

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.19.013

清热活血方对胶原诱导性关节炎模型大鼠 H3K18la 及 JAK2/STAT3 信号通路的影响

杨越, 张解玉, 张馨文, 魏光成, 石金杰, 李晓旭, 赵珈禾, 曹炜✉

中国中医科学院望京医院, 北京市朝阳区中环南路6号, 100102



[摘要] **目的** 基于组蛋白 H3 的赖氨酸 18 位乳酸化修饰 (H3K18la) 与 Janus 激酶 2/信号转导和转录激活子 3 (JAK2/STAT3) 信号通路探讨清热活血方治疗类风湿关节炎可能的作用机制。**方法** 24 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、清热活血方组、甲氨蝶呤组, 每组 6 只。除对照组外, 其余各组大鼠采用牛Ⅱ型胶原与弗氏不完全佐剂混合制成乳化剂, 建立胶原诱导性关节炎大鼠模型。自造模第 1 天开始, 清热活血方组以 20 g/(kg·d) 清热活血方灌胃, 每日 1 次; 甲氨蝶呤组予每周 1 mg/kg 甲氨蝶呤混悬液灌胃, 分别于每周二、四灌胃; 对照组、模型组每日以及甲氨蝶呤组非灌胃日均以 10 ml/(kg·d) 灌胃生理盐水, 每日 1 次。各组均连续灌胃 4 周。各组分别于第 2 次免疫后第 6、10、14、18、22 天进行关节炎指数评分; 最后一次灌胃后次日取材, HE 染色法检测膝关节滑膜及踝关节病理变化; ELISA 法检测大鼠血清中 C 反应蛋白 (CRP)、白细胞介素 17 (IL-17) 水平; 微量法检测滑膜中乳酸水平; 免疫共沉淀法获取大鼠膝关节滑膜组织中乳酸化蛋白后 Western Blot 法检测滑膜中 H3K18la 的水平; Western Blot 法检测踝关节磷酸化 Janus 激酶 2 (P-JAK2)、磷酸化信号转导和转录激活子 3 (P-STAT3) 蛋白表达水平。**结果** 病理结果显示, 对照组大鼠滑膜细胞排列整齐, 形态正常, 无血管增生情况。模型组大鼠滑膜细胞排列杂乱, 结构异常, 有血管增生与大量炎性细胞浸润; 与对照组比较, 关节炎指数评分、CRP、IL-17 水平显著增高, 滑膜中乳酸、H3K18la 及关节中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白水平均明显增高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 清热活血方组及甲氨蝶呤组大鼠滑膜与关节病理显示炎性损伤减轻, 关节炎指数评分、CRP、IL-17 水平显著降低, 乳酸、H3K18la 及 P-JAK2、P-STAT3 蛋白水平均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与甲氨蝶呤组比较, 清热活血方组在大鼠膝关节及踝关节病理改变相似, 以上各指标两组比较差异无显著统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 清热活血方可能通过调节乳酸含量下调 H3K18la 水平, 同时抑制 JAK2/STAT3 信号通路从而改善胶原诱导性关节炎模型大鼠炎症。**[关键词]** 类风湿关节炎; 胶原诱导性关节炎; 清热活血方; 乳酸; Janus 激酶 2; 信号转导和转录激活子 3

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的免疫介导性炎症性疾病, 通常表现为滑膜关节疼痛、肿胀和僵硬, 最终导致不可逆的关节畸形^[1]。研究^[2]显示, RA 患者在病情无法得到足够控制的同时还被药物的副作用影响, 并受到频繁就诊和安全监测负担的困扰。中药与西药联合应用治疗本病可发挥协同作用, 不良反应、耐药性和致残率均降低^[3]。清热活血法是国医大师路志正治疗

活动期 RA 的经典治法, 据此法创立的经验方清热活血方已经临床验证有效且安全^[4]。前期基础研究^[5]显示, 清热活血方能够抑制胶原诱导性关节炎 (CIA) 模型大鼠的关节炎进展。近年来研究发现, 由乳酸介导发生的翻译后修饰组蛋白乳酸化, 尤其是组蛋白 H3 的赖氨酸 18 位乳酸化修饰 (histone H3 lysine 18 lactylation, H3K18la), 在巨噬细胞、T 细胞等细胞中具有关键的细胞激活和功能分化的调节作用, 可能影响自身免疫性疾病的发生发展^[6-7]。最新单细胞测序研究^[8]发现, RA 患者乳酸化评分显著升高, 与免疫细胞浸润和免疫检查点

基金项目: 北京市自然科学基金(7242261); 中国中医科学院望京医院高水平中医医院建设项目(WJCC-202317, WJCC-202321)

