

苗药验方“四大血”对胶原诱导关节炎大鼠 IL-17 和 VEGF 表达的影响*

袁桃花^{1**}, 李欣芯¹, 陈丽亚¹, 曹胜宇¹, 孙见飞¹, 刘华¹, 吴昌学^{2***}, 吴宁^{1***}

(1. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨苗药验方“四大血”(SX)对牛Ⅱ型胶原蛋白诱导关节炎(CIA)大鼠白细胞介素 17(IL-17)及血管内皮生长因子(VEGF)表达水平的影响。方法: 42 只 SD 大鼠分为空白对照组(NG 组, $n=7$)及造模组($n=35$), 除 NG 组外, 所有大鼠用牛Ⅱ型胶原与等量不完全弗氏佐剂混合乳化剂于尾根部皮下注射致炎、复制 CIA 动物模型, 造模第 14 天将造模组大鼠均分为模型对照组(Mod 组), SX 高、中、低药物治疗组(分别给予 SX 40、20 及 10 g/kg 灌胃, 21 d, $n=7$)及阳性药物对照组(GTW 组, 给予雷公藤多甙片 40 g/kg 灌胃, 21 d, $n=7$); 于造模第 14 天、给药治疗第 7、14 及 21 天时检测足肿胀度(ER); 给药第 21 天时, 观察大鼠膝关节滑膜组织病理改变, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法测定大鼠膝关节滑膜组织 VEGF mRNA 的表达, ELISA 法检测大鼠血清 IL-17 及 VEGF 水平。结果: 与 Mod 组相比, SX 40、20 及 10 g/kg 组、GTW 组大鼠足关节 ER 减轻, 关节滑膜组织炎性细胞浸润明显下降, 纤维组织增生及水肿程度减轻; 治疗第 21 天时, 与 Mod 组比较, SX 40、20 及 10 g/kg 组大鼠膝关节滑膜组织 VEGF mRNA 水平、血清 VEGF 含量均显著降低($P<0.01$), SX 40、20 g/kg 组血清 IL-17 含量显著降低($P<0.01$)。结论: SX 能有效缓解 CIA 病情, 其机制可能与降低 IL-17 和 VEGF 含量有关。

[关键词] 类风湿性关节炎; 白细胞介素 17; 血管内皮生长因子; 苗药验方“四大血”; 牛Ⅱ型胶原蛋白诱导关节炎大鼠模型; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)06-0664-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.009

Effects of Sidaxue on the Expression Level of IL-17 and VEGF in CIA Rats

YUAN Taohua¹, LI Xinxin¹, CHEN Liya¹, CAO Shengyu¹, SUN Jianfei¹,
LIU Hua¹, WU Changxue², WU Ning¹

(1. School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of "Sidaxue" of Miao medicine prescription on the expression levels of IL-17 and VEGF in CIA rats. **Methods:** 42 SD rats were divided into blank control group (NG group, $n=7$) and module group ($n=35$). In addition to the NG group, all the rats were subcutaneously injected with bovine type II collagen and equivalent Freund's adjuvant to induce inflammation and replicate CIA animal model. On the 14th day, the rats in the model group were divided into model control group (Mod group), SX high, medium and low dose treatment group (respectively give SX 40, 20 and 10 g/kg to fill the stomach, 21 d, $n=7$) and positive drug control (GTW group, give GTW 40 g/kg to fill the stomach, 21 d, $n=7$). The degree of swelling was detected on the 14th day of modeling and the 7th, 14th and 21 day of administration. After 21th day of administration, syno-

*[基金项目] 贵州省科技合作计划项目[黔科合 LH 字(2015)7330]; 2014 年贵州省卫生计生委科学技术基金项目; 贵州省 2018 年大学生创新创业训练计划项目(2018520333、2018520352、2018520353)

