

## 三叶青藤醇提取物通过调控成纤维样滑膜细胞增殖、迁移及炎症因子分泌抑制佐剂性关节炎的作用研究

阳 洋<sup>1</sup>, 胡梦凡<sup>2</sup>, 赵有为<sup>3</sup>, 肖顺丹<sup>3</sup>, 冷 静<sup>2,3</sup>, 梁 亮<sup>2,3</sup>, 运晨霞<sup>1,2,3\*</sup>

1. 广西中医药大学 基础医学院, 广西 南宁 530200

2. 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 广西 南宁 530200

3. 广西高校特色实验动物模型重点实验室, 广西 南宁 530200

**摘要:** 目的 探讨三叶青藤醇提取物 (IREE) 通过抑制成纤维样滑膜细胞 (FLS) 增殖、迁移, 抑制炎症通路活化及炎症因子释放, 发挥抗类风湿关节炎的作用机制。方法 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、青藤碱 (50 mg·kg<sup>-1</sup>) 组和 IREE 低、高剂量 (50、100 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, 除对照组外, 采用弗氏完全佐剂尾根部 sc 建立佐剂性关节炎 (AA) 大鼠模型, 给药始于造模 2 周后, 共 30 d, 每天 ig 给药 1 次, 对照组与模型组给予 0.9% 氯化钠溶液; 进行关节炎指数 (AI) 评分; 通过 HE 染色观察大鼠踝关节滑膜组织的病理特征; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测滑膜组织中肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素 (IL)-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 的表达水平; Western blotting 检测 Toll 样受体 8 (TLR8)/核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路蛋白在 AA 大鼠踝关节滑膜中的表达情况。分离 AA 大鼠关节滑膜组织中的 FLS, 采用 CCK-8 法检测不同质量浓度 IREE 对 FLS 活力的影响, 筛选最佳药物浓度; 将 FLS 分为对照组、青藤碱 (200 nmol·mL<sup>-1</sup>) 组及 IREE 低、中、高质量浓度 (1、2、3  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) 组, 通过细胞克隆形成实验、划痕实验和 Transwell 迁移实验分别检测 FLS 的增殖和迁移能力。结果 与对照组相比, 模型组大鼠踝关节滑膜层显著增厚, 滑膜细胞多层堆积, 炎症细胞大量浸润, 关节间隙狭窄, 血管翳生成增多; AI 评分显著增加, 滑膜组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 水平显著升高, TLR8、Myd88、P65、p-P65 蛋白表达量显著增多, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与模型组相比, IREE 低、高剂量组明显减轻滑膜组织增生和炎症细胞浸润, 显著降低 AI 评分, 并显著降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 水平及 TLR8、Myd88、P65、p-P65 蛋白表达, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。成功分离 AA 大鼠原代 FLS, 与对照组相比, IREE 低、中、高质量浓度组均显著抑制 FLS 的增殖和迁移能力 ( $P < 0.05$ 、0.01)。结论 IREE 通过抑制 FLS 的增殖和迁移能力, 抑制 TLR8/NF- $\kappa$ B 信号通路活化, 降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促炎细胞因子的表达, 从而发挥抗类风湿关节炎的作用。

**关键词:** 三叶青藤醇提取物; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 增殖; 迁移; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)09-2472-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.09.009

## Study on mechanism of ethanol extract from *Illigera rhodantha* in inhibiting adjuvant-induced arthritis by regulating fibroblast-like synoviocyte proliferation, migration, and inflammatory cytokine secretion

YANG Yang<sup>1</sup>, HU Mengfan<sup>2</sup>, ZHAO Youwei<sup>3</sup>, XIAO Shundan<sup>3</sup>, LENG Jing<sup>2,3</sup>, LIANG Liang<sup>2,3</sup>, YUN Chenxia<sup>1,2,3</sup>

1. School of Basic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Key Laboratory of Integrative Translational Medicine of Guangxi High Incidence Infectious Diseases, Nanning 530200, China

3. Key Laboratory of Guangxi Characteristic Experimental Animal Disease Model, Nanning 530200, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of IREE in treating rheumatoid arthritis (RA) by inhibiting fibroblast-like synoviocyte (FLS) proliferation, migration, and inflammatory cytokine release. **Methods** SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the sinomenine (50 mg·kg<sup>-1</sup>) group and the IREE low-dose (50 mg·kg<sup>-1</sup>) and high-dose (100 mg·kg<sup>-1</sup>)

收稿日期: 2025-03-11

基金项目: 广西科技厅自然科学基金面上项目 (2023JJA140940); 广西中医药大学高层次人才培育创新团队-医学免疫学创新团队 (2022B006); 研究生创新创业训练项目 (YCSW2023403)

作者简介: 阳 洋 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治类风湿关节炎机制。E-mail: 2604835963@qq.com

\*通信作者: 运晨霞 (1977—), 女, 教授, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治类风湿关节炎机制。E-mail: yunchenxia@foxmail.com

groups. Except for the control group, the adjuvant arthritis (AA) rat model was established by subcutaneous injection of Freund's complete adjuvant at the tail base. Administration began two weeks after modeling and lasted for 30 days, with one oral administration per day. The control and model groups were given 0.9% sodium chloride solution. The arthritis index (AI) score was evaluated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological features of ankle synovial tissues. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was performed to detect mRNA levels of tumor necrosis factor (*TNF*)- $\alpha$ , interleukin (*IL*)-1 $\beta$ , and *IL*-6 in synovial tissues, Western blotting detection of Toll like receptor 8 (*TLR8*)/nuclear factor kappa B (*NF*- $\kappa$ B) signaling pathway proteins in the synovial tissue of AA rats' ankles. FLS were isolated from AA rat synovial tissues, and the CCK-8 assay was used to evaluate IREE's effects on FLS viability to determine the optimal concentration. FLS were divided into blank, sinomenine (200 nmol·mL<sup>-1</sup>), and low-, medium-, and high-dose IREE (1, 2, 3  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) groups. Cell colony formation, scratch, and Transwell migration assays were conducted to assess FLS Proliferation and migration. **Results** Compared with the control group, the ankle joint synovial layer of the model group rats was significantly thickened, with multiple layers of synovial cells accumulated and a large number of inflammatory cells infiltrated. The joint space was narrowed, and the pannus formation was increased. The AI score was significantly increased, and the mRNA levels of *TNF*- $\alpha$ , *IL*-1 $\beta$  and *IL*-6 in the synovial tissue were significantly elevated, as well as the protein expression levels of TLR8, Myd88, P65 and p-P65, with all differences being statistically significant ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Compared with the model group, the low and high dose groups of IREE significantly alleviated the synovial tissue hyperplasia and inflammatory cell infiltration, significantly reduced the AI score, and significantly decreased the mRNA levels of *TNF*- $\alpha$ , *IL*-1 $\beta$  and *IL*-6 and the protein expression of TLR8, Myd88, P65 and p-P65, with all differences being statistically significant ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Primary FLS from AA rats were successfully isolated. Compared with the control group, the low, medium and high concentration groups of IREE significantly inhibited the proliferation and migration ability of FLS ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** IREE exerts anti-rheumatoid arthritis effects by suppressing FLS proliferation and migration, as well as reducing the expression of pro-inflammatory cytokines (*TNF*- $\alpha$ , *IL*-1 $\beta$ , and *IL*-6). **Key words:** ethanol extract of *Illigera rhodantha* Hance.; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synovial cells; proliferation; migration; inflammation

