

· 经典名方 ·

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

李佳钰¹, 赵帆², 陆麒麟¹, 蔡义思¹, 林鸿鑫¹, 刘刚³, 袁立霞^{1*}

(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)

[摘要] 目的: 观察当归拈痛汤对佐剂性关节炎(AA)大鼠滑膜组织内、外凋亡途径中关键调控因子表达水平的影响, 进一步探讨该方防治类风湿关节炎的作用机制。方法: 将40只SPF级SD大鼠随机分为正常组、模型组、当归拈痛汤组(11.34 g·kg⁻¹)和雷公藤组(9.45 mg·kg⁻¹), 除正常组外, 其余各组采用灭活结核分支杆菌佐剂建立佐剂性关节炎大鼠模型, 于免疫当天开始按分组每日灌胃给药, 正常组与模型组大鼠给予等体积生理盐水, 持续28 d。观察大鼠一般情况和体质量改变, 足趾容积测量仪检测受试大鼠足趾容积的变化, 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠膝关节滑膜组织形态学改变, 蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组大鼠滑膜组织肿瘤坏死因子受体超族成员6(Fas), Fas相关死亡域蛋白(FADD), B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax)及其共同下游效应分子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3) mRNA和蛋白的表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠足趾容积显著增加($P<0.01$), 滑膜细胞增生显著, 滑膜组织Fas, FADD, Bax和Caspase-3 mRNA和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平明显升高($P<0.01$); 与模型组比较, 当归拈痛汤组和雷公藤组大鼠的足趾肿胀度显著减轻($P<0.01$), 滑膜增生情况明显改善, Fas, FADD, Bax和Caspase-3 mRNA和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结论: 当归拈痛汤可以有效减轻AA大鼠关节肿胀情况, 改善滑膜组织异常增生, 其作用机制可能与调控内、外在凋亡途径相关因子Fas, FADD, Bax, Bcl-2, Caspase-3表达, 促进滑膜细胞凋亡相关。

[关键词] 当归拈痛汤; 类风湿性关节炎; 佐剂性关节炎大鼠; 肿瘤坏死因子受体超族成员6(Fas); B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2); 细胞凋亡

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202409

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201117.1021.003.html>

[网络出版日期] 2020-11-17 14:58

Effect of Danggui Niantongtang on Key Factors of Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathway in Synovial Tissue of Adjuvant Arthritis Rats

LI Jia-yu¹, ZHAO Fan², LU Qi-jin¹, CAI Yi-si¹, LIN Hong-xin¹, LIU Gang³, YUAN Li-xia^{1*}

(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)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danggui Niantongtang on the protein and mRNA expression of key regulatory factors of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathway in synovial tissue of adjuvant arthritis (AA) rats, and to further explore the mechanism of Danggui Niantongtang in the prevention and

[收稿日期] 20200915(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673875, 81774382); 广东省自然科学基金项目(A030313721)

[第一作者] 李佳钰, 在读硕士, 从事中医药对于类风湿关节炎的防治研究, E-mail: 447544787@qq.com

[通信作者] *袁立霞, 博士, 教授, 从事中医药对于类风湿关节炎的防治研究, E-mail: cnylxtcm@163.com

treatment of rheumatoid arthritis. **Method:** The general condition of AA rats, including its body weight, were observed. The changes of toe volume were detected by toe volume meter. Histopathological changes of synovium of knee joint were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA and protein expression levels of tumor necrosis factor receptor super family 6 (Fas), Fas-associating protein with a novel death domain(FADD), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and cysteinyl aspartate specific proteinase Caspase-3 (Caspase-3) were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the toe volume of the model group increased significantly ($P<0.01$), with significantly proliferated synovial cells, significantly reduced mRNA and protein expression levels of Fas, FADD, Bax and Caspase-3 in synovial tissues ($P<0.05$, $P<0.01$), and significantly increased Bcl-2 level ($P<0.01$). Compared with the model group, the swelling degree of toes in Danggui Niantongtang group and Tripterygium group was significantly alleviated ($P<0.01$), with significantly improved synovial hyperplasia, significantly increased mRNA and protein expression levels of Fas, FADD, Bax and Caspase-3 ($P<0.05$, $P<0.01$), and significantly decreased expression levels of bcl-2 mRNA and protein ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Danggui Niantongtang can effectively reduce joint swelling and abnormal proliferation of synovial tissue in AA rats. Its mechanism may be related to regulating the expression of Fas, FADD, Bax, Bcl-2 and Caspase-3, and promoting the apoptosis of synovial cells.

