

- on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(5): 411-420.
- [4] Francesco R. Is type 2 diabetes an operable intestinal disease? [J]. Diabetes Care, 2008, 31(S2): S290-S296.
- [5] 李杰, 丁红丽. 胰岛素治疗糖尿病的不良反应[J]. 临床合理用药, 2013, 6(11): 94-98.
- [6] 周国坚, 湛剑飞. 胰岛素治疗糖尿病的不良反应的临床分析[J]. 中国医药导报, 2011, 8(28): 64-66.
- [7] 金菊庆. 降糖药致不良反应 359 例分析[J]. 中国药房, 2014, 25(10): 920-922.
- [8] 王晓兵, 叶山东. 二甲双胍相关性乳酸酸中毒的研究进展[J]. 安徽医学, 2014, 35(1): 130-133.
- [9] 刁玉林, 姜威, 朱婷, 等. 天然植物多糖抗糖尿病研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(4): 275-279.
- [10] 姚先梅, 段贤春, 吴健, 等. 太子参多糖对实验性糖尿病大鼠血糖血脂代谢和肾脏病理的影响[J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 23-26.
- [11] 田春雨, 刘志霞, 王亚, 等. 双益降糖方对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 177-180.
- [12] 刘方洲, 宋献美, 王晓丽, 等. 杨桃叶总黄酮的降血糖作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 279-281.
- [13] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 780.
- [14] 宋振玉. 中草药现代研究(第 2 卷)[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996: 160.
- [15] 申竹芳, 陈其明, 刘海帆, 等. 黄皮香豆精的降血糖作用[J]. 药学报, 1989, 24(5): 391-392.
- [16] 熊曼琪, 张横柳, 朱章志, 等. 黄皮叶、小叶山绿豆、广木香降血糖作用的实验研究[J]. 广州中医学院学报, 1994, 11(1): 41-44.
- [17] Li WL, Zheng HC, Bukuru J, et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 92(1): 1-21.
- [18] 闻智鸣. 不同剂量和不同给药次数的链脲佐菌素对大鼠胰岛的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(10): 1128.

(编辑: 梁进权)

昆母汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 bax、bcl-2 的影响

林昌松¹, 陈秀敏², 刘清平¹, 徐 强¹, 关 彤¹, 陈纪藩¹, 刘凤震³, 吴 莹³ (1. 广州中医药大学第一附属医院风湿病科, 广东 广州 510405; 2. 广东省中医院 广州中医药大学博士后科研流动站, 广东 广州 510120; 3. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察昆母汤醇提液(KMT)对人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(RA-FLS)B 淋巴细胞瘤-2 基因(bcl-2)、bcl-2 相关 X 蛋白(bax)mRNA 及蛋白的影响, 探讨昆母汤治疗 RA 的部分作用机制。**方法** 滑膜组织取自行关节置换术或关节镜检查术的 8 例活动性类风湿关节炎(RA)患者, 分离出 FLS 并进行原代培养, 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)观察 bax、bcl-2 mRNA 表达的变化, 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 bax、bcl-2 蛋白含量的变化。**结果** 与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)组比较, KMT 高剂量组可以明显促进 bax mRNA 表达, 明显抑制 bcl-2 mRNA 表达, 且 bax mRNA/bcl-2 mRNA 比值明显提高($P < 0.05$, $P < 0.01$); KMT 中、高剂量组可以提高 bax 蛋白含量, 各剂量组均可降低 bcl-2 蛋白含量, bax/bcl-2 的蛋白比值明显提高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且有一定的剂量依赖性。**结论** 昆母汤可能通过抑制 bcl-2 的表达, 同时促进 bax 的表达, 调节 bax/bcl-2 比值来发挥对 RA-FLS 的促凋亡作用, 具有治疗 RA 的潜在价值。

关键词: 昆母汤; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; B 淋巴细胞瘤-2 基因; bcl-2 相关 X 蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0656-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.002

