Open Access
DOI:10.3724/zdxbyxb-2025-0685

炎症性疾病

·专题报道·

黄芩清热除痹胶囊抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞炎症及增殖的机制

胡月迪，刘　健

安徽中医药大学第一附属医院风湿一科，安徽 合肥 230031

［摘　要］ **目的：**明确烷基化修复同源蛋白5（ALKBH5）/环状RNA0091685（circ_0091685）/真核起始因子4A-Ⅲ（eIF4A3）轴在类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞（RA-FLS）中的作用，并探讨黄芩清热除痹胶囊（HQC）是否通过该轴调控RA-FLS炎症及增殖。**方法：**基于基因表达综合数据库（GEO）中的微阵列数据集筛选类风湿关节炎患者与健康人群的差异表达基因，并进行基因本体（GO）、京都基因和基因组数据库（KEGG）富集分析以筛选差异表达基因相关的生物学过程和作用通路。建立外周血单个核细胞和RA-FLS共培养模型，通过过表达或沉默*ALKBH5*、circ_0091685、*EIF4A3*，以及突变circ_0091685的N^6-甲基腺苷（m^6A）位点，验证ALKBH5是否通过介导circ_0091685 m^6A修饰靶向eIF4A3影响RA-FLS炎症及增殖。同时建立佐剂性关节炎大鼠模型，观察HQC对大鼠的影响，并通过HQC含药血清作用于RA-FLS探索ALKBH5/circ_0091685/eIF4A3轴在HQC发挥疗效过程中的作用机制。在体外实验中，采用5-乙炔基-2′-脱氧尿苷（EdU）染色检测细胞增殖能力、酶联免疫吸附试验检测炎症因子水平、逆转录定量聚合酶链反应检测*EIF4A3*和circ_0091685表达水平、蛋白质印迹法检测ALKBH5和eIF4A3表达水平、RNA免疫共沉淀法验证circ_0091685与eIF4A3结合、比色法及RNA甲基化免疫共沉淀–定量聚合酶链反应检测m^6A修饰水平；在体内实验中，采用苏木精–伊红染色、番红O-固绿染色和甲苯胺蓝染色观察大鼠膝关节组织病理变化。**结果：**GEO中，类风湿关节炎患者样本与健康人群样本的前20个差异表达基因包括*ALKBH5*和*EIF4A3*。GO分析显示生物学过程存在甲基化修饰，KEGG分析显示富集通路包括IL-17信号通路等。与*ALKBH5*沉默对照组比较，*ALKBH5*沉默组ALKBH5、circ_0091685、eIF4A3、IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达均减少，EdU相对阳性细胞数减少（均$P<0.01$），而*ALKBH5*过表达组则相反。与*ALKBH5*过表达+circ_0091685

收稿日期（Received）：2025-10-04　修改返回日期（Revised）：2025-12-07　接受日期（Accepted）：2026-01-27　网络预发表日期（Online）：2026-04-08

基金项目（Funding）：国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目（国中医药人教函〔2023〕85号）；安徽省中医药健康服务高质量发展工程中医治疗优势病种（临床循证能力提升）项目（皖财社〔2024〕1359号）；安徽省高校优秀青年骨干教师国外访问研修项目（gxgwfx2021029）

第一作者（First author）：胡月迪，住院医师，主要从事中医药防治风湿病研究；E-mail：yuedihu@foxmail.com；ORCID：0000-0002-3958-5654

通信作者（Corresponding author）：刘　健，主任医师，教授，博士生导师，主要从事中医药防治风湿病研究；E-mail：liujianahzy@126.com；ORCID：0000-0003-3101-7553

对照组比较,*ALKBH5*过表达+circ_0091685突变组炎症因子IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达均显著减少(均$P<0.01$)。RNA免疫共沉淀检测结果显示,circ_0091685可与eIF4A3特异性结合。沉默circ_0091685或*EIF4A3*均能降低细胞中炎症因子IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达水平,EdU相对阳性细胞数减少(均$P<0.01$),而过表达circ_0091685或*EIF4A3*则相反。HQC干预后,佐剂性关节炎大鼠膝关节组织病理有所改善。HQC含药血清干预后,RA-FLS中IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α、ALKBH5、circ_0091685、eIF4A3表达减少且EdU相对阳性细胞数减少(均$P<0.05$),而总RNA m^6A和circ_0091685 m^6A水平升高(均$P<0.05$);在加入HQC含药血清基础上过表达*ALKBH5*能升高IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达水平(均$P<0.01$);在加入HQC含药血清基础上过表达circ_0091685亦能升高IL-6、IL-23、TNF-α表达水平(均$P<0.01$)。此外,加入HQC含药血清或沉默circ_0091685均能降低IL-6、IL-23、TNF-α及eIF4A3表达(均$P<0.01$),表明HQC含药血清和沉默circ_0091685具有协同作用关系。**结论**:HQC通过调控ALKBH5介导的circ_0091685 m^6A修饰靶向eIF4A3抑制RA-FLS炎症及增殖。

[**关键词**] 类风湿关节炎;黄芩清热除痹胶囊;成纤维样滑膜细胞;炎症;增殖;烷基化修复同源蛋白5;circ_0091685;真核起始因子4A-Ⅲ;甲基化修饰;大鼠
[**中图分类号**] R593.22 [**文献标志码**] A

Mechanism of Huangqin Qingre Chubi Capsule in inhibiting inflammation and proliferation of fibroblast-like synoviocyte in rheumatoid arthritis

HU Yuedi, LIU Jian (*Department of Rheumatology and Immunology, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China*)
Corresponding author: LIU Jian, E-mail: liujianahzy@126.com, ORCID: 0000-0003-3101-7553

[**Abstract**] **Objective**: To clarify the role of the ALKBH5/circ_0091685/eIF4A3 axis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte (RA-FLS) and to investigate whether a traditional Chinese medicine preparation Huangqin Qingre Chubi Capsule (HQC) regulates inflammation and proliferation of RA-FLS through this axis. **Methods**: Differentially expressed genes (DEGs) between RA patients and healthy individuals were screened based on microarray datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were performed to identify related biological processes and pathways. A co-culture model of peripheral blood mononuclear cells and RA-FLS was established. Through overexpression or silencing of *ALKBH5*, circ_0091685, and *EIF4A3*, combined with site-directed mutation of the N^6-methyladenosine (m^6A) sites within circ_0091685, we verified whether ALKBH5 targets eIF4A3 by mediating m^6A modification of circ_0091685, thereby affecting RA-FLS inflammation and proliferation. Meanwhile, an adjuvant-induced arthritis rat model was established to observe the therapeutic effects of HQC *in vivo*. Furthermore, HQC-containing serum was applied to RA-FLS to explore the underlying mechanism involving the ALKBH5/circ_0091685/eIF4A3 axis. Cell proliferation was assessed by 5-ethynyl-2′-

deoxyuridine (EdU) staining; inflammatory cytokine levels were measured by ELISA; expression of *EIF4A3* and circ_0091685 was detected by RT-qPCR; protein expression of ALKBH5 and eIF4A3 was analyzed by Western blotting; the binding between circ_0091685 and eIF4A3 was validated by RNA immunoprecipitation (RIP); total RNA m^6A levels and m^6A modification on circ_0091685 were detected by colorimetric assay and methylated RNA immunoprecipitation-qPCR, respectively; and histopathological changes in rat knee joints were observed using hematoxylin and eosin staining, safranin O-fast green staining, and toluidine blue staining. **Results**: *ALKBH5* and *EIF4A3* were among the top 20 DEGs between RA patients and healthy individuals. GO analysis indicated enrichment of methylation-related biological processes, and KEGG analysis identified enriched pathways including the IL-17 signaling pathway. Compared with the *ALKBH5* silencing control group, the *ALKBH5*-silenced group showed decreased expression of ALKBH5, circ_0091685, eIF4A3, reduced levels of IL-6, IL-17A, IL-23 and TNF-α, and a lower relative number of EdU-positive cells (all $P<0.01$), whereas the *ALKBH5* overexpression group exhibited the opposite effects. Compared with the *ALKBH5* overexpression+circ_0091685 control group, the *ALKBH5* overexpression+circ_0091685 mutant group had significantly reduced IL-6, IL-17A, IL-23, and TNF-α levels (all $P<0.01$). RIP assays confirmed that circ_0091685 specifically binds to eIF4A3. Silencing circ_0091685 or *EIF4A3* decreased the levels of IL-6, IL-17A, IL-23 and TNF-α, and reduced the relative number of EdU-positive cells (all $P<0.01$), while overexpressing circ_0091685 or *EIF4A3* produced opposite effects. After HQC intervention, the pathological changes in the knee joints of adjuvant-induced arthritis rats were ameliorated. After treatment with HQC-containing serum, RA-FLS showed decreased expression of IL-6, IL-17A, IL-23, and TNF-α, along with a reduced relative number of EdU-positive cells (all $P<0.05$), as well as downregulated expression of ALKBH5, circ_0091685, and eIF4A3 (all $P<0.05$), while total RNA m^6A and circ_0091685 m^6A levels were elevated (all $P<0.05$). In the presence of HQC-containing serum, overexpression of *ALKBH5* significantly upregulated the expression of IL-6, IL-17A, IL-23 and TNF-α (all $P<0.01$). Similarly, in the presence of HQC-containing serum, overexpression of circ_0091685 significantly upregulated the expression of IL-6, IL-23 and TNF-α (all $P<0.01$). These findings indicated that overexpression of *ALKBH5* or circ_0091685 reversed the inhibitory effects of HQC-containing serum on RA-FLS inflammation and proliferation. Furthermore, both HQC-containing serum treatment and circ_0091685 silencing significantly reduced IL-6, IL-23, TNF-α and eIF4A3 expression (all $P<0.01$), suggesting a synergistic interaction between HQC-containing serum and circ_0091685 silencing. **Conclusion**: HQC inhibits inflammation and proliferation of RA-FLS by targeting eIF4A3 through ALKBH5-mediated m^6A modification of circ_0091685.

