

调气汤对大鼠类风湿性关节炎的治疗作用和机制研究

陈李泽成¹ 李金凤¹ 乔锋^{1△}

[摘要] **目的:**研究调气汤对类风湿性关节炎的治疗作用和机制。**方法:**体外培养胶原诱导型关节炎大鼠成纤维样滑膜(CIA-FLS)细胞,将细胞分为对照组、TNF- α 组、调气汤 40, 50 和 60 $\mu\text{g/mL}$ 组, TNF- α (10 ng/mL)处理细胞 30 min,然后用调气汤处理细胞 48 h。检测细胞活力、细胞凋亡和细胞中 Atg5、Beclin-1、LC3- I / II、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR 的蛋白表达,以及细胞上清中 TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-17、IFN- γ 和 IL-10 含量。SPF 级 SD 大鼠(雄性, 30 只)随机分为对照组、模型组、低剂量组(25 mg/kg调气汤的佐剂诱导型关节炎(AIA)大鼠)、中剂量组(50 mg/kg 调气汤的 AIA 大鼠)、高剂量组(100 mg/kg 调气汤的 AIA 大鼠),建立胶原诱导型关节炎(CIA)大鼠模型。采用苏木精-伊红染色观察 AIA 大鼠的组织病理变化,采用 ELISA 法测量大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量。**结果:**与 TNF- α 组比较,调气汤各剂量组细胞活力下降、细胞凋亡增加,且细胞中 Atg5、Beclin-1、LC3- I / II、PI3K、p-mTOR 蛋白表达下调,同时细胞上清中 TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-17、IFN- γ 含量减少,IL-10 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,调气汤低剂量组的组织病理图像中观察到轻度骨侵蚀;调气汤中剂量和高剂量组的组织病理图像显示为正常的关节腔,没有骨侵蚀和滑膜增生;血清上清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**调气汤通过下调 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制 CIA-FLS 细胞增殖和自噬,并促进细胞凋亡和发挥抗炎活性,对类风湿性关节炎具有潜在的治疗活性。

[关键词] 调气汤;类风湿性关节炎;成纤维滑膜细胞;自噬;肿瘤坏死因子

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)02-0006-06

Study on the Efficacy and Mechanism of Tiaoqi Decoction on the Treatment of Rheumatoid Arthritis in Rats

CHEN-LI Zecheng¹ LI Jinfeng¹ QIAO Feng^{1△}

¹ The First Clinical Medical College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi China.

Abstract Objective: To investigate the effect and mechanism of Tiaoqi decoction on the treatment of rheumatoid arthritis. **Methods:** Collagen-induced arthritis fibroblast-like synovial (CIA-FLS) cells of collagen-induced arthritis rats were cultured in vitro. The cells were divided into control group, TNF- α group, Tiaoqi decoction 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ and 60 $\mu\text{g/mL}$ groups. TNF- α (10 ng/mL) was used to treat the cells for 30 min, and then cells were treated with Tiaoqi decoction for 48 h. Cell viability, apoptosis, protein expression of Atg5, Beclin-1, LC3- I / II, PI3K, p-AKT, AKT, p-mTOR in cells was detected. The content of TNF- α , IL-6, TGF- β , IL-17, IFN- γ and IL-10 in the cell supernatant was measured. 30 male SPF SD rats were randomly divided into control group, model group, low-dose group (25 mg/kg Tiaoqi decoction adjuvant induced arthritis (AIA) rats), middle-dose group (50 mg/kg Tiaoqi decoction AIA rats), high-dose group (100 mg/kg Tiaoqi decoction AIA rats). A collagen-induced arthritis (CIA) rat model was established. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of AIA rats, and ELISA was used to measure the contents of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in rat serum. **Results:** Compared with TNF- α group, the cell viability was decreased and the apoptosis was increased in Tiaoqi decoction group. The protein expression of Atg5, Beclin-1, LC3- I / II, PI3K and p-mTOR was down-regulated by Tiaoqi decoction. The content of TNF- α , IL-6, TGF- β , IL-17 and IFN- γ was decreased and the content of IL-10 was increased in the cell

¹ 陕西中医药大学第一临床医学院(陕西 咸阳, 712046)

