

豨莶丸治疗类风湿关节炎的分子机制:基于蛋白质组学

李亚辉¹, 杨欣^{2,4}, 姚血明³, 黄聪^{2,3}

贵州中医药大学¹信息工程学院,²基础医学院,³第二附属医院, 贵州 贵阳 550025;⁴贵州省高等学校中药(民族药)药性与效应研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025

摘要:目的 基于蛋白质组学分析豨莶丸(XXW)治疗类风湿关节炎(RA)的分子机制。方法 复制大鼠胶原诱导关节炎模型,48只大鼠适应环境后随机分为6组(8只/组),造模成功2周后灌胃豨莶丸进行干预,豨莶丸低、中、高剂量换算后灌胃给药分别为200、400、800 mg/kg,雷公藤多苷片(LGTDGP)9 mg/kg,1次/d。正常对照组和模型对照组灌胃等体积1%羧甲基纤维素钠,连续灌胃给药3周。采用ELISA试剂盒测定大鼠血清中IL-10、IL-6、TNF- α 的含量。基于串联质谱标签(TMT)技术筛选豨莶丸高剂量组与模型组间的差异表达蛋白,通过R软件分析核心靶标及信号通路。基于ggplot2、tidyverse等数据处理与可视化包,对免疫细胞浸润数据及相关基因表达数据进行整合处理,计算核心靶点与各类免疫细胞(如T细胞、B细胞、巨噬细胞等)的相关性。采用免疫组化和免疫荧光验证核心靶点的表达情况。结果 与正常对照组比较,模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-6的含量明显升高($P<0.01$),IL-10含量降低($P<0.01$);与模型组比较,雷公藤多苷片、豨莶丸高剂量、中剂量组大鼠血清中TNF- α 、IL-6的含量降低($P<0.01$, $P<0.05$),IL-10含量增加($P<0.05$, $P<0.01$)。蛋白质组学分析发现模型组和豨莶丸高剂量组交集出160个差异蛋白,趋化因子(CCL5),信号转导与转录激活因子1(STAT1),颗粒酶B(GZMB)和白介素7受体(IL7R)为核心靶点。CCL5、STAT1的ROC曲线下面积大于0.9。4个核心靶点(CCL5、STAT1、GZMB、IL7R)与中央记忆CD4 T细胞、效应记忆CD4 T细胞、骨髓源性抑制细胞等呈正相关($P<0.05$)。免疫组化及免疫荧光分析发现,与空白对照组比较,模型组大鼠踝关节中CCL5、STAT1蛋白表达水平升高($P<0.01$);与模型组比较,经豨莶丸治疗后CCL5、STAT1蛋白表达水平降低($P<0.01$)。结论 豨莶丸对CIA大鼠具有关节保护作用,通过降低血清中促炎因子IL-6、TNF- α 的含量,同时升高抗炎因子IL-10的水平,减轻炎症反应,其机制与调控CCL5、STAT1等蛋白的表达相关。

关键词:豨莶丸;类风湿关节炎;蛋白质组学;免疫细胞浸润

Molecular mechanism of Xixian Pills for improving rheumatoid arthritis in rats: a proteomic analysis

LI Yahui¹, YANG Xin^{2,4}, YAO Xueming³, HUANG Cong^{2,3}

¹School of Information Engineering, ²School of Basic Medicine, ³Second Affiliated Hospital, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; ⁴Key Laboratory of Properties and Effects of Traditional Chinese Medicine (Ethnic Medicine) of Guizhou Province, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To analyze the molecular mechanism of Xixian Pills for treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Forty-eight rats were randomized into 6 groups ($n=8$), including a normal control group, a collagen-induced arthritis (CIA) model group, 3 Xixian Pills treatment (200, 400 and 800 mg/kg) groups, and a Tripterygium glycosides tablet (TGT) treatment group. In the latter 4 groups, the rats were treated with daily gavage of Xixian Pills or TGT 2 weeks after CIA modeling for 3 consecutive weeks. The differentially expressed proteins in high-dose Xixian Pills group and the model group compared with the normal control group were screened based on the tandem mass spectrometry tag (TMT) technology, and the core targets and signaling pathways were analyzed. The immune cell infiltration and gene expression data were analyzed using ggplot2 and tidyverse packages, and the correlation coefficients between the core targets and the immune cells were calculated. **Results** The CIA rats showed significantly increased serum levels of TNF- α and IL-6 and lowered serum IL-10 level. Treatments with high- and medium-dose Xixian Pills and TGT all significantly reduced serum TNF- α and IL-6 and increased IL-10 levels in CIA rats. Proteomic analysis identified 160 differential proteins between the model group and high-dose Xixian Pills group, and the core targets included CCL5, STAT1, GZMB and IL7R. The areas under the ROC curve of CCL5 and STAT1 were both greater than 0.9. Immunohistochemical and immunofluorescence staining revealed increased levels of CCL5 and STAT1 in the ankle joints of CIA rats, which were significantly decreased after treatment with Xixian Pills. **Conclusion** Treatment with Xixian Pills offers protection of the joints in CIA rats possibly by inhibiting joint inflammation via regulating protein expressions of CCL5 and STAT1.

Keywords: Xixian Pills; rheumatoid arthritis; proteomics; immune cell infiltration

收稿日期:2025-03-05

基金项目:贵州省科技厅贵州省基础研究计划项目(黔科合基础-ZK[2024]一般358);贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目(贵中医TD合字[2022]004号)

作者简介:李亚辉,博士,讲师,E-mail: 3844639309@qq.com

通信作者:杨欣,博士,教授,硕士生导师,E-mail: 25066640@qq.com

类风湿关节炎(RA)作为一种常见的关节疾病,其患病率在不同地区呈现出较大差异。据研究显示,全球范围内该病的总体发病率为0.5%~1.0%^[1]。在我国大陆地区,其发病率为0.42%,且存在明显的性别差异,男性患病率远低于女性。同时,RA可发生于任何年龄段,并且患病率会随着年龄的增长而增加,发病率与年龄呈

正相关^[2]。Safiri等^[3]研究了1990~2017年195个国家的RA情况,从性别、年龄、社会人口指数等多维度分析了患病率、发病率及伤残调整生命年的水平与变化趋势,发现年龄标准化的患病率和发病率呈上升态势,加拿大、巴拉圭、危地马拉等国尤为明显。目前,RA已成为一项重大的全球公共卫生挑战。部分患者病情进展迅速,在发病后的2年内,关节周围会出现不可逆性损伤,这使得该病具有较高的致残率和死亡率,给患者家庭乃至整个社会都带来了沉重的负担^[4,5]。

