

· 药理 ·

风湿祛痛胶囊对类风湿关节炎滑膜 Akt 和 MAPK 信号通路的影响

刘春芳¹, 何莲花¹, 王靖霞¹, 李逸群¹, 孙丛丛¹, 荆宇², 苗艳东², 林娜^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 通化金马药业集团股份有限公司, 北京 100028)

[摘要] 目的: 观察风湿祛痛胶囊(FSQTC)对蛋白激酶 B(Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的影响,以探讨其抑制类风湿关节炎(RA)滑膜血管新生的机制。方法:采用 SD 大鼠诱导建立胶原诱导性关节炎(CIA)模型,灌胃给予 FSQTC 低、中、高剂量(0.25, 0.5, 1 g·kg⁻¹)19 d 后,取膝关节滑膜组织备用;血管内皮细胞生长因子(VEGF, 20 μg·L⁻¹)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC),肿瘤坏死因子-α(TNF-α, 20 μg·L⁻¹)体外诱导人 RA 成纤维样滑膜细胞系 MH7A,分别加入不同质量浓度 FSQTC(0.02, 0.1, 0.5 μg·L⁻¹)作用后,取细胞备用。分别提取滑膜组织以及 MH7A 和 HUVEC 两种细胞中的蛋白,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化 Akt(p-Akt), p-p38 MAPK, p-细胞外信号调节激酶(ERK), p-氨基末端激酶(JNK)的蛋白表达水平。结果: CIA 模型组大鼠关节滑膜中 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 的表达水平均较正常组显著升高($P < 0.01$),经 0.25, 0.5, 1 g·kg⁻¹·d⁻¹的 FSQTC 治疗后降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与空白组比较, VEGF 或 TNF-α 能分别诱导 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 在 MH7A 或 HUVEC 细胞中的异常升高($P < 0.01$), 0.02, 0.1, 0.5 μg·L⁻¹的 FSQTC 能明显降低 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK 的表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: FSQTC 能负调节 Akt 和 MAPK 信号通路在 CIA 大鼠滑膜组织、体外培养的血管内皮细胞和成纤维滑膜细胞中的异常活化,这可能与其对 RA 滑膜血管新生的抑制作用有关。

[关键词] 风湿祛痛胶囊; 蛋白激酶 B; 丝裂原活化蛋白激酶; 胶原诱导性关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 内皮细胞; 类风湿关节炎

[中图分类号] R289; R593.22; R364.5; R654.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)13-0035-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191336

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190318.1310.002.html>

[网络出版时间] 2019-03-19 16:15

Effect of Fengshi Qutong Capsule on Synovial Akt and MAPK Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis

LIU Chun-fang¹, HE Lian-hua¹, WANG Jing-xia¹, LI Yi-qun¹, SUN Cong-cong¹, JING Yu²,
MIAO Yan-dong², LIN Na^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China;
2. Tonghua Golden-horse Group, Beijing 100028, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Fengshi Qutong capsule (FSQTC) on protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways of rheumatoid arthritis (RA). **Method:** Collagen-induced arthritis (CIA) was induced in SD rats, and the synovial membranes of the knee joints were prepared after 19 days of oral administration of 0.25, 0.5, 1 g·kg⁻¹ FSQTC. MH7A cells were induced by tumor necrosis factor-α (TNF-α, 20 μg·L⁻¹) *in vitro*, and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were

[收稿日期] 20190124(017)

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20171011)

[第一作者] 刘春芳, 副研究员, 从事中药药理研究, E-mail: chunfang666@126.com

[通信作者] * 林娜, 研究员, 从事抗炎中药药理研究, E-mail: linna888@163.com

induced by vascular endothelial growth factor (VEGF). FSQTC (0.02, 0.1, 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) were added to MH7A/HUVEC cells, and then the cells were collected. Proteins of synovial tissue, MH7A and HUVEC cells were extracted, and then were detected the expression of p-Akt, p-p38 MAPK, p-extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p-Jun n-terminal kinase (JNK) by Western blot. **Result:** The expression levels of p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK and p-JNK in the synovial membrane of CIA model were significantly increased compared with normal group ($P < 0.01$), and the treatment of 0.25, 0.5 and 1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ FSQTC significantly decreased their expression levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$). To compared with control group, the expression levels of p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK and p-JNK in MH7A or HUVEC cells induced by TNF- α or VEGF were increased ($P < 0.01$), respectively, and these factors are significantly reduced by 0.02, 0.1, 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ FSQTC ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** FSQTC can down-regulate the abnormal activation of Akt and MAPK signaling pathways in the synovial membrane of CIA rats, fibroblast synovial cells and vascular endothelial cells, which is related to the inhibition of synovial angiogenesis in the treatment of RA.

