

· 药理 ·

断藤益母汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 MEKK2 及 CIA 小鼠关节炎的影响

王强¹, 韩隆胤¹, 魏赓权¹, 李楠², 潘东梅³, 刘敏莹⁴, 林昌松^{4*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 2. 暨南大学中医学院, 广州 510405;
3. 南方医科大学中医药学院, 广州 510405; 4. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] 目的: 为了研究断藤益母汤(DTYMD)在类风湿关节炎中对丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)上游激酶的调控作用, 阐明 DTYMD 抗炎的分子机制。方法: 培养成纤维样滑膜细胞, 将细胞分为空白组, 模型组, DTYMD 高、中、低质量浓度组(1 000, 800, 600 mg·L⁻¹), 甲氨蝶呤(MTX)组(20 μmol·L⁻¹)组, 采用蛋白免疫印迹法(Western blot), 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)对丝裂原活化蛋白激酶激酶 2 (MEKK2)的蛋白和 mRNA 表达进行分析。将 42 只雄性 DBA/1J 小鼠随机分为 6 组, 每组 7 只, 分别为正常组, 模型组, MTX 组(2 mg·kg⁻¹), DTYMD 低、中、高剂量组(6.25, 12.5, 25 mg·kg⁻¹)。除正常组外, 其他 5 组均采用二次免疫法构建胶原诱导型关节炎(CIA)模型。给药结束后, 取小鼠后肢踝关节行苏木素-伊红(HE)染色并进行关节病理评分。结果: 与模型组比较, DTYMD 以浓度依赖方式抑制成纤维样滑膜细胞活性($P < 0.01$); 与空白组比较, 模型组细胞增殖率升高($P < 0.01$)。与模型组比较, DTYMD 高、中质量浓度组降低 MEKK2 蛋白及 mRNA 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, DTYMD 不同剂量组均降低细胞基质金属蛋白酶-1(MMP-1), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6(IL-6)的表达($P < 0.01$); 与空白组比较, 模型组 MMP-1, IL-6, TNF- α 表达明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在动物实验中, 与模型组比较, DTYMD 高、中剂量组可以降低 CIA 小鼠关节肿胀度($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与正常组比较, 模型组小鼠二次免疫后关节明显肿胀($P < 0.05$)。在 CIA 小鼠踝关节 HE 染色中, 与空白组比较, 模型组小鼠病理学评分升高($P < 0.01$); 与模型组比较, DTYMD 高、中剂量小鼠关节病理评分明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: DTYMD 可能通过下调 MEKK2 对细胞因子 IL-6, TNF- α , MMP-1 负性调控, 从而缓解类风湿关节炎的炎症反应。

[关键词] 断藤益母汤; 类风湿关节炎; 丝裂原活化蛋白激酶激酶 2; 炎症因子; 胶原诱导型关节炎小鼠模型

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0031-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200502

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191120.0901.001.html>

[网络出版时间] 2019-11-20 11:14

Mechanism of Duanteng Yimu Decoction on Expression of MEKK2 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts and Arthritis in CIA Mice

WANG Qiang¹, HAN Long-yin¹, WEI Zhen-quan¹, LI Nan², PAN Dong-mei³,
LIU Min-ying⁴, LIN Chang-song^{4*}

(1. First College of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan University, Guangzhou 510405, China;
3. School of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510405, China;
4. The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** Duanteng Yimu decoction (DTYMD) is effective in treatment of rheumatoid

[收稿日期] 20190727(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573930, 81774262); 广东省自然科学基金项目(2017A030311009, 2018A0303130112); 中央高校基本科研业务费专项(21618335)

[第一作者] 王强, 博士, 从事中医药防治风湿病研究, E-mail: wangqiang5250@163.com

[通信作者] *林昌松, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治风湿病研究, Tel: 020-36598915, E-mail: linchs999@163.com

arthritis (RA) by relieving joint inflammation and down-regulating some inflammatory factors in a short period of time, but the mechanism is still unclear. We aimed to investigate upstream kinase of mitogen activated protein kinases (MAPK) and define the anti-inflammatory mechanism of DTYMD. **Method:** Fibroblasts-like synovial cells (FLSs) were divided into blank group, model group ($IL-1\beta$), high-dose DTYMD group ($1\ 000\ mg \cdot L^{-1}$), medium-dose DTYMD group ($800\ mg \cdot L^{-1}$), low-dose DTYMD group ($600\ mg \cdot L^{-1}$) and armour ammonia butterfly (MTX) group ($20\ \mu mol \cdot L^{-1}$). The protein and mRNA expressions of mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MEKK2) were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR). Totally 42 male DBA/1J mice were randomly divided into 6 groups, with 7 mice in each group, namely normal group, model group and MTX group ($2\ mg \cdot kg^{-1}$), low-dose DTYMD group ($6.25\ mg \cdot kg^{-1}$), medium-dose DTYMD group ($12.5\ mg \cdot kg^{-1}$), and high-dose DTYMD group ($25\ mg \cdot kg^{-1}$). Except for the normal group, the other five groups were included in collagen-induced arthritis (CIA) model by secondary immunoassay. After administration, the posterior limbs and ankle joints were stained with htoxylin-eosin (HE), and the pathological scores of the joints were evaluated. **Result:** Compared with the model group, DTYMD inhibited the activity of FLSs in a concentration-dependent manner ($P < 0.01$). Compared with the blank control group, the cell proliferation rate of the model group increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, high and middle-dose DTYMD groups could inhibit protein and mRNA expressions of MEKK2 ($P < 0.01$), but there was no significant difference in low-dose group. However, the expression of DTYMD protein in high/medium/low-dose groups was significantly higher than that in blank group ($P < 0.01$), but there was no significant difference in MTX group. Compared with the model group, the expressions of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL) -6 were negatively regulated in different DTYMD groups ($P < 0.01$), and the expressions of MMP-1, IL-6, TNF- α in the model group were significantly higher than those in the blank group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the animal experiment, compared with the model group, high/middle-dose DTYMD groups could decrease the degree of joint swelling in CIA mice ($P < 0.01$), but there was no significant difference in the low dose group, and the joint swelling in the model group was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$). In HE staining of ankle joint of CIA mice, the pathological scores of high/small-dose DTYMD groups were significantly lower those of model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the pathological score of model group was higher than that of blank group ($P < 0.01$). **Conclusion:** DTYMD might down-regulate MEKK2 to negatively regulate inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and MMP-1, thereby alleviating the inflammatory response in rheumatoid arthritis.

