

李华燕, 苏培培, 王鑫, 等. 基于 miR-146a 调控 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨加味四妙散对尿酸钠晶体诱导的 RAW264.7 细胞炎症的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(6): 41-49.

Li HY, Su PP, Wang X, et al. Mechanism of Jiawei Simiao powder on monosodium urate crystal-induced RAW264.7 cell inflammation via miR-146a regulation of the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(6): 41-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.06.005

基于 miR-146a 调控 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨 加味四妙散对尿酸钠晶体诱导的 RAW264.7 细胞 炎症的作用机制

李华燕^{1,2}, 苏培培¹, 王鑫^{1,2}, 牛源源^{1,2}, 陈祺恒^{1,2}, 孙千惠^{1,2}, 杜明瑞^{1,2*}

(1.河南中医药大学第一附属医院风湿病科, 郑州 450000; 2.河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046)

【摘要】 目的 研究加味四妙散通过微小 RNA-146a (microRNA-146a, miR-146a) 调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路对尿酸钠 (monosodium urate, MSU) 晶体诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型的影响, 探讨其抗炎作用机制。方法 以 MSU 晶体诱导 RAW264.7 细胞建立痛风性关节炎模型, 分为空白对照组、模型组、加味四妙散组和秋水仙碱组。CCK-8 法检测各组细胞活性, 酶联免疫吸附法检测白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平, 实时荧光定量聚合酶链式反应检测 miR-146a miRNA 和 TLR4、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)、NF- κ B p65 mRNA 表达, Western blot 检测 TLR4、MyD88、TRAF6、磷酸化 (phospho, p)-NF- κ B p65 蛋白表达。结果 与空白对照组比较, 模型组 miR-146a 表达显著降低 ($P<0.01$), TLR4、MyD88、TRAF6 的 mRNA 和蛋白表达、p-NF- κ B p65 蛋白表达以及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达水平均显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 加味四妙散组和秋水仙碱组 miR-146a 的表达明显升高 ($P<0.01$), TLR4、MyD88、TRAF6 的 mRNA 和蛋白表达以及 p-NF- κ B 的蛋白表达均明显降低 ($P<0.01$), IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著降低 ($P<0.05$)。结论 加味四妙散可能通过上调 miR-146a, 抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活, 减少炎症因子的产生, 从而减轻 MSU 晶体诱导的巨噬细胞炎症反应。

【关键词】 加味四妙散; 痛风性关节炎; miR-146a; TLR4/NF- κ B 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 06-0041-09

Mechanism of Jiawei Simiao powder on monosodium urate crystal-induced RAW264.7 cell inflammation via miR-146a regulation of the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway

【基金项目】 河南省中医药传承与创新人才工程 (仲景工程) 中医药学科拔尖人才项目 (CZ0325-15); 河南省卫生健康委员会国家中医药传承创新中心联合共建科研专项 (2024ZXZX1052)。

【作者简介】 李华燕 (1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治风湿免疫疾病研究。E-mail: 2424514335@qq.com

【通信作者】 杜明瑞 (1978—), 女, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 中医药防治风湿免疫疾病研究。

E-mail: dumingrui@126.com

LI Huayan^{1,2}, SU Peipei¹, WANG Xin^{1,2}, NIU Yuanyuan^{1,2}, CHEN Zhenheng^{1,2}, SUN Qianhui^{1,2}, DU Mingrui^{1,2*}

(1. Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

2. the First Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Jiawei Simiao powder on the Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway through miR-146a in monosodium urate (MSU) crystal-induced RAW264.7 macrophage inflammation models, and to explore its anti-inflammatory mechanism. **Methods** A cell model of gouty arthritis was established by inducing RAW264.7 cells with MSU crystals. Cells were divided into control, model, Jiawei Simiao powder, and colchicine groups and cell viability was assessed using the CCK-8 method. Levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Expression levels of miR-146a miRNA and TLR4, myeloid differentiation factor 88 (MyD88), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), and NF- κ B p65 mRNA were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction amplification technology, and protein expression levels of TLR4, MyD88, TRAF6, and phospho (p)-NF- κ B p65 were evaluated by Western blot. **Results** miR-146a expression was significantly decreased in the model group compared with the control group ($P < 0.01$), while mRNA and protein expression levels of TLR4, MyD88, and TRAF6, and protein expression of p-NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6, and TNF- α were significantly increased ($P < 0.01$). In contrast, miR-146a expression was significantly increased ($P < 0.01$) and mRNA and protein expression of TLR4, MyD88, and TRAF6, and p-NF- κ B p65 protein expression ($P < 0.01$), as well as IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels ($P < 0.05$) were significantly decreased in the Jiawei Simiao powder and colchicine groups. **Conclusions** Jiawei Simiao powder may alleviate MSU crystal-induced macrophage inflammatory responses by upregulating miR-146a, suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway activation, and decreasing secretion of inflammatory factors.