类风湿关节炎 (RA) 是一种常见的慢性炎症性疾病, 主要累及关节及其周围软组织, 临床表现为持续性滑膜炎、关节畸形及进行性残疾, 严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。RA 的病理机制复杂, 其中成纤维样滑膜细胞 (FLS) 的异常活化被认为是疾病进展的核心环节。FLS 不仅是关节滑膜的主要组成部分, 还在炎症微环境中受多种细胞因子 [如肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 $\beta$ 、IL-17 等] 驱动, 通过激活 Toll 样受体 8 (TLR8) / 核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 等信号通路, 促进自身增殖、迁移及侵袭, 进而加剧关节组织的破坏<sup>[2-3]</sup>。此外, FLS 还可通过分泌大量炎症因子, 进一步扩大炎症反应并加速关节结构的损伤<sup>[4-5]</sup>。因此, 靶向 FLS 的异常生物学行为已成为 RA 治疗的重要策略之一。

三叶青藤 *Illigera rhodantha* Hance. 为广西特色壮药, 属青藤科植物红花青藤的干燥地上部分, 主产于广西地区<sup>[6]</sup>, 其性甘、辛、温, 具祛风散瘀、消肿止痛之效, 民间常以白酒浸泡或水煎酒冲服的方式用于治疗跌打肿痛及 RA 等疾病<sup>[7-8]</sup>。近年来, 药理学研究进一步揭示了三叶青藤醇提物 (IREE) 抗炎作用的科学依据: 李江团队通过邻二甲苯诱导的小鼠耳肿胀、卡拉胶致大鼠足肿胀、乙酸诱导的腹

腔毛细血管通透性增高及棉球肉芽肿等经典炎症模型, 系统证实 IREE 可显著抑制非特异性炎症反应, 并降低炎性渗出液中前列腺素 E2 (PGE2) 水平<sup>[9-10]</sup>; 在胶原性关节炎大鼠模型中, 该提取物能剂量相关性地减轻关节肿胀率, 且表现出低毒性特点<sup>[11]</sup>。

基于传统应用与前期研究, 本课题组探索了 IREE 抗 RA 机制<sup>[12]</sup>, 网络药理学分析提示 IREE 通过多成分协同作用调控多条细胞信号通路, SW982 滑膜肉瘤细胞实验则证实其含药血清可抑制 TLR8 通路及下游炎症因子表达, 提示其可能通过调控 FLS 功能发挥治疗作用。为进一步验证这一假说, 本研究通过构建佐剂性关节炎 (AA) 大鼠模型, 并分离大鼠踝关节滑膜组织 FLS, 结合体内外实验系统探讨 IREE 对 FLS 生物学行为及炎症因子分泌的调控机制。研究结果不仅为阐明三叶青藤药酒的民间疗效提供科学依据, 更为开发基于天然药物的 RA 治疗新策略提供参考。

## 1 材料

### 1.1 实验药物

三叶青藤, 购自广西白云山盈康药业有限公司, 经广西中医药大学覃骊兰教授鉴定为三叶青藤 *Illigera rhodantha* Hance. 的干燥地上部分。IREE 由实

实验室自提,提取方法详见本课题组前期研究成果<sup>[12]</sup>。

### 1.2 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 30 只, 体质量 160~200 g, 5~6 周龄, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(湘)2019-0004。饲养环境温度(23.0±0.5)℃, 相对湿度 60%~80%。动物实验严格遵守广西中医药大学实验动物伦理委员会的要求, 动物实验伦理审查编号为 SYXK 桂 2019-0001。

### 1.3 实验试剂

青藤碱(批号 HY-15122, 质量分数 99.94%) 购自 MCE 公司; 热灭活结核杆菌 (*M. Tuberculosis* Des.H37Ra)(批号 7314933) 购自美国 BD 公司; 总 RNA 提取试剂盒(批号 TM429021) 购自天漠科技开发有限公司; SuPerReal 荧光定量预混试剂增强版(批号 U8731) 购自天根生化科技有限公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒(批号 21341436) 购自 BiosharP 公司; 胎牛血清(批号 2010106C) 购自 Thermo Fisher 公司; DMEM 高糖基础培养基(批号 WH0121A231) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; SABC-FITC-兔 IgG 免疫组化染色试剂盒(批号 SA1064)、SABC-CY3-小鼠 IgG 免疫组化染色试剂盒(批号 SA1072) 购自武汉博士德生物工程有限公司; RIPA 裂解液(强)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(碧云天生物公司); TLR8 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司]; P65 抗体(赛默飞世尔科技有限公司); p-P65 抗体(Cell Signaling Technology); GAPDH 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

### 1.4 实验仪器

qTOWER3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪(德国耶拿分析仪器股份公司); 自动酶标分析仪(美国伯腾仪器有限公司); 荧光倒置显微镜(德国蔡司公司); 凝胶成像分析系统(ChampChemiTM Top610plus)(北京赛智创业科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 AA 大鼠模型构建及分组给药

SPF 级雄性 SD 大鼠, 7 周龄、体质量约 200 g 时进行实验。大鼠随机分为 5 组, 每组 6 只, 分别为对照组、模型组、青藤碱(50 mg·kg<sup>-1</sup>) 组和 IREE 低、高剂量(50、100 mg·kg<sup>-1</sup>) 组。除对照组外, 均制备 AA 大鼠模型: 先将热灭活结核杆菌研磨至灰白色、再加入矿物油用三通管乳化制成 5 mg·mL<sup>-1</sup> 乳剂, 每只大鼠以 0.3 mL 的量在尾根部 sc<sup>[13]</sup>。给药

始于造模 2 周后, 共 30 d, 每天 ig 给药 1 次, 对照组与模型组给予 0.9% 氯化钠溶液。给药期间每 6 天根据大鼠踝关节肿胀程度和足趾炎症情况进行打分(表 1)<sup>[14]</sup>, 累计得分即为每只大鼠的关节炎指数(AI)。

表 1 AI 评分

Table 1 AI scoring

得分	症状
0	无红斑和肿胀
1	红斑和轻度肿胀局限于足中段或踝关节
2	红斑和轻度肿胀从踝关节蔓延至足中段
3	红斑和轻度肿胀从踝关节蔓延至关节
4	红斑和重度肿胀包括了踝、足和趾

