

温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠外周血单核细胞 DNA 甲基化转移酶表达的影响

刘喜德¹ 冯莹莹² 蔡 龙¹ 周红娟¹ 叶丽红¹ 余建明¹ 王云卿² 杜 静¹ 杨梦霞²

摘要 目的 观察温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎(collagen-inducing arthritis, CIA)大鼠外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)表达的影响,探讨温化蠲痹方治疗 CIA 的作用机制。**方法** 将 90 只 Wistar 大鼠随机分为造模组(80 只)及正常对照组(10 只,简称正常组)。造模组在大鼠尾根部注射牛Ⅱ型胶原乳剂制备 CIA 模型。将造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组、甲氨喋呤组(MTX)、温化蠲痹方低、中、高剂量组(简称中药低、中、高剂量组),每组 10 只。模型组给予生理盐水灌胃;中药低、中、高剂量组分别给予温化蠲痹方 22.9、45.8、68.7 g/(kg·d)灌胃,均每日 1 次;MTX 组按 0.78 mg/kg 剂量灌胃 MTX 混悬液,每周 1 次,连续 30 日。采用容积法(排水体积)评价足趾肿胀度。给药干预后提取各组大鼠 PBMCs,采用实时定量 PCR 法检测 PBMCs DNMTs(DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b)mRNA 表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠足趾明显肿胀($P < 0.01$);与模型组比较,中药低、中、高剂量组及 MTX 组大鼠足趾肿胀明显减轻($P < 0.01$)。与本组治疗前比较,中药各剂量组及 MTX 组大鼠足趾肿胀减轻($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠 PBMCs DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 表达明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,中药各剂量组及 MTX 组 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 表达水平明显升高(均 $P < 0.01$);中药各剂量组 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** CIA 大鼠 PBMCs DNMTs 表达降低。温化蠲痹方上调 CIA 大鼠 PBMCs DNMTs 表达无明显剂量依赖性。通过上调 DNMTs 表达,调节 CIA 大鼠甲基化状态可能是其治疗 CIA 作用机制之一。

关键词 温化蠲痹方;胶原诱导性关节炎;外周血单核细胞;DNA 甲基化转移酶

Effects of Wenhua Juanbi Recipe on the Expressions of DNA Methyltransferases in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Collagen-Inducing Arthritis Rats LIU Xi-de¹, FENG Ying-ying², CAI Long¹, ZHOU Hong-juan¹, YE Li-hong¹, YU Jian-ming¹, WANG Yun-qing², DU Jing¹, and YANG Meng-xia² 1 Department of Arthropathy, Zhejiang Provincial Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Hangzhou (310003); 2 Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Wenhua Juanbi Recipe (WJR) on the expressions of DNA methyltransferases (DNMTs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of collagen-inducing arthritis (CIA), and to study its mechanism for treating CIA. **Methods** Totally 90 Wistar rats were randomly divided into the model group ($n = 80$) and the normal control group ($n = 10$). Rats of the model group were injected with type II collagen of bovine (BC II) emulsion from the tail to establish CIA model. Successfully modeled 50 CIA rats were randomly divided into five groups, i.e., the model group, the methotrexate (MTX) group, the low dose WJR group, the middle dose WJR group, the high dose WJR group, 10 in each group. Rats in the model group were administered with normal saline by gastroga-

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No. LY12H29008);浙江省中医药科技计划项目(No. 2012ZB121, No. 2013ZB096, No. 2008CA086, No. 2015ZA143);杭州市医药卫生科技计划项目(No. 2010B027, No. 2014A37);杭州市科技发展计划资助项目(No. 20092133W09, No. 20120633B12);第三批全国优秀中医临床人才研修项目(2012)

作者单位:1.浙江省中西医结合医院关节病科(杭州 310003);2.浙江中医药大学第二临床医学院(杭州 310053)

