

## 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

陆麒麟<sup>1</sup>, 李佳钰<sup>1</sup>, 蔡义思<sup>1</sup>, 赵帆<sup>2</sup>, 林鸿鑫<sup>1</sup>, 刘刚<sup>3</sup>, 袁立霞<sup>1,4\*</sup>

(1. 南方医科大学 中医药学院, 广州 510515; 2. 广州中医药大学 深圳医院 (福田), 深圳 518034;  
3. 南方医科大学 南方医院, 广州 510515; 4. 南方医科大学 第五附属医院, 广州 510920)

**【摘要】** 目的:研究当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠的防治作用及对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(Beclin1), p62 表达的影响。方法:将6周龄SD雄性大鼠随机分为正常组,风湿热痹模型组,当归拈痛汤低、中、高剂量组(5.67, 11.34, 22.68 g·kg<sup>-1</sup>), 甲氨蝶呤(MTX)组(1.35 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组10只,通过对大鼠尾部皮下注射灭活结核分支杆菌佐剂建立佐剂性关节炎大鼠模型,用人工气候箱进行风湿热痹证模型造模16 d,于免疫当天灌胃给药,持续28 d。进行大鼠一般情况观察及足趾肿胀度、关节炎指数(AI)检测,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠膝关节滑膜组织病理形态学改变,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠滑膜组织LC3, Beclin1, p62的mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)及免疫组化法分别检测大鼠滑膜组织LC3, Beclin1, p62的蛋白表达。结果:与正常组比较,风湿热痹模型组大鼠给药16, 20, 24, 28 d时足趾肿胀度显著升高( $P<0.01$ ), AI显著升高( $P<0.01$ ), 滑膜细胞增生显著,自噬蛋白LC3, Beclin1 蛋白及mRNA表达显著上调( $P<0.01$ ), p62蛋白及mRNA表达显著下调( $P<0.01$ );与风湿热痹模型组比较,各给药组大鼠足趾肿胀度减轻,滑膜增生情况有不同程度改善,LC3, Beclin1的mRNA和蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ), p62的mRNA和蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),且当归拈痛汤中剂量组防治效果最佳。结论:当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠有明显的防治作用,且这种防治作用可能与调控滑膜组织中自噬相关因子LC3, Beclin1, p62的表达,抑制自噬有关。

**【关键词】** 当归拈痛汤; 风湿热痹; 类风湿性关节炎; 微管相关蛋白1轻链3(LC3); 自噬关键分子酵母 Atg6 同系物(Beclin1); p62; 自噬

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R593.22 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)01-0041-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211842

[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 Expression of Autophagy-related Proteins LC3, Beclin1 and p62 in Rats with Adjuvant Arthritis Differentiated into Wind-damp-heat Impediment

LU Qi-jin<sup>1</sup>, LI Jia-yu<sup>1</sup>, CAI Yi-si<sup>1</sup>, ZHAO Fan<sup>2</sup>, LIN Hong-xin<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>3</sup>, YUAN Li-xia<sup>1,4\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;  
2. Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Futian), Shenzhen 518034, China;  
3. Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;  
4. The Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510920, China)

**【Abstract】** **Objective:** To observe the preventive and control effects of Danggui Niantongtang against adjuvant arthritis differentiated into wind-damp-heat impediment in rats and its influences on the expression of autophagy-related proteins microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), homolog of yeast Atg6 (Beclin1) and p62. **Method:** The six-week-old male SD rats were randomly divided into the normal group,

[收稿日期] 20210508(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673875, 81774382); 广东省中医药局课题项目(20181175)

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

[通信作者] \* 袁立霞, 博士, 教授, 从事中医药方证研究, E-mail: cnylxtcm@163.com

wind-damp-heat impediment model group, low-, medium-, and high-dose Danggui Niantongtang (5.67, 11.34, 22.68 g·kg<sup>-1</sup>) groups, and methotrexate (MTX, 1.35 mg·kg<sup>-1</sup>) group, with 10 rats in each group. A rat model of adjuvant arthritis was established by subcutaneous injection of inactivated *Mycobacterium tuberculosis* into the tail root, followed by exposure to the manual climatic box for 16 d for inducing the wind-damp-heat impediment. The drugs were administered intragastrically on the day of immunization for 28 d. The general conditions of rats were observed and the swelling degree of toes and arthritis index (AI) were detected. The pathological changes in the synovial tissues of the knee joints were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA expression levels of LC3, Beclin1, and p62 in the synovial tissues were measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), followed by the assay of their protein expression by Western blot and immunohistochemistry. **Result:** Compared with the normal group, the wind-damp-heat impediment model group exhibited significantly increased swelling degree of toes ( $P<0.01$ ), increased AI ( $P<0.01$ ), proliferated synovial cells ( $P<0.01$ ), up-regulated LC3 and Beclin1 protein and mRNA expression ( $P<0.01$ ), and down-regulated p62 protein and mRNA expression ( $P<0.01$ ) after 16, 20, 24, 28-d medication. Compared with the wind-damp-heat impediment model group, each medication group displayed alleviated toe swelling and synovial hyperplasia to different degrees, decreased mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1 ( $P<0.01$ ), and increased p62 mRNA and protein expression ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), with the best outcomes observed in the medium-dose Danggui Niantongtang group. **Conclusion:** Danggui Niantongtang effectively relieves adjuvant arthritis due to wind-damp-heat impediment in rats, which may be related to its regulation of the expression of autophagy-related proteins LC3, Beclin1, and p62 and the inhibition of autophagy.

