

藜麦源三萜抑制类瘤样滑膜成纤维样细胞增殖 缓解类风湿关节炎的研究

郭慧琴¹ 李松涛² 李旭霞³ 李卓玉² 刘丹² 武海丽^{3*} 张莉芸^{1*}

¹山西白求恩医院(山西医学科学院), 山西医科大学第三医院, 同济山西医院, 太原 030032;

²山西大学生物技术研究所, 教育部化学生物学与分子工程重点实验室, 太原 030000;

³山西大学生命科学学院, 太原 030000)

摘要 该文旨在明确藜麦源三萜(CQWT)对类风湿性关节炎(RA)潜在的干预作用。该研究首先采用CCK8和EdU法检测了CQWT对RA-FLS细胞增殖的影响; 其次通过集落形成实验评估了RA-FLS的克隆形成能力; 随后通过流式细胞术检测了细胞凋亡情况, 并采用Western blot检测了凋亡蛋白的表达情况; 再次通过伤口愈合和Transwell实验评估了CQWT对RA-FLS细胞迁移侵袭能力的影响, 同时通过qPCR和Western blot检测了EMT相关蛋白的表达情况; 接着又采用ELISA分析了炎症因子分泌水平; 最后构建CIA小鼠, 评估了CQWT对关节炎症状、血清炎症因子水平及滑膜病理改变的影响。体外实验结果显示, CQWT显著抑制RA-FLS增殖和集落形成, 并通过上调Caspase-3表达诱导细胞凋亡。同时, CQWT通过增加E-cadherin表达水平, 下调N-cadherin和Vimentin的表达, 从而抑制RA-FLS迁移和侵袭。此外, CQWT能显著抑制RA-FLS细胞中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的分泌。体内实验结果表明, CQWT可显著降低CIA小鼠关节炎指数, 降低血清炎症因子水平, 减轻滑膜增生和关节组织病理损伤, 进而改善RA。总之, 藜麦麸皮中三萜类化合物可通过抑制RA-FLS的异常增殖和迁移侵袭, 诱导其凋亡并减轻炎症反应, 从而延缓RA的病理进程。这些发现为藜麦源三萜在RA干预中的潜在应用提供了理论基础。

关键词 藜麦源三萜; 增殖; 凋亡; 迁移; 类风湿关节炎

Chenopodium quinoa Willd Triterpenoid Alleviated Rheumatoid Arthritis through Inhibiting the Proliferation of Tumor-Like Synovial Fibroblast

GUO Huiqin¹, LI Songtao², LI Xuxia³, LI Zhuoyu², LIU Dan², WU Haili^{3*}, ZHANG Liyun^{1*}

¹Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences, Third Hospital of Shanxi Medical University, Tongji Shanxi Hospital, Taiyuan 030032, China; ²Institute of Biotechnology, the Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030000, China; ³College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030000, China)

Abstract This work was to investigate the potential therapeutic effects of the CQWT (*Chenopodium quinoa* Willd triterpenoid) on RA (rheumatoid arthritis). Here, the cell proliferation of RA-FLS (rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes) was evaluated using CCK8 and EdU assays, and clonogenic capacity was as-

收稿日期: 2026-01-17 接受日期: 2026-02-27

国家自然科学基金(批准号: 32400331)、山西白求恩医院科研创新团队科技攻关项目(批准号: 2024AOXIANG02)、山西省白求恩医院科学基金(批准号: 2023RC36)、山西省应用基础研究计划(批准号: 202303021222320)和山西大学文瀛青年学者资助的课题

*通信作者。Tel: 15035140438, E-mail: whl@sxu.edu.cn; Tel: 13834547708, E-mail: zhangly@sxhqh.com.cn

Received: January 17, 2026 Accepted: February 27, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32400331), the Research and Innovation Team Project for Scientific Breakthroughs at Shanxi Bethune Hospital (Grant No.2024AOXIANG02), the Science Foundation of Shanxi Bethune Hospital (Grant No.2023RC36), the Project of Shanxi Applied Basic Research Program (Grant No.202303021222320) and the Program for Young Scholar Talents of Wenying in Shanxi University

*Corresponding authors. Tel: +86-15035140438, E-mail: whl@sxu.edu.cn; Tel: +86-13834547708, E-mail: zhangly@sxhqh.com.cn

essed by colony formation assays. Apoptosis was analyzed by flow cytometry, and the expression of apoptosis-related proteins was determined through Western blot. The effects of CQWT on RA-FLS migration and invasion were examined using wound healing and Transwell assays, while the expression of EMT (epithelial-mesenchymal transition)-related markers was analyzed by qPCR and Western blot. Inflammatory cytokine secretion was measured through ELISA. In addition, a CIA (collagen-induced arthritis) mouse model was established to evaluate the effects of CQWT on arthritis severity, serum inflammatory cytokine levels, and synovial pathological alterations. *In vitro* results demonstrated that CQWT significantly inhibited RA-FLS proliferation and colony formation and induced apoptosis through upregulation the Caspase-3 expression. Meanwhile, RA-FLS migration and invasion were markedly suppressed by CQWT, accompanied by increased E-cadherin expression and decreased expression of N-cadherin and Vimentin. Furthermore, the secretion of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in RA-FLS was significantly reduced following CQWT treatment. *In vivo*, CQWT administration significantly decreased arthritis scores in CIA mice, suppressed serum inflammatory cytokine levels, and alleviated synovial hyperplasia and joint pathological damage, thereby ameliorating RA progression. In conclusion, triterpenoid compounds derived from quinoa bran were shown to ameliorate RA-associated pathological progression through inhibiting abnormal RA-FLS proliferation, migration, and invasion, inducing apoptosis, and attenuating inflammatory responses. These findings provide a theoretical basis for the potential application of quinoa-derived triterpenoids in RA prevention and intervention.

Keywords *Chenopodium quinoa* Willd triterpenoid; proliferation; apoptosis; migration; rheumatoid arthritis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性的以滑膜炎为主要病理特征、致残率高的自身免疫疾病^[1], 女性RA的发病率约是男性的3倍^[2]。目前, 类风湿关节炎的治疗方式主要依赖于药物, 包括非甾体抗炎药、糖皮质激素、抗风湿药、生物制剂和JAK抑制剂, 但在长期使用过程中常伴随诸多副作用, 这些副作用严重限制了这些药物的临床推广^[3-4]。

成纤维细胞样滑膜细胞(fibroblast-like synovocytes, FLS)是RA病理生理过程中的关键效应细胞。在RA炎症环境下, 活化的FLS呈“类肿瘤细胞样”表型, 表现为过度增殖、凋亡抵抗以及迁移和侵袭能力增强, 并通过分泌炎性细胞因子和基质金属蛋白酶促进血管翳形成及关节破坏^[5]。因此, 抑制FLS侵袭并诱导其凋亡可能是RA临床治疗的新策略。

