE 组以 0.60 g/(kg·d)外用、TWG 组 6.25 mg/(kg·d)灌胃、VOT 组乳胶剂 0.016 mL/(kg·d)外用,NOR 组与 CIA 组以生理盐水涂抹膝关节,连续给药 28 d。观察大鼠一般状态、双下肢肿胀程度;观察各组膝、踝关节病理形态,借助微型计算机断层扫描(micro-CT)观察骨质改变,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定、蛋白免疫印迹法(Western Blot)观察外周血及组织骨破坏与骨保护相关因子与蛋白表达。**结果:**与 NOR 组比较,CIA 组一般状态不佳,关节炎评分与足趾容积均显著增高,micro-CT 显示踝关节、跖趾关节破坏严重,血清 MMP1、MMP13、RANKL 显著增高,滑膜组织中 RANKL/OPG 显著升高。与 CIA 组相比,各治疗组随着给药时间的增加,关节炎评分与足趾容积均有下降,micro-CT 显示踝关节、跖趾关节骨表面积/骨体积比值低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 TWE 组与 VOT 组改善最为明显,差异有统计学意义($P < 0.01$);各治疗组血清 MMP1、MMP13、RANKL、关节组织中 RANKL/OPG 均低于 CIA 组。**结论:**复方雷公藤外敷剂能够改善模型大鼠关节骨破坏,其作用机制可能与降低 MMP1、MMP13、RANKL 水平,抑制 RANKL/OPG,调控骨平衡有关。

[关键词] 类风湿关节炎;胶原诱导型关节炎;雷公藤;外治;核因子- κ B 受体活化因子受体;骨保护素

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)02-0012-06

Study on Compound Tripterygium Wilfordii External Application on the Improvement of Bone Destruction in Rats with Collagen-Induced Arthritis Based on RANKL/OPG

CHENG Zengyu¹ JIANG Wen¹ XU Haodong² LI Da¹ WANG Yiran¹ TANG Xiaopo^{1△}

¹ Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

² Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 215003, Jiangsu China.

Abstract Objective: To observe the efficacy of compound tripterygium wilfordii external application on bone morphology of rats with type II collagen-induced arthritis and to explore its possible mechanism. **Methods:** 50 female SD rats were randomly divided into normal group (NOR group), model group (CIA group), compound tripterygium wilfordii external application group (TWE group), tripterygium wilfordii glycosides group (TWG group) and voltaren cream group (VOT group) with 10 rats in each group. Except for the NOR group, rats in the other groups were induced by subcutaneous injection of type II collagen into the tail root, and strengthened immune after 7 d. The rats in the TWE group (0.60 g/(kg·d)), TWG group (6.25 mg/(kg·d)) and VOT group (latex 0.016 mL/(kg·d)) were treated for 28 d, while the CON group and CIA group coated knee and ankle joint with normal saline for 28 d. The general state and the swelling degree of both lower limbs of rats were

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81873281)

中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A01502)

国家重点研发计划项目(2018YFC1705203)

中国中医科学院自主选题(ZZ15-XY-PT-11)

¹ 中国中医科学院广安门医院(北京,100053)

² 南京中医药大学附属苏州市中医医院

△通信作者 E-mail: tangxiaopo@163.com

and the swelling degree of both lower limbs of rats were

observed, the bone changes were observed by microcomputer tomography (micro-CT), and the expression of bone protection related factors and proteins in peripheral blood and tissue were observed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot. **Results:** Compared with NOR group, the general condition of CIA group was poor, the arthritis index and toe volume were significantly increased, micro-CT showed that ankle joint and metatarsophalangeal joint were seriously damaged, the MMP1, MMP13, RANKL in serum and the RANKL/OPG in synovium were significantly increased. Compared with the CIA group, the arthritis index and toe volume of each treatment group decreased with the increase of administration time, and micro-CT showed that the bone surface area / bone volume ratio of ankle joint and metatarsophalangeal joint was lower than that of the CIA group ($P < 0.05$), especially in TWE group and VOT group is obvious ($P < 0.05$). The serum MMP1, MMP13, RANKL and RANKL/OPG in joint tissue in each treatment group were lower than those in CIA group. **Conclusion:** Compound tripterygium wilfordii external application can effectively improve the destruction of articular bone in CIA rats, and its mechanism may be related to reducing the levels of MMP1, MMP13 and RANKL, inhibiting RANKL/OPG and regulating bone balance.

