

盘龙七片通过抑制 PI3K-AKT-GSK-3 β 信号通路介导的炎症反应改善类风湿性关节炎的分子机制研究

马荣¹, 赵艳婷¹, 刘妍¹, 刘妍如^{1*}, 唐志书^{1,2*}, 宋忠兴¹, 周瑞¹, 张德柱³, 张丽⁴

(1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 陕西 咸阳 712083;

2. 北京中医药大学, 北京 100700;

3. 陕西盘龙药业集团股份有限公司, 陕西 商洛 711400;

4. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] 该研究基于中药整体调节与多靶点作用特点,探讨盘龙七片通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)-蛋白激酶 B (AKT) 信号通路关键蛋白糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)、蛋白激酶 B3 (AKT3) 改善类风湿性关节炎的作用机制。采用右后足掌皮内注射 II 型胶原蛋白-完全弗氏佐剂诱导佐剂性关节炎大鼠模型,给予不同剂量盘龙七片进行干预,通过观察大鼠体质量变化,测量足趾容积,HE 染色观察踝关节滑膜组织病理形态及 ELISA 检测血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平评估药效;将前期网络药理学筛选得到的靶点与非靶向代谢组学得到的与治疗相关的生物标记物进行关联,用于关键通路富集以及关键靶点获取,然后利用 Western blot 和 RT-qPCR 方法对关键靶点进行验证。动物实验结果显示,与模型组比较,盘龙七片各剂量组均能显著改善类风湿性关节炎 (RA) 大鼠的体质量下降趋势,减轻足趾肿胀程度,抑制滑膜组织纤维增生和炎性细胞浸润,并降低血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎因子水平,且呈现一定的剂量依赖性。代谢组学结果显示,盘龙七片对 RA 相关的 276 个生物标记物中的 179 个有调控作用。富集结果显示,PI3K-AKT 信号通路中的 GSK-3 β 、PIK3CA 和 AKT3 蛋白是盘龙七片干预 RA 的关键靶点。Western blot 和 RT-qPCR 对关键靶点的验证结果显示,盘龙七片对以上 3 个靶点有显著调控作用。综上所述,盘龙七片对类风湿性关节炎的干预作用可能与其对 PI3K-AKT 信号通路的 GSK-3 β 、PIK3CA 和 AKT3 蛋白的调控有关。

[关键词] 盘龙七片; 类风湿性关节炎; PI3K-AKT 信号通路; GSK-3 β ; PIK3CA; AKT3

Molecular mechanism of Panlongqi Tablets in ameliorating rheumatoid arthritis by suppressing PI3K-AKT-GSK-3 β signaling pathway-mediated inflammatory responses

MA Rong¹, ZHAO Yan-ting¹, LIU Yan¹, LIU Yan-ru^{1*}, TANG Zhi-shu^{1,2*}, SONG Zhong-xing¹, ZHOU Rui¹,
ZHANG De-zhu³, ZHANG Li⁴

(1. Shaanxi Provincial and Ministerial Co-constructed Collaborative Innovation Center for Industrialization of Traditional Chinese Medicine Resources, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

3. Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shangluo 711400, China;

4. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

[收稿日期] 2025-08-27

[基金项目] 陕西省中医药科技创新提质扩能计划项目 (TZKN-CXRC-23); 全国中药特色技术传承人才培养项目 (国中医药人教函[2023]96 号)

[通信作者] * 刘妍如, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药质量控制及物质基础研究, E-mail: yanzi_2203@aliyun.com; * 唐志书, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源开发与中药质量分析研究, E-mail: tzs6565@163.com

[作者简介] 马荣, 硕士研究生, E-mail: 2963644985@qq.com

[Abstract] Based on the holistic regulation and multi-target characteristics of TCM, this study investigated the mechanism of Panlongqi Tablets (PLQT) in ameliorating rheumatoid arthritis (RA) by regulating key proteins, including glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), and protein kinase B3 (AKT3), within the PI3K-AKT signaling pathway. An adjuvant-induced arthritis (AIA) rat model was established by intradermal injection of type II collagen-Freund's complete adjuvant into the right hind paw, and rats received different doses of PLQT for intervention. Pharmacodynamic effects were evaluated by monitoring changes in body weight, measuring paw swelling, observing ankle synovial tissue pathology via hematoxylin-eosin (HE) staining, and detecting serum levels of inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β), using ELISA. Targets identified through prior network pharmacology screening were integrated with therapy-related biomarkers from untargeted metabolomics for key pathway enrichment and identification of critical targets. Western blot and RT-qPCR were subsequently used to validate the expression of these key targets. Animal experimental results showed that, compared with the model group, all PLQT dose groups significantly improved weight loss, reduced paw swelling, inhibited synovial tissue fibrosis hyperplasia and inflammatory cell infiltration, and decreased serum levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β in RA rats, exhibiting a partial dose-dependent manner. Metabolomics analysis revealed that PLQT exerted regulatory effects on 179 of 276 RA-related biomarkers. Enrichment analysis revealed that GSK-3 β , PIK3CA, and AKT3 proteins in the PI3K-AKT signaling pathway were the key targets for PLQT intervention in RA. Validation by Western blot and RT-qPCR demonstrated that PLQT significantly modulated the expression of these three proteins. In conclusion, the therapeutic effects of PLQT on RA are likely associated with regulation of GSK-3 β , PIK3CA, and AKT3 within the PI3K-AKT signaling pathway.

