

芍药苷抑制佐剂性关节炎大鼠 mTOR 信号通路的实验研究*

缪成贵¹, 熊友谊¹, 秦梅颂¹, 陈浩¹, 常俊²

1. 安徽科技学院食品药品学院(凤阳 233100); 2. 安徽医科大学第四附属医院(合肥 230032)

【摘要】 目的 研究芍药苷(paeoniflorin, PF)对佐剂性关节炎(adjvant arthritis, AA)大鼠关节滑膜成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)内 mTOR 信号的影响。方法 将大鼠分为正常组、AA 组、AA+PF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、AA+PF 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、AA+PF 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 AA+PBS 组,除正常组外,其余各组大鼠均采用完全弗氏佐剂足跖注射法制备 AA 大鼠, AA+PF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、AA+PF 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、AA+PF 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组大鼠造模后向尾静脉注射剂量为 0.1 mL/200g 体重 PF,研究 3 个剂量 PF 对 AA 大鼠关节炎评分的影响。造模后第 28 天股动脉放血处死正常组和 AA 组大鼠,分离各组大鼠关节滑膜组织,培养 FLS,将培养出的 FLS 分为正常组、AA 组、AA+PF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,通过 Real time qPCR 检测 PF 加药对 AA 大鼠 FLS 内 mTOR 表达的影响,Western blot 检测 PF 对 AA 大鼠 FLS 磷酸化 mTOR(p-mTOR)蛋白表达的影响,ELISA 检测 PF 对 AA 大鼠 FLS 细胞因子白细胞介素(IL)-1、IL-6 表达的影响,real time qPCR 检测 PF 加药对 AA 大鼠 FLS 内 MMP3 表达的影响,向 FLS 转染 mTOR 过表达载体 48 h 后再次检测 IL-1、IL-6 和 MMP3 的表达。结果 PF 能够降低 AA 大鼠关节炎评分。PF 加药后 48 h,与 AA 组 FLS 相比,AA 大鼠 FLS 在 PF 为 1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 mTOR 表达均降低。与 AA 组 FLS 相比,AA 大鼠 FLS 在 PF 为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 p-mTOR 蛋白表达量也降低。PF 加药后 48 h,与 AA 组 FLS 相比,AA 大鼠 FLS 在 PF 为 1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 IL-1、IL-6、MMP3 表达均降低。向 AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 FLS 转染 mTOR 过表达载体 48 h,与转染前相比,IL-1、IL-6、MMP3 表达均升高。结论 PF 可以改善 AA 大鼠病理,其机制可能与 AA 大鼠 FLS 内 mTOR 信号的抑制有关。

【关键词】 芍药苷 佐剂性关节炎 成纤维样滑膜细胞 mTOR 信号

Experimental Study on Paeoniflorin Inhibiting mTOR Signaling Pathway in Adjuvant Arthritis Rats MIAO Cheng-gui¹, XIONG You-yi¹, QIN Mei-song¹, CHEN Hao¹, CHANG Jun². 1. Food and Drug College, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China; 2. The Fourth Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Heifei 230032, China

【Abstract】 Objective To study the effect of paeoniflorin (PF) on mTOR signal in synovial fibroblast-like synoviocytes (FLS) in rats with adjuvant arthritis. **Methods** AA model rats were prepared by complete Freund's adjuvant injection in foot-plantar, the PF was injected to rats in AA + PF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, AA + PF 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group and AA + PF 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group by the tail vein injection at the dose of 0.1 mL/200 g body mass, and the effects of three doses of PF on arthritis scores in AA rats were studied. The modeling rats and control rats were sacrificed at 28 d after modeling, then the synovium was separated from rat articular, the FLS were cultured. The effect of PF on the expression of mTOR and MMP3 in AA FLS was detected by the real time qPCR. The effect on the cytokine IL-1, IL-6 was detected by ELISA, and the Western blot was used to investigate the role of PF in the mTOR phosphorylation. Furthermore, FLS were transfected with mTOR vectors, and the effect of mTOR overexpression on the PF roles was detected by real time qPCR and ELISA. **Results** The tail vein injection of PF can significantly reduce the AA rat arthritis score. Compared with AA group, the expression of mTOR in AA+PF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AA+PF 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was significantly decreased at 48 h after dosing. Compared with AA group, the relative expression of p-mTOR protein in PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was also decreased. Compared with AA group at 48 h after dosing, the levels of IL-1, IL-6 and MMP3 in AA+PF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AA+PF 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were significantly decreased, respectively. Compared with PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, the relative expression of IL-1, IL-6 and MMP3 in PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +mTOR vectors was increased. **Conclusion** PF can significantly inhibit the pathology of AA rats, and its mechanism may be related to the inhibition of mTOR signal in FLS of AA rats.

