

网络出版时间: 2024-12-26 15:43:54 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1134.004>

# 基于网络药理学和动物实验 探讨葛根素治疗类风湿关节炎的作用机制

高月<sup>1,2</sup> 唐芳<sup>3</sup> 马武开<sup>3</sup> 兰维娅<sup>3</sup> 蒋总<sup>3</sup> 金泽旭<sup>1</sup>( <sup>1</sup> 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵阳 550002; <sup>2</sup> 高邮市中医医院内科, 高邮 225699;<sup>3</sup> 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科, 贵阳 550003)

**摘要** 目的 通过网络药理学和动物实验探讨葛根素治疗类风湿关节炎(RA)的作用机制。方法 使用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)和SwissTargetPrediction数据库收集葛根素靶点,使用GeneCards、OMIM数据库获取RA的疾病相关靶点,利用Cytoscape 3.7.2软件建立蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络,通过Metascape数据库进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;使用II型胶原乳剂复制RA大鼠-胶原诱导型关节炎(CIA)模型,将49只Wistar大鼠随机分为空白对照(Con)组、CIA模型(CIA)组、低、中、高剂量葛根素(L-M-H-*puerarin*)组、甲氨蝶呤(MTX)组、雷公藤多苷片(TGT)组。除Con组外,其余各组大鼠制成CIA大鼠模型后连续灌胃28 d。观察各组大鼠后肢关节红肿情况及踝关节病理改变,Western blot检测滑膜糖原合成酶激酶3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)蛋白表达,qPCR检测滑膜GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、*c-Myc* mRNA表达。结果 获得134个葛根素作用靶点,RA疾病相关靶点基因5 821个,葛根素与RA交集靶点基因102个,涉及JAK-STAT、NF- $\kappa$ B、Wnt等184条信号通路。动物实验结果表明,M-*puerarin*和MTX干预后大鼠后足红肿症状改善并且关节滑膜中炎性细胞浸润明显减少,软骨及骨组织破坏程度减轻。与CIA组相比,M-*puerarin*干预后的大鼠滑膜组织中GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin蛋白表达和GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、*c-Myc* mRNA表达均下降( $P < 0.05$ )。结论 葛根素可以通过多靶点、多途径协同治疗RA,可能通过抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,缓解CIA大鼠滑膜增生,减轻关节软骨侵蚀及骨破坏情况。

**关键词** 葛根素; 类风湿关节炎; CIA大鼠; 网络药理学; Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路; 滑膜增生

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0022-10

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.004

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)作为一种慢性炎性自身免疫性疾病,以对称性多关节炎为主要临床表现。在中医学领域属于尪痹病范畴。RA患者发病早期即可出现滑膜病变,其中滑膜成纤维细胞的异常增殖、迁移及T淋巴细胞、巨噬细胞等单个核细胞浸润形成的滑膜炎导致血管翳生成、关节软骨及骨的侵蚀破坏,病程后期严重影响RA患者正常生活<sup>[1-3]</sup>。目前针对RA的治疗方法以糖皮质激素、非甾体抗炎药、抗风湿药如甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)、来氟米特等为主,但针对RA滑膜病变尚无有效治疗措施。

葛根素属于一种从葛根中提取出来的异黄酮类单体化合物<sup>[4]</sup>,有保护心血管系统、抗糖尿病的作用<sup>[5-6]</sup>,还有抗炎、抗肿瘤、调控骨代谢的作用<sup>[7]</sup>。葛根素治疗骨关节炎的相关研究<sup>[8]</sup>表明其能够抑制关节炎症,保护关节软骨及骨。该研究从网络药理学及体内实验角度初步探讨葛根素治疗RA的分子机制,为临床治疗RA提供思路及依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学

**1.1.1 葛根素靶点基因的收集** 在中药系统药理学数据库和分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database, TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)检索“葛根”,显示出药物成分,选取“*puerarin*”并下载相关靶点。在SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)输入葛根素的化学分子式,物种选择“*Homo sapiens*”,下载相关靶点。将上述数据库中收集的靶点基因汇总去重,获得葛根素靶点。将获得的靶点蛋白输入Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)

2024-11-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82160917); 贵州省科技计划项目(编号: 黔科合基础-ZK(2023)一般435); 贵州省高等学校重点实验室建设项目(编号: 黔教技(2023)017号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(编号: QZYY-2020-005)

作者简介: 高月,女,硕士研究生;

唐芳,女,教授,主任医师,博士生导师,通信作者, E-mail: 64550932@qq.com

prot. org/) 进行转化校正,得到标准化基因名。

**1.1.2 RA 疾病靶点基因的收集** 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 中检索关键词“rheumatoid arthritis”,获取 RA 的疾病相关靶点,并将靶点输入 Uniprot 数据转化为相应的标准化基因名。

**1.1.3 葛根素与 RA 共同靶点的筛选** 将葛根素靶点基因和 RA 疾病靶点基因同时录入 Venny2.1.0 在线做图软件 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 进行映射后构建维恩图,得到药物-疾病交集基因。交集基因不仅是葛根素和 RA 联系的靶点基因,也可能是葛根素治疗 RA 的节点。

**1.1.4 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建及核心靶点筛选** 利用 STRING 数据库在线软件 (<https://string-db.org/>) 构建 PPI 网络模型。选择“Multiple Protein”,将药物-疾病共同交集基因输入数据库中,研究种属选择“Homo sapiens”,最低相互作用阈值选定为中等“medium confidence(0.400)”,其他参数均保持默认设置,删除无相互作用的节点后获得 PPI 网络数据图,将蛋白信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制相互作用网络,进行 degree 值排名,以筛选核心靶点。

**1.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes, KEGG) 富集分析** 将药物-疾病共同交集基因输入 Metascape 数据库 (<https://www.metascape.org/gp/index.html>) 中,研究种属选择“Homo sapiens”,设定阈值  $P < 0.05$ ,对交集基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 富集分析,GO 功能富集分析中从生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 3 个方面进行分析,最后将筛选后的数据用微生信在线软件 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化处理。

## 1.2 动物实验

**1.2.1 动物** 健康 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 49 只,体质量 150~180 g,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,许可证号: SCXK(湘) 2019-0013,检疫后送贵州中医药大学实验动物研究所饲养。实验经贵州中医药大学动物实验伦理审查通过,编号: 20210620004。

**1.2.2 药物** 葛根素(大连美仑生物技术有限公司,批号: MB6183-S),MTX 片(上海信谊药厂有限公司,批号: 036211003),雷公藤多苷片 (tripterysium

glycosides tablets, TGT) (贵州汉方药业有限公司,批号: 1450007)。

**1.2.3 试剂与仪器** 牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司,批号: 20021); 弗氏完全佐剂(美国默克 SIGMA 公司,批号: F-5881); 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号: G1120); 兔抗大鼠糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 单克隆抗体(美国 Proteintech 公司,批号: 22104-1-AP); 兔抗大鼠  $\beta$ -连环蛋白 (beta-Catenin,  $\beta$ -catenin) 单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号: ab32572); GAPDH 单克隆抗体(上海碧云天生物技术有限公司,批号: AF1186); TRIzol(美国 invitrogen 公司,批号: 15596026); PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(批号: RR047A)、TB Green Premix Ex Taq II(批号: RR820A)(日本 TAKARA 公司); 石蜡切片机(批号: RM2255)、显微镜(批号: DM30000)(德国 Leica 公司)、PowerPac Basic 电泳仪(批号: 041BR142600)、ChemiDOC Touch Imaging System(批号: 732BR1158)、CFX96 Real-Time PCR System(批号: 1855095)(美国 Bio-Rad 公司)。

