

· 基础研究 ·

温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达的影响

黄梦婷¹ 郑琳琳¹ 刘喜德²

摘要 目的 研究温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠成纤维样滑膜细胞(FLS)微小 RNA-146a(miRNA-146a)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)、白细胞介素-1 受体相关激酶 1(IRAK1)基因表达的影响。**方法** 选用雌性 Wistar 大鼠 70 只,按随机数字表法分为正常组(10 只,生理盐水每天 1 次)和造模组(60 只)。造模组采用尾部皮内多点注射牛 II 型胶原乳剂的方法进行免疫,建立 CIA 模型。造模成功后(40 只)用随机数字表法分为温化蠲痹方组(中药组,温化蠲痹方每天 22.9 g/kg,每天 1 次灌胃)、模型组(生理盐水 2 mL 每天 1 次灌胃)、甲氨蝶呤组(MTX 组,MTX 混悬液每周 0.78 mg/kg,每周 1 次灌胃)和温化蠲痹方加 MTX 组(中药加西药组,灌胃药物同中药组及 MTX 组),每组 10 只。采用容积法(排水体积)和计分法分别评价足趾肿胀度和关节炎程度。治疗 30 天后处死大鼠,取各组膝关节滑膜,运用 HE 染色,光镜下观察大鼠滑膜病理;采用 5 级评分法评定滑膜炎细胞浸润和滑膜细胞增生的程度;运用实时荧光定量 PCR 检测滑膜中 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠足趾肿胀明显,滑膜炎性细胞浸润和增生程度明显($P<0.05$);模型组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,中药组、MTX 组、中药加西药组足趾肿胀明显减轻,关节滑膜炎性细胞浸润和增生程度显著减轻,miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达明显降低($P<0.05$)。与 MTX 组比较,中药加西药组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达更低($P<0.05$)。**结论** 中药温化蠲痹方可能通过抑制成纤维样滑膜细胞 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达从而抑制 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞增生,发挥其抗炎作用。MTX 加用温化蠲痹方比单纯 MTX 治疗效果更好。

关键词 胶原诱导性关节炎;温化蠲痹方;滑膜组织

Effects of Wenhua Juanbi Recipe on the Expressions of miRNA-146a, TRAF6, and IRAK1 in Fibroblast-like Synoviocytes in Collagen-induced Arthritis Rats HUANG Meng-ting¹, ZHENG Lin-lin¹, and LIU Xi-de² *1 Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 2 Department of Athrology, Zhejiang Provincial Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Hangzhou (310003)*

ABSTRACT Objective To study the effects of Wenhua Juanbi Recipe (WJR) on the expressions of microRNA-146a (miRNA-146a), tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), and interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) in fibroblast-like synoviocytes (FLS) in collagen-induced arthritis (CIA) rats. **Methods** Totally 70 female Wistar rats were divided into making normal control group ($n=10$, administered with normal saline, once a day) and model group ($n=60$) by random number table. Rats in the model group was immunized by intradermal injection of bovine collagen type II emulsion at multiple points of the tails to establish CIA model. The successfully modeled CIA rats ($n=40$) were divided into WJR group (administered with WJR at 22.9 g/kg, once a day), model group (administered with normal saline, once a day), Methotrexate group (MTX, administered with MTX suspension at 0.78 mg/kg per

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No.LY17H270004);浙江省中医药科技计划项目(No.2020ZB180);杭州市卫生科技计划重大项目(No.Z20200026)

