类叶牡丹关节注射液治疗类风湿性关节炎的作用机制Δ

吕邵娃*，邬芸煜，刘泉莉，任雨涵，郭玉岩，匡海学#（黑龙江中医药大学教育部北药基础与应用研究重点实验室/黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室，哈尔滨 150040）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2025）08-0926-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.08.06

摘 要 目的 探究类叶牡丹关节注射液治疗类风湿性关节炎（RA）的作用机制。**方法** 类叶牡丹中的主要皂苷类成分通过Swiss Target Prediction网站获取作用靶点，与从GeneCards、OMIM数据库中收集的RA治疗靶点并取交集，基于网络药理学建立交互网络，进行基因本体功能、京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析。采用大耳兔背部注射弗氏完全佐剂建立RA模型进行验证，比较各组大耳兔关节炎指数评分、膝关节直径和痛阈值变化，观察滑膜组织形态变化，检测血清和关节滑液中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6水平以及滑膜关节膜组织中Janus激酶2（JAK2）、信号转导与转录激活因子3（STAT3）蛋白的磷酸化水平。**结果** 网络药理学筛选出类叶牡丹关节注射液与RA的交集靶点有143个，构建“药物-成分-靶点”网络后获取核心成分为刺囊酸、齐墩果酸、常春藤皂苷元、葳岩仙皂苷A、葳岩仙皂苷C等；蛋白质-蛋白质相互作用网络构建排前10名的核心靶点分别为*SRC*、*STAT3*、*MAPK1*、*EGFR*、*PIK3CA*、*MAPK3*、*GRB2*、*JUN*、*PTPN11*、*JAK2*；KEGG通路富集分析结果显示，类叶牡丹关节注射液治疗RA主要涉及JAK/STAT信号通路等。实验验证结果显示，与模型组比较，类叶牡丹关节注射液可减轻大耳兔膝关节肿胀和滑膜层增生，使下层结缔组织增生减少、炎症细胞和毛细血管数量减少；显著降低关节炎指数评分（类叶牡丹低剂量组除外），膝关节直径，血清和关节滑液中TNF-α、IL-1β、IL-6水平以及JAK2、STAT3蛋白的磷酸化水平（$P<0.05$或$P<0.01$）；显著升高痛阈值水平（$P<0.01$）。**结论** 类叶牡丹关节注射液中刺囊酸、齐墩果酸、常春藤皂苷元、葳岩仙皂苷A、葳岩仙皂苷C可能是缓解RA炎症反应的核心成分，其作用机制可能与抑制JAK/STAT信号通路、减轻炎症反应有关。

关键词 类叶牡丹；类叶牡丹关节注射液；类风湿性关节炎；JAK/STAT信号通路；网络药理学

Mechanism of joint injection of *Caulophyllum robustum* Maxim in the treatment of rheumatoid arthritis

LYU Shaowa, WU Yunyu, LIU Quanli, REN Yuhan, GUO Yuyan, KUANG Haixue (Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine/ Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Pharmacodynamic Substances of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To explore the mechanism of joint injection of *Caulophyllum robustum* Maxim in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **METHODS** The targets of main saponins in *C. robustum* Maxim were obtained from Swiss Target Prediction, and the RA treatment targets collected from the GeneCards and OMIM database were intercrossed to establish an interaction network based on network pharmacology. Gene ontology analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were performed. RA model was established by injecting complete Freund's adjuvant into the back of rabbits for verification. The arthritis index score, knee diameter and pain threshold of rabbits were compared. Pathological examination of rabbit synovial tissue was carried out. The levels of tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and IL-6 in rabbit serum and synovial fluid were detected. The phosphorylation levels of tyrosine protein Janus kinase 2 (JAK2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) proteins in rabbit synovium were detected. **RESULTS** Network pharmacology identified 143 intersection targets between the drug and RA. After the construction of the "drug-component-target" network, the core components of the network were echinocystic acid, oleanolic acid, hederagenin, cauloside A and cauloside C, etc. Additionally, the top 10 core targets of PPI network were *SRC*, *STAT3*, *MAPK1*, *EGFR*, *PIK3CA*, *MAPK3*, *GRB2*, *JUN*, *PTPN11* and *JAK2*. The results of KEGG pathway analysis showed that the JAK/STAT signaling pathway was mainly involved in the treatment of RA by joint injection of *C. robustum* Maxim. Results of validation test showed that compared with model group, joint injection of *C. robustum* Maxim could reduce the swelling of rabbit knee joint, relieve the hyperplasia of synovial layer, reduce the hyperplasia of lower connective tissue, and reduce the number of inflammatory cells and capillaries. The arthritis index score (excluding low-dose group of *C. robustum* Maxim), knee diameter, the levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 in serum and synovial fluid, and the protein phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 were decreased significantly ($P<0.05$ of $P<0.01$), while the pain threshold were reduced significantly ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** The core components that may alleviate the inflammatory response of RA in joint injection of *C. robustum* Maxim could include echinocystic acid, oleanolic

Δ **基金项目** 国家自然科学基金项目（No.82474098）

* **第一作者** 教授，硕士生导师。研究方向：中药新药与新剂型。E-mail：lswa5599@hotmail.com

通信作者 教授，博士生导师。研究方向：中药性味理论及中药药效物质基础。电话：0451-87267047。E-mail：HXKUANG56@163.com

acid, hederagenin, cauloside A, and cauloside C. Its mechanism may be related to the inhibition of JAK/STAT signaling pathway and the reduction of inflammatory responses.