### 2.2 标本采集

于末次给药后禁水禁食 12 h, 无痛处死大鼠, 分离大鼠踝关节: 右侧踝关节置于 4% 多聚甲醛中浸泡、用于 HE 染色; 左侧踝关节冻存于 -80 ℃、用于 RNA 检测; 取一只关节肿胀明显的模型组大鼠, 分离其滑膜组织原代 FLS。

### 2.3 苏木精-伊红(HE)染色检测大鼠踝关节 FLS 的病理特征

大鼠踝关节在 4% 多聚甲醛中浸泡 3 d 后, 用 EDTA 室温脱钙 4 周, 常规制备组织切片, HE 染色分析滑膜组织学变化。

### 2.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 IREE 对大鼠踝关节滑膜组织细胞因子表达水平的影响

用 Trizol 试剂提取大鼠踝关节滑膜组织总 RNA, 将总 RNA (1 μg) 逆转录成 cDNA 后, 以 cDNA 为模板进行定量分析。以 GAPDH 为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算相对表达量, 引物序列见表 2。

### 2.5 Western blotting 检测 AA 大鼠踝关节滑膜组织 TLR8、MyD88、P65、p-P65 蛋白表达水平

将各组踝关节滑膜组织剪切成细小的碎片, 加

表 2 引物序列

Table 2 Primer Sequences

基因名称		引物序列(5'→3')
<i>TNF-α</i>	正向	CGAGTCTGGGCAGGTCTA
	反向	GTGGTGGTCTTGTGCTTAA
<i>IL-1β</i>	正向	ACAGTGGCAATAGGATG
	反向	TGTAGTGGTGGTCGGAGA
<i>IL-6</i>	正向	ATCTGAGGTGCCCATGCTAC
	反向	CCTGACCCAACCACAAATGC
<i>GAPDH</i>	正向	TGATTCTACCCACGGCAAGT
	反向	AGCACTACCCCATTTGATGT

入 RIPA 裂解液 (强), 离心混匀 (20 mg 组织加入 150~250  $\mu\text{L}$  裂解液), 加入蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂混合物。使用研磨仪研磨, 70 Hz 研磨 90 s, 暂停 20 s, 重复 3 次后冰上裂解 30 min。充分裂解后, BCA 定量计算样品的蛋白浓度, 设置蛋白的质量浓度为 3  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 轻柔混匀离心后置 100  $^{\circ}\text{C}$  金属浴中变性 5 min。80 V、30 min 电泳至浓缩胶后继续以 120 V、90 min 完成电泳。80 mA 恒温冰水浴条件下转膜 120 min 后于摇床使用封闭液封闭 10 min。加入一抗后于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜, 隔日于常温摇床振摇, 二抗孵育 1 h, 清洗后于凝胶成像系统进行显色, 成像结果使用 Image J 进行灰度积分并分析。

## 2.6 FLS 的分离及鉴定

将分离的滑膜组织在含双抗的 PBS 中清洗后剪成 1  $\text{mm}^2$  大小<sup>[15]</sup>, 放入 60 mm 培养皿中, 贴壁后加入 DMEM 完全培养基培养, 每 2~3 天换液, 待细胞汇合率达 80% 以上进行传代。取第 3 代 FLS 细胞, 以每孔  $2.5\times 10^4$  个接种至带细胞玻片的 12 孔板中, 细胞长至 80% 融合后加入 4% 多聚甲醛固定; 0.2% Triton 破膜后加入 PBS 清洗, 加入山羊血清封闭; 加入兔抗人 Vimentin 抗体及小鼠抗人 CD68 抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 滴加生物素标记山羊抗兔及山羊抗鼠工作液, 滴加 SAC-Dylight488、SAC-CY3 工作液; DAPI 染色后滴加抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

## 2.7 CCK-8 检测 IREE 对 FLS 相对存活率的影响

接种 5 000 个细胞于 96 孔板, 分为对照组、IREE (1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组, 每组 6 个复孔, 待细胞贴壁后加不同质量浓度 IREE 干预, 分别于干预 24、48 h 后, CCK-8 检测 FLS 细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

## 2.8 FLS 分组及给药

将 FLS 接种贴壁后分为对照组 (不做任何处理)、青藤碱 (200  $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组和 IREET 低、中、高质量浓度 (1、2、3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组, 共 6 组, 用于以下实验。

## 2.9 细胞克隆实验检测 IREE 对 FLS 增殖的影响

分别接种每孔 100、200 个细胞于 6 孔板, 每组 3 个复孔。按照“2.8”项分组及给药, 药物干预 14 d 后甲醇固定, 结晶紫染色后显微镜拍照。将  $\geq 50$  个细胞的集落统计为 1 个克隆, 计数克隆形成数。

## 2.10 划痕实验检测 IREE 对 FLS 迁移的影响

接种每孔  $2\times 10^4$  个细胞于 12 孔板, 每组 3 个复孔, 细胞融合度达到 70% 后, 用 10  $\mu\text{L}$  的无菌移液管尖在细胞层上制造划痕, 按照“2.8”项分组及给药, 拍照并统计 0、24、48 h 划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (\text{0 h 划痕面积} - \text{24 h 划痕面积}) / \text{0 h 划痕面积}$$

## 2.11 Transwell 小室检测 IREE 对 FLS 迁移的影响

接种每孔  $1\times 10^4$  个细胞于 24 孔板的上室, 每组 3 个复孔, 下室加入完全培养基, 按照“2.8”项分组及给药, 药物干预 24 h 后甲醇固定, 擦去小室内细胞, 结晶紫染色后显微镜对小室底部的细胞进行拍照。每个小室随机取 5 个视野, 计算平均穿膜细胞数。

## 2.12 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有统计分析均使用 GraphPad Prism9.5 进行, 多组间差异比较用单因素方差分析及 SNK-*q* 检验, 检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 3 结果

### 3.1 IREE 降低 AA 大鼠 AI

如表 3 所示, 与对照组比较, 给药 6 d, 各组大鼠 AI 评分无明显变化; 给药 12 d, 模型组大鼠

表 3 AA 大鼠关节 AI 评分 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 3 AA rat joint AI score ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	剂量/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	AI 评分				
		给药 6 d	给药 12 d	给药 18 d	给药 24 d	给药 30 d
对照	—	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型	—	0.00 $\pm$ 0.00	2.83 $\pm$ 0.41*	3.50 $\pm$ 0.55*	4.00 $\pm$ 0.00*	4.00 $\pm$ 0.00*
IREE	50	0.00 $\pm$ 0.00	2.83 $\pm$ 0.41*	3.67 $\pm$ 0.52*	3.33 $\pm$ 0.52*#	3.17 $\pm$ 0.75*#
	100	0.00 $\pm$ 0.00	3.00 $\pm$ 0.00*	3.50 $\pm$ 0.55*	3.50 $\pm$ 0.55*#	3.33 $\pm$ 0.52*#
青藤碱	50	0.00 $\pm$ 0.00	2.83 $\pm$ 0.41*	3.50 $\pm$ 0.55*	3.67 $\pm$ 0.52*	3.33 $\pm$ 0.52*#

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

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group.

