

基于 NF-κB 信号通路探讨异槲皮素对关节炎大鼠巨噬细胞向 M2 型极化的影响

侯 豹¹, 次旦南卓², 张仕杰¹, 徐安静¹, 蔡维维¹, 朱雪雪¹, 孙海建¹, 米 玛², 邱丽颖^{1*}
(1. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122; 2. 西藏藏医药大学, 西藏 拉萨 850000)

摘要: **目的** 探讨异槲皮素对关节炎大鼠炎症微环境的影响。**方法** 将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、异槲皮素组 (50 mg/kg) 和地塞米松组 (2.5 mg/kg), 每组 10 只。除对照组外, 其余各组在第 1、8 天于大鼠尾根部、背部和足底区域注射牛 II 型胶原 (2 mg/mL) 与等体积不完全弗氏佐剂的混合乳液, 每次 200 μL, 构建胶原诱导的类风湿性关节炎 (RA) 模型。造模第 15 天后开始给药, 拍摄并记录大鼠的爪和关节状况。使用 Micro-CT 对大鼠足部进行三维成像, 并分析骨体积分数; 使用小动物高频超声成像对大鼠膝关节进行成像, 观察积液水平; HE 染色法评价滑膜组织病理变化; 免疫组织化学法检测膝关节滑膜组织 IL-6、TNF-α 和 IL-10 表达; 流式细胞仪分析骨髓源巨噬细胞 (BMDM) 表型; 免疫荧光染色检测滑膜组织中 M2 型巨噬细胞表达。通过网络药理学筛选异槲皮素作用于 RA 的靶点, 使用虚拟分子对接法探究异槲皮素与靶蛋白的结合位点和结合能。通过脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症, 探究异槲皮素在细胞水平的抗炎作用, 以及对 BMDM 的极化作用, 并验证异槲皮素对 RA 的作用靶点。**结果** 动物实验结果表明, 异槲皮素可修复胶原诱导的关节炎大鼠的骨畸形, 改善骨体积分数 ($P<0.05$), 降低膝关节滑膜组织中炎症因子水平 ($P<0.01$), 改善胶原诱导的关节炎大鼠膝关节炎症微环境。网络药理学结果表明, 异槲皮素对 RA 的作用潜在靶点主要有 NF-κB、Akt 和 TNF-α。在细胞水平, 异槲皮素可以显著抑制 NF-κB 活化, 诱导 BMDM 向 M2 型极化, 降低促炎因子 IL-6、IL-1β 表达, 促进 IL-10 和 Arg-1 表达。**结论** 异槲皮素可以通过抑制 NF-κB 活化, 诱导滑膜组织中巨噬细胞向 M2 型极化, 改善 RA 的炎症微环境。

关键词: 异槲皮素; 类风湿性关节炎; 巨噬细胞; 炎症微环境; NF-κB

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)06-2038-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.042

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、全身性、炎症性自身免疫性疾病, 影响全球约 1% 的人口^[1]。类风湿性关节炎患者忍受着长期的关节疼痛, 这不仅给他们带来了沉重的经济负担, 还造成了由疾病引起的精神痛苦^[2]。临床上治疗 RA 的药物以抗风湿药物和糖皮质激素为主。RA 患者长期使用皮质类固醇会引起心血管疾病、糖尿病、骨质疏松等, 亟需寻求安全、有效、负担得起的治疗方案。

几十年来, 传统中医对 RA 的治疗具有一套全面的治疗策略。异槲皮素是黄酮类化合物, 具有广泛的生物活性和多种药理作用^[3], 其广泛存在于锦葵科植物和罗布麻的花中、杨梅树叶、杜仲叶和桑叶等植物中, 现有研究表明多种植物的生物活性与其中所含的异槲皮素密切相关^[4-5]。有研究证实, 异槲皮素对体内外成骨都有实质性的有利影响^[6-7]。此外, 黄酮类化合物可通过抑制 NLRP3 或 NF-κB 通路的激活来刺激 M1 巨噬细胞向 M2 巨噬细胞的极化^[8-9]。

因此, 本研究通过建立胶原诱导型关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠模型, 探究异槲皮素对骨畸形的修复能力和改善 RA 炎症微环境的潜力。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (200±20) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 [实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2022-0004], 饲养于江南大学无锡医学院实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (苏) 2021-0056], 环境温度 20~26 ℃, 相对湿度 40%~70%, 标准饮食饮水。动物实验经江南大学伦理委员会批准 (实验动物伦理编号 JN. No20230228S0250519)。

1.2 试剂与药物 异槲皮素 (货号 B10373) 购自上海士锋生物技术有限公司。RAW264.7 细胞购自武汉博士德生物工程有限公司。牛 II 型胶原 (货号 20022) 购自美国 Chondrex 公司; 不完全弗氏佐剂 (货号 F5506) 购自美国 Sigma 公司; IL-6、IL-10 一级抗体 (货号 BA4339、

收稿日期: 2024-08-26
基金项目: 国家自然科学基金 (82370364); 藏医药“十四五”内涵建设项目 (2023ZYIGH04); 江苏省实验动物协会 2023 年项目 (DWXH202310)
作者简介: 侯 豹 (1989—), 男, 硕士, 实验师, 研究方向为天然产物在关节炎治疗中的应用。Tel: 15961867218, E-mail: houbao2015@163.com
* 通信作者: 邱丽颖 (1965—), 女, 教授, 研究方向为天然产物开发与应用。Tel: 13861690781, E-mail: qiulydoc@sina.com

