



程氏蠲痹汤通过阻断WTAP-Wnt7b-Wnt/ β -catenin信号轴抑制类风湿性关节炎病理*

吴雅婕^{1,2}, 徐文博³, 袁美玲^{1,2}, 周欣悦^{1,2}, 蔡意康^{1,2}, 曹会波⁴, 段强军⁵,
陶童祥⁶, 缪成贵^{1,2,5,7 Δ}

1. 安徽中医药大学新安医学与中医药现代化研究所(合肥 230012); 2. 安徽中医药大学中西医结合学院 药理学教研室(合肥 230012);
3. 安徽中医药大学附属马鞍山中医院(马鞍山 243000); 4. 安徽中医药大学滁州中西医结合医院 内分泌科(滁州 239099);
5. 安徽中医药大学中西医结合学院 实验(实训)教学中心(合肥 230012); 6. 安徽中医药大学中西医结合学院
病原生物与免疫教研室(合肥 230012); 7. 香港大学李嘉诚医学院 中医药学院(香港 999077)

【摘要】 目的 采用胶原诱导的关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)小鼠和类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者的成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLSs)研究程氏蠲痹汤(CSJBD)的抗RA作用,并探讨其作用机制。**方法** 体内实验:实验动物为体质量17~20 g的雄性C57BL/6小鼠,构建CIA模型。将小鼠分为正常组、模型组(CIA)、模型+CSJBD-L组(8.1 g/kg)、模型+CSJBD-M组(16.2 g/kg)、模型+CSJBD-H组(32.4 g/kg)和模型+来氟米特(LEF)组(0.05 mg/10 g),每组10只。CSJBD每天灌胃两次,LEF每天灌胃一次,持续28 d。体外实验:将RA FLSs分为RA FLSs组、RA FLSs+CSJBDS-L组(10%含药血清)、RA FLSs+CSJBDS-M组(15%含药血清)、RA FLSs+CSJBDS-H组(20%含药血清)和RA FLSs+NC组(阴性对照)。在观察肾母细胞瘤1相关蛋白(Wilms tumor 1 associated protein, WTAP)是否调控Wnt7b研究中,将RA FLSs分为RA FLSs组、RA FLSs+si-WTAP#3组、RA FLSs+si-WTAP#3+Wnt7b-OE组和RA FLSs+si-WTAP#3+Wnt7b-NC组。在研究CSJBD影响RA FLSs机制中,将RA FLSs分为RA FLSs组、RA FLSs+CSJBDS-M组、RA FLSs+CSJBDS-M+Wnt7b-OE组和RA FLSs+CSJBDS-M+NC组。采用超高效液相色谱法(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)测定CSJBD部分单体化合物作为CSJBD制备的质量标准,采用生物信息学、CCK-8、RT-qPCR、Western blot、免疫荧光等方法研究CSJBD治疗RA的疗效和机制。**结果** UPLC检测显示,阿魏酸、蛇床子素、桑皮苷A、羌活醇和龙胆苦苷是制备CSJBD的质量控制标准品。CSJBD改善了CIA小鼠的RA病理,降低了血清中白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、IL-8和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的水平,降低了RA病理基因MMP3和Fibronectin的表达。生物信息学预测CSJBD可能通过Wnt7b抑制Wnt/ β -catenin信号通路来抑制RA病理。实验结果表明,WTAP和Wnt7b的表达在RA中显著增加。敲低WTAP后,Wnt7b的表达显著降低,Wnt/ β -catenin信号通路也受到抑制,组间差异有统计学意义($P<0.05$),证实WTAP通过调控Wnt7b发挥作用。通过实验验证,CSJBD显著抑制Wnt/ β -catenin信号通路和RA FLSs增殖,Wnt7b-OE可逆转CSJBD对Wnt/ β -catenin信号通路和RA FLSs增殖的抑制作用,证实Wnt7b是CSJBD的直接靶标。**结论** CSJBD通过阻断WTAP-Wnt7b-Wnt/ β -catenin信号轴抑制RA病理,Wnt7b是CSJBD的直接靶点。

【关键词】 类风湿性关节炎 程氏蠲痹汤 WTAP Wnt7b Wnt/ β -catenin 信号通路

Cheng's Juanbi Decoction Inhibits Rheumatoid Arthritis Pathology by Blocking the WTAP-Wnt7b-Wnt/ β -Catenin Signaling Axis

WU Yajie^{1,2}, XU Wenbo³, YUAN Meiling^{1,2}, ZHOU Xinyue^{1,2}, CAI Yikang^{1,2}, CAO Huibo⁴, DUAN Qiangjun⁵, TAO Tongxiang⁶, MIAO Chenggui^{1,2,5,7 Δ} . 1. Center for Xin'an Medicine and Modernization of Traditional Chinese Medicine of IHM, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Department of Pharmacology, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 3. Affiliated Ma'anshan Traditional Chinese Medicine Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Ma'anshan 243000, China; 4. Department of Endocrinology, Chuzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Chuzhou 239099, China; 5. Department of Experimental Teaching Center, School of

* 国家自然科学基金(No. 82274310), 2022年安徽省重点研究与开发计划项目(No. 2022e07020028), 安徽省高校科研项目计划(自然科学类)(No. 2024AH051026, No. 2024AH040139), 安徽省质量工程项目(No. 2023jyxm0345), 安徽省研究生教育质量工程项目(No. 2024cxcysj131), 安徽中医药大学科研项目(No. 2022BHTNXA05)和合肥市大健康研究院新安医学与中医药现代化研究所专项(No. 2023CXMMTCM025)资助

Δ 通信作者, E-mail: miaocg@ahtcm.edu.cn

出版日期: 2025-09-20

Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 6. Department of Pathogenic Biology and Immunology, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 7. School of Chinese Medicine, LKS Faculty of Medicine, the University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

△ Corresponding author, E-mail: miaocg@ahtcm.edu.cn

[Abstract] Objective Cheng's Juanbi Decoction (CSJBD) is a classic traditional Chinese medicine formula for treating rheumatoid arthritis (RA), exhibiting significant clinical efficacy, but the underlying mechanisms remain unclear. We investigated whether CSJBD inhibited RA pathology by blocking the WTAP-Wnt7b-Wnt/ β -catenin signaling axis using a collagen-induced arthritis (CIA) mouse model and fibroblast-like synoviocytes (FLSs) derived from RA patients (RA FLSs) and examined the underlying mechanisms. **Methods** We conducted *in vivo* experiments. Male C57BL/6 mice weighing 17 to 20 g were used to establish the CIA model. The mice were assigned to 6 groups, including the normal group, the model (CIA) group, the model + CSJBD-L (8.1 g/kg) group, the model + CSJBD-M (16.2 g/kg) group, the model + CSJBD-H (32.4 g/kg) group, and the model + leflunomide (LEF) (0.05 mg/10 g) group, with 10 mice in each group. CSJBD was administered twice daily via gastric gavage, while LEF was administered once daily via gastric gavage, for a duration of 28 days. We also conducted *in vitro* experiments. RA FLSs were assigned to 4 groups, including the RA FLSs + CSJBDs-L group receiving 10% CSJBDs-containing serum, the RA FLSs + CSJBDs-M group receiving 15% CSJBDs-containing serum, the RA FLSs + CSJBDs-H group receiving 20% CSJBDs-containing serum, and the RA FLSs + NC group (negative control). To study whether WTAP regulated Wnt7b, RA FLSs were divided into the RA FLSs group, the RA FLSs + si-WTAP#3 group, the RA FLSs + si-WTAP#3 + Wnt7b-OE group, and the RA FLSs + si-WTAP#3 + Wnt7b-NC group. To study the underlying mechanism by which CSJBD affected RA FLSs, RA FLSs were divided into the RA FLSs group, the RA FLSs + CSJBDs-M group, the RA FLSs+CSJBDs-M + Wnt7b-OE group, and the RA FLSs+CSJBDs-M + NC group. We used ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) to identify and quantify key monomer compounds from CSJBD as quality criteria for CSJBD preparation. Bioinformatics, CCK-8, RT-qPCR, Western blot, immunofluorescence, and related methods were employed to assess the therapeutic efficacy and underlying mechanisms of CSJBD in treating RA. **Results** According to the UPLC analysis, ferulic acid, osthole, mulberroside A, notopterol, and gentiopicroside were identified as quality control standards for the preparation of CSJBD formula. CSJBD improved RA pathology in CIA mice, reduced the levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-8, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in their serum, and decreased the expression of RA pathological genes *MMP3* and fibronectin, with the difference between groups being statistically significant. Bioinformatics analysis suggested that CSJBD might inhibit RA pathology by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway through Wnt7b. Experimental results showed that the expression of WTAP and Wnt7b was significantly increased in RA. After knocking down WTAP, the expression of Wnt7b was significantly reduced, and the Wnt/ β -catenin signaling pathway was also inhibited, with the difference between groups being statistically significant ($P < 0.05$), confirming that WTAP regulated the pathway via Wnt7b. According to experimental verification, CSJBD significantly inhibited the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the proliferation of RA FLSs. Wnt7b overexpression reversed the inhibitory effect of CSJBD on the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the proliferation of RA FLSs, indicating that Wnt7b is the direct target of CSJBD. **Conclusion** CSJBD inhibits RA pathology by blocking the WTAP-Wnt7b-Wnt/ β -catenin signaling axis, with Wnt7b identified as a direct therapeutic target of CSJBD.