KEYWORDS *Caulophyllum robustum* Maxim; Joint injection of *Caulophyllum robustum* Maxim; rheumatoid arthritis; JAK/STAT signaling pathway; network pharmacology

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种常见的慢性全身性免疫疾病，全球平均患病率为0.4%～1.3%[1]，严重威胁着患者的健康和生活质量。RA的主要病理特征包括滑膜增生、关节内炎症以及持续的关节破坏，这些变化不仅导致关节疼痛、肿胀和功能障碍，还可能引发关节畸形和残疾[2]。当前，临床上常用的RA治疗药物虽然在一定程度上能够缓解病情，但由于药物剂型（片剂、贴剂等）的影响，其在机体内的代谢复杂，往往难以直接到达病变部位，从而影响治疗效果，并可能带来消化道、肾脏损伤等不良反应[3]。关节腔内注射能够使药物在关节内积蓄，并以恒定或需要的速度释放，从而有效控制关节炎症、减轻疼痛，为RA患者提供了新的治疗选择[4]。

类叶牡丹 *Caulophyllum robustum* Maxim. 别称红毛七，为小檗科红毛七属类叶牡丹的根及根茎，性温，味苦辛，作为一种传统中药，具有散瘀止痛、活血通络等功效，在民间常用于治疗RA等疾病[5]。现代研究表明，类叶牡丹含有皂苷、生物碱等多种活性成分，这些成分具有抗风湿、抗炎和免疫调节等药理活性[5]。《全国医药产品大全》（1988年版）记载，民间曾将单味类叶牡丹制成注射液用于RA治疗，能够有效缓解RA患者的疼痛和肿胀等症状，改善关节功能，但因其工艺、质量与作用机制均不够明确，未推广使用[6]。本研究通过网络药理学技术，对类叶牡丹的皂苷类成分进行分析，预测其抗RA的潜在靶点和通路，并通过体内实验验证关键通路，进而探究类叶牡丹关节注射液抗RA的作用机制，以期并为开发新型抗RA药物提供理论支持。

1 材料

1.1 主要仪器

LXI-Ⅱ型离心机购自上海医用分析仪器厂，Synergy-H1型酶标仪购自美国PerkinElmer公司，4600型凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司，Moticam 3000型显微摄影成像系统购自美国Motic公司，EPS 300型电泳仪、VE-186型转移槽、VE 180型垂直电泳槽、iCEN-24R型超速冷冻离心机均购自杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 主要试剂

鹿瓜多肽注射液（货号230910，规格2 mL/支）购自哈尔滨誉衡制药有限公司；类叶牡丹关节注射液（实验室自制，批号20230904，规格2 mL/支，每1 mL类叶牡丹关节注射液中类叶牡丹皂苷C、D、G、H和leoniticin D 5种皂苷的总含量不低于0.90 mg）；弗氏完全佐剂（complete Freund's adjuvant，CFA；货号F6801）购自北京博奥拓科技有限公司；白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（货号分别为ML027836、ML051629、ML001696）均购自上海酶联生物科技有限公司；Janus激酶2（Janus kinase 2，JAK2）抗体、信号转导与转录激活因子3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）抗体、磷酸化（p）-JAK2抗体、p-STATA3抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体（货号分别为bs23004R、bs1141R、bs2485R、bs22386R、bs41373R）均购自北京博奥森生物技术有限公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗（货号SA00001-4）购自美国Proteintech公司；十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳快速制备试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、全蛋白提取试剂盒（货号分别为WLA013、WLA004、WLA019）均购自沈阳万类生物科技有限公司；聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜（货号IPVH00010）购自美国Millipore公司。

1.3 实验动物

清洁级雌性日本大耳兔36只，体重（2.5±0.5）kg，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，动物生产许可证号：SCXK（辽）2020-0001。大耳兔在温度18～24 ℃、相对湿度40%～60%的环境中适应性喂养1周。动物实验经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准（审批号：2023091820），所有实验操作均遵守国际和当地实验动物使用和保护委员会颁布的条例。

