

· 基础研究 ·

温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎小鼠滑膜增殖、凋亡及 Hotair/Wnt1/ β -catenin 通路的影响黄柳云¹ 周海丽¹ 詹魁骏¹ 刘喜德²

摘要 目的 以胶原诱导性关节炎 (CIA) 小鼠为实验对象进行体内实验, 从 Hotair/Wnt1/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路的角度, 分析温化蠲痹方 (WHJBD) 对类风湿性关节炎 (RA) 的干预机制。方法 选用雄性 DBA/1J 小鼠建立 CIA 模型, 将造模成功小鼠按随机数字表法分为 4 组: 模型组 (CIA 组)、温化蠲痹方组 (WHJBD 组)、甲氨蝶呤组 (MTX 组)、WHJBD+MTX 组, 每组 6 只。并随机选取同一批次的正常小鼠 6 只作为正常组。WHJBD 组每天予 WHJBD 灌胃 (25.78 g/kg)、MTX 组每周予 MTX 灌胃 (1.288 mg/kg)、WHJBD+MTX 组同时予 WHJBD 及 MTX 灌胃, 正常组及 CIA 组予同等剂量生理盐水灌胃, 均持续 4 周。采用游标卡尺测量足掌和踝关节的肿胀程度并计算关节肿胀度, 实时荧光定量 PCR 法检测各组 Hotair、Wnt 抑制因子 1 (WIF1)、C-myc、G1/S - 特异性周期蛋白 (CyclinD1) 表达水平, 免疫组化检测 Wnt1、 β -catenin、肿瘤增殖抗原抗体 (Ki-67)、Caspase3、B 淋巴细胞瘤 -2 (Bcl2)、Bcl2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达水平。结果 与 CIA 组比较, WHJBD、MTX、WHJBD+MTX 组干预后小鼠关节肿胀度随着干预时间的增加逐渐降低; 增殖相关蛋白 Ki-67 表达减少, 凋亡相关蛋白 Caspase3、Bax 表达增加, Bcl2 表达减少; Hotair、WIF1 基因表达增加, C-myc、CyclinD1 基因表达减少; 通路蛋白 Wnt1、 β -catenin 表达减少; 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 WHJBD 具有减轻 CIA 小鼠足掌和踝关节肿胀度和关节炎程度, 调节 Hotair/Wnt1/ β -catenin 通路和滑膜组织的增殖、凋亡, 发挥治疗 CIA 小鼠作用。

关键词 温化蠲痹方; 类风湿性关节炎; 胶原诱导性关节炎; Hotair/Wnt1/ β -catenin 信号通路

Effects of Wenhua Juanbi Decoction on Proliferation, Apoptosis and Hotair/Wnt1/ β -catenin Pathway in the Synovial Membrane of Collagen-Induced Arthritis Mice HUANG Liu-yun¹, ZHOU Hai-li¹, ZHAN Kui-jun¹, and LIU Xi-de² *1 Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 2 Department of TCM, Zhejiang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Hangzhou (310003)*

ABSTRACT Objective Taking collagen-induced arthritis (CIA) mice as experimental subjects, *in vivo* experiments were conducted to analyze the therapeutic mechanism of Wenhua Juanbi Decoction (WHJBD) in preventing and treating rheumatoid arthritis (RA) from the perspective of Hotair/Wnt1/ β -catenin signaling pathway. **Methods** Male DBA/1J mice were selected and the CIA mouse model was established, and successfully modeled mice were divided into 4 groups: model group (CIA group), WHJBD group, methotrexate group (MTX group), WHJBD+MTX group, 6 in each group. And 6 normal mice from the same batch were randomly selected as the normal group. Mice in WHJBD group were given WHJBD per day by gastrogavage (25.78 g/kg). Mice in the MTX group were given MTX per week by gastrogavage (1.288 mg/kg). Those in the WHJBD+MTX group were given with both WHJBD and MTX by gastrogavage. Those in the normal and model groups were given the same dose of normal saline by gastrogavage. All medication lasted for 4 successive weeks.

