

基于质谱技术分析补骨颗粒对软骨细胞蛋白质组学的影响

余光书¹, 林焱斌¹, 许宏滨², 李杰辉², 张寿雄²

【摘要】目的: 通过定量观察补骨颗粒对大鼠膝关节软骨细胞蛋白质表达的影响, 探讨补肾活血中药对软骨细胞的作用机制。方法: 将软骨细胞经补骨颗粒含药血清传代培养后通过定量蛋白质组学串联质谱标签标记技术进行检测, 使用 Maxquant (v1.5.2.8) 进行检索。选择 UniProt-GOA 数据库注释工具对差异蛋白进行基因功能聚类 GO 分析; 采用 KEGG 在线服务工具 KAAS 对提交的蛋白进行注释, 之后通过 KEGG mapper 将注释过的蛋白匹配入数据库相应的通路中进行检索分析; 使用预测亚细胞定位的软件 wolfsort 对所提交的蛋白进行亚细胞定位注释。结果: 通过数据库检索, 补骨颗粒含药血清及空白血清干预软骨细胞后共鉴定到 5028 个蛋白质, 包含 25 423 个肽段, 其中 4297 个蛋白质包含定量信息。以 1.3 倍为变化阈值, t 检验中 $P < 0.05$ 为标准, 空白血清组中 163 个蛋白表达发生上调, 188 个蛋白表达发生下调; 补骨颗粒含药血清干预后有 164 个蛋白表达发生上调, 58 个蛋白表达发生下调。其中, 具有生物学信息的目标差异蛋白有腺苷酸转位酶 1、热休克蛋白 27、肌浆/内质网钙 ATP 酶 1、钠/钾转运 ATP 酶、果糖二磷酸醛缩酶 A、3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸变位酶 1、 β -烯醇化酶、L-乳酸脱氢酶、糖原合成酶、肉碱棕榈酰转移酶 1。结论: 补骨颗粒能够影响软骨细胞的腺苷酸转位酶 1、热休克蛋白 27、醛缩酶 A、 β -烯醇化酶及肉碱棕榈酰转移酶 1 等表达, 对于揭示软骨细胞的凋亡机制具有重要意义。

【关键词】 补骨颗粒; 蛋白质组学; 含药血清; 软骨细胞; 细胞凋亡; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.2095-4174.2019.09.001

Analysis of Proteomic Effects of Bugu Keli (补骨颗粒) on Chondrocyte Protein Based on Mass Spectrometry
YU Guang-shu, LIN Yan-bin, XU Hong-bin, LI Jie-hui, ZHANG Shou-xiong

【ABSTRACT】 Objective: By quantitatively observing the effects of Bugu Keli (补骨颗粒) on the expression of protein in knee joint chondrocyte of rats, to explore the mechanism of medicinals of nourishing kidney and activating the circulation of blood. Methods: Chondrocytes were subcultured in medicated serum with Bugu Keli and detected by quantitative proteomics tandem mass spectrometry tagging technology. Maxquant (v1.5.2.8) was used to retrieve. UniProt-GOA database annotation tool was selected to perform gene function clustering GO analysis of differentially expressed proteins; KEGG online service tool KAAS was used to annotate the submitted proteins, and then KEGG mapper was used to match the annotated proteins into the corresponding pathways in the database for retrieval and analysis. Wolfps was used to predict subcellular localization. Results: A total of 5028 proteins, including 25 423 peptide segments were identified after the intervention of medicated serum

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2016J01597); 福州市科技计划项目 (2017-S-130-5)

作者单位: 1. 厦门大学附属福州第二医院, 福建 福州 350007; 2. 福建中医药大学, 福建 福州 350122

通信作者: 林焱斌 福建省福州市仓山区上藤路 47 号, 812953900@qq.com, 13960743906

and blank serum on chondrocyte. Among them, 4297 proteins contained quantitative information. With 1.3 times as the change threshold and $P < 0.05$ as the standard in the t test, 163 protein expressions were up-regulated and 188 protein expressions were

down-regulated in the blank serum group. One hundred and sixty-four protein expressions were up-regulated and 58 protein expressions were down-regulated after the intervention of the drug-containing serum. Among them, the target differential proteins with biological information are adenylate translocatase 1, heat shock protein 27, Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1, sodium/potassium transporter ATPase, fructose diphosphate aldolase A, 3-phosphate glyceraldehyde dehydrogenase, phosphoglycerol mutase 1, β -enolase, L-lactate dehydrogenase, glycogen synthase, and carnitine palmitoyltransferase 1. **Conclusion:** Bugu Keli can affect the expression of adenylate transposase 1, heat shock protein 27, aldolase A, β -enolase and carnitine palmitoyltransferase 1 in chondrocyte, which is of great significance in revealing the apoptotic mechanism of chondrocyte.