串联质量标签(TMT)技术是当前应用最广泛的定量方法之一^[6]。该技术在多个研究领域具有重要应用价值,其可以用于筛选和验证候选药物靶点,快速识别不同表达的蛋白质,发现潜在的治疗靶点^[7];可以用于药物作用机制的研究,通过比较药物处理组和对照组的蛋白质表达差异,揭示药物的作用机理;可以帮助评估药物的安全性和药效,为药物研发提供重要依据^[9]。

中药具有整体调节、多靶点作用的独特优势,在RA的干预机制研究领域日益深入,为临床治疗提供了新思路。豨莶丸(XXW)作为一味经典的中药制剂,仅由单味豨莶草加工制成,其药用价值在历代医籍中均有记载,具有显著的祛风除湿、通痹止痛、健体强身之效^[9,10]。本研究基于TMT定量蛋白质组学分析豨莶丸治疗RA

的分子机制。将围绕“模型复制→分子机制解析→多学科交叉验证”的逻辑主线,通过体内实验,结合免疫组化、免疫荧光等技术,探讨豨莶丸治疗RA的信号通路及核心靶点,为临床应用豨莶丸防治RA提供科学依据,进一步促进豨莶丸及其活性成分的研发应用,是一项十分有意义的创新性尝试。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康SD大鼠48只(雄性,180±20 g),由贵州中医药大学实验动物研究所提供《SYXK(黔)2021-0005》,经贵州中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号:20250523003)。

1.1.2 主要试剂与药物 甲酸(Thermo Fisher Scientific); BCA定量试剂盒; SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(碧云天); Trypsin (Promega); 二巯苏糖醇(DTT, Sigma); TMT 6plex Isobaric Mass Tag Labeling kit (Thermo Fisher Scientific)。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)ELISA试剂盒购自深圳子科生物科技有限公司。豨莶丸(江西民济药业有限公司,9 g/丸)

1.1.3 主要仪器 实验所需要的仪器设备见表1。

表1 实验仪器设备及其来源

Tab.1 Experimental instruments and equipment and their sources

Experimental equipment	Model	Company
Nanoscale liquid chromatography instrument	EASY-nLC	Thermo fisher scientific
Ultrasonic disrupter	JY96-IIN	Ningbo xinzhi
Low-temperature high-speed centrifuge	5430R	Eppendorf
Vortex oscillator	G-560E	Scientific industries
Thermostatic incubator	GNP-9080	Shanghai jinghong
Mass spectrometer	Orbitrap Exploris 480	Thermo fisher scientific
Vacuum centrifuge concentrator	LNG-T98	Taicang huamei
Ultraviolet spectrophotometer	260 Bio	Thermo fisher scientific
High-performance liquid chromatography	1260 infinity II	Agilent technologies, inc.
Nano Drop	ND3000	Thermo fisher scientific

1.2 方法

1.2.1 复制模型及给药 48只大鼠适应环境后随机分为6组(豨莶丸高、中、低剂量组、雷公藤多苷片组、正常对照组和模型对照组,8只/组),按照文献复制大鼠胶原诱导关节炎(CIA)模型^[11,12]。造模成功2周后开始药物干预,豨莶丸低、中、高剂量换算后灌胃给药分别为200、400、800 mg/kg^[13],雷公藤多苷片(LGTDGP)9 mg/kg,1次/d。正常对照组和模型对照组灌胃等体积1%羧甲基纤维素钠,连续灌胃给药3周。

1.2.2 踝关节肿胀度测量 给药第0天及第21天,用游标卡尺测量每组大鼠右侧踝关节周长,并称量大鼠体质量。踝关节的肿胀度:周长(cm)/体质量(g)的比值。

1.2.3 病理组织学分析 实验结束后,腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血。取大鼠踝关节浸入4%多聚甲醛中固定24 h,固定完成后,依次进行脱钙处理,待组织硬度适宜后进行石蜡包埋,制作切片。在光学显微镜下观察踝关节病理组织学变化。

1.2.4 血清相关细胞因子水平检测 腹主动脉取血, 静置 30 min, 4 °C 离心机 4000 r/min 离心 30 min, 分离出上层血清, 置 -80 °C 冰箱保存备用。使用 ELISA 试剂盒检测 IL-10、IL-6、TNF- α 细胞因子的含量。TNF- α 的检测范围为 10 pg/mL~320 pg/mL, IL-6 的检测范围为 5 pg/mL~160 pg/mL, IL-10 检测范围为 12.5 pg/mL~400 pg/mL。

1.2.5 蛋白定性定量分析 取适量样本溶解后, 精确称取 100 mg 进行胰蛋白酶消化处理。按照 TMT 标记试剂盒说明书的操作步骤进行标记^[14, 15]。标记完成并混合后的肽段, 采用 Agilent 1260 Infinity II HPLC 系统进行分级。每份样品通过纳升流速 Easy nLC 系统实现分离, 所用缓冲液配置如下: A 液为含 0.1% 甲酸的水溶液, B 液为含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈水溶液。分离梯度设置具体为: 0~3 min, B 液占比维持 6%; 3~45 min, B 液占比从 6% 线性提升至 28%; 45~50 min, B 液占比从 28% 线性提升至 38%; 55~60 min, B 液占比保持 100%。实验所用数据库为 Rattus_norvegicus_10116。

1.2.6 核心靶点筛选 通过 STRING(<https://string-db.org/>)和 Cytoscape(<https://cytoscape.org/>)联合分析差异蛋白相互作用, 基于 STRING 数据库检索差异蛋白间潜在的相互作用, 并构建蛋白质相互作用网络, 明确差异蛋白之间的相关性。利用 Cytoscape 输出核心靶点^[16]。

1.2.7 核心靶点 ROC 分析 从标准化表达矩阵中获取 CCL5、STAT1、GZMB 和 IL7R 基因的表达情况, 绘制 ROC 曲线并进行分析, 计算 ROC 曲线下面积(AUC), 评估 CCL5、STAT1、GZMB 和 IL7R 基因用于 RA 诊断的价值。

1.2.8 免疫组化检测大鼠踝关节 CCL5 和 STAT1 表达 免疫组化检测大鼠踝关节 CCL5 和 STAT1 的表达。每个样品封闭 20 min 后分别加稀释好的一抗, 4 °C 过夜孵育, PBS 冲洗, 加入稀释的二抗。阳性细胞染色程度评分: 未染色(阴性)为 0 分, 淡黄色(弱阳性)为 1 分、棕黄色(阳性)为 2 分、棕褐色(强阳性)为 3 分。阳性细胞计分: 无阳性细胞为 0 分, 1%~10% 阳性细胞为 1 分、11%~

