

秦艽不同配伍对风寒湿痹模型大鼠 MMP-3 及 TIMP-1 的影响

苏杉, 王蓉, 赵敏, 吴晨, 高慧琴*
(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**观察秦艽寒热不同配伍药对对风寒湿痹型类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)模型大鼠踝关节基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3),基质金属蛋白酶组织抑制物-1(matrix metalloproteinase tissue inhibitor-1, TIMP-1)的影响。**方法:**选取 80 只 SD 大鼠并随机分为正常组, II 型胶原组, 风寒湿痹证模型组, 雷公藤多苷片组($6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 单味秦艽组($25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 秦艽配伍威灵仙(秦威组, $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 秦艽配伍桑寄生(秦桑组, $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 秦艽配伍防己(秦防组, $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 共 8 组, 每组 10 只。采用注射 II 型胶原乳剂诱导并给予风寒湿刺激制备风寒湿 RA 大鼠模型。模型建立完成后正常组, II 型胶原组及风寒湿痹证模型组大鼠给予生理盐水, 各给药组给予相应药液灌胃。实验过程中, 每 3 d 测量 1 次大鼠左后足跖厚度, 计算足跖肿胀度; 实验第 38 天对各组大鼠进行关节炎指数(AI)评分; 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测大鼠血清类风湿因子(RF)含量; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测踝关节 MMP-3, TIMP-1 的表达水平; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)技术检测踝关节 MMP-3, TIMP-1 mRNA 的表达。**结果:**与正常组比较, II 型胶原组及风寒湿痹证模型组足跖肿胀度, AI 评分, 血清 RF 含量, 踝关节 MMP-3 蛋白表达水平, MMP-3 mRNA 明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 踝关节 TIMP-1 蛋白表达水平, TIMP-1 mRNA 显著降低($P < 0.01$); 与风寒湿痹证模型组比较, 各给药组足跖肿胀度, AI 评分及血清 RF 含量均有不同程度降低, 其中秦威组降低最显著($P < 0.01$); Western blot 及 Real-time PCR 结果显示, 与风寒湿痹证模型组比较, 各给药组踝关节 MMP-3 蛋白表达水平及 MMP-3 mRNA 表达水平均显著降低($P < 0.01$), 以秦威组降低最明显, 雷公藤多苷片组、秦威组及秦桑组大鼠踝关节 TIMP-1 蛋白表达水平及 TIMP-1 mRNA 表达水平均有所升高, 以秦威组升高最显著($P < 0.01$)。**结论:**对于风寒湿痹型类风湿关节炎, 平温相配的秦威组疗效优于平平相配的秦桑组、平寒相配的秦防组及单味秦艽组, 实验结果与中医“寒者热之”的原则基本相符。该配伍治疗风寒湿痹型类风湿关节炎的机制可能与其可以减少 MMP-3, 升高 TIMP-1 的表达, 减轻关节软骨破坏有关。

[关键词] 秦艽; 风寒湿痹; 类风湿关节炎; 类风湿因子(RF); 基质金属蛋白酶-3(MMP-3); 基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0008-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190334

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.1038.036.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 15:09

Effect of Different Combinations of Gentianae Macrophyllae Radix on MMP-3 and TIMP-1 in Rheumatoid Arthritis Rats with Wind-cold-dampness Arthralgia

SU Shan, WANG Rong, ZHAO Min, WU Chen, GAO Hui-qin*
(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of different combinations of Gentianae Macrophyllae Radix (Qinjiao) on the ankle joint matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) of rheumatoid arthritis (RA) model rats with wind-cold-dampness arthralgia. **Method:** Eighty healthy SD rats were randomly divided into 8 groups, namely blank control group, collagen II model group, wind-cold-

[收稿日期] 20180725(013)

[基金项目] 国家自然科学基金地区项目(81360648)