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

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

DOI: 10.7661/j.cjtm.20200824.320

week, once a week), WJR plus MTX group (the same methods as those for WJR group and MTX group) by random number table, 10 rats in each group. The foot swelling and the arthritis index were evaluated using volume method (displacement volume) and scoring method. After 30 days treatment, synovium of the knee was collected. Using HE staining, the inflammatory cell infiltration and multiplication of synoviocytes were evaluated by 5 grades score of synovium pathology under light microscope. Expression levels of miRNA-146a, TRAF6, and IRAK1 were detected by Real-time PCR. **Results** Compared with the normal group, foot swelling was obviously seen, with obvious degrees of inflammatory cell infiltration and hyperplasia in the model group ($P < 0.05$). The expressions of miRNA-146a, TRAF6, and IRAK1 significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, foot swelling was significantly attenuated, with significantly reduced degrees of inflammatory cell infiltration and hyperplasia in the WJR group, MTX group, and WJR plus MTX group. Expressions of miRNA-146a, TRAF6, and IRAK1 were also obviously decreased ($P < 0.05$). Compared with the MTX group, the expressions of miRNA-146a, TRAF6, and IRAK1 were lower in WJR plus MTX group ($P < 0.05$). **Conclusions** WJR inhibited proliferation of fibroblast-like synoviocytes and exerted its anti-inflammatory effects by inhibiting expressions of miRNA-146a, TRAF6, and IRAK1 in CIA rats. MTX plus WJR was better than MTX treatment alone.

KEYWORDS collagen induced arthritis; Wenhua Juanbi Recipe; synovium

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种临床上常见的慢性全身性自身免疫性疾病, 约占总人口的 1%^[1]。其主要临床表现是侵袭性关节炎, 病理表现常有滑膜炎、血管翳形成, 严重时则有软骨和骨破坏, 致残率高, 严重危害着人民健康。成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 位于关节滑膜, 在软骨和关节的损伤、破坏和变形中起重要作用^[2]。RA 尚无特异性治疗手段, 探索 RA 发病机制及筛选有效治疗药物研究具有重要临床价值。中药温化蠲痹方治疗 RA 活动期能够显著提高治疗效果^[3]。本实验旨在通过观察温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠滑膜病理的改变及成纤维样滑膜细胞微小 RNA-146a (microRNA-146a, miRNA-146a)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)、白细胞介素-1 受体相关激酶 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1) 表达的影响, 从而为温化蠲痹方治疗 RA 提供实验依据。

材料与方 法

1 动物 SPF 级健康雌性 Wistar 大鼠 70 只, 鼠龄 4~5 周体重 (110±10)g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0005, 由浙江中医药大学动物实验研究中心提供及饲养, 实验动物使用许可证号: SYXK (浙) 2018-0012。本实验获得浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准 (No. IACUC-2018121706)。

2 药物 温化蠲痹方 (由威灵仙 30 g 延胡索

20 g 蜈蚣 6 g 忍冬藤 12 g 白芥子 10 g 防风 10 g 全蝎 6 g 炒薏苡仁 30 g 海桐皮 20 g 丹参 15 g 白芷 10 g 制僵蚕 10 g 组成, 浙江省中西医结合医院制剂室提供, 生药量为 1 g/mL, 批号: 20190619); 甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX, 2.5 mg/片, 通化茂祥制药有限公司, 批号: 181102)。

3 主要试剂及仪器

3.1 主要试剂 弗氏不完全佐剂 (incomplete Freund's adjuvant, IFA, 美国 Chondrex 公司, 批号: 7002); 牛 II 型胶原 (bovine collagen type II, BC II, 美国 Chondrex 公司, 批号: 20022); Trizol (RNAiso Plus, 日本 Takara 公司, 批号: AIG1649A); 4% 多聚甲醛固定液 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 批号: F716FA0002]; Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (日本 Takara 公司, 批号: AHG1528A); All-in-One miRNA First-strand cDNA Synthesis Kit (美国 GeneCopoeia 公司, 批号: B13WY0301); FastStart Universal SYBR Green Master (瑞士巴塞尔 Roche 公司, 批号: 11610100); 引物: 均由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司设计合成, 引物序列及引物长度如下: 目的基因: miRNA-146a: 5'-TGAGAACTGAATTCATGGGTT-3', 22 bp; TRAF6: 上游引物: 5'-CAGTCCCTGCACATTCAGT-3', 20 bp, 下游引物: 5'-CTGGGCCAACAGTCTCATGT-3', 20 bp; IRAK1: 上游引物: 5'-TACCTGCCTGAGGAGTACATCAA-3', 23 bp, 下游引物: 5'-TCATCTTCAATCAGGTCTTTCA-GA-3', 24 bp; 内参基因: U6 snRNA: 上游引物: 5'-

