

本文引用: 刘芙蓉, 李硕夫, 梅文亚, 湛欢, 刘平安, 周日宝. 羊躑躅含药血清对 TNF- α 诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及炎症因子分泌的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1809-1814.

羊躑躅含药血清对 TNF- α 诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及炎症因子分泌的影响

刘芙蓉¹, 李硕夫², 梅文亚¹, 湛欢¹, 刘平安³, 周日宝¹

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007;

3. 湖南省中医药研究院, 湖南长沙 410006

[摘要] 目的 探究羊躑躅含药血清对肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes, RA-FLS)增殖和炎症因子分泌的影响和作用机制,为临床治疗 RA 提供理论及实验依据。**方法** 将细胞分为空白组、模型组、雷公藤多苷组、5%和10%空白血清组及5%和10%羊躑躅含药血清组。RA-FLS经TNF- α (10 ng/mL)处理24 h以构建RA细胞模型。CCK-8检测细胞增殖情况。采用ELISA检测炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)和 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)的含量。Western blot检测蛋白激酶B(protein kinase B, AKT1)、磷酸化AKT1(phosphorylated AKT1, p-AKT1)、原癌基因c-JUN、p-c-JUN、p65、p-p65、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)蛋白表达水平。**结果** 与未用羊躑躅含药血清处理的正常RA-FLS相比,用5%和10%羊躑躅含药血清处理的细胞增殖活性在48 h内没有明显的变化($P>0.05$),而用20%和30%羊躑躅含药血清处理的细胞增殖活性明显降低($P<0.05$)。与空白组相比,模型组的细胞增殖活性显著上升($P<0.05$);与5%和10%空白血清组相比,5%和10%羊躑躅含药血清组的细胞增殖活性均显著降低($P<0.05$)。与空白组相比,模型组的IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2和IFN- γ 水平均明显升高($P<0.05$);与5%和10%空白血清组相比,5%和10%羊躑躅含药血清组的IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2和IFN- γ 水平明显下降($P<0.05$)。与空白组相比,模型组的EGFR表达量以及AKT1、c-JUN和p65的磷酸化水平均明显升高($P<0.05$);与5%和10%空白血清组相比,5%和10%羊躑躅含药血清组的EGFR表达量以及AKT1、c-JUN和p65的磷酸化水平显著降低($P<0.05$)。此外,10%羊躑躅含药血清的效果比5%羊躑躅含药血清更为显著($P<0.05$)。**结论** 羊躑躅含药血清能抑制TNF- α 诱导的RA-FLS增殖及促炎因子的分泌,其机制可能与调控EGFR、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、AKT和c-Jun N末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路有关。

[关键词] 类风湿关节炎;成纤维样滑膜细胞;羊躑躅含药血清;细胞增殖;炎症因子

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.009

Effects of medicated serum containing *Rhododendron molle* G. Don on the proliferation and inflammatory factors secretion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis induced by tumor necrosis factor

LIU Xiaorong¹, LI Shuofu², MEI Wenyua¹, ZHAN Huan¹, LIU Ping'an³, ZHOU Ribao¹

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects and mechanism of action of medicated serum containing *Rhododendron molle* G.

[收稿日期]2023-02-02

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2022JJ80086);湖南省卫健委科学研究项目(D202302078705);湖南省教育厅科学研究项目(19C1384);湖南省大学生创新创业训练计划项目(2022-5313);湖南省中医药管理局科研计划项目(2021161);湖南中医药大学中药学一级学科开放基金项目(2020ZYX01);湖南中医药大学青苗计划(校行人字[2017]25);湖南省一流学科中药学(校行科字[2018]3);2020年湖南省一流本科专业建设点(湘教通[2020]248号);中药资源与开发2020年国家级一流本科专业建设点(教高厅函[2021]7号);中药学专业。