通讯作者:刘喜德, Tel: 0571-56108429, E-mail: liuxide2001@sohu.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.10.1219

vage, once per day. Rats in low, middle, and high dose WJR groups were administered with WJR by gastrogavage at the daily dose of 22.9, 45.8, 68.7 g/kg, respectively (once per day). Rats in the MTX group were administered with MTX suspension (0.78 mg/kg) by gastrogavage, once per week for 30 successive days. The paw swelling was evaluated using volume method (draining volume). PBMCs were extracted from each group after intervention. mRNA expression levels of DNMTs (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) were detected by real-time quantitative PCR. Results Compared with the normal group, the paws were obviously swollen in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, swollen paws were obviously alleviated in low, middle, and high dose WJR groups, and the MTX group ($P < 0.01$). Compared with before treatment in the same group, swollen paws were obviously alleviated in low, middle, and high dose WJR groups, and the MTX group ($P < 0.01$). Compared with the normal group, expression levels of DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b in PBMCs were obviously lowered in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, expression levels of DNMT1, DNMT3a, DNMT3b in PBMCs were obviously elevated in low, middle, and high dose WJR groups, and the MTX group (all $P < 0.01$). There was no significant difference in expression levels of DNMT1, DNMT3a, or DNMT3b in PBMCs among low, middle, and high dose WJR groups ($P > 0.05$). Conclusions Expression levels of DNMTs in PBMCs of CIA rats decreased. WJR up-regulated the expression level of DNMTs in PBMCs of CIA rats in no obvious dose dependent way. One of WJR's mechanisms for treating CIA might be up-regulating expression levels of DNMTs, and adjusting the state of DNA methylation.

KEYWORDS Wenhua Juanbi Recipe; collagen-inducing arthritis; peripheral blood mononuclear cell; DNA methyltransferases

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是滑膜细胞异常增生为特点的全身性自身免疫病。DNA 甲基化是体内一种必要的 DNA 外生性特征,可以调节基因表达,保持基因组完整性,还对染色体稳定和构成起重要作用^[1],DNA 甲基化改变可影响许多基因表达,包括与黏附分子和细胞因子表达相关的一些基因,导致 T 细胞自身反应性发生改变,与自身免疫性疾病发病关系密切^[2]。DNA 甲基化由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMTs) 催化完成。在 RA 患者外周血 T 细胞有 DNA 甲基化的受损,结果支持 DNA 甲基化与 RA 之间的联系^[3]。温化蠲痹方为临床经验方,前期研究表明,该方对 RA 有较好疗效^[4],本研究探讨温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎 (collagen-inducing arthritis, CIA) 大鼠外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) DNA 甲基化转移酶表达的影响。

材料与方

1 动物 90 只健康雌性 Wistar 大鼠,体重 (110 ± 10) g, SPF 级,由浙江中医药大学动物实验中心提供,动物合格证号:SYXK (浙)2008-0115。大鼠饲养于清洁级实验室,温度 20 ~ 22 °C,相对湿度 55% ~ 65%,单笼饲养,喂饲基础饲料,自由摄食、饮水。

2 药物 温化蠲痹方组成:防风 15 g 威灵仙

30 g 蜈蚣 2 条 白芥子 12 g 全蝎 6 g 白芷 10 g 僵蚕 10 g 忍冬藤 20 g 丹参 15 g 薏苡仁 30 g,由浙江省中西医结合医院制剂室煎制 (含生药 1 g/mL)。甲氨喋呤 (methotrexate, MTX) 购自上海信谊制药有限公司,批号:130425)。

3 试剂与仪器 牛Ⅱ型胶原 (type II collagen of bovine, BC II) 购自 Chondrex 公司 (批号:2002-1); 不完全弗氏佐剂 (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) 购自 Chondrex 公司 (批号:7002); 冰醋酸 (杭州化学试剂有限公司,批号:20130624); 在无菌条件下,用 0.1 mol/L 冰醋酸在冰浴中充分溶解 BC II,浓度为 4 mg/mL,置于 4 °C 冰箱过夜后,与 IFA 等体积混合、振荡乳化,制成 BC II 乳剂,浓度为 2 mg/mL,置 4 °C 冰箱保存备用。大鼠淋巴细胞分离液 (天津市灏洋生物科技有限责任公司,批号:LTS1083); 全血 RNA 提取试剂盒 (OMEGA,批号:DRR024A); QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN,批号:Y5-204054)。PCR 扩增仪 (美国应用生物系统公司,ABI Prism® 7000 型); 低温高速离心机 (台式 Eppendorf 15810R,编号:0031739); 足趾容积测量仪 (山东医学科学院设备厂)。

4 模型制备与动物分组 将 90 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组 10 只 (简称正常组) 和造模组 (80 只),造模组大鼠参照《药理学实验指南—新药发