CTCGCTTCGGCAGCACA-3, 17 bp, 下游引物: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3', 20 bp; GAPDH: 上游引物: 5'-GGTGATGCTGGTGCTGAGTA-3', 20 bp, 下游引物: 5'-CGGAGATGATGACCCCTTTG-3', 20 bp。

3.2 主要仪器 足趾容积测量仪(山东医学科学院设备厂);石蜡包埋机(型号:AP280-2,德国 Microm 公司);超低温冰箱(型号:DW-FL208,中科美菱公司);PCR 仪(型号:ABI Prism 7000,美国应用生物系统公司);光学显微镜(型号:Th4-200,日本 Olympus 公司);RNA 浓度测量仪(型号:NANODROP 2000,美国 Thermo 公司)。

4 方法

4.1 CIA 大鼠模型建立及分组 将 70 只大鼠适应性喂养 7 天后按随机数字表法分为造模组(60 只)和正常组(10 只)。参照《药理学实验指南-新药发现和药理学评价》^[4]及文献[5,6]进行造模(略有改进)。具体:(1)BC II 乳剂的制备:在无菌条件下,用牛 II 型胶原与 IFA 等体积混合、振荡乳化,制成 BC II 乳剂,浓度为 2 mg/mL。(2)注射方法:初次免疫时在造模组大鼠尾根部 3 个点进行皮内多点注射,总量 0.3 mL(含 0.6 mg BC II)。正常组注射 0.3 mL 生理盐水。二次免疫时于上述 3 个点多点注射,总量 0.15 mL。(3)在注射 BC II 乳剂后的第 14 天评估造模成功情况,造模成功的评价标准:关节炎指数(arthritis index, AI)评分标准分级:0 分:无红肿;1 分:趾关节稍肿,足爪或足垫单个区域炎症;2 分:关节轻度红肿,足爪和足垫或踝关节 2 个区域以上的炎症;3 分:关节中度红肿,轻度功能障碍;4 分:关节重度红肿,僵直甚至畸形,严重功能障碍。同时满足单侧左足外踝以下隆起的体积>1.6 mL 和 AI 评分>4 分为造模成功^[7]。再按随机数字表法把造模成功后大鼠(40 只)分成 MTX 组(10 只)、中药组(10 只)、模型组(10 只)、中药加西药组(10 只)。

4.2 给药方法 用药剂量按照实验动物与人体体表面积比等效剂量换算比例^[8],并根据大鼠的体重进行,具体:临床成人 MTX 用量为每周 0.143 mg/kg,则大鼠每周为 0.78 mg/kg;临床成人中药用量为每天 3.2 g/kg,则大鼠每天为 22.9 g/kg。MTX 组以 MTX 混悬液灌胃,MTX 配置成浓度为 0.045 mg/mL 的混悬液,用量为每周 0.78 mg/kg;中药组以温化蠲痹方汤剂灌胃,用量为每天 22.9 g/kg;模型组、正常组以 2 mL 生理盐水灌胃,每天 1 次^[9]。中药加西药组以温化蠲痹方汤剂及 MTX 混悬液灌胃,用量、用法分别

同中药组及 MTX 组。连续用药 30 天。

4.3 标本采集及处理 于给药 30 天后进行标本采集及处理。PCR 滑膜组织采集:大鼠腹腔注射 10%水合氯醛麻醉致死,酒精浸泡消毒后仰卧固定,在膝关节偏外侧一手用镊子夹起疏松的皮肤,另一手拿手术弯剪纵行剪开皮肤直至暴露出以膝关节为中心约 3cm×3cm 的区域,沿髌骨上缘约 0.3~0.4cm 处垂直于股骨骨面切断肌肉,再分别沿髌骨两侧向下分离至胫骨,用镊子夹住被切断的靠近膝关节的肌肉远端往下翻,在膝关节腔处可见由髌骨下极向下延续的一层平滑光亮呈淡黄色的滑膜组织。用眼科直镊钝性分离关节囊的滑膜层和纤维层,然后以眼科镊轻轻夹住滑膜边缘,用消毒的手术刀完整切取滑膜组织,约 20~40 mg,PCR 样本放进盛有 1 mL Trizol 的 EP 管中。HE 病理染色样本采集:大鼠麻醉后致死,手术剪刀截取膝关节,用 4%多聚甲醛固定。

