

甘草查尔酮A通过调控MAPK信号通路抑制 MH7A细胞增殖并诱导凋亡

郭婉怡^{1,2}, 袁蓓^{2,3}, 汪倩^{2,3}, 苏晓慧^{2*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012)

[摘要] **目的:**探讨甘草查尔酮A(Licochalcone A, LCA)对类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞(MH7A)增殖和凋亡以及相关炎症因子的影响,并揭示丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和LCA调控MH7A细胞增殖和凋亡的关系。**方法:**培养MH7A细胞,将细胞分为空白组,LCA各浓度给药组(10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);采用噻唑蓝(MTT)比色法和DAPI染色检测MH7A细胞增殖情况;PI染色和流式细胞仪检测MH7A细胞周期,Annexin V/PI染色后流式细胞仪检测MH7A细胞凋亡情况。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测LCA对炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β) mRNA的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测LCA对MAPK信号通路关键蛋白的影响,同时应用细胞外信号调节激酶(ERK)特异性抑制剂PD98059处理,观察磷酸化(p)-ERK和IL-1 β 蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,LCA能剂量依赖性抑制MH7A细胞增殖,活细胞数量显著减少($P<0.01$),而进入细胞周期早期凋亡的细胞数量显著增多($P<0.01$)。此外,与肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组比较,LCA能剂量依赖性逆转TNF- α 导致的炎症因子IL-1 β mRNA表达的升高($P<0.01$)。与空白组比较,LCA能剂量依赖性的促进MAPK信号通路中关键蛋白ERK,氨基末端激酶(JNK)和p38的磷酸化表达($P<0.01$)。与PD98059组比较,ERK的剂量依赖性磷酸化作用被抵消,同时LCA 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对IL-1 β 的抑制作用消失。**结论:**LCA能抑制MH7A细胞增殖和诱导其凋亡,可能与其促进MAPK通路相关蛋白磷酸化的表达继而抑制炎症因子的表达有关。

[关键词] 甘草查尔酮A; 类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞(MH7A); 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路; 细胞凋亡; 白细胞介素(IL)-1 β

[中图分类号] R2-0;R289;R285.5;R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0068-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202439

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201016.1700.006.html>

[网络出版日期] 2020-10-19 09:06

Licochalcone A Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of MH7A Cells by Regulating MAPK Signaling Pathway

GUO Wan-yi^{1,2}, YUAN Bei^{2,3}, WANG Qian^{2,3}, SU Xiao-hui^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China; 3. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of licochalcone A (LCA) on the proliferation and apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (MH7A) as well as the related inflammatory factors, also to reveal the relevance between mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and LCA regulation of MH7A cell proliferation and apoptosis. **Method:** MH7A cells were cultured and divided into blank group,

[收稿日期] 20200714(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703787);北京市自然科学基金面上项目(7202142);优秀青年科技人才(创新类)培养专项(ZZ13-YQ-043)

[第一作者] 郭婉怡,在读硕士,从事抗炎中药药理研究,E-mail:15777114502@163.com

[通信作者] *苏晓慧,博士,助理研究员,从事抗炎中药药理研究,E-mail:sxh66159@163.com

LCA groups (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The proliferation of MH7A cells was detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and immunofluorescence staining. The cell cycle of MH7A cells was determined by flow cytometry after PI staining and apoptosis was detected by flow cytometry after Annexin V/PI staining. The effect of LCA on interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). Western blot was used to detect the effect of LCA on the key proteins of MAPK signaling pathway, meanwhile, PD98059, a specific ERK inhibitor, was used to observe the expression levels of p-ERK and IL-1 β . **Result:** Compared with blank group, LCA could inhibit the proliferation of MH7A cells in a dose-dependent manner, and the number of living cells decreased significantly ($P<0.01$), while the number of early apoptotic cells increased significantly ($P<0.01$). Compared with the tumor necrosis factor- α (TNF- α , 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) group, LCA could reverse the expression of IL-1 β mRNA induced by TNF- α ($P<0.01$). and compared with the blank group, LCA also promoted the phosphorylation of ERK, JNK and p38 in a dose-dependent manner ($P<0.01$). After ERK inhibitor PD98059 inhibited ERK phosphorylation, the inhibitory effect of LCA 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ on IL-1 β disappeared. **Conclusion:** LCA can inhibit the proliferation and induce apoptosis of MH7A cells, which may be related to the phosphorylation of MAPK pathway related proteins, and then inhibit the expression of inflammatory factors.

