

# 依达拉奉调节 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路对类风湿性关节炎大鼠血管生成及炎症反应的影响\*

刘畅<sup>1</sup> 郭林红<sup>1</sup> 刘佳<sup>1</sup> 陈南芳<sup>1</sup> 王亚娇<sup>2</sup>

(唐山中心医院 1. 风湿免疫科; 2. 神经内科重症监护室, 河北 唐山 063000)

**【摘要】** 目的 探讨依达拉奉(Eda)调节缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路对类风湿性关节炎(RA)大鼠血管生成及炎症反应的影响。方法 将 60 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠分为 control 组、RA 组、Eda 组、甲氨蝶呤组、二甲基草酰甘氨酸(DMOG)组(HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路激活剂),每组 12 只,除 control 组外均采用 II 型胶原蛋白联合完全弗氏佐剂复制 RA 大鼠模型。所有干预结束后,检测大鼠足趾肿胀度、痛阈值并对大鼠进行关节炎评分;ELISA 法检测血清白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )水平;CD31 免疫组化检测足关节滑膜组织血管密度;HE 染色观察足关节滑膜组织病理改变;qRT-qPCR 法检测 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 表达;Western blot 法检测 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路蛋白表达。结果 相较于 control 组,RA 组大鼠足趾肿胀度、关节炎评分、IL-6、TNF- $\alpha$  水平、足关节滑膜组织血管密度、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 及蛋白表达升高,压痛阈值、热痛阈值降低( $P<0.05$ );相较于 RA 组,Eda 组与甲氨蝶呤组大鼠足趾肿胀度、关节炎评分、IL-6、TNF- $\alpha$  水平、足关节滑膜组织血管密度、HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 及蛋白表达降低,压痛阈值、热痛阈值升高( $P<0.05$ );HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路激活剂 DMOG 可减弱 Eda 对 RA 大鼠血管生成及炎症反应的抑制作用( $P<0.05$ )。结论 Eda 通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路,抑制血管生成、降低炎症反应,从而起到减轻 RA 的作用。

**【关键词】** 依达拉奉;HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路;类风湿性关节炎;血管生成;炎症反应

**【中图分类号】** R593.22 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2024.11.006

## Impacts of edaravone on angiogenesis and inflammatory reaction in rheumatoid arthritis rats by regulating the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway

LIU Chang<sup>1</sup>, GUO Linhong<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, CHEN Nanfang<sup>1</sup>, WANG Yajiao<sup>2</sup>

(1. Department of Rheumatology and Immunology, Tangshan Central Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China;

2. Neurology Intensive Care Unit, Tangshan Central Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the impacts of edaravone (Eda) on angiogenesis and inflammatory reaction in rheumatoid arthritis (RA) rats by regulating the hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. **Methods** 60 rats were separated into control group, RA group, Eda group, methotrexate group, and dimethylxaloglycine (DMOG) group (HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway activator), with 12 rats in each group. Except for the control group, RA rat model was replicated using type II collagen combined with complete Freund's adjuvant. After all interventions were completed, the degree of foot swelling and pain threshold of rats were measured, and arthritis scores were performed on the rats. ELISA method was applied to detect serum levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). CD31 immunohistochemistry was applied to detect the vascular density of synovial tissue in the foot joint. HE staining was applied to observe pathological changes in the synovial tissue of the foot joint. QRT-qPCR method was applied to detect HIF-1 $\alpha$  and VEGF mRNA expression. Western blot was applied to detect the expression of HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway proteins. **Results** Compared to the control group, the foot swelling degree, arthritis score, IL-6, TNF- $\alpha$  levels, vascular density of synovial tissue in the foot joints, HIF-1 $\alpha$ , VEGF mRNA

基金项目:河北省 2023 年度医学科学研究课题计划(20231838)

引用本文:刘畅,郭林红,刘佳,等.依达拉奉调节 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路对类风湿性关节炎大鼠血管生成及炎症反应的影响[J].西部医学,2024,36(11):1588-1593,1599. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2024.11.006

and protein expression increased in RA group, while the tenderness threshold and heat pain threshold decreased ( $P < 0.05$ ). Compared to the RA group, the foot swelling degree, arthritis score, IL-6, TNF- $\alpha$  levels, vascular density of synovial tissue in the foot joints, HIF-1 $\alpha$ , VEGF mRNA and protein expression decreased in Eda group and methotrexate group, while the tenderness threshold and heat pain threshold increased ( $P < 0.05$ ). The HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway activator DMOG was able to weaken the inhibitory effect of Eda on angiogenesis and inflammatory reaction in RA rats ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Eda can inhibit angiogenesis and reduce inflammatory reaction by inhibiting the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway, thereby reducing RA.

