

• 论 著 •

二甲双胍对佐剂关节炎大鼠炎症和滑膜细胞自噬的影响*

陈笑天¹, 宋宜宁², 咸 郝², 蒋文博², 祖梦涵², 闫雪松², 徐 亮², 王庆斌², 王 颖^{2△}

(1. 蚌埠医学院第一附属医院骨科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院药学院药理教研室, 安徽 蚌埠 233000)

[摘要] **目的** 探讨二甲双胍(Met)对佐剂关节炎(AA)大鼠炎症和滑膜细胞自噬的作用及机制。**方法** 采用 Freund 完全佐剂诱导 AA 大鼠模型。采用足爪肿胀度评分评价 Met 对 AA 大鼠炎症的作用。取大鼠滑膜进行原代滑膜细胞培养,采用四甲基偶氮唑盐比色法检测 Met 对滑膜细胞增殖的影响。采用蛋白质印迹检测 Met 及 Compound C 对自噬相关蛋白——自噬效应蛋白 Beclin 1 抗体、P62 表达的影响。**结果** Met 可改善 AA 大鼠的全身炎症反应,减轻足爪部肿胀,尤其是高剂量时效果更明显;Met 可抑制肿瘤坏死因子-α(TNF-α)刺激的大鼠滑膜细胞增殖,且呈时间剂量依赖性;Met 可抑制 TNF-α 刺激的大鼠滑膜细胞自噬,而 Compound C 可降低 Met 抑制自噬的程度。**结论** Met 可改善 AA 大鼠的全身炎症反应,且可在体外抑制 TNF-α 刺激的大鼠滑膜细胞增殖及自噬,其机制可能与 Met 激活 AMP 激活蛋白激酶信号通路相关。

[关键词] 二甲双胍; 佐剂关节炎; 滑膜细胞自噬

DOI:10. 3969/j. issn. 1009-5519. 2023. 14. 003 **中图法分类号:**R684. 3

文章编号:1009-5519(2023)14-2352-05 **文献标识码:**A

Effect of metformin on inflammation and synovial cell autophagy
in adjuvant arthritis rats*

CHEN Xiaotian¹, SONG Yining², XIAN Hao², JIANG Wenbo², ZU Menghan², YAN Xuesong²,
XU Liang², WANG Qingbin², WANG Ying^{2△}

(1. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University,
Bengbu, Anhui 233004, China; 2. Pharmacology Department of Bengbu Medical College,
Bengbu, Anhui 233000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of metformin(Met) on inflammation and synovial cell autophagy in adjuvant arthritis(AA) rats. **Methods** The AA rat model was induced by Freund complete adjuvant. The effect of Met on inflammation in AA rats was evaluated by paw swelling score. Primary synovial cells were cultured from rat synovial cells, and the effects of Met on synovial cell proliferation were detected by tetramethylazolium salt colorimetry. The effects of Met and Compound C on the expression of Beclin1 antibody and P62, a protein associated with autophagy, were detected by western blot. **Results** Met could improve the systemic inflammatory response and reduce the swelling of the paws in AA rats, especially at high dose. Met inhibited the proliferation of synovial cells stimulated by tumor necrosis factor-α(TNF-α) in a time-dose dependent manner. Met inhibited autophagy in TNF-α-stimulated synovial cells, and Compound C reduced the degree of Met inhibition. **Conclusion** Met can improve systemic inflammatory response in AA rats, and inhibit the proliferation and autophagy of TNF-α-stimulated synovial cells in vitro, which may be related to the activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway by Met.

[Key words] Metformin; Adjuvant arthritis; Synovial autophagy

类风湿关节炎(RA)是一种自身免疫性和全身炎症性疾病,以滑膜炎症、软骨和骨破坏及全身表现为主^[1]。发病 1 年内未治疗的 RA 患者中 20%~30% 将发生永久性功能丧失,严重影响患者的健康和生活质量^[2]。RA 病因不明,目前认为该病的发生和病情

进展与感染、遗传、免疫紊乱等有关。成纤维样滑膜细胞(FLS)来源于内膜间质细胞,其异常增生活化是 RA 特征性标志之一,常被看作是滑膜炎症和骨破坏中的关键作用点^[3],在 RA 的病程进展中发挥着重要作用。FLS 异常增殖导致其存在自噬失衡,这一“失