A00021-3) 购自武汉博士德生物工程有限公司; CD86 抗体 (货号 560582) 购自上海百赛生物科技股份有限公司; CD86、CD163 抗体 (货号 A1199、A8383) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。脂多糖 (LPS, 货号 S1732) 购自上海碧云天生物科技股份有限公司; IFN- γ (货号 p01580) 购自安诺伦 (北京) 生物科技有限公司; DAPI 活性染料 (货号 D1306) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 固定剂、渗透缓冲液、FcR 抗体 (货号 554722、554723、156603) 均购自美国 BD 公司; CD206 抗体 (货号 141707) 购自美国 BioLegend 公司。

1.3 仪器 PCR 扩增仪 (德国艾本德公司); Micro-CT [型号 quantum GX II, 珀金埃尔默仪器 (上海) 有限公司]; 小动物高频超声成像系统 [型号 Vevo 3100 LT, 富士胶片 (中国) 投资有限公司]; 数字玻片扫描仪 (匈牙利 3DHISTECH 公司); 荧光显微镜 (型号 Axio Imager Z2, 德国蔡司公司);

2 方法

2.1 CIA 大鼠模型构建 将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、异槲皮素组和地塞米松组, 每组 10 只, 除对照组外, 其余各组均建立 CIA 关节炎大鼠模型。将牛 II 型胶原 (2 mg/mL) 与等体积的不完全弗氏佐剂混合, 并在冰上用注射器将乳液完全乳化。第 1 天进行初级免疫, 于大鼠尾根和足底区域多点注射 200 μ L 混合乳液; 第 8 天, 再次注射相同体积胶原乳液进行加强免疫^[10-12]。15 d 后, 拍摄并记录大鼠的爪和关节状况, 同时开始给药, 异槲皮素组灌胃给予 50 mg/kg 异槲皮素溶液, 地塞米松组灌胃给予 2.5 mg/kg 地塞米松溶液, 对照组和模型组灌胃给予生理盐水, 给药体积约 0.2 mL。

2.2 股骨和爪的 Micro-CT 检测 给药 30 d 后, 用异氟烷持续麻醉大鼠, 在小型动物成像床上进行成像。采用 Micro-CT 对股骨和爪的畸形、骨体积分数 (BV/TV) 进行检测。Micro-CT 扫描电压 90 kV; 扫描电流 80 μ A; 扫描视野 86 mm; 扫描时间 4 min; 扫描方式为高分辨率; 滤片 Cu 0.1 mm; 扫描分辨率 172 μ m。

2.3 小动物高频超声成像系统评估关节积液 用 1.5% 异氟烷麻醉大鼠, 用脱毛膏对大鼠膝关节进行脱毛, 将大鼠放在手术台上进行持续麻醉。使用 MX400 超声成像探头和小动物高频超声成像系统对大鼠的膝关节进行成像。

2.4 血清细胞因子水平检测 给药 30 d 后, 采集血样, 室温静置 15 min, 3 000 r/min 离心 20 min, 收集血清。ELISA 试剂盒检测血清 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 Arg-1 水平。

2.5 膝关节组织病理学观察 取各组大鼠膝关节, 于 4% 多聚甲醛中固定 10 d, 进行 4 周的脱钙处理。将脱钙后的膝关节包埋在石蜡中, 制备 5 μ m 切片。切片脱蜡后使用梯度乙醇进行水合, 苏木精-伊红染色试剂盒染色。通过数字切片扫描仪观察膝关节病理变化。对半月板和滑膜组织中血管翳的严重程度进行评分, 根据严重程度, 将血管翳分为 5 个等级, 即正常 (1 分)、局部轻度血管翳 (2 分)、

部分重度血管翳 (3 分)、重度血管翳 (4 分) 和极严重血管翳 (5 分)。

2.6 免疫组织化学 (IHC) 法检测 IL-6、TNF- α 和 IL-10 表达 取各组大鼠膝关节组织切片进行脱蜡, 经乙醇梯度水化、柠檬酸抗原修复、过氧化物酶失活和 BSA 封闭后, 将切片与特异性一级抗体 (稀释比 1 : 200) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。第二天, 将组织切片在 37 $^{\circ}$ C 下复温 1 h, 用 PBS 缓冲溶液洗涤, 室温下用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗孵育 2 h。使用数字玻片扫描仪观察 IL-6、TNF- α 和 IL-10 在大鼠膝关节中的表达。

2.7 免疫荧光 (IF) 染色检测 M2 型巨噬细胞表达 取各组大鼠膝关节组织切片, 95 $^{\circ}$ C 下用 EDTA 缓冲液进行抗原回收, 组织切片用 5% 山羊血清封闭 30 min, 对于 M2 巨噬细胞的染色, 使用抗 CD68 和抗 CD163 进行共染色。用 Alexa Fluor 488 (绿色) 标记的山羊抗小鼠 IgG 和 AlexaFluor 594 标记的山羊防兔 IgG 在室温下避光孵育 2 h, 洗涤后用 DAPI 对细胞核进行复染。使用荧光显微镜观察染色情况, 通过 Image Pro Plus 6.0 软件对荧光强度进行量化。

2.8 RAW264.7 炎症模型构建和干预 将对数生长期的 RAW264.7 细胞以 2×10^5 /孔的密度接种至 6 孔板中, 先以 1 μ g/mL LPS 诱导 24 h, 再分别以 0.25、2.5 μ mol/L 异槲皮素处理 24 h。

