



# 团 体 标 准

T/CACM 1567—2024

## 类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证动物模型建立规范

Guidelines for establishing animal models of rheumatoid arthritis with cold dampness obstruction pattern and damp heat obstruction pattern

2024-01-11 发布

2024-01-11 实施

中华中医药学会 发布

## 目 次

前言 .....	II
引言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 类风湿关节炎的诊断标准与中医辨证标准 .....	1
4.1 类风湿关节炎诊断标准 .....	1
4.2 类风湿关节炎寒湿痹阻证的辨证标准 .....	2
4.3 类风湿关节炎湿热痹阻证的辨证标准 .....	2
5 类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证病证结合动物模型的建立 .....	2
5.1 类风湿关节炎大鼠模型的建立 .....	2
5.2 类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠模型的建立 .....	2
5.3 类风湿关节炎湿热痹阻证大鼠模型的建立 .....	3
5.4 类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证大鼠模型的评价指标及标准 .....	3
6 标准建议概要表 .....	6
附录 A（资料性） 类风湿关节炎病证结合动物模型研究进展 .....	8
参考文献 .....	12

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件中的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国中医科学院中药研究所提出。

本文件由中华中医药学会归口。

本文件起草单位：中国中医科学院中药研究所、南方医科大学中西医结合医院、华中科技大学同济医学院附属同济医院、北京中医药大学中药学院、成都中医药大学药学院、澳门科技大学中医药学院、香港浸会大学中医药学院、南方医科大学比较医学研究所、中国中医科学院西苑医院、中国中医科学院中医基础理论研究所、北京中医药大学第三附属医院、北京大学深圳医院、北京中医药大学东直门医院、《中医正骨》杂志编辑部、中国中医科学院中医临床基础医学研究所、北京中医药大学中医学院、安徽中医药大学第一附属医院、天津中医药大学第一附属医院、中国中医科学院广安门医院、南京大学生命科学学院、中日友好医院临床医学研究所、上海中医药大学光华医院、福建省第二人民医院、中国中医科学院望京医院、复旦大学药学院、河南中医药大学中医药科学院、广州中医药大学第一附属医院、上海中医药大学附属曙光医院、河南风湿病医院、中日友好医院、上海中医药大学龙华医院、武汉大学中南医院循证与转化医学中心和上海中医药大学附属曙光医院。

本文件主要起草人：林娜、张彦琼、肖长虹、涂胜豪、孙建宁、徐世军。

本文件参与起草人（按姓氏拼音排序）：曹炜、陈卫衡、何东仪、姜泉、靳英辉、孔祥英、李泰贤、梁倩倩、林昌松、林娜、刘春芳、刘宏潇、刘健、刘维、刘兆兰、娄玉铃、吕诚、毛霞、苗明三、沈晓燕、孙建宁、孙洋、唐今扬、陶庆文、涂胜豪、王海隆、王庆文、王义军、王智勇、吴宽裕、肖诚、肖涟波、肖长虹、徐世军、詹红生、张彦琼、赵咏芳。

本文件指导委员会：刘良、吕爱平、顾为望、刘建勋、陈小野、陈卫衡。

## 引 言

类风湿关节炎 (Rheumatoid arthritis) 是一种常见的以对称性多关节炎为主要临床表现, 以关节滑膜炎、关节进行性破坏为特征, 严重者导致关节畸形和功能丧失的慢性炎症性自身免疫病<sup>[1]</sup>。目前, 全球 0.5%~1.0% 的人群饱受该病困扰<sup>[2]</sup>, 5 年~10 年致残率达 43.5%<sup>[3]</sup>, 已严重影响患者的生活质量、生理功能、社会功能和心理功能, 给社会造成巨大负担<sup>[4,5]</sup>。现代医学治疗类风湿关节炎的方法主要包括药物治疗和手术治疗<sup>[6]</sup>, 其中, 药物治疗包括非甾体抗炎药物 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、糖皮质激素类药物、传统合成改善病情抗风湿药物 (disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) 以及生物制剂 DMARDs 或靶向合成 DMARDs。然而, 具有不同证型的类风湿关节炎患者对于上述治疗方案的应答不尽相同, 总有效率不足 70%<sup>[7]</sup>。

类风湿关节炎中医命名为“尪痹”。依照 T/CACM 013—2017<sup>[8]</sup>、GB/T 15657—2021、GB/T 16751.1—2023, GB/T 16751.2—2021 和 GB/T 16751.3—2023)<sup>[9-12]</sup>, 寒湿痹阻证和湿热痹阻证属于类风湿关节炎的核心证候和主要辨证分型<sup>[13]</sup>。很多中医名家在长期的临床实践中, 也常常以“寒热为纲”辨证论治, 取得了显著的疗效<sup>[14]</sup>。类风湿关节炎病证结合动物模型研究进展见附录 A。

病证结合动物模型是连接中医基础和临床的桥梁, 可在一定程度模拟临床实际诊疗中的病证一体, 对系统阐释疾病的科学内涵及揭示中医药防治疾病的作用原理具有重要意义<sup>[15]</sup>。前期已有针对类风湿关节炎核心证候“寒湿痹阻证和湿热痹阻证”病证结合动物模型的建立方法, 如通过风寒湿和风湿热外部刺激, 并结合外涂葡萄球菌肠毒素B; 或在胶原诱导型关节炎 (Collagen-induced arthritis, CIA) /佐剂诱导型关节炎 (Adjuvant-induced arthritis, AIA) 模型基础上, 于人工气候造模箱内给予环境因素刺激造模<sup>[16-17]</sup>。然而, 上述方法建立的病证结合动物模型存在与临床对应性不佳、疾病严重度和病证结合评价指标均未进行规范化和标准化等问题<sup>[18]</sup>, 在一定程度上影响了中医药研究水平提高和中西医结合高质量发展。

项目组以病证结合诊疗思想为指导, 以类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证动物模型为示范, 联合国内相关领域的临床、药学、动物学和方法学等知名专家, 遵循“证据为主、共识为辅、经验为鉴”的原则, 在综合评价病证结合动物模型与人类疾病相比较的发病机理同源性、行为表型一致性和药物治疗预见性的基础上, 共同制定了涉及动物类型、关节炎造模方法、外部刺激条件和成模评估指标等内容的类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证动物模型建立规范, 旨在为揭示中医药优势病种的病证本质、疗效机制以及开展创新型中药新药研发提供有效的研究媒介, 具有重要的学术价值、社会效益和应用前景。

本文件项目组成员在项目正式启动前均签署了“利益冲突声明书”, 且已存档 (共 73 人次)。参加本文件制定的专家和执笔人均声明“无利益冲突”。本文件在制定过程中, 相关科研项目管理部门未参与本文件的制作, 也未对参与本文件制定的专家提出任何要求和意见。

