

- expression and uncoupled mitochondrial respiration [J]. *Mol Metab*, 2018, 9(3): 28-42.
- [18] Liu Q, Krishnasamy Y, Rehman H, et al. Disrupted renal mitochondrial homeostasis after liver transplantation in rats [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140906
- [19] Yuan Y, Huang S, Wang W, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha ameliorates mitochondrial dysfunction and protects podocytes from aldosterone-induced injury [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(7): 771-789.
- [20] Hong Y A, Lim J H, Kim M Y, et al. Fenofibrate improves renal lipotoxicity through activation of AMPK-PGC-1alpha in db/db mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96147.
- [21] Stiles A R, Simon M T, Stover A, et al. Mutations in TFAM, encoding mitochondrial transcription factor A, cause neonatal liver failure associated with mtDNA depletion [J]. *Mol Genet Metab*, 2016, 119(1/2): 91-99.
- [22] 谢俊, 陈泽斌, 吴松, 等. 标本配穴法电针对慢性心肌梗死大鼠心肌线粒体结构及线粒体DNA相关调控因子表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(3): 1251-1255.

## 大黄素对 TNF- $\alpha$ 诱导的类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响

孟庆良<sup>1</sup>, 孟婉婷<sup>2</sup>, 卞华<sup>3\*</sup>, 郑福增<sup>1\*</sup>, 谷慧敏<sup>1</sup>, 左瑞庭<sup>1</sup>, 周子朋<sup>1</sup>, 王慧莲<sup>1</sup>, 苗喜云<sup>1</sup>, 马俊福<sup>1</sup>

(1. 河南省中医院风湿病科, 河南 郑州 450002; 2. 河南中医药大学/上海中医药大学中医系, 河南 郑州 450002; 3. 南阳理工学院张仲景国医学院, 河南 南阳 473004)

**摘要:**目的 探讨大黄素对 TNF- $\alpha$  诱导的类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响。方法 将人类类风湿性关节炎成纤维样滑膜 HFLS-RA 细胞随机分为对照组 (未处理)、诱导组 (TNF- $\alpha$  处理)、25  $\mu\text{mol/L}$  大黄素组 (TNF- $\alpha$  和大黄素处理)、50  $\mu\text{mol/L}$  大黄素组 (TNF- $\alpha$  和大黄素处理) 和 100  $\mu\text{mol/L}$  大黄素组 (TNF- $\alpha$  和大黄素处理)。采用 MTT 法和克隆形成实验检测细胞的存活率和克隆形成率, 流式细胞仪检测细胞的凋亡率, RT-PCR 检测凋亡相关基因 *Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 的表达, ELISA 检测细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平, Western blot 检测细胞中 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路相关蛋白 p-I $\kappa\text{B}\alpha$  和 p-NF- $\kappa\text{B}$  p65 的表达。结果 TNF- $\alpha$  能够使 HFLS-RA 细胞的存活率、克隆形成率、*Bcl-2* mRNA 的表达和 p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 、p-NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白的表达以及细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平升高 ( $P < 0.05$ ), 而细胞凋亡率和 *Bax* mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ); 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  大黄素能够呈浓度依赖性抑制 TNF- $\alpha$  引起的上述变化 ( $P < 0.05$ )。结论 大黄素可能通过抑制 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的活化抑制类风湿性关节炎滑膜细胞增殖和炎症反应。

**关键词:** 大黄素; 类风湿性关节炎; 类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞; 炎症因子; NF- $\kappa\text{B}$  信号通路

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)02-0480-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.02.036

类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的自身免疫性慢性疾病, 慢性炎症、滑膜增生和关节进行性破坏是其重要的病理特征; 在 RA 的发生发展过程中, 成纤维样滑膜细胞是其重要的效应细胞, 可通过异常增殖、产生炎症因子逐渐浸润至包括软骨和骨关节在内的多种关节或器官, 严重威胁着人们的身体健康<sup>[1-2]</sup>。因此, 抑制成

