

当归拈痛汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞自噬与凋亡的影响

陆麒麟¹, 李佳钰², 蔡义思¹, 林鸿鑫¹, 范丹丹³, 接力刚³, 袁立霞^{1,4*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学检验与生物技术学院, 广州 510515;
3. 南方医科大学珠江医院, 广州 510260; 4. 南方医科大学第五附属医院, 广州 510920)

[摘要] 目的:研究当归拈痛汤对类风湿关节炎(RA)成纤维样滑膜细胞自噬与凋亡的影响,进一步探讨当归拈痛汤防治RA的相关机制。方法:收集临床RA患者的滑膜组织,分离出成纤维样滑膜细胞(FLS)并进行培养,将RA-FLS细胞分为4组,分别为空白血清组、当归拈痛汤含药血清低、中、高剂量组。通过划痕实验,transwell侵袭实验检测当归拈痛汤对RA-FLS细胞迁移、侵袭能力的影响;Hoechst 33342法检测RA-FLS细胞凋亡水平;单丹磺酰尸胺(MDC)染色检测细胞自噬水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),微管相关蛋白1轻链3(LC3),自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)的mRNA和蛋白表达水平。结果:与正常血清组比较,当归拈痛汤含药血清低、中、高剂量组均能减缓划痕愈合($P<0.01$),并且能显著减少侵袭到下室的RA-FLS细胞的数目($P<0.01$);Hoechst33342结果显示当归拈痛汤含药血清低、中、高可以不同程度促进RA-FLS细胞凋亡($P<0.01$);MDC染色后,低、中、高当归拈痛汤含药血清组中自噬小体明显减少;与空白含药血清组比较,当归拈痛汤含药血清低、中、高剂量干预后,Bcl-2, LC3, Beclin1的mRNA和蛋白的表达水平显著下降($P<0.01$),Bax的mRNA和蛋白的表达水平显著升高($P<0.01$)。结论:当归拈痛汤对RA成纤维样滑膜细胞增殖有明显抑制作用,其作用机制可能与抑制自噬、促进凋亡有关。

[关键词] 当归拈痛汤; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 自噬; 凋亡

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0019-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220236

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211123.1509.002.html>

[网络出版日期] 2021-11-23 16:55

Effect of Danggui Niantongtang on Autophagy and Apoptosis of Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocyte

LU Qi-jin¹, LI Jia-yu², CAI Yi-si¹, LIN Hong-xin¹, FAN Dan-dan³, JIE Li-gang³, YUAN Li-xia^{1,4*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
3. Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510260, China;
4. The Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510920, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Danggui Niantongtang (DGNTT) on cell apoptosis and autophagy in rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS). **Method:** RA-FLS were isolated and cultured from the synovial tissue of RA patients. The cells were treated with 10% blank serum (blank control group), 10% sera containing low, medium and high doses of DGNTT. Wound healing assay and cell invasion test were applied to observe the effect of RA-FLS invasion technique. The apoptosis and autophagy level of RA-FLS

[收稿日期] 20210810(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673875, 82074160)

[第一作者] 陆麒麟,在读硕士,从事中医药对于类风湿关节炎的防治研究,E-mail:260834998@qq.com

[通信作者] *袁立霞,博士,教授,从事方证机理研究,E-mail:cnlyxtcm@163.com

cells was detected by Hoechst33342 method and monodansylcadaverine (MDC) staining. The mRNA and protein expression levels of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), autophagy key molecular yeast Atg6 homolog 1 (Beclin1) were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** Compared with the blank control group, each dose of serum could slow down the wound healing and significantly Reduce the number of RA-FLS cells invading the lower chamber ($P < 0.01$), the mRNA and protein expression levels of Bcl-2, LC3, Beclin1 were significantly decreased ($P < 0.01$), and Bax were significantly increased ($P < 0.01$). Hoechst33342 results showed that low, medium and high doses DGNTT could promote RA-FLS cell apoptosis. After MDC staining, autophagosome in low, medium and high doses DGNTT decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** Danggui Niantongtang can effectively inhibit the proliferation of fibroblast-like synoviocytes. Its mechanism may be related to promote apoptosis and inhibit autophagy of fibroblast-like synoviocytes.

