

青藤碱调控巨噬细胞极化对胶原诱导性关节炎大鼠的影响

Effects of sinomenine on collagen – induced arthritis rats *via* regulating macrophage polarization

王金凤, 刘杰, 王枫,
刘晓庆, 马腾茂

(山东中医药高等专科学校 医学系, 山东 烟台
264199)

WANG Jin – feng, LIU Jie,
WANG Feng, LIU Xiao – qing,
MA Teng – mao

(Department of Medicine, Shandong
College of Traditional Chinese Medicine,
Yantai 264199, Shandong Province,
China)

基金项目: 山东省中医药科技基金资助项目
(Z – 2023079)

作者简介: 王金凤(1975 –), 女, 副教授, 主要从事
中西医结合临床方面的研究

通信作者: 王金凤

MP: 13906453869

E – mail: xycwan750705@163.com

摘要:目的 探究青藤碱(Sin)通过调控巨噬细胞极化治疗胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠的可能作用机制。**方法** 将Wistar大鼠随机分为对照组(正常饲养)、模型组(尾根部注射牛Ⅱ型胶原建立CIA模型)和低、中、高剂量实验组(在模型组基础上,分别灌胃40、80、160 mg · kg⁻¹ Sin)以及 inh – NC组和 inh – miR – 885 – 5p组[在高剂量实验组基础上,分别尾静脉注射微小RNA – 885 – 5p(miR – 885 – 5p)阴性对照和 miR – 885 – 5p 抑制药],持续4周,每组各10只。统计各组大鼠关节炎指数(AI)及足跖肿胀度,用苏木精 – 伊红染色法观察踝关节滑膜组织病理状况,用实时荧光定量聚合酶链反应检测大鼠滑膜组织中 miR – 885 – 5p 相对表达水平,用蛋白质印迹法检测大鼠滑膜组织中相关蛋白相对表达水平,用酶联免疫吸附试验法检测血清炎症因子水平,用末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法检测大鼠滑膜细胞凋亡情况。**结果** 对照组、模型组、高剂量实验组的 AI 评分分别为 0、(7.20 ± 1.38)和(5.50 ± 1.10)分,足跖肿胀度分别为 35.32 ± 7.05、72.46 ± 14.47 和 51.65 ± 10.31, miR – 885 – 5p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18、0.52 ± 0.10 和 0.71 ± 0.14;对照组、模型组、高剂量实验组、inh – NC组和 inh – miR – 885 – 5p 组的细胞因子信号传导抑制因子 1(SOCS1)蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18、0.51 ± 0.10、0.75 ± 0.15、0.71 ± 0.14 和 0.55 ± 0.11,白细胞介素(IL) – 6 水平分别为(35.29 ± 7.05)、(215.82 ± 43.15)、(121.33 ± 24.25)、(115.62 ± 23.08)和(207.39 ± 41.36) pg · mL⁻¹,细胞凋亡率分别为(31.47 ± 6.29)%、(12.19 ± 2.43)%、(22.03 ± 4.41)%、(20.16 ± 4.03)%和(13.37 ± 2.66)%。低、中、高剂量实验组的上述指标呈剂量依赖性变化,高剂量实验组和对照组的上述指标与模型组相比,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); inh – miR – 885 – 5p 组的上述指标与 inh – NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** Sin 能够调控巨噬细胞极化,改善 CIA 大鼠滑膜炎症,其机制可能与上调 miR – 885 – 5p 表达,激活 SOCS1/信号转导及转录激活因子 3(STAT3)信号途径有关。

关键词: 青藤碱;微小核糖核酸 – 885 – 5p;胶原诱导性关节炎;细胞因子信号传导抑制因子 1;信号转导及转录激活因子 3;炎症因子;凋亡

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.06.018

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001 – 6821(2025)06 – 0846 – 06