**1.2.4 动物造模与分组给药** 将 49 只 Wistar 大鼠随机分为 7 组,每组 7 只,分别为空白对照 (Control, Con) 组、CIA 模型 (collagen-induced arthritis, CIA) 组、低剂量葛根素 (low dose puerarin, L-puerarin) 组、中剂量葛根素 (medium dose puerarin, M-puerarin) 组、高剂量葛根素 (high dose puerarin, H-puerarin) 组、MTX 组、TGT 组。除 Con 组外,其余各组大鼠于其尾根部及右足跖部各注射 0.1 ml II 型胶原乳剂,7 d 后于尾根部再次注射 0.1 ml II 型胶原乳剂以诱导 CIA 大鼠模型的复制。造模成功后,葛根素给药剂量参照文献<sup>[9]</sup>,MTX 成人用量 10 mg/周, TGT 成人用量 60 mg/d,对应人和动物间按体表面积折算的等效剂量比率表制定灌胃给药剂量。Con 组及 CIA 组每只大鼠以 0.3% 羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl cellulose-Na, CMC-Na) [10 ml/(kg·d)] 灌胃, L-puerarin、M-puerarin、H-puerarin 组每只分别以 5.13、15.4、138.6 mg/(kg·d) (溶于 0.3% CMC-Na) 每天灌胃, MTX 组每只以 0.9 mg/kg 每周灌胃, TGT 组每只以 5.4 mg/(kg·d) 灌胃,各组从造模完成后进行连续灌胃 28 d。

## 1.2.5 指标检测

**1.2.5.1 足跖肿胀情况及踝关节组织 HE 染色** 每日观察大鼠毛发、活动量、精神状态等。从第 1 次

注射牛 II 型胶原开始 ,每隔 7 d 在注射或给药后使用电子数显卡尺测量右足跖厚度并记录。灌胃 28 d 后对各组大鼠后肢关节处进行拍照 ,肉眼观察各组大鼠后肢关节红肿情况。取各组大鼠后肢踝关节组织 ,经组织固定、脱钙、组织脱水、组织浸蜡及组织包埋后进行组织切片及 HE 染色 ,使用显微镜查看各组踝关节组织病理改变情况。

1.2.5.2 Western blot 检测滑膜 GSK-3β、β-catenin 蛋白表达 取各组大鼠关节滑膜组织 ,组织匀浆并使用全蛋白提取试剂盒提取总蛋白 ,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定所提取组织的总蛋白浓度 ,对提取出的蛋白变性后进行 10% SDS-PAGE 电泳 ,电转移至 PVDF 膜上进行免疫杂交反应 ,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h ,孵育一抗、二抗 ,采用 ECL 增强发光检测试剂盒曝光显影 ,使用凝胶成像分析系统检测各蛋白条带灰度值。

1.2.5.3 实时荧光定量聚合酶链反应( real-time quantitative polymerase chain reaction ,qPCR) 检测滑膜 GSK-3β、β-catenin、c-Myc mRNA 表达 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成 ,见表 1。将滑膜组织充分裂解后 ,采用 TRIzol 提取细胞总 RNA ,用酶标仪测定提取的 RNA 在波长 260、280 nm 处吸光度值 ,当吸光度 260 nm/280 nm 比值达 1.9 ~ 2.2 时可以用于后续反转录 ,cDNA 产物在 25 μl 体系中进行 根据 TB Green Premix Ex Taq II 说明书设定反应条件进行扩增程序 ,以 β-actin 为内参基因 ,采用 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 相对定量法计算每组各基因相对表达量。

表 1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer name and sequence

Genes	Primer sequences (5'-3')
β-actin	F: CCCATCTATGAGGGTTACGC
	R: TTTAATGTCAAGCAGGATTTC
GSK-3β	F: CCATCCTTATCCCTCCTCAC
	R: CATTAGTATCTGAGGCTGCTG
β-catenin	F: ACCATCGAGAGGGCTTGTTC
	R: CGCACTGCCATTTTAGCTCC
c-Myc	F: TGAAAAGAGCTCCTCGCGTT
	R: AAATAGGGCTGCACCGAGTC

1.3 统计学处理 实验数据结果均以平均值 ± 标准差(  $\bar{x} \pm s$  ) 表示 ,采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析。所有数据均进行正态分布及方差齐性检验 ,如果符合正态分布 ,则采用单因素方差分析; 对不符合正态分布的组别 ,则采用多个样本的非参数秩和检验; 组间比较 ,方差齐性用 LSD 法 ,不齐

时用 Tamhance's T2 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 葛根素靶点与疾病靶点交集分析 将 TCM-SP、SwissTargetPrediction 网站收集的葛根素作用靶点汇总、去重 ,获得 134 个葛根素作用靶点; 通过 GeneCards、OMIM 数据库检索到 RA 疾病相关靶点基因有 5 821 个。利用 Venny 2.1.0 在线做图软件绘制 Venn 图并获得葛根素与 RA 交集靶点基因 102 个 ,见图 1。

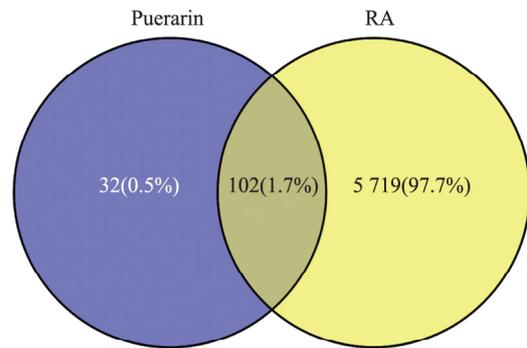


图 1 葛根素与 RA 交集靶点基因 Venn 图

Fig. 1 Venn map of intersection target gene of puerarin and RA

2.2 PPI 网络构建与核心靶点筛选结果 将 102 个交集靶点基因输入 STRING 数据库在线软件构建 PPI 网络图 ,删除无相互作用的靶点基因 1 个 ,其中网络图中共有 101 个节点 ,1 168 条边 ,degree 值越大则节点越大 ,填充的颜色越深 ,见图 2。将 degree 值不小于 20 的靶点基因绘制成柱状图 ,见图 3。其中 degree 值排名前三的靶点基因为 AKT1、TNF、EGFR ,其余靶点基因包括 STAT3、Bcl-2、JUN、MMP9、GSK3β 等 ,提示这些靶点基因可能成为葛根素治疗 RA 的关键靶点之一。

