

本文引用: 张钧岚, 赵 芳, 张 也, 戴宗顺, 林 也, 蔡 雄, 唐媛媛. 基于代谢组学联合分析的青附蠲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.

基于代谢组学联合分析的青附蠲痹汤调控精氨酸代谢治疗 类风湿关节炎病证的机制研究

张钧岚^{1,2}, 赵 芳¹, 张 也¹, 戴宗顺³, 林 也¹, 蔡 雄^{1*}, 唐媛媛^{2*}

1. 湖南中医药大学中医药科学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南 长沙 410208;

3. 宁乡市人民医院中医风湿免疫科, 湖南 长沙 410600

[摘要] **目的** 基于代谢组学与网络药理学联合分析, 探讨青附蠲痹汤(QFJBT)治疗佐剂性关节炎(AIA)风寒湿痹证大鼠的作用机制, 并重点验证其对精氨酸代谢通路的调控作用。 **方法** 将 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组(8 只)与造模组(40 只), 前者注射等体积生理盐水, 后者用于建立 AIA 风寒湿痹证大鼠模型。造模结束后次日, 将造模成功的大鼠随机均分为模型组、甲氨蝶呤(MTX)组及 QFJBT 低、中、高剂量组, 每组 8 只。给药干预期间, 空白对照组与模型组每日灌胃等体积生理盐水, 1 次/天; QFJBT 低、中、高剂量组分别按 4.59、9.18、18.36 g/kg 剂量灌胃给药, 1 次/d; MTX 组按 1 mg/kg 剂量灌胃甲氨蝶呤, 每 3 天 1 次。各组均连续干预 42 d, 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用仪非靶向代谢组学技术分析大鼠血浆代谢谱, 通过多元统计分析筛选差异代谢物及关键信号通路; 结合网络药理学筛选交集靶点, 并利用 Metscape 构建“化合物-反应-酶-基因”通路, 对核心通路进行整合分析; 采用 Western blot 对关键靶点进行验证。 **结果** QFJBT 可显著改善 AIA 大鼠异常代谢状态, 精氨酸生物合成被鉴定为关键代谢途径。整合分析提示, 精氨酸代谢通路(涵盖精氨酸的合成、分解及功能调控)可能是 QFJBT 发挥作用的核心代谢基础。Western blot 结果显示, QFJBT 可下调精氨酸酶 1/2(Arginase 1/2)($P<0.001$)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达水平($P<0.05$), 并促进精氨琥珀酸合成酶1(ASS1)表达恢复($P<0.05$); 同时可抑制 mTOR($P<0.05$)及 NF- κ B 信号通路的过度活化($P<0.001$)。 **结论** QFJBT 可能通过协同抑制 mTOR/NF- κ B 信号轴, 调控精氨酸代谢通路, 从代谢、免疫、炎症及氧化应激等多个层面发挥综合调节作用。

[关键词] 类风湿关节炎; 青附蠲痹汤; 佐剂性关节炎; 风寒湿痹证; 代谢组学; 精氨酸代谢

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.04.006

Mechanism of Qingfu Juanbi Decoction in regulating arginine metabolism for treating rheumatoid arthritis based on combined metabolomics analysis

ZHANG Junlan^{1,2}, ZHAO Fang¹, ZHANG Ye¹, DAI Zongshun³, LIN Ye¹, CAI Xiong^{1*}, TANG Yuanyuan^{2*}

1. Institute of Chinese Medical Sciences, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

3. Department of Chinese Medicine Rheumatology, Ningxiang People's Hospital, Changsha, Hunan 410600, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanisms of Qingfu Juanbi Decoction (QFJBT) in treating adjuvant-induced arthritis (AIA) rats with wind-cold-dampness impediment pattern based on integrated metabolomics and network pharmacology analysis, with a focus on verifying its regulatory effect on the arginine metabolism pathway. **Methods** Forty-eight SPF male SD rats were randomly divided into a blank control group ($n=8$) and a modeling group ($n=40$). The blank control group received an equal volume

[收稿日期] 2025-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82405235); 湖南省自然科学基金项目(2023JJ40477); 长沙市自然科学基金项目(kq2208499); 湖南中医药大学院校联合课题重点项目(2022XYLH158)。

[通信作者] * 唐媛媛, 女, 博士, 讲师, E-mail: tanggy@hnucm.edu.cn; 蔡 雄, 男, 博士, 教授, E-mail: caixiong@hnucm.edu.cn。

of normal saline, while the modeling group was used to establish the AIA rat model with wind-cold-dampness impediment pattern. On the day after successful modeling, the model rats were randomly and equally divided into model group, methotrexate (MTX) group, and low-, medium-, and high-dose QFJBT groups, with 8 rats in each group. During the intervention period, the blank control and model groups received an equal volume of normal saline by gavage once daily. The low-, medium-, and high-dose QFJBT groups received QFJBT at doses of 4.59, 9.18, and 18.36 g/kg, respectively, once daily by gavage. The MTX group received methotrexate at 1 mg/kg by gavage once every three days. All groups were continuously treated for 42 days. Rat plasma metabolic profiles were analyzed using untargeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS. Multivariate statistical analysis was performed to screen for differential metabolites and key signaling pathways. Combined with network pharmacology, intersecting targets were identified. The Metscape was used to construct a "compound-reaction-enzyme-gene" network, followed by integrative analysis of the core pathways. Key targets were further validated by Western blot. **Results** QFJBT significantly ameliorated the abnormal metabolic status in AIA rats, and arginine biosynthesis was identified as the key metabolic pathway. Integrative analysis suggested that the arginine metabolic pathway, encompassing arginine synthesis, breakdown, and functional regulation, may represent the core metabolic basis underlying the therapeutic effects of QFJBT. Western blot results demonstrated that QFJBT downregulated the expression of arginase 1/2 ($P<0.001$) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) ($P<0.05$), while promoting the restoration of argininosuccinate synthase 1 (ASS1) expression ($P<0.05$). Additionally, QFJBT inhibited the overactivation of the mTOR ($P<0.05$) and NF- κ B signaling pathways ($P<0.001$). **Conclusion** QFJBT may exert its comprehensive regulatory effects across multiple levels including metabolism, immunity, inflammation, and oxidative stress by synergistically inhibiting the mTOR/NF- κ B signaling axis and thereby modulating the arginine metabolic pathway.

