

骆驼蓬对类风湿关节炎 NLRP3、TLR4 信号通路的影响

田新玮¹,王静¹,郑琦丽¹,裴静¹,陈昶²

(1. 新疆医科大学第五附属医院,新疆 乌鲁木齐 830011;

2. 滕州市中医医院风湿免疫科,山东 滕州 277500)

摘要:目的 探究骆驼蓬外敷对类风湿关节炎大鼠 NLRP3、TLR4 信号通路及滑膜损伤的影响。方法 24 只 SD 雌雄各半大鼠随机分组(对照组、模型组和骆驼蓬组, $n=8$)。对模型组和骆驼蓬组进行胶原诱导型关节炎(CIA)构建大鼠类风湿关节炎模型(14 d 免疫造模)。造模完成对骆驼蓬组大鼠进行骆驼蓬外敷[0.50 g/(kg·d)],持续治疗 28 d,对照组、模型组不作处理。治疗期间定期对大鼠的关节肿胀度、关节炎指数进行追踪记录。大鼠给药 28 d 后处死,ELISA 检测其血清及滑膜组织上清液中类风湿因子(RF)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-18(IL-18)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)对滑膜组织中的 NLRP3 信号通路分子(caspase-1、IL-1 β 、IL-18)和 TLR4 信号通路分子[Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)、磷酸化核因子 kB p65(p-NF-kB p65)、核蛋白(NF-kB p65)]及其 mRNA 表达水平进行检测。结果 根据检测结果可知,模型组大鼠右后肢关节肿胀度(4.67 ± 0.53)mm 远大于骆驼蓬组关节肿胀度(2.78 ± 0.38)mm;模型组和骆驼蓬组关节炎指数随着试验的推进不断增加,骆驼蓬组始终低于模型组;ELISA 检测发现模型组体内的 RF、IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平均比对照组和骆驼蓬组显著增高($P<0.001$);Western blot 检测发现:模型组 NLRP3 信号通路分子(caspase-1、IL-1 β 、IL-18、IL-1 β mRNA、IL-18mRNA)表达水平和 TLR4 信号通路分子(TLR4、MyD88、p-NF-kB p65 及 TLR4 mRNA)表达水平均比对照组和骆驼蓬组显著增高($P<0.001$)。结论 骆驼蓬外敷可以通过降低血清细胞因子水平,抑制 NLRP3、TLR4 信号通路,影响其蛋白及 mRNA 表达,缓解类风湿关节炎,降低对关节滑膜的损伤。

关键词:骆驼蓬;TLR4;NLRP3;滑膜损伤;类风湿关节炎

中图分类号:R256 文献标志码:A 文章编号:1000-1719(2024)10-0136-05

Effect of Luotuopeng (Peganum harmala L.) on NLRP3 and TLR4 Signaling in Rheumatoid Arthritis

TIAN Xinwei¹, WANG Jing¹, ZHENG Qili¹, PEI Jing¹, CHEN Chang²

(1. The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang, China;

2. Tengzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tengzhou 277500, Shandong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Luotuopeng (Peganum harmala L.) external application on NLRP3 and TLR4 signaling pathways and synovial injury in rats with rheumatoid arthritis. **Methods** Twenty-four SD rats, half male and half female, were randomly divided into control group, model group and Luotuopeng (Peganum harmala L.) group, 8 rats in each group. The model group and Luotuopeng (Peganum harmala L.) group set up the collagen-induced arthritis (CIA) rat model (14 days of immune modeling). The model was completed and the rats in the Luotuopeng (Peganum harmala L.) group used Luotuopeng (Peganum harmala L.) external application [0.50 g/(kg·d)] for 28 days, and the control group and the model group were not treated. During treatment, the joint swelling and arthritis index of rats were tracked regularly. The rats were executed 28 days after administration, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detected the levels of rheumatoid factor (RF), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and synovial tissue supernatant. Western blot method detected recombinant NLR family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) signaling pathway molecules [cysteine-requiring aspartate protease-1 (caspase-1), IL-1 β , IL-18] and TLR4 signaling pathway molecules [Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), phosphorylated nuclear factor kB p65 (p-NF-kB p65), nuclein] and their mRNA expression levels in synovial tissues. **Results** According to the test results, the joint swelling of the right hind limb [(4.67 ± 0.53) points] in the model group was much greater than that [(2.78 ± 0.38) points] of the joint swelling of the Luotuopeng (Peganum harmala L.) group. The arthritis index of the model group and the Luotuopeng (Peganum harmala L.) group increased as the trial progressed, and the index of the Luotuopeng (Peganum harmala L.) group was always lower than that of the model group. ELISA detection found that the levels of RF, IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α in the