[Key words] Rheumatoid arthritis Cheng's Juanbi Decoction WTAP Wnt7b Wnt/ β -catenin signaling pathway

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节病变为主的慢性、系统性自身免疫疾病^[1]。其主要病理特征为持续的关节滑膜炎、滑膜增生、软骨侵蚀和不可逆的关节损坏,严重可导致残疾^[2]。RA病理机制较为复杂,成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLSs)是RA发病机制中的主要效应细胞,其异常增殖是持续性滑膜炎和关节表面软骨损伤的主要原因^[3]。暴露于骨髓和T细胞衍生的细胞因子、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 或缺乏这些细

胞因子都会驱动RA中FLSs表型的变化,进而影响RA病理^[4-5]。

经典名方程氏蠲痹汤(CSJBD)主要用于治疗RA等疾病。其主要成分包括羌活、独活、肉桂(桂心)、秦艽、海风藤、桑枝、当归、川芎、乳香、木香、甘草(炙)等,其作用是祛风除湿、散寒通络,用于治疗风寒湿邪引起的痹症,如四肢沉重、关节酸痛、活动不利等^[6]。CSJBD包含的多种抗炎成分,包括阿魏酸、蛇床子素、桑皮昔A、羌活醇和龙胆苦苷,可作为CSJBD制剂的质量标志物^[7-8]。

Wnt信号通路是影响生理和病理的重要调节机制,

对发育生物学、肿瘤学和炎症性疾病具有重要意义^[9-12]。Wnt7b是Wnt蛋白家族的一员,在RA患者的滑膜组织中,Wnt7b的表达显著升高,尤其是在发炎区域、FLSs和滑膜血管壁中显著表达^[13]。Wnt/ β -catenin通路的激活导致基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的上调,尤其是MMP3,与疾病活动度、关节损伤和骨侵蚀机制相关^[14]。

肾母细胞瘤1相关蛋白(Wilms tumor 1 associated protein, WTAP)是一种m6A甲基转移酶,在RA患者的滑膜组织和FLSs中WTAP mRNA水平显著升高^[15]。本文研究了WTAP通过Wnt7b影响RA病理的机制,以及CSJBD的干预效果,并探讨WTAP能否成为RA诊断和治疗的新靶点。本研究结果有助于阐明RA的发病机制,为CSJBD临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药物

CSJBD配方由滁州市中西医结合医院(中国滁州)提供,包括以下中草药:羌活15 g、独活15 g、桂枝12 g、秦艽15 g、当归12 g、川芎12 g、炙甘草5 g、海风藤15 g、桑枝12 g、乳香6 g和木香6 g(15:15:12:15:12:12:5:15:12:6:6)。制备CSJBD煎剂,加入10倍质量的蒸馏水,浸泡2 h。煮两次,每次煮1 h,然后将两次药液混合。将合并后的药液移到旋转蒸发器中,并通过加热将其浓缩至200 mL。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂

胎牛血清(10270106)购自Gibco; TRIzol 试剂(99940401)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;完全弗氏佐剂(CFA, 7009)购自chondrex; MMP3 (AB52915, 1:250)、Fibronectin(AB268020, 1:200)等抗体购自Abcam; Wnt7b(BS-6244R, 1:300)购自北京博奥森生物技术有限公司;山羊抗兔IgG/Alexa Fluor[®]/594(ZF-0516)等二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL化学发光试剂盒(BL520B)、PCR试剂盒(BL697A)、反转录试剂盒(BL696A)和CCK8试剂盒(BS350A)均购自白鲨生物科技有限公司;WTAP敲低质粒(H591016-0002、H594055-0005、H592002-0000)和Wnt7b过表达质粒(E607403)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2.2 仪器

倒置荧光显微镜(AE2000)购自麦克奥迪实业集团有限公司;离心机(5428AK410885)购自德国艾本德股份公司;逆转录仪(6331DR308821)购自德国艾本德股份公司;罗氏lightCycler 96荧光定量PCR仪(17557)购自上海实维

实验仪器技术有限公司);Leica DMI8 S倒置荧光显微镜(514106)购自罗氏德国徕卡公司;Olympus显微镜(CX41)购自奥林巴斯株式会社;318C+酶标仪(286032040)购自上海欧沛分析仪器有限公司。

1.3 生物信息学分析

1.3.1 生物信息学预测

使用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)筛选CSJBD中的化合物,阈值分别为口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和药物相似性(DL) ≥ 0.18 。通过PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索筛选的化合物Canonical SMILES,并将其导入Swiss target prediction(<http://swisstargetprediction.ch/index.php>)以预测靶点。选择Probability > 0 的靶点作为CSJBD化合物的潜在靶标^[16]。

通过Gene Cards(<https://www.genecards.org>) (Relevance score > 2)、OMIM(<https://www.omim.org/>)数据库,以“Rheumatoid arthritis”为关键词查询RA靶点。将CSJBD化合物靶点与RA的靶点取交集,绘制韦恩图。并将交集靶点导入Cytoscape 3.7.2中,构建CSJBD-化合物-RA靶点网络^[17]。

将CSJBD治疗RA的潜在靶点导入互作基因检索工具数据库(String, <https://www.stringdb.org/>)并构建蛋白质互作(PPI)网络。将PPI数据文本导入Cytoscape 3.7.2软件。采用聚类分析MCODE插件通过模块分析确定了15个聚类模块。Degree ≥ 155 (Degree前十五)的选定节点作为核心靶基因。将Degree、Betweenness和Closeness中位数以上的目标交集作为后续富集分析的重要目标。使用DAVID数据库(<https://david.ncicrf.gov/summary.jsp>)进行GO功能注释和KEGG通路分析,并对其进行可视化。使用R语言的limma包对数据进行差异分析,筛选出阈值大于1.3倍和 $P < 0.05$ 的差异表达基因,对 $P < 0.05$ 的检验水准进行了FDR值校正(adj.P.val),并将数据可视化^[18]。

1.3.2 分子对接

将CSJBD化合物的SDF和mol2结构导入Swiss Target Prediction和PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),并下载化合物的2D框架。然后,在Chem3D软件中将化合物的2D结构转换为3D结构。在RCSB PDB数据库(<https://www.pdbus.org/>)中搜索靶基因的mol2蛋白结构并对其进行优化。将得分最高的结构进一步处理为3D分子结构pdb文件^[19]。使用Pymol 2.5.4对配体进行脱水和氢化处理,并将与活性成分和靶基因匹配的蛋白质受体转化为pdbqt形式。使用AUTODOCK Vina1.2.2进行分子对接,并使用Pymol

2.5.4检查CSJBD与靶基因受体蛋白之间的结合位点,并可视化对接结果^[20]。

1.4 超高效液相色谱法检测CSJBD质量标志物

准确称量羌活醇、阿魏酸、蛇床子素、龙胆苦苷和桑皮苷A标准品,并加入甲醇制备质量浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。通过0.22 μm 膜过滤以获得工作液,注入超高效液相色谱(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)仪器中。使用ACQUITY UPLC®BEH C18 (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm)进行UPLC分析,参数如下:流动相,甲醇-水(梯度洗脱见表1);流速,0.200 mL/min;检测波长,280 nm;柱温,30 $^{\circ}\text{C}$;进样体积,10 μL 。分析条件如下:0:000,流速0.200 mL/min,乙腈5%,0.1%磷酸95%。30:000,流速0.200 mL/min,乙腈95%,0.1%磷酸5%。

表1 梯度洗脱
Table 1 Gradient elution

Time/min	Flow velocity/(mL/min)	Methanol/%	Water/%
0:000	0.200	5.0	95.0
10:000	0.200	15.0	85.0
25:000	0.200	30.0	70.0
60:000	0.200	45.0	55.0
85:000	0.200	60.0	40.0
110:000	0.200	100.0	0.0
120:000	0.200	100.0	0.0

1.5 动物实验

1.5.1 胶原诱导的关节炎模型小鼠的制备

雄性C57BL/6小鼠购自杭州子源实验动物科技有限公司(中国杭州),体质量17~20 g,生产许可证号:SCXK(浙江)2019-0004,适应性饲喂1周后制备胶原诱导的关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型。建模试剂以鸡II型胶原蛋白为乳化剂,与完全弗氏佐剂CFA以1:1(体积比)混合30 min,将0.1 mL建模试剂注入小鼠尾根皮下,完成第一次免疫。第二次免疫在第一次免疫后的第21天进行,方法和注射量与第一次免疫相同^[21]。实验方案经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号:AHUCM-mouse-2024149。

1.5.2 关节炎评分

单只小鼠足RA关节炎评分标准如下:0级(0分),无红肿;1级(1分),小鼠脚趾关节红肿;2级(2分),中足和所有脚趾发红和肿胀;3级(3分),踝关节以下红肿;4级(4分),膝关节以下所有关节(包括膝关节)发红和肿胀。所有足关节的累积评分为每只小鼠的关节炎评分。每只小鼠最大评分为16分。CIA组小鼠的前、后足均出现肿

胀,判定为小鼠CIA模型建立^[22]。

1.5.3 动物实验分组及处理

CIA模型制备后,排除死亡/濒临死亡/不能活动、腹泻或小便失禁、无力摄食或饮水、瘫痪等模型小鼠。按照实验动物随机分组原则,以及人和小鼠间按体表面积折算的等效剂量,造模成功的CIA小鼠编号后分组如下:模型组(CIA)、模型+CSJBD-L组(8.1 g/kg)、模型+CSJBD-M组(16.2 g/kg)、模型+CSJBD-H组(32.4 g/kg)、模型+NC组(阴性对照,灌胃等体积生理盐水)和模型+来氟米特(LEF)组(0.05 mg/10 g)。用PASS统计软件,设定统计参数 $\alpha=0.05$ (双尾),样本量初步估算为8只,为扩大样本量,本实验将每组小鼠数量设定为10只。另随机分配10只未造模小鼠作为正常组。按照盲法原则,研究者1独立负责模型小鼠的随机分组,研究者2独立负责对各组模型小鼠给药。每组CIA小鼠给予相应剂量CSJBD灌胃,每天2次,LEF灌胃每天1次,持续28 d^[23]。

