

• 药理与临床 •

基于代谢组学与琥珀酸/血管内皮生长因子信号通路的雷公藤煨制增效机制研究

陈 殊, 石宣宜, 顾子娴, 陈家毅, 蒋红霞, 张 亮, 孙 群, 刘建群*

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要:目的 观察雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 煨制前后对胶原诱导型关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型大鼠的影响, 并基于代谢组学与琥珀酸/血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 炎症信号通路共同探索雷公藤煨制的增效机制。方法 采用大鼠尾根部皮内注射牛 II 型胶原乳剂复制 CIA 大鼠模型, 分别给予醋酸地塞米松、雷公藤生品总提取物、雷公藤煨制品总提取物治疗 20 d。通过大鼠足肿胀度、关节炎评分、血清中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 水平、滑膜病理组织切片评估药效; 采用代谢组学技术对各组间的代谢差异进行表征; 检测滑膜中琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 活力以及琥珀酸和富马酸的含量; 采用免疫组化法检测滑膜组织 VEGFA、血小板-内皮细胞黏附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) 表达。结果 与模型组比较, 雷公藤生品总提取物组和煨制品总提取物组大鼠足肿胀度和关节炎评分显著降低 ($P < 0.05$), 血清中 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$), 滑膜组织病理改变明显减轻, 滑膜中琥珀酸含量显著降低 ($P < 0.05$), SDH 活力无明显改变, 滑膜组织 VEGFA 和 CD31 表达均显著下调 ($P < 0.05$)。与生品总提取物组比较, 煨制品总提取物组 SDH 活力无明显改变, 其余各项指标明显更向对照组接近 ($P < 0.05$)。代谢组学结果表明, 从模型组中共筛选出 15 个差异代谢物, 经煨制总提取物治疗后, 6 个差异代谢物较模型组明显回调 ($P < 0.05$), 且与生品总提取物组相比明显更接近对照组 ($P < 0.05$)。这些代谢物的变化涉及了缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、色氨酸代谢、能量代谢、花生四烯酸代谢。结论 煨制可显著提高雷公藤对 CIA 模型大鼠的治疗效果, 其增效作用机制可能与调控缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 色氨酸代谢, 能量代谢, 花生四烯酸代谢途径有关。雷公藤可通过调节琥珀酸/VEGF 信号通路改善类风湿关节炎, 煨制可增强雷公藤对该信号通路的调控从而发挥增效作用。

关键词: 雷公藤; 煨制; 类风湿关节炎; 代谢组学; 琥珀酸/血管内皮生长因子炎症信号通路; 1-羟基-2,5,8-三甲基-9-芴酮 1-1-羟基-2,5,8-三甲基-9-芴酮; 雷公藤甲素; triptofordine A; 雷公藤内酯酮; 雷公藤红素; 雷公藤晋碱; 雷公藤定碱; 雷公藤次碱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)12-3851-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.012

Enhancing efficacy mechanism of roasted *Tripterygium wilfordii* based on metabolomics and succinate/VEGF signal pathway

CHEN Shu, SHI Xuan-yi, GU zi-xian, CHEN Jia-yi, JIANG Hong-xia, ZHANG Liang, SUN Qun, LIU Jian-qun
Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To explore the enhancing efficacy mechanism of roasted *Tripterygium wilfordii* (TW) based on metabolomics and succinate/vascular endothelial growth factor (VEGF) signal pathway by observing the effect of TW before and after roasting on collagen-induced arthritis (CIA) model rats. **Methods** CIA model rats were induced by hypodermic injecting with bovine type II collagen emulsion into the tails of rats and then treated with dexamethasone acetate, total extract of TW and total extract of roasted TW

收稿日期: 2023-02-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860686); 江西省主要学科学术和技术带头人资助项目 (20182BCB22004); 江西中医药大学校级科技创新团队发展计划 (CXTD22007)

作者简介: 陈 殊, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础及质量评价研究。E-mail: 804118328@qq.com

***通信作者:** 刘建群, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及质量评价研究。Tel: (0791)87118786 E-mail: liu5308@sina.com

for 20 d. The curative effect was assessed by paw swelling, arthritis scores, serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and pathological sections of synovial tissue. The differences in metabolic expression profiles among groups were characterized based on metabolomics. Succinate dehydrogenase (SDH) viability as well as succinate and fumarate content in synovial tissue were detected. The expressions of VEGFA and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) in synovial tissue was measured by immunohistochemistry. **Results** Compared with model group, paw swelling and arthritis scores in total extract and roasted total extract groups were significantly decreased ($P < 0.05$), interleukin-1 β level in serum was significantly decreased ($P < 0.05$), synovial histopathological changes were ameliorated, content of succinate in synovium was significantly decreased ($P < 0.05$), SDH activity was not significantly changed, expressions of VEGFA and CD31 in synovium were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with total extract group, SDH activity in roasted total extract group had no obvious change, and the other indexes were obviously closer to the control group ($P < 0.05$). The metabolomics results showed that a total of 15 differential metabolites were screened from the model group. Among them, six differential metabolites were significantly callback compared to the model group after treatment with roasted total extract. Moreover, the levels of these six metabolites in roasted total extract group were significantly closer to the levels in control group than in total extract group ($P < 0.05$). The results indicated that these metabolite changes involved valine, leucine and isoleucine biosynthesis, tryptophan metabolism, energy metabolism and arachidonic acid metabolism. **Conclusion** Roasting is able to improve the therapeutic effect of TW on CIA model rats. The enhancing efficacy mechanism may be related to the regulation of valine, leucine and isoleucine biosynthesis, tryptophan metabolism, energy metabolism and arachidonic acid metabolic pathways. TW modulates the succinate/VEGF inflammatory signal pathway to improve rheumatoid arthritis. Roasting enhances the anti-rheumatoid arthritis effect of TW by regulating succinate/VEGF signal pathway.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; roasting; rheumatoid arthritis; metabolomics; succinate/vascular endothelial growth factor inflammatory signal pathway; 1-hydroxy-2,5,8-trimethyl-9-fluorenone; triptolide; triptofordine A; triptonide; tripterine; wilforgine; wilfordine; wilforine

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫性疾病, 以关节滑膜炎和血管新生为主要病理特征, 具有较高发病率与致残率^[1]。据估计, 高达 80% 的 RA 患者有一种或多种并发症, 从而导致寿命缩短^[2]。严重影响患者的健康和生活质量, 造成了沉重的社会负担。目前, 最常用于治疗 RA 的药物主要是改善病情类抗风湿药、新型生物制剂、非甾体抗炎药、糖皮质激素等, 长期使用这些药物不良反应较多, 且治疗周期较长, 患者难以坚持, 导致治疗效果不佳^[3]。因此, 开发高效低毒的药物来治疗 RA 具有重要意义。

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 为卫矛科雷公藤属植物, 具有祛风除湿、消除止痛、活血化瘀、解毒杀虫等功效^[4]。雷公藤自 1969 年来被广泛应用于 RA 的治疗, 疗效显著, 是国内治疗 RA 的首选单味中药^[5]。然而, 雷公藤对肝、肾、心血管系统、泌尿系统、血液系统、生殖系统等有明确的损害, 限制了其临床应用^[6-7]。本课题组前期研究发现煨制雷公藤不良反应较小, 治疗佐剂性关节炎的效果显著优于生药^[8], 然而煨制对雷公藤的增效作用机制尚不清楚。代谢组紊乱是 RA 发生发展过程中的重要事件, RA 发病过程中会影响到代谢的多个途径, 从而对机体代谢物产生影响, 代谢组学可从系统生物学角度

为 RA 的治疗提供新的思路^[9-10]。琥珀酸是能量代谢中三羧酸循环的中间代谢产物, 其在滑膜组织中的堆积是 RA 有别于其他关节炎的标志, 也被认为是导致滑膜病理变化的关键因素之一^[11]。研究表明, 抑制琥珀酸的堆积可降低血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的产生和滑膜组织中内皮细胞的活化, 抑制血管新生, 从而改善 RA^[12]。琥珀酸可作为一个潜在的信号分子将代谢与血管新生联系起来。基于此, 本实验建立胶原诱导型关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠模型以评价煨制前后雷公藤治疗 RA 的疗效差异, 同时基于代谢组学与琥珀酸/VEGF 炎症信号通路共同探讨雷公藤煨制抗 RA 的增效作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只, 体质量 170~190 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (赣) 2019-0004。动物适应性饲养 7 d 后用于实验, 温度 23~26 °C, 相对湿度 50%~70%。动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 JZLLSC20220515)。

