

[药 理]

基于NF- κ B/NLRP3/Caspase-1信号通路探讨益气蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠软骨细胞焦亡的影响

崔馨予¹, 李浩林¹, 李伟青^{2*}, 康惠琴¹, 程伟刚¹, 贺佩鑫¹, 杨彩红¹, 陈平², 王海东²

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省中医院风湿骨病中心, 甘肃兰州 730050)

摘要: **目的** 探讨益气蠲痹方对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠软骨细胞焦亡的影响。**方法** 50只大鼠于尾根部皮下注射牛Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂等体积的混合乳液,以诱导建立CIA模型,并将其随机分为模型组、甲氨蝶呤组(0.35 mg/kg)和益气蠲痹方低、中、高剂量组(9.4、18.7、37.4 g/kg);另取10只正常大鼠作为空白组。灌胃给药4周后,观察大鼠一般情况,检测关节肿胀程度及关节炎指数;HE染色观察踝关节病理变化;ELISA法检测血清IL-1 β 、IL-18和TNF- α 水平;RT-qPCR法检测踝关节软骨组织NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA表达;Western blot法检测踝关节软骨组织NF- κ B、NLRP3和Caspase-1蛋白表达;免疫组化法检测踝关节软骨组织NLRP3、GSDMD阳性表达。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠关节肿胀程度、关节炎指数升高($P<0.01$);血清IL-1 β 、IL-18和TNF- α 水平升高($P<0.01$);踝关节出现软骨表面缺损破坏,细胞数量减少、形态改变、排列不规则,滑膜组织有大量的炎性细胞浸润;踝关节软骨组织NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA表达和NF- κ B、NLRP3、Caspase-1蛋白表达均升高($P<0.01$);踝关节软骨组织NLRP3、GSDMD阳性表达升高($P<0.01$);与模型组比较,益气蠲痹方中、高剂量组和甲氨蝶呤组大鼠关节肿胀程度、关节炎指数降低($P<0.01$);踝关节病理损伤程度减轻;血清IL-1 β 、IL-18和TNF- α 水平降低($P<0.01$);踝关节软骨组织NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA表达和NF- κ B、NLRP3、Caspase-1蛋白表达均降低($P<0.05$, $P<0.01$);踝关节软骨组织NLRP3、GSDMD阳性表达降低($P<0.01$)。**结论** 益气蠲痹方可减轻CIA大鼠炎症反应,其作用可能与抑制NF- κ B/NLRP3/Caspase-1信号通路活化,从而抑制软骨细胞焦亡有关。

关键词: 益气蠲痹方;类风湿关节炎;软骨细胞焦亡;炎症反应;NF- κ B/NLRP3/Caspase-1信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)09-2880-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.009

Effects of Yiqi Juanbi Formula on chondrocyte pyroptosis in collagen-induced arthritic rats via NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway

CUI Xin-yu¹, LI Hao-lin¹, LI Wei-qing^{2*}, KANG Hui-qin¹, CHENG Wei-gang¹, HE Pei-xin¹, YANG Cai-hong¹, CHEN Ping², WANG Hai-dong²

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Center for Rheumatology and Musculoskeletal Health, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Yiqi Juanbi Formula on chondrocyte pyroptosis in rat models of collagen-induced arthritis (CIA). **METHODS** Fifty rats were subcutaneously injected at the tail base with an emulsion containing equal volumes of bovine type II collagen and incomplete Freund's adjuvant (IFA) to establish the CIA models. These rats were then randomly assigned to the model group, the methotrexate group (0.35 mg/kg), and the low-dose, medium-dose, and high-dose Yiqi Juanbi Formula groups (9.4, 18.7, 37.4 g/kg),

收稿日期: 2024-10-23

基金项目: 国家自然科学基金(82460945);甘肃省中医药管理局科研项目(GZKP-2023-7);甘肃省重点人才项目(2025RCXM076)兰州市指导性计划项目(2023-ZD-39)

作者简介: 崔馨予(2000—),女,硕士生,从事中医药防治风湿病的研究。Tel: 17339856129, E-mail: 2842187474@qq.com

* **通信作者:** 李伟青(1978—),男,硕士生导师,副主任医师,从事中医药防治风湿病的研究。Tel: 13893484627, E-mail: liweiqing1226@163.com