【Keywords】 Jiawei Simiao powder; gouty arthritis; miR-146a; TLR4/NF- κ B signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

痛风性关节炎(gouty arthritis, GA)是一种因尿酸钠(monosodium urate, MSU)晶体沉积在关节及其周围组织引发的炎症性疾病,其发病率随着社会经济快速发展和膳食模式的转变呈逐年上升趋势,已成为影响人类健康的公共卫生问题^[1-3]。MSU晶体被巨噬细胞识别后,会激活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,进而触发一系列炎症反应,释放如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-6等炎症因子,导致关节红肿热痛等典型症状^[4-5]。目前,临床上常用非甾体抗炎药、秋水仙碱等药物治疗GA,但长期使用可能引发胃肠道反应和肝肾损伤等副作用,且难以从根本上控制疾病进展^[6-7]。因此,寻找安全有效、副作用小的抗痛风药物成为当前研究的重要方向。

近年来,微小RNA(microRNA, miRNA)作为一种重要的基因表达调控因子,在炎症性疾病

中的作用日益受到关注^[8]。其中,微小RNA-146a(miRNA-146a, miR-146a)被证实可通过靶向TLR4/NF- κ B信号通路关键分子,负向调控炎症反应,在GA的发生发展中发挥重要作用^[9-10]。研究表明,miR-146a表达水平在GA患者和MSU晶体诱导的炎症模型中均显著下调,而过表达miR-146a可抑制TLR4/NF- κ B信号通路活化,减轻炎症反应^[9-11]。

中药复方加味四妙散源于经典名方四妙散,具有清热利湿、通络止痛之功效^[12]。本方在原方基础上加入赤芍、白术、萆薢、土茯苓以增强通络除痹的功效,临床上常用于治疗湿热下注型GA,疗效确切,且安全性良好^[10-13]。现代药理学研究证实,加味四妙散具备抗炎、镇痛及调节免疫等多种药理活性,但其具体作用机制尚未完全阐明。目前,关于加味四妙散抗GA的研究主要集中在炎症因子、氧化应激等方面,而从miRNA角度探讨其作用机制的研究尚未见报道。本研究以MSU晶体诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症模

型为研究对象,深入探讨加味四妙散的抗炎作用机制。重点探究该方剂是否通过调节 miR-146a 的表达水平来干预 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化,以期为其临床应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

24 只 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 品系大鼠(8 周龄,体质量 180~220 g)购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2024-0001]。动物饲养在河南中医药大学 SPF 级动物实验屏障环境内[SYXK(豫)2021-0015],本研究方案经机构实验动物伦理委员会审批通过(IACUC-202306033),实验研究过程遵守动物实验 3R 原则。实验期间进食普通标准饲料,自由饮水,12 h/12 h 光照/黑暗循环更替,室温控制在 22~24 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~60%。

1.1.2 细胞

RAW264.7(小鼠单核巨噬细胞系)由上海富衡生物科技有限公司提供(FH0328)。

1.2 主要试剂与仪器

加味四妙散(剂型为单味中药的配方颗粒:黄柏 10 g、苍术 15 g、薏苡仁 30 g、牛膝 20 g、赤芍 10 g、白术 15 g、萆薢 30 g、土茯苓 30 g)购自于河南中医药大学第一附属医院中药房(批号 0061367883);秋水仙碱片(东彼迪药业有限公司,国药准字 H20113208);MSU 晶体(美国 Invivogen 公司,批号 tlr-msu);DMEM 培养基(北京杰辉博高生物技术有限公司,批号 C11995500BT);青链霉素混合液(北京索莱宝公司,批号 P1400);胰蛋白酶消化液(北京索莱宝公司,批号 T3160);高效 RIPA 裂解液(北京索莱宝公司,批号 R0010);BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝公司,批号 PC0020);CCK-8 试剂(美国 Glpbio 公司,批号 GK10001);IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号 E-EL-M0037、E-EL-M0044、4660050);SYBR Green qPCR 试剂盒(日本 TOYOBO 公司,批号 QPK-201);逆转录试剂盒(日本 TOYOBO 公司,批号 FSQ-101);TLR4 抗体(美国 Affinity 公司,批号 AF7017);髓样分化因子 88(myeloid

differentiation factor 88, MyD88)抗体(美国 Affinity 公司,批号 AF5195);TNF 受体相关因子 6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)抗体(美国 Affinity 公司,批号 AF5376);磷酸化(phospho, p)-NF- κ B p65 抗体(美国 GeneTex 公司,批号 GTX133899);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(美国 GeneTex 公司,批号 GTX100118);HRP 标记山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 SA00001-2)。

