

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.20.013

防己黄芪汤对胶原诱导性关节炎模型大鼠 关节组织 Notch2/DLL1 通路的影响

高玉亭, 李振, 赵雨薇, 赵彩虹, 刘进, 郝慧琴✉

山西中医药大学基础医学院, 山西省晋中市高校园区大学街 121 号, 030619



[摘要] **目的** 探讨防己黄芪汤治疗类风湿关节炎(RA)的可能作用机制。**方法** 72只Wistar雌性大鼠随机分为正常组12只及造模组60只。造模组大鼠给予注射牛Ⅱ型胶原溶液和完全弗氏佐剂/不完全弗氏佐剂建立胶原诱导性关节炎(CIA)模型,造模成功的48只大鼠随机分为模型组及防己黄芪汤低、中、高剂量组,每组12只。防己黄芪汤低、中、高剂量组分别给予2.2、4.4、8.8 g/(kg·d)防己黄芪汤灌胃,正常组和模型组给予4 ml/(kg·d)生理盐水灌胃,均连续灌胃6周。每周记录大鼠体质量并进行关节炎评分,观察大鼠关节组织病理形态,检测血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)和干扰素 γ (IFN- γ)水平,关节组织Notch2、DLL1 mRNA和蛋白表达水平。**结果** 与模型组比较,防己黄芪汤中、高剂量组大鼠体质量升高,关节炎评分降低,血清细胞因子TNF- α 、IL-6和IFN- γ 水平显著降低,关节组织Notch2、DLL1蛋白及mRNA表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。病理结果显示,滑膜增生、炎性细胞浸润、关节囊形成和关节间隙变窄显著缓解。与防己黄芪汤低剂量组比较,防己黄芪汤中、高剂量组关节组织病理改善情况良好,关节炎评分降低,血清细胞因子TNF- α 、IL-6和IFN- γ 水平显著降低,关节组织DLL1 mRNA和Notch2蛋白表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与防己黄芪汤中剂量组比较,防己黄芪汤高剂量组血清中细胞因子TNF- α 和IL-6水平升高,关节组织Notch2 mRNA表达升高, DLL1 mRNA表达降低($P<0.01$)。**结论** 防己黄芪汤可显著改善CIA模型大鼠关节炎症状,中剂量效果最佳,其作用机制可能与抑制关节组织Notch2/DLL1信号通路、调节自身免疫功能、降低促炎细胞因子的表达有关。

[关键词] 类风湿关节炎;胶原诱导性关节炎;防己黄芪汤;炎症因子;Notch2/DLL1信号通路

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种主要影响关节的慢性自身免疫性疾病,其特征是受累关节的渐进性对称发炎,导致软骨破坏、骨侵蚀和残疾,是最常见的慢性炎症性疾病之一,其发病与遗传和环境因素有关^[1-3]。防己黄芪汤出自《金匮要略·痉湿喝病脉证治》,曰:“风湿,脉浮,身重,汗出,恶风者,防己黄芪汤主之”^[4],主治风湿兼气虚之湿痹。临床观察表明,防己黄芪汤及其加减方能够显著改善RA患者的关节炎症状,具有良好的抗炎效果^[5-7]。防己黄芪汤对胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠的关节炎症状和肿胀有显著改善

作用^[8],但防己黄芪汤治疗RA的靶点和途径有待进一步研究。研究^[9]表明,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)和干扰素 γ (IFN- γ)等细胞因子介导了RA关节内基质失调,也在RA的发生发展过程中扮演重要角色。另有研究^[5]表明,Notch信号通路在炎症和感染过程中发挥了关键作用,可通过诱导促炎细胞因子的表达介导炎症反应。目前包括人类在内的哺乳动物中鉴定出4种跨膜受体分子(Notch1、Notch2、Notch3、Notch4),3种三角状配体(DLL1、DLL3、DLL4),以及2种锯齿状配体(Jagged1、Jagged2)^[11-12]。因此,本研究建立CIA大鼠模型,探讨防己黄芪汤对Notch2/DLL1通路的影响,以期为阐明防己黄芪汤治疗RA的作用机制提供研究基础。本实验经山西中医药大学实验动物伦理委员会审查通过(批件号:

基金项目:国家自然科学基金(81904034);山西省基础研究计划(201901D211534);山西中医药大学青年科学家培育项目(2021PY-QN-04);山西中医药大学科技创新能力培育计划(2021PY-JC-08);山西中医药大学博士启动基金(2020BK02)

✉ 通讯作者:hhq@sxtem.edu.cn, (0351)3179800

2019LL156)。

1 资料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性 Wistar 大鼠 72 只, 体质量 (160 ± 10) g, 6~8 周龄, 购自北京市昌扬西山养殖场, 动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0010。饲养条件: 12 h 光照/黑暗交替, 自由进食、饮水, 温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~60%。

