桃仁膝康丸含药血清经 NF-κB 通路调控巨噬细胞 M1/M2 极化平衡的实验研究

肖　鹏[1,2]　杨昭杰[1,2]　罗亚鸽[1,2]　陈宝龙[1,2]　谢　文[1,2]（通讯作者）

1.河南省洛阳正骨医院（河南省骨科医院） 河南 洛阳 471002

2.河南省卫生健康委员会骨代谢与分析重点实验室 河南 洛阳 471002

【摘　要】：骨关节炎（OA）以滑膜炎症和巨噬细胞 M1/M2 极化失衡为核心病理特征，桃仁膝康丸临床疗效确切但其免疫药理机制尚未阐明。本研究旨在探讨桃仁膝康丸含药血清对巨噬细胞极化的调控作用及 NF-κB 信号通路机制。采用 RAW264.7 细胞系诱导的 M1、M2 极化模型，给予高、中、低剂量含药血清干预，并通过流式细胞术、qPCR、Western blot 及 ELISA 检测极化标志物、炎症因子及通路蛋白表达；同时利用 NF-κB 抑制剂 BAY-11-7082 进行机制验证。结果显示，含药血清剂量依赖性抑制 M1 标志物（CD86）及 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达，促进 M2 标志物（CD206）及 IL-10 分泌；显著下调 p-p65 和 p-IκBα水平。BAY-11-7082 联合处理呈协同抑制 M1 效应，但部分削弱 M2 促进作用。研究表明桃仁膝康丸通过抑制 NF-κB 通路双向重塑巨噬细胞极化平衡，其促 M2 效应可能涉及非 NF-κB 依赖机制，为 OA 免疫治疗提供了新靶点与实验依据。

【关键词】：骨关节炎；桃仁膝康丸；巨噬细胞极化；信号通路

DOI:10.12417/2811-051X.26.13.087

引言

骨关节炎（OA）作为常见的关节退行性疾病，已成为引发中老年人慢性疼痛和肢体功能障碍的主要病因[1,2]。OA 本质是一类由低度慢性炎症所推动，以滑膜免疫微环境失衡为主要病理特性的全关节病症[2]。滑膜微环境中，巨噬细胞数量最多、可塑性最高，其表型极化失衡是炎症持续发展、软骨破坏加重的主要原因。在生理状况下，滑膜巨噬细胞主要是具有抗炎修复功效的 M2 型，但是在 OA 发展进程中，巨噬细胞大量朝着促炎的 M1 型转变，释放 TNF-α、IL-1β、IL-6 等促炎细胞因子，进一步加快软骨基质的降解，最终造成炎症不断加重的恶性循环[3,4]。故而通过抑制 M1 极化、诱导 M2 极化以恢复两者平衡的调控措施是 OA 治疗新思路[5]。中药复方对巨噬细胞极化进行调控，特别是通过 NF-κB 通路起作用的具体机制目前不清晰[6]。桃仁膝康丸能有效改善患者症状，但其免疫药理学根据目前尚不明确。本研究用桃仁膝康丸含药血清对 RAW264.7 细胞进行干预，建立 LPS 诱导 M1 极化、IL-4 诱导 M2 极化的并行模型，同时结合 NF-κB 抑制剂 BAY-11-7082 展开机制证实，目的在于确定该复方能够通过抑制 NF-κB 通路双向重塑巨噬细胞的极化平衡，为 OA 免疫医治提供实验支撑。

1 材料与方法

1.1 桃仁膝康丸含药血清制备与细胞培养

给予小鼠桃仁膝康丸高、中、低剂量（每天 2.4g/kg、1.2g/kg、0.6g/kg）连续灌胃。末次给药后，经腹主动脉采血，后分离血清。血清灭活后，过滤除菌保存备用。RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞使用含 10%胎牛血清、含青链霉素的 RPMI-1640 完全培养基培养。

1.2 巨噬细胞极化模型构建及药物干预

RAW264.7 细胞加入浓度为 100 ng/mL 的 LPS 刺激诱导 M1 极化。加入浓度为 20 ng/mL 的重组小鼠 IL-4 诱导 M2 极化。造模完成后加入不同剂量含药血清的培养基进行干预，同时设置空白对照组。干预结束后收集细胞与培养上清用于检测。设置 LPS 模型组、LPS+不同剂量含药血清组、LPS+含药血清+BAY-11-7082 联合干预组；先用 BAY-11-7082 预处理细胞，再给予 LPS 及含药血清处理；最后收集细胞样本，检测巨噬细胞极化表型、炎症因子的 mRNA 与蛋白表达，以及 NF-κB 通路关键分子的蛋白表达水平。

