基于 IL-6/STAT3 通路研究苗药方剂“四大血”对胶原诱导性关节炎小鼠的保护作用

谢佳[1,2]，罗进芳[1,2*]

[1.贵州中医药大学，贵州 贵阳，550025；2.贵州省高等学校中药（民族药）药性与效应研究重点实验室，贵州 贵阳，550025]

摘要：目的 基于白细胞介素-6（IL-6）/STAT3 通路研究苗药方剂“四大血”（SX）对胶原诱导性关节炎（CIA）小鼠的保护作用机制。**方法** 取 40 只 C57BL/6 雄性小鼠随机均分为 4 组[正常组、模型组、SX 组和甲氨蝶呤（MTX）组]，采用鸡Ⅱ型胶原和完全弗氏佐剂混合乳化剂诱导类风湿性关节炎（RA）小鼠模型。造模成功后按照实验分组（每组 6 只）进行灌胃给药。分别检测各组小鼠的足肿胀程度、关节病理改变、关节炎指数（AI）评分、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）和 IL-6 水平、关节滑膜组织中 p-STAT3 蛋白表达情况。**结果** SX 对 RA 疾病相关指标有显著改善作用，可以降低小鼠足肿胀程度、关节炎滑膜炎症、AI 评分、TNF-α 和 IL-6 水平，抑制 p-STAT3 蛋白的表达。**结论** SX 可以发挥明显的抗 RA 作用，其可通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路蛋白（p-STAT3）表达发挥对 CIA 小鼠的保护作用。

关键词：苗药方剂；四大血；类风湿性关节炎；胶原诱导性关节炎

中图分类号： R285.5　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 2096-1413(2024)01-0001-05

Study on the protective effect of the Miao ethnomedicine recipe "Sidaxue" on collagen induced arthritis mice based on IL-6/STAT3 pathway

XIE Jia[1,2], LUO Jinfang[1,2*]

[1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; 2. Key Laboratory on the Property & Effect of Chinese Medicine (Ethnic Medicine), Guizhou Province, Guiyang 550025, China]

ABSTRACT: Objective To study the protective effect and mechanism of the Miao ethnomedicine recipe "Sidaxue" (SX) on collagen induced arthritis (CIA) mice based on the interleukin-6 (IL-6)/STAT3 pathway. Methods Forty male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups [normal group, model group, SX group and methotrexate (MTX) group], and the rheumatoid arthritis (RA) mouse model was induced by combination of chicken type Ⅱ collagen and complete Freund's adjuvant. After successful modeling, the drug was administered by gavage according to experimental groups (6 mice in each group). The degree of foot swelling, joint pathological changes, Arthritis Index (AI) score, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-6 levels, and p-STAT3 protein expression in joint synovium were detected respectively. Results SX can significantly improve RA disease-related indicators, reduce the degree of foot swelling, arthritis synovitis, AI score, TNF-α and IL-6 levels, and inhibit p-STAT3 protein expression. Conclusion SX can exert a significant anti-RA effect and exert a protective effect on mice with CIA by inhibiting the expression of IL-6/STAT3 signaling pathway protein (p-STAT3).

KEYWORDS: Miao ethnomedicine recipe; Sidaxue; rheumatoid arthritis; collagen induced arthritis

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis, RA）是一种慢性炎症性自身免疫性疾病，病因目前还未完全知晓[1]。该病严重影响患者的日常生活质量，严重者甚至最终会导致残疾和死亡。RA 发病机制尚未完全清楚，目前还未有完全治愈该疾病的药物，且临床治疗 RA 的西药存在价格昂贵、疗效不佳和副作用明显等问题[2-3]。

RA 属于中医学风湿病（痹证或痹病）范畴。当前，

DOI：10.19347/j.cnki.2096-1413.202401001

基金项目：贵州省科技计划项目（自然科学）（黔科合基础-ZK[2022]一般 477）；2022 年度贵州省卫生健康委科学技术基金项目（No.gzwkj2022-055）；贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题（No.QZYY-2021-012）；贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目[贵中医大创合字（2021）8 号]。

作者简介：谢佳（2000— ），男，学士。研究方向：中药抗炎免疫药理研究。

* 通讯作者：罗进芳，E-mail:497880740@qq.com.