2.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析结果 将葛根素与 RA 的交集靶点基因导入 Metascape 数据平台 ,进行 GO 功能富集分析( P < 0.05 )。将整理得到的数据上传到微生信平台 ,可视化作图 GO 功能富集分析数据 ,见图 4。GO 富集分析共获得 1 376 个 BP ,77 个 CC ,134 个 MF ,依据 count 值大小 ,分别列举每个模块前 20 的条目。由 GO 分析结果可知 ,这些靶点基因 BP 主要涉及对激素的反应、对无机物的反应、磷代谢过程的正向调控、对氧气水平的反应、细胞凋亡信号通路的调控、程序性细胞死亡的正

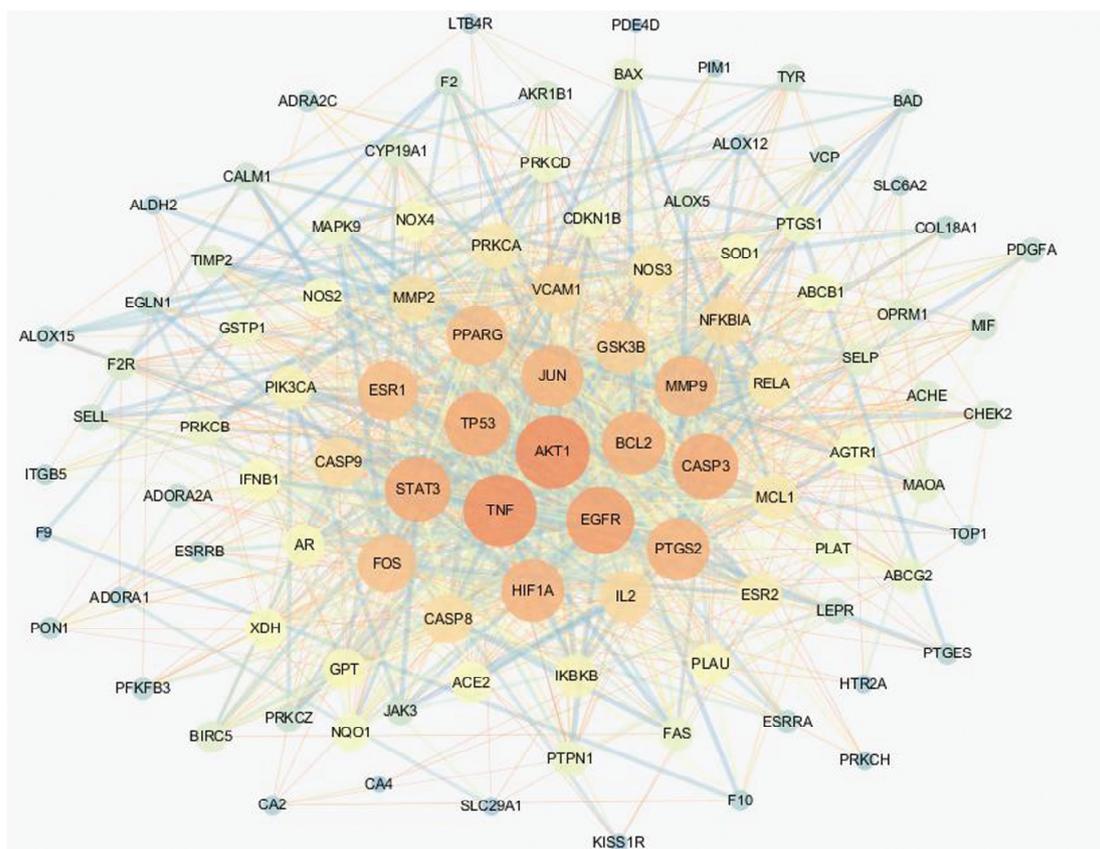


图 2 PPI 网络图

Fig. 2 Network chart of PPI

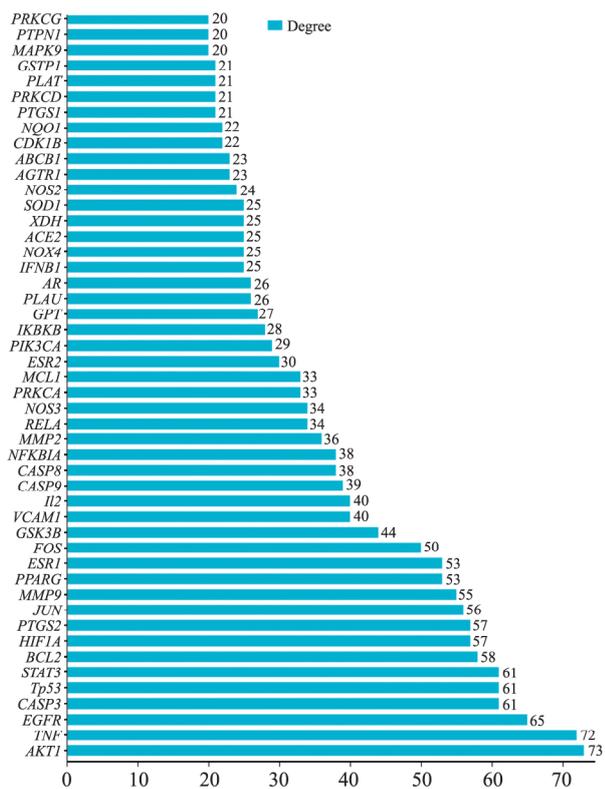


图 3 Degree 值不小于 20 的靶点基因

Fig. 3 Target genes with a degree of no less than 20

向调控、炎症反应等,见图 4A; CC 主要表现为细胞膜侧、Bcl-2 家族蛋白复合物、细胞体、细胞质核周区域、囊泡腔、髓鞘、核基质等,见图 4B; MF 主要表现为激酶结合、氧化还原酶活性、蛋白质同源二聚化活性、泛素蛋白连接酶结合、蛋白磷酸酶结合、蛋白酶结合等,见图 4C。

通过 KEGG 通路富集分析得到 184 条信号通路 ( $P < 0.05$ ) 将整理得到的数据上传到微生信平台,得到相关 KEGG 信号通路富集分析气泡图,见图 5。通过 Cytoscape 3.7.2 软件绘制葛根素治疗 RA 核心靶点基因与相关信号通路的网络图,见图 6。主要信号通路有癌症通路、脂质和动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、前列腺癌、低氧诱导因子(HIF-1) 信号通路、癌症中的蛋白聚糖、雌激素信号通路、JAK-STAT 信号通路、瞬时受体电位 (TRP) 离子通道的炎症介质调节、NF- $\kappa$ B 信号通路、坏死性凋亡、Wnt 信号通路等。以上结果表明,葛根素治疗 RA 的机制与细胞凋亡、激素调节、癌症、炎症及免疫密切相关。通过对 GO 生物过程、KEGG 通路的分析研究表明,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可能在 RA 滑膜病变的机制中发挥一定作用。见图 6。

