

黄芪杂多糖对佐剂性关节炎大鼠促炎因子分泌及关节滑膜细胞凋亡的调节作用

李宏全*, 邱建东, 杨丽华

(山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 建立大鼠佐剂性关节炎 (AA) 模型, 研究黄芪杂多糖 (AHPS) 对佐剂性关节炎大鼠促炎因子分泌及关节滑膜细胞凋亡的调节作用。采用常规病理组织学检查大鼠膝关节滑膜, 放射免疫法测定血清中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量, Tunel 检测滑膜细胞凋亡, 免疫组化检测 Bcl-2、Bax 表达, 并进行足爪容积测定和关节炎症评分。结果显示: AHPS 和雷公藤多苷 (TWP) 均能显著改善 AA 大鼠原发和继发性临床症状及关节滑膜炎的炎性变化; AHPS (1 000 和 500 mg·kg⁻¹) 及 TWP (60 mg·kg⁻¹) 可使 AA 大鼠的血清 TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 并可使 AA 大鼠的膝关节滑膜细胞凋亡数量显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); AA 大鼠的 Bax 阳性表达率有所升高 ($P > 0.05$), Bcl-2 阳性表达率升高显著 ($P < 0.01$), 而 AHPS (1 000 和 500 mg·kg⁻¹) 可显著下调 AA 大鼠膝关节滑膜 Bcl-2 的阳性表达和上调 Bax 的阳性表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果表明: AHPS 诱导 AA 大鼠膝关节滑膜细胞凋亡的作用与下调 Bcl-2 和上调 Bax 蛋白表达有关, 抑制促炎因子分泌是其抗炎作用的分子机制之一。

关键词: 黄芪杂多糖; 佐剂性关节炎; 促炎因子; 细胞凋亡; Bax; Bcl-2

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 07-0731-06

Regulation of Astragalus heteropolysaccharides on synoviocytes apoptosis and proinflammatory cytokine secretion of rats with adjuvant arthritis

LI Hong-quan*, QIU Jian-dong, YANG Li-hua

(College of Veterinary Medicine and Animal Science, Agricultural University of Shanxi, Taigu 030801, China)

Abstract: This study is to observe anti-inflammation mechanism of Astragalus heteropolysaccharides (AHPS) on rats with adjuvant arthritis (AA). Rats were treated with AHPS (1 000, 500, and 250 mg·kg⁻¹, ig) and Tripterygium wilfordii polyglycoside (TWP, 60 mg·kg⁻¹, ig), separately. TNF- α and IL-1 β contents in serum were determined with radioimmunoassay, pathomorphologic changes of synovium of knee joint were observed by histological section with HE staining, synoviocyte apoptosis of knee joint of rats was analyzed by Tunel detection, and Bax and Bcl-2 positive expression were detected by immunohistochemical method. The results were as follows: (1) both AHPS and TWP could improve significantly primary and secondary clinical symptoms of rats with AA and inflammatory response in articular synovium; (2) the contents of TNF- α and IL-1 β in serum of rats with AA increased significantly composed with those in groups treated with AHPS (1 000 and 500 mg·kg⁻¹), and the amount of synoviocyte apoptosis decreased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); (3) the positive expression of Bax in synovium of rats with AA was a little bit higher than that in normal control ($P > 0.05$), but the positive expression of Bcl-2 significantly increased ($P < 0.01$). AHPS (1 000 and 500 mg·kg⁻¹) could up-regulate positive expression of Bax and down-regulate the positive expression of Bcl-2 significantly ($P < 0.05$).

收稿日期: 2008-12-29.

基金项目: 山西省科技攻关项目 (033021); 山西省自然科学基金项目 (20041093).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-354-6289568, E-mail: hongquanljoe@yahoo.com.cn

or $P < 0.01$). The results show that AHPS can evidently decrease $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ level in serum of rats with AA, which is one of molecular mechanisms that AHPS has anti-inflammatory properties. AHPS can induce synoviocyte apoptosis of rats with AA, which is achieved by the regulating effect of AHPS on the positive expression of Bax and Bcl-2.

