

基于 AKT-FOXO1-IL-9 通路探讨葛根素 治疗类风湿关节炎大鼠效果评价

刘小瑜¹, 于 涵¹, 余 杰², 高静茹¹, 马庆庆¹, 石继海³, 董向力⁴, 郝金奇¹, 殷若澜¹, 余艳琴^{1,5}

(包头医学院¹ 公共卫生学院、² 护理学院, 包头 014010;

包头医学院第一附属医院³ 皮肤性病科、⁴ 蒙医骨伤科、⁵ 临床流行病学研究中心, 包头 014010)

摘要 **目的** 基于蛋白激酶 B (AKT) - 磷酸化叉头框蛋白 O1 (FOXO1) - 白介素 (IL) - 9 (AKT-FOXO1-IL-9) 信号通路, 探究葛根素治疗类风湿关节炎 (RA) 大鼠的疗效机制。**方法** 将 36 只大鼠随机分为空白组, 模型组, 阳性对照组, 葛根素低、中、高剂量组, 除空白组外, 其余组采用 II 型胶原诱导建立 RA 大鼠模型。造模成功后, 给予不同剂量葛根素和甲氨蝶呤治疗, 检测大鼠体重和足趾厚度, 采用生化方法检测大鼠血液流变学指标, 采用 X 光观察大鼠关节形态变化, 采用番红固绿染色观察大鼠关节组织的病理学, ELISA 法检测大鼠血清中 IL-9 及类风湿因子水平, Western blot 检测蛋白 AKT、FOXO1 的变化。**结果** 与空白组相比, 模型组大鼠足趾厚度最厚, X 线光片显示关节狭窄比较明显, 边缘性骨侵袭较重; 番红固绿染色显示关节边缘出现毛刺样改变, 伴有炎症细胞的渗出, 软骨细胞增殖分泌加剧; 炎症因子 IL-9 及类风湿因子水平表达最高, AKT、FOXO1 蛋白表达量最高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 不同剂量葛根素治疗组大鼠足趾厚度降低; X 光片显示, 葛根素治疗组大鼠脚掌关节狭窄及边缘性骨侵袭有改善; 番红固绿染色结果显示, 不同剂量的葛根素治疗后, 炎症细胞渗出减少, 炎症因子 IL-9 及类风湿因子、AKT、FOXO1 蛋白表达水平降低且差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中高剂量葛根素组最明显。与高剂量的葛根素组相比, 阳性对照组以上结果均降低且差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 葛根素通过抑制 AKT-FOXO1-IL-9 通路对 RA 大鼠具有良好的疗效, 其中葛根素高剂量组 (60 mg/kg) 的疗效最好且存在剂量反应关系。

关键词 葛根素; 类风湿关节炎; 疗效; AKT; FOXO1

中图分类号 R 345.9

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492 (2025) 10 - 1839 - 08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2025.10.009

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 在中国治疗达标率仅为 28%, 与西方国家相差较大 (50% ~ 60%)^[1]。根据国际 RA 最新管理建议, 甲氨蝶呤是首选治疗策略, 长期服用会引起口腔炎、黏膜炎、脱发等, 对患者脏器造成不可逆的损害^[2]。基于此, 需要寻求一种有效、副作用小、价格低廉的药物迫在眉睫。葛根素具有抗炎、抗氧化、预防骨坏死的作用, 有研究^[3-4]表明, 葛根素通过抑制氧化应激和炎症, 能有效缓解糖尿病、高血压以及 RA 等疾病。

蛋白激酶 B (serine/threonine protein kinase, AKT) - 磷酸化叉头框蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FOXO1) 信号通路是一种重要的细胞生存和代谢调节通路, AKT 通过磷酸化 FOXO1 激活信号通路下游的信号因子如白介素 (interleukin, IL) - 9 发挥抗氧化、抗炎等作用^[3]。研究^[5-6]表明, 在调节性 T 细胞 (Treg) 细胞中 AKT 通过抑制细胞活化减少 IL-9 分泌降低其免疫抑制功能, 从而改善 RA。本研究通过检测葛根素对 RA 大鼠形态学、炎症因子、相关蛋白 AKT、FOXO1 和 IL-9 的表达探讨其可能机制, 为葛根素治疗 RA 提供临床价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选购内蒙古大学动物中心 SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只 [生产许可证号: Scxk (蒙) 2021-0001], 6 周龄, 体质量 120 ~ 160 g, 所有实验大鼠处于相同环境下 (环境清洁, 温度适宜, 自然光照) 饲养 1 周。所有实验方案均经伦理委员会批准 (包医动物伦理 [2023] 10 号)。

1.2 主要试剂与仪器 葛根素 (上海罗恩公司, 货

2025 - 07 - 02 接收

基金项目: 内蒙古自治区科技创新引导项目 (编号: CXYD2022BT06); 包头医学院科学研究基金项目 (编号: BYJJ-BSJJ 202201); 包头医学院青年科技人才发展计划项目 (编号: BYJJ-DXK 2022034); 内蒙古医学科学院公立医院科研联合基金科技项目 (编号: 2024GLLH0526)

作者简介: 刘小瑜, 女, 硕士研究生;

余艳琴, 女, 副教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: yan-qin0324@126.com