1.2 药材

雷公藤根采自江西省萍乡市, 经江西中医药大

学刘建群教授鉴定为卫矛科植物雷公藤 *T. wilfordii* Hook. f. 的根。

1.3 药品与试剂

醋酸地塞米松(批号 20210601)购自新乡市常乐制药有限责任公司;对照品 1-羟基-2,5,8-三甲基-9-芴酮、tripfordine A、雷公藤定碱、雷公藤晋碱均为本实验室自制,质量分数均>98%;对照品雷公藤红素(批号 FY210927)、雷公藤甲素(批号 FY140320)、雷公藤内酯酮(批号 FY140325)及雷公藤次碱(批号 FY140323)均购自郑州丰耀农业科技有限公司,质量分数均>98%;琥珀酸(批号 MUST-11052307)购自成都曼斯特生物科技有限公司;富马酸(批号 F-016-170426)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;牛 II 型胶原(批号 20022)、不完全弗氏佐剂(批号 7002)均购自美国 Chondrex 公司;白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)检测试剂盒(批号 20221025)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)检测试剂盒(批号 20221017)均购自南京建成生物工程研究所;乙腈(质谱级,批号 C11976742)购自德国 Merck 公司;甲醇(质谱级,批号 L2017082)、甲酸(质谱级,批号 J2022123)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;VEGFA 抗体(批号 19003-1-AP)购自美国 Proteintech 公司;血小板-内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)抗体(批号 Bs-0468R)、生物素标记山羊抗兔抗体(批号 bs-0295G-Bio)、HRP 标记链霉亲和素(批号 bs-0437P-HRP)均购自北京博奥森生物技术有限公司;二氨基联苯胺显色试剂盒(批号 ZLI-9017)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 仪器

Acquity UPLC 液相色谱系统、Q-TOF SYNAPT G2 HDMS 型质谱仪(美国 Waters 公司);Milli-Q 型超纯水仪(美国 MilliPore 公司);Agilent1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);SPARK 10M 型多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司);YLS-7B 型足趾容积测量仪(济南益延科技发展有限公司);MF43 型显微镜、MC50 型数码成像测量分析系统(广州明美科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备

按照本课题组前期研究方法制备雷公藤生品总

提取物(total extract, TE)和煨制品总提取物(roasted total extract, RTE)^[8]。将雷公藤根药材均分为 2 份,其中 1 份用黄泥均匀包裹,包层厚度约 0.3 cm,于 200 °C 的烘箱中煨制 45 min,凉透后剥离黄泥。将经煨制处理的药材和未经处理的药材分别切碎,均采用 5 倍量 70%乙醇回流提取 3 次(1.5、1.5、1 h)。提取液合并浓缩,减压蒸干,即得到 TE 和 RTE。

2.2 TE 和 RTE 成分分析及含量测定

研究表明,雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤红素以及生物碱是雷公藤的主要有效成分^[13-15],课题组前期研究发现雷公藤红素及其煨制转化物 1-羟基-2,5,8-三甲基-9-芴酮,以及生物碱是雷公藤煨制后显著变化的成分^[16],故本研究选取雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤红素、雷公藤次碱、雷公藤晋碱、雷公藤定碱、tripfordine A(生物碱)、1-羟基-2,5,8-三甲基-9-芴酮 8 个成分对 TE 和 RTE 进行成分分析及含量测定。

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤红素、雷公藤次碱、雷公藤晋碱、雷公藤定碱、tripfordine A、1-羟基-2,5,8-三甲基-9-芴酮适量,加甲醇溶解并定容,均制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品储备液。上述对照品储备液各取 0.5 mL 于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,即得各对照品质量浓度为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取 TE 0.1 g(相当于生药材 0.794 g)、RTE 0.093 5 g(相当于生药材 0.794 g),用甲醇溶解后定容于 10 mL 量瓶中,即得 10 mg/mL TE 供试品溶液和 9.35 mg/mL RTE 供试品溶液。

2.2.3 成分分析及含量测定 根据混合对照品溶液和供试品溶液的 HPLC 图谱,对比分析 TE 和 RTE 中的主要成分及煨制后显著变化的成分,采用外标法计算雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤红素、雷公藤次碱、雷公藤晋碱、雷公藤定碱、tripfordine A、1-羟基-2,5,8-三甲基-9-芴酮在 TE 和 RTE 中的含量。色谱条件:Diamondsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~10 min, 5%~25% B; 10~12.5 min, 25%~30.5% B; 12.5~30 min, 30.5%~47% B; 30~47 min, 47%~72% B; 47~57 min, 72%~100% B; 57~60 min, 100% B; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 218 nm; 进样量 10 μ L; 柱温为室温。

2.3 CIA 大鼠模型的制备

根据文献中的方法复制 CIA 大鼠模型^[17]。将等体积的牛Ⅱ型胶原溶液和不完全弗氏佐剂在冰浴上用手持式匀浆机充分混匀制备乳剂，质量浓度为 1 mg/mL。大鼠尾根部皮内注射 0.2 mL 乳剂进行初次免疫，7 d 后继续注射 0.1 mL 上述乳剂加强免疫。

2.4 动物分组及给药

取 7 只大鼠作为对照 (control, CON) 组，剩余大鼠均尾根部皮内注射胶原乳剂复制模型，CON 组大鼠于同部位注射等体积生理盐水。加强免疫后挑选造模成功的大鼠随机均分为模型 (model, MOD) 组、醋酸地塞米松 (dexamethasone acetate, DXMS) 组、TE 组和 RTE 组，每组 7 只。实验约第 21 天出现炎症症状后，开始连续 ig 给药 20 d。CON 组和 MOD 组 ig 等体积的 5% 羧甲基纤维素钠溶液，DXMS 组 ig 醋酸地塞米松 4.72 mg/kg (根据临床等效剂量换算)，TE 组和 RTE 组参照课题组前期研究给药剂量分别 ig 4.5 g/kg 各提取物 (按生药量计)^[8]。

2.5 样本的采集及处理

于末次给药后收集尿液样本，将大鼠放入代谢笼，禁食不禁水，收集 6 h 的尿液，收集后置于 -80 °C 冰箱保存。将收集的尿液各取 500 μ L 合并于干燥离心管中，涡旋 60 s 混合均匀，标记为质控样品。另外，所有样品各取 500 μ L，分别置于干燥离心管中，4 °C、4000 r/min 离心 10 min，加甲醇 3 mL，涡旋 3 min，4 °C、12 000 r/min 离心 15 min，取上清液 3 mL，氮气吹干后加甲醇 200 μ L 复溶。复溶液涡旋 3 min 后，4 °C、12 000 r/min 离心 15 min，取上清液转移至自动进样瓶中进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析。大鼠在收集完尿液后麻醉，采用腹主动脉取血，采血后室温静置 1 h，3000 r/min 离心 15 min，分离血清用于炎症因子 IL-1 β 的检测。最后取大鼠肝、肾以及滑膜组织于 4% 多聚甲醛中固定。

2.6 观察指标及检测方法

2.6.1 一般状况观察 分别于造模前、给药前、给药后观察并记录大鼠的饮食情况、毛色状态及行为变化等肉眼可见的特征。

2.6.2 足肿胀度检测及关节炎评分 给药后 0、4、8、12、16、20 d 用足趾容积测量仪测量大鼠足趾容积，并进行关节炎评分。关节炎评分标准^[18]：0 分为无肿胀、红肿；1 分为跗骨或踝关节出现红肿；2 分为从脚踝到跗骨出现肿胀和发红；3 分为从脚踝到跗骨关节出现红肿；4 分为脚踝、跗骨和跖骨周

围红肿。大鼠的关节炎评分大于 4 分，则表示造模成功，大鼠单个肢体的得分不能超过 4 分，共计得分不能超过 16 分。

足趾肿胀度 = 造模后足趾容积平均值 - 造模前足趾容积平均值

2.6.3 IL-1 β 含量检测 严格按试剂盒说明书，采用 ELISA 法检测血清中 IL-1 β 的含量。

2.6.4 代谢组学分析条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)，流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (B)，梯度洗脱：0~2 min, 5% B；2~16 min, 5%~29% B；16~21 min, 29%~47% B；21~24 min, 47%~80% B；24~26 min, 80%~95% B；26~32 min, 95% B；32~32.1 min, 95%~5% B；32.1~34 min, 5% B；体积流量 0.3 mL/min；进样量 3 μ L；柱温 30 °C；样品室温度 10 °C。

离子源温度为 120 °C，采用正离子扫描模式，毛细管电压为 3.0 kV，锥孔电压为 40 V，采集范围为 m/z 50~1000。为确保质量的准确性和重复性，利用亮氨酸脑啡肽进行实时质量校正。为保证整个分析系统的稳定性，在本实验中使用质控样品进行方法学验证，质控样品由每个正常样品各取 500 μ L 混合而得。同一模式下，批量样品检测时以随机顺序进行，以减少误差。

2.6.5 肝、肾及滑膜组织病理学的检测 4% 多聚甲醛固定后的肝、肾及滑膜组织进行常规的苏木素-伊红 (HE) 染色，在光镜下观察各组肝、肾及滑膜组织病变情况。