# 类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证动物模型建立规范

## 1 范围

本文件明确了类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证动物模型的定义、建立方法、评价指标及标准方面的关键性问题。

本文件适用于从事类风湿关节炎诊疗相关的临床和基础研究的科研人员建立类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证动物模型。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 15657 中医病证分类与代码

GB/T 16751.1 中医临床诊疗术语 第1部分：疾病

GB/T 16751.2 中医临床诊疗术语 第2部分：证候

## 3 术语和定义

GB/T 15657、GB/T 16751.1 和 GB/T 16751.2 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**寒湿痹阻证** cold dampness obstruction pattern

因寒湿侵袭，痹阻经脉，骨节失养所致。临床以关节肿胀冷痛，固定不移，遇寒痛剧，甚或关节僵硬、畸形，舌质淡或暗，舌苔白或滑腻，脉沉弦或弦紧，伴见患处皮色不红，触之冰冷等为特征的证候。

### 3.2

**湿热痹阻证** damp heat obstruction pattern

因湿热侵淫，痹阻筋骨关节所致。临床以肢体关节肿胀沉重，局部红肿灼痛，痛不可触，得冷稍舒，舌质红，舌苔黄腻，脉滑数，或伴见身热，口渴等为特征的证候。

## 4 类风湿关节炎的诊断标准与中医辨证标准

### 4.1 类风湿关节炎诊断标准

参照 1987 年 美国风湿病学会（ARA）分类标准<sup>[20]</sup>或 2010 年美国风湿病学会/欧洲抗风湿病联盟

(ACR/EULAR) 类风湿关节炎分类标准<sup>[21]</sup>。

#### 4.2 类风湿关节炎寒湿痹阻证的辨证标准

具备主症 2 项，或主症 1 项 + 次症 2 项，结合舌、脉即可诊断，具体内容如下。

##### a) 主症：

- 1) 关节冷痛，触之不温，皮色不红；
- 2) 疼痛遇寒加重，得热痛减。

##### b) 次症：

- 1) 关节拘急，屈伸不利；
- 2) 肢冷，或畏寒喜暖；
- 3) 口淡不渴。

##### c) 舌脉：舌体胖大，舌质淡，苔白或腻，脉弦或紧。

#### 4.3 类风湿关节炎湿热痹阻证的辨证标准

具备主症 2 项，或主症 1 项 + 次症 2 项，结合舌、脉即可诊断，具体内容如下。

##### a) 主症：

- 1) 关节肿热疼痛；
- 2) 关节触之热感或自觉热感。

##### b) 次症：

- 1) 关节局部皮色发红；
- 2) 发热；
- 3) 心烦；
- 4) 口渴或渴不欲饮；
- 5) 小便黄。

##### c) 舌脉：舌质红，苔黄腻或黄厚，脉弦滑或滑数。

### 5 类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证病证结合动物模型的建立

注：本模型是以雄性 Lewis 大鼠，佐剂诱导型关节炎（AIA）为例。

#### 5.1 类风湿关节炎大鼠模型的建立

5.1.1 造模剂的制备：于造模前 2 h 将 100 mg 灭活结核杆菌 M tuberculosis H37 Ra 溶入 10 mL 液体石蜡中形成 10 mg/mL 悬浮液，每隔 10 min 吹打一次，避光保存。

5.1.2 单纯 AIA 模型的诱导：对各模型组中雄性 Lewis 大鼠（6 周~8 周龄，200 g ± 20 g）尾部皮下注射 0.1 mL 配置好的 10 mg/mL 的造模剂，诱导 AIA 模型。正常对照组以等量生理盐水对照处理。

#### 5.2 类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠模型的建立

在复制 AIA 模型的同时，模拟类风湿关节炎致病原因，分别施加外界风寒湿（风速 6 m/s，相对湿度均为 60%，温度为 4℃，每日 2 h，连续 14 天）刺激，制备类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠模型。

### 5.3 类风湿关节炎湿热痹阻证大鼠模型的建立

在复制 AIA 模型的同时，模拟类风湿关节炎致病原因，分别施加外界风湿热（风速 6 m/s，相对湿度均为 90%，温度为 37℃，每日 2 h，连续 14 天）刺激，制备类风湿关节炎湿热痹阻证大鼠模型。

### 5.4 类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证大鼠模型的评价指标及标准

#### 5.4.1 疾病严重度评价指标

通过以下评价指标观察并记录各组大鼠的疾病严重情况：

- a) 动物整体状态：自免疫第 1 天开始，每日观察大鼠精神状态和食欲等；
- b) 疾病发生率：至造模第 27 天，取材前，记录每组发病大鼠只数/造模大鼠总只数的比例；
- c) 首次发病时间：自免疫第 1 天开始，记录每组大鼠首次发病时间；
- d) 右后肢肿胀度、关节炎临床积分和受累关节影像学改变：自免疫 8 天开始，每两日用游标卡尺测量大鼠的右后肢直径，评估大鼠关节炎临床积分，截止至取材前一天；同时，于取材前一天运用 X 线和 micro-CT 观察大鼠受累关节的影像学改变；
- e) 体重：自免疫第 1 天开始，每周测量大鼠体重两次，截止至取材前一天；
- f) 炎性因子水平：大鼠取材后，收集血清，以 Elisa 法测定正常对照组、各 AIA 模型组大鼠血清中超敏 C 反应蛋白、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17 和 IL-23 含量；
- g) 免疫球蛋白 G (IgG) 和免疫球蛋白 M (IgM) 含量：大鼠取材后，收集血清，以酶联免疫吸附测定 (Elisa) 法测定正常对照组、各 AIA 模型组大鼠血清中 IgG 和 IgM 含量；
- h) 胸腺指数：于取材当天收集并称量大鼠胸腺，除以相应的大鼠体重，计算胸腺指数 (mg/g)；
- i) 脾脏指数：于取材当天收集并称量大鼠脾脏，除以相应的大鼠体重，计算脾脏指数 (mg/g)。

#### 5.4.2 疾病严重度评价标准

疾病严重度评价标准如下：

- a) 发病时间和发病率：类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证大鼠的首次发病时间（造模后第 8 天~10 天）均早于单纯类风湿关节炎大鼠（12 天~14 天），发病率为 100%；
- b) 疾病表征：类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证大鼠精神萎靡、食欲不振、关节红肿、关节炎临床积分升高、畸形症状以及病理改变表现明显，湿热痹阻证更甚。对证方剂干预后可显著改善其精神状态、食欲、关节病变程度、降低关节炎临床积分和右后肢肿胀度、缓解体重下降，而不对证方剂对其的改善作用不显著；
- c) “炎症-免疫”系统调节相关指标：类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证大鼠体内超敏 C 反应蛋白、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17 和 IL-23 等炎性因子水平、IgG 和 IgM 含量，以及胸腺/脾脏指数均较正常组大鼠高。对证方剂干预后可显著降低其血清中各炎性因子水平、IgG 和 IgM 含量，以及胸腺/脾脏指数，而不对证方剂对其的改善作用不显著。

