芍药苷脂质体调控 NF－κB 信号通路抑制巨噬细胞极化减轻类风湿关节炎滑膜炎症*

王东轶，商玮，蔡辉✉

东部战区总医院中西医结合科，江苏 南京 210002

摘要：目的：探讨芍药苷脂质体（paeoniflorin liposome，Pae－LS）对类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）大鼠滑膜巨噬细胞极化的调控作用及对核转录因子－κB（nuclear factor－κB，NF－κB）信号通路的影响。方法：从 40 只 SD 大鼠中随机选取 8 只作为正常组（Normal 组），其余大鼠采用牛Ⅱ型胶原建立胶原诱导性关节炎（collagen－induced arthritis，CIA）模型。造模成功后随机分为模型组（CIA 组）、空白脂质体组（LS 组）、芍药苷组（Pae 组）、芍药苷脂质体组（Pae－LS 组），每组 8 只，尾静脉注射生理盐水或药物，干预 25 d。评估各组大鼠关节炎指数、后爪关节肿胀率及体质量；HE 染色观察踝关节病理形态，Western blot 和 RT－qPCR 法检测滑膜组织肿瘤坏死因子－α（tumor necrosis factor－α，TNF－α）、白细胞介素－1β（interleukin－1β，IL－1β）、白细胞介素－6（interleukin－6，IL－6）、白细胞介素－10（interleukin－10，IL－10）、NF－κB p65、抑制蛋白 κB 激酶 α（inhibitor of nuclear factor kappa－B kinase α，IKKα）蛋白和基因表达水平，流式细胞术检测滑膜组织 $CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞、$CD68^+iNOS^+$ 巨噬细胞数量。结果：与 Normal 组比较，CIA 组大鼠关节炎指数、关节肿胀率升高（$P<0.001$），体质量降低（$P<0.001$），滑膜组织显著增生伴大量炎症细胞弥漫浸润，病理评分升高（$P<0.001$），TNF－α、IL－1β、IL－6、NF－κB p65、IKKα 蛋白和基因表达水平升高（$P<0.001$），$CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞数量与 $CD68^+iNOS^+$ 巨噬细胞数量升高（$P<0.001$）。与 CIA 组比较，Pae 组和 Pae－LS 组大鼠关节炎指数、关节肿胀率降低（$P<0.01$），体质量升高（$P<0.01$），滑膜组织增生减轻、炎症细胞浸润减少，病理评分降低（$P<0.01$），TNF－α、IL－1β、IL－6、NF－κB p65、IKKα 蛋白和基因表达水平降低（$P<0.01$），$CD68^+iNOS^+$ 巨噬细胞数量降低（$P<0.01$），$CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞数量升高（$P<0.01$），且 Pae－LS 组的效果优于 Pae 组（$P<0.01$）。结论：Pae－LS 可通过抑制 NF－κB 信号通路活化，促进巨噬细胞由 M1 型向 M2 型转变，从而减轻 CIA 大鼠滑膜炎症。

关键词：芍药苷脂质体；类风湿关节炎；滑膜炎症；巨噬细胞极化；NF－κB 信号通路；大鼠
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.08.241
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999（2026）08－1625－09

Paeoniflorin Liposome Regulating NF－κB Signaling Pathway to Inhibit Macrophage Polarization and Alleviate Synovial Inflammation in Rheumatoid Arthritis

WANG Dongyi，SHANG Wei，CAI Hui

Department of Integrative Medicine，Eastern Theater General Hospital，Nanjing Jiangsu China 210002

Abstract：Objective：To investigate the effects of paeoniflorin liposome（Pae－LS）on synovial macrophage polarization in rats with

* **基金项目**：军队系统国家中医药管理局重点专科（专病）建设项目（2007ZDZB001）
作者简介：王东轶（1990－），女，江苏南京人，医学博士，主治医师，研究方向：中医药防治风湿免疫疾病。
✉**通信作者**：蔡辉，医学博士，主任医师，博士研究生导师，研究方向：中医药防治风湿免疫疾病。E－mail：njzy_caihui@163.com

rheumatoid arthritis (RA) and their impact on the nuclear factor - κB (NF - κB) signaling pathway. Methods: 40 SD rats were randomly selected, with 8 rats assigned to the normal group (Normal), while the rest were induced with collagen - induced arthritis (CIA) using bovine type II collagen. After successful modeling, rats were randomly divided into the model group (CIA), empty liposome group (LS), paeoniflorin group (Pae), and paeoniflorin liposome group (Pae - LS), with 8 rats in each group, administered saline or drugs via tail vein injection for 25 days. Arthritis index, hind paw swelling rate, and body weight were assessed in each group; HE staining was used to observe ankle joint pathology; Western blot and RT - qPCR analyzed synovial tissue expression levels of tumor necrosis factor - α (TNF - α), interleukin - 1β (IL - 1β), interleukin - 6 (IL - 6), interleukin - 10 (IL - 10), NF - κB p65, and inhibitor of nuclear factor kappa - B kinase α (IKKα) proteins and genes; flow cytometry was used to detect the quantities of $CD68^+CD206^+$ and $CD68^+iNOS^+$ macrophages in synovial tissue. Results: Compared with the Normal group, the CIA group rats showed increased arthritis index and joint swelling rate ($P<0.001$), decreased body weight ($P<0.001$), significant synovial tissue hyperplasia with extensive inflammatory cell infiltration, higher pathology scores ($P<0.001$), and elevated protein and gene expression levels of TNF - α, IL - 1β, IL - 6, NF - κB p65, and IKKα ($P<0.001$). The quantities of $CD68^+CD206^+$ macrophages and $CD68^+iNOS^+$ macrophages were also increased ($P<00.01$). Compared with the CIA group, the Pae group and Pae - LS group rats showed reduced arthritis index and joint swelling rate ($P<0.01$), increased body weight ($P<0.01$), less synovial hyperplasia and reduced inflammatory cell infiltration, lower pathology scores ($P<0.01$), decreased protein and gene expression of TNF - α, IL - 1β, IL - 6, NF - κB p65, and IKKα ($P<0.01$), decreased $CD68^+iNOS^+$ macrophage quantities ($P<0.01$), and increased $CD68^+CD206^+$ macrophage quantities ($P<0.01$), with the Pae - LS group showing better effects than the Pae group ($P<0.01$). Conclusion: Pae - LS may reduce synovial inflammation in CIA rats by inhibiting NF - κB signaling pathway activation and promoting the shift of macrophages from M1 to M2 type.

