

苗药“四大血”通过抑制HIF-1 α /PDK1介导的糖酵解重编程调控巨噬细胞极化并缓解胶原诱导型关节炎大鼠滑膜炎症

沈婉婷¹, 陈一哲¹, 付欣予¹, 袁家涛¹, 周 均¹, 黄 丽², 吴 宁²

贵州医科大学¹临床医学院, ²基础医学实验教学中心, 贵州 贵阳 561113

摘要:目的 探究贵州苗医验方“四大血”(SX)对胶原诱导型关节炎(CIA)大鼠滑膜组织糖酵解和巨噬细胞极化的作用机制。方法 将32只SD大鼠随机均分为空白组、模型组、雷公藤多苷片阳性对照组(GTW 40 mg/kg)、SX组(SX 40 g/kg), 8只/组。除空白组外, 其余组别均构建CIA大鼠模型。造模成功后, 灌胃给药21 d, 其中空白组与模型组灌胃生理盐水。检测大鼠足肿度、关节炎指数(AI), HE染色观察滑膜组织病理变化, 免疫荧光染色检测滑膜组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、甘露糖受体(CD206)表达, ELISA法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)水平, 分光光度法检测滑膜组织乳酸含量, Western blotting与实时荧光定量PCR法检测缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、丙酮酸脱氢酶激酶同工酶1(PDK1)、己糖激酶2(HK2)的蛋白及mRNA表达。采用UHPLC-MS鉴定SX入血成分并预测靶点, 通过差异分析和WGCNA鉴定类风湿关节炎(RA)相关基因, 经Venn交集分析锁定候选靶点, 再通过多种机器学习算法筛选关键枢纽基因。利用AlphaFold3预测HIF-1 α 与PDK1的互作结构, 对关键基因进行虚拟敲除, 使用分子对接探究靶点与入血成分的互作关系。结果 动物实验中, 与模型组相比, SX能显著减轻CIA大鼠关节肿胀度和AI评分($P<0.01$); 改善滑膜增生与炎性细胞浸润; 降低血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量($P<0.05$); 下调iNOS表达、上调CD206表达, 抑制巨噬细胞M1型极化; 同时显著下调滑膜组织中HIF-1 α 、PDK1、HK2的蛋白及mRNA表达水平($P<0.01$); 鉴定出29种SX入血活性成分、756个潜在靶点及908个RA核心相关基因, 经交集分析获得38个候选靶点, 机器学习筛选出9个关键基因。AlphaFold3预测显示HIF-1 α 与PDK1存在强互作关系, 虚拟敲除分析表明, 敲除HIF1A和PDK1可显著扰动巨噬细胞中TNF、NF- κ B等炎症信号通路, 分子对接显示互作较强。结论 本研究通过全方动物实验和入血成分预测分析验证了苗药“四大血”可通过抑制HIF-1 α /PDK1信号通路, 纠正糖酵解重编程, 进而促进巨噬细胞M2型极化, 有效缓解CIA大鼠关节炎症。

关键词: 类风湿关节炎; 四大血; HIF-1 α /PDK1通路; 糖酵解重编程; 巨噬细胞极化

Miao medicine Sidaxue regulates macrophage polarization and alleviates synovial inflammation in collagen-induced arthritis rats by inhibiting HIF-1 α /PDK1-mediated glycolytic reprogramming

SHEN Wanting¹, CHEN Yizhe¹, FU Xinyu¹, YUAN Jiatao¹, ZHOU Jun¹, HUANG Li², WU Ning²

¹Clinical Medical College, ²Basic Medical Experimental Teaching Center, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Miao medicine prescription Sidaxue (SX) for inhibiting glycolysis in the synovial tissue and promoting macrophage polarization in rats with collagen-induced arthritis (CIA). **Methods** Thirty-two SD rats were randomized into normal control group, CIA model group, tripterygium glycosides (40 mg/kg; positive control) treatment group, and SX (40 g/kg) treatment group ($n=8$). Except for those in the normal control group, all the rats were subjected to CIA modeling and treated with saline, tripterygium glycosides or SX by gavage for 21 consecutive days. Paw swelling, arthritis index, synovial pathology, inflammatory factors, glycolysis-related indicators and gene expressions were detected. UHPLC-MS was used to screen the components of SX in the blood of SX-treated rats. The target genes of the active components of SX and rheumatoid arthritis (RA) were predicted using bioinformatics analysis, and the hub genes were identified using machine learning algorithms. The binding sites between HIF-1 α and PDK1 were predicted using AlphaFold3, and the interactions between SX components and their targets were simulated using molecular docking. **Results** SX treatment significantly alleviated joint swelling, lowered arthritis scores, improved synovial lesions, and reduced serum levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in CIA rats, resulting in also inhibition of macrophage polarization and down-regulation of HIF-1 α , PDK1 and HK2 expressions in the synovial tissues. Twenty-nine components of SX were detected in the blood of SX-treated rats, and 9 key target genes were identified. AlphaFold3 predicted a strong interaction between HIF-1 α and PDK1, and their virtual

knockout was shown to disturb the inflammatory pathways in the macrophages. Molecular docking studies suggested stable docking between the active components of SX and their key targets. **Conclusion** SX alleviates joint inflammation in CIA rats by inhibiting the HIF-1 α /PDK1 signaling pathway, correcting glycolytic reprogramming, and promoting M2 polarization of macrophages.

Keywords: rheumatoid arthritis; Sidaxue; HIF-1 α /PDK1 pathway; glycolytic reprogramming; macrophage polarization

收稿日期: 2026-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(82260829); 2024年国家级大学生创新创业计划训练项目(2024106600520)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82260829).

作者简介: 沈婉婷, 在读本科生, E-mail: 1527214678@qq.com; 陈一哲, 在读本科生, E-mail: 2322045095@qq.com。沈婉婷、陈一哲共同为第一作者

通信作者: 吴 宁, 教授, E-mail: 1638210715@qq.com; 黄 丽, 副教授, E-mail: 12155501@qq.com

类风湿关节炎(RA)是以关节滑膜慢性炎症为特征的自身免疫性疾病,可导致关节破坏和功能丧失^[1,2]。糖酵解在RA发病机制中发挥着重要作用:炎症关节微环境的氧张力变化会诱导缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)在缺氧滑膜中高表达^[3,4],后者通过活化丙酮酸脱氢酶激酶同工酶1(PDK1)^[5],推动细胞代谢从线粒体氧化磷酸化向糖酵解转变,赋予细胞抗凋亡能力^[6],而已糖激酶2(HK2)作为关键的糖酵解限速酶,可调控成纤维细胞样滑膜细胞(FLS)侵袭功能并启动异常免疫反应,成为RA靶向治疗的潜在新靶点^[7,8]。与此同时,巨噬细胞作为RA炎症微环境的核心组分,其源于骨髓造血干细胞单核细胞及胚胎卵黄囊祖细胞^[9,10],在微环境信号刺激下可极化为促炎的M1型(分泌大量炎症因子)或抗炎修复的M2型^[11-13],而糖酵解作为RA巨噬细胞的主要代谢方式,其介导的代谢重编程可能是影响巨噬细胞表型极化、导致功能异常并推动病程进展的重要因素^[14,15]。

目前,临床上对于RA的治疗主要选择化学药物,存在价格昂贵、疗效欠佳、不良反应严重等局限性^[16],亟需研发替代治疗药物。苗药验方“四大血”(SX)由见血飞、黑骨藤、鸡血藤及五花血藤配成,是RA特色药方,效果显著且毒副作用小^[17-19]。课题组前期研究结果显示,SX可减轻胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠关节滑膜炎性细胞浸润程度,抑制关节滑膜组织增生^[20,21],推测其可能通过调控RA相关代谢及免疫通路发挥作用。目前,通过调节巨噬细胞功能以改善RA炎症的研究越来越受到关注,尤其是中医药诱导巨噬细胞极化的相关研究^[22]。然而,国内外未见SX介导巨噬细胞极化调控机制的相关研究。因此,明确SX对巨噬细胞极化方向的调控效应,可能为揭示其治疗RA的分子机制提供新的切入点。HIF-1 α 作为糖酵解的关键调节因子,在RA发展中具有重要作用,同时糖酵解重编程在巨噬细胞极化中扮演核心角色^[14,15],因此,靶向HIF-1 α /PDK1通路调控糖酵解重编程、抑制巨噬细胞M1型极化,或可成为RA治疗的重要潜在方向。

鉴于中药复方整体药效依赖多种成分的协同作用,且口服后进入血液循环的成分可成为发挥药效的活性成分^[23,24],而病理状态下机体肠道菌群、代谢酶功能及组织超微结构的差异还会影响药物体内动态过程^[25],明确SX在体内的动态过程和入血活性成分及其作用机制尤为重要。本研究构建CIA大鼠模型,验证SX在病理状态下吸收入血并分布至靶器官的潜在药效成分,并采用UHPLC-MS鉴定SX的入血成分,结合网络药理学预测其与HIF-1 α /PDK1通路及巨噬细胞极化相关靶点的相互作用,从代谢—免疫交叉视角深入探究通过调控HIF-1 α /PDK1介导的糖酵解重编程影响巨噬细胞极化的具体机制。本研究利用全方进行干预的策略既遵循

