

· 基础研究 ·

粉防己碱对类风湿模型作用的体内与体外试验[△]马春骋^{1,2}, 张庆宇¹, 孙超¹, 刘绪昌¹, 朱克¹, 王广硕¹, 丰荣杰^{1*}

(1. 山东第一医科大学附属省立医院脊柱外科, 山东济南 250021; 2. 菏泽市立医院, 山东菏泽 274000)

摘要: [目的] 探讨粉防己碱对蛋白聚糖诱导的类风湿性关节炎的体内与体外作用, 探讨其可能的作用机制。[方法] 体内试验, 42只BALB/C小鼠随机分为正常组、模型组、粉防己碱低量组、中量组、高量组和对照组。除正常组外, 其他动物给予蛋白聚糖诱导的类风湿性关节炎 (proteoglycan-induced arthritis, PGIA) 小鼠模型。低量组每天给予粉防己碱 7.5 mg/kg, 中量组每天 15 mg/kg, 高量组每天 30 mg/kg 灌胃, 正常组和模型组均给予等体积的生理盐水, 对照组每天给予塞来昔布 60.7 mg/kg, 连续治疗 28 d。体外试验, MH7A 细胞同上分组给予粉防己碱处理。[结果] 体内实验: 用药第 28 d, 与模型组相比, 低、中、高量组和对照组在后爪厚度 [(5.1±0.1) mm vs (3.6±0.2) mm vs (3.0±0.2) mm, (2.4±0.2) mm, (3.6±0.1) mm, $P<0.001$]、关节炎评分 [7.0 (7.0, 7.0) vs 5.0 (4.0, 5.0) vs 4.0 (4.0, 4.0), 2.0 (1.0, 2.0), 2.0 (1.0, 2.0), $P<0.001$]、血清中 TNF- α [(320.6±7.2) pg/mL vs (264.5±13.1) pg/mL vs (217.3±40.0) pg/mL vs (159.8±17.2) pg/mL vs (160.7±11.3) pg/mL, $P<0.001$]、IL-1 β [(365.1±32.2) pg/mL vs (217.7±18.8) pg/mL vs (161.1±18.3) pg/mL vs (110.6±4.8) pg/mL vs (110.4±3.8) pg/mL, $P<0.001$]、IL-6 含量 [(435.5±33.3) pg/mL vs (261.7±30.6) pg/mL vs (189.0±8.1) pg/mL vs (152.9±13.3) pg/mL vs (154.7±11.1) pg/mL, $P<0.001$]、组织学评分和 μ CT 检查评分均有显著改善 ($P<0.05$)。体外实验: 与模型组相比, 低、中、高量组在 EdU 阳性细胞数量、p-Akt 和 p-P65 的蛋白表达水平、M2 巨噬细胞浸润和激活状态的肥大细胞浸润均显著改善 ($P<0.05$)。[结论] 粉防己碱可抑制类风湿模型的炎症进展和滑膜增生, 其机制可能与调控 AKT 和 NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 粉防己碱, 类风湿模型, 体内试验, 体外试验**中图分类号:** R681**文献标志码:** A**文章编号:** 1005-8478 (2025) 21-1971-08

Effect of tetrandrine on rheumatoid model in vivo and in vitro // MA Chun-cheng^{1,2}, ZHANG Qing-yu¹, SUN Chao¹, LIU Xu-chang¹, ZHU Ke¹, WANG Guang-shuo¹, FENG Rong-jie^{1*}. 1. Department of Spinal Surgery, Shandong Provincial Hospital, Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China; 2. Heze Municipal Hospital, Heze 274000, Shandong, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of tetrandrine (TET) on proteoglycan-induced rheumatoid arthritis (RA) in vivo and in vitro, search the possible mechanism of action. [Methods] In vivo experiment, 42 BALB/C mice were randomly divided into the normal control group, model group, as well as tetrandrine low dose (LD) group, medium dose (MD) group, high dose (HD) group and control group. Except the normal group, all animals in other groups underwent proteoglycan-induced arthritis (PGIA) treatment to create RA mouse model. The LD group was given TET 7.5 mg/kg · d⁻¹, the MD group was 15 mg/kg · d⁻¹, the HD group was 30 mg/kg · d⁻¹, while the normal group and the model group were given equal volume of normal saline, and the control group was given celecoxib 60.7 mg/kg · d⁻¹ for 28 days. In vitro experiments, MH7A cells were treated with TET in similar manner as in vivo test. [Results] In vivo experiment, compared with the model group, the LD group, MD group, HD groups and the control group had significant improvements in terms of the paw thickness [(5.1±0.1) mm vs (3.6±0.2) mm vs (3.0±0.2) mm vs (2.4±0.2) mm vs (3.6±0.1) mm, $P<0.001$], arthritis score [7.0 (7.0, 7.0) vs 5.0 (4.0, 5.0) vs 4.0 (4.0, 4.0) vs 2.0 (1.0, 2.0) vs 2.0 (1.0, 2.0), $P<0.001$], serum TNF- α [(320.6±7.2) pg/mL vs (264.5±13.1) pg/mL vs (217.3±40.0) pg/mL vs (159.8±17.2) pg/mL vs (160.7±11.3) pg/mL, $P<0.001$], IL-1 β [(365.1±32.2) pg/mL vs (217.7±18.8) pg/mL vs (161.1±18.3) pg/mL vs (110.6±4.8) pg/mL, (110.4±3.8) pg/mL, $P<0.001$], IL-6 [(435.5±33.3) pg/mL vs (261.7±30.6) pg/mL vs (189.0±8.1) pg/mL vs (152.9±13.3) pg/mL vs (154.7±11.1) pg/mL, $P<0.001$], the histological score ($P<0.05$) and μ CT score ($P<0.05$). In vitro experiment, compared with the model group, the LD group, MD group and HD groups had significant improvements in terms of number of EdU positive cells ($P<0.05$), P-Akt and P-P65 protein expression levels ($P<0.05$), infiltration of M2 macrophages and infiltration of activated mast cells ($P<0.05$). [Conclu-