[Key words] licochalcone A; fibroblast-like synoviocytes (MH7A) cells; mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway; apoptosis; interleukin-1 β (IL-1 β)

类风湿性关节炎(RA)是一种慢性、系统性自身免疫性疾病,以滑膜组织炎性增生、关节软骨及软骨下骨进行性骨破坏为特征。全世界患病率约1%~1.5%,致残率较高。发病时,滑膜细胞在高水平炎性细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),前列腺素和基质金属蛋白酶(MMPs)持续刺激下滑膜细胞异常增殖,进而引起滑膜组织炎性增生和关节骨破坏^[1-2]。因此,在RA关节损坏和组织重构中,滑膜细胞既是关节损伤的效应细胞,也通过多种途径成为关节骨破坏的参与者,其功能的改变在疾病的进程中起着至关重要的作用。

甘草是我国传统的中草药,首载于东汉的《神农本草经》,列为上品,有悠久的药用历史。中医处方离不开甘草,有“十方九草”之说。甘草的主要成分是三萜类化合物和黄酮类化合物。近年来国内外学者主要进行了黄酮类及微量酚性成分的研究,表明甘草中成分查尔酮类化合物甘草查尔酮A (licochalcone A, LCA)具有明显的抗炎活性^[3],既可抑制IL-1 β 诱导的人软骨细胞中核转录因子- κ B (NF- κ B)和NF- κ B抑制蛋白 α (I κ B α)的磷酸化进而抑制骨关节炎^[4],还可激活Kelch样环氧丙烷相关蛋白-1/转录因子E2相关因子2(Nrf2)信号通路抑制丝氨酸349(Ser349)上p62的磷酸化从而抑制类风湿关节炎^[5]。更有研究表明LCA能够通过阻断G₂/M过渡时的细胞周期进程并诱导凋亡来抑制肺

癌细胞的生长^[6]。而丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路在抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的过程中发挥了极为重要的作用^[7],因此,本课题通过探索LCA对滑膜细胞类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞(MH7A)增殖和凋亡以及相关炎性因子IL-1 β 的影响,揭示MAPK信号通路磷酸化与滑膜细胞增殖、凋亡以及炎性因子的关系,从而为LCA治疗RA的分子机制研究提供实验依据,并为临床上RA防治药物开发提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞 MH7A细胞系,购自上海冠导生物工程有限公司,货号C0878,传至第6~10代用于实验。

1.2 药物与试剂 LCA(上海源叶生物科技有限公司,批号C15A10M94486);DMEM培养基,胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为C11995500BT, 16000-044);荧光染料4,6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI,美国Sigma公司,批号D9542-5MG);曲拉通X-100,RIPA裂解液,5 \times SDS-PAGE变性蛋白上样缓冲液,Bradford法蛋白质定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号分别为A1009, C1053, B1012, P1510);细胞外信号调节激酶(ERK),氨基末端激酶(JNK),p38,磷酸化(p)-ERK, p-JNK, p-p38, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国CST公司,批号分别为4695, 9258, 8690, 4370, 4668, 4511, 4970);二抗兔抗及小鼠抗(美国EarthOx公司,批号分别为E030120, E030110);trizol试剂(美国Invitrogen公

司,批号 15596026); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(美国 Thermo 公司,批号 K16221); 噻唑蓝(MTT)试剂(索莱宝生物科技有限公司,批号 M8180)。