中医药在 RA 的治疗中已有长期临床实践积累以及显著的治疗效果。深入研究中医药治疗 RA 的作用和机制，挖掘出治疗效果好、副作用低的中药以治疗 RA 具有重要的意义。

贵州苗药资源丰富，其中苗药方剂“四大血”（Sidaxue, SX）是贵州苗族地区特有的用于治疗炎症、通气、散血的传统苗药方，该苗药方由见血飞、黑骨藤、鸡血藤、五花血藤共同组成，临床主要将其用于治疗风湿疼痛、跌打损伤等病症。然而，目前 SX 治疗 RA 仍然处于经验用药的阶段，且对于其治疗 RA 机制的相关研究较少。

既往有学者的前期研究发现，STAT3 通路在炎症反应中具有重要调节作用，抑制 STAT3 通路可以有效抑制炎症因子产生，从而发挥肯定的抗炎作用[4]。在前期研究也发现，抑制白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）/STAT3 通路可以通过抑制巨噬细胞炎症模型分泌的炎症因子产生从而发挥抗炎作用[4]。目前未见基于 IL-6/STAT3 通路来研究苗药方剂 SX 对胶原诱导性关节炎（collagen induced arthritis, CIA）小鼠的保护作用和机制研究的相关报道。故本文首次研究苗药方剂 SX 是否通过调节 IL-6/STAT3 信号通路发挥其对 CIA 小鼠的保护作用，现将具体内容报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物饲养

本实验研究中所用的实验动物为 C57BL/6 小鼠（雄性，40 只，7~8 周龄），SPF 级，体重 18~20 g，均购自斯贝福（北京）生物技术有限公司[许可证号：SCXK（京）2019-0010]。本研究中所有动物实验研究经贵州中医药大学动物实验伦理审查委员会批准后进行。

1.2 药物、主要试剂及仪器

苗药方剂 SX 是由见血飞、黑骨藤、鸡血藤、五花血藤 4 味藤本药材共同组成，由贵州中医药大学苗医药教研室鉴定后提供，以用于本次实验研究。SX 药液的制备方法按照参考文献[5]，其中见血飞、黑骨藤、鸡血藤、五花血藤的比例为 15:8:22:15，共取 2 000 g。置于水煎锅并加入适量水，煎煮 3 次（时间分别为 1 h、30 min、30 min）后形成浓缩液 500 mL，此时浓度为 4 000 g/L，4 ℃冰箱保存；甲氨蝶呤（methotrexate, MTX）（批号：SM9600）购自北京索莱宝科技有限公司，100 mg；鸡Ⅱ型胶原（批号：20012）购自美国 Chondrex 公司；完全弗氏佐剂（批号：7001）购自美国 Chondrex 公司；小鼠 IL-6 和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α, TNF-α）试剂盒（ELISA）购自杭州联科生物技术有限公司；小鼠单抗 β-actin 购自武汉三鹰生物技术有限公司（货号：66009-1-Ig）；HRP 标记羊抗小鼠二抗购自武汉博士德生物工程有限公司（货号：BA1051）；HRP 标记羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司，蛋白 marker（10-250KD）购自海利克思，兔单抗 p-STAT3（Y705）购自美国 CST 公司（货号：9145）；酶标仪购自 Thermo Fisher 公司（型号：1510）。