✉ 通讯作者: academic_caoweie66@163.com

分子表达呈正相关。Janus 激酶 2 (JAK2) /信号转导和转录激活子 3 (STAT3) 通路介导细胞因子受体的信号传导在巨噬细胞分化、CD4⁺ T 细胞亚群的分化和维持中起重要作用^[9], 是经典的炎症信号通路。另有研究表明, RA 滑膜组织中乳酸的蓄积可促进局部缺氧炎症微环境的形成^[10]。本研究从 H3K18la 与 JAK2/STAT3 信号通路进一步解析清热活血方治疗 RA 的可能效应学机制, 为其临床应用与转化提供证据。本研究方案经中国中医科学院广安门医院伦理委员会 (批准文号 IACUC-GAMH-2022-003-02) 及中国中医科学院望京医院伦理委员会 (批准文号 WJEC-YJS-2024-006-P001) 批准。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量 (240±15)g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2024-0003。实验中心内环境温度 (20±2)℃, 相对湿度 45%~50%, 12 h/12h 明暗交替, 自由饮水。

1.2 药物

清热活血方主要由金银花、土茯苓、苍术、黄柏、赤芍、丹参、绵萆薢、青风藤、莪术组成, 药物剂量比例为 10:10:5:3:5:5:5:5:3, 由四川新绿色药业科技发展有限公司制备成配方颗粒, 颗粒生药比为 1:19, 将颗粒制成含生药 2 g/ml 的灌胃剂。甲氨蝶呤片 (批号 H31020644), 上海信谊药厂有限公司, 配制为 0.1 mg/ml 的混悬液。

1.3 主要试剂与仪器

免疫原性牛Ⅱ型胶原 (货号: 20022)、弗氏不完全佐剂 (货号: 7002), Chondrex 公司; 苏木素染色液 (货号: BLB-03)、伊红染色液 (货号: BLB-06), 北京九州柏林生物科技有限公司; C 反应蛋白 (CRP) ELISA 试剂盒 (货号: EK394-24)、白细胞介素 17 (IL-17) ELISA 试剂盒 (货号: EK317), 杭州联科生物技术股份有限公司; 乳酸测试盒 (货号: A019-2-1), 南京建成生物工程研究所; 通用裂解液 (货号: AIWB-012), 亲和 (武汉) 生命科技有限责任公司; 乳酸化泛抗体 (Pan K1a) (货号: PTM-1401RM)、H3K18la 抗体 (货号: PTM-1406RM)、组蛋白 H3 抗体 (货号: PTM-1002RM), 杭州景杰生物科技股份有限公司; 磷酸化 Janus 激酶 2 (P-JAK2) 抗体 (货号: 3776)、磷酸化信号转导和转录激活子 3 (P-STAT3) 抗体

(货号: 9145), Cell Signaling Technology 公司; Protein A 琼脂糖磁珠 (货号: P2085), 上海碧云天生物技术有限公司; 鼠二抗 (货号: bs-40296G-HRP)、兔二抗 (货号: bs-40295G-HRP), 北京博奥森生物技术有限公司。

紫外可见分光光度计 (型号: Lambda P40), PerkinElmer 公司; 组织包埋机 (型号: Histocentre3)、组织切片机 (型号: FINESSE ME+), Thermo Fisher Scientific 公司; 正置光学显微镜 (型号: DM6000B), Leica 公司; 电泳仪 (型号: PowerPacTMBasic)、凝胶成像系统 (型号: ChemiDoc XRS), Bio-Rad 公司。

1.4 造模方法

采用牛Ⅱ型胶原、弗氏不完全佐剂建立 CIA 模型^[11-12]: 将牛Ⅱ型胶原、弗氏不完全佐剂按照 1:1 比例混合制成乳化剂, 第一次免疫即实验第 1 天于大鼠左侧尾根部皮下注射 0.2 ml 乳化剂, 实验第 8 天第二次加强免疫于大鼠右侧尾根部皮下注射 0.1 ml 乳化剂。大鼠出现关节肿胀、滑膜增厚以及滑膜成纤维细胞增生等症状表示造模成功^[11-12]。实验中 18 只大鼠均造模成功。