[**Key words**] Rheumatoid arthritis; Huangqin Qingre Chubi Capsule; Fibroblast-like synoviocyte; Inflammation; Proliferation; ALKBH5; circ_0091685; eIF4A3; Methylation modification; Rats

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(7): 587-601.]

[缩略语] 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA);成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte,FLS);N^6-甲基腺苷(N^6-methyladenosine,m^6A);信使RNA(messenger RNA,mRNA);烷基化修复同源蛋白5(α-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5,ALKBH5);外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC);聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR);定量聚合酶链反应(quantitative PCR,qPCR);逆转录定量聚合酶链反应(reverse transcription qPCR,RT-qPCR);黄芩清热除痹胶囊(Huangqin Qingre Chubi Capsule,HQC);真核起始因子4A-Ⅲ(eukaryotic initiation factor 4A-Ⅲ,eIF4A3);基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus,GEO);基因本体(Gene Ontology,GO);京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS);肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α);增强化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL);二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay,BCA);放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay,RIPA);乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA);小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA);苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining,HE染色);番红O-固绿染色(safranin O-fast green staining,SO/FG染色);5-乙炔基-2′-脱氧尿苷(5-ethynyl-2′-deoxyuridine,EdU);酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA);微RNA(microRNA,miRNA,miR)

RA是一种炎症性自身免疫病,可引起关节破坏,严重时可致关节畸形[1-2]。炎症刺激伴随RA发展全过程,慢性炎症刺激RA-FLS异常增殖、迁移,加速促炎性细胞因子分泌,加快骨侵袭和骨破坏[3-4]。RNA修饰是真核生物重要的转录后表观遗传修饰[5]。RNA的不同碱基上存在着约10种不同的甲基化标记,其中m^6A是mRNA上最广泛的甲基化修饰[6],ALKBH5是m^6A修饰的关键去甲基化酶。研究显示,环状RNA m^6A修饰参与肿瘤、胰腺炎、骨关节炎等多种炎症相关疾病的进展[7-10],ALKBH5介导的去甲基化修饰显著影响RA的滑膜增生和侵袭[11]。本团队前期研究利用RA患者PBMC进行全转录组高通量测序检测了环状RNA表达谱,得到165个环状RNA,进一步通过生物信息学分析和RT-qPCR实验筛选获得了一个与RA免疫炎症相关且在RA患者中高表达的环状RNA——hsa_circ_0091685(以下简称circ_0091685)[12]。

健脾清热通络方的代表制剂HQC是安徽中医药大学第一附属医院的院内制剂,具有清热利湿、祛风止痛、健脾通络之功效。前期研究通过超高效液相色谱–串联质谱、指纹图谱对HQC的核心成分进行了鉴定,证明其核心成分黄芩苷、栀子苷、木犀草素、齐墩果酸、薏苡素、苦杏仁苷等含量较高、稳定性良好[13-14]。临床观察和动物实验证明HQC在缓解RA患者炎症反应和降低佐剂性关节炎大鼠炎症细胞、滑膜组织水肿中的作用[15-16]。然而,既往研究尚未从表观遗传修饰的角度探讨HQC抗炎和抗增殖的作用机制。本研究首先通过生物信息学筛选出*ALKBH5*和*EIF4A3*是RA的差异表达基因,初步探究其在m^6A甲基化修饰中的作用。在此基础上,进一步结合体内外实验验证HQC通过ALKBH5介导circ_0091685 m^6A修饰抑制RA-FLS炎症及增殖的机制,旨在为HQC临床应用于RA治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源及处理

在GEO中检索关键词“rheumatoid arthritis”、“homo sapiens”和“expression profiling by array”。微阵列数据集包括RA患者样本和健康人群样本,最终筛选出信息完整的23个数据集,包括16个RA患者样本和7个健康人群样本。使用R 4.2.3软件对芯片数据进行预处理,通过“normalize”包归一化处理、“sva”包去除批次效应后得到的数据用于后续分析。

采用“limma”包,以$P<0.05$、$|\log_2(\text{差异倍数})|\geq1$

为标准，筛选出不同矩阵中RA的差异表达基因。对筛选出的差异表达基因进行聚类分析，并绘制火山图。使用R 4.2.3软件中“clusterProfiler”、“enrichplot”和“complexHeatmap”包进行GO和KEGG功能富集分析，以P<0.05为富集结果的筛选阈值。

1.2 动物、细胞、药物、试剂和仪器

46只雄性无特定病原体级Sprague Dawley大鼠[许可证号：SCXK（苏）2020-0009]购自中国江苏华创信诺医药科技有限公司，6~8周龄，体重（170±20）g，被饲养在温度20~24 ℃，湿度40%~60%的环境中。RA-FLS（FH0699）为中国上海富衡生物科技有限公司产品。

HQC购自安徽中医药大学第一附属医院（批号：20220802；专利号：ZL201110095718.X）[17]。阳性对照药物甲氨蝶呤为中国上海上药信谊药厂有限公司产品。弗氏完全佐剂（2203）为德国BioFroxx公司产品；苏木精染液（BA4041）、伊红染液（醇溶性）（BA4023）均为中国珠海贝索生物技术有限公司产品；改良番红O-固绿软骨染色试剂盒（G1371）为中国北京索莱宝科技有限公司产品；戊巴比妥钠（20200216）为中国天津希恩思生化科技有限公司产品；E-Click EdU Cell Proliferation Imaging Assay Kit（E-CK-A376）为中国武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司产品；甲苯胺蓝染色液（G1032）、PBS（G4207）均为中国武汉塞维尔生物科技有限公司产品；人IL-6（RX106126H）、人IL-17A（RX1061160H）、人IL-23（RX104793H）、人TNF-α（RX106146H）均为中国泉州市睿信生物科技有限公司产品；m^{6}A RNA甲基化定量检测试剂盒EpiQuik m^{6}A RNA Methylation Quantification Kit（P-9005-48）为美国EpigenTek公司产品；TRIzol™试剂（15596018）、ECL超敏发光试剂盒（34094）为美国Thermo Fisher Scientific公司产品；氯仿（20191013）、异丙醇（20220716）、无水乙醇（20230513）为中国上海苏懿化学试剂有限公司产品；NovoStart® SYBR High-Sensitivity qPCR SuperMix（E099-01A）、NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit（E041-01A）为中国苏州近岸蛋白质科技股份有限公司产品；RNA免疫沉淀试剂盒RNA Immunoprecipitation（RIP）Kit（Bes5101）为中国广州伯信生物科技有限公司产品；BCA蛋白浓度测定试剂盒（BL521A）、RIPA裂解液（BL504A）为中国安徽白鲨生物科技有限公司产品；β-肌动蛋白（TA-09）为中国北京中杉金桥生物科技有限公司产品；EIF4A3（17504-1-AP）为美国Proteintech公司产品。

倒置显微镜（CKX53）为日本Olympus公司产品；酶标分析仪（RT-6100）为中国深圳雷杜生命科学股份有限公司产品；PCR仪（PTC-200）为美国Bio-Rad公司产品；迷你掌中宝离心机（LX-300）为中国海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品；高速冷冻离心机（S-1-150S）为中国郑州宏华仪器有限公司产品；荧光qPCR仪（StepOne Plus）为美国ABI公司产品；超微量分光光度计（OD1000+）为中国南京五义科技有限公司产品；切片机（RM2016）为德国Leica公司产品。

1.3 建立PBMC和RA-FLS共培养模型

将永生化的RA-FLS进行培养，待细胞生长融合至70%时弃去培养基，PBS清洗两次，弃去PBS，加入胰蛋白酶消化细胞。在显微镜下观察，当细胞呈圆形的颗粒状时加入2 mL完全培养基终止消化，轻柔吹打贴壁细胞使其重悬，按1∶2比例传代培养，使用传代3~4代的细胞用于后续共培养。

纳入2023年8—11月安徽中医药大学第一附属医院风湿科RA住院患者5例，并招募健康志愿者5名作为健康对照者。使用EDTA抗凝管分别收集健康对照者和RA患者的静脉血5 mL，按1∶1倒入PBS混匀，使用含Ficoll-Paque分离液的离心管于4 ℃ 1500×g离心5min，吸出PBMC后加入PBS继续离心5 min，丢弃上清液，PBS清洗三次，用完全培养基重悬，可获得健康对照者及RA患者的PBMC，于−80 ℃保存备用。