DOI:10.20184/j.cnki.Issn1005-8478.110116

[△]基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 82302682); 山东省自然科学基金资助项目 (编号: ZR2020QH072)

作者简介: 马春骋, 在读硕士研究生, 研究方向: 骨科学, (电子信箱) 1316242496@qq.com

* 通信作者: 丰荣杰, (电子信箱) frongjie@163.com

sion] Tetrandrine can inhibit the progression of inflammation and synovial hyperplasia in rheumatoid models, and the mechanism may be related to the regulation of AKT and NF- κ B signaling pathways.

Key words: tetrandrine, rheumatoid model, in vivo test, in vitro test

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病因不明的以关节病变为主的非特异性炎症, 初始病变为持续的滑膜炎以及滑膜增生, 随后出现软骨破坏、骨侵蚀, 最终导致关节的永久性破坏和畸形。全球 0.5%~1% 的人口患有 RA, 其致残率高, 患者的生活质量严重下降^[1]。目前, 临床上主要使用非甾体抗炎药、改善病情的抗风湿药、糖皮质激素和生物制剂等西药来控制 RA 的病情。然而, 也有一些缺点, 如副作用严重、病程长、药物价格高^[2, 3]。因此, 迫切需要找到治疗效果确切、副作用小、成本低的抗 RA 药物。

成纤维细胞样滑膜细胞 (fibroblast like synovial cells, FLS) 是 RA 发生发展过程中具有重要效应的细胞, FLS 的激活会释放大量细胞因子和炎症介质, 导致关节滑膜组织中炎性细胞浸润和滑膜细胞异常增生, 并形成血管翳, 破坏软骨和骨骼的正常组织结构, 最终导致关节畸形和功能丧失^[4]。因此, 抑制滑膜炎和增生可能在避免持续的关节恶化中发挥作用。

粉防己碱 (Tetrandrine) 又叫汉防己甲素, 是一种具有广泛生物活性的双苄基异喹啉钙通道阻滞剂, 粉防己碱可用于镇痛及治疗癌症、哮喘、关节炎等疾病^[5, 6]。同时, 粉防己碱具有抗炎和抗过敏作用, 可抑制肥大细胞激活^[7]。已有研究报道, 粉防己碱对佐剂性小鼠关节炎的抗炎作用, 但对于其治疗 RA 的机制尚不明确^[8]。因此, 在本研究中, 用 TNF- α 刺激人类风湿性关节炎滑膜细胞系 MH7A 建立 RA 的体外模型, 并用蛋白聚糖诱导的关节炎 (proteoglycan-induced arthritis, PGIA) 小鼠模型体内试验评估粉防己碱对 RA 模型的治疗作用, 并探讨其潜在机制, 为临床治疗 RA 提供新思路^[9, 10]。

1 材料与方法

1.1 试验动物与材料

12 周龄体重 (19 $\pm$ 2) g 雌性小鼠由河南斯凯贝斯生物技术有限公司 (中国河南) 提供。本研究采用的动物程序经山东第一医科大学附属省立医院动物使用与护理委员会批准 (编号: 2022-105)。粉防己碱 (纯度 99.91%) 购自美国 MCE 公司, 塞来昔布胶囊

购自辉瑞公司, 完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、PVDF 膜均购自德国 Merck 公司, 蛋白聚糖 (Proteoglycan, PG) 购自上海允麦生物科技有限公司, 高糖 DMEM 培养基购自赛默飞世尔科技公司, 胎牛血清 FBS 购自苏州依科赛生物科技有限公司, 重组人 TNF- α 、AKT、GAPGH 抗体、Goat Anti-Rabbit IgG+ HRP 均购自武汉三鹰生物技术有限公司, p-p65、p-AKT 抗体购自济南赛约尔生物技术有限公司, ELISA 试剂盒 (IL-6、TNF- α 、IL-1 β) 均购自联科生物股份有限公司 (中国), EdU 细胞增殖试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司, 1%青霉素-链霉素、培养瓶、离心管、DMSO、RIPA 裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、ECL 化学发光试剂盒、SDS-page 凝胶试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 体内试验

1.2.1 动物分组与处理

42 只 BALB/C 小鼠随机分为正常组、模型组、低、中、高剂量组和对照组。除正常组外, 模型组和治疗组皮下多点注射 100 μ L 含 PG (1 mg/mL) 的完全弗氏佐剂, 免疫诱导 RA 模型, 对照组注射等体积的生理盐水, 在第 1 次免疫后 21 d, 注射含 PG 的不完全弗氏佐剂 (1:1) 加强免疫, 在第 1 次免疫后 42 d, 注射含 PG 的完全弗氏佐剂再次加强免疫, 3 次免疫造模后, 进行大体观察并进行肿胀度评分和关节炎评分, 对造模成功的动物模型小鼠 (肿胀度评分和关节炎评分有统计学意义): 低、中、高剂量组每天分别给予粉防己碱 7.5 mg/kg、15 mg/kg 和 30 mg/kg 灌胃治疗, 正常组和模型组均给予等体积的生理盐水, 对照组每天给予塞来昔布 60.7 mg/kg, 连续治疗 28 d。