[Keywords] Danggui Niantongtang; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; autophagy; apoptosis

类风湿关节炎(RA)是一种慢性全身性自身免疫疾病,其病变特点是关节滑膜过度增生和炎性细胞浸润,最终导致骨及软骨破坏。其中RA成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖与凋亡失衡是滑膜过度增生及血管翳形成的主要原因^[1]。

自噬和凋亡作为程序性细胞死亡的两种主要形式,共同参与RA发病机制。自噬和凋亡的异常与RA的发展密切相关。自噬是在应激等不利条件下保护细胞存活的一种调节方式,RA患者的成纤维样滑膜细胞自噬水平增强,凋亡减少。自噬和凋亡二者对RA的发病起到关键作用,可以通过影响不同因子调控RA,且二者能被多种刺激共同激活,甚至互相制约转化等^[2-3]。FLS是RA患者滑膜组织中最主要的细胞类型之一,其定位于滑膜内膜衬里层,能产生多种炎性因子、趋化因子及基质降解酶,导致关节炎症和骨质破坏,因此RA-FLS的过度增殖在RA发病机制中发挥了重要作用,是RA病程进展过程中的关键细胞,是治疗RA最关键的靶点^[4-5]。在RA患者中,FLS细胞具有低凋亡率和高自噬水平的特点,低凋亡率和高自噬指数会刺激FLS的活化和增殖,最终导致慢性炎症和关节破坏^[6],并且自噬水平的上调会抑制凋亡,从而更有利于FLS的存活。中医经典名方当归拈痛汤首载于张元素《医学启源》中,其具有利湿清热,疏风止痛之功,临床常用于治疗RA属风湿热痹证患者。课题组前期实验证实当归拈痛汤可以有效抑制RA-FLS细胞增殖^[7],因此本实验通过检测自噬和凋亡相关基因和蛋白的表达水平,对于阐明该方作用机制尤为重要,以期当为当归拈痛汤防治RA提供新的靶点。

1 材料

1.1 滑膜组织和动物 本实验的滑膜组织均取自2020年2月至2021年2月南方医科大学珠江医院行膝关节人工置换术的患者。RA诊断符合1987年美国风湿病学会年会(ACR)诊断标准,并通过南方医科大学珠江医院医学伦理委员会审查。手术患者均签署了知情同意书。实验动物为SPF级SD大鼠40只,雄性,体质量(160±10)g,由南方医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(粤)2016-0041,于南方医科大学SPF级实验室饲养。实验符合南方医科大学实验动物伦理委员会要求和原则(编号L2019201)。

1.2 药物和试剂 当归拈痛汤由羌活15g,茵陈15g,炙甘草15g,猪苓9g,泽泻9g,防风9g,知母9g,苍术9g,当归9g,葛根6g,苦参6g,人参6g,升麻3g,黄芩3g组成。上述诸药均购自南方医院中药房,由南方医科大学中医药学院马骥教授按照2020年版《中华人民共和国药典》进行鉴定,鉴定所购买中药为正品。按照配比称取当归拈痛汤各味药材放置于煎煮容器中,加蒸馏水800mL,充分浸泡0.5h,武火煮沸后再文火煎煮0.5h,倒出药液,过滤布过滤。药渣加蒸馏水600mL再次煎煮,煮沸后文火煎煮0.5h,过滤布过滤。将两次滤液混合,利用旋转蒸发器浓缩药液,按照人与大鼠体表面积折算的等效剂量比值0.018换算^[8],低、中、高剂量为等效剂量的0.5,1,2倍,分别浓缩为含生药量5.67,11.34,22.68g·kg⁻¹的溶液,冷却后装入灭菌50mL离心管中-20℃保存备用。Hoechst33342染色液,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白G

(IgG)(武汉博士德公司,批号分别为20180702,201912);单丹磺酰尸胺(MDC)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20200324);逆转录试剂盒,TRIzol,高灵敏性染料法实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为20181017,R401-01-AA,20181015);BCA定量试剂盒,结晶紫染液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为20190203,072920200207); β -肌动蛋白(β -actin),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为07/2019,05/2019,04/2019);自噬蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3),自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为00093290,00080987);Matrigel(美国Corning公司,批号1084001);高糖型DMEM培养基(美国Sigma公司,批号8119284)。其他常规化学试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 仪器 HERA cell 240i型二氧化碳培养箱,FC型酶标仪(美国Thermo公司);N-12008型旋转蒸发器(日本Eyela公司);DS-11型超微量紫外分光光度计(美国DeNovix公司);LightCycler96型Real-time PCR仪(瑞士Roche公司);5804R型高速离心机(德国Eppendorf公司);IX53型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);Mini-Protean Tetra型电泳仪及转膜仪(美国Bio-Rad公司);FluorChem E型灵敏全自动成像分析仪(美国Cell Biosciences公司)。