AI 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 随着病程延长, AI 逐渐升高, 第 24 天时达高峰。与模型组相比, 给药 24 d, IREE 低、高剂量组 AI 评分显著降低 ( $P < 0.05$ ); 给药 30 d, IREE 低、高剂量组及青藤碱组 AI 评分显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2 IREE 改善 AA 大鼠踝关节滑膜炎

HE 染色结果显示, 对照组大鼠踝关节腔面呈现完整、规则、光滑的状态, 滑膜细胞排列规则, 未见明显增生。与对照组比较, 模型组大鼠踝关节滑膜层增厚, 可见多层滑膜细胞堆积, 提示 FLS 过

度增殖; 同时有大量炎症细胞浸润, 关节间隙狭窄, 血管翳生成增多; 与模型组比较, IREE 低、高剂量组及青藤碱组病理症状均有明显改善 (图 1)。

### 3.3 IREE 降低踝关节滑膜组织 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 炎症因子 mRNA 表达水平

与对照组比较, 模型组大鼠踝关节  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$  mRNA 相对表达量增高, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, IREE 低、高剂量组和青藤碱组踝关节组织中  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$  mRNA 相对表达量明显降低 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。

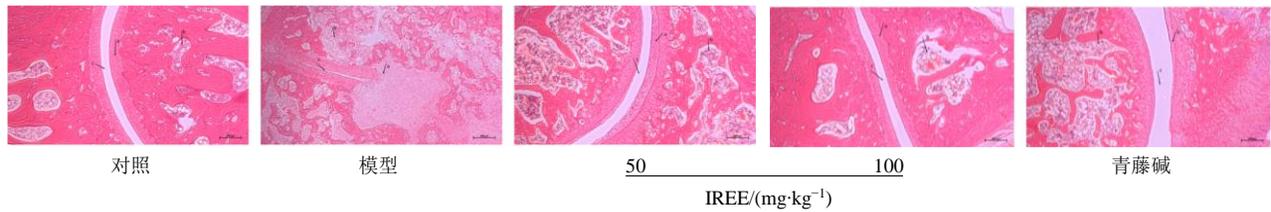


图 1 踝关节滑膜组织 HE 染色 ( $\times 200$ )

Fig. 1 Synovial tissue of ankle joint stained with HE ( $\times 200$ )

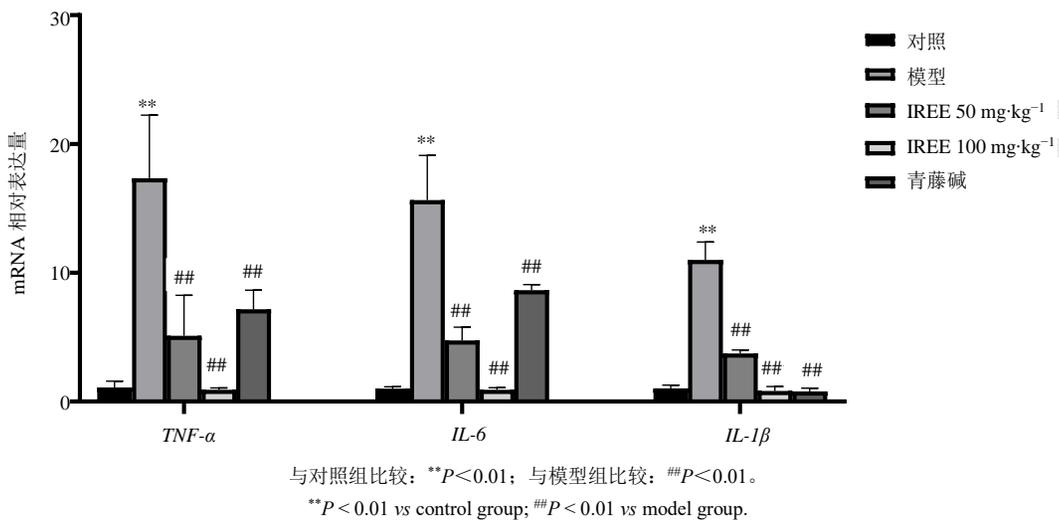


图 2 踝关节滑膜组织中细胞因子 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 2 Relative expression levels of cytokine mRNA in ankle joint synovial tissue ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.4 IREE 抑制 AA 大鼠踝关节 TLR8 及其信号通路蛋白表达

Western blotting 结果表明 (图 3), 与对照组相比, 模型组 TLR8、Myd88、P65、p-P65 蛋白表达量明显增多, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, IREE 低、高剂量组 TLR8、Myd88、P65、p-P65 蛋白表达量明显降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。AA 大鼠造模后 TLR8/NF- $\kappa$ B 通路活化, TLR8、Myd88、P65、p-P65 蛋白表达量显

著增多, 在 IREE 干预下, TLR8、Myd88、P65、p-P65 蛋白表达量显著降低, 提示 IREE 可能通过抑制 TLR8 通路的活化从而抑制 RA 的炎症发展。

### 3.5 FLS 分离及鉴定

组织块培养法分离 AA 大鼠的 FLS, 倒置显微镜下观察发现组织块贴壁第 3 天起有细胞从组织块周围游出, 网状分布, 细胞多呈长梭形, 也有星形和圆形, 边界清楚, 细胞周围清晰, 待细胞传代至第 3 代后, 圆形细胞减少, 多为梭形、大小一致的