in contrast to the ten intact rats serving in the normal control group. Following four weeks of intragastric administration, the rats had their general conditions observed; their joint swelling and arthritis indices measured; their ankle joint pathology assessed by HE staining; their serum levels of IL-1 β , IL-18 and TNF- α detected by ELISA; their mRNA expressions of *NLRP3*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1 β* , *IL-18* and *TNF- α* in ankle cartilage quantified by RT-qPCR; their protein expressions of NF- κ B, NLRP3 and Caspase-1 in ankle cartilage analyzed by Western blot; and their NLRP3 and GSDMD positive expressions in ankle cartilage examined by immunohistochemistry. **RESULTS** Compared to the control group, the model group showed significantly increased joint swelling and arthritis indices ($P < 0.01$); elevated serum levels of IL-1 β , IL-18 and TNF- α ($P < 0.01$); pathological changes including cartilage surface defects, reduced cell count, altered cellular morphology, irregular cell arrangement, and significant inflammatory cell infiltration in synovial tissue; upregulated mRNA expressions of *NF- κ B*, *NLRP3*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1 β* , *IL-18* and *TNF- α* ($P < 0.01$) and increased protein expressions of NF- κ B, NLRP3 and Caspase-1 ($P < 0.01$) in ankle cartilage; enhanced positive expressions of NLRP3 and GSDMD in ankle cartilage ($P < 0.01$). Compared to the model group, the groups intervened with methotrexate or medium- or high-dose Yiqi Juanbi Formula exhibited reduced joint swelling and arthritis indices ($P < 0.01$); alleviated pathological damage in ankle joints; decreased serum levels of IL-1 β , IL-18 and TNF- α ($P < 0.01$); downregulated mRNA expressions of *NF- κ B*, *NLRP3*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1 β* , *IL-18* and *TNF- α* ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reduced protein expressions of NF- κ B, NLRP3 and Caspase-1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in ankle cartilage; and diminished positive expressions of NLRP3 and GSDMD in ankle cartilage ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Yiqi Juanbi Formula alleviates inflammation in CIA rats, potentially by inhibiting the activation of the NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway, thereby suppressing chondrocyte pyroptosis.

KEY WORDS: Yiqi Juanbi Formula; rheumatoid arthritis; chondrocyte pyroptosis; inflammatory response; NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的进行性、炎症性关节病, 随着病情进展, 持续增生滑膜炎易导致软骨和骨的破坏, 最终造成关节功能丧失^[1-2]。研究表明, RA 关节软骨破坏多与炎症反应密切相关, 软骨因其生物学特性及结构特点, 是一种非自我修复组织, 一旦受损很难愈合^[3]。其中易受损的软骨细胞被证明在 RA 关节滑膜中释放炎症因子, 进一步促进炎症反应和软骨细胞外基质的降解^[4]。细胞焦亡在 RA 病程进展中至关重要, 核转录因子 (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) /NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor family protein 3, NLRP3) /胱天蛋白酶 (Caspase) -1 信号通路是经典的细胞焦亡途径, 该通路激活后可诱发软骨细胞焦亡, 从而加重炎症反应及软骨退变^[5-6]。

益气薏痹方是甘肃省名中医王海东教授以治痹名方四神煎、四妙散为基础化裁而来的经验方。前期研究发现益气薏痹方可减轻胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠软骨破坏程度, 但具体机制尚不清楚。因此, 本研究以软骨细胞焦亡为切入点, 观察益气薏痹方对 CIA 大鼠炎症

反应及 NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 信号通路的影响。

1 材料

1.1 动物 60 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 7~8 周龄, 体质量 (200 \pm 20) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010], 饲养于甘肃中医药大学动物实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2021-0004], 温度 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 70%, 12 h/12 h 光/暗循环, 自由进食水和饲料。所有实验均按照机构指南进行, 并经甘肃中医药大学伦理委员会批准 (伦理号 SY2023-753)。

1.2 药物 益气薏痹方由黄芪 15 g、炙黄芪 15 g、炒白术 15 g、苍术 12 g、薏苡仁 20 g、黄柏 15 g、石斛 15 g、忍冬藤 20 g、鸡血藤 20 g、川牛膝 20 g、远志 15 g 组成, 以上药材均购自甘肃省中医院门诊中药房, 并由甘肃省中医院药学部王红丽主任中药师鉴定, 均符合 2020 年版《中国药典》。将药材浸泡 30 min, 第 1 次煎煮 30 min 后过滤, 加水再煎煮 30 min, 过滤后将 2 次药液混匀, 用旋转蒸发仪浓缩至 1.5 g/mL, 放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。甲氨蝶呤 (国药准字 H31020644, 规格 2.5

mg×16片×1盒)购自上海上药信谊药厂有限公司,研磨成粉末状,加蒸馏水制成混悬液。

1.3 试剂 牛Ⅱ型胶原、不完全弗氏佐剂(美国 Chondrex 公司,批号 230483、230421);白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ELISA 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,货号 byj001);IL-18 ELISA 试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司,货号 RX302871R);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(上海麦莎生物科技有限公司,货号 MS3056-B);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号 G1120);NF- κ B、Caspase-1 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号 AF6456、AF5418);NLRP3 抗体(江苏佰嘉生物科技有限公司,货号 DF7438);免疫组化试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,货号 ZN2939-EGO);逆转录试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,货号 11123ES60];消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 抗体(美国 CST 公司,货号 10137)。