**[Keywords]** Danggui Niantongtang; wind-damp-heat impediment; rheumatoid arthritis; microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3); homolog of yeast Atg6 (Beclin1); p62; autophagy

类风湿关节炎(RA)是一种以侵蚀性、对称性关节炎为主要临床表现的慢性、全身性自身免疫性疾病,其基本的病理改变为关节滑膜的异常增生、血管翳形成,并逐渐出现关节的软骨和骨破坏,最终可能导致关节畸形和功能丧失。RA在全国的发病率约为0.5%~1%,并且在不同性别,种族和地理位置中有较大差异<sup>[1]</sup>。

目前关于可能影响RA的发病机制研究涉及环境因素、遗传因素、免疫系统紊乱、炎症因子、凋亡、自噬等方面。随着研究的发展,越来越多的结果指出,除了细胞凋亡以外<sup>[2]</sup>,自噬是类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(RA-FLS)过度增生的又一重要机制。自噬是指真核细胞利用溶酶体对细胞器及蛋白质进行降解的生物学过程,在细胞更新、细胞物质的回收再利用、以及维持细胞内环境稳态中具有重要的作用<sup>[3]</sup>。近年来研究发现异常的自噬可打破自身免疫系统稳态,与多种风湿性疾病的病理改变都密切相关,有研究发现在RA患者中滑膜细胞的自噬水平明显升高,并且在RA中滑膜细胞自噬水平的上调可以及时清除错误折叠蛋白、受损的细胞器等变性的胞浆成分,从而提高了FLS的存活率和

活性,进一步减少其凋亡,使滑膜炎症和过度增生持续存在,加重RA病情<sup>[4-7]</sup>。中医学认为RA属于“痹证”范畴,在RA发生过程中,风湿热痹证是其重要证型之一。当归拈痛汤是传统经典中药复方,出自《医学启源》,具有利湿清热,疏风止痛之功。已有临床研究证实,该方对防治关节炎有显著疗效,且在临床常与西药合用,能在有效降低炎症指标、控制病情发展的同时减少不良反应的发生<sup>[8-9]</sup>。本课题组临床试验表明,当归拈痛汤防治风湿热痹证RA有显著疗效。亦有研究证明,当归拈痛汤可以抑制急性期炎症,提高大鼠滑膜细胞的凋亡率,从而有效抑制滑膜细胞增殖,但当归拈痛汤对RA的防治作用是否与自噬活性调控有关未见报道<sup>[10-12]</sup>。因此,本实验通过建立风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠模型,研究当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠的防治作用,以及对滑膜组织中自噬相关蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3),自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1)及p62表达的影响,为当归拈痛汤防治RA提供新的靶点及理论基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只,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 级实验室常规饲养,适应性喂养 7 d 后开始实验。本实验符合南方医科大学实验动物伦理委员会要求和原则,决议编号为 L2019201。

**1.2 药物与试剂** 当归拈痛汤由羌活 15 g,茵陈 15 g,猪苓 9 g,苍术 9 g,泽泻 9 g,知母 9 g,防风 9 g,当归 9 g,苦参 6 g,葛根 6 g,人参片 6 g,黄芩 3 g,升麻 3 g,白术 3 g,炙甘草 15 g 组成,所有药物由南方医院中药房提供,经南方医科大学马骥教授鉴定为正品,按药物比例配置,加入适量蒸馏水,按照煎煮标准浓缩成生药质量浓度为 1.134 g·mL<sup>-1</sup> 的当归拈痛汤药液,待自然冷却后收集到离心管中,-20 °C 冰箱冷藏备用;甲氨蝶呤(上海上药信谊药厂有限公司,批号 036190807);矿物油(美国 Sigma 公司,批号 N1586);灭活结核分支杆菌(Mtb,美国 BD 公司,批号 7104681);RIPA 裂解液,BCA 蛋白定量试剂盒,TRIzol,苏木素,伊红(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 090718181024,101518181113,061318190723,112818190320,120318190215); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 CST 公司,批号 08/2018);LC3,Beclin1,p62(美国 Proteintech 公司,批号分别为 00093290,00080987,00080720);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(武汉博士德生物工程有限公司,批号 201912);逆转录试剂盒,高灵敏性染料法定量聚合酶链式反应(PCR)检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为 7E470E0,7E381B9);3,4 mm 氧化锆研磨珠(赛维尔公司,批号分别为 FZ194802, FZ200102)。

**1.3 仪器** 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);N-12008 型旋转蒸发器(日本 Eyela 公司);PV-200 型足趾容积测量仪(四川科仪诚科技有限公司);RM2135 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);DS-11 型超微量紫外分光光度计(美国 DeNovix 公司);LightCycler96 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(瑞士 Roche 公司);Mini-Protean Tetra 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);FluorChem E 型超灵敏全自动成像分析仪(美国 Cell Biosciences 公司);FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、造模及给药** 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、风湿热痹模型组、当归拈痛汤低、中、

高剂量组、甲氨蝶呤组,每组 10 只。除正常组外,其余组大鼠参照文献[13]采用尾根部经皮下注射 Mtb 配置的弗式完全佐剂(1 mg/只)进行造模,从造模第 1 天起将大鼠置于风湿热环境的人工气候箱(温度 36 °C,湿度 90%,风速 5 m·s<sup>-1</sup>)中进行干预 16 d,共 64 h(2 次/d,每次 2 h)。当归拈痛汤各剂量组与甲氨蝶呤组大鼠从免疫当天开始给药,根据人与大鼠体表面积折算的等效剂量比值为 0.018 进行换算,当归拈痛汤低、中、高剂量组分别为等效剂量的 0.5, 1, 2 倍(5.67, 11.34, 22.68 g·kg<sup>-1</sup>)<sup>[14]</sup>,当归拈痛汤各剂量组每只每日灌胃相应剂量的当归拈痛汤 2 mL,甲氨蝶呤组灌胃蒸馏水配制的甲氨蝶呤片混悬液(1.35 mg·kg<sup>-1</sup>)2 mL,正常组、风湿热痹模型组给予等体积生理盐水。连续给药 28 d,于末次灌胃 2 h 后对大鼠进行相应处理。

