

· 临床论著 ·

温化蠲痹方对类风湿关节炎患者外周血单个核细胞微小 RNA-146a、DNA 甲基化转移酶表达的影响

刘喜德¹ 刘 敏¹ 蔡 龙¹ 周红娟¹ 王珊珊¹ 叶丽红¹
杜 静¹ 王安琪² 贺利群² 郑琳琳²

摘要 **目的** 观察温化蠲痹方对活动期类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)微小 RNA-146a(miRNA-146a)、DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)表达影响及 miRNA-146a 与 DNMTs 表达的相关性。**方法** 采用随机数字表法,将 60 例 RA 患者随机分为两组:中药温化蠲痹方加西药治疗组(简称治疗组,30 例)及对照组(30 例)。其中对照组口服甲氨蝶呤片(MTX,每周 1 次,每次 7.5 mg),来氟米特片(LEF,每天 1 次,每次 10 mg),美洛昔康片(每天 1 次,每次 7.5 mg)。治疗组在对照组治疗的基础上,加用温化蠲痹方,每天 1 剂,分 2 次口服,疗程 12 周。观察两组临床疗效、治疗前后症状、体征,包括中医证候疗效分析、健康状况评估(HAQ 评分)、疾病活动指数(DAS28)、患者疼痛评估(VAS 评分)、晨僵时间等,检测血沉(ESR)、C 反应蛋白(CRP)、类风湿因子(RF)、抗环瓜氨酸肽抗体(抗 CCP 抗体)、血小板(PLT)计数,运用实时定量 PCR 方法检测外周血 miRNA-146a 与 DNMTs 表达。**结果** 治疗组总有效率[90.0%(27/30)]优于对照组[80.0%(24/30), $P < 0.05$]。与对照组比较,治疗组 ACR20、ACR50 达标率(分别为 43.3%、36.7%)高于对照组(33.3%、26.7%, $P < 0.05$);治疗组 DAS28、HAQ 评分、VAS 评分降低,关节肿胀数、关节压痛数减少、晨僵时间缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$);miRNA-146a、DNMTs、ESR、CRP、RF、抗 CCP 抗体、PLT 计数差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);活动期 RA 患者 PBMCs DNMTs 表达水平降低($P < 0.01$)、miRNA-146a 表达水平升高($P < 0.01$),miRNA-146a 表达水平与 DNMT1($r = -0.362$, $P = 0.04$)、DNMT3a($r = -0.566$, $P = 0.01$)、DNMT3b($r = -0.382$, $P = 0.03$)呈负相关。治疗组出现肝酶升高、胃肠道反应等不良反应明显降低($P < 0.05$)。**结论** 中药温化蠲痹方加西药治疗 RA 疗效优于单纯西药治疗组,其机制可能与下调活动期 RA 患者 miRNA-146a 表达、上调 DNMTs 表达有关。

关键词 温化蠲痹方;类风湿关节炎;miRNA-146a;DNA 甲基化转移酶

Effects of Wenhua Juanbi Recipe on the Expressions of miRNA-146a and DNA Methyltransferases in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Rheumatoid Arthritis LIU Xi-de¹, LIU Min¹, CAI Long¹, ZHOU Hong-juan¹, WANG Shan-shan¹, YE Li-hong¹, DU Jing¹, WANG An-qi², HE Li-qun², and ZHENG Lin-lin² 1 Department of Athroopathy, Zhejiang Provincial Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Hangzhou (310003); 2 Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Wenhua Juanbi Recipe (WJR) on the expressions of miRNA-146a and DNA methyltransferases (DNMTs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with active rheumatoid arthritis (RA), and the correlation between miRNA-146a and DNMTs. **Methods** Sixty RA patients were assigned to the treated group and the control group by random

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No. LY17H270004, No. LY12H29008);浙江省中医药科技计划项目(No. 2012ZB121, No. 2015ZA143);杭州市医药卫生科技计划项目(No. 2014A37);杭州市科技发展计划(No. 20160533B45)

作者单位:1.浙江省中西医结合医院关节病科(杭州 310003);2.浙江中医药大学第二临床医学院(杭州 310053)