1.2 药物

防己黄芪汤由防己、黄芪、白术、甘草按照 4:5:3:2 比例配伍, 防己、黄芪、白术购自安徽盛海堂中药饮片有限公司, 甘草购自安徽省亳州市南京皖中药饮片厂, 采用传统水煎法煎药。

1.3 主要试剂及仪器

牛 II 型胶原 (批号 190306), 美国 Chondrex 公司; 完全弗氏佐剂/不完全弗氏佐剂 (批号 SLBR3877V、SLBM9362V), 美国 Sigma 公司; TNF- α (批号 BG200713RAC)、IL-6 (批号 BG200713RAC) 和 IFN- γ ELISA 试剂盒 (批号 BG200720RAC), 上海 BLUEGENE 公司; 琼脂糖胶快速回收试剂盒 (批号 BH-S63713), 上海博湖生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒 (批号 B511321), 上海生工生物工程技术有限公司; One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (批号 AT311)、Top Green qRT-PCR SuperMix (批号 AQ131)、pEASY®-T1 Cloning Vector 试剂盒 (批号 CT101), 北京全式金生物技术有限公司; 兔抗 Notch2 抗体 (批号 bs-21664R), 北京 Bioss 生物技术有限公司; 兔抗 DLL1 抗体 (批号 A14277), 武汉 ABclonal 生物科技有限公司; 兔抗 β -Actin 抗体 (批号 bs-0061R-HRP), 北京博奥森生物技术有限公司; Masson 染色试剂盒 (批号 G1340)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 SE134)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 PC0020)、ECL 显色液 (批号 PE0010)、DAB 显色剂 (批号 DA1015)、苏木精染色剂 (批号 H8070), 北京索莱宝科技有限公司; 辣根过氧化物酶 (批号 KL131119), 上海康朗生物科技有限公司。

切片机 (型号 RM2235 cwEU), 德国 LEICA 公司; 倒置荧光显微镜 (型号 Ts2R-FL), 尼康株式会社; 高速冷冻离心机 (型号 5804R), 德国 Eppendorf 股份公司; 荧光定量 PCR 仪 (型号 QuantStudio 5), 新加坡 Life Technologies 公司; 化学发光

成像分析系统 (型号 ChemiDoc), 美国 Bio-Rad 公司; 一体式超纯水仪 (型号 LabTower EDI 15)、酶标仪 (型号 51119600C), 美国赛默飞公司。

1.4 动物分组、造模及给药

72 只大鼠适应性饲养 1 周后采用随机数字表法分为正常组 12 只及造模组 60 只。将牛 II 型胶原溶液和完全弗氏佐剂 1:1 (v/v) 混合, 并乳化成混合物, 于第 0 天在造模组大鼠尾跟和背部按 0.5 ml/只进行多点皮下注射。第 7 天, 将完全弗氏佐剂替换成不完全弗氏佐剂, 按 0.3 ml/只腹腔注射加强免疫 1 次^[13]。第 14 天, 观察造模组大鼠关节炎发病情况, 并记录关节炎指数评分^[14], 评分 ≥ 4 分则为造模成功^[15]。48 只大鼠造模成功, 按随机数字表法分为模型组及防己黄芪汤低、中、高剂量组, 每组 12 只。第 14 天开始给药, 防己黄芪汤低、中、高剂量组分别按照 2.2、4.4、8.8 g/(kg·d) 灌胃, 每日 2 次, 其中 4.4 g/(kg·d) 为根据《中药药理研究方法学》^[16] 人鼠剂量换算方法换算的大鼠与 60 kg 成人的等效剂量。正常组和模型组给予 4 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 每日 2 次。各组大鼠均连续灌胃 6 周。

1.5 标本采集

第 56 天, 各组大鼠禁食过夜, 3% 戊巴比妥钠 45 mg/kg 腹腔注射麻醉后处死大鼠, 腹主动脉取血, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 10 min, 离心半径为 16 cm, 收集血清。取左踝关节, 液氮冻存, 取右踝关节, 4% 多聚甲醛固定。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 体质量和关节炎指数评分 每周记录大鼠体质量并进行关节炎指数评分^[14]。关节炎指数评分由非实验参与人员通过视觉观察大鼠四肢关节的肿胀程度进行评估, 每只大鼠四肢关节的总评分最高为 16 分。评分标准为: 0 分: 无关节红肿; 1 分: 踝关节或足趾的轻度红肿; 2 分: 踝关节的中度红肿; 3 分: 包括趾关节在内的全足明显红肿; 4 分: 全足明显红肿伴关节变形、功能障碍。