将健康对照者或RA患者的PBMC置于Transwell小室上室，传代后的RA-FLS置于Transwell小室下室，放入培养箱中培养24 h，收集下室健康对照者的细胞为对照细胞，收集下室RA患者的细胞为RA-FLS模型细胞。

1.4 构建质粒和siRNA

构建*ALKBH5*、circ_0091685、*EIF4A3*过表达质粒，分别为pc-DNA3.1-*ALKBH5*、pc-DNA3.1-circ_0091685、pc-DNA3.1-*EIF4A3*，作为*ALKBH5*、circ_0091685、*EIF4A3*过表达组，空载体pc-DNA3.1为过表达对照组（OE-NC）；构建*ALKBH5*、circ_0091685、*EIF4A3*的siRNA，分别为si-*ALKBH5*、si-circ_

0091685、si-*EIF4A3*,作为*ALKBH5*、circ_0091685、*EIF4A3*沉默组,同时设置沉默对照组(si-NC);构建突变体质粒circ_0091685 MUT(m^6A位点突变)作为circ_0091685突变组,野生型质粒circ_0091685 WT作为circ_0091685对照组。质粒和siRNA均由中国通用生物(安徽)股份有限公司合成。siRNA序列见表1,过表达质粒和siRNA转染效率见附图1。

表1 小干扰RNA序列
Table 1 Small interfering RNA sequences

序列名称	序列(5′→3′)
ALKBH5 (si-NC)	正向:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反向:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
ALKBH5-1060 (si-*ALKBH5*)	正向:GUGUCCGUGUCCUUCUUUATT 反向:UAAAGAAGGACACGGACACTT
circ_0091685 (si-NC)	正向:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反向:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
circ_0091685-184 (si-circ_0091685)	正向:GUAUAGAGAUAGUGUGCAAUU 反向:UUGCACACUAUCUCUAUACUU
EIF4A3 (si-NC)	正向:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反向:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
EIF4A3-230 (si-*EIF4A3*)	正向:AGACAUGACUAAAGUGGAAUU 反向:UUCCACUUUAGUCAUGUCUUU

ALKBH5:烷基化修复同源蛋白5;NC:阴性对照;circ_0091685:环状RNA0091685;*EIF4A3*:真核起始因子4A-Ⅲ.

1.5 佐剂性关节炎大鼠模型建立及含药血清制备

所有大鼠经一周常规饲养后,36只用于动物实验,10只用于制备含药血清。36只动物实验大鼠遵循完全随机对照分组法及"3R"原则分为六组,分别为:正常对照组、模型对照组、HQC小剂量组、HQC中剂量组、HQC大剂量组和甲氨蝶呤组,每组6只。除正常对照组外,其余大鼠于左足跖注射弗氏完全佐剂(0.2 mL/只)建立佐剂性关节炎模型。造模后第14天起,HQC小、中、大剂量组分别灌胃0.648、1.296、2.592 g/kg HQC,连续14 d;甲氨蝶呤组灌胃1.8 mg/kg甲氨蝶呤,每周一次;正常对照组和模型对照组灌胃0.9%氯化钠溶液,连续14 d。各组均按2 mL/100 g灌胃。末次灌胃2 h后用戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠,在麻醉状态下取膝关节放入10%甲醛溶液中固定。最后,大鼠予腹腔注射戊巴比妥钠(250 mg/kg)实施安乐死。

10只用于制备含药血清的大鼠灌胃HQC混悬液(6.48 g/kg,临床等效剂量的20倍),灌胃量按2 mL/100 g计算,连续灌胃7 d。末次给药2 h后用戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠,腹主动脉采血,分离血清,补体灭活,即得含药血清,于−80 ℃冰箱保存备用。最后,大鼠予腹腔注射戊巴比妥钠(250 mg/kg)实施安乐死。在HQC含药血清干预的细胞实验中,分为五组:正常对照组(1.3节中收集的对照细胞)、模型对照组(1.3节中收集的RA-FLS模型细胞)、5%HQC含药血清组、10%HQC含药血清组和20%HQC含药血清组。其中,正常对照组和模型对照组细胞均于普通培养基中培养,三个含药血清组将RA-FLS模型细胞分别置于含相应体积分数HQC含药血清的培养基中培养。

1.6 组织病理学染色观察大鼠膝关节组织病理变化

将大鼠膝关节固定在4%多聚甲醛溶液中24 h,随后转入10% EDTA溶液中脱钙2周。经梯度乙醇脱水(80%、95%、100%,各3 min),将切片放入烧杯中,流水缓慢冲洗,洗去乙醇,直到切片干净透明,石蜡包埋后,行连续切片,厚度为4 μm。切片分别进行HE、SO/FG和甲苯胺蓝染色后,经梯度乙醇脱水(80%、95%、100%,各2 min),二甲苯透明后密封,于显微镜下观察组织病理变化。

1.7 EdU染色检测细胞增殖能力

收集各组细胞,按照EdU试剂盒说明书配制EdU-Click反应物,加入500μL Click反应液,孵育2 h,依次进行固定、透化、荧光标记、核染、清洗,染色完成后于倒置荧光显微镜下拍照,采用ImageJ软件统计分析相对阳性细胞数,每组重复三次。

1.8 ELISA检测炎症因子水平

收集各组细胞,按照试剂盒说明书配制工作液,加稀释液和待测样品,经水浴孵育、洗涤、洗板、添加底物后,使用酶标仪于450 nm处测定吸光度值,计算IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α浓度。

1.9 RT-qPCR检测*EIF4A3*、circ_0091685表达

收集各组细胞,进行RNA提取、逆转录反应,每组重复六次。以*β-Actin*为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量。引物序列为*EIF4A3*(142 bp):正向5′-CCATCAGCAATCCAGCAACG-3′,反向5′-GAGCAAGCAGCCCCTGAATA-3′;circ_0091685(141 bp):正向5′-GCTCGACAAAACAGTGTCGC-3′,反向5′-TAAAATGCGGGTCCCTCTCG-3′;*β-Actin*(96 bp):正向5′-CCCTGGAGAAGAGCTACGAG-3′,反向5′-

GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT-3′。

1.10 蛋白质印迹法检测ALKBH5和eIF4A3蛋白质表达

收集各组细胞，加入RIPA细胞裂解液，依次进行上样、电泳、转膜、封闭、一抗孵育。参照说明书，分别按1∶1000、1∶10 000进行一抗和二抗稀释。最后进行蛋白质检测，以β-肌动蛋白为内参，每组重复三次。

1.11 RNA免疫共沉淀验证circ_0091685与eIF4A3结合

收集各组细胞，按照RNA免疫沉淀试剂盒说明书操作，分别进行细胞裂解、去除DNA、平衡蛋白质A/G磁珠，在磁力架中收集磁珠后弃去上清液，随后进行免疫沉淀：将eIF4A3抗体（3 μg）、阴性对照IgG抗体（3 μg）分别与磁珠混合，于垂直混匀器（10转/min）中4 ℃孵育16 h，按说明书依次加入免疫沉淀试剂，55 ℃孵育1 h，洗脱RNA，以磁力架收集磁珠转移上清液至新的无核糖核酸酶离心管中。按照NovoStart® SYBR High-Sensitivity qPCR SuperMix说明书操作步骤检测eIF4A3抗体和IgG抗体中circ_0091685表达，每组重复三次。

1.12 比色法检测总RNA m^{6}A水平

提取各组细胞的总RNA，按照m^{6}A RNA甲基化定量检测试剂盒说明书进行缓冲液和溶液准备、RNA结合、m^{6}A RNA捕获。观察到培养基变成蓝色时加入相应混合液，变成黄色后终止酶反应，2~15 min使用酶标仪在450 nm处检测吸光度值，每组重复三次。根据吸光度值计算总RNA m^{6}A水平。

1.13 RNA甲基化免疫共沉淀-qPCR检测circ_0091685的m^{6}A修饰水平

收集各组细胞进行RNA提取，按照m^{6}A RNA甲基化定量检测试剂盒说明书在PCR管中配制免疫捕捉液并混匀，经历涡旋和孵育后将PCR管置于磁力架上进行RNA释放、回收，最后按荧光qPCR操作步骤完成实验，每组重复三次。引物序列见1.9节。