**【Key words】** Edaravone; HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway; Rheumatoid arthritis; Angiogenesis; Inflammatory reaction

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性、炎症性、自身免疫性疾病,其病理特征为持续性滑膜炎,增生性滑膜组织形成,软骨和骨骼的破坏及病理性血管大量生成<sup>[1-2]</sup>。其中病理性血管生成发生在疾病的最早阶段,被认为是从急性炎症到慢性炎症的转变<sup>[3]</sup>。在 RA 中,促血管生成因子多于抑血管生成因子,导致内皮细胞浸润增加,促进滑膜炎,并损害骨骼和软骨<sup>[4]</sup>。因此,抑制血管生成、减轻炎症反应可能是治疗 RA 的重要治疗靶点。依达拉奉(Edaravone, Eda)是一种有效的自由基清除剂,研究发现,Eda 可通过降低细胞凋亡和炎症反应蛋白的水平,从而减轻胶原诱导关节炎大鼠的症状<sup>[5]</sup>。Liu 等<sup>[6]</sup>研究表明,Eda 可以通过抑制血管生成、破骨细胞分化和炎症反应来减轻完全弗氏佐剂诱导的关节炎。缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是一种重要的转录调节因子,可调节缺氧驱动的血管生成<sup>[7-8]</sup>。研究发现,在 RA 条件下,HIF-1 $\alpha$  沉积到发炎的滑膜区域促进血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)表达,进而诱导内皮细胞增殖、迁移和血管管形成<sup>[9]</sup>。但 Eda 通过调节 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号轴对 RA 大鼠血管生成及炎症反应的影响仍待进一步的探索。基于此,本研究采用 II 型胶原蛋白联合完全弗氏佐剂复制 RA 大鼠模型,对此进行探讨。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄的 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 180~220 g,生产许可证号:SCXK(粤)2022-0002,来源于广东省医学实验动物中心。饲养温度 20.0~26.0 °C,湿度 35.0%~75.0%,并保持 12 h 光/暗循环的标准实验室条件下,适应一周,期间自由获取食物和水。所有实验方案均获石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司实验动物中心伦理委员会批准(审批号:2023-1163)。

1.2 主要试剂与仪器 Eda(89-25-8,德州瑞泰医药科技有限公司);甲氨蝶呤(MXS18026-25 g,上海冯莱生物科技有限公司);二甲基草酰甘氨酸(DMOG)

(AS81071-50 mg,浙江联硕生物科技有限公司);牛 II 型胶原(BLD-BCL2,北京博蕾德生物科技有限公司);完全弗氏佐剂(XY-MY-1001,上海烜雅生物科技有限公司);大鼠白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ ) ELISA 检测试剂盒(QN-PS1726、QY-R1716,上海岑特生物科技有限公司);HE 染色试剂盒(YX-DK00686,浙江羽翔生物科技有限公司);RIPA 裂解液(JLC-E1144,江西江蓝纯生物试剂有限公司);蛋白定量试剂盒(PT0001,北京雷根生物技术有限公司);RNA 提取试剂盒(Trizol 法)(EZB-TZ1-L,上海海方生物技术有限公司);反转录试剂盒(JK-R5096,上海晶抗生物工程有限公司);ECL 化学发光检测试剂盒(E-CS-0050c,上海恒斐生物科技有限公司);兔抗 CD31(ab182981)、GAPDH(ab181602)、HIF-1 $\alpha$ (ab179483)、VEGF(ab214424)及 HPR 偶联的山羊抗兔 IgG(ab205718,英国 Abcam 公司);HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、GAPDH 引物由南京钟鼎生物技术有限公司合成;高速离心机(CK4200,无锡百泰克生物技术有限公司);多功能全自动酶标仪(51B11001,北京云肽生物科技有限公司);电泳仪(JY1000E,成都君意华荣科技有限公司);光学显微镜(Echo Revolve,美国 Echo Laboratories 公司);qPCR 仪(7500 型,美国 ABI 公司);切片机(KH-LQ3800,湖北孝感阔海医疗科技有限公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 动物建模、分组和干预 将 60 只大鼠分为 control 组、RA 组、Eda 组、甲氨蝶呤组、DMOG 组(HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路激活剂),每组 12 只,除 control 组外均采用 II 型胶原蛋白联合完全弗氏佐剂复制 RA 大鼠模型<sup>[10]</sup>。将牛 II 型胶原蛋白与完全弗氏佐剂按 1:1 的比例混合并充分乳化,每只大鼠在右后足跖下注射 0.1 mL 乳液,第 7 天在尾根部进行第二次注射。大鼠后肢足趾红肿、踝关节体积增大,提示 RA 大鼠模型构建成功。control 组注射等体积生理盐水。Eda 组腹腔注射 50 mg/kg 的 Eda<sup>[6]</sup>,甲氨蝶呤组灌胃 3.8 mg/kg 甲氨蝶呤<sup>[10]</sup>;DMOG 组腹腔注射 50 mg/kg

的 Eda 和 40 mg/kg 的 DMOG<sup>[11]</sup>; control 组腹腔注射等体积生理盐水, 每天给药 1 次, 持续 7 周。

1.3.2 足肿胀度及关节炎评分 采用水容积法测量 RA 大鼠给药干预前后右后足容积, 即为足肿胀度。关节炎评分: 0 级 = 关节无发红; 1 级 = 小脚趾关节红点或轻度肿胀; 2 级 = 关节中度肿胀; 3 级 = 严重肿胀; 4 级 = 关节变形而没有承重能力。关节炎评分的总分是 16 分。

