

## 芍药苷通过调控 ALOX5 表达调节铁死亡缓解类风湿性关节炎

范文强, 路依林, 张 超, 边彩月, 高 晓, 马苗苗

新乡市中心医院(新乡医学院第四临床学院)风湿免疫科, 河南 新乡 453099

**摘 要:** **目的** 探讨芍药苷通过调控花生四烯酸 5-脂氧合酶(arachidonate 5-lipoxygenase, ALOX5)表达介导铁死亡, 从而缓解类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)进展的作用机制。**方法** 通过 GeneCards 数据库获得 RA 靶点, CTD 和 SwissTargetPrediction 数据库获得芍药苷靶点, 收集 GEO 数据库 GSE77298 数据集中表达上调的差异表达基因, 对 RA 靶点、表达上调的差异表达基因与芍药苷靶点取交集, 获得交集靶点。通过 String 网站和 Cytoscape 软件获得蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 根据度值算法筛选获得靶基因 ALOX5。采用分子对接技术验证芍药苷与 ALOX5 的结合能力。将 ALOX5 的干扰 RNA(siRNA)、ALOX5 过表达质粒(oeALOX5)和阴性对照组(siNC/oeNC)转染至 RA 成纤维样滑膜细胞(RA-fibroblast like synovial cells, RA-FLS)中, 设置 siNC、siALOX5 组、对照组、芍药苷(50  $\mu\text{g/mL}$ )组、芍药苷+oeNC 组、芍药苷+oeALOX5 组。采用 CCK-8、流式细胞术和 Transwell 实验检测细胞活力、凋亡、迁移及侵袭情况; 采用 ELISA 检测炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )水平; 采用试剂盒检测  $\text{Fe}^{2+}$ 和铁含量; 采用 Western blotting 检测 ALOX5 和铁死亡相关蛋白谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)表达。**结果** ALOX5 在 RA-FLS 细胞中的表达显著高于人成纤维样滑膜细胞( $P<0.001$ )。干扰 ALOX5 抑制 RA-FLS 细胞迁移和侵袭( $P<0.001$ ), 并促进细胞凋亡( $P<0.001$ )。网络药理学分析发现 ALOX5 是芍药苷的靶基因。与对照组比较, 芍药苷显著下调 ALOX5 的表达( $P<0.001$ ), 抑制细胞活力、迁移、侵袭和炎症反应( $P<0.001$ ), 促进细胞凋亡( $P<0.001$ ), 降低  $\text{Fe}^{2+}$ 和铁含量( $P<0.001$ ), 上调 GPX4 表达( $P<0.001$ ); 过表达 ALOX5 显著逆转了芍药苷对 RA-FLS 细胞的作用( $P<0.05, 0.01, 0.001$ )。**结论** 芍药苷通过调控 ALOX5 表达介导铁死亡, 从而缓解 RA 进展, 为 RA 治疗提供了重要理论依据和新的方法。

**关键词:** 芍药苷; 花生四烯酸 5-脂氧合酶; 铁死亡; 类风湿性关节炎; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)23-8645-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.23.016

## Paeoniflorin alleviates rheumatoid arthritis by regulating ALOX5 expression to modulate ferroptosis

FAN Wenqiang, LU Yilin, ZHANG Chao, BIAN Caiyue, GAO Xiao, MA Miaomiao

Department of Rheumatology and Immunology, the Fourth Clinical College, Xinxiang Medical College, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453099, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism by which paeoniflorin alleviates the progression of rheumatoid arthritis (RA) by regulating the expression of arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5) and mediating ferroptosis. **Methods** RA targets were obtained from GeneCards database, paeoniflorin targets were obtained from CTD and SwissTargetPrediction databases, and up-regulated differentially expressed genes were collected from the GSE77298 dataset in GEO database. The intersection of RA targets, up-regulated differentially expressed genes and paeoniflorin targets was obtained. A protein-protein interaction (PPI) network was obtained through String website and Cytoscape software, and the target gene ALOX5 was screened based on the degree algorithm. Molecular docking technology was used to verify the binding ability of paeoniflorin with ALOX5. ALOX5 interfering RNA (siRNA), ALOX5 overexpression plasmid (oeALOX5) and negative control group (siNC/oeNC) were transfected into RA-fibroblast like synovial cells (RA-FLS), siNC, siALOX5 group, control group, paeoniflorin (50  $\mu\text{g/mL}$ ) group, paeoniflorin + oeNC group, and paeoniflorin +

收稿日期: 2025-08-22

基金项目: 河南省科技攻关项目(242102310010); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20230890); 河南省高等学校重点科研项目(26B310003)

作者简介: 范文强, 硕士, 副主任医师, 从事类风湿性关节炎机制研究。Tel: 18637373010 E-mail: fwq.1125@163.com

oeALOX5 group were set up. Cell viability, apoptosis, migration and invasion were detected using CCK-8, flow cytometry and Transwell assays; ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); Kit was used to detect Fe<sup>2+</sup> and iron contents; Western blotting was used to detect the expressions of ALOX5 and ferroptosis associated protein glutathione peroxidase 4 (GPX4). **Results** The expression of ALOX5 in RA-FLS cells was significantly higher than that in human fibroblast like synovial cells ( $P < 0.001$ ). Interference with ALOX5 inhibited migration and invasion of RA-FLS cells ( $P < 0.001$ ), and promoted cell apoptosis ( $P < 0.001$ ). Network pharmacology analysis revealed that ALOX5 was the target gene of paeoniflorin. Compared with control group, paeoniflorin significantly down-regulated the expression of ALOX5 ( $P < 0.001$ ), inhibited cell viability, migration, invasion and inflammatory response ( $P < 0.001$ ), promoted cell apoptosis ( $P < 0.001$ ), reduced Fe<sup>2+</sup> and iron contents ( $P < 0.001$ ), and up-regulated GPX4 expression ( $P < 0.001$ ); Overexpression of ALOX5 significantly reversed the effect of paeoniflorin on RA-FLS cells ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). **Conclusion** Paeoniflorin mediates ferroptosis by regulating ALOX5 expression, thereby alleviating the progression of RA and providing important theoretical basis and new methods for RA treatment.

