

网络出版时间: 2025-06-30 14:29:02 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0856.001>

黄芪提取物对类风湿关节炎继发肺间质病变大鼠肺损伤的影响及机制

赵悦 杨金良 罗 寰 席文秀 王珺璐 郑学军

(河北北方学院附属第一医院风湿免疫科 张家口 075000)

摘要 目的 研究黄芪提取物(AME)对类风湿关节炎继发肺间质病变(RA-ILD)大鼠肺损伤及骨髓分化因子88(MyD88)/Toll样受体4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)p65通路的影响。方法 将SD大鼠随机分为对照组、RA-ILD组、AME低剂量组(5 g/L)、AME高剂量组(10 g/L)、AME高剂量+脂多糖(LPS)组(10 g/L AME + 1 mg/L TLR4激活剂LPS)。除对照组外,其余组大鼠均通过注射牛Ⅱ型胶原蛋白、弗氏完全佐剂和博莱霉素构建RA-ILD模型;检测大鼠关节炎指数、肺组织湿干重比;ELISA检测肺泡灌洗液炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;苏木精-伊红染色观察大鼠膝关节组织和肺组织病理学变化;Western blot检测大鼠肺组织自噬因子Beclin 1、微管相关蛋白1A/1B-轻链3(LC3)Ⅱ/I及MyD88/TLR4/NF- κ B p65通路相关蛋白表达。结果 与对照组比较,RA-ILD组大鼠膝关节组织和肺组织受损,关节炎指数、肺组织湿干重比、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平、MyD88、TLR4蛋白表达水平及p-NF- κ B p65/NF- κ B p65比值升高($P < 0.01$)。Beclin 1、LC3 Ⅱ/I蛋白表达降低($P < 0.01$)。与RA-ILD组比较,AME低剂量组、AME高剂量组大鼠组织损伤减轻,关节炎指数、肺组织湿干重比、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平、MyD88、TLR4蛋白表达水平及p-NF- κ B p65/NF- κ B p65比值呈剂量依赖性降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Beclin 1、LC3 Ⅱ/I蛋白表达呈剂量依赖性升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与AME高剂量组比较,AME高剂量+LPS组大鼠组织损伤加重,关节炎指数、肺组织湿干重比、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平、MyD88、TLR4蛋白表达水平及p-NF- κ B p65/NF- κ B p65比值升高($P < 0.01$)。Beclin 1、LC3 Ⅱ/I蛋白表达降低($P < 0.01$)。结论 AME抑制MyD88/TLR4/NF- κ B p65通路,缓解RA-ILD大鼠肺损伤。

关键词 黄芪提取物;类风湿关节炎;肺间质病变;肺损伤;MyD88/TLR4/NF- κ B p65通路;炎症;自噬

中图分类号 R 593.22; R 563.13

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)07-1173-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.002

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种全身性免疫性疾病,可延伸到关节之外,引发多种并发症。肺部有丰富的结缔组织和血液供应,是常见的受累器官^[1]。肺间质病变(interstitial lung disease, ILD)是RA的一种严重并发症,由于缺乏确切病因和明显的临床症状,RA继发ILD(RA-ILD)在早期阶段经常难以发现,晚期时肺纤维化已经非常严峻^[1-2]。现有治疗方法效率低、成本高、副作用严重,迫切需要研发新的替代药物和靶点。黄芪是一种常用的中药,具有广泛的生物学功能,包括抗炎、抗氧化、免疫调节、自噬调节、抗纤维化等^[3]。通痹颗粒用于治疗RA-ILD,其主要成分之一为黄芪^[4]。骨髓分化因子88(myeloid differentiation factor 88,

MyD88)/Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路能够加重炎症和损伤,抑制该信号通路可以缓解RA大鼠炎症^[5]。研究^[6]报道,黄芪甲苷IV能够通过抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路抑制炎症和氧化应激反应,进而减轻PM2.5诱导的大鼠肺损伤。但黄芪提取物(astragalus mongholicus extract, AME)能否调节MyD88/TLR4/NF- κ B p65通路减轻RA-ILD大鼠肺损伤尚未可知,因此,该研究通过注射牛Ⅱ型胶原蛋白、弗氏完全佐剂和博莱霉素构建大鼠RA-ILD模型,探讨AME对RA-ILD大鼠肺损伤的影响及可能机制,为确定更精确的RA-ILD治疗靶点提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD雄性大鼠50只,体重160~180 g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物合格证号为SCXK(鲁)2022-0006。将大鼠

2025-03-23 接收

基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(编号:20231416)

作者简介:赵悦,女,主治医师,通信作者, E-mail: zy18732367252@

126.com

关在一个光/暗循环 12 h/12 h、湿度 40%~60%、温度(25±2)℃的房间里适应培养 1 周。本研究已获得河北北方学院附属第一医院医学伦理委员会批准,批准号为 2023034。

