

龙胆苦苷对佐剂性关节炎大鼠的抗炎作用

谢小倩¹, 李贺^{1,2}, 王亚乐¹, 刘晶晶¹, 万志杰¹, 罗沙沙¹, 赵则月¹, 李晓天^{1*}
(1. 郑州大学 药学院, 郑州 450001; 2. 郑州大学 第一附属医院, 郑州 450052)

[摘要] **目的:** 通过研究龙胆苦苷(GPS)对佐剂性关节炎大鼠(AA)的治疗作用,探讨其对于大鼠炎症反应的影响。**方法:** 36 只雄性 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 6 只,分别为正常组,模型组,GPS 低、中、高剂量组、甲氨蝶呤(MTX)组。除正常组,其余大鼠建立 AA 模型,在大鼠右后趾足垫内皮内注射 0.1 mL 完全弗氏佐剂(CFA)。造模成功后,各组连续给药 7 d,1 次/d,GPS 低、中、高剂量组灌胃给药剂量为 30,60,120 mg·kg⁻¹,MTX 组腹腔注射给药剂量为 0.2 mg·kg⁻¹,正常组与模型组灌胃给予等量的生理盐水。开始给药后每天使用数字游标卡尺及足趾容积测量仪记录各组大鼠的足厚度、足体积,第 7 天使用小动物活体成像以及苏木素-伊红染色的方法对大鼠的踝关节进行 X 射线检查和病理组织学检查。实验结束后大鼠腹主动脉取血,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒测定血清中白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的水平,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定滑膜组织中 IL-6,TNF-α mRNA 水平。**结果:** 与正常组比较,模型组大鼠大鼠足体积及足厚度,血清 IL-6,TNF-α 水平和滑膜组织中 IL-6,TNF-α mRNA 水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠足体积及足厚度结果显著下降($P<0.01$);血清 TNF-α 水平显著下降($P<0.01$);滑膜组织中 IL-6,TNF-α mRNA 水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。此外,X 射线检查及病理组织学检查结果发现 GPS 对于 AA 大鼠的踝关节也有保护作用。**结论:** 龙胆苦苷通过抑制血清 IL-6,TNF-α 水平及滑膜组织中 IL-6,TNF-α mRNA 水平发挥对 AA 大鼠的保护作用。

[关键词] 龙胆苦苷; 佐剂性关节炎; 类风湿性关节炎; 抗炎
[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)06-0058-06
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200403
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191105.0928.002.html>
[网络出版时间] 2019-11-06 08:26

Anti-inflammatory Effect of Gentiopicroside in Adjuvant-induced Arthritis Rats

XIE Xiao-qian¹, LI He^{1,2}, WANG Ya-le¹, LIU Jing-jing¹, WAN Zhi-jie¹,
LUO Sha-sha¹, ZHAO Ze-yue¹, LI Xiao-tian^{1*}
(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

[Abstract] **Objective:** To study the therapeutic and inflammatory effects of gentiopicroside (GPS) on adjuvant-induced arthritis (AA) rats. **Method:** The 36 male SD rats were randomly divided into six groups, namely the model group, GPS groups (low, medium and high dose), and the methotrexate (MTX) group, with six rats in each group. AA rats were induced through intradermal injection with 0.1 mL complete Freund's adjuvant (CFA) into the right hind paw, except the normal group. After modeling, rats in each group were treated with drugs for 7 days, once a day. The doses were 30, 60, 120 mg·kg⁻¹ in the GPS groups, and 0.2 mg·kg⁻¹ in the MTX group. The normal group and the model group were intragastrically treated with the same volume of normal saline. During the experiment, the paw thickness and paw volume of rats were recorded everyday by the digital vernier calipers and the toe volume measuring instrument. On the seventh day, X-ray and histopathological

