

· 基础研究 ·

温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠
成纤维样滑膜细胞凋亡的影响刘喜德¹ 黄柳云² 郑琳琳² 黄梦婷² 周海丽² 柯雅妮² 刘 敏¹

摘要 目的 研究温化蠲痹方对微小核糖核酸-146a (miRNA-146a) / 核因子 κ B (NF- κ B) 环路诱导胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠成纤维样滑膜细胞 (FLS) 凋亡作用及其相关分子机制。方法 选用雌性 Wistar 大鼠 25 只, 按随机数字表法分为正常组 (10 只) 和造模组 (15 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。在造模成功后 (12 只, 造模成功率为 80%) 随机选取 10 只作为模型组, 分别取正常大鼠和 CIA 大鼠的关节滑膜, 用组织块培养法培养出原代 FLS, 培养至第 3 代进行干预实验。分别过表达、沉默 miRNA-146a, 并加入通路阻断剂和含药血清共培养, 应用荧光定量聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 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; Western Blot 法检测磷酸化核因子 κ B p65 (NF- κ B p65, p-p65)、核因子 κ B 抑制因子 α ($I\kappa$ B α)、增殖细胞核抗原 (PCNA)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3) 蛋白表达; 流式细胞术检测各组 FLS 凋亡; CCK-8 法检测各组 FLS 增殖。结果 与正常组比较, 模型组大鼠足掌厚度明显增加 ($P<0.01$); 正常转染 miRNA-146a 组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达及 PCNA、p-p65 蛋白表达增加, Caspase-3、 $I\kappa$ B α 蛋白表达及 FLS 凋亡率降低 ($P<0.05$); 正常转染反义 miRNA-146a 组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达及 PCNA、p-p65 蛋白表达降低, Caspase-3、 $I\kappa$ B α 蛋白表达及 FLS 凋亡率增加 ($P<0.05$)。与 CIA 对照组比较, CIA 转染 miRNA-146a 组 TRAF6、IRAK1 基因表达及 PCNA、p-p65 蛋白表达增加, Caspase-3、 $I\kappa$ B α 蛋白表达及 FLS 凋亡率降低 ($P<0.05$); CIA 转染反义 miRNA-146a 组 TRAF6、IRAK1 基因表达及 PCNA、p-p65 蛋白表达降低, Caspase-3、 $I\kappa$ B α 蛋白表达及 FLS 凋亡率增加 ($P<0.05$)。加入 NF- κ B 通路阻断剂后, 随着阻断时间延长及 PCNA、p-p65 蛋白表达降低, Caspase-3、 $I\kappa$ B α 蛋白表达增加 ($P<0.05$)。与对照血清组比较, 中药含药血清组细胞增殖率降低 ($P<0.05$)。结论 温化蠲痹方可以通过 miRNA-146a/NF- κ B 环路诱导 FLS 凋亡、抑制 FLS 增殖。

关键词 温化蠲痹方; 胶原诱导性关节炎; 微小核糖核酸-146a; 核因子 κ B 信号通路; 凋亡

Effects of Wenhua Juanbi Recipe on Inducing Apoptosis of Fibroblast-like Synoviocytes in Collagen-induced Arthritis Rats LIU Xi-de¹, HUANG Liu-yun², ZHENG Lin-lin², HUANG Meng-ting², ZHOU Hai-li², KE Ya-ni², and LIU Min¹ 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 study the apoptotic effects of Wenhua Juanbi Recipe (WJR) on the fibroblast-like synoviocytes (FLS) of collagen-induced arthritis (CIA) rats through the microRNA-146a/nuclear factor- κ -gene binding (miRNA-146a/NF- κ B) circuit and its related molecular mechanisms. **Methods** Totally 25 female Wistar rats were divided into normal control group ($n=10$) and model making group ($n=15$) by random number

