透骨血竭散对类风湿关节炎小鼠 JAK2/STAT3 信号通路及 Th17/Treg 失衡的影响*

陈杜，邓文雯，姜如，肖智

长沙市第三医院中西医结合科，湖南 长沙 410035

摘要：目的：探索透骨血竭散对类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）小鼠 Janus 激酶 2（Janus kinase 2，JAK2）/信号传导及转录激活蛋白 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）信号通路及调节性 T 细胞（regulatory T cells，Treg）/辅助性 T 细胞 17（T helper cell 17，Th17）失衡的影响。方法：急性口服毒性实验：30 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组和 5 个处理组，每组 5 只；对照组小鼠灌胃无菌过滤水，处理组小鼠以不同剂量透骨血竭散灌胃（55 mg·kg^{-1}、175 mg·kg^{-1}、550 mg·kg^{-1}、1 750 mg·kg^{-1}、5 000 mg·kg^{-1}），每日 1 次，连续 14 d。采用概率加权回归法（Bliss 法）计算小鼠半数致死量（median lethal dose，LD50）和 95% 置信区间。亚急性毒性实验：20 只 C57BL/6 小鼠随机分为空白组和 3 个处理组，每组 5 只；空白组小鼠灌胃无菌过滤水，处理组小鼠以不同剂量透骨血竭散灌胃（500 mg·kg^{-1}、1 000 mg·kg^{-1}、1 500 mg·kg^{-1}），连续 28 d，每天观察小鼠的中毒症状。从 30 只 C57BL/6 小鼠中随机选取 10 只作为正常组，其余小鼠注射鸡Ⅱ型胶原蛋白（弗氏完全佐剂乳化）；第 21 天，继续注射鸡Ⅱ型胶原蛋白（弗氏不完全佐剂乳化）增强 1 次，从而建立关节炎模型。第 27 天，将造模成功的小鼠随机分为模型组、透骨血竭散组（1 500 mg·kg^{-1}），每组 10 只，连续灌胃 5 周，每日 1 次。采用流式细胞术检测脾脏 Treg、Th17 细胞数量，Western blot 检测滑膜组织 JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3 表达水平，ELISA 检测滑膜组织肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor alpha，TNF－α）、白细胞介素－1β（interleukin－1β，IL－1β）、白细胞介素－17（interleukin－17，IL－17）、白细胞介素－10（interleukin－10，IL－10）含量，并进行关节炎评分（arthritis score，AS）。结果：透骨血竭散的 LD50 为 3 878 mg·kg^{-1}，95% 置信区间为 1 470～5 498 mg·kg^{-1}。空白组和透骨血竭散各剂量组小鼠均未见死亡或明显的中毒症状。与正常组比较，模型组小鼠脾脏 Treg 百分比减少、Th17 百分比增加（$P<0.01$）；与模型组比较，透骨血竭散组小鼠脾脏 Treg 百分比增加、Th17 百分比下降（$P<0.01$）。与正常组比较，模型组小鼠滑膜组织 TNF－α、IL－1β、IL－17 含量升高且 IL－10 含量降低（$P<0.01$）；与模型组比较，透骨血竭散组小鼠滑膜组织 TNF－α、IL－1β、IL－17 含量降低且 IL－10 含量升高（$P<0.01$）。与正常组比较，模型组小鼠滑膜组织 JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3 表达水平升高（$P<0.05$）；与模型组比较，透骨血竭散组小鼠滑膜组织 JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3 表达水平降低（$P<0.05$）。结论：透骨血竭散可改善 RA 小鼠症状，其机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活，调节 Th17/Treg 平衡，抑制炎症反应有关。

关键词：类风湿关节炎；透骨血竭散；JAK2/STAT3 信号通路；Th17/Treg；炎症；小鼠
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.01.003
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)01－0014－07

Effect of Tougu Xuejie Powder on JAK2/STAT3 Signaling Pathway and Th17/Treg Imbalance in Rheumatoid Arthritis Mice

CHEN Du，DENG Wenwen，JIANG Ru，XIAO Zhi

Department of Integrative Medicine，The Third Hospital of Changsha，Changsha Hunan China 410035

Abstract：Objective：To explore the drug safety of Tougu Xuejie Powder and its effect on the imbalance of Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway and regulatory T cells (Treg)/T helper cell 17 (Th17) in