* 基金项目:蚌埠医学院自然科学重点项目(2020byzd054);蚌埠医学院校级创新训练项目(bydc2021013)。
作者简介:陈笑天(1989—),硕士研究生,主治医师,主要从事骨科基础研究。 △ 通信作者,E-mail:wangying_0711@126. com。

衡”状态主要来源于 FLS 的细胞信号传导异常,即激活不同的细胞表面膜受体会通过不同方式的细胞信号传导途径引起不同蛋白激酶的持续激活。

自噬是一种保守的次级溶酶体降解过程,通过该过程细胞降解并回收细胞内成分以应对环境应激,从而维持细胞内环境的稳态^[4]。多项研究表明,自噬与 RA 相关^[5-7],然而其对疾病的确切表现尚存在争议。因此,探索 FLS 自噬失衡与 FLS 异常增生活化的相互关系及其相关的调控途径可能为 RA 提供新的治疗策略。

二甲双胍(Met)是治疗 2 型糖尿病的核心药物^[8],在 50 余年的临床应用中已显示出安全、有效、不良反应少等优点。近年来,多项研究发现,Met 还能抑制全身炎症反应、调节免疫、影响骨代谢等^[9],但目前对其作用机制并未完全阐明。Met 可激活 AMP 激活蛋白激酶(AMPK),与自噬信号网络相关^[10]。本研究观察了 Met 对佐剂关节炎(AA)大鼠及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的大鼠 FLS 自噬的影响,并探讨了其相关机制,旨在为 RA 的临床治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 完全弗氏佐剂购自 Chondrex Inc(USA),Met 片(格华止)购自中美上海施贵宝制药有限公司,甲氨蝶呤(MTX)购自通化茂祥制药有限公司,二甲基亚砷购自上海麦克林生化有限公司,胎牛血清购自南京维森特生物技术有限公司,杜氏改良高糖 Eagle 培养基(DMEM)购自美国 Gibco 公司,二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶配制试剂盒、蛋白质印迹(Western blot)一抗稀释液均购自上海碧云天生物技术有限公司,兔抗自噬效应蛋白(Beclin1)抗体、鼠抗 β -Actin、兔抗 P2 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司,TNF- α 购自美国 Protein tech 公司,YLS-7C 足趾容积测量仪购自安徽正华仪器设备有限公司,抗原修复液、免疫组织化学(免疫组化)二抗、二氨基联苯胺显色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司,免疫染色封闭液购自上海碧云天生物技术有限公司,LEICA 2235 型轮转切片机、LEICA AUTOSTAINER XL 全自动染色机、LEICA ASP300S 全自动生物组织脱水机均购自德国 LEICA, MICROM HM525 型冷冻切片机、MICROM EC350-1 冷热台包埋机均购自德国 MICROM,TEC2500 病理组织烘漂仪购自常州市郝思琳医用仪器有限公司。

1.1.2 实验动物 雄性 SD 大鼠[平均体重(150 $\pm$ 20)g]购自蚌埠医学院实验动物中心[证号:SCXK(苏)2017-0001]。光照/暗循环 12 h,恒温[(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C],平均湿度为(50 $\pm$ 10)%。本研究经蚌埠医学

院动物实验伦理审查委员会批准(证书编号:2017-013)。大鼠 FLS 为原代细胞培养。

1.2 方法

1.2.1 构建 AA 大鼠模型 将液体石蜡置于高压蒸汽灭菌锅灭菌,冷却后取适量液体石蜡加入到无菌安瓿瓶中,将卡介苗放置于 80 $^{\circ}$ C 油浴锅中灭活 2 h,倒入装有液体石蜡的安瓿中与液体石蜡混合,配制终浓度为 10 mg/mL 的完全弗氏佐剂,冰上充分研磨 6~8 h 至乳化。第 0 天于大鼠右后爪足底皮下注射 0.15 mL 完全弗氏佐剂的乳剂,观察到大鼠继发侧足趾出现红肿表明 AA 模型构建成功。采用同样方法注射生理盐水作为正常组。在大鼠免疫后第 14 天开始出现炎症表现,根据致炎后足爪肿胀程度和多发性炎症指数评分情况分为正常组,AA 组,Met 低、高剂量组[50、100 mg/(kg $\cdot$ d),腹腔注射,给药 2 周]和 MTX 组(0.5 mg/kg,每 3 天 1 次,腹腔注射,给药 2 周)。