1.5 动物分组与干预方法

使用抽签法将 24 只大鼠分成对照组、模型组、清热活血方组、甲氨蝶呤组 4 组, 每组 6 只。除对照组外, 其余各组大鼠均建立 CIA 模型。自造模第 1 天开始, 清热活血方组按照既往研究结果^[13]最佳有效灌胃剂量为生药 20 g/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次; 甲氨蝶呤组予每周 1 mg/kg 甲氨蝶呤混悬液灌胃, 分别于每周二、周四灌胃; 对照组、模型组每日以及甲氨蝶呤组非灌胃日均以 10 ml/(kg·d) 灌胃生理盐水, 每日 1 次。各组均连续灌胃 4 周。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 关节炎指数评分 分别于第 2 次免疫后第 6、10、14、18、22 天各评估 1 次。每足 4 分制, 关节炎指数评分为四足之和。评分标准^[14]如下: 正常计 0 分, 单关节皮肤红肿计 1 分, 踝关节蔓延至跗骨的轻度红肿计 2 分, 踝关节蔓延至跖骨的中度红肿计 3 分, 踝关节蔓延至趾骨的严重红肿, 伴关节僵直、畸形计 4 分。

1.6.2 HE 染色观察膝关节滑膜及踝关节病理变化 最后一次灌胃后次日进行取材, 每组抽签法随机取 3 只大鼠的完整膝关节滑膜、踝关节, 4% 多聚甲醛固定。固定 48 h 后, 经脱钙、脱水处理, 石蜡包埋, 切成 4 μm 切片, 进行 HE 染色, 显微镜下

观察膝关节滑膜及踝关节病理情况。

1.6.3 ELISA 法检测血清炎症因子水平 1.2%戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后腹主动脉取血，收集全部大鼠血清。ELISA 试剂盒检测大鼠 CRP、IL-17 水平，按照试剂盒步骤进行，使用紫外可见分光光度仪在 450 nm 波长处测量光密度。

1.6.4 微量法检测膝关节滑膜组织中乳酸含量 取全部大鼠膝关节滑膜组织样本匀浆后，取上清液，使用乳酸测试盒进行试剂配制，使用紫外可见分光光度仪在 530 nm 波长处读数。

1.6.5 免疫共沉淀法获取膝关节滑膜组织中乳酸化蛋白 取全部大鼠膝关节滑膜组织处理后加入适量裂解缓冲液（含蛋白酶抑制剂），取少量裂解液备用。剩余裂解液加 1 μg Pan K1a 抗体，4℃ 慢摇孵育过夜。预处理过的 10 μl protein A 琼脂糖珠加入与抗体孵育过夜的裂解液中，4℃ 缓慢摇晃孵育 2~4 h，使抗体与 protein A 琼脂糖珠偶连。免疫沉淀反应后，获取乳酸化蛋白。

1.6.6 Western Blot 法检测膝关节滑膜组织中 H3K18la 及踝关节中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白水平 提取全部大鼠膝关节滑膜及踝关节总蛋白后，使用 SDS-PAGE 分离并转移至 PVDF 膜。5% 牛血清白蛋白 BSA 室温封闭 1.5 h，加入 Pan K1a 抗体(1:1000)、H3K18la 抗体(1:1000)、组蛋白 H3 抗体(1:1000)、P-JAK2 抗体 (1:1000)、P-STAT3 抗体 (1:2000)、β-Actin(1:1000)抗体 4℃ 过夜。加入二抗(1:5000)后，室温轻摇 1 h，进行显影、曝光，最后获取蛋白条带图，在 Image J 1.52 软件中计算灰度值进行后续统计分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 28.0 及 Graphpad Prism 9.4.0 软件对数据统计分析。数据满足正态分布采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，满足方差齐采用单因素方差分析，不满足方差齐则采用 Welch 检验。数据不符合正态分布，采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异

具有统计意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间关节炎指数评分比较

与对照组比较，模型组大鼠足关节出现明显肿胀；与模型组比较，清热活血方组、甲氨蝶呤组足关节肿胀程度明显减轻；甲氨蝶呤组肿胀程度较清热活血方组略有减轻（见附图，请扫描本文二维码获取）。图 1 示，与对照组比较，模型组大鼠关节炎指数评分增长迅速；清热活血方组、甲氨蝶呤组增长幅度较模型组减小；甲氨蝶呤组较清热活血方组增长幅度减小。在第 2 次免疫后第 10 天关节炎指数评分达到最高峰，为判断造模是否成功，对此时间点关节炎指数评分进行分析，对照组关节炎指数评分为 0 分，模型组关节炎指数评分为 (8.6 ± 2.37) 分，较对照组显著增高 ($P < 0.01$)；清热活血方组关节炎指数评分为 (4.6 ± 3.78) 分、甲氨蝶呤组为 (2.9 ± 2.89) 分，两组关节炎指数评分均较模型组降低 ($P < 0.05$)，而清热活血方组、甲氨蝶呤组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

