

苗族药金乌健骨汤对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 NF- κ B p65, IKK- α 及 IKK- β 表达的影响

宁乔怡¹, 周静¹, 李东晓², 姚血明¹, 马武开^{1*}, 候雷¹

(1. 贵阳中医学院第二附属医院, 贵阳 550003; 2. 深圳龙岗区中医院, 广东深圳 518172)

[摘要] 目的:探讨苗族药金乌健骨汤对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞核转录因子- κ B p65 (NF- κ B-p65), I κ B 激酶- α (IKK- α)及 I κ B 激酶- β (IKK- β)表达水平的影响,并探讨其作用机制。方法:通过细胞培养,在体外构建类风湿关节炎滑膜成纤维细胞模型,将3~5代细胞随机分为6组,分别是空白组、苗族药金乌健骨汤含药血清冻干粉高、中、低剂量(28.8, 9.6, 3.2 g·kg⁻¹)组、雷公藤多苷(3 mg·kg⁻¹)组和泼尼松(1.5 mg·kg⁻¹)组,用各药物含药血清冻干粉对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞进行干预24 h后,观察类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的形态学改变,采用流式细胞仪检测各组类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组类风湿关节炎滑膜成纤维细胞中 NF- κ B p65, IKK- α 及 IKK- β 蛋白表达水平。结果:与空白组比较,类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的凋亡随着金乌健骨汤浓度的升高,凋亡率明显升高($P < 0.05$),类风湿关节炎滑膜成纤维细胞中 IKK- α , IKK- β 及 NF- κ B p65 的表达水平明显下调($P < 0.05$)。结论:苗族药金乌健骨汤能够诱导类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的凋亡,下调 NF- κ B p65, IKK- α 及 IKK- β 的表达水平。

[关键词] 类风湿关节炎; 滑膜成纤维细胞; 苗族药金乌健骨汤; 核转录因子- κ B; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0154-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070154

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1353.050.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 13:53

Effect of Miao Medicine Jinwu Jiangu Decoction on Expression of NF- κ B p65, IKK- α and IKK- β in FLS of RA

NING Qiao-yi¹, ZHOU Jing¹, LI Dong-xiao², YAO Xue-ming¹, MA Wu-kai^{1*}, HOU Lei¹

(1. No. 2 Hospital Affiliated to Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550003, China;
2. Longgang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518172, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Miao medicine Jinwu Jiangu decoction on the expression levels of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) p65, I κ B kinase- α (IKK- α) and I κ B kinase- β (IKK- β) in the fibroblast-like synoviocyte of rheumatoid arthritis (FLS of RA) and explore its mechanism. **Method:** FLS of RA models were established *in vitro* through culturing, and the second to third generation cells were randomly divided into 6 groups: blank group, tripterygium wilfordii group, prednisolone group, Jinwu Jiangu decoction high, middle and low dose treatment groups (28.8, 9.6, 3.2 g·kg⁻¹). After treatment for 24 h, the morphological changes were observed in all groups. Then flow cytometry was adopted to detect the apoptosis rate of the processed fibroblast-like synoviocyte of RA and Western blot was used to detect the expression levels of NF- κ B p65, IKK- α and IKK- β of the fibroblast-like synoviocyte of rheumatoid arthritis. **Result:** As compared with the

[收稿日期] 20160623(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360580);贵州省科技计划课题项目(黔科合SY字[2015]3048);贵阳中医学院研究生创新计划项目(ZYYCX12007)

[第一作者] 宁乔怡, 硕士, 住院医师, 从事中西医结合临床工作, Tel:15185145670, E-mail:185737453@qq.com

[通讯作者] *马武开, 博士, 教授, 从事中西医结合临床工作, Tel:0851-85556970, E-mail:walker55@163.com

control group, the apoptosis rate of the fibroblast-like synoviocyte of rheumatoid arthritis was gradually increased with the higher concentration of Jinwu Jiangu decoction ($P < 0.05$), and the expression levels of NF- κ B p65, IKK- α and IKK- β were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Miao medicine Jinwu Jiangu decoction can induce the apoptosis of fibroblast-like synoviocyte of rheumatoid arthritis, and reduce the expression levels of NF- κ B p65, IKK- α and IKK- β in fibroblast-like synoviocyte of rheumatoid arthritis.