* **基金项目**：长沙市自然科学基金项目（kq2014011）

rheumatoid arthritis (RA) mice. Methods: Acute oral toxicity test: 30 C57BL/6 mice were randomly divided into a control group and 5 treatment groups, with 5 mice in each group; The mice in the control group were given a gavage with sterile filtered water, while the mice in the treatment group were given a gavage with different doses of Tougu Xuejie Powder (55 mg · kg^{-1}, 175 mg · kg^{-1}, 550 mg · kg^{-1}, 1 750 mg · kg^{-1}, 5 000 mg · kg^{-1}) once a day for 14 consecutive days. Calculate the median lethal dose (LD50) and 95% confidence interval of mice using probability weighted regression (Bliss method). Subacute toxicity test: 20 C57BL/6 mice were randomly divided into a blank group and 3 treatment groups, with 5 mice in each group; The blank group mice were given a gavage with sterile filtered water, while the treatment group mice were given a gavage with different doses of Tougu Xuejie Powder (500 mg · kg^{-1}, 1 000 mg · kg^{-1}, 1 500 mg · kg^{-1}) for 28 consecutive days, and the poisoning symptoms of the mice were observed daily. Select 10 out of 30 C57BL/6 mice randomly as the normal group and inject remaining mice with chicken type Ⅱ collagen (emulsified with Freund's complete adjuvant) and inject the same material another time on the 21st day to establish an arthritis model. On the 27th day, the successfully modeled mice were randomly divided into a model group and a Tougu Xuejie Powder group (1 500 mg · kg^{-1}), with 10 mice in each group. They were orally administered for 5 weeks, once a day. Flow cytometry was used to detect Treg and Th17 in the spleen, and Western blot was used to detect the expression levels of JAK2, p - JAK2, STAT3 and p - STAT3 in synovial tissue. ELISA was used to detect tumor necrosis factor alpha (TNF - α), Interleukin - 1β (IL - 1β), Interleukin - 17 (IL - 17) and interleukin - 10 (IL - 10) levels in synovial tissue, and arthritis score (AS) was performed. Results: The LD50 of Tougu Xuejie Powder is 3 878 mg · kg^{-1}, with a 95% confidence interval of 1 470 - 5 498 mg · kg^{-1}. No death or obvious toxic symptoms were observed in the control group and each dose group of mice treated with Tougu Xuejie Powder. Compared with that of the normal group, the percentage of Treg in the spleen of the model group mice decreased and the percentage of Th17 increased significantly ($P<0.01$). Compared with that of the model group, the percentage of Treg in the spleen of mice in the group treated with Tougu Xuejie Powder increased, while the percentage of Th17 decreased significantly ($P<0.01$). Compared with that of the normal group, TNF - α, IL - 1β, IL - 17 content in synovial tissue of model group mice increased while the content of IL - 10 decreased significantly ($P<0.01$). Compared with that of the model group, TNF - α, IL - 1β, IL - 17 content in synovial tissue of Tougu Xuejie Powder group mice decreased while the content of IL - 10 increased significantly ($P<0.01$). Compared with that of the normal group, the expression levels of JAK2, p - JAK2, STAT3 and p - STAT3 increased in the synovial tissue of the model group mice significantly ($P<0.05$). Compared with that of the model group, the expression levels of JAK2, p - JAK2, STAT3 and p - STAT3 in the synovial tissue of mice treated with Tougu Xuejie Powder decreased significantly ($P<0.05$). Conclusion: Tougu Xuejie Powder can relieve symptoms in RA mice, the mechanism of which may be related to inhibiting the activation of JAK2/STAT3 signaling pathway, regulating Th17/Treg balance and inhibiting inflammatory response.

Key words: rheumatoid arthritis; Tougu Xuejie Powder; JAK2/STAT3 signaling pathway; Th17/Treg; inflammation; mouse

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性疾病,可逐渐破坏软骨和骨骼关节[1]。研究表明,调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)/辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)失衡在 RA 进展中起重要作用[2-3]。Th17 主要通过分泌白细胞介素 -17A(interleukin - 17A, IL - 17A)和肿瘤坏死因子 - α(tumor necrosis factor alpha, TNF - α)来介导促炎反应,导致组织破坏以及软骨和骨骼破坏。Treg 主要通过分泌白细胞介素 - 10(interleukin - 10, IL - 10)和转化生长因子 - β(transforming growth factor - β, TGF - β)来介导抗炎反应,从而维持免疫耐受状态,并调节过敏和自身免疫性疾病的发展[4-6]。Th17 调控的信号途径与多种自身免疫性疾病相关,相应的靶向抑制剂在 RA 治疗中发挥显著作用。研究证实,Treg 在 RA 进展过程中进行性减少,而其数量和功能恢复可以稳定 RA 病情[7]。因此,RA 的诱导和进展特征是 Treg 异常反应,并向 Th17 反应转化,导致促炎/抗炎细胞因子功能紊乱。