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (No.LY21H270001); 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中医科 (杭州 310003)

通讯作者: 刘喜德, Tel: 0571-56108429, E-mail: liuxide2001@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220719.306

The swelling of the foot and ankle joints were measured by vernier calipers. Real-time qPCR was used to detect the expression levels of Hotair, Wnt inhibitory factor 1 (WIF1), C-myc, and G1/S - specific cyclin - D1 (CyclinD1) in each group, and immunohistochemistry was used to detect the expression levels of Wnt1, β -catenin, antigen identified by monoclonal antibody Ki67 (Ki-67), Caspase3, B-cell lymphoma-2 (Bcl2) and Bcl2 associated X protein (Bax) proteins. **Results** Compared with the CIA group, the swelling of mice in the WHJBD, MTX and WHJBD+MTX groups after treatment decreased gradually as intervention time went on. The expression of proliferation-related protein Ki-67 decreased, the expressions of apoptosis-related proteins Caspase3 and Bax increased, and the expression of Bcl2 decreased ($P<0.05$). The expressions of Hotair and WIF1 genes increased. The expressions of C-myc and CyclinD1 genes decreased ($P<0.05$). The expression of pathway proteins Wnt1 and β -catenin decreased ($P<0.05$). **Conclusion** WHJBD reduced the degree of swelling and arthritis in the paw and ankle joints of CIA mice, regulated the proliferation and apoptosis of Hotair/Wnt1/ β -catenin pathway and synovial tissue, thus playing a therapeutic role in CIA mice.

KEYWORDS Wenhua Juanbi Decoction; rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; Hotair/Wnt1/ β -catenin signaling pathway

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种受环境、自身免疫、遗传等多重风险因素影响的自身免疫性疾病,影响着 0.28%~0.45% 的我国人口^[1], 其中约有 1/3 的患者因疾病而提前停止工作^[2]。并且在确诊后 5 年, 30%~40% 患者的关节会因骨骼与软骨的进行性损伤出现功能障碍^[3], 这给我国带来了巨大的经济和人力负担。

Wnt 蛋白家族是高度垂直进化保守且广泛存在的。其信号转导级联控制着无数生物的生长发育以及各种病理现象, 包括 RA^[4]。长链非编码 RNA 在自身免疫性疾病的研究中也引起了广泛的关注, 如 Hotair: RA 中的免疫细胞和滑膜组织都受到了 Hotair 不同程度的影响^[5]。滑膜组织是关节腔内重要的结缔组织。滑膜研究证明, 分析滑膜组织可以反映药物治疗的有效性和病情的变化^[6]。温化蠲痹方 (Wenhua Juanbi Decoction, WHJBD) 是基于多年对 RA 临床总结出来的经验方, 在临床中取得了较好的疗效^[7]; 为了进一步明确治疗机制, 本团队选用胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型, 即目前研究 RA 最常用的、具有 RA 的病理特征和免疫学特征的模型^[8], 通过体内动物实验, 验证 WHJBD 对滑膜增殖、凋亡和 Hotair/Wnt1/ β -catenin 通路的影响。

材料与方法

1 动物 DBA/1J 小鼠, 45 只, SPF 级, 雄性, 6~8 周龄, 购买于上海斯莱克动物实验有限公司, 饲养于浙江中医药大学动物实验中心, 实验动物许可证: [SYXK (浙) 2021-0012], 按照标准自由饮食, 温度: 20~26 °C, 湿度: 40%~70%, 适应性喂养

1 周后开始实验, 并经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准 (No.IACUC-20210823-06)。

2 药物 WHJBD 组成: 威灵仙 30 g 忍冬藤 20 g 防风 10 g 全蝎 6 g 蜈蚣 2 条 僵蚕 10 g 白芥子 10 g 白芷 10 g 元胡 20 g 海桐皮 20 g 炒薏苡仁 30 g, 均购于杭州市红十字会医院中药房, 制成母液浓度为 100 mg/mL 的水煎剂, 由杭州市红十字会医院煎药室提供。小鼠用药剂量换算根据《实验动物学》^[9] 中实验动物及人的体表面积比例进行药物剂量换算, 小鼠用药剂量为每日 25.78 g/kg。

甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX, 2.5 mg, 上海信谊药厂有限公司, 批号: H31020644) 混悬液: 小鼠用药剂量为每周 1.288 mg/kg, 将 MTX 研磨成粉末, 逐步融入 0.5% 羧甲基纤维素钠中, 换算方法同上, 配置成 MTX 混悬液。

3 主要试剂与仪器 牛 II 型胶原 (chondrex, 批号: 20022); 完全佐剂 (chondrex, 批号: 7008); 不完全佐剂 (chondrex, 批号: 7002); B 淋巴细胞瘤 -2 (B-cell lymphoma-2, Bcl2) 抗体 (Abcam, 批号: GR3412384-2); Bcl2 相关 X 蛋白 (Bcl2 associated X protein, Bax) 抗体 (Cell Signaling Technology, 批号: 2); Caspase3 抗体 (Cell Signaling Technology, 批号: 19); 肿瘤增殖抗原 (antigen identified by monoclonal antibody Ki67, Ki-67) 抗体 (Abcam, 批号: GR3193982-1); Wnt1 蛋白 (Santa CRUZ, 批号: #L1619); β -连环蛋白 (β -catenin) 抗体 (Cell Signaling Technology, 批号: 5); 马抗小鼠 IgG (Cell Signaling Technology, 批号: 35); 山羊抗兔 IgG 抗体 (杭州达文生物有限公司, 批号: J805472710); RNA 组织提取试剂盒 (上海奕杉生物科技有限公司,

批号: ES111901F); 三氯甲烷 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 141016); 羧甲基纤维素钠 (北京索莱宝科技有限公司, 由浙江中医药大学动物实验中心提供); DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: K216405E); 逆转录试剂盒 (TAKARA, 批号: AHG1528A); FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, 批号: 11610100); EDTA 脱钙液 (博士德生物工程有限公司, 批号: 13189A71); PCR 引物 (英潍捷基 (上海) 贸易有限公司); NanoDrop2000 (Thermo); 96 孔无裙边 PCR 板 (Axygen); 游标卡尺 (义乌市开拓五金有限公司); 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); RM2016 型切片机 (德国徕卡仪器有限公司); HD-330 型摊片机 (湖北慧达仪器有限公司)。

4 方法

4.1 CIA 模型建立 参考试剂说明书: 初次免疫: 牛 II 型胶原蛋白与等体积完全佐剂混合, 制成乳化剂, 滴在蒸馏水上不散开则乳化成功。在鼠尾多点注射 0.1 mL 乳化剂。21 天后进行再次免疫: 牛 II 型胶原蛋白和等体积弗氏不完全佐剂混合, 制成乳化剂, 检验方法同上。在鼠尾部多点注射 0.1 mL 乳化剂。根据关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分表^[10]对小鼠模型进行评分, 每只老鼠 4 足最高评分为 16 分, 评分 ≥ 1 分为造模成功^[11], 剔除造模失败小鼠 5 只。

4.2 分组及药物干预 将造模成功的小鼠按照随机数字表法分为 CIA 组、WHJBD 组、MTX 组、WHJBD+MTX 组, 每组 6 只, 并随机选取同一批次的正常小鼠 6 只作为正常组。WHJBD 组每天予水煎剂 25.78 g/kg; MTX 组每周予混悬液 1.288 mg/kg; WHJBD+MTX 组每天予同等剂量 WHJBD 水煎剂, 每周予同等剂量的 MTX 混悬液。用药 4 周后, 使用 3% 戊巴比妥钠进行麻醉, 取小鼠关节滑膜, -80 °C 保存 (动物采用二氧化碳吸入法处死)。