[Key words] Fengshi Qutong capsule; protein kinase B; mitogen-activated protein kinase; collagen-induced arthritis; fibroblast-like synovial cell; endothelial cell; rheumatoid arthritis

类风湿关节炎(RA)是一种病因未明的炎症性全身免疫性疾病,其病理特征为关节滑膜炎、血管翳形成、软骨和骨破坏,最终导致关节变形及功能障碍^[1]。研究表明,多种信号通路如磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 转导异常引发的滑膜炎和血管异常增生是 RA 主要的病理基础^[2-3],针对这些信号通路的药物治疗为 RA 的研究热点。抗风湿中药复方因疗效好、副作用小的优势而在 RA 临床广泛应用。风湿祛痛胶囊(FSQTC)是治疗 RA 疗效较好的中成品种,由经典名方二妙散及蜂房、乌梢蛇、金钱白花蛇等 19 味中药组成,具有燥湿祛风、活血化瘀、通络止痛功效^[4]。课题组前期研究显示,FSQTC 能有效抑制大鼠胶原诱导性关节炎(CIA)的滑膜血管新生,具有调节滑膜细胞和血管内皮细胞的增殖、迁移及成血管功能,降低炎症因子和血管新生调控因子表达的作用^[5-8]。此作用是否与调控 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路有关尚不清楚。本研究拟借助 CIA 大鼠动物模型以及由肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的 RA 成纤维样滑膜细胞 MH7A 和由血管内皮细胞生长因子(VEGF)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)两个体外模型,观察 FSQTC 对滑膜血管新生主要信号调控因子 Akt 与 p38 MAPK,细胞外信号调节激酶(ERK),氨基末端激酶(JNK)磷酸化水平的影响作用,为进一步探索其抑制滑膜血管生成治疗 RA 的作用机制提供的实验依据。

1 材料

1.1 动物及细胞 SPF 级 SD 大鼠 60 只,雄性,体质量 160 ~ 180 g,购自中国食品药品检定研究院,合

格证号 SCXK(京)2014-0013。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,日光灯照明,空调控温,实验操作符合中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物福利伦理审查委员会标准,编号 2017-067。适应性饲养 3 d 后用于实验。MH7A 细胞购自日本 Riken Cell Bank 公司,取 4 ~ 8 代用于实验;HUVEC 购自上海子实生物公司,取 4 ~ 8 代用于实验。

1.2 药物及试剂 FSQTC(通化金马药业集团有限公司,批号 20170926),由川黄柏、苍术、威灵仙、鸡血藤、蜂房、乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇、西红花、土鳖虫、醋没药、醋乳香、独活、全蝎、蜈蚣、地龙、羌活、桂枝、姜黄共 19 味药材组成;甲氨蝶呤(上海源叶生物科技有限公司,批号 SN1122RA14);不完全弗氏佐剂,牛 II 型胶原(C II)(美国 Chondrex. Inc 公司,批号分别为 7002,2002);兔抗 Akt, p38 MAPK,细胞外信号调节激酶(ERK), JNK,磷酸化 Akt (p-Akt), p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK 抗体(美国 CST 公司,批号分别为 9272, 8690, 4695, 9258, 4060, 4511, 4370, 4668S);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab181602);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G, Bradford 蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号分别为 C2226, P1510);0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号 25200-072)。

1.3 仪器 IKA T10 型手持式匀浆机[艾卡(广州)仪器设备有限公司]; Fusion FX5 Spectra 型凝胶成像仪(法国 Vilber 公司); TS-1 型水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); JCLK 型制冰机

(常熟市菱科电器有限公司); PowerPac™ Basic 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); 371 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 制备 CIA 大鼠模型 等体积的 C II 和不完全弗氏佐剂混合, 冰浴下进行乳化, 直至滴水不扩散, 大鼠尾根皮内注射乳化剂 0.2 mL/只(含 C II 200 μg), 第 7 天注射 C II 0.1 mL/只激发免疫。大鼠前肢或后肢出现关节红肿, 表明造模成功^[9]。