1.2.2 检测指标与方法

大体观察: 在小鼠用药第 1 d (第 1 次免疫后 42 d), 每周测量每只小鼠后足肉脯厚度并进行关节炎评分^[11]。

血清检测: 治疗 28 d 后, 小鼠脱颈椎处死, 每只小鼠进行眼球取血法取全血 2 mL, 小鼠血液以 1 500 r/min 离心 10 min 后, 获得血清, 其中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度严格按照 ELISA 试剂盒中的说明进行测量。

组织学检查：对每组 3 只小鼠踝关节取材，组织固定，脱钙，石蜡包埋后矢状切片，制备 5 μm 矢状组织切片并用 HE 和番红固绿染色，在光学显微镜下观察，对结果进行组织学观察评分^[12]。

显微计算机断层扫描 (μCT) 检查：对每组 3 只小鼠踝关节取材，组织固定，使用 μCT 检查 (viva CT 40, Scanco 274 Medical, Switzerland) 以 10.5 μm 、100 kV、98 μa 的分辨率扫描单个踝关节的微结构，并进行影像学观察评分^[11]。

1.3 体外试验

1.3.1 细胞分组与处理

CCK-8 分析与分组：将 MH7A 细胞 (1×10^5 cells/mL) 接种到 96 孔板中 24 h，然后用 0、5、10 和 15 $\mu\text{mol/L}$ 的粉防己碱处理 24 h，以无血清 DMEM 孔为对照，按照 CCK-8 试剂盒说明书步骤检测细胞活力。根据结果进行分组：空白组、模型组、低量组 (5 $\mu\text{mol/L}$)、中量组 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和高量组 (15 $\mu\text{mol/L}$)。

EdU 细胞增殖试验：同上步骤铺板后，低、中、高量组分别用粉防己碱 (5、10 和 15 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h，除空白组外其余用 TNF- α (20 ng/mL) 持续刺激。将各组细胞在含有 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 的培养基孵育 2 h，固定在多聚甲醛中，用 0.5% Triton X-100 透化，并用 Apollo[®] 染色反应溶液染色。然后，用 DAPI 对细胞核进行染色。使用高分辨率成像系统 (Operetta[™]; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 对细胞进行成像，并对 EdU 阳性细胞的数量进行定量。

Western Blot 试验：将 MH7A 细胞 (1×10^4 cells/mL) 接种于 6 孔板，各组干预步骤同上。用 RIPA 裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 (100:1:1) 提取细胞总蛋白，通过 10% SDS-PAGE 分离并转移至 PVDF 膜上。将膜用 5% 脱脂牛奶封闭后与相关一抗 (p-p65、p-AKT、AKT 和 GAPDH) 一起孵育。冲洗后，二抗室温孵育 1 h。用 ECL 化学发光试剂盒显影检测，Image J 分析灰度值，目的蛋白相对表达水平=目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。

转录组测序和免疫浸润分析：小鼠处死后，在模型组和粉防己碱治疗组中，每组随机取 3 只小鼠踝关节组织提取 RNA 后，利用 DESeq2 软件进行差异表达基因分析，其中符合 $P < 0.05$ 且 fold change > 2 或 fold change < 0.5 的阈值的基因被定义为差异表达基因 (DEGs)。使用 R (v 3.2.0) 对 DEGs 进行层次聚类分析，用于展示基因在不同组和样本中的表达模式。推断浸润免疫细胞的比例，用标准化基因表达数据并参

考 CIBERSORT 官网 (<https://cibersortx.stanford.edu/>, 2024 年 1 月 20 日访问) 提供的基因表达特征模板，通过 CIBERSORT 算法评估各个样本中 22 种免疫细胞的相对丰度。

1.4 统计学方法

应用 SPSS Statistics 27 软件进行统计分析。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，资料呈非正态分布以中位数四分位数 [M (P25, P75)] 表示，通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Kruskal-Whitney 秩和检验来分析，两组组间比较使用 LSD、Tamhane、Mann-Whitney U 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内试验

2.1.1 大体观察

如表 1 所示，用药第 1 d，与正常组相比，其他各组小鼠爪子厚度和关节炎评分均显著增加 ($P < 0.05$)，用药第 28 d，与模型组相比，低、中、高量组和对照组后爪厚度和关节炎评分均显著降低 ($P < 0.05$)。小鼠后爪厚度和关节炎评分由高至低为模型组 $>$ 低量组 $>$ 中量组 $>$ 高量组 $>$ 正常组，并且高量组与对照组作用相当 ($P > 0.05$)。用药 28 d 过程中，除正常组，其他各组的爪子厚度和关节炎评分，均呈现先增长后降低的趋势，且与模型组对比，低中高量组和对照组后爪厚度和关节炎评分增长高峰提前，降低落点更低。

2.1.2 血清检测

如表 1 所示，与正常组相比，模型组及低、中、高量组血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均显著升高 ($P < 0.05$)，与模型组相比，低、中、高、量组和对照组血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均显著降低 ($P < 0.05$)，综上，各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度水平为模型组 $>$ 低量组 $>$ 中量组 $>$ 高量组 $>$ 正常组。粉防己碱高量组与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.1.3 组织学检查

如图 1 及表 1 的 HE、番红固绿染色图片和组织学观察评分结果，与正常组相比，模型组小鼠踝关节滑膜增生、炎症细胞浸润和软骨损伤、组织学观察评分显著增高 ($P < 0.05$)，与模型组相比，低中高量组和对照组踝关节组织中出现的滑膜增生、炎症细胞浸润和软骨损伤有明显改善，组织学观察评分显著降低