**2.2 大鼠一般情况观察及足趾肿胀度、关节炎指数(AI)检测** 观察大鼠的精神状态、毛发光泽度、活动灵敏度、饮食情况、踝关节形态等。并于造模后第 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 天用足趾容积测量仪测量各组大鼠足趾大小,并记录 AI 评分。对比大鼠在造模前后的足趾容积变化,进而判断各组大鼠的足趾肿胀情况。关节炎评分标准如下<sup>[15]</sup>:无关节红肿,0 分;趾关节出现轻微红肿,1 分;足趾关节以下部位肿胀,2 分;踝关节以下部位肿胀,3 分;整个足爪肿胀,4 分。总分为双后足累积得分。

**2.3 大鼠滑膜组织的提取** 将大鼠处死后,仰位固定,75%乙醇消毒,沿膝关节正中纵行切开皮肤以暴露出以膝关节为中心约 3 cm×3 cm 的区域,以齿镊提起髌骨。沿髌骨上沿约 0.5 cm×0.5 cm 处向下切开直至股骨,再分别沿髌骨两侧向下分离至胫骨,小心剥离滑膜组织,于磷酸盐缓冲液(PBS)中清洗后立即于液氮速冻置于-80 °C 冰箱保存,或放入 4% 多聚甲醛固定用于后续操作。

**2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠滑膜组织病理形态学变化** 将取出的各组大鼠滑膜组织放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋切片,HE 染色,后再行乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光镜下观察大鼠滑膜组织病理形态学变化。

**2.5 Real-time PCR 检测 LC3, Beclin1, p62 的 mRNA 表达** 取适量滑膜组织放入 2 mL 匀浆管中,加入适量 TRIzol,每个匀浆管内放入 2 粒 4 mm 及 3 粒 3 mm 氧化锆匀浆珠,匀浆 3 次,4 °C,13 500×g 离心 15 min,TRIzol 法提取总 RNA,测定 RNA 样品

的纯度与浓度,将RNA逆转录为cDNA,以cDNA为模板进行Real-time PCR扩增,反应条件为95℃预变性30 s,95℃变性10 s,60℃退火30 s,循环40次,之后进行Roche公司Real-time PCR仪设定的melting以及cooling程序,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达量。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。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Beclin1	上游 TCAGGAACCTCACAGTCCAT	153
	下游 GTAGACATCATCTGGCTGGG	
LC3	上游 TTGGTCAAGATCATCCGGCG	104
	下游 TCAGCGATGGGTGTGGATAC	
p62	上游 GAGGCTTTCAGGCGACTA	138
	下游 GCCGGCACTCCTTCTTCTTT	
GAPDH	上游 AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	389
	下游 GGCGGAGATGATGACCCTTT	

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠滑膜组织LC3, Beclin1, p62蛋白表达** 将滑膜组织样本置于2 mL匀浆管中,加入配置好的RIPA裂解液,每管加入1粒4 mm及2粒3 mm氧化锆研磨珠,匀浆3次,4℃静置30 min,4℃,13 500×g离心15 min,取上清,采用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定,配置12%聚丙烯酰胺凝胶,取20 μg上样,

表2 当归拈痛汤对风湿热痹模型大鼠足趾肿胀度的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Danggui Niantongtang on toe volume of wind-damp-heat arthralgia AA model rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	足趾肿胀度							
		1 d	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d	28 d
正常		2.03±0.10	2.08±0.03	2.15±0.20	2.20±0.09	2.25±0.12	2.31±0.23	2.35±0.21	2.43±0.18
风湿热痹模型		1.96±0.05	2.07±0.08	2.26±0.12	2.45±0.13 <sup>1)</sup>	2.64±0.09 <sup>2)</sup>	2.90±0.08 <sup>2)</sup>	3.32±0.12 <sup>2)</sup>	3.45±0.21 <sup>2)</sup>
当归拈痛汤	5.67	1.92±0.26	2.05±0.12	2.12±0.20	2.22±0.21 <sup>3)</sup>	2.35±0.11 <sup>4)</sup>	2.51±0.12 <sup>4)</sup>	2.57±0.05 <sup>4)</sup>	2.61±0.06 <sup>4)</sup>
	11.34	2.09±0.22	2.15±0.15	2.19±0.22	2.25±0.16 <sup>3)</sup>	2.34±0.21 <sup>4)</sup>	2.45±0.06 <sup>4)</sup>	2.49±0.09 <sup>4)</sup>	2.53±0.08 <sup>4)</sup>
	22.68	1.96±0.13	2.06±0.17	2.14±0.08	2.29±0.14	2.39±0.08 <sup>4)</sup>	2.49±0.15 <sup>4)</sup>	2.52±0.05 <sup>4)</sup>	2.57±0.13 <sup>4)</sup>
甲氨蝶呤	0.001 35	2.00±0.12	2.08±0.12	2.17±0.15	2.23±0.18 <sup>3)</sup>	2.32±0.18 <sup>4)</sup>	2.39±0.17 <sup>4)</sup>	2.41±0.11 <sup>4)</sup>	2.48±0.23 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与风湿热痹模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表4,5同)。

**3.2 对风湿热痹模型大鼠AI的影响** 在实验的第8天开始,除正常组外各组大鼠AI值逐渐升高,FSR组大鼠在第20天左右达到峰值,此后,FSR组大鼠AI值无明显改变;与模型组比较,第16天起,当归拈痛汤各剂量组及MTX组大鼠AI都出现不同程度下

电泳(80~120 V,2 h),350 mA恒流转膜1.5 h,5%脱脂奶粉封闭2 h,TBST洗膜3次,一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,二抗(1:6 000),4℃孵育2 h,TBST洗膜3次,加入ECL工作液,于超灵敏全自动成像分析仪曝光成像。使用Image J软件分析各条带灰度值,进行统计分析。