号:R005493),冰醋酸(台新宁制药有限公司),完全弗氏佐剂(CFA)、鸡Ⅱ型胶原(CⅡ)、ELISA检测试剂盒(泉州九邦生物科技有限公司,货号:QZ-10049),AKT(杭州景杰生物科技股份有限公司,货号:PTM-6649),FOXO1、 β -actin(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号:AF6419和66009-1-Ig),BCA总蛋白定量测定试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,货号:A202),SFH-2型高速匀浆机(江苏省环宇科学仪器厂),不锈钢游标卡尺(上海力衡仪器仪表有限公司)。

1.3 建立Ⅱ型胶原诱导免疫的关节炎大鼠模型

向100 mL去离子水中加0.05 mL冰醋酸得到溶液A;将溶液A与鸡Ⅱ型胶原混合制成2 mg/mL的溶液B;溶液B与等体积完全弗氏佐剂冰浴匀浆得乳剂C,存4℃冰箱。大鼠皮内注射C共0.3 mL(四肢与尾部),针口经过氧化氢、生理盐水冲洗及碘伏消毒,对照组注生理盐水。大鼠每日腹腔注射青霉素钠3 d,防感染7 d后重复操作,大鼠双足红肿变形,形成稳定的CIA模型。

1.4 大鼠分组 将实验大鼠分为空白组,模型组,阳性对照组,葛根素低、中、高剂量组,每组各6只。除空白组与模型组外,阳性对照组给予甲氨蝶呤0.2 mg/kg灌胃,各治疗组给予低剂量组葛根素20 mg/kg,中剂量组葛根素40 mg/kg,高剂量组葛根素60 mg/kg灌胃,每日1次,治疗28 d。

1.5 大鼠一般形态检测 对大鼠一般状况如毛发光泽度、脚掌红肿及变形情况、行动灵活性等指标进行观察。采用天平检测各组大鼠体质量与观察大鼠足趾部软组织的肿胀程度,用游标卡尺测量各组大鼠的脚掌厚度(大鼠足趾部软组织相对最薄处);在实验的第7、14、21、28天各记录1次。大鼠关节炎指数评分标准:0分,无发红或肿胀;1分,局限于跗关节或脚踝红肿;2分,发红和轻度肿胀从踝关节延伸到跗关节;3分,发红和中度肿胀从脚踝延伸到跗骨关节;4分,遍布足部的严重肿胀或肢体僵硬^[7]。

1.6 大鼠脚掌X光、踝关节番红固绿染色 治疗28 d后,处死大鼠,取大鼠脚掌进行X光检测。大鼠踝关节滑膜组织于多聚甲醛中固定,石蜡包埋后切片进行番红固绿染色,通过200倍显微镜下观察大鼠关节组织病理学改变。

1.7 血液流变学的测定 取大鼠腹主动脉血液5 mL存于采血管中,采用生化自动检测仪器测血清生化指标、血液细胞分析仪检测各组大鼠各指标含量的变化。

1.8 ELISA法检测大鼠血清中IL-9及类风湿因子水平 取腹主动脉血离心,取上层血清。按照ELISA试剂盒说明书检测血清样本中IL-9及类风湿因子表达水平。

1.9 Western blot法检测大鼠滑膜组织蛋白AKT、FOXO1相对表达水平 处死大鼠并取出滑膜组织,在冰浴中迅速称重并加入裂解液,进行组织匀浆。使用RIPA裂解缓冲液分离总蛋白,将蛋白质进行定量、电泳、转膜、封闭,然后将膜与一抗AKT(1:1 000)、FOXO1(1:1 000)在4℃下孵育过夜,以actin(1:1 000)作为内部参考洗涤后,将膜暴露于HRP标记的二抗(1:500)中2 h。加入ECL试剂可视化蛋白质。使用Image LabTM软件分析目标蛋白在滑膜组织中的相对表达水平。

1.10 统计学处理 使用SPSS 23.0分析数据,计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用单因素方差分析,多时间点检测采用重复测量设计,各项检测两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状况、X光片及番红固绿染色结果 空白组大鼠脚掌正常;模型组大鼠脚掌红肿,活动范围小,且以后脚为轴进行频繁变换,与空白组大鼠相比行为活动有明显差异,精神状态欠佳,出现站立不稳的现象。与模型组相比,葛根素低、中、高剂量以及阳性对照组大鼠脚掌部位红肿情况逐渐减轻;其中葛根素高剂量组和阳性对照组大鼠表现明显好转。结果见图1。

X光检测结果显示,空白组大鼠关节表现正常,模型组大鼠关节狭窄比较明显,边缘性骨侵袭较重,与模型组相比,不同剂量的葛根素和甲氨蝶呤治疗后各组大鼠脚掌关节狭窄均有不同程度缓解,偶有边缘性骨侵袭和骨质疏松改变,且呈剂量依赖性症状有所减轻。见图2。

番红固绿染色结果显示,空白组软骨组织呈现为红色或橙红色,胶原纤维为绿色,颜色对比分明,关节间隙与关节面清晰光滑平整,未见明显的增生和破坏。与空白组相比较,模型组关节腔边缘出现毛刺样改变,伴随炎症细胞的渗出,软骨细胞增殖分泌加剧。在不同剂量的葛根素和甲氨蝶呤治疗后,各组大鼠的炎症细胞减少,关节腔边缘也出现了不同程度的好转,且呈剂量依赖性。其中甲氨蝶呤治疗后效果最明显。见图3。