收稿日期: 2014-03-26

作者简介: 林昌松, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治风湿病研究。Email: lincshs999@163.com。通讯作者: 陈秀敏, 在站博士后, 研究方向: 中医药防治风湿病研究。Email: candy011011@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173634); 广东省自然科学基金自由申请项目(S2011010005660)。

Effects of *Kunmu* Decoction on Bax and Bcl-2 Expression in Fibroblast-like Synoviocytes of Rheumatoid Arthritis Patients

LIN Changsong¹, CHEN Xiumin², LIU Qingping¹, XU Qiang¹, GUAN Tong¹, CHEN Jifan¹, LIU Fengzhen³, WU Ying³ (1. Department of Rheumatology and Immunology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Postdoctoral Mobile Research Station of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China; 3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the effects of alcohol extract of *Kunmu* decoction (KMT) on the expression of B-cell lymphoma-2(bcl-2) and bcl-2 associated X protein(bax) in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA-FLS) *in vitro*, and to explore the possible therapeutic mechanism. **Methods** Synovial tissues were obtained from patients with active RA subjecting to the revised criteria of the American College of Rheumatology, who received joint replacement or arthroscopy. Real time-PCR was used for the expression of bax and bcl-2 mRNA in RA-FLS. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect the expression of bax and bcl-2 protein. **Results** High-dosage KMT had obvious inhibitive effect on the expression of bax induced by tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ($P < 0.01$). Compared with TNF- α group, methotrexate (MTX) and high-dosage KMT had obvious inhibitory effect on the expression of bcl-2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with MTX group, high-dosage KMT had obvious inhibitory effect on the expression of bcl-2 mRNA and protein ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Low-, moderate- and high-dosage KMT increased the ratio of bax/bcl-2 in a dose-dependent manner. **Conclusion** *Kunmu* decoction may promote the apoptosis of RA-FLS by regulating the expression of bcl-2, bax mRNA and protein and the ratio of bax/bcl-2, showing possible therapeutic effect for RA.

Keywords: *Kunmu* decoction; Rheumatoid arthritis; Fibroblast-like synoviocytes; B-cell lymphoma-2; Bcl-2 associated X protein

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的炎性关节病,其病变特点为滑膜炎以及由此造成的关节软骨和骨质破坏,最终导致关节畸形。滑膜细胞凋亡缺陷促发增生性滑膜炎而导致软骨和骨的破坏是 RA 的主要病理特征。研究^[1]发现,RA 滑膜组织中细胞凋亡率较低,其中衬里下层滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synovocyte, FLS)凋亡率仅有 3%,而衬里层 FLS 几乎无凋亡现象,与此同时,FLS 从原来的 1~3 层增殖到 5~6 层甚至更多,这表明 RA-FLS 增殖可能与其凋亡不足有关。Perlman H 等^[2]研究显示抗凋亡基因,特别是 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, bcl-2)在 RA-FLS 中的表达显著增高,因此推测 RA-FLS 凋亡不足可能与 bcl-2 的过度表达有关。昆母汤是临床上治疗 RA 的常用处方,我们通过对 78 例活动期 RA 患者进行临床研究,结果表明昆母汤联合甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)能够更好地改善患者的临床症状、体征和实验室指标,优于单独

使用 MTX^[3]。同时,前期研究^[4]证实昆母汤醇提液(KMT)对 RA-FLS 增殖有抑制作用。因此,我们进一步探讨 KMT 对 RA-FLS 促凋亡基因 bcl-2 相关 X 蛋白(bcl-2 Associated X Protein, bax)和抗凋亡基因 bcl-2 的影响,为昆母汤治疗 RA 的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 滑膜组织来源 取自于广州中医药大学第一附属医院骨科或风湿病科行关节置换或关节镜检查术的 8 名活动期 RA 患者,其诊断均符合 2009 年 ACR 和 EULAR 联合颁布的 RA 诊断标准^[5],术前均获得患者知情同意。参考文献方法^[4]体外培养 RA-FLS。

1.2 药物及试剂 昆母汤醇提液(KMT)由昆明山海棠和益母草组成,按文献方法^[5]制备,KMT 所含生药量为 $7.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; MTX,上海医药集团有限公司信谊制药总厂,批号:036140507;肿瘤坏死因子- α