[第一作者]刘芙蓉,女,讲师,硕士,研究方向:中药资源与药效物质研究,E-mail:364059345@qq.com。

Don on the proliferation and inflammatory factors secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA-FLS), so as to provide theoretical and experimental basis for clinical treatment of RA. **Methods** RA-FLS cells were divided into blank group, model group, tripterygium glycosides group, blank serum (5%, 10%) groups, and medicated serum (5%, 10%) groups. RA-FLS were treated with TNF- α (10 ng/mL) for 24 h to construct RA cell models. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was utilized to examine cell proliferation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the content of inflammatory factors including interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-17A (IL-17A), interleukin-6 (IL-6), interleukin-2 (IL-2), and interferon- γ (IFN- γ). Western blot was used to determine the protein expression levels of protein kinase B (AKT1), phosphorylated AKT1 (p-AKT1), c-JUN, p-c-JUN, p65, p-p65, and epidermal growth factor receptor (EGFR). **Results** Compared with the groups without medicated serum containing *Rhododendron molle* G. Don, there was no significant change in cell proliferation activity within 48 h in the 5% and 10% medicated serum containing *Rhododendron molle* G. Don groups ($P>0.05$), but cell proliferation activity significantly reduced in the 20% and 30% medicated serum containing *Rhododendron molle* G. Don groups ($P<0.05$). Compared with the blank group, cell proliferation activity in the model group was significantly higher ($P<0.05$). Compared with the 5% and 10% blank serum groups, cell proliferation activity in the medicated serum groups containing different doses of *Rhododendron molle* G. Don was significantly lower ($P<0.05$). Compared with the blank group, the levels of IL-1 β , IL-17A, IL-6, IL-2, and IFN- γ in the model group were significantly higher ($P<0.05$). Compared with the blank serum groups, the levels of IL-1 β , IL-17A, IL-6, IL-2, and IFN- γ in the serum groups containing different doses of *Rhododendron molle* G. Don were significantly lower ($P<0.05$). Compared with the 5% and 10% blank group, the expression level of EGFR as well as the phosphorylation levels of AKT1, c-JUN, and p65 in the model group were significantly higher ($P<0.05$). Compared with the blank serum groups, the expression levels of EGFR as well as the phosphorylation levels of AKT1, c-JUN, and p65 in the medicated serum groups containing different doses of *Rhododendron molle* G. Don were significantly lower ($P<0.05$). Additionally, the effects of the 10% serum containing *Rhododendron molle* G. Don were more significant than those of the 5% medicated serum containing *Rhododendron molle* G. Don ($P<0.05$). **Conclusion** The medicated serum containing *Rhododendron molle* G. Don can inhibit cell proliferation and the secretion of pro-inflammatory factors of RA-FLS induced by TNF- α , which may be related to the regulation of EGFR, nuclear factor κ B (NF- κ B), AKT, and c-JUN N-terminal kinase (JNK) pathways.

[**Keywords**] rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocyte; medicated serum containing *Rhododendron molle* G. Don; cell proliferation; inflammatory factor

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以多关节滑膜炎增生、骨及软骨破坏为主要特征的一类慢性自身免疫性疾病^[1-2]。该病久治不愈, 致残率极高, 严重影响患者的生活质量^[3-4]。虽然多种抗风湿药, 如细胞因子拮抗剂、B 细胞耗竭药和 T 细胞共刺激阻滞剂对治疗 RA 有一定临床疗效, 但 RA 患者的死亡率仍然高于普通人群^[5]。因此, 探索新的有效和安全的治疗 RA 的方法非常重要。

羊躑躅 (*Rhododendron Molle* G. Don) 属杜鹃花科杜鹃花属药用植物, 在《滇药录》《畚医药》《瑶药》等书中均有记载。羊躑躅根提取物炮制后可去除毒性, 广泛应用于 RA 的临床防治, 有较好的治疗效果^[6], 同时还能消肿、祛风、止痛及治疗风寒和湿气^[7]。目前, 对羊躑躅及其有效活性成分抗 RA 的药理研究较多, 主要集中在药效学研究^[8-10]等方面。然而, 羊躑躅治疗 RA 的具体作用机制尚未完全阐明。