[第一作者] 苏杉, 在读硕士, 从事中药与复方应用研究, E-mail: 747464066@qq.com

[通信作者] *高慧琴, 教授, 硕士生导师, 从事中药基础理论及临床应用研究, Tel: 0931-8765520, E-mail: ghq@gszy.edu.cn

dampness syndrome model group, positive control group, single-taste Gentianae Macrophyllae Radix group, Gentianae Macrophyllae Radix-Clematidis Radix et Rhizoma group (GC group), Gentianae Macrophyllae Radix-Taxilli Herba group (GT group), Gentianae Macrophyllae Radix-Stephanlae Tetrandrae Radix group (GS group), with 10 rats in each group. Rat model of wind-cold-dampness RA was induced through the injection with type II collagen emulsion and wind-cold-dampness stimulation. After the establishment of the model, the blank control group, collage II model group and wind-cold-dampness syndrome model group were given normal saline, and the corresponding liquid medicine was given to each administration group. In the experiment, the thickness of the left posterior metatarsal of rats was measured every 3 days, and the swelling degree of metatarsal was calculated. The arthritis index (AI) was evaluated on the 38th day of the experiment. The serum rheumatoid factor (RF) content of rats was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of MMP-3 and TIMP-1 in ankle joint were detected by Western blot. The expressions of MMP-3 and TIMP-1 mRNA in ankle joint were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR). **Result:** Compared with the blank group, the swelling degree, AI score, serum RF content, MMP-3 protein expression and MMP-3 mRNA expression in ankle joints of collage II model group and model wind-cold-dampness syndrome group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the TIMP-1 protein expression and TIMP-1 mRNA expression in ankle joints were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the wind-cold-dampness syndrome model group, the swelling degree of foot and metatarsal, AI score and serum RF content of each administration group were decreased to different degrees, especially in Qinwei group ($P < 0.01$). The results of Western blot and Real-time PCR showed that the expressions of MMP-3 protein and MMP-3 mRNA in ankle joints of each administration group were significantly lower than those of wind-cold-dampness syndrome model group ($P < 0.01$). The expressions of TIMP-1 protein and TIMP-1 mRNA in ankle joints of rats in positive control group, GC group and GT group were significantly higher than those in GC group ($P < 0.01$). **Conclusion:** For rheumatoid arthritis with wind-cold-dampness arthralgia, mild and warm traditional Chinese medicine (TCM) has a better effect than the combination of mild and cold TCM or mild TCM drugs. The experimental results are basically consistent with the principle of "treating cold diseases with hot medicine". The mechanism of the compatibility in treating rheumatoid arthritis due to wind-cold-dampness arthralgia may be related to the reduction of MMP-3, the increase of TIMP-1 expression and the reduction of articular cartilage damage.

[Key words] Gentianae Macrophyllae Radix; wind-cold-dampness arthralgia; rheumatoid arthritis (RF); rheumatoid factor; matrix metalloproteinase-3 (MMP-3); tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1)

类风湿关节炎是一种以关节病变为主要特征的慢性、全身性自身免疫疾病^[1]。临床主要表现为局部关节疼痛、肿胀、晨僵、关节软骨破坏、贫血等^[2]，属中医“痹证”范畴。痹证是指由于风、寒、湿等邪气闭阻经络，影响气血运行，从而导致肢体筋骨、关节等处疼痛、酸楚、麻木或关节屈伸不利。本病是一种反复发作性疾病，致残率高，预后不良，目前没有很好的治疗方法。中药用于治疗类风湿关节炎历史悠久，功效确切，作用温和，不良反应小。

秦艽是常用的祛风湿药，性平，具有祛风湿、止痹痛等功效，主要用于治疗风湿痹痛、筋脉拘挛等症。本课题前期研究发现秦艽配伍威灵仙、秦艽配伍羌活及秦艽配伍桑寄生对于风寒湿痹大鼠血清炎症因子的降低作用强于秦艽配伍防己^[3]。通过

查阅相关文献^[4-7]，选温性祛风湿药威灵仙、平性祛风湿药桑寄生，寒性祛风湿药防己与秦艽组成平温相配、平平相配、平寒相配的配伍关系，观察秦艽不同配伍药对对风寒湿痹类风湿关节炎模型大鼠血清类风湿因子 (RF) 及踝关节基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)，基质金属蛋白酶组织抑制物-1 (matrix metalloproteinase tissue inhibitor-1, TIMP-1) 表达的影响，通过比较秦艽及其寒热不同配伍药对的疗效，进一步探讨药性与疾病、药性与药效之间的关系。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠，体质量 (200 ± 20) g，80 只，雌雄皆用，甘肃中医药大学科研实验中心提供，合格证号 SCXK(甘)2015-0002。本研究经甘肃