纤维样滑膜细胞增殖、控制或减轻滑膜炎进展是治疗 RA 的重要策略。

目前, 临床上治疗 RA 的常用药物为甲氨蝶呤和来氟米特等生物制剂, 但因其不良反应和价格昂贵等因素给患者用药带来严重负担。RA 属于中医学的“痹症”范畴, 中药治疗 RA 一直是研究的热点。大黄素是药用植物大黄

**收稿日期:** 2019-07-07

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81874456)

**作者简介:** 孟庆良 (1971—), 男, 主任医师, 研究方向为中西医结合防治风湿病。Tel: 13592618229, E-mail: yaying869469@163.com

\* **通信作者:** 卞华 (1973—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中西医结合防治风湿病。Tel: 13733119266, E-mail: yaying869469@163.com

郑福增 (1962—), 男, 主任医师, 研究方向为中西医结合防治风湿病。Tel: 13592618229, E-mail: 15838027255@163.com

的有效成分之一,具有抗炎、抗菌、抗病毒和抗癌等多种生物活性,其对角膜炎和心肌炎等多种自身免疫性具有良好的改善作用<sup>[3-5]</sup>。核转录因子  $\kappa$ B (nuclearfactor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路是一种细胞内重要的信号转导通路,可通过肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、B 细胞活化因子和病毒等刺激因子的活化诱导产生炎症因子参与炎症反应,也可通过调控细胞的增殖和凋亡等生物学过程参与 RA 的发生发展<sup>[6-7]</sup>。已有研究<sup>[8]</sup>指出,大黄素可通过抑制成纤维样滑膜细胞增殖和转移发挥抗 RA 发生发展的作用,但其对炎症因子及 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响尚不清楚。TNF- $\alpha$  是一种常见的促炎因子,可造成成纤维样滑膜细胞炎症损伤<sup>[9]</sup>。本研究以人类风湿性关节炎成纤维样滑膜 HFLS-RA 细胞为研究对象,通过观察大黄素对 TNF- $\alpha$  刺激的 HFLS-RA 细胞增殖凋亡、炎症因子和 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响,探讨其抗 RA 发生发展的分子机制,以期为大黄素的临床应用提供实验依据。

## 1 材料

1.1 药物与试剂 大黄素(纯度>98%,批号 20161025)购于北京索莱宝科技公司;胰蛋白酶(批号 SH30042.01)、DMEM 高糖培养基(批号 SH30022.018B)购于美国 HyClone 公司;胎牛血清(批号 16000-44)、青链霉素(批号 1450572)购于美国 Gibico 公司;TNF- $\alpha$ (批号 YW-6)购于上海生物工程公司;噻唑蓝(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT;批号 2035B358)购于美国 Promega 公司;Trizol 试剂(批号 DP121221)购于北京天根生物有限公司;p-I $\kappa$ B $\alpha$  抗体(货号 ab7217)、p-NF- $\kappa$ B p65 抗体(货号 ab95020)购于英国 Abcam 公司; $\beta$  肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(批号 161106)、辣根过氧化物酶(Horse reddish peroxidase, HRP)山羊抗兔/鼠(批号 160913)购于北京中杉金桥生物技术有限公司;放射免疫沉淀法(Radio-Immunoprecipitation Assay, RIPA)裂解液(批号 P0013B)购于上海碧云天生物研究所;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(批号 20161021)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )(批号 20161028)购于南京建成生物工程研究所;逆转录试剂盒(批号 RR420 A)购于日本 Takara 公司;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量分析试剂盒(批号 23225)购于美国 Pierce 公司。

1.2 仪器 Gallios 型号流式细胞仪购于美国 Beckman Coulter 公司;CFX384 型号实时定量 PCR 仪购于美国 Bio-Rad 公司;MK3 型号酶标仪购于美国 Thermo 公司;GelDoc XR+型号购于美国 Bio-Rad 公司;TS100-F 型号倒置显微镜购于日本尼康公司;XSP-9CA 型号光学显微镜购于上海光学仪器厂。

