

# 风湿祛痛胶囊对 TNF- $\alpha$ 诱导的人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞功能的影响

何莲花<sup>1,2</sup>, 李逸群<sup>1</sup>, 王靖霞<sup>1</sup>, 孙丛丛<sup>1</sup>, 刘春芳<sup>1\*</sup>, 荆宇<sup>3</sup>, 苗艳东<sup>3</sup>, 林娜<sup>1\*</sup>

1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
2. 北京大学 深圳医院, 广东 深圳 518036;
3. 通化金马药业集团股份有限公司, 北京 100028)

**[摘要]** 目的:研究风湿祛痛胶囊(FSQTC)对肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )诱导的人类风湿关节炎(RA)成纤维样滑膜细胞增殖、迁移、黏附、侵袭和分泌功能的影响。方法:TNF- $\alpha$ (20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )体外诱导 RA 患者成纤维样滑膜细胞(MH7A),加入不同浓度 FSQTC(0.02,0.1,0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用后,分别采用噻唑蓝(MTT)比色法,转移小室(transwell)迁移、黏附及侵袭实验检测 MH7A 细胞的增殖活性、迁移、黏附及侵袭能力,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞上清中白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 及血管内皮细胞生长因子(VEGF)的含量。结果:与空白组比较,TNF- $\alpha$ (20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )能显著增加 MH7A 细胞的增殖、迁移、黏附、侵袭能力及分泌 IL-1 $\beta$ 和 VEGF 的含量( $P < 0.01$ );与 TNF- $\alpha$ 组比较,FSQTC(0.02,0.1,0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用 24 h 对 TNF- $\alpha$ 诱导的 MH7A 细胞增殖活性没有明显影响,作用 48 h 能浓度依赖地降低 TNF- $\alpha$ 诱导增加的 MH7A 细胞增殖活性( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),作用 24 h 还能显著降低 TNF- $\alpha$ 诱导升高的 MH7A 细胞迁移、黏附、侵袭能力及分泌 IL-1 $\beta$ 和 VEGF 的含量( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。结论:FSQTC 可降低 MH7A 细胞增殖、迁移、黏附、侵袭及分泌 IL-1 $\beta$ 和 VEGF 的能力。

**[关键词]** 风湿祛痛胶囊;成纤维样滑膜细胞(MH7A);增殖;迁移;侵袭;黏附

**[中图分类号]** R289;R593.22;R446.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0116-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190739

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181220.1807.001.html>

**[网络出版时间]** 2018-12-24 16:18

## Effect of Fengshi Qutong Capsule on Function of Human Synovial Cells in Rheumatoid Arthritis Induced by TNF- $\alpha$

HE Lian-hua<sup>1,2</sup>, LI Yi-qun<sup>1</sup>, WANG Jing-xia<sup>1</sup>, SUN Cong-cong<sup>1</sup>, LIU Chun-fang<sup>1\*</sup>,  
JING Yu<sup>3</sup>, MIAO Yan-dong<sup>3</sup>, LIN Na<sup>1\*</sup>

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;
2. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China;
3. Tonghua Golden-horse Group, Beijing 100028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of Fengshi Qutong capsule (FSQTC) on proliferation, migration, adhesion, invasion and secretion of human synovial cells in rheumatoid arthritis (RA) induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and explore its mechanism. **Method:** Human synovial cells (MH7A) in RA patients were induced *in vitro* by using TNF- $\alpha$  (20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). After treatment with different concentrations of FSQTC (0.02, 0.1, 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), MTT colorimetric assay, transwell migration, adhesion and invasion tests were used

