

类叶牡丹提取物对 TNF- α 诱导的人类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞因子的影响

吕邵娃¹, 崔杰¹, 段继新¹, 李国玉², 郭玉岩¹, 匡海学¹(1. 黑龙江中医药大学北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 利用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的人类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞(MH7A)对细胞因子分泌的影响来探讨类叶牡丹提取物(Caulophyllum robustum Maxim Extract, CRME)抗类风湿性关节炎(RA)的分子机制。方法 采用噻唑蓝(MTT)法检测 CRME 对 MH7A 活力的影响, 选取半数抑制浓度(IC₅₀)以下的药物浓度作为干预剂量; ELISA 法检测 CRME(50, 100, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)剂量对 TNF- α (20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)诱导 MH7A 细胞释放白介素-6(IL-6)、白介素-4(IL-4)、血管内皮生长因子(VEGF)、核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)、促凋亡因子(Bax、FasL)和抗凋亡因子(Bcl-2)的影响。结果 CRME 在质量浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ~500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对细胞活力均无影响, IC₅₀ 值为 645.32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。与空白组比较, 模型组细胞上清中 IL-4、IL-6、VEGF、RANKL、Bax、Bcl-2 和 FasL 含量均显著提高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与模型组比较, CRME 各剂量组均能降低 IL-6 水平及升高 IL-4 水平($P < 0.01$); CRME 100, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组能明显降低 VEGF 的表达($P < 0.05$), 且具有浓度依赖性; CRME 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组能明显降低 RANKL 含量($P < 0.01$); CRME 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组可促进 FasL 的表达($P < 0.01$); CRME 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组可降低 Bcl-2 的表达($P < 0.05$); CRME 各剂量组均可促进 Bax 的表达($P < 0.01$)。结论 减轻炎症、降低血管翳形成、增加骨保护, 促进异常增生的滑膜细胞的凋亡可能是 CRME 抗类风湿性疾病的机理之一。

关键词: 类叶牡丹提取物; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞因子; 类风湿性关节炎

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2018)02-0000-00

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2018.02.000

Effects of Caulophyllum robustum Maxim Extract on cytokines induced by TNF- α in human rheumatoid arthritis fibroblasts

LV Shaowei¹, CUI Jie¹, DUAN Jixin¹, GUO Yuyan¹, LI Guoyu², KUANG Haixue¹ (1. Laboratory of Pharmacodynamic Material Base of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Basics and Application of Northern Medicines, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040 Heilongjiang, China; 2. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076 Heilongjiang, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of anti-rheumatoid arthritis (RA) of Caulophyllum robustum Maxim Extract (CRME) through studying the secretion of cytokines for human rheumatoid arthritis fibroblast synovial cells (MH7A) which was induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α). Methods The effect of CRME on the viability of MH7A was detected by Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and the drug

收稿日期: 2017-08-14

作者简介: 吕邵娃, 女, 教授, 研究方向: 中药的药效物质基础和新药物开发。Email: 1031892056@hotmail.com。通信作者: 匡海学, 博士, 教授, 研究方向: 中药及复方的药效物质基础研究及中药性味研究。Email: hxkuang56@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81373929); 国家十二五重大新药创制项目(2013ZX09102019); 黑龙江中医药大学创新人才基金(2012); 黑龙江省自然科学基金(H201304)。

concentration below the half inhibitory concentration (IC_{50}) value was chosen as the intervention dose; detection the effect of CRME (50, 100, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of MH7A cells were stimulated by $\text{TNF-}\alpha$ (20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), then the secretion of interleukin-6 (IL-6), interleukin-4 (IL-4), vascular endothelial growth factor (VEGF), receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), pro-apoptotic factor (Bax, FasL) and anti-apoptotic factor (Bcl-2) were measured by ELISA. Results CRME showed no significant effect on the cell viability in MH7A cells at doses range from 50 to 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. IC_{50} of CRME to MH7A cells was 645.32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Compared with the blank group, the contents of IL-4, IL-6, VEGF, RANKL, Bax, Bcl-2 and FasL in the cell supernatant of the model group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, each dose group of CRME could reduce the level of IL-6 and increase the level of IL-4 ($P < 0.01$); CRME at the concentration of 100, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ could decreased the expression of VEGF significantly ($P < 0.05$) with a dose-dependent manner; The content of RANKL of CRME 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dose group was significantly decreased ($P < 0.01$); CRME 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dose group can promote the expression of FasL ($P < 0.01$); CRME 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dose group could reduce the expression of Bcl-2 ($P < 0.05$); All doses of CRME groups could promote the expression of Bax ($P < 0.01$). Conclusion One of the mechanisms that CRME against rheumatoid diseases may be through reduce inflammation and angiogenesis, increase bone protection and promote apoptosis of synovial cells of abnormal proliferation.

