

本文引用: 刘芙蓉, 李硕夫, 刘湘丹, 王志辉, 曾娟, 周日宝. 基于TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴探讨闹羊花毒素III对类风湿关节炎的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(6): 992-998.

基于TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴探讨闹羊花毒素III对类风湿关节炎的影响

刘芙蓉¹, 李硕夫^{2*}, 刘湘丹¹, 王志辉¹, 曾娟¹, 周日宝¹

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

[摘要] 目的 本研究旨在探讨闹羊花毒素III调控TLR4、MyD88和NF- κ B的机制,以及闹羊花毒素III对类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的影响。方法 RA大鼠模型通过II型胶原诱导构建。随机将Wistar大鼠分成6组($n=8$):假手术组(Sham组)、RA模型组(Model组)、阳性药物雷公藤组[TWG组, $50\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$]、闹羊花毒素III低剂量组[R-III Lo组, $0.06\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$]、中剂量[R-III Mi组, $0.12\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$]和高剂量组[R-III Hi组, $0.24\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$]。测定各组大鼠的关节炎指数(arthritis index, AI);采用HE染色、ELISA、Western blot和RT-qPCR检测闹羊花毒素III对TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴及RA的影响。结果 与Model组比较,闹羊花毒素III处理显著降低了RA大鼠的AI评分($P<0.05$)。闹羊花毒素III对滑膜组织的恶性增生和炎症细胞浸润有明显的抑制作用。与Model组比,闹羊花毒素III各剂量组的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、VEGF、MMP-2、MMP-9、TLR4、MyD88、p-NF- κ B/NF- κ B因子的水平降低且呈浓度依赖性($P<0.05$)。与TWG组比,R-III Lo和R-III Mi组的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、VEGF、MMP-2、MMP-9、TLR4、MyD88、p-NF- κ B/NF- κ B因子的水平升高($P<0.05$),而R-III Hi组无显著差异($P>0.05$)。结论 闹羊花毒素III可以通过下调TLR4、MyD88、NF- κ B因子的表达水平来改善RA。本研究为利用闹羊花毒素III治疗RA提供了一定的实验基础。

[关键词] 闹羊花毒素III; TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴; 类风湿关节炎; 羊躅躅; 炎症; 血管生成

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.06.005

Effects of Rhodotoxin III on rheumatoid arthritis based on TLR4/MyD88/NF- κ B signal axis

LIU Xiaorong¹, LI Shuofu^{2*}, LIU Xiangdan¹, WANG Zhihui¹, ZENG Juan¹, ZHOU Ribao¹

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of rhodojaponin III on rheumatoid arthritis (RA) by regulating toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), and nuclear factor- κ B (NF- κ B). **Methods** Type II collagen was used to construct the RA rat model. Wistar rats were randomly divided into 6 groups, with 8 rats in each group: normal feeding group (sham group), RA model group (Model group), positive drug tripterygium wilfordii group [TWG group, $50\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$], low-dose Rhodojaponin III group [R-III Lo group, $0.06\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$], medium-dose group [R-III Mi group, $0.12\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$], and high-dose group [Rhodojaponin III Hi group, $0.24\text{ mg}\cdot(\text{kg}\cdot\text{d})^{-1}$]. The arthritis index (AI) of the rats was scored. Meanwhile, HE ELISA, Western blot, and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) were used to detect the effects of Rhodojaponin III on TLR4/MyD88/NF- κ B signal axis and RA. **Results** Rhodojaponin III significantly reduced the AI scores of RA rats compared with model group ($P<0.05$).

[收稿日期] 2022-11-09

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2022JJ80086); 湖南省卫生健康委员会计划研究项目(D202302078705); 湖南省大学生创新创业训练计划项目(2022-5313); 湖南省教育厅科学研究项目(19C1384); 湖南省中医药管理局科研计划项目(2021161); 湖南中医药大学中药学一级学科开放基金项目(2020ZYX01); 湖南中医药大学青苗计划(校行人字[2017]25); 湖南省一流学科中药学(校行科字[2018]3); 2020年湖南省一流本科专业建设点(湘教通[2020]248号); 2020年国家级一流本科专业建设点(教高厅函[2021]7号); 中药学专业。

[第一作者] 刘芙蓉, 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 中药资源与药效物质研究。

[通信作者] * 李硕夫, 男, 硕士, E-mail: 258509325@qq.com。

and it effectively inhibited the development of malignant hyperplasia and inflammatory cell infiltration into synovial tissue. Meanwhile, compared with model group, the expression levels of the tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), TLR4, MyD88, and phospho-nuclear factor-kappa-B (p-NF- κ B)/NF- κ B were reduced in R-III Lo, Mi, and Hi groups ($P < 0.05$). Compared with the TWG group, the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, VEGF, MMP-2, MMP-9, TLR4, MyD88, p-NF- κ B/NF- κ B factors increased in the R-III Lo and R-III Mi groups ($P < 0.05$), while no significant differences were observed in the R-III Hi group ($P > 0.05$). **Conclusion** Rhodojaponin III can improve RA by down-regulating the expression levels of TLR4, MyD88, and NF- κ B. This paper offered a solid experimental foundation for the use of Rhodojaponin III in the treatment of RA.