[Key words] rheumatoid arthritis (RA); fibroblast-like synoviocyte; Jinwu Jiangu decoction; nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B); apoptosis

类风湿关节炎(RA)是以全身对称性多关节炎为主要临床表现的慢性自身免疫性疾病,在RA自然病程中,5~10年致残率为60%,病程30年的致残率为90%,大约35%RA患者在10年内丧失工作能力^[1]。目前RA的西药治疗副作用大且治疗费用高,给RA患者的治疗带来很大的阻力。RA的发病机制尚不完全清楚,国内外研究发现滑膜成纤维细胞(fibroblast-like-synoviocyte, FLS)可分泌高水平的促炎性细胞因子、化学趋化因子、基质蛋白降解酶等^[2],促使核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路的异常活化,进而使滑膜细胞的增殖与凋亡失衡^[3,4],同时通过抑制NF- κ B信号通路的活性,能在一定程度上改善RA病情^[5]。可见NF- κ B在类风湿关节炎滑膜成纤维细胞过度增殖的过程中起着关键的作用。目前大多数研究以探索单药对RA相关炎性细胞因子的影响为主^[6-12],本研究以“配单不配双、三位一体”苗族医理论为基础,组成苗族药金乌健骨汤,该汤剂是课题组应用多年的临床经验方,具有补肾健骨、祛风通络、活血止痛之功,同时作为复方制剂具有多靶点、多途径治疗RA的特点。经前期的研究证实该方在RA的治疗中具有良好疗效^[13-18]。本研究通过观察苗族药金乌健骨汤对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的凋亡及其中NF- κ B p65, I κ B 激酶- α (IKK- α)及I κ B 激酶- β (IKK- β)表达水平的影响,探索苗族药金乌健骨汤治疗RA的分子机制,为苗族药金乌健骨汤治疗RA提供基础实验研究依据。

1 材料

1.1 标本来源 按照1987年美国风湿病学会(ACR)修订的分类标准^[19],纳入骨科行关节置换术的8名RA患者,签署知情同意后,患者行关节置换术后取下滑膜组织,置于无菌袋中,4℃保存运至实验室,在2h内对滑膜组织进行处理及培养。

1.2 动物 SPF级健康新西兰大白兔36只,雌雄各半,由贵阳医学院动物实验中心提供,合格证号SCXK(黔)2012-0001。体重(2±0.2)kg。饲养于贵阳医学院动物实验中心的专业兔笼中,每笼

1只,自由摄食、饮水。本研究获得贵阳医学院第二附属医院实验动物伦理委员会批准,所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.3 试剂与仪器 胎牛血清(FBS),青、链霉素溶液(Gibco公司,批号分别为16000-44,1450572);DMEM高糖培养基,0.25%胰蛋白酶溶液(HyClone公司,批号分别为SH30022.018B,SH30042.01);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(Yeasen公司,批号40302EX20);Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore公司,批号WBKLS0100);Anti-NF- κ B p65 Antibody, Anti-beta actin antibody, Anti-IKK- α antibody, Anti-IKK- β antibody(Abcam公司,批号分别为ab95020, ab54724, ab54626, ab12139)。

MCO-18AIC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司);FACSCANTO II型流式细胞分析仪(美国BD公司);XD-101-060004型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);DYCZ-25D型双垂直电泳仪, DYCZ-40D型转印电泳槽(北京市六一仪器厂)。

1.4 药物 苗族药金乌健骨汤由狗脊、乌梢蛇、千年健、黑骨藤、三七(粉)、青风藤(小花)、白芍、姜黄等组成,由贵阳医学院第二附属医院中药房提供,处方中各味药的用量在2015版《中国药典》规定安全剂量之内。煎汤浓缩,使生药浓度为1g·mL⁻¹,置于4℃保存备用。雷公藤多苷片(贵州汉方制药有限公司,批号Z52020369/130501),醋酸泼尼松(浙江仙琚制药有限公司,批号H33021207/1403104)。

2 方法

2.1 含药血清冻干粉制备 将36只健康新西兰大白兔随机分为6组,分别为苗药金乌健骨汤含药血清冻干粉高、中、低剂量(28.8,9.6,3.2g·kg⁻¹)组、雷公藤多苷(3mg·kg⁻¹)组和醋酸泼尼松(1.5mg·kg⁻¹)组和空白组。折算以60kg成人体重每日常规服药剂量为标准(成人用量按金乌健骨汤生药量96g,2次/d,雷公藤多苷片20mg,3次/d,强的松为30mg,1次/d),按照人与兔药物剂量换算

