

本文引用: 柳玉佳, 杨烨晗, 吴伊莹, 贺选玲, 王莘智, 徐豫湘. 通痹颗粒调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路治疗胶原诱导性关节炎大鼠的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(7): 1336–1344.

通痹颗粒调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路治疗 胶原诱导性关节炎大鼠的机制研究

柳玉佳¹, 杨烨晗², 吴伊莹¹, 贺选玲¹, 王莘智¹, 徐豫湘^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

〔摘要〕 **目的** 观察通痹颗粒调控磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠的治疗作用及机制。**方法** 60 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、雷公藤多苷片组及低、中、高剂量通痹颗粒组, 每组 10 只。空白组常规饲养, 其余各组以牛 II 型胶原建立 CIA 大鼠模型。造模成功后, 空白组、模型组予以 0.9% 氯化钠注射液灌胃, 雷公藤多苷片组给予雷公藤多苷片(0.024 g/kg)灌胃, 低、中、高剂量通痹颗粒组分别给予(1.8、3.6、7.2 g/kg)通痹颗粒灌胃, 每天 1 次, 连续 28 d。比较各组大鼠关节炎指数评分、关节肿胀度变化; HE 染色观察大鼠滑膜组织病理学形态; RT-qPCR 法及 Western blot 测定 PI3K、Akt、mTOR 及自噬标志蛋白 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 II (LC3-II) mRNA 及蛋白表达水平; ELISA 测定白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、基质金属蛋白酶(MMP)-1 和 MMP-13 水平。**结果** 与空白组比较, 模型组治疗第 0、7、14、21、28 天关节炎指数评分、关节肿胀度和 PI3K、Akt、mTOR mRNA 及蛋白表达水平平均升高($P < 0.05$), 血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13 水平平均升高($P < 0.05$); Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达水平平均降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 雷公藤多苷片组和低、中、高剂量通痹颗粒组治疗第 7、14、21、28 天关节炎指数评分、关节肿胀度和 PI3K、Akt、mTOR mRNA 及蛋白表达水平平均降低($P < 0.05$), 血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13 水平平均降低($P < 0.05$); Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达水平平均升高($P < 0.05$)。与雷公藤多苷片组比较, 低、中剂量通痹颗粒组治疗后关节炎指数评分、关节肿胀度和 PI3K、Akt、mTOR mRNA 及蛋白表达水平平均升高($P < 0.05$), 血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1 水平平均升高($P < 0.05$), Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达水平平均降低($P < 0.05$); 高剂量通痹颗粒组关节炎指数评分、关节肿胀度和 PI3K、Akt、mTOR mRNA 及蛋白表达水平平均降低($P < 0.05$), 血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1 水平平均降低($P < 0.05$), 滑膜 Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达水平平均升高($P < 0.05$)。模型组大鼠关节结构广泛破坏、形态紊乱, 滑膜明显增厚, 伴随大量炎症细胞浸润及新生血管增生; 各给药组大鼠关节滑膜损伤均改善, 关节侵蚀破坏减轻, 滑膜增厚及炎症浸润明显减少, 以高剂量通痹颗粒组改善情况最为显著。**结论** 通痹颗粒可有效改善 CIA 大鼠关节滑膜炎症, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活、提升滑膜细胞自噬水平相关, 适用于痰瘀深伏的顽痹证候。

〔关键词〕 类风湿关节炎; 通痹颗粒; 胶原诱导性关节炎; 细胞自噬; PI3K/Akt/mTOR 信号通路

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.07.004

Mechanism of Tongbi Granule in treating collagen-induced arthritic rats by regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

LIU Yujia¹, YANG Yehan², WU Yiyang¹, HE Xuanling¹, WANG Shenchi¹, XU Yuxiang^{1*}

〔收稿日期〕 2026-05-17

〔基金项目〕 湖南省医学学科 A 类建设项目(中医内科)(湘卫医发[2025]7 号); 湖南省自然科学基金项目(2025JJ80928, 2026JJ82264); 长沙市自然科学基金项目(kq2502047)。

〔通信作者〕 * 徐豫湘, 男, 硕士, 副主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: 39623004@qq.com。

