

基于串联质谱标签定量蛋白质组学的痹祺胶囊治疗类风湿性关节炎的作用机制

姚鹏飞^{1,2,3,4}, 韩彦琪^{2,3,4}, 张祥麟⁵, 许浚^{2,3,4}, 王磊⁶, 李新^{2,3,4}, 张铁军^{2,3,4*}, 刘昌孝^{2,3,4*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462

3. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300462

4. 天津药物研究院 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300462

5. 天津达仁堂京万红药业有限公司, 天津 300112

6. 津药达仁堂集团股份有限公司, 天津 300193

摘要: **目的** 利用串联质谱标签 (tandem mass tags, TMT) 定量蛋白质组学技术研究痹祺胶囊治疗类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的作用机制。 **方法** 建立 II 型胶原蛋白诱导的 RA 大鼠模型, 并给予痹祺胶囊进行干预, 取对照组 (C)、模型组 (M)、痹祺胶囊 0.4 g/kg 给药组 (BQ) 的左膝关节组织, 采用 TMT 定量蛋白质组学技术分析鉴定各组大鼠膝关节组织中的蛋白, 以表达差异倍数 ≥ 1.2 或差异倍数 ≤ 0.83 且 $P < 0.05$ 筛选 M vs C、BQ vs M、BQ vs C 差异表达蛋白, 并分析经痹祺胶囊干预后有回调趋势的差异表达蛋白。最后通过 GeneCards、OMIN 数据库检索 RA 疾病靶点, 与回调蛋白进行交集分析得到与 RA 疾病相关的回调蛋白, 对其进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和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, 明晰痹祺胶囊对 RA 的作用机制。 **结果** 经痹祺胶囊干预后有 121 个差异蛋白具有回调趋势, 其中 38 个与 RA 疾病相关, 如 $\beta 2$ 整合素 (integrin subunit beta 2, ITGB2)、钙调蛋白 2 (calmodulin 2, CALM2)、钙调磷酸酶 B 亚基 (calcineurin subunit B type 1, PPP3R1)、前列腺素合成酶 (prostacyclin synthase, PTGIS) 等。生物信息学分析发现这些回调蛋白参与了与 RA 相关的多条信号通路, 如 ITGB2 参与调节 RA 及白细胞跨上皮细胞迁移信号通路; CALM2、PPP3R1 通过调节钙信号通路, 进而调节 T 细胞、B 细胞受体信号通路、T 细胞分化及破骨细胞分化等信号通路; PTGIS 参与花生四烯酸代谢途径等。 **结论** 痹祺胶囊可能通过干预 ITGB2、PPP3R1、CALM2、PTGIS 等蛋白的表达, 调节了与 RA 相关的多条信号通路, 发挥免疫抑制、抗炎、活血、抑制骨破坏和骨吸收、抑制血管翳生成等多方面药理作用, 从而达到治疗 RA 的效果。

关键词: 蛋白质组学; 痹祺胶囊; 类风湿性关节炎; 差异表达蛋白; $\beta 2$ 整合素; 钙调蛋白 2; 钙调磷酸酶 B 亚基; 前列腺素合成酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7638-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.005

Mechanism of Biqi Capsule in treatment of rheumatoid arthritis based on tandem mass tags quantitative proteomics

YAO Peng-fei^{1,2,3,4}, HAN Yan-qi^{2,3,4}, ZHANG Xiang-lin⁵, XU Jun^{2,3,4}, WANG Lei⁶, LI Xin^{2,3,4}, ZHANG Tie-jun^{2,3,4}, LIU Chang-xiao^{2,3,4}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

收稿日期: 2023-06-29

基金项目: 国家自然科学基金重点项 (U21A20406)

作者简介: 姚鹏飞, 硕士研究生, 从事中药药理及作用机制研究。E-mail: yao924111312@163.com

*通信作者: 张铁军, 研究员。E-mail: zhangtj@tjipr.com

刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liucx@tjipr.com

4. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
5. Tianjin Darentang Jingwanhong Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300112, China
6. Tianjin Pharmaceutical Da Ren Tang Group Co., Ltd., Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the mechanism of Biqi Capsule (痹祺胶囊) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) by tandem mass tags (TMT) quantitative proteomics technology. **Methods** The rat model of RA induced by type II collagen was established, and Biqi Capsule were given for intervention. The left knee joint tissues of control group (C), model group (M) and Biqi Capsule 0.4 g/kg administration group (BQ) were taken. TMT quantitative proteomics technology was used to analyze and identify the proteins in the knee joint tissues of rats in each group. The differentially expressed proteins of M vs C, BQ vs M, BQ vs C were screened by expression difference multiples ≥ 1.2 or difference multiples ≤ 0.83 and $P < 0.05$, and the differentially expressed proteins with a callback trend after Biqi Capsule intervention were analyzed. Finally, RA disease targets were retrieved through GeneCards and OMIN databases, and the callback proteins related to RA disease were obtained by intersection analysis. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed to clarify the mechanism of Biqi Capsule on RA. **Results** After the intervention of Biqi Capsule, a total of 121 differential proteins had a callback trend, of which 38 were related to RA diseases, such as integrin subunit beta 2 (ITGB2), calmodulin 2 (CALM2), calcineurin subunit B type 1 (PPP3R1), prostacyclin synthase (PTGIS), etc. Bioinformatics analysis showed that these callback proteins were involved in multiple signaling pathways related to RA, such as ITGB2 was involved in the regulation of RA and leukocyte transendothelial cell migration signaling pathways; CALM2 and PPP3R1 regulated T cell, B cell receptor signaling pathway, T cell differentiation and osteoclast differentiation by regulating calcium signaling pathway; PTGIS was involved in arachidonic acid metabolic pathway. **Conclusion** Biqi Capsule may regulate multiple signaling pathways related to RA by interfering with the expressions of ITGB2, PPP3R1, CALM2, PTGIS and other proteins, and exert immunosuppression, anti-inflammation, blood circulation, inhibition of bone destruction and bone resorption, inhibition of pannus formation and other pharmacological effects, so as to achieve the effect of treating RA.

