防风石油醚提取物调节中性粒细胞胞外诱捕网对类风湿性关节炎大鼠的改善作用及机制Δ

张向阳[1*]，魏　薇[1]，徐　鹏[1]，李　宁[1]，葛文静[2]，王新义[1]，梁瑞峰[2,3]，薛爱荣[1#]（1.河南省中西医结合医院/河南省中医药研究院疼痛风湿科，郑州　450004；2.河南省中西医结合医院/河南省中医药研究院中药研究所，郑州　450004；3.河南中医药大学药学院，郑州　450046）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）19-2345-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.19.05

摘　要　目的　探究防风石油醚提取物通过调节中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）对类风湿性关节炎（RA）大鼠的改善作用及机制。**方法**　采用牛Ⅱ型胶原与弗氏完全佐剂建立大鼠RA模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组和防风石油醚提取物低、中、高剂量组（55、110、220 mg/kg），另设不造模的正常组，每组10只。各组大鼠灌胃相应药液或等体积2%吐温-80溶液，每天1次，连续28 d。观察大鼠足趾肿胀度并进行关节炎指数（AI）评分，检测大鼠血清中白细胞介素1β（IL-1β）、IL-10、IL-17、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、25-羟基维生素D_3[25（OH）D_3]、髓过氧化物酶（MPO）、中性粒细胞弹性蛋白酶（NE）和NETs的水平，观察大鼠踝关节病理学形态变化，检测大鼠踝关节中瓜氨酸化组蛋白H3（CitH3）以及滑膜组织中细胞色素P450 24A1（CYP24A1）、细胞色素P450 27B1（CYP27B1）、维生素D受体（VDR）、肽基精氨酸脱亚胺酶4（PAD4）的表达水平。**结果**　与模型组比较，防风石油醚提取物中、高剂量组大鼠给药后第14天至第28天的足趾肿胀度和AI评分均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；血清中IL-1β、IL-17、TNF-α、MPO、NE和NETs水平均显著降低，IL-10、25（OH）D_3水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；踝关节间隙变宽，结构明显改善；踝关节中CitH3以及滑膜组织中CYP24A1、PAD4表达水平均显著降低，滑膜组织中CYP27B1、VDR表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　防风石油醚提取物可能通过调控维生素D系统，抑制NETs生成，进而改善RA症状。

关键词　类风湿性关节炎；防风；石油醚提取物；维生素D；中性粒细胞胞外诱捕网；炎症因子

Improvement effect and mechanism of petroleum ether extract of *Saposhnikovia divaricata* on rheumatoid arthritis rats by regulating neutrophil extracellular traps

ZHANG Xiangyang[1], WEI Wei[1], XU Peng[1], LI Ning[1], GE Wenjing[2], WANG Xinyi[1], LIANG Ruifeng[2,3], XUE Airong[1]（1. Dept. of Pain and Rheumatology, Henan Integrative Medicine Hospital/Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, Henan Integrative Medicine Hospital/Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China; 3. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the improvement effect and mechanism of petroleum ether extract of *Saposhnikovia divaricata* on rheumatoid arthritis (RA) rats by regulating neutrophil extracellular traps (NETs). **METHODS** Establishment of rat RA model using bovine type Ⅱ collagen and Freund's complete adjuvant. The model rats were randomly divided into model group and low-dose, middle-dose and high-dose groups (55, 110, 220 mg/kg) of petroleum ether extract of *S. divaricata*; the normal group without modeling was also established, with 10 rats in each group. Each group was given corresponding drugs or constant volume of 2% Tween-80 solution intragastrically, once a day, for consecutive 28 days. The toe swelling degree in rats was observed, and the arthritis index (AI) was scored. The serum levels of interleukin-1β (IL-1β), IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-α (TNF-α), 25-hydroxyvitamin D_3 [25(OH)D_3], myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE) and NETs in rats were detected. The histopathological changes in ankle joint were observed. The expression of citrullinated histone H3 (CitH3) in ankle joint as well as the expressions of cytochrome P450 24A1 (CYP24A1), cytochrome P450 27B1 (CYP27B1), vitamin D receptor (VDR) and peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) in synovium were all determined. **RESULTS**

Δ**基金项目**　国家自然科学基金面上项目（No.81873022）；河南省中医药科学研究专项课题（No.2019ZYZD09）

＊**第一作者**　副主任医师，硕士。研究方向：中药防治风湿性疾病。E-mail：zhhn371@163.com

＃**通信作者**　主任医师，硕士生导师。研究方向：中药防治风湿性疾病。E-mail：zhongyao626@126.com

Compared with the model group, the toe swelling degree and AI score in the middle-dose and high-dose groups of petroleum ether extract of *S. divaricata* decreased significantly from day 14 to day 28 after administration ($P<0.05$ or $P<0.01$). The serum levels of IL-1β, IL-17, TNF-α, MPO, NE and NETs decreased significantly, while the levels of IL-10 and 25(OH)D_3 increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The widened ankle joint space and the improved structure were found; the expression of CitH3 in ankle joint, and the expressions of CYP24A1 and PAD4 in synovium were down-regulated significantly, while the expressions of CYP27B1 and VDR were up-regulated significantly in synovium ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** The petroleum ether extract of *S. divaricata* may inhibit the production of NETs and improve the symptoms of RA by regulating the vitamin D system.
KEYWORDS rheumatoid arthritis; *Saposhnikovia divaricata*; petroleum ether extract; vitamin D; neutrophil extracellular traps; inflammatory factors