[**Key words**] Duanteng Yimu decoction; rheumatoid arthritis; mitogen-activated protein kinase kinase 2; inflammatory factor; collagen induced arthritis (CIA) mice model

类风湿关节炎(RA)是一种以关节滑膜组织炎症为特征的慢性免疫性疾病,可导致关节破坏,已成为我国人民致残的重要病因之一。治疗的主要目的是控制疼痛和炎症,减少关节损伤和残疾,维持或改善身体机能和生活质量^[1]。达标治疗已被确定为一项指导治疗 RA 的重要原则之一,治疗药物中除了包含传统改善病情抗风湿药物(DMARDs)外,也包括生物制剂、靶向小分子药物等^[2]。相比较于单靶标治疗策略,中医药多成分-多靶标的治疗策略显示出一定优势,在 RA 的治疗中发挥了一定作用。然而,如何阐释中药治疗类风湿关节的作用机制以及筛选更多具有潜在治疗作用的药物成为研究难题。

RA 在中国古代被称为“尪痹”“痹病”“厉节”等,中医药治疗 RA 历史悠久,疗效显著。在“因地制宜”“辨证论治”理念的指导下,本课题组提出岭南地区 RA “筋伤骨损”理论,“肝肾亏虚,风湿瘀阻”是其主要病机,确立了“补益肝肾、祛风除湿、化痰通络”的基本治法^[3-4]。在广东省名中医陈纪藩教授的指导下,结合临床实践,拟出断藤益母汤,并对组方不断进行优化,进行拆方研究、配伍增效研究、配伍减毒研究。本研究中的复方以黑骨藤为君药,南蛇藤为臣药以祛风除湿、消肿止痛;以续断、益母草为佐使药补肝肾、强筋骨、活血消肿。动物实验表明断藤益母汤可显著改善佐剂诱导的 RA 大鼠模型的关节破坏程度^[5]。

丝裂原活化蛋白激酶激酶 2 (MEKK2) 属于丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 基因家族, 参与调节多种 MAPK 信号通路, 是 MAPK 级联反应的主要上游激活因子^[6]。研究发现 HeLa 细胞和大鼠成纤维细胞的 MEKK2 在丝裂原刺激时转位入细胞核, 在细胞核激活了 MAPK7 和 MAPK 激酶 (MAP2K5)^[7]。用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测 RA 和骨关节炎滑膜组织中 MEKK1, MEKK2, ASK1, 发现表达升高, 但仅检测到少量其他 MAPKs 的表达^[6,8]。在前期的研究中, 已发现断藤益母汤对 MAPK 信号通路有调控作用, 然而尚不清楚断藤益母汤能否对 MAPK 上游激活因子起到调控作用。此外, 通过网络药理学研究, 发现 MEKK2 既参与 RA 的病理过程, 也是断藤益母汤的作用靶点之一, 因此通过试验验证断藤益母汤对 MEKK2 的作用也有利于揭示复方的作用效果。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 DBA/1 雄性小鼠 42 只 (6 组, 7 只/组), 10 周龄, 体质量 (18.36 ± 1.52) g, 购于南京大学南京生物医药研究院公司 (实验动物合格证编号 32002100007149)。动物实验于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房完成 [实验动物使用许可证号 SYXK (粤) 2018-0085]。饲养条件: 独立通气笼 IVC 系统, 每笼 4 只, 温度 (25 ± 4) °C, 相对湿度 50% ~ 70%, 自由摄食标准饲料及饮用灭菌纯净水, 维持 12 h 光照, 昼夜循环。动物购买后适应性饲养 7 d 后开始相关实验。本研究获得广州中医药大学医学伦理委员会审核批准 (审批编号 20180829001), 动物实验过程中遵循“3R”原则, 注重保障动物福利。

1.2 成纤维样滑膜细胞 (FLSs) 培养 ①本研究使用的滑膜组织标本来源于 2017 年 1 月至 2018 年 8 月广州中医药大学第一附属医院风湿病科的 8 例 RA 患者, 其中女性 5 例, 男性 3 例, 年龄 41 ~ 60 岁, 均符合 1987 年美国风湿病协会 (ACR) 修订的 RA 的诊断标准。本研究经医学伦理委员会批准, 并根据 1975 年赫尔辛基宣言 (The Declaration of Helsinki) 的相关规定进行。关节镜下滑膜切除术或膝关节置换术中取得滑膜组织, 用含双抗磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤若干次, 将滑膜组织剪碎为约 1 mm × 1 mm × 1 mm 的组织块。将组织块放置于培养皿, 倒置, 于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中孵育 4 ~ 5 h。组织块贴壁后, 加入完全培养基 3 mL 继续培养。大量 FLSs 从组织旁边移行出后, 待细胞融合度

约为 85%, 使用 3 ~ 5 代细胞完成实验, 本研究获广州中医药大学第一附属医院伦理委员会批准, 患者签署知情同意书。

1.3 药物与试剂 黑骨藤 (贵阳市中药材市场), 经广州中医药大学张丹雁教授鉴定为萝藦科杠柳属植物黑龙骨 *Periploca forrestii* 的干燥根及茎, 标本保存于广州中医药大学药材鉴定室, 标本编号 20180411001; 续断 (广东康美药业股份有限公司, 批号 180700489), 益母草 (广东省药材公司中药饮片厂, 批号 189303), 由广州中医药大学第一附属医院药理学部唐洪梅主任中药师鉴定分别为川续断科植物川续断 *Dipsocus asper* 的干燥根, 唇型科植物益母草 *Leonurus japonicus* 的新鲜或干燥地上部分。注射用甲氨蝶呤 (MTX, 山西普瑞药业有限公司, 批号 20170203); 胎牛血清, DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号分别为 42q0082k, 8118080); MEKK2 抗体, 上样缓冲液 (美国 CST 公司, 批号分别为 19607S, 72718180722); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G (美国 Asbio 公司, 批号 40818180620); RIPA 裂解液 (强), BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 蛋白酶抑制剂混合物, BeyoECL Plus, 转膜液, SDS-PAGE 电泳液, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (碧云天生物技术研究, 批号分别为 P0013B, 100517180413, P1010, 51518180603, 122817180502, 80918180809, 501518180619); Prestained Protein Ladder (美国 Thermo 公司, 批号 610353); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Affinity 公司, 批号 2412111); trizol 试剂 (美国 Ambion 公司, 批号 204402); DEPC 水 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 批号 E606BA0012]; 人白细胞介素 (IL)-6, 人肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (达科为生物技术股份有限公司, 批号分别为 E106018052, 041525C2018); 人基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) ELISA 试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 00112); 噻唑蓝 (MTT, 武汉默沙克生物科技有限公司, 批号 20170601)。二甲苯, 中性树胶 (国药集团化学试剂有限公司, 批号为 10023418, 10004160); 苏木素-伊红 (HE) 染液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G1005-4)。

1.4 仪器 3111 型 CO₂ 细胞培养箱, 1300 系列 A2 型生物安全柜, NanoDrop 2000 型微量分光光度计 (美国 Thermo 公司); FACSCalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); 5415D 型低温超速离心机, 5702 型常温离心机, 3120 型微量移液器 (德国 Eppendorf

公司);991 型超低温冰箱(美国 Thermo Scientific Forma 公司);RP4100 型酶标仪,164-5050 型电泳仪和转膜仪,biorad ChemiDoc MP 型多功能成像系统,CFX96 型 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Milli-Q Academic 型超纯水系统(美国 Millipore 公司);WD-9405D 型恒温摇床(北京六一仪器厂);CX41-32C0 型普通光学显微镜(日本 Olympus 公司);DMi8-M 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司);MS105D 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);CU-420 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司)。

