

桂芍知母汤调控 cGAS-STING-NF- κ B 对 CIA 大鼠骨保护机制研究

丁明辉, 徐鹏刚*

西安市第五医院风湿免疫科七病区, 陕西 西安 710082

摘要: 目的 基于 cGAS-STING-NF- κ B 通路探讨桂枝芍药知母汤在控制胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠炎症活动及起到骨保护作用的相关分子机制。方法 Wistar 大鼠 60 只, 随机分为正常组、模型组、甲氨蝶呤组及桂芍知母汤低、中、高剂量组, 每组 10 只, 干预 4 周, qPCR 法检测滑膜组织 OPG、RANK、RANKL mRNA 表达情况, ELISA 法检测大鼠血清 cGAMP、IL-6 水平。结果 与正常组大鼠相比, 模型组大鼠 RANK、RANKL mRNA 表达上调, 而 OPG mRNA 表达下降 ($P < 0.05$), 各治疗组与模型组相比, OPG mRNA 表达升高, RANK、RANKL mRNA 表达有所下降 ($P < 0.05$); 桂芍知母汤大剂量组对 OPG mRNA 上调较明显 ($P < 0.05$); 随着药物浓度逐渐增加, RANK、RANKL mRNA 表达抑制进一步加强 ($P < 0.05$)。模型组血清 cGAMP、IL-6 水平较正常组升高 ($P < 0.05$); 各药物治疗组血清 cGAMP、IL-6 水平低于模型组, 其中桂芍知母汤高剂量组改善尤为突出 ($P < 0.05$)。结论 桂枝芍药知母汤能调控 cGAS-STING-NF- κ B 轴的相关细胞因子表达, 从而缓解 CIA 大鼠关节炎症反应, 并抑制 RANK/RANKL 等骨破坏相关因子的表达, 起到一定的骨保护作用。

关键词: 类风湿关节炎; 桂枝芍药知母汤; 骨质破坏

The Bone Protection Mechanism of Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction By Regulating cGAS-STING-NF- κ B axis in CIA Rats

Ding Minghui, Xu Penggang*

Xi'an Fifth Hospital, Xi'an, Shaanxi 710082

Abstract: Objective To explore the molecular mechanisms by which the Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction controls the inflammatory activity and exerts bone-protective effects in collagen-induced arthritis (CIA) rats through the cGAS-STING-NF- κ B pathway. Methods 60 Wistar rats were randomly divided into 6 groups, with 10 rats in each group. The intervention lasted for 4 weeks. QPCR was used to detect the mRNA expression of OPG, RANK, and RANKL in the synovial tissue. ELISA was used to measure the levels of cGAMP and IL-6 in the rat serum. Results The expression of RANK and RANKL mRNA in the model group rats was upregulated, while the expression of OPG mRNA was decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of OPG mRNA in each treatment group was increased, and the expression of RANK and RANKL mRNA was somewhat decreased ($P < 0.05$). The high-dose group showed a more significant upregulation of OPG mRNA ($P < 0.05$). As the drug concentration gradually increased, the inhibition of RANK and RANKL mRNA expression was further enhanced ($P < 0.05$). The levels of cGAMP and IL-6 in the serum of the model group were higher than those in the normal group ($P < 0.05$). The levels of cGAMP and IL-6 in the serum of each drug treatment group were lower than those in the model group, with the high-dose group showing particularly prominent improvement ($P < 0.05$). Conclusion Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction can regulate the expression of cytokines related to the cGAS-STING-NF- κ B axis, thereby alleviating joint inflammation in CIA rats and inhibiting the expression of bone destruction-related factors such as RANK/RANKL, playing a certain role in bone protection.