[△]通信作者 E-mail: qiaofeng7502@163.com

supernatant of Tiaoqi decoction group. Compared with the model group, mild bone erosion was observed in the pathological images of the Tiaoqi decoction low-dose group, the histological study of the Tiaoqi decoction medium-dose and high-dose groups showed normal joint cavity without bone erosion and slippage, the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the serum supernatant were all significantly decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tiaoqi decoction can inhibit the proliferation and autophagy of CIA-FLS cells by down-regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, and promote cell apoptosis and exert anti-inflammatory activity, which has potential therapeutic activity on rheumatoid arthritis.

Keywords: Tiaoqi decoction; rheumatoid arthritis; fibroblast synoviocytes; autophagy; TNF- α

类风湿性关节炎(RA)是一种慢性自身免疫性疾病,表现为滑膜炎及骨和软骨破坏^[1]。成纤维滑膜细胞介导促炎因子和趋化因子的大量表达,直接或间接对骨和软骨造成侵蚀破坏^[2-4]。TNF- α 与类风湿性关节炎密切相关,TNF- α 诱导胶原诱导型关节炎大鼠成纤维样滑膜(CIA-FLS)细胞模型广泛应用于类风湿性关节炎的发病和治疗研究^[5-7]。调气汤含党参、白术、茯苓、陈皮、黄连、丹参、川芎等多味药材,具有活血化瘀、消肿止痛之效,本院采用该方剂长期用于类风湿性关节炎患者治疗,但机制不太清晰,故本实验观察了调气汤对类风湿性关节炎的作用和机制,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD大鼠,SPF级别,30只,雄性,购买于广东医科大学实验动物中心,所有动物实验均经过动物伦理委员会的同意和批准。

1.1.2 细胞培养 胶原诱导型关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞(CIA-FLS)购自上海延生生物技术有限公司(许可证编号为J2900117872001),用DMEM(含10% FBS,100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)培养液于37℃,在5% CO₂细胞培养箱中培养。

1.1.3 试剂 重组大鼠TNF- α 购自Peprotech(美国);Anti-Atg5、Anti-mTOR和Anti-p-mTOR一抗购自Abcam(美国);Anti-AKT和Anti-p-AKT一抗购自Affinity Biosciences(美国);Anti-PI3K、Anti-LC3和Anti-Beclin-1一抗购自MBL(日本);TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-17、IFN- γ 和IL-10大鼠ELISA试剂盒购自武汉中美科技有限公司。

1.1.4 药物 调气汤配方由党参20 g,白术15 g,茯苓15 g,陈皮10 g,清半夏10 g,莱菔子15 g,紫苏叶12 g,砂仁10 g,鸡内金15 g,佩兰15 g,黄连12 g,丹参15 g,川芎15 g,白茅根30 g,酒大黄10 g,土茯苓30 g,川牛膝15 g组成。按比例称取药物,高速中药粉碎机粉碎,加入75%乙醇,浸泡2 h,加热回流提取4 h,过滤收集滤液,65℃减压回收乙醇,旋转蒸发器浓缩成浸膏,真空干燥箱干燥粉碎,使用DMEM高糖培养基配制成10 mg/mL母液,过滤除菌,备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞活力测定 将细胞培养于96孔板,用不同浓度(60,50,40,30,25,20,15,10,5 μ g/mL)自拟调气汤处理细胞48 h,弃掉培养液,用PBS洗涤细胞,随后加入CCK-8试剂孵育60 min,采用酶标仪于450 nm检测吸光度,重复3次。

1.2.2 细胞分组与给药 将细胞分为对照组、TNF- α 组、调气汤40,50和60 μ g/mL组。根据文献报道^[8],细胞点板培养12 h后,用TNF- α (10 ng/mL)处理细胞30 min,然后用调气汤处理细胞48 h,进行后续处理。

1.2.3 细胞凋亡测定 将细胞培养于6孔板,待上述处理结束后,弃掉培养液,用预冷PBS洗涤细胞,随后重悬,并且加入Annexin V-FITC和磷脂酰肌醇(PI)染液孵育15 min,然后使用流式细胞分析仪检测,并用FlowJo 7.6软件分析。