2 方法与结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 类叶牡丹主要化学成分及靶点检索

皂苷类成分是类叶牡丹中的主要药效成分[7]，本文选择类叶牡丹中已知的主要皂苷类成分（LYMD1～15，见表1），通过Swiss Target Prediction网站（http://www.swisstargetprediction.ch/）检索成分靶点，整理得到的靶点经UniProt数据库（https://www.uniprot.org/）数据校准后，对获得的靶点分别根据可能性（大于0）和norm fit值进行筛选[8]，去除重复值后，共获得195个靶点。

2.1.2 RA相关靶点的获取和筛选

以“rheumatoid arthritis”为关键词在GeneCards数据库（https://www.genecards.org/）、OMIM数据库（https://www.omim.org/）中对疾病靶点进行检索，分别获得5 961、42个疾病靶点，去重后获得5 990个与RA相关的靶点。

2.1.3 “药物-成分-靶点”网络构建及可视化分析

将获得的药物成分靶点与疾病靶点相互映射，获得143个交集靶点。将类叶牡丹15种皂苷类成分和交集靶点上传至Cytoscape 3.9.1软件（https://cytoscape.org/）作图，构建“药物-成分-靶点”网络。对网络进行拓扑分析，该网络有143个节点和387边。根据度值（度值越大表明相连节点越多）筛选排前5名的皂苷类成分作为类叶牡丹关节注射液治疗RA的核心成分，分别为刺囊酸、齐墩果酸、常春藤皂苷元、葳岩仙皂苷A、葳岩仙皂苷C。

表1　类叶牡丹中的主要皂苷类成分

序号	英文名称	中文名称	分子式
LYMD1	3-*O*-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin-28-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside	—	$C_{47}H_{76}O_{18}$
LYMD2	3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-caulophyllogenin-28-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester	类叶牡丹苷C	$C_{59}H_{96}O_{28}$
LYMD3	3β-[(α-L-arabinopyranosyl)-oxy]-16α-hydroxy-23-oxo-olean-12-en-28-oic acid	—	$C_{35}H_{54}O_9$
LYMD4	cauloside A	葳岩仙皂苷A	$C_{35}H_{56}O_8$
LYMD5	cauloside B	葳岩仙皂苷B	$C_{35}H_{56}O_9$
LYMD6	cauloside C	葳岩仙皂苷C	$C_{41}H_{66}O_{13}$
LYMD7	cauloside D	葳岩仙皂苷D	$C_{53}H_{86}O_{22}$
LYMD8	cauloside G	葳岩仙皂苷G	$C_{59}H_{96}O_{27}$
LYMD9	cauloside H	葳岩仙皂苷H	$C_{59}H_{96}O_{28}$
LYMD10	echinocystic acid	刺囊酸	$C_{30}H_{48}O_4$
LYMD11	hederagenin	常春藤皂苷元	$C_{30}H_{48}O_4$
LYMD12	hederagenin-28-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester	—	$C_{48}H_{78}O_{18}$
LYMD13	leonticin D	—	$C_{53}H_{86}O_{23}$
LYMD14	oleanolic acid	齐墩果酸	$C_{30}H_{48}O_3$
LYMD15	oleanolic acid-3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside	—	$C_{41}H_{66}O_{14}$

—：暂无中文名称。

2.1.4　蛋白质-蛋白质相互作用网络构建

将交集靶点上传至String数据库（https://string-db.org/）进行蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络构建，物种设置为“Homosapiens”，最低相互作用评分设置为0.9，其余参数保持默认设置，结果导入Cytoscape 3.9.1软件，根据度值进行筛选。结果显示，度值排前10名的核心靶点分别为*SRC*、*STAT3*、*MAPK1*、*EGFR*、*PIK3CA*、*MAPK3*、*GRB2*、*JUN*、*PTPN11*、*JAK2*。

2.1.5　潜在靶点生物功能富集分析

将交集靶点上传至DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行基因本体（gene ontology，GO）功能富集分析，结果显示，共得到347个条目，包括243个生物过程（biological process，BP）、44种细胞成分（cellular component，CC）、60种分子功能（molecular function，MF）。根据*P*值选取BP、CC、MF排前10名的条目（$P<0.01$）进行可视化处理，见图1A。

将交集靶点上传至DAVID数据库，进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析，结果显示，共富集到153条与类叶牡丹关节注射液治疗RA相关的通路。根据*P*值筛选出128条通路（$P<0.01$），根据*P*值排列与RA相关的信号通路前3名分别为JAK/STAT信号通路、促分裂原活化的蛋白质激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路、肾素血管紧张素系统（renin-angiotensin system，RAS）信号通路。上述通路可能是类叶牡丹关节注射液抗RA的作用机制。根据*P*值选取前20条KEGG通路条目（$P<0.01$）进行可视化处理，见图1B。