Key words: Astragalus heteropolysaccharides; adjuvant arthritis; proinflammatory cytokine; apoptosis; Bax; Bcl-2

目前, 治疗类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的药物主要有非甾体抗炎药物、缓解疾病的抗风湿性药物、糖皮质激素类药物以及 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-1 受体拮抗剂等^[1], 这些药物的临床应用仍有许多限制, 有些生物制剂的疗效还有待于大规模临床研究加以证实。中草药治疗 RA 有着悠久的历史, 近年来中药有效提取成分如雷公藤多苷等在 RA 及其实验动物模型的治疗中显示了良好的抗炎作用^[2, 3]。医学临床实践及研究证明, 黄芪多糖 (Astragalus polysaccharide, APS) 对人和动物机体的特异性和非特异性免疫功能有广泛的影响^[4, 5], 特别是能够增强红细胞免疫黏附功能、促进体内免疫复合物的清除^[6], 有可能对 RA 具有一定的治疗作用, 但目前尚未有相关的研究报告。本课题从中药蒙古黄芪中获得一种黄芪杂聚多糖 (Astragalus heteropolysaccharide, AHPS)^[7, 8], 并建立佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠疾病模型, 对其调控 AA 大鼠促炎症因子分泌和关节滑膜细胞凋亡进行研究。

材料与方法

实验动物 雄性 Wistar 大鼠 40 只, 购自山西医科大学实验动物中心, 体重 200~220 g, 自由摄食和饮水, 自然光照, 环境温度 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, 适应 1 周后诱导关节炎。

药品与试剂 雷公藤多苷片 (10 mg/片), 皮内注射用卡介苗 (BCG, 成都生物制品研究所), 弗氏不完全佐剂 (IFA, 美国 Sigma 公司), $\text{TNF-}\alpha$ 试剂盒和 $\text{IL-1}\beta$ 试剂盒 (解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所), DAB 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), Tunel 试剂盒及 Bcl-2 试剂盒和通用型二抗试剂盒 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司), Bax 试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司)。

AHPS 的制备 按照本课题组报道方法制备^[7, 8]: 蒙古黄芪粉碎后过 100 目筛, 按液料比 8 : 1 浸泡过夜后调 pH=10, 在微波加热 20 min、加热温度 120°C 、乙醇沉淀浓度 70% 的工艺条件下制得 AHPS 粗提物; 经蛋白酶法脱除蛋白质、DEAE-cellulose52 和

Sephadex G-100 柱层析脱色及纯化后, 高效凝胶过滤色谱法 (HPGPC) 测定其分子质量为 1.1×10^4 D、纯度 97.16%; 柱前衍生化高效液相色谱法 (HPLC) 测定其单糖组成及分子摩尔比为 Rha : Glc : Gal : Ara = 1.19 : 72.01 : 5.85 : 20.95, 红外光谱和 ^1H NMR 显示主要构型为 α -吡喃构型, 主链部分由 Glu 1 $\rightarrow$ 6 糖苷键构成, 饱和溶液 pH = 6.2。用 AHPS 给 Wistar 大鼠每日按 $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃 2 次 (7 d), 一般状况观察、血液学和血液生化指标检查以及病理组织学检查均未异常。

主要仪器设备 荧光显微镜 (BX51 型, 日本 Olympus), γ 放射免疫计数仪 (GC-1500 型, 科大创新股份有限公司中佳分公司), 超薄切片机 (KD-2508 型, 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)。

AA 大鼠模型的建立 按照文献^[9]方法制备完全弗氏佐剂; 实验组 30 只大鼠分别用乙醚麻醉, 75% 酒精消毒右后足跖部, 皮内注射完全弗氏佐剂 0.1 mL ($10 \text{ mg BCG} \cdot \text{mL}^{-1}$), 空白组 6 只大鼠用等剂量生理盐水做同样处理, 接种完全弗氏佐剂大鼠的表现与文献^[10]报道一致, 表明大鼠 AA 疾病模型复制成功。