Key words: paeoniflorin liposomes; rheumatoid arthritis; synovial inflammation; macrophage polarization; NF - κB signaling pathway; rat

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是多种免疫细胞参与的慢性炎症性疾病,严重者可造成残疾。环境因素和遗传因素交互作用促使机体对某些基质蛋白的耐受性丧失[1],进而激活固有免疫和获得性免疫应答。目前,RA 的发病机制尚未完全明确,但巨噬细胞作为免疫应答的重要参与者,在其中发挥了至关重要的作用。巨噬细胞在不同刺激因素的作用下可极化为促进炎症反应的 M1 型巨噬细胞(表面高表达 CD80、CD86 和 iNOS 等)或参与组织修复的 M2 型巨噬细胞(表面高表达 CD163、CD206 和 Arg - 1 等),且在微环境发生改变时,这两种极化表型具有可逆性[2]。在调控巨噬细胞极化的过程中,细胞核转录因子 - κB(nuclear factor - kappa B, NF - κB)信号通路是至关重要的传导途径。NF - κB 抑制蛋白激酶(IκB kinase, IKK)被肿瘤坏死因子 - α(tumor necrosis factor - α, TNF - α)、白细胞介素(interleukin, IL) - 1β 和脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)等激活后,导致 IκB 泛素化,进而激活 NF - κB,使其转位至细胞核调控炎症因子的基因转录,从而调控巨噬细胞极化[3-5]。

芍药苷(paeoniflorin, Pae)是毛茛科植物芍药根的提取物,能有效改善佐剂性关节炎大鼠的滑膜炎症,降低 IL - 1、前列腺素 E2 和 IL - 6 等炎症介质水平[6]。药代动力学研究表明,Pae 不易透过机体的生理屏障,存在生物利用率低和剂量依赖性不良反应的缺陷。新型给药系统,即用纳米材料包裹药物被动或主动靶向运送至炎症组织或靶细胞,可以有效解决上述问题。本课题组前期构建的由聚乙二醇和叶酸共同修饰的脂质体(liposome, LS)包裹 Pae,能够靶向活化的巨噬细胞,促进 M1 型巨噬细胞向 M2 表型极化,减轻胶原诱导性关节炎(collagen - induced arthritis, CIA)大鼠的关节肿胀程度[7]。本研究拟进一步探索 Pae - LS 影响滑膜巨噬细胞极化的作用机制,为 RA 滑膜炎症的治疗提供新思路。

1　材料

1.1　实验动物　健康雌性 SPF 级 SD 大鼠 40 只,8 周龄,体质量 180 ~ 220 g,购于上海市计划生育科学研究所实验动物经营部,许可证号:SCXK(沪)2018 - 0006。动物饲养在东部战区总医院 SPF 级实验动物中心独立通风笼盒内,室温(22 ± 2)℃,相对湿度(50 ± 10)%,12 h 光照/12 h 黑暗节律,自由摄食和饮水。本研究遵循动物保护原则,并经东部战区总医院实验动物伦理委员会批准,伦理审批编号:2022DZGKJDWLS - 0082。

1.2　主要试剂　脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、二甲基亚砜、蛋白酶抑制剂混合液、I 型胶原酶、胆固醇半琥珀酸酯(cholesteryl hemisuccinate, CHEMS)

购自 Sigma 公司；干扰素 - γ（interferon - γ，IFN - γ）、IL - 4 购自 PeproTech 公司；磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）购自南京生兴生物技术有限公司；二辛可宁酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白浓度测定试剂盒、HRP 抗小鼠抗体、HRP 抗兔抗体、MTT 试剂购自上海碧云天生物技术股份有限公司；APC - CD206、APC - iNOS、PE - CD68 抗体购自 eBioscience 公司；PE - F4/80 抗体购自 Santa Cruz 公司；达尔伯克（氏）必需基本培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素溶液购自 Hyclone 公司；逆转录试剂盒、SYBR Green 溶液、Trizol 购自 Takara 公司；焦碳酸二乙酯、四甲基乙二胺、氯仿购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；30% 聚丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、过硫酸铵、Tween - 20 购自北京索莱宝科技有限公司；PVDF 膜购自 Millipore 公司。

1.3　主要仪器　Calibur 型流式细胞仪（美国 BD 公司）；Multiskan 51119000 型酶标仪、Nano Drop 2000 型超微量紫外 - 可见分光光度计（ThermoFisher Scientific 公司）；StepOne plus 型荧光定量 PCR 仪、Veriti 型 PCR 仪（Applied Biosystems 公司）；Mini Protean 3 型 SDS - PAGE 电泳仪、170 - 3930 型湿法转膜仪（Bio - Rad 公司）；TY - 80R 型脱色摇床（金坛市医疗仪器厂）；5200 型化学发光成像仪（上海天能生命科学有限公司）；Tecnai 10 型透射电子显微镜（荷兰 FEI 公司）。

2　方法

2.1　药物制备　采用薄膜分散法制备聚乙二醇和叶酸双修饰脂质体，4 ℃避光保存。空白脂质体以 DOPE、CHEMS、DSPE - PEG2000、DSPE - PEG2000 - 叶酸为原料，按摩尔比 6∶4∶0.5∶0.1 混合，溶于三氯甲烷，旋转蒸发形成脂质薄膜，制备空白脂质体混悬液，脂质质量浓度为 10 g·L^{-1}。精密称取 Pae 标准品，溶于无菌生理盐水，配制质量浓度为 10 g·L^{-1} 的 Pae 母液，使用时按需稀释。芍药苷脂质体的脂质膜制备工艺同空白脂质体，采用硫酸铵梯度法载药。