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (No.LY21H270001, 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. 20210825.369

table. Rats in the model making group were induced by intradermal injection of bovine collagen type II emulsion at multiple points of the tails to establish CIA model. The successfully modeled CIA rats ($n=12$, success rate of modeling was 80%) were randomly selected as the model group (10 rats). The joint synovium of normal rats and CIA rats were taken, and primary FLS were cultured by explant culture method to the third generation for intervention experiments. miRNA-146a was overexpressed and silenced respectively, and pathway blockers and drug-containing serum were added to co-culture. The expressions of miRNA-146a, tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6), and IL-1 receptor associated kinase 1 (IRAK-1) genes were detected by quantitative real-time PCR (α RT-PCR). p-NF- κ B p65 (p-p65), NF-kappa-B inhibitor alpha ($I\kappa B\alpha$), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and Caspase-3 protein expressions were detected by Western Blot. FLS apoptosis in each group was detected by flow cytometry (FCM). FLS proliferation in each group was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. **Results** Compared with the normal group, the pads thickness of the model group became thicker ($P<0.01$). The expressions of miRNA-146a, TRAF6, IRAK1, PCNA, p-p65 increased ($P<0.05$), the expressions of Caspase-3 and $I\kappa B\alpha$ and FLS apoptosis rate decreased ($P<0.05$) in normal transfection miRNA-146a group. The expressions of miRNA-146a, TRAF6, IRAK1, PCNA, p-p65 decreased ($P<0.05$), the expressions of Caspase-3 and $I\kappa B\alpha$ and FLS apoptosis rate increased ($P<0.05$) in normal antisense transfection miRNA-146a group. Compared with CIA control group, the expressions of TRAF6, IRAK1, PCNA, p-p65 increased ($P<0.05$), the expressions of Caspase-3 and $I\kappa B\alpha$ and FLS apoptosis rate decreased ($P<0.05$) in CIA transfection miRNA-146a group. The expressions of TRAF6, IRAK1, PCNA, p-p65 decreased ($P<0.05$), the expression of Caspase-3 and $I\kappa B\alpha$ and FLS apoptosis rate increased ($P<0.05$) in CIA antisense transfection miRNA-146a group. As the extending of blocking time after adding pathway blocker went by, the expressions of PCNA, p-p65 decreased ($P<0.05$), the expressions of Caspase-3 and $I\kappa B\alpha$ increased ($P<0.05$). Compared with control serum group, the expressions of FLS proliferation rate decreased in Chinese herbs-containing serum group ($P<0.05$). **Conclusion** WJR induced the apoptosis of FLS and inhibited its proliferation through miRNA-146a/NF- κ B circuit.

KEYWORDS Wenhua Juanbi Recipe; collagen induced rheumatoid arthritis; microribonucleic-146a; nuclear factor- κ gene binding signaling pathway; apoptosis

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、进行性、侵袭性疾病, 表现为关节疼痛、畸形、破坏。其特性为滑膜组织炎症性增生, 血管襻形成以及软骨组织和骨骼的破坏, 成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocyte, FLS) 在其中发挥着重要作用。

FLS 是一种非免疫细胞, 通过产生关节滑液及关节内膜的细胞外基质成份维持关节内外的稳定。在传统认知中, FLS 充当着一个“被动反应者”角色, 可以对特异性免疫和非特异性免疫所驱动的炎症刺激做出适当的反应^[1]。但是在 RA 中, 持续的炎症刺激导致 FLS 发生了一系列转变。增殖与凋亡之间失衡导致 FLS 数量不断增加、对凋亡抗性增强, 同时通过表观遗传所获得的具有侵袭能力的相关表型促进炎症发生及关节、组织破坏^[2]。

微小核糖核酸 (microribonucleic, miRNA) 是一类非编码 RNA, 通过选择性结合到 30 个非翻译区的特定位点来调节靶信使 RNA 稳定性, 从而抑制翻译与 RNA 降解。有报道证实 miRNA-146a 可以

降低炎症反应, miRNA-146a 在系统性红斑狼疮中表达下调, 在 RA 中却是呈上调趋势^[3]。目前 RA 尚无根治方法, 中医药治疗 RA 具有一定优势, 本团队前期临床研究表明, 温化蠲痹方治疗 RA 取得满意疗效^[4], 且该方可以通过抑制 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 (IL-1 receptor associated kinase 1, IRAK1) 基因表达从而抑制胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠 FLS 增生, 发挥其抗炎作用^[5]。本实验通过探究温化蠲痹方通过调控 miRNA-146a/核因子 κ B (nuclear factor- κ -gene binding, NF- κ B) 环路对 FLS 增殖和凋亡影响的机制, 为临床应用温化蠲痹方治疗 RA 提供实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级健康雌性 Wistar 大鼠 25 只, 体重 (110 ± 10) g, SPF 级健康雄性 SD 大鼠 6 只, 体重 (200 ± 20) g。上述实验动物购于上海斯莱

