

基于PI3K/Akt/mTOR信号通路调控自噬探讨当归四逆汤对痛风性关节炎大鼠的影响

路荣荣, 曹越, 雷晓蕾, 李茹超, 刘必旺*
(山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

[摘要] **目的:**基于磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,探讨当归四逆汤对痛风性关节炎(GA)大鼠自噬水平的影响。**方法:**60只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组(0.3 mg·kg⁻¹)和当归四逆汤低、中、高剂量组(6.54、13.08、26.16 g·kg⁻¹),每组10只,并分别给予相应药物灌胃,正常组、模型组给予等体积生理盐水灌胃,连续7 d。于第5天给药1 h后向各组(正常组除外)大鼠右侧踝关节注射尿酸钠混悬液(50 g·L⁻¹)建立GA模型,正常组注射等体积的无菌生理盐水。观察大鼠踝关节肿胀情况;测定血清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-1β水平;观察踝关节病理形态变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测滑膜PI3K、磷酸化(p)-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、微管相关蛋白1轻链3 II/I(LC3 II/I)、自噬效应蛋白(Beclin-1)、泛素结合蛋白(p62)表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测PI3K、Akt、mTOR、LC3、Beclin-1、p62 mRNA表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠关节肿胀指数显著升高(P<0.01),血清TNF-α、IL-6、IL-1β水平升高(P<0.01),踝关节滑膜组织可见明显炎性细胞浸润和纤维组织增生,滑膜组织PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62蛋白表达显著升高(P<0.01),PI3K、Akt、mTOR、p62 mRNA表达显著升高(P<0.01),LC3 II/I、Beclin-1蛋白和LC3、Beclin-1 mRNA表达降低(P<0.01)。与模型组比较,当归四逆汤中、高剂量组大鼠关节肿胀明显减轻(P<0.05);血清中TNF-α、IL-6、IL-1β表达量显著明显降低(P<0.05);踝关节滑膜组织未见明显炎性细胞浸润,纤维组织增生减轻;滑膜组织PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62蛋白表达量均明显降低(P<0.05),PI3K、Akt、mTOR、p62 mRNA表达量亦明显降低(P<0.05),而LC3 II/I、Beclin-1蛋白和LC3、Beclin-1 mRNA表达量均明显上升(P<0.05)。**结论:**当归四逆汤可以抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,提高大鼠滑膜组织自噬水平,改善痛风性关节炎,并且以高剂量效果最佳。

[关键词] 当归四逆汤; 痛风性关节炎; 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)信号通路; 自噬; 滑膜组织

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)12-0078-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230244

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20230210.1719.019.html>

[网络出版日期] 2023-02-13 11:56:57

Danggui Sinitang Mitigates Gouty Arthritis in Rats by Regulating Autophagy via PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway

LU Rongrong, CAO Yue, LEI Xiaolei, LI Ruchao, LIU Biwang*
(Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of Danggui Sinitang in mitigating gouty arthritis (GA) in rats by regulating autophagy via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Method:** Sixty male SD rats were randomly assigned into normal, model, colchicine (0.3 mg·kg⁻¹), and low-, medium-, and high-dose Danggui Sinitang (6.54, 13.08,

[收稿日期] 2022-11-18

[基金项目] 2018年传承工作室建设项目(2018TD-004);山西省高等学校大学生创新创业训练计划项目(20220718)

