资木瓜总苷对RA模型小鼠的骨保护作用及机制Δ

邓　颖[1,2*]，金　璨[1,2]，段志豪[1,2]，张晓丽[1,2]，李世刚[1,2#]（1.三峡大学基础医学院，湖北 宜昌　443002；2.三峡大学国家中医药管理局中药药理（肿瘤）科研三级实验室，湖北 宜昌　443002）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）09-1042-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.09.04

摘　要　目的　研究资木瓜总苷对类风湿关节炎（RA）模型小鼠的骨保护作用及可能机制，为进一步将其开发为抗RA药物提供参考。**方法**　将70只雄性DBA/1小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、资木瓜总苷低剂量组（60 mg/kg）、资木瓜总苷高剂量组（240 mg/kg）和雷公藤多苷片组（阳性对照，30 mg/kg），每组14只。除正常组外，其余各组小鼠均采用葡萄糖-6-磷酸异构酶混合多肽诱导制备RA小鼠模型。观察并记录各组小鼠的体质量、后足趾厚度、关节炎评分；采用苏木精-伊红染色法、抗酒石酸酸性磷酸酶染色法及番红固绿染色法观察小鼠踝关节组织的滑膜炎症及骨、软骨破坏情况；采用酶联免疫吸附测定法检测小鼠血清中白细胞介素6（IL-6）和踝关节组织中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、IL-4、IL-10的含量；采用Western blot法检测小鼠踝关节组织中核因子κB受体活化因子配体（RANKL）、核因子κB受体活化因子（RANK）、骨保护素（OPG）、肿瘤坏死因子受体相关蛋白6（TRAF6）、活化T细胞核因子1（NFATC1）的蛋白表达水平。**结果**　在给药结束时，与正常组比较，模型组小鼠的体质量显著降低（$P<0.05$），关节炎评分和左、右后足趾厚度均显著增加（$P<0.05$）；踝关节组织出现明显滑膜增生和炎症细胞浸润，破骨细胞数目明显增多，软骨组织破坏明显；血清中IL-6含量及踝关节组织中TNF-α含量和RANKL、RANK、TRAF6、NFATC1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），而踝关节组织中IL-4、IL-10含量和OPG蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组小鼠的上述病理形态学变化和指标含量/水平均得到显著改善（$P<0.05$）。**结论**　资木瓜总苷对RA模型小鼠具有一定的骨保护作用；其机制可能与降低IL-6、TNF-α含量，升高IL-4、IL-10含量，抑制RANKL/RANK/OPG信号通路活化，从而抑制破骨细胞增殖和促进软骨及骨组织修复有关。

关键词　资木瓜总苷；类风湿关节炎；核因子κB受体活化因子配体；核因子κB受体活化因子；骨保护素

The osteoprotective effects and mechanisms of RA model mice by total saponins of *Chaenomeles speciosa*

DENG Ying[1,2], JIN Can[1,2], DUAN Zhihao[1,2], ZHANG Xiaoli[1,2], LI Shigang[1,2*][1. School of Basic Medicine, Three Gorges University, Hubei Yichang 443002, China; 2. Level Ⅲ Laboratory of Pharmacology (Tumor) Research in Chinese Medicine, National Bureau of Traditional Chinese Medicine, Three Gorges University, Hubei Yichang 443002, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the osteoprotective effects and possible mechanism of total saponins of *Chaenomeles speciosa* on rheumatoid arthritis (RA) model mice, and to provide reference for further development of anti-RA drugs. **METHODS** Seventy male DBA/1 mice were randomly divided into normal group, model group, low-dose and high-dose groups of *C. speciose* total saponins (60, 240 mg/kg), *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets group (positive control, 30 mg/kg), with 14 mice in each group. In addition to the normal group, the other groups of mice were induced by glucose-6-phosphate isomerase mixed polypeptide to prepare RA model. The body weight, rear toes thickness and arthritis scores of each group were recorded; the synovial inflammation, bone and cartilage destruction of ankle joint tissues were observed by hematoxylin-eosin staining, tartrate-resistant acid phosphatase staining and safranin O-fast green staining; the contents of interleukin-6 (IL-6) in serum and tumor necrosis factor α (TNF-α), IL-4 and IL-10 in ankle joint tissues were detected by ELISA; the expression levels of receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL), receptor activator of nuclear factor-κB (RANK), osteoprotegerin (OPG), tumor necrosis factor receptor-associated protein 6 (TRAF6) and nuclear factor of activated T cells 1 (NFATC1) protein in ankle joint tissues were detected by Western blot assay. **RESULTS** At the end of administration, compared with normal group, the body mass of mice in the model group was significantly reduced ($P<0.05$), and the arthritis score and the thickness of the left and right rear toes were significantly increased ($P<0.05$); the ankle joint tissues of mice in the model group showed significant synovial proliferation and inflammatory infiltration, the number of osteoclasts increased significantly and