[**Keywords**] Rhodojaponin III; TLR4/MyD88/NF- κ B signal axis; rheumatoid arthritis; Yangzhizhu [*Rhododendron molle* (Blum) G.Don]; inflammation; angiogenesis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的自身免疫性疾病^[1]。目前,全国有0.5%的人患有RA^[2]。RA的主要特征有:滑膜炎、血管翳形成、邻近骨侵蚀、以及关节肿胀和疼痛等^[3-6]。虽然多种抗风湿药物具有良好临床治疗效果,但RA患者与正常人仍相差了10~15年的预期寿命^[7]。因此,我们需要进一步探索治疗RA的药物。

人体内各种炎性细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-7、TNF- α 等)能够促进炎症反应,加重邻近骨破坏,这表明炎症因子可能影响RA的发展^[8-12]。有研究表明,阻断TNF- α 、IL-1、IL-6和IL-7等炎症因子释放,可以减缓RA相关炎症反应^[13-14]。TLR4能够接收外界刺激并将其转化为信号分子,从而传导相关炎症和免疫信号^[15-16]。例如,TLR4通过依赖MyD88途径激活NF- κ B信号^[17],促进TNF- α 、IL-1、IL-7、IL-6等下游炎性因子的合成与分泌^[18],从而导致RA炎症和免疫反应发生^[17-20]。多项研究表明,控制TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴有助于减轻RA症状^[21-22]。因此,为缓解RA的发展,我们亟须探索阻断TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴的新药物。

羊躑躅 *Rhododendron molle* (Blum) G.Don 是中医用来治疗RA的常用药物,其提取物具有镇痛、消炎和免疫抑制的作用^[23]。目前研究发现,羊躑躅中的主要活性成分之一闹羊花毒素III具有抑炎作用,能够抑制TNF- α 和IL-1 β 释放^[24]。前期的研究报道了闹羊花毒素III通过介导Wnt1/Dvl1/ β -catenin信号通路来抑制滑膜细胞增殖和细胞炎症的产生,从而缓解RA^[25]。而闹羊花毒素II能抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴,抑制细胞炎症反应改善RA^[26-27]。闹羊花毒素III和II均为羊躑躅的二萜类化合物,具有相似的化学结构^[28]。因此,我们将进一步探讨闹羊花毒素III是否也能通过TLR4/MyD88/NF- κ B轴来改善RA。本研究拟通过研究闹羊花毒素III对RA的调

节作用,以期闹羊花毒素III临床治疗RA提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

48只Wistar雄性大鼠(200 \pm 20)g购自长沙市天勤生物技术有限公司。许可证号:SYXK(湘)2022-0007。实验伦理审批编号:LL2022061401。实验前先适应性饲养1周。

1.2 主要试剂及仪器

生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司,型号:BioPrep-24);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope6100);荧光定量PCR仪(Thermo Fisher Scientific,型号:PIKOREAL96)。

闹羊花毒素III(上海联迈生物工程有限公司,批号:LM20895);雷公藤多苷片(贵州汉方药业有限公司,批号:2003006);牛II型胶原和完全弗氏佐剂购自美国Chondrex公司(批号分别为:20022和7001);RIPA裂解液(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:AWB0136);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific,批号:23225);TRIzol总RNA提取试剂盒和mRNA逆转录试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司(批号分别为:CW0580S和CW2569);一抗VEGF、MMP-2、MMP-9、MyD88、p-NF- κ B均购买自英国Abcam公司(批号分别为:ab32152、ab92536、ab76003、ab219413、ab76302);TLR4抗体、核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体、 β -actin抗体、HRP goat anti-mouse IgG和HRP goat anti-rabbit IgG抗体以及IL-1 β 、IL-6、IL-17和TNF- α ELISA试剂盒均购自美国Proteintech公司(批号分别为:19811-1-AP、10745-1-AP、66009-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2、KE00021、KE10007、KE10020、KE10002)。