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China

[Abstract] **Objective** To observe the therapeutic effects and mechanism of Tongbi Granule in regulating the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in rats with collagen-induced arthritis (CIA). **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into blank group, model group, Tripterygium Glycosides Tablet group, and low-, medium-, and high-dose Tongbi Granule groups, with 10 rats in each group. The blank group received routine feeding, while the other groups were used to establish CIA rat models using bovine type II collagen. After successful modeling, the blank group and model group were given 0.9% sodium chloride injection by gavage; the Tripterygium Glycosides Tablet group received Tripterygium Glycosides Tablets (0.024 g/kg); and the low-, medium-, and high-dose Tongbi Granule groups received Tongbi Granule at doses of 1.8, 3.6, and 7.2 g/kg, respectively, once daily for 28 consecutive days. The arthritis index score and joint swelling degree were compared among groups. HE staining was used to observe the histopathological morphology of synovial tissue. RT-qPCR and Western blot were employed to determine the mRNA and protein expression levels of PI3K, Akt, mTOR, and the autophagy marker proteins Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3-II). ELISA was used to measure the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), and MMP-13. **Results** Compared with the blank group, the model group showed increased arthritis index scores and joint swelling on days 0, 7, 14, 21, and 28; elevated mRNA and protein expression levels of PI3K, Akt, and mTOR; and higher serum levels of IL-1 β , TNF- α , MMP-1, and MMP-13 ($P<0.05$), while the mRNA and protein expression levels of Beclin-1 and LC3-II decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the Tripterygium Glycosides Tablet group and all three Tongbi Granule dose groups exhibited decreased arthritis index scores and joint swelling on days 7, 14, 21, and 28; reduced mRNA and protein expression levels of PI3K, Akt, and mTOR; lower serum IL-1 β , TNF- α , MMP-1, and MMP-13 levels ($P<0.05$); and increased mRNA and protein expression levels of Beclin-1 and LC3-II ($P<0.05$). Compared with the Tripterygium Glycosides Tablet group, the low- and medium-dose Tongbi Granule groups showed higher arthritis index scores and joint swelling, elevated PI3K/Akt/mTOR mRNA and protein expression levels, and increased serum IL-1 β , TNF- α , and MMP-1 levels ($P<0.05$), along with decreased Beclin-1 and LC3-II mRNA and protein expression levels ($P<0.05$); the high-dose Tongbi Granule group showed decreased arthritis index scores and joint swelling, reduced PI3K/Akt/mTOR mRNA and protein expression levels, and lower serum IL-1 β , TNF- α , and MMP-1 levels ($P<0.05$), while synovial Beclin-1 and LC3-II mRNA and protein expression levels increased ($P<0.05$). In the model group, the joint structure was extensively damaged and disorganized, with marked synovial hyperplasia, abundant inflammatory cell infiltration, and neovascularization. In all treatment groups, synovial injury was ameliorated, with reduced joint erosion, synovial thickening, and inflammatory infiltration; the most pronounced improvement was observed in the high-dose Tongbi Granule group. **Conclusion** Tongbi Granule can effectively improve synovial inflammation in CIA rats, and its mechanism of action may be related to inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and enhancement of synovial cell autophagy, making it suitable for treating intractable impediment pattern with deep-rooted phlegm and blood stasis.

[Keywords] rheumatoid arthritis; Tongbi Granule; collagen-induced arthritis; autophagy; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性疾病,基本病理表现为关节滑膜血管

增生,并逐渐出现关节软骨和骨质破坏,最终导致关节畸形和功能丧失,甚至出现多器官、系统受累^[1-2]。

因此,早期诊断及治疗对于缓解滑膜炎症、阻断关节结构破坏和畸形发生至关重要^[3]。

目前,RA 的发病机制尚未完全明确。研究表明,在 RA 疾病的进程中,细胞自噬失调发挥了重要作用^[4-5]。RA 病理状态下,细胞自噬功能异常紊乱,细胞程序性死亡受阻,成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)异常增殖并呈高活化状态,局部慢性炎症浸润持续,逐步侵蚀关节结构,最终造成骨质破坏、关节畸形等不可逆损伤^[6]。磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路是调控细胞自噬、炎症反应及基质代谢的核心信号通路,该通路的异常激活与 RA 的发病密切相关^[7-8]。本研究以 PI3K/Akt/mTOR 信号通路为核心靶点,旨在探讨通痹颗粒对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠通路核心蛋白表达以及下游炎症细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin, IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1 和 MMP-13 水平的调控作用,同时检测自噬相关蛋白 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3 type, LC3)-II 的表达情况,从分子层面阐释通痹颗粒对 RA 治疗作用的潜在机制。

1 材料

1.1 实验动物

选择健康 SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只,体重 200~250 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养于通风良好的环境中,环境湿度 40%~60%、温度 20~25 ℃,采用 12 h 明暗交替光照。本实验所有动物操作均严格遵循实验规范,并经湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理批号:ZYFY20210813-12)。

1.2 药物与主要试剂

通痹颗粒(当归、黄芪、血竭、白芥子、僵蚕、甘草)由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。雷公藤多苷片(湖南千金协力药业有限公司,国药准字

Z43020138,批号:240628,规格:10 mg/片)。牛Ⅱ型胶原(北京凯诗源生物科技有限公司,货号:T07-0597);弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司,批号:F5881);戊巴比妥钠(上海源叶生物科技有限公司,批号:S11064);HE 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0105M);RNA 提取液、逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒、Beclin-1 抗体、LC3-II 抗体、PI3K 抗体、mTOR 抗体、Akt 抗体、GAPDH 抗体、HRP-山羊抗兔(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G3013、G3337、G3326、GB112053、GB113801、GB112375、GB111840、GB114082、GB15004、GB23303);TNF- α 、IL-1 β 、MMP-1、MMP-13 ELISA 试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:GEH0004、GEH0002、GB115708、GB11247)。