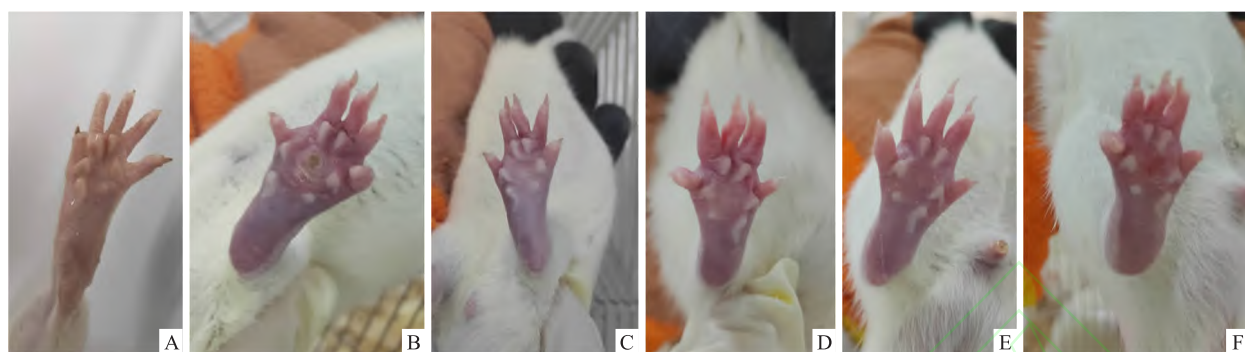


图1 各处理组大鼠外观形态结果比较 $\times 1.5$

Fig. 1 Comparison of appearance and morphology results of rats in different treatment groups $\times 1.5$

A: Blank group; B: Model group; C: Positive control group; D: Low dose group of puerarin; E: Puerarin medium dose group; F: High dose group of puerarin.

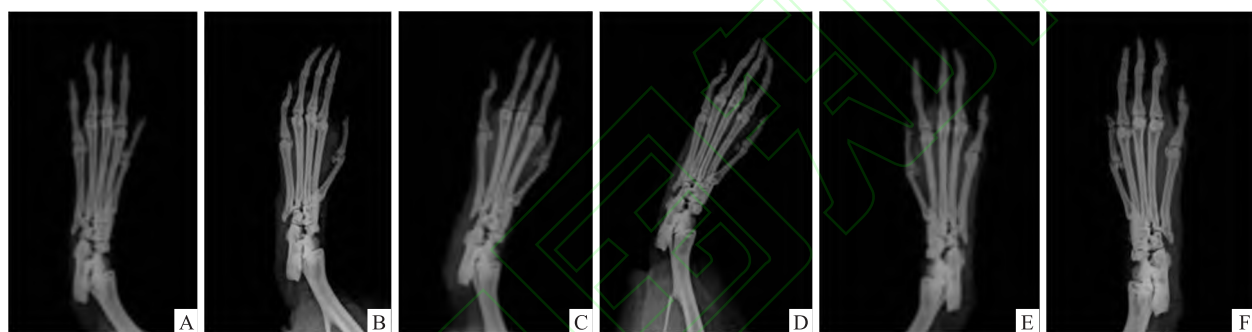


图2 各处理组大鼠X光片结果比较 $\times 1.5$

Fig. 2 Comparison of X-ray images of rats in different treatment groups $\times 1.5$

A: Blank group; B: Model group; C: Positive control group; D: Low dose group of puerarin; E: Puerarin medium dose group; F: High dose group of puerarin.

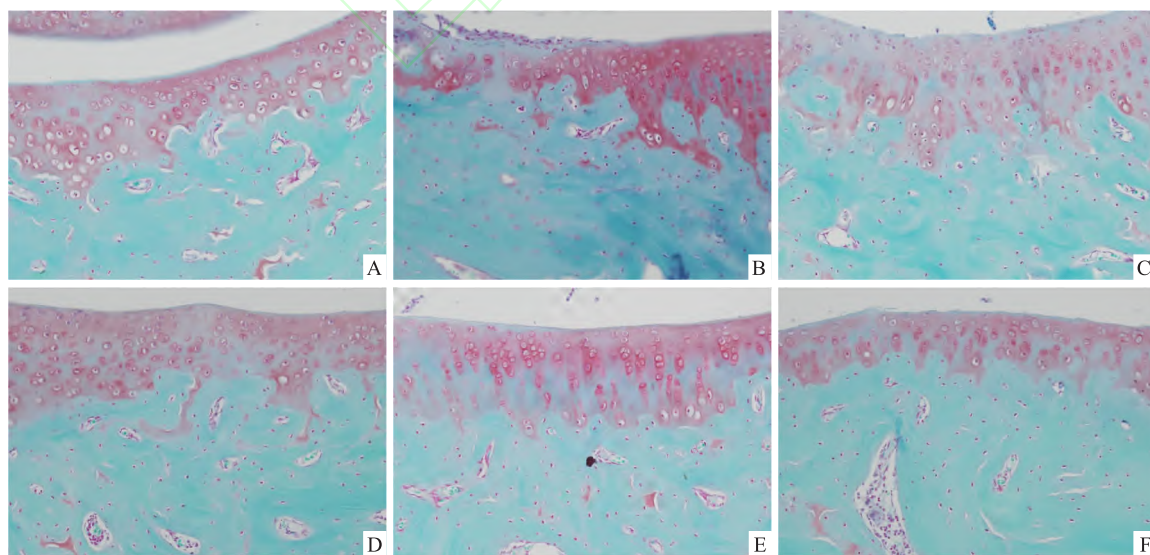


图3 各处理组大鼠踝关节番红固绿染色结果 $\times 200$

Fig. 3 Results of Safranin green staining of ankle joints of rats in different treatment groups $\times 200$

A: Blank group; B: Model group; C: Positive control group; D: Low dose group of puerarin; E: Puerarin medium dose group; F: High dose group of puerarin.

