

痹祺胶囊对类风湿性关节炎关键靶点的调节作用

韩彦琪^{1,2,3}, 宋紫腾^{1,2,3}, 姚鹏飞^{1,4}, 张祥麒⁵, 许浚^{1,2,3}, 王磊⁶, 赵专友^{1,2,3}, 张铁军^{1,2,3*}, 刘昌孝^{1,2,3*}

1. 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
2. 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
3. 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
4. 天津中医药大学, 天津 301617
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 采用 G 蛋白偶联受体及酶活检测实验方法, 探究痹祺胶囊对类风湿性关节炎关键靶点的调节作用, 明确其作用机制。方法 选取与抑制滑膜炎炎症相关的靶点[环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、趋化因子受体 4 (C-C chemokine receptor type 4, CCR4)], 与抑制血管翳生成相关的靶点[血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2/KDR)], 与抑制基质降解相关的受体[基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)], 以及与活血相关的靶点[凝血酶、磷酸二酯酶 (cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase, PDE3A)、肾上腺素受体 α 1 (alpha-1A adrenergic receptor, ADRA1A)]为研究载体, 通过胞内钙离子荧光和酶抑制剂检测技术评价痹祺胶囊中 19 个主要单体成分对受体的拮抗作用以及对酶的抑制活性。结果 19 个化合物中, 土的宁、党参炔苷、茯苓酸、丹参素、丹参酮 II_A、丹酚酸 B、迷迭香酸、人参皂苷 Rb₁、阿魏酸、藜本内酯、牛膝皂苷 D 可显著抑制 COX-2 活性; 马钱子碱、土的宁、党参炔苷、白术内酯 III、茯苓酸、丹参素、丹参酮 II_A、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、藜本内酯、蜕皮甾酮、甘草苷可显著抑制 NOS 活性; 丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 对 NF- κ B 有较好拮抗作用; 藜本内酯、牛膝皂苷 IV、甘草次酸可拮抗 CCR4; 茯苓酸、牛膝皂苷 IV、丹酚酸 B、藜本内酯、甘草次酸能抑制 VEGFR2/KDR; 党参炔苷、丹参素、丹酚酸 B、迷迭香酸、藜本内酯可抑制 MMP-3 活性; 丹参素、丹参酮 II_A、阿魏酸可抑制凝血酶活性, 迷迭香酸、丹酚酸 B、藜本内酯、甘草苷可抑制 PDE3A 活性; 马钱子碱、土的宁、藜本内酯、牛膝皂苷 IV、甘草次酸可拮抗 ADRA1A。结论 痹祺胶囊可能通过干预 COX-2、NOS、NF- κ B、CCR4、VEGFR2/KDR、MMP-3、凝血酶、PDE3A 及 ADRA1A 等关键靶点, 发挥抗炎止痛、抑制血管翳形成及基质降解、活血作用, 进而起到治疗类风湿性关节炎的药效作用。其药效物质基础可能为马钱子碱、土的宁、党参炔苷、白术内酯 III、茯苓酸、丹参素、迷迭香酸、阿魏酸、丹参酮 II_A、丹酚酸 B、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、藜本内酯、蜕皮甾酮、牛膝皂苷 D、甘草次酸、甘草苷。

关键词: 痹祺胶囊; 类风湿性关节炎; 关键靶点; 作用机制; 药效物质基础; 马钱子碱; 土的宁; 甘草苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7648-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.006

Regulatory effect of Biqi Capsule on key targets of rheumatoid arthritis

HAN Yan-qi^{1,2,3}, SONG Zi-teng^{1,2,3}, YAO Peng-fei^{1,4}, ZHANG Xiang-qi⁵, XU Jun^{1,2,3}, WANG Lei⁶, ZHAO Zhuan-you^{1,2,3}, ZHANG Tie-jun^{1,2,3}, LIU Chang-xiao^{1,2,3}

1. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
2. 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: 2023-06-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (U21A20406)

作者简介: 韩彦琪, 副研究员, 研究方向为中药药效及作用机制研究。E-mail: hanyq@tjpr.com

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

刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liucx@tjpr.com

3. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, 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 explore the regulatory effect of Biqi Capsule (痹祺胶囊) on key targets of rheumatoid arthritis by G protein coupled receptor (GPCR) and enzyme activity assay. **Methods** The receptors cyclooxygenase-2 (COX-2), nitric oxide synthase (NOS), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and C-C chemokine receptor type 4 (CCR4) related to the inhibition of synovial inflammation, vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2/KDR) associated with the inhibition of pannus formation, matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) related to the inhibition of matrix degradation, thrombin, cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase (PDE3A), alpha-1A adrenergic receptor (ADRA1A) related to blood circulation were selected as research vectors. Intracellular calcium fluorescence detection and enzyme inhibitor detection techniques were used to evaluate the antagonistic effect of 19 main monomer components in Biqi Capsule on receptor and the inhibitory activity on enzyme. **Results** Among the 19 compounds, strychnine, lobetyolin, pachymic acid, danshensu, tanshinone IIA, salvianolic acid B, rosmarinic acid, ginsenoside Rb1, ferulic acid, ligustilide, and achyranthes saponin D significantly inhibited COX-2 activity; Brucine, strychnine, lobetyolin, atractylenolide III, pachymic acid, danshensu, tanshinone IIA, salvianolic acid B, rosmarinic acid, notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1, ligustilide, ecdysterone and liquiritin could significantly inhibit NOS activity; Danshensu, rosmarinic acid and salvianolic acid B had good antagonistic effects on NF- κ B; Ligustilide, achyranthes saponin IV and glycyrrhetic acid could antagonize CCR4; Pachymic acid, achyranthes saponin IV, salvianolic acid B, ligustilide and glycyrrhetic acid could inhibit VEGFR2/KDR; Lobetyolin, danshensu, salvianolic acid B, rosmarinic acid and ligustilide could inhibit MMP-3 activity; Danshensu, tanshinone IIA and ferulic acid could inhibit the activity of thrombin; Rosmarinic acid, salvianolic acid B, ligustilide and liquiritin could inhibit PDE3A activity; Brucine, strychnine, ligustilide, achyranthes saponin IV and glycyrrhetic acid could antagonize ADRA1A. **Conclusion** Biqi Capsule may exert anti-inflammatory, analgesic, blood activating, inhibiting pannus formation, and matrix degradation effects by interfering with key targets of COX-2, NOS, NF- κ B, CCR4, VEGFR2/KDR, MMP-3, thrombin, PDE3A, ADRA1A, and thus play a role in treatment of rheumatoid arthritis. Its pharmacodynamic material basis may be brucine, strychnine, lobetyolin, atractylenolide III, pachymic acid, danshensu, rosmarinic acid, ferulic acid, tanshinone IIA, salvianolic acid B, notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, ginsenoside Rb1, ligustilide, ecdysterone, achyranthes saponin D, glycyrrhetic acid and liquiritin.

Key words: Biqi Capsule; rheumatoid arthritis; key targets; mechanism; pharmacodynamic material basis; brucine, strychnine; liquiritin

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、系统性、炎症性自身免疫性疾病, 属于中医“痹病 (证)”范畴。主要表现为对称性、慢性、进行性多关节炎。RA 的基本病理特征是滑膜炎, 由于关节滑膜细胞增生, 形成血管翳, 进而侵犯关节软骨、软骨下骨、韧带和肌腱等, 造成关节软骨、骨关节囊破坏, 最终导致关节畸形和功能丧失, 严重时甚至可致残疾, 对患者的生活造成不利影响。现代医学表明, RA 患者伴有炎症、血瘀、软骨损伤等症[1]。

痹祺胶囊由马钱子、地龙、党参、茯苓、白术、川芎、丹参、三七、牛膝、甘草 10 味药材组成, 具有益气养血、祛风除湿、活血止痛的功效。临床研究表明, 痹祺胶囊对 RA 具有显著的治疗效果[2-5], 但对其作用机制的研究还不全面。为探究痹祺胶囊的关键作用靶点并明晰其药效物质基础, 本研究在

前期化学物质组、血中移行成分[6]及网络药理学研究的基础上并结合相关文献, 选取了 10 味药材中各结构类型的主要代表性成分共 19 个化合物为研究对象, 同时以与抑制滑膜炎相关的受体[环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、趋化因子受体 4 (C-C chemokine receptor type 4, CCR4)], 与活血相关的受体[凝血酶、磷酸二酯酶 (cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase, PDE3A)、肾上腺素受体 α 1 (alpha-1A adrenergic receptor, ADRA1A)], 与抑制血管翳生成相关的受体[血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2/KDR)], 以及与抑制基质降解相关的受体[基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)] 9 个关键靶点为研究载体, 通过运用胞内

