

基于滑膜液与血清代谢组学探究马钱子碱载药微针对胶原诱导性关节炎大鼠的代谢调控机制

黄 润¹, 宋信莉^{1,2,3*}, 张建锋⁴, 王丙元¹, 钱舒琪¹, 王世运¹, 蔡艳丽¹, 刘竹鑫¹, 王 楠¹, 宋桃伟¹, 徐 剑^{1,2}, 杨道斌⁵, 陈中芬⁶

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025
2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025
3. 贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025
4. 贵州威利德制药有限公司, 贵州 贵阳 550081
5. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550025
6. 贵阳市妇幼保健院, 贵州 贵阳 550003

摘要: **目的** 通过滑膜液与血清代谢组学探究马钱子碱载药微针不同给药方式对胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠的代谢调节作用, 为揭示马钱子碱载药微针治疗类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的药效机制提供实验依据。**方法** 采用超高液相色谱串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 非靶向代谢组学方法, 将对照组、马钱子碱水凝胶穴位微针组 (XWMN)、马钱子碱水凝胶非穴位微针组 (FXWMN)、空白微针组 (KBMN) 及传统针刺组 (ZC) 分别与模型组比较, 系统分析干预后 CIA 大鼠滑膜液与血清内源性代谢物谱变化。**结果** 基于滑膜液代谢组学筛选获得各给药组与模型组比较的差异代谢物, 通过对差异代谢物的回调趋势分析发现, 与模型组比较, XWMN 组 3 种代谢物显著回调, FXWMN 组 5 种代谢物显著回调, KBMN 组 3 种代谢物显著回调, ZC 组 3 种代谢物显著回调; XWMN 组代谢调控主要涉及环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、丁酸代谢、核苷酸代谢等通路, 富集的通路数量多于其他给药组。基于血清代谢组学筛选获得各给药组与模型组比较的差异代谢物, 通过对差异代谢物的回调趋势分析发现, 与模型组比较, XWMN 组 5 种代谢物显著回调, FXWMN 组 15 种代谢物显著回调, KBMN 组 12 种代谢物显著回调, ZC 组 3 种代谢物显著回调; XWMN 组代谢调控主要涉及嘌呤代谢、花生四烯酸代谢等 RA 关键致病通路, FXWMN 组涉及嘌呤代谢、ABC 转运器通路等 3 条通路, KBMN 组涉及嘌呤代谢、亚油酸代谢等 7 条代谢通路。**结论** 马钱子碱载药微针不同给药方式均能不同程度调节 CIA 大鼠的异常代谢。其中, 马钱子碱载药微针穴位给药可通过调控滑膜液中 3-羟基丁酸、脱氧胞苷等代谢物表达, 作用于 cAMP 信号通路、丁酸代谢、核苷酸代谢等通路, 抑制炎症反应、调节免疫细胞分化, 同时通过调控血清嘌呤代谢、花生四烯酸代谢通路, 发挥抗炎作用。相较于非穴位给药、空白微针及传统针刺, 穴位给药对关键致病通路 (如嘌呤代谢、花生四烯酸代谢) 的干预作用更为突出。

关键词: 马钱子碱; 水凝胶微针; 类风湿性关节炎; 滑膜液; 血清代谢组学; 嘌呤代谢; 花生四烯酸代谢; cAMP 信号通路
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)19-7697-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.016

Metabolic regulation mechanism of brucine-loaded microneedles in rats with collagen-induced arthritis based on synovial fluid and serum metabolomics

HUANG Run¹, SONG Xinli^{1,2,3}, ZHANG Jianfeng⁴, WANG Bingyuan¹, QIAN Shuqi¹, WANG Shiyun¹, CAI Yanli¹, LIU Zhuxin¹, WANG Nan¹, SONG Taowei¹, XU Jian^{1,2}, YANG Daobin⁵, CHEN Zhongfen⁶

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
2. National Engineering Research Center for Miao Medicine, Guiyang 550025, China

收稿日期: 2026-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82260770); 贵州省高层次创新型人才 (黔科合平台人才-GCC [2023] 037); 贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目 (贵中医 TD 合字 [2022] 004 号); 贵州中医药大学药用高分子材料研究中心 (贵中医党办发 [2019] 70)

作者简介: 黄 润, 女, 硕士研究生, 主要从事中药及民族药物新制剂及新剂型等研究。E-mail: 3032947339@qq.com

***通信作者:** 宋信莉, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新技术与新剂型等研究。E-mail: 392347047@qq.com

3. Engineering Research Center for Processing and Preparation of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
4. Guizhou Weilide Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550081, China
5. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
6. Guiyang Maternal and Child Health Hospital, Guiyang 550003, China

Abstract: Objective To explore the metabolic regulatory effects of different administration methods of brucine-loaded microneedles on rats with collagen-induced arthritis (CIA) through synovial fluid and serum metabolomics, and to provide experimental evidence for elucidating the mechanism of brucine-loaded microneedles in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The non-targeted metabolomics method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was adopted. The control group, brucine-loaded hydrogel acupoint microneedles group (XWMN), brucine-loaded hydrogel non-acupoint microneedles group (FXWMN), blank microneedles group (KBMN) and traditional acupuncture group (ZC) were respectively compared with model group. The changes in the profiles of endogenous metabolites in the synovial fluid and serum of CIA rats after intervention were systematically analyzed. **Results** Based on the screening of synovial fluid metabolomics, differential metabolites were obtained for comparison between each treatment group and the model group. Analysis of the reversal trends of the differential metabolites showed that, compared with model group, three metabolites in XWMN group, five in FXWMN group, three in KBMN group, and three in ZC group were significantly restored toward normal levels. The metabolic regulation of XWMN group mainly involved the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway, butyrate metabolism, nucleotide metabolism and other pathways, with a higher number of enriched pathways compared to other treatment groups. Based on serum metabolomics screening, differential metabolites were obtained for comparison between each treatment group and the model group. Through the analysis of the regression trend of differential metabolites, it was found that compared with model group, five metabolites in XWMN group showed significant regression, 15 metabolites in FXWMN group showed significant regression, 12 metabolites in KBMN group showed significant regression, and three metabolites in ZC group showed significant regression; The metabolic regulation of XWMN group mainly involved key pathogenic pathways such as purine metabolism and arachidonic acid metabolism in RA, while FXWMN group involved three pathways including purine metabolism and ABC transporter pathway, and KBMN group involves seven metabolic pathways including purine metabolism and linoleic acid metabolism. **Conclusion** Different administration methods of brucine-loaded microneedles can modulate the aberrant metabolism in CIA rats to varying degrees. Notably, acupoint administration of brucine-loaded microneedles exerts anti-inflammatory effects and regulates immune cell differentiation by modulating the expression of metabolites such as 3-hydroxybutyrate and deoxycytidine in synovial fluid, thereby influencing pathways like cAMP signaling, butanoate metabolism, and nucleotide metabolism. Concurrently, it exerts anti-inflammatory effects by modulating serum metabolic pathways including purine metabolism and arachidonic acid metabolism. Compared with non-acupoint administration, blank-microneedle treatment and traditional acupuncture, acupoint administration demonstrates a more prominent modulatory effect on key pathogenic pathways (e.g., purine metabolism, arachidonic acid metabolism).

Key words: brucine; hydrogel microneedles; rheumatoid arthritis; synovial fluid; serum metabolomics; purine metabolism; arachidonic acid metabolism; cAMP signaling pathway

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以对称性关节炎症、滑膜增生及软骨破坏为主要特征的自身免疫性疾病, 全球患病率约 1%, 严重威胁患者关节功能及生活质量^[1-3]。马钱子碱作为传统有毒中药马钱子的主要活性生物碱, 具有显著的抗炎、镇痛及免疫调节作用, 其毒性仅为土的宁的 1/20, 且具有显著药理活性, 是潜在的抗 RA 药物^[4-5]。现代研究表明, 足三里是治疗 RA 最常用的穴位之一, 通过针刺或穴位贴敷可调节免疫功能、抑制炎症因子, 从而阻断 RA 炎症反应^[6]。然而 RA 的治疗常依赖口服药物或手术干预, 但这些

方法往往伴随明显的不良反应、耐药性及病情反复等问题, 与此同时, 自然疗法、热疗等非药物治疗方式在临床实践中的效果大多有限, 难以达到稳定持久的缓解^[7-8]。因此, 在传承中医精髓的基础上, 开发一种更精准、更便捷的新治疗 RA 体系, 已成为当前重要的发展方向。

水凝胶微针 (hydrogel microneedles, HMNs) 作为新型经皮递药系统, 可穿透皮肤角质层形成微米级孔道, 通过溶胀作用实现药物缓释, 具有生物相容性好、无基质残留、给药精准等优势, 能有效解决水难溶性药物的经皮吸收难题^[9]。课题组前期

已成功制备马钱子碱水凝胶穴位微针 (brucine-loaded hydrogel acupoint microneedles, Bru-HFAM) 递药系统, 证实其具有良好的机械性能及抗 RA 疗效^[10]。

研究表明, 滑膜液和血液中的代谢物可作为穴位刺激效应的产物^[11], 因此探究治疗后代谢物的调节作用可作为穴位刺激效应的评价方式。通过代谢组学, 探究穴位刺激对机体内部物质和信息的扰动及机体对穴位刺激应答, 有助于阐明穴位微针治疗 RA 作用机制。基于此, 本研究采用超高液相色谱串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 进行检测, 系统分析 Bru-HFAM 对胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠滑膜液及血清代谢谱的影响, 筛选差异代谢物并解析相关代谢通路, 旨在从代谢层面阐明 Bru-HFAM 治疗 RA 的作用机制, 为该递药系统的临床转化提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 Wistar 大鼠, 体质量 200~220 g, 购自斯贝福 (北京) 生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2024-0001, 动物质量合格证号 No.110324251104104825。动物于动物房常规饲养, 饮用自来水, 给予标准大鼠饲料。动物房光照充足, 通风良好, 实验前饲养 1 周适应环境。动物实验经贵州中医药大学伦理委员会批准 (批准号 SY2025128)。

1.2 药品与试剂

马钱子碱对照品 (质量分数 99.83%, 批号 21110417) 购自北京中科质检生物技术有限公司; 乙醇 (批号 20221008) 购自天津市风船化学试剂科技有限公司; 甲醇 (批号 C15280410) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 无水氯化钙 (批号 D10GS170933)、弗氏佐剂 (批号 SLCQ7622)、牛 II 型胶原蛋白 (批号 L22S11C125306) 购自上海源叶生物科技有限公司; 生理盐水 (批号 D23081504) 购自贵州科伦药业有限公司。

