

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.07.006

基于 LRG1/TGF- β 信号轴探讨清热活血方调节“炎症-骨破坏”治疗类风湿关节炎的靶向作用机制

刘蔚翔¹, 施雨², 张彦琼³, 巩勋¹, 姜泉[✉]

1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁5号, 100053; 2. 中国人民解放军北京卫戍区朝阳第十离职干部休养所; 3. 中国中医科学院中药研究所



[摘要] 通过梳理前期相关研究, 认为湿热证是类风湿关节炎(RA)的核心证候, 清热活血方是治疗RA湿热证的有效方剂。“炎症-骨破坏”是RA的关键病理环节, 也是清热活血方疗效的优势环节所在, 富含亮氨酸 α 2糖蛋白1(LRG1)可介导转化生长因子- β (TGF- β)信号通路参与RA“炎症-骨破坏”病理过程, 或可作为清热活血方治疗RA湿热证的疗效靶点蛋白。据此提出科学假说, 即清热活血方可能通过靶向调控LRG1所介导的TGF- β 信号通路调节“炎症-骨破坏”治疗RA, 并设想后续通过临床研究证实清热活血方对LRG1的临床干预效应, 通过动物实验明确清热活血方对LRG1/TGF- β 信号轴的作用机制以及LRG1/TGF- β 信号轴表达与否对清热活血方的疗效影响。

[关键词] 类风湿关节炎; 湿热证; 清热活血方; 炎症; 骨破坏; 富含亮氨酸 α 2糖蛋白1; 转化生长因子- β

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以侵蚀性关节炎为主要表现的自身免疫病^[1]。“炎症-骨破坏”是RA的关键病理环节, 也是导致RA病情迁延难愈、致畸致残、影响生活质量的关键原因^[2]。RA是中医药治疗的优势病种之一, 但目前RA中医证候的生物学内涵及对证方药的作用原理尚未完全明确, 在一定程度上妨碍了中医药精准诊疗与疗效突破的研究进程, 成为提高中医药临床疗效的瓶颈问题^[3]。

我们基于临床观察与前期研究认为湿、热、瘀是RA的核心病理要素^[4], 并确立了湿热证候是RA的核心证候^[5]。2017年中华中医药学会风湿病分会制订的《类风湿关节炎病证结合诊疗指南》^[3]中将清热活血方(组成: 金银花、土茯苓、黄芪、青风藤、炒苍术、萆薢、赤芍、丹参、黄柏、莢术、蜈蚣、蜂房)作为RA湿热证候的推荐治疗用

方, 且前期对国内RA治疗现状进行分析, 发现清热活血方是国内治疗RA使用频次最高的中医药复方^[6]; 其可有效改善RA湿热证的临床症状, 控制疾病活动度, 延缓骨破坏进程^[7-8], 但相关证候生物学内涵及方药的作用机制尚未完全明确。我们前期通过蛋白组学技术发现, 富含亮氨酸 α 2糖蛋白1(LRG1)在RA湿热证中呈高表达^[9], 而LRG1介导的转化生长因子- β (TGF- β)信号通路在RA“炎症-骨破坏”中发挥着重要作用^[10-12]。因此, 本文旨在探讨清热活血方基于LRG1/TGF- β 信号轴调节“炎症-骨破坏”治疗RA的靶向疗效机制, 并基于此提出LRG1可作为清热活血方治疗RA的靶点蛋白之一的科学假说, 或可有助于诠释运用清热活血方论治RA“方证相应”的科学内涵。

1 国内外RA治疗研究现状及发展动态

1.1 “炎症-骨破坏”是RA关键病理环节, 也是清热活血方的优势疗效环节

RA发病机制复杂, 与炎症活动密切相关, 骨破坏是基于RA持续的炎症活动基础上发生关节畸形、功能丧失的病理环节, 自身免疫细胞的激活导

基金项目: 国家自然科学基金(82305224, 82230121, 82274507); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A01501); 中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项(ZZ17-YQ-011); 中华中医药学会风湿病分会青年培英计划人才培养项目(202327-001)

