

麝香乌龙丸对 RA 患者外周血 miR-146a、miR-130 及 miR-223 表达水平的影响

王志文¹, 王松松¹, 崔建美¹, 曹 颖¹, 徐丁洁¹, 袁 强², 于笑涵¹, 任晨晖¹, 仲伟静¹

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000)

摘要: **目的** 探讨麝香乌龙丸(人工麝香、制川乌、地龙等)含药血清对类风湿关节炎(RA)患者外周血单个核细胞(PBMCs)中 miR-146a、miR-130、miR-223 表达水平的影响。**方法** 从 30 例 RA 患者血液中提取 PBMCs, 将细胞分为 3 组, 空白对照组、空白血清组、麝香乌龙丸含药血清组。48 h 后提取总 RNA, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测 3 种 miR 的表达水平。**结果** 与空白血清组相比, 麝香乌龙丸含药血清组 miR-146a、miR-130、miR-223 表达水平显著降低($P < 0.01$)。**结论** 麝香乌龙丸可通过下调 PBMCs 中 miR-223、miR-130、miR-146a 表达水平来抑制 RA 患者炎症。

关键词: 麝香乌龙丸; 类风湿关节炎(RA); miR-146a; miR-130; miR-223

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)11-2255-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.11.006

Effects of Shexiang Wulong Pills on the expression levels of miR-146a, miR-130 and miR-223 of peripheral blood in patients with RA

WANG Zhi-wen¹, WANG Song-song¹, CUI Jian-mei¹, CAO Ying¹, XU Ding-jie¹, YUAN Qiang², YU Xiao-han¹, REN Chen-hui¹, ZHONG Wei-jing¹

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 2. Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the effects of Shexiang Wulong Pills (*Moschus Artifactus*, *Aconiti Radix Cocta*, *Pheretima*, etc.) drug serum on the expression levels of miR-146a, miR-130 and miR-223 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with rheumatoid arthritis (RA). **METHODS** PBMCs were extracted from blood of 30 cases of RA patients, cells were divided into three groups, blank control group, serum-free group and Shexiang Wulong Pills drug serum group. After 48 hours, total RNA was extracted, then the expression levels of three miRs were detected by RT-PCR. **RESULTS** Compared with the serum-free group, the expression levels of miR-146a, miR-130 and miR-223 in the Shexiang Wulong Pills drug serum group were significantly decreased ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Shexiang Wulong Pills can inhibit inflammation in RA patients by down-regulating the expression levels of miR-223, miR-130 and miR-146a in PBMCs.

KEY WORDS: Shexiang Wulong Pills; rheumatoid arthritis (RA); miR-146a; miR-130; miR-223

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节炎症细胞浸润、滑膜增生为主要病理表现的自身免疫性疾病,其发病机制复杂,由多种免疫细胞和免疫因子参与,近年来,miRNA与RA的关系被国内外专家所重视,并逐步形成RA发病机制的热点问题。微小核糖核酸(microRNA, miR)是

收稿日期: 2017-04-18
基金项目: 河北省重大医学科研课题资助项目(ZYZ2013017)
作者简介: 王志文(1955—),男,教授,主任医师,硕士生导师,研究方向为中西医结合防治风湿免疫疾病。Tel: 15383055698, E-mail: wangzhiwen_1955@163.com

一类约 22 个核苷酸组成的内源性、非编码、单链小分子 RNA, 广泛存在于多种真核生物中。研究显示, miR 通过调控 T、B 淋巴细胞的分化, 参与固有免疫应答和适应性免疫应答, 在自身免疫性疾病(如 RA)中发挥重要作用^[1-3]。因此, 本研究选取了与 RA 发病密切相关的 miR-223、miR-130 及 miR-146a 3 个 miR, 通过分析麝香乌龙丸含药血清干预后, RA 患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中 3 种 miR 表达水平的变化, 从基因水平探讨麝香乌龙丸治疗 RA 的作用机制。