2.2 各组大鼠体质量、足趾厚度、关节炎指数评分

对各组大鼠体质量重复资料方差分析结果显示,不同时间点各组大鼠体质量差异有统计学意义($F_{\text{时间}}=183.23, P_{\text{时间}}<0.05$),治疗组别与时间之间无交互作用($F_{\text{组别} \times \text{时间}}=0.44, P_{\text{组别} \times \text{时间}}=0.90$),说明随时间变化不同组别大鼠体质量之间无差别。见表1。

大鼠足趾厚度重复测量结果显示,各组大鼠足趾厚度之间存在时间、组别、组别与时间之间的交互效应作用($F_{\text{时间}}=41.13, P_{\text{时间}}<0.05; F_{\text{组别}}=23.18, P_{\text{组别}}<0.05; F_{\text{时间} \times \text{组别}}=2.19, P_{\text{时间} \times \text{组别}}<0.05$),除空白组外各处理组大鼠足趾厚度随时间的增加出现先增加后降低,且有剂量反应关系,其中时间、组别存在统计学差异,足趾厚度在治疗前、后各组内各时间点之间差异有统计学意义($P<0.05$),而各组间足趾厚度比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

各组大鼠关节炎指数结果显示,与空白组相比,其余各组关节炎指数差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗第2、3、4周,与模型组相比,阳性对照组与高剂量组差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.3 各处理组大鼠的血液流变学指标比较 结果显示,各处理组全血黏度不同,差异有统计学意义($P<0.05$),与空白组相比,模型组低、中、高切值升

高。与模型组相比,葛根素低剂量组、中剂量组低切,葛根素高剂量组低、中、高切,阳性对照组低、中、高切均降低($P<0.05$)。与葛根素低剂量组相比,葛根素高剂量组高切值以及阳性对照组的高、中及低切值降低差异有统计学意义($P<0.05$)。与葛根素中剂量组相比,葛根素高剂量组低切值以及阳性对照组的高、中及低切值降低差异有统计学意义($P<0.05$),与葛根素高剂量组相比,阳性对照组的中及低切值降低差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.4 各处理组大鼠生化指标结果 结果显示,各处理组谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、尿素氮(blood urea nitrogen, BuN)差异有统计学意义($P<0.05$),与空白组相比,模型组,葛根素中、高剂量组 ALT、BuN 水平降低($P<0.05$),阳性对照组升高($P<0.05$),而葛根素低剂量组中 ALT 水平降低($P<0.05$);与模型组相比,葛根素中、高剂量组 BuN 水平降低($P<0.05$),阳性对照组 BuN 和 ALT 升高($P<0.05$)。与低剂量的葛根素组相比,葛根素中、高剂量组 BuN 和 ALT 水平降低($P<0.05$),而阳性对照组升高($P<0.05$),与葛根素中剂量和高剂量组相比,阳性对照组 BuN 和 ALT 水平升高($P<0.05$)。各处理组谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酐(creatinine, Cr)差异无统计学意义($P>0.05$)。见表5。

表 1 各处理组大鼠体质量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6, g$)

Time	Blank group	Model group	Positive group	Low dose group	Medium dose group	High dose group
Before mold making	138.97 ± 11.36	126.20 ± 7.53	129.07 ± 5.84	136.40 ± 8.32	139.17 ± 5.40	137.20 ± 3.29
After molding	177.97 ± 16.66 [*]	169.63 ± 9.90 [*]	174.13 ± 6.31 [*]	180.43 ± 30.86 [*]	174.93 ± 12.05 [*]	181.33 ± 12.28 [*]
First week	217.00 ± 16.67 ^{*#}	202.40 ± 14.51 ^{*▲}	209.23 ± 15.69 [*]	222.50 ± 2.54 ^{*#}	204.53 ± 8.78 ^{*#}	213.53 ± 10.40 ^{*#}
Second week	256.87 ± 8.62 ^{*#&}	238.90 ± 25.02 ^{*#&}	253.53 ± 19.59 ^{*#&}	258.00 ± 17.91 ^{*#&}	240.57 ± 16.78 ^{*#&}	247.13 ± 13.24 ^{*#&}
Third week	267.40 ± 16.04 ^{*#&}	245.70 ± 30.03 ^{*#&}	264.77 ± 27.61 ^{*#&}	268.40 ± 20.40 ^{*#&}	243.03 ± 21.30 ^{*#&}	251.53 ± 13.68 ^{*#&}
The fourth week	286.03 ± 12.36 ^{*#&△}	257.27 ± 40.27 ^{*#&△}	292.03 ± 30.27 ^{*#&△}	287.83 ± 18.31 ^{*#&}	257.87 ± 23.57 ^{*#&}	266.47 ± 14.40 ^{*#&}

^{*} $P<0.05$ vs Before mold making; [#] $P<0.05$ vs After molding; [&] $P<0.05$ vs First week of treatment; [△] $P<0.05$ vs Second week of treatment; [▲] $P<0.05$ vs Third week of treatment.

