

基于 PI3K/Akt/mTOR、HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 通路探讨大戟二烯醇抗类风湿性关节炎的作用

李澳文¹, 张新轩², 刘霞¹, 姚雨含³, 李晨阳³, 赵军^{1,3*}

1. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学 公共卫生学院, 新疆 乌鲁木齐 830011

3. 新疆维吾尔自治区药物研究院 新疆维吾尔药重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830004

摘要: **目的** 探讨大戟二烯醇 (EUP) 对类风湿性关节炎 (RA) 的防治作用及机制。 **方法** 将雄性大鼠随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为对照组、模型组、雷公藤多苷 (TG, 阳性药, 7.5 mg·kg⁻¹) 组和 EUP 低、中、高剂量 (16、32、64 mg·kg⁻¹) 组, 除对照组外, 其余大鼠右后足趾 sc 0.2 mL 弗氏完全佐剂 (FCA) 制备佐剂性关节炎 (AA) 模型, 造模后第 2 天开始给药, TG 组和 EUP 组按相应剂量 ig 给药, 每天 1 次, 连续 ig 给药 30 d。实验期间测量大鼠体质量和足趾肿胀度并进行关节指数评分; 给药结束后, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察大鼠踝关节组织病理学变化; ELISA 法检测大鼠血清中类风湿因子 (RF)、C 反应蛋白 (CRP)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 的含量; Western blotting 法检测大鼠关节组织中磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR)、缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2)、血管生成素 2 (ANG2) 蛋白的表达。 **结果** 与模型组相比, 经 EUP 治疗后, 大鼠双侧后肢肿胀程度明显减轻, 关节炎评分显著下降 ($P < 0.001$), 关节组织病变程度有所改善; 大鼠血清中 RF、CRP、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 关节组织中 PI3K 蛋白表达及 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值明显下调, HIF-1 α 、VEGFR2、ANG2 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$ 、0.01)。 **结论** EUP 有较好的抗 RA 活性, 其作用机制可能与 PI3K/Akt/mTOR、HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 信号通路有关。

关键词: 大戟二烯醇; 类风湿性关节炎; 炎症反应; PI3K/Akt/mTOR 通路; HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 通路

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)03-1938-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.06.007

Exploring anti-rheumatoid arthritis effects of euphol via PI3K/Akt/mTOR, HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 signaling pathways

LI Aowen¹, ZHANG Xinxuan², LIU Xia¹, YAO Yuhan³, LI Chenyang³, ZHAO Jun^{1,3}

1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

3. Xinjiang Key Laboratory for Uighur Medicine, Institute of Materia Medica of Xinjiang, Urumqi 830004, China

Abstract: Objective To investigate the preventive and therapeutic effects of euphol (EUP) on rheumatoid arthritis (RA) and its underlying mechanism. **Methods** Male rats were randomly divided into six groups, with 8 rats in each group, namely the control group, the model group, the tripterygium glycosides (TG, positive drug, 7.5 mg·kg⁻¹) group, and the low-, medium-, and high-dose EUP (16, 32, and 64 mg·kg⁻¹) groups. Except for the control group, the right hind toe of the remaining rats was subcutaneously injected with 0.2 mL of complete Freund's adjuvant (FCA) to establish adjuvant arthritis (AA) models. Administration began on the second day after modeling. The TG and EUP groups were administered the corresponding doses ig once a day for 30 consecutive days. During the experiment, the body weight and toe swelling degree of the rats were measured, and the arthritis index was scored. After administration, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of the rat ankle joint. The

收稿日期: 2026-01-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82360764)

作者简介: 李澳文 (1999—), 女, 硕士研究生, 从事中药与天然药物研究与开发。E-mail: ml7662543186@163.com

*通信作者: 赵军 (1973—), 男, 博士生导师, 研究员, 主要从事天然产物的研究与开发。E-mail: zhaojun21cn@163.com

levels of rheumatoid factor (RF), C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) in the rat serum were detected by ELISA. The expressions of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR), hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), and angiopoietin 2 (ANG2) proteins in the rat joint tissues were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, after treatment with EUP, the swelling degree of the bilateral hind limbs of the rats was significantly reduced, and the arthritis score was significantly decreased ($P < 0.001$). The degree of joint tissue lesions was improved. The levels of RF, CRP, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the rat serum were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), PI3K expression and the p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR ratios in joint tissues were significantly decreased, while the protein expressions of HIF-1 α , VEGFR2, and ANG2 were also downregulated ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** EUP exhibits potent anti-RA activity, which may be associated with inhibition of the PI3K/Akt/mTOR and HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 signaling pathways.

Key words: euphol; rheumatoid arthritis; inflammatory response; PI3K/Akt/mTOR pathway; HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 pathway

类风湿关节炎 (RA) 是一种以持续性滑膜炎为核心、可累及多系统的慢性炎症性自身免疫性疾病, 如果治疗不当, 可导致进行性关节损害, 严重者可导致永久性残疾和死亡^[1-3]。在 RA 的发病过程中, 免疫细胞持续募集、浸润滑膜组织并处于激活状态, 逐步形成以细胞因子网络推动的炎症微环境。在炎症微环境持续刺激下, 滑膜成纤维样细胞 (FLS) 中磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 介导的蛋白激酶 B (Akt) 磷酸化增强, 激活下游哺乳动物雷帕霉素靶标蛋白 (mTOR) 复合体, mTORC1 还可通过抑制自噬、促进炎症介质与血管生成相关因子 [如缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子 (VEGF)] 的表达, 进一步放大炎症微环境加重滑膜炎炎症^[4-5]。因此, 抑制 PI3K/Akt/mTOR、HIF-1 α /VEGFR2/血管生成素-2 (ANG2) 过度激活被认为是干预 RA 的潜在策略。