钙离子荧光检测和酶抑制剂检测技术评价痹祺胶囊中 19 个主要单体成分对 9 个关键靶点的抑制活性。

1 材料

1.1 药品与试剂

QUANTI-Blue™ 检测试剂(批号 QBS-4222)、丙磺舒(批号 2157171)购自美国 InvivoGen 公司; 细胞活力荧光检测试剂盒(批号 0000424721)购自美国 Promega 公司; G418(批号 2121442)购自美国 Gibco 公司; 星形孢菌素(批号 S142105)购自 Selleckchem 公司; Fluo-4 Direct 试剂盒(批号 2325989)、HBSS(批号 2193007)、HEPES(批号 2192573)购自美国 Invitrogen 公司; 人凝血酶(批号 F1900752)、BIOPHEN CS-11(38)(批号 F2000197)购自 HYPHEN BioMed 公司; KDR(批号 07CBS-0540)购自 Carna 公司; Peptide FAM-P22 GL(批号 P180116-MJ112393)购自 Biochem 公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 批号 WXBD820V4)、阿加曲班(批号 141396-28-3)、肾上腺素(批号 WXBD1853V)、WB4101(批号 117H46492)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP, 批号 987-65-5)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 474382)、EDTA(批号 60-00-4)购自美国 Sigma 公司; FLIPR® Calcium 4 assay kit(批号 3233461)、IMAP FP IPP Explorer Kit(批号 MD167386)、羧基荧光素标记的环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP, 批号

2873747)购自 Molecular Devices 公司; PDE3A(批号 110802HEGE)购自 BPS 公司; Dipyrindamole(批号 15979)购自美国 MCE 公司; 人 TARC/CCL17(批号 M2106001)购自 Genscrip 公司; C-021(批号 2A/249015)购自 Tocris 公司; OptiPlate™-384 黑色微孔板(批号 8240-18341)购自美国 PerkinElmer 公司; COX-2 抑制剂检测试剂盒(批号 041421210419)购自上海碧云天生物技术有限公司; NOS 抑制剂检测试剂盒(批号 7G26K02080)购自 BioVision 公司; MMP-3 抑制剂检测试剂盒(批号 GR3381906-1)购自英国 Abcam 公司; 19 个单体化合物信息见表 1。

1.2 细胞

HEK-Dual™ TNF- α 细胞、稳定表达 CCR4 受体的 HEK293 细胞购自上海药明康德新药开发有限公司; 稳定表达 ADRA1A 受体的 CHO-K1 细胞购自上海睿智化学研究有限公司。

1.3 仪器

FlexStation 3 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); TC20 型细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司); CKX41SF 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); Echo550 型超声波纳升液体处理系统(美国 Labcyte 公司); EZ Reader II 型激酶检测仪/微流控系统(美国 Perkin Elmer 公司); Allegra™ 25R 型离心机(美国 Beckman 公司); 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

表 1 19 个单体化合物信息

Table 1 Information of 19 monomer compounds

序号	化合物	厂家	批号	质量分数	来源
1	马钱子碱	中国食品药品检定研究院	110706-200505	95.90%	马钱子
2	土的宁	中国食品药品检定研究院	110705-200306	97.00%	马钱子
3	党参炔苷	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-21061005	99.57%	党参
4	白术内酯 III	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-20110611	99.97%	白术
5	茯苓酸	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-18072910	98.31%	茯苓
6	丹参素	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-18060920	98.38%	丹参
7	丹参酮 II _A	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-17101811	99.33%	丹参
8	丹酚酸 B	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-21030110	98.60%	丹参
9	迷迭香酸	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-18053110	99.02%	丹参
10	三七皂苷 R ₁	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-21011910	98.12%	三七
11	人参皂苷 R _{g1}	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-20110810	99.16%	三七
12	人参皂苷 R _{b1}	成都曼斯特生物科技有限公司	110704-201827	91.20%	三七
13	阿魏酸	上海源叶生物科技有限公司	L03A9D57744	≥98%	川芎
14	藁本内酯	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-21090104	≥98%	川芎
15	蜕皮甾酮	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-21060110	99.12%	牛膝
16	牛膝皂苷 D	上海源叶生物科技有限公司	S04GB159770	≥94%	牛膝
17	次黄嘌呤	上海源叶生物科技有限公司	T13J11X107944	≥98%	地龙
18	甘草次酸	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-21030707	99.10%	甘草
19	甘草苷	成都曼斯特生物科技有限公司	MUST-21052114	99.16%	甘草

2 方法

2.1 抑制滑膜炎症相关靶点抑制实验

2.1.1 COX-2 抑制活性实验 取适量待测样品,用 DMSO 将化合物配制成 0.2、2 mmol/L 检测浓度的溶液(终浓度为 10、100 $\mu\text{mol/L}$)。以塞来昔布为阳性对照,以 100 $\mu\text{mol/L}$ 的起始浓度(终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$),在 DMSO 中 5 倍连续梯度稀释 8 个点。按照试剂盒说明书进行操作,计算每个样品的抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{RFU}_{100\% \text{酶活性对照}} - \text{RFU}_{\text{样品}}) / (\text{RFU}_{100\% \text{酶活性对照}} - \text{RFU}_{\text{空白对照}})$$

2.1.2 NOS 抑制活性实验 取适量待测样品,用缓冲液将化合物配制成 40、400 $\mu\text{mol/L}$ (终浓度为 10、100 $\mu\text{mol/L}$),以二苯基氯化碘盐(diphenyleneiodonium chloride, DPI)为阳性对照,以 200 $\mu\text{mol/L}$ 的起始浓度(终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$),用缓冲液 5 倍连续梯度稀释 8 个点。按照试剂盒说明书进行操作,计算抑制率。

2.1.3 NF- κ B 拮抗实验 将 10 μL 终浓度为 10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的待测样品加入到 96 孔板,参考化合物肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)最高质量浓度为 1000 ng/mL,3 倍梯度,共 9 个质量浓度,阴性对照孔(NC)和阳性对照孔(PC)每孔加入 10 μL 培养基(DMSO 终体积分数为 0.5%)。然后按照 5×10^4 个/孔将 80 μL HEK-Dual™ TNF- α 细胞接种于已加好待测样品的 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱共孵育 2 h 后,PC 组每孔加入 10 μL 培养基,其余组每孔加入 10 μL 200 ng/mL 的 TNF- α (终质量浓度 20 ng/mL),离心后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱共孵育 24 h。每孔取 20 μL 细胞上清,加入含有 180 μL QUANTI-Blue™ 试剂的实验板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,用多功能酶标仪 SpectraMax M2e 检测 650 nm 的吸光度(A)值。按照 Celltiter-Glo 说明书方法操作,化学发光信号(RLU)用多功能酶标仪 synergy2 检测。

$$\text{化合物抑制活性} = (A_{\text{化合物}} - A_{\text{NC}}) / (A_{\text{PC}} - A_{\text{NC}})$$

$$\text{细胞活性} = \text{RLU}_{\text{化合物}} / \text{RLU}_{\text{PC}}$$

2.1.4 CCR4 拮抗实验 稳定表达 CCR4 受体的 HEK293 细胞 (DMEM+10%胎牛血清、300 $\mu\text{g/mL}$ G418、2 $\mu\text{g/mL}$ BS),以 1×10^6 个/mL 接种于多聚赖氨酸包被的 384 孔板,5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育过夜。

(1) 80%有效浓度(80% effective concentration,

EC₈₀)检测:去除细胞板中培养液,每孔加入 20 μL 检测缓冲液(20 mmol/L HEPES、1 \times HBSS、0.5% BSA),再加入 20 μL Fluo-4 检测试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min,室温静置 10 min。将激动剂人 TARC/CCL17 用检测缓冲液 3 倍稀释成 10 个浓度并转移到 EC₈₀ 检测化合物板中,每孔 30 μL (起始浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$)。启动仪器,从化合物板中转移 10 μL 激动剂到细胞板中,读数,计算 EC₈₀。

(2) 化合物拮抗活性检测:将 19 个化合物用 DMSO 稀释为 2 mmol/L 溶液(终浓度为 10、100 mmol/L),将阳性拮抗剂 C-021 进行 3 倍稀释成 10 个浓度(起始终浓度 50 mmol/L),用 Echo 分别转移 900 nL 到 CCR4 化合物板中,每孔加入 30 mL 检测缓冲液。去除细胞板中培养液,每孔加入 20 mL 检测缓冲液,然后再加入 20 mL Fluo-4 检测试剂。用 FLIPR 转移 10 mL 化合物至细胞板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min,室温静置 10 min。配制 CCR4 的 EC₈₀ 并加入到 EC₈₀ 板中,每孔 30 mL。从 EC₈₀ 板中转移 10 mL 化合物到细胞板中,读数,计算各化合物抑制率。

$$\text{抑制率} = 100 - (\text{RLU} - \text{LC}) / (\text{DMSO} - \text{LC})$$

RLU 为相对 A 值,1 至 Maximum allowed 的读值;DMSO 为 DMSO 组荧光信号平均值;LC 为拮抗剂最高浓度点荧光信号平均值

2.2 抑制血管翳形成相关靶点抑制实验

将 FAM 标记的底物多肽和 ATP 加入 1 倍激酶缓冲液[(50 mmol/L HEPES、pH 7.5、0.001 5%聚氧乙烯月桂醚-35(Brij-35)],形成 2.5 倍底物溶液。用 DMSO 配制 19 个待测化合物储液,用激酶缓冲液稀释成 5 倍检测浓度(终浓度为 10、100 $\mu\text{mol/L}$)。阳性抑制剂星形孢菌素最高检测浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$,3 倍稀释,10 个浓度点。取 5 μL 的 5 倍浓度阳性对照及待测样品到 384 孔反应板,空白对照组加 5 μL DMSO。加入 10 μL 2.5 倍激酶溶液,阴性对照孔加入等体积 1 倍激酶缓冲液,室温下孵育 10 min。加入 10 μL 2.5 倍底物溶液,28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min 后加入 35 μL 终止液终止反应。激酶检测仪读取转化率数据,计算抑制率。