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western Blot)法 根据制造商说明操作提取细胞总蛋白,采用BCA法蛋白定量,加入Loading Buffer(4 \times)于100℃煮沸5 min,然后采用SDS-PAGE电泳分离蛋白,电泳条件:80 V,30 min;120 V,60 min。随后采用100 V,90 min将电泳分离后的蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,用5% BSA室温封闭60 min,洗膜,用一抗(Atg5、Beclin-1、LC3-I/II、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR和GAPDH,按1:1 000稀释)4℃孵育过夜,洗膜,用二抗(HRP标记山羊抗兔IG,按1:10 000稀释)室温孵育90 min,洗膜,用ECL化学发光法显影检测,ImageJ分析灰度值。

1.2.5 胶原诱导型关节炎(CIA)大鼠模型 向大鼠的左后爪足垫注射100 μ L含有10 mg/mL结核分枝杆菌和100 μ g/mL胶原的完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant,CFA)。对照组大鼠注射100 μ L生理盐水,然后将大鼠随机分为5组(每组 $n=6$):对照组(0.5% CMC-Na溶液的正常大鼠),模型组(含0.5% CMC-Na溶液的诱导型关节炎大鼠),低剂量组(20 mg/kg调气汤的佐剂诱导型关节炎(AIA)大鼠),中剂量组(40 mg/kg调气汤的AIA大鼠),高剂量组

(60 mg/kg 调气汤的 AIA 大鼠)。从首次造模开始,灌胃给予调气汤或溶剂,1 次/d,连续 28 d。

1.2.6 组织病理学检测 大鼠处死后,收集踝关节组织并立即固定于多聚甲醛(4%)溶液 24 h,然后置于 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙,每周更换 1 次,连续 4 周,脱钙后乙醇梯度脱水,二甲苯洗涤,并包埋于石蜡中。最后切成 5 μm 薄片,用苏木精-伊红染色,并用光学显微镜观察拍照。

1.2.7 酶联免疫吸附(ELISA)法 根据制造商说明书采用大鼠 ELISA 试剂盒检测细胞上清或血清中 IL-1β、TNF-α、IL-6、TGF-β、IL-17、IFN-γ 和 IL-10 含量。

1.3 统计学方法

所有数据均采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,用 One-Way ANOVA 进行多组数据的检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 CIA-FLS 细胞活力测定结果

与对照组比较, TNF-α 组细胞的活力差异无统计学意义(96.30% ± 1.09% vs 96.50% ± 2.69%, $P > 0.05$)。与 TNF-α 组比较,调气汤 40,50 和 60 μg/mL 组细胞的活力显著下降,差异有统计学意义(分别为 48.70% ± 2.52%, 44.00% ± 1.68% 和 26.00% ±

1.74%, $P < 0.001$),见图 1。

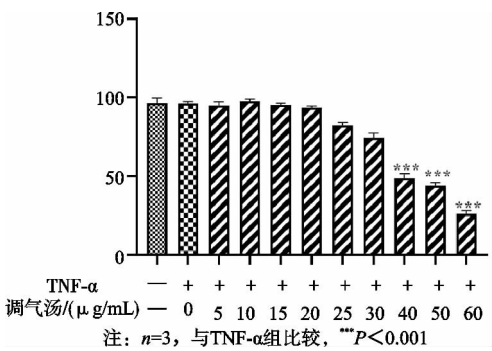


图 1 各组 CIA-FLS 细胞活力测定结果

2.2 各组 CIA-FLS 细胞凋亡测定结果

与对照组比较, TNF-α 组细胞凋亡差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 TNF-α 组比较,调气汤 40,50 和 60 μg/mL 组细胞凋亡显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 各组 CIA-FLS 细胞自噬蛋白的表达量比较

与对照组比较, TNF-α 组细胞中 Atg5、Beclin-1 和 LC3-I/II 表达量显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 TNF-α 组比较,调气汤 40,50 和 60 μg/mL 组细胞中 Atg5、Beclin-1 和 LC3-I/II 表达量显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3 和表 1。

