

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2024.z20240522001

基于外泌体微小 RNA 研究化癥强肾通痹方联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的作用机制

牛运宝¹, 梁华胜², 萧韵婷¹, 吴晓东², 陈向红², 王茂杰^{2,3,4}, 梅丽艳², 高恺昕², 黄闰月^{2,3,4}, 陈秀敏^{2,3,4,5}

1. 广州中医药大学第二临床医学院(广东 广州 510120); 2. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)风湿科(广东 广州 510120); 3. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)省部共建中医湿证国家重点实验室(广东 广州 510120); 4. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)粤港澳中医药与免疫疾病研究联合实验室(广东 广州 510120); 5. 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)广东省中医药防治难治性慢病重点实验室(广东 广州 510120)

【摘要】 目的 从血清外泌体微小 RNA(miRNA) 角度研究化癥强肾通痹方联合甲氨蝶呤(MTX) 治疗类风湿关节炎(RA) 的作用机制, 为 RA 的临床治疗及新药研发提供思路。方法 选取 12 例采用化癥强肾通痹方联合 MTX 治疗后疗效较为明显的 RA 患者, 收集治疗前后的全血样本, 采用外泌体提取试剂盒提取血清外泌体, 借助外泌体 miRNA 表达测序技术检测患者血清外泌体 miRNA 表达谱, 通过数据库预测差异表达 miRNA 的靶基因, 然后利用基因本体(GO) 和京都基因和基因组百科全书(KEGG) 富集分析解析差异表达 miRNA 的靶基因功能。结果 ①共构建 24 个 miRNA 文库, 测序结果显示, 治疗前后 RA 患者血清外泌体中有 19 个 miRNA 表达下调($P<0.05$)、1 个 miRNA 表达上调($P<0.05$)。②实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR) 法检测结果显示, 经治疗, RA 患者血清外泌体中 hsa-miR-15b-3p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-199b-5p、hsa-miR-223-5p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-589-5p、hsa-miR-619-5p 相对表达量降低($P<0.05$), 与 miRNA 测序结果一致。③靶基因预测涉及 SMAD 家族成员 2 基因(SMAD2)、成纤维细胞生长因子受体 3 基因(FGFR3)、C-C 基序趋化因子配体 2 基因(CXCL2) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Pim-1 原癌基因(PIMI) 等。④大多数靶基因富集的通路包括机体系统、代谢、人类疾病和环境信息处理等, 均与骨和软骨的破坏以及炎症有关。结论 化癥强肾通痹方联合 MTX 治疗 RA 的作用机制可能与调节血清外泌体 miRNA 及其靶基因来预防 RA 诱导的骨和软骨破坏以及炎症有关。

【关键词】 类风湿关节炎; 外泌体; 微小 RNA; 中药复方; 甲氨蝶呤; 中西医结合疗法

Mechanism of Huayu Qiangshen Tongbi Decoction combined with methotrexate in treatment of rheumatoid arthritis based on exosomal microRNA research

NIU Yunbao¹, LIANG Huasheng², XIAO Yunting¹, WU Xiaodong², CHEN Xianghong², WANG Maojie^{2,3,4}, MEI Liyan², GAO Kaixin², HUANG Runyue^{2,3,4}, CHEN Xiumin^{2,3,4,5}

1. The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Rheumatology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou, Guangdong 510120, China; 3. State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou, Guangdong 510120, China; 4. Guangdong-Hong

Kong-Macau Joint Lab on Chinese Medicine and Immune Disease Research, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou, Guangdong 510120, China; 5. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Refractory Chronic Diseases, The Second Affiliated

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274421); 广东省自然科学基金项目(2024A1515012464, 2021A1515011477); 广东省中医院院内专项(MB2020KF03, YN2023MB15)

[作者简介] 牛运宝, 男, 硕士研究生, 主要从事中西医结合内科临床与研究工作

[通信作者] 陈秀敏, 副研究员, 硕士研究生导师;

E-mail: candy011011@gzucm.edu.cn

Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou, Guangdong 510120, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of the Huayu Qiangshen Tongbi Decoction (HQTD) combined with methotrexate (MTX) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) from the perspective of serum exosomal microRNAs (miRNAs), providing new insights into the clinical treatment of RA and the development of new drugs. **Methods** Twelve RA patients who exhibited significant therapeutic responses to HQTD combined with MTX were selected for the study. Whole blood samples were collected from each patient both before and after treatment. Serum exosomes were isolated using commercially available exosome extraction kits, and the exosomal miRNA expression profiles were analyzed via miRNA sequencing technology. Differentially expressed miRNAs were identified, and their target genes were predicted using established databases. Functional enrichment analyses, including Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), were performed to elucidate the biological functions of the target genes associated with the differentially expressed miRNAs. **Results** ① A total of 24 miRNA libraries were successfully constructed. Sequencing analysis revealed that 19 miRNAs were significantly downregulated ($P < 0.05$) and 1 miRNA was upregulated ($P < 0.05$) in the serum exosomes of RA patients after treatment. ② Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) confirmed that after treatment, the relative expression levels of *hsa-miR-15b-3p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-199b-5p*, *hsa-miR-223-5p*, *hsa-miR-532-5p*, *hsa-miR-589-5p*, and *hsa-miR-619-5p* in serum exosomes of RA patients were reduced ($P < 0.05$), aligning with the miRNA sequencing results. ③ Target gene predictions identified genes such as SMAD family member 2 (*SMAD2*), fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*), C-C motif chemokine ligand 2 (*CXCL2*), and serine/threonine-protein kinase Pim-1 proto-oncogene (*PIMI*). ④ Most of the pathways enriched for these target genes were associated with body systems, metabolism, human diseases, and environmental information processing, implicating bone and cartilage destruction and inflammation in the disease process. **Conclusion** The mechanism by which HQTD combined with MTX treats RA may involve the regulation of serum exosomal miRNAs and their target genes, potentially preventing RA-induced bone and cartilage destruction and inflammation.

