

从 VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT 信号轴所介导的血管新生调控网络 探索白虎加桂枝汤干预类风湿关节炎热证的作用及其机制

李聪翀^{1,2}, 张彦琼², 李玮婕², 毛霞², 刘毓东^{1,2}, 马兆臣², 林雅^{1*}, 林娜^{2*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 出自《金匮要略》的热痹经方白虎加桂枝汤 (BHGZD) 临床治疗类风湿关节炎 (RA) 的疗效确切。但针对该方的作用机制研究多围绕调节机体炎症反应和免疫功能等方面, 对其抑制滑膜血管新生的药效与机制尚未见报道。本研究采用转录组学数据挖掘、生物网络分析与“动物-细胞”实验验证相整合的研究策略, 探讨 BHGZD 干预 RA 热证滑膜血管过度新生病理环节的潜能和分子机制。动物福利和实验过程均遵循中国中医科学院实验动物伦理委员会的规定。网络分析结果表明, BHGZD 干预 RA 热证的候选网络靶标显著参与多条血管新生调节相关通路。其中, 血管内皮生长因子 A-血管内皮生长因子受体 2 (VEGFA-VEGFR2) 信号通路包含多个 BHGZD 候选网络靶标, 如 VEGF、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、丝-苏氨酸激酶 (AKT) 等。进一步的实验验证结果表明, BHGZD 可有效降低佐剂诱导性关节炎热证大鼠膝关节滑膜中血小板-内皮细胞黏附分子 (CD31) 的表达, 血清中 VEGF 的水平、内皮性一氧化氮合酶 (eNOS) 的活性, 关节组织中磷酸化血管内皮生长因子受体 2 (p-VEGFR2)、p-PI3K 以及 p-AKT 蛋白的表达水平, 升高血清中内皮抑素 (endostatin) 的水平, 并显著减少 HUVEC、MH7A 细胞的迁移和侵袭活性, 及 HUVEC 细胞的管腔形成活性。综上所述, BHGZD 具有缓解 RA 热证滑膜血管过度新生的潜能, 其作用机制可能与干预 VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT 信号通路相关。

关键词: 白虎加桂枝汤; 类风湿关节炎; 热证; 滑膜血管新生; 转录组学; 网络药理学

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-1044-10

Exploring the effect and mechanism of Baihu-Guizhi Decoction on rheumatoid arthritis with hot syndrome from the angiogenesis regulatory network mediated by VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT signaling pathway

LI Cong-chong^{1,2}, ZHANG Yan-qiong², LI Wei-jie², MAO Xia², LIU Yu-dong^{1,2},
MA Zhao-chen², LIN Ya^{1*}, LIN Na^{2*}

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: Baihu-Guizhi Decoction (BHGZD), a prescription from "Synopsis of the Golden Chamber", has a definite clinical effect in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). However, the research on the mechanism of this prescription mainly focuses on the regulation of inflammatory response and immune function, and its efficacy and mechanism of inhibiting synovial angiogenesis have not been reported. In the current study, transcriptomics data mining, biological network analysis and "in vivo-in vitro" experimental verification integrated research strategy

收稿日期: 2021-11-05; 修回日期: 2021-11-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81630107); 中国中医科学院科技创新工程资助项目 (CI2021A01508).

*通讯作者 Tel: 86-10-64014411-2869, E-mail: 80979984@qq.com; linna888@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1585

to explore the potential and molecular mechanism of BHGZD in RA synovial angiogenesis with hot syndrome. Animal welfare and experimental procedures follow the regulations of the Animal Ethics Committee of China Academy of Chinese Medical Sciences. The results of network analysis showed that the candidate network targets of BHGZD intervention in RA with hot syndrome were significantly involved in multiple angiogenesis regulation related pathways. Among them, vascular endothelial growth factor A-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFA-VEGFR2) signaling pathway contains multiple BHGZD candidate network targets, such as VEGF, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), etc. Further experimental results showed that BHGZD could effectively reduce the expression of CD31 in knee synovium, the expression level of VEGF in serum, the activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylated VEGFR2 (p-VEGFR2), p-PI3K and p-AKT in joint tissue of adjuvant-induced arthritis rats with hot syndromes, the migration and invasion activity of HUVEC and MH7A cells, and the lumen formation activity of HUVEC cells and improve the expression level of endostatin in serum. In conclusion, BHGZD has the potential to alleviate excessive synovial angiogenesis in RA with hot syndrome, and its mechanism may be related to the intervention of VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Baihu-Guizhi Decoction; rheumatoid arthritis; hot syndrome; excessive synovial angiogenesis; transcriptomics; network analysis

在类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的病理进程中, 滑膜组织所处的炎性微环境、血小板的过度活化等刺激打破了体内血管生成调节因子的平衡状态, 诱发滑膜血管过度新生, 进而形成的血管翳是引发关节病变、软骨破坏的始动因素之一^[1,2]。现代医学多采用改善病情类抗风湿药、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 靶向干预制剂以及抗肿瘤药物, 抑制 RA 受累滑膜血管的过度新生, 但长期应用上述药物往往会带来显著的不良反^[3]。出自《金匱要略》的热痹经方白虎加桂枝汤 (Baihu-Guizhi Decoction, BHGZD), 具有清热除湿、通络止痛之功效^[4], 临床用于治疗 RA 和痛风性关节炎等疾病, 疗效确切^[5]。然而, 针对该方的作用机制研究多围绕调节机体炎症反应和免疫功能等方面^[6,7], 对其抑制滑膜血管新生的药效与机制尚未见报道。近年来, 系统生物学、网络药理学、转录组学等学科飞速发展, 其整体性、系统性的特点与中医药的整体观念、辨证论治、组方配伍原则相契合^[8,9]。因此, 本研究采用转录组学数据挖掘、生物网络分析与“动物-细胞”实验验证相结合的研究策略探讨 BHGZD 干预 RA 热证滑膜血管过度新生病理环节的潜能和分子机制, 为深入阐明该方治痹的科学内涵提供实验依据, 也为指导临床用药提供参考。

材料与方法

实验用动物 雄性 Lewis 大鼠, 清洁级, 体重 200 ± 20 g, 6~8 周龄, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2016-0006。实验期间自由饮水, 饲固体饲料, 恒温、恒湿, 饲养于中国中医