1.2.2 足趾容积测量 测量并记录免疫前用足趾容积测量仪将各组大鼠左后(继发侧)足爪容积作为免疫第 0 天的足爪容积,此后每 3 天对大鼠继发侧足爪容积进行测量作为致炎后足爪容积,直到第 28 天。足爪肿胀度(μ L)=致炎后容积-致炎前容积。

1.2.3 大鼠后足关节病理检查及 AMPK 免疫组化检测 切片脱蜡至水:经二甲苯 I、II、III,3 次,每次 5 min;确保二甲苯足量、有效;无水乙醇 2 次,每次 5 min,95%乙醇 2 次,每次 5 min,蒸馏水 2 次,每次 5 min。采用柠檬酸抗原修复法热修复后冷却至室温,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,每次 5 min。免疫染色封闭液室温封闭 15 min,封闭后甩掉封闭液,不洗,加一抗孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜。室温平衡 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,二抗孵育,37 $^{\circ}$ C,30 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min,二氨基联苯胺显色,显微镜观察确定显色终点;显色完毕苏木精复染核 2 min,自来水返蓝,梯度浓度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。每只大鼠选择组织切片 1 张,采用显微镜显影系统采集图像。

1.2.4 大鼠 FLS 培养及鉴定 SD 大鼠通过颈椎脱臼法处死,在无菌操作下取出大鼠双侧膝关节滑膜组织,剪成 1~2 mm³ 大小的组织块,以 DMEM 培养液洗涤 2~3 次。取数个组织块均匀分布在培养瓶中的底壁上,使培养瓶翻转,瓶底朝上,置于培养箱内,培养箱设置为 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳,培养 2 h 使其贴壁。取出培养瓶加入少许含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液,使组织块刚好被覆盖为宜,再放入培养箱中继续培养,换液间隔时间为 1~2 d,待组织块长出 FLS 后去除组织块继续培养,待细胞长满后用 0.25%胰蛋白酶处理细胞并进行传代培养,3 代纯化后用于后续实验。倒置显微镜观察 FLS 形态及生长情况。见图 1。将 FLS 分为空白组(FLS)、TNF- α 组(FLS+TNF- α

25 ng/mL)、TNF- α + Met 组 (FLS + TNF- α 25 ng/mL + Met 5、10、20、40 mmol/L)、TNF- α + AMPK 抑制剂——Compound C 组 (10 μ mol/L) 和 TNF- α + Met + Compound C 组。

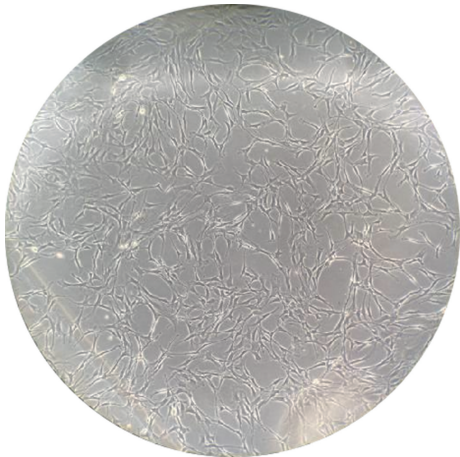


图 1 倒置显微镜观察大鼠 FLS 形态及生长情况

1.2.5 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法 将生长密度达到 80% 左右的大鼠 FLS 消化离心, 弃上清液, 含 5% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液重悬, 调整细胞密度为 5×10^4 个/mL。取 100 μ L 接种至 96 孔板, 每组 5 个复孔, 细胞培养箱中贴壁后吸取旧液, 加入含 5% FBS 的 DMEM 培养液, 按既定给药方案 (浓度梯度为 0、5、10、20、40 mmol/L) 给药, 并用新鲜 5% FBS 的 DMEM 培养液补足至 200 μ L。在细胞培养箱中培养 24、48、72 h 后加入 20 μ L MTT 试剂, 放入细胞培养箱孵育 4 h。孵育结束后沿孔壁缓慢吸弃旧液, 并在每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜, 37 $^{\circ}$ C 烘箱中孵育 30 min, 于酶标仪波长 490 nm 处读取吸光度, 计算细胞存活率。