Keywords: rheumatoid arthritis; exosomes; microRNA; traditional Chinese medicine compound; methotrexate; integrated Chinese and Western medicine therapy

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性进行性自身免疫性疾病,其特征表现为持续性的滑膜炎,然后出现骨和软骨破坏,最终导致关节畸形,甚至出现永久性残疾,预期寿命缩短^[1-4]。目前治疗 RA 的药物主要包括传统合成改善病情抗风湿药物(csDMARDs)[甲氨蝶呤(MTX)、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、羟氯喹],生物改善病情抗风湿药物(bDMARDs)[阿巴西普、阿达木单抗、培塞利珠单抗(希敏佳)等],以及靶向合成改善病情抗风湿药物(tsDMARDs)(巴瑞替尼、非戈替尼、枸橼酸托法替布、乌帕替尼)^[2],其中一线治疗药物 MTX 因其确切的疗效和良好耐受性被临床广泛使用,但也存在许多毒副作用,故常需与其他药物联合使用^[4-7]。中医药治疗 RA 历史悠久,其有效性和耐受性值得肯定^[8-9]。化瘀强肾通痹方是课题组治疗 RA 的常用中药复方,与 MTX 联用,疗效满意^[10-12]。然而,化瘀强肾通痹方联合 MTX 治疗 RA 的作用机制尚不清楚。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是长度约为 18~22 个核苷酸的内源性非编码 RNA,可通过降解或抑制靶向 mRNA 翻译发挥重要的调控作用^[13-15]。研究^[14]发现,RA 患者的滑膜组织、血液、免疫细胞或滑膜液中存在多种异常表达的 miRNA,包括 *miR-146a*、*miR-155* 和 *miR-223* 等。越来越多的证据表明 miRNA 参与 RA 的发病和治疗。本课题组前期研究^[11]发现,化瘀强肾通痹方对 RA 有较好的治疗效果,对 *lncRNA uc.477* 和

miR-19b 有调节作用,该方还能够通过上调 *miR-125b* 减轻 RA 的临床症状,并通过靶向酪蛋白激酶 2(CK2)抑制核因子- κ B(NF- κ B)诱导的炎症^[15]。外泌体被认为是 RA 患者体内传递信息的重要载体,其内含的 miRNA 包含调节受体细胞功能的重要信息。研究^[16]发现,外泌体可以促进特异性炎症标志物的表达,也可以相互作用形成蛋白质网络,诱导 RA 发病所必需的信号通路。RA 患者滑膜外泌体含有瓜氨酸化肽,可作为抗原决定簇并参与 RA 自身免疫^[17]。此外,在 RA 患者中,外泌体可以通过调节免疫细胞活性发挥免疫抑制作用^[18]。本研究首次通过外泌体 miRNA 表达测序技术研究化瘀强肾通痹方联合 MTX 对 RA 患者血清外泌体 miRNA 表达谱的影响,并采用基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析解析差异表达 miRNA 的靶基因功能,寻找该中西医联合疗法发挥疗效的生物学标志物,研究其治疗 RA 的作用机制,以期对 RA 的临床治疗及新药研发提供思路。

1 材料与方法

1.1 病例选择

1.1.1 病例来源 本研究收集的病例均为 2016 年 8 月至 2018 年 9 月就诊于广东省中医院风湿科门诊的 RA 患者,依据以下纳入标准与排除标准进行筛选,根据患者意愿签订知情同意书。本研究方案经广东省中医院伦理审查委员会批准(批准号:B2016-076-01)。

1.1.2 纳入标准 ①符合RA的诊断标准^[19-20];②基于C反应蛋白水平的28个关节疾病活动度评分(DAS28-CRP评分)^[21]>3.2分;③在过去4周内稳定服用非甾体抗炎药(NSAID),或在过去1周内未服用过NSAID;④在过去4周内未服用改善病情抗风湿药物(DMARDs),或虽服用过DMARDs,但在本研究开始之前已完成药物清除;⑤口服糖皮质激素者,剂量必须在入组前至少4周内稳定至相当于 ≤ 10 mg/d泼尼松的剂量。

1.1.3 排除标准 ①合并其他自身免疫风湿性疾病者,如干燥综合征、系统性红斑狼疮;②创伤、骨关节炎、晶体性关节炎或化脓性关节炎导致关节肿胀的患者;③合并感染者;④患有严重的脑、心血管、肝、肾、肺或造血系统疾病者;⑤患有活动性胃十二指肠溃疡或胃炎者;⑥对本研究所用药物过敏者;⑦在过去4周内参与过其他临床试验者。

1.2 一般资料 本课题组在前期临床研究^[11]中共纳入45例治疗组病例,治疗方案为口服MTX片,10~15 mg/次,1次/周;化瘀强肾通痹方1剂/d,水煎,早晚分服;疗程为24周。本研究选取12例疗效较为明显的RA患者进行生物学标志物研究。

1.3 研究方法

1.3.1 主要试剂与仪器 Magen™ (HiPure Serum/Plasma miRNA Kit)(批号:R4314),美基生物科技有限公司;miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit与Ribo™ Exosome Isolation Reagent(for plasma or serum)(批号:R10048.3、C10110-2),广州市锐博生物科技有限公司。

PCR仪(型号:C1000 Touch),美国Bio-Rad公司;生物分析仪(型号:2100),美国Agilent公司;实时定量PCR仪(型号:CFX96),美国Bio-Rad公司;高通量测序仪(型号:4000),美国Illumina公司;紫外分光光度计(型号:K5500),北京凯奥科技发展有限公司。