1.3 仪器 3111型二氧化碳培养箱, MK3型全自动酶标仪, ABI7500型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国 Thermo 公司); LX-100 手掌型离心机(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 3K15型低温高速离心机(美国 Sigma 公司); CKX41型倒置显微镜, CKX31型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Powerpac™ Basic型电泳仪, Mini Trans-Blot Cell型转移电泳槽(美国 Bio-Rad 公司); Fusion FX型凝胶成像仪(法国 Vilber 公司)。

2 方法

2.1 MH7A 细胞系的建立和培养 本实验将 MH7A 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,并加入 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素和 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素,置于含 5% CO_2 的 37°C 培养箱内培养,每 2 d 换液 1 次。取对数生长期细胞进行实验。

2.2 MTT 比色法检测细胞活力 以 6.3×10^3 个/mL 密度接种于 96 孔板中,每孔加入 $200 \mu\text{L}$,培养至指数生长周期(24 h),按实验设计的分组方法再每孔加入不同浓度的 LCA($1, 5, 10, 20, 50, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每组 5 个复孔,同时设置空白组。培养 24 h 后,倒置显微镜下观察细胞的生长情况。小心取走上清,加入 $90 \mu\text{L}$ 新鲜培养液,再加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 $10 \mu\text{L}$ 继续培养 4 h。吸掉培养液加入二甲基亚砜(DMSO) $150 \mu\text{L}$,于摇床上低速震荡 10 min,使结晶充分溶解,使用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度 A ,根据公式计算细胞活力。

2.3 DAPI 染色法检测 MH7A 细胞增殖情况 以 7.5×10^4 个/mL 的细胞密度接种到 6 孔板中,加样量 2 mL/孔 ,培养 24 h 后加入不同浓度的 LCA($10, 2, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组给予正常培养基,继续培养 24 h 后,将贴有细胞的玻片取出,4% 多聚甲醛室温固定 10 min,0.1% Triton-100 细胞穿孔 15 min,DAPI 染色 3 min,最后用荧光封片剂封片并于激光扫描共聚焦显微镜下观察拍照。

2.4 流式细胞仪检测 MH7A 细胞周期和凋亡

2.4.1 细胞周期检测 以 7.5×10^4 个/mL 的细胞密度接种到 6 孔板中, 2 mL/孔 ,培养 24 h 后分别加入不同浓度的 LCA($10, 2, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组给予正常培养基,继续培养 24 h 后胰酶消化,收集细胞进行 PI 染色,流式细胞仪检测各组 MH7A 细胞

周期。

2.4.2 细胞凋亡检测 以 7.5×10^4 个/mL 的细胞密度接种到 6 孔板中, 2 mL/孔 ,培养 24 h 后分别加入不同浓度的 LCA($10, 20, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组给予正常培养基,继续培养 48 h 后胰酶消化,收集细胞。FITC 标记的 Annexin-V 和 PI 各 $5 \mu\text{L}$ 混匀后避光孵育 20 min,避光并不时振动,30 min 内上流式细胞仪检测 MH7A 细胞凋亡情况。

2.5 Real-time PCR 检测 IL-1 β mRNA 的表达 以 7.5×10^4 个/mL 的细胞密度接种到 6 孔板中, 2 mL/孔 ,培养 24 h 后使用 TNF- α ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导细胞,同时给 LCA($10, 20, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组给予正常培养基。24 h 后收集细胞,使用 trizol 法提取各组细胞总 RNA,并测定浓度。应用反转录试剂盒,逆转录合成 cDNA。进行 Real-time PCR 反应,PCR 扩增程序:预变性 94°C 5 min;随后为 94°C 15 s 及 60°C 30 s,分别为 40 个循环。最后按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 IL-1 β mRNA 相对表达量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 MAPK 通路相关蛋白的表达 以 7.5×10^4 个/mL 的细胞密度接种到 6 孔板中, 2 mL/孔 ,培养 24 h 后分别加入不同浓度的 LCA ($10, 20, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组给予正常培养基,继续培养。最后收集细胞后,用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白。采用 Bradford 法进行蛋白定量,加热法进行蛋白变性,用 10% SDS-PAGE 进行电泳, 80 V , 30 min; 120 V , 60 min。随后 120 V , 100 min 将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(NC 膜)上,NC 膜用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次, 5 min/次, β -actin (1: 1 000), ERK (1: 1 000), JNK (1: 1 000), p38 (1: 1 000), p-ERK (1: 2 000), p-JNK (1: 1 000), p-p38 (1: 1 000) 抗体 4°C 孵育过夜。次日用 TBST 洗涤 3 次,用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗 (1: 5 000) 室温孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次后按照 ECL 试剂盒方法显影,所获结果采用 Image J 1.44 软件测量各条带的灰度值。

