

基于定量蛋白质组学研究当归拈痛汤对风湿热痹佐剂性关节炎大鼠的作用机制

蔡义思¹, 李佳钰¹, 陆麒瑾¹, 富丽萍¹, 潘慕倩¹, 刘刚¹, 袁立霞^{1,2*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 检验与生物技术学院, 南方医院, 广州 510515;

2. 南方医科大学第五附属医院, 广州 510920)

[摘要] **目的:**应用定量蛋白质组学研究当归拈痛汤对风湿热痹佐剂性关节炎(AA)大鼠的作用机制。**方法:**60只SD大鼠随机分为正常组、模型组、当归拈痛汤低、中、高剂量组及甲氨蝶呤(MTX)组,每组10只,大鼠尾部皮下注射灭活结核分支杆菌佐剂(Mtb)进行AA的造模,人工气候箱干预16 d建立风湿热痹证模型,造模当天开始给药干预,持续干预28 d。提取大鼠滑膜组织蛋白质,使用4D非标记定量(4D-LFQ)蛋白质组学研究当归拈痛汤中剂量组与风湿热痹证模型组之间的差异蛋白情况,采用免疫组化及蛋白免疫印迹法(Western blot)验证与线粒体途径细胞凋亡相关的差异蛋白。**结果:**从滑膜组织中检测出4 756个蛋白质,其中4 234个蛋白质包含定量信息。当归拈痛汤与模型组差异蛋白为814个。基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析显示,当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠的滑膜蛋白质组确有影响,且差异蛋白集中在对免疫系统的调控、急性炎症的反应和凋亡水平的调节。免疫组织化学与蛋白免疫印迹法验证发现,与模型组比较,当归拈痛汤各剂量组及MTX组滑膜组织中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)及细胞色素C(Cyt C)蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2的表达水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),剪切型胱天蛋白酶-9(cleaved Caspase-9)/胱天蛋白酶-9(Caspase-9)显著升高($P<0.01$),磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)/蛋白激酶B(Akt)明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**当归拈痛汤对风湿热痹证类风湿关节炎的治疗涉及多靶点,其可能通过调节Akt/Bax/Bcl-2通路,促进线粒体途径细胞凋亡,从而发挥其对风湿热痹证类风湿关节炎的防治作用。

[关键词] 当归拈痛汤; 风湿热痹证; 类风湿关节炎; 蛋白质组学; 细胞凋亡

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0062-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220642

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220121.1106.001.html>

[网络出版日期] 2022-01-21 13:30

Mechanism of Danggui Niantongtang on Adjuvant Arthritis Rats with Wind-dampness-heat Arthralgia Based on Quantitative Proteomics

CAI Yisi¹, LI Jiayu¹, LU Qijin¹, FU Liping¹, PAN Muqian¹, LIU Gang¹, YUAN Lixia^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, School of Laboratory Medicine and Biotechnology,

Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. The Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510920, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Danggui Niantongtang (DGNT) against adjuvant arthritis (AA) rats with wind-dampness-heat arthralgia by quantitative proteomics. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into normal group, model group, angelica came pain soup low, medium and high dose group and methotrexate (MTX) group, each group of 10, only the rat tail root subcutaneously inactivated mycobacterium tuberculosis (Mtb) of adjuvant to build model of AA, artificial climate box intervention 16 d

[收稿日期] 2021-08-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673875,81774382);广东省自然科学基金项目(2022A1515011681)

[第一作者] 蔡义思,在读硕士,从事方剂学研究,E-mail:993764181@qq.com

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

rheumatic fever bi syndrome model is set up, building the day began to drug intervention, The intervention lasted for 28 days. The proteins of synovial tissues in experimental rats were extracted. The differential proteins in the medium-dose DGNT group and the model group were detected and analyzed by 4D label-free quantification (4D-LFQ) proteomics. The differentially expressed proteins associated with mitochondrial pathway apoptosis were verified by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** A total of 4 756 proteins were identified from rat synovial tissues, of which 4 234 proteins contained quantitative information. There were 814 differential proteins between the model group and the DGNT group. As revealed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome (KEGG) enrichment analyses, DGNT had an effect on the synovial proteome of AA rats with wind-dampness-heat arthralgia, and the differential proteins were enriched in the regulation of the immune system, response to acute inflammation, and apoptosis regulation. As demonstrated by the results of immunohistochemistry and Western blot, compared with the model group, the DGNT groups and the MTX group showed increased protein expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein (Bax) and cytochrome C (Cyt C) ($P<0.05$, $P<0.01$), reduced Bcl-2 level ($P<0.05$, $P<0.01$), elevated level of cleaved cysteinyl aspartate-specific protease 9 (Caspase-9)/Caspase-9 ($P<0.01$), and decreased level of phosphorylated protein kinase B (p-Akt)/Akt ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** DGNT involved multiple targets in the treatment of AA with wind-dampness-heat arthralgia and it may exert its effect in the prevention and treatment by regulating the Akt/Bax/Bcl-2 pathway and promoting the cell apoptosis in the mitochondrial pathway.