2 方法

2.1 当归拈痛汤含药血清的制备 将40只SPF级SD大鼠分为4组,分别为正常组,当归拈痛汤低、中、高剂量组,每组10只,每组每日灌胃2次,每次灌胃 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,正常组灌服等体积生理盐水。连续灌胃1周后,10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉采血,采血管室温静置30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(半径10 cm),同组血清混合后 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活30 min, $0.22\ \mu\text{m}$ 过滤器过滤,密封, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 RA-FLS的提取和原代培养 RA患者的滑膜组织取出后,用无菌剪将组织块剪成 $1\ \text{mm}^3$ 体积的小块,均匀涂抹于培养瓶底面,倒扣放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵箱4 h后加入完全培养基正常培养,待细胞完全爬出后传代培养,第3~6代RA-FLS状态稳定,细胞形态为长梭型,因此后续实验都选用第3~6代RA-FLS。

2.3 划痕实验检测当归拈痛汤对RA-FLS细胞迁移能力的影响 将细胞接种于6孔板,每组设置3个复孔,待细胞汇合度至80%~90%,用枪头比直尺进行划痕,弃去培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,于显微镜下拍照记录划痕的间距,此时为0 h。设置10%空白组,10%当归拈痛汤含药血清低、中、高组。于5% CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养,分别在划痕后0,24,48,72 h用光学显微镜拍照观察划痕间距变化情况,利用Image J软件计算划痕面积的变化,并计算24,48,72 h迁移率,迁移率=(0 h划痕面积-24/48/72 h划痕面积)/0 h划痕面积 $\times 100\%$ 。

2.4 transwell侵袭实验检测当归拈痛汤对RA-FLS细胞侵袭能力的影响 按1:8比例将Matrigel和高糖型DMEM充分混合,取混合液 $45\ \mu\text{L}$ 均匀铺于transwell小室, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中过夜凝固。将RA-FLS用无血清培养基重悬稀释至 5×10^5 个/mL,在上室中加入细胞悬液 $100\ \mu\text{L}$,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养24 h,倒去小室液体,在下室中加入完全培养基 $500\ \mu\text{L}$,上室按照10%空白组,10%当归拈痛汤含药血清低、中、高剂量组各加入培养液 $100\ \mu\text{L}$ 。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 环境中培养24 h后取出transwell小室,PBS洗2次,4%多聚甲醛固定40 min,结晶紫染色1 h后,擦去基质胶,在显微镜下拍照记录各组RA-FLS细胞的侵袭情况,并进行计数和统计。

2.5 Hoechst33342/PI双染检测FLS细胞凋亡水平 收集对数期细胞接种于96孔板中,细胞贴壁后弃去培养液,PBS洗2次,按照实验分组分别加入10%空白血清或10%低、中、高剂量当归拈痛汤含药血清,细胞培养箱培养48 h。培养结束后弃去培养基,加入细胞染色缓冲液 $100\ \mu\text{L}$,再依次加入Hoechst33342染色液和PI染色液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 染色20 min,染色结束后弃去孔内液体,PBS洗2次,荧光显微镜拍照观察。各组随机选取3个不同视野进行细胞计数,取平均值作为各组的凋亡指数。

2.6 MDC染色检测FLS自噬水平变化 将RA-FLS细胞以 4×10^4 个/mL将细胞接种于96孔板,细胞贴壁后分别加入10%空白血清以及10%低、中、高剂量当归拈痛汤含药血清,药物干预48 h后去除培养基,用 $1\times$ Wash buffer洗2次,使用配置好的MDC工作液染色30 min, $1\times$ Wash buffer洗3次,荧光显微镜下观察(激发滤光片波长355 nm,阻断滤光片波长512 nm)。

2.7 Real-time PCR检测Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1的mRNA表达水平 各组给药干预48 h后,TRIzol

抽提RNA,将提取出的RNA按照诺唯赞逆转录试剂盒步骤,每20 μL体系添加1 μg的RNA作为逆转录模板合成cDNA,以cDNA为模板进行Real-time PCR反应,反应条件为95 °C预变性30 s,95 °C变性10 s,60 °C退火30 s,40个循环,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA相对表达水平,3次重复后,进行统计学分析。引物由擎科生物科技有限公司合成,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因,引物序列见表1。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 RA-FLS 中 Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1 的蛋白表达 各组给药