1.3 仪器

Y339 型仪器 PDMS 微针模具 (台州微芯医药科技有限公司); ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); AE/240 型十万分子一电子天平 (上海梅特勒仪器有限公司);

CMA 4004 Syrin Pump 型微量注射泵、MAB 85 型低温双通道微量收集器 [康森特生物科技 (长沙) 有限公司]; 8010436 型线性探针 (瑞典 CMA 公司); UHPLC-Orbitrap Exploris 240 型超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); JXDC-20 型氮气吹扫仪 (上海净信实业发展有限公司); LNG-T88 型台式快速离心浓缩干燥器 (太仓市华美生化仪器厂); Centrifuge 5430R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 Bru-HFAM 的制备

参考课题组前期的制备方法^[10], 称取 50 mg 马钱子碱对照品, 加入 10 mL 40% 乙醇使其溶解, 得到马钱子碱溶液, 备用。

称取 0.15 g 卡波姆于烧杯, 均匀铺在杯底, 滴加 2 mL 马钱子碱溶液, 搅拌均匀后静置溶胀 30 min。少量多次加入聚乙烯醇 1.5 g 及马钱子碱溶液 6 mL, 边加边搅拌, 直至混合基质溶液均匀, 无小团块, 于 4 °C 冰箱静置过夜, 充分溶胀。次日, 称取 0.2 g 酒石酸, 加入 2 mL 马钱子碱溶液溶解, 与混合基质溶液混合均匀, 再次置于 4 °C 冰箱过夜, 使交联充分。将载药基质溶液填充到微针模具中, 4 000 r/min 离心 10 min, 在干燥器中干燥 24 h 后取出, 放入 105 °C 电热干燥箱中干燥 2 h, 取出冷却至室温, 脱模, 即得 Bru-HFAM。

2.2 CIA 模型的制备

称取牛 II 型胶原蛋白 50 mg, 与 25 mL 冰醋酸溶液 (0.1 mol/L) 混匀, 配制质量浓度为 2 mg/mL 的胶原溶液, 于实验前 1 d 配制, 并将其置于 4 °C 冰箱过夜, 使充分溶解。初次免疫当日, 于 4 °C 冰浴中将胶原溶液逐滴滴加至等体积 (25 mL) 弗式完全佐剂中混合, 反复乳化, 边滴加边搅拌, 至出现油包水状态, 且滴入水中不会扩散, 即得 1 mg/mL 胶原乳剂。初次免疫于大鼠右后足及尾根部注射 0.3 mL 胶原乳剂致炎^[12], 并于第 7 天再次加强免疫。大鼠足爪红肿, 关节处明显肿胀则视为造模成功。

2.3 动物分组与给药

将造模成功的大鼠随机分为模型组、空白微针组 (KBMN)、马钱子碱水凝胶穴位微针组 (XWMN)、马钱子碱水凝胶非穴位微针组 (FXWMN)、传统针刺组 (ZC), 每组 6 只, 另取 6 只正常大鼠作为对照组。于二次免疫 7 d 天后开始首次给药, 给药前 1 d 预先剃除大鼠右后足处毛发。

对照组和模型组于大鼠右后足脱毛关节处肌肉涂抹生理盐水; KBMN 组于大鼠右后足足三里处给予 1 片空白微针, 5 d/次, 持续 25 d; XWMN 组于大鼠右后足脱毛足三里处给予 1 片载药微针, 5 d/次, 持续给药 25 d; FXWMN 组于大鼠右后足脱毛关节肌肉处给予 1 片载药微针, 5 d/次, 持续给药 25 d; ZC 组于大鼠足三里穴位进行针刺, 深度控制在 5 mm 左右, 采用手法行针, 平补平泻, 行针频率保持在 60 次/min, 施针强度以大鼠能够耐受为宜, 1 次/d^[13], 持续 25 d。

2.4 样本采集

2.4.1 微透析采集滑膜液样本 于给药 25 d 结束后, 对大鼠进行微透析采集滑膜液。将微透析探针小心植入大鼠的关节腔, 植入成功后, 以 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 速度连续灌流林格氏液 1 h, 以此减轻植入过程对机体组织带来的伤害, 并减缓大鼠可能会出现的不适反应, 此过程中需认真查看大鼠的状况, 待大鼠生命体征平稳后, 将采样间隔设为 30 min, 连续采集 480 min^[14]。

2.4.2 血清样本采集 滑膜液取样结束后, 每组大鼠 ip 2%戊巴比妥钠麻醉, 使用普通真空采血管从腹主动脉采血。于室温静置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.5 样本处理

分别精密吸取 100 μL 滑膜液和血清样本置于 1.5 mL 离心管里, 加入含 0.02 mg/mL L-2-氯苯丙氨酸的乙腈-甲醇 (1:1) 溶液 400 μL , 混匀后, 5 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 30 min, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 30 min。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心 15 min, 吸取上清液, 氮气吹干后, 用 50%乙腈复溶, 并于 5 $^{\circ}\text{C}$ 超声萃取 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 吸取上清液置于内插管里, 置于进样小瓶开始上机分析。此外, 分别从每个样品中吸取 20 μL 上清液混合后, 作为质量控制 (quality control, QC) 样本。

2.6 UPLC-MS/MS 检测

2.6.1 色谱条件 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 A 为 95%水+5%乙腈 (含 0.1%甲酸), B 为 47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水 (含 0.1%甲酸), 梯度洗脱: 0~1.5 min, 100%~95% A; 1.5~2 min, 95%~90% A; 2~4.5 min, 90%~70% A; 4.5~5 min, 70%~0 A; 5~6.3 min, 100% B; 6.3~6.4 min, 0~100% A; 6.4~8 min, 100% A; 体积流量 0.40 mL/min; 进样量 3 μL ; 柱

温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.6.2 质谱条件 电喷雾离子源 (electro-spray ionization, ESI); 扫描范围 m/z 70~1 050; 鞘气体积流量 60 arb; 辅助气体积流量 20 arb; 辅助气加热温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 正离子模式喷雾电压 3 400 V; 负离子模式喷雾电压-3 000 V, 离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$, 归一化碰撞能 20、40、60 V; 一级质谱分辨率 60 000, 二级质谱分辨率 15 000。

2.7 数据处理与分析

将原始数据经 Progenesis QI v3.0 代谢组学数据分析软件处理, 生成包含保留时间、峰面积、质荷比及化合物鉴定信息的数据矩阵。将该矩阵进行归一化处理, 并多元统计分析。为确保所建模型的可靠性, 采用七轮交叉验证对模型稳定性加以评估。采用无监督的主成分分析 (principal components analysis, PCA) 初步考察样本组的整体分布状况和离散程度。为进一步明确组间具有生物学意义的代谢差异, 采用正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 监督统计方法减少不相关变异的影响。OPLS-DA 技术是由偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares, PLS-DA) 方法演变而来, 通过引入正交信号校正技术, 根据模型生成的变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 以及 student's t 检验概率值, 能够将组间差异信息集中于第一预测成分, 从而更有效地筛选出组间差异显著的代谢物。其中 $\text{VIP}>1$ 且 $P<0.05$, 差异倍数 (fold change, FC) >1.5 且 $\text{FC}<1/1.5$ ^[15], $\text{RSD}<30\%$ 的代谢物, 被认为是有统计学意义的差异代谢物。

2.8 Bru-HFAM 干预 CIA 大鼠滑膜液代谢通路分析

将筛选出的差异代谢物导入 Majorbio 平台, 并基于数据库开展富集分析与代谢通路分析, 以明确这些代谢物在生物代谢网络中所参与的主要通路及其生物学意义。

3 结果

3.1 血清代谢组学分析

3.1.1 PCA 结果 图 1 为 QC 样本在正、负离子模式下的总离子色谱图, 峰形较为理想, 分布也较为均匀, 表明仪器性能稳定, 能够为实验提供可靠的数据支持。基于大鼠滑膜液样本的代谢物数据, 通过 PCA 建立了多元统计模型, 对对照组、模型组、XWMN 组、FXWMN 组、KBMN 组及 ZC 组进行

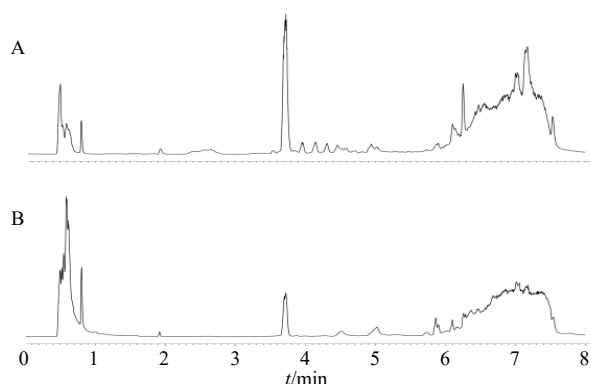
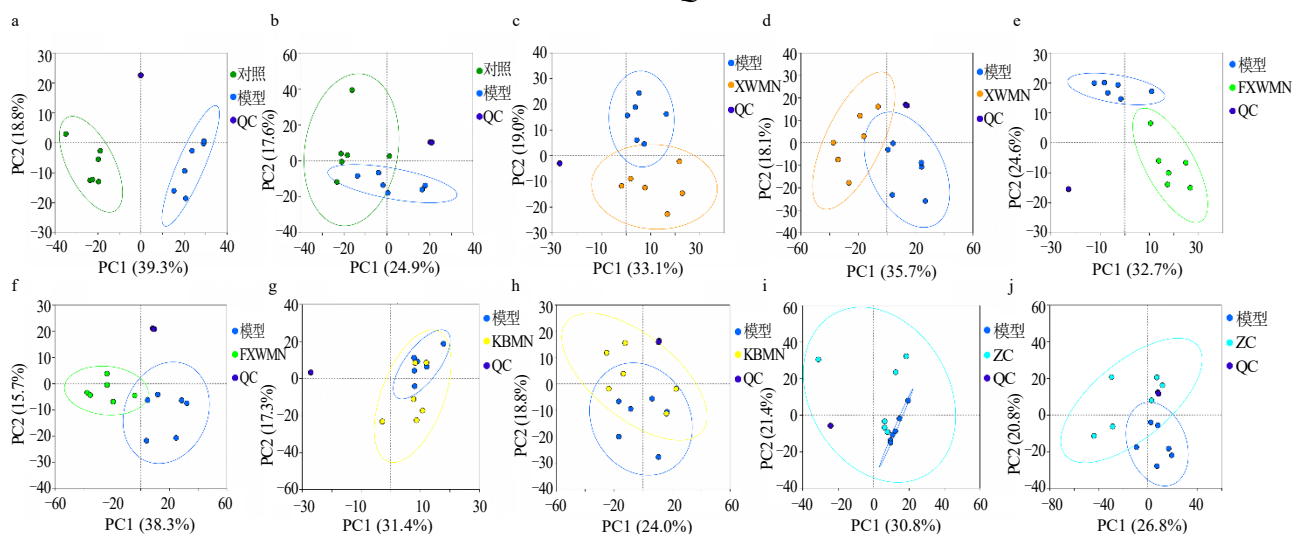


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下 QC 样本的总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatogram of QC sample in positive (A) and negative (B) ion modes



a、c、e、g、i-正离子模式；b、d、f、h、j-负离子模式；a、b-模型组 vs 对照组；c、d-XWMN 组 vs 模型组；e、f-FXWMN 组 vs 模型组；g、h-KBMN 组 vs 模型组；i、j-ZC 组 vs 模型组；图 3、4、9~11 同。

a、c、e、g、i-positive ion mode；b、d、f、h、j-negative ion mode；a、b-model group vs control group；c、d-XWMN group vs model group；e、f-FXWMN group vs model group；g、h-KBMN group vs model group；i、j-ZC group vs model group；Same as figs. 3, 4, 9—11.