✉ 通讯作者: doctorjq@126.com

致炎症活动、成骨-破骨细胞失衡是 RA 骨破坏的关键^[2]，因此“炎症-骨破坏”是 RA 防治的重点与难点。我们前期对 RA 湿热证候的生物学内涵进行了初步探索^[13]，发现湿热证候中，与血管炎、关节疼痛和发热等相关的关键网络靶标基因数量最多，与活动期 RA 病理表现高度吻合；关键网络靶标基因最显著富集于物质和能量代谢相关通路以及热反应、疼痛感觉相关生物功能，这与中医学“湿、热、瘀”病机所导致的临床症状密切相关^[4]；该证候关键网络靶标基因还参与 RA “免疫-炎症”相关通路和反应、骨破坏相关通路、滑膜血管翳生成相关通路和反应等。因此，“炎症-骨破坏”是 RA 湿热证候的关键病理环节。

湿、热、瘀影响气血津液运行而导致 RA 发病，同时 RA 由于气血津液运行不畅也加重湿、热、瘀的产生。湿、热、瘀不化，邪盛正虚、邪热炽盛，是 RA 炎症活动的中医病机^[4]，邪久不祛、深入于内，进而出现热盛蚀骨的骨破坏病机变化^[14]。清热活血方是中国中医科学院广安门医院风湿病科经过近 40 年的临床实践总结出的经验用方，我们前期开展了大量动物基础实验和临床试验，发现清热活血方能调节机体辅助性 T 细胞 17 (Th17) /调节性 T 细胞 (Treg) 免疫失衡^[15]，减轻滑膜炎症和延缓关节破坏的进展，可用于治疗 RA 湿热证候患者^[16-17]。全国多中心、大样本的随机对照试验^[18-19]证实，清热活血方有助于 RA 湿热证候患者快速缓解症状，改善炎症指标和疾病活动度，并显著减缓 RA 骨破坏的放射学进展，进一步明确了清热活血方治疗 RA 湿热证候的临床疗效及其在改善炎症活动、延缓骨破坏方面的临床优势。因此，“炎症-骨破坏”也是清热活血方的优势疗效环节。

1.2 LRG1 可介导 TGF- β 信号通路参与 RA “炎症-骨破坏”病理过程

LRG1 为富含亮氨酸重复序列家族中最早发现的成员，其首要功能是在蛋白质的相互作用中提供一个多用的结构框架^[20]，已被证明参与机体的信号转导、蛋白质相互作用和细胞发育等^[21-23]。研究发现，LRG1 可介导 TGF- β 信号通路 (LRG1/TGF- β 信号轴) 影响风湿免疫疾病的发展^[24-25]。

有学者对 LRG1 基因敲除小鼠与野生型小鼠模拟胶原诱导性关节炎 (CIA) 进行研究，发现 LRG1 可能通过 TGF- β /Smad2 信号通路促进 Smad2 的磷酸化，影响免疫内稳态的 CD4⁺T 细胞的分化方向^[10]，

从而影响辅 Th17 和 Treg 的比例。而 Th17 和 Treg 比例失衡在 RA 炎症机制中起着重要作用^[11]。在骨平衡调节细胞中，LRG1 介导的 TGF- β 信号通路参与了成骨细胞增殖、胶原合成以及成骨细胞凋亡的过程，研究表明 LRG1 会干扰 TGF- β 超家族的骨形态发生蛋白 (BMPs)，从而影响成骨形成^[12]。而当 LRG1 受到抑制时，能提高 TGF- β 、Smad3、Smad4 和 pSmad2/3 (磷酸化的 smad2/3) 的表达，降低 Smad7 的表达，从而促进成骨细胞增殖和胶原合成，抑制成骨细胞凋亡，延缓骨破坏的进展^[26]。

综上所述，LRG1 可介导 TGF- β 信号通路影响 Th17/Treg 免疫平衡进而参与 RA 的炎症活动，也可通过 TGF- β 信号通路调节骨平衡。因此，LRG1/TGF- β 信号轴可能是 RA 炎症、骨破坏发病机制的共同通路。