Th17 的分化依赖于白细胞介素 -6(interleukin - 6, IL - 6),视黄酸相关孤儿核受体(retinoid - related orphan receptor, ROR)γt 和信号传导及转录激活蛋白 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是构建 Th17 功能表型的关键转录因子[8-10]。IL - 6 通过与 RORγt 结合从而调节 IL - 17 分泌,与其他相关受体结合后激活 Janus 激酶(Janus kinase, JAK)活性并磷酸化和激活 STAT3,从而调节细胞因子分泌[11-12]。因此,靶向炎症反应诱导的关键步骤(如 JAK - STAT 途径)是 RA 治疗的重要策略之一。目前,多种 JAK 抑制剂在 RA 治疗中具有显著疗效,例如托伐茵素和巴瑞替尼[1,13]。然而,这些药物可能伴有血栓形成、胆固醇水平升高、胃肠道反应和感染等副作用。因此,迫切需要寻找更为安全有效的替代治疗药物。

中医学认为 RA 归属于“痹证”“历节”等范畴,正如《素问 · 痹论》所言:“风寒湿三气杂至,合而为

痹也。其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为着痹也[14]。”RA 的基本病机为痰、瘀、虚交错,气血不畅则痛,湿停痰聚,血瘀致虚,导致机体正气不足,抵抗力下降,易于招致风、寒、湿、热等外邪侵犯关节[15]。治疗上,补虚、祛邪、化瘀应贯穿始终。透骨血竭散具有通络止痛、活血化瘀、温经通阳等功效,可用于治疗 RA。研究表明,透骨血竭散通过调节 Toll 样受体 4(Toll - like receptor 4,TLR4)/核因子 - κB(nuclear factor - κB,NF - κB)信号通路缓解 RA 大鼠的关节炎症[16],但 T 细胞功能转化相关机制的研究尚未报道。因此,本研究旨在探讨透骨血竭散是否通过调节 RA 小鼠 JAK2/STAT3 信号通路及 Th17/Treg 失衡,从而发挥治疗 RA 的作用。

1　材料

1.1　动物　C57BL/6 雄性小鼠 80 只,6 ~ 8 周龄,体质量(20 ± 2) g,购自上海实验动物中心。所有动物饲养在温度 22 ~ 24 ℃、湿度 40% ~ 60%、12 h/12 h 光暗循环环境中,自由进食和饮水。动物实验经长沙市第三医院实验动物伦理委员会审核通过,伦理审批编号:2018 - KL - 005,并根据美国国立卫生研究院指南进行动物护理和使用。

1.2　药物与试剂　透骨血竭散(院内制剂,购自湖南省长沙市第三医院);弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、鸡Ⅱ型胶原蛋白(美国 Chondrex 公司,货号:7009、7002、20022);FITC 偶联抗人 CD4 抗体(英国 Abcam 公司;货号:ab59474);PE 偶联抗人叉头框蛋白 3(forkheadbox protein 3,Foxp3)抗体、PE 偶联抗 IL - 17 抗体、流式破膜缓冲液(美国 eBioscience 公司;货号:12 - 5573 - 82、12 - 7177 - 81、00 - 8333 - 56);RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF)、ECL 超敏化学发光试剂(上海碧云天生物科技有限公司,货号:P0013B、ST505、P0018);JAK2 抗体、p - JAK2 抗体、STAT3 抗体、p - STAT3 抗体、GAPDH 抗体(美国 CST 生物科技有限公司,货号:3230、8082、4904、9145、5147);ELISA 试剂盒:IL - 17、IL - 1β、TNF - α、IL - 10(美国 R&D Systems 生物科技有限公司,货号:MHS170、MHSLB00、MHSTA50、M1000B - 1)。

1.3　仪器　EYELA FDU - 2110 冻干机(东京理化器械公司);微量离心机、流式细胞仪(美国赛默飞世尔生物科技有限公司,型号:Sorvall Legend Micro 17R、Attune NxT);电泳仪、化学发光凝胶成像仪(美国伯乐科技有限公司,型号:PowerPacTM、ChemiDoc XRS +);酶标仪(青岛精诚仪器仪表有限公司,型号:JC - 1200MB);电子天平(上海析牛莱伯仪器有限公司,型号:FA1004);超净工作台(苏州赛鸿泰净化科技有限公司,型号:SHT - CJ - PP);磁力搅拌器(上海垒固仪器仪表有限公司,型号:CJJ - 78 - 1);超声破碎仪(上海净信实业发展有限公司,型号:UP - 250)。

2　方法

2.1　药物制备　透骨血竭散组成包括:透骨草 10 g,补骨脂 10 g,艾叶 10 g,当归 10 g,桂枝 10 g,忍冬藤 10 g,青风藤 9 g,䗪虫 6 g,白芥子 6 g,白芍 6 g,红花 6 g,血竭 6 g。所有中药先用 800 mL 无菌过滤水浸泡 30 min,然后用 1000 mL 无菌过滤水煮沸 30 min,煎煮至约 200 mL 药液;药渣加入 1 000 mL 无菌水,按照上述方法再次煎煮,最后将 2 次浓缩药液混合(约 400 mL);将所得药液制备冻干粉,-20 ℃储存备用。