科学院中医基础理论研究所实验动物中心, 适应性饲养 3 天后用于实验。所有实验动物符合中国中医科学院中医基础理论研究所伦理委员会实验动物福利与伦理的相关规定 (编号: 2019-026)。

实验用细胞 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 购自上海子实生物公司, 取 4~8 代用于实验, 关节炎滑膜成纤维细胞 (a cell line of human fibroblast-like synoviocytes, MH7A) 购自 Riken Cell Bank, 均取 4~8 代用于实验。

实验药物及其制备方法、主要试剂及仪器 白虎加桂枝汤药材购自北京同仁堂药店, 由石膏 (Gypsum Fibrosum, Shigao, 60 g)、知母 (Rhizoma Anemarrhenae, Zhimu, 15 g)、桂枝 (Ramulus Cinnamomi, Guizhi, 10 g)、甘草 (Radix Glycyrrhizae, Gancan, 5 g)、粳米 (Round-shaped Rice, Jingmi, 30 g), 共 5 味药材组成, 药粉的制备方法基于《中华人民共和国药典》(2020 年版) 及本课题组的前期研究^[7]; 甲氨蝶呤片 (通化茂祥制药有限公司, 国药准字 H22022674); 造模剂 M tuberculosis H37 Ra (美国 BD 公司, #231141); 兔单克隆抗体: 血小板-内皮细胞黏附分子 (CD31, 货号 ab182981) (美国 Abcam 公司), 磷酸化丝-苏氨酸激酶 (p-AKT, 货号 4060T)、磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH, 货号 5174T) (美国 CST 公司); 兔多克隆抗体: 磷酸化血管内皮生长因子受体 2 (p-VEGFR2, 货号 AP1095)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (p-PI3K, 货号 AP0854) (武汉爱博泰克生物科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (货号 P0010S, 上海碧云天生物技术有限公司); 大鼠 VEGF ELISA 试剂盒 (货号 ml064294)、大鼠内皮抑素 (endostatin, ES) ELISA 检测试剂盒 (货号 ml003042)、大鼠内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 试

剂盒 (货号 ml003124-C) (上海酶联生物科技有限公司); DMEM 培养基 (批号: SH30022.01B, 美国 Hyclone 公司); ECM 培养基 (批号: 1001, 美国 Sciencell 公司); Transwell 转移小室 (批号: 3422, 美国 Costar 公司); 基质胶 (批号: 354234, 美国 BD 公司); 结晶紫 (批号: DZ0055, LEAGENE 公司); 4% 多聚甲醛 (批号: G1101, 武汉赛维尔生物科技有限公司); 重组人源 VEGF₁₆₅ (批号: 100-20)、重组人源 TNF- α (批号: 300-01A) (美国 PeproTech 公司); 全基因组表达谱芯片 (Agilent Whole Rat Genome Microarray 4 × 44K, 货号: G4131F, 上海伯豪生物技术有限公司); Agilent 表达谱芯片配套试剂盒 (Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color, 货号: 5190-2305, 美国 Agilent Technologies 公司); RNeasy mini kit (货号: 74106, 德国 QIAGEN 公司)。正置显微镜、成像系统 (广州市明美光电技术有限公司); 稳压稳流电泳仪、凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); 水套式 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 烤片机 (KPJ-1A)、轮转式切片机 (QPJ-C)、生物组织包埋机 (BMJ-1B) (天津天利航空机电有限公司)。

AIA 热证大鼠模型的建立、分组及给药方式 选用健康 6~8 周龄雄性 Lewis 大鼠 51 只, 在造模前随机分为正常组 (control, $n = 15$)、AIA-热证模型组 (AIA-H, $n = 15$)、AIA-热证-白虎加桂枝汤给药组 (AIA-H-BHGZD, $n = 15$)、AIA-热证-甲氨蝶呤给药组 (AIA-H-MTX, $n = 6$)。AIA 热证大鼠模型的造模方法同本课题组前期报道^[7], 即每只大鼠单次尾根皮内注射 0.1 mL 完全弗式佐剂 (10 mg·mL⁻¹ 热灭活的结核分枝杆菌酪酸的液体石蜡混悬液) 诱导 AIA 模型, 从初次免疫日起, 大鼠饲养在风速 (6 m·s⁻¹)、温度 (37 °C)、湿度 (90%) 的人工培养箱中, 持续 15 天, 每天 2 h。期间按照本课题组前期研究的最佳给药剂量和方式进行给药^[6,10], 即从初次免疫当天开始给药, BHGZD 给予 21.4 g·kg⁻¹, MTX 给予 0.2 mg·kg⁻¹, 持续 30 天, 同时, 正常组和 AIA 组灌服等体积蒸馏水。AIA 热证大鼠的疾病严重程度评价及 BHGZD 干预该模型的药效学评价均已在本课题组前期研究论文中报道^[7]。

BHGZD 候选靶标谱的收集与整理 基于 TCMIP v2.0 平台^[11] (www.tcmip.cn/), 收集 BHGZD 中知母、桂枝、甘草、石膏和粳米 5 味药材所含成药性等级为中至高级的化学成分, 预测 BHGZD 所含化学成分的候选靶标谱 (筛选条件: 可信度得分 > 0.8)。

AIA-热证相关基因集的收集与整理 利用本课题组前期开展的动物实验样本^[7], 收集正常组、AIA 热证模型组和 BHGZD 给药组大鼠的外周血细胞及滑膜组织, 分别表征全身病理状态和病变靶器官状态。进一

步开展转录组表达谱芯片检测获得热证大鼠滑膜组织和外周血细胞的基因表达谱数据, 以 fold change > 2.0, $P < 0.05$ 为标准, 筛选 AIA 热证模型组与正常组的组间差异基因集, 得到 AIA-热证相关基因集; 筛选 BHGZD 给药组与 AIA 热证模型组的组间差异基因集, 得到 BHGZD 效应基因集。

“BHGZD 效应基因-AIA 热证基因”互作网络的构建与通路富集分析 利用 String 数据库^[12] (<http://string-db.org/>, version: 11.5) 中基因间相互作用信息, 提取 BHGZD 效应基因及 AIA 热证基因之间的互作关联性, 进而构建“BHGZD 效应基因-AIA 热证基因”互作网络, 通过计算节点连接度、介度、紧密度这 3 个网络拓扑特征值, 选取其大于所有节点拓扑特征值中位数两倍的节点作为网络中的核心节点, 并基于 KEGG^[13] (<https://www.kegg.jp/>) 和 Reactome 数据库^[14] (<https://reactome.org/>), 针对上述核心节点基因进行功能富集分析, 进一步推测 BHGZD 干预 AIA 热证的核心通路。

