

• 数据挖掘与循证医学 •

靶向铜死亡相关基因治疗类风湿关节炎生物信息学分析及干预中药的预测

杨会军¹, 郭响², 李伟青¹, 苏小军¹, 田雪梅¹, 王海东¹, 金芳梅^{1*}

1. 甘肃省中医院 风湿骨病中心, 甘肃 兰州 730050

2. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003

摘要: **目的** 探索铜死亡相关基因在类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 中的表达及其作用机制, 并筛选通过靶向铜死亡基因治疗 RA 的潜在中药。**方法** 通过检索 GEO 数据库获得 RA 芯片数据, 分析铜死亡基因在 RA 中表达水平; 依据铜死亡基因表达情况构建高表达亚型和低表达亚型, 并进行差异分析, 筛选出与 RA 相关的铜死亡基因。按不同分组对基因表达矩阵进行免疫浸润分析, 并分析免疫浸润细胞与铜死亡基因之间的相关性。利用 KOBAS 在线工具对差异基因进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。通过 Herb 数据库检索靶向铜死亡基因治疗 RA 的潜在中药及其有效成分, 使用 Autodock vina 软件模拟药物与铜死亡靶蛋白结合活性。通过收集临床样本验证铜死亡相关基因在 RA 中表达水平。**结果** *FDX1*、*DLD*、*DLAT*、*LIAS*、*GLS*、*LIPT1* 和 *PDHB* 7 个铜死亡相关基因在 RA 中差异表达。免疫浸润分析结果显示, 在 RA 中活化的记忆 CD4⁺T 细胞、静息自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞和中性粒细胞与铜死亡相关。富集分析结果显示, 铜死亡主要与趋化因子信号通路、Toll 样受体信号通路、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、核因子- κ B 信号通路、p53 信号通路和过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路相关。虎杖叶可能是靶向铜死亡基因治疗 RA 的潜在中药。分子对接结果显示, 虎杖叶有效成分均有与铜死亡靶蛋白结合的可能。*DLD*、*GLS*、*FDX1*、*DLAT* 在 RA 患者外周血单个核细胞中 mRNA 表达水平升高。**结论** 铜死亡相关基因表达水平与 RA 病程进展相关, 并预测虎杖叶是潜在靶向铜死亡基因治疗 RA 的药物, 为 RA 的临床诊疗及药物开发提供了新的方向和理论基础。

关键词: 类风湿关节炎; 铜死亡相关基因; 免疫浸润; 生物信息学; 虎杖叶; 二氢硫辛酰胺脱氢酶; 谷氨酰胺酶; 铁氧还原蛋白 1; 二氢硫辛酸转乙酰化酶

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4253-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.018

Bioinformatics analysis of targeting cuproptosis-related genes therapy for rheumatoid arthritis and prediction of intervention traditional Chinese medicine

YANG Hui-jun¹, GUO Xiang², LI Wei-qing¹, SU Xiao-jun¹, TIAN Xue-mei¹, WANG Hai-dong¹, JIN Fang-mei¹

1. Osteopathy and Rheumatology Center, Lanzhou 730050, China

2. The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China

Abstract: Objective To explore the expression of cuproptosis-related genes in rheumatoid arthritis (RA) and mechanism, and to screen the potential traditional Chinese medicine in the treatment RA by targeting cuproptosis-related genes. **Methods** The RA microarray data were obtained by searching the GEO database, and the expression levels of cuproptosis-related genes in RA were analyzed. The high expression subtypes and low expression subtypes were constructed according to the expression of cuproptosis-related genes, and differential analysis was performed to screen out the cuproptosis-related genes related to RA. Immune infiltration analysis was performed on the gene expression matrix by different groups and the correlation between immune infiltrating cells and cuproptosis-related genes was

收稿日期: 2022-12-23

基金项目: 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目实施方案 (国中医药人教函[2022]226 号); 国家自然科学基金项目 (82260880); 国家重点研发计划 (2018YFC1705202, 2018YFC1705203); 国家中医药管理局行业专项 (20150700107); 甘肃省中医药项目 (GZKP-2021-12); 兰州市科技指导性计划项目 (2022-ZD-73); 王海东甘肃省名中医传承工作室建设项目 (甘卫中医函[2022]50 号)

作者简介: 杨会军 (1985—), 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向为风湿骨病发病机制及中医特色疗法和中药干预研究。

E-mail: yhj_16999@163.com

***通信作者:** 金芳梅, 女, 主治医师, 研究方向为风湿骨病发病机制及中医特色疗法和中药干预研究。E-mail: 13909406533@163.com

analyzed. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed on differential expressed genes by the Kobas online tool. The Herb database was used to search for potential traditional Chinese medicines and their active ingredients in the treatment of RA by targeting cuproptosis-related gene, and the Autodock vina software was used to simulate the possible binding of drugs and cuproptosis-related target proteins. The expression levels of cuproptosis-related genes in RA were verified by clinical samples. **Results** A total of seven cuproptosis-related genes (*FDX1*, *DLD*, *DLAT*, *LIAS*, *GLS*, *LIPT1*, and *PDHB*) were differentially expressed in RA. The result of immune infiltration analysis showed that activated memory CD4⁺ T cells, resting NK cells, and neutrophils were associated with cuproptosis in RA. The results of pathway enrichment analysis showed that cuproptosis was mainly associated with the chemokine signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, tumor necrosis factor signaling pathway, nuclear factor- κ B signaling pathway, p53 signaling pathway, and peroxisome proliferators-activated receptors signaling pathways. Leaf of Huzhang (*Polygonum cuspidatum*) may be a potential drug in the treatment of RA by targeting cuproptosis-related gene, and the molecular docking results showed that the active components in leaf of *P. cuspidatum* may bind to cuproptosis-related proteins. The mRNA expression levels of *DLD*, *GLS*, *FDX1* and *DLAT* in peripheral blood mononuclear cells of RA patients increased. **Conclusion** The expression level of cuproptosis -related genes is related to the progression of RA disease, and predicted that *P. cuspidatum* leaf is a potential drug in treatment of RA by targeting cuproptosis-related genes, which provides a new direction and theoretical basis for the clinical diagnosis and treatment of RA and drug development.

Key words: rheumatoid arthritis; cuproptosis-related genes; immune infiltraton; bioinformatics; leaf of *Polygonum cuspidatum*; *DLD*; *GLS*; *FDX1*; *DLAT*

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是临床上常见的一种炎症性疾病, 症状主要表现为持续性疼痛、压痛和关节破坏^[1]。祖国医学认为 RA 属于“痹证”范畴, 主要因气血痹阻, 经脉不通而痛; 气行不畅而痹阻经络; 血瘀气阻而化热^[2]。目前我国 RA 患病率约 0.42%, 全球患病率约 0.27%^[3-4]。RA 作为慢性疾病已成为全世界关注的公共卫生问题之一。RA 的标准治疗手段主要用于控制炎症和关节疼痛, 但常用的非甾体抗炎药、糖皮质激素、改善病情的抗风湿药物和生物制剂长期服用会引起不良反应^[4-5]。因此, 寻找安全、有效的治疗药物或治疗策略对 RA 临床治疗具有重要意义。RA 的病理过程受 T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和肥大细胞等免疫细胞与成纤维样滑膜细胞之间的串扰影响^[6]。免疫细胞的激活会分泌多种炎症因子, 进而影响软骨细胞、破骨细胞和成纤维细胞导致软骨损伤和骨骼破坏^[5-6]。干预这些免疫细胞或免疫因子作为 RA 治疗相关研究的新方法和新靶点具有很大的潜力, 相关的治疗方案仍在研究中^[6]。

细胞死亡与 RA 的疾病发展密切相关。如成纤维样滑膜细胞死亡减少导致滑膜细胞过度增殖, 从而引发滑膜炎^[7]。自身免疫性 T 细胞和 B 细胞的细胞死亡失衡也会增加自身免疫反应和炎症反应^[8]。随着细胞死亡研究领域的快速发展, 针对 RA 细胞死亡的相关临床治疗策略也取得了一定的进展^[7-8]。铜死亡是一种新发现的细胞死亡方式, 其机制与线