1.3 RA 模型构建和给药处理

将小鼠随机均分为 4 组后进行标记编号，实验分组为正常组、模型组、SX 组和 MTX 组。提前准备好经高压蒸汽灭菌的研钵，按照体积比例 1:1，分别取 2.5 mL 的鸡Ⅱ型胶原和完全弗氏佐剂放置于冰浴状态下充分乳化后备用。正常组小鼠分别在其尾根部皮下注射 100 μL 生理盐水，剩余小鼠每只均在其尾根部皮下注射 100 μL 鸡Ⅱ型胶原与完全弗氏佐剂混合乳化剂，注射完成后即完成第一次免疫。1 周后按照第一次免疫的方法进行操作，完成第二次免疫诱导造模。取造模成功后[参考已经发表的文献[6]评分标准：关节炎指数（Arthritis Index, AI）评分>2 分判断为造模成功]的小鼠进行随机分组（每组 6 只），分为模型组、SX 组和 MTX 组，SX 组按照 20 g/kg（参考已经发表的文献[7]）的给药剂量进行 SX 灌胃治疗，MTX 组按照 1 mg/kg 的剂量进行 MTX 灌胃治疗，正常组和模型组按照 0.1 mL/10 g 的剂量给予生理盐水，1 次/d，连续灌胃治疗 21 d。

1.4 测定小鼠足肿胀值、AI 评分、HE 染色

在 CIA 小鼠模型建立（参考文献[6]）前用游标卡尺测量其右后足肿胀厚度数值，且造模完成后按照实验分组进行给药，随后每隔 1 周对其足肿胀值进行测量；造模成功后定期观察并记录 CIA 小鼠四肢足肿胀情况并进行评分（参考文献[6]中的 AI 评分量表要求），每隔 1 周记录 1 次评分。取小鼠膝关节，去除多余的皮肤和肌肉组织，于 4%多聚甲醛中固定 24 h，脱钙后，乙醇梯度脱水，石蜡包埋，切片，采用 HE 染色后，在显微镜下观察关节组织病理改变情况。

1.5 ELISA 测定血清中 TNF-α 和 IL-6 含量

最后 1 周给药结束后，对小鼠先进行摘除眼球取血，然后脱颈椎处死，将所取血液于室温放置 1 h，然后离心 10 min（3 000 rpm），随后小心吸取离心后的上清液。按 ELISA 试剂盒检测说明书的操作方

法检测小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 含量，使用酶标仪于 450 nm 波长测量光密度（optical density, OD）值，并根据公式计算各组小鼠血清样品中 TNF-α 和 IL-6 的浓度。

1.6 Western blotting 检测小鼠关节组织中 p-STAT3 蛋白表达

取各组小鼠后腿，去掉多余的肌肉组织后暴露关节组织，按照试剂盒说明书用 RIPA 裂解液提取小鼠滑膜组织（避免蛋白降解，需要在冰上提取蛋白）。BCA 法测定小鼠关节滑膜组织的总蛋白浓度，随后加入蛋白上样缓冲液和蛋白样品充分混匀后将样品置于沸水中煮 5~10 min，随后用 10% PAGE 胶电泳分离不同分子量的蛋白后，将蛋白转印到PVDF膜上，5%脱脂奶粉室温封闭 1~2 h，分别加入 p-STAT3 和 STAT3 一抗（1:500 稀释）及 β-actin 一抗（1:500 稀释），4 ℃摇床孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后（5 min/次），加入 HRP 标记二抗，室温下孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次后（5 min/次），采用电化学发光法显影，拍照保存。采用 Image J 软件分析条带灰度值，以 β-actin 作为内参对照，分析比较目的蛋白（p-STAT3）的相对表达水平变化。

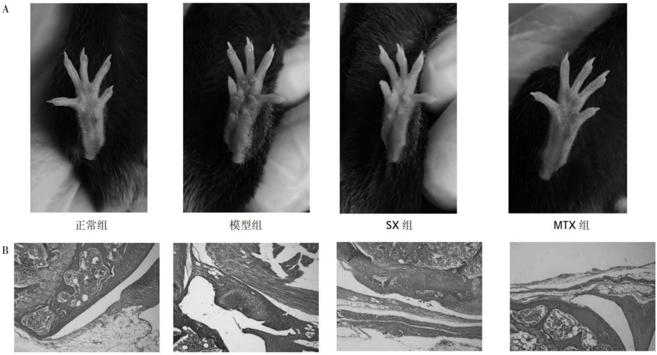
1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism9 软件处理数据，计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，使用单因素方差分析进行多重比较，两组间比较采用 t 检验，以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的足部肿胀程度比较