2.7 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件对实验数据进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验进行 3 次及以上重复, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 LCA 对 MH7A 细胞增殖的影响 MTT 结果显示,与空白组比较,不同浓度的 LCA 作用 24 h 后, MH7A 细胞增殖被明显抑制,其中 $50, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LCA 组对细胞的抑制作用最显著 ($P < 0.01$), LCA 在

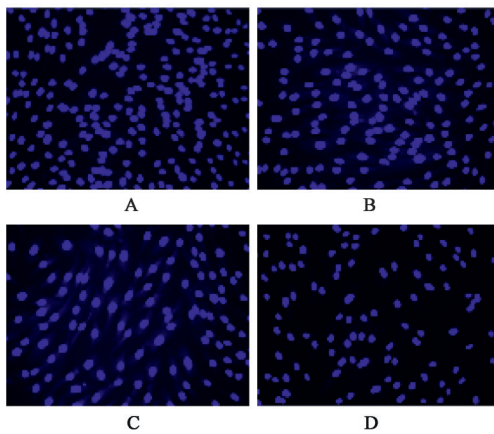
浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 MH7A 细胞增殖的抑制率接近 50%, 与此同时显微镜下观察细胞未见明显的细胞死亡。基于此结果本实验设定 LCA 的给药浓度为 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。DAPI 染色结果表明, 当给予不同浓度 LCA (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用后, 细胞核无明显的固缩和破裂, 无明显的细胞死亡, 但是与空白组比较, 细胞数量明显减少, 因此说明了 LCA 抑制 MH7A 细胞增殖而不是毒性导致的细胞数量减少。见表 1, 图 1。

表 1 LCA 对 MH7A 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of LCA on MH7A cells viability ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白	-	101.01±1.89
LCA	1	97.37±2.01
	5	95.24±6.94
	10	96.81±5.91
	20	94.51±5.87
	50	57.85±5.62 ¹⁾
	100	5.04±1.86 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ (表 2, 3, 5, 6 同)。



A. 空白组; B. LCA $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. LCA $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. LCA $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 3 同)

图 1 LCA 对 MH7A 细胞增殖的影响 (DAPI, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of LCA on proliferation of MH7A cells (DAPI, $\times 200$)

3.2 LCA 对 MH7A 细胞周期的影响 为了进一步判断 LCA 对 MH7A 增殖的影响, 给药 24 h 后通过 PI 染色后流式细胞仪检测分析, 结果显示, 与空白组比较, 随着 LCA 给药浓度的增加 G_1 的值逐渐降低, S 和 G_2/M 期逐渐升高 ($P<0.01$), 基于以上结果可以判断 LCA 作用于 MH7A 细胞以后使细胞部分停滞在 S 和 G_2/M 期, 细胞周期受阻, 更进一步明确了 LCA 具有抑制 MH7A 细胞增殖的作用。见表 2。

3.3 LCA 对 MH7A 细胞凋亡的影响 LCA 阻断细

表 2 LCA 对 MH7A 细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of LCA on MH7A cell cycle ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	G_1 /%	S/%	G_2/M
空白	-	78.84±1.36	10.16±1.15	10.10±0.24
LCA	10	67.70±1.33 ¹⁾	14.30±1.22	17.10±0.29
	20	59.90±2.83 ¹⁾	25.10±5.90 ¹⁾	15.00±3.08
	40	41.48±1.73 ¹⁾	18.60±4.60 ¹⁾	39.91±3.91 ¹⁾