2.9 RT-qPCR 法检测炎症因子 mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂提取各组细胞的 RNA, 然后经逆转录获得 1 μ g cDNA, 并用 SYBR Green 进行荧光定量 PCR。以 β -actin 为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 Arg-1 mRNA 相对表达。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列
IL-1 β	正向 5'-GCTGAAAGCTCTCCACCTCAATG-3'
	反向 5'-TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTG-3'
IL-6	正向 5'-TCCTACCCCAATTTCCAATGCT-3'
	反向 5'-TGCTCTTGCTCCTTAGCCAC-3'
IL-10	正向 5'-CAAGGCACTGGAGCAGGTGAAG-3'
	反向 5'-CGCTTTGGTGAGTAGACAGAGGTC-3'
Arg-1	正向 5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3'
	反向 5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC-3'
β -actin	正向 5'-CATGGAGTCCTGTGGCATCC-3'
	反向 5'-CTCCTTCTGCATCCTGTCGG-3'

2.10 网络药理学研究与虚拟分子对接 使用 Swiss Target Prediction website 预测异槲皮素可能作用的靶目标; 通过 GeneCard 数据库检索 RA 相关目标; 将获得的异槲皮素和 RA 相关靶标导入 STRING 11.5 数据库, 进行网络药理学图谱分析, 并使用 Cytoscape 3.7.0 软件对网络药理学图谱进行优化。使用 Discovery Studio 2021 软件进行虚拟分子对接, 选择异槲皮素作为配体, 与关节炎途径密切相关的常规途径蛋白, 如 PDB 蛋白数据库中的 NF- κ B 和 IKK β , 作为受体进行分子对接, 评估异槲皮素与靶蛋白的结合能和结合位点。

2.11 蛋白质印迹法检测 NF- κ B 和 IKK β 蛋白表达 将培养好的细胞收集到离心管中，使用 PBS 进行清洗，去除细胞外的干扰物，然后加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酯酶抑制剂的裂解液，通过超声波破碎仪进行细胞破碎，离心后获得含有目标蛋白的提取液。使用 10% 分离凝胶和 5% 浓缩凝胶对总蛋白质进行电泳分离，通过湿法将分离的蛋白转移到 PVDF 膜上，用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h，加入特异性一抗在 4℃ 下孵育过夜，加入 HRP 标记的二抗孵育 2 h，TBST 洗涤后使用 ECL 发光液显影，以目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 的光密度值比值表示目的蛋白相对表达量。

2.12 BMDM 细胞极化 从小鼠股骨和胫骨中获得骨髓细胞，巨噬细胞集落刺激因子诱导为成骨髓源巨噬细胞（bone marrow-derived macrophages, BMDM）。LPS（10 ng/mL）+ IFN- γ （20 ng/mL）诱导 BMDM 分化为 M1 巨噬细胞。培养 12 h 后，将其分为对照组、LPS+IFN- γ 组、异槲皮素组（LPS+IFN- γ 诱导后 6 h，加入终浓度为 0.25 μ mol/L 异槲皮素），细胞消化成单细胞悬浮液后 24 h，加抗小鼠 FcR 抗体 4℃ 孵育 15 min，加 DAPI 活性染料 4℃ 孵育 15 min 以区分死细胞，使用 FITC 大鼠抗小鼠 CD86 抗体在 4℃ 下表面染色 20 min。PBS 缓冲溶液洗涤细胞 2 次，固定剂在 4℃ 下固定 30 min，用渗透缓冲液洗涤 2 次。对于细胞内染色，APC 抗小鼠 CD206（MMR）抗体在渗透缓冲液中稀释，添加到细胞中，4℃ 染色 30 min。用渗透缓冲溶液洗涤 2 次后，将细胞重悬在 PBS 缓冲液中，并用 BD LSRFortessa 细胞分析仪检测。使用 FlowJo 软件进行数据分析。

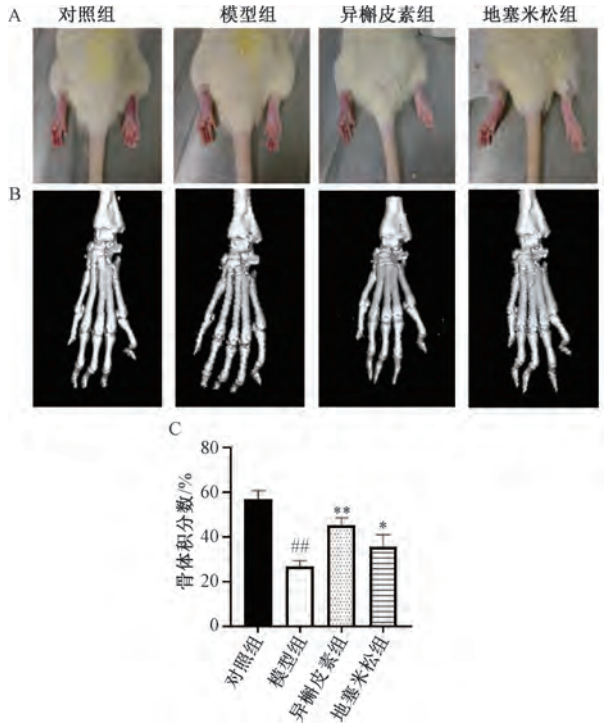
2.13 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 Dunnett 检验；2 组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 异槲皮素对 CIA 大鼠踝关节肿胀和骨质流失的影响 如图 1A 所示，异槲皮素可以减轻 CIA 大鼠踝关节肿胀，与模型组比较，异槲皮素组大鼠足肿胀抑制率为（40.00 $\pm$ 3.17）%。如图 1B~1C 所示，与对照组比较，模型组大鼠足关节出现畸形，表现为指间距离增加，骨体积分数降低（*P*<0.01）；与模型组比较，异槲皮素组大鼠足部骨畸形得到改善，骨体积分数增加（*P*<0.01）。以上结果表明，异槲皮素不仅能抑制 CIA 大鼠踝关节肿胀，改善骨畸形，还能提高骨体积分数。