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Bax	上游 TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG	257
	下游 GTCCAGCCCATGATGGTTCT	
Bcl-2	上游 GGATTGTGGCCTTCTTTGAG	234
	下游 CCAAAGTGGCAGAGTCTTC	
LC3	上游 CGACTTATTCGAGAGCAGCA	233
	下游 ACCTCTGAGATTGGTGTGGA	
Beclin1	上游 GGGTTGCGGTTTTTCTGGGA	100
	下游 GTGTCTCGCCTTTCTCAACC	
GAPDH	上游 CAAATCCATGGCACCCTCA	132
	下游 GACTCCACGACGTACTCAGC	

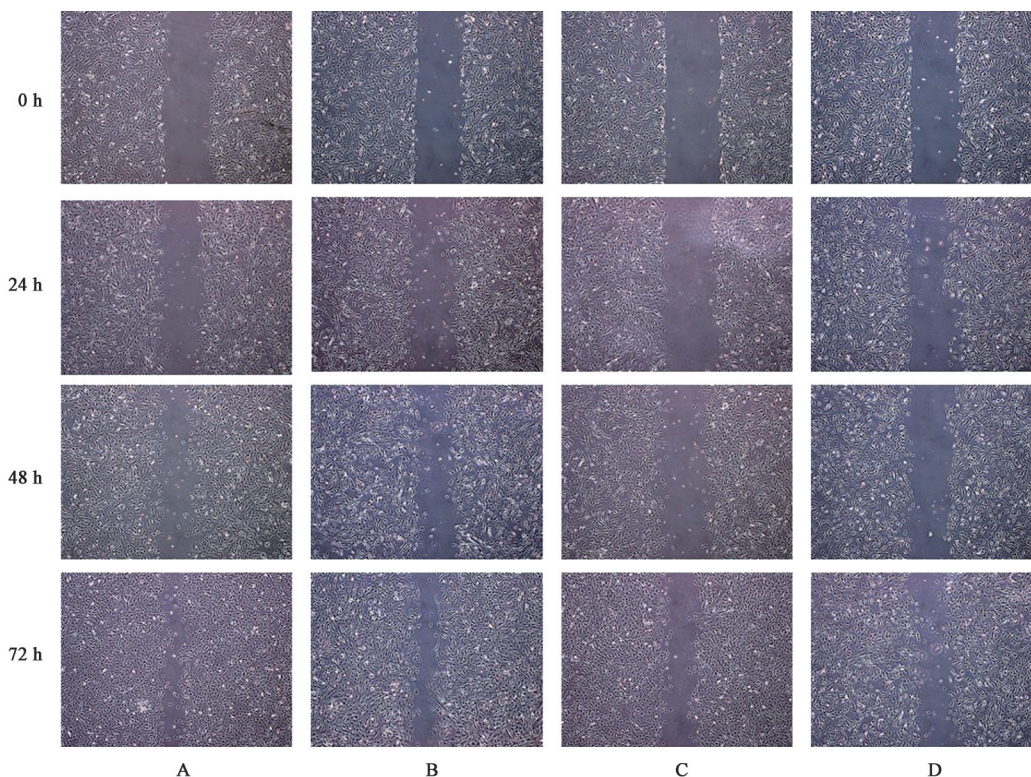
干预48 h后,弃培养液,PBS洗3次,收集细胞,以RIPA裂解液提取各组蛋白,用BCA蛋白浓度检测试剂盒进行蛋白浓度测定,配置12%聚丙烯酰胺凝胶,各组总蛋白上样量20 μg,电泳(80~120 V,2 h),200 mA恒流转膜1.5 h,5%脱脂奶粉封闭2 h,一抗稀释液稀释Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1, β-actin(1:1 000)4 °C孵育过夜,HRP标记的二抗(1:6 000)常温孵育2 h,采用ECL工作液于超灵敏全自动成像分析仪曝光成像。进行3次重复后,使用Image J软件进行灰度值运算并进行统计分析。

2.9 统计学处理 所有数据采用SPSS 20.0统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较满足正态分布条件及方差齐时,采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 RA-FLS 细胞迁移的影响 与空白组比较,当归拈痛汤含药血清低、中、高剂量组 RA-FLS 细胞迁移能力明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),提示当归拈痛汤含药血清对 RA-FLS 细胞的迁移具有抑制作用。见图1,表2。

3.2 对 RA-FLS 细胞侵袭的影响 与空白组比较,



A. 空白组;B. 当归拈痛汤含药血清低剂量组;C. 当归拈痛汤含药血清中剂量组;D. 当归拈痛汤含药血清高剂量组(图2~5同)

图1 当归拈痛汤对各组 RA-FLS 细胞迁移能力的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 1 Effect of Danggui Niantongtang on scratch-healing experiment in each group (inverted microscope, ×100)