[**Key words**] Danggui Niantongtang; rheumatoid arthritis; adjuvant arthritis rats; tumor necrosis factor receptor super family 6 (Fas); B-cell lymphoma-2 (Bcl-2); apoptosis

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,其病变特点是关节慢性炎症伴滑膜增生,以及炎性细胞浸润滑膜组织,最终导致骨和软骨的渐进性破坏^[1]。研究表明RA滑膜细胞增殖活跃、凋亡减少和分泌高水平促炎因子的生物学特性,是引起滑膜组织过度增生并具有侵蚀性的主要原因,其中滑膜细胞凋亡不足是RA发生发展中的一个重要病理机制^[2-3]。

细胞凋亡主要包含肿瘤坏死因子受体超族成员6(Fas)介导的外在膜受体途径,以及B淋巴瘤-2(Bcl-2)/Bcl-2相关X蛋白(Bax)调控的内在线粒体途径。Fas死亡受体在与其配体结合后,招募并激活具有Fas相关死亡结构域的蛋白Fas相关死亡域蛋白(FADD),进而引发级联反应诱发细胞凋亡;Bcl-2蛋白家族的成员是线粒体凋亡通路中重要的促凋亡和抗凋亡调控因子,参与调节凋亡小体形成。上述2种途径都会激活下游“凋亡执行者”半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),这是细胞凋亡的基础^[4-5]。中医经典名方当归拈痛汤出自《医学启源》,有利湿清热、疏风止痛之效,临床上常用于治疗湿热痹证。课题组前期研究发现,当归拈痛汤能够有效改善佐剂性关节炎(AA)大鼠关节滑膜炎症,降低血清炎症因子水平,并在体外实验中证实该方对RA成纤维样滑膜细胞增殖有明显抑制作用,能

够显著升高Fas/Caspase-8的表达水平,促进细胞凋亡^[6-8]。而对于该方能否同时调控凋亡双途径的体内实验尚未见报道,因此,本实验通过建立经典的AA大鼠关节炎模型^[9],研究当归拈痛汤对AA大鼠的干预作用,及其对滑膜组织中Fas,FADD,Bcl-2,Bax,Caspase-3表达水平的影响,进一步推测该药物的作用机制是否与调控内、外双凋亡途径相关,为该方在临床的应用提供更全面的实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠40只,雄性,体质量(160±10)g。由南方医科大学实验动物中心提供,动物许可证号SYXK(粤)2016-0167,于南方医科大学SPF级实验室常规饲养,适应性喂养7d后开始实验。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L2017214。

1.2 药物与试剂 当归拈痛汤由羌活15g,茵陈15g,炙甘草15g,猪苓9g,泽泻9g,防风9g,知母9g,苍术9g,当归9g,葛根6g,苦参6g,人参片6g,升麻3g,黄芩3g,白术3g组成,所有药物由南方医院中药房提供,经南方医科大学刘传明副教授鉴定为正品,按煎煮标准进行配置,用旋转蒸发仪浓缩到含生药1.134g·mL⁻¹的当归拈痛汤药液;雷公藤多苷片(湖南千金协力药业有限公司,批号20171223);灭活结核分支杆菌(*M.tuberculosis* H37Ra, Mtb, 美国BD公司,批号7104681);矿物油