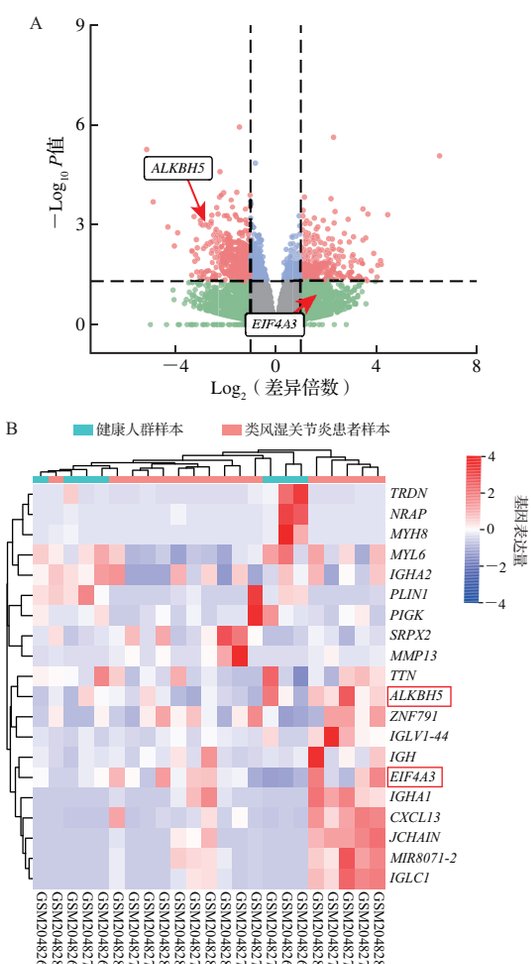
1.14 统计学方法

使用SPSS 26.0软件进行统计分析，使用GraphPad Prism 9.5.1软件绘图。符合正态分布的计量资料用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，方差齐性数据多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验，方差不齐数据多组间比较采用Kruskal-Wallis H非参数检验，组间两两比较采用Mann-Whitney U非参数检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RA的差异表达基因和富集分析结果

RA患者样本与健康人群样本的前20个差异表达基因包括*ALKBH5*和*EIF4A3*，见图1。对差异表达基因进行GO分析显示生物学过程存在甲基



A：火山图，总计19 348个差异表达基因，每个点代表一个基因，红色代表同时满足P<0.05、|log$_2$（差异倍数）|≥1的基因，蓝色代表满足P<0.05的基因，绿色代表满足|log$_2$（差异倍数）|≥1的基因，灰色代表P>0.05且|log$_2$（差异倍数）|<1的基因；B：前20个差异表达基因热图，红色表示基因表达量高于均值，蓝色表示基因表达量低于均值，白色表示接近平均水平。GSM为基因表达综合数据库中样本的存取号。

图1 类风湿关节炎患者样本与健康人群样本差异表达基因火山图和热图

Figure 1 Differentially expressed genes between rheumatoid arthritis patients and healthy individuals

化修饰,见附图2;KEGG分析显示富集通路包括IL-17信号通路等,见附图3。最终选择*ALKBH5*和*EIF4A3*分别作为circ_0091685的上下游作用基因进行后续实验。

2.2 ALKBH5上调circ_0091685和eIF4A3表达,促进RA-FLS炎症因子分泌及细胞增殖

与*ALKBH5*过表达对照组比较,*ALKBH5*过表达组ALKBH5、circ_0091685、eIF4A3及炎症因子表达增加,EdU相对阳性细胞数增加(均$P<0.01$);与*ALKBH5*沉默对照组比较,*ALKBH5*沉默组ALKBH5、circ_0091685、eIF4A3及炎症因子表达减少,EdU相对阳性细胞数减少(均$P<0.01$)。见表2、附图4和附图5。结果提示,ALKBH5通过上调circ_0091685、eIF4A3表达促进RA-FLS炎症因子分泌及细胞增殖。

2.3 ALKBH5介导circ_0091685 m^{6}A修饰促进RA-FLS炎症

与*ALKBH5*过表达对照组比较,*ALKBH5*过表达组炎症因子IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达增加(均$P<0.01$);与*ALKBH5*过表达+circ_0091685对照组比较,*ALKBH5*过表达+circ_0091685突变组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达减少(均$P<0.01$)。见表3。结果表明circ_0091685 m^{6}A位点突变能逆转过表达*ALKBH5*对RA-FLS炎症因子表达的影响,提示ALKBH5通过介导circ_0091685 m^{6}A修饰促进RA-FLS炎症。

2.4 circ_0091685靶向eIF4A3促进RA-FLS炎症因子分泌及细胞增殖

RNA免疫共沉淀检测结果显示,eIF4A3免疫沉淀复合物中circ_0091685含量较其阴性对照增加(分别为5.11±1.60和1.00±0.08,$P<0.05$),提示circ_0091685可以与eIF4A3特异性结合。

与circ_0091685过表达对照组比较,circ_0091685过表达组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达增加,EdU相对阳性细胞数增加(均$P<0.01$);与circ_0091685沉默对照组比较,circ_0091685沉默组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达减少,EdU相对阳性细胞数减少(均$P<0.01$)。见表4和附图6。与*EIF4A3*过表达对照组比较,*EIF4A3*过表达组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达增加,EdU相对阳性细胞数增加(均$P<0.01$);与*EIF4A3*沉默对照组比较,*EIF4A3*沉默组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达减少,EdU相对阳性细胞数减少(均$P<0.01$)。见表5和附图7。挽救实验结果显示,与circ_0091685过表达+*EIF4A3*沉默对照组比较,circ_0091685过表达+*EIF4A3*沉默组IL-6、IL-17A、

表2 沉默或过表达*ALKBH5*的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中ALKBH5、eIF4A3、circ_0091685、炎症因子表达及细胞增殖变化

Table 2 Changes in expression of ALKBH5, eIF4A3, circ_0091685, inflammatory factors, and cell proliferation in RA-FLS with silencing or overexpressing *ALKBH5*

($\bar{x}\pm s$, n=6)

组 别	ALKBH5$^{\triangle}$	eIF4A3$^{\triangle}$	circ_0091685	IL-6(pg/mL)
*ALKBH5*过表达对照组	0.441±0.032	0.470±0.044	1.04±0.30	5.15±0.71
*ALKBH5*过表达组	0.824±0.019**	0.773±0.037**	2.46±0.32**	8.53±0.81**
*ALKBH5*沉默对照组	0.496±0.031	0.518±0.020	1.02±0.24	5.18±0.32
*ALKBH5*沉默组	0.228±0.031$^{\#\#}$	0.267±0.021$^{\#\#}$	0.42±0.09$^{\#\#}$	3.68±0.45$^{\#\#}$

组 别	IL-17A (pg/mL)	IL-23 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	EdU相对阳性细胞数$^{\triangle}$
*ALKBH5*过表达对照组	5.02±0.62	5.30±0.98	5.12±0.50	0.2324±0.0017
*ALKBH5*过表达组	9.31±1.54**	8.74±0.94**	9.27±0.98**	0.3244±0.0030**
*ALKBH5*沉默对照组	5.04±0.57	5.08±0.81	5.02±0.47	0.2272±0.0077
*ALKBH5*沉默组	3.49±0.58$^{\#\#}$	3.44±0.71$^{\#\#}$	3.52±0.44$^{\#\#}$	0.1228±0.0013$^{\#\#}$

$^{\triangle}n$=3. 与*ALKBH5*过表达对照组比较,$^{**}P<0.01$;与*ALKBH5*沉默对照组比较,$^{\#\#}P<0.01$. ALKBH5:烷基化修复同源蛋白5;circ_0091685:环状RNA0091685;eIF4A3:真核起始因子4A-Ⅲ;TNF-α:肿瘤坏死因子α;EdU:5-乙炔基-2′-脱氧尿苷.

表3 过表达*ALKBH5*和circ_0091685 m^{6}A位点突变的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中炎症因子水平变化

Table 3 Changes in inflammatory factor levels in RA-FLS following *ALKBH5* overexpression and mutation of the circ_0091685 m^{6}A site

(pg/mL, $\bar{x}\pm s$, n=6)

组 别	IL-6	IL-17A	IL-23	TNF-α
*ALKBH5*过表达对照组	5.01±0.49	4.98±0.64	4.96±0.85	5.09±0.53
*ALKBH5*过表达组	9.24±1.12**	9.31±1.12**	9.17±1.29**	9.19±1.49**
*ALKBH5*过表达+circ_0091685对照组	14.48±1.23	14.02±1.33	14.18±1.27	14.87±1.04
*ALKBH5*过表达+circ_0091685突变组	12.15±0.63$^{\#\#}$	12.30±0.67$^{\#\#}$	12.42±0.88$^{\#\#}$	12.09±0.97$^{\#\#}$

与*ALKBH5*过表达对照组比较,$^{**}P<0.01$;与*ALKBH5*过表达+circ_0091685对照组比较,$^{\#\#}P<0.01$. ALKBH5:烷基化修复同源蛋白5;circ_0091685:环状RNA0091685;TNF-α:肿瘤坏死因子α.

表4 沉默或过表达circ_0091685的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中炎症因子表达及细胞增殖变化

Table 4 Changes in inflammatory factor levels and cell proliferation in RA-FLS with silencing or overexpressing circ_0091685

（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组　别	IL-6（pg/mL）	IL-17A（pg/mL）	IL-23（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）	EdU相对阳性细胞数△
circ_0091685过表达对照组	8.36±0.54	7.42±0.36	50.86±0.96	32.34±0.82	0.2234±0.0028
circ_0091685过表达组	13.66±0.84**	12.03±1.12**	71.69±2.68**	62.15±4.20**	0.3277±0.0024**
circ_0091685沉默对照组	8.40±0.53	7.19±0.57	48.99±1.69	33.45±1.09	0.2252±0.0028
circ_0091685沉默组	6.50±0.55##	4.39±2.88##	29.13±2.22##	22.89±1.34##	0.0931±0.0224##

△n=3. 与circ_0091685过表达对照组比较，**P<0.01；与circ_0091685沉默对照组比较，##P<0.01. circ_0091685：环状RNA0091685；TNF-α：肿瘤坏死因子α；EdU：5-乙炔基-2′-脱氧尿苷.