通讯作者:刘喜德, Tel: 0571-56108429, E-mail: liuxide2001@sohu.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20180917. 287

number table, 30 in each group. Patients in the control group took methotrexate (MTX, 7.5 mg each time, once per week), leflunomide (LEF, 10 mg each time, once per day), and meloxicam (Mobic, 7.5 mg each time, once per day). Those in the treated group took WJR additionally, one dose per day, taken in two portions. The therapeutic course for both groups was 12 weeks. Clinical effect, symptoms and physical signs [(including efficacy analyses of TCM symptoms and syndrome, Health Assessment Questionnaire (HAQ score), disease activity score (DAS 28), visual analogue scale (VAS), morning stiffness time], and laboratory indices [erythrocyte sedimentation rate (ESR), C reactive protein (CRP), rheumatoid factor (RF), anti-CCP antibody, platelet count (PLT)] were observed in two groups after treatment. The expression levels of microRNA-146a and DNMTs in PBMCs were detected by real-time quantitative PCR assay. Results The total effective rate was higher in the treated group than in the control group [90.0% (27/30) vs 80.0% (24/30), $P < 0.05$]. The standard rates of ACR20 and ACR50 were higher in the treated group than in the control group (43.3% vs 33.3%, 36.7% vs 26.7%, $P < 0.05$). DAS28, HAQ score, and VAS decreased, swollen joints number and tender joints number were reduced, morning stiffness time was shortened in the treated group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was statistical difference in miRNA-146a, DNMTs, ESR, CRP, RF, anti-CCP antibody, or PLT between the two groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of DNMTs decreased and the expression of miRNA-146a increased in PBMCs of active RA patients ($P < 0.01$). miRNA-146a was negatively correlated with DNMT1 ($r = -0.362$, $P = 0.04$), DNMT3a ($r = -0.566$, $P = 0.01$), and DNMT3b ($r = -0.382$, $P = 0.03$). Increased peptic enzymes and gastrointestinal reactions decreased significantly in the treated group ($P < 0.05$). Conclusions Combined therapy of WJR and Western medicines was superior to that of using Western medicines alone in treating RA. The effects were achieved possibly through down-regulating the expression of miRNA-146a and up-regulating the expression of DNMTs.

KEYWORDS Wenhua Juanbi Recipe; rheumatoid arthritis; miRNA-146a; DNA methyltransferases

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜异常增生为主要特点的全身性致畸性自身免疫性疾病。若病情控制不当,2年内50%~90%的患者会发生关节受损影像学改变,终致关节破坏、畸形^[1]。目前RA发病机制尚不甚清楚,无根治办法,研究RA发病机制及筛选有效治疗药物具有重要的临床价值。

微小RNA(miRNA)直接或间接参与了固有性和适应性免疫应答,是调节RA基因表达的表观遗传因子,可能在自身免疫性疾病发生发展过程中发挥重要负调控作用,而miRNA-146a即是其中一种^[2]。DNA甲基化和组蛋白修饰异常是造成免疫耐受功能受损和RA发生的主要表观遗传学机制,表观遗传学改变可能在自身免疫反应过程中发挥重要作用^[3]。DNA甲基化调节基因表达和基因组完整性,对染色体稳定和构成影响深远^[4]。它的改变可以调节众多基因表达而与自身免疫性疾病发病关系密切^[5]。

本课题组前期对中药温化蠲痹方治疗RA进行了系列基础和临床研究,取得较满意成果^[6,7],表观遗传在同为自身免疫性疾病的RA中亦发挥重要作用^[3]。基于此,本课题组旨在通过观察RA患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PB-

MCs) miRNA-146a、DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)表达及相关性,进而探讨中药温化蠲痹方治疗RA的作用机制。

资料与方法

1 RA 西医诊断标准及中医辨证分型标准

1.1 RA 西医诊断标准 参照2010年美国风湿病学会(ACR)/欧洲抗风湿联盟(EULAR)分类标准^[8]。

1.2 关节功能分级标准 参照美国风湿病协会(ARA)1987年修订的标准^[9]。I:日常活动不受限。II:分期标准有中等强度的关节活动受限,但能满足日常活动需要。III:关节有明显活动受限,患者不能从事大多数职业或不能很好照料自己。IV:丧失活动能力或被迫卧床或只能坐在轮椅上。

1.3 RA 病情活动标准 参照欧洲风湿病防治联合会(EULAR)制定的RA疾病活动度标准^[10]:28个关节的平均疾病活性评分(DAS28): $DAS28 \geq 5.1$ 为病情高活动度、 $3.2 \leq DAS28 < 5.1$ 为病情中活动度、 $2.6 \leq DAS28 < 3.2$ 为病情低活动度、 $DAS28 < 2.6$ 为病情缓解。