1.3 流式细胞术、qPCR 和 Western blot 检测

收集各组 RAW264.7 细胞，PBS 洗涤后，加入荧光素标记抗体 PE-Anti-mouse CD86 和 APC-Anti-mouse CD206，避光孵育染色。流式细胞仪上机检测。提取各组细胞总 RNA，反转录合成 cDNA，进行 qPCR 检测。检测基因包括 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10，以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-}\Delta\Delta Ct$ 法计算基因相对表达量。提取各组细胞总蛋白，定量后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭。一抗 4℃孵育过夜，随后加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗及 HRP 标记的山羊抗鼠二抗，室温孵育，化学发光显影。使用 ImageJ 软件分析条带灰度值。

基金：河南省中医药科学研究专项课题（编号：2017ZY2013）。

1.4 数据分析

qPCR、Western blot 及流式细胞术所得实验数据采用 Graph Pad Prism 9 软件进行统计分析与图表绘制。

2 结果

2.1 桃仁膝康丸含药血清抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 M1 极化

与空白对照组比较，LPS 刺激后，TNF-α、IL-1β、IL-6mRNA 与蛋白表达显著上调，IL-10 表达水平降低；M1 型（CD86⁺）巨噬细胞比例显著升高，M2 型（CD206⁺）巨噬细胞比例下降。含药血清干预后，促炎因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的 mRNA 及蛋白表达剂量升高逐步下降，抗炎因子 IL-10 表达水平上调；M1 细胞比例呈剂量依赖性降低，M2 细胞比例升高（图 1A-C）。结果提示桃仁膝康丸可抑制巨噬细胞 M1 极化，促进细胞向 M2 表型转换。

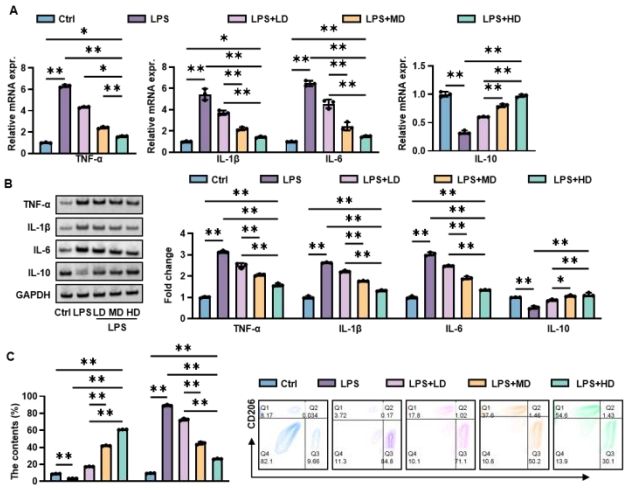

图 1 （A）qPCR 检测 mRNA 相对表达；（B）Westernblot 检测蛋白表达；（C）流式细胞术检测巨噬细胞 CD86/CD206 表型比例

2.2 桃仁膝康丸含药血清促进 IL-4 诱导的巨噬细胞 M2 极化

IL-4 处理可显著上调 IL-10 mRNA 与蛋白水平，升高 M2 型（CD206⁺）巨噬细胞比例。含药血清干预后，IL-10 的 mRNA 及蛋白表达同步升高，M2 细胞比例随给药剂量增加而升高。提示桃仁膝康丸可促进 IL-4 诱导的巨噬细胞向成熟 M2 抗炎修复表型极化，提升抗炎因子 IL-10 表达（图 2D-F）。

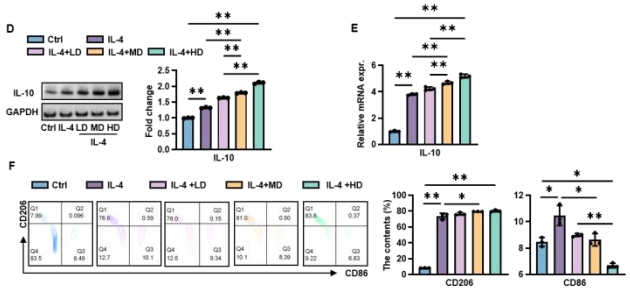

图 2 （D）Westernblot 检测蛋白表达；（E）qPCR 检测 mRNA 相对表达；（F）流式细胞术检测巨噬细胞表型比例

2.3 桃仁膝康丸通过抑制 NF-κB 信号通路调控巨噬细胞极化

LPS 刺激后，促炎因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达升高，M1 极化占优，同时显著上调 p-p65、p-Iκβ蛋白表达，激活 NF-κB 信号通路。含药血清可剂量依赖性下调促炎因子，降低 p-p65、p-Iκβ蛋白水平，抑制 NF-κB 通路活化，促进 M2 极化。