表5 沉默或过表达*EIF4A3*的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中炎症因子表达及细胞增殖变化

Table 5 Changes in inflammatory factor levels and cell proliferation in RA-FLS with silencing or overexpressing *EIF4A3*

（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组　别	IL-6（pg/mL）	IL-17A（pg/mL）	IL-23（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）	EdU相对阳性细胞数△
*EIF4A3*过表达对照组	8.30±0.47	7.43±0.49	49.88±1.00	31.62±1.53	0.2252±0.0022
*EIF4A3*过表达组	12.86±0.83**	15.10±1.49**	67.37±1.66**	56.81±3.81**	0.3224±0.0010**
*EIF4A3*沉默对照组	8.30±0.74	7.68±0.76	48.54±2.16	31.40±1.51	0.2264±0.0013
*EIF4A3*沉默组	5.86±0.60##	4.86±0.81##	32.08±4.95##	22.54±1.98##	0.0922±0.0066##

△n=3. 与*EIF4A3*过表达对照组比较，**P<0.01；与*EIF4A3*沉默对照组比较，##P<0.01. eIF4A3：真核起始因子4A-Ⅲ；TNF-α：肿瘤坏死因子α；EdU：5-乙炔基-2′-脱氧尿苷.

IL-23、TNF-α表达减少（均P<0.01），见表6。上述结果表明circ_0091685能靶向eIF4A3促进RA-FLS炎症及增殖。

2.5 HQC抑制佐剂性关节炎大鼠炎性损伤

HE染色结果显示，正常对照组滑膜细胞结构完整，染色均匀；与正常对照组比较，模型对照组、HQC小剂量组、HQC中剂量组可见炎症细胞浸润和纤维增生，滑膜细胞染色变深，软骨结构混乱；HQC大剂量组和甲氨蝶呤组较模型对照组、HQC小剂量组、HQC中剂量组改善明显。SO/FG染色和甲苯胺蓝染色结果显示，正常对照组关节软骨结构清晰，软骨细胞染色正常，软骨形态规整；与正常对照组比较，模型对照组、HQC小剂量组关节软骨结构混乱，软骨细胞染色退变，软骨形态改变；与模型对照组、HQC小剂量组比较，HQC中剂量组和甲氨蝶呤组软骨形态、软骨细胞染色有所恢复，HQC大剂量组改善最明显，表现为软骨细胞染色恢复良好，软骨基质降解明显减少。见图2。结果提示，HQC能抑制佐剂性关节炎大鼠关节炎症损伤。

2.6 HQC含药血清抑制RA-FLS炎症因子分泌及细胞增殖

表6 过表达circ_0091685和沉默*EIF4A3*的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中炎症因子表达变化

Table 6 Changes in inflammatory factor levels in RA-FLS with overexpressing circ_0091685 and silencing *EIF4A3*

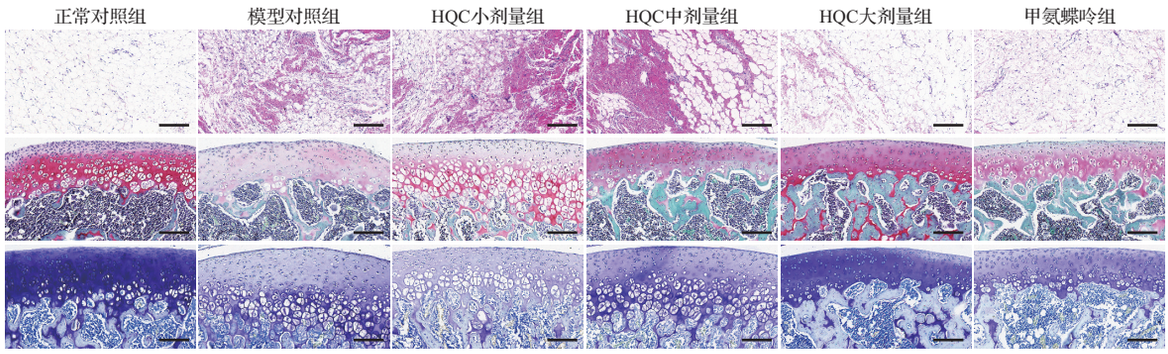
（pg/mL，$\bar{x}\pm s$，n=6）

组　别	IL-6	IL-17A	IL-23	TNF-α
circ_0091685过表达对照组	8.23±0.67	7.54±0.68	48.99±1.70	33.48±0.85
circ_0091685过表达组	13.81±0.78**	12.15±0.70**	73.18±2.71**	62.85±6.33**
circ_0091685过表达+*EIF4A3*沉默对照组	13.51±0.83	12.35±0.94	74.29±5.13	59.69±4.66
circ_0091685过表达+*EIF4A3*沉默组	9.53±0.59##	7.39±0.61##	54.25±3.77##	39.18±2.95##

与circ_0091685过表达对照组比较，**P<0.01；与circ_0091685过表达+*EIF4A3*沉默对照组比较，##P<0.01. circ_0091685：环状RNA0091685；eIF4A3：真核起始因子4A-Ⅲ；TNF-α：肿瘤坏死因子α.

与正常对照组比较，模型对照组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达增加，EdU相对阳性细胞数增加（均P<0.01）；与模型对照组比较，5%、10%和20%HQC含药血清组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达减少，EdU相对阳性细胞数减少（均P<0.05）。见表7和附图8。结果提示HQC含药血清能抑制RA-FLS炎症因子分泌及细胞增殖。

2.7 HQC含药血清抑制RA-FLS中ALKBH5、circ_0091685和



苏木精-伊红染色(上排)显示正常对照组滑膜细胞结构完整;模型对照组、HQC小剂量组、HQC中剂量组可见炎症细胞浸润和纤维增生,软骨结构混乱;而HQC大剂量组和甲氨蝶呤组改善明显. 番红O-固绿染色(中排)和甲苯胺蓝染色(下排)显示正常对照组关节软骨结构清晰、形态规整;模型对照组、HQC小剂量组关节软骨结构混乱、形态改变;而HQC中剂量组和甲氨蝶呤组软骨形态有所恢复,HQC大剂量组改善最明显. 标尺=50 μm. HQC:黄芩清热除痹胶囊.

图2 各组大鼠膝关节滑膜组织病理变化

Figure 2 Pathological changes in synovial tissue of knee joint in rats

表7 不同体积分数HQC含药血清干预后类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中炎症因子表达及细胞增殖变化

Table 7 Changes in inflammatory factor levels and cells proliferation in RA-FLS treated with different volume fractions of HQC-containing serum

($\bar{x}\pm s$, n=6)

组　别	IL-6(pg/mL)	IL-17A(pg/mL)	IL-23(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	EdU相对阳性细胞数$^{\triangle}$
正常对照组	2.35±0.39	2.14±0.53	21.56±1.71	9.80±0.68	0.0962±0.0011
模型对照组	8.71±0.62**	7.64±0.84**	49.16±2.46**	31.07±0.79**	0.2567±0.0033**
5%HQC含药血清组	6.59±0.48$^{\#\#}$	6.53±0.68$^{\#}$	40.06±1.80$^{\#\#}$	27.21±1.03$^{\#\#}$	0.2026±0.0015$^{\#\#}$
10%HQC含药血清组	5.49±0.30$^{\#\#}$	5.51±0.37$^{\#\#}$	35.36±1.04$^{\#\#}$	23.37±0.82$^{\#\#}$	0.1848±0.0009$^{\#\#}$
20%HQC含药血清组	4.84±0.47$^{\#\#}$	4.93±0.37$^{\#\#}$	30.28±9.58$^{\#\#}$	20.34±7.41$^{\#\#}$	0.1525±0.0014$^{\#\#}$

$^{\triangle}n$=3. 与正常对照组比较,$^{**}P$<0.01;与模型对照组比较,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01. HQC:黄芩清热除痹胶囊;TNF-α:肿瘤坏死因子α;EdU:5-乙炔基-2′-脱氧尿苷.

eIF4A3表达,提高m^{6}A修饰水平

与正常对照组比较,模型对照组ALKBH5、circ_0091685和eIF4A3表达增加,m^{6}A修饰水平下降(均P<0.01);与模型对照组比较,5%、10%和20%HQC含药血清组ALKBH5、circ_0091685、eIF4A3表达减少,m^{6}A修饰水平升高(均P<0.05)。见表8和附图9。结果提示,HQC含药血清能抑制ALKBH5、circ_0091685、eIF4A3表达,提高m^{6}A修饰水平。

2.8 HQC含药血清通过ALKBH5/circ_0091685/eIF4A3轴抑制RA-FLS炎症

与20%HQC含药血清+*ALKBH5*过表达对照

表8 不同体积分数HQC含药血清干预后类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞中ALKBH5、circ_0091685、eIF4A3表达水平和m^{6}A修饰水平比较