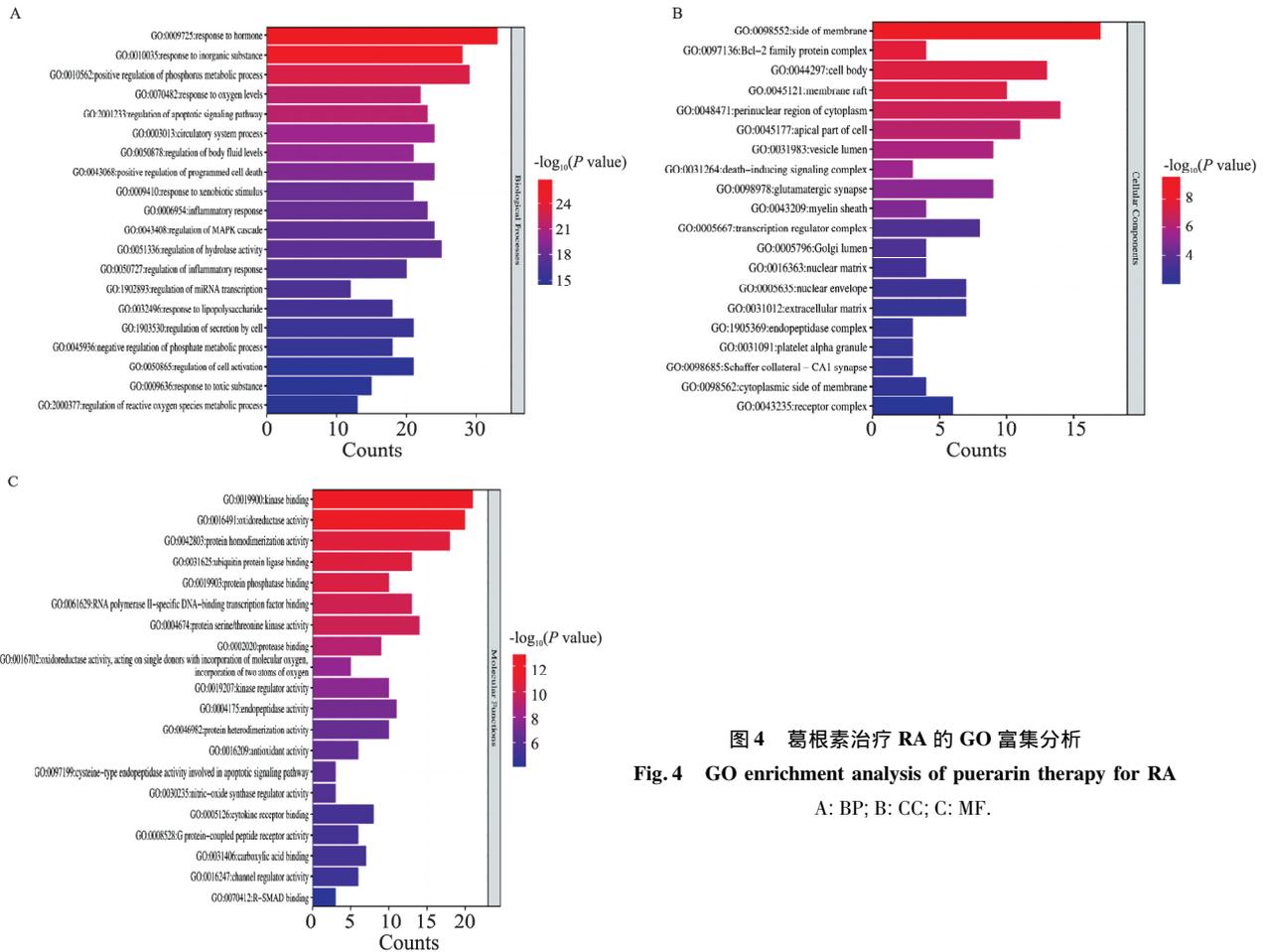


图4 葛根素治疗 RA 的 GO 富集分析  
Fig. 4 GO enrichment analysis of puerarin therapy for RA  
A: BP; B: CC; C: MF.

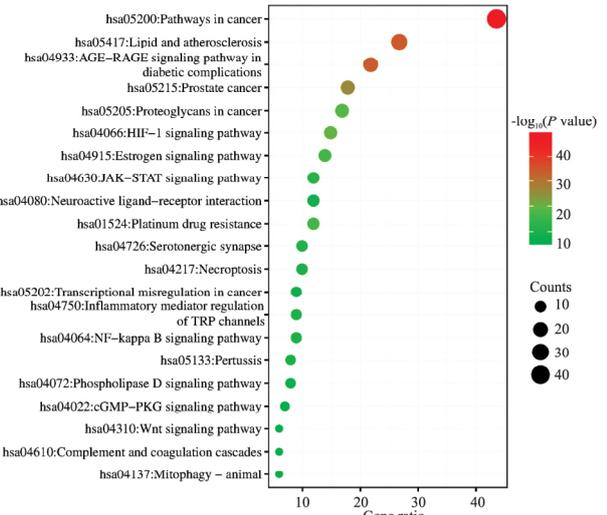


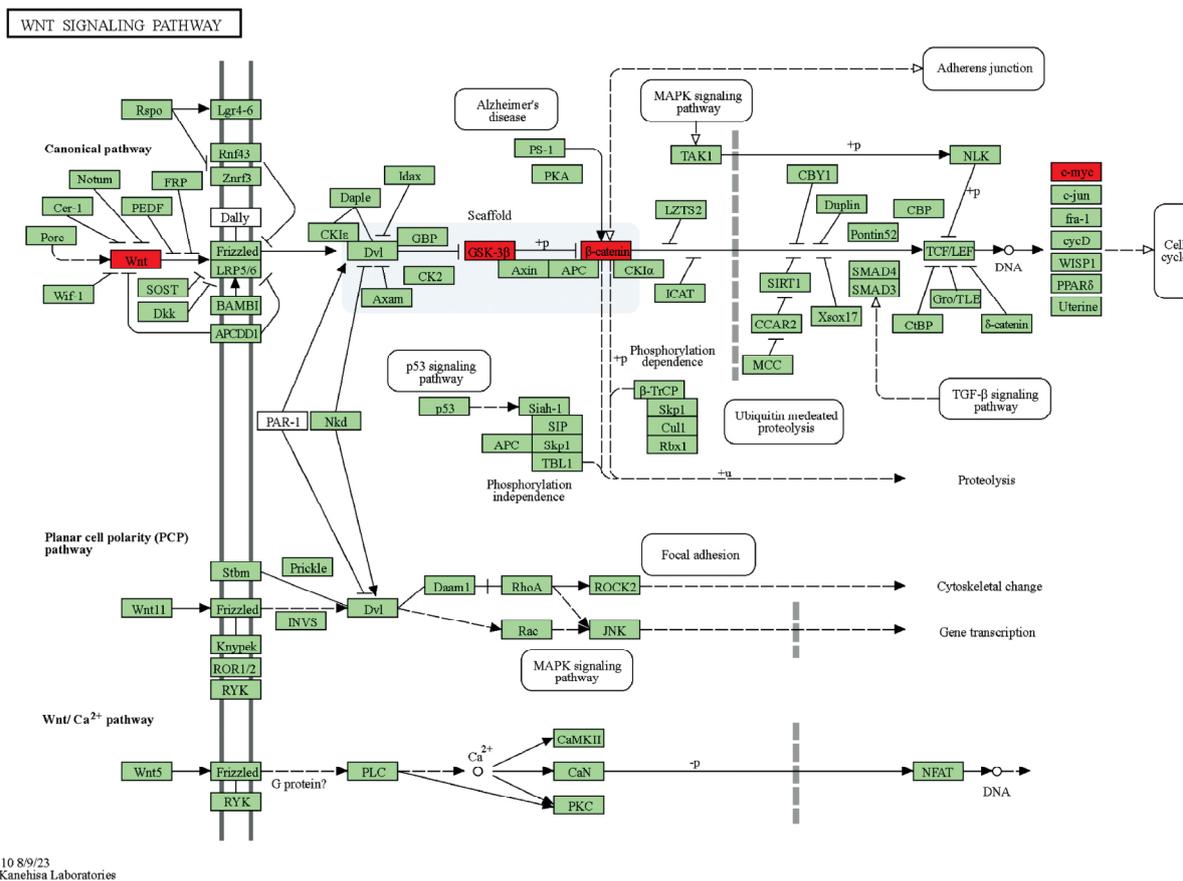
图5 葛根素治疗 RA 的 KEGG 通路富集分析  
Fig. 5 Enrichment analysis of KEGG pathway of puerarin therapy for RA