2.2　分组与处理　从 40 只 SD 大鼠中随机选取 8 只作为正常组（Normal 组），尾静脉注射生理盐水 10 mL·kg^{-1}。其余大鼠采用牛Ⅱ型胶原建立胶原诱导性关节炎（collagen - induced arthritis，CIA）模型，具体方法如下：将牛Ⅱ型胶原与完全弗氏佐剂等体积充分乳化，于大鼠尾根部、背部多点皮下注射，每只 0.2 mL；初次免疫第 14 天，采用牛Ⅱ型胶原 + 不完全弗氏佐剂复合物行二次加强免疫，每只 0.1 mL；21 d 后，大鼠出现足爪红肿、关节畸形、活动受限即判定为造模成功。将成模大鼠随机分为模型组（CIA 组，尾静脉注射生理盐水，10 mL·kg^{-1}）、空白脂质体组（LS 组，尾静脉注射空白脂质体，10 mL·kg^{-1}）、芍药苷组（Pae 组，尾静脉注射 Pae，100 mg·kg^{-1}·d^{-1}，10 mL·kg^{-1}）、芍药苷脂质体组（Pae - LS 组，尾静脉注射芍药苷脂质体，100 mg·kg^{-1}·d^{-1}，10 mL·kg^{-1}），每组 8 只，连续注射 25 d。

2.3　关节炎指数及关节肿胀程度评估　采用排水式体积计量器检测大鼠后爪体积，记录大鼠关节炎指数，并定期称体质量。建立 CIA 模型前测定后爪体积（V_0）和体质量，分别于干预第 0、10、20 和 25 天测量并记录大鼠后爪体积（V_X）、体质量和关节炎指数。关节肿胀率数值越高代表关节水肿、增生越严重。关节炎评分标准：0 分：关节无红肿，形态正常；1 分：趾关节轻度红肿；2 分：足跖关节红肿；3 分：踝关节以下全部红肿；4 分：全关节严重红肿、畸形、活动障碍。关节炎指数 = 四肢评分总和，分值越高代表关节炎症越重。

$$关节肿胀率(\%) = (V_X - V_0)/V_0 \times 100\%$$

2.4　踝关节组织病理学检查　处死大鼠后分离踝关节标本，经固定、脱钙、包埋后切片，HE 染色后对炎症细胞浸润、滑膜增生、软骨侵蚀和骨破坏进行评分（从 0 分到 4 分，总分 16 分）。评分标准：0 分：正常滑膜；1 分：轻微（炎症细胞浸润，骨赘形成）；2 分：轻度（炎症细胞浸润、软骨变薄和骨吸收）；3 分：中度（炎症细胞浸润，伴淋巴细胞聚集、软骨糜烂和明显骨吸收）；4 分：严重（炎症细胞浸润，伴水肿、严重骨侵蚀）。

2.5　RT - qPCR 法检测 *TNF - α*、*IL - 1β*、*IL - 6* 和 *IL - 10* mRNA 表达　分离获取大鼠关节滑膜组织后，制备 1 mm^3 组织块，用 DMEM 培养基洗涤，胶原酶和 DNase 消化组织，经 100 μm 滤网过滤后收集沉积物。将滑膜细胞悬液置于培养皿中，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。滑膜巨噬细胞黏附后，弃去未黏附的细胞和培养基，再用细胞刮刀刮下细胞。收集分离处理好的滑膜巨噬细胞后，用 Trizol 提取总 RNA，PrimeScript™ RT 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，使用 SYBR Premix Ex Taq™ Ⅱ（RR820A）试剂盒进行 RT - qPCR 反应。以 GAPDH 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因	正向引物(5′－3′)	反向引物(3′－5′)
IL－6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
IL－10	CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
TNF－α	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
IL－1β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

2.6　流式细胞术检测巨噬细胞表面标志物　收集各组滑膜巨噬细胞，用 200 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞并转移至圆底流式管。加入 CD68 抗体，避光孵育 20 min；经 1 mL PBS 洗涤、500 ×*g* 离心 5 min 后弃上清。按试剂盒说明书将细胞固定破膜后，分别加入 iNOS 和 CD206 抗体，4 ℃避光孵育 20 min。加入 1 mL PBS 重悬细胞，4 ℃、1 000 r·min^{-1} 离心 5 min，弃上清。加入 400 μL PBS 混匀，流式细胞仪检测 $CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞数量和 $CD68^+iNOS^+$ 巨噬细胞数量。

2.7　Western blot 法检测炎症因子及 NF－κB 信号通路蛋白表达　收集各组滑膜巨噬细胞，加入裂解液研磨至无沉淀，4 ℃离心 15 min，取上清液以 BCA 法测定蛋白含量。上样样品煮沸变性后行 SDS－PAGE 电泳并转膜，封闭 1 h。加入一抗(1∶1 500)4 ℃孵育过夜，二抗(1∶5 000)孵育 2 h。采用 Tanon ECL 化学发光液显色，于 Tanon 5200 化学发光成像仪下摄片，检测 TNF－α、IL－1β、IL－6、NF－κB p65、IKKα、IL－10 蛋白表达水平。

2.8　统计学方法　采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析，计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若数据服从正态分布且方差齐，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 *LSD* 检验；若数据不服从正态分布或方差不齐，则采用 *Kruskal－Wallis* 检验。多时点重复测量数据采用 *Pillai's Trace* 检验，后用 *LSD* 检验进行多重比较。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　各组大鼠关节炎指数、关节肿胀程度和体质量变化　关节炎指数：与 Normal 组比较，CIA 组大鼠关节炎指数升高($P<0.001$)；干预第 10、20、25 天，与 CIA 组比较，Pae 组与 Pae－LS 组大鼠关节炎指数降低($P<0.05$)；干预第 20、25 天，与 Pae 组比较，LS 组大鼠关节炎指数升高($P<0.01$)；干预第 25 天，与 Pae 组比较，Pae－LS 组大鼠关节炎指数降低($P<0.05$)，见表 2。

