

高良姜素调控 JAK3/STAT3 通路对大鼠类风湿性关节炎的影响^Δ

黄燕^{1*}, 王伟明², 刘海英³, 战艺¹, 陈曦⁴, 于得泓^{1#} (1. 牡丹江医科大学附属红旗医院风湿免疫科, 黑龙江牡丹江 157000; 2. 牡丹江医科大学附属红旗医院呼吸与危重医学科, 黑龙江牡丹江 157000; 3. 牡丹江医科大学附属红旗医院中西医结合科, 黑龙江牡丹江 157000; 4. 牡丹江医科大学附属红旗医院消化科, 黑龙江牡丹江 157000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)06-0764-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.06.12



摘要 **目的** 探讨高良姜素调控 Janus 激酶 3 (JAK3)/信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 通路对大鼠类风湿性关节炎 (RA) 的影响。**方法** 取 50 只雄性 SD 大鼠, 通过皮下注射由牛 II 型胶原、费氏完全佐剂构成的乳剂以构建诱导性关节炎模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组, 高良姜素低、中、高剂量组 (1、5、15 mg/kg) 和甲氨蝶呤组 (阳性对照, 2 mg/kg), 每组 10 只; 另取 10 只正常大鼠, 作为正常组。从造模第 15 天起, 各组大鼠灌胃相应药液或含 0.5% 吐温 80 的生理盐水, 每天 1 次, 连续 28 d。比较灌胃前及灌胃后各组大鼠的关节炎指数 (AI) 评分和足跖趾容积; 末次给药后 24 h, 检测其血清中白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-4、IL-10 水平, 观察踝关节滑膜组织病理变化, 并检测其踝关节滑膜组织中 UNC-51 样激酶 1 (ULK1)、Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、胱天蛋白酶 3 (caspase-3)、JAK3、磷酸化 JAK3 (p-JAK3)、STAT3、磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 蛋白的表达情况以及 LC3 阳性区域的荧光强度。**结果** 与模型组相比, 各药物组大鼠踝关节滑膜组织细胞增生、炎症细胞浸润等病理变化均有所改善; 其 AI 评分和足跖趾容积 (灌胃后 28 d), IL-6、TNF- α 水平, Bcl-2 蛋白的表达水平和 JAK3、STAT3 的磷酸化水平均显著降低 ($P < 0.05$); IL-4、IL-10 水平, ULK1、Beclin-1、Bax、caspase-3、LC3 蛋白的表达水平和 LC3 阳性区域的荧光强度均显著升高 ($P < 0.05$), 且高良姜素的作用具有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。**结论** 高良姜素可诱导 RA 大鼠滑膜组织细胞持续自噬、促进细胞凋亡、抑制滑膜细胞增生、减轻持续性炎症反应, 上述抗 RA 作用可能与其抑制 JAK3/STAT3 通路有关。

关键词 高良姜素; 类风湿性关节炎; 自噬; 凋亡; 滑膜细胞增生; 炎症反应; JAK3/STAT3 通路

Effects of galangin on rheumatoid arthritis in rats by regulating the JAK3/STAT3 pathway

HUANG Yan¹, WANG Weiming², LIU Haiying³, ZHAN Yi¹, CHEN Xi⁴, YU Dehong¹ (1. Dept. of Rheumatology and Immunology, the Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 2. Dept. of Respiratory and Critical Care Medicine, the Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 3. Dept. of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 4. Dept. of Gastroenterology, the Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of galangin on rheumatoid arthritis (RA) in rats by regulating the Janus kinase 3 (JAK3)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway. **METHODS** Fifty male SD rats were taken, and an emulsion composed of bovine type II collagen and Freund's complete adjuvant was injected subcutaneously to establish an induced arthritis model. The rats that were successfully modeled were randomly divided into model group, low, medium and high dose groups of galangin (1, 5, 15 mg/kg), and methotrexate group (positive control, 2 mg/kg), with 10 rats in each group. Another 10 normal rats were taken as the normal group. Starting from the 15th day of modeling, each group of rats was gavaged with the corresponding drug solution or normal saline containing 0.5% Tween 80 once a day for 28 consecutive days. The arthritis index (AI) scores and paw volume of rats were compared before and after gavage administration. Twenty-four hours after the last

administration, the serum levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-4 and IL-10 were determined, the pathological changes in ankle joint synovial tissue were observed, and the protein expressions of UNC-51 like kinase 1 (ULK1), Beclin-1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), B cell lymphoma 2 (Bcl-2),

Δ 基金项目 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (No. 2022-KYYWF-0683)