Abstract: Objective To investigate the possible mechanism of action of sinomenine (Sin) in the treatment of collagen – induced arthritis (CIA) rats by regulating macrophage polarization. **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group (normal diet and care), model group (CIA model was established with bovine type II collagen at

the tail), experimental - L, - M, - H groups (all on the basis of the model group, 40, 80 and 160 mg · kg⁻¹ Sin by gavage respectively), inh - NC group and inh - miR - 885 - 5p group[on the basis of the experimental - H group, the two groups were injected with a negative control of microRNA - 885 - 5p (miR - 885 - 5p) and miR - 885 - 5p inhibitor in the tail vein, respectively)], for four weeks, with 10 rats in each group. The arthritis index (AI) and plantar swelling of rats in each group were statistically analyzed. The pathological conditions of the synovial tissue of the ankle joint were observed by hematoxylin - eosin staining. Real - time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was performed to examine the relative expression level of *miR - 885 - 5p* in rat synovial tissue. Western blot was carried out to detect the expression of related proteins in the synovial tissue of rats. Enzyme - linked immunosorbent assay was used to detect the level of serum inflammatory factors. Terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated nick end labeling (TUNEL) was used to detect the apoptosis of rat synovial cells. **Results** The AI scores of the control group, model group and experimental - H group were 0, (7.20 ± 1.38) and (5.50 ± 1.10) scores, respectively; the paw swelling were 35.32 ± 7.05, 72.46 ± 14.47 and 51.65 ± 10.31, respectively; the relative expression levels of *miR - 885 - 5p* were 1.00 ± 0.18, 0.52 ± 0.10 and 0.71 ± 0.14, respectively. The relative expression levels of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) protein in the control, model group, experimental - H group, inh - NC group and inh - miR - 885 - 5p group were 1.00 ± 0.18, 0.51 ± 0.10, 0.75 ± 0.15, 0.71 ± 0.14 and 0.55 ± 0.11, respectively; the levels of interleukin (IL) - 6 were (35.29 ± 7.05), (215.82 ± 43.15), (121.33 ± 24.25), (115.62 ± 23.08) and (207.39 ± 41.36) pg · mL⁻¹, respectively; the apoptosis rates were (31.47 ± 6.29)%, (12.19 ± 2.43)%, (22.03 ± 4.41)%, (20.16 ± 4.03)% and (13.37 ± 2.66)%, respectively. The above indexes in the experimental - L, - M, - H groups were dose - dependent, and the differences in the above indexes between the experimental - H group and the control group were statistically significant compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), and the differences in the above indexes between the inh - miR - 885 - 5p group and the inh - NC group were also all statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Sin can regulate macrophage polarization, and improve synovial inflammation in CIA rats, which may be related to the up - regulation of *miR - 885 - 5p* expression and activation of SOCS1/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway.

Key words: sinomenine; microRNA - 885 - 5p; collagen - induced arthritis; suppressor of cytokine signaling 1; signal transducer and activator of transcription 3; inflammatory factors; apoptosis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种致残性慢性自身免疫性疾病,临床症状表现为多关节慢性滑膜炎、软骨和骨损伤,严重影响患者的生活质量^[1]。目前,RA的治疗以控制滑膜炎和骨破坏为切入点,非甾体抗炎药、抗风湿药、激素等常规治疗药物可在一定程度上缓解RA临床症状,但部分患者存在药物不良反应较大、耐受和依从性差等问题^[2]。青藤碱(sinomenine, Sin)是从青风藤及毛青藤中提取的单体生物碱,有抗肿瘤、抗炎、抗菌、镇痛、免疫抑制、降血压等药理作用,治疗RA具有疗效显著、药物不良反应小的优势^[3]。本研究旨在探究Sin通过调控巨噬细胞极化治疗胶原诱导性关节炎大鼠的可能作用机制,以期Sin治疗RA提供实验依据。

材料与方法

1 材料

动物 SPF级Wistar雌性大鼠,鼠龄3~4周,体

质量100~120 g,购自山东朋悦实验动物科技有限公司。动物生产许可证号:SCXK(鲁)2022 0006。本实验经山东中医药高等专科学校实验动物伦理委员会批准(伦理批号:2024-001)。