1.4 中医诊断及辨证候分型标准 参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[11] RA 诊断及辨证属寒热错杂、痰瘀痹阻型,证见关节肿痛而热,遇寒痛增,疼痛夜甚,关节屈伸不利,晨僵,关节畸形,恶风寒,口干,妇女月经量少或闭经。舌质黯红,有瘀点或瘀斑,苔黄腻或少苔或黄白相间,脉细、滑、数。

2 纳入标准 (1)符合 RA 西医诊断标准及中医辨证分型标准;(2)属活动期,DAS28 $\geq$ 3.2;关节功能分级为 I、II、III 级;(3)年龄 18~65 岁,病程 1~21 年;(4)所有患者签署知情同意书。

3 排除标准 (1)近期接受糖皮质激素或抗 RA 药物治疗;(2)妊娠或哺乳期妇女;(3)合并其他结缔组织病者;(4)合并心血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病;(5)精神病患者。

4 一般资料 60 例为浙江省中西医结合医院关节病科 2015 年 4 月—2016 年 11 月就诊的活动期 RA 患者,均符合纳入标准。采用随机数字表法按照就诊顺序分为对照组 30 例,其中男性 4 例,女性 26 例,年龄 18~65 岁,平均(49.93 $\pm$ 7.23)岁,病程 1~21 年,平均(9.16 $\pm$ 4.84)年,关节功能分级:I 级 6 例,II 级 10 例,III 级 14 例。治疗组 30 例,其中男性 3 例,女性 27 例,年龄 18~65 岁,平均(50.04 $\pm$ 7.76)岁,病程 2~18 年,平均(9.23 $\pm$ 4.7)年,关节功能分级:I 级 5 例,II 级 12 例,III 级 13 例。两组患者在性别、年龄、病程、关节功能分级、病情活动度比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究经浙江省中西医结合医院伦理委员会批准[No. [2014]临审字(08)号]。

5 治疗方法 对照组:予甲氨蝶呤片(MTX,每片 2.5 mg,上海医药集团有限公司信宜制药总厂,生产批号:070375),7.5 mg/次,每周 1 次口服。来氟米特片(LEF,每片 10 mg,大连美罗制药有限公司,生产批号:34151204),10 mg/次,每天 1 次口服。美洛昔康片(每片 7.5 mg,上海勃林格殷格翰药业有限公司,生产批号:953023),7.5 mg/次,每天 1 次口服。治疗组:在口服上述西药的同时,予自拟中药温化蠲痹方(由威灵仙 30 g 防风 10 g 白芥子 10 g 忍冬藤 12 g 制僵蚕 10 g 全蝎 6 g 蜈蚣 2 条 白芷 10 g 炒薏苡仁 30 g 元胡 20 g 海桐皮 20 g 炙甘草 5 g 组成,由浙江省中西医结合医院中药房提供,每天 1 剂,由患者自行文火煎 2 次,每次煎药 30 min,得药汁总量 500 mL),分两次口服。关节疼痛明显者方中加穿山甲 3 g;关节畏寒明显加桂枝 6 g;兼有湿热者,加茵陈 10 g;兼有阴虚内热者,加知母 6 g。疗程均为 12 周。分别在用药的 0、6、12 周进行疾病活

动性评估及相关指标检测。

6 观察指标及疗效判定标准

6.1 疾病疗效评定标准 采用 ACR 制定的病情改善的 ACR 标准^[12]。ACR20:与治疗前比较,治疗后各项指标整体改善 $\geq$ 20%,ACR50:与治疗前比较,治疗后各项指标整体改善 $\geq$ 50%,ACR:与治疗前比较,治疗后各项指标整体改善 $\geq$ 70%。

6.2 中医证候改善情况 参考 2002 年《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[11]结合临床实际加以制定。临床痊愈:中医临床症状、体征消失或基本消失,证候积分减少 $>95\%$ 。显效:中医临床症状、体征明显改善,证候积分减少 70%~95%。有效:中医临床症状、体征均有好转,证候积分减少 30%~69%。无效:中医临床症状、体征无明显改善,证候积分减少 $<30\%$ 。证候积分采用尼莫地平法,计算公式:[(治疗前积分-治疗后积分)/治疗前积分] $\times 100\%$ 。