图 2 PCA 得分图

Fig. 2 PCA score plot

表 1 OPLS-DA 模型拟合参数

Table 1 Fitting parameters of OPLS-DA model

模式	组别	R^2_X	R^2_Y	Q^2	R^2_Y/Q^2
正离子	模型 vs 对照	0.838	0.994	0.917	1.084
正离子	XWMN vs 模型	0.756	0.983	0.753	1.305
正离子	FXWMN vs 模型	0.607	0.988	0.892	1.108
正离子	KBMN vs 模型	0.523	0.936	0.506	1.850
正离子	ZC vs 模型	0.255	0.981	0.714	1.374
负离子	模型 vs 对照	0.585	0.989	0.441	2.242
负离子	XWMN vs 模型	0.741	0.993	0.861	1.153
负离子	FXWMN vs 模型	0.629	0.982	0.864	1.137
负离子	KBMN vs 模型	0.660	0.993	0.679	1.462
负离子	ZC vs 模型	0.614	0.989	0.890	1.111

系统性比较。如图 2 所示，5 组样本在正、负离子模式下均显示出明显的分离趋势，且 QC 样本表现出良好的聚合度，表明各组间代谢特征存在实质区别。

3.1.2 OPLS-DA 结果 为深入探究 CIA 大鼠关节滑膜液内代谢物的动态变化，将模型组 vs 对照组分别与 XWMN 组 vs 模型组、FXWMN 组 vs 模型组、KBMN 组 vs 模型组以及 ZC 组 vs 模型组，采用有监督的 OPLS-DA 同步建模进行比较，以系统筛选各组间具有统计学意义的差异代谢物。OPLS-DA 模型的可靠性主要通过解释率 R^2_Y 与预测能力 Q^2 2 项指标进行评估。如表 1 和图 3 所示，在正、负离子模式下，各比较组分布趋势完全分开， $R^2_Y > 0.9$ ， $Q^2 > 0.4$ ，证明模型稳定，预测能力可靠。为进一步

验证模型的有效性，在正、负离子模式分别对各组样本进行 200 次置换检验，结果如图 4 所示，所有置换检验模型的 R^2_Y 与 Q^2 值均低于原始模型相应点位，且 Q^2 回归线与纵轴相交于原点下方，表明模型未出现过拟合现象，符合后续分析的要求，可进一步开展差异代谢物的筛选。

3.1.3 差异代谢物的 Venn 分析 对 5 个比较组的差异代谢物进行 Venn 分析，结果如图 5 所示，模型组 vs 对照组特有的代谢物最多，有 55 种，反映了 CIA 大鼠本身所引发的广泛代谢波动；ZC 组 vs 模型组特有的差异代谢物最少，为 18 种；5 个比较

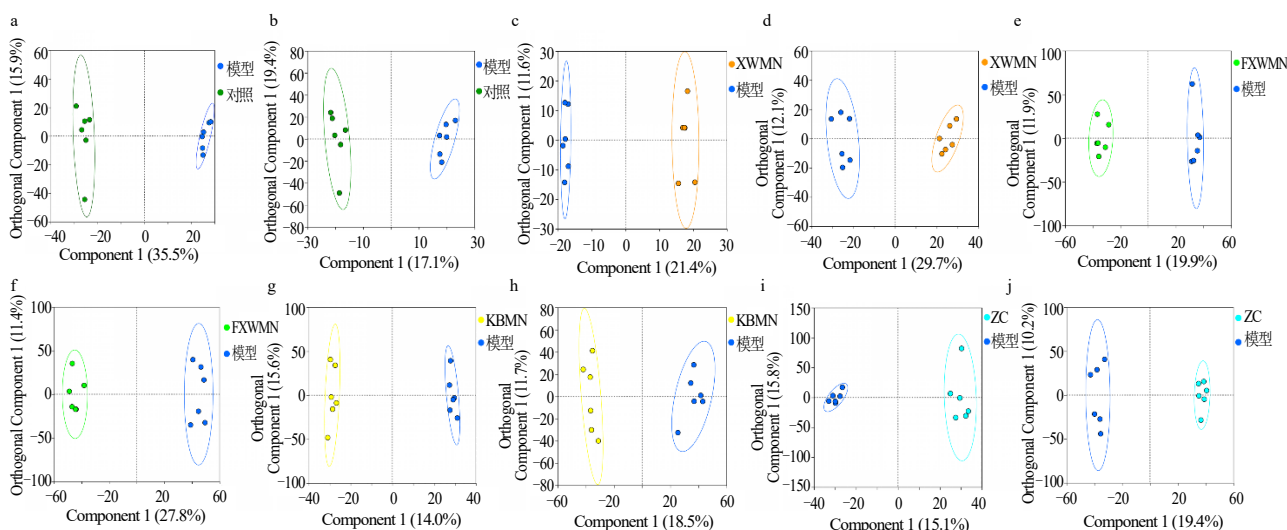


图 3 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score plot

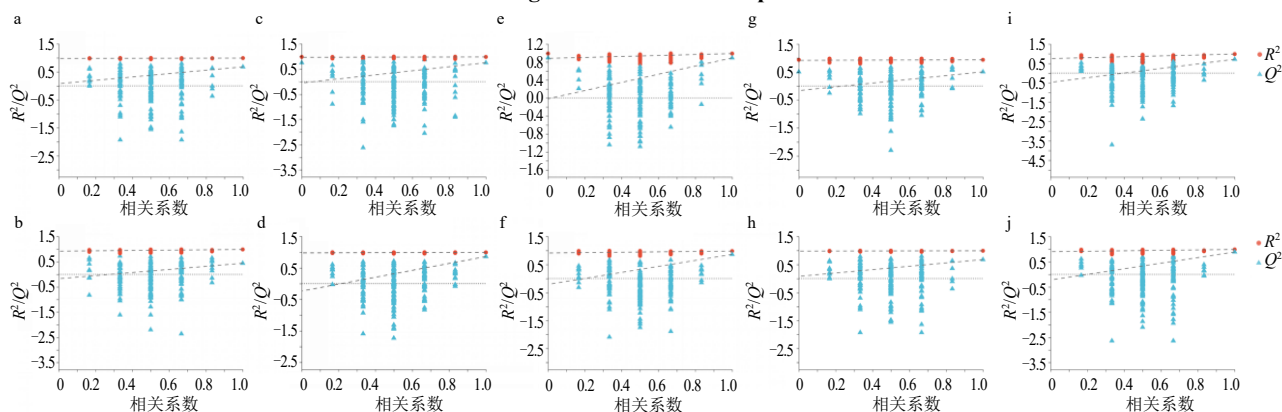


图 4 OPLS-DA 置换检验图

Fig. 4 OPLS-DA substitution test plot

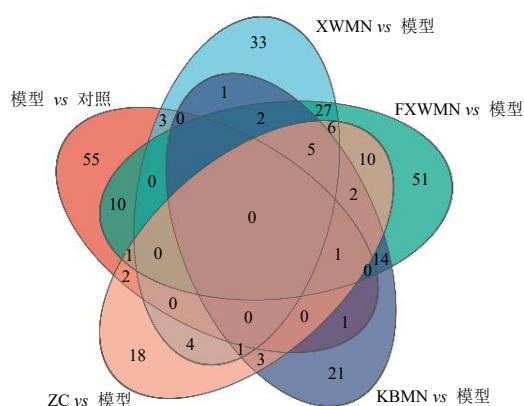


图 5 差异代谢物 Venn 图

Fig. 5 Venn diagram of differential metabolites

组没有共同差异代谢物。表明各组干预措施所影响的代谢通路或调控机制具有一定特异性。

3.1.4 差异代谢物筛选 通过有监督的 OPLS-DA 模型和单维分析 (Student test) 相结合的方法, 以

VIP ≥ 1 、 $P < 0.05$ 、FC > 1.5 且 FC 小于 1/1.5 为标准, 在正、负离子模式下对组间差异性代谢物进行筛选, 结果如图 6 所示, 模型组 vs 对照组差异代谢物数量达到 74 种, 上调 30 种, 下调 44 种; KBMN 组 vs 模型组共筛出 52 种差异代谢物, 上调 33 种, 下调 19 种; XWMN 组 vs 模型组共筛出 83 种差异代谢物, 上调 39 种, 下调 44 种, 表明穴位给药能够显著改变 CIA 大鼠的代谢轮廓; FXWMN 组 vs 模型组筛出差异代谢物数量达 130 种, 上调 66 种, 下调 64 种, 多于 XWMN 组, 表明 2 种给药方式所影响的代谢途径存在明显区别, 穴位刺激可能通过特定生物通路发挥更为聚焦的调控作用; ZC vs 模型组差异代谢物达 53 种, 上调 24 种, 下调 29 种, ZC 组差异代谢物数量明显低于 XWMN 组, 提示穴位给药能够持续对穴位刺激与药物递送的双重效应, 可能通过协同机制影响代谢网络, 其具体作用