2.1.2 分组和给药 大鼠按体质量随机分为正常组、模型组、风湿祛痛胶囊(0.25, 0.5, 1 g·kg⁻¹剂量组, 分别相当于临床剂量的 0.5, 1, 2 倍)^[5]和甲氨蝶呤组(0.2 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。大鼠造模第 2 天开始按体质量灌胃给药, 每天 1 次, 连续给药 19 d, 正常组和模型组灌胃同等条件下的蒸馏水。

2.1.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测炎症关节滑膜组织中 p-p38 MAPK, p38 MAPK, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-Akt 及 Akt 蛋白的表达 取炎症关节滑膜组织滑膜, 制备蛋白样品, 测定蛋白浓度, 制备 SDS-PAGE 凝胶, 上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗(Akt, p-Akt, JNK, p-JNK, p38 MAPK, p-p38 MAPK, ERK, p-ERK, 均为兔来源抗体, 1:1 000; GAPDH 为兔来源抗体, 1:2 万)、洗涤、孵育 IgG 抗体(1:5 000)、洗涤、显影、定影; 洗膜后加入 ECL 超敏发光液, 凝胶成像仪进行成像, 以蛋白条带灰度值代表蛋白表达量, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析, 最终以目的蛋白与 GAPDH 比值来评估蛋白表达水平。

2.2 体外实验

2.2.1 Western blot 检测 MH7A 细胞中 p-p38 MAPK, p38 MAPK, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-Akt 及 Akt 的蛋白表达水平 待 MH7A 生长至 80%~90% 融合时, 进行消化, 1 500 r·min⁻¹ 离心 3 min 弃上清后, 用含 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬 MH7A, 按 5×10⁴ 个/孔接种至 10 cm 培养皿中, 每组 4 复孔, 加入不同质量浓度 FSQTC(0.02, 0.1, 0.5 μg·L⁻¹) 作用 24 h 后, 加入终质量浓度为 20 μg·L⁻¹ 的 TNF-α(空白组加入等体积培养基), 作用 5 min 后弃上清, 预冷的 PBS 清洗 2 次, 收集细胞, 用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上处理 1 h(每隔 10 min 漩涡振荡 15 s), 4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清即为提取总蛋白。Bradford 法进行蛋白定量, 后

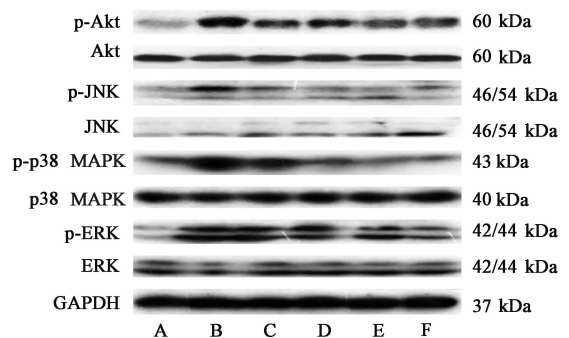
续操作如 2.1.3 项下进行。

2.2.2 Western blot 检测 HUVEC 细胞中 p-p38 MAPK, p38 MAPK, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-Akt 及 Akt 的表达水平 待 HUVEC 生长至 80%~90% 消化, 1 500 r·min⁻¹ 离心 3 min 弃上清后, 用含 5% FBS 的 RPMI H-DMEM 培养基重悬 HUVEC, 按 5×10⁴ 个/孔接种至提 10 cm 培养皿中, 每组 4 复孔, 加入不同质量浓度的 FSQTC(0.02, 0.1, 0.5 μg·L⁻¹) 作用 24 h 后, 加入终质量浓度为 20 μg·L⁻¹ 的 VEGF(空白组加入等体积培养基), 作用 15 min 后弃上清预冷的 PBS 清洗 2 次, 收集细胞, 用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上处理 1 h(每隔 10 min 漩涡振荡 15 s), 4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清即为提取总蛋白, Bradford 法进行蛋白定量, 后续操作如 2.1.3 项下。