6.3 主要症状、体征改善情况 关节压痛数(对全身 28 个关节的触痛进行评估)、肿胀关节数(用简化的 28 关节计算,肿胀明显、看不见骨性标志或有积液)、晨僵时间(min)。

6.4 患者疼痛评估 采用目视 10 cm 模拟标尺法(VAS 评分)^[13]。

6.5 患者对功能的综合评价 采用健康状况评分[(HAQ)评分]^[14],由患者自己填写的调查问卷(即斯坦福健康评估问卷),除能够表示 RA 患者的生活质量外,还可以表示患者功能受限程度(包括日常 8 大类别)。

6.6 血沉(ESR)、类风湿因子(RF)、C 反应蛋白(CRP)检测 ESR 采用魏氏法,正常值为 0~20 mm/h。RF、CRP 采用生化免疫一体机,CRP 正常值为 0~3 mg/L,RF 正常值为 <20 IU/mL。

6.7 抗环瓜氨酸肽抗体(抗 CCP 抗体)及血小板(PLT) 采用酶联免疫吸附法测定(≤ 25 RU/mL 为阴性, ≥ 26 RU/mL 为阳性),PLT 采用全自动血细胞分析仪。

6.8 miRNA-146a、DNMTs 检测 取患者抗凝全血 250 μ L,加入 750 μ L Trizol 充分混匀后放入 -80°C 冰箱冷冻保存备用。Trizol 法提取总 RNA:(1)室温静置 5 min;(2)加入 250 μ L 氯仿,剧烈振荡试管 20 s;(3)10 000 r/min,离心 15 min;(4)离心后吸取上层水相至一新 EP 管中,离心时间为 5 min;(5)加入 550 μ L 异丙醇,轻轻振荡混匀, -20°C 静置 5 min;(6)14 000 r/min,离心 20 min;(7)去除异戊醇,加入 1 mL 预冷 75%乙醇溶液,轻轻混匀, 4°C ,

9 500 r/min,离心 5 min;(8)弃去乙醇,静置,让 RNA 自然风干。反转录:将总 RNA 用 RNase-free 水稀释成浓度为 2 ng/ μ L。反应体系为 30 μ L,按如下加样:Total RNA 20 μ L,5 $\times$ Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time) 6 μ L,RNase free dH₂O 4 μ L。将样本轻柔混匀,short 后进行反转录反应,条件如下:37 $^{\circ}$ C,180 min;85 $^{\circ}$ C,5 s;4 $^{\circ}$ C,终止反应。所得产品-20 $^{\circ}$ C 保存备用。miRNA-146a 反转录 cDNA:将从外周血中提取的总 RNA 用 The NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kits 反转录成 cDNA。

荧光定量 PCR 反应:15 μ L 反应体系包括:mi-croRNA-146a:5'-TGAGAACTGAATTCCATGGGTT-3'; DNMT1:上游引物:GGCTGAGATGAG-GCAAAAAG,下游引物:ACCAACTCGGTACAG-GATGC;DNMT3a:上游引物:CCGATGCTGGGGA-CAAGAAT,下游引物:CCCGTCATCCACCAAGACAC;DNMT3b:上游引物:GACTCGAAGACGCA-CAGCTG,下游引物:CTCGGTCTTTGCCGTTGT-TATAG(由 Qiagen 公司设计合成)共 1.00 μ L,模板 cDNA 2.00 μ L,2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix 7.50 μ L, RNase-free Water 4.50 μ L。在 ABI 7000 定量 PCR 仪上扩增和检测,设置反应条件:95 $^{\circ}$ C,10 min 升温;95 $^{\circ}$ C,15 s 变性;60 $^{\circ}$ C,32 s 收集荧光;共 50 个循环。选取 GAPDH 管家基因(上游引物:CGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC,下游引物:CTCCGACGCCTGCTTACCACCTTCTT)作为 DNMTs 内参照,U6(上游引物:CTCGCTTCG-GCAGCACA,下游引物:AACGCTTCACGAATTT-GCGT)作为 miRNA 内参照,所有反应体系均为 3 复孔。按如下加样:总体积 15 μ L:2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix 7.5 μ L, Forward primer (3 μ mol/L) 0.5 μ L, Reverse primer (3 μ mol/L) 0.5 μ L,RNase-free Water 4.5 μ L,Template cDNA 2 μ L。对 PCR 检测结果,计算各标本的平均 Ct 值,各标本的 Ct 值减去内参基因的 Ct 值得到该标本的 Δ Ct 值,然后再减去板间对照 Δ Ct 值得到 $\Delta\Delta$ Ct 值,最后得到 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 值,对实时定量 PCR 的结果进行相对定量分析。