Keywords: rheumatoid arthritis; Guishao Zhimu Decoction; bone destruction

类风湿关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 作为自身免疫性疾病中主要侵犯患者外周关节的疾病, 会造成患者软骨、软骨下骨、关节周围组织等广泛的慢性炎症累积, 引起关节面虫蚀样改变, 关节间隙逐渐变窄, 最终导致关节畸形及失能, 许多患者往往因此丧失劳动能力, 给患者及家庭均带来极大心理及经济负担^[1]。RA 目前全球的患病率为 1%, 我国的患病率为 0.32% ~ 0.36%, 在我国约有 500 万患者^[2]。RA 患者往往长期应用非甾体抗炎药、免疫抑制剂、糖皮质激素、生物制剂等药物治疗, 其中糖皮质激素长期、不规范应用还会加重患者骨

基金项目 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2022JQ-803); 西安市第五医院院级科研项目 (2023dx02); 国家中医药管理局第五批全国中医临床优秀人才研修项目 (国中医药人教函〔2022〕1号)。

作者简介: 丁明辉, 西安市第五医院, 邮编: 710082, E-mail: manoastella@163.com

通信作者: 徐鹏刚, 西安市第五医院, 邮编: 710082, E-mail: xupg2006@163.com

质疏松病情，而由于不良反应或高昂费用，患者往往依从性较差，且药效与药物副反应间相互矛盾，此时配合中医治疗，往往事半功倍，达到“减毒增效”的结果。免疫系统功能的紊乱或亢进，可能是RA发病关键因素，但其调控机制复杂，至今仍无法被完全阐明，因此目前治疗上仍以改善患者症状、减轻炎症活动、延缓骨质破坏为主要目的。长期研究显示，核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路介导体内许多炎症活动的发生，在RA病程发展中起到了重要作用^[1,2]。RANKL作为NF- κ B受体配体，是NF- κ B的激活剂，其可与NF- κ B结合并诱导单核细胞/巨噬细胞谱系细胞分化为破骨细胞，进一步导致破骨细胞前体成熟。在NF- κ B介导的炎症活动过程中，RANKL/OPG通路同时被激活，导致骨溶解、骨质破坏，因此对其干预对类风湿关节炎患者骨保护起着十分重要的意义^[3]。而前期研究显示，cGAS/STING作为NF- κ B的上游信号，其收到感染、应激等外部刺激后，会激活NF- κ B，产生IL-1 β 、TNF- α 、IL-6等炎症因子^[4]，据此假设RANKL/OPG通路被进一步激活，加重RA骨破坏的发生。类风湿关节炎多被归属于“尪痹”的诊断范畴，“尪”体现了患者关节及骨破坏的严重性。前期实验证明，桂枝芍药知母汤能通过抑制cGAS/STING/NF- κ B通路从而降低炎症因子水平，改善CIA模型鼠关节肿胀情况，本研究将在此基础上进一步探讨其对下游RANKL/OPG通路的影响，以进一步明确桂枝芍药知母汤发挥对RA骨保护作用的相关分子机制。

一、实验材料与方法

(一) 实验动物

选择雌性SPF级Wistar大鼠共60只，体重110 \pm 10g，鼠龄6~8周，由河南斯克西斯提供，许可证号：SCXK(豫)2020-0005。所有大鼠饲养在室温20~26 $^{\circ}$ C、相对湿度40%~70%的环境中，自由摄食和饮水，适应性饲养7天后开始研究。

(二) 药物

桂枝芍药知母汤药物组成：桂枝12g、白芍9g、知母12g、生姜10g、甘草6g、防风12g、白术15g、麻黄6g、附片10g。中药材购于西安市第五医院门诊中药房，由西安市第五医院药剂科鉴定并煎煮，制成浓度分别为0.958g/mL、1.916g/mL、2.874g/mL的水煎液。