5 观察指标及检测方法

5.1 小鼠足掌和踝关节肿胀度 初次免疫前和免疫成功后, 采用游标卡尺测量小鼠足掌和踝关节肿胀度。小鼠进行药物干预后, 每隔 1 周测量 1 次, 每次测量均由同一个成员和同一把游标卡尺, 直至用药结束。关节肿胀度 (mm²) = 后爪厚度 (mm) × 踝关节宽度 (mm)。

5.2 免疫组化 取新鲜小鼠后肢滑膜组织, 并进行包埋, 将包埋好的组织块切成厚度约 5 μ m; 石蜡切片依次浸入二甲苯溶液透明、梯度乙醇复水; 滴加抗原修复液进行抗原修复后滴加山羊血清封闭液封

闭, 切片上滴加稀释好对应的一抗孵育 (β -catenin: 1: 50; Wnt1: 1: 50; Bax: 1: 50; Bcl2: 1: 5 000; caspase3: 1: 50; Ki-67: 1: 1 000), 4 °C 过夜, 次日孵育对应的二抗 (1: 2 000); 使用 DAB 显色试剂盒显色, 苏木素液复染, 1% 盐酸酒精分化、1% 胺水返蓝、梯度乙醇脱水、二甲苯透明; 中性树胶封片, 显微镜下采图, Image J 分析。

5.3 实时荧光定量 PCR 法 (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 根据组织 RNA 提取试剂盒说明书对滑膜组织进行 RNA 提取, NanoDrop2000 测定 RNA 浓度 (ng/ μ L) 和纯度, OD_{260/280} 比值介于 1.8~2.0 之间视为合格; 使用逆转录试剂盒进行逆转录, 合成 cDNA, 反应条件: 37 °C 180 min; 85 °C 5 min; 4 °C 保存; 使用 FastStart Universal SYBR Green Master 进行 qPCR: Hotair、C-myc 癌基因 (MYC proto-oncogene, C-myc) 和 G1/S- 特异性周期蛋白 (G1/S-specific Cyclin-D1, CyclinD1)、Wnt 抑制因子 1 (Wnt inhibitory factor 1, WIF1), 混匀、离心、上机, 反应条件如下: 预变性: 95 °C, 时间 30 s, 循环数 1; PCR 反应: 95 °C, 5 s, 循环数 40, 95 °C, 34 s, 循环数 40。各基因名称、序列及引物长度见表 1。

6 统计学方法 使用 GraphPad Prism 9 进行统计与分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间同期比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析及 LSD 或 SNK 检验; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 基因名称、序列及引物长度

基因名称	序列 (5' → 3')	引物长度 (bp)
Hotair	上游: GCGCCAACGTAGACCAAAG	20
	下游: TCTACCGATGTTGGGGACCT	20
CyclinD1	上游: TCGTGGCCTCTAAGATGAAGGA	22
	下游: TCGGGCCGATAGAGTTGT	19
C-myc	上游: ATGCCCCTCAACGTGAACCTTC	21
	下游: CGCAACATAGGATGGAGAGCA	21
β -actin	上游: GGACCTGACAGACTACCTCA	20
	下游: TCTTTGATGTACGCACGATTT	22
WIF1	上游: GCTCTGGAGCATCCTACCTT	20
	下游: AATCATGTGTAAAGGGGGCC	20

结 果

1 各组小鼠关节肿胀度变化比较 (表 2) 与本组第 0 天比较, CIA、WHJBD、MTX、WHJBD+MTX 组第 40、47、54、61、68 天关节肿胀度增大 (*P* < 0.01); 与正常组同期比较, CIA 组在第 40、47、54、61、68 天关节肿胀度更大 (*P* < 0.05);