1.3 LRG1 或可作为清热活血方治疗 RA 湿热证候的靶点蛋白

LRG1 主要在肝脏和中性粒细胞中表达，可由白细胞介素-6 (IL-6) 诱导产生^[27-28]，亦可被白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TGF- α) 和白细胞介素-22 (IL-22) 等细胞因子诱导生成^[29]。LRG1 在免疫性、炎症性疾病的致病机制中发挥着重要作用，可用于监测自身免疫性、炎症性疾病治疗期间的疾病活动变化，因此 LRG1 有望成为药物治疗免疫性、炎症性疾病的新靶点^[30]。研究发现 LRG1 与 RA 的疾病活动度具有明显的相关性，在经过治疗后 LRG1 水平与治疗前相比明显下降^[30]；且 LRG1 在鉴别 RA 的疾病活动度、检测关节炎动物模型的关节炎方面优于其他生物标志物^[31]。研究^[32]表明，血清 LRG1 水平与 RA 患者疾病活动评分 (DAS-28)、红细胞沉降率 (ESR)、C-反应蛋白 (CRP) 等疾病活动指标以及压痛、肿胀关节数量相关，LRG1 可以反映 RA 患者全身性炎症的水平，并可能在炎症过程中发挥作用，可作为评估 RA 患者病情活动的血清生物标志物。

我们前期对 RA 湿热证候的血清标志物进行探索，发现 LRG1 在湿热证候中呈高表达，可作为湿热证候的血清标志物^[9]，与健康人及其他 RA 证候患者相比均有显著性差异。因此，LRG1 或可作为清热活血方治疗 RA 湿热证候的靶点蛋白。

2 清热活血方治疗 RA 作用靶点的验证

随着“精准医疗”概念的提出，传统的药物研究模式已经转向了精准靶向药物分子设计策略。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease9, Cas9) [33] 具有定位靶向基因组的高效率、转染多个 sgRNA 的高成功率的优势, 通过特定的基因编辑可用于了解相应目标蛋白在疾病发生发展过程中的功能和药物治疗的影响。通过基因编辑技术改变生物体的特征, 有助于提高我们对疾病变化的理解, 开发相应药物, 甚至治愈疾病 [34]。

清热活血方治疗 RA 的作用机制是多途径、多靶点、多通路的网络调控作用复合叠加的结果, 蛋白质的结构和功能直接影响着生理或病理条件下生命体的活动机制, 决定着生命个体的外在表现型, 前期借助蛋白质组学寻找出 LRG1 可作为评价清热活血方治疗反应的生物标志物之一, 对建立 RA 精准中医药个体化的诊疗方式迈出了关键一步。因此, 如采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术制备 LRG1 基因敲除的动物模型, 或可有助于准确验证 LRG1/TGF- β 信号轴表达与否对病情变化及清热活血方的疗效影响。

3 清热活血方可能通过 LRG1/TGF- β 信号轴调控炎症和骨平衡治疗 RA

基于国内外的研究现状和前期研究发现, 我们提出科学假说, 即清热活血方可能通过靶向调控 LRG1/TGF- β 信号轴, 影响 Smad 蛋白及其磷酸化和 CD4⁺T 细胞的分化方向, 调节 Th17/Treg 的比例, 从而调控 RA 炎症活动; 同时影响 TGF- β 超家族的 BMPs, 调节骨平衡, 从而延缓骨破坏的进展。具体过程见附图 1 (扫描本文二维码获取)。

有关清热活血方基于 LRG1/TGF- β 信号轴治疗 RA 的关键靶点与机制, 尚未在国内外开展相关研究。我们拟在前期研究基础上, 着眼于 LRG1/TGF- β 信号轴, 设计相关实验方法与技术, 旨在明确清热活血方通过靶向调控 LRG1/TGF- β 信号轴, 调节“炎症-骨破坏”, 治疗 RA 的分子机制。验证上述科学假说的研究思路如下 (见附图 2, 扫描本文二维码获取)。