中医药大学实验动物伦理委员会批准, 编号 2017-126。

1.2 药物与试剂 秦艽、威灵仙、桑寄生、防己饮片, 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, SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(北京 Solarbio 公司, 批号分别为 908E052, 20170915); 完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司, 批号 SLBS1330V); RF 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司, 批号 MM-20956R1); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(美国 Immunoway Biotechnology 公司, 批号 B5201); MMP-3, TIMP-1 抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab53015, ab61224); 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国 Abbkine 公司, 批号 A21020); 超敏发光液(美国 Millipore 公司, 批号 1518901); SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 扩增试剂盒, ReverTra Ace[®] qPCR RT kit 逆转录试剂盒(含 trizol)[东洋纺(上海)生物科技有限公司, 批号分别为 717000, 711000]; GAPDH, MMP-3, TIMP-1 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司, 批号分别为 1410090677, 1408556116, 1408556117]。

1.3 仪器 RXZ-380A-LED 型改装后的智能人工气候箱(气候箱中装 3 个风扇, 控制风速为 $5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$)(宁波江南仪器厂); GFL3033 型气浴恒温摇床(北京博励行仪器有限公司); Benchmark Plus 型酶标仪, S1000[™] Thermal Cycler 型梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); DYY-7C 型电泳仪电源, DYCZ-24DN 型电泳仪及转膜仪(北京六一生物科技有限公司); C300 型凝胶成像仪(美国 Azure Biosystems 公司); 7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠适应性喂养 3 d 后, 随机数字表法将 80 只大鼠分为正常组, II 型胶原组, 风寒湿病证模型组(II 型胶原 + 风寒湿刺激), 雷公藤多苷组, 单味秦艽组, 秦威组, 秦桑组, 秦防组, 共 8 组, 每组 10 只。

2.2 胶原乳剂的制备 精密吸取冰乙酸 0.3 mL 置于 50 mL 容量瓶内, 加入注射用水定容, 得 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 冰乙酸溶液。精密称量天然牛 II 型胶原 5 mg 置于 25 mL 容量瓶内, 在冰水浴中, 用配置

好的冰乙酸溶液稀释、定容, 得 II 型胶原溶液, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内过夜。注射当天, 取 II 型胶原溶液 25 mL 与等体积完全弗氏佐剂在冰水浴中充分混匀乳化, 得 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胶原乳剂。

2.3 造模方法 于实验第 1 天, 除正常组, 其余组大鼠在背部两点(背部脊柱两侧)及尾根部一点, 剃毛, 皮内注射胶原乳剂 0.1 mL , 共 0.3 mL 。第 12 天, 在大鼠左后足跖皮内注射胶原乳剂 0.1 mL 进行二次免疫, 正常组在相同部位注射等体积注射用水。从初次注射胶原乳剂第 2 天开始, 即实验第 2 天, 除正常组及 II 型胶原组, 其余组大鼠均采用改装后的智能人工气候箱进行风寒湿痹型类风湿关节炎模型的造模^[3]。风寒湿环境条件: 温度 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 风速 $5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, 相对湿度 $\geq 95\%$, 风寒湿刺激时大鼠足跖没入 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 的冰水混合液中。1 次/d, 30 min /次, 连续 18 d。以大鼠足跖肿胀, 行动不便疼痛侧卧为度。

2.4 药液的制备 中药药液均由甘肃中医药大学中药药剂实验室协助制备。单味秦艽组: 称秦艽 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 , 过滤药渣后合并 2 次药液, 浓缩至每毫升含生药 1.67 g 。秦艽配伍组(秦威组、秦桑组、秦防组)按 1:1 比例分别取秦艽和威灵仙、秦艽和桑寄生、秦艽和防己各 150 g , 煎煮方法同上, 药液制备完成后放入 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内储存备用。雷公藤多苷液的制备, 将雷公藤多苷片碾成粉末状, 加适量生理盐水, 配制为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雷公藤多苷混悬液, 备用。

2.5 给药 造模结束后, 各中药组按 $25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予相应药液, 雷公藤多苷药组按 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予雷公藤多苷混悬液, 其余组给予等量生理盐水, 1 次/d, 连续 21 d。