50% 阳性细胞为 2 分, 51%~80% 阳性细胞为 3 分, >80% 阳性细胞为 4 分。免疫组化染色结果为阳性细胞染色程度评分与阳性细胞计分的乘积。

1.2.9 免疫荧光检测大鼠踝关节 CCL5 和 STAT1 蛋白阳性表达 踝关节组织用 4% 多聚甲醛进行固定, 将一抗 CCL5 和 STAT1 按照一定比例稀释(1:200), 4 °C 孵育过夜。二抗室温孵育 50 min, 显色、复染、封片等。选择合适的荧光通道观察 CCL5 和 STAT1 的染色情况, 随机选取 5 个不重叠的高倍视野进行拍照。采用 Image J 软件对所拍图像进行分析, 计算 CCL5 和 STAT1 的荧光强度(积分光密度值, IOD)和平均光密度(AOD), 以此量化分析 CCL5 和 STAT1 的表达水平。

1.2.10 核心靶点与免疫细胞的相关性分析 使用 R 语言(R4.3.0), 基于 ggplot2、tidyverse 及 ggExtra 包, 绘制 CCL5、STAT1、GZMB 和 IL17R 与免疫细胞的相关性可视化图。输入免疫细胞浸润结果文件、训练数据集风险文件, 去除正常对照组样本^[17]。横坐标代表相关的免疫特征基因, 纵坐标代表免疫细胞类型, 模块中颜色深浅代表该免疫特征基因与免疫细胞间的相关性的强弱。

1.3 统计学分析

数据分析采用 SPSS 统计软件。符合正态分布的数据以均数 \pm 标准差呈现, 多组间的比较采用单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时, 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠踝关节肿胀度及相关细胞因子检测

表 2 结果显示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠踝关节肿胀度增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 雷公藤多苷片(LGTDGP)、豨薟丸高剂量组(XXW-H)、中剂量组(XXW-M)大鼠踝关节肿胀度降低 ($P < 0.01, P < 0.05$); 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 的含量明显升高 ($P < 0.01$), IL-10 含量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, LGTDGP、XXW-H 和 XXW-M 的 TNF- α 、IL-6 的含量降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), IL-10 含量增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 踝关节肿胀度、炎症因子水平

Tab.2 Ankle joint swelling degree and inflammatory factor levels in the rats in different groups

Group	Ankle joint swelling degree	TNF- α (pg/L)	IL-6 (pg/L)	IL-10 (pg/L)
Control	0.229 \pm 0.016	54.86 \pm 7.4	38.94 \pm 8.6	55.32 \pm 3.6
Model	0.364 \pm 0.012**	144.68 \pm 10.2**	77.34 \pm 12.4**	22.62 \pm 6.1**
LGTDGP	0.243 \pm 0.015 ^{##}	62.32 \pm 10.3 ^{##}	45.63 \pm 11.3 ^{##}	46.24 \pm 7.6 [#]
XXW-H	0.268 \pm 0.017 ^{##}	70.24 \pm 9.6 ^{##}	55.24 \pm 7.7 ^{##}	47.35 \pm 5.8 ^{##}
XXW-M	0.291 \pm 0.016 [#]	98.63 \pm 12.4 [#]	59.24 \pm 14.3 [#]	38.36 \pm 8.7 [#]
XXW-L	0.324 \pm 0.021	125.34 \pm 18.9	69.34 \pm 9.7	30.24 \pm 9.6

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

2.2 大鼠踝关节组织病理学分析

正常大鼠踝关节结构正常,无炎性细胞浸润,滑膜细胞排列整齐,软骨表面光滑,关节腔内未见渗出液(图1);与正常对照组比较,模型组大鼠关节破坏明显,

周围大量中性粒细胞浸润,滑膜增生肥厚,纤维组织增生,软骨及骨骼损伤(图1)。LGTDGP、XXW-H和XXW-M病理改变明显(图1),炎细胞减少,血管增生减轻,稀莪丸低剂量组病理改变不明显(图1)。

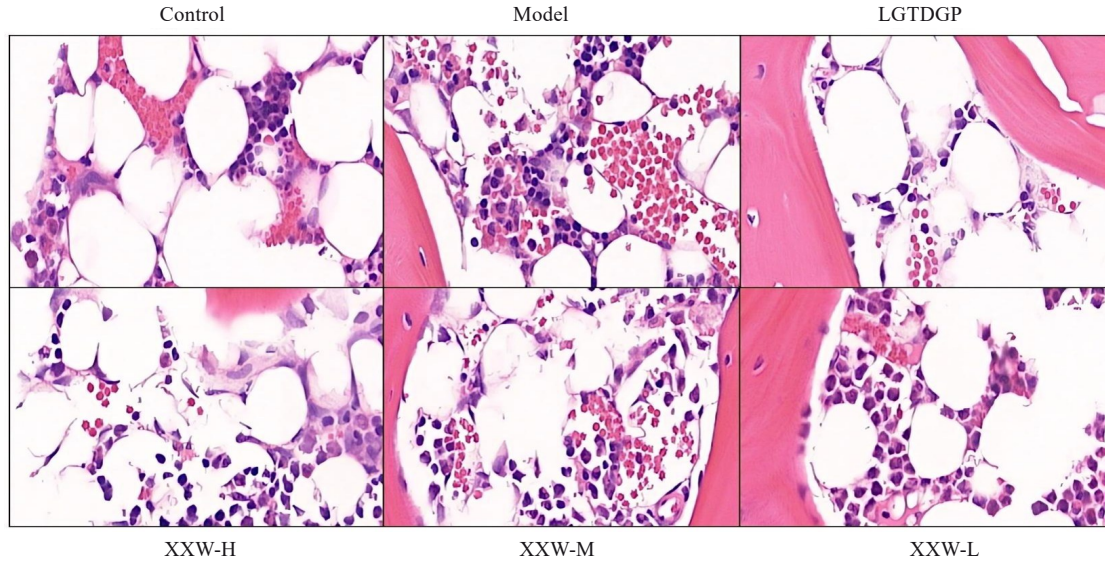


图1 HE染色观察各大鼠踝关节组织病理学变化

Fig.1 Histopathological changes of the ankle joint tissues of the rats (HE staining, original magnification: ×100).