1) 通过临床队列观察清热活血方对 RA 患者血清中 LRG1 的干预作用, 确证清热活血方对 LRG1 的干预效应。依托我们前期搭建的中医药治疗 RA 万人级临床队列-中国中医风湿病注册研究信息平台 (CERTAIN) [6], 以及中国中医科学院广安门医院建立的 RA 生物样本库, 纳入人口学特征基线一致的、运用清热活血方治疗的 RA 湿热证候患者,

收集治疗前后的患者临床资料, 采用 Western Blot 技术检测血清中 LRG1 蛋白含量变化, 基于临床资料对比分析疗效结局指标与 LRG1 之间的相关性。

2) 通过观察清热活血方对 CIA 模型大鼠的干预作用, 正向明确清热活血方对 LRG1/TGF- β 信号轴的调控作用与机制。建立大鼠 CIA 动物模型, 随机分组后分别采用清热活血方、依那西普、生理盐水进行干预治疗, 观察其病理形态学变化, 包括大鼠双后肢膝、踝、足趾肿胀情况, 关节及滑膜病理学改变, 骨侵蚀病理积分等; 采用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (Realtime-PCR)、蛋白质印迹 (Western Blot)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和免疫组化等技术分析外周血单个核细胞 (PBMC) 及关节滑膜组织中 LRG1 mRNA 表达水平和 LRG1 蛋白含量变化, 检测 TGF- β 、Smads、pSmads、IL-6 等与 TGF- β 信号通路相关的细胞因子和蛋白含量, 运用流式细胞术分析各组大鼠脾脏的 Th17/Treg 比重, 检测炎症相关指标; 同时检测大鼠的 BMPs、血钙、血磷、尿钙、尿磷、碱性磷酸酶、骨钙蛋白、骨碱性磷酸酶等骨形成相关指标。明确清热活血方对 LRG1/TGF- β 信号轴的调控作用, 以及对炎症和骨平衡的影响。

3) 基于 LRG1 基因敲除技术, 反向验证 LRG1/TGF- β 信号轴表达与否对病情活动及清热活血方的疗效影响。利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 C57BL/6N 品系小鼠基因组上的 LRG1 基因序列, 获得 LRG1 基因全身敲除的基因修饰小鼠, 分别将 C57BL/6N 野生型小鼠 (WT) 与 LRG1 基因敲除小鼠 (LRG1-KO) 建立 CIA 动物模型, 并纳入未予 CIA 处理的 C57BL/6N 野生型小鼠作为对照。采用清热活血方对三组小鼠进行干预治疗, 并设置空白对照组, 运用免疫组化分析 LRG1 在炎症诱导下局部关节滑膜组织中的表达情况, 采用 Realtime-PCR、Western Blot、ELISA 等技术分析 PBMC 及关节滑膜组织中 LRG1 mRNA 表达水平和 LRG1 蛋白含量变化, 检测 TGF- β 、Smads、pSmads、IL-6 等与 TGF- β 信号通路相关的细胞因子和蛋白含量, 运用流式细胞术分析各组小鼠脾脏的 Th17/Treg 比重, 检测炎症相关指标; 同时检测小鼠的 BMPs、血钙、血磷、尿钙、尿磷、碱性磷酸酶、骨钙蛋白、骨碱性磷酸酶等骨形成相关指标。验证 LRG1/TGF- β 信号轴表达与否对滑膜炎症程度及骨平衡的影响, 以及清热活血方治疗效果的差异情况。

4 小结与展望

中医药在 RA 治疗上不仅安全有效、且有助于长期维持 RA 病情稳定^[35-36], 国内 RA 患者群体对中医药方案具有较好的接受度^[37]。当前中医药治疗 RA 的临床与基础研究明确了中医药能有效改善 RA 湿热证候的炎症, 并延缓骨破坏的发生发展, 并各自从炎症通路、骨平衡机制方面阐述了中医药的疗效机制。