表 2 各处理组大鼠足趾厚度测量情况比较 ($\bar{x} \pm s, n=6, cm$)

Tab. 2 Comparison of toe thickness measurements of rats among different treatment groups ($\bar{x} \pm s, n=6, cm$)

Time	Blank group	Model group	Positive group	Low dose group	Medium dose group	High dose group
Before mold making	0.46 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.49 ± 0.022	0.48 ± 0.03	0.48 ± 0.04	0.49 ± 0.0
After molding	0.47 ± 0.0	0.74 ± 0.09 [*]	0.70 ± 0.05 [*]	0.74 ± 0.09 [*]	0.78 ± 0.02 [*]	0.74 ± 0.02 [*]
First week	0.49 ± 0.07	0.78 ± 0.05 [*]	0.70 ± 0.04 ^{*▲}	0.74 ± 0.05 [*]	0.72 ± 0.04 ^{*▲}	0.70 ± 0.05
Second week	0.46 ± 0.02	0.74 ± 0.03 [*]	0.63 ± 0.10 [*]	0.70 ± 0.11 [*]	0.71 ± 0.05 ^{*#}	0.68 ± 0.03 [*]
Third week	0.47 ± 0.02	0.72 ± 0.02 [*]	0.58 ± 0.04 ^{*#&}	0.67 ± 0.07 ^{*#&}	0.61 ± 0.02 ^{*#&△}	0.60 ± 0.03 ^{*#&}
The fourth week	0.49 ± 0.03	0.66 ± 0.05 ^{*#&▲△}	0.53 ± 0.02 ^{*#&△}	0.60 ± 0.03 ^{*#&△}	0.56 ± 0.06 ^{*#&△}	0.54 ± 0.05 ^{#&}

^{*} $P<0.05$ vs Before mold making; [#] $P<0.05$ vs After molding; [&] $P<0.05$ vs First week of treatment; [△] $P<0.05$ vs Second week of treatment; [▲] $P<0.05$ vs Third week of treatment.

表 3 各处理组大鼠关节指数评分 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.3 Joint index scores of rats in each treatment group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Time	Blank group	Model group	Positive group	Low dose group	Medium dose group	High dose group
Before mold making	0	0	0	0	0	0
After molding	0	3.20 ± 0.78 *	3.10 ± 0.84 *	3.20 ± 0.58 *	3.30 ± 0.50 *	3.20 ± 0.65 *
First week	0	3.10 ± 0.50 *	2.33 ± 0.52 *#	2.83 ± 0.41 * &	2.83 ± 0.41 * &	2.33 ± 0.52 *#△▲
Second week	0	3.17 ± 0.42 *	1.33 ± 0.52 *#	2.33 ± 0.52 *#&	2.00 ± 0.41 *#&	1.83 ± 0.41 *#&△
Third week	0	3.33 ± 0.52 *	1.17 ± 0.41 *#	2.33 ± 0.52 *#&	1.67 ± 0.52 *#△	1.33 ± 0.52 *#△

* $P < 0.05$ vs Blank group; # $P < 0.05$ vs Model group; & $P < 0.05$ vs Positive group; △ $P < 0.05$ vs Low dose group; ▲ $P < 0.05$ vs Medium dose group.

表 4 不同组大鼠血液流变学指标结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{mPa} \cdot \text{s}$)

Tab.4 Comparison of hemorheological indicators of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{mPa} \cdot \text{s}$)

Group	Low cut	Mid cut	High cut
Blank	11.83 ± 1.29	6.33 ± 0.69	4.51 ± 0.49
Model	13.80 ± 0.56 *	7.16 ± 0.25 *	5.01 ± 0.17 *
Low dose	12.71 ± 0.54 #	6.71 ± 0.17	4.75 ± 0.06
Medium dose	12.48 ± 0.09 #	6.62 ± 0.08	4.69 ± 0.12
High dose	11.89 ± 0.39 #▲	6.09 ± 0.30 #	4.22 ± 0.25 #△
Positive	10.20 ± 0.65 *#&△▲	5.56 ± 0.38 *#&△▲	4.02 ± 0.29 *#△▲
F value	9.05	6.94	5.41
P value	< 0.05	< 0.05	< 0.05

* $P < 0.05$ vs Blank group; # $P < 0.05$ vs Model group; △ $P < 0.05$ vs Low dose group; ▲ $P < 0.05$ vs Medium dose group; & $P < 0.05$ vs High dose group.

表 5 各处理组大鼠的生化指标结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.5 Comparison of biochemical index results among different treatment groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	ALT (U/L)	AST (U/L)	BuN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
Blank	27.50 ± 9.75	48.00 ± 18.34	3.65 ± 1.09	20.17 ± 5.53
Model	19.33 ± 3.56 *	40.67 ± 6.74	2.62 ± 0.96 *	14.33 ± 4.46
Low dose	22.55 ± 6.88 *	44.65 ± 12.57	3.10 ± 1.82	16.52 ± 5.47
Medium dose	18.50 ± 4.14 △ *	39.83 ± 12.40	2.10 ± 0.40 *#△	14.33 ± 1.75
High dose	19.00 ± 8.12 △ *	36.67 ± 15.80	1.77 ± 0.61 *#△	15.17 ± 5.08
Positive	42.08 ± 2.97 *#&△▲	40.30 ± 8.54	4.32 ± 0.53 #&△▲	13.41 ± 2.67
F value	12.07	0.57	5.31	1.85
P value	< 0.05	0.72	< 0.05	0.13

* $P < 0.05$ vs Blank group; # $P < 0.05$ vs Model group; △ $P < 0.05$ vs Low dose group; ▲ $P < 0.05$ vs Medium dose group; & $P < 0.05$ vs High dose group.