[收稿日期] 20190725(015)
[基金项目] 河南省科技攻关项目(162102310540)
[第一作者] 谢小倩,在读硕士,从事药理学研究,E-mail:1648044166@qq.com
[通信作者] * 李晓天,博士,教授,从事药理毒理学和药物代谢动力学研究,Tel:0371-67781889,E-mail:lixt@zzu.edu.cn

examination of the ankle joints were performed by the small animal living imaging instrument and hematoxylin eosin stain. Blood samples were collected from the abdominal aorta at the end of the experiment to determine the levels of interleukin (IL) -6 and tumor necrosis factor (TNF) - α in serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The mRNA levels of IL-6 and TNF- α in synovial tissues were determined by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the normal group, the results of each index in the model group were significantly different ($P < 0.01$). Compared with the model group, the results of paw volume and paw thickness decreased significantly ($P < 0.01$), TNF- α level decreased significantly ($P < 0.01$), and IL-6 and TNF- α mRNA levels decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in drug treated groups. The results of X-ray and histopathological examinations indicated that GPS had a protective effect on the ankle joints of AA rats. **Conclusion:** GPS has the therapeutic effect on AA rats by inhibiting levels of proinflammatory cytokines in serum and relevant mRNA levels in synovial tissues.

[**Key words**] gentiopicroside; adjuvant-induced arthritis; rheumatoid arthritis; anti-inflammation

类风湿性关节炎(RA)是一种与不可逆的关节损伤和运动障碍相关的自身免疫性疾病,可导致进行性关节破坏。除关节外,其还影响其他器官,如脑、肝和肌肉^[1-4]。RA的临床症状主要是慢性炎症、滑膜炎、滑膜增生、关节肿胀和僵硬,并伴有全身炎症和自身抗体产生^[5]。目前,西药对于RA的治疗主要有4类药物。第1类是非甾体类抗炎药具有解热、镇痛、抗炎的作用,但缺乏特异性,治标而不能治本。第2类是慢作用抗风湿药,可抑制异常免疫功能来发挥作用,但存在起效慢、疗程长的问题。第3类是糖皮质激素,抑制体液免疫和细胞免疫发挥作用,但存在严重不良反应,长期服用可导致骨质疏松、诱发或加重感染等^[6]。第4类是生物制剂,其疗效显著,但不良反应可诱发药物性狼疮,增加患心血管疾病的风险等,毒副作用大^[7]。综上,虽然西药对于RA的治疗取得了一定的成效,但仍然存在不良反应。因此,开发新的疗效好副作用小的中药或中药成分越来越成为近来研究的方向。

龙胆苦苷(GPS)是从植物秦艽中分离出来的中药单体化合物。已有研究表明,龙胆苦苷具有保肝、抗炎、松弛平滑肌以及抗氧化作用^[8-11]。2002年,刘占文等^[12]的研究表明GPS对于急性肝损伤的小鼠有明显的肝脏保护作用。陈长勋等^[13]、郭海凤等^[14]、赵文娜等^[15]的研究表明GPS对急慢性炎症均有一定的抑制作用。2018年,CHEN等^[16]的研究表明,GPS可调节核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路抑制破骨细胞生成。以上药理研究结果提示GPS具有治疗RA的潜力。鉴于GPS治疗RA的作用机制尚未完全明确,本研究旨在测定大鼠足肿胀水平;血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)

水平;滑膜组织中IL-6,TNF- α mRNA水平等,来评估中药单体成分GPS对于RA的抗炎效果,并初步探讨相关的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠36只,雄性,体质量(200 $\pm$ 20)g,购自江苏省南京市江宁区青龙山动物繁殖场,合格证号SCXK(苏)2017-0001,饲养于郑州大学IVC动物房,使用许可证号SYXY(苏)2017-0005。所有大鼠适应性喂养7d后开始实验,实验动物均符合郑州大学动物伦理委员会的要求。

1.2 药物及试剂 GPS(成都德思特生物技术有限公司,纯度>98%,批号DST180410-070);甲氨蝶呤(MTX,大连美仑生物技术有限公司,批号J0519A);苏木素-伊红(HE)染液(南京建成生物工程研究所,批号20181115);戊巴比妥钠(北京索莱宝科技有限公司,批号20180620);完全弗氏佐剂(CFA,美国Sigma公司,批号20180915);大鼠TNF- α ,IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京达科为生物技术有限公司,批号分别为20181011,20181013);大鼠超纯RNA提取试剂盒,反转录试剂盒,荧光定量试剂盒(江苏康为世纪生物科技有限公司,批号分别为30332,70339,40403);引物合成由郑州瑞优生物科技有限公司完成。