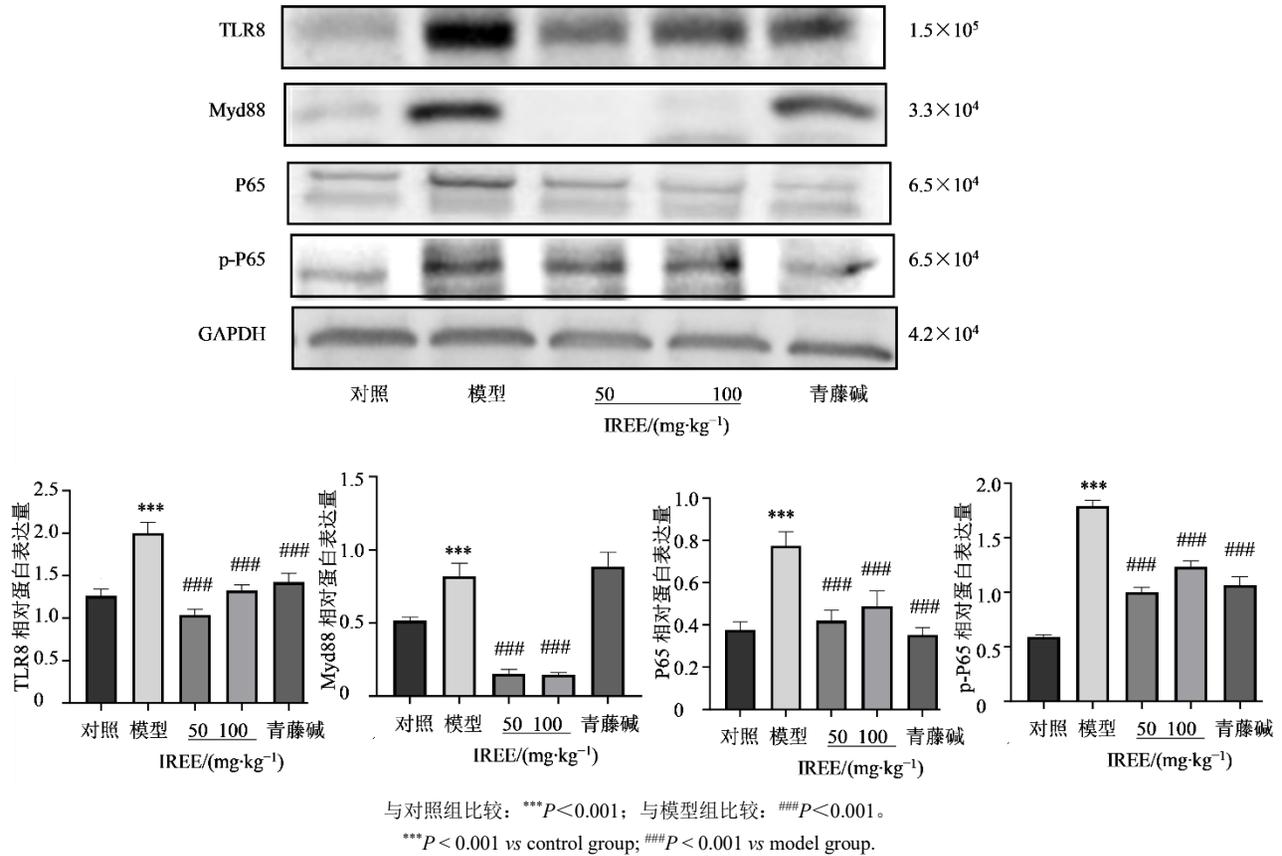


图 3 AA 大鼠踝关节滑膜 TLR8 相关通路蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 3 Expression of TLR8-related pathway proteins in synovial tissue of AA rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

细胞, 推测其为 FLS (图 4); 免疫荧光结果显示, 分离并培养至第 3 代的细胞 Vimentin 表达为阳性, 细胞质内出现绿色荧光, 巨噬样滑膜细胞标志蛋白 CD68 表达为阴性, 细胞质内未出现红色荧光, 证明该细胞为 FLS (图 5)。

### 3.6 IREE 对 FLS 活力的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 药物干预 24、48 h 时, 不同质量浓度的 IREE 均显著抑制 FLS 细胞的活性 ( $P < 0.05$ ), 其中, 1、2、3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药物质量浓度干预 48 h 后细胞活性抑制率分别为 28.4%、34.9%、65.6%, 抑制效果具有浓度相关性 ( $P < 0.001$ ); 与同一浓度 IREE 作用于 FLS 细胞相比较,

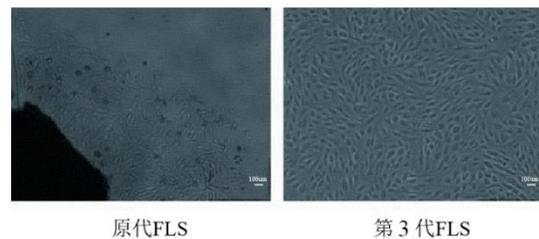


图 4 原代滑膜细胞贴壁生长情况 ( $\times 100$ )

Fig. 4 Primary synovial cells adherent growth condition ( $\times 100$ )

IREE 对 FLS 细胞活力的影响呈时间相关性。故选择 1、2、3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  IREE 梯度药物浓度作为后续 FLS 细胞克隆、划痕、Transwell 实验的干预条件。

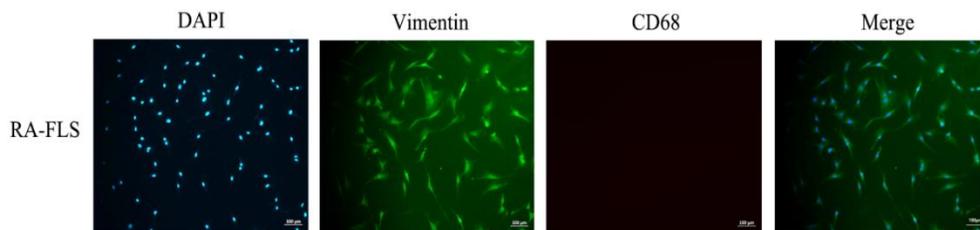
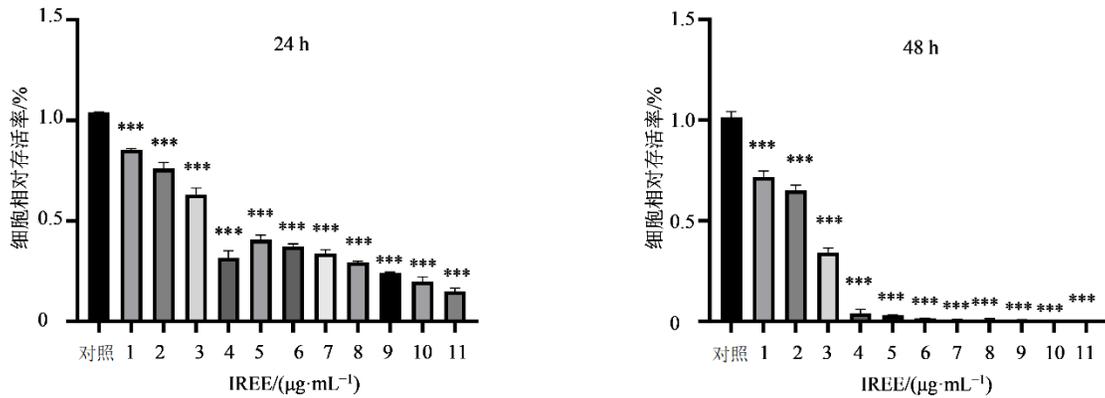


图 5 原代 FLS 免疫荧光鉴定结果 ( $\times 100$ )

Fig. 5 Primary FLS Immunofluorescence Identification Results ( $\times 100$ )



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ 。

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 6 IREE 不同时间点对 FLS 活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 6 Effect of IREE at different time points on vitality of FLS ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3.7 IREE 抑制 FLS 增殖