1.1.2 主要试剂 牛Ⅱ型胶原(货号: MYM-MC7806, 北京博奥派克生物科技有限公司); 弗氏完全佐剂(货号: YB123532, 湖南韵邦生物科技股份有限公司); 博莱霉素(货号: R25001, 南京沃博生物科技有限公司); AME(货号: 84687-43-4, 纯度: 98%以上, 成都锦泰和医药化学技术有限公司); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(货号: S11060, 上海源叶生物科技股份有限公司); 白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(货号: EK301B、EK306、EK382, 杭州联科生物技术股份有限公司); 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色液(货号: G1120, 北京索莱宝科技有限公司); BCA 蛋白质定量试剂盒(货号: ml095441, 上海酶联生物科技有限公司); 兔抗鼠一抗: GAPDH、Beclin 1、LC3 II/I、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65, 小鼠抗大鼠一抗: TLR4 及羊抗兔、羊抗小鼠二抗(货号: ab181602、ab207612、ab192890、ab219413、ab16502、ab239882、ab8376、ab205718、ab205719, 英国 Abcam 公司); 发光 HRP 底物(货号: WBKLS0100, 美国密理博公司)。

1.1.3 主要仪器 恒温烘箱(型号: DHG-9240A, 上海一恒科学仪器有限公司); 光学显微镜(型号: DM3000, 德国 Leica 公司); 酶标仪(型号: Synergy NEO2 HTS, 美国 BioTek 公司); 电子分析天平(型号: QL-E120A, 厦门莱斯德科学仪器有限公司); 离心机(型号: TGL20M, 江苏新春兰科学仪器有限公司); 凝胶成像仪(型号: ChemiDoc XRS+, 美国 Bio-rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型构建与分组 将大鼠随机分为对照组、RA-ILD 组、AME 低剂量组、AME 高剂量组、AME 高剂量+LPS 组, 每组 10 只。除对照组, 其余大鼠均用牛Ⅱ型胶原和弗氏完全佐剂制备 1 g/L 乳化剂, 沿大鼠尾部多点皮下注射 200 μ L 乳化剂, 关节炎指数评分>4 分且足部明显肿胀的大鼠被认为已成功构建 RA 模型。第 13 天, 将 RA 建模成功的大鼠通过气管内注射 100 μ L 博莱霉素(2.5 mg/kg)诱导 ILD, 对照组大鼠注射 100 μ L 0.9% 氯化钠溶液^[7]。博莱霉素注射次日, AME 低、高剂量组分别灌胃 5、

10 g/L 的 AME^[8], AME 高剂量+LPS 组灌胃 10 g/L AME 和 1 mg/L LPS, 对照组和 RA-ILD 组灌胃等量的 0.9% 氯化钠溶液 2 次/d, 持续 28 d。

1.2.2 关节炎指数评分 观察各组大鼠关节红肿程度, 并对每只大鼠的 4 只爪子进行评分, 评分标准如下: 正常为 0 分; 1 分表示 1 个关节红斑或肿胀; 2 分表示 2 个或多个关节肿胀; 3 分表示所有关节肿胀; 4 分表示强直或畸形。每只大鼠 4 只爪子的累积得分即为关节炎指数^[9]。

1.2.3 肺组织湿干重比 处死大鼠, 切除右肺, 并立即称湿重。将右肺置于 60℃ 的恒温烘箱中 48 h, 再次称重为干重。计算肺组织湿干重比。

1.2.4 炎症因子水平检测 用钝头穿刺针缓慢注射 2 mL 预冷 0.9% 氯化钠溶液进行左支气管肺泡灌洗。灌洗时间 3 min, 灌洗 2 次, 将肺泡灌洗液在 4℃、12 000 r/min 下离心 10 min。收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒测定上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平。

1.2.5 HE 染色 HE 染色观察小鼠膝关节和左肺的病理损伤。取小鼠的膝关节 4% 多聚甲醛溶液固定, 置于室温下的脱钙溶液中脱钙 30 d, 取出膝关节脱水并用二甲苯清洗; 1/2 左肺组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 梯度乙醇脱水。将脱水后的膝关节和左肺包埋在石蜡中, 切片, 烘烤, 进行 HE 染色, 自然风干, 在光学显微镜下观察病理变化。

1.2.6 Western blot 检测自噬因子与 MyD88/TLR4/NF- κ B p65 通路相关蛋白表达 RIPA 从剩余左肺组织中提取蛋白质, 测定浓度, 电泳分离, 转移到聚偏二氟乙烯膜上。室温脱脂乳封闭 1 h, 与一抗(Beclin 1、LC3 II/I、MyD88、TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 和 GAPDH, 1:1 000) 4℃ 孵育过夜。第 2 天与二抗(1:30 000) 室温孵育 1 h。用 HRP 底物对蛋白质可视化, 使用 ImageJ 软件进一步定量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件分析数据, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间和两两进一步比较分别采用单因素方差分析和 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠关节炎指数比较 RA-ILD 组大鼠关节炎指数相较于对照组升高($P < 0.01$); AME 低剂量组、AME 高剂量组关节炎指数相较于 RA-ILD 组降低($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性; AME 高剂量+LPS 组关节炎指数相较于 AME 高剂量组升高($P <$