1 一般资料

选取 2015 年 11 月至 2016 年 5 月于华北理工大学附属医院风湿免疫门诊首次确诊、未经过抗风湿治疗的 RA 患者 30 例, 年龄 18~50 岁。入选标准符合 2010 年欧洲抗风湿病联盟(EULAR)制定的 RA 分类标准和评分系统^[4], 评分在 6~8 分确诊为 RA。排除标准: 同时合并其他风湿病的患者, 如系统性红斑狼疮、干燥综合征等; 严重心血管疾病及肺部疾病, 肝、肾功能异常; 患有精神、神经系统、血液疾病患者; 肿瘤患者; 妊娠或哺乳期妇女; 其他原因引起的免疫功能异常患者。

2 方法

2.1 药物、试剂与仪器

2.1.1 药物 麝香乌龙丸由人工麝香、制川乌、生地龙、生全蝎、生黑豆 5 味药材组成, 冀药制字 Z20051581。

2.1.2 试剂 人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司); 胎牛血清(Gibco 公司); 双抗(HyClone 公司); RPMI 1640 培养基(Gibco 公司); Trizol(Invitrogen 公司); cDNA 逆转录试剂盒(MBI 公司); PCR 试剂盒(Invitrogen 公司); RNA 酶抑制剂(Invitrogen 公司)。无水乙醇、异丙醇、氯仿(天津市富宇精细化工有限公司)。

2.1.3 仪器 流式细胞仪(BD FACSCalibur); H1850R 高速冷冻离心机(湖南湘仪); 梯度 PCR 仪(美国 Bio-rad); CFX96 定量 PCR 反应机(美国 Bio-rad)。

2.2 操作

2.2.1 含药血清的制备 按照随机数字表法将 SPF 级 SD 大鼠 12 只分为 2 组: 空白对照组、麝香乌龙丸组, 分别给予 10 mL/(kg·d)生理盐水、麝香乌龙丸水提液(200 mg/mL)灌胃 7 d, 腹主动

脉取血, 提取含药血清, -80℃保存备用。

2.2.2 外周血标本的收集 采集患者静脉血 5 mL, 置于 EDTA-K2 处理过的采血管, 迅速反转采血管数次, 将血样于 60 min 内送往实验室提取细胞。

2.2.3 PBMCs 的分离 超净台下取 5 mL 人淋巴细胞分离液, 置于 15 mL 无菌离心管中。取 EDTA-K2 抗凝血 5 mL, 沿离心管壁缓慢将血液加到分离液上方, 1 800 r/min、18~20℃离心 20 min, 离心管内液体分 4 层, 取第 2 层(白膜层)转入另一 15 mL 无菌离心管中, 加 2 倍体积 PBS 缓冲液, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 重复洗涤 1 次, 重悬细胞备用。

2.2.4 细胞的培养及药物干预 将单个核细胞用培养基(89% 1640 培养液、10% 胎牛血清、1% 双抗)重悬, 转移到培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后细胞计数, 将细胞分为 3 组: 空白对照组(培养基)、空白血清组、麝香乌龙丸含药血清组, 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h。

2.2.5 总 RNA 的提取 将培养的细胞转移至 1.5 mL 无菌离心管中, PBS 缓冲液稀释, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收集细胞, 加入 1 mL 预冷的 Trizol, 混匀, 置于冰上 5 min, 每毫升 Trizol 加 0.2 mL 氯仿后剧烈振荡 15 s, 置于冰上 5 min, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, 液体分 3 层, 取 0.5 mL 上层置于另一离心管中, 等比例加入异丙醇混匀, 置于冰上 10 min, 4℃、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 室温或真空干燥 RNA 沉淀 2~5 min, 加 20 μL DEPC 水, 各组取总 RNA 样品 2 μL, 测定样品 RNA 在 A_{260 nm}/A_{280 nm} 处的吸光度, 以检测各组样品 RNA 的纯度及浓度。剩余总 RNA 按每 10:1 的比例加入 RNA 酶抑制剂, -80℃保存备用。

2.2.6 cDNA 的合成 按照 cDNA 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, -80℃保存备用。

2.2.7 引物序列 miR-223 的引物序列: 正向引物 5'-CCACGCTCCGTGTATTTGAC-3'; 反向引物 5'-CCGCACTTGGGGTATTTGAC-3'。miR-130 的引物序列: 正向引物 5'-GCTGGCCAGGCTCTTTTACA-3'; 反向引物 5'-AGTGGACATACGCAATCTCG-3'。miR-146a 的引物序列: 正向引物 5'-GAGAACTGAATTC-CATGGGTGTTG-3'; 反向引物 5'-GACAGAGATATCCCAGCTGAAGAA-3'。U6snRNA 的引物序列: 正向引物 5'-GCTCGCTTCGGCAGCACA-3'; 反向引

