

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.03.016

王牧, 李梦兰, 赵旭, 等. 黑骨藤醇提取物调控巨噬细胞极化对小鼠痛风性关节炎的影响及机制研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(3): 179-190.

黑骨藤醇提取物调控巨噬细胞极化 对小鼠痛风性关节炎的影响及机制研究

王牧¹, 李梦兰¹, 赵旭¹, 谢青青², 肖嘉威¹, 帅世全^{1,2}

1. 川北医学院第二临床医学院/南充市中心医院 风湿免疫科, 四川 南充 637000;

2. 南充市中心医院 炎症与免疫南充市重点实验室, 四川 南充 637000

摘要: 探讨黑骨藤醇提取物对小鼠痛风性关节炎的抗炎作用及其初步机制, 将 C57/BL 雄性小鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱组和黑骨藤组, 对照组和模型组给予 7 d 生理盐水灌胃, 其余两组每天分别用秋水仙碱 0.3 mg/kg 或黑骨藤 50 mg/kg 灌服。给药第 5 d 时, 除对照组外其余 3 组在小鼠右踝关节注射 50 μ L 尿酸钠悬液构建急性痛风性关节炎模型。造模 48 h 后测定小鼠足趾容积并进行步态评分, HE 染色观察滑膜组织病理学特征, ELISA 检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4 和 IL-10 水平, 免疫荧光染色检测滑膜 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 和 M2 型巨噬细胞标志物 Arg1 的水平, 免疫组化检测 p-AMPK 和 HIF-1 α 蛋白的表达水平。将 RAW264.7 巨噬细胞随机分为对照组、尿酸钠组(MSU 组)、尿酸钠+黑骨藤组(MSU+PFS 组)、尿酸钠+黑骨藤+Compound C 组(MSU+PFS+CC 组), 用尿酸钠晶体刺激 RAW264.7 巨噬细胞构建体外炎症模型。蛋白质印迹法检测各组 iNOS、Arg1、p-AMPK 和 HIF-1 α 蛋白表达水平, 用试剂盒测定各组葡萄糖、乳酸和细胞 ATP 浓度。结果显示: 秋水仙碱与黑骨藤醇提取物减轻了小鼠右踝关节肿胀, 降低了关节步态评分、滑膜组织炎细胞浸润, 下调了 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌水平, 提高了 IL-4、IL-10 的分泌水平。黑骨藤能减少 RAW264.7 巨噬细胞 iNOS 蛋白表达, 上调 Arg1 蛋白表达, 激活 p-AMPK, 下调 HIF-1 α 表达, 并增加细胞的 ATP 水平, 降低葡萄糖消耗和乳酸生成, AMPK 抑制剂 Compound C 可以减弱黑骨藤醇提取物的上述作用。综合表明: 黑骨藤醇提取物可能通过 AMPK/HIF-1 α 途径调节巨噬细胞极化, 从而减轻痛风性关节炎的炎症反应。

关键词: 黑骨藤; 痛风性关节炎; 巨噬细胞极化

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2025)03-0179-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The Effect and Preliminary Mechanism Study of *Periploca forrestii* Schltr Alcohol Extract Regulating Macrophage Polarization on Gouty Arthritis in Mice

WANG Mi¹, LI Menglan¹, ZHAO Xu¹,
XIE Qingqing², XIAO Jiawei¹, SHUAI Shiquan^{1,2}

收稿日期: 2024-06-07

基金项目: 南充市科技计划项目(22JCYPJT0008)。

作者简介: 王牧, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事风湿免疫疾病的基础研究。

通信作者: 帅世全, 主任医师。

1. The Second Clinical Hospital of North Sichuan Medical College/Rheumatology and Immunology Department of Nanchong Central Hospital, Nanchong Sichuan 637000, China;
2. Inflammation and Immunology Nanchong Key Laboratory, Nanchong Central Hospital, Nanchong Sichuan 637000, China

Abstract: To explore the anti-inflammatory effect and potential mechanism of *Periploca forrestii* Schltr alcohol extract on gouty arthritis of mice. C57/BL male mice were randomly divided into a control group, a model group, a colchicine group, and *P. forrestii* Schltr group. The control group and model group were given physiological saline by gavage for 7 days, while the other two groups were given colchicine (0.3 mg/kg) and *P. forrestii* Schltr (50 mg/kg) by gavage, respectively. On the 5th day of administration, except for the control group, the other three groups were injected with 50 μ L sodium urate suspension into the right ankle joint of mice to construct an acute gouty arthritis model. After 48 hours of modeling, the volume of mouse toes was measured and gait scores were performed. HE staining was used to observe synovial tissue pathology, ELISA was performed to detect the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, and IL-10 in serum, immunofluorescence staining was used to detect the levels of M1 macrophage marker iNOS and M2 macrophage marker Arg1 in synovium, and immunohistochemistry was used to detect the expression levels of p-AMPK and HIF-1 α proteins. RAW264.7 cells were randomly divided into control group, sodium urate group, sodium urate+*P. forrestii* Schltr group, and sodium urate+*P. forrestii* Schltr+Compound C group. An *in vitro* inflammatory model was constructed by stimulating RAW264.7 cells with sodium urate crystals. Protein blotting was used to detect the expression levels of iNOS, Arg1, p-AMPK, and HIF-1 α proteins in each group, and the concentrations of glucose, lactate, and cellular ATP in each group were measured using reagent kits. Colchicine and *P. forrestii* Schltr alcohol extract reduced swelling of the right ankle joint of mice, decreased joint gait score, synovial tissue inflammatory cell infiltration, downregulated TNF- α , IL-1 β , IL-6 secretion levels, and increased IL-4 and IL-10 secretion levels. *P. forrestii* Schltr alcohol extract can reduce the expression of iNOS protein in RAW264.7 cells, upregulate the expression of Arg1 protein, activate p-AMPK, downregulate the expression of HIF-1 α , and increase the ATP level of cells, reduce glucose consumption and lactate production. Compound C can weaken the above effects of *P. forrestii* Schltr alcohol extract. *P. forrestii* Schltr alcohol extract may regulate macrophage polarization and alleviate gouty arthritis response through the AMPK/HIF-1 α pathway.

Key words: *Periploca forrestii* Schltr; gouty arthritis; macrophage polarization

痛风性关节炎(Gout Arthritis, GA)是一种由尿酸钠晶体(Monosodium Urate Crystals, MSU)在滑膜、骨、关节囊、软骨和组织中积聚引起的炎症性关节疾病^[1-2]。迄今,临床上常用抗痛风急性发作的药物有较大毒副作用,因而寻找无毒副作用或毒副作用小的天然产物备受关注。黑骨藤(*Periploca forrestii* Schltr, PFS)又叫狭叶蓬莱葛,是中国西南地区的传统药用植物,其提取物具有抗炎、镇痛及强心等功效^[3-4]。研究发现,巨噬细胞是参与GA发展的重要效应细胞^[5],其极化状态与痛风的发生和发展密切相关^[6-7]。黑骨藤醇提取物能否调控巨噬细胞极化状态减轻GA症状与机制还未见报道,本研究通过构建小鼠急性痛风性关节炎模型,观察黑骨藤醇提取物对小鼠痛风性关节炎的防治效果及调控巨噬细胞极化状态的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