【Key words】 Paeoniflorin Adjuvant arthritis Fibroblast-like synovial cells mTOR signaling

* 国家自然科学基金(No. 81302783)、安徽科技学院稳定人才项目(No. ZRC2014473)、安徽科技学院优秀人才项目(No. XJYXRC201801)和安徽省重点研究和研发计划(No. 1804a0802218)资助

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以持续性的慢性关节滑膜炎为主要特点的系统性、自身免疫性疾病,疾病特征主要是手足小关节的对称性、侵袭性关节炎,并且伴有小关节软骨损伤、关节外器官受累及血清类风湿因子阳性等疾病特征,严重的可导致人手足关节畸形及功能丧失^[1-2]。RA 发病机制目前仍未完全阐明,但有研究表明关节滑膜成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)在发病机制中发挥关键作用^[3]。佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)大鼠病理特点与人 RA 疾病特点非常相似,是常用的 RA 病理研究和药物治疗研究的动物模型^[4]。芍药苷(paeoniflorin, PF)来源于毛茛科植物芍药根、牡丹根,是中药材芍药的主要药效成分,具有抗炎抗溃疡、扩张血管、解热解痉、镇痛镇静等药理作用,研究表明芍药苷对 RA 具有一定的治疗作用^[5]。本实验以 AA 大鼠作为 RA 研究的动物模型,以 mTOR 信号为切入点,深入研究 PF 影响 AA 大鼠病理的分子机制,为 RA 疾病防治提供新思路新方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

PF 购自上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$, 20 mg/支, CAS 号 23180-57-6; 脂质体 Lipofectamine 2000、Opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司; mTOR 过表达载体由上海吉玛制药技术有限公司提供; 逆转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司; real time qPCR 试剂盒购自德国 Qiagen 公司; 新生胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; ELISA 试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 AA 大鼠制备及大鼠关节炎评分

采用完全弗氏佐剂制备 AA 大鼠模型,实验采用的雄性 SD 大鼠购自安徽医科大学实验动物中心(皖医动准 01 号),体质量为 160~180g。实验大鼠随机分为正常组、AA 组、AA+PF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PBS 对照组。正常组大鼠一次性足跖注射 0.1 mL/200 g 体质量生理盐水作为对照,其余各组大鼠采用一次性足跖注射完全弗氏佐剂 0.1 mL/200 g 体质量制备 AA 大鼠。造模后向各治疗组大鼠尾静脉注射各自剂量的 PF 或 PBS 0.1 mL/200 g 体质量,隔天注射 1 次 PF。治疗后第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天时采用大鼠关节炎评分评价

药物治疗效果^[6],评分对象分别为 AA 大鼠的 1 只鼻子、1 只尾巴、2 只耳朵和 4 只足爪,共 8 个评分对象,每个评分对象出现结节或红肿被评为 1 分,每只大鼠最高评分为 8 分。

1.3 FLS 原代培养

造模后第 28 天股动脉放血处死正常组和 AA 组大鼠,分离大鼠关节滑膜组织,采用组织块法培养大鼠关节滑膜中的 FLS。大鼠处死后在无菌条件下分离大鼠后腿膝关节滑膜组织,剪碎组织块并转移至一次性细胞培养瓶中培养至组织块边缘长出成片 FLS。去除组织块,胰酶消化后用移液枪吹散 FLS,1:2 比例扩大培养。培养正常组和 AA 组 FLS,分组为正常组、AA 组、AA+PF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、AA+PF 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,培养 48 h 后检测 mTOR、MMP3 基因和 IL-1、IL-6、p-mTOR 蛋白在各组 FLS 中的表达。

