

青藤碱通过 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 途径治疗胶原诱导性关节炎大鼠的作用机制

冯霞¹, 李振^{2,3#}, 申彤¹, 郭乾育³, 曹建阳¹, 朱紫鹏¹, 梁美娥^{3*}, 庞全海^{1*}

1. 山西农业大学动物医学学院 山西 太谷 030801

2. 山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619

3. 山西白求恩医院 (山西医学科学院同济山西医院), 山西医科大学第三医院, 山西 太原 030032

摘要:目的 探讨青藤碱通过长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 核富集转录本 1 (nuclear-enriched autosomal transcript 1, NEAT1) /高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) -核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 途径改善胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠炎症反应的免疫学机制。方法 24 只雌性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、甲氨蝶呤 (0.9 mg/kg) 组和青藤碱 (100 mg/kg) 组, 每组 6 只。除对照组外, 其余大鼠构建 CIA 模型, 造模成功后, 连续给药 4 周。检测各组大鼠关节炎评分、足趾容积及血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-17A、IL-10、IL-13 水平; 检测大鼠踝关节骨微结构; 检测大鼠肝、肾功能指标及肝、肾、脾、关节病理学变化; qRT-PCR 和 Western blotting 检测大鼠关节中 LncRNA NEAT1、HMGB1、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达水平; 免疫组化法分析大鼠关节中 HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达及定位。结果 与对照组比较, 模型组大鼠踝关节肿胀明显, 足趾容积显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17A 水平显著升高 ($P < 0.001$), IL-10、IL-13 水平显著降低 ($P < 0.001$); 踝关节骨侵蚀严重, 骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨体积分数 (bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th) 显著降低 ($P < 0.001$), 骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb.Sp) 显著升高 ($P < 0.01$); 脾脏淋巴小结大小及数量显著增加, 关节腔缩小并且有大量炎性细胞浸润, 软骨组织破坏; 关节中 LncRNA NEAT1、HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$), HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。与模型组比较, 各给药组大鼠踝关节肿胀程度明显减轻, 关节炎评分、足趾容积显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17A 水平显著降低 ($P < 0.001$), IL-10、IL-13 水平显著升高 ($P < 0.001$); 踝关节表面侵蚀情况有不同程度的缓解, BMD、BV/TV、Tb.Th 显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), Tb.Sp 显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 肝、肾功能指标及病理学检测正常; 淋巴小结数量减少, 关节、软骨破坏情况明显减轻; 关节中 LncRNA NEAT1、HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$), HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结论 青藤碱通过调控 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 途径, 减轻关节肿胀和损伤, 抑制炎症反应, 缓解类风湿关节炎进程。
关键词: 青藤碱; LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 途径; 类风湿关节炎; 炎症反应; 免疫
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)19-7068-11
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.19.018

Mechanism of sinomenine in treatment of rats with collagen-induced arthritis via LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 pathway

FENG Xia¹, LI Zhen^{2,3}, SHEN Tong¹, GUO Qianyu³, CAO Jianyang¹, ZHU Zipeng¹, LIANG Meie³, PANG Quanhai¹

1. College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

收稿日期: 2025-06-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32273089, 81904034); 山西省基础研究计划面上项目 (202303021211172, 202403021221262); 中国博士后科学基金 (2022M722004); 山西省中医药科技专项科研课题 (2023ZYCY058, 2024ZYY2A015, 2024ZYY2A019); 山西省卫生健康委科研课题 (2019011)

作者简介: 冯霞 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物疾病诊疗。E-mail: 739698795@qq.com

#共同第一作者: 李振 (1988—), 男, 博士后, 副教授, 研究方向为风湿免疫性疾病中西医结合研究。E-mail: lz88@sxtcm.edu.cn

***通信作者:** 梁美娥 (1980—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为天然抗炎药物的筛选改造及免疫调节机制研究。E-mail: liangmeie@163.com
庞全海 (1963—), 男, 教授, 研究方向为动物疾病诊疗。E-mail: pangquanhai@126.com

2. College of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

3. The Third Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi Bethune Hospital (Shanxi Academy of Medical Sciences, Tongji Shanxi Hospital), Taiyuan 030032, China

Abstract: Objective To investigate the immunological mechanism of sinomenine in improving inflammatory response in rats with collagen-induced arthritis (CIA) through long non-coding RNA nuclear-enriched autosomal transcript 1 (LncRNA NEAT1)/high mobility group box-1 protein (HMGB1)-nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) pathway. **Methods** A total of 24 female Wistar rats were randomly divided into control group, model group, methotrexate (0.9 mg/kg) group and sinomenine (100 mg/kg) group, with six rats in each group. Except the control group, the other rats were all made CIA model. After successful modeling, the drugs were given continuously for four weeks. The arthritis scores, toe volume, levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-17A, IL-10 and IL-13 in serum were detected; Ankle joint bone micro-structure was detected; Liver and kidney function indicators, as well as the pathological changes of liver, kidney, spleen and joints of each group of rats were detected; The mRNA and protein expression levels of LncRNA NEAT1, HMGB1, Toll-like receptor (TLR4), NF- κ B p65 in joints of rats were detected by qRT-PCR and Western blotting; HMGB1, TLR4, NF- κ B p65 protein expressions and localization in joints of rats were analyzed by immunohistochemical method. **Results** Compared with control group, ankle joint swelling and toe volume in model group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-17A in serum were significantly increased ($P < 0.001$), while levels of IL-10 and IL-13 were significantly decreased ($P < 0.001$); The ankle bone erosion was serious, bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) were significantly decreased ($P < 0.001$), and trabecular separation (Tb.Sp) was significantly increased ($P < 0.01$); The size and number of splenic lymph nodes were significantly increased, joint lumen was shrank and there was a large number of inflammatory cells infiltrated, and cartilage tissue was destroyed; The expressions of LncRNA NEAT1, HMGB1, TLR4 and NF- κ B p65 mRNA in joints were significantly increased ($P < 0.001$), and the expressions of HMGB1, TLR4 and NF- κ B p65 proteins were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with model group, the ankle swelling of rats in each administration group was significantly reduced, the arthritis score and toe volume were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-17A in serum were significantly decreased ($P < 0.001$), while the levels of IL-10 and IL-13 were significantly increased ($P < 0.001$); The surface erosion of ankle joint was alleviated to different degrees, BMD, BV/TV, Tb.Th were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), and Tb.Sp was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); Liver and kidney function indexes and pathological tests were normal; The number of lymph nodules was decreased, and the damage of joints and cartilage was obviously alleviated; The expressions of LncRNA NEAT1, HMGB1, TLR4 and NF- κ B p65 mRNA in joints were significantly decreased ($P < 0.001$), and the expressions of HMGB1, TLR4 and NF- κ B p65 proteins were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Sinomenine regulates LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 pathway, reduces joint swelling and injury, inhibits inflammatory response, and alleviates the progression of rheumatoid arthritis.