2.3 抑制基质降解相关靶点抑制实验

取适量待测样品,用 DMSO 将化合物配制成一定浓度的母液,用乙醇稀释到 1、10 mmol/L 检测浓度的溶液(终浓度为 10、100 $\mu\text{mol/L}$)。以 NNGH 为阳性对照,以 1300 $\mu\text{mol/L}$ 的起始浓度(终浓度 13

μmol/L), 在 DMSO 中 10 倍连续梯度稀释 8 个点。按照试剂盒说明书操作。

2.4 活血作用相关靶点抑制实验

2.4.1 凝血酶抑制活性实验 以阿加曲班为阳性对照, 以 2 mmol/L 的起始浓度(终浓度 200 μmol/L), 在 DMSO 中 5 倍连续梯度稀释 8 个点, 转移 6 μL 到 96 孔反应板中; 待测样品转移 6 μL 到反应板中, 化合物终浓度为 10、100 μmol/L, 空白对照孔及 100%酶活性对照孔每孔加入 6 μL DMSO。配制含 0.05 mol/L Tris buffer、0.3 mol/L NaCl、pH 7.8 的缓冲液, 100%酶活性对照孔、阳性对照组及样品组各加入 42 μL, 空白对照组加入 48 μL。用缓冲液将凝血酶(FIIa)稀释为工作浓度 3 NIH/mL(终浓度 0.3 NIH/mL), 100%酶活性对照孔、阳性对照组及样品组各加入 6 μL, 37 °C 孵育 5 min。用缓冲液将底物稀释为工作质量浓度 2.5 mg/mL(终质量浓度 0.25 mg/mL), 向每组各加入 6 μL, 37 °C 孵育 5 min, 在 405 nm 检测 A 值, 计算抑制率。

2.4.2 PDE3A 抑制活性实验 5 倍反应缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.2、10 mmol/L MgCl₂、0.05% NaN₃、0.01% 聚山梨酯-20、1 mmol/L DTT); 反应终止液(5 倍 IMAP progressive binding A 溶液、5 倍 IMAP progressive binding B 溶液、IMAP progressive binding bead)。阳性抑制剂曲喹辛最大给药浓度为 0.1 μmol/L, 3 倍梯度稀释, 共 10 个给药浓度, 待测化合物给药浓度为 10、100 μmol/L。

将化合物用 DMSO 在 Echo384 孔板上稀释到所需要的浓度, 用 Echo550 仪器从 Echo384 孔板中转移 200 nL 样品到 384 反应板中, 阴性对照(加酶组)和阳性对照(不加酶组)均转移 200 nL 的 100% DMSO。将 PDE3A 加入 1 倍反应缓冲液, 形成终质量浓度为 0.075 μg/mL 的 2 倍酶溶液。将 FAM 标记的 cGMP 加入 1 倍反应缓冲液, 形成 2 倍底物溶液。向 384 孔反应板孔中加入 10 μL 的 2 倍酶溶液, 对于无酶活对照孔, 用 10 μL 的 1 倍反应缓冲液替代酶溶液, 1000 r/min 离心 1 min, 室温下孵育 15 min, 每孔中加入 10 μL 的 2 倍底物溶液, 1000 r/min 离心 1 min, 室温反应 30 min, 每孔中加入 60 μL 的反应终止液终止反应, 室温下摇床 600 r/min 振荡避光孵育 60 min。用酶标仪读数, 参数设置 Ex480/Em535(s), Em535(p), 计算抑制率。

2.4.3 ADRA1A 受体拮抗活性实验 以肾上腺素和 WB4101 为阳性激动化合物和阳性拮抗化合物,

最高检测浓度为 4 μmol/L, 4 倍稀释, 10 个浓度点。19 个化合物用 DMSO 配制, 最终检测浓度为 10、100 μmol/L, DMSO 体积分数均未超过 0.2%。稳定表达 ADRA1A 受体的 CHO-K1 细胞以 1.5 × 10⁴ 个/孔接种到 384 微孔板, 过夜培养后加入 20 μL 染料, 再加入 10 μL 配制好的样品溶液后在培养箱中孵育 1 h, 再于室温平衡 15 min。检测时, 将细胞板、阳性激动剂板放入 FLIPR 内指定位置, 由仪器自动加入 12.5 μL 的 5 × EC₈₀ 浓度的阳性激动剂, 运行抑制剂检测程序, 仪器总体检测时间为 120 s, 在第 21 秒时自动将 12.5 μL 阳性激动剂加入到细胞板内。以 1~20 s 的平均荧光强度值作为基线, 21~120 s 的最大荧光强度值减去基线值即为相对荧光强度值(ΔRFU)。

$$\text{激活率} = (\Delta\text{RFU}_{\text{化合物}} - \Delta\text{RFU}_{\text{背景}}) / (\Delta\text{RFU}_{\text{EC100 激动剂}} - \Delta\text{RFU}_{\text{背景}})$$

$$\text{抑制率} = 1 - (\Delta\text{RFU}_{\text{化合物}} - \Delta\text{RFU}_{\text{背景}}) / (\Delta\text{RFU}_{\text{EC80 激动剂}} - \Delta\text{RFU}_{\text{背景}})$$

2.5 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5 进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 选用“log(inhibitor) vs. response-variable slope”拟合分析, 计算阳性对照的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 抑制滑膜炎症相关靶点实验结果

3.1.1 COX-2 实验结果 通过多浓度梯度给药, 得到阳性抑制剂塞来昔布对 COX-2 的抑制率曲线(图 1), 计算得到 IC₅₀ 值为 10.73 nmol/L。19 个化合物对 COX-2 抑制活性实验结果见图 2。由结果可知, 与阴性对照组比较, 丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 在 10、100 μmol/L 对该酶抑制率达 80% 以上, 均有显著抑制活性($P < 0.001$); 藜本内酯在 10、100 μmol/L 对该酶也有较显著抑制作用($P < 0.05$ 、0.001), 且都有一定浓度相关性。人参皂苷 Rb₁、阿魏酸在 100 μmol/L 浓度对该酶抑制率均在 70% 以上, 丹参酮 II_A、党参炔苷在 100 μmol/L 浓度对该酶抑制率均在 50% 以上, 均有显著抑制活性($P < 0.001$); 土的宁、茯苓酸、牛膝皂苷 D 在 10、100 μmol/L 对该酶抑制率在 30%, 且都具有显著性差异($P < 0.01$ 、0.001)。