1.4 仪器 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);超低温培养箱(中科美菱低温科技股份有限公司);酶标仪、梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);包埋机、切片机(德国 Leica 公司);显微镜[舜宇光学(北京)仪器有限公司];医用离心机(湖南可成仪器设备有限公司);超低温冰箱、定时定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司);超微量分光光度计[聘克仪器(上海)有限公司];Western blot 转膜仪、Western blot 电泳仪、Western blot 电源(北京六一生物科技公司);化学发光成像仪(北京赛智创业科技有限公司);分析天平(德国赛多利斯公司);E-BLOT 成像仪[易亨特生命科学(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 CIA 大鼠模型制备、分组与给药 随机取 10 只大鼠作为空白组,其余 50 只大鼠进行造模。将牛Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂在冰上等体积混合,直至完全乳化,在大鼠尾根部皮下多点注射 0.2 mL 胶原乳剂。第 7 天,按照上述方法在大鼠尾根皮下多点注射 0.1 mL 胶原乳剂以增强免疫反应。空白组大鼠则注射等量生理盐水。以关节炎指数 ≥ 4 分为造模成功^[7]。将造模成功的 50 只大鼠按随机数字表法随机分为模型组、甲氨蝶呤组和益气蠲痹方低、中、高剂量组。从加强免疫第 7 天开始,

依据成人与大鼠的折算系数得出大鼠用量^[8],其中益气蠲痹方低、中、高剂量组分别给予 9.4、18.7、37.4 g/kg 益气蠲痹方,每天 1 次;甲氨蝶呤片组给予 0.35 mg/kg 甲氨蝶呤片混悬液,每 4 天 1 次;空白组和模型组给予等体积蒸馏水,每天 1 次,持续 28 d。

2.2 大鼠关节肿胀程度、关节炎指数检测 在每只大鼠右踝关节处用记号笔画一标志线,分别在造模前及药物干预第 0、7、14、21、28 天用软尺测量大鼠踝关节同一部位直径,以肿胀后、肿胀前直径的差值与肿胀前直径比值的百分数作为关节肿胀度。从药物干预后第 0、7、14、21、28 天进行关节炎指数(AI)评分,具体评分标准为 0 分,关节无红肿;1 分,跗骨或踝关节轻度红肿;2 分,从足踝到跗骨有中度红肿;3 分,从足踝延及跗骨关节中度红肿伴轻度功能障碍;4 分,最严重的红肿、僵硬伴严重的功能障碍。每只足均进行评分,计算四足的分数之和,由 2 名实验员独立评分并取其平均数。

2.3 取材 末次给药结束后,大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉,腹主动脉采血,全血静置 10~20 min 后,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min,收集上层血清于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。取各组大鼠右踝关节,于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,备用。取大鼠左踝关节软骨,于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

2.4 HE 染色观察踝关节组织病理学改变 将在 4% 多聚甲醛中固定的踝关节组织放入 10% EDTA 中脱钙,梯度体积分数乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,脱蜡,行常规 HE 染色,将染色后的切片进行脱水、透明处理,使用中性和树胶封片,于光学显微镜下观察组织病理学改变,如软骨破坏、滑膜血管增生、炎细胞浸润等。

2.5 ELISA 法检测血清炎症因子水平 按照试剂盒说明书,用 ELISA 法检测血清炎症因子 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度,并绘制标准曲线,计算出各样品浓度。

2.6 RT-qPCR 法检测踝关节软骨组织 NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 通路相关基因 mRNA 表达 提取大鼠踝关节软骨组织中总 RNA,使用分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,将 RNA 逆转录成 cDNA,随后进行定量实时 PCR 实验以量化相关基因的表达,引物由北京擎科生物科技股份有限公司设计并合成,序列见表 1。RT-qPCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C

30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

| 基因 | 正向序列(5'→3') | 反向序列(5'→3') |
|-----------|---------------------------|--------------------------|
| NF-κB | TCTTCTTTTGGTAGGGAACCTCTTG | GGTGTACAGGCAGACCTCATG |
| NLRP3 | GCAGAGCCTACAGTTGGGTGA | CAGGCTTTTCCTCCTGGAGAGC |
| Caspase-1 | ACTCGTACAGCTTGCCCTCA | CTGGGCAGGCAGCAAATTC |
| GSDMD | CCAGCATGGAAGCCTTAGAG | CAGAGTCGAGCACCAGACAC |
| IL-1β | TCGTGCTGTCTGACCCATGT | AGGGATTTTGTCTGTGCTTGT |
| IL-18 | GCCTGTCTCGAGGATATGACT | CCTTCACAGAGAGGGTCACAG |
| TNF-α | ACTGGCGTGTTCATCCGTTCT | CTGAGCATCGTAGTTGTTGGAAAT |
| GAPDH | AATGGTGAAGGTCCGTCTGAAC | AGGTC AATGAAGGGGTCGTTG |