1.5.4 HE染色检测膝关节组织病理变化

戊巴比妥钠麻醉小鼠,颈椎脱臼法处死。分离小鼠膝关节,并在体积分数为4%多聚甲醛中固定24 h。使用10%乙二胺四乙酸溶液脱盐小鼠膝关节,然后使用梯度乙醇脱水和透明化。最后将小鼠膝关节包埋在石蜡中,连续切片样品块。切片染色、脱水、澄清和密封,在显微镜下观察小鼠膝关节组织病理学变化。

1.5.5 组织免疫荧光检测MMP3和Fibronectin

将样品的石蜡切片在60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘烤60 min,并依次用二甲苯和乙醇(100%、100%和70%)进行3次洗涤。将洗涤后的切片浸泡在抗原修复溶液中,用小火烘烤20 min,然后冷却。将切片在3% H_2O_2 中孵育,滴加山羊血清封闭液,在室温下避光孵育10 min。滴加一抗MMP3(1:250)和Fibronectin(1:200),在室温下避光孵育30 min,并用缓冲溶液洗涤。然后滴加稀释的二抗,孵育10 min,用缓冲溶液洗涤。滴加TSA染料,孵育10 min,滴加3% H_2O_2 并孵育10 min。然后滴加适量的DAPI,室温孵育5 min,用抗荧光猝灭密封剂密封。最后,使用Pannoramic MIDI扫描切片并观察结果^[23]。

1.6 细胞实验

1.6.1 制备含CSJBD的血清(CSJBDS)

中剂量组小鼠灌胃CSJBD 5 d,每天2次,剂量为16.2 g/kg。最后一次给药45 min后采用戊巴比妥钠麻醉小鼠,股动脉取血,然后颈椎脱臼法处死。将血清以3 000 r/min离心10 min,上层血清在56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中灭活30 min,获得的CSJBDS储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ ^[24]。正常组小鼠灌胃等体积生理盐水,灌胃方法同前述中剂量组小鼠,获得

的血清作为未给药的阴性对照血清(NC组血清)。

1.6.2 FLSs细胞培养

正常FLSs(HUM-iCell-s010)和RA FLSs(iCell-008a)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。细胞培养基由10%胎牛血清、高葡萄糖DMEM培养基和1%青霉素-链霉素溶液组成。弃去培养基, PBS清洗3次, 胰酶消化后以1:3比例进行传代。然后将FLSs置于细胞培养箱中, 在37℃、体积分数为5% CO₂条件下孵育。本研究使用的FLSs是第3代至第6代FLSs^[24]。

1.6.3 细胞分组及处理

将RA FLSs分为RA FLSs组、RA FLSs+CSJBDS-L组(10%含药血清+90%培养基)、RA FLSs+CSJBDS-M组(15%含药血清+85%培养基)、RA FLSs+CSJBDS-H组(20%含药血清+80%培养基)和RA FLSs+NC组血清(阴性对照)^[24]。不同剂量CSJBDS培养细胞24 h后, 收集细胞用于下一步实验。

1.6.4 CCK8检测RA FLSs细胞活力

将RA FLSs均匀接种到96孔板中。RA FLSs完全黏附在壁上后, 相应剂量CSJBDS培养24 h。参照CCK8试剂盒说明, 测定不同剂量CSJBDS对RA FLSs增殖的影响。向96孔板每孔加入10 μL CCK8溶液, 在培养箱中孵育2 h, 并使用酶标仪检测每个孔中450 nm处的吸光度值。

1.6.5 ELISA检测IL-1β、IL-6、IL-8和TNF-α

参照试剂盒说明书建立检测标准曲线。向样品孔中加入40 μL样品稀释工作液和10 μL样品, 然后加入50 μL酶标记试剂。轻轻摇动, 充分混合, 37℃下孵育30 min。取出ELISA板, 轻轻洗涤每个孔5次, 然后加入50 μL显影剂A和50 μL显影剂B。充分混合后, 避光孵育10 min, 然后加入终止溶液。使用酶标仪检测各孔OD值。每组检测3个样本, 每个样本测量3次^[25]。

1.6.6 RT-qPCR检测*c-Myc*、*CCND1*、*Wnt7b*、 β -catenin和*WTAP*

使用Trizol试剂从RA FLSs中提取总RNA。根据逆转录试剂盒说明, 制备总反应体系, 涡旋混合物5 s, 离心。使用逆转录检测试剂盒获得cDNA。使用PCR仪器和RT-qPCR试剂盒扩增每个基因的cDNA, 引物序列见表2。扩增参数: 95℃, 15 s, 40次循环; 60℃, 60 s, 40次循环; 72℃, 30 s, 40次循环。在3个独立样品上重复检测每个基因, 每个独立样品重复3次, 然后使用2^{-ΔΔCt}方法分析结果^[25]。

1.6.7 Western blot检测*c-Myc*、*CCND1*和 β -catenin

用PBS洗涤RA FLSs两次, 弃去培养基, 加入细胞裂解缓冲液以裂解细胞。使用SDS-PAGE分离蛋白质并将其转移到PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭2 h, 在室温下用TBST洗涤3次, 并将PVDF膜分别在稀释的一抗*c-Myc*(1:1000)、*CCND1*(1:10000)、 β -catenin(1:1000)和 β -actin(1:1000)中于4℃孵育过夜。TBST洗涤3次后, 用密封溶液密封, 然后室温下在稀释的相应二抗中孵育1 h。TBST洗涤3次后, ECL检测试剂盒检测蛋白质条带, 并使用ImageJ软件进行灰度分析^[25]。

1.6.8 细胞免疫荧光检测MMP3和Fibronectin

在室温下将各组RA FLSs用体积分数为4%多聚甲醛固定30 min。PBS清洗后, 用0.5% Triton X-100将RA FLSs通透10 min, 并用5% BSA封闭2 h, 与稀释的一抗MMP3(1:250)和Fibronectin(1:200)一起孵育过夜。PBS清洗后, 加入适当比例的荧光二抗避光孵育2 h。在暗室中用DAPI对细胞核进行染色, 使用Leica DMi8荧光显微镜捕获细胞的荧光图像^[26]。

1.6.9 质粒转染

对于*Wnt7b*过表达, 使用500 μL非双抗体培养基在37℃和体积分数为5% CO₂的6孔板中培养RA FLSs, 直到RA

表 2 RT-qPCR引物序列
Table 2 RT-qPCR primer sequences

Gene	Upstream primers (5'→3')	Downstream primers (5'→3')
β -catenin	GTGGGTGGTATAGAGGCTCTTG	ATGGCAGGCTCAGTGATGTCTTC
<i>c-Myc</i>	CGTCCTCGGATCTCTGCTCTC	GGTGGTGGGCGGTGTCTC
<i>CCND1</i>	CCCTCGGTGTCTACTTCAAATG	TCGCAGACCTCCAGCATCC
<i>Wnt7b</i>	ACGGCGTGTCTGGCTCCTG	CCCGCACCACCTCCACCTG
β -actin	CCTGGCACCCAGACAAT	GGGCCGGACTCGTCATAC
<i>WTAP#1</i>	AGAGAUGAGUAAUUCUAA	UUAGAAUUAACUCAUCUCU
<i>WTAP#2</i>	GCAAGAGUGUACUACUCA	UUGAGUAGUACACUCUUGC
<i>WTAP#3</i>	GGAACAGACUAAAGACAAA	UUUGUCUUUAGUCUGUUC

c-Myc: cellular myelocytomatosis oncogene; *CCND1*: cyclin D1; *Wnt7b*: Wnt family member 7B; *WTAP*: Wilms' tumor 1-associated protein.

FLSs覆盖6孔板底部的80%~90%。将4 μ g *Wnt7b*过表达质粒溶解在250 μ L opti培养基中,充分混合,等待5 min。将10 μ L LipoHigh溶解在250 μ L opti培养基中,充分混合,等待5 min。将质粒培养基和LipoHigh培养基充分混合,在室温下孵育20 min,加入RA FLSs中,在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂条件下培养RA FLSs 6 h。然后更换为正常FLSs培养基,继续培养24 h,从RA FLSs中提取总RNA和蛋白质。对于WTAP敲低,用DEPC水将质粒稀释至20 μ mol/L,将100 pmol WTAP敲低质粒溶解在250 μ L Opti培养基中以制备质粒培养基。使用5 μ L LipoHigh和250 μ L Opti制备LipoHigh培养基,其余步骤与上述过表达相同。敲低序列见表2。

对于研究WTAP是否调控Wnt7b,将RA FLSs分为RA FLSs组、RA FLSs+si-WTAP#3组、RA FLSs+si-WTAP#3+Wnt7b-OE组和RA FLSs+si-WTAP#3+Wnt7b-NC组。为了研究CSJBD治疗RA FLSs的具体机制,将RA FLSs分为RA FLSs组、RA FLSs+CSJBDS-M组、RA FLSs+CSJBDS-M+Wnt7b-OE组和RA FLSs+CSJBDS-M+NC组。RT-qPCR检测*Wnt7b*、*WTAP*、*CCND1*、*c-Myc*和 β -catenin, Western blot检测*CCND1*、*c-Myc*和Nuclear β -catenin, ELISA检测IL-1 β 、IL-6和IL-8,免疫荧光检测Wnt7b, CCK8检测RA FLSs细胞活力。