Keywords: rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; tripterygium wilfordii; external treatment; nuclear factor- κ B receptor activating factor ligand; osteoprotegerin

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是我国常见的慢性致残性疾病^[1],血管翳、滑膜炎和进行性骨破坏是类风湿关节炎的主要病理特征^[2]。类风湿关节炎引发的高致残率是临床亟待解决的重点和难点^[3-4],尽管生物制剂的应用有了很大突破,但临床达标仍有待提高^[5-7]。中医药在延缓类风湿关节炎骨破坏方面有显著优势,既往研究提出湿热瘀为类风湿关节炎核心病机^[8-10],研究发现采用清热活血法能够改善类风湿关节炎骨破坏,降低致残率^[11-12]。

核因子- κ B 受体活化因子受体(Nuclear Factor- κ B Receptor Activating Factor Ligand, RANKL)/骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)信号通路是调节破骨细胞生成、活化的经典信号通路。既往研究显示复方雷公藤外敷剂能降低关节炎症反应^[13-15]、抑制血管生成^[16-17]。本研究在前期研究的基础上,基于 RANKL/OPG 调节骨破坏,探索其防治类风湿关节炎的作用机制,以期为临床推广中医复方外治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 健康 6 周龄雌性 SD 大鼠 50 只,体重为 180~200 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司(许可证号为 SCXK(京)2019-0008),饲养于中国中医科学院广安门医院 SPF 级实验动物中心,相对湿度约为 60%,24 °C 恒温,明暗交替,充足食水。

将大鼠根据体重随机分为正常组(Normal, NOR 组)、模型组(Collagen Induced Arthritis, CIA 组)、复方雷公藤外敷剂组(Compound Tripterygium Wilfordii External Application, TWE 组)、雷公藤多苷组(Tripterygium Wilfordii Glycosides, TWG 组)和扶他林乳胶剂组(Voltaren, VOT 组),每组各 10 只。

1.1.2 实验药物 复方雷公藤外敷剂:所需中药材由中国中医科学院药学中心提供,生产厂家为北京丰泰金源药业有限公司;凝胶剂由中国中医科学院中药研究所制备,每克凝胶含生药量 0.48 g,4 °C 环境保存,给药前 1 h 取出所需凝胶,放置回温。

雷公藤多苷片:黄石飞云制药,10 mg/片,生产批号为 20170101。将其研磨成粉,以纯净水溶解备用,4 °C 环境保存,给药前水浴加热至 25 °C。

扶他林乳胶剂:北京诺华制药,20 g/支,每支含双氯芬酸钠 0.2 g,批号为 X4128,常温保存。

1.1.3 主要试剂及仪器 免疫源性牛 II 型胶原(Chondrex 公司,货号为 20022),不完全弗氏佐剂(Chondrex 公司,7002);苏木精染色液(北京九洲柏林生物技术有限公司,BLB-03),伊红染色液(BLB-06);4%多聚甲醛溶液(Biosharp, BL539A),MMP1 试剂盒(Elabscience 公司, E-EL-R0617c), MMP13 (Elabscience 公司, E-EL-R0045c), RANKL (Elabscience 公司, E-EL-R0841c); RANKL 抗体 (Abcam 公司, ab239607), OPG 抗体 (Abcam 公司, ab203061); BCA 蛋白检测试剂盒(Cwbiotech, 02912E); micro-CT 扫描仪(Bruker, 型号为 Skyscan1174),手提式均质仪(德国 IKA 公司, 型号为 T10 Basic Ultra-turrax),足趾肿胀容积测量仪(成都泰盟, 型号为 PV-200),高速冷冻离心机(Hettich Mikro220R),全自动多功能酶标仪(Thermo, MULTISKAN MK3),摇床(Kylin-Bell, 型号为 MH-1)。

1.2 方法

1.2.1 免疫原制备与造模^[18] 免疫原于造模当天制备,制备过程保证在超净台上进行。于冰浴环境中,将等量的牛 II 型胶原与弗氏佐剂充分混合,用高速均质仪搅拌乳化 10 min 左右,最终乳化程度达到滴

入水里不分散,即制成浓度为 1 mg/mL 牛Ⅱ型胶原乳剂。

首次免疫于大鼠适应性饲养 7 d 后进行,于大鼠左侧尾根部皮下注射 0.15 mL Ⅱ型胶原乳剂,一周后于大鼠右侧尾根部皮下注射 0.15 mL Ⅱ型胶原乳剂。NOR 组采用等量生理盐水按同样方法进行。