四环三萜类成分大戟二烯醇 (EUP) 是民族药大戟脂的主要活性成分, 也存在于中药甘遂、京大戟等大戟科所属的药用植物中^[6-7], 具有抗炎、抗肿瘤等多种生物活性^[8-9]。EUP 可通过抑制环氧合酶-2 (COX-2) 上调、减少炎症细胞浸润、下调促炎症因子的表达及调控核因子 κ B (NF- κ B) 通路减轻炎症反应^[10-11]。前期研究发现大戟脂总三萜对弗氏完全佐剂 (FCA) 诱导的大鼠关节炎具有明显的防治作用^[12], EUP 是总三萜的主要标识性成分, 质量分数可达 47.03%^[13]; 经典的抗炎镇痛实验也显示了 EUP 的抗炎镇痛作用^[14]。然而, 目前 EUP 改善 RA 的作用尚未有文献报道。本实验通过 FCA 诱导的大鼠佐剂性关节炎 (AA) 模型, 基于 PI3K/Akt/mTOR、HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 通路探讨 EUP 改善 RA 的作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量为 180~200 g, 购于新疆医科大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (新) 2023-0001, 使用许可证号 SYXK (新) 2023-0004; 饲养于 SPF 级屏障环境, 室内温度 22~25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 明暗轮换的环境下可自由摄食饮水。该实验方案已获得动物伦理委员会批准 (审批号 IACUC-JT-20240415-02), 所有涉及动物的研究均严格遵守公认的国际规章制度。

1.2 药品与主要试剂

雷公藤多苷片 (TG, 浙江德恩制药有限公司, 批号 24061068); EUP (新疆药物研究院, 批号 EU202407, 质量分数 96.28%); FCA (Sigma-Aldrich 公司, 批号 SLCR0904); 大鼠 C 反应蛋白 (CRP) 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒、大鼠类风湿因子 (RF) ELISA 试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司, 批号 JL10287、JL21136); 大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒和大鼠白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, 批号为 E-EL-R2856, E-EL-R0015)、大鼠白细胞介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒 (瑞迪生物科技有限公司, 批号为 RE1074R); 苯甲磺酰氟 (PMSF)、5 \times 蛋白上样缓冲液、蛋白磷酸酶抑制剂混合物、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、高效 RIPA 裂解液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 制备试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 P0100、P1040、P1260、PC0020、R0010、P1200-2); β -actin 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 23660-1-AP)、PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR

抗体 (Cell Signaling Technology, 批号分别为 4249、4691、4060、2983、5536); HIF-1 α 、VEGFR2、ANG2 抗体 (Abcam 公司, 批号分别为 ab179483、ab315238、ab155106); 特超敏 ECL 化学发光底物试剂盒 (biosharp 公司, 批号 BL520A)。

1.3 主要仪器

PV-200 足趾容积测量仪 (成都泰盟软件有限公司); PowerPac 蛋白电泳系统 (Bio-Rad 公司); Azure 600 蛋白成像化学发光仪 (Azure Biosystems 公司); Multiskan GO 全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Centrifuge 5430R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、AA 模型的建立及给药

根据文献报道的方法建立 FCA 关节炎模型^[15]。将 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、TG (阳性药, 7.5 mg·kg⁻¹) 组和 EUP 低、中、高剂量 (16、32、64 mg·kg⁻¹) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余组大鼠的右后足趾 sc 0.2 mL 的 FCA。对照组和模型组 ig 给予等体积的 0.5% CMC-Na 溶液, TG 组和 EUP 组按相应剂量 ig 给药。造模当天即为第 0 天, 第 2 天开始给药, 连续给药 30 d。

2.2 一般指标观察

实验期间, 每周固定时间称量大鼠体质量; 每 2 天测量大鼠左、右后足趾肿胀度, 并同步进行关节指数评分。关节指数评分按文献报道判定标准^[16]进行: 0, 无肿胀; 1, 轻微肿胀和红斑; 2, 中度肿胀和红斑; 3, 严重肿胀和红斑; 4, 严重畸形和不能使用肢体。

足趾肿胀度 = 第 n 天足爪体积 - 初始足爪体积

2.3 样本采集与处理

末次给药 1 h 后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 称质量, 腹主动脉取血, 室温静置 2 h 后, 4 °C、3000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 分装后冻于 -80 °C 冰箱保存备用。血清采集完成后, 将大鼠左右后肢的皮毛剥离, 去除多余的肌肉和脂肪, 充分暴露踝关节组织, 小心取下滑膜。将部分踝关节组织置于组织固定液中, 其余踝关节滑膜组织用锡纸包好放入液氮速冻, 后转移至 -80 °C 冰箱保存备用。

2.4 踝关节组织苏木精-伊红 (HE) 染色

部分踝关节组织保存在 4% 多聚甲醛中, 首先踝关节石蜡切片制备与脱蜡至水: 取踝关节组织固定、脱钙后, 常规脱水、透明、浸蜡包埋并切片 (取

材与包埋统一切片方向); 烤片后经二甲苯脱蜡, 并梯度乙醇返水至水。苏木素染色: 切片入苏木素染色约 5 min, 水洗; 0.5% 盐酸酒精分化至染色质清晰, 水洗并返蓝。伊红染色: 切片入伊红染色约 1 min, 水洗。最后, 脱水透明封片、镜检与图像采集: 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后中性树脂封片; 光镜下观察病理变化, 分析并拍照。