1.3.2 外泌体分离 收集12例患者治疗前后的全血样本,差速离心提取血浆样品,然后采用外泌体提取试剂盒从血浆样品中分离外泌体。

1.3.3 miRNA测序 使用Magen™ (HiPure Serum/Plasma miRNA Kit)提取和纯化来自外泌体的miRNA,每个样品制备含1 μ g RNA的miRNA文库,并采用生物分析仪和实时定量PCR鉴定制备的文库质量和产量。建库成功后使用高通量测序仪对样本(共24个样本,12个为治疗前血清外泌体,12个为治疗后血清外泌体)进行测序,以获得最佳组织miRNA图谱。

为了获得高质量的干净数据,本研究通过内部Perl脚本分析原始数据。在剔除含有接头或10%以上poly-N序列以及Phred分数<5%的低质量数据后,所有干净数

据与基于GeneBank数据库和Rfam 11.0数据库的miRNA配对,以去除rRNA、scRNA、snoRNA、snRNA和tRNA。同时,所有干净数据通过TopHat v2.0.9软件运行默认参数与人类参考基因组(Grch38)配对。外显子或内含子的标签可能来源于mRNA降解的片段,因此把这些标记去除,同时去除重复序列数据。

在miRBase数据库中搜索所有干净数据,识别干净数据中的已知miRNA。此外,所有未注释的标签都与人类参考基因组(Grch38)配对,然后利用Mireap v0.2软件预测的基因组位置和发夹结构来确定新的候选miRNA。

1.3.4 miRNA表达谱的构建以及差异分析 根据各组miRNA的表达情况,本研究使用以下公式将miRNA表达标准化为百万分之转录本(TPM)。TPM=实际miRNA数量/总干净数据 $\times 10^6$ 。随后,绘制总miRNA热图以显示不同分组的miRNA表达水平,并对表达模式相似的miRNA进行聚类。基于miRNA表达水平,参照文献^[22]中的有关方法分析各组间差异表达的miRNA,并用于后续分析和验证。

1.3.5 验证miRNA测序结果 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测血清外泌体中差异表达的miRNA水平。首先使用miRNA提取试剂盒提取和纯化来自外泌体的miRNA,然后通过miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒反转录miRNA,接着利用PCR试剂盒在PCR仪中开展RT-qPCR。随后将靶miRNA表达量与内参(U6)表达量相比进行标准化,然后利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算靶miRNA的相对表达量。反应条件:95℃处理10 min,95℃处理10 s,60℃处理20 s,70℃处理10 s;共进行40个循环。制作熔解曲线:70℃至95℃,每0.5℃读板1次并停5 s。引物序列见表1。

1.3.6 miRNA靶基因预测 根据已知的miRNA的序列,借助RNAhybrid v2.1.2、PITA、Miranda v3.3a、TargetScan等软件和相关网站预测治疗前后表达差异miRNA的靶基因。上述软件和网站预测结果重合的靶基因是更可靠的miRNA靶基因。通过Cytoscape v3.6.0软件构建miRNA-靶基因网络。

1.3.7 差异表达miRNA靶基因的GO和KEGG通路富集分析 基于GO数据库,所有治疗前后表达差异miRNA的靶基因都匹配到功能注释或GO术语,本研究也同时统计了匹配每个GO术语的基因数量。通过与人类基因组背景比较和超几何检验分析,确定显著富集的GO术语。KEGG用于分子通路富集分析,以确定与人类基因组背景相比,差异表达miRNA的靶基因中显著富集的代谢通路或信号转导通路。

1.4 统计学方法 借助SPSS 17.0统计软件建立数据库并进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
<i>hsa-miR-15b-3p</i>	上游:ACACTCCAGCTGGGAATGCACCTGGGCAAGGA	54
	下游:TAGAGCAGCAAATAATGATTCCG	
<i>hsa-miR-16-5p</i>	上游:ACACTCCAGCTGGGAATGCACCTGGGCAAGGA	54
	下游:CGCCAATATTTACGTGCTGCTA	
<i>hsa-miR-199b-5p</i>	上游:ACACTCCAGCTGGGAATGCACCTGGGCAAGGA	55
	下游:GAACAGATAGTCTAAACACTGGG	
<i>hsa-miR-223-5p</i>	上游:ACACTCCAGCTGGGAATGCACCTGGGCAAGGA	54
	下游:AACTCAGCTTGTCAAATACACG	
<i>hsa-miR-532-5p</i>	上游:ACACTCCAGCTGGGAATGCACCTGGGCAAGGA	54
	下游:ACGGTCCTACTCTCAAGGCATG	
<i>hsa-miR-589-5p</i>	上游:ACACTCCAGCTGGGAATGCACCTGGGCAAGGA	54
	下游:CTCAGAGCAGACGTGTTCTCA	
<i>hsa-miR-619-5p</i>	上游:ACACTCCAGCTGGGAATGCACCTGGGCAAGGA	54
	下游:GGCTCATGCCTGTAATCCCTGC	
<i>U6</i>	上游:CTCGCTTCGGCAGCACAA	190
	下游:AACGCTTCACGAATTTGCGT	