model group were significantly higher than those in the control group and Luotupeng(*Peganum harmala* L.) group($P < 0.001$). Western blot detection found that the expression levels of NLRP3 signaling pathway molecules(caspase-1, IL-1 β , IL-18, IL-1 β mRNA, IL-18mRNA) and TLR4 signaling pathway molecules(TLR4, MyD88, p-NF-kB p65 and TLR4 mRNA) in the model group were significantly higher than those in the control group and Luotupeng(*Peganum harmala* L.) group($P < 0.001$). **Conclusion** External application of Luotupeng(*Peganum harmala* L.) can reduce the serum cytokine level, inhibit the NLRP3 and TLR4 signaling pathways, affect the expressions of proteins and mRNA, alleviate rheumatoid arthritis, and reduce the damage to the joint synovium.

Keywords: Luotupeng(*Peganum harmala* L.); TLR4; NLRP3; synovial injury; rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是慢性、进行性的自身免疫疾病,该病与炎症反应的加剧密切相关^[1-2]。RA是由多种因素共同导致的,具体发病机制尚未完全明确。RA的根治性方法尚无定论,临床通常是通过减少炎症堆积来控制RA的发展^[3-4]。研究称^[5],与RA相关的自身免疫性炎症与遗传和环境危险因素之间存在密切关联,炎症反应的触发因素有很多,例如接受感染和损害的受体等,这些受体通过识别内源性及外源性信号分子参与机体免疫反应。研究称^[6-7],NLRP3炎性小体是先天性免疫反应的重要组成部分,其介导的信号通路参与了RA的发生发展。因此,可以将抑制NLRP信号通路作为治疗RA的手段。在此信号通路中含有多种因子,如天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(cysteinyl aspartate specific protease, Caspase-1),白介素(interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18),上述因子均可参与机体对病原微生物清除及免疫应答的产生。Toll样受体4(toll-likereceptor-4, TLR4)也是机体固有免疫的重要成员,其是固有免疫系统中重要的跨膜信号转导受体,具有激发免疫应答的作用^[8]。免疫反应失调引起的炎症反应是RA发病的原因之一,TLR4信号通路激活也会参与RA炎症反应^[9-10]。早期积极抗炎治疗可有效延缓RA病理进程,考虑可以通过抑制上述信号通路达到治疗的目的。

由于RA病情的复杂性,西药治疗时多采取长期联合用药,但是部分患者服药依从性差,不能长期坚持,导致治疗效果不佳。中医遵循辨证论治,认为RA的发生与正气、营卫及风寒湿三者相关^[11]。骆驼蓬为新疆的道地药材,主要有抗炎、止痛及抗病毒的作用。本实验以NLRP3、TLR4信号通路作为切入点,探索骆驼蓬外敷治疗RA的可能作用机制,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物材料

SD雌雄各半大鼠24只,体质量(200 $\pm$ 20 g)g,购自新疆医科大学动物中心[合格证号:SCXK(新)2018-0003],在SPF环境(T=25℃,RH=60%,昼夜轮换周期为12h)下适应性饲养1周。本研究经动物伦理委员会批准同意。

