

## 实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.01.010

## 脊蛇祛湿胶囊对胶原诱导性关节炎模型大鼠血清 NETs 水平和巨噬细胞极化的影响

任妮娜<sup>1</sup>, 马武开<sup>2</sup>✉, 凌益<sup>1</sup>, 姚血明<sup>2</sup>, 黄颖<sup>2</sup>, 陆道敏<sup>2</sup>, 陈昌明<sup>2</sup>, 黄维琛<sup>2</sup>

1. 贵州中医药大学, 贵州省贵阳市花溪区栋青路4号, 550025; 2. 贵州中医药大学第二附属医院

**[摘要]** 目的 从中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 介导的巨噬细胞极化角度探讨脊蛇祛湿胶囊治疗类风湿关节炎的可能作用机制。方法 将24只雌性SD大鼠随机分为空白对照组、模型组、脊蛇祛湿胶囊组、肽基精氨酸脱亚胺酶4 (PAD4) 抑制剂组, 每组6只。除空白对照组外, 其他各组制备胶原诱导性关节炎大鼠模型。造模成功后, 脊蛇祛湿胶囊组大鼠每日灌胃脊蛇祛湿胶囊 1.47 g/kg, PAD4 抑制剂组每周腹腔注射 PAD4 抑制剂 4 mg/kg, 空白对照组、模型组、PAD4 抑制剂组每日灌胃 2 ml 纯水, 均持续 4 周。分别于造模后第 7、14、21、28、35 天时观察各组大鼠四肢关节病变程度, 进行关节炎指数 (AI) 评分; 末次给药结束 24 h 后, HE 染色、番红固绿染色、TRAP 染色观察膝关节组织病理形态, 流式细胞术检测大鼠外周血 M1、M2 型巨噬细胞计数, ELISA 法检测大鼠血清酒石酸酸性磷酸酶 (TRACP)、NETs、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 含量, 实时荧光定量 PCR 法和 Western Blot 法检测大鼠膝关节软骨组织髓过氧化物酶 (MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL)、骨保护素 (OPG)、p65 蛋白及 mRNA 表达。结果 与空白组比较, 模型组 AI 评分升高 ( $P < 0.05$ ); 膝关节病理显示滑膜炎性细胞浸润、血管新生及骨软骨破坏明显, TRAP 染色破骨细胞计数、M1 型巨噬细胞计数升高, M2 型巨噬细胞计数减少; 血清 TRACP、NETs、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 iNOS 含量升高 ( $P < 0.05$ ); 膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、p65 蛋白及其 mRNA 表达升高, OPG 蛋白及其 mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组大鼠膝关节病理显示滑膜炎性细胞浸润、血管新生及骨软骨破坏改善; 造模后第 21、28、35 天 AI 评分降低, TRAP 染色破骨细胞计数减少, M1 型巨噬细胞计数降低、M2 型巨噬细胞计数升高, 血清 TRACP、NETs、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 iNOS 含量降低 ( $P < 0.05$ ); 膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、p65 蛋白及其 mRNA 表达降低, OPG 蛋白及其 mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ )。与 PAD4 抑制剂组比较, 脊蛇祛湿胶囊组大鼠 AI 评分降低, M1 型巨噬细胞计数降低, M2 型巨噬细胞计数升高 ( $P < 0.05$ ); 血清 TRACP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS 含量降低, MPO、RANKL、p65 蛋白及其 mRNA 表达降低, OPG 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ )。结论 脊蛇祛湿胶囊治疗类风湿关节炎机制可能是抑制 NETs 形成、下调 RANKL/核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路、调控巨噬细胞 M1/M2 极化失衡, 从而抑制破骨细胞生成与活化并缓解炎性骨破坏。

**[关键词]** 类风湿关节炎; 胶原诱导性关节炎; 中性粒细胞胞外诱捕网; 巨噬细胞极化; 脊蛇祛湿胶囊

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以滑膜炎和骨质破坏为特征的自身免疫性疾病。我

国 RA 患者数量已超 500 万, 是造成残疾的重要原因之一<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>发现由多形核中性粒细胞形成的抗菌蛋白修饰的细胞外染色质网络——中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 与 RA 骨侵蚀关系密切。NETs 可增强核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 诱导的破骨细胞生成及其骨吸收

**基金项目:**国家自然科学基金(82274678, 82360948, 82405366); 贵州省教育厅高等学校自然科学研究项目(黔教技[2024]118号); 贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目(贵中医TD合字[2022]4号); 贵州中医药大学研究生教育创新计划项目(YCXKYB2023010)

✉ 通讯作者:walker55@163.com

功能<sup>[3]</sup>。在不同微环境的刺激下,巨噬细胞可极化为 M1 型和 M2 型。巨噬细胞极化失衡与 RA 的发生和发展密切相关,其中 M1 型巨噬细胞在 RA 发生发展中发挥了促进炎症和骨质破坏的关键作用<sup>[4]</sup>。因此,抑制 NETs、维持巨噬细胞极化平衡对 RA 炎性骨破坏的治疗具有重要作用。

脊蛇祛湿胶囊(又称金乌健骨胶囊)为贵州中医药大学第二附属医院院内制剂(批准文号:黔药制字 Z20160028),是治疗 RA 的有效经验方<sup>[5]</sup>。前期研究<sup>[6-7]</sup>发现脊蛇祛湿胶囊可刺激骨形成和抑制骨吸收,改善骨代谢,防治 RA 继发的骨破坏;同时可调控 M1 型巨噬细胞相关通路,从而改善 RA 炎症状态。在此基础上,本研究观察脊蛇祛湿胶囊对胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠 NETs 及巨噬细胞极化失衡的影响,进一步探讨其治疗 RA 的机制。本实验通过贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批准号:20250311004)。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

24 只 SPF 级雌性健康 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量 150~180 g,由武汉贝赛模式生物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(鄂)2021-0011。饲养于贵州中医药大学动物实验中心,相对湿度 50%~70%,温度 20~25℃,12 h/12 h 光照黑暗循环,实验期间自由摄食普通饲料及饮水,饲料、水源经严格消毒处理。