Key words: sinomenine; LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 pathway; rheumatoid arthritis; inflammatory response; immune

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性全身性自身免疫性疾病, 主要表现为关节肿胀僵硬、滑膜内增生及骨骼破坏^[1-2], 伴有外周器官损伤^[3-4]。在全球范围内, RA 影响约 1% 的人口^[5-6]。抗风湿药物、非甾体抗炎药等是目前 RA 最常用的治疗药物^[7], 但价格昂贵且具有一定不良反应, 因此, 探索新的治疗手段至关重要。近年来, 中医药被广泛应用于 RA 的治疗, 与传统药物相比, 中药治疗表现出更好的临床疗效和较少的不良反应 (包括过敏反应和胃肠道疾病)^[8]。青风藤是防己科植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 的干燥藤茎, 是一种用于治疗风湿病和关节疾病的传统中药^[9]。青风藤已被开发制成正清风痛宁注射剂和缓

释片剂等, 临床上用来治疗类风湿关节炎和其他风湿性疾病^[10]。青藤碱是从青风藤中分离的异喹啉生物碱, 其药用形式主要是盐酸盐, 分子式为 $C_{19}H_{23}NO_4$, 相对分子质量为 329.39^[11], 临床上具有较高的安全性和强大的抗炎和免疫调节作用^[12-13], 然而, 其确切的作用机制尚不完全清楚, 这在一定程度上限制了青藤碱在全球范围内的推广和应用。

长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, LncRNAs) 是一类缺乏蛋白质编码潜能且长度超过 200 个核苷酸的 RNA^[14]。已有研究证实, LncRNAs 在 RA 等自身免疫性疾病中发挥重要作用^[15-16], LncRNA 核富集转录本 1 (nuclear-enriched autosomal transcript 1, NEAT1) 通过促进类风湿关节炎成纤维

样滑膜细胞增殖、迁移、侵袭和炎性细胞因子分泌,诱导 RA 的发生^[17]。抑制 LncRNA NEAT1 的表达,可阻断高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1)-核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号传导,有效改善脂多糖刺激产生的细胞凋亡,降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 的表达,减轻炎症反应^[18]。进一步研究表明,青藤碱可以通过下调 LncRNAs 的表达,增强软骨细胞活力和细胞克隆形成能力,降低 γ 干扰素、TNF- α 的表达,抑制细胞凋亡、炎症反应,从而减轻骨关节炎软骨细胞损伤^[19]。因此,本研究通过构建胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠模型,给予青藤碱进行干预,揭示青藤碱通过调控 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 途径治疗 RA 的免疫学机制,为临床应用青藤碱靶向治疗 RA 提供一定的研究基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 Wistar 大鼠 24 只,6~8 周龄,体质量 (160 $\pm$ 10) g,购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司,许可证号 SCXK (京) 2019-0010。动物饲养于山西白求恩医院实验动物中心,常规饲养。动物实验经山西中医药大学伦理委员会批准 (批准号 AWE202302079)。

1.2 药品与试剂

青藤碱 (批号 S817690,质量分数为 97%) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司;甲氨蝶呤片 (国药准字 H31020644,批号 197221004) 购自上海上药信谊药厂有限公司;牛 II 型胶原 (批号 20022) 购自美国 Chondrex 公司;弗氏完全佐剂 (批号 F5881)、弗氏不完全佐剂 (批号 F5506) 购自美国 Sigma 公司;苏木素-伊红 (HE) 染色液 (批号 DH0006) 购自北京雷根生物技术有限公司;改良番红 O-固绿软骨染色试剂盒 (批号 G1371)、总 RNA 提取试剂盒 (批号 R1200)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 P1200)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 PC0020)、DAB 显色试剂盒 (批号 DA1010)、山羊抗兔二抗 (批号 SE134) 购自北京索莱宝科技有限公司;IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、IL-13、IL-17A ELISA 试剂盒 (批号分别为 ml064292、ml037361、ml002859、ml037371、ml107039、ml037365) 购自上海酶联生物科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶

(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、尿素 (carbonyl diamide, UREA)、尿酸 (uric acid, UA) 试剂盒 (批号分别为 105-000442-00、105-000443-00、105-000452-00、105-000476-00) 购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、肌酐 (creatinine, CRE) 试剂盒 (批号分别为 A059-2-2、C011-2-1) 购自南京建成生物工程研究所;反转录试剂盒 (批号 R2020L)、荧光定量试剂盒 (批号 S2024L) 购自 US EVERBRIGHT 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 bsm-33033M)、HMGB1 抗体 (批号 bs-55098R)、NF- κ B p65 抗体 (批号 bs-0465R) 购自北京博奥森生物技术有限公司;Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 抗体 (批号 T61519S) 购自上海艾比玛特医药科技有限公司;即用型免疫组化 UltraSensitiveTM SP 试剂盒 (批号 KIT-9730) 购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 仪器

ZH-ZZY 型足趾容积测量仪 (安徽正华生物仪器设备有限公司);ELX808 型酶标仪 (美国 BioTek 公司);BS-180 型全自动生化分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);Skyscan 1276 型 Micro-CT 扫描机 (布鲁克科学仪器香港有限公司);DM2500 型 LED 生物显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司);Light Cycler 96 型实时荧光定量 PCR 仪、734BR4160 型 ChemiDocTM 成像系统 (美国 Bio-Rad 公司);UV-1800PC 型紫外可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

雌性 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、甲氨蝶呤 (0.9 mg/kg) 组和青藤碱 (100 mg/kg)^[20]组,每组 6 只。除对照组外,其余大鼠构建 CIA 模型。大鼠适应性饲养 1 周后初次免疫,于大鼠背部三点及尾跟部两点皮内注射弗氏完全佐剂/牛 II 型胶原蛋白混合 (1:1) 乳化剂 (0.5 mL/只);7 d 后加强免疫,ip 弗氏不完全佐剂/牛 II 型胶原蛋白混合 (1:1) 乳化剂 (0.3 mL/只)。初次免疫 14 d 后,各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 生理盐水 (2.0 mL/只),1 次/d,连续给药 4 周。每周记录各组大鼠关节炎评分、足趾容积及关

节肿胀度。关节炎评分标准：0 分，正常；1 分，关节轻度红肿；2 分，关节中度红肿；3 分，足爪明显红肿；4 分，整个足部明显肿胀，关节变形，影响行动。四肢足趾评分>8 分（共 16 分）代表模型构建成功。

2.2 取材

给药结束后，各组大鼠禁食不禁水 10 h，乙醚麻醉、腹主动脉采血，于室温静置 30 min，4 ℃、2 500 r/min 离心 10 min，取上清，-80 ℃保存；分离脾脏、肝脏、肾脏、关节，一部分于 4%多聚甲醛固定，剩余部分于-80 ℃保存。