**Key words:** paeoniflorin; arachidonate 5-lipoxygenase; ferroptosis; rheumatoid arthritis; inflammation

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以慢性滑膜炎、进行性关节破坏和系统性炎症为特征的自身免疫性疾病, 致残率高且根治手段有限。目前临床治疗主要依赖非甾体抗炎药、免疫抑制剂及生物制剂, 但长期使用易引发感染、肝肾毒性或耐药性<sup>[1-2]</sup>。因此, 迫切需要寻找新的治疗方法。芍药苷是从传统抗风湿中药芍药中提取的单萜苷类活性成分, 具有明确的抗炎、抗氧化应激、免疫调节及关节保护作用<sup>[3-4]</sup>。芍药苷被广泛用于缓解 RA 患者的关节炎症, 其抗炎特性有助于减轻疼痛和肿胀。同时, 芍药苷被认为是一种相对安全的药物选择, 适用于对常规治疗或生物制剂出现不良反应的患者<sup>[5]</sup>。

花生四烯酸 5-脂氧合酶 (arachidonate 5-lipoxygenase, ALOX5) 是催化花生四烯酸代谢生成白三烯 (如白三烯 B<sub>4</sub>、白三烯 C<sub>4</sub>) 的关键酶, 参与炎症反应、细胞凋亡、铁死亡等多种生理及病理过程<sup>[6-7]</sup>。研究发现, 槲皮素通过调节脓毒症中的 ALOX5/磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路, 减轻脂多糖诱导的心肌损伤<sup>[8]</sup>。也有研究发现, ALOX5 驱动 RA 中 CD4<sup>+</sup>T 细胞的焦亡和组织炎症<sup>[9]</sup>。通过网络药理学分析发现 ALOX5 是芍药苷治疗 RA 的潜在作用靶点, 但芍药苷是否通过调控 ALOX5 介导铁死亡进而缓解 RA 进展尚不明确, 亟需深入探索。因此, 本研究旨在探究芍药苷靶向调控 ALOX5 表达介导铁死亡和 RA 进展的影响, 为芍药苷治疗 RA 提供新的思路。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人成纤维样滑膜细胞 (human fibroblast like

synovial cells, H-FLS) 和类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞 (RA-FLS) 细胞购自上海雅吉生物科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

芍药苷 (批号 P0038, 质量分数  $\geq 98\%$ )、Transwell 小室 (批号 CLS3422)、Matrigel 基质胶 (批号 CLS354234) 购自美国默克公司; DMEM 培养基 (批号 12491015)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 10099141C)、TRIzol 试剂 (批号 15596026CN)、转染试剂 (批号 18324010) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 胰蛋白酶 (批号 T1300)、CCK-8 试剂盒 (批号 CA1210)、Fe<sup>2+</sup>检测试剂盒 (批号 CA1530)、铁含量检测试剂盒 (批号 BC5310) 购自北京索莱宝科技有限公司; 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (批号 CB10373-Hu)、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (批号 CB10347-Hu)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒 (批号 CB11762-Hu) 购自上海科艾博生物技术有限公司; 蛋白提取试剂盒 (批号 R0018S)、AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 C1062M) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 青霉素-链霉素 (批号 60162ES76) 购自上海翌圣生物科技有限公司; ALOX5 抗体 (稀释比例 1:600, 批号 FNab00007) 购自武汉菲恩生物科技有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体 (稀释比例 1:1 000, 批号 ab125066)、 $\beta$ -actin 抗体 (稀释比例 1:1 000, 批号 ab8226) 购自英国 Abcam 公司; 本研究所有的 siRNA 和过表达质粒均由和源生物技术有限公司设计并合成, siALOX5 上游引物 5'-CAAUUCAAUUACUAUUGAAUG-3', 下游引物 5'-UUCAUAGUAAUUGAAUUGGG-3'。

### 1.3 仪器

A28137 型实时定量 PCR 仪、B1A-BP 型电泳仪、A51119500C 型酶标仪、A44115 型凝胶成像分析仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CytoFLEX 型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司); BZ-X1000 型倒置显微镜(基恩士有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

以“paeoniflorin”为关键词在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得其结构的 SMILES 格式, 在 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 收集相关靶点; 在 CTD 数据库(<https://ctdbase.org/>) 以“paeoniflorin”为关键词获得靶点, 合并去重后, 获得芍药苷靶点。以“rheumatoid arthritis”为检索词, 在 GeneCards 数据库(<https://GeneCard.org/>) 中收集 RA 疾病相关靶点。