实验设计 按照单因素完全随机设计, 未注射完全弗氏佐剂的 6 只健康大鼠为空白组; 30 只注射完全弗氏佐剂的大鼠在致炎后第 20 天随机分成 5 组, 每组 6 只, 分别为模型组、阳性对照组和 AHPS 高、中、低剂量组。空白组和模型组每日用 3 mL 生理盐水分两次灌胃, 阳性对照组每日用 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 雷公藤多苷分两次灌胃, AHPS 高、中、低剂量组每日分别按 1 000、500 和 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 分两次灌胃, 实验期为 14 d。本实验共给 39 只大鼠注射完全弗氏佐剂, 达到实验要求的为 36 只, 造模成功率 92.3%。实验中各组检测样本数 $n = 6$ 。

样品采集及处理 末次给药结束 24 h 后, 经大鼠眼眶采集非抗凝血, 收集血清, -20°C 保存备用。处死采血后的大鼠, 采集膝关节滑膜层组织, 4°C 条件下 4% 多聚甲醛固定 24 h。

大鼠膝关节滑膜常规病理组织学检查 将 4% 多聚甲醛、 4°C 固定的膝关节滑膜组织常规组织切片,

HE 染色, 光学显微镜下观察, 彩色显微摄影。

放射免疫法测定血清中的 IL-1 β 、TNF- α 参考时步卿等^[11]的放射免疫测定方法, 按相应试剂盒说明书进行。

Tunel 检测滑膜细胞凋亡以及免疫组化检测 Bcl-2、Bax 表达 分别参考胡永红等^[12]的 Tunel 染色方法和免疫组化方法, 按相应试剂盒说明书进行; 采用 DP70-IPT 图像采集分析系统 5.0, 统计切片中阳性细胞积分光密度值 (IOD) 和面积。

足爪容积测定 按照刘健等^[13]的操作方法: 用配制好的苦味酸溶液, 在大鼠踝关节处作一标记。测量时将大鼠后肢浸入容积杯中使踝关节标记与液面重叠, 抽吸上升液体至原液面水平, 读出所吸液体量, 此即实测足爪容积, 与造模前之差值即为足趾肿胀度。

关节炎评分 按照 Gu 等^[14]的方法, 全身病变程度按 5 级评分法评价: 0 分为无红肿, 1 分为小趾关节稍肿, 2 分为趾关节和足跖肿胀, 3 分为踝关节以下的足爪肿胀, 4 分为包括踝关节在内全部足爪肿胀。根据未注射佐剂的其余 3 只肢体的病变程度累计积分, 计算出关节炎指数 (arthritis index, AI)。

统计学分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件包, 运用单因素方差分析对所有实验数据进行多组间两两比较 (新复极差法, SSR)。

结果

1 AHPS 对 AA 大鼠足爪肿胀度的影响

随剂量的增加, AHPS 对 AA 大鼠足爪肿胀度呈现抑制作用 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 且 AHPS 1 000 mg·kg⁻¹ 剂量组与阳性对照组的差异不显著 ($P > 0.05$), 见图 1。

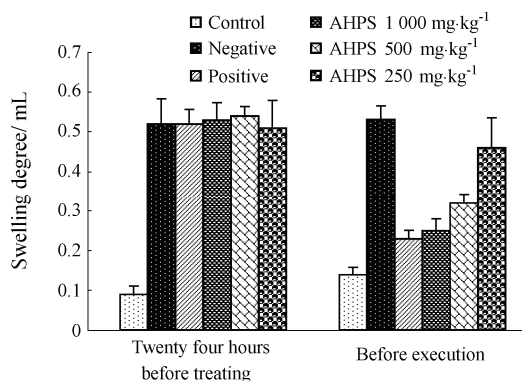


Figure 1 Effect of AHPS on paw's swelling in AA rats ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