本研究通过肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导 RA 细胞模型, 探究羊躑躅含药血清对 TNF- α 处理的 RA 成纤维样滑膜细胞 (rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial, RA-FLS) 增殖和炎症因子分泌的影响和机制, 为羊躑躅的临床应用提供科学依据。

1 方法

1.1 动物及细胞

健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只, 4 周龄, 体质量 (200 \pm 20) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。RA-FLS (批号: BS-C1162506) 购自上海宾穗生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

低速离心机 (型号: SL02, 上海知信实验仪器技术有限公司); Bio-Tek 酶标仪 (型号: MB-530, 深圳市汇松科技发展有限公司); 超净工作台 (型号: YT-CJ-2NB, 北京亚泰科隆仪器技术有限公司); 化学发光成像系统 (型号: ChemiScope6100, 上海勤翔科学仪器有限公司)。倒置生物显微镜 (型号: DSZ2000X, 北京中显恒业仪器仪表有限公司); 培养箱 (型号: DH-160I, 上海三腾仪器有限公司)。

1.3 主要试剂

TNF- α (货号: P5318, 上海碧云天生物技术有限公司); 雷公藤多苷 (纯度 98%, 货号: JKBw1779, 上海经科化学科技有限公司); CCK-8 (货号: NU679, 日本同仁化学研究所); DMEM 培养基 (货号: D5796-

500ML,美国Sigma公司);胎牛血清(货号:10099141,美国Gibco公司);RIPA裂解液(货号:AWB0136,长沙艾碧维生物科技有限公司);青霉素-链霉素溶液(货号:SV30010,上海碧云天生物技术有限公司); γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)(货号:RIF00)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)(货号:RLB00)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)(货号:R6000B)、白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)(货号:DY8410-05)(美国R&D Systems公司);白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)(货号:BMS634,美国赛默飞世尔科技公司);p-c-JUN(货号:ab32385)、p-p65(货号:ab76302)、IL-6(货号:ab259341)、c-JUN(货号:ab40766)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR, 货号:ab52894)均购自英国Abcam公司;p-AKT1(28731-1-AP)、AKT1(货号:10176-2-AP)、p65(货号:10745-1-AP)、 β -actin(货号:66009-1-Ig)(美国Proteintech公司);羊抗鼠IgG-HRP(货号:SA00001-1)和羊抗兔IgG-HRP(货号:SA00001-2)均购于美国Proteintech公司。

1.4 羊蹄躅提取物及含药血清的制备

将羊蹄躅根粉碎,与10倍量的纯水混合,将混合物回流提取2 h,重复3次,合并提取液。羊蹄躅提取物经洗脱、减压浓缩后制得^[8,11]。羊蹄躅水提取液大鼠用药剂量为42.84 mg/kg,空白组给予等体积的生理盐水,雷公藤多苷组给药剂量为9.45 mg/kg。各组均采用灌胃给药,每日1次,连续给药1周。末次给药90 min后腹主动脉采血,3 000 r/min离心10 min收集血清。所得血清于56 °C下灭活30 min,过滤后于-20 °C保存备用。

1.5 细胞培养及分组处理

RA-FLS在含有胎牛血清(10%)与青霉素-链霉素溶液(1%)的DMEM中培养,培养箱条件为5% CO₂、37 °C。细胞贴壁后吸出培养液,分别加入5%、10%、20%、30%不同浓度的羊蹄躅含药血清进行干预,并用CCK-8测定在48 h时细胞的增殖活性。将细胞随机分为7组,即空白组(细胞正常培养)、模型组(细胞用10 ng/mL TNF- α 处理24 h^[12-15])、雷公藤多苷组(细胞用10 ng/mL TNF- α 和10%雷公藤多苷血清培养基处理24 h)、5%空白血清组(细胞用10 ng/mL TNF- α 和5%空白血清培养基处理24 h)、5%含药血清组(细胞用10 ng/mL TNF- α 和5%羊蹄躅含药血清培养基处理24 h)、10%空白血清组