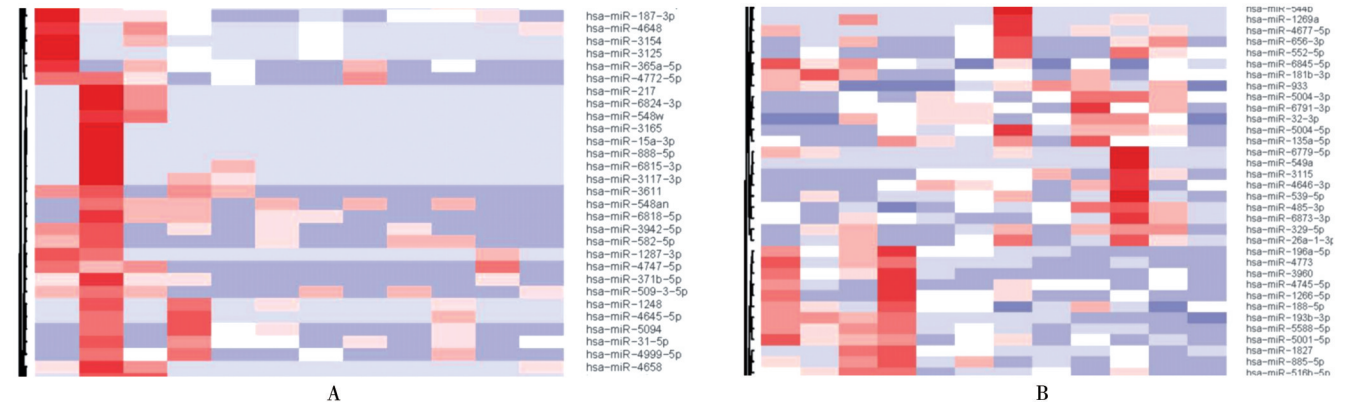
比较采用配对 *t* 检验。所有统计检验均为双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 血清外泌体 miRNA 鉴定 共构建 24 个 miRNA 文库,包括 12 个治疗前血清外泌体样本和 12 个治疗后血清外泌体样本,通过测序揭示 miRNA 表达谱。与 GenBank 和 Rfam 11.0 比对后, rRNA、scRNA、snoRNA、snRNA、tRNA 从干净数据中移除。将干净数据与人类参考基因组(Grch38)比对,发现治疗前血清外泌体样本和治疗后血清外泌体样本分别含有 935 个和 972 个已知 miRNA。此外,我们还发现了 RA 患者血清外泌体

中含有 602 个新 miRNA。

2.2 RA 血清外泌体 miRNA 表达谱特征 图 1、表 2 展示了治疗前后 RA 患者血清外泌体中 miRNA 的表达水平,这些 miRNA 来源于腺苷三磷酸结合盒(ABC)基因家族、1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(ACO)基因家族、长链酰基辅酶 A 合成酶(ACSL)基因家族、17 号染色体开放阅读框(C17orf)基因家族、钾离子通道 E(KCNE)基因家族等,其中有 19 个 miRNA 表达下调($P<0.05$)、1 个 miRNA 表达上调($P<0.05$),变化较为明显的有 *hsa-miR-4648*、*hsa-miR-4658*、*hsa-miR-3960*、*hsa-miR-1291* ($|\log_2|>3$)。



注:A、B 分别为截取的差异明显的 miRNA 表达图谱。

图 1 治疗前后患者血清外泌体 miRNA 表达谱特征

2.3 验证情况 为验证测序结果,我们随机选择了 7 个差异表达的 miRNA 表达谱进行检测。RT-qPCR 结果如图 2 所示,与治疗前比较,治疗后 RA 患者血清外泌体中 *hsa-miR-15b-3p*、*hsa-miR-16-5p*、*hsa-miR-199b-5p*、*hsa-miR-223-5p*、*hsa-miR-532-5p*、*hsa-miR-589-5p*、*hsa-*

miR-619-5p 相对表达量降低($P<0.05$),与 miRNA 测序结果一致(表 2)。

2.4 差异表达 miRNA 的靶基因预测 借助 miRDB、miRTarBase、miRWalk 和 TargetScan 等数据库预测差异表达 miRNA 的靶基因。分别搜集

表2 治疗前后患者血清外泌体中差异表达的miRNA (FPKM)

miRNA-ID	治疗前	治疗后	log2(差异倍数)	趋势
hsa-miR-4648	0.185 4	0.014 4	-3.686 5	下调
hsa-miR-4658	0.119 0	0	-3.572 9	下调
hsa-miR-3960	0.259 4	0.028 4	-3.191 2	下调
hsa-miR-1291	0.422 5	0.051 7	-3.030 7	下调
hsa-miR-196a-5p	0.381 6	0.053 8	-2.826 4	下调
hsa-miR-6131	0.630 3	0.099 7	-2.660 4	下调
hsa-miR-885-5p	0.421 0	0.070 8	-2.572 0	下调
hsa-miR-3934-5p	0.733 1	0.123 4	-2.5707	下调
hsa-miR-199b-5p	8.585 5	1.672 8	-2.359 6	下调
hsa-miR-3135b	15.600 0	3.093 8	-2.334 1	下调
hsa-miR-144-5p	2.746 4	0.683 1	-2.007 4	下调
hsa-miR-619-5p	5.081 7	1.294 4	-1.973 0	下调
hsa-miR-16-5p	525.622 0	135.260 5	-1.958 3	下调
hsa-miR-100-5p	194.513 2	58.833 8	-1.725 2	下调
hsa-miR-15b-3p	7.017 6	2.420 4	-1.535 7	下调
hsa-miR-4286	2.818 9	1.026 4	-1.457 5	下调
hsa-miR-532-5p	1 349.466 7	531.321 9	-1.344 7	下调
hsa-miR-589-5p	44.510 6	17.638 5	-1.335 4	下调
hsa-miR-223-5p	1 056.220 1	435.799 8	-1.277 2	下调
hsa-miR-5004-5p	0.059 3	0.270 0	2.189 0	上调

miRDB 数据库 381 个靶基因、miRTarBase 数据库 52

个靶基因、miRWalk 数据库 9 275 个靶基因和 TargetScan 数据库 3 357 个靶基因(图 3)。这些靶基因包括 SMAD 家族成员 2 基因(*SMAD2*)、成纤维细胞生长因子受体 3 基因(*FGFR3*)、C-C 基序趋化因子配体 2 基因(*CXCL2*)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Pim-1 原癌基因(*PIM1*)等。借助 Cytoscape v3.7.0 软件构建 miRNA-mRNA 调控网络(图 4),以进一步确定治疗前后患者血清外泌体中差异表达 miRNA 的作用,结果显示上述 miRNA 可调控多个靶基因,进而发挥治疗作用。