1.7 统计学方法

采用统计软件SPSS 27.0进行分析,数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。当方差齐性假设成立时,采用单因素方差分析(ANOVA)比较多组间的差异;当方差齐性假设不成立时,采用Welch检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析

2.1.1 CSJBD抗RA靶点和信号通路的生物信息学预测

通过TCMSP、PubChem和Swiss target prediction databases,本研究获得了799个CSJBD中化合物的相关靶点。通过Gene Cards和OMIM数据库获得2528个与RA相关的靶点,包括Gene Cards中的2486个靶点和OMIM中的42个靶点。将CSJBD靶点和RA靶点相交,得到351个共有靶点,并绘制维恩图(附图1A和附图1B)。将药物、相应化合物和交叉靶点导入Cytoscape 3.7.2中,构建中药-CSJBD化合物-交叉靶点的网络图(附图1C)。

CSJBD共有351个治疗RA的潜在靶点被导入STRING数据库,从而构建了PPI网络,随后使用Cytoscape 3.7.2版对其进行分析(附图1D)。通过MCODE分析确定的第一个模块得分为50.000,从而确定了58个与CSJBD相

关的RA治疗关键靶点(附图1E)。选择Degree ≥ 155 (Degree前15名)作为核心靶点,从而鉴定出前15个核心靶基因:*CTNNB1*、*HSP90AA1*、*STAT3*、*MMP9*、*MTOR*、*SRC*、*MYC*、*HIF1A*、*CCND1*、*CASP3*、*BCL2L1*、*GAPDH*、*BCL2*、*ESR1*和*AKT1*。值得注意的是,*CTNNB1*、*MYC*和*CCND1*被鉴定为Wnt/ β -catenin信号通路中的关键基因(附图1F)。

对CSJBD和RA之间的共同靶点进行GO分析,富集了690条生物过程。其中,98项与细胞组成有关,而148项与分子功能有关(附图1G)。对与药物疾病相关的常见靶点进行KEGG通路富集分析,共产生166条信号通路。按照Environmental Information Processing的 $P < 0.05$ 的原则进行筛选,得到23条富集的通路,包含Wnt/ β -catenin信号通路(附图1H)。使用GEO数据库筛选了差异表达基因,与健康个体相比,RA患者*MYC*和*CCND1*的表达显著增加(附图1I~1L)。这些预测表明,CSJBD可能通过Wnt/ β -catenin信号通路改善RA。

将CSJBD化合物与对RA有影响的Wnt家族蛋白Wnt1、Wnt5a、Wnt7b、Wnt8和Wnt11对接。发现CSJBD化合物与Wnt7b具有良好的结合能力(表3、附图1M)。分子对接结果表明,CSJBD可能通过影响Wnt/ β -catenin信号通路,从而调节Wnt7b影响RA病理。附图1见网络资源附件。

表3 单体化合物与Wnt7b具有良好的结合能力

Table 3 Monomer compounds have good binding ability with Wnt7b

Monomer compounds	Estimated ΔG / (kcal/mol)	Binding energy / (kJ/mol)
Notopterol	-7.131	-29.856
Osthole	-6.582	-27.558
Gentiopicroside	-6.938	-29.048
Mulberroside A	-7.907	-33.105
Ferulic acid	-5.619	-23.526

2.2 CSJBD制剂质量标准的确定

采用UPLC检测了CSJBD的5种活性成分,即阿魏酸、龙胆苦苷、羌活醇、桑皮苷A和蛇床子素(附图2A~2E),并将这5种成分作为CSJBD制备的质量标准。上述5种单体化合物的混合峰(附图2F)对应于CSJBD的峰(附图2G)。基于溶剂峰(附图2H),这5种单体化合物在不同批次的CSJBD制剂中含量稳定,表明CSJBD可用于抗RA药理研究。附图2见网络资源附件。

2.3 CSJBD减轻CIA小鼠的病理

CIA小鼠的关节炎症状随造模时间延长逐渐恶化,CSJBD给药后,CIA小鼠的关节炎评分(图1A)、足爪肿胀厚度(图1B)、体质量(图1C)和充血红肿(图1D)显著

改善。HE结果显示CIA小鼠滑膜组织增生、关节表面损伤和关节软骨弥漫性破坏;而CSJBD减轻了CIA

小鼠的滑膜增生并改善了关节表面损伤,且其疗效随着药物剂量的增加而增加(图1E)。与正常小鼠相比,

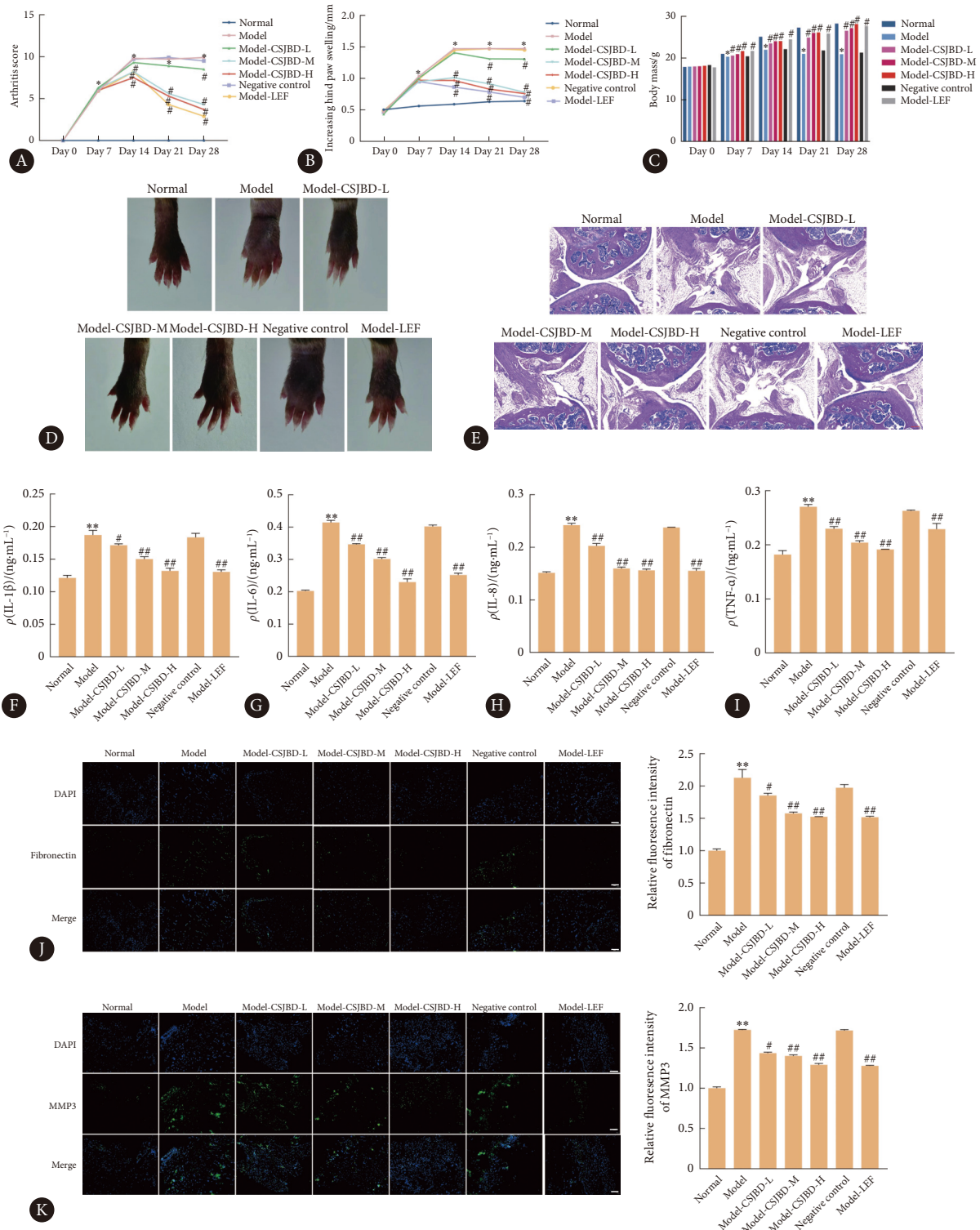


图 1 CSJBD减轻CIA小鼠的病理

Fig 1 CSJBD alleviates pathology in CIA mice

A, Changes in arthritis scores in CIA mice ($n = 10$ in each group). B, Changes in foot swelling in CIA mice ($n = 10$ in each group). C, Changes in body mass in CIA mice ($n = 10$ in each group). D, Changes in congestion, redness, and swelling of the feet of CIA mice ($n = 3$). E, CIA mouse knee joint HE staining (scale bar = 100 μm) ($n = 3$). F-I, Changes in serum IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α in CIA mice, respectively ($n = 3$). J and K, Tissue immunofluorescence of fibronectin and MMP3 (scale bar = 150 μm) ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. model group.