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, 饲养于浙江中医药大学动物实验中心屏障环境 (室温 25℃, 相对湿度 40%~60%, 日光照 12 h), 全封闭 SPF 状态下隔离普通饲养。实验动物许可证号: 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 主要试剂及仪器

2.1 主要试剂 牛Ⅱ型胶原 (bovine collagen type II, BC II, 美国 Chondrex 公司, 批号:20022); 弗氏不完全佐剂 (incomplete Freund's adjuvant, IFA, 美国 Chondrex 公司, 批号: 7002); 增强型 CCK-8 试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司, 批号: 040219190604); Lipofectamine 3000 Transfection Kit (Invitrogen, 批号: 2067565); 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC; 上海生工生物工程股份有限公司, 批号: E917BA0020); Annexin V 凋亡试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司, 批号: E606336); p-NF- κ B p65 (p-p65, S536) Rabbit mAb (CST, 批号: 17); I κ B- α Rabbit mAb (CST, 批号: 12); PCNA XP (R) Rabbit mAb (CST, 批号: 4); Caspase-3 Rabbit Ab (CST, 批号: 18); GAPDH (6C5) sc-32233 mouse monoclonal IgG (Santa Cna Biotechnology, 批号: F0316); 引物均由 Qiagen 公司设计合成, 具体见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5' - 3')	引物长度
miRNA-146a	UGAGAACUGAAUCCAUUGGGUU	22bp
U6 snRNA	上游: CTCGCTTCGGCAGCACACA	17bp
	下游: AACGCTTCACGAATTTGCGT	20bp
TRAF6	上游: CAGTCCCCTGCACATTCAGT	20bp
	下游: CTGGGCCAACAGTCTCATGT	20bp
IRAK1	上游: TACCTGCCTGAGGAGTACATCAA	23bp
	下游: TCATCTTCAATCAGGTCTTTCAGA	24bp
GADPH	上游: GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	20bp
	下游: CGGAGATGATGACCCTTTTG	20bp

2.2 主要仪器 全自动流式细胞仪 (型号: AW07006, 美国贝克曼); 二氧化碳细胞培养箱 (型号: WJ-160A-3, 上海新苗公司); RNA 浓度测量仪 (型号: NANODROP 2000, 美国 Thermo 公司); PCR 仪 (型号: ABI Prism 7000, 美国应用生物系统公司); 全自动化学成像系统 (型号: JS-1046, 上海培清科技有限公司)。

3 细胞培养 大鼠腹腔注射麻醉, 浸在酒精中

消毒后, 在无菌条件下取滑膜。用手术剪把滑膜剪成 2~3 mm³ 大小的组织块, 剪碎后放进含有 20% FBS 高糖型 DMEM 培养基的 12 孔培养板中, 置于 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养, 培养至第 3 代进行后续实验。

4 中药含药血清制备 将 6 只 SD 大鼠随机分为空白对照组 (3 只) 和中药组 (3 只), 中药组给予灌胃温化蠲痹方 (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 延胡索 20 g 海桐皮 20 g 炙甘草 5 g 组成), 用药剂量根据实验动物与人体体表面积比等效剂量换算比例及用药前大鼠体重进行计算^[6], 临床成人中药用量为每天 3.2 g/kg, 则大鼠为 22.9 g/kg (相当于临床用量的 10 倍), 依据文献 [7] 给药方法, 中药组大鼠按 1 mL/100 g 灌胃, 空白对照组给予等剂量生理盐水灌胃, 连续给药 3 天, 1 天 2 次, 于末次给药 60 min 后, 行腹主动脉采血。采集所得血液于室温静置 60 min, 待血清析出后, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离得到血清, 56℃ 水浴灭活 30 min, 置 -80℃ 冰箱中保存备用。