3.1.2 NOS 实验结果 通过多浓度梯度给药, 得到阳性抑制剂 DPI 对 NOS 的抑制率曲线(图 1), 其

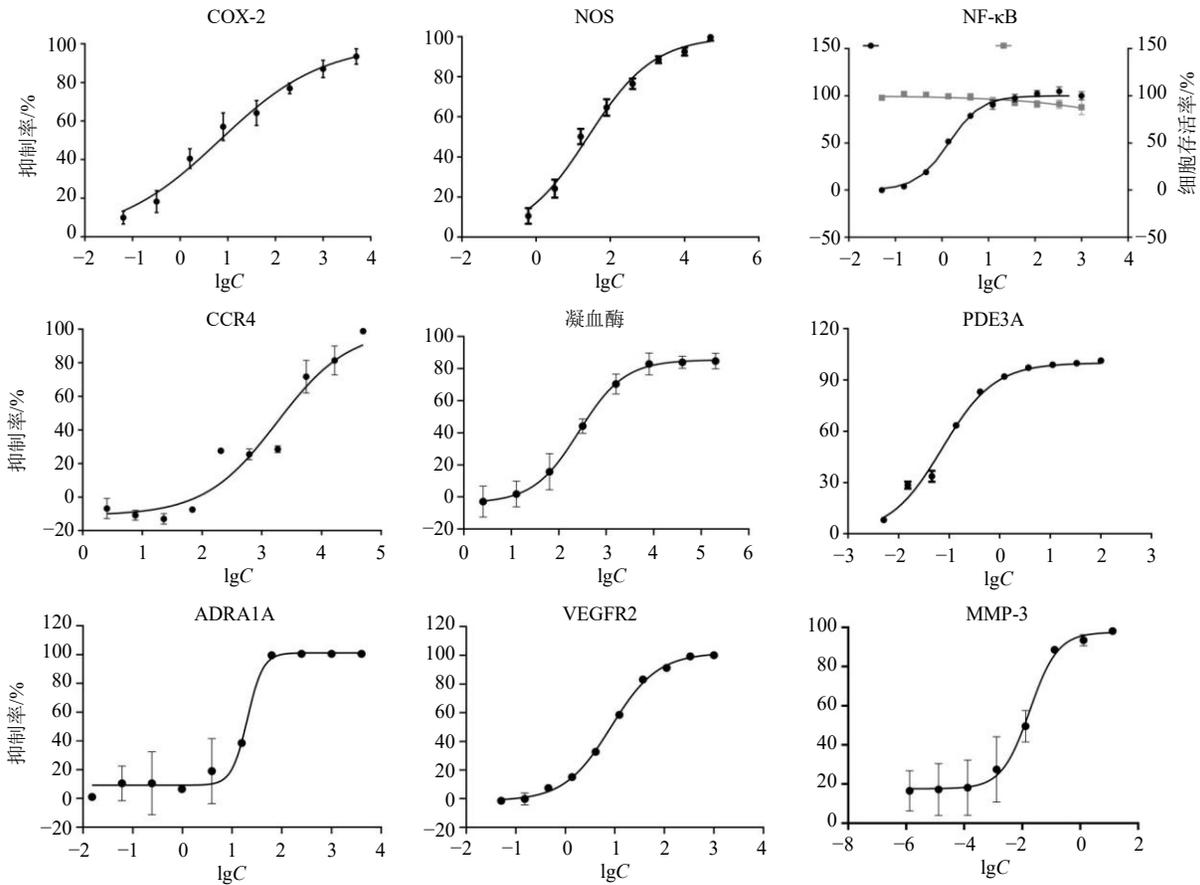
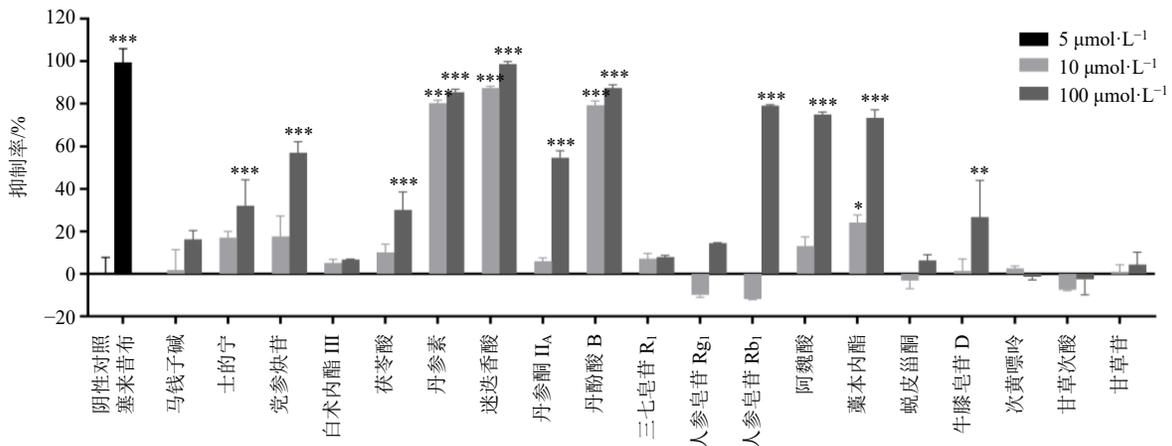


图 1 阳性化合物活性曲线 (n = 2)

Fig. 1 Activity curves of positive compounds (n = 2)



与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs negative control group, same as below figures

图 2 19 个化合物对 COX-2 抑制活性 (n = 2)

Fig. 2 Inhibitory activity of 19 compounds against COX-2 (n = 2)

IC₅₀ 为 22.68 nmol/L。19 个化合物对 NOS 抑制活性结果见图 3。由结果可知, 与阴性对照组比较, 迷迭香酸、丹酚酸 B 在 10、100 μmol/L 对 NOS 均有显著抑制活性 ($P < 0.001$), 且 100 μmol/L 浓度下抑制率达 100% 以上, 抑制活性最强; 人参皂苷 Rb₁、

藜本内酯、马钱子碱、士的宁、党参炔苷在 10、100 μmol/L 均有显著抑制活性 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 丹参素、蜕皮甾酮、甘草苷、茯苓酸、三七皂苷 R₁、白术内酯 III 在 100 μmol/L 浓度对该酶有显著抑制作用 ($P < 0.01, 0.001$)。

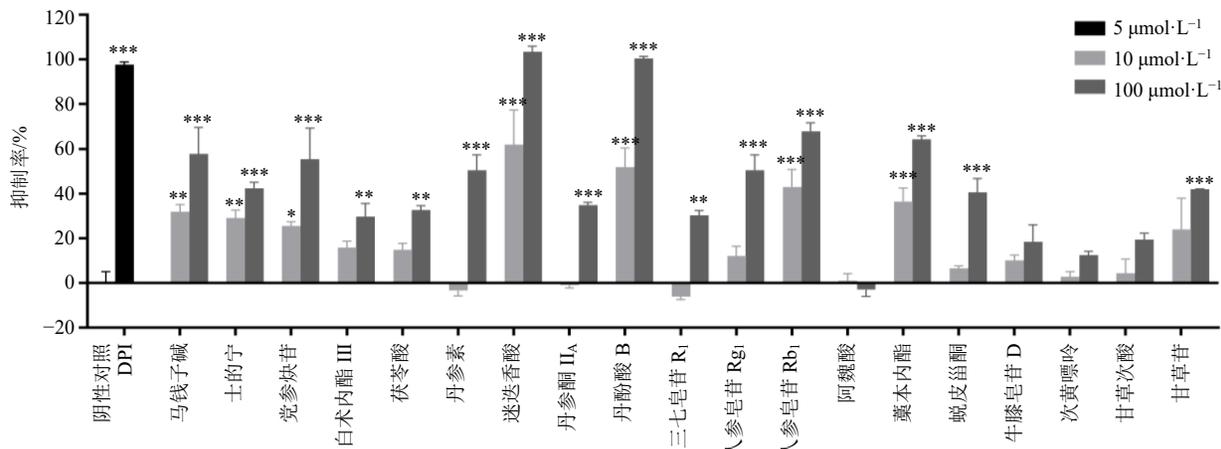


图 3 19 个化合物对 NOS 抑制活性 (n = 2)

Fig. 3 Inhibitory activity of 19 compounds against NOS (n = 2)

3.1.3 NF- κ B 实验结果 通过多浓度梯度给药, 得到阳性激动剂 TNF- α 对 NF- κ B 的激动结果及细胞存活率 (图 1), 计算得到 EC₅₀ 为 1.33 ng/mL, 50%

的细胞发生细胞毒性反应的浓度 (median cytotoxic concentration, CC₅₀) > 1000 ng/mL. 19 个化合物对 NF- κ B 抑制活性及对细胞存活率影响见图 4、5。由

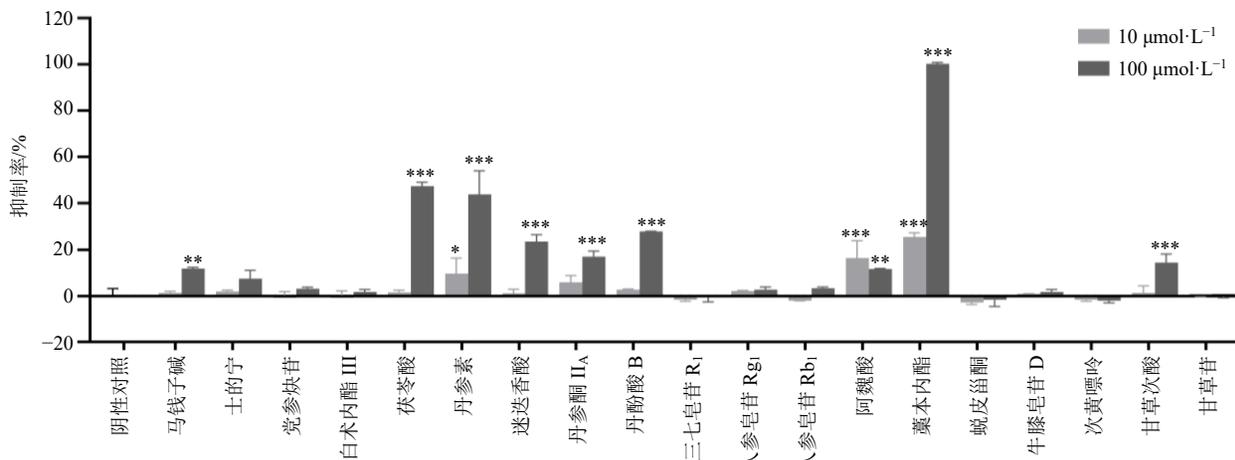


图 4 19 个化合物对 NF- κ B 抑制活性 (n = 2)

Fig. 4 Inhibitory activity of 19 compounds against NF- κ B (n = 2)