1.2.6 Western blot 将细胞接种于 60 mmol/L 平

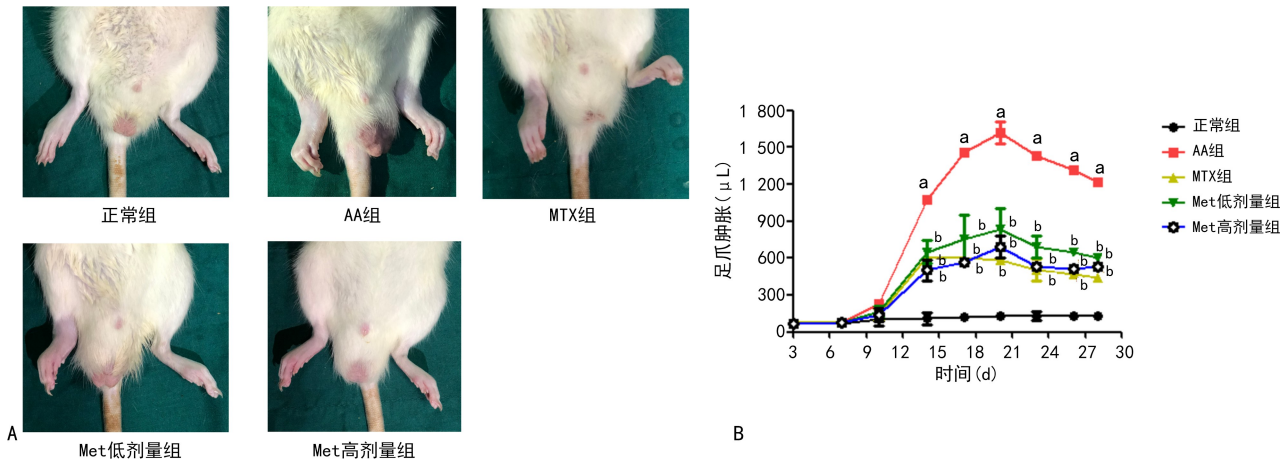
皿中, 每个平皿接种 50×10^4 细胞。药物刺激 24 h 后收集细胞, 每组加入适量放射免疫沉淀实验蛋白裂解液, 冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C 离心, 提取细胞总蛋白。使用二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量, 然后取 50 mg 蛋白进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳, 转膜至膜聚偏二氟乙烯膜; 室温封闭 2~3 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TPBS 缓冲液洗 3 次, 相应二抗孵育 2 h, TPBS 缓冲液洗 3 次。化学发光增强试剂盒显影, Bio-Rad 凝胶成像仪对膜进行曝光获取图像。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Dunnett's-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Met 可改善 AA 大鼠足爪肿胀度 AA 组大鼠的足爪肿胀从免疫后第 10 天开始, 第 20 天左右达到高峰, 高剂量 Met 可明显改善 AA 大鼠足爪肿胀度, 效果与 MTX 组接近。见图 2A。AA 大鼠足爪肿胀度在免疫后第 14 天明显增加, 免疫后第 20 天左右达高峰。Met (50、100 mg/kg) 和 MTX (0.5 mg/kg) 均能不同程度降低 AA 大鼠足爪肿胀度, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2B。

2.2 Met 对大鼠膝关节滑膜组织 AMPK 的影响 正常组大鼠膝关节滑膜组织 FLS 呈纺锤状, 细胞核呈蓝色, AMPK 阳性表达部位呈棕黄色。Met 高剂量组大鼠膝关节滑膜组织 AMPK 免疫组化染色呈棕色, 部分区域可见褐色, 表达也呈强阳性。与正常组、Met 组比较, AA 组大鼠膝关节滑膜组织 AMPK 免疫组化染色偶尔可见阳性细胞, 染色区域明显降低, 染色深度也明显减弱。见图 3、4。