[Keywords] Danggui Niantongtang; wind-dampness-heat arthralgia; rheumatoid arthritis; proteomics; apoptosis

类风湿关节炎(RA)是一种以关节慢性炎症为主要特征的自身免疫性疾病,滑膜炎是其最主要的病理改变之一。类风湿关节炎滑膜炎的病理特征包括成纤维样滑膜细胞的异常增生、新生血管形成及炎性细胞浸润,进而导致血管翳形成及进行性骨关节破坏,甚至畸形、残疾。RA约影响全球1%的人口,其发病率具有一定的性别差异、地域差异^[1-3]。目前RA的病因仍未明确,临床上主要使用改善病情的抗风湿药、非甾体抗炎药、糖皮质激素及其他生物制剂等治疗RA,然而这些药物多存在长期服用毒副作用较多的缺点^[4]。因此,探求且深入研究治疗RA的新靶点、新药物始终是国内外学者的研究重点。而发掘有效防治RA的中药方剂并深入研究其治疗机制,就是其中重要的研究工作。

中医认为RA归属于“痹证”范畴,正气不足,卫外不固,风、寒、湿、热等邪气闭阻经络,不通则痛,故成痹证。当归拈痛汤源于清代易水学派大家张元素的《医学启源》,是治疗风湿热痹证的经典名方。其组成为茵陈、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、白术及升麻,全方共15味药,具有利湿清热,疏风止痛的功效。课题组前期已有临床研究表明当归拈痛汤治疗风湿热痹类风湿关节炎确有良好的疗效^[5]。

蛋白质组学研究是基于蛋白质组成和细胞、组织或生物体的变化,大规模研究蛋白质的特征,包括蛋白质表达水平、翻译后修饰和蛋白质-蛋白质相互作用的一种研究方式^[6]。通过蛋白质组学研究,能在蛋白质水平上全面了解疾病发生、细胞代谢等过程。基于蛋白质组学的技术已被广泛应用于识别生物标志物和探索致病机制等研究领域,以及许多疾病的早期诊断和预后及药物开发^[7]。目前基于质谱的定量蛋白质组学逐渐成熟,这种检测方式通过质谱与高效液相及电离技术结合,能够高效进行蛋白质的分离与鉴定,具有高通量、高分辨率等优点。其通过检测患病组织样本中蛋白质丰度的相对变化,提供有关人类疾病的蛋白质相互作用、信号通路和生物标志物的综合信息^[8-10]。而在整合了四级杆飞行时间、捕获离子淌度及同步累积连续碎裂扫描模式的全新质谱技术上衍生出的4D蛋白质组学技术,不仅革命性提升了蛋白质组学定量的准确性和灵敏性,而且极大地减少了检测时间与样品量^[11]。应用4D蛋白质组学技术可以从整体水平上研究药物干预前后,细胞或动物模型内所有蛋白质的表达情况,进而阐明药物作用的分子机制。此研究思路与中医的整体观及中药方剂多环节、多靶点、多组分的作用机制不谋而合,已被广泛应用于

中医复方的作用机制研究^[12-14]。

佐剂性关节炎(AA)大鼠的发病症状、病理表现及关节外症状等方面都与RA相近,在RA病变特点或防治RA的药物研究中被广泛应用^[15-16],故选取其作为此次研究的动物模型。本研究采用4D非标记定量(4D-LFQ)蛋白质组学技术系统研究当归拈痛汤治疗风湿热痹佐剂性关节炎大鼠的靶点蛋白,运用生物信息学分析差异蛋白的生物学功能,结合课题组前期对凋亡通路的研究,筛选出凋亡相关蛋白进行分析,并进行免疫组化及蛋白免疫印迹法(Western blot)验证。以助于阐述当归拈痛汤防治类风湿关节炎的作用机制,为当归拈痛汤的临床应用提供重要的科学依据。

1 材料

1.1 动物 由南方医科大学实验动物中心提供的6周龄SPF级雄性SD大鼠60只,体质量(160±10)g,许可证号为SYXK(粤)2016-0041,于南方医科大学SPF级实验室饲养,自由饮食,适应性喂养7 d后开展实验。实验符合南方医科大学的实验动物伦理委员会相关要求及原则,伦理决议编号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、泽泻9 g、知母9 g、防风9 g、苍术9 g、当归9 g、苦参6 g、葛根6 g、人参6 g、升麻3 g、白术3 g、黄芩3 g、炙甘草15 g组成,上述饮片均由南方医院中药房提供,由南方医科大学马骥教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》规范;甲氨蝶呤片(MTX,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);蛋白激酶B(Akt)、磷酸化Akt(p-Akt)抗体(中国Affinity Biosciences公司,批号分别为#20t9742、#34d5362);胱天蛋白酶-9(Caspase-9)、细胞色素C(Cyt C)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为00077448、00047881); β -肌动蛋白(β -actin)、剪切型胱天蛋白酶-9(cleaved Caspase-9)、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、3723TT、05/2019、04/2019);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(武汉博士德生物公司,批号201912);3、4 mm研磨珠(钢)(赛维尔公司,批号分别为20221026、202308);其他常规化学试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.3 仪器 N-12008型旋转蒸发仪(日本Eyela公司);Mini-Protean Tetra型电泳仪及转膜仪(美国

Bio-Rad公司);IX53型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);5804R型高速离心机(德国Eppendorf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);TMY-4型8高速组织研磨机(天津泰斯特公司)。

2 方法

2.1 药物溶液制备 按处方配比准确称取当归拈痛汤各味药物放入中药煎煮煲中,加入蒸馏水800 mL浸泡30 min。用武火煮沸后转文火煎煮1 h,将药液倒出备用。往药煲中加入蒸馏水600 mL进行二次煎煮,武火煮沸后文火煎煮30 min。将两次煎煮所得药液混合,纱布过滤后转移至旋转蒸发仪中浓缩,将低、中、高不同质量浓度分别浓缩至0.567、1.134、2.268 g·mL⁻¹。各剂量药液装入新的50 mL离心管中-20℃保存,备用。