**2.7 免疫组化法检测大鼠滑膜组织LC3, Beclin1, p62的蛋白定位和表达** 切片脱蜡水化,抗原修复10 min,PBS洗涤3次,室温封闭10 min后,PBS洗涤3次,5% BSA外源性封闭15 min,孵育一抗,4℃孵育16 h,孵育后PBS洗涤3次,室温孵育二抗1 h,PBS洗涤3次,DAB显色,终止显色后,将切片放入自来水中浸泡10 min。苏木素复染60 s,自来水冲洗10 s后放入1%盐酸乙醇中分化10 s,自来水浸泡10 min返蓝。脱水、透明、封片、显微镜下观察。

**2.8 统计学处理** 所有数据用SPSS 20.0统计软件分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较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), $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对模型大鼠足趾肿胀度的影响** 与正常组比较,风湿热痹模型组大鼠在免疫接种后第12~16天左右出现足趾肿胀,先是足爪,后逐渐延伸至踝关节,甚者出现关节畸形和功能障碍,第16天左右足趾明显肿胀( $P<0.01$ );与模型组比较,第16天起,当归拈痛汤各剂量组和甲氨蝶呤组大鼠足趾肿胀程度显著降低( $P<0.01$ )。见表2。

降( $P<0.01$ )。见表3。

**3.3 对风湿热痹模型大鼠滑膜组织形态学的影响** HE染色显示,正常组大鼠膝关节滑膜结构完好,滑膜细胞排列整齐,呈扁平形,滑膜组织由1~2层滑膜细胞组成,且细胞间仅有少量间质,无炎性

表3 当归拈痛汤对风湿热痹模型大鼠关节炎评分(AI)的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Danggui Niantongtang on arthritis index (AI) of wind-damp-heat arthralgia model rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

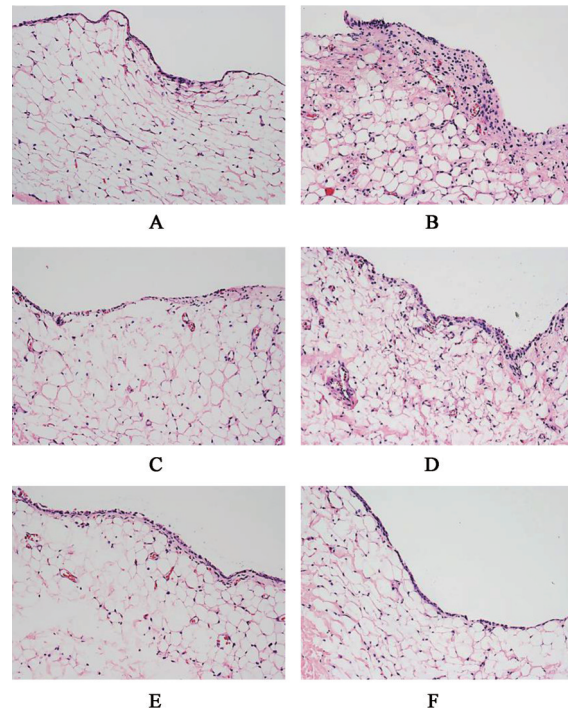
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AI				
		8 d	16 d	20 d	24 d	28 d
风湿热痹模型		1.70±0.12	5.50±0.10	7.50±0.13	7.67±0.15	7.67±0.20
当归拈痛汤	5.67	1.55±0.11	4.22±0.08 <sup>2)</sup>	6.00±0.05 <sup>2)</sup>	6.00±0.09 <sup>2)</sup>	5.89±0.09 <sup>2)</sup>
	11.34	1.50±0.08	3.67±0.07 <sup>2)</sup>	5.60±0.13 <sup>2)</sup>	5.60±0.13 <sup>2)</sup>	5.00±0.11 <sup>2)</sup>
	22.68	1.55±0.09	3.96±0.12 <sup>2)</sup>	6.10±0.07 <sup>2)</sup>	6.10±0.07 <sup>2)</sup>	5.34±0.07 <sup>2)</sup>
甲氨蝶呤	0.001 35	1.00±0.06 <sup>1)</sup>	1.33±0.14 <sup>2)</sup>	1.60±0.15 <sup>2)</sup>	1.67±0.12 <sup>2)</sup>	1.50±0.13 <sup>2)</sup>

注:与风湿热痹模型组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01。第1天各组大鼠AI值均为0。

细胞浸润,边界清晰可见,与正常组比较,模型组滑膜组织增生显著,大约为正常组的4~5倍,滑膜细胞水肿严重、排列紊乱,部分滑膜组织呈不规则增生,有大量炎细胞浸润且滑膜边界弥散不清;经干预防治后,与模型组比较,当归拈痛汤各剂量组和甲氨蝶呤组大鼠滑膜组织仅伴有轻微增生,滑膜组织由2~3层滑膜细胞组成,炎性浸润情况得到有效改善,滑膜细胞排列较为整齐,提示各给药组大鼠滑膜异常增生情况得到有效改善。见图1。

**3.4 对风湿热痹模型大鼠滑膜LC3, Beclin1, p62 mRNA表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠滑膜组织LC3, Beclin1 mRNA表达量显著升高, p62 mRNA表达显著降低(P<0.01);与模型组比较,当归拈痛汤低、中、高剂量组和甲氨蝶呤组大鼠滑膜组织中LC3, Beclin1 mRNA均显著降低, p62 mRNA表达量显著升高(P<0.01)。见表4。

**3.5 对风湿热痹模型大鼠滑膜LC3, Beclin1, p62蛋白表达的影响** 免疫组化结果显示, LC3, Beclin1, p62蛋白定位于胞浆中,与正常组比较,模型组大鼠滑膜组织LC3, Beclin1蛋白表达量明显增多, p62蛋白表达量明显减少;与模型组比较,当归拈痛汤低、中、高剂量组和甲氨蝶呤组LC3, Beclin1蛋白表达



A. 正常组; B. 风湿热痹模型组; C. 当归拈痛汤低剂量组; D. 当归拈痛汤中剂量组; E. 当归拈痛汤高剂量组; F. 甲氨蝶呤组(图2~5同)

图1 当归拈痛汤对风湿热痹型大鼠滑膜组织病理学影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Danggui Niantongtang on synovial tissues histopathology of wind-damp-heat arthralgia model rats (HE, ×200)