表2 当归拈痛汤对各组细胞迁移率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Danggui Niantongtang on relative scratch ratio of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	24 h 迁移率	48 h 迁移率	72 h 迁移率
空白		32.89±0.04	54.12±0.08	78.69±0.12
当归拈痛汤	5.67	24.68±0.19 ¹⁾	42.92±0.09 ²⁾	56.21±0.13 ²⁾
	11.34	11.89±0.03 ²⁾	28.72±0.05 ²⁾	47.21±0.02 ²⁾
	22.68	15.26±0.07 ²⁾	21.68±0.08 ²⁾	34.69±0.01 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表3-6同)。

当归拈痛汤含药血清低、中、高剂量组均能显著减少侵袭到 transwell 下室的细胞数(P<0.01),提示当归拈痛汤含药血清具有抑制 RA-FLS 细胞侵袭的作用。见图2,表3。

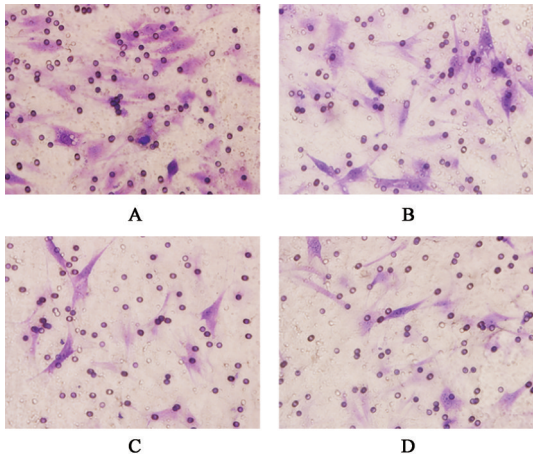


图2 当归拈痛汤对 RA-FLS 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫,×400)
Fig. 2 Effect of Danggui Niantongtang on invasion of RA-FLS cells in lower compartment of transwell chambers in each group (crystal violet,×400)

3.3 对 RA-FLS 细胞凋亡水平的影响 与空白组比较,当归拈痛汤含药血清各剂量组细胞蓝光强度均

表3 当归拈痛汤对各组 RA-FLS 细胞 transwell 小室下室侵袭细胞数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Danggui Niantongtang on number RA-FLS cells in lower chamber of each transwell chamber ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	细胞侵袭数目/个
空白		26.60±3.52
当归拈痛汤	5.67	18.50±4.23 ²⁾
	11.34	6.40±2.50 ²⁾
	22.68	8.80±3.15 ²⁾

有不同程度升高(P<0.01),且强蓝光细胞数量增多,红光细胞数量无明显变化且强度没有明显增加,提示当归拈痛汤含药血清低、中、高剂量能够不同程度增加 RA-FLS 细胞凋亡水平。见表4,图3。

表4 当归拈痛汤对各组 RA-FLS 细胞凋亡水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Danggui Niantongtang on apoptosis of RA-FLS ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡指数/%
空白		18.0±2.6
当归拈痛汤	5.67	37.0±3.9 ²⁾
	11.34	55.0±6.4 ²⁾
	22.68	46.0±4.3 ²⁾