2.3 血清中炎症因子水平的检测

按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠血清中炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17A、IL-10、IL-13）的水平。

2.4 踝关节 Micro-CT 扫描

取出固定的大鼠后肢，剪去多余肌肉备用。采用 Micro-CT 扫描各组大鼠关节，CTvox 软件三维重建，CTan 分析软件对踝关节骨密度（bone mineral density, BMD）、骨体积分数（bone volume fraction, BV/TV）、骨小梁厚度（trabecular thickness, Tb.Th）、骨小梁分离度（trabecular separation/spacing, Tb.sp）进行分析。

2.5 肝、肾功能相关指标检测及肝、肾组织病理学观察

检测各组大鼠血清中 ALT、AST、ALP、CRE、

UREA、UA 水平。

大鼠肝、肾组织修块后，梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片（5 μm）。常规脱蜡脱水，经 HE 染色后，中性树胶封片，于显微镜下观察病理学变化。

2.6 脾脏、关节病理学观察

脾脏 HE 染色步骤同“2.5”项。踝关节置于多聚甲醛固定 24 h 以上，置于 EDTA 脱钙液中脱钙 5 周，每 3 天更换 1 次脱钙液，直到针可以轻松刺入且无明显阻力，说明脱钙完成。之后进行 HE 及番红 O-固绿染色。中性树胶封片，于显微镜下观察病理学变化。

2.7 qRT-PCR 检测关节中 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF-κB p65 途径核心基因 mRNA 表达

取冻存的关节组织于液氮中充分研磨，采用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，测定 RNA 浓度及纯度，-80 ℃保存。根据 HiScript III RT SuperMix for qPCR 说明书逆转录 RNA 为 cDNA。采用 qRT-PCR 检测各组大鼠关节中 LncRNA NEAT1、HMGB1、TLR4、NF-κB p65 mRNA 表达水平，构建 20 μL 反应体系：2×Realtime PCR Super mix 10 μL、cDNA 模板 2.0 μL、正、反向引物各 0.5 μL、dd H₂O 7.0 μL。反应程序：94 ℃、5 min；94 ℃、30 s，60 ℃、30 s，72 ℃、30 s，40 个循环；72 ℃、5 min，每个指标重复 3 次。以 GAPDH 为内参基因，采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	登录号	引物序列 (5'-3')	产物/bp
GAPDH	NM_017008.4	F: ATGACTCTACCCACGCAAG R: TGGGTTTCCCGTTGATGACC	75
LncRNA NEAT1	XR_005494735.2	F: ACTGCTTGACACCCCATGCC R: CGGTGATGACCACGGCTACC	100
HMGB1	NM_012963.4	F: TCCTTCGGCCTTCTTCTTGT R: CGGCCTTCTTTTCATAGGGC	152
NF-κB p65	NM_199267.2	F: GACCTGGAGCAAGCCATTAG R: CACTGTACCTGGAAGCAGA	123
TLR4	NM_019178.2	F: CCAGAGCCGTTGGTGTATCT R: CAGAGCATTGTCTCCCACT	181

2.8 Western blotting 检测关节中 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF-κB p65 途径核心蛋白表达

采用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 组织/细胞裂解液提取各组大鼠关节总蛋白，BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%脱脂牛奶，室温

摇床封闭 2 h，分别加入 GAPDH（1：5 000）、HMGB1（1：500）、NF-κB p65（1：400）、TLR4（1：1 000）一抗，4 ℃孵育过夜；加入二抗（1：15 000），室温孵育 1 h，TBST 漂洗，超敏 ECL 即用型发光底物显色，采用凝胶成像分析仪曝光显影，Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

2.9 免疫组化检测关节中 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 途径核心蛋白表达及定位

取各组大鼠关节石蜡切片,按照通用 SP 检测试剂盒说明书依次进行脱蜡、柠檬酸钠缓冲液抗原修复、过氧化氢酶灭活、非特异性抗原位点封闭,滴加 HMGB1 (1:50)、NF- κ B p65 (1:100)、TLR4 (1:50) 抗体,4 °C 孵育 12~16 h;复温后滴加二抗,37 °C 孵育 30 min,PBS 溶液冲洗;加入链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶,于 37 °C 孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染,盐酸乙醇分化,常规脱水后中性树胶封片,于显微镜下观察并拍照,采用

Image J 软件统计阳性表达区域。

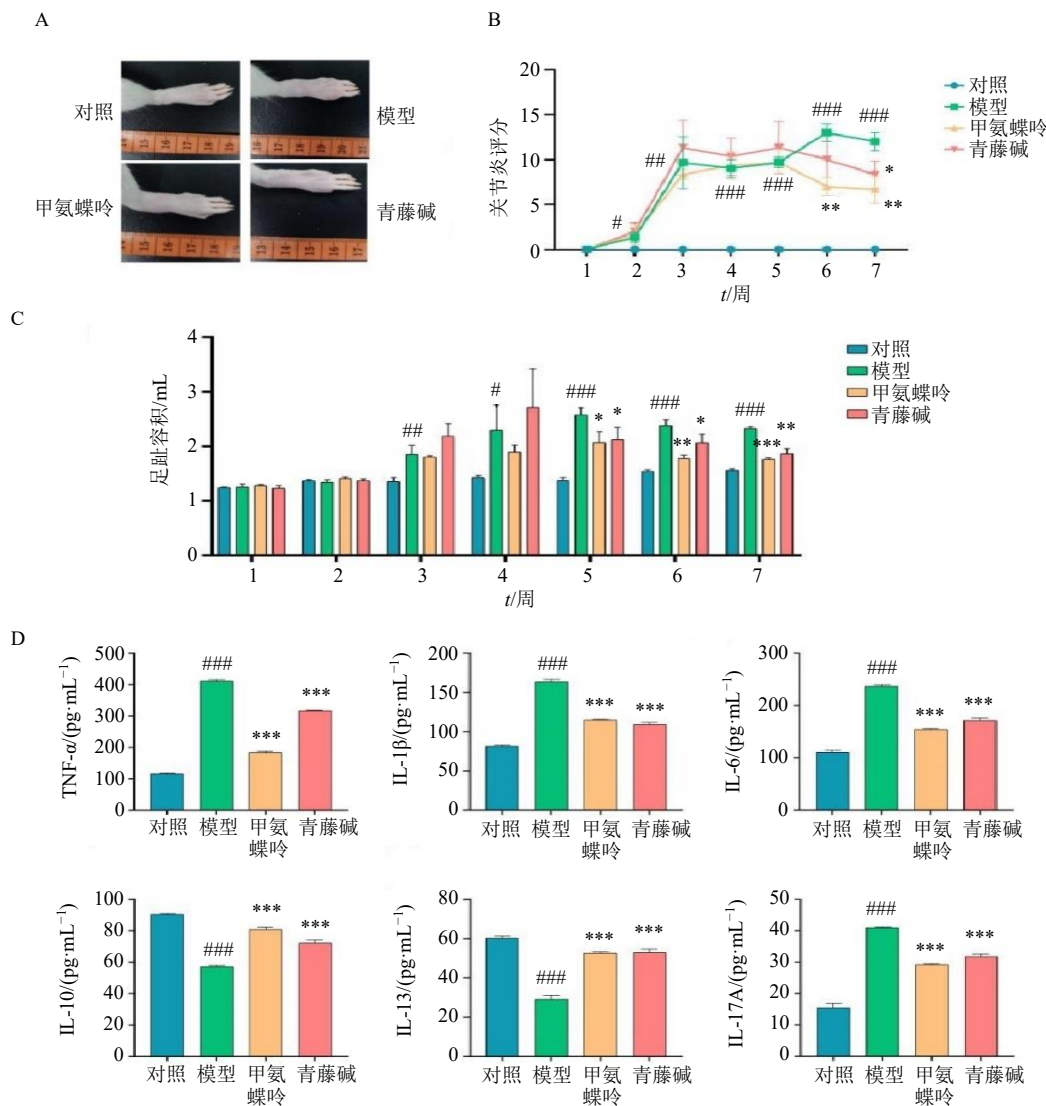
2.10 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8.0.2 软件对数据进行分析作图,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,两两比较采用独立 t 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠关节炎评分、足趾容积及血清中炎症因子水平