表4 当归拈痛汤对风湿热痹模型大鼠滑膜组织LC3, Beclin1, p62 mRNA表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Danggui Niantongtang on expression of LC3, Beclin1, p62 mRNA in synovial tissues of wind-damp-heat arthralgia model rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LC3	Beclin1	p62
风湿热痹模型		1.47±0.10 <sup>2)</sup>	1.65±0.06 <sup>2)</sup>	0.49±0.01 <sup>2)</sup>
当归拈痛汤	5.67	0.92±0.03 <sup>4)</sup>	0.89±0.03 <sup>4)</sup>	1.12±0.13 <sup>4)</sup>
	11.34	0.84±0.02 <sup>4)</sup>	0.76±0.07 <sup>4)</sup>	1.59±0.08 <sup>4)</sup>
	22.68	0.89±0.04 <sup>4)</sup>	0.81±0.09 <sup>4)</sup>	1.25±0.05 <sup>4)</sup>
甲氨蝶呤	0.001 35	0.72±0.07 <sup>4)</sup>	0.70±0.05 <sup>4)</sup>	1.58±0.14 <sup>4)</sup>

注:设正常组各mRNA表达量均为1。

明显减少, p62蛋白表达明显增多。见图2~4。

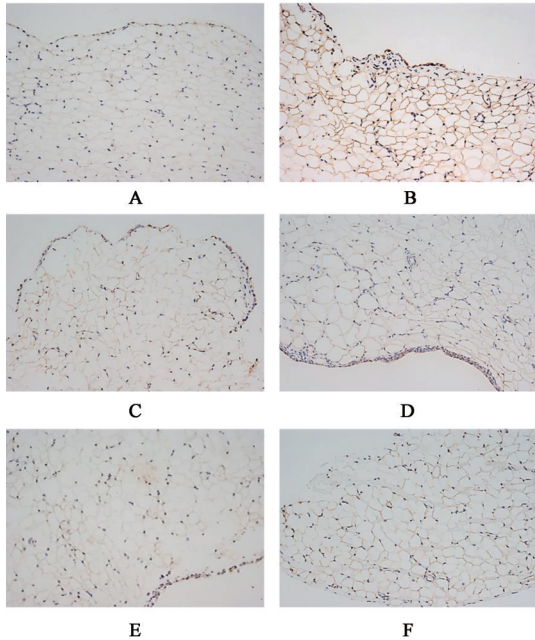


图2 当归拈痛汤对风湿热痹型大鼠滑膜组织LC3蛋白表达量的影响(IHC, ×200)

Fig. 2 Effect of Danggui Niantongtang on expression of LC3 protein in synovial tissues of wind-damp-heat arthralgia model rats (IHC, ×200)

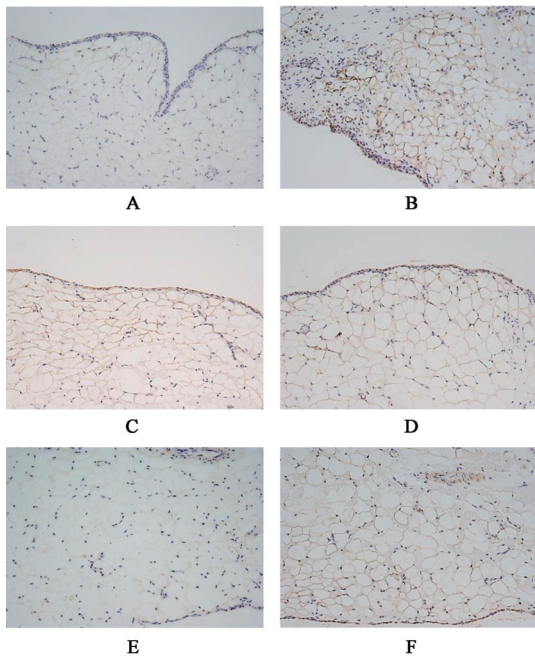


图3 当归拈痛汤对风湿热痹型大鼠滑膜组织Beclin1蛋白表达量的影响(IHC, ×200)

Fig. 3 Effect of Danggui Niantongtang on expression of Beclin1 protein in synovial tissues of wind-damp-heat arthralgia model rats (IHC, ×200)

3.6 对风湿热痹模型大鼠滑膜LC3, Beclin1, p62蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠滑

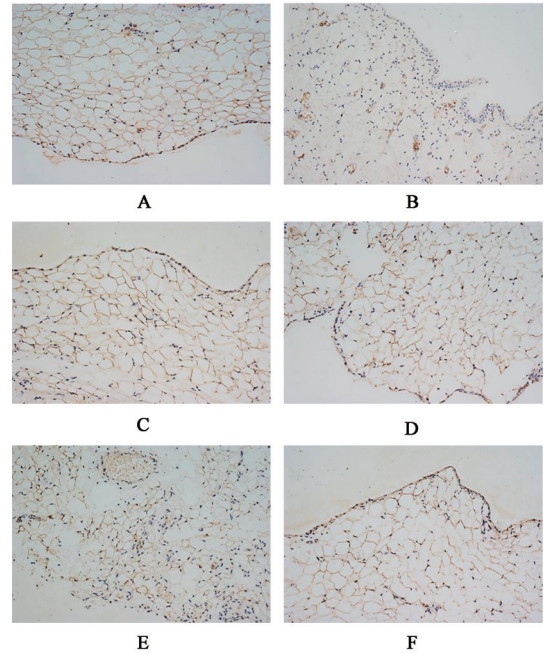


图4 当归拈痛汤对风湿热痹型大鼠滑膜组织p62蛋白表达量的影响(IHC, ×200)

Fig. 4 Effect of Danggui Niantongtang on expression of p62 protein in synovial tissues of wind-damp-heat arthralgia AA model rats (IHC, ×200)