(tumor necrosis factor- α , TNF- α), 美国 Sigma 公司; RT-Reagent 逆转录酶试剂盒, 日本 TaKaRa 公司; bax、bcl-2 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒, 美国 RD 公司。

1.3 分组及给药 将细胞分为空白对照组(培养基中加入等体积的 DMSO), TNF- α 组(终浓度为 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α), MTX 组(终浓度为 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α 和 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTX), KMT 低、中、高剂量组(终浓度为 $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α 基础上分别加入终浓度为 100, 200, $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 KMT)。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 FLS bax、bcl-2 mRNA 的表达 对干预后的细胞按文献方法^[5]进行 bax、bcl-2 mRNA 检测。PCR 引物序列: bax, 上游引物: 5-GTGCACCAAGGTGCCGGAAC-3, 下游引物: 5-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA -3, 扩增长度 205 bp; bcl-2, 上游引物: 5-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC -3, 下游引物: 5-AGATCATCTCTGCCTGAGTATGCTT-3, 扩增长度 318 bp; 内参 β -action, 上游引物: 5-CCTAGAAGCATTTGCGGTGC-3, 下游引物: 5-TCATGAAGTGTGACGTTGAC-3, 扩增长度 250 bp。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。实验重复 3 次, 取其平均值。计算 bax、bcl-2 mRNA 表达相对含量($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)。 ΔCt = 目标基因-内参基因, $\Delta\Delta\text{Ct}$ = 实验组 ΔCt - 对照组 ΔCt 。

1.5 ELISA 法检测 FLS bax、bcl-2 蛋白的含量 选取第 3~5 代对数生长期的 FLS, 调整细胞浓度为 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$, 以每孔 2 mL 接种于 6 孔板中培养, 细胞同期化后分组处理, 分组与干预方法同 1.3 项下, 作用 24 h。按照试剂盒说明书 ELISA 法测定上清液中 bax、bcl-2 蛋白的含量。

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS17.0 统计软件, 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KMT 对 FLS bax、bcl-2 mRNA 的影响 见表 1。与空白对照组比较, TNF- α 组 bax mRNA 表达明显降低, bcl-2 mRNA 表达明显上升($P<0.05$, $P<0.01$); 与 TNF- α 组比较, KMT 高剂量组可明显促进 bax mRNA 的表达($P<0.01$); KMT 高剂量组和 MTX 组可明显抑制 bcl-2 mRNA 的表达($P<0.05$, $P<$

0.01), 且 KMT 高剂量组的抑制作用优于 MTX 组($P<0.05$)。与空白对照组比较, TNF- α 组 bax mRNA/bcl-2 mRNA 的比值明显降低($P<0.01$); 与 TNF- α 组比较, KMT 高剂量组能明显提高 bax mRNA/bcl-2 mRNA 的比值($P<0.01$)。

表 1 KMT 对 RA-FLS bax、bcl-2 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of KMT on the expression of bax and bcl-2 mRNA in RA-FLS

组别	浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	bax mRNA	bcl-2 mRNA	bax mRNA/bcl-2 mRNA
空白对照组		$1.00\pm 0.00^*$	$1.00\pm 0.00^{**}$	$1.00\pm 0.00^{**}$
TNF- α 组	0.01	0.68 ± 0.25	1.99 ± 0.41	0.35 ± 0.21
MTX 组	0.01(TNF- α)+1(MTX)	0.60 ± 0.17	$1.28\pm 0.90^*$	0.47 ± 0.40
KMT 低剂量组	0.01(TNF- α)+100(KMT)	0.37 ± 0.44	1.85 ± 0.49	0.20 ± 0.26
KMT 中剂量组	0.01(TNF- α)+200(KMT)	0.36 ± 0.76	1.55 ± 0.82	0.23 ± 0.44
KMT 高剂量组	0.01(TNF- α)+400(KMT)	$1.30\pm 0.15^{**}$	$0.75\pm 0.59^{***}$	$1.73\pm 0.15^*$