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种以滑膜炎症为主要特征的进行性自身免疫疾病，主要表现为关节滑膜炎症和异常增生、关节与骨破坏，最终引发关节畸形和功能丧失[1]。RA致病因素众多，中性粒细胞胞外诱捕网（neutrophil extracellular traps，NETs）的大量形成被认为是RA致病的关键环节。RA患者的外周血液和关节液中存在大量中性粒细胞，当其受刺激后可激活髓过氧化物酶（myeloperoxidase，MPO），并触发中性粒细胞弹性蛋白酶（neutrophil elastase，NE）从嗜酸性颗粒中转运至细胞核，从而水解染色质上的组蛋白，使染色质成为游离的DNA，最终形成以DNA为骨架的NETs[2]。高水平的NETs不仅可增加抗环瓜氨酸肽抗体的分泌进而加重RA病情，而且可促进滑膜成纤维细胞增殖并产生促炎因子[3]。研究发现，维生素D、维生素D受体（vitamin D receptor，VDR）及相关代谢酶构成的维生素D系统可通过抑制核因子κB信号通路减少NETs的形成[4]。流行病学调查也显示，维生素D水平与RA的发病率和疾病活动度之间呈负相关[5]。

中药防风具有祛风解表、胜湿止痛的功效，临床常用于治疗感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒等症。在治疗RA的方剂中，防风也常作为基础组方应用，如大防风汤、防风通络丸等。防风主要含有色原酮、香豆素、挥发油等活性成分，具有镇痛、抗炎等药理作用[6]。本课题组前期研究发现，防风石油醚提取物、正丁醇提取物均具有抗RA作用，且石油醚提取部位的抗RA作用更为显著，可降低关节炎大鼠的足趾肿胀度，抑制RA成纤维样滑膜细胞增殖[7]。本研究在前期实验基础上，通过注射Ⅱ型胶原建立大鼠RA模型，基于维生素D系统和NETs考察防风石油醚提取物对RA大鼠的改善作用及机制，以期为RA的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Synergy NEO型全功能酶标仪（美国Bio-Tek公司）、PV-200型足趾容积测量仪（成都泰盟软件有限公司）、2K15型高速低温离心机（德国Sigma公司）、RM2245型切片机（德国Leica公司）、CX31型显微镜（日本Olympus公司）、Fluor Chem R型凝胶成像分析仪（美国Protein Simple公司）、1290 Infinity Ⅱ型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）。

1.2 主要药品与试剂

防风（批号2301041）购自安徽普仁中药饮片有限公司，经河南省中医药研究院王慧森副研究员鉴定为伞形科植物防风*Saposhnikovia divaricata*（Turcz.）Schischk.的干燥根。香柑内酯、异欧前胡素对照品（批号分别为2023157、2022331，纯度均大于98%）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；牛Ⅱ型胶原（批号20021）购自美国Chondrex公司；免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒、苏木素-伊红（HE）染色试剂盒（批号分别为P0615、P0203、C0105S）均购自上海碧云天生物技术有限公司；弗氏完全佐剂（批号068K8761）购自美国Sigma公司；白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-10、IL-17、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）试剂盒（批号分别为20230704、20230609、20230719、20230602）均购自北京索莱宝科技有限公司；25-羟基维生素D_3[25-hydroxyvitamin D_3，25(OH)D_3]；用于评价体内维生素D水平]、MPO、NE、NETs酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为ml038316、ml003250、ml003280、ml060524）均购自上海酶联生物科技有限公司；兔源细胞色素P450 27B1（cytochrome P450 27B1，CYP27B1）多克隆抗体、兔源细胞色素P450 24A1（cytochrome P450 24A1，CYP24A1）多克隆抗体、兔源VDR多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号分别为bs14146R、bs3899R、bs10618R、bs0295G）均购自北京博奥森生物技术有限公司；兔源瓜氨酸化组蛋白H3（citrullinated histone H3，CitH3）、肽基精氨酸脱亚胺酶4（peptidyl arginine deiminase 4，PAD4）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体（批号分别为ab281584、ab214810、ab181602）均购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为8周龄的SPF级雄性SD大鼠，共70只，体重（200±10）g，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。大鼠饲养于河南省中医药研究院实验动物中心（环境温度22～25 ℃、相对湿度50%～60%、12 h/12 h明暗交

