

徐长卿根提取物对类风湿性关节炎的治疗作用及分子机制研究*

王晨, 黄旺香, 阳陈英, 朱海婷, 陈曦雅, 康敬玲, 和七一, 余晓东

(重庆师范大学 生命科学学院 教育部活性物质生物技术工程研究中心 重庆市生物活性物质工程研究中心, 重庆 401331)

摘要:为探究徐长卿(*Cynanchum paniculatum*)根提取物对类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的治疗作用并揭示其中潜在的分子机制,采用完全弗氏佐剂构建抗原诱导性类风湿性关节炎(adjuvant induced arthritis, AIA)大鼠(*Rattus norvegicus*)模型,然后分别以不给药的正常大鼠和 AIA 大鼠作为对照组和模型组,并分别以口服 100、250、500 mg·kg⁻¹的徐长卿根提取物和 0.51 mg·kg⁻¹ 甲氨蝶呤的 AIA 大鼠作为低、中、高剂量组和阳性药物组;对各组大鼠的爪肿程度、体质量、器官指数进行了测量,同时利用酶联免疫吸附试验检测血清中促炎性细胞因子的水平,测定趾部组织中髓过氧化物酶(MPO)活力,并通过实时定量 PCR 检测核因子- κ B(NF- κ B)通路中关键基因的 mRNA 表达水平,采用气相色谱-质谱法对徐长卿根提取物的活性成分进行了分析鉴定。结果显示:1)与模型组相比,低、中、高剂量组爪肿程度均有明显减轻,且血清中的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素 6(IL-6)水平以及脚踝组织中的 MPO 活力明显降低,并且呈现明显的剂量效应;同时这 3 组大鼠的体质量和免疫器官的生长发育并没有明显受到徐长卿根提取物的影响。2)与模型组相比,阳性药物组和中、高剂量组 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 和白介素 1 β 等因子的基因 mRNA 表达水平明显降低,且呈现明显的剂量效应。3)徐长卿根提取物主要活性成分为丹皮酚、棕榈酸、亚油酸、5-羟甲基糠醛等。从上述结果可知,徐长卿根提取物表现出良好的 RA 治疗效果,它可能主要通过丹皮酚和亚油酸发挥治疗作用,具体治疗分子机制涉及对 NF- κ B 通路的调节。

关键词:徐长卿根提取物;类风湿性关节炎模型;NF- κ B 通路;促炎性细胞因子;气相色谱-质谱法

中图分类号:Q175

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2024)05-0129-12

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性疾病,主要表现为关节、软骨和滑膜组织的炎症和损伤^[1-2]。据估计,当前全球 RA 患者人数约为全球人口总数的 0.5%~2%,而且 RA 发病率一直呈上升趋势^[3]。RA 给患者带来的不良后果包括关节畸形和关节功能丧失,对患者的日常活动能力和生活质量造成严重影响。目前临床上通常采用非甾体抗炎药、抗风湿药等药物来减轻 RA 带来的疼痛和炎症反应^[4-5],但是这些药物无法完全治愈 RA,并且可能引发严重的副作用,例如脏器毒性、心血管疾病风险增加等。因此,上述治疗 RA 药物在临床使用时受到了一定的限制^[6]。

鉴于现有治疗 RA 方法存在着一定局限性,研究人员对传统中草药提取物产生了兴趣,因为它们通常具有良好的疗效以及较小的副作用,并被视为非甾体抗炎药物的有效替代品^[7]。萝藦科(Asclepiadaceae)植物徐长卿(中文学名别仙踪)(*Cynanchum paniculatum*)作为药用植物,广泛分布于中国、韩国和日本^[8-9]。现代医学研究表明,徐长卿具有多种药用功效。许青松等人^[10]发现徐长卿全草水煎剂在小鼠(*Mus musculus*)肉芽肿抗炎实验、热板法和扭体法镇痛实验中表现出抗炎镇痛功效。谢斌等人^[11]通过实验测得质量浓度为 100 g·L⁻¹ 的徐长卿全草水煎剂对人(*Homo sapien*)肝癌细胞分泌乙肝表面抗原和乙型肝炎 E 抗原的抑制率分别为 99.31%和 95.2%,提示它具有抗乙型肝炎病毒的功效。杨小四等人^[12]研究证实徐长卿中的丹皮酚能够通过甲酰胺受体通路抑制 RA。另据《中国药典》记载,徐长卿的根具有理气、除湿和止痛的功效,用于治疗多种疾病,包括风湿病、风疹、湿疹等^[13]。然而尽管徐长卿根被广泛用于治疗 RA,但其中的作用机制尚未完全阐明^[14-17]。

基于上述研究背景,本研究采用完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)构建抗原诱导性类风湿性关节炎(adjuvant induced arthritis, AIA)大鼠(*Rattus norvegicus*)模型,以评估徐长卿根提取物的治疗效果。

* 收稿日期:2023-09-27 修回日期:2024-03-18 网络出版时间:2024-05-21T16:45

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 3227030453);重庆市林业改革发展基金(No. Yu-lin-ke-tui-2019-2)

第一作者简介:王晨,女,研究方向为药理学, E-mail: 2021110513054@stu.cqnu.edu.cn; 通信作者:余晓东,男,教授,博士, E-mail: yxd@cqn. edu. cn

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/50.1165.n.20240520.1954.003>

评估指标包括大鼠的体质量、爪肿程度和器官指数,并观察踝关节组织病理切片。同时,通过检测血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白介素 6(interleukin-6, IL-6)的水平以及趾部组织中髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的活力来评估徐长卿根提取物的抗炎作用。此外,本研究还考察了核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、TNF- α 、IL-6、白介素 1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)等因子的基因 mRNA 表达水平,以深入了解徐长卿根提取物对关节炎的治疗机制;最后基于气相色谱-质谱法(GC-MS)对徐长卿根提取物的成分进行了分析鉴定,以便更加深入探索它对 RA 的作用效应和分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用体质量为 180~200 g 的雄性 SD 大鼠由湖南上佳实验动物有限公司供应,实验动物生产许可证号为 SCXK(湘 2019-0004)。大鼠的饲养条件如下:相对湿度为 50%~70%,温度保持在 22~23 °C,光照条件为 12 h 光照:12 h 黑暗,食物量和饮水量不做任何限制。所有与动物相关的操作程序严格遵守教育部活性物质与生物技术工程研究中心实验动物伦理委员会批准的伦理准则和方案,所有与动物有关的实验均按照美国《实验动物管理和使用指南》中规定的报告标准进行。

1.2 实验药材

徐长卿药材购自安徽辉丰药业有限公司,经植物分类学鉴定确认后,部分药材以标本形式(编号为 220406)保存在重庆师范大学生命科学学院。

1.3 实验试剂与仪器设备

CFA 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;甲氨蝶呤购自上海信谊药业有限公司;TNF- α 、IL-6 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自上海羽朵生物科技有限公司;MPO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Trizol 试剂购自上海碧云天生物技术股份有限公司;PrimeScriptTM RT 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;SYBR Green PCR 混合试剂盒购自苏州宇恒生物科技有限公司;其他相关化学药品均为分析纯级别。

实验所用主要仪器设备有:巩义宇翔 RE-52A 型旋转蒸发器、四川蜀科 TGL-20 型高速冷冻离心机、北京博医康 FD-1A-50 型冻干机、上海闪谱生物科技有限公司生产的 SP-Max 2300A2 型光吸收型全波长酶标仪、美国 Thermo NANODROP 4000 型分光光度计以及美国 Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR 检测系统。