Δ **基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.82274170，No.81673665）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：类风湿关节炎药理学。E-mail：splenly@foxmail.com

＃**通信作者**　教授，硕士生导师，博士。研究方向：类风湿关节炎药理学。E-mail：Fox201@163.com

significant destruction of cartilage tissue. The content of IL-6 in serum, the content of TNF-α, the protein expression levels of RANKL, RANK, TRAF6 and NFATC1 in the ankle joint tissues were increased significantly ($P<0.05$), while the contents of IL-4 and IL-10, the protein expression level of OPG in the ankle joint tissues were decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, above pathomorphological changes and the content/level of indicators of mice in each administration group were significantly improved ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Total saponins of *C. speciosa* may exert osteoprotective effects on RA model mice, the mechanism of which may be associated with reducing the contents of IL-6 and TNF-α, increasing the contents of IL-4 and IL-10, inhibiting the activation of RANKL/RANK/OPG signal pathway, thus inhibiting the proliferation of osteoclasts and promoting the repair of cartilage and bone tissue.

KEYWORDS total saponins of *Chaenomeles speciosa*; rheumatoid arthritis; receptor activator of nuclear factor-κB ligand; receptor activator of nuclear factor-κB; osteoprotegerin

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种以滑膜炎症和关节骨破坏为主的慢性全身性、炎症性疾病[1]。其主要病理特征是滑膜增生、血管生成、血管翳形成、炎症细胞浸润、关节软骨破坏、骨破坏，最终导致关节功能障碍甚至畸形[2]。其中骨破坏是RA致畸致残的主要原因[3]。目前很多RA的临床治疗药物由于具有较强的毒副作用和昂贵的成本，限制了其临床应用[4]。因此，开发低毒高效的抗RA关节骨破坏药物具有重要的经济和社会意义。

资木瓜总苷是从中药皱皮木瓜 *Chaenomeles speciosa*（Sweet）Nakai中提取的有效活性物质。本课题组前期研究发现，资木瓜总苷可通过调节肠道菌群来抑制K/B×N小鼠（血清转移性关节炎模型小鼠）的炎症因子水平，从而改善其关节炎症状[5]；同时体外研究也发现，资木瓜总苷中的莽草酸单体成分可通过抑制肥大细胞脱颗粒，从而对软骨损伤起到保护作用[6]。然而，资木瓜总苷在RA骨破坏中的作用仍不明确。

据报道，核因子κB受体活化因子配体（receptor activator of nuclear factor-κB ligand，RANKL）/核因子κB受体活化因子（receptor activator of nuclear factor-κB，RANK）/骨保护素（osteoprotegerin，OPG）信号通路参与了RA的骨破坏进程[7]。研究发现，在RA患者的血清及关节液中，RANKL的表达水平显著升高，且其表达水平与RA的风湿活动度评分呈正相关[8]。因此，本研究拟使用葡萄糖-6-磷酸异构酶（glucose-6-phosphate isomerase，G6PI）混合多肽制备DBA/1小鼠RA模型[9]，并通过RANKL/RANK/OPG信号通路探讨资木瓜总苷对G6PI诱导的RA模型小鼠的骨保护作用及可能的作用机制，为将资木瓜总苷进一步开发为抗RA药物提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有Centrifuge 5804R型高速离心机[艾本德（上海）国际贸易有限公司]、MPS 60型光学显微镜（德国Leica公司）、ChemiScope 6100型化学发光成像系统（上海勤翔科学仪器有限公司）、DYCZ-40型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）、NFINITE 200 PRO型酶标仪（瑞士Tecan公司）。