胞周期进程后并诱导细胞进入凋亡程序, 与空白组比较, LCA 作用 MH7A 细胞 48 h 后, 可明显促进 MH7A 细胞早期凋亡 ($P<0.01$), 但未见明显的晚期凋亡, 说明随着给药时间延长, LCA 能够诱导 MH7A 细胞进入早期凋亡程序。见表 3。

表 3 LCA 对 MH7A 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of LCA on apoptosis of MH7A cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白	-	3.40±0.53
LCA	10	5.10±0.96
	20	9.00±1.91 ¹⁾
	40	21.06±0.35 ¹⁾

3.4 LCA 对 TNF- α 诱导的 IL-1 β mRNA 的影响

与空白组比较, TNF- α 诱导 MH7A 细胞 24 h 后, IL-1 β mRNA 表达显著增高 ($P<0.01$)。TNF- α 诱导的同时, 加入不同剂量 LCA 干预, 与 TNF- α 诱导组比较, LCA 能剂量依赖性地降低 IL-1 β mRNA 水平 ($P<0.01$)。见表 4。

表 4 LCA 对细胞因子 IL-1 β mRNA 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of LCA on IL-1 β mRNA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

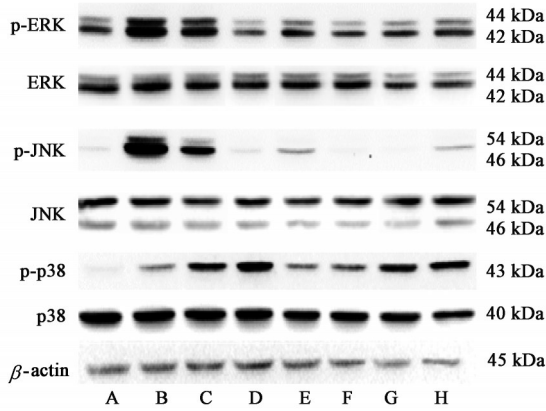
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 β
空白	-	1.00±0.03
TNF- α	-	103.50±37.38 ¹⁾
LCA	10	42.27±23.03 ²⁾
	20	21.40±4.66 ²⁾
	40	4.77±1.96 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P<0.01$; 与 TNF- α 诱导组比较²⁾ $P<0.01$ 。

3.5 LCA 对 MH7A 细胞 MAPK 通路 p-ERK, p-JNK, p-p38 蛋白表达的影响

LCA $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用于 MH7A 细胞不同时间点 (1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 h) 后, 与空白组比较, LCA 作用 1 h 后 ERK 和 JNK 的磷酸化水平显著增强 ($P<0.01$), 4 h 后 p38 的磷酸化水平显著增强 ($P<0.01$)。因此, 基于以上的最佳时间点, 分别给予不同浓度 LCA (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

干预,与空白组比较,LCA能够剂量依赖性的促进ERK,JNK,p38的磷酸化。见图2,3,表5,6。



A. 空白组;B. 给药1 h组;C. 给药2 h组;D. 给药4 h组;E. 给药8 h组;F. 给药12 h组;G. 给药16 h组;H. 给药24 h组

图2 LCA 40 μmol·L⁻¹作用于MH7A细胞不同时间点的蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Protein expression of MH7A cells treated with 40 μmol·L⁻¹ LCA at different time points