2 方法

2.1 药品制备 分别取黑骨藤、南蛇藤、续断、益母草,按照 2:2:1:1 的临床用药比例投料,加 10 倍量超纯水,水煎 1 次过滤药渣,冷凝浓缩至每毫升药物 200 g·L⁻¹ 母液,使用 200 目尼龙网筛过滤。然后 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,使用 0.45 μm 细菌滤器过滤除菌,然后置于 -80 ℃ 低温冰箱备用,用时稀释。使用注射用甲氨蝶呤,5 mg/瓶,相对分子质量为 454.45,加入磷酸盐缓冲液(PBS) 550 μL,使粉末彻底溶解,此时 MTX 药物浓度为 20 mmol·L⁻¹,用时稀释,-80 ℃ 低温冰箱保存。

2.2 RA 细胞模型制备及分组 将 FLSs 细胞分为空白组,模型组,断藤益母汤组,MTX 组。除空白组外,其余各组使用质量浓度为 10 μg·L 的 IL-1β 刺激 24 h 制备为 RA 细胞模型^[9]。然后将模型组进行药物干预,根据细胞毒性及课题组前期预实验结果确定给药剂量,最终将细胞分为 6 组,分别为空白组,模型组(IL-1β),断藤益母汤高、中、低质量浓度组(1 000,800,600 mg·L⁻¹),MTX 组(20 μmol·L⁻¹)。

2.3 MTT 比色法检测细胞活性 将细胞分为空白组,模型组,断藤益母汤组,MTX 组。RA FLSs 以 6×10⁴ 个/mL 的密度接种于 96 孔板,每组 4 个复孔,给予断藤益母汤或 MTX 药物干预 24 h 后,每孔加入 MTT 液 10 μL,孵育 4 h。弃废液,每孔加入 DMSO 150 μL,在 570 nm 波长处检测吸光度 A。

2.4 ELISA 检测细胞因子水平 收集细胞上清,1 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清。100 μL/孔加入标准品、样品、稀释缓冲液,每组 3 个复孔。50 μL/孔加入生物素结合抗体,室温孵育 1 h。洗板 3 次,在滤纸上扣干。100 μL/孔加入辣根过氧化物酶结合抗体,室温孵育 20 min。再次洗版,重复操作 3 次。100 μL/孔加入 TMB,室温避光孵育 5~30 min 之间,加入终止液以终止反应。用检测波长 450 nm

读值。绘制标准曲线,计算样品浓度。

2.5 细胞总蛋白提取及 BCA 法测定蛋白浓度 将细胞分为空白组,模型组,断藤益母汤组,MTX 组,药物干预 24 h。用预冷的 PBS 清洗细胞 1~2 次,每皿加入适量含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液。冰上刮取细胞,裂解 20 min,使用高速离心机 4 ℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定吸光度 A,于 562 nm 波长处检测。浓度绘制标准曲线,计算样品浓度。将样品浓度标准化,加入 5 倍上样缓冲液,100 ℃ 加热 10 min 使蛋白变性,样品 -80 ℃ 低温冰箱保存。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 MEKK2 蛋白的表达 使用伯乐公司凝胶模具,检漏,配制 10% 的分离胶和 5% 浓缩胶,最后加入 10% APS 及 TEMED,混匀后缓慢加入玻璃板,加入异丙醇 1 mL 压胶,室温放置 10~40 min,加入浓缩胶,缓慢插入梳子,室温放置 10~30 min。配制 1 L 电泳液,用移液器于各泳道加入蛋白 Marker 6 μL 或样品 20 μL。浓缩胶使用恒压 80 V,电泳约 30 min,分离胶使用恒压 120 V,电泳约 60 min。使用甲醇浸泡 0.45 μm PVDF 膜,使膜活化。配制转膜液,冰上预冷,安装转膜系统后恒流 300 mA 转膜 120 min。使用 5% BSA 室温下封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。一抗稀释液以 1:1 000 的浓度配制 MEKK2 及 GAPDH 一抗,摇床上 4 ℃ 孵育 12~15 h。使用 TBST 洗膜 3 次,每次约 10 min。使用二抗稀释液以 1:2 000 的浓度稀释抗体,室温下摇床孵育 2 h,洗膜 3 次,每次 10 min。配制 ECL 发光液,于暗室中每个条带滴加显影液 200 μL,采用信号积累模式曝光。使用 Image Lab 软件进行图像分析,计算相对灰度值。

2.7 Real-time PCR 检测 MEKK2 mRNA 的表达 将细胞分为空白组,模型组,断藤益母汤组,MTX 组,药物干预 24 h。弃培养液,用 4 ℃ 预冷 PBS 清洗细胞 3 次,每皿加入 trizol 试剂 1 mL,室温裂解 15 min。加入三氯甲烷 200 μL,剧烈震荡 3 min,室温静置 10 min,然后 12 000 r·min⁻¹,4 ℃ 离心 20 min。吸取上清液到无酶的离心管中,加入异丙醇 200 μL,摇晃充分混匀管内液体,室温静置 10 min 后,12 000 r·min⁻¹ 4 ℃ 离心 15 min。弃上清液,加 75% 乙醇 1 mL,12 000 r·min⁻¹ 4 ℃ 离心 10 min。弃上清,保留沉淀,置于超净台风干。采用 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒,参照说明书配制反应体系,MEKK2(168 bp)引物序列,上游 5'-TCAGCAA

GCTTTGAACTCAATC-3', 下游 5'-CTGTCCAAAGG CAATTTTAGCT-3'; GAPDH (95 bp) 引物序列, 上游 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游 5'-TGGT GAAGACGCCAGTGGA-3'。反应条件为 20 °C 逆转录 15 min, 40 °C 逆转录 45 min, 90 °C 灭活 2 min。扩增条件为 95 °C 预变性 60 s, 70 °C 变性 30 s, 60 °C 灭活 20 s, 循环 30 次。采用三步法进行 PCR 反应, 将靶基因出峰的循环数 (C_t 值) 与内参基因 (GAPDH rRNA) 进行比较, 计算各目的基因 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值, 并以空白组的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值作为基线计算各目的基因的相对表达水平。

2.8 小鼠 CIA 模型构建 采用随机数字表法将小鼠随机分为 6 组, 每组 7 只, 分别为正常组、模型组、断藤益母汤高、中、低剂量组和 MTX 组。制备经典的 CIA 小鼠模型^[10], 免疫制剂制备: 将牛二型胶原溶解于冰乙酸中, 与完全弗式佐剂以 1:1 的比例用注射器反复抽吸以充分乳化冰上保存备用。首次免疫: 在每只小鼠在小鼠尾根部, 避开血管, 多点皮下注射乳化剂 100 μL 。于初次免疫 21 d 后进行加强免疫, 每只小鼠尾根皮下注射牛 II 型胶原 100 μL 。