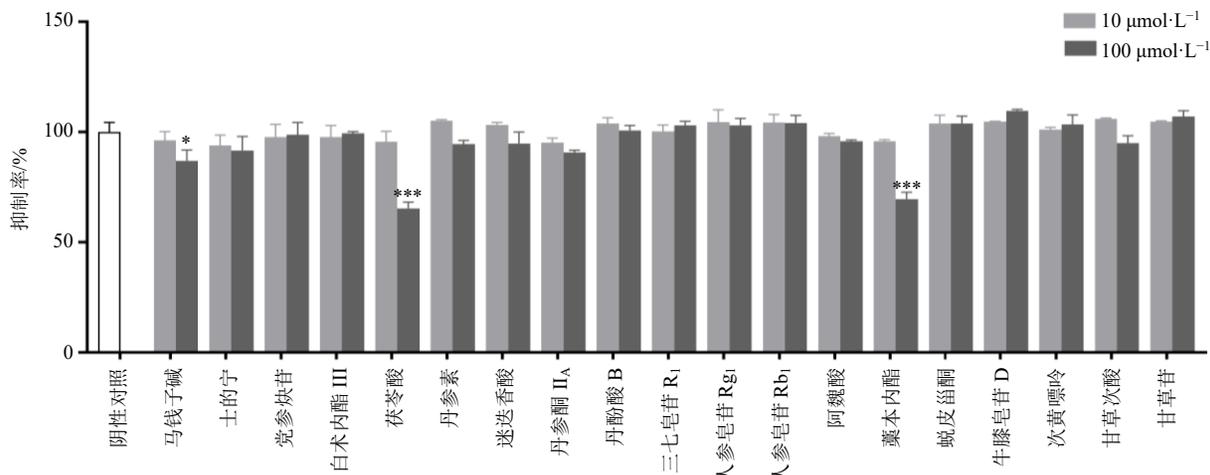


图 5 19 个化合物细胞存活率结果 (n = 2)

Fig. 5 Cell survival rate results of 19 compounds (n = 2)

结果可知,与阴性对照组比较,藁本内酯、茯苓酸、马钱子碱在 100 $\mu\text{mol/L}$ 对 TNF- α 诱导的 NF- κB 均有显著抑制活性,但结合细胞存活率结果,以上 3 个化合物在该浓度下的细胞存活率分别为 67.5%、65.4%、87.0%,均显示出显著毒性($P < 0.05$ 、 0.001),因此推测藁本内酯、茯苓酸、马钱子碱对 NF- κB 抑制活性为假阳性结果;丹参素、阿魏酸低、高浓度及丹酚酸 B、迷迭香酸、丹参酮 II_A、甘草次酸高浓度和藁本内酯低浓度对 NF- κB 均有显著抑制活性($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),且无细胞毒性。

3.1.4 CCR4 实验结果 通过多浓度梯度给药,得到阳性拮抗剂 C-021 对 CCR4 的拮抗结果(图 1),计算得到 IC₅₀ 为 1.80 $\mu\text{mol/mL}$ 。19 个化合物对 CCR4 拮抗活性见图 6。由结果可知,与阴性对照组比较,藁本内酯在低、高浓度对 CCR4 均有显著拮抗活性($P < 0.001$),且呈浓度相关性;甘草次酸在高浓度

对 CCR4 有显著拮抗活性($P < 0.001$),其他化合物无显著拮抗作用。

3.2 抑制血管翳形成实验结果

通过多浓度梯度给药,得到阳性抑制剂星形孢菌素对 VEGFR2/KDR 的抑制率曲线(图 1),其 IC₅₀ 为 8.40 nmol/L。19 个化合物对 VEGFR2/KDR 抑制活性结果见图 7。由结果可知,与阴性对照组比较,茯苓酸、牛膝皂苷 D 在低、高浓度对该靶点有较强抑制作用($P < 0.01$ 、 0.001),抑制率最高分别为 77.77%、60.51%;丹参素在高浓度抑制率为 62.26%,有较好抑制作用($P < 0.001$);丹酚酸 B、人参皂苷 R_{g1}、马钱子碱在低、高浓度有较弱抑制作用($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001);甘草次酸、三七皂苷 R₁、藁本内酯、迷迭香酸、甘草苷、阿魏酸在高浓度下对该酶均有较弱抑制作用($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

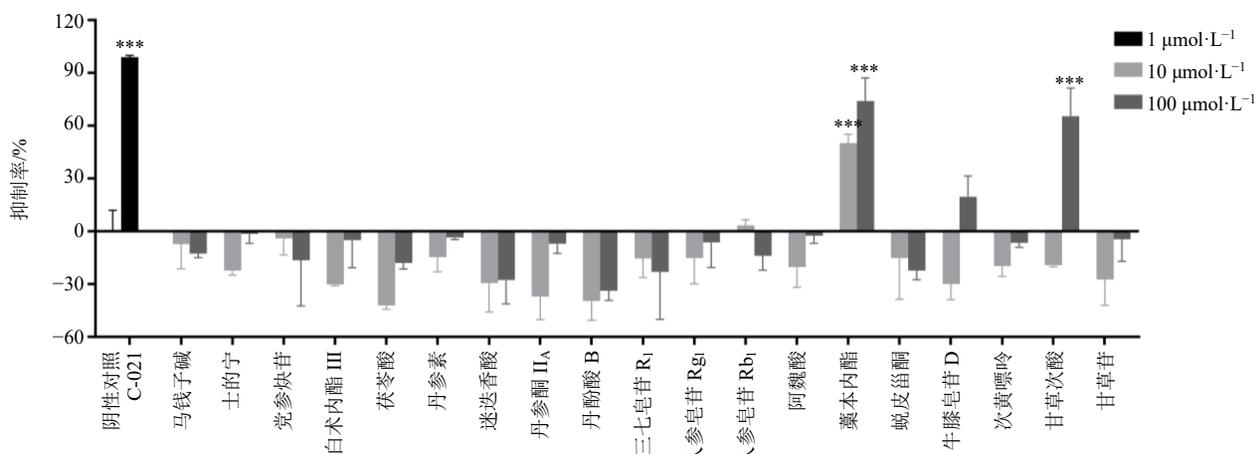


图 6 19 个化合物对 CCR4 抑制活性 (n = 2)

Fig. 6 Inhibitory activity of 19 compounds against CCR4 (n = 2)

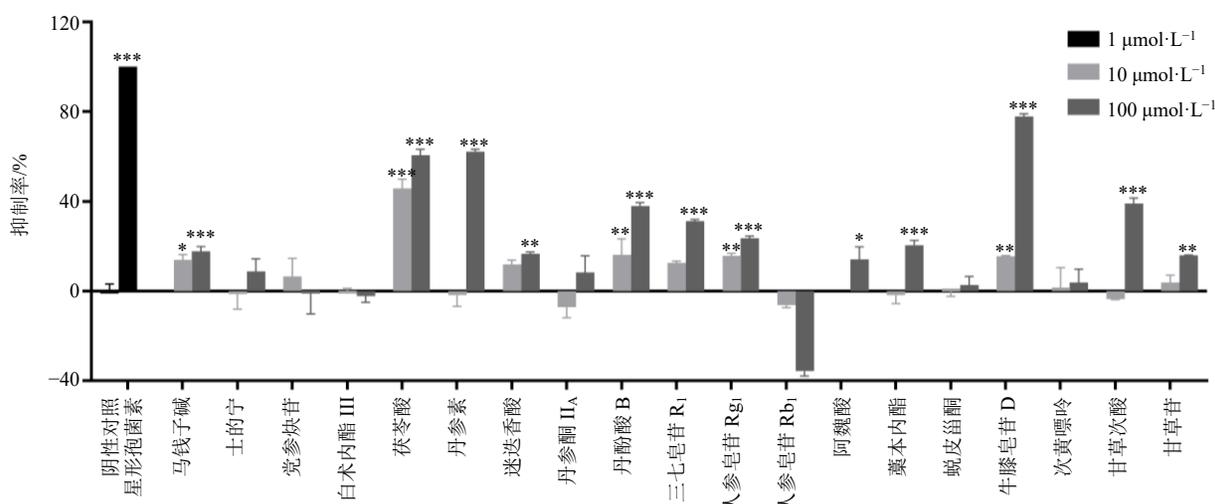


图 7 19 个化合物对 VEGFR2/KDR 抑制活性 (n = 2)

Fig. 7 Inhibitory activity of 19 compounds against VEGFR2/KDR (n = 2)

3.3 抑制基质降解相关靶点实验结果

通过多浓度梯度给药,得到阳性抑制剂 NNGH 对 MMP-3 的抑制效应曲线,见图 1,其 IC₅₀ 值为 18.14 mmol/L。19 个化合物对 MMP-3 抑制活性实验结果见图 8。结果表明,与阴性对照组比较,丹参素、藜本内酯、丹酚酸 B、迷迭香酸在低、高浓度对 MMP-3 表现出显著抑制作用 ($P < 0.01$ 、 0.001),其中藜本内酯抑制率分别为 70.84%、73.79%,丹参素高浓度抑制率为 73.56%,均显示较强抑制活性。党参炔苷在高浓度亦有较弱抑制活性 ($P < 0.05$),其他化合物无显著抑制作用。

3.4 活血作用相关靶点实验结果

3.4.1 凝血酶实验结果

通过多浓度梯度给药,得到阳性抑制剂阿加曲班对凝血酶的抑制率曲线(图 1),其 IC₅₀ 为 602.30 nmol/L。19 个化合物对凝血酶

抑制活性结果见图 9。由结果可知,与阴性对照组比较,丹酚酸 B、迷迭香酸、阿魏酸、丹参酮 II_A、丹参素在低、高浓度对凝血酶均有显著的抑制活性 ($P < 0.01$ 、 0.001),且除丹参酮 II_A 外,其他 4 个化合物都呈现浓度相关性。