*** 第一作者** 主治医师。研究方向: 风湿免疫及相关疾病。E-mail: 904802168@qq.com

通信作者 主治医师。研究方向: 风湿免疫及相关疾病。E-mail: 282201235@qq.com

Bcl-2-associated X protein (Bax), caspase-3, JAK3, phosphorylated JAK3 (p-JAK3), STAT3 and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) in the synovial tissue of the ankle joint were detected, as well as the fluorescence intensity of LC3-positive areas. **RESULTS** Compared with the model group, the pathological changes such as cellular proliferation of ankle joint synovial tissue and infiltration of inflammatory cells in rats of each administration group showed improvement. Moreover, their AI scores and paw pad volumes (on day 28 after gavage), the levels of IL-6 and TNF- α , the protein expression of Bcl-2, and the phosphorylation levels of JAK3 and STAT3 were all significantly reduced ($P<0.05$). The levels of IL-4 and IL-10, the protein expressions of ULK1, Beclin-1, Bax, caspase-3 and LC3, as well as the fluorescence intensity of LC3-positive areas, were all significantly increased ($P<0.05$). Moreover, the effect of galangin was in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Galangin can induce sustained autophagy in synovial tissue cells of RA rats, promote cell apoptosis, inhibit synovial cell proliferation, and alleviate persistent inflammatory responses. The above anti-RA effects may be related to the inhibition of the JAK3/STAT3 pathway. **KEYWORDS** galangin; rheumatoid arthritis; autophagy; apoptosis; synovial cell proliferation; inflammatory response; JAK3/STAT3 pathway

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性疾病,其发生与滑膜炎、软骨变性等密切相关,患者常伴有身体残疾、关节破坏,以及早期死亡风险增加和生活质量下降^[1]。研究表明,机体自噬失衡会使滑膜细胞抗凋亡能力增强,从而导致其异常增殖并侵袭软骨和骨组织,最终引发持续炎症和关节损伤^[2]。Janus激酶3(Janus kinase 3, JAK3)/信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是介导细胞因子功能的核心通路,在调控细胞增殖、分化等生物学过程中发挥重要作用。在RA患者中,该通路异常激活,不仅促使促炎细胞因子大量生成,还干扰自噬正常调节,进而参与RA的发生发展^[3]。因此,寻找能够靶向JAK3/STAT3通路以恢复自噬平衡的RA治疗手段具有重要意义。

高良姜素是一种黄酮醇类天然化合物,具有抗炎、抗菌、抗氧化等药理活性,对RA等病症具有显著的治疗潜力^[4]。有报道称,该成分可通过抑制JAK2/STAT3通路激活来减轻小鼠内皮炎症、改善动脉粥样硬化^[5]。然而,高良姜素能否通过影响该类通路来调控细胞自噬和凋亡,进而发挥改善RA的作用尚不清楚。基于此,本研究拟通过探讨高良姜素对JAK3/STAT3通路介导的细胞自噬及凋亡的调控作用,揭示其抗RA的潜在作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括SynergyH1型多功能酶标仪(美国BioTek公司)、BX53型显微镜和IXplore IX85型倒置显微镜(日本Olympus公司)、LD-4080型病理切片仪(上海聚慕医疗器械有限公司)、LF-C600型化学发光成像分析系统(北京龙方科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

高良姜素对照品(纯度99.99%,货号HY-N0382)和弗氏完全佐剂(货号HY-153808)均购自美国MedChem-Express公司;甲氨蝶呤对照品(纯度 $\geq 99\%$,货号SM9600)购自北京索莱宝科技有限公司;牛Ⅱ型胶原(type II collagen, CⅡ;货号T80025)购自美国Target-

Mol公司;戊巴比妥钠(货号P3761)购自美国Sigma公司;白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-4、IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号分别为PI328、PT516、PI615、PI525)均购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗UNC-51样激酶1(UNC-51 like kinase 1, ULK1)、Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、B细胞淋巴瘤2(B cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、胱天蛋白酶3(caspase-3)、JAK3、磷酸化JAK3(phosphorylated, p-JAK3)、STAT3、磷酸化STAT3(phosphorylated, p-STAT3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗,以及Alexa Fluor[®] 594鬼笔环肽(货号分别为54T、3495T、3868T、3498T、5023T、9662S、8863T、5031T、12640T、9145T、2118S、7074S、12877S)均购自美国Cell Signaling Technologies公司。

1.3 实验动物

60只SPF级雄性SD大鼠,7~8周龄,体重(220 $\pm$ 20)g,购自牡丹江医科大学,动物生产许可证号为SCXK(黑)2024-003。所有大鼠均饲养于该校标准动物房[每12 h光照/黑暗交替,温度(25 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C,相对湿度(55 $\pm$ 10)% ,噪声不超过60 dB]内,自由饮水、摄食。本研究方案已获得牡丹江医科大学附属红旗医院医学科研伦理委员会批准,批号为202535415。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