2.2 动物分组、造模及给药 60只6周龄SD大鼠随机分为6组,分别为正常组、模型组、当归拈痛汤低、中、高剂量组及甲氨蝶呤组,每组10只。正常组除外,其余组大鼠均采用尾根部经皮下注射Mtb诱导剂0.2 mL(5 g·L⁻¹)进行造模^[15],正常组大鼠注射等体积生理盐水。免疫当天除正常组外,其余组大鼠均开始风湿热环境干预:转移至人工气候箱内,以湿度90%、温度36℃、风速5 m·s⁻¹为条件,每天干预2次,每次2 h,持续16 d。按体表面积之比得出人与大鼠给药量折算系数为0.018,等效剂量换算后,取其0.5倍(5.67 g·kg⁻¹)、1倍(11.34 g·kg⁻¹)、2倍(22.68 g·kg⁻¹)为此次实验的低、中、高剂量,各组大鼠自造模当日开始给药,予相应剂量的当归拈痛汤药液2 mL;MTX组每周灌胃2次,每次灌服2 mL MTX混悬液(1.35 mg·kg⁻¹);正常组与模型组每天予以生理盐水2 mL,连续灌胃28 d。末次灌胃2 h后进行下一步实验。

2.3 大鼠滑膜组织的提取 处死大鼠,仰位固定,75%乙醇消毒膝关节,使用手术器械沿膝关节正中纵行切开皮肤,暴露出以膝关节为中心约3 cm×3 cm的区域,用齿镊轻轻提起髌骨,沿着髌骨上沿向下切开直至股骨,再沿髌骨两侧向下切开直至胫骨,即打开膝关节腔,可见髌骨底端向上延续的一薄层平滑淡黄色滑膜组织。使用镊子小心剥离滑膜组织,置于无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中清洗,迅速液氮速冻后置于-80℃冰箱保存。

2.4 大鼠滑膜组织4D-LFQ蛋白质组学检测

2.4.1 样品准备 选取模型组与当归拈痛汤中剂

量组进行下述滑膜组织蛋白质组学研究,自-80℃冰箱中取出两组的滑膜组织,每组随机选取3个样本。

2.4.2 蛋白提取与定量 将组织置于液氮预冷的研钵中,加入液氮,迅速研磨直至组织呈粉末状,向组织中加入4倍体积的蛋白裂解液,混匀后转移到离心管中,超声裂解,4℃、12 000×g离心10 min,上清液转移到新的离心管,BCA法测定蛋白浓度,备用。

2.4.3 胰酶酶解 各组蛋白取等量进行酶解,裂解液调整至相同体积,加入等体积预冷的丙酮混匀,再加入4倍体积预冷丙酮,-20℃冰箱沉淀2 h,4℃、4 500×g离心5 min,弃去上清液,再用预冷丙酮沉淀2次,晾干。加入EAB,超声打散,加胰蛋白酶作用过夜,加入二硫苏糖醇(DTT)进行还原,使用碘乙酰胺(IAA)室温避光孵育15 min。

2.4.4 液相色谱-质谱联用分析 EASY-nLC1200超高效液相系统分离肽段,分离后的肽段注入NSI离子源中电离,使用Exploris480质谱分析。

2.4.5 数据库搜索 二级质谱数据使用PD2.4检索。数据库为Rattus_norvegicus_10116(29 951条序列),数据库中添加反库及常见的污染库,可计算结果中假阳性率并消除污染蛋白的影响;定量方法为非标记定量(LFQ),蛋白鉴定、肽匹配图谱(PSM)鉴定的伪发现率(FDR)为1%。

2.4.6 数据分析 检测到各组蛋白样品中具有统计学意义的差异蛋白并进行生物信息学分析:评估蛋白定量重复性用到主成分分析(PCA),相对标准差(RSD)和皮尔森相关性这3种方法。对差异蛋白进行注释和功能分类则通过基因本体(GO)、蛋白结构域分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集。

2.5 免疫组化检测 Bax、Bcl-2、Cyt C的蛋白定位和表达 制备切片,脱蜡水化,加入枸橼酸钠溶液,加热抗原修复10 min,冷却后PBS洗涤3次,内源性封闭液避光室温封闭10 min,PBS洗涤,外源性封闭液封闭15 min。加入一抗,4℃孵育16 h,PBS洗涤,加入一抗室温孵育1 h,避光加入DAB显色,终止显色后使用苏木素复染核,封片后显微镜下观察。

2.6 Western blot 检测 Akt、p-Akt、Caspase-9及cleaved Caspase-9的蛋白表达 取各组滑膜组织样本于2 mL匀浆管中,加入配置好的蛋白裂解液,匀浆,4℃静置30 min裂解,4℃、13 500 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm),吸取上清,BCA法测定蛋

白浓度,根据浓度加入稀释液与上样缓冲液,95℃加热5 min变性。配置12%聚丙烯酰胺凝胶,取样品20 μg上样,电泳(80 V 30 min、120 V 60 min),恒流(350 mA)转膜1.5 h,配置5%脱脂牛奶封闭2 h,用TBST洗膜3次,孵育对应的一抗(1:1 000)4℃过夜,TBST洗膜3次后,二抗(1:6 000)4℃孵育2 h,TBST洗膜3次后,加入ECL工作液,超灵敏全自动成像分析仪曝光成像。使用Image J 1.8.0.112软件分析灰度值,进行统计分析。