中医复方“整体观”的治疗理念,搭建了传统经验用药与现代分子机制研究的桥梁,为后续SX关键单体成分的分选纯化及靶向药物开发奠定前期基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD大鼠32只,雌雄各半,体重180~220 g,贵州医科大学实验动物中心提供,合格证号[SYXK(黔)2018-001]。本研究已获得贵州医科大学实验动物伦理委员会审查批准(伦理批号:2200095),实验动物操作均按照国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条例》执行。

1.1.2 主要试剂与仪器 “四大血”——由五花血藤、鸡血藤、见血飞、黑骨藤四味药材组成(贵州中医药大学苗医药教研室),雷公藤多苷片(黄石飞云制药有限公司),弗氏不完全佐剂(Sigma),牛II型胶原(Chondrex),大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(凡科维),大鼠HIF-1 α 、PDK1、HK2总蛋白抗体(安诺伦北京生物科技有限公司),二抗(Bioworld),PCR逆转录试剂盒(宝日医生物技术有限公司),其余试剂均为进口或国产分析纯产品。酶标仪(BIO-TEK),荧光定量PCR仪(Applied Biosystems),水平电泳槽(DYY-III 31D,北京六一仪器厂),Quantity One凝胶成像分析系统(BIO-RAD),超净工作台(吴江市伟峰净化设备有限公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 动物分组 32只SPF级SD大鼠(雌雄各半),体重为180~200 g,恒温恒湿喂养1周后,随机分为空白组(Normal)、模型组(Model)、雷公藤多苷片阳性对照组(GTW 40 mg/kg)、SX组(SX 40 g/kg),8只/组。

1.2.2 CIA大鼠模型建立 在冰上将相同体积的不完全弗氏佐剂与浓度为2 mg/mL牛II型胶原蛋白混合制成牛II型胶原乳剂,使其充分乳化。Nor组在尾根部皮下注射等体积生理盐水(NS),其余组于每只大鼠尾根处皮下注射0.2 mL配置好的乳化剂,7 d后以0.1 mL乳剂于大鼠右足跖皮下注射进行二次免疫^[26]。对各组大鼠采用关节炎指数(AI)评分。并采用水容积法检测大鼠足肿胀度,足肿计算公式为 $ER(\%) = (V_2 - V_1) / V_1 \times 100\%$ (其中V1为造模前,V2为造模后)。造模后每日观察大鼠关节有无红肿、功能障碍及畸形;测量大鼠足肿度。造模第14天时,通过AI评分判定造模情况,评分标准^[27]:关节无红肿为0分;关节有红色斑点或轻度肿胀为1分;关节病变并有中度红肿为2分;关节除中度红肿外并伴有轻度功能障碍为3分;关节重度红肿、僵直甚至畸形,并伴严重功能障碍为4分;AI评分 ≥ 2 分为造模成功。

1.2.3 药物制备与给药 取SX 2000g(五花血藤、鸡血藤、见血飞、黑骨藤比例为15:22:15:8)^[28],加适量水煮3次(时间分别为1 h、30 min、30 min),合并药液,小火浓缩至500 mL,SX药液终浓度为4 g/mL^[17],4℃冰箱备用。雷公藤多苷片配制成浓度为4 mg/mL的悬液。于二次免疫后第2天开始给药,SX组灌胃给药浓度分别为40 g/kg(按生药计),GTW组给药浓度为40 mg/kg,Normal组和Model组用等量0.9%氯化钠注射液灌胃,1次/d,连续21 d。

1.2.4 标本采集 于末次给药后,各组大鼠采用异氟烷吸入麻醉进行终末取材,诱导浓度为4%~5%,维持浓度为1.5%~2.5%。待大鼠翻正反射消失、夹趾无明显反应并确认达到深麻醉状态后,于麻醉状态下行心脏取血。采血完成后处死大鼠,并确认呼吸、心跳停止后进行组织取材。血液置于真空采血管中室温静置2 h,待血清析出后离心分离血清,置于-80℃冰箱低温保存。沿大鼠膝关节正中切开,暴露膝关节周围区域,打开关节腔,可见淡黄色滑膜组织,剥离后置PBS中清洗,液氮速冻后置于-80℃冰箱低温保存。

1.2.5 病理切片观察 将固定于甲醛中的膝关节取出,放入配置好的甲酸脱钙液中1周,经脱水、透明、包埋、切片后二甲苯及无水乙醇脱蜡复水,HE染色后中性树胶封固,光学显微镜下观察切片。

1.2.6 免疫荧光染色法 切片脱蜡,梯度乙醇复水后蒸馏水洗,浸入修复液微波修复,冷却后PBS洗涤。经3% H₂O₂封闭内源性过氧化物酶、BSA封闭非特异性结合并PBS洗涤后,滴加特异性诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、甘露糖受体(CD206)、白细胞分化抗原68(CD68)稀释一抗(1:200)于4℃湿盒孵育过夜。PBS洗涤后,超敏兔鼠通用二抗(1:400)37℃孵育30 min,再次PBS洗涤,DAPI染核,抗荧光淬灭封片剂封片后立即荧光显微镜观察。

1.2.7 ELISA检测 对大鼠心脏取血后,离心取血清,-80℃冷冻保存,检测时待其充分解冻,按照ELISA试剂盒操作方法步骤进行处理并通过酶标仪平行测定IL-1β、IL-6和TNF-α水平。

1.2.8 分光光度法检测滑膜组织中乳酸含量 取滑膜组织,用预冷的生理盐水冲洗后,按质量(mg)与体积(μL)比1:9加入磷酸盐缓冲液,冰浴条件下机械匀浆,随后以12 000 r/min速度、4℃离心15 min,收集上清液作为待测样本。乳酸检测基于乳酸脱氢酶催化反应体系:在酸性条件下,乳酸被乳酸脱氢酶氧化生成丙酮酸,同时伴随NAD⁺还原为NADH。通过测NADH的吸光度 $A_{340\text{ nm}}$,计算乳酸浓度^[29]。

1.2.9 实时荧光定量PCR法 取大鼠滑膜组织匀浆,利用Trizol Reagent试剂盒在冰上充分研磨提取总RNA,

取1 μL样本通过超微量紫外分光光度计检测样品 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值及RNA浓度。将RNA逆转录为cDNA,于-20℃冰箱保存。配置定量PCR反应体系,采用qRT-PCR检测,扩增程序为:预变性95℃30 s,变性95℃10 s,退火60℃30 s,循环40次,对目的基因扩增产物进行统计学分析。引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。引物序列见表1。

表1 HK2、HIF-1α、PDK1、GAPDH的引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR of HK2, HIF-1α, PDK1 and GAPDH

Primer		Sequences (5' to 3')
HK2	Forward	GCTGCTGCTGAAGAAGATGG
	Reverse	CCAGAGGGAGTCGATGTTGA
HIF-1α	Forward	GCTGATTGTGAGCCTTCTATG
	Reverse	TCATCTGTAAAGTGGGTCTCGT
PDK1	Forward	ATGGCGTCCGTGGAGAAGTA
	Reverse	TCAGTCTTGGCGTAGTCGTT
GAPDH	Forward	GAAGCTGGTCATCAACGGGA
	Reverse	GGCGGAGATGATGACCCCTTT

1.2.10 Western blotting 取大鼠关节滑膜组织,经RIPA裂解液研磨提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。配制聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,加入稀释的一抗HK2(1:1000)、HIF-1α(1:1000)、PDK1(1:1000)、β-actin(1:1000),4℃孵育过夜,TBST洗涤5次,6 min/次,二抗HRP标记山羊抗兔或小鼠IgG(1:5000)室温孵育2 h,洗膜后在凝胶成像仪上进行蛋白条带检测分析,计算灰度值。

1.2.11 UHPLC-MS 采用超高效液相色谱-高分辨率质谱联用仪(UPLC-Q-Exactive HFX)对样品进行化学成分分析。化合物的结构鉴定基于与本地标准品数据库的匹配,匹配标准包括:一级精确质量(相对分子质量误差<25 ppm)和二级碎片谱图信息。对中药中响应强度高的物质进行了严格的人工二次核对。最后,通过系统比较药材中的成分、空白对照组以及给药组样品的检测结果,筛选并鉴定了血中主要移行成分。

1.2.12 SX作用靶点获取 首先从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取SX各活性成分的SMILES及结构。随后,利用Swiss Target Prediction和PharmMapper进行靶点预测,将两数据库的预测结果取并集,然后汇总所有活性成分的靶点,构建最终的四大血作用靶点列表。