1.3 主要仪器

高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:5418R);超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号:NanoDrop One);实时荧光定量 PCR 仪、垂直电泳仪、湿式转膜仪、电泳仪电源、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:CFX Connect、Mini-PROTEAN Tetra、Trans-Blot Turbo、PowerPac HC、ChemiDoc MP);光学显微镜(日本 Olympus 公司,型号:BX53);全自动酶标仪(美国 BioTek 公司,型号:Synergy H1);足跖肿胀测量仪(成都泰盟软件有限公司,型号:YLS-7B);石蜡切片机(德国 Leica 公司,型号:RM2235)。

2 方法

2.1 分组造模及给药

将 60 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为 6 组:空白组、模型组、雷公藤多苷片组和低、中、高剂量通痹颗粒组,每组 10 只。空白组正常饲养,其余 5 组给予牛Ⅱ型胶原诱导造模^[9],具体造模方法如下:将 20 mg 牛Ⅱ型胶原加入 10 mL 0.1 mol/L 的冰醋酸中配制成浓度为 2 mg/mL 的溶液,并放置在 4 ℃冰箱中过夜;隔日在冰浴环境下取等体积的 10 mL 弗氏不完全佐剂混合,冰浴乳化至油包水状态,配制成 1 mg/mL 浓度的胶原乳剂;取 0.2 mg 胶原乳剂于大鼠尾根部多点皮下注射进行初始免疫,7 d 后同前法以 0.1 mg 进行增强免疫,14 d 后进行造模评判。若

关节炎指数评分达 4 分及以上,则可视为造模成功^[9]。

造模成功后开始进行灌胃处理。以 60 kg 成人每天临床等效剂量为依据,大鼠剂量按体表面积换算为等效剂量^[10],雷公藤多苷片组予以 0.024 g/(kg·d)灌胃处理;低、中、高剂量通痹颗粒组分别予 1.8、3.6、7.2 g/(kg·d)通痹颗粒灌胃处理。空白组和模型组予等体积 0.9%氯化钠注射液灌胃。每天灌胃 1 次,连续 28 d。关节炎指数评分和关节肿胀度分别于治疗第 0、7、14、21、28 天进行测量。灌胃 28 d 后,将全部大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠进行麻醉,于腹动脉抽取大鼠血液,在 4 ℃下以 3 000 r/min 速度离心 20 min(离心半径 12 cm),获取并冷藏血清样本,用于 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1 和 MMP-13 的检测。取大鼠左膝滑膜组织样本置于 4%多聚甲醛中固定,用于组织病理学分析;右膝滑膜组织样本则立即冻存于液氮中,在 -80 ℃冰箱中保存,用于分析 PI3K、Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 和相关蛋白的表达情况。

2.2 关节炎指数评分

根据四肢关节红肿程度以及受累关节数目进行关节炎指数评分。0 分:正常;1 分:单一关节出现红肿;2 分:红肿扩展到多个关节或轻微涉及全部足爪;3 分:足爪红肿较为明显;4 分:足爪严重红肿并失去正常韧性。对四肢关节的计分进行累计,关节炎指数评分越高,则症状越严重,最高分数为 16 分^[11]。

2.3 测量关节肿胀度

在实验大鼠的后双足踝关节上方 1 cm 处画出浸水标记线作为参考,采用足跖肿胀测量仪进行测定,以体积(mL)变化来评价大鼠足跖的肿胀情况。

2.4 HE 染色观察滑膜组织病理学变化

大鼠左膝滑膜组织样本用多聚甲醛固定,EDTA 室温脱钙 28 d,自来水冲洗 24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切割成厚度约为 2 μ m 的薄片,行 HE 染色,以中性透明树脂封制成标本,显微镜下观察滑膜组织的病理形态。

2.5 RT-qPCR 法测定 PI3K、Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 水平

分离大鼠右膝关节滑膜组织,使用 Trizol 法提取总 RNA,超微量分光光度计检测其浓度和纯度,逆转录反应合成 cDNA,严格参照试剂说明书操作。以

所得 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增,反应程序设置如下:95 ℃预变性 90 s;随后行 40 个循环扩增,依次为 95 ℃变性 20 s、64 ℃退火 20 s、72 ℃延伸 30 s;并以 72 ℃终延伸 90 s。熔解曲线采集温度区间设定为 60~95 ℃,内参基因为 GAPDH,各引物扩增效率均处于 90%~110%区间,符合荧光定量 PCR 标准,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的 mRNA 相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	方向	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
PI3K	正向	TGGCCACATTGTCTCTTGGG	124
	反向	ACAAGAAGTCCGGGGTTAGG	
Akt	正向	CCCTTCCTTACAGCCCTCAA	117
	反向	CGTCTTCTCGGAGTGCAAG	
mTOR	正向	TATGACCCCAACCAGCCAAT	156
	反向	AGGAAAACAACTCGTGCTGCC	
Beclin-1	正向	GAGGTACCGACTTGTTCCT	108
	反向	TGCACACAGTCCAGAAAAGC	
LC3-II	正向	GCGATACAAGGGTGAGAAGC	89
	反向	TTCAGAGATGGGTGTGGACA	
GAPDH	正向	GTTGTGATCTGACATGCCG	132
	反向	GGTGAAGAATGGGAGTTGC	