(细胞用10 ng/mL TNF- α 和10%空白血清培养基处理24 h)、10%含药血清组(细胞用10 ng/mL TNF- α 和10%羊蹄躅含药血清培养基处理24 h)。

1.6 CCK-8法测定细胞增殖能力

将细胞接种于96孔板内,每孔 1×10^4 个细胞(100 μ L),设3个复孔。用不同剂量的羊蹄躅提取物干预细胞,处理48 h后,加入CCK-8溶液(10 μ L/孔)。采用Bio-Tek酶标仪测定450 nm处的光密度(optical density, OD)值,即吸光度值。

1.7 ELISA测定细胞上清液中炎症因子的含量

使用相应试剂盒检测细胞上清液中炎症因子(IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2和INF- γ)的含量。板上固定相应的一抗,将未结合的抗体洗去,然后将标准品、对照品或样品加入每个孔中,混匀并密封,在室温下孵育2 h。随后,吸去每个孔的液体并用洗涤缓冲液清洗,向每个孔中加入120 μ L特异性二抗。将未结合的二抗洗去后,向每个孔中加入100 μ L辣根过氧化物酶底物溶液。孔板在室温下避光孵育30 min,之后加入终止液终止反应。然后使用Bio-Tek酶标仪在30 min内测定各组样品在450 nm处的光密度值,并通过标准曲线计算样品中目标蛋白的浓度。

1.8 Western blot测定细胞中蛋白的相对表达水平

用RIPA裂解液(含蛋白酶和磷酸酶抑制剂)对RA-FLS进行裂解。收集蛋白质,100 °C沸水变性,通过10% SDS-PAGE分离并转移到NC膜上,用PBST配制5%脱脂奶粉封闭NC膜,1 h后,分别加入AKT1(1:1 000)、p-AKT1(1:3 000)、c-JUN(1:3 000)、p-c-JUN(1:5 000)、p65(1:1 000)、p-p65(1:1 000)、EGFR(1:5 000)和 β -actin(1:5 000)一抗,4 °C下孵育过夜。用PBST洗涤3次后,按上述一抗的种属特异性加入二抗:羊抗兔IgG-HRP(1:6 000)或羊抗鼠IgG-HRP(1:5 000),常温下孵育1 h,PBST冲洗3次。随后使用ECL化学发光系统和放射自显影,扫描和分析蛋白质。最后用Quantity one专业灰度分析软件分析曝光后条带的灰度值。

1.9 统计学分析

以上实验均重复3次。试验结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。实验均采用单因素方差分析进行多组间差异的显著性检验。使用GraphPad Prism 8.0.2软件进行统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 羊蹄躅含药血清对RA-FLS增殖的影响

与未添加羊蹄躅含药血清的RA-FLS相比,添

加了 5%和 10%羊蹄躅含药血清的细胞增殖活性在 48 h 内无明显变化($P>0.05$)。然而当羊蹄躅含药血清浓度上升至 20%和 30%时,RA-FLS 增殖活性受到明显抑制($P<0.05$)。故本研究选择 5%和 10%含药血清进行后续实验。详见图 1。

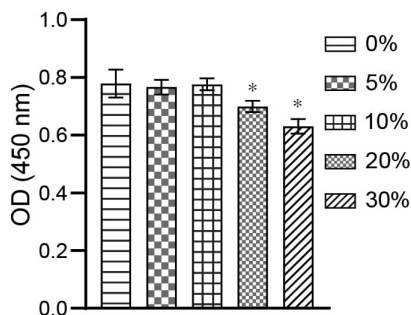


图 1 羊蹄躅含药血清对 RA-FLS 增殖的影响
注: $n=3$ 。与 0%含药血清比较, $*P<0.05$ 。

2.2 羊蹄躅含药血清抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖

CCK-8 结果显示,与空白组比较,模型组的细胞增殖活性显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,雷公藤多苷组的细胞增殖活性明显降低($P<0.05$),而 5%和 10%空白血清组无明显变化($P>0.05$)。与 5%和 10%空白血清组相比,5%和 10%羊蹄躅含药血清组的细胞增殖活性显著降低($P<0.05$)。另外,与雷公藤多苷组相比,10%羊蹄躅含药血清组的细胞增殖活性显著降低($P<0.05$)。详见图 2。