2.7 Western blot 法检测踝关节软骨组织 NF-κB、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达 将大鼠踝关节软骨组织剪成合适大小并提取总蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度, 制备 SDS-PAGE 凝胶, 蛋白变性后上样, 凝胶电泳, 将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h, 加入稀释后的一抗 (NF-κB、NLRP3、Caspase-1 抗体), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜以去除未结合的抗体, 加入对应的稀释后的二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 将显色液均匀滴加在膜上, 排出气泡后进行曝光, 保存照片, 并采用 Image J 软件对条带进行量化分析。

2.8 免疫组化法检测软骨组织 NLRP3、GSDMD 阳性表达 取固定于 4% 多聚甲醛中的大鼠踝关节, 经脱水、石蜡包埋、切片后, 用二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水, 抗原修复后, 将内源性过氧化物酶阻断剂滴加到载玻片中, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次后滴加 1% 山羊血清封闭 30 min, 去除血清,

滴加一抗在 4 °C 下孵育过夜, PBS 洗涤 3 次后加入二抗在 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次后使用 DAB 显色, 并用苏木精复染, 脱水, 中性树脂封片, 于光学显微镜下观察、拍照, 并用 Image J 软件分析其阳性面积占比。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理, 实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 进一步两两多重比较采用 LSD 法。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 益气蠲痹方对 CIA 大鼠关节肿胀程度、关节炎指数的影响 与空白组比较, 模型组大鼠关节肿胀度、关节炎指数升高 (P<0.01); 与模型组比较, 21 d 后, 益气蠲痹方各剂量组和甲氨蝶呤组大鼠关节肿胀度、关节炎指数均降低 (P<0.05, P<0.01), 见表 2~3。

表 2 各组大鼠关节肿胀程度比较 (% , $\bar{x} \pm s$, n=10)

Tab. 2 Comparison of joint swelling severity in rats in each group (% , $\bar{x} \pm s$, n=10)

| 组别 | 0 d | 7 d | 14 d | 21 d | 28 d |
|-----------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 5.21±1.14 | 6.70±1.59 | 16.10±2.69 | 27.15±3.36 | 31.32±2.01 |
| 模型组 | 86.58±11.06 ^{##} | 90.39±9.88 ^{##} | 92.26±8.92 ^{##} | 94.34±10.36 ^{##} | 88.43±8.98 ^{##} |
| 益气蠲痹方低剂量组 | 85.97±8.61 | 88.37±9.56 | 86.82±8.57 | 81.94±9.13 [*] | 74.88±13.98 [*] |
| 益气蠲痹方中剂量组 | 87.84±10.18 | 86.38±9.85 | 81.56±12.77 [*] | 77.31±12.94 ^{**} | 67.87±16.46 ^{**} |
| 益气蠲痹方高剂量组 | 85.47±11.83 | 83.21±9.31 | 72.24±15.45 ^{**} | 64.83±16.24 ^{**} | 55.25±16.58 ^{**} |
| 甲氨蝶呤组 | 88.24±11.44 | 81.17±11.09 [*] | 67.51±14.28 ^{**} | 58.67±17.85 ^{**} | 43.96±11.89 ^{**} |

注: 与空白组比较, ^{##}P<0.01; 与模型组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01。

表 3 各组大鼠关节炎指数比较 (分, $\bar{x} \pm s$, n=10)

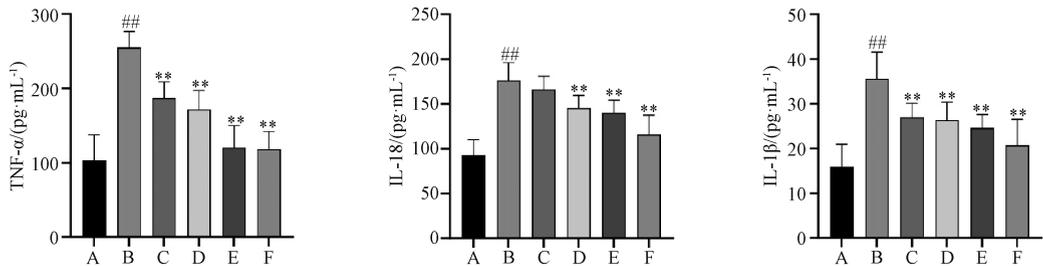
Tab. 3 Comparison of arthritis index in rats in each group (score, $\bar{x} \pm s$, n=10)