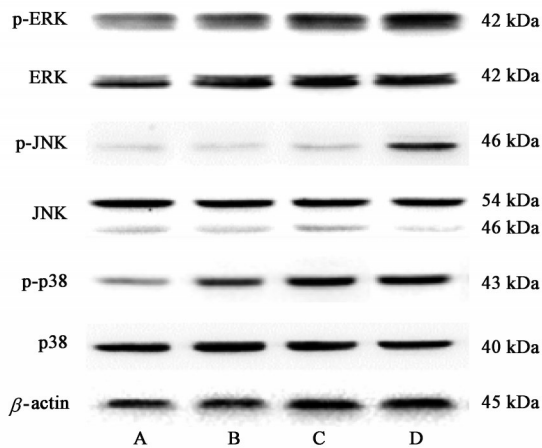


图3 不同浓度LCA作用于MH7A细胞对的蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of MH7A cells treated with different concentrations of LCA

表5 LCA 40 μmol·L⁻¹作用于MH7A细胞不同时间点的蛋白表达情况(̄x±s, n=3)

Table 5 Protein expression of MH7A cells treated with 40 μmol·L⁻¹ LCA at different time points (̄x±s, n=3)

组别	浓度 μmol·L ⁻¹	给药时间/h	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK	p-p38/p38
空白	-	-	0.53±0.06	0.07±0.01	0.16±0.11
LCA	40	1	1.15±0.04 ¹⁾	1.05±0.10 ¹⁾	0.51±0.24
		2	1.07±0.05 ¹⁾	0.71±0.03 ¹⁾	0.62±0.10
		4	0.54±0.18	0.08±0.01	1.07±0.08 ¹⁾
		8	0.52±0.02	0.16±0.03	0.74±0.35
		12	0.59±0.20	0.06±0.02	0.63±0.12
		16	0.86±0.02 ¹⁾	0.07±0.03	0.61±0.34
		24	1.23±0.22 ¹⁾	0.29±0.15 ¹⁾	1.02±0.33 ¹⁾

3.6 抑制ERK磷酸化后LCA对MH7A细胞中p-ERK蛋白表达以及炎症因子IL-1β的影响 与ERK抑制剂PD98059组比较,LCA给药组ERK的剂量依赖性磷酸化作用被弱化,同时LCA 10, 20 μmol·L⁻¹给药组对IL-1β的抑制作用消失,LCA 40 μmol·L⁻¹给药组与PD98059组比较对IL-1β仍然具有抑制作用(P<0.01),LCA可能通过参与MAPK通路关键蛋白的磷酸化抑制炎症因子进而影响MH7A细胞的增殖和凋亡。见图4,表7。

4 讨论

关节滑膜主要功能是产生滑膜液,润滑关节面和为关节提供营养支持,然而RA患者异常增生的滑膜细胞性质上类似于局限性侵袭生长的肿瘤细胞,导致关节畸形及和关节功能障碍。滑膜异常增生造成RA患者关节软骨和骨组织损害的同时,也会分泌多种炎症介质,进一步促进了炎症反应^[8-9]。有研究表明,通过在关节腔内注射竞争性的抗Fas抗体或FasL来抑制滑膜细胞的异常增生,这种抑制滑膜炎的方法能有效缓解RA动物模型病情进展^[10-11]。紫杉醇通过G₂/M期阻滞抑制滑膜细胞增殖,并通过诱导滑膜细胞凋亡对滑膜细胞产生毒性,对不增殖的滑膜细胞和软骨细胞却没有毒性,能有效抑制关节骨破坏^[12]。因此,抑制成纤维样滑膜细胞增殖、诱导成纤维样滑膜细胞的凋亡可作为一种治疗RA的方法。MH7A细胞系是由类风湿性关节炎患者的成纤维样滑膜细胞经SV40T抗原基因转化而来的具有不死性的细胞系,继承人RA成纤维样滑膜细胞的特点,可代替人RA成纤维样滑膜细胞用于RA的研究。本研究首先将药物LCA对MH7A细胞增殖和细胞凋亡的影响作为评价药效的首要指标。结果显示,LCA能有效的抑制MH7A细胞增殖和诱导MH7A细胞的凋亡。