2.9 药物干预 CIA 小鼠造模第 22 天 (加强免疫后 1 d) 开始药物干预, 干预方法为小鼠和人用药量按公斤体重换算为 1:0.11^[11-13], 断藤益母汤处方日用量为 1.25 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 小鼠为 11.375 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。每只小鼠的给药体积为 0.02 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$; 正常组和模型组予灌胃生理盐水 0.02 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。根据参考文献报道及课题组前期经验, MTX 给药量为 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每周灌胃 2 次, 其余时间予灌胃生理盐水 0.02 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 连续灌胃 4 周。药物干预周期为 31 d。

2.10 CIA 小鼠取材 第 32 天开始取材。通过摘除眼球采血, 用弯头镊夹取眼球, 根据需要捻动拇指与食指的方向, 使血液从眼眶内以不同速度垂直流入离心管; 将离心管中的血置 37 °C 温箱或水浴 1 h, 再置 4 °C 冰箱内 3~4 h, 待血液凝固血块收缩后, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清保存于 -20 °C 冰箱中保存备用。分别取出小鼠脾脏、胰腺、睾丸、双下肢备用。

2.11 关节肿胀度评分 初次免疫后开始, 每隔 2 d 观察小鼠一般情况及关节变化情况, 然后记录关节炎症状评分^[14]。关节指数按 0~4 评分。无肿胀为 0 分; 轻度肿胀和/或轻度红肿为 1 分; 轻到中度肿胀为 2 分; 明显肿胀, 关节活动受限为 3 分; 严重水肿, 关节僵直为 4 分。

2.12 HE 染色观察小鼠关节组织病理学变化 小鼠出死处死后, 取小鼠后肢踝关节, 以 10% 甲醛固定 24 h, 用 10% EDTA 脱钙处理约 1 个月。脱水, 石蜡包埋切片, 用 HE 染色, 在光学显微镜下观察病理组织学变化, 并拍照。

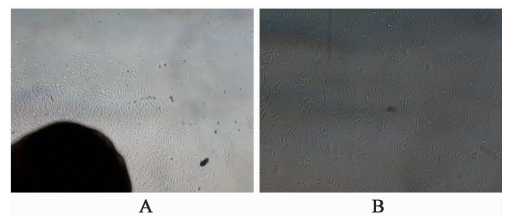
2.13 关节滑膜病理学评分 关节周围炎症评分: 没有炎症细胞浸润为 0 分; 20 个炎症细胞/高倍视野 (100 \times) 为 1 分; 20~50 个炎症细胞/高倍视野 (100 \times) 为 2 分; >50 个炎症细胞/高倍视野 (100 \times) 为 3 分。骨破坏评分, 正常为 0 分; 少量软骨丢失为 1 分, 骨破坏局限在独立的区域; 大片软骨破坏, 由血管翳导致的大片骨侵蚀为 2 分; 关节结构完全破坏为 3 分; 病理总评分 = 关节周围炎症评分 + 骨破坏评分。

2.14 脾脏指数测定 脾脏指数是指摘取脾脏后, 用滤纸吸干残血, 然后称质量 (mg), 脾脏指数 = 脾脏质量/体质量 $\times 100\%$, 得到脾脏指数。

2.15 统计学方法 所有数据用 STATA 15.1 统计软件, 定量数据使用 $\bar{x} \pm s$ 计算; 多个样本均数比较采用 One-way ANOVA 法, 若方差齐则采用两两样本比较, 使用 Bonfferoni 分析; 重复测量数据使用球对称检验后, 若符合球形性则使用两因素重复测量数据方差分析; 非正态性分布数据采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RA FLSs 培养 观察光学显微镜下 RA FLSs, 滑膜组织块培养约 7 d 可见梭形细胞从组织块边缘移行出, 呈放射状分布。2~4 周后渐覆盖细胞培养皿。3 代后细胞呈长梭型, 细胞核卵圆形, 居中, 形态与 FLSs 相符。见图 1。



A. 滑膜组织块培养 7 d; B. FLSs 培养 3 代后

图 1 类风湿性关节炎 (RA) 成纤维样滑膜细胞培养 (倒置显微镜, $\times 40$)

Fig. 1 Fibrous synovial cell culture of rheumatoid arthritis (inverted microscope, $\times 40$)

3.2 对 RA FLSs 增殖的影响 与空白组比较, 模型组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 使用 1 000, 800, 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 断藤益母汤和

20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MTX 干预 FLSs, 24 h 时断藤益母汤干预组 RA FLSs 存活率明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且以浓度依赖性方式使细胞活力下降, MTX 组细胞存活率也下降 ($P < 0.05$); 48 h 后, 断藤益母汤高质量浓度组细胞存活率明显下降 ($P < 0.05$), 断藤益母汤中、低质量浓度组差异无统计学意义, MTX 组细胞存活率下降 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 断藤益母汤对 RA FLSs 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Duanteng Yimu decoction (DTYMD) on activity of RA FLSs ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h 细胞存活率	48 h 细胞存活率
空白	-	86.1 \pm 3.4	81.3 \pm 3.2
模型	-	100.0 ²⁾	100.0 ²⁾
断藤益母汤	1 000	81.2 \pm 2.9 ⁴⁾	83.9 \pm 2.2 ⁴⁾
	800	87.3 \pm 2.0 ⁴⁾	91.9 \pm 3.0
	600	94.5 \pm 3.3 ⁴⁾	96.2 \pm 1.2 ²⁾
MTX	20 ⁵⁾	90.3 \pm 0.7 ³⁾	89.0 \pm 1.9 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; ⁵⁾ 表示剂量单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 2~4 同)。

3.3 对 FLSs MEKK2 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组 MEKK2 mRNA 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,经过不同浓度断藤益母汤和 MTX 干预后,断藤益母汤高、中质量浓度组及 MTX 组 MEKK2 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 断藤益母汤对 FLSs MEKK2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of DTYMD on MEKK2 mRNA expression in RA FLSs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	MEKK2
空白	-	1.01 \pm 0.18
模型	-	1.73 \pm 0.13 ²⁾
断藤益母汤	1 000	1.29 \pm 0.08 ⁴⁾
	800	1.44 \pm 0.06 ³⁾
	600	1.72 \pm 0.12
MTX	20 ⁵⁾	1.44 \pm 0.09 ³⁾

3.4 对 FLSs MEKK2 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 MEKK2 蛋白的表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,断藤益母汤高、中剂量及 MTX 组 MEKK2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$);断藤益母汤低剂量组蛋白表达水平有下降趋势,但无统计学差异。见图 2,表 3。

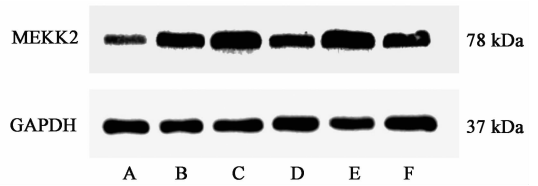


图 2 FLSs MEKK2 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of expression of MEKK2 protein in FLSs