2.6.6 滑膜组织中 SDH 活性及琥珀酸含量测定

(1) SDH 活性测定：将滑膜组织用液氮冻硬后立即研磨成粉，根据其质量加入 10 倍的生理盐水以制备匀浆。取滑膜组织匀浆液，参照说明书检测 SDH 活性。

(2) 琥珀酸含量测定^[19]：吸取 300 μ L 滑膜匀浆加入等量的 0.5 mol/L 高氯酸混合均匀，样品冰浴 10 min 后，4 °C、14 000 r/min 离心 20 min，上清液通过 0.45 μ m 微孔膜过滤器滤过。制备浓度为 1 000 μ mol/L 的标准溶液，用 0.45 μ m 微孔膜过滤至注射瓶中。HPLC 分析条件：Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱，以 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 2.5) 为流动相进行等度洗脱，体积流量 1 mL/min，波长 210 nm，柱温 25 °C，进样量 10 μ L。

2.6.7 免疫组化法检测滑膜组织 VEGFA、CD31 表达

取“2.6.5”项下石蜡切片,经脱蜡、水化处理后,用pH 6.0的柠檬酸缓冲液修复抗原,3% H₂O₂室温孵育10 min以消除内源性过氧化氢酶活性,3%牛血清白蛋白溶液室温封闭15 min。随后滴加 VEGFA (1:200)、CD31 (1:200)一抗工作液,4℃孵育过夜;加入生物素标记的二抗,37℃孵育15 min;加入HRP标记链霉亲和素工作液,37℃孵育15 min。最后加二氨基联苯胺显色,苏木素复染,脱水、透明,中性树胶封片,于显微镜下观察并拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件读取平均吸光度(A)值进行统计分析。

2.7 数据处理与统计学分析

将 UPLC-Q-TOF-MS 获得的原始数据采用 MassLynx 4.1 软件处理。基于 Progenesis QI 软件进行峰对齐、峰匹配等处理,得到包含化合物保留时间和质荷比信息的文本文件。将处理后的数据矩阵导入 SIMCA 14.1 软件,对样品进行多变量统计分析。采用主成分分析(principal component analysis, PCA)得分图直观表示组间差异,通过偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)的变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)值筛选生物标志物,并利用软件中得到的可能标记物的质荷比,在数据库中检索化合物信息。根据数据库中化合物的碎片峰与样品中的化合物碎片峰进行对比,结合相关文献,对这些化合物进行筛选,推测可能的“RA生物标志物”“抗RA生物标志物”以及“抗RA增效生物标志物”。同时再利用 MetaboAnalyst 5.0 结合相关文献分析参与的体内代谢通路。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学处理。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 TE 和 RTE HPLC 分析

混合对照品溶液和供试品溶液的 HPLC 分析见图 1,雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤红素、雷公藤次碱、雷公藤晋碱、雷公藤定碱、tripfordine A、1-羟基-2,5,8-三甲基-9-茛酮在 TE 和 RTE 中的含量见表 1。

3.2 各组大鼠一般状况检查

各组大鼠在造模成功后出现进食减少,神态疲倦,常处于休息状态,大鼠足爪部位可见红斑与肿胀,关节功能活动障碍,活动迟缓,部分大鼠常因疼痛难忍而啃咬红肿部位。治疗结束后,CON 组大

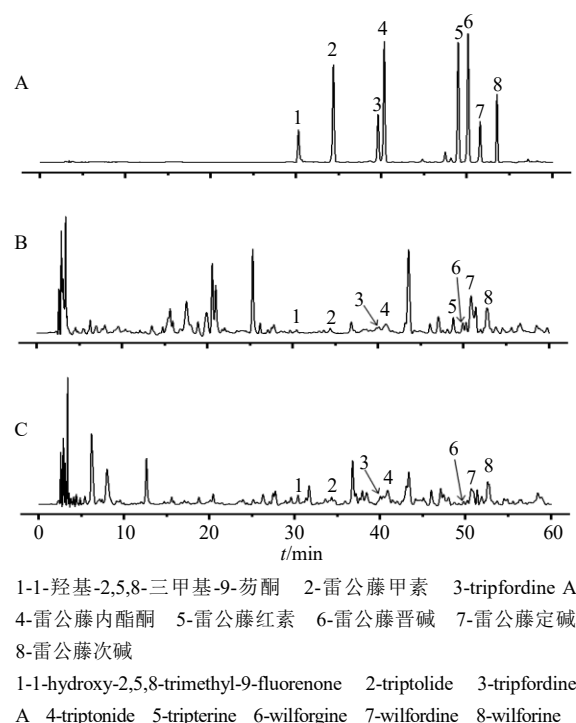


图 1 混合对照品 (A)、TE 供试品 (B) 和 RTE 供试品 (C) HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standard solution (A), TE test solution (B) and RTE test solution (C)

表 1 TE 和 RTE 中 8 个成分的含量

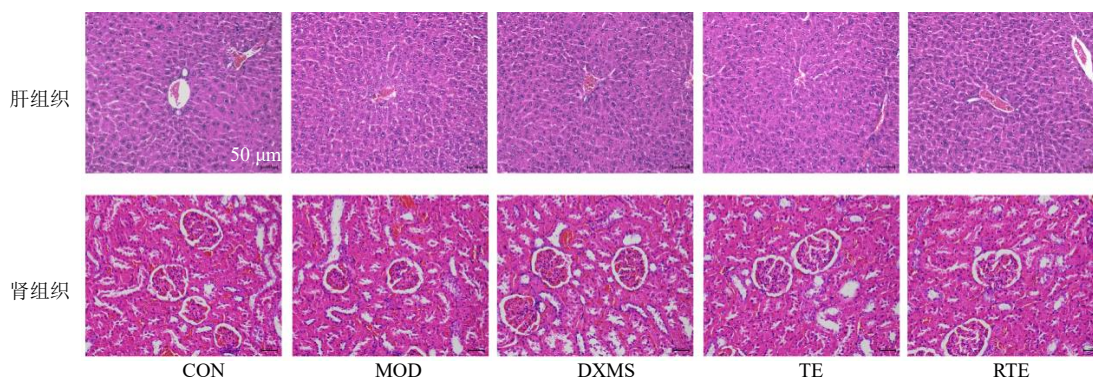
Table 1 Contents of eight components in TE and RTE

成分	质量分数/%	
	TE	RTE
1-羟基-2,5,8-三甲基-9-茛酮	1.264	1.610
雷公藤甲素	0.541	0.561
tripfordine A	1.077	1.318
雷公藤内酯酮	0.945	0.951
雷公藤红素	1.089	0.000
雷公藤晋碱	0.743	0.218
雷公藤定碱	11.388	8.898
雷公藤次碱	3.842	3.583

鼠精神状况良好,毛色光泽,行为活跃,反应灵敏;MOD 组与之前没有明显变化;TE 组和 RTE 组大鼠食欲恢复,神态与活动皆正常,足肿胀度明显减轻;DXMS 组大鼠神态与活动皆正常,足肿胀度明显减轻,但食欲仍未恢复。

3.3 各组大鼠肝、肾组织病理变化

如图 2 所示,各组大鼠肝组织结构正常,肝小叶结构清晰,肝索排列整齐,未见炎性细胞浸润和纤维组织增生,肝细胞正常,未见肝细胞变性、水肿、坏死。各组大鼠肾组织结构正常,细胞质和细胞核染色清晰,肾小管腔、肾小球和囊腔完整,无充血或炎性细胞浸润现象。肝肾组织切片结果表明,



CON-对照组 MOD-模型组 DXMS-醋酸地塞米松组 TE-生品总提取物组 RTE-煨制品总提取物组, 下图同

CON-control group MOD-model group DXMS-dexamethasone acetate group TE-total extract group RTE-roasted total extract group, same as below figures

图 2 各组大鼠肝脏和肾脏病理变化 (HE, ×200)

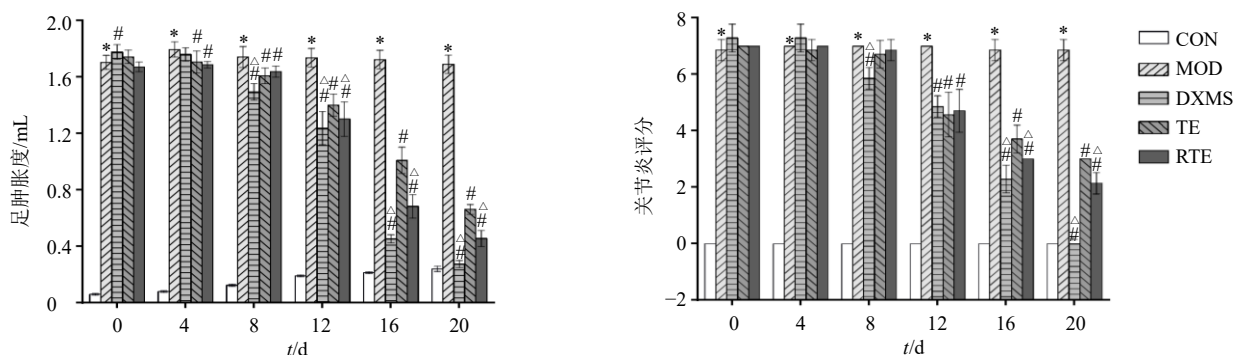
Fig. 2 Pathological changes of liver and kidney in each group of rats (HE, × 200)

