黑沙蒿有效物质群改善类风湿性关节炎的作用机制研究Δ

呼格吉乐[1*]，王青虎[1#]，张小峰[1]，康秀荣[2]，白迎春[1]，李胡日查[1]，高明霞[1]（1.内蒙古民族大学蒙医药学院，内蒙古 通辽 028000；2.通辽职业学院药品食品系，内蒙古 通辽 028000）

中图分类号 R965；R285　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2025）13-1604-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.13.09

摘　要　目的 基于分化簇4（CD4）/淋巴细胞特异性酪氨酸激酶（LCK）/70 kDa链相关蛋白激酶（ZAP70）/白细胞介素17（IL-17）信号通路研究黑沙蒿有效物质群（简称HSH）对类风湿性关节炎（RA）的改善作用及机制。**方法** 将大鼠分为正常组、模型组和HSH低、中、高剂量组（2.7、10.8、21.6 mg/kg）以及阳性对照组（雷公藤多苷片，6.3 mg/kg），每组10只。除正常组外，其余各组大鼠采用完全弗氏佐剂诱导RA模型。造模成功后，各组大鼠灌胃相应药物或生理盐水，每天1次，连续28 d。检测大鼠踝关节肿胀度、关节炎指数；观察大鼠踝关节组织病理形态学；检测大鼠血清和关节液中炎症因子[IL-1β、IL-21、IL-17A、IL-2、γ干扰素（IFN-γ）和IL-6]水平，大鼠全血及脾脏中Th1、Th17、Treg细胞水平，大鼠踝关节滑膜中LCK、原癌基因酪氨酸蛋白激酶Fyn、ZAP70、CD45、视黄酸受体相关孤儿受体γt亚型（RORγt）、叉头框蛋白3（Foxp3）的蛋白和mRNA表达水平。**结果** 与正常组比较，模型组大鼠踝关节肿胀度，关节炎指数，血清和关节液中IL-1β、IL-21、IL-17A、IL-2、IFN-γ、IL-6水平，全血和脾脏中Th1、Th17细胞水平以及Th17/Treg值，踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt蛋白和mRNA表达水平均显著增加/升高（$P<0.05$）；脾脏中Treg细胞水平、踝关节滑膜中Foxp3蛋白和mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组和HSH各剂量组上述大部分指标水平显著逆转（$P<0.05$），踝关节组织病变程度明显改善、炎症减轻。**结论** HSH可通过调节T细胞受体信号通路中CD4/LCK/ZAP70/IL-17途径的级联反应，调节Th17/Treg平衡，从而抑制RA大鼠的炎症反应，减轻滑膜组织损伤。

关键词　黑沙蒿；有效物质群；类风湿性关节炎；CD4/LCK/ZAP70/IL-17信号通路；Th17/Treg平衡；炎症反应

Study on mechanism of the effective substance groups from *Artemisia ordosica* in ameliorating rheumatoid arthritis

Hugejile[1], WANG Qinghu[1], ZHANG Xiaofeng[1], KANG Xiurong[2], BAI Yingchun[1], Lihuricha[1], GAO Mingxia[1]（1. College of Traditional Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Inner Mongolia Tongliao 028000, China; 2. Department of Medicine and Food, Tongliao Vocational College, Inner Mongolia Tongliao 028000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the ameliorating effect and mechanism of the effective substance groups from *Artemisia ordosica* (Abbreviated as HSH) on rheumatoid arthritis (RA) based on cluster of differentiation 4/lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase/zeta-chain-associated protein kinase of 70 kDa/interleukin-17 (CD4/LCK/ZAP70/IL-17) signaling pathway. **METHODS** The rats were divided into normal group, model group, HSH low-dose, medium-dose and high-dose groups (2.7, 10.8, 21.6 mg/kg) and positive control group (Tripterygium glycosides tablet, 6.3 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for normal group, RA rat model was induced by complete Freund's adjuvant in other groups. After modeling, each group was given relevant medicine or normal saline intragastrically, once a day, for 28 consecutive days. The changes in ankle joint swelling and arthritis index in rats were determined; the pathological changes of ankle joint tissue were observed; the levels of inflammatory factors [IL-1β, IL-21, IL-17A, IL-2, interferon-γ (IFN-γ) and IL-6] in serum and joint fluid of rats were determined; the levels of Th1, Th17 and Treg cells in the whole blood and spleen of rats were detected; protein and mRNA expressions of LCK, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn (Fyn), ZAP70, CD45, RAR-related orphan receptor γt (RORγt), and forkhead box protein 3 (Foxp3) in ankle synovial tissue were determined. **RESULTS** Compared with normal group, the changes in ankle joint swelling, arthritis index, the levels of IL-1β, IL-21, IL-17A, IL-2, IFN-γ and IL-6 in serum and joint fluid, the levels of Th1, Th17 cells and Th17/Treg value in whole