2.6 Western blot 检测滑膜细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白

剪碎的滑膜组织置于含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中,在冰上裂解 30 min。4 ℃下以 12 000 r/min 离心 15 min(离心半径 12 cm),收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白经 SDS-PAGE 分离,根据目标蛋白分子量选择凝胶浓度,电泳分离后采用湿转法转印至 PVDF 膜上,转印电流恒定 300 mA,转印 90~120 min。采用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h;加入 PI3K、Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II 一抗,均按 1:1 000 稀释,4 ℃孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记山羊抗兔二抗,稀释比 1:5 000,室温孵育 1.5 h。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。采用 ECL 显影检测蛋白条带,使用 ImageJ 软件定量灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度比值作为相对表达量。

2.7 ELISA 检测血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13 水平

离心好的血清室温静置 30 min,用 ELISA 测定

血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13 水平,具体流程严格按照试剂盒说明书进行,450 nm 波长下测定各孔 OD 值。

2.8 统计学分析

用 SPSS 25.0 统计软件分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验。采用 Bonferroni 法对多重比较进行校正,以降低 I 类错误的风险。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠关节炎指数评分情况

与空白组比较,模型组治疗第 0、7、14、21、28 天关节炎指数评分均升高($P<0.05$)。与模型组比较,雷公藤多苷片组和低、中、高剂量通痹颗粒组治疗第 7、14、21、28 天关节炎指数评分均降低($P<0.05$)。与雷公藤多苷片组比较,低、中剂量通痹颗粒组治疗第 28 天关节炎指数评分升高($P<0.05$),高剂量通痹颗粒组关节炎指数评分降低($P<0.05$)。详见表 2。

3.2 各组大鼠关节肿胀度情况

与空白组比较,模型组治疗第 0、7、14、21、28 天关节肿胀度均升高($P<0.05$)。与模型组比较,雷公藤

多苷片组和低、中、高剂量通痹颗粒组治疗第 7、14、21、28 天关节肿胀度均减小($P<0.05$)。与雷公藤多苷片组相比,低、中剂量通痹颗粒组治疗第 28 天关节肿胀度增大($P<0.05$),高剂量通痹颗粒组肿胀度减小($P<0.05$)。详见表 3。

3.3 各组大鼠左膝滑膜组织病理学变化情况

空白组的滑膜组织结构显示正常,细胞排列有序,滑膜完整且未见损害或细胞增殖现象。模型组的滑膜组织有明显损伤侵蚀,滑膜组织及血管增生,细胞排列错乱,并伴随大量炎症细胞的浸润。雷公藤多苷片组较低、中剂量通痹颗粒组滑膜组织表面破坏减少,滑膜组织稍有增厚,未见明显血管增生,细胞排列相对有序,见中量炎症细胞浸润。低、中剂量通痹颗粒组较模型组滑膜组织表面侵蚀破坏及增生减少,仍可见少量血管增生,炎症细胞浸润减少。高剂量通痹颗粒组滑膜组织恢复状况最为良好,滑膜组织轻度增生,未见异常血管新生,并且仅观测到极少量的炎症细胞侵袭。详见图 1。

3.4 各组大鼠滑膜细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关 mRNA 表达水平情况

与空白组比较,模型组大鼠滑膜细胞 PI3K、Akt、mTOR 的 mRNA 表达水平升高($P<0.05$),Beclin-1、

表 2 各组大鼠关节炎指数评分比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$, 分)

Table 2 Comparison of arthritis index scores among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, points)

组别	治疗第 0 天	治疗第 7 天	治疗第 14 天	治疗第 21 天	治疗第 28 天
空白组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	9.09 $\pm$ 0.63*	10.36 $\pm$ 0.71*	9.51 $\pm$ 0.24*	8.96 $\pm$ 0.57*	8.73 $\pm$ 0.69*
雷公藤多苷片组	9.11 $\pm$ 0.59*	8.52 $\pm$ 0.12**	7.27 $\pm$ 0.26**	6.39 $\pm$ 0.54**	5.91 $\pm$ 0.27**
低剂量通痹颗粒组	9.10 $\pm$ 0.47*	8.74 $\pm$ 0.36**	7.81 $\pm$ 0.53**	7.38 $\pm$ 0.24**	6.97 $\pm$ 0.51** Δ
中剂量通痹颗粒组	9.08 $\pm$ 0.51*	8.45 $\pm$ 0.85**	7.49 $\pm$ 0.35**	6.92 $\pm$ 0.45**	6.58 $\pm$ 0.49** Δ
高剂量通痹颗粒组	9.07 $\pm$ 0.49*	8.13 $\pm$ 0.57**	6.97 $\pm$ 0.74**	5.85 $\pm$ 0.42**	5.14 $\pm$ 0.30** Δ

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与雷公藤多苷片组比较, $\Delta P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠关节肿胀度比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$, mL)

Table 3 Comparison of joint swelling degree of among different groups of rat ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, mL)

