

基于 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡探讨痹通方对类风湿关节炎大鼠的保护作用及机制

齐庆^{1,2}, 孙蓬远^{1,2}, 许诺¹, 关蕊¹, 郑建南², 赵夜雨², 于静², 高明利²

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 探讨痹通方通过调控 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体介导的细胞焦亡途径对类风湿关节炎大鼠的保护作用及机制。方法 将 70 只 SD 大鼠随机分为 7 组: 痹通方低、中、高剂量组分别给予 4.2、8.4、16.8 g/(kg·d) 灌胃, 甲氨蝶呤组按 7.5 mg/(kg·d) 灌胃, MCC950 组 30 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予蒸馏水灌胃。于造模后第 29 天开始灌胃给药, 1 次/d。在末次给药 8 h 后取材, HE 染色法检测各组大鼠踝关节组织形态学变化; ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-18 (IL-18)、白介素-1 β (IL-1 β) 相关指标变化; RT-qPCR 法检测 TNF- α 、IL-18、IL-1 β 、血清单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、巨噬细胞炎症蛋白-1a (MIP-1a) 相关基因水平变化, 免疫组化法检测 IL-1 β , NLRP3 蛋白水平变化, Western Blot 法检测黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)、凋亡相关点样蛋白 (ASC)、半胱氨酸蛋白酶前体-1 (pro-Caspase-1)、Caspase-1、IL-18、IL-1 β 、活化的 gasdermin D (cleaved-GSDMD)、GSDMD、NLRP3。结果 与正常组比较, 模型组大鼠踝关节间隙变窄, 关节软骨表面不规则增厚, 骨质出现轻度破坏, 关节内可见炎性细胞和滑膜组织增生 ($P < 0.01$), 模型组血清 TNF- α 、IL-18、IL-1 β 含量均明显升高 ($P < 0.01$), 模型组 TNF- α 、IL-18、IL-1 β 、MCP-1、MIP-1a mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.01$), 免疫组化法显示模型组 IL-1 β 、NLRP3 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$), WB 法显示模型组 AIM2、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 痹通方高剂量组、甲氨蝶呤组及 MCC950 组上述各项检测指标均得到明显改善 ($P < 0.05$ 或 0.01)。结论 痹通方能够改善大鼠类风湿关节炎状态, 其机制可能与调控 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡途径相关。

关键词: 类风湿关节炎; 痹通方; 细胞焦亡; NLRP3 炎症小体

中图分类号: R289.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2024)09-0179-09

Protective Effect and Mechanism of Bitong Decoction (痹通方) on Rheumatoid Arthritis Rats Based on NLRP3 Inflammasome Mediated Pyroptosis

QI Qing^{1,2}, SUN Pengyuan^{1,2}, XU Nuo¹, GUAN Rui¹, ZHENG Jiannan², ZHAO Yeyu², YU Jing², GAO Mingli²

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China)

Abstract: *Objective* To investigate the protective effect and mechanism of Bitong Decoction (痹通方) on rheumatoid arthritis rats by regulating the pyroptosis pathway mediated by NLRP3 inflammasome. *Methods* Seventy SD rats were randomly divided into 7 groups: Bitong Decoction low-dose, medium-dose and high-dose groups [4.2, 8.4, 16.8 g/(kg·d) by gavage], methotrexate group [7.5 mg/(kg·d) by gavage], MCC950 group [30 mg/(kg·d) by gavage]. The normal group and model group were given distilled water by gavage. On the 29th day after modeling, the drug was administered by gavage once a day. HE staining was used to detect the morphological changes of ankle joints in each group at 8 h after the last administration. The changes of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-18 (IL-18) and interleukin-1 β (IL-1 β) related indexes were detected by ELISA. The levels of TNF- α , IL-18, IL-1 β , monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1a (MIP-1a) related genes were detected by RT-qPCR. The protein levels of IL-1 β and NOD like receptor heat protein domain associated protein 3 (NLRP3) were detected by immunohistochemistry. Melanoma deficiency factor 2 (AIM2), apoptosis related point like protein (ASC), cysteine protease precursor 1 (pro-Caspase-1), Caspase-1, IL-18, IL-1 β , cleaved-GSDMD, GSDMD and NLRP3 were detected by Western Blot. *Results* Compared with those of the normal group, the ankle joint