团队前期基于 RA “湿、热、瘀”核心病理要素, 明确了 RA 湿热证候与清热活血方的核心方证对应关系及清热活血方治疗 RA 的临床疗效, 并进一步明确了“炎症-骨破坏”是 RA 湿热证候的核心病理环节和清热活血方的优势疗效环节, 初步探索出 RA 湿热证候、清热活血方的共同差异蛋白是 LRG1, 为本文提出的科学假说提供了依据。然而关于 LRG1 能否作为清热活血方治疗 RA 的作用靶点、清热活血方基于“炎症-骨破坏”相关通路治疗 RA 的分子机制尚不清楚, 需要进一步确证 LRG1 作为清热活血方的疗效靶点, 明确清热活血方基于 LRG1 介导的下游通路调节“炎症-骨破坏”治疗 RA 的作用机制, 从而阐释 RA 核心方证的科学内涵, 明确中医药治疗 RA 的优势环节, 有助于突破 RA 中医药精准诊疗的临床瓶颈。

参考文献

- [1]SMOLEN JS, ALETAHA D, BARTON A, et al. Rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18001. doi: 10. 1038/nrdp. 2018. 1.
- [2]VEIGAS B, MATIAS A, CALMEIRO T, et al. Antibody modified gold nanoparticles for fast colorimetric screening of rheumatoid arthritis [J]. Analyst, 2019, 144(11): 3613-3619.
- [3]中华中医药学会风湿病分会. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2018, 59(20): 1794-1800.
- [4]刘蔚翔, 姜泉. 类风湿关节炎“湿、热、瘀”病机理论探析 [J]. 中医杂志, 2020, 61(24): 2148-2153.
- [5]王建, 巩勋, 唐晓颇, 等. 1602 例类风湿关节炎患者中医证候分布特点的多中心横断面调查 [J]. 中医杂志, 2018, 59(11): 963-967.
- [6]GONG X, LIU WX, LI D, et al. China rheumatoid arthritis registry of patients with Chinese medicine (CERTAIN): rationale, design, and baseline characteristics of the first 11, 764 enrollees [J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154236. doi: 10. 1016/j. phymed. 2022. 154236.
- [7]姜泉, 冯兴华, 王承德, 等. 清热活血方治疗类风湿关节炎患者 71 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2012, 53(6): 488-491.
- [8]张富渊, 姜泉, 李达, 等. 清热活血方药重塑类风湿关节炎骨免疫微环境的研究思路 [J]. 中医杂志, 2023, 64(10): 999-1003, 1007.
- [9]王新贤, 殷海波, 姜泉, 等. 基于 iTRAQ 蛋白质组学技术筛选类风湿关节炎湿热瘀阻证血清标志物 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(10): 1209-1213.
- [10]URUSHIMA H, FUJIMOTO M, MISHIMA T, et al. Leucine-rich alpha 2 glycoprotein promotes Th17 differentiation and collagen-induced arthritis in mice through enhancement of TGF- β -Smad2 signaling in naïve helper T cells [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 137.
- [11]SAMARPITA S, RASOOL M. Cyanidin restores Th17/Treg balance and inhibits T follicular helper cell differentiation via modulation of ROCK2 signaling in an experimental model of rheumatoid arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101(Pt B): 108359. doi: 10. 1016/j. intimp. 2021. 108359.
- [12]CAMILI C, HOEH AE, DE ROSSI G, et al. LRG1: an emerging player in disease pathogenesis [J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 6.
- [13]陈文佳, 巩勋, 刘蔚翔, 等. 从“病-证-症”关联网络探索类风湿关节炎中医证候的生物内涵 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(3): 796-806.
- [14]张富渊, 宋梦歌, 徐浩东, 等. 基于“热盛蚀骨”理论探析类风湿关节炎骨破坏的防治 [J]. 世界中西医结合杂志, 2022, 17(11): 2129-2133.
- [15]武子英, 曹炜, 祁鑫, 等. 清热活血方对胶原诱导性关节炎大鼠肠道微生态及 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(6): 681-686.
- [16]JIANG Q, ZHOU XY, WANG L, et al. A one-year evaluation of radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis treated by Qingre Huoxue Decoction [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(4): 256-261.
- [17]李光耀, 唐晓颇, 姜泉, 等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎骨破坏 5 年期放射学观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(4): 516-520.
- [18]GONG X, LIU WX, TANG XP, et al. Traditional Chinese medicine Qingre Huoxue treatment vs. the combination of methotrexate and hydroxychloroquine for active rheumatoid arthritis: a multicenter, double-blind, randomized controlled trial [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 679588. doi: 10. 3389/fphar. 2021. 679588.
- [19]ZHANG RM, TANG XP, WANG J, et al. The impact of traditional Chinese medicine Qingre Huoxue treatment and the combination of methotrexate and hydroxychloro-