Δ **基金项目** 国家自然科学基金项目（No.82260681）；内蒙古自治区自然科学基金项目（No.2023MS08027）；内蒙古自治区教育厅一流学科科研专项项目子课题（No.YLXKZX-NMD-002）；蒙药研发国家地方联合工程研究中心开放课题（No.MDK2024004）

* **第一作者** 博士研究生。研究方向：蒙药有效物质及其药理研究。E-mail：1033814209@qq.com

通信作者 教授，博士生导师，博士。研究方向：蒙药有效物质及其药理研究。E-mail：wqh693@163.com

blood and spleen, and the protein and mRNA expression levels of LCK, Fyn, ZAP70, CD45, and RORγt in ankle joint synovium were all significantly increased/elevated ($P<0.05$). The level of Treg cells in the spleen, as well as the protein and mRNA expression levels of Foxp3 in the ankle joint synovium were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with model group, most of the above-mentioned indicators were significantly reversed in the positive control group and all dose groups of HSH ($P<0.05$). The degree of pathological changes in ankle joint tissues was markedly improved, and inflammation was alleviated. **CONCLUSIONS** HSH can regulate the cascade reactions in the CD4/LCK/ZAP70/IL-17 pathway within the T-cell receptor signaling pathway, thereby modulating the Th17/Treg balance. This leads to the suppression of inflammatory responses and the alleviation of synovial tissue damage in rats with RA.

KEYWORDS *Artemisia ordosica*; effective substance groups; rheumatoid arthritis; CD4/LCK/ZAP70/IL-17 signaling pathway; Th17/Treg balance; inflammatory responses

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种以滑膜炎为病理基础的炎症性和自身免疫性疾病。我国关节炎患者有1亿以上，且人数在不断增加，尤其是在内蒙古严寒地区[1-2]。RA归属于蒙医“协日乌素”病，据蒙医燥“协日乌素”功效理论，药物治疗RA时，辨证选择具有燥“协日乌素”功效的蒙药，以调三根、扶胃火，促进精华与糟粕的分解[3]。

黑沙蒿是具有燥“协日乌素”功效的蒙药材之一，对关节肿胀和疼痛有明显的干预效果，尤其对“协日乌素”病的有效率可达到90%以上[4]。本课题组前期对黑沙蒿活性成分进行分析后发现，黑沙蒿有效物质群（简称HSH）主要含有苯丙素类、黄酮类及酚酸类化合物[5-6]，可明显改善RA大鼠的一般情况，减轻关节肿胀程度，但具体作用机制尚不明确。本课题组前期采用网络药理学的方法预测了HSH改善RA的作用机制，结果发现其可能通过调节T细胞受体信号通路中分化簇4（cluster of differentiation 4，CD4）/淋巴细胞特异性酪氨酸激酶（lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase，LCK）/70 kDa链相关蛋白激酶（zeta-chain-associated protein kinase of 70 kDa，ZAP70）/白细胞介素17（interleukin-17，IL-17）信号通路发挥作用[7]。基于此，本研究拟基于上述信号通路探究HSH改善RA的作用机制，以期为HSH治疗RA提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

DNM-9602型酶标分析仪购自北京普朗新技术有限公司，CaliburⅡ型流式细胞仪购自碧迪医疗器械（上海）有限公司，NANODROP 2000型分光光度计、ABI7500型荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司，SQS-120P型数字扫描成像系统购自深圳生强生物科技有限公司，YLS-7C型足趾容积测量仪购自北京智鼠多宝生物科技有限责任公司。