**[收稿日期]** 20181013(004)

**[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]** 何莲花, 博士后, 从事中药抗类风湿关节炎相关研究, E-mail: helianhua126@126.com

**[通信作者]** \* 刘春芳, 副研究员, 从事抗炎中药药理研究, E-mail: chunfang666@126.com;

\* 林娜, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理和中药药性研究, E-mail: linna888@163.com

to detect the proliferation, migration, adhesion and invasion of the MH7A, respectively. The expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in MH7A supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** As compared with blank control group, TNF- $\alpha$  (20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly increased the proliferation, migration, adhesion, invasion and secretion of IL-1 $\beta$  and VEGF of MH7A cells ( $P < 0.01$ ). FSQTC (0.02, 0.1, 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) had no significant effect on proliferation of TNF- $\alpha$ -induced MH7A cells after treatment for 24 hours. After 48 hours of treatment, proliferation of MH7A cells induced by TNF- $\alpha$  was decreased in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Within 24 hours, the migration, adhesion, invasion, invasion, and secretion of IL-1 and VEGF in MH7A cells were also decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** FSQTC can inhibit the proliferation, migration, adhesion, invasion and secretion of IL-1 $\beta$  and VEGF in MH7A cells.

[**Key words**] Fengshi Qutong capsule; human synovial cell (MH7A); proliferation; migration; invasion; adhesion

类风湿关节炎(RA)是慢性、炎症性、全身免疫疾病,其主要病理特点为滑膜细胞炎性增生、血管翳形成,侵袭软骨和骨组织,最终导致关节畸形和功能丧失<sup>[1-3]</sup>。RA滑膜组织中的成纤维样滑膜细胞(FLS)是滑膜炎性增生的主要效应细胞,具有异常增殖、迁移、黏附、侵袭和分泌等类肿瘤的生物特性,在RA病理过程中起重要作用<sup>[4]</sup>。因此,抑制RA滑膜细胞的异常功能,能有效控制滑膜炎和增生,阻止其侵蚀软骨和骨组织,减缓RA病情进展。中药治疗RA因其疗效好、毒副作用小而备受关注。风湿祛痛胶囊(FSQTC)是临床治疗RA的有效中成药,由川黄柏、苍术、威灵仙等19味中药组成,其具有镇痛、抗炎等作用<sup>[5-6]</sup>。课题组前期实验研究已证明FSQTC具抑制胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠关节滑膜血管新生的作用,对血管内皮细胞生长因子(VEGF)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)功能也有负调节效应<sup>[7-9]</sup>。为了有利于进一步探索相关作用机制,本研究针对滑膜细胞炎症增生这一RA重要病理关节,采用人RA成纤维样滑膜细胞(MH7A)经肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )体外诱导培养模型,观察FSQTC对MH7A细胞增殖、迁移、黏附、侵袭和分泌能力的影响,探讨FSQTC对类风湿性关节炎的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** MH7A细胞购自日本Riken cell bank公司,取4~8代用于实验。

**1.2 试剂** FSQTC由川黄柏、苍术、威灵仙、蜂房、鸡血藤、乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇、红花、土鳖虫、醋没药、醋乳香、独活、全蝎、蜈蚣、地龙、羌活、桂枝及姜黄19味中药组成,FSQTC粉末(通化金马药业集团股份有限公司,批号为20170926);RPMI 1640

培养基(美国Hyclone公司,批号SH30809.01B);噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,批号M5655);胎牛血清(美国Gibco公司,批号16000-044);基质胶(美国Corning公司,批号354234);转移小室(transwell,美国Costar公司,批号3422);recombinant human TNF- $\alpha$ (美国PeproTech公司,批号300-01A);纤连蛋白(美国Millipore公司,批号FC010);牛血清白蛋白(BSA,瑞士Roche公司,批号10735078001);二甲基亚砜(DMSO,美国Amresco公司,批号0231);VEGF,白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉Elabscience公司,批号分别为E-EL-H0111c,E-EL-H0149c);结晶紫(北京科海金忠科技有限公司,批号2014071603)。

**1.3 仪器** RVIO型旋转蒸发仪(德国KIA公司);TD5A-WS型低速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);XDS-1B型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);BX50型正置显微镜,CKX31型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);MK3型全自动酶标仪,371型二氧化碳培养箱(美国Thermo公司)。