### 1.2 药物

脊蛇祛湿胶囊(批号:20221001,规格:0.45 g×36 粒),由贵州中医药大学第二附属医院药剂科提供。组成:金毛狗脊(苗语:窝有加溜)15 g、千年健 15 g、黑骨藤(苗语:蛙莽塞)10 g、乌梢蛇(苗语:伦敬怪)10 g、小花青风藤(苗语:傻豆老你)15 g、三七(苗语:加松略确)6 g、白芍 12 g、姜黄(苗语:龚山滚)9 g、甘草 6 g。称取脊蛇祛湿胶囊内容物粉末溶于纯水中,涡旋振荡至充分混悬,配制成浓度为 0.1764 g/ml 的母液,于 4℃ 保存备用。肽基精氨酸脱亚胺酶 4(PAD4)抑制剂 GSK484(货号:G881625),上海麦克林生化科技股份有限公司,称取 GSK484 粉末溶于 DMSO 中,配制成浓度为 4.8 mg/ml 的母液,于 -20℃ 保存备用。

### 1.3 主要试剂与仪器

牛 II 型胶原冻干粉(货号:20022),美国 Chondrex 公司;弗氏完全佐剂(货号:HY-153808),美国 MedChemExpress 公司;藻红蛋白(PE)标记的 CD86 抗体(货号:200307),美国 Biologend 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD45 抗体(货号:FITC-65228)、抗原呈递细胞(APC)标记的 CD163 抗体(货号:APC-65169)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号:60004-1-Ig)、髓过氧化物酶(MPO)抗体(货号:66177-1-Ig)、p65 抗体(货号:10745-1-AP),武汉三鹰生物技术有限公司;苏木素(货号:H9627),美国 Sigma 公司;伊红(货号:71014460),国药集团化学试剂有限公司;番红固绿染液(货号:G1053)、TRAP 染色试剂盒(货号:G1050),武汉赛维尔生物科技有限公司;大鼠 NETs ELISA 试剂盒(货号:JL52124),上海江莱生物科技有限公司;大鼠酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)ELISA 试剂盒(货号:MM-0689R2)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA 试剂盒(货号:MM-0180R2)、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )ELISA 试剂盒(货号:MM-0047R2)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)ELISA 试剂盒(货号:MM-0889R2),江苏酶免实业有限公司;中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)抗体(货号:Ab310335),英国 Abcam 公司;RANKL 抗体(货号:AF0313),江苏亲科生物研究中心有限公司;骨保护素(OPG)抗体(货号:A00863)、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二抗(货号:BA1051)、HRP 标记羊抗兔二抗(货号:BA1054),武汉博士德生物工程有限公司;总 RNA 提取试剂(货号:R401-01)、ChamQ SYBR 实时荧光定量 PCR 预混液(货号:Q311-02),南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

流式细胞仪(型号:cytoFLEX),美国 Beckman-coulter 公司;病理切片机(型号:Leica RM 2016),上海徕卡仪器有限公司;显微镜(型号:Nikon Fi3),日本 Nikon 公司;酶标仪(型号:Multiskan FC),美国 Thermo Scientific 公司;电泳仪(型号:LF-600S),北京龙方科技有限公司;PCR 仪(型号:PR-96),杭州米欧仪器有限公司;垂直电泳槽(型号:DYCZ-24DN),北京六一仪器厂;化学发光成像系统(型号:SH-523),杭州申花科技有限公司。

#### 1.4 动物分组及造模方法

将 24 只 SD 大鼠按照随机数字表分为空白对照组、模型组、脊蛇祛湿胶囊组和 PAD4 抑制剂组, 每组 6 只。适应饲养 7 天后, 除空白对照组外, 其他各组参照文献[8]复制 CIA 大鼠模型。在 0.1 mol/L 冰乙酸 5 ml 中加入 10 mg 牛Ⅱ型胶原冻干粉, 浓度为 2 mg/ml, 置于 4℃ 冰箱过夜。造模前与弗氏完全佐剂等体积混合, 冰浴乳化, 配制为浓度 1 mg/ml 的胶原乳剂。在大鼠尾根部及右后足垫部各皮内注射胶原乳剂 0.1 ml 致炎。1 周后再次加强免疫, 每只大鼠于尾根部及右后足垫部各皮内注射胶原乳剂 0.2 ml 致炎。每周观察并采用关节炎指数 (AI) 评估关节病变, AI 评分  $\geq 4$  分被评判为造模成功<sup>[7]</sup>, 并纳入后续实验。本研究造模成功率为 100%。

#### 1.5 给药方法

造模成功后, 脊蛇祛湿胶囊组参照前期研究<sup>[9]</sup>及成人与动物药物剂量换算系数表<sup>[10]</sup>计算给药剂量, 以 60 kg 成人每日常用负荷剂量的 3 倍剂量换算为有效剂量, 予脊蛇祛湿胶囊 1.47 g/(kg·d) 灌胃。每日灌胃前将母液充分振荡混匀, 根据每只大鼠的实时体质量, 按 1.47 g/kg 的给药剂量计算所需母液体积, 并用纯水将其稀释至最终灌胃体积为 2 ml 后进行灌胃。PAD4 抑制剂组: 每周腹腔注射 4 mg/kg 的 PAD4 抑制剂 GSK484, 每次给药前, 将母液解冻并涡旋混匀, 根据每只大鼠的实时体质量, 计算所需母液体积, 并用生理盐水将最终注射体积统一稀释至 1 ml 后进行腹腔注射。空白对照组、模型组、PAD4 抑制剂组每日灌胃 2 ml 纯水。各组均持续给药 4 周。

#### 1.6 样本收集和处理

于末次给药结束 24 h 后, 各组大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 对所有大鼠行腹主动脉采血。采集 5~8 ml 全血经离心处理制备血清, 于 -80℃ 冻存以备 ELISA 检测; 取剩余全血, 立即分离外周血淋巴细胞, 并行流式细胞术。随后对大鼠的右后膝关节进行解剖, 分离滑膜、关节软骨和骨组织。部分组织用 4% 多聚甲醛固定, 以进行组织病理学检查, 剩余的软骨组织立即在液氮中冷冻并于 -80℃ 储存, 以备后续的 RNA 和蛋白提取。