5 造模方法 将 25 只 Wistar 大鼠适应性喂养 7 天, 按照随机数字表法分为正常组 10 只, 造模组 15 只, 造模参照《药理学实验指南-新药发现和药理学评价》^[8]; 制备 BC II 乳剂, 浓度为 2 mg/mL; 于造模组大鼠尾跟部 3 个部位进行皮下注射总量为 0.3 mL 的 BC II 乳剂; 7 天后进行 2 次免疫, 二次免疫时注射部位同为尾跟部 3 点皮下注射, 总量 0.15 mL。于 2 次免疫后的第 7~14 天测量大鼠足掌厚度以进行造模评估, 造模成功的评价标准: 关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分标准分级^[9]: 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。在造模成功的 12 只大鼠 (造模成功率 80%) 中随机选取 10 只作为模型组。

6 检测指标及方法

6.1 大鼠一般情况 观察各组 CIA 大鼠的精神状态、毛发色泽、肢体活动灵敏度、饮食度等并进行记录。

6.2 大鼠足掌厚度 以左后肢胫骨下端内踝处为标志点, 在造模前和造模后第 14 天用游标卡尺测量大鼠左踝关节直径。

6.3 细胞转染 将第 3 代正常、CIA 大鼠成纤维

样滑膜细胞分别接种于 6 孔板中（每孔 0.25×10^6 个细胞）并放进 5% CO_2 、37℃ 培养箱中培养，待细胞汇合度为 60%~80% 时使用 Lipofectamine 3000 进行转染。正常、CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞分别转染 miRNA-146a、反义 miRNA-146a，并分组如下：正常对照组、正常转染 miRNA-146a 组、正常转染反义 miRNA-146a 组；CIA 对照组、CIA 转染 miRNA-146a 组、CIA 转染反义 miRNA-146a 组。在 2 个离心管中用不含血清的改良 Eagle 培养基（Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM）稀释转染试剂和 miRNA，并混合均匀。两种试液 1:1 混合，静置室温孵育 10~15 min。将孵育好的混合液分别加入到每孔细胞中，放入细胞培养箱中培养 48 h 后收集细胞。

6.4 加入含药血清共培养 用改良 DMEM 高糖型细胞培养液配置 10% 含药血清与对照血清的培养基，以 2 mL/孔加入 6 孔细胞培养板，与 FLS 共培养 24 h 后收集细胞。

6.5 加入 NF- κ B 通路阻断剂 PDTC 取 4.1 mg 浓度为 $2.5 \times 10^4 \mu\text{mol/L}$ 的 PDTC 加入 1 mL 的灭菌蒸馏水中，每 1 mL 的细胞培养基中加入 4 μL 的 PDTC 溶液。分别在加入阻断剂后 0、6、24、48 h 后检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3（cysteineyl aspartate specific proteinase-3, Caspase-3）、NF- κ B 抑制因子 α （NF-kappa-B inhibitor alpha, I κ B α ）、增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen, PCNA）、p-p65 表达。

6.6 流式细胞术检测 FLS 凋亡情况 使用 Annexin V 凋亡试剂盒进行流式细胞术。将 FLS 接种在 6 孔板中（ 1×10^6 细胞/孔），培养 48 h，然后通过胰蛋白酶消化收集细胞，并用 PBS 重悬细胞。参照膜联蛋白 V - 异硫氰酸荧光素（Annexin V - FITC）/碘化丙啶（propidium iodide, PI）双染法细胞凋亡试剂盒说明书，分别加入 5 μL Annexin V - FITC 和 10 μL PI，室温下闭光孵育 15 min，用流式细胞仪检测 FLS 凋亡情况，每组设 3 个复孔。

6.7 CCK-8 测定 FLS 增殖情况 将第 3 代 CIA 大鼠与正常大鼠的成纤维样滑膜细胞以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 浓度接种到 96 孔板中，并向每孔加入 100 μL 不含双抗的培养基，放入培养箱中培养 24 h。在测试前 1 h 向待测孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值（FLS 增值率）。