免疫组化法检测大鼠膝关节滑膜组织血管标志物 CD31 的表达 取膝关节石蜡切片, 依次放入二甲苯-100% 乙醇-95% 乙醇-90% 乙醇-80% 乙醇-70% 乙醇中进行梯度脱蜡, PBS 洗, 滴加复合消化液 20 min-37 °C, PBS 洗, 滴加抗原修复液 20 min-37 °C, PBS 洗, 3% 过氧化氢室温 10 min, PBS 洗, 5% BSA 封闭 2 h-37 °C, 滴加 1:1 000 稀释后的 CD31 抗体, 4 °C 孵育过夜, 结合山羊抗兔二抗 1 h-37 °C、DAB 显色、封片, 显微镜观察关节滑膜内 CD31 阳性表达的情况。

ELISA 法检测大鼠血清中 VEGF 和 ES 的表达以及 eNOS 的酶活性 大鼠麻醉后采取腹主动脉取血, 离心取上清, -80 °C 保存。按说明书要求对大鼠血清中 eNOS 的酶活性、VEGF 和 ES 的表达水平进行测定并计算 VEGF/ES 的比值, 比较各组别之间的差异并进行分析。

Western blot 法检测大鼠膝关节中 p-VEGFR2、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达 取大鼠左后肢样本通过研磨制备关节粉末样品, 用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度并定量, 加热法进行蛋白变性; 制备 8% SDS-PAGE 凝胶上样后进行电泳 (90 V-30 min, 120 V-60 min)、转膜 (200 mA-90 min 或 280 mA-90 min)、封闭, 4 °C 过夜孵育 p-VEGFR2 (1:2 000)、p-PI3K (1:2 000)、p-AKT (1:2 000) 及 GAPDH (1:10 000) 一抗, 次日用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h 后洗膜并显影; 利用 Image J 软件分析条带灰度值, 以各组目的蛋白条带与各组内参 GAPDH 条带的灰度

值比值作为该蛋白的相对表达量并进行统计分析。

细胞培养 HUVEC 置于 15% 胎牛血清、青、链霉素各 $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ECM 培养基, MH7A 置于 10% 胎牛血清、青、链霉素各 $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DMEM 培养基, 均置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中, 隔天换液, 细胞贴壁达 80% 左右胰酶消化传代。

Transwell 共培养迁移实验检测 HUVEC 细胞的迁移能力 取对数生长期的 MH7A 细胞, 消化细胞, 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬后, 将 MH7A 细胞以每孔 $600 \mu\text{L}$ 、 5×10^4 个细胞种于 24 孔板中。待 MH7A 种板 24 h 后, 取对数生长期的 HUVEC 细胞, 消化细胞, 将 Transwell 小室放于提前种板 MH7A 的 24 孔板中, 上室加入 $100 \mu\text{L}$ 用无血清 ECM 培养基重悬的 HUVEC 5×10^4 个, 以及 $100 \mu\text{L}$ 终浓度为 7.14、14.28 和 $28.54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BHGZD, 依次定义为低、中、高剂量组 (BHGZD-L、BHGZD-M、BHGZD-H), 正常组和模型组加入等体积培养基, 下室即为提前 24 h 种板的 MH7A 细胞; 待细胞迁移 6 h 后, 将小室置于 4% 多聚甲醛中固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 清洗 3 次, 用润湿的棉签拭去 Transwell 小室上室中未迁移的细胞; 在光学显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件自动分析迁移到小室下表面的细胞数。

Transwell 迁移实验检测 HUVEC 细胞与 MH7A 细胞的迁移能力 取对数生长期的 HUVEC 细胞与 MH7A 细胞并分别消化。Transwell 小室的上室中加入 $100 \mu\text{L}$ 用无血清 ECM 培养基重悬的 HUVEC 3×10^4 个或 $100 \mu\text{L}$ 用无血清 DMEM 培养基重悬的 MH7A 5×10^4 个, 以及 $100 \mu\text{L}$ 低、中、高剂量的 BHGZD, 正常组和模型组加入等体积培养基; 下室分别加入含 15% FBS 的 ECM 培养基和/或终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 VEGF (HUVEC 细胞) 以及含 10% FBS 的 DMEM 培养基和/或终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α (MH7A 细胞); 待细胞迁移 6 h 后, 将小室置于 4% 多聚甲醛中固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 清洗 3 次, 用润湿棉签拭去 Transwell 小室上室中未迁移细胞; 在光学显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件自动分析迁移到小室下表面的细胞数。

Transwell 侵袭实验检测 HUVEC 细胞与 MH7A 细胞的侵袭能力 提前将基质胶置于 4°C 冰箱过夜融化, 用 ECM 基础培养基 1:8 稀释 (HUVEC 细胞) 或 DMEM 基础培养基 1:8 稀释 (MH7A 细胞), 每孔 $40 \mu\text{L}$ 包被 Transwell 小室上室底部, 置于 37°C 培养箱中 3 h 使基质胶聚合成凝胶备用; Transwell 上室中加入 $100 \mu\text{L}$ 用无血清 ECM 培养基重悬的 HUVEC 5×10^4 个或 $100 \mu\text{L}$ 用无血清 DMEM 培养基重悬的 MH7A 5×10^4 个, 以及

$100 \mu\text{L}$ 低、中、高剂量的 BHGZD, 正常组和模型组加入等体积培养基; 下室分别加入含 20% FBS 的 ECM 培养基和/或终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 VEGF (HUVEC 细胞) 以及含 20% FBS 的 DMEM 培养基和/或终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α (MH7A 细胞); 待 HUVEC 细胞侵袭 20 h 后, MH7A 细胞侵袭 24 h 后, 将小室置于 4% 多聚甲醛中固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 清洗 3 次, 用润湿棉签拭去 Transwell 小室上室中未侵袭细胞; 在光学显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件自动分析迁移到小室下表面的细胞数。

