

火把花根片通过调控NOD2/SMAD3/VEGFA信号通路干预类风湿关节炎血管内皮细胞功能紊乱的作用机制研究

蔡冰冰¹, 陈亚文², 李涛², 曾源², 张彦琼², 林娜², 毛霞^{2*}, 林雅^{1*}

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

摘要: 类风湿关节炎 (RA) 是一种慢性难治性自身免疫病, 主要表现为滑膜炎症和关节破坏。血管生成在 RA 的病理进程中起着关键作用, 血管内皮细胞作为血管生成的核心参与者, 其功能紊乱加速促进滑膜炎症, 加剧血管翳的形成及关节破坏。中成药火把花根片临床上治疗 RA 效果显著, 但其通过调控血管内皮细胞功能抑制 RA 血管生成的机制尚未明晰。本研究采用转录组学数据挖掘、生物网络分析与体内外实验验证相结合的研究策略, 初步探讨了火把花根片抑制 RA 血管生成的潜在分子机制。动物福利和实验过程均遵循中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会的规定 (批准号: IBTCMCACMS21-2307-06)。网络分析结果表明核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2 (NOD2)、SMAD 家族成员 3 (SMAD3) 和血管内皮生长因子 A (VEGFA) 等核心基因显著富集于 NOD 样受体信号通路、VEGF 信号通路等, 提示火把花根片可能通过调控血管生成相关通路, 影响血管内皮细胞功能, 从而抑制血管生成。体内研究中火把花根片能显著下调佐剂诱导性关节炎 (AIA) 模型大鼠踝关节组织中血小板-内皮细胞黏附分子 (CD31) 和 VEGF 阳性表达。体外实验进一步验证, 火把花根片可有效抑制由 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞迁移、侵袭及管腔形成, 显著降低血管生成相关因子 VEGFA、CD31、血管生成素-1 (Ang-1) 的表达水平, 减少 HUVEC 细胞中 CD31、VEGF 的阳性表达。同时, 火把花根片还明显抑制 NOD2、SMAD3、VEGFA 等相关蛋白表达。综上, 本研究揭示火把花根片通过靶向 NOD2/SMAD3/VEGF 信号轴改善血管内皮细胞功能, 抑制 RA 异常血管生成的作用。上述研究丰富了中成药火把花根片在抑制 RA 病理性血管生成方面的科学内涵, 也为临床防治类风湿关节炎提供新的思路。

关键词: 火把花根片; 类风湿关节炎; 血管生成; 人脐静脉内皮细胞; 血管内皮细胞功能紊乱; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0397-11

Investigation on the mechanisms of Colquhounia Root Tablets in reversing vascular endothelial cell dysfunction of rheumatoid arthritis via modulating NOD2/SMAD3/VEGFA signaling axis

CAI Bing-bing¹, CHEN Ya-wen², LI Tao², ZENG Yuan², ZHANG Yan-qiong², LIN Na², MAO Xia^{2*}, LIN Ya^{1*}

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by synovial inflammation, joint destruction, and functional impairment. Angiogenesis plays a key role in the pathological progression of RA with dysfunction of endothelial cells to promote synovial inflammation, sustain pannus formation, subsequently

收稿日期: 2024-10-11; 修回日期: 2024-12-02.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (82274176).

*通讯作者 Tel: 86-591-22861335, E-mail: 80979984@qq.com;

Tel: 86-10-64014411-2869, E-mail: xmao@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0980

leading to joint damage. Colquhounia Root Tablets (CRT), a Chinese patent drug, has shown a satisfying clinical efficacy in treating RA, while the underlying mechanism by which CRT inhibits RA-associated angiogenesis remains unclear. In this study, we applied a research approach combining transcriptomic data analysis, bio-network mapping, and *in vivo* and *in vitro* experiments to explore the molecular mechanisms of CRT in suppressing angiogenesis in RA. Animal welfare and experimental procedures follow the regulations of the Animal Ethics Committee of Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences (ratification number: IBTCMCACMS21-2307-06). Network analysis identified that key genes such as nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2), SMAD family member 3 (SMAD3), and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) significantly enriched in pathways related to NOD-like receptor signaling and VEGF signaling, indicating that CRT may inhibit angiogenesis by regulating vascular endothelial cell function with modulating angiogenesis-related pathways. *In vivo* data showed that CRT significantly reduced the positive expression of CD31 and VEGF in the ankle joint of adjuvant-induced arthritis (AIA) rats. *In vitro* data further confirmed that CRT effectively inhibited VEGF-induced migration, invasion, and tube formation in HUVECs, while significantly reduced the expression of angiogenesis-related factors VEGF/CD31/Ang-1, as well as the positive expression of VEGF and CD31 in HUVECs. Furthermore, CRT markedly decreased the protein expression of NOD2, VEGFA, and SMAD3. In conclusion, these findings indicate that CRT may inhibit the RA-related angiogenesis by targeting the NOD2/SMAD3/VEGF signaling axis to improve endothelial cell function, enriching the scientific connotation of CRT in inhibiting pathological angiogenesis in RA and also offer new insights for clinical prevention and treatment of RA.

Key words: Colquhounia Root Tablets; rheumatoid arthritis; angiogenesis; human umbilical vein endothelial cell; vascular endothelial cell dysfunction; pharmacological mechanism

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种由免疫系统异常激活导致持续性炎症发生, 造成关节滑膜炎性病变甚至软骨破坏的慢性进展性疾病。RA 具有高患病率、高复发率、高致残率及并发症风险, 对患者生活质量和健康构成长期威胁^[1,2]。近年来, 主流的改善病情抗风湿药物 (disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) 以及靶向药物的出现使得 RA 治疗取得快速进展, 但这些药物存在针对性不佳、长期使用易出现胃肠道反应及脏器损伤病变等不良反应的临床应用局限性^[3,4]。

在 RA 病理过程中, 血管生成是关节滑膜持续炎症和关节破坏的重要推动力。血管内皮细胞功能的异常调控在此过程中起着关键作用^[5]。血管内皮细胞通过增殖、迁移和管腔形成, 促进滑膜微环境中的新生血管形成。这些新生血管为关节滑膜等炎症部位提供营养、炎性细胞和因子以维持 RA 持续性炎症状态, 并加速血管翳的形成, 最终导致软骨侵蚀和破坏^[6]。此外, 滑膜细胞过度增殖造成局部组织的缺氧微环境, 缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 在 RA 滑膜中表达上调, 导致促血管生成因子的大量释放, 进一步刺激内皮细胞过度活化、异常增殖和迁移, 加剧滑膜病理性血管异常新生^[7-9]。因此, 靶向调控血管内皮细胞功能进而抑制异常的血管生成, 是减缓 RA 病情进展的重要策略。

中成药火把花根片是来源于卫矛科雷公藤属昆明山海棠 [*Tripterygium hypoglaucom* (Levl.) Hutch] 的根部提取物, 有效成分包含雷公藤甲素、雷公藤红素和雷公藤次碱等, 具有祛风除湿、活血止痛、续筋接骨等功效^[10,11], 与中医治疗 RA 即“痹症”的理论高度契合。现代药理学研究表明^[12-15], 火把花根片具有良好抗炎镇痛、免疫抑制作用, 以及毒性较低的特点, 广泛用于防治 RA 且疗效显著。然而, 其在 RA 病理环节中抑制血管生成的具体作用机制尚未明晰。本研究结合网络药理学和体内外实验验证, 系统探讨火把花根片在改善血管内皮细胞功能, 抑制 RA 病理性血管生成中的作用和调控机制, 以期揭示中成药火把花根片在 RA 血管生成中的作用原理并进一步明确其临床防治的应用潜能。