现和药理学评价》^[5]及相关文献^[6]方法制备 CIA 大鼠模型,于大鼠尾根部 5 个部位进行皮内注射,总量 0.3 mg,于初次免疫 2 周后同前法进行第 2 次免疫,总量 0.3 mg。造模成功标准:致炎前用足趾容积测量仪测量每只大鼠左后足足趾容积,作为致炎前足趾基础容积。每周进行关节炎指数(arthritis index, AI)评分。于首次注射 C II 乳剂后 18 天,根据 AI 评分进行模型成功评定^[7]。AI 标准分级如下:无红肿计 0 分;趾关节稍肿,足爪或足垫单个区域炎症计 1 分;关节轻度红肿,足爪和足垫或踝关节 2 个区域以上的炎症计 2 分;关节中度红肿,轻度功能障碍计 3 分;关节重度红肿,僵直甚至畸形,严重功能障碍计 4 分。AI 评分 >4 分,单侧左足外踝以下隆起的体积 >1.6 mL 为造模成功。将造模成功后的 50 只大鼠随机分为模型组、MTX 组、温化蠲痹方低、中、高剂量组(简称中药低、中、高剂量组),每组 10 只。用药前模型组、MTX 组、温化蠲痹方低、中、高剂量组大鼠 AI 评分及足趾容积比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5 给药方法 造模成功后开始给药,中药低、中、高剂量组大鼠分别按 22.9、45.8、68.7 g/(kg·d)剂量灌胃温化蠲痹方(低、中、高剂量分别相当于临床用量的 10、20、30 倍)。正常组及模型组灌胃等量生理盐水,均每日 1 次;MTX 组按 0.78 mg/kg 剂量灌胃 MTX 混悬液(相当于临床用量 10 倍),每周 1 次。连续用药 30 天。

6 样本采集

6.1 PBMCs 提取 将大鼠麻醉后,取大鼠心脏血 6~8 mL, -20℃ 保存备用。将新鲜全血以 3 倍体积的 PBS 液稀释后,取 2 倍全血体积的大鼠淋巴细胞分离液置于 50 mL 离心管底部(即 1 mL 全血采用 2 mL 大鼠淋巴细胞分离液),将 PBS 稀释后的大鼠全血混合液体逐滴铺加于分离液上层,保持两者液面边界清晰不混合。室温条件下 400 r/min,离心 35 min,取所得液体依次分别为红色水相、雾状白色层及沉淀管底的细胞层,利用吸管吸取雾状层置于新的离心管中加入适量 PBS 液,3 000 ×g,离心 10 min,即可得到大鼠白细胞沉淀(-80℃ 保存)。

6.2 PBMCs 总 RNA 提取 采用 Omega E.Z. N.A Blood RNA Kit 试剂盒提取大鼠外周血淋巴细胞总 RNA。具体步骤如下(为适应本实验已改良):加 350 μL MRC 液至白细胞团中,涡旋 30 s;将上述混合液体置于 65℃ 水浴锅,温育 10 min;室温条件下以 13 000 ×g,离心 3 min;取 450 μL 上层液相;加入 250 μL 无水乙醇,涡旋 10 s;将上述液体全部加入

RNA 提取专用试管内,室温下 10 000 ×g,离心 30 s,弃滤出液体;加入 700 μL RNA Wash Buffer I,室温下 10 000 ×g,离心 30 s,弃滤出液体并换上新的收集管;加入 500 μL RNA Wash Buffer II,室温下 10 000 ×g,离心 30 s,弃滤出液体;重复上一步骤;将 RNA 提取专用试管置于室温下 25 000 ×g,离心 2 min 甩干;将外收集管换成 1.5 mL EP 管(无 RNA 酶),加入 30~50 μL DEPC 水(试剂盒提供)溶解 RNA,25 000~30 000 ×g 室温下离心 1 min。

6.3 总 RNA 鉴定 选择孔径大小适合的点样梳,垂直架于胶版一端,使点样梳底部离电泳槽水平面距离为 0.5~1 mm。称取 0.25 g 琼脂糖,加入 25 mL 1 × TAE 电泳缓冲液中,微波炉加热使琼脂糖溶解均匀。于 50 mL 的离心管中加入 1.25 mL EB (10 mg/mL)。待凝胶冷却至约 50℃,倒入 50 mL 离心管中。将离心管中的凝胶溶液轻轻倒入电泳凝胶板上,除去气泡。待凝胶凝固后,小心取出点样梳。在电泳槽中加入 1 × TAE 电泳缓冲液,将胶板放入电泳槽中(点样孔一端靠近电泳槽的负极),使电泳缓冲液没过胶面,混合后,移液枪点样,记录样品点样顺序及样量。连接电泳槽与电泳仪之间的电源线,开启电源,电泳,最高电压不超过 5 V/cm。当指示剂跑过胶板的 2/3,可终止电泳;切断电源后,将电泳凝胶块放在凝胶成像仪中观察。

