

葛根素通过调控 TAK1 介导的 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻大鼠类风湿关节炎症状

徐买元, 李妮, 李嘉懿, 张涛, 马俐文, 林涛, 余浩楠, 吴宁, 吴遵秋, 黄丽
贵州医科大学基础医学院化学与生物化学实验室, 贵州 贵阳 561113

摘要:目的 以转化生长因子 β 激活激酶1(TAK1)为靶标探讨葛根素(Pur)对胶原诱导型关节炎(CIA)大鼠滑膜炎的作用机制。方法 将60只健康SD大鼠随机均分为空白组(Nor)、模型组(Mod)、雷公藤多苷片阳性对照组(GTW, 10 mg/kg)和葛根素低、中、高剂量组(Pur 10、30、100 mg/kg), 10只/组。经皮下注射牛型II胶原建立CIA大鼠模型,并通过每日经口灌胃的方式给予治疗,持续3周。采用关节炎指数(AI)评分法,分别于造模前1周,灌胃前1周及灌胃后第1、2、3周观察大鼠后足关节病变情况。计算大鼠肝脏指数,采用HE染色法观察大鼠关节滑膜病理变化,Real-time PCR法检测滑膜组织TAK1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA的表达水平,Western blotting检测滑膜组织TAK1、p-TAK1、TLR4、NF- κ B p65蛋白表达水平。结果 相较于Mod组,GTW组和Pur高剂量组大鼠肝脏指数下降($P<0.05$)。GTW组和Pur低、中、高剂量组足趾肿胀度及关节炎指数评分均小于Mod组($P<0.05$)。光镜下观察大鼠关节滑膜病理组织切片,Mod组可见滑膜细胞增生,滑膜水肿,滑膜结缔组织排列疏松、不规则,伴有少量以淋巴细胞、巨噬细胞为主的炎性细胞浸润;而GTW组和Pur低、中、高剂量组中,滑膜炎均有不同程度的降低,且随Pur剂量增高,治疗效果呈逐渐增强的趋势。与Mod组比较,GTW组和Pur低、中、高剂量组大鼠膝关节滑膜组织中TAK1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA和蛋白表达量均有不同程度的降低($P<0.05$)。结论 葛根素可抑制CIA大鼠关节炎炎症反应,其机制可能为下调TAK1的表达,从而抑制TLR4/NF- κ B信号转导途径。

关键词: 葛根素; 类风湿关节炎; 滑膜组织; TAK1; Toll样受体4; 核因子 κ B p65

Puerarin alleviates rheumatoid arthritis in rats by modulating TAK1-mediated TLR4/NF- κ B signaling pathway

XU Maiyuan, LI Ni, LI Jiayi, ZHANG Tao, MA Liwen, LIN Tao, YU Haonan, WU Ning, WU Zunqiu, HUANG Li

Laboratory of Chemistry and Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic mechanism of puerarin for alleviating synovitis in rats with collagen-induced arthritis (CIA). **Methods** In a SD rat model of CIA, we tested the effects of daily gavage of puerarin at low, moderate and high doses (10, 30, and 100 mg/kg, respectively) for 3 weeks, with tripterygium glycosides (GTW, 10 mg/kg) as the positive control, on swelling in the hind limb joints regions evaluated by arthritis index scoring. Mass fraction of the liver of the rats was calculated, and pathologies in joint synovial membrane were observed with HE staining. The expressions of transforming growth factor β -activated kinase-1 (TAK1), Toll-like receptor 4 (TLR4), and nuclear factor kappa-Bp65 (NF- κ B p65) at the mRNA and protein levels in the synovial tissues were detected using Real-time PCR and Western blotting. **Results** Compared with those in the model group, the rats in GTW group and high-dose puerarin group showed significantly reduced mass fraction of the liver. Treatment with GTW and puerarin at the 3 doses all significantly alleviated plantar swelling, lowered arthritis index scores, and improved synovitis in CIA rats ($P<0.05$), and the effects of puerarin showed an obvious dose dependence. Both GTW and puerarin treatments significantly lowered TAK1, TLR4, and NF- κ B p65 mRNA and protein expressions in the synovium of CIA rats. **Conclusion** Puerarin alleviates synovium damages in CIA rats possibly by suppressing the TLR4/NF- κ B signaling pathway via downregulating TAK1 expression.

Keywords: puerarin; rheumatoid arthritis; synovium; TAK1; Toll-like receptor 4; nuclear factor kappa-B p65

类风湿关节炎(RA)是一种以滑膜炎、软骨破坏和关节畸形为特征的慢性进行性、炎症性、对称性自身免疫性疾病,其发病机制尚不完全清楚^[1],可导致不可逆残疾,致残率高达61.3%^[2]。RA全球患病率达0.4%~1.3%,女性发病率约为男性3倍,绝经后女性发病率达

到高峰,提示雌激素水平波动与疾病进程存在密切关联^[3-5]。新近流行病学研究进一步揭示,月经初潮年龄延迟(>14岁)、多产(子女 \geq 4)、卵巢切除史及激素替代治疗等雌激素相关因素均可增加RA风险^[6],这为深入探究雌激素信号调控机制提供了重要线索。

在RA病理进程中,转化生长因子 β 激活激酶1(TAK1)作为促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK)家族核心成员,通过调控核因子 κ B抑制蛋白激酶/蛋白激酶B/丝裂原活化蛋白激酶(IKK/Akt/MAPK)信号网络驱动炎症反应^[7,8]。值得注意的是,李锡团队^[9]首次发现雌激素可通过下调滑膜细胞TAK1表

收稿日期:2025-04-05

基金项目:国家自然科学基金(82260829);2022年省级大学生创新创业计划训练项目(S202210660092)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82260829).