组别	治疗第 0 天	治疗第 7 天	治疗第 14 天	治疗第 21 天	治疗第 28 天
空白组	3.22 $\pm$ 0.25	3.21 $\pm$ 0.14	3.21 $\pm$ 0.07	3.21 $\pm$ 0.41	3.20 $\pm$ 0.19
模型组	4.31 $\pm$ 0.41*	4.42 $\pm$ 0.35*	4.54 $\pm$ 0.16*	4.59 $\pm$ 0.27*	4.63 $\pm$ 0.39*
雷公藤多苷片组	4.34 $\pm$ 0.27*	4.18 $\pm$ 0.26**	3.86 $\pm$ 0.32**	3.45 $\pm$ 0.19**	3.29 $\pm$ 0.15**
低剂量通痹颗粒组	4.32 $\pm$ 0.32*	4.21 $\pm$ 0.21**	4.07 $\pm$ 0.45**	3.84 $\pm$ 0.27**	3.67 $\pm$ 0.32** Δ
中剂量通痹颗粒组	4.35 $\pm$ 0.21*	4.13 $\pm$ 0.18**	3.95 $\pm$ 0.39**	3.74 $\pm$ 0.36**	3.58 $\pm$ 0.29** Δ
高剂量通痹颗粒组	4.33 $\pm$ 0.29*	4.04 $\pm$ 0.25**	3.68 $\pm$ 0.23**	3.37 $\pm$ 0.42**	3.03 $\pm$ 0.10** Δ

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与雷公藤多苷片组比较, $\Delta P<0.05$ 。

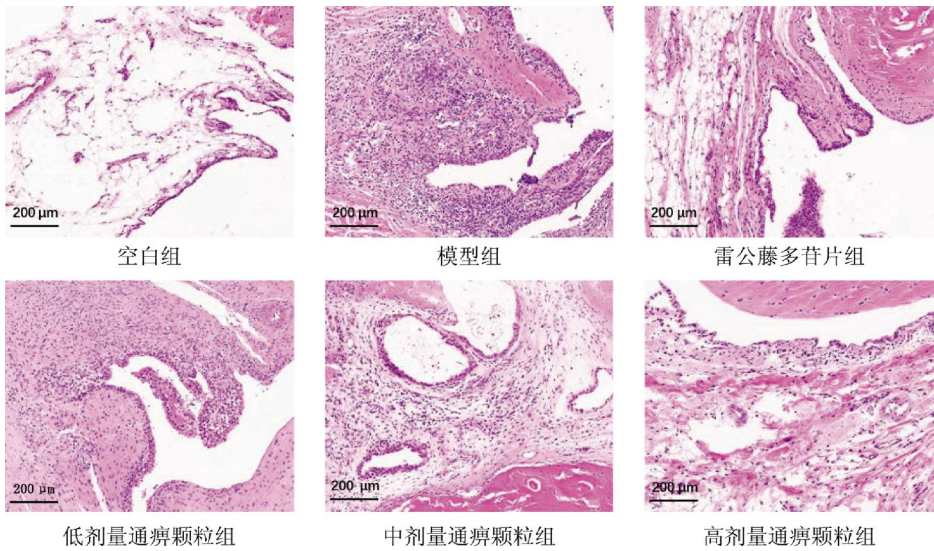


图 1 各组大鼠左膝滑膜组织病理学比较(HE,×200)

Fig.1 Comparison of left knee synovial histopathology among different groups of rat (HE, ×200)

LC3-Ⅱ的 mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。与模型组比较,雷公藤多苷片组和低、中、高剂量通痹颗粒组 PI3K、Akt、mTOR 的 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$), Beclin-1、LC3-Ⅱ的 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。与雷公藤多苷片组比较,低、中剂量通痹颗粒组 PI3K、Akt、mTOR 的 mRNA 表达水平升高($P<0.05$), Beclin-1、LC3-Ⅱ的 mRNA 表达水平降低($P<0.05$);高剂量通痹颗粒组 PI3K、Akt、mTOR 的 mRNA 表达水平降低($P<0.05$), Beclin-1、LC3-Ⅱ的 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。详见表 4。

3.5 各组大鼠滑膜细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达水平情况

与空白组相比,模型组大鼠滑膜细胞 PI3K、Akt、mTOR 的蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), Beclin-1、LC3-Ⅱ的蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与模型组比

较,雷公藤多苷片组和低、中、高剂量通痹颗粒组 PI3K、Akt、mTOR 的蛋白表达水平降低($P<0.05$), Beclin-1、LC3-Ⅱ的蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与雷公藤多苷片相比,低、中剂量通痹颗粒组 PI3K、Akt、mTOR 的蛋白表达水平升高($P<0.05$), Beclin-1、LC3-Ⅱ的蛋白表达水平降低($P<0.05$);高剂量通痹颗粒组 PI3K、Akt、mTOR 的蛋白表达水平降低($P<0.05$), Beclin-1、LC3-Ⅱ的蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见表 5、图 2。

3.6 各组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13 水平情况

与空白组相比,模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13 水平均升高($P<0.05$);与模型组比较,雷公藤多苷片组和低、中、高剂量通痹颗粒组 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13 水平均降低($P<0.05$)。