1.4 实验方法

1.4.1 徐长卿根提取物的制备

通过浸渍法制备徐长卿根提取物。将 200 g 的徐长卿根干燥后研磨成粉末后在 45 °C 下与乙醇溶液($\varphi_{\text{乙醇}}=70\%$)以 $m_{\text{药材}}:V_{\text{提取液}}=1\text{ g}:5\text{ mL}$ 比例混合后进行 30 min 的超声处理,之后进行过滤并收集滤液,以上处理过程重复 2 次。合并所有滤液并在 45 °C 下使用旋转蒸发器去除其中残留的乙醇,然后冷冻干燥,获得 38.47 g 的徐长卿根乙醇提取物,提取率为 19.24%(以生药质量计),于 -20 °C 条件保存该提取物。

1.4.2 AIA 建模及给药

AIA 模型的建立遵循 Bao 等人^[18]的研究方法,即在用于 AIA 建模的大鼠的左后足垫注射 100 μL CFA,而在与之对照的大鼠的同一部位注射 100 μL 生理盐水($w_{\text{氯化钠}}=0.9\%$),最后得到 AIA 大鼠。将用于后续给药实验的大鼠随机分为 6 个实验组,每组 6 只,其中:对照组采用正常大鼠,以蒸馏水代替药物进行给药;模型组采用 AIA 大鼠,以蒸馏水代替药物进行给药,每日 1 次;3 个徐长卿根提取物组即低、中、高剂量组均采用 AIA 大鼠,分别以每 1 kg 体质量服用 100、250、500 mg 徐长卿根提取物的剂量进行给药,每日 1 次;阳性药物组采用 AIA 大鼠,以每 1 kg 体质量服用 0.51 mg 甲氨蝶呤的剂量进行给药,每 7 d 给药 2 次。上述 6 组大鼠的给药时间始于 CFA 诱导后第 7 d,采用口服给药,并连续处理 20 d。

1.4.3 爪肿程度、体质量和器官指数的测量

爪肿程度、体质量和器官指数的测量按照 Zhao 等人^[19]的方法进行。在给药期间,大鼠的体质量和左后足距厚度由 2 名独立观察员测量;每 4 d 使用电子天平测量 1 次大鼠的体质量。同时,每 4 d 使用游标卡尺评估大鼠左后肢爪的厚度,以爪肿胀度(R)衡量爪肿程度,具体计算公式为:

$$R=[(T'-T)/T]\times 100\%,$$

其中: T 和 T' 分别为 CFA 致炎前、后的足跖厚度(单位:mm)。该项测量持续至在 CFA 诱导后第 28 d 结束。随后,收集大鼠的脾脏和胸腺以进行器官指数的分析,器官指数用器官湿质量(单位:g)与大鼠体质量(单位:g)的百分比表示。

1.4.4 组织病理学分析

用乙醚对 CFA 诱导后第 28 d 的大鼠进行麻醉,分离出踝关节组织。在去除皮肤和周围肌肉后,使用多聚甲醛溶液($w_{\text{多聚甲醛}}=4\%$)固定踝关节组织 24 h。然后使用乙二胺四乙酸脱钙液进行脱钙处理,每 3 d 更换 1 次脱钙液。随后,用磷酸缓冲液冲洗 2 次踝关节组织,每次 30 min。然后使用自动脱水机对踝关节组织进行脱水,并进行石蜡包埋切片。对切片进行伊红染色后,在光学显微镜下观察其中的病理学和组织学变化。

1.4.5 ELISA 分析

在 CFA 诱导后的第 28 d,使用乙醚对大鼠进行麻醉,从眼眶静脉穿刺收集血液,经过 8 min、 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的离心后取上清液获得血清样本。将 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 标准品稀释到适当质量浓度,每个质量浓度梯度设置 2 个重复孔,每孔加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 标准品稀释液,用于标准曲线的建立;设置空白孔和样品孔,每孔各加入 $40\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液和 $10\text{ }\mu\text{L}$ 各组实验组样品,且除空白孔外其他孔均加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 酶标试剂,用于检测大鼠血清 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 水平。在加入酶标试剂后,轻轻震荡酶标板使之与各孔内的样液混匀,用封板膜封闭,将酶标板在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min。小心去除封板膜,使用洗涤液重复洗涤 3 次去除孔内附着的液体后,首先加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ ELISA 试剂盒中的显色剂 A 再加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 该试剂盒中的显色剂 B 混匀,室温避光反应 10 min 后,加入终止液,使溶液变为黄色。使用酶标仪在波长 450 nm 处测量各组样品的吸光度。标准曲线按照试剂盒说明书制作,然后据此计算各组大鼠血清的 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 质量浓度。

1.4.6 MPO 活力测定

从各组大鼠的趾部收集趾部组织,并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min。称取组织质量后,制备组织匀浆($w_{\text{趾部组织}}=5\%$)。每个实验组别都设置对照管和测试管,每管加入 $180\text{ }\mu\text{L}$ 的组织匀浆,然后加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ MPO 试剂盒中的试剂 4 吹打混匀,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴 15 min。每个管中分别加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ MPO 试剂盒中的试剂 5,且对照管和测试管中分别加入 3 mL 的双蒸水和显色剂,混匀后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴 30 min。最后,各组分别加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ MPO 试剂盒中的试剂 7,混匀后在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴 10 min。使用酶标仪在波长 460 nm 处测量各组样品的吸光度。根据 MPO 试剂盒说明书中的相关说明计算各组大鼠趾部组织的 MPO 活力。

1.4.7 实时定量 PCR(RT-qPCR)分析

为检测大鼠足部组织中基因 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平,首先使用 Trizol 从各组大鼠足部组织中提取总 RNA。然后根据逆转录试剂盒说明书进行 RNA 逆转录,在 $1\text{ }\mu\text{L}$ 提取的 RNA 中加入 $4\text{ }\mu\text{L}$ $4\times\text{gDNA Wiper Mix}$,再加入 $11\text{ }\mu\text{L}$ RNase-free ddH₂O,混匀后 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min,随后加入 $4\text{ }\mu\text{L}$ $5\times\text{HiScript III qRT SuperMix}$,混匀后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min,最后在 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 s。根据 SYBR Green PCR 混合试剂盒的说明进行 RT-qPCR,每个反应的体系包括: $1\text{ }\mu\text{L}$ 模板 cDNA、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 浓度均为 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上游和下游引物、 $5\text{ }\mu\text{L}$ Green Taq Mix 和 $3\text{ }\mu\text{L}$ ddH₂O。RT-qPCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,然后进行 40 个循环的 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。RT-qPCR 反应在 Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR 仪上进行,并且将 GAPDH 基因作为内参基因,各基因扩增所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列
GAPDH	上游引物:5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3',下游引物:5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'
NF-κB	上游引物:5'-GCGCATCCAGACCAACAATAAC-3',下游引物:5'-GCCGAAGCTGCATGGACACT-3'
TNF-α	上游引物:5'-GAAACACACGAGACGCTGAA-3',下游引物:5'-CCACTCAGGCATCGACATTC-3'
IL-6	上游引物:5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3',下游引物:5'-ACTGGTCTGTTGTGGGTGGT-3'
IL-1β	上游引物:5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3',下游引物:5'-ACTGGTCTGTTGTGGGTGGT-3'