2.6 观察指标及方法

2.6.1 足跖肿胀度 用游标卡尺测量大鼠左后足跖厚度, 每 3 d 测量 1 次, 计算大鼠足跖肿胀度, 肿胀度 = $(C_t - C_0) / C_0$, C_0 表示致炎前足跖厚度, C_t 表示致炎后足跖厚度。

2.6.2 关节炎指数(AI)评分 实验第 38 天对各组大鼠进行 AI 评分, 采用 5 级评分法, 正常、无关节炎记 0 分, 足趾关节轻度发红或肿胀记 1 分, 足趾或踝关节中度肿胀记 2 分, 踝关节严重肿胀或踝关节以下全部肿胀记 3 分, 整个足爪肿胀或关节严重变形、不能负重记 4 分。每只大鼠 4 只足爪评分之和作为最终的关节炎评分, 每只大鼠最高不超过 16 分。

2.6.3 ELISA 检测大鼠血清 RF 含量 末次给药

1 h 后,大鼠股动脉取血 5 mL,静置 2 h 后,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,取血清,用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 RF 含量,具体操作步骤严格按照说明书进行。

2.6.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测踝关节 MMP-3, TIMP-1 蛋白的表达 取大鼠踝关节部位,每组 3 只,提取踝关节蛋白样本,并检测蛋白浓度,将样本上样至 12% 的 SDS-PAGE 凝胶梳孔中,电泳,转膜,封闭,一抗 MMP-3, TIMP-1 (1:800) 中孵育,过夜后,洗膜,二抗 (1:1 000) 孵育,洗膜, ECL 发光显影,凝胶成像仪曝光,拍照,应用 Image J 软件检测条带灰度值,将目的条带灰度值比内参的光密度值,得到目的蛋白的相对表达量。

2.6.5 Real-time PCR 检测踝关节 MMP-3, TIMP-1 mRNA 表达 取大鼠踝关节部位,每组 3 只,提取踝关节 RNA 样本。按照说明书运用 trizol 法提取样本总 RNA,微量紫外分光光度计检测样本 RNA 浓度,确保吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0,然后将 RNA 样本采用 ReverTra Ace[®] qPCR RT kit 逆转录试剂盒进行逆转录,反应体系为 50 μL,具体步骤按说明书操作。反应参数设置为 37 °C 15 min, 98 °C 5 min, 然后 -20 °C 保存。选用 GAPDH 为内参,采用 SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 扩增试剂盒,反应体系为 20 μL,具体步骤按说明书操作。反应参数设置为 95 °C 60 s, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 溶解曲线分析,进行 40 个循环。PCR 引物序列见表 1。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料服从正态分布时以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

名称	序列 (5'-3')	扩增长度/bp
GAPDH	上游 CATGCCGCTGGAGAAAC	92
	下游 AGCCGAGGATGCCCTTAGT	
MMP-3	上游 GAGAGTGTGGATTCTGCCATTGAGAG	80
	下游 TCAGAGATCTGGAGAATGTGAGTGG	
TIMP-1	上游 GCCTCTGGGATCCTCTTGT	20
	下游 TAACCAGGTCGGAGTTGCAG	