[Key words] Panlongqi Tablets; rheumatoid arthritis; PI3K-AKT signaling pathway; GSK-3 β ; PIK3CA; AKT3

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20251011.705

类风湿性关节炎(RA)是一种以慢性滑膜炎、进行性关节破坏为特征的自身免疫性疾病,其病理过程涉及异常免疫激活、促炎因子中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 级联释放以及滑膜增生,最终导致关节畸形与功能丧失^[1]。中医药以“调和”为理念,凭借其多成分、多靶点、整体调节的优势,在RA治疗中展现出独特潜力^[2]。盘龙七片是一种由盘龙七、壮筋丹、五加皮、杜仲、当归等29味中药组成的复方口服制剂,具有消炎止痛、通痹散结、活血化瘀的作用^[3]。其中去氢木香内酯、龙胆苦苷和木香炔内酯等成分具有显著抗炎作用,主要用于治疗风湿性关节、腰肌劳损等^[4]。

本研究通过构建佐剂性关节炎大鼠模型,以体质量、足趾肿胀程度、滑膜组织病理变化、血清炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)等指标评估盘龙七片药效。然后采用非靶向代谢组学和网络药理学联合分析方法,筛选出盘龙七片在抗类风湿性关节炎上的关键通路和蛋白。进一步采用Western blot和RT-qPCR方法从分子生物学的角度验证关键靶点的表达,以探究盘龙七片通过抑制相关靶点引起的炎症反应进而改善类风湿性关节炎的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

盘龙七片(批号20210329)购自陕西盘龙药业

有限公司;雷公藤多苷片(批号20200403)购自远大医药黄石飞云制药有限公司;吡哆美辛肠溶片(批号2007004)购自江苏亚邦爱普森药业有限公司;完全弗氏佐剂(批号SLCH4887)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;高效切片石蜡(批号Q/YSQN40-91)购自上海华永石蜡有限公司;鼠源TNF- α 试剂盒(批号10212432C)、鼠源IL-6试剂盒(批号10004160)、鼠源IL-1 β 试剂盒(批号CK008)均购自深圳欣博盛生物科技有限公司;2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix(Non-ROX)(批号G3320)、引物(批号G33208)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;鼠源磷脂酰肌醇3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)试剂盒(批号202301)、鼠源糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)试剂盒(批号Dec-22)、鼠源蛋白激酶B3(AKT3)试剂盒(批号Dec-22)购自上海科艾博生物科技有限公司;鼠源3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)试剂盒(批号202211)购自上海初态生物科技有限公司;PMSF(100 mmol $\cdot$ L⁻¹)(批号202301)、BCA蛋白定量检测试剂盒(批号G2026)、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(批号G2003-50T)、蛋白Marker(批号G2083-250UL)、0.45 μ m PVDF膜(批号WGPVDF45)、脱脂奶粉(批号GC310001-100g)、聚山梨酯20(批号GC204002-100ML)、ECL化学发光试剂盒(批号G2014-50ML)、超敏ECL化学发光

试剂盒(批号 G2020-25ML)、抗体孵育盒(批号 G9055-4)、RNA 提取液(批号 G3013)、无核酸酶超纯水(批号 G4700)、RIPA 裂解液(批号 G2002-100ML)、50×Cocktail 蛋白酶抑制剂(批号 G2006-250μL)、磷酸化蛋白酶抑制剂(批号 G2007-1ML)、5×蛋白还原型上样缓冲液(批号 G2013)、转膜缓冲液(批号 G2017)、电泳缓冲液(批号 G2018)、TBS 缓冲液(批号 G0001-2L)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;三氯甲烷(批号 10006818)、异丙醇(批号 80109218)、无水乙醇(批号 10009218)均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

Triple TOF 5600⁺质谱仪(上海 SCIEX 爱博才思分析仪器贸易有限公司);KQ-300DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Thermo Micro 17R 微量低温离心机(上海珂维仪器有限公司);Nikon Eclipse E100 正置光学显微镜(日本尼康公司);YLS-7C 足趾容积测量仪(济南益延科技发展有限公司);KZ-III-F 研磨仪、SVE-2 垂直电泳仪、SVT-2 转印电泳仪、DS-2S100 摇床、Stepone plus 荧光定量 PCR 仪均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;JY92-11N 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);6100 化学发光仪(上海勤翔科学仪器有限公司);JB-P5 包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 病理切片机(上海徠卡仪器有限公司)。

1.3 动物

42 只 SPF 级雄性大鼠,6~8 周龄,体质量(280±20)g,购自陕西西安交通大学医学部,许可证号 SCXK(陕)2020-001,饲养于陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心动物实验室。大鼠饲养环境:温度(20±6)℃,湿度 40%±20%,光照黑暗 12/12 h。在正式实验前,大鼠适应性喂养 1 周,自由摄食饮水。所有动物实验均经陕西中医药大学动物伦理委员会批准(批准编号 SUCMDL20210429001)。

2 方法

2.1 溶液配制

取盘龙七片(每片 0.3 g)、雷公藤多苷片(每片 10 mg)和吡美辛肠溶片(每片 25 mg),分别研磨成细粉。精密称定各药粉适量,加入生理盐水涡旋振荡溶解。盘龙七片与雷公藤多苷片均配制成 0.1 mg·mL⁻¹药液,吡美辛肠溶片配制成 0.05 mg·mL⁻¹药液。

2.2 动物分组、造模及给药

将 42 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为空白组、模型组、雷公藤多苷片组(9.4 mg·kg⁻¹)、吡美辛肠溶片组(4.5 mg·kg⁻¹)和盘龙七片高(640 mg·kg⁻¹)、中(320 mg·kg⁻¹)、低(160 mg·kg⁻¹)剂量组,每组 6 只^[5-6]。参照文献方法建立 RA 大鼠模型,除空白组大鼠外,各组大鼠于右后足掌皮内注射 II 型胶原蛋白-完全弗氏佐剂乳剂^[7]。以大鼠体内血清炎症因子明显升高且右后足趾肿胀为造模成功标志^[8-10]。造模完成后,各给药组大鼠按设定剂量每日灌胃给药 1 次,空白组与模型组大鼠给予等体积生理盐水,连续干预 28 d^[11-13]。