4.4 观测指标及检测方法

4.4.1 一般情况 记录 CIA 大鼠毛发色泽、饮食、活动及发生的变化。

4.4.2 足趾肿胀度和 AI 评分 使用足趾容积测量仪测得各组大鼠左后足足趾容积,观测足趾肿胀度。测量位置:以无毛区为标记线,即测量标记线以下的足趾容积(mL);测量时间:第 0 天、第 14 天(造模成功)、第 24 天(用药后 10 天)、第 34 天(用药后 20 天)、第 44 天(用药后 30 天),同时进行 AI 评分(评分标准如前所述)。

4.4.3 病理形态学观察及病理形态学评价 用 4%多聚甲醛固定各组一侧大鼠滑膜组织,石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色,在显微镜下观察并照相。病理形态学评价,按大鼠滑膜病理 5 级评分法评定^[10]。炎性细胞浸润:0 分:无浸润;1 分:1~5 个/HP;2 分:6~10 个/HP;3 分:11~15 个/HP;4 分:形成小脓肿。滑膜细胞增生程度:0 分:无浸润;1 分:肿胀增生(多);2 分:肿胀增多相连;3 分:肿胀增多双层;4 分:肿胀增多 3 层以上。

4.4.4 采用实时荧光定量 PCR 检测 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达 将各组大鼠麻醉后取出滑膜关节放进 1.5 mL 的离心管中,加入 1 mL 的 Trizol 后放入 -80 °C 冰箱冷冻保存备用。使用时,用微量样本研磨器将滑膜组织进行研磨后重新放进 1 mL 的 Trizol 中。用 Trizol 法提取总 RNA,测定其浓度。miRNA-146a 反转录 cDNA、普通 RNA 反转录,反应体系为 15 μL,按试剂盒说明书进行操作,使用 PCR 仪进行反应,其条件为:37 °C,180 min;85 °C,5

min;4 ℃,终止反应。实时荧光定量 PCR 反应,miR-NA 为 20 μL 体系,普通基因为 15 μL 体系,分别按试剂盒说明书加试剂。依照反应条件进行 40 个循环。选取 U6 作为 miRNA 内参照,以 GAPDH 管家基因作为 TRAF6、IRAK1 内参照,所有反应体系均为 2 复孔。计算标准化后的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值来表示 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 的基因表达含量。

4.5 统计学方法 运用 SPSS 25.0 统计软件进行数据统计分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示计量资料,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组内方差齐时比较采用 *LSD* 检验,方差不齐时用 *Dunnett T3* 检验,所有的统计检验方法均采用双侧检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 CIA 大鼠一般情况(图 1) 正常组大鼠左后足呈现正常淡红色,脚踝部无肿胀,足趾不增厚,活动自如。模型组大鼠注射 BC II 乳剂后 12 h 内尾根部注射处可见溃疡,大概 7 天左右结痂。注射 48 h 内大鼠活动减少,大鼠后足趾关节、足底及周围皮肤逐渐变得红肿。注射 7 天后,大鼠足趾关节变得明显红肿,足掌厚度增加。第 2 周二次免疫后,到第 3 周时足趾肿胀得越发明显并逐渐加重,双后肢均呈现红色,足趾关节肿胀严重甚至变形,行动受限。免疫 4~5 周后,大鼠发病严重的可见四肢肿胀呈紫红色甚至暗紫色,四肢足趾畸形僵硬,无法屈伸,按压膝关节等关节活动处发现有抵抗,无法伸直,行动严重受限,大部分只能拖足而行。发病中 CIA 大鼠普遍出现大便稀溏、饮食减少、