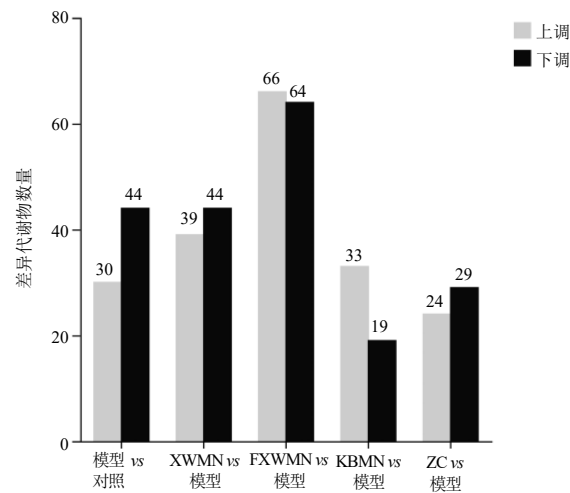


图 6 各比较组差异代谢物数量统计图
Fig. 6 Statistical chart of differential metabolite counts among comparison groups

表 2 与模型组 vs 对照组比较各给药组显著回调的差异代谢物

Table 2 Significant differences in metabolites that showed a significant increase in each administration group compared to model group vs control group

组别	代谢物	P值	FC值	变化趋势
XWMN vs模型	脱氧胞苷	0.027	12.124	↑
	3-羟基丁酸	0.045	3.164	↓
	DG(PGE ₂ /a-17 : 0/0 : 0)	0.011	0.336	↓
FXWMN vs模型	3-羟基丁酸	0.010	4.357	↓
	硫酸对甲酚	0.021	4.733	↓
	(±)-9-HpODE	0.006	0.503	↓
	10-羟基癸酸	0.014	3.067	↓
	酪氨酰基组氨酸	0.047	0.029	↓
KBMN vs模型	3-羟基丁酸	0.029	2.730	↓
	10-羟基癸酸	0.014	1.944	↓
	dihydroneopterin phosphate	0.009	0.531	↓
ZC vs模型	硫酸对甲酚	0.049	2.077	↓
	12-HETE	0.012	0.276	↓
	10-羟基癸酸	0.000	3.103	↓

“↑”表示上调，“↓”表示下调；变化趋势是相对于模型组 vs 对照组的差异代谢物；表 5 同。

“↑” indicates upregulated, “↓” indicates downregulated; Change trend refers to the differences in metabolites between model group vs control group; Same as table 5.

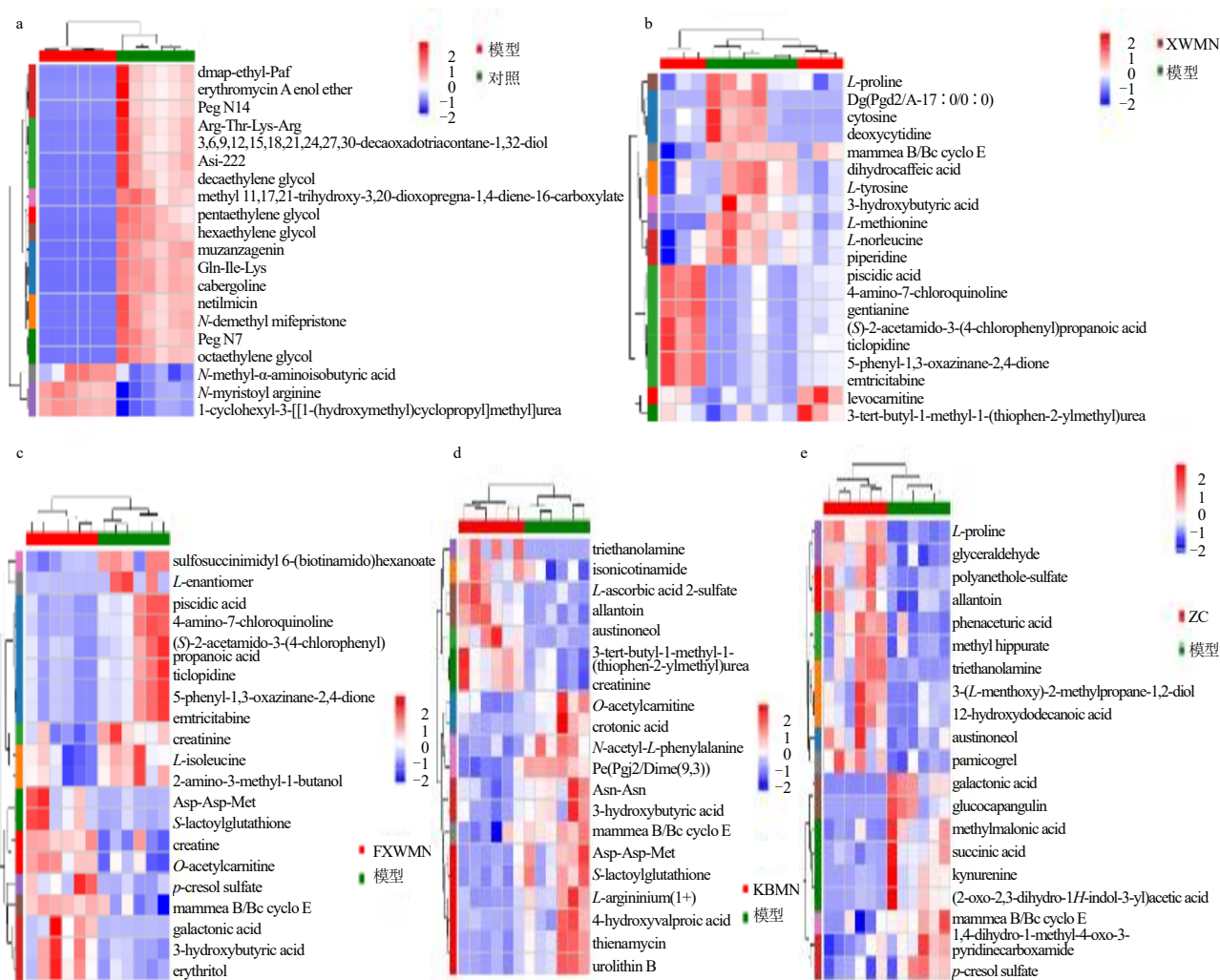
3.1.6 差异代谢物聚类分析 对差异代谢物进行聚类分析，如图 7 所示，与对照组相比，模型组的代谢模式发生显著改变，表明 CIA 大鼠模型构建成功，并且在疾病状态下，大鼠关节滑膜液代谢发生紊乱。在给予穴位给药治疗后，模型组中的异常代谢物发生一定回调趋势，这一聚类结果表明，所筛选出的差异代谢物具有良好的可靠性，Bru-HFAM 治疗对疾病引起的代谢紊乱具有一定的纠正作用。在非穴位给药组以及其他含马钱子碱给药的组别中，也观察到了 CIA 大鼠代谢轮廓的显著改变，说明马钱子碱本身具有明确的代谢调节活性。进一步

路径仍有待进一步研究验证。

整体而言，不同比较组之间不仅在差异代谢物的种类与数量上存在区别，其表达变化的方向与程度也各具特征，这从代谢层面系统揭示了疾病模型以及各类给药方式所带来的特异性影响，为理解其作用机制提供了依据。

3.1.5 差异代谢物的表达 为了更好地阐明 Bru-HFAM 的作用机制，将 XWMN 组 vs 模型组、FXWMN 组 vs 模型组、KBMN 组 vs 模型组以及 ZC 组 vs 模型组的差异代谢物分别与模型组 vs 对照组的差异代谢物进行 Venn 分析，进一步筛选得到 XWMN vs 模型组有 3 种代谢物被显著回调，FXWMN 组 vs 模型组有 5 种代谢物被显著回调，KBMN 组 vs 模型组有 3 种代谢物被显著回调，ZC 组 vs 模型组有 3 种代谢物被显著回调（表 2）。

对比不同给药方式的效果可见，XWMN 组在回调异常代谢物方面展现出更接近生理状态的趋势，而 FXWMN 组引起的代谢变化范围虽广，但其模式与穴位干预有所区别。这一现象提示，穴位刺激可能并非单纯增强药物作用，而是通过协同调节，更精准地影响与 RA 相关的特定代谢网络。综合聚类分析结果，Bru-HFAM 穴位给药能够促使 RA 相关代谢物从病理状态向正常生理水平恢复，且穴位刺激在这一过程中显示出协同调节作用。表明该疗法可能通过调控关键代谢物水平、影响相应代谢通路，并结合穴位特异性刺激，共同发挥对 RA 的改善作用。



a-模型组 vs 对照组; b-XWMN 组 vs 模型组; c-FXWMN 组 vs 模型组; d-KBMN 组 vs 模型组; e-ZC 组 vs 模型组; 图 14 同。

a-model group vs control group; b-XWMN group vs model group; c-FXWMN group vs model group; d-KBMN group vs model group; e-ZC group vs model group; Same as fig. 14.

图 7 各组差异代谢物聚类热图

Fig. 7 Cluster heatmaps of differential metabolites in each group

3.1.7 代谢通路富集分析 将模型组 vs 对照组差异代谢物与各给药组显著回调的差异代谢物进行代谢通路富集分析, 模型组 vs 对照组共富集出 53 条代谢通路, 主要与丁酸代谢、核苷酸代谢、抗坏血酸和醛酸代谢、铁死亡、氮代谢等通路相关, 其中丁酸代谢、辅助因子的生物合成、叶酸生物合成等 24 条通路影响较大。如表 3 所示, XWMN 组富集得到 5 条通路, FXWMN 组得到 2 条通路, KBMN 组得到 4 条通路, ZC 组得到 3 条通路。XWMN 组参与的通路数量多于其他给药组, 表明 Bru-HFAM 穴位给药可能通过调控多条通路治疗 RA, 并且可能通过穴位刺激和递药的结合方式来增强治疗 RA 的效果。

表 3 各组差异代谢物 KEGG 富集通路

Table 3 KEGG enrichment pathways of differential metabolites in each group

组别	通路	P 值
XWMN	嘧啶代谢	0.028
	丁酸代谢	0.020
	核苷酸代谢	0.025
	ABC 转运器	0.058
	cAMP 信号通路	0.011
FXWMN	丁酸代谢	0.010
	cAMP 信号通路	0.005
KBMN	丁酸代谢	0.020
	叶酸生物合成	0.025
	辅助因子的生物合成	0.136
	cAMP 信号通路	0.011
ZC	花生四烯酸代谢	0.017
	卵巢类固醇生成	0.005
	醛固酮的合成和分泌	0.005