Key words: proteomics; Biqi Capsule; rheumatoid arthritis; differentially expressed proteins; integrin subunit beta 2; calmodulin 2; calcineurin subunit B type 1; prostacyclin synthase

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种系统性、对称性、异质性的慢性自身免疫性疾病, 主要病理特征为滑膜炎、血管翳生成、骨破坏及关节软骨损伤等^[1-2]。RA 发病机制复杂, 属中医“痹症”范畴, 《素问·痹论》有“风寒湿三气杂至, 合而为痹也”^[3], 外邪入侵是 RA 的主要病因。《类证治裁·痹证》记载: “诸痹, 良由营卫先虚, 腠理不密, 风寒湿乘虚内侵”^[4], 表明营卫不固、腠理疏松、气血亏虚是 RA 的内在病因。目前西医主要采用非甾体类抗炎药、抗风湿药、糖皮质激素以及生物制剂等药物进行治疗, 但长期服用会对中枢系统、消化系统、心血管损伤和肝肾功能等造成不同程度的损害^[5]。中药在 RA 的治疗中具有抗炎、镇痛、免疫调节等多重作用, 通过对机体进行多方面调节, 疗效显著, 不良反应小, 部分单味药及其复方制剂已在临床上得到广泛应用^[6]。

痹祺胶囊由马钱子、党参、白术、丹参、茯苓、牛膝、地龙、川芎、三七和甘草 10 味中药组成, 具有益气养血、祛风除湿、活血止痛的功效。临床上

用于治疗气血不足, 风湿痹阻, 肌肉关节酸痛, 关节肿大, 风湿、RA, 软组织损伤等症^[7-8]。文献报道, 痹祺胶囊对 RA 患者疗效确切, 能够显著降低患者红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 和免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 等病理指标, 有效改善患者关节疼痛、晨僵及关节肿胀程度等症状, 具有一定的骨保护作用, 提高患者的生活质量^[9-11]。基于此, 本研究通过运用串联质量标签 (tandem mass tags, TMT) 技术对 RA 大鼠膝关节组织进行蛋白质组学研究, 通过分析不同组间的差异表达蛋白, 为 RA 的诊断和发病机制提供新的线索, 并初步明确痹祺胶囊对 RA 的治疗机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 110~130 g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2019-0010。动物饲养于温度 20~26 °C、相对

湿度 45%~65%的屏障环境内。动物实验经天津天诚新药评价有限公司实验动物伦理委员会批准(No.2021031803)。

1.2 药品与试剂

痹祺胶囊(批号 408700)由天津达仁堂京万红药业有限公司提供;醋酸泼尼松片(批号 21020162)购自新乡市常乐制药有限责任公司;雷公藤总苷片(批号 180502)购自上海复旦复华药业有限公司;弗氏完全佐剂(批号 SLCJ4384)购自美国 Sigma 公司;鸡 II 型胶原蛋白(批号 200323)购自 Chondrex 公司;胰蛋白酶(批号 20220408)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAM, 批号 SLCB6518)、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT, 批号 P1171)购自美国 Promega 公司;尿素(批号 STBJ7774)购自美国 GibcoBRL 公司;乙二胺四乙酸(批号 2398B510)、苯甲基磺酰氟(批号 0106B036)、考马斯亮蓝染料 G250(批号 0138B020)、过硫酸胺(批号 BCBG6210V)购自美国 Amresco 公司;十二烷基硫酸钠(批号 031M0035V)、TEMED(批号 SHBC4286V)、溴酚蓝(批号 SHBL3668)购自美国 Sigma 公司;乙腈(批号 F21LCL201)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;TMT 试剂盒(批号 WJ334398)购自美国 Pierce 公司。

1.3 仪器

L-3000 型常规液相(RIGOL 公司);Ultimate 3000 nano LC system 纳升液相(美国 DIONEX 公司);Powerlook 2100XL-USB 扫描仪(英国 UMAX 公司);Fisher Q-Exactive 质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机选取 10 只作为对照组,其余大鼠在左侧足跖肉垫处皮内注射鸡 II 型胶原蛋白(0.1 mL/只),对照组注射等体积生理盐水。在第 1 次注射免疫的第 7 天,在背部注射 0.1 mL 相同乳剂加强免疫,观察大鼠状态至造模第 15 天,筛选双侧关节出现炎症肿胀的大鼠随机分为模型组、泼尼松(10 mg/kg)组、雷公藤总苷(10 mg/kg)组和痹祺胶囊各剂量(0.05、0.10、0.20、0.40 g/kg)组,每组 10 只。各给药组连续 ig 给药 15 d,对照组及模型组 ig 等体积 0.5%羧甲基纤维素钠溶液。末次给药前禁食不禁水 12 h 以上,末次给药结束 1 h 后,麻醉,腹主动脉采血,取对照组(C)、

模型组(M)、痹祺胶囊 0.4 g/kg 组(BQ)的大鼠左膝关节组织,每组随机取 3 个样本混为 1 个重复样本,每组 3 个重复用于蛋白质组学研究。

2.2 样品蛋白提取及浓度测定

在组织样品中加入裂解液,置于研磨机中匀浆混匀后,4 °C、20 000×g 离心 30 min。取上清后加入预冷的 TCA-丙酮,-20 °C 沉淀 2 h 以上。纯丙酮洗涤,4 °C、20 000×g 离心 30 min 后弃上清,在沉淀加入纯丙酮,-20 °C 沉淀 20 min,重复 3 次,清洗沉淀。在沉淀中加入裂解液,超声 5 min 助溶,20 000×g 离心 30 min,取上清。加入 DTT 至终浓度 10 mmol/L。56 °C 水浴 1 h,随后迅速加入 IAM 至终浓度 55 mmol/L,暗处静置 1 h。20 000×g 离心 30 min,取上清,使用 BCA 法对蛋白进行定量,取 1 μL 蛋白提取液(0.2 mg/mL)进行浓度测定。根据定量结果进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,判定蛋白浓度的准确度及蛋白提取质量。