[**Keywords**] rheumatoid arthritis; Qingfu Juanbi Decoction; adjuvant-induced arthritis; wind-cold-dampness impediment pattern; metabolomics; arginine metabolism

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节疼痛、肿胀、晨僵、畸形和功能障碍为主要临床表现的自身免疫性疾病,其病因不明、发病机制复杂,为临床难治性疾病^[1-2]。RA 是临床患病人数最多的自身免疫性疾病,全世界每 200 个成年人中就有 1 人受到累及。最新流行病学研究显示,RA 的患病率在不断上升,同时它也是致残率最高的关节炎类型之一,是亟待解决的公共卫生问题^[3-4]。在 RA 的治疗上,改善病情抗风湿药(disease-modifying antirheumatic medications, DMARDs)是临床应用较为广泛的核心药物。然而,DMARDs 临床应用不仅受限于个体应答不一及总体疗效欠佳,更因易诱发感染、恶性肿瘤及消化道损伤等严重不良反应而亟待寻求更优的治疗策略^[5]。

RA 属于中医学“痹证”之“尪痹”,《素问·痹论篇》曰“风寒湿三气杂至合而为痹也”为其基础病机,中医药辨证论治临床诊疗 RA 对其病情缓解和延缓骨破坏均具有明显的优势^[6]。青附蠲痹汤(简称QFJBT)源于经典名方乌头汤的化裁,由制附子、青风藤、黄芪、白芍、牡丹皮配伍组成,在湖南中医药大学第一附属医院风湿免疫科长期临床实践中应用多年。课题组前期的临床疗效观察证实,该方治疗寒湿痹

阻型RA具有较好的疗效,可显著改善患者的 28 关节疾病活动度评分(disease activity score in 28 joints, DAS28)评分及中医证候积分^[7]。进一步的药效学评价表明,QFJBT 能显著降低佐剂性关节炎(adjuvant-induced arthritis, AIA)病证大鼠的关节肿胀率和关节炎指数评分,明显抑制血清中关键炎症因子的水平。

目前,该方作用机制研究多依赖于网络药理学预测,缺乏对体内外活性成分及其调控内源性代谢通路的整体探索,难以全面阐释其药效物质基础及作用机制^[8]。因此,本研究拟采用代谢组学技术与网络药理学相结合的方法,系统分析 QFJBT 干预 AIA 风寒湿痹证大鼠模型的内源性代谢物及潜在作用靶点,并对关键信号通路进行实验验证,以揭示其多维度药理机制,为临床推广应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物来源

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,体质量 50~70 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心屏障环境内,使用许可证号 SYXK(湘)2019-0009。饲养环境温度控

制在 23~25 ℃,相对湿度为 45%~70%,并维持 12 h/12 h 明暗交替光照周期。所有动物实验操作均遵循湖南中医药大学实验动物福利与伦理审查要求(伦理批准号 LL2019092003)。

1.2 主要仪器

ACQUITY 超高效液相色谱系统(美国沃特世公司);QTRAP 5500 质谱仪(上海爱博才思分析仪器贸易有限公司);20R 台式微量冷冻离心机(美国贝克曼库尔特有限公司);Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统及 ChemiDoc XRS+凝胶成像系统(美国伯乐生命科学产品有限公司);T10 组织匀浆机(德国艾卡仪器设备有限公司);ATY224 电子天平(日本岛津公司);改良的智能人工气候箱(上海汗诺仪器有限公司)。

1.3 主要试剂

DIFCO 灭活结核杆菌 H37 Ra(货号:231141,美国碧迪医疗器械有限公司);矿物油(货号:M8410,美国西格玛-奥德里奇公司);GAPDH 抗体(货号:10494-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);精氨酸琥珀酸合成酶 1(argininosuccinate synthase 1, ASS1)抗体(货号:DF13425,杭州戴格生物科技有限公司);精氨酸酶 1/2(arginase 1/2)抗体(货号:DF12497, Affinity Biosciences);诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体(货号:18985-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);磷酸化雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)及总 mTOR 抗体(货号:5536/2983)、磷酸化核因子 κ B p65 亚基(phosphorylated nuclear factor kappa-B p65, p-NF- κ B p65)及总 NF- κ B p65 抗体(货号:3033/8042)均购自美国赛信通生物试剂有限公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒及 ECL 化学发光液均购自碧云天生物技术有限公司;色谱级甲醇、乙腈和甲酸购自美国西格玛-奥德里奇公司。

2 方法

2.1 AIA 风寒湿痹证大鼠模型建立与药物干预

取 SPF 级雄性 SD 大鼠,随机分为 6 组,每组 6 只,即空白对照组、甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)1 mg/kg 组(MTX 组)、AIA 风寒湿痹证模型组(AIA 组),以及 QFJBT 4.59 g/(kg·d)组(QFJBT 低剂量组)、QFJBT

9.18 g/(kg·d)组(QFJBT 中剂量组)、QFJBT 18.36 g/(kg·d)组(QFJBT 高剂量组)。除空白组外,其余各组大鼠每天均置于智能人工气候箱内接受风寒湿造模(温度 4 ℃、湿度 90%~95%、风速 5 m/s,时间 4 h),14 d 后尾根部皮下注射 100 μ L 含 200 μ g 热灭活结核分枝杆菌的完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)诱导 AIA,且在 CFA 免疫后再风寒湿造模 6 d,本研究所用复合模型的成功标准参照课题组已建立的成熟方案^[9-10]。模型判定标准参照本课题组已发表于本刊的前期研究并严格遵循既往文献中已标准化的造模规范:(1)中医证候^[9-10]判定:造模后大鼠出现精神萎靡、畏寒蜷缩、扎堆少动、毛色晦暗、便溏等典型风寒湿表征。结合饮水量、热刺激阈痛值和关节炎评分等指标及大鼠整体表现,综合判定风寒湿痹证大鼠模型是否成功建立。(2)关节炎评分^[11]判定:采用 5 级评分法评价关节病变程度。0 分:无红肿;1 分:小趾关节红肿;2 分:小趾关节和足跖部红肿;3 分:踝关节以下足爪均红肿;4 分:包括踝关节在内的全部足爪严重红肿、畸形或僵硬。大鼠单侧关节评分均达到 1 分及以上即视为造模成功。