1.2 主要药品与试剂

资木瓜总苷（批号202205）为本课题组自制，经高效液相色谱法检测其中主要成分为齐墩果酸、熊果酸，其含量分别为0.90%、0.17%；雷公藤多苷片（批号14002003117，规格10 mg）购自远大医药黄石飞云制药有限公司；多肽片段hGPI 325-339（IWYINCFGCETHAML）和hGPI 469-483（EGNRPTNSIVFTKLT）均由宁波康贝生化有限公司合成；百日咳毒素（批号180，规格50 μg）购自美国List Biological Laboratories公司；完全弗氏佐剂购自美国Sigma公司；小鼠白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、IL-4、IL-10酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（批号分别为E-EL-M0044c、E-EL-M3063、E-EL-M0043c、E-EL-M0046c）均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）染色液、番红固绿染液、兔源β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号GB11001）和辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔IgG二抗（批号GB23303）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；兔源RANKL抗体（批号WL00285）购自沈阳万类生物科技有限公司；兔源RANK抗体（批号ab200369）、兔源OPG抗体（批号ab183910）均购自英国Abcam公司；兔源活化T细胞核因子1（nuclear factor of activated T cells 1 protein，NFATC1）抗体（批号8032）、兔源肿瘤坏死因子受体相关蛋白6（tumor necrosis factor receptor-associated factor 6，TRAF6）抗体（批号67591）均购自美国CST公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性DBA/1小鼠，共70只，鼠龄为9～10周，体质量为（22±1）g，均购自北京华阜康生物科技股份有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2019-0008。所有DBA/1小鼠均饲养于三峡大学动物实验中心的SPF级环境中[实验动物使用许可证号为SYXK（鄂）2022-0061]。饲养环境温度为（22±2）℃，湿度为（55±2）%，12 h交替照明。适应性喂养1周后开始正式实验。实验期间动物自由摄食、饮水，垫料保持干燥清洁。本研究通过了三峡大学动物伦理委

员会的审核批准（伦理审查号为2022010H1），并且在实验中严格遵循《实验动物管理条例》。

2 方法

2.1 G6PI诱导制备RA小鼠模型

将多肽片段hGPI 325-339和hGPI 469-483各60 μg混合溶解于75 μL超纯水中，将等体积的完全弗氏佐剂和溶解后的混合多肽分别吸入2个玻璃注射器内，尽量排尽注射器内空气并连接三通管，冰上制备乳化剂。将制好的乳化剂于小鼠尾根部皮下多点注射（150 μL/只），随后立即腹腔注射百日咳毒素（300 ng/只）建立RA模型，注射乳化剂当天记为造模第0天。造模后第2、8天分别再次腹腔注射百日咳毒素加强免疫[10]。关节炎评分大于8分即为造模成功[11]。

2.2 分组与给药

采用随机数字表法将70只小鼠随机分成正常组、模型组、资木瓜总苷低剂量组、资木瓜总苷高剂量组和雷公藤多苷片组（阳性对照），每组14只。除正常组外，其余各组均按“2.1”项下方法制备RA模型。各给药组小鼠在末次注射百日咳毒素加强免疫后开始给药：资木瓜总苷低、高剂量组小鼠分别给予资木瓜总苷60、240 mg/kg（剂量根据课题组前期研究结果设置[12]）；雷公藤多苷片组小鼠给予雷公藤多苷片30 mg/kg（剂量参考文献[13]设置）。正常组和模型组小鼠给予等体积生理盐水。所有小鼠均采用灌胃的方式，每天1次，连续13 d。

2.3 小鼠关节红肿及一般状态观察

造模后，观察小鼠关节红肿和一般状态，每组选择12只小鼠进行后续实验。统计小鼠一般情况，剔除组内差异较大的数据，每组选取12只小鼠进行统计。

2.4 小鼠体质量、后足趾厚度、关节炎评分检测及取材

多肽造模后，每隔1天测量并记录1次小鼠体质量、左和右后足趾厚度，同时对小鼠的四肢足趾进行关节炎评分。关节炎评分以0～4分记录，四肢足趾得分累积相加即得到每只小鼠的关节炎评分，最高分为16分[14]。具体评分细则如下：0分，关节正常，无明显红肿；1分，足趾轻度红肿；2分，脚掌红肿；3分，脚踝严重肿胀和发红；4分，全腿和所有足趾严重肿胀、变形或强直，无承重能力。在多肽造模后第21天时处死小鼠，采集小鼠血液标本及踝关节组织样本，备用。

2.5 小鼠踝关节组织病理形态学变化观察

采用苏木精-伊红（HE）染色法进行检测。取小鼠新鲜踝关节组织，经固定、脱钙、脱水、包埋、切片（片厚4 μm）、烤片后，常规进行HE染色，再用中性树胶封片。将切片晾干后在显微镜下镜检，进行图像采集分析。

2.6 小鼠踝关节组织中破骨细胞活化情况观察

采用TRAP染色法进行检测。将“2.4”项下踝关节组织切片置于二甲苯中脱蜡、梯度乙醇水化，随后蒸馏水洗2 min，用TRAP固定液在4 ℃下固定1 min，然后加入TRAP孵育液在37 ℃下孵育45 min，再用甲基绿染细胞核，经分化透明后用中性树胶封片。切片晾干后在显微镜下镜检，进行图像采集分析。