CO₂ 细胞培养箱(苏州捷美电子有限公司,型号 CIB-191TX);荧光定量 PCR 仪(西安天隆科技有限公司,型号 TL-988);超微量分光光度计(Thermo 公司,型号 NanoDrop2000);酶标检测仪(南京德铁公司,型号 HBS-1096A);化学发光成像系统(武汉莫纳生物科技有限公司,型号 QuickChemi 5200)。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清的制备

24 只大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为加味四妙散组和空白对照组,每组 12 只。参考文献记载^[13],按成人与大鼠体表面积比例换算等效剂量,分别灌胃加味四妙散溶液(31.75 g/kg)和生理盐水,给药体积为 10 mL/kg,每天 2 次,连续给药 7 d。末次给药 1 h 后,实验动物经腹腔注射 1%戊巴比妥钠进行麻醉处理,经腹主动脉采集全血样本。将血液样本于常温条件下静置 1~2 h,随后以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 15 min,分离获取血清样本。混匀同组大鼠血清,56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后分装于无菌冻存管中,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.2 细胞培养

RAW264.7 细胞在 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清及 100 U/mL 青链霉素)中培养,放于细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂)中维持生长。定期观察细胞状态,待细胞密度达到 80%~90%时,使用 0.25%胰蛋白酶消化液进行传代培养。

1.3.3 CCK-8 法筛选最佳药物浓度及造模时间

用不含血清的 DMEM 培养基配置不同浓度的药物对细胞进行分组处理,设置空白对照组、MSU 组(50、100、200、400、600 $\mu\text{g/mL}$)、加味四妙散组(1%、2%、5%、10%、15%、20%加味四妙散含

药血清)和秋水仙碱组(50、100、200、400、600 ng/mL)。孵育 24 h 后,弃去原培养基,每孔加入 100 μ L 含 10% CCK-8 的完全培养基,继续孵育 1 h 后测量各孔的吸光值,计算细胞活力,筛选出最佳药物浓度。接着,用 0、50、100、200、400 μ g/mL 的 MSU 溶液刺激细胞,分别于 0、3、6、12、24 h 取培养上清,用 ELISA 法检测 IL-1 β 水平,以确定炎症模型的最佳造模时间。

1.3.4 细胞分组与干预

将 RAW264.7 细胞以 2.0×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板,分为空白对照组、模型组(MSU, 200 μ g/mL)、加味四妙散组(MSU+10%加味四妙散含药血清)、秋水仙碱组(MSU+100 ng/mL 秋水仙碱)。模型组、加味四妙散组、秋水仙碱组分别加入 200 μ g/mL MSU 混悬液培养 12 h,建立 GA 细胞模型。随后,治疗组分别加入相应药物,空白对照组和模型组不做处理,继续培养 24 h。

1.3.5 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平

收集不同处理组的细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒操作流程检测炎症因子含量。通过标准品浓度梯度建立标准曲线,据此计算样本中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的精确浓度。

1.3.6 实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 miR-146a 和 TLR4/NF- κ B 通路的基因表达

采集不同处理组 RAW264.7 细胞,使用 TRIzol 法提取总 RNA 后,然后通过逆转录酶将 RNA 模板逆转录为 cDNA。随后进行 PCR 扩增,反应程序设置如下:初始 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,继以 40 个循环的扩增反应(95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s)。U6 和 GAPDH 作为 miRNA 和 mRNA 的内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miR-146a 以及 TLR4、MyD88、TRAF6、NF- κ B p65 mRNA 的相对表达量。各检测基因的特异性引物序列见表 1 所示。

1.3.7 Western blot 检测 TLR4/NF- κ B 通路的蛋白表达

采集不同处理组 RAW264.7 细胞,利用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,通过 BCA 蛋白定

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer names	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
miR-146a-5p	R:CGCGTGAGAACTGAATTCCA F:ACTGCAGGGTCCGAGGTATT
TLR4	R:TCCACAAGAGCCGAAAGTT F:TGAAGATGATGCCAGAGCGG
MyD88	R:GAGCACTGTCCCACAGACAA F:AGTAGCAGATGAAGGCGTCG
TRAF6	R:CGCCAAAATGGAACGCAGA F:TGCTTCCATCTCGGCAACTT
NF- κ B p65	R:TGTATTTACGGGACCTGGC F:CAGGCTAGGCTCAGCGTATG
U6	R:AACGCTTCACGAATTTGCGT F:CTCGCTTCGGCAGCACAA
GAPDH	R:TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG F:TGTGTCCGTCGTGGATCTGA