参考相关研究方法^[6],取50只大鼠按下述方法构建诱导性关节炎模型:将牛CⅡ溶于0.05 mol/L乙酸中,配成2 mg/mL的储备液,于4 $^{\circ}$ C搅拌过夜;将储备液置于冰浴中,加入等体积弗氏完全佐剂,乳化,制成1 mg/mL的CⅡ乳剂。于大鼠尾根部皮下注射CⅡ乳剂100 μ L(含200 μ g CⅡ)进行初次免疫;7 d后,于其尾根部和背部皮下注射等量CⅡ乳剂进行加强免疫。另取10只大鼠,同法注射等体积生理盐水,作为正常组。1周后观察

并采用关节炎指数(arthritis index, AI)对大鼠关节病变程度进行系统评估,当AI评分 ≥ 4 分时,判定诱导性关节炎模型构建成功^[6]。

将造模成功的大鼠(造模成功率达100%)随机分为模型组,高良姜素低、中、高剂量组(1、5、15 mg/kg^[7])和甲氨蝶呤组(阳性对照,2 mg/kg^[8]),每组10只。自加强免疫后1周(即造模第15天)起,各药物组大鼠灌胃相应药液,正常组和模型组大鼠灌胃等体积含0.5%吐温80的生理盐水,每天1次,连续28 d。

2.2 大鼠AI评分和足跖趾容积检测

比较各组大鼠灌胃前(0 d)以及灌胃后7、14、21、28 d的AI评分和足跖趾容积。AI评分标准如下:正常无红肿,记0分;足跖轻微肿胀/红斑,记1分;踝足泛红伴肿胀,记2分;中度肿胀/红斑,记3分;后爪严重肿胀/红斑,记4分;计算四肢评分总和,最高分为16分^[6]。采用足容积排水法对各组大鼠踝关节及以下部位(含踝关节)的体积进行测定,并计算足跖趾容积:足跖趾容积=(造模后容积-造模前容积)/造模前容积 $\times 100\%$ 。

2.3 取材

末次给药后24 h,将大鼠以腹腔注射戊巴比妥钠的方式进行麻醉,采集腹主动脉血1 mL。随后,处死各组大鼠,取其踝关节滑膜组织,一部分于4%多聚甲醛溶液中固定,另一部分于-80℃下保存。

2.4 大鼠血清中炎症因子水平检测

取“2.3”项下各组大鼠血液样品,于室温下静置2 h后,在4℃下以3 000 r/min离心10 min,取上层血清,按ELISA试剂盒说明书方法操作,以全功能酶标仪检测血清中IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10水平。

2.5 大鼠踝关节滑膜组织病理形态观察

取“2.3”项下各组大鼠经4%多聚甲醛溶液固定48 h的踝关节滑膜组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片;取切片适量,进行苏木精-伊红(HE)染色,于显微镜下观察其踝关节滑膜组织的病理变化。

2.6 大鼠踝关节滑膜组织中相关蛋白表达检测

采用Western blot和免疫荧光实验对各组大鼠踝关节滑膜组织中细胞自噬相关蛋白(ULK1、Beclin-1、LC3)、凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、caspase-3)和通路相关蛋白(JAK3、p-JAK3、STAT3、p-STAT3)的表达情况进行检测。

(1)Western blot实验:取“2.3”项下各组大鼠冻存的踝关节滑膜组织适量,以RIPA裂解液裂解30 min后离心,收集上清液,测定总蛋白浓度并煮沸变性;取变性蛋白,经电泳分离后转膜,再以5%脱脂牛奶于室温下封闭1 h;洗膜后,加入ULK1、Beclin-1、LC3、Bax、Bcl-2、caspase-3、JAK3、p-JAK3、STAT3、p-STAT3、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000),于4℃下孵育过夜;洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释比例

为1:5 000),于室温下孵育2 h;洗膜后,进行ECL显影、成像,并通过Image J软件分析各蛋白条带的灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值表示各目的蛋白的表达水平,以LC3 II与LC3 I、p-JAK3与JAK3、p-STAT3与STAT3的蛋白表达比值表示LC3的表达水平和JAK3、STAT3的磷酸化水平。

(2)免疫荧光染色实验:取“2.5”项下各组大鼠的踝关节滑膜组织切片,经脱蜡、水化后,浸入3% H_2O_2 溶液孵育,再以柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复;用山羊血清封闭30 min后,加入LC3一抗(稀释比例为1:1 000),于4℃下孵育过夜;洗膜后,加入Alexa Fluor[®] 594 鬼笔环肽(稀释比例为1:5 000),于37℃下孵育1 h;洗膜后,用4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)染色10 min,再以抗荧光淬灭剂终止反应,封片后,用倒置显微镜观察,并使用Image J分析LC3阳性区域(呈红色)的荧光强度。