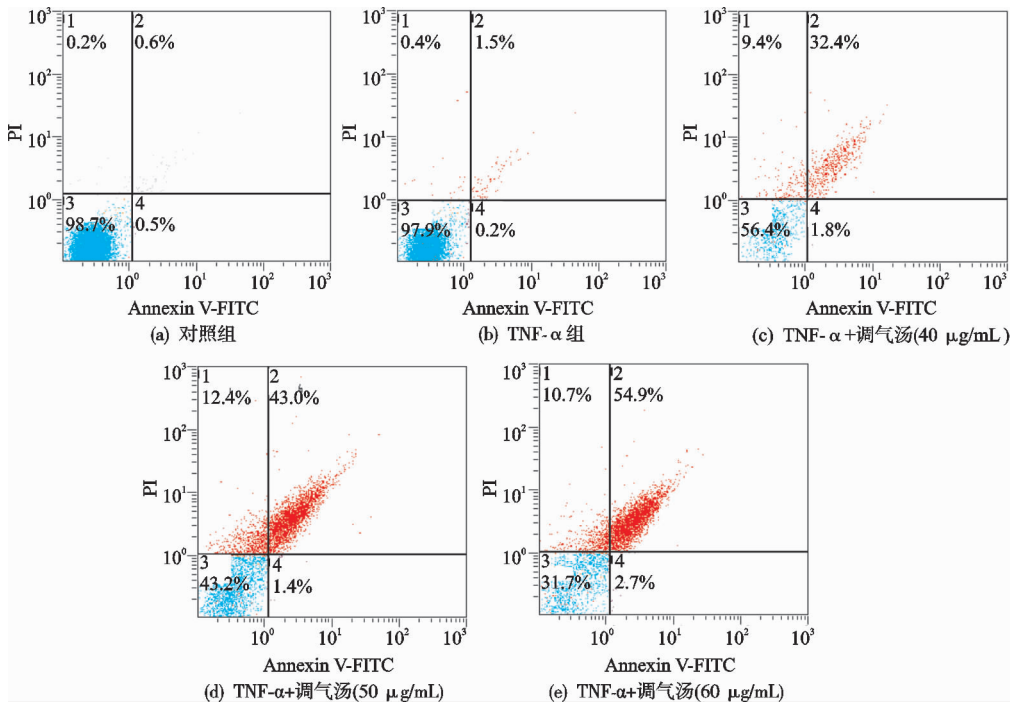


图 2 各组 CIA-FLS 细胞凋亡测定结果($n = 3$)

表 1 各组 CIA-FLS 细胞自噬蛋白的表达量比较($n = 3, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	TNF-α (10 ng/mL)	TNF-α (10 ng/mL) + 调气汤		
			40 μg/mL	50 μg/mL	60 μg/mL
Atg5	1.12 ± 0.020	1.40 ± 0.019 ¹⁾	1.05 ± 0.027 ²⁾	0.82 ± 0.032 ²⁾	0.91 ± 0.037 ²⁾
Beclin-1	0.85 ± 0.017	1.11 ± 0.031 ¹⁾	0.51 ± 0.021 ²⁾	0.51 ± 0.032 ²⁾	0.48 ± 0.026 ²⁾
LC3- I / II	1.11 ± 0.020	1.12 ± 0.043 ¹⁾	0.67 ± 0.030 ²⁾	0.61 ± 0.023 ²⁾	0.64 ± 0.026 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$;2)与 TNF-α 组比较, $P < 0.05$ 。

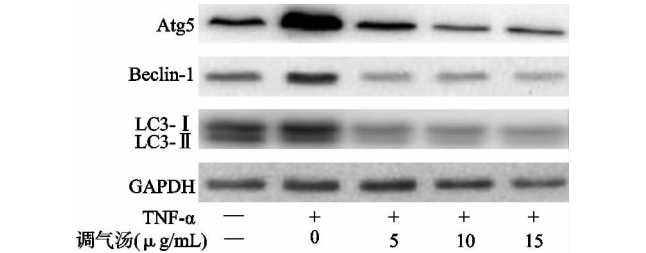


图 3 各组 CIA-FLS 细胞自噬蛋白的表达量比较

2.4 各组 CIA-FLS 细胞中 PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR 蛋白表达量比较