2.3 统计学分析 本实验统计学数据处理分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 方差齐时采用单因素方差分析, 方差不齐采用秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 FSQTC 对 CIA 大鼠炎症关节滑膜组织中 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠炎症关节滑膜组织中 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, FSQTC 0.25, 0.5, 1 g·kg⁻¹ 剂量组 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 甲氨蝶呤组的作用与 FSQTC 1 g·kg⁻¹ 组作用相近; 各组间 Akt, p38 MAPK, ERK 和 JNK 的蛋白表达水平无统计学差异。见图 1, 表 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. FSQTC 0.25 g·kg⁻¹ 组; D. FSQTC 0.5 g·kg⁻¹ 组; E. FSQTC 1 g·kg⁻¹ 组; F. 甲氨蝶呤组

图 1 CIA 大鼠关节滑膜中 Akt 和 MAPK 信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of protein expression of Akt and MAPK signaling pathway in synovium of CIA rats joints

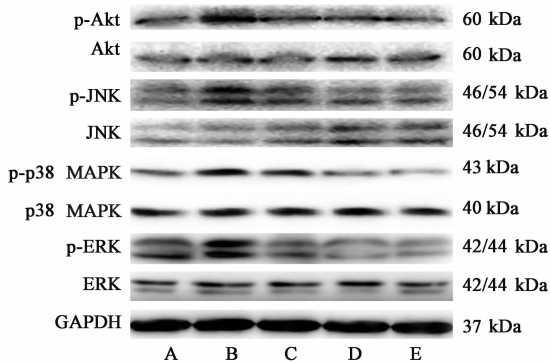
表 1 FSQTC 对 CIA 大鼠关节滑膜中 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK, Akt, p38 MAPK, ERK 和 JNK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of FSQTC on protein expression of p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK, Akt, p38 MAPK, ERK and JNK in synovium of CIA rats joints ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-Akt/GAPDH	p-p38 MAPK/GAPDH	p-ERK/GAPDH	p-JNK/GAPDH
正常	-	1.000 ± 0.169	1.000 ± 0.054	1.000 ± 0.023	1.000 ± 0.053
模型	-	1.794 ± 0.176 ¹⁾	3.943 ± 0.556 ¹⁾	1.864 ± 0.087 ¹⁾	3.818 ± 0.613 ¹⁾
FSQTC	0.25	1.442 ± 0.099 ²⁾	3.170 ± 0.519 ²⁾	1.441 ± 0.169 ²⁾	2.906 ± 0.459 ²⁾
	0.5	1.158 ± 0.189 ²⁾	2.331 ± 0.057 ³⁾	1.388 ± 0.256 ²⁾	2.452 ± 0.057 ²⁾
	1	1.027 ± 0.154 ³⁾	2.210 ± 0.054 ³⁾	1.274 ± 0.232 ³⁾	2.336 ± 0.52 ³⁾
甲氨喋呤	0.002	1.139 ± 0.269 ²⁾	1.869 ± 0.054 ³⁾	1.155 ± 0.097 ³⁾	2.145 ± 0.051 ³⁾

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Akt/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	ERK/GAPDH	JNK/GAPDH
正常	-	1.000 ± 0.037	1.000 ± 0.149	1.000 ± 0.022	1.000 ± 0.045
模型	-	1.014 ± 0.233	1.057 ± 0.165	0.990 ± 0.029	1.016 ± 0.040
FSQTC	0.25	0.953 ± 0.128	1.080 ± 0.189	1.047 ± 0.034	1.162 ± 0.142
	0.5	1.120 ± 0.037	1.082 ± 0.190	0.946 ± 0.122	1.026 ± 0.048
	1	1.047 ± 0.213	1.060 ± 0.118	0.926 ± 0.217	1.129 ± 0.114
甲氨喋呤	0.002	0.996 ± 0.321	1.091 ± 0.089	0.905 ± 0.020	1.108 ± 0.044

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 FSQTC 对 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞中 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 蛋白表达的影响
HUVEC 细胞经 VEGF 诱导后 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 0.02, 0.1, 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ FSQTC 作用后能显著降低 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞中异常升高的 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 蛋白表达水平 ($P < 0.05, P < 0.01$); 各组间 Akt, p38 MAPK, ERK 和 JNK 蛋白表达无统计学差异。见图 2, 表 2。