材料与方 法

药品与试剂 火把花根片浸膏由重庆市药研院制药有限公司提供, 批号: T221201, 固形物含量 71.1%; 甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 片, 批号: 036210105, 购自上海上药信谊药厂有限公司; 灭活结核分枝杆菌 H37Ra (批号: 231141), 美国 BD 公司; 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 购自北京绿源科为生物科技有限公司; ECM 全套培养基 (货号: 1001), 美国 Sciencell 公司; 基质胶 (货号: 354234), 美国 Corning 公司; 核苷酸结合寡聚化结构域

蛋白 2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, NOD2) 鼠单克隆抗体, 货号: sc-56168, 美国 Santa Cruz 公司; 兔单克隆抗体: 血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) (货号: ab214424)、SMAD 家族成员 3 (SMAD family member 3, SMAD3) (货号: ab40854)、血管生成素-1 (angiopoietin-1, Ang-1) (货号: ab183701)、兔多克隆抗体: 血小板-内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31) (货号: ab281583), 美国 Abcam 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (货号: 6004-1-IG)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠二抗 (货号: SA00001-1)、CD31 兔多克隆抗体 (货号: 11265-1-AP)、重组人源 VEGF₁₆₅ (货号: HZ-1038), 武汉三鹰生物技术有限公司; HRP 标记羊抗兔二抗 (货号: AS014)、VEGF 兔单克隆抗体 (货号: A23759)、Cy3 标记山羊抗兔 IgG(H+L) (货号: AS007), 武汉爱博泰克生物科技有限公司。Human CD31、VEGF、Ang-1 ELISA 试剂盒 (批号: ml1060878R、ml1064281R、ml1060749R), 上海酶联生物科技有限公司; SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒 (货号: P0012AC)、快速封闭液 (货号: P0013B), 上海碧云天生物技术股份有限公司; RIPA 组织/细胞裂解液 (货号: R0020)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: PC0020)、膜再生液 (货号: SW3022)、4% 细胞组织固定液 (货号: P1110)、Triton X-100 (货号: T8200)、DAPI 溶液 (货号 C0065), 北京索莱宝科技有限公司。

主要仪器 低温离心机 (型号: 5840R), 德国 Eppendorf 公司; 全自动酶标仪 (型号: MK3)、水套式 CO₂ 培养箱 (型号: CI191C), 美国 Thermo 公司; 凝胶成像系统 (型号: Tanon-5200), 上海 Tanon 科技公司; 电泳仪 (型号: PowerPac Basic), 美国 Bio Rad 公司; 普通光学显微镜 (型号: AE30/3), 日本尼康株式会社; 正置显微镜 (型号: ML31)、成像系统 (型号: MS60), 广州市明美光电技术有限公司; Revolve Generation 2 正倒置一体荧光显微镜, 型号: RVL2-K2, 美国 Echo 公司。

火把花根片候选靶标的收集和预测 利用 ETCM 2.0 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM2/front/#/>) 检索并收集整理火把花根片 (昆明山海棠) 所含中药的化学成分谱; 以及从中医药整合药理学网络计算平台 (TCMIPv2.0, <http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home>) 中检索火把花根片的相关化学成分及其潜在靶点, 使用“化合物靶标工具”对相关化学成分进行结构预测, 最终获得火把花根片候选靶标基因 (筛选条件: 可靠性参数 > 0.7)。

RA 疾病基因集收集和整理 根据 GEO 数据库中临床 RA 患者外周血转录组表达谱数据集 (GSE55235) 进行转录组数据的筛选; 并利用生信盒子平台 (<http://vip.sangerbox.com/>) 进行 ID 转换及差异基因分析, 以 $P < 0.05$, $|\log_2FC| > 1$ 为标准, 筛选 RA vs CON 差异基因。

“疾病基因-药物靶标”蛋白质互作 (PPI) 网络的构建及核心靶点挖掘 基于在线分析蛋白相互作用数据库 STRING 10.0 (<http://string-db.org/>) 中的生物分子间相互作用信息, 挖掘火把花根片针对 RA 的“药物靶标-疾病基因”相互作用, 并运用 Cytoscape3.9.0 软件中 CytoHubba 工具分析各靶标的最大团中心性 (maximal clique centrality, MCC)、度中心性 (degree centrality)、中介中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality), 进行关键节点的筛选, 最后选取其大于所有节点拓扑特征值中位数的节点为网络中的核心靶点。PPI 网络构建全部由 Cytoscape3.9.0 进行可视化。

功能及通路富集分析 使用 DAVID 工具 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对上述核心靶点进行 KEGG (<https://www.kegg.jp/>) 通路富集分析, 进一步推测火把花根片干预 RA 的核心通路。

实验动物 雄性 SPF 级 Lewis 大鼠 56 只 (购买自北京维通利华公司生物科技有限公司), 体质量 220~250 g, 动物许可证号: SYXK (京) 2021-0017。本研究操作严格遵循动物实验福利相关规定, 经中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会伦理审核批准 (批准号: IBTCMCACMS21-2307-06)。动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心, 所有动物自由饮水饮食, 恒温 24 ± 1 °C、光照/黑暗周期为 12 h。

实验动物模型建立及给药

造模剂的制备 结核杆菌溶于液体石蜡中配制浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 造模剂, 充分混合均匀。

佐剂诱导性关节炎 (adjuvant-induced arthritis, AIA) 大鼠模型的建立 按体质量随机分为 7 组, 每组 8 只, 分组为: 正常组 (CON)、模型组 (MOD)、火把花根片 0.5、1、2、4 倍剂量组 (CRT-0.5、1、2、4)、甲氨蝶呤组 (MTX)。除 CON 组外, 其余各组大鼠提前剃去尾根部毛发, 每只于尾根部皮内注射造模剂 0.1 mL, 诱导为 AIA 大鼠模型。

所有大鼠自免疫当天开始给药。CRT-0.5、1、2、4 倍剂量组按火把花根片 0.5、1、2、4 倍临床等效剂量 (72.5 、 145 、 290 、 $580 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行干预; MTX 组按甲氨蝶呤临床等效剂量 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行干预。灌胃 4 周,

每日1次, CON组和MOD组给予等体积生理盐水。各给药组按0.5 mL/100 g给药容量, 药物均溶于纯水中。配制CRT-0.5、1、2、4倍溶液浓度分别为20.39、40.79、81.58、163.15 mg·mL⁻¹; MTX配制成浓度为0.04 mg·mL⁻¹。

免疫组织化学法检测AIA模型大鼠CD31、VEGF的阳性表达 实验末次给药结束后, 取实验各组大鼠踝关节组织进行石蜡切片, 依次放入二甲苯-100%乙醇-95%乙醇-90%乙醇-80%乙醇-70%乙醇中进行梯度脱蜡, PBS洗, 滴加复合消化液20 min, 37 °C, PBS洗, 滴加抗原修复液20 min, 37 °C, PBS洗, 3%过氧化氢室温10 min, PBS洗, 5% BSA封闭2 h, 37 °C, 滴加稀释比为1:1 000的一抗(VEGF、CD31) 4 °C孵育过夜, 结合山羊抗兔二抗1 h, 37 °C、DAB显色、封片, 利用Image J分析阳性面积, 测定大鼠踝关节组织血管生成标志物CD31、VEGF阳性相对表达量。