药品与试剂 Sin,规格:每瓶25 g,纯度:≥98%,批号:MO7HS177208,购自上海源叶生物科技有限公司;牛Ⅱ型胶原,规格:每瓶10 mg/5 mL,批号:230479,购自美国Chondrex公司;弗氏不完全佐剂,规格:每瓶5 mL,批号:240068,购自美国Chondrex公司。miR - 885 - 5p抑制物(miR - 885 - 5p inhibitor, inh - miR - 885 - 5p)及其阴性对照(inh - NC)、荧光探针和所有引物,均由上海生工生物工程股份有限公司提供;信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)抗体、磷酸化STAT3(phosphorylation STAT3, p - STAT3)抗体、细胞因子信号传导抑制因子1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyce-

raldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体,均购自美国 CST 公司;分化簇(cluster of differentiation, CD)206 抗体、CD86 抗体,均购自武汉三鹰生物技术有限公司;山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、山羊抗小鼠 IgG 二抗,均购自美国 BioWorld 公司;肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α , TNF - α)、白细胞介素 - 6 (interleukin - 6, IL - 6)、IL - 10 和 IL - 4 试剂盒,均购自江苏酶免实业有限公司;反转录、荧光定量分析试剂盒,均购自北京天根生化科技公司;苏木精 - 伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色试剂盒、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白法检测试剂盒、末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 试剂盒,均购自北京索莱宝科技有限公司。

仪器 Multiskan FC 酶标仪、PikoReal 定量聚合酶链反应 (real - time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT - qPCR) 仪,均为美国 Thermo Fisher 公司产品;BX51 倒置荧光显微镜,日本 Olympus 公司产品;ChemiDoc XRS + 凝胶成像系统,美国 Bio - Rad 公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建、动物分组与给药方法

将 $2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛 II 型胶原与弗氏不完全佐剂充分乳化,于大鼠尾根部皮下注射 0.3 mL 作为基础免疫,1 周后于大鼠尾根部皮下注射 0.2 mL 进行加强免疫;对照组大鼠注射等体积 0.9% NaCl。建模时间为 14 d。将 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组和低、中、高剂量实验组以及 inh - NC 组和 inh - miR - 885 - 5p 组。对照组:不做任何处理;模型组:按照上述方法建立胶原诱导性关节炎 (collagen - induced arthritis, CIA) 模型;低、中、高剂量实验组:基于模型组大鼠,分别给予 40 、 80 和 $160\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Sin 灌胃处理,每天 1 次,持续 4 周;inh - NC 组:基于高剂量实验组大鼠,尾静脉注射 $60\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NC inhibitor,每周 2 次,持续 4 周;inh - miR - 885 - 5p 组:基于高剂量实验组大鼠,尾静脉注射 $60\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ miR - 885 - 5p inhibitor,每周 2 次,持续 4 周。

2.2 关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分

根据关节肿胀程度、颜色及关节活动情况记录并评价大鼠全身关节病变程度。评分标准:0 分表示无关节肿胀;1 分表示小趾关节稍肿;2 分代表趾关节和足趾肿胀;3 分是踝关节以下的足爪肿胀;4 分则包括踝关节在内全部足爪肿胀^[4]。将肢体的病变程度累

积积分,最高分值为 16 分。

2.3 足跖肿胀度评价^[5]

在大鼠造模前 1 d、给药前 1 d (给药前) 和给药 28 d (给药后),用足趾容积测量仪分别测量大鼠双后肢足爪的容积。足跖肿胀度 = $(V_1 - V_0) / V_0 \times 100\%$, V_1 是给药前 1 d 或给药 28 d 足跖容积, V_0 为造模前 1 d 足跖容积。

2.4 HE 染色法检测大鼠踝关节滑膜组织病理变化

将大鼠麻醉,仰卧固定,剥离大鼠的踝关节滑膜,多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色后,用显微镜进行组织形态学观察。

2.5 RT - qPCR 法检测大鼠滑膜组织中 miR - 885 - 5p 相对表达水平^[6]

用 TRIzol 法提取 inh - NC 组、inh - miR - 885 - 5p 组大鼠血清和每组大鼠滑膜组织的总 RNA,根据试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA 并配制体系进行定量扩增,以 U6 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法检测 miR - 885 - 5p 相对表达水平。