与对照组比较,模型组大鼠踝关节肿胀明显(图 1-A),关节炎评分和足趾容积显著升高($P < 0.05$ 、0.01、0.001,图 1-B、C),血清中 TNF- α 、IL-



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 各组大鼠关节肿胀情况 (A)、关节炎评分 (B)、足趾容积 (C) 及血清中炎症因子水平 (D) ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

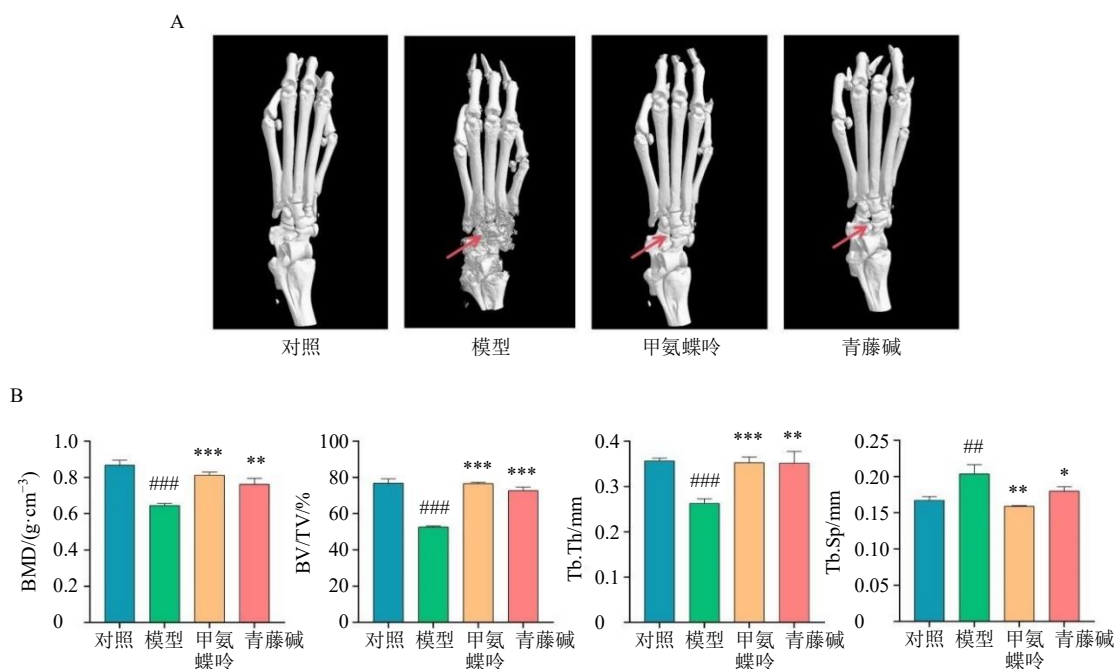
Fig. 1 Joint swelling (A), arthritis score (B), toe volume (C) and levels of inflammatory factors in serum (D) of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

1 β 、IL-6、IL-17A 水平显著升高 ($P<0.001$, 图 1-D), IL-10、IL-13 水平显著降低 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠踝关节肿胀程度明显缓解, 关节炎评分和足趾容积显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17A 水平显著降低 ($P<0.001$), IL-10、IL-13 水平显著升高 ($P<0.001$)。

3.2 各组大鼠踝关节 Micro-CT 扫描及定量分析结果

各组大鼠踝关节 Micro-CT 扫描 (图 2-A) 显

示, 对照组大鼠踝关节关节面平整光滑, 无明显缺损或磨损; 模型组大鼠踝关节有严重骨侵蚀, 关节表面出现蜂窝状侵蚀点; 与模型组比较, 各给药组大鼠关节侵蚀有不同程度的缓解。如图 2-B 所示, 与对照组比较, 模型组 BMD、BV/TV、Tb.Th 显著降低 ($P<0.001$), Tb.Sp 显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组 BMD、BV/TV、Tb.Th 显著升高 ($P<0.01$ 、0.001), Tb.Sp 显著降低 ($P<0.05$ 、0.01)。



A 图中箭头表示关节破坏位置。

Arrows in figure A indicate locations of joint destruction.

图 2 各组大鼠 Micro-CT 扫描 (A) 及定量分析 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Micro-CT scanning (A) and quantitative analysis (B) of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 各组大鼠肝、肾功能及肝、肾组织病理学变化

如图 3-A、B 所示, 各组大鼠血清中肝、肾功能相关指标 (ALT、AST、AKP、CRE、UREA、UA) 均处于正常水平。如图 3-C 所示, 各组大鼠肝细胞排列整齐, 结构完整, 肝索排列正常, 肝小叶形态完整, 无核分裂及淋巴细胞渗出, 亦无异常坏死、增生或炎性细胞浸润未见。如图 3-D 所示, 各组大鼠肾小管上皮细胞排列整齐, 肾小球体积和结构正常, 未见异常增生或炎性细胞浸润。表明青藤碱安全性较好, 对大鼠肝、肾功能无损伤。

3.4 各组大鼠关节和脾脏病理学变化

各组大鼠关节和脾脏病理学检测结果 (图 4) 显示, 对照组大鼠脾脏淋巴小结大小及数量均处于

正常范围, 无异常变化, 且关节面平整光滑, 软骨组织完整; 模型组大鼠脾脏淋巴小结大小及数量显著增加, 并且出现融合, 关节腔缩小几乎消失, 表明有大量炎性细胞浸润, 软骨组织破坏, 软骨细胞减少; 与模型组比较, 各给药组大鼠淋巴小结体积减小, 炎症减轻, 关节破坏情况明显减轻。