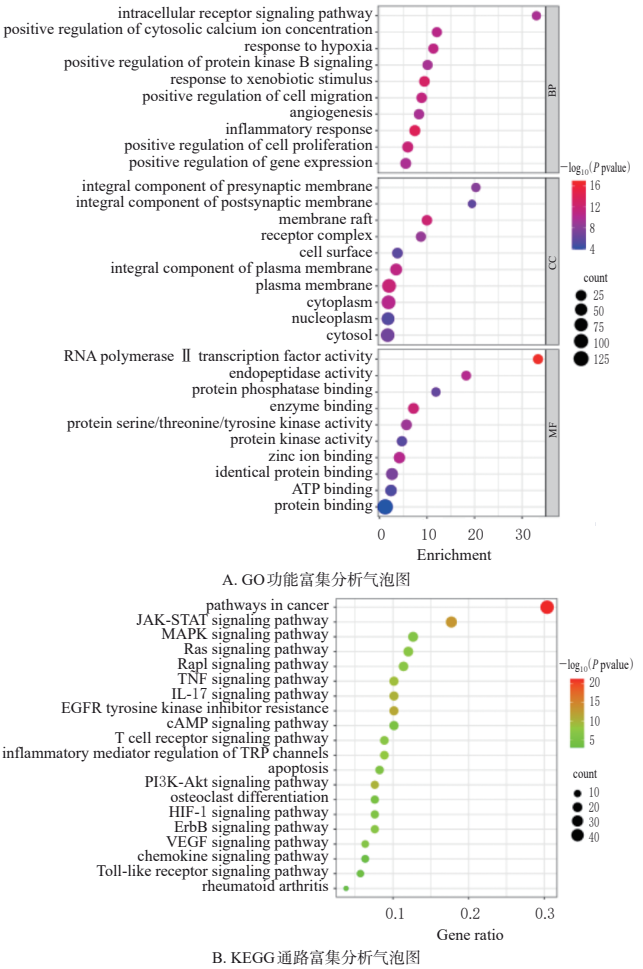


图1　类叶牡丹关节注射液治疗RA的潜在靶点生物功能富集分析图

2.2　动物实验验证

2.2.1　大耳兔RA模型建立、分组与给药

大耳兔适应性饲养7 d后进行造模：背部肩胛骨间及左跖部进行脱毛，左跖部皮下注射CFA 0.4 mL，同时注射背部4点，每点0.2 mL[9]；实验开始第7、14天各加强注射CFA 1次，每只大耳兔背部2点，每点0.2 mL。以关节炎指数评分作为造模成功的依据，实验开始后评分。评分标准：0分，正常；1分，关节稍红肿；2分，关节轻度红、肿、热；3分，关节中度红、肿、热及轻度功能障碍；4分，关节重度红、肿、热及严重功能障碍，不能负重。每只大耳兔最大积分16分，当单个关节炎指数评分达到2分时，即可认为造模成功[10]。将30只造模成功的大耳兔随机分为阳性对照组、模型组和类叶牡丹低、中、高剂量组，每组6只；另选取6只正常大耳兔在相同位置注射等体积生理盐水作为空白组。

实验第21、28、35天，类叶牡丹低、中、高剂量组大耳兔双后膝关节处按照低、中、高剂量（相当于生药量4.06、8.12、16.24 mg/kg，给药剂量通过预实验确定）分别注射不同浓度的类叶牡丹关节注射液，每天1次。实验第21、28、35天，阳性对照组大耳兔双后膝关节注射鹿瓜多肽注射液0.8 mg/kg（给药剂量根据人体与动物等效剂

量体表面积法换算），每天1次。实验第21、28、35天，空白组和模型组大耳兔均双后膝关节注射生理盐水0.5 mL，每天1次。

2.2.2　类叶牡丹关节注射液对RA大耳兔膝关节的影响

以关节炎指数评分、膝关节直径和痛阈值变化反映类叶牡丹关节注射液对RA大耳兔膝关节的影响。（1）关节炎指数评分：在实验第0、7、14、21、28、35、42天对大耳兔关节进行评分。（2）膝关节直径：大耳兔膝关节周围剃毛后，伸直后肢后沿髌骨下缘进行标记作测量点。在实验第0、7、14、21、28、35、42天分别测量大耳兔膝关节直径。（3）痛阈值：使用压力测痛装置对大耳兔的外膝眼部位施加压力，以大耳兔出现弹腿动作作为疼痛反应指标。信号出现时，记录压力值作为痛阈值，在实验第0、7、14、21、28、35、42天分别检测大耳兔痛阈值，重复3次，每2次间隔5 min，取均值。

实验数据采用SPSS 26.0软件进行统计分析，采用GraphPad Prism 10.1.2软件绘图。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，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

结果显示，在实验第21天，与空白组比较，其他组大耳兔的关节炎指数评分和膝关节直径均显著增加，痛阈值均显著降低（$P<0.01$）。在实验第42天，与空白组比较，模型组大耳兔的关节炎指数评分和膝关节直径均显著增加，痛阈值显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大耳兔关节炎指数评分（类叶牡丹低剂量组除外）、膝关节直径均显著降低（$P<0.01$或$P<0.05$），痛阈值均显著增加（$P<0.01$）。结果见图2。