6~8周龄、体质量 20 ± 0.23 g的雄性SPF级C57/BL小鼠共24只,购于川北医学院动物实验中心,在温度22~25℃条件下饲养,充足饮食和饮水,每12 h明暗循环。研究严格按照川北医学院动物伦理委

员会的方案(2023100)实施。小鼠 RAW264.7 巨噬细胞购于上海一研生物科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

秋水仙碱片,云南西双版纳药业有限责任公司;尿酸钠晶体,美国 Sigma 公司;IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-10 试剂盒,上海茁彩生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒,碧云天生物技术有限公司;诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)抗体,Proteintech 公司;低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)抗体,Abclonal 公司;磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(phosphorylated AMP-activated protein kinase, p-AMPK),Affbiotech 公司;AMPK 抑制剂 Compound C,北京德航五洲科技有限公司。

1.3 黑骨藤醇提取物的制备

黑骨藤(PFS)药材采集于贵州省贵阳市,由川北医学院药学院分离提取与鉴定^[8]。取黑骨藤药材 120 g 粉碎,加入 70%乙醇 1 200 L,在 70 ℃水浴中回流提取 2 h,过滤,重复 3 次,合并滤液;分别用石油醚和正丁醇萃取,正丁醇溶剂在真空蒸发器中蒸发,生成正丁醇组分;将最终提取液干燥即得到 PFS 醇提取物活性成分,最后将混合物配制成 1 g/mL 的药汁并灭菌包装。

1.4 急性痛风性关节炎的建模与关节肿胀评价

随机将 24 只 C57/BL 雄性小鼠分为 4 组,对照组和模型组给予 7 d 生理盐水灌胃;秋水仙碱组与黑骨藤醇提取物组每天分别用秋水仙碱 0.3 mg/kg 或黑骨藤醇提取物 50 mg/kg 连续灌胃 7 d;第 5 d 给药时,除对照组外其余 3 组在小鼠右踝关节腔注射 25 mg/mL 的尿酸钠混悬液 50 μ L,构建急性痛风性关节炎模型^[9]。造模前及造模后 48 h 测定小鼠右踝关节足趾容积并进行步态评分,肿胀度(S)的计算公式^[10]为:

$$S = \frac{V_{\text{测定}} - V_{\text{初始}}}{V_{\text{初始}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $V_{\text{测定}}$ 为测定时间点足容积; $V_{\text{初始}}$ 为初始足容积。

步态评分标准^[9]:步态正常,计 0 分。静止时,双后肢着地无明显差异;活动时,患侧肢体承重减轻,轻度跛行,计 1 分。不管静止还是活动状态下,患侧肢体承重均明显减弱,明显跛行,计 2 分。患侧肢体不能承重,完全离地,三足步态,计 3 分。

1.5 小鼠踝关节病理形态学观察

第 7 d 灌胃 1 h 后,颈椎脱臼处死小鼠。取小鼠建模侧踝关节,4%多聚甲醛固定,EDTA 脱钙 60 d,石蜡包埋并切片,苏木精—伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,显微镜观察,采用数字病理切片扫描进行拍片。

1.6 ELISA 测定血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-4 的分泌情况

末次给药 1 h 后心脏穿刺采血,静置 2 h,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,ELISA 法检测小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平。

1.7 免疫学方法检测 iNOS、Arg1、p-AMPK 和 HIF-1 α 的蛋白表达

一组切片脱蜡脱水,柠檬酸钠抗原修复,使用 CD68、iNOS、Arg1 作为一抗,染色完成后用荧光倒置显微镜检测分析;另一组切片脱蜡脱水,微波修复抗原,加 p-AMPK 和 HIF-1 α 后 4 ℃过夜, DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片,并采用 Image J 软件分析其阳性表达的吸光度值,计算阳性率。

1.8 RAW 264.7 巨噬细胞模型的构建及给药

将 1×10^5 个/孔的 RAW 264.7 巨噬细胞接种于 6 孔板,每组做 3 个复孔。将细胞分为对照组(常规培养)、尿酸钠组(MSU 组,100 μ g/mL MSU 混悬液刺激 6 h)、尿酸钠+黑骨藤组(MSU+PFS 组,在 MSU 组基础上加入 50 μ g/mL 的 PFS,处理 12 h)、尿酸钠+黑骨藤+Compound C 组(MSU+PFS+CC 组),在 MSU+PFS 组基础上加入 5 μ mol/L 的 Compound C 处理 2 h)。

1.9 采用 MTT 法检测 RAW 264.7 巨噬细胞活力

将 RAW264.7 巨噬细胞接种于 96 孔板中, 5×10^4 个/孔,分别设置空白组、对照组和给药组。将孔板

放置在条件为 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 之后将培养基更换为含有不同药物浓度(0、25、50、100、200、400 μg/mL)的黑骨藤培养基, 每孔加入 100 μL, 并继续孵育 12 h。在检测前, 每孔避光加 20 μL MTT(5.0 mg/mL)培养 4 h, 遗弃培养液, 每孔加 150 μL DMSO, 37 ℃孵育 10 min, 570 nm 处测定 OD 值并计算细胞活力。

1.10 免疫印迹法检测 iNOS、Arg1、p-AMPK、HIF-1α 的蛋白表达水平

收集各组巨噬细胞, 用 RIPA 裂解液从细胞中提取总蛋白。使用等量蛋白质上样, 选择 10% 的十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离; 然后全部转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 iNOS、Arg1、p-AMPK、HIF-1α, TBST 冲洗, 后加入二抗, ECL 暗室显色, Image-Pro Plus 分析蛋白表达水平。

1.11 RAW 264.7 巨噬细胞内 ATP、葡萄糖摄取量、乳酸生成量的测定

收集各组巨噬细胞及培养液, 使用 ATP 含量试剂盒检测各组 RAW264.7 巨噬细胞中 ATP 的含量; 吸取上清液, 使用葡萄糖和乳酸含量检测试剂盒分别检测葡萄糖消耗水平和乳酸分泌水平, 具体步骤参照说明书。

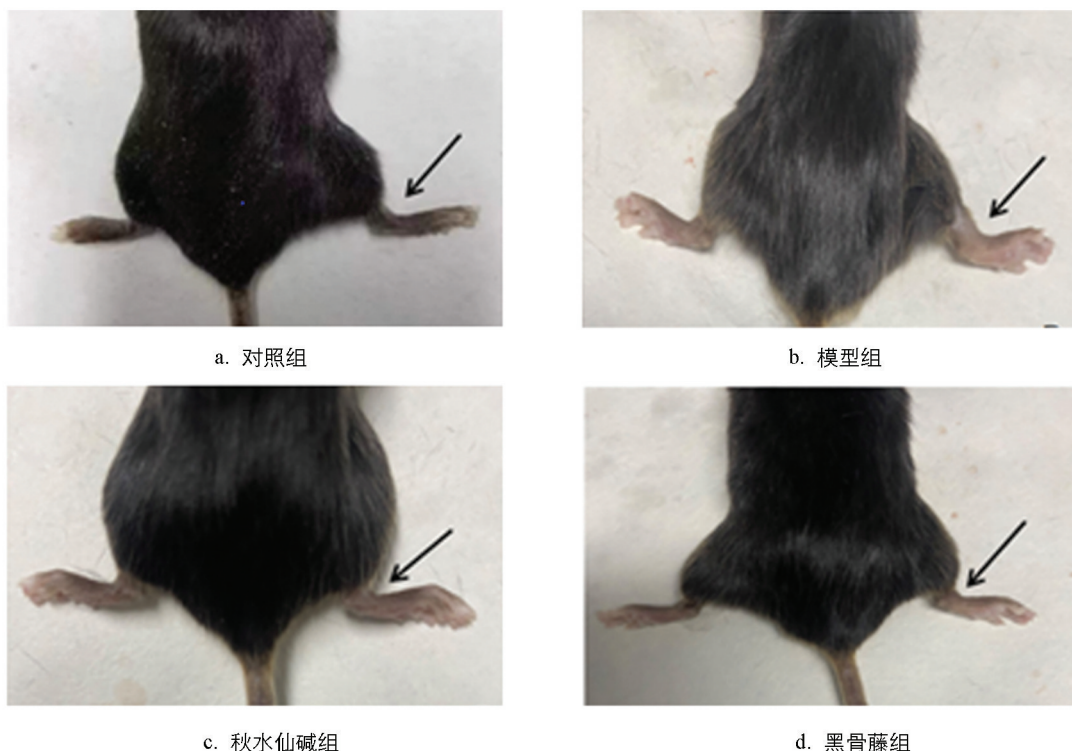
1.12 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