2.6 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 法检测滑膜组织 miR - 885 - 5p 的荧光强度

miR - 885 - 5p 的特异性探针序列为 $5' - \text{DIG} - \text{UCCACUACACCCCGCUGCCUC} - \text{DIG} - 3'$,取“2.4”石蜡包埋后的切片,经固定脱水后,加入杂交液室温孵育 12 h,4',6 - 二脒基 - 2 - 苯基吡啶将细胞核染成蓝色,最后置于荧光显微镜下观察。

2.7 蛋白质印迹法测定大鼠滑膜组织中相关蛋白表达情况^[7-8]

取各组大鼠滑膜组织,加入放射免疫沉淀法裂解缓冲液提取总蛋白,BCA 法检测各组滑膜组织蛋白浓度,电转移至聚偏氟乙烯膜上,用 5% 脱脂奶粉溶液室温下封闭,抗体孵育后,滴加电化学发光显影液显色,以 GAPDH 为内参,于凝胶成像系统仪下成像,用 Image J 软件进行灰度值量化分析。

2.8 酶联免疫吸附试验 (enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测大鼠血清炎症因子水平

大鼠麻醉后腹主动脉取血,以 $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,将上清液保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,用 ELISA 试剂盒检测血清 TNF - α 、IL - 6、IL - 4 和 IL - 10 的水平。

2.9 TUNEL 法检测大鼠滑膜组织细胞凋亡率

取“2.4”石蜡包埋后的切片,二甲苯和梯度乙醇脱蜡水化后,加入 $20\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶 K 溶液通透,室温孵育 20 min,蒸馏水清洗,按照说明书加入配制

的 TUNEL 检测液,37 ℃ 下避光孵育 1 h,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗,加入 4',6 - 二脒基 - 2 - 苯基吡啶对细胞核复染,荧光显微镜观察,细胞凋亡率 (%) = 阳性细胞数 / 总细胞数 × 100 % 。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,2 组间比较用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 Sin 对 CIA 大鼠 AI 及足跖肿胀度的影响

对照组大鼠正常饲养,不做处理;模型组大鼠用牛Ⅱ型胶原与弗氏不完全佐剂建立 CIA 模型;低、中、高剂量实验组基于模型组分别灌胃 40、80、160 mg · kg⁻¹ Sin 处理;inh - NC 组和 inh - miR - 885 - 5p 组基于高剂量实验组,分别尾静脉注射 miR - 885 - 5p 阴性对照和 miR - 885 - 5p 抑制药。

给药前,模型组大鼠的 AI 评分和足跖肿胀度均显著高于对照组 (均 *P* < 0.001);低、中、高剂量实验组大鼠的 AI 评分和足跖肿胀度与模型组相比,在统

计学上差异均无统计学意义 (均 *P* > 0.05)。给药后,中、高剂量实验组大鼠的 AI 评分均显著低于模型组 (*P* < 0.05, *P* < 0.01);低、中、高剂量实验组大鼠的足跖肿胀度均显著低于模型组 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。结果见表 1。

2 Sin 对 CIA 大鼠踝关节滑膜组织病理学的影响

HE 结果显示:对照组大鼠踝关节滑膜组织结构正常,无炎性细胞浸润;模型组滑膜细胞紊乱,肥大变形突起,滑膜增生形成血管翳,并可见大量炎性细胞浸润;低、中、高剂量实验组的上述病理变化有不同程度减轻。结果见图 1。

3 Sin 对 CIA 大鼠滑膜组织中 miR - 885 - 5p 表达的影响

对照组、模型组和低、中、高剂量实验组的 miR - 885 - 5p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18、0.52 ± 0.10、0.63 ± 0.12、0.68 ± 0.13 和 0.71 ± 0.14;模型组与对照组相比,miR - 885 - 5p 相对表达水平显著降低 (*P* < 0.001);低、中、高剂量实验组与模型组相比,miR - 885 - 5p 相对表达水平均显著升高 (均 *P* < 0.05)。