#### 5.4.3 中医证型评价指标

通过以下指标观察并记录各组大鼠的中医证型指标情况。

- a) 关节表面温度：从发病第一天开始，每日通过红外热像仪测量大鼠右后肢关节表面温度。
- b) 受累踝关节处皮肤颜色：从发病第一天开始，每日观察受累踝关节处皮肤颜色。

- c) 每日饮水量和尿量：运用量筒测量每组大鼠每日饮水量和尿量。
- d) 二便形状和颜色：从发病第一天开始，每日观察大鼠大便形状和大小便颜色。
- e) 受累关节痛阈：以 Von frey hair 机械疼痛测试仪、热辐射疼痛测试仪和丙酮测量各组大鼠痛阈，分别在造模前、造模后测量（每隔两天测量一次），每次测量维持 3 个周期，中间间隔 5 min：
  - 1) 机械痛：将大鼠放置于密闭网格框架内，露出足底，用 Von frey hair 机械疼痛测试仪中不同重量的测试针分别刺激大鼠后足底表面，基于上下法测量其退缩反应频率<sup>[22]</sup>；
  - 2) 热辐射痛：将大鼠放置于密闭透明框架内，调节热辐射红外测痛仪刺激强度，使正常对照组大鼠的退缩反应时间为 15 s 左右；用此强度作为基准刺激其他各模型组大鼠足底，记录反应时间<sup>[23]</sup>；
  - 3) 丙酮冷刺激痛：将大鼠放置于密闭网格框架内，露出足底，用 50  $\mu\text{L}$  的丙酮通过 1 mL 注射器喷洒刺激大鼠后足底表面，1 min 内对其反应进行监测和评分，并按 3 分制评分。0 分：后足无反应；1 分：后足 1 次撤回反应；2 分：后足多次撤回反应，伴有 1 次舌舔；3 分：后足多次撤回反应，伴有多次舌舔<sup>[24]</sup>。
- f) 能量代谢水平相关酶和激素：大鼠取材后，收集血清和血浆，运用 Elisa 或生化法测量上述指标含量。
- g) 血流变血液黏度、凝血因子、血细胞比容和受累肢体微血流量等：大鼠取材后，收集血清和血浆，运用仪器检测上述指标变化。

#### 5.4.4 中医证型评价标准

中医证型评价标准如下：

- a) 关节表面温度：类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠的关节表面温度显著低于单纯类风湿关节炎大鼠，湿热痹阻证大鼠的关节表面温度显著高于单纯类风湿关节炎大鼠；对证方剂干预后可升高/降低其关节表面温度，而不对证方剂对其影响不明显；
- b) 受累踝关节处皮肤颜色：类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠的受累踝关节处皮肤红肿程度低于单纯类风湿关节炎大鼠，湿热痹阻证大鼠的受累踝关节处皮肤红肿程度高于单纯类风湿关节炎大鼠；对证方剂干预后可改善其红肿程度，而不对证方剂对其影响不明显；
- c) 每日饮水量和尿量：类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠的每日饮水量和尿量均少于正常大鼠和单纯类风湿关节炎大鼠，湿热痹阻证大鼠的每日饮水量和尿量均多于正常大鼠和单纯类风湿关节炎大鼠；对证方剂可有效提高/减少其每日饮水量和尿量，而不对证方剂对其影响不明显；
- d) 二便形状和颜色：类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠便溏、尿液色白，湿热痹阻证大鼠便秘、尿液发黄；对证治疗可有效改善大便形状，二便颜色，而不对证方剂对其影响不明显；
- e) 受累关节痛阈：类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠和湿热痹阻证大鼠痛阈（机械痛、热辐射痛和丙酮冷刺激痛）均显著低于正常大鼠和单纯类风湿关节炎大鼠。其中，类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠的丙酮冷刺激痛阈降低更为明显，而湿热痹阻证大鼠的热辐射痛阈降低更为明显；对证治疗可有效改善类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠的机械痛阈和丙酮冷刺激痛阈/湿热痹阻证大鼠的机械痛阈和热辐射痛阈，而不对证方剂对其影响不明显；
- f) 能量代谢水平相关酶和激素：类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠的能量代谢指标（肝脏  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$  酶、琥珀酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、大鼠血浆 FT3、FT4、促甲状腺激素、促甲

状腺释放激素)水平均显著低于正常大鼠和单纯类风湿关节炎大鼠,湿热痹阻证大鼠的能量代谢指标水平均显著高于正常大鼠和单纯类风湿关节炎大鼠;对证方剂可有效提高/降低其能量代谢水平,而不对证方剂对其影响不明显;

- g) 血流变血液黏度、凝血因子、血细胞比容和受累肢体微血流量等:类风湿关节炎寒湿痹阻证大鼠的血液黏度和受累肢体微血流量等均显著低于正常大鼠和单纯类风湿关节炎大鼠,湿热痹阻证大鼠的上述指标均显著高于正常大鼠和单纯类风湿关节炎大鼠;对证方剂可有效提高/降低其血流变等水平,而不对证方剂对其影响不明显。

#### 5.4.5 类风湿关节炎寒湿痹阻证的生物内涵

##### 5.4.5.1 中医证型核心基因集

###### 5.4.5.1.1 应同时满足以下筛选标准:

- a) 与正常大鼠或单纯类风湿关节炎大鼠相比,基因表达量显著升高(差异倍数大于2倍,且 $P < 0.05$ );
- b) 在证型差异基因互作网络的三种拓扑特征值(连接度、介度、紧密度)均显著高于其相应指标中位数。

5.4.5.1.2 筛选结果: A2M, ADCY2, ADCY7, AGT, ALOX15B, BCL2L1, BDKRB1, CCL2, CCL20, CCL5, CCR5, CCR7, CD4, CD40, CDKN1A, CHRM4, CHUK, CIITA, CSF2, CXCL12, EDNRB, ESR1, FGF2, FOS, GNAO1, ICAM1, IFNG, IKBKB, IL10, IL17A, IL18, IL1A, IL1B, IL2, IL23A, IL3, IL4, IL6, IL8, IRF4, IRF5, IRF7, JUN, LCK, LEP, MMP1, MMP2, MMP9, NCOA3, OXTR, PPARG, PRKAR1B, PTGS2, PTK2B, SAA1, SPP1, STAT1, TGFBI, TLR2, TLR4, TNF, TNFSF11, VEGFA。