在 GEO 数据库 GSE77298 数据集(样本为 16 个 RA 晚期患者滑膜组织与 7 个健康对照组滑膜组织)中, 以  $P < 0.05$ 、 $|\log_2$  差异倍数(fold change, FC)|  $> 0$  为筛选条件获得表达上调的差异表达基因(up-regulated differentially expressed, Up-DEGs)。通过 Venn 数据库(<https://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) 将收集的芍药苷、RA 靶点和 Up-DEGs 取交集, 获得芍药苷治疗 RA 的靶点。

### 2.2 分子对接验证

通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得芍药苷结构, 通过 RCSB 网站(<https://www1.rcsb.org/>) 获得受体蛋白 ALOX5 结构(7TTK)。利用 PYMOL2.0.7 软件将受体蛋白和小分子配体进行去水处理, 使用 AutoDockTools 1.5.7 软件对受体蛋白和小分子进行对接(设置 Grid Box 参数为 size\_x=123.2, size\_y=123.2, size\_z=121.2), 使用 PYMOL 软件对分子对接结果进行可视化。

### 2.3 细胞培养与处理

细胞用含 10% FBS 和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。将细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔接种到 6 孔板中, 待细胞密度为 70%~80%时, 使用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 作为转染试剂, 按照说明书将 siNC、oeNC、siALOX5 和 ALOX5 过表达质粒 oeALOX5 转染至 RA-FLS 细胞中。

取对数生长期的 RA-FLS 细胞, 以  $1 \times 10^4$  个/孔

接种于 96 孔板中, 培养过夜。设置对照组、芍药苷组、芍药苷+oeNC 组、芍药苷+oeALOX5 组, 对照组加入不含药物的培养基; 芍药苷组加入 50  $\mu\text{g/mL}$  芍药苷<sup>[10]</sup>处理 24 h; 芍药苷+oeNC 组转染空载体, 并加入 50  $\mu\text{g/mL}$  芍药苷处理 24 h; 芍药苷+oeALOX5 组转染过表达 ALOX5, 并加入 50  $\mu\text{g/mL}$  芍药苷处理 24 h。

### 2.4 Western blotting 检测 ALOX5 和 GPX4 蛋白表达

按“2.3”项下处理后, 离心收集细胞沉淀, 加入 RIPA 裂解液进行裂解, 提取总蛋白并测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后, 孵育一抗和二抗, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 通过凝胶成像分析仪采集图像。

### 2.5 CCK-8 测定细胞活力

按“2.3”项下处理后, 加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 37 °C 孵育 1.5 h, 采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)值。

### 2.6 细胞凋亡测定

按“2.3”项下处理后, 各组取 1 mL 细胞悬液( $2 \times 10^5$  个/mL), 离心收集细胞沉淀, 加入 400  $\mu\text{L}$  结合缓冲液重悬, 加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 10  $\mu\text{L}$  PI (20  $\mu\text{g/mL}$ ), 避光孵育 1 h。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 2.7 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭

通过预先未包被或包被 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室评估细胞迁移和侵袭能力。按“2.3”项下处理后, 收集细胞, 用无血清培养基重悬, 将细胞密度调整为  $1 \times 10^5$  个/mL。Transwell 小室内接种细胞悬液, 下室加入含 10% FBS 的培养基, 培养 24 h, 用结晶紫进行染色。于显微镜下观察并拍照, 计数迁移和侵袭的细胞数量。

### 2.8 ELISA 检测炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平

按“2.3”项下处理后, 收集各组细胞,  $1000 \times g$  离心 20 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平。

### 2.9 Fe<sup>2+</sup>和铁含量的检测

按“2.3”项下处理后, 收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书测定 Fe<sup>2+</sup>水平; 收集细胞裂解液, 按照试剂盒说明书测定铁含量。

### 2.10 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 21.0 软件进行统

计分析, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 两组间比较则运用独立样本 *t* 检验。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学获得芍药苷治疗 RA 的靶点

通过 GeneCards 数据库获得 RA 靶点 6 704 个。CTD 数据库获得 37 个芍药苷靶点, Swisstarget prediction 数据库获得 106 个芍药苷靶点, 合并去重后获得 142 个芍药苷靶点。对 RA 靶点、芍药苷靶点和 Up-DEGs 取交集, 共获得 19 个交集靶点 (图 1), 结合文献检索筛选获得靶基因 ALOX5。

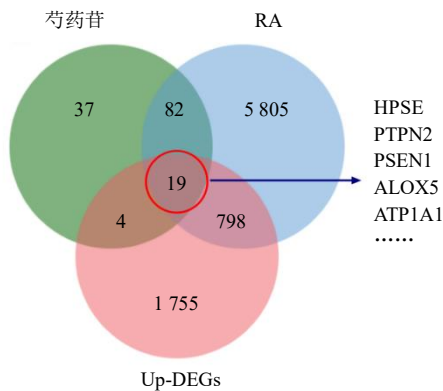


图 1 芍药苷治疗 RA 靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of targets of paeoniflorin in treatment of RA

#### 3.2 干扰 ALOX5 降低 RA-FLS 细胞活力并促进细胞凋亡

如图 2 所示, RA-FLS 细胞中 ALOX5 蛋白表达水平显著高于 H-FLS ( $P < 0.01$ )。干扰 ALOX5 后, ALOX5 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ , 图 3-A), 细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ , 图 3-B), 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.001$ , 图 3-C)。