2.3 蛋白质酶解及肽段 TMT 标记

分别取每个样品 30 μg 加入到 10 K 超滤管中,4 °C、14 000×g 离心 40 min 后,弃上清液。随即加入 200 μL TEAB 溶液(50 mmol/L),4 °C、14 000×g 离心 40 min,弃上清液。加入 1 μg/μL Trypsin,100 μg 蛋白质底物加入 3.3 μg 酶,37 °C 水浴 24 h。冻干消化液,然后每管加入 25 μL TEAB(200 mmol/L)复溶肽段。每管加入 41 μL 乙腈,加入 TMT 标记试剂,混匀后,室温孵育 1 h;加入 8 μL 5%羟胺,室温放置 15 min,真空浓缩仪抽干。

2.4 肽段预分离

使用 RIGOL L-3220 型常规液相进行肽段预分离纯化,色谱条件:Gemini NX-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.60 mm, 5 μm),流动相为 5%乙腈水溶液(A)-95%乙腈水溶液(B),梯度洗脱:0~95 min,100% A;95~101 min,100%~95% A;101~107 min,95%~91% A;107~113 min,91%~87% A;113~119 min,87%~81% A;119~125 min,81%~20% A;125~130 min,20%~95% A;体积流量 1 mL/min。准备样品:标记后抽干的样品用 1 mL 5%乙腈水溶液溶解,15 000×g 离心 10 min,取上清进行测试,得到预分离色谱图,按照色谱图分布,将出峰较少的组分进行合并,最终合并成 10 个组分,冻干后使用 C₁₈ 反相色谱进行除盐。

2.5 蛋白质谱检测

将 10 个预分离的样品采用 Dionex ultimate 3000

nano LC system 纳升液相进行分离。流动相 A 为 0.1%甲酸-2%乙腈水溶液, B 为 0.1%甲酸-98%乙腈水溶液, 洗脱梯度: 0~40 min, 95% A; 40~45 min, 95%~70% A; 45~48 min, 70%~40% A; 48~55 min, 40%~20% A; 55~65 min, 20%~95% A; 体积流量 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。分离后使用 Q-Exactive 质谱仪检测肽段信号, 质谱条件及参数为正离子模式, 母离子扫描范围 m/z 350~2000, 二级分辨率 35 000, 毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$, 离子源电压 1800 V, 碎裂模式高能碰撞解离 (higher collision energy dissociation, HCD), 归一化碰撞能量为 30 eV。

2.6 蛋白质鉴定及定量分析

将质谱原始文件输入到 PD(Proteome Discoverer 1.4, Thermo) 软件对质谱谱图进行筛选, 谱图筛选母离子范围 m/z 350~6000, 二级质谱图中最小峰数 10, 信噪比阈值 1.5。PD 软件根据 Mascot 2.3 搜索结果和筛选后的谱图进行蛋白鉴定, 参数设置: 固定修饰为 Carbamidomethyl (C), 可变修饰为 Oxidation (M)、Gln \rightarrow Pyro-Glu (N-term Q)、TMT 6 plex (K)、TMT 6 plex (N-term), 一级质量偏差为 1.5×10^{-5} , 二级质量偏差为 6×10^{-6} , 最大允许露切数为 1, 酶的类型为 Trypsin。鉴定所用蛋白数据库为 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)。定量分析时蛋白定量取值类型为 Median, 最小肽段数为 1, 归一化方法为 Median。对结果进行 ANOVA 方差分析, 进行差异显著性评估。选取 $P < 0.05$ 、差异倍数 ≥ 1.2 或差异倍数 ≤ 0.83 的蛋白为差异表达蛋白。

2.7 差异表达蛋白聚焦分析

对 M vs C、BQ vs M 2 个比较组的差异表达蛋白进行 Venn 图分析, 得到痹祺胶囊干预后有回调趋势的蛋白, 进一步与 GeneCards、OMIN 数据库检索得到的 RA 疾病靶点进行交集分析, 从而获取痹祺胶囊治疗后与 RA 疾病相关的回调蛋白。

2.8 生物信息学分析

通过 OmicsBean 数据库对 RA 相关的回调蛋白进行生物信息学分析, 分别从细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物过程 (biological process, BP) 3 个方面对靶点蛋白进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能分析, 同时对靶点蛋白进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路分析。

2.9 统计学分析

使用 R version 3.6.1 进行数据统计, 两组间比较采用 ANOVA 方差分析。

3 结果

3.1 差异表达蛋白结果分析

以 $P < 0.05$ 、差异倍数 ≥ 1.2 或差异倍数 ≤ 0.83 为条件筛选 M vs C、BQ vs M、BQ vs C 的差异蛋白 (显著上调表达蛋白和显著下调表达蛋白), 统计得到的差异表达蛋白火山图见图 1。结果显示, M vs C 组共有 1583 个差异表达蛋白, 其中上调蛋白有 784 个, 下调蛋白有 799 个; BQ vs M 组共有 234 个差异表达蛋白, 其中上调蛋白有 124 个, 下调蛋白有 110 个; BQ vs C 组共有 1548 个差异表达蛋白, 其中上调蛋白有 761 个, 下调蛋白有 787 个。

通过对痹祺胶囊治疗前后的差异表达蛋白进行 Venn 图分析 (图 2)。结果发现治疗前后共有 187 个蛋白重叠, 其中有 121 个差异表达蛋白具有回调趋势 (热图分析见图 3), 其中 69 个蛋白在 M 组中表达升高, 经痹祺胶囊治疗后显著下调; 52 个蛋白在 M 组中表达降低, 痹祺胶囊治疗后显著上调。由于这 121 个蛋白在造模前后和给药治疗后均发生了显著的差异表达变化, 初步推断它们与 RA 的发病以及痹祺胶囊的干预途径密切相关, 极有可能成为痹祺胶囊治疗 RA 的潜在靶标蛋白。