关节肿胀率：与 Normal 组比较，CIA 组大鼠关节肿胀率升高($P<0.001$)；干预第 10、20、25 天，与 CIA 组比较，Pae 组与 Pae－LS 组大鼠关节肿胀率降低($P<0.01$)；干预第 10、20、25 天，与 Pae 组比较，LS 组大鼠关节肿胀率升高($P<0.01$)；干预第 20、25 天，与 Pae 组比较，Pae－LS 组大鼠关节肿胀率降低($P<0.05$)，见表 3。

表 2　各组大鼠不同时间点关节炎指数比较　($\bar{x} \pm s$，分)

组别	*n*	0 d	10 d	20 d	25 d
Normal 组	8	0	0	0	0
CIA 组	8	6.63 ± 0.52***	7.13 ± 0.64***	7.00 ± 0.53***	6.88 ± 0.35***
LS 组	8	6.75 ± 0.46	7.00 ± 0.53	6.50 ± 0.53$^{\#\#}$	6.50 ± 0.53$^{\#\#}$
Pae 组	8	6.38 ± 0.52	6.25 ± 0.46$^{\triangle}$	5.00 ± 0.53$^{\triangle\triangle}$	5.00 ± 0.53$^{\triangle\triangle}$
Pae－LS 组	8	6.50 ± 0.53	5.50 ± 0.76$^{\triangle\triangle}$	4.25 ± 0.71$^{\triangle\triangle}$	4.13 ± 0.83$^{\#\triangle\triangle}$

注：与 Normal 组比较，$***P<0.001$；与 CIA 组比较，$\triangle P<0.05$，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Pae 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$。

表 3　各组大鼠不同时间点关节肿胀率比较　($\bar{x} \pm s$，%)

组别	*n*	0 d	10 d	20 d	25 d
Normal 组	8	25.43 ± 2.89	28.03 ± 3.06	29.08 ± 3.60	29.65 ± 3.27
CIA 组	8	69.72 ± 6.03***	76.86 ± 5.51***	76.03 ± 5.98***	75.03 ± 7.05***
LS 组	8	70.42 ± 8.28	74.78 ± 5.85$^{\#\#}$	70.42 ± 5.06$^{\#\#}$	69.25 ± 5.86$^{\#\#}$
Pae 组	8	71.00 ± 6.18	64.85 ± 8.60$^{\triangle\triangle}$	56.25 ± 9.10$^{\triangle\triangle}$	53.81 ± 8.08$^{\triangle\triangle}$
Pae－LS 组	8	69.04 ± 10.48	58.86 ± 7.09$^{\triangle\triangle}$	48.05 ± 4.66$^{\#\triangle\triangle}$	46.24 ± 4.64$^{\#\#\triangle\triangle}$

注：与 Normal 组比较，$***P<0.001$；与 CIA 组比较，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Pae 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$。

体质量：与 Normal 组比较，CIA 组大鼠体质量降低（$P<0.001$）；干预第 20、25 天，与 CIA 组比较，Pae 组与 Pae－LS 组大鼠体质量升高（$P<0.01$）；干预第 20、25 天，与 Pae 组比较，LS 组大鼠体质量降低（$P<0.01$）；干预第 25 天，与 Pae 组比较，Pae－LS 组大鼠体质量升高（$P<0.05$），见表 4。

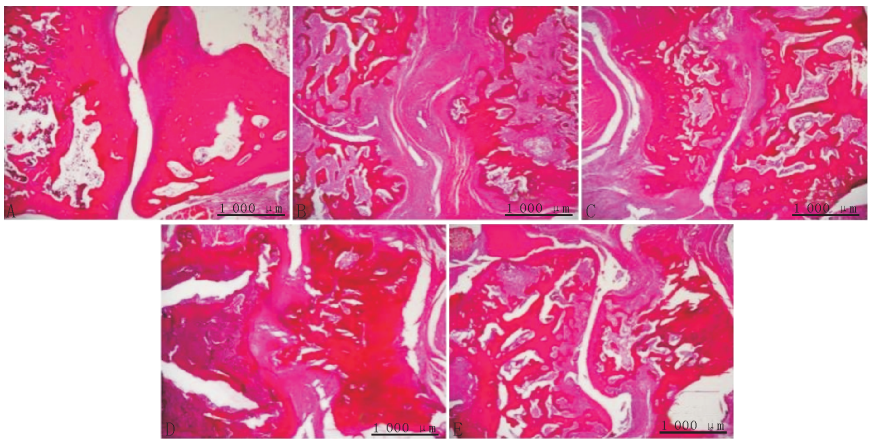
表 4　各组大鼠不同时间点体质量比较　（$\bar{x}\pm s$，g）

组别	n	0 d	10 d	20 d	25 d
Normal 组	8	432.25±9.32	459.00±7.89	490.25±9.51	505.00±13.13
CIA 组	8	382.38±10.93***	396.13±9.22***	413.00±7.87***	417.25±6.84***
LS 组	8	383.25±16.21	393.13±13.21	407.50±13.50$^{\#\#}$	413.00±13.26$^{\#\#}$
Pae 组	8	385.00±10.31	400.13±6.75	426.88±6.77$^{\triangle\triangle}$	431.25±9.16$^{\triangle\triangle}$
Pae－LS 组	8	380.63±15.72	405.50±12.98	438.13±9.70$^{\triangle\triangle}$	448.63±7.82$^{\#\triangle\triangle}$

注：与 Normal 组比较，$***P<0.001$；与 CIA 组比较，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Pae 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$。