膜组织LC3, Beclin1蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ), p62蛋白表达显著下降( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 当归拈痛汤低、中、高剂量组和甲氨蝶呤组LC3, Beclin1蛋白表达均有不同程度下降( $P<0.01$ ), p62蛋白表达水平有不同程度升高( $P<0.01$ )。见图5, 表5。

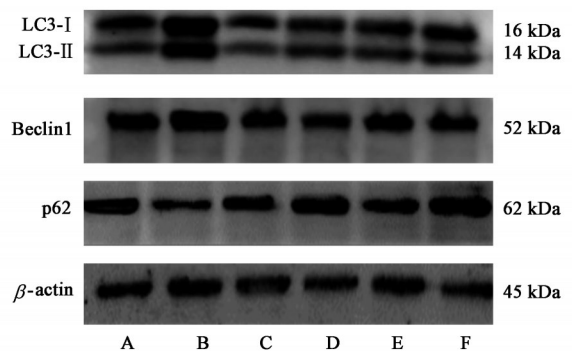


图5 风湿热痹型大鼠滑膜组织LC3, Beclin1, p62蛋白表达电泳  
Fig. 5 Electrophoresis of LC3, Beclin1, p62 protein expression in synovial tissues of wind-damp-heat arthralgia model rats

#### 4 讨论

中医学认为RA归属于“痹证”范畴, 在RA发生过程中, 风湿热痹型类风湿关节炎是临床中的常见证型。风湿热痹形成是内外因相合致病的结果。由于久居潮湿炎热之地, 或处于天暑地蒸之中, 风

表5 当归拈痛汤对风湿热痹型大鼠滑膜组织LC3, Beclin1, p62蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of Danggui Niantongtang on expression of LC3, Beclin1, p62 protein in synovial tissues of wind-damp-heat arthralgia AA model rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	LC3- II /LC3- I	Beclin1 /β-actin	p62 /β-actin
正常		0.95±0.06	0.56±0.02	0.86±0.04
风湿热痹模型		1.37±0.10 <sup>2)</sup>	1.14±0.01 <sup>2)</sup>	0.51±0.01 <sup>2)</sup>
当归拈痛汤	5.67	0.86±0.01 <sup>4)</sup>	0.45±0.02 <sup>4)</sup>	0.84±0.03 <sup>3)</sup>
	11.34	0.81±0.06 <sup>4)</sup>	0.43±0.12 <sup>4)</sup>	1.24±0.01 <sup>4)</sup>
	22.68	0.82±0.04 <sup>4)</sup>	0.47±0.14 <sup>4)</sup>	1.15±0.09 <sup>4)</sup>
甲氨蝶呤	0.001 35	0.79±0.05 <sup>4)</sup>	0.44±0.05 <sup>4)</sup>	1.32±0.15 <sup>4)</sup>

湿热等外邪侵袭机体, 湿热交阻, 壅遏于骨节经脉, 引发风湿热痹; 或由于素体脾胃虚弱, 运化失常, 加之膏脂蕴积, 肥甘厚腻, 酿生湿热, 湿热内蕴, 复感风邪, 风与湿热相搏, 流注经络关节, 气血流通不畅而成风湿热痹。其病邪性质为风、湿、热三邪。病机转化表现为由表入里, 由浅入深, 由肌肤到筋骨。正如清代顾靖远所言: “若邪郁病久, 风变为火, 寒变为热, 湿变为痛, 又当易辙寻之, 宜通络活血, 疏散邪滞剂中, 而能以降火清热利湿之品(《顾氏医镜·卷十三·痹6》)”。因此根据风湿热痹证病机特点及主要证候, 结合RA活动期的临床特点, 兼顾中医“急则治标, 缓则治本”的原则, 临床多以清热利湿, 疏风止痛为其治疗大法。

张元素以“洁古治病, 不用古方”这一指导思想, 在《医学启源》中创制出当归拈痛汤这一著名方剂, 体现了独有的制方思想和特色。当归拈痛汤全方组成为茵陈、羌活、黄芩、猪苓、泽泻、知母、防风、当归、葛根、苦参、苍术、人参、炙甘草、白术、升麻。方中羌活、茵陈为君药, 羌活辛苦性温, 上升发散, 长于搜风通痹, 可驱散肌表之邪, 且可胜湿、通利关节。茵陈苦泄降下, 善于清热利湿。二药相合湿热去、痹痛除, 使风湿热邪内外分消。黄芩、苦参苦寒泄火燥湿; 防风、葛根、升麻疏风解表, 祛风湿于外, 臣药相伍祛风清热除湿, 使湿热上、中、下三路分消, 以增君药之力。佐以苍术苦温, 燥湿运脾, 除内外之湿; 白术甘温, 健脾燥湿, 配伍苍术意在补脾之不足, 泻湿浊之有余。为避免邪去伤正, 方中佐以人参、当归益气养血, 配伍白术益气补脾之效显著。知母苦润而不燥, 可助诸药清热之力, 还可防苦燥渗利伤阴。甘草为佐使药, 既可调和诸药, 又可助白术、人参益气健脾之功。纵观全方配伍, 疏风清

热, 淡渗利湿, 燥湿健脾, 益气养血, 升阳化湿, 诸法合用共奏利湿清热、疏风止痛之功。故当归拈痛汤适用于风湿热痹, 证属湿重热轻的RA患者。RA发病机制复杂, 尚无治愈手段, 中医药对于RA的治疗相比西医治疗具有多靶点、个体化、疗效明显、副作用小等优势。目前在临床当归拈痛汤已经应用于RA活动期的治疗<sup>[16]</sup>, 2018年中华中医药学会风湿病分会制定的《类风湿关节炎病证结合诊疗指南》推荐当归拈痛汤为治疗RA风湿热痹证的经典方剂, 为更好的投入临床应用, 现需对当归拈痛汤防治RA风湿热痹证的疗效及其影响的机制展开研究。