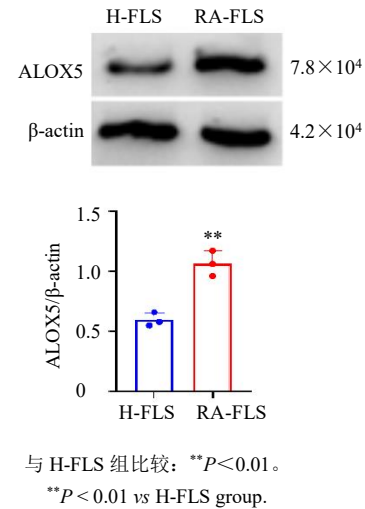


图 2 H-FLS 和 RA-FLS 细胞中 ALOX5 蛋白表达  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 ALOX5 protein expression in H-FLS and RA-FLS cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

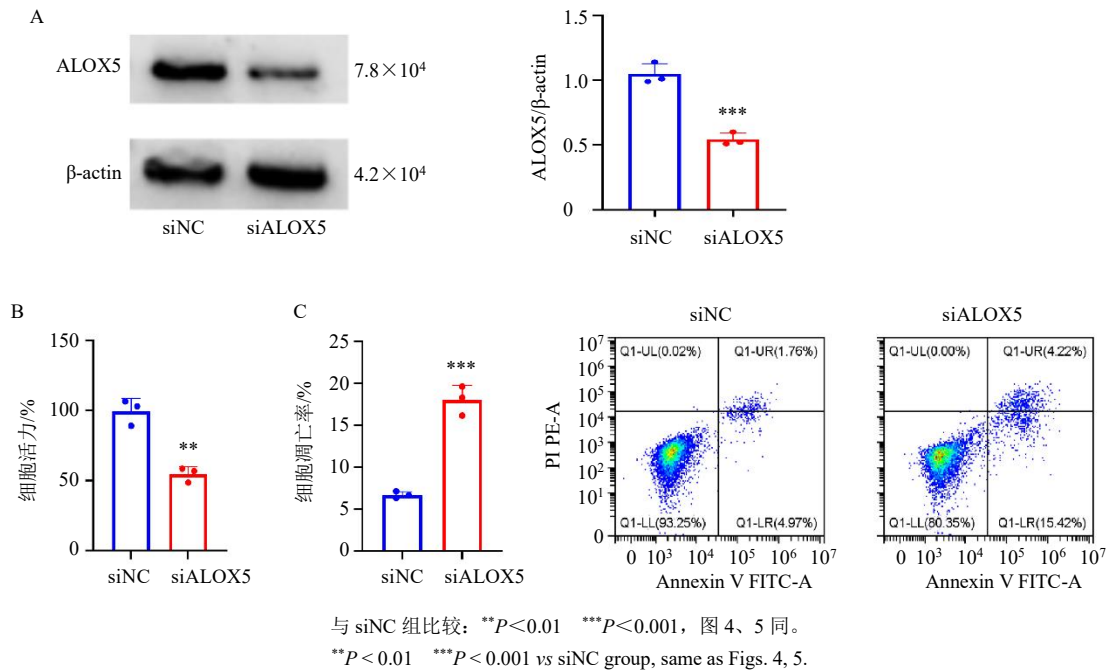


图 3 干扰 ALOX5 对 RA-FLS 细胞 ALOX5 蛋白表达 (A)、细胞活力 (B) 和凋亡 (C) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of interference with ALOX5 (siALOX5) on ALOX5 protein expression (A), cell viability (B) and apoptosis (C) of RA-FLS cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 干扰 ALOX5 抑制 RA-FLS 细胞迁移和侵袭

如图 4 所示, 干扰 ALOX5 后, 迁移和侵袭细胞数均显著减少 ( $P < 0.001$ )。

### 3.4 干扰 ALOX5 抑制 RA-FLS 细胞炎症反应和铁死亡

干扰 ALOX5 后, 细胞中 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.001$ , 图 5-A), Fe<sup>2+</sup>和铁含量显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001, 图 5-B、C), GPX4

蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ , 图 5-D)。

### 3.5 过表达 ALOX5 逆转芍药苷对 RA-FLS 细胞活力和凋亡的影响

通过 PubChem 获得芍药苷 3D 结构的 PDB 格式, Uniport 获得 ALOX5 的蛋白结构, 通过 PYMOL 软件进行去水处理。通过 Autodock 软件将芍药苷与 ALOX5 进行分子对接 (图 6), 结合能为 -7.6 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol)。