2.3 羊蹄躅含药血清抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中促炎因子的分泌

与空白组比较,模型组的 IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2 和 IFN- γ 水平均明显升高($P<0.05$)。与模型组相比,雷公藤多苷组的 IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2 和

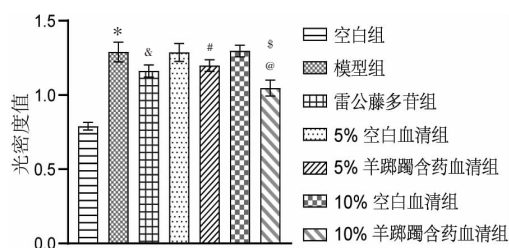


图 2 羊蹄躅含药血清抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖
注: $n=3$ 。与空白组比较, $*P<0.05$;与模型组比较, $^{\&}P<0.05$;与 5%空白血清组比较, $^{\#}P<0.05$;与 10%空白血清组比较, $^{\@}P<0.05$,与雷公藤多苷组比较, $^{\$}P<0.05$ 。

IFN- γ 水平显著下降($P<0.05$),而 5%和 10%空白血清组无明显变化($P>0.05$)。与 5%和 10%空白血清组相比,5%和 10%羊蹄躅含药血清组的 IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2 和 IFN- γ 水平显著降低($P<0.05$)。与雷公藤多苷组相比,10%羊蹄躅含药血清组的 IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2 和 IFN- γ 水平显著降低($P<0.05$)。详见图 3。

2.4 羊蹄躅含药血清抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中增殖和炎症相关蛋白的表达

与空白组比较,模型组的 EGFR 的表达及 AKT1、c-JUN 和 p65 的磷酸化水平均明显增加($P<0.05$)。与模型组相比,雷公藤多苷组的 EGFR 的表达及 AKT1、c-JUN 和 p65 的磷酸化水平均明显下降($P<0.05$),而 5%和 10%空白血清组无明显变化($P>0.05$)。与 5%和 10%空白血清组相比,5%和 10%羊蹄躅含药血清组的 EGFR 的表达及 AKT1、c-JUN 和 p65 的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。与雷公藤多苷组相比,10%羊蹄躅含药血清组的 EGFR 的表达及 AKT1、c-JUN 和 p65 的磷酸化水平均明显降低($P<0.05$)。详见图 4。

