

基于毒效评价和代谢组学的铁棒锤 抗类风湿关节炎的作用机制研究

李梦佳^{1,2}, 李聪颖^{2,3}, 沙梦香², 张艺^{2*}, 刘悦^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川成都 611137; 2. 成都中医药大学民族医药学院, 四川成都 611137; 3. 河西学院, 甘肃张掖 734000)

[摘要] 研究藏族药铁棒锤及其炮制品对类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的影响,探讨其炮制减毒存效作用及机制。应用牛Ⅱ型胶原诱导类风湿关节炎(type II collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型;给药后记录大鼠体质量,计算心脏指数、免疫器官指数和关节炎指数;酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测大鼠血清中肌酸激酶(creatinase, CK)、心肌特异性肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT)等多种因子水平;苏木素-伊红染色观察心脏组织及踝关节组织病理学形态变化;免疫组化法检测心肌连接蛋白43(connexin 43, Cx43)在大鼠心脏的表达;超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱(UPLC-Triple-TOF-MS)检测大鼠血清内源性代谢物水平,筛选潜在生物标志物并分析相关代谢通路。结果表明,铁棒锤生品能使大鼠心脏组织局部心肌纤维变性坏死,心脏指数显著增高,心肌组织Cx43表达平均阳性面积明显降低,血清中CK、cTnT等含量明显增高;大鼠免疫器官指数、血清中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎症因子含量减低、受损滑膜及关节面改善,效毒共存;糵制铁棒锤未见明显心脏毒性反应,同时显著降低大鼠关节炎指数、免疫器官指数及血清中IL-6等多种炎症因子含量,改善受损滑膜及关节面,减毒存效作用确切。血清代谢组学研究共筛选出19个铁棒锤生品及糵制铁棒锤抗RA的潜在生物标志物,主要涉及甘油磷脂代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢及类固醇激素合成等。综上,藏族药铁棒锤具有防治RA的作用,生品有一定心脏毒性,糵制后减毒存效作用确切,其治疗RA的机制与抗炎,调节甘油磷脂代谢、氨基酸代谢有关。

[关键词] 铁棒锤;糵制;血清代谢组学;类风湿关节炎;减毒存效

Study on mechanism of *Aconitum pendulum* in treating rheumatoid arthritis based on toxicity efficacy evaluation and metabonomics

LI Meng-jia^{1,2}, LI Cong-ying^{2,3}, SHA Meng-xiang², ZHANG Yi^{2*}, LIU Yue^{2*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
3. Hexi University, Zhangye 734000, China)

[Abstract] The study aims to investigate the effects and potential mechanism of raw and processed *Aconitum pendulum* Busch on rheumatoid arthritis (RA) and analyze their toxicity attenuating and efficacy retaining effects. The bovine type II collagen-induced arthritis (CIA) rat model was established. The weight, cardiac index, immune organ index, and arthritis index of the rats were recorded and calculated after administration. ELISA was used to measure the expressions of creatine kinase (CK), cardiac troponin T

[收稿日期] 2023-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82130113);国家重点研发计划项目(2023YFC3504402);中国博士后科学基金项目(2021MD703800);四川省自然科学基金青年基金项目(2022NSFSC1449)

[通信作者] *张艺,研究员,博士生导师,主要从事民族药药效物质基础及信息化研究,E-mail: zhangyi@cdutcm.edu.cn; *刘悦,副教授,硕士生导师,主要从事中药民族药药效物质基础与作用机制研究,E-mail: liuyue2@cdutcm.edu.cn

[作者简介] 李梦佳,硕士研究生,E-mail: lmj549831@outlook.com

(cTnT), and multiple factors. The pathological morphological changes in heart tissue and ankle joint tissue were observed by hematoxylin-eosin staining. Connexin 43 (Cx43) expression in the hearts of CIA rats was detected via immunohistochemical method. The levels of endogenous metabolites in the serum of CIA rats were detected by UPLC-Q-TOF-MS. Potential biomarkers were screened, and related metabolic pathways were analyzed. The results showed that raw *A. pendulum* could induce local myocardial fiber degeneration and necrosis, increase the cardiac index, decrease the average positive area of Cx43 expression significantly, and increase the expressions of CK and cTnT in cardiac tissue of rats. Meanwhile, raw *A. pendulum* could decrease the immune organ index, interleukin-6 (IL-6), and other inflammatory cytokine contents in the serum and improve the damaged synovium and joint surface of CIA rats, with toxicity and efficacy coexisting. The Zanba stir-fired *A. pendulum* could reduce the index of arthritis, immune organ index, and content of IL-6 and inflammatory cytokines in serum and improve damaged synovium and joint surface of CIA rats with no obvious cardiac toxicity, showing significant toxicity attenuating and efficacy retaining effects. A total of 19 potential biomarkers of raw *A. pendulum* and Zanba stir-fired *A. pendulum* against RA were screened by serum metabolomics, including glycerophospholipid metabolism, glycine, serine, and threonine metabolism, arginine and proline metabolism, and steroid hormone synthesis. In conclusion, Xizang medicine *A. pendulum* is preventive and curative for RA. Raw *A. pendulum* has certain cardiotoxicity, and Zanba stir-fired *A. pendulum* has significant toxicity attenuating and efficacy retaining effects. The anti-RA mechanism may be related to the regulation of glycerophospholipid and amino acid metabolism.

[Key words] *Aconitum pendulum*; stir-fired with Zanba; serum metabolomics; rheumatoid arthritis; toxicity attenuating and efficacy retaining

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20240115.701

藏族药铁棒锤为毛茛科乌头属铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch 和伏毛铁棒锤 *A. flavaum* Hand. - mazz. 的干燥块根,以铁棒锤 *A. pendulum* 最为多用。藏族医药经典著作《晶珠本草》《四部医典》中记载其性苦、热,有祛风除湿、驱寒止痛等功效,以复方形式广泛应用于治疗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等疾病^[1-3]。与附子、草乌类似,铁棒锤作为一种乌头类药材,二萜生物碱是其主要药效成分,也是毒性成分,使用不当会引发严重的心脏、神经及消化毒性,甚至死亡。《晶珠本草》记载铁棒锤为“不流动毒之首,若不炮制去毒,入药甚险”,特别强调其毒性及炮制必要性^[4]。糌粑制铁棒锤是藏族医常用特色炮制方法^[5]。该方法以藏族常用主食糌粑为炮制辅料,经加热拌炒后,铁棒锤中强毒性的效应成分双酯型生物碱(乌头碱、3-脱氧乌头碱等)水解为中等毒性的效应成分单酯型生物碱(苯甲酰乌头碱、3-脱氧苯甲酰乌头碱、16-表-焦乌头碱等),从化学成分角度说明了炮制减毒存效作用^[6]。但其炮制后对于机体的减毒作用及抗 RA 的作用及机制还未见报道。

代谢组学是一门研究细胞、组织或生物体经某种扰动或刺激后参与新陈代谢、维持生命正常生理活动的内源性代谢物质或代谢途径变化规律的学科,该方法借助液质联用等技术对生物体血液、尿液、粪便、组织样本的代谢物进行定性定量分析,是解释复杂性病理或生理变化的重要方法^[7]。本研