1.2.2 给药剂量与方法 TWE 组:按 0.60 g/(kg·d)外用给药,涂抹双膝、踝关节。

TWG 组:给予雷公藤多苷 6.25 mg/(kg·d),灌胃给药。

VOT 组:乳胶剂按 0.016 mL/(kg·d)外用给药,涂抹双膝、踝关节。

NOR 组及 CIA 组:以生理盐水涂抹双膝、踝关节。

各组于加强免疫后第 3 天起进行干预,记为 0 d,给药时间为每天上午 9:00~10:00,连续 28 d。

1.3 观察内容与指标检测

1.3.1 足趾肿胀度观察 每周进行 1 次关节炎指数 (Arthritis Index, AI) 评分,按照无肿胀 0 分、轻微红肿 1 分、中度红肿 2 分、重度红肿 3 分、关节畸形 4 分的标准^[19]。

每周进行 1 次足趾肿胀容积 (Paw Swelling, PS) 测量:采用大鼠足趾容积测量仪测量大鼠足趾关节体积。将大鼠双后肢踝关节以下部分没入水中,所得水体积即为大鼠关节肿胀体积,而后取双后肢体积的平均值。

1.3.2 关节病理苏木精-伊红染色法 (Hematoxylin-eosin staining, HE) 染色 骨组织常规石蜡包埋,4 μm 切片;将切片分别放入二甲苯(I)、二甲苯(II)、乙醇 (100%, 95%, 80%, 75%) 脱蜡,蒸馏水洗涤 2 min;苏木精染色 5 min,流水冲洗;盐酸酒精分化 30 s;蒸馏水洗涤 3~5 次;伊红染色 2 min;95%乙醇(I、II)、100%乙醇 (I、II)、二甲苯石碳酸脱水处理 1 min;二甲苯(I、II)透明处理;中性树胶封片,显微镜下观察拍照。

1.3.3 微型计算机断层扫描 (micro-CT) 观察骨破坏情况 采用 4% 多聚甲醛固定各组大鼠踝关节,进行 micro-CT 检测,从跟骨起连续切片 900 张,将厚度为 13.05 mm 的跗骨区域设定为三维重建区域,进行三维图像重建和分析。检测骨表面积 (Bone Surface Area, BS)、骨体积 (Bone Volume, BV)。成像分析软件为 Amira 4.1.2,扫描参数为电压 80 kV,电流 250 μA。

1.3.4 血清骨破坏相关因子 MMP1、MMP13、RANKL 检测 将保存于 -80 °C 冰箱的血清样品室温融化,采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 MMP1、MMP13、RANKL 指标:溶解稀释标准品,37 °C 孵育 2.5 h;弃溶液,洗涤溶液洗涤 5 次,干净纸巾吸干;加

入制备好的抗体,37 °C 温育 1 h;弃孔中废液后洗涤 3 次;每孔加 100 μL 酶结合物工作液,覆膜,37 °C 避光孵育 15 min;弃溶液,洗涤 3 次;每孔加 90 μL 底物溶液,覆膜,37 °C 避光孵育 15 min;每孔加终止液 50 μL,终止反应;450 nm 波长下测量吸光度。

1.3.5 膝骨关节囊 RANKL、OPG 蛋白表达水平检测 将保存于 -80 °C 冰箱的膝关节组织取出,匀浆后冰上裂解 30 min,12 000 r/min 离心 20 min,取上清进行蛋白定量及蛋白样本制备。按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明操作,测定蛋白浓度,以 RIPA 调整后,检测 RANKL、OPG 蛋白表达。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 26.0 统计软件建立数据库,GraphPad Prism 9.0 绘图。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,符合正态分布采用单因素方差分析,若满足方差齐性,采用 Bonferroni 检验,不满足方差齐性,采用 Tamhane T_2 检验。不符合正态分布采用非参数检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况与关节肿胀度

CIA 组大鼠整体无特殊改变,各造模组大鼠在免疫后逐步出现体型消瘦、精神不振、食欲减退伴体力下降。各治疗组大鼠随着用药时间的增加,整体症状与同期模型组大鼠相比有所改善。

结合关节炎指数评分与足趾肿胀容积测量发现,NOR 组大鼠实验过程中双足体积未见明显变化。各造模组大鼠自造模第 7 天起,大鼠关节肿胀逐渐加重,双足排水量逐渐增加,双足体积逐渐增大,关节炎指数评分增高,于造模第 21 天双足肿胀最为明显。而后出现双足体积逐渐减小,但持续高于同期 NOR 组大鼠双足体积,各给药组大鼠关节炎指数评分、足趾肿胀程度均低于同期 CIA 组大鼠。TWE 组在减轻关节炎指数评分与足趾肿胀度方面,优于 TWG 组与 VOT 组 (见图 1)。