粒体呼吸相关^[7]。铜离子通过与三羧酸循环过程中的脂酰化蛋白质结合, 使脂酰化蛋白聚集导致铁硫簇蛋白丢失, 进而诱发蛋白质毒性应激并造成细胞死亡^[7,9]。相关研究结果显示 RA 患者血液中铜含量升高, 且与炎症标志物呈正相关^[10]。铜死亡相关基因丙酮酸脱氢酶 E1 α 1 亚基 (pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1, *PDHA1*) 可能与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 协同调节 RA 中的巨噬细胞炎症反应, 且铜死亡另一相关基因丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 β (pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta, *PDHB*) 可能与成纤维样滑膜细胞的异常增殖相关^[11]。由此可见, 阐明铜死亡在 RA 发病过程中的作用机制并探寻相关治疗药物具有重要的研究意义。

传统中医药是中华文化的瑰宝, 治疗 RA 已有近千年历史。临床上中医主要通过祛风除湿、散瘀活血、通络止痛来消除痹症, 代表性的复方有蠲痹汤、独活寄生汤、乌头汤和桂枝芍药知母汤^[2,12]。有实验表明传统中药及其有效成分可以通过促进细胞凋亡、抑制成纤维样滑膜细胞异常增殖和抗炎等作用缓解 RA 症状^[2,13]。然而中药及其活性成分能否通过靶向铜死亡治疗 RA 尚未见相关研究报道。本研究旨在通过生物信息学方法阐明铜死亡相关基因在 RA 中的表达及作用机制, 筛选靶向铜死亡相关基因的中药及其活性成分。为明确铜死亡在 RA 中的调控机制并开发用于防治 RA 的靶向调节药物提供理论基础。

1 方法

1.1 铜死亡相关基因集获取

以“cuproptosis”和“铜死亡”为关键词分别检索 PubMed 数据库(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)和中国知网数据库(<https://www.cnki.net/>)截至 2022 年 9 月 30 日收录的与铜死亡相关文献,构建铜死亡相关基因集。共获得 10 个与铜死亡密切相关的基因:细胞周期依赖性激酶抑制基因 (cell cycle-dependent kinase inhibitory gene, *CDKN2A*)、铁氧还原蛋白 1 (ferridoxin 1, *FDXI*)、二氢硫辛酰胺脱氢酶 (dihydrolipoamide dehydrogenase, *DLD*)、二氢硫辛酸转乙酰化酶 (dihydrolipoamide acetyltransferase, *DLAT*)、硫辛酸合成酶 (lipoic acid synthetase, *LIAS*)、谷氨酰胺酶 (glutaminase, *GLS*)、脂酰转移酶 1 (lipoyltransferase 1, *LIPT1*)、金属调节转录因子 1 (metal regulatory transcription factor 1, *MTF1*) 用于后续分析^[9]。

1.2 RA 滑膜基因表达数据集获取

以“rheumatoid arthritis”为关键词检索由美国国立生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 创建并维护的基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 获取 RA 基因表达数据集。数据集筛选要求: (1) 数据集包含 RA 组和正常对照组, 且每组样本量不少于 3; (2) RA 组未经药物或其他手段干预治疗; (3) 数据集信息完整无缺失。

1.3 RA 样本分型

基于铜死亡相关基因在 GEO 数据集 RA 样本中的表达水平, 使用 Consensus Cluster Plus R 语言包对所有 RA 样本进行表达一致性聚类分析, 将样本分为铜死亡基因表达模式不同的亚型。

1.4 基因表达差异分析

通过 RStudio 2022.02.1 软件的“Limma”R 语言包, 对检索得到的基因表达数据集根据不同分组进行基因表达差异分析。以差异倍数 (fold change, FC) 绝对值大于 2 及校正后 $P < 0.05$ 为差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 筛选标准。差异分析结果通过微生信 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线网页工具对结果进行可视化处理。

1.5 免疫浸润分析

基于基因表达数据矩阵使用 CIBERSORT 去卷

积分评估每个样本中 22 种免疫细胞占比。比较不同分组间 (正常对照组 vs RA 组、RA1 组 vs RA2 组) 22 种免疫细胞丰度差异。

1.6 富集分析

将需要分析的基因简称导入在线网页工具 Kobas (<http://bioinfo.org/kobas>) 进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。分析物种设置为“智人 (homo sapiens)”, 以 $P < 0.05$ 为筛选标准。

1.7 潜在治疗中药预测

对在 RA 病理过程中发挥重要作用的铜死亡相关基因, 通过本草图鉴数据库 (HERB, <http://herb.ac.cn/>) 检索其相应中药。针对涵盖靶点较多的中药, 通过检索相关文献, 确定其有效成分。通过 SwissADME 在线工具 (<http://www.swissadme.ch>) 依据里宾斯基五规则 (Lipinski's rule of five, RO5) 筛选出成药性较好的有效成分, 并使用 ProTox-II 在线工具对有效成分进行安全性评估^[14]。借助 AutoDockTools 1.5.6 软件模拟中药有效成分结合铜死亡相关基因, 预测其治疗 RA 的潜在可能。

1.8 临床样本收集

本研究获得甘肃省中医院伦理委员会批准 (批准文号 2020-031-01), 所有研究对象均签署知情同意书。本研究于甘肃省中医院共收集 5 例健康志愿者外周血样本 (健康对照组) 及 5 例临床诊断为 RA 患者 (RA 组) 外周血样本, 所有外周血样本通过提取试剂分离出单核细胞, 放入 -80°C 冰箱保存。

纳入标准: (1) RA 组患者经临床医生诊断符合 2010 年美国风湿病学会联合欧洲抗风湿病联盟提出的 RA 诊断标准; (2) RA 组患者处于 RA 疾病活动期; (3) 年龄 18~80 岁; (4) 性别不限; (5) 签署知情同意书者。排除标准: (1) 患有精神疾病或其他原因无法配合者; (2) 合并其他急慢性疾病者; (3) 近期有生育要求或正处于妊娠期或哺乳期的女性; (4) 入组前 4 周内使用过药物干预治疗者。

1.9 实时荧光定量-PCR (real-time fluorescence quantification-PCR, RT-qPCR) 分析

通过 Trizol 法提取外周血样本单个核细胞总 RNA, 检测浓度后取 1000 ng RNA 为模板逆转录为 cDNA (Takara, RR047A)。引物序列如表 1 所示, 使用 SYBR green 染料 (诺唯赞, 批号 Q141-02) 按 20 μL 体系进行 40 个循环的扩增。Ct 值以磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence of genes

基因	序列 (5'-3')
<i>FDX1</i>	上游: CCTCTTTGGAGTCTCTCGCGG 下游: CAGCCCAACCGTGATCTGT
<i>DLD</i>	上游: CTCTTGCTTTGGAATATGGAGC 下游: AAAAGCTTCTGATAAGGTCGGA
<i>DLAT</i>	上游: ACTCCCCAGCCTTTAGCTC 下游: CAATCCCTTTCTCTACTGCCAAC
<i>GAPDH</i>	上游: GGAGCGAGATCCCTCCAAAT 下游: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

dehydrogenase, GAPDH) 为内参按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析。

1.10 统计分析

研究数据采用 SPSS 16.0 软件分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 铜死亡相关基因在 RA 中表达情况

通过检索 GEO 数据库得到物种为人的 RA 滑膜基因表达数据集 GSE89408。数据集基于芯片 GPL11154, 包括对照组样本 28 例, RA 样本 152 例。基于 GSE89408 数据集, 10 个铜死亡相关基因表达差异分析结果显示 (图 1-A), 与正常对照组相比, RA 组关节滑膜 *FDX1*、*DLD*、*DLAT*、*LIAS*、*GLS*、*LIPT1*、*MTF1*、*PDHA1* 和 *PDHB* 表达上调且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 铜死亡相关基因表达分型