间数据比较运用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠足跖肿胀度的影响 实验第 18 天,与正常组比较,各模型组肿胀度显著升高 ($P < 0.01$); 给药后各给药组肿胀度有所降低;实验第 36 天,与病证模型组比较,单味秦艽组及秦威组显著降低 ($P < 0.01$),雷公藤多苷组、秦桑组及秦防组次之 ($P < 0.05$),其中秦威组降低最明显,且秦威组肿胀度明显低于秦防组 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.2 对大鼠 AI 评分的影响 与正常组比较, II 型胶原组和病证模型组 AI 评分显著升高 ($P < 0.01$),且病证模型组 AI 评分显著高于 II 型胶原组 ($P < 0.01$); 与 II 型胶原组及病证模型组比较,各给药组 AI 评分明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),且各中药组中秦威组降低最明显;各给药组间比较,秦防组 AI 评分明显高于雷公藤多苷组及秦威组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎大鼠足跖肿胀度及 AI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of different compatibility of Gentianaе Macrophyllae Radix on plantar swelling degree and AI score of rheumatoid arthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	足跖肿胀度			AI 评分/分
		18 d	27 d	36 d	
正常	-	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.05	0
II 型胶原	-	0.43 ± 0.18 ²⁾	0.30 ± 0.12 ¹⁾	0.26 ± 0.10 ²⁾	2.36 ± 0.65 ²⁾
病证模型	-	0.52 ± 0.26 ²⁾	0.37 ± 0.16 ¹⁾	0.29 ± 0.12 ²⁾	3.16 ± 1.04 ^{2,4)}
雷公藤多苷	0.006	0.42 ± 0.14 ²⁾	0.30 ± 0.08 ²⁾	0.19 ± 0.10 ^{1,5)}	1.20 ± 0.24 ^{4,6)}
单味秦艽	25	0.42 ± 0.14 ²⁾	0.24 ± 0.09 ¹⁾	0.18 ± 0.08 ^{1,6)}	1.62 ± 0.51 ^{4,6)}
秦威	25	0.50 ± 0.14 ²⁾	0.20 ± 0.11	0.17 ± 0.12 ⁶⁾	1.22 ± 0.38 ^{4,6)}
秦桑	25	0.43 ± 0.15 ²⁾	0.21 ± 0.09	0.20 ± 0.06 ^{1,5)}	1.54 ± 0.41 ^{4,6)}
秦防	25	0.46 ± 0.16 ²⁾	0.28 ± 0.11 ¹⁾	0.26 ± 0.10 ^{2,5,8)}	1.82 ± 0.42 ^{3,6,7,8)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 II 型胶原组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与病证模型组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与雷公藤多苷组比较⁷⁾ $P < 0.05$;与秦威组比较⁸⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 对大鼠血清 RF 的影响 与正常组比较, II 型胶原组及病证模型组血清 RF 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 II 型胶原组及病证模型组比较, 秦威组血清 RF 水平降低最显著 ($P < 0.01$), 且秦威组血清 RF 水平明显低于单味秦艽组及秦防组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎大鼠血清 RF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

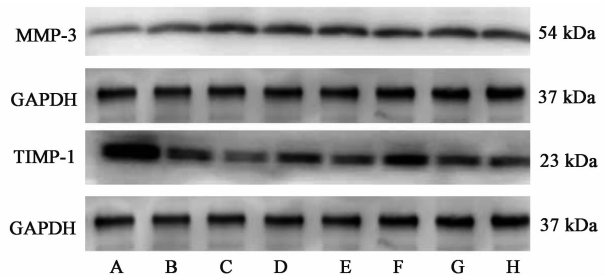
Table 3 Effect of different compatibility of Gentianaes Macrophyllae Radix on serum RF content in rheumatoid arthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RF/U·L ⁻¹
正常	-	30.08 ± 8.40
II 型胶原	-	45.49 ± 12.69 ¹⁾
病证模型	-	45.90 ± 10.09 ¹⁾
雷公藤多苷	0.006	38.69 ± 9.13
单味秦艽	25	43.34 ± 6.34
秦威	25	34.35 ± 5.51 ^{2,3,4)}
秦桑	25	41.78 ± 8.56
秦防	25	44.52 ± 10.32 ⁵⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 II 型胶原组比较²⁾ $P < 0.01$; 与病证模型组比较³⁾ $P < 0.01$; 与单味秦艽组比较⁴⁾ $P < 0.05$; 与秦威组比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 对大鼠踝关节 MMP-3, TIMP-1 蛋白表达的影响 与正常组比较, II 型胶原组与病证模型组 MMP-3 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$), TIMP-1 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$), 且病证模型组 MMP-3 蛋白相对表达量显著高于 II 型胶原组 ($P < 0.01$), TIMP-1 蛋白相对表达量显著低于 II 型胶原组 ($P < 0.01$); 与 II 型胶原组比较, 雷公藤多苷组、单味秦艽组、秦桑组及秦防组 MMP-3 蛋白相对表达量明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 雷公藤多苷组、单味秦艽组、秦桑组及秦防组 TIMP-1 蛋白相对表达量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而秦威组 TIMP-1 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与病证模型组比较, 各给药组 MMP-3 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$), 其中以秦威组 MMP-3 蛋白相对表达量最低, 除秦防组, 其余给药组 TIMP-1 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$); 各给药组间比较, 单味秦艽组 MMP-3 蛋白相对表达量显著高于雷公藤多苷组 ($P < 0.01$), 秦威组 MMP-3 蛋白相对表达量显著低于雷公藤多苷组 ($P < 0.01$), 秦艽配伍组 MMP-3 蛋白相对表达量显著低于单味秦艽组 ($P < 0.01$); 秦威组 TIMP-1 蛋白相对表达量显著高于