将造模成功的大鼠随机分为 6 组:空白组、AIA 组、MTX 组,以及 QFJBT 低、中、高 3 个剂量组。其中,空白组不进行造模,其余各组均接受造模处理。药物干预于造模结束后的次日开始。空白组和 AIA 组均灌胃等体积生理盐水;MTX 组于第 0、3、7、14、21、28、35 天灌胃 MTX [1 mg/(kg·d)],每天 1 次;QFJBT 低、中、高剂量组分别灌胃 4.59、9.18、18.36 g/(kg·d)的 QFJBT,连续给药至第 42 天,每天 1 次。干预结束后采集血浆、肝脏及踝关节组织样本用于后续分析。

2.2 大鼠血浆样本代谢组学分析

造模后第 42 天,大鼠禁食不禁水 24 h,颈静脉取血 0.7 mL,收集在含肝素的 1.5 mL EP 管中。血样均在 2 h 内于 4 ℃、3 600 r/min 离心 15 min,取上清液得血浆样品,液氮速冻 15 min 后,置于-80 ℃超低温冰箱中保存。模型组与 QFJBT 高剂量组各 8 只大鼠的血浆样本,用于后续代谢组学分析。

精密吸取样品至 EP 管,加入提取液(甲醇:乙腈=1:1, v/v, 含同位素标记内标混合物),涡旋 30 s,超

声 10 min, 置于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心沉淀蛋白, 取上清液至进样瓶。所有样品另取等量上清液混合, 制备 QC 样品上机检测。

原始数据经 ProteoWizard 格式转换与 XCMS 预处理后, 通过 HMDB 数据库注释代谢物。将标准化数据导入 SIMCA 14.1 软件进行多变量分析, 构建的 OPLS-DA 模型表现出优异的拟合与预测能力 ($R^2Y=0.91$, $Q^2=0.82$), 并经 CV-ANOVA ($P<0.01$) 及 200 次置换检验确认模型稳健且无过拟合。随后, 结合变量投影重要度 ($VIP>1$) 与 t 检验 ($P<0.05$) 筛选差异代谢物, 并运用 MetaboAnalyst 5.0 进行通路富集分析, 以阐明 QFJBT 干预的潜在代谢机制。

2.3 QFJBT 药效作用的代谢组学和网络药理学整合分析

通过 ADME 参数、药代动力学特性及药物化学类药性, 从超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用仪谱中筛选出 24 个潜在活性成分(白芍 3 个、牡丹皮 6 个、黄芪 4 个、青风藤 3 个、附子 9 个, 其中白芍与牡丹皮共同含有 1 个), 并预测其靶点; 同时整合 GeneCards、OMIM、TTD、DisGeNET、PharmGKB、NCBI、DrugBank 和 KEGG 8 个数据库, 经 UniProt 统一人类基因符号、设定阈值 (GeneCards relevance score ≥ 15 等) 并用 Excel 与 R 双重去重后, 得到 6 058 个 RA 相关靶点, 再以 Venny 2.1.0 提取药物-疾病交集靶点。随后将网络药理学交集靶点与代谢组学差异代谢物一并导入 Cytoscape, 借助 MetScape 构建“化合物-反应-酶-基因”网络, 并基于 KEGG 与 Bio-

Cyc 完成通路富集, 锁定关键代谢通路。

2.4 QFJBT 对关键代谢通路相关蛋白表达的影响

取适量组织, 经预冷 PBS 冲洗后, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液进行匀浆; 离心 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\times g$, 15 min) 后收集上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经煮沸变性后, 进行 SDS-PAGE 电泳 (浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V)。之后通过湿转法 (250 mA, 90 min) 将蛋白转印至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。分别加入 GAPDH (1:2 000)、ASS1 (1:1 000)、arginase 1/2 (1:1 000)、iNOS (1:1 000)、mTOR/p-mTOR (1:1 000) 及 NF- κ B p65/p-NF- κ B p65 (1:1 000) 一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 洗膜后加入 HRP 标记二抗 (1:5 000), 室温孵育 1~2 h。最后经 ECL 化学发光显影, 使用 ImageJ 软件对条带灰度值进行定量分析, 以比较各组蛋白表达的差异。

2.5 数据统计与分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 9.5.5 软件进行统计分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。两组间比较符合正态性和方差齐性时采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 方差齐时选用 Tukey 事后检验, 方差不齐时选用 Dunnett 检验。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学显著性。

3 结果

3.1 QFJBT 干预 AIA 风寒湿痹证大鼠作用的代谢组学影响

主成分分析 (principal component analysis, PCA)

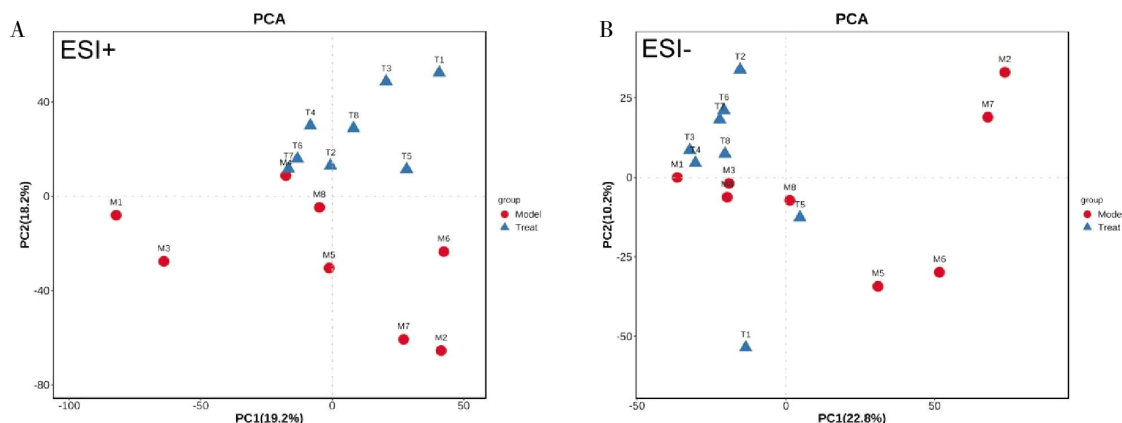


图 1 QFJBT 干预痹证大鼠的代谢组学分析数据质量评估与模型验证

Fig.1 Quality assessment and model validation of metabolomics data in QFJBT-treated model rats