- quine on the radiological progression of active rheumatoid arthritis; a 52-week follow-up of a randomized controlled clinical study [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022;5808400. doi: 10.1155/2022/5808400.
- [20] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–132.
- [21] HAUPT H, BAUDNER S. Isolation and characterization of an unknown, leucine-rich 3.1-S-alpha2-glycoprotein from human serum (author's transl) [J]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1977, 358(6): 639–646.
- [22] TAKAHASHI N, TAKAHASHI Y, PUTNAM FW. Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich alpha 2-glycoprotein of human serum [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82(7): 1906–1910.
- [23] KOBE B, KAJAVA AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(6): 725–732.
- [24] WANG X, ABRAHAM S, MCKENZIE JAG, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling [J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 306–311.
- [25] ZOU Y, XU Y, CHEN X, et al. Research progress on leucine-rich alpha-2 glycoprotein 1: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 809225. doi: 10.3389/fphar.2021.809225.
- [26] GU Z, XIE D, HUANG C, et al. MicroRNA-497 elevation or LRG1 knockdown promotes osteoblast proliferation and collagen synthesis in osteoporosis via TGF- β 1/Smads signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12619–12632.
- [27] SHIRAI R, HIRANO F, OHKURA N, et al. Up-regulation of the expression of leucine-rich alpha(2)-glycoprotein in hepatocytes by the mediators of acute-phase response [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(4): 776–779.
- [28] O'DONNELL LC, DRUHAN LJ, AVALOS BR. Molecular characterization and expression analysis of leucine-rich alpha2-glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation [J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(3): 478–485.
- [29] SERADA S, FUJIMOTO M, TERABE F, et al. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(11): 2169–2179.
- [30] SERADA S, FUJIMOTO M, OGATA A, et al. iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(4): 770–774.
- [31] FUJIMOTO M, SERADA S, SUZUKI K, et al. Leucine-rich α 2-glycoprotein as a potential biomarker for joint inflammation during anti-interleukin-6 biologic therapy in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(8): 2056–2060.
- [32] HA YJ, KANG EJ, LEE SW, et al. Usefulness of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a disease activity biomarker in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(9): 1199–1204.
- [33] CONG L, RAN FA, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [34] DOUDNA JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing [J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 229–236.
- [35] HE YT, OU AH, YANG XB, et al. Traditional Chinese medicine versus western medicine as used in China in the management of rheumatoid arthritis: a randomized, single-blind, 24-week study [J]. *Rheumatol Int*, 2014, 34(12): 1647–1655.
- [36] XING Q, FU L, YU Z, et al. Efficacy and safety of integrated traditional Chinese medicine and western medicine on the treatment of rheumatoid arthritis: a meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020: 4348709. doi: 10.1155/2020/4348709.
- [37] LU MC, LIVNEH H, CHIU LM, et al. A survey of traditional Chinese medicine use among rheumatoid arthritis patients: a claims data-based cohort study [J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(5): 1393–1400.