表6 不同浓度LCA对MH7A细胞的蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of protein expression of MH7A cells treated with different concentrations of LCA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK	p-p38/p38
空白	-	0.61±0.01	0.18±0.04	0.38±0.06
LCA	10	0.58±0.03	0.32±0.15	0.74±0.07
	20	0.98±0.18 ¹⁾	0.51±0.30 ¹⁾	1.08±0.08 ¹⁾
	40	1.24±0.28 ¹⁾	1.20±0.28 ¹⁾	1.00±0.16 ¹⁾

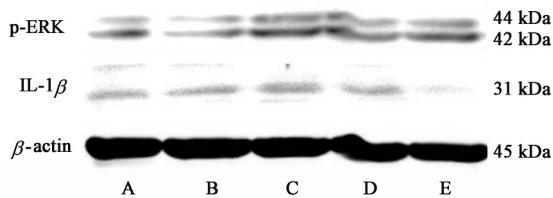


图4 加入ERK抑制剂后LCA对p-ERK蛋白表达的影响
A. 空白组; B. PD98059组; C. LCA 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. LCA 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. LCA 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

Fig. 4 Effect of LCA on expression of p-ERK protein after adding ERK inhibitor

表7 加入ERK抑制剂后LCA对p-ERK蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of LCA on expression of p-ERK protein after adding ERK inhibitor ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-ERK/ β -actin	IL-1 β / β -actin
空白	-	0.224±0.010	0.197±0.025
PD98059	10	0.215±0.007	0.194±0.015
LCA	10	0.454±0.023 ¹⁾	0.229±0.016
	20	0.453±0.015 ¹⁾	0.196±0.012
	40	0.463±0.023 ¹⁾	0.099±0.010 ¹⁾

注:与PD98059组比较¹⁾ $P<0.01$ 。

由于IL-1 β 和TNF- α 等是参与RA发病的重要细胞因子。在RA发病过程中,多种细胞来源的IL-1 β 和TNF- α 可以在关节炎部位刺激单核细胞和巨噬细胞以及T,B淋巴细胞的活化,促进成纤维样细胞增殖,活化破骨细胞,导致软骨降解增加,在组织损伤中起重要作用^[13-15]。本实验发现LCA能有效的抑制TNF- α 诱导的炎性因子的表达,尤其对IL-1 β 抑制效果最明显。

MAPK信号通路由4个不同的级联途径共同组成,包括ERK1/2, JNK1/2/3, p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)和细胞外信号调节激酶5(ERK5),每条信号通路都具有高度特异性和独立的功能,在某些程度上几条信号通路间会有一定的串话(crosstalk)^[16]。MAPK信号通路在调节组织炎症反应、细胞增殖与凋亡和免疫反应等病理生理过程发

挥重要作用,激活MAPK信号通路可以促进ERK, JNK, p38三者的磷酸化,进而抑制炎症细胞的增殖或促进炎症细胞凋亡。徐怡等^[7]研究发现胡桃醌可通过激活p38/JNK MAPK信号通路促进JNK, p38磷酸化来诱导Tac8113细胞凋亡,从而有效抑制Tac8113细胞增殖;王慧莲等^[17]发现汉黄芩素能够通过诱导成纤维样滑膜细胞中活性氧(ROS)的产生,继而激活p38 MAPK信号通路促进p38蛋白磷酸化进而介导细胞线粒体损伤相关的凋亡。本研究结果显示, LCA能够剂量依赖性的促进ERK, JNK, p38三者的磷酸化,因此,笔者推测LCA可能通过促进MAPK信号通路的磷酸化,从而抑制MH7A细胞增殖和促进MH7A细胞凋亡发挥抗炎作用。为了验证这一结论,本实验在LCA干预MH7A细胞的同时,加入ERK抑制剂之后,发现ERK的磷酸化水平降低, LCA促进ERK磷酸化的作用明显被抑制,同时LCA 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对IL-1 β 的抑制作用也显著降低,但是LCA 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对IL-1 β 仍然有明显的抑制作用。推测可能原因是LCA促进的是ERK, JNK, p38三者的磷酸化,即三者共同作用抑制IL-1 β 表达从而抑制细胞增殖并促进凋亡,而本实验只选择ERK抑制剂PD98059抑制ERK的磷酸化,而LCA促JNK和p38的磷酸化没有被抑制,高浓度的LCA仍可通过促进JNK, p38的磷酸化发挥着抑制IL-1 β 作用,具体机制有待进一步探索。