** 贵州医科大学 2018 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: 348921576@qq.com; 1638210715@qq.com

网络出版时间: 2019-06-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190622.0723.009.html>

vial tissue of the knee joint was taken to prepare pathological tissue sections. The expression of VEGF mRNA in rat synovial tissue was detected by qRT-PCR and the expression levels of IL-17 and VEGF in rat serum were detected by ELISA. **Results:** Compared with the Mod group, the swelling of the rat foot joints in the SX 40, 20 and 10 g/kg groups and the GTW group was alleviated; the infiltration of inflammatory cells was significantly decreased; the fibrous tissue hyperplasia and edema extent were alleviated. Compared with the Mod group on 21th day, mRNA levels of VEGF in SX 40, 20 and 10 g/kg serum were significantly down-regulated ($P < 0.01$), and IL-17 levels in SX 40 g/kg and 20 g/kg groups were decreased ($P < 0.01$). **Conclusions:** SX can effectively alleviate the condition of CIA by reducing the expression levels of IL-17 and VEGF.

[**Key words**] rheumatoid arthritis; interleukin 17; vascular endothelial growth factor; Miao medicine prescription "Sidaxue"; bovine type II collagen induced arthritis rat model; rats, Sprague-Dawley

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种侵犯滑膜关节的慢性、炎症性自身免疫系统疾病^[1], 主要表现为关节红肿、畸形等, 致残率在所有关节病中高居首位^[2-3]。目前, 临床上没有特异且有效的治疗 RA 药物^[4-5]。苗药验方“四大血” (sidaxue, SX) 由苗药黑骨藤、见血飞、五花血藤、鸡血藤 4 味藤本药材组成, 是苗族地区治疗气血瘀阻等疾病的天然药方, 也是其作为治疗 RA 的特有药方, 但至今仅为经验用药阶段, 关于其治疗 RA 的作用机制研究较少^[6]。本课题组前期研究结果显示, SX 对佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠有良好的疗效, 能缓解关节肿胀程度、抑制关节滑膜组织增生等病理表现^[7-8]。胶原诱导关节炎大鼠 (collagen induced arthritis in rats, CIA) 关节局部的炎症等病理表现与 RA 相似, 是研究 RA 的常用模型^[9-10], 本研究通过复制 CIA 大鼠动物模型, 采用不同剂量的 SX 对其治疗, 观察 SX 治疗前后 CIA 大鼠关节足肿胀度 (ER)、病理组织变化, 分析 SX 对 CIA 大鼠白细胞介素 17 (interleukin-17, IL-17)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 含量的影响, 评估 SX 对 RA 的治疗效果、探讨其作用机制, 为临床开发 SX 提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及药物 42 只 SD (Sprague Dawley) 大鼠, 雌雄各半, 体质量 180 ~ 220 g, 由 Chongqing Tengxin Biological Technology Co. Ltd 提供, 合格证号 [SCXK (渝) 2007. 005]; 苗药 SX 由贵州中医药大学苗医药教研室提供并经田振华副教授鉴定, 雷公藤多苷片购自 HUANGSHI FEIYUN CO. LTD,

20080301; Freund' S Complete Adjuvant (IFA) 购自美国 Sigma 公司, 批号 033K8933。

1.1.2 主要试剂 大鼠 IL-17 ELISA 试剂盒购于 Shenzhen zike Biological Technology, 大鼠 VEGF 试剂盒购于安徽巧伊生物技术有限公司, Prime ScriptRT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 购自 TaKaRa Biomedical Technology (Beijing), AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 购自 Vazyme Biotech Co, Ltd, 多功能酶标仪为美国, 荧光定量 pCR 仪为 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 42 只 SD 大鼠随机分为空白对照组 (NG 组, $n = 7$) 和造模组 ($n = 35$), 造模组大鼠用牛 II 型胶原适量与等量不完全弗氏佐剂混合乳化剂于尾根部皮下注射复制 CIA 动物模型, 造模第 14 天时将造模组大鼠分为 5 组, 即模型对照组 (Mod 组, $n = 7$), SX 高、中、低药物治疗组 (40、20、10 g/kg 组, $n = 7$) 以及阳性药物对照组 (雷公藤多苷片, GTW 组, $n = 7$)。