1.2 主要药品与试剂

完全弗氏佐剂和鼠源IL-17A、叉头框蛋白3（forkhead box protein 3，Foxp3）抗体（批号分别为1003234204、2422187、2565424）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；固定/破膜试剂盒和鼠源γ-干扰素（interferon-γ，IFN-γ）、CD25、CD3抗体（批号分别为00833356、70411023、A30651、AF13982）均购自美国BD公司；流式细胞微球阵列法灵活检测试剂组包括IFN-γ、IL-2、IL-1β、IL-6、IL-17A、IL-21单因子微球检测组件（货号分别为558342、558346、560232、560231、560282、564343）均购自美国BD公司；鼠源CD4、CD8a抗体（批号分别为2386305、AF14045）均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；兔源LCK、原癌基因酪氨酸蛋白激酶Fyn（proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn，简写为Fyn）、ZAP70、CD45、视黄酸受体相关孤儿受体γt亚型（RAR-related orphan receptor γt，RORγt）单克隆抗体以及山羊抗兔免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG（货号分别为ab227975、ab184276、ab32410、ab317446、ab207082、111035003、115035003）均购于美国Jackson公司；鼠源GAPDH单克隆抗体（货号REK0005）购于天津锐尔康生物科技有限公司；雷公藤多苷片（批号Z42021212，规格10 mg）购于远大医药黄石飞云制药有限公司；所有基因的引物由深圳华大基因科技有限公司合成。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性SD大鼠，体重为180～220 g，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，动物生产许可证号为SCXK（辽）2020-0001。大鼠饲养在内蒙古民族大学蒙医药学院动物实验中心，自由进食进水；环境温度为24～26 ℃，湿度为（55±5）%，光照和黑暗12 h交替。本实验经内蒙古民族大学附属医院医学伦理委员会批准，批件号为NM-LL-2024-03-12-08。

2 方法

2.1 HSH的制备

取黑沙蒿20 kg，用95%乙醇回流提取2次，每次6 h，回收乙醇，得到乙醇提取物；利用硅胶色谱柱分离乙醇提取物，先用石油醚-乙酸乙酯溶液（80∶1，*V*/*V*）脱脂后，再用甲醇洗脱，合并洗脱液，回收溶剂后得到HSH（得率为0.2%）[7]。

2.2 分组、造模、给药及取材

将大鼠适应性饲养1周后，选取60只大鼠，使用随机数字表法分为6组，分别为正常组、模型组和HSH低、中、高剂量组（2.7、10.8、21.6 mg/kg[8]）以及阳性对照组（雷公藤多苷片，6.3 mg/kg，剂量根据临床等效剂量换算），每组10只。除正常组外，对其余各组大鼠腹腔注射戊巴比妥（35 mg/kg）麻醉后，于大鼠左后足跖趾垫处一次性注射完全弗氏佐剂，每只0.15 mL[9]，以诱导RA大鼠模型。正常组大鼠在相同部位注射等体积生理盐水。3 d后观察造模大鼠左后足踝关节红肿情况，若明显肿胀，提示造模成功[10]。各组大鼠灌胃相应药物或生理盐水，每天1次，连续28 d。

末次给药24 h后，通过腹腔注射戊巴比妥麻醉大鼠，收集其腹主动脉血，取部分腹主动脉血制备血清，置于−80 ℃冰箱中保存备用。另取腹主动脉血适量，置于肝素锂抗凝管中，备用。取血完成后，处死各组大鼠，以2 mL磷酸盐缓冲液（PBS）灌洗其踝关节，经离心处理后即得关节液；剖取脾脏、踝关节组织保存备用。

2.3 大鼠踝关节肿胀度及关节炎指数检测

在造模前及给药后第1、7、14、21、28天，分别测定各组大鼠踝关节容积以计算踝关节肿胀度[11]，同时采用5级评分法对大鼠左后足的关节炎程度进行主观评分，记录为关节炎指数[12]。

2.4 大鼠踝关节组织病理形态学观察

取各组大鼠踝关节组织适量，以4%多聚甲醛固定24 h，经脱水包埋后切片；然后进行苏木素-伊红（HE）染色，经中性树胶封片后，采用显微镜观察大鼠踝关节组织病理形态学特征。

2.5 大鼠血清和关节液中炎症因子水平检测

取各组大鼠血清和关节液样品适量，按照试剂盒说明书方法处理，采用流式细胞微球阵列法检测大鼠血清和关节液中IL-1β、IL-21、IL-17A、IL-2、IFN-γ和IL-6水平。

2.6 大鼠全血及脾脏中Th1、Th17、Treg细胞水平检测

取各组大鼠全血样品，经Ficoll分离液分离外周血单个核细胞，用无菌PBS洗涤2次，重悬细胞；加入LAC缓冲液培养4 h，以激活淋巴细胞，待测。另取各组大鼠脾脏组织适量，置于细胞筛中研磨组织，得单细胞悬液，经无菌PBS洗涤2次后，重悬细胞；加入LAC缓冲液培养4 h，以激活淋巴细胞，待测。取上述两种细胞样品适量，分别加入不含EDTA的胰酶进行消化，然后用冷PBS冲洗细胞，加入抗体CD3、CD4、CD8a、CD25的混合物，于4 ℃避光孵育30 min；固定破膜后，加入细胞内抗体IFN-γ、IL-17A、Foxp3，室温避光染色30 min；采用流式细胞仪测定全血及脾脏组织中Th1、Th17、Treg细胞水平。