7 观察指标及检测方法

7.1 足趾肿胀度 采用足趾容积测量仪测量各组大鼠左后足足趾容积,观测足趾肿胀度。以无毛区为标记线,即测量标记线以下的足趾容积(mL);分别于造模成功(0 天)及造模后 7、14、21、28 天进行检测。

7.2 大鼠 PBMCs DNMT1、DNMT13a 及 DNMT13b 表达检测 采用 Real-Time PCR 法检测:(1)DNMTs 反转录 cDNA:将 PBMCs 中提取的总 RNA 用 RNase-free 水稀释为 2 ng/μL 浓度。采用赛默飞 RevertAid Hminus First strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒,反应体系为 20 μL,按如下加样(冰浴条件下):总体积 12 μL (Total RNA 10 μL, Random Primer 1 μL, DEPC-Water 1 μL),加好模板 RNA 和引物后于 65℃ 温育 5 min,后置于冰上急冷继续按如下加样(冰浴条件下):总体积 8 μL (5 × 反应缓冲液 4 μL, RiboLock RNase Inhibitor 1 μL, dNTP Mix 2 μL, 反转录酶 1 μL),将加好的样品冰上吹打混匀放入 PCR 仪,设置反应条件 25℃ 5 min 升温;42℃ 60 min 延伸;70℃ 5 min 退火;所得产品

-80 ℃ 保存备用。(2)DNMTs 荧光定量 PCR 反应:按 QIAGEN Fast SYBR Green Kit 试剂盒说明书操作。采用 2 × SYBR Green Buffer 通用混合液,10 μL 反应体系包括: DNMT1: 上游引物: 5'-GATCGAATTCATGCCGCGCGTACCGCCAG-3', 下游引物: 5'-ATGGTGGTTTGCCTGGTGC-3', 142 bp; DNMT3a: 上游引物: 5'-GGGGACGTCCG-CAGCGTCACAC-3', 下游引物: 5'-CAGCCTTG-GACTCGA GAAATCGC-3', 113 bp; DNMT3b: 上游引物: 5'-CCTGCTGAATTACTACGCCCC-3', 下游引物: 5'-GTCTGTGTAGTGCACAGGAAAGCC-3', 101 bp。DNMTs 上下游引物共 1 μL, 模板 cDNA 2 μL, 2 × SYBR Green Buffer 5 μL, RNase-free Water 2 μL。在 ABI 7000 定量 PCR 仪上扩增和检测,设置反应条件:95 ℃, 5 min 升温;95 ℃, 10 s 变性;60 ℃, 30 s 收集荧光;共 50 个循环。选取 GAP-DH 管家基因作为内参照,所有反应体系均为 3 个复孔。按如下加样(冰浴条件下):总体积 10 μL (2 × SYBR Green Buffer 5 μL, DNMTs 引物(上、下)/GAPDH 1 μL, cDNA 2 μL, RNase-free Water 2 μL)。计算各标本平均 Ct 值,各样本的 Ct 值 - 看家基因的 Ct 值得到该样本的 ΔCt 值,然后再减去板间对照 ΔCt 值得到 ΔΔCt 值,最后得到 2^{-ΔΔCt} 值,对实时定量 PCR 结果进行相对定量分析。

8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD-*t* 检验,组内不同时间点数据比较采用重复测量数据的方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠足趾肿胀度比较(表 1) 与正常组比较,模型组大鼠足趾明显肿胀(*P* < 0.01);与模型组比较,给药当日(0 天)及给药 7 天,中药低、中、高剂量组和 MTX 组大鼠足趾肿胀度比较,差异无统计学意义

(*P* > 0.05)。给药 14、21、28 天,中药低、中、高剂量组及 MTX 组大鼠足趾肿胀度明显减轻,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。给药 14、21、28 天,与 MTX 组比较,中药低、中、高剂量组大鼠足趾肿胀程度比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。与本组治疗前比较,给药 14、21、28 天,中药低、中、高剂量组及 MTX 组大鼠足趾肿胀明显减轻(*P* < 0.05)。