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1705202); 辽宁省教育厅项目(L201916)

作者简介: 齐庆(1984-), 女, 辽宁营口人, 副主任医师, 硕士, 研究方向: 中西医结合临床治疗风湿免疫性疾病。

通讯作者: 高明利(1960-), 男, 辽宁沈阳人, 主任医师, 博士研究生导师, 硕士, 研究方向: 中西医结合临床治疗风湿免疫性疾病。

space of the model group was narrowed, the surface of articular cartilage was irregularly thickened, the bone was slightly destroyed, the inflammatory cells and synovial tissue hyperplasia were observed in the joint ($P < 0.01$), and the serum contents of $\text{TNF} - \alpha$, $\text{IL} - 18$ and $\text{IL} - 1\beta$ in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). The mRNA expressions of $\text{TNF} - \alpha$, $\text{IL} - 18$, $\text{IL} - 1\beta$, $\text{MCP} - 1$ and $\text{MIP} - 1\alpha$ in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Immunohistochemistry showed that the protein expressions of $\text{IL} - 1\beta$ and NLRP3 in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Western Blot method showed AIM2 , ASC , $\text{pro} - \text{Caspase} - 1$, $\text{Caspase} - 1$, $\text{IL} - 18$ and $\text{IL} - 1\beta$ in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with those of the model group, the above indexes in the Bitong Decoction high-dose group, methotrexate group and MCC950 group were significantly improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Bitong Decoction can improve the state of rheumatoid arthritis in rats, and its mechanism may be related to the regulation of NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis pathway.

Keywords: rheumatoid arthritis; Bitong Decoction(痹通方); pyroptosis; NLRP3 inflammasome

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种病因不明的多因素自身免疫性疾病,主要影响关节,可出现关节外表现。由于其复杂性,且目前无法完全阐明其病理生理机制,防治RA需要多学科交叉研究^[1]。自身免疫性风湿性疾病的异质组还包括系统性红斑狼疮、干燥综合征、脊柱关节炎、银屑病关节炎等,它们的体征和症状与RA相似,鉴别诊断必不可少,尽管已经提出了许多生物分子机制,但RA的病因尚未完全阐明^[2]。细胞焦亡这一概念在被定义为一种细胞程序性死亡,典型的焦亡是由炎性体组装介导的,其中NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3($\text{NOD} - \text{like receptor thermal protein domain associated protein 3}$, NLRP3)炎症小体就是其中之一^[3],目前的研究已发现细胞焦亡与神经系统疾病、感染性疾病、自身免疫性疾病、心血管疾病和肿瘤等疾病有着密切的关系^[4-7]。中医药是中华民族传承千百年的宝藏,其对RA的防治已在临床上被证明颇有疗效,RA在中医中可归为“痹证”的范畴,《黄帝内经》曰:“风寒湿三气杂至,合而为痹”,若根据风寒湿三邪还可分为行痹、痛痹和着痹^[8]。然而,中医药在防治RA方面也存在靶向不明确、作用机制不清等问题。因此,本研究通过建立大鼠RA模型,观察痹通方通过调控 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡途径改善RA的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠70只,体质量180~200 g,购买于辽宁长生生物科技有限公司,许可证号:SCXK(辽)2020-0002,饲养于辽宁中医药大学动物实验中心,予普通动物饲料喂养,温度湿度适宜,1周后进行实验。

1.1.2 实验药品 痹通方组方药材购买于辽宁中医药大学附属医院中药局,由桃仁15 g,红花15 g,防风15 g,川芎15 g,牛膝20 g,鸡血藤25 g,白芍15 g,熟地黄20 g,当归20 g等9味药材组成。甲氨蝶呤购于辽宁中医药大学附属医院西药局。

1.1.3 主要试剂及设备 MCC950 购于深圳欣博盛生物科技有限公司,ELISA试剂盒肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF} - \alpha$)、白介素-18($\text{IL} - 18$)、白介素-1 β ($\text{IL} - 1\beta$)购于上海酶联生物科技有限公司, $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 18$ 、 $\text{IL} - 1\beta$ 、血清单核细胞趋化蛋白-1($\text{MCP} - 1$)、巨噬细胞炎性蛋白-1 α ($\text{MIP} - 1\alpha$)购于武汉三鹰生物科技有限公司,黑素瘤缺乏因子2(AIM2)、凋亡相关点样蛋白(ASC)、 $\text{pro} - \text{Caspase} - 1$ 、 $\text{Caspase} - 1$ 、 $\text{IL} - 18$ 、 $\text{IL} -$