1.2 药物

骆驼蓬全草购自新疆医科大学第五附属医院中药房,批号:15011303;弗氏不完全佐剂购自北京博奥龙免疫技术有限公司,批号:KX0210047Q-10;Immunization Grade Bovine Type II Collagen 购自 Chondrex,批号:20021。

1.3 主要仪器及试剂

ELISA试剂盒购自武汉华美生物;BCA蛋白检测盒购自南京建成生物工程研究所。RIPA裂解液购自赛默飞公司。显微镜是日本尼康E200,TGL-16GB离心机购自上海飞鸽仪器有限公司,酶标仪为美国Bio-Rad xMarkTM产品。

1.4 方法

1.4.1 动物分组与建模

24只雌雄各半大鼠随机分组(对照组、模型组、骆驼蓬组, $n=8$)进行1周适应性驯养。对模型组和骆驼蓬组大鼠右后足垫皮下注射含II型胶原完全弗氏佐剂(C=4 mg/mL,V=50 L)诱导类风湿关节炎,7 d后注射含II型胶原的不完全弗氏佐剂(1:1)进行二次免疫,构建RA模型(大鼠右后肢足趾红肿,踝关节体积明显增大视为造模成功)。对照组在同一时间相同位置注射等量的0.9%氯化钠溶液,实验期间除用药外3组的饲养条件完全相同。完成14 d免疫造模。

1.4.2 用药方法

骆驼蓬组:将新鲜骆驼蓬草捣碎后予以0.50 g生药/(kg·d)外敷,每天上午11:00—12:00敷在膝关节、踝关节及足趾,1 h后洗掉外敷物,连续治疗28 d。

其余两组不作任何处理。

1.5 观察指标及评价方法

1.5.1 关节肿胀程度

用电子游标卡尺对3组大鼠右后肢直径进行测量,取组内平均值,与对照组进行对比,计算其相对肿胀度。肿胀度=踝关节周长-致炎前此处周长。

1.5.2 关节炎指数

定时(T=7 d)记录3组大鼠右后肢关节炎指数,对肿胀程度进行打分(0分正常,0~2分轻微肿胀,2~5分明显肿胀,5~8分严重肿胀,8~10分溃烂)。

1.5.3 ELISA检测

给药28 d后,麻醉大鼠(10%的水合氯醛),取腹主动脉血4 mL,离心(2000 r/min,10 min)取血清。采用酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)测血清中IL-1 β 、IL-6、RF、TNF- α 、IL-18水平。按照试剂盒说明,先配置标准溶液,用酶标仪检测其在450 nm波长处的吸光度值。绘制标准曲线,配制待测样品,分别测得其吸光度值,将数值代入标准曲线中,即得待测样本相应指标浓度。

1.5.4 Western blotting检测

1.5.4.1 NLRP3、caspase-1、ASC、IL-1 β 及IL-18蛋白水平及mRNA表达水平 提取各组滑膜组织中的总蛋白,并用二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测盒检测其

浓度,电泳,转膜,洗膜,孵育后,对其进行显影曝光。用 Image J 软件检测分析各蛋白条带灰度值,分析其蛋白相对表达量。

1.5.4.2 TLR4、MyD88、p - NF - kB p65、NF - kB p65 蛋白水平及 mRNA 表达水平 提取 3 组大鼠滑膜组织,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,Nuclear Extract Kit 试剂盒提取核蛋白,CBA 法对蛋白质进行定量,电泳,转膜,洗膜,孵育后,对其进行显影曝光。以 Histone H3、 β - actin 表达水平作为内参用 Image J 软件检测分析各蛋白条带灰度值,分析其蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 26.0 对实验数据进行分析,采用 t 检验模型组与对照组,骆驼蓬组与模型组间的比较分析,采用单因素方差(one - way ANOVA)进行多组间比较分析。 $P < 0.05$ 视为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 关节肿胀度变化