本研究在高剂量含药血清干预基础上联合 NF-κB 特异性抑制剂 BAY-11-7082 进行干预。结果显示，LPS-HD 组、LPS+BAY-11-7082 组、LPS-HD+BAY-11-7082 组的 NF-κB 通路磷酸化蛋白水平、促炎因子与抗炎因子 mRNA 表达水平均处于同一水平，组间未见显著性差异。结果表明，桃仁膝康丸可部分通过抑制 NF-κB 信号通路，调控 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应（图 3G-I）。

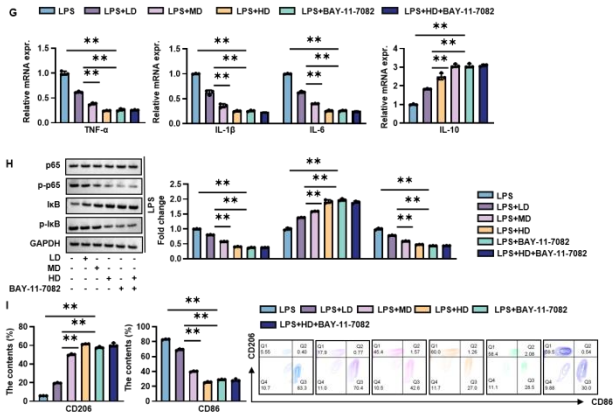

图 3 （G）通路阻断后 qPCR 检测 mRNA 水平；（H）Westernblot 检测蛋白表达；（I）流式细胞术检测通路阻断后巨噬细胞极化表型

3 讨论

本项研究验证，桃仁膝康丸含药血清能够以剂量依赖的方式双向调节巨噬细胞 M1/M2 极化的平衡。与单一成分相比复方具备抑制 M1 以及促进 M2 的双重调控效能，展现出中药多成分、多靶点协同调节的独特长处[7,8,9]。含药血清能够明显降低 LPS 诱导的 p-p65 以及 p-IκBα蛋白的水平，并且对总蛋白的表达没有影响，这意味着其作用的靶点处于 IκB 激酶（IKK）复合物或者该复合物的上游环节。此结果与 TNF-α、IL-1β、IL-6 等 NF-κB 下游促炎因子的 mRNA 和蛋白表达同时下降高度相符，为 NF-κB 通路抑制—M1/M2 表型转变的调控途径提供因果根据。

采用 BAY-11-7082 进行干预后，在 M1 模型里展现出协同抑制效果，但是在 M2 模型中一定程度上减弱 M2 极化，这表明抑制 NF-κB 是桃仁膝康丸抑制 M1 极化的主要环节，但其促进 M2 极化的作用可能还依赖 PI3K/Akt 等非 NF-κB 通路。含药

血清未彻底清除促炎因子基础分泌，仅将滑膜微环境从 M1 主导的促炎状态转至 M2 主导的修复状态，这种调节更符合生理调控特性。

综上所述桃仁膝康丸能够通过抑制 NF-κB 信号通路对巨噬细胞 M1/M2 极化平衡开展双向重塑，为骨关节炎（OA）免疫医治提供直接的实验证据以及潜在的新作用靶点。

参考文献：

[1] Chen B,Hong H,Sun Y,et al.Role of macrophage polarization in osteoarthritis(Review).Exp Ther Med.2022;24(6):757.Published 2022 Dec.

[2] Zou X,Xu H,Qian W.Macrophage Polarization in the Osteoarthritis Pathogenesis and Treatment.Orthop Surg.2025;17(1):22-35.

[3] Zhang Y,Ji Q.Macrophage polarization in osteoarthritis progression:a promising therapeutic target.Front Cell Dev Biol.11:1269724. Published 2023 None.

[4] Ou Q,Tang S,Zhu J,et al.Spermidine ameliorates osteoarthritis via altering macrophage polarization.Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.2024;1870(4):167083.

[5] Cheng J,Liu M,Li Q,Zhao L,Zhang Q.Macrophage polarization:A bridge connecting osteoarthritis and osteoporosis.Biochem Biophys Res Commun.801:153322.

[6] Sun Y,Zuo Z,Kuang Y.An Emerging Target in the Battle against Osteoarthritis:Macrophage Polarization.Int J Mol Sci.2020;21(22). Published 2020 Nov 12.

[7] Ji X,Du W,Che W,Wang L,Zhao L.Apigenin Inhibits the Progression of Osteoarthritis by Mediating Macrophage Polarization. Molecules.2023;28(7).Published 2023 Mar 24.

[8] Wang W,Chu Y,Lu Y,et al.Skatole Alleviates Osteoarthritis by Reprogramming Macrophage Polarization and Protecting Chondrocytes. Research(Wash D C).8:0604.Published 2025 None.

[9] Zhang H,Li J,Xiang X,et al.Tert-butylhydroquinone attenuates osteoarthritis by protecting chondrocytes and inhibiting macrophage polarization.Bone Joint Res.2021;10(11):704-713.