1.2.13 类风湿关节炎核心基因获取 整合GEO的3个RA滑膜转录组数据集(GSE55457, GSE77298,

GSE89408)。数据预处理后,使用sva包的ComBat函数校正批次效应。随后,筛选差异表达基因(DEGs),阈值设为FDR<0.05且|log2FC|>0.585。同时,我们使用WGCNA包构建共表达网络,确定最佳软阈值($R^2>0.8$)并识别基因模块(minModuleSize=50, mergeCutHeight=0.25)。通过计算模块与疾病性状的相关性筛选出关键模块。最后,我们将DEGs与WGCNA关键模块基因取交集确定RA核心基因用于下游分析。

1.2.14 交集获得核心基因列表 从OMIM及GeneCards数据库中分别检索糖酵解和巨噬细胞极化的相关基因,并取并集,构建了糖酵解和巨噬细胞极化靶点集。随后,将两个靶点集与四大血作用靶点及RA核心基因进行交集分析,并通过Venn图可视化。

1.2.15 机器学习筛选核心基因 利用训练集中的数据,采用了十二种经典的机器学习算法——Lasso、Ridge、Enet、Stepglm、SVM、LDA、glmBoost、plsRglm、RF、GBM、XGBoost和Naive Bayes——开发了127个预测模型。基于独立的验证集数据,使用AUC作为核心性能指标,对所有模型的预测效能进行了严格评估与比较。最后,为确定候选核心基因,统计了在所有表现优良的模型中被选为特征的基因,并依据其出现频率进行排序。整个分析过程中的热图可视化均使用ComplexHeatmap软件包完成^[30, 31]。

1.2.16 AlphaFold3 为探究核心靶点的相互作用,运用AlphaFold3精准预测核心靶点的结构,对互动可能性进行探究。当ipTM>0.8,pTM>0.5时,则认为结构可信度

较高且互作能力强。

1.2.17 基于单细胞数据的虚拟敲除 在健康人滑膜单细胞数据(GSE246416)进行质控、注释等步骤,在其巨噬细胞中,利用scTenifoldKnk算法对核心基因进行虚拟敲除^[32],对受到显著扰动的下游基因进行富集分析,进一步揭示这些核心基因在维持巨噬细胞正常功能中的作用,并反向推断它们在RA中的功能异常后果。

1.2.18 分子对接 使用CB-Dock2服务器进行主要入血成分与靶点蛋白的分子对接,以评估靶点与成分的互作。

1.3 统计学分析

采用SPSS 26.0进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示。采用Shapiro-Wilk检验进行正态性检验,采用Levene检验进行方差齐性检验。符合正态分布且方差齐的两组数据比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析,不符合正态分布的数据采用非参数检验。以P<0.05为差异具有统计学意义。所有实验至少独立重复3次。

2 结果

2.1 CIA大鼠双后肢足趾的外观和足肿度

造模前,各组CIA大鼠的外观无异常,足趾肿胀度差异无统计学意义,二次免疫后,与Normal组相比,Model组、GTW组及SX组大鼠双后肢均出现明显红肿,毛发干枯现象,活动度下降。经21 d给药干预,与Model组相比GTW组、SX组足肿度下降($P<0.05,P<0.01$,表2)。

表2 SX对CIA大鼠双后肢足肿胀度的影响
Tab.2 Effect of Sidaxue (SX) on paw swelling of bilateral hind limbs of rats with collagen-induced arthritis (CIA) (Mean±SD, n=8)

Group	Observation time				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
Normal	1.76±0.14	1.86±0.10	1.89±0.08	1.88±0.11	1.95±0.09
Model	1.86±0.13	2.22±0.21***	2.85±0.34***	2.49±0.24***	2.69±0.30**
GTW	1.83±0.07	2.12±0.19***	2.48±0.23*** [#]	2.31±0.20*** [#]	2.34±0.21*** [#]
SX	1.82±0.16	2.10±0.20***	2.37±0.22***	2.28±0.23***	2.45±0.25*** [#]

P<0.01, *P<0.001 vs the Normal group, [#]P<0.05, ^{##}P<0.01 vs Model group.

2.2 SX对CIA大鼠AI评分的影响

AI评分可以客观反映出大鼠发病的情况,21 d给药干预,与Normal组相比,Model组大鼠AI评分增高($P<0.001$),而与Model组相比,GTW组和SX组的AI评分下降($P<0.01$,表3)。

2.3 大鼠滑膜组织切片HE染色与免疫荧光染色

光镜下观察各组大鼠踝关节HE染色切片,Normal组大鼠骨层清晰,软骨内无血管和神经,滑膜结构排列清晰且疏松,衬里层由单层或双层滑膜细胞排列,滑膜组织未见炎性细胞及纤维组织增生。Model组大鼠

关节滑膜组织增生明显,软骨下层骨组织受侵蚀,坏死区域伴有炎细胞浸润,组织内亦可见毛细血管增生。GTW组及SX组可见少量炎性细胞浸润及纤维组织增生(图1A~D)。

免疫荧光染色结果显示(图1E~H):与Normal组相比,Model组滑膜组织巨噬细胞中CD206荧光强度降低,阳性细胞数显著减少,而iNOS荧光强度显著增强;与Model组相比,GTW组、SX组巨噬细胞中CD206荧光强度增强,阳性细胞数显著增加($P<0.001$),而iNOS荧光强度显著降低($P<0.05$)。

表3 SX对CIA大鼠AI评分的影响

Tab.3 Effect of SX on arthritis index (AI) score in CIA rats (*Mean±SD, n=8*)

Group	Observation time				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
Normal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Model	3.75±0.51***	3.62±0.53***	3.62±0.46***	3.50±0.53***	3.62±0.52***
GTW	3.55±0.65	3.53±0.55	2.50±0.53 [#]	1.25±0.43 ^{##}	0.37±0.58 ^{###}
SX	3.87±0.63	3.67±0.51	2.62±0.58	1.50±0.53 [#]	0.50±0.53 ^{##}

****P*<0.001 compared with Normal group; [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01, ^{###}*P*<0.001 vs Model group.