[第一作者] 路荣荣,在读硕士,从事中医名方临床应用及作用机制研究,E-mail:769358029@qq.com

[通信作者] *刘必旺,副教授,从事中医名方临床应用及作用机制研究,E-mail:Lbw3084@sina.com

and 26.16 g·kg⁻¹) groups (*n*=10) and administrated with corresponding drugs by gavage. The rats in the normal group and model group were administrated with equal volume of normal saline by gavage for 7 days. One hour after administration on day 5, the GA model was established by injecting sodium urate suspension (50 g·L⁻¹) into the right ankle joint of rats in other groups except the normal group, and the rats in the normal group were injected with sterile normal saline of the same volume. The swelling and pathological changes of the ankle joint were observed. The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and IL-1 β were determined. Western blot was employed to determine the protein levels of PI3K, phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (Akt), phosphorylated Akt (p-Akt), mTOR, phosphorylated mTOR (p-mTOR), microtubule-associated protein 1 light chain 3 II/I (LC3 II/I), autophagy effector Beclin-1, and ubiquitin-binding protein p62 in the synovial tissue. Real-time fluorescent quantitative PCR (Real-time PCR) was employed to determine the mRNA levels of PI3K, Akt, mTOR, LC3, Beclin-1 and p62. **Result:** Compared with the normal control, the model group showed increased joint swelling index ($P<0.01$), elevated serum levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β , inflammatory cell infiltration, and fibrous tissue hyperplasia. In addition, the model group showed up-regulated protein levels of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, and p62 and mRNA levels of PI3K, Akt, mTOR, and p62 in the synovial tissue, while it showed down-regulated protein levels of LC3 II/I and Beclin-1 and mRNA levels of LC3 and Beclin-1 ($P<0.01$). Compared with the model group, medium- and high-dose Danggui Sinitang alleviated the joint swelling ($P<0.01$), lowered the serum levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β ($P<0.05$), and relieved the inflammatory cell infiltration in the synovial tissue of the ankle joint and the fibrous tissue hyperplasia. Moreover, they down-regulated the protein levels of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, and p62 and the mRNA levels of PI3K, Akt, mTOR, and p62 in the synovial tissue ($P<0.05$), while they up-regulated the protein levels of LC3 II/I and Beclin-1 and the mRNA levels of LC3 and Beclin-1 ($P<0.05$). **Conclusion:** Danggui Sinitang, especially at a high dose, can inhibit PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to improve autophagy in the synovial tissue, thereby mitigating GA.

[Keywords] Danggui Sinitang; gouty arthritis; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway; autophagy; synovial tissue

痛风性关节炎(GA)是由于嘌呤代谢紊乱、尿酸排泄受阻引起的体内尿酸升高,尿酸钠(MSU)晶体沉积于关节囊、滑膜等组织导致的自身免疫性炎症性疾病^[1]。最新研究发现,GA全球患病率逐年上升且呈年轻化趋势,约为1%~4%,对患者的生活造成严重影响^[2]。目前治疗GA的常用药物有非甾体抗炎药、秋水仙碱片等,然而这些药物具有明显的不良反应,可能会导致胃肠道不良反应,严重的可能导致黄疸、蛋白尿等^[3]。现代研究表明,中医药可缓解疼痛、减轻炎症反应,激发抗病能力、调节免疫功能、减少药物不良反应,具有治病防病、标本兼顾的独特优势^[4]。

当归四逆汤出自《伤寒论》,是中医临床温经散寒,养血通脉的代表方剂。现代研究表明,当归四逆汤能够有效抑制炎症,改善炎症反应^[5]。国医大师王世民教授临床用于治疗GA疗效显著,但其具体干预机制目前尚未明确。自噬是近年来的研究热点,研究表明,自噬异常对尿酸钠诱导的痛风性

关节炎具有重要意义,其中磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路是调控细胞自噬的经典通路^[6-7]。故本研究以PI3K/Akt/mTOR信号通路为主,探讨当归四逆汤对GA大鼠滑膜组织自噬水平的影响及作用机制,为GA的临床研究提供一些思维方法和实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康雄性SD大鼠60只,SPF级,体质量200~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产合格证号SCXK(京)2016-0011。饲养于山西中医药大学动物实验中心动物房,饲养环境温度18~22℃,相对湿度达50%~70%,自由饮水饮食。实验由山西中医药大学实验动物伦理审查委员会审查通过,编号2022DW258。适应性喂养1周后进行正式实验。