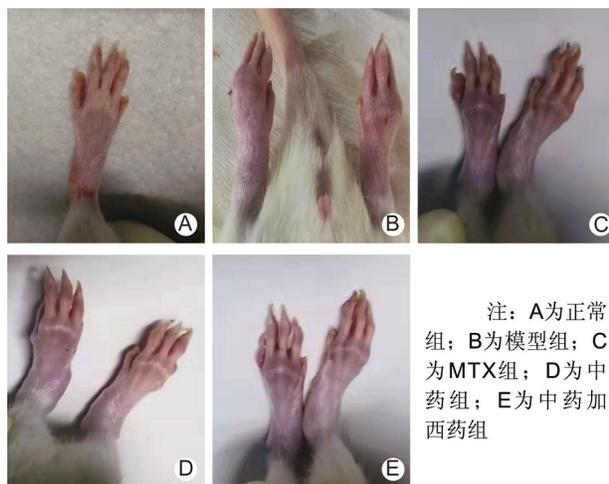


图 1 各组大鼠灌胃 30 天后足趾外观

精神萎靡、行动迟缓、体重增长减缓甚至下降;毛发稀疏无光泽,有的大鼠伴有脱毛。MTX 组、中药组、中药加西药组大鼠后肢关节肿胀度较模型组轻,一般状况较好。

2 各组大鼠足趾肿胀度和 AI 评分比较(表 1、2) 与正常组比较,在造模 14 天,模型组大鼠足趾肿胀体积、AI 评分明显升高 (*P*<0.05);与模型组比较,在造模 24、34、44 天,中药组、中药加西药组和 MTX 组大鼠足趾肿胀度明显减轻、AI 评分明显降低 (*P*<0.05, *P*<0.01);而中药组、中药加西药组和 MTX 组比较,差异无统计学意义 (*P*>0.05)。与造模 14 天比较,24、34、44 天,中药组、MTX 组和中药加西药组大鼠足趾肿胀度明显减轻、AI 评分明显降低 (*P*<0.05)。

表 1 各组大鼠不同时间足趾肿胀体积比较 (mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	足趾肿胀体积				
		造模 0 d	14 d	24 d	34 d	44 d
正常	10	1.10±0.08	1.20±0.04	1.32±0.06	1.26±0.05	1.24±0.08
模型	10	1.17±0.20	1.80±0.21*	1.77±0.11	1.60±0.12	1.61±0.11
MTX	10	1.12±0.12	1.78±0.10	1.74±0.13 ^{△△}	1.59±0.09 ^{△△}	1.49±0.10 ^{△△}
中药	10	1.12±0.13	1.91±0.22	1.74±0.11 ^{△△}	1.63±0.12 ^{△△}	1.51±0.14 ^{△△}
中药加西药	10	1.10±0.08	1.83±0.16	1.74±0.10 ^{△△}	1.59±0.08 ^{△△}	1.46±0.08 ^{△△}

注:与正常组同期比较,**P*<0.05;与模型组同期比较,[△]*P*<0.05;与本组治疗前(造模 14 天)比较,^{△△}*P*<0.05

表 2 各组大鼠不同时间 AI 评分比较 (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	AI 评分			
		造模 14 d	24 d	34 d	44 d
正常	10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	10	4.90±0.99*	4.90±0.88**	4.40±0.70**	4.50±0.97**
MTX	10	4.50±0.71	3.50±0.53 ^{△△}	3.10±0.32 ^{△△}	3.00±0.00 ^{△△}
中药	10	4.50±0.71	3.45±0.50 ^{△△}	3.30±0.48 ^{△△}	3.10±0.32 ^{△△}
中药加西药	10	4.60±0.84	3.40±0.52 ^{△△}	3.10±0.32 ^{△△}	2.90±0.32 ^{△△}

注:与正常组同期比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与模型组同期比较,[△]*P*<0.01;与本组治疗前(造模 14 天)比较,^{△△}*P*<0.05

3 各组大鼠滑膜病理结果比较(图 2) 正常组滑膜细胞无增生现象,衬里层呈 1~2 层细胞厚度,细胞排列规则,表面光滑,无或少量炎细胞浸润。模型组大鼠可见明显的滑膜细胞增生,滑膜细胞增殖达 4 层,排列紊乱,滑膜组织充血水肿,毛细血管增生,并可见炎细胞浸润,滑膜内血管丰富。中药组、MTX 组和中药加西药组滑膜组织结构较模型组明显改善,滑膜组织充血水肿程度减轻,滑膜细胞呈轻度增生,浸润的炎细胞和血管增生数量减少,滑膜纤维组织增生得到抑制。