1.4 mTOR 过表达载体构建

将 mTOR 基因编码 CDS 序列构建到 PEX-3 质粒上,以得到 CUL4B 过表达质粒^[7]。引物由上海吉玛制药技术有限公司合成。PCR 反应完成后,利用 Agarose 电泳并切胶回收 mTOR 基因片段。用 SalI 和 BamHI 对 pEX-3 进行酶切,电泳,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收双酶切的 pEX-3 载体条带。利用 ClonExpress[®] Entry One Step Cloning Kit,将扩增好的片段,重组克隆到线性化的 pEX-3 载体中。制备感受态细胞,将连接产物转化感受态细胞。从平板上挑取克隆菌落,小抽质粒并做鉴定挑出阳性克隆,重组质粒测序验证并大量抽提。将 FLS 细胞分为 AA 组、AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +mTOR 过表达质粒组和 AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +PBS 组。在 1.5 mL EP 管中加入 250 μL 无血清 DMEM 培养基,加入 2.5 μg 质粒,混匀;取另一 1.5 mL EP 管,加入 250 μL 无血清 DMEM,加入 5 μL lipofectamin2000,混匀,室温放置 5 min 后将两管混合,室温放置 20 min 后与 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PF 共转染 AA+PF+mTOR 过表达质粒组 FLS,与 PBS 共转染 AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +PBS 组 FLS。37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 继续培养 48 h,分别收样,检测 MMP3 基因及 IL-1、IL-6 蛋白的水平。

1.5 Real time qPCR 检测 FLS mTOR、MMP3 基因表达

采用 real time qPCR 检测 mTOR、MMP3 基因表达^[7]。Trizol 试剂常规方法提取各组 FLS 总

RNA,参照逆转录试剂盒提供的方法逆转录得到各组细胞的 cDNA,参照 Qiagen 公司提供的 real time qPCR 实验方法检测 mTOR、MMP3 基因表达。mTOR sense (5'-3'):CGCTGTCATCCCTTTATC G, anti-sense (5'-3'): ATGCTCAAACACCTCCAC C; MMP3 sense (5'-3'): TGATGAACGATGGAC AGATGA, anti-sense (5'-3'), AGCATTGGCTG AGTGAAAGAG。β-actin sense (5'-3'): CCCATC TATGAGGGTTACGC, anti-sense (5'-3'): TTTA ATGTCACGCACGATTTC。目的基因 mRNA 的相对表达量以公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.6 ELISA 检测 FLS 中 IL-1、IL-6 表达

采用 ELISA 试剂盒检测 IL-1、IL-6 表达^[8]。取各组 FLS,参照试剂盒提供的检测方法,标准品孔中加入标准品 50 μL,样品孔中先加入细胞上清液 10 μL,再加入样品稀释液 40 μL。然后各孔中加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的 IL-1、IL-6 抗体,置 37 °C 培养箱中孵育 60 min。各孔反复洗涤 5 次后加检测底物 A、B 各 50 μL,再置 37 °C 培养箱孵育 15 min。最后各孔加终止液 50 μL,测定 450 nm 处吸光度值,以正常组吸光度值为参照计算各组 IL-1、IL-6 相对表达量。

1.7 Western blot 检测 p-mTOR 蛋白表达

将培养的各 FLS 收集后加入细胞裂解液和 PMSF(100 mmol/L),12 000 r/min 高速离心 5 min 后取上清液 -20 °C 冻存备用。各组蛋白置沸水中煮 5 min 后电泳分离,然后转膜并进行免疫印迹分析。Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP[®] Rabbit mAb 购自 Cell Signaling Technology (CST)公司,工作浓度 1:800。内参鼠单克隆抗体 β-actin 购自 Santa Cruz 公司,工作浓度 1:1 000。与一抗相对应的二抗购自中杉金桥生物工程有限公司。二抗孵育完成后将 PVDF 膜置入凝胶成像系统拍照,以 β-actin 蛋白灰度值为内参,根据目的蛋白灰度值计算目的蛋白相对表达量。

1.8 统计学方法

数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 One-Way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PF 对 RA 的治疗作用

结果(图 1)显示,高剂量 PF(PF 400 μg/mL)在造模给药第 7 天即能抑制 AA 大鼠评分($P <$

0.05),PF 3 个剂量组(100 μg/mL、200 μg/mL、400 μg/mL)从第 14 天开始均能抑制 AA 大鼠关节炎评分($P < 0.05$)。