#### 1.7 观察指标及方法

1.7.1 大鼠不同时间 AI 评分 分别于造模后第 7、14、21、28、35 天时观察大鼠四肢关节病变程度, 以监测关节炎的发作情况。根据关节肿胀及变形程度进行 AI 评分<sup>[11]</sup>, 0 分: 无关节炎; 1 分: 小趾关

节轻度肿胀; 2 分: 小趾关节和足跖肿胀; 3 分: 踝关节以下的足爪肿胀; 4 分: 包括踝关节在内全部关节肿胀。大鼠四肢关节得分之和即为 AI 评分。

1.7.2 关节组织形态学观察 1) HE 染色法观察膝关节滑膜组织形态: 每组采用随机数字表法取 3 只大鼠右后膝关节滑膜组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 脱水、透明、包埋, 切片 (厚度约 4  $\mu\text{m}$ ) 备用。将膝关节滑膜组织石蜡切片脱蜡后行 HE 染色, 风干后中性树胶封片, 镜检, 每只大鼠随机选取 3 个不重叠视野进行观察和图像采集, 以评估滑膜组织的形态变化。

2) 番红固绿染色观察膝关节软骨组织形态: 每组采用随机数字表法取 3 只大鼠右后膝关节软骨组织置入配制好的 10% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液中脱钙 30 天。脱钙后制作软骨组织切片 (厚度约 4  $\mu\text{m}$ ), 脱蜡, 行固绿染色, 继而行番红染色、脱水、透明、风干、中性树胶封片、镜检, 收集图像并分析。按照文献 [12] 方法行半定量评分, 0 分: 健康状态, 软骨无破坏; 1 分: 软骨表层出现轻度蛋白多糖丢失和/或软骨侵蚀; 2 分: 软骨表层和/或深层钙化软骨层出现中度蛋白多糖丢失和/或软骨侵蚀; 3 分: 软骨表层和深层钙化软骨层出现重度蛋白多糖丢失和/或软骨侵蚀。

3) TRAP 染色观察膝关节骨组织形态: 每组采用随机数字表法取 3 只大鼠右后膝关节软骨下骨组织置入配制好的 10% EDTA 溶液中脱钙 30 天; 脱钙后制作骨组织切片 (厚度约 4  $\mu\text{m}$ ), 脱蜡, 将切片用组化笔画圈后放在湿盒 (加有一定量的防止切片蒸干的纯水) 中, 用 37℃ 纯水孵育 2 h。切片孵育完成后倾去纯水, 滴加 TRAP 工作液覆盖组织, 置于 37℃ 避光反应 20~30 min。苏木素滴染 2 min, 流水冲洗返蓝。后切片经透明、风干、中性树胶封片、镜检, 收集图像并分析。破骨细胞的判定标准为: TRAP 染色阳性 (细胞质呈红色或红紫色), 且含有不少于 3 个细胞核的多核巨细胞。每张切片于 200 倍视野下随机选取 3 个不重叠的视野, 计数每个视野内的破骨细胞数量, 最终取其平均值作为破骨细胞计数。

1.7.3 流式细胞术检测大鼠外周血 M1、M2 型巨噬细胞计数 实验前将所有的试剂自然恢复至室温待用, 按说明书以  $1 \times 10^4$  个细胞上机, 先将微球涡旋 30 s, 用时再涡旋 30 s。按要求配制、稀释校准品; 加样、避光振荡孵育, 根据流式细胞仪上样需求上机检测。大鼠 M1 型巨噬细胞标记为 CD45<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>,

M2 型巨噬细胞标记为 CD45<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>。

1.7.4 ELISA 法检测大鼠血清 TRACP、NETs、TNF-α、IL-1β、iNOS 含量 各指标按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，加终止液终止反应后，用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔 OD 值。以标准品的已知浓度为横坐标，相应 OD 值为纵坐标，绘制标准曲线，并拟合得到回归方程。将样本的 OD 值代入该方程，计算得出血清中目标物质含量。

1.7.5 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、OPG、P65 mRNA 表达 各组采用随机数字表法选取 3 只大鼠膝关节软骨组织，采用 Trizol 法提取组织 RNA，取适当浓度 RNA 按照试剂盒操作，反转录生成 cDNA。按试剂盒说明书，cDNA 产物在 20 μl 体系中进行扩增，进行实时荧光定量 PCR 检测，引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。统计 Ct 值，以 GAPDH 作为对照，采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 相对定量法计算各组目标 mRNA 的表达差异，引物序列见表 1。

表 1 大鼠 RANKL、OPG、MPO、NE、P65、GAPDH 引物序列  
Table 1 Primer sequences for RANKL, OPG, MPO, NE, P65 and GAPDH in rats

| 引物名称  | 引物序列                     | 产物长度/bp |
|-------|--------------------------|---------|
| RANKL | 上游: TCAGCCGTTTGCTCACCTC  | 138     |
|       | 下游: ACCCTTAGTTTCCGTTGC   |         |
| OPG   | 上游: TCCTGGCACCTACCTAAA   | 114     |
|       | 下游: CAGTACACGCATTCATCAC  |         |
| MPO   | 上游: TGAGGGCTGCCGACTATCT  | 219     |
|       | 下游: GGCTGCGTCTGTTGTTGC   |         |
| NE    | 上游: TCCACCGACCATCCAACCAG | 127     |
|       | 下游: GACACCATGAAGGCCAAGC  |         |
| P65   | 上游: GCGTCCTTTTACTCGTA    | 113     |
|       | 下游: TTCATGTTAATGGCGTTC   |         |
| GAPDH | 上游: ACAGCAACAGGCTGGTGGAC | 252     |
|       | 下游: TTTGAGGCTGCAGCGAACTT |         |