##### 5.4.5.2 中医证型核心基因所参与的生物学反应

5.4.5.2.1 能量代谢相关生物学反应和分子活性: Regulation of lipid metabolic process, Oxidoreductase activity, Oxidation-reduction process, Organic acid metabolic process, Oxoacid metabolic process, Carboxylic acid metabolic process, Lipid metabolic process。

5.4.5.2.2 血液循环相关生物学反应: Blood circulation, Circulatory system process。

##### 5.4.5.3 中医证型核心基因所参与的通路

5.4.5.3.1 激素合成和能量代谢相关通路: Steroid biosynthesis, Biosynthesis of unsaturated fatty acids, Nicotinate and nicotinamide metabolism, PPAR signaling pathway。

5.4.5.3.2 血液循环相关通路: Vascular smooth muscle contraction。

5.4.5.3.3 与细胞外基质和细胞黏附相关通路: ECM-receptor interaction, Cell adhesion molecules (CAMs), Focal adhesion。

5.4.5.3.4 与神经递质功能相关通路: Neuroactive ligand-receptor interaction。

#### 5.4.6 类风湿关节炎湿热痹阻证的生物内涵

##### 5.4.6.1 中医证型核心基因集

###### 5.4.6.1.1 筛选标准:

- a) 与正常大鼠或单纯类风湿关节炎大鼠相比,基因表达量显著升高(差异倍数大于2倍,且 $P < 0.05$ );

0.05);

b) 在证型差异基因互作网络的三种拓扑特征值（连接度、介度、紧密度）均显著高于其相应指标中位数。

5.4.6.1.2 筛选结果：A2M, AGT, AHR, CCL2, CCL20, CCL21, CCL5, CCR5, CD28, CD3D, CD3G, CD40, CD80, CD86, CD8A, CD8B, CHRM4, CHUK, CIITA, CSF2, CTLA4, CXCL1, CXCL12, CXCL5, CXCR4, ESR1, FLT1, FOS, HLA-DRB5, ICAM1, IFNG, IGF1, IKBKB, IL10, IL17A, IL18, IL1A, IL1B, IL2, IL23A, IL2RB, IL4, IL4R, IL6, IL8, IRF5, IRF7, ITGAV, ITGB2, JUN, MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, NFKB2, PDLIM7, PDPK1, PGF, PLAU, PPARG, PRDM1, PRKCQ, PRLR, PTGS2, PTK2B, RAC2, SAA1, SPP1, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS1, TLR2, TLR4, TLR9, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFSF11, TRAF1, VEGFA, ZAP70。

#### 5.4.6.2 中医证型核心基因所参与的生物学反应

免疫调节相关生物学反应：T cell receptor complex, Positive regulation of leukocyte chemotaxis, Positive regulation of leukocyte migration, Regulation of leukocyte chemotaxis, Granulocyte chemotaxis, Regulation of leukocyte migration。

#### 5.4.6.3 中医证型核心基因所参与的通路

5.4.6.3.1 免疫调节相关通路：Primary immunodeficiency, T cell receptor signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, Cytokine-cytokine receptor interaction。

5.4.6.3.2 细胞外基质和细胞黏附相关通路：ECM-receptor interaction, Cell adhesion molecules；

5.4.6.3.3 神经递质功能相关通路：Neuroactive ligand-receptor interaction。

## 6 标准建议概要表

本文件达成 5 条标准建议，见表 1。

表 1 类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证动物模型建立达成的标准建议概要表

序号	标准条目	投票结果 <sup>a</sup>	推荐强度
1	构建类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证病证结合动物模型时，雄性大鼠/小鼠较雌性大鼠/小鼠，以及兔等动物更为适宜，其中雄性 DBA/1J 小鼠、Wistar 大鼠、SD 大鼠、C57BL/6 小鼠、人 TNF 转基因小鼠和 Lewis 大鼠均可作为实验动物载体	37/38 (97.36%) 推荐	标准建议
2	构建类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证病证结合动物模型时，胶原诱导型关节炎模型和佐剂诱导型关节炎模型均可有效模拟临床类风湿关节炎患者发病机制	38/38 (100.00%) 推荐	标准建议
3	运用人工气候造模箱为诱导类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证病证结合动物模型的有效造模方法。其中，寒湿痹阻证的空气湿度为 60%~70%，温度为 4℃；湿热痹阻证的空气湿度为 90%~95%，温度为 37℃。风速为 6 m/s，每日刺激 2 h~3 h，连续 14 天	38/38 (100.00%) 推荐	标准建议

表 1 类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证动物模型建立达成的标准建议概要表（续）

序号	标准条目	投票结果 <sup>a</sup>	推荐强度
4	<p>评估类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证病证结合动物模型成功与否的疾病严重度指标主要包括：</p> <p>1) 动物精神状态、体重、食欲、毛发色泽枯荣；</p> <p>2) 关节炎发病率、肢体累计率、炎症积分、首次发病时间、受累踝关节和膝关节病变；</p> <p>3) 动物血清中超敏 C 反应蛋白、TNF-<math>\alpha</math>、IL-6、IL-17 和 IL-23 等炎症因子表达水平；</p> <p>4) 动物血清中 IgG 和 IgM 含量</p>	38/38 (100.00%) 推荐	标准建议
5	<p>评估类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻证病证结合动物模型成功与否的中医证型指标主要包括：</p> <p>1) 关节表面温度；</p> <p>2) 受累踝关节处皮肤颜色；</p> <p>3) 每日饮水量和尿量；</p> <p>4) 二便形状和颜色；</p> <p>5) 受累关节痛阈（机械痛、热辐射痛、冷痛）；</p> <p>6) 能量代谢相关指标（肝脏 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶、Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶、琥珀酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、大鼠血浆 FT3、FT4、促甲状腺激素、促甲状腺释放激素）表达水平；</p> <p>7) 血流变血液黏度、凝血因子、血细胞比容和受累肢体微血流量等</p>	38/38 (100.00%) 推荐	标准建议
注：标准条目均为专家标准形成。			
<sup>a</sup> 投票结果中分母为参与投票总人数，分子为实际投票人数。			

## 附录 A

(资料性)