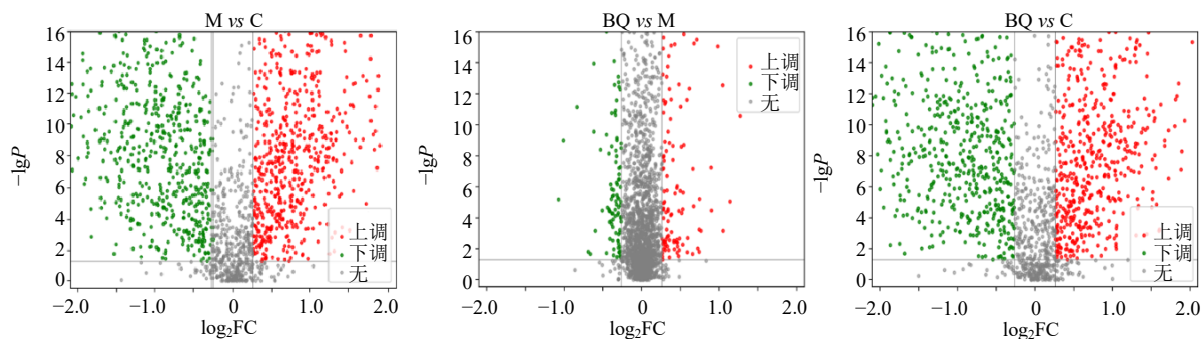


图 1 火山结果示意图

Fig. 1 Volcanic result diagram

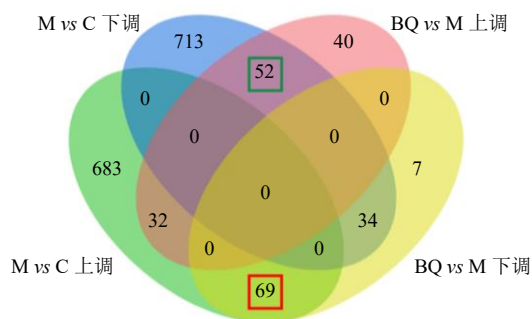


图 2 各组差异蛋白 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of differential protein analysis in each group

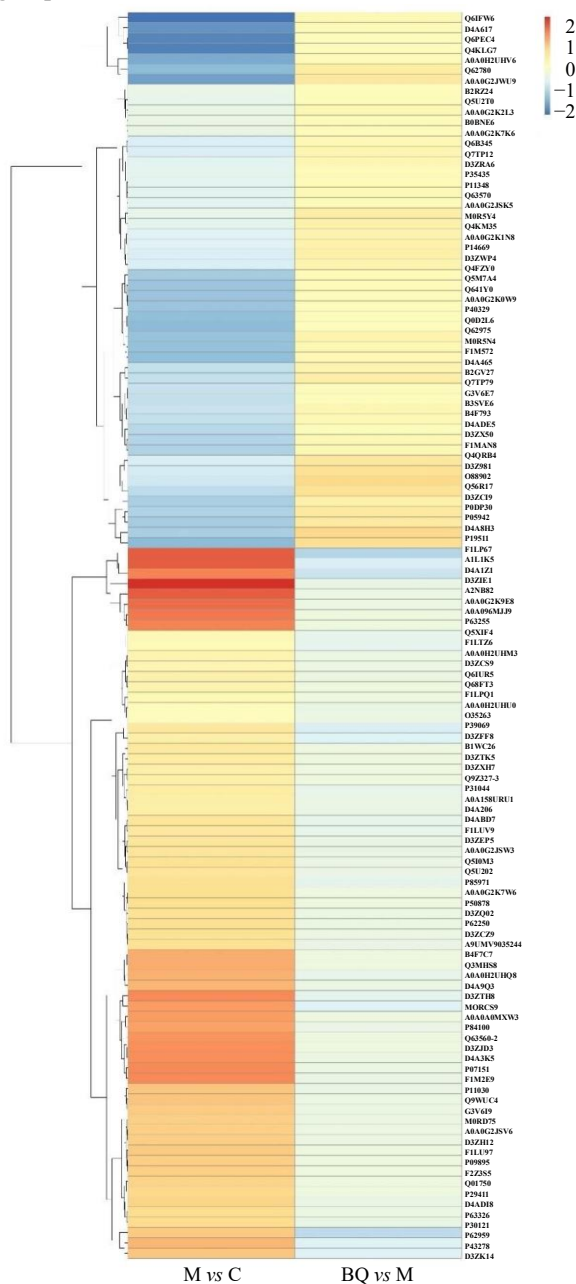


图 3 121 个回调蛋白热图

Fig. 3 Heat map of 121 callback proteins

3.2 回调蛋白聚焦分析

为了进一步聚焦痹祺胶囊对 RA 作用的核心靶点, 通过 GeneCards、OMIM 数据库检索 RA 疾病靶点, 共得到 5082 个疾病靶点, 通过与 121 个回调蛋白进行交集分析, 最终得到 38 个与 RA 疾病相关的回调蛋白, 相关信息见表 1, 初步认为 38 个蛋白为痹祺胶囊干预的核心靶点。

3.3 生物信息学分析

GO 分析结果见图 4 (以 P 值最小的前 20 个条目进行做图分析)。分析结果发现, 38 个核心回调蛋白在 CC 方面主要参与细胞外囊泡、外泌体、基

表 1 与 RA 疾病相关的回调蛋白信息

Table 1 Callback protein information associated with RA disease

蛋白	M vs C	BQ vs M
PPP3R1	1.24	0.31
CALM2	1.44	0.44
RPS8	3.73	0.56
ITGB2	1.26	0.69
HP	1.24	0.71
RPL23	3.63	0.71
NCAM1	1.76	0.74
MIF	1.28	0.74
RPL13	3.62	0.76
TIMP2	2.01	0.77
CFHR1	1.76	0.78
B2M	3.66	0.80
RPS6	2.28	0.80
RPS16	1.89	0.81
RPL4	1.97	0.81
ALYREF	1.60	0.82
PEBP1	1.48	0.82
RPS25	1.29	0.83
PSMA7	0.40	1.21
SUCLG2	0.81	1.21
SKP1	0.24	1.21
SHMT1	0.24	1.22
DAP	0.74	1.22
RARS1	0.40	1.22
FMOD	0.54	1.23
ENTPD1	0.27	1.23
DDOST	0.41	1.24
QDPR	0.70	1.25
ATP5F1C	0.72	1.27
S100A11	0.63	1.28
SETD7	0.53	1.28
LAMA5	0.48	1.30
TNXB	0.55	1.33
PSMB10	0.72	1.45
ANXA3	0.66	1.46
S100A4	0.46	1.63
PTPN22	0.61	1.86
PTGIS	0.36	1.97