($P<0.05$)，模型组>低量组>中量组>高量组>正常组，高量组与对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1. 粉防己碱体内试验六组动物检测结果与比较 [组织学和影像学评分 ($n=3$), 其余指标 ($n=7$)]							
Table 1. Comparison of test results among the six groups in vivo [histology and radiography score ($n=3$), other indicators ($n=7$)]							
指标	正常组	模型组	低量组	中量组	高量组	对照组	P 值
后爪厚度 (mm)							
用药第 1 d	2.1±0.1	4.3±0.1	4.3±0.0	4.4±0.1	4.3±0.2	4.3±0.1	<0.001
用药第 7 d	2.2±0.1	5.6±0.1	5.4±0.1	5.2±0.1	5.2±0.1	5.1±0.1	<0.001
用药第 14 d	2.2±0.1	6.4±0.2	5.5±0.2	5.1±0.1	4.6±0.1	4.7±0.2	<0.001
用药第 21 d	2.2±0.1	6.1±0.1	4.8±0.2	4.3±0.1	3.7±0.1	3.6±0.1	<0.001
用药第 28 d	2.3±0.1	5.1±0.1	3.6±0.2	3.0±0.2	2.4±0.2	2.3±0.1	<0.001
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
关节炎评分							
用药第 1 d	0.0 (0.0, 0.0)	5.0 (5.0, 5.0)	5.0 (5.0, 6.0)	5.0 (5.0, 5.0)	5.0 (5.0, 5.0)	5.0 (5.0, 5.0)	<0.001
用药第 7 d	0.0 (0.0, 0.0)	8.0 (7.0, 8.0)	7.0 (6.0, 8.0)	7.0 (6.0, 7.0)	7.0 (6.0, 7.0)	6.0 (6.0, 7.0)	<0.001
用药第 14 d	0.0 (0.0, 0.0)	8.0 (8.0, 8.0)	7.0 (7.0, 8.0)	7.0 (6.0, 7.0)	6.0 (5.0, 6.0)	6.0 (5.0, 6.0)	<0.001
用药第 21 d	0.0 (0.0, 0.0)	8.0 (8.0, 8.0)	7.0 (6.0, 8.0)	6.0 (6.0, 6.0)	4.0 (4.0, 4.0)	4.0 (4.0, 4.0)	<0.001
用药第 28 d	0.0 (0.0, 0.0)	7.0 (7.0, 7.0)	5.0 (4.0, 5.0)	4.0 (4.0, 4.0)	2.0 (1.0, 2.0)	2.0 (1.0, 2.0)	<0.001
P 值	1.000	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
组织学评分	0.0 (0.0, 0.0)	8.0 (8.0, 8.0)	6.0 (6.0, 6.5)	5.0 (5.0, 5.0)	2.0 (2.0, 2.5)	2.0 (2.0, 2.5)	<0.001
影像学评分	0.0 (0.0, 0.0)	6.0 (6.0, 6.0)	5.0 (4.5, 5.0)	3.0 (3.0, 3.0)	2.0 (2.0, 2.0)	2.0 (1.5, 2.0)	<0.001
ELISA (pg/mL)							
TNF- α	26.7±11.2	320.6±7.2	264.5±13.1	217.3±40.0	159.8±17.2	160.7±11.3	<0.001
IL-1 β	6.4±1.1	365.1±32.2	217.7±18.8	161.1±18.3	110.6±4.8	110.4±3.8	<0.001
IL-6	14.5±3.3	435.5±33.3	261.7±30.6	189.0±8.1	152.9±13.3	154.7±11.1	<0.001
M2 巨噬细胞浸润丰度		0.2±0.0			0.3±0.0		0.037
激活的肥大细胞浸润丰度		0.2±0.1			0.0±0.0		0.042

2.1.4 μ CT 检查

如图 1 及表 1 所示 μ CT 检查图片和影像学观察评分结果，与正常组相比，模型组小鼠踝关节骨赘增多，关节畸形，影像学观察评分显著增高 ($P<0.05$)，与模型组相比，低、中、高量组和对照组的踝关节：骨赘增多，关节畸形的情况有明显改善，影像学观察评分均显著降低 ($P<0.05$)，综上，影像学评分为模型组>低量组>中量组>高量组>正常组，高量组与对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 体外试验

2.2.1 CCK-8 分析

如表 2 所示，粉防己碱处理 MH7A 细胞 24 h 后，与正常组相比，低量组、中量组、高量组的细胞活力差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2.2 EdU 细胞增殖试验

如图 2 及表 2 所示，与正常组相比，模型组的 EdU 阳性细胞数量显著增多，与模型组相比，低、

中、高量组的 EdU 阳性细胞数量均显著减少 ($P<0.05$)，综上所述，EDU 阳性细胞相对量为模型组>低量组>中量组>高量组 ($P<0.05$)。模型组、低量组、中量组均>正常组。

2.2.3 Western Blot 试验

如表 2 所示，与正常组相比，模型组 p-Akt、p-P65 的蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$)，与模型组相比，低、中、高量组 p-Akt、p-P65 的蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$)。综上，p-Akt、p-P65 蛋白表达水平为：模型组>低量组>中量组>高量组 ($P<0.05$)，模型组、低量组、中量组均>正常组，各组细胞 Akt 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 转录组测序和免疫浸润分析

如表 1 所示，与模型组相比，粉防己碱治疗组中 M2 巨噬细胞浸润丰度显著升高 ($P<0.05$)，而激活状态的肥大细胞浸润丰度显著降低 ($P<0.05$)。