Table 8 Expression of the ALKBH5, circ_0091685, eIF4A3 and m^{6}A modification levels in RA-FLS treated with different volume fractions of HQC-containing serum

($\bar{x}\pm s$, n=6)

组　别	ALKBH5$^{\triangle}$	circ_0091685	*EIF4A3* mRNA	eIF4A3$^{\triangle}$	总RNA m^{6}A$^{\triangle}$	circ_0091685 m^{6}A$^{\triangle}$
正常对照组	0.34±0.03	1.00±0.07	1.01±0.16	0.321±0.014	0.0959±0.0018	111.55±12.64
模型对照组	0.86±0.24**	2.55±0.17**	4.02±0.48**	0.887±0.054**	0.0547±0.0023**	39.65±1.62**
5%HQC含药血清组	0.69±0.05$^{\#}$	2.07±0.16$^{\#\#}$	3.25±0.17$^{\#\#}$	0.816±0.038$^{\#}$	0.0621±0.0034$^{\#}$	56.99±6.78$^{\#}$
10%HQC含药血清组	0.54±0.04$^{\#\#}$	1.48±0.08$^{\#\#}$	2.26±0.29$^{\#\#}$	0.654±0.008$^{\#\#}$	0.0756±0.0025$^{\#\#}$	78.06±8.08$^{\#\#}$
20%HQC含药血清组	0.41±0.04$^{\#\#}$	1.22±0.03$^{\#\#}$	1.43±0.31$^{\#\#}$	0.497±0.051$^{\#\#}$	0.0871±0.0039$^{\#\#}$	103.17±7.64$^{\#\#}$

$^{\triangle}n$=3. 与正常对照组比较,$^{**}P$<0.01;与模型对照组比较,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01. HQC:黄芩清热除痹胶囊;ALKBH5:烷基化修复同源蛋白5;circ_0091685:环状RNA0091685;eIF4A3:真核起始因子4A-Ⅲ;mRNA:信使RNA;m^{6}A:N^6-甲基腺苷.

组比较，20%HQC含药血清+*ALKBH5*过表达组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达增加（均$P<0.01$）；与20%HQC含药血清+*ALKBH5*沉默对照组比较，20%HQC含药血清+*ALKBH5*沉默组IL-6、IL-17A、IL-23、TNF-α表达减少（均$P<0.01$）。见表9。结果提示，过表达*ALKBH5*可逆转HQC含药血清对RA-FLS炎症因子的影响。

与20%HQC含药血清+circ_0091685过表达对照组比较，20%HQC含药血清+circ_0091685过表达组IL-6、IL-23、TNF-α及eIF4A3表达增加（均$P<0.01$）；与circ_0091685沉默对照组比较，circ_0091685沉默组IL-6、IL-23、TNF-α及eIF4A3表达减少（均$P<0.01$），且circ_0091685沉默组接近20%HQC含药血清组水平。上述结果见表10和附图10，提示过表达circ_0091685可逆转HQC含药血清对RA-FLS炎症因子及eIF4A3的影响，且沉默circ_0091685和HQC含药血清具有协同作用。

综上，HQC含药血清可能通过抑制ALKBH5/circ_0091685/eIF4A3轴在RA-FLS中发挥抗炎作用。

3 讨 论

RA是最常见的系统性炎症性关节炎，以四肢小关节炎症为主要特征，并可影响软骨和滑膜，虽然RA的发病机制尚不明晰，但滑膜炎症是其主要表现[18]。FLS是RA滑膜炎症的主要效应细胞，可侵入并附着关节软骨，增加黏附因子和炎症因子（如TNF-α、IL-1、IL-6）释放，刺激滑膜增生和血管生成，这些炎症因子进入血液循环后可诱发全身炎症反应[19-21]。本研究通过Transwell小室建立PBMC和RA-FLS共培养模型，收集经过PBMC微环境刺激后的RA-FLS模型细胞进行后续实验，力求在体外最大限度地模拟人体内的RA炎性微环境。

临床上RA患者的关节滑液和血清中发现IL-6和TNF-α的血药浓度与RA严重程度呈正相关[22]。IL-17是T细胞诱导的炎症反应的早期启动因子，IL-17A是IL-17细胞因子家族的

表9 各组类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞经20% HQC含药血清联合*ALKBH5*过表达或沉默处理后炎症因子水平比较

Table 9 Comparison of inflammatory factor levels in each group of RA-FLS treated with 20% HQC-containing serum combined with *ALKBH5* overexpression or silencing

（pg/mL，$\bar{x}\pm s$，n=6）

组　别	IL-6	IL-17A	IL-23	TNF-α
20%HQC含药血清组	5.07±0.49	4.93±0.77	31.32±2.20	20.54±0.92
20%HQC含药血清+*ALKBH5*过表达对照组	5.06±0.54	4.98±0.62	30.75±2.14	20.24±0.54
20%HQC含药血清+*ALKBH5*过表达组	8.10±0.85**	8.22±0.79**	45.68±1.66**	39.10±2.41**
20%HQC含药血清+*ALKBH5*沉默对照组	5.07±0.39	5.11±0.57	30.23±1.22	20.28±0.62
20%HQC含药血清+*ALKBH5*沉默组	2.10±0.52$^{\#\#}$	3.24±0.64$^{\#\#}$	26.07±1.97$^{\#\#}$	16.49±1.04$^{\#\#}$

与20%HQC含药血清+*ALKBH5*过表达对照组比较，$^{**}P<0.01$；与20%HQC含药血清+*ALKBH5*沉默对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$. HQC：黄芩清热除痹胶囊；ALKBH5：烷基化修复同源蛋白5；TNF-α：肿瘤坏死因子α.

表10 20%HQC含药血清和circ_0091685过表达或沉默处理类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞各组的炎症因子和eIF4A3表达水平比较

Table 10 Comparison of inflammatory factor and eIF4A3 expression levels in each group of RA-FLS treated with 20% HQC-containing serum and circ_0091685

（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组　别	IL-6（pg/mL）	IL-17A（pg/mL）	IL-23（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）	eIF4A3$^{\triangle}$
20%HQC含药血清组	4.64±0.39	3.42±0.20	32.25±2.36	15.49±1.71	0.453±0.050
20%HQC含药血清+circ_0091685过表达对照组	4.74±0.48	3.36±0.29	32.48±2.82	15.89±1.59	0.430±0.069
20%HQC含药血清+circ_0091685过表达组	6.29±0.44**	2.52±0.14**	42.42±2.15**	26.73±2.36**	0.846±0.018**
circ_0091685沉默对照组	6.63±0.45	2.03±0.27	47.83±3.04	31.87±1.45	1.047±0.107
circ_0091685沉默组	4.77±0.35$^{\#\#}$	3.41±0.22$^{\#\#}$	32.40±2.56$^{\#\#}$	15.48±1.40$^{\#\#}$	0.500±0.106$^{\#\#}$

$^{\triangle}n$=3. 与20%HQC含药血清+circ_0091685过表达对照组比较，$^{**}P<0.01$；与circ_0091685沉默对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$. HQC：黄芩清热除痹胶囊；circ_0091685：环状RNA0091685；eIF4A3：真核起始因子4A-Ⅲ；TNF-α：肿瘤坏死因子α.

典型成员,其能通过诱导关节炎症、局灶性骨侵蚀和软骨损伤参与早期RA[23]。IL-23/IL-17信号通路作为一种重要的免疫通路在胶原诱导性关节炎大鼠中发挥促炎作用[24]。本研究通过生物信息学方法筛选出参与RA发病的重要信号通路IL-17信号通路,并进一步围绕该信号通路的相关炎症因子IL-17A、IL-6、IL-23、TNF-α展开层层验证。

环状RNA发现于20世纪70年代,随着高通量测序和生物信息学技术的发展,其在多种疾病中的作用已逐渐阐明[25-26]。既往研究发现,hsa_circ_0001859通过靶向miR-204/211参与RA炎症进展[27],circ_0091685亦与RA的免疫炎症密切相关[12];eIF4A3是环状RNA生产的启动子,可调节包括mRNA剪接和转录在内的多种生物学过程,eIF4A3还能与环状RNA结合并影响细胞核外移[28, 29-31]。上述研究提示eIF4A3可能通过调控circ_0091685参与RA炎症过程。本课题组前期通过生物信息学分析发现circ_0091685的结合蛋白为eIF4A3[16]。本研究通过RNA免疫共沉淀实验证实了circ_0091685的结合靶点为eIF4A3,沉默*EIF4A3*可逆转circ_0091685过表达所致的炎症因子水平升高,并验证了circ_0091685/eIF4A3轴对炎症因子表达的影响,提示circ_0091685能靶向eIF4A3促进RA-FLS炎症。

m^6A修饰是重要的表观遗传修饰,其修饰过程可逆,由甲基转移酶复合体("编写者")和去甲基化酶("擦除器")动态调节,并由m^6A结合蛋白("读取器")识别[32]。既往研究发现,去甲基化酶ALKBH5能催化RNA的氧化脱甲基化,发挥去甲基化作用[33-34];ALKBH5介导的m^6A修饰在多种癌症、缺血性和炎症性疾病中发挥调控作用[35-38];ALKBH5作为m^6A修饰的关键去甲基化酶[39],介导m^6A修饰影响RA-FLS的增殖、迁移和侵袭[40]。本研究通过GO分析显示RA患者样本与健康人群样本的差异表达基因富集于甲基化修饰相关通路。进一步研究发现,过表达*ALKBH5*基础上突变circ_0091685 m^6A位点可逆转过表达*ALKBH5*对炎症因子表达的影响,提示ALKBH5能介导circ_0091685 m^6A修饰促进RA-FLS炎症。此外,通过沉默或过表达*ALKBH5*、circ_0091685、*EIF4A3*,观察其对RA-FLS炎症及增殖的影响,证明了ALKBH5/circ_0091685/eIF4A3轴正向调控RA-FLS的炎症反应及增殖。