基于 10 个铜死亡相关基因在 RA 样本关节滑膜表达情况, 将 152 例 RA 滑膜样本进行一致性聚类分析 (图 1-B), 分为 RA1 和 RA2 2 种亚型。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 结果显示 (图 1-C), RA1 与 RA2 2 种亚型间存在差异, 可用于进一步分析。铜死亡相关基因在 RA1 和 RA2 2 种亚型表达差异分析结果显示 (图 1-D), 与 RA1 组相比, RA2 组 *CDKN2A*、*FDX1*、*DLD*、*DLAT*、*LIAS*、*GLS*、*LIPT1*、*PDHA1* 和 *PDHB* 表达下调且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 差异分析结果

基于数据集 GSE89408 将 RA 组与正常对照组相比, 根据 DEGs 筛选条件, 共得到 10 558 个 RA 滑膜 DEGs (图 2-A)。铜死亡 2 个亚型 RA1 与 RA2 分组间差异分析共得到 652 个 DEGs (图 2-B)。对 2 次差异分析结果进行交集分析, 得到 501 个共同

DEGs。

2.4 通路富集分析结果

501 个共同 DEGs 通路分析结果 (图 2-C) 显示, 趋化因子 (chemokine) 信号通路、Toll 样受体 (Toll-like receptor) 信号通路、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路、p53 信号通路和过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisomeproliferators-activated receptor, PPAR) 信号通路与铜死亡相关, 在 RA 病理过程中发挥重要作用。

2.5 免疫浸润分析结果

免疫浸润分析结果显示, 与正常对照组相比 (图 3-A), RA 组关节滑膜样本中记忆 B 细胞 (B cell memory, $P < 0.001$)、浆细胞 (plasma cells, $P < 0.05$)、未活化的记忆 $CD4^+$ T 细胞 (T cells $CD4^+$ memory resting, $P < 0.000 1$)、活化的记忆 $CD4^+$ T 细胞 (T cells $CD4^+$ memory activated, $P < 0.000 1$)、滤泡辅助性 T 细胞 (T cells follicular helper, $P < 0.05$)、调节性 T 细胞 (T cells regulatory, $P < 0.000 1$)、 $\gamma\delta$ T 细胞 (T cells gamma delta, $P < 0.05$)、静息自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞 (NK cells resting, $P < 0.01$)、活化 NK 细胞 (NK cells activated, $P < 0.000 1$)、单核细胞 (monocytes, $P < 0.05$)、M1 型巨噬细胞 (macrophages M1, $P < 0.000 1$)、静息树突细胞 (dendritic cells resting, $P < 0.05$)、静息肥大细胞 (mast cells resting, $P < 0.01$) 和中性粒细胞 (neutrophils, $P < 0.000 1$) 丰度存在差异。

RA1 组与 RA2 组免疫浸润分析结果 (图 3-B) 显示, 两组间初始 $CD4^+$ T 细胞 (T cells $CD4^+$ naive, $P < 0.01$)、活化的记忆 $CD4^+$ T 细胞 ($P < 0.05$)、静息 NK 细胞 ($P < 0.05$)、M2 型巨噬细胞 (macrophages M2, $P < 0.001$)、嗜酸性粒细胞 (eosinophils, $P < 0.05$) 和中性粒细胞 ($P < 0.01$) 丰度存在差异。

2.6 铜死亡相关基因诊断价值分析

结合在正常对照组与 RA 组及 RA1 与 RA2 组间差异表达的铜死亡相关基因, 共有 8 个共同铜死亡相关基因 (*DLAT*、*DLD*、*FDX1*、*GLS*、*LIAS*、*LIPT1*、*PDHA1* 和 *PDHB*) 表达存在差异。借助微生信在线网页工具构建基因受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线, 获得基因对 RA 诊断的灵敏度和特异度, 评估基因对 RA 诊断价值。结果 (图 4) 显示, *DLAT* (AUC=0.862)、*DLD*

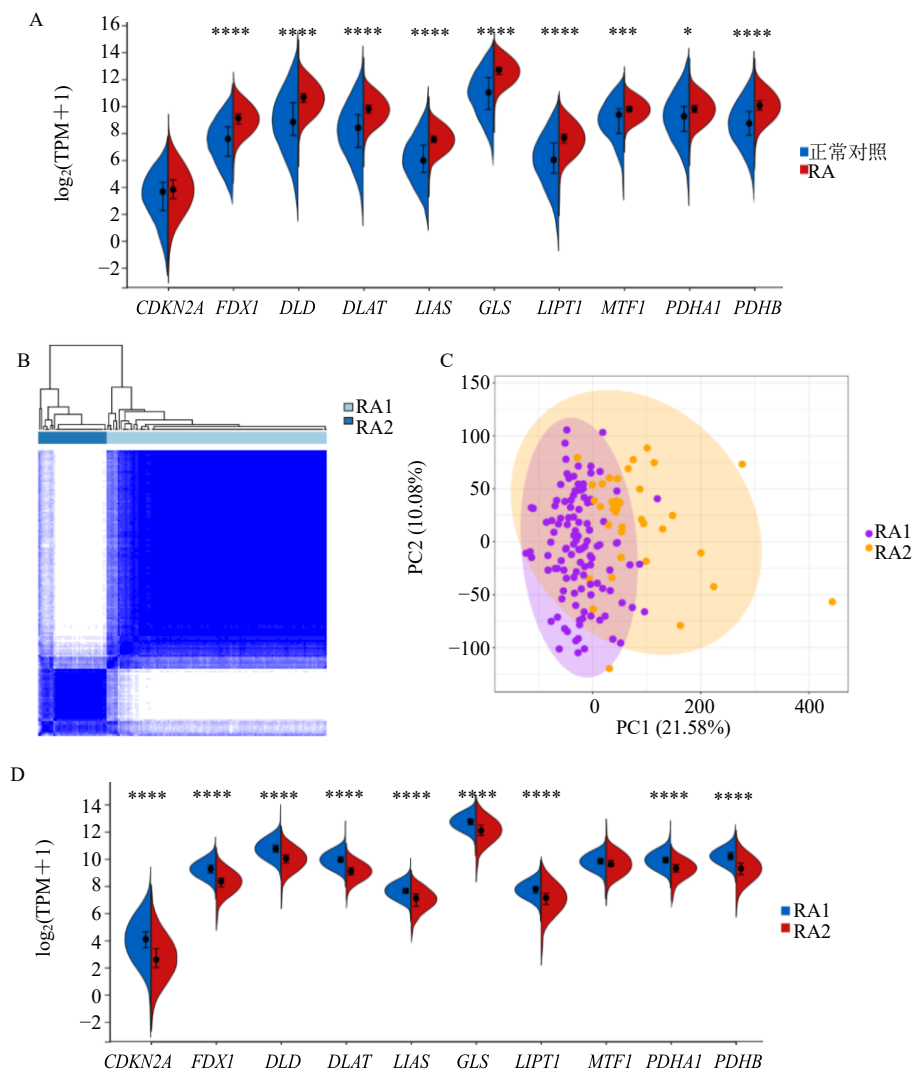


图 1 RA 中差异表达的铜死亡相关基因
Fig. 1 Differentially expressed cuproptosis-related genes are in RA
A-铜死亡相关基因在正常对照组和 RA 组表达水平, 与正常对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$; B-基于铜死亡相关基因表达水平对 RA 样本聚类分析; C-RA 不同亚型组 PCA 分析结果; D-RA 不同亚型组铜死亡相关基因表达水平, 与 RA1 组比较: **** $P < 0.0001$
A-expression levels of cuproptosis-related genes in normal control group and RA group, * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ vs normal control group;
B-cluster analysis of RA samples based on the expression levels of cuproptosis-related genes; C-PCA analysis of different subtype groups of RA; D-expression levels of cuproptosis-related genes in different subtype groups of RA, **** $P < 0.0001$ vs RA1 group