模型组大鼠右后肢关节肿胀度(4.67 ± 0.53) mm 远大于骆驼蓬组关节肿胀度(2.78 ± 0.38) mm,且 $P <$

表2 3组ELISA检测RF、IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	RF/(IU/L)	IL - 1 β /(pg/mL)	IL - 6/(ng/L)	IL - 18/(pg/mL)	TNF - α /(pg/mL)
对照组	8	54.58 $\pm$ 2.67	177.32 $\pm$ 27.16	29.58 $\pm$ 2.78	45.67 $\pm$ 5.82	54.388 $\pm$ 17.88
模型组	8	103.56 $\pm$ 2.58 *	1672.78 $\pm$ 56.22 *	87.28 $\pm$ 6.89 *	327.87 $\pm$ 24.92 *	124.897 $\pm$ 15.90 *
骆驼蓬组	8	78.47 $\pm$ 3.66	980.24 $\pm$ 34.58#	35.98 $\pm$ 4.52#	159.36 $\pm$ 9.43#	85.374 $\pm$ 23.64#

注: * 为模型组与对照组比较, $P < 0.001$,#为骆驼蓬组与模型组比较, $P < 0.001$ 。

2.2 关节滑膜组织 NLRP3、caspase - 1、IL - 1 β 、IL - 18、IL - 1 β mRNA 及 IL - 18mRNA 蛋白相对表达水平检测结果

对大鼠的各组关节滑膜组织 NLRP3、caspase - 1、IL - 1 β 、IL - 18、IL - 1 β mRNA 及 IL - 18mRNA 蛋白相对表达水平进行检测。结果显示,与对照组相比,模型

表3 3组关节滑膜组织 NLRP3、caspase - 1、IL - 1 β 、IL - 18、IL - 1 β mRNA 及 IL - 18mRNA 蛋白相对表达水平检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NLRP3	caspase - 1	IL - 1 β	IL - 18	IL - 1 β mRNA	IL - 18mRNA
对照组	8	0.39 $\pm$ 0.025	0.56 $\pm$ 0.027	17.439 $\pm$ 12.288	0.179 $\pm$ 0.096	1.138 $\pm$ 0.067	1.089 $\pm$ 0.256
模型组	8	0.98 $\pm$ 0.017 *	0.99 $\pm$ 0.084 *	43.338 $\pm$ 21.425 *	0.958 $\pm$ 0.538 *	18.731 $\pm$ 0.832 *	50.276 $\pm$ 1.083 *
骆驼蓬组	8	0.56 $\pm$ 0.035#	0.67 $\pm$ 0.017#	24.493 $\pm$ 11.768#	0.296 $\pm$ 0.170#	7.934 $\pm$ 0.198#	23.975 $\pm$ 0.764#

注: * 为模型组与对照组比较, $P < 0.001$,#为骆驼蓬组与模型组比较, $P < 0.001$ 。

2.3 关节滑膜组织 TLR4、MyD88、p - NF - kB p65、NF - kB p65 及 TLR4 mRNA 蛋白相对表达水平检测结果

对大鼠的各组关节滑膜组织 TLR4、MyD88、p - NF - kB p65、NF - kB p65 及 TLR4 mRNA 蛋白相对表

表4 3组关节滑膜组织 TLR4、MyD88、p - NF - kB p65、NF - kB p65 及 TLR4 mRNA 蛋白相对表达水平检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TLR4	MyD88	p - NF - kB p65	NF - kB p65	TLR4 mRNA
对照组	8	0.507 $\pm$ 0.162	0.12 $\pm$ 0.035	0.255 $\pm$ 0.047	0.971 $\pm$ 0.062	1.103 $\pm$ 0.098
模型组	8	1.001 $\pm$ 0.136 *	1.05 $\pm$ 0.05 *	0.787 $\pm$ 0.056 *	1.002 $\pm$ 0.082	2.578 $\pm$ 0.162 *
骆驼蓬组	8	0.861 $\pm$ 0.086#	0.11 $\pm$ 0.08#	0.530 $\pm$ 0.046#	1.019 $\pm$ 0.083	1.268 $\pm$ 0.095#