Keywords: Caulophyllum robustum Maxim extract; tumor necrosis factor alpha; cytokine; rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 是发病率和致残率较高的全身慢性免疫性疾病, 主要表现为滑膜细胞炎性浸润, 浸润处毛细血管及其周围成纤维滑膜细胞增生, 并向软骨内侵入, 使关节软骨破坏, 严重者骨质破坏, 导致关节畸形和功能障碍。目前, 尽管 RA 发病机制尚不清楚, 但是大量研究表明 RA 与炎性细胞因子、血管内皮生长因子和核因子- κB 受体活化因子配体等高表达有关。因此, 抑制上述因子的表达, 促进炎性滑膜细胞的凋亡是治疗 RA 的有效手段。类叶牡丹 (Caulophyllum robustum Maxim, CRM) 是东北地区特色药材, 具有抑菌、抗炎、镇痛等作用。《中药大辞典》记载: 其性温, 味苦辛, 具有祛风活血、理气止痛的功效, 可用于跌打损伤、风湿痹痛、月经不调、胃腹疼痛等症, 尤其在治疗类风湿关节炎方面有独特疗效^[1-3]。前期研究显示类叶牡丹抗 RA 作用与降低炎症因子水平, 抑制非特异性免疫、体液免疫以及细胞免疫等有关^[1, 4-9]。本文以肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的人类类风湿关节炎成纤维滑膜细胞模型来研究类叶牡丹提取物 (CRME) 对抗炎、活血、骨保护及促凋亡等方面的作用, 对阐明类叶牡丹抗 RA 作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养 人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细

胞系 MH7A, 购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

1.2 药物与试剂 CRME, 制备方法: 取类叶牡丹根茎 1 kg, 加入 8 倍量的 95% 乙醇, 浸泡过夜, 回流提取两次, 每次 2 h, 回收再装上 AB-8 大孔树脂柱用纯净水和 70% 乙醇 (V/V) 洗脱, 70% 乙醇洗脱液浓缩得到提取液, 过夜静置, 抽滤, 旋转蒸发仪 55 $^{\circ}\text{C}$ 蒸干所得滤液, 得固体粉末 201.25 g, 提取率为 20.125%。DMEM 培养基 (批号: 8116349)、胎牛血清 (批号: 42G5163K), 均购自美国 Gibco 公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 批号: 0607B25), 购自美国 PeproTech 公司; 白介素-4 (IL-4)、白介素-6 (IL-6)、血管内皮生长因子 (VEGF)、核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL)、Bax、FasL 和 Bcl-2 检测试剂盒 (批号: E20170601A) 购自美国 R&D System 公司。

1.3 仪器 SCB-1360 型超净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司, 311 型二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 公司, CKX41 型倒置显微镜, 日本 OLYMPUS 公司, 酶标仪, 美国 PerkinElme 公司, CT15E 型离心机, 日本 Hitach 公司。

1.4 细胞培养 MH7A 细胞接种于细胞培养瓶中, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基 4 mL, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中培养, 每周更换培养基 2-3 次。

1.5 测定细胞生长曲线 采用计数法, 取生长良好的细胞, 调整 MH7A 细胞密度至 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 做传代培养接种细胞, 共接种 21 瓶, 每隔 24 h 计数一次, 每次 3 瓶, 分别计数并算平均值, 连续 7 d, 根据细胞计数结果, 以单位细胞数(细胞数 mL^{-1})为纵坐标, 以时间为横坐标绘制生长曲线。确定细胞的对数生长期以进行后续实验。