($AUC=0.826$)、 $FDX1$ ($AUC=0.880$)、 GLS ($AUC=0.901$)、 $LIAS$ ($AUC=0.852$)、 $LIPT1$ ($AUC=0.851$) 和 $PDHB$ ($AUC=0.857$) 特异性较高。此外, $PDHA1$ ($AUC=0.658$) 特异性较低。

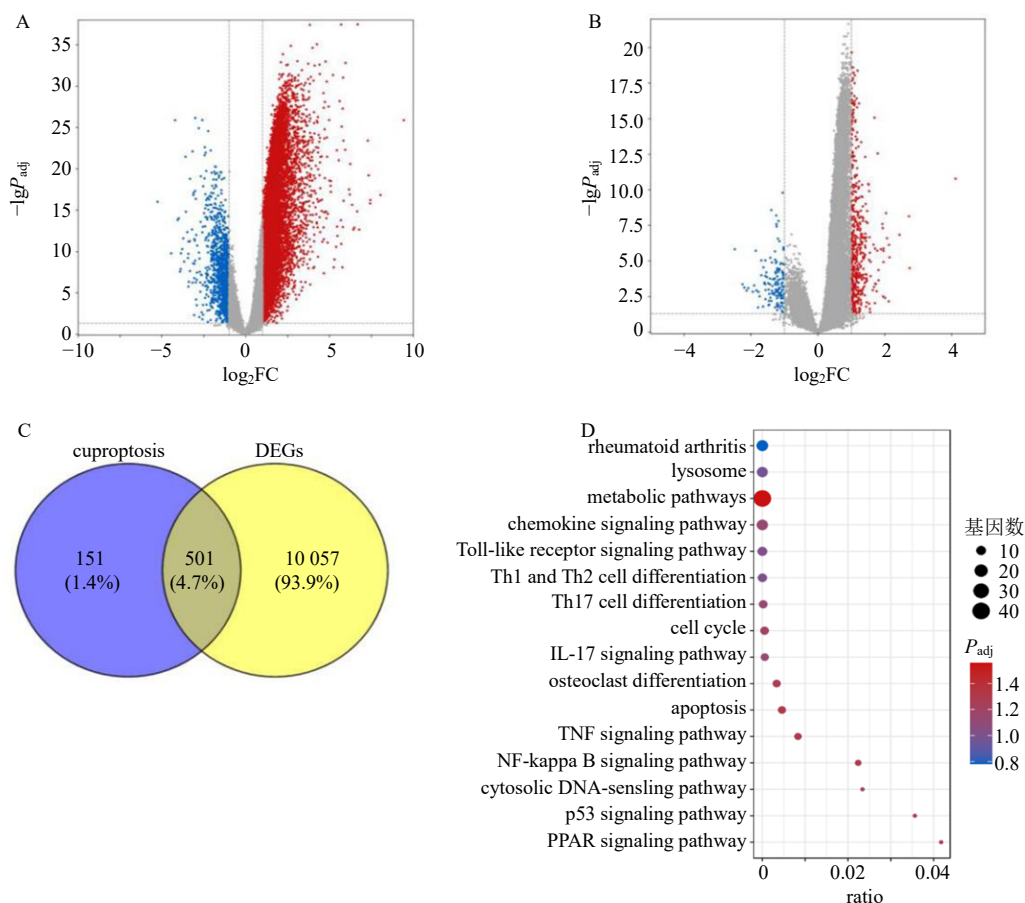
2.7 相关性分析结果

7 个共同铜死亡相关基因与 3 个共同差异免疫细胞 (活化的记忆 $CD4^+T$ 细胞、静息 NK 细胞和中性粒细胞) 相关性分析结果如图 5 所示, $DLAT$ 、 DLD 、 $FDX1$ 、 GLS 、 $LIAS$ 、 $LIPT1$ 和 $PDHB$ 之间表达相关性均为正相关 ($r > 0.05$)。活化的记忆 $CD4^+T$ 细胞与 7 个铜死亡相关基因表达均呈正相关。与

之相反, 静息 NK 细胞与 7 个铜死亡相关基因表达的相关性系数均小于 0。中性粒细胞与 7 个铜死亡相关基因表达相关性较弱。

2.8 靶向铜死亡基因治疗 RA 的潜在中药及其有效成分确定

基于 Herb 数据库检索能靶向 7 个共同铜死亡相关基因的潜在中药, 其中未能找到能靶向 $LIAS$ 、 $LIPT1$ 和 $PDHB$ 基因的中药, 潜在靶向 $DLAT$ 、 DLD 、 $FDX1$ 和 GLS 基因的治疗 RA 的中药如表 2 所示。通过检索相关文献确定中药的有效成分, 无相关文献则通过 Herb 数据库补充。共获得 7 种潜在中药



A-正常对照组与 RA 组差异分析火山图; B-RA1 组与 RA2 组差异分析火山图, 蓝色代表表达下调基因, 红色代表表达上调基因, 灰色代表无统计学差异基因; C-RA 不同亚型组差异基因与 RA 相关基因韦恩图; D-交集基因相关通路

A-volcano chart of difference analysis between normal control group and RA group; B-volcano chart of difference analysis between RA1 group and RA2 group, blue dots are down-regulated genes, red dots are up-regulated genes, and gray dots are genes with no statistical difference; C-venn diagram of DEGs in different subtype groups of RA and RA-related genes; D-intersection DEGs-related pathways

图 2 通路富集分析结果

Fig. 2 Result of pathway enrichment analysis

(草莓车轴草、虎杖叶、白罂粟、丽春花果实、水团花、粟壳和罂粟嫩苗), 并确定 41 种有效成分。

2.9 分子对接模拟药物分子与蛋白结合

通过 SwissADME 在线工具共筛选出符合 RO5 原则的药物成分 13 种 (表 3), 安全性评估结果显示咖啡酸、库明吉啉、大黄素、考迈斯托醇、阿魏酸、没食子酸和白藜芦醇毒性较低 (毒性等级 >3 , 出现毒性反应数 ≤ 1)。以甲氨蝶呤为阳性对照。将以上 7 个安全性较高的成分与 7 个共同铜死亡相关基因进行分子对接, 药物分子配体与蛋白受体结合能如图 6-A 所示。结合能均小于 0, 表明药物分子与蛋白受体有结合可能。尽管吗啡与 DLAT 结合能最低, 但鉴于吗啡属于危险药物, 成为 RA 治疗药物可能性较低。本研究展示其他结合能较低的构象。DLD 与大黄素结合构象、库明吉啉与 FDX1 结合构

象如图 6-B、C 所示。

2.10 两组受试者基线资料

最终正常对照组和 RA 组各纳入 5 例受试者。两组受试者基线资料如表 4 所示。

2.11 铜死亡相关基因在 RA 患者中 mRNA 表达水平

铜死亡相关基因 *DLD*、*GLS*、*FDX1*、*DLAT* 在健康受试者和 RA 患者外周血单个核细胞中 mRNA 表达水平如图 7 所示。与健康对照组相比, RA 患者外周血单个核细胞中 *DLD*、*GLS*、*FDX1*、*DLAT* 的 mRNA 表达水平明显升高且差异具有统计差异 ($P < 0.05$, 0.01)。