2.2　透骨血竭散急性口服毒性实验　30 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组和 5 个处理组,每组 5 只。小鼠禁食 3 h 后,对照组小鼠灌胃无菌过滤水(10 mL · kg^{-1}),处理组小鼠以不同剂量透骨血竭散灌胃(55 mg · kg^{-1}、175 mg · kg^{-1}、550 mg · kg^{-1}、1 750 mg · kg^{-1}、5 000 mg · kg^{-1}),每日 1 次,连续 14 d,每天观察小鼠的行为表现和生存状况,并于第 0 天、第 7 天、第 14 天记录小鼠体质量。灌胃结束次日,小鼠腹腔注射戊巴比妥钠溶液(60 mg · kg^{-1})进行麻醉,打开腹腔,观察肺、肝脏和小肠等腹部脏器有无出血。采用概率加权回归法(Bliss 法),通过 SPSS 20.0 软件计算小鼠半数致死量(median lethal dose,LD50)和 95% 置信区间。

2.3　透骨血竭散亚急性毒性实验　根据 OECD 测试指南 No. 407[17] 进行透骨血竭散的亚急性毒性研究。20 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为空白组和 3 个透骨血竭散处理组,每组 5 只。依据急性口服毒性实验结果确定透骨血竭散的给药剂量为 500 mg · kg^{-1}、1 000 mg · kg^{-1}、1 500 mg · kg^{-1},空白组小鼠灌胃无菌过滤水,连续 28 d,每天观察小鼠的中毒症状,每周称重,并随时根据体质量调整灌胃量。

2.4　胶原诱导的关节炎(collagen - induced arthritis,CIA)模型建立　C57BL/6 雄性小鼠尾静脉注射

200 μL 由弗氏完全佐剂乳化的鸡Ⅱ型胶原蛋白(2 g·L^{-1}),每日 1 次,连续 3 d;造模第 21 天,小鼠尾静脉注射 200 μL 由弗氏不完全佐剂乳化的鸡Ⅱ型胶原蛋白(2 g·L^{-1})增强 1 次;次日开始进行关节炎评分(arthritis score,AS),每 2 天进行 1 次评分,以 4 个脚趾评分总和作为每只小鼠的关节炎评分,大于 6 分表示 CIA 模型建立成功,评分标准见表 1。

表 1　关节炎评分标准

关节情况	评分
正常关节	0 分
单趾肿胀	1 分
多趾肿胀	2 分
所有脚趾和脚背肿胀	3 分
爪子和脚踝严重肿胀	4 分

2.5　分组及给药　从 30 只 C57BL/6 小鼠中随机选取 10 只作为正常组,其余小鼠采用“2.4”项方法进行造模。第 27 天,将造模成功的小鼠随机分为模型组和透骨血竭散组,每组 10 只。模型组灌胃无菌蒸馏水(10 mL·kg^{-1}),透骨血竭散组灌胃透骨血竭散药液(1 500 mg·kg^{-1}),每日 1 次,连续 5 周。灌胃结束次日,小鼠腹腔注射戊巴比妥钠溶液(60 mg·kg^{-1}),分离脾脏和膝关节滑膜组织。

2.6　流式细胞术检测脾脏 Treg、Th17 细胞数量　冰上无菌取小鼠脾脏组织,在 RPMI 1640 基础培养基中切成小块并研磨,移液管分散细胞团。组织研磨液经纱布过滤,滤液以 1 300 r·min^{-1}离心 5 min,弃上清,2 mL 红细胞裂解液重悬细胞,轻摇至出现白色絮状物,加入 RPMI 1640 终止反应,1 300 r·min^{-1}离心 5 min。

预冷 PBS 清洗细胞,加入细胞表面抗体 CD4、Foxp3、IL－17,4 ℃避光孵育 30 min;加入 3 mL 流式染色缓冲溶液,500 r·min^{-1}离心 5 min,弃上清;加入 250 μL 流式破膜缓冲液,4 °C 孵育 1 h;加入 3 mL 流式染色缓冲溶液洗涤,离心后弃上清;加入 700 μL 流式染色缓冲溶液,离心后弃上清;加入 2 mL 膜渗透液,离心,弃上清;100 μL 洗涤缓冲液悬浮细胞,洗涤并离心,弃上清;加入 250 μL 流式染色缓冲溶液重悬细胞,流式细胞仪上机检测。

2.7　Western blot 检测小鼠滑膜组织 JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3 蛋白表达水平　小鼠滑膜组织经研磨后用含有蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液处理,冰上静置 30 min 后,以 1 300 r·min^{-1}离心取上清。采用 BCA 法进行蛋白定量,100 ℃变性 10 min,通过 SDS－PAGE 电泳分离蛋白质,然后转移到 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;加入一抗(1∶1 000),4 ℃条件下孵育过夜;加入二抗(1∶4 000),室温孵育 1 h;配置 ECL 化学发光液,凝胶成像仪下显影并拍照。