4 Sin 基于 miR - 885 - 5p 对 SOCS1/STAT3 通路蛋白表达水平的影响

inh - NC 组和 inh - miR - 885 - 5p 组血清中

表 1 各组大鼠关节炎指数 (AI) 评分和足跖肿胀度的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of arthritis index (AI) scores and plantar swelling of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	AI (score)		Plantar swelling (%)	
		Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment
Control	10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.57 ± 0.31	35.32 ± 7.05
Model	10	4.70 ± 0.94 ***	7.20 ± 1.38 ***	19.32 ± 3.85 ***	72.46 ± 14.47 ***
Experimental - L	10	4.80 ± 0.96	6.10 ± 1.21	18.54 ± 3.71	60.33 ± 11.05 [#]
Experimental - M	10	4.60 ± 0.92	5.70 ± 1.13 [#]	18.27 ± 3.65	56.24 ± 11.23 [#]
Experimental - H	10	4.80 ± 0.95	5.50 ± 1.10 ^{##}	19.66 ± 3.93	51.65 ± 10.31 ^{##}

Control group: Normal feeding; Model group: The collagen - induced arthritis model was established by bovine type II collagen; Experimental - L, - M, - H groups: On the basis of the model group, 40, 80, 160 mg · kg⁻¹ Sin was given intragastrically, respectively; Compared with control group, *** *P* < 0.001; Compared with model group, [#] *P* < 0.05, ^{##} *P* < 0.01.

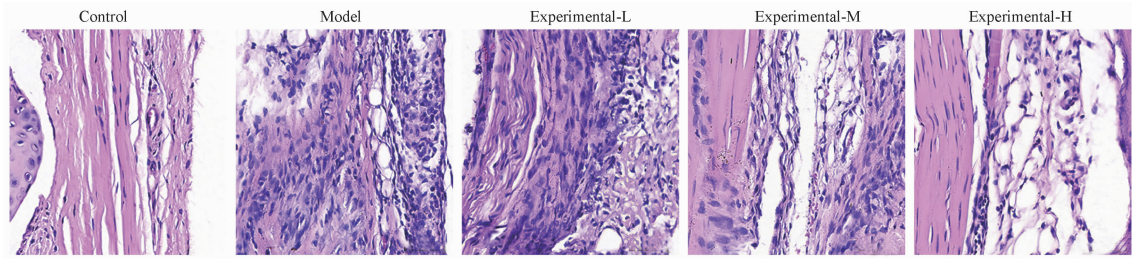


图 1 用苏木精 - 伊红染色法观察各组大鼠滑膜组织病理形态 (× 200)
Figure 1 Hematoxylin eosin was used to observe the pathological morphology of synovial tissue in rats of each group (× 200)

miR-885-5*p*相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 和 0.62 ± 0.12 ,滑膜组织中 *miR*-885-5*p* 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 和 0.58 ± 0.11 ,*inh*-*miR*-885-5*p* 组的上述指标与 *inh*-NC 组比较均显著降低(均 $P < 0.001$)。对照组、模型组、低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组、*inh*-NC 组、*inh*-*miR*-885-5*p* 组的 SOCS1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 0.51 ± 0.10 、 0.62 ± 0.12 、 0.67 ± 0.13 、 0.75 ± 0.15 、 0.71 ± 0.14 和 0.55 ± 0.11 ,STAT3 蛋白磷酸化相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 2.66 ± 0.53 、 2.15 ± 0.42 、 1.93 ± 0.38 、 1.78 ± 0.35 、 1.84 ± 0.37 和 2.47 ± 0.49 ;模型组与对照组相比,SOCS1 蛋白相对表达水平显著降低,STAT3 蛋白磷酸化相对表达水平显著升高(均 $P < 0.001$);低、中、高剂量实验组与模型组相比,SOCS1 蛋白相对表达水平显著升高,STAT3 蛋白磷酸化相对表达水平显著降低(均 $P < 0.05$);*inh*-NC 组与高剂量实验组相比,SOCS1 蛋白相对表达水平和 STAT3 蛋白磷酸化相对表达水平均无显著性差异(均 $P > 0.05$);*inh*-*miR*-885-5*p* 组与 *inh*-NC 组相比,SOCS1 蛋白相对表达水平显著降低,STAT3 蛋白磷酸化相对表达水平显著升高(均 $P < 0.05$)。