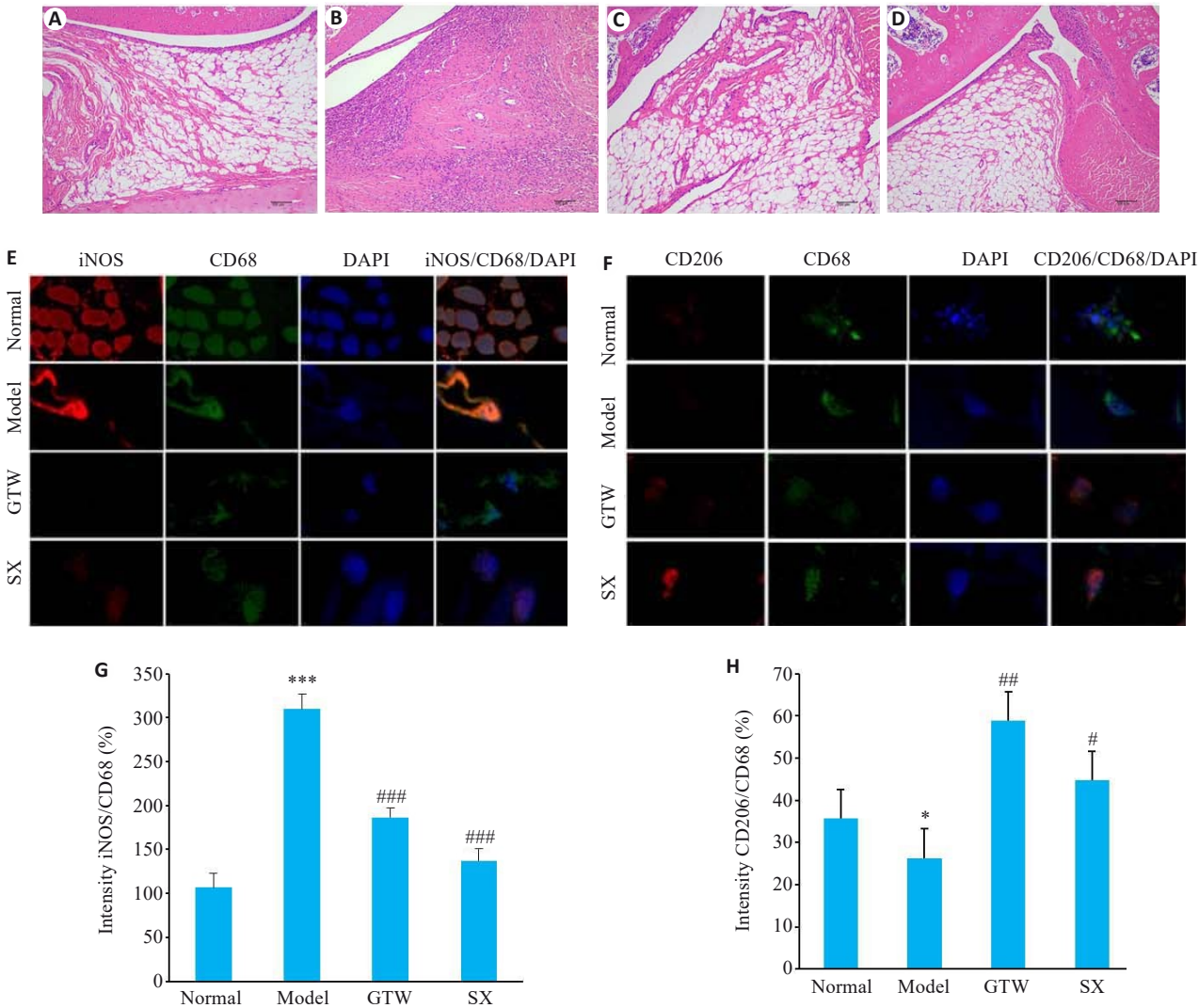


图1 各组大鼠滑膜组织HE染色及免疫荧光染色检测

Fig.1 HE and immunofluorescence staining of the synovial tissues of the rats from each group. **A-D**: HE staining of the synovial tissues in normal control, CIA model, GTW, SX groups, respectively (Original magnification: $\times 100$). **E, F**: Immunofluorescence staining of M1 macrophages (iNOS, red) and M2 macrophages (CD206, red) (Scale bar=10 μ m). **G, H**: Quantitative analysis of fluorescence intensity ratio of iNOS⁺ or CD206⁺ to CD68⁺ (*Mean±SD, n=3*). **P*<0.05, ****P*<0.001 vs normal group; [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01, ^{###}*P*<0.001 vs model group.

2.4 SX对血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的影响

ELISA检测结果(表4)显示,与Normal组相比,连续给药21 d后,Model组TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量上升,差异有统计学意义(*P*<0.01)。与Model组相比,GTW组、SX组TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量显著降低(*P*<0.01)。

2.5 SX对CIA大鼠模型滑膜组织糖酵解的影响

与Normal组比较,Model组滑膜组织中乳酸含量明显升高(*P*<0.05);SX组与GTW组较Model组滑膜组织中乳酸含量明显降低(*P*<0.05,图2A)。

RT-PCR检测结果显示(图2B):连续给药21 d后,

表4 SX对CIA大鼠炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6的影响
Tab.4 Effect of SX on serum levels of TNF-α, IL-1β, and IL-6 in CIA rats (n=8, Mean±SD)

Group	TNF-α	IL-1β	IL-6
Normal	30.81±4.56	12.14±1.85	32.79±4.26
Model	62.86±5.68**	54.52±4.51**	79.78±5.35**
GTW	39.82±5.88 [#]	32.36±3.97 [#]	42.65±6.31 [#]
SX	32.62±6.43 ^{##}	30.89±2.36 ^{##}	33.52±4.54 ^{##}

**P<0.01 vs the Normal group; [#]P<0.05, ^{##}P<0.01 vs the Model group.

相较于Normal组,Model组大鼠膝关节滑膜组织中HK2、HIF-1α、PDK1 mRNA表达水平显著升高(P<0.01)。与Model组相比,SX组与GTW组HK2、HIF-1α、PDK1 mRNA表达水平显著降低(P<0.01)。

Western blotting实验结果显示(图2C、D):连续给

药21 d后,相较于Normal组,Model组大鼠膝关节滑膜组织中HK2、HIF-1α、PDK1蛋白表达水平增高(P<0.001, P<0.01)。与Model组相比,SX组与GTW组HK2、HIF-1α、PDK1蛋白表达下降(P<0.001, P<0.01)。

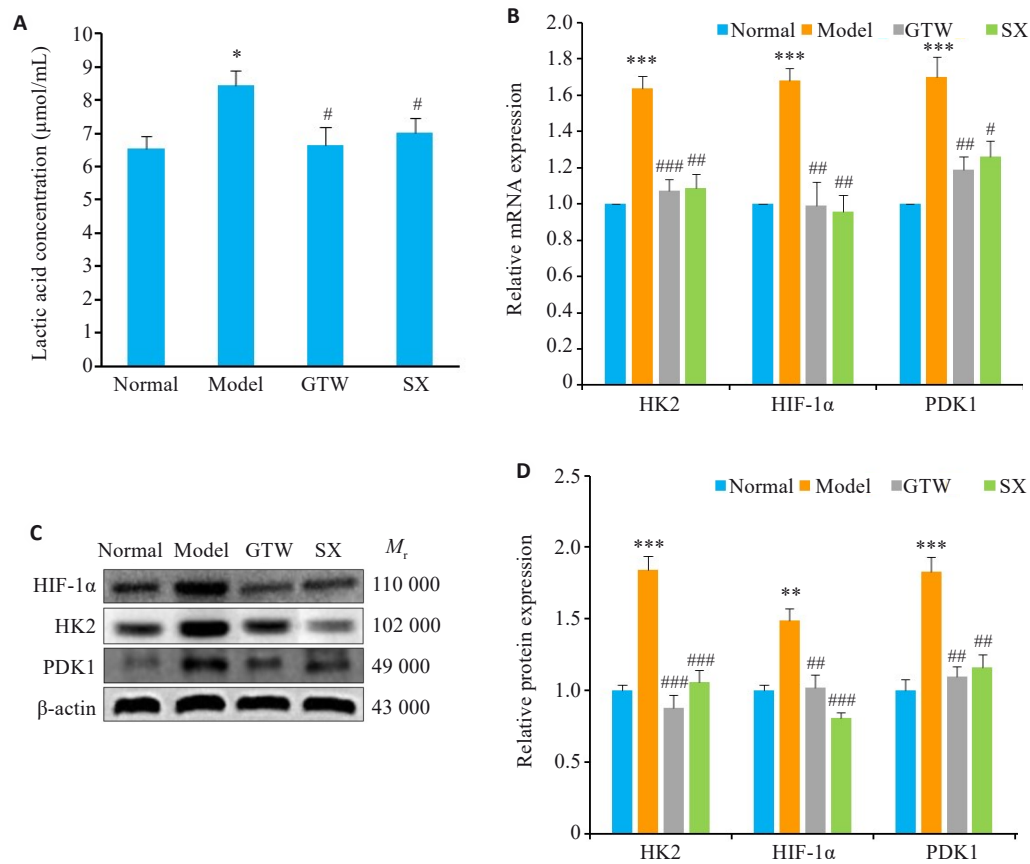


图2 SX对CIA大鼠模型滑膜组织糖酵解的影响
Fig.2 Effects of SX on glycolysis in the synovial tissues of CIA rats. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs the normal group; [#]P<0.05, ^{##}P<0.01, ^{###}P<0.001 vs the model group.

2.6 SX入血活性成分及作用靶点鉴定

通过UHPLC-MS获取SX含药血清的质谱数据(图3),识别了29种主要的入血活性成分(表5)。综合Swiss Target Prediction以及PharmMapper结果后共计获得了756个靶点。

2.7 RA相关靶基因的鉴定

主成分分析(PCA)结果显示(图4A、B),标准化有

效消除了因不同批次来源导致的样本聚集偏差。差异表达分析确定了4506个在RA中有显著改变的基因。这些表达变化通过火山图和热图可视化(图4C、D)。对于加权基因共表达网络分析(WGCNA)识别出8个不同的基因共表达模块(图4E)。模块与性状关联分析表明,红色模块与疾病状态呈现最强的正相关性(P<0.05)。通过对DEGs和来自WGCNA的模块基因