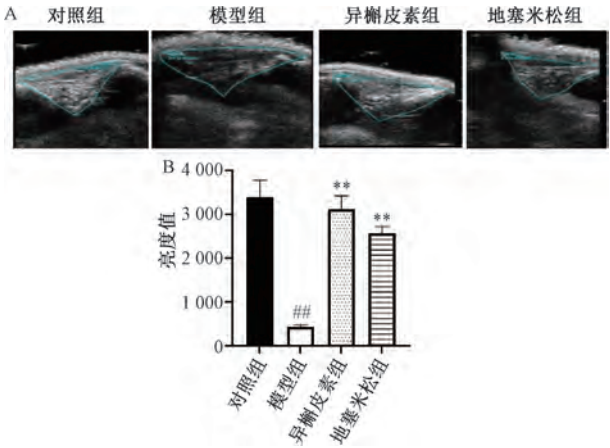
3.2 异槲皮素对 CIA 大鼠膝关节积液的影响 通过小动物高频超声成像系统观察大鼠膝关节，积液部位呈现低回声，主要表现为暗灰色和黑色影像；相反，滑膜和软骨组织表现为高回声区，主要表现为白色成像。如图 2 所示，异槲皮素可改善大鼠膝关节积液程度（*P*<0.01）。异槲皮素可能通过改善 CIA 大鼠关节的慢性炎症状态，促进滑膜组织修复，减轻关节积液。

3.3 异槲皮素对 CIA 大鼠滑膜组织病理形态的影响 如图 3 所示，模型组大鼠膝关节半月板和滑膜组织内炎性血管



注：与对照组比较，##*P*<0.01；与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01。

图 1 各组大鼠踝关节组织形态和骨体积分数比较（ $\bar{x}\pm s$ ，*n*=10）

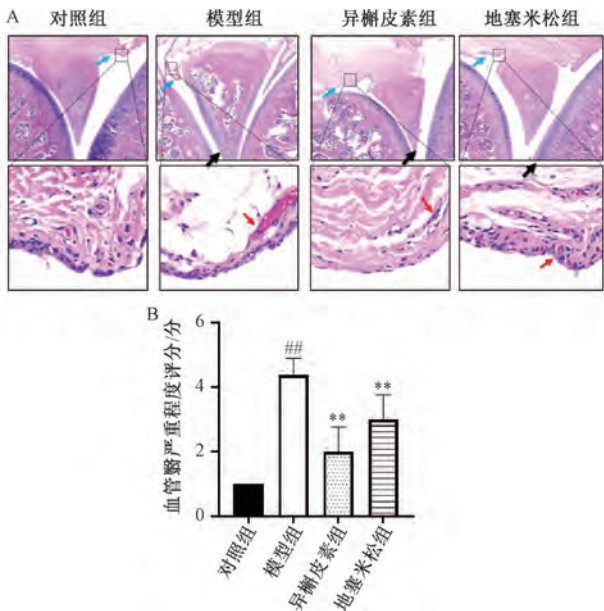


注：与对照组比较，##*P*<0.01；与模型组比较，***P*<0.01。

图 2 各组大鼠关节积液情况（ $\bar{x}\pm s$ ，*n*=10）

翳明显（*P*<0.01）；异槲皮素组和地塞米松组半月板炎性血管翳和滑膜血管翳程度均减轻（*P*<0.01）。

3.4 异槲皮素对 CIA 大鼠滑膜组织炎症的影响 如图 4A~4F 所示，与对照组比较，模型组促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 以及抗炎因子 IL-10 表达升高（*P*<0.01）；与模型组比较，异槲皮素组 IL-6 和 TNF- α 表达降低（*P*<0.01），IL-10 表达升高（*P*<0.05），地塞米松组 IL-6、TNF- α 、IL-10 表达降低（*P*<0.05，*P*<0.01）。提示异槲皮素逆转了滑膜组织中促炎因子的高表达，同时增强了抗炎因子表达，从而改善关节炎微环境。考虑到 M2 型巨噬细胞分泌 IL-10，后续对滑膜组织中 M2 型巨噬细胞进行检测。