表 4 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关 mRNA 表达量比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Comparison of mRNA expression levels related to PI3K/Akt/mTOR signaling pathway among different groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	PI3K	Akt	mTOR	Beclin-1	LC3-Ⅱ
空白组	0.42±0.06	0.65±0.07	0.63±0.17	1.08±0.06	1.23±0.12
模型组	1.49±0.05*	1.41±0.08*	1.37±0.15*	0.38±0.04*	0.31±0.05 *
雷公藤多苷片组	0.68±0.07*#	0.80±0.05*#	0.91±0.11*#	0.72±0.03*#	0.82±0.07*#
低剂量通痹颗粒组	1.21±0.09*# Δ	1.29±0.07*# Δ	1.16±0.03*# Δ	0.55±0.06*# Δ	0.57±0.08*# Δ
中剂量通痹颗粒组	0.86±0.10*# Δ	0.95±0.10*# Δ	1.09±0.05*# Δ	0.71±0.07*# Δ	0.59±0.06*# Δ
高剂量通痹颗粒组	0.55±0.05*# Δ	0.63±0.06*# Δ	0.72±0.04*# Δ	0.94±0.09*# Δ	1.08±0.08*# Δ

注:与空白组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与雷公藤多苷片组比较, $\Delta P<0.05$ 。

表 5 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白相对表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Comparison of protein expression levels related to PI3K/Akt/mTOR signaling pathway among different groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	PI3K	Akt	mTOR	Beclin-1	LC3-II
空白组	0.32±0.05	0.14±0.03	0.49±0.04	0.87±0.12	1.37±0.06
模型组	0.87±0.08*	0.31±0.04*	1.13±0.06*	0.23±0.08*	0.26±0.07*
雷公藤多苷片组	0.41±0.02* [#]	0.20±0.03* [#]	0.66±0.02* [#]	0.62±0.04* [#]	1.13±0.03* [#]
低剂量通痹颗粒组	0.53±0.04* ^{#△}	0.28±0.04* ^{#△}	0.84±0.05* ^{#△}	0.42±0.07* ^{#△}	0.65±0.07* ^{#△}
中剂量通痹颗粒组	0.47±0.03* ^{#△}	0.21±0.02* ^{#△}	0.76±0.07* ^{#△}	0.58±0.06* ^{#△}	0.68±0.05* ^{#△}
高剂量通痹颗粒组	0.31±0.05* ^{#△}	0.12±0.04* ^{#△}	0.57±0.03* ^{#△}	0.71±0.03* ^{#△}	1.22±0.04* ^{#△}

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与雷公藤多苷片组比较,[△] $P<0.05$ 。

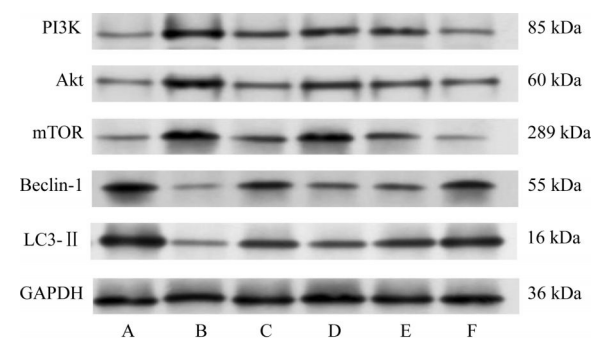


图 2 滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白免疫印迹图

Fig.2 Immunoblots of PI3K/Akt/mTOR pathway proteins in synovial tissues

注:A.空白组;B.模型组;C.雷公藤多苷片组;D.低剂量通痹颗粒组;E.中剂量通痹颗粒组;F.高剂量通痹颗粒组。

与雷公藤多苷片组相比,低、中剂量通痹颗粒组IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1 水平升高($P<0.05$),高剂量通痹颗粒组 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1 水平降低($P<0.05$)。详见表 6。

4 讨论

RA 是一种常见的自身免疫性关节病,女性发病率约为男性的 3 倍^[3]。RA 属于中医学“痹证”“历节病”“鹤膝风”等范畴,现统一规范为“尪痹”。中医

药治疗 RA 历史悠久,且具有独特优势^[9]。雷公藤多苷片为临床治疗 RA 的经典天然药物制剂,具有抗炎、调节机体免疫紊乱的作用,是 RA 基础研究中常用的阳性对照药物^[11]。本课题组总结临床经验,认为虚、瘀、痰为 RA 的基本病机,气血亏虚是 RA 发生发展的重要基础,痰瘀互结为关键致病因素,并拟定通痹颗粒治疗本病。方中当归为君药,可活血调经、化瘀止痛,《日华子本草·草部上品》谓其可“治一切风,一切血,补一切劳,破恶血,养新血”;黄芪为臣药,可补中益气,与当归搭配气血共调,取当归补血汤之意,《医方考·血证门》载“当归味厚,为阴中之阴,故能养血;黄芪则味甘补气者也”。血竭活血化瘀定痛;僵蚕、白芥子相伍,豁痰散结消肿、可祛皮里膜外之痰,三者均为佐药。甘草缓急止痛,调和诸药而为使。研究表明,通痹颗粒可以有效缓解 RA 模型 CIA 大鼠的关节炎症,缓解骨破坏^[12-13]。其机制尚需进一步明确。本研究发现,通痹颗粒高剂量组疗效优于中、低剂量组及阳性对照组,契合中医“重剂起沉痾”的用药理论。《景岳全书·杂证谟·痹》言:“痹证久而不愈,当用峻剂搜剔经络。”RA 痰瘀深伏于筋