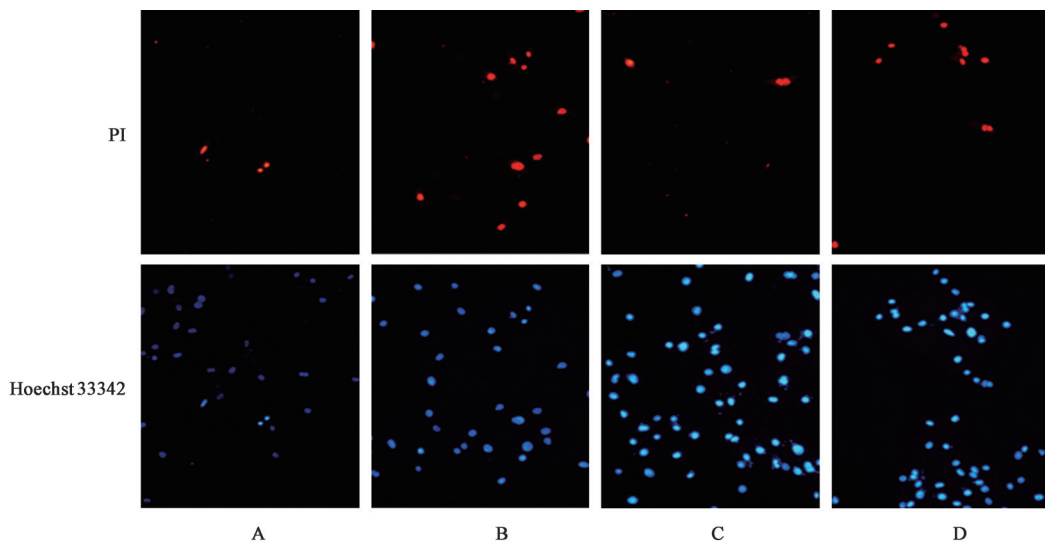


图3 当归拈痛汤对 RA-FLS 细胞凋亡的影响 (倒置显微镜,×200)

Fig. 3 Effect of Danggui Niantongtang on apoptosis of RA-FLS (inverted microscope,×200)

3.4 对RA-FLS细胞自噬水平的影响 与空白组比较,当归拈痛汤含药血清低、中、高剂量组MDC染

色阳性斑点数减少,提示当归拈痛汤可抑制FLS细胞自噬水平。见图4。

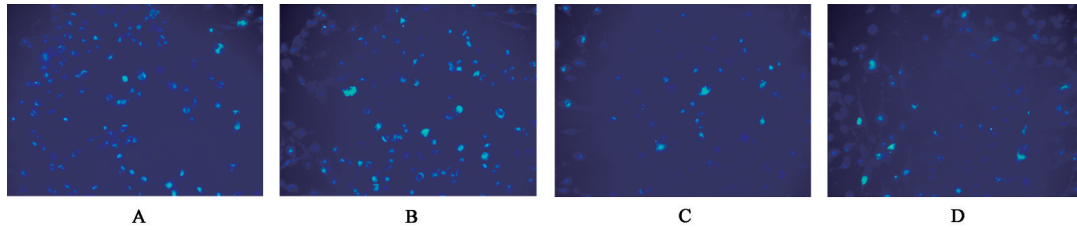


图4 当归拈痛汤对RA-FLS细胞自噬的影响(MDC,×100)

Fig. 4 Effect of Danggui Niantongtang on autophagy of RA-FLS(MDC,×100)

3.5 对RA-FLS细胞Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1的 mRNA表达水平的影响 与空白组比较,不同剂量的当归拈痛汤含药血清干预后,Bcl-2, LC3, Beclin1

的 mRNA 表达水平显著下降($P<0.01$), Bax 的 mRNA 表达水平显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表5。

表5 当归拈痛汤对RA-FLS中Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1 mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Danggui Niantongtang on expression of Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1 mRNA in RA-FLS ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax	Bcl-2	LC3	Beclin1
当归拈痛汤	5.67	1.30±0.18 ²⁾	0.53±0.09 ²⁾	0.79±0.18 ²⁾	0.84±0.18 ²⁾
	11.34	1.21±0.20 ²⁾	0.49±0.05 ²⁾	0.68±0.20 ²⁾	0.72±0.20 ²⁾
	22.68	1.43±0.08 ²⁾	0.74±0.10 ²⁾	0.63±0.08 ²⁾	0.67±0.08 ²⁾

注:设空白组各mRNA表达水平均为1。

3.6 对RA-FLS细胞Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1的蛋白表达水平的影响 与空白组比较,不同剂量的当归拈痛汤含药血清干预后,Bcl-2, LC3, Beclin1的蛋

白的表达水平显著下降($P<0.01$), Bax 的蛋白的表达水平显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表6,图5。

表6 当归拈痛汤对RA-FLS中Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Danggui Niantongtang on expression of Bax, Bcl-2, LC3, Beclin1 protein in RA-FLS ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	LC3 II /LC3 I	Beclin1/ β -actin
空白		1.41±0.08	1.27±0.04	0.96±0.09	1.15±0.07
当归拈痛汤	5.67	1.69±0.11 ²⁾	1.16±0.05	0.74±0.01 ²⁾	1.06±0.05 ¹⁾
	11.34	1.57±0.13 ²⁾	1.04±0.09 ²⁾	0.71±0.06 ²⁾	1.01±0.16 ²⁾
	22.68	1.72±0.08 ²⁾	1.01±0.03 ²⁾	0.86±0.14 ¹⁾	0.95±0.11 ²⁾