1.6.2 关节组织病理形态 大鼠踝关节在 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 经脱钙、脱水处理, 石蜡包埋, 切成厚度为 4 μm 切片, 进行 Masson 染色, 显微镜下观察。

1.6.3 血清 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平 使用 ELISA 试剂盒对血清 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 的表达水平进行定量, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测量光密度, 根据标准曲线计算浓度。

1.6.4 关节组织 Notch2、DLL1 mRNA 表达 根据 NCBI GenBank 公布的 Notch2 和 DLL1 cDNA 序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物, 由北京擎科新业生物技术有限公司合成。引物序列: Notch2: 上游 TCTGATCCGCAACCGAGTAA; 下游 CAGTGGAGG GCAGATTTTCC, 产物大小 262 bp; DLL1: 上游 GGGGACGATGTTCCGATAA; 下游 TCGGCACAGG-TAGGAGTTG, 产物大小 72 bp。提取不同实验组大鼠关节组织总 RNA, 采用全式金公司反转录试剂盒合成 cDNA。20 μ l 反转录体系: 总 RNA 1 μ l、随机引物 1 μ l、2 $\times$ ES Reactin Mix 10 μ l、RT/RI Enzyme Mix 1 μ l、gDNA 酶 1 μ l、ddH₂O 1 μ l。反转录条件: 42 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。参照琼脂糖凝胶快速回收试剂盒说明对 Notch2、DLL1 PCR 扩增产物纯化与回收, 按照 pEASY[®]-T1 Cloning Vector 试剂盒说明将回收的 DNA 片段连接至 pEASY[®]-T1 Cloning-Vector, 并提取质粒 DNA。计算质粒拷贝数, 构建质粒标准品, 绘制绝对定量标准曲线。

qRT-PCR 检测 Notch2、DLL1 mRNA 水平, 20 μ l 反应体系: qRT-PCR Mix 10 μ l、正反向引物各 0.5 μ l、cDNA 2 μ l、ddH₂O 7 μ l, 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 共 40 个循环。根据绝对定量质粒标准品测定的拷贝数、稀释比例及体积, 计算反应标准孔中的拷贝数, 输入至绝对定量标准曲线中, 运算并输出 Notch2、DLL1 mRNA 绝对表达量。

1.6.5 Western blot 法检测关节组织 Notch2、DLL1 蛋白表达 提取大鼠踝关节组织总蛋白, 检测蛋白浓度, 用 SDS-PAGE 分离并转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 并在 4 $^{\circ}$ C 分别加入兔抗 Notch2 抗体 (1:1000)、兔抗 DLL1 抗体 (1:1000) 和兔抗 β -Actin 抗体 (1:1500) 孵育 12~16 h。加入山羊抗兔 IgG 二抗 (1:3000) 后, 20 $^{\circ}$ C 轻摇 1 h, 进行显影、曝光。采用 Gelpro 32 软件测定光密度值确定相对表达量。

1.6.6 免疫组织化学法检测关节组织 Notch2、DLL1 蛋白表达 将大鼠踝关节组织切片进行脱水、

脱蜡、封闭处理。湿盒内 4 $^{\circ}$ C 下分别加入兔抗 Notch2 抗体 (1:100)、兔抗 DLL1 抗体 (1:100) 孵育 12~16 h, 37 $^{\circ}$ C 恒温 20 min。37 $^{\circ}$ C 下加 HRP 标记的二抗, 恒温 20 min。使用 DAB 进行显色, 用苏木精对细胞核复染。透明、封片, 显微镜下观察。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 23.0 进行统计分析, 计量资料均符合正态分布且方差齐, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析进行多组比较, LSD 法进行两两比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间体质量和关节炎指数评分比较

表 1 示, 第 42 天开始, 模型组体质量显著低于正常组 (P<0.05 或 P<0.01), 防己黄芪汤高剂量组体质量显著高于模型组 (P<0.05 或 P<0.01); 第 49 天开始, 防己黄芪汤低、中剂量组体质量高于模型组 (P<0.05 或 P<0.01)。表 2 示, 第 49 天开始, 防己黄芪汤低、中、高剂量组关节炎指数评分均低于模型组 (P<0.05 或 P<0.01), 第 56 天, 防己黄芪汤中、高剂量组关节炎指数评分低于防己黄芪汤低剂量组 (P<0.05)。

2.2 各组大鼠关节滑膜组织病理结果

图 1 (扫描本文二维码获取彩图) 示, 正常组大鼠踝关节结构正常, 无炎性细胞浸润和软骨破坏。模型组大鼠的踝关节在软组织和滑膜层中表现出明显的炎性细胞浸润和滑膜增生, 出现由软骨破坏导致的关节翳形成和关节间隙狭窄。与模型组大鼠比较, 防己黄芪汤低剂量组减少了关节软组织和滑膜层的炎性细胞浸润, 防己黄芪汤中、高剂量组显著缓解了关节软组织和滑膜层的滑膜增生、炎性细胞浸润、关节翳形成和关节间隙变窄。