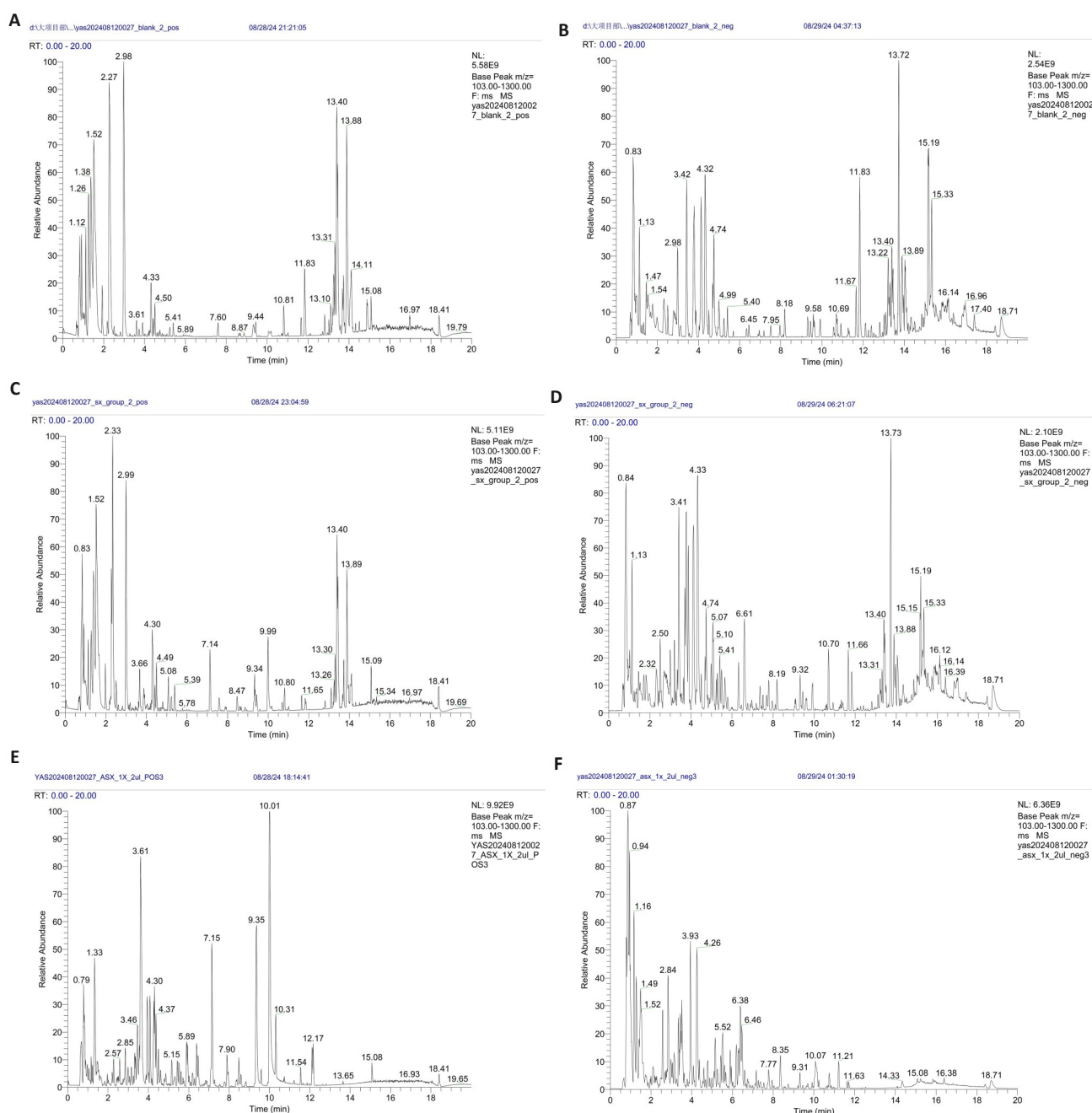


图3 正离子模式(A、C、E)和负离子模式(B、D、F)下的空白血清、四大血含药血清样品和四大血提取物的总离子流色谱图

Fig.3 Total ion current chromatograms of blank serum, SX-mediated rat serum, and SX extract in positive ion mode (A, C, E) and negative ion mode (B, D, F).

取交集后,鉴定出最终的908个RA相关基因(图4F)。将巨噬细胞极化、糖酵解以及RA核心靶点及四大血作用靶点取交集后,共计获得了38个待选基因(图4G)。

2.8 机器学习

RF+Stepglm[forward]模型在训练和验证阶段均表现出卓越的性能和准确性(图5A),鉴定出9个关键基因:HIF1A、STAT1、MCL1、AURKA、CDK1、PNP、PLK4、MAPT、FPR2。ROC曲线分析证明了这些核心基因均具备有效的疾病区分能力,其中全部基因的AUC超过0.8(图5B、C)。鉴于HIF-1 α 在组织中鉴定出的特异性表达强度,我们将其选为后续研究的重点对象。

2.9 AlphaFold3预测及基于单细胞数据的虚拟敲除

将HIF-1 α 的核酸序列与PDK1蛋白质序列提交用于结构预测,ipTM=0.9、pTM=0.52,结构可信度较高且互作用较强,且核心区域呈深蓝色,提示pLDDT置信度>90,佐证了结构的可信度(图6A)。

通过对细胞进行聚类分析,我们共注释出了八种主要的细胞亚群,包括内皮细胞、成纤维细胞、天然淋巴样细胞、T细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞、B细胞以及一群增殖细胞(图6B)。

利用scTenifoldKnn方法模拟了关键基因HIF1A与PDK1的敲除(图6C、D),最终分析确定了受HIF1A

表5 四大血入血成分解析结果
Tab.5 Results of the analysis of blood-borne components of Sidaxue

Serial number	t (min)	Component	Lon species	Measured value (m/z)	Score
1	3.32	Fumaritine	[M+H] ⁺	356.15	0.99
2	3.46	Heriguard	[M+H C ₇ H ₁₂ O ₆] ⁺	163.04	0.99
3	3.55	Procyanidin B2	[M+H] ⁺	579.15	0.99
4	3.63	Magnoflorine	[M] ⁺	342.17	0.93
5	4.26	3-O-Feruloylquinic acid	[M+H] ⁺	369.12	0.99
6	4.31	Glu-Thr	[M+H] ⁺	249.11	0.93
7	5.16	N-Malonyltryptophan	[M+H] ⁺	291.10	0.83
8	5.43	7-hydroxy-4-(methoxymethyl)coumarin	[M+H] ⁺	207.06	0.89
9	5.51	Brutieridin	[M+H C ₁₈ H ₂₈ O ₁₃] ⁺	303.09	0.92
10	5.90	4-Hydroxy-7-methyl-2-[2-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxypropan-2-yl]-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-5-one	[M+H] ⁺	439.16	0.97
11	7.15	Toddalolactone	[M+H] ⁺	309.13	1.00
12	7.89	Visamminol	[M+H] ⁺	277.11	0.96
13	8.48	Skimmianine	[M+H] ⁺	260.09	0.95
14	9.34	Isopimpinellin	[M+H] ⁺	247.06	1.00
15	10.01	Pimpinellin	[M+H] ⁺	247.06	1.00
16	12.12	Phellopterin	[M+H] ⁺	301.11	0.98
17	2.84	Neochlorogenic acid	[M-H] ⁻	353.09	0.97
18	3.36	Wikstrol A	[M-H C ₆ H ₆ O ₃] ⁻	417.10	0.73
19	3.95	Catechin	[M-H] ⁻	289.07	1.00
20	4.09	2-beta-D-Glucopyranosyloxy-4-methoxy-cis-cinnamic acid	[M-H-H ₂ O] ⁻	337.09	0.98
21	4.37	(-)-Lyoniresinol 9'-O-glucoside	[M-H] ⁻	581.22	0.95
22	4.79	N-Acetyl-L-phenylalanine	[M-H] ⁻	206.08	0.98
23	5.15	Asn-Asn	[M-H] ⁻	245.09	0.73
24	5.51	Hesperidin	[M-H] ⁻	609.18	1.00
25	6.32	Azelaic acid	[M-H] ⁻	187.10	1.00
26	6.60	Salicylic acid	[M-H] ⁻	137.02	1.00
27	8.35	1-O-[(2beta,3beta,5xi,9xi,18xi)-2,23-Dihydroxy-28,29-dioxo-3-(beta-D-xylopyranosyloxy)olean-12-en-28-yl]-beta-D-glucopyranose	[M-H] ⁻	825.43	0.99
28	10.76	Mocimycin	[M-H] ⁻	795.42	0.97
29	11.22	Medicagenic acid 3-O-beta-D-glucoside	[M-H] ⁻	663.37	0.97

影响的237个基因、受PDK1影响的184个基因。2个关键基因虚拟敲除的基因富集分析中最重要的通路包括TNF信号传导通路、NF-κB信号通路等生物过程。

2.10 分子对接

对上述29种主要入血成分与HIF1A进行分子对接，vina score均小于-5,提示它们有良好的结合潜力(表6)。

3 讨论

RA的病理机制复杂,涉及滑膜缺氧微环境失衡、糖酵解代谢重编程及巨噬细胞极化等。临床常用抗RA药物虽能缓解症状,但存在肝毒性、生殖系统损伤等不良反应^[16],因此挖掘低毒高效的民族医药活性成分具有

重要临床价值。SX作为苗医传统验方,前期研究已证实其可抑制CIA大鼠血管增生,缓解CIA大鼠模型炎症反应^[17],但具体分子机制尚待阐明。本研究通过整合体内实验与多组学分析,揭示了SX通过靶向抑制HIF-1α/PDK1信号轴,纠正滑膜组织异常的糖酵解重编程,驱动巨噬细胞由促炎M1型向抗炎M2型极化,从而治疗RA的分子机制。

在RA病程中,长期炎性刺激逐渐导致正常滑膜细胞能量代谢以糖酵解为主,合成大量乳酸,进一步增强炎症因子的合成和释放,加速RA的发展^[33],HIF-1信号通路是细胞应对缺氧微环境调控代谢适应与生存的核心信号通路,并且HIF-1α可激活有氧糖酵解代谢重编