| 组别 | 0 d | 7 d | 14 d | 21 d | 28 d |
|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常组 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |
| 模型组 | 7.90±0.96 ^{##} | 8.18±1.14 ^{##} | 8.38±1.16 ^{##} | 8.10±1.21 ^{##} | 7.91±1.05 ^{##} |
| 益气蠲痹方低剂量组 | 7.81±0.81 | 7.75±0.77 | 7.60±0.74 ^{**} | 6.57±0.56 ^{**} | 5.47±0.73 ^{**} |
| 益气蠲痹方中剂量组 | 7.72±0.77 | 7.27±0.82 ^{**} | 6.23±0.79 ^{**} | 4.95±0.78 ^{**} | 3.50±0.52 ^{**} |
| 益气蠲痹方高剂量组 | 7.89±1.23 | 7.17±1.03 ^{**} | 5.35±0.62 ^{**} | 3.93±0.37 ^{**} | 3.02±0.37 ^{**} |
| 甲氨蝶呤组 | 7.39±0.98 | 6.90±0.80 ^{**} | 5.84±0.75 ^{**} | 4.60±0.62 ^{**} | 3.42±0.38 ^{**} |

注: 与空白组比较, ^{##}P<0.01; 与模型组比较, ^{**}P<0.01。

3.2 益气蠲痹方对 CIA 大鼠踝关节组织病理形态的影响 空白组大鼠软骨结构正常, 表面光滑平整, 细胞形态规则, 排列整齐, 滑膜无增生; 与空白组比较, 模型组中可见到软骨表面出现缺损破坏, 细胞数量减少、形态改变、排列不规则, 滑膜组织有大量炎性细胞浸润; 与模型组比较, 益气蠲痹方低剂量组仍存在软骨面缺损、炎性细胞的大量浸润, 益气蠲痹方中剂量组和甲氨蝶呤组软骨表面相对完整, 炎性浸润逐渐减轻, 益气蠲痹方高剂量组关节软骨表面趋向完整, 层次结构较为清晰, 存在少量炎性细胞浸润, 见图 1。

3.3 益气蠲痹方对 CIA 大鼠血清炎症因子水平的影响 与空白组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比



注: A 为空白组, B 为模型组, C~E 为益气蠲痹方低、中、高剂量组, F 为甲氨蝶呤组。与空白组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

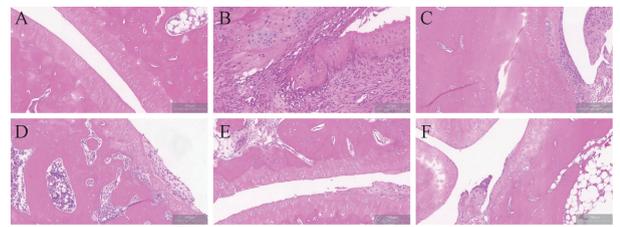
图 2 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Comparison of serum levels of IL-1 β , IL-18 and TNF- α in rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.4 益气蠲痹方对 CIA 大鼠踝关节软骨组织 NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 通路相关基因 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠踝关节软骨组织 NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA 表达均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气蠲痹方各剂量组和甲氨蝶呤组大鼠踝关节软骨组织 NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA 表达均降低 ($P < 0.01$), 见图 3。

3.5 益气蠲痹方对 CIA 大鼠 NF- κ B、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠踝关节软骨组织 NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气蠲痹方中、高剂量组和甲氨蝶呤组大鼠踝关节软骨组织 NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 益气蠲痹方低剂量组大鼠踝关节软骨组织 NF- κ B、Caspase-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 4。

3.6 益气蠲痹方对 CIA 大鼠踝关节软骨组织



注: A 为空白组, B 为模型组, C~E 为益气蠲痹方低、中、高剂量组, F 为甲氨蝶呤组。

图 1 各组大鼠踝关节组织病理形态 (HE 染色, $\times 100$)

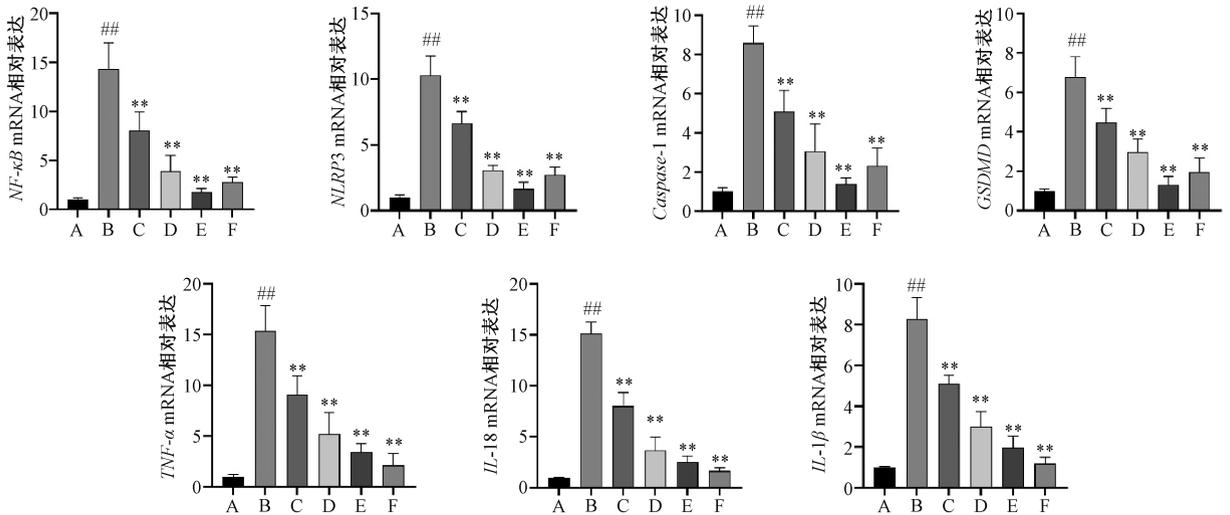
Fig. 1 Histopathological morphology of ankle joint in rats in each group (HE staining, $\times 100$)