与对照组比较, IREE 低、中、高质量浓度组细胞克隆数显著减少 ( $P < 0.01$ ), 且作用呈质量浓度相关性 (图 7)。

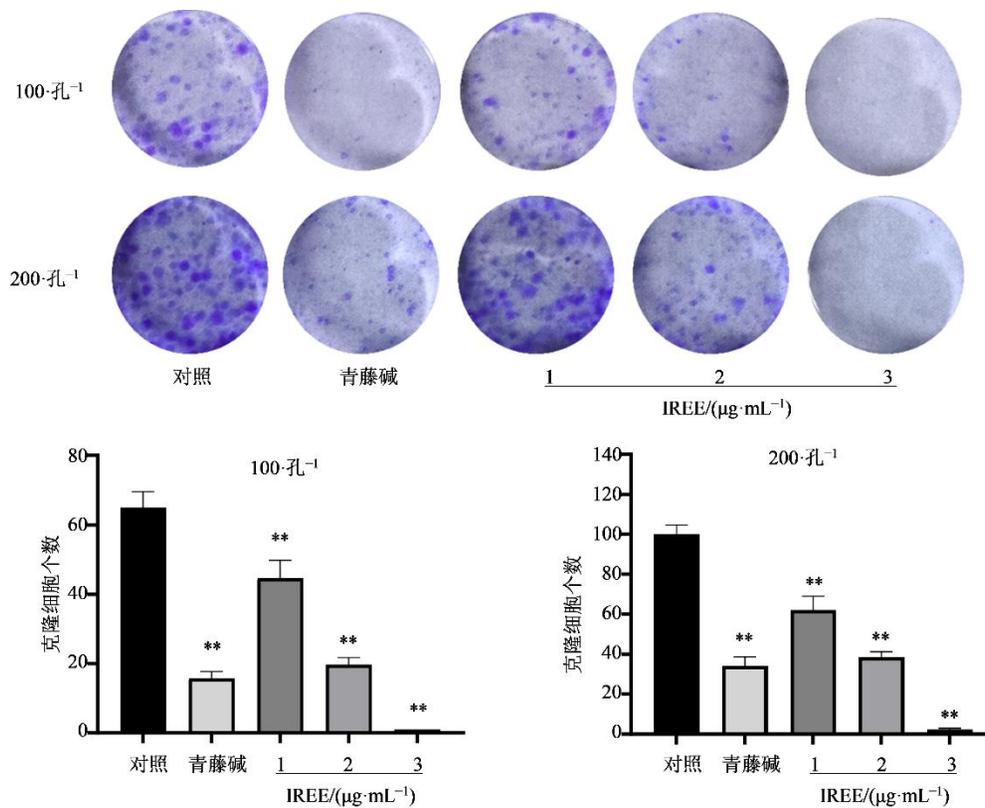
### 3.8 IREE 抑制 FLS 划痕愈合能力

与对照组比较, 青藤碱组划痕愈合能力显著下降 ( $P < 0.01$ ), IREE 不同质量浓度组划痕愈合能力

均显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与 24 h 相比, 48 h 时 IREE 抑制细胞划痕愈合效果更强 (图 8)。

### 3.9 IREE 抑制 FLS 迁移能力

在 Transwell 迁移实验中, 与对照组相比, 青藤碱组细胞的迁移能力减弱 ( $P < 0.01$ ); IREE 不同质量浓度组 FLS 迁移能力均显著减弱 ( $P < 0.05, 0.01$ ) (图 9)。



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group.

图 7 IREE 对 FLS 集落形成的作用 ( $\times 50, \bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 7 Effect of IREE on FLS colony formation ( $\times 50, \bar{x} \pm s, n=3$ )

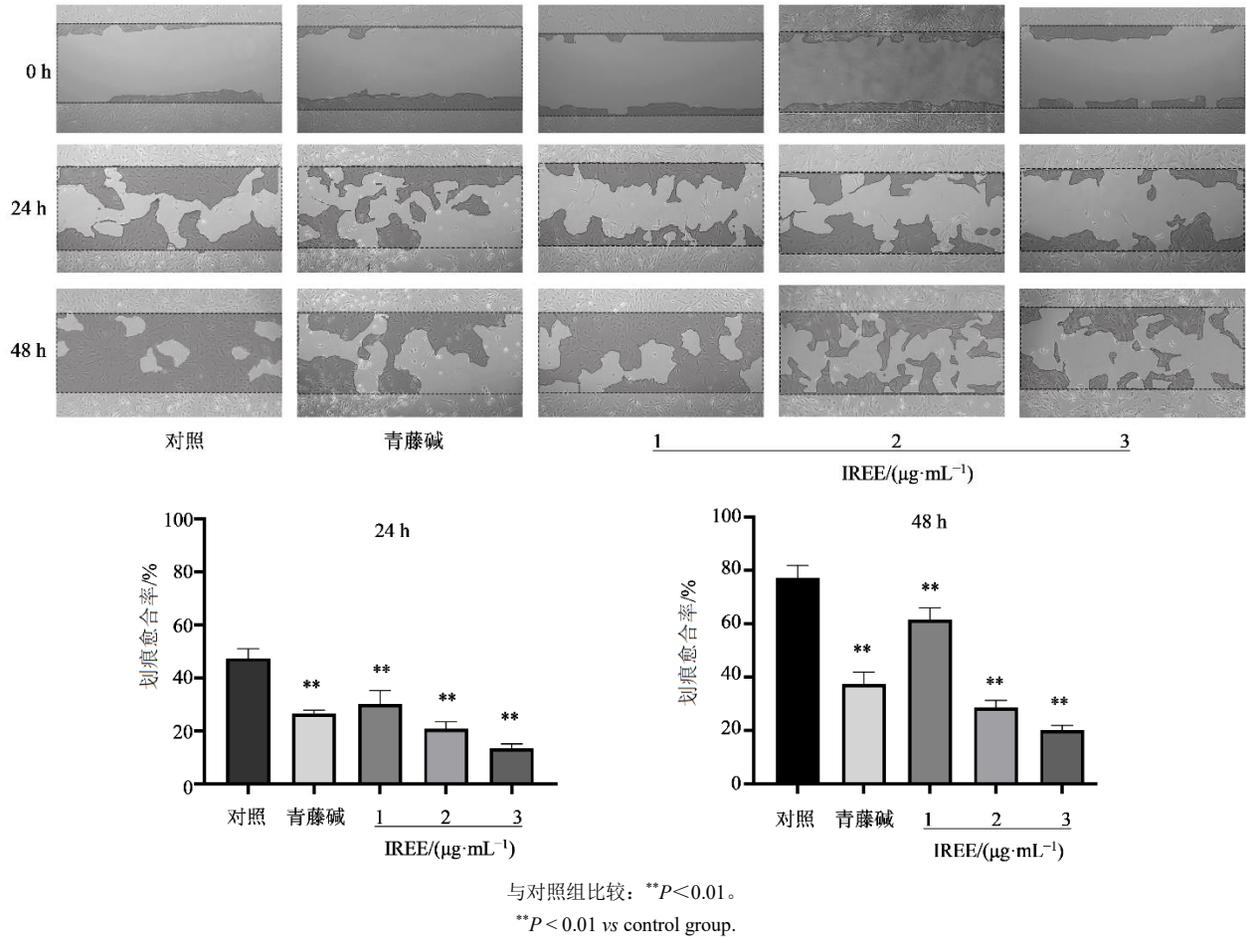


图 8 IREE 对 FLS 划痕愈合率的作用 ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 8 Effect of IREE on scratch healing rate of FLS ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