物 5'-GAGGTATTTCGCACCAGAGGA-3'。

miR-223、miR-130、miR-146a 及 U6snRNA 均由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成。

2.2.8 RT-PCR 检测 miR 以 cDNA 为模板，U6snRNA 为内参照，各组样品设置 3 个复孔。PCR 反应条件：95 ℃ 预热 5 min，94 ℃ 15 s，58 ℃ 30 s，70 ℃ 34 s，共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示每种 miR 相对表达量。

2.3 统计学方法 各组实验均重复 3 次，实验数据用 Excel 软件录入，采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析，以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)，方差齐两两比较采用小差异法 (least significant difference, LSD) 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

miR-146a、miR-130 及 miR-223 的表达水平的比较：无论是目的基因还是内参基因，它们的扩增曲线和溶解曲线良好，没有非特异的扩增；空白血清组与空白对照组相比，miR 表达水平均无明显差异 ($P > 0.05$)；麝香乌龙丸含药血清组与空白血清组、空白对照组相比，miR-146a、miR-130 和 miR-223 表达水平均下调，差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。如表 1 所示。

表 1 miR-146a、miR-130 及 miR-223 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of the expression levels of miR-146a, miR-130 and miR-223 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-146a	miR-130	miR-223
空白对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
空白血清组	1.09 ± 0.45	0.96 ± 0.21	0.99 ± 0.55
麝香乌龙丸含药血清组	0.14 ± 0.00 **	0.54 ± 0.05 **	0.34 ± 0.06 **

注：与空白血清组比较，** $P < 0.01$

4 讨论

中医强调整体、平衡、综合与生态，因此在治疗自身免疫性疾病（如 RA 等）方面具有较强的优势。麝香乌龙丸出自宋朝许叔微《普济本事方》中的“麝香圆”，课题组对其原方中药味、剂量结合现代药理研究及制剂工艺进一步研发而成，主要应用于对 RA 的治疗，并获得了满意的疗效。麝香辛、温，具有活血通络、消肿止痛功效，并能通行十二经；制川乌辛、苦、大热，能祛风除湿，温经止痛；地龙善通经活络，引川乌直达寒湿所结之处；全蝎息风解痉止痛，与地龙共同发挥搜剔窜透作用，使寒湿之邪从经络、肌肉、筋骨而出；黑豆

味甘性平，有滋肾健脾、治风湿痹痛之效，并解诸药之毒。诸药配伍，共凑温经散寒、舒筋活络、行血祛瘀、消肿止痛之功效^[5]。在对其药理和机理实验中发现^[6-10]，麝香水提物和川乌对各种致炎剂（如角叉菜胶、二甲苯等诱发大鼠、小鼠关节炎）均有明显抑制作用，且对佐剂性关节炎等免疫炎症也有显著抑制作用，同时还有明显镇痛活性；地龙有较强的调节免疫及抗炎镇痛作用，其可缩短炎症周期，减少炎症性渗出，加速伤口愈合，减轻患者疼痛；全蝎具有免疫抑制及镇痛作用。课题组发现，麝香乌龙丸通过对 RA 关键因子的调控，发挥了对软骨和骨的保护作用^[11-15]。在本研究中，主要观察麝香乌龙丸对 RA 相关 miR 的调节作用及其机制。

研究表明，miR 通过影响多种细胞因子来参与对炎症和自身免疫性疾病的调控。miR-130 可以显著上调 T 细胞的活化，引起自身免疫性疾病的发生^[16]；miR-223 在 RA 患者外周血中表达持续升高，抑制胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor, IGF-1) 介导的白介素-10 (interleukin, IL-10)、IL-17 产生，导致促炎因子/抑炎因子表达水平失衡^[17-18]，敲低破骨细胞 miR-223 的表达，还可以抑制 RA 患者骨和软骨的破坏，降低 RA 的严重程度^[19-20]；miR-146a 在 RA 患者的外周血单核细胞中高表达，其通过识别肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF6) 和白细胞介素 1β 受体关联激酶 1 (IL-1 receptor-associated kinase, IRAK-1) 负反馈调节炎症性免疫反应。然而，由于 miR-146a 功能失活，不能发挥正常的负反馈作用，导致了 TNF-α 的大量产生，促进了 RA 的发生、发展^[21]。最新研究也发现，过度表达的 miR-146a 能够协同 TNF-α 抑制 T 细胞的凋亡，促进其向 IL-17 分泌细胞分化，从而参与了对 RA 的调控^[22]。