2.7 大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt、Foxp3蛋白表达检测

取各组大鼠踝关节的滑膜组织适量，经裂解后提取总蛋白。将蛋白变性处理后，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白转移到PVDF膜上，以5%脱脂乳密封，在室温下放置1 h；加入LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt、Foxp3、GAPDH（稀释度均为1∶3 000）孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释度为1∶5 000）孵育2 h；再次洗膜后，采用化学发光试剂盒显影，采用Image J软件分析蛋白条带，以目的蛋白与内参GAPDH的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt、Foxp3 mRNA表达检测

采用TRIzol试剂提取各组大鼠踝关节的滑膜组织总RNA，然后逆转录为cDNA；以cDNA为模板进行PCR扩增。扩增条件为95 ℃预变性10 min；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算各目的基因的表达水平。引物序列和扩增产物长度见表1。

表1 引物序列和扩增产物长度

引物名称	引物序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
LCK	正向：CTCGTCCGGCTTTATGCAGT	85
	反向：GGAAATCTACTAGGCTCCCGTT	
Fyn	正向：ATTGGCCCGGATTGAAG	266
	反向：TGAGCTCGTGCAGGGAGA	
Foxp3	正向：AGCCTGCCTCAGACAAGAAC	202
	反向：GAAGAAGAGGAGGTGTGGGC	
RORγt	正向：GTGCAATGTGGCCTACTCCT	164
	反向：GCAGACTGTCCCTCTGCTTC	
ZAP70	正向：GAGTGTCCGCCCGAAATGTA	150
	反向：CTGTTCACACTGTGGGGGTC	
CD45	正向：GGGCTGAGCCAGCATCTAAA	190
	反向：TCCTTAGCAGGGCCATTTCG	
GAPDH	正向：TGATGGGTGTGAACCACGAG	152
	反向：AGTGATGGCATGGACTGTGG	

2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.2软件进行统计分析。数据均符合正态分布，以$\bar{x} \pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Tukey's HSD检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠踝关节肿胀度及关节炎指数的检测结果

与正常组比较，模型组大鼠给药期间踝关节肿胀度、关节炎指数均显著增加/升高（$P<0.05$）。与模型组比较，除第7天的阳性对照组外，各给药组大鼠从给药第7天开始，踝关节肿胀度均显著减小（$P<0.05$）；HSH中、高剂量组大鼠从给药第7天开始，关节炎指数均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2、表3。

表2 HSH对大鼠踝关节肿胀度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，mL）

组别	第1天	第7天	第14天	第21天	第28天
正常组	0.00±0.10	0.04±0.12	0.24±0.12	0.05±0.14	0.20±0.17
模型组	1.93±0.56[a]	1.55±0.21[a]	1.49±0.19[a]	1.48±0.27[a]	1.33±0.33[a]
阳性对照组	1.76±0.54	1.48±0.34	1.29±0.24[b]	1.18±0.30[b]	0.72±0.26[b]
HSH高剂量组	1.96±0.53	1.23±0.35[b]	1.31±0.29[b]	1.08±0.26[b]	0.63±0.28[b]
HSH中剂量组	1.88±0.24	1.30±0.22[b]	1.29±0.18[b]	1.23±0.16[b]	0.89±0.20[b]
HSH低剂量组	1.86±0.33	1.30±0.19[b]	1.25±0.14[b]	1.25±0.19[b]	1.08±0.12[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

表3 HSH对大鼠关节炎指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	第1天	第7天	第14天	第21天	第28天
正常组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	7.10±0.88[a]	6.40±0.52[a]	5.90±0.57[a]	6.00±0.47[a]	5.70±0.48[a]
阳性对照组	6.70±0.67	6.10±0.57	5.60±0.52	5.50±0.53[b]	4.50±0.53[b]
HSH高剂量组	7.10±1.20	5.60±0.70[b]	5.30±0.48[b]	5.20±0.63[b]	4.30±0.67[b]
HSH中剂量组	6.80±0.63	5.80±0.63[b]	5.40±0.52[b]	5.40±0.52[b]	4.40±0.70[b]
HSH低剂量组	6.90±0.74	5.90±0.74	5.50±0.53	5.60±0.52	4.80±0.42[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.2 大鼠踝关节组织病理形态学观察结果