作者简介:徐买元,在读本科生,E-mail: 2634892993@qq.com

通信作者:吴遵秋,高级实验师,E-mail: 457581851@qq.com;黄丽,

副教授,E-mail: 12155501@qq.com

达抑制CIA进展,这一发现将雌激素保护效应与TAK1调控机制直接关联。而TAK1的功能实现依赖于与TGF- β 激活激酶1结合蛋白(TAB)蛋白复合物组装,其可被肿瘤坏死因子- α (TNF α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等炎性介质激活,进而调控下游核因子 κ B(NF- κ B)和MAPK通路^[10]。这提示TAK1可能构成雌激素调控RA的关键分子节点。进一步研究发现,Toll样受体4(TLR4)/NF- κ B信号轴在RA发病机制中发挥重要作用,TLR4在RA患者滑膜组织中的表达显著升高,通过识别损伤相关分子模式,经TAK1介导激活IKK复合物,促使核因子 κ B抑制蛋白(I κ B)降解并释放NF- κ B入核,启动IL-1 β 、白细胞介素-6(IL-6)、TNF- α 等炎性因子转录,不仅加剧滑膜炎,更通过促进破骨分化导致骨侵蚀^[11-13]。鉴于TAK1处于TLR4/NF- κ B通路的上游枢纽位置,靶向TAK1可能成为调控该信号轴的关键策略^[14]。

目前针对RA的临床治疗主要为非甾体抗炎药、糖皮质激素和改善疾病的抗风湿药物等,但现有治疗策略只能缓解疾病症状和进展^[15],且存在起效慢、毒副作用大、价格昂贵及个体疗效差异显著等局限性,因此,亟待开发基于新靶点或新作用机制的药物以满足临床治疗需求^[16,17]。近年来,中药制剂在RA的临床治疗中展现出显著优势,其通过多靶点调控、多通路干预及多层次调节的综合作用机制,可有效改善RA临床症状,弥补西药治疗的局限性^[18,19]。葛根素(Pur)作为一种从豆科葛属植物中提取的天然异黄酮类小分子成分,具有副作用小、安全性高等优点^[20]。在抗炎领域,葛根素表现出卓越的潜力,具有多靶点、多途径作用,能够同时作用于NF- κ B和MAPK通路,减少下游炎症因子的产生和释放^[21]。此外,葛根素兼具雌激素样活性与骨保护效应,其可通过激活雌激素受体(ER α /ER β)调节雌激素信号通路,在骨代谢调控中展现独特价值^[22-24]。高月等^[25]研究发现,葛根素可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路,缓解CIA大鼠滑膜增生,减轻关节软骨侵蚀及骨破坏情况。新近研究表明,许多天然产物通过调节TLR4/NF- κ B信号通路发挥显著的抗炎作用,其相关信号转导机制与药理作用正被逐步揭示并得到实验验证^[26]。Wang等^[27]证实葛根素抗RA的机制涉及TLR4/NF- κ B通路抑制及氧化应激缓解。此外,Zhang等^[28]发现葛根素可阻断Akt活化,下调TNF- α 、IL-1 β 表达,抑制破骨分化;同时通过调节B细胞淋巴瘤-2/基质金属蛋白酶-13/基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(Bcl-2/MMP-13/TIMP-1)平衡减少软骨细胞凋亡^[29],凸显其多维度抗RA的潜力。宋锡国等^[30]研究亦表明,葛根素对于RA的治疗效果确切,可缓解疼痛和降低炎症,改善病患生活质量。

现有文献已明确TLR4/NF- κ B通路在RA中的重要作用^[31],证实葛根素可通过拮抗该通路抑制炎症反

应^[32],且TAK1作为该通路的关键调控节点已被验证为潜在的治疗靶点^[8,33]。然而,目前研究多聚焦于葛根素对TLR4/NF- κ B通路下游效应分子的调控,对其上游调控节点(如TAK1)的作用机制研究仍较为匮乏^[34]。此外,现有关于TAK1的研究主要聚焦于合成抑制剂的开发^[7,9,33,35],而天然药物成分(如葛根素)如何靶向调控TAK1及其分子互作网络的探索有限,这在一定程度上限制了其临床转化潜力,更为重要的是,葛根素是否通过直接干预TAK1介导的TLR4/NF- κ B通路活化以改善RA炎症反应,目前尚未在疾病模型中获得直接实验证据,相关分子机制仍有待进一步解析。

本研究通过构建CIA大鼠模型,整合中药成分与现代分子机制探索,创新性地以TAK1这一上游调控节点为核心,在葛根素的干预下,测定滑膜细胞中TLR4/NF- κ B信号通路的表达情况,探究葛根素缓解RA炎症与TAK1/TLR4/NF- κ B信号通路的相关性,旨在拓展葛根素在RA治疗中的科学依据,为进一步探索和研发基于天然产物的TAK1靶向疗法提供新策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 60只8周龄、体质量为180~220 g的健康SPF级SD雄性大鼠,贵州医科大学实验动物中心提供[合格证号:XYSK(贵)2023-0002]。本研究已获得学校实验动物伦理委员会审查批准(伦理批号:2400320),且严格遵守伦理委员会规定。

1.1.2 主要试剂与仪器 雷公藤多苷片(黄石飞云制药有限公司),葛根素(西安东峰生物科技有限公司),不完全弗氏佐剂(Sigma),牛Ⅱ型胶原(Chondrex),放射免疫沉淀裂解液、二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒、Trizol Reagent试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),一抗TAK1、NF κ B-p65、TLR4、 β -Actin及二抗Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)(Bioworld),一抗p-TAK1抗体(佰嘉生物科技有限公司),引物(武汉天一辉生物科技有限公司),PCR逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司),其余试剂均为进口或国产分析纯产品。水平电泳槽DYY-Ⅲ31D及DYY-5型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂),酶标仪(BIO-TEK),Quantity One凝胶成像分析系统(BIO-RAD)。

1.2 研究方法

1.2.1 分组及造模 SD大鼠随机均分为空白组(Nor)、模型组(Mod)、雷公藤多苷片阳性对照组(GTW 10 mg/kg)和葛根素低、中、高剂量组(Pur 10、30、100 mg/kg),10只/组。于无特定病原体(SPF)级实验室适应性喂养1周后造模,取适量2 mg/mL牛Ⅱ型胶原与等量不完全弗氏佐剂于冰上混合,并完全乳化至其滴于水中不扩散。Mod

组、GTW组及Pur低、中、高剂量组大鼠于尾根部皮下注射乳化后的混合物0.2 mL进行初次免疫,1周后于足跖皮下再次注射乳化剂0.1 mL加强免疫1次;Nor组大鼠于尾根部皮下注射同量生理盐水。造模期间每日观察并拍照记录大鼠关节红肿及畸形等情况,通过关节炎指数(AI)评分判定造模情况,AI评分 ≥ 4 分即可视为造模成功。