注：RANKL，核因子-κB 受体活化因子配体；OPG，骨保护素；MPO，髓过氧化物酶；NE，中性粒细胞弹性蛋白酶；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.7.6 Western Blot 法检测大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、OPG、p65 蛋白表达 每组采用随机数字表法选取 3 只大鼠膝关节软骨组织，剪碎，置于 2 ml EP 管中，加入清洗干净的钢珠。每管加 200 μl 裂解液裂解（含 2 μl PMSF、2 μl 磷酸酶抑制剂）置于自动匀浆机中匀浆。匀浆完成后将 EP 管置于冰上裂解 30 min。BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白样品，电泳，转膜，封闭 2 h。用封闭液稀释相应的一抗 [GAPDH（1：10 000）、MPO（1：5000）、NE（1：1000）、RANKL（1：2000）、OPG（1：1000）、p65（1：5000）]，使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中，4℃孵育过夜。用 TBST 稀释相应的 HRP 标记二抗（1：10 000），使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中，室温摇床孵育 2 h。洗膜，滴加显影液，化学发光成像系统中曝光显影。Image J 1.53e 和 Image-Pro Plus 6.0 软件分析条带的灰度值，蛋白的相对表达量按以下公式计算：目标蛋白相对表达量=目标蛋白条带灰度值÷对应 GAPDH 条带灰度值。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8 软件统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，组间比较用单因素方差分析；方差齐时，两两比较采用 LSD 检验，方差不齐时，两两比较采用 Tamhance's  $T_2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间 AI 评分比较

表 2 示，与空白对照组同时间比较，模型组大鼠各时间点 AI 评分升高 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，脊蛇祛湿胶囊组、PAD4 抑制剂组大鼠第 21、28、35 天 AI 评分降低 ( $P < 0.05$ )；与 PAD4 抑制剂组比较，脊蛇祛湿胶囊组大鼠第 35 天 AI 评分降低 ( $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠各时间点 AI 评分比较  
Table 2 Comparison of AI scores at each time point among groups (分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 鼠数 | 第 7 天                   | 第 14 天                  | 第 21 天                   | 第 28 天                   | 第 35 天                    |
|-----------|----|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 空白对照组     | 6  | 0                       | 0                       | 0                        | 0                        | 0                         |
| 模型组       | 6  | 1.67±0.82 <sup>a)</sup> | 6.67±1.21 <sup>a)</sup> | 11.67±1.03 <sup>a)</sup> | 12.17±1.17 <sup>a)</sup> | 10.17±1.17 <sup>a)</sup>  |
| 脊蛇祛湿胶囊组   | 6  | 1.50±0.84               | 6.67±1.21               | 6.17±0.75 <sup>b)</sup>  | 5.67±1.21 <sup>b)</sup>  | 3.67±1.37 <sup>b)c)</sup> |
| PAD4 抑制剂组 | 6  | 1.67±0.82               | 7.00±1.41               | 7.50±1.05 <sup>b)</sup>  | 7.00±0.89 <sup>b)</sup>  | 6.33±1.86 <sup>b)</sup>   |

注：AI，关节炎指数。

a) 与空白对照组同时间比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组同时间比较， $P < 0.05$ ；c) 与 PAD4 抑制剂组同时间比较， $P < 0.05$ 。

## 2.2 各组大鼠关节组织病理形态比较

图 1 示, HE 染色显示, 空白对照组大鼠膝关节滑膜组织可见关节腔内组织细胞核、细胞质结构正常; 模型组见大量炎细胞浸润, 滑膜组织增生增厚明显, 呈肉芽肿性改变, 出现新生血管组织, 形成血管翳, 骨结构明显破坏; 与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组和 PAD4 抑制剂组大鼠滑膜组织炎性细胞浸润及增生明显减轻, 极少量血管新生组织, 关节骨及软骨未见明显破坏。

番红固绿染色显示, 空白对照组关节软骨表面完整, 软骨细胞排列整齐, 软骨与骨基质分界线明显, 着色良好, 未见软骨破坏; 模型组大鼠软骨表面结构破坏严重, 软骨细胞排列散乱, 可见“啃噬”样改变, 软骨与骨基质分界模糊, 着色较浅; 与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组、PAD4 抑制剂组上述情况有不同程度的改善, 部分着色仍较浅, 但未见“啃噬”样改变。表 3 示, 番红固绿染色半定量评分各组间比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

TRAP 染色显示, 空白组未见 TRAP 阳性细胞; 与空白组比较, 模型组大鼠的软骨下骨区域可见大量 TRAP 阳性多核巨细胞; 经脊蛇祛湿胶囊组和 PAD4 抑制剂干预后, 给药组的骨破坏得到明显改

善。与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组和 PAD4 抑制剂 TRAP 阳性细胞数量减少, 细胞分布趋于分散。表 3 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠破骨细胞计数增多 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组、PAD4 抑制剂组破骨细胞计数减少 ( $P<0.05$ )。