### 类风湿关节炎病证结合动物模型研究进展

#### A.1 概述

类风湿关节炎 (Rheumatoid arthritis) 是一种常见的以对称性多关节炎为主要临床表现, 以关节滑膜炎、关节进行性破坏为特征, 严重者导致关节畸形和功能丧失的慢性炎症性自身免疫病<sup>[1]</sup>。目前, 全球 0.5%~1.0% 的人群饱受该病困扰<sup>[2]</sup>, 5 年~10 年致残率达 43.5%<sup>[3]</sup>, 已严重影响患者的生活质量、生理功能、社会功能和心理功能, 给社会造成巨大负担<sup>[4,5]</sup>。现阶段治疗类风湿关节炎的药物, 如非甾体类抗炎药、疾病改善性抗风湿药等西药, 尽管取得了一些疗效, 但毒副作用大。而中医药治疗类风湿关节炎具有毒副作用小和药效持久的特点, 近年来在临床中又愈加广泛的应用, 其基础研究也成为热点。

类风湿关节炎在中医中属于“尪痹”, 依照 T/CACM 013—2017<sup>[8]</sup>、GB/T 15657-2021、GB/T 16751.1—2023、GB/T 16751.2—2021 和 GB/T 16751.3—2023<sup>[9-12]</sup>, 该病具有 8 个核心证候, 分别是: 风湿痹阻证、寒湿痹阻证、湿热痹阻证、痰淤痹阻证、淤血痹足证、气血两虚证、肝肾亏虚证和气阴两虚证。随着西方医学传入我国, 现代中医吸收了西医辨病之长, 逐渐形成病证结合、辨证论治模式, 其在类风湿关节炎的中医诊疗中发挥出显著疗效。病证结合动物模型是连接中医基础和临床的桥梁, 可在一定程度模拟临床实际诊疗中的病证一体, 对系统阐释疾病的科学内涵及揭示中医药防治疾病的作用原理具有重要意义<sup>[15]</sup>。现将近年类风湿关节炎病证结合动物模型的研究进行综述。

#### A.2 寒湿痹阻与湿热痹阻病证结合动物模型

在临床中, 中医对于类风湿关节炎的辨证分型较多, 其中寒证和热证型为重点, 占有证型的 71.8%<sup>[25]</sup>。《素问·阴阳应象大论》记载“善诊者, 察色按脉, 先别阴阳”。即通过辨证类风湿关节炎患者全身和局部症状, 分为阴(寒)阳(热)两类。阴(寒)是患者关节冷痛而肿, 肢冷不温, 遇寒痛剧, 得热痛减, 喜暖恶寒, 小便清长等; 阳(热)是患者关节红肿疼痛或酸痛, 发热, 得冷痛减, 口渴, 小便黄等。众多中医名家在长期的临床实践中以寒热为纲辨证指导类风湿关节炎的治疗, 疗效显著<sup>[14]</sup>。现阶段外邪致痹的病证结合动物模型包括结合 CIA 或 AIA 的风湿痹症以及药物干预。

肖长虹等在 CIA 大鼠模型的基础上, 分别通过风寒湿和风湿热外部刺激, 同时结合外涂葡萄球菌肠毒素 B, 构造类风湿关节炎寒湿痹阻证和湿热痹阻病证结合动物模型。即从 Wistar 大鼠接受胶原注射开始, 每天给予 1 h 相应的外部刺激, 刺激条件为风速 18 m/s, 空气湿度 100%, 其中, 风寒湿和风湿热刺激的温度分别为 7℃~10℃和 36℃~38℃, 共持续 9 天。在实验第 7 天~9 天, 将 10 μg 葡萄球菌肠毒素 B 外涂于每只大鼠双后肢踝关节以下后刺激。通过观察关节表面温度、双后肢足垫厚度、关节炎性积分、迟发性超敏反应以及血清 IgG 型类风湿因子和抗 II 型胶原抗体水平来评估模型成功与否, 发现单纯风寒湿刺激可明显降低雌性大鼠关节炎性积分, 推迟发病时间, 而外涂葡萄球菌肠毒素 B

后, 显著提高雄性大鼠的关节炎性积分和类风湿因子水平, 降低关节表面温度。单纯风湿热刺激可显著提高雌性大鼠早期的关节表面温度, 增加关节炎性水平<sup>[26]</sup>。同时, 基于实验第 31 天不同组大鼠踝关节的组织切片显示大鼠关节炎性积分与病变关节处滑膜细胞增生呈正相关, 单纯风湿热刺激和风寒湿刺激+葡萄球菌肠毒素 B 可分别促进雌性和雄性大鼠关节软骨侵袭、滑膜内炎性细胞浸润和血管增生<sup>[16]</sup>。因此, 综合药物感染和环境刺激因素, 风湿热刺激于雌性大鼠和风寒湿刺激+葡萄球菌肠毒素 B 于雄性大鼠可分别作为类风湿关节炎寒湿痹阻与湿热痹阻动物模型。

镇兰芳等在构造 CIA 模型后, 自免疫第一天开始, 将模型组 Wistar 大鼠放入人工气候造模箱中干预, 其中, 风寒湿刺激组的空气湿度为  $(90 \pm 4)\%$ , 温度为  $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 而风湿热刺激组的空气湿度为  $(90 \pm 4)\%$ , 温度为  $(33 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 风力均为 3 级, 每日刺激 4 小时, 连续 30 天。处死后, 观察各组大鼠的组织病理学变化和血清中 CD44 表达水平, 发现风寒湿刺激组与风湿热刺激组大鼠关节内滑膜组织增生明显, 并伴有大量炎性细胞浸润, 血清内 CD44 水平较正常组和单纯 CIA 模型组相比显著升高。即风寒湿热外邪可作为促进因素, 显著影响 CIA 大鼠发病的严重程度<sup>[27]</sup>。

罗奎元等也是在 CIA 模型的基础上, 自免疫第二天起在人工气候造模箱内给予环境因素刺激, 其中, 风寒湿刺激组的空气湿度为  $80\% \sim 99\%$ , 温度为  $0^\circ\text{C} \sim 4^\circ\text{C}$ , 而风湿热刺激组的空气湿度为  $80\% \sim 99\%$ , 温度为  $35^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ , 风速为  $4 \text{ m/s}$ , 每日刺激 30 min, 连续 28 天。观察各组大鼠的饮食和活动等整体状况, 检测受累关节肿胀度以及血清中 IgG 含量, 发现风寒湿刺激组与风湿热刺激组大鼠足趾肿胀和血清中 IgG 含量较空白组相比均显著升高, 可在一定程度模拟中医理论中的寒湿痹阻与湿热痹阻<sup>[28]</sup>。

吕爱平等结合 CIA 模型和寒湿刺激构造寒湿痹阻模型。将 Wistar 大鼠放入  $15^\circ\text{C}$  左右的冷水中游泳 7 min, 每天一次, 连续 1 周后, 用含 II 型胶原粗提物的乳化混合物于动物尾部和踝部多处皮下注射 1 次, 分别在第 7 天~第 45 天取材, 观察大鼠滑膜损伤、软骨损伤以及酶类的变化, 发现在病理形态方面, 模型组大鼠关节滑膜细胞增生、滑膜组织中胶原纤维沉淀、淋巴细胞浸润, 以及软骨细胞扁平层破坏。在免疫学方面, 滑膜组织中存在 II 型胶原, 酯酶阳性细胞和酸性磷酸酶活性增加, 与人寒湿痹阻有相似之处<sup>[17]</sup>。