HUVEC细胞培养 HUVEC细胞培养于ECM专用培养基(5%胎牛血清、5%青、链霉素、5%生长因子); 置于37 °C、5% CO₂培养箱中, 隔天换液, 细胞贴壁达80%左右胰酶消化传代。

HUVEC细胞诱导及给药、分组 待细胞生长汇合程度达80%~90%后, 0.25%胰酶消化, 培养基重悬后计数, 按照每孔5×10⁴个的密度接种于6孔板; 待细胞贴壁继续培养至细胞融合60%~70%左右, 除对照(CON)组外, 模型组及药物组均加入终浓度为20 ng·mL⁻¹ VEGF置于培养箱先行诱导90 min后, 再加入不同浓度的火把花根片(0.5、5、50 μg·mL⁻¹)及MTX(1 μmol·L⁻¹)培养24 h。将实验随机分为对照组(CON)、模型组(MOD)、火把花根片低、中、高剂量组(CRT-L/M/H)、甲氨蝶呤组(MTX)。

Transwell迁移实验 取对数生长期的HUVEC细胞消化。各给药组Transwell小室的上室中加入1 mL用无血清ECM培养基重悬的HUVEC细胞3×10⁴个, 以及200 μL相应浓度的火把花根片及MTX, CON组和MOD组加入等体积培养基; 除CON组外, 其余各组下室加入终浓度为20 ng·mL⁻¹ VEGF, 并补充ECM完全培养基至500 μL, 待细胞迁移16 h后, 将小室置于4%多聚甲醛中固定15 min, 0.1%结晶紫染色15 min, PBS清洗3次, 用润湿棉签拭去Transwell小室上室中未迁移细胞, 在光学显微镜下观察并拍照(200×, 400×), 采用Image J软件自动分析迁移到小室下表面的细胞数。

Transwell侵袭实验 提前将基质胶置于4 °C冰箱过夜融化, 用ECM基础培养基1:8稀释, 每孔45 μL包被Transwell小室上室底部, 静置于37 °C培养箱中2 h

使基质胶聚合成凝胶备用; Transwell上室加入100 μL用无血清ECM培养基重悬的HUVEC细胞3×10⁴个, 以及100 μL相应浓度的火把花根片及MTX, CON组和MOD组加入等体积培养基; 除CON组外, 其余各组下室加入终浓度为20 ng·mL⁻¹ VEGF, 并补充ECM完全培养基至500 μL, 待细胞侵袭培养16 h后, 将小室置于4%多聚甲醛中固定15 min, 0.1%结晶紫染色15 min, PBS清洗3次, 用润湿棉签拭去Transwell小室上室中未迁移细胞, 在光学显微镜下观察并拍照(200×, 400×), 采用Image J软件自动分析迁移到小室下表面的细胞数。

HUVEC细胞管腔形成实验 提前将基质胶放置冰上并放入4 °C溶解, 取100 μL溶解后的基质胶铺于96孔板内, 将96孔板置于37 °C培养箱中静止30 min至1 h; 消化细胞, 终止消化后离心弃去培养液, 用PBS洗1或2遍, 重悬制备细胞悬液。除CON组外, 每孔100 μL、1×10⁴个细胞接种于96孔板中, 同时加入终浓度为20 ng·mL⁻¹ VEGF, 接种后放入培养箱内预培养0.5 h, 再加入100 μL相应浓度的火把花根片及MTX, 放入培养箱培养5 h。置于显微镜下拍照观察血管状结构形成情况并拍照(100×), 计算管腔数。

ELISA法检测HUVEC细胞血管生成相关因子的表达水平 各组细胞给药24 h后吸取上清, 于4 °C、2 500 r·min⁻¹离心10 min, 取上清待测。采用ELISA法测定CD31、VEGF、Ang-1水平, 操作严格按照试剂盒说明书进行。

免疫荧光法检测HUVEC细胞中CD31、VEGF的阳性表达 细胞按每孔1×10⁴个的密度接种于12孔板中, 并按照各实验分组进行诱导及给药置于37 °C、5% CO₂孵育箱培养24 h后, PBS清洗1遍, 滴加4%多聚甲醛室温固定30 min, 依次使用0.1% Triton X-100处理5 min、5% BSA封闭20 min, PBS清洗, 滴加一抗CD31、VEGF稀释液(稀释比均为1:200)于4 °C冰箱孵育过夜, PBS清洗后, 滴加荧光二抗(1:400), PBS再次清洗后, DAPI避光染色15 min, 封片, 通过荧光显微镜观察染色情况并摄取图像, 采用Image J软件分析CD31、VEGF的阳性表达。

Western blot法检测HUVEC细胞相关蛋白表达 将给药培养24 h后的细胞胰酶消化, 2 500 r·min⁻¹离心5 min, 弃去上清。PBS洗后再次2 500 r·min⁻¹离心5 min, 弃上清, 加入适量提前配好混有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液, 置于冰上裂解20 min后, 于4 °C、12 000 r·min⁻¹离心15 min, 所得上清即为细胞蛋白原液。经BCA蛋白浓度定量, 100 °C金属浴加热变性10 min。取30 μg总蛋白上样, 设置电泳

条件为恒压 80 V 30 min、120 V 60 min 进行 SDS-PAGE 电泳, 250 mA 恒流湿法转膜 60 min, 快速封闭 30 min 后, 加入一抗稀释液 (NOD2, 1:200、CD31, 1:1 000、Ang-1, 1:15 000、SMAD3, 1:1 000、VEGFA, 1:1 000) 置于 4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤后二抗稀释液 (1:3 000) 常温孵育 1 h, TBST 洗涤后采用 ECL 法化学发光成像检测目的蛋白条带, 使用 Image J 对目的蛋白进行灰度值分析, 通过与内参蛋白 (GAPDH) 比值计算得出目的蛋白的相对表达量。

数据处理与分析 采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件作图, 采用 SPSS 24.0 软件进行数据分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 满足方差齐性, 使用 LSD 进行分析, 如不满足, 则使用非参数齐性检验。各组数据结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

结果

1 火把花根片在 RA 治疗中的潜在作用机制挖掘

本研究基于临床 RA 患者外周血转录组表达谱数据集 (GSE55235), 按照 $P < 0.05$, $|\log_2 FC| > 1$ 的标准, 筛选出 RA vs CON 差异基因, 共得到 1 216 个基因; 通过整合 ETCM、TCMIP 数据库获取火把花根片的候选靶标基因共 244 个。随后, 基于 STRING 数据库中生物分子间相互作用信息, 构建 CRT 靶向 RA 的“药物靶标-疾病基因”的相互作用网络, 得到包含 1 441 个节点, 23 782 条边的 PPI 网络。使用 CytoHubba 工具进行网络拓扑特征值分析 ($\text{degree} \geq 19$; $\text{MCC} \geq 51\ 972$; $\text{closeness} \geq 531.7$; $\text{betweenness} \geq 534.5$), 筛选出 483 个核心基因; 利用 DAVID 工具进行 KEGG 通路富集分析, 共富集到 148 条通路。去除不相关通路, 基于 $P < 0.001$ 的标准最终筛选出 49 条核心通路。