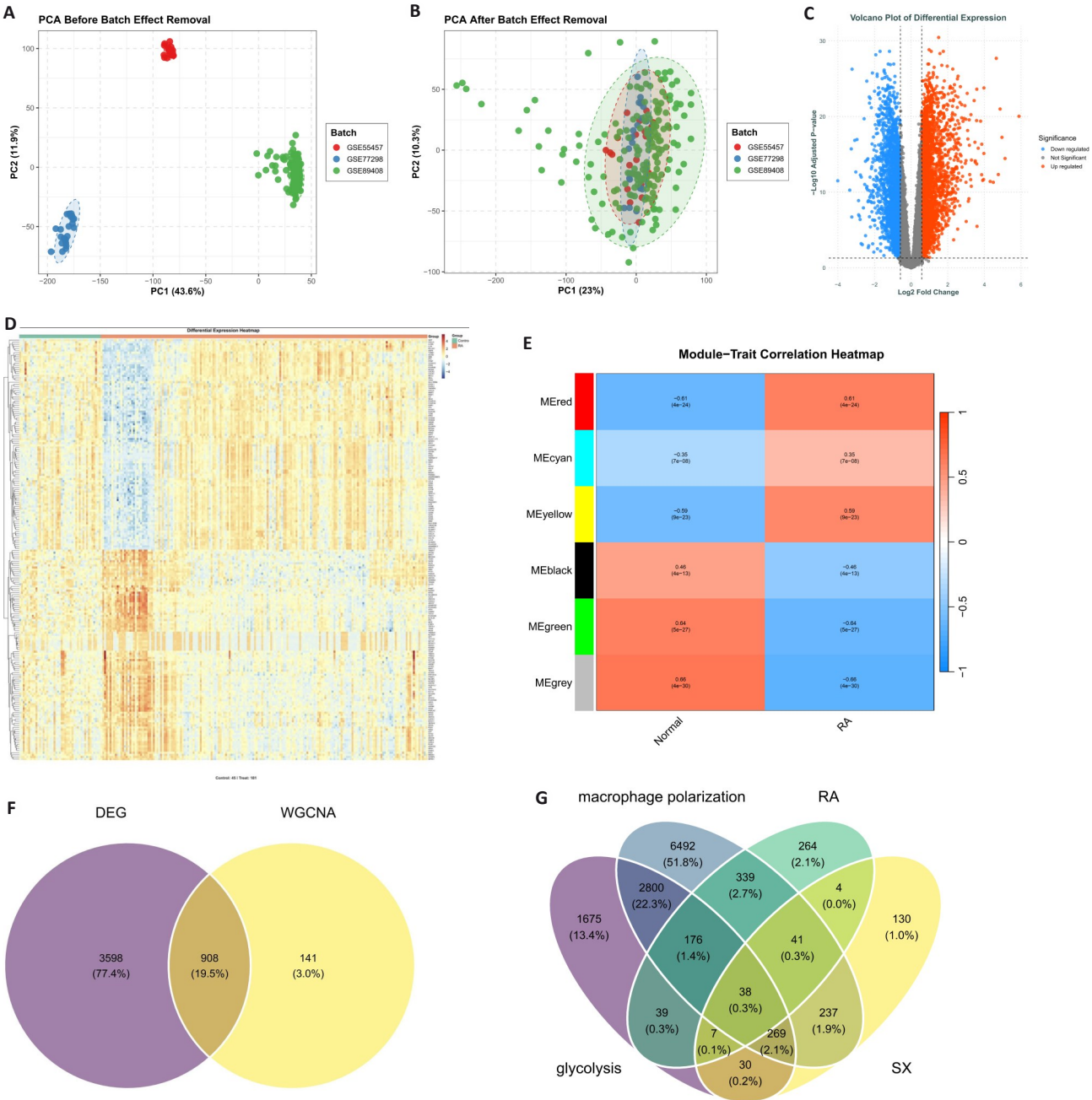


图4 类风湿关节炎相关靶点基因的确定

Fig.4 Determination of rheumatoid arthritis (RA)-related target genes. **A:** Principal component analysis (PCA) of samples before batch effect correction. **B:** PCA after batch effect correction. **C:** Volcano plot of differentially expressed genes (DEGs) in RA synovium. **D:** Heatmap of the DEGs. **E:** Module-Trait Correlation Heatmap by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). **F:** Intersection analysis of the DEGs and WGCNA key module genes. **G:** Intersection analysis of the targets of the blood-entering components of SX, RA core genes, glycolysis, and macrophage polarization targets.

程促进骨形成^[34, 35]。研究表明^[36], HIF-1 α 可直接结合 HK2 基因的启动子, 激活其转录, 促进 HK2 蛋白表达, 继而增强细胞对葡萄糖的捕获和糖酵解起始效率。HIF-1 α 是 PDK1 的核心上游调控因子, 可直接结合 PDK1 基因的高反应元件并激活其转录, 促使 PDK1 表达升高。而高表达的 PDK1 能有效抑制线粒体中的丙酮酸脱氢酶复合物, 使糖代谢流向有氧糖酵解^[34], 为巨噬细胞的促炎功能提供了快速的能量和合成原料。而在本研究中, 通过 HE 切片、AI 评分及足肿度结果, 确

定了 SX 可以有效缓解类风湿关节炎炎症, 并且 SX 能下调 CIA 大鼠滑膜组织中 HK2、HIF-1 α 、PDK1 mRNA 和蛋白表达水平。与 Model 组相比, SX 组中滑膜组织乳酸含量明显减少。表明 SX 具有抑制滑膜组织糖酵解重编程的作用, 其机制可能与 HIF-1 α /PDK1 通路有关, 而 HK2 也是该过程的关键因子。

代谢重编程与巨噬细胞表型密切相关, RA 患者体内存在 M1/M2 巨噬细胞比例失衡^[37]。糖酵解的过度激活会使 M1 型巨噬细胞可分泌多种促炎症细胞因子, 如

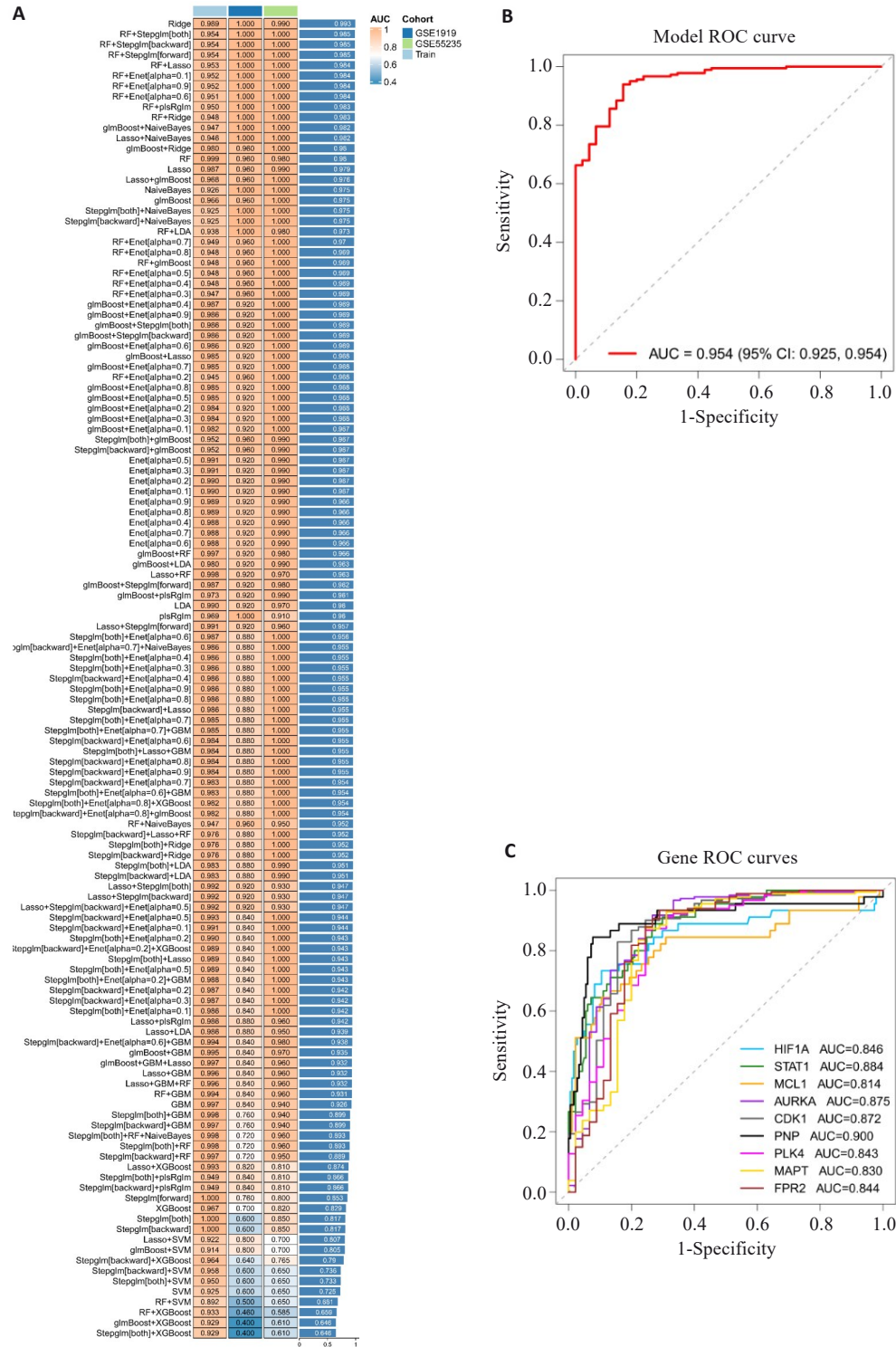


图5 类风湿关节炎核心基因鉴定

Fig.5 Identification of the core genes associated with RA. **A**: Performance evaluation of 127 predictive models constructed using 12 classic machine learning algorithms. **B**: ROC curve of the optimal RF+Stepglm [forward] model. **C**: Single-gene ROC curve analysis of the 9 core genes.