2.7 统计学方法

采用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。所有计量数据均服从正态分布且方差齐,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验。检验水平 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 高良姜素对模型大鼠AI评分和足跖趾容积的影响

与正常组相比,模型组大鼠的AI评分和足跖趾容积均普遍升高;与模型组相比,各药物组的AI评分和足跖趾容积均普遍降低,且高良姜素的作用具有剂量依赖性($P<0.05$),详细变化趋势见表1、表2。

表1 各组大鼠AI评分比较($\bar{x} \pm s, n=10$,分)

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	0	0	0	0	0
模型组	12.63 $\pm$ 0.76 ^a	13.25 $\pm$ 1.33 ^a	12.59 $\pm$ 0.89 ^a	13.16 $\pm$ 1.20 ^a	12.74 $\pm$ 0.93 ^a
高良姜素低剂量组	13.33 $\pm$ 0.97	12.43 $\pm$ 0.73	11.43 $\pm$ 1.16 ^b	10.38 $\pm$ 1.01 ^b	9.72 $\pm$ 0.69 ^b
高良姜素中剂量组	12.08 $\pm$ 0.85	11.76 $\pm$ 0.94 ^b	10.59 $\pm$ 0.92 ^b	9.32 $\pm$ 0.71 ^{bc}	8.16 $\pm$ 0.38 ^{bc}
高良姜素高剂量组	13.19 $\pm$ 0.96	11.01 $\pm$ 0.98 ^b	9.87 $\pm$ 0.77 ^b	8.10 $\pm$ 0.59 ^{cd}	6.20 $\pm$ 0.74 ^{cd}
甲氨蝶呤组	12.79 $\pm$ 0.86	11.33 $\pm$ 1.02 ^b	9.95 $\pm$ 0.65 ^b	7.75 $\pm$ 0.69 ^b	6.32 $\pm$ 0.57 ^b

a:与正常组相比, $P<0.05$;b:与模型组相比, $P<0.05$;c:与高良姜素低剂量组相比, $P<0.05$;d:与高良姜素中剂量组相比, $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠足跖趾容积比较($\bar{x} \pm s, n=10$,%)

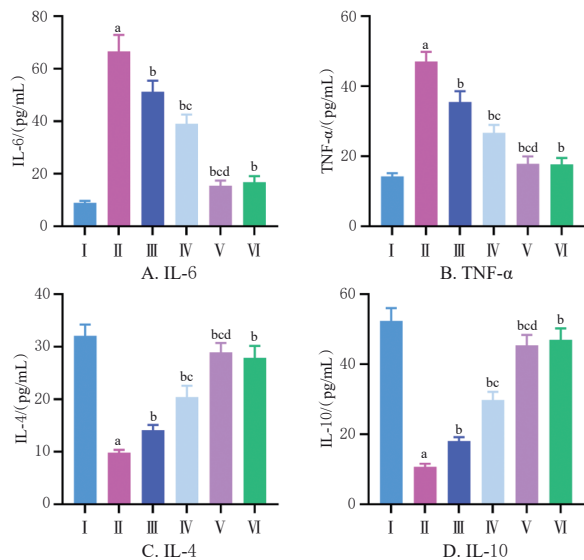
组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常组	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.02
模型组	0.65 $\pm$ 0.04 ^a	0.74 $\pm$ 0.05 ^a	0.79 $\pm$ 0.04 ^a	0.69 $\pm$ 0.05 ^a	0.67 $\pm$ 0.03 ^a
高良姜素低剂量组	0.66 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.03 ^b	0.60 $\pm$ 0.02 ^b	0.52 $\pm$ 0.03 ^{bc}	0.42 $\pm$ 0.02 ^b
高良姜素中剂量组	0.65 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.02 ^{bc}	0.50 $\pm$ 0.03 ^{bc}	0.41 $\pm$ 0.02 ^{bc}	0.33 $\pm$ 0.02 ^{bc}
高良姜素高剂量组	0.64 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.03 ^{cd}	0.35 $\pm$ 0.02 ^{cd}	0.29 $\pm$ 0.01 ^{cd}	0.23 $\pm$ 0.01 ^{cd}
甲氨蝶呤组	0.65 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.02 ^b	0.36 $\pm$ 0.02 ^b	0.28 $\pm$ 0.03 ^b	0.22 $\pm$ 0.02 ^b

a:与正常组相比, $P<0.05$;b:与模型组相比, $P<0.05$;c:与高良姜素低剂量组相比, $P<0.05$;d:与高良姜素中剂量组相比, $P<0.05$ 。