注: A 为 Met 对大鼠足爪肿胀度的影响; B 为各组大鼠足爪肿胀度比较, 与正常组比较, $^a P < 0.05$; 与 AA 组比较, $^b P < 0.05$ 。

图 2 Met 对大鼠足爪肿胀的影响

2.3 Met 抑制 TNF- α 刺激的大鼠 FLS 增殖活性 与空白组比较, TNF- α 组大鼠 FLS 增殖率明显增强, Met 能抑制大鼠 FLS 增殖, 且随药物浓度 (5、10、20、

40 mmol/L) 增加和时间 (24、48、72 h) 延长 Met 的抑制作用逐渐增强, 10 mmol/L 作用大鼠 FLS 24 h 能明显抑制大鼠 FLS 的增殖活性, 并可作为最适实验条

件用于后续实验。见图 5。

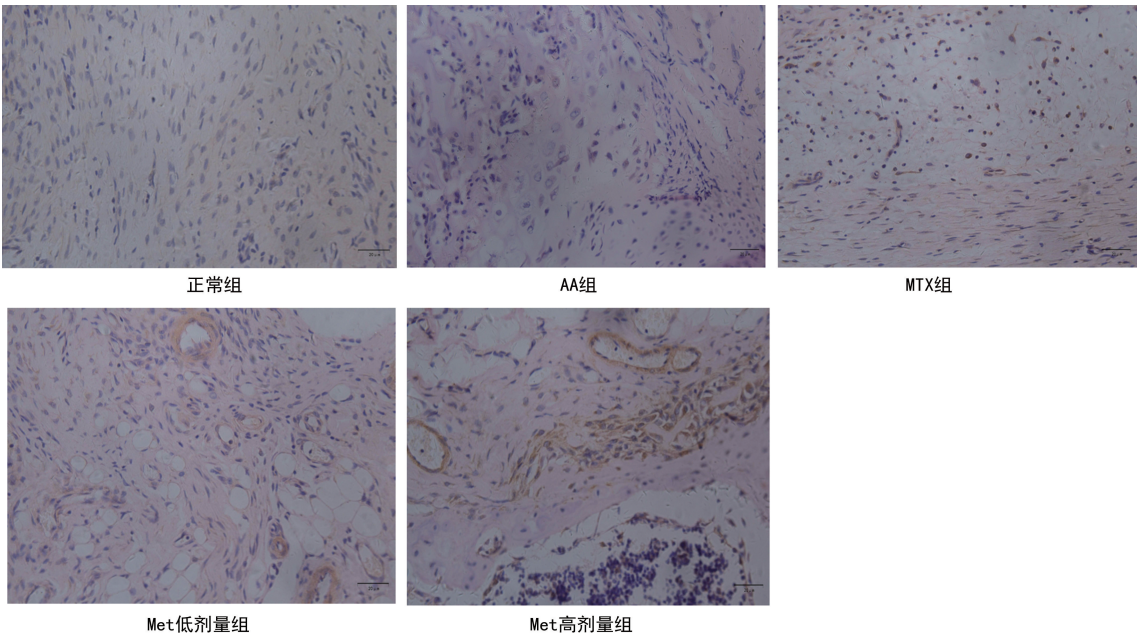
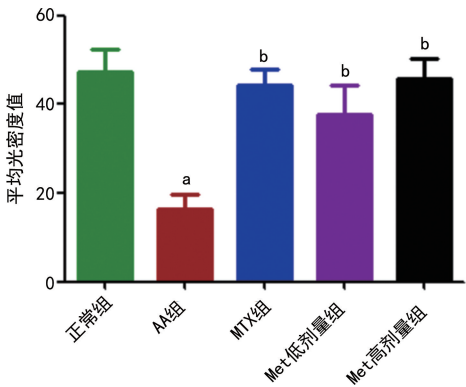


图 3 大鼠膝关节滑膜组织病理 AMPK 免疫组化检测(200×,标尺:20 μm)



注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与 AA 组比较,^b $P<0.05$ 。
图 4 各组大鼠膝关节滑膜组织 AMPK 免疫组化结果比较