实验显示，麝香乌龙丸能够下调患者外周血 PBMCs 中 miR-223、miR-130 及 miR-146a 的表达水平，可能通过下调 PBMCs 中三者的表达水平来发挥调节免疫的作用。但麝香乌龙丸作为一个中药复方，其对 miR 调节的具体机制尚不明确，还需进一步深入研究。

参考文献：

[1] 庞春艳, 王永福. 微小 RNA 在类风湿关节炎诊断和治疗中的作用[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(5): 554-556.

[2] Trenkmann M, Brock M, Gay R E, *et al.* Tumor necrosis factor α -induced microRNA-18a activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through a feedback loop in NF- κ B signaling[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(4): 916-927.

[3] 冯知涛. RA 患者外周血 miR-146a、miR-16 表达与疾病活动、中医证型相关性及其青藤碱制剂对其干预的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2011.

[4] Aletaha D, Neogi T, Silman A J, *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria; an American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(9): 2569-2581.

[5] 王志文, 任晨晖, 袁 强, 等. 麝香乌龙丸治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎的临床疗效[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1910-1914.

[6] 王志文, 张爱国, 袁 强, 等. 麝香乌龙丸抗炎及镇痛药理研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 584-586.

[7] 刘 瑶, 焦豪妍. 川乌毒理与药理现代研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(3): 66-67.

[8] 杜 航, 孙佳明, 郭晓庆, 等. 地龙的化学成分及药理作用[J]. 吉林中医药, 2014, 34(7): 707-709.

[9] 王丹彤, 王丹辉. 中药地龙的化学成分及药理作用研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(68): 254-255.

[10] 史 磊, 张天锡, 杜聪颖, 等. 中药全蝎活性成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(4): 89-91.

[11] 苗 柳, 袁 强, 崔建美, 等. 麝香乌龙丸联合来氟米特片治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎 59 例临床观察[J]. 中医杂志, 2016, 57(19): 1666-1669.

[12] 仲伟静, 袁 强, 刘海涛, 等. 麝香乌龙丸对类风湿关节炎患者血清 OPG、RANKL 表达的影响[J]. 中医药临床杂志, 2016, 28(3): 351-354.

[13] 毕东敏, 魏建芬, 张万壮, 等. 麝香乌龙丸对中医不同证型类风湿关节炎血清 MIF、ICAM-1、VCAM-1 表达的影响[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2016, 13(4): 129-132.

[14] 任晨晖, 袁 强, 董玉山, 等. 麝香乌龙丸联合甲氨蝶呤及美洛昔康治疗类风湿关节炎临床观察[J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(9): 20-22, 38.

[15] 苗 柳. 麝香乌龙丸治疗类风湿关节炎患者的随机对照临床研究[D]. 唐山: 华北理工大学, 2016.

[16] Zhang N, Bevan M J. Dicer controls CD8⁺ T-cell activation, migration, and survival[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21629-21634.

[17] Filková M, Aradi B, Senolt L, *et al.* Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 73(10): 1898-1904.

[18] Lu M C, Yu C L, Chen H C, *et al.* Increased miR-223 expression in T cells from patients with rheumatoid arthritis leads to decreased insulin-like growth factor-1-mediated interleukin-10 production[J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 177(3): 641-651.

[19] Li Y T, Chen S Y, Wang C R, *et al.* Brief report: amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223 [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(10): 3240-3245.

[20] Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, *et al.* Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation[J]. *Mod Rheumatol*, 2013, 23(4): 674-685.

[21] Pauley K M, Satoh M, Chan A L, *et al.* Upregulated miR-146a expression in Peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R101.

[22] Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, *et al.* MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients[J]. *BMC Musculoskeletal Disord*, 2010, 11: 209.