管腔形成实验 提前将基质胶置于 4°C 冰箱过夜融化, 在冰上用基质胶每孔 $100 \mu\text{L}$ 包被 48 孔板后 37°C 放置 2 h 使其凝固; 用含 5% FBS 的 ECM 培养基重悬 HUVEC, 按每孔 $100 \mu\text{L}$ 、 2×10^4 个接种至提前用基质胶包被的 48 孔板中, 加入终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 VEGF, 0.5 h 后给药组分别加入 $100 \mu\text{L}$ 低、中、高剂量的 BHGZD, 正常组和模型组加入等体积培养基; 于 37°C 培养箱中孵育 5 h 后在光学显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件自动分析形成管腔的分支点数及分支长度。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件对实验数据进行统计, 组间差异采用单因素方差分析, 实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结果

1 BHGZD 具有缓解 RA 热证滑膜血管过度新生的潜能

AIA 热证大鼠模型的疾病严重程度评价及 BHGZD 干预该模型的药效学评价均已在本项目组前期研究论文中报道^[7]。结果表明, 模型组大鼠的关节红肿、畸形症状明显, 其最终发病率、关节炎临床积分、关节肿胀度和关节表面温度分别约为 100%、43.56、10.95 cm 和 33.65°C , 机械痛阈值、冷痛阈值、热辐射反应时间及体重均显著降低, 表明造模成功, 而 BHGZD 可显著改善关节炎的严重程度, 升高大鼠的体重及疼痛阈值, 且药效与阳性药 MTX 相似。在此基础上, 本研究整合 AIA 热证组与正常组的组间差异基因作为“AIA-热证相关基因集”, 共 485 个基因; 基于 TCMIP v2.0 平台, 整合 BHGZD 反向调控 AIA 热证基因集与 BHGZD 候选靶标谱得到“BHGZD 效应基因集”, 共 635 个基因; 基于 String 数据库, 构建上述“BHGZD 效应基因-AIA 热证基因”互作网络, 共包含 659 个节点和 3 614 条边; 经网络拓扑特征值计算, 筛选出 196 个核心节点作为 BHGZD 干预 AIA 热证的关键网络靶标。基于 KEGG

和 Reactome 数据库, 针对上述核心节点基因进行功能富集分析, 结果发现, 59 个 BHGZD 关键网络靶标显著参与调节血管新生相关通路, 初步表明该方具有干预 RA 热证滑膜血管新生的潜能, 且 VEGF、PI3K 和 AKT 等核心靶标显著参与 VEGFA-VEGFR2 信号通路 (富集显著性: $P = 0.0198$, 图 1)。接下来本研究拟利用 AIA 热证大鼠模型以及 RA 靶细胞, 从该信号轴系统评价 BHGZD 对于 RA 热证滑膜血管新生的干预药效及作用机制 (图 2)。

2 BHGZD 可显著降低 AIA 热证大鼠膝关节滑膜中 CD31 的表达

与正常组相比, AIA-H 组大鼠膝关节滑膜组织中 CD31⁺染色 (棕褐色) 细胞数量明显增多 ($P < 0.01$); 与 AIA-H 组相比, AIA-H-BHGZD 组以及 AIA-H-MTX 组大鼠膝关节滑膜组织中 CD31⁺细胞的阳性表达存在不同程度降低 ($P < 0.01$), 提示 BHGZD 与 MTX 均能显著抑制热证滑膜血管翳的生成 (图 3)。

3 BHGZD 可显著改善 AIA 热证大鼠血清中 VEGF 和 ES 的含量以及 eNOS 酶活性的异常改变

与正常组相比, AIA-H 组大鼠血清中 VEGF 含量、eNOS 酶活性以及 VEGF/ES 的比值显著升高 ($P < 0.01$), 而 ES 的含量显著降低 ($P < 0.01$); 与 AIA-H 组相比, AIA-H-BHGZD 组以及 AIA-H-MTX 组大鼠血清中 VEGF 含量、eNOS 酶活性以及 VEGF/ES 的比值显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 ES 的含量显著升高 ($P < 0.05$), 提示 BHGZD 与 MTX 均能显著改善 AIA 热证大鼠血清中 VEGF 和 ES 含量以及 eNOS 酶活性的异常改变 (图 4)。

4 BHGZD 可显著改善 AIA 热证大鼠关节组织中 p-VEGFR2、p-PI3K 以及 p-AKT 蛋白质的异常升高

与正常组相比, AIA-H 组大鼠关节组织中 p-VEGFR2、p-PI3K 以及 p-AKT 的蛋白质表达量表达显著升高 ($P < 0.01$); 与 AIA-H 组相比, AIA-H-BHGZD 组以及 AIA-H-MTX 组大鼠关节组织中 p-VEGFR2、

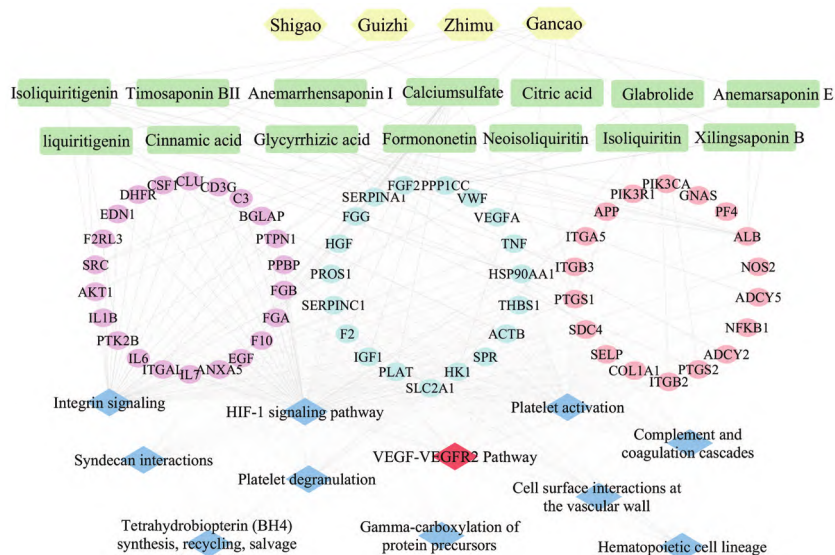


Figure 1 Interaction network of Baihu-Guizhi Decoction (BHGZD) key targets, AIA-hot syndrome (AIA-H) related genes and its involved pathway. The hexagonal nodes refer to the herbs from BHGZD, the rectangle nodes refer to the composition from herbs, the round nodes refer to the key network targets and the square node refers to the pathway