2.7 小鼠踝关节软骨组织破坏情况观察

采用番红固绿染色法进行检测。将“2.4”项下踝关节组织切片置于二甲苯中脱蜡、梯度乙醇水化后，用自来水洗2 min，随后用苏木素染核1 min，自来水洗及盐酸酒精分化后用固绿染色5 min；蒸馏水浸洗3次，再用番红染色3 min，经分化透明后用中性树胶封片。切片晾干后在显微镜下镜检，进行图像采集分析。

2.8 小鼠血清中IL-6含量检测

采用ELISA法进行检测。将小鼠血液标本于室温下静置至少2 h，随后以3 000 r/min在4 ℃下离心20 min，吸取上层血清，按试剂盒说明书相关方法操作，用酶标仪测定血清中IL-6的含量。每组随机选取8只小鼠样本的结果进行统计分析。

2.9 小鼠踝关节组织中TNF-α、IL-4、IL-10含量检测

采用ELISA法进行检测。用预冷的磷酸盐缓冲液（PBS）清洗小鼠踝关节组织，将50 mg踝关节组织置于1.5 mL EP管中，加入450 μL PBS，破碎关节组织后离心（以12 000 r/min在4 ℃离心15 min）提取上清液，然后按照试剂盒说明书相关方法操作，用酶标仪测定小鼠踝关节组织中TNF-α、IL-4、IL-10的含量。每组随机选取8只小鼠样本的结果进行统计分析。

2.10 小鼠踝关节组织中RANKL/RANK/OPG信号通路相关蛋白表达水平检测

采用Western blot法进行检测。用预冷的PBS冲洗小鼠踝关节组织，称取50 mg组织于1.5 mL EP管中，加入1 mL PBS，剪碎关节组织并离心（以12 000 r/min在4 ℃离心10 min），弃上清液。向组织沉淀中加入450 μL RIPA裂解液，匀浆后离心（以12 000 r/min在4 ℃离心10 min），取上清液。用二喹啉甲酸（BCA）法检测上清液中总蛋白浓度，取30 μg变性后的蛋白上样，行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（电泳时间为80 min，电压为80、110 V），电泳完后转膜至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上（转膜时间为90 min，转膜电流为250 mA），用5% 脱脂牛奶封闭1 h；加入β-actin（内参）、RANKL、RANK、OPG、TRAF6、NFATC1一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；以TBST缓冲液洗膜3次，加入二抗（稀释比例均为1∶3 000），室温孵育1 h；TBST洗膜3次，用ECL化学发光法显色成像，使用Image J 1.42q软件分析条带灰度值。以目的蛋白条带灰度值与内参β-actin蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平，并以正常组结果为1对各组蛋白表达结果进行归一化处理。每组随机选取3只小鼠样本的结果进行统计分析。

2.11 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件及Image J 1.42q软件对数据进行处理。计量资料满足正态分布以$\bar{x} \pm s$表示，多

组间比较采用单因素方差分析，组间进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 资木瓜总苷对RA模型小鼠关节红肿及一般状态的影响

正常组小鼠一般状态尚可，关节无红肿，皮肤无破溃。模型组小鼠四肢足趾在造模后第8～10天开始出现不同程度的红肿，在造模后第14天达到高峰，足趾红肿严重者伴有皮肤破溃并遗留关节畸形，同时伴精神萎靡不振、食欲减退、体质量减轻、毛发稀疏等症状。各给药组小鼠关节红肿程度及一般状态均较模型组有所改善。

3.2 资木瓜总苷对RA模型小鼠体质量、关节炎评分及后足趾厚度的影响

与正常组比较，在给药结束时，模型组小鼠体质量显著降低（$P<0.05$），关节炎评分及左、右后足趾厚度均显著增加（$P<0.05$）。与模型组比较，在给药前各给药组小鼠的体质量、关节炎评分及左、右后足趾厚度的差异均无统计学意义（$P>0.05$）；而在给药结束时，各给药组小鼠的体质量均显著升高（$P<0.05$），关节炎评分及左、右后足趾厚度均显著减小（$P<0.05$）。给药结束时各组小鼠的体质量、关节炎评分及足趾厚度测定结果见表1。