2.4 Met 可影响自噬相关蛋白的表达 与空白组比较,TNF- α 组大鼠 FLS Beclin1 表达明显上调,P62 表达明显下调;TNF- α +Met 组(10 mmol/L)大鼠 FLS

Beclin1 表达明显下调,P62 表达明显上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。且 TNF- α 组与 TNF- α +Compound C 组(10 μ mol/L)无明显差别,但与 TNF- α +Met 组(10 mmol/L)比较,TNF- α +Met(10 mmol/L)+Compound C 组(10 μ mol/L)大鼠 FLS Beclin1 下调及 P62 上调程度均降低。见图 6。

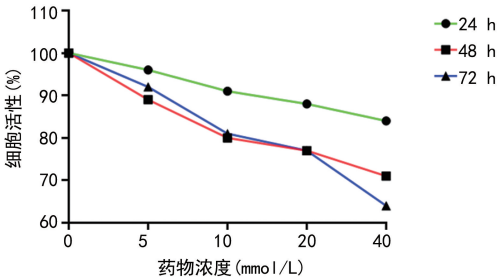
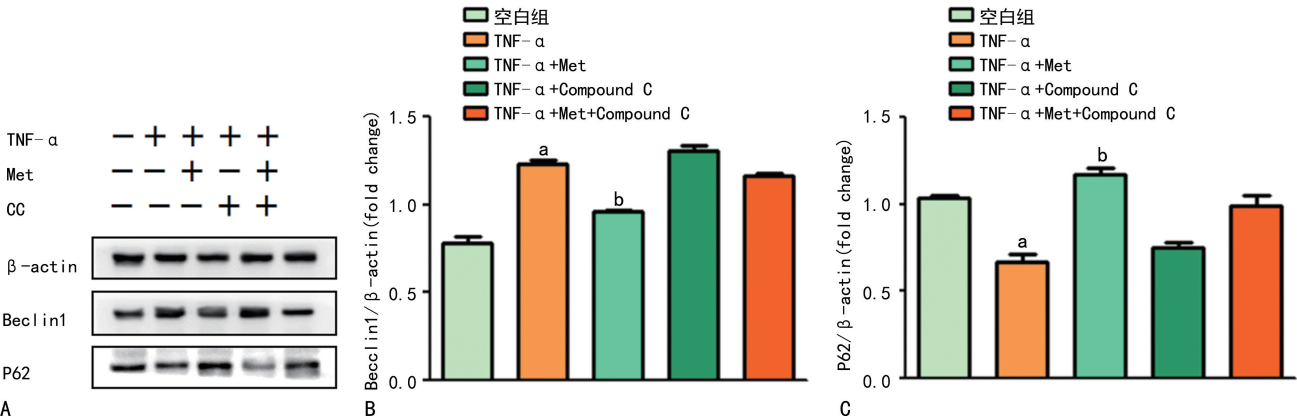


图 5 Met 对大鼠 FLS 增殖的影响



注:A 为 Western blot 检测大鼠 FLS Beclin1、P62 的表达;B、C 为光密度法定量评价 Beclin1/ β -actin 和 P62/ β -actin 的表达;与空白组比较,^a $P<0.05$;与 TNF- α 组比较,^b $P<0.05$ 。

图 6 Met 对大鼠 FLS 自噬相关蛋白表达的影响

3 讨 论

RA 是一种以关节病变引起肢体严重畸形的全身性自身免疫性疾病,在全球的发病率为 1% 左右,发病机制不明。目前,RA 的治疗大多数基于传统的治疗方案,包括非甾体抗炎药、抗风湿药物、糖皮质激素类药物及最新的生物治疗。但由于非甾体类抗炎药、抗风湿药物、糖皮质激素类药物等长期服用有严重的不良反应,生物制剂价格高昂且疗效需进一步证实,尤其是在用于活动性低的 RA 患者的临床试验中收效甚微^[11]。一些学者针对 RA 的治疗也做出猜想并进行了实验验证,如 CHANG 等^[12] 通过从紫草中提取其主要活性成分——紫草素,证明了其具有减轻 AA 大鼠的炎性反应,达到治疗 RA 的目的。此外还有相当部分患者对已有的药物治疗反应较差,无法缓解病情。寻找疗效好且不良反应少的新型药物具有重要意义。