表 6 各组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13 水平比较($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

Table 6 Comparison of serum levels of IL-1 β , TNF- α , MMP-1, and MMP-13 among different groups of rat ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	IL-1 β	TNF- α	MMP-1	MMP-13
空白组	38.61±3.37	30.12±3.79	3.82±0.39	4.25±0.87
模型组	98.45±4.34*	92.37±3.03*	11.76±0.66*	8.42±1.27*
雷公藤多苷片组	59.93±3.08* [#]	49.82±3.52* [#]	6.69±0.32* [#]	5.89±0.91* [#]
低剂量通痹颗粒组	72.98±3.37* ^{#△}	64.59±4.01* ^{#△}	9.02±0.55* ^{#△}	5.87±0.92* [#]
中剂量通痹颗粒组	61.56±3.71* ^{#△}	52.33±3.67* ^{#△}	7.15±0.32* ^{#△}	5.90±0.88* [#]
高剂量通痹颗粒组	50.92±3.75* ^{#△}	41.74±3.56* ^{#△}	5.93±0.28* ^{#△}	5.88±0.95* [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与雷公藤多苷片组比较,[△] $P<0.05$;多重比较经 Bonferroni 校正。

骨滑膜,病位深、病势缠绵,轻剂量药力单薄,难以深入搜剔伏痰、散久瘀;高剂量的通痹颗粒药力峻猛直达病所,破深部痰瘀互结,契合顽痹痰瘀深伏的核心病机,为本研究的量效差异提供了中医理论支撑。

自噬作为Ⅱ型程序性细胞死亡方式,可通过溶酶体降解受损细胞器及异常堆积的大分子物质,对维持细胞内环境稳态具有重要意义^[14]。适度的细胞自噬有助于保障细胞的内在环境稳定性;若细胞自噬过度,则可能导致细胞结构的损害^[15]。Beclin-1是自噬起始阶段的标志性蛋白之一,其水平高低与自噬程度呈正相关^[16]。LC3蛋白分为LC3-I和LC3-II两种形式,参与细胞自噬泡的形成。LC3-I分布在细胞浆内,LC3-II则保留在细胞内自噬体膜上,故LC3-II或LC3-II/LC3-I的高低能够更好地反映自噬水平的强弱^[17]。PI3K/Akt/mTOR信号通路是机体调控自噬最为重要的负向细胞内转导信号,其异常活化能降低滑膜细胞自噬水平,进而刺激TNF- α 、IL-1 β 等促炎性细胞因子的表达,并通过信号传递刺激MMP基因活化,诱发并加重关节破坏^[18-21]。同时,通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路可以增加LC3-II/LC3-I和Beclin-1蛋白的表达水平,进而提高滑膜细胞自噬水平,减轻RA炎症反应^[23]。

本研究以PI3K/Akt/mTOR信号通路为核心切入点,选取Beclin-1、LC3-II作为自噬水平的特征性标志物,系统探究通痹颗粒对CIA大鼠的治疗作用及潜在分子机制。结果显示,CIA模型组大鼠关节炎指数评分、关节肿胀度升高,滑膜病理出现明显的炎症浸润与肿胀损伤,符合RA的病理表型。同时,模型组大鼠滑膜组织中PI3K、Akt、mTOR的表达水平升高,血清促炎性细胞因子IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1及MMP-13含量升高,而自噬关键因子Beclin-1、LC3-II的表达水平降低,提示RA的发病可能与PI3K/Akt/mTOR信号通路异常激活密切相关,该通路的过度活化可抑制滑膜细胞自噬水平,进而诱发并加重关节炎症损伤。经药物干预后,各剂量通痹颗粒组关节炎指数评分、关节肿胀度均较模型组降低,提示通痹颗粒可有效改善CIA大鼠关节肿胀、炎症浸润的状态,并能缓解大鼠的滑膜病理学损伤,具有明确的抗炎治疗作用。分子结果显示,各剂量通痹颗粒组可下

调大鼠滑膜组织PI3K、Akt、mTOR表达水平,有效抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路异常活化,同时降低血清IL-1 β 、TNF- α 、MMP-1、MMP-13水平,缓解关节炎与基质破坏损伤,并轻度上调滑膜组织Beclin-1、LC3-II的表达水平,逆转滑膜细胞自噬抑制状态,高剂量通痹颗粒的干预效果更优。

综上所述,通痹颗粒可有效抑制CIA大鼠滑膜组织PI3K/Akt/mTOR信号通路的异常激活,降低促炎性细胞因子与MMP的释放,减轻关节炎与骨质破坏,同时轻度上调下游自噬相关蛋白Beclin-1、LC3-II的表达,改善滑膜细胞自噬抑制状态。本研究尚存在以下不足:其一,仅检测PI3K/Akt/mTOR通路核心蛋白总表达水平,尚不能全面阐释通路的动态磷酸化激活机制;其二,缺乏对自噬小体或者线粒体损伤情况的电镜形态学证据,自噬机制论证不够全面。后续研究将以细胞自噬为主要切入点,完整阐释通痹颗粒对通路活化的磷酸化调控作用,并通过透射电镜观察滑膜组织自噬小体、自噬溶酶体数量与形态,进一步阐明通痹颗粒治疗RA的分子机制。同时,开展体外干预实验及大样本、多中心临床研究,充分评估药物长期使用的安全性,为通痹颗粒的临床推广应用及新药研发提供更为充分的实验与临床依据。