1.2.2 构建 CIA 动物模型 将 4 g/L 牛 II 型胶原与等量不完全弗氏佐剂在冰上充分混匀乳化后, 滴一滴于水中不扩散, 取乳剂 200 μ L 于大鼠尾根及左足垫部皮下注射, NG 组用等量生理盐水 (physiological saline, NS) 注射, 一周后加强免疫, 总计 300 μ L; 造模第 14 天时, 通过关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分判定造模情况^[11]。AI 评分标准: 关节无红肿为 0 分, 关节有红色斑点或轻度肿胀为 1 分, 关节病变并有中度红肿为 2 分, 关节除中度红肿外并伴有轻度功能障碍为 3 分, 关节重度红肿、僵直甚至畸形并伴有严重功能障碍为 4 分; AI 评分 ≥ 2 分为造模成功。

1.2.3 SX 制备 给药单味苗药五花血藤、鸡血

藤、见血飞、黑骨藤按照 15:22:15:8 的比例配制,共取 2 000 g,参考文献[6-8]煎制成浓度为 4 kg/L 的试药(按生药量计),置于 4 °C 冰箱备用。给药方案:造模成功后,药物治疗组大鼠按 0.1 L/kg 剂量给予 SX 进行灌胃治疗,SX 40 g/kg、20 g/kg、10 g/kg 组浓度依次为 4 g/mL、2 g/mL 及 1 g/mL,GTW 组按 4 g/mL 进行灌胃,NG 组和 Mod 组用等量 NS 灌胃,灌胃给药 21 d。

1.3 观察指标

1.3.1 足趾 ER 测量 造模前及造模第 7、14 天,给药第 7、14 及 21 天时,采用自制足趾仪测量大鼠左右后足趾容积,反复 3 次取均值,计算足趾 ER,公式为 $ER(\%) = (V_1 - V_2) / V_2 \times 100\%$ (其中 V_2 为造模前的容积, V_1 造模后的容积)。

1.3.2 标本采集及大鼠血清 IL-17、VEGF 的含量 给药第 21 天,最后一次 SX 灌胃结束时,用 10% 水合氯醛麻醉大鼠,心脏取血,常温下垂直静置 2 h,见淡黄色血清析出后,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法测定大鼠血清 IL-17、VEGF 含量,操作步骤按试剂盒说明书进行;同时取出大鼠滑膜组织,部分制作病理组织切片,观察其炎症反应,部分用于检测 VEGF mRNA 表达。

1.3.3 大鼠关节滑膜组织的炎症反应及 VEGF mRNA 表达 取大鼠关节滑膜组织制作的病理组织切片,4% 中性甲醛固定液中进行固定,观察其炎症反应;采用实时荧光定量 PCR (quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 法检测大鼠关节滑膜组织 VEGF mRNA 表达水平,根据 GenBank 提供的大鼠 VEGF mRNA 序列 (AY702972)、GAPDH mRNA 序列 (内对照, NM_017008); 进行引物设计并合成,

VEGF 上游引物为 5' CCTGGCTTTACTGCTGTACCT 3', 下游引物为 5' GCTGGTAGACGTCCATGAACT 3'; GAPDH 上游引物为 5' GTGCCAAAAGGTCATCATCTC 3', 下游引物为 5' GGTTACACCCATCACAAACATG 3'; 提取样本总 RNA, 溶于 DEPC 水中 (-80 °C 保存备用), 用超微量紫外分光光度计测 RNA 样品 $A_{260/280}$ 值及浓度, 按照逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA 样本, 采用 pCR 操作扩增目的基因, 条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s 循环 40 次, 溶解曲线扩增条件为 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理实验数据。