2.5 各处理组大鼠 IL-9 及类风湿因子表达水平比较 血清结果显示,各处理组大鼠血清中 IL-9、类风湿因子表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白组相比,模型组、低剂量的葛根素组 IL-9、类风湿因子表达水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且 IL-9 在中剂量葛根素组表达水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比,不同剂量的葛根素组和阳性组中 IL-9、类风湿因子表达水平均降低,差异有统计学意义 ($P <$

0.05),与低剂量的葛根素组相比,葛根素高剂量组和阳性组中 IL-9 表达水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与葛根素中剂量组相比,葛根素高剂量组、阳性对照组中 IL-9 表达降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 6。

2.6 各处理组大鼠滑膜组织 AKT 和 FOXO1 蛋白相对表达量 各处理组大鼠滑膜组织 AKT 和 FOXO1 蛋白相对表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白组相比,模型组、葛根素低、中剂量

的 AKT 和 FOXO1 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,不同剂量的葛根素组和阳性对照组 AKT 和 FOXO1 蛋白表达水平降低且差异均有统计学意义($P < 0.05$),且呈现剂量反应关系。结果见图 4。

表 6 不同组大鼠 IL-9 和类风湿因子表达比较
($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{ng/L}$)

Tab. 6 Comparison of IL-9 and rheumatoid factor expression in rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{ng/L}$)

Group	IL-9	RF
Blank	5.80 ± 0.06	4.00 ± 0.79
Model	10.16 ± 0.25 *	5.83 ± 0.31 *
Low dose	8.90 ± 0.38 *#	4.87 ± 0.25 *#
Medium dose	8.33 ± 0.23 *#	4.70 ± 0.40#
High dose	6.50 ± 0.27#△▲	4.53 ± 0.21#
Positive	6.39 ± 0.82#△▲	4.70 ± 0.17#
F value	47.82	6.35
P value	<0.01	<0.05

* $P < 0.05$ vs Blank group; # $P < 0.05$ vs Model group; △ $P < 0.05$ vs Low-dose group; ▲ $P < 0.05$ vs Medium dose group.

3 讨论

RA 临床表现以关节肿胀、关节畸形为主。本研究表明模型组大鼠表现出外观形态的改变、足趾厚度增加、脚掌红肿以及“三足跛行”等,同时伴随精神状态欠佳和站立不稳,X 光片脚掌关节狭窄及边缘性骨侵蚀,而番红固绿染色则揭示炎症细胞增多及关节腔边缘毛刺样改变,说明 RA 模型造模成功^[7]。而不同剂量的葛根素治疗后,大鼠外观形态中脚掌肿胀程度、足趾厚度等均得到缓解,X 光片脚掌关节狭窄减少,番红固绿染色结果显示,炎症细胞

减少及关节腔边缘改变减弱,呈现剂量反应关系;其中高剂量组最明显,说明葛根素通过抑制炎症细胞活性和减少炎症介质释放来减轻症状而达到治疗 RA 作用^[8]。

体质量变化是评估 RA 疾病进展和疗效的间接指标^[9]。在本研究中模型组大鼠体质量增长最慢,可能与 RA 引起急性炎症反应致使大鼠体质量降低有关。而葛根素和甲氨蝶呤治疗可能与抑制炎症反应使动物体质量增加有关。RA 引起炎症反应释放炎症因子(如 IL-9),炎症介质增加了红细胞和血浆蛋白的聚集导致血液黏稠度增加影响血液的流动性以及引起关节损伤^[10-11]。本研究表明,模型组的全血黏度指标和炎症因子 IL-9 表达量最高,而不同剂量的葛根素和甲氨蝶呤使全血黏度和炎症因子 IL-9 表达量降低且具有剂量反应关系,可能与葛根素与甲氨蝶呤具有抗炎和免疫调节作用,改善血液流变学指标以及抑制 IL-9 的产生,进而减轻炎症反应。研究^[11]表明,RA 会导致患者肝脏受累引起肝功能异常,表现为 ALT、AST 水平升高。本研究结果显示,RA 大鼠的 ALT、BUN 水平显著降低,说明 RA 大鼠发生的肝肾损伤,而葛根素中、高剂量则能显著降低 ALT 和 BUN 水平,说明葛根素通过改善肾小球滤过功能或降低蛋白质代谢率来保护肝肾。使用甲氨蝶呤治疗 RA 大鼠 ALT 和 BUN 的升高,与临床使用甲氨蝶呤治疗 RA 引起肝肾损伤结论一致^[12]。类风湿因子是 IgG 中 Fc 段的自身抗体,在 RA 患者血清中阳性,且与疾病活动性和严重程度相关^[13]。本研究表明,模型组大鼠类风湿因子含量最高,而葛根素低、中、高剂量组及阳性对照组和空白组类风湿因子 RF 水平均降低,且差异有统计学意义($P <$