2.3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平显著升高 (P<0.01)。与模型组比

表 1 各组大鼠不同时间体质量比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天	第 49 天	第 56 天
正常组	12	239.9 $\pm$ 6.6	259.1 $\pm$ 9.9	272.5 $\pm$ 12.6	274.6 $\pm$ 19.1	278.8 $\pm$ 28.1	294.9 $\pm$ 28.7	299.3 $\pm$ 29.2
模型组	12	233.2 $\pm$ 14.6	252.8 $\pm$ 22.7	256.7 $\pm$ 11.1	258.0 $\pm$ 13.6	257.4 $\pm$ 14.5 ^{a)}	259.8 $\pm$ 8.4 ^{b)}	265.3 $\pm$ 7.4 ^{b)}
防己黄芪汤低剂量组	12	247.8 $\pm$ 15.6	249.9 $\pm$ 9.3	263.8 $\pm$ 11.2	266.6 $\pm$ 11.5	274.3 $\pm$ 9.2	281.8 $\pm$ 12.6 ^{b) c)}	283.0 $\pm$ 8.6 ^{b) c)}
防己黄芪汤中剂量组	12	234.4 $\pm$ 19.2	244.1 $\pm$ 17.2	255.8 $\pm$ 16.1	258.5 $\pm$ 15.4	264.0 $\pm$ 15.4	278.5 $\pm$ 10.5 ^{b) c)}	290.9 $\pm$ 5.5 ^{b) d)}
防己黄芪汤高剂量组	12	244.3 $\pm$ 11.3	247.1 $\pm$ 11.9	260.8 $\pm$ 13.4	267.7 $\pm$ 16.6	276.3 $\pm$ 13.4 ^{c)}	286.9 $\pm$ 10.4 ^{b) d)}	284.0 $\pm$ 10.0 ^{b) c)}

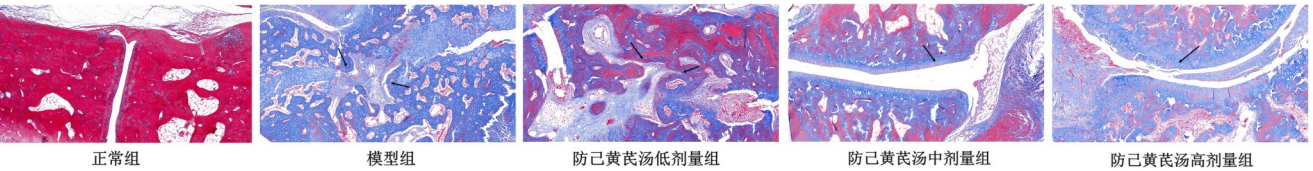
注: a) 与正常组比较, P<0.05; b) 与正常组比较, P<0.01; c) 与模型组比较, P<0.05; d) 与模型组比较, P<0.01。

表 2 各组大鼠不同时间关节炎评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天	第 49 天	第 56 天
正常组	12	—	—	—	—	—	—	—
模型组	12	7.50±1.64 ^{a)}	8.17±1.17 ^{a)}	9.00±1.90 ^{a)}	11.00±1.10 ^{a)}	11.17±1.83 ^{a)}	11.50±2.07 ^{a)}	10.17±1.17 ^{a)}
防己黄芪汤低剂量组	12	7.67±2.34 ^{a)}	9.00±1.90 ^{a)}	10.33±1.37 ^{a)}	10.33±1.63 ^{a)}	10.00±2.00 ^{a)}	9.67±1.03 ^{a) b)}	8.33±1.51 ^{a) b)}
防己黄芪汤中剂量组	12	6.83±0.75 ^{a)}	7.83±1.94 ^{a)}	9.50±1.76 ^{a)}	10.00±2.00 ^{a)}	11.00±1.41 ^{a)}	9.00±0.63 ^{a) c)}	6.50±1.05 ^{a) c) d)}
防己黄芪汤高剂量组	12	7.00±1.79 ^{a)}	9.67±1.37 ^{a)}	10.33±1.37 ^{a)}	10.67±1.21 ^{a)}	11.33±1.86 ^{a)}	8.33±1.63 ^{a) c)}	6.50±1.52 ^{a) c) d)}

注：“—”为未进行检测。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与防己黄芪汤低剂量组比较, $P<0.05$ 。