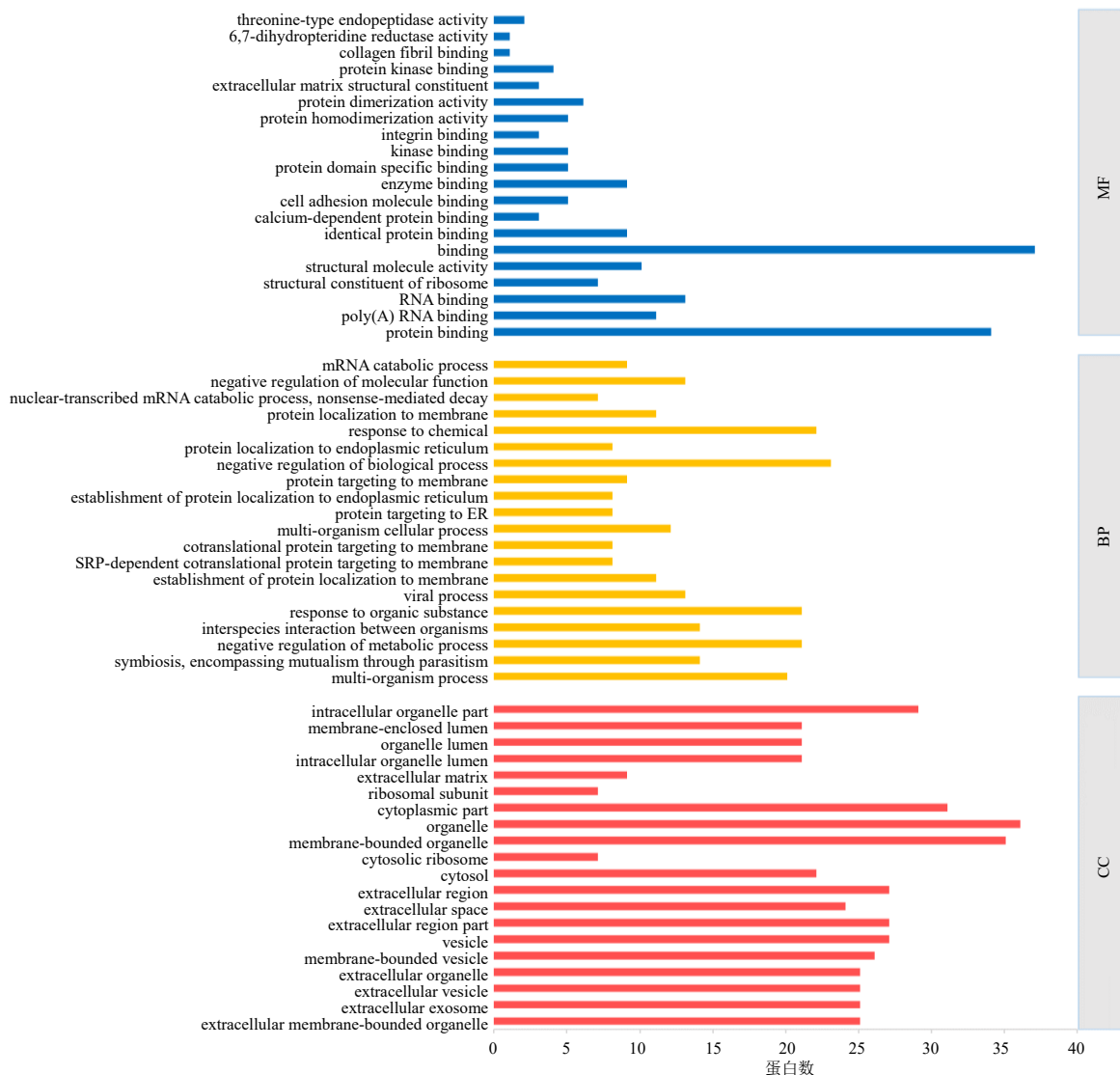


图 4 RA 相关的回调表达蛋白 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis of RA-related callback proteins

质、细胞外空间成分的构成，也涉及多种细胞器、细胞质、核糖体亚基以及细胞膜结构的组成。在 BP 方面主要涉及对代谢过程、分子功能、多种生物过程的调控，调节有机物间的相互作用及反应等生物过程。在 MF 方面主要参与多种蛋白质、蛋白酶、整合素、细胞黏附分子、RNA 结合等生物成分的结合过程，调节生物结构成分、多种蛋白酶及细胞外基质结构成分的活性。由此可推断痹祺胶囊可能通过干预上述生物过程及功能，多方面调节机体机能，进而发挥对 RA 的治疗作用。

3.4 通路富集分析

通路富集分析（图 5）发现，38 个核心回调蛋白参与了 RA 信号通路，与免疫和炎症相关的通路如 T、B 细胞受体信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化

信号通路、Th17 细胞分化信号通路、白细胞跨内皮迁移等，与骨破坏相关的通路如破骨细胞分化信号通路，与血管翳生成相关通路如血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）信号通路，与活血相关信号通路如血管平滑肌收缩、花生四烯酸代谢等。结果表明，痹祺胶囊可能通过干预 $\beta 2$ 整合素（integrin subunit beta 2, ITGB2）、钙调磷酸酶 B 亚基（calcineurin subunit B type 1, PPP3R1）、钙调蛋白 2（calmodulin 2, CALM2）、前列腺素合成酶（prostacyclin synthase, PTGIS）及 FOMD 等核心蛋白的表达，调节与免疫、炎症、破骨细胞分化、血管平滑肌及血管翳生成等相关信号通路，进而发挥免疫抑制、抗炎、活血、抑制破骨细胞分化及血管翳生成等作用，从而达到对 RA 的治疗效果。