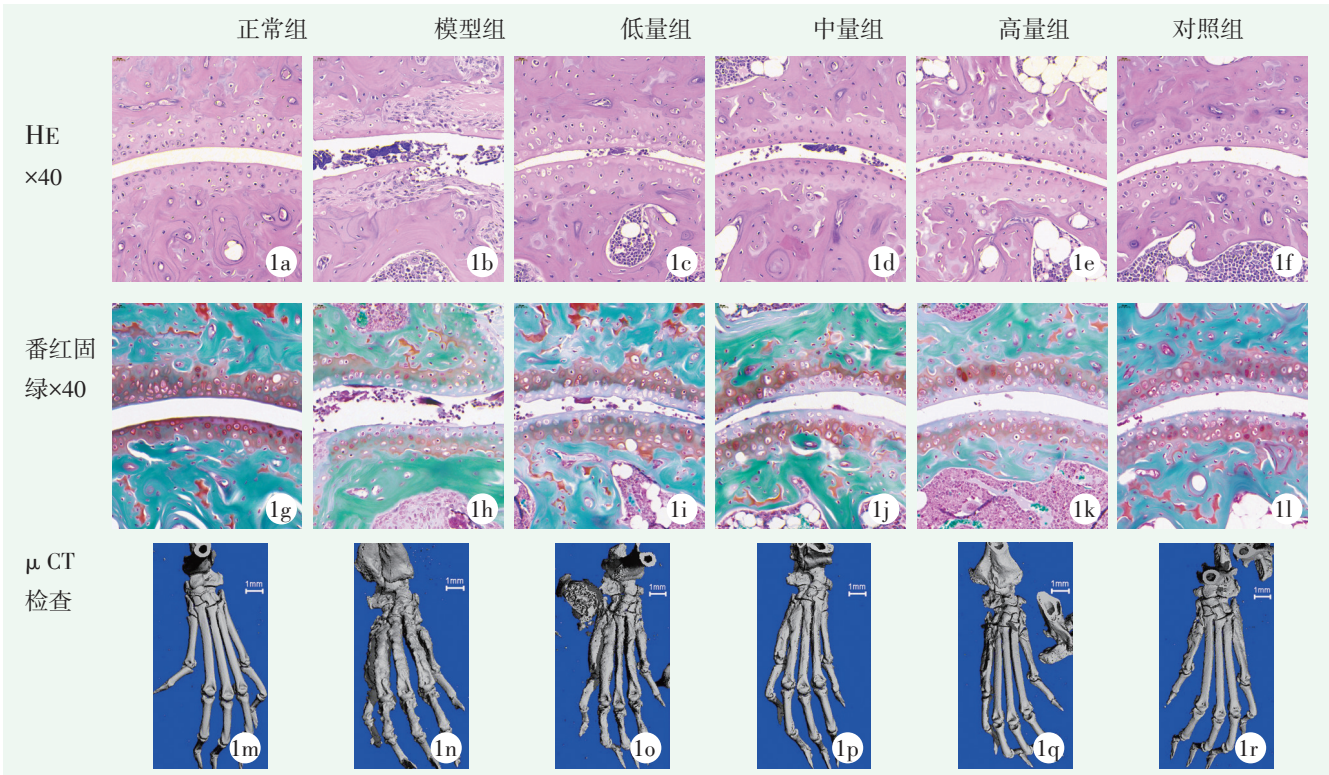


图 1. 粉防己碱体内试验用药后 28 d 6 组动物关节的病理学切片与 μ CT 检测结果。1a~1f: 踝关节 HE 染色切片; 1g~1l: 踝关节番红固绿染色切片 (红色代表软骨组织, 绿色代表骨质); 1m~1r: 踝关节 μ CT 检查图片。
Figure 1. Pathological sections and μ CT detection results of joints in six groups of animals 28 days after the in vivo experimental use of tetrandrine. 1a~1f: Ankle joint HE staining sections; 1g~1l: Ankle joint safranin green staining section (red represents cartilage tissue, green represents bone); 1m~1r: Ankle joint μ CT examination images.