2.5 差异表达 miRNA 的靶基因功能分析 图 5 中的直方图显示了在生物过程、细胞成分和分子功能中每个 GO 条目富集的基因数量,以及靶基因富集的分子功能相关 GO 条目,其中核苷酸结合(nucleotide binding)、阳离子结合(cation binding)、离子结合(ion binding)、金属离子结合(metal ion binding)、核酸结合(nucleic acid binding)、催化活性(catalytic activity)、有机环化合物结合(organic cyclic compound binding)、杂环化合物结合(heterocyclic compound binding)显著性较高[$-\log_{10}(P) < 125$]。图 6 显示了 miRNA 的靶基因显著富集的关键通路,大多数靶基因富集的通路与机体系统、代谢、人类疾病和环境信息处理有关,包括神经营养因子信号通路(neurotrophin signaling pathway)、代谢通路

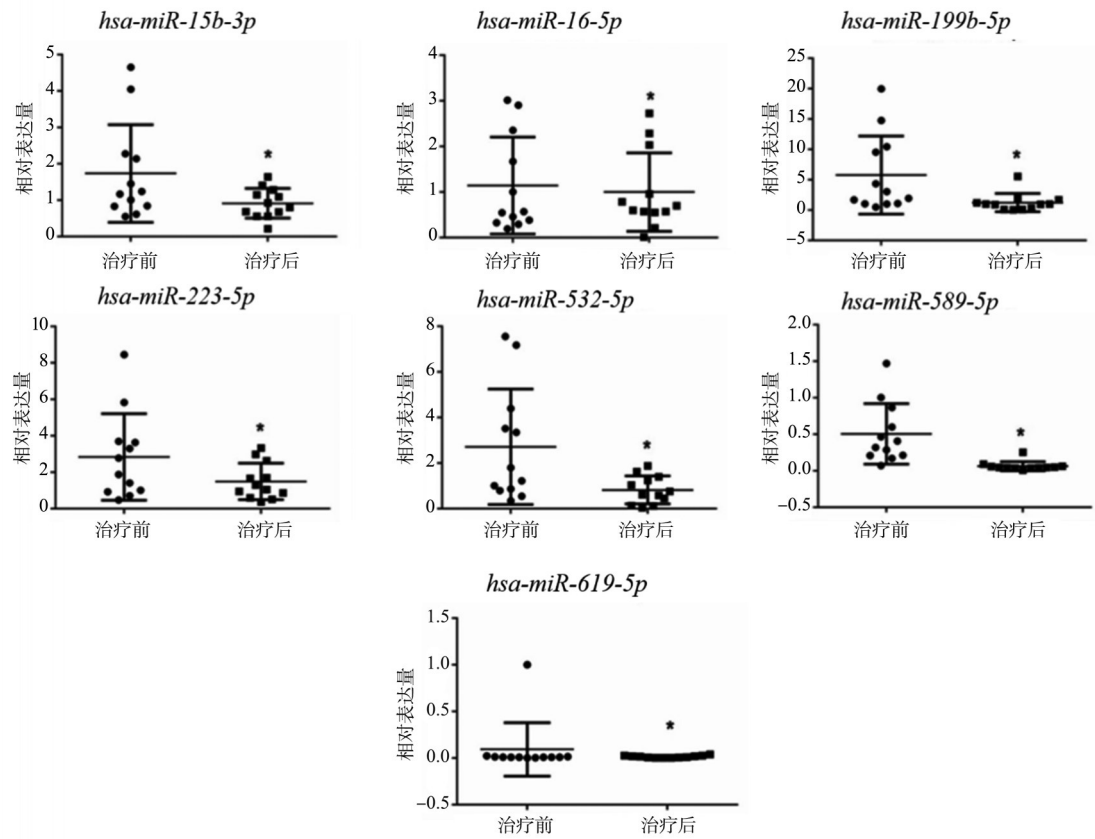


图2 差异表达 miRNA 验证情况(n=12)

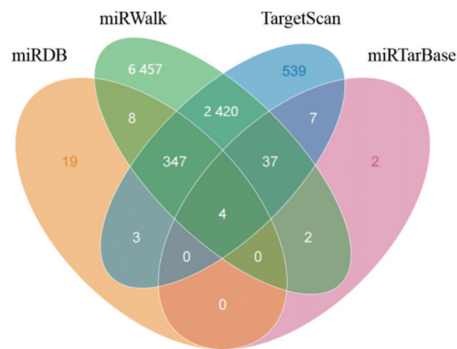


图3 差异表达 miRNA 的靶基因预测结果
(metabolic pathways)、AMP 蛋白激酶(AMPK)信号通路

(AMPK signaling pathway)和转化生长因子- β (TGF- β)通路等,与骨和软骨的破坏以及炎症有关。

3 讨论

近年来,中西医结合综合疗法广泛应用于 RA 的治疗中^[23]。MTX 是 RA 的一线治疗药物,但存在胃肠道反应、肾脏损坏等毒副作用^[24],因此临床常与其他药物配合使用。中药及中药复方可以提高 MTX 治疗 RA 的疗效,并减少 MTX 的副作用^[25-28]。化瘀强肾通痹方是广东省中医院风湿科的经验方,用于治疗难治性 RA。全方以丹参、穿山龙为君,活血化瘀、疏通脉络;黄芪与白