林娜等基于中医理论指导, 结合实验动物病理特点和实验室指标, 以及长期实验观察和药物反证, 在上述寒湿痹阻和湿热痹阻模型的基础上构建了 CIA 和 AIA 的寒证和热证病证结合模型。即 CIA 或 AIA 诱导关节炎模型后, 将雄性 SD 或 Lewis 大鼠放置人工气候造模箱内, 分别给与风寒湿和风湿热刺激, 其中, 风寒湿刺激组的空气湿度为  $60\% \sim 70\%$ , 温度为  $4^\circ\text{C}$ , 而风湿热刺激组的空气湿度为  $90\% \sim 95\%$ , 温度为  $37^\circ\text{C}$ , 风速为  $6 \text{ m/s}$ , 每日刺激 2 h, 连续 14 天。观察关节临床积分、首次发病时间、肢体累计率、体重等疾病严重度指标, 以及关节表面温度、每日饮水量、血流速等病证结合指标, 发现寒证与热证模型组大鼠的关节临床积分和肢体累计率均较单纯 CIA 或 AIA 模型组高, 首次发病时间提前 2 天~3 天, 体重减轻, 提示环境外部刺激可增加疾病严重度。寒证模型组大鼠的关节表面温度、每日饮水量和血流速均较单纯 CIA 或 AIA 模型组低, 而热证模型组大鼠相反, 这符合“寒痹肤温扪之凉或常温而热痹肤温扪之发热”的临床实践和《素问·调经论》“气血者, 喜温而恶寒, 寒则泣而不行, 温则消而去之”的记载。此外, 研究发现寒痹经方乌头汤和热痹经方白虎加桂枝汤可分别显著改善寒证 CIA 或 AIA 模型和热证 CIA 或 AIA 模型的疾病严重度和恢复病证结合指标的异常变化, 这进一步证实了本课题组所构建的类风湿关节炎寒证和类风湿关节炎热证模型的有效性和合理性<sup>[29-31]</sup>。

### A.3 痰瘀互结病证结合动物模型

血瘀痹阻和痰瘀痹阻在中医理论中属于重要的病机。血瘀始终贯穿于类风湿关节炎的发生发展，表现为受累关节有针刺感疼痛。痰瘀源于类风湿关节炎患者脏腑气机失调，痰浊内生。通过外部环境模拟血瘀和痰瘀构造类风湿关节炎病证结合模型，对于研究其病机病因意义重大。

李学荣等在运用 CIA 法诱导 SD 大鼠关节炎模型后，从以下三方面诱导大鼠气虚血瘀模型：

- a) 游泳：将大鼠置于 15℃ 左右的冷水中游泳至疲劳，每天一次；
- b) 饮食：饥饿和高脂饮食；
- c) 寒湿刺激：大鼠游完泳后在通风条件下晾干。

作用 1 个月后观察大鼠的精神状况、毛发光泽度、关节肿胀度和血清中炎症因子水平，发现大鼠精神萎靡，毛发枯黄，血液粘度高，血清中炎症因子水平与空白组相比显著升高<sup>[32]</sup>。李茜等在 CIA 模型的基础上，参照盐酸肾上腺素注射液合冰水应激致慢性血瘀的方法，将 0.1 mg/kg 的盐酸肾上腺素注射液皮下注射至大鼠体内，2 h 后放置于 4℃ 左右的冷水中游泳 5 min，连续 2 周。观察不同时间点大鼠整体状况、足趾肿胀程度、关节炎评分、促炎因子表达水平、血流变，以及膝关节软骨病理变化，发现与空白组相比，CIA 血瘀模型组大鼠精神状况差、足趾肿胀度和关节炎评分显著增加，血清中类风湿因子、肿瘤坏死因子、血栓素 A2 等表达水平，以及大鼠血液在高中低切变率下的全血黏度和血浆黏度均升高，受累关节软骨破坏显著，较理想的符合了类风湿关节炎血瘀证的临床特点<sup>[33]</sup>。

唐平先等依据“肥人多痰湿”的理论，在造模前一周以精炼猪油饲养大鼠，造模后给与高脂饲料诱导 Wistar 大鼠高脂血，发现与空白组相比，大鼠精神衰弱，便溏，足趾肿胀度、类风湿因子水平和肿瘤坏死因子等表达显著升高，同时具备了 CIA 和痰瘀痹阻证的特点<sup>[34]</sup>。

### A.4 脾肾虚证病证结合动物模型

虚证病证结合动物模型是一类新起的类风湿关节炎病证结合模型，尚未标准化和规范化，有待进一步完善。

杜中平等在给 SD 大鼠造 CIA 模型前，腹腔注射 0.5 mg/kg 的利血平，持续 2 周造脾虚 CIA 模型，观察大鼠整体状态、关节炎指数、关节肿胀度、骨和软骨破坏、炎症因子表达水平、脾淋巴细胞增值以及回肠病理改变，发现脾虚 CIA 模型组大鼠出现了精神倦怠、毛枯疏无光泽、饮食减少、体重降低、便溏，以及小肠粘膜受损等脾虚症状，且大鼠关节肿胀明显，滑膜组织增生，骨和软骨破坏严重，体内抗 II 型胶原抗体和炎症因子水平均显著升高。即此模型同时反应了脾虚症状和类风湿关节炎的发病特点<sup>[35]</sup>。肖诚等在 CIA 造模前，灌胃给与 DBA 小鼠 25 mL/kg 的大黄煎液一周，外加饥饱失常法饲养一周后进行 CIA 免疫诱导，再饥饱失常法持续饲养 9 周，构造 CIA 脾虚模型。观察大鼠整体状态、关节炎指数、关节肿胀度和病理学改变等指标，发现 CIA 脾虚模型组大鼠体重降低、关节红肿、受累关节处骨和软骨病理改变明显，血清中炎症因子水平显著升高，与单纯 CIA 模型组相比差异显著<sup>[36]</sup>。

王燕等分别采用去势法和羟基脲法构造大鼠肾虚模型，并在此基础上诱导 SD 大鼠 CIA 模型。在去势法中摘除大鼠双侧卵巢与睾丸，于术后 28 天复制 CIA 模型。在羟基脲法中给与大鼠灌胃 375 mg/kg 羟基脲 17 天后，复制 CIA 模型。观察大鼠整体状态、关节炎肿胀度、血浆抗 II 型胶原抗体、炎症因子水平、肾上腺环腺苷酸和环鸟苷酸水平来对比两种肾虚 CIA 模型，发现两种肾虚 CIA 模型大鼠均出现