3.2 血清代谢组学分析结果

3.2.1 PCA 结果 如图 8 所示, QC 样本总离子流图峰形较为理想, 分布也较为均匀, 表明仪器性能稳定。为分析不同组别血清代谢物之间的整体差异, 分别建立模型组 vs 对照组、XWMN 组 vs 模型组、FXWMN 组 vs 模型组、KBMN 组 vs 模型组、ZC 组 vs 模型组的 PCA 多元统计模型。采用多元统计分析方法对正、负离子模式合并数据进行 PCA 初步分析, 如图 9 所示, 除模型组 vs 对照组、XWMN 组 vs 模型组、ZC 组 vs 模型组在正离子模式下分离情况不显著外, 其余各组在正、负离子模式下均显著分离, 提示各组间可能存在化学成分差异, 而 QC 样本表现出良好的聚合度, 证明了检测系统的高度稳定性和可靠性以及良好的重现性。

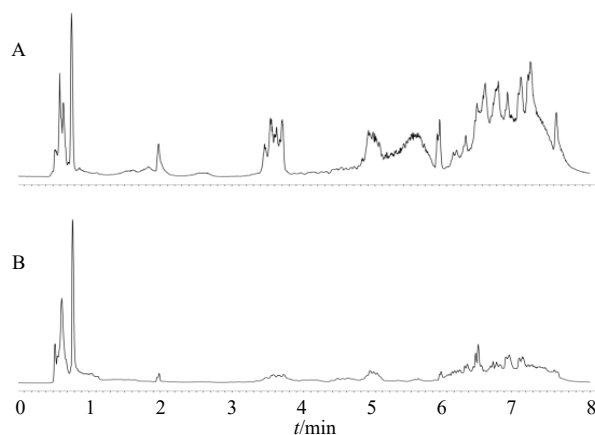


图 8 正 (A)、负 (B) 离子模式下 QC 样本的总离子流图
Fig. 8 Total ion chromatogram of QC sample in positive (A) and negative (B) ion modes

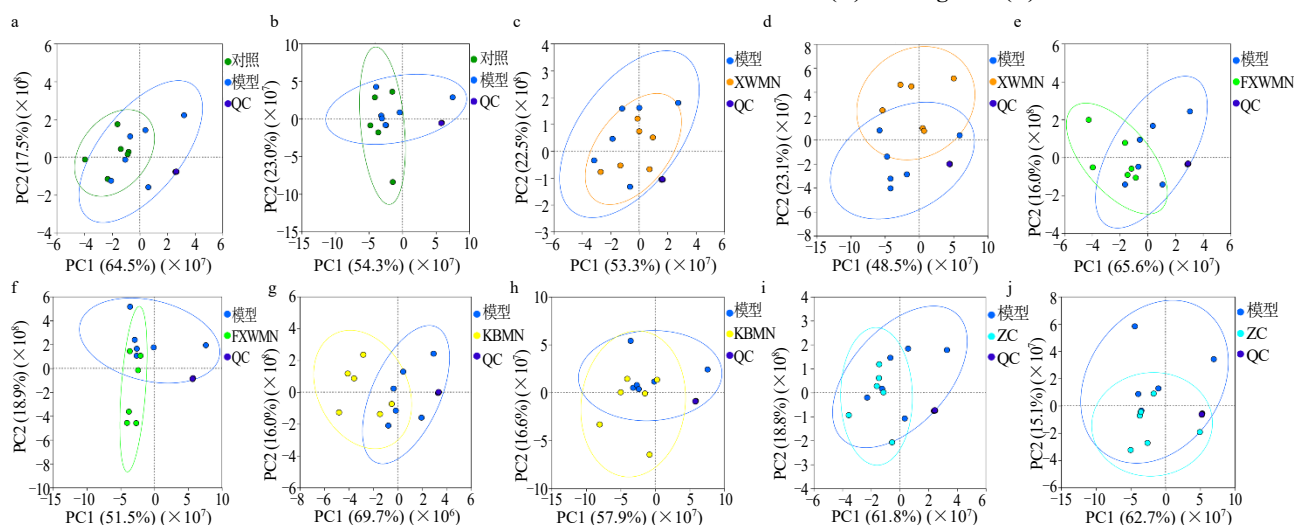


图 9 不同组间 PCA 图

Fig. 9 PCA analysis diagram among different groups

3.2.2 OPLS-DA 结果 将模型组 vs 对照组、XWMN 组 vs 模型组、FXWMN 组 vs 模型组、KBMN 组 vs 模型组、ZC 组 vs 模型组进行两两比较, 各组模型拟合参数见表 4, 正、负离子模式下, 除 ZC 组 vs 模型组与模型组 vs 对照组外, 各比较组之间的 R^2_Y 较高, 说明模型解释率较高; 除模型组 vs 对照组、XWMN 组 vs 模型组、ZC 组 vs 模型组在正离子模式及 ZC 组 vs 模型组在负离子模式下预测较差外, 其他组在正、负离子模式下 $Q^2 \geq 0.5$, 预测能力较好。正、负离子模式得分图 (图 10) 均呈现显著分离, 且样本均分布在置信圈内, 表明各组之间样本存在组间差异, 且差异较明显。其置换检验结果如图 11 所示, 所有置换检验模型的 R^2_Y 与 Q^2 值均

表 4 OPLS-DA 模型拟合参数

Table 4 Fitting parameters of OPLS-DA model

模式	组别	R^2_X	R^2_Y	Q^2	R^2_Y/Q^2
正离子	模型 vs 对照	0.143	0.568	0.306	1.856
正离子	XWMN vs 模型	0.103	0.660	0.016	42.038
正离子	FXWMN vs 模型	0.212	0.701	0.574	1.221
正离子	KBMN vs 模型	0.277	0.719	0.604	1.190
正离子	ZC vs 模型	0.136	0.472	0.181	2.608
负离子	模型 vs 对照	0.160	0.820	0.515	1.592
负离子	XWMN vs 模型	0.190	0.832	0.615	1.353
负离子	FXWMN vs 模型	0.253	0.883	0.767	1.151
负离子	KBMN vs 模型	0.172	0.765	0.500	1.530
负离子	ZC vs 模型	0.172	0.835	0.470	1.777

低于原始模型相应点位, 且 Q^2 回归线与纵轴相交于原点下方, 表明模型未出现过拟合现象, 符合后续分析的要求, 可进一步开展差异代谢物的筛选。

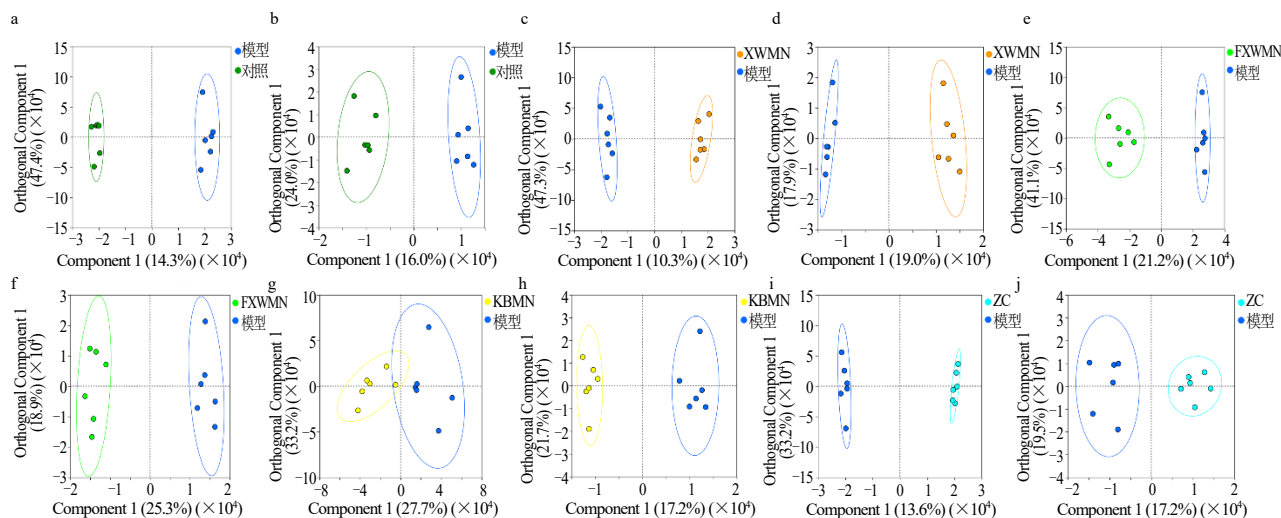


图 10 OPLS-DA 得分图

Fig. 10 OPLS-DA score plot

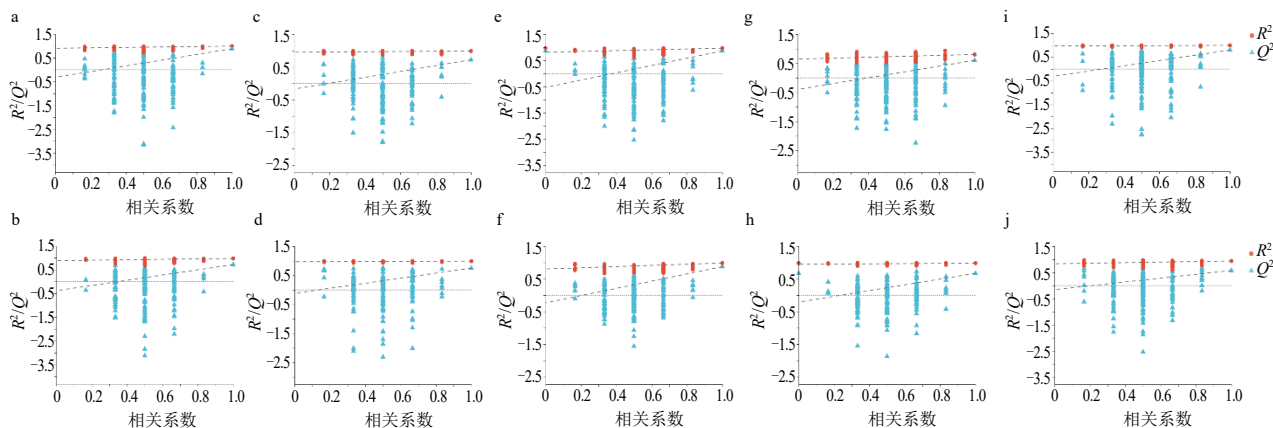


图 11 各比较组 OPLS-DA 置换检验图

Fig. 11 Permutation test diagrams of OPLS-DA for each comparison group

3.2.3 差异代谢物筛选 如图 12 所示, 正、负离子模式下模型组 vs 对照组共筛出 140 种差异代谢物, 其中上调 99 种, 下调 41 种; XWMN 组 vs 模型组共筛出 155 种差异代谢物, 其中 111 种上调, 44 种下调; FXWMN 组 vs 模型组共筛出 305 种差异代谢物, 106 种上调, 199 种下调; KBMN 组 vs 模型组共筛出 253 种差异代谢物, 46 种上调, 207 种下调; ZC 组 vs 模型组共筛出 167 种差异代谢物, 75 种上调, 92 种下调。绘制 Venn 图 (图 13) 发现不同比较组之间差异代谢物无相交, 但不同给药组 vs 模型组与模型组 vs 对照组代谢集均有交集, 表明不同给药方式均影响了 CIA 大鼠机体代谢, 但不同给药组影响的代谢物有较大不同。