表1 给药结束时各组小鼠的体质量、关节炎评分及足趾厚度测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	体质量/g	关节炎评分/分	左后足趾厚度/mm	右后足趾厚度/mm
正常组	21.94±1.24	0	2.56±0.01	2.56±0.02
模型组	18.53±0.61[a]	8.25±1.42[a]	2.96±0.20[a]	2.98±0.15[a]
资木瓜总苷低剂量组	19.29±0.62[b]	5.83±1.28[b]	2.72±0.10[b]	2.76±0.12[b]
资木瓜总苷高剂量组	19.72±0.55[b]	4.66±1.60[b]	2.67±0.06[b]	2.68±0.06[b]
雷公藤多苷片组	20.21±0.55[b]	4.50±1.32[b]	2.63±0.10[b]	2.63±0.09[b]

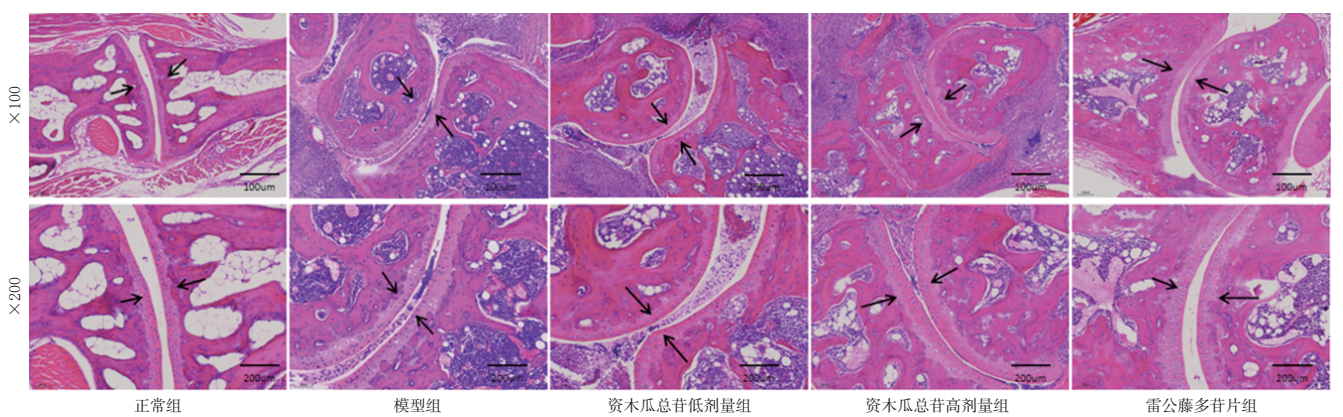
a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.3 资木瓜总苷对RA模型小鼠踝关节组织病理形态学变化的影响

正常组小鼠踝关节滑膜正常，软骨面光滑，关节结构完整，无骨质破坏，无炎症细胞浸润，关节间隙正常。模型组小鼠踝关节可见滑膜组织增生，骨髓腔内可见较多增生聚集的炎症细胞，并有血管翳形成，关节间隙变窄，关节表面有明显缺损，关节破坏明显。各给药组小鼠踝关节的上述病理情况均有所好转。结果见图1。

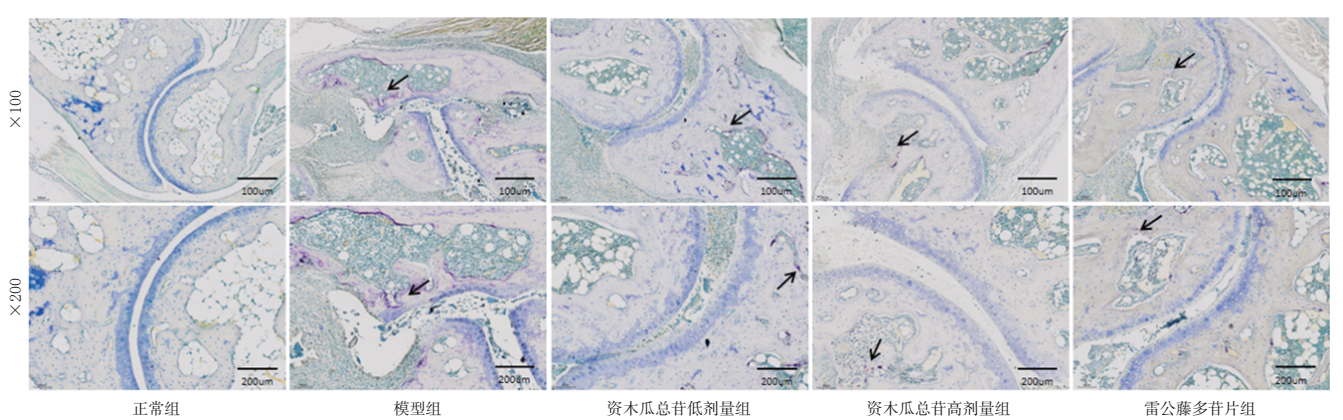
3.4 资木瓜总苷对RA模型小鼠踝关节组织中破骨细胞活化的影响

正常组小鼠踝关节组织中破骨细胞数目较少，而模型组小鼠踝关节组织中破骨细胞数目明显增多，提示存在明显的关节骨破坏。与模型组比较，各给药组小鼠踝关节组织中破骨细胞数目均减少，表明给药后小鼠骨破坏程度减轻。结果见图2。