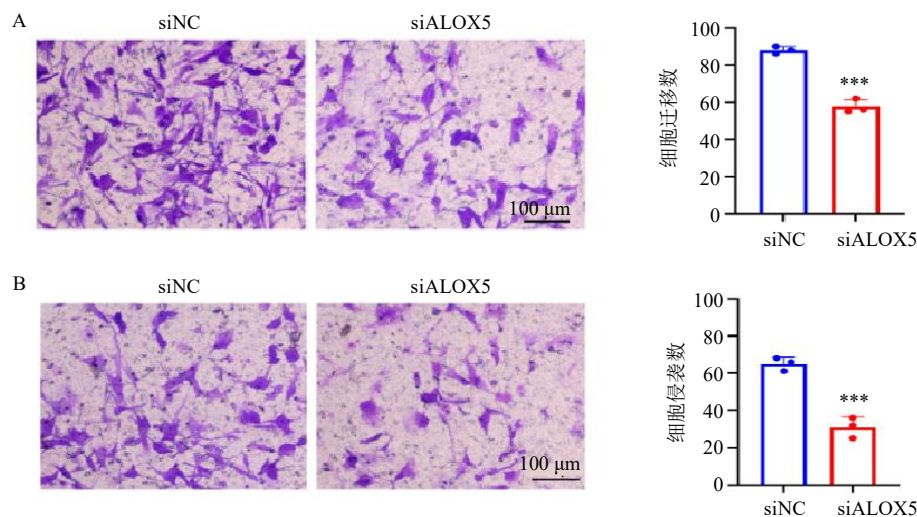
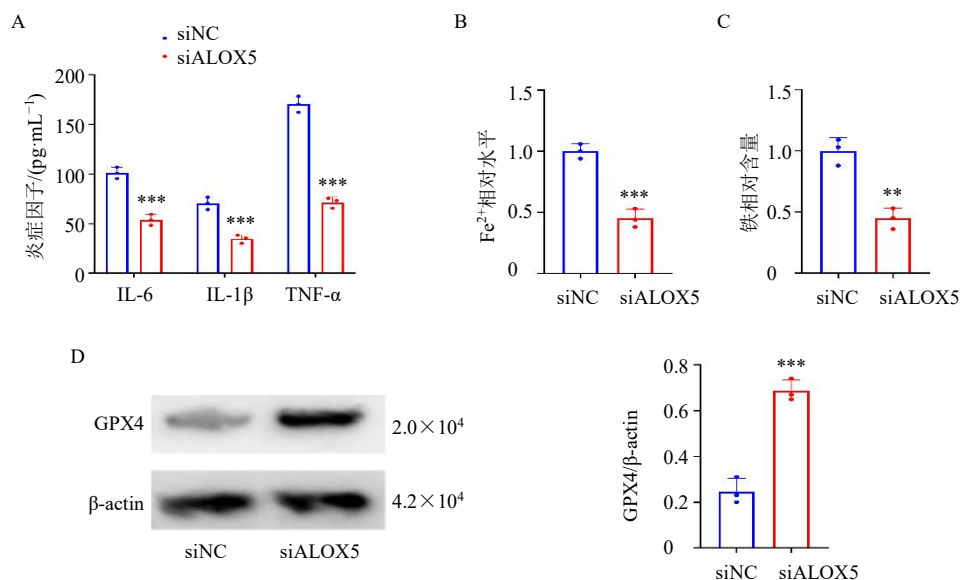


图 4 干扰 ALOX5 对 RA-FLS 细胞迁移 (A) 和侵袭 (B) 的影响 ( $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 4 Effect of siALOX5 on migration (A) and invasion (B) of RA-FLS cells ( $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

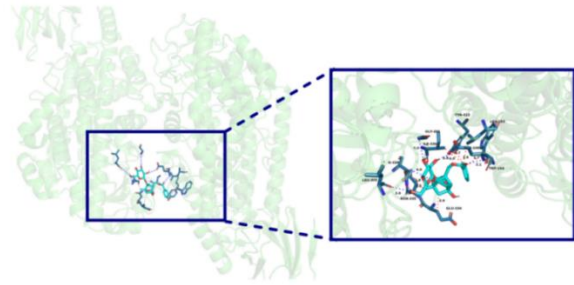


A-炎症因子水平; B-Fe<sup>2+</sup>水平; C-铁含量; D-GPX4 蛋白表达。

A-inflammatory factor levels; B-Fe<sup>2+</sup> level; C-iron content; D-GPX4 protein expression.

图 5 干扰 ALOX5 对 RA-FLS 细胞炎症反应和铁死亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 5 Effect of siALOX5 on inflammatory response and ferroptosis of RA-FLS cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



绿色部分表示 ALOX5 蛋白, 青色部分表示芍药苷, 蓝色键为氢键, 红色虚线表示疏水相互作用。

Green part represents ALOX5 protein, cyan part represents paeoniflorin, blue bonds are hydrogen bonds, and red dashed lines denote hydrophobic interactions.