指数^[20], 计算所需药量, 高剂量组为正常人用量的 3 倍给药, 雷公藤多苷组和醋酸泼尼松组按正常人用量给药, 空白组给予等量生理盐水, 每日分 2 次给药, 连续 3 d, 于末次灌胃 2 h 后在无菌操作条件下心脏取血, 静置 30 min 后, 吸取上清, 用 0.22 μm 微孔过滤器除菌, 分装于 1.5 mL 离心管后, 逐级冻存, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中真空干燥蒸干制成干燥粉末, 各组获得冻干粉总量与所灌胃药物总量之比约 1:3, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 细胞培养 用眼科剪将滑膜组织剪碎成大小约 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 的组织块, 整齐贴在培养瓶的一面, 将 15% FBS-DMEM 培养基 4 mL 加入培养瓶中, 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养 4 h 后, 再将培养瓶翻转, 让培养基充分接触组织块, 置放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 2~3 d, 密切观察细胞生长情况, 及时换液。待细胞长满后, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化, 经传代去除杂质后, 获取纯净的 FLS, 采用波形蛋白检测^[21-22], 鉴定 FLS。取 3~5 代对数生长期细胞用于实验。

2.3 流式细胞仪检测 FLS 的凋亡 取对数生长期 FLS, 计数并调整细胞悬液密度为 5×10^6 个/mL, 每孔 1 mL 接种于 6 孔板中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱培养。培养 24 h 后将细胞分为 6 个组, 将金乌健骨汤含药血清高、中、低剂量组、泼尼松组、雷公藤多苷组和空白组, 分别加入每孔细胞中, 继续培养细胞 24 h 后, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 2 次, 加入 Binding Buffer 缓冲液制成 1×10^6 个/mL 悬液。取 Falcon 试管, 按样品顺序编号空白管及样品管号, 向 Falcon 管内加入细胞悬液 100 μL 。向样品管内分别加入 PI, FITC Annexin V 各 5 μL , 轻轻混匀, 室温, 避光孵育 15 min。加入 Binding Buffer 缓冲液 50 μL , PBS 300 μL , 轻轻混匀。1 h 内流式细胞分析仪检测, 每个样品检测 6 次, 采用 FASCDiva 软件分析检测结果。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 FLS 细胞 NF- κB p65, IKK- α 及 IKK- β 蛋白表达 取对数生长期 FLS, 计数并调整细胞悬液密度为 5×10^6 个/mL, 每孔 1 mL 接种于 6 孔板中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱培养。按 2.3 项下, 加入不同含药血清冻干粉, 继续培养 24 h 后提取细胞总蛋白, 蛋白 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后, 每组各取 40 μg 加入样品槽, 蛋白总体积不超过 20 μL , 进行 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶电泳, 电压 80 V 电泳 30 min, 待电泳条带跑出两层胶之间的分界线时, 将电压调至 120 V

电泳 90 min, 待溴酚蓝达到理想位置时停止电泳。将装好的凝胶夹放入电转槽中, 加入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的电转缓冲液, 在冰浴中恒流 200 mA 转移 2 h。转膜完成后, 洗膜, 一抗 (1:500) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗在室温孵育 2 h 后进行 ECL 显色, 定影, 曝光, 胶片经扫描后, 用 Image-Pro Plus 软件进行蛋白灰度分析。每个样本重复 3 次。目的蛋白相对表达量为目的蛋白/内参蛋白。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 20.0 对实验数据进行统计分析。分析得出的实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 主要分析方法有 t 检验, 单因素方差分析, χ^2 检验, Wilcoxon 检验等, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 金乌健骨汤含药血清冻干粉对 FLS 细胞形态学的影响 药物干预处理 24 h 后, 成纤维样滑膜细胞倒置相差显微镜下观察呈梭形、纺锤状、星形、多角形、树突形等, 纯化后细胞形态逐渐单一化, 多为梭形且大小均一、呈平行或漩涡样排列, 细胞核边界清楚, 为卵圆形, 位于细胞的中间, 可见明显的核仁。空白组细胞呈肿瘤样增殖, 细胞梭形, 平行排列; 金乌健骨汤含药血清 ($3.2\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组细胞增殖受抑制, 细胞间隙增宽, 基本呈梭形; 金乌健骨汤含药血清 ($9.6\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组细胞减少, 生物活性下降, 贴壁弱; 金乌健骨汤含药血清 ($28.8\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组细胞核固缩明显, 呈半悬浮状态; 雷公藤多苷组细胞增殖受抑制, 细胞间隙增宽, 呈梭形; 泼尼松组细胞核固缩明显, 半悬浮状态。与空白组比较, 随着金乌健骨汤治疗组含药血清冻干粉浓度升高, FLS 形态由梭形逐渐变圆, 体积缩小, 细胞间隙逐渐增宽, 细胞贴壁能力减弱, 细胞核边集, 细胞质丢失形成突起。与雷公藤多苷组及泼尼松组比较, 金乌健骨汤含药血清 ($9.6, 28.8\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组镜下观察的形态学的改变没有明显的差异。见图 1。