替），自由摄食饮水。本实验方案经河南省中医药研究院实验动物福利伦理审查委员会审核和批准（伦理审查批件号为HNTCMDW-20230214）。

2 方法

2.1 药物制备

参考本课题组前期研究方法制备[8]：将防风饮片粉碎过40目筛，称取1 kg粉末，加入95%乙醇8 L加热回流提取2次，每次1.5 h，合并滤液并回收溶剂至无乙醇气味，得乙醇提取物。残渣用6 L蒸馏水煎煮2次，每次1.0 h，合并滤液，浓缩干燥后得水提取物。将乙醇提取物与水提取物混合后用适量蒸馏水制成混悬液，用等体积的石油醚萃取4次，合并萃取液，减压浓缩，得石油醚提取物22.73 g，得率为2.27%。采用高效液相色谱法检测石油醚提取物中香柑内酯、异欧前胡素含量分别为16.43、9.27 mg/g。实验时取石油醚提取物溶于2%吐温-80溶液后使用。

2.2 动物分组、造模与给药

大鼠适应性饲养5 d后，随机分为正常组（10只）和造模组（60只）。将牛Ⅱ型胶原溶液（2.0 g/L，用0.1 mol/L醋酸溶解）与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化，制成含牛Ⅱ型胶原（1 g/L）的乳化剂。造模组大鼠于5个点（背部3个点、尾根部及右后足跟部各1个点，0.1 mL/点）注射乳化剂；7 d后每只大鼠于尾根部再次注射乳化剂0.2 mL以加强免疫，建立RA大鼠模型[9]。正常组大鼠不造模，仅在相应部位注射等体积生理盐水代替。14 d后进行关节炎指数（arthritis index，AI）评分，具体评分标准为：关节无发红、无肿胀记为0分；足趾关节轻度肿胀或局部发红记为1分；足趾至足背肿胀或发红记为2分；踝关节及以下红肿且活动轻微受限记为3分；关节严重红肿、畸形、僵硬且活动明显受限记为4分；四肢累计得分为AI评分，最高分为16分，评分≥4分视为造模成功[10]。

选取造模成功的大鼠40只按随机数字表法分为模型组和防风石油醚提取物低、中、高剂量组（55、110、220 mg/kg，相当于防风生药临床等效剂量的2.5、5、10倍），每组10只。正常组和模型组大鼠灌胃等体积2%吐温-80溶液，其余各组大鼠灌胃相应药物，每天1次，连续28 d。实验期间，观察大鼠的一般情况，包括大鼠毛发色泽、精神状态、活动情况、关节肿胀等的变化。

2.3 大鼠足趾肿胀度及AI评分

分别于给药前及给药后第7、14、21、28天用足趾容积测量仪测量大鼠右后足容积，以与造模前的足趾容积差值为足趾肿胀度。定期观察大鼠足趾及关节红肿、畸形、活动等情况，并进行AI评分。

2.4 大鼠血清中炎症因子、25（OH）D3、MPO、NE和NETs的检测

采用ELISA法检测。末次给药24 h后，用异氟烷麻醉大鼠，腹主动脉取血，静置30 min后，以3 000 r/min离心10 min分离血清，按照试剂盒说明书方法检测大鼠血清中IL-1β、IL-10、IL-17、TNF-α、25（OH）D_3、MPO、NE和NETs的水平。

2.5 大鼠踝关节病理学形态观察

采用HE染色法观察。采血后处死大鼠，小心分离其右后踝关节，置于4%多聚甲醛溶液中固定48 h，经脱钙、脱水、透明、石蜡包埋后，进行常规切片。取部分组织切片（剩余部分用于CitH3表达水平的检测）置于二甲苯中脱蜡后放入梯度乙醇中水化，随后将切片放入苏木素染液中染色5 min，用流水冲洗后再浸入伊红染液中染色2 min，经中性树胶封固后，采用显微镜观察大鼠踝关节病理学形态改变情况。

2.6 大鼠踝关节中CitH3表达水平的检测

采用免疫组化法检测。取大鼠踝关节组织切片，脱蜡水化，以柠檬酸钠抗原修复液修复、10%正常山羊血清室温封闭1 h，随后滴加CitH3一抗（稀释度为1∶300），4 ℃孵育过夜，然后以磷酸盐缓冲液冲洗3次；滴加二抗（稀释度为1∶500），37 ℃孵育30 min，再次清洗3次后滴加DAB显色，以苏木素复染，经分化、冲洗、返蓝、梯度乙醇脱水后，以二甲苯透明、封片，再置于显微镜下观察。采用Image-Pro Plus 6.0软件分析CitH3蛋白的阳性表达水平，结果以平均光密度值表示。每张切片随机选3个视野分析，取其平均值。