1.2 药物与试剂 当归四逆汤药方(当归12 g、桂枝9 g、白芍9 g、细辛3 g、通草6 g、炙甘草6 g、大枣

8枚),中药饮片购于山西中医药大学附属医院中药房,经山西中医药大学刘必旺副教授鉴定均为正品。秋水仙碱片(西双版纳版纳药业有限公司,批号20180906);尿酸钠(美国Sigma公司,批号BCCB4889);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉Bioswamp公司,批号分别为RA20035、RA20607、RA20020);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BA1054);PI3K、Akt、mTOR抗体(武汉ABclonal生物科技有限公司,批号分别为A4992、A18675、5500002837);自噬效应蛋白(Beclin-1)抗体(北京Bioss公司,批号BS-1353R);自噬微管相关蛋白1轻链3(LC3)、p62、 β -actin抗体、苏木素染液、伊红染液(武汉Servicebio公司,批号分别为GB11124、GB11239-1、GB15003、CR2109146、CR2011064);M5 UniversalPlus RNA Mini Kit、反转录试剂盒、A Mini Kit(北京聚合美生物科技有限公司,批号分别为MF036-01、MF949-01、MF036-01)。

1.3 仪器 2016型转轮式切片机(德国徕卡公司);QuantStudioTM5型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、ProFlexTM BASE型反转录仪(美国赛默飞世尔科技公司);ImageQuant LAS 500型一体化成像仪(美国GE公司)。

2 方法

2.1 分组、给药及造模 将实验大鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组、当归四逆汤低、中、高剂量组,每组10只。按人与大鼠体表面积折算等效剂量换算^[8],秋水仙碱组剂量为 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,当归四逆汤低、中、高剂量组为 6.54 、 13.08 、 $26.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,分别为等效量1、2、4倍。大鼠适应性喂养1周后,给药组每日灌胃相应药物,连续7 d,其余组灌胃等体积无菌氯化钠溶液。第5天给药1 h后,参照CODERRE等^[9]造模方法制备GA模型,弯曲大鼠右侧踝关节使其成直角,暴露踝关节与胫骨之间的间隙。以大鼠右后肢背侧正中踝关节与胫骨之间的关节腔为进针点,使用1 mL注射器针尖与胫骨呈 45° 向关节腔注射尿酸钠混悬液 $0.1 \text{ mL}(50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1})$ 。以大鼠关节腔对侧鼓起,关节红肿发热,提示造模成功^[10]。正常组注射等体积无菌氯化钠溶液。

2.2 大鼠踝关节肿胀指数 在造模前和造模后4、12、24、48 h使用游标卡尺测量大鼠右侧踝关节同一部位周长。计算踝关节肿胀指数,关节肿胀指数=

(测定时间点关节周径-初始周径)/初始周径。

2.3 ELISA检测大鼠血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平 大鼠踝关节肿胀度测量结束后,将大鼠麻醉处理,腹主动脉取血,室温静置30 min, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径13.5 cm),离心后收集血清。严格按照ELISA试剂盒说明书检测血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色检测大鼠踝关节病理组织形态 取大鼠右侧踝关节,固定于4%多聚甲醛溶液。按照脱钙、脱水浸蜡、包埋、切片、HE染色步骤进行操作,光学显微镜下观察组织病理形态变化。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠滑膜组织中PI3K、磷酸化(p)-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、LC3 II/I、Beclin-1、p62蛋白表达 取各组大鼠滑膜组织,加入RIPA裂解液研磨滑膜组织离心后取上清,BCA测定蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳,转膜封闭, 4°C 孵育相应一抗(PI3K,1:1 000;p-PI3K,1:1 500;Akt,1:1 000;p-Akt,1:1 000;mTOR,1:500;p-mTOR,1:1 000;LC3,1:1 500;Beclin-1,1:1 500;p62,1:1 000; β -actin,1:1 000)。TBST洗膜,加入二抗(1:5 000)室温孵育1 h,ECL试剂显色,使用Image J图像分析软件分析目标蛋白灰度值。

2.6 Real-time PCR检测大鼠滑膜组织中PI3K、Akt、mTOR、LC3、Beclin-1、p62 mRNA表达 取大鼠滑膜组织,提取滑膜组织总RNA并逆转录为cDNA,再以cDNA为模板进行扩增目标基因。配制反应体系进行扩增, 95°C 预变性3 min; 95°C 扩增5 s, 60°C 扩增20 s,共40个循环。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的mRNA表达水平,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

2.7 统计学分析 运用SPSS 25.0统计软件对数据进行分析,服从正态分布且方差齐性以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,多组间比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠踝关节肿胀指数的影响 与正常组比较,模型组大鼠造模后4、12、24、48 h关节肿胀指数显著上升($P < 0.01$),且在造模12 h达到高峰;与模型组比较,各给药组在造模后各时间点关节肿胀指数均明显降低($P < 0.05$);与秋水仙碱组比较,当归四逆