3.2 金乌健骨汤含药血清冻干粉对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡的影响 与空白组比较, 各用药组 FLS 凋亡率均显著升高 ($P < 0.01$), 以金乌健骨汤含药血清 ($9.6, 28.8\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和泼尼松组凋亡率最高, 3 组间比较无统计学意义; 与雷公藤多苷组比较, 金乌健骨汤含药血清 ($9.6, 28.8\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 金乌健骨汤对 FLS 细胞 p65, IKK- α 及 IKK- β 蛋白表达的影响 与空白组比较, 随着金乌健骨汤含药血清冻干粉浓度的增加, IKK- α , IKK- β 及 NF- κB p65 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与

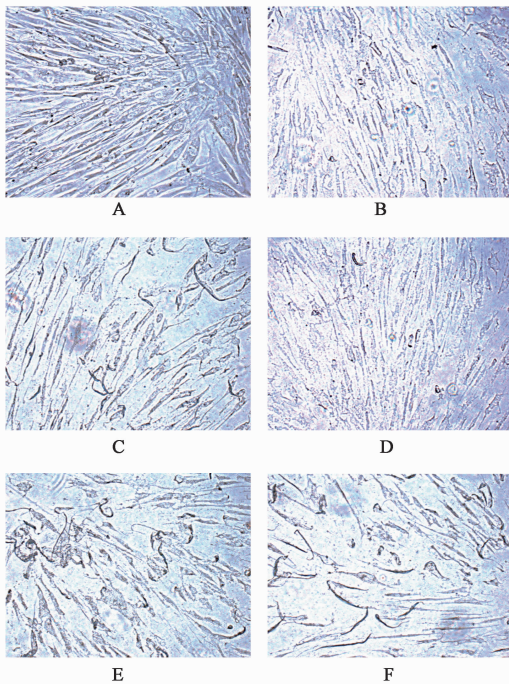


图 1 金乌健骨汤对 FLS 细胞形态的影响 (倒置显微镜, $\times 200$)
A. 空白组; B. 雷公藤多苷组; C. 泼尼松组; D ~ F. 金乌健骨汤含药血清 (3.2, 9.6, 28.8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组 (图 2 同)

图 1 金乌健骨汤对 FLS 细胞形态的影响 (倒置显微镜, $\times 200$)
Fig. 1 Effect of Jinwu Jiangu decoction on morphology of FLS cells (inverted microscope, $\times 200$)

表 2 金乌健骨汤对细胞 NF- κ B p65, IKK- β 及 IKK- α 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Jinwu Jiangu decoction on expression levels of NF- κ B p65, IKK- β and IKK- α ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | NF- κ B p65/ β -actin | IKK- α / β -actin | IKK- β / β -actin |
|-------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 空白 | - | 0.632 \pm 0.045 | 0.641 \pm 0.067 | 0.627 \pm 0.053 |
| 雷公藤多苷 | 3 | 0.584 \pm 0.098 ¹⁾ | 0.573 \pm 0.087 ¹⁾ | 0.591 \pm 0.08 ¹⁾ |
| 泼尼松 | 1.5 | 0.213 \pm 0.077 ¹⁾ | 0.216 \pm 0.044 ¹⁾ | 0.223 \pm 0.078 ¹⁾ |
| 金乌健骨汤 | 3 200 | 0.513 \pm 0.050 ^{1,2)} | 0.545 \pm 0.049 ^{1,2)} | 0.579 \pm 0.076 ^{1,2)} |
| | 9 600 | 0.406 \pm 0.062 ^{1,2)} | 0.438 \pm 0.044 ^{1,2)} | 0.496 \pm 0.096 ^{1,2)} |
| | 28 800 | 0.203 \pm 0.097 ^{1,2,3)} | 0.202 \pm 0.010 ^{1,2,3)} | 0.167 \pm 0.081 ^{1,2,3)} |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与雷公藤多苷组比较²⁾ $P < 0.05$;与泼尼松组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