量试剂盒测定蛋白浓度。随后制备适当浓度的 SDS-PAGE 电泳凝胶,将等量蛋白样品进行电泳分离、转膜、封闭,接着依次添加特定抗体(TLR4、MyD88、TRAF6、p-NF- κ B p65、GAPDH,稀释比例均为 1 : 1000)、HRP 标记的二抗(稀释比例为 1 : 5000)进行孵育。最后,使用 ECL 发光液进行显色反应,并通过 Image Pro Plus 6.0 软件处理图像,以 GAPDH 作为内参蛋白进行标准化处理,计算各目标蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较,正态分布数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较方差齐时选用 LSD 法,若方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验;若数据不满足正态分布则采用非参数检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物干预对细胞活性的影响

与空白对照(0 μ g/mL)组比较,200 μ g/mL MSU 溶液、10%加味四妙散含药血清和 100 ng/mL 秋水仙碱显著降低了细胞活性($P<0.05$, $P<0.01$),且细胞活性随药物浓度增加呈下降趋势,见图 1。为确保药物浓度既能产生足够的生物效应,又不对细胞造成过度毒性,最终选择 200 μ g/mL MSU 溶液、10%加味四妙散含药血清和 100

ng/mL 秋水仙碱作为后续实验的干预浓度。

2.2 GA 炎症模型的最佳造模时间

各组中 IL-1 β 水平随着 MSU 晶体浓度和时间的增加而升高,以 MSU 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 组 IL-1 β 的升高最为显著($P<0.01$),并于 12 h 达到平台期,在 24 h 内保持相对稳定,见图 2。结合 CCK-8 检测结果,以 200 $\mu\text{g/mL}$ MSU 晶体造模 12 h 作为最佳造模浓度和时间。

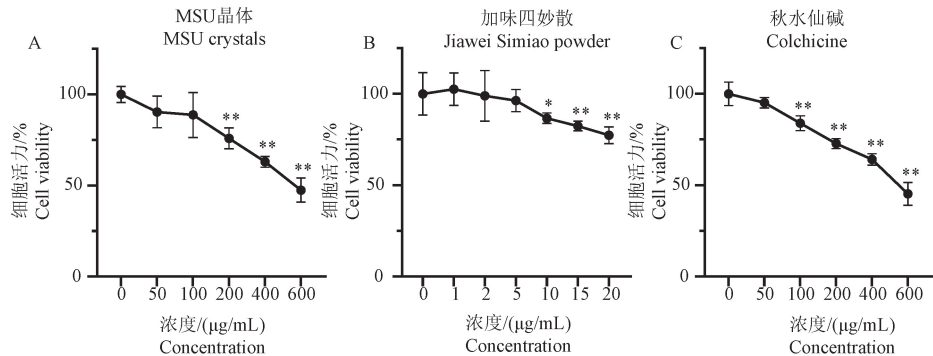
2.3 加味四妙散对 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响

炎症因子检测结果显示,相较于空白对照

组,模型组上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达含量显著增加($P<0.01$),表明 MSU 晶体成功诱导了 RAW264.7 细胞的炎症反应,炎症因子释放增加;与模型组比较,加味四妙散组和秋水仙碱组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著下调($P<0.01$),提示加味四妙散和秋水仙碱均能有效抑制 MSU 晶体诱导的炎症因子释放,且加味四妙散的作用与秋水仙碱相当,见表 2。

2.4 加味四妙散对 miR-146a 和 TLR4/NF- κB 通路基因表达的影响

与空白对照组比较,模型组 miR-146a miRNA



注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 1 不同浓度药物干预对细胞活性的影响

Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 Impact of drug intervention on cell viability

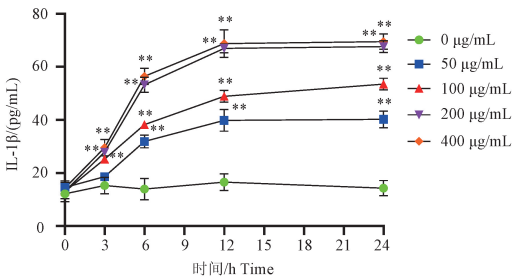
表 2 加味四妙散对 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

Table 2 Effect of Jiawei Simiao powder on the contents of IL-1 β , IL-6, and TNF- α ($\bar{x}\pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

组别 Groups	IL-1 β	IL-6	TNF- α
空白对照组 Control group	13.28 $\pm$ 2.43	95.85 $\pm$ 13.32	22.97 $\pm$ 2.98
模型组 Model group	61.69 $\pm$ 3.94 **	318.43 $\pm$ 16.56 **	82.77 $\pm$ 5.03 **
加味四妙散组 Jiawei Simiao powder group	30.96 $\pm$ 5.04 ** #	184.10 $\pm$ 23.67 ** #	44.58 $\pm$ 6.15 ** #
秋水仙碱组 Colchicine group	25.06 $\pm$ 4.46 ** #	156.31 $\pm$ 21.45 ** #	37.42 $\pm$ 5.44 ** #

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, # $P<0.01$.