1.4.8 徐长卿根提取物活性成分的 GC-MS 检测

首先用乙醇溶解徐长卿根提取物样品并配制成质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的样品溶液,然后经过 $0.45 \mu\text{m}$ 孔径的滤膜过滤,以确保样品溶液的纯净度。之后,采用以下条件对样品溶液进行 GC-MS 检测:色谱柱为 Thermo TG-SQC GC column($15 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$, ID $\times 0.25 \mu\text{m}$),载气为高纯度氦气(纯度不低于 99.999%),柱温设定为 80°C ,进样口温度为 280°C ,柱内载气流量为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。GC 程序从 80°C 开始,持续 5 min,然后以 $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 280°C ,最后在 280°C 下持续 5 min。进样量为 $1 \mu\text{L}$ 。质谱采用 EI(电子冲击)作为离子源,离子源温度为 250°C ,电子能量为 70 eV,倍增电压为 1 200 V,发射电流为 $50 \mu\text{A}$,传输线温度为 300°C ,扫描范围为质荷比(m/z) $45 \sim 450$ 。通过与质谱数据库(如美国国家标准与技术研究所, NIST)中存储的已知成分进行峰值比对和识别,确定样品中化合物的成分。

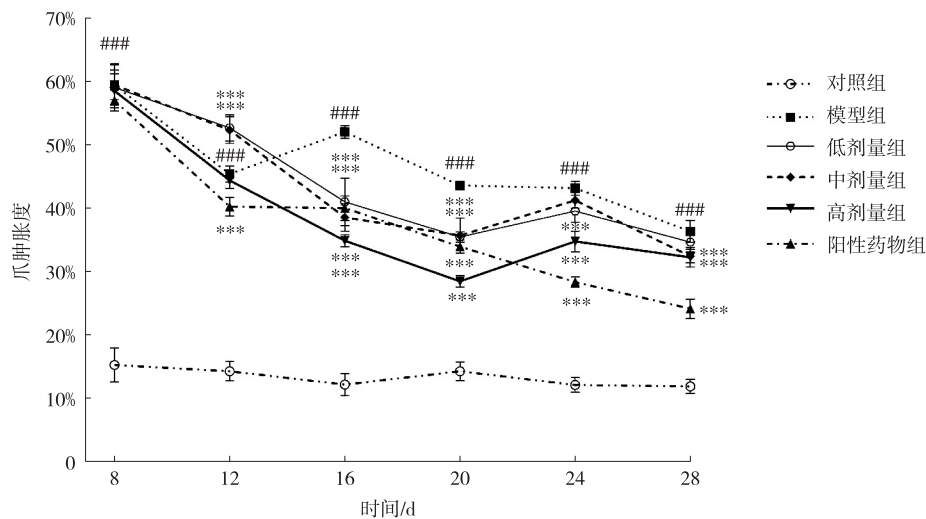
1.5 数据分析

使用 GraphPad Prism 7.0 软件统计分析实验数据,数据以“平均值 $\pm$ 标准差”形式表示。通过单因素方差分析对实验数据进行分析,当 $p < 0.05$ 时,统计结果视为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 对爪肿程度、体质量和器官指数的影响

在本研究中,注射 CFA 的大鼠的脚掌在诱导后第 3 d 开始出现明显肿胀。图 1 显示:在诱导后第 8 d,模型组的爪肿胀度($56\% \pm 0.3\%$)高于对照组的爪肿胀度($15\% \pm 0.3\%$),两者差异具有统计学意义($p < 0.001$);在诱导后第 12 d,阳性药物组的爪肿胀度($40\% \pm 0.1\%$)低于模型组的爪肿胀度($45\% \pm 0.1\%$),两者差异具有统计学意义($p < 0.001$);在诱导后第 16 d,高、中、低剂量组的爪肿胀度分别为 $35\% \pm 0.1\%$ 、 $41\% \pm 0.4\%$ 和 $39\% \pm 0.2\%$,均低于模型组的爪肿胀度($52\% \pm 0.1\%$),且差异均具有统计学意义($p < 0.001$)。值得注意的是,徐长卿根提取物对改善 AIA 大鼠的 RA 症状呈现出明显的剂量效应关系,高剂量($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)徐长卿根提取物对 AIA 大鼠的治疗效果最佳。



注:数据以“平均值 $\pm$ 标准差”形式表示,下同;各组样本量为 6;“###”表示模型组与对照组相比数据差异在 $p < 0.001$ 水平具有统计学意义;“***”表示模型组与徐长卿根提取物组(低、中、高剂量组)和阳性药物(甲氨蝶呤)组的数据差异在 $p < 0.001$ 水平具有统计学意义。

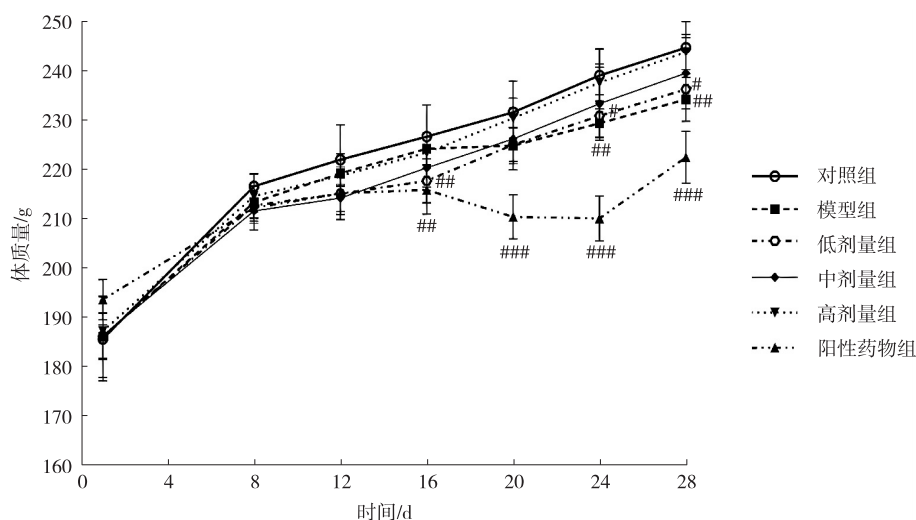
图 1 各组大鼠的爪肿程度

Fig. 1 The paw swelling degree of each rat group

由图 2 可知:阳性药物组体质量在诱导后第 16 d 开始出现下降,此时阳性药物组体质量为(216.02 ± 4.89) g,小于对照组体质量(226.81 ± 6.42) g,两者差异具有统计学意义($p < 0.05$);在诱导后第 24 d 阳性药物组体质量下降到(210.26 ± 4.51) g,仍低于此时的对照组体质量(239.1 ± 5.39) g,两者差异具有统计学意义($p < 0.001$)。相反地,接受徐长卿根提取物治疗的大鼠体质量在整个实验过程中均呈持续增长趋势。