1.6 MTT 法检测对细胞活力的影响 按 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中培养。24 h 后弃去上清, 空白组加入 100 μL 不完全培养基, 样品组分别加入 100 μL 质量浓度为 10, 50, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CRME, 每浓度设 6 个复孔, 溶剂对照组仅加入等量的不完全培养基, 继续培养 20 h, 每孔加入 20 μL 质量浓度为 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 置于 CO_2 培养箱, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后, 弃去原来培养液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 振荡 10 min。采用酶标仪在 490 nm 处检测各孔的吸光度, 计算抑制率及半数抑制浓度(IC_{50})值, 来确定后续实验的给药浓度。

1.7 ELISA 法检测相关细胞因子含量 调整 MH7A 细胞密度至 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中培养。24 h 细胞贴壁后弃去上清, 空白组仅加入等量的不完全培养基培养, 模型组用不完全培养基培养预处理 1 h 后, 加入 100 μL 20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ $\text{TNF-}\alpha$; 样品组分别加入质量浓度为 50、100、500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CRME 100 μL , 预处理 1 h 后, 再加入 100 μL $\text{TNF-}\alpha$ (终浓度 20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 每组 3 个复孔。置于 CO_2 培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 24 h 后收集细胞上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-4、IL-6、VEGF、RANKL、Bax、Bcl-2 和 FasL 的含量。

1.8 统计学处理方法 采用 SPSS(版本 20.0)统计软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 MH7A 细胞生长曲线绘制 结果见图 1、图 2。MH7A 细胞形态为长梭形, 生长较缓, 细胞在接种的第 3 天进入对数生长期, 第 6~7 天达高峰。

2.2 CRME 对 MH7A 细胞活力的影响 结果见图 3。采用 MTT 法检测经 CRME 处理后, MH7A 细胞活力的变化绘制细胞抑制率曲线图 3, 并计算 IC_{50}

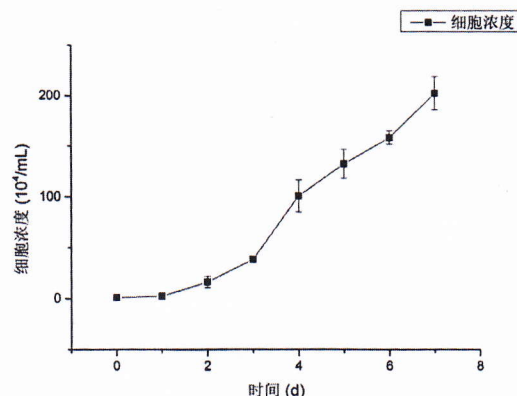


图 1 MH7A 细胞生长曲线

Figure 1 Cell growth curve



图 2 MH7A 细胞形态图($\times 100$, 第 3 天)

Figure 2 The cell morphology of MH7A cells($\times 100$)

值。结果显示, CRME 在质量浓度为 50~500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对细胞活力均无影响, IC_{50} 值为 645.32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表明后续实验选择的 CRME 不宜超过 645.32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本实验采用高、中、低(500, 100, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)三个剂量来考察其对不同细胞因子的影响。