IL-1 β 、IL-6、TNF- α ，并上调CD86和CD80、iNOS等表达，促进炎症的发生发展^[38]。而M2型巨噬细胞可分泌白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子 β (TGF- β)等抗炎细胞因子，同时上调精氨酸酶1(Arg1)、CD206等表达，发挥抗炎和免疫调节作用^[39]。而在本实验中SX组大鼠血清中巨噬细胞M1型极化相关炎症因子TNF- α 、

IL-1 β 、IL-6表达水平均下降，这说明SX不仅有抗炎作用，还可以抑制巨噬细胞M1型极化。同时，SX组巨噬细胞中CD206荧光强度增强，说明SX可促进CIA大鼠滑膜组织中的巨噬细胞向M2型极化。以上结果提示：SX可能通过抑制CIA大鼠滑膜组织HIF-1 α /PDK1信号通路的激活，减少糖酵解的发生，促进巨噬细胞M2

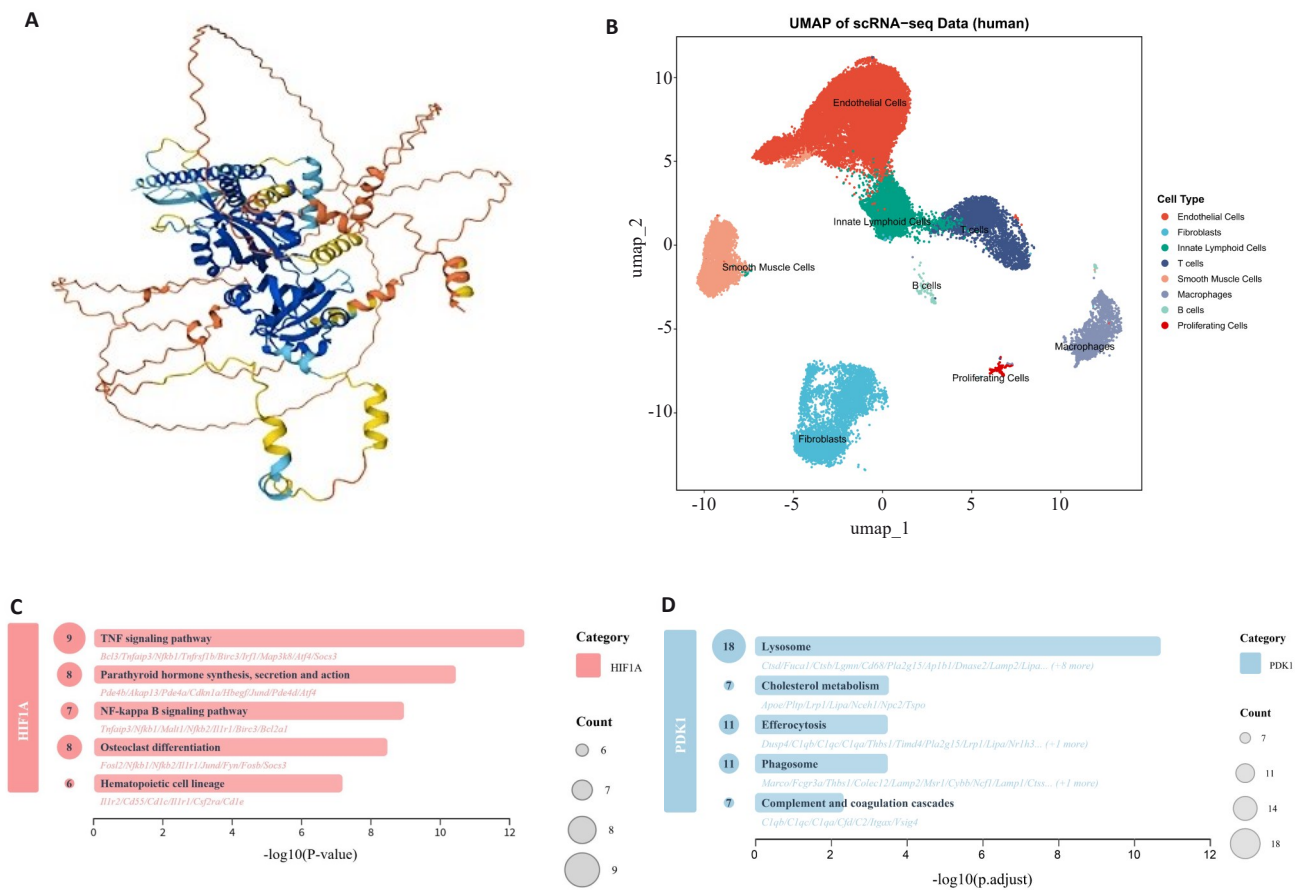


图6 蛋白互作及虚拟敲除结果图

Fig.6 Results of protein-protein interaction and virtual knockout. **A:** AlphaFold3 predicts the interaction structure between HIF-1 α and PDK1 proteins. **B:** Single-cell clustering annotation of human synovial tissue. **C:** Enrichment analysis of the downstream perturbed genes after virtual knockout of HIF1A. **D:** Enrichment analysis of downstream perturbed genes after virtual knockout of PDK1.

型极化,从而缓解大鼠滑膜组织的炎性浸润情况。

为进一步探究具体有效的入血活性成分,本研究通过UHPLC-MS鉴定SX的入血成分,并基于网络药理学和转录组学分析、机器学习的整合方法,锁定了HIF1A作为连接SX药效与糖酵解/巨噬细胞极化的核心靶点。利用AlphaFold3预测互作结构和分子对接证实了SX活性成分与HIF-1 α /PDK1轴的强亲和力。最后基于scTenifoldKnk算法,对关键基因进行虚拟敲除,以探究其在巨噬细胞中的下游调控网络。结果进一步揭示了HIF1A是SX治疗RA,并连接糖酵解与巨噬细胞极化的最关键核心靶点,其机制可能涉及通过调控HIF-1 α /PDK1互作轴,进而影响下游TNF/NF- κ B通路。与此同时,分子对接结果显示,SX的入血活性成分橙皮苷(Hesperidin)与HIF1A有较强结合活性,并且已有研究证实,橙皮苷可通过调控HIF-1 α 相关通路,促进高糖诱导的肾小球系膜细胞自噬、凋亡,抑制其增殖及炎症反应^[40]。

综上所述,本研究首先以SX全方进行体内干预实

验,初步明确其抗RA药效;鉴于复方治疗RA通常受多靶点、多通路复杂网络协同调控,为进一步探究药物有效活性成分,我们通过UHPLC-MS鉴定出29种原型入血成分,并结合网络药理学与机器学习分析,证实其核心作用靶点为HIF1A,且靶点预测结果与体内药效趋势高度吻合,提示上述入血成分可能是SX发挥抗RA效应的关键物质基础。同时,本研究还整合了AlphaFold3、分子对接及基因虚拟敲除等多维技术,旨在从多视角揭示SX药效机制,为SX的临床应用提供新依据。然而,SX治疗RA是一个受复杂网络严密调控的过程,后续的研究可利用原型入血成分鉴定结果,开展多学科、多维度的交叉研究,进一步分离、纯化关键成分,在巨噬细胞等体外模型及动物模型中,通过干预关键因子并解析其相互作用关系,对HIF-1 α /PDK1的靶向机制进行深度验证,同时针对关键基因虚拟敲除后基因富集得到的TNF信号通路、NF- κ B信号通路等开展系统研究,从而丰富SX治疗RA的理论基础及科学依据,促进中医药现代化发展。