甲氨蝶呤片：上海信谊，5mg/片，国药准字H31020644，批号：070104，用前以蒸馏水配制成0.104mg/mL的混悬液。

(三) 主要试剂与仪器

牛II型胶原液(Chondrex, 20022)，完全弗氏佐剂(普西唐, F10125)，电子天平(福建华志电子科技有限公司, HZT-FA100)，游标卡尺(绿林)，高纯度琼脂糖(Monad, ME00101S)，2 \times RNA Loading Buffer(Beyotime, 090922221024)，安全核酸染料(Monad, 00006214)，ChamQ SYBR Qpcr Master MIX(Vazyme, Q311-02)，Nuclease-Free Water(Monad)，无水乙醇(国药集团10009218)，反转录试剂盒(Thermo, 622)，酶标分析仪(Rayto, RT-6100)，大鼠cGAMP酶联免疫吸附试剂盒(九邦生物, ZC-55576-J)、大鼠NF- κ B酶联免疫吸附试剂盒(碧云天, SN368)等。

(四) 实验方法

适应性饲养后的大鼠根据体重按随机数字表法进行分组，其中10只为正常组，其余50只建立胶原诱导性关节炎(CIA)模型。初次免疫后28d计算大鼠的关节炎指数(AI)，AI评分 \geq 1分为关节炎发病，AI评分 \geq 4分表示造模成功。将造模成功大鼠随机分为模型组、雷公藤组及中药低、中、高剂量组，每组10只。其中正常组和模型组大鼠给予蒸馏水灌胃；甲氨蝶呤组给予配制好浓度的药物混悬液灌胃，频次为1次/周，其余时间给予蒸馏水灌胃1次/日；中药低、中、高剂量组分别给予相剂量的桂枝芍药知母汤灌胃，1次/日，共干预4周。

(五) 检测指标及方法

1. 大鼠一般状况及足爪肿胀情况

干预期间观察各组大鼠进食、饮水、精神等一般状况。观察大鼠造模前、造模期间及药物干预后的足爪肿胀情况并记录，判断造模及药效情况。大鼠末次给药后24h干预腹腔注射戊巴比妥钠(0.025g/kg)麻醉，麻醉后进行后续实验。

2. qPCR法检测大鼠膝关节滑膜组织RANK、RANKL、OPG mRNA表达

每组取3只大鼠，剥离韧带下滑膜组织后迅速投入液氮冻存。提取RNA后取10 μ lRNA产物上样于琼脂凝胶中电泳，在紫外分光光度计上测定总RNA浓度及纯度；行qPCR法测定RANK、RANKL、OPG mRNA在CIA大鼠滑膜组织中的表达，采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算各目的基因的相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列设计

引物名称	类型	序列(5' -3')	长度(bp)
Actin	F	AGCAGCAGCGAAAGTGC	126
	R	GATGATGATAATGATGATGGTGTGCAG	
RANK	F	GACTCTCCAGGTCCTCTCCA	133
	R	CACAGGGCAGACACACT	
RANKL	F	CGCCAACATTTGCTTTCCGG	119
	R	CAGGTACTTGCCGTAGTCTCG	
OPG	F	CTACTGCACCCTGGACATCA	180
	R	TAGCTCTGCCTATCTTGGAACTC	

3. 血清学指标

麻醉后的大鼠行腹主动脉取血，3000r/min离心10分钟，按照试剂盒说明书采用ELISA法检测血清中cGAMP、IL-6水平，cGAS的活性通过检测血清中cGAMP的水平来间接评估，IL-6的水平提示NF- κ B激活情况。

(六) 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行数据分析，以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)，两两比较采用LSD检验，以P<0.05为有统计学意义。

二、结果

(一) 大鼠一般状况

造模及药物干预期间，中药高剂量组有1只动物死亡，其余大

鼠均存活；正常组大鼠均精神良好，反应灵活，体重逐渐增长；各模型组大鼠造模后出现关节肿胀，导致活动量减少，进食量相应减少，精神不济，毛发枯槁；各药物干预组大鼠因关节肿胀改善，活动量及进食有不同程度的增加。