2.3 差异表达蛋白及核心靶点分析

基于TMT鉴定结果,选择蛋白丰度改变倍数>1.2或<0.8, $P < 0.05$ 的蛋白为差异蛋白(图2A)。与正常对照组比较,模型组鉴定出346个差异蛋白;与模型组比较,给予XXW-H干预后,鉴定出287个差异蛋白。模型

组和XXW-H组共同交集出160个差异蛋白,其中98个差异蛋白高表达,62个差异蛋白低表达(图2B)。通过对160个差异蛋白进行相互作用分析,发现趋化因子(CCL5),信号转导与转录激活因子1(STAT1),颗粒酶B(GZMB)和白介素7受体(IL7R)为核心靶点(图2C)。

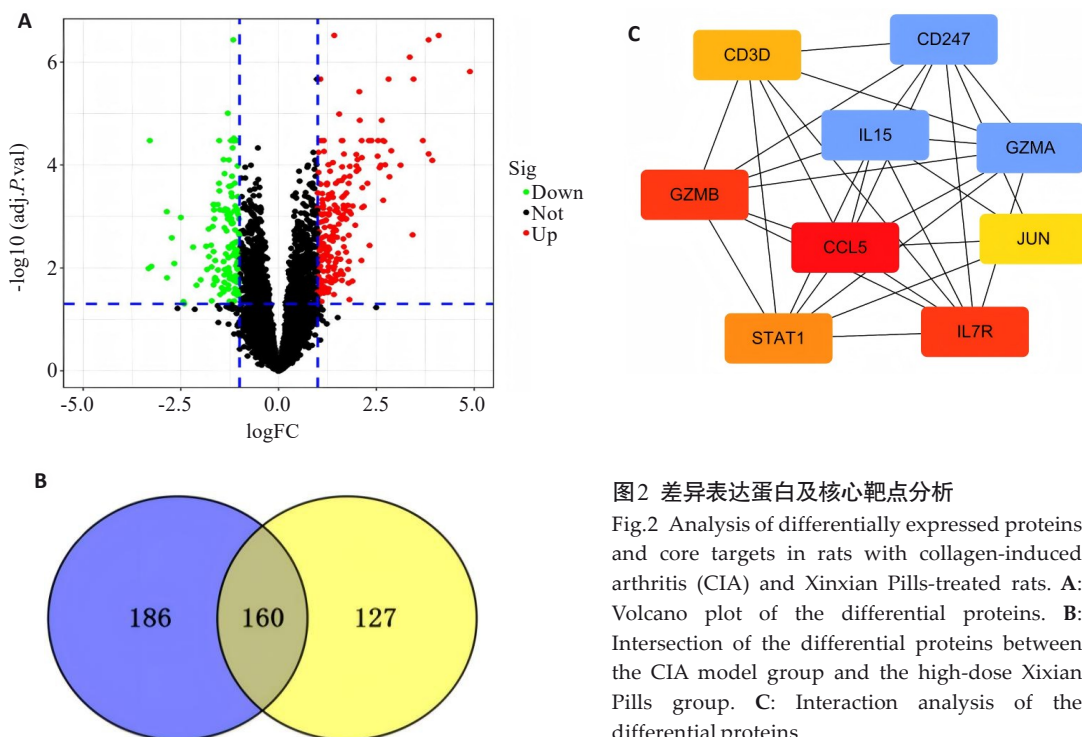


图2 差异表达蛋白及核心靶点分析

Fig.2 Analysis of differentially expressed proteins and core targets in rats with collagen-induced arthritis (CIA) and Xixian Pills-treated rats. A: Volcano plot of the differential proteins. B: Intersection of the differential proteins between the CIA model group and the high-dose Xixian Pills group. C: Interaction analysis of the differential proteins.

2.4 通路分析

160个差异蛋白主要参与56条信号通路($P \leq 0.01$), 输出前10条信号通路,其中与RA相关的通路主要为辅

助性T细胞17(Th17)细胞分化、破骨细胞分化、Th1和Th2细胞分化等(表3)。

表3 差异基因通路分析

Tab.3 Differential gene pathway analysis

NO.	Path name	Gene count	P	FDR
1	Primary immunodeficiency	9	2.57E-10	3.62E-08
2	Hematopoietic cell lineage	11	1.34E-08	9.43E-07
3	Cytokine-cytokine receptor interaction	17	3.06E-08	1.18E-06
4	Th17 cell differentiation	11	3.33E-08	1.18E-06
5	Epstein-Barr virus infection	14	5.84E-08	1.65E-06
6	Osteoclast differentiation	11	5.47E-07	1.29E-05
7	Th1 and Th2 cell differentiation	9	9.08E-07	1.83E-05
8	Human T-cell leukemia virus 1 infection	13	1.24E-06	2.19E-05
9	Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	8	1.57E-05	0.0002
10	Breast cancer	9	6.57E-05	0.0005

2.5 差异表达基因ROC分析

从标准化表达矩阵中获取CCL5、STAT1、GZMB和IL7R基因的表达情况,绘制ROC曲线并进行分析。

CCL5、STAT1的ROC曲线下面积大于0.9;GZMB和IL7R曲线下面积大于0.8(图3)。CCL5、STAT1蛋白的表达采用免疫组化和免疫荧光进一步验证分析。

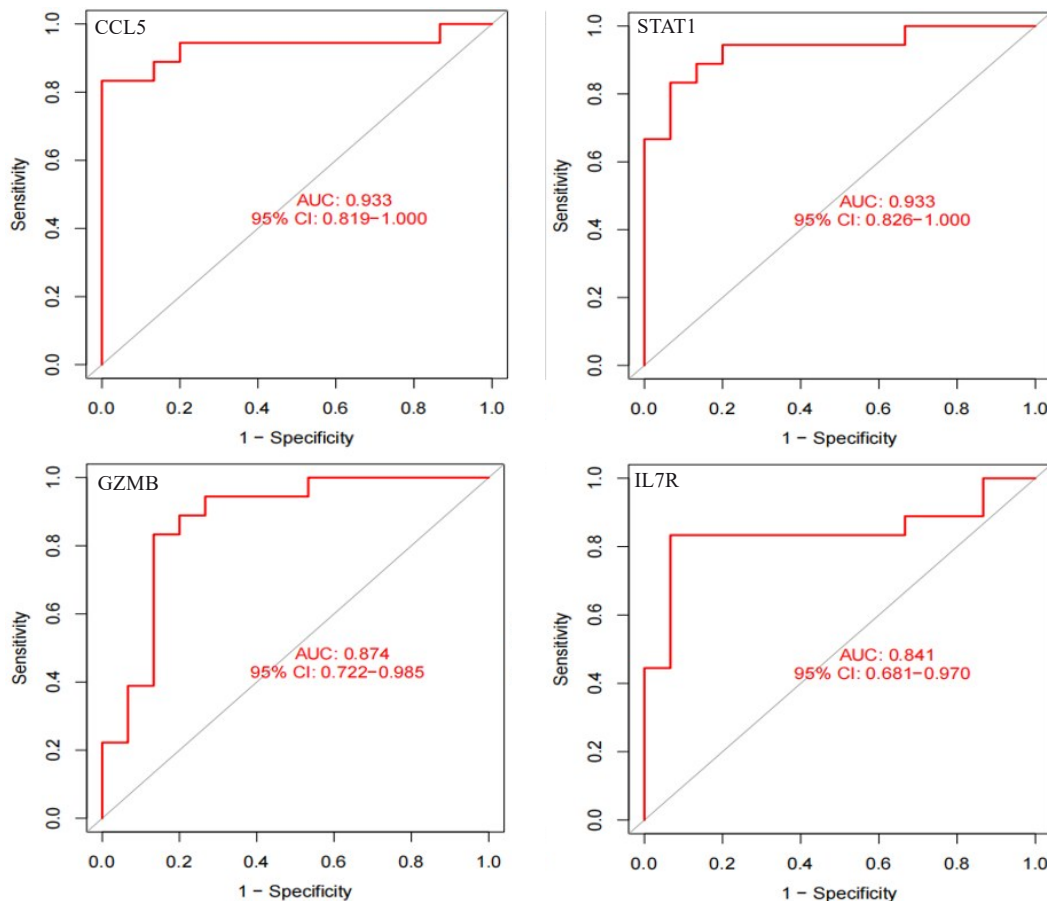


图3 CCL5、STAT1、GZMB和IL7R差异表达基因ROC分析

Fig.3 ROC analysis of the differentially expressed genes CCL5, STAT1, GZMB, and IL7R.