1.3 方法

1.3.1 II型胶原诱导建立RA大鼠模型 RA大鼠

模型采用 II 型胶原诱导进行构建^[27,29]。具体操作如下:将终浓度为 2 mg/mL 的牛 II 型胶原溶液与完全弗氏佐剂以 1:1 混合制成 II 型胶原乳剂。于大鼠尾部皮下注射 300 μ L 制好的 II 型胶原乳剂。7 天后,同剂量二次注射 II 型胶原乳剂。同时设置假手术组(Sham 组),对该组大鼠注射等剂量生理盐水作为对照。每日观察大鼠关节肿胀情况。实验期间每 4 天根据关节肿胀程度评估关节炎指数(arthritis index, AI)。以 AI 作为判断 RA 大鼠模型构建成功与否的标准。AI 评分每 4 天统计一次,根据关节肿胀程度进行评价。总共分为 4 个等级:未出现任何发红、肿胀状况,计为 0 分;趾关节出现轻微发红、肿胀状况,计为 1 分;趾或者足趾关节出现发红、肿胀状况,计为 2 分;除踝关节外,全部后肢关节出现发红、肿胀状况,计为 3 分;所有后肢关节出现发红、肿胀状况,计为 4 分^[30]。由于前爪炎症的发生率很低,后足关节更容易出现严重肿胀,因此,选用两后肢之和来评价大鼠的发病机制^[31]。所有关节肿胀评分之和即为 AI 值。当 AI \geq 4 时,RA 大鼠模型构建成功^[32]。

1.3.2 分组与给药 雷公藤疗法是当前治疗 RA 最有效和关键的疗法之一^[33]。因此,本研究用雷公藤作为阳性对照药物。随机将 48 只 Wistar 雄性大鼠分成 Sham 组、RA 模型组(Model 组)、阳性药物雷公藤组[TWG 组,50 mg \cdot (kg \cdot d)⁻¹]、闹羊花毒素 III 低剂量组[R-III Lo 组,0.06 mg \cdot (kg \cdot d)⁻¹]、闹羊花毒素 III 中剂量组[R-III Mi 组,0.12 mg \cdot (kg \cdot d)⁻¹]、闹羊花毒素 III 高剂量组 [R-III Hi 组,0.24 mg \cdot (kg \cdot d)⁻¹]、每组 8 只,灌胃给药。Sham 组和 Model 组灌胃等剂量的生理盐水。28 d 后,将大鼠麻醉,固定四肢,然后剪开腹壁,腹主动脉采血。最后,剪开皮肤,从邻近肌肉中分离踝关节,剪短两侧韧带,暴露滑膜位置,取出滑膜,并用于后续实验。

1.3.3 HE 染色观察滑膜组织形态 用 4% 多聚甲醛固定大鼠踝关节滑膜组织。随后经石蜡包埋、切片、烘烤二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、苏木精和伊红染液染色、脱水、封片等过程,在光学显微镜下观察大鼠踝关节滑膜组织形态病变情况。

1.3.4 ELISA 检测血清中促炎因子含量 取腹主动脉全血,在 4 $^{\circ}$ C 下,1000 \times g 离心 15 min,取上层血清用于检测。分别按照试剂盒操作步骤,检测血清中促炎因子含量的变化。

1.3.5 Western blot 检测血管生成、TLR4/MyD88/NF- κ B 轴相关蛋白 用 RIPA 裂解缓冲液提取大鼠踝关节滑膜组织中的总蛋白。再用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量。随着 SDS-PAGE 电泳后,将总蛋白转移至硝化纤维素膜上。将膜与一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再与二抗孵育 90 min。内参蛋白为 β -actin。最后,分析蛋白 VEGF、MMP-2、MMP-9、TLR4、MyD88、p-NF- κ B、NF- κ B 的相对表达量。

1.3.6 RT-qPCR 检测 TLR4/MyD88/NF- κ B 轴相关基因表达 按照试剂盒说明,用 TRIzol 试剂提取踝关节滑膜组织总 RNA。然后,用紫外分光光度计测定 260 nm 与 280 nm 处的吸光度值,并计算其浓度跟纯度。再用 mRNA 反转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA。接下来,将 cDNA 直接用于荧光定量 PCR 反应。运用 Primer 5 软件设计引物,结果见表 1。最后,以 β -actin 为内参基因,用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算基因相对表达量。

1.4 统计学分析

本研究使用 GraphPad Prism 9 对实验数据进行评估。数据均用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。数据差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和多因素方差分析(two-way ANOVA)。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 闹羊花毒素 III 对 RA 大鼠的改善作用

首先,我们评估了不同时间点的 AI 评分变化。随着天数的变化,Sham 组中 AI 评分无显著变化($P>0.05$)。随着天数的变化,Model 组 AI 评分逐渐升高,在第 12 天达到最高值($P<0.05$),12 d 以后无显著变化($P>0.05$)。随着天数的变化,TWG、R-III Lo 组、R-III Mi 组、R-III Hi 组 AI 评分逐渐升高,在第 12 天达到最高值,12 d 以后 AI 评分逐渐降低($P>0.05$)。

表 1 引物序列

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
β -actin	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC
TLR4	GGCTTCTAACCTGAACGACCT	ATGATTCCTTTGCCTGAGTTGCTT
MyD88	ACTGTATGAACTGAAGACCCGATC	ACTCCTGTTTCTGCTGTTGCGTA
NF- κ B	CACCAAAGACCCACCTCACCG	CTTGCTCCAGGTCTCGCTTC