Discussion on the Targeting Mechanism of *Qingre Huoxue Formula* (清热活血方) for Treatment of Rheumatoid Arthritis by Regulating “Inflammation-Bone Destruction”: Based on LRG1/TGF- β Signalling Axis

LIU Weixiang¹, SHI Yu², ZHANG Yanqiong³, GONG Xun¹, JIANG Quan¹

1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053; 2. Chaoyang Tenth Retired Cadre Rehabilitation Center of the Beijing Garrison of the People's Liberation Army of China; 3. Institute Of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT Based on the previous publications, it is believed that damp-heat syndrome is the core syndrome of rheumatoid arthritis (RA), and *Qingre Huoxue Formula* (清热活血方) is an effective formula for the treatment of

damp-heat syndrome of RA. “Inflammation-bone destruction” is a key pathological link of RA, and it is also the advantage of the effectiveness of *Qingre Huoxue Formula*. Leucine rich α -2-glycoprotein 1 (LRG1) can mediate the transforming growth factor- β (TGF- β) signalling pathway to participate in the pathogenic process of “inflammation-bone destruction” of RA, and it can be used as a target protein in the treatment of damp-heat syndrome of RA by *Qingre Huoxue Formula*. Accordingly, a scientific hypothesis was proposed that *Qingre Huoxue Formula* may regulate TGF- β signalling pathway mediated by LRG1 to improve “inflammation-bone destruction” of RA, and it was envisioned that the clinical effect of *Qingre Huoxue Formula* on LRG1 could be confirmed through clinical studies, and the mechanism of action of *Qingre Huoxue Formula* on the LRG1/TGF- β signalling axis as well as the influence of the expression or non-expression of the LRG1/TGF- β signalling axis on the therapeutic effectiveness of *Qingre Huoxue Formula* could be clarified through animal experiments.

Keywords rheumatoid arthritis; damp-heat syndrome; *Qingre Huoxue Formula* (清热活血方); inflammation; bone destruction; leucine rich α -2-glycoprotein 1; transforming growth factor- β

(收稿日期: 2023-07-26; 修回日期: 2023-11-01)

[编辑: 果 彤, 侯建春]

(上接第 677 页)

TU Jinwen's Experience in the Treatment of Severe Influenza Based on the Heat Toxin Theory

LYU Anqi¹, SHI Yufeng¹, YANG Yi², Ke Jia², TU Jinwen²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, 430060; 2. Hubei Provincial Hospital of TCM/ Hubei University of Chinese Medicine Affiliated Hospital / Hubei Academy of TCM

ABSTRACT To summarize Professor TU Jinwen's clinical experience in the treatment of severe influenza based on the theory of “heat toxin”. It is believed that “heat toxin” is the main mechanism of severe influenza, emphasized the pathogenesis process that toxin enters with the pathogenic *qi*, heat generates by the toxin, and changes initiate from the toxin, and proposed simultaneous treatment of warmth and toxin, and combination of multiple methods as the treatment principles. Syndrome differentiation in clinic should combine with *wei-qi-ying*-blood. The disease in the early stage located in *wei* (defensive) and *qi* level, treated by clearing heat and resolving toxins, releasing the exterior and expelling pathogen, harmonizing the exterior and interior, dredging the bowels with diarrhea, and combining other methods to get rid of the heat and toxin, and modified Self-Prescribed *Tuire No. 1 Formula* (退热 1 号方) is recommended; the disease in progression stage located in *ying*-blood, treated by relieving heat and resolving toxins, and clearing the *ying* level and cooling the blood, with prescriptions as modified Self-Prescribed *Tuire No. 1 Formula* plus *Qingying Decoction* (清营汤), or *Xijiao Dihuang Decoction* (犀角地黄汤); the disease in the late stage with of *yin* fluid consumption, and heat toxin in the blood level, treated by eliminating heat and resolving toxins, and enriching *yin* and cooling the blood, with prescriptions as modified *Shashen Maidong Decoction* (沙参麦冬汤) and *Zhuye Shigao Decoction* (竹叶石膏汤). At the same time, it is emphasised that heat-clearing and fire-draining method and harmonising methods are important, and that dispelling pathogen should not injure healthy *qi*, and that the selection of prescriptions and medicines need consider syndrome differentiation and treatment.

Keywords influenza; severe case; heat toxin; experience of famous doctors; TU Jinwen

(收稿日期: 2023-08-09; 修回日期: 2023-12-03)

[编辑: 姜 冰]