表达显著降低($P<0.01$),而 TLR4、MyD88 和 TRAF6 mRNA 表达升高($P<0.01$),NF- κB p65 呈上升的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,加味四妙散组和秋水仙碱组 miR-146a miRNA 表达升高($P<0.01$),而 TLR4、MyD88 和 TRAF6 mRNA 表达显著下降($P<0.01$),提示加味四妙散可能通过上调 miR-146a 的表达,抑制 TLR4/NF- κB 信号通路的激活。NF- κB p65 表达在各组之间无明显差异($P>0.05$),可能与 NF- κB 的调控主要发生在蛋白水平有关,见表 3。



注:与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, ** $P<0.01$ 。
图 2 GA 炎症模型的最佳造模时间
Note. Compared with the 0 $\mu\text{g/mL}$ group, ** $P<0.01$.

Figure 2 Optimal molding time in the GA inflammation model

2.5 加味四妙散对 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

如表 4 和图 3 所示,与空白对照组比较,模型组 TLR4、MyD88、TRAF6 和 p-NF-κB p65 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$),这进一步证实 MSU 晶体

激活了 TLR4/NF-κB 信号通路;与模型组比较,加味四妙散组和秋水仙碱组的 TLR4、MyD88、TRAF6 及 p-NF-κB p65 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$),表明加味四妙散可能通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的蛋白表达,阻断炎症信号的传递,

表 3 加味四妙散对 miR-146a 和 TLR4/NF-κB 通路基因表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Effect of Jiawei Simiao powder on the genes expression of miR-146a and TLR4/NF-κB pathway($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	miR-146a	TLR4	MyD88	TRAF6	NF-κB p65
空白对照组 Control group	1.00±0.09	1.00±0.22	1.00±0.10	1.00±0.16	1.00±0.09
模型组 Model group	0.40±0.08 **	2.85±0.31 **	3.26±0.24 **	2.66±0.27 **	1.12±0.05
加味四妙散组 Jiawei Simiao powder group	0.67±0.07 ** [#]	1.45±0.13 * [#]	1.49±0.07 ** [#]	1.27±0.29 [#]	1.14±0.19
秋水仙碱组 Colchicine group	0.83±0.06 * [#]	1.28±0.14 [#]	1.48±0.13 ** [#]	1.46±0.23 * [#]	1.03±0.11

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with model group, [#] $P<0.01$.

表 4 加味四妙散对 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Effect of Jiawei Simiao powder on the protein expression of TLR4/NF-κB pathway($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	TLR4	MyD88	TRAF6	p-NF-κB p65
空白对照组 Control group	0.31±0.13	0.11±0.03	0.29±0.08	0.08±0.01
模型组 Model group	0.84±0.11 **	0.62±0.03 **	0.88±0.08 **	0.59±0.07 **
加味四妙散组 Jiawei Simiao powder group	0.56±0.06 * [#]	0.47±0.01 ** [#]	0.63±0.03 ** [#]	0.39±0.09 ** [#]
秋水仙碱组 Colchicine group	0.46±0.05 [#]	0.32±0.06 ** [#]	0.40±0.10 [#]	0.21±0.03 * [#]

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with model group, [#] $P<0.01$.

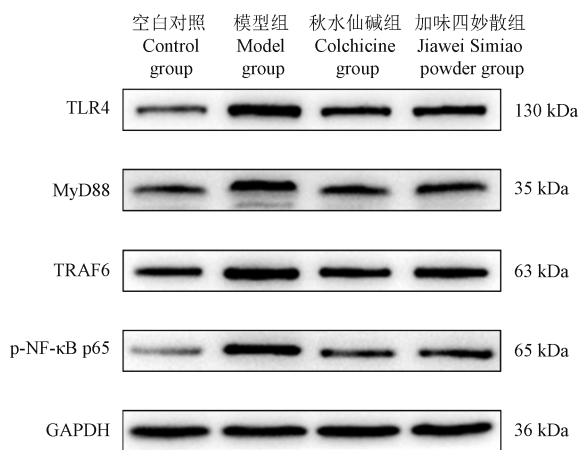


图 3 加味四妙散对 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of Jiawei Simiao powder on the protein expression of TLR4/NF-κB pathway