3.4.2 PDE3A 实验结果

通过多浓度梯度给药,得到阳性抑制剂曲喹辛对 PDE3A 的抑制率曲线(图 1),其 IC₅₀ 为 0.09 nmol/L。19 个化合物对 PDE3A 抑制活性结果见图 10。由结果可知,与阴性对照组比较,丹酚酸 B、迷迭香酸在低、高浓度下对该酶均有显著抑制作用,并呈浓度相关性 ($P < 0.001$),且在高浓度下抑制率达 100% 以上,抑制活性强;丹参素、藜本内酯及甘草苷在高浓度时对 PDE3A 抑制活性也较显著 ($P < 0.001$),其他化合物无显著抑制作用。

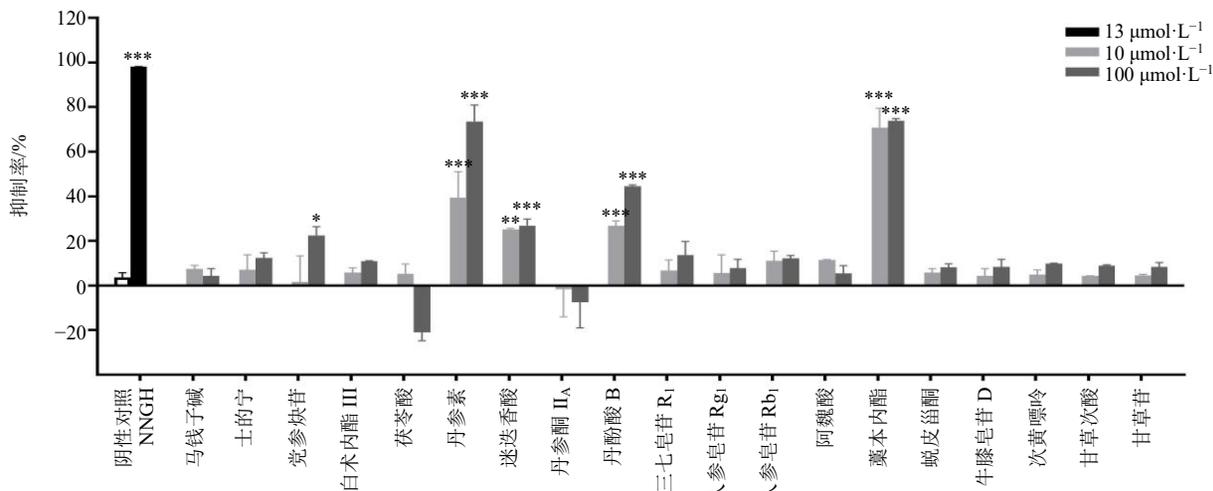


图 8 19 个化合物对 MMP-3 抑制活性 (n = 2)

Fig. 8 Inhibitory activity of 19 compounds against MMP-3 (n = 2)

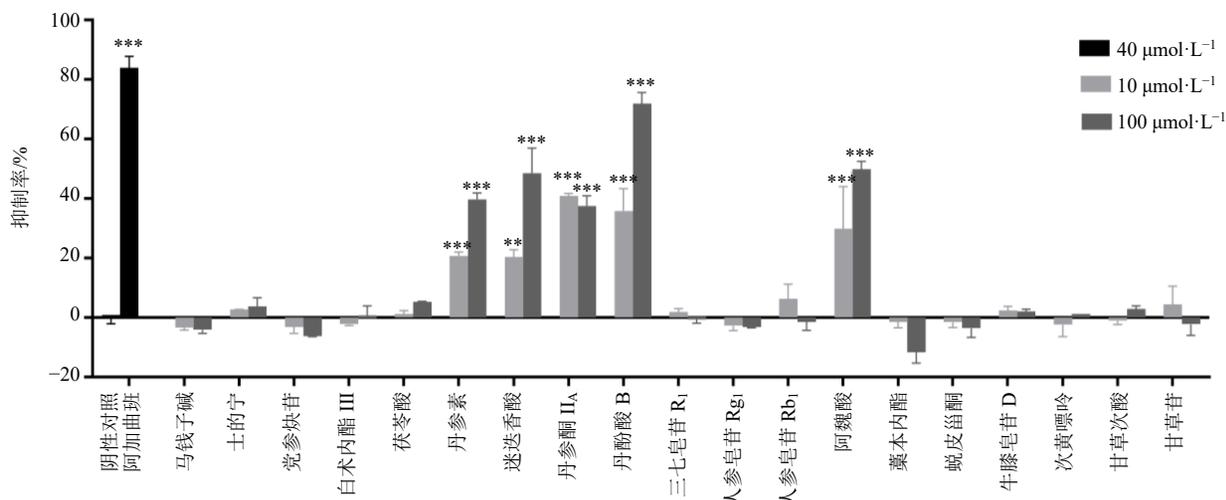


图 9 19 个化合物对凝血酶抑制活性 (n = 2)

Fig. 9 Inhibitory activity of 19 compounds against thrombin (n = 2)

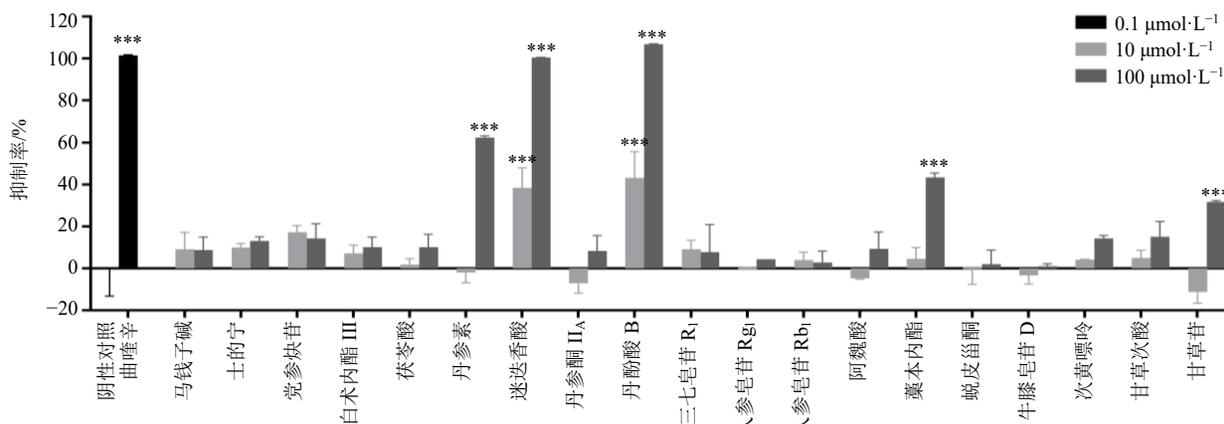


图 10 19 个化合物对 PDE3A 抑制活性 (n = 2)

Fig. 10 Inhibitory activity of 19 compounds against PDE3A (n = 2)

3.4.3 ADRA1A 实验结果 通过多浓度梯度给药, 得到阳性拮抗剂 WB4101 对 ADRA1A 的拮抗曲线 (图 1), 其 IC₅₀ 为 18.09 nmol/L。19 个化合物对 ADRA1A 拮抗活性结果见图 11。由结果可知, 与阴性对照组比较, 马钱子碱在低、高浓度对 ADRA1A

拮抗率分别为 96.78%、74.54%, 拮抗作用强 (P < 0.001) 且呈现浓度相关性; 甘草次酸及藜本内酯高浓度和人参皂苷 Rb₁ 低浓度对 ADRA1A 拮抗率分别为 97.32%、64.09%、65.56%, 也有较显著拮抗活性 (P < 0.001)。其他化合物无显著拮抗作用。

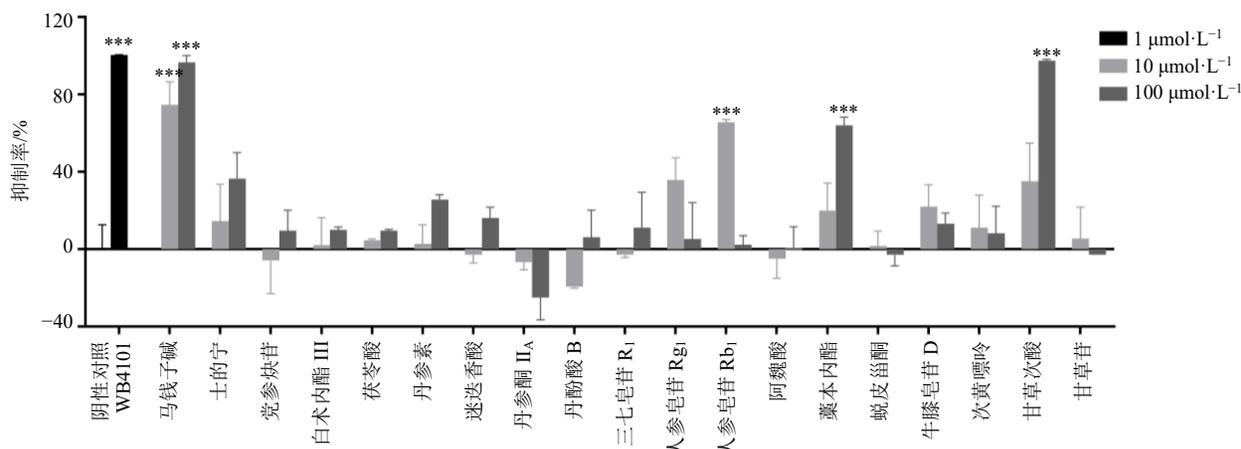


图 11 19 个化合物对 ADRA1A 抑制活性 (n = 2)