结合文献调研和上述通路分类显示, 发现核心基因显著富集于与 RA 病理环节中“免疫-炎症”失衡相关的通路, 包括细胞因子-细胞因子受体相互作用、破骨细胞分化、Th17 细胞分化、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、NOD 样受体信号通路等, 以及与血管生成密切相关通路: 血小板活化、松弛素信号通路、VEGF 信号通路、HIF-1 信号通路、造血细胞谱系、白细胞跨内皮迁移、FoxO 信号通路等 (图 1A), 提示 CRT 可能通过调控上述相关通路发挥延缓 RA 病程进展的作用。

通过对所构建火把花根片靶向 RA 的“药物靶标-疾病基因”的相互作用网络进一步分析, 结果显示 NOD2、SMAD3 和 VEGFA 等核心靶标基因显著富集于与调节免疫炎症、血管生成相关环节密切相关的

NOD 样受体信号通路、VEGF 信号通路、FoxO 信号通路等 (图 1B)。其中, NOD2 既是 RA 疾病差异基因也是火把花根片药物作用靶标, 作为 NOD 样受体信号通路中的起始关键分子直接影响 RA 的炎症进展, 其通过识别外来病原体并激活下游免疫细胞和炎症介质释放, 推动 RA 中的免疫炎症失衡, 加剧滑膜炎和关节破坏, 发挥上游调控作用^[16,17]; 同时 NOD2 促炎信号会引发并维持 RA 中的持续性局部炎症微环境, 使得活性转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β) 的释放增加^[18], 进一步激活与其相关的下游靶点 SMAD3 的信号转导, 促进滑膜细胞、成纤维细胞的增殖和血管生成过程^[19]。此外, 作为 RA 疾病差异基因的 SMAD3 还可通过与 VEGF 信号通路的相互作用, 调节与血管生成相关的基因表达, 如 VEGF, 引起内皮细胞增殖和迁移, 增加血管通透性, 从而影响血管生成过程^[20,21]。本研究进一步发现同样作为 RA 疾病差异基因和火把花根片药物作用靶标的核心基因 VEGFA, 能够激活 VEGF 信号通路促进病理性血管新生和滑膜增生^[8]。因此, 本课题组推测靶向 NOD2/SMAD3/VEGFA 信号轴是火把花根片缓解 RA 免疫炎症紊乱、改善血管内皮细胞功能紊乱及血管生成过程的潜在治疗机制。

2 火把花根片可显著降低 AIA 模型大鼠踝关节组织 CD31、VEGF 的阳性表达

与 CON 组相比 (图 2), AIA 模型大鼠踝关节组织中 CD31、VEGF 的阳性表达面积显著增多 ($P < 0.001$); 火把花根片各剂量组可不同程度地减少 CD31、VEGF 的阳性面积 ($P < 0.05$, $P < 0.001$); 与 MTX 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 火把花根片可抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞迁移和侵袭能力

如图 3 所示, 与 CON 组相比, HUVEC 细胞加入 20 ng·mL⁻¹ VEGF 后, MOD 组迁移和侵袭细胞数量显著增加 ($P < 0.001$); 与 MOD 组相比, 火把花根片各浓度组具有良好量效关系, 其迁移及侵袭的细胞数量呈现不同程度的降低 ($P < 0.001$), 其中, 其对迁移细胞数量的抑制作用与 MTX 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。提示火把花根片各浓度组可明显抑制 HUVEC 细胞的迁移、侵袭能力。

4 火把花根片可抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞管腔形成

据图 4 血管形成统计, MOD 组 HUVEC 细胞管腔分支点数目较 CON 组显著增加 ($P < 0.001$); 火把花根片各浓度组 HUVEC 细胞管腔分支点数目显著低于 MOD 组 ($P < 0.001$), 且呈浓度依赖关系, 与 MTX 组对

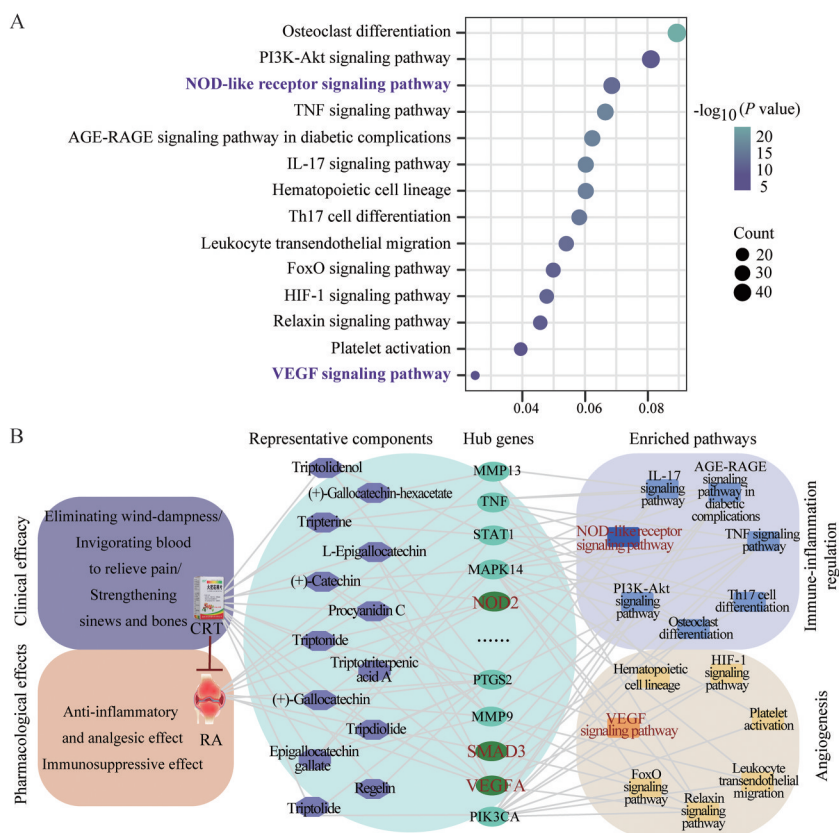


Figure 1 The KEGG enrichment analysis and key pathway network diagram of Colquhounia Root Tablets (CRT) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). A: The core genes were significantly enriched in signaling pathways related to the regulation of "immune-inflammation" and angiogenesis, as displayed in the bubble chart; B: The "drug component-core target" pathway diagram associated with the angiogenesis mechanism of CRT in the treatment of RA, where the octagonal nodes represent the active components of CRT, circular nodes represent core network targets, and rectangular nodes represent enriched pathways