注：箭头所指为关节间隙

图1 各组小鼠踝关节病理形态学观察的显微图（HE染色）



注：箭头所指为破骨细胞

图2 各组小鼠踝关节破骨细胞活化情况观察的显微图（TRAP染色）

3.5 资木瓜总苷对RA模型小鼠踝关节软骨组织破坏的影响

正常组小鼠踝关节软骨组织表面光滑完整。模型组小鼠踝关节软骨组织表面崎岖不平、断裂，软骨组织层变薄，软骨细胞数目明显减少。与模型组比较，各给药组小鼠踝关节软骨组织表面较光滑，软骨组织层增厚，软骨细胞数目明显增多。结果见图3。

3.6 资木瓜总苷对RA模型小鼠血清/踝关节组织中炎症因子含量的影响

与正常组比较，模型组小鼠血清中IL-6含量及踝关节组织中TNF-α含量均显著升高（$P<0.05$），而踝关节组织中IL-4、IL-10含量均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组小鼠血清中IL-6含量及踝关节组织中TNF-α含量均显著降低（$P<0.05$），而踝关节组织中IL-4、IL-10含量均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

表2 各组小鼠血清中IL-6及踝关节组织中TNF-α、IL-4、IL-10含量测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，pg/mL）

组别	IL-6	TNF-α	IL-4	IL-10
正常组	126.96±31.11	72.76±22.31	269.75±9.74	309.24±12.34
模型组	3 088.90±372.45[a]	258.98±57.39[a]	150.87±8.56[a]	140.93±11.68[a]
资木瓜总苷低剂量组	764.01±44.56[b]	144.92±28.25[b]	182.59±21.23[b]	214.32±19.02[b]
资木瓜总苷高剂量组	294.38±74.47[b]	126.79±43.08[b]	191.96±19.56[b]	259.62±16.94[b]
雷公藤多苷片组	251.59±34.62[b]	118.74±18.96[b]	243.86±17.16[b]	279.69±22.96[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.7 资木瓜总苷对RA模型小鼠踝关节组织中RANKL/RANK/OPG信号通路相关蛋白表达的影响

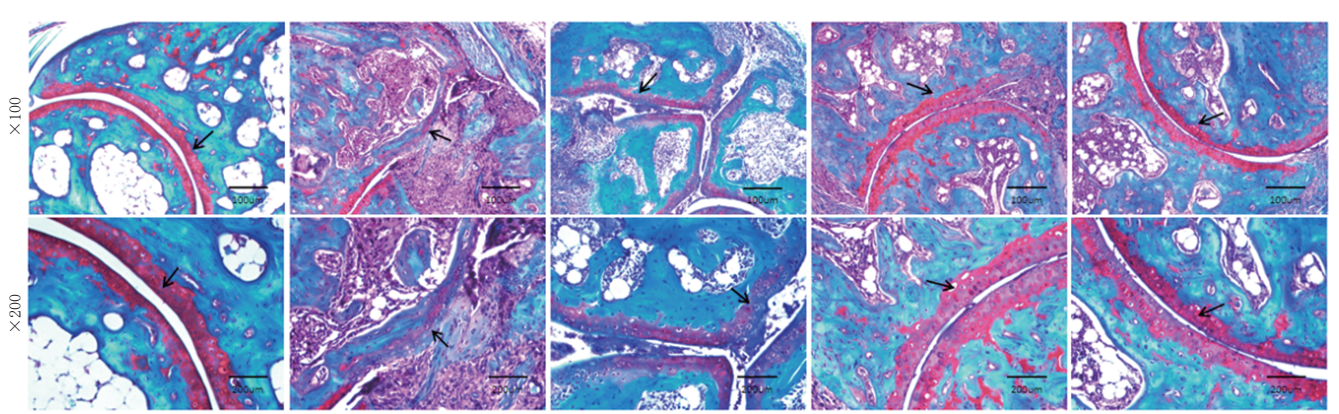
与正常组比较，模型组小鼠踝关节组织中RANKL、RANK、TRAF6、NFATC1蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$），OPG蛋白的表达水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，各给药组小鼠踝关节组织中RANKL、RANK、TRAF6、NFATC1蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$），OPG蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$）。结果见图4、表3。