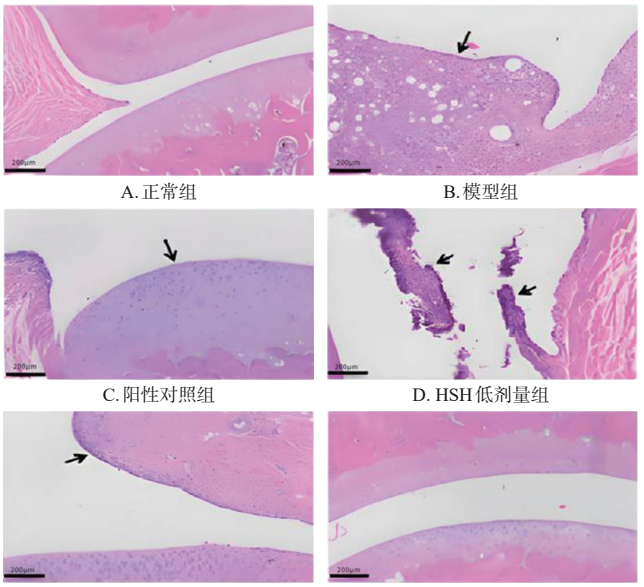
正常组大鼠踝关节结构正常，关节软骨表面平滑整洁，软骨细胞排列有序，滑膜组织结构正常，未观察到炎症细胞浸润和血管增生等病理变化。模型组大鼠踝关节滑膜组织明显增生、排列紊乱并延伸至关节腔内，出现大量炎症细胞浸润，且形成肉芽组织和血管翳。与模型组相比，各给药组大鼠踝关节组织病变程度明显改善，炎症减轻。结果见图1。

3.3 大鼠血清和关节液中炎症因子水平的检测结果

与正常组比较，模型组大鼠血清和关节液中IL-1β、IL-21、IL-17A、IL-2、IFN-γ、IL-6水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组和HSH低、中、高剂量组大鼠血清（HSH高剂量组IL-1β以及阳性对照组和HSH低剂量组IL-6除外）和关节液中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表4、表5。

3.4 大鼠全血及脾脏中Th1、Th17、Treg细胞水平检测结果

与正常组比较，模型组大鼠全血和脾脏中Th1、Th17细胞水平及Th17/Treg值均显著升高（$P<0.05$），脾脏中Treg细胞水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组大鼠全血中Th1、Th17（阳性对照组除外）细胞水平及Th17/Treg值均显著降低（$P<0.05$）；阳性对照组和HSH高剂量组大鼠全血中Treg细胞水平均显著升高（$P<0.05$）；各给药组大鼠脾脏中上述细胞水平及Th17/Treg值大部分显著逆转（$P<0.05$）。结果见表6、表7。



注：箭头所指为滑膜组织增生。

图1 各组大鼠踝关节组织病理染色观察结果（HE染色，标尺：200 μm）

表4 HSH对大鼠血清中炎症因子水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，pg/mL）

组别	IL-1β	IL-21	IL-17A	IL-2	IFN-γ	IL-6
正常组	354.10±12.67	192.50±8.69	76.37±4.05	422.00±19.24	52.74±1.35	739.80±135.50
模型组	423.60±39.56[a]	245.90±18.50[a]	95.17±1.66[a]	618.40±132.20[a]	66.32±6.54[a]	1 030.00±56.48[a]
阳性对照组	362.30±22.78[b]	209.00±21.31[b]	86.67±3.53[b]	473.70±32.00[b]	55.81±2.37[b]	918.30±17.99
HSH高剂量组	380.20±13.33	206.00±9.30[b]	84.75±3.47[b]	493.10±14.98[b]	59.33±3.22[b]	855.30±24.21[b]
HSH中剂量组	368.20±15.97[b]	210.20±9.94[b]	86.38±3.92[b]	461.50±21.68[b]	55.43±1.81[b]	884.60±21.64[b]
HSH低剂量组	372.60±19.65[b]	221.80±17.57[b]	88.74±2.24[b]	489.50±27.40[b]	56.55±1.76[b]	898.60±39.09

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

表5 HSH对大鼠关节液中炎症因子水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，pg/mL）

组别	IL-1β	IL-21	IL-17A	IL-2	IFN-γ	IL-6
正常组	386.30±16.06	231.24±25.47	96.11±6.86	345.12±29.80	45.76±4.09	849.61±38.49
模型组	518.79±54.70[a]	371.74±74.03[a]	179.35±28.13[a]	546.01±93.50[a]	69.60±8.01[a]	1 194.03±31.58[a]
阳性对照组	434.41±23.45[b]	265.36±35.88[b]	115.91±24.21[b]	391.78±36.44[b]	54.56±4.77[b]	993.38±137.10[b]
HSH高剂量组	434.53±22.88[b]	264.63±13.59[b]	107.66±12.35[b]	433.86±21.51[b]	57.76±4.08[b]	934.19±126.20[b]
HSH中剂量组	429.67±23.15[b]	254.28±30.42[b]	114.01±17.33[b]	412.39±36.17[b]	55.73±3.08[b]	971.00±58.46[b]
HSH低剂量组	441.56±18.18[b]	265.34±20.14[b]	113.83±9.37[b]	419.03±29.16[b]	58.39±4.82[b]	992.58±111.40[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.5 大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt、Foxp3蛋白表达检测结果