0.01)。见图1。

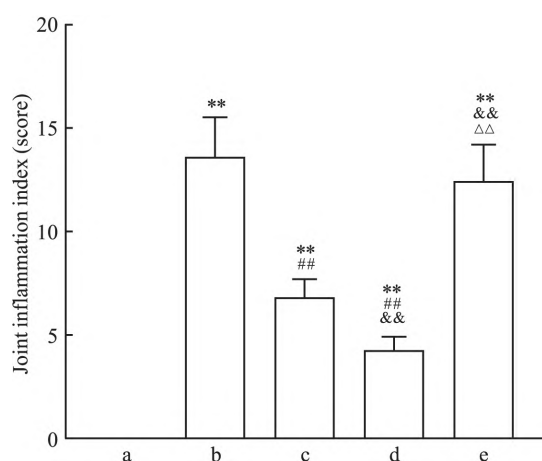


图1 各组大鼠关节炎症评分比较($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Fig.1 Comparison of joint inflammation scores of rats

in each group($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

a: Control group; b: RA-ILD group; c: Low-dose AME group; d: High-dose AME group; e: High-dose AME + LPS group; ** $P < 0.01$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs RA-ILD group; && $P < 0.01$ vs Low-dose AME group; △△ $P < 0.01$ vs High-dose AME group.

2.2 各组大鼠肺组织湿干重比 RA-ILD 组大鼠肺组织湿干重比相较于对照组升高($P < 0.01$); AME 低剂量组、AME 高剂量组湿干重比相较于 RA-ILD 组降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性; AME 高剂量 + LPS 组湿干重比相较于 AME 高剂量组升高($P < 0.01$)。见图2。

2.3 各组大鼠炎症因子水平比较 RA-ILD 组大鼠炎症因子水平相较于对照组升高($P < 0.01$); AME 低剂量组、AME 高剂量组炎症因子水平相较于 RA-ILD 组降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性; AME 高剂量 + LPS 组炎症因子水平相较于 AME 高剂量组升高($P < 0.01$)。见表1。

2.4 各组大鼠膝关节、肺组织病理学变化 对照组大鼠膝关节软骨结构正常; RA-ILD 组大鼠存在大量

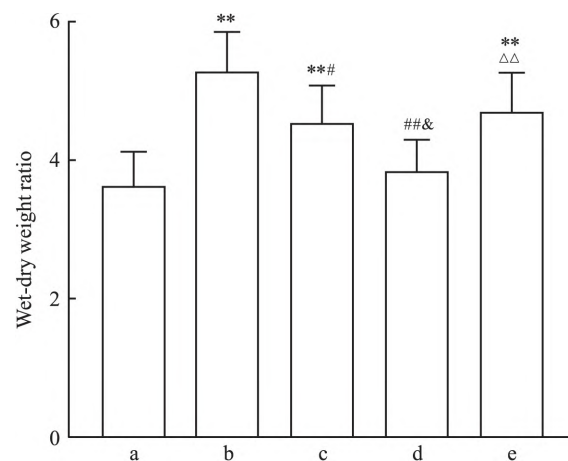


图2 各组大鼠肺组织湿干重比较($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Fig.2 Comparison of lung tissue wet-dry weight

in each group($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

a: Control group; b: RA-ILD group; c: Low-dose AME group; d: High-dose AME group; e: High-dose AME + LPS group; * $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs RA-ILD group; & $P < 0.05$ vs Low-dose AME group; △△ $P < 0.01$ vs High-dose AME group.

单核细胞浸润, 软骨下骨质侵蚀, 浅表软骨损伤, 关节间隙紊乱, 出现部分骨强直; AME 低剂量组、AME 高剂量组与 RA-ILD 组比较, 滑膜中单核细胞浸润减少, 侵蚀减轻, 软骨变厚; AME 高剂量 + LPS 组上述组织损伤较 AME 高剂量组加重。见图3。

对照组的肺组织细胞、肺泡大小正常, 毛细血管无增大; RA-ILD 组肺组织水肿, 肺泡腔内可见中性粒细胞, 肺泡壁在一定程度上增厚, 纤维化严重; AME 低剂量组、AME 高剂量组肺泡结构相对完整, 肺组织损伤减轻; AME 高剂量 + LPS 组组织损伤较 AME 高剂量组加重。见图3。

2.5 各组大鼠自噬因子与 MyD88/TLR4/NF-κB p65 通路相关蛋白表达比较 RA-ILD 组大鼠 Beclin 1、LC3 II / I 蛋白表达水平相较于对照组降低($P < 0.01$), MyD88、TLR4、p-NF-κB p65/NF-κB p65 水平