从而发挥抗炎作用。

3 讨论

GA 在中医学中属于“痹证”“白虎历节风”等范畴^[12]。其发病多因外邪侵袭关节,或饮食不节,湿热内生,或肝肾亏虚,筋骨失养,导致湿、热、痰、瘀等病理产物积聚于关节部位,阻滞经络气血运行,不通则痛,引发疼痛和红肿热痛等症状^[12,14]。现代药理学研究表明,加味四妙散含有槲皮素、吴茱萸次碱、汉黄芩素、黄芩素、山柰酚等多种活性成分,可作用于 IL-17、NOD 样受体、TLRs、NF-κB 等多个信号通路,具有抗炎、降尿酸、抗氧化应激、调节软骨细胞功能的作用^[15-18],这提示加味四妙散抗痛风疗效具有多成分、多靶标、多通路的特点。本团队前期研究证实,加味四妙散能显著减轻 GA 模型大鼠的关节肿胀,并

通过调控 miR-223-3p 抑制 NOD 样受体蛋白 3/IL-1 β 信号通路,从而抑制痛风炎症反应^[19]。在临床应用中,加味四妙散也能有效缓解 GA 患者的关节炎症与疼痛,调节体内湿热环境,预防复发,且安全性良好^[20-21]。

GA 的发病机制涉及 MSU 晶体引发的免疫炎症反应,其中 TLR4/NF- κ B 信号通路起核心调控作用^[22-23]。MSU 晶体作为内源性危险信号分子,被 TLR4 受体识别,经过 MyD88、TRAF6 等一系列信号转导活化 NF- κ B,释放炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6,引发痛风级联炎症反应^[4-5]。这些因子不仅与痛风炎症反应和疼痛程度密切相关,还可再次激活炎症信号通路,形成正反馈循环,加剧炎症反应^[24-27]。miRNAs 是一类由 20~22 个核苷酸构成的非编码 RNA,通过结合 mRNA 的 3' 非编码区,调控其降解和翻译,在免疫调节和炎症反应中发挥重要作用^[28]。多项研究表明,miR-146a 能直接靶向 TLR4、TRAF6 和白细胞介素-1 受体相关激酶 1 等分子,负向调控 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化,进而有效阻断炎症信号的传递,从而减轻炎症反应^[9-10,29]。这些发现提示,miR-146a 和 TLR4/NF- κ B 信号通路可能是治疗 GA 的重要调节途径。

在本研究中,MSU 晶体诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型中,miR-146a 表达降低,而 TLR4、MyD88、TRAF6、p-NF- κ B p65 及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达升高,这与既往研究结果一致,证实该模型成功模拟了 GA 急性炎症反应的病理过程,MSU 晶体可能通过抑制 miR-146a 的表达,激活 TLR4/NF- κ B 信号通路,导致炎症反应的加剧^[10]。加味四妙散含药血清干预能够显著抑制 MSU 晶体诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应,呈现显著的抗炎效应:一方面上调 miR-146a 表达,另一方面抑制上述关键分子及炎症因子的表达。MSU 晶体引起的 miR-146a 下调趋势可被加味四妙散逆转,结合已有研究证据,表明 miR-146a 的上调是药物抑制炎症通路的重要机制,这为中药调控 miRNA 治疗 GA 提供了有力支持^[9-10,29]。加味四妙散还可下调 TLR4、MyD88、TRAF6 的基因和蛋白表达,并显著抑制 p-NF- κ B p65 的磷酸化,证实其能够有效抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路关键分子的表达,阻断炎症信号的传递,减轻炎症反

应。这一结果与 miR-146a 的负调控作用相一致,提示加味四妙散可能通过上调 miR-146a 抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,从基因表达和蛋白水平双重阻断炎症信号,减少炎症因子的产生,从而发挥抗炎作用。此外,实验中模型组 p-NF- κ B p65 蛋白表达升高,而 NF- κ B p65 mRNA 表达无显著变化,考虑可能与蛋白质的翻译后修饰和细胞信号通路的激活有关。

尽管本研究获得了一些有价值的发现,但仍存在一些不足之处。首先,本研究主要研究药物干预后 miR-146a 的表达变化,尚未直接调控 miR-146a,未来研究拟通过构建 miR-146a 的过表达和抑制模型,以深入评估其功能及药物疗效。其次,本研究仅在体外细胞模型中进行,缺乏体内实验的验证,未来需在动物模型中进一步验证加味四妙散的抗炎作用及其机制。此外,miR-146a 的靶基因众多,本研究仅初步探讨了其在加味四妙散抗 GA 中的作用,其具体调控机制(如是否涉及其他 miRNA 或信号通路)仍需深入探究。