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PI3K	上游 CACCTCCGCAACCAATCCTGAC	95
	下游 AGCTCGAACTCTGTCTCCTTCTGG	
Akt	上游 CACAGGTCGCTACTATGCCATGAAG	132
	下游 GCAGGACACGGTCTCAGTAAGC	
mTOR	上游 CAACCAGCCAATCATTGCATTGAG	103
	下游 ATGTCCGTTGCTGCCATAAGTG	
LC3	上游 CCAGGACAAGCAGGCAGATGAAG	149
	下游 CAGGCTTTCGTCTCTCCACCATC	
Beclin-1	上游 TCAAGATCCTGGACCGAGTGACC	110
	下游 CTCCTCTCCTGAGTTAGCCTCTTCC	
p62	上游 TCGTGGTCGTGGGGTGTCTG	133
	下游 TCTGGTGATGGAGCCTCTTACTGG	
GAPDH	上游 TGAAGGGTGGAGCCAAAAG	115
	下游 AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	

汤高剂量组差异无统计学意义。见表2。

3.2 对大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,当归四逆汤中、高剂量组和秋水仙碱组大鼠血清 TNF- α 、

IL-6、IL-1 β 均明显降低($P<0.05$);与秋水仙碱组比较,当归四逆汤高剂量组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平差异无统计学意义。见表3。

3.3 对大鼠踝关节组织病理学的影响 正常组踝关节滑膜组织结构清晰完整,滑膜细胞完整,无炎性细胞浸润和细胞组织增生。与正常组比较,模型组踝关节滑膜组织结构紊乱,纤维组织增生,大量中性粒细胞、巨噬细胞等炎性细胞浸润,呈显著病理损伤。与模型组比较,当归四逆汤各剂量组和秋水仙碱组踝关节滑膜组织病理损伤明显减轻,纤维组织增生程度减轻,未见明显细胞浸润。见图1。

3.4 对大鼠滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及自噬相关蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠的滑膜组织 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62 蛋白表达显著上升($P<0.01$),Beclin-1、LC3 II / I 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,当归四逆汤中、高剂量组和秋水仙碱组 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62 蛋白表达量均明显降低($P<0.05$),Beclin-1、LC3 II / I 蛋白表达量明显上升($P<0.05$);与秋水仙碱组比较,当归四逆汤高剂量组 p-PI3K、Akt、mTOR、p-mTOR、LC3 II / I 蛋白表达差异无统计学意义。见图2和图3、表4和表5。

表2 当归四逆汤对大鼠踝关节肿胀指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Danggui Sinitang on swelling index of ankle joint in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

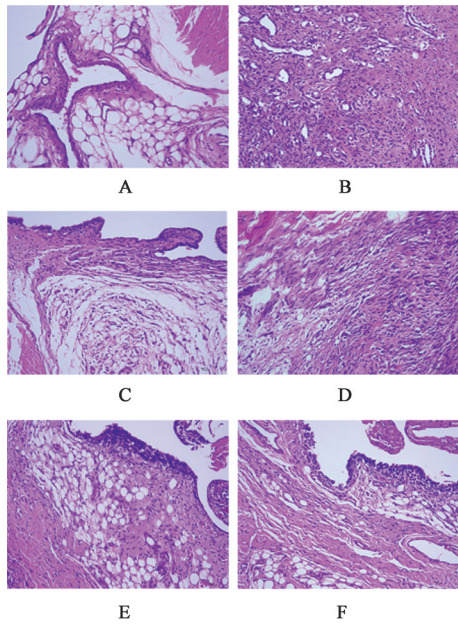
组别	剂量/g·kg ⁻¹	4 h	12 h	24 h	48 h
正常组		0.058±0.007	0.053±0.008	0.044±0.006	0.029±0.004
模型组		0.486±0.024 ¹⁾	0.613±0.046 ¹⁾	0.551±0.031 ¹⁾	0.406±0.056 ¹⁾
秋水仙碱组	3×10 ⁻⁴	0.313±0.026 ²⁾	0.444±0.038 ²⁾	0.401±0.047 ²⁾	0.246±0.053 ²⁾
当归四逆汤低剂量组	6.54	0.440±0.070 ³⁾	0.537±0.054 ^{2,3)}	0.481±0.034 ^{2,3)}	0.320±0.063 ^{2,3)}
当归四逆汤中剂量组	13.08	0.409±0.056 ^{2,3)}	0.507±0.049 ²⁾	0.474±0.025 ^{2,3)}	0.294±0.041 ²⁾
当归四逆汤高剂量组	26.16	0.330±0.044 ²⁾	0.488±0.031 ²⁾	0.450±0.036 ²⁾	0.268±0.024 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与秋水仙碱组比较³⁾ $P<0.05$ (表3-表6同)