表1 各组大鼠炎症因子水平($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Tab.1 Levels of inflammatory factors in rats in each group($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Group	IL-1β (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF-α (μg/L)
Control	26.78 ± 2.82	22.73 ± 4.37	63.56 ± 8.37
RA-ILD	101.69 ± 14.06 **	86.04 ± 10.53 **	251.67 ± 29.39 **
Low-dose AME	88.72 ± 10.71 * **	60.92 ± 8.73 * **	202.18 ± 23.61 * **
High-dose AME	46.80 ± 5.06 * ** &&	30.97 ± 5.31 * ** &&	120.34 ± 14.58 * ** &&
High-dose AME + LPS	93.07 ± 10.09 * ** △△	75.98 ± 8.06 * ** && △△	243.37 ± 26.15 * ** && △△

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs RA-ILD group; & $P < 0.01$ vs Low-dose AME group; △△ $P < 0.01$ vs High-dose AME group.

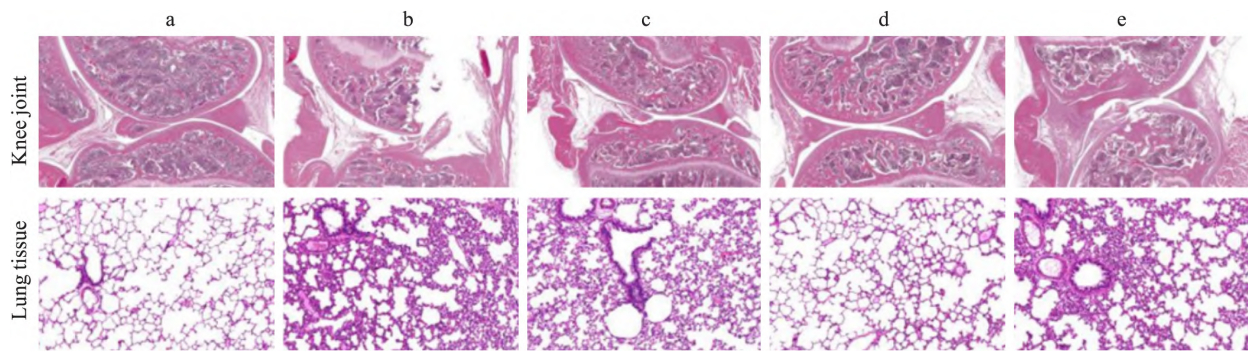


图3 各组大鼠膝关节、肺组织病理染色图 HE ×100

Fig. 3 Pathological staining of knee joint and lung tissues of rats in each group HE ×100

a: Control group; b: RA-HLD group; c: Low-dose AME group; d: High-dose AME group; e: High-dose AME + LPS group.

表2 各组大鼠肺组织中相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Tab. 2 Comparison of related protein expression in lung tissues of rats in all groups($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Group	Beclin1	LC3 II / I	MyD88	TLR4	p-NF-κB p65 / NF-κB p65
Control	0.94 ± 0.17	0.88 ± 0.15	1.26 ± 0.18	1.17 ± 0.23	0.22 ± 0.05
RA-HLD	0.28 ± 0.06 **	0.29 ± 0.05 **	2.78 ± 0.34 **	2.98 ± 0.45 **	0.89 ± 0.15 **
Low-dose AME	0.45 ± 0.08 ** #	0.47 ± 0.07 ** ##	1.72 ± 0.25 ** ##	1.87 ± 0.28 ** ##	0.66 ± 0.14 ** ##
High-dose AME	0.79 ± 0.12 * ## &	0.68 ± 0.10 * ## &	1.36 ± 0.22 ## &	1.45 ± 0.24 ## &	0.46 ± 0.06 * * ## &
High-dose AME + LPS	0.32 ± 0.09 * * △△	0.33 ± 0.08 * * & △△	2.55 ± 0.33 * * & △△	2.63 ± 0.35 * * & △△	0.83 ± 0.13 * * & △△

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs RA-HLD group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs Low-dose AME group; △△ $P < 0.01$ vs High-dose AME group.

升高($P < 0.01$); AME 低剂量组、AME 高剂量组 Beclin 1、LC3 II / I 蛋白表达水平较 RA-HLD 组呈剂量依赖性升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ,MyD88、TLR4、p-NF-κB p65 / NF-κB p65 水平呈剂量依赖性降低($P < 0.01$); AME 高剂量 + LPS 组 Beclin 1、LC3 II / I 蛋白表达水平相较于 AME 高剂量组降低($P < 0.01$) ,MyD88、TLR4、p-NF-κB p65 / NF-κB p65 水平升高($P < 0.01$)。见图4、表2。