(Mineral oil, 美国 Sigma 公司, 批号 N1586); trizol, BCA 定量试剂盒, RIPA 裂解液, 苏木素, 伊红(上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 061318190723, 101518181113, 090718181024, 112818190320, 120318190215); Fas, FADD, Bcl-2, Bax, Caspase-3, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 07/2019, 02/2019, 05/2019, 04/2019, 10/2018, 08/2018); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(武汉博士德生物公司, 批号 201912); HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper), ChamQ SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号分别为 7E470E0, 7E381B9)。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); RM2135 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); PV-200 型足趾容积测量仪(四川科仪诚科技有限公司); 5804R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司); DS-11 型微量紫外分光光度计(美国 DeNovix 公司); Mini-Protean Tetra 型电泳仪, 转膜仪(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); LightCycler96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士 Roche 公司); IX53 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 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 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、当归拈痛汤组、雷公藤组, 每组 10 只。除正常组外, 其余组大鼠参照文献^[6]采用尾根部经皮下注射 Mtb 诱导剂(1 mg/只)进行造模。当归拈痛汤组与雷公藤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, 当归拈痛汤组每日灌服当归拈痛汤 11.34 g·kg⁻¹, 雷公藤多苷组给予蒸馏水配制的雷公藤多苷片混悬液 9.45 mg·kg⁻¹灌服, 正常组、模型组给予等量的生理盐水。连续给药 28 d, 于末次灌胃 2 h 后对大鼠进行相应的处理。

2.2 大鼠一般情况观察及体质量检测 观察各组大鼠的精神状态、足趾和踝关节形态、活动灵敏度、毛发光泽度、饮食量等。并于造模前和造模后第 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 天检测并记录各组大鼠体质量增长情况。

2.3 大鼠足趾肿胀度的检测 在未进行造模时和造模完成后的第 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 天, 用足趾

容积测量仪对受试大鼠的足趾大小进行测量, 对比大鼠在造模前后的足趾容积变化, 进而判断大鼠的足趾肿胀情况。

2.4 大鼠滑膜组织的提取 大鼠处死后, 将大鼠仰位固定, 乙醇消毒, 无菌处理, 沿膝关节正中纵行切开皮肤直至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 0.3 cm×0.4 cm 处向下切割直至股骨, 再分别沿髌骨两侧向下分离至胫骨, 此时即打开了膝关节腔, 可见由髌骨下极向上延续有一层平滑光亮呈淡黄色的滑膜组织。完整剥离滑膜组织, 于磷酸盐缓冲液(PBS)中涮洗后立刻液氮速冻置于-80℃冰箱保存, 或放入 4% 多聚甲醛中固定用于苏木素-伊红(HE)染色。

2.5 HE 染色观察滑膜组织的形态学变化 将刚取出的各组大鼠滑膜组织, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 将已固定的标本取出, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, HE 染色后光镜下观察滑膜组织病理形态学变化。

2.6 Real-time RCR 检测 Fas, FADD, Bax, Bcl-2, Caspase-3 mRNA 的表达 取滑膜组织, 参照 trizol 说明书提取总 RNA, 利用紫外分光光度计测定 RNA 样品的质量与浓度, 选用吸光度 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 的 RNA, 按照 Vazyme 反转录说明书进行 cDNA 第一链合成, 反应体系 20 μ L, 反应条件为 42℃ 2 min 去除基因组 DNA, 37℃ 15 min, 85℃ 5 s 合成第一链; 再以 cDNA 为模板, 利用 Vazyme Real-time PCR 试剂盒进行扩增, 设置 3 个复孔, 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 仪器预设定的 melting 和 cooling 程序, 运用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算 mRNA 的相对表达量, 3 次独立实验后, 进行统计学分析。引物于 NCBI Primer-blast 设计, 由擎科生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Fas, FADD, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达 取出滑膜组织样本, 用组织剪切成细小碎片, 按碧云天 RIPA 说明书, 加入适量配置好的 RIPA 裂解液, 4℃ 裂解 30 min, 12 000×g, 4℃ 离心 15 min, 取上清, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 根据浓度加入稀释液与上样缓冲液, 将样品于 95℃ 加热 5 min 变性, 取 20 μ g 进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳, 350 mA 恒流转膜 1.5 h, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 抗目标蛋白一抗(稀释比例为 1:1 000)4℃ 孵育 18 h, TBST 洗膜 3 次, 辣根 HRP 偶联