2.3 样本收集与处理

分别于给药前 0 d、造模后 7 d 和给药后 7、14、28 d 采用代谢笼法收集各组大鼠 24 h 尿样。4℃,12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,真空冷冻干燥,于-80℃保存用于代谢组学分析。于造模后第 7 天,采用眼眶采血法取大鼠眶丛静脉血 0.5 mL,静置 30 min,于 4℃,5 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,于-80℃保存用于 ELISA 检测。于灌胃干预后 28 d,大鼠禁食禁水 12 h,腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉,取右后足踝关节腔滑膜组织液氮速冻,于-80℃保存用于 Western blot 和 RT-PCR 分析;截取右后肢踝关节上下 0.5 cm 骨关节,剔除皮肤与脂肪组织,于 4%多聚甲醛组织固定液中保存,用于组织病理检测^[14]。

2.4 足趾肿胀程度测量

固定大鼠使其致炎侧(右侧)踝关节呈自然下垂角度;将右后足缓慢浸入盛有蒸馏水的烧杯中,调整水位至外踝尖下 0.5 mm 处,待仪器示数稳定后记录容积值。每只大鼠重复测量 3 次,取平均值作为单次测量结果,每周测定 1 次(为减少实验误差,测量者为同一人)^[15-17]。计算足趾肿胀程度,足趾肿胀程度=(大鼠造模/给药后足趾容积-大鼠初始足趾容积)/大鼠初始足趾容积×100%。

2.5 血清 ELISA 检测

取 2.3 项下血清样本,按照 ELISA 试剂盒操作流程,检测大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量。

2.6 踝关节组织病理观察

取 2.3 项下踝关节样本,乙醇梯度脱水,石蜡包埋制备切片,苏木精-伊红(HE)染色后置于电子显微镜下观察其组织形态^[18-19]。

2.7 非靶向代谢组学分析

2.7.1 色谱条件 色谱柱 ACQUITY UPLC® HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为 2 mmol·L⁻¹ 甲酸铵和 0.05% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈-异丙醇(1:1)。梯度洗脱(0~1.5 min, 1%~2% B; 1.5~23 min, 2%~60% B; 23~24 min, 60%~98% B; 24~27 min, 98% B; 27~27.1 min, 98%~1% B; 27.1~33 min, 1% B), 柱温 40℃, 体积流量 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL。

2.7.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 采用正、负离子扫描模式。电压 5 500、-4 500 V; 雾化气(GS1)与辅助气(GS2)均为氮气, 气压 50 psi(1 psi≈6.895 kPa); 气帘气(CUR) 35 psi; 离子源温度 550℃; 去簇电压(DP) 40 V; 碰撞能量(CE) 10 eV/-30 eV, 离子的扫描范围 m/z 70~1 200, 以 MS² 模式收集 12 个超过 100 cps 的最强峰值。利用 Analyst TF 1.7.1 软件采集数据, 借助 PeakView® 2.2 软件数据库、MasterView™ 1.1 软件和 Metabolites 数据库进行代谢物分析鉴定, 以 MultiQuant 3.0.2 软件进行代谢物鉴定数据整理。

2.7.3 差异代谢物筛选与生物标志物确定 将 MultiQuant 3.0.2 软件整理的数据库导出, 对数据进行预处理, 色谱峰面积归一化, 基于 MetaboAnalyst 在线平台进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)。以差异倍数(FC)>1.5、 t 检验($P<0.05$)和变量重要性投影(VIP>1.0)筛选空白组与模型组间差异代谢物; 进一步通过各组 PLS-DA 模型的空间分布离散度, 识别给药干预后代谢轮廓变化, 以 ROC 曲线下面积(AUC)筛选与 RA 相关的生物标记物。

2.8 关键作用靶点与代谢组学关联分析

为进一步分析盘龙七片对 RA 诱发的代谢紊乱的作用。采用 PCA 的方法对各组的代谢差异进行分析, 筛选与盘龙七片治疗作用相关的生物标记物。基于前提的网络药理学发现, 将所得到的关键靶点与治疗相关的生物标记物进行关联分析, 采用 MetaboAnalyst (<http://metpa.metabolomics.ca/>)平台中的 Joint-Pathway Analysis 模块对盘龙七片治疗 RA 参与的主要生化代谢途径进行富集和分析^[20]。设置显著性差异卡值 $\text{Home } P<0.05$ 及 pathway impact>0.1, 对盘龙七片治疗 RA 的关键代谢通路进行筛选和评价, 找到与治疗相关的关键靶点与代谢物。

2.9 差异代谢物含量测定

对上述筛选得到的与治疗相关的关键生物标记物进行定量分析, 取 2.3 项下尿液样本, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤, 检测各组大鼠尿样中差异代谢物的表达。

2.10 Western blot 检测

对上述筛选得到的与治疗相关的关键靶点从蛋白水平进行验证, 取各组大鼠滑膜组织匀浆提取蛋白, 采用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度后进行 Western blot 检测。配制 10% 分离胶与 5% 浓缩胶并上样, 电泳时设置浓缩胶、分离胶阶段恒压分别为 60、90 V。200 mA 恒流转至 PVDF 膜, 封闭液封闭 1 h 后在 4℃ 孵育一抗过夜。TBST 洗膜 5 次, 室温孵育二抗 1 h, 再次洗膜, 观察条带, 运用 ImageJ 软件进行定量分析。