3 讨论

RA 主要特征包括关节内滑膜的炎症、增生,进而导致软骨与骨骼的损伤和破坏、关节畸形、功能丧失^[1-2]。RA 与氧化应激、炎症反应等相关细胞因子的增加有关^[10]。同时,自噬会降解 RA 患者功能失调的细胞成分,减轻关节损伤^[11]。RA-HLD 是一种由关节炎反应引起的肺部疾病,主要病理表现包括局部成纤维细胞增殖向肌成纤维细胞转化、上皮间质转化、激活促纤维化炎症因子、细胞外基质积聚、肺组织肺泡囊腔样扩张的发展和炎症,这些变化导致肺纤维化、肺结构变形、肺部气体交换区域有效面积减小和肺功能丧失,最终使大多患者死于缺氧性呼吸衰竭^[11]。据报道,肺纤维化的病理进展是由细胞衰老、凋亡、自噬驱动的^[12]。因此,寻找有效改善

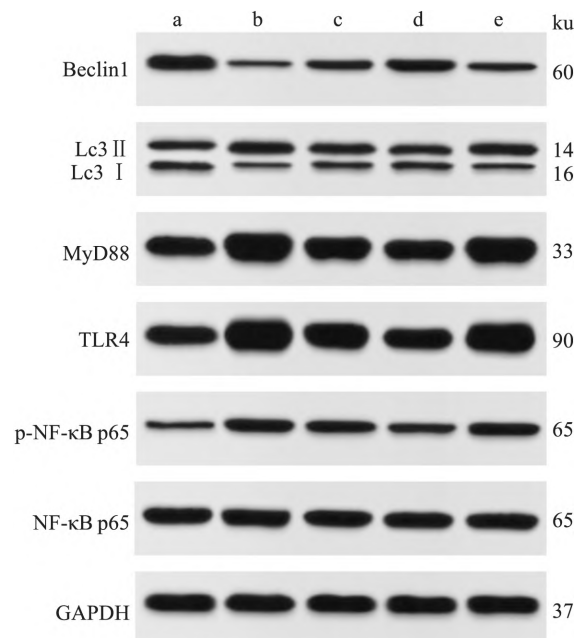


图4 各组大鼠肺组织中自噬因子与 MyD88/TLR4/NF-κB p65 通路相关蛋白表达

Fig. 4 The expression of autophagy factor and MyD88/TLR4/NF-κB p65 pathway related proteins in lung tissues of rats in each group

a: Control group; b: RA-HLD group; c: Low-dose AME group; d: High-dose AME group; e: High-dose AME + LPS group.

肺纤维化、促进自噬的药物对治疗 RA-ILD 至关重要。

黄芪的主要药用成分包括黄芪甲苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、黄芪糖蛋白,其具有抗炎、免疫调节、自噬调节、抗纤维化、改善心肺功能和抗衰老的生物学作用。有研究显示,黄芪甲苷通过抑制氧化应激和炎症反应来抑制肺纤维化^[12],而黄芪总黄酮通过抗炎减轻 RA 的病理进展^[13]。此外,含有黄芪的中药方剂玉屏风可以缓解肺纤维化,搜风散结方可用于治疗 RA^[10-11]。上述结果均表明黄芪在 RA 以及 ILD 中均具有重要作用。因此,本研究利用不同剂量的 AME 治疗 RA-ILD 大鼠,结果发现,大鼠关节炎指数、肺组织湿干重比、肺泡灌洗液炎症因子水平较 RA-ILD 组呈剂量依赖性降低,Beclin 1、LC3 II / I 蛋白表达呈剂量依赖性升高,组织损伤减轻,表明 AME 可以诱导自噬,改善肺损伤,治疗 RA-ILD 大鼠。

MyD88 在气道炎症反应方面发挥重要作用,是炎性肺病的治疗靶点^[14]。TLR4 调节先天免疫系统和适应性免疫系统,启动炎症信号级联,刺激促炎细胞因子的释放,在肺损伤的发展中至关重要^[15]。已证明 TLR4 能够通过 MyD88 依赖途径激活下游效应核因子 NF- κ B 磷酸化,激活炎症,并导致对氧化应激的过度反应^[16-17]。研究^[16-17]显示,黄芪赤风汤负调控 MyD88/TLR4/NF- κ B 信号通路以减轻急性肾损伤的炎症和纤维化,黄芪多糖抑制 TLR4/JNK/NF- κ B/MyD88 通路减轻乙醇诱导的肝纤维化。在 RA 中,抑制 TLR2/4-MyD88-NF- κ B 信号通路可以缓解 RA 大鼠的疼痛反应和炎症^[18-19]。以上研究表明,MyD88/TLR4/NF- κ B 通路已作为治疗 RA 和肺纤维化的一种有前景的治疗方法。本研究结果发现,RA-ILD 大鼠 MyD88、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 水平较高;AME 治疗后 MyD88、TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 水平降低,表明 AME 对 MyD88/TLR4/NF- κ B p65 信号通路具有抑制作用。LPS 能够激活 TLR4/NF- κ B 通路,进而导致促炎因子级联反应,该过程随着免疫细胞的浸润和激活而启动^[20]。为研究 AME 改善 RA-ILD 大鼠肺损伤是否与 MyD88/TLR4/NF- κ B p65 信号通路有关,本研究用 TLR4 激活剂 LPS 联合高剂量 AME 治疗大鼠,结果发现 LPS 逆转了 AME 对 RA-ILD 大鼠的治疗作用。由此说明,AME 改善 RA-ILD 大鼠肺损伤可能与抑制 MyD88/TLR4/NF- κ B p65 信号通路的作用及调节免疫细胞的功能有关。