2.4 葛根素对 CIA 大鼠足跖肿胀厚度影响 首次注射 II 型胶原时,各组大鼠右后足肿胀厚度差异无统计学意义。第 7 ~ 14 天时 除 Con 组外,其余各组的 CIA 大鼠右后足肿胀厚度持续增加。第 21 ~ 28

天时,CIA 组大鼠右后足肿胀厚度持续增加,而 M- puerarin、H- puerarin、MTX 及 TGT 干预后的 CIA 大鼠右后足肿胀厚度开始减小。第 35 天时,M- puerarin 及 MTX 干预后的 CIA 大鼠右后足肿胀厚度较前明显减小,但与 Con 组相比差异无统计学意义。见图 7。

与 Con 组相比,造模成功后的其余各组大鼠毛发枯燥,饮食减少,活动量减少,精神萎靡,双后肢足趾部可见明显红肿,且均有舔足行为。与 CIA 组相比,用药干预的各组大鼠饮食和活动量都稍有增加,双后足红肿症状有一定改善,第 35 天时,肉眼观察各组大鼠后足情况,其中 M- puerarin 组及 MTX 组的大鼠右后足红肿症状明显消退,见图 8。

2.5 葛根素对 CIA 大鼠踝关节组织病理学 Con 组中大鼠关节组织正常,滑膜中内膜层细胞单层排列,内膜下层可见脂肪组织、血管及成纤维细胞。CIA 组中滑膜中细胞明显增生,层次增多,有大量炎性细胞浸润,可见血管翳形成,向软骨表面侵蚀性生长,破坏软骨组织及骨组织。L- puerarin 和 H- puerarin 干预后滑膜中仍然可见滑膜细胞增生,炎性细胞



04310 8/9/23  
(c) Kanehisa Laboratories

图 6 Wnt 信号通路过程分析

Fig. 6 Process analysis of Wnt signaling pathway

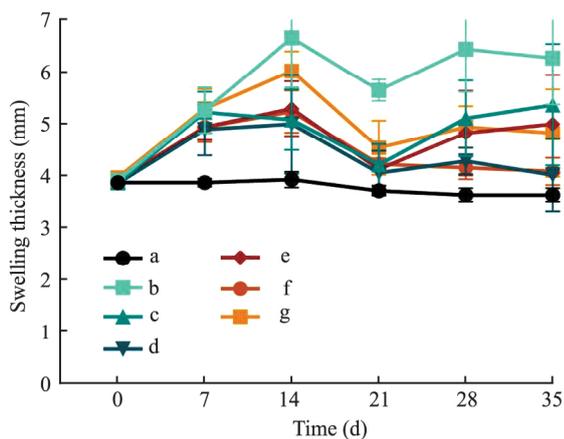


图 7 各组大鼠右后足肿胀厚度变化

Fig. 7 Swelling thickness changes of right hind paws in each group of rats

a: Con group; b: CIA group; c: L-puerarin group; d: M-puerarin group; e: H-puerarin group; f: MTX group; g: TGT group.

浸润 软骨及骨组织的少量破坏。TGT 干预后 滑膜轻度增生, 虽仍有炎性细胞浸润和血管翳形成, 但关节病变程度比 CIA 组明显减轻。M-puerarin 和 MTX

干预后关节病变程度明显减轻, 滑膜中虽有炎性细胞浸润, 但细胞分布、种类及关节骨骼状态更接近 Con 组。见图 9。

**2.6 葛根素对 CIA 大鼠滑膜组织中 GSK-3β、β-catenin 蛋白表达的影响** 与 Con 组相比, 其余各组的大鼠滑膜中 GSK-3β、β-catenin 蛋白浓度均升高 ( $P < 0.05$ )。与 CIA 组相比, 用药干预组的大鼠滑膜中 GSK-3β、β-catenin 蛋白浓度均降低 ( $P < 0.05$ )。在各用药干预组中, M-puerarin 干预后的大鼠滑膜中 GSK-3β、β-catenin 蛋白表达在各用药干预组中最低, 表明 M-puerarin 可能通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路影响下游因子表达。见图 10。

**2.7 葛根素对 CIA 大鼠滑膜组织中 GSK-3β、β-catenin、c-Myc mRNA 表达的影响** 与 Con 组相比, CIA 组大鼠滑膜中 Wnt/β-catenin 信号通路相关因子 GSK-3β、β-catenin 及下游因子 c-Myc mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ )。与 CIA 组相比, 用药干预组大鼠滑膜中 GSK-3β、β-catenin 和 c-Myc mRNA 表达均不同程度下降。其中, M-puerarin 干预后的大鼠滑