2.11 RT-PCR 检测滑膜组织中 GSK-3β、PIK3CA 和 AKT3 的表达

采用快速提取试剂盒提取组织 RNA, 测定 RNA 浓度并反转录成 cDNA。AKT3 引物序列: 5'-GGATGAAGTGGCACATACTCTGA-3' (正向) 和 5'-ACGCTCTTTTGTCTGGAAGGAAT-3' (反向); GSK-3β 引物序列: 5'-CACTGTAACATAGTCCGATTGCG-3' (正向) 和 5'-TCTGGCGACTCTGTACACTGTTT-3' (反向); PIK3CA 引物序列: 5'-AGTGGCTCAAGGACAAGAACAG-3' (正向) 和 5'-CGGTCTCCAATTCCCAAGATAAA-3' (反向)。将该基因作为荧光定量模板, 40 次热循环后收集荧光信号, 使用相对定量的方法来确定表达值, 使用循环阈值确定 AKT3、GSK-3β 和 PIK3CA 的基因表达水平。

2.12 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。多组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA)中的 LSD 检验, 当 $P<0.05$ 时, 差异具有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8 软件绘制结果, 所有数据均以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)来表示。

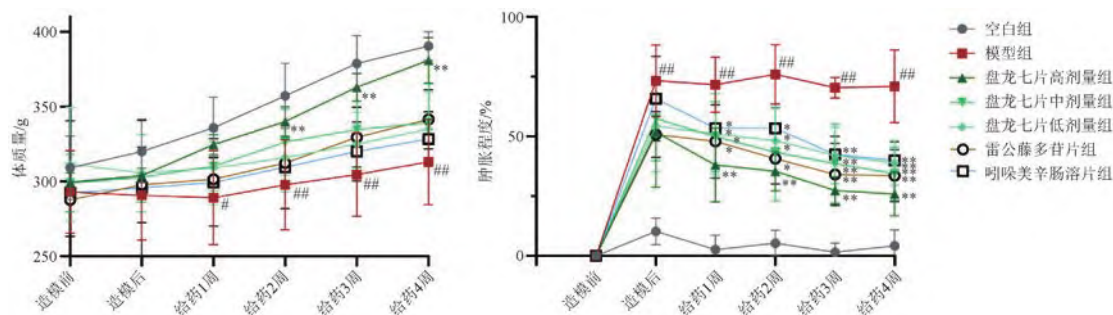
3 结果

3.1 盘龙七片对 RA 大鼠体质量及足趾肿胀程度的影响

与空白组比较, 模型组大鼠体质量下降、活动能力减弱, 且足部皮肤红肿、关节活动受限及足趾肿胀程度显著增加; 与模型组相比, 各给药组干预后, 大鼠体质量和活动能力均逐渐恢复, 足趾肿胀自治疗 1 周

后呈现缩小趋势,至第 4 周时显著改善,其中盘龙七片高剂量组在体质量恢复、活动能力提升及关节肿胀

消退方面效果最为明显,且足部皮肤状况改善程度优于雷公藤多苷片组与吡罗美辛肠溶片组,见图 1。



与空白组比[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

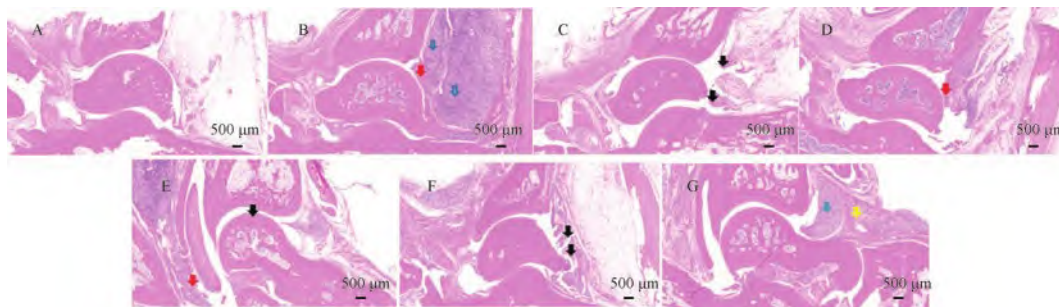
图 1 盘龙七片干预 RA 大鼠的体质量及足趾肿胀程度变化趋势($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 1 Trends in body weight changes and paw swelling in RA rats treated with Panlongqi Tablets($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.2 盘龙七片对 RA 模型大鼠关节滑膜的影响

与空白组相比,模型组滑膜可见较多的纤维组织增生,一侧滑膜可见大的结节状物,脂肪细胞减少,间质大量的成纤维细胞增生,大量的淋巴细胞浸润;与模型组相比,盘龙七片高、中、低剂量组滑膜处可见轻微的纤维组织增生,中剂量

组滑膜脂肪细胞减少,低剂量组组织距骨关节面局部软骨细胞和基质结构较紊乱,数量轻微减少,滑膜脂肪细胞减少;雷公藤多苷片组的滑膜增生减少,脂肪细胞减少淋巴细胞浸润减少;吡罗美辛肠溶片组脂肪细胞减少,较多的淋巴细胞浸润,见图 2。



A. 空白组;B. 模型组;C. 盘龙七片高剂量组;D. 盘龙七片中剂量组;E. 盘龙七片低剂量组;F. 雷公藤多苷片组;G. 吡罗美辛肠溶片组。红色箭头指示滑膜脂肪细胞减少,皱襞样向关节腔凸起,纤维组织和成纤维细胞增生;蓝色箭头指示滑膜可见大的结节状物;黄色箭头指示淋巴细胞浸润;黑色箭头指示滑膜处可见轻微的纤维组织增生,组织距骨关节面局部软骨细胞和基质结构较紊乱。

图 2 盘龙七片干预 RA 大鼠膝关节滑膜 HE 染色切片($\times 20$)

Fig. 2 HE stained sections of knee synovium in RA rats treated with Panlongqi Tablets ($\times 20$)

3.3 盘龙七片对 RA 大鼠血清炎症因子水平的影响

与空白组相比,模型组大鼠血清炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平显著增高;与模型组相比,盘龙七片各剂量组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平显著降低,且呈现一定的剂量依赖性,雷公藤多苷片组和吡罗美辛肠溶片组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 水平下降较为显著。以盘龙七片高剂量组的效果最为显著,