各药物在该剂量下连续给药 20 d 不产生明显的肝、肾毒性。

3.4 各组大鼠关节炎评分及足肿胀度

如图 3 所示, 与 CON 组比较, MOD 组足肿胀度和关节炎评分显著升高 ($P < 0.05$); 与 MOD 组

比较, TE 组和 RTE 组自给药第 4 天后足肿胀度显著降低 ($P < 0.05$), 自给药第 12 天后关节炎评分显著降低 ($P < 0.05$)。RTE 组自给药第 12 天后足肿胀度和给药第 16 天后关节炎评分显著低于 TE 组 ($P < 0.05$), 并且趋势更向 CON 组靠近。



与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 MOD 组比较: # $P < 0.05$; 与 TE 组比较: ^ $P < 0.05$, 下图同

* $P < 0.05$ vs CON group, # $P < 0.05$ vs MOD group; ^ $P < 0.05$ vs TE group, same as below figures

图 3 各组大鼠足肿胀度变化和关节炎评分 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Fig. 3 Changes of paw swelling and arthritis scores of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

3.5 雷公藤煨制前后对 CIA 大鼠血清中 IL-1 β 水平的影响

如图 4 所示, 与 CON 组比较, MOD 组大鼠血清中 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 MOD 组比较, 各给药组 IL-1 β 水平均显著下降 ($P < 0.05$); 与 TE 组比较, RTE 组 IL-1 β 水平显著下降 ($P < 0.05$)。

3.6 尿液代谢组学

3.6.1 大鼠尿液总离子流图 采用 UPLC-Q-TOF-MS 进行尿液样品的分离和数据采集, 得到各组大鼠尿液的总离子流图 (图 5)。结果发现各组样品的总离子流图基本相似, 但各组峰形及峰面积存在一

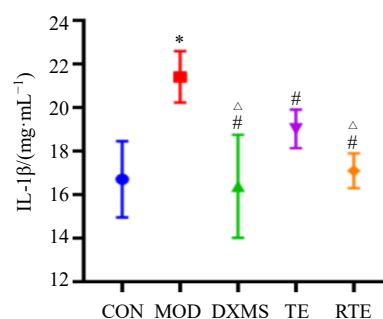


图 4 各组大鼠血清中 IL-1 β 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Fig. 4 IL-1 β level in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

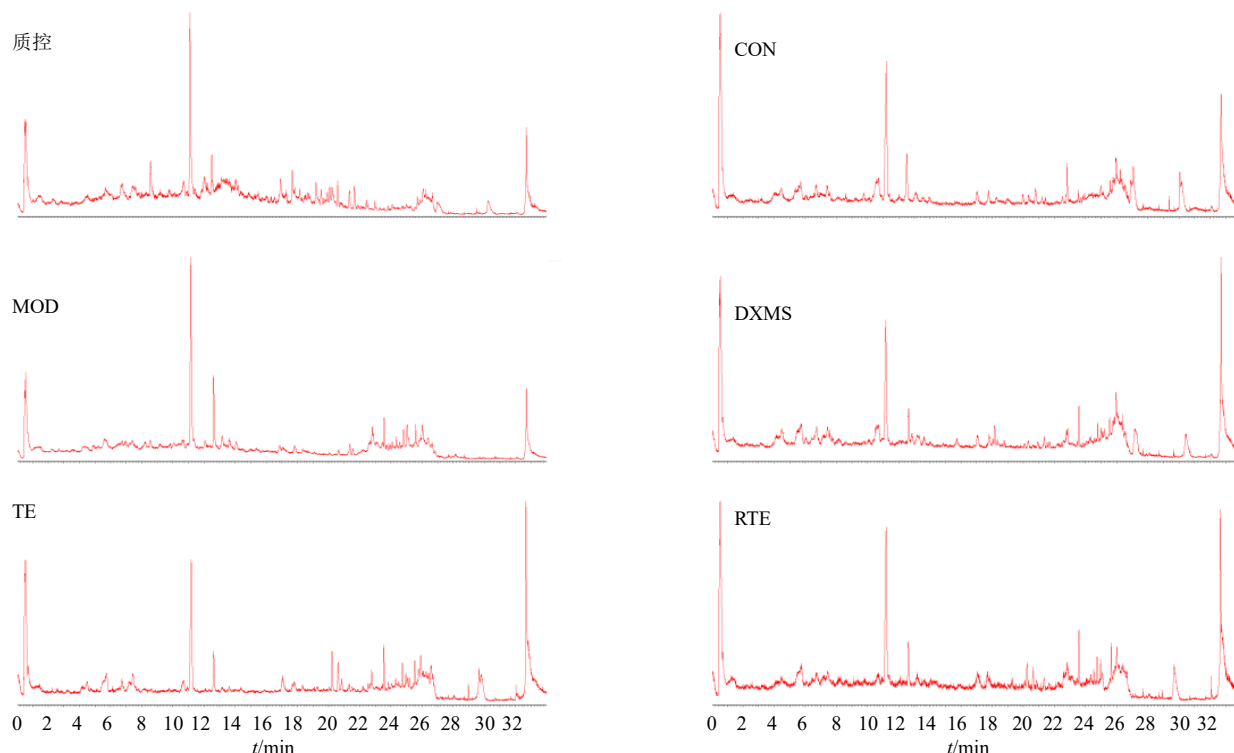


图 5 正离子模式下大鼠尿液总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatograms of urine samples under positive mode

定差异,表明大鼠体内部分代谢物发生变化。

3.6.2 PCA 和 OPLS-DA 分析 首先应用 PCA 散点图(图 6)过滤异常值,然后采用 OPLS-DA(图 7)对数据进行分析以突出组间差异,便于后续寻找潜在差异生物标志物。PCA 结果显示,各组样本之间存在一定的交叉,但 CON 组与 MOD 组样本可较明显地分开,表明 CIA 大鼠尿液中的代谢物发生了明显的变化。OPLS-DA 结果显示,CON 组和 MOD

组、DXMS 组与 MOD 组、TE 组与 MOD 组、RTE 组与 MOD 组以及 TE 组和 RTE 组分离明显,显示了良好的模型适应性。为了避免过度拟合,本研究还进行了 OPLS-DA 模型验证(置换检验 $n=200$)。结果见图 7,模型具有较好的稳定性且不存在过拟合现象。

3.6.3 生物标志物的筛选 通过 VIP 值($VIP>1$)及 P 值($P<0.05$)筛选出差异性化合物。将差异性化合物精确的分子离子在 HMDB 数据库中进行数据识别,找出对应物质,见表 2。通过对比 CON 组和 MOD 组,最终从尿液中筛选出 5-羟基吡啶乙酸、白三烯 B₄、尿苷 5'-单磷酸等 15 个与 RA 相关的生物标志物。9 个生物标志物在 TE 治疗后明显回调,为 TE 潜在的抗 RA 生物标志物,包括 (S)-2-乙酰-2-羟基丁酸、肌酸、5-羟基吡啶乙酸、N-乙酰色氨酸、N-棕榈酰色氨酸、5-甲酰胞嘧啶、白三烯 B₄、磷脂酸(8:0/10:0)、3-羟基-4,6-庚二炔-1-yl-1-葡萄糖苷。其中 RTE 组 (S)-2-乙酰-2-羟基丁酸、5-羟基吡啶乙酸、N-乙酰色氨酸、肌酸、磷脂酸(8:0/10:0)、白三烯 B₄ 等代谢物水平与 TE 组相比具有显著性差异($P<0.05$),并向 CON 组回调,为 RTE 潜在的抗 RA 增效生物标志物,见图 8。