2.2.3　类叶牡丹关节注射液对RA大耳兔膝关节滑膜组织形态的影响

在实验第42天，将大耳兔麻醉，颈总动脉取血；双侧膝关节腔内注射2 mL生理盐水，局部轻揉后抽取关节腔内滑液，将血液和关节滑液分别以3 000 r/min离心15 min，取上清液，分装于EP管，−80 ℃保存。处死大耳兔，沿双侧后膝关节中心纵向切开表面皮肤，分离髌骨和胫骨，剥离滑膜组织，多聚甲醛固定。同法采集另一侧膝关节滑膜组织，液氮冷冻后，−80 ℃保存。取出大耳兔滑膜组织，进行脱水、浸蜡、包埋、切片、苏木素-伊红染色、封片，观察其形态变化并进行图像分析。

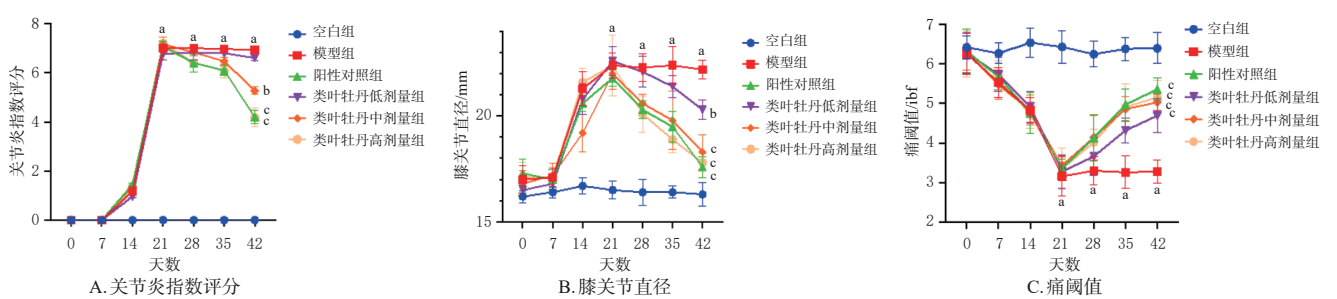
结果显示，空白组大耳兔膝关节滑膜排列规整，滑膜下层结缔组织无增生和水肿，未见炎症细胞浸润与毛细血管扩张。与空白组比较，模型组大耳兔膝关节滑膜明显增厚且排列紊乱，滑膜下层结缔组织明显增生，可见大量的炎症细胞浸润、毛细血管增生并扩张充血。与模型组比较，各给药组大耳兔膝关节滑膜上述病理变化均有不同程度的改善，表现为滑膜层增生减轻，下层结缔组织增生减少，炎症细胞和毛细血管数量减少，以类叶牡丹高剂量组和阳性对照组改善最为明显。结果见图3。

2.2.4　类叶牡丹关节注射液对RA大耳兔血清及关节滑液中TNF-α、IL-1β、IL-6水平的影响

取“2.2.3”项下血液和关节滑液的上清液，按ELISA试剂盒提供的操作流程，分别检测血清及关节滑液中TNF-α、IL-1β及IL-6水平。参考“2.2.2”项下方法进行统计分析，结果显示，与空白组比较，模型组大耳兔血清和关节滑液中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大耳兔血清和关节滑液中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2。

2.2.5　类叶牡丹关节注射液对RA大耳兔膝关节滑膜组织中JAK2和STAT3磷酸化的影响

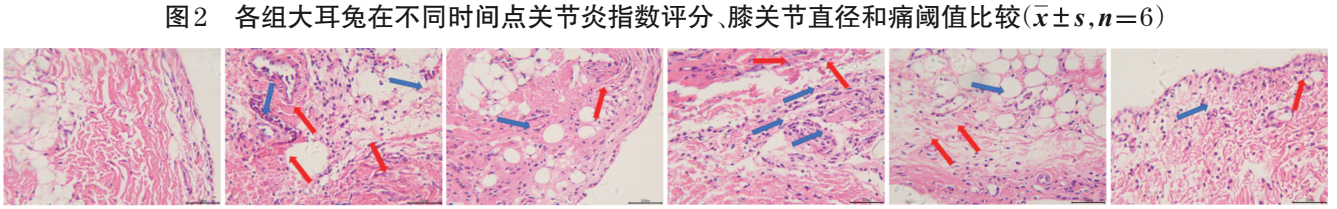
采用Western blot法检测。取“2.2.3”项下滑膜组织，将每个样本置于裂解液中进行蛋白提取，提取后按照BCA蛋白浓度测定试剂盒步骤操作进行蛋白定量，在制胶后上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳；电泳结束后转至PVDF膜，将PVDF膜进行封闭，封闭后进行一抗、二抗抗体孵育（JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、GAPDH一抗稀释比例均为1∶1 000，二抗稀释比