2 AHPS 对 AA 大鼠关节炎指数 (AI) 的影响

试验前各造模组 AA 大鼠均出现不同程度的踝关节肿胀、足爪肿胀等继发症状。AHPS 剂量组 AA 大鼠的 AI 值随剂量的增加呈现下降趋势。其中, AHPS 1 000 和 500 mg·kg⁻¹ 剂量组的 AA 大鼠 AI 值低于模型组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) 而与阳性对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$), AHPS 250 mg·kg⁻¹ 剂量组与模型组比较无显著差异 ($P > 0.05$), 而高于阳性对照组 ($P < 0.05$), APS 1 000 mg·kg⁻¹ 剂量组 AA 大鼠的 AI 值最低 (图 2)。

3 AA 大鼠膝关节滑膜组织病理学检查结果

空白组: 滑膜菲薄、平滑, 滑膜细胞扁、核椭圆形、常为 1~3 层紧密排列, 无炎性细胞浸润 (图 3A); 模型组: 滑膜层和滑膜下层可见大量炎性细胞浸润, 细胞层次可达 6~13 层, 排列不整齐, 滑膜充血, 表面有大量纤维素覆盖 (图 3B); 阳性对照组: 滑膜细胞 2~4 层, 排列整齐致密, 纤维素渗出不明显, 滑膜下有少量淋巴细胞浸润; AHPS 1 000 mg·kg⁻¹ 剂量组: 滑膜细胞 3~6 层, 排列整齐致密, 纤维素渗出明显减少, 滑膜下细胞浸润不明显 (图 3C); AHPS 500 mg·kg⁻¹ 剂量组: 滑膜细胞 5~7 层, 排列较为整齐致密, 纤维素渗出减少, 滑膜下细胞浸润不明显; AHPS 250 mg·kg⁻¹ 剂量组: 滑膜细胞 6~10 层, 排列不整齐, 纤维素渗出较明显, 滑膜下炎性细胞浸润明显。

4 AHPS 对大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 含量的影响

模型组 AA 大鼠的血清 TNF- α 、IL-1 β 含量高于空白组 ($P < 0.01$); AHPS 剂量组的 TNF- α 、IL-1 β 含量随剂量的增加呈下降趋势, 其中 AHPS 1 000 和 500 mg·kg⁻¹ 剂量组的组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但低于模型组 ($P < 0.01$) 而与阳性对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$), 见表 1。

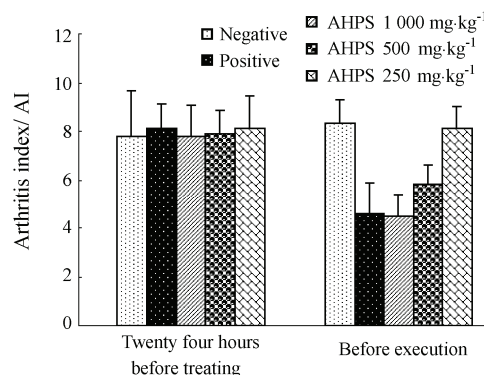


Figure 2 Effect of AHPS on arthritis index in AA rats ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

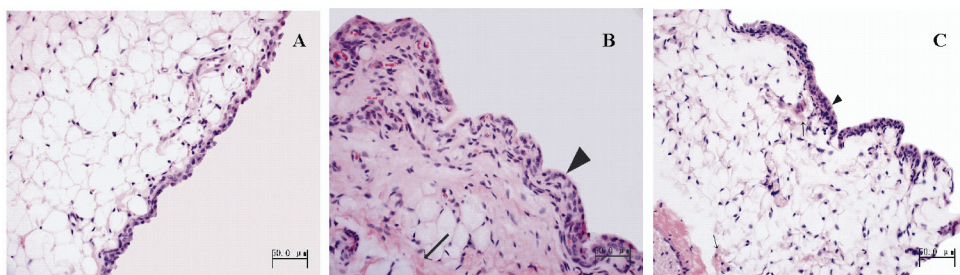


Figure 3 Effect of AHPS on pathomorphologic changes of synovium of knee joint by histological section with HE staining. A: The normal state of synovium in control group; B: The increase of synovium thickness and inflammatory cell infiltration in negative group (►); C: The decrease of synovium thickness and inflammatory cell infiltration in AHPS 1 000 mg·kg⁻¹ group (►)