1.2.2 给药方案 第2次造模结束后1周开始给药,各组大鼠均灌胃给药。给药方案:Pur低、中、高剂量组分别按照体质量10 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg^[36]给予Pur,GTW组给药浓度为10 mg/kg,Nor及Mod组给予等量生理盐水灌胃,每天同一时间灌胃,1次/d,持续给药3周。

1.2.3 各组大鼠一般情况的观察、关节炎指数(AI)评分法、关节肿胀率测算 每日定期观察各组大鼠的饮食量、精神状态,拍照记录关节红肿、关节畸形情况等。初次注射乳化剂当天起,采用AI评分法分别于造模前1周(适应性喂养阶段),灌胃给药前1周(造模结束后1周),灌胃给药后1周、2周、3周观察大鼠后足关节病变情况。AI评分标准如下:0分(无红肿);1分(关节有红色斑点或轻度肿胀);2分(关节病变中度红肿);3分(关节除中度红肿外,伴有轻度功能障碍);4分(关节重度红肿,僵直甚至畸形,严重功能障碍);将2只后踝关节的病变程度累计积分,计算关节炎指数,每只大鼠AI评分最高为8分,AI评分越高表示关节病变越严重。初次免疫起,每隔1周,采用大鼠足部容积测量仪测量大鼠双后足肿胀度,足肿胀度计算公式如下:ER(%)=(V1-V2)/V2 \times 100%(其中V2为造模前的容积,V1造模后的容积)。

1.2.4 标本采集 末次给药次日,麻醉处死各组大鼠,取仰卧位固定,取肝脏组织并称质量,计算肝脏指数,肝脏指数=肝脏质量(g)/体质量(g) \times 100%;并取各组大鼠炎症后腿,沿膝关节正中将皮肤纵行切开、暴露3 cm \times 3 cm以膝关节为中心的区域,齿镊提起髌骨,从上缘0.5 cm处沿两侧向下分离,可见膝关节腔内附着有淡黄色半透明的薄层滑膜组织,小心将其剥离,一部分使用4%多聚甲醛固定,用于HE染色,另一部分使用生理盐水冲洗后置于-80℃冰箱保存,用于Western blotting及Real-time PCR检测相关蛋白表达水平。

1.2.5 滑膜组织病理学观察 将固定于4%多聚甲醛中的膝关节滑膜组织常规梯度脱水后依次进行浸蜡、包埋、切片与贴片、脱蜡水化、HE染色,脱蜡水化、脱苯、复水、常规梯度染色、梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,在光学显微镜下观察滑膜组织形态学变化。

1.2.6 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)法检测滑膜组织TAK1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA的含量 取大鼠关节滑膜组织匀浆,利用Trizol Reagent试剂盒提取总

RNA,依次测定RNA样品浓度、纯度,逆转录合成互补脱氧核糖核酸(cDNA)并进行Real-time PCR扩增(扩增程序:预变性95℃30s,变性95℃10s,退火60℃30s,循环40次),采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算mRNA的相对表达量,3次平行实验后,对目的基因扩增产物与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)光密度值进行统计学分析。引物由武汉天一辉生物科技有限公司合成(表1)。

表1 各基因的引物序列

Tab.1 Primer sequences used for Real-time PCR

Primer	Sequences
GAPDH	
Forward:	5'-GAAGCTGGTCATCAACGGGA-3'
Reverse:	5'-GGCGGAGATGATGACCCTTT-3'
TLR4	
Forward:	5'-CCGCTCTGGCATCATCTTCATTG-3'
Reverse:	5'-GCTTTTCCATCCAACAGGGCTTT-3'
TAK1	
Forward:	5'-ATCAACAAGCACCACCGTAA-3'
Reverse:	5'-AATGTGGGAGTGGCTATCAGA-3'
NF κ B-p65	
Forward:	5'-GCTTGCTTTAGCCCTTTGGT-3'
Reverse:	5'-AAGAGGGAAGAAGCCACCAG-3'

1.2.7 Western blotting 检测滑膜组织TAK1、p-TAK1、TLR4、NF- κ B p65蛋白的表达 取各组大鼠关节滑膜组织,置于已加RIPA裂解液2 mL的研磨管,充分研磨,4℃静置裂解30 min,4℃下12 000 r/min离心15 min,取上清液,BCA法测定蛋白浓度;依次制备10%聚丙烯酰胺凝胶,上样10 μ L,80~120 V电泳2 h,200 mA恒流转膜1 h,5%脱脂奶粉封闭3 h,加入对应的一抗NF- κ B p65(1:1000)、TLR4(1:1000)、TAK1(1:1000)、pTAK1(1:1000)、 β -actin(1:5000),于4℃孵育过夜,TBST洗涤5 min/次,共6次,加入HRP辣根过氧化物酶偶联二抗(1:5000),室温摇床缓慢摇动1.5 h,TBST洗涤5 min/次,共6次,经增强型化学发光试剂(ECL)工作液显色,凝胶成像仪上进行蛋白条带检测,采用条带分析软件处理条带,并计算灰度值,蛋白的表达量为条带与各组内参 β -actin灰度值的比值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行数据分析,数据采用均数 \pm 标准差表示,各组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。所有实验均独立重复3次。

2 结果

2.1 足趾外观及双后肢足肿胀度

CIA大鼠足趾外观结果显示,第2次造模结束后,

与Nor组相比,Mod组、GTW组及Pur各剂量组大鼠双后肢均出现明显红肿,毛发干枯现象,行动迟缓甚至无法直立行走。连续灌胃给药3周后,与Mod组相比,各

给药组足肿胀度均降低,其中GTW组及Pur 30 mg/kg、100 mg/kg组足肿胀度降低最为显著($P<0.05, P<0.01, P<0.001$,表2、图1)。

表2 葛根素对CIA大鼠双后肢足肿胀度的影响

Tab.2 Effect of puerarin on swelling of bilateral hind limb joints in rats with collagen-induced arthritis (Mean±SD, n=10)