1.3 仪器 YLS-7B型足趾容积测量仪(山东省医学科学院提供);GNP-9160型恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);Light Cycler 96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士Roche公司);In-vivo MSFXPRO型小动物活体成像仪(美国Bruker公司);AZY1705879型微量紫外分光光度计(美国Thermo公司);XS105型电子天平(美国Mettler Toledo公司);Cetrifuge 5418R型低温

离心机(德国 Eppendorf 公司);Spectra Mr 型全波长酶标仪(美国 Dynex 公司)。

2 方法

2.1 佐剂性关节炎(AA)大鼠模型的建立、分组以及给药 SD 大鼠 36 只,随机分为 6 组,分别为正常组,模型组,GPS 低、中、高剂量组,MTX 组。在大鼠右后趾足垫内皮内注射 CFA($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)0.1 mL 致炎进行造模^[17-18]。正常组大鼠相同位置注射 0.1 mL 盐水。皮内注射时,先用酒精棉球在注射部位消毒。造模后第 1~7 天, GPS 组大鼠分别用 30, 60, 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[15,19] 的龙胆苦苷进行灌胃给药, MTX 组给予甲氨蝶呤 0.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射给药(按临床等效剂量换算),正常组和模型组灌胃给药等剂量的生理盐水。

2.2 AA 大鼠足体积、足厚度的测定 注射 CFA 后,每天用足趾容积测量仪测量各组大鼠的右后足趾容积(每只平行测量 3 次,取平均值),并使用数字游标卡尺测量各组大鼠右后足的足垫厚度。实验第 7 天拍摄各组大鼠右后足的肿胀情况,作为一般状态观察的结果。

2.3 AA 大鼠 X 射线成像 实验第 7 天,采用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,麻醉后将大鼠仰面固定在已经消过毒的样品托盘上。使用小动物活体成像拍摄大鼠踝关节和右后趾,设定曝光时间为 15 s。X 射线检查用于评估踝关节周围软组织肿胀和关节畸形的严重程度。

2.4 AA 大鼠病理组织学检查 将实验所得的大鼠踝关节用 10% 甲醛固定,脱钙,然后进行石蜡包埋、切片,最后 HE 染色,制成病理组织学切片,放于光学显微镜下观察病理组织学变化并摄片。

2.5 ELISA 检测 AA 大鼠血清 IL-6, TNF- α 的含量 实验第 7 天,采用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,逐层打开腹腔,腹主动脉取血收集于离心管中,室温自然凝固 20 min, 2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min (离心半径 6 cm)后,取上层血清。按试剂盒说明书的操作步骤建立标准曲线并测定血清样本在 450 nm 处的吸光度 A,代入标准曲线后求出样本 IL-6, TNF- α 浓度。

2.6 Real-time PCR 检测 AA 大鼠滑膜组织中 IL-6, TNF- α mRNA 水平 将大鼠麻醉后固定,沿膝关节正中纵向切开,剥除韧带层,即可见到淡黄色滑膜组织,使用眼科剪完整分离滑膜组织,并立刻液氮速冻置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存。取出滑膜组织样本,室温自然解冻。所有提取 RNA 的器材无酶处理,滑膜组

织在液氮中充分研磨,采用 trizol 试剂提取总 RNA,使用微量分光光度计测定总的 RNA 浓度,且保证 260 nm 处的 A 与 280 nm 处的 A 比值在 1.8~2.2。反转录体系为 20 μL ,包含 2 000 ng 的总 RNA,反转录程序为 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min,反转录产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。荧光定量采用 50 μL 反应体系,程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 600 s, 2 步扩增法包括变性(95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s)和退火(60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s)40 个循环。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析, β -肌动蛋白(β -actin)为内参基因。TNF- α (上游 5'-AGATGTGGAAC TGGCAGAGG-3' 和下游 5'-GAGCCCATTGCGA ACTTCT-3', 扩增长度 181 bp), IL-6 (上游 5'-CGGAGAGGAGACTTCACAG-3' 和下游 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3', 扩增长度 161 bp), β -actin (上游 5'-GTCGTACCACTGGCATTGTG-3' 和下游 5'-TCTCAGCTGTGCTGCTGAAG-3', 扩增长度 180 bp)^[20]。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析,组间两两比较采用单因素方差分析,检测方法为 Bonferroni test 或 Dunnett's test,所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