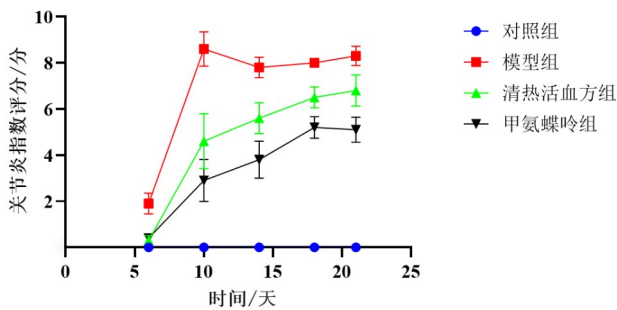
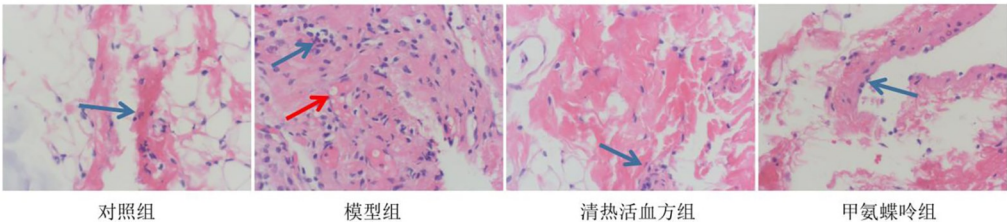


图 1 各组大鼠不同时间关节炎指数评分变化趋势
Figure 1 Trends in arthritis index scores of rats in each group at different time points

2.2 各组大鼠膝关节滑膜及踝关节病理情况比较

图 2 示，对照组滑膜细胞排列整齐形态正常，无血管增生。模型组滑膜细胞排列紊乱，结构异常，且有血管增生及浸润有大量炎性细胞。与模型



注：蓝色箭头所示为滑膜组织，红色箭头所示为血管增生。

图 2 各组大鼠膝关节滑膜组织 HE 染色病理结果 (×20)
Figure 2 Pathological results of HE staining in synovial tissue of knee joints in each group

组比较, 清热活血方组、甲氨蝶呤组滑膜细胞排列紊乱, 形态结构异常的滑膜细胞较少, 无明显血管增生及较少的炎性细胞浸润。清热活血方组、甲氨蝶呤组滑膜病理差别不明显。

图 3 示, 对照组踝关节软骨面平整光滑, 关节间隙正常, 无增生滑膜组织, 未发现炎性细胞。模型组踝关节软骨面平滑度欠佳, 粗糙, 滑膜组织增生及大量炎性细胞浸润, 关节腔内炎性渗出。与模型组比较, 清热活血方组、甲氨蝶呤组大鼠踝关节软骨面平整性较好, 滑膜组织轻度增生, 少有炎性细胞浸润。清热活血方组、甲氨蝶呤组踝关节病理差别不明显。

2.3 各组大鼠血清炎症因子水平比较

表 1 示, 与对照组大鼠比较, 模型组血清 CRP、IL-17 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 清热活血方组、甲氨蝶呤组血清 CRP、IL-17 水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 清热活血方组与甲氨蝶呤组之间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 CRP、IL-17 水平比较
Table 1 Comparison of serum CRP and IL-17 levels among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CRP/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	IL-17/ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$
对照组	6	467.10 $\pm$ 8.52	6.69 $\pm$ 0.28
模型组	6	641.17 $\pm$ 60.24 ^{a)}	7.29 $\pm$ 0.05 ^{a)}
清热活血方组	6	520.64 $\pm$ 7.98 ^{b)}	6.82 $\pm$ 0.02 ^{b)}
甲氨蝶呤组	6	466.03 $\pm$ 58.46 ^{c)}	6.70 $\pm$ 0.04 ^{c)}

注: CRP, C 反应蛋白; IL-17, 白细胞介素 17。
a) 与对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;
c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠踝关节中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白水平比较

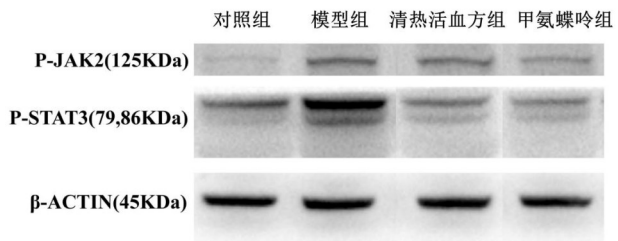
表 2 示, 与对照组比较, 模型组大鼠踝关节中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白水平增高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 清热活血方、甲氨蝶呤组大鼠踝关节中

P-JAK2、P-STAT3 蛋白水平减少 ($P<0.05$), 清热活血方组、甲氨蝶呤组 P-JAK2、P-STAT3 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠踝关节中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白电泳图见图 4。