综上所述,加味四妙散可能通过上调 miR-146a 表达,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活,减少促炎因子的产生,进而减轻 MSU 晶体诱导的巨噬细胞炎症反应。本研究初步揭示了加味四妙散通过上调 miR-146a 抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的抗炎机制,为加味四妙散的临床应用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] DALBETH N, GOSLING A L, GAFFO A, et al. Gout [J]. Lancet, 2021, 397(10287): 1843-1855.
- [2] ZHU B, WANG Y, ZHOU W, et al. Trend dynamics of gout prevalence among the Chinese population, 1990-2019: a joinpoint and age-period-cohort analysis [J]. Front Public Health, 2022, 10: 1008598.
- [3] JEONG Y J, PARK S, YON D K, et al. Global burden of gout in 1990-2019: a systematic analysis of the global burden of disease study 2019 [J]. Eur J Clin Invest, 2023, 53(4): e13937.
- [4] 胡伟琼,程虹毓,魏荣锐,等. 痛风急性和慢性期分子机制研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(3): 379-384.
HU W Q, CHENG H Y, WEI R R, et al. Progress in molecular mechanisms of acute and chronic gout [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(3): 379-384.

- [5] 欧阳香, 丁婷, 杨海艳, 等. 痛风性关节炎发病机制相关信号通路的研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 234-240.
- OUYANG X, DING T, YANG H Y, et al. Research progress of signal pathway related to pathogenesis of gouty arthritis [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(4): 234-240.
- [6] AFINOGENOVA Y, DANVE A, NEOGI T. Update on gout management: what is old and what is new [J]. Curr Opin Rheumatol, 2022, 34(2): 118-124.
- [7] 魏凯, 杜星辰, 章渊源, 等. 中西医不同治疗策略对痛风性关节炎的疗效及安全性分析 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(12): 6133-6138.
- WEI K, DU X C, ZHANG Y Y, et al. Analysis of the efficacy and safety of different treatment modalities of Chinese and Western medicine on gouty arthritis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(12): 6133-6138.
- [8] LOGANATHAN T, GEORGE DOSS C. Non-coding RNAs in human health and disease: potential function as biomarkers and therapeutic targets [J]. Funct Integr Genomics, 2023, 23(1): 33.
- [9] CHEN X, GAO Q, ZHOU L, et al. miR-146a alleviates inflammation of acute gouty arthritis rats through TLR4/MyD88 signal transduction pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(21): 9230-9237.
- [10] 柳涛红, 朱丹, 青玉凤, 等. 微 RNA-146a 通过 Toll 样受体信号途径在 RAW264.7 细胞痛风性关节炎模型炎症反应中的研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2020, 24(8): 522-529.
- LIU T H, ZHU D, QING Y F, et al. Expression of miRNA-146a in the inflammatory response of RAW264.7 cell through Toll-like receptor signaling pathway in gout arthritis model [J]. Chin J Rheumatol, 2020, 24(8): 522-529.
- [11] 徐阳洋, 青玉凤, 张全波, 等. 微小 RNA-146a 在原发性痛风性关节炎患者的变化及其临床意义 [J]. 中华风湿病学杂志, 2016, 20(12): 796-800.
- XU Y Y, QING Y F, ZHANG Q B, et al. Expression of microRNA-146a and its clinical significance in primary gout arthritis [J]. Chin J Rheumatol, 2016, 20(12): 796-800.
- [12] 姜泉, 韩曼, 唐晓颇, 等. 痛风和高尿酸血症病证结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2021, 62(14): 1276-1288.
- JIANG Q, HAN M, TANG X P, et al. Guideline for diagnosis and treatment of gout and hyperuricemia based on the combination of disease and syndromes [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(14): 1276-1288.
- [13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [14] 李华燕, 杜明瑞. 探讨《金匱要略》痛风的病因病机及其方药的临床应用 [J]. 风湿病与关节炎, 2023, 12(12): 51-54.
- LI H Y, DU M R. Exploring the etiology and pathogenesis of gout, and the clinical application of prescriptions for it in synopsis of the golden chamber [J]. Rheum Arthritis, 2023, 12(12): 51-54.
- [15] 容伟明, 袁长深, 段戡, 等. 基于网络药理学探讨四妙散治疗痛风性关节炎的潜在机制 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(26): 8-11, 197-198.
- RONG W M, YUAN C S, DUAN K, et al. Discussion on the potential mechanism of Simiao Powder in the treatment of gouty arthritis based on network pharmacology [J]. China Med Her, 2021, 18(26): 8-11, 197-198.
- [16] 章晓云, 顾兵, 李华南, 等. 治疗痛风性关节炎的四妙散活性成分靶基因筛选及生物学功能分析 [J]. 山东医药, 2021, 61(24): 54-58.
- ZHANG X Y, GU B, LI H N, et al. Screening of target genes of Simiao powder in treatment of gouty arthritis and analysis of their biological functions [J]. Shandong Med J, 2021, 61(24): 54-58.
- [17] XU H, WU J, WANG S, et al. Network pharmacology and *in vivo* experiments reveal the pharmacological effects and molecular mechanisms of Simiao Powder in prevention and treatment for gout [J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1): 152.
- [18] 甘斌, 李华南, 章晓云, 等. 中药单体治疗痛风性关节炎研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(10): 5848-5852.
- GAN B, LI H N, ZANG X Y, et al. Research progress in the treatment of gouty arthritis with traditional Chinese medicine monomer [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(10): 5848-5852.
- [19] 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.
- DU M R, SONG Z, LI H Y, et al. Effect of modified Simiaosan on miR-223-3p and NLRP3/IL-1 β signaling pathway in rats with acute gouty arthritis [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(14): 63-70.
- [20] 杜明瑞, 赵哲, 李华燕, 等. 基于 NLRP3/IL-1 β 信号通路探讨清热利湿化浊法(加味四妙散)对湿热痹阻型慢性痛风性关节炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(11): 133-140.
- DU M R, ZHAO Z, LI H Y, et al. Mechanism of Qingre Lishi Huazhuo method (Modified Simiaosan) on chronic