造模成功后，除正常组小鼠足部未有较大变化外，其余组别小鼠足部均出现不同程度的红肿。如图 1A 所示，与正常组小鼠足部比较，其余各组均存在不同程度的足趾肿胀，其中模型组小鼠足部的肿胀程度最为严重。图 1B 结果显示，正常组小鼠的关节滑膜组织未见炎症细胞和滑膜增生；模型组小鼠的关节滑膜组织可见明显的滑膜增生，软骨塌陷，淋巴细胞、浆细胞浸润；SX 组小鼠的关节滑膜组织关节腔大致正常，滑膜细胞部分增生，但滑膜增生程度明显低于模型组；MTX 组小鼠的关节滑膜组织未见明显的滑膜增生，关节腔大致正常。



正常组　　模型组　　SX 组　　MTX 组

正常组　　模型组　　SX 组　　MTX 组

图 1　各组小鼠足部肿胀程度和关节滑膜组织病理形态学变化比较（HE，100×）

给药 7、14、21 d 后，SX 组与 MTX 组的足肿胀厚度明显小于模型组，差异具有统计学意义（P<0.05，表 1）。

2.2 各组小鼠不同时间点的 AI 评分比较

给药前，模型组、SX 组、MTX 组的 AI 评分均高于正常组（P<0.01）；给药 7、14、21 d 后，SX 组与MTX 组的 AI 评分均低于模型组，差异具有统计学意义（P<0.01）。见表 2。

2.3 各组小鼠血清中的 TNF-α、IL-6 水平比较

模型组的 TNF-α、IL-6 水平高于正常组（P<0.01）；SX 组和 MTX 组的 TNF-α、IL-6 水平明显低于模型组（P<0.05）。见图 2。

表 1　各组小鼠不同时间点的足肿胀厚度比较（n=6，$\bar{x}\pm s$，mm）

组别	给药前	给药 7 d 后	给药 14 d 后	给药 21 d 后
正常组	2.41±0.04	2.41±0.02	2.42±0.03	2.43±0.05
模型组	2.64±0.10*	2.81±0.10**	2.91±0.10**	2.94±0.05**
SX 组	2.61±0.06*	2.65±0.08$^{*\#}$	2.71±0.10$^{**\#}$	2.73±0.10$^{**\#}$
MTX 组	2.59±0.09*	2.62±0.11$^{*\#}$	2.65±0.12$^{*\#}$	2.68±0.11$^{*\#}$

注：与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01；与模型组比较，$^{\#}$P<0.05。

表 2　各组小鼠不同时间点的 AI 评分比较（n=6，$\bar{x}\pm s$，分）

组别	给药前	给药 7 d 后	给药 14 d 后	给药 21 d 后
正常组	0	0	0	0
模型组	4.67±1.40**	7.25±3.83**	7.75±1.54**	6.50±1.38**
SX 组	3.00±1.10**	3.83±0.98$^{**\#\#}$	4.17±0.41$^{**\#\#}$	3.67±0.52$^{**\#\#}$
MTX 组	2.50±0.55**	3.69±1.21$^{**\#\#}$	3.92±0.80$^{**\#\#}$	3.50±0.55$^{**\#\#}$