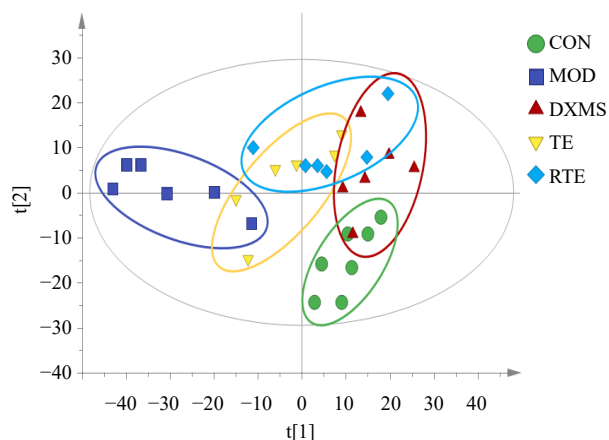


图 6 各组大鼠尿液 PCA 散点图

Fig. 6 PCA score plots of samples in urine of rats in each group

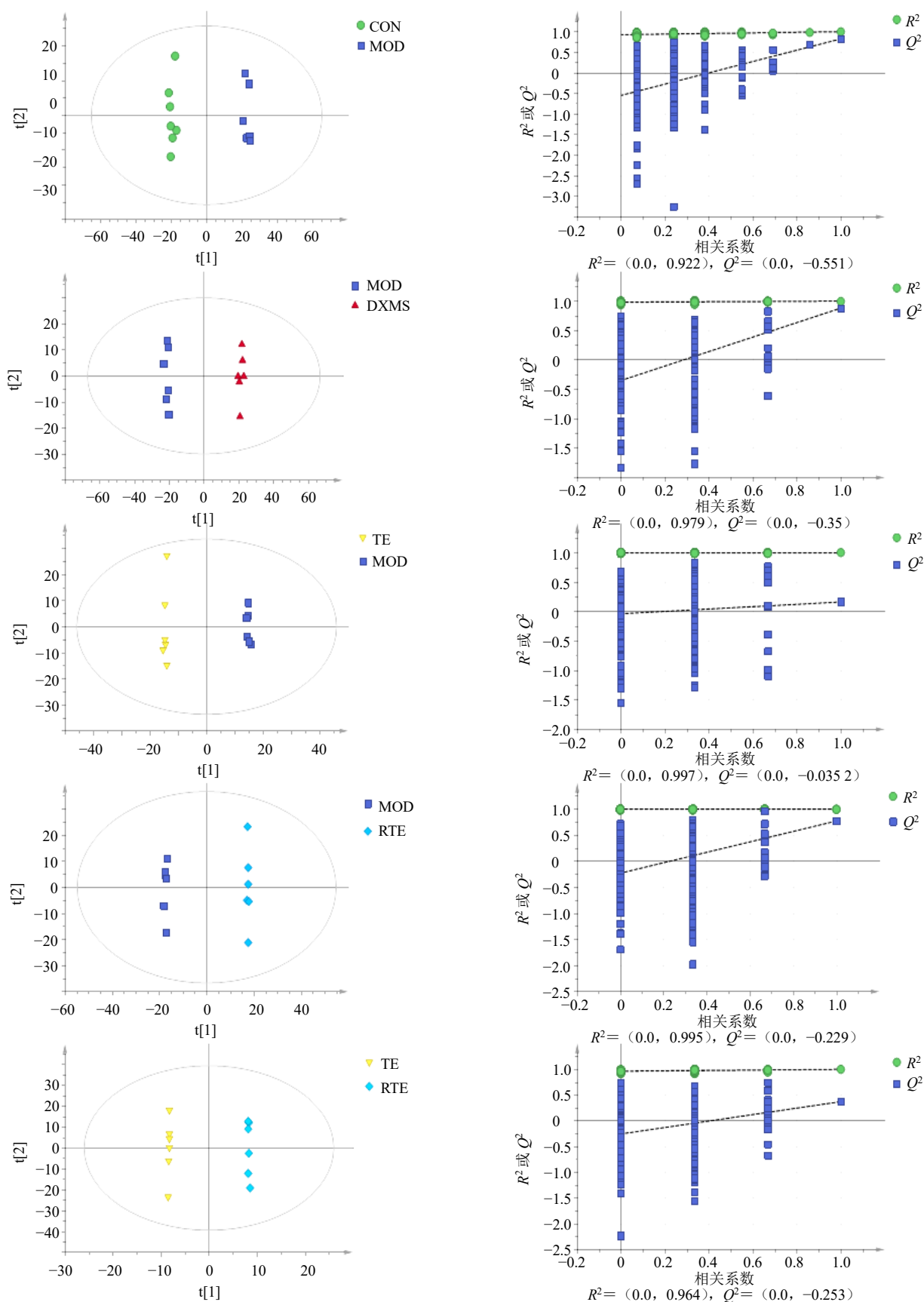


图 7 各组大鼠尿液 OPLS-DA 及相应模型验证图

Fig. 7 OPLS-DA score plots and corresponding model validation plot of samples in urine of rats in each group

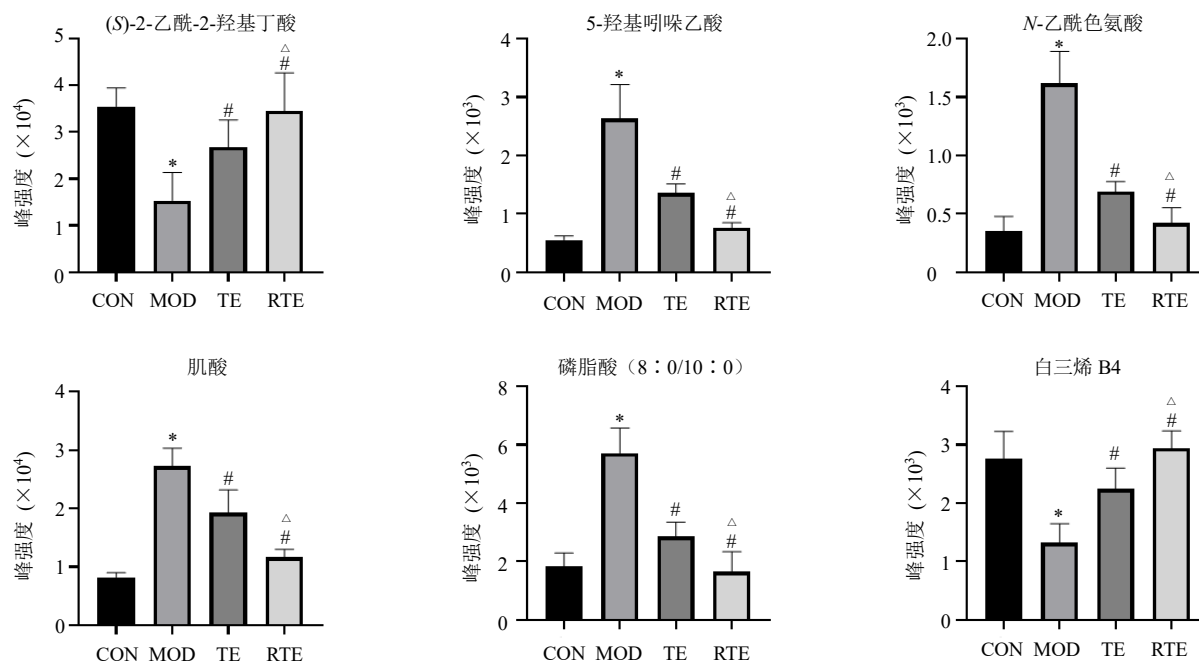
表 2 各组大鼠尿液中内源性差异代谢物

Table 2 Endogenous differential metabolites of samples in urine of rats in each group

<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	VIP	代谢物	分子式	加合形式	误差 ($\times 10^{-6}$)
147.064 8	27.34	4.14	(<i>S</i>)-2-乙酰-2-羟基丁酸 $\uparrow\uparrow\uparrow$	C ₆ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	3
209.090 7	11.35	1.33	5-羟基吡啶乙酸 $\uparrow\downarrow\downarrow$	C ₁₀ H ₉ NO ₃	[M+NH ₄] ⁺	7
247.110 1	8.44	1.07	<i>N</i> -乙酰色氨酸 $\uparrow\downarrow\downarrow$	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	10
443.323 3	25.25	1.25	<i>N</i> -棕榈酰色氨酸 $\uparrow\uparrow\uparrow$	C ₂₇ H ₄₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	8
431.085 7	7.60	2.75	环状 <i>N</i> -乙酰羟色胺葡萄糖醛酸苷 $\downarrow$	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₈	[M+K] ⁺	1
304.136 3	11.35	1.06	3-羟基-4,6-庚二炔-1-yl-1-葡萄糖苷 $\uparrow\downarrow\downarrow$	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	9
170.033 6	10.37	3.52	肌酸 $\uparrow\downarrow\downarrow$	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	[M+K] ⁺	6
170.033 4	12.49	3.05	β -肌基丙酸 $\downarrow$	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	[M+K] ⁺	4
217.987 7	4.49	1.49	<i>S</i> -羧甲基- <i>L</i> -半胱氨酸 $\downarrow\uparrow$	C ₅ H ₉ NO ₄ S	[M+K] ⁺	3
475.239 3	14.79	1.72	磷脂酸(8:0/10:0) $\uparrow\downarrow\downarrow$	C ₂₁ H ₄₁ O ₈ P	[M+Na] ⁺	8
359.222 4	26.08	1.10	白三烯 B ₄ $\uparrow\downarrow\downarrow$	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	[M+Na] ⁺	9
162.027 5	5.63	3.67	5-甲酰胞嘧啶 $\downarrow\uparrow\uparrow$	C ₅ H ₅ N ₃ O ₂	[M+Na] ⁺	1
325.044 0	4.49	1.45	尿苷 5'-单磷酸 $\downarrow$	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	[M+H] ⁺	3
397.056 6	4.47	3.49	<i>N</i> ₁ -(5-磷酸 α - <i>D</i> -核糖基)-5,6-二甲基苯并咪唑 $\downarrow\uparrow$	C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₇ P	[M+K] ⁺	1
271.038 0	9.78	2.81	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-5,7,9,11-十三碳四炔-1,2,3,4-四醇 $\downarrow$	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	[M+K] ⁺	5