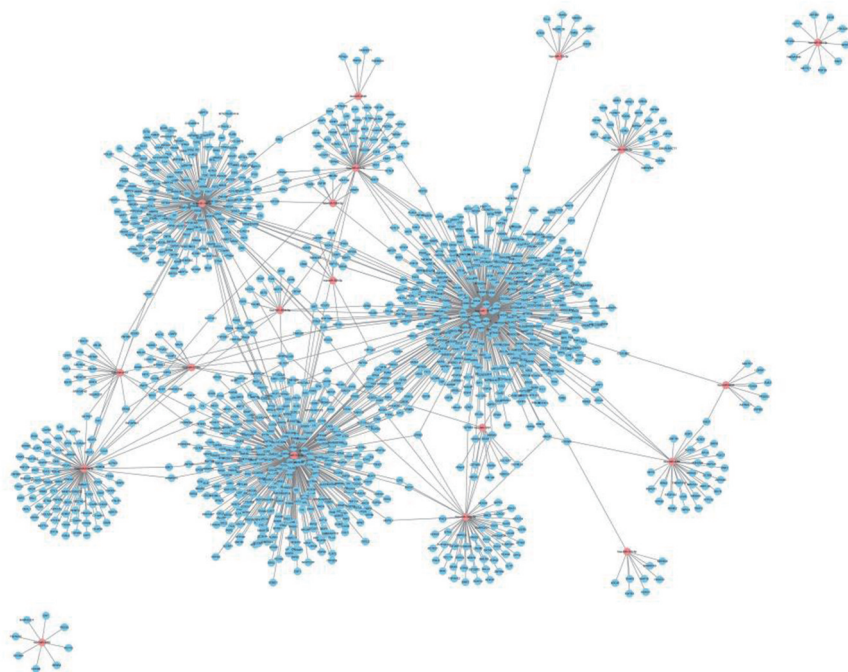


图4 miRNA-mRNA 调控网络

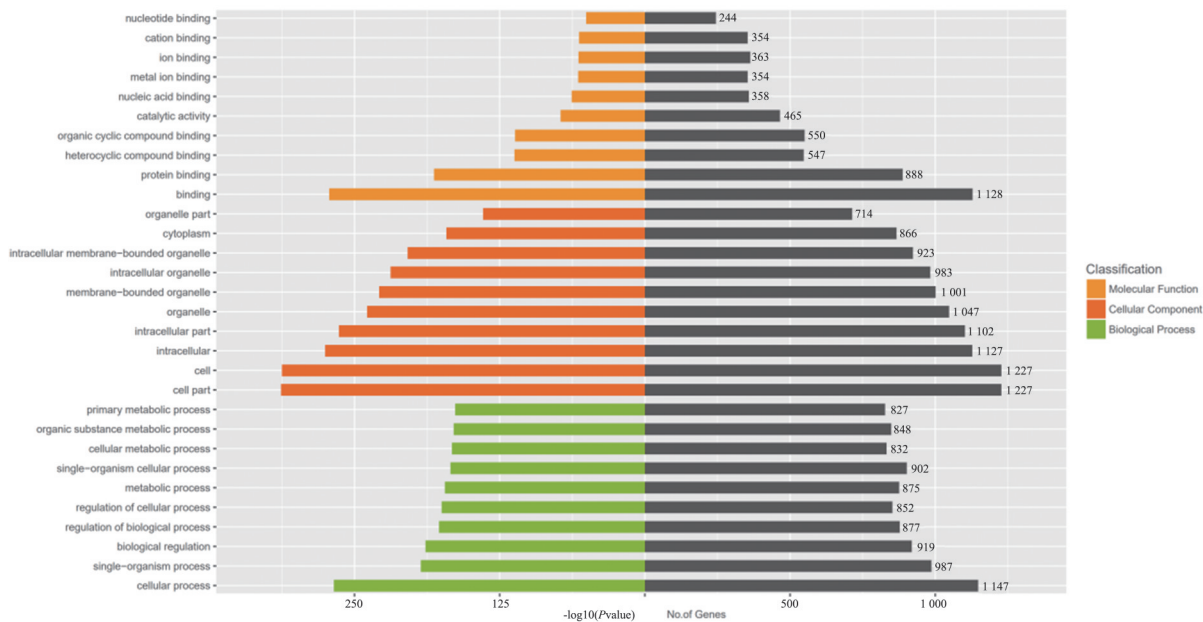


图5 差异表达 miRNA 靶基因的基因本体(GO)分析

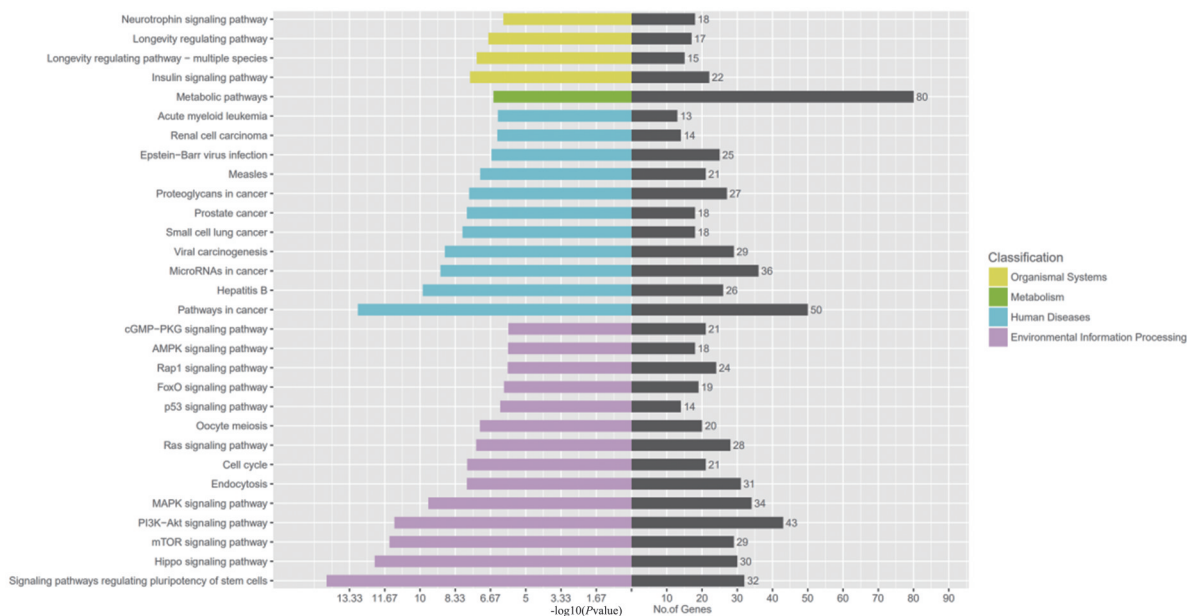


图6 差异表达 miRNA 靶基因的京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

芍、丹参同用,健脾益气、柔肝活血,杜仲、骨碎补、续断深入肝肾经络,补肝肾、强筋骨,共为臣药;白芍与天山雪莲为佐,阴阳平衡、调和药性,既能制约黄芪之燥性,又能协同君药祛风湿、止痛;熟地黄、炙甘草助白芍养血,并强化续断补肝肾的作用,为使药。本课题组前期研究^[11-12,29]结果显示,化瘀强肾通痹方能较好地控制 RA 的进展,与 MTX 联用效果良好。但化瘀强肾通痹方联合 MTX 治疗 RA 的机制尚不清楚。

本研究共发现 20 个差异表达的血清外泌体 miRNA,包括 *hsa-miR-15b-3p*、*hsa-miR-16-5p*、*hsa-miR-199b-5p*、*hsa-miR-223-5p*、*hsa-miR-532-5p*、*hsa-miR-589-5p*、*hsa-miR-619-5p* 等,其中 19 个 miRNA (*hsa-miR-4648*、*hsa-miR-4658*、*hsa-miR-3960* 等)表达下调 ($P < 0.05$),1 个 miRNA (*hsa-miR-5004-5p*)表达上调 ($P < 0.05$)。已有研究^[30-32]发现,*hsa-miR-3960*可通过靶向人普列克底物蛋白同源域家族 A 成员 2 基因(*PHLDA2*)使跨膜多聚糖蛋白 1(*SDC1*)/Wnt/ β -连环蛋白轴失活,从而缓解骨关节炎中的软骨细胞损伤;*hsa-miR-144-3p*的表达水平与促炎性细胞因子/趋化因子之间存在很强的相关性;*hsa-miR-223*对免疫细胞分化和炎症反应具有调节作用,从而影响 RA 的进展。

化瘀强肾通痹方可以抑制 RA 诱导的炎症反应并改善骨质流失^[10,33]。本研究中血清外泌体差异表达 miRNA 的靶基因包括 *SMAD2*、*FGFR3*、*CXCL2* 和 *PIM1*,显著富集的关键通路包括机体系统、代谢、人类疾病和环境信息处理等,均与骨和软骨的破坏以及炎症有关。*SMAD2*、*FGFR3* 表达异常与关节软骨发育不良有关^[34-35],*CXCL2*、*PIM1* 的过度表达则会导致关节破坏和骨质流失^[36-37]。此外,*SMAD2*、*FGFR3* 在预防炎症方面