A.关节炎指数评分　B.膝关节直径　C.痛阈值

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$，c：与模型组比较，$P<0.01$；ibf：压力单位。

图2　各组大耳兔在不同时间点关节炎指数评分、膝关节直径和痛阈值比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）



A.空白组　B.模型组　C.阳性对照组　D.类叶牡丹低剂量组　E.类叶牡丹中剂量组　F.类叶牡丹高剂量组

红色箭头：血管增生；蓝色箭头：炎症细胞浸润。

图3　各组大耳兔膝关节滑膜组织形态显微图（苏木素-伊红染色，标尺为50 μm）

表2　各组大耳兔血清和关节滑液中TNF-α、IL-1β、IL-6水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mL）

组别	血清			关节滑液		
	TNF-α	IL-1β	IL-6	TNF-α	IL-1β	IL-6
空白组	136.12±12.39	43.44±1.75	75.26±3.83	146.24±5.41	36.19±1.57	56.3±2.33
模型组	410.42±16.37[a]	103.37±1.88[a]	145.33±0.57[a]	369.74±8.66[a]	93.37±3.28[a]	147.44±3.10[a]
阳性对照组	208.31±8.86[b]	63.28±3.46[b]	90.84±4.28[b]	219.88±2.47[b]	44.88±1.04[b]	103.66±4.16[b]
类叶牡丹低剂量组	306.06±8.89[b]	74.59±1.51[b]	137.35±2.86[c]	329.32±6.38[b]	81.63±1.23[b]	123.96±4.17[b]
类叶牡丹中剂量组	283.97±13.84[b]	71.08±0.69[b]	128.68±2.12[b]	327.75±5.26[b]	78.86±1.46[b]	101.63±2.85[b]
类叶牡丹高剂量组	222.04±5.36[b]	68.71±0.37[b]	124.2±3.26[b]	226.41±3.07[b]	48.76±0.42[b]	98.31±1.74[b]

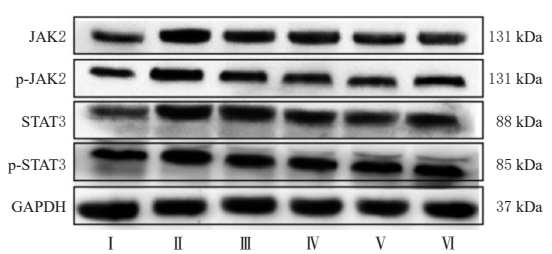
a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

例均为1∶5 000）；PVDF膜用ECL发光液处理，扫描胶片，以GAPDH为内参，用Gel-Pro凝胶定量分析软件对目的蛋白条带进行灰度值分析，以磷酸化前后蛋白条带的灰度值比值为指标结果。参考“2.2.2”项下方法进行统计分析，结果显示，与空白组比较，模型组大耳兔膝关节滑膜组织中p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3水平均显著增加（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大耳兔膝关节滑膜组织中p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表3、图4。

表3　各组大耳兔膝关节滑膜组织中p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
空白组	1.053 3±0.032 2	0.800 0±0.055 7
模型组	1.193 3±0.041 6[a]	0.956 7±0.094 5[a]
阳性对照组	0.890 0±0.045 8[b]	0.456 7±0.025 2[b]
类叶牡丹低剂量组	0.906 7±0.020 8[b]	0.796 7±0.081 5[b]
类叶牡丹中剂量组	0.873 3±0.070 2[b]	0.616 7±0.035 1[b]
类叶牡丹高剂量组	0.843 3±0.055 1[b]	0.470 0±0.026 5[b]

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$。



Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：阳性对照组；Ⅳ：类叶牡丹低剂量组；Ⅴ：类叶牡丹中剂量组；Ⅵ：类叶牡丹高剂量组。

图4　各组大耳兔膝关节滑膜组织中JAK/STAT信号通路相关蛋白表达的电泳图

3　讨论

RA是一种慢性自身免疫性疾病，其主要表现为关节滑膜的炎症和异常增生，这种炎症导致滑膜组织中出现血管增生和炎症级联反应，两者相互协同，共同促进了关节结构的逐步破坏[8]。一线的抗RA药物主要包括非甾体抗炎药和糖皮质激素药等，能够减轻RA的症状，但长期服用会产生严重的毒副作用[11]。而中医药由于其多靶点、多组分、毒副作用小的特点，在治疗慢性疾病方面表现出独特的优势，特别是在RA的临床治疗中，具有良好的疗效和安全性。中药关节注射结合了中药的特点和关节注射的优势，直接将中药有效成分输送至病变的关节部位，从而避免了口服给药可能带来的影响[12]。近年来，关节疾病的治疗中出现了多种关节注射中药制剂，然而，治疗RA的中药关节注射液研究较少。因此，抗RA关节注射液的新药研究具有广阔的应用前景。