$\uparrow$ 表示 MOD 组相对于 CON 组上调, $\downarrow$ 表示 MOD 组相对于 CON 组下调; $\uparrow$ 表示 TE 组相对于 MOD 组上调, $\downarrow$ 表示 TE 组相对于 MOD 组下调; $\uparrow$ 表示 RTE 组相对于 MOD 组上调, $\downarrow$ 表示 RTE 组相对于 MOD 组下调

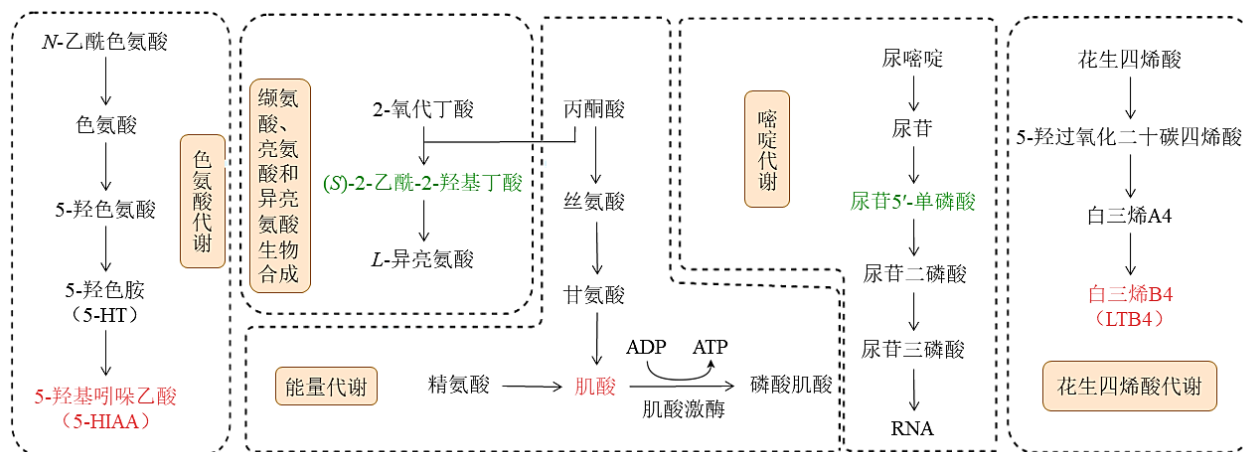
$\uparrow$ means MOD group vs CON group increase, $\downarrow$ means MOD group vs CON group decrease; $\uparrow$ means TE group vs MOD group increase, $\downarrow$ means TE vs MOD group decrease; $\uparrow$ means RTE group vs MOD group increase, $\downarrow$ means RTE group vs MOD group decrease

图 8 与煨制增效相关的差异代谢物含量 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Fig. 8 Differential metabolite levels associated with enhancing efficacy of roasting ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

3.6.4 代谢通路分析 将筛选出的差异代谢物进行代谢途径通路分析, 结果见图 9。缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 能量代谢, 色氨酸代谢, 花生四烯酸代谢, 嘧啶代谢与 RA 的发生发展有关。RTE 可通过调节缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 能量代谢, 色氨酸代谢, 花生四烯酸代谢途径来减轻炎症反应, 并且通过这些途径发挥其增效作用。

3.7 琥珀酸/VEGF 信号通路

3.7.1 滑膜组织病理切片 如图 10 所示, CON 组、DXMS 组和 RTE 组可见滑膜细胞排列规则, 滑膜内纤维间质排列疏松, 无炎性细胞浸润; MOD 组可见滑膜增生明显, 内衬细胞层次增加明显, 间质纤维增生, 伴有大量炎性细胞浸润; TE 组可见滑膜增生, 间质纤维增生, 伴有少量炎性细胞浸润。



红色表示相对于模型组上调, 绿色表示相对于模型组下调

Red indicated upregulation relative to the model group, while green indicated downregulation

图 9 与 RA 相关的代谢网络

Fig. 9 Metabolic networks associated with RA

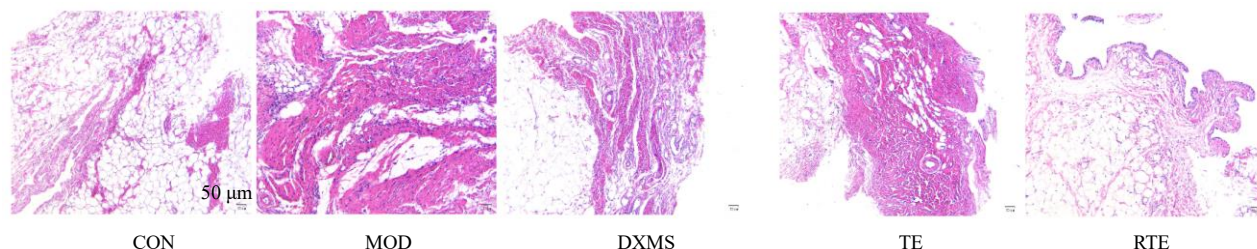


图 10 各组大鼠滑膜组织病理变化 (HE, ×100)

Fig. 10 Pathological changes of synovial tissue of rats in each group (HE, ×100)

3.7.2 对 SDH 活性及琥珀酸、富马酸含量的影响 如图 11 所示, 与 CON 组比较, MOD 组 SDH 活力、富马酸含量明显下降 ($P < 0.05$), 琥珀酸含量明显上升 ($P < 0.05$); 与 MOD 组比较, 各给药组 SDH 活力、富马酸含量均无显著性差异, 琥珀酸含量明显下降 ($P < 0.05$); 与 TE 组比较, DXMS 组和 RTE 组 SDH 活力、富马酸含量均无显著性差异,

琥珀酸含量明显下降 ($P < 0.05$)。

3.7.3 对 VEGFA、CD31 表达的影响 如图 12 所示, 与 CON 组比较, MOD 组 CD31 和 VEGFA 表达明显增加 ($P < 0.05$); 与 MOD 组比较, 各给药组 CD31 和 VEGFA 表达均明显减少 ($P < 0.05$); 与 TE 组比较, DXMS 组和 RTE 组 CD31 和 VEGFA 表达均明显减少 ($P < 0.05$)。

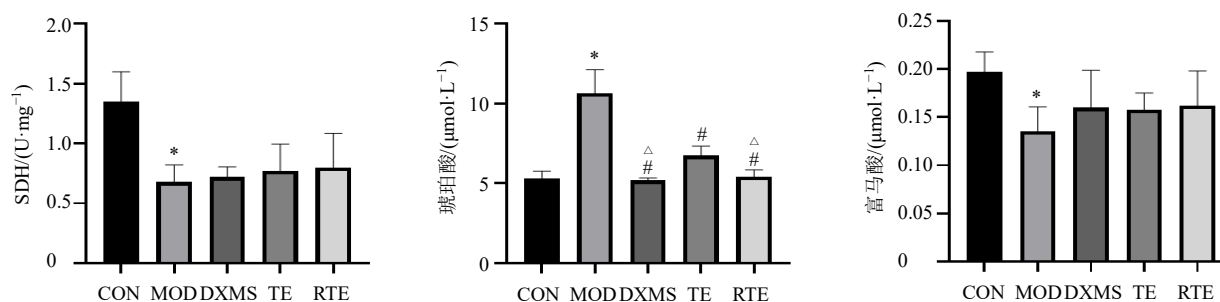


图 11 雷公藤煨制前后对 CIA 大鼠滑膜组织中 SDH 活力以及琥珀酸、富马酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 Effect of *T. wilfordii* on SDH activity and succinate, fumarate contents in synovial tissue of CIA rats before and after roasting ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