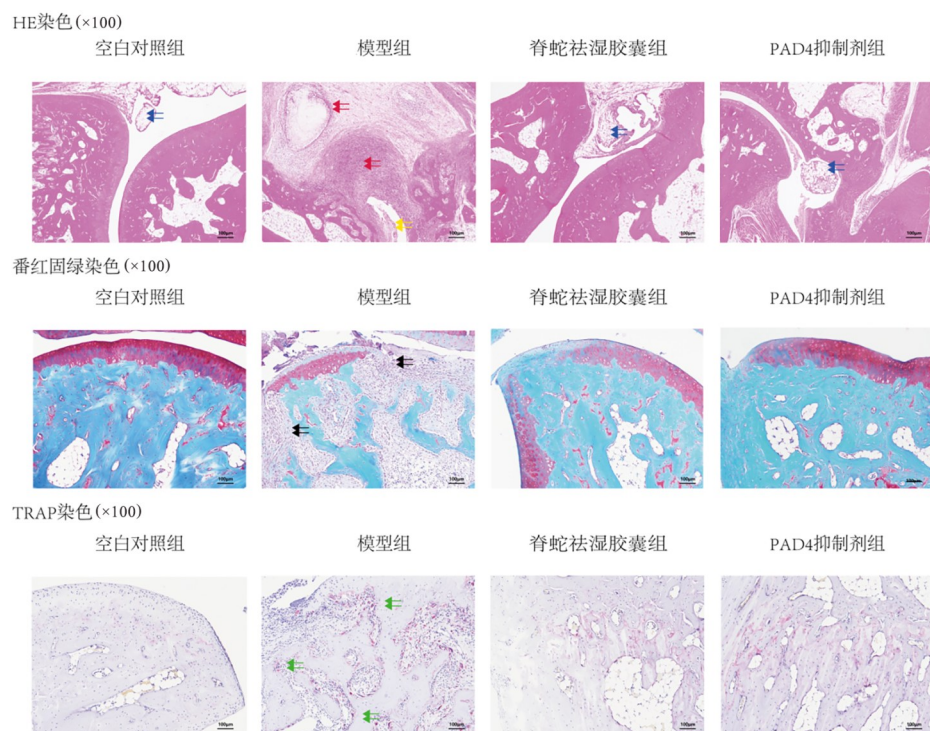
表 3 各组大鼠膝关节番红固绿染色半定量评分和 TRAP 染色破骨细胞计数比较

| 组别        | 鼠数 | 番红固绿染色半定量评分/分 | TRAP 染色破骨细胞计数/个          |
|-----------|----|---------------|--------------------------|
| 空白对照组     | 3  | 0             | 0.33±0.58                |
| 模型组       | 3  | 2.67±0.58     | 28.00±2.65 <sup>a)</sup> |
| 脊蛇祛湿胶囊组   | 3  | 1.00±1.00     | 3.67±3.79 <sup>b)</sup>  |
| PAD4 抑制剂组 | 3  | 1.00±1.00     | 5.00±2.65 <sup>b)</sup>  |

注: a) 与空白对照组比较,  $P<0.05$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.05$ 。

## 2.3 各组大鼠外周血 M1、M2 型巨噬细胞计数比较

表 4 示, 与空白对照组比较, 模型组 M1、M2 型巨噬细胞计数升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组、PAD4 抑制剂组 M1 型巨噬细胞



注: 红色箭头示炎细胞浸润, 蓝色箭头示骨关节滑膜组织, 黄色箭头示血管翳, 黑色箭头示“啃噬”样改变, 绿色箭头示破骨细胞。

图 1 各组大鼠膝关节组织病理图

Figure 1 Histological staining of knee joint tissues in each group

计数降低, M2 型巨噬细胞计数升高 ( $P<0.05$ ); 与 PAD4 抑制剂组比较, 脊蛇祛湿胶囊组 M1 型巨噬细胞计数降低, M2 型巨噬细胞计数升高 ( $P<0.05$ )。

表 4 各组大鼠外周血 M1、M2 型巨噬细胞计数比较  
Table 4 Comparison of peripheral blood M1 and M2 macrophage counts among groups (%) ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | 鼠数 | M1 型巨噬细胞                   | M2 型巨噬细胞                   |
|-----------|----|----------------------------|----------------------------|
| 空白对照组     | 6  | 1.63±0.11                  | 0.39±0.12                  |
| 模型组       | 6  | 9.33±0.27 <sup>a)</sup>    | 2.17±0.61 <sup>a)</sup>    |
| 脊蛇祛湿胶囊组   | 6  | 3.55±0.46 <sup>b) c)</sup> | 9.17±0.88 <sup>b) c)</sup> |
| PAD4 抑制剂组 | 6  | 4.70±0.45 <sup>b)</sup>    | 7.39±1.08 <sup>b)</sup>    |

注: a) 与空白对照组比较,  $P<0.05$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c) 与 PAD4 抑制剂组比较,  $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠血清 TRACP、NETs、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS 含量比较

表 5 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠血清 TRACP、NETs、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS 含量升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组、PAD4 抑制剂组 TRACP、NETs、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS 含量降低 ( $P<0.05$ ); 与 PAD4 抑制剂组比较, 脊蛇祛湿胶囊组 TRACP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS 含量降低 ( $P<0.05$ )。

2.5 各组大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、OPG、p65 mRNA 表达比较

表 6 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠膝关

节软骨组织 MPO、NE、RANKL、p65 mRNA 表达升高, OPG mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组、PAD4 抑制剂组 MPO、NE、RANKL、p65 mRNA 表达降低, OPG mRNA 表达升高 ( $P<0.05$ ); 与 PAD4 抑制剂组比较, 脊蛇祛湿胶囊组大鼠 MPO、RANKL、p65 mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ )。

2.6 各组大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、OPG、p65 蛋白水平比较

表 7 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、p65 蛋白水平升高, OPG 蛋白水平降低 ( $P<0.05$ )。与模型组比较, 脊蛇祛湿胶囊组、PAD4 抑制剂组 NE、RANKL、p65 蛋白水平降低, OPG 蛋白水平升高 ( $P<0.05$ ); 脊蛇祛湿胶囊组 MPO 蛋白水平降低 ( $P<0.05$ )。与 PAD4 抑制剂组比较, 脊蛇祛湿胶囊组 MPO、RANKL、p65 蛋白水平降低, OPG 蛋白水平升高 ( $P<0.05$ )。各组大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、OPG、p65 蛋白电泳图见图 2。

3 讨论

目前 RA 的临床治疗面临各种挑战, 如治疗策略反应不足、不良事件发生和治疗费用过高<sup>[1, 13]</sup>。苗药的有效性及其优势在 RA 治疗中有所体现<sup>[14]</sup>。苗医药理论针对 RA 的治疗以克毒、败毒、赶毒等为主。脊蛇祛湿胶囊是贵州中医药大学第二附属医院