Met 安全、有效、不良反应少,近年来,越来越多的证据证明,其除降糖外,还具有抗炎、调节免疫、抗肿瘤等作用,但其在 RA 中的效果及机制仍不明确。本研究观察了不同剂量 Met 对 AA 大鼠的作用,结果显示,Met 可改善 AA 大鼠足爪肿胀度,且呈剂量依赖性。Met 还可激活 AMPK 信号通路,是 AMPK 的激活剂。AMPK 是哺乳动物体内一种丝氨酸/苏氨酸激酶,是体内能量代谢至关重要的调节因子,AMPK 的激活可能与自噬相关。本研究大鼠膝关节滑膜组织 AMPK 免疫组化结果显示,Met 可激活 AA 大鼠 AMPK 信号通路。

目前,围绕 RA 发病机制的研究表明,FLS 作为滑膜细胞的主要细胞,既是靶细胞,也是效应细胞,其异常活化可能是 RA 发病的重要环节^[13-14]。以 FLS 为靶细胞有效干预和防治 RA、有效控制 FLS 异常增生活化是阻止 RA 病情进展的关键性节点。TNF- α 作为前炎症细胞因子,在 RA 发生和持续中具有关键作用,多被用于体外诱导 RA-FLS 模型研究 RA 发病机制及药物治疗机制^[15-16]。本研究在体外原代培养大鼠 FLS,并用 TNF- α (25 ng/mL) 模拟 RA 滑膜微环境,MTT 检测结果显示,Met 可抑制 TNF- α 刺激的大鼠 FLS 增殖,且呈时间及浓度依赖性。滑膜细胞的异常增生活化可能与其自身自噬失衡有关,关节滑膜代谢微环境的改变会使 FLS 自噬增加,进而导致 FLS 局部积累并赋予其侵袭性表型。Beclin1 是形成自噬体的必需分子,能与多种蛋白反应调控自噬体的形成和成熟。P62 是自噬选择性底物,在自噬发生过程中被自噬-溶酶体通路降解,自噬的缺失使 P62 明显聚集。本研究 Western blot 对自噬相关蛋白的检测结果显示,与空白组比较,TNF- α 组大鼠 FLS Beclin1 表达明显上调,P62 表达明显下调;TNF- α + Met

组 (10 mmol/L) 大鼠 FLS Beclin1 表达明显下调,P62 表达明显上调,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外为探究 Met 是否通过 AMPK 信号通路影响 FLS 自噬,本研究使用了 AMPK 抑制剂——Compound C (10 μ mol/L),结果显示,TNF- α 组与 TNF- α + Compound C 组 (10 μ mol/L) 无明显差别,但与 TNF- α + Met 组 (10 mmol/L) 比较,TNF- α + Met (10 mmol/L) + Compound C 组 (10 μ mol/L) 大鼠 FLS Beclin1 下调及 P62 上调程度均降低。说明 Met 可能通过激活 AMPK 信号通路影响 FLS 自噬。

综上所述,Met 可在体内改善 AA 大鼠关节炎症状,并且在体外抑制大鼠 FLS 增殖,降低其自噬,其机制可能与 Met 激活 AMPK 信号通路相关,但具体机制尚需后续更深入的探究。本研究结果为 Met 作为 RA 临床治疗用药提供了新的依据。

参考文献

- [1] KULKA J P. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. J Chronic Dis, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [2] ROUBILLE C, RICHER V, STARNINO T, et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: A systematic review and meta-analysis[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(3): 480-489.
- [3] KORB-PAP A, BERTRAND J, SHERWOOD J, et al. Stable activation of fibroblasts in rheumatic arthritis-causes and consequences [J]. Rheumatology (Oxford), 2016, 55 (suppl 2): ii64-67.
- [4] MIZUSHIMA N. Autophagy: Process and function[J]. Genes Dev, 2007, 21(22): 2861-2873.
- [5] YANG R, ZHANG Y, WANG L, et al. Increased autophagy in fibroblast-like synovio-cytes leads to immune enhancement potential in rheumatoid arthritis[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15420-15430.
- [6] ZHU L, WANG H, WU Y, et al. The autophagy level is increased in the synovial tissues of patients with active rheumatoid arthritis and is correlated with disease severity[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 7623145.
- [7] KATO M, OSPELT C, GAY R E, et al. Dual role of autophagy in stressin-(下转第 2362 页)

kg/m²[J]. *Am Surg*, 2020, 86(2):158-163.