注: * 为模型组与对照组比较, $P < 0.001$,#为骆驼蓬组与模型组比较, $P < 0.001$ 。

3 讨论

RA 属中医学“痹证”范畴,根据中医学记载及现在研究表明,中医外治法对 RA 具有良好的效果,可以

0.05。

2.2 关节炎指数

造模成功初期(0 d),模型组和骆驼蓬组关节炎指数近似($P > 0.05$);造模成功 1 ~ 4 周,骆驼蓬组关节炎指数均低于模型组($P < 0.05$)。详见表 1。

表1 两组造模成功后关节炎指数比较($\bar{x} \pm s$) 单位:分

组别	例数	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
模型组	8	1.08 $\pm$ 0.35	3.57 $\pm$ 0.78	5.87 $\pm$ 0.98	7.76 $\pm$ 0.34	8.09 $\pm$ 0.31
骆驼蓬组	8	1.05 $\pm$ 0.24	1.25 $\pm$ 0.34	1.87 $\pm$ 0.57	2.08 $\pm$ 0.26	2.35 $\pm$ 0.21
<i>t</i> 值		0.200	7.712	9.979	37.535	43.360
<i>P</i> 值		>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 ELISA 检测 RF、IL - 1 β 、IL - 6、IL - 18、TNF - α 水平结果

由检测结果可知,与对照组相比较,模型组体内的 RF、IL - 1 β 、IL - 6、IL - 18、TNF - α 水平均显著增高, $P < 0.001$;与模型组相比较,骆驼蓬组体内的 RF、IL - 1 β 、IL - 6、IL - 18、TNF - α 水平均显著降低,且 $P < 0.05$ 。详见表 2。

组体内的 NLRP3、caspase - 1、IL - 1 β 、IL - 18、IL - 1 β mRNA 及 IL - 18mRNA 蛋白相对表达水平均显著增高, $P < 0.001$;与模型组相比较,骆驼蓬组体内的 NLRP3、caspase - 1、IL - 1 β 、IL - 18、IL - 1 β mRNA 及 IL - 18mRNA 蛋白相对表达水平均显著降低,且 $P < 0.05$ 。详见表 3。

达水平进行检测,结果显示,与对照组相比,模型组体内的 TLR4、MyD88、p - NF - kB p65 及 TLR4 mRNA 水平均显著增高($P < 0.001$);与模型组相比较,骆驼蓬组体内的 TLR4、MyD88、p - NF - kB p65 及 TLR4 mRNA 水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表 4。

缓解关节疼痛、肿胀等症状。且外敷方式吸收快,起效快,避免胃肠吸收带来的不良反应,具有安全、作用直接及起效快的优点。

本研究结果显示:模型组大鼠右后肢关节肿胀度远大于骆驼蓬组关节肿胀度;模型组和骆驼蓬组关节炎指数随着试验的推进不断增加,骆驼蓬组始终低于模型组。骆驼蓬为新疆道地药材,据记载:“风湿骨刺疼痛,取适量研末敷用;急性风湿性关节炎取适量捣烂敷患处”^[12]。此药具有宣肺气、祛风除湿、消肿止痛之功效^[13]。而现代药理学表明,骆驼蓬含有大量生物碱,主要的成分是骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱,抗菌及抑制免疫的作用强大,进而发挥抗炎镇痛的作用^[14]。近几年还发现该药具有抗肿瘤作用,RA 与肿瘤有相似的病理特征,即存在病理性新生血管形成^[15]。通过分析本研究结果发现,骆驼蓬发挥了抑制新生血管的作用,抑制炎症反应进程,起到减轻关节肿胀的作用。