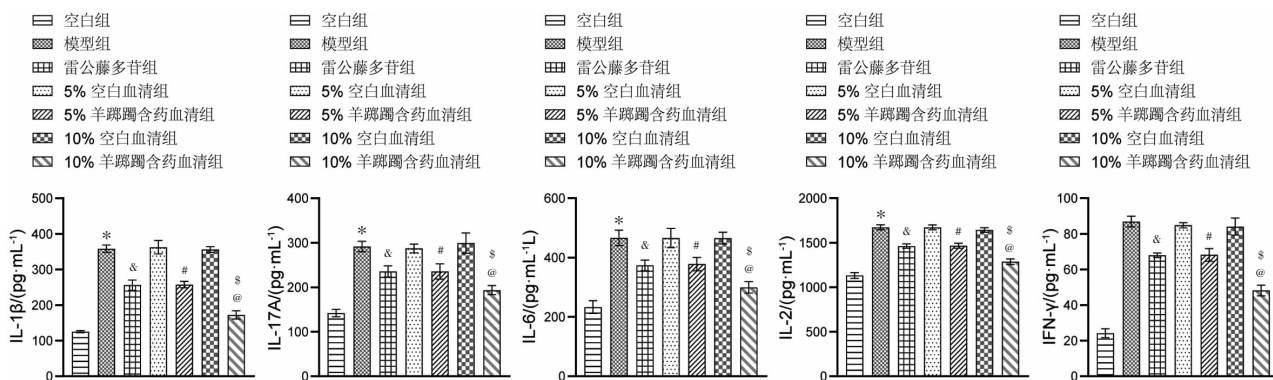


图 3 羊蹄躅含药血清抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中促炎因子的分泌

注: $n=3$ 。与空白组比较, $*P<0.05$;与模型组比较, $^{\&}P<0.05$;与 5%空白血清组比较, $^{\#}P<0.05$;与 10%空白血清组比较, $^{\@}P<0.05$;与雷公藤多苷组比较, $^{\$}P<0.05$ 。

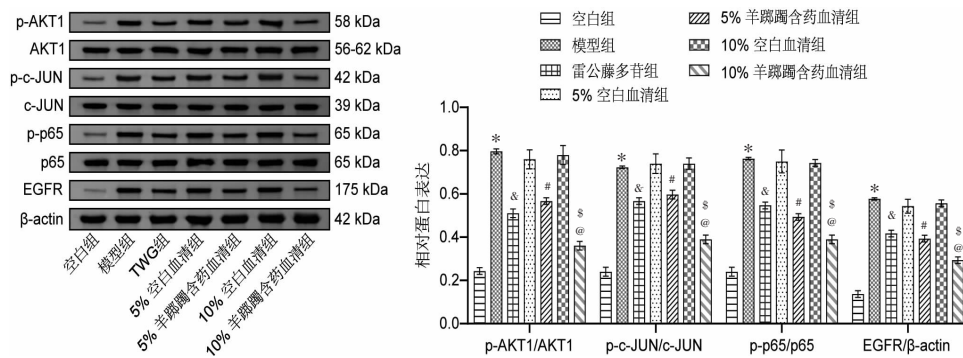


图4 踯躅含药血清抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中增殖和炎症相关蛋白的表达

注: $n=3$ 。与空白组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$; 与 5%空白血清组比较, @ $P<0.05$; 与 10%空白血清组比较, \$ $P<0.05$; 与雷公藤多苷组比较, & $P<0.05$ 。

3 讨论

RA 是一种常见的全身性免疫介导的炎症性疾病,其特征是关节疼痛、肿胀,并严重损害身体功能和生活质量^[1-2]。活化的 RA-FLS 表现出与肿瘤细胞相似的侵袭性特征,这是异常增生和关节破坏的主要触发因素^[6]。因此,能否有效控制 RA-FLS 的增殖是治疗 RA 的关键。目前,雷公藤多苷在 RA 的治疗中显示出了显著的临床疗效,并成为 RA 相关研究中常用的阳性药物^[17]。如研究:苗药金乌健骨方对 RA-FLS 细胞自噬以及 IL-17/IL-17R 的影响^[18-19]、自拟蠲痹补肾方含药血清对 RA-FLS 细胞增殖与凋亡的影响^[20],以及红景天含药血清对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖的影响^[21]等,都将雷公藤多苷作为阳性药物对照。

有研究表明,RA 的发病机制亦涉及各种细胞因子和细胞的复杂网络,这些细胞因子和细胞会触发滑膜细胞增殖并导致软骨和骨的损伤^[22]。其中,炎症相关的细胞因子在 RA 的发病过程中发挥重要作用,如促炎因子 IL-1 β 、IL-6 以及 IFN- γ 分别通过影响破骨细胞的发育,刺激中性粒细胞迁移、破骨细胞成熟和血管内皮生长因子刺激的血管翳增殖以及破坏软骨和骨骼,促进 RA 的发生^[2, 23-24]。同时,有令人信服的证据支持 EGFR、NF- κ B、AKT 和 JNK 信号通路也参与 RA 的病理调节^[12, 25-28]。具体来说,EGFR 靶向的 FLS、内皮细胞和破骨细胞在 RA 的发病机制中起主要作用^[25]。NF- κ B 和 JNK 是 RA 等免疫性疾病的两种关键调节剂,通过诱导炎症介质的表达,在炎症调节中起着重要作用^[26, 29-30]。AKT 通路是 NF- κ B 的上游分子,是参与 RA 发病的重要细胞内通路^[12, 27]。因此,抑制 EGFR、NF- κ B、AKT 和 JNK 信号通路被认为是治疗 RA 的关键靶点和有效的治疗策略。据