[11] SUN L, ZHAO B, HUANG Y, et al. Feasibility of laparoscopy gastrectomy for gastric cancer in the patients with high body mass index; A systematic review and meta-analysis[J]. *Asian J Surg*, 2020, 43(1):69-77.

[12] SHIMADA S, SAWADA N, ISHIYAMA Y, et al. Impact of obesity on short- and long-term outcomes of laparoscopy assisted distal gastrectomy for gastric cancer[J]. *Surg Endosc*, 2018, 32(1):358-366.

[13] MIYASAKA M, EBIHARA Y, TANAKA K, et al. The effect of the body mass index on the short-term surgical outcomes of laparoscopic total gastrectomy: A propensity score-matched study[J]. *J Minim Access Surg*, 2020, 16(4):376-380.

[14] 戴青松, 陈远志, 孙伟, 等. 肥胖对腹腔镜直肠癌手术的影响[J]. *腹腔镜外科杂志*, 2021, 26(5):339-342.

[15] 杨奕, 王伟, 彭承宏. Clavien-Dindo 分级系统在消化外科的应用现状及前景[J]. *外科理论与实*

践, 2019, 24(2):175-178.

[16] FRIEDMAN J M. Leptin and the regulation of body weigh; Keio J Med[J]. *Keio J Med*, 2011, 60(1):1-9.

[17] HAAKINSON D J, LEEDS S G, DUECK A C, et al. The impact of obesity on breast cancer: A retrospective review [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(9):3012-3018.

[18] LIN X J, WANG C P, LIU X D, et al. Body mass index and risk of gastric cancer; A meta-analysis[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2014, 44(9):783-791.

[19] 魏铎沛, 李霓, 王刚, 等. 身体测量指标与胃癌发病风险的流行病学研究进展[J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(11):1481-1486.

[20] SUBASINGHE D, ACOTT N, KUMARAS-INGHE M P. A survival guide to HER2 testing in gastric/gastroesophageal junction carcinoma[J]. *Gastrointest Endosc*, 2019, 90(1):44-54.

(收稿日期:2022-11-05 修回日期:2023-03-19)

(上接第 2356 页)

duced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(1):40-48.

[8] 甘立霞. 二甲双胍的临床作用及研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(11):1601-1605.

[9] YANG C, ZHAO N, LI D, et al. Metformin improves the sensitivity of ovarian cancer cells to chemotherapeutic agents[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3):2404-2411.

[10] ALERS S, LOFFLER A S, WESSELBORG S, et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy; Cross talk, shortcuts, and feedbacks[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(1):2-11.

[11] CHANG Y, JIA X, WEI F, et al. CP-25, a novel compound, protects against autoimmune arthritis by modulating immune mediators of inflammation and bone damage[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:26239.

[12] 杨敬宁, 郭薇, 王瑞, 等. 紫草素对大鼠佐剂性关节炎滑膜炎症的影响[J]. *现代医药卫生*, 2009, 25(19):2891-2893.

[13] TURNER J D, FILER A. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2015, 27(2):175-182.

[14] AREND W P, FIRESTEIN G S. Pre-rheumatoid arthritis: Predisposition and transition to clinical synovitis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(10):573-586.

[15] IGARASHI H, YAHAGI A, SAIKA T, et al. A pro-inflammatory role for A20 and ABIN family proteins in human fibroblast-like synovio-cytes in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Lett*, 2012, 141(2):246-253.

[16] HUANG C C, CHIOU C H, LIU S C, et al. Melatonin attenuates TNF-α and IL-1β expression in synovial fibroblasts and diminishes cartilage degradation; Implications for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(3):e12560.

(收稿日期:2022-12-08 修回日期:2023-02-17)