3.2 高良姜素对模型大鼠血清中炎症因子水平的影响

与正常组相比,模型组大鼠血清中IL-6、TNF- α 水平均显著升高,IL-4、IL-10水平均显著降低($P<0.05$);与模型组相比,各药物组大鼠血清中IL-6、TNF- α 水平

均显著降低,IL-4、IL-10水平均显著升高($P<0.05$),且高良姜素的作用具有剂量依赖性($P<0.05$)。结果见图1。



I: 正常组; II: 模型组; III: 高良姜素低剂量组; IV: 高良姜素中剂量组; V: 高良姜素高剂量组; VI: 甲氨蝶呤组; a: 与正常组相比, $P<0.05$; b: 与模型组相比, $P<0.05$; c: 与高良姜素低剂量组相比, $P<0.05$; d: 与高良姜素中剂量组相比, $P<0.05$ 。

图1 各组大鼠血清中炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.3 高良姜素对模型大鼠踝关节滑膜组织病理形态的影响

正常组大鼠踝关节结构完整,滑膜上皮层未见增生。模型组大鼠可见踝关节软骨变性坏死,滑膜区域有炎症细胞浸润、滑膜细胞增生,关节腔内出现组织坏死,且伴有炎症细胞渗出。与模型组相比,各药物组大鼠踝关节滑膜组织病理变化均有不同程度改善。结果见图2。

3.4 高良姜素对模型大鼠踝关节滑膜组织中相关蛋白表达的影响

3.4.1 细胞自噬相关蛋白

与正常组相比,模型组大鼠踝关节滑膜组织中ULK1、Beclin-1、LC3蛋白的表达水平和LC3阳性区域的荧光强度均显著升高($P<0.05$);与模型组相比,各药物组大鼠踝关节滑膜组织中ULK1、Beclin-1、LC3蛋白的表达水平和LC3阳性区域的荧光强度均显著升高($P<0.05$),且高良姜素的作用具有剂量依赖性($P<0.05$)。结果见表3、图3、图4。

3.4.2 细胞凋亡相关蛋白

与正常组相比,模型组大鼠踝关节滑膜组织中Bax、caspase-3蛋白的表达水平均显著降低,Bcl-2蛋白的表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,各药物组大鼠踝关节滑膜组织中Bax、caspase-3蛋白的表达水平均显著升高,Bcl-2蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$),且高良姜素的作用具有剂量依赖性($P<0.05$)。结果见图5。

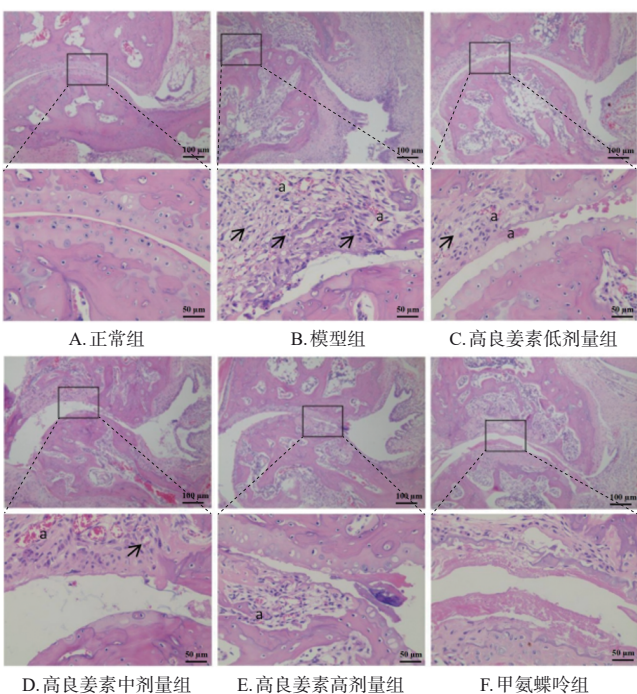


图2 各组大鼠踝关节滑膜组织病理形态观察的显微图(HE染色)

表3 各组大鼠踝关节滑膜组织中自噬相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ULK1/GAPDH	Beclin-1/GAPDH	LC3 II/LC3 I	LC3荧光强度
正常组	0.33±0.02	0.20±0.01	0.30±0.02	0.02±0.01
模型组	0.45±0.03 ^a	0.26±0.02 ^a	0.37±0.03 ^a	0.06±0.01 ^a
高良姜素低剂量组	0.67±0.03 ^b	0.49±0.03 ^b	0.43±0.02 ^b	0.12±0.02 ^b
高良姜素中剂量组	0.81±0.05 ^{bc}	0.60±0.02 ^{bc}	0.50±0.03 ^{bc}	0.19±0.03 ^{bc}
高良姜素高剂量组	1.10±0.07 ^{bcd}	1.05±0.06 ^{bcd}	0.92±0.07 ^{bcd}	0.33±0.05 ^{bcd}
甲氨蝶呤组	1.08±0.08 ^b	1.01±0.07 ^b	0.89±0.05 ^b	0.27±0.04 ^b

a: 与正常组相比, $P<0.05$; b: 与模型组相比, $P<0.05$; c: 与高良姜素低剂量组相比, $P<0.05$; d: 与高良姜素中剂量组相比, $P<0.05$ 。