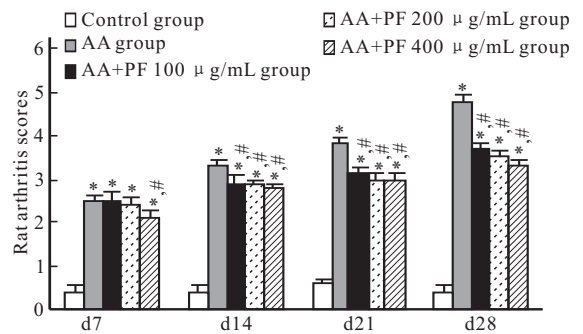


图 1 大鼠关节炎评分法评价 PF 尾静脉注射对 AA 大鼠的治疗效果

Fig 1 Evaluation of the effect of PF tail vein injection on AA rats by rat arthritis scoring method

* $P < 0.05$, vs. control group, # $P < 0.05$, vs. AA group

2.2 PF 对 AA 大鼠 FLS mTOR mRNA 表达的影响

与正常组相比,mTOR 在 AA 组大鼠 FLS 中表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 AA 组 FLS 相比,PF 加药 48 h 后,mTOR 在 AA+PF 各组 FLS 中表达均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 3 个 PF 剂量组之间差异无统计学意义。见图 2。

2.3 PF 对 AA 大鼠 FLS p-mTOR 蛋白表达的影响

与正常组相比,AA 组 p-mTOR 蛋白相对表达量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 AA 组相比,2 μg/mL PF 加入 48 h 后,AA+PF 2 μg/mL 组 p-mTOR 蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 ELISA 检测 PF 对 AA 大鼠 FLS 细胞因子 IL-1、IL-6 表达的影响

培养各组 FLS,与正常组相比,IL-1、IL-6 的表达量均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 AA 组相比,PF 加药 48 h 后,AA+PF 1 μg/mL、AA+PF 2 μg/mL、AA+PF 4 μg/mL 各组中的 IL-1、IL-6 表达量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 PF 对 MMP3 表达的影响

结果(图 5)显示,AA 组的 MMP3 相对表达量高于正常组,PF 3 个剂量组(PF 1 μg/mL、PF 2 μg/mL、PF 4 μg/mL)MMP3 相对表达均低于 AA 组。

2.6 mTOR 过表达对 PF 作用的干扰

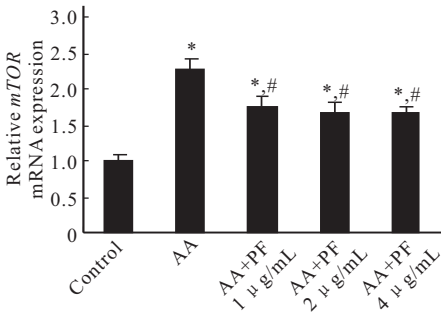


图 2 Real time qPCR 检测各组大鼠 FLS 中 mTOR 表达

Fig 2 The expression of mTOR in rat FLS of each group evaluated by real time qPCR

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. AA group

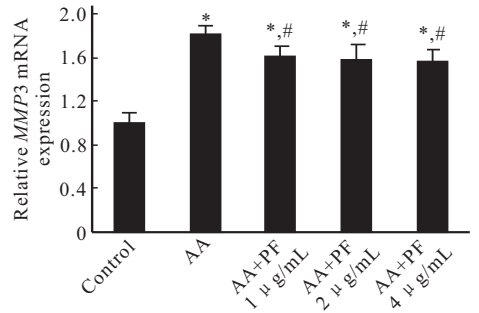


图 5 Real time qPCR 检测 PF 对 MMP3 表达的影响

Fig 5 Effect of PF on the MMP3 expression evaluated with real time qPCR

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. AA group

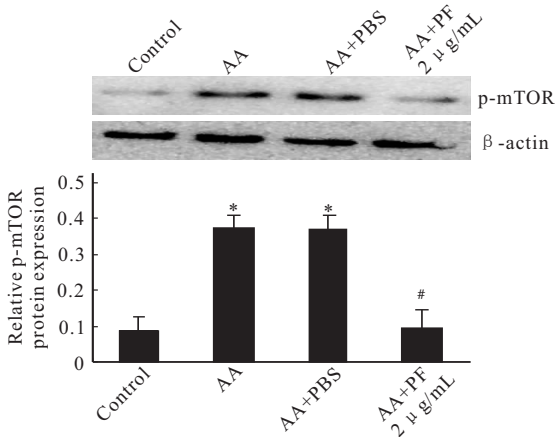


图 3 Western blot 检测各组大鼠 FLS 中 p-mTOR 蛋白表达

Fig 3 The expression of p-mTOR in rat FLS of each group detected with Western blot