雷公藤多苷组、单味秦艽组、秦桑组及秦防组 ($P < 0.01$), 秦防组 TIMP-1 蛋白相对表达量显著低于秦桑组 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 4。



A. 空白组; B. II 型胶原组; C. 病证模型; D. 雷公藤多苷组; E. 单味秦艽组; F. 秦威组; G. 秦桑组; H. 秦防组

图 1 大鼠踝关节 MMP-3, TIMP-1 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of MMP-3, TIMP-1 protein in ankle joint of rheumatoid arthritis rats

表 4 秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎大鼠踝关节 MMP-3, TIMP-1 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of different compatibility of Gentianaes Macrophyllae Radix on relative expression of MMP-3, TIMP-1 protein in ankle joint of rheumatoid arthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-3/GAPDH	TIMP1/GAPDH
正常	-	0.47 ± 0.02	1.08 ± 0.03
II 型胶原	-	0.82 ± 0.04 ¹⁾	0.66 ± 0.04 ¹⁾
病证模型	-	1.22 ± 0.03 ^{1,3)}	0.45 ± 0.01 ^{1,3)}
雷公藤多苷	0.006	0.92 ± 0.04 ^{3,4)}	0.54 ± 0.02 ^{3,4)}
单味秦艽	25	1.02 ± 0.04 ^{3,4,5)}	0.55 ± 0.00 ^{3,4)}
秦威	25	0.84 ± 0.01 ^{4,5,6)}	0.78 ± 0.01 ^{3,4,5,6)}
秦桑	25	0.88 ± 0.00 ^{2,4,6)}	0.54 ± 0.03 ^{3,4,7)}
秦防	25	0.89 ± 0.04 ^{2,4,6)}	0.45 ± 0.01 ^{3,5,6,7,8)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 II 型胶原组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与病证模型组比较⁴⁾ $P < 0.01$; 与雷公藤多苷组比较⁵⁾ $P < 0.01$; 与单味秦艽组比较⁶⁾ $P < 0.01$; 与秦威组比较⁷⁾ $P < 0.01$; 与秦桑组比较⁸⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 对大鼠踝关节 MMP-3, TIMP-1 mRNA 表达的影响 与正常组比较, II 型胶原组与病证模型组 MMP-3 mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.01$), TIMP-1 mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$), 且病证模型组 MMP-3 mRNA 表达量显著高于 II 型胶原组 ($P < 0.01$); 与 II 型胶原组及病证模型组比较, 各给药组 MMP-3 mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$), 各中药组中以秦威组 MMP-3 mRNA 表达量最低, 雷公藤多苷组及各秦艽配伍组 TIMP-1 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 以秦威组 TIMP-1 mRNA

表达量最高;各给药组间比较,单味秦艽组及各秦艽配伍组 MMP-3 mRNA 表达量均显著高于雷公藤多苷组 ($P < 0.01$),单味秦艽组、秦桑组及秦防组 TIMP-1 mRNA 表达量显著低于雷公藤多苷组 ($P < 0.01$),而秦威组 TIMP-1 mRNA 表达量显著高于雷公藤多苷组 ($P < 0.01$),秦威组及秦桑组 TIMP-1 mRNA 表达量显著高于单味秦艽组 ($P < 0.01$),秦桑组及秦防组 TIMP-1 mRNA 表达量显著低于秦威组 ($P < 0.01$),秦防组 TIMP-1 mRNA 表达量显著低于秦桑组 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎大鼠踝关节 MMP-3, TIMP-1 mRNA 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of different compatibility of Gentianae Macrophyllae Radix on MMP-3, TIMP-1 mRNA expression in ankle joint of rheumatoid arthritis rats with wind-cold-dampness arthralgia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	MMP-3	TIMP-1
正常	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
II 型胶原	-	5.42 ± 0.15 ¹⁾	0.04 ± 0.00 ¹⁾
病证模型	-	28.11 ± 0.94 ^{1,3)}	0.04 ± 0.00 ¹⁾
雷公藤多苷	0.006	1.01 ± 0.07 ^{3,5)}	0.22 ± 0.03 ^{3,5)}
单味秦艽	25	3.75 ± 0.14 ^{3,5,6)}	0.04 ± 0.00 ⁶⁾
秦威	25	3.20 ± 0.52 ^{3,5,6)}	0.32 ± 0.04 ^{3,5,6,7)}
秦桑	25	3.77 ± 0.24 ^{3,5,6)}	0.16 ± 0.01 ^{2,5,6,7,8)}
秦防	25	3.62 ± 0.25 ^{3,5,6)}	0.07 ± 0.01 ^{2,4,6,8,9)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 II 型胶原组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与病证模型组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$;与雷公藤多苷组比较⁶⁾ $P < 0.01$;与单味秦艽组比较⁷⁾ $P < 0.01$;与秦威组比较⁸⁾ $P < 0.01$;与秦桑组比较⁹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