与正常组比较，模型组大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt蛋白表达水平均显著升高，Foxp3蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠踝关节滑膜中上述蛋白表达水平大部分显著逆转（$P<0.05$）。结果见图2、表8。

表6　HSH对大鼠全血中Th1、Th17、Treg细胞水平及Th17/Treg值的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

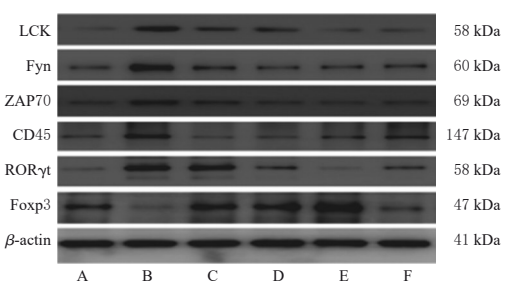
组别	Th1/%	Treg/%	Th17/%	Th17/Treg
正常组	2.02±1.03	10.21±1.41	1.86±0.87	0.19±0.09
模型组	11.91±4.15[a]	9.04±1.80	11.30±4.27[a]	1.31±0.58[a]
阳性对照组	4.90±1.54[b]	11.47±2.12[b]	4.35±1.43[b]	0.39±0.14[b]
HSH高剂量组	5.29±2.53[b]	12.34±3.89[b]	5.03±1.46[b]	0.53±0.18[b]
HSH中剂量组	3.24±1.43[b]	9.60±1.82	3.10±1.47[b]	0.33±0.17[b]
HSH低剂量组	5.32±1.85[b]	7.24±1.20	5.48±2.69[b]	0.51±0.12[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

表7　HSH对大鼠脾脏中Th1、Th17、Treg细胞水平及Th17/Treg值的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	Th1/%	Treg/%	Th17/%	Th17/Treg
正常组	0.61±0.21	12.69±1.84	1.98±0.46	0.16±0.04
模型组	4.72±1.22[a]	6.87±0.95[a]	2.74±0.55[a]	0.41±0.10[a]
阳性对照组	1.65±0.39[b]	8.98±1.20[b]	2.87±0.66	0.32±0.06
HSH高剂量组	3.52±1.28	12.23±1.94[b]	1.40±0.49[b]	0.12±0.05[b]
HSH中剂量组	1.35±0.52[b]	9.91±1.24[b]	1.84±0.30[b]	0.19±0.03[b]
HSH低剂量组	2.23±0.96[b]	10.18±1.96[b]	1.04±0.19[b]	0.11±0.03[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。



A：正常组；B：模型组；C：阳性对照组；D：HSH高剂量组；E：HSH中剂量组；F：HSH低剂量组。

图2　大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt、Foxp3蛋白表达的电泳图

表8　HSH对大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt、Foxp3蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	LCK/GAPDH	Fyn/GAPDH	ZAP70/GAPDH	CD45/GAPDH	RORγt/GAPDH	Foxp3/GAPDH
正常组	0.147±0.024	0.249±0.020	0.149±0.032	0.072±0.023	0.041±0.011	0.373±0.169
模型组	0.346±0.029[a]	0.575±0.024[a]	0.293±0.005[a]	0.338±0.035[a]	0.439±0.041[a]	0.069±0.018[a]
阳性对照组	0.300±0.048	0.423±0.037[b]	0.151±0.013[b]	0.274±0.014	0.192±0.041[b]	0.181±0.052
HSH高剂量组	0.191±0.026[b]	0.379±0.062[b]	0.235±0.032[b]	0.081±0.014[b]	0.178±0.017[b]	0.592±0.096[b]
HSH中剂量组	0.178±0.007[b]	0.420±0.044[b]	0.140±0.038[b]	0.174±0.081[b]	0.255±0.028[b]	0.089±0.028
HSH低剂量组	0.150±0.047[b]	0.297±0.052[b]	0.135±0.019[b]	0.191±0.028[b]	0.129±0.033[b]	0.639±0.178[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.6　大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt、Foxp3 mRNA表达检测结果

与正常组比较，模型组大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt mRNA表达水平均显著升高，Foxp3 mRNA表达水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$），阳性对照组和HSH低剂量组大鼠踝关节滑膜中Foxp3 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表9。