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Fas	上游 GGGCCCATTTTGTCTGTC AAC	184
	下游 TTCCACTTCTAAACCATGCCCT	
FADD	上游 GAAGCCTGAGTGATCGGGTA	138
	下游 ATGCTTCTCCACCAGGTCAG	
Bcl-2	上游 CTGGTGGACAACATCGCTCT	100
	下游 ATAGTTCCACAAAGGCATCCCAG	
Bax	上游 AGCTGCAGAGGATGATTGCTG	178
	下游 CTGATCAGCTCGGGCACTTTA	
Caspase-3	上游 GAGCTTGG AACCGGAAGAAA	112
	下游 AGTCCATCGACTTGCTTCCA	
GAPDH	上游 AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	389
	下游 GCGGAGATGATGACCCTTT	

的二抗(稀释比例为 1:6 000)4 °C 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 加入现配 ECL 工作液, 在超灵敏全自动成像分析仪曝光成像。使用 Image J 软件分析各个条带

的灰度值, 最后进行统计分析。

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, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AA 大鼠一般情况及体质量的影响 正常组大鼠状态良好, 饮食正常, 毛发光泽, 体质量自然增加, 运动自如, 反应灵活。模型组大鼠于造模后第 7~9 天开始出现逐渐加重的足趾或足踝关节肿胀, 精神倦怠、运动迟缓、毛发枯槁, 饮水及进食量减少, 并出现生长速度的明显减慢。与模型组比较, 当归拈痛汤组大鼠的状态和毛发光泽度的改变较轻, 且体质量在第 2 周开始逐渐高于模型组大鼠 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 出现恢复性增长。雷公藤组大鼠虽症状较轻, 但于造模后第 7~9 天同样出现进食较少, 体质量增长减慢, 不喜活动, 倦怠, 皮毛出现粗糙或发黄。体质量改变。见表 2。

表 2 当归拈痛汤对 AA 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Danggui Niantongtang (DN) on body weight in AA rat ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	1 d	8 d	16 d	24 d	28 d
正常		143.58±4.95	184.46±4.55	234.63±11.41	280.86±8.63	303.44±11.19
模型		141.29±8.71	182.39±3.96	216.44±9.22 ¹⁾	233.88±8.70 ²⁾	242.32±7.54 ²⁾
当归拈痛汤	11.34	142.01±5.98	181.41±4.16	230.00±5.30 ³⁾	267.96±4.48 ³⁾	272.15±5.58 ³⁾
雷公藤	0.009 45	145.19±7.85	182.09±3.75	222.64±7.16 ³⁾	258.43±6.22 ³⁾	266.65±5.26 ³⁾

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 3~5 同)。

3.2 对 AA 大鼠足趾肿胀度的影响 与正常组大鼠比较, AA 大鼠在免疫接种后初期足趾并无明显改变, 第 8~12 天左右出现足趾肿胀, 首先是足爪, 然后延伸至足垫、踝关节, 甚者出现关节的强直畸形和

功能障碍, 第 16~20 天左右足趾明显肿胀显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 当归拈痛汤组和雷公藤组的大鼠足趾肿胀程度显著降低 ($P < 0.01$), 且 20 d 后开始出现足趾肿胀程度减轻。见表 3。