3.2　各组大鼠踝关节组织病理学变化　HE 染色显示，Normal 组大鼠滑膜结构完整，细胞排列规整，无炎症细胞浸润；CIA 组和 LS 组大鼠滑膜显著增生增厚，大量中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞弥漫浸润；Pae 组大鼠滑膜增生减轻，炎症细胞浸润减少；Pae－LS 组大鼠滑膜形态基本恢复，仅见少量散在炎症细胞，组织损伤改善最为显著，见图 1。

与 Normal 组比较，CIA 组大鼠踝关节病理评分升高（$P<0.001$）；与 CIA 组比较，Pae 组和 Pae－LS 组大鼠踝关节病理评分降低（$P<0.01$）；与 Pae 组比较，LS 组大鼠踝关节病理评分升高（$P<0.01$），Pae－LS 组大鼠踝关节病理评分降低（$P<0.01$），见表 5。



注：A：Normal 组；B：CIA 组；C：LS 组；D：Pae 组；E：Pae－LS 组。

图 1　各组大鼠踝关节 HE 病理染色图

表 5　各组大鼠踝关节病理评分比较（$\bar{x}\pm s$，分）

组别	n	病理评分
Normal 组	8	0
CIA 组	8	10.75±0.46***
LS 组	8	10.25±0.71$^{\#\#}$
Pae 组	8	6.75±1.04$^{\triangle\triangle}$
Pae－LS 组	8	5.25±1.04$^{\#\#\triangle\triangle}$

注：与 Normal 组比较，$***P<0.001$；与 CIA 组比较，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Pae 组比较，$\#\#P<0.01$。

3.3　各组大鼠滑膜组织促炎和抗炎细胞因子表达比较　与 Normal 组比较，CIA 组大鼠滑膜组织 TNF－α、IL－1β、IL－6 蛋白和基因表达水平升高（$P<0.001$）；与 Normal 组比较，CIA 组大鼠滑膜组织 *IL－10* 基因表达水平升高，蛋白表达水平降低（$P<0.001$）。与 CIA 组比较，Pae 组和 Pae－LS 组大鼠 TNF－α、IL－1β、IL－6 蛋白和基因表达水平降低（$P<0.01$）；与 CIA 组比较，Pae 组和 Pae－LS 组大鼠 IL－10 蛋白和基因表达水平升高（$P<0.01$）。与 Pae 组比较，LS 组大鼠 TNF－α、IL－1β、IL－6 蛋白和基因表达水平升高（$P<0.01$），IL－10 蛋白和基因表达水平降低（$P<0.01$），Pae－LS 组则与此相反（$P<0.05$），见表 6、表 7、图 2。

3.4　各组大鼠滑膜组织巨噬细胞极化情况　与 Normal 组比较，CIA 组大鼠滑膜组织 $CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞数量与 $CD68^+iNOS^+$ 巨噬细胞数量升高（$P<0.001$）。与 CIA 组比较，Pae 组和 Pae－LS 组大鼠滑膜组织 $CD68^+iNOS^+$ 巨噬细胞数量降低

（$P<0.01$），$CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞数量升高（$P<0.01$）。与 Pae 组比较，Pae－LS 组大鼠滑膜组织 $CD68^+iNOS^+$ 巨噬细胞数量降低（$P<0.01$），$CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞数量升高（$P<0.01$），见图 3、表 8。

表 6　各组大鼠滑膜组织 *IL－1β*、*IL－6*、*IL－10* 和 *TNF－α* mRNA 表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

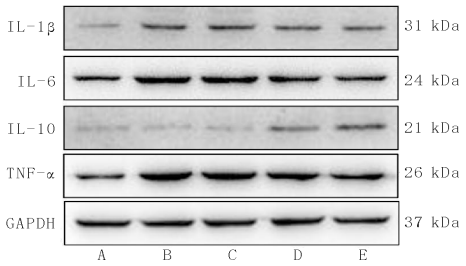
组别	n	*IL－1β* mRNA	*IL－6* mRNA	*IL－10* mRNA	*TNF－α* mRNA
Normal 组	8	1.19±0.44	1.19±0.29	0.91±0.08	1.18±0.10
CIA 组	8	4.89±1.20***	6.91±0.87***	0.97±0.16***	3.79±0.08***
LS 组	8	5.09±0.55$^{\#\#}$	6.74±1.07$^{\#\#}$	0.96±0.11$^{\#\#}$	3.81±0.17$^{\#\#}$
Pae 组	8	3.01±0.66$^{\triangle\triangle}$	4.28±1.10$^{\triangle\triangle}$	2.02±0.17$^{\triangle\triangle}$	2.63±0.12$^{\triangle\triangle}$
Pae－LS 组	8	1.84±0.58$^{\#\triangle\triangle}$	2.56±0.55$^{\#\#\triangle\triangle}$	3.03±0.36$^{\#\#\triangle\triangle}$	1.73±0.09$^{\#\#\triangle\triangle}$

注：与 Normal 组比较，$***P<0.001$；与 CIA 组比较，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Pae 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$。

表 7　各组大鼠滑膜组织 IL－1β、IL－6、IL－10 和 TNF－α 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	IL－1β/GAPDH	IL－6/GAPDH	IL－10/GAPDH	TNF－α/GAPDH
Normal 组	8	0.09±0.02	0.40±0.03	0.08±0.03	0.35±0.04
CIA 组	8	0.35±0.03***	1.07±0.06***	0.07±0.02***	0.94±0.04***
LS 组	8	0.36±0.03$^{\#\#}$	1.04±0.04$^{\#\#}$	0.08±0.02$^{\#\#}$	0.91±0.05$^{\#\#}$
Pae 组	8	0.24±0.04$^{\triangle\triangle}$	0.78±0.03$^{\triangle\triangle}$	0.15±0.03$^{\triangle\triangle}$	0.70±0.05$^{\triangle\triangle}$
Pae－LS 组	8	0.17±0.03$^{\#\#\triangle\triangle}$	0.49±0.03$^{\#\#\triangle\triangle}$	0.22±0.03$^{\#\#\triangle\triangle}$	0.55±0.05$^{\#\#\triangle\triangle}$