表 2 各组小鼠关节肿胀度比较 (mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 天	40 天	47 天	54 天	61 天	68 天
正常	3	4.03 ± 0.60	5.07 ± 0.44	5.05 ± 0.37	4.84 ± 0.12	5.15 ± 0.45	4.68 ± 0.24
CIA	3	4.23 ± 0.48	14.93 ± 0.34* [△]	15.34 ± 3.39* [△]	13.15 ± 3.13* [△]	12.18 ± 1.91* [△]	11.86 ± 2.26* [△]
WHJBD	3	3.90 ± 0.38	15.88 ± 1.60*	13.49 ± 1.41*	10.82 ± 1.49*	9.49 ± 1.40*	9.26 ± 0.97*
MTX	3	4.07 ± 0.15	15.27 ± 1.49*	13.07 ± 1.67*	12.31 ± 0.74*	10.27 ± 1.48*	9.40 ± 1.32*
WHJBD+MTX	3	4.13 ± 0.20	14.19 ± 1.09*	10.83 ± 1.77* [▲] [○]	9.88 ± 2.07*	9.34 ± 1.82*	8.11 ± 1.56* [▲]

注: 与本组第 0 天比较, *P<0.01; 与正常组同期比较, [△]P<0.05; 与 CIA 组同期比较, [▲]P<0.05; 与 WHJBD 组同期比较, [○]P<0.05

与 CIA 组同期比较, WHJBD+MTX 组第 47、68 天关节肿胀度减轻 (P<0.05); 与 WHJBD 组同期比较, WHJBD+MTX 组第 47 天关节肿胀度减轻更甚 (P<0.05)。

2 各组小鼠滑膜组织 Ki-67 表达比较 (表 3) 与正常组比较, CIA 组 Ki-67 表达增加 (P<0.05); 与 CIA 组比较, WHJBD、MTX、WHJBD+MTX 组治疗后 Ki-67 表达减少 (P<0.05); 分别与 WHJBD 组或 MTX 组比较, WHJBD+MTX 组治疗后 Ki-67 表达更低, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。

表 3 各组小鼠滑膜组织 Ki-67 表达比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

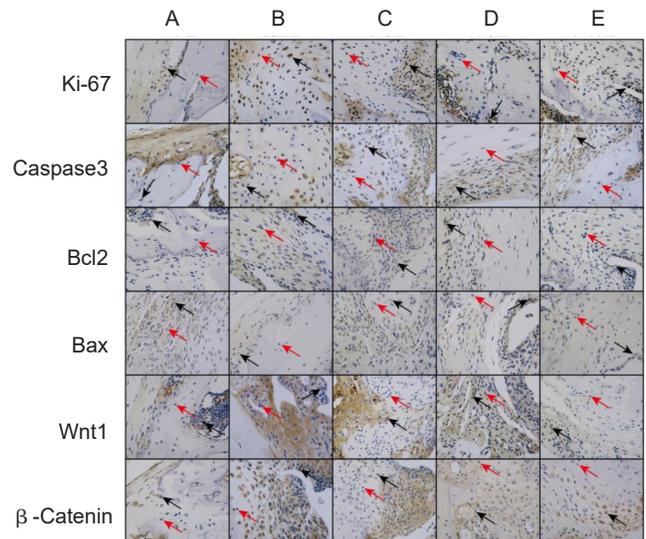
组别	n	Ki-67 阳性细胞率
正常	3	0.357 ± 0.032
CIA	3	0.750 ± 0.036*
WHJBD	3	0.547 ± 0.035 [△]
MTX	3	0.567 ± 0.025 [△]
WHJBD+MTX	3	0.453 ± 0.032 [▲] [○]

注: 与正常组比较, *P<0.05; 与 CIA 组比较, [△]P<0.05; 与 WHJBD 组比较, [▲]P<0.05; 与 MTX 组比较, [○]P<0.05

3 各组小鼠滑膜组织 Caspase3、Bcl2、Bax、Wnt1、β-Catenin 蛋白表达比较 (表 4, 图 2) 与正常组比较, CIA 组 Bcl2、Wnt1、β-Catenin 表达增加, Caspase3、Bax 蛋白表达减少 (P<0.05); 与 CIA 组比较, WHJBD、MTX、WHJBD+MTX 组治疗后 Bcl2、Wnt1、β-Catenin 蛋白表达减少 (P<0.05), Caspase3、Bax 蛋白表达增加 (P<0.05); 分别与 WHJBD、MTX 组比较, WHJBD+MTX 组治疗后 Bcl2、Wnt1、β-Catenin 蛋白表达更低, 差异均有