6.8 蛋白免疫印迹（Western Blot）实验 收集 FLS 细胞，加入适量的 1 $\times$ SDS 细胞裂解液裂解细胞

提取蛋白质，将蛋白在 10% SDS-PAGE 凝胶上进行电泳，并转移至聚偏氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜上。然后在室温下将 PVDF 膜浸泡在 5% 的脱脂牛奶摇床中封闭 2 h。将膜与相应的一抗在 4℃ 下孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次后，将膜与 HRP 标记的二抗室温下孵育 1 h。最后全自动化学成像系统显影，使用 Image J 软件分析蛋白质条带灰度值，测定 Caspase-3、I κ B α 、PCNA、p-p65 表达。

6.9 实时定量聚合酶链式反应（real-time polymerase chain reaction, RT-PCR）分析 使用 Trizol 试剂提取总 RNA 并测定其浓度，使用逆转录试剂盒对每个样品进行逆转录成 cDNA，反应体系为 15 μL ，其条件为：37℃，180 min；85℃，5 min；4℃，终止反应。实时荧光 PCR 反应体系均为 15 μL ，2 个复孔，miRNA-146a 内参基因为 U6，普通基因内参基因为 GAPDH，使用 PCR 仪进行反应。其相对基因表达量通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 算法进行计算，测定 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达。

7 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， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠的一般情况（图 1） 正常组大鼠状态良好，饮食正常，活动自如，动作敏捷，反应灵活，体重自然增加，四肢颜色呈淡粉色。CIA 大鼠普遍精神萎靡、行动迟缓、食欲不振、毛发枯槁，体重增长减缓甚至停滞，四肢中某些肢体肿胀、畸形、僵硬、行动不便，严重的甚至完全无法活动，患肢颜色呈紫红色。



注：A 为造模前；B 为造模后

图 1 造模前后大鼠足趾外观

2 两组大鼠足掌厚度比较（表 2） 与造模前比较，模型组大鼠足掌厚度明显增加（ $P < 0.01$ ）；与正常组比较，模型组大鼠足掌厚度明显增加（ $P < 0.01$ ）。

3 各组 FLS 凋亡率比较（表 3） 与正常对照

表 2 两组大鼠足掌厚度比较 (mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	足掌厚度	
		造模前	造模第 14 天
正常	10	3.151 ± 0.100	3.207 ± 0.151
模型	10	3.231 ± 0.160	5.434 ± 0.929* [△]

注: 与本组造模前比较, * $P < 0.01$; 与正常组比较, [△] $P < 0.01$

组比较, 正常转染 miRNA-146a 组 FLS 凋亡率降低 ($P < 0.05$), 正常转染反义 miRNA-146a 组 FLS 凋亡率增加 ($P < 0.05$); 与 CIA 对照组比较, CIA 转染 miRNA-146a 组 FLS 凋亡率降低 ($P < 0.05$), CIA 转染反义 miRNA-146a 组 FLS 凋亡率增加 ($P < 0.05$); 分别与正常转染 miRNA-146a 组、CIA 转染 miRNA-146a 组比较, 正常转染反义 miRNA-146a 组、CIA 转染反义 miRNA-146a 组 FLS 凋亡率增加 ($P < 0.05$)。

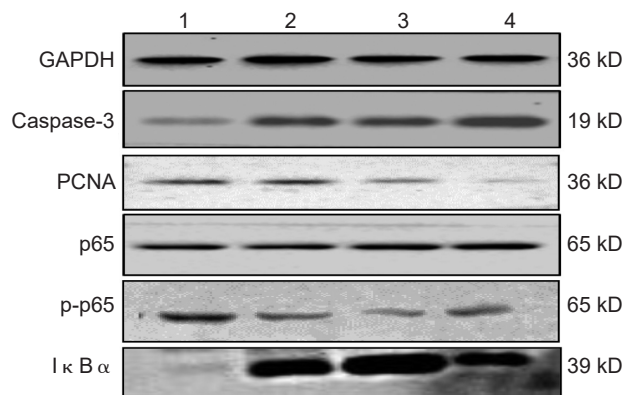
表 3 各组 FLS 凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率
正常对照	3	15.71 ± 0.93
正常转染 miRNA-146a	3	12.89 ± 0.69*
正常转染反义 miRNA-146a	3	16.74 ± 0.37* [△]
CIA 对照	3	12.53 ± 0.77
CIA 转染 miRNA-146a	3	10.61 ± 0.36 [△]
CIA 转染反义 miRNA-146a	3	14.61 ± 0.17 [△] [○]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 CIA 对照组比较, [△] $P < 0.05$; 与正常转染 miRNA-146a 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 CIA 转染 miRNA-146a 组比较, [○] $P < 0.05$