此外,我们比较了不同组间的 AI 评分。在 4 d 后, Model 组大鼠 AI 评分显著高于 Sham 组($P<0.05$)。8 d 后, TWG 组、R-III Mi 组、R-III Hi 组与 Model 组比较, AI 评分显著降低($P<0.05$),且 R-III Hi 组和 TWG 组 AI 评分基本一致($P>0.05$)。见图 1A。Sham 组大鼠滑膜组织结构正常,表面光滑无增生;Model 组、R-III Lo 组、R-III Mi 组大鼠滑膜组织增生,层次模糊,伴有大量炎性细胞浸润;TWG 组、R-III Hi 组大鼠滑膜组织表面光滑,且层次清晰,见图 1B。

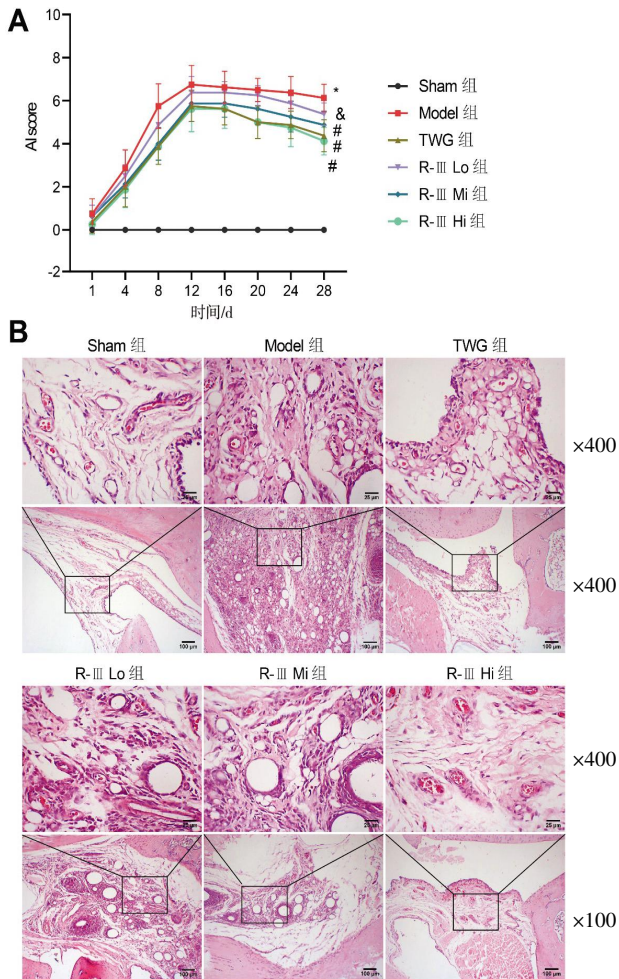


图 1 姜黄素对 RA 大鼠的改善作用

注:A. AI 评分变化, $n=8$, 与 Sham 组比较, $*P<0.05$; 与 Model 组比较, $*P<0.05$; 与 TWG 组比较, $*P<0.05$ 。B. HE 染色观察各组滑膜组织病理情况。

2.2 姜黄素抑制 RA 大鼠的炎症反应

如图 2 所示,相比于 Sham 组, Model 组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-17 含量显著升高($P<0.05$)。相比于 Model 组, R-III Lo、R-III Mi、R-III Hi 组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 含量呈浓度依赖性降低($P<0.05$)。与 TWG 组比较, R-III Lo、R-III Mi 组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 含量显著升高($P<0.05$), 而 R-III Hi 组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 含量无显著变化($P>0.05$)。

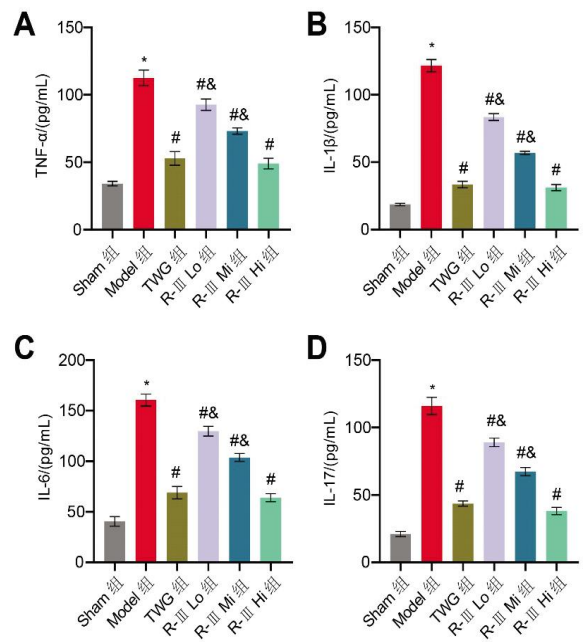


图 2 姜黄素对 RA 大鼠血清促炎因子释放的影响
注:A. TNF- α 含量的检测;B. IL-1 β 含量的检测;C. IL-6 含量的检测;D. IL-17 含量的检测。与 Sham 组比较, $*P<0.05$; 与 Model 组比较, $*P<0.05$; 与 TWG 组比较, $*P<0.05$ 。