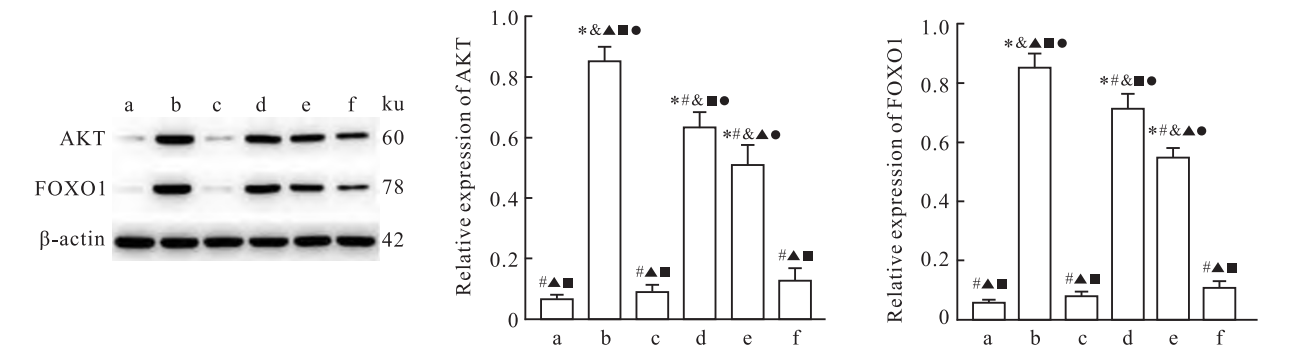


图 4 不同处理组大鼠滑膜组织 AKT 和 FOXO1 蛋白表达情况

Fig. 4 The expression of AKT and FOXO1 proteins in synovial tissue of rats in different treatment groups

a: Blank group; b: Model group; c: Positive control group; d: Low dose group; e: Medium dose group; f: High dose group; * $P < 0.05$ vs Blank group; # $P < 0.05$ vs Model group; & $P < 0.05$ vs Positive control group; △ $P < 0.05$ vs Low dose group; ▲ $P < 0.05$ vs Medium dose group; ● $P < 0.05$ vs High dose group.

0.05),其中高剂量组降低最显著。以上结果显示,葛根素与甲氨蝶呤疗效相似,但是葛根素不会引起肝肾功能损害。

AKT-FOXO1 信号通路具有调控细胞生长与增殖、代谢、迁移与侵袭以及自噬与凋亡等功能。FOXO1 作为 AKT 的下游靶蛋白,其活性受 AKT 磷酸化调控。在 RA 中,AKT 异常激活会磷酸化 FOXO1 抑制其转录活性,进而释放炎症因子如 TNF- α 和 IL-9 及关节破坏^[14-15]。本研究表明,与空白组相比,模型组 AKT、FOXO1 蛋白及 IL-9 表达水平显著升高,说明 AKT-FOXO1 信号通路活化可能与 RA 的病理过程相关。而不同剂量的葛根素治疗后,AKT、FOXO1 和 IL-9 的表达水平呈现下降趋势且呈现剂量反应关系,其中葛根素高剂量组中 AKT、FOXO1 和 IL-9 的表达水平下降趋势更为明显,提示葛根素可能通过调节 AKT-FOXO1-IL-9 通路抑制炎症细胞的活化和细胞因子的产量,减轻炎症反应来发挥治疗作用。

综上所述,葛根素通过抑制 AKT-FOXO1-IL-9 通路,抑制炎症因子的释放,从而发挥对 RA 大鼠疗效,其中葛根素剂量为 60 mg/kg 时疗效最佳。为提高临床应用的效果,后续可以采用葛根素联合用药探索更佳疗效并减少不良反应。

参考文献

- [1] He J, Maharaj A B. Highlights of advancement in rheumatoid arthritis research and clinical practice[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2025, 39(1): 102040. doi:10.1016/j.berh.2025.102040.
- [2] Qiao L, Hu J, Ou D, et al. Comparison of the efficacy and safety of methotrexate injection and methotrexate tablets in active RA[J]. *Rheumatology*, 2025, 64(6): 3426–33. doi:10.1093/rheumatology/keaf054.
- [3] Long Z, Xiang W, He Q, et al. Efficacy and safety of dietary polyphenols in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of 47 randomized controlled trials[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1024120. doi:10.3389/fimmu.2023.1024120.
- [4] Yang M, Luo Y, Liu T, et al. The effect of puerarin on carotid intima-media thickness in patients with active rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial[J]. *Clin Ther*, 2018, 40(10): 1752–64. e1. doi:10.1016/j.clinthera.2018.08.014.
- [5] Wang Y H, Peng Y J, Liu F C, et al. Interleukin 26 induces macrophage IL-9 expression in rheumatoid arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7526. doi:10.3390/ijms24087526.
- [6] Tu J, Chen W, Xue Z, et al. Uncovered role of Th9 and IL-9 in rheumatoid arthritis: current status and future directions[J]. *Semin Immunol*, 2025, 79: 101979. doi:10.1016/j.smim.2025.101979.
- [7] Li J, He J, Kuhn K A, et al. Animal models informing the role of the microbiome and its metabolites in rheumatoid arthritis[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2025, 51(2): 325–46. doi:10.1016/j.rdc.2025.01.004.
- [8] Deng W, Zhang W, He Q. Study on the mechanism of puerarin against osteoarthritis from ferroptosis based on network pharmacology and bioinformatics[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397(2): 959–68. doi:10.1007/s00210–023–02653–9.
- [9] 代贝贝, 祖胜芹, 周仁鹏, 等. ASIC1 基因敲除对佐剂性关节炎小鼠关节软骨损伤的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(4): 567–72. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.04.008.
- [9] Dai B B, Zu S Q, Zhou R P, et al. Effects of ASIC1 knockout on articular cartilage injury in adjuvant arthritis of mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(4): 567–72. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.04.008.
- [10] Weber B, Weisenfeld D, Massarotti E, et al. Interplay between systemic inflammation, myocardial injury, and coronary microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis: results from the LiIRA study[J]. *J Am Heart Assoc*, 2024, 13(9): e030387. doi:10.1161/JAHA.123.030387.
- [11] Wang L, Huang S, Li S, et al. Efficacy and safety of umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for rheumatoid arthritis patients: a prospective phase I/II study[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 4331–40. doi:10.2147/DDDT.S225613.
- [12] Tufan E, Sivas G G, Gürel-Gökmen B, et al. Whey protein concentrate ameliorates the methotrexate-induced liver and kidney damage[J]. *Br J Nutr*, 2023, 130(10): 1704–11. doi:10.1017/S0007114523000752.
- [13] Vandebeek D, Lodewijckx E, Van Hoovels L, et al. Integrating pretest probability for rheumatoid arthritis with likelihood ratios of RF and ACPA to improve clinical utility of rheumatoid arthritis autoantibody testing[J]. *Clin Chim Acta*, 2025, 564: 119928. doi:10.1016/j.cca.2024.119928.
- [14] Tan L, Wang X, Wang S, et al. Soufeng Sanjie formula alleviates the progression of lupus and joint injury by regulating the ALK-BH5-FoxO1-PFKFB3 axis in M-MDSCs[J]. *Phytomedicine*, 2025, 141: 156687. doi:10.1016/j.phymed.2025.156687.
- [15] Wu N, Yuan T, Yin Z, et al. Network pharmacology and molecular docking study of the Chinese Miao medicine sidaxue in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 435–66. doi:10.2147/DDDT.S330947.