表 3 断藤益母汤对 RA FLSs MEKK2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of DTYMD on expression of MEKK2 protein in RA FLSs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	MEKK2/GAPDH
空白	-	0.56 \pm 0.05
模型	-	1.00 ²⁾
断藤益母汤	1 000	0.29 \pm 0.04 ⁴⁾
	800	0.71 \pm 0.07 ⁴⁾
	600	0.96 \pm 0.20
MTX	20 ⁵⁾	0.46 \pm 0.09 ⁴⁾

3.5 对 FLSs 炎症因子表达的影响 与空白组比较,模型组 MMP-1, IL-6, TNF- α 表达明显上升 ($P < 0.05$) 与模型组比较,断藤益母汤组和 MTX 组 MMP-1, IL-6, TNF- α 表达显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 断藤益母汤对 RA FLSs 炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of DTYMD on inflammatory factors of RA FLSs ($\bar{x} \pm s, n = 5$) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	MMP-1	IL-6	TNF- α
空白	-	107.5 \pm 5.5	252.9 \pm 9.6	23.9 \pm 2.0
模型	-	165.2 \pm 6.2 ¹⁾	4 747.9 \pm 70.0 ¹⁾	103.2 \pm 10.6 ¹⁾
断藤益母汤	1 000	111.2 \pm 6.8 ⁴⁾	3 978.6 \pm 168.6 ⁴⁾	52.0 \pm 5.8 ⁴⁾
	800	114.4 \pm 5.1 ⁴⁾	4 219.3 \pm 105.1 ⁴⁾	60.3 \pm 3.9 ⁴⁾
	600	154.5 \pm 5.7 ⁴⁾	4 376.0 \pm 204.5 ⁴⁾	77.5 \pm 5.2 ⁴⁾
MTX	20 ⁵⁾	111.8 \pm 3.9 ⁴⁾	4 184.0 \pm 87.9 ⁴⁾	50.0 \pm 7.0 ⁴⁾

3.6 对 CIA 小鼠体质量的影响 与空白组比较,其他各组小鼠皮毛欠光泽,精神倦怠。除断藤益母汤低剂量组外,其他各组小鼠从 36 d 开始体质量持续下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中断藤益母汤高剂量组小鼠体质量从 42 d 开始高于模型组、断藤益母汤中、低剂量组, MTX 组,但差异无统计学意义;与空白组比较,模型组体质量下降,从 33 d 开始差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 断藤益母汤对 CIA 小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 5 Effect of DTYMD on body mass of CIA mice($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	21 d	24 d	27 d	30 d	33 d	36 d
正常	-	24.1 ± 0.7	24.3 ± 0.7	25.5 ± 0.5	23.7 ± 0.7	23.2 ± 0.5	25.2 ± 0.8
模型	-	23.1 ± 1.5	23.2 ± 1.2	22.7 ± 1.5	21.1 ± 1.7	19.7 ± 1.5 ²⁾	18.7 ± 1.8 ²⁾
断藤益母汤	25.0	22.7 ± 1.6	22.5 ± 2.5	22.1 ± 3.0	21.5 ± 3.3	19.8 ± 3.4	19.5 ± 3.6 ¹⁾
	12.5	23.5 ± 1.9	23.5 ± 1.8	23.9 ± 1.8	22.0 ± 1.7	20.8 ± 1.8	20.2 ± 2.4 ¹⁾
	6.25	22.8 ± 1.5	23.5 ± 1.3	24.2 ± 1.6	22.5 ± 1.8	21.5 ± 2.0	20.7 ± 2.3
MTX	2	22.7 ± 1.1	22.6 ± 1.9	22.8 ± 3.7	22.0 ± 3.3	22.2 ± 2.9	21.7 ± 2.4

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	39 d	42 d	45 d	48 d	51 d	53 d
正常	-	24.6 ± 0.8	25.3 ± 0.6	25.3 ± 0.4	24.6 ± 0.5	25.0 ± 0.7	25.3 ± 0.6
模型	-	17.8 ± 1.8 ²⁾	18.3 ± 0.5 ²⁾	18.2 ± 0.6 ²⁾	17.4 ± 0.6 ²⁾	17.5 ± 1.1 ²⁾	17.8 ± 0.7 ²⁾
断藤益母汤	25.0	19.2 ± 3.6 ¹⁾	19.1 ± 3.3	18.8 ± 3.2 ²⁾	18.5 ± 3.1 ²⁾	18.2 ± 3.1 ²⁾	18.1 ± 2.7 ²⁾
	12.5	19.5 ± 2.6	18.4 ± 2.2 ²⁾	18.0 ± 1.4 ²⁾	17.0 ± 1.6 ²⁾	16.4 ± 1.7 ²⁾	16.0 ± 1.3 ²⁾
	6.25	20.4 ± 3.1	22.3 ± 1.5	21.7 ± 1.5	21.2 ± 1.3	20.8 ± 1.9	20.6 ± 2.6 ¹⁾
MTX	2	20.2 ± 2.6	17.4 ± 2.0 ²⁾	16.8 ± 1.9 ²⁾	16.2 ± 1.7 ²⁾	15.9 ± 1.7 ²⁾	15.0 ± 1.9 ²⁾

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⁾ $P < 0.01$ (表 6~8 同)。

3.7 对 CIA 小鼠脾脏指数的影响 与正常组比较,模型组小鼠脾脏指数明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,断藤益母汤高、中剂量组及 MTX 组脾脏指数显著下降($P < 0.01$),断藤益母汤低剂量组脾脏指数有下降趋势,但差异无统计学意义。见表 6,图 3。

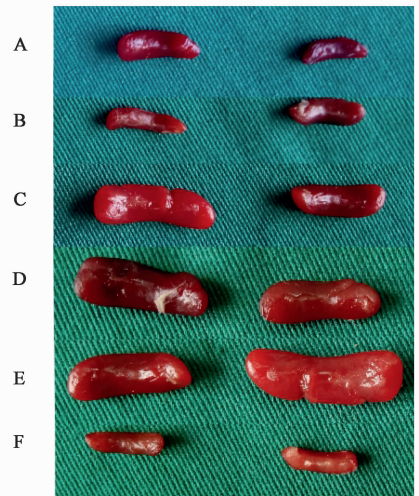
表 6 断藤益母汤对 CIA 小鼠脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 6 Effect of DTYMD on spleen index of CIA mice($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	脾脏指数/%
正常	-	1.10 ± 0.38
模型	-	2.93 ± 0.44 ¹⁾
断藤益母汤	25.0	1.37 ± 0.32 ⁴⁾
	12.5	1.47 ± 0.49 ⁴⁾
	6.25	2.51 ± 0.44
MTX	2	0.31 ± 0.02 ⁴⁾