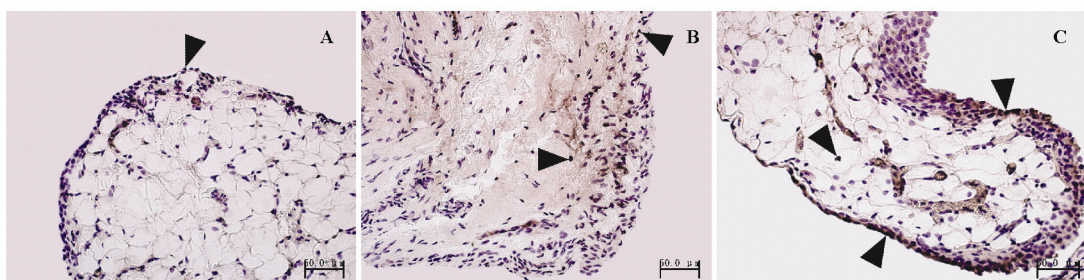


Figure 4 Effect of AHPS on synovium apoptosis of knee joint in AA rats (Tunel). A: Few apoptotic synoviocytes of normal synovium in control group (►); B: The amount of apoptotic synoviocytes in negative group increased but no significant difference compared with that in control group (►); C: The amount of apoptotic synoviocytes in AHPS 1 000 mg·kg⁻¹ group increased significantly compared with that in negative group ($P < 0.01$, ►)

Table 1 Effect of AHPS on the levels of TNF- α and IL-1 β in serum of the AA rats ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Dose/mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·mL ⁻¹	IL-1 β /ng·mL ⁻¹
Control		0.716 0 $\pm$ 0.109 7 ^c	0.158 0 $\pm$ 0.023 9 ^b
Negative		1.203 3 $\pm$ 0.176 7 ^a	0.388 3 $\pm$ 0.068 5 ^a
Positive		0.834 0 $\pm$ 0.062 7 ^c	0.160 0 $\pm$ 0.073 5 ^b
AHPS	1 000	0.843 3 $\pm$ 0.182 8 ^c	0.171 7 $\pm$ 0.053 8 ^b
	500	0.904 0 $\pm$ 0.148 8 ^{bc}	0.248 0 $\pm$ 0.043 2 ^b
	250	1.133 3 $\pm$ 0.157 2 ^{ab}	0.363 3 $\pm$ 0.056 8 ^a

The difference between averages with a same letter was not significant ($P > 0.05$), and the difference between averages with a different letter was significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$)

5 AHPS 对大鼠关节滑膜细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 表达的影响

5.1 大鼠关节滑膜细胞凋亡的测定结果 关节滑膜凋亡细胞 (APO, 图 4) 的平均吸收度值 (A) 统计结果表明: AHPS 剂量组的滑膜凋亡细胞 A 值随剂量的增加呈上升趋势, 其中 AHPS 1 000 和 500 mg·kg⁻¹ 剂量组的滑膜凋亡细胞 A 值比模型组升高 ($P < 0.01$), 且 250 mg·kg⁻¹ 剂量组显著低于 1 000 mg·kg⁻¹ 剂量组 ($P < 0.05$); 阳性对照组与 AHPS 1 000 mg·kg⁻¹ 剂量组的组间差异不显著; 模型组与空白组的组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但均低于 AHPS 1 000 和 250 mg·kg⁻¹

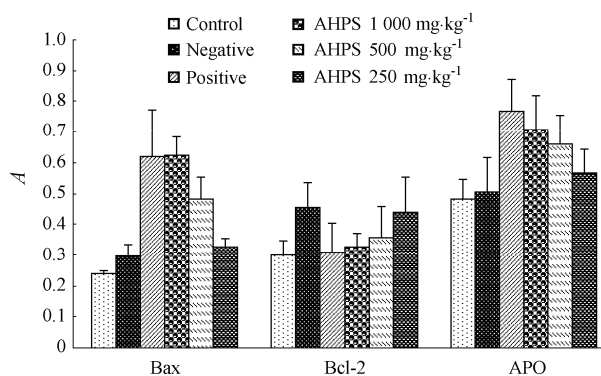


Figure 5 Effect of AHPS on synoviocytes apoptosis, Bax and Bcl-2 positive expression in AA rats ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