## 2 方法

2.1 细胞、培养与分组 将来自于美国 ATCC 细胞库的人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞株 HFLS-RA 解冻复苏后,接种于含 15% 胎牛血清、100  $\mu$ g/mL 链霉素和

100 U/mL 青霉素的 DMEM 高糖培养基中,置于条件为 37  $^{\circ}$ C 和 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱(日本 SANYO 公司)中培养。每 2 天换液 1 次。待细胞融合度达 85% 时,胰蛋白酶消化,并按 1:3 比例传代至第 4 代时进行后续实验。实验分为 5 组,分别为对照组(未处理)、诱导组(给予 20 ng/mL TNF- $\alpha$  处理)、25  $\mu$ mol/L 大黄素组(给予 20 ng/mL TNF- $\alpha$  和 25  $\mu$ mol/L 大黄素共同处理)、50  $\mu$ mol/L 大黄素组(给予 20 ng/mL TNF- $\alpha$  和 50  $\mu$ mol/L 大黄素共同处理)和 100  $\mu$ mol/L 大黄素组(给予 20 ng/mL TNF- $\alpha$  和 100  $\mu$ mol/L 大黄素共同处理)。每组设置 3 个重复。

1.3 MTT 法检测 取对数生长期的 HFLS-RA 细胞以每孔 5 000 个细胞接种至含完全培养基的 96 孔细胞板上,于培养箱内培养过夜。根据“1.2”项下分组给药干预 24 h。每个处理设置 6 个平行孔。干预结束后,取出培养板,吸去培养液后加入质量浓度为 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu$ L 干预 4 h。以 200  $\mu$ L 二甲基亚砷溶解 MTT 结晶物后,采用美国 Thermo 公司的酶标仪检测各处理组细胞在 450 nm 处的光密度值(OD 值)。按照公式细胞存活率=(OD 值<sub>药物组</sub>/OD 值<sub>对照组</sub>) $\times$ 100% 计算各组细胞的存活率。实验重复 3 次。

2.2 克隆形成实验 取干预 24 h 后的 HFLS-RA 细胞,以每皿 300 个细胞接种至 60 mm 培养皿中,于培养箱中培养 12 d 后,吸去培养基以磷酸缓冲液冲洗。冲洗 2 次后,加入预冷的 4% 甲醇溶液。待固定 10~15 min 后,经磷酸缓冲液洗涤后,加入 0.1% Giemsa 溶液。待染色 15~30 min 后,流水冲洗晾干。置于显微镜下观察统计克隆细胞数。其中,大于 50 个细胞的集落记为有效克隆,以克隆形成率=(克隆细胞数/接种细胞株) $\times$ 100% 的公式计算各组细胞的克隆形成能力。实验重复 3 次。

2.3 流式细胞仪检测 将干预 24 h 后的 HFLS-RA 细胞以胰蛋白酶消化制备细胞悬液。取细胞悬液 1 mL,经磷酸缓冲液洗涤和离心后,重悬于 200  $\mu$ L 的结合缓冲液中,加入 5  $\mu$ L 膜联蛋白 V-FITC (Annexin V-FITC) 和 10  $\mu$ L 碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)避光条件下染色 15 min 后,补加 300  $\mu$ L 的结合缓冲液,上美国 Beckman Coulter 公司的流式细胞仪进行检测。实验重复 3 次。