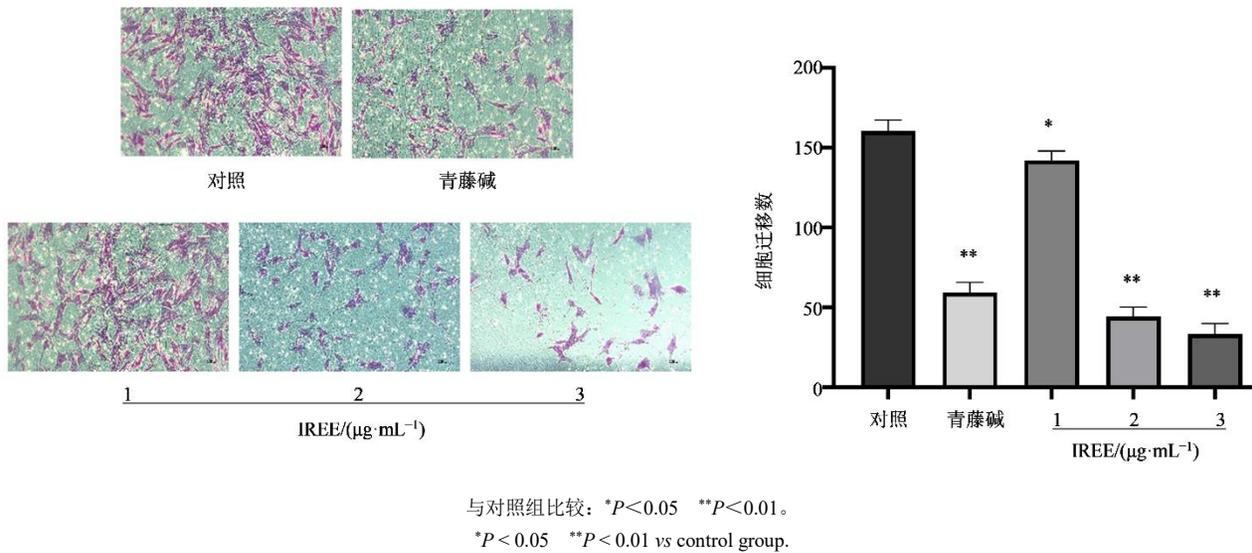


图 9 IREE 对 FLS 迁移能力的作用 ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 9 Effect of IREE on migration ability of FLS ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

#### 4 讨论

RA 是一种以全身关节慢性炎症为特征的自身

免疫性疾病<sup>[6]</sup>, 其病理过程中 FLS 的异常活化发挥着核心作用, 已成为 RA 治疗的重要靶点<sup>[7]</sup>。在疾

病状态下, FLS 在 TLR8/NF- $\kappa$ B 等信号通路活化, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等促炎细胞因子的刺激下, 通过复杂的信号转导网络和代谢重编程发生异常活化<sup>[18]</sup>, 表现为增殖能力增强、迁移活性提高及促炎因子分泌增加, 进而促进血管翳形成和关节破坏, 形成持续的炎症-损伤恶性循环<sup>[19]</sup>。尽管目前针对 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等细胞因子的生物制剂在 RA 治疗中取得了显著进展<sup>[20-22]</sup>, 但其潜在的不良反应限制了长期应用<sup>[23]</sup>。因此, 探索能够安全有效调控 FLS 功能的中药治疗方案具有重要的临床意义。

近年来, 关于中药通过 FLS 抑制 RA 的作用研究日益增多, 如益母草碱能显著抑制 RA-FLS 细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达及分泌, 同时对 RA FLS 的迁移和侵袭亦有抑制作用<sup>[24]</sup>; 黄芩清热除痹胶囊通过 FZD8-Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信号通路改善 RA, 显著抑制了 RA 患者 FLS 的增殖, 也降低了 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的水平<sup>[25]</sup>; 四妙散从很大程度上恢复了完全弗氏佐剂所致的小鼠关节炎反应, 降低了 Janus 激酶 2 (JAK2) 及信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 的磷酸化水平, 并能在细胞实验中显示降低 FLS 细胞的增殖及侵袭能力<sup>[26]</sup>。本课题组前期研究了中药单体芒果苷可通过 Toll 样受体 (TLR) 7/8 通路抑制 RA-FLS 增殖、迁移以及抗炎的重要作用, 为本实验提供了技术基础<sup>[27]</sup>。

本研究采用 AA 大鼠模型, 该模型通过弗氏完全佐剂注射可在 8~10 d 内诱导出与人类 RA 相似的病理特征, 包括滑膜增生、血管生成和软骨破坏等不可逆性改变<sup>[28]</sup>。实验结果显示, IREE 干预 30 d 可显著改善 AA 大鼠 AI, 抑制滑膜组织异常增生和炎性细胞浸润, 抑制 TLR8/NF- $\kappa$ B 等信号通路活化, 并降低滑膜组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等关键炎症因子的表达水平, 这些结果提示 IREE 体内能够有效抑制 AA 大鼠关节滑膜细胞的增生, 抑制炎症通路活化从而下调炎症因子表达, 缓解关节炎等症状。为进一步阐明 IREE 的作用机制, 本研究分离培养原代 FLS, 发现 IREE 可显著抑制 FLS 的克隆形成和迁移能力。其中, 克隆形成能力的抑制提示 IREE 可能通过调控细胞周期相关通路抑制 FLS 增殖, 这对缓解滑膜组织增生具有重要意义; 而迁移能力的抑制则可能减少 FLS 在关节腔内的浸润, 从而减轻炎症反应和组织损伤。这些发现为 IREE 通过调控 FLS 生物学特性发挥抗 RA 作用提