与对照组比较, TNF-α 组细胞中 PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR 表达量显著增加, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与 TNF-α 组比较, 调气汤 40, 50 和 60 μg/mL 组细胞中 PI3K 和 p-mTOR 表达量显著减

少, 差异有统计学意义($P<0.05$), 但 p-AKT/AKT 表达量差异无统计学意义($P>0.05$), 见图 4 和表 2。

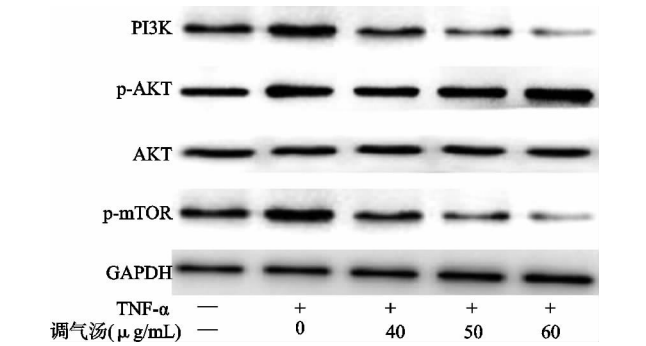


图 4 各组 CIA-FLS 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号蛋白的表达量比较

2.5 各组 CIA-FLS 细胞上清中炎症因子含量比较

表 2 各组 CIA-FLS 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号蛋白的表达量比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	TNF-α (10 ng/mL)	TNF-α (10 ng/mL)+调气汤		
			40 μg/mL	50 μg/mL	60 μg/mL
PI3K	1.01±0.018	1.26±0.031 ¹⁾	0.82±0.028 ²⁾	0.58±0.024 ²⁾	0.29±0.011 ²⁾
p-AKT/AKT	0.84±0.017	1.13±0.021 ¹⁾	1.02±0.012	1.08±0.030	1.17±0.020
p-mTOR	1.02±0.032	1.30±0.030 ¹⁾	0.86±0.015 ²⁾	0.60±0.026 ²⁾	0.28±0.011 ²⁾

注: 1) 与对照组比较, $P<0.05$; 2) 与 TNF-α 组比较, $P<0.05$ 。

与对照组比较, TNF-α 组细胞上清中 TNF-α、IL-6、TGF-β、IL-17 和 IFN-γ 含量均增加, IL-10 含量减少, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与 TNF-α 组比

较, 调气汤 40, 50 和 60 μg/mL 组细胞上清中 TNF-α、IL-6、TGF-β、IL-17 和 IFN-γ 含量均减少, IL-10 含量增加, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 3。

表 3 各组 CIA-FLS 细胞上清中炎症因子含量比较($n=3, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

项目	对照组	TNF-α (10 ng/mL)	TNF-α (10 ng/mL)+调气汤		
			40 μg/mL	50 μg/mL	60 μg/mL
TNF-α	365.9±4.73	620.7±9.60 ¹⁾	557.9±5.63 ²⁾	416.3±8.05 ²⁾	394.0±7.39 ²⁾
IL-6	636.6±6.60	766.0±10.85 ¹⁾	758.1±11.38	671.8±8.96 ²⁾	662.3±8.01 ²⁾
TGF-β	835.2±16.79	1 274.8±51.96 ¹⁾	1 076.5±51.86 ²⁾	1 043.6±42.90 ²⁾	927.5±16.96 ²⁾
IL-10	453.0±11.50	240.4±15.08 ¹⁾	279.8±8.41 ²⁾	344.4±9.09 ²⁾	409.2±6.27 ²⁾
IL-17	109.9±6.23	247.8±12.79 ¹⁾	222.3±9.27 ²⁾	187.9±5.06 ²⁾	176.3±8.45 ²⁾
IFN-γ	422.3±12.70	755.8±16.79 ¹⁾	717.7±9.42 ²⁾	636.8±16.12 ²⁾	628.5±16.35 ²⁾