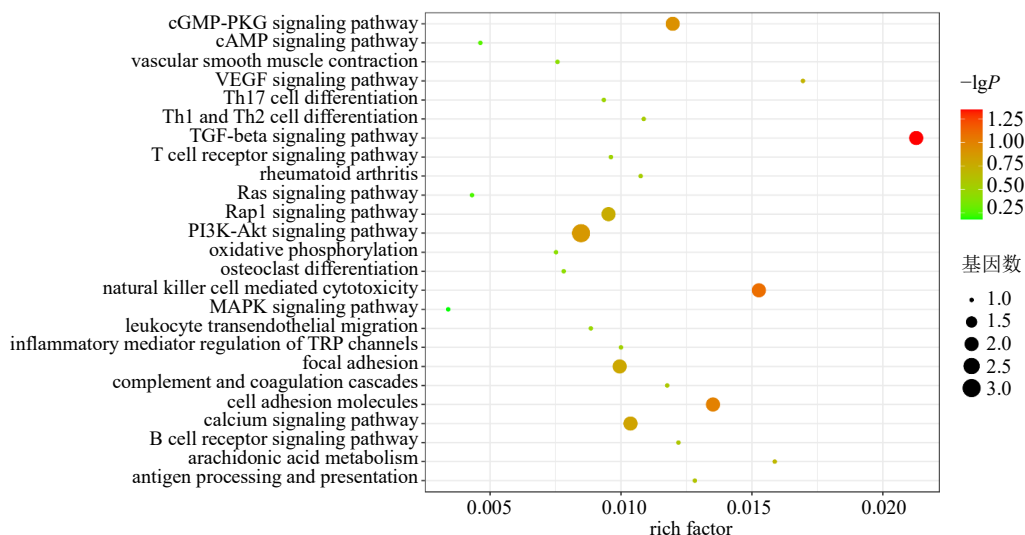


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

4 讨论

RA 是一种病因不明的进行性自身免疫性疾病，主要发病部位在于骨膜组织及其下的软骨，表现为滑膜炎、软骨损伤、多关节炎及损伤等。中医学认为 RA 属于“痹证”范畴，与“风、寒、湿”外邪入侵机体有关，其侵入人体，进而闭阻经络，淤血痰浊，致使气血不通，不通则痛，最终邪气停

留于关节，日久而成痹，最终出现关节肿大变形、淤血疼痛等症状^[12-13]。痹祺胶囊具有益气养血、祛风除湿、活血止痛的功效，对 RA 具有良好的疗效。本研究通过蛋白质组学实验发现，痹祺胶囊通过调节多个蛋白的表达，干预了 RA 信号通路、免疫及炎症信号传递、破骨细胞分化等过程，进而发挥免疫抑制、抗炎、软骨保护及活血等作用（图 6）。