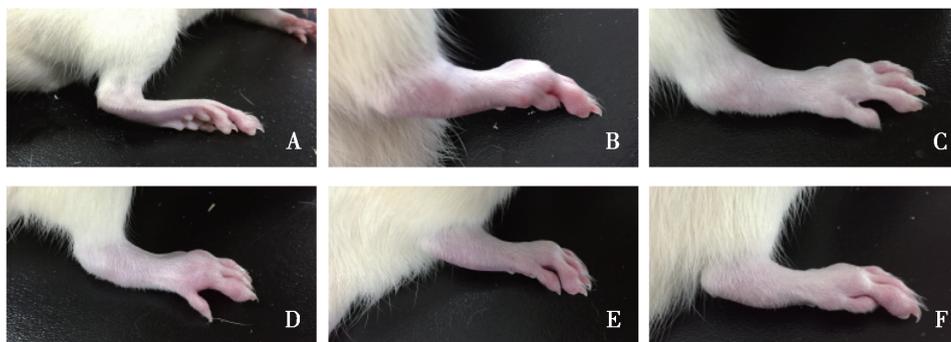
1.4 统计学分析

用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析, 结果用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间的数据比较采用单因素方差法 (One-Way-ANOVA) 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠足趾外观变化

在造模第 7 天时, NG 组大鼠生理状态正常、毛色光滑, 体重增加。而 Mod 组部分大鼠注射乳化剂的关节出现轻微红肿, 活跃程度降低, 毛色光泽下降; 造模第 14 天时, Mod 组大鼠致炎关节基本都出现不同程度的红肿, 甚至无法直立行走, 活动程度整体降低, 毛色缺乏光泽。药物治疗第 7 天时, 与 NG 组比较, SX 40 g/kg、20 g/kg 组、GTW 组大鼠活动程度稍微变大, 部分大鼠关节红肿开始减退; 治疗第 14 天时, 除 SX 10 g/kg 组外, 各治疗组大鼠关节红肿情况都开始得到缓解; 治疗第 21 天时, SX 10 g/kg 组小部分大鼠关节有轻度红肿, 但均能正常行走, 其余各治疗组大鼠关节红肿消退, 大鼠状态良好。见图 1。



注: A、B、C、D、E 及 F 依次为 NG、Mod、GTW、SX 40 g/kg、SX 20 g/kg 及 SX 10 g/kg 组

图 1 各组大鼠药物治疗第 21 天时足趾外观

Fig. 1 Joint swelling degree of rats in each group after 21th day of drug treatment

2.2 大鼠后足趾关节 ER

造模第 14 天时,除 NG 组外,其余各组大鼠左右后足趾均表现红肿,经过 SX 及 GTW 治疗后,灌胃给药第 7 天时,与 Mod 组比较,各组大鼠后足趾

ER 均不同程度下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),药物治疗第 14、21 天时,SX 和 GTW 治疗组与 Mod 组比较,后足趾 ER 均下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠后足趾关节 ER ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Joint swelling degree of rats in each group

分组	造模第 14 天	给药		
		第 7 天	第 14 天	第 21 天
NG 组	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.01	0.15 ± 0.04
Mod 组	0.57 ± 0.07 ⁽¹⁾	0.85 ± 0.22 ⁽¹⁾	0.82 ± 0.24 ⁽¹⁾	0.88 ± 0.23 ⁽¹⁾
GTW 组	0.43 ± 0.08 ⁽¹⁾	0.37 ± 0.16 ⁽¹⁾⁽³⁾	0.29 ± 0.04 ⁽¹⁾⁽³⁾	0.20 ± 0.06 ⁽¹⁾⁽³⁾
40 g/kg 组	0.42 ± 0.09 ⁽¹⁾	0.35 ± 0.16 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.27 ± 0.07 ⁽¹⁾⁽³⁾	0.15 ± 0.01 ⁽¹⁾⁽³⁾
20 g/kg 组	0.50 ± 0.02 ⁽¹⁾	0.39 ± 0.20 ⁽¹⁾	0.30 ± 0.14 ⁽¹⁾⁽³⁾	0.17 ± 0.15 ⁽¹⁾⁽³⁾
10 g/kg 组	0.54 ± 0.11 ⁽¹⁾	0.41 ± 0.11 ⁽¹⁾	0.39 ± 0.12 ⁽¹⁾⁽³⁾	0.19 ± 0.07 ⁽¹⁾⁽³⁾