近年来, 中医药及其活性成分在RA防治中的潜在优势逐渐受到关注。现有研究多集中于中医药通过调控免疫失衡、抑制炎性因子(如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等)释放以及改善炎症微环境, 从整体水平减轻RA的炎症反应^[6-7]。萜类化合物作为天然药物中重要的活性成分, 在抗炎和抗肿瘤方面显示出良好应用前景。已有研究表明, 多种植物来源的萜类化合物可通过调控炎症信号通路或诱导细胞凋亡, 抑制RA-FLS的异常增殖、迁移和侵袭^[8-9]。

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd)富含多种生物

活性成分, 包括萜类、多酚等, 具有免疫调节、抗炎和抗肿瘤等生物学活性^[10]。在前期研究中, 我们团队发现藜麦源三萜(*Chenopodium quinoa* Willd triterpenoid, CQWT)在体内外均表现出显著的抗肿瘤和抗炎作用^[11-13]。然而, CQWT是否可通过调控RA-FLS的肿瘤样生长行为从而改善RA仍不明确。基于此, 本研究通过体内外实验系统阐明CQWT对RA-FLS增殖、迁移、侵袭及凋亡的调控作用, 为藜麦资源的深度开发及RA潜在候选药物的研发提供新的实验依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 试剂和抗体

DMEM基础培养基(货号: 11965092)、胎牛血清(货号: A5256701)、青霉素-链霉素溶液(货号: 15140148)、胰蛋白酶(货号: 25200114)购自美国Gibco公司。kFluor488-EdU细胞增殖试剂盒(货号: KGA9602-100)购自江苏凯基因生物技术有限公司。TNF- α (货号: RXQ166)、IL-6(货号: RXQ96)、IL-1 β (货号: RXQ165)、RANKL(货号: RX105829H)和OPG酶联免疫吸附测定试剂盒(货号: RX105867H)购自泉州市睿信生物科技有限公司。结晶紫(货号: 548-62-9)购自上海索莱宝技术有限公司。Transwell小室(货号: TCS020024)购自广州洁特生物过滤股份

有限公司。Trizol(货号: SM129-02)、CCK8(货号: SC119-02)、V-FITC细胞凋亡试剂盒(货号: SC123-02)、CDNA反转录试剂盒(货号: SM134-02)及qPCR试剂盒(货号: SM143-02)购自北京赛文创新生物科技有限公司。Caspase-3(1:1 000, 货号: 25128-1-AP)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)(1:1 000, 货号: 20874-1-AP)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)(1:1 000, 货号: 22018-1-AP)、波形蛋白(Vimentin)(1:1 000, 货号: 10366-1-AP)、GAPDH(1:1 000, 货号: 10494-1-AP)、 β -actin(1:1 000, 货号: 20536-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司。免疫级牛II型胶原蛋白(货号: 20022)、弗氏完全佐剂(货号: 7001)和弗氏不完全佐剂(货号: 7002)购自美国Chondrex公司。

1.2 CQWT的提取、分离

按照DING等^[11]所描述的方法, 通过丙酮萃取成功从藜麦麸皮中提取出了CQWT。然后, 将CQWT样品通过AB-8大孔树脂柱进行分离纯化。采用高氯酸氧化法测定藜麦麸皮三萜化合物的浓度。随后我们采用UPLC-LC-MS分析系统对其活性组分进行质谱鉴定。

1.3 细胞培养

人的RA-FLS细胞在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。

1.4 CCK8和EdU检测细胞增殖情况

将处于对数生长期的RA-FLS细胞以 5×10^3 /孔的密度接种到96孔板中, 然后分别用0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4和0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度的CQWT进行处理, 向每孔中加入10 μL 的CCK8溶液。使用BioTek MQX200酶标仪在450 nm处测量每个孔的吸光度值。随后, 细胞经过EdU标记, 加入50 μL 4%多聚甲醛室温固定30 min, 然后用含3%牛血清白蛋白的PBS洗2次, 每孔加100 μL 含0.5% Triton X-100的PBS, 室温通透20 min。使用荧光显微镜观察EdU阳性细胞。

1.5 集落形成实验

将RA-FLS细胞按照 5×10^3 /孔的密度接种到6孔板中, 用CQWT处理1周, 弃掉培养基, PBS洗2次, 采用4%多聚甲醛室温固定30 min后用结晶紫染色15 min, 再用PBS洗3次, 最后使用光学显微镜观察集落数量^[14]。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况

RA-FLS细胞经CQWT处理后, 用不含EDTA的

胰蛋白酶37 °C消化10 min, 收集细胞。将细胞与V-FITC和碘化丙啶(propidium iodide, PI)混合, 然后通过流式细胞术检测凋亡细胞。

1.7 伤口愈合实验

将RA-FLS细胞按照 2×10^4 /孔的密度接种到24孔板中, 放置于37 °C培养箱中培养24 h, 使用200 μL 的枪头划破细胞层, 拍照并将其记录为0 h。然后用CQWT处理细胞, 继续放置于37 °C培养箱中培养24 h。在显微镜下观察并拍摄, 将其记录为24 h。计算细胞间的距离。

1.8 Transwell实验

为了评估RA-FLS细胞的迁移能力, 我们首先用CQWT处理RA-FLS细胞24 h, 然后用胰酶室温消化1 min, 用含血清的DMEM完全培养基终止消化。1 000 $\times g$ 室温离心5 min。弃掉上清, 用无血清的DMEM重悬细胞, 然后将细胞按照 3×10^3 /孔的密度接种到24孔板的Transwell小室中, 其中小室的下层补充500 μL 完全培养基, 将细胞放入培养箱培养48 h。实验结束后, 弃掉培养基, 将小室中的细胞用4%福尔马林室温固定30 min, 并用结晶紫染色以进行观察和分析。

1.9 qPCR实验

采用Trizol从RA-FLS细胞中提取总RNA。随后, 将1 μg 的RNA进行反转录转化为cDNA。接着, 使用2 \times SYBR Green qPCR试剂盒进行qPCR, 以GAPDH mRNA的Ct值作为对照。

1.10 蛋白质印迹分析

制备并收集RA-FLS细胞裂解液, 使用BCA蛋白质测定试剂盒检测其蛋白质浓度。等量的蛋白质通过SDS-PAGE进行分离, 随后将其转移到PVDF膜上。分别与Caspase-3、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白抗体4 °C过夜孵育。次日, 用三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗涤PVDF膜3次, 并在室温下与HRP偶联的二抗(1:1 000)孵育90 min。使用ECL试剂盒对蛋白质条带进行显色。

1.11 动物实验

健康的5周龄雄性DBA1/J小鼠均在山西省白求恩医院的动物实验中心饲养。本研究所有动物实验均经山西大学伦理委员会审核并批准(批准号: SXULL2020014)。经一周适应后, 先给小鼠注射II型胶原蛋白和弗氏完全佐剂进行初次免疫, 然后改用弗氏不完全佐剂进行加强免疫, 以建立CIA(collagen-induced arthritis)小鼠模型。将小鼠随