【Keywords】 Bugu Keli (补骨颗粒); proteomics; medicated serum; chondrocyte; apoptosis; rats

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种以膝关节软骨退行性变为主要病理特征的慢性骨关节疾病。目前有研究认为, 软骨细胞的代谢紊乱、衰老及凋亡是 KOA 的主要发病机制, 阻止或延缓软骨细胞凋亡是防治骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 的有效途径; 但是具体作用机制仍不明确, 也缺乏特效治疗药物^[1-2]。近年来, 随着细胞衰老及凋亡机制研究的不断深入, 以及蛋白质组学的不断发展, 应用蛋白质组学技术研究疾病机制越来越受到重视。其中串联质谱标签 (TMT) 是目前主流的定量蛋白标记技术, 不仅定量结果重复性高, 而且可以定位线粒体蛋白、膜蛋白和核蛋白等, 是目前研究疾病发生机制的重要手段。笔者基于既往临床观察发现, 补骨颗粒能够有效预防 KOA 发展进程, 因此拟应用串联质谱技术分析补骨颗粒对软骨细胞的作用机制, 以期为进一步研究 OA 的防治机制提供参考。

1 实验材料

1.1 实验动物 成年清洁型 SD 大鼠 40 只, 体重 (180 ± 20) g, 雌雄各半, 动物许可证号 SCXK 2016-0002, 由福建医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验试剂及药物 胶原酶 (编号 C8150) (北京市普京康利科技有限公司); DMEM 培养基 (编号 180-500)、质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶 (编号 TE2004Y)、胎牛血清 (编号 TBD11HT) (北京孚博生物科技有限公司); 软骨细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 补骨颗粒 (厦门大学附属福州第二医院药剂科)。

2 方法

2.1 药物制备 补骨颗粒药物组成: 骨碎补 20 g、

鹿衔草 12 g、淫羊藿 12 g、潞党参 15 g、茯苓 20 g、三七 3 g、川牛膝 9 g、当归 9 g、川芎 6 g、女贞子 15 g、枸杞子 9 g、生地黄 15 g、甘草 3 g。原药材由四川新绿色药业科技发展有限公司提供, 厦门大学附属福州第二医院药剂科负责加工制备, 每克颗粒药含原生药 9.8 g, 生理盐水加热溶解使用。

2.2 含药血清的制备 将 40 只成年 SD 大鼠随机分为空白血清组和含药血清组, 每组 20 只。按成人与大鼠体表面积折算的等效剂量比值 (系数为 6.25) 换算用量, 空白血清组予生理盐水 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, 含药血清组予补骨颗粒 $3.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃, 在灌胃时将补骨颗粒用生理盐水加热溶解成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水溶液, 每日 1 次, 连续 14 d。末次给药 2 h 后处死大鼠, 并在无菌条件下腹主动脉采血 5 mL, 静置 2 h, 低温 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后分离血清, 于 56°C 恒温水浴灭活 30 min, -80°C 冰箱保存。

2.3 软骨细胞的培养 取第 3 代 SD 大鼠软骨细胞, 消化后接种于培养皿, 置于 37°C , 体积分数为 5% 的 CO_2 恒温培养箱培养至贴壁, 更换含血清培养基, 设空白血清组及质量分数为 20% 的含药血清组^[3], 于 37°C , 体积分数为 5% 的 CO_2 恒温培养箱继续孵育, 直至铺满培养皿。

2.4 蛋白质提取、消化和 TMT 肽段标记 收集空白血清组软骨细胞及质量分数为 20% 的含药血清组软骨细胞, 分别加入 4 倍体积裂解缓冲液, 经超声裂解后于 4°C 环境下的离心机中以 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 将上清液转移至新的离心管中。往上清液中加入二硫苏糖醇至其浓度改变为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并于 56°C 热水浴中还原 30 min, 然后加入碘代乙