2.8　ELISA 检测小鼠滑膜组织炎症因子含量　采用 ELISA 试剂盒检测小鼠滑膜组织 IL－17、IL－1β、TNF－α 和 IL－10 含量。首先将标准品倍比稀释待用,在 96 孔板中加入样品和标准品,每孔加入生物素标记的抗体,37 ℃孵育 45 min。甩去孔中液体,每孔加入洗涤液,重复洗板 3 次,在滤纸上轻拍以吸干多余水分。每孔加入链霉亲和素－HRP,37 ℃ 孵育 45 min,重复洗板 3 次;每孔加入底物 A 和底物 B,37 ℃避光孵育 5 min;加入终止液,450 nm 波长处检测光密度(optical density,OD)值。

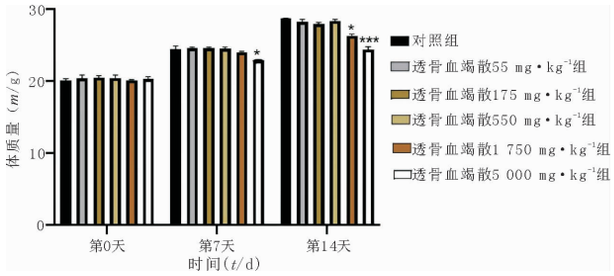
2.9　统计学分析　采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若数据服从正态分布,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析和 *Dunnett's post－hoc* 检验;不服从正态分布的多组间比较采用秩和检验。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　透骨血竭散的急性口服毒性　透骨血竭散 55 mg·kg^{-1}、175 mg·kg^{-1}、550 mg·kg^{-1}灌胃处理的小鼠没有出现死亡;当剂量增加至 1 750 mg·kg^{-1}时,实验过程中有 1 只小鼠死亡;剂量增加至 5 000 mg·kg^{-1} 时,实验过程中有 3 只小鼠死亡。采用 Bliss 法测定透骨血竭散的 LD50 为 3 878 mg·kg^{-1},95% 置信区间为 1 470～5 498 mg·kg^{-1}。实验期间,透骨血竭散 55 mg·kg^{-1}、175 mg·kg^{-1}、550 mg·kg^{-1}灌胃的小鼠未发现毒理学反应;透骨血竭散 1 750 mg·kg^{-1}、5 000 mg·kg^{-1}处理的小鼠,在首次给药后 12～20 h 出现急性毒性症状,包括嗜睡、运动障碍和运动迟缓等。

实验期间,对照组和透骨血竭散各剂量组小鼠的体质量均在逐渐增长;与对照组比较,透骨血竭散 5 000 mg·kg^{-1}处理的小鼠,在第 7 天、第 14 天的体质量降低($P<0.05$),见图 1。透骨血竭散 55 mg·kg^{-1}、175 mg·kg^{-1}、550 mg·kg^{-1}灌胃的小鼠,腹部脏器未见明显异常;透骨血竭散 1 750 mg·kg^{-1}、5 000 mg·kg^{-1} 处理后死亡小鼠的肺、肝脏和小肠均出现出血。

3.2　透骨血竭散的亚急性毒性　实验期间，空白组和透骨血竭散各剂量组小鼠均未见死亡或出现嗜睡、运动迟缓、运动障碍等症状。各组小鼠饮食正常、体质量逐渐增长，且各组小鼠体质量的差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 2。



注：与对照组比较，$*P<0.05$，$***P<0.01$。

图 1　透骨血竭散急性口服毒性实验期间小鼠体质量比较

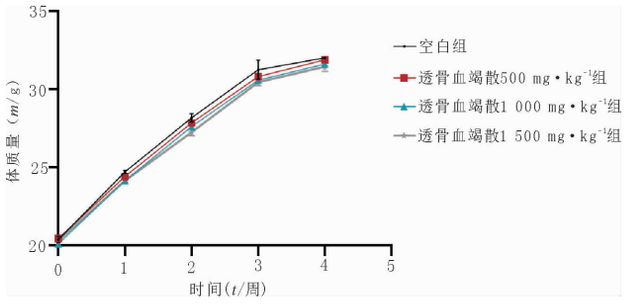
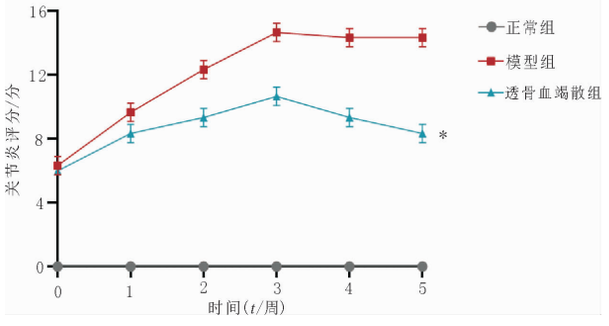