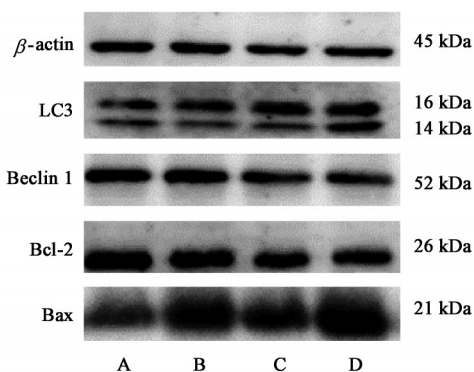


图5 RA-FLS细胞凋亡与自噬相关蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of apoptosis and autophagy related proteins of RA-FLS

4 讨论

类风湿关节炎是一种慢性、全身性自身免疫性疾病,是临床常见病和多发病。RA呈全球性分布,是造成人类丧失劳动力和致残的主要原因之一。RA全球范围内患病率约为0.5%,在我国患病率约为0.35%^[9-10]。在临床中尤其在广东岭南地区,病人多以风湿热痹证较多。张元素在《医学启源》中创制出当归拈痛汤这一著名方剂,临床用于治疗类风湿关节炎风湿热痹证,体现独有制方思想和特色。当归拈痛汤全方组成为当归、茵陈、羌活、黄芩、猪苓、苦参、泽泻、知母、防风、苍术、葛根、人参、炙甘

草、白术、升麻。纵观全方配伍,诸药合用共奏利湿清热、疏风止痛之功。目前在临床当归拈痛汤已用于RA活动期的治疗,现代研究表明当归拈痛汤可以有效抑制滑膜增生、炎细胞浸润,有效改善软骨和骨破坏^[11-13]。

FLS过度增殖及侵袭性增加与凋亡水平减少有密切联系,而凋亡减少可能是由于自噬水平升高导致的。近年来有研究发现自噬与包括RA在内的自身免疫性疾病相关^[14],RA及各种自身免疫性疾病存在自噬水平失调。自噬是真核细胞内一种高度保守的物质再循环的过程,通过降解受损细胞器、蛋白质及大分子物质在细胞存活中起着重要的作用^[15]。其作为一种细胞程序化死亡方式,其水平受多种自噬相关基因调节。LC3是检测自噬的标志性蛋白,是首个自噬小体膜蛋白,在自噬发生过程中,LC3首先被ATG4切割形成LC3 I,LC3 I又通过ATG3和ATG7参与的泛素样反应与磷脂酰乙醇胺偶联,形成持续附着于自噬小体膜上的LC3 II,因此,LC3 II可以作为检测自噬水平的标志物^[16-17]。Beclin1是Atg6的同源物,与自噬调控相关,通过激活Vps34在自噬调节中发挥核心作用,Beclin1-Vps34复合物激活后促进磷脂酰肌醇3-磷酸产生,从而促进自噬体成熟^[18-19]。已有研究证明,自噬激活与RA-FLS凋亡抵抗有关。凋亡与自噬可以相互影响,自噬可以抑制凋亡水平,从而有利于细胞存活,抑制自噬后,细胞对凋亡的敏感性提高^[20-21]。Bcl-2蛋白家族是细胞凋亡信号途径中关键凋亡调节因子,包括Bcl-2亚家族,Bax亚家族和特殊成员BH3亚家族。其中Bcl-2是抗凋亡基因,定位于线粒体外膜,是抑制凋亡发生的重要蛋白,主要是通过调控线粒体膜电位、抑制细胞色素C和凋亡诱导因子释放来阻止凋亡进程^[22-24]。Bax作为促凋亡蛋白,在接收到凋亡刺激信号后激活,通过破坏线粒体膜的完整性,与Bcl-2等抑制凋亡蛋白对抗,从而发挥抗凋亡作用^[25]。在机体中凋亡和自噬都不是单独存在,而是处于一种动态平衡。在RA疾病进展过程中,二者的平衡状态被打破,自噬水平升高导致FLS细胞凋亡抗性增加,进而导致RA持续性进展,RA病情进展又会导致自噬和凋亡水平严重紊乱。因此,使自噬和凋亡处于平衡状态对RA尤为重要。

本实验结果显示,与空白组比较,当归拈痛汤各剂量含药血清干预后,FLS细胞迁移、侵袭水平下降,Hoechst33342结果显示凋亡水平增加,MDC染

色结果显示自噬水平降低,Bcl-2,LC3,Beclin1的mRNA和蛋白表达水平显著下降,Bax的mRNA和蛋白表达水平显著升高。表明当归拈痛汤可以抑制FLS细胞自噬水平的同时增加FLS细胞凋亡。在不同剂量当归拈痛汤含药血清干预组中,当归拈痛汤中、高剂量含药血清组作用效果比低剂量含药血清组更显著。综合以上结果初步说明当归拈痛汤可以通过抑制FLS自噬、促进凋亡来发挥改善RA的作用。