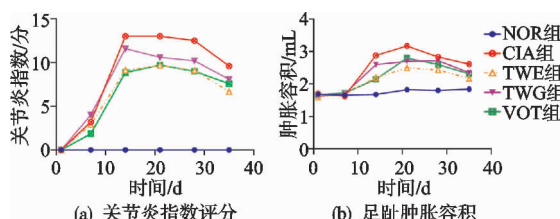


图 1 各组大鼠关节炎指数与足趾肿胀容积

2.2 大鼠膝、踝关节病理切片结果

观察各组大鼠膝、踝关节病理切片可发现:NOR 组大鼠关节面平滑有规则,关节构造整体明显可见、间隙清晰,无骨质的破坏和侵蚀,软骨和滑膜包围均匀无异常。CIA 组大鼠关节吸收明显,关节滑膜炎症明显,

关节软骨出现不同程度的破坏和纤维化,伴有程度不同的软组织水肿,滑膜组织异常增生并填充关节腔,间隙融合消失,关节面不连续无规则,胫骨远端骨小梁吸收破坏。各治疗组关节间隙中能够发现有少量炎性细

胞浸润和较多的滑膜微血管等软组织生长,关节软骨可见局部病变坏死伴部分损坏侵蚀,但总体均好于 CIA 组。TWE 组关节面清晰、规则,显示出骨保护作用。各组大鼠关节病理切片见图 2。

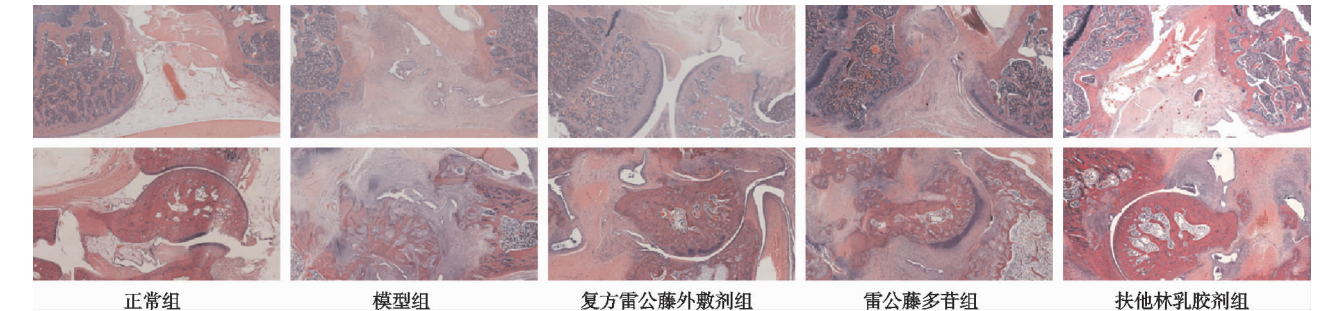


图 2 各组大鼠关节病理切片(上为膝关节,下为踝关节)

2.3 大鼠踝骨关节 micro-CT 检测结果

通过大鼠踝关节 micro-CT 检测发现:CIA 组大鼠骨关节面质地整体光滑平整,关节间隙清晰可见,骨与骨之间衔接紧凑有规则,未见骨质缺损和破坏。CIA 组大鼠踝关节骨关节面出现广泛骨侵蚀伴骨质疏松,骨实

质侵蚀呈虫蚀样和穿凿样缺损,骨质疏松明显。各治疗组大鼠骨破坏较 CIA 组显著轻微,差异有统计学意义($P<0.05$),其中 TWE 组和 VOT 组骨表面积/骨体积比值显著低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$),提示关节骨破坏得到了一定的抑制,见表 1 及图 3。

表 1 各组骨表面积、骨体积等指标比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	骨表面积/mm ²	骨体积/mm ³	骨表面积/骨体积
正常组	975.68±131.02	132.24±8.44	7.42±1.29
模型组	2 301.14±175.97 ¹⁾	160.17±15.52	14.40±0.79 ¹⁾
复方雷公藤外敷剂组	1 925.40±219.86 ²⁾	160.34±11.65	11.99±0.72 ²⁾
雷公藤多苷组	2 089.15±172.55	165.56±12.06	12.65±1.12 ³⁾
扶他林乳胶剂组	1 694.73±137.93 ²⁾	153.77±12.91	11.07±1.08 ²⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.01$;与模型组相比,2) $P<0.01$,3) $P<0.05$ 。