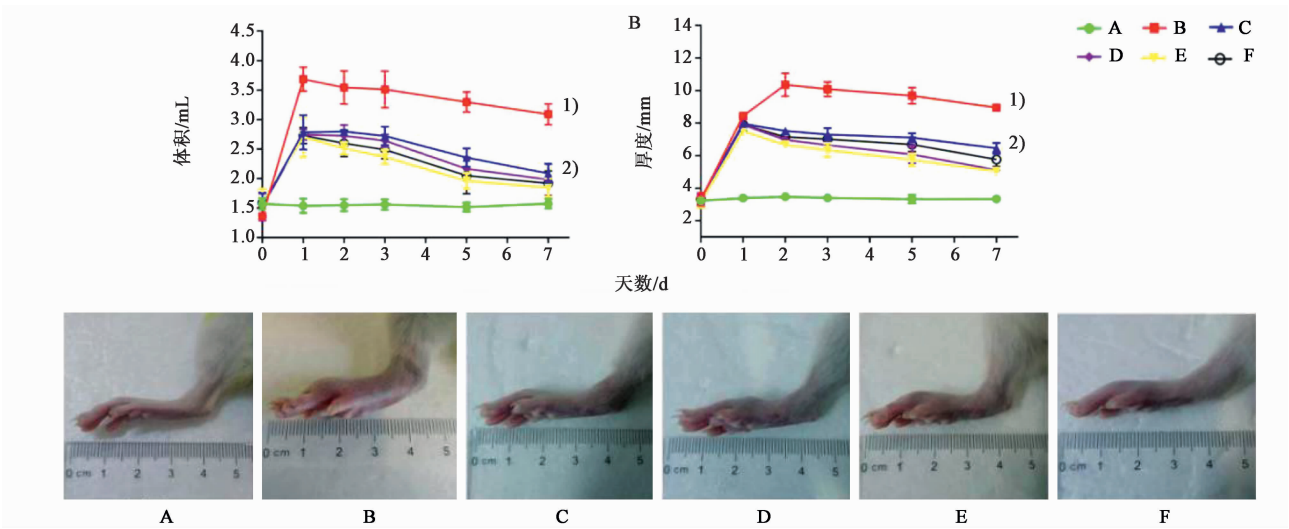
3 结果

3.1 对 AA 大鼠关节肿胀的影响 大鼠注射 CFA 后,1 d 内注射侧出现踝关节明显红肿,且已至整个脚掌及趾关节。造模成功后,使用不同剂量的 GPS 和 MTX 对大鼠进行治疗,给药 7 d 后结果显示与模型组比较, GPS 高、中、低剂量组和 MTX 组足体积、足厚度显著下降($P<0.01$)。一般状态观察结果显示, GPS 中、高剂量组和 MTX 组的足肿胀程度减轻。见图 1。

3.2 对 AA 大鼠血清 TNF- α , IL-6 水平及 TNF- α , IL-6 mRNA 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平及 TNF- α , IL-6 mRNA 水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, GPS 低、中、高剂量组 TNF- α 和 IL-6 水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, GPS 低、中、高剂量组 TNF- α 和 IL-6 mRNA 水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 1。

3.3 对 AA 大鼠踝关节的影响 与正常组比较,模型组大鼠关节周围软组织出现明显肿胀,足趾间隙增大;与模型组比较, GPS 低、中、高剂量组不同程度的减少了关节周围软组织及足趾间隙。见图 2。

3.4 对 AA 大鼠踝关节组织病理学的影响 正常组大鼠的关节软骨表现为具有完整光滑表面,且未



A. 正常组;B. 模型组;C. GPS 低剂量组;D. GPS 中剂量组;E. GPS 高剂量组;F. MTX 组(图 2,3 同);与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