滑膜炎是RA最初和最主要的病理改变，研究表明，类叶牡丹提取物中的皂苷类成分具有较强的抗炎作用[13]，对胶原诱导型关节炎小鼠的促炎细胞因子具有较高的抑制作用[7]。本研究通过构建“药物-成分-靶点”网络发现，类叶牡丹关节注射液中刺囊酸、齐墩果酸、常春藤皂苷元、葳岩仙皂苷A、葳岩仙皂苷C可能是缓解RA炎症反应的核心成分。皂苷是一类由非极性的三萜或甾体附着在亲水寡糖基上的糖苷，作为天然产物广泛分布于植物界，许多抗RA常用中药富含皂苷，如威灵仙、白头翁、续断等[14]。有研究报道，大多数皂苷元的生物活性高于其原皂苷，例如人参皂苷抗肿瘤活性为苷元，优于单糖苷和二糖苷[15]。皂苷类体内转化最主要的途径是去糖基化，其中葳岩仙皂苷A、葳岩仙皂苷C的母核为常春藤皂苷元[13]。研究发现，常春藤皂苷元、刺囊酸和齐墩果酸可与组蛋白去乙酰化酶（histone deacetylase，HDAC）3、HDAC8对接[16]，且能够通过影响TNF-α诱导的L929细胞中的HDAC3和HDAC8蛋白表达来发挥抗炎作用[17]。刺囊酸能通过抑制核因子κB和细胞外调节蛋白激酶的激活来阻止破骨细胞的形成，从而在RA骨破坏进程中起作用[18]。常春藤皂苷元通过激活Kelch样ECH关联蛋白/核因子E2相关因子/血红素加氧酶1信号通路来抑制炎症和保护软骨[19]。有报道发现，刺囊酸、齐墩果酸、常春藤皂苷元通过影响JAK/STAT信号通路来抑制促炎细胞因子和炎症介质的产生和释放，从而发挥抗炎作用[19—21]。

本研究对交集靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析，结果显示，类叶牡丹关节注射液主要通过JAK/STAT、MAPK、RAS信号通路在RA的治疗中扮演着重要角色。JAK/STAT信号通路在调控炎症反应、氧化应激和细胞凋亡的启动和进展中发挥了重要作用[22]，其持续激活导致了TNF-α、IL-1β、IL-6等促炎细胞因子水平升高。TNF-α作为炎症级联反应上游的关键因子，能够激活内皮细胞并募集滑膜成纤维细胞和巨噬细胞释放促炎细胞因子[23]，同时参与破骨细胞分化及相关细胞因子产生[24]。IL-1β促进滑膜炎症和破骨细胞生成，导致关节破坏和骨吸收，还通过刺激炎症介质间接影响RA[25]。此外，IL-1β促进成纤维细胞和软骨细胞释放基质金属蛋白酶，加速破骨细胞成熟与活化，造成软骨侵蚀与损坏，加重关节疼痛、肿胀[26]。IL-6参与免疫应答、炎症和骨代谢，上调血管内皮生长因子的表达，促进血管翳生成[27]。TNF-α、IL-1β、IL-6这3个促炎因子水平的升高与JAK/STAT信号通路的激活形成恶性循环，加剧滑膜炎症，促进血管内皮生长因子产生和血管翳生

成[28]。本实验研究显示，经类叶牡丹关节注射液治疗后，大耳兔膝关节的肿胀症状明显减轻，各给药组大耳兔膝关节滑膜及关节腔的病理变化均有所减轻，血清和关节滑液中的TNF-α、IL-1β、IL-6的生成被抑制，膝关节滑膜组织中p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3的水平显著下调，从而发挥抗RA作用。

综上所述，类叶牡丹关节注射液中刺囊酸、齐墩果酸、常春藤皂苷元、葳岩仙皂苷A、葳岩仙皂苷C可能是缓解RA炎症反应的核心成分，其作用机制可能与抑制JAK/STAT信号通路、减轻炎症反应有关。

参考文献

[1] KAUR C, MISHRA Y, KUMAR R, et al. Pathophysiology, diagnosis, and herbal medicine-based therapeutic implication of rheumatoid arthritis: an overview[J]. Inflammopharmacology, 2024, 32(3): 1705-1720.

[2] 陈平，王海东，杜小正，等. 针刀疏筋解结术对类风湿关节炎家兔滑膜炎症的影响及作用机制研究[J]. 中国中医药信息杂志，2024，31(7)：91-99.

[3] 顾春宇，王亦巍，康建英，等. 基于网络药理学技术探究雪莲注射液抗类风湿关节炎的作用及机制研究[J]. 中南药学，2025，23(3)：628-637.

[4] 李哲，陈斐斐，韩小康，等. 山药多糖关节腔注射对兔膝关节骨性关节炎炎症因子及关节软骨代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(23)：88-96.

[5] 吕邵娃，李春成，李国玉，等. 类叶牡丹化学成分与药理作用机制研究进展[J]. 中药材，2020，43(8)：2031-2036.