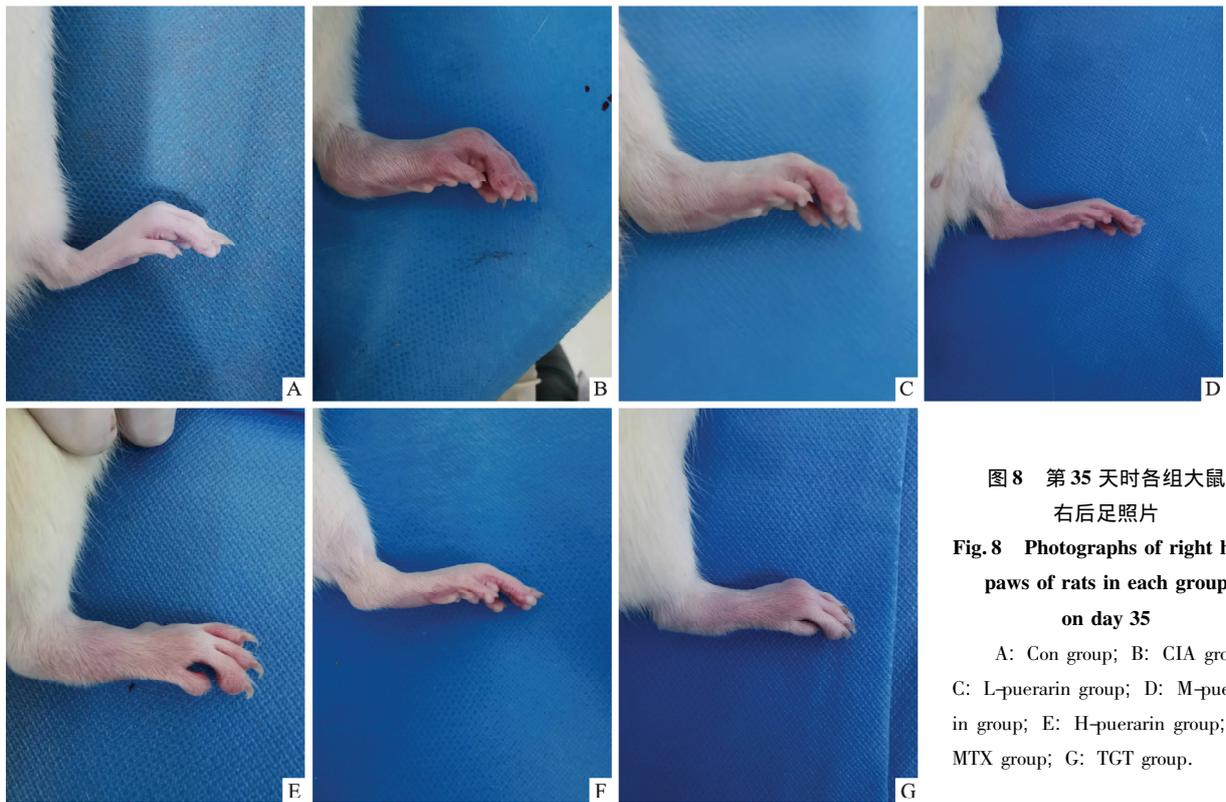


图8 第35天时各组大鼠右后足照片  
Fig. 8 Photographs of right hind paws of rats in each group on day 35

A: Con group; B: CIA group; C: L-puerarin group; D: M-puerarin group; E: H-puerarin group; F: MTX group; G: TGT group.

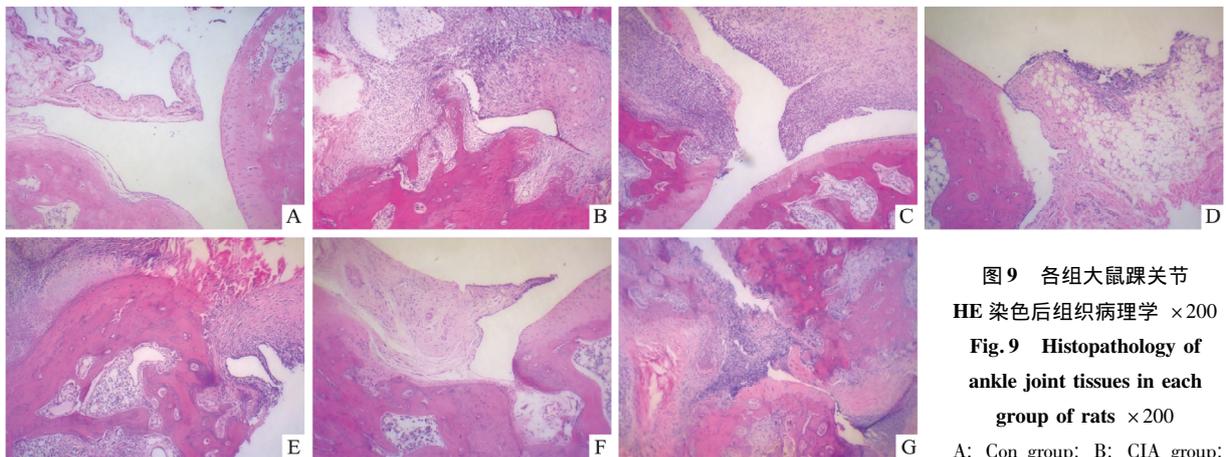


图9 各组大鼠踝关节 HE 染色后组织病理学 ×200  
Fig. 9 Histopathology of ankle joint tissues in each group of rats ×200

A: Con group; B: CIA group; C: L-puerarin group; D: M-puerarin group; E: H-puerarin group; F: MTX group; G: TGT group.

膜中 *GSK-3β*、*β-catenin* 及 *c-Myc* mRNA 表达在各用药干预组中最低。表明 M-*puerarin* 对 *Wnt/β-catenin* 信号通路及下游因子 *c-Myc* 的影响较显著。见表 2。

### 3 讨论

RA 属于最常见的炎性关节病之一,其主要病变部位在滑膜。经典的 *Wnt/β-catenin* 信号转导途径已被证明参与 RA 滑膜成纤维细胞的细胞增殖、迁移和侵袭过程<sup>[10]</sup>。有实验研究<sup>[11-12]</sup>表明,抑制

*Wnt/β-catenin* 信号通路不仅可以减缓由 *TNF-α* 刺激形成的 RA 成纤维细胞系的增殖、迁移及炎症因子的释放,还可以降低 RA 成纤维细胞的侵袭能力。本研究通过体内实验证实,CIA 大鼠的滑膜组织中 *Wnt/β-catenin* 信号通路异常激活,通路中的关键因子 *GSK-3β*、*β-catenin* 及下游因子 *c-Myc* 表达上升,上述表明改善 RA 滑膜病变可以通过抑制 *Wnt/β-catenin* 信号通路激活实现。

通过网络药理学技术预测,葛根素可能通过调控 *GSK-3β*、*β-catenin* 等相关靶点介导 *Wnt/β-catenin*

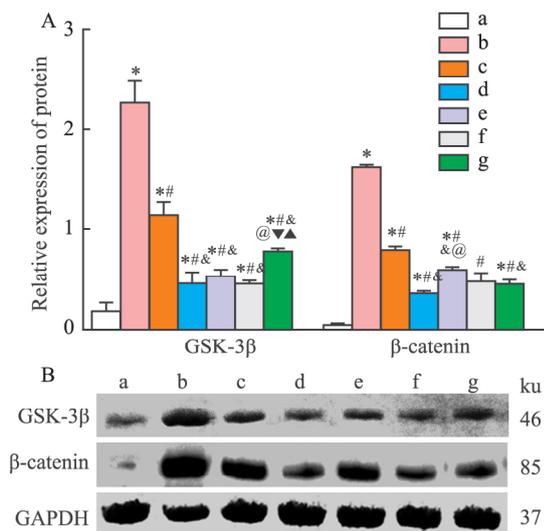


图 10 各组大鼠滑膜中 GSK-3β、β-catenin 的蛋白表达  
Fig. 10 Protein expression of GSK-3β, and β-catenin in the synovium of rats in each group

A: Comparison of the relative expression of GSK-3β and β-catenin in each group; B: Western blot results; a: Con group; b: CIA group; c: L-puerarin group; d: M-puerarin group; e: H-puerarin group; f: MTX group; g: TGT group; \*  $P < 0.05$  vs Con group; #  $P < 0.05$  vs CIA group; &  $P < 0.05$  vs L-Puerarin group; @  $P < 0.05$  vs M-Puerarin group; ▲  $P < 0.05$  vs H-Puerarin group; ▼  $P < 0.05$  vs MTX group.