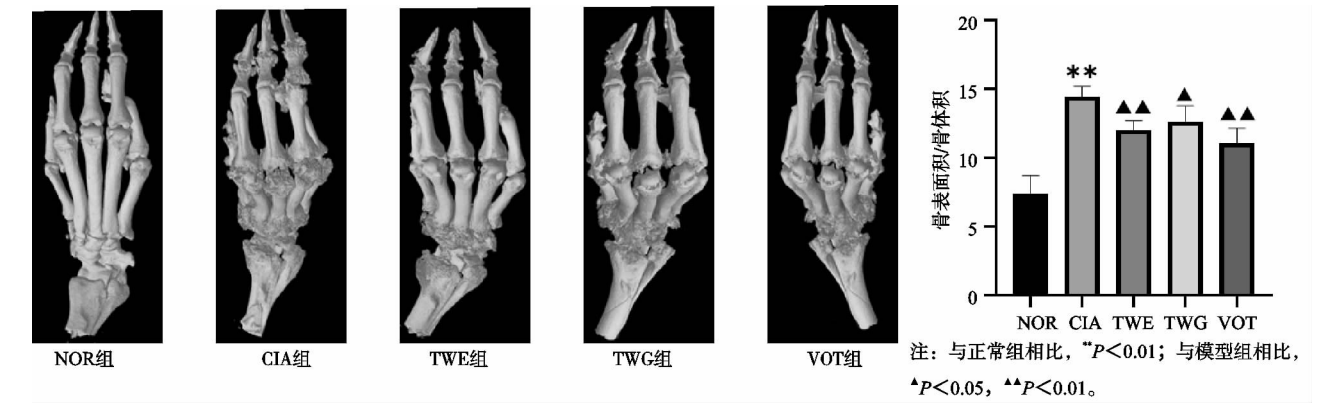


图 3 各组大鼠踝关节、足趾关节三维成像与踝关节骨表面积/骨体积比值

2.4 血清骨破坏相关因子 MMP1、MMP13、RANKL 检测结果

CIA 组大鼠血清中 MMP1、MMP13、RANKL 的表达水平较 NOR 组显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。各治疗组 MMP1、MMP13、RANKL 表达水平较模型组均有不同程度的降低,其中 TWE 组降低最为明显,差异有统计学意义($P<0.01$)。各治疗组血清 MMP13、RANKL 无明显差异($P>0.05$),TWE 组血清 MMP1 低于 VOT 组,差异有统计学意义($P<0.05$),显著低于 TWG 组($P<0.01$),见表 2 及图 4。

2.5 膝骨关节囊 RANKL、OPG 蛋白表达水平检测结果

NOR 组大鼠膝骨关节 RANKL 蛋白表达较 CIA 组显著升高($P<0.05$),提示破骨细胞分化。各治疗组 RANKL/OPG 均低于模型组,TWE 组、VOT 组明显优于 CIA 组($P<0.05$);然而两者的减少骨破坏的机制并不相同,VOT 组抑制 RANKL 表达为主,TWE 组则以增强 OPG 表达为主,但 RANKL/OPG 各治疗组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。蛋白表达检测结果见表 3 及图 5。

表 2 各组大鼠血清中 MMP1、MMP13、RANKL 表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	MMP1/(pg · mL ⁻¹)	MMP13/(pg · mL ⁻¹)	RANKL/(ng · mL ⁻¹)
正常组	3.77 ± 1.12	4.14 ± 0.95	204.69 ± 61.85
模型组	10.70 ± 2.79 ¹⁾	7.42 ± 1.11 ¹⁾	396.35 ± 64.19 ¹⁾
复方雷公藤外敷剂组	6.22 ± 2.74 ²⁾	5.76 ± 0.34 ²⁾	274.69 ± 74.62 ²⁾
雷公藤多苷组	8.73 ± 1.69	5.90 ± 0.76 ²⁾	294.07 ± 45.10 ²⁾
扶他林乳胶剂组	7.80 ± 2.35 ³⁾	5.88 ± 0.44 ²⁾	282.09 ± 15.01 ²⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.01$;与模型组相比,2) $P<0.01$,3) $P<0.05$ 。