Group	1 week before CIA modeling	1 week before gavage	1 weeks of gavage	2 weeks of gavage	3 weeks of gavage
Normal	1.435±0.332	1.418±0.215	1.442±0.235	1.456±0.324	1.436±0.243
Model	1.465±0.351	1.892±0.416***	1.852±0.632***	1.853±0.347***	1.865±0.359**
GTW	1.441±0.236	1.798±0.342	1.633±0.285###	1.536±0.245###	1.425±0.257###
Pur 10 mg/kg	1.425±0.317	1.865±0.416	1.831±0.375###	1.768±0.447###	1.703±0.654##
Pur 30 mg/kg	1.437±0.341	1.843±0.324	1.736±0.458#	1.563±0.152###▲	1.478±0.139###▲▲
Pur 100 mg/kg	1.427±0.387	1.824±0.332	1.715±0.519▲▲	1.6145±0.614###▲▲▲	1.444±0.335#▲▲▲

GTW: Tripterygium glycosides; Pur: Puerarin. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs the Normal group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs the Model group; ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$, ▲▲▲ $P<0.001$ vs GTW group



图1 各组大鼠足肿胀度

Fig.1 Hind limb joint swelling of the rats in each group. A-F: Normal control group, CIA Model group, GTW group, Puerarin (Pur) 10 mg/kg group, Pur 30 mg/kg group, and Pur 100 mg/kg group, respectively. Joint swelling was measured using the same measurement standard and instrument calibration.

2.2 大鼠关节AI评分

AI评分可以客观反映出大鼠发病的情况,第2次造模结束后,除Nor组外,各组大鼠AI评分均≥4分,造模成功率为100%。连续给药3周后,与Nor组相比,Mod组大鼠AI评分明显增高($P<0.001$),而与Mod组相比,GTW组和Pur 10 mg/kg组的AI评分明显下降($P<0.001, P<0.01$),而其余给药组差异无统计学意义(表3)。

2.3 大鼠肝脏质量分数

CIA大鼠肝脏指数结果显示,给药3周后,相较于Nor组,Mod组大鼠肝脏指数增加($P<0.05$);相较于Mod组,GTW组和Pur 100 mg/kg组大鼠肝脏指数下降($P<0.05, P<0.01$),Pur 10 mg/kg、30 mg/kg组有所下降,但差异无统计学意义(图2)。

2.4 组织学特征

光镜下观察可见,Nor组大鼠滑膜组织内层可见较

表3 葛根素对CIA大鼠关节AI评分的影响

Tab.3 Effect of puerarin on arthritis index score in rats with collagen-induced arthritis (Mean±SD, n=10)

Group	1week before CIA modeling	1week before gavage	1 weeks of gavage	2 weeks of gavage	3 weeks of gavage
Normal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Model	6.52±1.22***	6.45±1.25***	6.44±1.34***	6.32±1.68***	6.37±1.39***
GTW	6.25±1.21	6.56±1.36	4.55±1.12 [#]	2.54±0.78 [#]	0.89±0.21 ^{###}
Pur 10 mg/kg	6.55±1.32	6.43±1.41	5.82±1.27	5.04±1.17 [#]	4.36±0.42 ^{##}
Pur 30 mg/kg	6.46±1.18	6.15±1.23	4.78±1.31	4.24±1.42	2.56±0.89
Pur 100 mg/kg	6.59±1.76	6.38±1.29	4.52±1.23	2.24±1.02	0.74±0.15

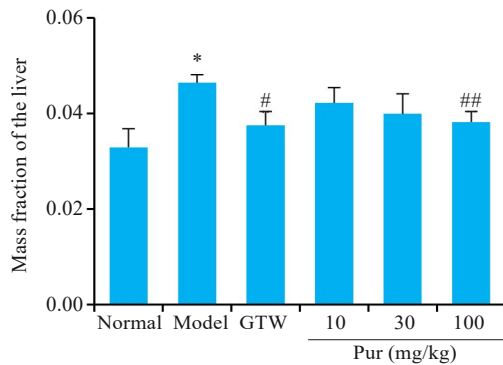
*** $P<0.001$ vs the Normal group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$ vs the Model group.

图2 葛根素对CIA大鼠肝脏质量分数的影响

Fig.2 Effect of puerarin on mass fraction of the liver of the rats with collagen-induced arthritis (Mean±SD, n=10). * $P<0.05$ vs the Nor group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs the Mod group.

薄的滑膜细胞,可见血管、脂肪细胞及结缔组织,结构清晰,未见明显的坏死及炎性细胞浸润;Mod组大鼠滑膜组织呈现明显病理改变,表现为滑膜细胞增生、脱落、水肿,结缔组织增生且排列紊乱,胶原纤维间隙增宽,伴有少量以淋巴细胞、巨噬细胞为主的炎性细胞浸润;GTW组滑膜组织内层可见较薄的滑膜细胞,结构清晰,未见明显异常;Pur 30 mg/kg、100 mg/kg组大鼠滑膜组织病理改变明显减轻,未见明显的坏死及炎性细胞浸润;Pur 10 mg/kg组滑膜水肿,结缔组织排列紊乱,仍伴有少量炎性细胞浸润(图3)。

2.5 TAK1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA的表达

Real-time PCR检测结果表明(图4),给药3周后,相较于Nor组,Mod组大鼠膝关节滑膜组织中TAK1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA明显上调($P<0.001$);相较于Mod组,Pur 100 mg/kg组大鼠膝关节滑膜组织中TAK1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA显著下调($P<0.01$ 、 $P<0.001$),Pur 30 mg/kg组大鼠膝关节滑膜组织TAK1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA下调($P<0.01$ 、 $P<0.05$),Pur 10 mg/kg组TAK1、TLR4、NF- κ B p65 mRNA轻微下调($P<0.05$)。

2.6 TAK1、p-TAK1、TLR4、NF- κ B p65蛋白的表达

Western blotting结果显示(图5),给药3周后,相较于Nor组,Mod组大鼠膝关节滑膜组织中TAK1、p-TAK1、TLR4、NF- κ B p65蛋白表达上调($P<0.01$ 、 $P<0.001$);相较于Mod组,Pur 30 mg/kg、100 mg/kg组大鼠膝关节滑膜组织中TAK1、p-TAK1、TLR4、NF- κ B p65蛋白表达均明显下调,其中,Pur 100 mg/kg组降低更显著($P<0.001$),Pur 10 mg/kg组大鼠膝关节滑膜组织中TAK1、p-TAK1、TLR4、NF- κ B p65蛋白表达下调($P<0.05$)。