1.3.3 压痛阈值及热痛阈值检测 固定大鼠, 用足底压痛检测仪压向大鼠右侧后足背, 记录大鼠挣扎或嘶叫时的压力值, 即为压痛阈值。随后将足底热测痛仪的探头放在大鼠右侧足底中央, 记录大鼠鸣叫或抬腿回避时所用时间, 即为热痛阈值。

1.3.4 IL-6、TNF- $\alpha$  水平检测 取腹主动脉血, 离心后收集上清。在酶标板上设置空白孔和标准孔, 分别加入标准品、待测血清样品和酶标记试剂。混匀后密封, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。加入显色剂后避光孵育 20 min, 加入 50  $\mu$ L 终止溶液。用酶标仪检测吸光度, 根据标准品的吸光度绘制标准曲线, 计算 IL-6、TNF- $\alpha$  水平。

1.3.5 HE 染色 每组随机选取 6 只, 处死后取足关节滑膜组织, 并在 4% 多聚甲醛中 1 d, 包埋在石蜡中, 切片机切成 3  $\mu$ m 的厚度切片。切片在二甲苯中脱蜡, 梯度乙醇脱水。PBS 冲洗切片 5 min, 苏木精和伊红染色后, 干燥、封片。光学显微镜观察染色图像并评估关节滑膜组织损伤。

1.3.6 CD31 免疫组化 取 1.3.5 大鼠足滑膜组织切片用 3% 过氧化氢处理 20 min 后、滴加山羊血清 37  $^{\circ}$ C 封闭 35 min。加 CD31(1:400)一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育, 加入二抗(1:500)在 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min。DAB 溶液染色细胞核、苏木精进行复染。二甲苯透明、中性树脂封片后镜检, Image J 软件图像分析软件 CD31 阳性表达, CD31 阳性细胞率代表血管密度。

1.3.7 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 表达检测 取剩余 6 只大鼠的足关节滑膜组织, 一部分冻存备用, 另一部分破碎后, 使用 TRIzol 试剂和 PureLink RNA Mini Kit 进行 RNA 提取。用 DNase I 处理 RNA 以避免 DNA 污染。通过 NanoDrop<sup>TM</sup> 分析评估总 RNA 的质量。根据制造商的说明, 使用反转录试剂盒以 20  $\mu$ L 的体积合成 cDNA。使用 StepOnePlus<sup>TM</sup> 实时荧光定量 PCR 系统和 PowerUp SYBR Green 预混液进行 qPCR 扩增。GAPDH 参考基因, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法进行比较定量。引物序列见表 1。

1.3.8 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路蛋白表达检测 用 RIPA 裂解物处理 1.3.7 冻存关节滑膜组织以提取总蛋白质, 对蛋白进行定量。20  $\mu$ g 蛋白样品通过 10%

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
HIF-1 $\alpha$	GAAGTG TACCCTAACT AGCCG	TCACAAATCAGCACCA AGC
VEGF	TGCTTTCTCCGCTCTGA	ACTGAGGAGTCCAACA T
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGA GTCA	AATGAAGGGGTCATTG ATGG

SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 在 4  $^{\circ}$ C 下与一抗 HIF-1 $\alpha$  (1:2 000)、VEGF (1:1 000)、GAPDH (1:1 000) 一抗孵育过夜, 然后将印迹膜与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 IgG(稀释度 1:1 000) 在室温下孵育 90 min。使用增强化学发光剂(ECL)发光显影后。各条带灰度值用 Image J 软件处理分析, 以 GAPDH 为内参计算 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达。

1.4 统计学分析 实验数据用 Graphpad Prism 9.0 软件进行分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间的比较用单因素方差分析, SNK- $q$  检验用于两组间的比较。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Eda 对大鼠足肿胀度及关节炎评分的影响 相较于 control 组, RA 组大鼠足肿胀度及关节炎评分升高( $P < 0.05$ ); 相较于 RA 组, Eda 组与甲氨蝶呤组大鼠足肿胀度及关节炎评分降低( $P < 0.05$ ); 相较于 Eda 组, DMOG 组大鼠足肿胀度及关节炎评分升高( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠足肿胀度及关节炎评分比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 2 Comparison of foot swelling degree and arthritis score of rats in each group

组别	足肿胀度(mL)	关节炎评分(分)
control 组	1.54 $\pm$ 0.23	0.00 $\pm$ 0.00
RA 组	5.89 $\pm$ 0.41 <sup>①</sup>	12.04 $\pm$ 1.57 <sup>①</sup>
Eda 组	2.57 $\pm$ 0.36 <sup>②</sup>	4.58 $\pm$ 1.29 <sup>②</sup>
甲氨蝶呤组	2.42 $\pm$ 0.34 <sup>②</sup>	4.26 $\pm$ 1.23 <sup>②</sup>
DMOG 组	3.78 $\pm$ 0.45 <sup>③</sup>	9.51 $\pm$ 1.38 <sup>③</sup>