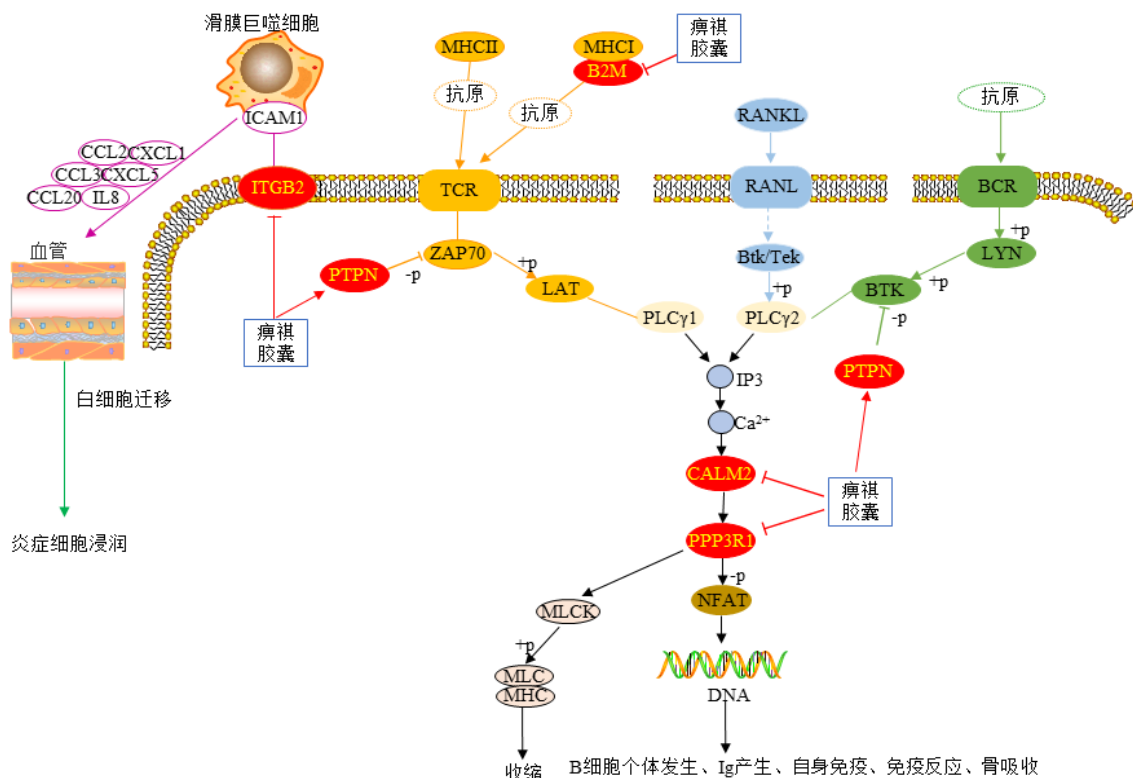


图 6 痹祺胶囊作用机制预测图

Fig. 6 Biqi Capsule mechanism prediction diagram

RA 作为自身免疫系统性疾病, 涉及多种免疫器官及免疫细胞、滑膜细胞及细胞因子表达等过程。现代药理学研究表明, 痹祺胶囊可通过下调白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、IL-18 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子表达, 调节 T 细胞分化及 Th1/Th2 细胞因子的平衡, 有效抑制关节炎症及滑膜增殖^[14-15]; T 淋巴细胞的增殖及分化在 RA 的发病过程中具有重要作用。细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 是一类介导细胞间和细胞与基质间起黏附作用的糖蛋白, 在 RA 滑膜炎症及免疫调节的形成过程中起重要作用^[16]; ITGB2 作为 T 细胞增殖及活化过程中的关键蛋白, 通过与 ICAM-1 特异性结合, 进而引起 T 细胞的黏附、迁移, 同时刺激 T 细胞活化, 活化的 T 细胞会促进多种细胞因子的释放, 致使机体免疫系统紊乱, 同时伴随炎症的发生^[17]。此外, 白细胞跨内皮细胞迁移与自身免疫和炎症形成密切相关。在组织损伤或感染时, 表达在白细胞上的 ITGB2 与血管内皮上的黏附分子 ICAM-1、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 相互结合, 紧密黏附后穿越内皮细胞及基膜, 跨内皮细胞迁移而离开血管, 从而引发自身免疫反应及炎症^[18-19]。另外, 蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 gene, PTPN22) 是参与 T 细胞信号调节的分子之一, 其通过去磷酸化和失活 T 细胞受体相关的激酶及其底物来防止 T 细胞激活, 可作为 T 细胞激活负调节因子^[20-21]。 β 2 微球蛋白 (Beta-2-microglobulin, B2M) 通常与主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC-I) 负责多种免疫细胞的抗原呈递, 参与 T 细胞的激活过程, 可作为 RA 诊断的标志物及治疗的潜在靶点^[22-23]。本研究发现, 与对照组比较, 模型组 ITGB2、B2M 的表达显著升高, PTPN22 表达显著降低, 而经痹祺胶囊干预后均可显著回调, 由此可见痹祺胶囊可通过抑制 ITGB2、B2M 表达, 增加 PTPN22 表达, 从而抑制 T 淋巴细胞活化及抗原递呈, 影响其功能的发挥, 进而降低 IL-6、IL-17、TNF- α 、 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 等下游细胞因子表达; 同时也可有效阻止白细胞跨内皮细胞迁移过程, 抑制白细胞募集, 共同发挥免疫抑制及抗炎作用。

Ca²⁺作为第二信使, 参与调节机体多种生物过

程及功能, 包括细胞存活、增殖、凋亡及免疫应答, 同时参与多种疾病过程, 与 RA 发病密切相关^[24], 王中华等^[25]通过基于网络药理学与 GEO 芯片方法探究发现钙信号通路是痹祺胶囊治疗 RA 的关键通路, 可通过调节基因功能发挥作用。T 细胞、B 细胞及其他免疫细胞表面上的抗体与携带抗原肽的抗原提呈细胞结合, 通过激活与不同磷脂酶 C 亚型偶联的 G 蛋白偶联受体, 刺激三磷酸肌醇 (inositol trisphosphate, InsP3) 的形成, InsP3 扩散至细胞内通过与其受体结合后导致细胞内 Ca²⁺浓度迅速升高^[26-27], Ca²⁺与 CALM2 结合形成复合物, 与 PPP3R1 结合后激活钙调神经磷酸酶, 激活 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 级联信号反应的正调控^[27-28], 最终调节 Th1、Th2、Th17 细胞分化并产生 IFN- γ 、IL-2、IL-12、IL-17 等细胞因子, 同时使得活化后的 B 细胞产生免疫球蛋白, 进而在机体自身免疫反应及炎症反应中共同发挥调节作用^[29-31]。另一方面, 在破骨细胞分化过程中, 骨髓基质细胞和成骨细胞分泌的抑制核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 与破骨细胞表面的核因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK) 结合, 经磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 激活 3InsP3-Ca²⁺信号通路, 钙信号通过活化 NFAT 的转录, 促进与破骨分化相关基因抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK)、降钙素受体 (calcitonin receptor, CTR)、基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 和 MMP-3 等表达, 促使破骨细胞发生融合、细胞骨架重塑和发挥骨吸收功能^[32-33], 研究发现, 痹祺胶囊能显著下调 RANKL 表达, 上调骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 表达, 从而抑制滑膜增生, 减轻关节软骨及骨破坏^[34-35]。同时, Ca²⁺也参与血管平滑肌收缩信号通路, PLC- β 激活后, 启动 Ca²⁺信号通路, 肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 可由 CALM2 激活, 进而对肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 进行磷酸化, 使肌球蛋白得以激活肌球蛋白三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶, 最终引起血管平滑肌的收缩^[36]。本实验发现, RA 模型组 CALM2 和 PPP3R1 的表达显著高于对照组, 经痹祺胶囊干预后有显著回调趋势, 由此推测, 痹祺胶囊通过抑制 CALM2 和 PPP3R1 表

达, 进而阻碍钙信号转导, 抑制 NFAT 的转录, 有效抑制 T 细胞、B 细胞中细胞因子的表达, 抑制与破骨分化相关基因的表达及血管平滑肌收缩, 从而发挥免疫抑制、抗炎、抑制骨吸收及活血等作用。

在花生四烯酸代谢中, PTGIS 会促进其代谢产生前列环素 (prostaglandin I₂, PGI₂), 其具有强烈的舒张血管和抑制血小板聚集的作用^[37], 同时也具有一定的抗炎及免疫调节作用^[38-39]。实验发现, 痹祺胶囊可使 PTGIS 表达升高, 通过调节花生四烯酸代谢, 抑制血小板聚集, 发挥活血功效。