究以藏族药铁棒锤生品及糌粑制铁棒锤为研究对象,通过毒效评价,阐明其炮制减毒(心脏毒性)存效(抗 RA 药效)作用;结合基于 UPLC-Triple-TOF/MS 代谢组学方法,以 RA 常用 II 型胶原诱导型关节炎(type II collagen-induced arthritis, CIA)模型为研究对象,分析铁棒锤生品和糌粑制铁棒锤对 CIA 模型大鼠血清代谢物及代谢通路的影响,探讨其减毒存效可能的作用机制,为藏族药铁棒锤安全有效应用奠定基础。

1 材料

1.1 药物

铁棒锤购于青海省海东市互助土族自治县加定镇加唐村,经成都中医药大学张艺研究员鉴定为毛茛科乌头属植物铁棒锤 *A. pendulum* 的干燥块根。糌粑购于四川省甘孜县,经本课题组检测为合格。阳性对照药甲氨蝶呤片(methotrexate, MTX, 批号 036191002, 2.5 mg/片)购于上海信谊药厂有限公司。

1.2 动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠,体质量 180~220 g,购自成都达硕实验动物有限公司。动物生产许可证编号 SCXK(川)2020-030,自由摄食和饮水,适应性喂养 1 周后开始实验。实验动物福利伦理审核申请备案编号 2022-28。

1.3 试剂与仪器

肌酸激酶(creatine kinase, CK, 批号 ZC-36739)、

大鼠心肌特异性肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT, 批号 ZC-37374)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号 ZC-37624)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β , 批号 ZC-36391)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2, 批号 ZC-36393)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6, 批号 ZC-36404) ELISA 试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司; 大鼠乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (批号 A020-2) 购自南京建成生物工程研究所; 弗氏完全佐剂 (Freund complete adjuvant, FAC, 批号 F10125-10 mL)、牛 II 型胶原 (type II collagen, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \times 5 \text{ mL}$, 批号 220195) 购自美国 Chondrex 公司; 磷酸二氢钠 (批号 20210527)、磷酸氢二钠 (批号 20211125) 购自福晨 (天津) 化学试剂有限公司; 多聚甲醛 (批号 20190408) 购自国药集团化学试剂有限公司; 柠檬酸盐缓冲液 (批号 ZLI-9065)、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (批号 ZLI-9062) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 一抗 (批号 A11752) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 二抗 (兔抗, 批号 GB23303)、苏木素染液 (批号 CR22002071) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 伊红染液 (批号 YE2080)、乙二胺四乙酸二钠 (ethylene diamine tetraacetic acid diso-diumsalt, EDTA-2Na, 批号 YE0105) 购自合肥博美生物科技有限责任公司; 乙腈、甲醇、甲酸 (色谱级) 购自美国 Fisher 公司。

酶标仪 (型号 SpectraMAX Plus384, 上海美谷分子仪器有限公司); 优普超纯水仪 (型号 UPH-II-10 T, 成都超纯科技有限公司); 数字切片扫描仪 (型号 Panoramic250, 匈牙利 3DHISTECH 公司); 全自动染色机 (型号 RS36, 常州派斯杰医疗设备有限公司); 显微镜 (型号 BA410, 配备数码三目摄像显微摄像系统, 厦门麦克奥迪实业集团有限公司); 质谱仪 (型号 Triple TOF-6600, 美国 AB Sciex 公司); 超高效液相色谱仪 (型号 LC20, 日本 Shimadzu 公司)。

2 方法

2.1 CIA 建模

大鼠适应性喂养 1 周后, 除空白对照组, 其余大鼠按照文献方法建立 CIA 模型^[8-9]: 冰浴状态下, 将牛 II 型胶原与弗氏完全佐剂用组织匀质机等体积混匀, 充分乳化, 置于 4 °C 冰箱中备用。将 0.2 mL 混

匀乳液注射于大鼠尾根部 2~3 cm 处皮下, 初次免疫后第 7 天, 对大鼠进行加强免疫, 乳液制备过程与初次免疫一致。随后, 将相同浓度的 0.1 mL 乳液注射于大鼠尾根部皮下, 空白对照组以等量生理盐水对照处理。

2.2 药物制备、分组与给药

铁棒锤生品洗净后, 晾干, 粉碎, 过 7 号筛, 即得; 糞粳制铁棒锤按课题组前期确定的炮制工艺制备^[10]。取粗细均匀的铁棒锤药材, 切成 2 cm 左右均匀的小块, 按铁棒锤与糞粳 1:3 比例置炒药机中 125 °C 拌炒 60 min, 取出, 放凉, 筛去糞粳, 粉碎, 过 7 号筛, 即得。使用前将铁棒锤生品、糞粳制铁棒锤、MTX 分别用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl-cellulose sodium, CMC-Na) 溶液配制成相应浓度。

将 CIA 模型复制成功的大鼠随机分为 6 组, 即铁棒锤生品 (SP, $63 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 糞粳制铁棒锤低 (ZB-L, $63 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中 (ZB-M, $126 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高 (ZB-H, $252 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组, 阳性药对照 (MTX, $1.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和模型对照 (model) 组, 其中铁棒锤生品组 15 只, 其余组均为 6 只。各组给药量参照预实验和等效剂量换算确定 [根据《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》(第一册)^[11], 铁棒锤等效剂量换算给药剂量为 $126 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 以此剂量为中剂量]。另设 6 只未造模大鼠为空白对照组 (control)。加强免疫 7 d 后, 各组大鼠每天灌胃给予相应药物, 连续给药 28 d。control 组和 model 组大鼠每天灌胃等剂量 0.5% CMC-Na 水溶液。

2.3 大鼠一般生理情况和关节炎指数评分

观察大鼠的一般情况并分别于给药前和给药后第 7、14、21、28 天称定各组大鼠体质量。给药前开始观察 CIA 大鼠的发病情况, 并每周观察记录关节颜色、肿胀和变形等情况, 加强免疫后, 每 7 d 进行一次关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分^[12]。

2.4 组织和样本采集

末次给药 2 h 后, 腹腔注射戊巴比妥钠 ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉大鼠后腹主动脉取血, 血液 25 °C 静置 30 min, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离血清, 血清保存在 -80 °C 冰箱中, 备用。灭菌器械取下心脏、脾脏、胸腺和踝关节, 并用预冷的生理盐水将各组织表面的血液清洗干净, 用滤纸吸干表面残留液后称重。大鼠右后踝关节无菌取下, -80 °C 保存, 备用。

2.5 心脏毒性研究

计算各组大鼠心脏指数,心脏指数=心脏湿质量/体质量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),观察炮制前后铁棒锤的心脏毒性及减毒作用。将称重后的大鼠心脏用4%多聚甲醛固定48 h,脱水后,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,脱水封片,数字切片扫描仪采集图像,观察大鼠心脏组织病理变化。将心脏石蜡标本切片后,进行脱蜡至水、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭、一抗孵育、二氨基联苯胺四盐酸(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色、复染细胞核、脱水封片等操作,数字切片扫描仪采集图像,Halo 数据分析计算每张图像Cx43 蛋白表达阳性面积占比。取2.4项部分血清,4℃下解冻,按ELISA试剂盒说明书进行操作,检测各组大鼠血清中LDH、CK、cTnT的含量。