起着关键作用^[38-39],*CXCL2*、*PIM1* 则在诱导炎症中发挥积极作用^[40-41]。*SMAD2* 通过 TGF- β 信号通路减轻软骨的破坏,*FGFR3* 通过 AMPK 信号通路促进骨生长^[42],*PIM1* 通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路诱导炎症发生^[43]。但上述靶基因在 RA 中的作用尚未明确。

本研究结果提示,化瘀强肾通痹方联合 MTX 治疗 RA 的作用机制可能与调节血清外泌体 miRNA 及其靶基因来预防 RA 诱导的骨和软骨破坏以及炎症有关。

参考文献:

- [1] SCOTT D L, WOLFE F, HUIZINGA T W. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [2] KERSCHBAUMER A, SEPRIANO A, BERGSTRÄ S A, et al. Efficacy of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2022 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(1): 95-106.
- [3] MCINNES I B, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [4] SCHAFFER D, FLORIN T, EAGLE C, et al. Risk of serious NSAID-related gastrointestinal events during long-term exposure: a systematic review[J]. Med J Aust, 2006, 185(9): 501-506.
- [5] KATTURAJAN R, S V, RASOOL M, et al. Molecular toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis treatment: A novel perspective and therapeutic implications[J]. Toxicology, 2021, 461: 152909.
- [6] DIXON W G, HYRICH K L, WATSON K D, et al. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR) [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(3): 522-528.
- [7] SZOSTAK B, MACHAJ F, ROSIK J, et al. Using pharmacogenetics to predict methotrexate response in rheumatoid arthritis patients[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020, 16(7): 617-626.