6.9 安全性检测 转氨酶、肌酐、尿素氮采用全自动生化分析仪;血常规采用全自动血细胞分析仪,以上检测均由浙江省中西医结合医院中心实验室完成。

7 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,多时间点检测数据采用重复测量数据的方差分析,组内比较采用 LSD 检验,两组临床疗效比较采用秩和

检验,相关性分析采用 Spearman's 相关检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组 ACR 疗效比较 对照组患者 ACR20 达标 10 例(33.3%),ACR50 达标 8 例(26.7%),ACR70 达标 2 例(6.7%),治疗组患者 ACR20 达标 13 例(43.3%),ACR50 达标 11 例(36.7%),ACR70 达标 3 例(10.0%),两组 ACR20、ACR50 达标率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2 两组中医证候疗效比较(表 1) 对照组显效 7 例,有效 17 例,无效 6 例,总有效 24 例(80.0%)。治疗组显效 8 例,有效 19 例,无效 3 例,总有效 27 例(90.0%),治疗组总有效率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 两组 DAS28、VAS 评分、HAQ 评分比较(表 1) 与本组治疗前比较,两组治疗中、治疗后患者 DAS28、VAS 评分、HAQ 评分降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与对照组同期比较,治疗组治疗后 DAS28、VAS 评分、HAQ 评分低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 两组患者治疗前后 DAS28、VAS 评分、HAQ 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	DAS28	VAS 评分(分)	HAQ 评分(分)
对照	30	治疗前	6.32 $\pm$ 0.52	3.31 $\pm$ 1.09	0.37 $\pm$ 0.17
		治疗中	5.19 $\pm$ 0.69 *	3.07 $\pm$ 1.04 *	0.30 $\pm$ 0.16 *
		治疗后	3.95 $\pm$ 0.82 *	2.72 $\pm$ 1.01 *	0.29 $\pm$ 0.18 *
治疗	30	治疗前	6.43 $\pm$ 0.67	3.57 $\pm$ 1.57	0.38 $\pm$ 0.19
		治疗中	4.54 $\pm$ 0.42 *	3.16 $\pm$ 1.52 *	0.28 $\pm$ 0.14 *
		治疗后	2.73 $\pm$ 0.56 ** $\Delta\Delta$	2.09 $\pm$ 1.36 ** Δ	0.22 $\pm$ 0.12 ** $\Delta\Delta$

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;下表同

4 两组治疗前后主要症状、体征改善情况比较(表 2) 与本组治疗前比较,治疗中、治疗后患者关节压痛数减少、关节肿胀数减少、晨僵时间缩短均有改善($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组比较,治疗组治疗中、治疗后患者关节压痛数、关节肿胀数、晨僵时间改善优于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 两组治疗前后主要症状、体征改善情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	关节压痛数(个)	关节肿胀数(个)	晨僵时间(min)
对照	30	治疗前	15.81 $\pm$ 2.20	10.42 $\pm$ 3.75	168.83 $\pm$ 26.16
		治疗中	10.92 $\pm$ 1.37 *	7.32 $\pm$ 3.61 *	103.97 $\pm$ 23.63 *
		治疗后	7.06 $\pm$ 1.64 **	3.43 $\pm$ 0.99 **	55.16 $\pm$ 18.06 **
治疗	30	治疗前	15.27 $\pm$ 3.08	10.52 $\pm$ 2.77	172.82 $\pm$ 25.47
		治疗中	9.23 $\pm$ 1.32 * Δ	6.31 $\pm$ 2.66 *	95.85 $\pm$ 28.84 *
		治疗后	5.92 $\pm$ 1.10 ** $\Delta\Delta$	2.58 $\pm$ 1.48 ** Δ	32.73 $\pm$ 21.96 ** $\Delta\Delta$

5 两组治疗前后 ESR、CRP、RF、抗 CCP 抗体及 PLT 计数比较(表 3) 与本组治疗前比较,治疗中、治疗后 ESR、CRP、RF、抗 CCP 抗体、PLT 计数均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组同期比较,治疗组治疗中、治疗后 ESR、CRP、RF、抗 CCP 抗体、PLT 计数表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