统计学意义 (P<0.05)。

4 各组小鼠滑膜组织 Hotair、WIF1、C-myc、CyclinD1 mRNA 表达比较 (表 5) 与正常组比较, CIA 组 Hotair、WIF1mRNA 表达降低 (P<0.05), C-myc、CyclinD1mRNA 表达增加 (P<0.05); 与 CIA 组比较, WHJBD、MTX、WHJBD+MTX 组干预后 Hotair、WIF1mRNA 表达增加 (P<0.05), C-myc、CyclinD1mRNA 表达减少 (P<0.05); 分别与 WHJBD、MTX 组比较, WHJBD+MTX 组治疗后 WIF-1、C-myc mRNA 表达更低, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。



注: A 为正常组; B 为 CIA 组; C 为 WHJBD 组; D 为 MTX 组; E 为 WHJBD+MTX 组; 红色箭头为阴性细胞; 黑色箭头为阳性细胞

图 2 各组小鼠滑膜组织 Ki-67、Caspase3、Bcl2、Bax、Wnt1、β-Catenin 蛋白表达 (免疫组化, ×400)

表 4 各组小鼠滑膜组织 Caspase3、Bcl2、Bax、Wnt1、β-Catenin 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase3	Bcl2	Bax	Wnt1	β-Catenin
正常	3	0.763 ± 0.085	0.310 ± 0.026	0.697 ± 0.015	0.290 ± 0.026	0.300 ± 0.035
CIA	3	0.517 ± 0.035*	0.663 ± 0.040*	0.363 ± 0.045*	0.733 ± 0.045*	0.770 ± 0.046*
WHJBD	3	0.643 ± 0.015 [△]	0.537 ± 0.020 [△]	0.623 ± 0.056 [△]	0.500 ± 0.070 [△]	0.577 ± 0.035 [△]
MTX	3	0.647 ± 0.031 [△]	0.557 ± 0.051 [△]	0.613 ± 0.040 [△]	0.620 ± 0.010 [△]	0.673 ± 0.020 [△]
WHJBD+MTX	3	0.680 ± 0.030 [△]	0.426 ± 0.040 [▲] [○]	0.587 ± 0.073 [△]	0.383 ± 0.030 [▲] [○]	0.463 ± 0.030 [▲] [○]

注: 与正常组比较, *P<0.05; 与 CIA 组比较, [△]P<0.05; 与 WHJBD 组比较, [▲]P<0.05; 与 MTX 组比较, [○]P<0.05

表 5 各组小鼠滑膜组织 Hotair、WIF1、C-myc、CyclinD1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hotair	WIF1	C-myc	CyclinD1
正常	3	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
CIA	3	0.788 ± 0.037*	0.019 ± 0.007*	1.369 ± 0.018*	1.697 ± 0.172*
WHJBD	3	1.349 ± 0.131 [△]	0.105 ± 0.006 [△]	1.121 ± 0.100 [△]	0.994 ± 0.120 [△]
MTX	3	1.409 ± 0.122 [△]	0.118 ± 0.005 [△]	1.018 ± 0.030 [△]	0.917 ± 0.015 [△]
WHJBD+MTX	3	1.621 ± 0.098 [△]	0.083 ± 0.000 ^{△▲○}	0.845 ± 0.087 ^{△▲○}	1.185 ± 0.188 [△]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与 CIA 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 WHJBD 组比较, [▲] $P < 0.05$; 与 MTX 组比较, [○] $P < 0.05$