2.7 大鼠滑膜组织中CYP24A1、CYP27B1、VDR、PAD4表达水平的检测

采用Western blot法检测。分离各组大鼠右后膝关节滑膜组织，加入裂解液研磨后提取总蛋白，分离上清液，根据BCA蛋白定量试剂盒说明书方法检测蛋白浓度。取蛋白样品适量，加入5×上样缓冲液煮沸变性，取等量蛋白经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳在120 V分离60 min，通过200 mA恒流将蛋白电转至聚偏二氟乙烯膜上，加5%脱脂奶粉室温封闭1 h；弃封闭液后漂洗3次，分别加入CYP24A1（稀释度为1∶800）、CYP27B1（稀释度为1∶1 000）、VDR（稀释度为1∶800）、PAD4（稀释度为1∶800）及GAPDH一抗（稀释度为1∶5 000），4 ℃孵育过夜；漂洗3次，滴加相应二抗（稀释度为1∶8 000）室温孵育60 min，然后滴加ECL发光液曝光，采用凝胶成像仪拍照，以目的蛋白与内参蛋白GAPDH的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 26.0软件分析数据。计量资料经Shapiro-Wilk检验均服从正态分布，以$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较使用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 防风石油醚提取物对RA大鼠一般情况的影响

正常组大鼠毛发正常有光泽，活动自如，反应敏捷。模型组大鼠毛发干黄，精神状态差，下肢踝关节处出现明显肿胀，行动迟缓，活动受限。与模型组比较，防风石油醚提取物中、高剂量组大鼠相关症状明显改善，精神状况一般，双下肢关节虽仍有肿胀，但是活动度较好。

3.2 防风石油醚提取物对RA大鼠足趾肿胀度的影响

与正常组比较，给药前后模型组大鼠足趾肿胀度均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，给药后，防风石油醚提取物各剂量组大鼠足趾肿胀度均不同程度地降低，且部分差异具有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表1。

表1 各组大鼠足趾肿胀度的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	给药前	给药后			
		第7天	第14天	第21天	第28天
正常组	0.06±0.05	0.08±0.05	0.07±0.04	0.08±0.06	0.07±0.05
模型组	1.28±0.21[a]	1.35±0.33[a]	1.38±0.36[a]	1.36±0.34[a]	1.35±0.36[a]
防风石油醚提取物低剂量组	1.32±0.24	1.19±0.28	1.17±0.29	1.09±0.27[b]	1.07±0.28[b]
防风石油醚提取物中剂量组	1.24±0.20	1.14±0.25	1.08±0.26[b]	0.97±0.22[c]	0.92±0.21[c]
防风石油醚提取物高剂量组	1.33±0.23	1.06±0.21[b]	0.99±0.23[c]	0.90±0.19[c]	0.84±0.18[c]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

3.3 防风石油醚提取物对RA大鼠AI评分的影响

与正常组比较，给药前后模型组大鼠AI评分均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，给药后，防风石油醚提取物各剂量组大鼠AI评分均不同程度地降低，且部分差异具有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2。

表2 各组大鼠AI评分的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，分）

组别	给药前	给药后			
		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	9.70±1.70[a]	9.80±1.75[a]	9.70±1.83[a]	9.90±1.80[a]	9.60±1.78[a]
防风石油醚提取物低剂量组	9.60±1.71	9.50±1.78	9.10±1.73	8.50±1.72[b]	8.10±1.66[b]
防风石油醚提取物中剂量组	9.80±1.75	8.90±1.73	8.30±1.64[b]	7.80±1.70[c]	7.30±1.64[c]
防风石油醚提取物高剂量组	9.90±1.73	8.20±1.62[b]	7.50±1.58[c]	7.10±1.60[c]	6.70±1.70[c]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

3.4 防风石油醚提取物对RA大鼠血清中炎症因子的影响

与正常组比较，模型组大鼠血清中IL-1β、IL-17和TNF-α水平均显著升高，IL-10水平显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，防风石油醚提取物中、高剂量组大鼠血清中IL-1β、IL-17和TNF-α水平均显著降低，IL-10水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表3。

3.5 防风石油醚提取物对RA大鼠血清中25（OH）D3、MPO、NE和NETs的影响

与正常组比较，模型组大鼠血清中25（OH）D_3水平显著降低，MPO、NE和NETs水平均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，防风石油醚提取物中、高剂量组大鼠血清中25（OH）D_3水平均显著升高，MPO、NE和NETs水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表4。

表3 各组大鼠血清中炎症因子水平的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，ng/L）

组别	IL-1β	IL-10	IL-17	TNF-α
正常组	24.29±3.85	67.85±9.81	35.33±4.94	31.65±5.83
模型组	98.87±19.74[a]	41.29±7.22[a]	60.86±11.65[a]	54.91±10.74[a]
防风石油醚提取物低剂量组	89.68±18.59	46.80±8.68	53.57±9.78	49.62±9.19
防风石油醚提取物中剂量组	80.73±17.36[b]	51.66±8.95[b]	46.22±9.39[c]	45.36±8.20[b]
防风石油醚提取物高剂量组	71.49±15.91[c]	58.32±9.67[c]	42.75±7.37[c]	39.44±7.65[c]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