见表 1。

3.4 盘龙七片对 RA 诱发的代谢紊乱的干预作用

3.4.1 盘龙七片对 RA 大鼠作用相关生物标记物筛选 基于 MetaboAnalyst 5.0 数据平台,比较正、负离子模式信噪比、峰强度等数据后,相比正离子模式,负离子模式响应较好。负离子模式数据经 PLS-DA,前 2 个主成分散点图显示,空白组与模型组代

表 1 盘龙七片对 RA 大鼠血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

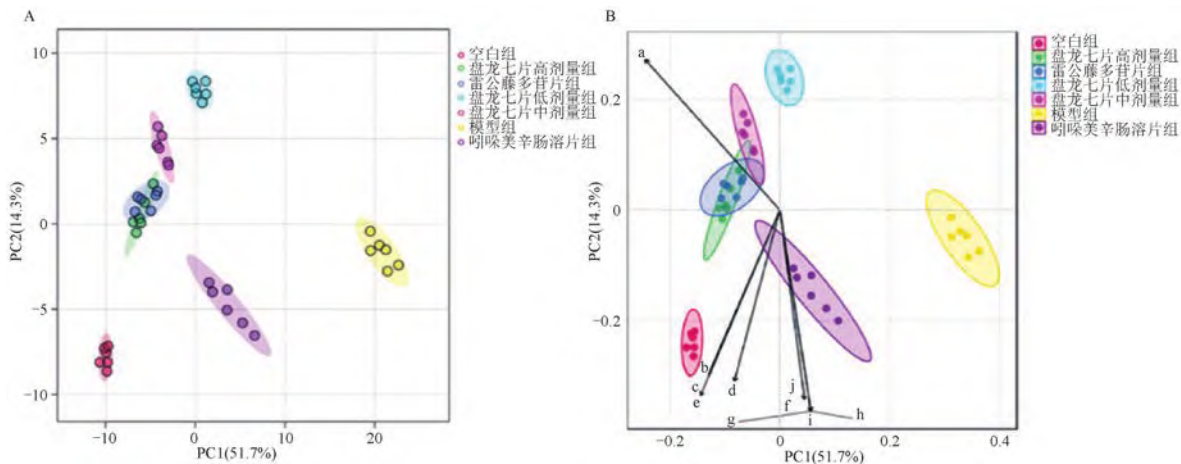
Table 1 Effects of Panlongqi Tablets on serum inflammatory cytokine levels in RA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IL-1β /pg·mL ⁻¹	IL-6 /pg·mL ⁻¹	TNF-α /pg·mL ⁻¹
空白	-	15.69±1.62	17.06±7.43	27.06±8.03
模型	-	41.13±3.36 ¹⁾	55.79±2.94 ¹⁾	41.06±5.52 ¹⁾
盘龙七片	640	17.08±0.81 ²⁾	20.57±4.78 ²⁾	31.04±5.66 ²⁾
	320	18.19±3.38 ²⁾	22.25±6.43 ²⁾	33.71±5.26 ²⁾
	160	25.82±1.49 ²⁾	25.25±5.35 ²⁾	35.65±6.63 ²⁾
雷公藤多苷片	9.4	22.32±4.23 ²⁾	23.87±8.21 ²⁾	37.07±3.54 ³⁾
吡喹酮美辛肠溶片	4.5	22.45±0.88 ²⁾	32.59±8.00 ²⁾	41.45±5.10

注:与空白组比¹⁾ $P<0.01$;与模型组相比²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表 2~4 同)。

谢轮廓显著分离,表明 RA 建模成功,2 组代谢水平有差异。结合 $FC>1.5$ 、 t 检验 ($P<0.05$)、VIP >1.0 和 $AUC>0.85$,筛选出 276 种与 RA 相关的生物标志物。进一步采用 PCA 对给药后各组内源性代谢物

进行变化趋势分析,前 2 个主成分散点图结果显示,盘龙七片给药后,高、中、低剂量组呈剂量相关恢复趋势,见图 3。盘龙七片各剂量组与雷公藤多苷片组治疗趋势相似,预测有相似的治疗机制。基于以上分类趋势结果,各组间生物标志物单因素方差分析结果显示,有 179 个在治疗后有显著恢复趋势,其中有 23 个呈剂量依赖性,包括 1,3-dimethyluric acid、1,9-dimethyluric acid、1-methyladenosine、2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine、2-amino-3-phosphonopropionic acid、3-ureidopropionic acid、5-hydroxylysine、benzamide、carnosine、cholestenone、diethylthiophosphate、glucaric acid、glycyl-glycine、homo-L-arginine、hydrocinnamic acid、hypoxanthine、isoci-tric acid、L-asparagine、L-dihydroorotic acid、menadio-ne、phosphonoacetate、phosphoserine、succinyl-CoA,相关生物标志物分析见表 2,表明盘龙七片、雷公藤多苷片和吡喹酮美辛肠溶片可以减轻 RA 大鼠代谢异常。



A. 给药各组主成分分析散点图;B. 给药各组主成分分析 Biplot 图;a. stearic acid;b. dehydroascorbic acid;c. trans-aconitic acid;d. niacinamide;e. propranolol;f. 2-methylglutaric acid;g. methylglutaric acid;h. 2,2-dimethylsuccinic acid;i. monomethyl glutaric acid;j. L-glutamic acid。