注: A 和 B 为正离子与负离子模式下所有样本的 PCA 得分图。

结果显示,模型组与 QFJBT 各剂量组的代谢谱呈现明显的分离趋势(图 1),表明干预后大鼠体内代谢状态发生显著改变,提示 QFJBT 对 AIA 风寒湿痹证大鼠具有明确的调节作用。这一结果进一步验证了 QFJBT 能够显著逆转 AIA 大鼠的异常代谢状态。

在正、负离子模式下,模型组与治疗组的代谢谱均呈现完全分离。模型参数显示良好的预测能力与稳健性(正离子模式: $R^2Y=0.912$, $Q^2=0.785$;负离子模式: $R^2Y=0.913$, $Q^2=0.577$;两组 Q^2 值均大于 0.5)(图 2A-B)。此外,200 次置换检验结果显示, Q^2 回归线与 Y 轴交点的截距均小于零(图 2C-D),进一步表明模型未出现过拟合,预测结果可靠。基于 OPLS-DA 模型(变量重要性投影 $VIP \geq 1$)并结合 t 检验($P < 0.05$),共筛选出 224 种差异代谢物,其中正离子模式下 160 种(141 种下调,19 种上调),负离子模式下 64 种(27 种下调,37 种上调)(图 2E)。经 FDR 校正后($FDR \text{ } q\text{-value} < 0.05$),显著差异代谢物数量为 47 个。我们核心关注的精氨酸代谢通路关键分子(精氨酸、瓜氨酸等)的 q 值均小于 0.01(图 2F)。

通过正、负离子模式下所有差异代谢物的层次聚类分析,可见不同组别间代谢物表达谱呈现明显区隔(图 3A-B)。分析结果表明,与模型组相比, QFJBT 治疗组的代谢谱发生显著改变。

基于 Metabo Analyst 平台进行代谢通路分析,以 $\text{Pathway Impact} > 0.1$ 且 $P < 0.05$ 为筛选标准,鉴定出两条关键代谢通路:甘油磷脂代谢和精氨酸生物合成(图 3C-D)。这些通路可能是 QFJBT 治疗 RA 的重要作用靶点。其中,精氨酸生物合成是更广泛的精氨酸代谢网络的核心组成部分。

3.2 QFJBT 干预 AIA 病证大鼠作用的代谢组学与网络药理学整合分析

进一步采用 MetScape 插件构建的“化合物-反应-酶-基因”通路(图 4)与通路富集分析(图 5)共同揭示,精氨酸代谢途径是 QFJBT 发挥治疗作用的核心枢纽。鉴于精氨酸代谢与类风湿关节炎的免疫炎症网络深度交织,本研究基于该整合网络,进一步将机制验证的焦点锁定在精氨酸双向代谢通路的关键酶(合成酶 ASS1 与催化酶 iNOS),并延伸探讨其

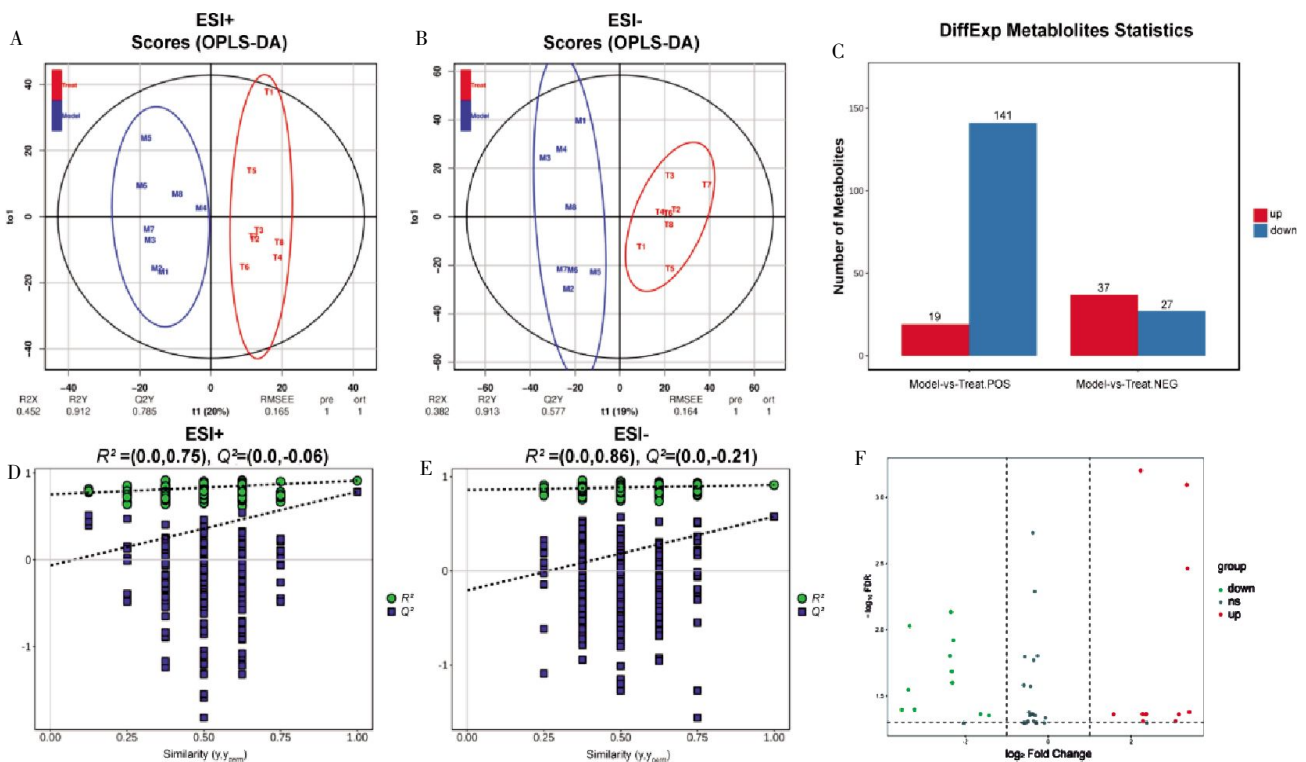


图 2 QFJBT 治疗组的代谢轮廓分析

Fig.2 Metabolic profiling of the QFJBT-treated groups

注:A、B.正离子及负离子模式下,治疗组与模型组血清代谢物的 OPLS-DA 得分图,图中红色标记表示显著上调的代谢物,蓝色标记表示显著下调的代谢物,灰色标记代表未达到显著性阈值的代谢物;C、D.正离子及负离子模式下 200 次置换检验图,红色表示高表达,蓝色表示低表达;E.整合正负离子模式数据所得的 PLS-DA 得分图;F.经 FDR 校正后差异代谢物的火山图。