参考文献

- [1] Gravallese E M, Firestein G S, Kosciel N, et al. What is rheumatoid arthritis?[J]. The New England Journal of Medicine, 2024, 390(13): e32.
- [2] Brown P, Pratt A G, Hyrich K L. Therapeutic advances in rheumatoid arthritis[J]. BMJ, 2024, 384: e070856.
- [3] Díaz-González F, Hernández-Hernández M V. Rheumatoid arthritis[J]. Medicina Clínica (English Edition), 2023, 161(12): 533-542.
- [4] Meyer A, Zack S R, Nijim W, et al. Metabolic reprogramming by Syntenin-1 directs RA FLS and endothelial cell-mediated inflammation and angiogenesis[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2024, 21(1): 33-46.
- [5] 李永红, 李浩林, 杨娟娟, 等. 基于“阴阳动态平衡”理论探讨自噬双向调控在类风湿关节炎中的作用及中医药干预机制[J]. 中国中医药信息杂志, 2026, 33(3): 15-20.
- [6] 田雨诗, 黄艺, 李太恒, 等. 类风湿关节炎骨破坏中自噬调控破骨细胞的作用及机制研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2025, 54(3):

- 424–428.
- [7] Xu K, He Y Z, Moqbel S A A, et al. SIRT3 ameliorates osteoarthritis via regulating chondrocyte autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 175: 351–360.
- [8] 郝锋, 吴立斌, 胡骏, 等. 艾灸对类风湿性关节炎模型大鼠足跖滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[J]. *中国针灸*, 2020, 40(11): 1211–1216.
- [9] 张钧岚, 赵芳, 张也, 等. 基于代谢组学联合分析的青附薏痹汤调控精氨酸代谢治疗类风湿关节炎病证的机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2026, 46(4): 697–706.
- [10] 刘涛, 季光. 科研思路与方法[M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 95–96, 220–221.
- [11] 马协丽, 姜泉, 巩勋, 等. 基于倾向性评分匹配的真实世界雷公藤多苷片治疗类风湿性关节炎的疗效性评价[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(18): 125–131.
- [12] 吴伊莹, 柳玉佳, 廖亮英, 等. 基于 Hepcidin 和 JAK2/STAT3 信号通路探讨通痹颗粒对胶原诱导性关节炎大鼠的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(6): 960–966.
- [13] 柳玉佳, 欧慧萍, 吴伊莹, 等. 通痹颗粒对胶原性关节炎大鼠 RANKL/RANK/OPG 系统及 MMP-3、TIMP-1 表达的影响[J]. *中医药导报*, 2021, 27(10): 22–26, 48.
- [14] D'Arcy M S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biology International*, 2019, 43(6): 582–592.
- [15] Deng H, Chen Y M, Wang L, et al. PI3K/mTOR inhibitors promote G6PD autophagic degradation and exacerbate oxidative stress damage to radiosensitize small cell lung cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14: 652.
- [16] Sugawara E, Kato M, Kudo Y, et al. Autophagy promotes citrullination of VIM (vimentin) and its interaction with major histocompatibility complex class II in synovial fibroblasts[J]. *Autophagy*, 2020, 16(5): 946–955.
- [17] 邵鑫, 蒋先虹, 王瑞, 等. 类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及巨噬的表达水平[J]. *风湿病与关节炎*, 2021, 10(1): 1–5, 11.
- [18] Xu H, Wang J, Al-Nusaif M, et al. CCL2 promotes metastasis and epithelial–mesenchymal transition of non-small cell lung cancer via PI3K/Akt/mTOR and autophagy pathways[J]. *Cell Proliferation*, 2024, 57(3): e13560.
- [19] Kim T H, Choi S J, Lee Y H, et al. Combined therapeutic application of mTOR inhibitor and vitamin D3 for inflammatory bone destruction of rheumatoid arthritis[J]. *Medical Hypotheses*, 2012, 79(6): 757–760.
- [20] Misra S, Bagchi A, Sarkar A, et al. Methotrexate and theaflavin-3, 3'-digallate synergistically restore the balance between apoptosis and autophagy in synovial fibroblast of RA: An ex vivo approach with cultured human RA FLS[J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29(5): 1427–1442.
- [21] 程伟刚, 李浩林, 杨娟娟, 等. 中医药调控 PI3K/Akt 信号通路治疗类风湿性关节炎的研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(5): 756–764.
- [22] Brightwell C R, Latham C M, Thomas N T, et al. A glitch in the matrix: The pivotal role for extracellular matrix remodeling during muscle hypertrophy[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2022, 323(3): C763–C771.
- [23] Li Y M, Yu P, Gao Y Y, et al. Effects of the combination of Epimedii Folium and Ligustri Lucidi Fructus on apoptosis and autophagy in SOP rats and osteoblasts via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024, 173: 116346.

(本文编辑 田梦妍)