机分为正常组、CIA组、甲氨蝶呤组(1 mg/kg)、CQWT低剂量组(25 mg/kg)、CQWT高剂量组(50 mg/kg), 每组7只小鼠。采用灌胃的方式给药, 持续8周。每周测量小鼠的体质量和踝关节直径。实验结束时, 通过眼眶取血, 于室温下4 000 r/min离心15 min收集血清样本用于酶联免疫吸附实验(ELISA), 测定血清中炎症因子的变化。

1.12 ELISA

向细胞中加入50 μL 冷PBS溶液, 反复冻融收集上清液。采用ELISA试剂盒检测上清液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、RANKL和OPG的变化。采用同样的方法检测小鼠血清中炎症因子的变化情况。

1.13 H&E和免疫组化染色

将DBA1/J小鼠的主要器官和踝关节用4%的多聚甲醛室温固定30 min, 经石蜡包埋并切成5 μm 厚的切片。通过H&E染色来评估组织的形态学特征。随后, 将踝关节的组织切片与Ki67抗体一起4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育90 min, 并使用DAB显色观察滑膜组织增生情况。

1.14 统计分析

所有数据均以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式呈现。采用SPSS 17.0软件进行统计分析。对照组与CQWT

组满足正态性和方差假设时, 使用 t 检验进行两组之间的比较。对于三组或更多组之间的比较, 进行单因素方差分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

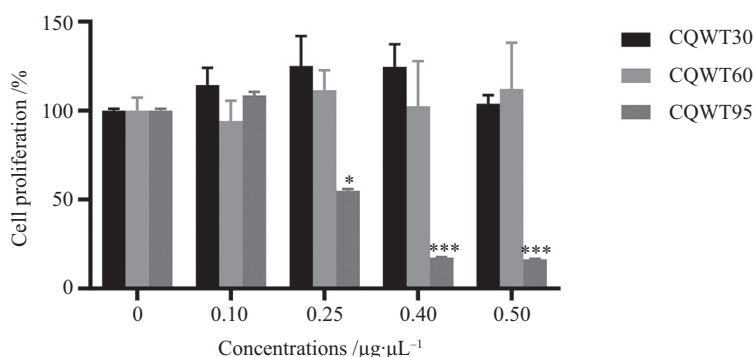
2 结果

2.1 CQWT的鉴定

将CQWT样品与AB-8大孔树脂柱材料吸附后, 用30%、60%和95%的乙醇梯度洗脱, 并评估了每种洗脱组分对RA-FLS增殖的影响。结果发现, 95%乙醇洗脱组分能显著抑制RA-FLS的增殖(图1)。因此, 对该组分进行了UPLC-LC-MS分析。结果表明其为萜类化合物, 主要包含夫西地酸、齐墩果酮酸、诺卡酮、齐墩果酸和茯苓酸A(表1)。

2.2 CQWT显著抑制RA-FLS的增殖

在RA发病过程中, 活化的FLS表现出类肿瘤的增殖特征。我们通过CCK8法评估了CQWT对RA-FLS增殖的影响。如图2A所示, CQWT处理24 h后, 其以剂量依赖的方式显著抑制RA-FLS的增殖(IC_{50} 为0.250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。而且, CQWT处理后RA-FLS集落形成明显受到抑制(图2B和图2C)。EdU实验也观察到类似的现象。CQWT处理后, RA-FLS中EdU阳性细



* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组比较。

* $P<0.05$, *** $P<0.001$ compared with the 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ group.