2.5 ELISA 法检测 RF 和 CRP 水平

采用 ELISA 法检测大鼠血清中 RF 与 CRP 水平, 按说明书完成加样、孵育、洗板、显色与终止反应等步骤; 使用酶标仪于 450 nm 波长测定各孔吸光度 (A) 值, 依据标准品绘制标准曲线并换算得到样本浓度。

2.6 ELISA 法检测炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平

采用 ELISA 法检测大鼠血清中促炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平, 按说明书完成加样、孵育、洗板、显色与终止反应等步骤; 使用酶标仪于 450 nm 波长测定各孔 A 值, 依据标准品绘制标准曲线并换算得到样本浓度。

2.7 Western blotting 法检测关节组织中相关蛋白的表达水平

取大鼠踝关节滑膜组织 30 mg, 加入 6 倍量的配制好的裂解液 (总蛋白裂解液: 蛋白酶抑制剂: 磷酸化酶抑制剂 = 100:1:1) 进行组织匀浆, 12 000 r·min⁻¹、4 °C 离心 15 min, 取上清, BCA 蛋白定量试剂盒测定其蛋白浓度后, 加入蛋白上样缓冲液, 高温变性, -80 °C 保存, 备用。蛋白经过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转移至 PVDF 膜, 封闭液封闭后, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜; 次日, 加入二抗室温孵育 1 h 后, 加入显影液 ECL 进行曝光, 采用 Image J 软件进行条带灰度值分析, 计算各组蛋白的相对表达量。

2.8 统计学分析

数据采用 SPSS 27.0 和 GraphPad Prism 10 进行统计分析和绘图, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对于符合正态分布, 且满足方差齐性检验的数据采用单因素方差分析, 反之使用非参数检验。

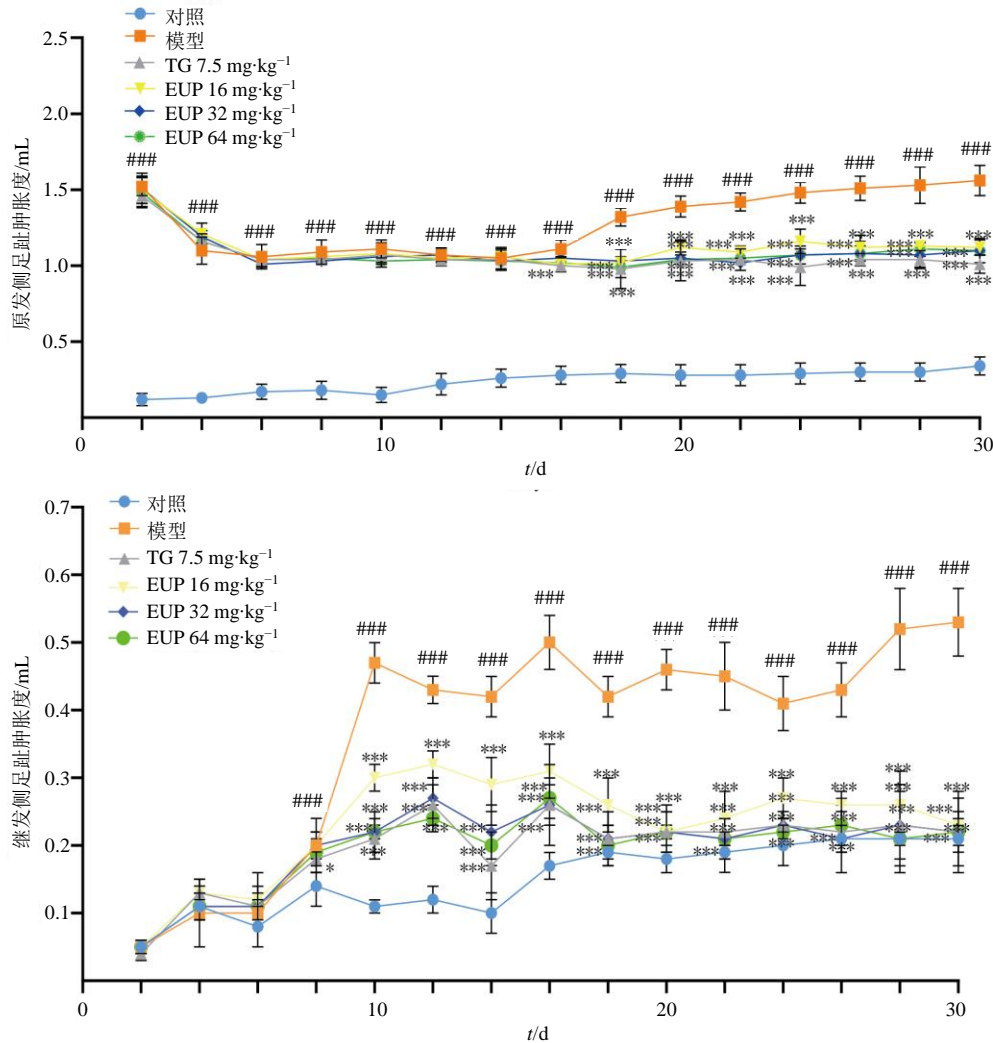
3 结果

3.1 EUP 对大鼠体质量和足趾肿胀度的影响

如图 1 所示, 大鼠原发侧足趾在注射 FCA 后, 开始严重肿胀泛红, 在造模后的 14 d 内, 注射 FCA 后大鼠原发侧足趾肿胀程度显著高于对照组大鼠

原发侧的足趾肿胀程度 ($P < 0.001$), 并且各给药组与模型组大鼠原发侧足趾肿胀度无显著性差异。造模后第 16 天起, TG 组和 EUP 低、中、高剂量组大鼠原发侧足趾肿胀度开始下降, 与模型组大鼠相比显著降低 ($P < 0.001$)。造模后第 8 天起, 所有注射