表4 各组大鼠血清中25（OH）D_3、MPO、NE和NETs水平的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，μg/L）

组别	25（OH）D_3	MPO	NE	NETs
正常组	28.06±3.04	83.25±17.91	12.57±2.83	18.49±3.14
模型组	15.77±3.29[a]	151.03±25.36[a]	23.09±5.11[a]	32.15±5.27[a]
防风石油醚提取物低剂量组	17.44±3.37	138.55±23.82	21.45±4.63	29.71±5.09
防风石油醚提取物中剂量组	19.59±3.62[b]	123.76±20.75[c]	18.86±4.16[b]	26.93±4.75[b]
防风石油醚提取物高剂量组	21.68±3.43[c]	112.64±18.29[c]	16.71±3.77[c]	23.27±4.46[c]

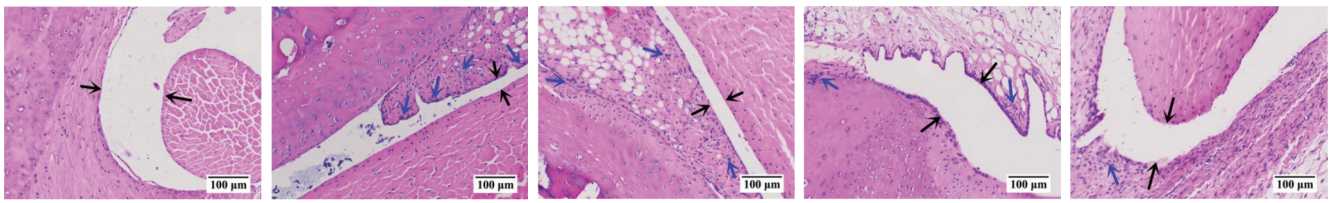
a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

3.6 防风石油醚提取物对RA大鼠踝关节组织病理学的影响

正常组大鼠踝关节结构清晰、间隙正常，软骨面光滑、未见骨质破坏，滑膜细胞排列有序，未见炎症细胞浸润。模型组大鼠踝关节可见大量炎症细胞浸润，关节间隙变窄，结缔及滑膜组织增生，软骨面较为粗糙，关节出现侵蚀，结构破坏严重。防风石油醚提取物低剂量组大鼠踝关节组织可见炎症细胞，但关节结构及骨质破坏有所改善；防风石油醚提取物中、高剂量组大鼠踝关节间隙变宽，结构明显改善，腔中可见少量炎症细胞，滑膜组织轻度增生。各组大鼠踝关节病理学形态见图1。

3.7 防风石油醚提取物对RA大鼠踝关节中CitH3表达的影响

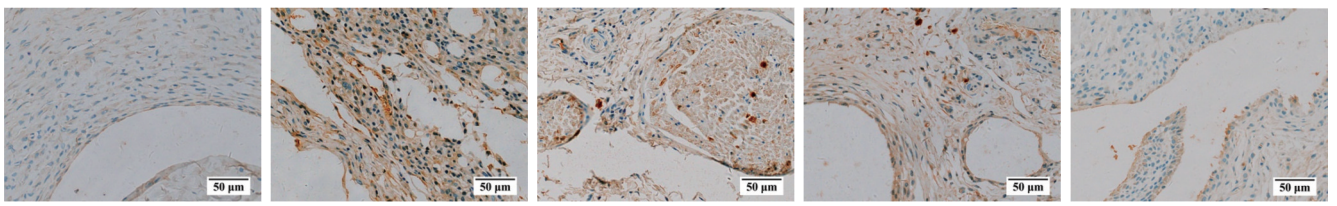
免疫组化染色结果显示，正常组大鼠踝关节可见少量CitH3阳性细胞，且染色较浅；模型组大鼠踝关节中CitH3阳性细胞数量增多且染色较深，主要定位于被侵袭的滑膜组织和被侵蚀的关节面周围。与正常组（平均光密度值为48.29±9.17）比较，模型组大鼠踝关节中CitH3表达水平（平均光密度值为107.06±20.62）显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，防风石油醚提取物各剂量组大鼠踝关节中CitH3阳性细胞数量减少，染色变浅，表达水平（平均光密度值分别为90.63±18.04、75.49±16.25、64.02±14.81）均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图2。