注: 1) 与对照组比较, $P<0.05$; 2) 与 TNF-α 组比较, $P<0.05$ 。

2.6 各组诱导型关节炎大鼠组织病理图像比较

正常组大鼠关节腔未见滑膜增生和骨损伤; 模型组大鼠组织病理图像显示滑膜增生, 骨质侵蚀, 关节腔狭窄; 调气汤低剂量组的病理图像中观察到轻度骨侵蚀; 调气汤中剂量和高剂量组的组织病理图像显示为正常的关节腔, 没有骨侵蚀和滑膜增生, 见图 5。

2.7 各组诱导型关节炎大鼠血清中炎症因子含量比较

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量均增加, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较, 调气汤低剂量组、中剂量组和高剂量组大鼠血清上清中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量均明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 4。

3 讨论

类风湿性关节炎是一种慢性炎症性自身免疫性关节疾病, 能够引起严重的关节疼痛和功能障碍, 严重影响患者的生活质量, 病理特征表现为滑膜炎及软骨和骨破坏^[9]。目前类风湿性关节炎的治疗主要集中在西药治疗(如细胞因子 TNF-α 抑制剂), 然而可能引起严重感染, 且靶标单一, 因此有必要找到一种更有效的类风湿性关节炎治疗方法。中药治疗类风湿性关节炎源远流长, 疗效明显, 副作用小, 受到研究者的广泛关注。调气汤中党参、白术、茯苓、陈皮和黄连等中药具有温经祛湿和利水渗湿之效, 丹参、川芎、白茅根、酒大黄具有逐瘀通经之效, 土茯苓、川牛膝具有通利关节之效, 各药合用具有活血化瘀、消肿止痛之效。本院采用该

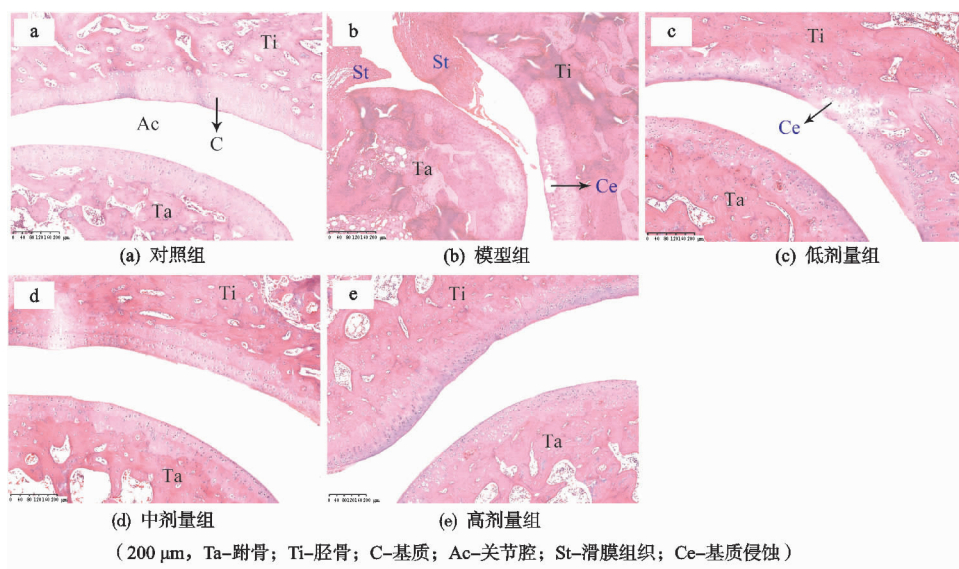


图 5 各组诱导型关节炎大鼠组织病理学比较

表 4 各组诱导型关节炎大鼠血清中炎症因子含量比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$, pg/mL)

项目	对照组	模型组	调气汤		
			低剂量组	中剂量组	高剂量组
TNF- α /(pg/mL)	69.88 \pm 18.42	177.0 \pm 23.45 ¹⁾	126.8 \pm 14.78 ²⁾	122.2 \pm 10.68 ²⁾	123.1 \pm 10.13 ²⁾
IL-6/(pg/mL)	46.79 \pm 20.35	166.7 \pm 24.14 ¹⁾	129.9 \pm 8.94	121.9 \pm 11.62 ²⁾	105.0 \pm 11.08 ²⁾
IL-1 β /(pg/mL)	52.55 \pm 4.79	255.7 \pm 20.31 ¹⁾	212.0 \pm 15.89 ²⁾	174.5 \pm 26.57 ²⁾	141.1 \pm 12.89 ²⁾