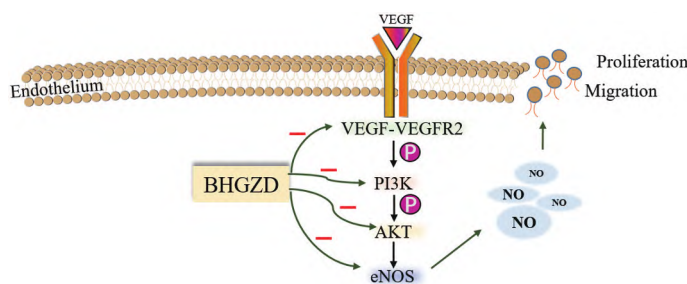


Figure 2 Illustration of regulatory mechanism of BHGZD against synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis (RA) with hot syndrome. VEGF: Vascular endothelial growth factor; eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; VEGFR2: Vascular endothelial growth factor receptor 2; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; AKT: Protein kinase

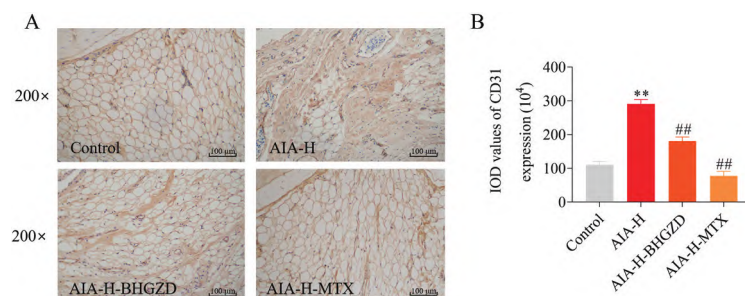


Figure 3 Effects of BHGZD on the expression of CD31 in knee joint synovium of AIA-H rats detected by immunohistochemistry. A: Representative images of immunohistochemical staining from different groups; B: Quantitative analysis of CD31 expression levels in knee joint synovium of AIA-H rats. $n \geq 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs the control group; ## $P < 0.01$ vs the AIA-H group. IOD: Integrated optical density

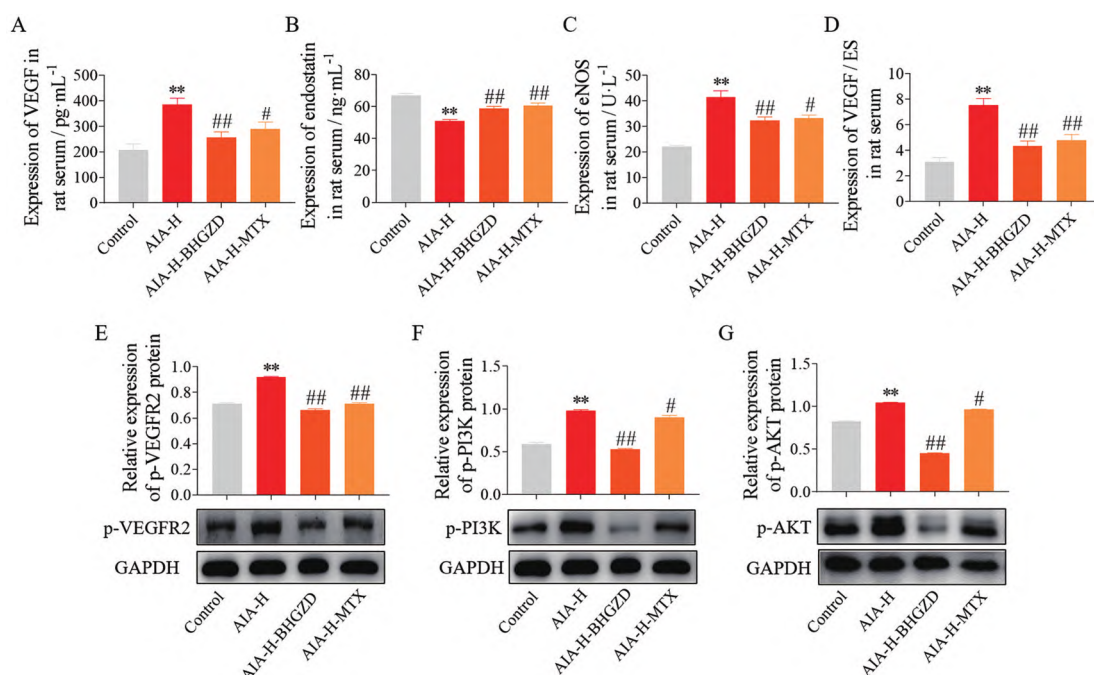


Figure 4 Effects of BHGZD on the expression of VEGF (A), endostatin (ES, B), eNOS (C) and VEGF/ES (D) in serum of AIA-H rats detected by ELISA and the expression of phosphorylated VEGFR2 (p-VEGFR2, E), phosphorylated PI3K (p-PI3K, F) and phosphorylated AKT (p-AKT, G) proteins in joint tissues of AIA-H rats detected by Western blot. $n \geq 5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs the AIA-H group

p-PI3K 以及 p-AKT 的蛋白质表达量均有不同程度的降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示 BHGZD 与 MTX 均能显著抑制 AIA 热证大鼠关节组织中 p-VEGFR2、p-PI3K 以及 p-AKT 蛋白质的异常升高 (图 4)。

5 BHGZD 可抑制共培养条件下 HUVEC 细胞迁移能力

与正常组相比, MH7A 诱导组迁移到下室的 HUVEC 数目明显增多 ($P < 0.01$), 提示在 MH7A 的诱导条件下可显著提高 HUVEC 的迁移能力; 与 MH7A 诱导组相比, BHGZD 低剂量组与正常组比较无统计学差异, 而 BHGZD 中、高剂量组 HUVEC 迁移的数目均不同程度的减少 ($P < 0.01$), 提示 BHGZD 可以抑制