A.正常组　B.模型组　C.防风石油醚提取物低剂量组　D.防风石油醚提取物中剂量组　E.防风石油醚提取物高剂量组

注：黑色箭头表示关节间隙；蓝色箭头表示炎症细胞。

图1　各组大鼠踝关节病理显微图（HE染色）

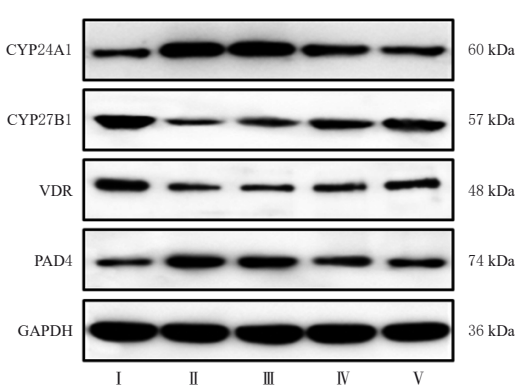


A.正常组　B.模型组　C.防风石油醚提取物低剂量组　D.防风石油醚提取物中剂量组　E.防风石油醚提取物高剂量组

图2　各组大鼠踝关节中CitH3的表达情况（免疫组化染色）

3.8　防风石油醚提取物对RA大鼠滑膜组织中CYP24A1、CYP27B1、VDR、PAD4表达的影响

与正常组比较，模型组大鼠滑膜组织中CYP24A1、PAD4表达水平均显著升高，CYP27B1、VDR表达水平均显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，防风石油醚提取物中、高剂量组大鼠滑膜组织中CYP24A1、PAD4表达水平均显著降低，CYP27B1、VDR表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图3、表5。



Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：防风石油醚提取物低剂量组；Ⅳ：防风石油醚提取物中剂量组；Ⅴ：防风石油醚提取物高剂量组。

图3　各组大鼠滑膜组织中CYP24A1、CYP27B1、VDR、PAD4蛋白表达的电泳图

表5　各组大鼠滑膜组织中CYP24A1、CYP27B1、VDR、PAD4蛋白表达水平的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	CYP24A1/GAPDH	CYP27B1/GAPDH	VDR/GAPDH	PAD4/GAPDH
正常组	0.36±0.11	0.59±0.17	0.47±0.15	0.34±0.10
模型组	0.74±0.19[a]	0.23±0.06[a]	0.24±0.06[a]	0.65±0.23[a]
防风石油醚提取物低剂量组	0.71±0.20	0.35±0.09	0.27±0.08	0.59±0.21
防风石油醚提取物中剂量组	0.54±0.15[b]	0.44±0.14[b]	0.33±0.10[c]	0.45±0.15[c]
防风石油醚提取物高剂量组	0.45±0.13[b]	0.52±0.16[b]	0.39±0.12[b]	0.41±0.13[b]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

4　讨论

目前药物是治疗RA的主要方法，常用的有抗风湿药、非甾体抗炎药、糖皮质激素等，但这些药物的不良反应较多，患者难以耐受，限制了其长期使用[11]。中医药治疗RA的效果确切，且具有较好的安全性，逐渐成为临床治疗RA的重要手段。

理想的动物模型在研究疾病发生发展机制和相关药物疗效评价中具有关键作用。RA大鼠的发病机制、症状表现等与人类RA具有较高的相似性，被公认为是研究RA的成熟模型[12]。在本研究中，RA大鼠表现出典型的关节炎症状，包括足趾肿胀、关节活动受限及AI评分升高等；HE染色结果进一步证实RA大鼠关节结构紊乱和炎症细胞浸润。经防风石油醚提取物干预后，大鼠相关症状得到了明显改善，关节组织病变减轻。这表明防风石油醚提取物对RA具有治疗潜力。

免疫功能紊乱是RA发生的重要因素，其中辅助性T细胞17（Th17）和调节性T细胞（Treg）的失衡起着关键作用[13]。Th17细胞分泌IL-17、TNF-α等促炎因子，招募中性粒细胞，然后激活T细胞，从而加重炎症的发生发展；Treg细胞主要分泌IL-10等抑炎因子，能抑制T细胞的激活，并上调共刺激分子和Ⅱ类主要组织相容性复合体分子，从而保护骨组织免受损伤[14]。因此，调控机体内促炎和抗炎因子的失衡状态是防治RA的重要策略之一。本研究结果显示，经防风石油醚提取物干预后，RA大鼠血清中IL-1β、IL-17和TNF-α水平降低，IL-10水平升高。这表明防风石油醚提取物对RA大鼠具有较好的抗炎作用。

维生素D的缺乏可促进RA的发生发展，RA患者血清中25（OH）D_3水平与RA的病变程度呈负相关[15]。临床试验表明，补充维生素D可有效降低RA发病风险[16]。