- gouty arthritis of dampness-heat obstruction syndrome based on NLRP3/IL-1 β signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(11): 133–140.
- [21] 杜明瑞, 赵哲, 李秦, 等. 加味四妙散对湿热痹阻型慢性痛风性关节炎炎症因子的影响及相关性分析 [J]. 中医药信息, 2024, 41(5): 56–63.
- DU M R, ZHAO Z, LI Q, et al. Influence of modified wonderfully effective four powder on inflammatory factors and correlation analysis in damp-heat stagnation type chronic gouty arthritis [J]. Inf Tradit Chin Med, 2024, 41(5): 56–63.
- [22] LIU W, PENG J, WU Y, et al. Immune and inflammatory mechanisms and therapeutic targets of gout: an update [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 121: 110466.
- [23] 于栋华, 石云鹤, 梁玉琴, 等. 中药调控炎症信号通路抗痛风性关节炎的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7): 244–251.
- YU D H, SHI Y H, LIANG Y Q, et al. Traditional Chinese medicine against gouty arthritis *via* regulating inflammatory signaling pathway: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(7): 244–251.
- [24] MANTOVANI A, DINARELLO C A, MOLGORA M, et al. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity [J]. Immunity, 2019, 50(4): 778–795.
- [25] 朱克强, 王晨, 惠晓艳, 等. 肿瘤坏死因子 α 在痛风性关节炎发病机制中的作用研究进展 [J]. 浙江医学, 2020, 42(6): 638–641.
- ZHU K Q, WANG C, XI X Y, et al. Research progress on the role of tumor necrosis factor α in the pathogenesis of gouty arthritis [J]. Zhejiang Med J, 2020, 42(6): 638–641.
- [26] 郭曹培, 程飘涛, 杨成兵, 等. 骨免疫与骨代谢 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 28(14): 2261–2266.
- GUO C P, CHENG P T, YANG C B, et al. Bone immunity and bone metabolism [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 28(14): 2261–2266.
- [27] 林泽玉, 徐林. 痛风致骨破坏机制的研究与进展 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(8): 1295–1300.
- LIN Z Y, XU L. Research progress in gout-induced bone destruction mechanism [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(8): 1295–1300.
- [28] 邵子晨, 李华南, 顾兵, 等. 痛风过程中微小 RNA、长链非编码 RNA 和环状 RNA 介导降尿酸、抗炎及调控骨代谢的协同调节作用 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(5): 765–771.
- SHAO Z C, LI H N, GU B, et al. MicroRNA, long non-coding RNA and circular RNA mediate the mechanism of decreasing uric acid, anti-inflammation and regulating bone metabolism in gout [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(5): 765–771.
- [29] ZHANG Q B, QING Y F, YIN C C, et al. Mice with miR-146a deficiency develop severe gouty arthritis *via* dysregulation of TRAF 6, IRAK 1 and NALP3 inflammasome [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 45.

[收稿日期] 2025-02-12