## 2 方法

**2.1 FSQTC的制备** 称取FSQTC粉末100 mg,用无菌蒸馏水充分溶解配成母液10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,经0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**2.2 细胞培养** MH7A置于10%胎牛血清、青霉素100  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,链霉素100  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的RPMI 1640培养基37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱内培养,隔天换液,细胞90%左右胰酶消化传代。

**2.3 MTT比色法检测MH7A的增殖活性** MH7A细胞 $5\times 10^4$ 个/mL接种于96孔板,每组设4复孔,培养过夜,加入0.02,0.1,0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ FSQTC和(或)终质量浓度为20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TNF- $\alpha$ ,并设置空

白组和空白加  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 组, 分别继续培养 24, 48 h, 每孔加入 MTT  $20 \mu\text{L}$ , 培养 4 h, 弃上清, 加入 DMSO, 每孔  $150 \mu\text{L}$ , 酶标仪  $492 \text{ nm}$  测吸光度  $A$ 。

**2.4 transwell 迁移实验检测 MH7A 的迁移能力**  
transwell 上室加入  $150 \mu\text{L}$  无血清 RPMI 1640 培养基重悬的 MH7A 细胞  $5 \times 10^4$  个及不同浓度的 FSQTC ( $0.02, 0.1, 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 下室加入含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基和/或  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$   $600 \mu\text{L}$ , 并设置空白组和空白加  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 组; 迁移 2 h 后, 润湿棉签拭去膜上未迁移细胞; 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 10 min, 蒸馏水冲洗 3 次; 将插槽翻转倒置, 正置光学显微镜观察迁移到膜下细胞, 每孔随机选取 5~8 个视野拍照并计数。

**2.5 黏附实验检测 MH7A 的黏附能力** 纤连蛋白  $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  加至 96 孔板中, 每孔  $50 \mu\text{L}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜后吸除多余液体, 每孔加入 1% BSA  $100 \mu\text{L}$  封闭, 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  孵箱内培养 60 min, 无血清培养基洗 2 次, 备用。MH7A 细胞等密度接种至 24 孔板, 贴壁后加入不同质量浓度的 FSQTC ( $0.02, 0.1, 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 (或) TNF- $\alpha$  (终质量浓度为  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并设置空白组和空白加  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 组, 培养 24 h, 消化细胞, 调整各组细胞密度按  $5 \times 10^4$  个/孔接种至纤连蛋白预包被的 96 孔板, 同时设置空白组, 每组 4 复孔; 孵育 1.5 h; 加入  $100 \mu\text{L}$  无血清培养基与 MTS  $20 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 4 h, 酶标仪  $492 \text{ nm}$  测  $A$ 。

**2.6 transwell 侵袭实验检测 MH7A 的侵袭能力**  
matrigel  $14 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜融化, 基础培养基 1:8 稀释, 包被 transwell 小室底部膜的上室面,  $40 \mu\text{L}$ /孔, 置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  60 min 使 matrigel 聚合成凝胶, 备用。matrigel 包被的 transwell 上室加入无血清 RPMI 1640 培养基重悬的 MH7A  $5 \times 10^4$  个及不同质量浓度的 FSQTC ( $0.02, 0.1, 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $150 \mu\text{L}$ , 下室加入含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基和/或 TNF- $\alpha$  (终质量浓度  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $600 \mu\text{L}$ , 并设置空白组和空白加  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 组; 侵袭 4 h 后, 润湿棉签拭去膜上未侵袭的细胞; 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 10 min, 蒸馏水冲洗 3 次; 将插槽翻转倒置, 用正置光学显微镜观察侵袭到膜下的细胞, 每孔随机选取 5~8 个视野拍照并计数。

**2.7 ELISA 检测 MH7A 分泌 VEGF 和 IL-1 $\beta$  的含量** MH7A 细胞按  $5 \times 10^4$  个/孔接种至 6 孔板, 加入终质量浓度为  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TNF- $\alpha$ , 1 h 后加入不同质量浓度的 FSQTC ( $0.02, 0.1, 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并