表 2 各组大鼠踝关节中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白水平比较
Table 2 Comparison of P-JAK2 and P-STAT3 protein levels in ankle joints among groups (β -Actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	P-JAK2	P-STAT3
对照组	6	0.21 $\pm$ 0.01	0.91 $\pm$ 0.04
模型组	6	0.59 $\pm$ 0.08 ^{a)}	1.80 $\pm$ 0.26 ^{a)}
清热活血方组	6	0.43 $\pm$ 0.20 ^{b)}	1.18 $\pm$ 0.13 ^{b)}
甲氨蝶呤组	6	0.41 $\pm$ 0.03 ^{b)}	1.16 $\pm$ 0.27 ^{b)}

注: P-JAK2, 磷酸化 Janus 激酶 2; P-STAT3, 磷酸化信号转导和转录激活子 3。
a) 与对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。



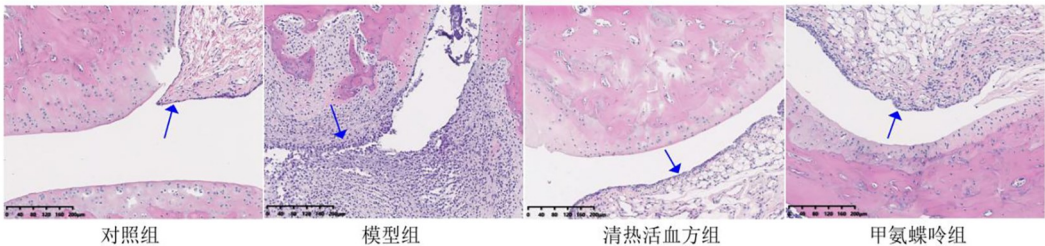
注: P-JAK2, 磷酸化 Janus 激酶 2; P-STAT3, 磷酸化信号转导和转录激活子 3。

图 4 各组大鼠踝关节中 P-JAK2、P-STAT3 蛋白电泳图
Figure 4 Electrophoretic bands of P-AK2 and P-STAT3 protein expression in ankle joints of each group

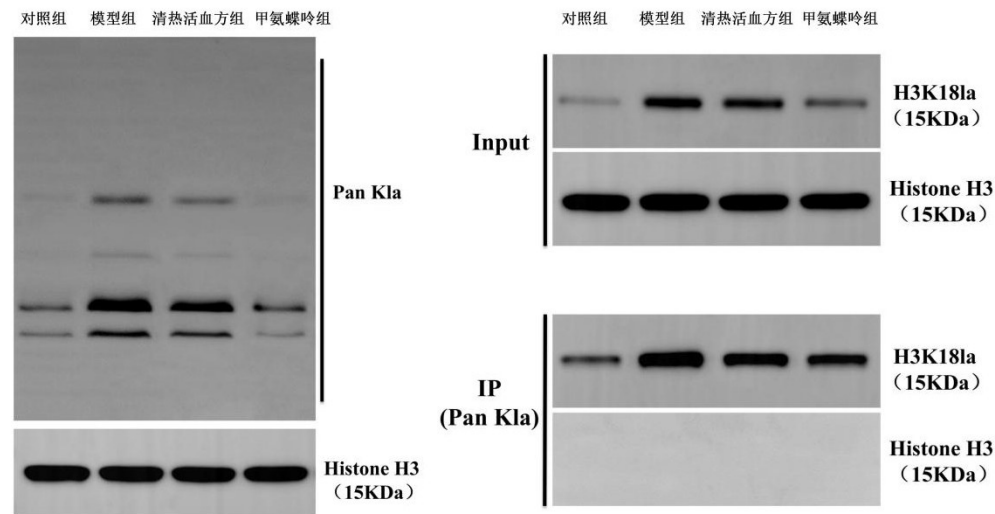
2.5 各组大鼠膝关节滑膜中乳酸水平、H3K18la 蛋白表达比较

表 3 示, 与对照组比较, 模型组乳酸含量升高 ($P<0.01$); 与模型组比较清热活血方、甲氨蝶呤组乳酸水平均降低 ($P<0.05$)。清热活血方组与甲氨蝶呤组之间的乳酸水平差异无统计学意义。

图 5 示, 以组蛋白 H3 为内参, 总蛋白中存在泛乳酸化蛋白与 H3K18la, 但条带显现不突出; 为



注: 箭头所示为踝关节滑膜细胞。
图 3 各组大鼠踝关节 HE 染色病理结果 ($\times 10$)
Figure 3 Pathological results of HE staining in ankle joints in each group