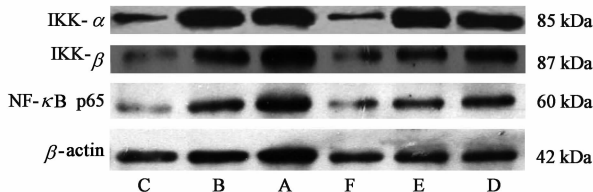


图 2 细胞 NF- κ B p65, IKK- β 及 IKK- α 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Jinwu Jiangu decoction on expression levels of NF- κ B p65, IKK- β and IKK- α

致炎因子的主要“开关”,是细胞内信号转导的枢纽,其信号途径的激活,能将细胞外的刺激信号转导到细胞核,激活含有 NF- κ B 位点的靶基因转录,参与 B 细胞的活化和多种细胞因子的基因表达,调控

表 1 金乌健骨汤对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Jinwu Jiangu decoction on apoptosis rate of FLS cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 凋亡率/% |
|-------|--------------------------------------|--------------------------------|
| 空白 | - | 2.7 \pm 0.5 |
| 雷公藤多苷 | 3 | 16.5 \pm 1.3 ¹⁾ |
| 泼尼松 | 1.5 | 19.1 \pm 1.0 ¹⁾ |
| 金乌健骨汤 | 28 800 | 20.3 \pm 0.7 ^{1,2)} |
| | 9 600 | 19.2 \pm 1.4 ^{1,2)} |
| | 3 200 | 12.3 \pm 0.9 ¹⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与雷公藤多苷组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

雷公藤多苷组比较,各浓度苗族药金乌健骨汤组 IKK- α , IKK- β 及 NF- κ B p65 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$);相较于泼尼松组而言,高剂量组 IKK- α , IKK- β 及 NF- κ B p65 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2 及图 2。

4 讨论

RA 以关节滑膜细胞的异常增生为主要病理改变,体内不同抗原通过识别细胞表面的相应抗体,激活下游信号通路,其中 NF- κ B 信号通路是启动

许多炎症因子如肿瘤坏死因子 (TNF)- α , 白细胞介素 (IL)-1 β 等的表达水平^[23],反之,FLS 是滑膜组织的重要组成部分,其异常增生可增加体内 TNF- α , IL-1 β , LPS 等的产生,从而周而复始地激活下游信号,不断地产生炎症因子并释放入关节腔积液、血液中,不断地侵蚀滑膜组织、软骨及骨质,最终引起关节破坏,形成了一个恶性循环^[26-27]。如何抑制 FLS 的增殖、促进其凋亡,同时阻断 NF- κ B 信号通路这一枢纽激活,成为目前治疗 RA 的关键点之一。本研究通过采取体外培养 RA 患者 FLS,采用金乌健骨汤对其进行干预,选用临床常用且疗效确切的中成药雷公藤多苷片及具有强大抗炎作用的糖皮质激素