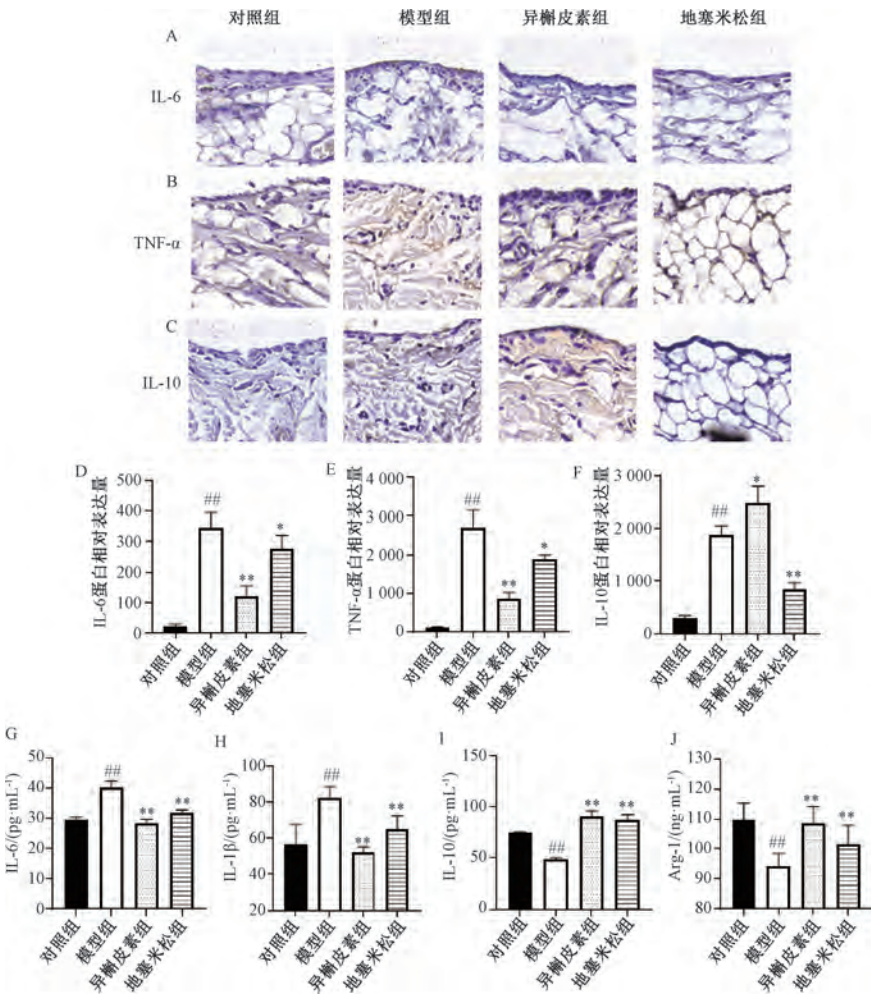
注：蓝色箭头指向滑膜，黑色箭头指向半月板中的炎症性血管翳，红色箭头指向滑膜组织血管翳。与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{**}*P*<0.01。

图 3 各组大鼠膝关节滑膜组织病理形态 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

如图 4G~4J 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清 IL-1 β 和 IL-6 水平升高 (*P*<0.01)，IL-10、M2 巨噬细胞标志物 Arg-1 水平降低 (*P*<0.01)；与模型组比较，异槲皮素组血清 IL-1 β 和 IL-6 水平降低 (*P*<0.01)，IL-10、Arg-1 水平升高 (*P*<0.01)。

3.5 异槲皮素对 CIA 大鼠滑膜组织 M2 巨噬细胞表达的影响 如图 5 所示，与对照组比较，模型组 M2 巨噬细胞表达降低 (*P*<0.01)；与模型组比较，异槲皮素组 M2 巨噬细胞表达升高 (*P*<0.01)，而地塞米松组 M2 巨噬细胞表达无明显差异 (*P*>0.05)。以上结果显示，异槲皮素可以通过诱导巨噬细胞在滑膜组织内转变为 M2 型，进而抑制促炎因子的分泌，从而潜在地改善滑膜炎。

3.6 异槲皮素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症的影响 异槲皮素在 0.025 $\mu\text{mol/L}$ 至 1 mmol/L 的范围内对 RAW264.7 细胞表现出安全性，见图 6A。如图 6B~6E 所示，与对照组比较，LPS 组 RAW264.7 细胞 IL-6、IL-1 β 、IL-10、Arg-1 mRNA 表达升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，0.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮素组 RAW264.7 细胞 IL-6、IL-1 β mRNA 表达降低 (*P*<0.01)，IL-10 mRNA 表达升高 (*P*<0.01)，2.5 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮素组 Arg-1 mRNA 表达升高 (*P*<0.05)。



注：与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 4 各组大鼠滑膜组织炎症水平比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