2.6 抗RA药效学研究

计算各组大鼠免疫器官指数,脾脏(胸腺)指数=脾脏(胸腺)湿质量/体质量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。取2.4项部分血清,4℃下解冻,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,检测血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6的含量。大鼠踝关节于4%多聚甲醛溶液固定48 h,脱钙脱水、石蜡包埋、切片后HE染色、封片等,显微镜观察各组大鼠踝关节组织病理变化,数字切片扫描仪采集图像。

2.7 血清样品制备

按照文献方法进行血清样品处理^[13],从-80℃冰箱中取出血清样本解冻,涡旋10 s混匀,取50 μL 至离心管中,加入300 μL 预冷的乙腈-甲醇(1:4)溶液,涡旋3 min,4℃下12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取200 μL 上清液至离心管中,-20℃冰箱中静置30 min,4℃下,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min,取180 μL 上清液至进样瓶,待测。在每个样本的上清液中各取10.0 μL 混合成质控(QC)样本,待测。

2.8 UPLC-Triple-TOF-MS 条件

Waters Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm,1.8 μm),流动相A为0.1%甲酸水,B为0.1%甲酸乙腈,梯度洗脱(0~11.00 min,5%~90% B;11~12 min,90% B;12~12.1 min,90%~5% B;12.1~14 min,5% B);柱温40℃;流速0.40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量2 μL 。

质谱条件:以氮气作为雾化、锥孔气;电喷雾电

离为正、负离子模式;电喷雾离子源(ESI),正离子模式离子化电压5 500 V,去簇电压60 V,脱溶剂气温度550℃。负离子模式离子化电压-4 500 V,去簇电压-60 V,脱溶剂气温度550℃;质量扫描范围 m/z 50~1 000。

2.9 毒效评价实验数据统计处理

采用GraphPad Prism 5.0软件统计数据,结果用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.10 代谢组学数据统计处理

原始数据经过ProteoWizard转换为mzXML格式,采用XCMS程序进行峰提取,对齐,保留时间校正,获得包含质荷比(m/z)、保留时间(t_R)等信息的数据矩阵。将数据矩阵导入SIMCA-P 14.0进行主成分分析(principal components analysis, PCA)和偏最小二乘法判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)。观察各组代谢物组间及组内整体差异,再进行正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA),获取2组间的差异代谢物,采用Permutation检验评价模型的可靠性和过拟合程度。根据变量权重投影值(variable important in projection, VIP) > 1 且 t 检验 $P < 0.05$ 筛选差异性代谢物,根据HMDB、Metlin和KEGG数据库鉴定差异代谢物,将差异代谢物导入MetaboAnalyst 5.0软件中进行代谢通路富集分析。

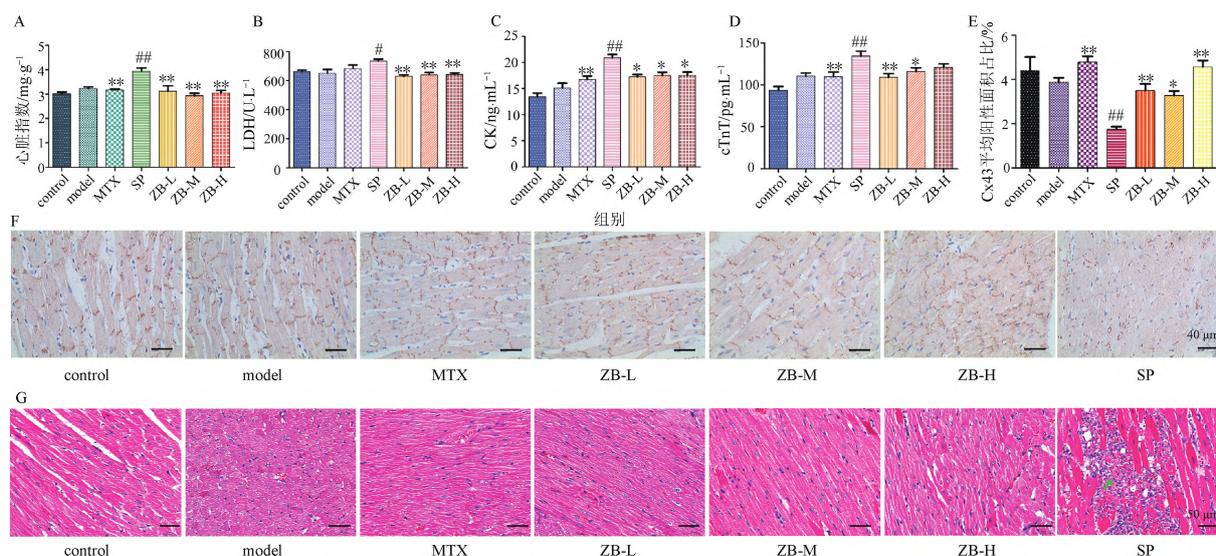
3 结果

3.1 基于心脏毒性的铁棒锤炮制减毒作用

3.1.1 大鼠一般情况 实验过程中,control组大鼠被毛光亮,正常进食及饮水,精神状态良好;model组大鼠在加强免疫后,被毛无光泽,逐渐由白色变为黄色,食、水摄入量明显降低,与control组相比四肢明显肿胀,后肢更明显,体质量下降,并增长缓慢;ZB-L、ZB-M、ZB-H及MTX组大鼠一般状态得到较明显的改善;SP组大鼠精神萎靡、毛发无光泽、代谢旺盛、稀便、眼角有白色分泌物、体质量增长缓慢。

3.1.2 心脏指数 model组大鼠心脏指数较control组差异无统计学意义;与model组相比,SP组大鼠心脏指数升高,差异有统计学意义,MTX、ZB-L、ZB-M、ZB-H组大鼠差异无统计学意义(图1A)。

3.1.3 血清中LDH、CK、cTnT测定 model组大鼠



A. 大鼠心脏指数;B. 大鼠血清中LDH含量;C. 大鼠血清中CK含量;D. 大鼠血清中cTnT含量;E. 大鼠心肌组织中Cx43平均阳性面积占比;F. 大鼠心肌组织中的Cx43表达(免疫组化,×400);G. 大鼠心肌组织病理变化(HE染色,×400),箭头指示心肌纤维变性坏死。control. 空白对照组;model. 模型对照组;MTX. 阳性药组;ZB-L. 糞制铁棒锤低剂量组;ZB-M. 糞制铁棒锤中剂量组;ZB-H. 糞制铁棒锤高剂量组;SP. 铁棒锤生品组(图2~6、表1同)。与model相比 $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ (图2同);与SP相比 $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图1 铁棒锤及糞制铁棒锤对类风湿关节炎大鼠心肌毒性的研究($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Study on myocardial toxicity of raw and Zanba stir-fired *Aconitum pendulum* in rheumatoid arthritis rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

血清中LDH、CK、cTnT浓度较control组差异无统计学意义;与model组相比,SP组大鼠血清中LDH、CK、cTnT浓度明显升高,MTX、ZB-L、ZB-M、ZB-H组大鼠差异无统计学意义(图1B~1D)。