较, 益气蠲痹方中、高剂量组和甲氨蝶呤组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平均降低 ($P < 0.01$), 益气蠲痹方低剂量组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P < 0.01$), 见图 2。

NLRP3、GSDMD 表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠踝关节软骨组织中 NLRP3、GSDMD 阳性表达增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气蠲痹方中、高剂量组和甲氨蝶呤组大鼠踝关节软骨组织 NLRP3、GSDMD 阳性表达均减少 ($P < 0.01$), 益气蠲痹方低剂量组大鼠踝关节软骨组织 GSDMD 阳性表达减少 ($P < 0.01$), 见图 5~6。

4 讨论

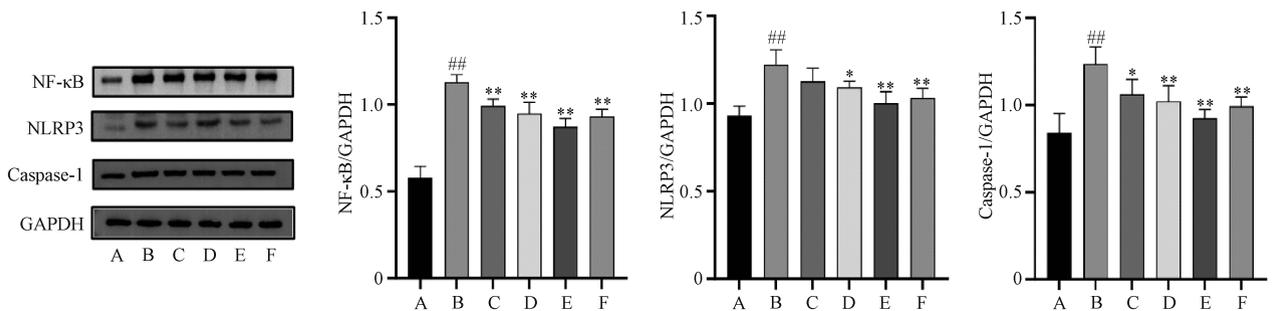
中医学认为 RA 归属于“痹证”范畴。益气蠲痹方是以四妙散和四神煎为基础, 结合西北地域气候特点及饮食特点并经过多年临床经验, 加减化裁而成的治痹经验方^[9], 临床上多用于治疗湿热痹阻型 RA, 具有益气健脾、清热祛湿、通络止痛之效。方中黄芪生用以益气化湿, 炙用以行血利痹, 二者用以驱散经隧深部邪气, 白术既健脾燥湿利水, 又增黄芪扶正固表之效, 三者共用为君药; 臣以苍术、薏苡仁、黄柏、石斛燥湿健脾、滋阴清热, 四药相合以绝生痰、湿热之源; 忍冬藤、鸡血藤活血通络止痛, 远志补益心肾, 预安未受邪之



注: A为空白组, B为模型组, C~E为益气薏痹方低、中、高剂量组, F为甲氨蝶呤组。与空白组比较, ## $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠踝关节软骨组织 *NF-κB*、*NLRP3*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1β*、*IL-18*、*TNF-α* mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