讨 论

随着国内 RA 的患病率逐步增加, 中国 RA 治疗情况不容乐观: 活动期 RA 缓解率低, 约有 1/5 的患者出现药物不良反应^[2]。

WHJBD 是由刘喜德教授经多年经验结合临床研究拟成。威灵仙辛散走窜, 行气活血以祛风湿; 忍冬藤能清能散, 以清热解毒见长, 两者一寒一热, 共为君药。根据现代药理学和动物实验: 威灵仙总皂苷是威灵仙的有效成分, 研究表明威灵仙总皂苷可以通过调节外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的百分率从而抑制炎症细胞因子分泌; 忍冬藤具有抗炎作用, 可以减低脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的巨噬细胞中炎症因子的表达, 且现代药理研究表明忍冬藤的抗炎作用是因为忍冬藤富含异绿原酸 A 和双黄酮^[12]。蜈蚣、全蝎和僵蚕三药合用为臣药。现代动物实验研究证明, 全蝎和蜈蚣联用, 可以缓解 CIA 大鼠的关节疼痛, 减少炎症细胞的浸润, 减轻关节软骨破坏, 减少滑膜增生, 从而改善关节损伤^[13]。延胡索行血中气滞, 气中血滞, 以消一身之痹痛, 海桐皮苦平入血, 燥湿兼能清热, 白芷上抵头目, 下抵胃肠, 中达肢体, 遍通肌肤以致毛窍, 通行气血两分, 防风治风, 升而能散, 散一身之风邪治一身之痛。用白芥子尽消阴阳两分之痰, 五药合用为佐药, 清久积湿, 行一身血, 祛一身之风, 故风湿自散; 薏苡仁米谷之属, 受阳明金土之精, 阳明润宗筋, 利机关, 金制风, 土胜湿, 驱久风痹痛兼顾护胃气, 为使药; 最后以炙甘草调和诸药, 助全方共奏祛风清热, 活血行气, 燥湿化痰之功。

Wnt1/ β -catenin 信号通路以多方面不同方式参与 RA, 最主要是增殖和凋亡。滑膜细胞的增殖和凋亡失衡是促进 RA 发展的重要原因。Wnt1 是一种糖蛋白, 可以与细胞表面的卷曲蛋白胞外区的富含半胱氨酸的区域结合, 并在低密度脂蛋白受体相关蛋白的协同作用下, 促进 β -catenin 入核, 维持它稳定, 然后启动下游基因转录和信号传导, 如 C-myc 和 CyclinD1^[14]。

实际上, Wnt 属于生长刺激因子, 研究表明, Wnt 可以通过调节滑膜成纤维样细胞的增殖参与 RA^[15]。在滑膜成纤维样细胞中过度表达 Wnt1, 导致了它的增殖不受控地增加、凋亡减少^[16]。但是其特异性在于诱导细胞增殖的同时赋予了生长组织形状的能力^[17]。作为信号通路靶基因 C-myc 和 CyclinD1, 都是具有调节细胞周期、凋亡、增殖的功能^[18]。

在本研究中, WHJBD、MTX 以及 WHJBD+MTX 用药作用均减轻了 Ki-67、Bcl2、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达; 降低了 C-myc、CyclinD1 基因表达; 增加了 Caspase3 和 Bax 的表达。表明了这 WHJBD 可能通过 Wnt1/ β -catenin 信号通路, 影响滑膜细胞的增殖和凋亡。两种药物单独或者其组合可以降低 Wnt1 的表达从而抑制 β -catenin 蛋白的积累和稳定, 抑制了下游靶基因 C-myc 和 CyclinD1 的表达, 从而增加了促凋亡蛋白 Caspase3、Bax 表达的增加。