图 6 芍药苷与 ALOX5 的分子对接图

Fig. 6 Molecular docking diagram of paeoniflorin and ALOX5

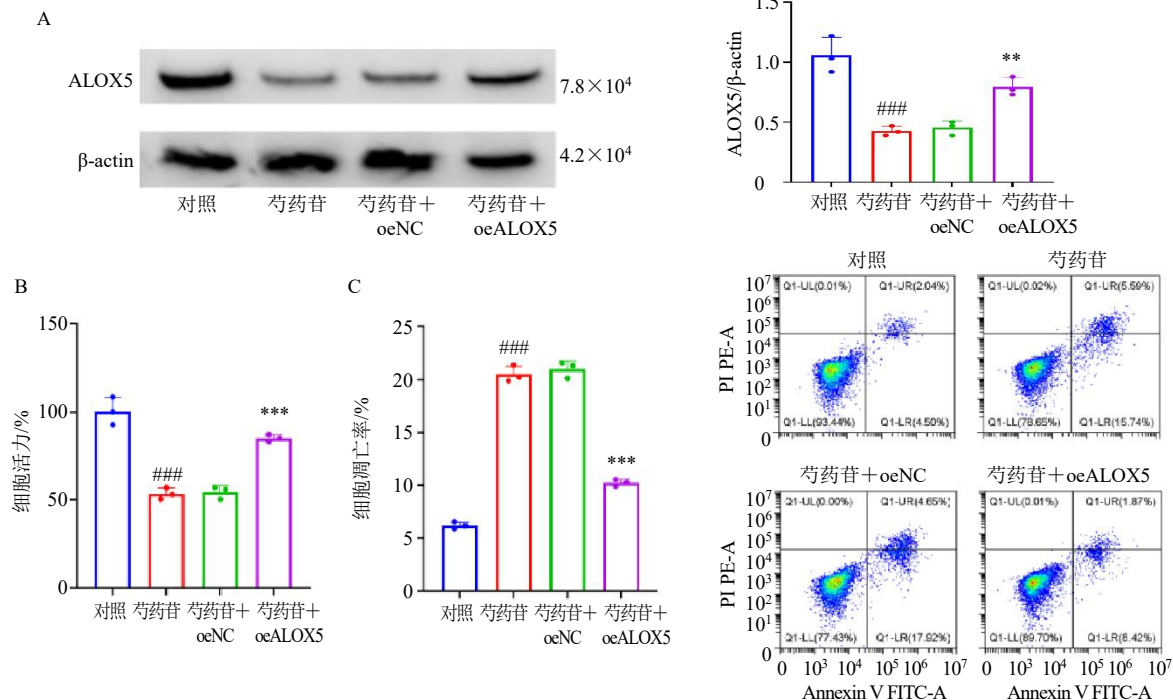


图 7 过表达 ALOX5 逆转芍药苷对 RA-FLS 细胞 ALOX5 蛋白表达 (A)、细胞活力 (B) 和凋亡 (C) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Overexpression of ALOX5 reverses effects of paeoniflorin on ALOX5 protein expression (A), cell viability (B) and apoptosis (C) in RA-FLS cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.7 过表达 ALOX5 逆转芍药苷对 RA-FLS 细胞炎症反应和铁死亡的影响

与对照组比较, 芍药苷处理后细胞中 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.001$ , 图 9-A), Fe<sup>2+</sup> 和铁含量显著降低 ( $P < 0.001$ , 图 9-B、C),

将 oeNC、oeALOX5 转染至细胞, 并给予芍药苷处理, 结果显示, 与对照组比较, 芍药苷处理后细胞中 ALOX5 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ , 图 7-A), 细胞活力显著降低 ( $P < 0.001$ ), 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与芍药苷组比较, 过表达 ALOX5 后 ALOX5 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 细胞活力显著升高 ( $P < 0.001$ ), 细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.001$ )。

### 3.6 过表达 ALOX5 逆转芍药苷对 RA-FLS 细胞迁移和侵袭的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 芍药苷处理后迁移和侵袭细胞数显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与芍药苷组比较, 过表达 ALOX5 后迁移和侵袭细胞数显著增加 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

GPX4 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ , 图 9-D); 与芍药苷组比较, 过表达 ALOX5 后细胞中 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), Fe<sup>2+</sup> 和铁含量显著升高 ( $P < 0.01$ 、0.001), GPX4 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。



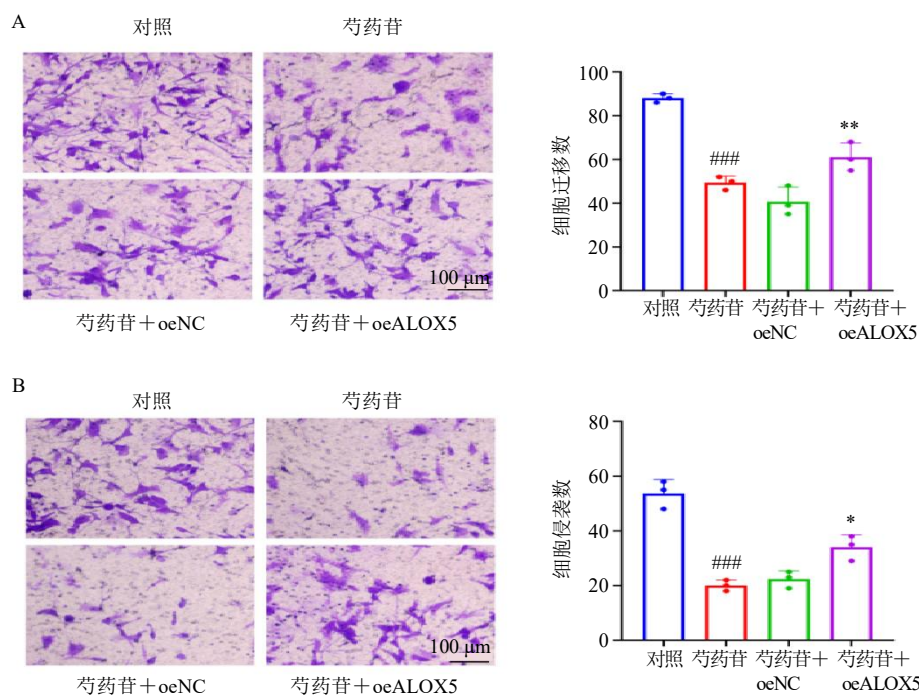
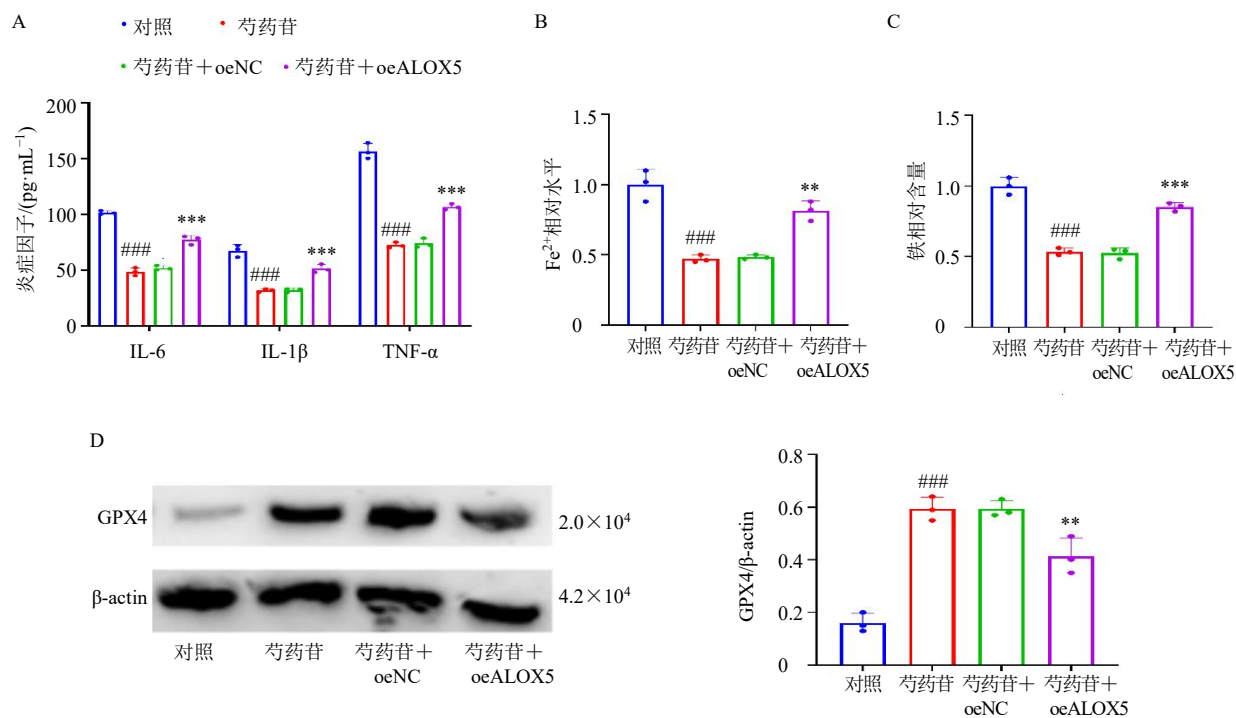