4 NF- κ B 通路阻断剂 PDTC 对 Caspase-3、I κ B α 、PCNA、p-p65 蛋白表达影响 (图 2, 表 4) 体外培养的 FLS 中加入 NF- κ B 通路阻断剂 PDTC, 分别阻断 0、6、24、48 h。随着阻断时间延长, Caspase-3 和 I κ B α 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); PCNA、p-p65 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

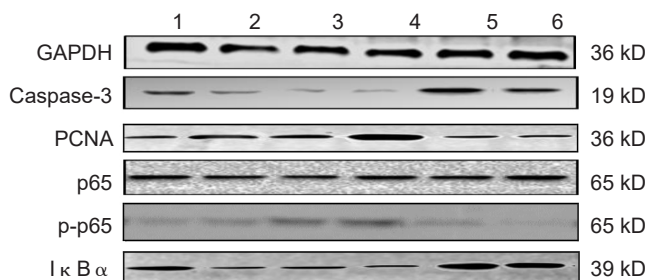
5 各组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达及 Caspase-3、PCNA、p-p65、I κ B α 蛋白表达水平比较 (图 3, 表 5) 与正常对照组比较, 正常转染 miRNA-146a 组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达及 PCNA、p-p65 蛋白表达增加, Caspase-3、I κ B α 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 正常转染反义 miRNA-146a 组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基



注: 1 为加入阻断剂 0 h; 2 为加入阻断剂 6 h; 3 为加入阻断剂 24 h; 4 为加入阻断剂 48 h

图 2 加入 NF- κ B 通路阻断剂后 PDTC 蛋白表达电泳图

因表达及 PCNA、p-p65 蛋白表达降低, Caspase-3、I κ B α 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。与 CIA 对照组比较, CIA 转染 miRNA-146a 组 TRAF6、IRAK1 基因表达及 PCNA、p-p65 蛋白表达增加, Caspase-3、I κ B α 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); CIA 转染反义 miRNA-146a 组 miRNA-146a、TRAF6、IRAK1 基因表达及 PCNA、p-p65 蛋白表达降低, Caspase-3、I κ B α 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。



注: 1 为正常对照组; 2 为 CIA 对照组; 3 为正常转染 miRNA-146a 组; 4 为 CIA 转染 miRNA-146a 组; 5 为正常转染反义 miRNA-146a 组; 6 为 CIA 转染反义 miRNA-146a 组

图 3 各组 Caspase-3、PCNA、p65、p-p65、I κ B α 蛋白表达电泳图

6 两组 FLS 增殖率比较 (表 6) 与对照血清组比较, 含药血清组 FLS 增殖率降低 ($P < 0.05$)。

讨论

虽然中医学理论中并无与 RA 具有明确关联的

表 4 NF- κ B 通路阻断剂 PDTC 对 Caspase-3、PCNA、I κ B α 、p-p65 蛋白表达的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

时间	n	Caspase-3	PCNA	I κ B α	p-p65
0 h	3	1.05 ± 0.15	0.83 ± 0.07	0.26 ± 0.03	1.02 ± 0.11
6 h	3	2.63 ± 0.20*	0.83 ± 0.09	2.18 ± 0.25*	0.46 ± 0.06*
24 h	3	2.89 ± 0.23*	0.42 ± 0.03*	2.31 ± 0.22*	0.34 ± 0.02*
48 h	3	2.95 ± 0.26*	0.28 ± 0.05*	2.56 ± 0.27*	0.31 ± 0.04*