注：与 Normal 组比较，$***P<0.001$；与 CIA 组比较，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Pae 组比较，$\#\#P<0.01$。



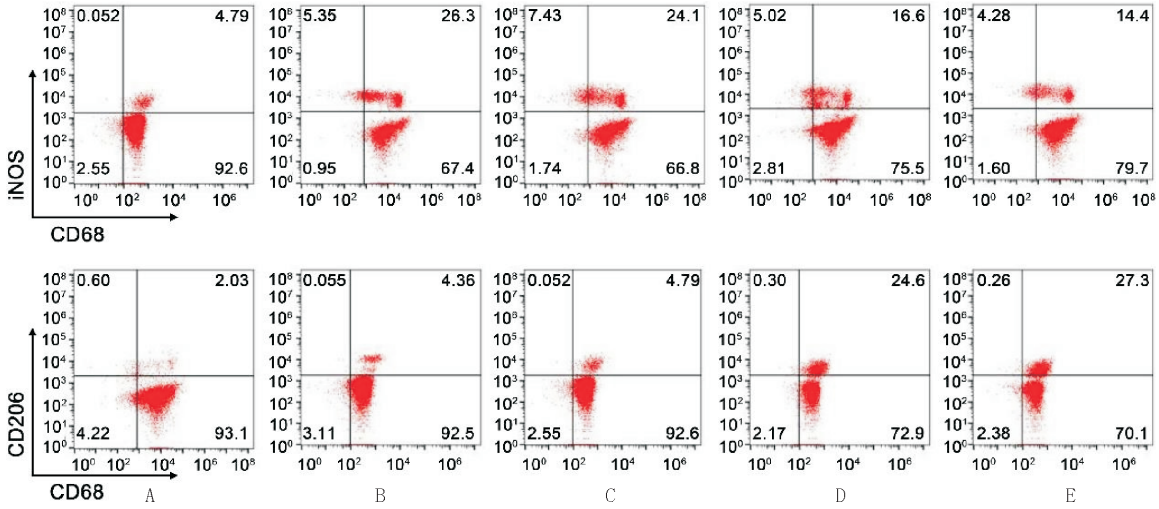
注：A：Normal 组；B：CIA 组；C：LS 组；D：Pae 组；E：Pae－LS 组。

图 2　各组大鼠滑膜组织 IL－1β、IL－6、IL－10 和 TNF－α 蛋白条带图

表 8　各组大鼠滑膜组织巨噬细胞分类比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	$CD68^+iNOS^+$ 巨噬细胞数量	$CD68^+CD206^+$ 巨噬细胞数量
Normal 组	8	1.92±0.11	1.31±0.22
CIA 组	8	25.21±0.88***	4.53±0.50***
LS 组	8	24.68±1.52	4.07±0.67
Pae 组	8	17.31±1.04$^{\triangle\triangle}$	23.90±0.94$^{\triangle\triangle}$
Pae－LS 组	8	14.17±0.59$^{\#\#\triangle\triangle}$	27.37±1.10$^{\#\#\triangle\triangle}$

注：与 Normal 组比较，$***P<0.001$；与 CIA 组比较，$\triangle\triangle P<0.01$；与 Pae 组比较，$\#\#P<0.01$。



注：A：Normal 组；B：CIA 组；C：LS 组；D：Pae 组；E：Pae－LS 组。

图 3　各组大鼠滑膜组织巨噬细胞极化检测流式图

3.5　各组大鼠滑膜组织 NF－κB p65 和 IKKα 蛋白和基因表达　与 Normal 组比较，CIA 组大鼠滑膜组织 NF－κB p65、IKKα 蛋白和基因表达水平升高（$P<0.001$）。与 CIA 组比较，Pae 组和 Pae－LS 组大鼠滑膜组织 NF－κB p65、IKKα 蛋白和基因表达水平降低（$P<0.01$）。与 Pae 组比较，LS 组大鼠滑膜组织 NF－κB p65、IKKα 蛋白和基因表达水平升高（$P<0.01$），Pae－LS 组则与此相反（$P<0.01$），见表 9、表 10、图 4。

表 9　各组大鼠滑膜组织 *NF－κB p65* 和 *IKKα* mRNA 表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

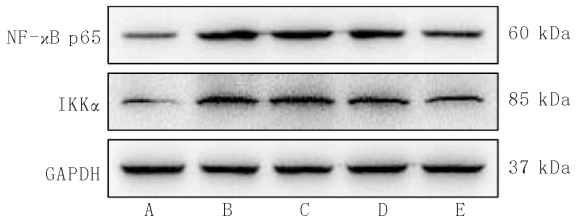
组别	n	*NF－κB p65* mRNA	*IKKα* mRNA
Normal 组	8	1.20±0.11	1.47±0.21
CIA 组	8	3.65±0.34***	7.24±0.59***
LS 组	8	3.77±0.33##	7.17±0.63##
Pae 组	8	2.74±0.34△△	4.76±0.68△△
Pae－LS 组	8	2.10±0.08##△△	3.24±0.54##△△

注：与 Normal 组比较，***$P<0.001$；与 CIA 组比较，△△$P<0.01$；与 Pae 组比较，##$P<0.01$。

表 10　各组大鼠滑膜组织 NF－κB p65 和 IKKα 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	NF－κB p65/GAPDH	IKKα/GAPDH
Normal 组	8	0.16±0.03	0.10±0.02
CIA 组	8	0.73±0.05***	0.56±0.04***
LS 组	8	0.76±0.05##	0.56±0.05##
Pae 组	8	0.55±0.05△△	0.41±0.03△△
Pae－LS 组	8	0.31±0.03##△△	0.18±0.04##△△