图 1 GPS 对于 AA 大鼠足体积、足厚度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.1 Effect of GPS on paw volume and paw thickness in AA rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 GPS 对 AA 大鼠细胞因子水平及相关 mRNA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of GPS on cytokine levels and related mRNA levels in AA rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\text{TNF-}\alpha/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{IL-6}/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α mRNA 相对表达量	IL-6 mRNA 相对表达量
正常	—	116.31 ± 7.67	76.97 ± 9.35	1.00	1.00
模型	—	$228.13 \pm 11.70^{1)}$	$124.92 \pm 3.83^{1)}$	$21.03 \pm 0.97^{1)}$	$11.10 \pm 0.40^{1)}$
GPS	30	$172.53 \pm 11.92^{3)}$	$104.28 \pm 5.56^{2)}$	$18.09 \pm 0.36^{3)}$	$9.23 \pm 0.60^{2)}$
	60	$164.77 \pm 8.51^{3)}$	$100.58 \pm 7.64^{3)}$	$17.63 \pm 0.68^{3)}$	$9.16 \pm 0.19^{2)}$
	120	$161.96 \pm 11.11^{3)}$	111.14 ± 5.16	$16.81 \pm 0.12^{3)}$	$7.39 \pm 0.75^{3)}$
MTX	0.2	$181.25 \pm 5.79^{3)}$	$97.68 \pm 1.15^{3)}$	$16.25 \pm 0.31^{3)}$	$7.74 \pm 0.91^{3)}$

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

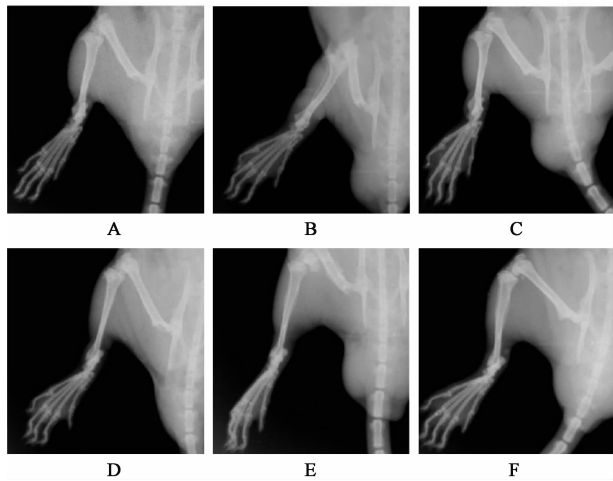


图 2 GPS 对 AA 大鼠踝关节的影响

Fig.2 Effect of GPS on ankle joint of AA rats

观察到软骨损伤,滑膜侵袭或骨破坏,未观察到炎性细胞浸润。模型组大鼠的踝关节病理组织学图片观

察到滑膜组织增生,炎性细胞聚集滑膜组织周围,并向关节腔侵袭,导致关节软骨破坏和骨侵蚀。与模型组比较,GPS 低、中剂量组和 MTX 组可不同程度的缓解 AA 大鼠的症状,减少骨侵蚀,抑制滑膜增生,未观察到明显的炎性细胞浸润,但是仍可观察到软骨损伤,而 GPS 高剂量组未观察到滑膜增生、软骨损伤、骨侵蚀及炎性细胞浸润。见图 3。

4 讨论

RA 是一种伴随慢性炎症的自身免疫病,其特征为滑膜炎,滑膜增生和不可逆的关节损伤^[21],具有较高的致残率。RA 在国内发病率为 0.3% ~ 0.4%,在全世界发病率约为 1%,并且女性患者数量高于男性^[22]。美国风湿学会指出早期干预对于 RA 的治疗是很重要的,能够减少关节损伤和改善功能^[23]。AA 是常见的用来研究 RA 的动物模型,其特征与 RA 具有病理生理学的相似性^[24-25],对抗