5 Sin 基于 *miR*-885-5*p* 对 CIA 大鼠滑膜组织中巨噬细胞标志蛋白相对表达水平的影响

对照组、模型组、低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组、*inh*-NC 组和 *inh*-*miR*-885-5*p* 组的 CD86 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.20 、 2.41 ± 0.47 、 2.01 ± 0.37 、 1.84 ± 0.36 、 1.63 ± 0.32 、 1.67 ± 0.33 和 2.38 ± 0.47 ,CD206 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 0.44 ± 0.09 、 0.53 ± 0.10 、 0.65 ± 0.12 、 0.71 ± 0.14 、 0.75 ± 0.15 和 0.49 ± 0.10 ;模型组与对照组相比,CD86 蛋白相对表达水平显著

升高,CD206 蛋白相对表达水平显著降低(均 $P < 0.001$);低、中、高剂量实验组与模型组相比,CD86 蛋白相对表达水平显著降低,CD206 蛋白相对表达水平显著升高(均 $P < 0.05$);*inh*-NC 组与高剂量实验组相比,CD86 和 CD206 蛋白相对表达水平均无显著性变化(均 $P > 0.05$);*inh*-*miR*-885-5*p* 组与 *inh*-NC 组相比,CD86 蛋白相对表达水平显著升高,CD206 蛋白相对表达水平显著降低(均 $P < 0.01$)。
6 Sin 基于 *miR*-885-5*p* 对 CIA 大鼠血清炎症因子水平的影响

模型组中 TNF- α 、IL-6 水平均显著高于对照组,IL-4 和 IL-10 水平均显著低于对照组(均 $P < 0.001$);低、中、高剂量实验组中 TNF- α 和 IL-6 水平均显著低于模型组,IL-4 和 IL-10 水平均显著高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$);*inh*-NC 组中 TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10 水平与高剂量实验组相比,在统计学上均无统计学意义(均 $P > 0.05$);*inh*-*miR*-885-5*p* 组中 TNF- α 和 IL-6 水平均显著高于*inh*-NC 组,IL-4 和 IL-10 水平均显著低于*inh*-NC 组(均 $P < 0.001$)。结果见表2。

7 Sin 基于 *miR*-885-5*p* 对 CIA 大鼠滑膜细胞凋亡的影响

对照组、模型组、低剂量实验、中剂量实验、高剂量实验组、*inh*-NC 组、*inh*-*miR*-885-5*p* 组的细胞凋亡率分别为 $(31.47 \pm 6.29)\%$ 、 $(12.19 \pm 2.43)\%$ 、 $(15.34 \pm 3.27)\%$ 、 $(17.36 \pm 3.57)\%$ 、 $(22.03 \pm 4.41)\%$ 、 $(20.16 \pm 4.03)\%$ 和 $(13.37 \pm 2.66)\%$;模型组与对照组相比,细胞凋亡率显著下降($P < 0.001$);低、中、高剂量实验组与模型组相比,细胞凋亡率均显著提高(均 $P < 0.05$);*inh*-*miR*-885-5*p* 组与 *inh*-NC 组相比,细胞凋亡率显著降低($P < 0.001$)。