1 β 、活化的gasdermin D(cleaved-GSDMD)、GSDMD、 NLRP3 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司。Fast King RT反转录试剂盒购于北京天根生化科技有限公司(批号:R6620);SYBR Select Master Mix 购于美国Life Technology公司(批号:1710054)。

正置显微镜(OLYMPUS, BX53),荧光显微镜(日本, Nikon),天能5200凝胶成像仪(上海,天能),CFX96Touch荧光定量qPCR检测系统(美国,BIO-RAD)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠类风湿关节炎制备及分组 参照文献方法^[9],采用牛Ⅱ型胶原溶于冰醋酸中,初次免疫时与弗氏佐剂25 mL反复乳化,制成含牛Ⅱ型胶原 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的完全弗氏佐剂乳化液。背部3点、尾根部及右后足掌皮内注射胶原乳化液各0.1 mL,总量0.5 mL。在初次免疫动物1周后进行加强免疫,给予大鼠尾根部皮内注射含有牛Ⅱ型胶原 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胶原乳化液0.2 mL/只,建立CIA大鼠模型,正常组大鼠在相应的时间点和部位,以相同的方式注射等体积生理盐水。28 d后对各组大鼠进行相应处理,随机分为7组。①正常组胃饲等量蒸馏水;②模型组胃饲等量蒸馏水;③痹通方低剂量组按 $4.2 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 给药;④痹通方中剂量组按 $8.4 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 给药;⑤痹通方高剂量组按 $16.8 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 给药;⑥甲氨蝶呤组按 $7.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃;⑦MCC950组 $30 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃;于造模后第29天开始灌胃给药,1次/d。在末次给药8 h后,腹主动脉取血, 4°C 3000 r/min,离心10 min取血清。将4组血清 56°C 水浴30 min,无菌滤器过滤除菌、分装保存备用。踝关节及滑膜组织取材后一半多聚甲醛固定,一半组织 -80°C 冻存备用。

1.2.2 HE染色法检测各组大鼠踝关节形态学变化 大鼠踝关节石蜡包埋后切成 $4 \mu\text{m}$ 厚的薄片,贴于载玻片后烤片,然后苏木精伊红染色,1%盐酸乙醇分化,乙醇梯度脱水,透明,中性树胶封片,显微镜下观察各组大鼠踝关节组织形态学变化。

1.2.3 ELISA法检测各组大鼠血清 $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 18$ 、 $\text{IL} - 1\beta$ 水平 血清取出放置为室温后,进行ELISA检测 $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 18$ 、 $\text{IL} - 1\beta$ 含量,具体操作按照试剂盒说明进行。

1.2.4 RT-qPCR检测各组大鼠 $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 18$ 、 $\text{IL} - 1\beta$ 、 $\text{MCP} - 1$ 、 $\text{MIP} - 1\alpha$ mRNA水平 按照Trizol试剂盒说明提取总RNA,核酸蛋白分析仪测定RNA纯度。逆转录获取扩增前cD-

NA。以2 μL cDNA 为模板进行扩增,依次按照95 ℃ 3 min,1个循环;95 ℃15 s,62 ℃20 s,72 ℃5 s,32个循环;72 ℃7 min,1个循环。按2^{-ΔΔCt}法进行定量分析,实验所需引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

表1 引物列表

基因	上游引物	下游引物
TNF-α	F-GATCGGTCCCAACAAGGAGG	R-GCTTGGTGCTTGTCTACGAC
IL-18	F-TGCCTGATATCGACCGAAGACGCCAAC	R-ACAGATAGGGTCACGCCAGTCTCT
IL-1β	F-GGCTTCTCTGTGCAAGTGTCT	R-TCTGGACAGCCCAAGTCAAG
MCP-1	F-ATAGCAGCCACCTTCATTC	R-GCTTCTTTGGGACACTTGCT
MIP-1a	F-CTGCCCTTGCTGTCTCTCTCTG	R-CTGCCGGCTTCGCTTGTTA
GAPDH	F-AGTGCCAGCTCTGCTCTATA	R-GCGGAGATGATGACCCITT