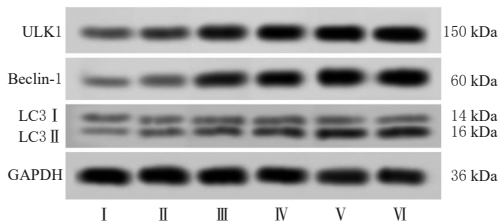


图3 各组大鼠踝关节滑膜组织中自噬相关蛋白表达的电泳图

图3 各组大鼠踝关节滑膜组织中自噬相关蛋白表达的电泳图

3.4.3 JAK3/STAT3通路相关蛋白

与正常组相比,模型组大鼠踝关节滑膜组织中JAK3、STAT3的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);与模型组相比,各药物组大鼠踝关节滑膜组织中JAK3、STAT3的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$),且高良姜素的作用具有剂量依赖性($P<0.05$)。结果见图6。

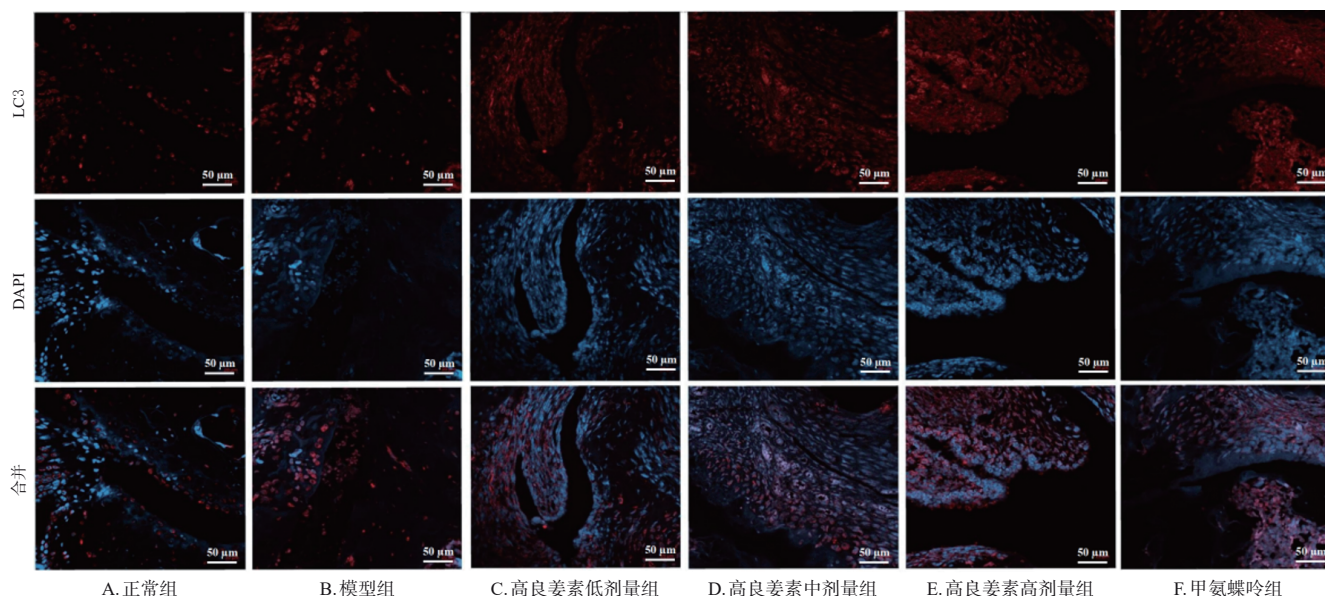
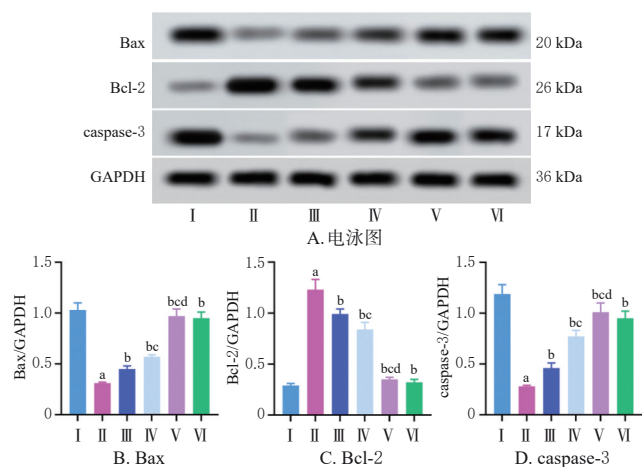