⁽¹⁾与 NG 组比较, $P < 0.01$;与 Mod 组比较, ⁽²⁾ $P < 0.05$, ⁽³⁾ $P < 0.01$

2.3 血清 IL-17 及 VEGF 含量

给药第 21 天时,与 NG 组比较,Mod 组血清 IL-17、VEGF 含量升高 ($P < 0.05$);与 Mod 组比较,NG、SX 40 g/kg 组血清 IL-17 含量下降 ($P < 0.05$),SX 20 g/kg、GTW 组血清 IL-17 含量下降更明显 ($P < 0.01$);与 Mod 组比较,SX 40、20、10 g/kg 组及 GTW 组血清中 VEGF 含量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

增生及炎细胞浸润现象均减少;而 SX 40、20 g/kg 组及 GTW 组仅可见少量的炎性细胞浸润及新生组织血管,增生较少,没有明显的软骨及骨组织的破坏,提示滑膜组织病理状况明显改善。

2.5 SX 对 CIA 大鼠滑膜关节组织 VEGF mRNA 表达的影响

给药第 21 天时,与 NG 组相比,Mod 组 VEGF mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05$);与 Mod 组比较,SX 40 g/kg、10 g/kg 组 VEGF mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$);SX 各组与 GTW 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 各组大鼠血清 IL-17 及 VEGF 含量 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Serum IL-17, VEGF content in each group of CIA rats

组别	血清 (ng/L)	
	IL-17 浓度	VEGF 浓度
NG 组	158.46 ± 14.44 ⁽³⁾	50.55 ± 8.62 ⁽⁴⁾
Mod 组	188.42 ± 22.14 ⁽¹⁾	159.71 ± 5.69 ⁽²⁾
GTW 组	139.31 ± 16.71 ⁽⁴⁾	64.92 ± 5.60 ⁽⁴⁾
SX 40 g/kg 组	153.22 ± 17.28 ⁽⁴⁾	110.05 ± 39.20 ⁽⁴⁾
SX 20 g/kg 组	156.05 ± 17.60 ⁽³⁾	88.92 ± 10.83 ⁽⁴⁾
SX 10 g/kg 组	182.87 ± 14.25	85.64 ± 10.41 ⁽⁴⁾

与 NG 组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$;与 Mod 组比较, ⁽³⁾ $P < 0.05$, ⁽⁴⁾ $P < 0.01$

2.4 大鼠滑膜组织 HE 染色

从图 2 中可以看出,NG 组大鼠滑膜组织由 1~2 层滑膜细胞构成,分布紧密、整齐,无炎症细胞的浸润及血管增生;Mod 组大鼠滑膜组织排列紊乱、增生明显,多达 5~6 层排列,且组织水肿严重,周围可见大量炎性细胞浸润、血管增生现象,在软骨面,还可见部分软骨细胞增生。SX 10 g/kg 组较 Mod 组的滑膜组织水肿程度较 Mod 组有所改善,

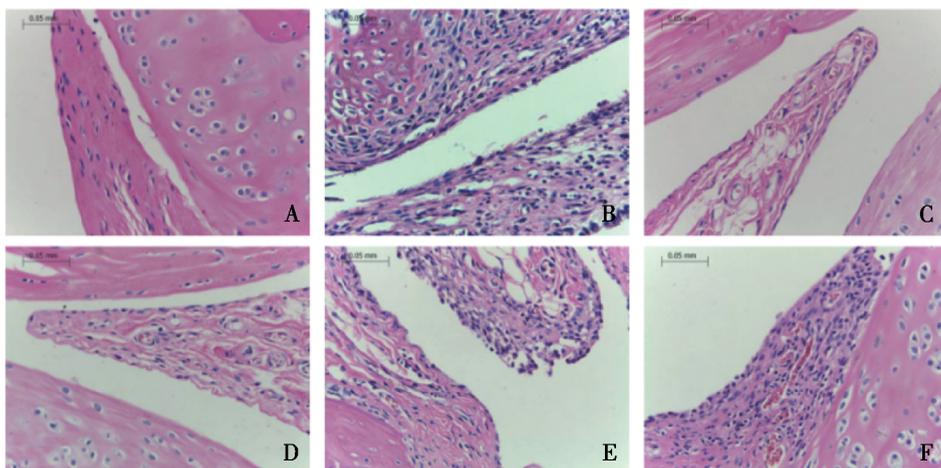
表 3 VEGF mRNA 在大鼠滑膜组织中的表达
Tab. 3 Expression of VEGF mRNA in synovial tissue of CIA rats