3.5 各组大鼠关节中 *LncRNA NEAT1*、*HMGB1*、*NF- κ B p65*、*TLR4* mRNA 表达水平

qRT-PCR 结果 (图 5) 显示, 与对照组比较, 模型组大鼠关节中 *LncRNA NEAT1*、*HMGB1*、*NF- κ B p65*、*TLR4* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠关节中 *LncRNA NEAT1*、*HMGB1*、*NF- κ B p65*、*TLR4* mRNA

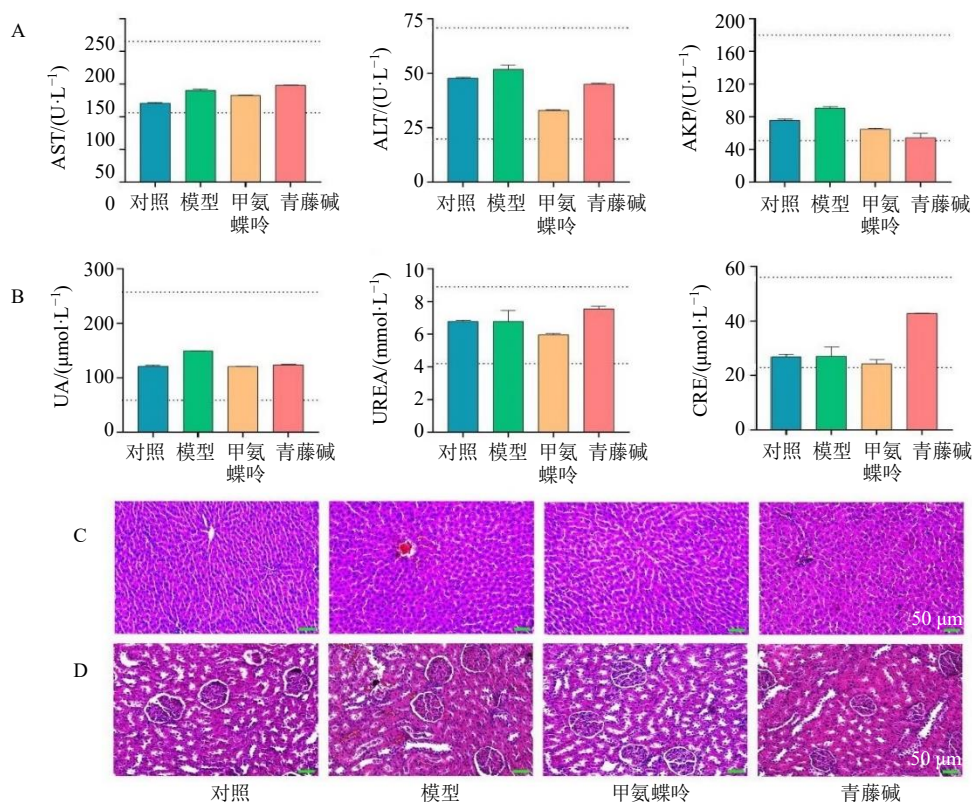
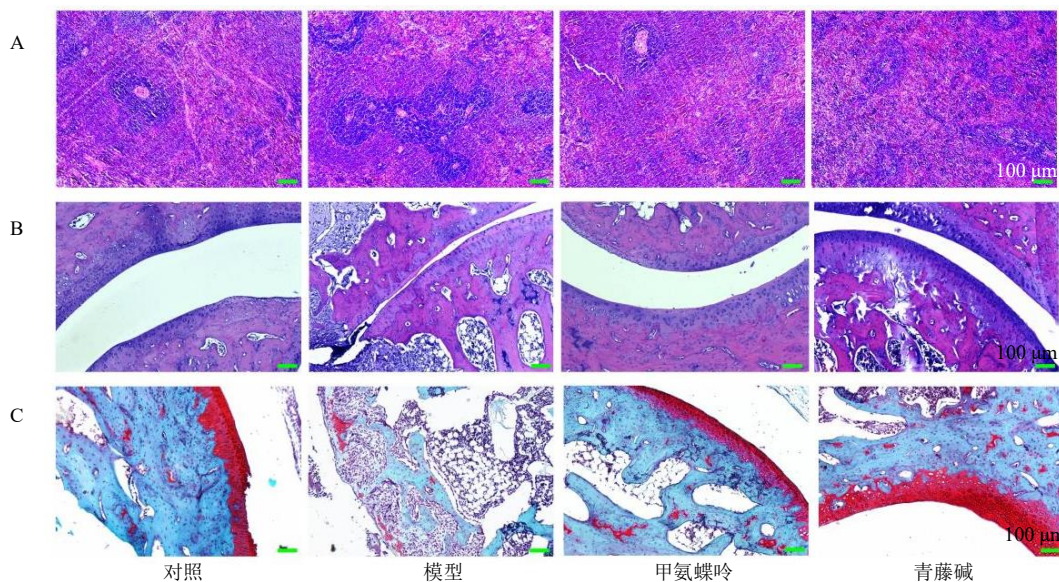


图 A、B 中虚线表示相关指标的正常值范围。

Dashed line indicates normal range of relevant indicators in figure A, B.

图 3 各组大鼠肝、肾功能 (A、B) 及肝、肾组织病理学变化 (C、D) (HE, ×20; $\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 3 Liver and renal function (A, B) and pathological changes in liver and kidney tissues (C, D) of rats in each group (HE, ×20; $\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-各组大鼠脾脏 HE 染色结果; B-各组大鼠关节 HE 染色结果; C-各组大鼠关节番红 O-固绿染色结果。

A-result of HE staining in spleen of rats in each group; B-result of HE staining of joints of rats in each group; C-result of safranin O-fast green staining of joints in each group of rats.