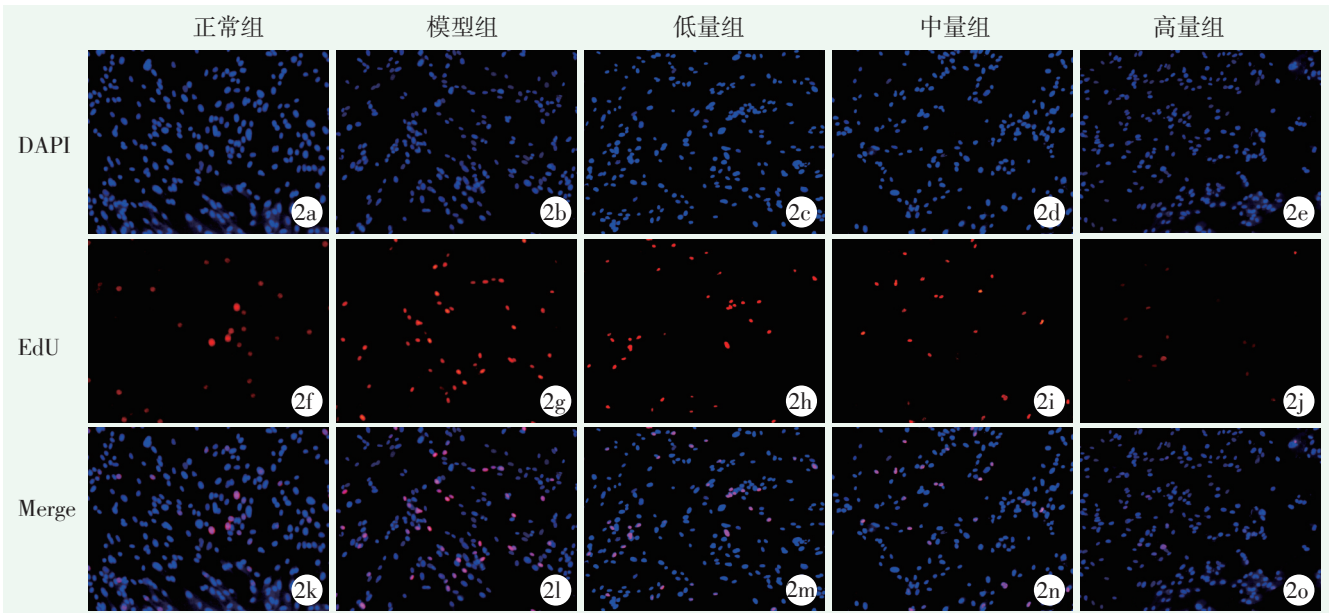


图 2. 粉防己碱体外试验用药后 24 h 5 组细胞 EDU 阳性细胞荧光图。荧光显微镜可以观察到 EDU 标记的细胞, 红色荧光代表 EDU 标记增殖的细胞, 蓝色荧光代表 DAPI 标记的活细胞。
Figure 2. Fluorescence maps of EDU positive cells in five groups of cells 24 hours after the use of tetrandrine in vitro. Fluorescence microscopy can observe EDU labeled cells, red fluorescence represents EDU labeled proliferating cells, and blue fluorescence represents DAPI labeled live cells.

表 2. 粉防己碱体外试验 5 组细胞检测结果与比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 2. Comparison of test results among the five groups for tetrandrine test in vitro ($n=3, \bar{x} \pm s$)

指标	正常组	模型组	低量组	中量组	高量组	P 值
细胞活力 (%)	1.0±0.1		1.0±0.1	0.9±0.0	0.9±0.0	0.651
EdU 荧光染色						
EdU 阳性细胞相对量	1.0±0.0	2.2±0.4	1.6±0.1	1.1±0.0	0.6±0.1	<0.001
Western blot 检测 (相对表达量)						
p-P65	0.6±0.1	1.3±0.1	0.9±0.1	0.8±0.0	0.6±0.1	<0.001
p-Akt	0.4±0.1	0.9±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1	<0.001
Akt	1.1±0.1	1.0±0.0	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	0.530

3 讨论

RA 是一种反复发作的慢性自身免疫性疾病, 炎症细胞和细胞因子通过促进自身免疫、维持慢性滑膜炎以及加剧关节组织的损伤, 参与类风湿性关节炎发病机制的各个阶段^[13]。TNF- α 产生于活化的单核细胞和巨噬细胞, 大量存在于 RA 患者的血清和关节炎滑膜中, 能够诱导炎症趋化因子的产生, 导致促炎白细胞的积累^[14, 15]。另外, TNF- α 还能诱导 RANKL 表达, 并与 RANKL 发挥协同作用, 从而起到直接促进破骨细胞分化的作用, 导致骨质破坏^[16]。Li 等^[17]发现, 风石祛痛胶囊可以在体内降低 CIA 大鼠炎症关节和血清中 RANKL 与 OPG 的比例, 并在体外抑制 TRAP+ 多核细胞的形成和骨吸收活性, 从而起到抗破骨细胞活性, 抑制 RA 骨破坏的作用。在本研究中, 粉防己碱改善了 PGIA 小鼠足爪症状, 降低了关节炎评分和血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量, 抑制炎症进展, 而且粉防己碱治疗后小鼠踝关节骨与软骨破坏有了很大改善, 但其进一步机制有待研究, 下一步研究可针对 OPG 和 RANKL 的表达开展。

有证据表明, RA 的发病机制与炎症细胞内信号通路失调有关, 例如 Akt 和 NF- κ B 信号通路^[18]。Akt 属于丝/苏氨酸蛋白激酶, 是重要的促生存激酶, 参与细胞的存活、增殖和代谢, p65 是 NF- κ B 家族成员之一, 其与 p50 形成异源二聚体, 是最常见的 NF- κ B 活性形式之一, Akt 通过磷酸化 I κ B 间接促进 NF- κ B p65 的活化并转位到细胞核, 促使炎症因子如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等的基因表达, 产生炎症反应^[19, 20]。Achudhan 等^[21]发现三萜类化合物 Antcin K 能降低胶原诱导型关节炎小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 水平, 可能是通过调控滑膜成纤维细胞 PI3K、AKT 和 NF- κ B 信号通路级联反应实现的。附

子脂溶性生物碱抑制 FLS 中 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路的激活, 从而抑制炎症介质的表达和合成^[22]。NF- κ B 和 Akt 通路还参与淫羊藿苷、龙胆苦苷和香叶木素对类风湿性关节炎的抗炎和抗滑膜增生作用^[23-25]。粉防己碱在体外还具有显著抑制 IL-6 的抗炎作用, 可能与调节中性粒细胞参与的炎症和 NET 的形成有关^[26]。在本研究中, 粉防己碱在体外降低了细胞的增殖率, 抑制了 Akt 和 NF- κ B p65 的磷酸化水平, 在体内减弱了 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症细胞因子的产生, 可能是通过调控 Akt 和 NF- κ B 信号通路来起到抗滑膜炎和抗滑膜增生作用的。