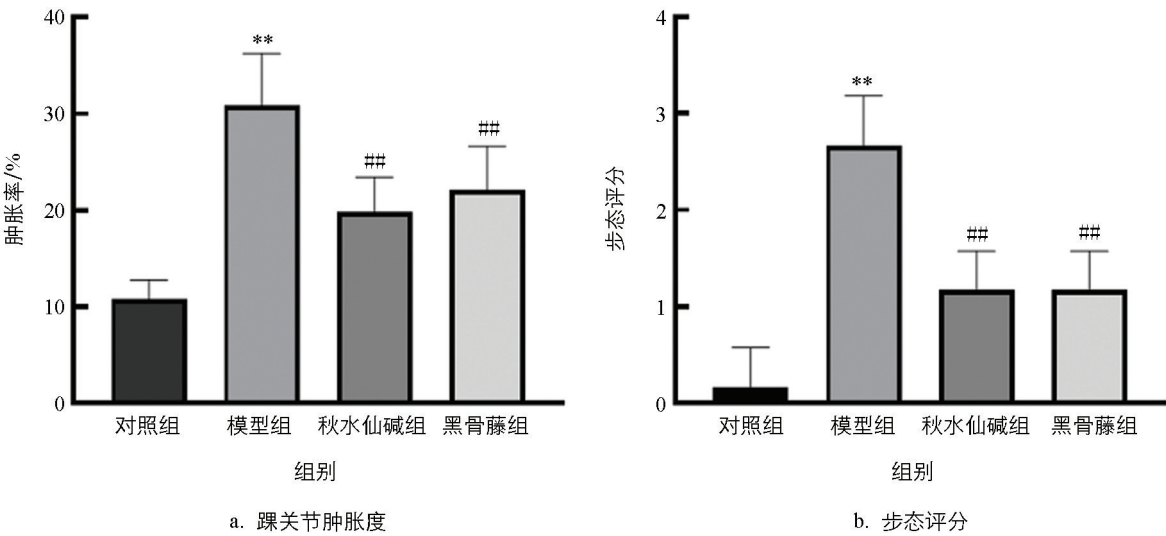
2.1 各组小鼠踝关节肿胀度与步态评分

小鼠踝关节肿胀程度见图 1, 结果显示, 与对照组比较, 模型组踝关节肿胀度和步态评分均显著升高; 与模型组比较, 秋水仙碱组和黑骨藤组踝关节肿胀度和步态评分均显著降低(图 2)。



箭头指示踝关节肿胀度比较。

图 1 各组小鼠踝关节肿胀程度

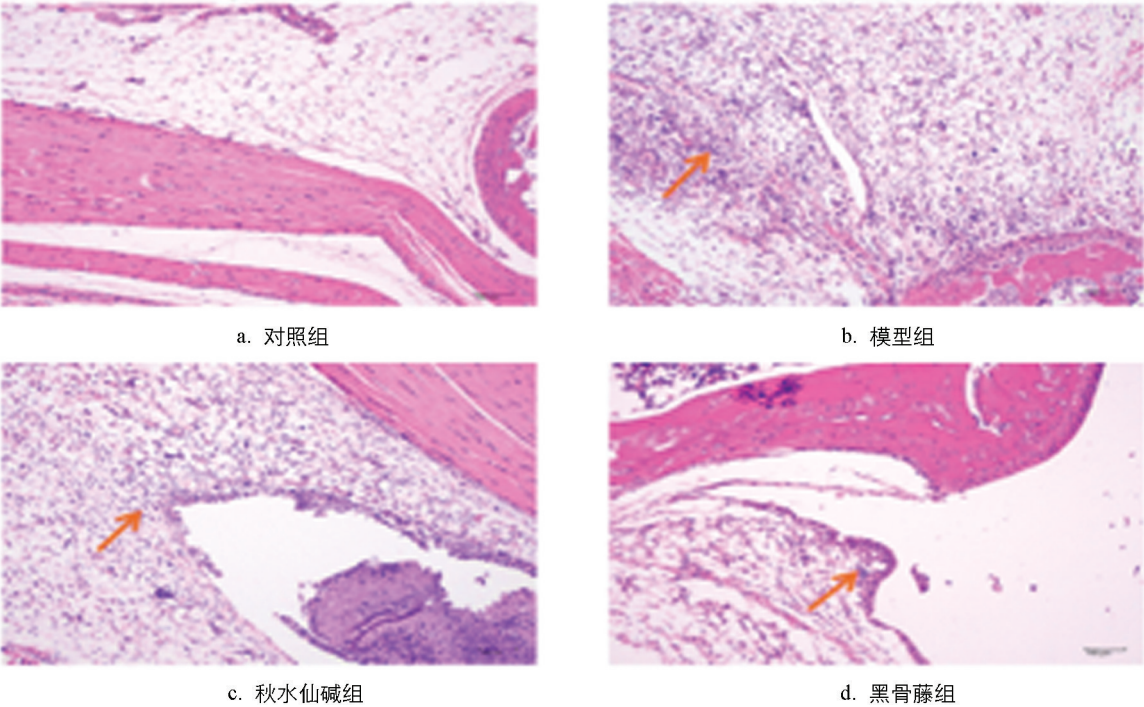


＊ ＊ 表示与对照组比较, $p<0.01$; # # 表示与模型组比较, $p<0.01$, 差异有统计学意义。

图 2 黑骨藤对小鼠踝关节肿胀度与步态评分的影响

2.2 小鼠踝关节组织病理学观察

由图 3 可知, 对照组小鼠踝关节滑膜细胞排列整齐, 周围软组织未出现炎细胞浸润; 模型组小鼠踝关节中, 滑膜细胞增生明显, 可见大量炎细胞浸润、纤维素样物质渗出、水肿、出血和新生毛细血管形成; 秋水仙碱组小鼠踝关节中滑膜细胞基本保持正常状态, 仅有少量炎细胞浸润; 黑骨藤组小鼠关节中, 滑膜细胞略有增生, 充血水肿不明显, 可见少量炎细胞浸润。