注：与正常组比较，**P<0.01；与模型组比较，$^{\#\#}$P<0.01。

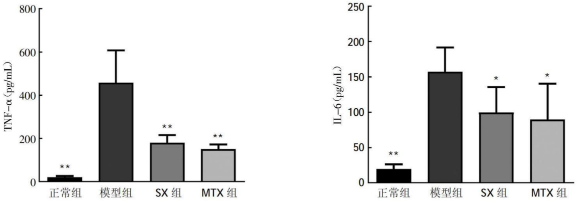


图 2　各组小鼠血清中的 TNF-α、IL-6 水平比较

注：与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。

2.4 各组小鼠关节滑膜组织 p-STAT3 蛋白表达水平比较

模型组小鼠关节滑膜组织中 p-STAT3 蛋白相对表达水平明显高于正常组（P<0.01）；SX 组和 MTX 组小鼠关节滑膜组织中 p-STAT3 蛋白相对表达水平明显低于模型组（P<0.05）。见图 3。

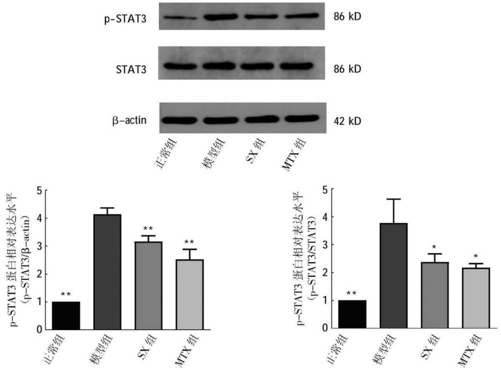


图 3　各组小鼠关节滑膜组织 p-STAT3 蛋白表达水平比较

注：与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。

3 讨论

RA 是一种慢性炎性自身免疫系统性疾病，其病理特征主要包括关节滑膜持续炎症、关节软骨破坏等[8]。近年来，RA 发病率和致残率也逐渐呈上升趋势，严重情况下会导致患者出现残疾和死亡。MTX 是国内外用于临床治疗 RA 的一线药物，但是不良反应较多[9]，本研究将其作为阳性药进行实验研究。

IL-6/STAT3信号通路是通过IL-6细胞因子激活，与其相应的受体结合后，Janus激酶（JAK）就会被激活[10]，从而在细胞质和细胞核之间交换信号，介导免疫抑制、血管生成、转移、增殖和生存的信号通路。IL-6可以通过与其同源膜受体结合而使JAKs磷酸化，继而激活STAT3，p-STAT3蛋白是通路激活的关键信号蛋白。

贵州省苗药资源丰富，其中苗药方剂SX作为贵州省苗族地区特有的用于治疗炎症、风湿、疼痛的特色民族药，对RA具有确切的治疗效果，但是目前SX治疗RA仍处于经验用药阶段，其具体作用机制尚不完全清楚。吴宁等[11]研究发现，SX可抑制MH7A细胞增殖、侵袭，减轻炎症反应，降低炎症发展趋势。李欣芯等[12]研究发现，SX对CIA大鼠具有明显保护作用，其主要是通过抑制NF-κB通路中关键蛋白（磷酸化的p65蛋白）的表达来发挥其对CIA大鼠的保护作用。

前期有临床研究发现，调节IL-6/STAT3通路可以有效减少炎症因子产生从而发挥抗炎作用[13]。中医药具有辨证治疗疾病的优势，不仅可以减轻患者的痛苦、延缓病情，而且副作用小[14]。SX具有通气散血、行瘀止痛的功效，是治疗RA的贵州苗族特色药方，但目前未见基于IL-6/STAT3通路来研究SX对CIA小鼠保护作用和机制研究的相关报道。故本研究以CIA小鼠为研究对象，首次研究SX是否可以通过调节IL-6/STAT3通路发挥对CIA小鼠的保护作用。

本研究发现，SX和阳性药MTX均可以明显降低小鼠的关节肿胀度、AI评分，改善关节病理情况，且可以明显抑制RA模型组小鼠血清中增加的炎症细胞因子TNF-α和IL-6的产生，说明SX和MTX有同样明确的抗RA效果。此外，SX可以明显抑制RA模型组小鼠关节滑膜组织中高表达的p-STAT3蛋白，而p-STAT3蛋白是通路激活的关键信号蛋白，既往有研究证明，IL-6通过活化STAT3而加重RA滑膜炎[15]，抑制p-STAT3蛋白高表达可以发挥治疗RA的作用，故本研究结果初步说明SX很可能通过抑制IL-6/STAT3信号通路而发挥其抗炎和抗RA作用。