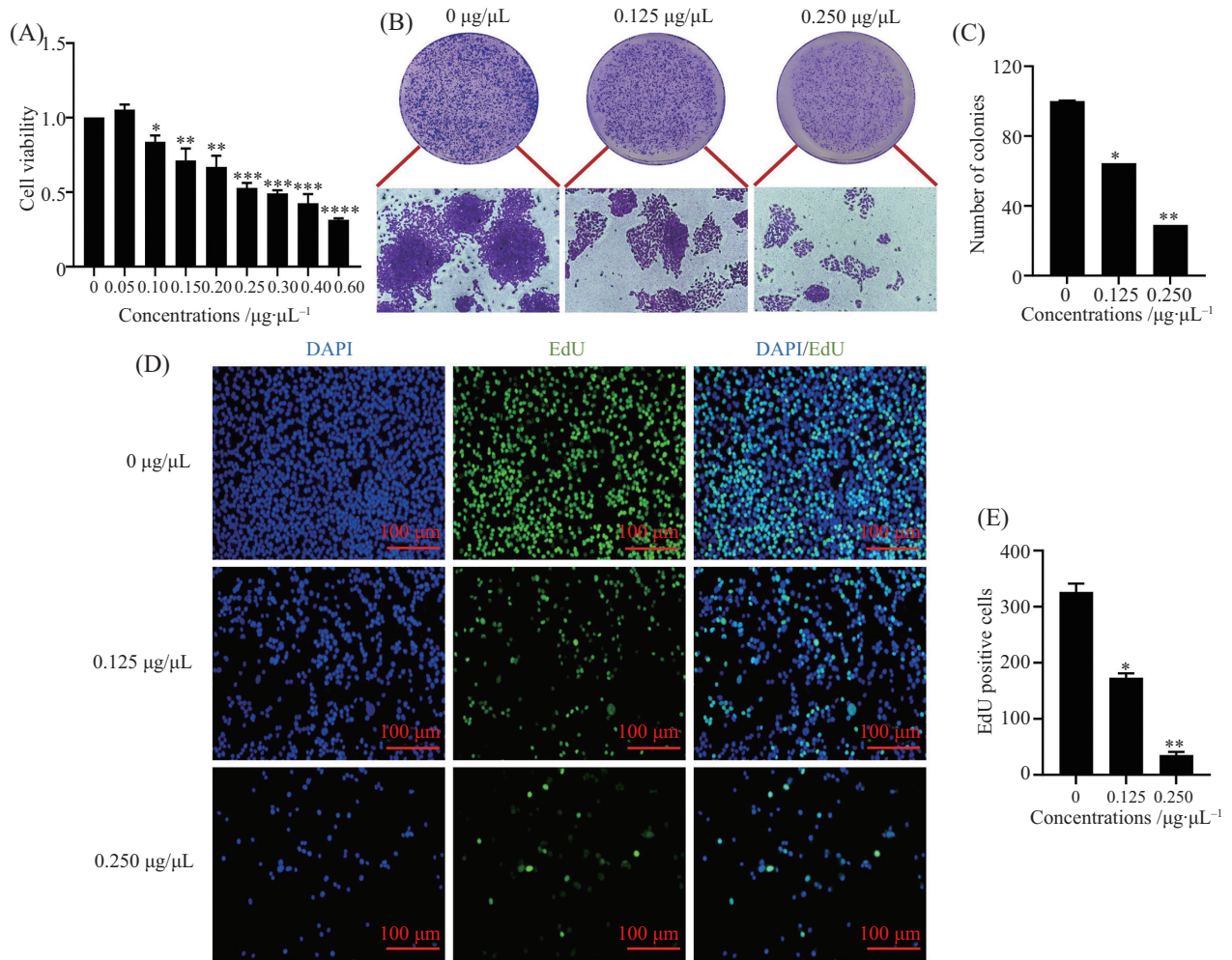
图1 CQWT各洗脱组分对RA-FLS细胞活力的影响

Fig.1 Effects of each elution component of CQWT on the viability of RA-FLS

表1 CQWT95的主要成分

Table 1 The main components of CQWT95

名称 Name	分类 Class	时间/min Time /min	百分比/% Percentage /%	CAS号 CAS_number
Fusidic acid	Steroids and steroid derivatives	9.601	4.714	6990-06-3
Oleanonic acid	Prenol lipids	9.601	4.101	17990-42-0
Nootkatone	Prenol lipids	9.601	4.095	4674-50-4
Oleanolic acid	Prenol lipids	9.974	2.379	508-02-1
Poricoic acid A	Prenol lipids	8.754	0.666	137551-38-3



A: CQWT对RA-FLS存活的影响。B: CQWT对RA-FLS集落形成能力的影响。C: 集落形成的定量分析。D: CQWT对RA-FLS中EdU阳性细胞数量的影响。E: EdU检测的定量统计分析。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与 $0\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组比较。

A: the effect of CQWT on the survival of RA-FLS. B: the effect of CQWT on the colony formation ability of RA-FLS. C: quantitative analysis of colony formation. D: the effect of CQWT on the number of EdU-positive cells in RA-FLS. E: quantitative statistical analysis of EdU detection. * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ compared with the $0\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ group.

图2 CQWT抑制了RA-FLS的增殖
Fig.2 CQWT inhibited the proliferation of RA-FLS

胞显著减少(图2D和图2E)。这些数据表明, CQWT能显著抑制RA-FLS的增殖。

2.3 CQWT能诱导RA-FLS凋亡

已知RA-FLS的延迟凋亡参与了RA的发病机制。为了确定CQWT是否能诱导RA-FLS凋亡, 将CQWT处理RA-FLS 24 h后通过流式细胞术检测凋亡情况。如图3A和图3B所示, 细胞凋亡率从2.55%分别上升到28.87%和47.29%。此外, CQWT处理后, Caspase-3的表达显著上调(图3C~图3E)。这些数据表明, CQWT能显著促进RA-FLS凋亡。

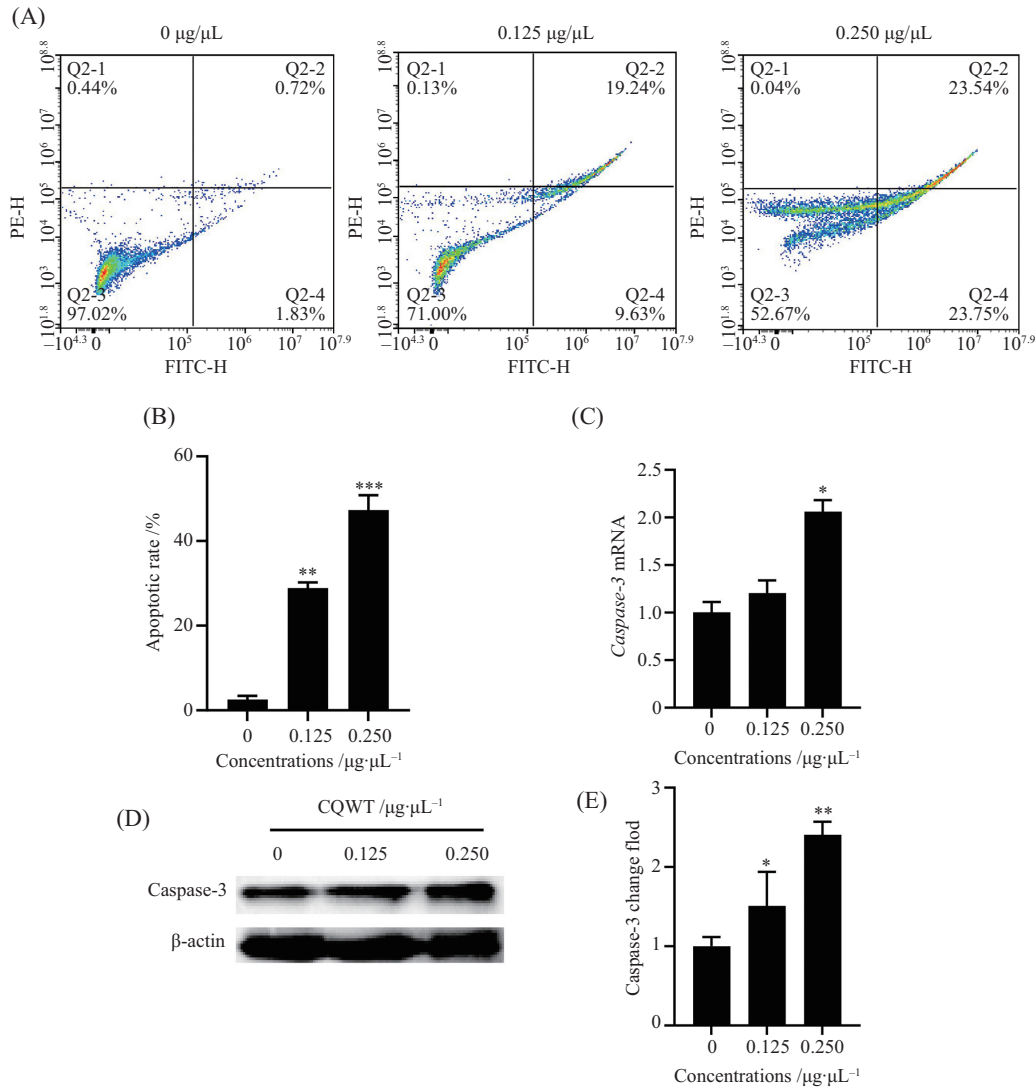
2.4 CQWT能抑制RA-FLS的迁移和侵袭

类瘤样增长的RA-FLS呈现较强的迁移和侵袭

特性。我们通过伤口愈合和Transwell实验评估了CQWT对RA-FLS迁移和侵袭能力的影响。如图4A和图4B所示, 与对照组相比, CQWT显著抑制了RA-FLS的迁移, 迁移率分别为63.16%和29.47%。Transwell实验显示CQWT处理后RA-FLS侵袭的数量显著减少(图4C和图4D)。此外, CQWT干预能显著促进E-钙黏蛋白的表达, 降低N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达水平(图4E~图4I)。这些数据表明, CQWT能显著抑制RA-FLS的迁移和侵袭。

2.5 CQWT能显著降低RA-FLS中炎症因子表达水平

我们通过qPCR和ELISA检测了不同浓度CQWT



A: 采用流式细胞术确定CQWT对RA-FLS凋亡的影响。B: 凋亡细胞的定量统计分析。C、D: 分别通过qPCR和Western blot评估CQWT对caspase-3表达的影响。E: 使用ImageJ软件进行Caspase-3的定量分析。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$, 与0 µg/µL组比较。

A: flow cytometry was used to determine the effect of CQWT on cell apoptosis. B: quantitative statistical analysis of apoptotic cells. C,D: the effect of CQWT on Caspase-3 expression was evaluated by qPCR and Western blot, respectively. E: quantitative analysis of Caspase-3 was performed using ImageJ software. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$ compared with the 0 µg/µL group.