图 3 盘龙七片干预 RA 大鼠的差异代谢组学分析

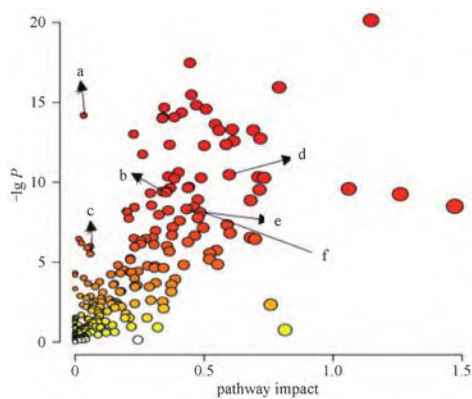
Fig. 3 Differential metabolomic analysis of Panlongqi Tablets in intervention in RA rats

表 2 盘龙七片对 RA 大鼠作用相关生物标志物单因素方差分析 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 One-way ANOVA of biomarkers associated with the effects of Panlongqi Tablets in RA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	3-ureidopropionic acid /×10 ⁵	phosphoserine /×10 ⁴	2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine /×10 ³	isocitric acid /×10 ⁷	menadiolone /×10 ⁴
空白	-	9.43±3.06	1.27±0.41	8.75±0.48	4.42±0.09	3.64±0.69
模型	-	1.57±0.89 ¹⁾	2.83±0.76 ¹⁾	2.51±0.74 ¹⁾	0.89±0.03 ¹⁾	10.90±0.61 ¹⁾
盘龙七片	640	10.50±2.37 ³⁾	1.22±0.24 ³⁾	6.16±0.89 ³⁾	2.73±0.17 ³⁾	4.96±0.56 ³⁾
	320	8.45±2.65 ³⁾	1.47±0.34 ³⁾	4.36±0.67 ²⁾	2.73±0.11 ³⁾	6.23±0.30 ³⁾
	160	7.69±2.37 ³⁾	1.66±0.53 ³⁾	4.13±0.49 ²⁾	1.93±0.21 ³⁾	8.82±0.25 ²⁾
雷公藤多苷片	9.4	4.37±1.32	1.92±0.57 ²⁾	6.29±1.54 ³⁾	2.72±0.47 ³⁾	7.40±0.46 ³⁾
吡喹酮美辛肠溶片	4.5	7.86±2.66 ³⁾	1.48±0.09 ³⁾	6.35±0.69 ³⁾	3.33±0.45 ³⁾	6.07±0.64 ³⁾

3.4.2 相关代谢通路分析 将前期网络药理学得到的核心靶点与上述得到的与治疗相关的生物标记物进行通路关联分析,结果显示,共富集得到 257 条相关通路。其中 PI3K-AKT 通路是网络药理学预测和治疗相关的代谢物同时涉及的重要代谢通路,其中 GSK-3 β 、PIK3CA 和 AKT3 蛋白在此信号通路上发挥着重要作用,AKT3 上游的代谢物 PIP3 为与治疗相关的生物标记物。基于此,本研究重点验证 PI3K-AKT 通路关键靶点 (GSK-3 β 、PIK3CA、AKT3) 及关键生物标记物 PIP3 的表达水平,见图 4。



a. IL-17 signaling pathway; b. Th17 cell differentiation; c. rheumatoid arthritis; d. MAPK signaling pathway; e. PI3K-AKT signaling pathway; f. VEGF signaling pathway.

图 4 盘龙七片干预 RA 大鼠代谢通路富集

Fig. 4 Enrichment of metabolic pathways associated with Pan-longqi Tablets in intervention in RA rats

3.4.3 关键生物标记物定量分析 与空白组相比,模型组大鼠 PIP3 含量高于空白组,与模型组相比,盘龙七片中、高剂量组大鼠代谢物中 PIP3 含量显著减少,见表 3,表明盘龙七片能减少炎症反应中 PIP3 水平,抑制 AKT 蛋白以及后续炎症反应进行。

表 3 盘龙七片调控 RA 大鼠关键生物标记物 PIP3 的验证 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Validation of PIP3, a key biomarker regulated by Pan-longqi Tablets in RA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	PIP3/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白	—	106.42 $\pm$ 5.73
模型	—	186.18 $\pm$ 4.56 ⁽¹⁾
盘龙七片	640	132.85 $\pm$ 6.48 ⁽³⁾
	320	160.94 $\pm$ 4.66 ⁽³⁾
	160	176.54 $\pm$ 15.16
雷公藤多苷片	9.4	183.80 $\pm$ 9.83
吡罗美辛肠溶片	4.5	191.30 $\pm$ 17.39

3.4.4 Western blot 和 RT-PCR 检测 与空白组比较,模型组大鼠关节组织中 GSK-3 β 、AKT3 及 PIK3CA 蛋白表达量显著升高,其中 AKT3 表达也明显上升;与模型组相比,盘龙七片高、中、低剂量组 GSK-3 β 、AKT3 和 PIK3CA 蛋白表达均呈剂量依赖性显著降低,且高剂量组下调作用最为显著;雷公藤多苷片组与吡罗美辛肠溶片组上述蛋白表达也显著降低,其中盘龙七片高剂量组与吡罗美辛组下调趋势相近,见图 5、表 4。

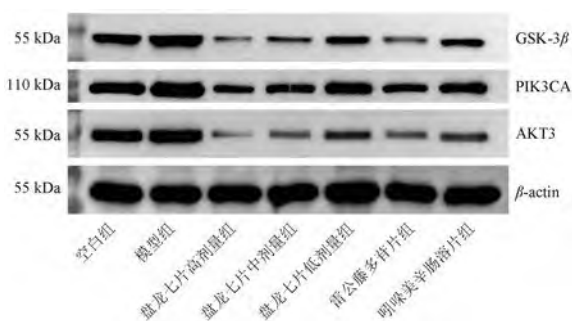


图 5 蛋白免疫印迹分析 GSK-3 β 、PIK3CA 与 AKT3 蛋白表达

Fig. 5 Western blot analysis of GSK-3 β , PIK3CA, and AKT3 protein expression

与空白组相比,模型组 GSK-3 β 、PIK3CA 和 AKT3 mRNA 表达显著上调;盘龙七片高、中、低剂量组均能剂量依赖性地抑制 GSK-3 β 、AKT3 mRNA 表达,而对 PIK3CA mRNA 的抑制作用仅见于高、中剂量组。雷公藤多苷片对 GSK-3 β 、PIK3CA、AKT3 mRNA 均有下调作用,而吡罗美辛肠溶片仅显著降低 GSK-3 β 与 PIK3CA mRNA 水平,见表 4。上述结果证实,盘龙七片通过剂量依赖性抑制 PI3K-AKT 信号通路关键因子 GSK-3 β 、PIK3CA 及 AKT3 的转录与翻译,发挥抗类风湿关节炎作用。