注：箭头所指为滑膜增生、软骨破坏、炎性细胞浸润、关节畸形和关节间隙变窄。

图 1 各组大鼠关节滑膜组织病理形态 (Masson 染色, $\times 100$)

较, 防己黄芪汤低、中、高剂量组 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平均显著降低 ($P<0.01$)。与防己黄芪汤低剂量组比较, 防己黄芪汤中剂量组 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ , 防己黄芪汤高剂量组 IL-6 和 IFN- γ 水平显著降低 ($P<0.01$)。与防己黄芪汤中剂量组比较, 防己黄芪汤高剂量组 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P<0.01$)。

2.4 各组大鼠关节组织 Notch2、DLL1 mRNA 表达比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组 Notch2、DLL1 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,

防己黄芪汤各剂量组 Notch2、DLL1 mRNA 表达均显著降低 ($P<0.01$)。与防己黄芪汤低剂量组比较, 防己黄芪汤中剂量组 Notch2、DLL1 mRNA 表达, 防己黄芪汤高剂量组 DLL1 mRNA 表达均显著降低 ($P<0.01$)。与防己黄芪汤中剂量组比较, 防己黄芪汤高剂量组 Notch2 mRNA 表达显著升高, DLL1 mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$)。

2.5 各组大鼠关节组织 Notch2、DLL1 蛋白表达免疫组织化学法检测结果比较

图 2 (扫描本文二维码获取彩图) 示, 棕色染色为 Notch2、DLL1 阳性细胞。各组大鼠关节中均

表 3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平比较 ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-6	IFN- γ
正常组	12	83.46±2.06	89.75±5.92	108.68±0.89
模型组	12	208.22±8.51 ^{a)}	260.27±8.87 ^{a)}	155.90±1.35 ^{a)}
防己黄芪汤低剂量组	12	175.46±1.15 ^{a) b)}	228.75±4.74 ^{a) b)}	144.11±7.23 ^{a) b)}
防己黄芪汤中剂量组	12	112.92±4.48 ^{a) b) c)}	172.98±4.36 ^{a) b) c)}	108.92±2.41 ^{b) c)}
防己黄芪汤高剂量组	12	167.60±2.22 ^{a) b) d)}	193.62±4.60 ^{a) b) c) d)}	112.88±0.97 ^{b) c)}

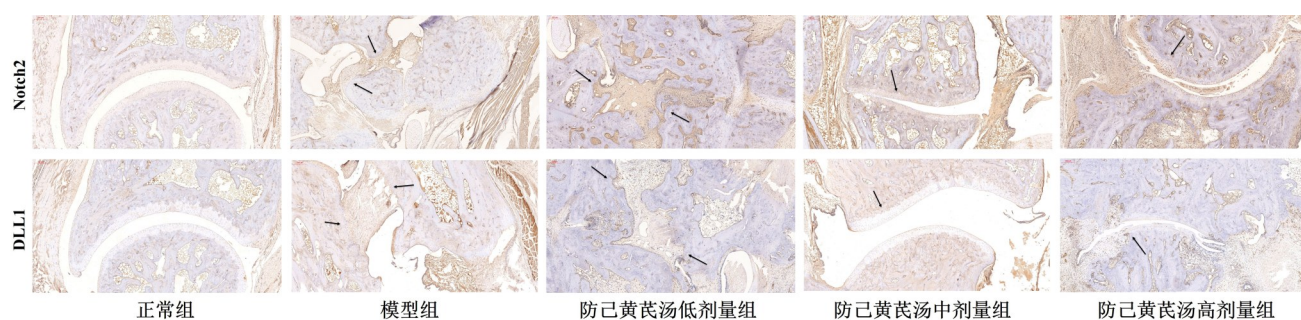
注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-6, 白细胞介素 6; IFN- γ , 干扰素 γ 。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与防己黄芪汤低剂量组比较, $P<0.01$; d) 与防己黄芪汤中剂量组比较, $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠关节组织 Notch2、DLL1 mRNA 表达比较 ($\text{copies}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Notch2	DLL1
正常组	12	4016.33±6.43	1328.67±4.73
模型组	12	10663.33±215.56 ^{a)}	3814.67±13.32 ^{a)}
防己黄芪汤低剂量组	12	4741.67±17.62 ^{a) b)}	2749.00±17.78 ^{a) b)}
防己黄芪汤中剂量组	12	2568.33±14.05 ^{a) b) c)}	1666.00±11.53 ^{a) b) c)}
防己黄芪汤高剂量组	12	4829.33±28.87 ^{a) b) d)}	1584.33±5.69 ^{a) b) c) d)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与防己黄芪汤低剂量组比较, $P<0.01$; d) 与防己黄芪汤中剂量组比较, $P<0.01$ 。