表9　HSH对踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt、Foxp3 mRNA表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	LCK	Fyn	ZAP70	CD45	RORγt	Foxp3
正常组	0.19±0.08	0.70±0.49	0.39±0.10	1.24±0.72	2.07±0.93	0.22±0.12
模型组	3.10±1.36[a]	18.15±3.17[a]	1.73±0.54[a]	43.92±6.70[a]	56.05±9.44[a]	0.03±0.01[a]
阳性对照组	1.00±0.43[b]	0.76±0.21[b]	0.54±0.11[b]	2.91±0.69[b]	10.67±2.44[b]	0.20±0.06[b]
HSH高剂量组	1.56±0.77[b]	4.59±1.23[b]	1.18±0.56[b]	5.00±1.04[b]	13.95±4.09[b]	0.05±0.01
HSH中剂量组	1.04±0.30[b]	3.61±1.41[b]	0.97±0.37[b]	3.16±1.24[b]	5.06±2.18[b]	0.13±0.03
HSH低剂量组	0.07±0.04[b]	3.42±1.33[b]	0.04±0.01[b]	1.72±0.62[b]	2.20±0.75[b]	0.42±0.12[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

4　讨论

黑沙蒿是具有潜在开发前景的燥“协日乌素”蒙药材，主要含苯丙素类、黄酮类及酚酸类成分，这些成分具有良好的抗炎和抗氧化作用，既能抑制IL-1β、IL-6和IL-17等促炎因子的表达，又能调节风湿性关节炎小鼠Th1/Th2淋巴细胞平衡和抑制氧化应激[13-14]。

在RA发展初期，可见滑膜血管损伤，随后T细胞（主要是$CD4^+$T细胞）流入，并被抗原呈递细胞进一步激活，产生IFN-γ、IL-2、IL-17等炎症因子[15]。Th17细胞是参与RA病情发展的重要免疫细胞[16]，IL-17是由Th17细胞分泌的促炎细胞因子，该分泌过程有着复杂的免疫调控机制，T细胞受体信号通路在其中发挥了重要作用[17]。本研究采用完全弗氏佐剂诱导RA大鼠模型，旨在基于T细胞受体信号通路中CD4/LCK/ZAP70/IL-17途径探讨HSH对RA的改善作用及潜在机制。

在RA的疾病发展过程中，炎症反应贯穿始终，因此抗炎是RA治疗的关键。$CD4^+$T细胞产生的Th1和Th17可分泌促炎因子，引起滑膜炎症；而产生的Th2可分泌抗炎因子，Treg可分泌免疫抑制因子，从而缓解RA炎症反应[18]。研究发现，调节Th1/Th2、Th17/Treg平衡对改善RA具有重要意义[19]。本研究结果显示，HSH可减轻RA大鼠的踝关节肿胀度，改善关节病理损伤，降低大鼠血清和关节液中IL-1β、IL-21、IL-17A、IL-2、IFN-γ、IL-6水平，调节Th1、Th17和Treg细胞水平，降低Th17/Treg值，提示HSH可能通过调节Th17/Treg平衡，减轻RA大鼠的炎症反应。

T细胞受体信号通路功能失调与RA的发生与发展有密切关系[20]。Src激酶、Syk激酶和磷酸酶是T细胞受体信号通路被激活和传导的关键酶，其中Src家族酪氨酸蛋白激酶Fyn、LCK可磷酸化细胞内免疫受体酪氨酸激活基序（immune receptor tyrosine-based activation motif，ITAM），而磷酸化的ITAM可招募细胞质内ZAP70聚集，被聚集的ZAP70则再次被LCK磷酸化和激活[21]。另外，跨膜酪氨酸磷酸酶CD45可解除Src分子的抑制作用，被激活的ZAP70可引起跨膜的T细胞活化连接蛋白（linker for activation of T cells，LAT）发生磷酸化，从而调

节下游信号活化T细胞，形成级联反应，最终导致细胞增殖和免疫调节紊乱[22]。RORγt是Th17细胞分化的关键转录因子，Foxp3是Treg细胞的特异性标记[23]。本研究结果显示，HSH可降低大鼠踝关节滑膜中LCK、Fyn、ZAP70、CD45、RORγt蛋白和mRNA表达水平，上调Foxp3蛋白和mRNA表达水平，提示HSH可通过调节T细胞的功能和分化，发挥抗炎和免疫调节作用。

综上所述，HSH可通过调节T细胞受体信号通路中CD4/LCK/ZAP70/IL-17途径的级联反应，调节Th17/Treg平衡，从而抑制RA大鼠的炎症反应，减轻滑膜组织损伤。

参考文献

[1] 刘志刚. 蒙医药辨证治疗类风湿性关节炎的临床疗效[J]. 中国民族医药杂志，2019，25(10)：10-11.