综上所述, LCA可能通过促进MAPK通路关键蛋白的磷酸化而抑制MH7A细胞的增殖、促进MH7A细胞的凋亡和抑制炎症因子的表达发挥抗关节炎作用。本研究揭示了LCA抑制类风湿性关节炎滑膜炎的分子机制,为临床抗类风湿关节炎新药的开发利用提供了实验依据。

[参考文献]

[1] XUE M, MCKELVEY K, SHEN K, et al. Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation [J]. Rheumatology (Oxford), 2014, 53 (12):2270-2279.
[2] NOSS E H, BRENNER M B. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis [J]. Immunol Rev, 2008, 223: 252-270.
[3] FU Y, CHEN J, LI Y J, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated

- from licorice [J]. Food Chem, 2013, 141 (2) : 1063-1071.
- [4] JIA T, QIAO J, GUAN D, et al. Anti-inflammatory effects of licochalcone A on IL-1 β -stimulated human osteoarthritis chondrocytes [J]. Inflammation, 2017, 40 (6):1894-1902.
- [5] QIU C, ZHANG T, ZHANG W, et al. Licochalcone A inhibits the proliferation of human lung cancer cell lines A549 and H460 by inducing G₂/M cell cycle arrest and ER stress [J]. Int J of Mol Sci, 2017, 18(8) : 1761.
- [6] SU X, LI T, LIU Z, et al. Licochalcone A activates Keap1-Nrf2 signaling to suppress arthritis via phosphorylation of p62 at serine 349 [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 115:471-483.
- [7] 徐怡,董伟杰. 胡桃醌通过 p38/JNK MAPK 信号通路调控口腔鳞癌 Tac8113 细胞增殖和凋亡 [J]. 中国药师, 2020, 23(1) : 1-4.
- [8] GENG Q, WEI Q, WANG S, et al. Physcion 8-O- β -glucopyranoside extracted from *Polygonum cuspidatum* exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory effects on MH7A rheumatoid arthritis-derived fibroblast-like synoviocytes through the TGF- β /MAPK pathway [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(2) : 745-754.
- [9] MARIJNISSEN R J, KOENDERS M I, SMEETS R L, et al. Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(10) : 2939-2948.
- [10] WAKISAKA S, SUZUKI N, TAKEBA Y, et al. Modulation by proinflammatory cytokines of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis (RA) [J]. Clin Exp Immunol, 1998, 114(1) : 119-128.
- [11] FIRESTEIN G S, MCINNES I B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Immunity, 2017, 46(2) : 183-196.
- [12] HUI A, KULKARNI G V, HUNTER W L, et al. Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(6) : 1073-1084.
- [13] HUANG C C, CHIOU C H, LIU S C, et al. Melatonin attenuates TNF- α and IL-1 β expression in synovial fibroblasts and diminishes cartilage degradation: implications for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. J Pineal Res, 2019, 66(3) : e12560.
- [14] TONG S, ZHANG C, LIU J. Platelet-rich plasma exhibits beneficial effects for rheumatoid arthritis mice by suppressing inflammatory factors [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4) : 4082-4088.
- [15] BOUTET M A, BART G, PENHOAT M, et al. Distinct expression of interleukin (IL) -36 α , β and γ , their antagonist IL-36Ra and IL-38 in psoriasis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease [J]. Clin Exp Immunol, 2016, 184(2) : 159-173.
- [16] SUN Y, LIU W, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6) : 600-604.
- [17] 王慧莲,孟庆良,李松伟,等. 汉黄芩素通过激活活性氧簇介导的 p38 MAPK 信号通路诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(7) : 890-895.

[责任编辑 孙丛丛]