3 讨论

类风湿关节炎是一种以关节滑膜炎为主要病理特征的慢性、全身性自身免疫疾病,尽管相关研究最近取得了一些进展,但RA患者仍然难以治疗^[37]。研究表明,以雷公藤为代表的中药可发挥良好的抗RA效果^[38-40],并有效降低药物不良反应的发生率。葛根素作为我国最常见的中药材之一,功效广泛^[41],具有类雌激素作用,被证明对骨骼有合成代谢作用^[42]。相关研究报道,葛根素可通过调节炎症因子的合成与释放,影响免疫细胞的表达发挥抗炎作用^[20]。本研究表明,葛根素能明显改善CIA大鼠AI指数评分,并可缓解免疫器官的过度反应,减轻关节滑膜组织病变,证实葛根素抗炎、消肿、抗风湿的功效,且疗效呈剂量依赖性。

TAK1已被证明与多种细胞内信号通路的激活有关^[43],其可通过调控NF- κ B和MAPK通路从而在炎症中发挥重要作用,抑制TAK1可显著降低促炎介质及趋化因子在肿瘤坏死因子(TNF)或脂多糖(LPS)刺激的免疫细胞中的表达水平,从而有效抑制炎症级联反应,这一调控机制使其成为开发抗炎及免疫调节药物的重要靶点^[44]。研究发现,RA-FLS中信号分子转导及激活依赖于TAK1,且与RA病变进展有关^[7]。体外实验表明,TAK1在IL-1诱导的RA滑膜细胞中高表达,抑制其表达则显著下调金属蛋白酶3(MMP-3)、IL-6 mRNA转录水平,进而缓解RA炎症^[45]。莫选荣等^[46]研究发现,通过

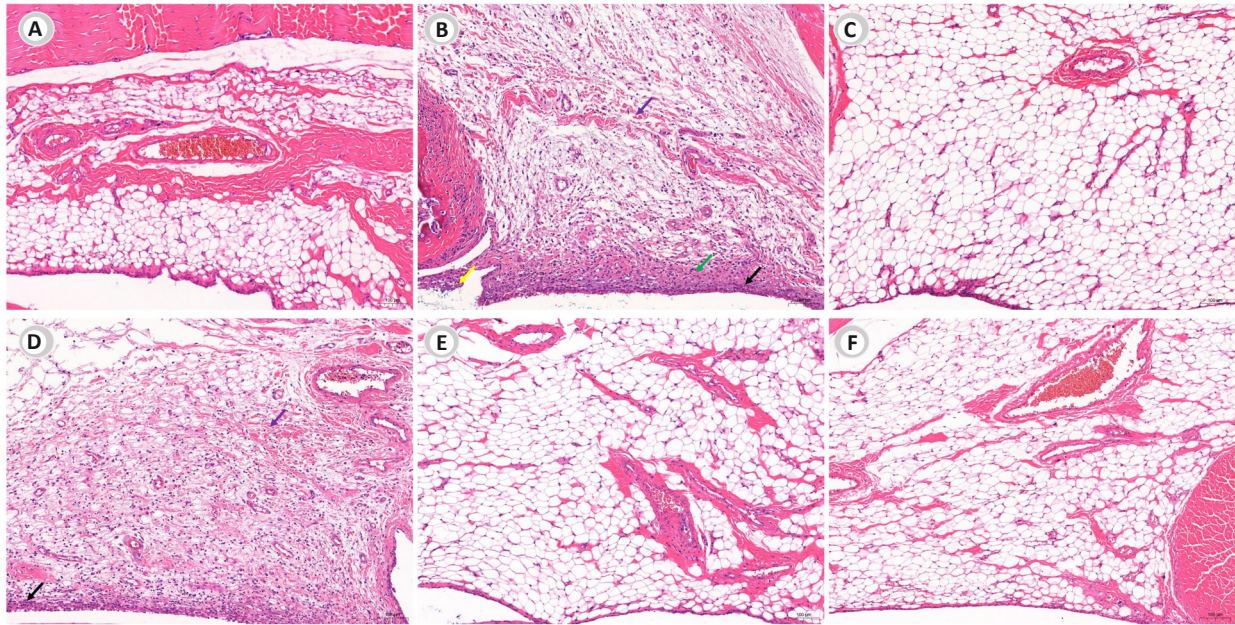


图3 各组大鼠滑膜组织病理改变

Fig.3 Pathological changes in the synovium of the rats. (HE staining, original magnification: $\times 100$). A-F: Normal control group, CIA model group, GTW group, Puerarin(Pur) 10 mg/kg group, Pur 30 mg/kg group, and Pur 100 mg/kg group, respectively. Black arrows indicate synovial cell hyperplasia, yellow arrows denote shedding of synovial cells, green arrows indicate connective tissue hyperplasia, and purple arrows highlight widening of collagen fiber interstices.