注: 与 control 组比较, ① $P < 0.05$ ; 与 RA 组比较, ② $P < 0.05$ ; 与 Eda 组比较, ③ $P < 0.05$ 。

2.2 Eda 对大鼠压痛阈值、热痛阈值的影响 相较于 control 组, RA 组大鼠压痛阈值、热痛阈值降低( $P < 0.05$ ); 相较于 RA 组, Eda 组与甲氨蝶呤组大鼠压痛阈值、热痛阈值升高( $P < 0.05$ ); 相较于 Eda 组, DMOG 组大鼠压痛阈值、热痛阈值降低( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组大鼠压痛阈值、热痛阈值比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 3 Comparison of tenderness threshold and heat pain threshold of rats in each group

组别	压痛阈值(kPa)	热痛阈值(s)
control 组	443.28±26.19	14.65±1.27
RA 组	200.57±20.48 <sup>①</sup>	5.24±1.08 <sup>①</sup>
Eda 组	348.95±24.37 <sup>②</sup>	9.58±1.23 <sup>②</sup>
甲氨蝶呤组	361.20±25.18 <sup>②</sup>	9.72±1.16 <sup>②</sup>
DMOG 组	269.72±23.48 <sup>③</sup>	7.15±1.10 <sup>③</sup>

注:与 control 组比较,① $P<0.05$ ;与 RA 组比较,② $P<0.05$ ;与 Eda 组比较,③ $P<0.05$ 。

2.3 Eda 对大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平的影 响 相较于 control 组,RA 组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高( $P<0.05$ );相较于 RA 组,Eda 组与甲氨蝶呤组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低( $P<0.05$ );相较于 Eda 组,DMOG 组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高( $P<0.05$ )。见表 4。

表 4 各组大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平比较( $\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n=12$ )

Table 4 Comparison of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  levels of rats in each group

组别	IL-6	TNF- $\alpha$
control 组	47.56±3.29	21.38±3.57
RA 组	158.94±9.28 <sup>①</sup>	96.47±6.68 <sup>①</sup>
Eda 组	71.43±5.6 <sup>②</sup>	35.68±4.39 <sup>②</sup>
甲氨蝶呤组	68.72±5.38 <sup>②</sup>	34.59±4.52 <sup>②</sup>
DMOG 组	123.51±8.79 <sup>③</sup>	60.78±5.29 <sup>③</sup>

注:与 control 组比较,① $P<0.05$ ;与 RA 组比较,② $P<0.05$ ;与 Eda 组比较,③ $P<0.05$ 。

2.4 Eda 对大鼠足关节滑膜组织病理损伤的影响 control 组未见明显病理损伤;相较于 control 组,RA 组大鼠滑膜下结缔组织可见炎症细胞的大量浸润以及微血管形成,且出现软骨损伤;相较于 RA 组,Eda 组与甲氨蝶呤组有效改善这些病理损伤;相较于 Eda 组,DMOG 组大鼠炎症细胞浸润及微血管形成增多。见图 1。

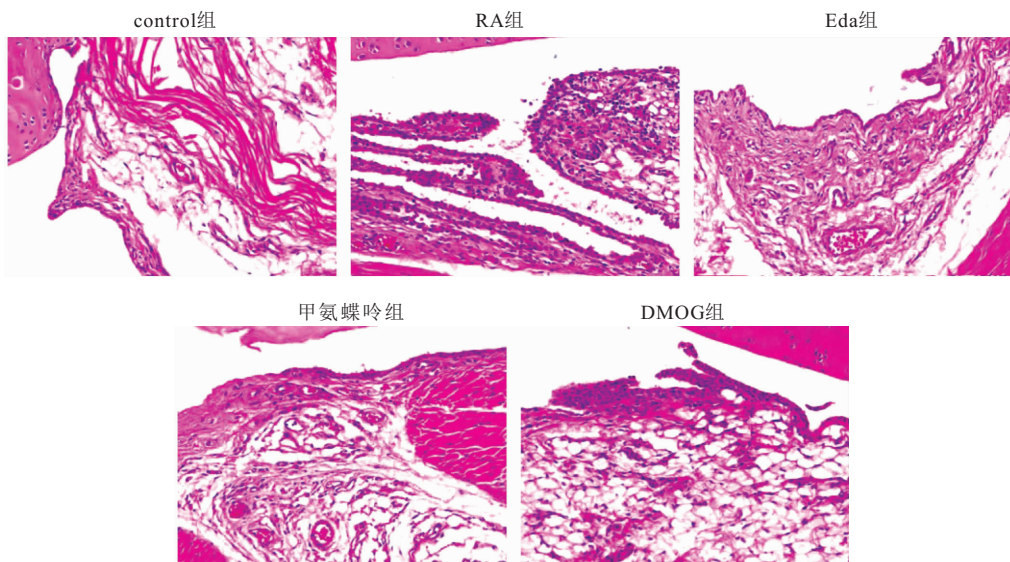


图 1 各组大鼠足关节滑膜组织病理损伤比较(HE 染色,200 $\times$ )

Figure 1 Comparison of pathological injury of synovial tissue of foot joint of rats in each group