酰胺调整浓度为 $11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在室温避光条件下孵育 15 min, 并将溶液中的尿素浓度稀释至低于 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以 1 : 50 (胰酶 : 蛋白) 的质量比例加入胰酶, 于 37°C 环境下酶解过夜; 然后以 1 : 100 的质量比例加入胰酶, 继续于 37°C 环境下酶解 4 h。待试剂解冻后用乙腈溶解, 并与肽段混合后置于条件下室温孵育 2 h, 经除盐后将标记的肽段真空冷冻干燥保存。

2.5 HPLC 分级与液相色谱 - 质谱联用分析 应用高 pH 反向 HPLC 法分级肽段, 将分级梯度设置为 8% ~ 32% 乙腈, pH 调整为 9, 在 60 min 内分离为 60 个组分, 然后将其合并为 18 个组分, 经真空冷冻干燥后用液相色谱流动相 A 溶解后使用 EASY-nLC 1000 超高效液相系统进行分离。流动相 A 为含体积分数为 0.1% 的甲酸和体积分数为 2% 的乙腈水溶液; 流动相 B 为含体积分数为 0.1% 的甲酸和 90% 的乙腈水溶液。液相梯度设置: 0 ~ 26 min, 9% ~ 25% B; 26 ~ 34 min, 25% ~ 36% B; 34 ~ 37 min, 36% ~ 80% B; 37 ~ 40 min, 80% B, 流速维持在 $700 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。将分离后的肽段注入 NSI 离子源中进行电离, 然后进行 Q Exactive TM 质谱分析。

2.6 数据库搜索及生物信息学分析 应用 Maxquant (v1.5.2.8) 软件检索 Proteome Rat 数据库中的二级质谱数据, 其中酶切方式设置为 Trypsin/P, 漏切位点数设为 2, 肽段最小长度设置为 7 个氨基酸残基, 肽段最大修饰数设为 5。选择 UniProt-GOA 数据库注释工具对差异蛋白进行基因功能聚类 GO 分析。采用 KEGG 在线服务工具 KAAS 对提交的蛋白进行注释, 然后通过 KEGG mapper 将注释过的蛋白匹配入数据库相应的通路中; 使用预测亚细胞定位的软件 wolfsort 对所提交的蛋白进行亚细胞定位注释。

3 结果

3.1 蛋白质组鉴定结果 通过数据库检索, 补骨颗粒含药血清及空白血清干预软骨细胞后共鉴定到 5028 个蛋白质, 包含 25 423 个肽段, 其中 4297 个蛋白质包含定量信息。以 1.3 倍为变化阈值, t 检验以 $P < 0.05$ 为标准, 空白血清组中 163 个蛋白表达发生上调, 188 个蛋白表达发生下调; 补骨颗粒含药血清干预后有 164 个蛋白表达发生上调,

58 个蛋白表达发生下调。

3.2 生物信息学分析 基因本论 (Gene Ontology, GO) 是对生物过程 (biological process)、细胞位置 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 进行分类。在发生变化的 222 个蛋白中主要参与生物过程的有 13 种, 其主要为单生物过程 (15%)、细胞过程 (15%)、生物调节 (12%)、代谢过程 (10%) 及应激反应 (9%); 细胞位置 9 个, 所占比例较高的前 5 个是细胞质 (27%)、细胞器 (23%)、细胞溶质 (14%)、细胞膜 (13%) 及蛋白质复合体 (9%); 分子功能有 8 个, 其中占比例较高的有离子结合 (54%)、激酶活性 (25%)、分子活性 (6%)、转运活性 (5%) 与分子功能调节剂 (3%)。

使用 wolfsort 软件对差异表达蛋白进行亚细胞结构的预测和分类发现, 细胞质中占 34%, 胞外基质中占 23%, 细胞核中占 19%, 线粒体中占 10%, 胞膜中占 9%。通过 KEGG 代谢通路分析表明, 差异蛋白共参与 198 个信号转导通路, 其中排名前 5 位的代谢通路为糖酵解通路 (5.73%)、碳代谢通路 (5.18%)、氨基酸的生物合成通路 (4.94%)、淀粉和蔗糖代谢通路 (3.96%)、内质网蛋白加工通路 (3.46%)。