图 2　透骨血竭散亚急性毒性实验期间小鼠体质量比较

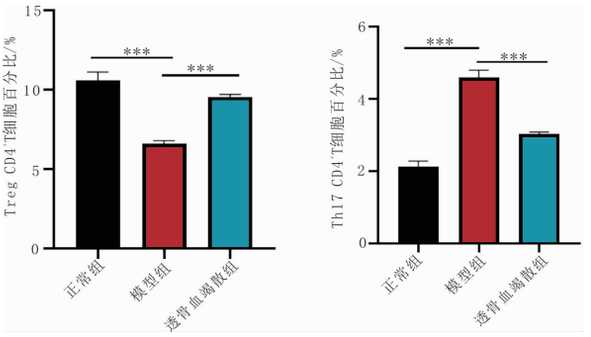
3.3　透骨血竭散对小鼠 AS 评分的影响　造模第 26 天，小鼠出现爪子和关节肿胀、畸形，且 AS 评分 >6 分，表明 CIA 模型复制成功。灌胃第 3 周，模型组和透骨血竭散组小鼠的 AS 评分达到峰值，且 AS 评分均高于正常组；灌胃第 5 周，与模型组比较，透骨血竭散组小鼠的 AS 评分降低（$P<0.01$），见图 3。



注：与模型组比较，$*P<0.01$。

图 3　各组小鼠关节炎评分比较

3.4　透骨血竭散对小鼠脾脏 Treg、Th17 细胞数量的影响　与正常组比较，模型组小鼠脾脏 Treg 细胞百分比减少、Th17 细胞百分比增加（$P<0.01$）；与模型组比较，透骨血竭散组小鼠脾脏 Treg 细胞百分比增加，Th17 细胞百分比下降（$P<0.01$），见图 4。

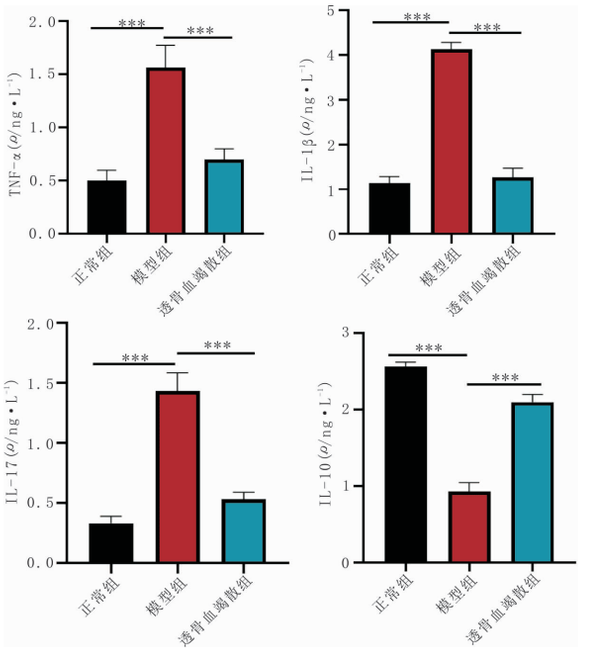


注：$***P<0.01$。

图 4　各组小鼠脾脏 Treg、Th17 细胞数量比较

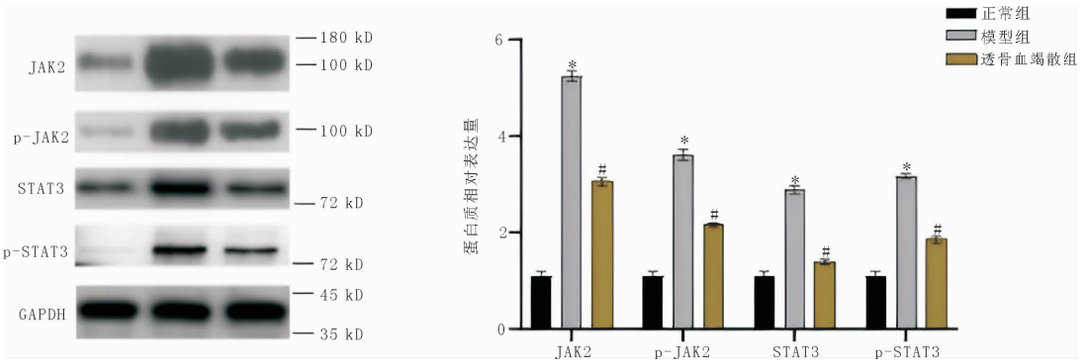
3.5　透骨血竭散对小鼠滑膜组织炎症因子含量的影响　与正常组比较，模型组小鼠滑膜组织 TNF－α、IL－1β、IL－17 含量升高（$P<0.01$）；与模型组比较，透骨血竭散组小鼠滑膜组织 TNF－α、IL－1β、IL－17 含量降低（$P<0.01$）。与正常组比较，模型组小鼠滑膜组织 IL－10 含量降低（$P<0.01$）；与模型组比较，透骨血竭散组小鼠滑膜组织 IL－10 含量升高（$P<0.01$），见图 5。