2.6 免疫组化检测大鼠踝关节中 CCL5 和 STAT1 蛋白表达

结果显示(表4,图4,5),与空白对照组比较,模型组大鼠踝关节中CCL5、STAT1的水平升高($P<0.01$);与模型组比较,经XXW-H和LGTDGP干预后,CCL5和STAT1的表达降低($P<0.01$)。

2.7 免疫荧光检测踝关节中 CCL5、STAT1 蛋白表达

与空白对照组比较,模型组大鼠踝关节中CCL5、

表4 CCL5、STAT1 阳性细胞记数及免疫组化评分(5个视野)
Tab.4 Counts of CCL5- and STAT1-positive cells in rat ankle joint tissues and immunohistochemical scores (5 fields)

Group	CCL5(%)	CCL5 B	STAT1(%)	STAT1 B
Control	12±3.1	1	13±3.2	1
Model	50±2.5**	3	49±2.5**	3
LGTDGP	23±2.5 [#]	2	22±2.0 [#]	2
XXW-H	30±2.5 [#]	2	33±2.5 [#]	2

** $P<0.01$ vs Control group; [#] $P<0.01$ vs Model group.

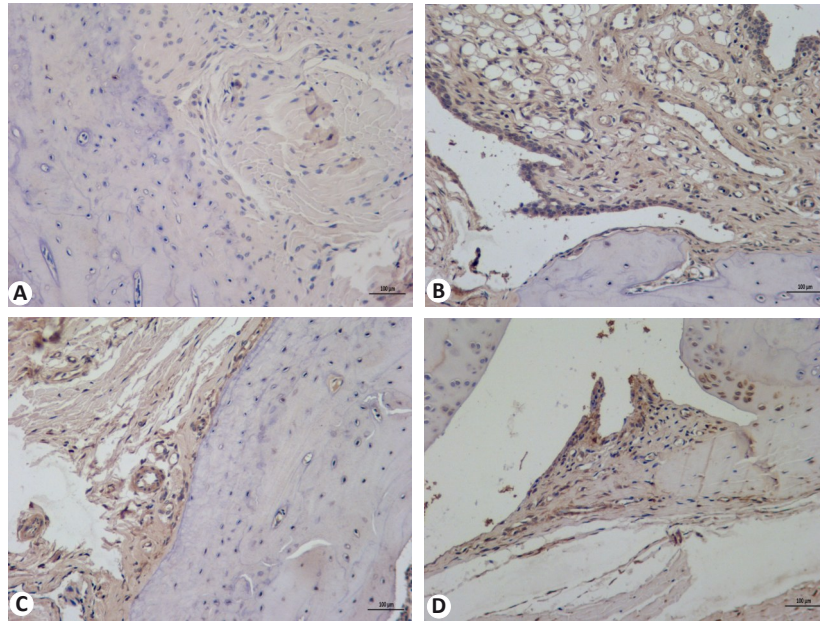


图4 各组大鼠踝关节中CCL5的表达

Fig.4 Expression of CCL5 in the ankle joints of the rats in each group (×200). A: Normal control group. B: Model group. C: Tripterygium glycosides tablet group. D: High-dose Xixian pill group.

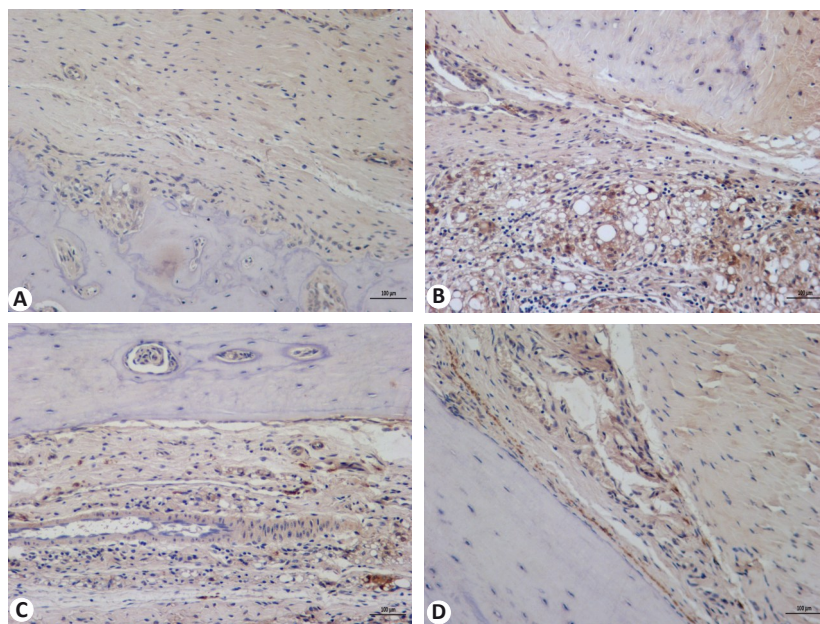


图5 各组大鼠踝关节中STAT1的表达

Fig.5 Expression of STAT1 in the ankle joints of the rats in each group (×200). A: Normal control group. B: Model group. C: Tripterygium glycosides tablet group. D: High-dose Xixian pill group.