表 3 当归拈痛汤对 AA 大鼠组织肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

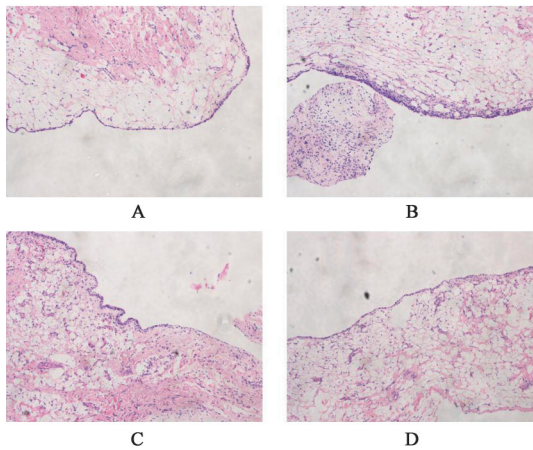
Table 3 Effect of DN on toe volume of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	1 d	8 d	16 d	24 d	28 d
正常		2.07±0.08	2.10±0.05	2.15±0.04	2.23±0.06	2.26±0.05
模型		2.02±0.08	2.10±0.44	2.82±0.08 ²⁾	2.86±0.09 ²⁾	2.88±0.09 ²⁾
当归拈痛汤	11.34	2.04±0.06	2.12±0.05	2.55±0.06 ⁴⁾	2.48±0.05 ⁴⁾	2.46±0.53 ⁴⁾
雷公藤	0.00945	2.06±0.07	2.11±0.66	2.61±0.74 ⁴⁾	2.55±0.07 ⁴⁾	2.53±0.07 ⁴⁾

3.3 对 AA 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整, 无炎症细胞浸润, 滑膜细胞单层延展, 边界清晰, 而模型组滑膜组织异常增生显著, 并伴有大量炎症细胞浸润且界限不清; 经干预治疗后, 当归拈痛汤组和雷公藤

组大鼠滑膜组织仅伴有轻微增生与炎性浸润, 提示 AA 大鼠滑膜异常增生明显改善。见图 1。

3.4 对 AA 大鼠滑膜组织 Fas, FADD, Bax, Bcl-2, Caspase-3 mRNA 表达水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠滑膜组织 Fas, FADD, Bax,



A. 正常组; B. 模型组; C. 当归拈痛汤组; D. 雷公藤组(图2同)
图1 当归拈痛汤对AA大鼠滑膜组织病理学影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Danggui Niantongtang on synovial tissues histopathology of AA rats(HE, ×100)

Caspase-3 mRNA 表达量明显下降, Bcl-2 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 当归拈痛汤组和雷公藤组大鼠滑膜组织中 Fas, FADD, Bax, Caspase-3 mRNA 均明显增加, Bcl-2 mRNA 表达量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表4。

3.5 对AA大鼠滑膜组织 Fas, FADD, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠滑膜组织 Fas, FADD, Bax, Caspase-3 蛋白表达明显下降, Bcl-2 蛋白表达显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 当归拈痛汤组和雷公藤组 Fas, FADD, Bax, Caspase-3 蛋白表达量明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图2, 表5。

4 讨论

RA 呈全球性分布, 是造成人类丧失劳动力和

表4 当归拈痛汤对AA大鼠滑膜组织 Fas, FADD, Bax, Bcl-2, Caspase-3 mRNA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of DN on expression of Fas, FADD, Bcl-2, Bax and Caspase-3 mRNA in synovial tissues of AA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Fas	FADD	Bax	Bcl-2	Caspase-3
模型		0.29±0.20 ²⁾	0.39±0.30 ¹⁾	0.32±0.23 ²⁾	1.60±0.17 ²⁾	0.26±0.22 ²⁾
当归拈痛汤	11.34	1.29±0.02 ⁴⁾	1.40±0.38 ³⁾	0.89±0.12 ³⁾	1.05±0.11 ⁴⁾	1.09±0.40 ³⁾
雷公藤	0.00945	1.14±0.38 ³⁾	1.21±0.37 ³⁾	0.90±0.27 ³⁾	1.13±0.09 ³⁾	1.10±0.45 ³⁾