注: 与 TNF- α 组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与 MTX 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

2.2 KMT 对 RA-FLS 上清液 bax、bcl-2 蛋白的影响 见表 2。与空白对照组比较, TNF- α 组 bax 蛋白含量下降, bcl-2 蛋白含量升高($P<0.05$, $P<0.01$); 与 TNF- α 组比较, MTX 组和 KMT 中、高剂量组可提高 bax 蛋白含量($P<0.05$, $P<0.01$), 且 KMT 高剂量组对 bax 蛋白的作用优于 MTX 组($P<0.05$); MTX 组和 KMT 低、中、高剂量组可降低 bcl-2 蛋白含量($P<0.05$), 且 KMT 高剂量组对 bcl-2 蛋白的作用优于 MTX 组($P<0.01$)。与空白对照组比较, TNF- α 组 Bax/Bcl-2 的蛋白比值明显降低($P<0.01$); 与 TNF- α 组比较, MTX 组和 KMT 低、中、高剂量组能明显提高 Bax/Bcl-2 的蛋白比值($P<0.01$); 且 KMT 高剂量组对 Bax/Bcl-2 的蛋白比值的作用优于 MTX 组($P<0.05$)。

表 2 KMT 对 RA-FLS 上清液 bax、bcl-2 蛋白含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of KMT on the expression of bax and bcl-2 protein in RA-FLS

组别	浓度	Bax/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	Bcl-2/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	Bax/Bcl-2
空白对照组		$45.29\pm 0.44^{**}$	$51.91\pm 0.56^*$	$0.87\pm 0.01^{**}$
TNF- α 组	0.01	29.62 ± 0.46	71.91 ± 1.73	0.41 ± 0.01
MTX 组	0.01(TNF- α)+1(MTX)	$37.39\pm 0.91^*$	$56.63\pm 0.53^*$	$0.66\pm 0.01^{**}$
KMT 低剂量组	0.01(TNF- α)+100(KMT)	32.06 ± 0.19	$60.04\pm 0.80^*$	$0.53\pm 0.06^{**}$
KMT 中剂量组	0.01(TNF- α)+200(KMT)	$38.23\pm 0.95^*$	$54.76\pm 0.55^{*\Delta}$	$0.70\pm 0.02^{**}$
KMT 高剂量组	0.01(TNF- α)+400(KMT)	$42.94\pm 1.11^{**\Delta\Delta}$	$51.62\pm 0.55^{**\Delta\Delta}$	$0.83\pm 0.02^{**\Delta\Delta}$

注: 与 TNF- α 组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 与 MTX 组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{**\#}P<0.01$; 与 KMT 低剂量组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

3 讨论

细胞凋亡是一个复杂的、严格受多基因调控的主动死亡过程,在这个过程中 bcl-2 家族起着重要作用^[6-7]。Bcl-2 家族成员可分为两大类,一类是抗细胞凋亡基因,如 bcl-2、bcl-X_L、bcl-w、mcl-1 等;另一类是促细胞凋亡基因,如 bax、bak、bcl-X_s、bok、bid、bad 等。Bcl-2 基因是在滤泡性淋巴瘤细胞中染色体易位 t(14:18)的断点上发现的一种原癌基因,bcl-2 蛋白则是由 bcl-2 抑制基因表达控制线粒体中致凋亡因子释放的抗凋亡类蛋白组成,具有抑制细胞凋亡和延长细胞寿命的功能,在许多细胞的凋亡中 bcl-2 的表达下降,过表达 bcl-2 则抑制细胞的凋亡。在发生凋亡过程中,bcl-2 家族的促凋亡蛋白在凋亡相关因子激活下,易位到线粒体膜上,破坏线粒体完整性,释放线粒体内的促凋亡因子,经过细胞信号转导途径逐步放大,最终导致凋亡发生^[8]。Sugiyama M 等^[9]用免疫组织化学证实在 RA 滑膜细胞过度表达 bcl-2、p53、p21 及 c-myc,而正常人滑膜细胞中这些蛋白均不表达,说明 RA 患者滑膜增殖可能是由于 FLS 中过度表达 bcl-2 等抗凋亡基因导致凋亡不足所致。Bax 基因是 bcl-2 相关蛋白基因,广泛分布于上皮细胞、造血细胞、淋巴细胞及神经细胞中,可提高细胞的凋亡敏感性,有直接促进细胞凋亡的功能。许多细胞凋亡中有 bax 表达的升高,转染 bax 能诱导细胞凋亡。死亡信号能激活 bax,使 bax 从细胞浆移位到线粒体膜上。bax 在移位到线粒体膜上后,很快形成同源二聚体,促进凋亡,而 bcl-2 则在 Bax 诱发凋亡过程中对其功能进行限制。Bcl-2 可以与 bax 形成二聚体,从而导致 bcl-2 的抗凋亡作用受到抑制,因此,调整 bcl-2 与 bax 的比例可以改变细胞凋亡的趋势,bax 比例增高,促进细胞凋亡,bcl-2 比例增高,则抑制细胞凋亡^[10-11]。Bcl-2/bax 比值对决定细胞是否进入凋亡状态有重要意义。