- [8] WANG Y, CHEN S, DU K, et al. Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114368.
- [9] 时一鸣, 常岑, 姜平, 等. 中药单体化合物调控 NF- κ B 信号通路干预类风湿关节炎的研究进展 [J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(10): 89-94.
- [10] 陈秀敏, 黄闰月, 晏菁遥, 等. 化痰通痹方联合甲氨蝶呤治疗难治性类风湿关节炎临床观察 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(11): 1326-1330.
- [11] WU J Q, CHEN X G, LV Y, et al. Chinese herbal formula Huayu-Qiangshen-Tongbi Decoction compared with leflunomide in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label, randomized, controlled, pilot study [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 484.
- [12] 吕媛. 化痰强肾通痹方联合 MTX 治疗类风湿关节炎的临床疗效及骨保护研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [13] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [14] HUANG R Y, WU J Q, LIU Z H, et al. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: what is the latest with regards to diagnostics? [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2019, 19(5): 363-366.
- [15] CHEN X M, GAO K X, WU X D, et al. Chinese herbal formula Huayu-Qiangshen-Tongbi Decoction attenuates rheumatoid arthritis through upregulating miR-125b to suppress NF- κ B-induced inflammation by targeting CK2 [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 2836128.
- [16] QIN Q, SONG R, DU P, et al. Systemic proteomic analysis reveals distinct exosomal protein profiles in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 9421720.
- [17] NI Z, ZHOU S, LI S, et al. Exosomes: roles and therapeutic potential in osteoarthritis [J]. *Bone Res*, 2020, 8: 25.
- [18] 于娟, 张立平, 孙宁, 等. 外泌体与自身免疫病的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(9): 972-976.
- [19] ARNETT F C, EDWORTHY S M, BLOCH D A, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(3): 315-324.
- [20] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN A J, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [21] SHEEHY C, EVANS V, HASTHORPE H, et al. Revising DAS28 scores for remission in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2014, 33(2): 269-272.
- [22] CHEN X M, YAO D N, WANG M J, et al. Deep sequencing of plasma exosomal microRNA level in psoriasis vulgaris patients [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 895564.
- [23] XING Q, FU L, YU Z, et al. Efficacy and safety of integrated traditional Chinese medicine and western medicine on the treatment of rheumatoid arthritis: a meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4348709.
- [24] 孙青, 谢瑶, 赵卫红, 等. 大剂量甲氨蝶呤治疗毒副作用系统分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(7): 781-785.
- [25] 朱露林, 张奇, 刘梦琴, 等. 中药及天然药物对甲氨蝶呤致肝损伤保护作用的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(7): 1727-1737.
- [26] 王妍. 雷公藤与甲氨蝶呤、黄芪与当归联用治疗 RA 机制的生物信息学分析 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2012.
- [27] 谢志忠. 三妙散联合西药治疗类风湿关节炎(湿热痹阻)随机平行对照研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2018, 32(10): 64-67.
- [28] 马永池. 独活寄生汤加针剂联合西药治疗类风湿关节炎(肝肾亏虚)随机平行对照研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2019, 33(3): 42-44.
- [29] WANG Z, LINGHU K G, HU Y, et al. Deciphering the pharmacological mechanisms of the Huayu-Qiangshen-Tongbi Formula through integrating network pharmacology and *in vitro* pharmacological investigation [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1065.
- [30] YE P, MI Z, WEI D, et al. MiR-3960 from mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles inactivates SDC1/Wnt/ β -Catenin axis to relieve chondrocyte injury in osteoarthritis by targeting PHLDA2 [J]. *Stem Cells Int*, 2022, 2022: 9455152.
- [31] KIM H J, KIM I S, LEE S G, et al. MiR-144-3p is associated with pathological inflammation in patients infected with *Mycobacteroides abscessus* [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(1): 136-149.
- [32] JIAO P, WANG X P, LUORENG Z M, et al. MiR-223: an effective regulator of immune cell differentiation and inflammation [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(9): 2308-2322.
- [33] NICOLIN V, DAL PIAZ F, NORI S L, et al. Inhibition of bone resorption by Tanshinone VI isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Eur J Histochem*, 2010, 54(2): e21.
- [34] NI Q, LU K, LI J, et al. Role of TGF β signaling in maternal ethanol-induced fetal articular cartilage dysplasia and adult onset of osteoarthritis in male rats [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 164(1): 179-190.
- [35] ZHOU S R, XIE Y L, LI W, et al. Conditional deletion of *Fgfr3* in chondrocytes leads to osteoarthritis-like defects in temporomandibular joint of adult mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24039.
- [36] KIM S D, KIM H N, LEE J H, et al. Trepidil, a platelet-derived growth factor antagonist, inhibits osteoclastogenesis by down-regulating NFATc1 and suppresses bone loss in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(6): 782-790.
- [37] BECKMANN J, DITTMANN N, SCHUTZ I, et al. Effect of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency on collagen antibody-induced arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18: 17.
- [38] ZHONG H, FAN X L, FANG S B, et al. Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent chronic allergic airway inflammation via TGF- β 1-Smad2/Smad3 signaling pathway in mice [J]. *Mol Immunol*, 2019, 109: 51-57.
- [39] FOTH M, ISMAIL N F B, KUNG J S C, et al. FGFR3 mutation increases bladder tumorigenesis by suppressing acute inflammation [J]. *J Pathol*, 2018, 246(3): 331-343.
- [40] DE FILIPPO K, DUDECK A, HASENBERG M, et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation [J]. *Blood*, 2013, 121(24): 4930-4937.
- [41] LIM R, BARKER G, LAPPAS M. Inhibition of PIM1 kinase attenuates inflammation-induced pro-labour mediators in human foetal membranes *in vitro* [J]. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(6): 428-440.
- [42] KOMLA-EBRI D, DAMBROISE E, KRAMER I, et al. Tyrosine kinase inhibitor NVP-BGJ398 functionally improves FGFR3-related dwarfism in mouse model [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(5): 1871-1884.
- [43] HENLEY Z A, BAX B D, INGLESBY L M, et al. From PIM1 to PI3Kdelta via GSK3 β : target hopping through the Kinome [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8(10): 1093-1098.

编辑: 严林

收稿日期: 2024-05-22