[6] 国家医药管理局上海医药工业研究院. 全国医药产品大全[M]. 北京：中国医药科技出版社，1988：458.

[7] LYU S W, DONG S Y, XU D, et al. Spectrum-effect relationships between fingerprints of *Caulophyllum robustum* Maxim and inhabited pro-inflammation cytokine effects [J]. Molecules, 2017, 22(11): 1826.

[8] 谯明，朱毅，胡君萍，等. 肉苁蓉治疗炎症性肠病的作用机制预测及验证[J]. 中国药房，2024，35(21)：2582-2589.

[9] 杨馨，陈俊，路晓清，等. 基于PTPN22干扰的艾灸对实验性类风湿性关节炎家兔滑膜细胞JAK1-STAT4信号通路的影响[J]. 成都中医药大学学报，2023，46(1)：25-31.

[10] 夏仕林，未怡，江小慢，等. 三妙丸治疗类风湿关节炎主要活性成分及作用机制的探讨[J]. 中国中药杂志，2024，49(19)：5204-5217.

[11] 樊万君，张佳音，王宸，等. 关节腔注射塞来昔布微球对大鼠类风湿性关节炎的治疗作用[J]. 中国药科大学学报，2021，52(5)：573-578.

[12] WANG Q H, LV S W, GUO Y Y, et al. Pharmacological effect of *Caulophyllum robustum* on collagen-induced arthritis and regulation of nitric oxide, NF-κB, and proinflammatory cytokines *in vivo* and *in vitro*[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 8134321.

[13] ZHU M T, LV S W, SUN Y P, et al. Characterization of metabolites of five typical saponins from *Caulophyllum robustum* Maxim and their biotransformation in fibroblast-like synoviocytes by UHPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS[J]. Arab J Chem, 2023, 16(6): 104757.

[14] 刘亚虓，李世兴，唐家美，等. 中药皂苷类成分治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. 中南药学，2023，21(11)：2969-2976.

[15] NAVARRO DEL HIERRO J, HERRERA T, FORNARI T, et al. The gastrointestinal behavior of saponins and its significance for their bioavailability and bioactivities[J]. J Funct Foods, 2018, 40: 484-497.

[16] 赵诗雨，笔雪艳，杨炳友，等. 基于HDAC3/8分子互作技术的类叶牡丹抗类风湿性关节炎有效部位活性成分分析[J]. 中草药，2020，51(8)：2117-2124.

[17] 吕邵娃，任雨涵，祝明涛，等. 类叶牡丹3种皂苷元对L929细胞炎症模型中HDAC表达的影响[J]. 中医药学报，2024，52(6)：38-43.

[18] YANG J H, LI B, WU Q, et al. Echinocystic acid inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by regulating NF-κB and ERK signaling pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(4): 673-677.

[19] SHEN Y, TENG L, QU Y H, et al. Hederagenin suppresses inflammation and cartilage degradation to ameliorate the progression of osteoarthritis: an *in vivo* and *in vitro* study[J]. Inflammation, 2023, 46(2): 655-678.

[20] 唐秀凤，高莹莹，李晓曦，等. 淫羊藿苷和齐墩果酸协同地塞米松对糖皮质激素敏感型/抵抗型细胞内信号通路蛋白的影响[J]. 医学研究生学报，2018，31(9)：910-915.

[21] CHENG Y C, ZHANG X, LIN S C, et al. Echinocystic acid ameliorates arthritis in SKG mice by suppressing Th17 cell differentiation and human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes inflammation[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(51): 16176-16187.

[22] 李金益，田杰祥，宋敏，等. 骨痨愈康丸通过JAK/STAT信号通路对类风湿关节炎大鼠滑膜组织的影响[J]. 中国病理生理杂志，2023，39(8)：1475-1482.

[23] KONDO N, KURODA T, KOBAYASHI D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 10922.

[24] 李夏林，张维新. TNF-α通过唾液酸化促进小鼠破骨细胞分化[J]. 南方医科大学学报，2021，41(12)：1773-1779.

[25] 熊燕，白玉，李媛，等. 艾灸对类风湿性关节炎患者血清中VEGF、IL-1β影响的研究[J]. 中华中医药学刊，2019，37(1)：142-145.

[26] BRODERICK L, HOFFMAN H M. IL-1 and autoinflammatory disease: biology, pathogenesis and therapeutic targeting[J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(8): 448-463.

[27] 杨晓珊，王瑞瑞，李英，等. IL-6介导JAK/STAT信号通路在胶原诱导性关节炎大鼠抑郁发生中的作用机制研究[J]. 中国免疫学杂志，2021，37(17)：2053-2058.

[28] CRISPINO N, CICCIA F. JAK/STAT pathway and nociceptive cytokine signalling in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2021, 39(3): 668-675.

（收稿日期：2024-11-14　修回日期：2025-03-11）
（编辑：舒安琴）