由 MH7A 诱导的 HUVEC 的迁移能力 (图 5)。

6 BHGZD 分别对 VEGF 诱导 HUVEC 细胞以及 TNF- α 诱导 MH7A 细胞的迁移能力产生抑制作用

与正常组相比, VEGF 组 HUVEC 细胞以及 TNF- α 组 MH7A 细胞迁移数目均明显增多 ($P < 0.01$), 提示 VEGF (20 ng·mL⁻¹) 与 TNF- α (20 ng·mL⁻¹) 可分别显著增强 HUVEC 与 MH7A 细胞的迁移能力; 与 VEGF 组相比, BHGZD 低、中、高剂量组 HUVEC 细胞迁移的数目均显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与 TNF- α 组相比, BHGZD 低、中、高剂量组 MH7A 细胞侵袭数目显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示 BHGZD 能分别降低由 VEGF 和 TNF- α 诱导升高的 HUVEC 与 MH7A 细胞迁

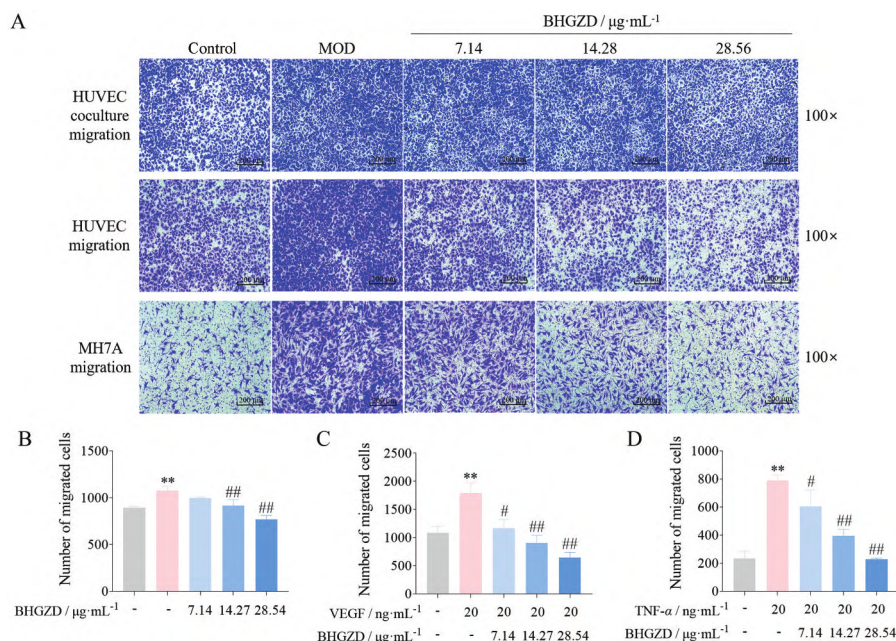


Figure 5 Effect of BHGZD on the migration of HUVEC and MH7A cells. HUVEC and MH7A cells were treated with the different doses of BHGZD and the cell migration was measured by using transwell assay. A: Representative photos of cell migration from different groups (scale bar: 100 $\times$, 200 μm); B: Quantitative analysis of cell coculture migration abilities of HUVEC cells; C: Quantitative analysis of cell migration abilities of HUVEC cells; D: Quantitative analysis of cell migration abilities of MH7A cells. $n \geq 5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs the control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs the different model (MOD) groups

移能力, 且呈剂量依赖性 (图5)。

7 BHGZD 分别对 VEGF 诱导 HUVEC 细胞以及 TNF- α 诱导 MH7A 细胞的侵袭能力产生抑制作用

与正常组相比, VEGF 组 HUVEC 细胞以及 TNF- α 组 MH7A 细胞侵袭数目均明显增多 ($P < 0.01$), 提示 VEGF (20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与 TNF- α (20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可分别显著增强 HUVEC 与 MH7A 细胞侵袭能力; 与 VEGF 组相比, BHGZD 高剂量组 HUVEC 细胞侵袭的数目总体呈下降趋势 ($P < 0.01$), 但 BHGZD 低、中剂量组与模型组比较无统计学差异; 与 TNF- α 组相比, BHGZD 低剂量组与模型组比较无统计学差异, 而 BHGZD 中、高剂量组 MH7A 细胞侵袭数目显著减少 ($P < 0.05$), 以上结果提示, BHGZD 能降低由 VEGF 和 TNF- α 分别诱导升高的 HUVEC 与 MH7A 细胞侵袭能力, 其中均以高剂量组作用效果为佳 (图6)。

8 BHGZD 可抑制由 VEGF 诱导的 HUVEC 管腔形成能力

与正常组相比, VEGF 组 HUVEC 细胞管腔分支点数目及分支长度均显著增加 ($P < 0.01$); 与 VEGF 组相比, BHGZD 低、中、高剂量组 HUVEC 细胞管腔分支点数目均不同程度减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), BHGZD 低剂量组与正常组管腔分支长度比较无统计学差异, 而 BHGZD 中、高剂量组管腔分支长度显著减少

($P < 0.01$), 提示 BHGZD 能降低由 VEGF 诱导升高的 HUVEC 细胞管腔形成能力 (图7)。

讨论

在 RA 的病理进程中, 由于体内血管生成调节因子的平衡状态被打破, 大量炎症因子的浸润诱发滑膜血管过度新生, 维持并促进形成的血管翳是引发关节病变、软骨破坏的始动因素之一^[1,2], 对于 RA 滑膜血管新生的调控研究一直都是中医药研究领域的热点。出自《金匱要略》的 BHGZD 是中医治疗热痹的经方, 全方由石膏、知母、桂枝、甘草、粳米 5 味药组成, 具有清热除湿、通络止痛之功效。临床多用 BHGZD 治疗 RA、痛风性关节炎、皮肤病等^[5], 疗效显著, 但对其机制的研究多围绕调节机体炎症反应和免疫功能等方面, 如通过抑制 Toll 样受体 4 介导的 NOD 样受体蛋白 3 炎性小体激活从而起到干预 RA 的作用^[7], 尚未见其抗 RA 血管过度新生的相关研究报道。因此, 本研究整合转录组表达谱数据挖掘和生物网络计算, 初步发现 BHGZD 具有抑制 RA 热证滑膜血管过度新生的潜能及其候选作用靶标, 并通过基于 AIA 热证大鼠模型与 RA 靶细胞的体内、体外实验, 从 VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT 信号轴所介导的血管新生调控轴探索 BHGZD 干预 RA 热证的作用机制。