表3 当归四逆汤对大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Danggui Sinitang on serum of TNF- α , IL-6, IL-1 β in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	IL-1 β
正常组		67.46±6.79	42.47±5.74	82.73±5.93
模型组		123.68±5.31 ¹⁾	87.32±7.50 ¹⁾	113.17±8.48 ¹⁾
秋水仙碱组	3×10 ⁻⁴	88.12±6.04 ²⁾	48.90±6.56 ²⁾	86.67±4.08 ²⁾
当归四逆汤低剂量组	6.54	114.14±8.58 ³⁾	73.37±7.90 ^{2,3)}	106.72±6.28 ³⁾
当归四逆汤中剂量组	13.08	106.68±9.68 ^{2,3)}	68.37±7.90 ^{2,3)}	99.40±4.81 ^{2,3)}
当归四逆汤高剂量组	26.16	95.45±7.81 ²⁾	52.72±6.38 ²⁾	93.73±4.82 ²⁾



注:A.正常组;B.模型组;C.秋水仙碱组;D.当归四逆汤低剂量组;E.当归四逆汤中剂量组;F.当归四逆汤高剂量组(图2和图3同)
图1 当归四逆汤对大鼠踝关节组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Danggui Sinitang on histopathology of ankle joint in rats (HE, ×200)

3.5 对大鼠滑膜组织 PI3K、Akt、mTOR、LC3、Beclin-1、p62 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠 PI3K、Akt、mTOR、p62 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$), Beclin-1、LC3 mRNA 水平降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,当归四逆汤中、高剂量组和秋

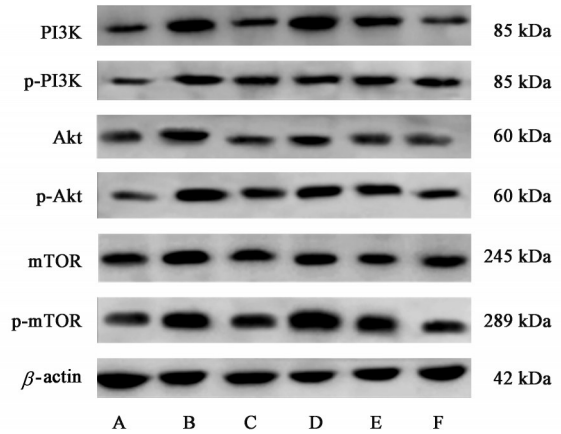


图2 大鼠滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of PI3K/Akt/mTOR signal pathway related protein in rat synovium

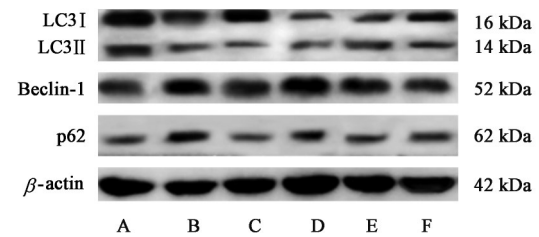


图3 大鼠滑膜组织自噬相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of autophagy related protein electrophoresis in rat synovium

水仙碱组 PI3K、Akt、mTOR、p62 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), Beclin-1、LC3 mRNA 表达升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与秋水仙碱组比较,当归四逆