FCA 的大鼠的继发侧足趾肿胀度均显著增加 ($P < 0.001$); 在造模后第 10 天, TG 和 EUP 各剂量组干预后, AA 大鼠继发侧足趾的肿胀程度被显著降低 ($P < 0.001$)。如表 1 所示, 模型组大鼠足趾肿胀度明显增加, 但是未对大鼠的体质量增长造成影响。



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 1 EUP 对 AA 大鼠双侧后足趾肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of EUP on swelling degree of bilateral hind paw in AA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表 1 EUP 对 AA 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of EUP on body weight in AA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	体质量/g					
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	30 d
对照	—	185.29 ± 4.37	231.06 ± 11.25	273.09 ± 13.83	321.39 ± 14.40	358.96 ± 18.24	367.50 ± 17.14
模型	—	190.26 ± 6.28	237.23 ± 13.49	264.69 ± 13.49	318.71 ± 18.71	354.44 ± 16.15	363.44 ± 12.51
TG	7.5	183.86 ± 5.05	224.41 ± 11.66	265.19 ± 3.46	319.70 ± 17.56	355.63 ± 20.39	364.21 ± 20.32
EUP	16.0	192.01 ± 13.80	230.30 ± 13.59	272.14 ± 15.88	321.20 ± 20.03	346.34 ± 25.98	361.89 ± 26.66
	32.0	191.05 ± 8.77	225.05 ± 13.45	256.30 ± 15.02	321.93 ± 19.68	355.39 ± 22.00	363.15 ± 19.83
	64.0	189.45 ± 11.73	236.40 ± 16.40	276.84 ± 16.82	319.74 ± 15.84	354.84 ± 11.62	361.75 ± 11.26

3.2 EUP 对大鼠关节指数评分的影响

如图 2 所示,造模后第 2 天起, FCA 诱导关节炎大鼠的关节指数评分与对照组比较显著升高

($P < 0.001$); 造模后第 10 天起, 与模型组大鼠相比较, TG 组和 EUP 各剂量组能显著降低 AA 大鼠的关节指数评分 ($P < 0.001$)。

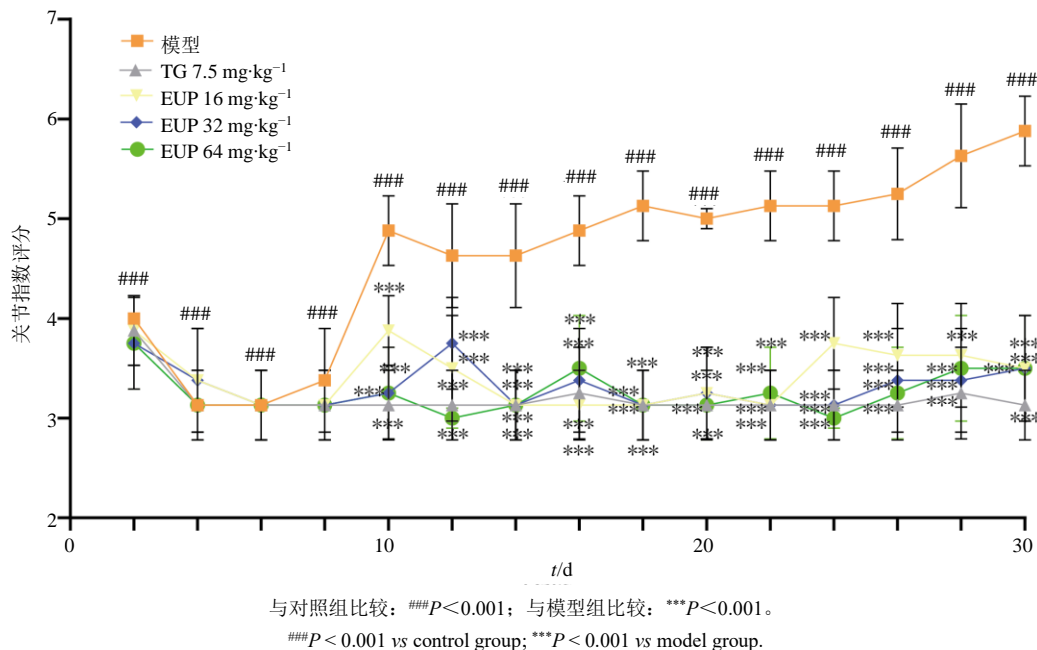


图 2 EUP 对 AA 大鼠关节指数评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of EUP on arthritis score of hind paws in AA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.3 EUP 对大鼠关节组织病理学的影响

光镜下观察大鼠关节组织的病理学变化,如图 3 所示,在对照组大鼠中关节组织结构正常,无关节组织病理学改变。与对照组比较,模型组大鼠可观察到关节腔纤维素渗出,滑膜增生,滑膜内炎细胞浸润等病理学改变。与模型组大鼠相比,经 TG 和 EUP 各剂量组治疗后,关节组织病理状态得到不同情况改善。结果表明, EUP 可在一定程度上改善 AA 大鼠关节组织病理损伤,提示其具有抗关节炎活性。