2 各组大鼠 PBMCs DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b 表达水平比较(表 2) 与正常组比较,模型组 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达水平降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01);与模型组比较,中药低、中、高剂量组及 MTX 组 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达水平升高(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与 MTX 组比较,中药低、中、高剂量组 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。中药低、中、高剂量组 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 2 各组大鼠 PBMCs DNMTs mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b
正常	10	1.65 ± 1.17	1.56 ± 0.64	1.53 ± 0.38
模型	10	0.22 ± 0.33 *	0.63 ± 0.14 *	0.26 ± 0.04 **
MTX	10	2.68 ± 0.44 ^{△△}	1.82 ± 0.68 [△]	4.37 ± 3.12 [△]
中药低剂量	10	2.40 ± 1.33 [△]	2.78 ± 0.97 ^{△△}	2.09 ± 2.01 [△]
低剂量	10	2.50 ± 1.11 [△]	2.95 ± 2.83 [△]	2.34 ± 1.54 ^{△△}
低剂量	10	2.10 ± 1.03 [△]	1.78 ± 0.14 ^{△△}	3.27 ± 2.99 [△]

注:与正常组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与模型组比较,[△]*P* < 0.05,^{△△}*P* < 0.01

讨 论

RA 属于中医学“痹证”的范畴。笔者通过长期临床观察,认为 RA 的基本病因病机为本虚标实、寒热错杂、痰瘀痹阻。患者素体阳虚、或阳盛、或阴虚阳亢、或失治误治等因素,风寒湿邪侵袭,出现热痹及阴虚内热,或湿热,伴有畏寒肢冷的症状,呈现寒热错杂之征;外邪痹阻肌肤、筋脉、骨节,致水湿不运

表 1 各组大鼠足趾肿胀度比较 (mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	0 天	7 天	14 天	21 天	28 天
正常	10	1.17 ± 0.54	1.21 ± 0.69	1.19 ± 0.73	1.33 ± 0.89	1.28 ± 0.76
模型	10	4.35 ± 0.75 [△]	4.56 ± 0.94 [△]	5.22 ± 1.13 [△]	4.96 ± 0.36 [△]	5.37 ± 0.93 [△]
MTX	10	4.63 ± 0.33	4.11 ± 1.39	3.86 ± 0.99 * [▲]	3.67 ± 0.85 * [▲]	3.48 ± 1.67 * [▲]
中药低剂量	10	4.31 ± 0.62	4.22 ± 0.67	4.01 ± 0.94 * [▲]	3.58 ± 0.95 * [▲]	3.36 ± 0.73 * [▲]
中剂量	10	4.56 ± 1.56	4.32 ± 1.85	4.10 ± 0.74 * [▲]	3.62 ± 0.45 * [▲]	3.41 ± 0.79 * [▲]
高剂量	10	4.28 ± 0.72	4.28 ± 0.62	4.06 ± 0.58 * [▲]	3.57 ± 0.55 * [▲]	3.40 ± 1.25 * [▲]

注:与本组治疗前(0 天)比较,**P* < 0.05;与正常组比较,[△]*P* < 0.01;与模型组比较,[▲]*P* < 0.05

聚而为痰,血行不畅滞而为瘀,痰瘀胶结,病情难愈。据此确立温经清化治法,包括温阳、化热、化湿、化痰及化瘀治法,拟温化蠲痹方,方中防风祛风解表、胜湿止痛,威灵仙温经祛风通络,共为君药;忍冬藤清热除痹,全蝎、蜈蚣剔络搜邪,具有消肿止痛之功,僵蚕祛风化痰,四药合用,清热痹,化痰瘀,为臣药;丹参性寒,活血化瘀,白芥子、白芷化痰消肿,通络止痛,为佐药。薏苡仁既淡渗健脾顾护脾胃,又利湿消肿蠲痹,为方中使药。全方配伍寒温并用,痰瘀并治,具有温通经络、化湿、化热(毒)、化痰、化瘀的功效,使寒散、湿化、热除、痰消、瘀祛而治疗 RA^[8]。