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. AA group

检测结果(图 6)显示,与 AA 组相比,AA+PF 2 μg/mL 组 IL-1、IL-6、MMP3 相对表达量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 AA+PF 2 μg/mL 组相比,AA+PF 2 μg/mL+mTOR 过表达组 IL-1、IL-6、MMP3 相对表达量均升高 ($P < 0.05$)。

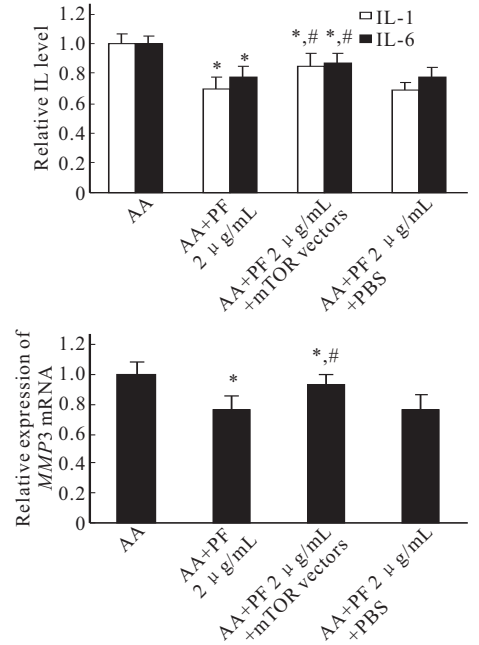


图 6 mTOR 过表达后 IL 和 MMP3 的表达

Fig 6 The effect of mTOR overexpression on ILs and MMP3 expressions

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. AA group

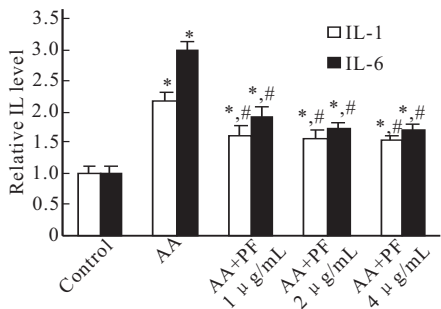


图 4 ELISA 检测各组大鼠 FLS 中 IL-1、IL-6 表达

Fig 4 The expression of IL-1 and IL-6 in rat FLS of each group detect with ELISA

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. AA group

3 讨论

RA 是一种慢性、持续性的自身免疫性疾病,研究表明其发病机制可能与遗传、炎症、环境因素等方面有关,现有的研究较深入的解释了 RA 的病理机制,但是 RA 发病机制仍然未能完全阐明^[9]。研究表明关节滑膜中的 FLS 异常增殖活化是 RA 发病的关键环节,激活的 FLS 分泌 IL-1、IL-6、IL-8 等细胞因子,促进 RA 病理相关基因 MMP3 和 fibronectin 表达,分泌细胞黏附分子、纤维连接蛋白等胞外基质蛋白,诱发了 RA 的发生发展。异常活化的 FLS 还能促进软骨的降解和血管翳的生成,增

加了关节炎程度^[10]。FLS 的异常活化也是骨不可逆损坏的主要原因^[11]。因此国内外 RA 病理及防治研究都聚焦于 FLS 的异常增殖活化机制。鉴于 FLS 在 RA 病理机制中的关键作用,本课题组分离培养出 FLS,以 FLS 为研究对象,探讨 PF 对 RA 病理机制的影响。

众多研究表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在肿瘤、心血管疾病,以及其他生理病理机制中发挥重要的调控作用,是细胞中经典的信号调控通路。特别是对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路起负调控作用的 PTEN 分子,在细胞增殖、凋亡、代谢等机制中发挥重要逆向调控作用,PTEN 是重要的肿瘤治疗靶点^[12]。近年来,研究发现 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与了 RA 病理机制,在 RA 的发生发展中起到重要的促进作用^[13]。鉴于 mTOR 在 RA 病理中的重要作用,课题组以 mTOR 为研究靶点,探讨 PF 对 mTOR 的作用。本实验在培养的各组 FLS 中加入 PF 48 h 后,采用 real time qPCR 检测 mTOR 在正常组、AA 组、AA+PF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PBS 对照组大鼠 FLS 中的表达。结果显示,与正常组相比,mTOR 在 AA 组大鼠 FLS 中表达显著升高,与 AA 组相比,mTOR 在 AA+PF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三个组中表达显著降低。采用 Western blot 检测发现,与正常组相比,AA 组大鼠 FLS 中 p-mTOR 蛋白相对表达量显著升高,与 AA 组相比,AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组中的 p-mTOR 蛋白相对表达量显著降低。提示在 AA 大鼠病理机制中 PF 可能通过抑制 mTOR mRNA 表达和 mTOR 蛋白磷酸化抑制 mTOR 信号,进而抑制 AA 大鼠病理发展。