注：箭头所指为 Notch2、DLL1 阳性细胞。

图2 各组大鼠关节组织 Notch2、DLL1 蛋白表达 (免疫组织化学法, ×200)

检测到不同程度的 Notch2、DLL1 阳性细胞。正常组大鼠关节结构完整, 关节滑膜层 Notch2、DLL1 阳性细胞较少。模型组大鼠关节结构损伤严重, 关节软组织和滑膜层 Notch2、DLL1 阳性细胞显著增多。与模型组比较, 防己黄芪汤低剂量组大鼠关节软组织和滑膜层 Notch2、DLL1 阳性细胞减少; 防己黄芪汤中、高剂量组大鼠关节损伤严重程度降低, 关节软组织和滑膜层 Notch2、DLL1 阳性细胞显著减少。

2.6 各组大鼠关节组织 Notch2、DLL1 蛋白表达 Western blot 法检测结果比较

图3、表5示, 与正常组比较, 模型组 Notch2、DLL1 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 防己黄芪汤低剂量组 Notch2 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), DLL1 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$); 防己黄芪汤中、高剂量组 Notch2、DLL1 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$)。与防己黄芪汤低剂量组比较, 防己黄芪汤中、高剂量组 Notch2 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$)。

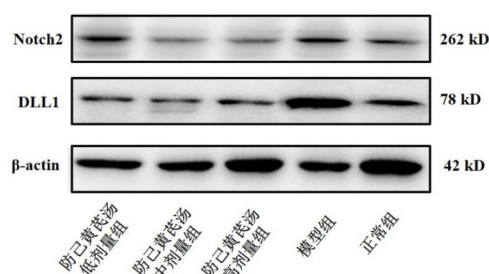


图3 各组大鼠关节组织中 Notch2、DLL1 蛋白表达比较

3 讨论

根据 RA 临床症状和体征可将其归为中医学“痹证”范畴。研究显示, 中医药在改善 RA 症状、延缓 RA 骨破坏等方面可以发挥重要作用^[17]。《素问·痹论篇》言:“风寒湿三气杂至, 合而为痹

表5 各组大鼠关节组织 Notch2、DLL1 蛋白表达

Western blot 法检测结果比较 (光密度, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Notch2	DLL1
正常组	12	0.18±0.01	0.28±0.02
模型组	12	0.50±0.14 ^{a)}	1.14±0.23 ^{a)}
防己黄芪汤低剂量组	12	0.44±0.05 ^{a)}	0.25±0.01 ^{b)}
防己黄芪汤中剂量组	12	0.22±0.02 ^{b) c)}	0.19±0.01 ^{b)}
防己黄芪汤高剂量组	12	0.13±0.03 ^{b) c)}	0.19±0.06 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与防己黄芪汤低剂量组比较, $P<0.01$ 。

也。”《伤寒杂病论》载有:“太阳病, 关节疼痛而烦, 脉沉而细者, 此为湿痹。”历代医家通过临床观察逐渐认识到非独风、寒、湿能致病, 机体营卫之气不足也是 RA 发病的一个重要因素^[18]。防己黄芪汤方中黄芪、白术益气固表; 白术、防己祛风除湿; 防己、黄芪两者相合, 祛风除湿而不伤正, 益气固表而不恋邪; 甘草发挥调和营卫作用。诸药相伍, 祛风与健脾除湿并用, 扶正与祛邪兼顾, 使风湿俱去, 诸证自除。本研究结果表明, 防己黄芪汤可显著增加大鼠体质量, 改善 CIA 大鼠的关节炎症状, 且中、高剂量治疗效果更佳, 证实了防己黄芪汤对 RA 的治疗效果。鉴于防己黄芪汤在 RA 临床治疗^[5-7]和动物模型^[8]干预中的确切效果, 本研究未设阳性对照组。

细胞因子在 RA 的病理和生理中起着至关重要的作用, 促炎细胞因子可刺激骨骼和软骨的炎症和降解, 血清中细胞因子的水平可以反映 RA 关节炎严重程度^[19]。TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 等细胞因子有助于诱导和维持炎症, 是 RA 治疗的重要靶标^[20-21]。本研究通过检测 CIA 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平, 发现不同剂量防己黄芪汤可以使这些促炎细胞因子水平显著下降, 且中剂量组效果最佳, 说明防己黄芪汤具有显著抑制炎症效果。