根据差异蛋白的表达量、分子功能、代谢通路和网络通路, 筛选出 41 个差异蛋白, 主要分为氧化还原酶、水解酶、裂解酶、转移酶、异构酶、大亚基结合蛋白、热休克蛋白等类别, 其中筛选出的目标差异蛋白有腺苷酸转位酶 1 (ANT1)、热休克蛋白 27 (HSP27)、肌浆 / 内质网钙 ATP 酶 1、钠 / 钾转运 ATP 酶、果糖二磷酸醛缩酶 A、3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸变位酶 1、 β -烯醇化酶、L-乳酸脱氢酶、糖原合成酶、肉碱棕榈酰转移酶 1, 可能参与其中的蛋白有肌球蛋白调节轻链 2、碳酸酐酶 1、碳酸酐酶 2、肌酸激酶 S 型、肌酸激酶 M 型、血管紧张素转换酶、超氧化物歧化酶、苹果酸脱氢酶、细胞色素 b-c1 复合物及琥珀酸脱氢酶复合物等。见表 1。

4 讨论

OA 属中医学“痹证”范畴, 外因多归于风、寒、湿三邪侵袭, 内因多为肝肾亏损。中老年以后多有肝肾亏损, 肝虚则血不养筋, 筋不能维持骨

表 1 差异蛋白的基本信息

检索号	蛋白质名称	基因名称	比值	等电点 (kDa)	覆盖率 (%)	类型	KEGG 通路
Q6P9Y4	ANT1	Ptp4a2	1.462	32.904	35.6	Up	cGMP-PKG 信号通路
G3V913	HSP27	Hspb1	1.453	22.807	24.3	Up	MAPK 信号通路
Q64578	肌浆 / 内质网钙 ATP 酶 1	Atp2a1	2.782	109.410	25.8	Up	cGMP-PKG 信号通路
P06686	钠 / 钾转运 ATP 酶	Atp1a2	2.153	112.220	16.8	Up	cGMP-PKG 信号通路
P05065	果糖二磷酸醛缩酶 A	Aldoa	1.906	39.351	43.1	Up	HIF-1 信号通路
D3ZDK7	3- 磷酸甘油醛脱氢酶	Pgp	1.458	34.600	12.5	Up	HIF-1 信号通路
P25113	磷酸甘油酸变位酶 1	Pgam1	1.302	28.832	29.9	Up	Glucagon 信号通路
P15429	β - 烯醇化酶	Eno3	3.733	47.013	19.1	Up	HIF-1 信号通路
P04642	L- 乳酸脱氢酶	Ldha	1.476	36.450	25.0	Up	HIF-1 信号通路
A2RRU1	糖原合成酶	Gys1	1.757	84.071	8.3	Up	AMPK 信号通路
Q63704	肉碱棕榈酰转移酶 1	Cpt1b	1.762	88.216	5.1	Up	AMPK 信号通路
P04466	肌球蛋白调节轻链 2	Mylpf	3.171	18.969	77.5	Up	-
B0BNN3	碳酸酐酶 1	Ca1	1.853	28.299	33.7	Up	-
P27139	碳酸酐酶 2	Ca2	2.132	29.113	20.8	Up	-
P09605	肌酸激酶 S 型	Ckmt2	2.543	47.385	18.6	Up	-
A0A0G2JSP8	肌酸激酶 M 型	Ckm	4.077	43.018	35.7	Up	-
P47820	血管紧张素转换酶	Ace	1.378	150.910	5.3	Up	-
P07632	超氧化物歧化酶	Sod1	1.336	15.911	27.9	Up	-
D3ZJH9	苹果酸脱氢酶	Me2	0.932	65.351	12.7	Up	-
B2RYS2	细胞色素 b-c1 复合物	Uqcrb	1.202	13.558	34.2	Up	-
P21913	琥珀酸脱氢酶复合物	Sdhb	0.985	31.830	17.7	Up	-

节之张弛而关节失滑利；肾虚则髓减，致使筋骨均失所养，骨赘形成，关节囊纤维变性和增厚，限制关节的活动；在外邪的作用下，关节周围的肌肉因疼痛而产生保护性痉挛，使关节活动进一步受到限制，增加了退行性变的进程，关节发生纤维性强直。所以治疗上以补益肝肾、强筋壮骨为主，同时结合老年患者多瘀的特点而辅以活血化瘀中药。基于此，笔者既往选用补骨颗粒治疗肾虚血瘀型老年性 OA，取得了较好疗效^[4]。但是，目前仍缺乏补骨颗粒治疗 OA 的具体作用机制，笔者拟通过蛋白质组学方法从整体蛋白质表达的水平上阐明 OA 肾虚血瘀发生的本质，从而寻找补肾活血方药的作用靶点。