报道,使用厄洛替尼抑制 EGFR 可改善胶原诱导的小鼠关节炎^[25]。此外,通过阻断 MH7A 细胞 NF- κ B/AKT/JNK 信号通路,可以抑制 TNF- α 刺激的炎症反应^[28]。同样地,YANG 等^[31]研究发现,苯丙素化合物通过调节 NF- κ B/AKT/JNK 信号通路显示出抗 RA 的作用。

羊躅躅是一种常用的药用植物,其根、叶、花和果实均可入药,在民间医学中常用于治疗 RA^[6]。有研究表明,羊躅躅中的二萜组分能显著降低 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平,可明显缓解 RA 的症状,效果类似于雷公藤多苷^[9]。LUO 等^[32]研究发现,羊躅躅提取物在体内能抑制完全弗氏佐剂诱导的大鼠关节炎的后足肿胀,降低关节炎指数,在体外能显著抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和 NO 的水平,从而起到抗 RA 的作用。

本研究通过 TNF- α 诱导 RA 细胞模型,以雷公藤多苷作为阳性对照,探究了羊躅躅含药血清对 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖及炎症因子分泌的作用及机制。本次体外实验发现,相比于正常的 RA-FLS, TNF- α 处理的细胞的增殖活性和 IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2 和 IFN- γ 的水平、EGFR 的表达及 AKT1、c-JUN 和 p65 的磷酸化水平显著升高。而羊躅躅含药血清能显著降低 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖活性和 IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-2 和 IFN- γ 的水平。此外,羊躅躅含药血清还降低了 RA-FLS 中 EGFR 的表达及 AKT1、c-JUN 和 p65 的磷酸化水平。综上所述,羊躅躅含药血清能抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 增殖及促炎因子的分泌,其机制可能与对 EGFR、NF- κ B、AKT 和 JNK 通路的调控有关。本研究为后续从羊躅躅中开发出治疗 RA 的新药提供了依据,未来将进行体内实验以进一步验证羊躅躅提取物对 RA 的治疗作用。