自噬是生物体内主要的降解过程, 当细胞受到外界刺激时以迅速而短暂的方式被激活, 从而维持细胞内环境稳定的一种主动生物学过程<sup>[17]</sup>。由于自噬对于在生理和病理情况下维持生物体内平衡至关重要, 因此, 自噬的改变已与多种临床疾病相关。自噬作为一种全新的细胞程序化死亡方式, 在RA的进展和发病机制中发挥重要作用。自噬可影响RA-FLS的存活, FLS细胞在滑膜中起着重要作用, 研究表明RA-FLS凋亡水平下降, 自噬水平升高。低凋亡率和高自噬指数会刺激RA患者中FLS的活化和增殖, 导致慢性炎症和关节破坏。因此自噬水平的升高可能影响RA-FLS存活并保护其免于凋亡<sup>[18-19]</sup>。在类风湿疾病早期, RA-FLS通过多种途径启动自噬, 清除受损细胞器, 维持细胞内环境稳态和细胞存活, 减少细胞凋亡。自噬水平异常与RA的疾病进程及关键病理环节密切相关, RA的滑膜细胞炎症程度及病情活动度与自噬水平正相关<sup>[20-22]</sup>。

目前自噬相关的重要标志物有LC3, Beclin1, p62<sup>[23-24]</sup>, LC3是检测自噬发生的标志性蛋白, 并且是首个自噬小体膜蛋白, 该蛋白有4个亚型(LC3A, LC3B, LC3B2和LC3C)。在自噬过程中, LC3被具有蛋白内切酶活性的ATG4剪切, 生成LC3-I, LC3-I通过ATG3和ATG7参与的泛素样反应, 使其与磷脂酰乙醇胺(PE)发生作用, 生成膜结合形式的LC3-II, 并持续附着于自噬体(autophagosome)膜上, 因此, LC3-II的表达水平与自噬呈正相关<sup>[25-27]</sup>。Beclin1是第一个发现的与自噬调控相关的关键因子, 是ULK1的下游靶点, ULK1的激酶通过磷酸化Beclin1, 激活脂酶VPS34, 诱导了细胞自噬发生, Beclin1可与Ⅲ型PI3K形成复合物, 调动相关自噬蛋白质定位于前自噬体<sup>[28]</sup>。p62/SQSTM1是自噬底物连接蛋白, 含有多个结构域, 可结合待降

解蛋白将其运输至自噬体中,最终在溶酶体中降解<sup>[29-30]</sup>。p62在自噬过程中不断被降解,而自噬功能被抑制或失活后,p62蛋白会在细胞质中累积,因此,p62与细胞自噬呈负相关。有研究表明,LC3, Beclin1, p62相对表达水平与疾病活动度相关<sup>[31]</sup>。比较药物治疗前后RA患者自噬水平,结果显示RA患者滑膜组织中自噬水平激活,LC3和Beclin1的mRNA相对表达水平在治疗后下降,p62表达水平升高,由此推测自噬活性降低可缓解RA患者病情,且自噬相关基因LC3, Beclin1, p62可以作为评价RA疾病活动度和治疗效果的指标<sup>[32]</sup>。因此,本研究通过探索RA,模型和自噬之间的关联,为临床监测RA病情以及判断药物疗效和疾病预后提供帮助。

本实验结果显示,与正常组比较,风湿热痹模型组大鼠足趾关节肿胀明显,滑膜HE染色显示滑膜细胞显著增生,大鼠滑膜组织中LC3, Beclin1的mRNA和蛋白水平明显升高,p62 mRNA和蛋白水平降低,表明模型制备成功,自噬水平升高。经过不同剂量当归拈痛汤或甲氨蝶呤的治疗后,大鼠一般情况改善,足趾肿胀度有所减轻,滑膜细胞增生和炎性细胞浸润情况明显改善,滑膜组织p62 mRNA和蛋白水平有不同程度增加,LC3, Beclin1 mRNA和蛋白水平均有所下降。在各个治疗组中,当归拈痛汤中、高剂量组的大鼠足趾肿胀度低于低剂量组,并且当归拈痛汤中、高剂量组LC3, Beclin1的mRNA和蛋白水平低于模型组和当归拈痛汤低剂量组,当归拈痛汤中、高剂量组p62 mRNA和蛋白水平高于模型组、当归拈痛汤低剂量组。但当归拈痛汤高剂量组大鼠在给药中后期出现性情易怒,饮水量增多,大便增多且烂软、臭秽粘腻等现象。综合以上结果初步说明相较当归拈痛汤低、高剂量组,当归拈痛汤中剂量对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠的防治效果更好,当归拈痛汤可以通过抑制类风湿滑膜成纤维细胞自噬发挥保护AA大鼠滑膜组织的作用。

综上所述,风湿热痹模型组大鼠滑膜组织的炎性浸润和滑膜细胞增生可能与自噬水平升高有关,当归拈痛汤可以通过抑制自噬,下调自噬相关蛋白LC3, Beclin1的表达和上调p62的表达,减轻风湿热痹模型组大鼠关节炎及滑膜增生情况,使关节炎大鼠的症状得到有效改善。当归拈痛汤设置不同剂量其目的在于确定该药物的最佳作用浓度,本实验结果显示,当归拈痛汤中剂量组作用效果强于低高剂量组,提示药物与疗效之间不是简单的正相关