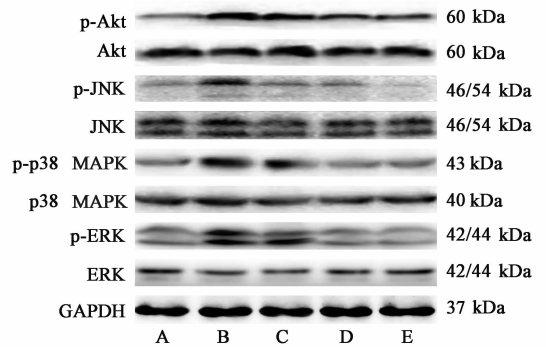


A. 空白组; B. VEGF 组; C. VEGF + FSQTC 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. VEGF + FSQTC 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. VEGF + FSQTC 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组
图 2 VEGF 诱导 HUVEC 中 Akt 和 MAPK 信号调控通路相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of Akt and MAPK signaling pathway in VEGF-induced HUVECs

3.3 FSQTC 对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞中 p-Akt,

p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 蛋白表达水平的影响
与空白组比较, TNF- α 组 MH7A 细胞中 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 的蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$); 0.02, 0.1 和 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 FSQTC 能明显降低 TNF- α 诱导异常升高的 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK 和 p-JNK 的蛋白表达水平 ($P < 0.05, P < 0.01$); 各组间 Akt, p38 MAPK, ERK 和 JNK 的蛋白表达水平无统计学差异。见图 3, 表 3。



A. 空白组; B. TNF- α 组; C. TNF- α + FSQTC 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. TNF- α + FSQTC 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. TNF- α + FSQTC 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 3 TNF- α 诱导 MH7A 中 Akt 和 MAPK 信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of Akt and MAPK signaling pathway of MH7A induced by TNF- α

4 讨论

新生血管形成伴随着滑膜炎增生是 RA 血管翳形成及关节破坏的基础^[10]。研究显示, RA 滑膜

表 2 FSQTC 对 VEGF 诱导 HUVEC 中 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK, Akt, p38 MAPK, ERK 和 JNK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 2 Effect of FSQTC on protein expression of p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK, Akt, p38 MAPK, ERK and JNK in VEGF-induced HUVECs ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	p-Akt/GAPDH	p-p38 MAPK/GAPDH	p-ERK/GAPDH	p-JNK/GAPDH
空白	-	1.000 ± 0.106	1.000 ± 0.047	1.000 ± 0.021	1.000 ± 0.211
VEGF	20	3.015 ± 0.087 ¹⁾	1.749 ± 0.128 ¹⁾	1.779 ± 0.117 ¹⁾	1.512 ± 0.147 ¹⁾
VEGF + FSQTC	20 + 0.02	2.386 ± 0.123 ³⁾	1.416 ± 0.130 ²⁾	1.472 ± 0.133 ²⁾	1.306 ± 0.230
	20 + 0.1	2.197 ± 0.078 ³⁾	1.322 ± 0.175 ²⁾	1.158 ± 0.252 ³⁾	1.173 ± 0.041 ²⁾
	20 + 0.5	1.869 ± 0.097 ³⁾	1.156 ± 0.085 ³⁾	1.020 ± 0.195 ³⁾	1.053 ± 0.190 ³⁾
组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Akt/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	ERK/GAPDH	JNK/GAPDH
空白	-	1.000 ± 0.025	1.000 ± 0.050	1.000 ± 0.023	1.000 ± 0.018
VEGF	20	0.956 ± 0.129	1.013 ± 0.112	1.006 ± 0.186	1.012 ± 0.026
VEGF + FSQTC	20 + 0.02	1.070 ± 0.025	1.062 ± 0.045	0.978 ± 0.153	0.992 ± 0.218
	20 + 0.1	1.098 ± 0.037	1.112 ± 0.052	1.025 ± 0.054	1.043 ± 0.027
	20 + 0.5	1.011 ± 0.203	1.029 ± 0.201	1.034 ± 0.022	1.066 ± 0.191