类风湿关节炎是一种常见疾病,患者常出现关节滑膜、软骨损坏及其他脏器功能的影响^[8]。对于类风湿关节炎的中药治疗,主要以温经、散寒、通络为主^[5]。类风湿关节炎主要的病变器官是关节滑膜,滑膜衬里层细胞异常增殖、血管翳生成、炎性细胞浸润、软骨基质降解^[9],而 MMPs 是参与关节软骨破坏的重要酶类^[10],可以降解细胞外基质的蛋白成分,促进血管翳对于软骨的侵蚀作用^[11]。类风湿关节炎患者外周血及关节滑膜、滑液中 MMPs 高表达,且与病情呈正相关^[12]。MMP-3 是 MMPs 中的重要成员之一,主要由滑膜细胞、成纤维细胞等分泌,是产生软骨降解最重要的蛋白酶^[13]。研究发现,类风湿关节炎患者的滑膜中 MMP-3 水平明显升高,可

有效反映类风湿关节炎患者的活动性,尤其对于中、重度患者,且与 28 关节疾病活动度评分(DAS28)相关^[12]。王晓霞等^[14]研究发现 RF 是自身抗体,ESR 及 C 反应蛋白(C reactive protein, CRP)可作为炎性指标,MMP-3 是软骨破坏程度的指标,这些指标可从不同角度反映类风湿关节炎患者的病情。临床研究结果发现 MMP-3 与 RF 滴度均高的类风湿关节炎患者病情的恶化速度快,认为 MMP-3 可以作为评估类风湿关节炎患者远期残废的可能指标^[15]。TIMP-1 是由巨噬细胞及结缔组织细胞产生,是 MMP-3 的天然抑制剂,可特异性地与 MMP-3 结合形成复合物,抑制 MMP-3 的活性^[16]。研究发现^[17-19],正常状态下,MMP-3 与 TIMP-1 两者维持相对平衡,病理状态下,类风湿关节炎患者血清及滑膜中的 MMP-3, TIMP-1 水平均有不同程度升高,但 MMP-3 的水平比 TIMP-1 高,两者的平衡被打破,导致软骨破坏增加,且 MMPs 与 TIMPs 的比值与软骨破坏程度呈正相关。TIMPs 不仅可以抑制激活状态的 MMPs,还可抑制或延缓原型 MMPs 变为激活状态^[10]。下调 MMP-3 与 TIMP-1 的比值对于减轻软骨破坏,缓解类风湿关节炎患者症状具有积极作用。

本实验动物模型是在单纯 II 型胶原模型基础上,模拟人类成因,施加风寒湿刺激,建立符合中医特点的病证结合的风寒湿痹类风湿关节炎动物模型。由实验结果可知,与正常组比较,II 型胶原组和病证模型组足跖肿胀度,AI 评分,血清 RF 含量,踝关节 MMP-3 蛋白相对表达量及踝关节 MMP-3 mRNA 表达量明显升高,且病证模型组高于 II 型胶原组,踝关节 TIMP-1 蛋白相对表达量及踝关节 TIMP-1 mRNA 表达量明显降低,且病证模型组 TIMP-1 蛋白相对表达量低于 II 型胶原组,认为造模基本成功,风寒湿痹类风湿关节炎模型比单纯类风湿关节炎模型严重。经药物治疗后,各给药组足跖肿胀度,AI 评分,血清 RF 含量,踝关节 MMP-3 蛋白相对表达量及踝关节 MMP-3 mRNA 表达量均有不同程度降低,其中秦威组降低最明显,均优于其他中药组;除秦防组及单味秦艽组,雷公藤多苷组、秦威组及秦桑组踝关节 TIMP-1 蛋白相对表达量及踝关节 TIMP-1 mRNA 表达量明显升高,秦威组升高最明显。综上所述,平温相配的秦威组对于风寒湿痹 RA 模型大鼠具有较好的治疗效果,优于平寒相配的秦桑组、平寒相配的秦防组及单味秦艽组,其机制可能与其降低血清 RF 含量及踝关节 MMP-3/TIMP-1,减轻软骨破坏、减少炎性细胞浸润有关。提示