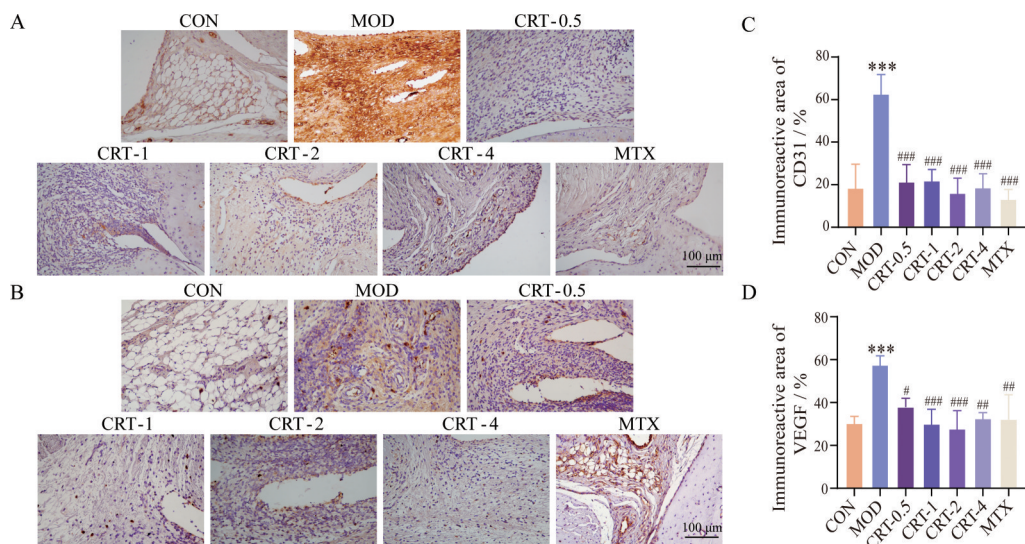


Figure 2 Effects of CRT (the doses of CRT groups are as follows: 72.5, 145, 290, 580 mg·kg⁻¹; MTX group: 0.2 mg·kg⁻¹) on platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) and vascular endothelial growth factor (VEGF) positive expression in the ankle joint of adjuvant-induced arthritis (AIA) model rats detected by immunohistochemistry. A: Representative images of immunohistochemical staining for CD31 in different groups (400×, scale bar: 100 μm); B: Representative images of immunohistochemical staining for VEGF in different groups (400×, scale bar: 100 μm); C: Quantitative analysis of CD31 expression levels in ankle joint of AIA model rats; D: Quantitative analysis of VEGF expression levels in ankle joint of AIA model rats. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$. ****P* < 0.001 vs CON group; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs MOD group

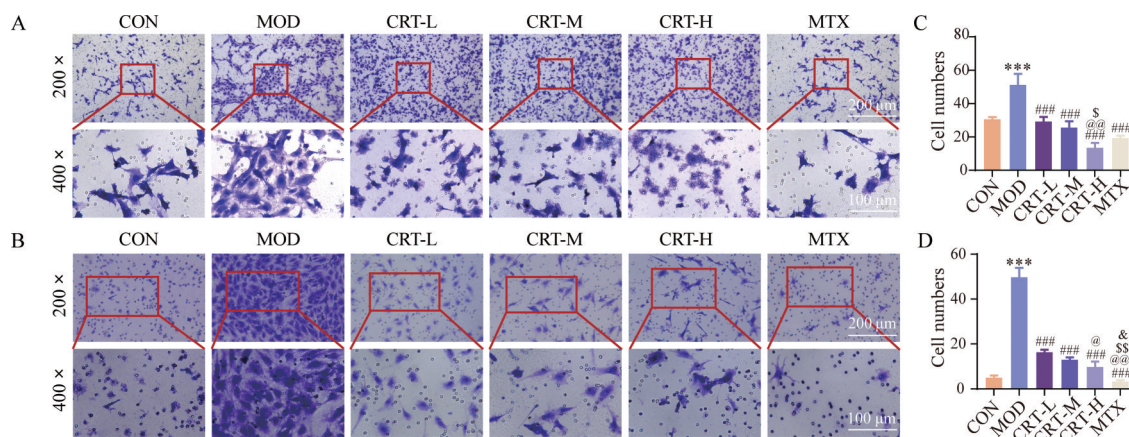


Figure 3 Effect of CRT (the concentrations of CRT-L/M/H: 0.5/5/50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; MTX: 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on VEGF-induced migration and invasion of HUVECs. A: Representative photos of cell migration from different groups; B: Representative photos of cell invasion from different groups; C: Quantitative analysis of cell migration abilities of HUVECs in different groups; D: Quantitative analysis of cell invasion abilities of HUVECs in different groups. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs CON group; ### $P < 0.001$ vs MOD group; @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$, @@@ $P < 0.001$ vs CRT-L group; $^{\text{S}}P < 0.05$, $^{\text{SS}}P < 0.01$ vs CRT-M group; & $P < 0.05$ vs CRT-H group

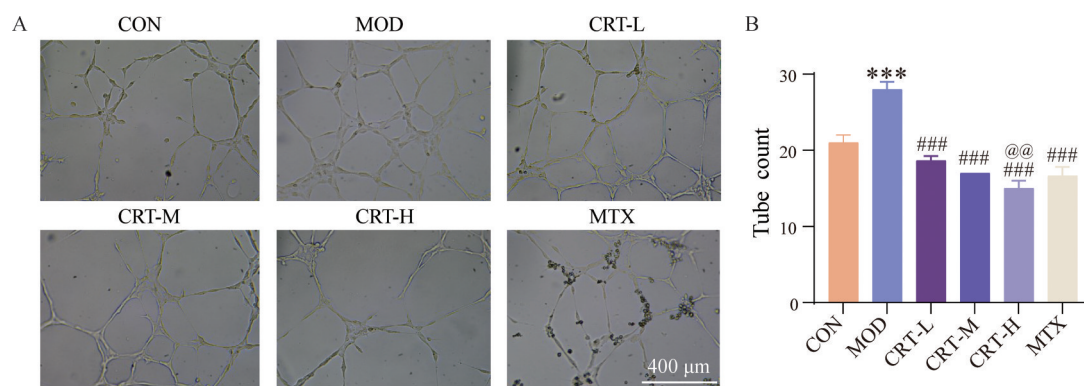


Figure 4 Effect of CRT on tube formation in VEGF-induced HUVECs. A: Tube formation in Matrigel (100 \times , scale bar: 400 μm); B: Quantitative analysis of tube formation abilities of HUVECs in different groups. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs CON group; ### $P < 0.001$ vs MOD group; @@ $P < 0.01$ vs CRT-L group

细胞管腔形成的抑制作用无明显差异 ($P > 0.05$), 表明火把花根片可显著抑制由 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞管腔形成。

5 火把花根片可显著改善 HUVEC 细胞上清液中血管生成相关因子的异常升高

本实验在各组细胞给药 24 h 后离心取上清进行 ELISA 含量测定, 结果如图 5 所示, 与 CON 组比较, HUVEC 细胞 MOD 组上清液中 VEGF、CD31、Ang-1 含量水平明显增高 ($P < 0.001$); 火把花根片各浓度组可显著降低 MOD 组中异常表达的三者含量水平 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 效果与 MTX 组相当 ($P > 0.05$), 提示火把花根片可通过显著降低 VEGF、CD31、Ang-1 含量水平有效抑制血管异常生成。

6 火把花根片可显著降低 HUVEC 细胞中 CD31、VEGF 的阳性表达

如图 6 免疫荧光结果所示, HUVEC 细胞 MOD 组

中 VEGF、CD31 阳性表达水平较 CON 组明显增高 ($P < 0.001$); 与 MOD 组比较, 火把花根片低、中、高浓度组二者阳性表达水平呈现不同程度下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 效果与 MTX 组相当 ($P > 0.05$), 表明火把花根片可显著降低 HUVEC 细胞中 CD31、VEGF 的阳性表达。

7 火把花根片可显著降低 HUVEC 细胞中 NOD2、SMAD3、VEGFA、CD31、Ang-1 蛋白表达

血管生成相关蛋白的表达量结果 (图 7) 说明, MOD 组 HUVEC 细胞 NOD2、SMAD3、VEGFA、CD31、Ang-1 蛋白表达水平较 CON 组明显升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 与 MOD 组比较, 火把花根片各浓度组 NOD2、SMAD3、VEGFA、CD31、Ang-1 蛋白表达水平呈现不同程度降低 ($P < 0.01$); 与火把花根片各浓度组相比, MTX 组中 SMAD3、Ang-1 的蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.001$), 而 NOD2、VEGF、CD31 的蛋白表达