注: 与阻断 0 h 比较, * $P < 0.05$

表 5 各组 miRNA-146a、TRAF 6、IRAK1 基因表达及 Caspase-3、PCNA、p-p65、I κ B α 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miRNA-146a	TRAF6	IRAK1	Caspase-3	PCNA	p-p65	I κ B α
正常对照	3	1	1	1	1.05 $\pm$ 0.13	0.56 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.01	1.28 $\pm$ 0.14
正常转染 miRNA-146a	3	5.68 $\pm$ 0.50*	1.79 $\pm$ 0.18*	3.70 $\pm$ 0.18*	0.42 $\pm$ 0.03*	1.11 $\pm$ 0.09*	0.20 $\pm$ 0.05*	0.77 $\pm$ 0.06*
正常转染反义 miRNA-146a	3	0.06 $\pm$ 0.02*	0.17 $\pm$ 0.02*	0.36 $\pm$ 0.13*	2.63 $\pm$ 0.21*	0.28 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.02*	1.79 $\pm$ 0.16*
CIA 对照	3	12.37 $\pm$ 1.34	3.17 $\pm$ 0.62	291.10 $\pm$ 3.40	0.53 $\pm$ 0.04	1.39 $\pm$ 0.12	0.12 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.08
CIA 转染 miRNA-146a	3	37.11 $\pm$ 1.93 $^{\Delta}$	29.72 $\pm$ 0.91 $^{\Delta}$	411.85 $\pm$ 6.96 $^{\Delta}$	0.26 $\pm$ 0.05 $^{\Delta}$	2.78 $\pm$ 0.31 $^{\Delta}$	0.29 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$	0.26 $\pm$ 0.03 $^{\Delta}$
CIA 转染反义 miRNA-146a	3	0.75 $\pm$ 0.11 $^{\Delta}$	0.35 $\pm$ 0.17 $^{\Delta}$	0.43 $\pm$ 0.12 $^{\Delta}$	2.11 $\pm$ 0.19 $^{\Delta}$	0.22 $\pm$ 0.03 $^{\Delta}$	0.05 $\pm$ 0.01 $^{\Delta}$	1.54 $\pm$ 0.12 $^{\Delta}$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与 CIA 对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

表 6 两组 FLS 增殖率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	增殖率			
		1d	2d	3d	4d
对照血清	3	1.87 $\pm$ 0.92	3.21 $\pm$ 1.05	3.91 $\pm$ 1.94	5.04 $\pm$ 3.49
含药血清	3	1.44 $\pm$ 0.71*	2.43 $\pm$ 0.87*	3.38 $\pm$ 1.10*	3.95 $\pm$ 2.65*

注:与对照血清组同期比较,* $P < 0.05$

病名,根据 RA 临床表现,中医学将其归于“痹病”。且 RA 病情缠绵难愈,但风、寒、湿三类外邪是痹病发病的关键,外邪入侵关节,致气血滞而成瘀、引浊湿聚而成痰,痰瘀互结伏于筋骨之间,久病则耗损肝肾,故关节强直、经脉拘挛。外邪非气血虚而不入,气血不足是痹病发病的基础。因此治疗多选择祛风、通络、化痰、培正。温化蠲痹方中威灵仙性善行,主诸风,入各经络,忍冬藤通络解毒,防风从各引经之药而无所不达,三药并用以散风湿、消痹痛,共为君;久病伤里,邪气伏藏于骨,非血肉有情之品无以搜刮深陷之痰湿邪气,故配伍全蝎、蜈蚣、僵蚕以增强逐瘀化痰之性;白芥子化痰、白芷燥湿、延胡索散瘀,与全蝎、蜈蚣、僵蚕共为臣;海桐皮舒筋通络以缓病情、薏苡仁渗湿健脾以消病因,共为佐。全方寒热并用、风湿痰瘀并消。

miRNA-146a 通过多途径参与了诸多疾病发生发展^[8,10]。研究证明 miRNA 表达改变与炎症信号通路的增强、促炎细胞因子分泌增加以及其他维持自身免疫恶性循环过程相关^[11]。对于 NF- κ B 通路,miRNA-146a 作为 NF- κ B 的依赖基因^[12],可以调节 NF- κ B 通路上下游进而调节 NF- κ B 通路的活性。TRAF6、IRAK1 作为 miRNA-146a 的下游靶基因,IRAK1 被认为是 TLR/IL-1 受体与 TRAF6 的连接器,且磷酸化的 IRAK1 可以与 TRAF6 结合^[13],从而激活 NF- κ B 信号通路。miRNA-146a 对 TRAF6、IRAK1 起到负调控的作用。