Fig. 11 Inhibitory activity of 19 compounds against ADRA1A (n = 2)

4 讨论

RA 以持续性滑膜炎和血管生成成为特征, 导致滑膜增生及骨骼和软骨的渐进性破坏^[7]。成纤维样滑膜细胞是除 T 细胞和 B 细胞外, RA 发生、发展的一个重要关键因素, 在 RA 炎症反应和关节损伤方面起着非常重要的作用^[8-10]。B 细胞活化产生的炎症反应诱导剂淋巴毒素 β (lymphotoxin β, LTβ), 滑膜巨噬细胞释放的 TNF-α、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6 等细胞因子以及树突细胞分泌转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 促使 Th17 细胞分化的 IL-17 共同刺激成纤维样滑膜细胞过度增殖不断产生大量炎症细胞因子, 如 IL-6、IL-1β、

TNF-α 等, 同时这些炎症因子可以诱导或加速成纤维样滑膜细胞转化和迁移; 产生的大量血管生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 通过与其受体 VEGFR2/KDR 结合, 可促进血管形成, 而不可控的新生血管形成可以导致炎症细胞浸润、滑膜组织增生, 形成血管翳-软骨结合和血管翳-骨结合, 最终导致软骨和骨破坏^[11]; 产生的 MMP-3, 可加重关节疼痛、肿胀、骨侵蚀和软骨破坏等症^[12]。活化的成纤维样滑膜细胞在炎症因子如 TNF-α、IL-6 和 IL-17 的激发下, 成纤维样滑膜细胞表达 NF-κB 受体活化因子配体 (receptor activator of NF-κB ligand, RANKL) 增多, 同时大量的巨噬细胞集落刺激因子

与前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 刺激成骨细胞中 RANKL 表达升高, 其与破骨细胞前体细胞表面的 NF-κB 受体活化因子 (receptor activator of NF-κB, RANK) 特异结合, 通过激活下游 NF-κB, 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)、MMP-1 和 MMP-3 等表达, 促使破骨细胞发生融合, 细胞骨架重塑, 促进骨吸收和骨质

溶解, 最终引起关节骨质侵蚀破坏^[13-16]。本研究结果表明, 痹祺胶囊中丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B、藜本内酯、人参皂苷 Rb₁、阿魏酸等主要成分能显著抑制 COX-2 活性, 进而降低 PGE₂ 表达, 抑制炎性及致痛反应; 茯苓酸、牛膝皂苷 D、丹参素、丹酚酸 B、人参皂苷 Rg₁、马钱子碱等成分能显著抑制 VEGFR2/KDR 活性, 从而减少新生血管形成; 丹参素、藜本内酯、丹酚酸 B、迷迭香酸能显著抑制 MMP3 活性, 减少基质降解, 减缓软骨破坏 (图 12)。

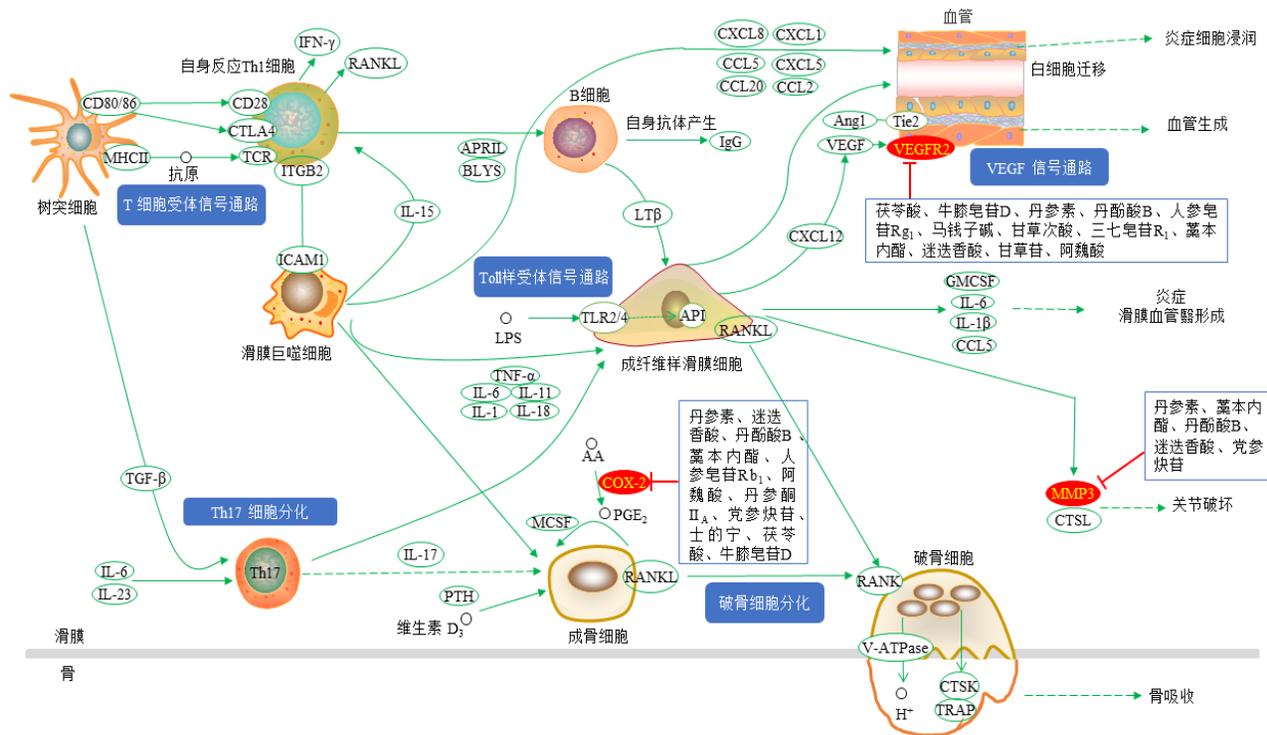


图 12 痹祺胶囊干预 RA 信号通路机制

Fig. 12 Mechanism of Biqi Capsule on intervention in RA signaling pathway

NF-κB 作为核转录因子介导细胞存活、增殖、凋亡及免疫应答等多种生物过程, 与 RA 发病密切相关^[17]。T 细胞、B 细胞表面上的抗体与对应受体结合, 刺激三磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP3) 和二酰基甘油 (diacylglycerol, DAG) 的形成, 导致细胞内 Ca²⁺浓度迅速升高^[18-19], 激活下游活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 级联信号反应的正调控^[20]及 NF-κB 信号通路, 最终调节 Th1、Th2、Th17 细胞分化并产生 γ-干扰素 (interferon-γ, 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^[21-23]。另外, CC 亚族趋化因子配体 22 (CC chemokine ligand 22, CCL22) 通过靶向作用受体

CCR4 激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), 进一步调节 NF-κB 信号通路, 最终作用于 DNA 转录因子释放趋化因子 CXCL1、CXCL2、CCL7 等, 在细胞迁移、凋亡及细胞存活等方面发挥作用^[24]。研究表明, RA 患者关节液中 NO 水平升高, NO 是一种重要的致炎因子, 由 NOS 催化 L-精氨酸生成, 在滑膜炎部位介导许多不同的细胞功能, 包括细胞因子产生、信号转导、线粒体功能和细胞凋亡^[25] (图 13)。本研究结果表明, 痹祺胶囊中丹参素、阿魏酸、丹酚酸 B、迷迭香酸、丹参酮 II_A、甘草次酸、藜本内酯对 NF-κB 有显著拮抗作用; 藜本内酯、甘草次酸对 CCR4 有显著拮抗作用; 迷迭香酸、丹酚酸 B、人参皂苷 Rb₁、藜本内酯、马钱子碱、士的宁、党参炔苷等成分对 NOS 有显著抑制活性。