表4 当归四逆汤对大鼠滑膜组织 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Danggui Sinitang on expression of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR proteins in synovium of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	PI3K/ β -actin	p-PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin	p-Akt/ β -actin	mTOR/ β -actin	p-mTOR/ β -actin
正常组		0.41±0.02	0.35±0.03	0.44±0.04	0.39±0.03	0.58±0.04	0.37±0.03
模型组		0.70±0.05 ¹⁾	0.67±0.06 ¹⁾	0.76±0.04 ¹⁾	0.68±0.02 ¹⁾	0.86±0.04 ¹⁾	0.64±0.08 ¹⁾
秋水仙碱组	3×10^{-4}	0.52±0.02 ²⁾	0.43±0.05 ²⁾	0.57±0.02 ²⁾	0.49±0.02 ²⁾	0.66±0.04 ²⁾	0.45±0.03 ²⁾
当归四逆汤低剂量组	6.54	0.65±0.03 ^{2,3)}	0.61±0.03 ³⁾	0.75±0.04 ³⁾	0.64±0.02 ³⁾	0.78±0.06 ^{2,3)}	0.57±0.07 ³⁾
当归四逆汤中剂量组	13.08	0.65±0.02 ^{2,3)}	0.57±0.02 ^{2,3)}	0.67±0.07 ^{2,3)}	0.62±0.05 ^{2,3)}	0.75±0.06 ^{2,3)}	0.53±0.08 ²⁾
当归四逆汤高剂量组	26.16	0.61±0.03 ^{2,3)}	0.46±0.07 ²⁾	0.63±0.05 ²⁾	0.57±0.05 ^{2,3)}	0.71±0.03 ²⁾	0.47±0.03 ²⁾

表5 当归四逆汤对大鼠滑膜组织 LC3 II / I、Beclin-1、p62 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Danggui Sinitang on expression of LC3 II / I, Beclin-1, p62 protein in synovial tissues of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	LC3 II / I	Beclin-1/ β -actin	p62/ β -actin
正常组		0.52±0.06	0.87±0.05	0.29±0.04
模型组		0.31±0.02 ¹⁾	0.33±0.02 ¹⁾	0.48±0.02 ¹⁾
秋水仙碱组	3×10^{-4}	0.47±0.05 ²⁾	0.51±0.03 ²⁾	0.32±0.02 ²⁾
当归四逆汤低剂量组	6.54	0.39±0.04 ³⁾	0.36±0.02 ³⁾	0.45±0.03 ³⁾
当归四逆汤中剂量组	13.08	0.41±0.05 ²⁾	0.39±0.04 ^{2,3)}	0.42±0.04 ^{2,3)}
当归四逆汤高剂量组	26.16	0.44±0.05 ²⁾	0.45±0.02 ^{2,3)}	0.39±0.02 ^{2,3)}

汤高剂量组 PI3K、Akt、p62 mRNA 表达差异无统计学意义。见表 6。

表 6 当归四逆汤对大鼠滑膜组织 PI3K、Akt、mTOR、LC3、Beclin-1、p62 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 Effect of Danggui Sinitang on expression of PI3K, Akt, mTOR, LC3, Beclin-1, p62 mRNA in synovial tissues of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K	Akt	mTOR	LC3	Beclin-1	p62
正常组		0.97±0.11	0.85±0.07	1.76±0.16	2.19±0.1	2.42±0.15	0.67±0.11
模型组		2.73±0.49 ¹⁾	1.88±0.32 ¹⁾	3.76±0.21 ¹⁾	1.21±0.06 ¹⁾	1.14±0.16 ¹⁾	1.59±0.29 ¹⁾
秋水仙碱组	3×10 ⁻⁴	1.57±0.09 ²⁾	1.16±0.13 ²⁾	2.15±0.17 ²⁾	1.92±0.22 ²⁾	2.16±0.2 ²⁾	0.85±0.11 ²⁾
当归四逆汤低剂量组	6.54	2.42±0.26 ³⁾	1.64±0.11 ³⁾	3.51±0.30 ³⁾	1.38±0.09 ³⁾	1.39±0.15 ³⁾	1.42±0.26 ³⁾
当归四逆汤中剂量组	13.08	2.16±0.27 ^{2,3)}	1.50±0.12 ^{2,3)}	3.28±0.16 ^{2,3)}	1.47±0.07 ^{2,3)}	1.52±0.14 ^{2,3)}	1.16±0.17 ^{2,3)}
当归四逆汤高剂量组	26.16	1.84±0.14 ²⁾	1.31±0.07 ²⁾	2.78±0.23 ^{2,3)}	1.70±0.08 ^{2,3)}	1.82±0.25 ^{2,3)}	0.88±0.20 ²⁾