CIA小鼠血清中IL-1β、IL-6、IL-8和TNF-α的表达升高 ($P < 0.01$)。用CSJBD后,上述炎症因子的表达水平随CSJBD剂量的增加而降低(图1F~1I)。此外,CSJBD治疗组和LEF组RA病理基因Fibronectin和MMP3的表达较模型组下调($P < 0.05$)(图1J、1K)。以上结果表明,CSJBD与LEF一样,对CIA小鼠的关节炎具有良好的治疗效果。

2.4 细胞实验

2.4.1 CSJBD抑制RA FLSs的病理基因的表达

CCK-8法筛选RA FLSs的剂量,结果显示,10%、15%和20% CSJBDs对RA FLSs的增殖具有良好的抑制作用(附图3见网络资源附件)。RA FLSs给药的3种剂量设置为10%(低剂量)、15%(中等剂量)和20%(高剂量)。免疫荧光检测结果显示,RA FLSs中Fibronectin(图2A)和MMP3(图2B)的表达均增加($P < 0.01$),而CSJBDs降低了MMP3和Fibronectin的异常升高,与RA FLSs组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4.2 CSJBD抑制Wnt/β-catenin信号通路

本研究检测了CSJBDs是否通过RA FLSs中的Wnt/β-catenin信号通路抑制RA FLSs激活。RT-qPCR和Western blot结果显示,与正常FLSs相比,RA FLSs组CCND1、c-Myc和β-catenin的mRNA和蛋白水平均增加($P < 0.01$)(图3)。而CSJBDs可下调CCND1、c-Myc和β-catenin的

表达,与RA FLSs组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。这表明Wnt/β-catenin信号通路是CSJBDs治疗RA的关键通路。

2.4.3 WTAP影响Wnt7b-Wnt/β-catenin信号轴和炎症因子的表达

RT-qPCR和免疫荧光结果证实Wnt7b在RA FLSs中的表达高于正常FLSs($P < 0.01$)(图4A、4B)。过表达Wnt7b后,Wnt7b mRNA的表达明显增加,表明Wnt7b过表达构建成功(图4C)。RT-qPCR结果显示,与正常FLSs相比,RA FLSs中WTAP mRNA水平升高($P < 0.01$)(图4D)。RT-qPCR筛选WTAP siRNA序列,si-WTAP#3可明显降低Wnt7b的表达(图4E、4F)。CCK-8结果显示,敲低WTAP可明显抑制RA FLSs的增殖,但过表达Wnt7b逆转上述结果(图4G)。过表达Wnt7b可以逆转敲低WTAP对CCND1、c-Myc和β-catenin的影响(图4H~4J),表明WTAP通过Wnt7b影响Wnt/β-catenin信号通路。ELISA结果还显示,敲低WTAP可明显降低IL-1β、IL-6和IL-8的表达,但Wnt7b过表达逆转上述结果(图4K~4M)。上述结果提示敲低WTAP抑制了Wnt7b-Wnt/β-catenin信号轴并减少了RA FLSs炎症因子的表达。

2.4.4 CSJBD通过Wnt7b抑制Wnt/β-catenin信号通路和RA FLSs增殖

RT-qPCR和Western blot检测结果显示,在RA FLSs中

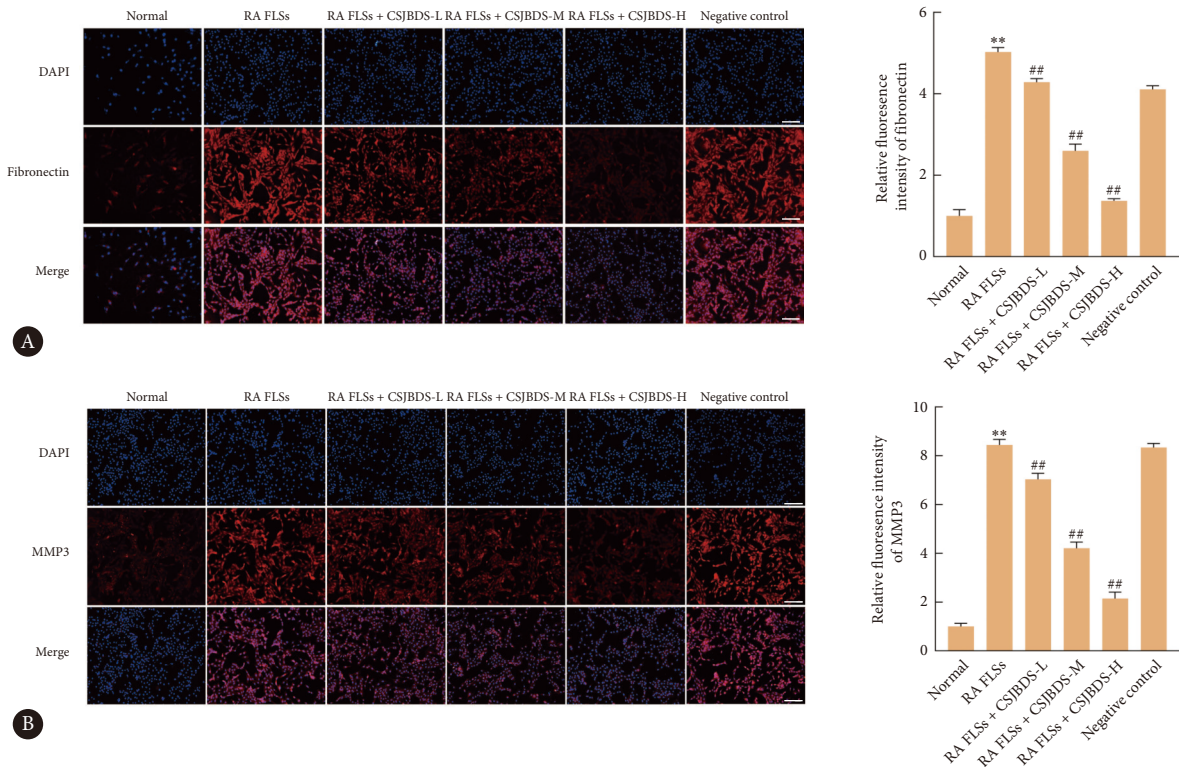


图 2 CSJBD抑制RA病理基因的表达

Fig 2 CSJBD inhibits the expression of pathological genes in RA

Cellular immunofluorescence of fibronectin (A) and MMP3 (B). ** $P < 0.01$, vs. normal group; ## $P < 0.01$, vs. RA FLSs group. $n = 3$. Scale bar = 150 μm.

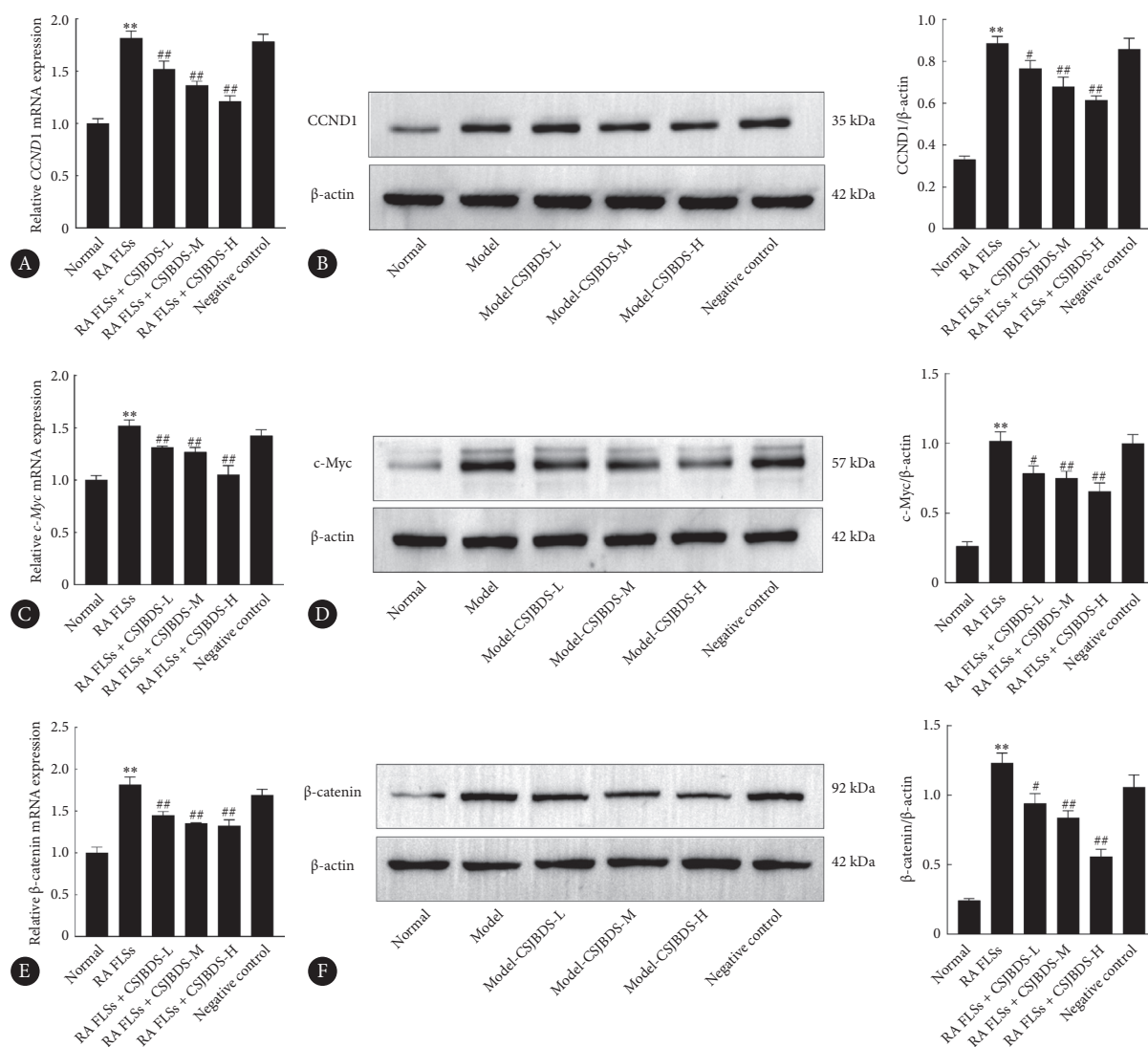


图 3 CSJBD抑制Wnt/β-catenin信号通路

Fig 3 CSJBD inhibits the Wnt/β-catenin signaling pathway

A, mRNA expression of *CCND1* in RA FLSs ($n = 9$). B, Protein expression of *CCND1* in RA FLSs ($n = 9$). C, mRNA expression of *c-Myc* in RA FLSs ($n = 9$). D, Protein expression of *c-Myc* in RA FLSs ($n = 9$). E, mRNA expression of β -catenin in RA FLSs ($n = 9$). F, Protein expression of β -catenin in RA FLSs ($n = 9$). ** $P < 0.01$, vs. normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. RA FLSs group.