6 两组患者治疗前后 PBMCs DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达比较(表 4) 与本组治疗前比较,两组治疗中、治疗后 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 表达水平均有不同程度升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组同期比较,治疗组治疗中、治疗后 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 表达水平升高($P < 0.05$)。

表 4 两组患者治疗前后 PBMCs DNMTs 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b
对照	30	治疗前	1.86 ± 0.89	1.54 ± 0.76	1.71 ± 0.97
		治疗中	2.33 ± 1.16 *	1.82 ± 0.79 *	2.13 ± 0.79 *
		治疗后	2.91 ± 1.25 **	2.02 ± 0.39 **	2.39 ± 1.37 **
治疗	30	治疗前	1.78 ± 0.45	1.39 ± 0.38	1.78 ± 0.42
		治疗中	2.57 ± 0.59 *△	1.93 ± 0.37 *△	2.36 ± 0.88 *△
		治疗后	3.25 ± 0.72 **△	2.35 ± 0.91 **△	2.72 ± 0.89 **△

7 两组患者治疗前后 PBMCs miRNA-146a 表达比较(表 5) 与本组治疗前比较,治疗中、后 miRNA-146a 表达水平均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组同期比较,治疗组治疗中、治疗后 miRNA-146a 表达水平更低($P < 0.05$)。

表 5 两组患者治疗前后 PBMCs miRNA-146a 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	miRNA-146a
对照	30	治疗前	1.62 ± 0.78
		治疗中	1.41 ± 0.77 *
		治疗后	0.81 ± 0.39 **
治疗	30	治疗前	1.70 ± 0.86
		治疗中	1.28 ± 0.60 *△
		治疗后	0.47 ± 0.49 **△

8 活动期 RA 患者 PBMCs DNMTs 与 miRNA-146a 表达相关性分析 活动期 RA 患者 PBMCs miRNA-146a 表达水平与 DNMT1($r = -0.362$, $P = 0.04$)、DNMT3a($r = -0.566$, $P = 0.01$)、DNMT3b($r = -0.382$, $P = 0.03$)均呈负相关。

9 不良反应 对照组出现胃肠道反应、转氨酶升高、白细胞下降、血压升高、口腔溃疡、皮疹分别为 6、7、2、2、3、1 例,治疗组分别为 3、4、1、2、2、2 例。与对照组比较,治疗组在胃肠道反应、转氨酶升高不良反应方面,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

RA 是一致畸性自身免疫性疾病,尚无根治的措施,中医药治疗 RA 具有一定的优势^[7]。本虚标实,寒热错杂,痰瘀痹阻为活动期 RA 患者主要病因病机,故采用温经清化之治法,拟温化蠲痹方,主要药物组成有防风、白芥子、威灵仙、僵蚕、全蝎、蜈蚣、白芷、忍冬藤等。方中防风祛风解表、胜湿止痛,为“除风去湿仙药”,威灵仙温经祛风通络,二者共为君药;白芥子性温,化痰散结消肿,忍冬藤性寒,能清热除痹、活血化瘀,三药合用,清热痹,化痰瘀,共为臣药;僵蚕、全蝎、蜈蚣均为血肉有情之品,有消肿止痛之功,三药配伍,剔络搜邪,白芷通络消肿止痛,以上四药共为佐药。全方配伍寒温并用,痰瘀并治,具有温通经络、祛瘀化痰、化湿的功效,使寒散、湿化、热除、痰消、瘀祛而治疗 RA^[15]。

DNA 甲基化的形成和维持主要依赖于 DNMTs 的作用。RA 患者广泛存在基因组 DNA 低甲基化^[16],尤其是滑膜成纤维细胞内的 DNA 长散布核元件(LINE-1)启动子上富含 GC 的 CpG 岛序列,其发生低甲基化作用而致某些基因异常表达,进而参与 RA 全身及关节局部炎症^[17]。Leonaviciene L 等^[18]指出 DNA 甲基化可能通过影响 CD4⁺T 细胞分化以及细胞因子的基因转录进而导致 RA 发生,主要表现为 Th1/Th2 比例失调。刘喜德等^[19]研究发现 CIA 大鼠 PBMCs DNMTs 表达降低,中药温化蠲痹方可能通过上调 DNMTs 表达,调节 CIA 大鼠甲基化状态而