设置空白组和空白加  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 组;  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 24 h 后, 收集细胞上清液, ELISA 检测上清中 VEGF 和 IL-1 $\beta$  含量, 具体操作参照试剂盒说明书进行。

**2.8 统计方法** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 FSQTC 对 TNF- $\alpha$  诱导 MH7A 细胞增殖活性的影响** 与空白组比较,  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 作用 24, 48 h 对 MH7A 细胞的增殖活性均无明显影响, TNF- $\alpha$  诱导 24, 48 h 后都能显著升高 MH7A 细胞的增殖活性 ( $P < 0.01$ ); 与 TNF- $\alpha$  组比较,  $0.02, 0.1, 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 作用 24 h 对 MH7A 细胞的增殖活性无明显差异, 作用 48 h 则能明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导增加的 MH7A 细胞增殖活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 FSQTC 对 TNF- $\alpha$  诱导 MH7A 细胞增殖活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

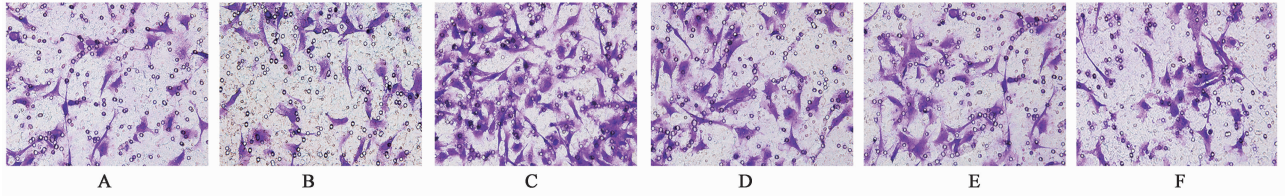
Table 1 Effect of FSQTC on proliferation of MH7A cell induced by TNF- $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白	-	$0.713 \pm 0.060$	$0.931 \pm 0.131$
FSQTC	0.5	$0.720 \pm 0.059$	$0.932 \pm 0.114$
TNF- $\alpha$	20	$1.029 \pm 0.064^{2)}$	$1.440 \pm 0.089^{2)}$
TNF- $\alpha$ + FSQTC	20 + 0.02	$1.021 \pm 0.110$	$1.216 \pm 0.144^{3)}$
	20 + 0.1	$1.018 \pm 0.086$	$1.196 \pm 0.116^{4)}$
	20 + 0.5	$1.104 \pm 0.117$	$1.116 \pm 0.083^{4)}$

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~5 同)。

**3.2 FSQTC 对 TNF- $\alpha$  诱导 MH7A 细胞迁移能力的影响** 与空白组比较,  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 对 MH7A 细胞迁移能力无明显影响, TNF- $\alpha$  组 MH7A 细胞迁移数目显著增多 ( $P < 0.01$ ); 与 TNF- $\alpha$  组比较, FSQTC  $0.02, 0.1, 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组 MH7A 细胞迁移数目均显著减少 ( $P < 0.01$ )。见图 1, 表 2。

**3.3 FSQTC 对 TNF- $\alpha$  诱导 MH7A 细胞黏附能力的影响** 与空白组比较,  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FSQTC 对 MH7A 细胞黏附能力无明显影响, 1% BSA 组细胞黏附能力显著降低 ( $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  组细胞黏附能力显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 TNF- $\alpha$  组比较, FSQTC  $0.02, 0.1, 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞黏附能力均明显降低



A. 空白组; B. 空白 + FSQTC 0.5 μg·L<sup>-1</sup> 组; C. TNF-α 组; D ~ F. TNF-α + FSQTC 0.02, 0.1, 0.5 μg·L<sup>-1</sup> 组 (图 2 同)

图 1 FSQTC 对 TNF-α 诱导 MH7A 细胞迁移能力的影响 (结晶紫, ×200)

Fig. 1 Effect of FSQTC on migration of MH7A cell induced by TNF-α (crystal violet, ×200)