同时,本课题组参照上海源叶生物科技有限公司试剂盒提供的检测步骤检测 PF 对 IL-1、IL-6 表达的影响。结果显示,与正常组相比,AA 组大鼠 FLS 中 IL-1、IL-6 表达都显著升高。与 AA 组相比,AA+PF 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AA+PF 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 各组中的 IL-1、IL-6 表达都显著降低,提示 PF 能显著抑制 RA 病理中 IL 的表达。同时,PF 能够显著抑制 AA 组大鼠 MMP3 的表达,提示 PF 对 AA 大鼠病理具有一定的抑制作用。为了进一步确认 PF 影响 AA 大鼠病理的靶点是 mTOR,本实验向 AA 大鼠 FLS 转染 mTOR 过表达载体,加药 PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至细胞培养液中共培养 48 h,real time qPCR 检测 mTOR 过表达对 PF 作用的干扰。结果

显示,与 AA 组相比,IL-1、IL-6、MMP3 在 PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组相对表达量都显著降低。与 PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组相比,IL-1、IL-6、MMP3 在 PF 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +过表达组相对表达量都显著升高,说明 PF 通过对 mTOR 的抑制起到抑制 AA 大鼠病理的作用。本实验以 mTOR 信号为研究切入点,研究了 PF 对 RA 动物模型病理影响的分子机制,进一步阐明了 PF 对 RA 的作用机制,为 RA 疾病防治提供了新思路新方法。

参 考 文 献

- [1] GRAMLING A, O' DELL JR. Initial management of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2012, 38(2):311-325.
- [2] SOKKA T, RANNIO T, KHAN NA. Disease activity assessment and patient-reported outcomes in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2012, 38(2):299-310.
- [3] REYNOLDS A, KOENIG AS, BANANIS E, et al. When is switching warranted among biologic therapies in rheumatoid arthritis? *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 2012, 12(3):319-333.
- [4] 陈晓宇, 李俊, 解雪峰, 等. 野菊花总黄酮诱导佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞凋亡. *解剖学报*, 2007, 38(5):569-571.
- [5] 周婷, 赵福涛. 芍药苷治疗类风湿关节炎及其他疾病的研究进展. *医学综述*, 2013, 19(13):2382-2384.
- [6] 缪成贵, 周国梁, 秦梅颂, 等. 禹州漏芦总黄酮对类风湿关节炎大鼠治疗机制研究. *浙江大学学报(医学版)*, 2015, 44(1):43-48.
- [7] MIAO CG, SHI WJ, XIONG YY, et al. miR-375 regulates the canonical Wnt pathway through FZD8 silencing in arthritis synovial fibroblasts. *Immunology Letters*, 2015, 164(1):1-10.
- [8] 缪成贵, 周国梁, 秦梅颂, 等. 白头翁皂苷对佐剂性关节炎大鼠 FZD8 表达的影响. *中国中药杂志*, 2015, 40(20):4063-4067.
- [9] KIM KW, CHO ML, KIM HR, et al. Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(4):1076-1086.
- [10] LI C, ZHAO J, SUN L, et al. RANKL downregulates cell surface CXCR6 expression through JAK2/STAT3 signaling pathway during osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 429(3):156-162.
- [11] MOR A, ABRAMSON SB, PILLINGER MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*, 2005, 115(2):118-128.
- [12] 陆建国, 俞松. mTOR 信号通路与肿瘤研究进展. *现代医药卫生*, 2015, 31(2):199-202.
- [13] 孟明, 梁红格, 方皓, 等. PI3K/Akt/mTOR 通路与自噬在类风湿关节炎滑膜细胞增生中的意义. *医学研究与教育*, 2013, 30(5):69-74.

(2018-01-07 收稿, 2018-04-21 修回)

编辑 汤洁