此外,阳性药物组脾脏和胸腺的器官指数分别为 $0.29\% \pm 0.01\%$ 和 $0.06\% \pm 0.01\%$,均小于对照组的这 2

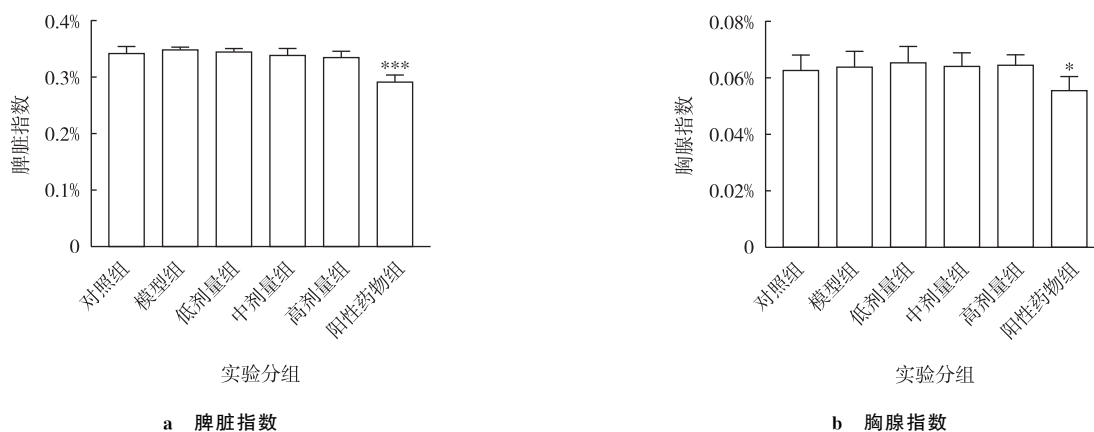
个器官指数($0.34\% \pm 0.01\%$ 、 $0.063\% \pm 0.006\%$),差异分别在 $p < 0.001$ 和 $p < 0.05$ 水平具有统计学意义(图3),表明甲氨蝶呤虽然能抑制 RA,但同时会导致大鼠免疫器官萎缩。相反地,图3还显示出徐长卿根提取物对大鼠免疫器官没有明显影响,说明它不仅治疗 RA,而且在治疗过程中不会对大鼠的免疫器官产生明显的副作用。



注:各组样本量为6,“##”“###”表示对照组与其他5组相比数据差异分别在 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 水平具有统计学意义。

图2 各组大鼠的体重

Fig. 2 The body weight of each rat group



注:各组样本量为6,“*”“***”表示对照组与其他5组相比数据差异分别在 $p < 0.05$ 和 $p < 0.001$ 水平具有统计学意义。

图3 各组大鼠脾脏和胸腺的器官指数

Fig. 3 The spleen and thymus indices of each rat group

2.2 对踝关节的组织病理学分析

在 AIA 大鼠模型中,在 CFA 诱导后的第 7 d,本研究首次观察到了明显的肿胀和红斑症状。随后,本研究进行了详细的组织病理学分析,以评估大鼠踝关节组织中巨噬细胞增殖和软骨细胞破坏的程度。如图 4 所示,接受徐长卿根提取物治疗后的大鼠踝关节的巨噬细胞的增殖受到明显抑制,并且软骨被破坏程度也得到缓解。这表明徐长卿根提取物对于巨噬细胞的活跃程度具有明显的抑制作用,进一步降低了 RA 的严重程度。

2.3 对血清中 IL-6、TNF- α 水平及趾部组织 MPO 活力的影响

图 5a、b 显示:模型组血清中促炎性细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的质量浓度分别为(71.25 ± 1.62)和(144.03 ± 2.49) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,高于对照组血清中这 2 个促炎性细胞因子的质量浓度(分别为(24.10 ± 2.46)和(74.58 ± 2.16) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$),且差异均具有统计学意义($p < 0.001$)。然而与模型组相比,阳性药物组的这 2 项指标(分别为(31.83 ± 1.05)和(87.13 ± 2.16) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)均更低,且均具有统计学意义上的差异($p < 0.001$)。高剂量组血清中 IL-6 和 TNF- α 的质量浓度分别为(35.45 ± 4.34)、(96.78 ± 2.63) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,均低于模型组的这 2 项指

标,且具有统计学意义上的差异($p < 0.001$)。中、低剂量组血清中 IL-6 质量浓度分别为(48.14 ± 2.59)、(106.34 ± 2.18) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,均低于模型组大鼠血清中 IL-6 质量浓度,且差异均具有统计学意义($p < 0.001$);中剂量组血清中 TNF- α 质量浓度(63.72 ± 7.18) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 低于模型组的该项指标,两者具有统计学意义上的差异($p < 0.001$);低剂量组血清中 TNF- α 的质量浓度为(141.52 ± 2.62) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,与模型组的该项指标差异不具有统计学意义。此外,大鼠踝关节组织中 MPO 活力测定的结果表明:对照组趾部组织 MPO 活力(1.26 ± 0.13) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 低于模型组的该项指标(3.20 ± 0.26) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$,两者具有统计学意义上的差异($p < 0.001$)。然而,阳性药物组和高剂量组趾部组织 MPO 活力(分别为(1.44 ± 0.24)和(2.74 ± 0.15) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)低于模型组的该项指标,差异均具有统计学意义($p < 0.001$),且不同剂量的徐长卿根提取物在治疗 RA 效果上均呈现出剂量效应(图 5c)。这些结果表明,徐长卿根提取物能有效抑制 AIA 大鼠体内的促炎性细胞因子产生和 MPO 活力,从而减轻了炎症反应。

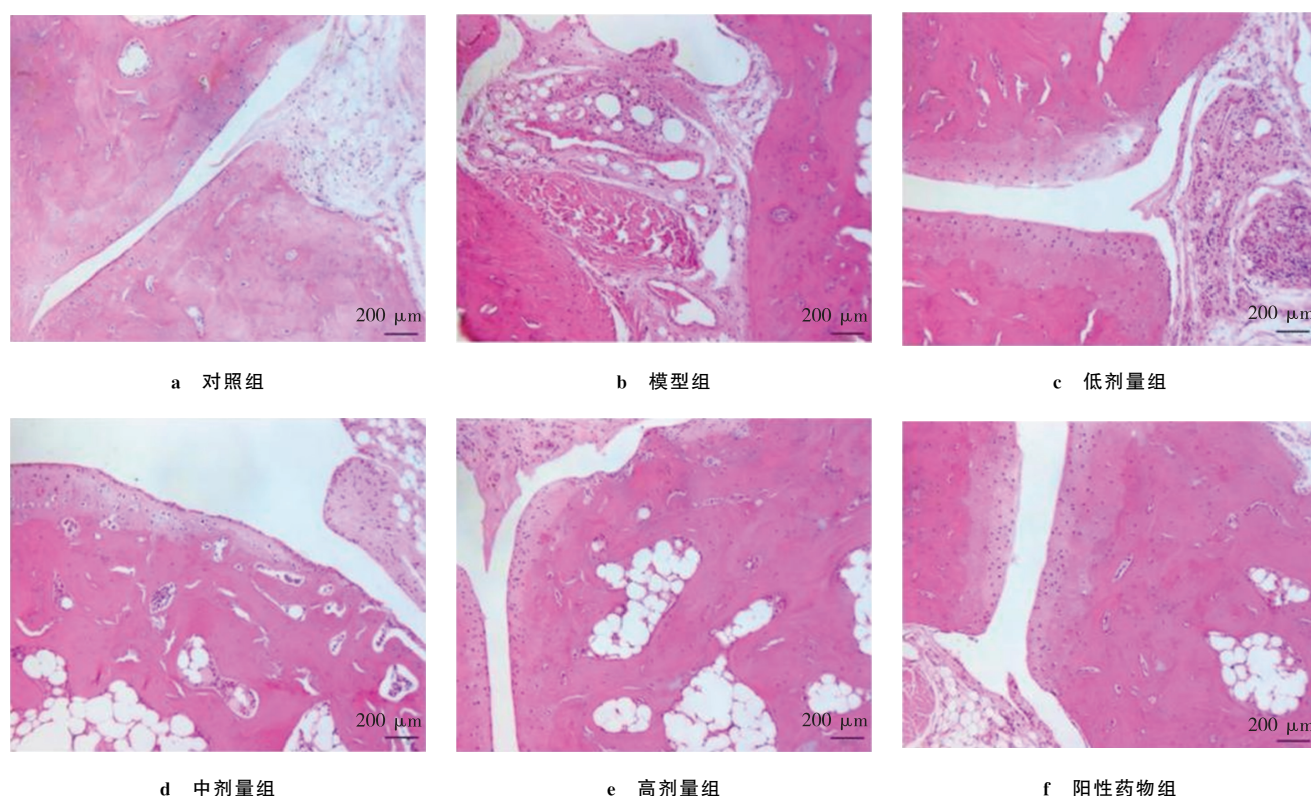
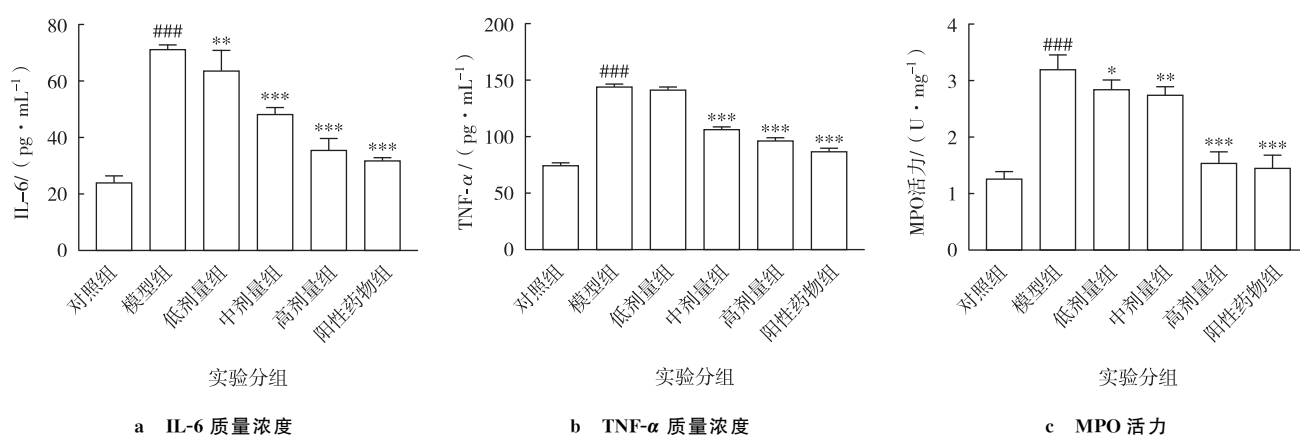