组别	VEGF mRNA 表达
NG 组	0.118 ± 0.033
Mod 组	1.000 ± 0.000 ⁽¹⁾
GTW 组	0.174 ± 0.034 ⁽¹⁾
SX 40 g/kg 组	0.024 ± 0.034 ⁽¹⁾⁽²⁾
SX 20 g/kg 组	0.437 ± 0.067
SX 10 g/kg 组	0.034 ± 0.032 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾与 NG 组比较, $P < 0.05$, ⁽²⁾与 Mod 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

RA 作为一种系统性的慢性自身免疫疾病,在全球均有发病,在我国,其患病率为 0.32% ~ 0.36%,是造成人类丧失劳动力和致残的主要原因之一^[1-3],其病变可以累及全身不同脏器(如肺、



注:A、B、C、D、E及F依次为NG、Mod、GTW、SX 40 g/kg、SX 20 g/kg及SX 10 g/kg组

图2 各组大鼠滑膜组织 HE 染色结果(400 ×)

Fig.2 Pathological tissue section of each group

心、肾、神经及消化系统等)^[12],但尤以关节受累最为突出,其病理表现为多发性外周关节炎,关节局部红肿,严重致关节畸形,病理变化为增生性滑膜炎,关节软骨破坏、骨侵蚀,关节腔内有炎性细胞浸润^[13]。目前,临床上没有治疗RA的特效药物,且常用的药物如改善关节炎症状的非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、改变病情抗风湿药(disease modifying anti-rheumatic drug, DMARDs)等均具有一定的毒副作用^[14]。RA作为难治性疾病之一,目前无法根治,国内外学者为了更好地对RA开展研究,根据RA的病因病机、病理学、免疫学特点等进行了大量的动物试验,形成了一些较为成熟的AA、CIA模型动物模型,二者在临床表现、实验室指标和病理机制上与人RA有着相似的特点,是常用的两种RA模型,其中CIA模型较为稳定,是研究RA发病机制和筛选治疗RA药物的理想模型,也是目前国际上公认的关节炎模型^[9-10]。而RA作为一种慢性免疫性炎症疾病,目前发病机理尚不清楚,而机体炎症反应与多种促炎细胞因子密切相关,在RA中白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、IL-17、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子介导的炎症反应在RA滑膜的病变过程中起重要作用,其中IL-17已被证实在组织炎症、自身免疫和宿主防御机制中发挥着关键作用,是一种较强的炎性细胞因子,RA患者关节滑液中出现高水平IL-17^[15-17]。目前许多研究证实炎症因子(如TNF- α 、

IL- 1β)的异常表达是RA发病及血管形成的重要原因,近年来,人们发现在RA的滑膜病变过程中有丰富的血管形成因子的表达,其中VEGF是一种特异作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子,是促血管生成的主要因素之一,是目前已知的作用最强的促血管生成因子,其能增加RA微血管通透性,促使RA血管新生,加重血管翳症状^[18-20]。实验研究证实,SX能减轻CIA大鼠关节肿胀程度,较好的改善CIA模型大鼠关节组织病理状况,且SX 40 g/kg改善明显,SX能下调血清中IL-17及VEGF的表达,且下调VEGF的水平比IL-17的稍高,初步说明在CIA大鼠的病理表现中,SX下调血管因子VEGF的作用比炎症因子IL-17的作用稍强。同时,本研究还检测出SX 10 g/kg对CIA大鼠血清IL-17的影响较小,而对于VEGF则是SX 40 g/kg影响相对较小,说明RA血管翳程度与炎症反应在一定程度上不呈正向发展关系。

综上所述,SX能通过调节IL-17、VEGF含量的变化对CIA大鼠病情的改善起到积极的作用,这为下一步深入研究SX通过调控VEGF及IL-17发挥对RA治疗的具体作用机制研究奠定基础。