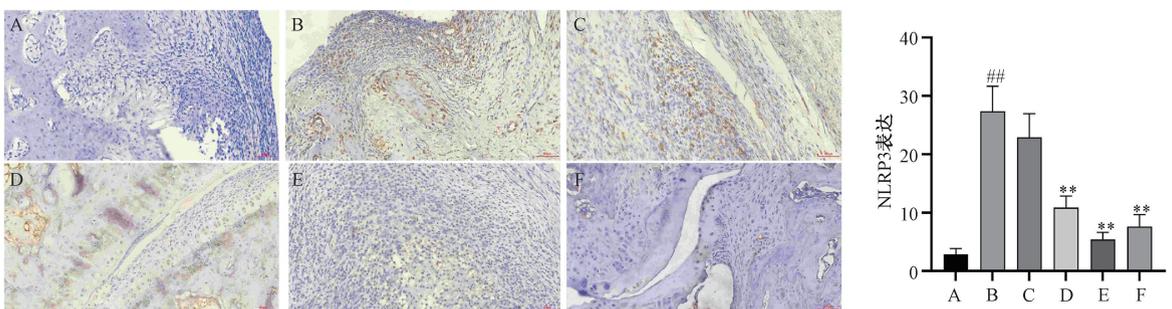
Fig. 3 Comparison of mRNA expressions of *NF-κB*, *NLRP3*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1β*, *IL-18* and *TNF-α* in rat ankle cartilage in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



注: A为空白组, B为模型组, C~E为益气薏痹方低、中、高剂量组, F为甲氨蝶呤组。与空白组比较, ## $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠踝关节软骨组织 *NF-κB*、*NLRP3*、*Caspase-1* 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

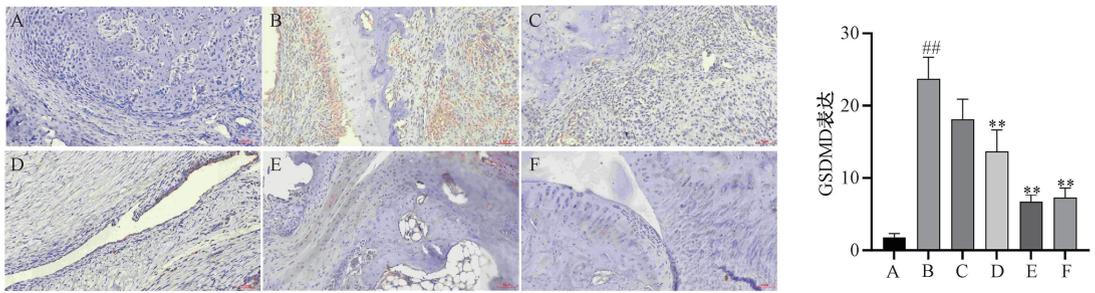
Fig. 4 Comparison of protein expressions of *NF-κB*, *NLRP3* and *Caspase-1* in rat ankle cartilage in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



注: A为空白组, B为模型组, C~E为益气薏痹方低、中、高剂量组, F为甲氨蝶呤组。与空白组比较, ## $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。

图5 各组大鼠踝关节软骨组织 *NLRP3* 表达比较 ($\times 60, \bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Comparison of *NLRP3* expression in rat ankle cartilage in each group ($\times 60, \bar{x} \pm s, n = 10$)



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 为益气蠲痹方低、中、高剂量组，F 为甲氨蝶呤组。与空白组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$ 。

图 6 各组大鼠踝关节软骨组织 GSDMD 表达比较 ($\times 60$, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 6 Comparison of GSDMD expression in rat ankle cartilage in each group ($\times 60$, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

地，同时祛瘀消肿，三者共为佐药；川牛膝通利关节，引诸药下行以助药势。全方扶正之力甚强，祛邪之力亦具，寒热并用，攻补兼施，使邪有出路，堪称妙方。

研究表明，湿热痹阻型 RA 患者更易发生关节软骨破坏^[10]。关节软骨由细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和嵌入其中的软骨细胞组成^[11]。RA 关节软骨破坏与炎症环境密切相关，多种促炎因子如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 可诱导软骨细胞死亡及其基质的降解^[12]，且软骨细胞稳态的失衡可进一步引发 ECM 的降解、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 分泌增加或作为促炎因子的来源加重软骨破坏^[13-15]。本研究发现，益气蠲痹方能够缓解 CIA 大鼠关节肿胀程度，降低关节炎指数并降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 水平，表明益气蠲痹方具有抑制炎症反应的作用；同时，益气蠲痹方能够减轻软骨缺损、软骨细胞异常及染色不均等病理变化，提示益气蠲痹方对 CIA 大鼠软骨组织有一定的保护作用。

促炎因子可通过诱导软骨细胞焦亡导致软骨破坏^[16]。细胞焦亡作为新型的的程序性死亡方式，可使细胞质膜破裂释放内容物及炎症因子，加剧 RA 炎症反应^[17-18]。其中，经典的细胞焦亡途径是由 NLRP3 炎症小体所介导的。当 NLRP3 响应细胞内、外刺激表达上调后，与凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、半胱天冬酶-1 前体 (pro Caspase-1) 组成炎症小体复合物^[19]。随后，NLRP3 炎症小体形成 Caspase-1 激活平台，以促进 IL-1 β 、IL-18 的活化，并进一步切割、激活膜成孔的 GSDMD，引发细胞焦亡^[20]。有研究证明，在 RA 大鼠软骨细胞中可检测到 NLRP3、Caspase-1 的活化^[21]。NF- κ B 作为炎症反应的关键介质，相关通路的激活不仅可促进