添加CSJBDs后, *CCND1*、*c-Myc*和 β -catenin的mRNA和蛋白水平明显下调; 过表达*Wnt7b*后, *CCND1*、*c-Myc*和 β -catenin的mRNA和蛋白水平明显上调(图5A~5F), 表明过表达*Wnt7b*可以逆转CSJBDs对Wnt/ β -catenin信号通路的抑制。此外, CCK8检测结果还显示, *Wnt7b*过表达干扰了CSJBDs对RA FLSs增殖的抑制作用(图5G)。上述结果证实, CSJBDs通过靶向*Wnt7b*抑制*Wnt7b*-Wnt/ β -catenin信号通路和RA FLSs的增殖。

3 讨论

RA是一种常见的自身免疫性疾病, 主要是关节滑膜的炎症性病变, 常累及手足小关节, 并伴有各种并发症和

关节外表现^[27]。RA影响世界约1%的人口, 女性RA患病率和疾病活动度高于男性^[28]。RA的诱导与T细胞、B细胞、巨噬细胞、细胞因子和趋化因子、微生物和自身抗体的病理变化密切相关, 提示存在许多影响RA发病机制的靶点^[29]。RA复杂病理机制和缺乏明确的病因使得RA的靶向治疗变得困难^[30-31]。中药因其多成分、多途径、多靶点的特点, 成为RA治疗药物研发的热点。CSJBDs作为治疗RA的经典名方, 治疗RA的历史悠久, 疗效良好, 但具体治疗机制尚未完全阐明^[32]。

FLSs是介导RA病理的效应细胞, 可产生促进滑膜炎和关节损伤的侵袭性表型^[33-34]。鉴于FLSs在RA病理和药物治疗中的重要性, 本研究通过培养RA FLSs, 观察

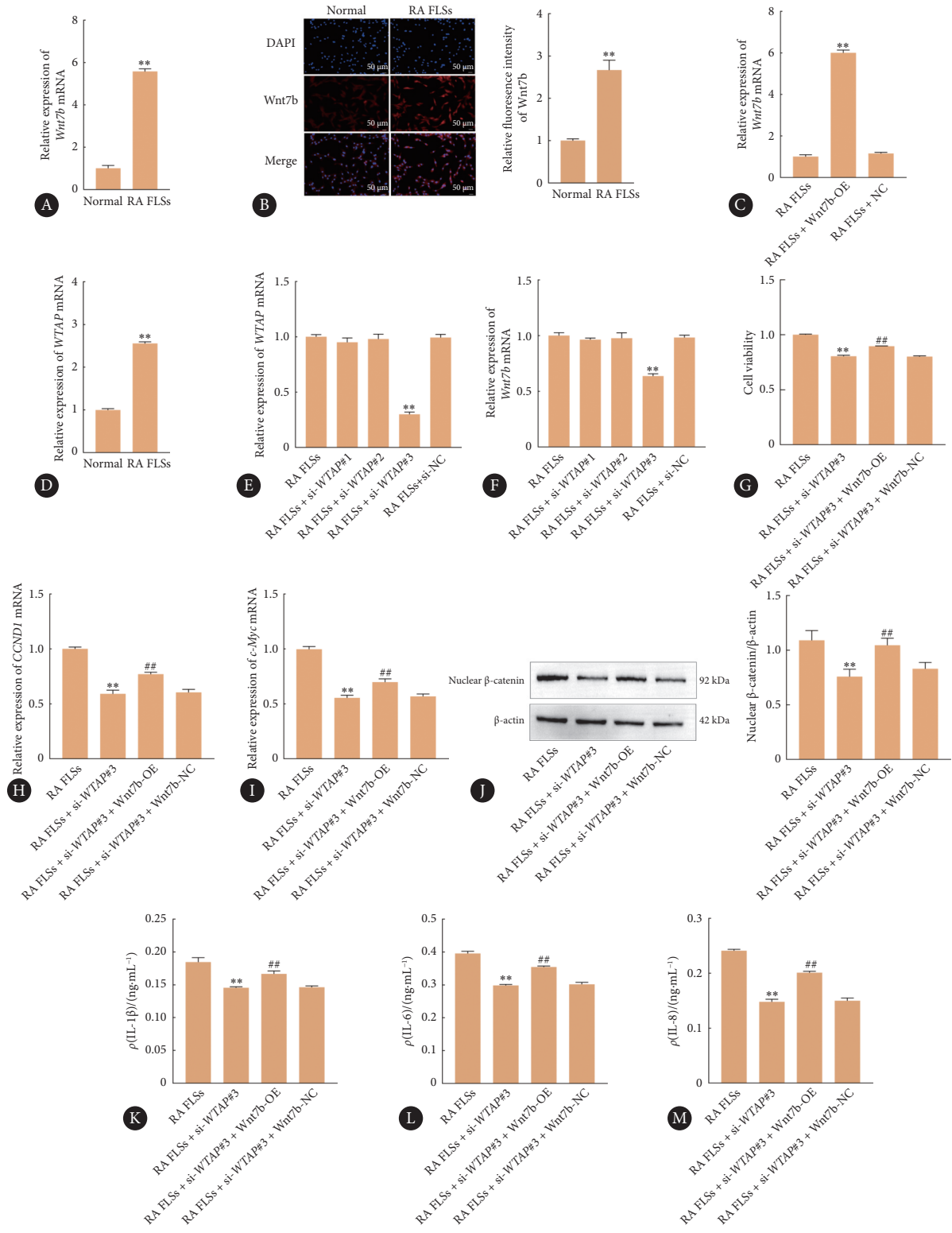


图 4 WTAP影响Wnt7b-Wnt/β-catenin信号轴和炎症因子的表达

Fig 4 WTAP affects Wnt7b-Wnt/β-catenin signaling axis and the expression of inflammatory factors

A, mRNA expression of *Wnt7b* in FLSs ($n = 9$). B, Cellular immunofluorescence *Wnt7b* (scale bar = 50 μm) ($n = 3$). C, Overexpression of *Wnt7b* mRNA expression in RA FLSs ($n = 9$). D, mRNA expression of *WTAP* in FLSs ($n = 9$). E, Screening *WTAP* siRNA sequences in RA FLSs ($n = 9$). F, The effect of knocking out *WTAP* on *Wnt7b* expression ($n = 9$). G, CCK-8 assay was conducted to determine the proliferation of RA FLSs ($n = 3$). H and I, mRNA expression of *CCND1* and *c-Myc* in RA FLSs ($n = 9$). J, Protein expression of β-catenin in RA FLSs ($n = 3$). K-M, Changes in serum IL-1β, IL-6, and IL-8 ($n = 3$). For A, B, and D: ** $P < 0.01$, vs. normal group. For C, E, and F: ** $P < 0.01$, vs. RA FLSs group; For G-M: ** $P < 0.01$, vs. RA FLSs group; ## $P < 0.01$, vs. RA FLSs + si-WTAP#3 group.