3 讨论

铜死亡是新发现的一种细胞死亡方式, 可能会影响 RA 中的各种细胞, 从而涉及炎症、血管生成和骨破坏的发展过程^[11]。本研究通过下载 GEO 芯

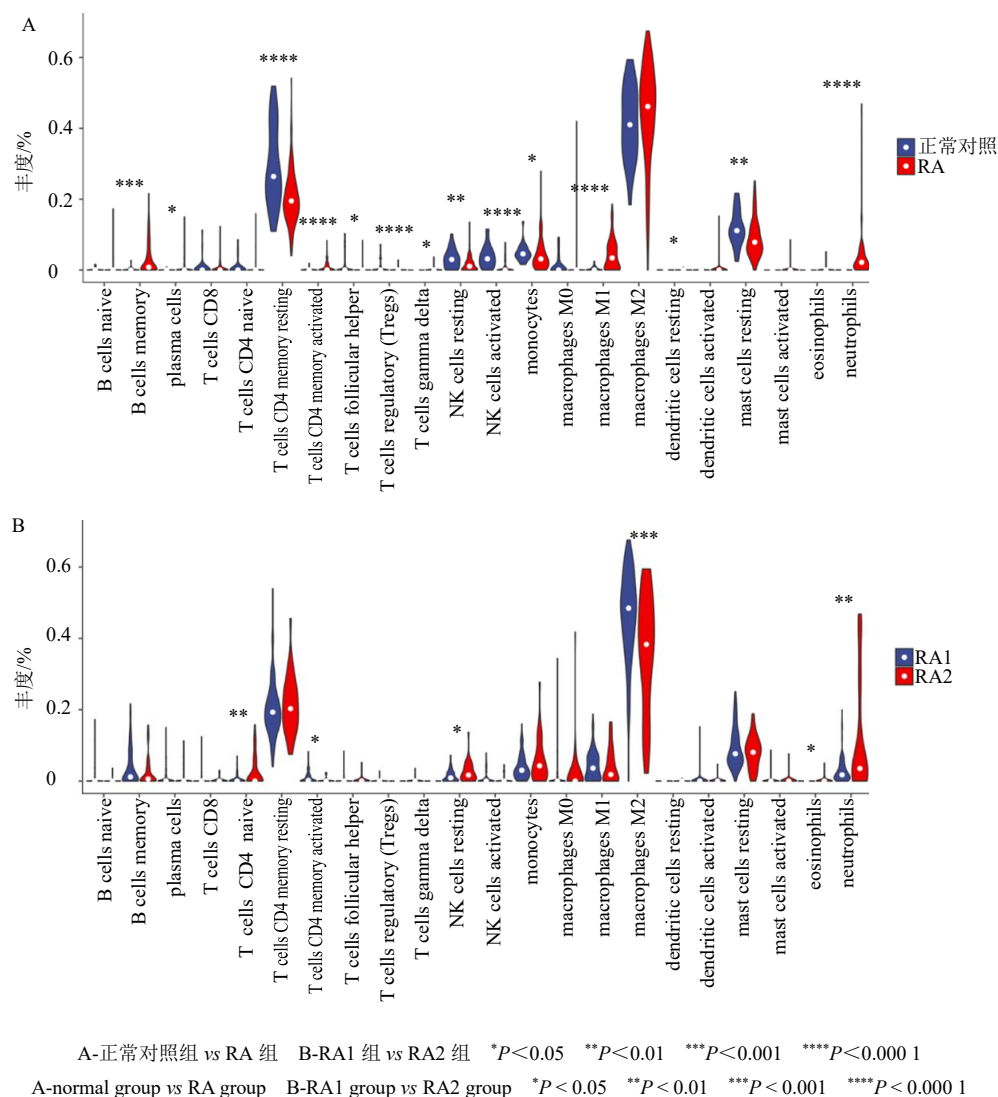


图 3 免疫浸润分析结果

Fig. 3 Result of immune infiltration assay

片数据,对 RA 滑膜基因表达数据分析结果显示,大部分铜死亡相关基因在 RA 患者样本中表达上调,这表明铜死亡与 RA 的疾病进展相关。基于铜死亡基因在 RA 样本中的表达水平,将 RA 样本分为铜死亡基因高表达亚型组和低表达亚型组。对正常对照组与 RA 组、铜死亡基因高表达组与低表达组分别进行免疫浸润分析,确定了 RA 中 3 个与铜死亡相关的免疫细胞,分别为活化的记忆 $CD4^+$ T 细胞、静息 NK 细胞和中性粒细胞。大量记忆 $CD4^+$ T 细胞、NK 细胞存在于 RA 患者外周血、关节滑膜与滑液中,这些细胞能够高效地产生促炎细胞因子进而导致关节炎,同时促进骨破坏^[17-18]。同样在 RA 环境中,中性粒细胞表达多种趋化因子受体,并释放大量炎症介质^[19]。因此,靶向抑制这些免疫

细胞,降低促炎细胞因子水平是一种有前景的 RA 治疗策略^[5]。铜死亡基因与免疫细胞可能在 RA 免疫浸润方面发挥重要作用,能否通过调节免疫细胞死亡缓解 RA 症状,有待进一步研究。

基于差异分析共得到 501 个 DEGs,KEGG 通路富集分析结果显示,RA 中铜死亡可能与趋化因子信号通路、Toll 样受体信号通路、IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、NF- κ B 信号通路、p53 信号通路和 PPAR 信号通路相关。NF- κ B 信号通路是细胞因子与炎症反应之间的桥梁,铜元素可以通过激活 NF- κ B 信号通路促进炎症和线粒体自噬障碍^[20]。在长期铜暴露或铜诱导的条件下,p53 表达增加且肿瘤坏死因子信号通路被激活,进一步促进细胞凋亡^[21-22]。Liu 等^[23]研究显示,铜元素可能通过激活