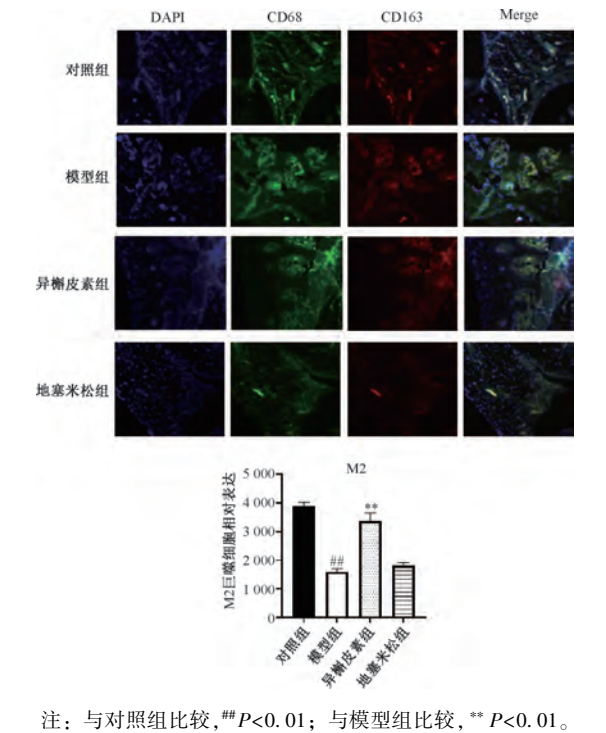


图 5 各组大鼠滑膜组织 M2 型巨噬细胞表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

3.7 异槲皮素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF- κ B/IKK β 信号通路的影响 网络药理学结果显示，异槲皮素治疗 RA 的靶点主要涉及 NF- κ B、Akt 和 TNF- α ，见图 7A。通过分子对接发现，异槲皮素与 NF- κ B 和 IKK β 都具有良好的结合位点和高结合能，异槲皮素与 NF- κ B 和 IKK β 之间的结合主要是氢键，见图 7B。如图 7C~7E 所示，与对照组比较，LPS 组 p-NF- κ B p65 和 p-IKK β 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与 LPS 组比较，0.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 异槲皮素组 p-NF- κ B p65 和 p-IKK β 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。以上结果提示，异槲皮素可能抑制 NF- κ B 通路的激活，进而阻断炎症因子的表达，从而改善炎症微环境，达到治疗关节炎的效果。

3.8 异槲皮素在体外诱导 BMDM 极化为 M2 表型 如图 8 所示，与对照组比较，LPS+IFN- γ 组 CD206⁺ 标记的 M2 巨噬细胞比例降低 ($P<0.01$)，CD86⁺ 标记的 M1 巨噬细胞比例升高 ($P<0.01$)；与 LPS+IFN- γ 组比较，异槲皮素组 CD206⁺ 标记的 M2 巨噬细胞比例升高 ($P<0.01$)，CD86⁺ 标记的 M1 巨噬细胞比例无明显变化 ($P>0.05$)。以上结果表明，异槲皮素虽然不能抑制 BMDM 向 M1 型极化，但是可以显著促进 BMDM 向 M2 型极化。