表 2 FSQTC 对 TNF-α 诱导 MH7A 细胞迁移能力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

Table 2 Effect of FSQTC on migration of MH7A cell induced by TNF-α ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

组别	质量浓度/μg·L <sup>-1</sup>	细胞迁移数目/个
空白	-	19.000 ± 3.464
FSQTC	0.5	18.986 ± 4.239
TNF-α	20	47.250 ± 6.944 <sup>2)</sup>
TNF-α + FSQTC	20 + 0.02	39.400 ± 7.011 <sup>4)</sup>
	20 + 0.1	30.048 ± 5.475 <sup>4)</sup>
	20 + 0.5	25.900 ± 5.363 <sup>4)</sup>

( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 3。

3.4 FSQTC 对 TNF-α 诱导 MH7A 细胞侵袭能力的影响 与空白组比较, 0.5 μg·L<sup>-1</sup> FSQTC 对 MH7A 细胞侵袭能力的影响无明显影响, TNF-α 组侵袭的

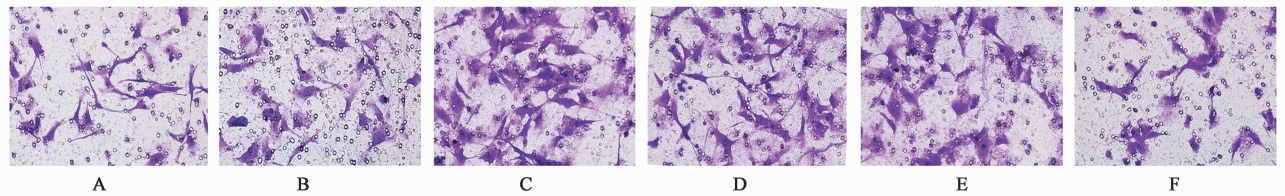


图 2 FSQTC 对 TNF-α 诱导 MH7A 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫, ×200)

Fig. 2 Effect of FSQTC on invasion of MH7A cell induced by TNF-α (crystal violet, ×200)

表 4 FSQTC 对 TNF-α 诱导 MH7A 细胞迁移能力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

Table 4 Effect of FSQTC on migration of MH7A cell induced by TNF-α ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

组别	质量浓度/μg·L <sup>-1</sup>	细胞迁移数/个
空白	-	16.714 ± 2.812
FSQTC	0.5	17.012 ± 2.769
TNF-α	20	48.250 ± 8.276 <sup>2)</sup>
TNF-α + FSQTC	20 + 0.02	43.556 ± 5.503 <sup>3)</sup>
	20 + 0.1	38.333 ± 3.969 <sup>4)</sup>
	20 + 0.5	32.778 ± 5.540 <sup>4)</sup>

表 3 FSQTC 对 TNF-α 诱导 MH7A 细胞黏附能力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 4)

Table 3 Effect of FSQTC on adhesion ability of MH7A cell induced by TNF-α ( $\bar{x} \pm s$ , n = 4)

组别	质量浓度/μg·L <sup>-1</sup>	A
空白	-	0.850 ± 0.080
FSQTC	0.5	0.848 ± 0.079
1% BSA	-	0.574 ± 0.034 <sup>2)</sup>
TNF-α	20	1.066 ± 0.062 <sup>2)</sup>
TNF-α + FSQTC	20 + 0.02	0.975 ± 0.052 <sup>3)</sup>
	20 + 0.1	0.933 ± 0.047 <sup>4)</sup>
	20 + 0.5	0.912 ± 0.027 <sup>4)</sup>

细胞数目显著增多 ( $P < 0.01$ ); 与 TNF-α 组比较, FSQTC 0.02, 0.1, 0.5 μg·L<sup>-1</sup> 组侵袭细胞数目均明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2, 表 4。