软骨降解^[22]，还可调控 NLRP3 的表达^[23-24]。本研究结果显示，在 CIA 大鼠中 NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 信号通路处于激活状态，而益气蠲痹方可下调该焦亡信号通路相关蛋白和 mRNA 的表达，且大鼠关节软骨组织中 NLRP3、GSDMD 阳性细胞数也减少，说明益气蠲痹方可能通过抑制 NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 信号通路的表达，减轻软骨细胞焦亡。

综上所述，益气蠲痹方能够减轻 CIA 大鼠炎症反应，减少焦亡相关因子的表达，从而发挥对软骨细胞的保护作用，其机制可能与抑制 NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 信号通路活化有关。

参考文献：

- [1] Wu Z, Ma D, Yang H, et al. Fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: surface markers and phenotypes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 93: 107392.
- [2] Maeda K, Yoshida K, Nishizawa T, et al. Inflammation and bone metabolism in rheumatoid arthritis: molecular mechanisms of joint destruction and pharmacological treatments[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2871.
- [3] Li M, Yin H, Yan Z, et al. The immune microenvironment in cartilage injury and repair[J]. *Acta Biomater*, 2022, 140: 23-42.
- [4] Ajmal I, Farooq M A, Abbas S Q, et al. Isoprenaline and salbutamol inhibit pyroptosis and promote mitochondrial biogenesis in arthritic chondrocytes by downregulating β -arrestin and GRK2[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 996321.
- [5] 谢芳, 简功辉, 戴斌玉, 等. 基于 CCL2/CCR2/NF- κ B 通路探讨活膝汤含药血清对软骨细胞焦亡的影响[J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(5): 30-36.
- [6] 林晴, 潘丹虹, 李路, 等. 荣筋拮痛方调控软骨细胞 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路改善骨关节炎炎症性病变的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(10): 5653-5658.
- [7] Milici A J, Kudlacz E M, Audoly L, et al. Cartilage preservation by inhibition of Janus kinase 3 in two rodent models of

- rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(1): R14.
- [8] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 30.
- [9] 李浩林, 程伟刚, 杨红梅, 等. 益气蠲痹方治疗脾失健运型膝关节炎性滑膜炎临床研究[J]. 西部中医药, 2024, 37(8): 124-128.
- [10] 古结乃特汗·拜克里木, 韩 玲, 卫 荣, 等. 湿热痹阻型与寒湿痹阻型类风湿关节炎患者细胞因子的差异[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(32): 6298-6301.
- [11] Xiang W, Zheng Q, Liu A, *et al*. Recent therapeutic strategies for excessive chondrocyte death in osteoarthritis: a review[J]. *Orthop Surg*, 2023, 15(6): 1437-1453.
- [12] Liu S, Ma H, Zhang H, *et al*. Recent advances on signaling pathways and their inhibitors in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Immunol*, 2021, 230: 108793.
- [13] Li Z, Huang Z, Zhang H, *et al*. P2X7 receptor induces pyroptotic inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis via NF- κ B/NLRP3 crosstalk[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8868361.
- [14] Li Z, Huang Z, Bai L. The P2X7 receptor in osteoarthritis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 628330.
- [15] 周俨淋, 张晓丽, 艾正文, 等. 软骨细胞在类风湿关节炎中的双重角色[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(5): 924-930.
- [16] 魏 霞, 李东倩, 骆诗琪, 等. 低强度脉冲聚焦超声对小鼠膝关节软骨细胞损伤中炎症因子和焦亡蛋白的影响[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(3): 268-276.
- [17] Frank D, Vince J E. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 99-114.
- [18] 李 楠, 马庆宇, 韩隆胤, 等. 补肾活血法对类风湿关节炎软骨细胞焦亡及 HMGB1/NLRP3 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 1929-1933.
- [19] Swanson K V, Deng M, Ting J P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 477-489.
- [20] Zu Y, Mu Y, Li Q, *et al*. Icarin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 307.
- [21] Zhao Y, Chen Y, Wang Z, *et al*. The method of Yiqi Yangyin Tongluo can attenuate the pyroptosis of rheumatoid arthritis chondrocytes through the ASIC1a/NLRP3 signaling pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(3): 145.
- [22] Deng Y, Lu J, Li W, *et al*. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF- κ B regulates osteoarthritic cartilage degradation[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4564.
- [23] Jiang S, Zhang H, Li X, *et al*. Vitamin D/VDR attenuate cisplatin-induced AKI by down-regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2021, 206: 105789.
- [24] Bauernfeind F G, Horvath G, Stutz A, *et al*. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression[J]. *J Immunol*, 2019, 183(2): 787-791.