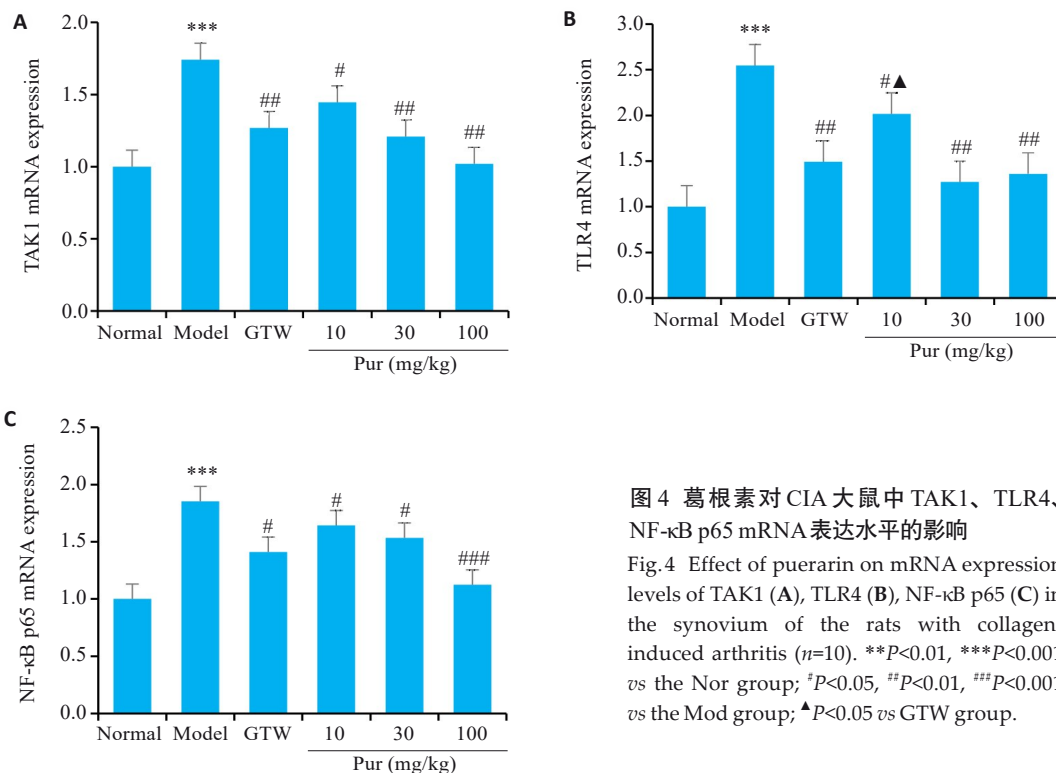


图4 葛根素对CIA大鼠中TAK1、TLR4、NF-κB p65 mRNA表达水平的影响

Fig.4 Effect of puerarin on mRNA expression levels of TAK1 (A), TLR4 (B), NF-κB p65 (C) in the synovium of the rats with collagen-induced arthritis ($n=10$). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs the Nor group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs the Mod group; ▲ $P<0.05$ vs GTW group.

沉默RA滑膜细胞TAK1基因能显著抑制TNF- α 诱导的IL-6、IL-8等炎症因子表达。此外,Freeze等^[47]研发的一种高效、选择性、口服生物可利用的TAK1抑制剂HS-276,亦可减轻CIA临床前小鼠血清中的疾病活动评分和炎症细胞因子,显著缓解RA的进展,同时减少不良事件的发生。在本实验研究中,通过观察镜下组织

HE病理切片,RT-PCR和Western blotting检测TAK1 mRNA和蛋白表达,表明TAK1在正常滑膜组织中,生理性表达较低,但在RA病理条件下显著增加,并可引起滑膜组织增生水肿、结缔组织结构紊乱、炎症细胞浸润等病理变化,而葛根素可降低TAK1水平,减轻大鼠滑膜炎,改善RA症状。

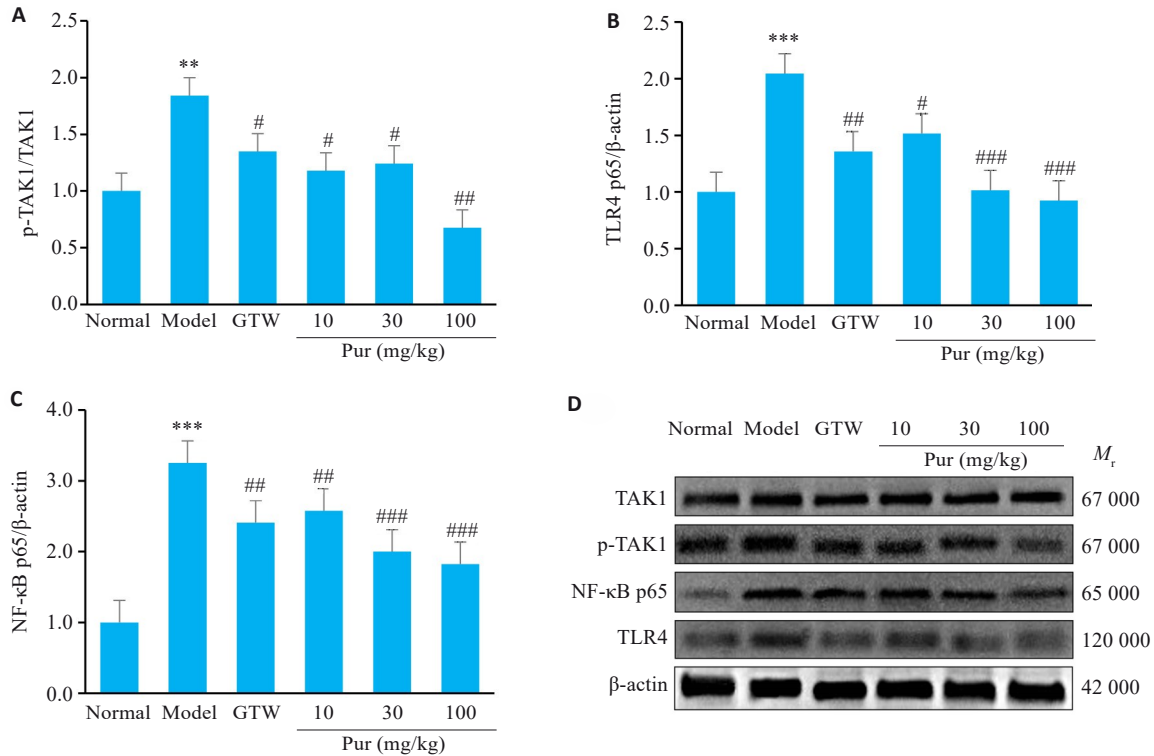


图5 葛根素对CIA大鼠中TAK1、p-TAK1、TLR4、NF- κ B p65蛋白表达水平的影响

Fig. 5 Effect of puerarin on expression levels of TAK1, p-TAK1, NF- κ B p65 and TLR4 proteins in the synovium of the rats with collagen-induced arthritis ($n=10$). A: Expression levels of TAK1 and p-TAK1 proteins in the synovium of the rats. B: Expression level of TLR4 protein in the synovium of the rats. C: Expression level of NF- κ B p65 protein in the synovium of the rats. D: Western blotting for detecting expression levels of TAK1, p-TAK1, NF- κ B p65 and TLR4 in each group. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs the Nor group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs the Mod group.