图4 各组大鼠踝关节滑膜组织中LC3表达的显微图(免疫荧光染色)



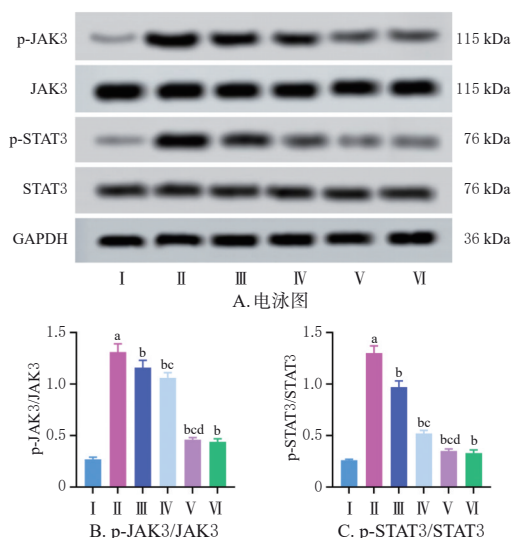
I: 正常组; II: 模型组; III: 高良姜素低剂量组; IV: 高良姜素中剂量组; V: 高良姜素高剂量组; VI: 甲氨蝶呤组; a: 与正常组相比, $P < 0.05$; b: 与模型组相比, $P < 0.05$; c: 与高良姜素低剂量组相比, $P < 0.05$; d: 与高良姜素中剂量组相比, $P < 0.05$ 。

图5 各组大鼠踝关节滑膜组织中细胞凋亡相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

4 讨论

有研究显示,高良姜素能抑制炎症、促进软骨细胞自噬,从而减轻膝骨关节炎的组织损伤^[9]。诱导性关节炎模型是常用的RA模型之一。本研究使用C II乳剂建立诱导性关节炎大鼠模型,并以不同剂量的高良姜素进行干预,结果显示,高良姜素可减轻大鼠踝关节滑膜组织损伤和炎症细胞浸润,能剂量依赖性地调节炎症因子水平,减少关节骨破坏,有望成为治疗RA的潜在新药。

自噬是细胞内重要的分解代谢机制,可通过降解病原体等途径来发挥机体保护作用,对维持细胞稳态、调节免疫反应至关重要。相关研究证实,自噬受阻可能促进成纤维细胞样滑膜细胞增殖,导致滑膜组织增生,而软骨细胞自噬功能下调则会引发细胞死亡和软骨破坏,



I: 正常组; II: 模型组; III: 高良姜素低剂量组; IV: 高良姜素中剂量组; V: 高良姜素高剂量组; VI: 甲氨蝶呤组; a: 与正常组相比, $P < 0.05$; b: 与模型组相比, $P < 0.05$; c: 与高良姜素低剂量组相比, $P < 0.05$; d: 与高良姜素中剂量组相比, $P < 0.05$ 。

图6 各组大鼠踝关节滑膜组织中JAK3/STAT3通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

从而加剧RA病情^[10]。因此,调节此类细胞自噬可能是治疗RA的关键靶点。研究指出,自噬过程受自噬相关蛋白复合体严格调控,在哺乳动物体内,ULK1、Beclin-1、LC3均为特定自噬相关蛋白的同源蛋白,其中Beclin-1蛋白的表达水平与LC3 II含量是评价自噬发生及活性的重要指标^[11]。本研究结果显示,与正常组相比,模型组大鼠滑膜组织中ULK1、Beclin-1、LC3蛋白的表达水平及LC3阳性区域的荧光强度均显著升高;经不同剂量高良姜素干预后,上述指标进一步上调。这提示,高良姜素可能通过诱导滑膜持续自噬状态,触发滑膜细胞凋亡,进而抑制其增殖,缓解滑膜过度增生对关节软骨及

骨组织的侵蚀与破坏。

本研究还探讨了高良姜素对滑膜组织细胞凋亡的影响。细胞凋亡与生物发育等过程密切相关,滑膜组织细胞自噬异常及凋亡与RA发生发展密切相关^[12]。本研究结果显示,高良姜素可剂量依赖性地上调促凋亡蛋白Bax、caspase-3的表达,下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,推测该成分可能通过诱导滑膜组织持续自噬状态而启动细胞凋亡程序,抑制细胞异常增殖,从而缓解关节软骨及骨组织的侵蚀与破坏。