3.5 FSQTC 对 TNF-α 诱导 MH7A 细胞上清中 IL-1β, VEGF 含量的影响 与空白组比较, 0.5 μg·L<sup>-1</sup> FSQTC 对 MH7A 细胞上清中 IL-1β, VEGF 含量无明显影响, TNF-α 组 IL-1β 和 VEGF 的含量均显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与 TNF-α 组比较, FSQTC 0.02, 0.1, 0.5 μg·L<sup>-1</sup> 组 IL-1β 和 VEGF 的含量均明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且对 IL-1β 的作用具有浓度依赖关系。见表 5。

#### 4 讨论

FSQTC 是由苍术、黄柏、威灵仙等组成的临床治疗 RA 的复方制剂, 方中以清热、燥湿、健脾之苍术和黄柏为君药; 以威灵仙、鸡血藤、蜂房、乌梢蛇、

表 5 FSQTC 对 TNF- $\alpha$  诱导 MH7A 细胞上清中 IL-1 $\beta$ , VEGF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 5 Effect of FSQTC on IL-1 $\beta$  and VEGF in supernatant of MH7A induced by TNF- $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ ) ng · L<sup>-1</sup>

组别	质量浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 $\beta$	VEGF
空白	-	36.215 $\pm$ 8.689	66.333 $\pm$ 29.215
FSQTC	0.5	35.319 $\pm$ 10.238	64.913 $\pm$ 31.960
TNF- $\alpha$	20	59.824 $\pm$ 13.105 <sup>2)</sup>	241.177 $\pm$ 49.584 <sup>2)</sup>
TNF- $\alpha$ + FSQTC	20 + 0.02	41.344 $\pm$ 12.879 <sup>3)</sup>	162.063 $\pm$ 24.225 <sup>3)</sup>
	20 + 0.1	32.543 $\pm$ 9.691 <sup>4)</sup>	141.438 $\pm$ 43.546 <sup>4)</sup>
	20 + 0.5	30.837 $\pm$ 5.607 <sup>4)</sup>	130.813 $\pm$ 43.605 <sup>4)</sup>

金钱白花蛇、蕲蛇为臣药,其能协助君药以燥湿散寒,祛风通络;佐以活血化瘀之红花、土鳖虫、醋乳香、醋没药,祛散寒湿之羌活、独活,搜剔内伏骨骱之风寒湿邪之地龙、全蝎、蜈蚣;桂枝温经通脉、姜黄调气和血为使;全方合力,共奏燥湿祛风、活血化瘀、通络止痛之功。现代药理研究表明,苍术能有效改善 RA 大鼠病情并抑制促炎细胞因子和炎症介质的产生<sup>[10]</sup>;黄柏通过降低血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平而发挥治疗大鼠佐剂型关节炎(AA)的作用<sup>[11]</sup>;羌活、独活能够减轻 AA 大鼠的足趾肿胀,提高机械压力刺激的痛阈值,抑制 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 的异常分泌<sup>[12-13]</sup>;鸡血藤总黄酮对大鼠 AA 有治疗作用,其作用可能与其恢复抗氧化酶活性、清除自由基的作用有关<sup>[14]</sup>;威灵仙总皂苷抑制 AA 大鼠 JAK2/STAT3 信号通路<sup>[15-16]</sup>;姜黄主要提取物姜黄素具有抗炎抗氧化等作用,有效抑制 AA, CIA 大鼠滑膜细胞增殖,有效治疗实验性 RA<sup>[17-18]</sup>。此外,乌梢蛇、蕲蛇、穿地龙、全蝎、蜈蚣都能有效缓解 AA 或 CIA 的关节损伤,其机制与诱导抑制滑膜细胞增殖,抑制炎性细胞因子表达,调节 Treg/Th17 比率有关<sup>[19-24]</sup>。课题组前期研究已显示 FSQTC 对大鼠 CIA 及其滑膜血管新生有较好的抑制作用<sup>[7-9]</sup>,但是对滑膜细胞功能的影响如何,尚需要进一步明确。