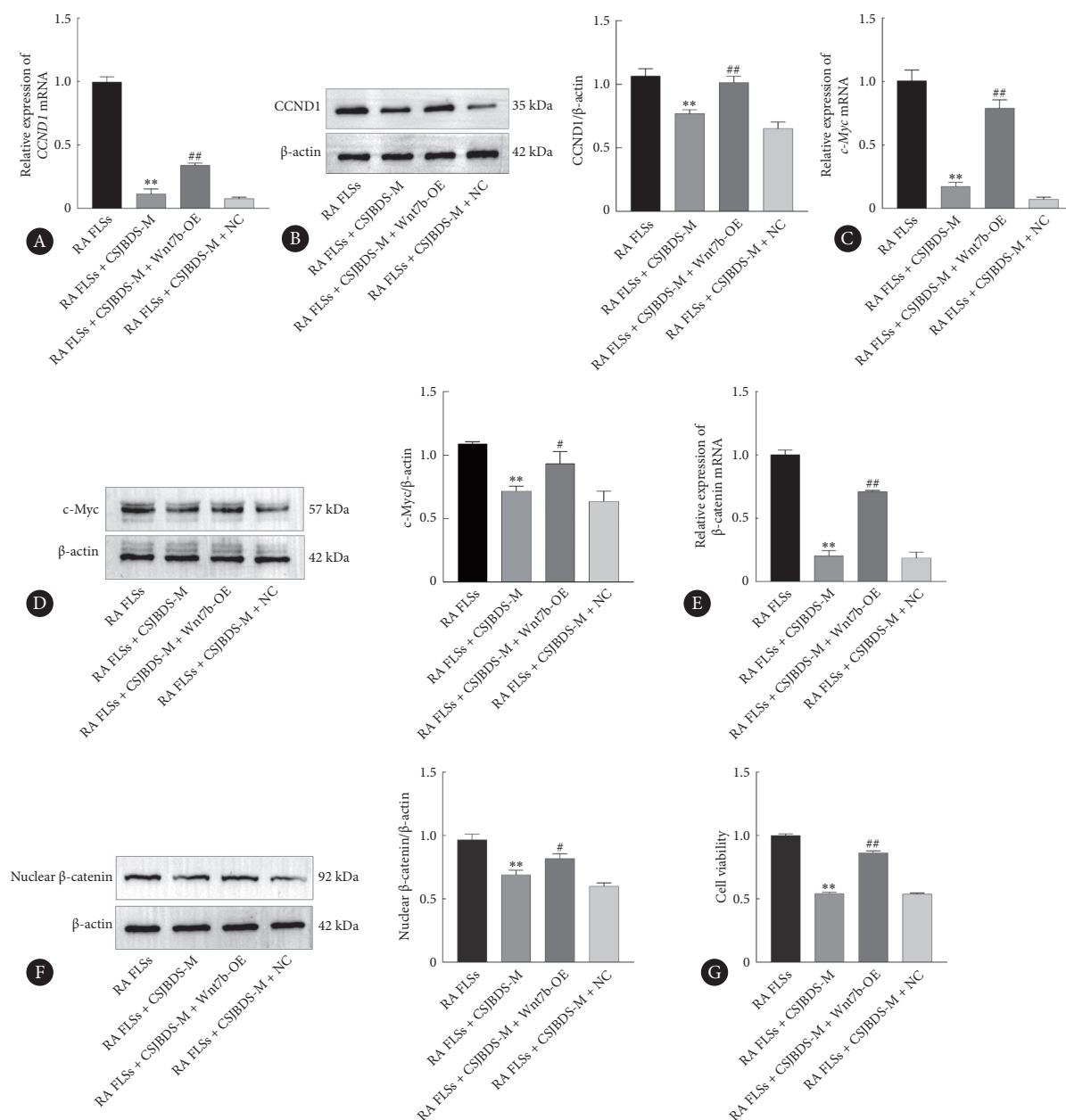


图 5 CSJBD通过WNT7b抑制Wnt/ β -catenin信号通路和RA FLSs增殖

Fig 5 CSJBD inhibits the Wnt/ β -catenin signaling pathway and RA FLSs proliferation through WNT7b

A, mRNA expression of *CCND1* in RA FLSs ($n = 9$). B, Protein expression of *CCND1* in RA FLSs ($n = 3$). C, mRNA expression of *c-Myc* in RA FLSs ($n = 9$). D, Protein expression of *c-Myc* in RA FLSs ($n = 3$). E, mRNA expression of β -catenin in RA FLSs ($n = 9$). F, Protein expression of β -catenin in RA FLSs ($n = 3$). G, CCK8 assay was conducted to determine the proliferation of RA FLSs ($n = 3$). ** $P < 0.01$, vs. RA FLSs group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. RA FLSs + CSJBDs-M group.

CSJBD对RA FLSs的调节作用。结果显示,CSJBD下调RA FLSs中MMP3和Fibronectin的表达,并抑制RA FLSs增殖。CIA模型与人类RA的病理特征相似,如滑膜细胞浸润、滑膜增生、软骨破坏和骨侵蚀,是RA的主要疾病模型^[35]。CSJBD治疗后,CIA小鼠关节炎评分、足部肿胀以及组织病理损伤得到改善,促炎因子TNF- α 、IL-6、IL-8和IL-1 β 表达明显降低。同时,免疫荧光结果也表明,CSJBD降低CIA小鼠滑膜组织中病理基因MMP3和Fibronectin表达。以上结果表明CSJBD是一种有效的抗RA中药方

剂,对RA病理有显著改善作用。

Wnt/ β -catenin信号通路的失调与各种疾病的发展有关。研究发现,催乳颗粒可通过影响Wnt/ β -catenin信号通路治疗产后缺乳^[36]。临床试验发现一些Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂对免疫细胞的调节和骨形成有影响^[37]。其中,SM04690是一种Wnt抑制剂,已被证明可有效缓解严重膝骨关节炎疼痛^[38]。Wnt/ β -catenin相关蛋白表达升高与RA患者的软骨和骨损伤有关^[39]。本研究通过生物信息学预测CSJBD的潜在靶点,随后筛选出15个核心靶点

基因进行GO分析和KEGG分析。核心靶基因包括 β -catenin、*c-Myc*和*CCND1*, KEGG分析包括Wnt/ β -catenin信号通路。因此, 笔者推测CSJBD通过Wnt/ β -catenin信号通路发挥治疗作用。

Wnt7b是一种具有强效成骨活性的Wnt蛋白, 通过刺激成骨细胞系细胞中葡萄糖代谢来促进骨形成。Wnt7b在小鼠骨骼发育过程中对维持骨稳态起关键作用^[40]。本研究发现Wnt7b可以通过各种途径影响RA进展, 表明它是调节RA病理的潜在靶点。分子对接结果显示, CSJBD的一些单体化合物与Wnt7b具有很强的结合能力, CSJBD显著抑制了Wnt7b的异常表达。细胞实验证实CSJBD可影响Wnt/ β -catenin信号通路重要成员的mRNA表达, 尤其抑制RA FLSs中 β -catenin、*CCND1*和*c-Myc*的异常高表达。此外, 本研究通过过表达*Wnt7b*验证了Wnt/ β -catenin信号通路在CSJBD治疗中的重要调节作用, 结果证明CSJBD靶向Wnt7b, 并通过抑制该信号通路抑制RA病理。WTAP是一种m6A甲基转移酶, 已成为m6A和癌症研究的热门话题。本研究发现WTAP在RA患者中表达, 并证实WTAP可调控Wnt7b, 通过Wnt7b影响Wnt/ β -catenin信号通路。

综上, CSJBD通过阻断WTAP-Wnt7b-Wnt/ β -catenin信号轴抑制RA病理, Wnt7b是CSJBD的直接靶点。本研究初步揭示了WTAP对RA病理的影响以及CSJBD治疗RA的机制, 提示WTAP可能是RA诊断和治疗的新靶点, 值得进一步深入的临床研究。鉴于中药成分较多, 药理作用存在多通路、多靶点特点, CSJBD可能存在其他抗RA靶点及信号通路。因此本课题组下一步拟采用转录组学、蛋白组学、代谢组学、空间代谢组学、液相色谱-质谱等方法进一步研究CSJBD入血成分及抗RA机制, 进一步在CSJBD入血成分中筛选有效单体, 评价单体对RA的药效及作用机制。

* * *

作者贡献声明 吴雅婕负责正式分析、调查研究、可视化和初稿写作, 徐文博、袁美玲和周欣悦负责研究方法, 蔡意康和曹会波负责验证, 段强军负责软件和监督指导, 陶童祥负责研究项目管理和监督指导, 缪成贵负责论文构思、数据审编、经费获取、提供资源、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊, 且对将要发表版本进行最终定稿, 并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution WU Yajie is responsible for formal analysis, investigation, visualization, and writing--original draft. XU Wenbo, YUAN Meiling, and ZHOU Xinyue are responsible for methodology. CAI Yikang and CAO Huibo are responsible for validation. DUAN Qiangjun is responsible for software and supervision. TAO Tongxiang is responsible for project administration and supervision. MIAO Chenggui is responsible for conceptualization, data curation, funding acquisition, resources,

supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] DI MATTEO A, BATHON J M, EMERY P. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2023, 402(10416): 2019-2033. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01525-8.
- [2] RADU A F, BUNGAU S G. Management of rheumatoid arthritis: an overview. *Cells*, 2021, 10(11): 2857. doi: 10.3390/cells10112857.
- [3] WU Z, MA D, YANG H, et al. Fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: surface markers and phenotypes. *Int Immunopharmacol*, 2021, 93: 107392. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107392.
- [4] SMITH M H, GAO V R, PERIYAKOIL P K, et al. Drivers of heterogeneity in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Nat Immunol*, 2023, 24(7): 1200-1210. doi: 10.1038/s41590-023-01527-9.
- [5] ZHENG Y, WEI K, JIANG P, et al. Macrophage polarization in rheumatoid arthritis: signaling pathways, metabolic reprogramming, and crosstalk with synovial fibroblasts. *Front Immunol*, 2024, 15: 1394108. doi: 10.3389/fimmu.2024.1394108.
- [6] WANG T, JIA Q, CHEN T, et al. Alleviation of synovial inflammation of Juanbi-Tang on collagen-induced arthritis and TNF-Tg mice model. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 45. doi: 10.3389/fphar.2020.00045.
- [7] PENG M, YAO Z, ZHANG J, et al. Discovery and validation of anti-arthritis ingredients and mechanisms of Qingfu Juanbi Tang, a Chinese herbal formulation, on rheumatoid arthritis. *J Ethnopharmacol*, 2024, 329: 118140. doi: 10.1016/j.jep.2024.118140.
- [8] LIU X D, CHEN Y, LIU F Y, et al. Effect of Wenhua Juanbi recipe on proliferation and apoptosis of synoviocytes in rats with collagen-inducing arthritis. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(6): 453-458. doi: 10.1007/s11655-011-0753-8.
- [9] RIM E Y, CLEVERS H, NUSSE R. The Wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators. *Annu Rev Biochem*, 2022, 91: 571-598. doi: 10.1146/annurev-biochem-040320-103615.
- [10] 沈齐, 张玲芳, 胡翰, 等. Wnt/ β -catenin信号通路在非小细胞肺癌中作用的研究进展. *现代肿瘤医学*, 2024, 32(3): 577-583. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2024.03.035.
- [11] SHEN Q, ZHANG L F, HU H, et al. Progress in the role of Wnt/ β -catenin signaling in non-small cell lung cancer. *J Modern Oncol*, 2024, 32(3): 577-583. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2024.03.035.
- [11] 聂伟东, 贾默然, 邵轶群, 等. 仙鹤草内酯通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制前列腺癌细胞的增殖和侵袭. *现代肿瘤医学*, 2024, 32(4): 589-595. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2024.04.001.
- [11] NIE W D, JIA M R, SHAO Y Q, et al. Inhibition of prostate cancer cell proliferation and invasion by agrimonolide via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Modern Oncol*, 2024, 32(4): 589-595. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2024.04.001.
- [12] 周广, 代小燕. Wnt10a及Wnt/ β -catenin信号通路促进宫颈癌细胞增殖及其机制研究. *现代肿瘤医学*, 2024, 32(11): 1978-1983. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2024.11.005.
- [12] ZHOU G, DAI X Y. Wnt10a and Wnt/ β -catenin signaling pathway promote the proliferation of cervical cancer cells and its mechanism. *J Modern Oncol*, 2024, 32(11): 1978-1983. doi: 10.3969/j.issn.1672-4992.2024.11.005.
- [13] SUN Y, JIANG H, PAN L, et al. LncRNA OIP5-AS1/miR-410-3p/Wnt7b axis promotes the proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via regulating the Wnt/ β -catenin pathway. *Autoimmunity*, 2023, 56(1): 2189136. doi: 10.1080/08916934.2023.2189136.
- [14] LERNER A, NEIDHÖFER S, REUTER S, et al. MMP3 is a reliable marker for disease activity, radiological monitoring, disease outcome