Hotair 作为一种新兴的治疗靶点, 可参与多种通路的调控, 包括 Wnt 信号通路。Hotair 作为 LncRNA 中的一员, 对下游基因、蛋白和通路调控作用非常复杂; 它本身不直接编码蛋白质。而主要通过调节转录因子的活性参与转录调控或充当分子支架组装复合物^[19]。WIF1 是一种分泌性蛋白, 可以结合 Wnt 蛋白并抑制其活性。有研究表明, Hotair 可以通过调节 WIF1 启动子的甲基化调节 Wnt 信号通路^[20]。本团队研究表明, Hotair 及 WIF1 在 CIA 小鼠滑膜组织呈低表达; WHJBD、MTX 以及 WHJBD+MTX 干预后 Hotair 和 WIF1 表达增加。因此推测 WHJBD 对 CIA 小鼠的干预作用可能通过促进 WIF1 的表达从而抑制 Wnt 信号通路活性。

总的来说, 本实验初步验证了 WHJBD 对 Hotair/Wnt1/ β -catenin 通路的影响, 以及其对 CIA 小鼠滑膜细胞增殖和凋亡的调节作用。有可能通过该机制, WHJBD 恢复 CIA 小鼠滑膜增殖和凋亡的平衡, 从而达到治疗的作用。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Xu C, Wang X, Mu R, et al. Societal costs of rheumatoid arthritis in China: a hospital-based cross-sectional study[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2014, 66 (4): 523–531.
- [2] Zhu H, Li R, Da Z, et al. Remission assessment of rheumatoid arthritis in daily practice in China: a cross-sectional observational study[J]. *Clin Rheumatol*, 2018, 37 (3): 597–605.
- [3] Taylor PC, Moore A, Vasilescu R, et al. A structured literature review of the burden of illness and unmet needs in patients with rheumatoid arthritis: a current perspective[J]. *Rheumatol Int*, 2016, 36 (5): 685–695.
- [4] Miao CG, Yang YY, He X, et al. wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling[J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (10): 2069–2078.
- [5] Li Z, Li XY, Jiang C, et al. Long non-coding RNAs in rheumatoid arthritis[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51 (1): e12404.
- [6] Smith MD, Baeten D, Ulfgren AK, et al. Standardisation of synovial tissue infiltrate analysis: How far have we come? How much further do we need to go?[J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65 (1): 93–100.
- [7] 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.
- [8] Alabarse P, Lora PS, Silva J, et al. Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia: CIA as an animal model of RA[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9 (3): 603–612.
- [9] 秦川. *医学实验动物学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 298.
- [10] Liu H, Zhu Y, Gao Y, et al. NR1D1 modulates synovial inflammation and bone destruction in rheumatoid arthritis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (2): 129.
- [11] Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, et al. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Res*, 1999, 1 (1): 81–91.
- [12] Su X, Zhu ZH, Zhang L, et al. Anti-inflammatory property and functional substances of *Lonicerae Japonicae Caulis*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113502.
- [13] 刘端勇, 赵海梅, 左志琴, 等. 全蝎蜈蚣对胶原免疫性关节炎大鼠的关节损伤改善作用 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28 (4): 73–76.
- [14] Cici D, Corrado A, Rotondo C. wnt signaling and biological therapy in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (22): 5552.
- [15] Cai L, Zong P, Zhou MY, et al. 7-hydroxycoumarin mitigates the severity of collagen-induced arthritis in rats by inhibiting proliferation and inducing apoptosis of fibroblast-like synoviocytes via suppression of wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 94: 153841.
- [16] Dinesh P, Kalaiselvan S, Sujitha S, et al. Mir-145-5p mitigates dysregulated wnt1/ β -catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 82: 106328.
- [17] Wang F, Tarkkonen K, Nieminen-Pihala V, et al. Mesenchymal cell-derived juxtacrine wnt1 signaling regulates osteoblast activity and osteoclast differentiation[J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34 (6): 1129–1142.
- [18] Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis[J]. *Cell Prolif*, 2003, 36 (3): 165–175.
- [19] Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes[J]. *Science*, 2010, 329 (5992): 689–693.
- [20] Zhang YF, Li CS, Zhou Y, et al. Effects of propofol on colon cancer metastasis through stat3/hotair axis by activating wif-1 and suppressing wnt pathway[J]. 2020, 9 (5): 1842–1854.

(收稿: 2022-03-29 在线: 2022-08-09)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