图3 CQWT能诱导RA-FLS凋亡

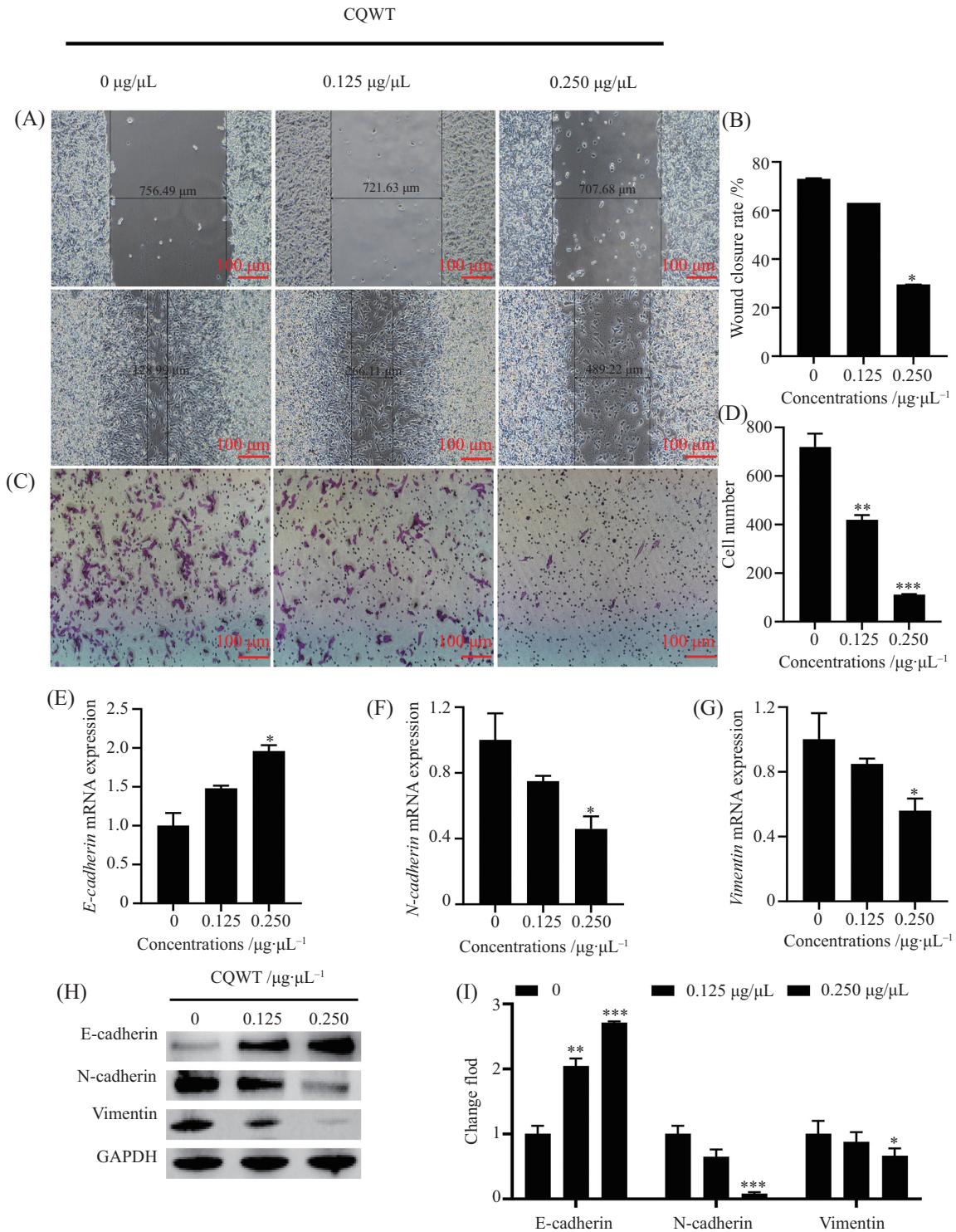
Fig.3 CQWT induced apoptosis in RA-FLS

处理RA-FLS 24 h后, *TNF-α*、*IL-6* 和 *IL-1β* 的mRNA表达水平和分泌量的变化。与对照组相比, 0.250 µg/µL的CQWT显著抑制了*TNF-α*、*IL-6*和*IL-1β*的表达(图5A和图5B)。此外, CQWT能显著降低RANKL的水平, 上调OPG的表达(图5C和图5D)。这些发现表明, CQWT通过抑制RA-FLS中关键促炎性细胞因子的产生来减轻RA。

2.6 CQWT能缓解CIA小鼠的RA症状

为了验证CQWT在体内是否具有抗RA的作用, 我们在DBA1/J小鼠中成功建立了CIA模型(图6A)。

与对照组相比, CIA小鼠的关节炎严重程度显著增加。CQWT干预显著降低CIA小鼠关节肿胀度及关节炎评分(图6B和图6C), 而体重则无明显变化(图6D)。ELISA实验结果显示, 与CIA组相比, CQWT干预能显著降低小鼠血清中*TNF-α*、*IL-6*和*IL-1β*的表达水平(图6E)。通过H&E染色进一步检查了踝关节的组织病理特征。在CIA小鼠中, 可以看到典型的RA相关病理特征, 包括炎症细胞浸润、滑膜增生和滑膜囊形成(图6F), 而这些病理变化在CQWT干预后得到了显著缓解。我们还发现, CQWT干预能显