对差异代谢物进一步筛选, 去除表达趋势不变及假阳性结果, 与模型组比较, XWMN 组有 5 种

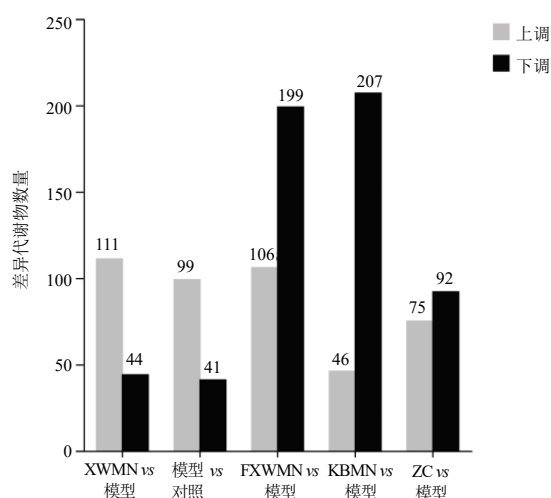


图 12 各比较组差异代谢物数量统计图

Fig. 12 Statistical chart of differential metabolite counts among comparison groups

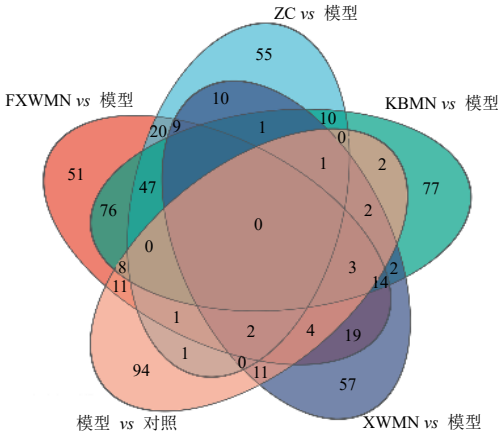


图 13 差异代谢物 Venn 图

Fig. 13 Venn diagram of differential metabolites

差异代谢物显著回调，FXWMN 组有 15 种差异代谢物显著回调，KBMN 组有 12 种差异代谢物显著回调，ZC 组有 3 种差异代谢物显著回调（表 5）。将各组筛选出的差异代谢物进行聚类热图分析，见图 14。

3.2.4 KEGG 富集通路分析 将不同组所得显著回调的代谢差异物进行 KEGG 富集通路分析，如表 6 所示，模型组 vs 对照组共富集到 29 条代谢通路，其中显著富集癌症的胆碱代谢、程序性坏死、细胞凋亡、长寿调节途径-蠕虫、药物代谢-其他酶及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢和花生四烯酸代谢 7 条代谢通路。这些通路主要作用于驱动炎症、破坏免疫稳态等，从而导致滑膜增生和关节骨破坏。XWMN

表 5 与模型组 vs 对照组比较各给药组显著回调的差异代谢物

Table 5 Significant differences in metabolites that showed a significant increase in each administration group compared to model group vs control group

组别	代谢物	P值	FC值	变化趋势
XWMN vs模型	11-dehydro-thromboxane B ₂	0.002	40.006	↑
	单乙酰二酰甘油	0.050	6.555	↑
	尿囊酸	0.022	2.123	↑
	DG(TXB ₂ /i-18 : 0/0 : 0)	0.025	0.537	↓
	N ₁ -乙酰亚精胺	0.023	1.996	↑
FXWMN vs模型	LysoPS(20 : 4)	0.002	0.459	↓
	PI(6-keto-PGF1 α /16 : 0)	0.006	2.110	↑
	LysoPS(18 : 2)	0.018	0.549	↓
	PI[6-keto-PGF1 α /22 : 4(7Z,10Z,13Z,16Z)]	0.008	0.220	↓
	4-羧基苯甘氨酸	0.002	0.282	↓
	尿囊酸	0.000	0.164	↓
	3-羧-4-甲-5-丙基咪喃戊酮酸	0.001	0.467	↓
	单乙酰二酰甘油	0.026	0.019	↓
	PI(6-keto-Pgf1 α /20 : 0)	0.005	0.399	↓
	甜菜碱	0.011	0.461	↓
	γ -glutamylaspartic acid	0.025	2.351	↑
	N ₁ -乙酰亚精胺	0.001	0.247	↓
	(Z)-dodec-5-enedioic acid	0.007	0.163	↓
	辛酰肉碱	0.019	0.482	↓
KBMN vs模型	LysoPS(20 : 3)	0.014	0.571	↓
	PS[5-iso-PGF ₂ VI/22 : 6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	0.030	1.987	↑
	GPCho(22 : 6/18 : 2)	0.002	2.279	↑
	PC[18 : 1(9Z)/14 : 0]	0.007	4.444	↑
	PI[6-keto-PGF1 α /22 : 4(7Z,10Z,13Z,16Z)]	0.019	0.322	↓
	4-羧基苯甘氨酸	0.003	0.319	↓
	1-(6-aminopurin-9-yl)-5-methylpyrimidine-2,4-dione	0.023	0.493	↓
	3-羧-4-甲-5-丙基咪喃戊酮酸	0.005	0.593	↓
	γ -glutamylaspartic acid	0.030	2.302	↑
	单乙酰二酰甘油	0.028	0.038	↓
	(Z)-dodec-5-enedioic acid	0.011	0.241	↓
	尿囊酸	0.001	0.247	↓
	PS[5-iso-PGF ₂ VI/20 : 3(5Z,8Z,11Z)]	0.037	1.958	↑
	PI(6-keto-PGF1 α /16 : 0)	0.002	2.160	↑
	PS[5-iso-PGF ₂ VI/22 : 6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	0.043	1.960	↑
ZC vs模型	N ₁ -乙酰亚精胺	0.035	0.575	↓

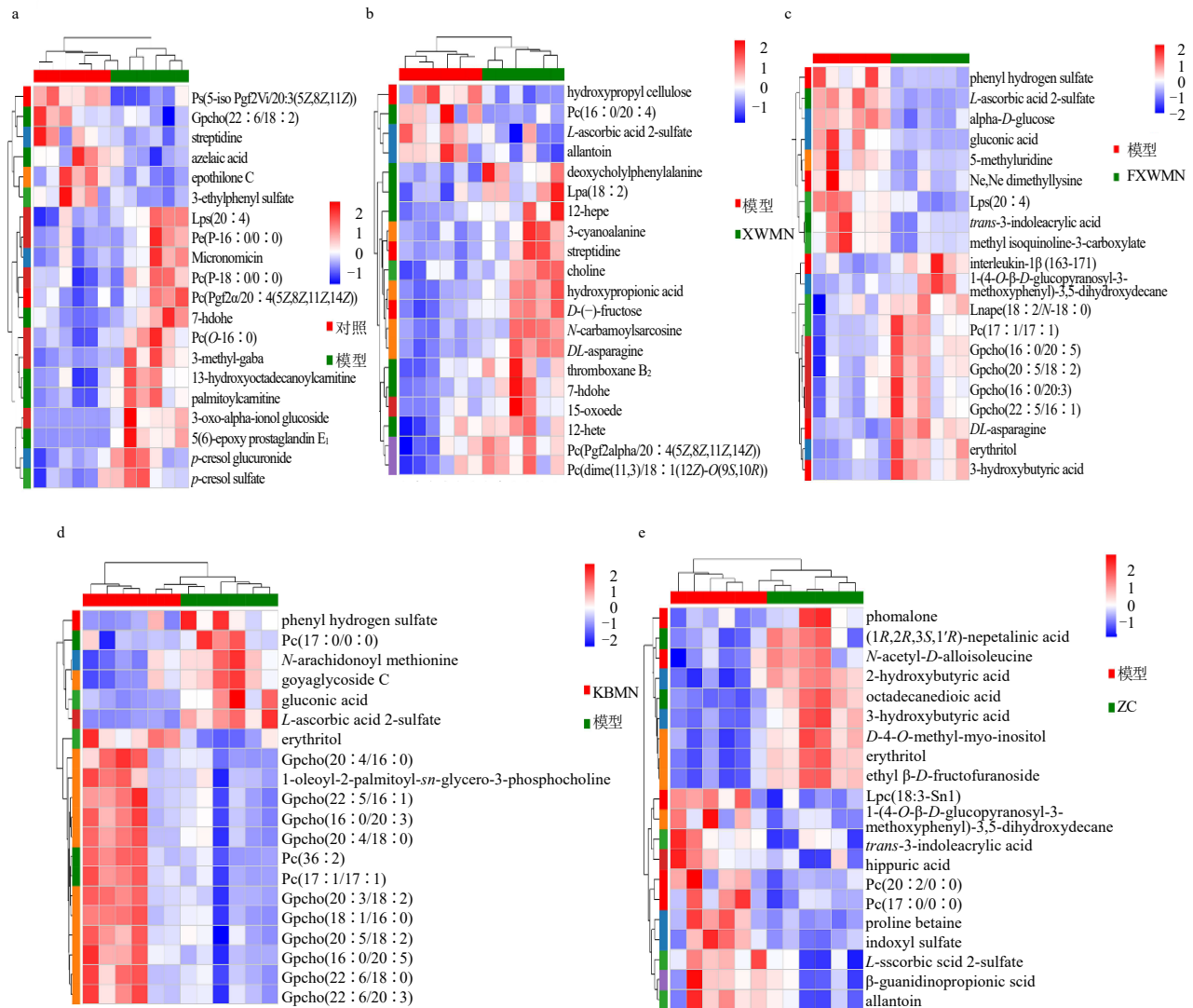


图 14 不同组聚类热图

Fig. 14 Cluster heat maps of different groups

表 6 显著回调的差异代谢物 KEGG 富集通路

Table 6 Significantly decreased metabolites with enriched KEGG pathways for differential metabolism

组别	通路	P值
XWMN	花生四烯酸代谢	0.034
	嘌呤代谢	0.043
	5-羟色胺能突触	0.018
FXWMN	ABC转运器	0.058
	嘌呤代谢	0.043
	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	0.021
KBMN	嘌呤代谢	0.043
	花生四烯酸代谢	0.034
	甘油磷脂代谢	0.024
	亚油酸代谢	0.012
	癌症的胆碱代谢	0.005
	α -亚麻酸代谢	0.019
	逆行内源性大麻素信号传导	0.008