有研究表明^[16],巨噬细胞产生的多种细胞因子参与了 RA 的发生发展,如 TNF- α 、IL-1 β 与其受体结合后,使得 RA 患者滑膜炎无限增生。本研究结果显示,模型组体内的 RF、IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平均比对照组和骆驼蓬组显著增高。提示骆驼蓬外敷能显著降低血清炎症因子水平,抑制滑膜异常增生,延缓软骨与骨的破坏,达到保护关节的目的。

以往有研究称^[17],蓬草除痹汤能改善 II 型胶原乳剂诱导的大鼠关节炎(CIA)后的炎症反应,而骆驼蓬草作为蓬草除痹汤的主要成分,笔者考虑骆驼蓬也可能对治疗 RA 具有一定作用。研究发现从骆驼蓬中提取的生物碱类具有显著的抗炎作用^[18],本研究也从炎症信号通路入手,探究该药的治疗效果。本研究通过 Western blot 检测发现:模型组 TLR4 信号通路分子(TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 及 TLR4 mRNA)表达水平均比对照组和骆驼蓬组显著增高。TLRs 家族在 B 细胞、单核巨噬细胞、T 细胞中广泛分布,其中分布在单核细胞上的 TLR4 与 RA 的发生具有密切关系。遭受病理损伤的组织 and 细胞会释放内源性损伤因子,然后结合 TLR4 信号通路上的因子,激活 MyD88 及核因子 NF- κ B,进一步促进炎症细胞因子释放。深入研究发现,特异性阻断 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路是治疗 RA 的有效途径^[19]。本研究发现 RA 模型 TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 及蛋白水平表达增加,这与以往研究报道关于 RA 患者对细菌脂多糖刺激反应敏感的结果相似^[20]。RA 在中医上治疗以祛邪通络为主,骆驼蓬具有祛风除湿、通络止痛的功效,药理学研究其具有较好的抗炎作用^[21]。本实验采用骆驼蓬对干预 RA 大鼠,结果显示骆驼蓬对 RA 的治疗作用主要体现在抗炎机制上,该药可以明显降低 TLR4 信号通路上的炎症因子表达。

NLRP3 炎性小体介导的信号通路参与了多种病理变化,上述通路被激活后,Caspase-1 会发生聚集,促进 IL-1 β 和 IL-18 释放,参与 RA 的病理过程。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著增加参与了慢性炎症、滑膜炎、软骨损伤等过程。本研究通过 Western blot 检测发现:模型组 NLRP3 信号通路分子(caspase-1、IL-18、IL-1 β 、IL-1 β mRNA、IL-18mRNA)表达水平高于其他两组。提示骆驼蓬能够抑制 NLRP3 炎性小体介导的信号通路中相关因子的

表达,抑制炎症因子的产生和释放,进而发挥改善 RA 症状的效果。

研究认为大量炎症因子释放加速了 RA 的进程,抑制炎症因子的产生和释放是治疗 RA 的策略^[22]。本研究探究骆驼蓬的治疗效果也是基于炎症信号通路及炎症因子入手,取得了理想的实验结果。本研究也存在不足之处,测量大鼠关节肿胀度时可能会受到人为因素的影响。此外,本实验仅从 NLRP3 炎症小体及其下游因子出发,结果可能存在偏倚,接下来还需要进一步充实实验结果。