2.4 RT-PCR 检测 收集待检测的 HFLS-RA 细胞,采用 Trizol 法提取总 RNA,并采用分光光度法检测总 RNA 的质量。再按照逆转录试剂盒说明书步骤将 RNA 反转录为 cDNA。将由中国 Invitrogen 公司合成的 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2), Bcl-2 引物(正向 5'-GGTGGGTCATGTGTGG-3' 和反向 5'-CGGTCAGGTACT-CAGTCATCC-3')、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 Associated X Protein), Bax 引物(正向 5'-GCGCTCGTGTCTGGACA-3' 和反向 5'-AGTATAGACACTCGTCACTGGTG-3') 和  $\beta$ -actin 引物(正向 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACACC-3' 和反向 5'-CATGGTGCTCCGCCAGACAG-3') 加入二乙基焦磷酸胺(diethyl pyrocarbonate, DEPC) 处理水稀释成终浓度为 0.4  $\mu$ mol/L 的工作液,取 1  $\mu$ L cDNA、各 1  $\mu$ L 正反引物、

10 μL 2×SYBR Premix Ex Taq II 和 7.4 μL ddH<sub>2</sub>O 配成 20 μL 的 PCR 反应体系，放入 PCR 仪中，按照 95 °C 120 s、(95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s) ×40 个循环的 PCR 扩增条件进行扩增，以 β-actin 作为管家基因，2<sup>-ΔΔCT</sup> 法分析 *Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 的相对表达水平。实验重复 3 次。

2.5 ELISA 法检测上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平 取含高糖培养基的 6 孔细胞板，将生长良好的 HFLS-RA 细胞以每孔 3×10<sup>5</sup> 个细胞接种，放入细胞培养箱中培养。按“2.1”项下的分组给药处理，每组设置 3 个复孔。处理 24 h 后，收集各处理组上清液，参照 ELISA 试剂盒说明书步骤分别检测 IL-6 和 IL-1β 水平。实验重复 3 次。

2.6 Western blot 检测 向待测的 HFLS-RA 细胞中加入含蛋白酶抑制剂的蛋白质裂解液提取总蛋白。向经 BCA 法定量后的总蛋白中加入等体积上样缓冲液于沸水浴中变性 3~5 min。取变性蛋白 60 μg 行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳分离。待完全分离后，电转于聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。浸于新鲜的含 5% 脱脂奶粉的 TBST (Tris-HCl 缓冲盐溶液+Tween) 溶液温育 1 h 后，放入 TBST 溶液稀释 1 000 倍的一抗中于 4 °C 下孵育 24 h。经 TBST 溶液洗膜 3 次，10 min/次，放入 TBST 溶液稀释 5 000 倍的二抗中 37 °C 下孵育 1 h。避光下加入化学发光剂显影曝光后，采用美国 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统扫描分析。实验重复 3 次。

2.7 统计学分析 实验数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用 SPSS 22.0 进行统计学分析，多组间比较使用单因素方差分析，组间多重比较采用 SNK-q；两组间比较采用独立样本 *t* 检

验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 大黄素对 HFLS-RA 细胞增殖的影响 MTT 检测结果显示，与对照组比较，诱导组细胞的存活率升高 (*P*<0.05)；与诱导组比较，25、50、100 μmol/L 大黄素处理组细胞的存活率下降 (*P*<0.05)。同时，克隆形成实验结果显示，诱导组细胞的克隆形成率较对照组升高 (*P*<0.05)；而给予 25、50、100 μmol/L 大黄素处理后，HFLS-RA 细胞的克隆形成率较诱导组均降低 (*P*<0.05)。随着大黄素浓度的增加，HFLS-RA 细胞的存活率和克隆形成率越低。见表 1。

表 1 各组细胞的存活率、克隆形成率和凋亡率 ( $\bar{x} \pm s, \%$ , *n*=9)

组别	细胞存活率	克隆形成率	细胞凋亡率
对照组	100±0.00	57.64±3.75	2.95±0.35
诱导组	148.42±11.58*	84.25±5.62*	1.26±0.16*
25 μmol/L 大黄素组	122.15±9.05#	64.54±3.15#	5.82±0.53#
50 μmol/L 大黄素组	84.36±5.63#	40.68±3.26#	10.36±1.05#
100 μmol/L 大黄素组	65.28±3.75#	23.47±2.32#	13.25±1.64#