2.7 统计学分析 所有数据均采用SPSS 20.0统计软件分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,使用最小显著性差异法(LSD)进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 滑膜组织蛋白数据质量评价 根据酶解和碎裂方式决定的一般规律,质谱检测到的肽段主要分布在7~20个氨基酸,并且蛋白相对分子质量与其覆盖度负相关,符合质控要求,因此检测结果和数据分析可信。

3.2 差异蛋白分析 本研究一共鉴定到4 756个蛋白质,其中4 234个蛋白质包含定量信息。将检测到的蛋白按 $P < 0.05$ 及差异表达倍数 > 1.5 或 $< 1/1.5$ 作为筛选条件,本次蛋白质组学分析共筛选出差异表达的蛋白814个。相较于模型组,当归拈痛汤组上调的蛋白有355个,下调的蛋白有459个。

3.3 差异蛋白GO分析 进一步分析蛋白质组学所鉴定到的差异蛋白,据GO二级注释分布发现,差异蛋白主要集中在生物进程(BP)部分,进而将BP部分Fisher's精确检验的 P 值前20个分类用气泡图展现出来,发现BP部分中,当归拈痛汤调控的差异蛋白显著富集于蛋白水解和肽酶活性调节及炎症反应和免疫应答调节部分,后者与RA发生发展密切相关,其主要包括炎症反应及其调节、急性期应答、急性炎症反应及其调节、B细胞和免疫球蛋白介导的体液免疫应答、补体激活的调节等10个分类。见图1和图2。

3.4 差异蛋白KEGG富集分析 KEGG通路富集并以气泡图展示前20个KEGG通路,发现当归拈痛汤调控的差异蛋白涉及与自身免疫和炎症相关的通路主要有原发性免疫缺陷、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、B细胞受体信号通路、核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路、钙信号通路、FC γ 受体(FC γ R)介导的吞噬作用及癌症中的转录失调等通路。

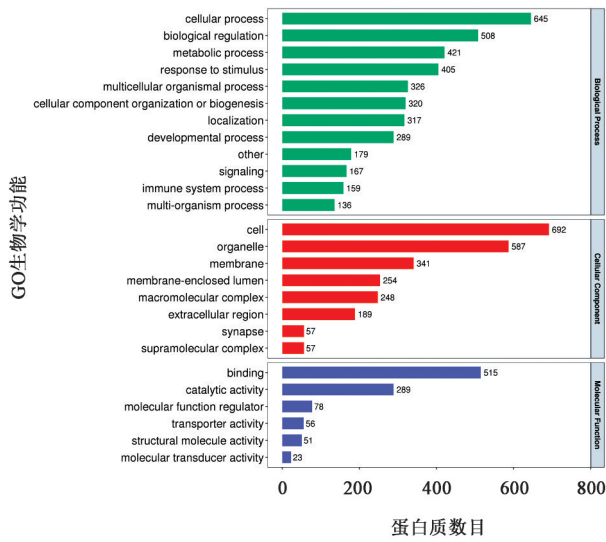


图 1 差异表达蛋白在 GO 二级分类中的分布

Fig. 1 Statistical distribution of differentially expressed proteins in GO classify

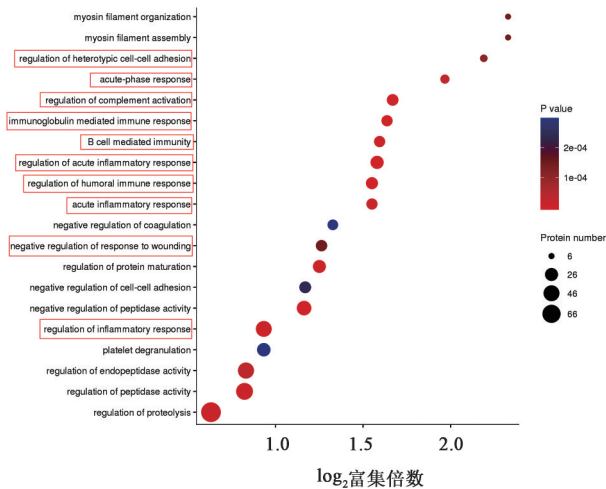


图 2 差异蛋白在 BP 中的 GO 富集气泡

Fig. 2 Enrichment bubble diagram of differential proteins in biological process

见图 3。

3.5 凋亡相关蛋白筛选及 STRING 分析 课题组一直致力于研究当归拈痛汤通过调控滑膜组织凋亡而发挥其防治作用的相关内容,已有部分研究成果^[17-19]。结合 KEGG 与 GO 分析,进行凋亡相关蛋白的筛选。从 RA 风湿热痹证与当归拈痛汤治疗后的差异表达蛋白中筛选出凋亡相关蛋白 13 个,其中上调的蛋白 6 个,下调的蛋白 7 个。将筛选出的凋亡相关蛋白与线粒体途径细胞凋亡关键调控蛋白 Bax 和 Bcl-2 一起上传至 STRING 数据库(<https://www.string-db.org/>)中分析蛋白间的相互作用。结果显示有 6 个蛋白尚未发现互相作用,剩余蛋白中与 Bax 或 Bcl-2 有密切关系的有组织蛋白酶 B