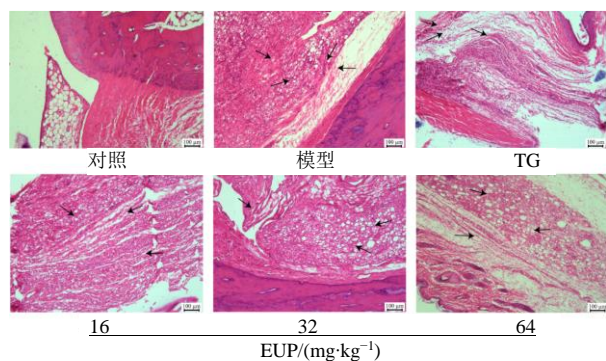


图 3 EUP 对 AA 大鼠关节组织病理学改变的影响 ($\times 100$)

Fig. 3 Impact of EUP on joints histopathological changes in AA rat ($\times 100$)

3.4 EUP 对大鼠血清 RF 和 CRP 水平的影响

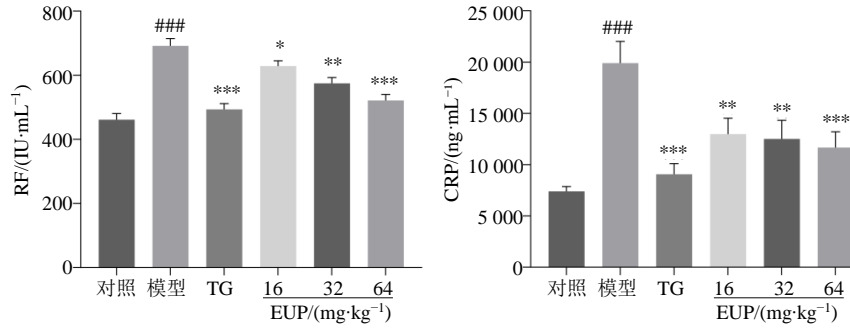
如图 4 所示,与对照组相比,模型组大鼠血清中 RF 和 CRP 水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, EUP 低、中、高剂量组和 TG 组大鼠血清中 RF 和 CRP 水平明显下降 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

3.5 EUP 对大鼠血清中炎症因子水平的影响

如图 5 所示,与对照组相比,模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, TG 和中、高剂量 EUP 能明显降低大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.6 EUP 对大鼠关节组织滑膜 PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白表达的影响

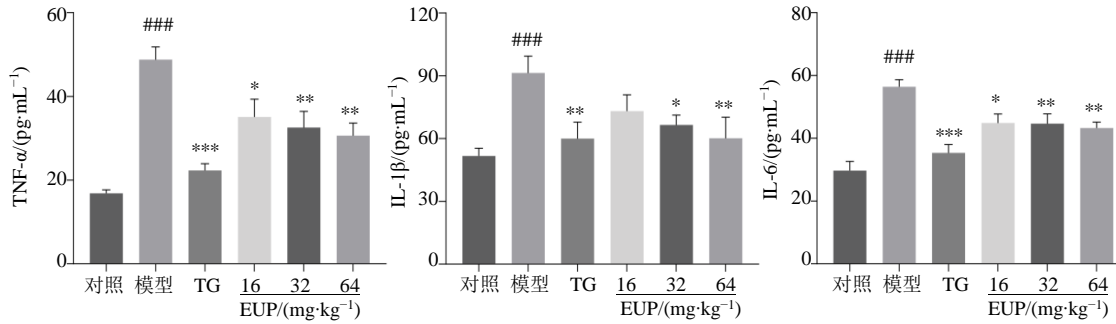
如图 6 所示,与对照组大鼠相比,模型组大鼠关节滑膜 PI3K、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组大鼠相比, EUP 中、高剂量组大鼠关节滑膜 PI3K、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)。结果表明, EUP 可能通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路发挥抗 RA 作用。



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。
^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图 4 EUP 对 AA 大鼠血清 RF 和 CRP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

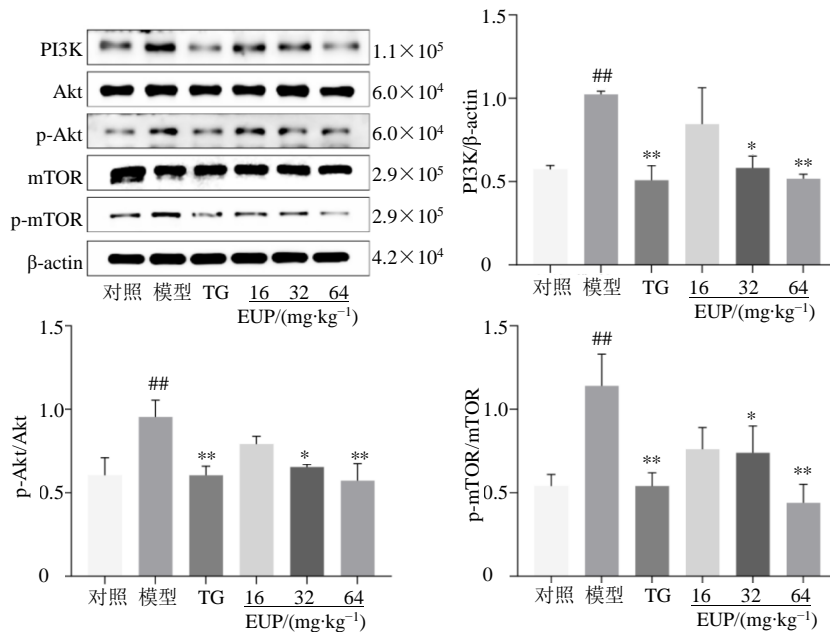
Fig. 4 Effect of EUP on serum RF and CRP levels in AA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。
^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图 5 EUP 对 AA 大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 Effect of EUP on serum TNF-α, IL-1β, and IL-6 levels in AA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