现代药理学研究表明，补骨颗粒中骨碎补、淫羊藿、鹿衔草、三七、当归、川芎等补肾活血中药含有的异补骨脂素、淫羊藿苷、蛇床子素等可以促进成骨细胞的增殖、抑制破骨细胞的吸收及炎症因子的表达，对防治 OA 疼痛及退行性变具有重要作用^[5-7]。笔者在此基础上应用串联质谱技术分析补骨颗粒复方对软骨细胞的整体蛋白质表达情况，发现补骨颗粒能够促进软骨细胞中 ANT1、HSP27

及糖酵解过程相关酶等的表达，这对进一步研究 KOA 发病机制提供了重要线索。

ANT1 是线粒体内膜的重要腺苷酸载体，是构成线粒体通透性转运孔道的主要成分，在调控线粒体内 ATP 协调变化及细胞凋亡方面有着重要意义^[8-9]。有文献报道，当机体处于缺氧环境时，可以通过 ANT1 表达减少活性氧的产生起到保护作用^[10-11]，并且 ANT1 可以降低胰岛素抵抗现象，对代谢性疾病具有重要的防护作用^[12]。通过蛋白质组学研究发现，补骨颗粒干预后软骨细胞内的 ANT1 表达将明显增多，这或许与党参、茯苓、三七及当归等药物有关^[13-15]；但是补骨颗粒的成分复杂，需要今后进一步的药理学研究。

HSP27 属于低分子量热休克蛋白家族之一，具有阻止应激因素引起损伤细胞的作用。在缺血、缺氧等条件下 HSP27 表达量将增加，并发生磷酸化与其他蛋白相互作用，在细胞的抗凋亡过程中起促进作用^[16-17]。线粒体是细胞内发生氧化磷酸化的细胞器，也是介导细胞凋亡通路的重要场所，有文献报道 HSP27 将会抑制线粒体内氧化酶活性而降低细胞中活性氧水平，从而抑制线粒体凋亡相

关蛋白的表达,在抑制细胞凋亡方面具有重要意义^[18]。补骨颗粒中的骨碎补、淫羊藿、鹿衔草等补益肝肾中药可以促进成骨细胞的增殖、抑制破骨细胞的吸收^[6-7],三七、当归等活血药物可以通过调控线粒体信号通路控制细胞的凋亡^[14-15],这些药物合用起到抑制软骨细胞凋亡的作用;同时笔者研究也发现,补骨颗粒能够促进HSP27的表达,因此补骨颗粒可能通过HSP27表达以对抗氧化应激的保护作用而抑制软骨细胞凋亡^[19]。

糖酵解过程是细胞获取能量的最重要过程,其中醛缩酶A、3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸变位酶1、 β -烯醇化酶、L-乳酸脱氢酶、肉碱棕榈酰转移酶1等是糖酵解过程的重要催化酶类。笔者通过补骨颗粒含药血清干预软骨细胞后发现,这些酶类的表达较前明显增加,这或许与党参、茯苓等补气健脾中药可以提高抗氧化酶的活性、抑制脂质过氧化物的产生及增强运动能力等有关^[13]。另外,糖酵解酶除了影响能量生成,还对细胞的缺氧环境具有一定的调控作用^[20],可以通过增强糖酵解过程触发血管内皮生长因子生成及促进肌动蛋白丝束形成等而促进细胞增殖、分化及迁移^[21],这或许与三七、当归等活血药物调控细胞的相关信号通路有关^[14-15],但仍需今后进一步的研究。

综上所述,本实验通过iTRAQ定量蛋白质组学技术分析补骨颗粒对软骨细胞蛋白质表达的影响,对于揭示软骨细胞的凋亡机制具有重要意义。另外,研究还发现了可能与软骨细胞凋亡相关的蛋白质有ANT1、HSP27、醛缩酶A、 β -烯醇化酶及肉碱棕榈酰转移酶1等,为KOA发病机制的研究提供了重要线索。

5 参考文献

[1] WANG GL,WU YB,LIU JT,et al.Upregulation of miR-98 Inhibits Apoptosis in Cartilage Cells in Osteoarthritis [J]. Genet Test Mol Biomarkers,2016,20 (11) :645-653.