4 讨论

本研究证实,盘龙七片可有效抑制佐剂性关节炎大鼠的关节肿胀、滑膜增生及血清促炎因子释放。非靶向代谢组学分析显示,盘龙七片显著回调 99 个类风湿性关节炎相关代谢物,其中关键肌醇磷脂代谢物 PIP3 的降低尤为突出。通路富集结果显示,PI3K-AKT 通路是盘龙七片治疗 RA 的关键通路, GSK-3 β 、PIK3CA 和 AKT3 是 PI3K-AKT 通路中的关键靶点。进一步分子生物学验证结果显示,盘龙七片能同步下调滑膜组织中 PIK3CA、AKT3 及 GSK-

表 4 Western blot 和 RT-PCR 法测定大鼠滑膜中 GSK-3 β 、AKT3 与 PIK3CA 蛋白及 mRNA 表达($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 4 Protein and mRNA expression levels of GSK-3 β , AKT3, and PIK3CA in rat synovial tissue determined by Western blot and RT-PCR analysis($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	GSK-3 β / β -actin	AKT3 / β -actin	PIK3CA / β -actin	GSK-3 β mRNA 相对表达	AKT3 mRNA 相对表达	PIK3CA mRNA 相对表达
空白	—	0.46 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.03
模型	—	0.55 $\pm$ 0.03 ¹⁾	0.78 $\pm$ 0.02 ¹⁾	1.19 $\pm$ 0.02 ¹⁾	2.08 $\pm$ 0.29 ¹⁾	2.22 $\pm$ 0.30 ¹⁾	1.30 $\pm$ 0.06 ¹⁾
盘龙七片	640	0.12 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.12 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.51 $\pm$ 0.02 ³⁾	1.03 $\pm$ 0.13 ³⁾	1.09 $\pm$ 0.10 ³⁾	0.89 $\pm$ 0.04 ³⁾
	320	0.24 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.23 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.66 $\pm$ 0.03 ³⁾	1.12 $\pm$ 0.17 ³⁾	1.08 $\pm$ 0.04 ³⁾	0.95 $\pm$ 0.05 ³⁾
	160	0.34 $\pm$ 0.03 ³⁾	0.34 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.86 $\pm$ 0.02 ³⁾	1.65 $\pm$ 0.13 ³⁾	1.17 $\pm$ 0.08 ³⁾	1.25 $\pm$ 0.05
雷公藤多苷片	9.4	0.15 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.23 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.67 $\pm$ 0.02 ³⁾	1.77 $\pm$ 0.04 ³⁾	1.71 $\pm$ 0.09 ²⁾	1.12 $\pm$ 0.05 ²⁾
吡哆美辛肠溶片	4.5	0.34 $\pm$ 0.03 ³⁾	0.36 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.86 $\pm$ 0.02 ³⁾	1.80 $\pm$ 0.07 ³⁾	1.95 $\pm$ 0.18	0.99 $\pm$ 0.05 ³⁾

3 β 的总蛋白与基因表达。由于 PIP3 含量减少与 PIK3CA 表达抑制呈显著正相关,由此可见盘龙七片可能通过抑制 PIK3CA 介导的 PIP3 生物合成,进而阻断 AKT3 信号。

PI3K-AKT 信号通路在 RA 病理进程中发挥核心调控作用,PI3K 被上游分子激活,活化的 PI3K 催化细胞膜 3,4 二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)转化为 PIP3,磷酸化激活 AKT^[21-23]。而 GSK-3 β 、PIK3CA 和 AKT3 蛋白在 PI3K-AKT 信号通路中起着关键作用,AKT3 能够响应胰岛素和生长因子,调控细胞信号传导,参与多种生物学过程,如细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤发生等^[24]。GSK-3 β 是 PI3K-AKT 信号通路的重要下游分子,通过与多种信号分子、结构蛋白和转录因子结合,参与细胞分化、增殖、存活和凋亡^[25]。PIK3CA 是 I 类异源二聚体的 PI3K 蛋白,在细胞增殖、免疫、炎症等过程中发挥重要作用^[26]。在 RA 病理状态下,PI3K-AKT 通路异常活化导致 PIK3CA 介导的 AKT 磷酸化、AKT3 亚型在免疫细胞和滑膜细胞中的激活及其下游关键节点 GSK-3 β 的失调等,共同驱动了 NF- κ B 等转录因子的活化、促炎细胞因子的过度产生、滑膜增生及破骨细胞分化,最终导致关节破坏^[27]。本研究通过整合非靶向代谢组学分析,筛选出 PIP3 等关键代谢物及 PI3K-AKT 信号通路作为盘龙七片干预类风湿性关节炎的核心作用途径。代谢轮廓的动态变化特征表明该复方可显著逆转 RA 相关代谢紊乱。分子生物学实验证实,在蛋白水平和 mRNA 水平上,盘龙七片均能显著回调 PIK3CA、AKT3 及 GSK-3 β 靶点的异常表达。这种多靶点抑制作用阻断了 PIK3CA 介导的 PIP3-AKT3 活化级联,进而抑制 GSK-3 β 信号传导,恢复 RA 导致的滑膜增生及炎症反应。值得注意的