注：与 Normal 组比较，***$P<0.001$；与 CIA 组比较，△△$P<0.01$；与 Pae 组比较，##$P<0.01$。



注：A：Normal 组；B：CIA 组；C：LS 组；D：Pae 组；E：Pae－LS 组。

图 4　各组大鼠滑膜组织 NF－κB p65 和 IKKα 蛋白条带图

4　讨论

滑膜巨噬细胞在 RA 关节炎症发生和发展过程中的作用具有异质性，不同表型的巨噬细胞在体内稳态和炎症过程中的功能各异[8-9]。巨噬细胞最初被分为 M1 表型和 M2 表型，其中 M1 型巨噬细胞由 IFN－γ 和 LPS 诱导分化，分泌促炎细胞因子和活性氧；M2 型巨噬细胞由 IL4/IL－13 诱导分化，分泌抗炎细胞因子并参与组织修复[10-11]。即使随后有研究发现在这两种表型之间存在与 RA 疾病发展和缓解相关的连续性表型，M1 型和 M2 型巨噬细胞仍是分别参与滑膜炎症和组织修复的经典表型[2,12-13]。值得注意的是，巨噬细胞极化具有可逆性，这使通过药物干预调节巨噬细胞极化来改善 RA 滑膜炎症具有可行性，也为 RA 免疫治疗提供了新策略。

近年来，通过调节巨噬细胞功能以减轻 RA 滑膜炎症的研究越来越受到关注，尤其是天然产物提取物诱导巨噬细胞极化的相关研究。Pae 是芍药的有效活性成分，可调节免疫细胞的激活和减少炎症介质的产生[14-15]。有研究表明，Pae 可通过诱导滑膜细胞凋亡、减少成纤维细胞样滑膜细胞迁移和抑制树突状细胞成熟来减轻 RA 动物模型的疾病严重程度[16-19]。然而，很少有研究关注 Pae 介导的巨噬细胞极化调节相关机制。此外，芍药苷虽然具有很好的抗炎作用，但其生物利用率低，即使是静脉给药，也会很快代谢为芍药代谢素－I[20-21]。相较于传统给药方式，采用脂质体包裹糖皮质激素、抗风湿药物和非甾体抗炎药等药物的新型给药系统具有更好的治疗效果[22-24]。在脂质体表面修饰聚乙二醇，可以减少网状内皮系统的识别和摄取，避免脂质体从循环中快速清除[25]。在脂质体表面修饰抗体、叶酸和多肽等配体，可以主动靶向结合细胞表面的蛋白，从而特异性调节靶细胞的功能[26-28]。其中，叶酸对活化的巨噬细胞表面的叶酸受体具有高亲和力，RA 滑膜中的巨噬细胞可通过内吞作用将表面修饰叶酸的脂质体内化至细胞质，并将其运送至内体结构中，载药脂质体将在内体的酸化作用下释放药物[29]。因此，本课题组制备了叶酸和聚乙二醇共同修饰的 Pae－LS，借助叶酸与活化巨噬细胞表面叶酸受体之间的相互作用载药靶向巨噬细胞，不仅增加了活化巨噬细胞的摄取量，也实现了血液中 pH 敏感性和长循环的特殊性质，是一个相对理想的靶向脂质体[7]。

本研究中，Pae－LS 能够调节 CIA 大鼠滑膜组织中巨噬细胞的极化，抑制 M1 型巨噬细胞极化，减少炎症细胞因子 IL－1β、IL－6 和 TNF－α 的释放；促进巨噬细胞向 M2 表型极化，增加抗炎细胞因子 IL－10 的产生，这与既往研究中 Pae 可促进小胶质细胞表型转化的结果相一致[30-31]。M1 型巨噬细胞

增加是 RA 疾病早期和发展的重要标志，可导致免疫系统的持续激活，而 M2 型巨噬细胞可产生 IL－10、IL－1RA 和 TGF－β 等细胞因子，促进组织修复和伤口愈合[32]。M1 和 M2 表型巨噬细胞稳态失衡是 RA 滑膜炎症中炎症介质产生的主要来源，可引发滑膜炎症并导致关节损伤。由此可见，诱导滑膜巨噬细胞从 M1 表型极化为 M2 表型有利于 RA 滑膜炎症的缓解和组织损伤的修复。Pae－LS 调控巨噬细胞的表型和功能很可能是减轻 RA 滑膜炎症的重要机制之一。

NF－κB 信号通路是巨噬细胞极化的关键传导通路，在滑膜炎症中发挥至关重要的作用。本研究发现，Pae－LS 处理 CIA 大鼠后滑膜巨噬细胞中 NF－κB p65 和 IKKα 表达水平降低，炎症细胞因子水平亦降低。NF－κB p65 和 IKKα 是 NF－κB 信号通路中的重要信号因子。IKK 信号小体（由 IKKα、IKKβ 和 NEMO 组成）被 IFN－γ 和 LPS 激活后可介导 IκB 磷酸化，促进 NF－κB p65 释放和转位至细胞核，参与 TNF－α、IL－1 和 IL－6 等炎症细胞因子的转录。由此推测，Pae－LS 通过抑制 IKK 信号小体的激活，减少 NF－κB p65 的核转位，进而促进 M1 表型向 M2 表型极化，缓解 CIA 大鼠的关节滑膜炎症。

综上所述，Pae－LS 可抑制 NF－κB 信号通路活化，调节巨噬细胞极化，减少炎症细胞因子分泌，本研究为 RA 的免疫靶向治疗提供新视角。芍药苷是一种具有复杂生物活性和多靶点作用的中药活性成分，且通过新型给药系统直接进入活化的巨噬细胞内发挥作用，后续仍需进一步研究深入探索其作用机制。

参考文献：

[1] McInnes I B, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205－2219.

[2] Alivernini S, MacDonald L, Elmesmari A, et al. Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis[J]. Nat Med, 2020, 26(8): 1295－1306.