图 4 各组大鼠关节组织的病理学切片图像

Fig. 4 Images of pathologic sections of joint tissue from each rat group

2.4 对促炎性细胞因子基因 mRNA 表达的影响

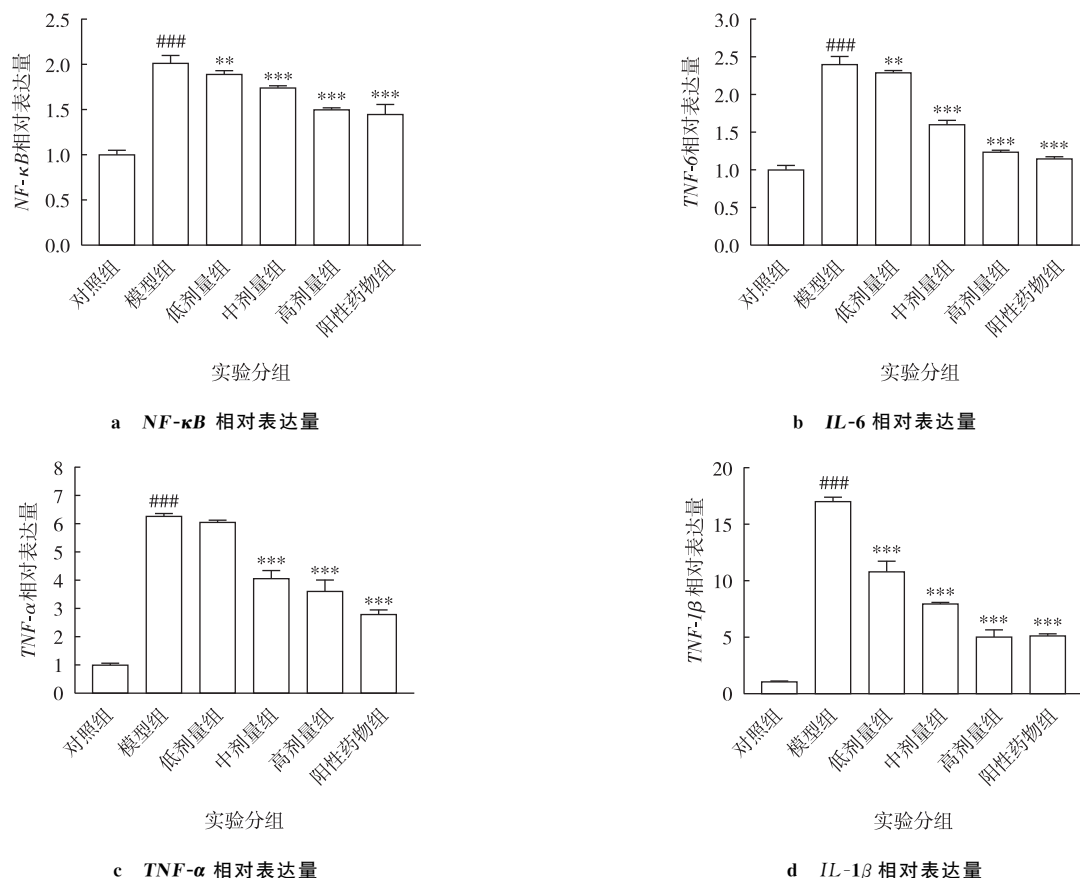
谢小倩等人^[20]研究发现,促炎性细胞因子如 TNF- α 和 IL-1 β 能够激活 NF- κ B,促使后者迁移到细胞核并上调促炎性细胞因子基因的表达,从而导致炎症反应加剧。图 6a 显示:模型组在 NF- κ B 基因 mRNA 相对表达量上比对照组更高,两者差异具有统计学意义($p < 0.001$);阳性药物组以及高剂量组在 NF- κ B 基因 mRNA 相对表达量上低于模型组与后者的差异具有统计学意义($p < 0.001$);徐长卿根提取物组在抑制 NF- κ B 基因 mRNA 表达上呈现出剂量效应。3 个促炎性细胞因子基因的 RT-qPCR 结果如图 6b、c、d 所示,其中:模型组 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 基因的 mRNA 相对表达量均高于对照组的这 3 项指标,与后者均具有统计学意义上的差异($p < 0.001$);与模型组相比,阳性药物组和中、高剂量组上述 3 个基因 mRNA 相对表达量更低,且与前者均具有统计学意义上的差异($p < 0.001$);低剂量组 IL-6 和 IL-1 β 基因 mRNA 相对表达量均低于模型组的这 2 项指标,与后者分别在 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 水平具有统计学意义上的差异;此外低剂量组与模型组的基因 mRNA 相对表达量没有统计学意义上的差异。上述结果表明,徐长卿根提取物可通过调节 NF- κ B 通路来抑制炎症反应,是治疗 RA 的有效药物备选。