表 5 各组大鼠血清 TRACP、NETs、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS 含量比较  
Table 5 Comparison of serum TRACP, NETs, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and iNOS levels among groups ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | 鼠数 | TRACP/pg·ml <sup>-1</sup>       | NETs/ng·ml <sup>-1</sup> | TNF- $\alpha$ /ng·ml <sup>-1</sup> | IL-1 $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup> | iNOS/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> |
|-----------|----|---------------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 空白对照组     | 6  | 2187.54±246.28                  | 3.78±0.39                | 178.37±23.57                       | 17.79±1.97                       | 3.26±0.60                       |
| 模型组       | 6  | 6663.63±497.30 <sup>a)</sup>    | 10.14±0.81 <sup>a)</sup> | 646.28±55.70 <sup>a)</sup>         | 58.67±4.24 <sup>a)</sup>         | 9.75±0.87 <sup>a)</sup>         |
| 脊蛇祛湿胶囊组   | 6  | 3422.73±330.05 <sup>b) c)</sup> | 5.89±0.77 <sup>b)</sup>  | 280.53±34.83 <sup>b) c)</sup>      | 26.41±2.64 <sup>b) c)</sup>      | 5.64±0.67 <sup>b) c)</sup>      |
| PAD4 抑制剂组 | 6  | 4401.00±393.83 <sup>b)</sup>    | 5.33±0.63 <sup>b)</sup>  | 396.38±44.92 <sup>b)</sup>         | 37.13±3.16 <sup>b)</sup>         | 7.01±0.72 <sup>b)</sup>         |

注: TRACP, 酒石酸性磷酸酶; NETs, 中性粒细胞胞外诱捕网; TNF- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ , 白细胞介素 1 $\beta$ ; iNOS, 诱导型一氧化氮合成酶。

a) 与空白对照组比较,  $P<0.05$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c) 与 PAD4 抑制剂组比较,  $P<0.05$ 。

表 6 各组大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、OPG、p65 mRNA 表达比较  
Table 6 Comparison of MPO, NE, RANKL, OPG, and P65 mRNA expression in knee cartilage tissue among groups ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | 鼠数 | MPO                        | NE                      | RANKL                      | OPG                     | P65                        |
|-----------|----|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 空白对照组     | 3  | 1.08±0.14                  | 1.07±0.10               | 1.07±0.10                  | 1.04±0.13               | 1.05±0.15                  |
| 模型组       | 3  | 3.52±0.29 <sup>a)</sup>    | 3.01±0.25 <sup>a)</sup> | 3.60±0.21 <sup>a)</sup>    | 0.48±0.12 <sup>a)</sup> | 3.59±0.23 <sup>a)</sup>    |
| 脊蛇祛湿胶囊组   | 3  | 1.76±0.14 <sup>b) c)</sup> | 1.78±0.16 <sup>b)</sup> | 1.50±0.14 <sup>b) c)</sup> | 0.84±0.10 <sup>b)</sup> | 1.81±0.14 <sup>b) c)</sup> |
| PAD4 抑制剂组 | 3  | 2.21±0.23 <sup>b)</sup>    | 1.75±0.11 <sup>b)</sup> | 2.05±0.22 <sup>b)</sup>    | 0.79±0.12 <sup>b)</sup> | 2.26±0.15 <sup>b)</sup>    |

注: MPO, 髓过氧化物酶; NE, 中性粒细胞弹性蛋白酶; RANKL, 核因子 $\kappa$ B 受体活化因子配体; OPG, 骨保护素。

a) 与空白对照组比较,  $P<0.05$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c) 与 PAD4 抑制剂组比较,  $P<0.05$ 。

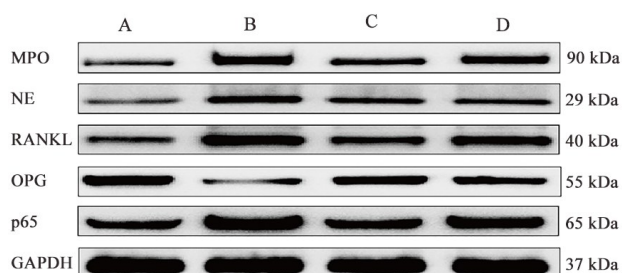
表 7 各组大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、OPG、p65 蛋白表达比较

Table 7 Comparison of MPO, NE, RANKL, OPG, and p65 protein expression in knee cartilage tissue among groups (/GAPDH,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 鼠数 | MPO                        | NE                      | RANKL                      | OPG                        | p65                        |
|-----------|----|----------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白对照组     | 3  | 0.20±0.04                  | 0.12±0.04               | 0.20±0.07                  | 0.80±0.02                  | 0.62±0.06                  |
| 模型组       | 3  | 0.76±0.10 <sup>a)</sup>    | 0.44±0.05 <sup>a)</sup> | 1.01±0.08 <sup>a)</sup>    | 0.21±0.05 <sup>a)</sup>    | 1.05±0.03 <sup>a)</sup>    |
| 脊蛇祛湿胶囊组   | 3  | 0.41±0.06 <sup>b) c)</sup> | 0.30±0.02 <sup>b)</sup> | 0.48±0.03 <sup>b) c)</sup> | 0.70±0.06 <sup>b) c)</sup> | 0.72±0.01 <sup>b) c)</sup> |
| PAD4 抑制剂组 | 3  | 0.65±0.07                  | 0.24±0.02 <sup>b)</sup> | 0.79±0.09 <sup>b)</sup>    | 0.55±0.07 <sup>b)</sup>    | 0.91±0.03 <sup>b)</sup>    |

注：GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶；MPO，髓过氧化物酶；NE，中性粒细胞弹性蛋白酶；RANKL，核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体；OPG，骨保护素。

a) 与空白对照组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；c) 与 PAD4 抑制剂组比较， $P < 0.05$ 。



注：A，空白对照组；B，模型组；C，脊蛇祛湿胶囊组；D，PAD4 抑制剂组。MPO，髓过氧化物酶；NE，中性粒细胞弹性蛋白酶；RANKL，核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体；OPG，骨保护素；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图 2 各组大鼠膝关节软骨组织 MPO、NE、RANKL、OPG、p65 蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis images of MPO, NE, RANKL, OPG, and p65 proteins in knee cartilage tissue of each group