研究表明,RA 滑膜细胞在炎症因子刺激下生物学特性发生改变,细胞增殖、迁移及侵袭能力大大增强<sup>[25-26]</sup>。已知原代 RA 滑膜细胞来源有限、且受代数限制,用于科研有一定困难<sup>[27-28]</sup>,而 MH7A 细胞是一种来源于 RA 患者的成纤维样滑膜细胞株,具有增殖速度快、可多次传代、贴近患者疾病状态等优点而已被广泛用于 RA 的研究中<sup>[29-34]</sup>。本实验采用 TNF- $\alpha$  诱导的 MH7A 细胞作为体外模型进行研究,结果显示 TNF- $\alpha$  在质量浓度为 20  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时能明显促进 MH7A 细胞的增殖、迁移、黏附和侵袭能

力。经 0.02, 0.1, 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度的 FSQTC 作用 48 h 后,能有效抑制由 TNF $\alpha$  诱导的异常增加的 MH7A 细胞的增殖活性,作用 2, 24, 4 h 能分别显著降低由 TNF- $\alpha$  诱导的 MH7A 细胞迁移、黏附和侵袭能力。与 48 h 的结果不同,课题组在 24 h 没有观察到有效 FSQTC 对 MH7A 细胞的增殖活性有明显影响,且 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  FSQTC 对无 TNF- $\alpha$  诱导的 MH7A 细胞的功能也是没有明显影响的,因此课题组认为本实验体系是稳定、可靠的,且在本实验体系下的 FSQTC 体外具有一定程度地抑制 TNF- $\alpha$  诱导的滑膜细胞功能的作用。

RA 滑膜细胞在炎症刺激下还能分泌大量炎症因子如 IL-1 $\beta$ , VEGF 等。IL-1 $\beta$  又能进一步招募炎症细胞、稽留炎症、介导滑膜炎,并促进滑膜细胞的黏附和侵袭能力。在 RA 中,VEGF 是促进血管形成的最重要细胞因子,它不仅促进了 RA 滑膜血管翳形成,同时也是 RA 发病过程中的直接促炎因子<sup>[26]</sup>。本实验中,课题组观察发现 TNF- $\alpha$  诱导 MH7A 细胞分泌高水平的 IL-1 $\beta$  和 VEGF,而 0.02, 0.1, 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度的 FSQTC 能够显著抑制这一作用。提示了 FSQTC 通过抑制由 TNF- $\alpha$  诱导成纤维样滑膜细胞分泌的 IL-1 $\beta$  和 VEGF,进而发挥抑制滑膜细胞炎症增生的作用。这与课题组前期研究发现的其抑制 CIA 大鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 VEGF 的作用一致<sup>[7]</sup>。

综上,FSQTC 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 MH7A 细胞增殖、迁移、黏附、侵袭和分泌 VEGF 及 IL-1 $\beta$  能力,从而发挥抑制 RA 滑膜炎增生作用,相关作用机制尚有待进一步的深入研究。

[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] XIN Y, David L B, Deepa H, et al. PUMA-mediated apoptosis in fibroblast-like synoviocytes does not require p53[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(6): 157.

[3] Cunnane G, Hummel K M, Muller-Ladner U, et al. Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1998, 46(1): 1-7.

[4] Marrelli A, Cipriani P, Liakouli V, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation? [J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(10): 595-598.