注:各组样本量为6,“###”表示模型组与对照组相比数据差异在 $p<0.001$ 水平具有统计学意义,“*”“**”“***”表示模型组与徐长卿提取物组(低、中、高剂量组)和阳性药物(甲氨蝶呤)组的数据差异分别在 $p<0.05$, $p<0.01$ 和 $p<0.001$ 水平具有统计学意义。

图5 各组大鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 质量浓度以及脚踝组织 MPO 活力

Fig. 5 IL-6 and TNF-α mass concentration in serum and MPO activity of ankle tissue from each rat group



注:各组样本量为3。“###”表示模型组与对照组相比数据差异在 $p<0.001$ 水平具有统计学意义,“*”“**”“***”表示模型组与徐长卿提取物组(低、中、高剂量组)和阳性药物(甲氨蝶呤)组的数据差异分别在 $p<0.01$ 和 $p<0.001$ 水平具有统计学意义。

图6 各组大鼠关节组织中 NF-κB、IL-6、TNF-α 和 IL-1β 基因的 mRNA 表达

Fig. 6 The mRNA expression of genes NF-κB, IL-6, TNF-α, and IL-1β in joint tissues from each rat group

2.5 徐长卿根提取物活性成分的 GC-MS 分析结果

图7为徐长卿根提取物主要活性成分的 GC-MS 分析结果。经过质谱数据库(NIST)检索,鉴定得出17种主要成分(表2),其中相对含量最高的成分是丹皮酚,其他相对含量较高的成分有棕榈酸、亚油酸、5-羟甲基糠醛等。

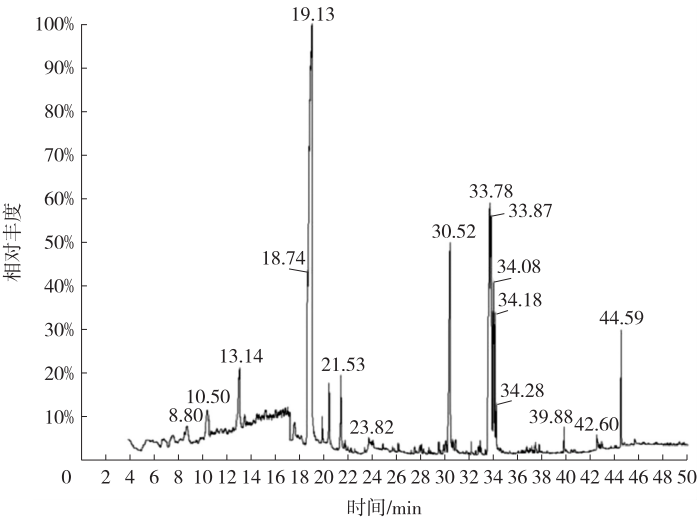


图 7 徐长卿根提取物相总离子流图

Fig. 7 Total ion chromatogram of *C. paniculatu* root extract

表 2 徐长卿根提取物的 GC-MS 分析

Tab. 2 GC-MS analysis of *C. paniculatu* root extract

保留时间/min	化学名称	分子式	相对分子质量/Da	相对含量/%
8.80	β -石竹烯	$C_{15}H_{24}$	204	2.59
10.50	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮	$C_6H_8O_4$	144	2.59
13.14	5-羟甲基糠醛	$C_6H_6O_3$	126	4.39
19.13	丹皮酚	$C_9H_{10}O_3$	166	58.68
20.56	2,4-二叔丁基苯酚	$C_{14}H_{22}O$	206	1.43
21.53	异丙酮丁酮	$C_9H_{10}O_3$	166	2.55
23.82	2-甲基-9- β -D-呋喃核糖基次黄嘌呤	$C_{11}H_{14}N_4O_5$	282	2.09
30.52	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	256	10.16
33.75	亚麻油	$C_{18}H_{32}O_2$	280	5.14
33.87	十八烷酸	$C_{18}H_{34}O_2$	282	1.44
33.92	顺式 13-十八烯酸	$C_{18}H_{34}O_2$	282	0.82
34.08	亚油酸乙酯	$C_{20}H_{36}O_2$	308	2.46
34.18	硬脂酸	$C_{18}H_{36}O_2$	284	2.06
34.28	油酸乙酯	$C_{20}H_{38}O_2$	310	0.54
39.88	1-棕榈酸单甘油酯	$C_{19}H_{38}O_4$	330	0.56
42.60	2-亚油酰甘油	$C_{21}H_{38}O_4$	354	0.25
44.59	反式角鲨烯	$C_{30}H_{50}$	410	2.26

3 讨论

RA 是一种慢性自身免疫性疾病,具体表现为关节滑膜炎症、关节畸形和系统性炎症反应等临床症状,在病

情加重时会严重影响患者的生活质量。尽管现有 RA 治疗药物在缓解病痛方面也有一定疗效,但也伴有严重的副作用^[21-23]。因此,研究人员对传统中草药的研究和应用变得愈加重要。徐长卿被传统中医学视为一种有效治疗 RA 的中草药,它的药用功效不仅包括抗病毒、抗炎镇痛等——近些年来人们还发现它在治疗蛇伤、宫颈癌、结膜炎、过敏性咳嗽等方面有着相当的潜力^[24-27]。尽管徐长卿早已在传统中医学领域被广泛应用,但它在相关疾病治疗中的具体作用机制尚不清楚,这也限制了该药材在临床中的进一步应用。

本研究以 CFA 诱导的 AIA 大鼠为实验对象,评估了徐长卿根提取物对 RA 的治疗效果。爪肿胀作为 RA 的典型症状之一,常被用来评估 RA 治疗效果。实验结果显示,不同剂量的徐长卿根提取物均能明显减轻 AIA 大鼠的爪肿程度,证实了该提取物具有明显的抗炎作用。此外,本研究通过对大鼠的体质量和免疫器官的观察,还确定了徐长卿根提取物治疗 RA 的安全性。在 RA 的发病机制中,巨噬细胞的异常活化与炎症反应密切相关^[28]。在本研究中,通过组织病理学观察发现,徐长卿根提取物能有效抑制 AIA 大鼠踝关节组织中巨噬细胞的增殖,从而进一步抑制了 RA 症状,这一结果为徐长卿作为治疗 RA 的潜在药物提供了有力的支持。

此外,RA 的炎症反应与促炎性细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的异常分泌有关,而后者会导致软骨破坏和关节受损^[29]。本研究发现,经过徐长卿根提取物治疗后,AIA 大鼠血清中的 TNF- α 和 IL-6 水平明显降低,同时踝关节组织中 MPO 的活力也有下降。这些结果强调了徐长卿根提取物对于抑制炎症反应具有重要作用,并因此减轻了 RA 的严重程度。进一步的分子机制研究通过 RT-qPCR 得到揭示,即徐长卿根提取物通过调节 NF- κ B 通路来抑制炎症反应。NF- κ B 作为一个重要的细胞信号通路,在 RA 进程中扮演了关键角色,它的异常激活与炎症的持续发展密切相关,NF- κ B 基因表达上调,从而刺激多个促炎性细胞因子基因如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 表达量增加,从而引发炎症反应^[30-34]。上述结果从更加微观的层面提示了徐长卿根提取物成为有效治疗 RA 药物的可能性。

经 GC-MS 分析鉴定,徐长卿根提取物的主要活性成分为丹皮酚、棕榈酸、亚油酸、5-羟甲基糠醛等物质。丹皮酚是徐长卿的主要活性成分之一,与非甾体抗炎药有相似的药理作用,具有抗炎镇痛、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等功效^[35]。此外,棕榈酸具有抑菌作用,亚油酸可调控 NF- κ B 通路,而 5-羟甲基糠醛则具有降血糖和保护神经细胞的功效^[36-38]。因此从有效成分层面来看,徐长卿根提取物可能主要通过丹皮酚和亚油酸来发挥治疗 RA 的作用。