3.1.4 各组大鼠心肌组织中Cx43蛋白表达 与control组相比,model组大鼠心肌组织Cx43蛋白含量无明显变化;与model组相比,SP组大鼠心肌组织Cx43蛋白含量明显降低,MTX、ZB-L、ZB-M、ZB-H组大鼠心肌组织Cx43蛋白含量均无明显变化(图1E、1F)。

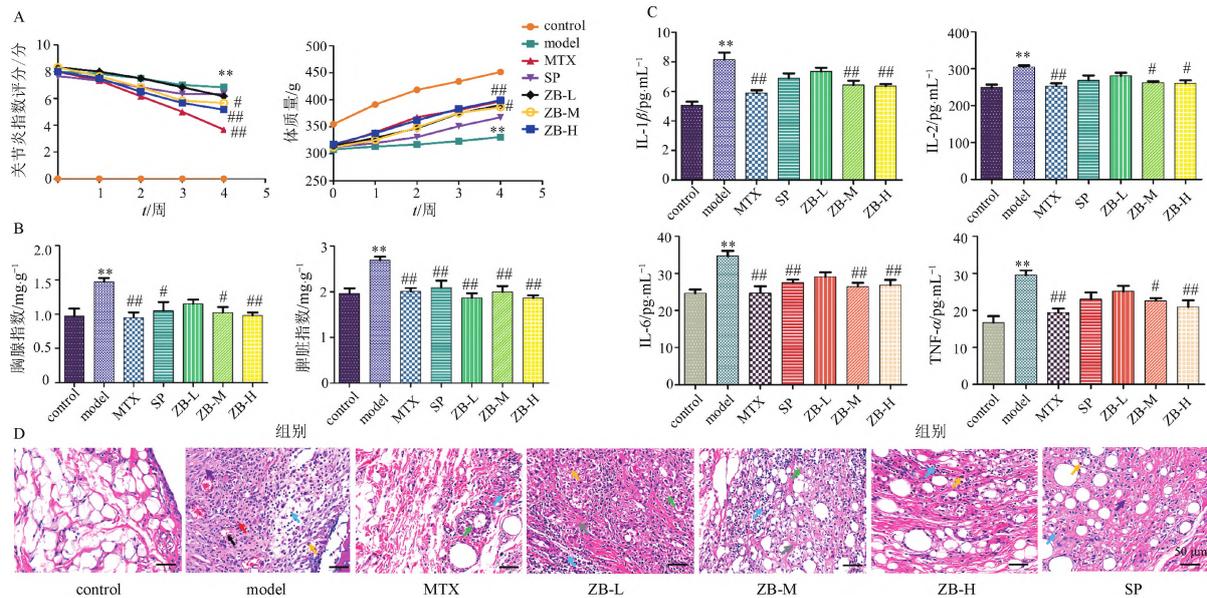
3.1.5 心肌组织病理变化 control、model、MTX、ZB-L、ZB-M、ZB-H组大鼠心肌组织心外膜结构完整清晰,心肌膜心肌纤维多集成束,肌束间有较多结缔组织和丰富的毛细血管,未见明显变性坏死,间质内无炎性细胞浸润及纤维结缔组织增生,心内膜未见明显坏死或纤维组织增生,未见明显病理变化;SP组大鼠心肌组织心外膜结构完整清晰,心肌膜心肌纤维多集成束,肌束间有较多结缔组织和丰富的毛细血管,局部心肌纤维变性坏死,结构模糊,坏死细胞胞核裂解、固缩,胞质溶解(图1G)。

3.2 抗RA药效研究

3.2.1 大鼠体质量及关节炎指数 加强免疫后,model组大鼠体质量较control组明显降低;药物干预28d后,与model组相比,MTX、ZB-L、ZB-M及ZB-H组,大鼠体质量明显升高;SP与model组相比差异无统计学意义(图2A)。加强免疫后,model组大鼠关节炎指数较control组显著升高;药物干预28d后,与model组相比,MTX、ZB-M及ZB-H组,大鼠关节炎指数显著降低;SP及ZB-L组,与model组相比差异无统计学意义(图2A)。

3.2.2 大鼠免疫器官指数变化 与control组相比,model组中大鼠胸腺指数升高;与model组相比,MTX、ZB-M、ZB-H及SP组大鼠胸腺指数显著降低,ZB-L组差异无统计学意义。model组大鼠脾脏指数较control组升高;与model组相比,MTX、SP、ZB-L、ZB-M、ZB-H各组大鼠脾脏指数均显著降低(图2B)。

3.2.3 血清中炎症因子测定 与control组相比,model组大鼠血清中IL-1 β 、IL-2、IL-6及TNF- α 浓度显著升高;与model组相比,MTX、ZB-M、ZB-H组大鼠血清中上述4种炎症因子水平浓度明显降低,差异有统计学意义。与model组相比,SP组大鼠血清



A. 关节炎指数及体质量变化; B. 免疫器官指数; C. 各组大鼠血清中炎症因子含量; D. 各组大鼠踝关节组织病理变化(HE染色, ×400)。紫色箭头指示纤维组织; 红色箭头指示中性粒细胞; 黄色箭头指示巨噬细胞; 蓝色箭头指示淋巴细胞; 黑色箭头指示血管; 绿色箭头指示细胞碎片; 灰色箭头指示纤维组织增生。与 control 相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 铁棒锤及糟把制铁棒锤抗类风湿关节炎药效研究($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Study on anti-rheumatoid arthritis effect of raw and Zanba stir-fired *Aconitum pendulum* in collagen-induced arthritis rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

中 IL-6 显著降低, 其余 3 种炎症因子水平差异均无统计学意义。与 model 组相比, ZB-L 组大鼠血清中 4 种炎症因子水平差异均无统计学意义(图 2C)。

3.2.4 踝关节组织病理变化 与 control 组相比, model 组大鼠滑膜及关节面受损均较为明显, 提示造模较为成功。与 model 组大鼠相比, ZB-L、ZB-M、ZB-H、SP、MTX 组整体病变均不同程度降低, 且 ZB-M、ZB-H 组及 MTX 组改善更明显(图 2D)。