活化的巨噬细胞可分为 M1 型和 M2 型两种表型, M1 型能促进机体产生炎症反应, M2 型通过合成抗炎因子并修复介质来抑制炎症反应并重塑组织结构^[27]。M1 巨噬细胞是炎症反应中的有效效应细胞, 能够产生促炎细胞因子, 包括 IL-23、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和特定趋化因子, 有效杀死微生物。M2 巨噬细胞具有通过分泌 IL-10 和转化生长因子参与调控炎症反应并促进组织重塑和修复的作用^[28]。在本研究中, 免疫浸润分析显示, 粉防己碱治疗组的小鼠巨噬细胞 M2 浸润度增加, 肥大细胞含量少, 其治疗机制可能与促进巨噬细胞 M2 极化有关, 这与 Yannick Degboé 报道的通过 IL-10、STAT3 机制进行 TNF 靶向的类风湿巨噬细胞极化的治疗机制类似, 也可能与抑制 NF- κ B 通道, 将 M1 极化细胞转化为 M2 极化细胞有关^[29-30]。

本研究结果表明, 粉防己碱对类风湿模型有明显的抗炎和抗滑膜增生作用, 其机制可能与抑制 AKT 和 NF- κ B 信号通路的激活及促进巨噬细胞 M2 极化有关, 为临床治疗类风湿关节炎提供新见解, 本文的不足之处是未能进一步研究粉防己碱对于类风湿模型中巨噬细胞的影响。

利益冲突声明 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 马春骋：课题设计、实施研究、采集分析和解释数据、起草文章、统计分析；张庆宇：课题设计、实施研究、分析和解释数据、文章审阅、统计分析、获取研究经费、行政及技术或材料支持、指导、支持性贡献；孙超：课题设计、分析和解释数据、文章审阅、行政及技术或材料支持、指导；刘绪昌：课题设计、分析和解释数据、文章审阅、行政及技术或材料支持、指导；朱克：实施研究、数据采集及分析和解释、起草文章、统计分析、支持性贡献；王广硕：实施研究、数据采集及分析和解释、起草文章、统计分析、支持性贡献；丰荣杰：课题设计、实施研究、文章审阅、统计分析、获取研究经费、行政及技术或材料支持、指导、支持性贡献

参考文献

- [1] Huang J, Fu X, Chen X, et al. Promising therapeutic targets for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 686155. DOI: 10.3389/fimmu.2021.686155.
- [2] Kerschbaumer A, Sepriano A, Smolen JS, et al. Efficacy of pharmacological treatment in rheumatoid arthritis: a systematic literature research informing the 2019 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79 (6): 744–759. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-216656.
- [3] 李颖, 汪悦, 覃仕化, 等. 类风湿性关节炎的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2011, 19 (7): 581–584. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2011.07.15.
Li Y, Wang Y, Qin SH, et al. Research progress in rheumatoid arthritis [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2011, 19 (7): 581–584. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2011.07.15.
- [4] Bartok B, Firestein G S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233 (1): 233–255. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x.
- [5] 王飞. 关节周围骨折手术后汉防己甲素片镇痛效果评价 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2015, 23 (10): 953–955. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2015.10.20.
Wang F. Evaluation of analgesic effect of Hanfangjiusu tablets after surgery for periarticular fractures [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2015, 23 (10): 953–955. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2015.10.20.
- [6] Luan F, He X, Zeng N. Tetrandrine: A review of its anticancer potentials, clinical settings, pharmacokinetics and drug delivery systems [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72 (11): 1491–1512. DOI: 10.1111/jphp.13339.
- [7] Teh BS, Chalmers AH, Playford S, et al. Inhibition of histamine release from rat mast cells by the plant alkaloid tetrandrine [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1988, 86 (2): 220–224. DOI: 10.1159/000234575.
- [8] 吴兴源, 张国如. 粉防己碱通过 NF- κ B 和 MAPK 信号通路影响人滑膜细胞炎症及对类风湿性关节炎治疗作用研究 [J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37 (9): 1636–1641. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2020.09.009.
Wu XY, Zhang GR. The effect of tetrandrine on human synovio-cytes inflammation and its treatment on rheumatoid arthritis through NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2020, 37 (9): 1636–1641. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2020.09.009.
- [9] Angyal A, Egelston C, Kobezda T, et al. Development of proteoglycan-induced arthritis depends on T cell-supported autoantibody production, but does not involve significant influx of T cells into the joints [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12 (2): R44. DOI: 10.1186/ar2954.
- [10] Glant TT, Radaics M, Nagyri G, et al. Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain - induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatism*, 2011, 63 (5): 1312–1321. DOI: 10.1002/art.30261.
- [11] Zhang Q, Peng W, Wei S, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction possesses anti-arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats via suppression of inflammatory reactions, inhibition of invasion & migration and induction of apoptosis in synovial fibroblasts [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109367. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109367.
- [12] Jing M, Yang J, Zhang L, et al. Celastrol inhibits rheumatoid arthritis through the ROS-NF- κ B-NLRP3 inflammasome axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107879. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107879.
- [13] Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (20): 10922. DOI: 10.3390/ijms222010922.
- [14] Brennan FM. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118 (11): 3537–3545. DOI: 10.1172/jci36389.
- [15] Moelants EAV, Mortier A, Van Damme J, et al. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91 (6): 393–401. DOI: 10.1038/icb.2013.15.
- [16] Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, et al. Tumor necrosis factor- α (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (1): 563–568. DOI: 10.1074/jbc.M008198200.
- [17] Li Y, Yang C, Jia K, et al. Fengshi Qutong capsule ameliorates bone destruction of experimental rheumatoid arthritis by inhibiting osteoclastogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114602. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114602.
- [18] Malemud CJ. Intracellular signaling pathways in rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Cell Immunol*, 2013, 4 (4): 160. DOI: 10.4172/2155-9899.1000160.
- [19] 范文斌, 包倪荣, 赵建宁. PI3K/Akt 信号通路在骨代谢中的作用 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21 (19): 1958–1962. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2013.19.11.
Fan WB, Bao NR. The role of PI3K/Akt signaling pathway in bone metabolism [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2013, 21 (19): 1958–1962. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2013.19.11.
- [20] Zhu X, Song Y, Huo R, et al. Cyr61 participates in the pathogene-