图 4 各组大鼠脾脏、关节病理学变化 (×10)

Fig. 4 Pathological changes of spleen and joints in rats in each group (×10)

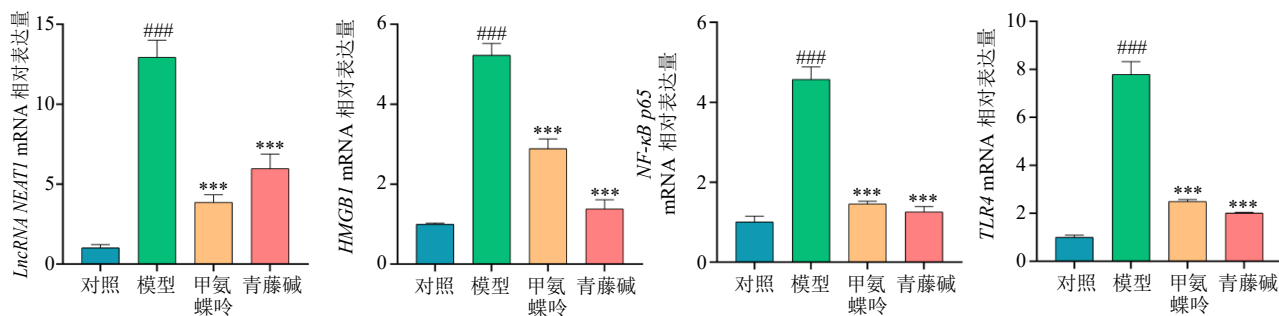


图 5 各组大鼠关节中 *LncRNA NEAT1*、*HMGB1*、*NF-κB p65*、*TLR4* mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Expressions of *LncRNA NEAT1*, *HMGB1*, *NF-κB p65* and *TLR4* mRNA in joint of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表达水平均显著降低 ($P < 0.001$)。

3.6 各组大鼠关节中 *HMGB1*、*NF-κB p65*、*TLR4* 蛋白表达水平

Western blotting 结果 (图 6) 显示, 与对照组比较, 模型组大鼠关节中 *HMGB1*、*NF-κB p65*、*TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 各给药组大鼠关节中 *HMGB1*、*TLR4*、*NF-κB p65* 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.7 各组大鼠关节中 *HMGB1*、*NF-κB p65*、*TLR4* 表达及定位分析

免疫组化结果 (图 7) 显示, 各组大鼠关节中均可检测到 *HMGB1*、*NF-κB p65*、*TLR4* 蛋白阳性表达。通过对关节腔附近阳性信号表达进行灰度值

分析, 结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠关节中 *HMGB1*、*NF-κB p65*、*TLR4* 表达显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 各给药组大鼠关节中 *HMGB1*、*NF-κB p65*、*TLR4* 表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

4 讨论

RA 作为一种自身免疫性疾病, 常伴有骨骼和软骨侵蚀, 最终可导致关节强直和畸形^[21-22], 其核心病理机制是免疫系统异常激活引发的过度免疫反应与持续炎症相互作用, 因此抑制免疫与炎症反应, 是 RA 早期诊断和靶向治疗的基础。研究发现, 青藤碱具有抗炎、抗风湿病的药理作用^[23-24]。临床上将正清风痛宁片用于类风湿关节炎患者, 治疗后, 患者关节肿胀指数、关节压痛指数及晨僵时间

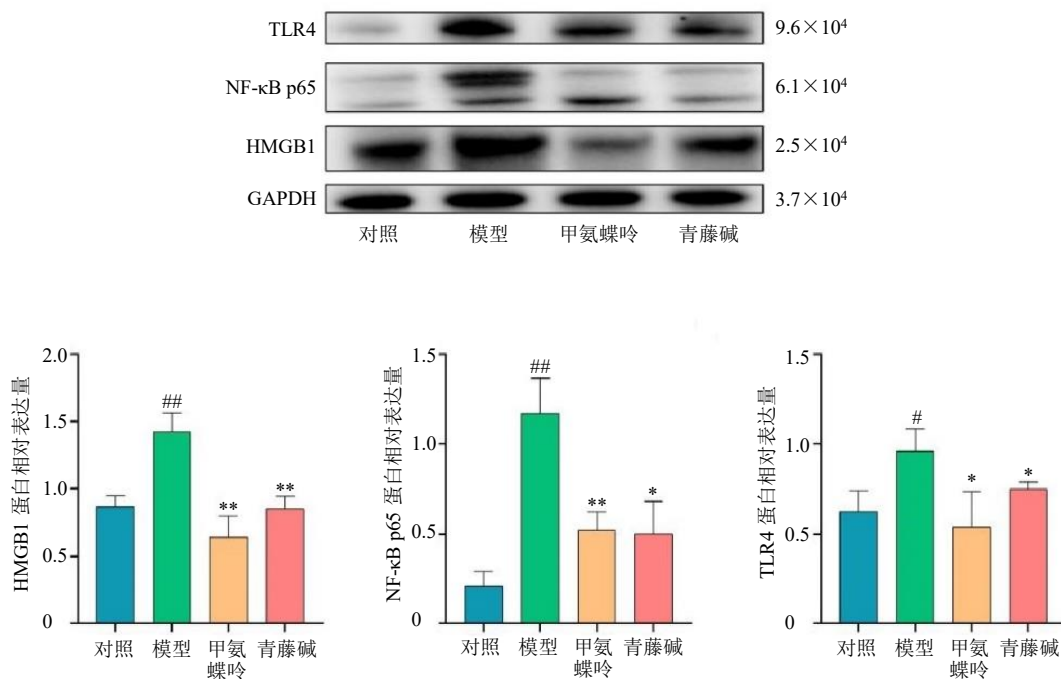


图 6 各组大鼠关节中 *HMGB1*、*NF-κB p65*、*TLR4* 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Expressions of *HMGB1*, *TLR4* and *NF-κB p65* protein in joint of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