3.6　透骨血竭散对 JAK2/STAT3 信号通路的影响　与正常组比较，模型组小鼠滑膜组织 JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与模型组比较，透骨血竭散组小鼠滑膜组织 JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），见图 6。



注：$***P<0.01$。

图 5　各组小鼠滑膜组织炎症因子含量比较



注：与正常组比较，$*P<0.05$；与模型组比较，$\#P<0.05$。

图 6　各组小鼠滑膜组织 JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3 蛋白表达水平比较

4　讨论

中医学认为，肝肾亏虚、风寒湿邪侵袭导致关节肿痛僵直、筋骨失养是 RA 的主要病因。透骨血竭散具有舒经通络、祛风活血、温经通阳、舒筋接骨的作用，可以对症治疗 RA[18]。方中透骨草、青风藤、红花活血化瘀，通络止痛；当归、艾叶、血竭祛湿温经、破血通经；诸药合用共奏散瘀止痛、通经温阳、化痰除痹、散邪通络之功效。研究表明，透骨血竭散外服或内服可显著减轻 RA 炎症反应和临床症状[19－20]，但其毒性评价和分子机制尚未见报道。

本研究通过不同的药物毒性实验评估了透骨血竭散的用药安全性，参考全球统一的分类标准[21]，根据 LD50 值（LD50 >2 000 mg·kg^{-1}）可将透骨血竭散归类为低毒性药物。28 天的亚急性口服毒性实验结果显示，透骨血竭散剂量为 1 500 mg·kg^{-1} 时，小鼠的体质量、进食和行为反应无明显异常。由此说明，透骨血竭散的口服剂量在 1 500 mg·kg^{-1} 以内时具有一定的用药安全性。

异常的 T 细胞亚群和免疫功能障碍与 RA 的发病机制密切相关，其中 Th17/Treg 失衡在其中起着重要作用。Treg 特异性转录因子 Foxp3 是调控 Treg 分化和功能的关键基因，Th17 通过 RORγt 调节分泌高水平的特征性细胞因子 IL－17[7,22]。本研究表明，透骨血竭散可增加 CIA 小鼠脾脏淋巴细胞 Treg 数量并降低 Th17 数量，纠正 Th17/Treg 失衡，抑制炎症因子 IL－17 分泌，进而缓解关节炎进程。IL－1β、TNF－α 分别由 Treg 和 Th17 分泌，且与 JAK/STAT 信号通路持续激活有关[23]。JAK/STAT 通路在 RA 发生发展中的相关研究，已被用于开发多种 JAK 抑制剂[24]，其中托伐茵素、巴瑞替尼等药物已获准应用于临床，但是安全性和经济成本仍需进一步优化。本研究中，透骨血竭散能显著降低 JAK2、p－JAK2、STAT3、P－STAT3 蛋白表达水平。由此说明，透骨血竭散可抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活，减少炎症因子分泌，从而缓解 RA 炎症反应，且具有用药安全性。

本研究存在一定的局限性，流式细胞术检测淋巴细胞是从小鼠脾脏组织中分离后过夜培养而来。在培养过程中，细胞可能分泌各种影响活性的物质，同时不能完全排除流式细胞分选过程中 Treg 与 Th17 相互污染的情况。此外，小鼠毒性实验中，采用的药物剂量范围较宽，并不能准确筛选出透骨血竭散的最佳用药剂量。最后，本研究缺乏临床数据，忽略了年龄、基础疾病、性别等背景因素，因此在转化应用过程中需要进一步完善临床观察数据。

综上所述，透骨血竭散可改善 RA 小鼠症状，其机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活，调节 Th17/Treg 平衡，抑制炎症反应有关。本研究初步验证透骨血竭散治疗 RA 的潜力，为 RA 的临床治疗提供新策略与转化依据。

参考文献：

[1] LIN Y J, ANZAGHE M, SCHULKE S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis[J]. Cells, 2020, 9(4): 880.

[2] PARADOWSKA－GORYCKA A, WAJDA A, ROMANOWSKA－PROCHNICKA K, et al. Th17/treg－related transcriptional factor expression and cytokine profile in patients with rheumatoid arthritis[J]. Front Immunol, 2020, 11: 572858.