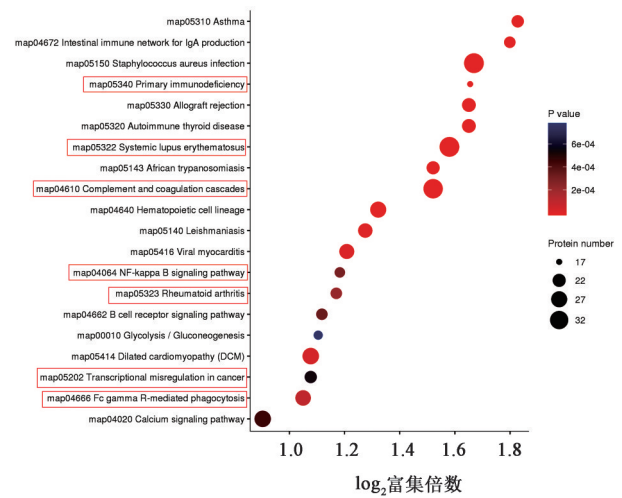


图 3 差异蛋白 KEGG 富集气泡

Fig. 3 KEGG enrichment bubble diagram of differential proteins

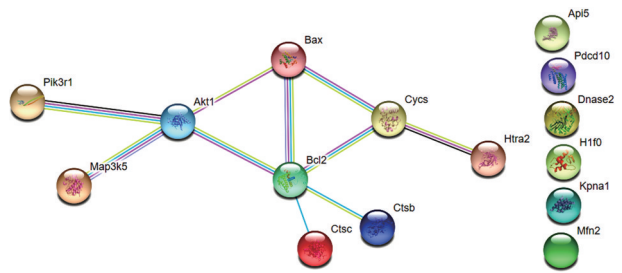


图 4 凋亡蛋白互作关系

Fig. 4 Interaction diagram of apoptotic proteins

(Ctsb), 组织蛋白酶 C (Ctsc), Cyt C 及蛋白激酶 B1 (Akt1)。见图 4、表 1。

3.6 凋亡相关蛋白验证分析 根据 GO、KEGG 分析以及 STRING 结果,采用免疫组化及 Western blot 对 Bax、Bcl-2、Cyt C、p-Akt/Akt、cleaved Caspase-9/Caspase-9 进行验证。

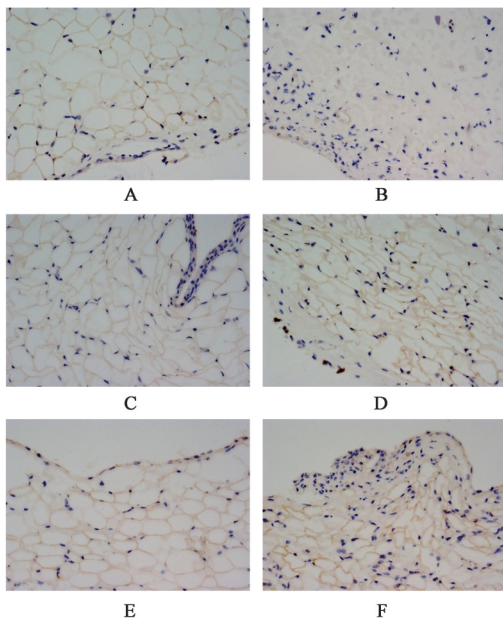
3.6.1 对风湿热痹证 AA 大鼠滑膜组织 Bax、Bcl-2、Cyt C 蛋白表达水平的影响 免疫组化结果显示,相较于正常组,模型组大鼠膝关节滑膜组织 Bax 和 Cyt C 蛋白的表达降低,Bcl-2 表达水平升高。同时,在 Bcl-2 的切片中可看出,相同封闭时间下,模型组的血管内褐色结晶明显更多,提示模型组滑膜组织新生血管较多且血管充血明显。与模型组比较,当归拈痛汤各剂量组和 MTX 组滑膜组织中促凋亡蛋白 Bax 表达升高,Cyt C 释放也随之增加,同时,其抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平下降。见图 5-图 7。

3.6.2 对风湿热痹证 AA 大鼠滑膜组织 Akt、p-Akt、Caspase-9、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组滑膜组织中 cleaved Caspase-9/Caspase-9 显著降低 ($P < 0.01$), p-Akt/Akt

表1 差异蛋白中筛选出的凋亡相关蛋白

Table 1 Apoptosis proteins in differentially expressed protein

蛋白序号	蛋白质注解	基因名	DGNTD /FSR 比率	DGNTD /FSR P 值	变化趋势	分子量 /kDa	亚细胞定位
P62898	Cytochrome c, somatic	Cytc	0.362 8	0.000 543 439	Down	11.6	mitochondria
B0BNB9	Htra serine peptidase 2	Htra2	0.452 2	0.022 405 757	Down	49.1	mitochondria
P80067	Dipeptidyl peptidase 1	Ctsc	0.552 6	0.016 915 240	Down	52.2	extracellular
P47196	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	Akt1	0.622 5	0.037 752 892	Down	55.7	cytoplasm
Q61RL2	Mitofusin 2, isoform CRA_a	LOC100911485	0.635 5	0.016 999 469	Down	86.1	mitochondria
Q63787	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	PI3K1	1.648 4	0.005 137 163	Up	83.5	nucleus
Q6IN22	Cathepsin B	Ctsb	1.651 6	0.000 074 592	Up	37.5	extracellular
D3ZZH6	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	MAPK5	2.269 9	0.005 431 606	Up	154.3	cytoplasm
P43278	Histone H1.0	H1-0	0.305 6	0.023 296 070	Down	20.9	nucleus
P83953	Importin subunit alpha-5	Kpna1	0.591 2	0.032 289 917	Down	60.1	nucleus
Q9QZK8	Deoxyribonuclease-2-alpha	Dnase2	1.580 8	0.017 546 008	Up	38.2	extracellular
Q6NX65	Programmed cell death protein 10	Pdcd10	1.525 1	0.000 664 885	Up	24.3	cytoplasm
B1WC49	Api5 protein	Api5	1.526 2	0.012 430 087	Up	56.8	cytoplasm