[2] GONÇALVES FB,ROCHA FA,ALBUQUERQUE RP,et al.Reproducibility assessment of different descriptions of the Kellgren and Lawrence classification for osteoarthritis of the knee [J]. Rev Bras Ortop,2016,51 (6) :687-691.

[3] 秦梦,王和鸣,姜玉铃.不同浓度骨痛舒片含药血清对体外培养软骨细胞增殖的影响[J].中国骨

伤,2011,24 (10) :841-844.

[4] 余光书,乐立盛,卓杰,等.补骨颗粒治疗骨关节炎慢性疼痛的机制研究[J].风湿病与关节炎,2019,8 (3) :33-37.

[5] SUN D,YAN Q,XU X,et al.LC-MS/MS analysis and evaluation of the anti-inflammatory activity of components from BushenHuoxue decoction [J]. Pharm Biol,2017,55 (1) :937-945.

[6] LI F,SUN X,MA J,et al.Naringin prevents ovariectomy-induced osteoporosis and promotes osteoclasts apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun,2014,452 (3) :629-635.

[7] PAN L,ZHANG Y,CHEN N,et al.Icariin Regulates Cellular Functions and Gene Expression of Osteoarthritis Patient-Derived Human Fibroblast-Like Synoviocytes [J]. Int J Mol Sci,2017,18 (12) :2656.

[8] CARDOUAT G,DUPARC T,FRIED S,et al.Ectopic adenine nucleotide translocase activity controls extracellular ADP levels and regulates the F₁-ATPase-mediated HDL endocytosis pathway on hepatocytes [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids,2017,1862 (9) :832-841.

[9] LI J,YAN Z,FANG Q.A Mechanism Study Underlying the Protective Effects of Cyclosporine-A on Lung Ischemia-Reperfusion Injury [J]. Pharmacology,2017,100 (1-2) :83-90.

[10] KLUMPE I,SAVVATIS K,WESTERMANN D,et al. Transgenic overexpression of adenine nucleotide translocase 1 protects ischemic hearts against oxidative stress [J]. J Mol Med (Berl),2016,94 (6) :645-653.

[11] WINTER J,KLUMPE IA,HEGER J,et al. Adenine nucleotide translocase 1 overexpression protects cardiomyocytes against hypoxia via increased ERK1/2 and AKT activation [J]. Cell Signal,2016,28 (1) :152-159.

[12] KENNY HC,RUDWILL F,BREEN L,et al. Bed rest and resistive vibration exercise unveil novel links between skeletal muscle mitochondrial function and insulin resistance [J]. Diabetologia,2017,60 (8) :1491-1501.

[13] ZHENG YS,WU ZS,NI HB,et al. Codonopsis pilosula polysaccharide attenuates cecal ligation and puncture sepsis via circuiting regulatory T cells in mice [J].

(下转第35页)