剂量组 (图 5)。

5.2 大鼠关节滑膜细胞 Bax 表达的测定结果 免疫组织化学法检测关节滑膜细胞凋亡相关蛋白 Bax 表达结果 (图 6): 模型组与空白组差异不显著 ($P > 0.05$); AHPS 各剂量组的滑膜细胞 Bax 阳性表达吸收度值随 AHPS 剂量的增加呈上升趋势, 阳性对照组、AHPS 1 000 和 500 mg·kg⁻¹ 剂量组的滑膜细胞 Bax 阳性表达吸收度值均较模型组显著升高 ($P < 0.01$), 见图 5。

5.3 大鼠滑膜细胞 Bcl-2 表达的测定结果 免疫组织化学法检测滑膜细胞凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达结果 (图 7): 模型组显著高于空白组 ($P < 0.01$), AHPS 各剂

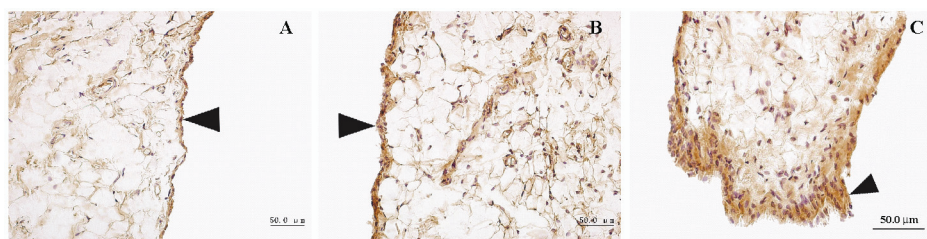


Figure 6 Effect of AHPS on the Bax positive expression in synovium of knee joint in AA rats by using immunohistochemical method (► shows Bax positive zone). A: A small amount of Bax expression in control group; B: The Bax positive expression in negative group increased but no significant difference compared with that in control group ($P > 0.05$); C: The Bax expression in AHPS 1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group increased significantly compared with that in negative group ($P < 0.01$)

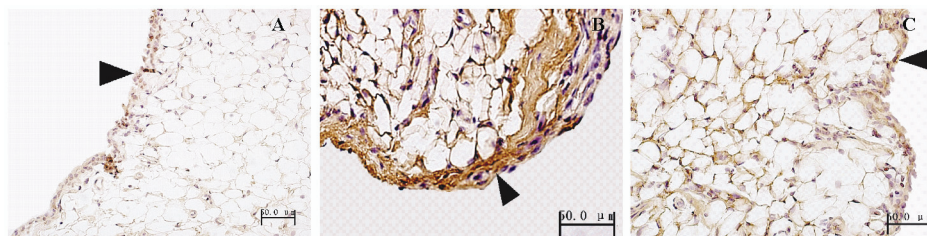


Figure 7 Effect of AHPS on the Bcl-2 positive expression in synovium of knee joint in AA rats by using immunohistochemical method (► shows Bcl-2 positive zone). A: A small amount of Bcl-2 positive expression in control group; B: The Bcl-2 positive expression increased significantly in negative group compared with that in control group ($P < 0.01$); C: The Bcl-2 positive expression decreased significantly in AHPS 1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group compared with that in negative group ($P < 0.01$)

量组的滑膜细胞 Bcl-2 阳性细胞吸收度值随 AHPS 剂量的增加呈下降趋势, 其中阳性对照组、AHPS 1 000 和 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的吸收度值组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但均较模型组显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 1 000 与 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但均低于 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见图 5。