- sis of rheumatoid arthritis by promoting proIL-1 β production by fibroblast-like synoviocytes through an AKT-dependent NF- κ B signaling pathway [J]. Clin Immunol, 2015, 157 (2): 187-197. DOI: 10.1016/j.clim.2015.02.010.
- [21] Achudhan D, Liu SC, Lin YY, et al. Antcin K inhibits TNF- α , IL-1 β and IL-8 expression in synovial fibroblasts and ameliorates cartilage degradation: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 790925. DOI: 10.3389/fimmu.2021.790925.
- [22] Guo C, He L, Hu N, et al. Aconiti lateralis radix praeparata lipid-soluble alkaloids alleviates IL-1 β -induced inflammation of human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by inhibiting NF- κ B and MAPKs signaling pathways and inducing apoptosis [J]. Cytokine, 2022, 151: 155809. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155809.
- [23] Wu ZM, Xiang YR, Zhu XB, et al. Icarin represses the inflammatory responses and survival of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by regulating the TRIB1/TLR2/NF- κ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 110: 108991. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108991.
- [24] Wang M, Li H, Wang Y, et al. Anti-rheumatic properties of gentiopicoside are associated with suppression of ROS-NF- κ B-NLRP3 axis in fibroblast-like synoviocytes and NF- κ B pathway in adjuvant-induced arthritis [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 515. DOI: 10.3389/fphar.2020.00515.
- [25] Chen Y, Wang Y, Liu M, et al. Diosmetin exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory effects on TNF- α -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through regulating the Akt and NF- κ B signaling pathways [J]. Phytother Res, 2019, 34 (6): 1310-1319. DOI: 10.1002/ptr.6596.
- [26] Lu Q, Jiang H, Zhu Q, et al. Tetrandrine ameliorates rheumatoid arthritis in mice by alleviating neutrophil activities [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 8589121. DOI: 10.1155/2022/8589121.
- [27] Zhu W, Jin Z, Yu J, et al. Baicalin ameliorates experimental inflammatory bowel disease through polarization of macrophages to an M2 phenotype [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 35: 119-126. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.03.030.
- [28] Wang L, Wu JP, He XJ. Butylphthalide has an anti-inflammatory role in spinal cord injury by promoting macrophage/microglia M2 polarization via p38 phosphorylation [J]. Spine, 2020, 45 (17): E1066-E1076. DOI: 10.1097/brs.0000000000003503.
- [29] Degboé Y, Rauwel B, Baron M, et al. Polarization of rheumatoid macrophages by TNF targeting through an IL-10/STAT3 mechanism [J]. Front Immunol, 2019, 10: 3. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00003.
- [30] 尤从新, 骆文生, 陈威, 等. NF- κ B 信号通道在膝关节炎的作用 [J]. 中国矫形外科杂志, 2023, 31 (15): 1397-1400. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2023.15.10.
- You CX, Luo WS, Chen W, et al. The role of NF- κ B Pathway in knee osteoarthritis [J]. Orthopedic Journal of China, 2023, 31 (15): 1397-1400. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2023.15.10.
- (收稿: 2024-02-06 修回: 2025-02-20)
(同行评议专家: 袁普卫, 李颖)
(本文编辑: 宁桦)

读者·作者·编者

如何检索引引《中国矫形外科杂志》及文献格式

点击本刊网址进入《中国矫形外科杂志》官网(<http://jxwk.ijournal.cn>), 点击上方菜单栏: 期刊浏览, 显示本刊站内检索窗口, 输入您要查找的自由词, 点击回车, 网页即显示相关内容, 点击排列方式, 您可按“相关性、发现时间...”排列篇名。点击篇名, 弹出摘要页面进行阅读。如果需要引用, 点击右上角“”符号, 在弹出的提示框里将内容复制粘贴: “Cul+C”复制, “Ctrl+V”在您的文中粘贴。

文献格式需严格按本刊格式要求进行修改, 作者仅引用前3位, 超过3位时, 加“等.”或“, et al.”。英文作者仅用姓(last name), 只有首字母大写, 而名(first name, middle name)则用其第一个字母大写缩写。文章题目仅首字母大写。期刊名用Pubmed标准缩写。

由于本刊正在申请加入Scopus数据库, 按数据库要求统一在文献后标注数字对象标识码(Digital Object Identifier, DOI), 中文参考文献补充原文的英译文献条目, 示例如下:

- [1] Fehlings MG, Tetreault L, Nater A, et al. The aging of the global population: the changing epidemiology of disease and spinal disorders [J]. Neurosurgery, 2015, 77 (Suppl 4): S1-S5. DOI: 10.1227/NEU.0000000000000953.
- [2] 南运东, 徐长科. 经皮内镜椎间孔入路减压治疗腰椎管狭窄症 [J]. 中国矫形外科杂志, 2021, 29 (19): 1811-1812. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2021.19.19.
- Nan YD, Xu CK. Percutaneous transforaminal endoscopic decompression for lumbar spinal stenosis [J]. Orthopedic Journal of China, 2021, 29 (19): 1811-1812. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2021.19.19.

参考文献格式详细规范请参照参考文献格式国家标准(GB-T7714-2005)。