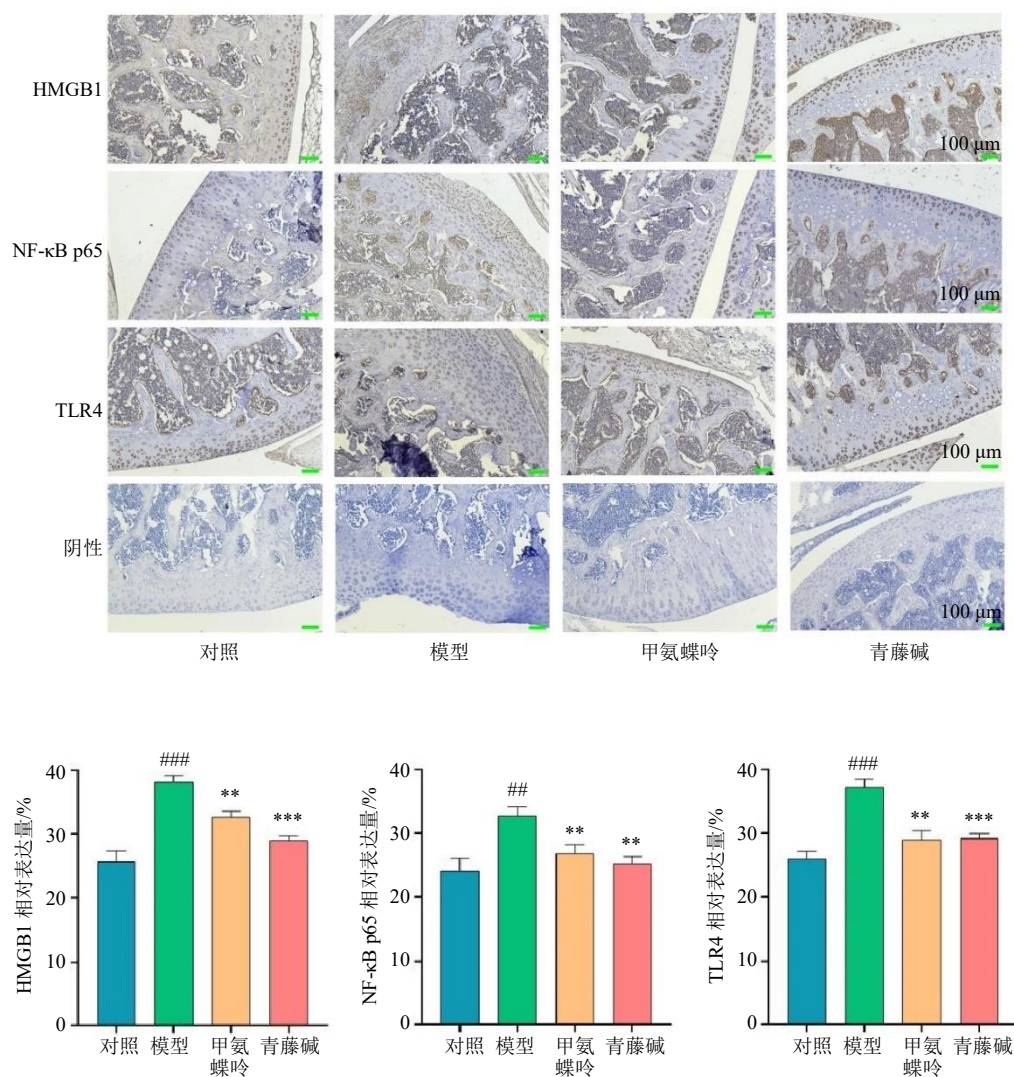


图 7 各组大鼠关节中 HMGB1、NF-κB p65、TLR4 表达及定位分析 ($\times 10$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7 Expressions and localization analysis of HMGB1, NF-κB p65, TLR4 in joints of rats in each group ($\times 10$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

均显著降低^[25-26]。在患者关节腔内注射正清风痛宁注射液,可有效改善患者血流量和滑膜厚度,缓解疼痛和炎症反应^[27]。然而,青藤碱在临床应用中存在生物利用度低、半衰期短、作用机制不明确等缺点,限制了其在临床中的广泛应用^[28]。本研究构建了 CIA 大鼠模型, CIA 大鼠关节炎评分明显上升,关节明显红肿,促炎因子水平明显升高,脾脏淋巴小结数量、体积明显增加,关节表面炎性细胞明显增加,关节及关节软骨出现明显损伤,提示 CIA 大鼠模型构建成功。

既往研究报道,青藤碱在佐剂性关节炎大鼠中发挥巨大的抗炎功能^[29],可通过改善关节炎大鼠的关节肿胀和发红,减少骨和软骨的破坏,进而减轻

炎症诱导的关节破坏性进展和关节炎症状。本研究结果显示,与模型组比较,青藤碱组大鼠关节畸形情况明显改善,关节炎评分显著降低,关节肿胀程度、充血现象明显减轻,关节轮廓趋于正常; Micro-CT 三维重建显示,青藤碱组骨侵蚀程度较模型组显著减轻,骨皮质连续完整无缺损,骨小梁排列规整致密,骨微结构完整性显著提升。在 RA 的发生过程中,炎症介质 (TNF- α 、IL-1 β 等) 聚集在关节滑膜,导致滑膜充血、增厚。研究表明,青藤碱可通过减少 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症细胞因子的释放,减轻炎症反应,并明显减轻骨和软骨的损伤^[30]。本研究结果显示,青藤碱组大鼠血清中促炎因子水平明显降低,抑炎因子水平明显升高;脾脏病理学

结果显示,脾脏淋巴小结数量明显减少,骨髓与红髓界限清晰,边缘区结构完整,炎性细胞浸润明显减少;关节病理学结果显示,青藤碱组踝关节滑膜的炎症细胞浸润显著减少,滑膜增生减轻,软骨表面更加光滑、软骨细胞数量增加,骨侵蚀显著减轻,关节面相对光滑;提示青藤碱对 CIA 大鼠有较好的治疗作用,通过降低促炎症因子表达,增加抑炎症因子的分泌,抑制机体炎症反应,减轻炎症诱导的骨关节破坏,进而有效改善 CIA 大鼠关节炎性损伤。同时各组大鼠肝、肾功能指标及肝、肾组织病理学检测正常,表明青藤碱对肝、肾功能的影响较小,具有较好的安全性。

现代药理学研究表明,多种中药单体均可通过靶向或调节 LncRNA 来影响 RA 等自身免疫性疾病^[31-32],LncRNA NEAT1 是副斑的重要组成部分,参与炎症细胞因子的分泌和免疫细胞的活化^[33]。研究发现,LncRNA NEAT1 在 RA 患者血液单核细胞和血液外泌体中显著上调^[34]。HMGB1 为 LncRNA NEAT1 的下游靶标,与正常个体相比,RA 患者血清中 HMGB1 水平显著升高^[35]。本研究结果显示,模型组大鼠关节 LncRNA NEAT1、HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平显著升高,HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平显著升高,与前期研究一致,说明 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 信号传导途径可通过介导炎症因子反应,参与 CIA 大鼠炎症反应的形成。HMGB1 广泛存在于细胞核中^[36-37],炎症反应过程中,HMGB1 高度乙酰化并从细胞核释放,与特异性识别受体 TLR4 结合,激活 NF- κ B 信号通路并放大炎症反应^[38-39]。Chen 等^[40]研究发现,通过抑制 LncRNA NEAT1 的表达,可抑制成纤维样滑膜细胞增殖,降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平,减轻 RA 滑膜炎的症状。研究表明,多种中药单体均可通过靶向抑制 LncRNA NEAT1/HMGB1 信号通路,降低 IL-6 和 TNF- α 的表达水平,调节局部或全身炎症反应^[41]。本研究结果显示,与模型组比较,青藤碱组大鼠关节中 LncRNA NEAT1、HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平显著降低,HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平显著降低。表明青藤碱可能通过靶向 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 途径,降低炎症因子表达,减轻炎症反应。