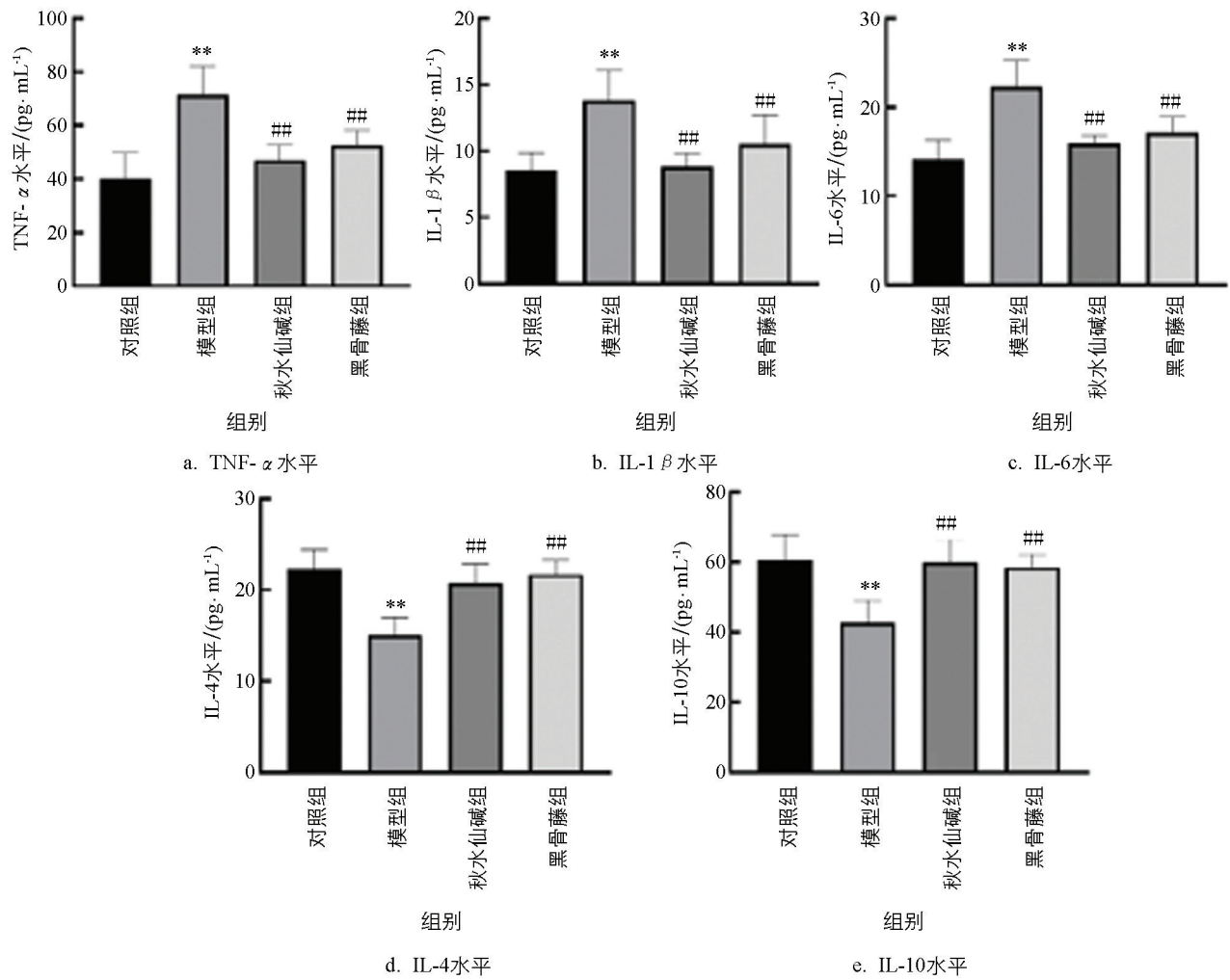


箭头指示炎细胞浸润。

图 3 各组小鼠踝关节滑膜组织病理学观察(HE 染色, $\times 200$)

2.3 各组小鼠血清炎症因子水平检测

由图 4 可知, 模型组小鼠血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 IL-6 水平显著升高, IL-4 、 IL-10 水平显著降低; 与模型组比较, 秋水仙碱和黑骨藤组小鼠血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 水平显著降低, IL-4 和 IL-10 水平显著升高。



※※表示与对照组比较, $p<0.01$; ##表示与模型组比较, $p<0.01$, 差异有统计学意义。

图 4 各组小鼠血清中炎症因子水平比较

2.4 各组小鼠踝关节组织巨噬细胞极化标志物 iNOS 和 Arg1 的表达情况

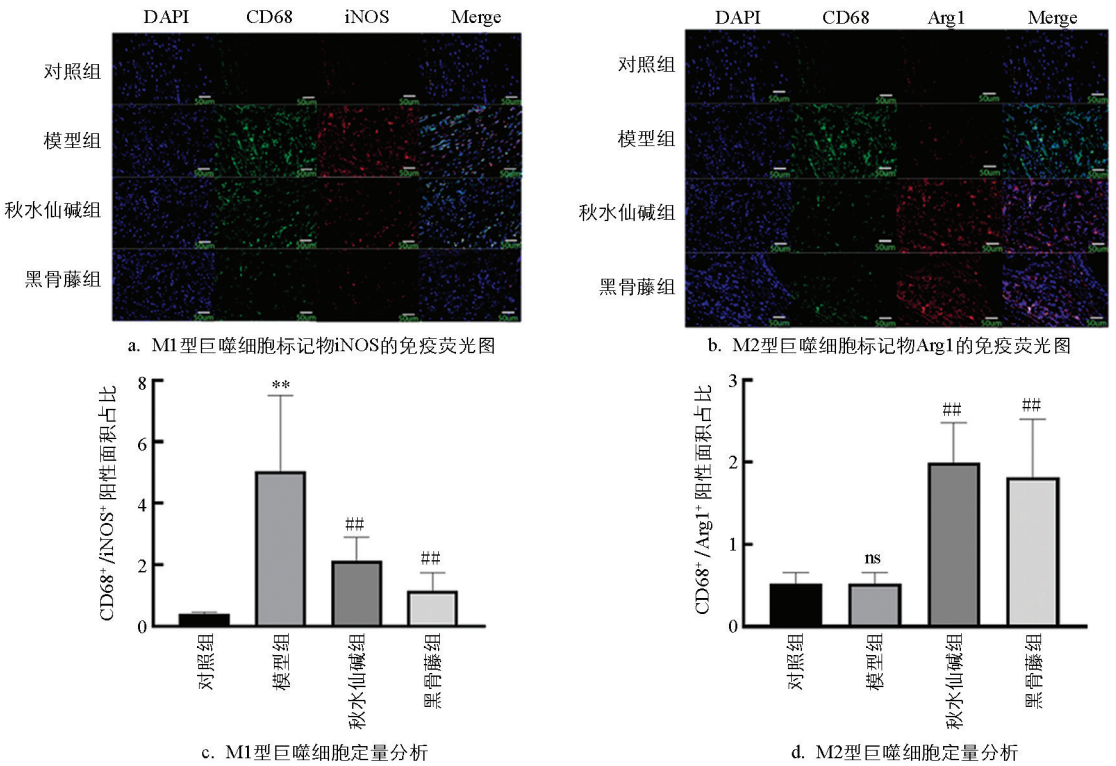
绿色染料标定 CD68, 红色染料标定 iNOS 和 Arg1, 蓝色染料标定细胞核, 通过这种方式可以对活化的 M1 和 M2 巨噬细胞进行区分。M1 巨噬细胞在膜表面高表达 CD68 和 iNOS, 而 M2 巨噬细胞则高表达 CD68 和 Arg1^[11]。由图 5 可知, 模型组小鼠关节滑膜组织中 M1 细胞的标记物 iNOS 蛋白荧光强度显著增强; 与模型组比较, 黑骨藤组和秋水仙碱组小鼠关节滑膜组织中 iNOS 蛋白荧光强度明显下降, 而 M2 细胞的标记物 Arg1 蛋白荧光强度显著增强。