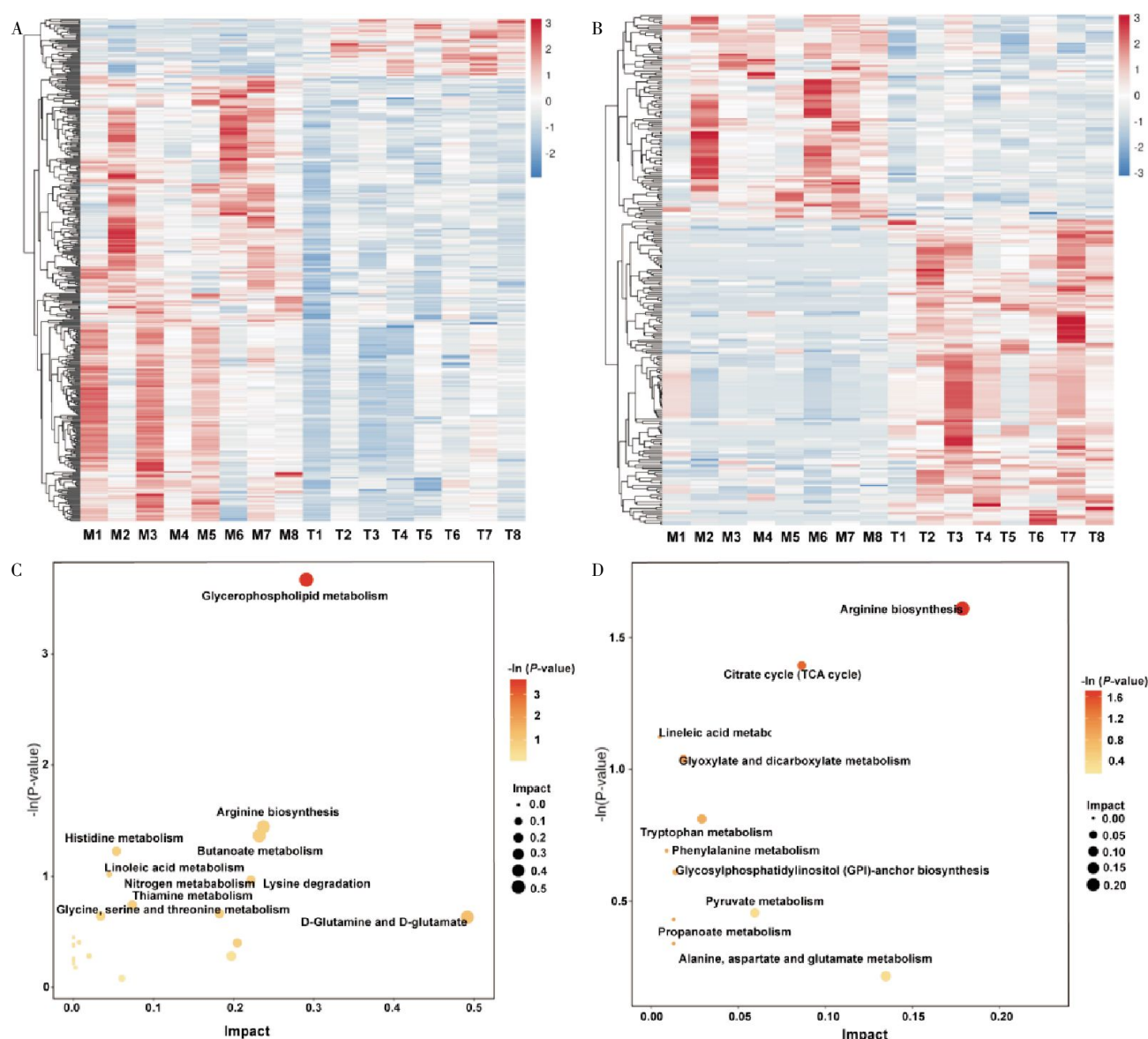


图3 QFJBT干预后的代谢组学分析

Fig.3 Metabolomics analysis following QFJBT intervention

注:A.正离子模式下模型组与治疗组的聚类热图;B.负离子模式下模型组与治疗组的聚类热图;C、D.正离子及负离子模式下代谢通路富集分析气泡图。

对下游关键细胞信号通路(mTOR 及 NF- κ B p65 磷酸化水平)的协同干预作用。

3.3 QFJBT 干预 AIA 病证大鼠精氨酸代谢通路的调控作用验证

与正常组相比,AIA 组大鼠肝脏中 ASS1 的蛋白表达水平显著下调($P<0.001$);与 AIA 组相比,QFJBT 中、高剂量组及 MTX 组 ASS1 的蛋白表达水平显著上调($P<0.05$);与 MTX 组相比,QFJBT 中、高剂量组效果相当($P>0.05$),但 QFJBT 低剂量组的 ASS1 蛋白表达水平低于 MTX 组($P<0.05$)。详见图 6。

与正常组相比,AIA 组大鼠关节组织中 Arginase

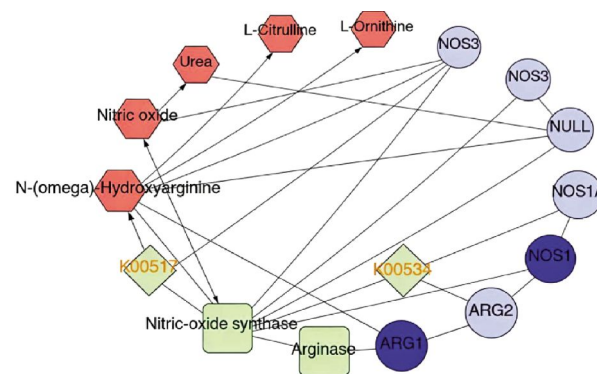


图4 尿素循环和精氨酸、脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺代谢的“化合物-反应-酶-基因”代谢通路图

Fig.4 "Compound-reaction-enzyme-gene" network of the urea cycle and the metabolism of arginine, proline, glutamate, aspartate, and asparagine