3.8 对 CIA 小鼠肿胀度评分的影响 与正常组比较,模型组肿胀度评分显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,其中断藤益母汤高剂量从 39 d 开始明显降低 CIA 小鼠关节肿胀度($P < 0.05, P < 0.01$),断藤益母汤中剂量组从 43 d 开始降低小鼠关节肿胀度($P < 0.05$),低剂量组未见明显差异。见表 7。

3.9 对 CIA 小鼠关节病理变化的影响 通过对 CIA 小鼠踝关节 HE 染色分析,发现正常组小鼠关节面光滑、完整,未见明显炎细胞浸润,滑膜组织未



A. MTX 组;B. 断藤益母汤高剂量组;C. 断藤益母汤中剂量组;D. 断藤益母汤低剂量组;E. 模型组;F. 正常组

图 3 断藤益母汤对 CIA 小鼠脾脏指数的影响

Fig. 3 Effect of DTYMD on spleen index of CIA mice

见明显增生。模型组小鼠有大量炎细胞浸润,滑膜组织增生明显,并出现滑膜组织向软骨和骨侵袭,关节面破损,呈现大面积被侵袭区域。断藤益母汤干预组小鼠见炎细胞浸润,滑膜组织增生,关节面不同程度破坏,但高剂量关节面相对光滑,滑膜增生不明显。正常组小鼠未见明显关节周围炎症、骨破坏。与正常组比较,模型组小鼠关节周围炎症、骨破坏评分和病理总评分和病理总评分显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,断藤益母汤高剂量组 CIA

表 7 断藤益母汤对 CIA 小鼠关节肿胀度评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 7 Effect of DTYMD on joint swelling score of CIA mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

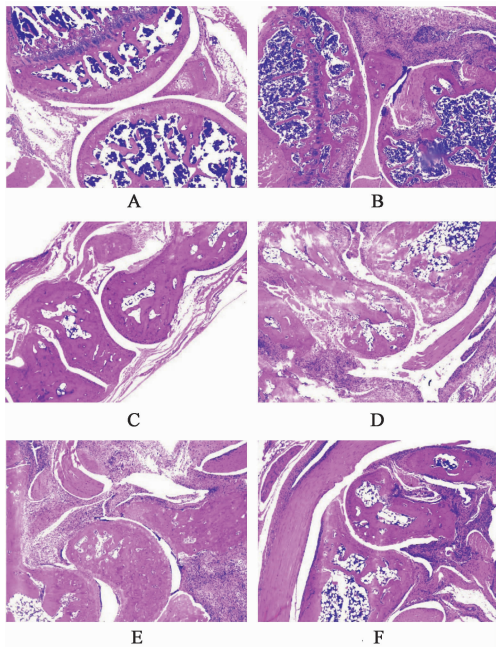
分

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	21 d	23 d	25 d	27 d	29 d	31 d	33 d	35 d
模型	-	1.20 ± 1.08 ²⁾	2.40 ± 1.19 ²⁾	3.40 ± 1.94 ²⁾	4.40 ± 1.70 ²⁾	6.60 ± 2.91 ²⁾	7.20 ± 2.32 ²⁾	8.00 ± 2.89 ²⁾	8.60 ± 1.12 ²⁾
断藤益母汤	25.0	1.57 ± 1.98	2.43 ± 1.43	3.00 ± 1.16	2.71 ± 1.98	2.71 ± 2.98	3.14 ± 2.93	4.00 ± 1.39	4.71 ± 1.38
	12.5	1.43 ± 1.13	3.00 ± 1.26	3.86 ± 1.48	4.86 ± 2.25	7.14 ± 2.24	8.29 ± 2.15	7.86 ± 2.12	7.86 ± 2.12
	6.25	2.43 ± 1.09	4.29 ± 1.42	4.43 ± 1.61	4.43 ± 1.61	5.71 ± 1.68	5.71 ± 1.68	4.29 ± 2.49	5.43 ± 2.39
MTX	2	2.14 ± 1.02	1.86 ± 1.27	1.71 ± 1.98	2.86 ± 1.95	4.00 ± 1.65	4.71 ± 2.77	5.43 ± 2.55	5.57 ± 1.73

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	37 d	39 d	41 d	43 d	45 d	47 d	49 d	51 d
模型	-	11.20 ± 2.57 ²⁾	11.80 ± 2.79 ²⁾	11.20 ± 2.45 ²⁾	10.60 ± 2.14 ²⁾	10.80 ± 3.22 ²⁾	11.20 ± 2.53 ²⁾	11.50 ± 3.68 ²⁾	11.25 ± 2.54 ²⁾
断藤益母汤	25.0	4.86 ± 1.87	4.14 ± 1.33 ³⁾	4.29 ± 2.55 ³⁾	4.00 ± 2.19 ³⁾	2.71 ± 2.85 ⁴⁾	1.86 ± 1.28 ⁴⁾	1.71 ± 2.14 ⁴⁾	1.71 ± 2.14 ⁴⁾
	12.5	7.00 ± 1.80	5.43 ± 1.9	6.00 ± 2.54	6.00 ± 2.54 ³⁾	4.71 ± 1.13 ³⁾	4.57 ± 1.97 ³⁾	4.00 ± 1.35 ³⁾	4.14 ± 1.59
	6.25	6.71 ± 1.85	7.71 ± 1.99	8.00 ± 1.40	7.00 ± 2.09	6.71 ± 2.01	6.86 ± 1.08	6.71 ± 1.01	7.14 ± 2.26
MTX	2	5.43 ± 1.42	5.00 ± 2.47	3.57 ± 1.86 ³⁾	3.29 ± 1.54 ³⁾	3.43 ± 2.64 ³⁾	3.71 ± 1.02 ³⁾	3.14 ± 1.57 ³⁾	3.00 ± 1.21 ³⁾

注:正常组关节肿胀度评分均为 0。

小鼠关节周围炎症、骨破坏评分和病理总评分显著下降 ($P < 0.01$), 中剂量组病理评分也下降, 但评分较高剂量组高 ($P < 0.05$), 低剂量组病理总评分下降, 但差异无统计学差异。见图 4, 表 8。



A. 正常组; B. 模型组; C. 断藤益母汤高剂量组; D. 断藤益母汤中剂量组; E. 断藤益母汤低剂量组; F. MTX 组

图 4 断藤益母汤对 CIA 小鼠关节病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 4 Effect of DTYMD on joint pathology of CIA mice (HE, ×100)

4 讨论

本研究旨在探究断藤益母汤对 MEKK2 表达的

表 8 断藤益母汤对 CIA 小鼠踝关病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 8 Effect of DTYMD on pathological scores of CIA mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

分

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	关节周围 炎症评分	骨破坏评分	病理总评分
正常	-	0.12 ± 0.25	0.13 ± 0.24	0.25 ± 0.45
模型	-	1.87 ± 0.45 ²⁾	1.75 ± 0.26 ²⁾	3.65 ± 0.34 ²⁾
断藤益母汤	25.0	0.87 ± 0.56 ⁴⁾	0.73 ± 0.45 ⁴⁾	1.60 ± 0.25 ⁴⁾
	12.5	1.30 ± 0.27 ³⁾	1.50 ± 0.54	2.80 ± 0.38 ³⁾
	6.25	1.76 ± 0.34	1.68 ± 0.36	3.44 ± 0.46
MTX	2	0.89 ± 0.46 ⁴⁾	0.83 ± 0.47 ⁴⁾	1.72 ± 0.49 ⁴⁾