表 3 两组 ESR、CRP、RF、抗 CCP 抗体、PLT 计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	ESR(mm/h)	CRP(mg/mL)	RF(IU/mL)	抗 CCP 抗体(U/mL)	PLT 计数($\times 10^9/L$)
对照	30	治疗前	33.67 ± 9.44	19.84 ± 3.71	329.32 ± 78.27	101.72 ± 19.03	327.22 ± 14.59
		治疗中	27.35 ± 3.93 *	16.20 ± 3.29 *	271.57 ± 87.24 *	76.03 ± 17.89 *	294.80 ± 26.39 *
		治疗后	21.76 ± 3.81 **	11.85 ± 2.59 **	218.12 ± 88.59 **	53.09 ± 16.25 **	260.41 ± 19.88 **
治疗	30	治疗前	33.71 ± 9.62	17.92 ± 2.24	332.97 ± 54.20	100.57 ± 16.14	326.48 ± 16.45
		治疗中	24.77 ± 3.96 *△	13.63 ± 2.33 *△	245.41 ± 75.71 *△	72.71 ± 16.02 *△	287.91 ± 26.74 *△
		治疗后	15.34 ± 2.42 **△	8.53 ± 1.78 **△	125.24 ± 47.95 **△	44.38 ± 14.93 **△	241.22 ± 16.12 **△

治疗 CIA。DNA 甲基化的异常与 RA 发病有着广泛联系,其中又以 DNMTs 异常表达对甲基化过程产生诸多影响。

miRNA 特异性结合靶 mRNA,致靶向 mRNA 降解或使其翻译过程抑制从而参与疾病发生发展。miRNA-146a 即是其中一种,Stanczyk J 等^[20]、Li J 等^[21]发现 miR-146a 在 RA 患者滑膜组织中高表达,CD4⁺T 细胞中高表达的 miRNA-146a 与 TNF- α 水平呈正相关,提示其可上调 TNF- α 水平,从而导致炎症反应及软骨与骨渐进性破坏。RA 患者 PBMCs miRNA-146a 表达上升水平与疾病活动趋势呈正相关。Murata K 等^[22]研究显示 miR-146a 表达量与关节触痛个数及 DAS28 评分成反比。活动期 RA 患者 miRNA-146a 显著升高与 TNF- α 表达水平呈正相关,但 TRAF6 和 IRAK-1 并未发生显著变化,推测可能由于异常 miRNA-146a 无法调节其靶点 TRAF6 和 IRAK-1 导致终产物 TNF- α 升高,介导 RA 炎症反应^[23,24]。本研究表明,CIA 大鼠 PBMCs miRNA-146a 表达升高,中药温化蠲痹方可能通过下调 miRNA-146a 表达,而调节免疫细胞分化、信号转导等达到治疗 CIA 作用^[25]。miRNA 直接或间接参与了固有性和适应性免疫应答,可能在 RA 滑膜炎症发生发展过程中发挥重要负调控作用^[2]。

DNA 甲基化与 miRNA 的相关性在 RA 中的作用研究较少。Starczynowski DT 等^[26]将急性白血病细胞系 HL-60 细胞去甲基化后,miRNA-146a 表达水平升高,推测 miRNA-146a 启动子区域被甲基化,从而抑制 miRNA-146a 转录。Jiang M 等^[27]发现在去甲基化的巨噬细胞中,miRNA-146a 表达水平升高。王丽娜等^[28]通过甲基化酶抑制剂作用于 K562 细胞,结果显示 miRNA-146a 表达水平升高,DNMTs 表达水平降低,以 DNMT3b 降低最为明显。以上研究表明 DNA 甲基化与 miRNA-146a 存在负调控关系,可能包括启动子去甲基化在内的多种机制所致。

本课题组研究结果表明,活动期 RA 患者 PBMCs DNMTs 表达水平明显降低,miRNA-146a 表达水平明显升高。DNMTs 表达水平与 miRNA-146a 呈负相关。提示在 RA 活动期,DNA 甲基化水平降低,可能使 T 细胞及其分泌的下游因子表达异常,参与 RA 发病过程。同时 miRNA-146a 表达水平明显升高,可能对下游中 IRAK1 mRNA 表达的抑制,miRNA-146 可能在 RA 滑膜炎症的负调控中发挥重要作用。