注: A. 正常组; B. 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. MTX组(图6-图8同)

图5 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠滑膜组织Bax蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of Danggui Niantongtang on expression of Bax of wind-damp-heat AA model rats (IHC, ×400)

显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 当归拈痛汤各剂量组和MTX组滑膜组织中cleaved Caspase-9/Caspase-9均显著上升($P < 0.01$), p-Akt/Akt均不同程度下降($P < 0.05, P < 0.01$)。提示当归拈痛汤可能通过抑制Akt的磷酸化水平, 增加Caspase-9的活化从而促进线粒体途径细胞凋亡。见图8、表2。

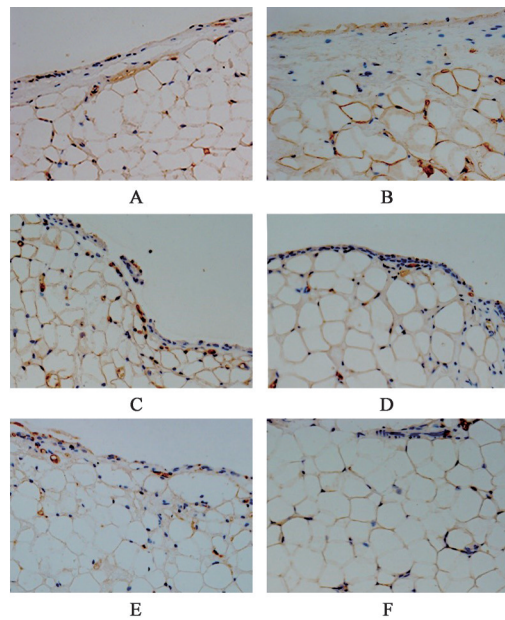


图6 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠滑膜组织Bcl-2蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 6 Effect of Danggui Niantongtang on expression of Bcl-2 of wind-damp-heat AA model rats (IHC, ×400)

4 讨论

RA归属于中医“痹证”范畴, 又有“历节”“顽痹”和“尪痹”之称, 其病名首见于《黄帝内经·素问》。痹证起病多由于正虚不固, 复感外邪, 内外合邪, 合而成痹。临床上主要将痹证分为风寒湿痹、风湿热痹、痰瘀痹阻及肝肾两虚等证型, 多以肌肉、筋骨、关节发生酸痛、麻木、重着、屈伸不利, 甚或关节肿大灼热等症状为主要表现^[20]。其中, 风湿热痹

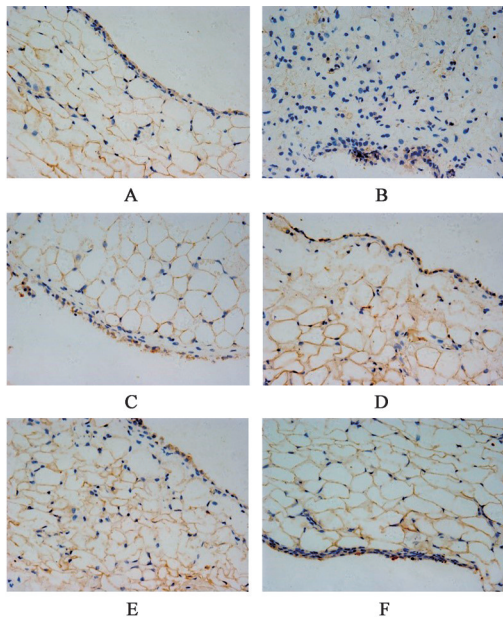


图7 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠滑膜组织Cyt C蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 7 Effect of Danggui Niantongtang on expression of Cyt C of wind-damp-heat AA model rats (IHC,×400)

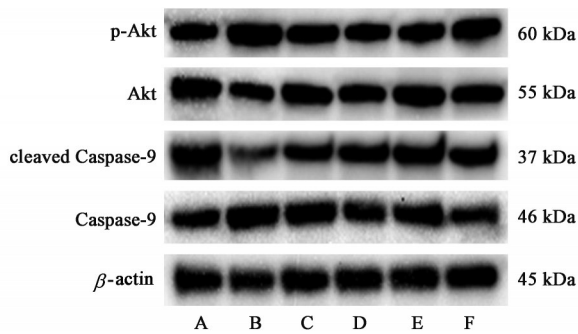


图8 风湿热痹证AA大鼠Akt、p-Akt、Caspase-9、cleaved Caspase-9蛋白表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of Akt, p-Akt, Caspase-9, cleaved Caspase-9 proteins expression in wind-damp-heat AA model rats

在RA各大常见证型中占据了很大比重^[21],一些临床研究也表明湿热型RA患者疾病活动度与炎症反应最高^[22-23]。久居湿热之地,复感风湿,风湿热相搏流注经络关节,气血阻滞而成痹;或素体阳盛或阴虚有热,复感风寒湿邪,郁久化热,壅滞骨节经脉,不通则痛,而为风湿热痹。根据风湿热痹证病因病机及证型特点,结合RA临床特点,临床确立以清热利湿,疏风止痛为其治疗准则,经典代表方为当归拈痛汤。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡方式。区别于坏死,细胞凋亡可以从病变受损的组织中清除异常的细胞,以便周围的正常细胞不受其影响。可见正常的细胞凋亡有助于维持机体内环境稳态。而