本研究探索了 miRNA-146a 对 CIA 大鼠 FLS 细胞增殖、凋亡的影响以及温化蠲痹方的调控机制。体外实验数据揭示了 CIA 大鼠 FLS 沉默 miRNA-146a 后,NF- κ B 通路表达降低,FLS 凋亡增加,增殖降低,

说明 miRNA-146a 可能通过参与 NF- κ B 通路调控 FLS 凋亡和增殖。加入阻断剂后,miRNA-146a 及其靶基因表达降低,进一步证明 miRNA-146a 是通过 NF- κ B 通路调控细胞凋亡和增殖。FLS 与温化蠲痹方含药血清共培养后,miRNA-146a 及其靶基因表达降低,FLS 凋亡增加,细胞增殖率降低,提示温化蠲痹方可能通过抑制 miRNA-146a 介导的 NF- κ B 通路诱导 FLS 凋亡和抑制 FLS 增殖。该研究表明,温化蠲痹方可以通过 miRNA-146a/NF- κ B 环路调节调节 FLS 的增殖与凋亡,这解释了 miRNA-146a 可能是温化蠲痹方治疗 RA 的潜在相关基因。

有研究报道 miRNA-146a 与靶基因 TRAF6、IRAK1 是负调控^[14],新近有研究发现,在神经系统中 miRNA-146a 可以降低 TRAF6 和 IRAK1 表达^[15],在 RA 患者中,药物治疗后外周血中 miRNA-146a、IRAK1、TRAF6、NF- κ B 基因表达下调,这提示药物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^[16]。这或许与 RA 中活动指数具有一定的相关性,或与 miRNA-146a 基因多态性相关,同时有研究表明 miRNA-146a 中 rs2910164 多态性性直接影响其靶向 TRAF6 和 IRAK1 的能力^[17];又或是在 RA 中存在其他通路或分子上调了 TRAF 6、IRAK1 基因表达,但与此同时,IRAK1、TRAF6 仍在 miRNA-146a 控制之下。因此仍需探究 miRNA-146a/IRAK1/TRAF6 更复杂的调控网络,其具体分子机制还有待进一步研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Mu N, Gu JT, Huang TL, et al. A novel NF-kappaB/YY1/microRNA-10a regulatory circuit in fibroblast-like synoviocytes regulates inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20059.
- [2] Karouzakis E, Gay RE, Gay S, et al. Epigenetic

- deregulation in rheumatoid arthritis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 711: 137–149.
- [3] Lochhead RB, Ma Y, Zachary JF, et al. MicroRNA-146a provides feedback regulation of lyme arthritis but not carditis during infection with *Borrelia burgdorferi*[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10 (6): e1004212.
- [4] 刘喜德, 刘敏, 蔡龙, 等. 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 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38 (11): 1320–1326.
- [5] 黄梦婷, 郑琳琳, 刘喜德. 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 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41 (4): 487–493.
- [6] Lenert A, Fardo DW. Detecting novel microRNAs in rheumatoid arthritis with gene-based association testing[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2017, 35 (4): 586.
- [7] 吴健宇, 穆静, 李仪奎. 血清药理学方法体外实验系统的血清添加量问题 [J]. *上海中医药杂志*, 2001, 9: 8–11.
- [8] 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.
- [9] Carter RA, Campbell IK, O'Donnell K, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint inflammation and alters B cell trafficking[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 128 (1): 44–51.
- [10] Fu HX, Fan XP, Li M, et al. MirRNA-146a relieves kidney injury in mice with systemic lupus erythematosus through regulating NF- κ B pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (16): 7024–7032.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (33): 12481–12486.
- [14] Ye H, Arron JR, Lamothe B, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling[J]. *Nature*, 2002, 418 (6896): 443–447.
- [15] 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: 311–311.
- [16] 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-kappa B and pro-inflammatory cytokines following a clinical trial in rheumatoid arthritis patients[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42 (3): 228–236.
- [17] Alevizos I, Lille GG. MicroRNAs in Sjögren's syndrome as a prototypic autoimmune disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 9 (9): 618–621.
- (收稿: 2021-02-16 在线: 2021-11-24)
- 责任编辑: 段碧芳
- 英文责编: 张晶晶