[3] TAKEUCHI Y, HIROTA K, SAKAGUCHI S. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell－mediated autoimmune arthritis[J]. Immunol Rev, 2020, 294(1): 164－176.

[4] HUANG Y, WANG H, BA X, et al. Decipher manifestations

and Treg/Th17 imbalance in multi – staging rheumatoid arthritis and correlation with TSDR/RORC methylation[J]. Mol Immunol,2020,127:1 – 11.

[5]VEENBERGEN S,SMEETS R L,BENNINK M B,et al. The natural soluble form of IL – 18 receptor beta exacerbates collagen – induced arthritis via modulation of T – cell immune responses[J]. Ann Rheum Dis,2010,69(1):276 – 283.

[6]HASHEMI V,FARROKHI A S,TANOMAND A,et al. Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in Iranian population[J]. Immunol Lett,2018,204:16 – 22.

[7]JIN S W,SUN S Y,LING H Z,et al. Protectin DX restores Treg/Th17 cell balance in rheumatoid arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome via miR – 20a[J]. Cell Death Dis,2021,12(3):280.

[8]KORN T,HILTENSPERGER M. Role of IL – 6 in the commitment of T cell subsets[J]. Cytokine,2021,146:155654.

[9]MURPHY K M,STOCKINGER B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances[J]. Nat Immunol,2010,11(8):674 – 680.

[10]NIU Q,HUANG Z C,WU X J,et al. Enhanced IL – 6/phosphorylated STAT3 signaling is related to the imbalance of circulating T follicular helper/T follicular regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther,2018,20(1):200.

[11]YANG X O,PANOPOULOS A D,NURIEVA R,et al. STAT3 regulates cytokine – mediated generation of inflammatory helper T cells[J]. J Biol Chem,2007,282(13):9358 – 9363.

[12]HOSSEINI A,GHARIBI T,MOHAMMADZADEH A,et al. Ruxolitinib attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) development as animal models of multiple sclerosis (MS)[J]. Life Sci,2021,276:119395.

[13]CIOBANU D A,POENARIU I S,CRINGUS L I,et al. JAK/STAT pathway in pathology of rheumatoid arthritis (Review)[J]. Exp Ther Med,2020,20(4):3498 – 3503.

[14]天津中医学院《素问》整理研究课题组.《黄帝内经素问》校注[J].天津中医学院学报,1985,4(3):35 – 38.

[15]张全爱,李晓宇,张奇文,等.方剑乔教授针药结合治疗类风湿性关节炎的临床思辨特色与治疗经验[J].浙江中医药大学学报,2023,47(6):608 – 612.

[16]邓文雯,肖智,姜如.透骨血竭散对类风湿性关节炎模型大鼠炎症因子的影响[J].陕西中医,2023,44(7):868 – 872.

[17]OECD. Test No. 407: Repeated dose 28 – day oral toxicity study in rodents[M]. Paris: OECD publishing,2008:176.

[18]胡筱薇,周凌燕.透骨血竭散外敷配合 TDP 治疗膝关节骨关节炎的临床观察[J].现代中西医结合杂志,2010,19(21):2640 – 2641.

[19]毕四丽,肖智,陈杜,等.外敷透骨血竭散对类风湿性关节炎患者的治疗效果观察[J].医学理论与实践,2022,35(6):991 – 993.

[20]毕四丽,陈杜,姜如,等.透骨血竭散外敷对类风湿性关节炎大鼠 T 细胞抗原受体通路中 Lck、Fyn 蛋白表达及滑膜细胞凋亡的影响[J].广州中医药大学学报,2022,39(9):2129 – 2135.

[21]SALEEM U,AMIN S,AHMAD B,et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of Saccharum munja Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG[J]. Toxicol Rep,2017,4:580 – 585.

[22]YAN S F,GOLUMBA – NAGY V,KOTSCHENREUTHER K,et al. Membrane – bound IL – 6R is upregulated on Th17 cells and inhibits Treg cell migration by regulating post – translational modification of VASP in autoimmune arthritis[J]. Cell Mol Life Sci,2021,79(1):3.

[23]MALEMUD C J. The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis[J]. Ther Adv Musculoskelet Dis,2018,10(5 – 6):117 – 127.

[24]SINGH S,SINGH S. JAK – STAT inhibitors: Immersing therapeutic approach for management of rheumatoid arthritis[J]. Int Immunopharmacol,2020,86:106731.

收稿日期:2024 – 10 – 03

作者简介:陈杜(1978 –),女,湖南长沙人,副主任医师,研究方向:中西医结合治疗风湿免疫疾病。

通信作者:肖智(1981 –),女,湖南岳阳人,医学硕士,副主任医师,研究方向:中医风湿疾病的诊疗研究。E – mail:13786159120@163.com

编辑:刘凯歌