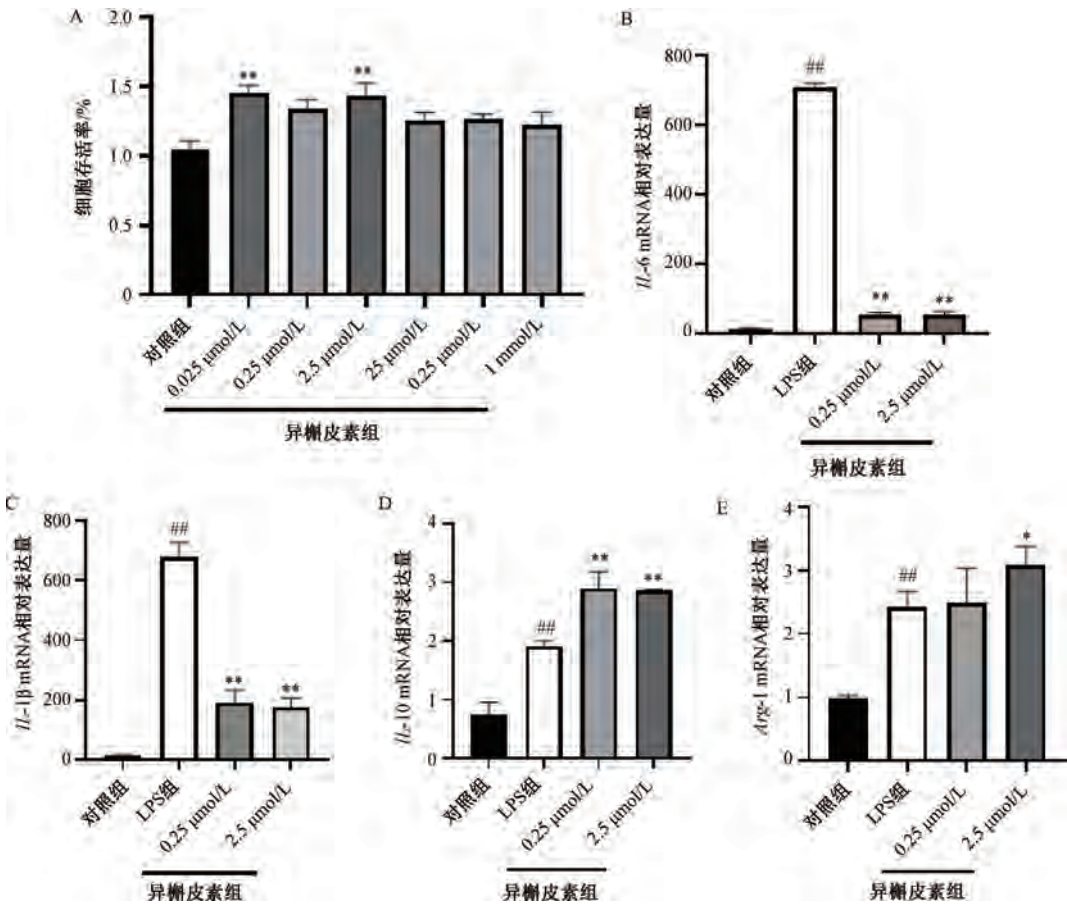
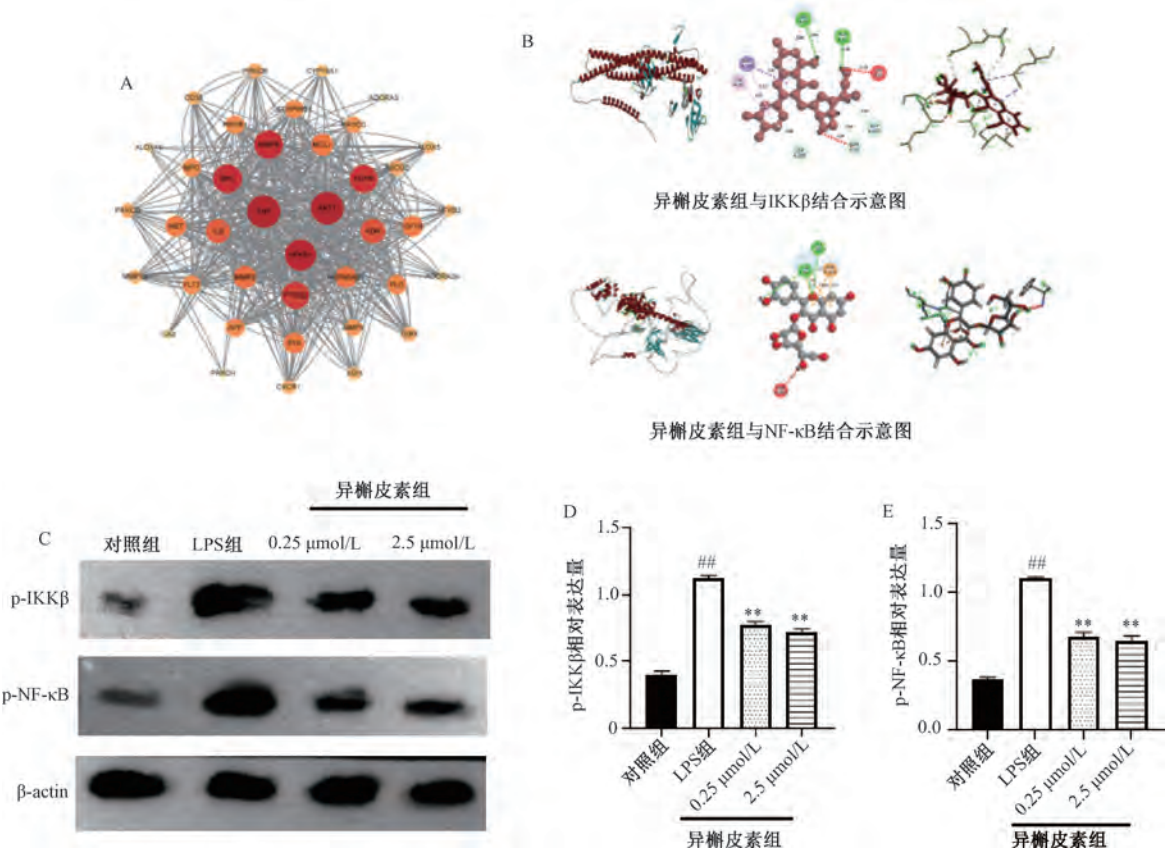
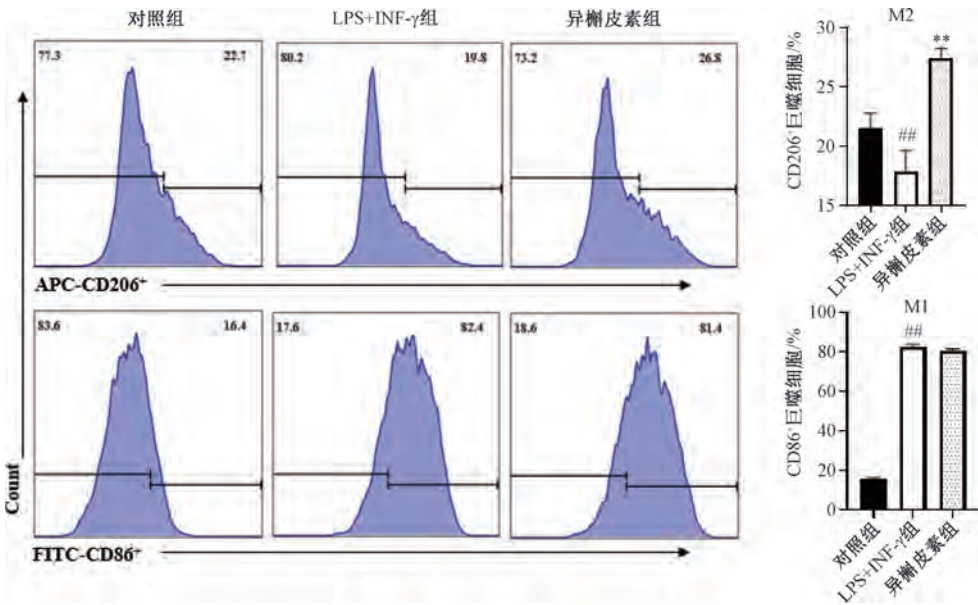


图 6 各组 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。
图 7 异槲皮素对 NF-κB/IKKβ 信号通路的作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。
图 8 异槲皮素对 BMDM 向 M2 表型极化的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

RA 是一种慢性、全身性、免疫性疾病，主要特征为滑膜持续炎症、滑膜异常增生、骨侵蚀等^[13-14]，多发于 30 岁至 50 岁女性，男女比例约为 1 : 3，这一现象可能与雌激素

分泌密切相关^[15-16]。随着病程的延长，RA 患者的残疾率不断上升，软骨和成骨出现不同程度的侵蚀，进而导致关节畸形，最终导致残疾或者死亡^[17-18]。因此，寻找一种有效缓解 RA 进程的药物迫在眉睫。现有的临床抗风湿药物的