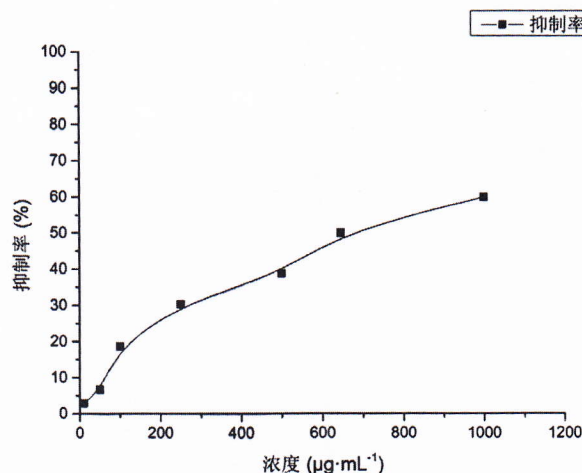


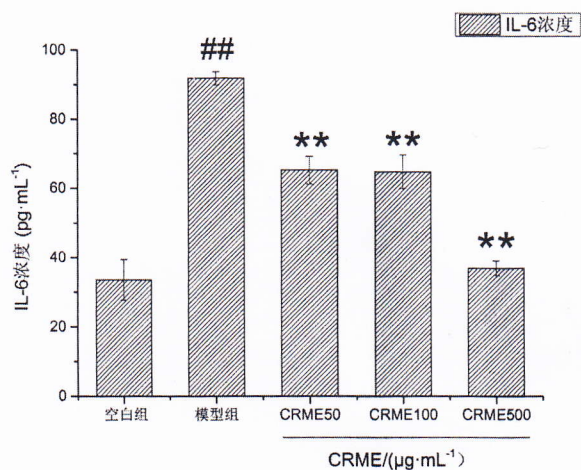
图 3 类叶牡丹提取物对 MH7A 细胞活力的影响

Figure 3 Inhibition effect of CRME on MH7A cells

2.3 CRME 对 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激的 MH7A 细胞分泌细胞

因子的影响

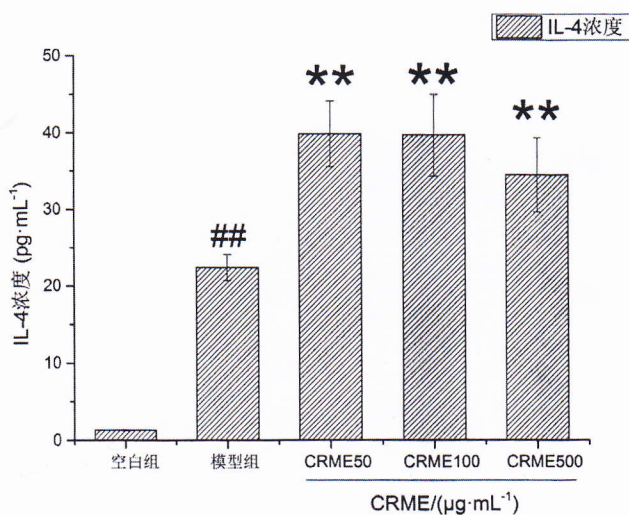
2.3.1 对炎症因子 IL-6 和抑炎因子 IL-4 的影响 结果见图 4、图 5。与空白组比较,模型组细胞上清中 IL-6、IL-4 含量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量的 CRME 即可极显著降低 IL-6 水平及升高 IL-4 的水平($P < 0.01$),且 CRME 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组能降低 IL-6 到接近正常水平,表明 CRME 具有抗炎作用且以 CRME 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组作用最为明显。



注:与空白组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图 4 CRME 对 TNF- α 诱导的 MH7A 分泌 IL-6 的影响

Figure 4 Effects of CRME on IL-6 secretion in TNF- α -induced MH7A cells



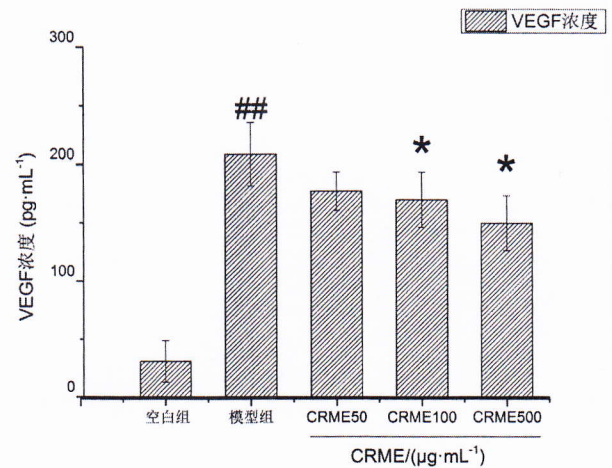
注:与空白组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图 5 CRME 对 TNF- α 诱导的 MH7A 分泌 IL-4 的影响

Figure 5 Effects of CRME on IL-4 secretion in TNF- α -induced MH7A cells

2.3.2 对 VEGF 的影响 结果见图 6。与空白组比较,模型组细胞上清中 VEGF 含量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,CRME 100, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组能明显降低 VEGF 的表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$),并呈一定的剂量依赖关系。实验表明 CRME 降低 VEGF 的表达也是其抗 RA 机制之一。

0.01)。与模型组比较,CRME 100, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组能明显降低 VEGF 的表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$),并呈一定的剂量依赖关系。实验表明 CRME 降低 VEGF 的表达也是其抗 RA 机制之一。