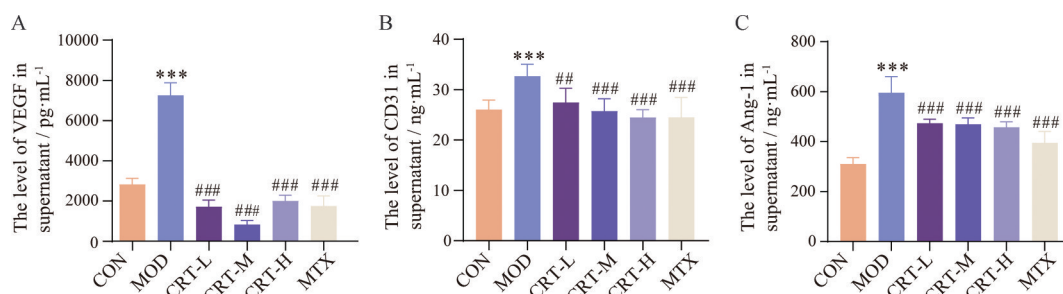


Figure 5 Effect of CRT on the levels of VEGF (A), CD31 (B), and Ang-1 (C) in the supernatant of VEGF-induced HUVECs. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs CON group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs MOD group

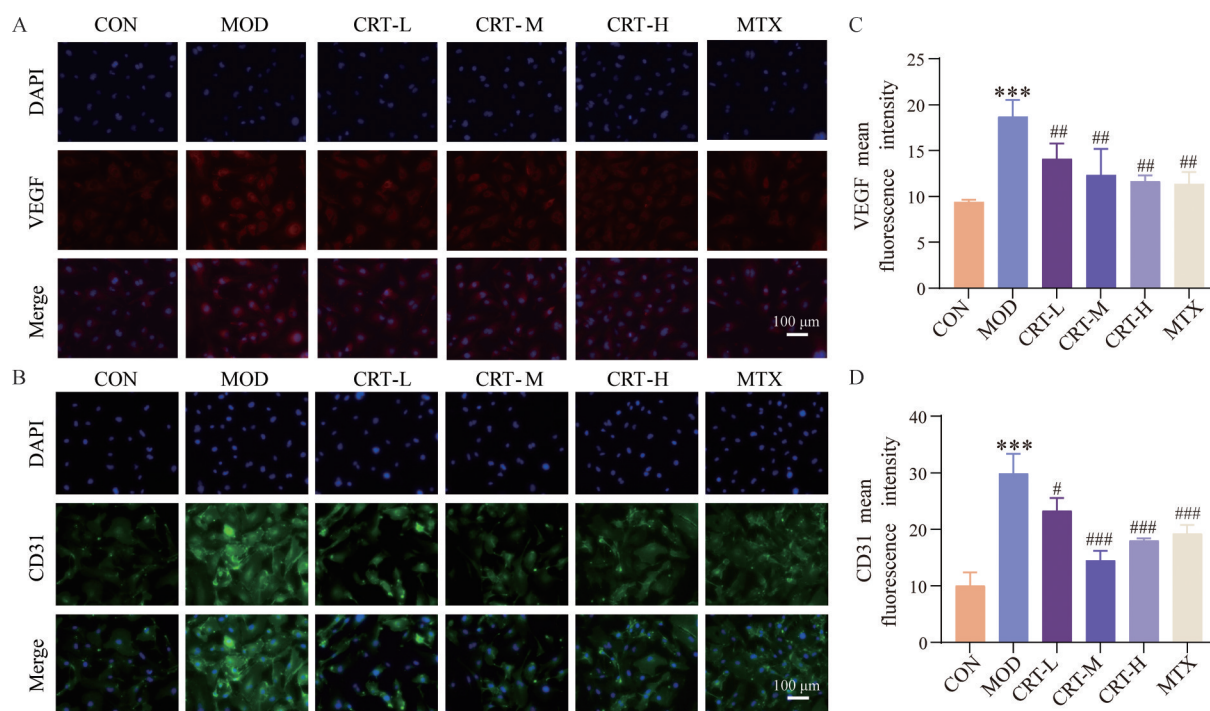


Figure 6 Effect of CRT on the positive expression levels of VEGF and CD31 in VEGF-induced HUVECs. A: Representative image of VEGF-positive expression level from different groups, with VEGF shown in red fluorescence and DAPI in blue fluorescence; B: Representative image of CD31-positive expression level from different groups, with CD31 shown in green fluorescence and DAPI in blue fluorescence; C: Quantitative analysis of VEGF-positive expression level of HUVECs in different groups; D: Quantitative analysis of CD31-positive expression level of HUVECs in different groups. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs CON group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs MOD group

水平无明显差异 ($P > 0.05$)。

讨论

尽管RA治疗取得了快速进展,但许多患者仍未能实现持续缓解^[1]。研究表明,抑制滑膜血管异常新生是RA早期治疗的重要策略,与RA患者预后密切相关^[22]。因此,亟需寻找有效的干预措施以抑制RA滑膜血管生成。

本研究基于火把花根片在治疗RA中呈现的临床有效性与安全性,结合转录组表达谱数据挖掘和网络药理学分析,初步探讨其在抑制RA滑膜血管生成中

的潜能及其候选作用靶标。网络分析结果发现NOD2、SMAD3和VEGFA等核心靶标基因显著富集于与调节免疫炎症、血管生成环节密切相关的NOD样受体信号通路、VEGF信号通路等,提示参与血管生成的NOD2/SMAD3/VEGFA信号轴可能是火把花根片治疗RA的潜在分子机制。进一步通过血管生成靶细胞的体外实验,以验证其对NOD2/SMAD3/VEGF信号轴的调控作用,揭示此信号轴在RA病程中的关键调节作用。