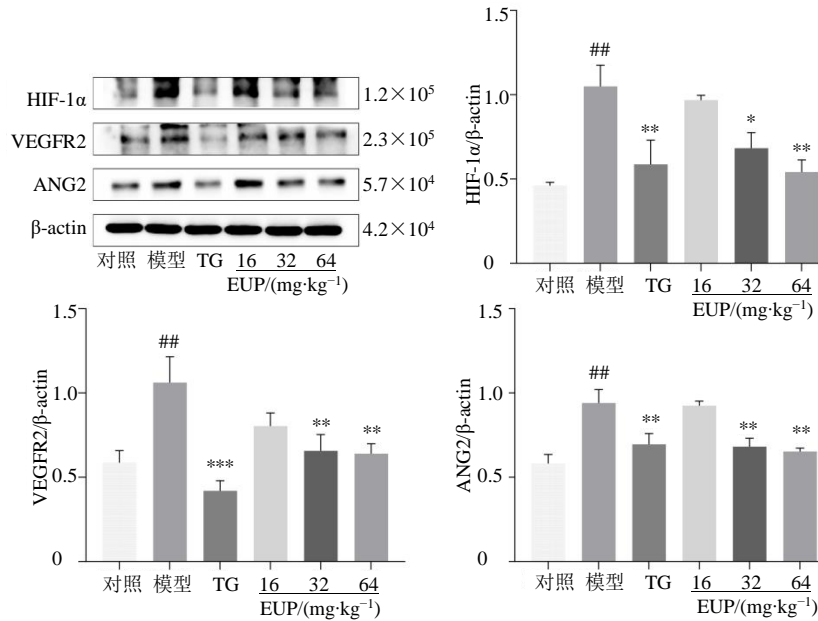
图 6 EUP 对 AA 大鼠关节组织滑膜 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of EUP on expression of PI3K/Akt/mTOR pathway related proteins in synovial membrane of AA rat joints ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 EUP 对大鼠关节组织滑膜 HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 通路蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠关节滑膜 HIF-1 α 、VEGFR2 和 ANG2 蛋白表达水平明显升

高 ($P < 0.01$); 与模型组大鼠相比, EUP 中、高剂量组大鼠关节滑膜 HIF-1 α 、VEGFR2 和 ANG2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)。结果表明, EUP 可能通过抑制血管生成相关信号发挥抗 RA 作用。



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图 7 EUP 对 AA 大鼠关节组织滑膜 HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of EUP on expression of HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 pathway related proteins in synovial membrane of AA rat joints ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

FCA 诱导的 AA 模型的致病机制和病理特点与人 RA 相似, 常见症状为关节肿胀和疼痛、滑膜炎性浸润和增生等^[17]。本研究以 FCA 诱导的大鼠 AA 模型模拟 RA 的持续性滑膜炎与进行性关节损伤过程。AA 组出现双侧后肢足趾肿胀度升高、关节指数评分上升及踝关节组织病理学改变, 提示模型构建成功。与 AA 组相比, EUP 各剂量组干预后可明显减轻双侧后肢足趾肿胀度并降低关节炎评分, 同时 HE 染色显示关节组织病理学损伤程度改善。RF 是诊断 RA 特异性较高且具有早期诊断价值的血清学标志物, 可与免疫球蛋白形成免疫复合物, 进而引发组织损伤和炎症反应^[18]。CRP 为典型急性期反应蛋白, 主要由肝细胞在炎症刺激下合成, 在 RA 的炎症反应中, 促炎细胞因子 (IL-6) 可显著促进肝脏急性期反应并上调 CRP 水平, 因此 CRP 常用于反映 RA 的炎症程度^[18-19]。TNF- α 主要由巨噬细胞等产生, 在 RA 患者滑液及滑膜组织中

可呈高表达, 是推动滑膜炎持续化与关节破坏的关键因子, 其不仅可自分泌强化炎症细胞活化, 还可旁分泌诱导多种促炎介质释放, 从而形成炎症级联放大效应^[20]。此外, TNF- α 、IL-1 β 与 IL-6 共同参与 RA 相关的滑膜炎反应。在大鼠佐剂性关节炎模型中, 与 RA 密切相关的 RF、CRP、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 在 AA 组大鼠血清中显著升高, EUP 干预可逆转这些因子水平的升高。以上研究结果表明 EUP 具有较好的抗 RA 作用。

PI3K/Akt/mTOR 通路的异常激活与免疫细胞浸润和炎症反应密切相关, 在 RA 的发生发展中发挥着重要作用^[21]。I 类 PI3K 作为脂质激酶, 被炎症因子激活后, 可催化磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸磷酸化 (PIP2) 生成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (PIP3), 进而磷酸化 Akt。Akt 活化可以调控滑膜细胞的凋亡和细胞炎性浸润等^[22]。Akt 活化后还可进一步激活 mTOR, 促进炎症介质的生成^[23-24]。mTOR 作为 PI3K/Akt 通路的重要下游节点, 在细胞生长、代谢