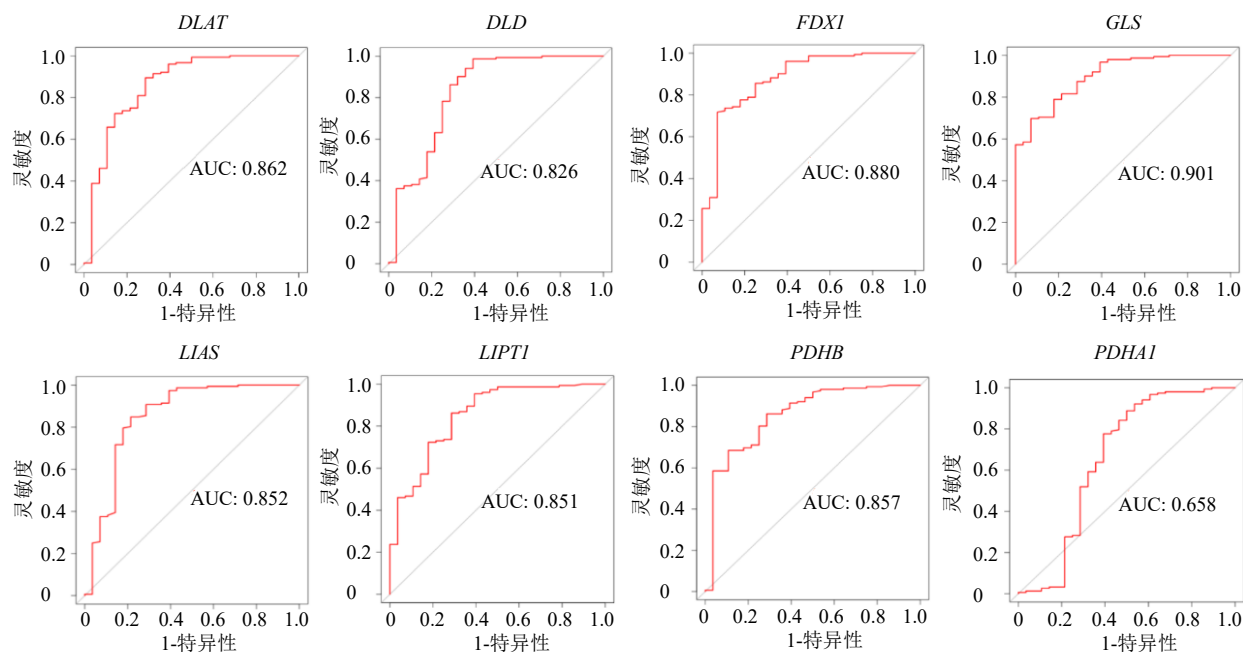


图 4 铜死亡相关基因 ROC 曲线
Fig. 4 Cuproptosis-related gene ROC curve

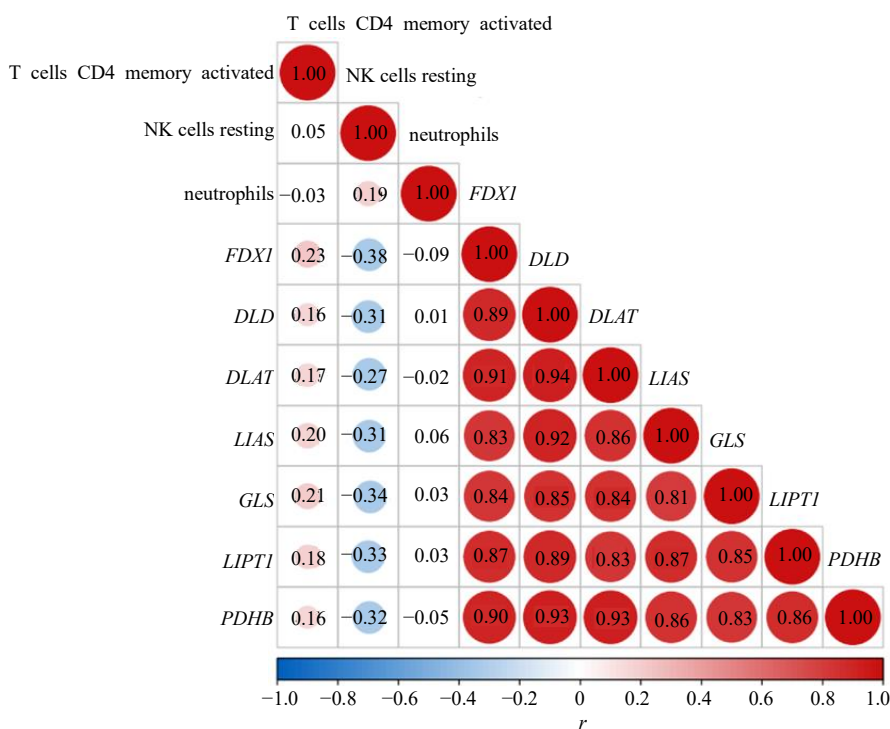


图 5 相关性分析结果
Fig. 5 Result of correlation analysis

PPAR 信号通路调节脂质代谢。PPAR 也已被证实对 CD4⁺T 细胞的存活、激活和分化具有调节作用^[24]。在 RA 中, 各种趋化因子通过靶向中性粒细胞、成骨细胞、NK 细胞、T 细胞、软骨细胞和巨噬细胞等

促进血管生成, 加重关节滑膜炎症, 并使关节长期处于慢性炎症环境中^[25]。此外, IL-17 通过与其受体结合刺激 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和趋化因子产生, 以及 NF- κ B 活化^[25]。而 NF- κ B 通路被认为是 RA 炎

表 2 靶向铜死亡基因治疗 RA 的潜在中药

Table 2 Potential traditional Chinese medicines in treatment of RA by targeting cuproptosis genes

中药	基因	有效成分	来源
草莓车轴草	GLS、DLAT	考迈斯托醇 (coumestrol)、库明吉啉 (coumingidine)	Herb 数据库
虎杖叶	FDX1、DLD	芦丁 (rutin)、金丝桃苷 (hyperoside)、异槲皮苷 (isoquercitrin)、扁蓄苷 (avicularin)、 槲皮苷 (quercitrin)、大黄素-1-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、瑞 诺苷 (reynoutrin)、槲皮素 (quercetin)、大黄素 (emodin)、大黄素甲醚 (phycion)、 决明松 (torachryson)、虎杖苷 (polydatin)、白藜芦醇 (resveratrol)、枸橼酸 (citric acid)、酒石酸 (tartaric acid)、苹果酸 (malic acid)、没食子酸 (gallic acid)、 咖啡酸 (caffeic acid)、阿魏酸 (ferulic acid)、绿原酸 (chlorogenic acid)、大 黄素-8-O-(6'-O-丙二酰基)-葡萄糖苷 [emodin 8-O-β-D-(6'-O-malonyl)-glucoside]、 决明酮-8-O-(6'-乙酰基)-葡萄糖苷、决明酮-8-O-β-D-葡萄糖苷 (torachryson 8- O-glucoside)	王欣等 ^[15]
白罂粟	DLD、DLAT	可待因 (codeine)、吗啡 (morphine)	Herb 数据库
丽春花果实	DLD、DLAT	吗啡	Herb 数据库
水团花	DLD、DLAT	奎诺酸 (quinovic acid)、奎诺酸-3-β-D-吡喃葡萄糖苷 (quinovic acid 3-β-D- glucopyranoside)、奎诺酸-3-β-D-吡喃葡萄糖苷-(28→1)-β-D-吡喃葡萄糖苷 [quinovic acid 3-β-D-glucopyranoside-(28→1)-β-D-glucopyranoside]、奎诺酸-3- β-D-吡喃葡萄糖苷-(1→3)-β-D-吡喃糖苷 (quinovic acid 3-β-D-glucopyranosyl- (1→3)-rhamnopyranoside)、芦荟大黄素 (aloe-emodin)、獐牙菜苷 (sweroside)、 马钱苷 (loganin)、去甲丁香色原酮 (noreugenin)、undulatoside B、5,7-二羟 基-2-甲基色酮 7-O-[β-D-呋喃芹菜糖基-(1→6)]-β-D-吡喃葡萄糖苷 [5,7- dihydroxy-2-methylchromone 7-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside]、 β-谷甾醇 (β-sitosterol)、胡萝卜苷 (daucosterol)	郭跃伟等 ^[16]
粟壳	DLD、DLAT	吗啡、罂粟碱 (papaverine)	Herb 数据库
罂粟嫩苗	DLD、DLAT	可待因 (codeine)、吗啡	Herb 数据库

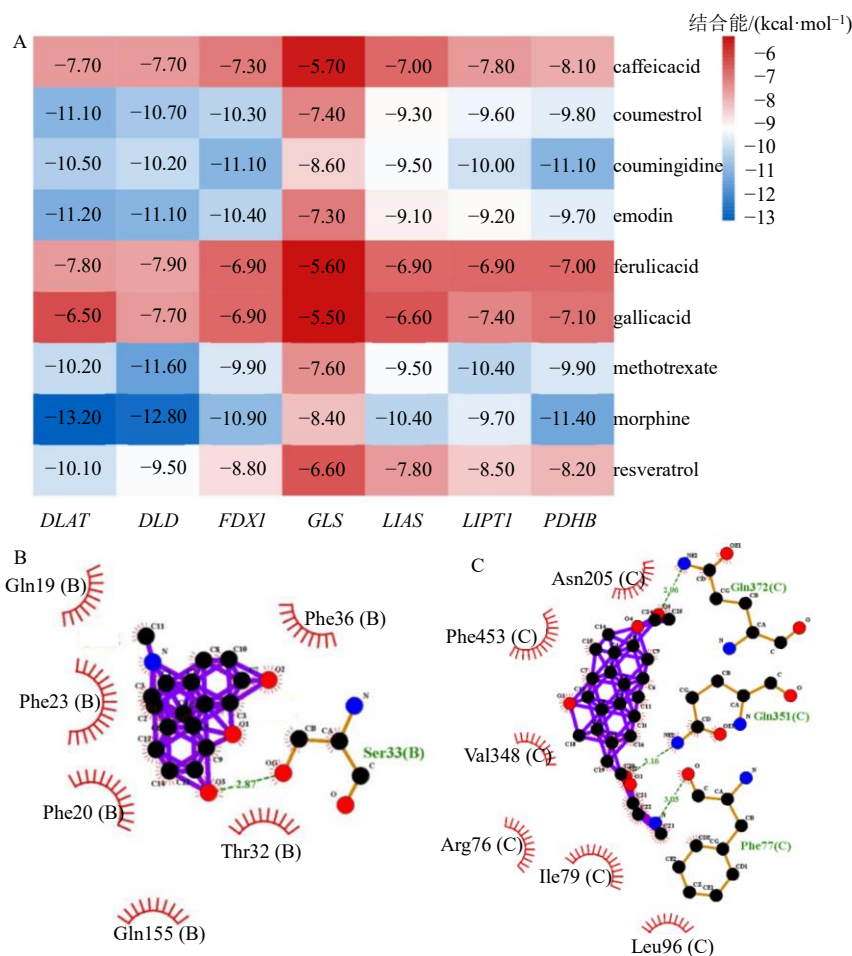
表 3 潜在治疗 RA 药物成分化学性质与毒性参数

Table 3 Chemical properties and toxicity parameters of active ingredients of potential therapeutic drugs