注: 设正常组各指标 mRNA 表达量为 1。

表5 当归拈痛汤对AA大鼠滑膜组织 Fas, FADD, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of DN on expression of Fas, FADD, Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein in synovial tissues of AA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Fas/ β -actin	FADD/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
正常		1.04±0.05	1.10±0.04	1.42±0.08	0.87±0.03	1.65±0.04
模型		0.92±0.05 ¹⁾	0.88±0.03 ²⁾	1.33±0.10 ¹⁾	1.57±0.10 ²⁾	1.37±0.03 ²⁾
当归拈痛汤	11.34	1.10±0.03 ⁴⁾	0.99±0.03 ³⁾	1.34±0.07 ³⁾	0.97±0.05 ⁴⁾	1.55±0.02 ⁴⁾
雷公藤	0.00945	1.09±0.01 ⁴⁾	1.05±0.03 ⁴⁾	1.51±0.05 ⁴⁾	1.05±0.04 ⁴⁾	1.66±0.09 ⁴⁾

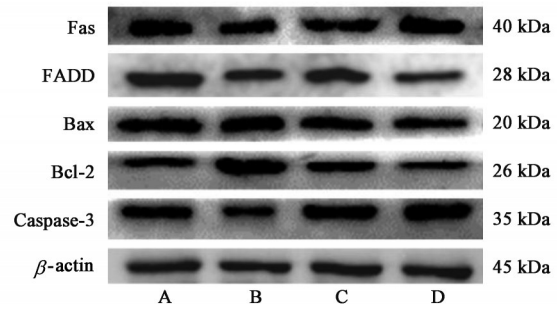


图2 各组大鼠滑膜组织 Fas, FADD, Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Fas, FADD, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 protein expression in synovial tissues of each rats

致残的主要原因之一。据统计, RA 全球范围内患病率约为 0.5%, 在我国患病率约为 0.35%, 按此患病率计算, 我国 RA 患者总数约为 500 万^[10]。RA 属中医学“痹证、痹病”范畴, 其主要病因病机可概况为正气亏虚、邪气侵袭、痰浊瘀血 3 个方面, 其主要证型有风湿痹阻证、寒湿痹阻证、湿热痹阻证、痰瘀痹阻、瘀血阻络证、气血两虚证、肝肾不足证、气阴两虚证^[11-12]。当归拈痛汤出自《医学启源》, 主治“湿热为病, 肢节烦痛, 肩背沉重, 胸膈不利, 遍身疼, 下注于胫, 肿痛不可忍”, 是《类风湿关节炎病证结合诊疗指南》推荐治疗 RA 风湿热痹证的经典方剂。方中羌活辛苦性温, 散外受之风邪, 胜湿止痛, 通利关节; 茵陈苦泄降下, 善于清利湿热, 使湿从小便而去, 二药相合湿热去、经络疏、痹痛除, 共为君药。臣以猪苓、泽泻淡渗湿热于下; 黄芩、苦参苦寒清热燥湿于内; 防风、升麻、葛根辛散祛风湿于外, 臣药相伍除湿、清热、祛风, 使湿热上中下分消, 以增君药之力。佐以苍术苦温, 擅除内外之湿; 白术甘温,

专以健脾燥湿,且与苍术合用补脾之不足而泻湿浊之有余;佐以人参片、当归益气养血,与白术相伍益气补脾之攻益著,使邪去而不伤正;佐入知母苦润而不燥,既可助诸药清热之力,还可防苦燥渗利伤阴之偏;炙甘草为佐使药,既可调和诸药,又可加强人参、白术等益气健脾之功。该方合风药胜湿、清热燥湿、淡渗利湿、健脾燥湿、升阳化湿诸法于一贯,融上、中、下分消湿热法为一体,以期湿去热孤,热清湿解,共奏利湿清热、疏风止痛之功。目前,已有临床研究证实,当归拈痛汤对防治RA有显著疗效,且在临床常与西药合用,能更有效的降低炎症指标、控制病情发展的同时减少不良反应的发生^[13-14]。