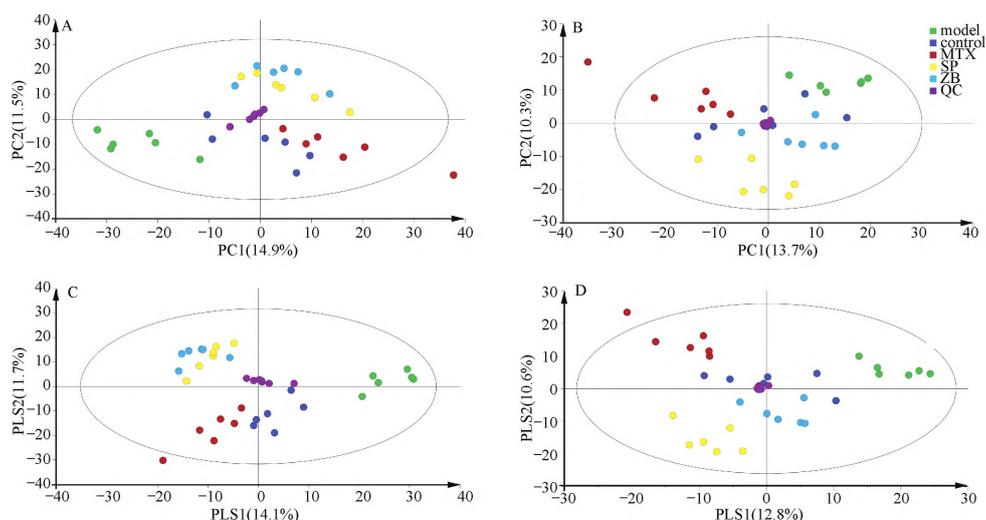
3.3 铁棒锤干预 RA 的血清代谢组学研究

3.3.1 PCA 与 PLS-DA 正、负离子模式下 PCA 结果和趋势大体类似。QC 样品分布集中, 表明分析方法及仪器稳定性良好。正离子模式下(图 3A), control 与 model 组能够较好区分, 说明 2 组之间的代谢物具有差异, 造模对大鼠体内代谢物影响较大, 提示造模成功。MTX 组、SP 组和 ZB 组均远离 model 组, 且接近 control 组, 表明这 3 种药物对类风湿性关节炎具有一定改善作用。SP 组和 ZB 组不能有效分开, 表明 2 组对于模型大鼠代谢的调控作用相似。在负离子模式下(图 3B), SP 及 ZB 组与 model 组同样能够较好区分, 且 ZB 组较 SP 组更接近 control

组, 提示糟把制铁棒锤对于 CIA 大鼠的干预效果优于生品组。为了获得各组大鼠组间更明显的分组特征, 进一步对所有样品数据进行有监督的 PLS-DA(图 3C、3D)。PLS-DA 得分图结果与 PCA 得分图结果相似, 表明铁棒锤生品、糟把制铁棒锤均能够改变 CIA 大鼠血清代谢轮廓。

3.3.2 OPLS-DA 为进一步确定 RA 相关的生物标志物, 本研究进一步将 control、model、SP 及 ZB 组各 2 组之间进行 OPLS-DA, 正、负离子模式下, control 组、model 组与各给药组完全分离(图 4A1~4A3、图 5A1~5A3)。为防止出现过拟合, 进一步进行置换检验, 各组的 Q^2 所在回归线与 Y 轴的截距均小于 0, 说明所建模型未出现过拟合现象(图 4B1~4B3、图 5B1~5B3)。S-plot 可以鉴定组间差异代谢物, 图中每一个点代表一个代谢物, 距离坐标轴越远, 表明对各组间差异贡献值越大(图 4C1~4C3、图 5C1~5C3), $VIP > 1$ 及 t 检验 $P < 0.05$ 的变量优先选为潜在的生物标志物。

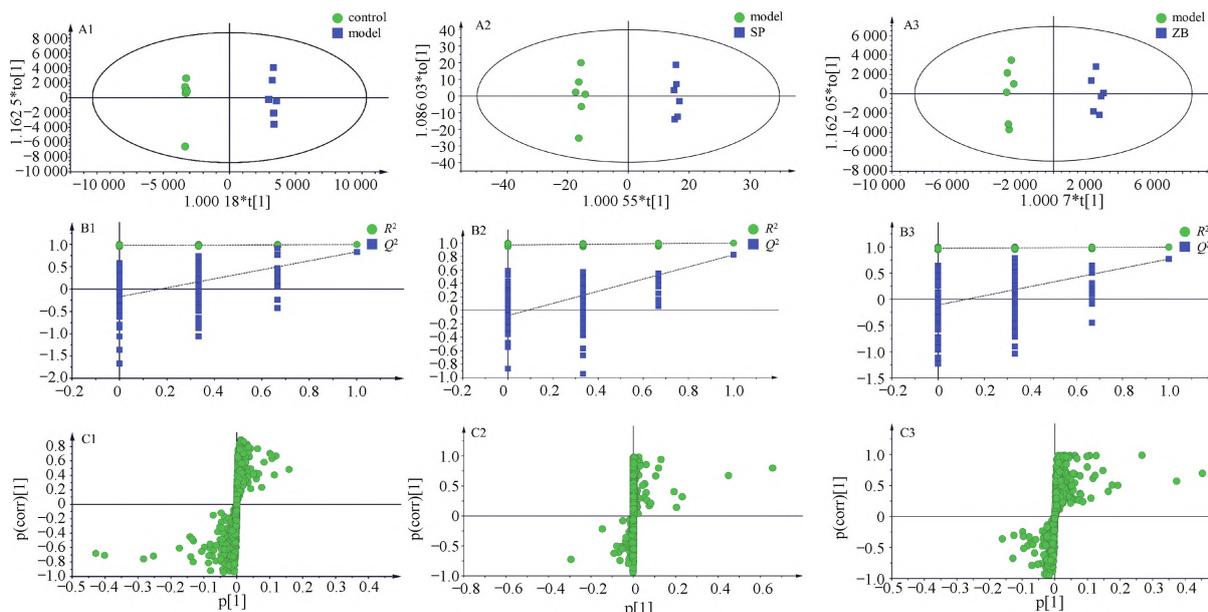
3.3.3 代谢物鉴定与代谢通路分析 根据 S-plot 图、 $VIP > 1$ 及 t 检验 $P < 0.05$ 为筛选原则, 在 control



A. 正离子模式下 PCA 得分图; B. 负离子模式下 PCA 得分图; C. 正离子模式下 PLS-DA 得分图; D. 负离子模式下 PLS-DA 得分图。ZB. 糞把制铁棒锤组(图 4~6、表 1 同)。

图 3 各组大鼠血清代谢轮廓 PCA 及 PLS-DA 得分图

Fig. 3 PCA and PLS-DA score plots of rat serum in each group



A1~A3. OPLS-DA 得分图; B1~B3. 各组 200 次置换检验图; C1~C3. 各组 S-plot 载荷图(图 5 同)。

图 4 正离子模式下各组 OPLS-DA 得分图、200 次置换检验图和 S-plot 载荷图

Fig. 4 OPLS-DA score, 200 displacement test plots, S-plot load map of each group in positive ion mode

组与 model 组之间筛选出 50 个差异标志物, SP 组与 model 组之间筛选出 36 个差异标志物, 将二者进行交集得到 10 个差异标志物(图 6A)。ZB 组与 model 组之间筛选出 37 个差异标志物, 将二者进行交集得到 13 个差异标志物(图 6B)。

将 SP 组与 model 组间筛选得到的 10 个差异代

谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 数据处理平台进行通路富集分析, 结果表明铁棒锤生品主要通过调节甘油磷脂代谢及类固醇激素合成等通路来干预 CIA 大鼠(图 6C), 溶血磷脂酰胆碱(lyso-phosphatidylcholine, LPC) (16:0/0:0) 和 L-苏氨酸水平上调, 而磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC) [14:0/20:1