2.3 姜黄素抑制 RA 大鼠的血管生成

与 Sham 组相比, Model 组中 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量显著升高($P<0.05$); TWG 组、R-III Lo 组、R-III Mi 组、R-III Hi 组中 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平相比于 Model 组, 呈剂量依赖性降低($P<0.05$)。R-III Lo 组、R-III Mi 组中 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平显著高于 TWG 组($P<0.05$), 而 R-III Hi 组中 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平与 TWG 组无显著差异详见图 3。

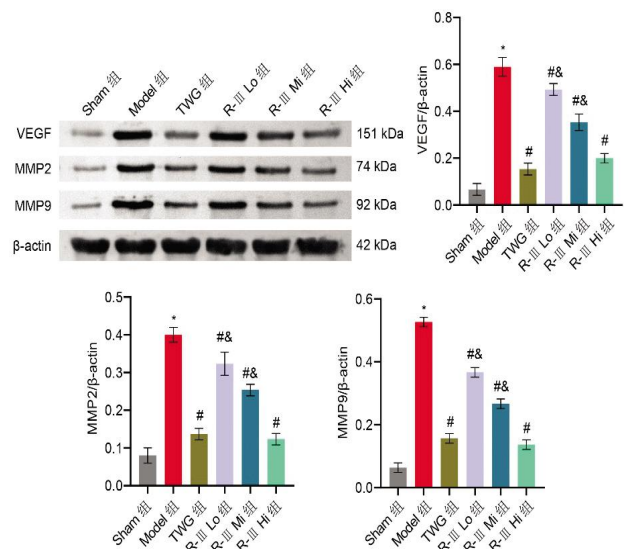


图 3 姜黄素对各组大鼠滑膜组织 VEGF、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

注:与 Sham 组比较, $*P<0.05$; 与 Model 组比较, $*P<0.05$; 与 TWG 组比较, $*P<0.05$ 。

2.4 闹羊花毒素Ⅲ抑制 RA 大鼠的 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号轴激活

如图 4A 所示,相较于 Sham 组,Model 组中 TLR4、MyD88、NF- κ B 基因的相对表达水平均显著上升 ($P < 0.05$)。R-Ⅲ Mi 组、R-Ⅲ Hi 组中 TLR4、MyD88、NF- κ B 基因的相对表达水平相比于 Model 组,均显著降低 ($P < 0.05$)。而 R-Ⅲ Lo 组与 Model 组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。R-Ⅲ Lo 组中 TLR4、MyD88、NF- κ B 基因的相对表达水平显著高于 TWG 组 ($P < 0.05$) 而 R-Ⅲ Mi 组、R-Ⅲ Hi 组中 TLR4、MyD88、NF- κ B 基因的相对表达水平与 TWG 组比,无显著性差异 ($P > 0.05$)。相比于 Sham 组,Model 组中 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$)。R-Ⅲ Lo 组、R-Ⅲ Mi 组、R-Ⅲ Hi 组中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白表达水平相比于 Model 组,均呈浓度依赖性降低 ($P < 0.05$)。R-Ⅲ Lo 组中 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达量显著高于 TWG 组 ($P < 0.05$) 而 R-Ⅲ Mi 组、R-Ⅲ Hi 组中 TLR4、MyD88、NF-

κ B 基因的蛋白表达量与 TWG 组比,无显著性差异 ($P > 0.05$),见图 4B。

3 讨论

RA 的发展与机体分泌的炎症因子^[34]密切相关。例如, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 等炎症因子的释放能够加重滑膜炎反应^[35]。本研究发现在 RA 造模后,大鼠 AI 评分显著增加,血清中促炎症因子表达水平显著上升。同时,在闹羊花毒素Ⅲ的干预下,大鼠血清中促炎症因子的释放被抑制。这些结果表明,闹羊花毒素Ⅲ能够抑制促炎症因子的释放,产生抑炎作用。综上,闹羊花毒素Ⅲ可能是通过抑制促炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 等的释放,缓解 RA。

滑膜组织炎症和骨关节破坏的另一原因可能是血管生成^[36]。研究表明 VEGF 能够调控血管生成,促进 RA 疾病发展^[37]。同时,VEGF 因子表达与 RA 患者病症也呈正相关的调控趋势,因此,可以选用 VEGF 检测 RA 病变程度^[38-39]。基质金属蛋白酶(MMP),影