调控及炎症反应中具有关键作用^[25]。mTOR 活化后可通过下游 S6K1 和 4E-BP1 促进炎症相关蛋白的翻译表达,增加 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子的生成^[26]。同时, mTOR 还可与 NF- κ B、HIF-1 α 等信号存在交互作用,共同放大促炎因子表达并促进异常血管生成,进而参与 RA 滑膜炎与关节损伤^[27]。在本研究结果中, EUP 明显下调 RA 大鼠滑膜组织中 PI3K、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平。此外,在 RA 的病程进展中,滑膜组织处于持续炎症与相对缺氧状态,缺氧应激可诱导 HIF-1 α 稳定表达并转位入核,进而上调血管生成相关因子,促进异常血管新生与血管重塑^[28]。VEGFR2 作为 VEGF 信号转导的关键受体,是驱动内皮细胞增殖、迁移与新生血管形成的核心环节^[29], ANG2 则参与血管成熟度与通透性调控,可增强内皮细胞激活并促进血管重塑,从而为炎症细胞持续进入滑膜提供更多通道,推动炎症微环境的维持与放大^[30-31]。本研究结果显示,模型组关节组织中 HIF-1 α 、VEGFR2 和 ANG2 蛋白水平显著升高,这提示 FCA 诱导的关节炎模型中也存在缺氧微环境与血管生成信号的异常激活。经 EUP 中、高剂量干预后, HIF-1 α 、VEGFR2 和 ANG2 蛋白表达水平明显下调,提示 EUP 可能通过抑制缺氧应答与血管生成,从而在关键环节削弱炎症细胞持续浸润与炎症放大。本研究结果显示 EUP 降低 p-mTOR/mTOR 的同时,下调 HIF-1 α 及其下游 VEGFR2、ANG2 蛋白表达,并伴随关节炎表型与血清炎症因子的改善。这些结果提示 2 条通路在药物干预下呈现一致变化趋势,可能存在潜在关联。在 RA 滑膜持续炎症过程中,局部缺氧与血管生成并非独立事件,而是与炎症信号相互促进的过程^[32]。既往研究表明 mTOR 信号可促进 HIF-1 α 蛋白表达,并增强缺氧应答及其下游促血管生成,从而推动 VEGFR2 介导的内皮细胞活化以及 ANG2 参与的血管重塑^[33]。结合本研究中 EUP 同步下调 p-mTOR/mTOR 与 HIF-1 α 、VEGFR2、ANG2 表达,并伴随炎症指标及关节组织损伤改善,提示 PI3K/Akt/mTOR 与 HIF-1 α 通路血管生成可能存在相关调控。

本研究从体内药效学与关节组织蛋白表达层面提示 EUP 可抑制 PI3K/Akt/mTOR 与 HIF-1 α /VEGFR2/ANG2 信号通路,改善 RA 炎症反应与异常血管。然而,本研究尚不能明确 EUP 对 HIF-1 α 通路介导血管生成过程的直接因果作用。未来将

结合 FLS 和内皮细胞模型及通路抑制剂干预等,进一步阐明其关键调控环节,也为后续研究提供清晰验证路径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心(北京协和医院),中国医师协会风湿免疫专科医师分会,中国康复医学会风湿免疫病康复专业委员会,等. 2024 中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2024, 63(11): 1059-1077.
National Clinical Research Center for Dermatologic and Immunologic Diseases (Peking Union Medical College Hospital), Chinese Association of Rheumatology and Immunology Physicians, Rheumatology and Immunology Professional Committee of Chinese Rehabilitation Medical Association. 2024 Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis [J]. Chin J Int Med, 2024, 63(11): 1059-1077.
- [2] Kerola A M, Kazemi A, Rollefstad S, et al. All-cause and cause-specific mortality in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis: A nationwide registry study [J]. Rheumatology, 2022, 61(12): 4656-4666.
- [3] Smolen J S, Aletaha D, Barton A, et al. Rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18001.
- [4] Bobkova T, Bobkov A, Li Y. Pharmacological inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway in rheumatoid arthritis synoviocytes: A systematic review and Meta-analysis (preclinical) [J]. Pharmaceuticals, 2025, 18(8): 1152.
- [5] Nasrollahizadeh A, Rahmati S, Chahkand M S G, et al. Autophagy in rheumatoid arthritis: Molecular mechanisms, diagnostic biomarkers, and emerging therapeutic strategies [J]. Inflammation, 2026, 49(1): 62.
- [6] 刘婧, 李晨阳, 赵军, 等. 大戟脂药材中四环三萜类成分大戟二烯醇、大戟醇的含量测定及提取工艺优化 [J]. 中国药房, 2021, 32(6): 708-712.
Liu J, Li C Y, Zhao J, et al. Content determination of tetracyclic triterpenoids as euphol and euphorbol in *Euphorbia resinifera* and the optimization of extraction technology [J]. China Pharm, 2021, 32(6): 708-712.
- [7] 冯雪梅, 毕楚遥, 许冰, 等. HPLC 法测定不同产地、生长年限、采收期的京大戟和甘遂中大戟二烯醇含量 [J]. 特产研究, 2020, 42(1): 54-57, 73.
Feng X M, Bi C Y, Xu B, et al. HPLC method for determination of euphol in *Euphorbia pekinensis* and