组显著回调的代谢差异物共富集到 3 条通路，分别为嘌呤代谢、5-羟色胺能突触、花生四烯酸代谢通路；FXWMN 组显著回调的代谢差异物共富集到 3 条代谢通路，分别为嘌呤代谢、ABC 转运器及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路；KBMN 组显著回调的代谢差异物共富集到 7 条代谢通路，分别为嘌呤代谢、花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、癌症的胆碱代谢、 α -亚麻酸代谢、逆行内源性大麻素信号传导通路。嘌呤代谢通路为各给药组共同富集的通路，表明 Bru-HFAM 抗 RA 的作用机制可能与腺苷信号通路有关。

4 讨论

课题组前期建立 CIA 大鼠模型，明确了 Bru-HFAM 不同给药方式的疗效差异，结果显示，穴位

微针组对 CIA 大鼠的疗效显著,非穴位微针组疗效较好,空白微针组有一定治疗效果,但疗效较弱,传统针刺组可对穴位产生刺激,但抗炎效果不如穴位微针给药稳定^[10]。为进一步探讨其作用机制,需结合 RA 的病理特征展开分析。现代研究表明,RA 的发病机制与遗传因素、环境因素、肠道菌群、氧化应激以及免疫紊乱等因素相关^[16],目前研究已发现在 RA 的不同发展阶段都存在多种免疫代谢的紊乱,如氨基酸代谢紊乱、脂肪酸代谢紊乱、糖代谢紊乱。研究显示免疫代谢紊乱中,代谢物异常与 RA 的发生和发展密切相关,如糖代谢中糖酵解活性的上调可导致 RA 患者关节滑膜增生、血管翳形成,加剧炎症和骨质破坏,而抑制糖酵解可以缓解滑膜细胞的炎症反应^[17];乳酸堆积的酸性微环境可诱导 RA 滑膜细胞的异常分化和滑膜增生^[18];氨基酸代谢产物色氨酸和苏氨酸可诱导白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的合成与释放^[19],并参与 RA 的炎症反应,而甘氨酸则抑制肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、IL-1 β 的表达^[20];RA 慢性炎症发展过程中,机体炎症细胞迅速增殖,而使作为燃料的谷氨酰胺含量降低^[21]。此外,RA 进程中炎性细胞因子可促进脂肪组织分解释放游离脂肪酸^[22],导致脂肪酸水平升高。因此,纠正代谢紊乱,探究 Bru-HFAM 对代谢物及相关通路的调节作用是研究其治疗 RA 的重要机制。

滑膜作为 RA 最早累及的结构,其分泌产生的滑膜液不仅对维持关节正常功能至关重要,也深度参与 RA 的病理发展过程^[23]。在此背景下,系统研究滑膜液代谢组学的变化,对于揭示该疾病的机制具有重要价值。滑膜液代谢组学结果显示,与对照组相比,模型组大鼠中有 74 种代谢物发生代谢紊乱,这些代谢物主要参与丁酸代谢、核苷酸代谢、抗坏血酸和醛酸代谢、铁死亡、氮代谢等通路,其中丁酸代谢、辅助因子的生物合成、叶酸生物合成等 24 条代谢通路为关键代谢通路,表明 CIA 大鼠的代谢紊乱可能与这 24 条代谢通路相关。经 XWMN 干预后,脱氧胞苷、3-羟基丁酸、二酰甘油 3 种代谢物被显著回调。对 3 种被显著回调的代谢物进行 KEGG 通路富集分析得到 5 条代谢通路,分别为 cAMP 信号通路、丁酸代谢、核苷酸代谢、嘧啶代谢、ABC 转运器,提示 Bru-HFAM 穴位给药可能通过这些通路抗 RA。有研究表明 cAMP 信号通路是炎症反应中关键的负向调节枢纽,cAMP 信号

通路是炎症反应的核心负向调控枢纽,其可通过激活蛋白激酶 A,磷酸化并抑制炎症中枢转录因子核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的活性,阻断 TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达,同时直接抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体的组装,阻止 IL-1 β 等炎性介质的成熟释放,是控制 RA 滑膜局部炎症的关键通路^[24-27]。本研究发现,CIA 模型大鼠滑膜液中环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路相关代谢物显著异常,其中 3-羟基丁酸水平显著升高,提示模型大鼠存在局部丁酸代谢紊乱与免疫耐受失衡;经 Bru-HFAM 穴位给药干预后 3-羟基丁酸水平显著回调,丁酸代谢通路的异常状态得到显著逆转。3-羟基丁酸是 cAMP 信号通路的关键上游调控分子,主要通过激活特定的 G 蛋白偶联受体来调控 cAMP 信号通路,3-羟基丁酸最明确、亲和力最高的受体是羟基羧酸受体 2 (hydroxycarboxylic acid receptor 2, HCAR2),3-羟基丁酸与 HCAR2 结合后,会激活抑制性 G 蛋白,活化的 G 蛋白会抑制腺苷酸环化酶的活性,从而降低细胞内 cAMP 水平,并抑制下游的蛋白激酶 A 活性^[28-29]。上述结果提示 Bru-HFAM 可通过调控 3-羟基丁酸的水平,恢复 cAMP 信号通路的抗炎功能,抑制关节局部的炎症级联反应,缓解滑膜炎症损伤。另有研究表明丁酸代谢通路能通过调节免疫细胞分化和功能,特别是促进调节性 T 细胞生成、抑制巨噬细胞过度活化,在肠道局部及全身层面建立免疫耐受,对炎症性肠病、代谢综合征等慢性炎症性疾病具有保护性调节作用^[30-31]。值得注意的是,3-羟基丁酸共同参与丁酸代谢与 cAMP 信号通路的调控,提示 Bru-HFAM 穴位给药可通过恢复丁酸代谢与 cAMP 信号通路的正常功能,与炎症抑制通路形成协同效应,多维度缓解 RA 病理损伤。还有研究指出核苷酸代谢通路通过提供 DNA 和 RNA 合成原料、生成表观遗传修饰底物以及产生具有信号功能的代谢产物来深度调控炎症的进程^[32]。本研究发现,CIA 模型大鼠滑膜液中核苷酸代谢、嘧啶代谢通路显著异常,核心代谢物脱氧胞苷水平显著降低;经 Bru-HFAM 穴位给药干预后,脱氧胞苷水平被显著回调。脱氧胞苷是参与核苷酸代谢的重要代谢物,脱氧胞苷为合成脱氧胞苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP) 的关键合成前

体, dCTP 是机体免疫应答中的关键物质, 可以保障快速增殖的免疫细胞的 DNA 复制与修复, 从而支持有效的克隆扩增与适应性免疫应答, 一旦脱氧胞苷代谢紊乱会导致 dCTP 耗竭, 从而引发 DNA 损伤和细胞周期阻滞或凋亡, 进而限制过度免疫反应或导致免疫缺陷^[33-34]; 脱氧胞苷还参与嘧啶代谢通路, 嘧啶代谢可以通过调节免疫细胞的增殖、分化和炎症信号的产生, 在多个层面深刻调控炎症反应^[35]。上述结果提示, Bru-HFAM 可通过调控脱氧胞苷的水平, 纠正核苷酸与嘧啶代谢通路的紊乱, 抑制滑膜细胞的异常增殖与免疫细胞的过度活化, 延缓关节结构破坏。相较于模型组, XWMN 组还下调了二酰甘油的表达, 研究表明二酰甘油能直接激活磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶亚型 (如 PKC θ 、PKC δ), 进而磷酸化并活化 NF- κ B、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 及活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T-cells, NFAT) 等关键炎症信号通路, 促进 TNF- α 、IL-6 等促炎因子表达^[36], 提示穴位给药也可能通过调控二酰甘油的表达, 从而调控 RA 的炎症反应。相比于模型组和对照组的差异代谢物, FXWMN 组、KBMN 组、ZC 组 10-羟基癸酸, 硫酸对甲酚酯等差异代谢物发生回调, 这种差异代谢物参与了花生四烯酸代谢、辅助因子的生物合成、叶酸生物合成等 9 条代谢通路。表明 FXWMN、KBMN、ZC 也能够一定程度上改善 CIA 大鼠的代谢轮廓。

根据血清非靶向代谢组学分析, 结合 OPLS-DA 模型与多标准筛选, 系统比较了不同干预方式对 CIA 大鼠模型血清代谢轮廓的影响。结果显示, 模型组与对照组之间存在 101 种差异代谢物, 涉及花生四烯酸代谢、细胞凋亡、程序性坏死、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等代谢通路, 这些通路主要作用于驱动炎症、破坏免疫稳态等, 从而导致滑膜增生和关节骨破坏, 与现有 RA 病理过程代谢研究背景相符^[16]。各治疗组均能显著回调造模后引起的代谢紊乱, 但其作用模式与强度存在明显差异。XWMN 组显著回调代谢物数量 5 种, 富集通路较为集中 (嘌呤代谢、5-羟色胺能突触、花生四烯酸代谢), 嘌呤代谢和花生四烯酸代谢通路提示其可能通过协同调节炎症与神经递质通路发挥干预作用; FXWMN 组回调代谢物富集通路涉及嘌呤代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、ABC 转运器 3 条代谢通路。甘氨酸是谷胱甘肽的关键前体, 其含

量减少导致滑膜组织氧化应激加剧, NLRP3 炎症小体过度激活^[37]; 甘氨酸等氨基酸代谢可通过提供一碳单位和谷胱甘肽前体, 支持细胞增殖修复与抗氧化防御^[38-39]; 而 ABC 转运蛋白则通过外排细胞内药物和潜在的外排炎症介质起到调控作用^[40], 达到抗 RA 作用; 空白微针与传统针刺均有一定的代谢回调能力, 分别回调差异代谢物 12 种和 3 种, 空白微针显著富集嘌呤代谢、花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、癌症的胆碱代谢、 α -亚麻酸代谢、逆行内源性大麻素信号传导等。同时, 嘌呤代谢通路在多个干预组中均被显著富集, 尤其是在 Bru-HFAM (无论穴位给药与否) 及空白微针组中均出现, 嘌呤代谢产物如腺苷已被广泛报道具有抗炎与免疫调节作用, 如嘌呤代谢可通过将胞外促炎信号 ATP 转化为具有强大免疫抑制作用的腺苷 (主要作用于 A2A 受体), 直接关闭炎症反应并抑制破骨细胞^[41]。因此推测, Bru-HFAM 抗 RA 的作用机制可能部分通过调节嘌呤代谢通路实现, 而微针物理刺激本身也可能通过该通路产生协同效应。此外, 模型组中显著上调的花生四烯酸代谢通路在 Bru-HFAM 穴位给药干预后得到回调, 进一步提示该给药方式在抑制炎症介质生成方面具有潜在优势。