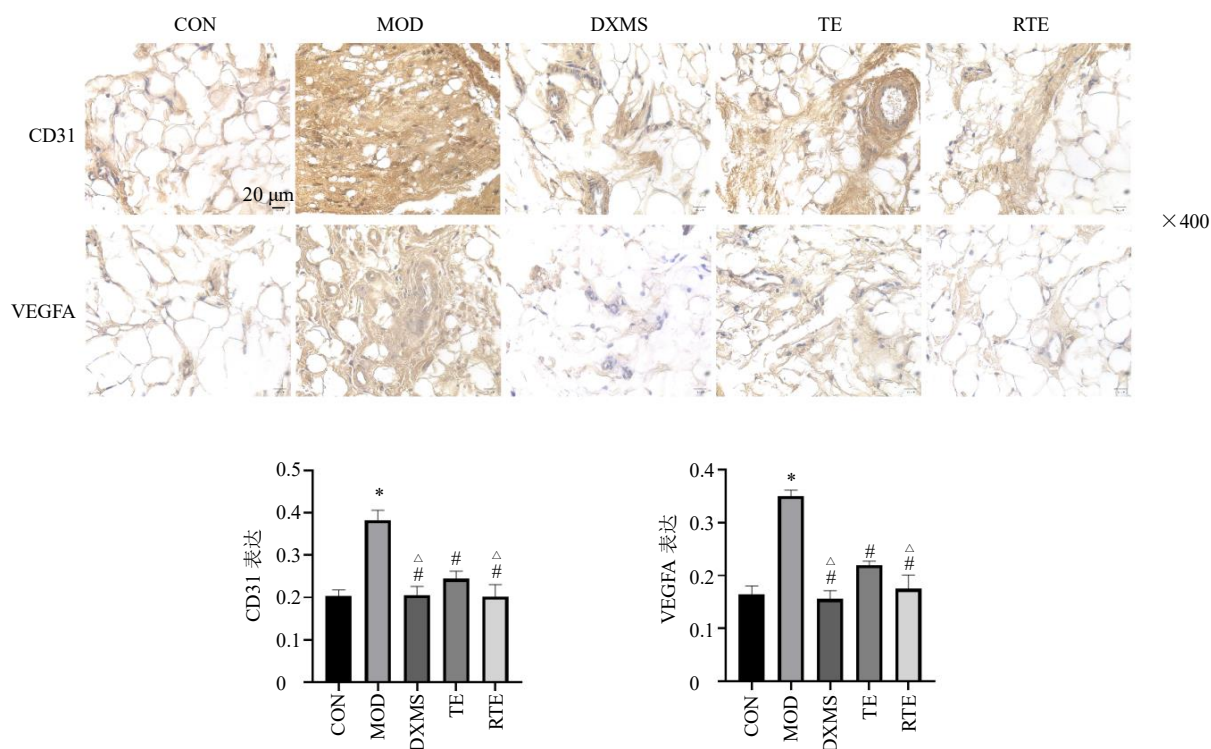


图 12 雷公藤煨制前后对 CIA 大鼠滑膜组织 CD31 和 VEGFA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 Effect of *T. wilfordii* on expressions of CD31 and VEGFA in synovial tissue of CIA rats before and after roasting ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

CIA 模型是一种经典的临床前模型,与人类 RA 的发病机制最为相似,是目前公认研究 RA 病理机制和评价治疗药物的最佳动物模型^[20]。模型大鼠的足肿胀程度和关节滑膜病理形态学的改变可以反映药物的疗效和作用强度,常用于药物有效性评价和药物筛选。IL-1 β 是与 RA 的发生发展过程中关系密切的促炎症细胞因子,在 RA 患者及 CIA 大鼠血清中的水平显著高于健康组^[21-22]。本研究发现 RTE 可明显降低 CIA 大鼠足肿胀程度、关节炎评分、血清中 IL-1 β 水平,改善关节滑膜增生和炎性细胞浸润,且效果显著优于 TE,说明煨制对雷公藤具有确切的增效作用。

4.1 代谢组学分析

代谢组学是一种可在机体内快速筛选药物疗效或毒性的系统生物学技术,采用“自上而下”的策略,在整体环境中反映生物系统代谢网络的最终症状,与中药治病整体性、动态性原则极其相似,可为评估中药的疗效和机制提供一种新思路^[23-24]。本研究基于代谢组学技术分析了雷公藤煨制前后对 CIA 模型大鼠的尿液代谢产物的影响,共筛选出 15 个潜在的 RA 生物标志物,其中 5-羟基吲哚乙酸、

尿苷 5'-单磷酸、肌酸、白三烯 B₄、N-乙酰色氨酸据以往的报道证明为可靠的 RA 生物标志物,对于疾病的发生具有重要意义。而 (S)-2-乙酰-2-羟基丁酸、环状 N-乙酰羟色胺葡萄糖醛酸苷、 β -胍基丙酸、N-棕榈酰色氨酸、5-甲酰胞嘧啶在以往的研究中鲜有报道,为本研究新发现的 RA 相关生物标志物。在 TE 组中鉴定出 9 个与抗 RA 相关的生物标志物,在 RTE 组鉴定出 6 个与抗 RA 相关的生物标志物。通过对比分析发现, RTE 组中的 6 个抗 RA 生物标志物与 TE 组高度重合,且与 TE 组相比明显更向 CON 组回调。代谢通路分析显示, TE 和 RTE 均通过调节缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,能量代谢,色氨酸代谢,花生四烯酸代谢发挥抗 RA 作用,煨制增效的机制可能与调控这些途径有关。

(S)-2-乙酰-2-羟基丁酸是一种短链酮酸,参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成代谢途径,其中主要影响异亮氨酸的生物合成。异亮氨酸是一种支链氨基酸,研究显示支链氨基酸可以刺激肿瘤坏死因子、细胞因子(如 IL-1 β)的产生^[25],这与本研究中 CIA 大鼠血清中 IL-1 β 升高结果一致。此外,异亮氨酸可以影响 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)前体物质的运转,造成中枢神经的疲劳^[26],这

与本研究模型大鼠神态疲倦相符合。本研究中,与 CON 组相比,MOD 组中 (S)-2-乙酰-2-羟基丁酸含量显著下降。(S)-2-乙酰-2-羟基丁酸含量的变化影响了异亮氨酸的合成,从而刺激了 CIA 大鼠相关因子与 5-HT 前体物质,引发了炎症反应和关节破坏,造成了机体的疲乏感。在给予 TE 和 RTE 后,(S)-2-乙酰-2-羟基丁酸含量较 CON 组显著上升。说明 TE 和 RTE 可以通过调节缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成抑制 RA 的炎症反应。

5-羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)是 5-HT 的分解产物,参与色氨酸代谢中的 5-羟色胺途径。当机体处于炎症状态时中或细胞受到损伤后,5-HT 会被释放并通过单胺氧化酶和醛脱氢酶转化为 5-HIAA^[27]。研究发现,佐剂性关节炎大鼠血清中 5-HIAA 水平显著上调^[28]。在本研究中,致炎的大鼠体内大量 5-HT 被释放转化为 5-HIAA 并随尿液排出,导致 MOD 组大鼠尿液中 5-HIAA 含量显著上升。TE 和 RTE 干预后,抑制了 5-HT 的释放,减少了 5-HIAA 的产生,导致尿液中的 5-HIAA 含量较 MOD 组显著下降。*N*-乙酰色氨酸是肠道微生物群产生的色氨酸的分解代谢物。研究发现,RA 患者存在色氨酸代谢异常,体内 *N*-乙酰色氨酸含量与 RA 发病率有关^[29]。本实验中 MOD 组较 CON 组 *N*-乙酰色氨酸的含量变化说明了 CIA 大鼠体内的色氨酸代谢被扰乱,而 TE 和 RTE 通过回调 *N*-乙酰色氨酸水平来改善色氨酸代谢异常,从而发挥治疗作用。

在许多疾病的过程中,随着炎症的发生和发展,体内能量的消耗会反映在代谢产物中。肌酸是一种含氮氨基酸,在机体内由精氨酸、甘氨酸及甲硫氨酸 3 种氨基酸所合成。肌酸可在肌酸激酶的作用下形成磷酸化肌酸,参与三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)循环,在细胞内能量的转运过程中具有重要作用^[30]。现代医学认为 RA 患者关节局部存在低氧、缺氧和低血糖状态,低氧导致氧化磷酸化途径 ATP 的生成障碍^[31]。在 CIA 大鼠中,低氧导致肌酸通过氧化磷酸化途径生成 ATP 的过程受到阻碍,能量反应受到抑制,从而导致肌酸在机体内的含量升高。在经 TE 和 RTE 治疗后,肌酸含量明显较 MOD 组下降,提示 TE 和 RTE 可能通过调节能量代谢发挥抗炎作用。

白三烯 B4 是一种炎症脂质介体,可激活并且聚集多种炎性和免疫效应细胞,作用于 T 淋巴细胞

释放各种细胞因子^[32]。研究发现,在 RA 机体中含有较高浓度的白三烯 B4,并且中性粒细胞释放白三烯 B4 的能力增强^[25]。白三烯 B4 通过抑制中性粒细胞凋亡并诱导其定向迁移、致关节疼痛过敏、调控免疫细胞分化和细胞因子表达等引发 RA 病人关节肿痛、骨质破坏等炎症反应^[33]。本实验中 MOD 组大鼠尿液中白三烯 B4 含量显著升高,与文献一致。经 TE 和 RTE 治疗后,白三烯 B4 含量显著下降,提示 TE 和 RTE 通过调控白三烯 B4 在体内的代谢和转化从而下调炎症因子的释放,进而发挥对 CIA 大鼠的治疗作用。

尿苷 5'-单磷酸是一种单磷酸盐形式的尿嘧啶核苷酸,能够由从头途径或体内核苷酸和核酸的降解产物获得。在 RA 患者的关节中有大量活化的 T 细胞,它们需要大量嘧啶以维持其增殖^[34]。研究表明,在佐剂性关节炎模型大鼠中尿苷 5'-单磷酸含量显著降低,是潜在的 RA 生物标志物^[35]。本实验结果与文献一致^[35],可能是活化的 T 细胞的增殖消耗了大量嘧啶,导致其含量的下降。