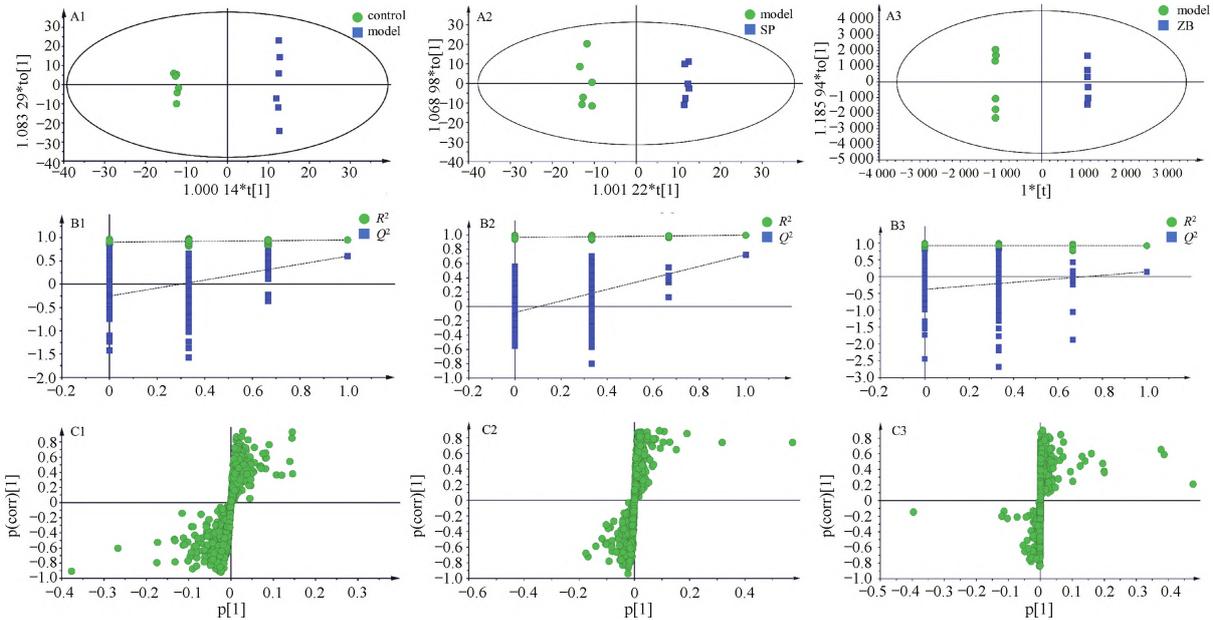
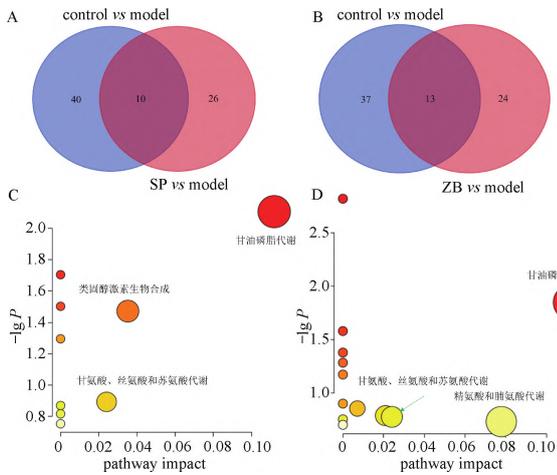


图 5 负离子模式下各组 OPLS-DA 得分图、200 次置换检验图、S-plot 载荷图

Fig. 5 OPLS-DA score, 200 displacement test plots, S-plot load map of each group in negative ion mode



A. control vs model 与 SP vs model 韦恩图; B. control vs model 与 ZB vs model 韦恩图; C. 铁棒锤生品对 CIA 大鼠代谢通路富集分析; D. 糞粑制铁棒锤对 CIA 大鼠代谢通路富集分析。

图 6 铁棒锤及糞粑制铁棒锤对类风湿关节炎大鼠代谢通路的影响

Fig. 6 Effect of raw and Zanba stir-fired *Aconitum pendulum* on metabolic pathway in rheumatoid arthritis rats

(11Z)、PC[14:1(9Z)/20:0]及脱氧胆酸甘氨酸结合物水平下调(表 1)。经糞粑炮制后的铁棒锤干预 CIA 大鼠的主要代谢途径有所差异。将 ZB 组与 model 组间筛选得到的 13 个差异代谢物导入 MetaAnalyst 5.0 数据处理平台进行通路富集分析发

现,糞粑制铁棒锤干预 CIA 大鼠主要通过调节甘油磷脂代谢,精氨酸和脯氨酸代谢及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(图 6D)。与 model 组相比,LPC(16:0/0:0)、D-哌啶酸、DL-2-氨基辛酸等 8 个代谢物上调,而 PC[14:1(9Z)/20:0]、十二烷肉碱、甘氨石胆酸下调(表 1)。基于上述潜在生物标志物构建相关基因蛋白代谢网络(见中国知网本文电子版增强出版附加材料)。

4 讨论

4.1 铁棒锤炮制减毒作用

研究初期,铁棒锤生品组共设置了低、中、高 3 个剂量组,大鼠造模给药后,中、高剂量组均出现了蓄积中毒、陆续死亡现象,故后续实验中,铁棒锤生品仅设置低剂量组。同时,为防止大鼠中毒死亡而影响实验样本数,铁棒锤生品(低剂量)组设置大鼠 15 只,最终存活 7 只大鼠,随机选取 6 只用于后续研究。

CK、LDH 为临床最常应用判断心肌是否出现损伤的指标^[14-16],其在细胞胞质中大量分布。心肌缺血时,细胞能量降低,代谢产物蓄积,发生细胞损伤及细胞生物膜通透性增加,导致细胞胞质酶的释放,灌注 Ca²⁺ 超载及氧自由基会造成生物膜进一步损伤,使得 CK 和 LDH 大量漏出。研究表明,乌头碱

表1 正、负离子模式下铁棒锤及糴粃制铁棒锤抗类风湿关节炎大鼠的内源性差异代谢物

Table 1 Endogenous differential metabolites in collagen-induced arthritis rats intervened by raw and Zanba stir-fired *Aconitum pendulum* in positive and negative ion modes