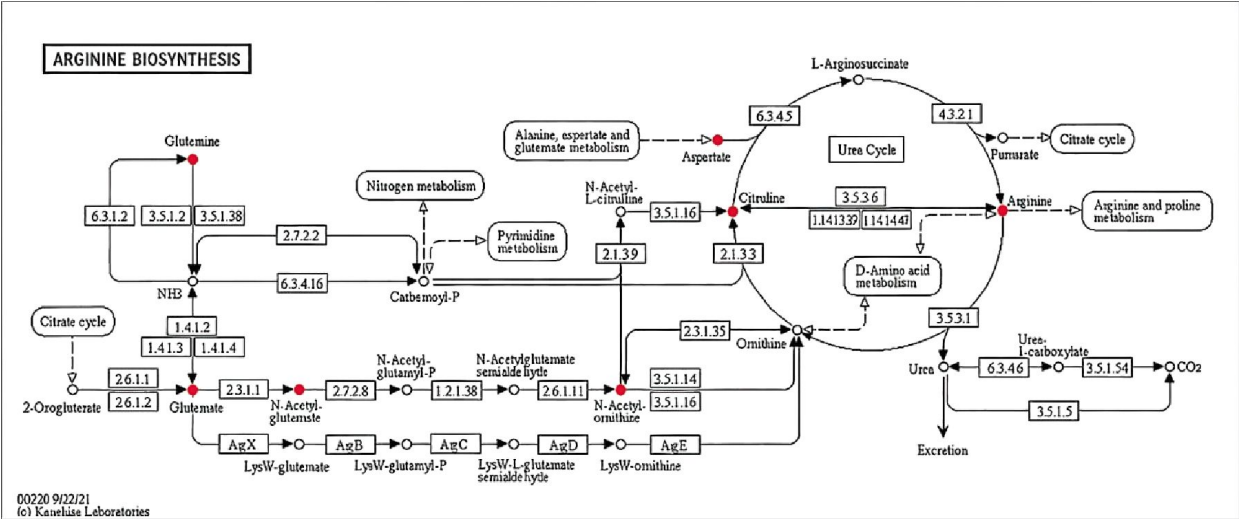


图 5 基于整合分析的核心机制:精氨酸代谢通路

Fig.5 Core mechanism based on integrated analysis: the arginine metabolism pathway

1/2 的蛋白表达水平显著上调($P<0.001$);与 AIA 组相比,QFJBT 高剂量组及 MTX 组能够有效下调 Arginase 1/2 蛋白表达水平($P<0.001$);与 MTX 组相比,QFJBT 低、中剂量组的 Arginase 1/2 表达水平依然显著偏高($P<0.001$, $P<0.001$),尽管 QFJBT 高剂量组有效降低了该蛋白表达,但其下调效果仍弱于 MTX 组($P<0.05$)。详见图 7。

3.4 QFJBT 对病证大鼠关节组织 iNOS 表达的影响

与正常组相比,AIA 组大鼠关节组织中 iNOS 的蛋白表达水平显著上调($P<0.05$);与 AIA 组相比,QFJBT 高剂量组和 MTX 组能够有效下调 iNOS 蛋白表达水平($P<0.05$);与 MTX 组相比,QFJBT 各剂量组展现出相近的 iNOS 蛋白下调作用($P>0.05$)。详见

图8。

3.5 QFJBT 对病证大鼠关节组织 mTOR 蛋白表达的影响

与正常组相比,AIA 组 mTOR 磷酸化水平显著升高($P<0.001$);与 AIA 组相比,QFJBT 高剂量组和 MTX 组可有效降低 mTOR 磷酸化水平($P<0.05$);与 MTX 组相比,QFJBT 低、中剂量组的 mTOR 磷酸化水平偏高($P<0.05$, $P<0.05$),QFJBT 高剂量组展现出与 MTX 组相近的下调 mTOR 磷酸化水平的作用($P>0.05$)。详见图 9。

3.6 QFJBT 对病证大鼠关节组织 NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

与正常组相比,AIA 组大鼠关节中 NF- κ B 关键亚基 p65 磷酸化水平明显升高($P<0.001$),与 AIA 组相

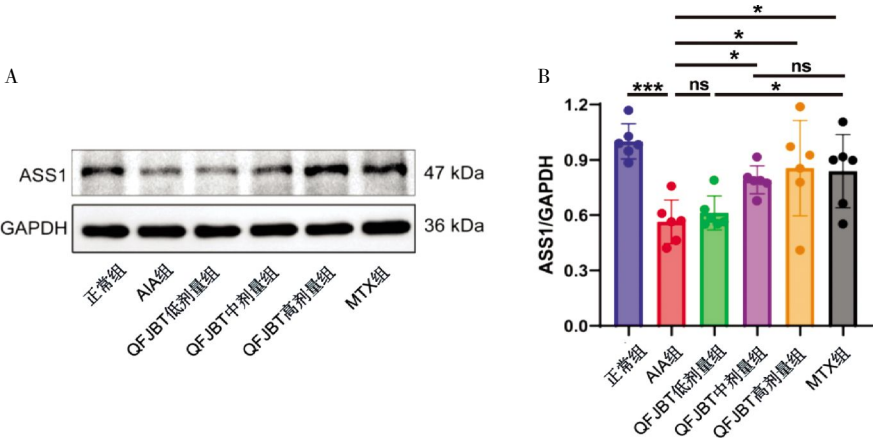


图 6 QFJBT 上调 ASS1 蛋白表达

Fig.6 QFJBT upregulates ASS1 protein expression

注:A. ASS1 的代表性蛋白印迹图;B.定量分析数据($n=6$)。* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