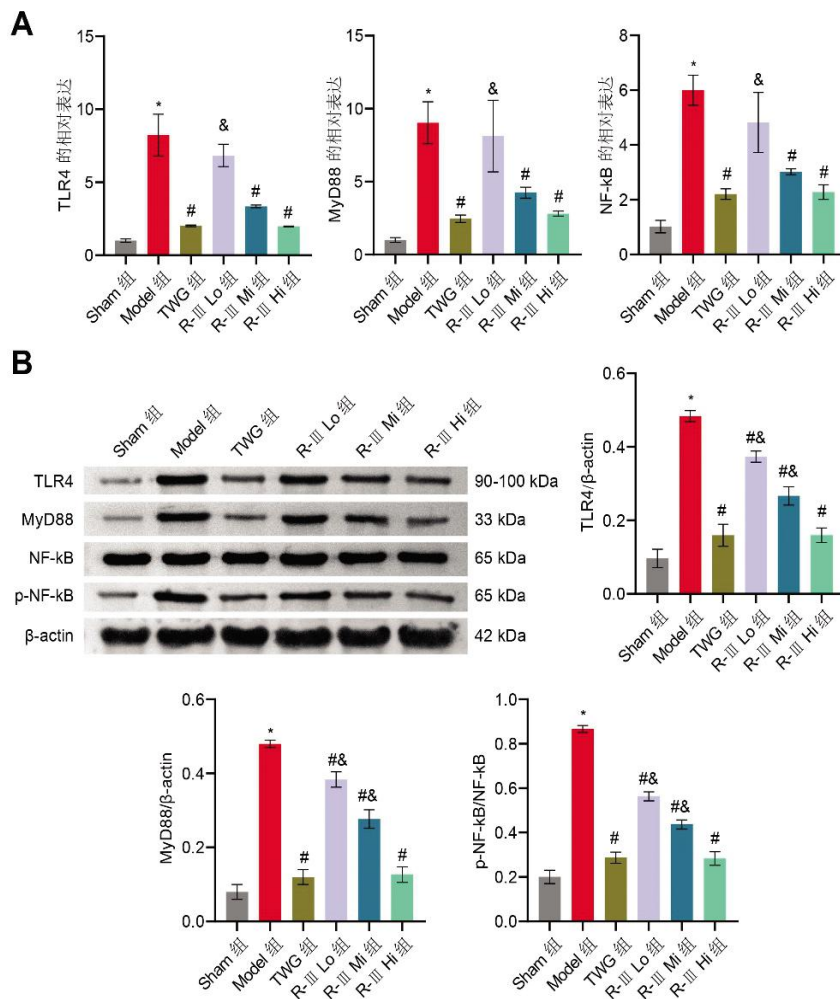


图 4 闹羊花毒素Ⅲ对 RA 大鼠的 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号轴相关因子的影响
注:A. TLR4、MyD88、NF- κ B 基因表达水平的柱形图;B. Western blot 分析 TLR4、MyD88、NF- κ B、p-NF- κ B 因子的表达。与 Sham 组比较,* $P < 0.05$;与 Model 组比较,# $P < 0.05$;与 TWG 组比较,& $P < 0.05$ 。

响骨关节破坏,RA滑膜液中MMP-2和MMP-9^[39]水平升高具有触发血管生成的能力^[40-42]。本研究结果显示,RA大鼠中促血管因子(MMP-2、MMP-9和VEGF)表达量显著升高,闹羊花毒素Ⅲ的干预显著下调了RA大鼠促血管生成因子VEGF、MMP-2和MMP-9的表达。这些结果说明,闹羊花毒素Ⅲ可通过下调促血管生成因子(MMP-2、MMP-9和VEGF)的表达来改善RA。

TLR4-MyD88-NF- κ B通路是常见于RA并调控相关炎症反应的信号通路^[43]。TLR4蛋白监控先天免疫与后天免疫,并在RA患者中表达异常升高^[44-45]。TLR4蛋白可以上调MyD88蛋白表达,促进NF- κ B因子积累,进而诱导促炎因子的分泌,加剧RA滑膜炎症反应和骨破坏^[46-49]。抑制该通路可以减缓相关炎症反应,从而改善RA^[50]。本研究表明,在RA大鼠中,TLR4、MyD88、p-NF- κ B/NF- κ B等相关因子含量显著上升,且闹羊花毒素Ⅲ能显著抑制RA滑膜组织TLR4、MyD88、p-NF- κ B/NF- κ B等相关因子水平的上升。由此,我们得出,闹羊花毒素Ⅲ可以通过抑制TLR4、MyD88、p-NF- κ B/NF- κ B因子表达上调,减少促炎因子的分泌,抑制关节滑膜恶性增生,从而改善RA大鼠相关病症。这将为闹羊花毒素Ⅲ治疗RA提供实验基础。

综上所述,本研究表明闹羊花毒素Ⅲ具有改善RA的作用。其主要作用机制可能是通过下调促血管生成相关因子(MMP-2、MMP-9和VEGF)和TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴相关蛋白的表达,抑制促炎因子诱导的炎症反应和抑制滑膜增生。