作用。发现断藤益母汤干预 RA FLSs 后, MEKK2 的蛋白和 mRNA 表达水平下调, 并且可以抑制 RA FLSs 炎症因子 MMP-1, TNF- α , IL-6 的表达水平。在动物实验中, 发现断藤益母汤减轻了 CIA 小鼠关节炎水平。

MAPKs 受 MAPK 激酶 (MEKK) 调控, 而 MEKK2 又调控 MAPK 激酶。证据表明 MEKK2 作为信号节点, 协同激活不同的 MAPK 亚群以对不同刺激做出反应^[15]。MEKK2 是 MAPK 信号通路的成员之一, 是哺乳动物基因组中 19 个 MEKK 超家族中的丝裂原活化蛋白激酶之一, MEKK 及其下游靶点被不同的细胞外刺激所激活, 并整合这些信号触发适当的细胞反应^[16-17]。MEKK2 可以激活 MEK5/ERK5 细胞信号通路, 可能在肿瘤生长和转移中起

重要作用,先前的研究表 MEKK2 具有促肿瘤作用,已发现 MEKK2 和 MEKK3 在几种癌症中过度表达,如乳腺癌、小细胞肺癌、肝癌、结直肠癌等^[18-20]。而 MEKK2 基因敲除后则抑制乳腺癌细胞的增殖^[21-23]。除 ERK5 通路外,MEKK2 还通过磷酸化 MAP2K7 激活 JNK/MAPK 通路^[24]。RA 成纤维样滑膜细胞被认为是类肿瘤细胞,RA 的病理特征之一就是 FLSs 的过度增殖。因此笔者推测 MEKK2 是否也参与 RA 病理过程。研究表明 JNK/MAPK 是 RA 发生的重要调节因子,用 MEKK2 免疫共沉淀法进行体外激酶分析表明,IL-1 可增加活化 JNK 的关键激酶 MEKK2 介导的磷酸化,从而发挥调控 JNK 激酶的作用^[25]。

课题组在前期的研究中已经使用了网络药理学和分子对接技术对 RA 的相关靶点进行了研究,结果表明 MEKK2 在 RA 中发挥作用^[26]。在 RA 和断藤益母汤的共有靶点中,有大量靶点与 MAPK 信号通路相关^[27-29]。由于 MEKK2 可以活化 MAPK2 从而激活 MAPK,而 MAPK 与大量炎症相关因子相关,因此提出假说即 MEKK2 可以对炎症相关靶点进行调控。本研究通过 IL-1 β 对 RAFLSs 进行刺激,发现 MEKK2 表达明显上升,此外相关的炎症因子表达也上调如 IL-6, TNF- α , MMP-1。这表明 MEKK2 可能通过 MAPK 家族下游激酶促进炎症因子的释放。在 RA 病理生理中存在的炎症过程主要是由细胞因子调节的,促炎和抗炎细胞因子失衡可以促进自身免疫、慢性炎症和关节损伤的发生^[30]。TNF- α , IL-17, IL-1, MMP-1 等细胞因子通过促进 RA 的炎症反应和诱导软骨破坏而发挥作用,而 IL-4, IL-10 和 IL-13 等细胞因子则是 RA 病理中的主要抗炎分子^[31]。在本研究中,FLSs 经过 IL-1 刺激后,其他炎症因子表达水平显著上调,尤其是 IL-6。这可能是 IL-1 作为外源性刺激可以显著影响 MAPK 信号通路,而 MAPK 信号通路的激活又可以引发下游的级联反应,从而导致更多炎症因子的释放。因此,断藤益母汤通过抑制 MEKK2 的表达对炎症因子的分泌产生影响可能是其治疗 RA 的潜在机制之一。

CIA 小鼠造模后,除正常组外,各组小鼠出现一般行为学的变化,如活动减少,精神萎靡,毛发欠光泽等。模型组、给药组小鼠的体质量均出现下降,但断藤益母汤高剂量组体质量下降较其他给药组少,但无统计学差异。本研究中,CIA 小鼠造模后体质量减轻,考虑可能是造模后小鼠关节炎发作。另外,每日一次的灌胃操作可能损伤胃黏膜,导致小鼠因

疼痛和胃黏膜损伤影响进食。此外,贫血是 RA 最常见的关节外表现之一,RA 可累及全身绝大多数器官和系统,慢性病贫血和缺铁性贫血是最常见的贫血病因^[32]。有学者认为促炎症细胞因子可以通过调节铁代谢,铁调素在免疫过程中大量表达且参与免疫反应,在机体铁平衡调节中发挥重要作用^[33]。由于炎症因子影响铁调素从而抑制骨髓红细胞生成导致 RA 相关贫血。因此认为,小鼠体质量减轻也可能与促炎因子导致 CIA 小鼠贫血,从而导致体质量下降有关。研究中发现,模型组小鼠脾脏明显肿大。脾脏种含有大量单核-巨噬细胞系统细胞,实质由红髓和白髓构成,具有造血和血液过滤功能,也是淋巴细胞迁移和接受抗原刺激后发生免疫应答、产生效应分子的重要场所^[34]。脾肿大是巨幼细胞性贫血的一个较常见的征象,并且多见于重度贫血。因此,小鼠脾大可能是由于贫血所致。本研究中,模型组小鼠脾脏明显大于正常组,给药干预后高、中剂量组小鼠脾肿大情况缓解,这一结果说明断藤益母汤可能通过对炎症因子的调控改善脾肿大的状况。

RA 主要影响全身关节,涉及自身抗体和炎症细胞向关节组织和滑膜的浸润。在初始阶段,滑膜内衬组织与多种浸润细胞结合,包括破骨细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞等。后期发生骨退化和破坏,造成 RA 患者残疾^[35]。在 HE 染色的病理切片中,在模型组可见大量染色炎细胞浸润于组织,同时滑膜内衬组织大量增生,局部可以突破软骨深入软骨下层。在细胞实验中也发现,滑膜细胞经 IL-1 β 刺激后可以显著增殖,增殖后的滑膜组织释放更多的炎症因子形成正反馈调节,从而加重了关节炎。HE 染色显示断藤益母汤干预组小鼠炎细胞浸润和滑膜增生均较模型组减轻,说明断藤益母汤可能通过多条通路抑制炎症因子从而起到骨保护作用。

综上所述,断藤益母汤可能对成纤维样滑膜细胞的 MEKK2 表达水平进行负性调控,并且对 RA 成纤维样滑膜细胞炎症因子 MMP-1, TNF- α , IL-6 的表达水平有抑制作用。在动物实验中,断藤益母汤对 CIA 小鼠的关节炎有明显地缓解作用。

[参考文献]