注：与对照组比较，\**P*<0.05；与诱导组比较，#*P*<0.05。

3.2 大黄素对 HFLS-RA 细胞凋亡的影响 流式细胞仪 (图 2) 检测对照组、诱导组、25 μmol/L 大黄素组、50 μmol/L 大黄素组和 100 μmol/L 大黄素组细胞的凋亡率存在差异 (*P*<0.05)，与对照组比较，诱导组细胞的凋亡率降低 (*P*<0.05)；与诱导组比较，25、50、100 μmol/L 大黄素组细胞的凋亡率均升高 (*P*<0.05)，且呈浓度依赖性。结果见图 1、表 1。

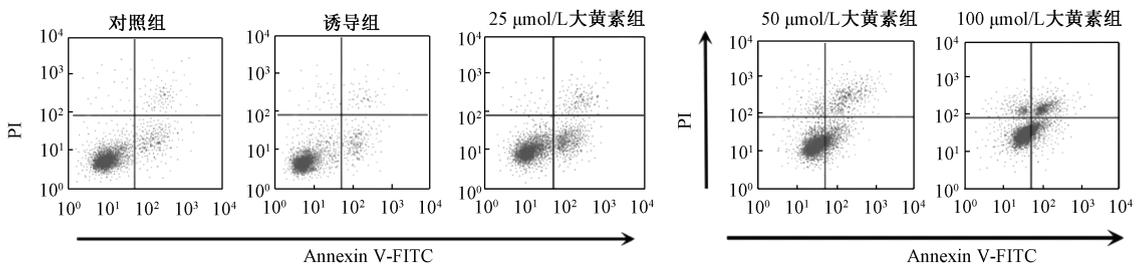


图 1 流式细胞仪检测各组 HFLS-RA 细胞的凋亡

3.3 大黄素对 HFLS-RA 细胞凋亡相关基因表达的影响 RT-PCR 检测结果显示，诱导组细胞中 *Bcl-2* mRNA 的表达水平高于对照组 (*P*<0.05)，而 *Bax* mRNA 表达低于对照组 (*P*<0.05)；随 25、50、100 μmol/L 大黄素浓度的升高，HFLS-RA 细胞中 *Bcl-2* mRNA 逐渐降低，而 *Bax* mRNA 表达逐渐升高，与诱导组比较，差异均有统计学意义 (*P*<0.05)。见表 2。

3.4 大黄素对 HFLS-RA 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平的影响 与对照组比较，诱导组中 IL-6 和 IL-1β 水平升高 (*P*<0.05)；而大黄素组较诱导组降低 (*P*<0.05)，且大黄素浓度越高降低幅度越明显。见表 3。

表 2 各组细胞中 *Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 的相对表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	<i>Bcl-2</i>	<i>Bax</i>
对照组	1.00±0.06	1.00±0.08
诱导组	2.36±0.18*	0.72±0.06*
25 μmol/L 大黄素组	1.75±0.12#	0.95±0.05#
50 μmol/L 大黄素组	1.24±0.08#	1.25±0.08#
100 μmol/L 大黄素组	0.58±0.03#	1.64±0.12#

注：与对照组比较，\**P*<0.05；与诱导组比较，#*P*<0.05。

3.5 大黄素对 HFLS-RA 细胞中 NF-κB 信号通路的影响 与对照组比较，诱导组细胞中 p-IκBα 和 p-NF-κB p65 蛋白的表达升高 (*P*<0.05)；与诱导组比较，25、50、

100 μmol/L 大黄素组细胞中 p-IκBα 和 p-NF-κB p65 蛋白的表达下降 ( $P < 0.05$ ), 且呈浓度依赖性。见图 2、表 4。