综上所述,AME 可能通过抑制 MyD88/TLR4/NF- κ B p65 信号通路来改善 RA-ILD 大鼠肺损伤。对于本实验中使用的 RA-ILD 动物模型,建模和治疗观察时间仅持续了 41 d,而临床治疗 RA-ILD 是一个长期的过程,因此,未来的研究需要评估黄芪在 RA-ILD 动物模型中改善肺损伤的持续疗效。

参考文献

- [1] Liu N, Fan X, Shao Y, et al. Resveratrol attenuates inflammation and fibrosis in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease via the AKT/TMEM175 pathway [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 457. doi: 10.1186/s12967-024-05228-1.
- [2] Lin X, Chen J, Tao C, et al. Osthole regulates N6-methyladenosine-modified TGM2 to inhibit the progression of rheumatoid arthritis and associated interstitial lung disease [J]. *Med Comm* (2020), 2023, 4(2): e219. doi: 10.1002/mco2.219.
- [3] Sun C, Liu H, Chi B, et al. Improvement of idiopathic pulmonary fibrosis through a combination of Astragalus Radix and Angelica sinensis Radix via mammalian target of rapamycin signaling pathway-induced autophagy in rat [J]. *J Thorac Dis*, 2024, 16(2): 1397-411. doi: 10.21037/jtd-24-28.
- [4] 姚璐莎,王雁芳,范伏元. 通痹颗粒对类风湿关节炎继发肺间质病变模型大鼠的保护作用 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(12): 1743-6. doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2020.12.014.
- [4] Yao L S, Wang Y F, Fan F Y. Protective effect of Tongbi Granule on rats with pulmonary interstitial disease secondary to rheumatoid arthritis [J]. *World Chin Med*, 2020, 15(12): 1743-6. doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2020.12.014.
- [5] Aswathy I S, Krishnan S, Peter J, et al. Scientific validation of anti-arthritis effect of Kashayams - A polyherbal formulation in collagen induced arthritic rats [J]. *J Ayurveda Integr Med*, 2021, 12(1): 20-7. doi: 10.1016/j.jaim.2018.02.139.
- [6] Wu Y, Xiao W, Pei C, et al. Astragaloside IV alleviates PM2.5-induced lung injury in rats by modulating TLR4/MyD88/NF- κ B signalling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 91: 107290. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107290.
- [7] Wei Y, Wang D, Wu J, et al. JAK2 inhibitors improve RA combined with pulmonary fibrosis in rats by downregulating SMAD3 phosphorylation [J]. *Int J Rheum Dis*, 2024, 27(5): e15164. doi: 10.1111/1756-185X.15164.
- [8] 林浩,龙凯琴. 黄芪提取物对支气管哮喘小鼠气道阻力及肺功能的影响及其机制 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2023, 33(14): 5-8. doi: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.14.002.
- [8] Lin H, Long K Q. Effects of Astragalus extract on airway resistance and lung function in mice with bronchial asthma and its mechanism [J]. *Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med*, 2023, 33(14): 5-8. doi: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.14.002.
- [9] Xie Y, Mai C T, Zheng D C, et al. Wutou decoction ameliorates experimental rheumatoid arthritis via regulating NF- κ B and Nr2f2: integrating efficacy-oriented compatibility of traditional Chinese medicine [J]. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153522. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153522.