4 讨论

木瓜为蔷薇科木瓜属植物，名列国家首批“药食同源”中药材名单。既往研究证明，木瓜具有抗炎、止痛的作用[15]。在前期研究中，本课题组发现中药皱皮木瓜的有效成分资木瓜总苷能通过肥大细胞-类胰蛋白酶-蛋白酶激活受体2-成纤维样滑膜细胞途径抑制K/B×N小鼠滑膜增生，具有抗RA作用[12]。雷公藤多苷是中药雷公藤的有效成分，被广泛用于RA的临床治疗[16]，因此本研究以雷公藤多苷片作为阳性对照药物。

本研究通过G6PI混合肽段诱导制备小鼠RA模型，然后灌胃模型小鼠资木瓜总苷进行干预。结果表明，造模后，模型组小鼠出现明显的关节红肿，并出现关节畸形；而资木瓜总苷干预后，小鼠关节肿胀程度明显减轻。本研究进一步通过HE染色法、TRAP染色法和番红固绿染色法观察小鼠踝关节组织，结果显示，模型组小鼠踝关节组织出现滑膜炎症细胞浸润，并有血管翳形成及软骨、骨破坏；而经资木瓜总苷干预后，小鼠踝关节的病理损伤明显改善。由此可见，资木瓜总苷可改善G6PI诱导的RA模型小鼠的关节炎症，缓解其关节疼痛，改善其关节软骨、骨破坏，具有RA骨保护作用。

骨破坏是造成RA患者关节残疾的主要因素，破骨细胞是唯一具有骨吸收能力的细胞，在RA骨破坏中起到重要作用[17]。研究发现，促炎细胞因子（如TNF-α、IL-6等）可促进破骨细胞分化，而抑炎细胞因子（如IL-4、IL-10等）则能抑制破骨细胞分化[18]。在破骨细胞分化过程中，RANKL与其受体RANK结合形成三聚复合体，随后募集TRAF6，促进下游核因子κB信号通路、磷脂酰肌醇-3-羟激酶-蛋白激酶信号通路及丝裂原激活的蛋白激酶家族的激活，进而启动NFATC1的转录，导致关节骨破坏的发生；而OPG则可竞争性地结合RANKL，从而抑制RANK信号通路的信号转导和骨吸收[19]。因此，阻断RANKL信号通路的活化、减少细胞因子释放、抑制破骨细胞分化、调节骨代谢紊乱是防治RA骨破坏的有效途径。本研究结果显示，与模型组比较，资木瓜总苷给药组小鼠的促炎细胞因子IL-6、TNF-α含量均显著降



注：箭头所指为软骨组织

图3 各组小鼠踝关节软骨组织破坏情况观察的显微图（番红固绿染色）

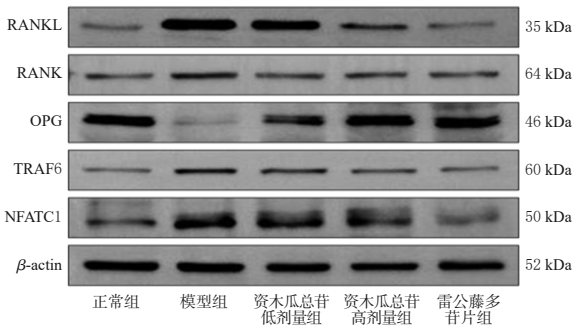


图4　各组小鼠踝关节组织中RANKL/RANK/OPG信号通路相关蛋白表达的电泳图

表3　各组小鼠踝关节组织中RANKL/RANK/OPG信号通路相关蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	RANKL/β-actin	RANK/β-actin	OPG/β-actin	TRAF6/β-actin	NFATC1/β-actin
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	2.23±0.03[a]	1.66±0.20[a]	0.27±0.12[a]	2.29±0.29[a]	1.90±0.07[a]
资木瓜总苷低剂量组	1.76±0.12[b]	1.19±0.11[b]	0.69±0.09[b]	1.58±0.17[b]	1.57±0.07[b]
资木瓜总苷高剂量组	1.49±0.19[b]	1.13±0.14[b]	0.94±0.23[b]	1.29±0.12[b]	0.94±0.16[b]
雷公藤多苷片组	1.22±0.15[b]	1.10±0.10[b]	1.00±0.22[b]	0.87±0.11[b]	0.80±0.29[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

低，而抑炎细胞因子IL-4、IL-10的含量均显著升高；小鼠踝关节组织中RANKL、RANK、NFATC1、TRAF6蛋白表达水平均显著降低，而OPG蛋白表达水平显著升高。以上结果表明，资木瓜总苷可通过调节炎症细胞因子水平、抑制RANKL/RANK/OPG信号通路活化来减轻RA模型小鼠的关节滑膜炎症及软骨、骨破坏。