表2 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠Akt、p-Akt、Caspase-9、cleaved Caspase-9蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Danggui Niantongtang on Akt, p-Akt, Caspase-9, cleaved Caspase-9 expression of wind-damp-heat AA model rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	p-Akt /Akt	cleaved Caspase-9 /Caspase-9
正常组		0.83±0.19	1.54±0.07
模型组		1.42±0.40 ²⁾	0.50±0.02 ²⁾
当归拈痛汤低剂量组	5.67	0.96±0.01 ³⁾	0.77±0.09 ⁴⁾
当归拈痛汤中剂量组	11.34	0.94±0.10 ⁴⁾	1.20±0.11 ⁴⁾
当归拈痛汤高剂量组	22.68	0.81±0.03 ⁴⁾	1.02±0.10 ⁴⁾
MTX组	0.001 35	0.93±0.10 ⁴⁾	1.12±0.09 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01

异常的细胞凋亡则与许多疾病的发生发展密不可分,如神经细胞过度凋亡可导致阿尔茨海默病等神经退行性疾病,而在诸如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病中,凋亡不足甚至凋亡逃避是其重要的病理特征^[24]。细胞凋亡有两大经典途径:膜死亡受体介导的外在途径以及线粒体介导的内在途径,细胞经由两大途径激活Caspase家族分解其细胞骨架及DNA,最终被吞噬细胞内吞^[25]。

本课题组近年来对当归拈痛汤经由膜受体Fas介导促进RA滑膜组织及成纤维样滑膜细胞凋亡的相关内容已有部分研究成果^[17-19],而当归拈痛汤是否能够通过内在线粒体途径介导的细胞凋亡及相关机制尚未明确。线粒体内在途径通路是指由氧化应激、DNA损伤等因素刺激,导致Bcl-2蛋白激活,促凋亡蛋白构象改变,线粒体膜通透性增加,线粒体内的Cyt C大量释放,与胞浆中的Apaf-1,前体胱天蛋白酶-9(pro-Caspase-9)结合形成多蛋白凋亡小体,进而活化Caspase-9激发级联反应而促使细胞凋亡^[26-27]。研究发现Akt通路也参与了线粒体途径的细胞凋亡,磷酸化的Akt可通过改变促凋亡蛋白Bax与Caspase-9的磷酸化水平,或影响其他凋亡相关蛋白的表达,从而发挥抑制凋亡的作用^[28-29]。

本次研究以大鼠的滑膜组织为检测样品,利用4D-LFQ蛋白质组学技术研究当归拈痛汤干预风湿热痹证RA大鼠的蛋白质组学变化,从滑膜组织中检测出4 756个蛋白质,其中4 234个蛋白质包含定量信息。差异蛋白分析结果发现当归拈痛汤涉及到814个差异蛋白,其中上调蛋白355个,下调蛋白459个。通过对这些差异蛋白进行GO和KEGG富

集分析,明确了这些蛋白的主要功能分布和主要作用通路。分析结果显示,当归拈痛汤对风湿热痹证RA大鼠的滑膜蛋白质组确有影响,且差异蛋白集中在对免疫系统的调控、急性炎症的反应和凋亡水平的调节。结合本课题组前期在凋亡方面的研究,拟筛选出细胞凋亡相关蛋白进行后续研究。

结合GO及KEGG分析筛选出有差异的凋亡相关蛋白13个,其中上调的蛋白6个,下调的蛋白7个。用STRING分析这些蛋白之间的相互作用。结果显示有6个蛋白尚未发现互相作用,剩余蛋白中与Bax或Bcl-2有密切关系的有Ctsb、Ctsc、Cyt C及Akt1。其中,在线粒体途径的细胞凋亡中,Bax/Bcl-2可以通过改变线粒体膜电位和通透性调控Cyt C的释放,释放至胞浆的Cyt C会激活Caspase级联反应引发细胞凋亡;Ctsb和Ctsc与Bax间尚无明确互作关系,仅有少量研究发现Ctsb的抑制剂或siRNA双顺反子构体会影响Bcl-2的活性进而影响细胞凋亡进程^[30],故不将Ctsb与Ctsc做为此次研究的靶点。经查阅相关文献及KEGG通路发现,Akt通路能够调节Bcl-2家族里多种凋亡相关蛋白及改变Caspase-9的活化程度从而影响线粒体途径的细胞凋亡,因此当归拈痛汤很有可能通过影响Akt信号通路而促进对风湿热痹证AA大鼠关节滑膜组织线粒体途径细胞凋亡,进而实现其对RA的多靶点作用。

基于上述结果,选取了p-Akt/Akt及线粒体凋亡通路相关蛋白Bax、Bcl-2、Cyt C、cleaved Caspase-9/Caspase-9,采用免疫组化与Western blot进行验证,从而分析当归拈痛汤对于风湿热痹证AA大鼠滑膜组织线粒体途径细胞凋亡水平的影响。实验结果显示,与正常组比较,模型组滑膜组织Bax和Cyt C的蛋白表达水平明显下降,Caspase-9的活化减少,Akt和Bcl-2的蛋白表达水平上升,Akt的磷酸化水平也显著升高,提示风湿热痹证RA大鼠滑膜组织中Akt活化增强,线粒体途径细胞凋亡水平降低;而与模型组相比,当归拈痛汤各剂量组及MTX组滑膜组织中Bax、Cyt C的蛋白表达水平显著升高,Bcl-2的表达水平下降,cleaved Caspase-9/Caspase-9升高,p-Akt/Akt下降。结果提示给药治疗后大鼠滑膜组织线粒体途径细胞凋亡水平升高。