维生素D不仅直接参与了机体的钙磷代谢、骨盐沉积，而且还可通过抑制T细胞、B细胞的增殖分化减少IL-1β、TNF-α等促炎因子的分泌，从而减轻RA的炎症程度[17]。天然维生素D包括维生素D_2和维生素D_3，二者均无活性，在体内先被25-羟化酶催化成25（OH）D_3；25（OH）D_3进一步经CYP27B1代谢生成具有活性的1，25-二羟维生素D_3，然后在维生素D结合蛋白的转运下与靶组织的VDR结合发挥生物学效应[18]。CYP24A1则可将25（OH）D_3、1，25-二羟维生素D_3催化为无活性的24，25-二羟维生素D_3，而24，25-二羟维生素D_3是维生素D系统灭活的关键酶[19]。研究表明，CYP27B1、CYP24A1和VDR除了在肝肾组织中表达，还表达于巨噬细胞、T细胞、树突状细胞等免疫细胞中，并受炎症因子调控[20]。本研究结果显示，RA大鼠血清中25（OH）D_3水平和滑膜组织中CYP27B1、VDR表达水平均降低，CYP24A1表达水平均升高；经防风石油醚提取物干预后，大鼠血清或滑膜组织中上述指标水平均逆转。这表明防风石油醚提取物可通过调控维生素D系统对RA产生改善作用。

中性粒细胞受到病原体的刺激后可活化MPO，并促使NE水解染色质上的组蛋白，使染色质去掉组装成为游离DNA，从而形成由DNA纤维、组蛋白和抗菌蛋白组成的网状NETs[21]。研究表明，NETs可加重炎症反应进而对组织造成损伤，许多免疫性疾病（如RA、系统性红斑狼疮等）均被证明与高水平的NETs有关[22]。维生素D可通过抑制核因子κB信号通路、下调还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶，减少NETs的产生[4]。此外，PAD4是PAD的一种亚型，表达于中性粒细胞，其催化组蛋白的精氨酸残基以脱亚胺的方式水解为CitH3，而CitH3可驱动染色质去致密化，从而促进NETs的形成[23]。PAD4是RA等自身免疫性疾病的始动因素，介导了NETs的生成[24]。本研究结果显示，RA大鼠血清中MPO、NE、NETs水平以及踝关节中CitH3和滑膜中PAD4的表达水平均升高；经防风石油醚提取物干预后，大鼠上述指标均逆转。这表明防风石油醚提取物可通过下调PAD4和CitH3表达，抑制NETs生成及其组分MPO、NE的释放，从而改善RA症状。

综上所述，防风石油醚提取物可通过调控维生素D系统，抑制NETs生成，进而改善RA病理症状。

参考文献

[1] VENETSANOPOULOU A I，ALAMANOS Y，VOULGARI P V，et al. Epidemiology and risk factors for rheumatoid arthritis development[J]. Mediterr J Rheumatol，2023，34（4）：404-413.

[2] 刘春晓，胡庆华. 中性粒细胞胞外诱捕网及其参与的免疫炎症性疾病研究进展[J]. 药学研究，2020，39（7）：405-410.
LIU C X，HU Q H. Research progress on neutrophil extracellular traps and related immune-inflammatory diseases [J]. J Pharm Res，2020，39（7）：405-410.

[3] OKAMOTO Y，DEVOE S，SETO N，et al. Association of sputum neutrophil extracellular trap subsets with IgA anti-citrullinated protein antibodies in subjects at risk for rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheumatol，2022，74（1）：38-48.

[4] HANDONO K，SIDARTA Y O，PRADANA B A，et al. Vitamin D prevents endothelial damage induced by increased neutrophil extracellular traps formation in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Acta Med Indones，2014，46（3）：189-198.

[5] TV P，KUMAR B，CHIDAMBARAM Y，et al. Correlation of rheumatoid arthritis disease severity with serum vitamin D levels[J]. Clin Nutr ESPEN，2023，57：697-702.

[6] 韩春雯，张丽娜，杨秀娟. 基于网络药理学的防风治疗类风湿性关节炎分子机制研究[J]. 长治医学院学报，2020，34（6）：401-407.
HAN C W，ZHANG L N，YANG X J. Study on the molecular mechanism of Saposhnikoviae Radix for rheumatoid arthritis based on network pharmacology[J]. J Changzhi Med Coll，2020，34（6）：401-407.

[7] 宋献美，李兵杰，张艳燕，等. 防风石油醚提取物对胶原诱导型关节炎大鼠p38 MAPK磷酸化和AQP-1表达的影响[J]. 中药药理与临床，2021，37（5）：80-85.
SONG X M，LI B J，ZHANG Y Y，et al. Effects of petroleum ether extract of *Saposhnikovia divaricata* on p38 MAPK phosphorylation and AQP-1 expression in collagen-induced arthritis rats[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med，2021，37（5）：80-85.

[8] 梁瑞峰，葛文静，李兵杰，等. 防风不同极性部位对腹泻大鼠的止泻作用和结肠不同亚型AQP的调控[J]. 天然产物研究与开发，2021，33（8）：1348-1355.
LIANG R F，GE W J，LI B J，et al. Antidiarrheal effect of different polarity extracts from *Saposhnikovia divaricata* and their regulatory roles on colonic expression of different AQP subtypes[J]. Nat Prod Res Dev，2021，33（8）：1348-1355.