4 讨论

尿酸钠晶体沉积并作用于巨噬细胞、中性粒细胞等,使免疫细胞募集引起大量炎症因子和趋化因子的释放,进而发生炎症反应导致 GA 的发生^[11-12]。中医学将 GA 归属“痹证”“历节”范畴,认为肝肾亏虚、寒湿痹阻与 GA 发病密切相关,治疗以散寒除痹通痹、温补肝肾为主。本研究中组方由当归、桂枝、芍药、细辛、通草、大枣、炙甘草组成,桂枝温通血脉、散寒活血;当归养血和血;细辛温经散寒,助桂枝温通血脉;白芍养血和营,助当归补益营血;通草通经脉,以畅血行;大枣、甘草,益气健脾养血;全方共奏“温经散寒,养血通脉”的功效。有研究表明当归四逆汤发挥疗效具有多成分、多靶点、多途径等特点,可以改善关节炎炎症反应、周围神经病变等^[13-15]。当归四逆汤临床治疗 GA 疗效显著,但其具体作用机制仍需进一步深入研究。

本研究制备 GA 大鼠模型,给予不同剂量当归四逆汤治疗,观察各组大鼠关节肿胀指数、血清炎症因子水平、踝关节病理形态。结果发现,与正常组比较,模型组大鼠关节肿胀指数明显增加,血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均明显升高,踝关节滑膜组织结构紊乱,可见纤维组织增生和炎性细胞浸润,提示造模成功。与模型组比较,当归四逆汤中、高剂量组大鼠关节肿胀指数明显降低,血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均显著下降,踝关节滑膜组织未见明显细胞浸润,纤维组织增生程度明显减轻。选用目前临床治疗 GA 应用较多的药物秋水仙碱片作为对照药,发现当归四逆汤高剂量组和秋水仙碱组大鼠上述指标均明显改善且差异无统计学意义。以上结果证明当归四逆汤能有效治疗 GA,缓解炎症反应,改善关节病理状态。

自噬是维持内环境稳态的自我保护机制,溶酶体降解受损的细胞器和蛋白质等物质,实现自身能

量更新的过程^[16]。已有研究表明自噬与炎症发生存在关联,在 GA 发病进程中发挥着重要作用^[17]。有研究表明,通过减少促炎因子的产生和促进细胞自噬,可以有效改善尿酸钠诱导的炎症反应^[18]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是调控细胞自噬的经典通路,PI3K 激活后能够产生磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP3),PIP3 能够磷酸化和激活 Akt, Akt 能够进一步激活 mTOR 激酶, mTOR 是自噬启动阶段的关键调节因子,活化后抑制自噬过程^[19-20]。Beclin-1、LC3 是自噬下游通路的重要分子,是自噬过程中的关键蛋白; p62 作为一种自噬特异性底物,能够表达体内的自噬水平^[21-22]。现代研究表明熊果酸提取物通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 途径促进自噬缓解 GA^[23]。此外,体内自噬水平的提高可以通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活,从而缓解大鼠软骨细胞炎症反应^[24]。本研究发现与正常组比较,模型组大鼠滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白及 mRNA 表达量显著上升;自噬相关蛋白和 mRNA 表达中 Beclin-1、LC3 表达量均显著降低, p62 表达量明显升高。表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路失调导致自噬异常能够影响 GA 发病。给予当归四逆汤干预后,与模型组比较,当归四逆汤中、高剂量组对上述蛋白和 mRNA 表达水平均有明显地改善作用,其中当归四逆汤高剂量组改善较为显著。以上结果提示当归四逆汤能够抑制 GA 大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的表达,提高大鼠自噬水平,改善 GA 滑膜炎症反应。