STAT1的表达水平升高($P<0.01$);与模型组比较,经XXW-H和LGTDGP干预后,CCL5、STAT1的表达降低($P<0.01$,表5,图6、7)。

表5 CCL5、STAT1免疫荧光图像光密度分析(5个视野)

Tab.5 Optical density analysis of CCL5 and STAT1 on immunofluorescence staining images (5 fields)

Group	CCL5 (IOD)	CCL5(AOD)	STAT1 (IOD)	STAT1(AOD)
Control	2804.89±222.73	0.22±0.02	2097.43±403.42	0.17±0.03
Model	13661.38±145.47**	0.82±0.01**	12904.86±720.16**	0.78±0.05**
LGTDGP	6487.84±228.86 [#]	0.42±0.01 [#]	6693.79±120.62 [#]	0.43±0.04 [#]
XXW-H	9687.52±253.10 [#]	0.60±0.02 [#]	9398.39±624.72 [#]	0.59±0.03 [#]

** $P<0.01$ vs Control group; [#] $P<0.01$ vs Model group.

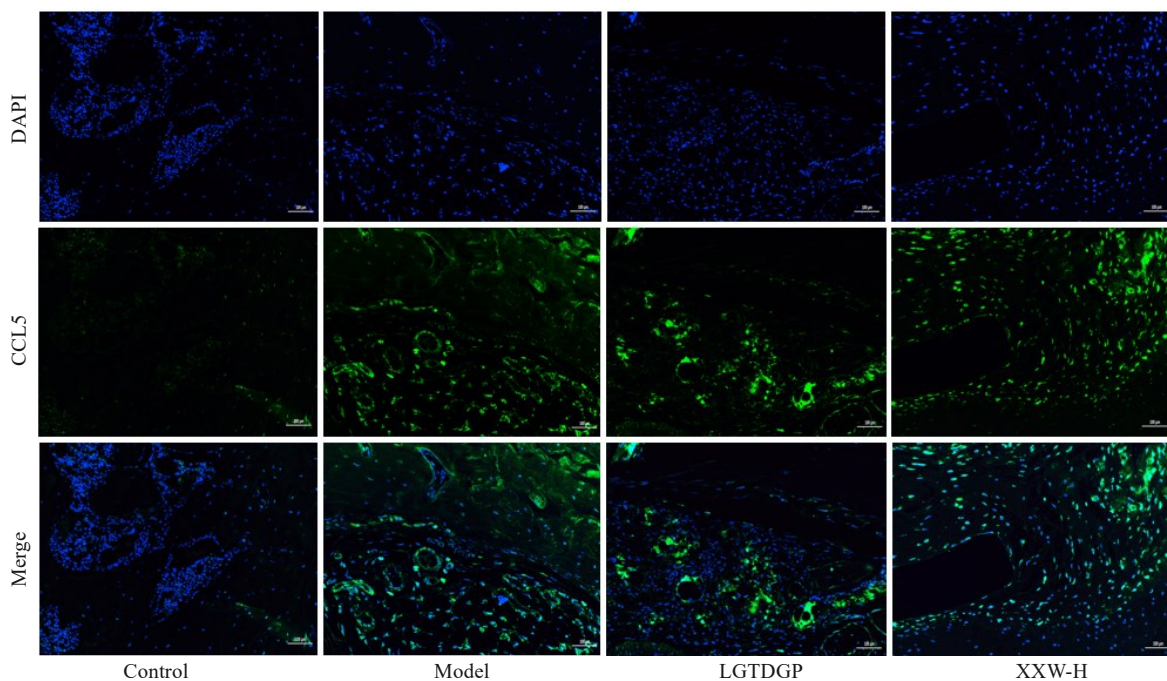


图6 免疫荧光检测大鼠踝关节组织中CCL5的表达

Fig.6 Immunofluorescence detection of CCL5 expression in rat ankle joint tissue (×200). Green fluorescence indicates CCL5, while blue fluorescence indicates the cell nucleus (Scale bar=50 μm).

2.8 差异表达基因与免疫细胞浸润之间的关系

基于R语言绘制CCL5、STAT1、GZMB和IL7R与免疫细胞的热图,纵坐标代表免疫细胞,横坐标代表CCL5、STAT1、GZMB和IL7R基因,模块中颜色代表CCL5、STAT1、GZMB和IL7R基因与免疫细胞间的相关性,发现CCL5、STAT1、GZMB和IL7R基因与多种免疫细胞相关(图8)。4个核心靶点(CCL5、STAT1、GZMB、IL7R)能同时与中央记忆CD4 T细胞、效应记忆CD4 T细胞、骨髓源性抑制细胞、调节性T细胞、效应记忆CD8 T细胞、活化的CD8 T细胞、活化的CD4 T细胞呈正相关($P<0.05$)。

3 讨论

豨薟丸作为治疗RA的潜在中药,遵循中医药辨证

施治的核心原则,充分彰显了中医药在RA治疗中整体调节、个体化干预的独特与显著优势。目前以豨薟草为成分开发的中成药豨薟通栓丸(胶囊)、豨薟风湿片(胶囊)、豨桐丸(豨薟草与臭梧桐配伍)、豨红通络口服液已经应用到临床上。豨薟草的活性成分(Phynova)对风湿性疼痛、关节和肌肉疼痛以及轻微运动损伤有益,已经获英国药品及保健品管理署(MHRA)批准发售,且现有研究表明豨薟草具有抗炎、缓解痹痛、免疫抑制等作用^[17,18]。本研究发现豨薟丸通过调节炎症因子发挥抗RA作用,TNF- α 主要涉及系统性炎症,具有广泛的生物学效应,由活化的单核细胞、巨噬细胞和T淋巴细胞产生,主要功能就是调节免疫细胞^[19]。目前以TNF- α 为靶点的生物药在自身免疫疾病中发挥作用。TNF- α 是重要的炎症介质,被认为是RA发生、发展的首要动员细