[9] LIU C H，LIN L，CUI W D，et al. *Lactiplantibacillus plantarum* HG20 attenuates Ⅱ type collagen-induced rheumatoid arthritis in rats via anti-inflammatory and inhibition of apoptosis[J]. J Appl Microbiol，2022，132（3）：2323-2330.

[10] 唐今扬，周彩云，王鑫，等. 金藤清痹颗粒通过调节免疫微环境对类风湿关节炎大鼠的干预作用[J]. 中成药，2022，44(11)：3459-3468.
TANG J Y，ZHOU C Y，WANG X，et al. Effects of Jinteng qingbi granules on rheumatoid arthritis rats through intervention of immune microenvironment[J]. Chin Tradit Pat Med，2022，44(11)：3459-3468.

[11] 杨琴，杨进锋，杨玉涛，等. 类风湿关节炎药物及手术治疗的研究进展[J]. 中华中医药学刊，2023，41(1)：133-136.
YANG Q，YANG J F，YANG Y T，et al. Research progress on drug and surgical treatment of rheumatoid arthritis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med，2023，41(1)：133-136.

[12] 江梦园，闫敏，李晓芳，等. 类风湿性关节炎动物模型的研究进展[J]. 世界中医药，2023，18(24)：3597-3602.
JIANG M Y，YAN M，LI X F，et al. Research progress in animal models of rheumatoid arthritis[J]. World Chin Med，2023，18(24)：3597-3602.

[13] WANG T，RUI J B，SHAN W Q，et al. Imbalance of Th17，Treg，and helper innate lymphoid cell in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol，2022，41(12)：3837-3849.

[14] 秦黄冠，周刊，付宇蕾，等. 飞龙掌血醇提物对类风湿性关节炎“肠-免疫-关节轴”中Th17/Treg平衡的影响[J]. 中国医院药学杂志，2023，43(10)：1089-1094.
QIN H G，ZHOU K，FU Y L，et al. Effect of ethanolic extract of *Toddalia asiatica* on balance of Th17/Treg in the “gut-immune-joint” axis of rheumatoid arthritis[J]. Chin J Hosp Pharm，2023，43(10)：1089-1094.

[15] CHANG R，DENG W Y，SONG X Q，et al. Value of combination of 25-(OH)-D_3，IL-6，and cyclic peptide containing citrulline antibodies in different stages of rheumatoid arthritis[J]. Am J Transl Res，2021，13(12)：13599-13607.

[16] MUKHERJEE D，LAHIRY S，THAKUR S，et al. Effect of 1，25 dihydroxy vitamin D_3 supplementation on pain relief in early rheumatoid arthritis[J]. J Family Med Prim Care，2019，8(2)：517-522.

[17] SAKALYTE R，DENKOVSKIJ J，BERNOTIENE E，et al. The expression of inflammasomes NLRP1 and NLRP3，toll-like receptors，and vitamin D receptor in synovial fibroblasts from patients with different types of knee arthritis[J]. Front Immunol，2022，12：767512.

[18] LUO M，LIU J，YUAN Y S，et al. The role of vitamin D-synthesizing enzyme CYP27B1 in systemic lupus erythematosus[J]. Turk J Med Sci，2022，52(4)：984-989.

[19] TUCKEY R C，CHENG C Y S，SLOMINSKI A T. The serum vitamin D metabolome：what we know and what is still to discover[J]. J Steroid Biochem Mol Biol，2019，186：4-21.

[20] SAPONARO F，SABA A，ZUCCHI R. An update on vitamin D metabolism[J]. Int J Mol Sci，2020，21(18)：6573.

[21] ISLAM M M，TAKEYAMA N. Role of neutrophil extracellular traps in health and disease pathophysiology：recent insights and advances[J]. Int J Mol Sci，2023，24(21)：15805.

[22] WRIGHT H L，LYON M，CHAPMAN E A，et al. Rheumatoid arthritis synovial fluid neutrophils drive inflammation through production of chemokines，reactive oxygen species，and neutrophil extracellular traps[J]. Front Immunol，2020，11：584116.

[23] 陈本露，钱龙. 肽酰基精氨酸脱亚胺酶4参与中性粒细胞外诱捕网的形成[J]. 中华风湿病学杂志，2015，19(3)：210-213.
CHEN B L，QIAN L. Peptide acyl arginine deiminase 4 participates in the formation of neutrophil extracellular trap net[J]. Chin J Rheumatol，2015，19(3)：210-213.

[24] YU S R，SHODA H，SUZUKI A，et al. Peptidylarginine deiminase type 4 deficiency reduced arthritis severity in a glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis model[J]. Sci Rep，2015，5：13041.

（收稿日期：2024-06-11　修回日期：2024-08-21）
（编辑：唐晓莲）