表 2 各组大鼠滑膜中 GSK-3β、β-catenin、c-Myc mRNA 表达 ( $n = 7, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 mRNA expression of GSK-3β, β-catenin, and c-Myc in synovium of rats in each group ( $n = 7, \bar{x} \pm s$ )

Groups	GSK3β	β-catenin	c-Myc
Con	1.03 ± 0.03	1.06 ± 0.07	1.03 ± 0.04
CIA	2.06 ± 0.58*	2.06 ± 0.53*	2.81 ± 0.44*
L-puerarin	1.37 ± 0.64#	1.87 ± 0.49*	2.13 ± 0.66*
M-puerarin	1.04 ± 0.41#	1.07 ± 0.44#&	1.04 ± 0.33#&
H-puerarin	1.33 ± 0.57#	1.77 ± 0.31* @	1.38 ± 0.43#
MTX	1.12 ± 0.26#	1.14 ± 0.58#&	1.71 ± 0.48#
TGT	1.11 ± 0.26#	1.12 ± 0.59#&	1.45 ± 0.55#
F value	2.67	6.20	5.88
P value	0.04	<0.01	<0.01

\*  $P < 0.05$  vs Con group; #  $P < 0.05$  vs CIA group; &  $P < 0.05$  vs L-Puerarin group; @  $P < 0.05$  vs M-Puerarin group; ▲  $P < 0.05$  vs H-Puerarin group.

信号通路干预 RA 关节滑膜病变。研究者们使用 400 mg/kg 葛根素对大鼠进行长期灌胃后获得较好的药物吸收代谢效果,且未发现肝肾毒性<sup>[13]</sup>。除此之外,研究者们给大鼠灌胃 20 mg/kg 葛根素配 0.5% CMC-Na 的混悬液,发现大鼠组织中药物浓度从高到低分别为肾、肝、肺、脾、心、脑,但在关节滑膜中的药物浓度尚未有研究者做进一步研究<sup>[14]</sup>。本

研究以不同剂量葛根素对 CIA 大鼠灌胃治疗,15.4 mg/(kg·d) 葛根素溶于 0.3% CMC-Na 的混悬液治疗后的 CIA 大鼠滑膜组织中炎性细胞浸润及滑膜侵蚀情况明显改善,Wnt/β-catenin 信号通路被抑制。葛根素能够介导 Wnt/β-catenin 信号通路作用于关节滑膜组织,以治疗 CIA 大鼠滑膜病变,但葛根素对滑膜的作用机制并未通过体外实验进一步验证。该研究为葛根素抑制 RA 滑膜成纤维细胞增殖、炎症因子释放及侵蚀过程的研究提供一定的理论依据和实验基础。

参考文献

[1] Firestein G S, Budd R C, Gabriel S E, et al. 凯利风湿病学[M]. 9 版. 栗占国译. 北京: 北京大学医学出版社 2015: 1146 - 57.

[1] Firestein G S, Budd R C, Gabriel S E, et al. Kelley's textbook of rheumatology[M]. 9 ed. Li Zhanguo Transl. Beijing: Peking University Medical Press, 2015, 1146 - 57.

[2] Chemin K, Gerstner C, Malmström V. Effector functions of CD4<sup>+</sup> T cells at the site of local autoimmune inflammation-lessons from rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2019, 10: 353. doi: 10.3389/fimmu.2019.00353.

[3] 李娟, 蒋扬青, 沈瑞明, 等. METTL3 通过 mRNA m<sup>6</sup>A 甲基化促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移及分泌炎症因子[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(4): 619 - 26. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.010.

[3] Li J, Jiang Y Q, Shen R M, et al. METTL3 promotes proliferation, migration, and secretion of inflammatory factors by mRNA m<sup>6</sup>A methylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(4): 619 - 26. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.010.

[4] Zhang B, Li M, Wang Q, et al. Exploring adverse effects of puerarin on catalase by multiple spectroscopic investigations and docking studies in vitro [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2019, 33(5): e22296. doi: 10.1002/jbt.22296.

[5] Wang S, Zhang S, Wang S, et al. A comprehensive review on Pueraria: insights on its chemistry and medicinal value [J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 131: 110734. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110734.

[6] 朱卫丰, 李佳莉, 孟晓伟, 等. 葛属植物的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1311 - 31. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20201124.601.

[6] Zhu W F, Li J L, Meng X W, et al. Research advances in chemical constituents and pharmacological activities of Pueraria genus [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(6): 1311 - 31. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20201124.601.

[7] 曹盼, 张樱山, 魏学明, 等. 葛根素药理作用研究新进展 [J]. 中成药 2021, 43(8): 2130 - 4. doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.028.

[7] Cao P, Zhang Y S, Wei X M, et al. New progress in pharmacological action of puerarin [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(8): 2130 - 4. doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.028.

[8] Wang D, Bu T, Li Y, et al. Pharmacological activity, pharmacokinetics, and clinical research progress of puerarin [J]. Antioxidants, 2022, 11(11): 2121. doi: 10.3390/antiox11112121.

- [9] 李凯,秦荣,邵佳乐,等. 葛根素对废用性骨质疏松大鼠模型的防治作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 535-40. doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20181012.003.
- [9] Li K, Qin R, Shao J L, et al. Preventive effect and mechanism of puerarin on rat models of disuse osteoporosis [J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(3): 535-40. doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20181012.003.
- [10] Liu F Y, Wang M Q, Liu M M, et al. Therapeutic effects of shikonin on adjuvant-induced arthritis in rats and cellular inflammation, migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes *via* blocking the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154857. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154857.
- [11] Zhang Z, Chen X, Gao B, et al. PLD1 knockdown reduces metastasis and inflammation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by modulating NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways [J]. *Autoimmunity*, 2021, 54(7): 398-405. doi: 10.1080/08916934.2021.1963957.
- [12] Cai L, Mu Y R, Liu M M, et al. Penta-acetyl geniposide suppresses migration, invasion, and inflammation of TNF- $\alpha$ -stimulated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes involving Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2021, 44(6): 2232-45. doi: 10.1007/s10753-021-01495-y.
- [13] 李泽桦,何颖妍,曾宇宏,等. 葛根素在大鼠体内的药代动力学特征和安全性的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(10): 1480-4. doi: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.10.024.
- [13] Li Z H, He Y Y, Zeng Y H, et al. Study on pharmacokinetic characteristics and safety of puerarin in rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39(10): 1480-4. doi: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.10.024.
- [14] Luo C F, Yuan M, Chen M S, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of puerarin solid lipid nanoparticles following oral administration [J]. *Int J Pharm*, 2011, 410(1-2): 138-44. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.064.