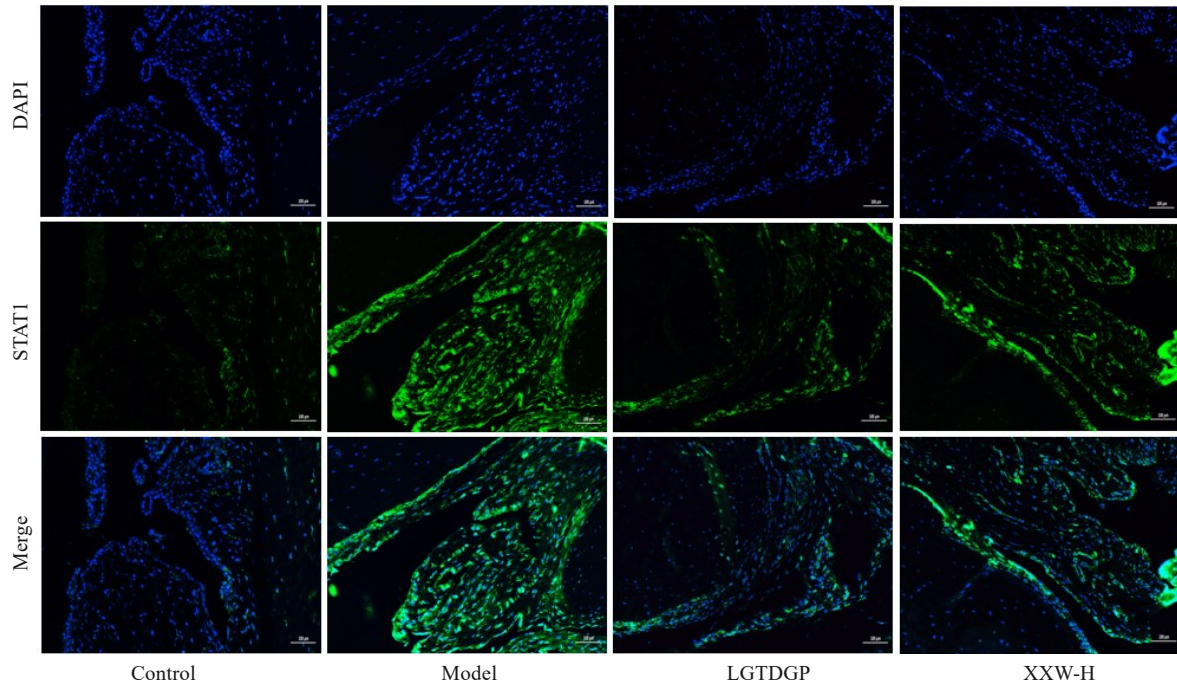


图7 免疫荧光检测大鼠踝关节组织中STAT1的表达

Fig.7 Immunofluorescence detection of STAT1 expression in rat ankle joint tissue (×200). Green fluorescence indicates STAT1, and blue fluorescence indicates the cell nucleus (Scale bar=50 μm).

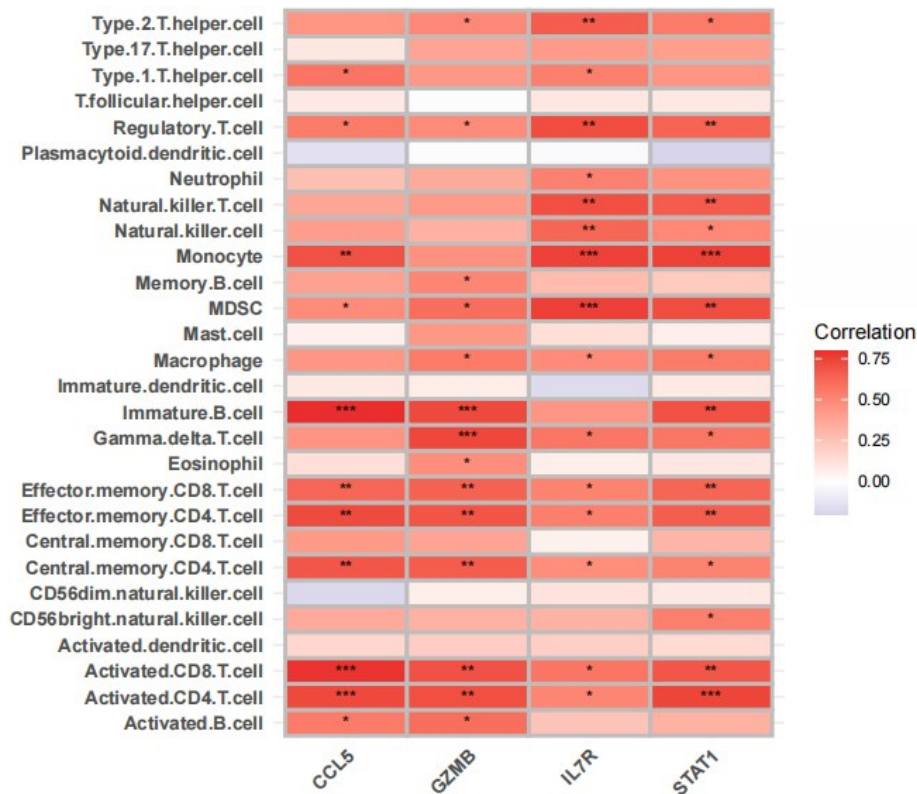


图8 核心靶点与免疫细胞浸润之间的关系

Fig.8 Relationship between the core targets and immune cell infiltration. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

胞因子,能启动并维持 RA 炎症反应,许多药物都以 TNF-α 为靶向目标进行研究;IL-6 导致 T 细胞的增殖,循环加重 RA 的炎症反应过程^[20];IL-10 具有免疫抑制及调控作用,已有研究发现 IL-10 在 RA 的治疗发挥作

用^[21]。本研究发现豨莶丸能降低大鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 的含量,升高 IL-10 的含量发挥抗炎作用,对 RA 大鼠具有保护作用。

在蛋白质组学研究中,核心靶点的发现和研究具有

重要意义,能更深入地理解细胞内蛋白质之间的相互作用和调控机制。本研究发现 160 个差异蛋白主要通过 Th17 细胞分化、破骨细胞分化、Th1 和 Th2 细胞分化信号通路参与 RA 的调节, Th17 细胞在 RA 的发生、发展中发挥着重要作用。Th17 细胞主要分泌白细胞介素-17(IL-17)、白细胞介素-22(IL-22)等促炎因子,参与 RA 的发生^[22]。通过核心靶点的筛选本研究发现豨莶丸主要调节 CCL5、STAT1、GZMB 和 IL7R 的表达治疗 RA,其中 CCL5、STAT1 的 ROC 曲线下面积大于 0.9,表明其在诊断 RA 方面具有较高价值。CCL5 是典型的炎症源性趋化因子,具有介导受体极化和定向树突状细胞、嗜碱性粒细胞等作用。CCL5 通过影响细胞免疫、体液免疫以及炎症过程在自身免疫疾病发挥着重要作用,如 RA、系统性血管炎、自身免疫性溶血性贫血^[23, 24]; IL7 是主要的促炎细胞因子,由辅助性 T 细胞(Th17)及先天性免疫细胞等分泌,在感染、自身免疫病、炎症等疾病中发挥主要作用^[25]; RA 滑膜组织中 STAT1/STAT3 被激活,导致抗凋亡分子表达上调,从而抑制细胞凋亡过程^[26]; GZMB 是一种丝氨酸蛋白酶,主要参与机体的病理过程。目前研究发现 GZMB 在 RA 中高表达, RA 的发生进展与 GZMB 的表达水平密切相关^[27, 28]。免疫细胞浸润也发现 4 个核心靶点(CCL5、STAT1、GZMB、IL7R)能同时与中央记忆 CD4 T 细胞、效应记忆 CD4 T 细胞、骨髓源性抑制细胞、效应记忆 CD8 T 细胞、活化的 CD8T 细胞、活化的 CD4 T 细胞呈正相关,进一步促进 RA 的发生、发展^[29, 30]。