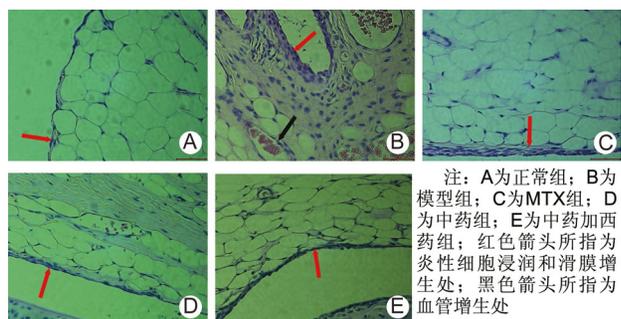


图 2 各组大鼠滑膜病理结果比较 (HE 染色,×40)

4 各组大鼠滑膜炎性细胞浸润及增生评分比较(表 3) 与正常组比较,模型组大鼠关节滑膜炎性细胞浸润和增生程度明显($P<0.01$);与模型组比较,中药组、中药加西药组和 MTX 组大鼠关节滑膜炎性细胞浸润和增生程度显著减轻($P<0.01$);而中药组、中药加西药组和 MTX 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠滑膜炎性细胞浸润及增生评分比较 (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	炎性细胞浸润	滑膜增生
正常	10	0.20±0.42	0.15±0.33
模型	10	2.90±0.73*	3.60±0.51*
MTX	10	1.30±0.48 [△]	1.45±0.59 [△]
中药	10	1.40±0.51 [△]	1.50±0.52 [△]
中药加西药	10	1.20±0.42 [△]	1.40±0.51 [△]

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.01$

5 各组大鼠滑膜组织中 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 mRNA 表达比较(表 4) 与正常组比较,模型组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达明显升高($P<0.01$);与模型组比较,用药 3 组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与 MTX 组比较,中药加西药组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 mRNA 表达更低($P<0.05$);与中药组比较,中药加西药组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 4 各组大鼠滑膜组织中 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miRNA-146a	TRAF6	IRAK1
正常	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	3	154.95±66.20*	205.72±62.44*	452.47±53.01*
MTX	3	70.07±29.77 ^{△△}	11.03±0.71 ^{△△}	54.92±10.23 ^{△△}
中药	3	20.75±8.13 [△]	4.58±4.50 ^{△△}	13.33±15.59 ^{△△}
中药加西药	3	16.08±11.15 ^{△△△}	3.47±1.56 ^{△△△}	3.95±0.51 ^{△△△}

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与 MTX 组比较,[△] $P<0.05$

讨 论

RA 属中医学“痹证”范畴。正气不足,卫外不固是发病的内在必然因素,邪气外侵是致病的重要条件^[11]。素体禀赋不足而致肝肾亏虚、营卫气血不足,感受风寒湿邪后,夹杂痰瘀痹阻肌肉、关节、经络形成痹证。临床发现活动期 RA 以周身关节畏寒,外有热痹的寒热错杂证居多。温经清化为活动期 RA 主要治法^[12]。笔者认为寒热错杂、痰瘀痹阻为活动期 RA 的主要病机,故采用温经清化的温化蠲痹方治疗,后经过大量临床实践筛选拟制而成,方中君药威灵仙温经祛风通络,防风祛风胜湿止痛;臣药忍冬藤清热除痹,再加僵蚕、蜈蚣、全蝎搜邪祛风化痰,四药共同发挥清热痹、化痰瘀作用;佐药丹参活血化瘀,白芷、白芥子、海桐皮、元胡,五药共用,化痰通络又止痛;使药薏苡仁既利湿消肿蠲痹,又淡渗健脾顾护脾胃^[13]。诸药合用共奏温经通络、清热除痹、化痰祛瘀之功。

课题组前期临床研究表明,运用温化蠲痹方治疗活动期 RA 可明显提高治疗效果,具有促进西药减量,减少西药不良反应,稳定病情等作用^[3]。该方具有影响 CIA 大鼠滑膜基因表达谱作用^[12],下调致炎细胞因子及阻止 CIA 大鼠骨侵蚀^[14],抑制滑膜细胞增殖、诱导滑膜细胞凋亡^[15]。本实验结果与已往的实验结果一致^[14,15,26]。