本文资料显示,HQC能缓解佐剂性关节炎大鼠的炎性浸润、纤维增生和软骨退变,细胞实验也显示HQC含药血清能抑制RA-FLS炎症因子分泌及细胞增殖,且这种抗炎和抑制细胞增殖的作用呈现一定的剂量依赖性。进一步研究显示HQC含药血清能够抑制ALKBH5、circ_0091685、eIF4A3表达,提高m^6A修饰水平,同样呈现剂量依赖性。此外,过表达circ_0091685可逆转HQC含药血清对RA-FLS炎症因子及eIF4A3的影响,且HQC含药血清与沉默circ_0091685抗炎作用趋势一致,提示HQC含药血清与沉默circ_0091685是协同作用关系。

综上所述,ALKBH5能介导circ_0091685 m^6A修饰靶向eIF4A3在RA-FLS炎症及增殖中发挥作用,而HQC能抑制佐剂性关节炎大鼠和RA-FLS炎症及增殖,其作用机制与调控ALKBH5/circ_0091685/eIF4A3轴及circ_0091685 m^6A修饰有关。然而,本文资料仅在细胞层面进行了机制探讨,未来有必要在体内进行进一步的机制验证。

本文附加文件见电子版。

志谢 本研究得到国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(国中医药人教函〔2023〕85号)、安徽省中医药健康服务高质量发展工程中医治疗优势病种(临床循证能力提升)项目(皖财社〔2024〕1359号)和安徽省高校优秀青年骨干教师国外访问研修项目(gxgwfx2021029)支持.安徽中医药大学第一附属医院风湿一科汪元主任医师、万磊主任医师、孙玥副主任医师、黄旦医师和孙艳秋医师提供资料、分析和解释部分实验结果

Acknowledgements This study was supported by National High Level Key Discipline Construction Project of Traditional Chinese Medicine (Document 2023-85 issued by the Department of Personnel and Education, National Administration of Traditional Chinese Medicine), Project of Advantageous Diseases Treated by Traditional Chinese Medicine (Clinical Capacity Improvement) under the High-Quality Development Project of Traditional Chinese Medicine Health Services in Anhui Province (Wancaishe〔2024〕No. 1359), and Overseas Visiting and Research Program for Excellent Young Backbone Teachers in Colleges and Universities of Anhui Province (gxgwfx2021029). WANG Yuan, WAN Lei, SUN Yue, HUANG Dan and SUN Yanqiu from the Department of Rheumatology

and Immunology of the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine provided materials and assisted with data analysis and experimental results interpretation

作者贡献 胡月迪和刘健参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容.所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责.具体见电子版

Author Contributions HU Yuedi and LIU Jian participated in the conception and design of the study, acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. The authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据可根据合理请求从通信作者(E-mail:liujianahzy@126.com)处获得

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study can be accessed upon reasonable request from the corresponding author at liujianahzy@126.com

医学伦理 本研究临床样本获取通过安徽中医药大学第一附属医院医学伦理委员会审查(2023AH-52)并符合1964年《赫尔辛基宣言》及之后的修订版或类似的伦理标准,所有参与者均签署知情同意书;动物实验遵循国家和安徽中医药大学有关实验动物管理和使用的规定,通过安徽中医药大学实验动物伦理委员会审查(AHUCM-rats-2023020)

Ethical Approval All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine (2023AH-52), and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All participants had signed an informed consent form. All applicable national guidelines and Anhui University of Chinese Medicine regulations for the care and use of animals were followed, and the research protocol of animal experiments was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Anhui University of Chinese Medicine (AHUCM-rats-2023020)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

参考文献(References)

[1] FIRESTEIN G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. **Nature**, 2003, 423(6937): 356-361.

[2] ARLEEVSKAYA M, TAKHA E, PETROV S, et al. Interplay of environmental, individual and genetic factors in rheumatoid arthritis provocation[J]. **Int J Mol Sci**, 2022, 23(15): 8140.

[3] 刘子琪, 吴雨柔, 张礼林, 等. 花椒水提物通过抑制滑膜细胞增殖及诱导细胞凋亡治疗类风湿性关节炎[J]. **中国实验方剂学杂志**, 2023, 29(20): 30-38.
LIU Ziqi, WU Yurou, ZHANG Lilin, et al. *Zanthoxylum bungeanum* aqueous extract treated rheumatoid arthritis by inhibiting synovial cell proliferation and inducing cell apoptosis[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2023, 29(20): 30-38. (in Chinese)

[4] SUN Y, LIU J, XIN L, et al. Xinfeng capsule inhibits inflammation and oxidative stress in rheumatoid arthritis by up-regulating LINC00638 and activating Nrf2/HO-1 pathway[J]. **J Ethnopharmacol**, 2023, 301: 115839.

[5] FRYE M, HARADA B T, BEHM M, et al. RNA modifications modulate gene expression during development [J]. **Science**, 2018, 361(6409): 1346-1349.

[6] AHMAD FAROOQI A, FAYYAZ S, POLTRONIERI P, et al. Epigenetic deregulation in cancer: enzyme players and non-coding RNAs[J]. **Semin Cancer Biol**, 2022, 83: 197-207.

[7] 吴 俊. N6腺苷甲基化修饰的环状RNA在重症急性胰腺炎中的作用研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2022.
WU Jun. The study on role of N6-methyladenosine-modificated circular RNAs in mice model of severe acute pancreatitis[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2022. (in Chinese)

[8] 张士保, 朱斐煜, 谢瑞玉, 等. CircRNA-100395基因通过启动子区甲基化调控miRNA-136-5p/Smad3轴促进前列腺癌细胞增殖及侵袭的机制研究[J]. **现代检验医学杂志**, 2022, 37(5): 44-49.
ZHANG Shibao, ZHU Feiyu, XIE Ruiyu, et al. Mechanism of CircRNA-100395 promoter methylation promoting prostate cancer cells proliferation and invasion by regulating miRNA-136-5p/Smad3 axis[J]. **Journal of Modern Laboratory Medicine**, 2022, 37(5): 44-49. (in Chinese)

[9] 王 振, 张 乐, 张钰哲. 基于circRNA的m^6A修饰对肿瘤及免疫的调控作用[J]. **中国生物化学与分子生物学报**, 2023, 39(2): 222-233.
WANG Zhen, ZHANG Le, ZHANG Yuzhe. Regulatory effect of m^6A modification based on CircRNA on tumor and immunity[J]. **Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 2023, 39(2): 222-233. (in Chinese)

[10] 陈 威, 徐玉德, 付志斌, 等. m^{6}A RNA甲基化在骨关节炎发病机制的研究[J]. **中国骨质疏松杂志**, 2024, 30(8): 1209-1214.
CHEN Wei, XU Yude, FU Zhibin, et al. Research progress on the pathogenesis of m^{6}A RNA methylation in osteoarthritis[J]. **Chinese Journal of Osteoporosis**, 2024, 30(8): 1209-1214. (in Chinese)

[11] KUANG Y, Li R, WANG J, et al. ALKBH5-mediated RNA m^{6}A methylation regulates the migration, invasion, and proliferation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes[J]. **Arthritis Rheumatol**, 2024, 76(2): 192-205.

[12] WEN J, LIU J, WANG X, et al. Expression and clinical significance of circular RNAs related to immunity and inflammation in patients with rheumatoid arthritis[J]. **Int Immunopharmacol**, 2021, 92: 107366.