综上所述,RA-FLS过度增殖以及迁移侵袭力增加与FLS凋亡水平降低有关,并且可能与自噬水平上升相关。当归拈痛汤可以抑制自噬,下调自噬相关蛋白LC3,Beclin1的表达。同时可以提高凋亡水平,上调促凋亡蛋白Bax的表达,下调抑凋亡蛋白Bcl-2的表达。当归拈痛汤对自噬和凋亡水平的共同调节有效抑制了FLS细胞的过度增殖、迁移以及侵袭,提示自噬与凋亡在RA中起到了重要的调控作用,因此进一步研究二者在RA中发挥的作用,对RA的诊断、治疗及预后都有深远意义。目前凋亡与自噬相互作用的机制研究不够成熟,需要在今后的工作中进行深入研究,从而帮助人们在RA诊疗方面取得一定进展。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CONFORTI A, DI C I, PAVLYCH V, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis[J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(2): 102735.
- [2] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582-592.
- [3] NETEA-MAIER R T, PLANTINGA T S, VAN DE VEERDONK F L, et al. Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease [J]. *Autophagy*, 2016, 12(2): 245-260.
- [4] ZHANG Q, LIU J, ZHANG M, et al. Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis [J]. *Biomolecules*, 2019, doi: 10.3390/biom9120795.
- [5] MCINNES I B, SCHEIT G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2017, 389(10086): 2328-2337.
- [6] NYGAARD G, FIRESTEIN G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting

- fibroblast-like synoviocytes [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(6): 316-333.
- [7] 赵帆, 李佳钰, 陆麒瑾, 等. 当归拈痛汤调控 Fas/Caspase-8 通路促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡 [J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(8): 1119-1126.
- [8] NAIR A B, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2): 27-31.
- [9] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学 [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 807.
- [10] MYASOEDOVA E, DAVIS J, MATTESON E L, et al. Is the epidemiology of rheumatoid arthritis changing? Results from a population-based incidence study, 1985-2014 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216694.
- [11] 胡南松, 胡志彦, 夏臣杰. 当归拈痛汤加减联合洛索洛芬钠对类风湿性关节炎(湿热痹阻型)患者关节疼痛及 MMP-3、ESR 的影响 [J]. *健康研究*, 2020, 40(6): 668-672.
- [12] 柳至如. 当归拈痛汤联合西药治疗活动期类风湿关节炎湿热痹阻证患者的临床疗效观察 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2020.
- [13] 钟义兰, 刘尚丽, 史雅锋. 归经当归拈痛汤联合西药治疗风湿性关节炎疗效及对患者类风湿因子的影响 [J]. *陕西中医*, 2021, 42(7): 918-921.
- [14] WU D J, ADAMOPOULOS I E. Autophagy and autoimmunity [J]. *Clin Immunol*, 2017, 176: 55-62.
- [15] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460-473.
- [16] 陆麒瑾, 李佳钰, 蔡义思, 等. 当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠自噬蛋白 LC3, Beclin1, p62 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20211842.
- [17] RUNWAL G, STAMATAKOU E, SIDDIQI F H, et al. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10147.
- [18] MAEJIMA Y, ISOBE M, SADOSHIMA J. Regulation of autophagy by Beclin1 in the heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95: 19-25.
- [19] ZHU M, DENG G, XING C, et al. BECN2 (Beclin2)-mediated non-canonical autophagy in innate immune signaling and tumor development [J]. *Autophagy*, 2020, 16(12): 2310-2312.
- [20] SHIN Y J, HAN S H, KIM D S, et al. Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(1): 19.
- [21] 李春蔚, 孙英焕, 杜明, 等. 凋亡与自噬的相互关系在类风湿性关节炎中的研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2017, 6(10): 65-68.
- [22] ZHANG Y, YANG X, GE X, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved Caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-733.
- [23] 董雅洁, 高维娟. Bcl-2、Bax、Caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(21): 4828-4830.
- [24] RAHMANI M, NKWOCHA J, HAWKINS E, et al. Cotargeting Bcl-2 and PI3K induces Bax-dependent mitochondrial apoptosis in aml cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 3075-3086.
- [25] LUO X, O'NEILL K L, HUANG K. The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved? [J]. *F1000Research*, 2020, 9: 935.

[责任编辑 孙丛丛]