有研究表明,miRNA 是正常生理或异常病理过程中的重要调节剂^[16,17]。Nakasa T 等^[18]发现 miRNA-146a 能够阻止破骨细胞产生,其在 RA 患者滑膜成纤维细胞、滑膜组织^[19]以及外周血单核细胞^[20]中表达明显升高,与疾病活动性密切相关。Li J 等^[21]发现 RA 患者滑液和外周血过表达的 miRNA-146a 可抑制 Jurkat T 细胞凋亡,提示 miRNA-146a 涉及 RA 发病。在 RA 患者滑膜组织中 miRNA-146a 与滑膜增生肥大、高水平 IL-17 以及疾病活动性密切相关^[22]。脂多糖等炎症递质通过核因子 κ B 通路可以促进 miRNA-146a 产生,miRNA-146a 通过下调靶基因 TRAF6 和 IRAK1 表达,进而下调核因子 κ B 表达,参

与炎症与免疫反应^[23,24]。最新研究发现,在神经系统中 miRNA-146a 可以显著降低 TRAF6 和 IRAK1 的表达^[25]。前期实验结果表明,CIA 大鼠 miRNA-146a 表达升高,中药温化蠲痹方可能通过下调 miRNA-146a 表达达到治疗作用^[26]。IRAK1 可以在 miRNA-146a 的控制下,但是 miRNA-146a 的表达率和抑制作用在各种疾病中可能有所不同^[27]。本研究表明,在 CIA 大鼠滑膜中 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 表达明显升高,给予中药温化蠲痹方干预后,三者的表达明显降低,说明温化蠲痹方可以降低滑膜中 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达,提示温化蠲痹方的作用机制可能与 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 mRNA 表达有关。有研究表明,在 RA 患者中,药物治疗后外周血中 miRNA-146a、IRAK1、TRAF6 及核因子 κ B 的基因表达下调,提示可能通过调节细胞因子环境来改善 miRNA-146a 对其靶分子的调节作用^[28]。所以,虽然有研究表明 miRNA-146a 与靶基因 TRAF6、IRAK1 是负调控,但在 CIA 大鼠滑膜中用药后 miRNA-146a 降低,而它的靶基因 TRAF6、IRAK1 亦是下调的,且使 CIA 大鼠足趾肿胀明显减轻,关节滑膜炎性细胞浸润和增生程度显著减轻,提示可能有其他的细胞因子或通路共同参与调控 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 的下调。

综上,温化蠲痹方显著减轻 CIA 大鼠足趾肿胀度的机制可能是通过下调滑膜中的 miRNA-146a 表达和下调其靶基因 TRAF6、IRAK1 的表达来发挥抗炎作用而达到治疗效果,其具体涉及的信号通路还需要进一步探索。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Urman A, Taklalsingh N, Sorrento C, et al. Inflammation beyond the joints: Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease[J]. *Scied J Cardiol*, 2018, 2(3): 1000019.
- [2] Mu N, Gu JT, Huang TL, et al. A novel NF- κ B/YY1/microRNA-10a regulatory circuit in fibroblast-like synoviocytes regulates inflammation in rheumatoid arthritis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20059.
- [3] 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.
- [4] Vogel HG, Vogel WH 主编. 杜冠华, 李学军, 张永祥等译. 药理学实验指南——新药发现和药理学评价[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 577-589.
- [5] Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis[J]. *J Exp Med*, 1997, 164(3): 857-867.
- [6] 栗占国, 张奉春, 鲍春德主编. 类风湿关节炎[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 61-61.
- [7] Carter RA, Campbell IK, O'Donnell K, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint involvement and alters B cell trafficking [J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 128(1): 44-51.
- [8] 徐叔云, 卞如廉, 陈修主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 468-468.
- [9] 叶丽红, 刘喜德, 李蕾, 等. 温化蠲痹方对胶原诱导性大鼠滑膜缺氧诱导因子表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(1): 66-69.
- [10] Takayanagi HH, Juji T, Miyazaki T, et al. Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus 2 mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoblasts[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(2): 137-146.
- [11] 李宝丽, 庄鸿贤. 中医药治疗类风湿性关节炎的思路与方法[J]. *中医杂志*, 2002, 43(5): 385-386.
- [12] 刘喜德, 洪旭涛, 蔡龙, 等. 温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜基因表达谱的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(10): 1398-1402.
- [13] 刘喜德, 杨梦霞, 叶丽红, 等. 基于多药耐药基因 P-糖蛋白表达研究温化蠲痹方治疗类风湿性关节炎的增效机制[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(11): 2727-2731.
- [14] 刘喜德, 叶丽红, 王云卿, 等. 温化蠲痹方对胶原诱导性大鼠滑膜血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(7): 1550-1552.
- [15] Liu XD, Chen Y, Liu FY, et al. Effect of Wenhua Juanbi Recipe on proliferation and apoptosis of synoviocytes in rats with collagen-inducing arthritis[J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(6): 453-458.
- [16] Wu XK, Yan LH, Liu YX, et al. microRNA-448 suppresses osteosarcoma cell proliferation and invasion through targeting EPHA7 [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): 1-10.
- [17] Xie X, Li YS, Xiao WF, et al. microRNA-379 inhibits the proliferation, migration and invasion of human osteosarcoma cells by targeting EIF4G2 [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(3): 1-19.
- [18] Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, et al. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(6): 1582-1590.
- [19] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of

- microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1284-1292.
- [20] Pauley KM, Satoh M, Chan AL, et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R101.
- [21] Li J, Wan Y, Guo Q, et al. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4⁺T cells from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3): R81.
- [22] Niimoto T. microRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11(1): 209-216.
- [23] Taganov KD, Oldin MP, Hang KJ, et al. NF- κ B dependent induction of microRNA miR-146a, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [24] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27(42): 5643-5647.
- [25] Liu GJ, Zhang QR, Gao X, et al. miR-146a ameliorates hemoglobin-induced microglial inflammatory response via TLR4/IRAK1/TRAF6 associated pathways [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 311.
- [26] 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.
- [27] Xia P, Fang X, Zhang ZH, et al. Dysregulation of miRNA-146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions [J]. *Immunol Lett*, 2012, 148(2): 151-162.
- [28] Mortazavi-Jahromi SS, Ahmadzadeh A, Rezaieyazdi Z, et al. The role of beta-d-mannuronic acid, as a new non-steroidal anti-inflammatory drug on expression of miR-146a, IRAK1, TRAF6, NF-kappaB and pro-inflammatory cytokines following a clinical trial in rheumatoid arthritis patients [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(3): 228-236.

(收稿: 2020-06-06 在线: 2020-09-28)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶

第三十次全国中西医结合肝病学术会议 (2021) 征文通知

中国中西医结合学会肝病专业委员会 2021 年学术年会——“第 30 次全国中西医结合肝病学术会议”暨“第 21 次浙江省中西医结合肝病学术会议”拟于 2021 年 8 月下旬在杭州市举行。会议将以常见慢性肝病中西医结合防治研究进展和临床经验总结为重点展开交流与讨论, 并将邀请国内知名专家做特邀报告。征文通知如下。

征文内容: 常见慢性肝病 (慢性病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌、代谢相关脂肪性肝病、酒精性肝病) 中西医结合防治研究进展或临床经验总结。已在学术刊物公开发表过的论文, 不再受理。

征文格式: 中文标题黑体、小四号字, 作者姓名及单位楷体小五号字, 正文宋体五号字, 1.5 倍行距, 英文及数字 Times New Roman 字体。

提交 500~1000 字中英文摘要。摘要须按照“目的、方法、结果、结论”格式撰写, 用于会刊印刷 (注意结果中提供重要的数据资料)。

如需参加大会优秀论文评选 (用于大会口头和壁报交流) 还须提交中文论文全文。

论文中写明作者姓名, 单位名称、电子邮箱、地址及邮编、联系电话。

截稿时间: 2021 年 7 月 15 日。

投稿方式: 电子邮件发送至 zgzyjhgbxh@126.com。本次征文不接受纸质文稿。