4 参考文献

- [1] ANDERSSON K M E, WASÉN C, JUZOKAITE L, et al. Inflammation in the hippocampus affects IGF1 receptor signaling and contributes to neurological sequelae in rheu-

- matoid arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, 115 (51): 12063 - 12072.
- [2] NAKAMURA H, SHIMAMURA S, YASUDA S, et al. Ectopic RASGRP2 (CalDAG-GEFI) expression in rheumatoid synovium contributes to the development of destructive arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(12): 1765 - 1772.
- [3] FEARON U, CANAVAN M, BINIECKA M, et al. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(7): 385 - 397.
- [4] KAN H J, DYAGILEV K, SCHULAM P, et al. Factors associated with physicians' prescriptions for rheumatoid arthritis drugs not filled by patients[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2018, 20(1): 1 - 12.
- [5] 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.
- [6] 莫晓川, 冯光霞, 曾佳, 等. 苗药四大血对佐剂性关节炎大鼠抗炎作用研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2015, 17(1): 15 - 18.
- [7] 吴昌学, 吴宁, 冯光霞, 等. 苗药方四大血对佐剂性类风湿关节炎大鼠 TNF- α 及 IL-1 β 表达的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2014, 39(1): 27 - 29.
- [8] 吴宁, 曾佳, 王时敏, 等. 苗药四大血对大鼠佐剂性关节炎作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(2): 120 - 123.
- [9] 罗薇, 任继刚, 周海燕, 等. 中医药研究中类风湿性关节炎动物模型建立的思考[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(2): 292 - 294.
- [10] FEUERHERM A J, DENNIS E A, JOHANSEN B. Cytosolic group IVA phospholipase A2 inhibitors, AVX001 and AVX002, ameliorate collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 29 - 42.
- [11] HUNG L H, WU C H, LIN B F, et al. Hyperimmune colostrum alleviates rheumatoid arthritis in a collagen-induced arthritis murine model[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(5): 3778 - 3787.
- [12] LEE Y H, BAE S C. Correlation between circulating VEGF levels and disease activity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis[J]. *Z Rheumatol*, 2018, 77(3): 240 - 248.
- [13] 赵智明, 蔡辉. 类风湿关节炎表观遗传学研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2017(4): 634 - 637.
- [14] VAN MULLIGEN E, DE JONG PHP, KUIJPER T M, et al. Gradual tapering TNF inhibitors versus conventional synthetic DMARDs after achieving controlled disease in patients with rheumatoid arthritis: first-year results of the randomised controlled TARA study [J]. *Ann. Rheum Dis*, 2019, 78(6): 746 - 753.
- [15] 郑美思, 江启煜, 赵琦瑶, 等. 基于生物信息学的桂枝芍药知母汤治疗 RA 的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017(10): 195 - 200.
- [16] MARWA O S, KALTHOUM T, WAJIB K, et al. Association of IL17A and IL17F genes with Rheumatoid Arthritis disease and the impact of genetic polymorphisms on response to treatment [J]. *Immunology Letters*, 2017, 183: 24 - 36.
- [17] SVENSSON M N, DOODY K M, SCHMIEDEL B J, et al. Reduced expression of phosphatase PTPN2 promotes pathogenic conversion of Tregs in autoimmunity [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3): 1193 - 1210.
- [18] DOSS H M, GANESAN R. An herbal compound ameliorates rheumatoid arthritis by the suppression of inflammatory immune responses in rats with adjuvant-induced arthritis and on cultured fibroblast like synoviocytes via the inhibition of the NF- κ B signaling pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 258: 175 - 186.
- [19] BOUSSEAU S, VERGORI L, SOLETTI R, et al. Glycosylation as new pharmacological strategies for diseases associated with excessive angiogenesis [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 191: 92 - 122.
- [20] BAE S C, LEE Y H. Association between the functional pTpN22 G788A (R263Q) polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: A meta-analysis[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 2018, 64(5): 46 - 51.

(2019-03-09 收稿, 2019-05-30 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张文龙