参考文献

- [1] 许 艳, 崔海虹, 朱静媛. 金线莲苷对 TNF- α 诱导的人类风湿关节炎滑膜细胞增殖及炎症因子、MMPs 产生的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(2): 38-42.
- [2] MCINNES I B, SCHEIT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [3] CHIU Y M, LU Y P, LAN J L, et al. Lifetime risks, life expectancy, and health care expenditures for rheumatoid arthritis: A nationwide cohort followed up from 2003 to 2016[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2021, 73(5): 750-758.
- [4] ROTTA D, FASSIO A, ROSSINI M, et al. Osteoporosis in inflammatory arthritides: New perspective on pathogenesis and treatment[J]. *Frontiers in Medicine*, 2020, 7: 613720.
- [5] VAN DEN HOEK J, BOSUIZEN H C, ROORDA L D, et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: A 15-year prospective cohort study[J]. *Rheumatology International*, 2017, 37(4): 487-493.
- [6] 罗永焱, 查加权, 李焰卿, 等. 羊躑躅根治疗类风湿性关节炎 114 例[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(8): 489-490.
- [7] 关德民, 刘庆彬. 羊不食草根加梅花针治疗类风湿性关节炎的临床研究[J]. 中医药信息, 2002, 19(2): 48-49.
- [8] 姚禹民. 中药羊躑躅二萜有效部位治疗类风湿性关节炎的成药性研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [9] HE Y C, YAO Y M, XUE Q W, et al. Anti-rheumatoid arthritis potential of diterpenoid fraction derived from *Rhododendron molle* fruits[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2021, 19(3): 181-187.
- [10] 薛秋雯, 梁 爽. 羊躑躅化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(5): 1350-1360.
- [11] 姚禹民, 房 鑫, 李 俊, 等. 羊躑躅二萜类成分和各极性部位的体内外抗炎活性研究[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(4): 84-88.
- [12] 何知广, 胡海平, 伍敏生. 三水白虎汤含药血清抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞迁移的临床研究[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(10): 283-284.
- [13] KONG L L, WANG L F, ZHAO Q, et al. Rhodojaponin II inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokine secretion in MH7A human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2020, 34(10): e22551.
- [14] QU S P, LI G W, MA H, et al. microRNA-193a-3p participates in the progression of rheumatoid arthritis by regulating proliferation and apoptosis of MH7A cells through targeting IGFBP5[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019, 23(11): 4850-4857.
- [15] TAO Y X, GE G R, WANG Q, et al. Exenatide ameliorates inflammatory response in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(7): 969-977.
- [16] WANG T T, JIA Q Y, CHEN T, et al. Alleviation of synovial inflammation of juanbi-Tang on collagen-induced arthritis and TNF-tg mice model[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 45.
- [17] HUBER L C, DISTLER O, TARNER I, et al. Synovial fibroblasts: Key players in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*, 2006, 45(6): 669-675.
- [18] 宋亚楠, 纪 伟. 雷公藤多甙片治疗类风湿性关节炎的研究进展[J]. 临床内科杂志, 2009, 26(10): 663-665.
- [19] 马武开, 曾 晨, 徐 晖, 等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜细胞自噬的调控作用研究[J]. 中药材, 2019, 42(4): 891-896.
- [20] 李 蓉, 姚血明, 宁乔怡, 等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜细胞 IL-17A/IL-17R 的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 546-551.
- [21] 解 骏, 李少华, 凌 芸, 等. 自拟薏痹补肾方含药血清对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖与凋亡的研究[J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(2): 68-71.
- [22] 田 乐, 朴松兰, 何艳新, 等. 红景天含药血清对肿瘤坏死因子 α 诱导的人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(3): 287-292.
- [23] KONDO N, KURODA T, KOBAYASHI D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 10922.
- [24] NAKAMURA I, JIMI E. Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1[J]. *Vitamins and Hormones*, 2006, 74: 357-370.
- [25] SRIRANGAN S, CHOY E H. The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis[J]. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2010, 2(5): 247-256.
- [26] LUO Y Q, SHEN Y, ZONG L Y, et al. Anti-rheumatoid arthritis potential of *Rhododendron molle* G. Don leaf extract in adjuvant induced arthritis rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 307: 116175.
- [27] SWANSON C D, AKAMA-GARREN E H, STEIN E A, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase ameliorates collagen-induced arthritis[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 188(7): 3513-3521.
- [28] CHEN Y, WANG Y S, LIU M, et al. Diosmetin exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory effects on TNF- α -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through regulating the Akt and NF- κ B signaling pathways[J]. *Phytotherapy Research*, 2020, 34(6): 1310-1319.
- [29] WANG J, ZHAO Q. Kaempferitin inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Phytotherapy Research: PTR*, 2019, 33(6): 1726-1735.
- [30] YANG L, LIU R H, OUYANG S, et al. Compounds DRG and DAG, two phenol glycosides, inhibit TNF- α -stimulated inflammatory response through blocking NF- κ B/AKT/JNK signaling pathways in MH7A cells[J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 1762-1770.
- [31] MENG D Q, LI J, LI H, et al. Salvianolic acid B remits LPS-induced injury by up-regulating miR-142-3p in MH7A cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 115: 108876.
- [32] SUN Y W, BAO Y, YU H, et al. Anti-rheumatoid arthritis effects of flavonoids from *Daphne genkwa*[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 83: 106384.
- [33] YANG L, LIU R H, FANG Y W, et al. Anti-inflammatory effect of phenylpropanoids from *Dendropanax dentiger* in TNF- α -induced MH7A cells via inhibition of NF- κ B, Akt and JNK signaling pathways[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 94: 107463.