- predictability, and therapeutic response in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2018, 32(4): 550-562. doi: 10.1016/j.berh.2019.01.006.
- [15] SU Y, WU Z, LIU Y, *et al.* Increased m6A RNA methylation and METTL3 expression may contribute to the synovitis progression of rheumatoid arthritis. *Exp Cell Res*, 2024, 442(2): 114237. doi: 10.1016/j.yexcr.2024.114237.
- [16] SHARMA R, KAUR G, BANSAL P, *et al.* Bioinformatics paradigms in drug discovery and drug development. *Curr Top Med Chem*, 2023, 23(7): 579-588. doi: 10.2174/1568026623666221229113456.
- [17] SAMANTRAY D, TANWAR A S, MURALI T S, *et al.* A comprehensive bioinformatics resource guide for genome-based antimicrobial resistance studies. *OMICS*, 2023, 27(10): 445-460. doi: 10.1089/omi.2023.0140.
- [18] RATHER M A, AGARWAL D, BHAT T A, *et al.* Bioinformatics approaches and big data analytics opportunities in improving fisheries and aquaculture. *Int J Biol Macromol*, 2023, 233: 123549. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123549.
- [19] NIU C, ZHANG P, ZHANG L, *et al.* Molecular targets and mechanisms of Guanxinling tablet in treating atherosclerosis: network pharmacology and molecular docking analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(39): e35106. doi: 10.1097/MD.00000000000035106.
- [20] GUO J, MEI Z W, WANG X J, *et al.* Molecular docking and network pharmacological analysis of *Scutellaria baicalensis* against renal cell carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2023, 27(23): 11574-11586. doi: 10.26355/eurrev_202312_34596.
- [21] HUANG Y, PENG Y, LI H, *et al.* Wilforine inhibits rheumatoid arthritis pathology through the Wnt11/ β -catenin signaling pathway axis. *Arthritis Res Ther*, 2023, 25(1): 243. doi: 10.1186/s13075-023-03224-2.
- [22] 王玉亭, 吴雅婕, 黄玉蓉, 等. 基于METTL3-SFRP4/Wnt/ β -catenin通路探讨黄芩清热除痹胶囊改善类风湿性关节炎的机制. *中国中药杂志*, 2024, 49(11): 3081-3094. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20240229.501.
- WANG Y T, WU Y J, HUANG Y R, *et al.* Mechanism of Huangqin Qingre Chubi Capsules in improving rheumatoid arthritis based on METTL3-SFRP4/Wnt/ β -catenin pathway. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2024, 49(11): 3081-3094. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20240229.501.
- [23] WANG X, ZHOU D, ZHOU W, *et al.* Clematichinenoside AR inhibits the pathology of rheumatoid arthritis by blocking the circPTN/miR-145-5p/FZD4 signal axis. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109376. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109376.
- [24] WANG X, CHANG J, ZHOU G, *et al.* The traditional Chinese medicine compound Huangqin Qingre Chubi Capsule inhibits the pathogenesis of rheumatoid arthritis through the CUL4B/Wnt pathway. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 750233. doi: 10.3389/fphar.2021.750233.
- [25] LI C, XUE Q, LI H, *et al.* Huangqin Qingre Chubi Capsule improves rheumatoid arthritis accompanied depression through the Wnt1/ β -catenin signaling pathway. *Int Immunopharmacol*, 2024, 138: 112474. doi: 10.1016/j.intimp.2024.112474.
- [26] HUANG Y, XU P, LIAO F, *et al.* Fat mass and obesity-associated protein inhibit the pathology of rheumatoid arthritis through the NSUN2/SFRP1/Wnt/ β -catenin signal axis. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(3): 283-294. doi: 10.1093/jpp/rgae003.
- [27] GRAVALLESE E M, FIRESTEIN G S. Rheumatoid arthritis - Common origins, divergent mechanisms. *N Engl J Med*, 2023, 388(6): 529-542. doi: 10.1056/NEJMr2103726.
- [28] VENETSANOPOULOU A I, ALAMANOS Y, VOULGARIS P V, *et al.* Epidemiology of rheumatoid arthritis: genetic and environmental influences. *Expert Rev Clin Immunol*, 2022, 18(9): 923-931. doi: 10.1080/1744666X.2022.2106970.
- [29] 万磊, 刘健, 黄传兵, 等. 不同免疫细胞亚群引起的炎症参与类风湿性关节炎骨破坏. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(11): 1026-1031. doi: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009103.
- WAN L, LIU J, HUANG C B, *et al.* Inflammation caused by different immune cell subsets is involved in bone destruction of rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2020, 36(11): 1026-1031. doi: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009103.
- [30] SCHERER H U, HÄUPL T, BURMESTER G R. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102400. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102400.
- [31] JANG S, KWON E J, LEE J J. Rheumatoid arthritis: pathogenic roles of diverse immune cells. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 905. doi: 10.3390/ijms23020905.
- [32] WANG R, CHEN X, GONG S, *et al.* Interpreting the pharmacological mechanisms of Juanbi recipe on rheumatoid arthritis through network pharmacology, molecular docking. *Ann Jt*, 2024, 9: 23. doi: 10.21037/aoj-23-72.
- [33] 李舒, 万磊, 刘健, 等. circCBLB抑制类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞增殖促进细胞凋亡并增加抗炎细胞因子水平. *细胞与分子免疫学杂志*, 2024, 40(2): 106-113. doi: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009819.
- LI S, WAN L, LIU J, *et al.* Circular RNA Cbl proto-oncogene B (circCBLB) inhibits proliferation, promotes apoptosis, and increases anti-inflammatory cytokine levels of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2024, 40(2): 106-113. doi: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009819.
- [34] TSALTSKAN V, FIRESTEIN G S. Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol*, 2022, 67: 102304. doi: 10.1016/j.coph.2022.102304.
- [35] MIYOSHI M, LIU S. Collagen-induced arthritis models. *Methods Mol Biol*, 2018, 1868: 3-7. doi: 10.1007/978-1-0716-3682-4_1.
- [36] 薛秋云, 黄玉蓉, 李慧, 等. 催乳颗粒通过分泌Frizzled相关蛋白2-Wnt/ β -catenin信号通路改善大鼠产后缺乳. *四川大学学报(医学版)*, 2024, 55(3): 619-629. doi: 10.12182/20240506201.
- XUE Q Y, HUANG Y R, LI H, *et al.* Cuiru Keli Improves Postpartum Hypogalactia in Rats Through Secreted Frizzled-Related Protein 2-Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2024, 55(3): 619-629. doi: 10.12182/20240506201.
- [37] LIU J, XIAO Q, XIAO J, *et al.* Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3. doi: 10.1038/s41392-021-00762-6.
- [38] YAZICI Y, McALINDON T E, GIBOFSKY A, *et al.* Lorecivint, a novel intraarticular CDC-like kinase 2 and dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A inhibitor and Wnt pathway modulator for the treatment of knee osteoarthritis: a phase II randomized trial. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(10): 1694-1706. doi: 10.1002/art.41315.
- [39] PRAJAPATI P, DOSHI G. An update on the emerging role of Wnt/ β -catenin, SYK, PI3K/AKT, and GM-CSF signaling pathways in rheumatoid arthritis. *Curr Drug Targets*, 2023, 24(17): 1298-1316. doi: 10.2174/0113894501276093231206064243.
- [40] LAWSON L Y, BRODT M D, MIGOTSKY N, *et al.* Osteoblast-specific Wnt secretion is required for skeletal homeostasis and loading-induced bone formation in adult mice. *J Bone Miner Res*, 2022, 37(1): 108-120. doi: 10.1002/jbmr.4445.

(2025-01-13收稿, 2025-08-26修回)

编辑 余琳



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*