No.	代谢物	分子式	m/z	t_R/min	control vs	model vs	model vs	ESI
					model	SP	ZB	
1	利塞膦酸	$C_7H_{11}NO_7P_2$	284.004 2	4.495 8	↓ ¹⁾	-	-	+
2	PC[14:0/20:1(11Z)]	$C_{42}H_{82}NO_8P$	760.582 9	10.116 8	↑ ¹⁾	↓ ³⁾	-	+
3	21-脱氧皮质醇	$C_{21}H_{30}O_4$	347.221 7	5.541 2	↑ ¹⁾	-	-	+
4	吡啶-3-丙酮酸	$C_{11}H_9NO_3$	204.065 0	4.130 6	↓ ¹⁾	-	-	+
5	LPC(16:0/0:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	496.339 7	8.709 2	↓ ¹⁾	↑ ⁴⁾	↑ ³⁾	+
6	PC[14:1(9Z)/20:0]	$C_{42}H_{82}NO_8P$	760.582 9	8.549 2	↑ ²⁾	↓ ⁴⁾	↓ ⁴⁾	+
7	D-哌啶酸	$C_6H_{11}NO_2$	130.085 4	0.636 7	↓ ²⁾	-	↑ ⁴⁾	+
8	十二烷肉碱	$C_{19}H_{37}NO_4$	344.280 0	6.439 1	↑ ²⁾	-	↓ ³⁾	+
9	5-脱氧-5-甲硫腺苷	$C_{11}H_{15}N_5O_3S$	298.096 4	2.718 8	↑ ²⁾	-	-	+
10	DL-2-氨基辛酸	$C_8H_{17}NO_2$	160.132 5	0.821 8	↓ ¹⁾	-	↑ ³⁾	+
11	L-脯氨酸	$C_5H_9NO_2$	116.069 6	0.798 6	↓ ²⁾	-	↑ ⁴⁾	+
12	甘氨石胆酸	$C_{26}H_{43}NO_4$	434.320 0	8.330 5	↑ ²⁾	-	↓ ⁴⁾	+
13	N-乙酰基亮氨酸	$C_8H_{15}NO_3$	172.098 3	3.525 9	↓ ¹⁾	-	-	-
14	脱氧胆酸甘氨酸结合物	$C_{26}H_{43}NO_5$	448.306 7	7.142 4	↑ ¹⁾	↓ ³⁾	-	-
15	皮质醇酮	$C_{21}H_{30}O_4$	345.207 2	5.546 8	↑ ¹⁾	-	-	-
16	乙酰戊烯醇酸	$C_{17}H_{24}O_4$	583.336 7	9.005 6	↓ ²⁾	-	↑ ⁴⁾	-
17	L-焦谷氨酸	$C_5H_7NO_3$	128.035 5	1.149 8	↓ ²⁾	-	↑ ³⁾	-
18	L-赖氨酸	$C_6H_{14}N_2O_2$	145.098 5	0.645 5	↓ ²⁾	-	↑ ⁴⁾	-
19	L-苏氨酸	$C_4H_9NO_3$	118.051 1	0.761 6	↓ ²⁾	↑ ³⁾	↑ ³⁾	-

注: ↑. 上升; ↓. 下降; 与 control 相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 model 相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

可使心肌细胞中 LDH 释放量增加,并具有一定的剂量依赖性^[17]。本文发现,铁棒锤生品较其他给药组在干预 CIA 大鼠 28 d 后,血清中 CK、LDH 含量明显升高,说明铁棒锤生品对大鼠心脏的损伤作用。而糴粃制铁棒锤各剂量组大鼠血清中 CK、LDH 含量与模型对照组相比未见升高,说明糴粃制铁棒锤对心肌细胞无明显损伤。

cTnT 为横纹肌兴奋收缩耦联的主要调节蛋白,心肌缺血或供氧不足,导致心肌细胞缺血坏死,坏死的心肌细胞中 cTnT 被大量释放入血,最终导致血清中 cTnT 浓度增高,是灵敏度和特异性较高的诊断心肌损伤的血清标志物。本研究发现,铁棒锤生品给药 28 d 后, CIA 大鼠血清 cTnT 含量明显增加,而糴粃制铁棒锤各剂量组大鼠血清中 cTnT 含量无明显变化。

心脏组织病理变化显示,铁棒锤生品干预 CIA 大鼠 28 d 后,大鼠心肌组织出现心肌纤维变性坏

死、结构模糊,坏死细胞核裂解、固缩、胞质溶解的现象,而其他组大鼠未见明显变性坏死。已有文献报道,乌头碱可使 Cx43 蛋白在特定位点脱磷酸化,从而诱发心律失常,次乌头碱能降低心肌细胞 Cx43 的表达量^[18-20]。本研究结果显示,铁棒锤生品组大鼠心肌组织中, Cx43 表达平均阳性面积占比较模型对照组明显降低。糴粃制铁棒锤组大鼠心肌组织中 Cx43 表达平均阳性面积占比较模型对照组无统计学意义。

综上,通过检测血清中 CK、LDH 等心脏功能相关指标含量、心脏组织病理变化及心脏缝隙连接通道蛋白免疫组化研究发现,铁棒锤生品具有一定的心脏毒性,其机制可能与高毒性的双酯型生物碱等成分使心肌连接蛋白 Cx43 表达降低,导致心肌细胞缺血坏死,使血清中 CK、LDH 及 cTnT 含量增加相关。而糴粃制铁棒锤未表现出明显心脏毒性,表明糴粃炒制可显著降低铁棒锤毒性。

4.2 铁棒锤炮制前后抗 RA 药效学研究

本研究通过观察 CIA 大鼠体质量、关节炎指数、免疫器官指数、血清中炎症因子变化及踝关节 HE 染色结果,发现阳性药对照组,糌粑制铁棒锤中、高剂量组及铁棒锤生品组均可降低大鼠血清炎症因子水平,减轻其踝关节滑膜增生、炎症细胞浸润,软骨损伤等病理状态,表现出了一定的抗 RA 作用,并以糌粑制铁棒锤中、高剂量组疗效更好。以上结果说明,铁棒锤生品及炮制品均有较好的抗 RA 作用,且糌粑制对铁棒锤减毒存效作用确切,该方法是铁棒锤安全有效使用的重要炮制手段。

4.3 铁棒锤炮制前后抗 RA 作用机制研究

RA 是一种自身免疫性疾病,研究发现 RA 患者血清中氨基酸、磷脂酰胆碱、丙酮酸、乳酸等代谢物水平紊乱,其发病机制可能与氨基酸代谢、脂质代谢及能量代谢有关^[21]。

研究表明,氨基酸代谢紊乱及其衍生物的异常表达与滑膜炎反应密切相关^[21-22]。苏氨酸参与调节细胞的应激反应,诱导 IL-6 的产生与释放,增强细胞膜表面 Toll 样受体功能,并影响 IL、TNF 的代谢^[22]。焦谷氨酸是 γ -谷氨酰胺循环的中间产物,谷氨酰胺可保护细胞、组织及器官免受自由基的损伤,从而提高机体抗氧化能力^[23],本研究结果表明,模型对照组大鼠血清中焦谷氨酸较空白对照组降低,提示模型组大鼠氧化应激反应增强^[24]。赖氨酸作为底物可参与蛋白质的生物合成并调控蛋白质代谢,具有提高机体免疫力,促进骨及软骨组织的生长,治疗骨质疏松等作用^[25]。赖氨酸水平下降,可使参与免疫组分合成的蛋白质合成降低,分解代谢增加,最终导致免疫调节能力降低而加重炎症反应^[25]。脯氨酸作为胶原蛋白的主要成分,对维持肌肉及关节的功能起着重要作用^[26]。本研究中,模型对照组较空白对照组大鼠血清中苏氨酸、赖氨酸、脯氨酸含量均下降,与文献报道一致^[27-28],说明 RA 与氨基酸代谢紊乱有关。

甘油磷脂,如 PC、LPC 等是细胞膜的主要成分。LPC 为 PC 在磷脂酶 A2 作用下的水解产物,在炎症诱导的免疫反应中发挥着重要的生物学功能^[29]。PC 和 LPC 可以激活炎症信号通路,使 TNF- α 合成增加,LPC 还可诱导血管内皮细胞中的环氧合酶 2 的表达,促进 RA 的发生发展^[21]。本研究表明,CIA 大鼠 LPC、PC 代谢出现紊乱,表明 RA 发病机制与