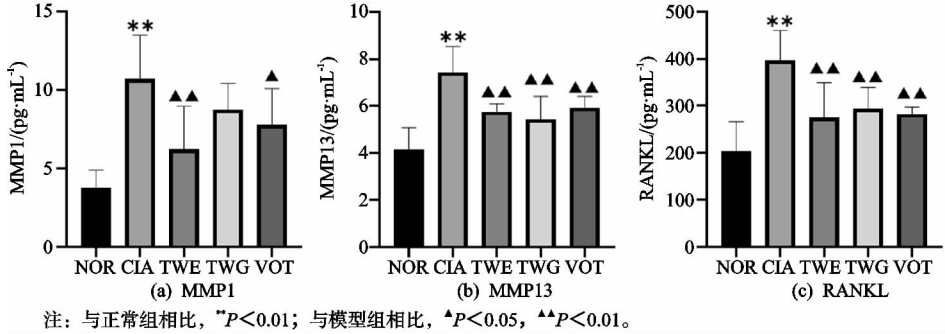


图 4 各组大鼠血清 MMP1、MMP13、RANKL 表达水平

表 3 各组大鼠膝关节囊 RANKL、OPG 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	RANKL	OPG	RANKL/OPG
正常组	0.41 ± 0.22	0.32 ± 0.15	1.27 ± 0.58
模型组	0.96 ± 0.35 ¹⁾	0.46 ± 0.18	2.28 ± 0.77 ¹⁾
复方雷公藤外敷剂组	0.77 ± 0.36	0.71 ± 0.41 ¹⁾	1.18 ± 0.30 ²⁾
雷公藤多苷组	0.77 ± 0.38	0.47 ± 0.15	1.61 ± 0.55
扶他林乳胶剂组	0.36 ± 0.19 ²⁾	0.41 ± 0.4	1.42 ± 0.99 ²⁾

注:1)与正常组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$ 。

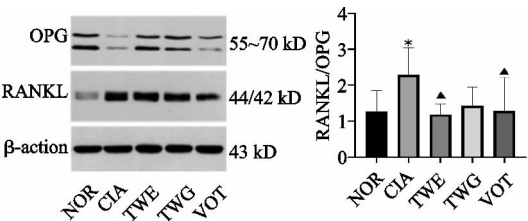


图 5 各组大鼠膝关节囊 RANKL、OPG 蛋白电泳图及各组 RANKL/OPG 水平

3 讨论

类风湿关节炎属中医尪痹范畴,病情迁延,致残率高。团队在既往研究的基础上,突破“肾主骨”这一理念,提出湿热瘀为其核心病机^[10],针对活动性类风湿关节炎关节红肿热痛的症状,发挥中医外治优势,创新雷公藤给药途径,研发出“复方雷公藤外敷剂”,用于类风湿关节炎关节肿痛的辅助治疗。复方雷公藤外敷剂围绕湿热瘀的核心病机而设,其中雷公藤祛风除湿、祛瘀通络为君,辅以大黄、芒硝、乳香、没药等清热解毒、活血通痹,共奏清热除湿、化瘀止痛之效。

本课题组前期实验研究表明^[16-17],复方雷公藤外敷剂可抑制细胞外调节蛋白激酶(Extracellular Regulated Protein Kinases, ERK)通路活化,显著降低 CIA

大鼠膝关节血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)和血管生成素(Angiopoietin, Ang)的蛋白含量和 mRNA 表达水平,提示复方雷公藤外敷剂可能通过调节 ERK/VEGF/Ang-1 信号通路,减轻关节炎症。在此基础上,课题组继续采用类风湿关节炎基础研究中技术成熟的 CIA 模型^[20-21],进一步探索其防治类风湿关节炎的作用与可能机制。

RANKL/OPG 是调节破骨细胞生成、活化的经典信号通路。RANKL 诱导破骨细胞促进骨破坏,同时表达基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinase, MMPs),加速软骨降解^[22],MMPs 被公认为免疫紊乱的生物标志物^[23],炎症介质刺激可诱导 MMPs 的产生,靶向抑制或调节 MMP 可防止类风湿关节炎组织破坏^[24],其中 MMP1、MMP13 在类风湿关节炎-成纤维样滑膜(RA-FLS)中表达上调^[22]。本实验与现代研究结果一致,CIA 组血清 MMP1、MMP13 升高,各治疗组低于 CIA 组,其中 TWE 组 MMP1 显著降低,疗效优于 TWG 组和 VOT 组,提示复方雷公藤外敷剂在类风湿关节炎治疗中抗炎作用突出,并表现出抑制骨破坏的作用。

RANKL/OPG 是调节骨吸收和骨形成平衡的杠杆,早期研究认为其是骨量和骨骼完整性的重要决定

性因素^[25],这一比例被用作受试药物疗效的指标^[26]。在类风湿关节炎中,OPG 表达下调,RANKL 上调,导致破骨细胞分化和关节严重破坏,OPG 作为 RANKL 的诱骗受体从成骨细胞释放出来,通过竞争性与 RANKL 结合并防止其与 RANK 结合来保护骨骼免受过度骨吸收^[25,27]。本实验中 CIA 组大鼠血清 RANKL、膝关节囊组织中 RANKL 蛋白表达水平明显高于各治疗组,经治疗后 TWE 组 OPG 显著升高,RANKL/OPG 显著低于模型组,提示骨破坏受到抑制。本实验结果与其他研究结果一致,如一项随机对照研究显示,针对 RANKL 的特异性抗体 Denosumab (地舒单抗),可抑制类风湿关节炎患者的骨破坏进展^[28]。龙胆科植物斜茎獐牙菜提取物獐牙菜苷(Swertiamarin)能够降低弗氏佐剂诱导的动物模型体内 RANKL 水平,并显著增加 OPG 表达,研究结果揭示獐牙菜苷在预防骨破坏方面具有抗破骨活性的作用^[29]。本研究中复方雷公藤外敷剂显著增加 OPG 表达,竞争性与 RANKL 结合,发挥骨保护作用。大鼠踝关节 micro-CT 检测显示复方雷公藤外敷剂缓解了 CIA 大鼠骨质的破坏,证实了其骨保护作用。