Evaluation of the effect of puerarin on rheumatoid arthritis in rats based on AKT-FOXO1-IL-9 pathway

Liu Xiaoyu¹, Yu Han¹, Yu Jie², Gao Jingru¹, Ma Qingqing¹,

Shi Jihai³, Dong Xiangli⁴, Hao Jinqi¹, Yin Ruolan¹, Yu Yanqin^{1,5}

(¹*School of Public Health*, ²*School of Nursing*, Baotou Medical College, Baotou 014010;

³*Dept of Dermatology*, ⁴*Dept of Orthopedics*, Mongolian Medicine, ⁵*Clinical Epidemiology Research Center*, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010)

Abstract **Objective** To explore the therapeutic mechanism of puerarin in treating rheumatoid arthritis (RA) rats based on the serine/tyrosine protein kinase B (AKT)-phosphorylated forkhead box protein O1 (FOXO1)-interleukin-9 (AKT-FOXO1-IL-9) signaling pathway. **Methods** 36 rats were randomly divided into a blank group, a model group, a positive control group, and low, medium, and high dose groups of puerarin. Except for the blank group, the other groups were induced with type II collagen to establish a RA rat model. After successful modeling, different doses of puerarin and methotrexate were given to treat the rats. The body mass and toe thickness of the rats were measured, and biochemical indicators of rat blood rheology were detected. X-ray was used to observe changes in rat joint morphology. Safranin green staining were used to observe the pathology of rat joint tissue. ELISA was used to detect the levels of IL-9 and rheumatoid factors in rat serum, and Western blot was used to detect changes in levels of AKT and FOXO1. **Results** Compared with the blank group, the model group had the lowest toe thickness, and X-ray images showed more obvious segmental stenosis and more severe marginal bone invasion; scaly like changes appeared at the edges of joints stained with safranin green, accompanied by the exudation of inflammatory cells and increased proliferation and secretion of chondrocytes; the expression levels of inflammatory factors IL-9 and rheumatoid factors were the highest, and the expression levels of AKT and FOXO1 proteins were the highest ($P < 0.05$). Compared with the model group, the toe thickness of rats treated with different doses of puerarin decreased; X-ray images showed that the puerarin treatment group of rats showed improvement in plantar joint stenosis and marginal bone invasion; the results of safranin green staining showed that after treatment with different doses of puerarin, the infiltration of inflammatory cells decreased, and the expression levels of inflammatory factor IL-9, rheumatoid factors, AKT, and FOXO1 proteins decreased significantly ($P < 0.05$), with the high-dose puerarin group showing the most significant difference. Compared with the high-dose puerarin group, the positive control group showed a significant decrease in the above results and statistical differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Puerarin has a good therapeutic effect on rats with RA by inhibiting the AKT-FOXO1-IL-9 pathway. The high-dose puerarin group (60 mg/kg) has the best therapeutic effect and the results show a dose-response relationship.

Key words puerarin; rheumatoid arthritis; therapeutic effect; AKT; FOXO1

Fund programs Science and Technology Innovation Guidance Project of Inner Mongolia Autonomous Region (No. CXYD2022BT06); Scientific Research Fund Project of Baotou Medical College (No. BYJJ-BSJJ 202201); Young Sci-Tech Talents Development Program of Baotou Medical College (No. BYJJ-DXK 2022034); Science and Technology Program of the Joint Fund of Scientific Research for the Public Hospitals of Inner Mongolia Academy of Medical Sciences (No. 2024GLLH0526)

Corresponding author Yu Yanqin, E-mail: yanqin0324@126.com