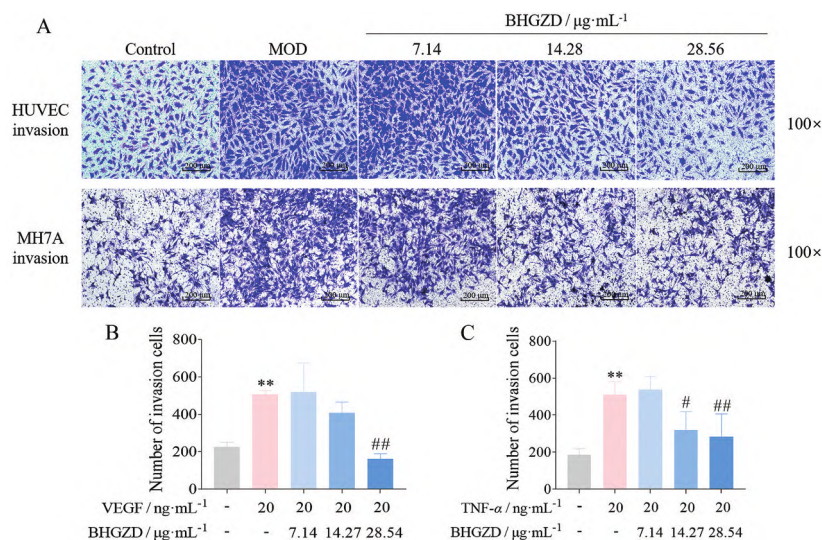


Figure 6 Effect of BHGZD on the invasion of HUVEC and MH7A cells. HUVEC and MH7A cells were treated with the different doses of BHGZD and the cell invasion was measured by using Transwell assay. A: Representative photos of cell invasion from different groups (scale bar: 100×, 200 μm); B, C: Quantitative analysis of cell invasive abilities of HUVEC (B) and MH7A (C) cells in different groups. $n \geq 5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs the different MOD groups

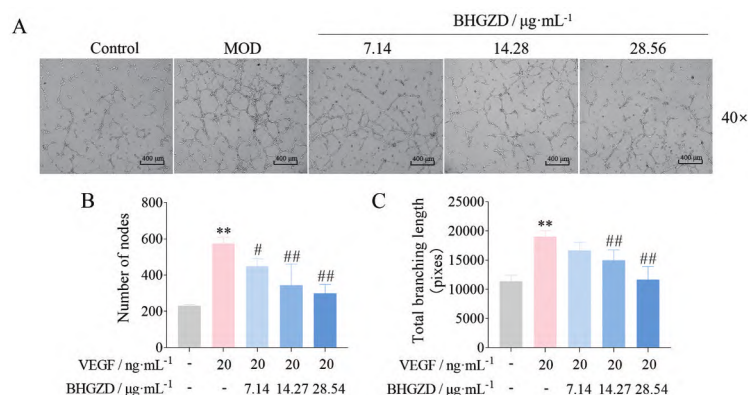


Figure 7 Effect of BHGZD on tube formation of HUVEC cells induced by VEGF. A: Tube formation in Matrigel (40×, scale bar: 400 μm); B, C: Quantitative analysis of tube formation of HUVEC cells in different groups. $n \geq 5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs the MOD group

BHGZD 作为中医治疗热痹的经典方剂, 在运用系统生物学、网络药理学等现代科学手段阐释其作用原理时, 不仅要关注方剂本身所治疗的疾病, 同时还要注重方证对应的关系。因此, 建立符合临床病证特征的动物模型已经成为“病-证-方”关联研究的重要环节。本研究在中医理论指导下, 复制了项目组前期已成功建立的 AIA 热证大鼠模型^[7,10], 即在复制 AIA 大鼠模型的同时, 模拟 RA 热证患者致病因素, 施加风湿热 (风速 6 m·s⁻¹, 相对湿度均为 90%, 温度为 37 °C, 连续 15 天条件刺激)。与单纯 AIA 模型相比, 该模型大鼠发病率更高, 为 100%, 其疾病严重程度较单纯 AIA 模型往往更为显著, 并符合临床热痹患者的实际发病情况, 也更能准确反映 BHGZD 的治疗效果^[7,10]。

CD31 作为免疫球蛋白超家族成员之一, 存在于血小板、多数白细胞以及内皮细胞间的紧密连接处, 参与白细胞迁移、血管生成以及整合素激活等生物过程^[15,16]。CD31 作为血管内皮细胞标志物, 其表达水平能够反映出滑膜组织中的微血管密度, 可作为滑膜内血管新生活程度的评价指标之一。在本研究中, AIA 热证组大鼠膝关节滑膜组织中 CD31⁺染色 (棕褐色) 细胞数量较正常组明显增多, 而 BHGZD 干预后能显著降低 CD31⁺细胞的阳性表达, 从而抑制滑膜血管翳的生成。血管生成促进因子和血管生成抑制因子共同维持体内血管新生的平衡状态, 其中 VEGF 与 ES 分别作为目前作用最强的血管生成和抑制因子之一, 二者在体内的动态平衡影响着 RA 的病理进程^[17,18]。本研

究结果表明, BHGZD 干预能显著降低 AIA 热证大鼠血清中 VEGF 的水平, 升高 ES 的水平, 从而显著调节二者的比值, 缓解 AIA 热证大鼠滑膜血管的过度新生。VEGF 作为血管新生的关键介质, 通过 VEGF 受体的 IV 类酪氨酸激酶受体家族进行信号传导, 而 VEGFR1 和 VEGFR2 均可与 VEGF 结合, 但 VEGFR2 比 VEGFR1 具有更强的促血管生成活性和更高的酪氨酸激酶活性, 因此 VEGF 主要还是与 VEGFR2 受体结合, 通过 VEGFR2 的磷酸化作用激活下游信号分子, 引起内皮细胞增殖和迁移, 增加血管通透性, 调节机体的血管新生等生物过程^[19,20]。本研究结果发现, BHGZD 不仅能够显著改善 AIA 热证大鼠血清中 VEGF 的表达, 还可进一步抑制 AIA 热证大鼠关节中 VEGFR2 蛋白的磷酸化。PI3K/AKT 信号通路作为 VEGF-VEGFR2 下游信号传导的重要组成部分, 与 RA 的滑膜血管新生密切相关^[21,22]。PI3K 在 VEGFR2 激活后可随之激活, 它的活化促使 AKT 发生磷酸化, 活化后的 AKT 可进一步激活多种蛋白, 参与机体血管新生的调节^[23]。本研究结果表明, AIA 热证大鼠关节组织中 p-VEGFR2 蛋白质表达量显著升高, 同时伴随着 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白质的表达量水平升高, 而在 BHGZD 的干预下, 以上升高的磷酸化蛋白表达水平均有不同程度的降低, 表明 BHGZD 可通过干预 VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT 信号通路对 RA 热证的滑膜血管新生产生抑制作用。eNOS 作为 AKT 下游的重要底物之一, 可被磷酸化的 AKT 直接激活, 释放产生的一氧化氮可促进内皮细胞的迁移、归巢等, 促进血管新生^[24,25], 而在本实验中, AIA 热证大鼠血清中升高的 eNOS 酶活性可在 BHGZD 的干预下显著降低。