综上所述，资木瓜总苷具有抑制G6PI诱导的RA模型小鼠的骨破坏作用，其作用机制可能与降低IL-6、TNF-α含量，升高IL-4、IL-10含量，抑制RANKL/RANK/OPG信号通路活化，从而抑制破骨细胞增殖和促进软骨及骨组织修复有关。本研究初步证实了资木瓜总苷可能是良好的RA骨保护药物，为优化RA的治疗方案提供了实验基础，但仍需进一步验证。

参考文献

[1] WU C Y, YANG H Y, LUO S F, et al. From rheumatoid factor to anti-citrullinated protein antibodies and anti-carbamylated protein antibodies for diagnosis and prognosis prediction in patients with rheumatoid arthritis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 686.

[2] XIN P L, JIE L F, CHENG Q, et al. Pathogenesis and function of interleukin-35 in rheumatoid arthritis[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 655114.

[3] LI Y Q, YANG C, JIA K X, et al. Fengshi Qutong capsule ameliorates bone destruction of experimental rheumatoid arthritis by inhibiting osteoclastogenesis[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 282: 114602.

[4] FRAENKEL L, BATHON J M, ENGLAND B R, et al. 2021 American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2021, 73(7): 924-939.

[5] 闫梦真，余婕，董甜甜，等. 由肠道菌群变化研究资木瓜总苷对K/B×N小鼠血清转移性关节炎的治疗作用[J]. 现代免疫学，2020，40(4)：265-271.

[6] 陈桂婷，郑倩倩，余婕，等. 资木瓜中莽草酸通过减少RBL-2H3细胞脱颗粒抑制大鼠软骨细胞分化[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2020，36(10)：890-896.

[7] TAKAYANAGI H. RANKL as the master regulator of osteoclast differentiation[J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 13-18.

[8] 李丽. 血清及关节液ANGPTL4、IL-17及RANKL与类风湿关节炎活动度的关系分析[J]. 中国医学创新，2022，19(18)：149-152.

[9] BRUNS L, FREY O, MORAWIETZ L, et al. Immunization with an immunodominant self-peptide derived from glucose-6-phosphate isomerase induces arthritis in DBA/1 mice[J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(4): R117.

[10] MENG M, CHEN S D, GAO X, et al. Adoptive immunotherapy of iNKT cells in glucose-6-phosphate isomerase (G6PI) -induced RA mice[J/OL]. J Vis Exp, 2020, 31(155)[2023-03-13]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32065164/.DOI: 10.3791/60048.

[11] 张瑞. 电针对CIA模型大鼠TNF-α、IL-1β和ICAM-1影响的实验研究[D]. 北京：北京中医药大学，2016.

[12] 周婷婷，陈先勇，陈桂婷，等. 通过MC-Tryptase-PAR-2-FLS途径探讨资木瓜总苷对K/B×N小鼠血清转移性关节炎的治疗作用[J]. 中国免疫学杂志，2021，37(4)：395-399，409.

[13] 冯群，孙蓉. 雷公藤多苷片抗炎作用及伴随肝毒性研究[J]. 中药新药与临床药理，2014，25(6)：713-716.

[14] WANG Q, QIN X Y, FANG J Y, et al. Nanomedicines for the treatment of rheumatoid arthritis: state of art and potential therapeutic strategies[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(5): 1158-1174.

[15] 马阮昕，詹晓婷，谢静文，等. 木瓜水提液抗炎、镇痛及免疫调节作用的实验研究[J]. 中国中医药科技，2017，24(5)：581-583.

[16] ZHENG W H, MEI Y F, CHEN C H, et al. The effectiveness and safety of *Tripterygium wilfordii* glycosides combined with disease-modifying anti-rheumatic drugs in the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of 40 randomized controlled trials[J]. Phytother Res, 2021, 35(6): 2902-2924.

[17] HUANG Z Y, LUO R, YANG L, et al. CPT1A-mediated fatty acid oxidation promotes precursor osteoclast fusion in rheumatoid arthritis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 838664.

[18] AMARASEKARA D S, YUN H, KIM S, et al. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks[J]. Immune Netw, 2018, 18(1): e8.

[19] HONMA M, IKEBUCHI Y, SUZUKI H. Mechanisms of RANKL delivery to the osteoclast precursor cell surface [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 27-33.

（收稿日期：2022-10-28　修回日期：2023-02-23）

（编辑：林　静）