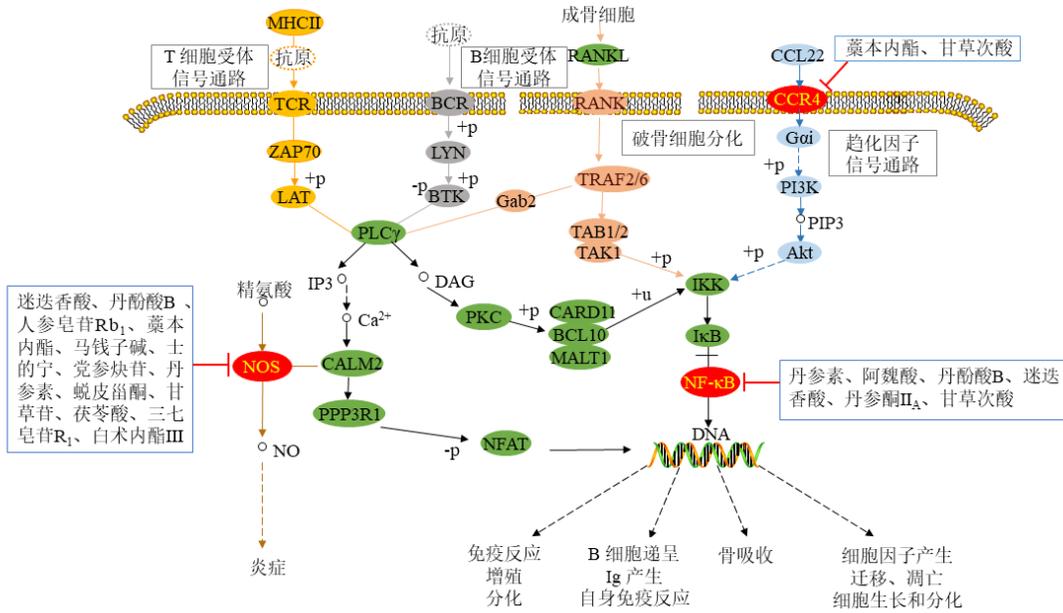


图 13 痹祺胶囊干预 NF-κB 信号通路机制

Fig. 13 Mechanism of Biqi Capsule on intervention in NF-κB signaling pathway

RA 属于中医“痹证”范畴，归属于血瘀证。研究表明，血瘀证是 RA 的基本病机之一^[26]。凝血酶通过与其受体 F2R 作用，激活磷脂酶 Cβ (phospholipase Cβ, PLCβ)，并特异性水解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2) 为 IP3 和 DAG 2 个第二信使，从而激活 Ca²⁺ 信号通路，随着胞质内 Ca²⁺ 浓度升高，蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 被激活，通过磷酸化调节下游信号传递，最终引起血小板聚集^[27]。另一方面，ADRA1A 被激

动后，同样可通过 PLCβ 激活 Ca²⁺ 信号通路，肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 可由钙调蛋白 2 (calmodulin 2, CALM2) 激活，进而对肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 进行磷酸化，使肌动球蛋白得以激活肌球蛋白 ATP 酶，最终引起血管平滑肌的收缩^[28]。此外，CALM2 可通过激动腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 产生 cAMP，进一步活化蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)，最终调节 MLC，松弛血管平滑肌^[29] (图 14)。本研究

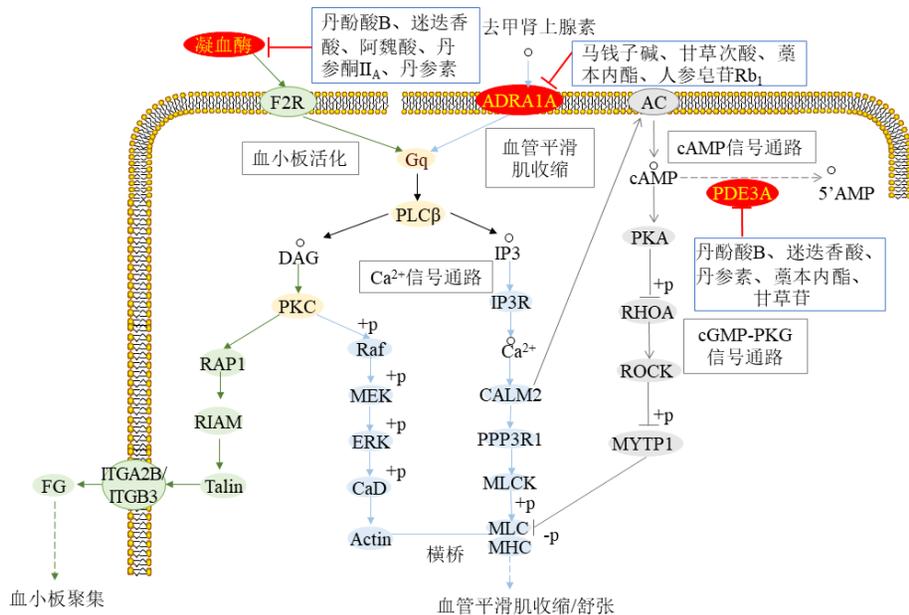


图 14 痹祺胶囊活血作用机制

Fig. 14 Mechanism of Biqi Capsule in promoting blood circulation

发现, 丹酚酸 B、迷迭香酸、阿魏酸、丹参酮 II_A、丹参素能显著抑制凝血酶活性; 马钱子碱、甘草次酸、丹参素、藁本内酯、人参皂苷 Rb₁ 能显著拮抗 ADRA1A; 丹酚酸 B、迷迭香酸、丹参素、藁本内酯、甘草苷能显著抑制 cAMP 降解酶 PDE3A 活性, 提高 cAMP 含量。由此推测, 痹祺胶囊通过干预凝血酶、PDE3A 及 ADRA1A, 进而抑制血小板聚集、促进血管平滑肌舒张, 发挥活血作用。

综上, COX-2、NOS、NF- κ B、CCR4、VEGFR2、MMP3、凝血酶、PDE3A、ADRA1A 可能为痹祺胶囊治疗 RA 的部分作用靶点。其主要成分通过抑制 COX-2、NOS、VEGFR2/KDR、MMP3 活性, 拮抗 NF- κ B、CCR4, 抑制滑膜炎性反应、滑膜异常增生、血管翳形成及关节软骨破坏; 通过抑制凝血酶及 PDE3A 活性, 拮抗 ADRA1A, 抑制血小板聚集、促进血管平滑肌舒张, 发挥活血作用。由于实验方法有限, 本研究仅对 RA 相关的几个靶点进行实验研究, 后续还应聚焦更多关键靶点进行更全面深入的探索。另外, 本研究采用的是体外酶活性测定方法, 缺少了机体对成分的吸收、代谢等的影响, 并且本研究是对单个化合物独立效果的分析, 未开展组分配伍的活性研究, 故后续实验还需针对以上几点开展体内验证及配伍研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 谢小倩, 王亚乐, 罗沙沙, 等. 类风湿性关节炎发病机制研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(71): 109-111.

[2] He Y F, Mai C T, Pan H D, *et al.* Targeting immunometabolism by active ingredients derived from traditional Chinese medicines for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(4): 451-460.

[3] 马登越, 葛群, 李晓彤, 等. 痹祺胶囊联合洛索洛芬钠治疗类风湿性关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(6): 1835-1838.

[4] Wang Z, Wu J Q, Li D Y, *et al.* Traditional Chinese medicine Biqi Capsule compared with leflunomide in combination with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: A randomized controlled trial [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 36.

[5] Chen X M, Wu J Q, Huang Q C, *et al.* Systematic review and Meta-analysis of the efficacy and safety of Biqi Capsule in rheumatoid arthritis patients [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 5221-5230.

[6] 刘建庭, 仇瑜, 卜睿臻, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的

痹祺胶囊化学物质组及入血成分的研究 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5496-5513.

- [7] Kaneko S, Kondo Y, Yokosawa M, *et al.* Rheumatoid arthritis and cytokines [J]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med*, 2016, 74(6): 913-918.
- [8] Wu Z W, Ma D, Yang H L, *et al.* Fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: Surface markers and phenotypes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 93: 107392.
- [9] Bustamante M F, Garcia-Carbonell R, Whisenant K D, *et al.* Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 110.
- [10] Nygaard G, Firestein G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(6): 316-333.
- [11] Schroeder M, Viezens L, Fuhrhop I, *et al.* Angiogenic growth factors in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2013, 33(2): 523-527.
- [12] Lerner A, Neidhöfer S, Reuter S, *et al.* MMP3 is a reliable marker for disease activity, radiological monitoring, disease outcome predictability, and therapeutic response in rheumatoid arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2018, 32(4): 550-562.
- [13] 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.
- [14] 郭占非, 齐路霞, 张超, 等. 基于 RANKL-RANK-OPG 信号通路探讨雷公藤甲素对类风湿关节炎骨破坏的作用机制 [J]. 湖北民族大学学报: 医学版, 2021, 38(4): 45-48.
- [15] Komatsu N, Takayanagi H. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis — Immune cell-fibroblast-bone interactions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(7): 415-429.
- [16] 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.
- [17] 蒋鹏, 宋科官. 破骨细胞及其分化调节机制的研究进展 [J]. 中国骨与关节杂志, 2017, 6(3): 223-227.
- [18] 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.
- [19] Berridge M J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(4): 1261-1296.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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*, 2021, 11: 584116.
- [24] 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.
- [25] Li H L, Wan A J. Apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: Possible roles of nitric oxide and the thioredoxin 1 [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 953462.
- [26] Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca²⁺-NFATc₁ signaling is an essential axis of osteoclast differentiation [J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1): 241-256.
- [27] Vilahur G, Gutiérrez M, Arzanauskaite M, *et al.* Intracellular platelet signalling as a target for drug development [J]. *Vasc Pharmacol*, 2018, 111: 22-25.
- [28] Corneth O B J, Klein Wolterink R G J, Hendriks R W. BTK signaling in B cell differentiation and autoimmunity [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2016, 393: 67-105.
- [29] Parker T, Wang K W, Manning D, *et al.* Soluble adenylyl cyclase links Ca²⁺ entry to Ca²⁺/cAMP-response element binding protein (CREB) activation in vascular smooth muscle [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7317.

[责任编辑 李亚楠]