滑膜液与血清作为反映 RA 局部病变与全身代谢状态的 2 类关键生物样本, 在本研究中展现出高度的代谢轮廓关联性与病理进程一致性。嘌呤代谢在滑膜液与血清模型组中均被显著富集, 提示这条通路不仅是局部滑膜炎症的核心调控节点, 也反映了全身免疫代谢网络的失调状态; 从病理机制角度来看, 滑膜液中 3-羟基丁酸的上调反映了局部酮体代谢紊乱与 cAMP 信号通路的抑制状态, 而血清中嘌呤代谢的紊乱则体现了系统性能量代谢与免疫调节通路的失衡。两者共同指向炎症信号通路的激活与代谢免疫稳态的破坏。值得注意的是, 滑膜液与血清给药组均富集花生四烯酸代谢通路, 花生四烯酸代谢通路是炎症核心通路, 也是 RA 病理过程中的关键代谢轴之一。滑膜液中显著回调的代谢物 (如脱氧胞苷、3-羟基丁酸、二酰甘油等) 与血清中富集的嘌呤代谢、花生四烯酸代谢在功能上高度协同, 脱氧胞苷作为核苷酸代谢前体, 既参与局部滑膜细胞的 DNA 修复与增殖调控, 也通过血清代谢网络影响全身免疫细胞的克隆扩增; 二酰甘油的下调则与 NF- κ B 等促炎通路的抑制相一致, 其在滑膜

局部的变化与血清中花生四烯酸代谢的下调形成上下游呼应。

综上,本研究通过滑膜液与血清代谢组学联合分析,系统揭示了 Bru-HFAM 穴位给药对 CIA 大鼠机体代谢紊乱的整体调控作用,明确了 Bru-HFAM 能够显著回调 CIA 大鼠滑膜液与血清中多种差异代谢物,并对 cAMP 信号通路、丁酸代谢、核苷酸代谢、花生四烯酸代谢、嘌呤代谢等关键代谢途径,提示其抗 RA 的疗效机制可能与调控免疫代谢稳态、抑制炎症信号传导及重建代谢平衡密切相关。本研究的主要局限性在于,当前实验主要在 CIA 大鼠模型中观察 Bru-HFAM 对局部滑膜液与整体血清代谢谱的调节作用,所发现的代谢物变化及通路富集结果不能直接外推至临床 RA 患者的复杂病理环境,同时在实验方法上,相比其他组的微针/针刺操作,缺乏对物理刺激本身的对照,在比较时可能存在安慰剂效应不匹配的问题。此外,代谢组学所揭示的差异代谢物与通路调控仍需结合功能验证实验进一步确证其因果关联与分子机制。不过,本研究将滑膜液微透析技术与代谢组学联用,成功构建了更贴近关节局部病理状态的代谢体系,所获得的代谢特征与通路富集证据为理解“微针-穴位-药物”协同作用机制提供了重要参考,为治疗 RA 提供了代谢层面的实验依据,也为微透析-代谢组学联用技术在疾病研究中的应用提供了示例。

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] Di Matteo A, Bathon J M, Emery P. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10416): 2019-2033.
- [3] Smith M H, Berman J R. What is rheumatoid arthritis? [J]. *Jama*, 2022, 327(12): 1194.
- [4] Kadian V, Rao R. Enhancing anti-inflammatory effect of brucine nanohydrogel using rosemary oil: A promising strategy for dermal delivery in arthritic inflammation [J]. *3 Biotech*, 2024, 14(6): 157.
- [5] Noman M, Qazi N G, Rehman N U, et al. Pharmacological investigation of brucine anti-ulcer potential [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 886433.
- [6] Lee M S, Shin B C, Ernst E. Acupuncture for rheumatoid arthritis: A systematic review [J]. *Rheumatology*, 2008, 47(12): 1747-1753.
- [7] Zhu R, Liao H Y, Huang Y C, et al. Application of injectable hydrogels as delivery systems in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Br J Hosp Med*, 2024, 85(8): 1-41.
- [8] Kou L F, Xiao S Y, Sun R, et al. Biomaterial-engineered intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 870-885.
- [9] Filho D, Guerrero M, Pariguana M, et al. Hydrogel-based microneedle as a drug delivery system [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(10): 2444.
- [10] 王世运, 宋信莉, 钱舒琪, 等. 基于“针刺+膨胀”双刺激的马钱子碱水凝胶微针对大鼠类风湿性关节炎的药效研究 [J]. *药学报*, 2026, 61(1): 283-291.
- [11] 王敏君, 刘磊, 胡玲, 等. 基于代谢组学技术的针灸效应机制研究进展 [J]. *上海针灸杂志*, 2020, 39(5): 643-646.
- [12] Badnikar K, Jayadevi S N, Pahal S, et al. Microscale engineering of hollow microneedle tips: Design, manufacturing, optimization and validation [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(2): 350-367.
- [13] Gill H S, Prausnitz M R. Pocketed microneedles for drug delivery to the skin [J]. *J Phys Chem Solids*, 2008, 69(5/6): 1537-1541.
- [14] Zhao W M, Zheng L J, Yang J H, et al. Dissolving microneedle patch-assisted transdermal delivery of methotrexate improve the therapeutic efficacy of rheumatoid arthritis [J]. *Drug Deliv*, 2023, 30(1): 121-132.
- [15] 张国瓊, 李瑛, 王紫艳, 等. 基于代谢组学探究补阳还五汤对缺血性心脑血管病气虚血瘀证的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2026, 32(2): 268-276.
- [16] 易茗. 类风湿关节炎发病机制及针灸干预的临床研究进展 [J]. *现代诊断与治疗*, 2025, 36(3): 366-368.
- [17] Garcia-Carbonell R, Divakaruni A S, Lodi A, et al. Critical role of glucose metabolism in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(7): 1614-1626.
- [18] Chang X T, Wei C. Glycolysis and rheumatoid arthritis: Glycolysis and RA [J]. *Int J Rheum Dis*, 2011, 14(3): 217-222.
- [19] Urbaniak B, Plewa S, Klupczynska A, et al. Serum free amino acid levels in rheumatoid arthritis according to therapy and physical disability [J]. *Cytokine*, 2019, 113: 332-339.
- [20] 杜瑞平, 张兴夫, 高民, 等. 甘氨酸的免疫调节作用及其分子机制 [J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 663-670.
- [21] 蒋思思. 基于代谢组学的维药刺山柑抗类风湿性关节炎有效性评价及作用机制研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015.
- [22] Navarini L, Afeltra A, Gallo Afflitto G, et al. Polyunsaturated fatty acids: Any role in rheumatoid

- arthritis? [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 197.
- [23] Verma A, Dubey N, Agrawal A, *et al.* Dietary, herbal and nutritional interventions for managing rheumatoid arthritis: A review [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2024, 25(2): 125-132.
- [24] Tavares L P, Negreiros-Lima G L, Lima K M, *et al.* Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 105030.
- [25] Schlegel N, Waschke J. cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier-a signaling pathway compromised in inflammation [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(3): 587-596.
- [26] Aslam M, Ladilov Y. Emerging role of cAMP/AMPK signaling [J]. *Cells*, 2022, 11(2): 308.
- [27] 李彪, 邹润, 苏发智, 等. 含羞草根水提物对干酵母致大鼠高热的解热作用及其药效物质基础 [J]. *中草药*, 2025, 56(11): 3920-3934.
- [28] Lin P, Cheng T C, Ma S Y, *et al.* *Bacillus bombysepticus* α -toxin binding to G protein-coupled receptor kinase 2 regulates cAMP/PKA signaling pathway to induce host death [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(3): e1005527.
- [29] Li Y M, Chen H M, Huang R H. HCAR2 inhibits prostate cancer invasion and metastasis by regulating cAMP signaling pathway [J]. *J Invest Med*, 2025: 10815589251406272.
- [30] Singhal R, Donde H, Ghare S, *et al.* Decrease in acetyl-CoA pathway utilizing butyrate-producing bacteria is a key pathogenic feature of alcohol-induced functional gut microbial dysbiosis and development of liver disease in mice [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1946367.
- [31] Zhou Z, Cao J S, Liu X M, *et al.* Evidence for the butyrate metabolism as key pathway improving ulcerative colitis in both pediatric and adult patients [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8309-8324.
- [32] Liu Q L, Liu J H, Wang S G, *et al.* Roles of nucleotide metabolism in pancreatic cancer [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1637768.
- [33] Samanta S, Rajasingh S, Cao T, *et al.* Epigenetic dysfunctional diseases and therapy for infection and inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis*, 2017, 1863(2): 518-528.
- [34] Diamond C P, Im J, Button E A, *et al.* AID, APOBEC3A and APOBEC3B efficiently deaminate deoxycytidines neighboring DNA damage induced by oxidation or alkylation [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj*, 2019, 1863(11): 129415.
- [35] Han Z L, Wang H Y, Guo D M, *et al.* Integrative transcriptomic and metabolomic profiling analyses reveal the molecular mechanism of Chinese traditional medicine huankuile suspension on TNBS-induced ulcerative colitis [J]. *Aging*, 2021, 13(4): 5087-5103.
- [36] Dzobo K E, Cupido A J, Mol B M, *et al.* Diacylglycerols and lysophosphatidic acid, enriched on lipoprotein(a), contribute to monocyte inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2024, 44(3): 720-740.
- [37] Zhang X F, Yin M D, Zhang D Y, *et al.* Metabolomics reveals disturbed amino acid metabolism during different stages of RA in collagen-induced arthritis mice [J]. *Inflammation*, 2024, 47(5): 1853-1867.
- [38] Li A M, Ye J B. Reprogramming of serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis*, 2020, 1866(10): 165841.
- [39] Ling H Z, Li M, Yang C L, *et al.* Glycine increased ferroptosis via SAM-mediated GPX4 promoter methylation in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2022, 61(11): 4521-4534.
- [40] Chai A B, Ammit A J, Gelissen I C. Examining the role of ABC lipid transporters in pulmonary lipid homeostasis and inflammation [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 41.
- [41] Dewulf J P, Marie S, Nassogne M C. Disorders of purine biosynthesis metabolism [J]. *Mol Genet Metab*, 2022, 136(3): 190-198.

[责任编辑 李亚楠]