2.5 各组小鼠滑膜组织 p-AMPK、HIF-1 α 蛋白的表达情况

由图 6 可知, 模型组小鼠滑膜组织 p-AMPK 蛋白水平明显降低, HIF-1 α 蛋白水平明显升高; 与模型组比较, 秋水仙碱组和黑骨藤组 p-AMPK 蛋白水平明显升高, HIF-1 α 蛋白水平明显降低。

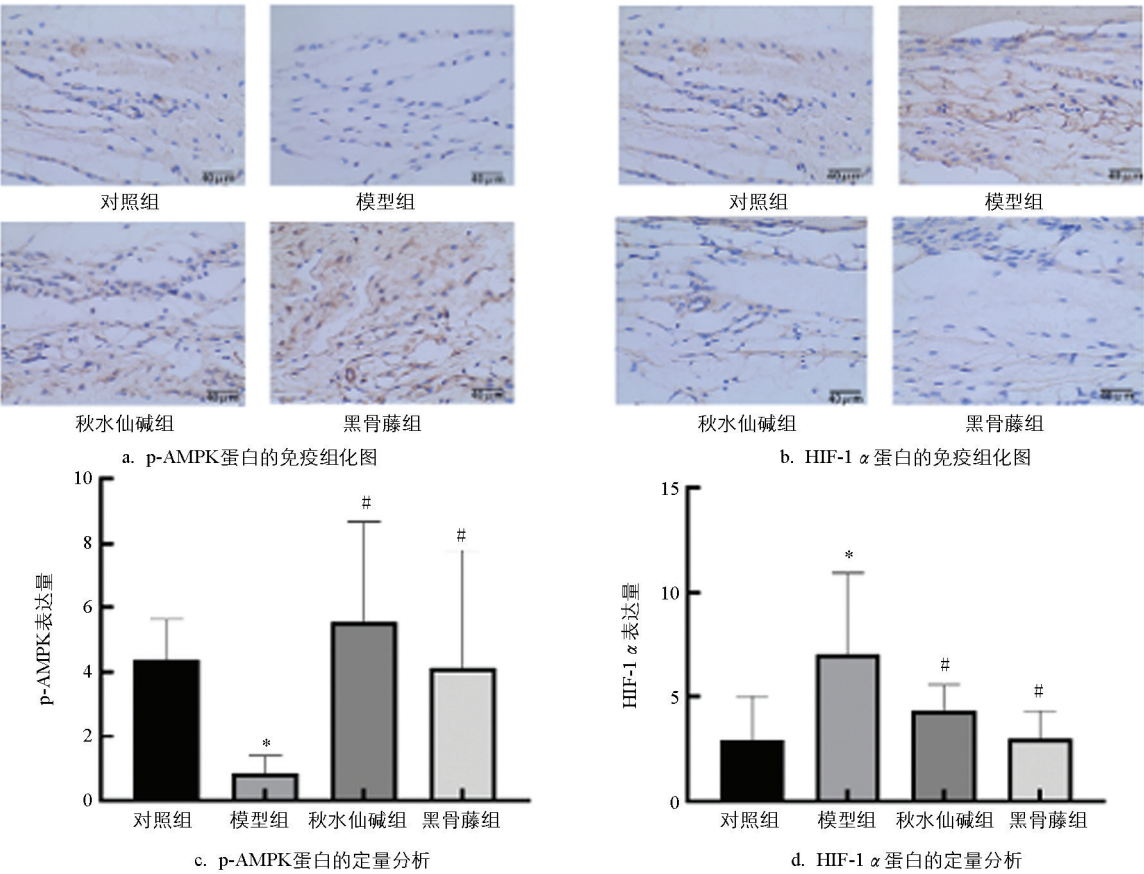
2.6 不同浓度黑骨藤对 RAW264.7 巨噬细胞活性的影响

由图 7 可知, 当黑骨藤浓度大于 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对细胞活力有显著抑制作用; 25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的黑骨藤对细胞活性影响不大, 提示在该浓度范围内对细胞没有明显毒性作用, 故本实验选用高浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ 的黑骨藤进行后续的细胞实验。



* * 表示与对照组比较, $p < 0.01$; # # 表示与模型组比较, $p < 0.01$, 差异有统计学意义; ns 表示 $p > 0.05$, 差异无统计学意义。

图 5 免疫荧光法检测关节组织巨噬细胞极化标志物 iNOS 和 Arg1 的表达情况



* 表示与对照组比较, $p < 0.05$; # 表示与模型组比较, $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

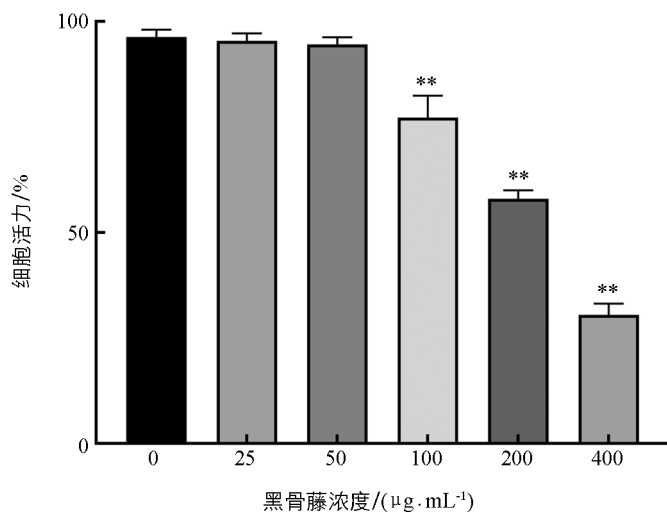
图 6 各组小鼠踝关节滑膜组织中 p-AMPK 和 HIF-1 α 的表达

2.7 黑骨藤通过 AMPK/HIF-1 α 通路对巨噬细胞极化的影响

由图 8 可知,尿酸钠组(MSU 组)iNOS 和 HIF-1 α 蛋白水平明显增加,Arg1 和 p-AMPK 蛋白水平显著降低;与 MSU 组比较,尿酸钠+黑骨藤组(MSU+PFS 组)iNOS 和 HIF-1 α 蛋白水平明显降低,Arg1 和 p-AMPK 蛋白水平显著增加;与 MSU+PFS 组比较,尿酸钠+黑骨藤+Compound C 组(MSU+PFS+CC 组)iNOS 和 HIF-1 α 蛋白水平明显增加,Arg1 和 p-AMPK 蛋白水平显著降低。