注：Histone H3，组蛋白 H3；H3K18la，组蛋白 H3 的赖氨酸 18 位乳酸化修饰；Pan K1a，乳酸化泛抗体。

图5 各组大鼠泛乳酸化及 H3K18la 蛋白表达条带图

Figure 5 Electrophoretic bands of global lactylation and H3K18la protein expression in each group

进一步获得更多 H3K18la，使用乳酸化泛抗体对乳酸化蛋白进行免疫共沉淀后再进行 Western Blot，结果显示，与对照组相比，模型组 H3K18la 水平明显增高 ($P<0.01$)；与模型组相比，清热活血方组、甲氨蝶呤组 H3K18la 水平明显降低 ($P<0.05$)。清热活血方组与甲氨蝶呤组之间 H3K18la 水平差异无统计学意义。

表3 各组大鼠膝关节滑膜中乳酸水平、H3K18la 蛋白水平比较

Table 3 Comparison of lactate and H3K18la protein levels in synovial tissue of knee joints among groups

组别	鼠数	乳酸/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$	H3K18la
对照组	6	5.50 $\pm$ 1.13	0.99 $\pm$ 0.30
模型组	6	21.27 $\pm$ 0.85 ^{a)}	6.72 $\pm$ 0.96 ^{a)}
清热活血方组	6	16.23 $\pm$ 1.02 ^{b)}	4.54 $\pm$ 0.80 ^{b)}
甲氨蝶呤组	6	13.75 $\pm$ 1.89 ^{b)}	3.01 $\pm$ 0.60 ^{b)}

注：H3K18la，组蛋白 H3 的赖氨酸 18 位乳酸化修饰。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

RA 属中医学“痹病”“痹证”范畴。张从正在《儒门事亲》中提出：“痹病以湿热为源，风寒为兼，三气合而为痹”，认为痹病乃湿热、风寒相合，而其中湿与风寒日久均可化热转归成热痹。叶桂《临证指南医案》指出：“有暑伤气，湿热入络而为痹者”“初病湿热在经，久则瘀热入络”，提出了瘀血致痹。因此，湿、热、瘀是 RA 活动期的关键病机^[15]，湿热久恋，血凝而痹阻脉络，邪气深入胶着，耗蚀筋骨气血，导致关节红、肿、胀、痛、

重、僵，甚至出现关节变形。清热活血方中金银花清热解毒、疏散风热，土茯苓解毒、除湿、通利关节，二药共用为君。苍术、黄柏清热利湿，赤芍、丹参清热凉血，共为臣药。佐以莪术、青风藤行血消肿止痛、祛湿通络，萆薢祛风湿、通经络。诸药合用，共奏清热利湿、活血止痛之功。临床研究证实，清热活血方能降低 RA 疾病活动度、红细胞沉降率、CRP 等^[4]，已被《类风湿关节炎病证结合诊疗指南》推荐应用于 RA 湿热瘀阻证^[15]。本研究选择被广泛使用的 RA 一线治疗药物甲氨蝶呤^[16]作为阳性对照。CIA 模型是最常见的研究 RA 自身免疫的模型^[17]。研究选用的 CRP、IL-17 是 RA 炎症的关键指标，临床上处于疾病活动期的 RA 患者 CRP 水平显著升高^[18]，IL-17 在促炎的同时还可通过协同作用放大由其他细胞因子诱导的 RA 炎症^[19]。本研究结果发现，清热活血方干预后，CIA 模型大鼠关节炎指数评分、膝关节和踝关节病理损伤及血清 CRP、IL-17 炎症因子水平均降低，与甲氨蝶呤组比较显示，清热活血方组关节肿胀程度稍重，但病理损伤两组差别不明显，炎症指标差异比较无统计学意义，证实清热活血方与甲氨蝶呤均具有显著的治疗效果。

JAK2/STAT3 信号通路为关键的多功能细胞因子传导途径，涉及调控免疫、增殖及炎症等多种病理生理过程，在 RA 发生发展中具有关键作用^[20]。研究表明，在 RA 患者的滑膜中 JAK2 和 STAT3 高表达^[21]；JAK2/STAT3 通路激活能使关节组织基质金属蛋白酶过表达，引发骨破坏，终致残疾^[22]。

因滑膜样本量有限,本研究提取实验大鼠关节滑膜附着处关节进行 JAK2/STAT3 通路的检测。P-JAK2、P-STAT3 是 JAK2 与 STAT3 在体内的激活状态,其与信号通路的传导密切相关,研究发现清热活血方与甲氨蝶呤均能显著降低磷酸化后的活性蛋白 P-JAK2、P-STAT3,且两组间差异无统计学意义,证实清热活血方同甲氨蝶呤均可能是通过调控 JAK2/STAT3 通路减少炎症因子的表达进而减轻 RA 的炎症损伤。