图 8 过表达 ALOX5 逆转芍药苷对 RA-FLS 细胞迁移 (A) 和侵袭 (B) 的影响 ( $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 8 Overexpression of ALOX5 reverses effects of paeoniflorin on migration(A) and invasion (B) of RA-FLS cells ( $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



A-炎症因子水平; B-Fe<sup>2+</sup>水平; C-铁含量; D-GPX4 蛋白表达。

A-inflammatory factor levels; B-Fe<sup>2+</sup> level; C-iron content; D-GPX4 protein expression.

图 9 过表达 ALOX5 逆转芍药苷对 RA-FLS 细胞炎症反应和铁死亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 9 Overexpression of ALOX5 reverses effects of paeoniflorin on inflammation response and ferroptosis in RA-FLS cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

## 4 讨论

RA 是一种以对称性多关节炎为特征的慢性自身免疫性疾病,是全球主要的公共卫生挑战之一<sup>[11]</sup>。RA 的病因尚未完全明确,但通常涉及遗传易感性、环境暴露、微生物感染和免疫调节异常之间的复杂相互作用<sup>[12-13]</sup>。RA 的治疗包括非甾体抗炎药、糖皮质激素、传统合成改善病情抗风湿药、关节置换术等<sup>[14-16]</sup>。但因不良反应、个体差异以及成本高昂的因素,这些治疗方案往往不被列为首选<sup>[17-19]</sup>。因此,寻找一种安全、有效且经济的方法来控制 RA 引起的关节损伤,已成为治疗 RA 的重要目标。

近年来,芍药苷抗 RA 的研究取得显著进展, Yang 等<sup>[10]</sup>研究发现,芍药苷通过下调 hsa\_circ\_009012 抑制 RA-FLS 细胞的炎症反应。也有研究发现芍药苷联合甲蝶呤通过抑制核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路的激活,下调环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 表达,改善 RA 大鼠足关节病理损伤<sup>[20]</sup>。本研究基于网络药理学和分子对接的方法探索芍药苷治疗 RA 的靶点,通过 Venn 图获得芍药苷治疗 RA 的新靶点 ALOX5,分子对接结果显示,芍药苷与 ALOX5 具有较强的结合能力。但目前尚未有文献报道芍药苷与 ALOX5 之间的作用。

ALOX5 参与多种疾病进展<sup>[21-22]</sup>。本研究发现 ALOX5 在 RA-FLS 细胞中高表达,干扰 ALOX5 后促进了 RA-FLS 细胞凋亡,抑制了 RA-FLS 细胞细胞迁移、侵袭、炎症反应。此外,干扰 ALOX5 后显著抑制细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  和铁含量,促进铁死亡相关蛋白 GPX4 的表达,从而抑制 RA-FLS 细胞铁死亡。进一步通过过表达 ALOX5 探讨芍药苷是否通过调控 ALOX5 表达改善 RA,结果显示,芍药苷显著下调 ALOX5 表达,降低细胞活力,提高细胞凋亡率,抑制细胞迁移和侵袭能力,抑制细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  和铁含量,促进 GPX4 表达,抑制炎症反应。而过表达 ALOX5 后显著逆转了芍药苷对 RA-FLS 细胞的作用。这一发现为针对芍药苷治疗 RA 提供了潜在的靶点。