2.5 Eda 对大鼠足关节滑膜组织血管密度的影响 相较于 control 组,RA 组大鼠足关节滑膜组织血管密度升高( $P<0.05$ );相较于 RA 组,Eda 组与甲氨蝶呤组大鼠足关节滑膜组织血管密度降低( $P<0.05$ );相较于 Eda 组,DMOG 组大鼠足关节滑膜组织血管密度升高( $P<0.05$ )。见表 5、图 2。

2.6 Eda 对大鼠足关节滑膜组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 表达的影响 相较于 control 组,RA 组大鼠 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 表达升高( $P<0.05$ );相较于 RA 组,Eda 组与甲氨蝶呤组大鼠 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 表达降低( $P<0.05$ );相较于 Eda 组,DMOG 组大鼠 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 表达升高( $P<0.05$ )。见表 6。

表 5 各组大鼠足关节滑膜组织血管密度比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Comparison of vascular density in synovial tissue of foot joint of rats in all groups

组别	关节滑膜组织血管密度(%)
control 组	7.65±1.10
RA 组	28.31±1.49 <sup>①</sup>
Eda 组	14.89±1.25 <sup>②</sup>
甲氨蝶呤组	13.57±1.23 <sup>②</sup>
DMOG 组	20.64±1.37 <sup>③</sup>

注:与 control 组比较,① $P<0.05$ ;与 RA 组比较,② $P<0.05$ ;与 Eda 组比较,③ $P<0.05$ 。

2.7 Eda 对大鼠足关节滑膜组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达的影响 相较于 control 组,RA 组大鼠 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达升高( $P<0.05$ );相较于 RA

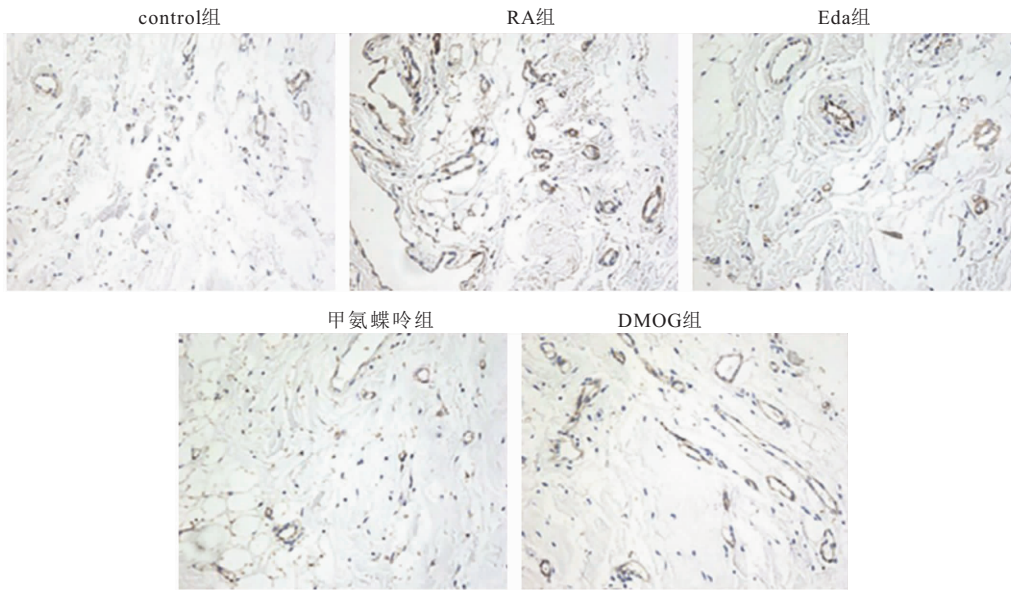


图 2 各组大鼠足关节滑膜组织血管密度比较(CD31 免疫组化染色, 200×)

Figure 2 Comparison of vascular density in synovial tissue of foot joint of rats in each group

表 6 各组大鼠足关节滑膜组织中 HIF-1α、VEGF mRNA 比较( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Table 6 mRNA comparison of HIF-1α and VEGF in synovial tissue of foot joint of rats in each group

组别	HIF-1α mRNA	VEGF mRNA
control 组	1.00±0.11	1.00±0.12
RA 组	2.45±0.18 <sup>①</sup>	2.28±0.16 <sup>①</sup>
Eda 组	1.37±0.15 <sup>②</sup>	1.23±0.14 <sup>②</sup>
甲氨蝶呤组	1.26±0.13 <sup>③</sup>	1.19±0.13 <sup>③</sup>
DMOG 组	1.89±0.16 <sup>③</sup>	1.87±0.15 <sup>③</sup>

注:与 control 组比较,①P<0.05;与 RA 组比较,②P<0.05;与 Eda 组比较,③P<0.05。

组,Eda 组与甲氨蝶呤组大鼠 HIF-1α、VEGF 蛋白表达降低(P<0.05);相较于 Eda 组,DMOG 组大鼠 HIF-1α、VEGF 蛋白表达升高(P<0.05)。见图 3、表 7。