注:1)与对照组比较,P<0.05;2)与模型组比较,P<0.05。

方剂长期用于类风湿性关节炎患者治疗,发现可以缓解患者的临床症状,但机制不太明确。本研究发现调气汤能够抑制 CIA-FLS 细胞增殖和自噬,并促进细胞凋亡,同时也具有抗炎活性。另外,调气汤可以缓解佐剂诱导型关节炎大鼠的关节病理损伤,降低血清中炎症因子的水平,对类风湿性关节炎具有潜在的治疗价值。

自噬也称为细胞的自我保护,是一种将细胞内变性蛋白质或坏死物质输送到溶酶体中进行降解和再循环以维持细胞稳态的机制^[10]。正常细胞中自噬水平较低,但饥饿、低氧应激反应、细胞因子刺激或病毒感染能够诱导自噬过度表达。在 TNF- α 诱导的自噬过程中,PI3K(磷酸肌醇 3-激酶)与 Beclin-1 结合以促进吞噬液泡的形成。可溶性自噬体膜微管蛋白的通用标记物 LC3- I 通过泛素化与磷脂酰乙醇胺(PE)共价结合形成 LC3- II,包在自噬体膜上以促进自噬体-溶酶体的形成^[11]。LC3- I 向 LC3- II 的转化是引起自噬的关键步骤,LC3- II / I 的水平与自噬正相关^[12-13]。本研究发现 TNF- α 诱导的 CIA-FLS 细胞相关自噬蛋白 Beclin-1 和 LC3- II / I 的表达水平增加,这之前文献报道相似^[14]。调气汤处理后,CIA-FLS 细胞中相关自噬蛋白 Beclin-1 和 LC3- II / I 的表达水平下调,这些结果表明调气汤能够抑制 CIA-FLS 细胞中 TNF- α 诱导的细胞自噬。

据报道 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对调节细胞自噬具有重要作用,PI3K 是存在于细胞质的一种丝氨酸/苏氨酸激酶,受多种细胞外信号调节(如细胞因子受体)。PI3K 激活磷脂酰肌醇(PI)磷酸化,将底物 PI-4,5-P2(PIP2)转换为 PI-3,4,5-P3(PIP3),作为第二信使募集并激活 PDK1 和 AKT,以调节多种转录因子,如 BAD、NF- κ B、Caspase9、mTOR^[15]。活化的 AKT 使凋亡因子 BAD(Bcl-xl/Bcl-2 相关的死亡启动子)的 Ser136 位点磷酸化,并结合分子伴侣 14-3-3,阻止 BAD-Bcl-xl/Bcl-2 二聚体形成,然后游离 Bcl-xl/Bcl-2 蛋白与 Beclin-1 结合以激活线粒体自噬。同时,AKT(Ser473)磷酸化激活下游的 mTOR(雷帕霉素靶蛋白),从而通过调节核糖体蛋白促进细胞增殖和自噬^[16]。本研究发现与对照组相比,TNF- α 诱导的 CIA-FLS 细胞中 PI3K, p-AKT 和 p-mTOR 水平升高,而 TNF- α 诱导的 CIA-FLS 细胞中 AKT 蛋白水平显著高于对照组。调气汤处理显著抑制 TNF- α 诱导的 PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 表达。因此,上述结果表明调气汤通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白磷酸化来抑制 CIA-FLS 细胞增殖,并抑制自噬。随后,检测了类风湿性关节炎相关的炎症因子 TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-10、IL-17 和 INF- γ 的含量,结果发现调气汤显著减少 TNF- α 诱导的 TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-17 和 INF- γ 含量,证实了调气汤对 TNF- α 诱导的