综上所述,骆驼蓬外敷可以通过降低血清细胞因子水平,抑制 NLRP3、TLR4 信号通路,影响其蛋白及 mRNA 表达,缓解类风湿关节炎,降低对关节滑膜的损伤。

参考文献

- [1] ZHAO Y, LIU W, QU J, et al. Per-/polyfluoroalkyl substance concentrations in human serum and their associations with immune markers of rheumatoid arthritis [J]. *Chemosphere*, 2022, 298 (10):e134338.
- [2] KUROWSKA STOLARSKA M, ALIVERNINI S. Synovial tissue macrophages in joint homeostasis, rheumatoid arthritis and disease remission[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2022, 18(7):384-397.
- [3] YANG Y, LIU Y, YU H, et al. Sesquiterpenes from *Kadsura coccinea* attenuate rheumatoid arthritis-related inflammation by inhibiting the NF- κ B and JAK2/STAT3 signal pathways [J]. *Phytochemistry*, 2022, 194(8):e113018.
- [4] GAO J, XIN L, GUO Q, et al. Twenty-year changes in mortality rates and underlying causes of death in patients with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease[J]. *Scand J Rheumatol*, 2021, 50 (5):360-364.
- [5] LV X, HUANG J, WANG H. MiR-30a-3p ameliorates oxidative stress in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via activation of Nrf2-ARE signaling pathway [J]. *Immunology Letters*, 2021, 232 (5):1-8.
- [6] WEI Q, LV F, ZHANG H, et al. MicroRNA-101-3p inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis by targeting PTGS2 [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1):e1136.
- [7] MENG X, ZHANG X, SU X, et al. Daphnes Cortex and its licorice-processed products suppress inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway and regulation of the metabolic profile in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 283(4):e114657.
- [8] ABDELWAHAB A, PALOSAARI S, ABDELWAHAB S A, et al. Differential synovial tissue expression of TLRs in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: A preliminary report [J]. *Autoimmunity*, 2021, 54(1):23-34.
- [9] ZHAO Y, SUN X, LIN J, et al. Panaxynol induces fibroblast-like synovial cell apoptosis, inhibits proliferation and invasion through TLR4/NF- κ B pathway to alleviate rheumatoid arthritis [J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 101(5):e1081.
- [10] 崔铁霞, 赵枫, 张娜娜, 等. 外周血 NLRP3 炎症小体表达和 Th 细胞亚群变化与类风湿关节炎患者的生活质量和关节功能的关联 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(16):1716-1719.
- [11] 彭程, 高明利, 于静, 等. 基于 NLRP3/caspase-1 信号通路影响软骨细胞焦亡探讨独活寄生汤干预类风湿关节炎作用机制 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(9):32-36.

草乌叶生物碱成分及其抗炎活性研究

敖登其木格¹, 张小峰¹, 特格喜白音², 乌力吉特古斯²

(1. 内蒙古自治区中蒙医药研究院, 内蒙古 呼和浩特 010010;

2. 内蒙古自治区国际蒙医医院, 内蒙古 呼和浩特 010065)

摘要:目的 探讨蒙古族习用药材草乌叶抗炎作用的物质基础及作用机制。方法 制备草乌叶生物碱组分, 并利用 LC-MS 技术进行质谱鉴定; 进一步检测鉴定生物碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型的影响。首先, 采用 CCK-8 法检测生物碱对 RAW264.7 细胞的增殖-毒性作用, 确定最大给药浓度; 其次, 通过 PCR 实验检测 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 和 iNOS 的基因表达情况; 采用 Griess 法测定 NO 浓度, ELISA 法测定炎症因子 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 含量; 最后通过 Western blotting 实验检测 COX-2 蛋白表达情况。结果 通过 LC-MS 技术同时鉴定了乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱等 6 种生物碱; 上述 6 种生物碱对 LPS 诱导的炎症因子 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 及 NO 具有不同程度的抑制作用, 且同时可抑制 iNOS 基因表达及 COX-2 蛋白表达。结论 草乌叶生物碱组分可含双酯型生物碱乌头碱、次乌头碱、新乌头碱及单酯型生物碱苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱等 6 种生物碱; 而这 6 种生物碱具有不同程度的体外抗炎效应, 抗炎作用机制可能与抑制 iNOS/COX-2 炎症信号传导有关。