讨论

AA 是一种 T 细胞依赖性、种属特异性、免疫介导性的疾病, 其发病机制与 RA 类似^[15], 作为一种经典的 RA 实验模型广泛应用于 RA 发病机制及抗炎药物疗效的研究。本实验给大鼠接种完全弗氏佐剂后, 大鼠所表现出的原发性、继发性局部和全身症状均说明成功建立了大鼠 AA 疾病模型。试验结果, AA 大鼠血清中的 TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高, 表明大鼠在 AA 发生过程中大量分泌促炎性细胞因子, 导致持续性的滑膜炎, 组织病理切片证实滑膜细胞层数明显增加, 滑膜下层有大量炎性细胞浸润, 滑膜表面有大量纤维素覆盖。虽然在 RA 的研究中证实 TNF 和 IL-1 大量集中出现在滑液中^[16], 但本实验结果说明测定血液中 TNF- α 和 IL-1 β 水平的变化对 RA 的研究同样重要。

路景涛等^[17]研究了 APS 对细菌脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞释放 TNF- α 、IL-1 β 的影响, 发现 APS 能抑制巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β ; 刘健等^[13,18]在研究以黄芪为君药的新型中药复方制剂——新风胶囊对 AA 大鼠的治疗作用及其机制中也获得了类似的结果。本实验结果表明, AHPS 能够显著降低 AA 大鼠血清中促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的水平, 有效对抗各种原发性和继发性病变, 显著改善 AA 大鼠的原发和继发性临床症状, 提示 AHPS 抑制促炎因子分泌是其抗炎症作用的分子机制之一。

RA 的发病与滑膜细胞凋亡过程密切相关, 其关节滑膜细胞过度增生源于滑膜细胞凋亡的相对不足, 诱导滑膜细胞凋亡对治疗 RA 有积极意义。大量研究证实, RA 关节滑膜细胞凋亡不足除了与诸如关节液中 TNF- α 的过度升高使抗 Fas 抗体介导的细胞凋亡受抑制及 Bcl-2 表达上调、关节部位的巨噬细胞及纤维细胞 caspase 8 抑制蛋白 (Flice-like inhibitory protein, FLIP) 过度表达而阻断 Fas 途径及结合其他凋亡受体、关节液中 sFas 水平升高并与膜 Fas 竞争性结合 FasL 等分子机制有关外^[19,20], 尚与野生型与突变型 P53 基因过度表达、Bcl-2 基因过度表达等因素密切相关^[21,22]。其中 Bcl-2 基因是研究最早的凋亡相关基因, 具有抑制细胞凋亡和延长细胞寿命的功能, 与 Bax 对凋亡的影响相反。RA 滑膜细胞的增殖

可能与 Bcl-2 的过量表达有关, 已有多项研究表明, RA 滑膜组织和滑膜成纤维样细胞 Bcl-2 蛋白较高^[23]。

本实验中, AA 大鼠关节滑膜组织 Bcl-2 表达明显增高、Bax 表达略有升高, 但这种改变与促炎症因子升高之间的关系有待证实。给 AA 大鼠连续灌胃 AHPS 后, 关节滑膜组织中 Bcl-2 蛋白表达下降, Bax 表达增加, 并显著提高了关节滑膜中的细胞凋亡, 改善了关节滑膜组织的病理改变。因此, AHPS 降低滑膜组织 Bcl-2、增加 Bax 蛋白的表达, 降低 Bcl-2/Bax 的比例, 可能是其延缓关节病理损伤的机制之一。