CIA-FLS 细胞具有抗炎作用。除此之外,本研究还应用体内佐剂诱导型关节炎大鼠模型探究了调气汤的抗类风湿性关节炎活性。

佐剂诱导型关节炎大鼠是一种佐剂诱导性自身免疫性关节炎模型,广泛应用于类风湿性关节炎的体内病理和干预治疗研究^[17-18]。本研究首先发现佐剂诱导型关节炎大鼠表现为关节腔狭窄,出现骨质侵蚀和滑膜增生,血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平明显升高,这说明本研究成功建立了佐剂诱导型关节炎大鼠模型,为后续的药物干预治疗提供了基础。本研究灌胃给予调气汤治疗,发现佐剂诱导型关节炎大鼠的病理损伤(关节腔狭窄、骨质侵蚀和滑膜增生)呈剂量依赖性缓解,并且血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平明显下降,这说明调气汤具有体内抗类风湿性关节炎活性,并与抑制炎症反应有关。

综上所述,本研究表明调气汤可通过下调 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来抑制 CIA-FLS 细胞增殖和自噬,并促进细胞凋亡和发挥抗炎活性,具有抗类风湿性关节炎活性,为调气汤的临床应用提供了理论基础。

参考文献

- [1] SHELEF M A. New relationships for old autoantibodies in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2019, 71(9):1396-1399.
- [2] 宁长青. IL-17 与类风湿性关节炎的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(9):67-69.
- [3] 李磊, 吴昊, 杨安忠, 等. 鼠尾草提取物对类风湿性关节炎的治疗作用及其机制研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(9):6-11.
- [4] IGARASHI H, YAHAGI A, SAIKA T, et al. A pro-inflammatory role for A20 and ABIN family proteins in human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. Immunol Lett, 2012, 141(2):246-253.
- [5] 巩勋, 姜泉, 韩曼, 等. 类风湿关节炎患者临床诊断相关特征研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(5):10-13.
- [6] 贾成艳, 常艳, 魏伟. 成纤维样滑膜细胞能量代谢异常关键分子在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(1):17-21.
- [7] 褚梦瑶, 路月亭. 肿瘤坏死因子 α 在自身免疫性疾病中的表达和临床应用前景[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41

- (3):358-362.
- [8] DENG H M, ZHENG M, HU Z L, et al. Effects of daphnetin on the autophagy signaling pathway of fibroblast-like synoviocytes in rats with collagen-induced arthritis (CIA) induced by TNF- α [J]. Cytokine, 2020, 127:154952.
- [9] 申婕好, 郑绪攀, 张珂, 等. 中药复方联合常规疗法治疗类风湿性关节炎研究进展[J]. 科学养生, 2021, 24(8):288-289.
- [10] 汪吉烽, 王维维, 吴颖慧, 等. TNF- α 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞自噬和增殖的影响及作用机制研究[J]. 浙江医学, 2021, 43(16):1719-1723.
- [11] AKKOC Y, KOCATURK N M, KIG C, et al. Autophagy as a molecular target for cancer treatment[J]. Eur J Pharm Sci, 2019, 134:116-137.
- [12] 郝锋, 刘磊, 桑佳佳, 等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠滑膜组织自噬相关分子表达的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(10):793-798.
- [13] SUN Y, SHEN J, ZENG L, et al. Role of autophagy in di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)-induced apoptosis in mouse Leydig cells[J]. Environ Pollut, 2018, 243(Pt A):563-572.
- [14] LINN Y, BEYER C, GIESSL A, et al. Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72(5):761-768.
- [15] PALANI D, RASOOL M K. Berberine inhibits IL-21/IL-21R mediated inflammatory proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the attenuation of PI3K/Akt signaling pathway and ameliorates IL-21 mediated osteoclastogenesis[J]. Cytokine, 2018, 106:54-66.
- [16] 孟明, 梁红格, 方皓, 等. PI3K/Akt/mTOR 通路与自噬在类风湿关节炎滑膜细胞增生中的意义[J]. 医学研究与教育, 2013, 30(5):69-74.
- [17] 杜成成, 谭余庆, 沈建英, 等. 双氢青蒿素对两种类风湿关节炎模型的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10):48-56.
- [18] EL-SHIEKH R A, EL-MEKKAWY S, MOUNEIR S M, et al. Therapeutic potential of russelioside B as anti-arthritis agent in Freund's adjuvant-induced arthritis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270:113779.

(收稿日期:2022-07-12)