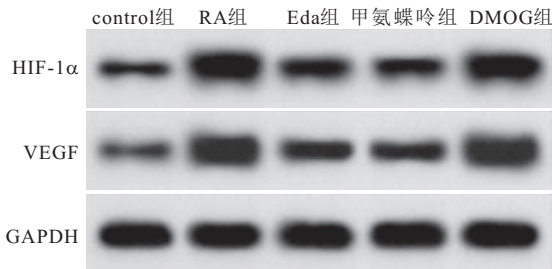


图 3 各组大鼠足关节滑膜组织中 HIF-1α、VEGF 蛋白表达比较

Figure 3 Comparison of HIF-1α and VEGF protein expression in the synovial tissue of foot joint of rats in all groups

### 3 讨论

RA 是一种常见的全身性炎症性自身免疫性疾病,主要影响人体关节,患者表现为关节肿胀、疼痛和

表 7 各组大鼠足关节滑膜组织中 HIF-1α、VEGF 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Table 7 Comparison of HIF-1α and VEGF expression in synovial tissue of foot joint of rats in all groups

组别	HIF-1α/GAPDH	VEGF/GAPDH
control 组	0.34±0.07	0.28±0.05
RA 组	1.59±0.13 <sup>①</sup>	1.73±0.14 <sup>①</sup>
Eda 组	0.67±0.10 <sup>②</sup>	0.58±0.09 <sup>②</sup>
甲氨蝶呤组	0.59±0.08 <sup>③</sup>	0.53±0.07 <sup>③</sup>
DMOG 组	1.24±0.12 <sup>③</sup>	1.38±0.13 <sup>③</sup>

注:与 control 组比较,①P<0.05;与 RA 组比较,②P<0.05;与 Eda 组比较,③P<0.05。

变形,导致残疾和死亡率增加<sup>[12-13]</sup>。血管生成在炎症和滑膜浸润的病理过程中起关键作用,主要驱动 RA 的进展。目前 RA 治疗主要是免疫抑制剂、非甾体抗炎药干预,但其疗效仍然有限,并且由于相关的不良副作用,临床药物的使用可能会受到限制<sup>[14]</sup>。因此,急需继续探索新的治疗策略。本研究采用 II 型胶原蛋白联合完全弗氏佐剂复制 RA 大鼠模型,发现模型大鼠足肿胀度、关节炎评分、IL-6、TNF-α 水平、足关节滑膜组织血管密度升高,压痛阈值、热痛阈值降低,滑膜下结缔组织可见炎症细胞的大量浸润以及微血管形成,且出现软骨损伤,提示 RA 大鼠模型构建成功。

血管生成是侵袭性翳的主要组成部分,被认为是滑膜细胞异常增殖的重要步骤,并通过向组织提供氧气和营养物质并募集免疫细胞来维持慢性炎症微环境<sup>[15]</sup>。因此,抑制血管生成、减轻炎症反应可能是治疗 RA 的重点。研究报道称,软骨细胞分泌的促炎细

胞因子如 TNF- $\alpha$  诱导的 II 型胶原的降解和丢失是骨关节炎进展的重要病理机制<sup>[16]</sup>。研究发现,Eda 以剂量依赖性方式可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 II 型胶原降解,对骨关节炎具有潜在的保护作用<sup>[17]</sup>。研究发现,Eda 通过清除 ROS 来抑制 NF- $\kappa$ B p65 的表达,不仅显著降低胶原诱导的关节炎大鼠足垫肿胀程度及宏观关节炎和微观病理学评分,还改善了胶原诱导的关节炎大鼠的生理状况,包括食欲、体重变化和皮毛脱落以及肢体活动能力<sup>[5,18]</sup>。此外研究发现,Eda 可以通过抑制血管生成、破骨细胞分化和降低促炎细胞因子水平(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等)来减轻完全弗氏佐剂诱导的关节炎<sup>[6]</sup>。本研究发现,Eda 与甲氨蝶呤干预后,降低了 RA 大鼠的足肿胀度、关节炎评分、IL-6、TNF- $\alpha$  水平、足关节滑膜组织血管密度,升高了压痛阈值、热痛阈值。提示 Eda 可通过抑制血管生成、降低炎症反应来减轻 RA。

VEGF 是 HIF-1 $\alpha$  的下游靶标,与促血管生成介质的产生有关。根据先前的研究,血管生成受抗血管生成因子和促血管生成因子的混合物调节,其中 VEGF 是促血管生成因子的主要诱导剂<sup>[19]</sup>。在炎症或缺氧环境中,VEGF 水平升高会促进血管损伤和异常血管的生长<sup>[20]</sup>。在缺氧期间 RA 血管生成扩增期间,HIF-1 $\alpha$  促进了 VEGF 的表达,然后 VEGF 促进内皮细胞的活化以诱导炎症,从而在 RA 的血管生成和关节炎之间建立串扰<sup>[21]</sup>。研究表明,抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A 信号通路可来缓解滑膜血管生成,减少炎症,从而来减轻 RA<sup>[11,22]</sup>。本研究发现,HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 及蛋白在 RA 大鼠足关节滑膜组织中高表达,Eda 可显著降低 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 及蛋白表达。而使用 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路激活剂 DMOG 后,RA 大鼠足关节滑膜组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 及蛋白表达升高、足关节滑膜组织血管密度也显著升高,并减弱了 Eda 对 RA 大鼠血管生成及炎症反应的抑制作用。