总之,闹羊花毒素Ⅲ可通过调节TLR4/MyD88/NF- κ B信号轴改善RA,这将为闹羊花毒素Ⅲ应用于RA的临床治疗提供可靠的实验依据。

参考文献

- [1] EVANGELATOS G, FRAGOULIS G E, KOULOURI V, et al. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: From pathogenesis to clinical impact[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2019, 18(11): 102391.
- [2] ALETAHA D, SMOLEN J S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: A review[J]. *JAMA*, 2018, 320(13): 1360-1372.
- [3] BI X, GUO X H, MO B Y, et al. LncRNA PICSAR promotes cell proliferation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes by sponging miRNA-4701-5p in rheumatoid arthritis[J]. *EBioMedicine*, 2019, 50: 408-420.
- [4] LIU H, ZHU Y L, GAO Y T, et al. NR1D1 modulates synovial inflammation and bone destruction in rheumatoid arthritis[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(2): 129.
- [5] RANA A K, LI Y, DANG Q J, et al. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 65: 348-359.
- [6] MATTHIJSEN X M E, WOUTERS F, SIDHU N, et al. Tenosynovitis has a high sensitivity for early ACPA-positive and ACPA-negative RA: A large cross-sectional MRI study[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2021, 80(8): 974-980.
- [7] VAN DEN HOEK J, BOSUIZEN H C, ROORDA L D, et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: A 15-year prospective cohort study[J]. *Rheumatology International*, 2017, 37(4): 487-493.
- [8] TAN Q, HUANG Q, MA Y L, et al. Potential roles of IL-1 subfamily members in glycolysis in disease[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2018, 44: 18-27.
- [9] 许艳, 崔海虹, 朱静媛. 金线莲苷对TNF- α 诱导的人类风湿关节炎滑膜细胞增殖及炎症因子、MMPs产生的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2022, 24(2): 38-42.
- [10] YOKOTA K, SATO K, MIYAZAKI T, et al. Characterization and function of tumor necrosis factor and interleukin-6-induced osteoclasts in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2021, 73(7): 1145-1154.
- [11] AKRAM M, DANIAL M, SULTANA S, et al. Traditional and modern management strategies for rheumatoid arthritis[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2021, 512: 142-155.
- [12] KOPER-LENKIEWICZ O M, SUTKOWSKA K, WAWRUSIEWICZ-KURYLONEK N, et al. Proinflammatory cytokines (IL-1, -6, -8, -15, -17, -18, -23, TNF- α) single nucleotide polymorphisms in rheumatoid arthritis—a literature review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2106.
- [13] MALHOTRA H, GARG V, SINGH G. Biomarker approach towards rheumatoid arthritis treatment[J]. *Current Rheumatology Reviews*, 2021, 17(2): 162-175.
- [14] ALAM J, JANTAN I, BUKHARI S N A. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 92: 615-633.
- [15] ARENAS-PADILLA M, MATA-HARO V. Regulation of TLR signaling pathways by microRNAs: Implications in inflammatory diseases[J]. *Central-European Journal of Immunology*, 2018, 43(4): 482-489.
- [16] QUERO L, TIADEN A N, HANSER E, et al. MiR-221-3p drives the shift of M2-macrophages to a pro-inflammatory function by suppressing JAK3/STAT3 activation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 3087.
- [17] WANG Q, ZHOU X, ZHAO Y J, et al. Polyphyllin I ameliorates collagen-induced arthritis by suppressing the inflammation response in macrophages through the NF- κ B pathway[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2091.
- [18] ICHISE Y, SAEGUSA J, TANAKA-NATSUI S, et al. Soluble CD14 induces pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells via toll-like receptor 4[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1689.
- [19] 袁娟, 胡玲, 宋小鸽, 等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织Toll样受体4-骨髓样分化因子88-核转录因子- κ B信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2015, 40(3): 199-204.
- [20] LI Y, XU J Z, GU C X, et al. Carvacrol suppresses inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(5): 8169-8176.