1.2.5 免疫组化法检测大鼠 IL-1β、NLRP3 的蛋白表达 取滑膜组织样本,石蜡包埋、切片,染色,切片温水展开,干燥后二甲苯及梯度乙醇脱蜡,过氧化氢孵育,PBS 洗涤后于高压锅内进行抗原修复,冷却至室温,血清封闭,一抗、二抗孵育,加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液孵化,PBS 洗涤、显色,苏木素复染,封片,镜检后分析 IL-1β、NLRP3 抗原蛋白的表达。

1.2.6 Western blot 法检测大鼠 AIM2、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、IL-18、IL-1β、cleaved-GSDMD、GSDMD、NLRP3 的蛋白表达 取各组大鼠滑膜组织,裂解、匀浆后取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对大鼠组织进行蛋白浓度的测定,加入适量的稀释液和上样缓冲液,变性后配胶待用,取样品 20 μg 上样,电泳、转膜、封闭,TBST 洗膜,加入一抗稀释液稀释 AIM2、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、IL-18、IL-1β、cleaved-GSDMD、GSDMD、NLRP3、GADPH(1:1000)4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,加入二抗孵育,TBST 洗膜,加 ECL 工作液,全自动成像分析仪下进行曝光成像。使用 Image J 软件进行统计分析。

1.3 统计学方法

实验数据均为计量资料数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graph-Pad Prism 8.0 软件统计分析。两组比较采用 *t* 检验,多组间比较首先进行单因素方差齐性分析。若方差齐,组间比较采用 LSD 法检验,若方差不齐,组间比较采用 Tamhane 法检验,*P* < 0.05 或 0.01 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠踝关节病理学改变

正常组大鼠踝关节间隙正常,软骨表面光滑完整,未见明显滑膜组织增生、炎性细胞浸润以及明显骨质破坏。模型组大鼠踝关节间隙变窄,关节软骨表面不规则增厚,骨质出现轻度破坏,关节内可见炎性细胞和滑膜组织增生。与模型组相比,痹通方高剂量组、甲氨蝶呤组和 MCC950 组可见关节间隙有所恢复,滑膜组织与正常组相似,滑膜细胞轻度增生,少量炎性细胞浸润。见插页 XLIII 图 1。

2.2 各组大鼠血清 TNF-α、IL-18、IL-1β 含量比较

与正常组大鼠相比,模型组大鼠血清的 TNF-α、IL-18、IL-1β 含量均明显升高(*P* < 0.01);与模型组相比,治疗各组的血清 TNF-α、IL-18、IL-1β 含量显著降低(*P* < 0.05 或 < 0.01),其中痹通方高剂量组、甲氨蝶呤组及 MCC950 组效果更加显著。见插页 XLIV 图 2。

2.3 各组大鼠 TNF-α、IL-18、IL-1β、MCP-1、MIP-1a mRNA 表达水平

与正常组大鼠相比,模型组大鼠滑膜组织的 TNF-α、IL-18、IL-1β、MCP-1、MIP-1a mRNA 表达均明显升高(*P* < 0.01);与模型组相比,治疗各组滑膜组织的 TNF-α、IL-18、IL-1β、MCP-1、MIP-1a mRNA 表达均显著降低(*P* < 0.05 或 < 0.01),其中痹通方高剂量组、甲氨蝶呤组及 MCC950 组效果更加显著。见插页 XLV 图 3。

2.4 免疫组化法检测各组大鼠 IL-1β、NLRP3 蛋白表达水平

与正常组大鼠相比,模型组大鼠滑膜组织的 IL-1β、NLRP3 蛋白表达水平均明显升高(*P* < 0.01);与模型组相比,治疗各组滑膜组织的 IL-1β、NLRP3 蛋白表达水平均显著降低(*P* < 0.01),其中痹通方高剂量组、甲氨蝶呤组及 MCC950 组效果更加显著,见插页 XLV 图 4-图插页 XLVI 图 5。

2.5 大鼠 AIM2、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、IL-18、IL-1β、cleaved-GSDMD、GSDMD、NLRP3 的蛋白表达