对于寒性疾病,应给予热性药物治疗会取得更好的治疗效果,与中医“寒者热之”治疗原则基本相符。

[参考文献]

[1] 宁乔怡,周静,李东晓,等.苗族药金乌健骨汤对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 NF- κ Bp65,IKK- α 及 IKK- β 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(7):154-159.

[2] 于天一,孔庆喜,陈丽妹,等.类风湿关节炎的病理机制浅析[J].黑龙江医药,2014,27(1):98-102.

[3] 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.

[4] 程仕萍,贾冬梅,周平生,等.基于文本挖掘的中医药治疗类风湿关节炎骨破坏用药规律[J].中医杂志,2016,57(11):970-974.

[5] 王颖,郑炜,刘小平,等.基于中医传承辅助平台的中医药治疗类风湿关节炎的用药规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(23):181-186.

[6] 柳春,梁永林,姚柳伊.类风湿关节炎寒湿痹阻证用药规律研究[J].中国中西医结合杂志,2013,33(9):1269-1272.

[7] 赵建萍,赵秀娟,陈谢谢,等.中药治疗类风湿关节炎的常用药分析[J].医药论坛杂志,2017,38(9):5-7.

[8] 张华东,曹炜.中医对类风湿关节炎发病机制的认识[J].现代中西医结合杂志,2003,12(13):1365-1366.

[9] Fiedorczyk M, Klimiuk P A, Sierakowski S, et al. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with early rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2006, 33(8):1523-1529.

[10] 谢艳莉,罗卉,左晓霞,等.⁹⁹Tc-亚甲基二膦酸盐对胶原诱导性关节炎大鼠的治疗作用及其对滑膜 MMP-3 和 TIMP-1 的影响[J].中华风湿病学杂志,2006,10(7):406-409.

[11] Smolen J S, Inoue D, Nakajima D, et al. Remission rates with tofacitinib treatment in rheumatoid arthritis: a comparison of various remission criteria [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 64(4):728-734.

[12] 周凌.基质金属蛋白酶-3 和超声 US7 评分在类风湿关节炎中的评价[D].上海:第二军医大学,2016.

[13] 殷寒秋,马华,刘春梅,等.瘦素和基质金属蛋白酶-3 与类风湿关节炎骨破坏相关性研究[J].中国免疫学杂志,2013,29(12):1285-1287.

[14] 王晓霞,李小峰,胡学芳.类风湿关节炎治疗前后血清基质金属蛋白酶-3 及普通实验室指标的比较[J].中国药物与临床,2005,5(7):500-502.

[15] Shinozaki M, Inoue E, Nakajima A, et al. Elevation of serum matrix metalloproteinase-3 as a predictive marker for the long-term disability of rheumatoid arthritis patients in a prospective observational cohort IORRA [J]. Mod Rheumatol, 2007, 17(5):403-408.

[16] 苏林冲.金边祛风饮对类风湿关节炎患者血清 MMP-3 和 TIMP-1 的影响[J].湖北民族学院学报:医学版,2010,27(4):8-10.

[17] Tchvetverikov I, Rondday H, El B V, et al. MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(7):881-883.

[18] 杨慧君,钱玉中,杨继章,等.胶原性关节炎大鼠滑膜组织细胞因子基质金属蛋白酶 3 和组织金属蛋白酶抑制剂 1 表达的变化[J].中国组织工程研究,2007,11(32):6402-6405.

[19] Cunnane G, Fitzgerald O, Beeton C, et al. Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(10):2263-2274.

[责任编辑 周冰冰]