(二) 滑膜组织 OPG、RANK、RANKL mRNA 表达情况

取各组大鼠滑膜组织并行 qPCR 扩增，统计结果显示，与正常组大鼠相比，模型组大鼠 RANK、RANKL mRNA 表达上调，而 OPG mRNA 表达下降 ($P < 0.05$)，各治疗组与模型组相比，OPG mRNA 表达升高，RANK、RANKL mRNA 表达有所下降 ($P < 0.05$)；桂芍知母汤大剂量组对 OPG mRNA 上调较明显 ($P < 0.05$)；随着药物浓度逐渐增加，RANK、RANKL mRNA 表达抑制进一步加强 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 大鼠滑膜组织 OPG、RANK、RANKL mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	n	OPG	RANK	RANKL
正常组	3	1.03 ± 0.26	1.02 ± 0.21	1.03 ± 0.28
模型组	3	0.24 ± 0.06*	3.56 ± 0.35*	4.89 ± 0.63*
甲氨蝶呤组	3	1.32 ± 0.10* ^Δ	1.11 ± 0.26 ^Δ	1.12 ± 0.32 ^Δ
低剂量组	3	0.42 ± 0.04* ^Δ	2.52 ± 0.79* ^Δ	3.12 ± 0.49* ^Δ
中剂量组	3	0.66 ± 0.09* ^Δ	1.74 ± 0.44* ^Δ	1.79 ± 0.62* ^Δ
高剂量组	3	1.27 ± 0.19* ^Δ	1.13 ± 0.28 ^Δ	1.05 ± 0.21 ^Δ

*与正常组相比，差异具有显著性 ($P < 0.05$)；^Δ与模型组相比，差异具有显著性 ($P < 0.05$)；[▲]与甲氨蝶呤组相比，差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

(三) 大鼠血清 cGAMP、IL-6 水平

模型组血清 cGAMP、IL-6 水平较正常组升高 ($P < 0.05$)；各药物治疗组血清 cGAMP、IL-6 水平低于模型组，其中桂芍知母汤高剂量组改善尤为突出 ($P < 0.05$)；桂芍知母汤高剂量组细胞因子改善与甲氨蝶呤组相比较，差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠血清 cGAMP、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm S$, ng/L)

组别	n	cGAMP	IL-6
正常组	10	4.83 ± 0.38	23.30 ± 2.52
模型组	10	6.93 ± 1.34*	31.83 ± 3.07*
甲氨蝶呤组	10	5.74 ± 1.14* ^Δ	28.54 ± 3.13* ^Δ
低剂量组	10	6.05 ± 1.29* ^Δ	29.45 ± 4.85*
中剂量组	10	5.38 ± 0.62 ^Δ	29.28 ± 3.32*
高剂量组	9	5.70 ± 1.15 ^Δ	26.56 ± 3.64* ^Δ

*与正常组相比，差异具有显著性 ($P < 0.05$)；^Δ与模型组相比，差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

三、讨论

近年来，由于 RA 导致的患者骨质破坏、关节失能越来越受到重视，找到行之有效的抗炎及骨保护药物具有十分重要的临床价值。自《黄帝内经素问》专设《痹论》一章以来，中医学对关节疼痛、僵硬、畸形的诊治与研究就不曾间断，各家学派均有涉及，其中桂枝芍药知母汤就是其中的著名方剂之一。桂芍知母汤出自名医张仲景之《金匮要略》，原文阐述无论寒热，只要是有关节疼痛、屈伸不利，就可应用本方治疗^[5]。方中既有祛风通络

之桂枝、麻黄、防风，又有温经通脉之附子、干姜，又用白术、甘草健脾益气，知母能清解郁热，白芍合甘草酸甘化阴、固护津液，亦补亦行，长久以来在临床取得了良好疗效^[6]。