与正常组大鼠相比,模型组大鼠滑膜组织的 AIM2、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、IL-18、IL-1β、cleaved-GSDMD、GSDMD、NLRP3 蛋白表达水平均明显升高(*P* < 0.01);与模型组相比,治疗各组滑膜组织的 AIM2、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、IL-18、IL-1β、cleaved-GSDMD、GSDMD、NLRP3 蛋白表达水平均显著降低(*P* < 0.01),其中痹通方高剂量组、甲氨蝶呤组及 MCC950 组效果更加显著。见插页 XLVII 图 6。

3 讨论

RA 被定义为与慢性炎症过程相关的全身性自身免疫性疾病,可损害人体的关节和关节外器官,其中包括心脏、肾脏、肺、消化系统、眼睛、皮肤和神经系统等^[10-11]。RA 的影响因素复杂,可能由遗传、环境和随机因素等多种原因导致^[12]。有研究表明,RA 的遗传风险估计约为 50%^[13-14]。类风湿因子和抗瓜氨酸化蛋白抗体的存在与否则可将 RA 分为两种类型(血清阳性和血清阴性),并且所涉及的危险因素之间也存在差异^[15-16]。尽管 RA 的病理生理机制尚未完全阐明,但 RA 的关节软骨侵蚀和破坏是其重要的表现,并与细胞因子和症网络有关,而细胞焦亡的过程与细胞质膜破坏有关,炎性介质 IL-1 和 IL-18 等被释放,这些炎症介质的大量释出是触发 RA 的关键因素之一^[17]。

细胞的死亡被认为是一个必要的生物过程,是生物体发育及其生存的基础。该过程包括细胞凋亡和焦亡。焦亡是一种细胞死亡的程序,其过程是通过炎性半胱天冬酶诱导的,随后导致细胞死亡,坏死和炎性的性质,并导致炎症性疾病^[18]。炎症介质的激活和释放导致关节炎症性介质下注的过程,并导致关节的破坏。与此同时,也有研究发现在血清和滑膜液中均观察到 IL-18 和 IL-1β 水平的升高,这就体现了炎症小体在 RA 中起到关节的破坏性作用^[13]。模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)在免疫系统具有多种作用,除了 c 型凝集素受体外,还含有跨膜 toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)。它由视黄酸诱导基因受体和 nod 样受体,等细胞质蛋白组成。PPRs 通过终止复杂的转录重编程来启动信号通路过程与细胞相关,因此通过炎症激活 Caspase-1^[19]。在病原体、细菌等信号的刺激下,细胞内的 NLRs 识别这些信号,通过衔接凋亡相关斑点样蛋白与 pro-Caspase-1 结合,激活 Caspase-1,活化的 Caspase-1 一方面切割 GasderminD 蛋白

(GSDMD),形成GSDMD氮端和碳端,GSDMD氮端就会和细胞膜上的磷脂蛋白结合,形成孔洞,释放内容物,诱导焦亡发生;另一方面,活化的Caspase-1对IL-1 β 和IL-18的前体进行切割,形成有活性的IL-1 β 和IL-18,并释放到胞外,造成炎症反应^[18,21-22]。NLRP3刺激导致炎症小体快速激活,IL-18分泌增多,通过NLRP3介导途径促进细胞焦亡的发生^[22]。因此,如何NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡对于防治RA的发展至关重要。

类风湿性关节炎归属于中医痹证。沈丕安教授认为本病多因风、寒、湿、热、痰、瘀、毒、虚等邪气侵袭机体^[23]。气血痹阻,运行不畅,导致筋脉关节失于濡养,不通则痛,乃本虚标实之证,病情发展若迁延日久亦致不荣则痛。由于该病无法根治,临床治疗中常选用抗风湿类药物如甲氨蝶呤,柳氮磺吡啶等,或者一些非甾体消炎药,糖皮质激素等缓解疼痛等症状,改善病情^[24]。故中医疗法常以祛风除湿、活血化瘀、通络止痛等治法为主,患者耐受度更高,不良反应更小。“瘀血”既作为常见致病因素引发此病,更作为病理产物痹阻脉络,贯穿病程^[25]。本药物中,桃仁、红花、活血祛瘀止痛,防风、川芎养血行气、祛瘀止痛,牛膝、鸡血藤舒经活络,白芍、熟地黄、当归与川芎取四物汤补血活血之意,全方共奏活血化瘀、通络止痛之效。