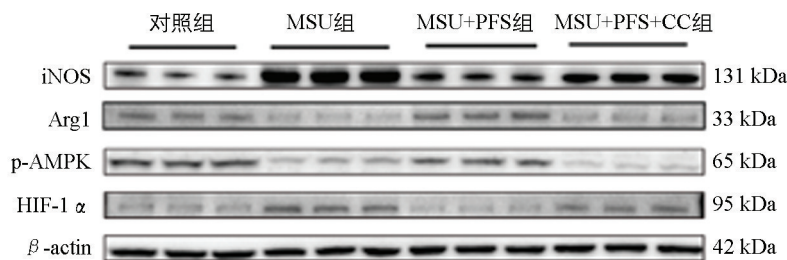
2.8 黑骨藤对尿酸钠刺激的 RAW264.7 巨噬细胞的糖酵解活性影响

由图 9 可知,MSU 组细胞内 ATP 水平

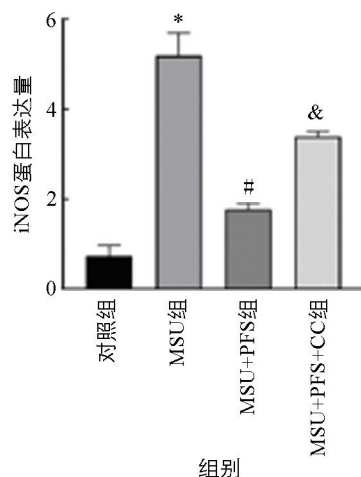


** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

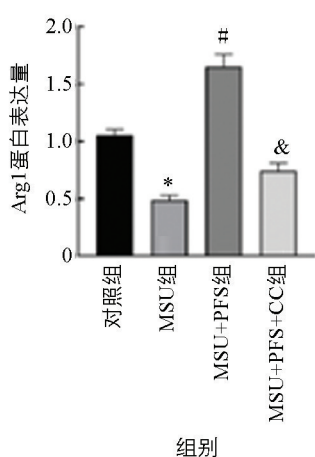
图 7 不同浓度黑骨藤对 RAW264.7 巨噬细胞活性的影响



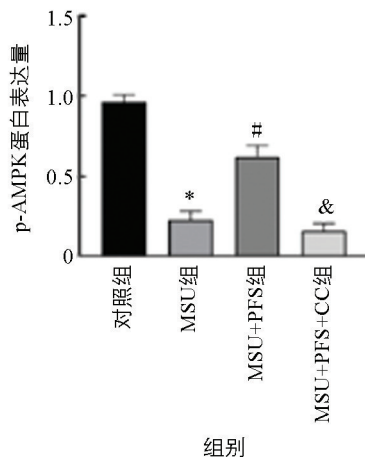
a. iNOS、Arg1、p-AMPK、HIF-1 α 和 β -actin 的蛋白电泳条带



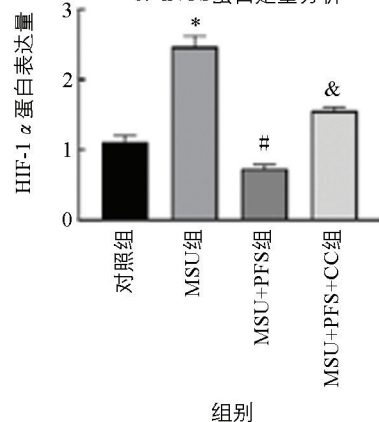
b. iNOS 蛋白定量分析



c. Arg1 蛋白定量分析



d. p-AMPK 蛋白定量分析

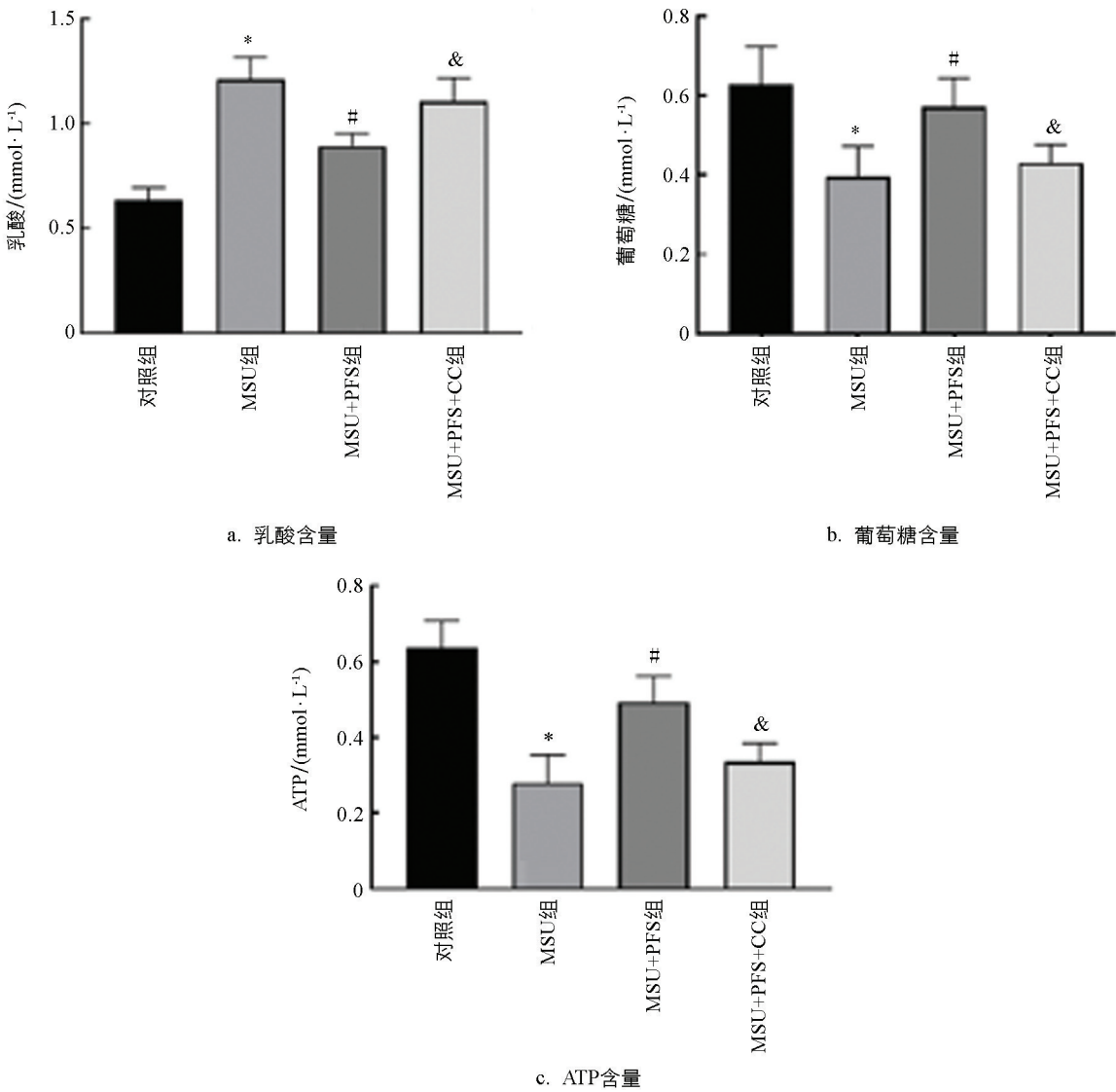


e. HIF-1 α 蛋白定量分析

* 表示与对照组比较, $p < 0.05$; # 表示与尿酸钠组(MSU 组)比较, $p < 0.05$; & 表示与尿酸钠+黑骨藤组(MSU+PFS 组)比较, $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 8 各组 RAW264.7 巨噬细胞中 iNOS、Arg1、p-AMPK、HIF-1 α 和 β -actin 的水平