本研究结果显示,TNF- α 可促进 bcl-2 的表达,抑制 bax 的表达,说明 TNF- α 可能是通过调节抗凋亡基因 bcl-2 和促凋亡基因 bax 的表达导致 RA-FLS 增生。KMT 高剂量组可以促进 bax mRNA 表达,抑制 bcl-2 mRNA 表达,且对其比值有明显提升作用,但低、中剂量组作用不明显;对 RA-FLS 上清液 bax、bcl-2 蛋白作用,KMT 中、高剂量组可以提高

bax 蛋白含量,KMT 各剂量组可以降低 bcl-2 蛋白含量,提高 bax/bcl-2 的蛋白比值,且这些作用有一定的剂量依赖性,说明 KMT 可能通过抑制 bcl-2、促进 bax 的表达,从而达到促进凋亡作用。作者前期研究^[5]提示 KMT 可抑制 RA-FLS 增殖,结合本实验结果,我们推测该作用可能是与抑制 bcl-2、促进 bax 表达有关。本实验初步探讨了 KMT 治疗 RA 的部分作用机制,为昆母汤治疗 RA 提供一定的实验依据。

参考文献:

- [1] 张绍龙,关振鹏,王军锋,等. 类风湿关节炎患者程序化死亡基因 5 与肿瘤坏死因子- α 的表达及其相关性分析[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(11): 746-748.
- [2] Perlman H, Georganas C, Pagliari LJ, et al. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability[J]. J Immunol, 2000, 164(10): 5227-5235.
- [3] 林昌松,陈秀敏,林云斌,等. 昆母汤佐治活动性类风湿关节炎的临床效果[J]. 广东医学, 2013, 34(16): 2580-2582.
- [4] 林昌松,陈秀敏,林云斌,等. 昆母汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及 RANKL/骨保护素系统的影响[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(18): 2955-2957.
- [5] American college of rheumatology subcommittee on rheumatoid arthritis guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(2): 328-346.
- [6] Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells[J]. Life Sci, 2002, 72(1): 23-34.
- [7] Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, et al. Resveratrol blocks interleukin-1 beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB inhibits proliferation, cause S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells[J]. Blood, 2003, 102(3): 987-995.
- [8] 杨连君,曹雪涛,于益芝. bcl-2, bax 与肿瘤细胞凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3): 232-234.
- [9] Sugiyama M, Tsukazaki T, Yoneckura A, et al. Location of apoptosis and related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 1996, 55(7): 442-449.
- [10] Rogeris F, Junior HJ, Vieira AS, et al. Bax and bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment[J]. Brain Res, 2006, 12(1): 80.
- [11] Shroff EH, Snyder C, Chandel NS. Bcl-2 family members regulate anoxia-induced cell death[J]. AntioxidRedoxSigna, 2007, 9(9): 1405-1409.

(编辑:梁进权)