表 3 各组 HFLS-RA 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	IL-6/(ng·mL <sup>-1</sup> )	IL-1β/(pg·mL <sup>-1</sup> )
对照组	1.86±0.05	36.22±3.54
诱导组	9.75±0.85*	122.56±10.15*
25 μmol/L 大黄素组	7.56±0.64#	106.35±7.23#
50 μmol/L 大黄素组	5.34±0.48#	75.24±5.82#
100 μmol/L 大黄素组	2.75±0.28#	41.16±3.26#

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与诱导组比较,# $P < 0.05$ 。

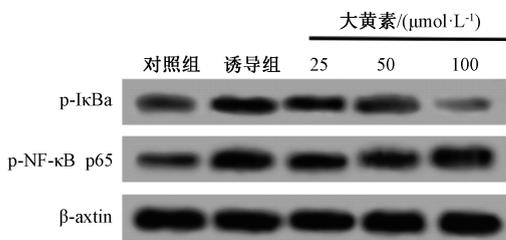


图 2 Western blot 检测 p-IκBα 和 p-NF-κB p65 蛋白的表达

表 4 各组 HFLS-RA 细胞中 p-IκBα 和 p-NF-κB p65 蛋白的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	p-IκBα	p-NF-κB p65
对照组	0.17±0.02	0.24±0.03
诱导组	0.63±0.05*	0.72±0.06*
25 μmol/L 大黄素组	0.42±0.03#	0.52±0.04#
50 μmol/L 大黄素组	0.16±0.02#	0.36±0.03#
100 μmol/L 大黄素组	0.08±0.01#	0.25±0.02#

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与诱导组比较,# $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

从中医角度讲, RA 是一种因风、寒、湿邪入侵导致的气血凝滞和经络痹阻的肢体关节病变, 关节肿胀压痛是急性活动期的重要表现。有报道<sup>[10]</sup>指出, 中药复方大黄散可通过缓解 RA 关节的红肿热痛改善 RA 病情, 而其中的君药大黄是我国传统的中草药, 具有逐瘀通经之功效。此外, 作为大黄的主要成分, 大黄素是一种蒽醌类化合物, 具有抗炎、免疫调节、抗病毒和抗肿瘤等药理作用。已有研究<sup>[11-12]</sup>证实, 大黄素可通过 Notch-1/Hes 信号通路促进胰腺细胞凋亡进而减轻胰腺炎反应; 另外, 在 LPS 刺激的小胶质细胞中, 还可通过 AMPK/Nrf2 信号通路发挥抗神经炎症的作用。

TNF-α 是参与滑膜炎反应的重要细胞因子, 贯穿 RA 的整个病程, 其作为一种促炎因子, 可通过激活巨噬细胞、中性粒细胞和单核细胞等参与免疫调节, 也可通过诱导成纤维样滑膜细胞和软骨细胞产生炎症介质, 在触发 RA 炎症反应和关节破坏等过程中发挥着重要作用。有研究<sup>[13-14]</sup>指出, TNF-α 可诱导 RA 滑膜细胞增殖, 抑制其凋亡并激活 NF-κB 信号通路。NF-κB 信号通路是与炎症反应关系密切的信号转导通路, NF-κB p65 是 NF-κB 家族中的重要成员,