表2 各组大鼠血清中炎症因子水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum levels of inflammatory factors in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	TNF- α (pg·mL ⁻¹)	IL-6(pg·mL ⁻¹)	IL-4(pg·mL ⁻¹)	IL-10(pg·mL ⁻¹)
Control	10	78.23 ± 15.46	35.29 ± 7.05	76.16 ± 15.22	87.36 ± 17.45
Model	10	487.89 ± 96.75***	215.82 ± 43.15***	15.67 ± 3.13***	11.35 ± 2.26***
Experimental-L	10	401.28 ± 79.87 [#]	167.30 ± 33.41 [#]	20.36 ± 4.27 [#]	15.48 ± 3.39 ^{##}
Experimental-M	10	362.27 ± 72.41 ^{##}	140.05 ± 27.76 ^{###}	26.51 ± 5.31 ^{###}	26.13 ± 5.21 ^{###}
Experimental-H	10	277.34 ± 55.41 ^{###}	121.33 ± 24.25 ^{###}	37.48 ± 7.09 ^{###}	38.59 ± 7.71 ^{###}
<i>inh</i> -NC	10	282.68 ± 56.48	115.62 ± 23.08	33.02 ± 6.61	41.23 ± 8.25
<i>inh</i> - <i>miR</i> -885-5 <i>p</i>	10	466.27 ± 93.25 $\Delta\Delta\Delta$	207.39 ± 41.36 $\Delta\Delta\Delta$	19.45 ± 3.88 $\Delta\Delta\Delta$	10.64 ± 2.10 $\Delta\Delta\Delta$

inh-NC group: On the basis of the experimental-H group, rats were injected with a negative control of microRNA-885-5*p* (*miR*-885-5*p*); *inh*-*miR*-885-5*p* group: On the basis of the experimental-H group, rats were injected with *miR*-885-5*p* inhibitor in the tail vein; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL-6: Interleukin-6; IL-4: Interleukin-4; IL-10: Interleukin-10; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; Compared with *inh*-NC group, $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.001$.

讨 论

既往研究发现,许多中药可以通过调控炎症信号通路,抑制炎症因子分泌,从而发挥抗炎作用,减轻关节和软骨组织的破坏^[9-10]。Sin 可以通过调节免疫、炎症、氧化应激等相关信号转导途径和阻断痛觉神经元信号传递,发挥治疗风湿免疫性疾病的作用^[11]。戴宗顺等^[12]研究发现,CIA 模型大鼠足肿胀容积和关节炎指数评分均显著增加,关节可见大量炎性细胞浸润并伴有严重骨破坏,50 mg·kg⁻¹ Sin 灌胃干预后,上述指标和病症均有显著改善,与本研究结果相一致。这表明 Sin 有减轻大鼠关节肿胀度和骨破坏的功效。

成熟巨噬细胞有 M1 和 M2 2 种极化状态。M1 型巨噬细胞可分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-12、活性氧和一氧化氮合成酶等细胞因子参与促炎反应;M2 型则高表达精氨酸酶-1、转化生长因子- β 、IL-10 等参与抗炎反应^[13]。在正常生理条件下,M1/M2 保持动态平衡。本研究发现,CIA 大鼠滑膜组织中 M1 型巨噬细胞标志物 CD86 大量表达,而 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 低表达;经 Sin 治疗后,滑膜中 CD86 表达下降,CD206 表达升高。

有研究显示,miR-885-5p 在氧化受损的血管平滑肌细胞中低表达,上调其表达可抑制细胞的恶性增殖和炎症反应^[14]。TNF- α 可与相应受体结合促进炎症因子产生,IL-6 是促炎因子,参与调控炎症因子表达,二者均可作为炎症评价指标,与疾病活动呈正相关^[15]。STAT3 是由 IL-6 激活的主要转录因子,RA 中高表达的炎症因子激活 IL-6-STAT3 细胞因子环,引发慢性持续性炎症和关节破坏,上调 SOCS1 可抑制磷酸化 STAT3 的表达,从而抑制炎症细胞因子的产生^[16]。UTTRA 等^[17]在对关节炎大鼠的研究中发现,麻黄乙醇水溶液提取物可通过下调促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平,升高抗炎介质 IL-4 和 IL-10 的水平,抑制关节炎大鼠疾病的发生和发展。本研究中,CIA 模型大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平均显著升高,IL-4 和 IL-10 水平均显著降低;经 Sin 治疗后,降低了血清 TNF- α 和 IL-6 水平,升高了 IL-4 和 IL-10 水平。

本研究提示,Sin 可促进巨噬细胞 M2 型极化并抑制 M1 型极化,诱导滑膜细胞凋亡,有效减轻 CIA 大鼠关节滑膜炎性损伤,其机制可能与上调 miR-885-5p 表达,激活 SOCS1/STAT3 信号通路有关。

参考文献:

[1] 王铁峰,苏洁,王伟东,等. 三叶青调节 Th17/Treg 平衡抗类风湿性关节炎的作用及机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,

2023,28(2):138—146.