是,盘龙七片对通路关键节点的协同调控显著区别于吡哆美辛等西药的单靶点模式,体现了中药复方多组分整合调节的独特优势。

本研究通过解析 PI3K-AKT-GSK-3 β 通路的调控机制,从现代药理学角度阐释了盘龙七片“活血化瘀、通痹散结”传统功效的科学基础,为经典方剂的临床应用提供了实验依据。通过整合非靶向代谢组学和网络药理学技术构建的“代谢-通路-靶点”多维验证模式,为复方中药的现代化机制研究提供了借鉴方法。

[参考文献]

- [1] NIU X F, YANG Y J, YU J J, et al. Panlongqi tablet suppresses adjuvant-induced rheumatoid arthritis by inhibiting the inflammatory response *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116250.
- [2] 欧慧萍,吴趋荟,沈泉,等.中医药防治类风湿关节炎的作用机制研究进展[J]. *吉林中医药*, 2021, 41(12): 1685.
- [3] 牛海宏,焦医钊,白如鑫.盘龙七片治疗类风湿关节炎风湿痹阻证的临床疗效研究[J]. *中国处方药*, 2022, 20(3): 134.
- [4] 刘妍,赵艳婷,刘妍如,等.基于“功效成分群”动态传递规律的盘龙七片质量标志物(Q-Marker)筛选[J]. *中草药*, 2024, 55(16): 5470.
- [5] 徐叔云.药理学实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2003.
- [6] 贾可欣,刘春芳,王金霞,等.盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠的镇痛作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(15): 61.
- [7] 于坤,徐枝芳,余楠楠,等.佐剂性和胶原诱导性关节炎模型比较分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(1): 106.
- [8] 马钰泱,狄泽敏,曹晴,等.佐剂性关节炎大鼠滑膜及血清中 MANF 的表达及其与炎症的相关性[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(4): 537.
- [9] 刘梨,张亮,艾坤,等.艾灸对佐剂性关节炎大鼠足趾滑膜组织自噬和凋亡的影响[J]. *针刺研究*, 2023, 48(3): 253.
- [10] 李培培,解国雄,宋珊珊,等.大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(5): 453.
- [11] 郑红梅,晋松.雷公藤多苷片对胶原诱导性关节炎大鼠血清

- HMGB1 和 IL-17 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 247.
- [12] 欧更, 辛昊, 周南. 基于 JAK2-STAT3 信号通路探讨硫酸羟氯喹治疗佐剂性类风湿性关节炎大鼠的作用机制[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(3): 273.
- [13] 李宁, 宋敏, 宋志靖, 等. 桃红四物汤加味对膝关节骨性关节炎大鼠关节软骨中 MMP-1 及 TIMP-1 的影响[J]. 甘肃中医学院学报, 2009, 26(6): 12.
- [14] 唐华燕, 徐星宇, 张娜, 等. 羌活地黄汤对佐剂性类风湿性关节炎大鼠作用机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(10): 1806.
- [15] WU X, LIU X G, JING Z K, et al. Moxibustion benignantly regulates circadian rhythm of REV-ERB α in RA rats[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(5): 1459.
- [16] 杨辉, 谢志军, 温成平. 中药复方外用于大鼠急性痛风性关节炎模型疗效及不同关节肿胀度测量方法效果的比较[J]. 中国中医急症, 2013, 22(12): 1994.
- [17] 唐利东, 王健英, 谭丹, 等. 杜仲三萜、环烯醚萜类成分对胶原诱导性关节炎大鼠的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5591.
- [18] 王昌河, 谢振丽, 吕建伟. 动物组织石蜡切片 HE 染色的快速方法[J]. 生物学通报, 2012, 47(7): 50.
- [19] 黄荷兰, 苏晓慧, 康世奇, 等. 基于 TLR4/TNF- α /MMP-9 信号通路研究马钱子水提物改善类风湿性关节炎大鼠疼痛的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6): 1429.
- [20] 赵艳婷, 刘妍如, 唐志书, 等. 盘龙七片治疗膝骨关节炎有效性和安全性的系统性评价及作用机制分析[J]. 中国现代中药, 2023, 25(2): 314.
- [21] 黄凤玉, 郭婉怡, 陈沛萍, 等. 基于 Src/PI3K/AKT 信号通路研究草乌甲素抑制类风湿关节炎骨破坏的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6): 1438.
- [22] 徐经纬, 郭克磊, 孟庆良, 等. 基于 PI3K-AKT-mTOR 信号轴探讨桂枝芍药知母汤干预类风湿性关节炎大鼠自噬的作用机制[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(13): 1502.
- [23] 郑秋含, 杜连云, 张众, 等. 基于 PI3K/AKT 信号通路探究红景天-鬼箭羽药对对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的作用机制及配伍规律[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(8): 875.
- [24] 李勋嘉, 李龙. PI3K-AKT-GSK-3 β 信号通路类风湿性关节炎的相关性研究[C]. 贵阳: 贵州省中医药继续教育学习班暨贵州省中西医结合学会肾病专业委员会学术年会, 2018.
- [25] 范友羊, 刘俊, 周海燕, 等. GSK-3 β 抑制剂对类风湿性关节炎小鼠脾脏树突状细胞亚群的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(9): 997.
- [26] 张行, 保国锋, 崔志明. PI3K/AKT 信号通路在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2019, 38(2): 358.
- [27] WANG L, XU P Y, XU Y, et al. A discovery of clinically approved Panlongqi Tablet for repositioning to treat osteoarthritis by inhibiting PI3K/AKT activation[J]. Phytomedicine, 2022, 105: 154360.

[责任编辑 陈玲]