- [21] SAMARPITA S, KIM J Y, RASOOL M K, et al. Investigation of toll-like receptor (TLR) 4 inhibitor TAK-242 as a new potential anti-rheumatoid arthritis drug[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2020, 22(1): 16.
- [22] HEGEWALD A B, BREITWIESER K, OTTINGER S M, et al. Extracellular miR-574-5p induces osteoclast differentiation via TLR 7/8 in rheumatoid arthritis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 585282.
- [23] 姚禹民, 房鑫, 李俊, 等. 羊躑躅二萜类成分和各极性部位的体内外抗炎活性研究[J]. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(4): 84-88.
- [24] HE Y C, YAO Y M, XUE Q W, et al. Anti-rheumatoid arthritis potential of diterpenoid fraction derived from *Rhododendron molle* fruits[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2021, 19(3): 181-187.
- [25] 刘笑蓉, 刘湘丹, 王智, 等. 闹羊花毒素Ⅲ通过调控 Wnt1/Dvl1/ β -catenin 通路影响成纤维样滑膜细胞增殖凋亡的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(10): 1199-1206.
- [26] 阚玉娜, 谢佳明, 马立威, 等. 中药活性成分改善类风湿性关节炎作用机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(10): 139-145.
- [27] KONG L L, WANG L F, ZHAO Q, et al. Rhodajaponin II inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokine secretion in MH7A human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2020, 34(10): e22551.
- [28] 夏德超, 杨天明, 朱景申, 等. 羊躑躅的研究进展[J]. *中药材*, 2002, 25(11): 829-832.
- [29] HU X M, TANG J H, ZENG G, et al. RGS1 silencing inhibits the inflammatory response and angiogenesis in rheumatoid arthritis rats through the inactivation of Toll-like receptor signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11): 20432-20442.
- [30] DA SILVEIRA K L, DA SILVEIRA L L, THORSTENBERG M L, et al. Free and nanoencapsulated vitamin D3: Effects on E-NTPDase and E-ADA activities in an animal model with induced arthritis[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2016, 34(4): 262-273.
- [31] ZHANG Q, PENG W, WEI S, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction possesses anti-arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats via suppression of inflammatory reactions, inhibition of invasion & migration and induction of apoptosis in synovial fibroblasts. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109367.
- [32] HU X, TANG J, ZENG G, et al. RGS1 silencing inhibits the inflammatory response and angiogenesis in rheumatoid arthritis rats through the inactivation of Toll-like receptor signaling pathway. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 20432-20442.
- [33] ZHANG Y Q, MAO X, LI W J, et al. *Tripterygium wilfordii*: An inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment [J]. *Medicinal Research Reviews*, 2021, 41(3): 1337-1374.
- [34] SHEN P, LIN W J, BA X, et al. Quercetin-mediated SIRT1 activation attenuates collagen-induced mice arthritis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 279: 114213.
- [35] FIGUS F A, PIGA M, AZZOLIN I, et al. Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2021, 20(4): 102776.
- [36] CHEN Z, WANG H Q, XIA Y, et al. Therapeutic potential of mesenchymal cell-derived miRNA-150-5p-expressing exosomes in rheumatoid arthritis mediated by the modulation of MMP14 and VEGF[J]. *Journal of Immunology*, 2018, 201(8): 2472-2482.
- [37] DAI C Q, KUO S J, HU S L, et al. VEGF-C gene polymorphisms increase susceptibility to rheumatoid arthritis[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2019, 16(10): 1397-1403.
- [38] LEE Y H, BAE S C. Correlation between circulating VEGF levels and disease activity in rheumatoid arthritis: A meta-analysis[J]. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 2018, 77(3): 240-248.
- [39] MELINCOVICI C S, BOȘCA A B, ȘUȘMAN S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. *Revue Roumaine De Morphologie et Embryologie*, 2018, 59(2): 455-467.
- [40] TATEMATSU N, WAGURI-NAGAYA Y, KAWAGUCHI Y, et al. Mithramycin has inhibitory effects on gliostatin and matrix metalloproteinase expression induced by gliostatin in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes[J]. *Modern Rheumatology*, 2018, 28(3): 495-505.
- [41] DU H Y, ZHANG X, ZENG Y C, et al. A novel phytochemical, DIM, inhibits proliferation, migration, invasion and TNF- α induced inflammatory cytokine production of synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients by targeting MAPK and AKT/mTOR signal pathway[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1620.
- [42] DAS S, AMIN S A, JHA T. Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 223: 113623.
- [43] 井维尧, 杜小正, 田杰祥, 等. 基于 TLR4/NF- κ B 通路的类风湿性关节炎滑膜炎发病机制及中医药治疗研究进展[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2022, 39(2): 84-89.
- [44] BAHRAMI A, PARSAMANESH N, ATKIN S L, et al. Effect of statins on toll-like receptors: A new insight to pleiotropic effects[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 135: 230-238.
- [45] ZHANG Y D, JI T F, MA S, et al. MLL1 promotes migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by activating the TRIF/NF- κ B signaling pathway via H3K4me3 enrichment in the TLR4 promoter region [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 82: 106220.
- [46] GOMES DA SILVA I I F, LIMA C A D, SILVA J E A, et al. Is there an inflammation role for MYD88 in rheumatoid arthritis? [J]. *Inflammation*, 2021, 44(3): 1014-1022.
- [47] MITCHELL J P, CARMODY R J. NF- κ B and the transcriptional control of inflammation [M]//*International Review of Cell and Molecular Biology*. Amsterdam: Elsevier, 2018: 41-84.
- [48] 李梅, 蒋锦梅, 欧大明, 等. 白术多糖对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(4): 552-557
- [49] 张传英, 胡玲, 蔡荣林, 等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠踝关节滑膜组织 Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2018, 43(11): 687-691.
- [50] 李宗祥, 肖凯. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨痹胶囊对胶原诱导型关节炎治疗机制的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(12): 1453-1457.