血管生成是一个依赖于血管内皮细胞功能的复杂过程,涉内皮细胞的活化、增殖、迁移、重塑等,其调控

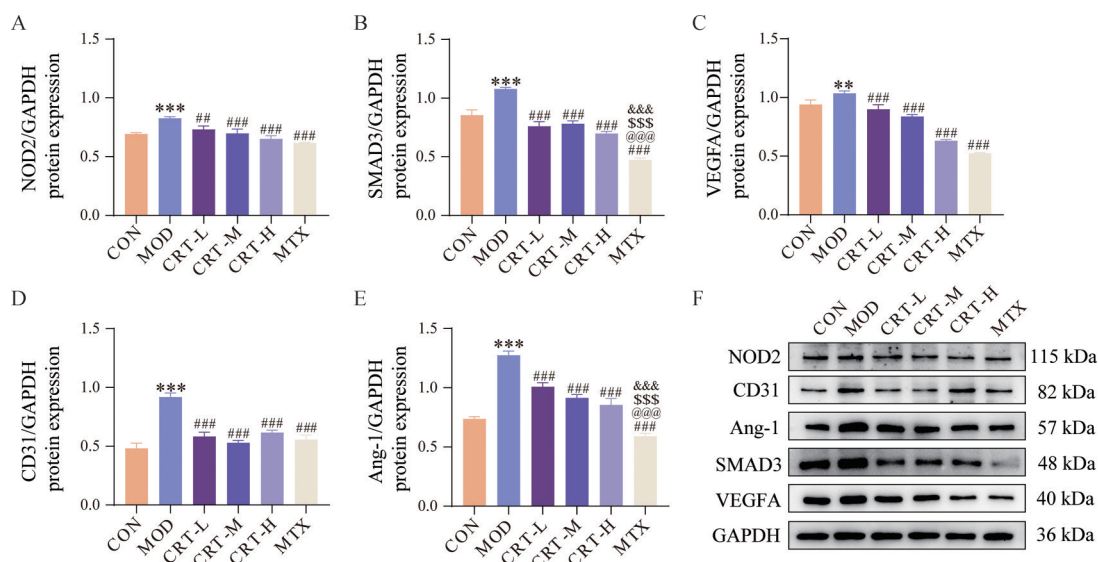


Figure 7 Effect of CRT on the protein expression levels of NOD2/SMAD3/VEGFA and angiogenesis-related factors in VEGF-induced HUVECs. A-E: Quantitative analysis of NOD2/SMAD3/VEGFA/CD31/Ang-1 protein expression levels of HUVEC in different groups; F: Western blot images of NOD2/SMAD3/VEGFA/CD31/Ang-1 proteins lanes. $n = 3, \bar{x} \pm s$. $*P < 0.01$, $**P < 0.001$ vs CON group; $\#P < 0.01$, $###P < 0.001$ vs MOD group; $@@@P < 0.001$ vs CRT-L group; $$$$P < 0.001$ vs CRT-M group; $\&\&\&P < 0.001$ vs CRT-H group

也受到多种生长因子和细胞因子的影响^[23,24]。现已知,滑膜血管异常新生是加重滑膜炎,促进早期RA发生发展的核心环节^[3]。而血管内皮细胞功能的正常与否直接决定血管生成的发生发展以及新生血管的稳定性^[25]。因此,内皮细胞功能的调节对于干预RA血管生成至关重要。在RA持续性炎症病理状态下,滑膜局部缺氧微环境,诱导促血管生成因子过度表达。血管内皮细胞对这些因子的高敏感性,进一步刺激内皮细胞过度活化、增殖和迁移,导致其功能失调,加剧滑膜血管过度新生,从而推动血管翳生成^[26-28]。由于血管内皮细胞在血管生成过程中的核心作用,本研究基于佐剂诱导性关节炎大鼠模型,选定血管内皮细胞标志物CD31和血管生成标志物VEGF评估火把花根片对RA病理组织中血管内皮功能的调控作用。进一步地,基于HUVEC细胞作为RA血管生成的经典效应细胞,通过迁移、侵袭及管腔形成实验模拟血管生成的动态过程^[29]以评估火把花根片对HUVEC细胞血管内皮功能的影响,来探讨其在RA血管生成中的作用。本实验结果表明,火把花根片可显著下调AIA模型大鼠踝关节组织中血管生成标志物CD31、VEGF的表达,有效降低由VEGF诱导的HUVEC细胞迁移、侵袭能力以及管腔形成能力,并呈现浓度依赖关系,提示火把花根片具有改善血管内皮功能失调,从而抑制RA血管异常新生的作用。

VEGF是血管生成的主要调节因子。RA患者滑膜组织中VEGF的表达显著升高,与疾病严重程度相

关^[27]。其中,作为最关键的促血管生成因子VEGFA通过与其受体特异性结合,显著促进内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成,进一步加速血管新生,从而加剧滑膜炎和关节损伤^[26]。在此过程中,NOD2/SMAD3/VEGF信号轴发挥了重要的调节作用。NOD2是一种胞质内模式识别受体,可触发炎症反应^[30]。它的异常激活不仅能触发NF- κ B和MAPK信号通路,增加HIF-1 α 表达,进一步调控VEGF表达而促进血管生成,还能促进多种炎症介质释放,从而加剧RA的炎症过程^[31,32]。SMAD3则作为TGF- β 信号传导途径的核心转录因子^[19,33],能直接参与VEGF的转录调控,并通过与HIF-1 α 等转录因子的协同作用,增强VEGF的表达,影响内皮细胞的过度活化、增殖和迁移,进一步推动血管新生^[34-37]。本研究Western blot实验结果进一步验证了火把花根片对这一信号通路的调控作用,提示火把花根片干预RA血管生成与NOD2/SMAD3/VEGF信号通路的激活有关,即火把花根片能够通过抑制NOD2的活化以减弱RA炎症反应,同时阻断SMAD3的信号传导减缓关节损伤过程,并进一步抑制VEGF的表达以改善内皮细胞功能紊乱,最终抑制病理性血管异常生成,达到缓解RA症状的效果。此外,RA病理状态下的VEGF表达升高,也进一步驱动滑膜内其他促血管生成因子的异常表达,导致血管内皮功能紊乱,加速血管异常生成。如血管内皮细胞标志物CD31,促使滑膜内皮细胞的异常增殖和新生血管形成,可作为血管生成活跃程度的评价指标之一^[24]。Ang-1的表达增加有

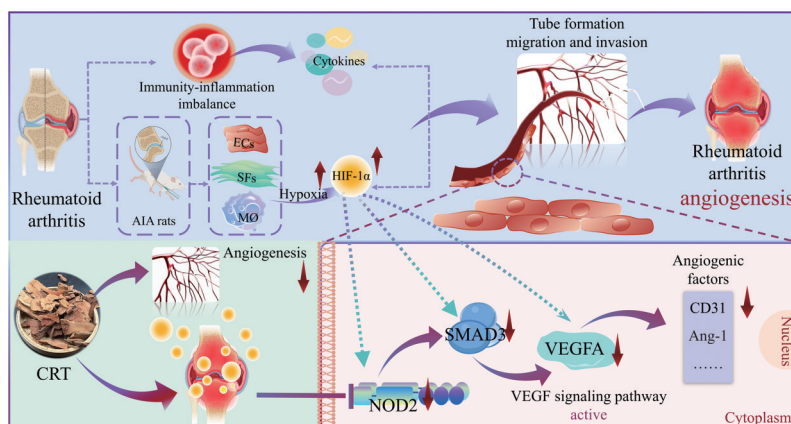


Figure 8 Schematic diagram of the mechanism by which CRT inhibits abnormal angiogenesis in RA

助于维持新生血管的成熟和稳定,导致滑膜组织中血管的异常增生^[5,9]。与其一致的是,本实验结果发现,火把花根片能够通过下调CD31、Ang-1的表达以抑制内皮细胞的功能异常,进而抑制血管异常生成,起到延缓RA病程进展的治疗作用(图8)。为验证上述发现,本研究计划在下一步工作中建立符合RA临床特征的动物模型,进一步深入研究火把花根片对于NOD2/SMAD3/VEGFA信号通路的体内调控作用,全面评估火把花根片干预RA血管生成的具体分子机制,为临床用药提供更为精准和个性化的指导。

本研究已证明火把花根片可显著下调AIA模型大鼠踝关节组织中血管生成标志物CD31、VEGF的阳性表达,有效抑制由VEGF诱导的HUVEC细胞迁移、侵袭及管腔形成以改善血管内皮细胞功能紊乱,显著降低血管生成相关因子VEGF、CD31、Ang-1的表达水平,减少HUVEC细胞中CD31、VEGF的阳性表达。从血管生成角度初步探讨了火把花根片通过改善血管内皮细胞功能以缓解RA滑膜异常血管生成的机制可能与靶向调控NOD2/SMAD3/VEGF信号通路有关。上述发现丰富了中成药火把花根片在抑制RA病理性血管生成方面的科学内涵,同时也为火把花根片治疗RA的临床应用提供了实验基础。