为对照,以探索苗族医药对改善 RA 患者临床症状、体征方面的作用机制。

金乌健骨汤全方具有补肾健骨、祛风通络、活血止痛之效。经多年的临床研究显示该方在 RA 的治疗中具有良好疗效,尤其是减轻 RA 患者临床症状、降低抗风湿药如甲氨蝶呤等的毒副作用方面显示了较好的临床疗效^[16-18]。前期实验研究提示,金乌健骨汤能够降低 CIA 大鼠血清 IL-17,IL-23 的表达,还能够抑制 CIA 大鼠关节肿胀,使血清中 IL-1,IL-1 β 及 TNF- α 的表达显著降低,明显减轻关节滑膜细胞增生、滑膜层及滑膜下层淋巴细胞浸润^[13-15]。本研究采用金乌健骨汤对 FLS 进行干预,随着药物浓度的升高,首先 FLS 在形态上体积不断缩小,出现核固缩,细胞间隙逐渐增宽,细胞贴壁能力减弱,细胞核边集,细胞质丢失形成突起,最终细胞密度减低;其次 FLS 凋亡呈药物剂量、浓度依赖性地逐渐增加;最后本研究检测到 IKK- β ,IKK- α ,NF- κ B p65 的蛋白表达水平随着含药血清冻干粉浓度的升高而降低,呈浓度依赖性地受到抑制。进一步证实了金乌健骨汤在促进 FLS 凋亡,抑制 NF- κ B 信号通路活性中的重要作用。

在静息状态下,NF- κ B 与抑制蛋白 I κ B 结合形成复合体,被稳定在细胞质中而不能发挥其基因转录调控的功能。有研究表明 IKK- β ,IKK- α 基础活化质粒表达本身即可诱导 NF- κ B 的活化,IKK- β 或 IKK- α 失活质粒的表达则可显著抑制 CD154 诱导 NF- κ B 的活化^[24]。由于 I κ B α 启动子上有一个 NF- κ B 反应元件,对刺激比较敏感,能够被快速降解与再合成^[25],当细胞受到外源性刺激,如 TNF- α ,IL-1 β ,T 细胞激活剂,生长因子及病毒感染等,IKK 蛋白激酶复合体被激活,NF- κ B 异二聚体进入细胞核内,与 DNA 上的 κ B 基序列相结合从而发挥转录调控作用。大量研究表明,NF- κ B 在 RA 中的作用主要有两个途径,一是 NF- κ B 活化后可加强 IL-1 β ,TNF- α ,IL-6 等基因的转录水平,同时 NF- κ B 活化又是 RA 滑膜表达的许多炎症介质,如 TNF- α ,IL-1 β 等炎症因子表达增强的正反馈结果,两者构成一反馈机制,导致类风湿关节炎炎症反应和结构破坏得以维持与进展^[26-27],可见 NF- κ B 对 RA 关节炎中炎症因子的调节呈双向性。二是可阻断滑膜细胞的凋亡。相关研究提示,NF- κ B 可调节细胞凋亡抑制蛋白的表达,对 TNF- α 诱导的类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的凋亡有拮抗作用^[28-30]。有关实验研究显示 NF- κ B p65 存在于滑膜细胞核内,在 RA 滑膜

中 NF- κ B 表达增多^[31-32];因其具有和某些基因上启动子区的固定核苷酸序列结合而启动基因转录的功能,故信号转导途径的抑制既可消除由细胞因子等引起细胞激活,亦可阻断致炎细胞因子的产生。本研究中,通过金乌健骨汤对 FLS 的干预进而降低 NF- κ B p65,IKK- β ,IKK- α 的表达水平,促进 FLS 的凋亡,从而阻断炎症因子-结合抗体-激活 NF- κ B 信号通路-释放炎症因子-FLS 异常增殖这一恶性循环,这可能是金乌健骨汤在改善 RA 患者临床症状、体征,减慢 RA 进程方面的作用机制。

[参考文献]

- [1] Saralynn A, Frederick W, Jingbo N, et al. Contemporary prevalence and incidence of work disability associated with rheumatoid arthritis in the US [J]. Arthritis Rheumatism, 2008, 59(4):474-480.
- [2] Yamannishi Y, Firestein G S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes [J]. Rheuma Arthritis, 2001, 27(2):355-368.
- [3] 贺琤雯,沈茜. 滑膜成纤维细胞在类风湿性关节炎发病中的作用[J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33(2):117-119.
- [4] Erlman H, Pagliari L J, LIU H, et al. Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to fas-mediated apoptosis [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(1):21-30.
- [5] Hiroshi O, Taku Y, Hirota K, et al. Inhibition of NF- κ B signaling by fasudil as a potential therapeutic strategy for rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(1):82-92.
- [6] 冯小可,谈文峰,王芳,等. 雷公藤红素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞中 RANKL,OPG 及炎症因子表达的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013, 33(6):759-765.
- [7] 张利,孙胜禄,范海波,等. 羟基积雪草苷对佐剂关节炎大鼠滑膜成纤维细胞活化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8):173-177.
- [8] 张永红,于慧敏,聂英坤. 紫草素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 COX-2 表达的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(3):261-265.
- [9] 刘益杰,冯伟,褚立希. 淫羊藿苷对 IL-1 β 刺激 RA 滑膜成纤维细胞增殖及 TNF- α 和 RANKL 分泌的影响[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(3):77-80.
- [10] 戴冠东,徐勇,戴勇,等. 脂联素对体外培养人类类风湿关节炎滑膜成纤维细胞合成 MMP-3 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(12):1-5.
- [11] 梁江,马武开,刘正奇,等. 黑骨藤乙醇提取物影响人