骨破坏可归为中医“骨蚀”范畴,如《灵枢·刺节真邪》篇曰:“虚邪之入于身也深,寒与热相搏……热胜其寒,则烂肉腐肌为脓,内伤骨为骨蚀。”活动性类风湿关节炎受累关节红肿热痛,成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖,释放大量炎症因子,构成骨破坏的滑膜微环境^[30],即“热胜其寒”的表现,课题组通过大规模证候调查^[31],确认了活动性类风湿关节炎湿热瘀的核心病机,复方雷公藤外敷剂以清热解毒、祛湿活血立方,病证相合,效果甚佳,局部用药,直达病所,发挥中医外治优势,扩大雷公藤适用患者群,抑制炎症反应,延缓骨破坏。本实验在给药中,选择常用的非甾体抗炎镇痛药扶他林乳胶剂为阳性对照药物,然而扶他林乳胶剂在提高 OPG 水平方面劣于复方雷公藤外敷剂。另一个阳性对照药为雷公藤多苷片,结果显示复方雷公藤外敷剂在局部防治骨破坏方面优于雷公藤多苷,再次证实了雷公藤外用的抗炎护骨优势。课题组后续研究将围绕滑膜微环境,开展体内、体外研究,多维探究、验证复方雷公藤外敷剂的作用机制。

综上所述,复方雷公藤外敷剂能够抑制类风湿关节炎骨破坏,其机制可能与降低血清骨破坏相关细胞因子 MMP1、MMP13、RANKL,调节滑膜组织 RANKL/OPG 信号通路有关。

参考文献

[1] 田新平,李梦涛,曾小峰.我国类风湿关节炎诊治现状与挑战:来自中国类风湿关节炎 2019 年年度报告[J].中华内科杂志,2021,60(7):593-598.

[2] SMOLEN J S,ALETAHA D,MCINNES I B. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet,2016,388(10055):2023-2038.

[3] 耿研,谢希,王昱,等.类风湿关节炎诊疗规范[J].中华内科杂志,2022,61(1):51-59.

[4] 周云杉,王秀茹,安媛,等.全国多中心类风湿关节炎患者残疾及功能受限情况的调查[J].中华风湿病学杂志,2013,17(8):526-532.

[5] LIU J J,LI R,GAN Y Z,et al. Clinical deep remission and related factors in a large cohort of patients with rheumatoid arthritis[J]. Chinese Med J, 2019, 132(9): 1009-1014.

[6] WANG G Y,ZHANG S L,WANG X R,et al. Remission of rheumatoid arthritis and potential determinants:a national multi-center cross-sectional survey[J]. Clin Rheumatol,2015,34(2):221-230.

[7] ALTEN R,MISCHKEWITZ M. 2021 ACR guideline reflects changes in RA treatment[J]. Nat Rev Rheumatol, 2021,17(9):513-514.

[8] 巩勋,崔家康,姜泉,等.1 388 例类风湿关节炎患者中医证型与疾病活动度特征横断面调查[J]. 中医杂志,2021,62(4):312-317.

[9] 刘蔚翔,姜泉.类风湿关节炎“湿、热、瘀”病机理论探析[J]. 中医杂志,2020,61(24):2148-2153.

[10] 刘蔚翔,姜泉. 见骨损而非独责之于肾[J]. 中医杂志, 2019,60(14):1198-1201.

[11] 杜羽,王雷,罗成贵,等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎 3 年期放射学评价研究[J]. 世界中西医结合杂志,2018,13(11):1577-1580.

[12] 李光耀,唐晓颇,姜泉,等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎骨破坏 5 年期放射学观察[J]. 世界中西医结合杂志, 2019,14(4):516-520.

[13] 焦娟,姜泉. 复方雷公藤外敷降低类风湿关节炎疾病活动度的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(11):1470-1472.

[14] 曹炜,焦娟,姜泉. 复方雷公藤外敷治疗活动期类风湿关节炎的临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志,2007,22(7):433-435.

[15] 焦娟,唐晓颇,员晶,等. 复方雷公藤外敷剂对类风湿关节炎患者关节疼痛的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2016,36(1):29-34.