综上所述,豨莶丸通过降低 CIA 大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 含量、增加 IL-10 含量发挥抗炎作用,起到对 CIA 大鼠关节的保护作用。在 ROC 曲线分析中, CCL5、STAT1 的 AUC 值大于 0.9, GZMB、IL7R 的 AUC 值大于 0.8,上述 4 个核心靶点作为 RA 的诊断标志物具有潜在价值。通过免疫组化和免疫荧光进一步验证 CCL5、STAT1 在 CIA 大鼠踝关节的表达情况。发现 CCL5、STAT1 在 CIA 大鼠踝关节中高表达,经豨莶丸治疗后表达下降。本研究已从动物实验水平为豨莶丸 RA 提供了理论依据,后续将进一步从体外实验水平展开深入分析。通过体内与体外研究的结合,有望弥补当前豨莶丸治疗 RA 作用机制研究中的不足,为其临床应用提供更全面的理论支持。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Wang GY, Zhang SL, Wang XR, et al. Remission of rheumatoid arthritis and potential determinants: a national multi-center cross-sectional survey[J]. Clin Rheumatol, 2015, 34(2): 221-30.
- [2] Jin SY, Li MT, Fang YF, et al. Chinese registry of rheumatoid

- arthritis (CREDIT): II. prevalence and risk factors of major comorbidities in Chinese patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 251.
- [3] Safiri S, Kolahi AA, Hoy D, et al. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(11): 1463-71.
- [4] Rudan I, Sidhu S, Papan A, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: a systematic review and analysis[J]. J Glob Health, 2015, 5(1): 010409.
- [5] Tsai SW, Hsieh MC, Li S, et al. Therapeutic potential of sclerolein in experimental models of rheumatoid arthritis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): E1351.
- [6] Liu XY, Dawson SL, et al. Isobaric tagging and data independent acquisition as complementary strategies for proteome profiling on an orbitrap astral mass spectrometer[J]. J Proteome Res, 2025, 24(3): 1414-24.
- [7] Burton NR, Backus KM. Functionalizing tandem mass tags for streamlining click-based quantitative chemoproteomics[J]. Commun Chem, 2024, 7(1): 80.
- [8] Huang LX, Liang L, Ji ZY, et al. Proteomics profiling of CD4⁺T-cell-derived exosomes from patients with rheumatoid arthritis[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 122: 110560.
- [9] Wang Q, Liang YY, Li KW, et al. Herba Siegesbeckiae: a review on its traditional uses, chemical constituents, pharmacological activities and clinical studies[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114117.
- [10] 胡慧华. 豨莶丸的配方优化及对实验性膝骨关节炎的药效及作用机理探讨[D]. 北京: 北京中医药大学, 2005.
- [11] 向 珊, 张宗星, 江 露, 等. 三百棒通过调控 PI3K/Akt 信号通路改善胶原诱导性类风湿性关节炎大鼠的血管翳[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(8): 1582-8.
- [12] 夏俊锋, 杨全伟, 刘新国, 等. 豨莶草对大鼠佐剂型关节炎的治疗作用及机制研究[J]. 中国药师, 2021, 24(2): 242-6.
- [13] Xiao B, Li J, Qiao Z, et al. Therapeutic effects of *Siegesbeckia orientalis* L. and its active compound luteolin in rheumatoid arthritis: network pharmacology, molecular docking and experimental validation[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116852.
- [14] 郑梓桐, 王美娟, 冯育林, 等. 基于蛋白质组学筛选关节炎相关生物标志物的研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(18): 6383-92.
- [15] Hsiao Y, Zhang HJ, Li GX, et al. Analysis and visualization of quantitative proteomics data using FragPipe-analyst[J]. J Proteome Res, 2024, 23(10): 4303-15.
- [16] Hou YW, Yang ZC, Ma JS, et al. Identification of PTPRC as a potential serum biomarker in rheumatoid arthritis using bioinformatics analysis and molecular docking[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 152: 114393.
- [17] Hu HH, Tang LX, Li XM. Experimental research of effect of crude and processed Herba Siegesbeckiae on anti-inflammation and anti-rheumatism[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2004, 29(6): 542-5.
- [18] Wang J, Cai Y, Wu Y. Antiinflammatory and analgesic activity of topical administration of *Siegesbeckia pubescens*[J]. Pak J Pharm Sci, 2008, 21(2): 89-91.
- [19] Liu JH, Qu B, Wang S, et al. Fengshi gutong capsules attenuates CIA-induced RA bone destruction in rats by targeting TNF- α inhibition: Integration and experimental validation of network

- pharmacology and proteomics[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 344: 119535.
- [20] Suda Y, Ikuta K, Hayashi S, et al. Comparison of anti-inflammatory and anti-angiogenic effects of JAK inhibitors in IL-6 and TNF- α -stimulated fibroblast-like synoviocytes derived from patients with RA[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 9736.
- [21] Peilin Z, Wenqiang W, Yongzhen L, et al. Inflammatory cytokines, metabolites, and rheumatoid arthritis[J]. *Postgrad Med J*, 2025, 101 (1194): 313-20.
- [22] Liu Y, Li L, Sun Y, et al. *Dictamnus dasycarpus* Turcz. Attenuates collagen-induced rheumatoid arthritis in DBA/1J mice through inhibiting IL-17 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 343: 119458.
- [23] Hinrichs AC, Blokland SLM, Kruize AA, et al. CCL5 release by CCR9+ CD8 T cells: a potential contributor to immunopathology of primary sjögren's syndrome[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 887972.
- [24] Alturaiqi W, Alhamad A, Alturaiqi M, et al. Assessment of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, and CCL 5 levels in newly diagnosed Saudi patients with rheumatoid arthritis[J]. *Int J Rheum Dis*, 2022, 25(9): 1013-9.
- [25] Liang Q, He L, Wang JW, et al. Targeting IL-17 and its receptors: a feasible way for natural herbal medicines to modulate fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 230: 116598.
- [26] Cacciapaglia F, Perniola S, Stano S, et al. Modulation of IL-6 receptor/STAT3 downstream signaling in rheumatoid arthritis patients[J]. *Exp Mol Pathol*, 2025, 141: 104951.
- [27] Aubert A, Liu A, Kao M, et al. Granzyme B cleaves tenascin-C to release its C-terminal domain in rheumatoid arthritis[J]. *JCI Insight*, 2024, 9(23): e181935.
- [28] Zhang Y, Cai X, Wang B, et al. Exploring the molecular mechanisms of the involvement of GZMB-Caspase-3-GSDME pathway in the progression of rheumatoid arthritis[J]. *Mol Immunol*, 2023, 161: 82-90.
- [29] Jonsson AH, Zhang F, Dunlap G, et al. Granzyme K⁺ CD8 T cells form a core population in inflamed human tissue[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(649): eabo0686.
- [30] Durham LE, Humby FC, Ng N, et al. Substantive similarities between synovial fluid and synovial tissue T cells in inflammatory arthritis *via* single-cell RNA and T cell receptor sequencing[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2024, 76(11): 1594-601.

(编辑:余诗诗)