RA 的发生和发展具有较强的自身免疫成分, 缺乏治疗可导致先天性免疫和适应性免疫机制密切

相互作用,促进慢性关节炎^[22]。Notch 信号通路调控体内包括免疫在内的多个细胞过程,在免疫细胞的发育和功能中发挥重要作用,是免疫系统的重要参与者^[23-24],并在 RA 等炎症性疾病的发病机制中起着关键作用^[25-26]。Notch 信号通路可刺激促炎细胞因子的产生,而抑制 Notch 信号通路可减轻炎症性关节炎的严重程度^[27]。因此,抑制 Notch 信号通路的活化被认为是治疗 RA 的可能方法之一^[28-29]。此外,Notch2/DLL1 在 Notch 信号通路介导的对破骨细胞生成的增强作用中处于主导地位,DLL1 通过 Notch2 可以促进破骨细胞生成^[30-31]。本研究发现,CIA 大鼠经过 6 周防己黄芪汤中剂量干预后 Notch2、DLL1 表达水平显著下降,说明防己黄芪汤中剂量可能通过下调 Notch2/DLL1 信号通路的表达,降低促炎细胞因子,改善关节炎症,其机制可能与阻断 DLL1 和 Notch2 的相互作用有关。

综上,本研究显示防己黄芪汤中剂量对 CIA 大鼠具有良好的治疗效果,可显著改善关节炎症,其机制可能与抑制 Notch2/DLL1 信号通路,调节自身免疫功能,降低血清促炎细胞因子表达水平有关。考虑到中医药治疗多途径、多靶点的特点,将进一步验证抑制 Notch2/DLL1 对下游通路产生的影响,并深入探讨其作用机制。

参考文献

- [1]SMOLEN JS, ALETAHA D, MCINNES IB. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [2]LIN YJ, ANZAGHE M, SCHÜLKE S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis[J]. Cells, 2020, 9(4): 880.
- [3]TAHERI M, EGHTEADARIAN R, DINGER ME, et al. Dysregulation of non-coding RNAs in rheumatoid arthritis[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110617. doi:10.1016/j.biopha.2020.110617.
- [4]张仲景. 金匮要略[M]. 陈纪藩, 主编. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1022.
- [5]王绪辉, 周重建, 闵熙敬, 等. 防己黄芪汤提取物治疗活动期类风湿性关节炎的临床药效评估[J]. 中医杂志, 1993, 34(3): 156-158.
- [6]华英. 防己黄芪汤合四物汤治疗老年性类风湿性关节炎的体会[J]. 浙江中医杂志, 2015, 50(4): 300.
- [7]万里伟, 王燕君, 兰凌凌, 等. 防己黄芪汤合独活寄生汤治疗类风湿性关节炎临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(3): 71-72.
- [8]贾庆运, 王拥军, 梁倩倩, 等. 防己黄芪汤对胶原诱导性关节炎小鼠的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(5): 6-9.
- [9]RIDGLEY LA, ANDERSON AE, PRATT AG. What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis?[J]. Curr Opin Rheumatol, 2018, 30(2): 207-214.
- [10]YANG G, ZHOU R, ZHOU Q, et al. Structural basis of Notch recognition by human γ -secretase[J]. Nature, 2019, 565(7738): 192-197.
- [11]高玉亭, 李振, 赵彩虹, 等. Notch 信号通路调控风湿免疫性疾病研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2020, 24(8): 553-557.
- [12]KEEWAN E, NASER SA. The role of Notch signaling in macrophages during inflammation and infection: implication in rheumatoid arthritis?[J]. Cells, 2020, 9(1): 111.
- [13]于坤, 徐枝芳, 余楠楠, 等. 佐剂性和胶原诱导性关节炎模型比较分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(1): 106-109.
- [14]XU N, WANG Y, ZHAO S, et al. Naltrexone (NTX) relieves inflammation in the collagen-induced-arthritis (CIA) rat models through regulating TLR4/NF κ B signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 79: 106056. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106056.
- [15]WANG X, YAN X, WANG F, et al. Role of methotrexate chronotherapy in collagen-induced rheumatoid arthritis in rats[J]. Z Rheumatol, 2018, 77(3): 249-255.
- [16]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 30.
- [17]李延婷, 姜泉, 巩勋, 等. 类风湿关节炎患者中医药治疗现状调查分析[J]. 中医杂志, 2020, 61(8): 676-680.
- [18]赵用, 鞠宝兆, 唐哲, 等. 从矛盾论之内外因关系视域探析《黄帝内经》营卫之气致痹理论[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(6): 62-65.
- [19]MATEEN S, ZAFAR A, MOIN S, et al. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Clin Chim Acta, 2016, 455: 161-171. doi: 10.1016/j.cca.2016.02.010.
- [20]NOACK M, MIOSEC P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis[J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(4): 365-383.
- [21]KATO M. New insights into IFN- γ in rheumatoid arthritis: role in the era of JAK inhibitors[J]. Immunol Med, 2020, 43(2): 72-78.
- [22]CATRINA AI, JOSHUA V, KLARESKOG L, et al. Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis[J]. Immunol Rev, 2016, 269(1): 162-174.
- [23]RADTKE F, FASNACHT N, MACDONALD HR. Notch signaling in the immune system[J]. Immunity, 2010, 32(1): 14-27.