[3] Dorrington M G, Fraser I D C. NF－κB signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration[J]. Front Immunol, 2019, 10: 705.

[4] Liu T T, Han Q B, Pan Y, et al. Carbon monoxide－releasing molecule－3 regulates the polarization of lipopolysaccharide－induced macrophages[J]. Inflammation, 2021, 44(5): 1737－1749.

[5] Chu F, Shi M, Lang Y, et al. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice via blockading NF－κB pathway[J]. Clin Exp Immunol, 2021, 204(2): 199－211.

[6] Zheng Y Q, Wei W, Zhu L, et al. Effects and mechanisms of Paeoniflorin, a bioactive glucoside from paeony root, on adjuvant arthritis in rats[J]. Inflamm Res, 2007, 56(5): 182－188.

[7] Wang D Y, Yang F, Shang W, et al. Paeoniflorin－loaded pH－sensitive liposomes alleviate synovial inflammation by altering macrophage polarity via STAT signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101(Pt A): 108310.

[8] McHugh J. Synovial macrophage populations linked to RA remission[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(9): 471.

[9] Culemann S, Grüneboom A, Nicolas－Avila J A, et al. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint[J]. Nature, 2019, 572(7771): 670－675.

[10] Orihuela R, McPherson C A, Harry G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(4): 649－665.

[11] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas[J]. J Clin Invest, 2012, 122(3): 787－795.

[12] Funes S C, Rios M, Escobar－Vera J, et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity[J]. Immunology, 2018, 154(2): 186－195.

[13] Boutet M A, Courties G, Nerviani A, et al. Novel insights into macrophage diversity in rheumatoid arthritis synovium[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(3): 102758.

[14] He C N, Peng Y, Xiao W, et al. Determination of chemical variability of phenolic and monoterpene glycosides in the seeds of Paeonia species using HPLC and profiling analysis[J]. Food Chem, 2013, 138(4): 2108－2114.

[15] Zhang L L, Wei W. Anti－inflammatory and immunoregulatory effects of paeoniflorin and total glucosides of paeony[J]. Pharmacol Ther, 2020, 207: 107452.

[16] Wang D D, Jiang M Y, Wang W, et al. Paeoniflorin－6′－O－benzene sulfonate down－regulates CXCR4－Gβγ－PI3K/AKT mediated migration in fibroblast－like synoviocytes of rheumatoid arthritis by inhibiting GRK2 translocation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(3): 805－812.

[17] Huang L C, Hu S Q, Shao M Y, et al. Combined Cornus officinalis and Paeonia lactiflora pall therapy alleviates rheumatoid arthritis by regulating synovial apoptosis via AMPK－

mediated mitochondrial fission[J]. Front Pharmacol,2021,12:639009.

[18]Jia X Y,Chang Y,Sun X J,et al. Regulatory effects of paeoniflorin-6′-O-benzene sulfonate (CP-25) on dendritic cells maturation and activation via PGE2-EP4 signaling in adjuvant-induced arthritic rats[J]. Inflammopharmacology,2019,27(5):997-1010.

[19]Zhai W J,Ma Z H,Wang W J,et al. Paeoniflorin inhibits Rho kinase activation in joint synovial tissues of rats with collagen-induced rheumatoid arthritis[J]. Biomedecine Pharmacother,2018,106:255-259.

[20]Takeda S,Isono T,Wakui Y,et al. Absorption and excretion of paeoniflorin in rats[J]. J Pharm Pharmacol,1995,47(12A):1036-1040.

[21]Zhou Y X,Gong X H,Zhang H,et al. A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects[J]. Biomedecine Pharmacother,2020,130:110505.

[22]Jia M D,Deng C F,Luo J W,et al. A novel dexamethasone-loaded liposome alleviates rheumatoid arthritis in rats[J]. Int J Pharm,2018,540(1/2):57-64.

[23]Micheli L,Bozdag M,Akgul O,et al. Pain relieving effect of-NSAIDs-CAIs hybrid molecules:systemic and intra-articular treatments against rheumatoid arthritis[J]. Int J Mol Sci,2019,20(8):1923.

[24]Shen Q Y,Shu H,Xu X L,et al. Tofacitinib citrate-based liposomes for effective treatment of rheumatoid arthritis[J]. Pharmazie,2020,75(4):131-135.

[25]Rahman M,Beg S,Anwar F,et al. Liposome-based nanomedicine therapeutics for rheumatoid arthritis[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst,2017,34(4):283-316.

[26]Boot E P,Koning G A,Storm G,et al. CD134 as target for specific drug delivery to auto-aggressive CD4$^+$ T cells in adjuvant arthritis[J]. Arthritis Res Ther,2005,7(3):R604-R615.

[27]You C C,Zu J N,Liu X Q,et al. Synovial fibroblast-targeting liposomes encapsulating an NF-κB-blocking peptide ameliorates zymosan-induced synovial inflammation[J]. J Cell Mol Med,2018,22(4):2449-2457.

[28]Chen M L,Amerigos J C K D,Su Z G,et al. Folate receptor-targeting and reactive oxygen species-responsive liposomal formulation of methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis[J]. Pharmaceutics,2019,11(11):582.

[29]Nogueira E,Gomes A C,Preto A,et al. Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy[J]. Nanomed Nanotechnol Biol Med,2016,12(4):1113-1126.

[30]Luo X Q,Li A,Yang X,et al. Paeoniflorin exerts neuroprotective effects by modulating the M1/M2 subset polarization of microglia/macrophages in the hippocampal CA1 region of vascular dementia rats via cannabinoid receptor 2[J]. Chin Med,2018,13:14.

[31]Chen Q L,Liu Y J,Zhang Y Y,et al. An in vitro verification of the effects of paeoniflorin on lipopolysaccharide-exposed microglia[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2020,2020:5801453.

[32]Udalova I A,Mantovani A,Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol,2016,12(8):472-485.

收稿日期:2026-02-21
编辑:刘凯歌