NF-κB 信号通路是经典炎症通路，其激活能广泛募集 IL-1、IL-6 及 TNF-α 等促炎因子，导致全身炎症活动的发生和加剧^[7]。近年来，许多研究开始关注环状 GMP-AMP 合成酶 (cGAS) / 干扰素基因刺激因子 (STING) 信号通路与肿瘤、感染及自身免疫疾病的关系，该通路的激活能进一步刺激 NF-κB 的活化及其他免疫应答的基因表达，参与在包括类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等全身炎症性疾病的发生发展之中^[8]。

在 RA 的疾病进程中，炎症通路的激活起着首要作用，而其带来的相关骨破坏因素，加重了疾病的破坏力。甲氨蝶呤作为治疗 RA 的锚定药物，能抑制 NF-κB 信号通路，从而抑制 RA 炎症活动^[9]。NF-κB 受体配体 (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL) 能与 NF-κB 结合，诱导单核-巨噬细胞向破骨细胞分化，因此在 NF-κB 介导的炎症过程中，RANKL/OPG 的激活，进一步导致了 RA 患者的骨质破坏^[10]。

本实验结果显示，桂枝芍药知母汤对于 CIA 大鼠滑膜 RANK/RANKL 的表达具有显著的抑制作用，能上调 OPG 的表达，其作用与甲氨蝶呤类似，且作用效果呈剂量依赖性。对于血清 cGAMP 和 IL-6 的表达，桂枝芍药知母汤也起到了相应抑制作用，且在药物干预过程中可以看到，应用桂枝芍药知母汤干预的 CIA 大鼠的症状改善相较甲氨蝶呤组更快速，其原因可能与甲氨蝶呤需在体内蓄积以起效有关，提示了临床用药时合并用药可以带给患者更迅速及显著的疗效。

综上，桂枝芍药知母汤能调控 cGAS-STING-NF-κB 轴的相关细胞因子表达，从而缓解 CIA 大鼠关节炎炎症反应，抑制骨破坏因子的表达，进而起到一定的骨保护作用。本研究尚有一定局限性，在 RA 发病过程中涉及许多复杂的免疫过程，未来可进一步细化研究，进一步丰富中医药治疗 RA 的思路与方法。

参考文献

- [1]ZHANG Q, LENARDO M J, BALTIMORE D. 30 Years of NF-κB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology [J]. Cell (Cambridge), 2017, 168(1-2): 37-57.
- [2]AGGARWAL B B. Nuclear factor-κB: The enemy within [J]. Cancer Cell, 2004, 6(3): 203-208.
- [3]李亦丞. 基于 NF-κB 及 OPG/RANKL/RANK 信号通路探究青蒿琥酯对骨关节炎的作用及机制 [D]. 新疆医科大学, 2020.
- [4]丁明辉, 曹茸, 徐鹏刚, 等. 桂枝芍药知母汤抑制 cGAS/STING/NF-κB 通路对类风湿关节炎大鼠炎症活动的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2024, 33(08): 1053-1059.
- [5]张仲景. 金匮要略方论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 18-19.
- [6]李雪萍, 刘伟伟, 郑川, 等. 从“络病-风药”新识桂枝芍药知母汤治疗类风湿性关节炎 [J]. 时珍国医国药, 2018(02): 391-393.
- [7]TANIGUCHI K, KARIN M. NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age [J]. Nature Reviews Immunology, 2018, 18(5): 309-324.
- [8]HOPFNER K, HORNUNG V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling [J]. Nature reviews. Molecular cell biology, 2020, 21(9): 501-521.
- [9]CRONSTEIN B N, AUNE T M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis [J]. Nature reviews. Rheumatology, 2020, 16(3): 145-154.
- [10]TRENKMANN M, BROCK M, BERTONCELJ M F, et al. Epigenetic Repression of the Long Noncoding Rna Hotair Regulates NF-κB Signalling and the Expression of Matrix Metalloproteases in Synovial Fibroblasts [J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2013, 72(Suppl 3): A201.