供了实验依据。

本实验从动物体内和细胞层面展现出 IREE 显著的抗 RA 潜力: 一方面, 其通过抑制滑膜组织中 TLR8/NF- $\kappa$ B 等信号通路的活化, 抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等关键炎症因子的表达, 有效缓解关节炎及病理损伤; 另一方面, IREE 可直接靶向 FLS 的生物学行为, 通过抑制其增殖与迁移活性, 阻断滑膜增生及炎症恶性循环的病理进程, 为临床应用提供了实验参考。然而, 基于中药复方多成分、多靶点的特性, IREE 的具体活性成分、分子作用机制及其与现有生物制剂的协同效应仍需深入探索。未来研究需结合代谢组学、网络药理学等技术明确其核心成分与靶点通路, 并通过大规模临床试验验证其长期疗效与安全性, 以推动 IREE 从基础研究向临床精准治疗的转化。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Di Matteo A, Bathon J M, Emery P. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10416): 2019-2033.
- [2] 江梦园, 闫敏, 李晓芳, 等. 类风湿性关节炎动物模型的研究进展 [J]. *世界中医药*, 2023, 18(24): 3597-3602. Jiang M Y, Yan M, Li X F, et al. Research progress in animal models of rheumatoid arthritis [J]. *World Chin Med*, 2023, 18(24): 3597-3602.
- [3] Tong Y T, Li X Y, Deng Q C, et al. Advances of the small molecule drugs regulating fibroblast-like synovial proliferation for rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1230293.
- [4] Chen J B, Wang K J, Xu X C, et al. Advances in signaling pathways and targets of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Medsci*, 2024, 5(1): 44-48.
- [5] Han P, Liu X, He J, et al. Overview of mechanisms and novel therapies on rheumatoid arthritis from a cellular perspective [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1461756.
- [6] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准. 第二册 [M]. 广西: 广西壮族自治区卫生厅, 1996. Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region. *Standards for Chinese Medicinal Materials in Guangxi. Volume 2* [M]. Guangxi: Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, 1996.
- [7] 黄若干, 宾祖焕, 黄建强, 等. 祛风湿药酒的薄层色谱鉴别研究 [J]. *中成药*, 2008, 30(6): 957-959. Huang R G, Bin Z H, Huang J Q, et al. Identification of qufengshi medicinal liquor by TLC [J]. *Chin Tradit Pat*

- Med, 2008, 30(6): 957-959.
- [8] 李江, 蔡小玲. 民族药三叶青藤的研究现状 [J]. 华夏医学, 2009, 22(5): 992-994.
- Li J, Cai X L. Research status of *Sinomenium trifolium*, a national medicine [J]. Acta Med Sin, 2009, 22(5): 992-994.
- [9] 李江, 蔡小玲, 罗昱澜, 等. 三叶青藤抗炎活性部位研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(11): 2623-2624.
- Li J, Cai X L, Luo Y L, et al. Study on the Anti-inflammatory active fraction of *Illigera rhodantha* Hance. [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2013, 24(11): 2623-2624.
- [10] 李江, 邓航, 付翔, 等. 三叶青藤醇提物的急性毒性及抗炎作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 312-313.
- Li J, Deng H, Fu X, et al. Study on the acute toxicity and anti-inflammatory effect of the ethanol extract of *Illigera rhodantha* hance. [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 22(2): 312-313.
- [11] 李江, 罗昱澜, 蔡小玲, 等. 三叶青藤醇提物对胶原性关节炎大鼠关节肿胀率和组织病理学作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2707-2708.
- Li J, Luo Y L, Cai X L, et al. The arthroncus rates and histopathology effects of the ethanol extracts of *Illigera rhodantha* hance. in collagen-induced rat arthritis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2012, 23(11): 2707-2708.
- [12] 周凡琦. 三叶青藤醇提物对人滑膜肉瘤细胞 (SW982) TLR8 及其信号通路调节作用研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.
- Zhou F Q. Study on the Regulatory Effect of Alcohol Extract of *Pueraria lobata* on TLR8 and Its Signaling Pathway in Human Synovial Sarcoma Cells (SW982) [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2020.
- [13] 高皖皎, 邓秋狄, 白殊同, 等. 佐剂型关节炎大鼠滑膜成纤维细胞模型建立及特征分析 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(12): 1693-1698.
- Gao W J, Deng Q D, Bai S T, et al. Establishment and characteristic analysis of fibroblast-like synoviocytes in rats with adjuvant arthritis [J]. Chin Pharmacol Bull, 2015, 31(12): 1693-1698.
- [14] Liu M Y, Zhao X F. Research Progress of tripterine in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Rheum Arthritis, 2020, 9(1): 72-75
- [15] 周凡琦, 李宝莹, 王凯涛, 等. 树鼩成纤维样滑膜细胞分离鉴定及 TLR8 通路相关分子检测方法的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(23): 3721-3727.
- Zhou F Q, Li B Y, Wang K T, et al. Isolation and identification of fibroblast-like synoviocytes from tree shrews and establishment of TLR8 pathway related molecular detection methods [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(23): 3721-3727.
- [16] 叶敏, 万军, 王李俊, 等. 中药通过调节肠道菌群治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7279-7284.
- Ye M, Wan J, Wang L J, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in treating rheumatoid arthritis by regulating intestinal flora [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(22): 7279-7284.
- [17] Qian H Y, Deng C Q, Chen S J, et al. Targeting pathogenic fibroblast-like synoviocyte subsets in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2024, 26(1): 103.
- [18] Masoumi M, Bashiri H, Khorramdelazad H, et al. Destructive roles of fibroblast-like synoviocytes in chronic inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis [J]. Inflammation, 2021, 44(2): 466-479.
- [19] 王言, 吴虹, 邓然, 等. 关节滑膜炎性微环境对类风湿关节炎发生发展作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(6): 754-759.
- Wang Y, Wu H, Deng R, et al. Research progress of synovial microenvironment in rheumatoid arthritis [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(6): 754-759.
- [20] Nadine B, Daniel M, Christian A, et al. Additive efficacy of a bispecific anti-TNF/IL-6 nanobody compound in translational models of rheumatoid arthritis [J]. Sci Translat Med, 2023, 15(681). Doi: 10.1126/Scitranslmed. Abq4419.
- [21] McInnes I B, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [22] Dinarello C A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases [J]. Blood, 2011, 117(14): 3720-3732.
- [23] Singh J A, Saag K G, Louis Bridges S Jr, et al. 2015 American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(1): 1-26.
- [24] 李楠. 益母草碱对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞活化、迁移和侵袭的调控及其机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- Li N. Study on the regulation and mechanism of leonurine on the activation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017.
- [25] 周婉婉. 黄芩清热除痹胶囊通过 FZD8-Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路改善类风湿性关节炎的机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- Zhou W W. Research on the mechanism of Huangqin

- Qingre Chubi Capsules in improving rheumatoid arthritis through the FZD8-Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2023.
- [26] 欧俊永, 刘梓龙, 刘彬, 等. 四妙散对类风湿关节炎及 FLS 细胞的实验研究 [J]. 中医药临床杂志, 2020, 32(12): 2290-2294.
- Ou J Y, Liu Z L, Liu B, et al. The experimental study of SiMiaoSan on rheumatoid arthritis and FLS cell [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2020, 32(12): 2290-2294.
- [27] 胡梦凡, 颜秋慧, 邓梦然, 等. 芒果苷抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、迁移及炎性因子的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(11): 1690-1695.
- Hu M F, Yan Q H, Deng M R, et al. Mangiferin inhibits proliferation, migration and inflammatory factor expression of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(11): 1690-1695.
- [28] 于坤, 徐枝芳, 余楠楠, 等. 佐剂性和胶原诱导性关节炎模型比较分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(1): 106-109.
- Yu K, Xu Z F, Yu N N, et al. Comparison of adjuvant-induced and collagen-induced arthritis animal models [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2018, 20(1): 106-109.

[责任编辑 兰新新]