精神萎靡、体毛枯疏、反应迟钝、便溏等肾虚症状，体内肾上腺环腺苷酸/环鸟苷酸比值显著降低，而抗Ⅱ型胶原抗体和炎性因子水平明显升高<sup>[37]</sup>。寿旗扬等通过单侧和双侧切除 Wistar 大鼠肾上腺导致下丘脑-垂体-肾上腺轴功能失常，术后恢复 7 天后诱导 AIA 模型，构建 AIA 肾虚模型。发现与空白组和单侧切除组大鼠相比，双侧切除组大鼠血清中皮质醇水平降低，且足趾肿胀度明显。即较理想模拟了 AIA 肾虚病证结合动物模型<sup>[38]</sup>。

#### A.5 类风湿关节炎病证结合动物模型在中医治疗方药作用原理研究应用中的注意事项及所存在的问题

类风湿关节炎病证结合模型的构建应完全遵循“方证对应”的中医基本理论，在模拟患者临床病理特征的前提下，选择符合中医病因的致病因素诱导模型，着重症状，体征和实验室指标，例如：大鼠精神状态、食欲、二便、毛发色泽枯荣、血液流变性指标、炎性因子和能量代谢水平等，结合辨证论治思想，并佐以方证对应和不对应的中医治疗方药进行干预，验证此方能否增加类风湿关节炎病证结合模型的科学性，从而形成具有中医属性的类风湿关节炎动物模型。尽管现有的类风湿关节炎病证结合动物模型能在一定程度上反映西医的“病”、中医的“证”和“方”，但仍无法完全复制类风湿关节炎患者的病理和中医证候特征，主要原因有以下几方面。

- a) 现阶段的类风湿关节炎病证结合模型均在单纯 CIA 或 AIA 模型的基础上，施加外部环境刺激或药物干预。虽然 CIA 和 AIA 模型是最常用的类风湿关节炎经典动物模型，与类风湿关节炎患者在临床表征和病理变化方面高度相似，但仍不能完全复制其所有的临床特点；且人为施加的外部刺激不能完全符合中医“外邪”的特质，还可能会改变单纯疾病模型的稳定性。
- b) 现有各种类风湿关节炎病证结合模型所采用的动物种属、性别、数量差异较大，且由于实验动物的依从性差，四诊“望、闻、问、切”资料难以准确获得，限制了病证结合动物模型的客观化和标准化。
- c) 现代药理研究对脾肾亏虚和气虚血瘀等证候的属性和机制未完全挖掘，因此，现有类风湿关节炎病证结合动物模型疾病严重度和病证结合评价指标的类型和程度尚未实现统一<sup>[39]</sup>。

#### A.6 展望

以寒湿痹阻和湿热痹阻为主的类风湿关节炎病证结合动物模型研究已取得了很大的进步，较单纯类风湿关节炎疾病模型而言，它更有利于动态观察“病”和“证”在动物机体中的发生发展变化，以及各项宏观和微观指标，是中医辨证论治和抗类风湿关节炎中药作用机理等研究的坚实基础<sup>[40]</sup>。在后续的相关研究中，应继续以“病证结合”和“方证对应”为指导思想，深入研究类风湿关节炎不同证型的致病因素，充分结合基于多组学整合和生物分子网络的系统生物学研究策略和方法，建立兼具证候和疾病表征、且能模拟病证动态演变特征的类风湿关节炎病证结合动物模型，为该病证的科学内涵解析及其“病-证-方”关联原理阐释提供有力工具。

## 参 考 文 献

- [1] 姜泉. 实用中医风湿免疫病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2022.
- [2] KASPER DL, FAUCIA S, HAUSER SL, et al. 哈里森内科学: 免疫与风湿性疾病分册[M]. 19版. 栗占国, 苏茵, 郭建萍, 译. 北京: 北京大学医学出版社, 2016: 9.
- [3] 中华医学会风湿病学分会. 2018中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2018;57(4): 242-251.
- [4] Rahman MM, Khasru MR, Rahman MA, Mohajan K, Fuad SM, Haque F, Bilkis F, Islam KA, Hasan MN, Hosain M. Quality of Life Assessment by SF-36 among the Patients with Rheumatoid Arthritis. *Mymensingh Med J.* 2022;31(3):586-591.
- [5] Drosos AA, Pelechas E, Kaltsonoudis E, Voulgari PV. Therapeutic Options and Cost-Effectiveness for Rheumatoid Arthritis Treatment. *Curr Rheumatol Rep.* 2020;22(8):44.
- [6] Gerd R Burmester, Janet E Pope. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2017 Jun 10;389(10086):2338-2348.
- [7] Mitsuhiro Akiyama, Yuko Kaneko. Pathogenesis, clinical features, and treatment strategy for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Autoimmun Rev.* 2022 May;21(5):103056.
- [8] T/CACM 013—2017 类风湿关节炎病证结合诊疗指南
- [9] GB/T 15657—2021 中医病证分类与代码
- [10] GB/T 16751.1—2023 中医临床诊疗术语 第1部分: 疾病
- [11] GB/T 16751.2—2021 中医临床诊疗术语 第2部分: 证候
- [12] GB/T 16751.3—2023 中医临床诊疗术语 第3部分: 治法
- [13] 姜泉, 王海隆, 巩勋, 罗成贵. 类风湿性关节炎病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2018, 59(20):1794-1800.
- [14] 李梢. 中国百年百名中医临床家丛书—李济仁, 张舜华. 北京: 中国中医药出版社, 2004:20.
- [15] 任钧国, 刘建勋, 韦佳慧. 病证结合药理学: 中药药理学研究的策略与方法[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19):4922-4929.
- [16] 肖长虹, 顾为望, 李留洋, 郭琳琅, 袁进, 胡文, 谢卫兵. 类风湿性关节炎风寒湿痹与风湿热痹动物模型的病理研究[J]. 中国实验动物学报, 1998(01):9-14.
- [17] 吕爱平, 王安民, 曾晓莲. 益肾蠲痹丸对大鼠实验性痹证影响的病理学研究[J]. 中医杂志, 1988(06):49-51.
- [18] 张新伟, 阿热艾·阿达力, 豆江移, 杨可人, 周晓涛, 周文涛. 类风湿关节炎病证结合动物模型研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(34):3868-3871.
- [19] ZYT 001.1~001.9-94 中医病证诊断疗效标准
- [20] Frank c. Arnett, steven m. Edworthy, daniel a. Bloch, dennis j. Mcshane, james f. Fries, norman s. Cooper, louis a. Healey, stephen r. Kaplan, matthew h. Liang, harvinder s. Luthra, thomas a. Medsger, jr., donald m. Mitchell, david h. Neustadt, robert s. Pinals, jane

g. Schaller, John T. Sharp, Ronald L. Wilder, and Gene G. Hunder. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):315-24. doi: 10.1002/art.1780310302.