JAK3/STAT3是关键的免疫调节与细胞增殖信号转导通路,在RA中,该通路的持续激活与滑膜组织病理变化密切相关,从而推动慢性滑膜炎的发生发展^[13]。JAK3缺失会导致淋巴细胞介导的促炎或抗炎功能异常,从而影响免疫系统整体功能,因此其抑制剂是具有临床应用前景的RA治疗药物^[14]。STAT3作为JAK3激酶下游底物,在RA发生发展中扮演核心致病角色,降低其表达有望抑制RA滑膜细胞生长、增殖及凋亡抵抗^[15]。本研究结果显示,高良姜素可剂量依赖性地降低JAK3、STAT3的磷酸化水平。这提示,高良姜素改善RA的炎症损伤可能与抑制JAK3/STAT3通路有关。

综上所述,高良姜素可诱导RA大鼠滑膜组织细胞持续自噬、促进细胞凋亡、抑制滑膜细胞增生、减轻持续性炎症反应,上述抗RA作用可能与其抑制JAK3/STAT3通路有关。这一发现为高良姜素作为RA治疗候选药物提供了科学依据,未来需进一步探索其临床应用价值。

参考文献

[1] CANNING J, SIEBERT S, JANI B D, et al. Examining the relationship between rheumatoid arthritis, multimorbidity and adverse health-related outcomes: a systematic review protocol[J]. J Comorb, 2020, 10: 2235042X209-06657.

[2] CHEN B J, WANG F Q, ZHANG Y, et al. PTEN-mediated FOXO signaling affects autophagy, migration and invasion of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Tissue Cell, 2024, 86: 102278.

[3] XIAO T, CHENG X Y, ZHI Y, et al. Ameliorative effect of *Alangium chinense* (Lour.) Harms on rheumatoid arthritis by reducing autophagy with targeting regulate JAK3-STAT3 and COX-2 pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt. 1): 117133.

[4] WANG D B, CHEN J R, PU L, et al. Galangin: a food-derived flavonoid with therapeutic potential against a wide spectrum of diseases[J]. Phytother Res, 2023, 37(12): 5700-5723.

[5] 陈杨, 喻霞, 赵紫玄, 等. 高良姜素通过抑制 JAK2-

STAT3 磷酸化减轻小鼠内皮炎症改善动脉粥样硬化[J]. 中南药学, 2023, 21(6): 1472-1479.

[6] 梁霄, 李娅兰, 张筠昊, 等. 基于TLR2/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路探讨独活寄生汤对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(11): 43-52.

[7] 张秋霞, 许春梅, 林文静, 等. 高良姜素调节 SDF-1/CXCR4 信号通路对肾病综合征大鼠免疫功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(8): 1945-1950.

[8] YANG J J, LIU J Y, LI J, et al. Celastrol inhibits rheumatoid arthritis by inducing autophagy via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 112: 109241.

[9] 杨青, 黄伟, 刘清毅, 等. 高良姜素对膝关节炎大鼠软骨细胞自噬和凋亡的影响[J]. 中国药房, 2025, 36(3): 312-317.

[10] MISRA S, BAGCHI A, SARKAR A, et al. Methotrexate and theaflavin-3, 3'-digallate synergistically restore the balance between apoptosis and autophagy in synovial fibroblast of RA: an *ex vivo* approach with cultured human RA FLS[J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(5): 1427-1442.

[11] HAO F, WANG Q, LIU L, et al. Effect of moxibustion on autophagy and the inflammatory response of synovial cells in rheumatoid arthritis model rat[J]. J Tradit Chin Med, 2022, 42(1): 73-82.

[12] ZHANG Y Q, SHI J C, XIE Y M, et al. Exploring the supplementary potential of all-trans retinoic acid with methotrexate in rheumatoid arthritis: modulation of synovial cell apoptosis and autophagy[J]. Clin Exp Rheumatol, 2024, 42(7): 1387-1397.

[13] ZHENG Y X, WEI K, JIANG P, et al. Macrophage polarization in rheumatoid arthritis: signaling pathways, metabolic reprogramming, and crosstalk with synovial fibroblasts[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1394108.

[14] CHEN C J, YIN Y, SHI G N, et al. A highly selective JAK3 inhibitor is developed for treating rheumatoid arthritis by suppressing γ c cytokine-related JAK-STAT signal[J]. Sci Adv, 2022, 8(33): eabo4363.

[15] YANG Y, LIN S D, YANG Z, et al. Circ_0001947 promotes cell proliferation, invasion, migration and inflammation and inhibits apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through miR-671-5p/STAT3 axis[J]. J Orthop Surg Res, 2022, 17(1): 54.

(收稿日期: 2025-12-19 修回日期: 2026-03-06)

(编辑: 李 劲)