但本研究仍存在一定局限性:①本研究仅基于 RA-FLS 细胞层面展开,未在动物模型中验证 ALOX5 及芍药苷的体内作用。细胞实验虽能反映特定分子的直接效应,但 RA 是涉及多因素参与的全身性疾病,ALOX5 在体内复杂病理环境中的表

达调控及芍药苷的靶向性、药效持续性等,仍需体内实验进一步确认。②本研究未纳入 RA 患者的临床样本验证,难以直接为芍药苷的临床应用提供循证依据。③本研究虽证实 ALOX5 可影响 RA-FLS 的活力、凋亡、铁死亡等生物学行为,且芍药苷通过调控 ALOX5 发挥作用,但未深入探讨 ALOX5 介导这些效应的下游分子机制。后续研究需结合动物模型、临床样本及多组学分析,进一步完善 ALOX5 的分子调控网络及芍药苷的体内作用机制,为其临床转化提供更充分的理论支持。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Radu A F, Bungau S G. Management of rheumatoid arthritis: An overview [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2857.
- [2] He J, Maharaj A B. Highlights of advancement in Rheumatoid Arthritis research and clinical practice [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2025, 39(1): 102040.
- [3] Hu Z Y, Wang X, Shi T, et al. Paeoniflorin alleviates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and depression through the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Antioxidants*, 2025, 14(5): 585.
- [4] 程泽芳, 刘波, 沈长虹, 等. 芍药苷抗氧化应激研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(12): 4499-4515.
- [5] 杨帆, 沈俊逸, 蔡辉. 芍药苷上调 lncRNA MALAT1 抑制 Wnt1/ $\beta$ -catenin 通路促进人类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞凋亡 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38(8): 692-698.
- [6] Chen X, Xie H, Liu Y, et al. Interference of ALOX5 alleviates inflammation and fibrosis in high glucose-induced renal mesangial cells [J]. *Exp Ther Med*, 2023, 25(1): 34.
- [7] Fang W X, Hu Z F, Shen B, et al. Downregulation of Alox5 inhibits ferroptosis to improve doxorubicin-induced cardiotoxicity via the P53/SLC7A11 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2025, 29(11): e70641.
- [8] Guan F, Du H S, Li J K, et al. Quercetin alleviates LPS-stimulated myocardial injury through regulating ALOX5/PI3K/AKT pathway in sepsis [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2024, 24(10): 1116-1124.
- [9] Cai H, Zhang J H, Xu H, et al. ALOX5 drives the pyroptosis of CD4<sup>+</sup> T cells and tissue inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Sci Signal*, 2024, 17(825): eadh1178.
- [10] Yang J P, Wei Z H, Li H Y, et al. Paeoniflorin inhibits the inflammation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by downregulating hsa\_circ\_009012 [J].



- Heliyon*, 2024, 10(9): e30555.
- [11] DI Matteo A, Emery P. Rheumatoid arthritis: A review of the key clinical features and ongoing challenges of the disease [J]. *Paininerva Med*, 2024, 66(4): 427-442.
- [12] Jin H M, Wang G, Lu Q C, *et al.* Pathophysiology of myopenia in rheumatoid arthritis [J]. *Bone Res*, 2025, 13(1): 64.
- [13] Caliozna L, Berni M, Torriani C, *et al.* Pathogenesis of osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and hemophilic arthropathy: The role of angiogenesis [J]. *Haemophilia*, 2024, 30(6): 1256-1264.
- [14] Babiker-Mohamed M H, Bhandari S, Ranganathan P. Pharmacogenetics of therapies in rheumatoid arthritis: An update [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2024, 38(4): 101974.
- [15] Nguyen T D, Abreu H, Tommasi N, *et al.* Calcium signaling dysregulation in rheumatoid arthritis: A comparative perspective with osteoarthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2025, 24(12): 103923.
- [16] Fautrel B, Kedra J, Rempenault C, *et al.* 2024 update of the recommendations of the French Society of Rheumatology for the diagnosis and management of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2024, 91(6): 105790.
- [17] Kirkham-Wilson F, Dennison E. Osteoporosis and rheumatoid arthritis: A review of current understanding and practice [J]. *Br J Hosp Med*, 2024, 85(11): 1-11.
- [18] Shakeel L, Shaukat A, Khaliq N, *et al.* Rheumatoid arthritis: A comprehensive overview of genetic markers, emerging therapies, and personalized medicine [J]. *Ann Med Surg*, 2025, 87(2): 696-710.
- [19] Sendaydiego X, Gold L S, Dubreuil M, *et al.* Use of biologic or targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs and cancer risk [J]. *JAMA Netw Open*, 2024, 7(11): e2446336.
- [20] 李瑾. 白芍药苷联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎作用及机制研究 [J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2025, 39(3): 224-229.
- [21] 欧阳秀芳, 赵宁, 付尚淼, 等. 肾缺血再灌注致肺损伤关键基因 *Alox5ap* 的筛选及其表达与功能验证 [J]. 南昌大学学报: 医学版, 2023, 63(6): 8-14.
- [22] Chen T, Liu J G, Wang C C, *et al.* ALOX5 contributes to glioma progression by promoting 5-HETE-mediated immunosuppressive M2 polarization and PD-L1 expression of glioma-associated microglia/macrophages [J]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(8): e009492.

[责任编辑 李亚楠]