风湿免疫科临床长期用于治疗 RA 的有效经验苗药方，以“赶毒（玛汝务翠）”为原则，秉承“气要通，血要散”“壅塞为病，通达为康”的苗医治疗理念制成<sup>[15]</sup>。方中以金毛狗脊（窝有加溜）为领头药治疗主要症状，千年健、黑骨藤（蛙莽塞）、乌梢蛇（伦敬怪）、小花青风藤（傻豆老你）、三七（加松略确）、白芍、姜黄（龚山滚）为铺底药辅助领头药的同时治疗次要症状，监护药甘草起到增效减毒之作用，全方具有“赶毒”的作用<sup>[16]</sup>。

现代研究显示，在 RA 中，促进 M1 巨噬细胞向 M2 巨噬细胞转化，抑制促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的释放可缓解滑膜炎状态<sup>[17]</sup>。抑制核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路可引起 M1 巨噬细胞减少、M2 巨噬细胞增多，调控巨噬细胞极化状态<sup>[18]</sup>。炎性细胞因子如 NETs、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等可抑制成骨细胞介导的骨质形成和修复，终致骨侵蚀<sup>[19-20]</sup>。因此，抑制 M1 型巨噬细胞及炎性细胞因子的分泌是缓解 RA 关节滑膜炎和骨破坏的重要方式。

Takei 等<sup>[21]</sup>首次发现经佛波酯处理后的中性粒

细胞表现为染色质均匀度降低且紧密排列的死亡方式，与典型的凋亡或坏死不同。Brinkmann 等<sup>[22]</sup>发现活化的中性粒细胞杀灭细菌时可出现上述类似死亡方式，并进一步定义中性粒细胞释放出的由 DNA 骨架染色质丝、组蛋白以及含 NE、MPO 等多种颗粒蛋白所形成的胞外纤维网状结构为 NETs，指出 NETs 的主要结构成分是 DNA，在 NETs 的降解过程中 PAD4 发挥重要作用。非活动期及活动期 RA 患者的外周血均可检测到 NETs 形成增加<sup>[23]</sup>。

本实验结果显示，脊蛇祛湿胶囊可有效控制 CIA 模型大鼠炎症表现并抑制破骨细胞的生成和活化，与 PAD4 抑制剂组具有类似的治疗效果。通过进一步的实验发现，脊蛇祛湿胶囊能改善 CIA 大鼠的关节炎 AI 评分及病理学表现，脊蛇祛湿胶囊可抑制巨噬细胞向 M1 极化，纠正巨噬细胞极化失衡，降低血清炎性因子及 NETs 含量，其改善效果优于 PAD4 抑制剂。PCR 和 Western Blot 结果显示，脊蛇祛湿胶囊可抑制 NETs、RANKL/NF- $\kappa$ B 信号通路相关指标的表达，同时促进 OPG 的转录和表达，且其调控作用优于 PAD4 抑制剂。在改善上述指标中脊蛇祛湿胶囊展现出综合治疗优势，提示其作为一种多靶点中药制剂在 RA 骨保护治疗中的潜在价值。

综上所述，脊蛇祛湿胶囊治疗 RA 的作用机制可能是抑制 NETs 形成，进而降低 RANKL/NF- $\kappa$ B 通路相关指标的表达，调控巨噬细胞极化失衡，抑制破骨细胞的生成与活化，改善 RA 炎症，缓解 RA 骨破坏。但本实验也具有一定局限性，虽然严格控制如给药剂量、频率、动物分组等变量，但在给药方式上存在差异，鉴于目前 PAD4 抑制剂给药唯一途径为腹腔注射，故选择腹腔注射作为给药方式。不同给药方式可能导致药物在体内的代谢、分布和排泄过程存在差异，从而影响实验结果的可比性，后续拟采用等效剂量交叉设计或药动/药效桥接等