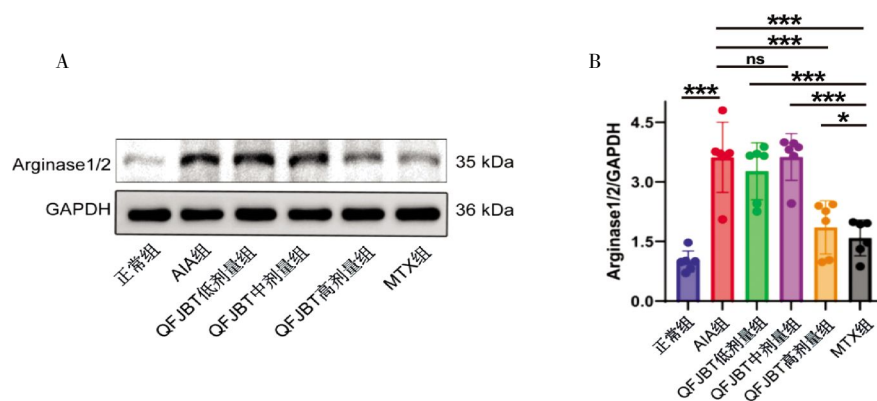


图 7 QFJBT 对 Arginase 1/2 蛋白表达的抑制作用

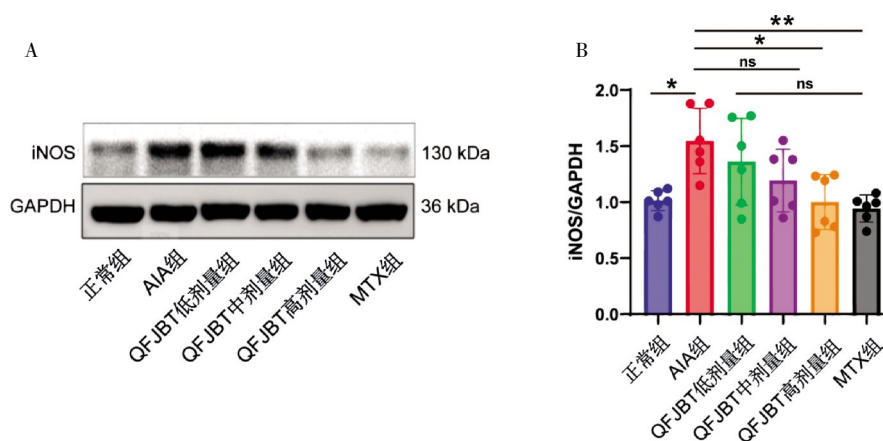
Fig.7 Inhibitory effect of QFJBT on Arginase 1/2 protein expression注:A. Arginase 1/2 的代表性蛋白印迹图;B.定量分析结果($n=6$)。* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

图 8 QFJBT 下调 iNOS 蛋白表达

Fig.8 QFJBT downregulates iNOS protein expression注:A. iNOS 的代表性蛋白印迹图;B.定量分析结果($n=6$)。* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

比,QFJBT 各组及 MTX 组能够有效降低 p-p65 水平($P<0.001$),且 QFJBT 的抑制作用呈现明显的剂量依赖性;与 MTX 组相比,QFJBT 低剂量组中 p-

p65 水平相对较高($P<0.001$),QFJBT 中、高剂量组展现出与 MTX 组相近的下调 p-p65 水平的作用($P>0.05$, $P>0.05$)。详见图 10。

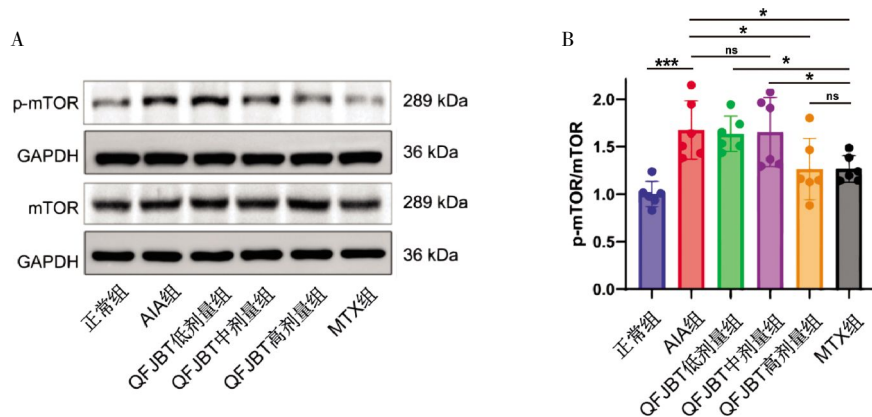
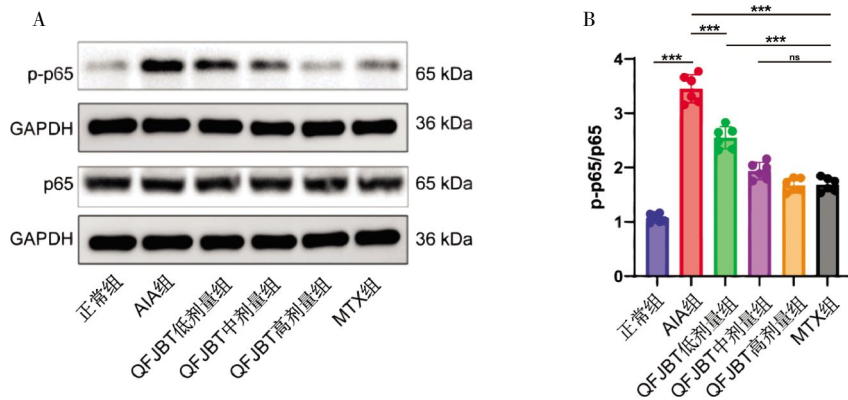


图 9 QFJBT 抑制 mTOR 信号通路的活化

Fig.9 QFJBT inhibits the activation of the mTOR signaling pathway注:A.mTOR 及其磷酸化形式(p-mTOR)的代表性蛋白印迹图;B.定量分析结果($n=6$)。* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

图 10 QFJBT 抑制 NF- κ B 信号通路的活化Fig.10 QFJBT inhibits the activation of the NF- κ B signaling pathway

注:A.p65 及其磷酸化形式(p-p65)的代表性蛋白印迹图;B.定量分析结果($n=6$)。*** $P<0.001$ 。

4 讨论

RA 是一种以滑膜炎症和骨破坏为特征的慢性自身免疫性疾病。中医学将其归属“痹证”范畴,认为其核心病机为风寒湿邪客于经络骨节,久则气血运行不畅,津液代谢失常,致痰瘀交结。QFJBT 组方旨在散寒除湿、祛风通络。从现代生物学语境审视,RA 的发生发展不仅是单纯的免疫失常,更伴随有关节局部微环境的代谢重编程与炎症信号级联放大的交织互作。寻找能同时纠正代谢紊乱与平抑炎症的中药复方,是当前 RA 治疗研究的重要方向。