成分	RO5					毒性反应					
	摩尔质量/ (g·mol ⁻¹)	氢键 供体数	氢键 受体数	脂质-水分配 系数	可旋转 键数	毒性等级	肝毒性	致癌性	免疫 毒性	致突变性	细胞毒性
芦荟大黄素	270.24	3	5	1.50	1	5	N	N	Y	Y	N
咖啡酸	180.16	3	4	0.93	2	5	N	Y	N	N	N
考迈斯托醇	268.22	2	5	2.46	0	4	N	Y	N	N	N
库明吉啉	433.58	1	6	3.51	7	5	N	N	Y	N	N
大黄素	270.24	3	5	1.87	0	5	N	N	N	Y	N
阿魏酸	194.18	2	4	1.36	3	4	N	N	Y	N	N
没食子酸	170.12	4	5	0.21	1	4	N	Y	N	N	N
去甲丁香色原酮	192.17	2	4	1.49	0	3	N	N	N	Y	N
大黄素甲醚	284.26	2	5	2.27	1	5	N	N	Y	Y	N
槲皮素	302.24	5	7	1.23	1	3	N	Y	N	Y	N
奎诺酸	486.68	3	5	4.85	2	4	N	Y	Y	N	N
白藜芦醇	228.24	3	3	2.48	2	4	N	N	N	N	N
决明松	246.26	2	4	2.41	2	5	N	N	Y	Y	N

Y-出现毒性反应 N-无毒性反应

Y-toxic reaction occurs N-no toxic reaction occurs



A-潜在治疗药物与靶点蛋白分子对接结合能 B-DLD 与大黄素结合构象 C-库明吉啉与 FDX1 结合构象

A-docking binding energy between potential therapeutic drugs and target protein B-bind pose of DLD and emodin C-bind pose of FDX1 and coumestrol

图 6 中药有效成分与铜死亡靶蛋白结合示意图

Fig. 6 Schematic diagram of binding of active ingredients of traditional Chinese medicine to cuproptosis target protein

表 4 两组受试者基线资料

Table 4 Baseline information of subjects in two groups

指标	RA 组	健康对照组
年龄/岁	47.8±12.8	40.6±5.5
性别 (男/女)/例	2/3	2/3
类风湿因子/(IU·mL ⁻¹)	372.88 (109.64, 697.02)	4.02 (2.23, 7.93)
抗环瓜氨酸抗体/(RU·mL ⁻¹)	154 (112, 270)	2 (1, 3)
血沉/(mm·h ⁻¹)	29 (10, 41)	14 (7, 16)
C-反应蛋白/(mg·L ⁻¹)	9.24 (2.79, 22.24)	3.46 (1.91, 4.93)
红细胞/(×10 ¹² ·L ⁻¹)	4.45±0.33	4.44±0.27
红细胞分布宽度变异系数/%	15.3 (14.2, 19.8)	13.3 (12.2, 14.1)
血小板/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	259.20±116.48	245.60±35.47
白细胞/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	5.07±1.15	4.87±0.68
中性粒细胞绝对值/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	2.93±0.89	2.34±0.23
淋巴细胞绝对值/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	1.61±0.34	1.72±0.41

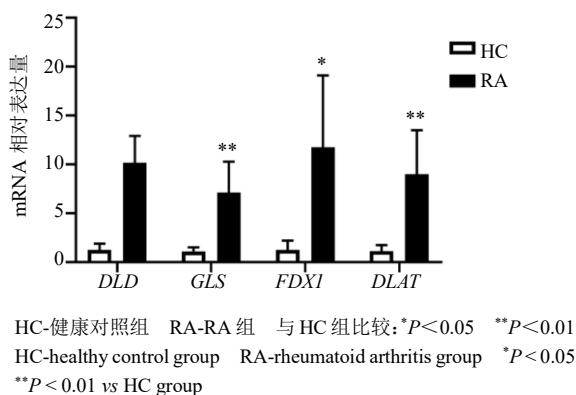


图 7 铜死亡相关基因在 RA 患者中 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 mRNA expression level of cuproptosis-related genes in RA patient ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

症反应的主要途径之一^[26]。由此可见,通过干预铜死亡相关通路促进促炎细胞群铜死亡可以有效缓解 RA 炎症。

铜死亡基因在 RA 芯片数据中表达分析结果显示, *FDX1*、*DLD*、*DLAT*、*LIAS*、*GLS*、*LIPT1* 和 *PDHB* 7 个基因在 2 次差异分析中均为差异表达基因,提示其可能是靶向铜死亡干预 RA 的重要基因。目前尚无 *FDX1* 在 RA 中的研究报道, *FDX1* 主要促进糖酵解和脂肪酸氧化,并改变氨基酸代谢参与炎症反应^[27]。*LIAS* 主要与线粒体功能、氧化应激和炎症有关,过表达 *LIAS* 可以增加调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 的数量并减少了 T 细胞浸润,抑制 NF- κ B 活性,减轻慢性炎症反应并保护线粒体功能^[11,28-29]。*GLS1* 在 RA 成纤维样滑膜细胞中表达上调,抑制 *GLS1* 表达水平可以抑制 RA 成纤维样滑膜细胞增殖并抑制关节炎小鼠的炎症反应^[30]。*LIPT1* 主要调节线粒体呼吸、乳酸和丙酮酸的产生,并与 RA 患者的滑膜细胞增殖和血管生成相关^[11,31]。*DLAT* 也能通过影响线粒体功能参与 RA 的发展^[11]。*PDHB* 已被确定为 RA 的易感基因,可能与帕金森病蛋白 7 共同调节 Treg 细胞并保持其功能完整性;*PDHB* 表达下调可能导致 RA 成纤维样滑膜细胞异常增殖^[11]。ROC 曲线分析 7 个重要基因, AUC 值均高于 0.5。以上结果表明这些基因可作为 RA 的诊断标志物和潜在治疗靶点。

通过检索相关数据库获得干预 RA 铜死亡基因的中药及其有效成分,得到 7 种中药及其 41 个有效成分。其中罂粟虽然具有敛肺涩肠、固肾镇痛等功效,但其主要成分吗啡和可待因等生物碱具有成瘾

性,已被国家列入麻醉精神类药品目录严格管制^[32]。本研究不探讨此类药物及相关成分。《本草拾遗》和《本草推陈》记载传统中药虎杖叶具有平肝潜阳、祛痰熄风等功效,临床上主要应用于治疗风湿关节疼痛、消炎和消肿等^[15]。相关研究表明,虎杖中有效成分具有抗炎和抗痛风作用,在血管生成方面具有双重作用,且长期高剂量应用虎杖会产生毒性,造成肝脏损伤,但毒性反应具有可逆性^[33]。因此,虎杖叶有成为靶向铜死亡缓解 RA 炎症症状治疗药物的潜在可能,但虎杖叶中发挥主要治疗作用的有效成分尚不明确,需要进一步筛选鉴定。根据 RO5 成药原则及毒性预测结果,筛选出咖啡酸、库明吉啉、大黄素、考迈斯托醇、阿魏酸、没食子酸和白藜芦醇 7 个药物成分。分子对接结果显示,这些药物成分均有与 RA 铜死亡靶点结合的可能。白藜芦醇已被应用于临床治疗 RA,且治疗效果较好。在 RA 中,白藜芦醇对 p53 通路具有调控作用并促进成纤维样滑膜细胞、巨噬细胞和浸润的炎症细胞凋亡^[34]。通过构建佐剂性关节炎大鼠模型,发现咖啡酸和阿魏酸可减轻关节炎大鼠炎症,缓解爪子水肿和炎症细胞浸润,保护关节组织免受血管翳形成以及软骨和骨破坏^[35-36]。大黄素通过抑制 NF- κ B 通路在胶原诱导关节炎小鼠中发挥抗炎作用^[37]。没食子酸可降低促炎细胞因子水平并诱导成纤维样滑膜细胞凋亡^[38]。在骨关节炎中,考迈斯托醇可以抑制 IL-1 β 诱导的炎症^[39]。由此可见,虎杖叶可以作为靶向铜死亡治疗 RA 的潜在治疗药物。