综上所述, 痹祺胶囊通过影响 ITGB2、CALM2、PPP3R1、PTPN22、B2M、PTGIS 等关键蛋白的表达, 抑制 T 淋巴细胞的活化、增殖及白细胞跨内皮细胞迁移, 阻止 Ca²⁺通路的信号传导, 调控花生四烯酸代谢等生物过程, 发挥免疫抑制、抗炎、抑制骨吸收及活血等药理作用。后续仍需针对这些关键靶点蛋白进行相关验证性实验研究, 以进一步明确痹祺胶囊治疗 RA 的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] McInnes I B, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [2] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [3] 柴剑波译. 黄帝内经 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2012: 131-537.
- [4] 刘怡, 秦玉龙. 《类证治裁》辨治痹证经验探析 [J]. *中医药通报*, 2015, 14(4): 43-45.
- [5] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. *中华内科杂志*, 2018, 57(4): 242-251.
- [6] 张靖, 周彬, 王彦丽, 等. 抗类风湿性关节炎中药的研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(15): 2189-2194.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1808.
- [8] 张冬梅, 李宝丽. 痹祺胶囊治疗胶原诱导型关节炎大鼠的作用机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(4): 1059-1062.
- [9] 白人骁. 痹祺胶囊治疗类风湿关节炎的多中心随机对照临床试验 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(9): 3821-3825.
- [10] 周忠良, 朱俊琛, 苏国宏. 痹祺胶囊联合关节腔内臭氧注射治疗膝骨性关节炎的疗效评价 [J]. *中草药*, 2023, 54(6): 1879-1885.
- [11] 蔡晓. 痹祺胶囊治疗类风湿关节炎的骨保护疗效评价 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [12] 龚雪, 汪元. 类风湿关节炎中医病因病机研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2020, 9(6): 62-65.
- [13] 成满福. 对网络数据库中类风湿性关节炎中医病因病机理论的研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2016.
- [14] 徐艳明. 痹祺胶囊对 CIA 大鼠 IL-6 及 JAK-STAT 信号通路的影响 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [15] 郑双融, 李宝丽. 痹祺胶囊对 II 型胶原诱导性关节炎大鼠滑膜增殖及血清 IL-18、TNF- α 水平的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(8): 3330-3333.
- [16] Lee J I, Park H J, Park H J, et al. Epitope-based ligation of ICAM-1: Therapeutic target for protection against the development of rheumatoid arthritis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(2): 450-455.
- [17] Altorki T, Muller W, Brass A, et al. The role of β_2 integrin in dendritic cell migration during infection [J]. *BMC Immunol*, 2021, 22(1): 2.
- [18] Schwartz A B, Campos O A, Criado-Hidalgo E, et al. Elucidating the biomechanics of leukocyte transendothelial migration by quantitative imaging [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 635263.
- [19] Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues [J]. *Immunity*, 2014, 41(5): 694-707.
- [20] Schulz S, Zimmer P, Pütz N, et al. rs2476601 in PTPN22 gene in rheumatoid arthritis and periodontitis—a possible interface? [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 389.
- [21] Abbasifard M, Imani D, Bagheri-Hosseinabadi Z. PTPN22 gene polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis (RA): Updated systematic review and meta-analysis [J]. *J Gene Med*, 2020, 22(9): e3204.
- [22] Wang H B, Liu B R, Wei J. Beta2-microglobulin (B2M) in cancer immunotherapies: Biological function, resistance and remedy [J]. *Cancer Lett*, 2021, 517: 96-104.
- [23] Wang Q, Fan Z J, Li J H, et al. Systematic analysis of the molecular mechanisms of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis using text mining [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2021, 39(4): 829-837.
- [24] 杨越, 李露, 崔玮璐, 等. Ca²⁺与类风湿性关节炎的相关性研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(10): 1602-1605.
- [25] 王中华, 赵安兰, 程超, 等. 基于网络药理学与 GEO 芯片探究痹祺胶囊治疗类风湿关节炎的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(1): 50-57.
- [26] Kong F Y, You H J, Zheng K Y, et al. The crosstalk between pattern-recognition receptor signaling and calcium signaling [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 192: 745-756.
- [27] Berridge M J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(4): 1261-1296.
- [28] Park Y J, Yoo S A, Kim M, et al. The role of calcium-

- calcineurin-NFAT signaling pathway in health and autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 195.
- [29] Kondo Y, Yokosawa M, Kaneko S, *et al.* Review: Transcriptional regulation of CD4⁺ T cell differentiation in experimentally induced arthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(5): 653-661.
- [30] Flytlie H A, Hvid M, Lindgreen E, *et al.* Expression of MDC/CCL22 and its receptor CCR4 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis [J]. *Cytokine*, 2010, 49(1): 24-29.
- [31] Wright H L, Lyon M, Chapman E A, *et al.* Rheumatoid arthritis synovial fluid neutrophils drive inflammation through production of chemokines, reactive oxygen species, and neutrophil extracellular traps [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 584116.
- [32] Zeng X Z, He L G, Wang S, *et al.* Aconine inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells by suppressing NF- κ B and NFATc₁ activation and DC-STAMP expression [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(2): 255-263.
- [33] Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca²⁺-NFATc₁ signaling is an essential axis of osteoclast differentiation [J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1): 241-256.
- [34] 谭洪发, 荣晓凤, 徐艳明, 等. 痹祺胶囊对 CIA 大鼠 OPG/RANKL 表达的影响 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(10): 878-883.
- [35] 张冬梅, 李宝丽. 痹祺胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠骨桥蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1359-1362.
- [36] 高文, 李科, 李雪萍, 等. 肌球蛋白轻链激酶介导的肌球蛋白调节轻链磷酸化研究 [J]. 医学信息, 2021, 34(8): 28-30.
- [37] Badimon L, Vilahur G, Rocca B, *et al.* The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(9): 2001-2015.
- [38] Dorris S L, Peebles R S. PGI₂ as a regulator of inflammatory diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 926968.
- [39] Norlander A E, Peebles R S. Prostaglandin I₂ and T regulatory cell function: Broader impacts [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(10): 1231-1234.

[责任编辑 李亚楠]