综上所述，苗药方剂SX可以发挥明显的抗RA作用，进一步的机制研究发现，SX可以通过抑制IL-6/STAT3信号通路蛋白（p-STAT3）表达，进而发挥抗炎和抗RA作用。本研究为SX临床上治疗RA等炎症相关疾病提供了新的科学实验研究依据，但本研究也有一定局限性，比如使用的药物剂量单一，目前得出的只是初步的研究结论，后续实验需要采用不同梯度剂量的SX来进行更深层的相关机制研究。总之，SX治疗RA的机制仍需要后续进一步研究和探索。

参考文献：

[1] CONIGLIARO P,TRIGGIANESE P,DE MARTINO E,et al. Challenges in the treatment of rheumatoid arthritis[J].Autoimmun Rev,2019,18(7):706-713.

[2] SERHAL L,EDWARDS CJ.Upadacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis[J].Expert Rev Clin Immunol,2019,15(1):13-25.

[3] 陈宏道,丁一帆,谢师旅,等.中医药治疗类风湿关节炎临床研究进展[J].江西中医药,2023,54(4):73-76.

[4] LUO JF,ZHOU H,LIO CK.Akebia saponin D inhibits the inflammatory reaction by inhibiting the IL-6-STAT3-DNMT3b axis and activating the Nrf2 pathway[J].Molecules,2022,27(19):6236.

[5] 袁桃花,李欣芯,陈丽亚,等.苗药验方"四大血"对胶原诱导关节炎大鼠IL-17和VEGF表达的影响[J].贵州医科大学学报,2019,44(6):664-669.

[6] 胡明月,朱俊秀,徐艳明,等.盐酸青藤碱治疗性给药对胶原诱导性关节炎小鼠的保护作用[J].中药新药与临床药理,2022,33(1):33-38.

[7] 梁玺,覃淇,张艺馨,等.苗药验方"四大血"对类风湿性关节炎大鼠关节炎症的作用及机制[J].贵州医科大学学报,2023,48(7):759-766.

[8] LIHUA C,ZHIYIN T.Microplastics aggravates rheumatoid arthritis by affecting the proliferation/migration/inflammation of fibroblast-like synovial cells by regulating mitochondrial homeostasis[J].Int Immunopharmacol,2023,120:110268.

[9] 蔡阳,叶梅.甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的常见不良反应分析[J].中国药物滥用防治杂志,2021,27(3):345-348.

[10] GARBERS C,APARICIO-SIEGMUND S,ROSE-JOHN S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition[J].Curr Opin Immunol,2015,34:75-82.

[11] 吴宁,袁桃花,姬进忠,等.苗药验方四大血对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡和焦亡的影响[J].南方医科大学学报,2021,41(10):1473-1483.

[12] 李欣芯,石光玉,陶然,等.苗药四大血对胶原诱导性关节炎大鼠的作用研究[J].安徽医科大学学报,2019,54(7):1071-1075.

[13] 吴东升,曹晖,张彧,等.基于IL-6/STAT3通路探讨芍药汤对溃疡性结肠炎Th17/Treg平衡的调节机制[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(9):46-52.

[14] 王岳玲,陈家平,王玲,等.温针灸联合子午流注针法治疗膝骨关节炎的临床观察[J].广州中医药大学学报,2022,39(5):1078-1083.

[15] GAO W,MCCORMICK J,CONNOLLY M,et al.Hypoxia and STAT3 signalling interactions regulate pro-inflammatory pathways in rheumatoid arthritis[J].Ann Rheum Dis,2015,74(6):1275-1283.