- Euphorbia kansui* in different regions, different growing years and different harvest time [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res*, 2020, 42(1): 54-57, 73.
- [8] Gade I S, Chadéneau C, Richard T S, et al. Euphol from *Tapinanthus* sp. induces apoptosis and affects signaling proteins in glioblastoma and prostate cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022, 23(12): 4205-4212.
- [9] Dutra R C, Simão da Silva K A B, Bento A F, et al. Euphol, a tetracyclic triterpene produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain: The involvement of cannabinoid system [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 63(4): 593-605.
- [10] Passos G F, Medeiros R, Marcon R, et al. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1/2/3): 413-420.
- [11] Dutra R C, de Cezaro de Souza P R, Bento A F, et al. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(4): 531-542.
- [12] 周茂杰, 谭为, 哈木拉提·哈斯木, 等. 基于 Nrf2/HO-1/GPX4 通路探讨大戟脂总三萜抗类风湿性关节炎的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(18): 4834-4842.
Zhou M J, Tan W, Hamutati H, et al. Total triterpenes of *Euphorbium* alleviates rheumatoid arthritis via Nrf2/HO-1/GPX4 pathway [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(18): 4834-4842.
- [13] Zhou M J, Tan W, Hasimu H, et al. *Euphorbium* total triterpenes improve Freund's complete adjuvant-induced arthritis through PI3K/Akt/Bax and NF- κ B/NLRP3 signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 306: 116146.
- [14] 刘婧, 刘燕, 赵军, 等. 大戟脂有效部位及大戟二烯醇抗炎镇痛作用研究 [J]. *医药导报*, 2021, 40(12): 1665-1670.
Liu J, Liu Y, Zhao J, et al. Study on the anti-inflammatory and analgesic effects of the effective parts of *Euphorbium resinifera* and euphol [J]. *Her Med*, 2021, 40(12): 1665-1670.
- [15] Abdel E L, Gaphar O A M, Abo-Youssef A M, et al. Effect of losartan in complete freund's adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 17(4): 1420-1430.
- [16] Zhao Y, Chang Z F, Li R, et al. Paclitaxel suppresses collagen-induced arthritis: A reevaluation [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 5044-5051.
- [17] González-Chávez S A, Chaparro-Barrera E, Alvarado-Jáquez M F, et al. Complete Freund's adjuvant induces a fibroblast-like synoviocytes (FLS) metabolic and migratory phenotype in resident fibroblasts of the inoculated footpad at the earliest stage of adjuvant-induced arthritis [J]. *Cells*, 2023, 12(6): 842.
- [18] Sahin D, Di Matteo A, Emery P. Biomarkers in the diagnosis, prognosis and management of rheumatoid arthritis: A comprehensive review [J]. *Ann Clin Biochem*, 2025, 62(1): 3-21.
- [19] Ngwa D N, Pathak A, Agrawal A. IL-6 regulates induction of C-reactive protein gene expression by activating STAT3 isoforms [J]. *Mol Immunol*, 2022, 146: 50-56.
- [20] Fujimoto S, Niuro H. Pathogenic role of cytokines in rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Med*, 2025, 14(18): 6409.
- [21] Roy T, Boateng S T, Uddin M B, et al. The PI3K-Akt-mTOR and associated signaling pathways as molecular drivers of immune-mediated inflammatory skin diseases: Update on therapeutic strategy using natural and synthetic compounds [J]. *Cells*, 2023, 12(12): 1671.
- [22] Cheng Q, Chen M, Liu M D, et al. Semaphorin 5A suppresses ferroptosis through activation of PI3K-Akt-mTOR signaling in rheumatoid arthritis [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 608.
- [23] Barker B E, Hanlon M M, Marzaioli V, et al. The mammalian target of rapamycin contributes to synovial fibroblast pathogenicity in rheumatoid arthritis [J]. *Front Med*, 2023, 10: 1029021.
- [24] Saxton R A, Sabatini D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cell*, 2017, 168(6): 960-976.
- [25] 王亚黎, 刘健, 万磊, 等. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠 Beclin1/PI3K-Akt-mTOR 的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(4): 464-469.
Wang Y L, Liu J, Wan L, et al. Effect of Xinfeng capsule on Beclin1/PI3K-Akt-mTOR of adjuvant arthritis rats [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2017, 37(4): 464-469.
- [26] Xu J, Jiang C S, Cai Y S, et al. Intervening upregulated SLC7A5 could mitigate inflammatory mediator by mTOR-P70S6K signal in rheumatoid arthritis synoviocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 200.
- [27] Du H Y, Wang Y C, Zeng Y C, et al. Tanshinone IIA suppresses proliferation and inflammatory cytokine production of synovial fibroblasts from rheumatoid

- arthritis patients induced by TNF- α and attenuates the inflammatory response in AIA mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 568.
- [28] MacDonald I J, Liu S C, Su C M, et al. Implications of angiogenesis involvement in arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 2012.
- [29] Wang X R, Bove A M, Simone G, et al. Molecular bases of VEGFR-2-mediated physiological function and pathological role [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 599281.
- [30] Akwii R G, Sajib M S, Zahra F T, et al. Role of angiopoietin-2 in vascular physiology and pathophysiology [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 471.
- [31] Zhao F, Hu Z Y, Li G J, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: Pathological characterization, pathogenic mechanisms, and nano-targeted therapeutic strategies [J]. *Bioact Mater*, 2025, 50: 603-639.
- [32] Brouwer E, Gouw A S H, Posthumus M D, et al. Hypoxia-inducible factor-1-alpha (HIF-1alpha) is related to both angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2009, 27(6): 945-951.
- [33] Ba X, Huang Y, Shen P, et al. WTD attenuating rheumatoid arthritis via suppressing angiogenesis and modulating the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 696802.

[责任编辑 兰新新]