毒副作用，极大地限制了它们的使用。而中药复方和中药提取物治疗 RA 具有悠久历史，且毒副作用较小。

异槲皮素是存在于多种中草药中的黄酮类化合物，本研究发现 CIA 大鼠模型显示出与 RA 类似的病理属性，包括骨耐受性破坏、滑膜组织内炎症细胞浸润、滑膜增生、骨畸形、骨密度损失和骨侵蚀^[10-11]等。异槲皮素可抑制 CIA 大鼠踝关节肿胀，改善骨质流失，表明异槲皮素对 RA 具有改善作用。本研究进一步分析发现，异槲皮素不仅可以缓解膝关节积液还可以减轻滑膜炎症，降低促炎因子 IL-1 β 和 IL-6 水平，提高抗炎因子 IL-10 和 Arg-1 水平。但是其作用机制仍不清楚，因此借助网络药理学来深入探究异槲皮素对 RA 的作用机制。

网络药理学结果显示，异槲皮素对 RA 的作用潜在靶点主要有 NF- κ B、Akt 和 TNF- α ，NF- κ B 通路是一种经典的炎症途径，同时也是多种中药成分作用于 RA 的主要靶点^[19-20]。通过虚拟分子对接发现，异槲皮素与 NF- κ B 和 IKK β 都具有良好的结合位点和较高的结合能。进一步验证实验发现，异槲皮素可以抑制 p-NF- κ B p65 和 p-IKK β 蛋白表达，这表明异槲皮素可能是通过抑制 NF- κ B 通路的激活，进而阻断炎症因子的表达，来改善滑膜炎症。

NF- κ B 通路与巨噬细胞极化的密切关系，以及 M1/M2 型巨噬细胞极化失衡对骨关节炎造成的严重损伤^[21-22]。本研究发现，异槲皮素可以促进 BMDM 向 M2 型极化，这也解释了异槲皮素促进 IL-10 和 Arg-1 表达的原因。

综上所述，本研究表明异槲皮素不仅改善了膝关节的炎症状态，还促进了抗炎因子和修复因子的分泌，修复了关节骨损伤，阻断了 RA 的持续恶化，其可能是通过靶向 NF- κ B 通路，促进滑膜组织中巨噬细胞向 M2 型极化，来改善滑膜组织的炎症微环境。

参考文献：

[1] Huizinga T W, Grondal G. Drivers of costly treatment strategies in rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2016, 388 (10041): 213-214.

[2] Cush J J. Rheumatoid arthritis: Early diagnosis and treatment[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2022, 48 (2): 537-547.

[3] Owczarek-Januszkiewicz A, Magiera A, Olszewska M A. Enzymatically modified isoquercitrin: Production, metabolism, bioavailability, toxicity, pharmacology, and related molecular mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 14784.

[4] 房仙颖, 章祎唯, 萧伟, 等. 异槲皮素的制备及研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 708-717.

[5] 蔡红蝶, 宿树兰, 郭盛, 等. 黄蜀葵花中黄酮类成分对前脂肪细胞增殖、分化及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4635-4641.

[6] Wei Z, Zheng D, Pi W, *et al.* Isoquercitrin restrains the

proliferation and promotes apoptosis of human osteosarcoma cells by inhibiting the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *J Bone Oncol*, 2023, 38: 100468.

[7] Huang G, Tang B, Tang K, *et al.* [Retracted] Isoquercitrin inhibits the progression of liver cancer *in vivo* and *in vitro* via the MAPK signalling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2023, 49(4): 73.

[8] Wang Y, Smith W, Hao D, *et al.* M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 459-466.

[9] Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan R A, *et al.* Curcumin alleviates renal dysfunction and suppresses inflammation by shifting from M1 to M2 macrophage polarization in daunorubicin induced nephrotoxicity in rats[J]. *Cytokine*, 2016, 84: 1-9.

[10] Miyoshi M, Liu S. Collagen-induced arthritis models[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1868: 3-7.

[11] Rosloniec E F, Whittington K, Proslovsky A, *et al.* Collagen-induced arthritis mouse model[J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(12): e313.

[12] Magari K, Nishigaki F, Sasakawa T, *et al.* Anti-arthritic properties of FK506 on collagen-induced arthritis in rats[J]. *Inflamm Res*, 2003, 52(12): 524-529.

[13] Firestein G S, McInnes I B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Immunity*, 2017, 46(2): 183-196.

[14] Weyand C M, Goronzy J J. The immunology of rheumatoid arthritis[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(1): 10-18.

[15] Littlejohn E A, Monrad S U. Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Prim Care*, 2018, 45(2): 237-255.

[16] Calabrese L H. Rheumatoid arthritis and primary care: the case for early diagnosis and treatment[J]. *J Am Osteopath Assoc*, 1999, 99(6): 313-321.

[17] Kandahari A M, Yang X, Dighe A S, *et al.* Recognition of immune response for the early diagnosis and treatment of osteoarthritis[J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 192415.

[18] Heidari B. Rheumatoid arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes[J]. *Caspian J Intern Med*, 2011, 2(1): 161-170.

[19] 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.

[20] Shen Y, Teng L, Qu Y, *et al.* Anti-proliferation and anti-inflammation effects of corilagin in rheumatoid arthritis by downregulating NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114791.

[21] Zhu W, Li X, Fang S, *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies induce macrophage subset disequilibrium in RA patients[J]. *Inflammation*, 2015, 38(6): 2067-2075.

[22] Fukui S, Iwamoto N, Takatani A, *et al.* M1 and M2 monocytes in rheumatoid arthritis: A contribution of imbalance of M1/M2 monocytes to osteoclastogenesis[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1958.