方式进行验证。

## 参考文献

- [1] 国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心(北京协和医院), 中国医师协会风湿免疫专科医师分会, 中国康复医学会风湿免疫病康复专业委员会, 等. 2024 中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. 中华内科杂志, 2024, 63(11): 1059-1077.
- [2] CARMONA-RIVERA C, CARLUCCI PM, GOEL RR, et al. Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis[J]. JCI Insight, 2020, 5(13): e139388.
- [3] SCHNEIDER AH, TAIRA TM, PÚBLIO GA, et al. Neutrophil extracellular traps mediate bone erosion in rheumatoid arthritis by enhancing RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. Br J Pharmacol, 2024, 181(3): 429-446.
- [4] YAN QQ, LIU HX, ZHU RY, et al. Contribution of macrophage polarization in bone metabolism: a literature review[J]. Cytokine, 2024, 184: 156768. doi:10.1016/j.cyt.2024.156768.
- [5] 杨琴, 杨进锋, 杨玉涛, 等. 脊蛇祛湿胶囊治疗类风湿关节炎的回顾性分析[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(1): 129-131.
- [6] 黄颖, 倪洪刚, 曹跃朋, 等. 苗药金乌健骨汤对类风湿关节炎患者骨代谢影响的研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2018, 40(2): 67-70.
- [7] LING Y, YANG YZ, REN NN, et al. Jinwu Jiangu capsule attenuates rheumatoid arthritis via the SLC7A11/GSH/GPX4 pathway in M1 macrophages[J]. Phytomedicine, 2024, 135: 156232. doi: 10.1016/j.phymed.2024.156232.
- [8] LARSSON P, KLEINAU S, HOLMDAHL R. Homologous type II collagen-induced arthritis in rats. Characterization of the disease and demonstration of clinically distinct forms of arthritis in two strains of rats after immunization with the same collagen preparation[J]. Arthritis Rheum, 1990, 33(5): 693-701.
- [9] 吴冈, 徐晖, 黄颖, 等. 金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎模型大鼠自噬相关基因表达的影响[J]. 中药材, 2021, 44(5): 1202-1207.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 79-106.
- [11] 张昕卓, 苏晓慧, 康世奇, 等. 马钱子水提物改善 II 型胶原诱导型类风湿关节炎大鼠骨破坏的作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6): 1421-1428.
- [12] HAYER S, VERVOORDELDONK MJ, DENIS MC, et al. 'SMASH' recommendations for standardised microscopic arthritis scoring of histological sections from inflammatory arthritis animal models[J]. Ann Rheum Dis, 2021, 80(6): 714-726.
- [13] DI MATTEO A, BATHON JM, EMERY P. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2023, 402(10416): 2019-2033.
- [14] 任妮娜, 凌益, 高元元, 等. 苗医药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2024, 13(9): 62-65, 71.
- [15] 蔡鑫, 唐芳, 马武开, 等. 苗药金乌健骨方治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(9): 2001-2004.
- [16] 黄颖, 马武开, 王莹, 等. 苗药金乌健骨胶囊对糖皮质骨质疏松模型大鼠 Hedgehog 信号的影响[J]. 中药材, 2021, 44(11): 2673-2676.
- [17] WEN Y, ZHANG S, MENG X, et al. Water extracts of Tibetan medicine Wuweiganlu attenuates experimental arthritis via inducing macrophage polarization towards the M2 type[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(pt a): 116934.
- [18] XIANG XC, XIN XR, HOU YB, et al. Diosgenin alters LPS-induced macrophage polarization by activating PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 126: 111270. doi:10.1016/j.intimp.2023.111270.
- [19] O'NEIL LJ, BARRERA-VARGAS A, SANDOVAL-HEGLUND D, et al. Neutrophil-mediated carbamylation promotes articular damage in rheumatoid arthritis[J]. Sci Adv, 2020, 6(44): eabd2688.
- [20] LIN YJ, ANZAGHE M, SCHÜLKE S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis[J]. Cells, 2020, 9(4): 880.
- [21] TAKEI H, ARAKI A, WATANABE H, et al. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis[J]. J Leukoc Biol, 1996, 59(2): 229-240.
- [22] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. Science, 2004, 303(5663): 1532-1535.
- [23] BEDINA S, MOZGOVAYA E, TROFIMENKO A, et al. Ab0073 neutrophil extracellular traps: coupling with rheumatoid arthritis flares and anti-citrulline autoantibodies persistence[J]. Ann Rheum Dis, 2022, 81(s1): 1168-1169.

## Effects of *Jishe Qushi Capsule* (脊蛇祛湿胶囊) on Serum NETs Levels and Macrophage Polarization in Collagen-Induced Arthritis Model Rats

REN Nina<sup>1</sup>, MA Wukai<sup>2</sup>, LING Yi<sup>1</sup>, YAO Xueming<sup>2</sup>, HUANG Ying<sup>2</sup>, LU Daomin<sup>2</sup>, CHEN Changming<sup>2</sup>, HUANG Weichen<sup>2</sup>

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550025; 2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the possible mechanism of *Jishe Qushi Capsule* (脊蛇祛湿胶囊, JQC) in treating rheumatoid arthritis (RA) from the perspective of macrophage polarization mediated by neutrophil extracellular traps (NETs). **Methods** Twenty-four female SD rats were randomly divided into four groups, blank control group, model group, JQC group, and peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) inhibitor group with 6 rats in each group. All groups but the blank control group were subjected to the induction of collagen-induced arthritis (CIA). After successful model establishment, rats in the JQC group received intragastric administration of JQC 1.47 g/kg daily; rats in the PAD4 inhibitor group received intraperitoneal injections of the PAD4 inhibitor 4 mg/kg weekly. Rats in the blank, model, and PAD4 inhibitor groups received 2 ml of pure water daily by gavage. All treatments lasted 4 weeks. Joint lesions of each group were assessed on day 7, 14, 21, 28, and 35 after model establishment, and arthritis index (AI) scores were recorded. At 24 h after the final administration, histopathology of knee joints, including HE staining, safranin O-fast green staining, and TRAP staining, was performed. Flow cytometry was used to detect the counts of M1 and M2 macrophages in peripheral blood. ELISA was used to determine serum levels of TRACP, NETs, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and iNOS. Western Blotting and qRT-PCR were used to measure MPO, NE, RANKL, OPG, and p65 protein and mRNA expression in knee cartilage tissue. **Results** Compared with the blank control group, the model group showed increased AI scores ( $P < 0.05$ ), marked synovial inflammatory infiltration, angiogenesis, and bone-cartilage destruction, increased TRAP-positive osteoclasts, increased M1 macrophages and decreased M2 macrophages, elevated serum TRACP, NETs, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and iNOS ( $P < 0.05$ ), elevated MPO, NE, RANKL, and p65 protein/mRNA expression and decreased OPG protein/mRNA expression in knee cartilage tissue ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the JQC group exhibited improved synovial inflammation, angiogenesis, and bone-cartilage damage, reduced AI scores on day 21, 28, and 35, decreased osteoclast counts, decreased M1 macrophages and increased M2 macrophages, reduced serum TRACP, NETs, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and iNOS ( $P < 0.05$ ), decreased MPO, NE, RANKL, and p65 protein/mRNA expression and increased OPG expression ( $P < 0.05$ ). Compared with the PAD4 inhibitor group, the JQC group showed significantly lower AI scores, reduced M1 macrophages, increased M2 macrophages ( $P < 0.05$ ), reduced serum TRACP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and iNOS, decreased MPO, RANKL, and p65 expression, and increased OPG levels ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The therapeutic mechanism of JQC for RA may involve inhibition of NETs formation, downregulation of the RANKL/NF- $\kappa$ B signaling pathway, and regulation of macrophage M1/M2 polarization imbalance, thereby suppressing osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction.

**Keywords** rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; neutrophil extracellular traps; macrophage polarization; *Jishe Qushi Capsule* (脊蛇祛湿胶囊)

(收稿日期: 2025-06-19; 修回日期: 2025-09-07)

[编辑: 贾维娜]