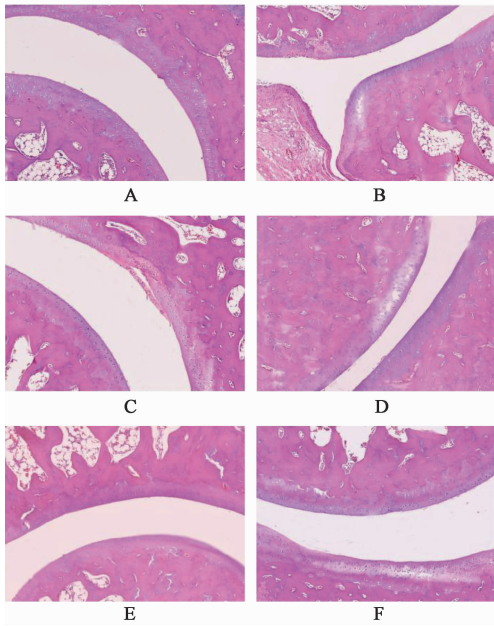


图 3 GPS 对 AA 大鼠踝关节组织病理学的影响 (HE, $\times 100$)
Fig. 3 Effect of GPS on ankle histopathology in AA rats (HE, $\times 100$)

炎药、免疫抑制或免疫调节均敏感,是筛选和研究抗关节炎药物的理想模型^[15]。本研究在于评价 GPS 对于 AA 大鼠原发性病变的影响,根据第四版《药理实验方法学》中对于佐剂性关节炎的描述,在致炎当日给药连续 7 d^[17]。

RA 患者长期处于慢性炎症所引起的心血管疾病是导致死亡的主要原因^[26-27],并且 RA 患者的心血管疾病风险是一般人群的 2 倍左右^[28-29]。因此,慢性炎症的抑制在 RA 的治疗策略中是非常重要的。促炎细胞因子,如 TNF- α 和 IL-6,能够刺激炎症,进而导致不可逆的软骨损伤和骨质侵蚀。因此,减少促炎细胞因子和相关 mRNA 水平有利于抑制炎症,预防关节损伤,减弱结构损伤进展。TNF- α 和 IL-6 都是重要的炎症介质。TNF- α 来自单核细胞, T 细胞,巨噬细胞,其通过激活白细胞,滑膜成纤维细胞,破骨细胞,内皮细胞和抑制调节性 T 细胞的功能来导致炎症和骨侵蚀。因此, TNF- α 在炎症反应中起主导作用^[30]。IL-6 也由多种免疫细胞产生,其激活白细胞,破骨细胞和内皮细胞,促进滑膜成纤维细胞的增殖,并且产生类似 TNF- α 的作用。

与模型组比较, GPS 组显著降低了 AA 大鼠血清中 TNF- α 水平;下调了滑膜组织中 TNF- α 和 IL-6 mRNA 水平;明显改善 AA 大鼠的足肿胀水平。此外, X 射线、病理组织学结果也表明 GPS 减少了 AA 大鼠的软骨损伤、骨侵蚀、滑膜增殖。因此 GPS 通

过抗炎发挥对 AA 大鼠的保护作用。鉴于本实验的研究结果,笔者认为龙胆苦苷是治疗 RA 的潜在药物,其相关治疗作用的分子生物学机制也值得更深入的研究。

综上所述, GPS 可通过降低了大鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 水平以及滑膜组织中 TNF- α 和 IL-6 mRNA 水平来发挥抗炎和对 AA 大鼠的保护作用。

[参考文献]