RA以免疫及非免疫细胞迁移至滑膜和关节液,引发促炎细胞因子升高为特征。NF- κ B是由两种Rel家族蛋白构成的二聚体蛋白质,广泛存在于各种细胞的细胞质中,是人体内一种重要的核转录因子^[48]。大量研究表明,在RA患者病变滑膜组织中,NF- κ B的表达水平显著升高,高度活化的NF- κ B可诱发多种促炎细胞因子的生成,促炎细胞因子的上调又可通过正反馈作用调节NF- κ B的活化,形成恶性循环,加重RA病情的发展^[49,50]。TLR4作为一种在天然免疫和炎症反应中起重要作用的模式识别受体^[51],表达于多种组织细胞中,可通过NF- κ B途径启动细胞内的信号转导^[13]。研究认为,TLR4与RA滑膜炎症联系密切,在RA患者关节血管翳形成及破骨性骨侵蚀中扮演着重要角色^[12],TLR4/NF- κ B信号通路已被证明是RA治疗的靶向途径^[13]。当TLR4受到配体刺激时,下游的接头蛋白肿瘤坏死因子受体相关因子6 (TRAF6)与白细胞介素-1受体相关激酶1/4 (IRAK1/4)一起被募集到髓样分化因子88 (MyD88)上形成复合物,使TRAF6发生泛素化激活TAK1,激活IKK,促使I κ B磷酸化降解,促使NF- κ B进入核内与靶基因的 κ B位点结合,发挥转录活性,启动相关靶基因表达,导致细胞的异常增殖与活化,最终加重

RA炎症^[52]。本研究RT-PCR和Western blotting实验结果显示,Mod组TLR4、NF- κ B p65 mRNA和蛋白表达上调,给予葛根素治疗后,大鼠滑膜组织中TLR4、NF- κ B p65表达水平明显降低,提示葛根素通过抑制TLR4的表达,使TAK1的激活效应减弱,进而抑制下游NF- κ B对相关靶基因表达的启动作用,下调相关炎症因子水平,减轻了大鼠膝关节滑膜炎反应。

综上所述,本研究揭示,葛根素可以改善CIA大鼠滑膜关节炎,其机制可能与葛根素通过抑制TAK1/TLR4/NF- κ B信号通路,下调相关炎症因子的表达有关。提示葛根素在RA治疗中的潜在价值,为其临床转化应用提供了实验依据,并为优化RA治疗策略提供了新思路。

本研究针对分子靶点的选择及信号通路的探索进行了创新,但局限于单一路径的聚焦,且实验方法的选择仍延续了前人经验,仍有一定滞后性。在后续研究中,我们将结合前沿技术和跨学科方法,通过多维度优化,重视多通路协同机制的解析,系统揭示葛根素的抗RA机制,对TAK1靶向机制进行深度验证,以提升研究的完整性和临床价值,为丰富葛根素的研究提供理论基础和科学依据,为中医药现代化提供更坚实的科学支撑。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] 高志, 吴傲, 胡仲翔, 等. 类风湿性关节炎中氧化应激与免疫浸润的生物信息学分析[J]. 南方医科大学学报, 2025, 45(04): 862-70.
- [2] 姜海昆, 芦鸿雁, 段吉隆, 等. 类风湿关节炎病人健康素养的研究进展[J]. 护理研究, 2025, 39(7): 1221-5.
- [3] 王洋洋, 徐媛, 苑功名, 等. 类风湿关节炎骨破坏及其针灸治疗的骨免疫学机制研究现状[J]. 山东中医杂志, 2022, 41(3): 343-7.
- [4] 祝静, 晏波, 蒋瑶, 等. 女性类风湿关节炎患者 miR-146a, miR-23b 的表达及雌激素对其的影响[J]. 川北医学院学报, 2020, 35(4): 637-41.
- [5] Wijdeven RH, Janssen H, Nahidiazar L, et al. Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11808.
- [6] Jiang LQ, Zhang RD, Musonye HA, et al. Hormonal and reproductive factors in relation to the risk of rheumatoid arthritis in women: a prospective cohort study with 223 526 participants[J]. RMD Open, 2024, 10(1): e003338.
- [7] Scameo SA, Eibschutz LS, Bendele PJ, et al. Pharmacological inhibition of TAK1, with the selective inhibitor takinib, alleviates clinical manifestation of arthritis in CIA mice[J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1): 292.
- [8] Jo S, Samarpita S, Lee JS, et al. 8-Shogaol inhibits rheumatoid arthritis through targeting TAK1[J]. Pharmacol Res, 2022, 178: 106176.
- [9] Li X, Li M. Erratum: Estrogen downregulates TAK1 expression in human fibroblast-like synoviocytes and in a rheumatoid arthritis model[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(3): 225.
- [10] Xu YR, Lei CQ. TAK1-TABs complex: a central signalosome in inflammatory responses[J]. Front Immunol, 2020, 11: 608976.
- [11] Bao Y, Sun YW, Ji J, et al. Genkwanin ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats through inhibiting JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways[J]. Phytomedicine, 2019, 63: 153036.
- [12] Li L, Pan Z, Ning D, et al. Rosmanol and carnosol synergistically alleviate rheumatoid arthritis through inhibiting TLR4/NF- κ B/ MAPK pathway[J]. Molecules, 2021, 27(1): 78.
- [13] 胡丹东, 崔玉娟, 张继. 亚油酸通过调节 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻大鼠类风湿关节炎[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(9): 1213-8.
- [14] Wi SM, Moon G, Kim J, et al. TAK1-ECSIT-TRAF6 complex plays a key role in the TLR4 signal to activate NF- κ B[J]. J Biol Chem, 2014, 289(51): 35205-14.
- [15] 李朝霞, 高鲁, 张晓峰, 等. 铁死亡在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(6): 889-94.
- [16] Cush JJ. Rheumatoid arthritis: early diagnosis and treatment[J]. Med Clin North Am, 2021, 105(2): 355-65.
- [17] Tian X, Wang Q, Li M, et al. 2018 Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Immunol Res, 2021, 2(1): 1-14.
- [18] 禄成龙, 宫玉锁, 刘建平, 等. 中医药介导 OPG/RANK/RANKL 信号通路防治类风湿性关节炎的研究进展[J]. 数理医药学杂志, 2023, 36(9): 697-707.
- [19] 宋泽冲, 照日格图. 中医药治疗类风湿性关节炎研究进展[J]. 新疆中医药, 2021, 39(1): 113-6.
- [20] 孟晓伟, 郭风梅, 王倩倩, 等. 葛根素的药理作用研究进展[J/OL]. 中国中药杂志, 2025, 50(11): 2954-68.
- [21] Sun J, Liu Y, Zhang J, et al. Puerarin attenuates insulin resistance by inhibiting endoplasmic reticulum stress and suppresses inflammation by modulating the JNK and IKK β /NF- κ B pathways in epididymal white adipose tissue of mice on a high-fat diet[J]. Mol Nutr Food Res, 2024, 68(16): e2400003.
- [22] 杨占华, 郝连升, 张建新. 葛根素对骨质疏松大鼠氧化应激反应、骨代谢和骨密度的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3): 413-7.
- [23] Chakraborty D, Gupta K, Biswas S. A mechanistic insight of phytoestrogens used for Rheumatoid arthritis: an evidence-based review[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111039.
- [24] 祁琳, 李新敏, 张玲玲, 等. 葛根素对成人成骨样 MG-63 细胞 OPG、RANKL 表达的调节作用[J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2020, 29(2): 1-6.
- [25] 高月, 唐芳, 马武开, 等. 基于网络药理学和动物实验探讨葛根素治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(1): 22-31.
- [26] Zhao Y, Wu J, Liu X, et al. Decoding nature: multi-target anti-inflammatory mechanisms of natural products in the TLR4/NF- κ B pathway[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1467193.
- [27] Wang C, Wang W, Jin X, et al. Puerarin attenuates inflammation and oxidation in mice with collagen antibody-induced arthritis via TLR4/NF- κ B signaling[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(2): 1365-70.
- [28] Zhang Y, Yan M, Yu QF, et al. Puerarin prevents LPS-induced osteoclast formation and bone loss via inhibition of Akt activation[J]. Biol Pharm Bull, 2016, 39(12): 2028-35.
- [29] 梁俊晖, 张常娥. 葛根素对骨性关节炎模型兔的作用机制研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(20): 2884-6.
- [30] 宋锡国, 苑文杰, 肖淑卿, 等. 葛根素治疗类风湿性关节炎的应用及临床有效性探究[J]. 东方药膳, 2021, (015): 206.
- [31] 高远, 李冀, 韩东卫, 等. 基于 TLR4/NF- κ B 炎性轴的白芥子经皮给药对类风湿性关节炎大鼠调控机制研究[J]. 中医药学报, 2023, 51(8): 17-22.
- [32] Hu ZJ, Chen D, Yan PH, et al. Puerarin suppresses macrophage M1 polarization to alleviate renal inflammatory injury through antagonizing TLR4/MyD88-mediated NF- κ B p65 and JNK/FoxO1 activation[J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155813.
- [33] Xie W, Li H, Yu T, et al. Design and synthesis of hederagenin derivatives for the treatment of sepsis by targeting TAK1 and regulating the TAK1-NF- κ B/ MAPK signaling[J]. J Med Chem, 2025, 68(3): 2694-719.
- [34] 杨丽萍, 张国用, 周人杰, 等. 葛根素通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对心力衰竭大鼠心肌炎症反应的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(5): 1042-7.
- [35] Wang W, Pang C, Zhang J, et al. Takinib inhibits microglial M1 polarization and oxidative damage after subarachnoid hemorrhage by targeting TAK1-dependent NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1266315.
- [36] 王丹姝, 燕柳艳, 孙姝婵, 等. 葛根素通过 TLR4/Myd88/NF- κ B 抑制 NLRP3 炎症小体抗大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 药理学报, 2021, 56(5): 1343-51.
- [37] Ke LQ, He QF, Qu J, et al. Bone-protective effects of neutralizing angiotensin-like protein 4 monoclonal antibody in rheumatoid