## Mechanism of puerarin in treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology and animal experimental verification

Gao Yue<sup>1,2</sup>, Tang Fang<sup>3</sup>, Ma Wukai<sup>3</sup>, Lan Weiya<sup>3</sup>, Jiang Zong<sup>3</sup>, Jin Zexu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Second School of Clinical Medicine, Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550002;

<sup>2</sup>Dept of Internal Medicine, Gaoyou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Gaoyou 225699;

<sup>3</sup>Dept of Rheumatology and Immunology, the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550003)

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of puerarin in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) by network pharmacology and animal experiments. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP) and SwissTargetPrediction database were used to collect puerarin targets, and the targets of RA were obtained from GeneCards database and OMIM database. The PPI network was established by Cytoscape 3.7.2 software. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes (KEGG) enrichment analysis were performed through the Metascape database. RA rat-collagen-induced arthritis (CIA) model was reproduced using type II collagen emulsion, 49 Wistar rats were randomly assigned to seven groups: control group, CIA model group, low-dose, medium-dose and high-dose puerarin group, methotrexate group, Tripterysium Glycosides Tablets group. Except for the control group, the other groups were given continuous gavage for 28 days after the CIA in rats model were prepared. The redness and swelling of the joints and ankle joint pathological changes were observed in each group. Western blot was used to detect the expression of Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ),  $\beta$ -catenin ( $\beta$ -catenin) proteins in the synovium. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression of GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin and *c-Myc* mRNA in the synovium. **Results** Puerarin had 134 target genes, RA had 5 821 target genes, and there were 102 overlapping target genes of puerarin and RA. It involved 184 signaling pathways, including JAK-STAT signaling pathway, NF- $\kappa$ B signaling pathway, Wnt signaling pathway, et al. The results of animal experiments showed that after the intervention of M-puerarin and MTX, the symptoms of redness and swelling of the hind foot were alleviated, the inflammatory cell infiltration in the synovium of the joint was significantly reduced, and the damage of cartilage and bone tissue was reduced. Compared with CIA group, the expressions of GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin protein and GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin and *c-Myc* mRNA in synovial tissue of rats after M-puerarin intervention decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Puerarin has the characteristic of multi-components, multi-targets and multi-pathway intervention in RA. Puerarin may alleviate synovial hyperplasia, reduce articular

网络出版时间: 2024-12-26 15:43:21 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1134.005>

## 参附注射液通过抑制铁死亡发挥 对缺氧缺血性脑损伤的保护作用

张晓彤<sup>1</sup> 张萌<sup>1</sup> 李刚<sup>2</sup> 胡阳<sup>3</sup> 荀雅静<sup>3</sup> 丁会<sup>1</sup> 沈栋林<sup>4</sup> 吴铭<sup>1\*</sup>  
(徐州医科大学<sup>1</sup> 第一临床医学院、<sup>3</sup> 第二临床医学院 徐州 221000;  
徐州医科大学附属医院<sup>2</sup> 口腔科、<sup>4</sup> 儿科 徐州 221000)

**摘要** 目的 观察缺氧缺血时脑组织损伤情况及使用参附注射液(SFI)后的病理改变、铁死亡相关因子的表达,探讨SFI通过抑制铁死亡发挥对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的保护作用机制。方法 构建SD大鼠HIBD模型,并用SFI进行干预。HE染色观察脑组织病理改变;尼氏染色观察神经元存活情况;Western blot、免疫组织化学、免疫荧光法检测脑组织谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、二价金属离子转运蛋白1(DMT1)的表达;试剂盒检测还原型谷胱甘肽(GSH)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及组织铁含量。体外培养小鼠小胶质细胞系(BV2),分为对照(Ctrl)组、氧糖剥夺(OGD)组、铁死亡诱导(Erastin)组、铁死亡抑制(Fer-1)组、SFI组、Erastin+SFI组,2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)活性氧(ROS)荧光探针检测ROS释放水平;免疫荧光染色观察细胞内GPX4、DMT1表达。结果 与Sham组相比,HIBD组大鼠脑组织中明显的神经细胞受损,GPX4表达下降( $P < 0.01$ ),DMT1表达升高( $P < 0.01$ ),GSH与SOD含量下降( $P < 0.01$ ),LDH、MDA及组织铁含量上升( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );而SFI干预后,与Sham组相比,GPX4表达升高( $P < 0.01$ ),DMT1表达下降( $P < 0.01$ ),GSH与SOD含量升高( $P < 0.01$ ),LDH、MDA及组织铁含量降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。BV2细胞实验显示:与Ctrl组相比,OGD组ROS含量明显升高且GPX4荧光强度表达明显下降、DMT1荧光强度上升( $P < 0.01$ );与OGD组相比,SFI组ROS含量降低,同时GPX4的表达升高,DMT1的表达降低( $P < 0.01$ )。结论 新生HIBD大鼠海马及皮质区损伤严重,GPX4表达下降、DMT1表达升高,提示铁死亡参与新生大鼠HIBD脑损伤,而SFI通过减少铁的聚集,减少ROS的产生,对HIBD实验动物模型和BV2细胞损伤模型具有保护作用。

**关键词** 缺氧缺血性脑损伤;铁死亡;氧化应激;氧糖剥夺;参附注射液;小胶质细胞

中图分类号 R 722.19

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0031-10

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.005

### 新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic

brain damage, HIBD)是一种脑组织缺氧缺血导致的脑损伤,是目前临床上导致新生儿出现残疾甚至死亡的主要原因,且针对HIBD临床上并无特异性治疗措施<sup>[1-2]</sup>。铁死亡(ferroptosis)是一种新提出的不同于一般细胞死亡的程序性死亡方式,近年来被诸多研究者发现其参与多种疾病的发病过程<sup>[3-4]</sup>。有研究<sup>[5-6]</sup>表明,脑部神经系统疾病与铁死亡相关。参附注射液(Shenfu injection, SFI)源自于祖国医学

2024-10-29 接收

基金项目:江苏省卫生健康委员会科研项目(编号:H2019004);江苏省研究生科研与实践创新计划(编号:KYCX22\_2911);江苏省大学生创新创业计划(编号:202010313048Y)

作者简介:张晓彤,女,硕士研究生;

吴铭,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,通信作者,

E-mail: 14083054@qq.com

cartilage erosion and bone destruction in CIA in rats by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Key words** puerarin; rheumatoid arthritis; CIA in rats; network pharmacology; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; synovial hyperplasia

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China(No. 82160917); Project of the Scientific and Technology Department of Guizhou Province (Official Document of Guizhou Basic Scientific Research, 2023, General No. 435); Key Laboratory Project in Universities of Guizhou Province (Official Document of Guizhou Education and Technology, 2023, No. 017); Chinese Medicine, Ethnic Medicine Science and Technology Research Project of Guizhou Administration of Traditional Chinese Medicine (No. QZYY-2020-005)

**Corresponding author** Tang Fang, E-mail: 64550932@qq.com