乳酸水平的增加是慢性炎症的关键特征,高水平乳酸是鉴别炎性关节炎的可靠指标^[23]。在乳酸的直接炎性作用之外,近年研究发现由乳酸介导的新组蛋白修饰乳酸化可能在多种疾病机制中发挥作用^[24]。研究^[25]发现,天麻素在体内外实验中可以靶向调控赖氨酸乙酰转移酶 8 以抑制组蛋白 H3K9 乳酸化,进而治疗类风湿性关节炎。还有研究发现青蒿素可通过 p300 介导的乳酸化作用,直接抑制糖酵解丙酮酸激酶的关键调控因子,减弱其对成纤维样滑膜细胞的增殖功能^[26]。本研究对大鼠的滑膜进行乳酸检测,发现模型组乳酸含量高于对照组,清热活血方及甲氨蝶呤干预后乳酸水平较模型组下降。进一步使用免疫共沉淀法对乳酸化组蛋白进行免疫共沉淀后再进行 Western Blot 实验检测滑膜中组蛋白乳酸化水平发现,模型组 H3K18la 较对照组升高,且清热活血方与甲氨蝶呤均能降低 CIA 大鼠的 H3K18la。由此证实,清热活血方或可通过调节乳酸的水平影响 H3K18la,进而对 RA 起到治疗作用。

综上所述,清热活血方可能通过调节膝关节滑膜乳酸的水平调控 H3K18la,抑制 JAK2/STAT3 通路,降低炎症因子对 RA 产生抗炎作用。但本研究中样本量较少,限制了蛋白的检测,且尚未对关键靶点之间的上下游关系进行验证,未来有待进一步扩大样本量,同时进行体外实验对 H3K18la 与 JAK2/STAT3 通路之间的确切联系进一步深入研究。

参考文献

- [1] BROWN P, PRATT AG, HYRICH KL. Therapeutic advances in rheumatoid arthritis [J]. BMJ, 2024, 384: e070856. doi: 10.1136/bmj-2022-070856.
- [2] HAUGEBERG G, HANSEN IJ, SOLDAL DM, et al. Ten years of change in clinical disease status and treatment in rheumatoid arthritis: results based on standardized monitoring of patients in an ordinary outpatient clinic in southern Norway [J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17(1):219.
- [3] 谢招虎,解静,吴晶金,等. 类风湿关节炎中西医药物治疗研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(7):1692-1695.
- [4] 姜泉,曹伟,唐晓颇,等. 清热活血方药治疗活动期类风湿关节炎的临床疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(7):588-592.
- [5] 智恺,刘春芳,曹伟,等. 清热活血方对肿瘤坏死因子 α 诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞迁移和黏附的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57(20):1777-1781.
- [6] XIN Q, WANG H, LI Q, et al. Lactylation: a passing fad or the future of posttranslational modification [J]. Inflammation, 2022, 45(4):1419-1429.
- [7] ZHANG D, TANG Z, HUANG H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation [J]. Nature, 2019, 574(7779):575-580.
- [8] FU W, WANG T, LU Y, et al. The role of lactylation in plasma cells and its impact on rheumatoid arthritis pathogenesis: insights from single-cell RNA sequencing and machine learning [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1453587. doi: 10.3389/fimmu.2024.1453587.
- [9] QIN Z, WANG R, HOU P, et al. TCR signaling induces STAT3 phosphorylation to promote TH17 cell differentiation [J]. J Exp Med, 2024, 221(3):e20230683.
- [10] PUCINO V, CERTO M, BULUSU V, et al. Lactate buildup at the site of chronic inflammation promotes disease by inducing CD4⁺ T cell metabolic rewiring [J]. Cell Metab, 2019, 30(6):1055-1074.
- [11] 乌日力嘎,乌兰其其格,呼日乐巴根,等. 类风湿关节炎大小鼠动物模型研究进展 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(20):69-72.
- [12] 叶冠成,陈光耀,江雯欣,等. 类风湿关节炎动物模型研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(5):88-92.
- [13] 武子英,曹伟,祁鑫,等. 清热活血方对胶原诱导性关节炎大鼠肠道微生态及 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(6):681-686.
- [14] CUZZOCREA S, MCDONALD MC, MOTA-FILIPPE H, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(2):320-328.
- [15] 中华中医药学会风湿病分会. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2018, 59(20):1794-1800.
- [16] 姜楠,田新平,曾小峰. 《2024 中国类风湿关节炎诊疗指南》解读 [J]. 协和医学杂志, 2025, 16(1):28-34.
- [17] BRAND DD, LATHAM KA, ROSLONIEC EF. Collagen-induced arthritis [J]. Nat Protoc, 2007, 2(5):1269-1275.
- [18] FELDMANN M, ELLIOTT MJ, WOODY JN, et al.