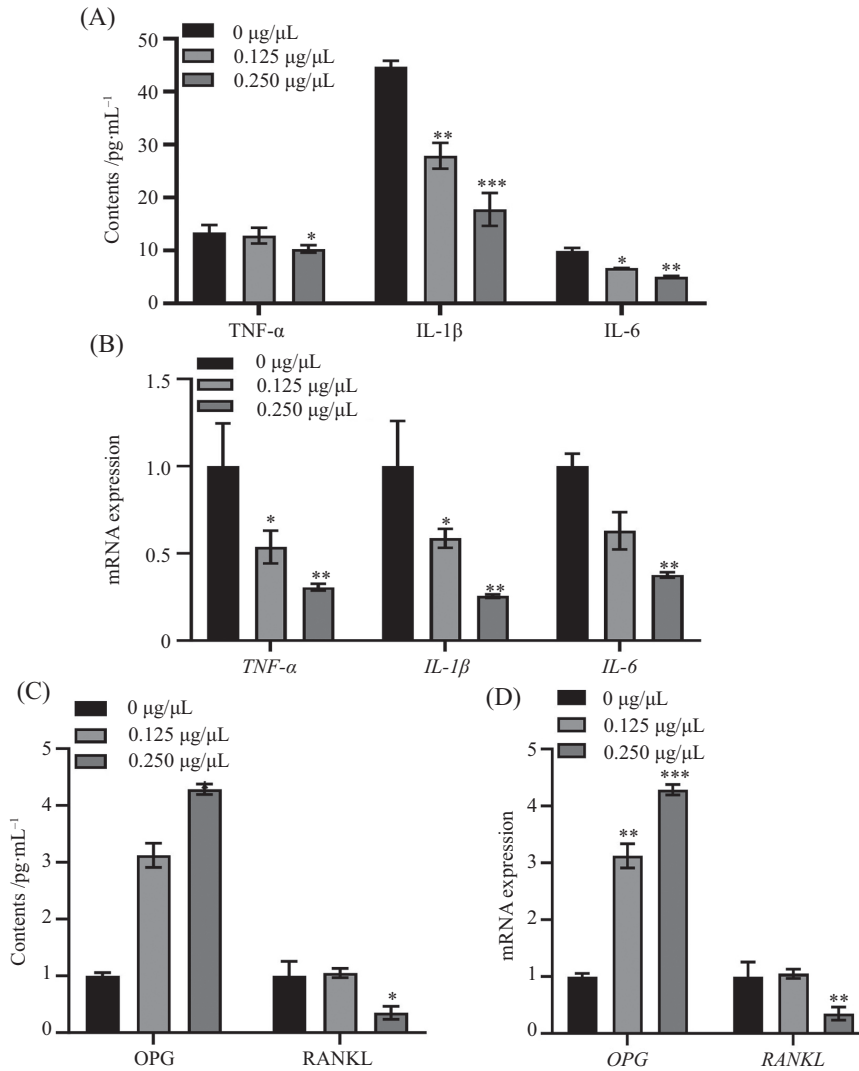


A: 采用伤口愈合实验评估CQWT处理后RA-FLS的迁移能力。B: 细胞迁移的定量统计分析。C: Transwell实验评估CQWT对RA-FLS侵袭能力的影响。D: 细胞侵袭的定量分析。E~H: CQWT处理后, 分别通过qPCR和Western blot检测RA-FLS中E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达情况。I: 使用ImageJ软件对E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白进行定量分析。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

A: the migration ability of RA-FLS after CQWT treatment was evaluated by the wound healing assay. B: quantitative statistical analysis of cell migration. C: the effect of CQWT on the invasion ability of RA-FLS was evaluated by the Transwell assay. D: quantitative analysis of cell invasion. E-H: the expressions of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin in RA-FLS after CQWT treatment were detected by qPCR and Western blot, respectively. I: quantitative analysis of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin was performed using ImageJ software. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

图4 CQWT对RA-FLS迁移和侵袭能力的影响

Fig.4 Effects of CQWT on the migration and invasion of RA-FLS



A、B: 分别通过ELISA和qPCR检测了CQWT处理24 h后RA-FLS中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的释放量及mRNA表达情况。C、D: 分别通过ELISA和qPCR方法检测了CQWT处理24 h后, RANKL和OPG的释放量及mRNA表达量。* P <0.05, *** P <0.001, *** P <0.001, 与对照组比较。

A,B: the release amounts and mRNA expression levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in RA-FLS after 24 h of CQWT treatment were detected by ELISA and qPCR, respectively. C,D: the release amounts and mRNA expression levels of RANKL and OPG after 24 h of CQWT treatment were detected by ELISA and qPCR, respectively. * P <0.05, *** P <0.001, *** P <0.001 compared with control group.

图5 CQWT对RA-FLS中炎症因子表达的影响

Fig.5 The effects of CQWT on the expression of inflammatory factors in RA-FLS

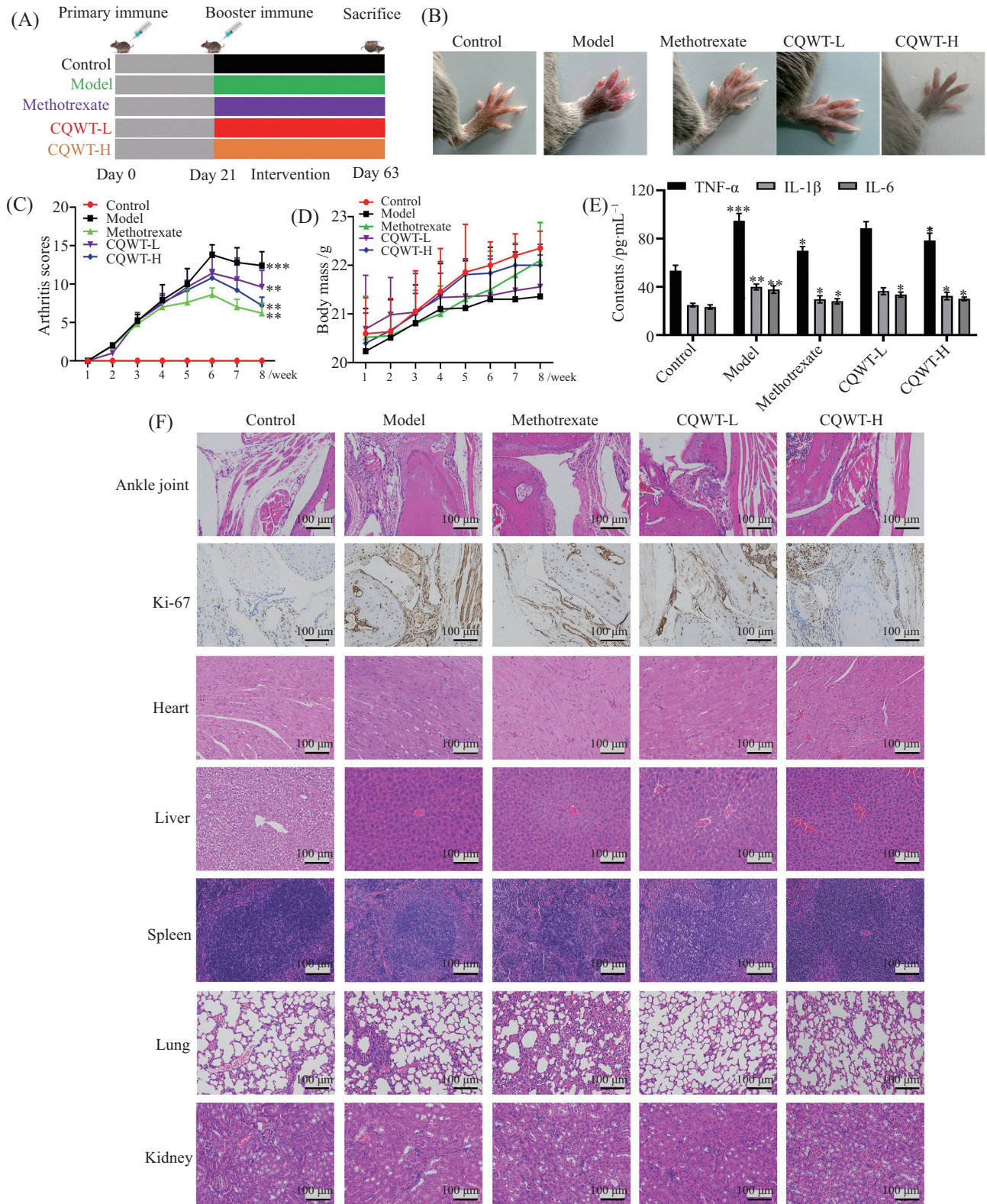
著抑制踝关节滑膜细胞的增殖(图6F)。更重要的是, CQWT干预对心、肝、脾、肺和肾等主要器官均未产生明显的毒性作用(图6F)。这些结果表明, CQWT在体内具有显著的抗RA活性。