- arthritis[J]. *Mol Ther*, 2024, 32(12): 4497-513.
- [38] 杨豫正, 姚晓玲, 罗 丰, 等. 雷公藤治疗类风湿关节炎作用机制的生物信息学分析及实验验证[J]. *中医杂志*, 2025, 66(7): 724-33.
- [39] 许林帅, 常 岑, 时一鸣, 等. 雷公藤及其有效成分治疗类风湿性关节炎的研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(5): 91-5.
- [40] 张 依, 王晓月, 丁子禾, 等. 中药配伍雷公藤制剂治疗类风湿关节炎的安全性系统评价及其增效减毒网络调控机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(5): 1-8.
- [41] 田赵威, 刘晨风, 王 琛. 葛根素在重大慢性疾病临床应用中的探索研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(3): 522-9.
- [42] 赵欣磊, 王建国, 刘有才, 等. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨葛根素治疗绝经后骨质疏松症大鼠的作用机制[J]. *包头医学院学报*, 2025, 41(1): 25-31.
- [43] Mihaly SR, Ninomiya-Tsuji J, Morioka S. TAK1 control of cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(11): 1667-76.
- [44] Scarneo S, Zhang X, Wang Y, et al. Transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1) mediates chronic pain and cytokine production in mouse models of inflammatory, neuropathic, and primary pain [J]. *J Pain*, 2023, 24(9): 1633-44.
- [45] Yang J, Li Y, Wang L, et al. LncRNA H19 aggravates TNF- α -induced inflammatory injury via TAK1 pathway in MH7A cells [J]. *Biofactors*, 2020, 46(5): 813-20.
- [46] 莫选荣, 谢江文, 吕国菊, 等. TAK1 基因沉默对 TNF- α 诱导的滑膜细胞 IL-6、IL-8 表达的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33(5): 471-5.
- [47] Freeze R, Yang KW, Haystead T, et al. Delineation of the distinct inflammatory signaling roles of TAK1 and JAK1/3 in the CIA model of rheumatoid arthritis [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2023, 11(4): e01124.
- [48] Xia ZB, Meng FR, Fang YX, et al. Inhibition of NF- κ B signaling pathway induces apoptosis and suppresses proliferation and angiogenesis of human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis [J]. *Medicine: Baltimore*, 2018, 97(23): e10920.
- [49] Maracle CX, Kucharzewska P, Helder B, et al. Targeting non-canonical nuclear factor- κ B signalling attenuates neovascularization in a novel 3D model of rheumatoid arthritis synovial angiogenesis [J]. *Rheumatology: Oxford*, 2017, 56(2): 294-302.
- [50] Noort AR, Tak PP, Tas SW. Non-canonical NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis: Dr Jekyll and Mr Hyde [J]? *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 15.
- [51] Wang Q, Zhou X, Zhao Y, et al. Polyphyllin I ameliorates collagen-induced arthritis by suppressing the inflammation response in macrophages through the NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2091.
- [52] 单佳铃, 程虹毓, 文 乐, 等. TLR/MyD 88/NF- κ B 信号通路参与不同疾病作用机制研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(4): 451-5.

(编辑:余诗诗)