细胞凋亡是不再需要或对生物体构成威胁的细胞的遗传程序性死亡,与坏死不同的是,凋亡是为了牺牲特定细胞以获得更大机体益处而做出的合理而积极的决定,正常的细胞凋亡对于维持机体动态平衡至关重要^[15]。细胞凋亡的两大最经典途径分别为,膜受体介导的外在途径和线粒体膜电位改变所介导的内在途径,并且不论何种形式的凋亡,最终都是由半胱天冬氨酸蛋白酶介导细胞骨架或DNA的分解,进而被吞噬细胞所内吞^[16-17]。Fas(也称为CD95, Apo-1, TNFRSF6)是一种细胞表面死亡受体,在其配体FasL的存在下,通过同型DD相互作用的方式与FADD发生互作,FADD再通过死亡效应域(DED)募集并同型结合Caspase-8和凋亡调节因子FADD样白细胞介素-1 β 转化酶抑制蛋白(cFLIP_L),这些蛋白形成死亡诱导的信号复合体(DISK),Caspase-8将直接激活效应者Caspase-3和Caspase-7,或通过加工Bcl-2同源结构域3蛋白Bid(II型信号)间接激活效应者Caspase-3和Caspase-7^[18-19]。Bcl-2家族蛋白参与调节细胞凋亡,家族成员根据其功能及Bcl-2同源性基序进行分类,分为抗凋亡(Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1和A1),促凋亡效应剂(Bax, Bak和Bok)和促凋亡的BH3-only蛋白(Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa和Puma),在接受死亡刺激后,BH3-only蛋白和抗凋亡效应剂失活,Bax和Bak通过同源寡聚化在细胞质线粒体外膜上形成孔,使细胞色素C释放到细胞质中,导致Caspase-9的活化,进而激活执行者Caspase-3和Caspase-7,引发细胞死亡^[20-21]。

异常的细胞凋亡与诸多疾病的发生密切相关,例如在自身免疫性疾病中,细胞凋亡减少,发生凋亡逃避^[22]。近年来研究发现,RA的发展是细胞浸

润和细胞增殖增加以及细胞死亡受损的结果,滑膜组织包括淋巴细胞和成纤维样滑膜细胞(FLS)在内的细胞出现Bax与Bcl-2表达水平失衡,Fas等蛋白表达水平下降、线粒体功能障碍等凋亡逃逸现象,异常增多的细胞沉积在滑膜内,进一步加重炎症和骨质破坏^[23-25]。通过不同的方式调节细胞凋亡水平,是近年来治疗RA的潜在靶点。因此本研究将促进内、外双途径凋亡作为切入点,探讨当归拈痛汤对AA大鼠的作用机制具有重要意义^[26-27]。

本实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠体质量显著减轻的同时足趾关节肿胀明显,滑膜HE染色显示滑膜细胞增生明显,滑膜组织中Fas, FADD, Bax, Caspase-3 mRNA和蛋白水平显著降低,Bcl-2 mRNA和蛋白水平明显升高,表明模型制备成功。经过当归拈痛汤或雷公藤多苷的治疗后,大鼠一般情况和体质量明显改善,足趾肿胀度相对减轻,滑膜组织仅有轻微增生和炎性细胞浸润,滑膜组织Fas, FADD, Bax, Caspase-3 mRNA和蛋白水平明显增加,Bcl-2 mRNA和蛋白水平明显下降,这说明当归拈痛汤可以通过上调内、外在凋亡途径中促凋亡基因表达、抑制抗凋亡基因表达的方式诱导滑膜细胞凋亡,发挥保护AA大鼠滑膜组织的作用。

综上所述,AA大鼠滑膜组织的炎性增生很可能与其凋亡抗性增加相关。当归拈痛汤可能通过激活滑膜组织的Fas受体,促进FADD合成,上调促凋亡蛋白Bax的同时降低抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,进而从内、外双途径引发下游Caspase-3所执行的级联反应,诱导滑膜细胞凋亡,从而阻止AA大鼠滑膜组织的异常增生,使得关节炎大鼠的症状得到改善。因此,本实验提示了当归拈痛汤治疗RA的双途径凋亡机制,为该方的临床应用及多靶点作用机制研究提供了一定的实验依据。然而,近年来也有研究发现,内、外凋亡途径除了有共同的下游效应分子外,二者内部也存在一定的相互作用,例如外在途径的Caspase-8除了会激活Caspase-3以外,还会切割促凋亡蛋白Bid,被切割的Bid作用于线粒体,诱导线粒体损伤,促进细胞色素C, Caspase-9等死亡因子的释放,是外在途径调节内在凋亡途径的一种形式^[28]。所以,当归拈痛汤是否能通过影响内、外在凋亡途径间的相互作用治疗RA,还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] FENG F, QIU H. Effects of Artesunate on chondrocyte

- proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102:1209-1220.
- [2] 邹秀娟,杨玉涛,马武开,等. 中医药对类风湿关节炎滑膜细胞作用机制研究概况[J]. *贵阳中医学院学报*, 2019, 41(6):91-94.
- [3] MA C, CHEN J, LI P. Geldanamycin induces apoptosis and inhibits inflammation in fibroblast-like synoviocytes isolated from rheumatoid arthritis patients [J]. *Cell Biochem*, 2019, 12(9):16254-16263.
- [4] 尚延春,申晟,柴巍巍,等. 当归拈痛汤对类风湿关节炎大鼠滑膜细胞凋亡通路的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(7):1718-1722.
- [5] KNIGHT T, LUEDTKE D, EDWARDS H, et al. A delicate balance-the Bcl-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 162:250-261.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] DENG Q, BAI S, GAO W, et al. Pristimerin inhibits angiogenesis in adjuvant-induced arthritic rats by suppressing VEGFR2 signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2):302-313.
- [10] MYASOEDOVA E, DAVIS J, MATTESON E L, et al. Is the epidemiology of rheumatoid arthritis changing? Results from a population-based incidence study, 1985-2014 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216694.
- [11] 李满意,刘红艳,陈传榜,等. 类风湿关节炎的中医证治[J]. *风湿病与关节炎*, 2020, 9(7):52-56.
- [12] 姜泉,王海隆,巩勋,等. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南[J]. *中医杂志*, 2018, 63(20):1794-1800.
- [13] 蒋华,张艳萍. 当归拈痛汤加减方联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的疗效探讨[J]. *当代医药论丛*, 2020, 18(2):200-201.
- [14] 柳至如. 当归拈痛汤联合西药治疗活动期类风湿关节炎湿热痹阻证患者的临床疗效观察[D]. 兰州:甘肃中医药大学, 2020.
- [15] 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.
- [16] XU X, LAI Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials [J]. *Biosci Rep*, 2019, doi:10.1042/BSR20180992.
- [17] GRILO A L, MANTALARIS A. Apoptosis: a mammalian cell bioprocessing perspective [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(3):459-475.
- [18] LEVOIN N, JEAN M, LEGEMBRE P. CD95 structure, aggregation and cell signaling [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:314.
- [19] GAGNOUX-PALACIOS L, AWINA H, AUDEBERT S, et al. Cell polarity and adherens junction formation inhibit epithelial Fas cell death receptor signaling [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(11):3839-3852.
- [20] CHONG S, MARCHI S, PETRONI G, et al. Noncanonical cell fate regulation by Bcl-2 proteins [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(7):537-555.
- [21] HARTMAN M L, CZYZ M. BCL-w: apoptotic and non-apoptotic role in health and disease [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4):260.
- [22] 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.
- [23] CROFT M, SIEGEL R M. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(4):217-233.
- [24] ZAFARI P, RAFIEI A, ESMAEILI S A, et al. Survivin a pivotal antiapoptotic protein in rheumatoid arthritis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12):21575-21587.
- [25] BARTOK B, FIRESTEIN G S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1):233-255.
- [26] ZHANG Q, LIU J, ZHANG M, et al. Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis [J]. *Biomolecules*, 2019, doi:10.3390/biom9120795.
- [27] 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.
- [28] HUMPHREYS L, ESPONA-FIEDLER M, LONGLEY D B. FLIP as a therapeutic target in cancer [J]. *FEBS J*, 2018, 285(22):4104-4123.

[责任编辑 周冰冰]