- [1] FIKRY E M, GAD A M, EID A H, et al. Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 110:878-886.
- [2] LIN J, HE Y, WANG B, et al. Blocking of YY1 reduce neutrophil infiltration by inhibiting IL-8 production via the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Immunol, 2019, 195 (2): 226-236.
- [3] LIU K, ZHANG Y, LIU L, et al. miR-125 regulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rheumatoid arthritis rats via PARP2 [J]. Biosci Rep, 2019, doi: 10.1042/BSR20180890.
- [4] WENDT M M N, DE OLIVEIRA M C, FRANCO-SALLA G B, et al. Fatty acids uptake and oxidation are increased in the liver of rats with adjuvant-induced arthritis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(3): 696-707.
- [5] YU C, LI X, HOU Y, et al. Hyaluronic acid coated acid-sensitive nanoparticles for targeted therapy of adjuvant-induced arthritis in rats [J]. Molecules, 2019, 24(1): E146.
- [6] 马占宾, 张连生, 王永东. 浅析类风湿性关节炎的药物治疗[J]. 医学综述, 2014, 20(12): 2221-2223.
- [7] 冯芳军, 王香玲. 类风湿性关节炎的研究进展[J]. 中医杂志, 2011(S1): 201-203.
- [8] HAN H, XU L, XIONG K, et al. Exploration of hepatoprotective effect of gentiopicroside on alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in rats by comprehensive proteomic and metabolomic signatures [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(4): 1304-1319.
- [9] CHEN C, WANG Y Y, WANG Y X, et al. Gentiopicroside ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via inhibiting inflammatory and fibrotic process [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(4): 2396-2403.

[10] TANG X, YANG Q, YANG F, et al. Target profiling analyses of bile acids in the evaluation of hepatoprotective effect of gentiopicroside on ANIT-induced cholestatic liver injury in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194:63-71.

[11] LYU J, GU W L, CHEN C X. Effect of gentiopicroside on experimental acute pancreatitis induced by retrograde injection of sodium taurocholate into the biliopancreatic duct in rats [J]. Fitoterapia, 2015, 102:127-133.

[12] 刘占文, 陈长勋, 金若敏, 等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(1):47-50.

[13] 陈长勋, 刘占文, 孙峥嵘, 等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J]. 中草药, 2003, 34(9):814-816.

[14] 郭海凤, 朴惠顺. 龙胆苦苷的提取工艺及药理作用研究进展[J]. 延边大学医学学报, 2010, 33(1):70-73.

[15] 赵文娜, 张爱军, 梁杨静, 等. 龙胆苦苷对结肠炎小鼠的治疗作用[J]. 西北药学杂志, 2017, 32(5):632-636.

[16] CHEN F, XIE L, KANG R, et al. Gentiopicroside inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by regulating NF- κ B and JNK signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 100:142-146.

[17] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010:749-750.

[18] POHANKA M, RUTTKAY-NEDECKÝ B, FUSEK J, et al. Melatonin regulates oxidative stress initiated by freund's complete adjuvant[J]. Acta Medica (Hradec Králové), 2015, 58(1):21-24.

[19] 陈雷, 王海波, 孙晓丽, 等. 龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5):903-906.

[20] NAIDU V G M, DINESH B K R, THWIN M M, et al. RANKL targeted peptides inhibit osteoclastogenesis and attenuate adjuvant induced arthritis by inhibiting NF- κ B activation and down regulating inflammatory cytokines [J]. Chemico Biol Interact, 2013, 203(2):467-479.

[21] 何莲花, 李逸群, 王靖霞, 等. 风湿祛痛胶囊对 TNF- α 诱导的人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7):116-121.

[22] 张靖, 周彬, 王彦丽, 等. 抗类风湿性关节炎中药的研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(15):2189-2194.

[23] 王志强, 宫彩霞, 李振彬. 基于信号通路的中药有效成分治疗类风湿关节炎机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8):226-234.

[24] 苏杉, 王蓉, 赵敏, 等. 秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎大鼠类风湿因子、C-反应蛋白及核转录因子- κ B 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19):159-165.

[25] 杜成成, 谭余庆, 沈建英, 等. 双氢青蒿素对两种类风湿关节炎模型的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10):48-56.

[26] MATEEN S, ZAFAR A, MOIN S, et al. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Clin Chim Acta, 2016, 455:161-171.

[27] DADOUN S, ZEBoulON-KTORZA N, COMBEScure C, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis [J]. Joint Bone Spine, 2013, 80(1):29-33.

[28] FIRESTEIN G S, MCINNES I B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Immunity, 2017, 46:183-196.

[29] LIAO K P. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis[J]. Trends Cardiovasc Med, 2017, 27:136-140.

[30] RIDGLEY L A, ANDERSON A E, PRATT A G. What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis? [J]. Curr Opin Rheumatol, 2018, 30:207-214.

[责任编辑 周冰冰]