3 讨论

RA是一种以慢性滑膜炎症、软骨和骨组织破坏为主要特征的自身免疫性疾病。成纤维样滑膜细胞在RA的发生和进展中发挥着关键调节作用, 是促成滑膜组织异常增生和炎症级联反应的重要效应细胞^[15]。评估RA-FLS详细生物行为特征对于阐明疾

病机制以及寻找新的治疗策略至关重要^[16]。在RA炎症微环境中, FLS持续活化并获得增强的抗凋亡能力, 是导致滑膜增生和疾病持续进展的重要原因之一^[5]。因此, 异常增殖并诱导其凋亡被认为是阻断滑膜增生和延缓RA进展的潜在有效策略^[17-18]。

萜类化合物是天然药物中重要的抗炎和抗肿瘤活性成分。研究表明, 植物来源的萜类化合物在抗RA方面具有广阔的应用前景。如从蓝萼菊中分离的二萜类化合物蓝萼甲素A能显著抑制RA-FLS增殖, 促进其凋亡^[6]。从梔子中分离的环烯醚萜苷类化合物能诱导AIA(adjvant-induced arthritis)大鼠



A: 动物实验示意图。B: 肿胀情况。C: 关节炎评分。D: 体质量。E: 血清中的炎症细胞因子的表达情况。F: CIA小鼠的踝关节、心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏的H&E染色结果以及通过免疫组织化学法分析滑膜组织Ki-67的表达情况。**P*<0.05, ****P*<0.001, *****P*<0.0001, 与对照组比较。

A: schematic diagram of the animal experiment. B: swelling condition. C: arthritis score. D: body mass. E: expression of inflammatory cytokines in serum. F: H&E staining results of the ankle joint, heart, liver, spleen, lung and kidney of CIA mice, as well as the expression of Ki-67 in synovial tissue analyzed by immunohistochemistry. **P*<0.05, ****P*<0.001, *****P*<0.0001 compared with control group.

图6 CQWT能缓解CIA小鼠的RA症状

Fig.6 CQWT improved the RA symptoms in CIA mice

FLS凋亡^[8]。在本研究中,我们发现CQWT显著抑制了RA-FLS的增殖,还通过增加Caspase-3表达水平来诱导细胞凋亡。在CIA小鼠中,CQWT干预后滑膜Ki-67表达水平显著降低。为此我们推测,CQWT可能通过抑制滑膜细胞的增殖并诱导其凋亡发挥抗RA作用。

除了数量上的变化外,RA-FLS还表现出过度的迁移和侵袭特性,这是导致软骨侵蚀和骨破坏的重要病理基础^[19-20]。研究表明,EMT效应在调控细胞迁移和侵袭能力中发挥重要作用^[21-22]。ZHANG等^[23]报道,黄芩素能显著上调FLS中E-钙黏蛋白的表达。从杜仲植物中分离获得的三萜类化合物白桦酸可通过抑制NF- κ B通路来阻滞RA-FLS的迁移和侵袭^[9]。我们之前的研究表明,藜麦中的萜类化合物通过下调miR-21-5p来抑制乳腺癌的迁移^[24]。在本研究中,CQWT干预后,E-钙黏蛋白表达显著上调,而N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达明显下调,提示CQWT可通过抑制EMT过程,从而有效抑制RA-FLS的迁移和侵袭。

在RA患者体内,关节腔内炎症细胞浸润可加速促炎性细胞因子的释放,从而增强RA-FLS的类瘤样表型^[25-26]。RA相关炎症介质还能促进破骨细胞活化,从而加重软骨和骨组织的结构性损伤^[27]。RANKL是破骨细胞分化的关键调控因子,而OPG则作为RANKL的诱饵受体,可通过与RANKL结合抑制破骨细胞生成,并促进成骨细胞分化与成熟^[28-29]。已有研究表明,普拉洛酯能有效降低MH7A细胞和CIA小鼠中IL-1 β 和IL-6等炎症细胞因子水平,从而抑制破骨细胞生成^[30]。雷公藤内酯醇可通过下调RA-FLS中的miR-221表达并降低炎症细胞因子水平从而延缓RA病程^[31]。在本研究中,我们发现CQWT干预显著降低TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和RANKL的表达水平,同时上调OPG的表达,提示CQWT可能通过调控炎症反应及骨代谢相关因子协同延缓RA的进展。

综上所述,本研究表明藜麦源三萜(CQWT)在体内外模型中均表现出显著的抗RA活性。CQWT可通过抑制RA-FLS的异常增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡并减轻炎症反应,从而缓解CIA小鼠的关节炎症并减轻滑膜病理损伤,并且对主要器官没有明显的毒性作用。这些发现表明藜麦源三萜有望成为治疗RA的有前景的候选药物。