而治疗后 RA 患者 PBMCs DNMTs 表达水平上升,提示温化蠲痹方可能通过上调 RA 患者低表达的

DNMTs,恢复 DNA 甲基化水平。治疗后 RA 患者 PBMCs miRNA-146a 表达水平下降,推测可能影响了下游靶基因 TRAF6、IRAK1 表达而达到治疗 RA 目的。本研究结果提示,下调 miRNA-146a 表达、上调 DNMTs 表达、通过对 DNMTs 及 miRNA-146a 的多靶点干预可能是温化蠲痹方治疗 RA 提高临床疗效机制之一。但 miRNA 对 DNA 甲基化调控机制及温化蠲痹方具体干预机制还需进一步深化研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003, 423(6937): 356-361.
- [2] Pedersen I, David M. MicroRNAs in the immune response[J]. Cytokine, 2008, 43(3): 391-394.
- [3] Dang MN, Buzzetti R, Pozzilli P. Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes[J]. Diabetes Metabolism Res Rev, 2013, 29(1): 8-18.
- [4] Doerfler W. On the biological significance of DNA methylation[J]. Biochemistry, 2005, 70(5): 505-524.
- [5] Sekigawa L, Okada M, Ogasawara H, et al. DNA methylation in systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2003, 12(2): 79-85.
- [6] 刘喜德,蔡龙,周红娟,等. 温经清化法治疗类风湿关节炎的临床及实验系列研究[J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(9): 5-8.
- [7] 刘喜德,张金禄,叶丽红,等. 温化蠲痹方对类风湿关节炎患者外周血 TNF- α 、IL-1 β 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(9): 789-793.
- [8] Aletta D, Neogi T, Siiman AJ, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification: an American College of Rheumatology European Union League against Rheumatism Collaborative Initiative[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9): 2569-2571.
- [9] Frank CA, Steven ME, Daniel AB, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1988, 31(3): 315-524.
- [10] Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR Response Criteria[J]. Clin Exp Rheumatol, 2005, 23(5 Suppl 39): S93-99.
- [11] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 115-119.
- [12] Felson DT, Anderson JJ, Boers M, et al. American College of Rheumatology preliminary defini-

- tion of improvement in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 38(6): 727–735.
- [13] Huskisson EC. Measurement of pain [J]. *Lancet*, 1974, 2(7889): 1127–1131.
- [14] Wilson BM, Daniel FA, Ruth J, et al. Eosinophilia in rheumatoid arthritis patients and its relation to disease activity: a single center experience from Kashmir, India [J]. *Reuma Clin*, 2016, 12(6): 313–318.
- [15] 刘喜德, 叶丽红, 杜静, 等. 基于《伤寒论》寒热并用攻补兼施组方探讨类风湿关节炎的临证施治 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(1): 10–12.
- [16] Xu XY, Wang MM, Xiao CS, et al. The study of DNA methylation in rheumatoid arthritis [J]. *Chin Rheumatol*, 2006, 10(8): 462–465.
- [17] Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, et al. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(12): 3613–3622.
- [18] Leonaviciene L, Bradunaite R, Astrauskas V. Proinflammatory cytokine interleukin-17 and its role in pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2004, 40(5): 419–422.
- [19] 刘喜德, 冯莹莹, 蔡龙, 等. 温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠外周血单个核细胞 DNA 甲基化转移酶表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(10): 1219–1223.
- [20] Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(4): 1001–1009.
- [21] Li J, Wan Y, Guo Q, et al. Altered micro-RNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4⁺T cells from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3): R81.
- [22] Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3): R86.
- [23] Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, et al. microRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11(1): 1–11.
- [24] Pauley KM, Satoh M, Clam AL, et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R101.
- [25] 刘喜德, 冯莹莹, 蔡龙, 等. 温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠外周血单个核细胞微小 RNA-146a 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(8): 1830–1834.
- [26] Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, et al. Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations [J]. *Blood*, 2011, 117(2): 595.
- [27] Jiang M, Xiang Y, Wang D, et al. Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages [J]. *Aging Cell*, 2012(11): 29.
- [28] 王丽娜, 曾建明, 李沫, 等. 5-Aza-2'-CdR 对 K562 细胞甲基化酶及 miRNA-146a、miR-29b 表达的影响 [J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(9): 625–627.

(收稿: 2018-01-14 在线: 2018-10-29)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