- Anti-tumor necrosis factor- α therapy of rheumatoid arthritis[J]. Adv Immunol, 1997, 64: 283–350. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60891-3.
- [19] LUBBERTS E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(7): 415–429.
- [20] BANERJEE S, BIEHL A, GADINA M, et al. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects[J]. Drugs, 2017, 77(5): 521–546.
- [21] WU JY, CHEN YJ, FU XQ, et al. Chrysoeriol suppresses hyperproliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and inhibits JAK2/STAT3 signaling [J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1): 73.
- [22] ZHAO Z, BI B, CHENG G, et al. Correction to: Melatonin ameliorates osteoarthritis rat cartilage injury by inhibiting matrix metalloproteinases and JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Inflammopharmacology, 2024, 32(2): 1649.
- [23] GARCIA-CARBONELL R, DIVAKARUNI AS, LODI A, et al. Critical role of glucose metabolism in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(7): 1614–1626.
- [24] IZZO LT, WELLEN KE. Histone lactylation links metabolism and gene regulation[J]. Nature, 2019, 574(7779): 492–493.
- [25] DAI Y, WANG S, LUO J, et al. Gastrodin attenuates rheumatoid arthritis by targeting KAT8 to inhibit the lactylation of H3K9 [J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1559744. doi:org/10.3389/fphar.2025.1559744.
- [26] WANG YH, GAO P, WANG YQ, et al. Small-molecule targeting PKM2 provides a molecular basis of lactylation-dependent fibroblast-like synoviocytes proliferation inhibition against rheumatoid arthritis[J]. Eur J Pharmacol, 2024, 972: 176551. doi:10.1016/j.ejphar.2024.176551.

Effects of *Qingre Huoxue Formulation* (清热活血方) on H3K18 Lactylation and the JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Rats with Collagen-Induced Arthritis

YANG Yue, ZHANG Xieyu, ZHANG Xinwen, WEI Guangcheng, SHI Jinjie, LI Xiaoxu, ZHAO Jiahe, CAO Wei

Wangjing Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100102

ABSTRACT Objective To investigate the potential mechanism of *Qingre Huoxue Formulation* (清热活血方, QHF) in the treatment of rheumatoid arthritis, focusing on histone H3 lysine 18 lactylation (H3K18la) and the janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway. **Methods** Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group, QHF group, and methotrexate (MTX) with 6 rats in each group. Except for the control group, rats were immunized with bovine type II collagen emulsified with incomplete Freund's adjuvant to establish a collagen-induced arthritis (CIA) model. From day 1 of modeling, the QHF group received intragastric administration of 20 g/(kg·d) once daily; the MTX group received intragastric administration of MTX suspension 1 mg/kg weekly on Tuesdays and Thursdays; the control group, model group, and MTX group on non-MTX days were given normal saline 10 ml/(kg·d) once daily. All interventions lasted for 4 weeks. Arthritis index (AI) scores were assessed on days 6, 10, 14, 18, and 22 after the second immunization. After the final gavage, synovial and ankle joint tissues were collected for hematoxylin-eosin (HE) staining to observe pathological changes. Serum C-reactive protein (CRP) and interleukin-17 (IL-17) levels were measured by ELISA; lactate levels in synovium were determined by a micro-method; H3K18la levels in synovial tissue were detected by co-immunoprecipitation and Western Blot; and phosphorylated JAK2 (P-JAK2) and phospho-rylated STAT3 (P-STAT3) expression in ankle joints was measured by Western Blot. **Results** In the control group, synovial cells were well organized and morphologically normal without angiogenesis. In the model group, synovial cells were disordered with abnormal structure, angiogenesis, and massive inflammatory infiltration. Compared with the control group, AI scores, CRP, IL-17, lactate, H3K18la, and P-JAK2/P-STAT3 levels were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, both the QHF and MTX groups showed alleviated inflammatory damage in synovial and joint pathology, with significantly reduced AI scores, CRP, IL-17, lactate, H3K18la, and P-JAK2/P-STAT3 protein levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). No significant differences were found between the QHF and MTX groups across the above indices ($P > 0.05$). **Conclusion** QHF may alleviate inflammation in CIA rats by regulating lactate content, downregulating H3K18la, and inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Keywords rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; *Qingre Huoxue Formulation* (清热活血方); lactate; janus kinase 2; signal transducer and activator of transcription 3

(收稿日期: 2025-03-11; 修回日期: 2025-06-24)

[编辑: 果 彤, 贾维娜]