- 类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及 COX-2、PGE-2 表达的研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 24-27.
- [12] 蔡佳宇, 常文静, 商玮, 等. 姜黄素对佐剂性关节炎模型大鼠 HIF-1 α 、VEGF 及 VEGFR 表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(3): 285-287.
- [13] 龙小琴, 陆道敏, 马武开. 金乌健骨汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清炎症因子的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(8): 4246-4248.
- [14] 马武开, 陆道敏, 姚血明, 等. 苗药金乌健骨汤对胶原诱导性关节炎模型大鼠血清 IL-23/IL-17 轴影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12): 2867-2869.
- [15] 陆道敏, 姚血明, 龙小琴, 等. 苗药金乌健骨汤对 CIA 大鼠血清 IL-1、IL-33 的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(10): 29-32.
- [16] 龙小琴, 马武开. 苗药金乌健骨汤治疗类风湿性关节炎(寒湿阻络证) 30 例临床观察[J]. 中医药导报, 2012, 18(10): 27-29.
- [17] 刘丽敏, 马武开. 苗药金乌健骨汤内服加五藤散外用治疗类风湿关节炎临床观察[J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(11): 14-15.
- [18] 黄华, 曹跃朋, 姚血明, 等. 金乌健骨汤配合改善病情抗风湿药治疗类风湿关节炎疗效观察[J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(1): 31-33.
- [19] 葛均波, 徐永健. 内科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 808-812.
- [20] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 332-335.
- [21] LIANG S C, LONG A J, Bennett F, et al. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment[J]. J Immunol, 2007, 179(11): 7791-7799.
- [22] Bush K A, Famrer K M, Waller J S, et al. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG₁ Fc fusion protein[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(3): 802-805.
- [23] 王云, 王礼文. 免疫细胞及细胞因子在类风湿性关节炎中的致病机制研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(4): 370-373.
- [24] 张恒, 张文, 张奉春. IKK- α 、 β 、 ϵ 及 TBK1 在 CD154 诱导转录因子 NF- κ B 活化中的作用[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2006, 26(8): 680-683.
- [25] Lee D K, Kang J E, Park H J, et al. FBI-1 enhances transcription of the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-responsive E-selectin gene by nuclear localization of the p65 subunit of NF-kappaB[J]. Biol Chem, 2005, 280(30): 27783-27791.
- [26] Makarov S S. NF-KappaB in rheumatoid arthritis a pivotal regulator of inflammatory hyperplasia, and tissue destruction[J]. Arthritis Res, 2001, 3(4): 200-206.
- [27] Kawasumi, Mizuho C, Mizuho K, et al. NF-kappaB and rheumatic diseases[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2006, 6(4): 359-372.
- [28] LIU H, Pope R M. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Pharmacol, 2003, 3(3): 317-322.
- [29] CAO W J, ZHANG Y Z, ZHANG D H, et al. Inhibition of NF-kappaB by mutant IkappaB alpha enhances TNF-alpha induced apoptosis in HL60 cells by controlling bcl-Xl expression[J]. China Med J, 2004, 117(7): 972.
- [30] BAI S, LIU H, CHEN K H, et al. NF-KappaB regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(12): 38-44.
- [31] Tak P P, Firestein G S. NF-kappaB: a key role in inflammatory disease[J]. Clin Invest, 2001, 107(1): 7-11.
- [32] Hirohata S, Miura Y, Tomita T, et al. Enhanced expression of mRNA for nuclear factor kappaB1 (p50) in CD34⁺ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(2): R54.

[责任编辑 张丰丰]