综上,青藤碱通过 LncRNA NEAT1/HMGB1-NF- κ B p65 途径,减轻 CIA 大鼠关节肿胀和损伤,

抑制炎症反应,缓解 RA 进程,为 RA 治疗提供新的靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Huang J, Fu X K, Chen X X, *et al.* Promising therapeutic targets for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 686155.
- [2] van Delft M A M, Huizinga T W J. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102392.
- [3] Figus F A, Piga M, Azzolin I, *et al.* Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(4): 102776.
- [4] Craig E, Cappelli L C. Gastrointestinal and hepatic disease in rheumatoid arthritis [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2018, 44(1): 89-111.
- [5] Sharma S D, Leung S H, Viatte S. Genetics of rheumatoid arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2024, 38(4): 101968.
- [6] Karami J, Aslani S, Jamshidi A, *et al.* Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; an updated review [J]. *Gene*, 2019, 702: 8-16.
- [7] Guo P, Huang C, Yang Q, *et al.* Advances in formulations of microneedle system for rheumatoid arthritis treatment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 7759-7784.
- [8] Wang Y, Chen S J, Du K Z, *et al.* Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114368.
- [9] 罗艳群, 沈小兰, 蔡三金, 等. 青藤碱化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(3): 898-911.
- [10] 徐易琳, 黄莉, 周莉莉, 等. 青藤碱药理作用及临床应用的研究进展 [J]. *华西药学杂志*, 2024, 39(2): 209-215.
- [11] Zhu J, Zhu H, Gao J. The anti-tumor potential of sinomenine: A narrative review [J]. *Transl Cancer Res*, 2023, 12(9): 2393-2404.
- [12] Luo J F, Zhu Y, Yu Y, *et al.* Sinomenine treats rheumatoid arthritis by inhibiting MMP9 and inflammatory cytokines expression: Bioinformatics analysis and experimental validation [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 12786.
- [13] 王霞, 赵丽, 杜庆玲, 等. 青藤碱调控 TLR4/NOX4 信号通路对心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(5): 1092-1098.
- [14] Han S, Chen X R, Huang L. The tumor therapeutic potential of long non-coding RNA delivery and targeting [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(4): 1371-1382.
- [15] Zou Y Y, Xu H S. Involvement of long noncoding RNAs

- in the pathogenesis of autoimmune diseases [J]. *J Transl Autoimmun*, 2020, 3: 100044.
- [16] Tofigh R, Hosseinpourfeizi M, Baradaran B, et al. Rheumatoid arthritis and non-coding RNAs; how to trigger inflammation [J]. *Life Sci*, 2023, 315: 121367.
- [17] Wang Y J, Hou L X, Yuan X W, et al. LncRNA NEAT1 targets fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via the miR-410-3p/YY1 axis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1975.
- [18] Zhou H C, Wang X H, Zhang B. Depression of lncRNA NEAT1 antagonizes LPS-evoked acute injury and inflammatory response in alveolar epithelial cells via HMGB1-RAGE signaling [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 8019467.
- [19] 陈晨, 郑润泉, 李宗玉. 青藤碱调控 LncRNA BLACAT1 对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(17): 2069-2073.
- [20] 石宇红, 彭琼, 任亚飞, 等. 青藤碱对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜血管新生的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(17): 1-6.
- [21] Peng Y H, Huang Y R, Li H, et al. Associations between rheumatoid arthritis and intestinal flora, with special emphasis on RA pathologic mechanisms to treatment strategies [J]. *Microb Pathog*, 2024, 188: 106563.
- [22] Nomura Y, Ishikawa H, Abe A, et al. Arthrodesis of the digital joint using intraosseous wiring in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Mod Rheumatol*, 2021, 31(1): 114-118.
- [23] Chen X, Lu C C, Duan Y W, et al. Recent advancements in drug delivery of sinomenine, A disease-modifying anti-rheumatic drug [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(12): 2820.
- [24] Lin Y, Ouyang Y, Hu M Y, et al. Multifunctional nanoparticles of sinomenine hydrochloride for treat-to-target therapy of rheumatoid arthritis via modulation of proinflammatory cytokines [J]. *J Control Release*, 2022, 348: 42-56.
- [25] 周莹莹, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 青藤碱及其新剂型治疗类风湿性关节炎的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7709-7717.
- [26] 向高, 何克剑, 尹龙, 等. 正清风痛宁治疗类风湿关节炎疗效及安全性系统评价和 GRADE 证据级别评价 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(3): 379-386.
- [27] Huang Y M, Zhuang Y, Tan Z M. Changes in rheumatoid arthritis under ultrasound before and after sinomenine injection [J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(1): 35-42.
- [28] Wang S W, Zhang L Z, Zhou Y H, et al. A review on pharmacokinetics of sinomenine and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 119: 110227.
- [29] Mu H, Yao R B, Zhao L J, et al. Sinomenine decreases MyD88 expression and improves inflammation-induced joint damage progression and symptoms in rat adjuvant-induced arthritis [J]. *Inflammation*, 2013, 36(5): 1136-1144.
- [30] Li J M, Yao Y D, Luo J F, et al. Pharmacological mechanisms of sinomenine in anti-inflammatory immunity and osteoprotection in rheumatoid arthritis: A systematic review [J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155114.
- [31] 吴丽丽, 邱志伟, 李莹莹, 等. 中医药调控 LncRNA 防治类风湿关节炎的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(7): 59-63.
- [32] Li C, Ni Y Q, Xu H, et al. Roles and mechanisms of exosomal non-coding RNAs in human health and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 383.
- [33] Hirose T, Yamazaki T, Nakagawa S. Molecular anatomy of the architectural NEAT1 noncoding RNA: The domains, interactors, and biogenesis pathway required to build phase-separated nuclear paraspeckles [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2019, 10(6): e1545.
- [34] Song J, Kim D, Han J, et al. PBMC and exosome-derived Hotair is a critical regulator and potent marker for rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Med*, 2015, 15(1): 121-126.
- [35] Zhang L H, Zhou Y Q, Jiang S Z, et al. Effects of metformin therapy on HMGB1 levels in rheumatoid arthritis patients [J]. *Eur J Med Res*, 2023, 28(1): 512.
- [36] Kaur I, Behl T, Bungau S, et al. Exploring the therapeutic promise of targeting HMGB1 in rheumatoid arthritis [J]. *Life Sci*, 2020, 258: 118164.
- [37] Chen R C, Kang R, Tang D L. The mechanism of HMGB1 secretion and release [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(2): 91-102.
- [38] Ren W X, Zhao L, Sun Y, et al. HMGB1 and Toll-like receptors: Potential therapeutic targets in autoimmune diseases [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 117.
- [39] Yang H, Wang H C, Andersson U. Targeting inflammation driven by HMGB1 [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 484.
- [40] Chen J, Luo X, Liu M, et al. Silencing long non-coding RNA NEAT1 attenuates rheumatoid arthritis via the MAPK/ERK signalling pathway by downregulating microRNA-129 and microRNA-204 [J]. *RNA Biol*, 2021, 18(5): 657-668.
- [41] Luo M, Liu Z Y, Hu Z R, et al. Quercetin improves contrast-induced acute kidney injury through the HIF-1 α /lncRNA NEAT1/HMGB1 pathway [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 889-898.