- 疗类风湿关节炎临床研究 [J] . 大众科技 ,2016,18 (8) :71-73,78.
- [12] 吴利群,蔡辉,于德勇,等.独活寄生汤加减治疗类风湿性关节炎的有效性探讨 [J] . 辽宁中医杂志,2010,37 (10) :1873-1874.
- [13] 郭乃亮,王伟.独活寄生汤联合甲氨蝶呤片治疗类风湿关节炎的临床疗效 [J] . 世界中医药,2018,13 (6) :1405-1408.
- [14] 张文举,杨豪,黄金承,等.独活寄生汤联合来氟米特治疗肝肾亏虚型类风湿关节炎 30 例 [J] . 风湿病与关节炎,2013,2 (9) :24-26.
- [15] 姜玲.独活寄生汤联合柳氮磺吡啶治疗类风湿性关节炎 40 例疗效观察 [J] . 浙江中医杂志,2014,49 (10) :738.
- [16] 喻萍,陈勇.独活寄生汤联合美洛昔康治疗类风湿性关节炎的临床研究 [J] . 现代中西医结合杂志,2015,24 (23) :2560-2562.
- [17] 陈倩倩.独活寄生汤联合美洛昔康治疗类风湿性关节炎临床研究 [J] . 辽宁中医药大学学报,2017,19 (5) :203-206.
- [18] 于建伟,刘福东,张万标.中西医结合治疗类风湿性关节炎 46 例临床疗效观察 [J] . 中国民族民间医药,2014,11 (23) :56-57.
- [19] 黄琳.加味独活寄生汤治疗类风湿性关节炎临床疗效观察 [J] . 亚太传统医药,2012,8 (8) :63-65.
- [20] 宋维海,代晶.独活寄生汤治疗活动期类风湿性关节炎临床观察 [J] . 四川中医,2016,34 (11) :112-114.
- [21] 曾宪祥.中西医结合治疗类风湿性关节炎的临床疗效分析 [J] . 中国医药指南,2012,10 (34) :608-609.
- [22] 向小乾,汲泓.独活寄生汤联合西药治疗类风湿性关节炎随机平行对照研究 [J] . 实用中医内科杂志,2012,26 (2) :48-49.
- [23] 邹里彬.独活寄生汤联合西药治疗活动期类风湿性关节炎 68 例 [J] . 陕西中医,2014,35 (7) :870-871.
- [24] 张可成.独活寄生汤治疗类风湿性关节炎 75 例临床研究 [J] . 亚太传统医药,2015,11 (10) :137-138.
- [25] 黎威.独活寄生汤治疗类风湿性关节炎 58 例 [J] . 辽宁医学院学报,2009,30 (3) :240.
- [26] 陈勉杰.独活寄生汤联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎 47 例 [J] . 中医研究,2013,26 (9) :20-21.
- [27] 姜海涛.中西医结合治疗类风湿性关节炎 36 例疗效分析 [J] . 吉林医学,2010,31 (18) :2862.
- [28] 陈立山,秦来昌,王元林.中西医结合治疗类风湿性关节炎 80 例临床观察 [J] . 中国实用医药,2009,4 (34) :141-142.
- [29] 张矿军,唐子惠,吴金玉.独活寄生汤联合硫酸羟氯喹治疗类风湿性关节炎 67 例疗效观察 [J] . 中国现代药物应用,2015,9 (7) :107-108.
- [30] 杨榆娟,杨嵩林.中西医结合治疗类风湿性关节炎疗效分析 [J] . 医学理论与实践,2012,25 (12) :1467-1468.

收稿日期:2019-03-13;修回日期:2019-05-31

(上接第9页)

- Shock,2014,41 (3) :250-255.
- [14] ZHOU L,ZHOU C,FENG Z,et al.Triptolide-induced hepatotoxicity can be alleviated when combined with Panax notoginseng saponins and Catapol [J] . J Ethnopharmacol,2018,214 (1) :232-239.
- [15] ZHUANG C,XU NW,GAO GM,et al.Polysaccharide from Angelica sinensis protects chondrocytes from H₂O₂-induced apoptosis through its antioxidant effects in vitro [J] . Int J Biol Macromol,2016,87 (6) :322-328.
- [16] XIONG B,LI M,XIANG S,et al.A1AR-mediated renal protection against ischemia/reperfusion injury is dependent on HSP27 induction [J] . Int Urol Nephrol,2018,50 (7) :1355-1363.
- [17] HE K,XIA L,ZHANG J,et al.LPS ameliorates renal ischemia/reperfusion injury via HSP27 up-regulation [J] . Int Urol Nephrol,2018,50 (3) :571-580.
- [18] ZHANG HL,JIA KY,Sun D,et al.Protective effect of HSP27 in atherosclerosis and coronary heart disease by inhibiting reactive oxygen species [J] . J Cell Biochem,2019,120 (3) :2859-2868.
- [19] ZOU S,LIAO M,YANG J,et al.Heat shock protein 27 plays a protective role in thoracic aortic dissection by promoting cell proliferation and inhibiting apoptosis [J] . Cell Mol Biol Lett,2017,22 (1) :24-28.
- [20] WEN YA,ZHOU BW,LV DJ,et al.Phosphoglycerate mutase 1 knockdown inhibits prostate cancer cell growth,migration,and invasion [J] . Asian J Androl,2018,20 (2) :178-183.
- [21] ZHANG D,JIN N,SUN W,et al.Phosphoglycerate mutase 1 promotes cancer cell migration independent of its metabolic activity [J] . Oncogene,2017,36 (20) :2900-2909.

收稿日期:2019-02-09;修回日期:2019-05-11