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 VEGF 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 FSQTC 对 TNF- α 诱导 MH7A 中 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK, Akt, p38 MAPK, ERK 和 JNK 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 3 Effect of FSQTC on protein expression of p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK, Akt, p38 MAPK, ERK and JNK of MH7A induced by TNF- α ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	p-Akt/GAPDH	p-p38 MAPK/GAPDH	p-ERK/GAPDH	p-JNK/GAPDH
空白	-	1.000 ± 0.078	1.000 ± 0.033	1.000 ± 0.048	1.000 ± 0.032
TNF- α	20	2.705 ± 0.079 ¹⁾	1.788 ± 0.163 ¹⁾	3.518 ± 0.564 ¹⁾	2.720 ± 0.450 ¹⁾
TNF- α + FSQTC	20 + 0.02	1.941 ± 0.229 ³⁾	1.303 ± 0.128 ²⁾	2.609 ± 0.122 ²⁾	2.066 ± 0.357 ²⁾
	20 + 0.1	1.861 ± 0.073 ³⁾	1.232 ± 0.213 ²⁾	2.493 ± 0.216 ³⁾	1.913 ± 0.328 ³⁾
	20 + 0.5	1.408 ± 0.072 ³⁾	1.045 ± 0.214 ³⁾	1.854 ± 0.142 ³⁾	1.812 ± 0.119 ³⁾
组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Akt/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	ERK/GAPDH	p-JNK/GAPDH
空白	-	1.000 ± 0.051	1.000 ± 0.048	1.000 ± 0.118	1.000 ± 0.032
TNF- α	20	0.994 ± 0.056	1.080 ± 0.405	0.996 ± 0.027	2.720 ± 0.450 ¹⁾
TNF- α + FSQTC	20 + 0.02	1.010 ± 0.127	1.086 ± 0.136	1.019 ± 0.115	2.066 ± 0.357 ²⁾
	20 + 0.1	1.029 ± 0.210	1.111 ± 0.069	0.995 ± 0.056	1.913 ± 0.328 ³⁾
	20 + 0.5	1.115 ± 0.040	1.051 ± 0.084	1.042 ± 0.039	1.812 ± 0.119 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 TNF- α 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

血管新生受细胞因子、信号通路等多种因素调节,其中与 Akt 信号传导通路密切相关。Akt 广泛存在于 RA 滑膜组织,其被 PI3K 激活而逐渐磷酸化,刺激细胞因子如 TNF- α , VEGF 等的表达,从而发挥其介导细胞生长、发育和血管调节作用的生物学效应^[11-12]。MAPK 信号通路的主要家族成员 p38 MAPK, ERK1/2 和 JNK 以活化的磷酸化形式也在 RA 患者的关节滑膜组织中大量表达^[13],有报道抑制 MAPK 通路的激活,可有效控制滑膜炎症和血管新生,保护关节软骨,减缓 RA 病程^[14]。因此, Akt 和 MAPK 信号通路在 RA 滑膜血管新生中起重要作用,抑制 Akt 和 MAPK 信号通路成为 RA 治疗的切入点。

目前 RA 的治疗药物包括非甾体抗炎药、改善病情的抗风湿药、糖皮质激素、生物制剂等,但由于其严重的毒副作用或价格昂贵等缺点,在临床应用

中受到限制,因而选择安全有效的抗风湿药成为医药者关注的重点。中医药有良好的抗炎、镇痛作用,在 RA 的治疗中占有很重要的地位。FSQTC 是临床治疗 RA 的有效中成药,且无明显毒副作用^[4]。既往研究证明, FSQTC 具有明显的抗炎、镇痛作用^[15-16]。本课题组前期的实验研究也显示了其具有抑制 CIA 大鼠关节滑膜炎症和血管新生的作用^[5-8]。为了进一步探索这一作用是否与调控 Akt 和 MAPK 信号通路有关,本实验首先采用 CIA 大鼠模型进行相关研究。结果显示, FSQTC 能够降低 CIA 大鼠炎症关节滑膜组织中的 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK 的表达水平,但对总蛋白的表达水平没有明显影响,提示 FSQTC 能负向调节炎症关节滑膜组织中 Akt 和 MAPK 信号通路的异常活化。由于血管内皮细胞是 RA 滑膜血管新生的主要效应细胞^[17-18],滑膜细胞则通过分泌促血管新生