关系,方药的剂量与治疗效果密切相关,但尚无证据表明药物用量和疗效呈线性关系<sup>[33]</sup>。并且方药剂量的选择不仅关乎于疗效,还与用药安全性有关。因此,应选择疗效最佳且无不良反应的药物剂量用作后续研究。本实验研究表明当归拈痛汤中剂量对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠有良好的防治作用且无副作用产生,并且可以有效改善自噬水平,可用于后续实验。该实验首次证实当归拈痛汤可以通过调控自噬水平防治风湿热痹型佐剂性关节炎,提示自噬是当归拈痛汤防治RA的一个新靶点,影响自噬的经典通路包括磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路,腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)信号通路,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等<sup>[34]</sup>,诸多信号通路之间相互关联,相比西药单靶点,中医药可以同时多条信号通路进行干预的多靶点特征更具优势。当归拈痛汤如何通过调控自噬相关信号通路治疗RA自噬分子机制还有待研究,并且目前诸多研究表明在RA不同时期自噬水平有相应改变,所以当归拈痛汤是否能影响疾病不同时期自噬水平的改变来治疗RA,还有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] ALETAHA D, SMOLEN J S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review [J]. JAMA, 2018, 320(13): 1360-1372.
- [2] YANG R, ZHANG Y, WANG L, et al. Increased autophagy in fibroblast-like synoviocytes leads to immune enhancement potential in rheumatoid arthritis [J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15420-15430.
- [3] BETH L, GUIDO K. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. Cell, 2019, 176(1/2): 11-42.
- [4] 李春蔚,孙英焕,杜明,等. 凋亡与自噬的相互关系在类风湿关节炎中的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2017, 6(10): 65-68.
- [5] YIN H, WU H, CHEN Y, et al. The therapeutic and pathogenic role of autophagy in autoimmune diseases [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1512.
- [6] VOMERO M, BARBATI C, COLASANTI T, et al. Autophagy and rheumatoid arthritis: current knowledges and future perspectives [J]. Front Immunol, 2018, doi:10.3389/fimmu.2018.01577.
- [7] ROCKEL J S, KAPOOR M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(9): 517-531.

- [ 8 ] 戴凤翔,邱联群. 当归拈痛汤联合西乐葆治疗急性痛风性关节炎的临床疗效观察[J]. 广州中医药大学学报,2020,37(3):422-425.
- [ 9 ] 赵海玲,周宗波,李建强,等. 当归拈痛汤加减内服外洗治疗膝骨性关节炎风湿热痹证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(13):105-110.
- [10] 袁立霞,刘亚伟. 当归拈痛汤及其拆方对类风湿性关节炎大鼠炎症因子谱的调控作用研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(6):1284-1287.
- [11] 许伏龙,袁立霞. 当归拈痛汤及拆方对类风湿性关节炎大鼠血清IL-6的影响[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(4):871-873.
- [12] 赵帆,李佳钰,陆麒麟,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.
- [13] 袁立霞,白殊同,李青原,等. Mtb诱导的佐剂性关节炎大鼠滑膜病变的蛋白质组学研究[J]. 南方医科大学学报,2014,34(9):1272-1276.
- [14] 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.
- [15] DURAI M, KIM H R, MOUDGIL K D. The regulatory C-terminal determinants within mycobacterial heat shock protein 65 are cryptic and cross-reactive with the dominant self homologs: implications for the pathogenesis of autoimmune arthritis [J]. J Immunol, 2004, 173(1):181-188.
- [16] 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.
- [17] ANTONIOLI M, DI R M, PIACENTINI M, et al. Emerging mechanisms in initiating and terminating autophagy [J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42 (1) : 28-41.
- [18] KARAMI J, MASOUMI M, KHORRAMDELAZAD H, et al. Role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: latest evidence and therapeutic approaches[J]. Life Sci, 2020, 254: 117734.
- [19] CONNOR A M, MAHOMED N, GANDHI R, et al. TNF- $\alpha$  modulates protein degradation pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(2):R62.
- [20] GALLUZZI L, BRAVO-SAN P J, LEVINE B, et al. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(7):487-511.
- [21] ROCKEL J S, KAPOOR M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(9):517-531.
- [22] ZHU L, WANG H, WU Y, et al. The autophagy level is increased in the synovial tissues of patients with active rheumatoid arthritis and is correlated with disease severity[J]. Media Inflamm, 2017, 2017: 1-9.
- [23] TAO Z, LIU L, ZHENG L D, CHENG Z. Autophagy in adipocyte differentiation [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1854:45-53.
- [24] VALENTE G, MORANI F, NICOTRA G, et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins Beclin1 and LC3 in ovarian cancer [J]. Bio Res Int, 2014, doi:10. 11569/wcjd. v23. i2. 318.
- [25] CHANG S J, OU-YANG F, TU H P, et al. Decreased expression of autophagy protein LC3 and stemness (CD44+/CD24-/low) indicate poor prognosis in triple-negative breast cancer [J]. Hum Pathol, 2016, 48: 48-55.
- [26] YANG A, PANTOOM S, WU Y. Elucidation of the anti-autophagy mechanism of the Legionella effector RavZ using semisynthetic LC3 proteins [J]. eLife, 2017, doi:10. 7554/eLife. 23905.
- [27] WEIDBERG H, SHVETS E, SHPILKA T, et al. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis[J]. EMBO J, 2010, 29(11):1792-1802.
- [28] 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.
- [29] RICARDO A, MALENE H, DAVID W. Walker . The selective autophagy receptor SQSTM1/p62 improves lifespan and proteostasis in an evolutionarily conserved manner[J]. Autophagy, 2020, 16(4):772-774.
- [30] NAWAS A F, RAMACHANDRAN J, THOMAS S, et al. Abstract 762: the interleukin-1 inflammatory cytokine family modulates p62/SQSTM1 accumulation in breast cancer cell lines [J]. Cancer Res, 2016, 76:762.
- [31] 吴茜,赵莉平,李彦魁,等. 外周血单个核细胞自噬相关基因LC3 II、Beclin-1与类风湿性关节炎的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(3):305-308.
- [32] 邵鑫,蒋先虹,王瑞,等. 类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及巨自噬的表达水平[J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(1):1-5.
- [33] 李明,杨丽娜. 基于中医汤剂的中药常用剂量研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(8):12-16.
- [34] MORSCH A, WISNIEWSKI E, LUCIANO T F, et al. Cigarette smoke exposure induces ROS-mediated autophagy by regulating sestrin, AMPK, and mTOR level in mice[J]. Redox Rep, 2019, 24(1):27-33.

[责任编辑 孙丛丛]