[21] Daniel Aletaha, Tuhina Neogi, Alan J Silman, Julia Funovits, David T Felson, Clifton O Bingham 3rd, Neal S Birnbaum, Gerd R Burmester, Vivian P Bykerk, Marc D Cohen, Bernard Combe, Karen H Costenbader, Maxime Dougados, Paul Emery, Gianfranco Ferraccioli, Johanna M W Hazes, Kathryn Hobbs, Tom W J Huizinga, Arthur Kavanaugh, Jonathan Kay, Tore K Kvien, Timothy Laing, Philip Mease, Henri A Ménard, Larry W Moreland, Raymond L Naden, Theodore Pincus, Josef S Smolen, Ewa Stanislawska-Biernat, Deborah Symmons, Paul P Tak, Katherine S Upchurch, Jiri Vencovský, Frederick Wolfe, Gillian Hawker. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2569-81. doi: 10.1002/art.27584.

[22] Shinoda K, Hruba VJ, Porreca F. Antihyperalgesic effects of loperamide in a model of rat neuropathic pain are mediated by peripheral delta-opioid receptors. *Neurosci Lett.* 2007 Jan 10;411(2):143-6.

[23] Baddack-Werncke U, Busch-Dienstfertig M, González-Rodríguez S, Maddila SC, Grobe J, Lipp M, Stein C, Müller G. Cytotoxic T cells modulate inflammation and endogenous opioid analgesia in chronic arthritis. *J Neuroinflammation.* 2017 Feb 6;14(1):30. doi:10.1186/s12974-017-0804-y.

[24]. Bardin L, Malfetes N, Newman-Tancredi A, Depoortère R. Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behav Brain Res.* 2009 Dec 28;205(2):360-6. doi:10.1016/j.bbr.2009.07.005.

[25] 姜泉, 蒋红, 曹炜, 焦娟. 475例类风湿关节炎患者中医临床证候分析[J]. 中医杂志, 2007(03):253-255.

[26] 肖长虹, 顾为望, 李留洋, 郭琳琅, 谢卫兵, 袁进, 郑普德. 类风湿性关节炎风寒湿痹与风湿热痹动物模型研究[J]. 中医杂志, 1996(06):361-365+324.

[27] 镇兰芳, 宋玉, 张六通. 外感风寒湿热对胶原诱导关节炎大鼠血清CD44水平的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(10):159-161.

[28] 罗奎元, 强宇靖, 刘飞, 马腾茂, 吴国泰, 高慧琴. 类风湿性关节炎病证结合大鼠模型的建立及血清免疫球蛋白G、乳酸脱氢酶水平变化的研究[J]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33(01):1-5.

[29] Weijie Li, Kexin Wang, Yudong Liu, Hao Wu, Yan He, Congchong Li, Qian Wang, Xiaohui Su, Shikai Yan, Weiwei Su, Yanqiong Zhang, Na Lin. A Novel Drug Combination of Mangiferin and Cinnamic Acid Alleviates Rheumatoid Arthritis by Inhibiting TLR4/NFκB/NLRP3 Activation-Induced Pyroptosis. *Front Immunol.* 2022 Jun 21;13:912933. doi: 10.3389/fimmu.2022.912933.

- [30] Xia Mao, Weijie Li, Wenjia Chen, Yingfei Li, Qian Wang, Xiaoyue Wang, Zifeng Pi, Danhua Wang, Haiyu Xu, Qiuyan Guo, Siyang Wu, Wenhao Cheng, Yanqiong Zhang, Na Lin. Exploring and characterizing a novel combination of paeoniflorin and talatizidine for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res.* 2020 Mar;153:104658. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104658.
- [31] Xia Mao, Yudong Liu, Weijie Li, Kexin Wang, Congchong Li, Qian Wang, Wenjia Chen, Zhaochen Ma, Xiaoyue Wang, Zihe Ding, Yanqiong Zhang, Na Lin. A promising drug combination of mangiferin and glycyrrhizic acid ameliorates disease severity of rheumatoid arthritis by reversing the disturbance of thermogenesis and energy metabolism. *Phytomedicine.* 2022 Sep;104:154216. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154216.
- [32] 李学荣, 李荣亨, 杨敏美. 复元胶囊治疗气虚血瘀证类风湿关节炎的机制[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(10):2304-2306.
- [33] 李茜, 梁晓东, 曹永仓, 唐迎雪. 类风湿关节炎血瘀证大鼠模型的制备及评价[J]. *山东中医药大学学报*, 2017, 41(05):476-481.
- [34] 唐平先. 类风湿性关节炎痰瘀痹阻证的临床及实验研究[D]. 北京: 中国中医研究院, 2004
- [35] 杜中平, 赵宏艳, 肖诚, 刘梅洁, 王燕, 吕诚, 吕爱平, 王少君, 滕静如, 鞠大宏. 类风湿性关节炎脾虚证病证结合动物模型的建立[J]. *世界科学技术(中医药现代化)*, 2012, 14(02):1384-1392.
- [36] 肖诚, 李艳, 左铮云, 徐彭, 鞠大宏, 滕静如, 吕爱平, 徐世杰. 芎附散对脾虚痹证(类风湿性关节炎)模型的影响[J]. *中医杂志*, 2007(11):1016-1019.
- [37] 王燕, 赵宏艳, 刘梅洁, 肖诚, 吕诚, 谭勇, 查青林, 李艳, 刘红, 吕爱平, 鞠大宏. 类风湿性关节炎肾虚证大鼠模型的建立[J]. *中西医结合学报*, 2011, 9(09):973-982.
- [38] 寿旗扬, 丁科, 周卫民, 朱科燕, 方明笋, 陈民利. 肾上腺切除肾阳虚大鼠佐剂性关节炎模型的建立[J]. *甘肃中医学院学报*, 2010, 27(04):7-9.
- [39] 杨亚旭, 邵丽娟, 黄小丽, 陈琳, 朱琦, 董小耘, 卜平, 孔桂美. 类风湿性关节炎常用动物造模方法的研究进展及评价标准比较[J]. *风湿病与关节炎*, 2015, 4(04):62-66.
- [40] 陈小野. 实用中医证候动物模型学[M]. 北京: 北京医科大学-协和医科大学联合出版社, 1993: 50-51.
-