[16] 赵越,唐晓颇,姜泉,等. 复方雷公藤外敷对Ⅱ型胶原诱导型关节炎大鼠滑膜组织细胞因子及 ERK 通路的影响[J]. 中医杂志,2017,58(7):582-586.

[17] 赵越,唐晓颇,姜泉,等. 复方雷公藤外敷对 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞中细胞因子和 ERK 通路表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2018,33(11):5155-5158.

[18] TRENTHAM D E,TOWNES A S,KANG A H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis[J]. J Exp Med,1977,146(3):857-868.

- al. Increased risk of ACL revision with non-surgical treatment of a concomitant medial collateral ligament injury;a study on 19 457 patients from the Swedish National Knee Ligament Registry[J]. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy,2019,27(8):2450-2459.
- [15] ZHU J,DONG J,MARSHALL B,et al. Medial collateral ligament reconstruction is necessary to restore anterior stability with anterior cruciate and medial collateral ligament injury [J]. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy,2017,26:550-557.
- [16] LIND M,JACOBSEN K,NIELSEN T. Medial collateral ligament (MCL) reconstruction results in improved medial stability;results from the Danish knee ligament reconstruction registry (DKRR) [J]. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy,2020,28(3):881-887.
- [17] 卢启贵,王平,黄东红,等. 自体半腱肌转移解剖重建膝内侧副韧带 III 度损伤的临床疗效分析[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2014,29(1):94-95.
- [18] 杨岩,姚鲁田,王岩峰,等. 异体跟腱与自体半腱肌肌腱移植治疗内侧副韧带 体部 III 度损伤的疗效[J]. 中国医科大学学报,2018,47(8):724-729.
- [19] 谢卫勇,朱伟民. 单束重建与解剖双束重建治疗内侧副韧带 III 级损伤的生物力学比较研究[J]. 中国修复重建外科杂志,2020,34(6):57-62.
- [20] XU H T,KANG K,ZHANG J,et al. An anatomical-like triangular-vector ligament reconstruction for the medial collateral ligament and the posterior oblique ligament injury with single femoral tunnel:a retrospective study[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research,2017,12(1):96.
(收稿日期:2022-10-19)
- (上接第 17 页)
- [19] ZHAO H,XU H,ZUO Z,et al. Yishen Juanbi pill ameliorates bone loss and destruction induced by arthritis through modulating the balance of cytokines released by different subpopulations of T cells[J]. Front Pharmacol, 2018,9:262.
- [20] CANNON G W,MCCALL S,COLE B C,et al. Effects of indomethacin, cyclosporin, cyclophosphamide, and placebo on collagen-induced arthritis of mice[J]. Agents Actions, 1990,29(3/4):315-323.
- [21] 夏晴,纪羽婷,刘海亮,等. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2020,30(11):107-113.
- [22] KOMATSU N,TAKAYANAGI H. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis-immune cell-fibroblast-bone interactions[J]. Nat Rev Rheumatol, 2022,18(7): 415-429.
- [23] BRIGHTWELL C R,LATHAM C M,THOMAS N T,et al. A glitch in the matrix;the pivotal role forextracellular matrix remodeling during muscle hypertrophy[J]. Am J Physiol-Cell Ph,2022,323(3):C763-C771.
- [24] ALAMGEER,HASAN U H,UTTRA A M,et al. Phytochemicals targeting matrix metalloproteinases regulating tissue degradation in inflammation and rheumatoid arthritis[J]. Phytomedicine,2020,66:153134.
- [25] BOYCE B F,XING L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin[J]. Arthritis Res Ther,2007,9(Suppl 1): S1.
- [26] GALLAGHER J C. Advances in bone biology and new treatments for bone loss[J]. Maturitas, 2008,60(1): 65-69.
- [27] TSUKASAKI M,ASANO T,MURO R,et al. OPG production matters where it happened[J]. Cell Rep,2020,32(10):108124.
- [28] TANAKA S,TANAKA Y. RANKL as a therapeutic target of rheumatoid arthritis[J]. J Bone Miner Metab,2021, 39(1):106-112.
- [29] HAIRUL-ISLAM M I,SARAVANAN S,THIRUGNAN-ASAMBANTHAM K,et al. Swertiamarin, a natural steroid, prevent bone erosion by modulating RANKL/RANK/OPG signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 53: 114-124.
- [30] 程增玉,徐浩东,姜雯,等. 类风湿关节炎滑膜微环境的中医属性及治则探讨[J]. 现代中西医结合杂志,2022,31(6):843-847.
- [31] 姜泉,蒋红,曹炜,等. 475 例类风湿关节炎患者中医临床证候分析[J]. 中医杂志,2007,48(3):253-255.
(收稿日期:2022-12-09)