综合上述,本研究通过动物体内实验证实了徐长卿根提取物对 RA 的治疗效果,并初步揭示了其中的作用机制。徐长卿具有明显的抗炎作用,不仅能够减轻患肢的肿胀,还能抑制巨噬细胞增殖和促炎性细胞因子异常分泌来减轻 RA 的严重程度。此外,本研究发现徐长卿根提取物通过调节 NF- κ B 通路来实现对 RA 的治疗效果,这为它作为一种潜在的治疗 RA 药物提供了重要的实验依据。然而,要深入理解徐长卿治疗 RA 的分子机制和临床应用前景,还需要进行进一步的研究和临床试验,这将有助于揭示它在治疗 RA 中的确切作用机制,并为它在 RA 治疗中的临床应用提供更加有力的理论和实践依据。

参考文献:

- [1] 温志华. 类风湿性关节炎发病机制的临床研究进展[J]. 临床医学, 2022, 42(7): 123-125.
WEN Z H. Advances in clinical research on the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Clinical Medicine, 2022, 42(7): 123-125.
- [2] 陆丹丹, 韩晓燕, 张晗, 等. 类风湿性关节炎药理实验模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 107-114.
LU D D, HAN X Y, ZHANG H, et al. Research and progress of rheumatoid arthritis experimental models[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2022, 32(5): 107-114.
- [3] WU D, LUO Y H, LI T, et al. Systemic complications of rheumatoid arthritis: Focus on pathogenesis and treatment[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 1051082.
- [4] TAN Y, BUCH M H. Difficult to treat' rheumatoid arthritis: current position and considerations for next steps[J]. RMD Open, 2022, 8(2): e002387.
- [5] ZHOU S Y, HUANG G L. Some important inhibitors and mechanisms of rheumatoid arthritis[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2022, 99(6): 930-943.
- [6] 王静, 赵庆杰, 卓小斌, 等. 类风湿性关节炎的治疗药物研究进展[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(6): 485-490.
WANG J, ZHAO Q J, ZHUO X B, et al. Research progress on therapeutic drugs for rheumatoid arthritis[J]. Journal of

- Pharmaceutical Practice and Service, 2019, 37(6): 485-490.
- [7] WANG Y, CHEN S J, DU K Z, et al. Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 279: 114368.
- [8] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 1997: 1894-1895.
- Jiangsu New Medical College. The dictionary of Chinese herbal medicine[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1997: 1894-1895.
- [9] TANG S Y, LI J Y, HUANG G J, et al. Effects of water extract of *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag. on different breast cancer cell lines[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2021; 2021: 6665949.
- [10] 许青松, 张红英, 李迎军, 等. 徐长卿水煎剂抗炎及镇痛作用的研究[J]. 李时珍国医国药, 2007, 18(6): 1407-1408.
- XU Q S, ZHANG H Y, LI Y J, et al. Effect of the extract of *Cynachum paniculatum* on anti-inflammation and analgesic in mice [J], Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2007, 18(6): 1407-1408.
- [11] 谢斌, 刘妮, 赵昉. 徐长卿水提物抗乙型肝炎病毒的体外实验研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(2): 196-197, 233.
- XIE B, LIU N, ZHAO F. *In vitro* experimental study on the effect of *Cynanchun paniculatum* extract against hepatitis B virus [J]. China Tropical Medicine, 2005, 5(2): 196-197, 233.
- [12] 杨小四, 邵玉宝, 李文昊, 等. 甲酰胺受体激活剂丹皮酚抑制类风湿关节炎的作用[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(9): 1320-1327.
- YANG X S, SHAO Y B, LI W H, et al. Paeonol inhibits rheumatoid arthritis through formyl peptide receptors[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2022, 38(9): 1320-1327.
- [13] 刘同亭. 徐长卿抗肿瘤分子生物学机制的研究进展[J]. 实用医药杂志, 2016, 33(5): 455-458.
- LIU T T. Research progress on anti-tumor molecular-biological mechanism of *Cynanchum paniculatum* [J]. Practical Journal of Medicine & Pharmacy, 2016, 33(5): 455-458.
- [14] ZHOU X R, XIA W X, ZHANG Y W, et al. *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag. ex H. Hara: a review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 260: 112994.
- [15] 张永清, 孙秀霞, 石作荣. 徐长卿临床应用研究概况[J]. 中医研究, 2005, 18(11): 52-58.
- ZHANG Y Q, SUN X X, SHI Z R. Survey of the research in clinical application of radix *Cynanchi paniculati* [J]. Traditional Chinese Medicinal Research, 2005, 18(11): 52-58.
- [16] 王凯丽, 许小芬, 杨辉, 等. 类风湿关节炎前状态的转归及中医药防治思路[J]. 中医杂志, 2021, 62(14): 1266-1268.
- WANG K L, XU X F, YANG H, et al. Regression of rheumatoid arthritis pre-state and the idea of prevention and treatment in traditional Chinese medicine[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 62(14): 1266-1268.
- [17] 沈之增. 徐长卿治疗带状疱疹后遗神经痛[J]. 中医杂志, 2001, 42(8): 457.
- SHEN Z C. Treatment of postherpetic neuralgia with herpes zoster by *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2001, 42(8): 457.
- [18] BAO Y R G, SUN Y W, JI J, et al. Genkwanin ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats through inhibiting JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways[J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2019, 63: 153036.
- [19] ZHAO X H, JIANG S R, DONG Q, et al. Anti-rheumatoid arthritis effects of iridoid glucosides from *Lamioophlomisrotata* (Benth.) Kudo on adjuvant-induced arthritis in rats by OPG/RANKL/NF- κ B signaling pathways [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 266: 113402.
- [20] 谢小倩, 王亚乐, 罗沙沙, 等. 类风湿性关节炎发病机制研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(71): 109-111.
- XIE X Q, WANG Y L, LUO S S, et al. Pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. World Latest Medicine Information, 2019, 19(71): 109-111.
- [21] GRAVALLESE E M, FIRESTEIN G S. Rheumatoid arthritis-common origins, divergent mechanisms[J]. The New England Journal of Medicine, 2023, 388(6): 529-542.
- [22] CHEN Y R, HSIEH F I, CHANG C C, et al. Effect on risk of stroke and acute myocardial infarction of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with rheumatoid arthritis[J]. American Journal of Cardiology, 2018, 121(10): 1271-1277.
- [23] LUO C H, XU X R, WEI X C, et al. Natural medicines for the treatment of fatigue: Bioactive components, pharmacology, and mechanisms[J]. Pharmacological Research, 2019, 148: 104409.
- [24] 陈千姿, 王晨, 黄旺香, 等. 基于 AutoDock Vina 筛选徐长卿抑制尖吻蝮蛇毒金属蛋白酶有效组分的研究[J]. 蛇志, 2023, 35(2): 137-143.