4 局限性

本研究探讨了CQWT在RA中的潜在干预作用。通过体内外实验揭示了CQWT对RA-FLS细胞增殖、凋亡、迁移侵袭及炎症因子释放的调控作用,并在CIA小鼠模型中验证了其缓解关节炎症和减轻病理损伤的作用。然而,本研究仍存在一定局限性,有待在后续研究中进一步完善。(1) CQWT的药代动力学特征及生物利用度尚不明确。目前的研究主要基于体外实验和动物模型,尚未系统评估CQWT在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程。这些关键药代动力学参数对于全面评价CQWT的体内有效性及其转化潜力具有重要意义。(2) 关于CQWT的长期安全性数据仍然缺乏。本研究主要关注其抗RA效果及短期毒性表现,而其在长期给药条件下的安全性、慢性毒性以及潜在的器官蓄积风险尚未通过规范的毒理学研究加以验证。在推进其进一步应用之前,有必要开展系统而长期的安全性评价。(3) CQWT的作用机制仍有待深入解析。本研究对其抗RA机制的阐释仍处于初步阶段,尚未明确其中发挥关键作用的具体活性成分及其直接分子靶点。后续研究可结合脂质组学/代谢组学分析(如LipMS)筛选潜在靶蛋白,并通过细胞热位移分析(cellular thermal shift assay, CETSA)、表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)等技术对靶点进行验证。同时,结合转录组测序等高通量技术,进一步解析CQWT是否可通过调控关键靶蛋白介导下游信号通路和细胞功能改变。(4) CQWT与现有抗RA药物的联合应用效果尚未得到评估。未来可通过体内外实验系统探索CQWT与传统抗RA药物或生物制剂的联用潜力,以期优化治疗方案提供实验依据。

参考文献 (References)

- [1] GRAVALLESE E M, FIRESTEIN G S, KOSCAL N, et al. What is rheumatoid arthritis [J]? *N Engl J Med*, 2024, 390(13): e32.
- [2] GRAVALLESE E M, FIRESTEIN G S. Rheumatoid arthritis-common origins, divergent mechanisms [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(6): 529-42.
- [3] BEHL T, MEHTA K, SEHGAL A, et al. Exploring the role of polyphenols in rheumatoid arthritis [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(19): 5372-93.
- [4] BROWN P, PRATT A G, HYRICH K L. Therapeutic advances in rheumatoid arthritis [J]. *BMJ*, 2024, 384: e070856.
- [5] NÉMETH T, NAGY G, PAP T. Synovial fibroblasts as potential drug targets in rheumatoid arthritis, where do we stand and where shall we go [J]? *Ann Rheum Dis*, 2022, 81(8): 1055-64.

- [6] LIU X L, WANG Z G, QIAN H, et al. Natural medicines of targeted rheumatoid arthritis and its action mechanism [J]. *Front Immunol*, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.945129.
- [7] WANG Y, CHEN S J, DU K Z, et al. Traditional herbal medicine: therapeutic potential in rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, doi: 10.1016/j.jep.2021.114368.
- [8] LI N, GONG Z H, LI X J, et al. Betulinic acid inhibits the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 186-93.
- [9] WANG S, DENG Z T, MA Y C, et al. The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2675-91.
- [10] REN G X, TENG C, FAN X, et al. Nutrient composition, functional activity and industrial applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. *Food Chem*, 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135290.
- [11] DING M, ZHANG X C, SHI J Y, et al. Terpenoids of quinoa bran suppresses colorectal cancer by inducing cell apoptosis [J]. *Food Biosci*, 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2023.102615.
- [12] FAN X X, FENG M M, GUO D, et al. Terpenoids from quinoa reverse chemoresistance in breast cancer by suppressing the stemness-related lncRNA 667012 [J]. *Food Front*, 2025, 6(1): 516.
- [13] QIAO Q Q, SHAN S H, GUO H Q, et al. Quinoa bran terpenoids ameliorates metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by enriching of *L. murinus* LQ719 [J]. *Food Res Int*, 2026, doi: 10.1016/j.foodres.2025.118084.
- [14] ZHANG H M, QIAO Q Q, ZHAO Y R, et al. Expression and purification of recombinant bowman-birk trypsin inhibitor from foxtail millet bran and its anticancer effect *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(18): 10439-50.
- [15] ZHOU M Y, GAO Z Y, LONG W C, et al. Salvianolic acid B alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting oxidative stress and pyroptosis through the Keap1-Nrf2/ROS/NLRP3 axis [J]. *Phyto-medicine*, 2025, doi: 10.1016/j.phymed.2025.157736.
- [16] JANG S, KWON E J, LEE J J. Rheumatoid arthritis: pathogenic roles of diverse immune cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 905.
- [17] ALSHEHRI Z S. Therapeutic targeting of apoptosis-driven inflammation in rheumatoid arthritis: a biochemical and molecular modeling approach using plant-derived compounds [J]. *Int J Rheum Dis*, 2025, 28(9): e70423.
- [18] HAO J Y, ZHENG J X, LIU C H, et al. CD36-mediated fatty acid metabolic reprogramming activates synovial fibroblasts and promotes rheumatoid arthritis progression [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, doi: 10.1016/j.intimp.2025.115594.
- [19] XU Q Q, KONG H X, REN S, et al. Coix seed oil alleviates synovial angiogenesis through suppressing HIF-1 α /VEGF-A signaling pathways via SIRT1 in collagen-induced arthritis rats [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 119.
- [20] YUE S R, FAN J Y, XIE D L, et al. Unveiling the therapeutic potential: targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2025, doi: 10.1017/erm.2025.11.
- [21] WANG Z S, LIAN S L, LIU Z C, et al. Baicalin inhibits A549 cells proliferation and EMT through targeting the EGFR pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2026, doi: 10.1016/j.intimp.2025.116011.
- [22] XIA P. The significance of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the initiation, plasticity, and treatment of glioblastoma [J]. *Genes Dis*, 2025, 13(1): 101711.
- [23] ZHANG X, GUAN X, PIAO Y S, et al. Baicalein induces apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through inactivation of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, doi: 10.1155/2022/3643265.
- [24] AN N, SHI J Y, YANG R P, et al. Terpenoids from quinoa suppresses breast cancer migration by down-regulating the miR-21-5p [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2025, 34(15): 3617-30.
- [25] SIUCHNIŃSKA H, MINAROWSKA A, WASILEWSKA E. Beyond joints: neuropsychiatric benefits of TNF- α and IL-6 inhibitors in rheumatoid arthritis-narrative review [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(17): 8361.
- [26] ZAVORITI A, MIOSSEC P. Understanding the effects of Janus kinase inhibitors on the cardiovascular system in comparison to main biological DMARDs in rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2025, 24(11): 103892.
- [27] KIKYO N. Circadian regulation of macrophages and osteoclasts in rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12307.
- [28] HUSSAIN M S, ISLAM T, ISLAM M S, et al. Clinical insights into the role of smoking, diabetes, and rheumatoid arthritis in osteoporotic fractures [J]. *Arch Osteoporos*, 2025, 20(1): 87.
- [29] ILCHOVSKA D D, BARROW D M. An overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(2): 102741.
- [30] QI X Y, MENG J J, LI C H, et al. Praelolide alleviates collagen-induced arthritis through increasing catalase activity and activating Nrf2 pathway [J]. *Phyto-medicine*, 2024, 135: 156040.
- [31] LI N, CHEN Z, FENG W, et al. Triptolide improves chondrocyte proliferation and secretion via down-regulation of miR-221 in synovial cell exosomes [J]. *Phyto-medicine*, 2022, 107: 154479.