正常情况下, NF-κB p65 与 p50 形成的二聚体与 NF-κB 抑制蛋白 IκB 结合成为无活性的复合物, 但当受到外界刺激时, IκB 降解使 NF-κB p65/p50 暴露出来, 导致 NF-κB 活化, 其活化后可通过诱导促炎因子如 IL-6 和 IL-1β 的生成加重炎症反应<sup>[15]</sup>, 还可引发 RA 滑膜细胞增殖和凋亡异常等反应, 参与 RA 发生发展<sup>[16]</sup>。本研究以 TNF-α 刺激体外培养的人类风湿性关节炎成纤维样滑膜 HFLS-RA 细胞 24 h 后发现, HFLS-RA 细胞的存活率、克隆形成率、Bcl-2 mRNA 的表达水平、p-IκBα 蛋白和 p-NF-κB p65 蛋白的表达水平和上清液中 IL-6、IL-1β 含量均明显升高, 细胞凋亡率和 Bax mRNA 的表达降低; 而给予 25、50 和 100 μmol/L 大黄素干预后, TNF-α 引起的上述变化均明显受到显著抑制, 且呈浓度依赖性。Bcl-2 和 Bax 是与细胞凋亡关系密切的抑凋亡因子和促凋亡因子, 在 RA 患者中 Bcl-2 表达升高而 Bax 表达降低, 通过活化抑制 RA 滑膜细胞凋亡信号, 促进细胞增殖<sup>[13,17]</sup>。已有报道<sup>[18-19]</sup>证实, 大黄素可抑制 NF-κB 信号通路的活化改善缺氧和脂多糖诱导的肠上皮屏障功能障碍, 而 NF-κB 信号通路受到抑制可降低舌鳞癌移植瘤细胞中 Bcl-2 和上调 Bax。结果提示, 大黄素可通过抑制 NF-κB 信号通路的活化抑制 HFLS-RA 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 减轻炎症反应。

综上所述, 大黄素可抑制 RA 滑膜细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 减轻炎症反应, 其分子机制可能与抑制 NF-κB 信号通路的活化有关。该结果为大黄素临床治疗 RA 提供新依据。然而, 大黄素是否通过调控其他信号通路或基因的表达发挥抗 RA 的作用还有待后续进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Paget S A, Gibofsky A. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Immunity*, 2017, 46(2): 183-196.
- [2] Zhang T, Li H, Shi J, et al. p53 predominantly regulates IL-6 production and suppresses synovial inflammation in fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 271-280.
- [3] Sharma R, Tiku A B, Giri A. Pharmacological properties of emodin-anthraquinone derivatives [J]. *J Nat Prod*, 2017, 3(1): 97-101.
- [4] Chen G, Zhang J, Zhang H, et al. Anti-inflammatory effect of emodin on lipopolysaccharide-induced keratitis in Wistar rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 12382-12389.
- [5] Song Z C, Wang Z S, Bai J H, et al. Emodin, a naturally occurring anthraquinone, ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 227(3): 225-230.
- [6] Zhai Y, Wu B, Li J, et al. CD147 promotes IKK/IκB/NF-κB pathway to resist TNF-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(1): 71-82.
- [7] Yao R B, Zhao Z M, Zhao L J, et al. Sinomenine inhibits the inflammatory responses of human fibroblast-like synoviocytes via