调控因子如 VEGF, TNF- α 调控血管内皮细胞, 在滑膜血管新生的病理机制中发挥重要作用^[19-22]。因此本实验采用由 TNF- α 诱导的 RA 成纤维样滑膜细胞和由 VEGF 诱导的血管内皮细胞两个体外细胞模型, 进一步观察 p-Akt, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK 在 HUVEC 和 MH7A 的蛋白表达变化。结果显示, FSQTC 能明显下调 Akt, p38 MAPK, ERK 和 JNK 在 MH7A 和 HUVEC 细胞中的磷酸化表达水平, 但对这些因子的总蛋白水平没有影响, 提示 FSQTC 不但对 CIA 大鼠关节滑膜、而且对体外 HUVEC 和 MH7A 细胞中的 Akt 和 MAPK 信号通路的异常活化均有明显抑制作用。

综上, 本研究在前期已证明 FSQTC 对 CIA 大鼠滑膜血管异常增生以及血管内皮细胞和成纤维样滑膜细胞的功能异常有抑制作用的基础上, 进一步采用整体和体外细胞模型证明了 FSQTC 能负调节 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路在 CIA 大鼠滑膜组织、体外培养的血管内皮细胞和成纤维样滑膜细胞中的异常活化, 相关研究结果将为这一方药抗 RA 滑膜血管新生的作用机制的深入研究提供初步的实验基础, 也有利于指导临床合理用药。

[参考文献]

[1] Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog E M. Hypoxia-a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(3):153-162.

[2] 张学增, 张育. RA 治疗新靶点——信号转导通路的调节[J]. *现代免疫学*, 2010, 30(3):253-256.

[3] 姜旭淦, 许化溪. 信号转导途径在类风湿性关节炎治疗中的应用进展[J]. *医学综述*, 2006(8):456-459.

[4] 程万强, 王林霞, 刘海瑜, 等. 风湿祛痛胶囊结合穴位注射治疗类风湿性关节炎的临床疗效研究[J]. *当代医学*, 2018, 24(29):4-6.

[5] 王靖霞, 刘春芳, 何莲花, 等. 风湿祛痛胶囊对大鼠胶原诱导性关节炎的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(2):89-95.

[6] 刘春芳, 王靖霞, 何莲花, 等. 风湿祛痛胶囊对 II 型胶原诱导性关节炎大鼠滑膜血管新生的影响[J]. *中国中药杂志*, 2019, doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20181220.001.

[7] 何莲花, 李逸群, 王靖霞, 等. 风湿祛痛胶囊对 TNF- α 诱导的人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(7):116-121.

[8] 李逸群, 何莲花, 刘春芳, 等. 风湿祛痛胶囊对 VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5):119-125.

[9] Bevaart L, Vervoordeldonk M J, Tak P P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8):2192-2205.

[10] 郭炜, 刘春芳, 林娜. 类风湿性关节炎滑膜血管新生与中医药[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10):308-312.

[11] GAO J, ZHOU X L, KONG R N, et al. MicroRNA-126 targeting PI3K2 promotes rheumatoid arthritis synovial fibro-blasts proliferation and resistance to apoptosis by regulating PI3K/Akt pathway [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 100(1):192-198.

[12] HAN W, XIONG Y, LI Y, et al. Anti-arthritis effects of clematichenoside (AR-6) on PI3K/Akt signaling pathway and TNF- α associated with collagen-induced arthritis[J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(1):13-22.

[13] 戴敏, 魏伟. 风湿性关节炎滑膜细胞信号转导机制研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(5):481-485.

[14] 张彦景, 张建新. MAPK 信号转导通路在类风湿性关节炎的研究进展 [J]. *河北医药*, 2016, 38(17):2677-2681.

[15] 孙晓丽, 周亚伟, 孙桂媛, 等. 风湿祛痛胶囊镇痛抗炎作用研究[J]. *人参研究*, 2018, 30(1):24-27.

[16] 孙璠璠, 李萍, 朱志杰, 等. 风湿祛痛胶囊的抗炎作用研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(1):26-28.

[17] Cury V, Moretti A I, Assis L, et al. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2013, 125:164-170.

[18] Camps M, Rückle T, Ji H, et al. Blockade of PI3K gamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Med*, 2005, 11(9):936-943.

[19] HUANG C, Jacobson K, Schaller M D. MAP kinases and cell migration [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 20):4619-4628.

[20] Gravalles E M, Manning C, Tsay A, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(2):250-258.

[21] YAN C, Boyd D D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 211(1):19-26.

[22] ZENG S, WANG K, HUANG M, et al. Halofuginone inhibits TNF- α -induced the migration and proliferation of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 43:187-194.

[责任编辑 全燕]