综上所述,当归四逆汤通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的异常激活,促进自噬功能,改善踝关节病理形态变化,降低炎症因子水平,从而缓解 GA 炎症反应。但因自噬受多条信号通路影响,其机制尚不完全明确仍需进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GU Y, ZHU Y, DENG G, et al. Curcumin analogue AI-44 alleviates MSU-induced gouty arthritis in mice via inhibiting cathepsin B-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 93: 107375.
- [2] GALOZZI P, BINDOLI S, DORIA A, et al. Autoinflammatory features in gouty arthritis [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(9): 1880.
- [3] HALL C J, SANDERSON L E, LAWRENCE L M, et al. Blocking fatty acid-fueled mROS production within macrophages alleviates acute gouty inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(5): 1752-1771.
- [4] 章晓云, 曾浩, 李华南, 等. 痛风性关节炎的发病机制及中医药治疗研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(11): 256-267.
- [5] 魏慧玲, 王海山, 杨伟娜. 当归四逆汤对硬皮病模型小鼠血清炎症因子表达及TLR4/NF- κ B信号通路的影响 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2020, 20(5): 563-566.
- [6] LEE J, KIM H R, QUINLEY C, et al. Autophagy suppresses interleukin-1 β (IL-1 β) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(6): 4033-4040.
- [7] PETRULEA M S, PLANTINGA T S, SMIT J W, et al. PI3K/Akt/mTOR: A promising therapeutic target for non-medullary thyroid carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(8): 707-713.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [9] CODERRE T J, WALL P D. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988, 29(3): 461-466.
- [10] 郭玉星, 熊辉, 易法银, 等. 蠲痹历节清方对改良痛风性关节炎模型大鼠滑膜的TLR4, NF- κ B, PPAR γ 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(23): 126-133.
- [11] JENA M, TRIPATHY A, MISHRA A, et al. Effect of canakinumab on clinical and biochemical parameters in acute gouty arthritis: A meta-analysis [J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29(1): 35-47.
- [12] VANITALLIE T B. Gout: Epitome of painful arthritis [J]. *Metabolism*, 2010, 59 (Suppl1): S32-S36.
- [13] 于丹, 底雪梅, 张其镔, 等. 基于网络药理学探究当归四逆汤抗多囊卵巢综合征的药理作用与机制 [J]. *中成药*, 2021, 43(12): 3332-3338.
- [14] 韦国雨, 陈清雄, 唐永亮, 等. 基于Wnt- β -catenin信号调控BMP-2表达探讨当归四逆汤防治类风湿性关节炎临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(1): 243-246.
- [15] 胡文梅, 贾爱明, 白长川. 当归四逆汤对糖尿病大鼠坐骨神经miR-210、HIF-1 α 和VEGF表达的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(5): 605-608.
- [16] SHAHRABI S, PARIDAR M, ZEINVAND-LORESTANI M, et al. Autophagy regulation and its role in normal and malignant hematopoiesis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21746-21757.
- [17] BIASIZZO M, KOPITAR-JERALA N. Interplay between NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 591803.
- [18] PIAO M H, WANG H, JIANG Y J, et al. Taxifolin blocks monosodium urate crystal-induced gouty inflammation by regulating phagocytosis and autophagy [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(4): 1335-1349.
- [19] BARRA F, EVANGELISTI G, FERRO D L, et al. Investigational PI3K/Akt/mTOR inhibitors in development for endometrial cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28(2): 131-142.
- [20] SON S M, KANG S, CHOI H, et al. Statins induce insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes via an autophagy-based unconventional secretory pathway [J]. *Mol Neurodegener*, 2015, 10(1): 1-11.
- [21] 马武开, 曾晨, 徐晖, 等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜细胞自噬的调控作用研究 [J]. *中药材*, 2019, 42(4): 891-896.
- [22] ROGOV V, DÖTSCH V, JOHANSEN T, et al. Interactions between autophagy receptors and ubiquitinlike proteins form the molecular basis for selective autophagy [J]. *Mol Cell*, 2014, 53(2): 167-178.
- [23] LOU D, ZHANG X, JIANG C, et al. 3 β , 23-Dihydroxy-12-ene-28-ursolic acid isolated from *Cyclocarya paliurus* alleviates NLRP3 inflammasome-mediated gout via PI3K-Akt-mTOR-dependent autophagy [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5541232.
- [24] XUE J F, SHI Z M, ZOU J, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1252-1261.

[责任编辑 孙丛丛]