MH7A 细胞作为人源 RA 病程中的效应细胞之一, 在 TNF- α 等炎症因子的诱导下过度活化引起的迁移、侵袭是 RA 滑膜血管新生的基础, 而血管新生的过程又依赖于血管内层 HUVEC 细胞的增殖、迁移、侵袭以及管腔形成能力。因此, 阐明 BHGZD 在体外对 MH7A 和 HUVEC 细胞功能的影响, 能为深入探究 BHGZD 干预 RA 滑膜血管新生提供更多强有力的证据。本研究结果表明, BHGZD 不仅可剂量依赖性地降低由 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞迁移、侵袭能力, 以及由 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞迁移、侵袭能力, 对 MH7A 诱导 HUVEC 迁移的共培养体系也产生了一定的抑制效果, 同时还可显著抑制由 VEGF 诱导的 HUVEC 管腔形成能力, 提示 BHGZD 可能通过干预以上过程缓解 RA 滑膜血管的过度新生。

综上所述, BHGZD 具有缓解 RA 热证滑膜血管过度新生的潜能, 其作用机制可能与干预 VEGF/VEGFR2/

PI3K/AKT 信号通路相关。本研究结果为深入阐释 BHGZD 治疗热痹的科学内涵以及指导临床用药提供实验依据。

作者贡献: 李聪翀负责实验验证、数据统计和文章撰写; 李玮婕、毛霞、刘毓东和马兆臣参与部分实验验证与数据采集; 张彦琼、林雅和林娜负责总体研究方案设计、论文审阅指导以及研究经费支持。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Chinese Rheumatology Association. 2018 Chinese guideline for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 2018, 57: 242-251.
- [2] Wang Y, Wu H, Deng R, et al. Research progress of synovial microenvironment in rheumatoid arthritis [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2020, 36: 754-759.
- [3] Maruotti N, Cantatore FP, Ribatti D. Putative effects of potentially anti-angiogenic drugs in rheumatic diseases [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70: 135-140.
- [4] Lang JR, Zeng J, Chen SL, et al. Research progress of classical Chinese medicine prescriptions in treating gout [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2021. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.20211206.012.
- [5] Wang C, Liu P, Qiu XP. Research on modern clinical application and experimental research of Baihu Guizhi decoction [J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2021, 13: 122-125.
- [6] Li W, Mao X, Wu H, et al. Deciphering the chemical profile and pharmacological mechanisms of Baihu-Guizhi decoction using ultra-fast liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry coupled with network pharmacology-based investigation [J]. *Phytomedicine*, 2020, 67: 153156.
- [7] Li W, Mao X, Wang X, et al. Disease-modifying anti-rheumatic drug prescription Baihu-Guizhi Decoction attenuates rheumatoid arthritis via suppressing TLR4-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 743086.
- [8] Li WJ, Lu JQ, Mao X, et al. A comparative study on the mechanisms of two classical herbal formulae for rheumatoid arthritis applying cold and heat patterns based on target network [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 1387-1397.
- [9] Zhang YQ, Li S. Progress in network pharmacology for modern research of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2015, 29: 883-892.
- [10] Mao X. An Investigation into the Network Modulation Mechanism of Wutou Decoction Acting on Rheumatoid Arthritis with Cold Pattern (乌头汤治疗类风湿性关节炎寒证的网络调节机制研究) [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2017.
- [11] Xu HY, Zhang YQ, Wang P, et al. A comprehensive review of

- integrative pharmacology-based investigation: a paradigm shift in traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 1379-1399.
- [12] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D607-D613.
- [13] Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, et al. KEGG: integrating viruses and cellular organisms [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: D545-D551.
- [14] Jassal B, Matthews L, Viteri G, et al. The reactome pathway knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: D498-D503.
- [15] Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) [J]. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23: 253-259.
- [16] Qian K, Zeng LY, Zheng XX, et al. Inhibitory effect of Duanteng Yimu Decoction on Pannus formation in mice with collagen-induced arthritis based on VEGF pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 63-71.
- [17] Ahluwalia A, Jones MK, Deng X, et al. An imbalance between VEGF and endostatin underlies impaired angiogenesis in gastric mucosa of aging rats [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305: G325-G332.
- [18] Matsumoto G, Hirohata R, Hayashi K, et al. Control of angiogenesis by VEGF and endostatin-encapsulated protein microcrystals and inhibition of tumor angiogenesis [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 1326-1333.
- [19] Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: binding and signalling at VEGFR2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1264.
- [20] Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59: 455-467.
- [21] Liu Q, Li YP, Dong P, et al. Correlation between PI3K/AKT signaling pathway and rheumatoid arthritis [J]. *Rheum Arthritis (风湿病与关节炎)*, 2021, 10: 62-66.
- [22] Zhang XJ, Liu J, Wan L, et al. Relations of synovial angiogenesis and PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in rats with adjuvant arthritis [J]. *China J Orthop Traumatol (中国骨伤)*, 2015, 28: 71-74.
- [23] Song F, Hu B, Cheng JW, et al. Anlotinib suppresses tumor progression *via* blocking the VEGFR2/PI3K/AKT cascade in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 573.
- [24] Li B, Zhang Y, Yin R, et al. Activating CD137 signaling promotes sprouting angiogenesis *via* increased VEGFA secretion and the VEGFR2/AKT/eNOS pathway [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 1649453.
- [25] Liao WX, Feng L, Zheng J, et al. Deciphering mechanisms controlling placental artery endothelial cell migration stimulated by vascular endothelial growth factor [J]. *Endocrinology*, 2010, 151: 3432-3444.