- [2] 杨锐,舒翊秦,文晖杰,等. 枫杨总黄酮通过抑制中性粒细胞外陷阱网的释放减轻大鼠类风湿性关节炎[J]. 南方医科大学学报,2024,44(9):1645—1652.
- [3] 胡剑威,丁超,吴莹,等. 青藤碱及其制剂治疗类风湿性关节炎的研究进展[J]. 陕西中医药大学学报,2024,47(3):1—7.
- [4] 吴伊莹,柳玉佳,廖亮英,等. 基于 Hesperidin 和 JAK2/STAT3 信号通路探讨通痹颗粒对胶原诱导性关节炎大鼠的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2024,44(6):960—966.
- [5] 樊万君,张佳音,王宸,等. 关节腔注射塞来昔布微球对大鼠类风湿性关节炎的治疗作用[J]. 中国药科大学学报,2021,52(5):573—578.
- [6] 封海岗,刘国文,曹洪. m~6A 修饰的 circ_100367 通过调控 miR-885-5p 轴介导甲状腺乳头状癌免疫逃逸[J]. 现代肿瘤医学,2023,31(11):1979—1985.
- [7] 董文哲,刘健,端淑杰. 新风胶囊通过调节 SOCS1/STAT3/miR326 改善类风湿关节炎患者 Th17/Treg 失衡状态[J]. 免疫学杂志,2018,34(6):499—506.
- [8] 董克臣,张萌,梁毅,等. 康复新液调控巨噬细胞极化防治大鼠急性放射性口腔黏膜炎[J]. 安徽医药,2023,27(12):2366—2370.
- [9] 陶盼,刘凡,李智斌. 基于炎症因子探讨膝骨关节炎的中医药研究进展[J]. 河北中医,2024,46(8):1403—1408.
- [10] 王永峰,王海瑜,康天伦,等. 芍药附子汤加味对胶原诱导性关节炎大鼠肌少症炎症介质及肌蛋白的影响[J]. 世界中医药,2024,19(8):1063—1068.
- [11] 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.
- [12] 戴宗顺,张逢,林也,等. 青藤碱伍芍药甘草协同增效抗胶原诱导性关节炎作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报,2023,43(12):2143—2149.
- [13] SHAPOURI - MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. J Cell Physiol,2018,233(9):6425—6440.
- [14] YU F, LIU J, WEI X. Circ - ABCA1 promotes oxidized low - density lipoprotein - induced inflammation and phenotypic switch in vascular smooth muscle cells[J/OL]. Clinics (Sao Paulo), 2024, 79: e100343. 2024 - 03 - 28 [2024 - 09 - 11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38554490/>.
- [15] 郭媛媛,朱志坤,王飘,等. 复方柏连制剂对小鼠抗炎镇痛作用及湿热型 UC 模型大鼠 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达的影响[J]. 医药导报,2023,42(8):1104—1109.
- [16] 顾文,张正菊,马卫国,等. 穿石通痹汤通过调节 GABRB1 - SOCS1/JAK1/STAT3 信号途径对 CIA 模型大鼠关节炎炎症损伤的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2024,19(5):915—926.
- [17] UTTRA A M, ALAMGEER, SHAHZAD M, et al. Ephedra gerardiana aqueous ethanolic extract and fractions attenuate Freund complete adjuvant induced arthritis in Sprague Dawley rats by downregulating PGE2, COX2, IL-1 β , IL-6, TNF- α , NF- κ B and upregulating IL-4 and IL-10 [J/OL]. J Ethnopharmacol, 2018, 224:482—496. 2018 - 10 - 05 [2024 - 09 - 11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29920358/>.

(收稿日期 2024 - 10 - 28)