[13] 刘剑桥, 刘晓闯, 刘 健, 等. 黄芩清热除痹胶囊HPLC指纹图谱初步研究及3个成分含量测定[J]. **中国医药生物技术**, 2022, 17(1): 56-58.
LIU Jianqiao, LIU Xiaochuang, LIU Jian, et al. Preliminary study on HPLC fingerprint of Huangqin Qingre Chubi capsules and determination of three components [J]. **Chinese Medicinal Biotechnology**, 2022, 17(1): 56-58. (in Chinese)

[14] 董心同, 甘珮荣, 柯江涛, 等. UHPLC-MS/MS同时测定黄芩清热除痹胶囊中6种活性成分[J]. **安徽中医药大学学报**, 2021, 40(6): 97-102.
DONG Xintong, GAN Peirong, KE Jiangtao, et al. Simultaneous determination of six active components in Huangqin Qingre chubi capsule by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. **Journal of Anhui University of Chinese Medicine**, 2021, 40(6): 97-102. (in Chinese)

[15] 丁本珺, 黄传兵, 付 鹏, 等. 黄芩清热除痹胶囊联合湿热痹阻外洗方治疗类风湿关节炎湿热痹阻证30例临床观察[J]. **甘肃中医药大学学报**, 2022, 39(4): 53-57.
DING Benjun, HUANG Chuanbing, FU Peng, et al. Clinical observation on 30 cases of rheumatoid arthritis with damp-heat bi-obstructing syndrome treated by Huangqin Qingre Chubi Jiaonang combined with Shire Bizu Waixi Fang[J]. **Journal of Gansu University of Chinese Medicine**, 2022, 39(4): 53-57. (in Chinese)

[16] HU Y, LIU J, QI Y, et al. Integrating clinical data mining, network analysis and experimental validation reveal the anti-inflammatory mechanism of Huangqin Qingre Chubi Capsule in rheumatoid arthritis treatment [J]. **J Ethnopharmacol**, 2024, 329: 118077.

[17] 刘 健, 黄传兵, 汪 元, 等. 一种用于治疗湿热痹阻症的药物及其制备方法[P]. ZL201110095718.X. 2012-07-04.
LIU Jian, HUANG Chuanbing, WANG Yuan, et al. A medicament for treating damp-heat obstruction-type bi syndrome and preparation method thereof[P]. ZL201110095718.X. 2012-07-04. (in Chinese)

[18] LEE D M, WEINBLATT M E. Rheumatoid arthritis [J]. **Lancet**, 2001, 358(9285): 903-911.

[19] LEFEVRE S, MEIER F M P, NEUMANN E, et al. Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis[J]. **Curr Pharm Des**, 2015, 21(2): 130-141.

[20] PETRELLI F, MARIANI F M, ALUNNO A, et al. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: one year in review 2022 [J]. **Clin Exp Rheumatol**, 2022, 40(3): 475-482.

[21] JO S, SAMARPITA S, LEE J S, et al. 8-Shogaol inhibits rheumatoid arthritis through targeting TAK1[J]. **Pharmacol Res**, 2022, 178: 106176.

[22] SHRIVASTAVA A K, PANDEY A. Inflammation and rheumatoid arthritis[J]. **J Physiol Biochem**, 2013, 69 (2): 335-347.

[23] LUBBERTS E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis[J]. **Nat Rev Rheumatol**, 2015, 11(10):562.

[24] SCHINOCCA C, RIZZO C, FASANO S, et al. Role of the IL-23/IL-17 pathway in rheumatic diseases: an overview[J]. **Front Immunol**, 2021, 12: 637829.

[25] SÄNGER H L, KLOTZ G, RIESNER D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1976, 73(11): 3852-3856.

[26] IVANOV A, MEMCZAK S, WYLER E, et al. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals[J]. **Cell Rep**, 2015, 10(2): 170-177.

[27] LI B, LI N, ZHANG L, et al. Hsa_circ_0001859 regulates ATF2 expression by functioning as an miR-204/211 sponge in human rheumatoid arthritis[J]. **J Immunol Res**, 2018, 2018: 9412387.

[28] LI Q, WANG Z, WANG J, et al. Regulatory feedback loop between circ-EIF4A3 and EIF4A3 Enhances autophagy and growth in colorectal cancer cells[J]. **Transl Oncol**, 2024, 46: 101996.

[29] LIN Y, ZHANG J, CAI J, et al. Systematic analysis of gene expression alteration and co-expression network of eukaryotic initiation factor 4A-3 in cancer[J]. **J Cancer**, 2018, 9(24): 4568-4577.

[30] ZHANG Z, KRAINER A R. Splicing remodels messenger ribonucleoprotein architecture via eIF4A3-dependent and-independent recruitment of exon junction complex components[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2007, 104 (28): 11574-11579.

[31] JIANG X, PENG M, LIU Q, et al. Circular RNA hsa_circ_0000467 promotes colorectal cancer progression by promoting eIF4A3-mediated c-Myc translation[J]. **Mol Cancer**, 2024, 23(1): 151.

[32] SUN T, WU R, MING L. The role of m^{6}A RNA methylation in cancer[J]. **Biomed Pharmacother**, 2019, 112: 108613.

[33] YOU Y, FU Y, HUANG M, et al. Recent advances of m^{6}A demethylases inhibitors and their biological functions in human diseases[J]. **Int J Mol Sci**, , 2022, 23 (10): 5815.

[34] YOU Y, FU Y, HUANG M, et al. Recent advances of m^6A demethylases inhibitors and their biological functions in human diseases[J]. **Int J Mol Sci**, , 2022, 23 (10): 5815.

[35] CHENG C, WANG P, YANG Y, et al. Smoking-induced M2-TAMs, via circEML4 in EVs, promote the progression of NSCLC through ALKBH5-regulated m^6A modification of $SOCS_2$ in NSCLC cells[J/OL]. **Adv Sci (Weinh)**, 2023, 10(22): e2300953.

[36] LI Y, ZHENG Z, LI Y, et al. Regulation of partial endothelial-to-mesenchymal transition by circATXN1 in ischemic diseases[J]. **Nat Commun**, 2025, 16(1): 6357.

[37] LIU H, JIANG Y, LU J, et al. m^6A-modification regulated circ-CCT3 acts as the sponge of miR-378a-3p to promote hepatocellular carcinoma progression[J]. **Epigenetics**, 2023, 18(1): 2204772.

[38] ZHANG J, ZHANG Y, ZHANG J. N6-Methyladenosine modified circ-NAB1 modulates cell cycle and epithelial-mesenchymal transition via $CDKN_3$ in endometrial cancer [J]. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, 2024, 70(5): 161-169.

[39] ZHENG G, DAHL J A, NIU Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility[J]. **Mol Cell**, 2013, 49(1): 18-29.

[40] KUANG Y, LI R, WANG J, et al. ALKBH5-mediated RNA m^6A methylation regulates the migration, invasion, and proliferation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes[J]. **Arthritis Rheumatol**, 2024, 76(2): 192-205.

［本文编辑 余 方 沈 洁］

· 学术动态 ·

梁廷波教授团队采用装甲型嵌合抗原受体T细胞治疗肝细胞癌患者

2026年7月15日，浙江大学医学院附属第一医院梁廷波、章琦教授团队与合作者在《自然》（*Nature*）杂志发表题为“GPC3-specific dnTGFβRⅡ-armoured CAR T cells for hepatocellular carcinoma”的研究论文（DOI：10.1038/s41586-026-10786-z），报道了靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖3（GPC3）并共表达显性负性转化生长因子β受体Ⅱ（dnTGFβRⅡ）的装甲型嵌合抗原受体T细胞（CAR-T细胞）C-CAR031治疗中晚期肝细胞癌临床研究结果，并系统解析了其中作用及耐药机制，为突破实体瘤CAR-T细胞治疗瓶颈提供了新思路。

肝细胞癌中晚期患者治疗选择十分有限。虽然CAR-T细胞治疗已在血液系统肿瘤中取得显著疗效，但肝癌免疫抑制性微环境，尤其是TGFβ介导的免疫抑制信号，严重制约其疗效。研究人员利用在CAR-T细胞中共表达dnTGFβRⅡ来增强其对TGFβ的抵抗能力。临床前研究证实，dnTGFβRⅡ可阻断TGFβ介导的SMAD2/3信号通路激活，在反复接触肿瘤细胞并受到TGFβ抑制的情况下，未加装“装甲”（即未共表达dnTGFβRⅡ）的CAR-T细胞杀伤能力和γ干扰素分泌水平明显下降，而共表达dnTGFβRⅡ的C-CAR031受到的影响相对较小；在异种移植小鼠模型中，C-CAR031也表现出更强的肿瘤控制能力，并能更好地进入肿瘤组织。上述结果为开展人体临床研究提供了依据。

Ⅰ期临床试验共纳入36例不可切除、既往接受过系统治疗的进展期肝细胞癌患者。结果显示，32例患者的靶病灶较基线缩小，中位最佳缩小幅度为41.6%；客观缓解率达44.4%，疾病控制率为91.7%，中位无进展生存期和总生存期分别为4.2个月和14.2个月，治疗后6个月和12个月的总存活率分别为91.3%和60.7%；34例患者出现细胞因子释放综合征，但仅有2例为3级，且未观察到免疫效应细胞相关神经毒性综合征或免疫效应细胞相关噬血细胞综合征样综合征，显示出令人鼓舞的抗肿瘤活性和可接受的安全性。

研究人员还利用DSP、Xenium等空间转录组技术并结合体内外功能实验证实CCL3/CCL5-CCR5趋化轴可促进效应T细胞募集，增强抗肿瘤免疫应答，应对耐药问题。这些发现为进一步优化CAR-T细胞设计、筛选适宜治疗人群及探索联合治疗策略提供了依据。

浙江大学医学院附属第一医院章琦教授、傅琦涵副主任医师、沈艺南主治医师和曹婉悦博士为论文第一作者。研究得到国家科技重大专项、国家自然科学基金等支持。