- [10] Hua D , Yang J , Meng Q , et al. Soufeng Sanjie formula alleviates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting Th17 cell differentiation[J]. *Chin Med* , 2021 , 16(1) : 39. doi: 10.1186/s13020-021-00448-9.
- [11] Chen X , Wei M , Li G D , et al. YuPingFeng (YPF) upregulates caveolin-1 (CAV1) to alleviate pulmonary fibrosis through the TGF- β 1/Smad2 pathway[J]. *J Ethnopharmacol* , 2024 , 319(Pt 3) : 117357. doi: 10.1016/j.jep.2023.117357.
- [12] Guan Y , Zhang J , Cai X , et al. Astragaloside IV inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis *via* lncRNA-ATB/miR-200c/ZEB1 signaling pathway[J]. *Gene* , 2024 , 897: 148040. doi: 10.1016/j.gene.2023.148040.
- [13] Liu X Y , Xu L , Wang Y , et al. Protective effects of total flavonoids of Astragalus against adjuvant-induced arthritis in rats by regulating OPG/RANKL/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol* , 2017 , 44: 105-14. doi: 10.1016/j.intimp.2017.01.010.
- [14] Abdel-Aziz A M , Fathy E M , Hafez H M , et al. TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway involved in the protective effect of diacerein against lung fibrosis in rats[J]. *Hum Exp Toxicol* , 2023 , 42: 9603271231200213. doi: 10.1177/09603271231200213.
- [15] 陈茂琼, 杨萌婷, 蔡 姣, 等. BMSCs 通过调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路抑制 LPS 诱导急性肺损伤小鼠炎症反应[J]. *安徽医科大学学报* , 2023 , 58(12) : 2073-80. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.013.
- [15] Chen M Q , Yang M T , Cai J , et al. BMSCs inhibit inflammation in mice with LPS-induced acute lung injury by regulating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Acta Univ Med Anhui* , 2023 , 58(12) : 2073-80. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.013.
- [16] Li L , Zhao M , Chang M , et al. Protective effect of modified Huangqi Chifeng decoction on immunoglobulin A nephropathy through toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor-kappa B signaling pathway [J]. *J Tradit Chin Med* , 2024 , 44 (2) : 324-33. doi: 10.19852/j.cnki.jtcm.20240203.001.
- [17] Sun X , Zheng Y , Tian Y , et al. Astragalus polysaccharide alleviates alcoholic-induced hepatic fibrosis by inhibiting polymerase I and transcript release factor and the TLR4/JNK/NF- κ B/MyD88 pathway[J]. *J Ethnopharmacol* , 2023 , 314: 116662. doi: 10.1016/j.jep.2023.116662.
- [18] Omran E , Alzahrani A R , Ezzat S F , et al. Deciphering the therapeutic potential of trimetazidine in rheumatoid arthritis *via* targeting mi-RNA128a , TLR4 signaling pathway , and adenosine-induced FADD-microvesicular shedding: *in vivo* and *in silico* study [J]. *Front Pharmacol* , 2024 , 15: 1406939. doi: 10.3389/fphar.2024.1406939.
- [19] Sun S Y , Yan Q Q , Qiao L N , et al. Electroacupuncture alleviates pain responses and inflammation in collagen-induced arthritis rats *via* suppressing the TLR2/4-MyD88-NF- κ B signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med* , 2023 , 2023: 9050763. doi: 10.1155/2023/9050763.
- [20] Fu Y J , Xu B , Huang S W , et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice *via* inhibiting the expression of CD14 [J]. *Acta Pharmacol Sin* , 2021 , 42(1) : 88-96. doi: 10.1038/s41401-020-0411-9.

Effects and mechanism of astragalus mongholicus extract on lung injury in rats with rheumatoid arthritis induced interstitial lung disease

Zhao Yue , Yang Jinliang , Luo Huan , Xi Wenxiu , Wang Junlu , Zheng Xuejun

(*Dept of Rheumatology and Immunology , The First Affiliated Hospital of Hebei North University , Zhangjiakou 075000*)

Abstract Objective To investigate the effects of astragalus mongholicus extract (AME) on lung injury and the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) /Toll-like receptor 4 (TLR4) /nuclear factor kappa B (NF- κ B) p65 pathway in rheumatoid arthritis induced interstitial lung disease (RA-ILD) rats. **Methods** SD rats were randomly divided into a control group , RA-ILD group , low-dose AME group (5 g/L) , high-dose AME group (10 g/L) , and high-dose AME + lipopolysaccharide (LPS) group (10 g/L AME + 1 mg/L TLR4 activator LPS) . Except for the control group , rats in all other groups were injected with bovine type II collagen , Freund's complete adjuvant , and bleomycin to establish the RA-ILD model. The arthritis index and lung tissue wet-dry weight ratio of rats were tested. ELISA was applied to detect the levels of inflammatory factors interleukin (IL) -1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bronchoalveolar lavage fluid. Hematoxylin eosin staining was used to observe pathological changes of rat knee joint tissue and lung tissue. Western blot was applied to detect the expression of autophagy factors Beclin 1 , microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) II / I , and MyD88/TLR4/NF- κ B p65 pathway related proteins in lung tissue. **Results** Compared with control group , knee joint tissue and lung tissue of rats in RA-ILD group were damaged , the arthritis index , lung tissue wet-dry weight ratio , levels of IL-1 β , IL-6 , and TNF- α , the expression levels of MyD88 and TLR4 proteins , and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 ratio increased ($P < 0.01$) , the expression of Beclin 1 and LC3 II / I proteins decreased ($P < 0.01$) . Compared with RA-ILD

网络出版时间: 2025-06-30 12:53:27 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0856.002>