References

- [1] Strand V, Singh JA. Improved health-related quality of life with effective disease-modifying antirheumatic drugs: evidence from randomized controlled trials [J]. Am J Manag Care, 2008, 14: 234–254.
- [2] Yang ZX, Li ZB, Song ZC, et al. Effects of TWP on the contents of MIF, IL-1 β and TNF- α in serum of CIA rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2008, 24: 59–61.
- [3] Li NN. Effects of TWP on the contents of TNF- α and IL-6 in plasma of RA patients [J]. Acta Guangxi Med Univ (广西医科大学学报), 2005, 22: 681–683.
- [4] Shao BM, Xu W, Dai H. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 20: 1103–1111.
- [5] Li HQ, Wu CH, Gao H, et al. Effect of astragalus polysaccharides on immune function of erythrocytes of chickens infected with IBDV [J]. Vet Sci China (中国兽医学), 2006, 36: 74–79.
- [6] Li HQ, Reeve-Johnson L, Wang JD. Effect of Astragalus polysaccharides on erythrocyte immune adherence of chickens inoculated with infectious Bursal disease virus [J]. Agric Sci China (中国农业科学), 2007, 6: 1402–1408.
- [7] Li HQ, Zhao MC. Optimizing microwave-assisted extraction technology of Astragalus polysaccharides with response surface methodology [J]. J Tradit Chin Vet Med (中国兽医杂志), 2007, 26: 10–14.
- [8] Li HQ, Zhao WG, Lü XH. Analysis of chemical components and structure and bioactivity on immunopotentiator Astragalus polysaccharides [J]. J Tradit Chin Vet Med (中国兽医杂志), 2008, 27: 5–8.
- [9] Xū SY, Bian RL, Chen X. Pharmacology Experimental Methodology (药理实验方法学) [M]. 3rd ed, Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 890.
- [10] Huang NY, Gu Y, Liu FG. The animal model of rheumatoid arthritis [J]. Acta Laser Biol Sin (激光生物学报), 2000, 9: 142–145.
- [11] Shi BQ. Study on serum TNF- α level, B-cell count and T-cell subsets distribution in peripheral blood in patients with rheumatoid arthritis [J]. J Radioimmunol (放射免疫学杂志), 2006, 19: 197–199.
- [12] Hu YH, Weng GM, Lu FE, et al. Experimental investigation on triptolide induced apoptosis of synoviocytes in collagen induced arthritis rat [J]. Chin J Rheumatol (中华风湿病学杂志), 2004, 8: 131–134.
- [13] Lu J, Han MX, Zhang WD, et al. Influence of XINFENG capsule on serum level of IL-1, TNF- α , IL-4 and IL-10 in adjuvant arthritis rats [J]. J Anhui Tradit Chin Med Coll (安徽中医学院学报), 2002, 21: 44–46.
- [14] Gu WZ, Brandwein SR. Inhibition of type II collagen induced arthritis in rats by triptolide [J]. Int Immunopharmacol, 1998, 20: 389–400.
- [15] Zhang LL, Shen YX, Wei W. Relation between animal models of RA and clinic [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2002, 18: 502–505.
- [16] Schuna AA, Megeff C. New drugs for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Am J Health-Syst Pharm, 2000, 157: 225–235.
- [17] Lu JT, Yang Y, Chen MZ. Effect of astragalus polysaccharides on IL-1, NO and TNF secreted by lipopolysaccharide-induced normal rat peritoneal macrophages [J]. Acta Univ Med Anhui (安徽医科大学学报), 2004, 39: 139–141.
- [18] Liu J, Liu WD, Chen GL, et al. Therapeutic effect of Xinfeng capsule in treating adjuvant arthritis in rats and its effect on fas, fasL and bc1-2 expression in synovial membrane [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med (中国中西医结合杂志), 2002, 22: 599–602.
- [19] Schedel J, Gay RE, Kuenzfer P, et al. FLICE inhibitory protein expression in synovial fibroblasts and at sites of cartilage and bone erosion in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46: 1512–1518.
- [20] Proussakova OV, Rabaya NA, Moshnikova AB, et al. Oligomerization of soluble Fas antigen induces its cytotoxicity [J]. Biol Chem, 2003, 38: 36236–36241.
- [21] Sun HS, Chen Y, Pang XQ, et al. Advance on apoptosis with rheumatoid arthritis [J]. Chin J Rheumatol (中华风湿病学杂志), 2000, 4: 181–183.
- [22] Zhang J, Bardos T, Mikecz K, et al. Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis [J]. J Immunol, 2001, 166: 4981–4986.
- [23] Hilbers I, Hansen T, Petrow PK, et al. Expression of the apoptosis accelerator Bax in rheumatoid arthritis synovium [J]. Rheumatol Int, 2003, 23: 75–81.