甘油磷脂代谢异常关系密切^[30]。

在本研究中,与模型组相比,铁棒锤生品干预后大鼠血清中有 5 个甘油磷脂类代谢物水平显著回调,主要包括 LPC (16:0/0:0)、PC [14:0/20:1 (11Z)] 及 PC [14:1 (9Z)/20:0] 等,推测铁棒锤生品抗 RA 机制为促进 PC 水解为 LPC。而糌粑制铁棒锤抗 RA 机制与生品略有差异。经糌粑制铁棒锤干预后,大鼠血清中有 11 个代谢物水平显著回调,主要为甘油磷脂类和氨基酸类,其中上调 LPC (16:0/0:0)、D-哌啶酸等 8 个代谢物水平,下调 PC [14:1 (9Z)/20:0]、十二烷肉碱、甘氨石胆酸 3 个代谢物水平。推测糌粑制铁棒锤抗 RA 机制为促进 PC 水解为 LPC 密切相关。此外,糌粑制铁棒锤可影响血清中氨基酸类代谢物水平,进而影响炎症因子的释放、提高机体抗氧化能力、影响机体蛋白代谢等,最终达到抗 RA 的作用。研究同时发现,铁棒锤生品对甘油磷脂类代谢物水平调节范围更广泛,而糌粑制铁棒锤对甘油磷脂及氨基酸类代谢物均具有较好的回调作用。而糌粑制铁棒锤能够回调的代谢物种类更多,提示其对 CIA 大鼠血清代谢紊乱的调控作用较铁棒锤更为广泛,可能使其表现出更好的抗 RA 药效。该结果与药效学研究相符合。

综上,藏族药铁棒锤生品及炮制品均可通过降低 CIA 大鼠免疫器官指数,降低血清中炎症因子水平,改善大鼠滑膜及关节面受损程度,通过抗炎、调节甘油磷脂代谢、氨基酸代谢,从而干预 RA 的发展。糌粑制铁棒锤炮制减毒存效作用确切,为铁棒锤的安全有效应用,以及未来针对甘油磷脂代谢、氨基酸代谢靶向调节作用的药物开发提供科学数据。

[参考文献]

- [1] 赵梅宇. 藏族药榜那的鉴别及炮制减毒研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2018.
- [2] 黄仕其, 张焯焯, 李玉泽, 等. 铁牛七药材研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(9): 39.
- [3] LI C Y, ZHOU Z, XU T, et al. *Aconitum pendulum* and *Aconitum flavum*: a narrative review on traditional uses, phytochemistry, bioactivities and processing methods [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 292: 115216.
- [4] 藏族医药经典文献集成编委会. 晶珠本草[M]. 蒂玛尔·丹增彭措, 毛继祖, 罗尚达等编译. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 105.
- [5] 青海省食品药品监督管理局. 青海省藏族药炮制规范[M]. 西宁: 青海人民出版社, 2010: 96.
- [6] LI C Y, SHA M X, PEI Z Q, Dynamic variations in the chemical

- constituents of Tiebangchui stir-fried with Zanba by integrating UPLC-Q-TOF-MS based metabolomics and DESI-MSI [J]. *Arabian J Chem*, 2023, 16: 104957.
- [7] 陈佳俊, 周玉枝, 秦雪梅. 代谢组学技术在生物医药领域研究中的创新与应用[J]. *药学学报*, 2023, 58(8): 2271.
- [8] 董琳琳, 丰晨然, 赵一颖, 等. 基于 PPAR- γ /NF- κ B 信号通路探究芍甘附子汤对胶原诱导性关节炎大鼠的干预作用及作用机制[J]. *中南药学*, 2022, 20(1): 45.
- [9] 周颖芳, 林芷君, 龚宇, 等. 蜂针对 II 型胶原诱导性关节炎大鼠 Th1/Th2 平衡的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(5): 2539.
- [10] LI S L, YU L Q, LI C Y, et al. Optimization of processing technology for Tiebangchui with Zanba based on CRITIC combined with Box-Behnken response surface method [J]. *J Vis Exp*, 2023, doi:10.3791/65139.
- [11] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药(第一册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- [12] 王钰洁, 钟晓宇, 王新红, 等. 基于 TLRs/MAPKs/NF- κ B 信号通路探讨灰毛党参抗类风湿性关节炎活性及机制[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(22): 6164.
- [13] ZHENG F J, ZHAO X J, ZENG Z D, et al. Development of a plasma pseudotargeted metabolomics method based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(8): 2519.
- [14] 李晗, 宋玲, 高云航, 等. 诃子、甘草与制草乌合用调控心脏代谢酶 CYP2J3 减毒机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(17): 88.
- [15] 柯振符, 杨文杰, 黎舒. 几种常见心肌损伤生化标记物应用价值的比较和分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11(2): 83.
- [16] 冯群, 李晓宇, 栾永福, 等. 附子水提物单次给药对小鼠心脏“量-时-毒”关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(5): 927.
- [17] 刘岩. 乌头类生物碱心肌毒性作用的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [18] 王世红, 陈安宝, 李芳. 乌头碱中毒心脏毒性的分子机制研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2020, 35(6): 972.
- [19] 章诗伟, 任杰林, 张黎, 等. 乌头碱对培养新生大鼠心肌细胞 Connexin43 蛋白磷酸化的影响[J]. *中国法医学杂志*, 2008, 23(2): 92.
- [20] 李志勇, 谭鹏, 孙建宁, 等. 次乌头碱对乳大鼠原代培养心肌细胞 Ca^{2+} 及 Cx43 表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(11): 2689.
- [21] 吕丽苹, 胡扬, 宋辉, 等. 中药及民族药治疗类风湿性关节炎大鼠代谢组学研究进展[J]. *中南药学*, 2023, 21(1): 192.
- [22] 刘翌, 彭成, 谢运飞. 类风湿性关节炎与氨基酸代谢变化的规律性探讨[J]. *四川医学*, 2021, 42(8): 794.
- [23] LI H, JIANG W, LIU Y, et al. The metabolites of glutamine prevent hydroxyl radical-induced apoptosis through inhibiting mitochondria and calcium ion involved pathways in fish erythrocytes[J]. *Free Radical Biol Med*, 2016, 92: 126.
- [24] 占翔. 微透析技术结合代谢组学探讨栀子苷干预佐剂性关节炎大鼠代谢紊乱的机制[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.
- [25] 蒋思思. 基于代谢组学的维药刺山柑抗类风湿性关节炎有效性评价及作用机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015.
- [26] 徐依依. 基于苍术燥性对 RA 药效学及代谢组学研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [27] MADSEN R, LUNDSTEDT T, GABRIELESON J, et al. Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(1): R19.
- [28] KOBAYASHI T, OKADA M, ITO S, et al. Amino acid profiles in relation to chronic periodontitis and rheumatoid arthritis[J]. *Open J Stomatol*, 2014, 4(2): 49.
- [29] 庞祥天. 基于脂质组学艾灸治疗类风湿性关节炎大鼠的效应机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [30] LI Y, LV D, LIU R, et al. Non-target metabolomic analysis reveals the therapeutic effect of *Saposhnikovia divaricata* decoction on collagen-induced arthritis rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113837.

[责任编辑 陈玲]