- the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Die Pharmazie*, 2017, 72(6): 355-360.
- [ 8 ] 彭菲菲, 徐艳明, 谭洪发, 等. 大黄素对类风湿关节炎滑膜细胞增殖及转移的抑制作用[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(1): 34-39.
- [ 9 ] Wang W, Zhong L, Meng Q, *et al.* Chronic calcium channel inhibitor verapamil antagonizes TNF- $\alpha$ -mediated inflammatory reaction and protects against inflammatory arthritis in mice[J]. *Inflammation*, 2016, 39(5): 1624-1634.
- [10] 刘勇光, 荣晓凤, 陈文龙. 复方大黄散对佐剂性关节炎大鼠的作用研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(2): 203-207.
- [11] 石占利, 方 堃, 孙 静, 等. 大黄素对重症急性胰腺炎大鼠胰腺细胞凋亡的干预作用[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(11): 1830-1834.
- [12] Park S Y, Jin M L, Ko M J, *et al.* Anti-neuroinflammatory effect of emodin in LPS-stimulated microglia; involvement of AMPK/Nrf2 activation[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(11): 1-12.
- [13] 汪荣盛, 刘 佳, 童 萍, 等. 雷藤舒对 TNF- $\alpha$  诱导的人类风湿关节炎滑膜成纤维细胞促凋亡、抗炎及对 Ras-MAPKs 信号通路的调节作用[J]. *上海中医药大学学报*, 2016, 30(3): 82-87.
- [14] 罗心静, 莫选荣, 周玲玲. TNF- $\alpha$  诱导类风湿关节炎滑膜细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路活化的探讨[J]. *免疫学杂志*, 2012, 28(4): 321-323.
- [15] Chen K Y, Wang L C. Stimulation of IL-1 $\beta$  and IL-6 through NF- $\kappa$ B and sonic hedgehog-dependent pathways in mouse astrocytes by excretory/secretory products of fifth-stage larval *Angiostrongylus cantonensis*[J]. *Parasit Vectors*, 2017, 10(1): 445-455.
- [16] 罗海恩, 毛新展. NF- $\kappa$ B p65 基因沉默对类风湿性关节炎滑膜细胞增殖凋亡的影响[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(35): 8-11.
- [17] 谷远洋, 金 翔. 白藜芦醇对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J]. *江苏医药*, 2015, 41(18): 2182-2184.
- [18] Lei Q, Qiang F, Chao D, *et al.* Amelioration of hypoxia and LPS-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by emodin through the suppression of the NF $\kappa$ B and HIF1 $\alpha$  signaling pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1629-1639.
- [19] Lu X, Xie B, Li X, *et al.* Effects of NF-B/p65 siRNA on expressions of bcl-2 and bax in xenografted human tongue squamous cell carcinoma[J]. *TUMOR*, 2011, 31(1): 44-48.

## 美廉净凝胶对宫颈炎的药效学探究

王雨佳<sup>1</sup>, 王梦如<sup>1#</sup>, 赵健铤<sup>1</sup>, 金凡茂<sup>1</sup>, 沈咏梅<sup>1,2</sup>, 刘 衡<sup>1</sup>, 何 苗<sup>1\*</sup>, 李 玥<sup>1\*</sup>

(1. 云南省昆虫生物医药研发重点实验室 药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心 中国西南药用昆虫及蛛形类资源开发利用协同创新中心, 云南 大理 671000; 2. 药用美洲大蠊四川省重点实验室, 四川 成都 610000)

**摘要:** 目的 研究美廉净凝胶对大鼠宫颈炎的药效作用。方法 采用阴道灌注苯酚胶浆建立大鼠宫颈炎模型, 实验大鼠分为正常对照组, 模型对照组, 凝胶组, 阳性药组, 美廉净凝胶高、中、低剂量组。造模结束后次日阴道给药, 连续 10 d, 末次给药后处死大鼠, 检测血清中 CP、MDA、T-SOD 水平, 计算脏器指数并进行组织病理学检查。结果 与模型对照组比较, 美廉净凝胶高、中、低剂量组均能降低造模大鼠的外阴炎症评分、肾脏指数、宫颈指数以及血清中 CP、MDA、T-SOD 水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 宫颈以及阴道组织病理情况得到一定的改善。结论 美廉净凝胶可减轻宫颈组织充血水肿, 对宫颈炎模型大鼠有一定的药效作用。

**关键词:** 美廉净; 凝胶; 宫颈炎; 苯酚

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)02-0484-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.02.037

收稿日期: 2019-06-06

基金项目: 国家自然科学基金 (81660605, 81860742, 81860765); 云南省教育厅科学研究基金产业化培育项目 (2016CYH15)

作者简介: 王雨佳 (1994—), 男, 研究方向为中药药理。Tel: 18586407296, E-mail: 18014918521@163.com

#共同第一作者: 王梦如 (1992—), 女, 研究方向为中药药理。Tel: 15947971269, E-mail: 15947971269@163.com

\*通信作者: 何 苗 (1983—), 女, 博士生, 助理研究员, 研究方向为免疫药理学。Tel: 15125255898, E-mail: mio-h@163.com

李 玥 (1986—), 女, 博士生, 研究实习员, 研究方向为中药药理。Tel: 18288745169, E-mail: liyue0208@163.com