表6 分子对接结果
Tab.6 Results of molecular docking

Blood-entering component	Vina score for HIF1A(kcal/mol)
(-)-Lyoniresinol 9'-O-glucoside	-7.70
2-beta-D-Glucopyranosyloxy-4-methoxy-cis-cinnamic acid	-6.70
1-O-[(2beta,3beta,5xi,9xi,18xi)-2,23-Dihydroxy-28,29-dioxo-3-(beta-D-xylopyranosyloxy)olean-12-en-28-yl]-beta-D-glucopyranose	-9.00
3-O-Feruloylquinic acid	-7.70
2-(4-Hydroxy-7-methyl-5-oxo-2,3-dihydro-5H-furo[3,2-g]chromen-2-yl)propan-2-yl hexopyranoside	-8.70
Wikstrol A	-8.60
7-hydroxy-4-(methoxymethyl)coumarin	-6.00
Asn-Asn	-6.30
Azelaic acid	-5.30
Brutieridin	-8.70
Catechin	-7.50
Fumaritine	-7.80
Glu-Thr	-5.80
Heriguard	-7.80
Hesperidin	-9.30
Isopimpinellin	-6.60
Magnoflorine	-8.10
Medicagenic acid 3-O-beta-D-glucoside	-10.10
Mocimycin	-8.90
N-Acetyl-L-phenylalanine	-6.40
Neochlorogenic acid	-7.70
N-Malonyltryptophan	-7.30
Phellopterin	-7.30
Pimpinellin	-6.70
Procyanidin B2	-8.50
Salicylic acid	-6.30
Skimmianine	-6.60
Toddalolactone	-6.70
Visamminol	-7.30

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Di Matteo A, Bathon JM, Emery P. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2023, 402(10416): 2019-33.

[2] Parab A, Bhatt LK. T-cell metabolism in rheumatoid arthritis: focus on mitochondrial and lysosomal dysfunction[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2024, 46(3): 378-84.

[3] Xu J, Feng ZT, Chen SX, et al. Taxol alleviates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting the formation of microvessels[J]. Clin Rheumatol, 2019, 38(1): 19-27.

[4] Touhidul Islam SM, Won J, Khan M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 drives divergent immunomodulatory functions in the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. Immunology, 2021, 164(1): 31-42.

[5] Damerau A, Kirchner M, Pfeiffenberger M, et al. Metabolic reprogramming of synovial fibroblasts in osteoarthritis by inhibition of pathologically overexpressed pyruvate dehydrogenase kinases [J]. Metab Eng, 2022, 72: 116-32.

[6] Škorja Milić N, Dolinar K, Miš K, et al. Suppression of pyruvate dehydrogenase kinase by dichloroacetate in cancer and skeletal muscle cells is isoform specific and partially independent of HIF-1α [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8610.

[7] 雷海桃, 王金海, 高韵奇, 等. 己糖激酶2在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2025, 31(1): 90-5.

[8] Chen JX, Li GR, Sun DJ, et al. Research progress of hexokinase 2 in inflammatory-related diseases and its inhibitors[J]. Eur J Med Chem, 2024, 264: 115986.

[9] Su PF, Li O, Ke K, et al. Targeting tumor-associated macrophages: Critical players in tumor progression and therapeutic strategies (Review)[J]. Int J Oncol, 2024, 64(6).

[10] Cersosimo F, Lonardi S, Bernardini G, et al. Tumor-associated

- macrophages in osteosarcoma: from mechanisms to therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5207.
- [11] Peng Y, Zhou MX, Yang H, et al. Regulatory mechanism of M1/M2 macrophage polarization in the development of autoimmune diseases[J]. *Mediat Inflamm*, 2023, 2023: 8821610.
- [12] Kzhyshkowska J, Shen JX, Larionova I. Targeting of TAMs: can we be more clever than cancer cells? [J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21(12): 1376-409.
- [13] Siouti E, Andreakos E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165: 152-69.
- [14] 余 芸, 蔡伟伟, 周 静, 等. 代谢重编程调控巨噬细胞极化及其在类风湿关节炎中的作用[J]. *药学报*, 2020, 55(9): 2027-34.
- [15] Kumar V. Inflammation research sails through the sea of immunology to reach immunometabolism[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 128-45.
- [16] 欧慧萍, 吴趋荟, 沈 泉, 等. 中医药防治类风湿关节炎的作用机制研究进展[J]. *吉林中医药*, 2021, 41(12): 1685-8.
- [17] 袁桃花, 黄宇键, 李佳豪, 等. 贵州苗药方“四大血”对CIA大鼠滑膜血管增生的作用机制[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2019, 40(5): 824-9, 843.
- [18] 吴 宁, 曾 佳, 王时敏, 等. 苗药四大血对大鼠佐剂性关节炎作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(2): 120-3.
- [19] 梁 玺, 覃 淇, 张艺馨, 等. 苗药验方“四大血”对类风湿性关节炎大鼠关节炎的作用及机制[J]. *贵州医科大学学报*, 2023, 48(7): 759-66.
- [20] 吴 宁, 袁桃花, 姬进忠, 等. 苗药验方四大血对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡和焦亡的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(10): 1473-83.
- [21] Wu N, Yuan TH, Yin ZX, et al. Network pharmacology and molecular docking study of the Chinese Miao medicine sidaxue in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 435-66.
- [22] 马麦丽娜, 李喜媛, 马晓飞, 等. 中医药调控M1/M2巨噬细胞极化治疗类风湿关节炎研究进展[J]. *中国医药导刊*, 2025, 27(8): 780-5.
- [23] 胡白飞, 高倩茹, 胡海明, 等. 中药物物质基础研究进展: 从化学物质组学到肠道转化物质组学[J]. *中国生物工程杂志*, 2026, 46(4): 142-54.
- [24] 陈旺宇, 节笑笑, 陈甜甜, 等. 中药血清药物化学研究现状[J]. *中国医药科学*, 2023, 13(4): 26-9, 86.
- [25] 彭 鹏, 李佳欣, 杨新月, 等. 基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS分析泻白散在正常和慢性支气管炎小鼠体内的入血成分及其代谢差异[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(1): 219-27.
- [26] 郭 帅, 褚小磊, 沈 桐, 等. 两种佐剂制备CIA大鼠模型的效果比较[J]. *蚌埠医学院学报*, 2022, 47(3): 281-4.
- [27] 王 璵, 尹 葳, 蔡雪阳, 等. 基于SOCS1/STAT3信号通路探究红禾麻乙酸乙酯部位对Ⅱ型胶原诱导关节炎大鼠的影响[J]. *中成药*, 2023, 45(7): 2364-7.
- [28] 王远迎, 戴兴月, 陈春彦, 等. 苗药验方四大血可减少关节炎大鼠滑膜组织的坏死性凋亡和血管新生: 基于抑制RIPK1/RIPK3/MLKL通路[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(12): 1774-82.
- [29] Li XJ, Li FX, Jing WY, et al. Effect of heat-reinforcing needling on hypoxia-inducible factor 1 α and glycolysis activity in rabbits with cold syndrome of rheumatoid arthritis[J]. *Acupunct Res*, 2024, 49(6): 585-93.
- [30] Wu TZ, Hu EQ, Xu SB, et al. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. *Innovation*, 2021, 2(3): 100141.
- [31] Gu ZG, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(18): 2847-9.
- [32] Osorio D, Zhong Y, Li GX, et al. scTenifoldKnn: an efficient virtual knockout tool for gene function predictions *via* single-cell gene regulatory network perturbation[J]. *Patterns*, 2022, 3(3): 100434.
- [33] Wang Q, Ren JH, Lin X, et al. Inflammatory stimulus-responsive polymersomes reprogramming glucose metabolism mitigates rheumatoid arthritis[J]. *Biomaterials*, 2025, 312: 122760.
- [34] 尹煜辉, 李 琰, 齐保玉, 等. 基于有氧糖酵解探究补骨生髓方含药血清通过介导HIF-1 α 促进MC3T3-E1细胞成骨分化的作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(5): 818-24.
- [35] Jin ZX, Kho J, Dawson B, et al. Nitric oxide modulates bone anabolism through regulation of osteoblast glycolysis and differentiation[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(5): e138935.
- [36] Pei XY, Lu LJ, Huang ZQ, et al. Activation of M1 macrophages promotes diabetic kidney disease by modulating glycolysis *via* HIF-1 α -HK2 signaling pathway[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2025, 17(1): 362.
- [37] Tardito S, Martinelli G, Soldano S, et al. Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: a systematic review[J]. *Autoimmun Rev*, 2019, 18(11): 102397.
- [38] Ye L, Wen ZY, Li YQ, et al. Interleukin-10 attenuation of collagen-induced arthritis is associated with suppression of interleukin-17 and retinoid-related orphan receptor γ t production in macrophages and repression of classically activated macrophages[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(2): R96.
- [39] Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism[J]? *Front Immunol*, 2014, 5: 603.
- [40] 李 森, 李 瑞, 杨晓芳, 等. 橙皮苷调控mTOR/HIF-1 α 通路对高糖诱导的肾小球系膜细胞自噬的影响[J]. *天津中医药*, 2025, 42(1): 78-83.

(编辑:余诗诗)