DNA 甲基化是指在 DNMTs 的催化作用下,以 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体站,在 CPG 二核苷酸胞嘧啶嘧啶环的 5 号碳原子上添加甲基形成 5' 甲基胞嘧啶的共价修饰过程。DNA 甲基化是体内一种必要的 DNA 外生性特征,它调节基因表达和基因组完整性,还对染色体稳定和构成起重要作用^[1],DNA 甲基化改变可以影响许多基因表达,包括一些与黏附分子和细胞因子表达相关基因,导致 T 细胞自身反应性发生改变,而与自身免疫性疾病发病关系密切^[2]。

DNA 甲基化由 DNMTs 催化完成,这些酶被位于不同染色体上的不同的基因所编码。DNA 甲基化转移酶有 3 种:DNMT1、DNMT3a/b、DNMT3L。DNMT1 又名甲基化维持酶,它是在细胞有丝分裂时将母链碱基甲基化状态传给子链中发挥作用^[9];DNMT3a/b 是重新甲基化酶(*de novo* methyltransferases),对于双链均未有甲基化的 DNA 进行修饰,使双链均甲基化,在决定胚胎发育分化中起重要作用,但目前 DNMT3L 的功能尚不清楚。

有学者研究发现,RA 患者基因组 DNA 甲基化水平普遍降低^[10]。RA 患者存在基因组 DNA 广泛低甲基化,尤其在滑膜成纤维细胞(rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, RASFs)内的 DNA 或长散布核元件(LINE-1)启动子上富含 GC 的 CpG 岛序列发生低甲基化作用^[3],导致某些基因的异常表达,从而参与 RA 的全身及关节局部炎症。本研究结果表明,中药各剂量组大鼠足趾肿胀度较模型组明显减轻,提示中药温化蠲痹方对 CIA 大鼠具有治疗作用。

另外本研究结果表明,CIA 大鼠 PBMCs DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达水平明显降低,提示在 CIA 大鼠 PBMCs 中,DNA 甲基化水平降低,从而使 T 细胞及其分泌的下游因子表达异常,参与 RA 的发病

过程。另外,用药后中药各剂量组及 MTX 组 CIA 鼠 PBMCs DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达水平均上调,提示温化蠲痹方可能通过上调 CIA 大鼠低表达的 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b,恢复 DNA 甲基化水平,减少下游炎性细胞因子分泌而发挥治疗 CIA 作用。中药各剂量组 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达无差异,提示温化蠲痹方上调 DNMTs 无剂量依赖性。

本研究中温化蠲痹方可上调 CIA 大鼠 PBMCs DNMTs 表达水平,提示中药温化蠲痹方可能通过调节 DNMTs 而影响 DNA 甲基化水平达到治疗 CIA 作用,可能是其治疗 CIA 的作用机制之一。DNA 甲基化受多种因素调控,如微小 RNA 等,其影响 DNA 甲基化的具体机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Doerfler W. On the biological significance of DNA methylation [J]. Biochemistry, 2005, 70 (5): 505-524.
- [2] Sekigawa L, Okada M, Ogasawara H, et al. DNA methylation in systemic lupus erythematosus [J]. Lupus, 2003, 12(2): 79-85.
- [3] Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, et al. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60 (12): 3613-3622.
- [4] 刘喜德,张金禄,叶丽红,等. 温化蠲痹方对类风湿关节炎患者外周血 TNF- α 、IL-1 β 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(9): 789-793.
- [5] 沃格尔 HG,沃格尔 WH 著. 杜冠华,李学军,张永祥,等编译. 药理学实验指南—新药发现和药理学评价 [M]. 北京:科学出版社, 2001, 577-589.
- [6] Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis [J]. J Exp Med, 1997, 19(7): 857-867.
- [7] Carter RA, Campbell IK, O'Donnell K, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint involvement and alters B cell trafficking [J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128(1): 44-51.
- [8] Liu XD, Chen Y, Liu FY, et al. Effect of Wenhua Juanbi Recipe on proliferation and apoptosis of synoviocytes in rats with collagen-inducing arthritis [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(6): 453-458.
- [9] Sawalha AH. Epigenetics and T cell immunity [J]. Autoimmunity, 2008, 41(4): 245-252.
- [10] Xu XY, Wang MM, Xiao CS, et al. The study of DNA methylation in rheumatoid arthritis [J]. Chin Rheumatol, 2006, 10(8): 462-465.

(收稿:2015-05-06 修回:2015-12-28)