本研究结果显示,与正常组相比,模型组大鼠踝关节间隙变窄,关节软骨表面不规则增厚,骨质出现轻度破坏,关节内可见炎性细胞和滑膜组织增生,模型组血清TNF- α 、IL-18、IL-1 β 含量均明显升高,模型组TNF- α 、IL-18、IL-1 β 、MCP-1、MIP-1 α mRNA表达均明显升高,免疫组化法显示模型组IL-1 β 、NLRP3蛋白表达水平均明显升高,WB法显示模型组AIM2、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、IL-18、IL-1 β 升高,提示NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡途径所造成的炎症介质TNF- α 、IL-1 β 和IL-18的产生,这些产物广泛地影响着RA相关炎症发生与发展,加重加速其病情的进展。痹通方高剂量组可显著改善模型组大鼠的关节炎症损伤,明显改善炎症及细胞焦亡相关指标的表达,提示痹通方可改善大鼠类风湿关节炎状态,其机制可能与调控NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡途径相关。本次实验未进行体外细胞实验的相关研究,尚有待进行进一步深入探究。

参考文献

[1] CHEN J Q, MAN S M. Rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018(4):18002.

[2] HAMMAKER D, FIRESTEIN G S. Epigenetics of inflammatory arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2018, 30(2): 188-196.

[3] SHI J J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665.

[4] SONG L M, PEI L, YAO S L, et al. NLRP3 inflammasome in neurological diseases, from functions to therapies[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 63.

[5] SHEN H H, YANG Y X, MENG X, et al. NLRP3: a promising therapeutic target for autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2018, 17(7): 694-702.

[6] JIA C, CHEN H W, ZHANG J, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 67: 311-318.

[7] PEZUK J A. Pyroptosis in combinatorial treatment to improve cancer

patients' outcome, is that what we want? [J]. EBioMedicine, 2019, 41: 17-18.

[8] 郭苏健,姚博,赵延龙,等. 类风湿关节炎的中医药治疗优势[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(7): 1769-1771.

[9] MIYOSHI M, LIU S. Collagen-induced arthritis models[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1868: 3-7.

[10] CONFORTI A, DI COLA I, PAVLYCH V, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(2): 102735.

[11] FIGUS F A, PIGA M, AZZOLIN I, et al. Rheumatoid arthritis: extra-articular manifestations and comorbidities[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(4): 102776.

[12] ROBERTS-THOMSON P J, JONES M E, WALKER J G, et al. Stochastic processes in the causation of rheumatic disease[J]. J Rheumatol, 2002, 29(12): 2628-2634.

[13] PETROVSKÁ N, PRAJZLEROVÁ K, VENCovsky J, et al. The pre-clinical phase of rheumatoid arthritis: from risk factors to prevention of arthritis[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(5): 102797.

[14] MACGREGOR A J, SNIEDER H, RIGBY A S, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(1): 30-37.

[15] VANDER HELM-VAN M A, VERPOORT K N, BREEDVELD F C, et al. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(4): 1117-1121.

[16] DING B, PADYUKOV L, LUNDSTRÖM E, et al. Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(1): 30-38.

[17] CHADHA S, BEHL T, BUNGAU S, et al. Mechanistic insights into the role of pyroptosis in rheumatoid arthritis[J]. Curr Res Transl Med, 2020, 68(4): 151-158.

[18] MAN S M, KANNEGANTI T D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2016, 16: 7-21.

[19] BURSKA A, BOISSINOT M, PONCHEL F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 545493.

[20] WANG J Z, HU M J, WANG J, et al. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity[J]. Science, 2019, 364(6435): eaav5870.

[21] CHEN J Q, CHEN Z J. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation[J]. Nature, 2018, 564(7734): 71-76.

[22] SWANSON K V, DENG M, TING J P Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(8): 477-489.

[23] 赵镇玺,沈丕安,陈薇薇. 7+1理论合沈氏羌活地黄汤辨治类风湿关节炎[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(11): 39-43.

[24] 郑雪霞,王强,许舒迪,等. 林昌松治疗类风湿关节炎经验[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(5): 965-969.

[25] 王帆帆,刘健,方妍妍,等. 中药治疗类风湿关节炎血瘀证的文献数据挖掘和Meta分析[J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(7): 31-37, 46.