作者贡献: 蔡冰冰负责手稿撰写工作; 蔡冰冰、陈亚文负责实验验证; 李涛、曾源负责数据处理; 张彦琼、林娜、毛霞、林雅负责实验设计、实验指导和手稿修改; 张彦琼、毛霞、林娜提供了实验经费支持。所有作者都阅读了手稿的最终版本。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Axel F, Benoît G, Bridget H, et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18: 591-602.
- [2] Zhao F, He Y, Zhao Z, et al. The Notch signaling-regulated angiogenesis in rheumatoid arthritis: pathogenic mechanisms and therapeutic potentials [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1272133.
- [3] Laha A, Nasra S, Bhatia D, et al. Advancements in rheumatoid arthritis therapy: a journey from conventional therapy to precision medicine *via* nanoparticles targeting immune cells [J]. *Nanoscale*, 2024, 16: 14975-14993
- [4] Maruotti N, Cantatore FP, Ribatti D. Putative effects of potentially anti-angiogenic drugs in rheumatic diseases [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70: 135-140.
- [5] Wang Y, Wu H, Deng R, et al. Research progress of synovial microenvironment in rheumatoid arthritis [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2020, 36: 754-759.
- [6] Kartik B, Kevin W. Precision medicine in rheumatoid arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2022, 36: 101742.
- [7] Gan PR, Liu C, Wu H, et al. The role of HIF-VEGF-Ang-2 signal transduction-mediated synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1246-1252.
- [8] Robert L, Severino U, Andromachi K, et al. VEGF/VEGFR2 signaling regulates hippocampal axon branching during development [J]. *eLife*, 2019, 8: e49818.
- [9] Ouyang D, Li X, Zhan GX, et al. Inhibition of Pannus Formation by Wutoutang in AIA rats with wind-cold-dampness Bi syndrome *via* down-regulating HIF-1 α /VEGFA/Ang signaling pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志)*, 2024, 30: 10-18.
- [10] Zhong Y, Zhao X, Zhao J, et al. Research progress of pharmacological effects and clinical applications of Huobahuagen Tablets [J]. *Drug Eval Res (药物评价研究)*, 2021, 44: 2020-2027.
- [11] Wang T, Li ZF, Li T, et al. Research progress on the mechanism of Kunmingshanhaitang in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Rheum Arthritis (风湿病与关节炎)*, 2019, 8: 60-63.
- [12] Wang KX, Mao X, Zhang YQ, et al. *In vitro* "benefit-risk" evaluation and network regulation mechanism of Colquhounia Root Tablets and its key material basis [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2022, 47: 6438-6449.

- [13] Ge JD, Huang NN, Li XJY, et al. Study on efficacy network and mechanism of Huobahuagen Tablets treating different diseases with same method for lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 4223-4235.
- [14] Li J, Zhao XF, Gui FJ, et al. Clinical study of Huobahuagen Tablets combined with leflunomide in treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Drugs Clin (现代药物与临床)*, 2022, 37: 2333-2338.
- [15] Yao P. Integrated Network Pharmacology and Metabolomics to Explore the Mechanism of *Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch for the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Formulation Improvement (基于网络药理学和代谢组学的昆明山海棠对类风湿关节炎治疗机制的初步探究及制剂改进)[D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2024.
- [16] Franca R, Vieira SM, Talbot J, et al. Expression and activity of NOD1 and NOD2/RIPK2 signalling in mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2016, 45: 8-12.
- [17] Kim HW, Kwon YJ, Park BW, et al. Differential expressions of NOD-like receptors and their associations with inflammatory responses in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2017, 35: 630-637.
- [18] Zong J, Salim M, Zhou H, et al. NOD2 deletion promotes cardiac hypertrophy and fibrosis induced by pressure overload [J]. *Lab Invest*, 2013, 93: 1128-1136.
- [19] Zhou G, Sun X, Qin Q, et al. Loss of SMAD7 promotes inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2537.
- [20] Youn CJ, Ashmi D, Peter R, et al. SMAD3-deficient mice have reduced esophageal fibrosis and angiogenesis in a model of egg-induced eosinophilic esophagitis [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2014, 59: 10-16.
- [21] Peng L, Wang S, Yin JW, et al. Effects of isoflurane on angiogenesis and SMAD signaling pathway in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2019, 35: 1731-1738.
- [22] Kim JW, Kong JS, Lee S, et al. Angiogenic cytokines can reflect the synovitis severity and treatment response to biologics in rheumatoid arthritis [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52: 843-853.
- [23] Fang J, Wang Z, Miao CY. Angiogenesis after ischemic stroke [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44: 1305-1321.
- [24] Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Angiogenesis*, 2015, 18: 433-448.
- [25] Li PT. Characteristics of Plasma Exosomes in Rheumatoid Arthritis and Its Effect on the Function of Human Vascular Endothelial Cells (类风湿关节炎血浆外泌体特征及对入血管内皮细胞功能的影响) [D]. Guizhou: Guizhou Medical University, 2020.
- [26] Li CC, Zhang YQ, Li WJ, et al. Exploring the effect and mechanism of Baihu-Guizhi Decoction on rheumatoid arthritis with hot syndrome from the angiogenesis regulatory network mediated by VEGF/VEGFR2/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1044-1053.
- [27] Luo K, Wang Z, Wang K. Impacts of alpinetin on angiogenesis in knee osteoarthritis rats by regulating the VEGF/SphK1/S1P signaling pathway [J]. *Tianjin Med J (天津医药)*, 2024, 52: 480-485.
- [28] Yan H, Liu EZ, Zhou HH, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes proliferation of endothelial cell and increase expression of VEGF in rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Jt Surg (Elec Ed) (中华关节外科杂志(电子版))*, 2013, 7: 373-377.
- [29] Wang JX, Jia KX, Ming RR, et al. Protective effect of Tongluo Shenggu Capsule on function damage of human umbilical vein endothelial cells induced by glucocorticoid [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2021, 27: 48-55.
- [30] Trindade BC, Chen GY. NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases [J]. *Immunol Rev*, 2020, 297: 139-161.
- [31] Pang Y, Zhao L, Ji X, et al. Analyses of transcriptomics upon IL-1beta-stimulated mouse chondrocytes and the protective effect of catalpol through the NOD2/NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Molecules*, 2023, 28: 1606.
- [32] Zhao N, Hou CC, Zhang P, et al. Expression of NOD-like receptors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis [J]. *J New Med (新医学)*, 2019, 50: 855-858.
- [33] Wu YP, Zhou G, Gao S, et al. Effect of Shuangxigujiaobao on fracture healing in rats by regulating bone growth factor and TGF- β /SMAD3 pathway [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志)*, 2024. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20240716.1821.004.html>.
- [34] Lin S, Xie J, Gong T, et al. SMAD signal pathway regulates angiogenesis via endothelial cell in an adipose-derived stromal cell/endothelial cell co-culture, 3D gel model [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 412: 281-288.
- [35] Iwanishi H, Fujita N, Tomoyose K, et al. Inhibition of development of laser-induced choroidal neovascularization with suppression of infiltration of macrophages in SMAD3-null mice [J]. *Lab Invest*, 2016, 96: 641-651.
- [36] Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, et al. Interdependence of HIF-1alpha and TGF-beta/SMAD3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300: F898.
- [37] Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, et al. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 38527-38535.