综上所述,本研究以定量蛋白质组学技术结合免疫组化及Western blot验证,发现当归拈痛汤能够调节Akt/Bax/Bcl-2通路,促进线粒体途径细胞凋亡,从而发挥其对风湿热痹证RA的防治作用。基

于本次研究结果,课题组未来将在动物实验的基因层面及体内细胞实验层面进行进一步研究验证,从分子-细胞-组织-动物4个层面探索当归拈痛汤对风湿热痹证RA防治作用的分子机制,多方面证实以增强研究结果可靠性,以期当归拈痛汤的临床应用提供重要的科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MCINNES I B, SCHETT G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2017,389(10086):2328-2337.
- [2] RIDGLEY L A, ANDERSON A E, PRATT A G. What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis? [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2018, 30 (2) : 207-214.
- [3] ALPIZAR-RODRIGUEZ D, FINCKH A. Is the prevention of rheumatoid arthritis possible? [J]. *Clin Rheumatol*, 2020,39(5):1383-1389.
- [4] BURMESTER G R, POPE J E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2017, 389 (10086):2338-2348.
- [5] 袁立霞. 当归拈痛汤治疗类风湿关节炎53例疗效观察[J]. *山东中医药大学学报*, 2008,5:407-408.
- [6] YANG X, SHI Y, ZHANG D, et al. Quantitative proteomics characterization of cancer biomarkers and treatment[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021,21:255-263.
- [7] ZHANG W, SUN L, WANG Y, et al. Identification of significant potential signaling pathways and differentially expressed proteins in patients with wheat intolerance based on quantitative proteomics [J]. *J Proteomics*, 2021,246:104317.
- [8] PAPPAREDDI N, MARTIN L, WÜHR M. A Review on quantitative multiplexed proteomics [J]. *ChemBiochem*, 2019,20(10):1210-1224.
- [9] AEBERSOLD R, MANN M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function [J]. *Nature*, 2016,537(7620):347-355.
- [10] 王刘子腾. 蛋白质组学在肿瘤研究中的应用探讨[J]. *当代化工研究*, 2019,7:189-191.
- [11] MEIER F, BRUNNER A D, KOCH S, et al. Online parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018,17(12):2534-2545.
- [12] 贾国香,董亚倩,杨娜,等. 蛋白质组学策略助力中药现代化的研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2021, 40(3):277-285.
- [13] 辛萍,匡海学,李晓亮,等. 蛋白质组学技术及其在中

- 药作用机制研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5):904-912.
- [14] HASHIGUCHI A, TIAN J, KOMATSU S. Proteomic contributions to medicinal plant research: From plant metabolism to pharmacological action[J]. *Proteomes*, 2017, 5(4):35.
- [15] 赵丽军, 石磊. 类风湿关节炎实验动物模型研究进展[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(18):3115-3117.
- [16] 夏晴, 纪羽婷, 刘海亮, 等. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 107-113.
- [17] 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.
- [18] 赵帆. 当归拈痛汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响和机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [19] 李佳钰, 赵帆, 陆麒瑾, 等. 当归拈痛汤对佐剂性关节炎大鼠滑膜组织内外凋亡途径关键因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4):1-7.
- [20] 吴晨, 魏昀, 葛珊, 等. 类风湿关节炎风寒湿痹与风湿热痹的研究进展[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(6): 1008-1011.
- [21] 袁林, 吴金玉, 张之燕, 等. 中医治疗类风湿关节炎风湿热证的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(9): 195-197.
- [22] 巩勋, 崔家康, 姜泉, 等. 1388 例类风湿关节炎患者中医证型与疾病活动度特征横断面调查[J]. 中医杂志, 2021, 62(4):312-317.
- [23] 吴昊, 王文婷, 张雷, 等. 腕关节超声检查在类风湿性关节炎中医辨证分型中的运用研究[J]. 新中医, 2019, 51(9):17-20.
- [24] 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.
- [25] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of Bcl-2 family proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(3):175-193.
- [26] ZHANG X, WANG S, TU P, et al. Sesquiterpene lactone from *artemisia argyi* induces gastric carcinoma cell apoptosis via activating NADPH oxidase/reactive oxygen species/mitochondrial pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 837:164-170.
- [27] 李建民, 刘江, 吴发印. 雷公藤甲素介导线粒体凋亡途径抗肿瘤研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(12): 2354-2359.
- [28] 赵齐飞, 刘焕, 王晓雅, 等. 芪苈强心胶囊通过 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路延缓氧化应激损伤心肌细胞线粒体途径凋亡[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9):681.
- [29] CHEN J, WANG M, WANG H, et al. Zearalenone promotes apoptosis of mouse Leydig cells by targeting phosphatase and tensin homolog and thus inhibiting the PI3K/Akt signal pathway [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(47):67779-67787.
- [30] WILLIAMS B, DHARMAPATNI A, CROTTI T. Intracellular apoptotic pathways: A potential target for reducing joint damage in rheumatoid arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(3):219-231.

[责任编辑 孙丛丛]