降低,乳酸排泄和葡萄糖消耗增加;与 MSU 组比较,MSU+PFS 组巨噬细胞内 ATP 水平增加,乳酸排泄和葡萄糖消耗降低;与 MSU+PFS 组比较,MSU+PFS+CC 组细胞内 ATP 水平明显降低,乳酸排泄和葡萄糖消耗明显增加。



* 表示与对照组比较, $p < 0.05$; # 表示与尿酸钠组(MSU 组)比较, $p < 0.05$; & 表示与尿酸钠+黑骨藤组(MSU+PFS 组)比较, $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 9 各组 RAW264.7 细胞中乳酸排泄、葡萄糖消耗和 ATP 水平($n=3$)

3 讨论与结论

痛风是临床常见的炎症性关节炎,且近年来其发病率及致残率呈现出逐渐升高的趋势^[12]。目前治疗痛风的药物有秋水仙碱、非甾体抗炎药和糖皮质激素,但以上药物均存在一定的副作用,比如胃肠道不适、消化道出血、过敏等^[13-14],因此,临床上急需寻找一种安全高效的药物。

黑骨藤(PFS)为西南地区常用药,常用于治疗风湿性、类风湿性关节炎^[4, 15-16]。近年来有研究发现,黑骨藤在痛风的治疗中具有显著效果。党荣敏等^[17]研究表明黑骨藤醇提物可下调痛风模型大鼠关节的 IL-1 β 、IL-6、IL-8 与 TNF- α 的表达,减轻大鼠踝关节的肿胀,减少滑膜组织炎症细胞的浸润。这一研究结果证实了 PFS 可有效治疗痛风性关节炎(GA),但其药理机制至今尚未完全阐明,因此本课题组针对黑骨藤治疗痛风性关节炎的机制展开了进一步研究。

巨噬细胞主导的先天免疫是早期 GA 发生和进展的主要原因^[18],也是其发生和进展的重要效应细胞,在不同的微环境中表现出高度的可塑性和异质性,具有对感染和损伤做出快速反应、有利于损伤组织修复的两大关键作用,即巨噬细胞首先极化为促炎表型(M1),然后转变为抗炎表型(M2),以便在直接危险过去时促进修复^[19]。MSU 晶体在关节腔内聚集并与单核/巨噬细胞系统相互作用是诱导急性痛风性关节炎的关键。在 GA 小鼠关节组织中,M1 型巨噬细胞数量增加,可引起 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等促炎细胞因子的过量产生,大量的促炎细胞因子会导致免疫失衡,促进炎症的发展。M2 型巨噬细胞能够分泌 IL-4 和 IL-10 等抗炎细胞因子,可缓解关节炎症并促进组织损伤修复,因此,在痛风的炎症发展中,巨噬细胞从 M1 到 M2 的极化可能有助于急性炎症的自限性,而极化障碍则导致急性炎症慢性化^[20]。M1 巨噬细胞高表达 iNOS,M2 巨噬细胞高表达 Arg1,这些标志物的检测已被用于测定巨噬细胞的极化状态^[21-25]。在本研究中,PFS 给药后能够抑制 MSU 诱导的 GA 小鼠 M1 型巨噬细胞极化及炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的表达,同时促进 M2 型极化及抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10 的表达。这一结果表明 PFS 可能通过调节巨噬细胞极化来缓解 GA 小鼠的炎症反应。

AMPK 是一种在进化过程中高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,被认为是巨噬细胞极化的调节因子^[26]。根据最新的研究,激活 AMPK 可以加速 NF- κ B 的降解,增加 Akt 的活性,从而抑制炎症反应,促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞的转化^[27]。HIF-1 α 是诱导低氧基因及细胞氧内环境修复的核心调节因子,可调控细胞的生长、增殖、迁移、炎症和凋亡等过程^[28-29]。有报道认为 HIF-1 α 是控制炎症细胞的代谢开关,可促进细胞的缺氧适应^[30-31]。激活 HIF-1 α 可以抑制 M1 型巨噬细胞极化和糖酵解,控制关节和皮肤的炎症反应^[32]。M1 巨噬细胞主要依靠有氧糖酵解快速提供 ATP 来合成炎症小体^[33]。炎症发生时,活化的 M1 巨噬细胞中三羧酸循环中间产物琥珀酸产量整体增加^[34-35],琥珀酸的增加有助于 HIF-1 α 的稳定,这是巨噬细胞持续产生 IL-1 β 所必需的条件^[36]。下调 HIF-1 α 表达,可以抑制 MSU 诱导的巨噬细胞炎症反应^[37]。相反,过表达 HIF-1 α 会导致 MSU 诱导的巨噬细胞线粒体氧化受损,细胞代谢转向糖酵解代谢途径^[38]。本实验监测了巨噬细胞的葡萄糖摄取和乳酸分泌能力以及细胞内 ATP 水平,结果显示,在 MSU 诱导的巨噬细胞中,乳酸排泄和葡萄糖消耗水平升高,细胞内 ATP 水平降低;PFS 激活了 AMPK 途径,抑制 HIF-1 α 过表达,导致有氧糖酵解减少,逆转了 M1 巨噬细胞的这种代谢。故 PFS 可能通过 HIF-1 α 途径调节细胞的能量代谢,抑制炎性因子的产生。在本实验中,我们发现 PFS 能上调 p-AMPK、Arg1 的表达,下调 iNOS、HIF-1 α 的表达,表明 PFS 能促进 AMPK 磷酸化和 M2 型巨噬细胞极化,减少促炎细胞因子的释放,增加抗炎细胞因子的表达,进而促进急性痛风性关节炎的炎性反应缓解。在 MSU 诱导的巨噬细胞被施与 AMPK 抑制剂后,PFS 增加了 iNOS 水平,降低了 Arg1 水平等,因此,本实验研究结果证实 PFS 可通过 AMPK/HIF-1 α 途径调节巨噬细胞 M1/M2 极化以发挥抗炎作用。

综上所述,PFS 通过 AMPK/HIF-1 α 来抑制 MSU 晶体在体内外诱导的炎性反应,并且促进巨噬细胞从 M1 促炎表型转换为 M2 抗炎表型,减少炎性细胞因子的释放,增加抗炎细胞因子的释放,最终缓解小鼠急性痛风性关节炎。以上实验结果为中医临床领域运用 PFS 治疗痛风性关节炎提供了新的理论和实验依据。

参考文献:

- [1] DALBETH N, GOSLING A L, GAFFO A, et al. Gout [J]. The Lancet, 2021, 397(10287): 1843-1855.
- [2] LIU L, ZHU L J, LIU M D, et al. Recent Insights into the Role of Macrophages in Acute Gout [J]. Frontiers in Immunology, 2022(13): 955806.
- [3] SUN J, ZHOU Z Y, ZHOU Y, et al. Anti-Rheumatoid Arthritis Pharmacodynamic Substances Screening of *Periplocoforrestii* SCHLTR.: Component Analyses in Vitro and in Vivo Combined with Multi-technical Metabolomics [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(18): 13695.