氨氯地平通过抑制足细胞的 Ca^{2+} 内流促进细胞自噬

赵 韦¹, 徐德苹¹, 廖开楠¹, 蔡春林², 臧丹丹³, 周海胜^{1,3}(安徽医科大学¹ 生物化学教研室、² 病理生理学教研室、³ 科研实验中心, 合肥 230032)

摘要 目的 探究降血压药物氨氯地平对足细胞内 Ca^{2+} 内流及其自噬的影响。方法 体外常规培养永生化的人足细胞 (HPC), 使用血管紧张素 II (Ang II) 以及 L 型 Ca^{2+} 阻断剂氨氯地平单独或者联合处理 HPC 细胞, Ca^{2+} 成像系统实时检测药物处理后 HPC 细胞内 Ca^{2+} 通量的瞬时变化; Western blot 法检测自噬标志蛋白 LC3B-II / LC3B-I 比值变化、Beclin-1、P62 和凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达水平; 流式细胞术检测 488 nm 处 Fluo-4AM 的阳性细胞数以分析 HPC 细胞内 Ca^{2+} 内流水平; Lyso-Tracker Green 活细胞染色分析溶酶体荧光强度; 流式细胞术检测 HPC 细胞凋亡率。结果 与对照组比较, Ang II 组 Ca^{2+} 瞬时通量和 Fluo-4AM 阳性细胞数显著增加 ($P < 0.001$)、自噬标志蛋白 LC3B-II / LC3B-I 比值 ($P < 0.001$) 和 Beclin-1 的蛋白表达 ($P < 0.01$) 均降低、P62 的表达升高 ($P < 0.01$)、溶酶体荧光强度减弱 ($P < 0.05$)、细胞凋亡率升高 ($P < 0.0001$)、凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达降低 ($P < 0.01$)、Bax 蛋白升高 ($P < 0.001$)。与对照组比较, 氨氯地平组 Fluo-4AM 阳性细胞数显著降低 ($P < 0.001$)、LC3B-II / LC3B-I 比值 ($P < 0.001$) 和 Beclin-1 的蛋白表达 ($P < 0.001$) 均升高、P62 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)、溶酶体荧光强度增强 ($P < 0.01$)、细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$)、Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.001$)、Bax 蛋白降低 ($P < 0.001$)。与 Ang II 组比较, Ang II + 氨氯地平组 Fluo-4AM 阳性细胞数显著降低 ($P < 0.001$)、LC3B-II / LC3B-I 比值 ($P < 0.01$) 以及 Beclin-1 的蛋白表达升高 ($P < 0.05$)、P62 蛋白降低 ($P < 0.01$)、溶酶体荧光强度增加 ($P < 0.05$)、细胞凋亡率降低 ($P < 0.001$)、Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.001$)、Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.001$)。结论 氨氯地平抑制足细胞内 Ca^{2+} 内流, 促进足细胞自噬、抑制凋亡, 对于预防高血压肾病发生具有一定的作用。

关键词 足细胞; 氨氯地平; 血管紧张素 II; 自噬; Ca^{2+} ; 细胞凋亡

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)07-1179-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.003

2025-03-30 接收

基金项目: 安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目(编号: gxbjZD2021046)

作者简介: 赵 韦, 女, 硕士研究生;

周海胜, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

足细胞是位于肾小球基底膜的终末分化上皮细胞, 其正常的形态和结构对维持肾小球滤过及屏障功能至关重要^[1]。由于其再生能力很低, 足细胞非常敏感, 容易受到外界压力变化的影响^[2]。 Ca^{2+} 作为细胞内重要的第二信使, 参与并调节细胞内各种活动。在肾小球相关疾病等慢性肾病发展过程中,

group, the low-dose and high-dose AME groups showed reduced tissue damage in rats, the arthritis index, lung tissue wet-dry weight ratio, levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , the expression levels of MyD88 and TLR4 proteins, and p-NF- κ B p65 / NF- κ B p65 ratio showed a dose-dependent decrease ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the expression of Beclin 1 and LC3 II / I proteins showed a dose-dependent increase ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with high-dose AME group, the tissue damage of rats in the high-dose AME + LPS group was worsened, the arthritis index, lung tissue wet-dry weight ratio, levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , the expression levels of MyD88 and TLR4 proteins, and p-NF- κ B p65 / NF- κ B p65 ratio were higher ($P < 0.01$), the expression of Beclin 1 and LC3 II / I proteins was lower ($P < 0.01$). **Conclusion** AME inhibits the MyD88 / TLR4 / NF- κ B p65 pathway and alleviates lung injury in RA-ILD rats.

Key words astragalus mongholicus extract; rheumatoid arthritis; interstitial lung disease; lung injury; MyD88 / TLR4 / NF- κ B p65 pathway; inflammation; autophagy

Fund program Medical Science Research Project of Hebei Provincial Health Commission (No. 20231416)

Corresponding author Zhao Yue, E-mail: zy18732367252@126.com