#### 4 结论

Eda 通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路,抑制血管生成、降低炎症反应,从而起到减轻 RA 的作用。本研究可能为 RA 的预防和治疗带来新的思路。但 Eda 抑制 RA 的血管生成是否涉及其他通路仍有待探索。

致谢:石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司为提供了 SPF 级的动物饲养房、先进的实验设备和良好的实验条件。没有这些设备和条件,本研究的实验就不能顺利进行,更不能得到理想的实验结果。非常感谢石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司提供的支持和保障。

#### 【参考文献】

- [1] 李冬艳,陈文娟,田亚丹,等.竞争性内源 RNA 在类风湿关节炎中的调控作用研究进展[J].中国医药,2023,18(8):1272-1276.
- [2] DI MATTEO A, BATHON J M, EMERY P. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2023, 402(10416): 2019-2033.
- [3] ZHAO F, HE Y, ZHAO Z, *et al.* The Notch signaling-regulated angiogenesis in rheumatoid arthritis: pathogenic mechanisms and therapeutic potentials [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1272133.
- [4] ZHAO L, WU Q, LONG Y, *et al.* microRNAs: critical targets for treating rheumatoid arthritis angiogenesis[J]. J Drug Target, 2024, 32(1): 1-20.
- [5] ZHANG X, YE G, WU Z, *et al.* The therapeutic effects of edaravone on collagen-induced arthritis in rats[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2): 1463-1474.
- [6] LIU J, ZHAO N, SU S H, *et al.* Anti-Arthritic Effect of Edaravone Against Complete Freund Adjuvant Induced Arthritis via Osteoclast Differentiation and HIF-1 $\alpha$ -VEGF-ANG-1 Axis[J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17: 519-534.
- [7] 蔡晖,宋颖,石华宗,等.miR-519d-3p 靶向 HIF-1 $\alpha$  抑制高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞功能障碍及血管生成[J].国际眼科杂志,2023,23(7):1087-1092.
- [8] CHEN W, WU P, YU F, *et al.* HIF-1 $\alpha$  Regulates Bone Homeostasis and Angiogenesis, Participating in the Occurrence of Bone Metabolic Diseases[J]. Cells, 2022, 11(22): 3552.
- [9] 郑雪霞,钱凯,韩玉凤,等.基于 HIF-1 $\alpha$ /VEGF- $\alpha$  信号通路探讨南续益母颗粒抑制胶原诱导型关节炎小鼠滑膜血管生成的作用机制[J].中药新药与临床药理,2023, 34(6):771-780.
- [10] 李光淳,李高峰,张兆琦,等.枸杞多糖对类风湿关节炎大鼠炎症反应及 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J].中国老年学杂志,2024,44(5):1119-1124.
- [11] 杜红丽,张晨宇,赵清.黄芩素通过调节 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路抑制类风湿关节炎大鼠的炎症反应和病理性血管生成[J].中国病理生理杂志,2022,38(12):2213-2219.
- [12] 李梦兰,孙红兵,熊安吉,等.类风湿关节炎患者血清中硬骨素的相关研究[J].西部医学,2023,35(7):1074-1078.
- [13] CUSH J J. Rheumatoid Arthritis: Early Diagnosis and Treatment[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2022, 48(2): 537-547.
- [14] RADU A F, BUNGAU S G. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview[J]. Cells, 2021, 10(11): 2857.
- [15] WANG Y, WU H, DENG R. Angiogenesis as a potential treatment strategy for rheumatoid arthritis[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 910: 174500.
- [16] ZHENG W, ZHOU T, ZHANG Y, *et al.* Simplified  $\alpha$ 2-macroglobulin as a TNF- $\alpha$  inhibitor for inflammation alleviation in osteoarthritis and myocardial infarction therapy[J]. Biomaterials, 2023, 301: 122247.
- [17] HUANG C, LIAO G, HAN J, *et al.* Edaravone suppresses degradation of type II collagen[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(4): 840-844.
- [18] 齐晖,靳洪涛,张凤肖.依达拉奉对大鼠胶原诱导关节炎的治疗作用及其机制[J].中国老年学杂志,2012,32(17):3730-3732.