- [1] 磨红, 马宗伯, 吴成龙. 类风湿关节炎治疗研究进展[J]. 内科, 2017, 12(3): 334-337.
- [2] 胡晓敏, 宗英, 余珊珊, 等. 类风湿关节炎治疗药物的研发进展及趋势[J]. 中国新药杂志, 2017, 26

- (1):36-43.
- [3] 陈光星, 陈纪藩, 林昌松, 等. 《金匱要略》理论指导下类风湿关节炎诊治的实践与发展[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(6):727-729.
- [4] 林昌松, 梁江, 刘风震, 等. 断藤益母汤治疗类风湿关节炎的临床疗效观察[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(6):632-637.
- [5] 刘清平, 李楠, 孙骏炜, 等. 断藤益母汤对佐剂性关节炎大鼠骨破坏的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10):146-149.
- [6] 杨欢, 徐云芝, 李呈贞, 等. MEKK2 在类风湿关节炎患者中的表达及临床意义[J]. 现代免疫学, 2016, 36(3):177-182.
- [7] TSIUMPEKOU M, PAPADOPOULOS N, BUROVIC F, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of Erk5 MAP-kinase is dependent on Mekk2, Mek1/2, PKC and PI3-kinase, and affects BMP signaling [J]. Cell Signal, 2016, 28(9):1422-1431.
- [8] ZHAO Q, LEE F S. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta [J]. J Biol Chem, 1999, 274(13):8355-8358.
- [9] LI N, XU Q, LIU Q P, et al. Leonurine attenuates fibroblast-like synoviocyte-mediated synovial inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology (Oxford, England), 2017, 56(8):1-11.
- [10] 展俊平, 孟庆良, 孟婉婷, 等. 补阳还五汤对类风湿关节炎小鼠 MPO, NE mRNA 表达及 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24):158-163.
- [11] 吴婷婷, 屈会化, 胡丽娜, 等. 基于树鼯体表面积的树鼯与人类及其他实验动物等效剂量换算系数的测算[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1):203-205.
- [12] 黄娟萍, 罗裕, 江力, 等. 中药药动学研究中给药剂量的现状分析[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(21):1685-1689.
- [13] 张宏, 王旭昀, 刘美奇, 等. 中药含药血清实验动物灌胃给药剂量探讨[J]. 吉林中医药, 2015, 35(6):623-625.
- [14] WANG C, CHEN S, WU C, et al. Prophylactic adenovirus-mediated human kallistatin gene therapy suppresses rat arthritis by inhibiting angiogenesis and inflammation[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(4):1319-1324.
- [15] KESAVAN K, LOBEL-RICE K, SUN W, et al. MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts [J]. J Cell Physiol, 2004, 199(1):140-148.
- [16] LU J, LIU L, ZHENG M, et al. MEKK2 and MEKK3 suppress Hedgehog pathway-dependent medulloblastoma by inhibiting GLII function [J]. Oncogene, 2018, 37(28):3864-3878.
- [17] CUEVAS B D, ABELL A N, JOHNSON G L. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration [J]. Oncogene, 2007, 26(22):3159-3171.
- [18] HUANG T, SHE K, PENG G, et al. MicroRNA-186 suppresses cell proliferation and metastasis through targeting MAP3K2 in non-small cell lung cancer [J]. Int J Oncol, 2016, 49(4):1437-1444.
- [19] BROWN R D, AMBLER S K, LI M, et al. MAP kinase kinase kinase-2 (MEKK2) regulates hypertrophic remodeling of the right ventricle in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, 304(2):269-281.
- [20] SLATTERY M L, LUNDGREEN A, WOLFF R K. MAP kinase genes and colon and rectal cancer [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(12):2398-2408.
- [21] FAN Y, GE N, WANG X, et al. Amplification and over-expression of MAP3K3 gene in human breast cancer promotes formation and survival of breast cancer cells [J]. J Pathol, 2014, 232(1):75-86.
- [22] HASAN R, SHARMA R, SARAYA A, et al. Mitogen activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3/MEKK3) overexpression is an early event in esophageal tumorigenesis and is a predictor of poor disease prognosis [J]. BMC Cancer, 2014, 14(1):2.
- [23] JIANG L I, HUANG M, WANG L, et al. Overexpression of MEKK2 is associated with colorectal carcinogenesis [J]. Oncol Lett, 2013, 6(5):1333-1337.
- [24] AHMAD S, ST. HILAIRE V R, DANDEPALLY S R, et al. Discovery and characterization of an iminocoumarin scaffold as an inhibitor of MEKK2 (MAP3K2) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(1):205-211.
- [25] HAMMAKER D R, BOYLE D L, CHABAUD-RIOU M, et al. Regulation of c-Jun N-terminal kinase by MEKK-2 and mitogen-activated protein kinase kinase kinases in rheumatoid arthritis [J]. J Immunol, 2004, 172(3):1612-1618.
- [26] 王强, 刘敏莹, 韩隆胤, 等. 基于网络药理学探讨断藤益母汤治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24):150-158.

- [27] CUI Y, JIANG L, SHAO Y, et al. Anti-alcohol liver disease effect of *Gentiana macrophyllae* extract through MAPK/JNK/p38 pathway [J]. *J Pharma Pharmacol*, 2019, 71(2):240-250.
- [28] AHMED H I, MOHAMED E A. Candesartan and epigallocatechin-3-gallate ameliorate gentamicin-induced renal damage in rats through p38-MAPK and NF- κ B pathways[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 33(3):1-9.
- [29] TALWAR H, BAUERFELD C, BOUHAMDAN M, et al. MKP-1 negatively regulates LPS-mediated IL-1 β production through p38 activation and HIF-1 α expression [J]. *Cell Signal*, 2017, 34:1-10.
- [30] 蔡叙东, 林昌松, 潘东梅, 等. 断藤益母汤对破骨细胞 RANKL 信号通路及 MMP-9 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12):68-73.
- [31] SAG S, SAG M S, TEKEOG LU I, et al. Relationship of hematologic markers with IL-17 and IL-1 beta in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Back Musculoskelet Rehabil*, 2018, 31(4):703-707.
- [32] 俞建钰, 陈晗, 陈祥芳, 等. 类风湿关节炎合并慢性贫血的机制探讨[J]. *风湿病与关节炎*, 2018, 7(12):52-54.
- [33] 唐岚, 张艳, 张海燕. 类风湿关节炎合并贫血患者体内铁调素含量与铁代谢、炎症反应、免疫应答的相关性分析 [J]. *海南医学院学报*, 2018, 24(16):1479-1482.
- [34] 金英兰, 陈曦, 董秀帅, 等. 巨幼细胞性贫血与脾大的临床相关性分析[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(25):4872-4874.
- [35] HUTAMI I R, TANAKA E, IZAWA T. Crosstalk between Fas and SIP1 signaling via NF- κ B in osteoclasts controls bone destruction in the TMJ due to rheumatoid arthritis [J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2019, 55(1):12-19.

[责任编辑 周冰冰]