精氨酸作为连接机体免疫应答与代谢调控的核心枢纽分子,其代谢通路的失衡是驱动 RA 滑膜炎症、血管生成及软骨破坏的关键致病代谢特征^[12]。在 RA 病理状态下,精氨酸的分解存在两条相互竞争的致病途径:一是 iNOS 过度激活,将精氨酸转化为过量的 NO,直接加剧氧化应激与组织损伤;二是 Arginase 1/2 高表达,不仅竞争性消耗精氨酸导致免疫细胞功能抑制,其产生的多胺等还会促进滑膜成纤维细胞异常增殖^[13-14]。此外,精氨酸也是关键的细胞内营养“感应器”,其丰度直接影响 mTOR 信号通路的活性;而 mTOR 的异常激活与 RA 滑膜血管生成密切相关^[15-16]。在这一复杂通路中,NF- κ B 作为炎症反应的“主开关”,不仅与 mTOR 形成正反馈环路以放大炎症^[17],且本身即是诱导 iNOS 基因转录的关键上游调控因子^[18]。

基于上述机制,本研究结合代谢组学与分子生物学验证,深入分析了 QFJBT 对 AIA 风寒湿痹证大

鼠的干预作用。本研究发现,QFJBT 能显著纠正 AIA 大鼠全局性的代谢紊乱,并精准靶向精氨酸代谢通路。具体而言,QFJBT 显著下调了大鼠体内 Arginase 1/2 及 iNOS 的异常高表达,提示其能有效阻断病理状态下精氨酸的过度“恶性消耗”;同时,精氨酸合成关键酶 ASS1 表达上调,表明其可能通过增强合成途径进行代偿性修复。这种“抑消耗、促合成”的双向调节,从源头上切断了 NO 和多胺等致病介质的原料供应。在信号转导层面,本研究观察到 QFJBT 在调节精氨酸代谢的同时,显著抑制了 mTOR 的过度磷酸化。这提示该方剂可能通过纠正氨基酸的异常代谢流,解除了致病性营养信号对 mTOR 的持续刺激。更重要的是,QFJBT 强效抑制了 NF- κ B p65 的磷酸化,这为前文观察到的 iNOS 高表达被逆转提供了一个明确的上游机制解释。因此,QFJBT 实现了从“抑制上游炎症信号(NF- κ B)”到“纠正下游代谢重编程(iNOS/Arginase)”的贯通性干预。

综合上述分析,本研究得出结论:QFJBT 干预 AIA 大鼠可能并非依赖单一靶标,而是主要以精氨酸代谢通路(ASS1/Arginase 1/2/iNOS)为调节枢纽,并伴随对 mTOR/NF- κ B 信号轴的协同抑制,进而发挥抗炎、调节免疫微环境及纠正代谢紊乱的综合效应。这一机制印证了 QFJBT 抑制 iNOS 和 NF- κ B 的“祛邪(抗炎、抗氧化)”之效,以及恢复精氨酸代谢稳态的“扶正(恢复营养与免疫稳态)”之功,高度契合了中医药“调代谢以平免疫”及多系统、多靶点协同治疗的整体观优势。

本研究亦存在一定局限。首先,本研究主要基于

AIA 动物模型,其临床转化价值需进一步验证。其次,QFJBT 中具体活性成分及其与上述关键靶点间的直接作用关系尚不明确。后续将结合血清药物化学及功能获得/缺失实验,进一步阐明其“成分-靶点-通路-表型”的因果作用链条。

参考文献

- [1] GRAVALLESE E M, FIRESTEIN G S. Rheumatoid arthritis – common origins, divergent mechanisms[J]. *New England Journal of Medicine*, 2023, 388(6): 529–542.
- [2] SMOLEN J S, ALETAHA D, MCINNES I B. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023–2038.
- [3] FINCKH A, GILBERT B, HODKINSON B, et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2022.
- [4] JIN W, WANG Q, JIN C, et al. Spatiotemporal distributions and regional disparities of rheumatoid arthritis in 953 global to local locations, 1980–2040, with deep learning –empowered forecasts and evaluation of interventional policies' benefits[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2025, 84(7): 1104–1116.
- [5] KONZETT V, ALETAHA D. Management strategies in rheumatoid arthritis[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2024, 20(12): 760–769.
- [6] 中华中医学学会《类风湿关节炎病证结合诊疗指南》项目组. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南(2025 年)[J]. *中医杂志*, 2025, 66(17): 1842–1856.
- [7] 李 鑫, 林 也, 陈小娟, 等. 青附蠲痹汤治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎的临床疗效观察[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(1): 403–407.
- [8] LIANG Z, DING C. TCMHTI: A transformer-based herb-target interaction prediction model for Qingfu Juanbi Decoction in rheumatoid arthritis[J]. *Digital Chinese Medicine*, 2025, 8(2): 206–218.
- [9] 李 鑫, 魏艳霞, 林 也, 等. 风寒湿外邪对痹证(佐剂性关节炎)发生发展的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(12): 1496–1501.
- [10] 林 也, 戴宗顺, 张 婷, 等. 基于“以方测证”的类风湿关节炎风寒湿痹证动物模型的构建研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(5): 668–672.
- [11] 戴宗顺, 唐媛媛, 尧忠柳, 等. 青附蠲痹汤治疗类风湿关节炎病证作用的网络药理学分析与实验验证[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(11): 2054–2062.
- [12] CANÈ S, GEIGER R, BRONTE V. The roles of arginases and arginine in immunity[J]. *Nature Reviews. Immunology*, 2025, 25(4): 266–284.
- [13] GAO Y, ZHANG Y, LIU X. Rheumatoid arthritis: Pathogenesis and therapeutic advances[J]. *Medicine Communications*, 2024, 5(3): e509.
- [14] HUANG J B, CHEN Z R, YANG S L, et al. Nitric oxide synthases in rheumatoid arthritis[J]. *Molecules*, 2023, 28(11): 4414.
- [15] BARKER B E, HANLON M M, MARZAIOLI V, et al. The mammalian target of rapamycin contributes to synovial fibroblast pathogenicity in rheumatoid arthritis[J]. *Frontiers in Medicine*, 2023, 10: 1029021.
- [16] KARONITSCH T, KANDASAMY R K, KARTNIG F, et al. mTOR senses environmental cues to shape the fibroblast-like synovio-cyte response to inflammation[J]. *Cell Reports*, 2018, 23(7): 2157–2167.
- [17] KRACHT M, MÜLLER-LADNER U, SCHMITZ M L. Mutual regulation of metabolic processes and proinflammatory NF- κ B signaling[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2020, 146(4): 694–705.
- [18] GANSTER R W, TAYLOR B S, SHAO L, et al. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by STAT 1 and NF- κ B[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(15): 8638–8643.

(本文编辑 苏 维)