[5] 姚晖. 风湿祛痛胶囊结合穴位注射治疗类风湿性关

- 节炎的临床研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(1): 52-54.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 刘春芳, 王靖霞, 何莲花, 等. 风湿祛痛胶囊对实验性类风湿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.cjcmn.2018/220001.
- [9] 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, doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20190538.
- [10] 樊国琴, 刘春芳, 赵娟, 等. 道地和非道地苍术对类风湿性关节炎大鼠病情及促炎细胞因子和炎症介质的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2731-2735.
- [11] 张宏伟, 王嘉琪, 张婕, 等. 盐炙关黄柏拆分组分对佐剂型关节炎大鼠的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(7): 1577-1580.
- [12] 刘晨, 王英豪, 陈智煌, 等. 药对羌活与独活及其单味药治疗佐剂关节炎初步研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(12): 20-22.
- [13] 邱明山, 陈进春, 徐振兴, 等. 独活对大鼠胶原诱导性关节炎的治疗作用[J]. 中医正骨, 2012, 24(2): 6-8.
- [14] 刘仰斌, 张志花. 鸡血藤总黄酮对大鼠佐剂性关节炎作用的实验研究[J]. 医学研究与教育, 2014, 31(5): 1-4.
- [15] 邓龙飞, 汪永忠, 韩燕全, 等. 威灵仙总皂苷抑制佐剂性关节炎大鼠JAK2/STAT3信号通路[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(2): 153-158.
- [16] 汪永忠, 邓龙飞, 韩燕全, 等. 威灵仙总皂苷对佐剂性关节炎(AA)大鼠IL-6、IL-10及滑膜中p-JAK2、p-STAT3表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 86-90.
- [17] 朱丽艳, 杨林. 姜黄素对CIA大鼠滑膜细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 87-89.
- [18] 商玮, 赵凌杰, 赵智明, 等. 姜黄素对佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞分泌VEGF及IL-6的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(25): 3159-3161.
- [19] 蒋福升, 马哲龙, 陈金印, 等. 乌梢蛇水提物对大鼠佐剂性关节炎作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2013, 20(4): 367-368.
- [20] 王浩, 冯知涛, 朱俊卿, 等. 乌梢蛇II型胶原蛋白调控胶原诱导性关节炎小鼠肠系膜淋巴结Treg/Th17平衡[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(5): 622-626.
- [21] 吴贺勇, 李娟, 李亚玲. 水溶性乌梢蛇总蛋白对成纤维样滑膜细胞分泌白介素-1 $\beta$ 、 $\alpha$ -肿瘤坏死因子和白介素-10的影响[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(10): 1969-1972.
- [22] 吴贺勇, 李娟. 乌梢蛇蛋白对滑膜细胞增殖、凋亡及wt-p53/bcl-2 mRNA表达的影响[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(4): 358-361, 368.
- [23] 刘芳, 董改英, 瞿晶田, 等. 蕲蛇煮散剂的最佳粉碎粒度优选及其对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(28): 3935-3937.
- [24] 赵海梅, 左志琴, 程绍民, 等. 全蝎、蜈蚣对胶原诱导型关节炎大鼠小肠黏膜IL-2、IL-4、IL-10表达及关节损伤的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 80-83.
- [25] Paleolog E M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res, 2002, 4(3): 81-90.
- [26] Koch A E. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(6): 951-962.
- [27] Bottini N, Firestein G S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors[J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(1): 24-33.
- [28] Clavel G, Bessis N, Boissier M C. Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. Joint Bone Spine, 2003, 70(5): 321-326.
- [29] 王霞, 杨健, 宋菲, 等. 苗药黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类部位对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞MH7A增殖及炎症因子分泌的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(28): 3949-3952.
- [30] 蔡文虹, 孙保东, 张宝凤, 等. 原代类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞及成熟细胞系生长特性的比较[J]. 中国当代医药, 2012, 19(20): 8-9, 15.
- [31] ZHANG K, GAO S, GUO J Y, et al. Hypericin-photodynamic therapy inhibits proliferation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes cell line MH7A[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(2): 130-137.
- [32] ZUO J, XIA Y, LI X, et al. Selective modulation of MAPKs contribute to the anti-proliferative and anti-inflammatory activities of 1, 7-dihydroxy-3, 4-dimethoxyxanthone in rheumatoid arthritis-derived fibroblast-like synoviocyte MH7A cells[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 168: 248-254.
- [33] Jeong M, Cho J, Shin J I, et al. Hempseed oil induces reactive oxygen species-and C/EBP homologous protein-mediated apoptosis in MH7A human rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 745-752.
- [34] Nakayama H, Yaguchi T, Yoshiya S, et al. Resveratrol induces apoptosis MH7A human rheumatoid arthritis synovial cells in a sirtuin 1-dependent manner[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(1): 151-157.

[责任编辑 全燕]