[2] 余琪婷，余琪祥. 类风湿性关节炎治疗的研究进展[J]. 临床医学进展，2024，14(7)：79-83.

[3] 乌兴荣. 蒙医辨证治疗类风湿性关节炎的临床疗效[J]. 中国民族医药杂志，2019，25(8)：11-12.

[4] 乌兰，特木其乐，玉兰，等. 蒙药治疗膝关节骨性关节炎疗效分析[J]. 内蒙古医学杂志，2011，43(6)：654-655.

[5] WANG Q H，PA B，GONG J H，et al. Phenylpropanoids，flavonoids，and terpenoids from *Artemisia ordosica* Krasch.[J]. Magn Reson Chem，2019，57(6)：326-330.

[6] 包玉秋，王青虎，那仁朝克图，等. 蒙药黑沙蒿的TLC鉴别及HPLC定量分析[J]. 中国药学杂志，2020，55(5)：357-361.

[7] 郝俊生. 基于网络药理学研究黑沙蒿活性部位及其治疗风湿性关节炎的作用机制[D]. 通辽：内蒙古民族大学，2020.

[8] WANG X，CHANG J，ZHOU G L，et al. The traditional Chinese medicine compound Huangqin qingre chubi capsule inhibits the pathogenesis of rheumatoid arthritis through the CUL4B/Wnt pathway[J]. Front Pharmacol，2021，12：750233.

[9] 蒋雨晴，苏程果，周海燕，等. 电针对佐剂性关节炎大鼠踝关节炎症的HIF-1α/MDM2/p53信号通路的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2023，25(10)：3413-3419.

[10] LIU C H，LI Y T，WEN C L，et al. Dehydrozingerone alleviates hyperalgesia，oxidative stress and inflammatory factors in complete Freund's adjuvant-induced arthritic rats[J]. Drug Des Devel Ther，2022，16：3015-3022.

[11] 李培培，解国雄，宋珊珊，等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J]. 中国免疫学杂志，2012，28(5)：453-457.

[12] 李树岗，贾超，宋远瑛. IL-37b作用于树突状细胞CD39/ATP轴抑制类风湿性关节炎大鼠炎症反应的作用及机制[J]. 免疫学杂志，2022，38(1)：51-58.

[13] LIAO Y，LIN X，LI J C，et al. Nodakenin alleviates renal ischaemia-reperfusion injury via inhibiting reactive oxygen species-induced NLRP3 inflammasome activation[J]. Nephrology (Carlton)，2021，26(1)：78-87.

[14] SHAABAN H H，HOZAYEN W G，KHALIEFA A K，et al. Diosmin and trolox have anti-arthritic，anti-inflammatory and antioxidant potencies in complete Freund's adjuvant-induced arthritic male Wistar rats：roles of NF-κB，iNOS，Nrf2 and MMPs[J]. Antioxidants (Basel)，2022，11(9)：1721.

[15] 吴梦娟，聂安政，朱春胜，等. 秦皮水煎液干预类风湿性关节炎的作用研究[J]. 中医药信息，2024，41(6)：9-12.

[16] 李鑫，蔡雄，刘良. Th17细胞在类风湿关节炎发病机制中的作用研究进展[J]. 中国药理学通报，2020，36(3)：309-312.

[17] SHUI X L，LIN W，MAO C W，et al. Blockade of IL-17 alleviated inflammation in rat arthritis and MMP-13 expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2017，21(10)：2329-2337.

[18] 邱安琪，彭新国. 细胞因子在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J]. 检验医学与临床，2023，20(6)：830-834.

[19] 王金凤，黄海量，刘杰，等. 中药调控Th17/Treg平衡治疗类风湿关节炎的研究现状[J]. 中国药房，2023，34(6)：763-768.

[20] SHAH K，AL-HAIDARI A，SUN J M，et al. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease[J]. Signal Transduct Target Ther，2021，6(1)：412.

[21] SHAW A T，MAEDA Y，GRAVALLESE E M. IL-17A deficiency promotes periosteal bone formation in a model of inflammatory arthritis[J]. Arthritis Res Ther，2016，18：104-109.

[22] 莫宗成，李恒华，黄文涛，等. 松节方醇提物对类风湿关节炎模型大鼠T细胞抗原受体信号通路相关分子表达的影响[J]. 中草药，2020，51(2)：406-411.

[23] 蒋宇，汤郁，陈頔，等. 类风湿关节炎患者$CD4^+CD25^+CD127^-$调节性T细胞CXCR4的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版)，2023，43(4)：459-467.

（收稿日期：2025-01-14　修回日期：2025-06-01）

（编辑：唐晓莲）