4.2 对琥珀酸/VEGF 炎症信号通路的影响分析

RA 的发病机制目前尚不明确,关节滑膜炎和血管新生是其基本病理特征。血管新生发生在炎症关节组织的早期,可以促进炎症细胞向关节的浸润,在 RA 的发展中起着重要作用^[36]。VEGFA 作为效果突出的促血管生成因子,在 RA 滑膜组织中高表达^[37],可促进滑膜内皮细胞活化以诱导炎症,从而在 RA 中建立血管新生和关节炎之间的相互作用^[38]。炎性介质 CD31 被视为内皮细胞和血管细胞的表面分子标志,主要高表达于血管内皮细胞的胞质中,在血管的生成中起到重要的作用^[39]。在本研究中 TE 和 RTE 可明显下调 VEGFA 和 CD31 的表达,RTE 下调的趋势较 TE 更加明显,提示雷公藤可调节血管新生改善 RA,煨制增效作用与血管新生有关。

琥珀酸是能量代谢中三羧酸循环的中间产物,可由 SDH 水解为富马酸。研究表明,琥珀酸在 RA 患者关节滑膜液中大量堆积可加剧关节滑膜炎和血管新生,阻断琥珀酸在滑膜中的堆积可抑制血管新生和滑膜炎,从而改善 RA^[12]。本实验发现 TE 和 RTE 均可抑制模型大鼠的琥珀酸堆积,煨制品抑制效果显著优于生品。在三羧酸循环中抑制 SDH 活力会导致琥珀酸过度堆积^[40]。然而本研究中 CIA 大鼠中 SDH 活性显著高于健康大鼠且雷公藤煨制前

后大鼠滑膜中 SDH 活性、富马酸含量无显著差异。结合文献发现,琥珀酸的积累可能是 SDH 活性逆转的结果^[12]。而雷公藤并未参与对 SDH 活性的调控,煨制增效机制也与 SDH 活性无关。

综上,煨制可有效提高雷公藤对 CIA 大鼠的治疗效果,其增效机制与调节缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,能量代谢,色氨酸代谢有关。在与 RA 发病相关的差异代谢物中,5-羟基吡啶乙酸、尿苷 5'-单磷酸、肌酸、白三烯 B₄、N-乙酰色氨酸经文献研究证明为可靠的 RA 生物标志物,对于疾病的发生具有重要意义。而 (S)-2-乙酰-2-羟基丁酸、环状 N-乙酰羟色胺葡萄糖醛酸苷、 β -肌基丙酸、N-棕榈酰色氨酸、5-甲酰胞嘧啶在 RA 的研究中鲜有报道,为本研究新发现的 RA 相关生物标志物。经进一步的研究发现,雷公藤可调节琥珀酸/VEGF 炎症信号通路阻止琥珀酸堆积和抑制血管新生,从而改善 RA,煨制可增强雷公藤对该信号通路的调控从而发挥增效作用。本研究首次从代谢组学的角度及琥珀酸/VEGF 炎症信号通路阐释了煨制雷公藤抗 RA 增效机制,为煨制在雷公藤中的应用提供了科学依据,为雷公藤的深入研究提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] Yu K H, Chen H H, Cheng T T, *et al.* Consensus recommendations on managing the selected comorbidities including cardiovascular disease, osteoporosis, and interstitial lung disease in rheumatoid arthritis [J]. *Medicine*, 2022, 101(1): e28501.
- [3] 杨琴, 杨进锋, 杨玉涛, 等. 类风湿关节炎药物及手术治疗的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 133-136.
- [4] 蒋红霞, 伍秋珊, 刘莉, 等. 雷公藤三萜类成分及其药理活性研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(4): 1223-1231.
- [5] 黄谣. 基于 Treg/Th17 细胞失衡探讨雷公藤甲素治疗 RA 的作用和机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2021.
- [6] 姜淼, 张海波, 张霞, 等. 雷公藤多苷不良反应及配伍减毒研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(5): 64-66.
- [7] 陈殊, 刘莉, 蒋红霞, 等. 雷公藤药理与毒理机制代谢组学研究进展 [J]. 海峡药学, 2022, 34(2): 1-6.
- [8] 刘建群, 张国华, 高俊博. 烘箱煨制雷公藤药效毒性及成分变化研究 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(10): 7-9.
- [9] Xu L X, Chang C, Jiang P, *et al.* Metabolomics in rheumatoid arthritis: Advances and review [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 961708.
- [10] Hanlon M M, Canavan M, Barker B E, *et al.* Metabolites as drivers and targets in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2022, 208(2): 167-180.
- [11] Kim S, Hwang J, Xuan J H, *et al.* Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e97501.
- [12] Li Y, Liu Y, Wang C, *et al.* Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1 α /VEGF axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 126: 1-14.
- [13] 姬翔宇, 张子雯, 陈姿伊, 等. 一测多评法同时测定雷公藤药材及制剂雷公藤多苷片中 7 个质控成分 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5338-5347.
- [14] 刘莉, 闫君, 舒积成, 等. 雷公藤生物碱类成分及其药理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(12): 2170-2181.
- [15] 白雪, 付瑞嘉, 乐世俊, 等. 雷公藤治疗类风湿性关节炎研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 265-275.
- [16] 刘建群, 罗素花, 张锐, 等. 基于 UPLC-Q-TOF MS 研究煨制对雷公藤化学成分的影响 [J]. 质谱学报, 2018, 39(5): 573-582.
- [17] 梁瑞峰, 李兵杰, 葛文静, 等. 防风不同提取部位的极性差异及其对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜水通道蛋白的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3312-3320.
- [18] 张妍, 王健英, 陈晓云, 等. 基于 NF- κ B 通路探讨杜仲皮、叶醇提取物对胶原诱导型关节炎大鼠炎症性骨破坏的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1645-1653.
- [19] Li Y, Zheng J Y, Liu J Q, *et al.* Succinate/NLRP3 inflammasome induces synovial fibroblast activation: Therapeutic effects of clematichinenoside AR on arthritis [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 532.
- [20] 李利青, 张逢, 彭馥芝, 等. 类风湿关节炎实验性动物模型研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(11): 1492-1497.
- [21] 王艳, 尹伟洲. 类风湿性关节炎患者血清 IL-1 β 、IL-32 的表达及其与临床预后的关系 [J]. 河南医学研究, 2022, 31(21): 3885-3888.
- [22] 李东薇, 穆柏辰, 窦德强, 等. 甘草附子汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清和关节液中 IL-1 β 、IL-10 及 TNF- α 含量的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6355-6358.
- [23] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. Metabonomics: Understanding the metabolic responses of living systems

- to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [24] 李偲. “成分—药效—代谢—靶标”多维关联模式下特色中药耳聋胶囊防治庆大霉素致听力损失的药效物质基础及作用机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [25] 杜小正, 袁博, 张星华, 等. 基于代谢组学研究热补针法治疗类风湿关节炎寒证家兔的作用机制 [J]. *针刺研究*, 2017, 42(3): 202-208.
- [26] 张永怡. 基于代谢组学技术研究艾灸干预类风湿关节炎大鼠的效应机制 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [27] Lyu S, Rao Y, Liu P, *et al*. Metabolomics analysis reveals four biomarkers associated with the gouty arthritis progression in patients with sequential stages [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2022, 55: 152022.
- [28] 沈彩红. 茜草醇提物治疗类风湿性关节炎的代谢组学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [29] Pavlova T, Vidova V, Bienertova-Vasku J, *et al*. Urinary intermediates of tryptophan as indicators of the gut microbial metabolism [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 987: 72-80.
- [30] 王誉杰, 张进威, 王讯, 等. 胍基乙酸及代谢产物肌酸的研究进展 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(8): 1577-1584.
- [31] 李永祥, 刘剑. 肌酸激酶与血压关系及其在高血压治疗中的研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2015, 31(14): 2143-2146.
- [32] 许丹. 类叶牡丹有效部位干预胶原诱导型关节炎大鼠的代谢组学研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [33] 魏志萍. LTB4 和 BLT1 在类风湿关节炎中的作用 [J]. *中国医药科学*, 2020, 10(12): 50-52.
- [34] 王俏. 类风湿性关节炎患者对来氟米特反应的预后模型构建 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.
- [35] Xie Y F, Feng W W, Liu M C, *et al*. Investigation of efficacy enhancing and toxicity reducing mechanism of combination of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Paeoniae Radix Alba* in adjuvant-induced arthritis rats by metabolomics [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 9864841.
- [36] Balogh E, Biniecka M, Fearon U, *et al*. Angiogenesis in inflammatory arthritis [J]. *Isr Med Assoc J*, 2019, 21(5): 345-352.
- [37] 褚小磊. 槲皮素对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 VEGFA 表达影响及血管新生靶点筛选 [D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2021.
- [38] Gong Y Y, Yu Z Y, Wang Y N, *et al*. Effect of moxibustion on HIF-1 α and VEGF levels in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Pain Res Manag*, 2019, 2019: 4705247.
- [39] 夏士涛, 王培宇, 魏静, 等. 海风藤醇提物抑制 CD31 因子对 CSDH 模型大鼠血肿外膜血管炎症影响的研究 [J]. *中医药学报*, 2022, 50(11): 37-41.
- [40] Chouchani E T, Pell V R, Gaude E, *et al*. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS [J]. *Nature*, 2014, 515(7527): 431-435.

[责任编辑 李亚楠]