4 结论

靶向铜死亡基因促进免疫细胞死亡,从而缓解 RA 炎症,是一种很有前景的治疗策略。本研究分析了铜死亡基因在 RA 中表达水平差异,且可能与记忆 CD4⁺ T 细胞、NK 细胞和中性粒细胞免疫浸润相关。同时本研究预测虎杖叶有效成分可能靶向铜死亡基因缓解 RA 炎症。本研究的分析结果为靶向铜死亡治疗 RA 的相关研究提供了新的方向和理论基础,为临床 RA 治疗提供新的选择药物。但研究仍存在问题,如未能检索到草莓车轴草有效成分及其药理作用的相关文献,有待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Padyukov L. Genetics of rheumatoid arthritis [J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(1): 47-62.
- [2] 叶敏, 万军, 王李俊, 等. 中药通过调节肠道菌群治疗

- 类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7279-7284.
- [3] Finckh A, Gilbert B, Hodgkinson B, *et al.* Global epidemiology of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(10): 591-602.
- [4] 耿研, 谢希, 王昱, 等. 类风湿关节炎诊疗规范 [J]. 中华内科杂志, 2022, 61(1): 51-59.
- [5] Mueller A L, Payandeh Z, Mohammadkhani N, *et al.* Recent advances in understanding the pathogenesis of rheumatoid arthritis: New treatment strategies [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3017.
- [6] Zhao J N, Guo S C, Schrodi S J, *et al.* Molecular and cellular heterogeneity in rheumatoid arthritis: Mechanisms and clinical implications [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 790122.
- [7] Cobine P A, Brady D C. Cuproptosis: Cellular and molecular mechanisms underlying copper-induced cell death [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(10): 1786-1787.
- [8] Zhao J N, Jiang P, Guo S C, *et al.* Apoptosis, autophagy, NETosis, necroptosis, and pyroptosis mediated programmed cell death as targets for innovative therapy in rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 809806.
- [9] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, *et al.* Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-1261.
- [10] Wang H J, Zhang R R, Shen J, *et al.* Circulating level of blood iron and copper associated with inflammation and disease activity of rheumatoid arthritis [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2023, 201(1): 90-97.
- [11] Zhao J N, Guo S C, Schrodi S J, *et al.* Cuproptosis and cuproptosis-related genes in rheumatoid arthritis: Implication, prospects, and perspectives [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 930278.
- [12] 王帆帆, 刘健, 方妍妍, 等. 中医药改善类风湿关节炎血瘀证的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(9): 74-77.
- [13] Wang Y, Chen S, Du K, *et al.* Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114368.
- [14] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23(1/2/3): 3-25.
- [15] 王欣, 覃瑶, 孙建彬, 等. 虎杖叶的化学成分、药理活性、临床应用及质量控制研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(10): 196-200.
- [16] 郭跃伟, 黄伟晖, 陈雯婷, 等. 水团花化学成分的研究 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(3): 15-19.
- [17] Yang Y Y, Day J, Souza-Fonseca Guimaraes F, *et al.* Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases [J]. *Clin Transl Immunol*, 2021, 10(2): e1250.
- [18] Luque-Campos N, Contreras-López R A, Jose Paredes-Martínez M, *et al.* Mesenchymal stem cells improve rheumatoid arthritis progression by controlling memory T cell response [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 798.
- [19] Cecchi I, Arias de La Rosa I, Menegatti E, *et al.* Neutrophils: Novel key players in rheumatoid arthritis. Current and future therapeutic targets [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(11): 1138-1149.
- [20] Zhou Q, Zhang Y, Lu L, *et al.* Copper induces microglia-mediated neuroinflammation through ROS/NF-κB pathway and mitophagy disorder [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 168: 113369.
- [21] Li Y L, Chen H M, Liao J Z, *et al.* Long-term copper exposure promotes apoptosis and autophagy by inducing oxidative stress in pig testis [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2021, 28(39): 55140-55153.
- [22] Liu H, Guo H R, Jian Z J, *et al.* Copper induces oxidative stress and apoptosis in the mouse liver [J]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1-20.
- [23] Liu L, Sui X Y, Li F C. Effect of dietary copper addition on lipid metabolism in rabbits [J]. *Food Nutr Res*, 2017, 61(1): 1348866.
- [24] Le Menn G, Neels J. Regulation of immune cell function by PPARs and the connection with metabolic and neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1575.
- [25] Fang Q H, Zhou C, Nandakumar K S. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis [J]. *Mediat Inflamm*, 2020, 2020: 1-20.
- [26] Ilchovska D D, Barrow D M. An Overview of the NF-κB mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF-κB ligand RANKL and related nutritional interventions [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(2): 102741.
- [27] Zhang Z Y, Ma Y R, Guo X L, *et al.* FDX1 can impact the prognosis and mediate the metabolism of lung adenocarcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 749134.
- [28] Tian S, Nakamura J, Hiller S, *et al.* New insights into immunomodulation via overexpressing lipoic acid synthase as a therapeutic potential to reduce atherosclerosis [J]. *Vasc Pharmacol*, 2020, 133/134: 106777.
- [29] Zhao Y, Xu G, Li H, *et al.* Overexpression of endogenous lipoic acid synthase attenuates pulmonary fibrosis induced

- by crystalline silica in mice [J]. *Toxicol Lett*, 2020, 323: 57-66.
- [30] Takahashi S, Saegusa J, Sendo S, *et al.* Glutaminase 1 plays a key role in the cell growth of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 1-10.
- [31] Chang X T, Wei C. Glycolysis and rheumatoid arthritis [J]. *Int J Rheum Dis*, 2011, 14(3): 217-222.
- [32] 宋小兰, 王丽萍, 赵宁娟, 等. 基于气相色谱-质谱和网络药理学探讨紫斑罂粟壳挥发油镇咳祛痰平喘的作用机制 [J]. *分析测试技术与仪器*, 2022, 28(3): 343-352.
- [33] 梁春晓, 王珊珊, 陈淑静, 等. 虎杖化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(4): 1264-1276.
- [34] Sheng S Y, Wang X Y, Liu X, *et al.* The role of resveratrol on rheumatoid arthritis: From bench to bedside [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 829677.
- [35] Fikry E M, Gad A M, Eid A H, *et al.* Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 878-886.
- [36] Zhu L J, Zhang Z S, Xia N N, *et al.* Anti-arthritis activity of ferulic acid in complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis in rats: JAK2 inhibition [J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(2): 463-473.
- [37] Hwang J K, Noh E M, Moon S J, *et al.* Emodin suppresses inflammatory responses and joint destruction in collagen-induced arthritic mice [J]. *Rheumatology*, 2013, 52(9): 1583-1591.
- [38] Yoon C H, Chung S J, Lee S W, *et al.* Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Jt Bone Spine*, 2013, 80(3): 274-279.
- [39] You J S, Cho I A, Kang K R, *et al.* Coumestrol counteracts interleukin-1 β -induced catabolic effects by suppressing inflammation in primary rat chondrocytes [J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 79-91.

[责任编辑 潘明佳]