- CHEN Q Z, WANG C, HUANG W X, et al. Screening the effective components of *Cynanchum paniculatum* inhibiting the metalloproteinases from *Deinagkistrodon acutus* venom based on AutoDock Vina[J]. Journal of Snake, 2023, 35(2): 137-143.
- [25] 宫贺, 孟鋈钰, 伦昕月, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨徐长卿治疗宫颈癌的作用机制[J]. 济宁医学院学报, 2022, 45(6): 392-399.
- GONG H, MENG Y J, LUN X Y, et al. Research on mechanisms of *Cynanchum paniculatum* in treatment of cervical cancer based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. Journal of Jining Medical University, 2022, 45(6): 392-399.
- [26] 贺海辉, 沈洪. 徐长卿对溃疡性结肠炎模型大鼠核因子 NF- κ B 信号通路的影响[J]. 世界中医药, 2022, 17(2): 192-195.
- HE H H, SHEN H. Effects of *Cynanchum paniculatum* on NF- κ B signaling I pathway in ulcerative colitis model rats[J]. World Chinese Medicine, 2022, 17(2): 192-195.
- [27] 龙胜泽, 黄少东, 陈艳, 等. 徐长卿散剂联合布地奈德治疗激素敏感性咳嗽的临床疗效[J]. 上海中医药大学学报, 2022, 36(4): 26-30.
- LONG S Z, HUANG S D, CHEN Y, et al. Clinical effect of *Cynanchi paniculati* radix et rhizoma powder combined with budesonide in treatment of corticosteroid-responsive cough[J]. Acta Universitatis Traditionis Medicalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai, 2022, 36(4): 26-30.
- [28] 李士杰, 姜爱莉, 刘宇, 等. 巨噬细胞介导的炎症反应在材料生物相容性评价中的意义[J]. 组织工程与重建外科, 2022, 18(5): 436-440.
- LI S J, JIANG A L, LIU Y, et al. The significance of macrophage-mediated inflammatory responses in the evaluation of material biocompatibility[J]. Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery, 2022, 18(5): 436-440.
- [29] 曹峰, 黄承, 程继伟, 等. β -arrestin-2 靶向 NF- κ B 通路抑制类风湿性关节炎中 FLSs 的炎症反应[J]. 医学研究杂志, 2022, 51(1): 88-93.
- CAO F, HUANG C, CHEN J W et al. Inhibitory effect of β -arrestin-2 on inflammatory response of FLSs in rheumatoid arthritis by targeting NF- κ B pathway[J]. Journal of Medical Research, 2022, 51(1): 88-93.
- [30] CHANG C, XU L X, ZHANG R R, et al. MicroRNA-mediated epigenetic regulation of rheumatoid arthritis susceptibility and pathogenesis[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 838884.
- [31] ŚWIERKOT J, NOWAK B, CZARNY A, et al. The activity of JAK/STAT and NF- κ B in patients with rheumatoid arthritis [J]. Advances in Clinical & Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University, 2016, 25(4): 709-717.
- [32] YIN G, WANG Y, CEN X M, et al. Lipid peroxidation-mediated inflammation promotes cell apoptosis through activation of NF- κ B pathway in rheumatoid arthritis synovial cells[J]. Mediators of Inflammation, 2015, 2015: 460310.
- [33] XIA Z B, MENG F R, FANG Y X, et al. Inhibition of NF- κ B signaling pathway induces apoptosis and suppresses proliferation and angiogenesis of human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis[J]. Medicine, 2018, 97(23): e10920.
- [34] 卢曼晨, 庞静雯. 艾灸对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织 TLR4/NF- κ B 信号通路影响[J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(4): 491-497.
- LU M C, PANG J W. Effect of moxibustion on TLR4/NF- κ B signaling pathway in synovial tissues of adjuvant arthritis rats [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2021, 40(4): 491-497.
- [35] 吴成武, 王伟, 汤休书, 等. 徐长卿丹皮酚通过调控 Wnt/ β -catenin 通路保护 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(23): 5346-5351.
- WU C W, WANG W, TANG X S, et al. *Cynanchum paniculatum* paeonol protects against IL-1 β -induced chondrocyte injury by modulating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2021, 41(23): 5346-5351.
- [36] 赵燕妮, 韩洁, 周宁宁, 等. 棕榈酸对溶藻弧菌的抑制效果及其作用机制研究[J]. 陕西科技大学学报, 2022, 40(6): 62-69.
- ZHAO Y N, HAN J, ZHOU N N, et al. Study on the inhibitory effect and mechanism of palmitic acid on *Vibrio alginolyticus* [J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2022, 40(6): 62-69.
- [37] 耿芸, 宋海燕, 刁学织. 基于 NF- κ B 通路探究亚麻油干预心肌梗死大鼠心肌纤维化的作用机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(9): 1598-1604.
- GENG Y, SONG H Y, DIAO X Z. The protective effect of linseed oil on myocardial fibrosis in rats with myocardial infarction based on NF- κ B pathway[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease, 2023, 21(9): 1598-1604.
- [38] 曹蕊, 张迅, 李小梅, 等. 5-羟甲基糠醛的制备及其应用研究进展[J]. 辽宁化工, 2023, 52(12): 1863-1866.
- CAO R, ZHANG X, LI X M, et al. Research progress in preparation and application of 5-hydroxymethylfurfural[J]. Liaoning Chemical Industry, 2023, 52(12): 1863-1866.

Inhibitory Effect and Molecular Mechanism of *Cynanchum paniculatum* Extract on Rheumatoid Arthritis

WANG Chen, HUANG Wangxiang, YANG Chenying, ZHU Haiting,
CHEN Xiya, KANG Jingling, HE Qiyi, YU Xiaodong

(Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, Ministry of Education Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: To investigate the therapeutic effects of *Cynanchum paniculatum* root extract on rheumatoid arthritis (RA) and to reveal the underlying molecular mechanisms. A rat (*Rattus norvegicus*) model of antigen-induced rheumatoid arthritis (AIA) was constructed using complete freund's adjuvant (CFA), and normal and AIA rats without drug administration were then used as control and model groups, and AIA rats with oral doses of 100, 250, and 500 mg · kg⁻¹ of *C. paniculatum* root extract and 0.51 mg · kg⁻¹ methotrexate were used as the low, medium, and high dose groups and positive drug group, respectively. Subsequently, paw swelling, body weight, and organ index of rats were measured, and enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum pro-inflammatory factor levels, myeloperoxidase (MPO) content in ankle tissues, and RT-qPCR to detect the mRNA expression levels of key genes of the NF-κB pathway. In addition, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to analyze and identify the components of the *C. paniculatum* root extract. The results showed that: 1) Compared with the model group, the degree of paw swelling was significantly reduced in the low, medium and high dose groups. And serum levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin 6 (IL-6) as well as MPO content in ankle tissues were significantly reduced ($p < 0.001$) in a dose-dependent manner. In addition, the body weight and the growth and development of immune organs of these three groups of rats were not affected by the extract of *C. paniculatum* root. 2) RT-qPCR results showed that the mRNA expression levels of NF-κB, TNF-α, IL-6, and interleukin 1β genes were significantly ($p < 0.001$) decreased by the positive drug group and medium and high dose groups of *C. paniculatum* root extract compared with the model group in a dose-dependent manner. 3) GC-MS results showed that the root extract of *C. paniculatum* mainly contained paeonol, palmitic acid, linoleic acid, and 5-hydroxymethylfurfural. It is clear from the above results that *C. paniculatum* root extract showed good RA therapeutic effects, which may act primarily through paeonol and linoleic acid, and the preliminary reveals that its therapeutic mechanism may be related to the regulation of NF-κB pathway.

Keywords: *Cynanchum paniculatum* root extract; rheumatoid arthritis model; NF-κB pathway; proinflammatory cytokine; gas chromatography-mass spectrometry

(责任编辑 方 兴)