分子机制还有待进一步研究。

#### 4 结论

TBMS I 可抑制肝癌细胞的生长,而这种作用是通过抑制 HIF-1 $\alpha$  来抑制细胞糖酵解实现的。这为 TBMS I 在肝癌防治中的应用提供了科学依据。

#### 【参考文献】

- [1] HANAHAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.
- [2] WARBURG O, WIND F, NEGELEIN E. The metabolism of tumors in the body[J]. *J Gen Physiol*, 1927, 8(6): 519-530.
- [3] FU Y, MACKOWIAK B, FENG D, *et al.* MicroRNA-223 attenuates hepatocarcinogenesis by blocking hypoxia-driven angiogenesis and immunosuppression[J]. *Gut*, 2023, 72(10): 1942-1958.
- [4] 夏宁,刘丽华. 低氧诱导因子促进恶性肿瘤免疫逃逸的机制及其临床转化[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(11): 1129-1134.
- [5] PAREDES F, WILLIAMS H C, SAN MARTIN A. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 502: 133-142.
- [6] XU Y, WANG G, CHEN Q, *et al.* Intrinsic apoptotic pathway and G2/M cell cycle arrest involved in tubeimoside I-induced EC109 cell death[J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25(3): 312-321.
- [7] JIA G, WANG Q, WANG R, *et al.* Tubeimoside-1 induces glioma apoptosis through regulation of Bax/Bcl-2 and the ROS/Cytochrome C/Caspase-3 pathway[J]. *OncoTargets Ther*, 2015, 8: 303-311.
- [8] LIN Y, XIE G, XIA J, *et al.* TBMS1 exerts its cytotoxicity in NCI-H460 lung cancer cells through nucleolar stress-induced p53/MDM2-dependent mechanism, a quantitative proteomics study[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1864(2): 204-210.
- [9] WANG Y, DENG L, ZHONG H, *et al.* Natural plant extract tubeimoside I promotes apoptosis-mediated cell death in cultured human hepatoma (HepG2) cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(6): 831-838.
- [10] 钟洪哲,红郭,王雅婕. 土贝母昔甲对人肝癌 HepG2 细胞迁移和侵袭的抑制作用[J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2016, 25(9): 705-707, 781.
- [11] MADHAVAN S, NAGARAJAN S. GRP78 and next generation cancer hallmarks: An underexplored molecular target in cancer chemoprevention research[J]. *Biochimie*, 2020, 175: 69-76.
- [12] ZHANG Z, ZHANG H J. Glycometabolic rearrangements-aerobic glycolysis in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): roles, regulatory networks, and therapeutic potential[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2021, 25(12): 1077-1093.
- [13] LIAO Y F, YIN S, CHEN Z Q, *et al.* High glucose promotes tumor cell proliferation and migration in lung adenocarcinoma via the RAGE-NOXs pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 8536-8541.
- [14] WANG G, LI Y, YANG Z, *et al.* ROS mediated EGFR/MEK/ERK/HIF-1 $\alpha$  Loop Regulates Glucose metabolism in pancreatic cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(4): 873-878.
- [15] ZHANG X, AI Z, CHEN J, *et al.* Glycometabolic adaptation mediates the insensitivity of drug-resistant K562/ADM leukemia cells to adriamycin via the AKT-mTOR/c-Myc signalling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 1869-1876.
- [16] BHATTACHARYA R, BROWN J S, GATENBY R A, *et al.* A gene for all seasons: The evolutionary consequences of HIF-1 in carcinogenesis, tumor growth and metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2024, 102-103: 17-24.
- [17] MASSARI F, CICCARESE C, SANTONI M, *et al.* Metabolic phenotype of bladder cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 45: 46-57.
- [18] LIN D, WU J. Hypoxia inducible factor in hepatocellular carcinoma: A therapeutic target[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(42): 12171-12178.
- [19] DING Z N, DONG Z R, CHEN Z Q, *et al.* Effects of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  overexpression on hepatocellular carcinoma survival: A systematic review with meta-analysis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2021, 36(6): 1487-1496.
- [20] CAO S, YANG S, WU C, *et al.* Protein expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and hepatocellular carcinoma: a systematic review with meta-analysis[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2014, 38(5): 598-603.
- [21] 陈嵘,李淑敏,李旭华,等. 软坚散结方调控小鼠 HIF-1 $\alpha$  糖酵解分子转录抑制肝肿瘤细胞增殖机制研究[J]. *陕西中医*, 2023, 44(7): 839-842, 848.
- [22] MA R, SONG G, YOU W, *et al.* Anti-microtubule activity of tubeimoside I and its colchicine binding site of tubulin[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 62(4): 559-568.
- [23] XU Y, CHIU J F, HE Q Y, *et al.* Tubeimoside-1 exerts cytotoxicity in HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress pathways[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(3): 1585-1593.
- (收稿日期:2024-01-03;修回日期:2024-08-29;编辑:刘灵敏)
- (上接第 1593 页)
- [19] GHALEHBANDI S, YUZUGULEN J, PRANJOL M Z I, *et al.* The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 949: 175586.
- [20] AHMAD A, NAWAZ M I. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis[J]. *J Cell Biochem*, 2022, 123(12): 1938-1965.
- [21] XU Q, KONG H, REN S, *et al.* Coix seed oil alleviates synovial angiogenesis through suppressing HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A signaling pathways via SIRT1 in collagen-induced arthritis rats[J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 119.
- [22] JIANG T T, JI C L, YU L J, *et al.* Resveratrol-induced SIRT1 activation inhibits glycolysis-fueled angiogenesis under rheumatoid arthritis conditions independent of HIF-1 $\alpha$  [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(5): 1021-1035.
- (收稿日期:2024-04-18;修回日期:2024-08-07;编辑:刘灵敏)