- [24]KEEWAN E, NASER SA. Notch-1 signaling modulates macrophage polarization and immune defense against mycobacterium avium paratuberculosis infection in inflammatory diseases[J]. Microorganisms, 2020, 8(7): 1006.
- [25]GAO W, SWEENEY C, CONNOLLY M, et al. Notch-1 mediates hypoxia-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(7): 2104–2113.
- [26]CHRISTOPOULOS PF, GJØLBERG TT, KRÜGER S, et al. Targeting the notch signaling pathway in chronic inflammatory diseases [J]. Front Immunol, 2021, 12: 668207. doi: 10.3389/fimmu.2021.668207.
- [27]PARK JS, KIM SH, KIM K, et al. Inhibition of notch signalling ameliorates experimental inflammatory arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(1): 267–274.
- [28]CHEN J, LI J, CHEN J, et al. Treatment of collagen-induced arthritis rat model by using Notch signalling inhibitor[J]. J Orthop Translat, 2021, 28: 100–107. doi: 10.1016/j.jot.2021.01.003.
- [29]WEI K, KORSUNSKY I, MARSHALL JL, et al. Notch signalling drives synovial fibroblast identity and arthritis pathology[J]. Nature, 2020, 582(7811): 259–264.
- [30]Sekine C, Koyanagi A, Koyama N, et al. Differential regulation of osteoclastogenesis by Notch2/Delta-like 1 and Notch1/Jagged1 axes[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(2): R45.
- [31]Sekine C, Nanki T, Yagita H. Macrophage-derived delta-like protein 1 enhances interleukin-6 and matrix metalloproteinase 3 production by fibroblast-like synoviocytes in mice with collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(10): 2751–2761.

Effect of *Fangji Huangqi Decoction* (防己黄芪汤) on Notch2 /DLL1 Pathway in Joint Tissues of Collagen-induced Arthritis Model Rats

GAO Yuting, LI Zhen, ZHAO Yuwei, ZHAO Caihong, LIU Jin, HAO Huiqin

College of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, 030619

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Fangji Huangqi Decoction* (防己黄芪汤, FHD) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Seventy-two female Wistar rats were randomly divided into normal group (n=12) and modeling group (n=60). Rats in the modeling group were given bovine type II collagen solution and complete/incomplete Freund's adjuvant to establish the rat model of collagen-induced arthritis (CIA). Forty-eight successfully modeled rats were randomly divided into a model group, and FHD low, medium and high dose groups, with 12 rats in each group. FDH at the concentration of 2.2, 4.4, 8.8 g/(kg·d) by gavage was given to FDH low, medium and high dose groups, respectively, while 4 mL/(kg·d) normal saline by gavage was given to the normal group and model group; the interventions were administered for six weeks in all the groups. The weight of rats and the score of arthritis were assessed every week; the pathological morphology of joint tissues were observed; the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN- γ) in serum, as well as the Notch2 and DLL1 mRNA and protein expression in the joint tissues were detected. **Results** Compared to those in the model group, the weight of rats in the FHD medium and high dose groups increased; the score of arthritis was reduced; the expression of cytokines TNF- α , IL-6 and IFN- γ in serum significantly decreased; the expression of Notch2, DLL1 mRNA and protein in joints were significantly reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$). The pathological results showed that synovial hyperplasia, inflammatory cell infiltration, pannus formation and narrowing of joint space were significantly alleviated. Compared to the FHD low dose group, the medium and high dose groups improved the pathological damage of joint tissues; the arthritis score decreased; the expression of cytokines TNF- α , IL-6 and IFN- γ in serum were significantly reduced; the expression of DLL1 mRNA and Notch2 protein in the joint tissues decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to those in the FHD medium dose group, the expression of serum cytokines TNF- α and IL-6 in the high dose group significantly increased; the expression of Notch2 mRNA was significantly up-leveled; and the expression of DLL1 mRNA was significantly reduced. **Conclusion** FHD can significantly improve the arthritis symptoms of CIA model rats, and the medium dose works best. The mechanism may be related to its function of inhibiting Notch2/DLL1 signaling pathway, regulating autoimmune function and reducing the expression of proinflammatory cytokines.

Keywords rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; *Fangji Huangqi Decoction* (防己黄芪汤); inflammatory factors; Notch2/DLL1 signaling pathway

(收稿日期: 2021-05-18; 修回日期: 2021-07-23)

[编辑: 王利芬]