- [4] 甘秀海,周欣,赵超,等. 黑骨藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2012, 39(9): 20-21.
- [5] RENAUDIN F, ORLIAGUET L, CASTELLI F, et al. Gout and Pseudo-Gout-Related Crystals Promote GLUT1-Mediated Glycolysis that Governs NLRP3 and Interleukin-1 β Activation on Macrophages [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2020, 79(11): 1506-1514.
- [6] 周金萍,罗程,李海燕,等. 德昂酸茶水提物对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞抗炎作用的研究 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(3): 431-438.
- [7] 贾萍,陈刚,杨娟,等. 四妙丸对大鼠痛风性关节炎发展的影响及调控巨噬细胞极化研究 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3498-3502.
- [8] BAO C M, LIU Y Q, SUN X, et al. Periploca Forrestii Saponin Ameliorates CIA via Suppressing Proinflammatory Cytokines and Nuclear Factor Kappa-B Pathways [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176672.
- [9] CODERRE T J, WALL P D. AnkleJoint Urate Arthritis (AJUA) in Rats: An Alternative Animal Model of Arthritis to that Produced by Freund's Adjuvant [J]. *Pain*, 1987, 28(3): 379-393.
- [10] 杜明瑞,宋哲,李华燕,等. 加味四妙散对急性痛风性关节炎大鼠 miR-223-3p 与 NLRP3/IL-1 β 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(14): 63-70.
- [11] MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, et al. The Chemokine System in Diverse Forms of Macrophage Activation and Polarization [J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(12): 677-686.
- [12] SONG J, JIN C Y, SHAN Z Y, et al. Prevalence and Risk Factors of Hyperuricemia and Gout: A Cross-Sectional Survey from 31 Provinces in Mainland China [J]. *Journal of Translational Internal Medicine*, 2022, 10(2): 134-145.
- [13] BACCHI S, PALUMBO P, SPONTA A, et al. Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review [J]. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2012, 11(1): 52-64.
- [14] ANGELIDIS C, KOTSIALOU Z, KOSSYVAKIS C, et al. Colchicine Pharmacokinetics and Mechanism of Action [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(6): 659-663.
- [15] 孙文娟,龙春芳,龙毅. 黑骨藤的化学成分和药效研究进展 [J]. 凯里学院学报, 2021, 39(3): 55-59.
- [16] 马庆,邹颖,付强. 黑骨藤的化学成分及质量控制研究进展 [J]. 广东化工, 2023, 50(5): 112-113, 101.
- [17] 党荣敏,刘元忠,谢洪书,等. 黑骨藤抗急性痛风性关节炎的实验研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(9): 1295-1298.
- [18] CHEN R, YANG J, WU M J, et al. M2 Macrophage Hybrid Membrane-camouflaged Targeted Biomimetic Nanosomes to Reprogram Inflammatory Microenvironment for Enhanced Enzyme-Thermo-Immunotherapy [J]. *Advanced Materials*, 2023, 35(39): e2304123.
- [19] WANG L, WANG D G, ZHANG T L, et al. The Role of Immunometabolism in Macrophage Polarization and Its Impact on Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023(14): 1117548.
- [20] LATOUR Y L, GOBERT A P, WILSON K T. The Role of Polyamines in the Regulation of Macrophage Polarization and Function [J]. *Amino Acids*, 2020, 52(2): 151-160.
- [21] ZHAO J X, LI X L, HU J X, et al. Mesenchymal Stromal Cell-derived Exosomes Attenuate Myocardial Ischaemia-Reperfusion Injury through miR-182-Regulated Macrophage Polarization [J]. *Cardiovascular Research*, 2019, 115(7): 1205-1216.
- [22] TUGAL D, LIAO X D, JAIN M K. Transcriptional Control of Macrophage Polarization [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2013, 33(6): 1135-1144.
- [23] WANG Y H, SMITH W, HAO D J, et al. M1 and M2 Macrophage Polarization and Potentially Therapeutic Naturally Occurring Compounds [J]. *International Immunopharmacology*, 2019(70): 459-466.
- [24] ORECCHIONI M, GHOSHEH Y, PRAMOD A B, et al. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1 (LPS+) Vs. Classically and M2 (LPS-) Vs. Alternatively Activated Macrophages [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019(10): 1084.
- [25] 郝佳瑶,黄逸晨,张娟,等. 巨噬细胞极化在痛风性关节炎中的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2022, 51(10): 24-27.

- [26] XU X, GAO W W, LI L, et al. Annexin A1 Protects Against Cerebral Ischemia-reperfusion Injury by Modulating Microglia/Macrophage Polarization via FPR2/ALX-Dependent AMPK-mTOR Pathway [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 119.
- [27] CUI Y X, CHEN J H, ZHANG Z, et al. The Role of AMPK in Macrophage Metabolism, Function and Polarisation [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 892.
- [28] MCGETTRICK A F, O'NEILL L A J. The Role of HIF in Immunity and Inflammation [J]. *Cell Metabolism*, 2020, 32(4): 524-536.
- [29] 赵思涵, 李红艳. 低氧诱导因子 1α 在炎症中的作用研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(22): 2809-2814.
- [30] PROSSER G, BRANDENBURG J, REILING N, et al. The Bacillary and Macrophage Response to Hypoxia in Tuberculosis and the Consequences for T Cell Antigen Recognition [J]. *Microbes and Infection*, 2017, 19(3): 177-192.
- [31] YUN Z H, TAN Y L, WANG Y B, et al. Hypoxia Decreases Macrophage Glycolysis and M1 Percentage by Targeting microRNA-30c and mTOR in Human Gastric Cancer [J]. *Cancer Science*, 2019, 110(8): 2368-2377.
- [32] ZHOU J, YU Y, YANG X, et al. Berberine Attenuates Arthritis in Adjuvant-induced Arthritic Rats Associated with Regulating Polarization of Macrophages through AMPK/NF- κ B Pathway [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 852: 179-188.
- [33] YE L, JIANG Y, ZHANG M M. Crosstalk between Glucose Metabolism, Lactate Production and Immune Response Modulation [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2022(68): 81-92.
- [34] THAPA B, LEE K. Metabolic Influence on Macrophage Polarization and Pathogenesis [J]. *BMB Reports*, 2019, 52(6): 360-372.
- [35] TANNAHILL G M, CURTIS A M, ADAMIK J, et al. Succinate is an Inflammatory Signal that Induces IL- 1β through HIF- 1α [J]. *Nature*, 2013, 496(7444): 238-242.
- [36] KIM J, BAE J S. Metabolic Regulation of Macrophages in Tumor Microenvironment [J]. *Current Opinion in Hematology*, 2018, 25(1): 52-59.
- [37] WU M, ZHANG M L, MA Y W, et al. Chaetocin Attenuates Gout in Mice through Inhibiting HIF- 1α and NLRP3 Inflammasome-dependent IL- 1β Secretion in Macrophages [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 670: 94-103.
- [38] MENG Q Y, GUO P H, JIANG Z Y, et al. Dexmedetomidine Inhibits LPS-induced Proinflammatory Responses via Suppressing HIF 1α -dependent Glycolysis in Macrophages [J]. *Aging*, 2020, 12(10): 9534-9548.

责任编辑 周仁惠