关键词: 草乌叶; 生物碱; 炎症; RAW264.7 细胞

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1719(2024)10-0140-06

Study on Anti-Inflammatory Active Components and Mechanism of Caowuye (Aconiti Kusnezoffii Folium)

Aodengqimuge¹, ZHANG Xiaofeng¹, Tegexibaiyin², Wulijitegusi²

(1. Inner Mongolia Traditional Chinese Mongolian Medical Research Institute, Hohhot 010010, Inner Mongolia, China;

2. Inner Mongolia International Mongolian Hospital, Hohhot 010065, Inner Mongolia, China)

Abstract: **Objective** To investigate the material basis and mechanism of anti-inflammatory effect of the traditional Mongolian medicine Caowuye (Aconiti Kusnezoffii Folium). **Methods** The alkaloid components of Caowuye (Aconiti Kusnezoffii Folium) were isolated and representative components in alkaloids were identified by liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS). Then, a cell counting kit-8 assay was used to determine the effects of alkaloid components on the viability of RAW264.7 macrophages. Secondly, anti-inflammation effects of alkaloid components in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macro-

作者简介: 敖登其木格 (1987-), 女 (蒙古族), 内蒙古锡林郭勒盟人, 副主任药师, 硕士, 研究方向: 中药 (蒙药) 抗炎免疫药理学。

- [12] 樊玉祥, 曾凡业, 马丽丽, 等. 骆驼蓬提取物 β -咔啉类生物碱对 SGC-7901 及裸鼠移植瘤组织 PI3K 和 AKT 表达影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(2): 99-105, 113.
- [13] 雷秀英, 伊力亚斯·艾萨, 张瑜, 等. 骆驼蓬总碱对 Tau 蛋白的降解作用[J]. 新疆医科大学学报, 2021, 44(5): 615-619.
- [14] 孙焱, 师国洋, 于慧敏. 追风活络饮合复方乌头微乳剂治疗类风湿关节炎风寒湿痹证疗效及对炎症指标的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(10): 1085-1088.
- [15] 王革新, 张驰, 王大强, 等. 基于化瘀通痹方干预活动期类风湿关节炎效果观察及血清 TNF- α 、IL-1 β 、CRP 变化机制探究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(8): 50-53.
- [16] 田新玮, 陈昶, 郑琦丽, 等. 新疆骆驼蓬对 II 型胶原诱导型关节炎大鼠滑膜组织及细胞因子的影响[J]. 中医临床研究, 2021, 13(4): 27-29.
- [17] 张博, 金玥, 薛斌. 散寒除痹汤对类风湿关节炎 (寒湿痹阻型) 患者 IL-17、ASM、GPx、RF 及免疫功能的影响[J]. 中药材, 2021, 44(4): 985-988.
- [18] 郭玉琴, 鲁玉辉. 加味宣痹汤对急性痛风性关节炎大鼠 TLR4/MyD88/IRAK4 通路的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1706-1710.
- [19] 燕丽君, 佟胜全, 刘静, 等. 白芍总苷介导 TLR4/NF- κ B 信号通路对类风湿关节炎模型大鼠的治疗作用及其机制[J]. 吉林大学学报 (医学版), 2021, 47(2): 390-396.
- [20] 汤样华, 杨振杰, 莫亚峰, 等. 益肾除痹方对类风湿关节炎大鼠血清及关节滑膜细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、INF- γ 的影响[J]. 中国现代医生, 2021, 59(35): 27-31.
- [21] 李楠, 马庆宇, 韩隆胤, 等. 补肾活血法对类风湿关节炎软骨细胞焦亡及 HMGB1/NLRP3 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 1929-1933.
- [22] 汤文通, 洪盛威, 孙广瀚, 等. 青藤碱治疗气阴两虚型类风湿关节炎的效果及对 MyD88 依赖性信号通路的影响[J]. 临床误诊误治, 2022, 35(1): 24-28.