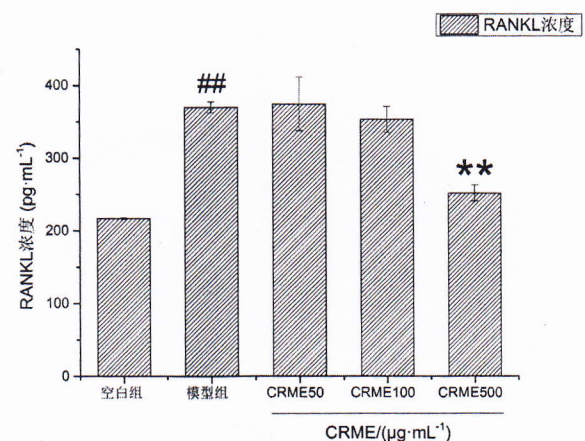


注:与空白组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

图 6 CRME 对 TNF- α 诱导的 MH7A 分泌 VEGF 的影响

Figure 6 Effect of CRME on VEGF secretion in TNF- α -induced MH7A cells

2.3.3 对 RANKL 的影响 结果见图 7。与空白组比较,模型组细胞上清中 RANKL 含量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,CRME 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组细胞上清中 RANKL 含量显著降低并趋近于正常水平,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。实验表明高浓度的 CRME 通过调节 RANKL 的分泌量会增强抗 RA 作用。



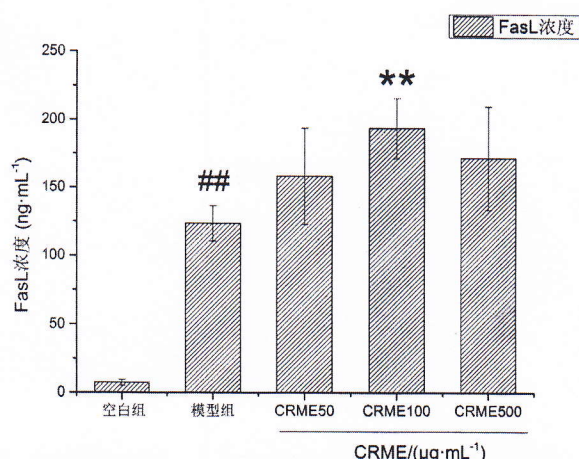
注:与空白组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图 7 CRME 对 TNF- α 诱导的 MH7A 分泌 RANKL 的影响

Figure 7 Effect of CRME on RANKL secretion in TNF- α -induced MH7A cells

2.3.4 对促凋亡因子 FasL、Bax 和抗凋亡因子 Bcl-2 的影响 结果见图 8、图 9、图 10。与空白组比较,

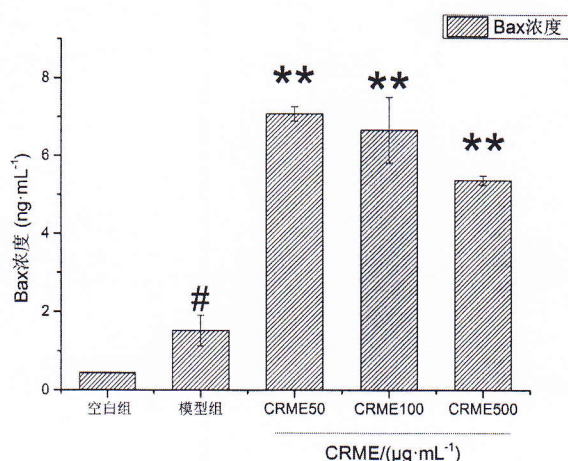
促凋亡因子 FasL、Bax 和抗凋亡因子 Bcl-2 的表达水平显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, CRME $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组可明显增加促凋亡因子 FasL 的表达 ($P < 0.01$), 促进滑膜细胞的凋亡, CRME 50、100、500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组均可促进促凋亡因子 Bax 的表达 ($P < 0.01$), CRME $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量组可显著抑制抗凋亡因子 Bcl-2 的表达 ($P < 0.01$)。实验表明, CRME 可通过促进促凋亡因子 FasL 和 Bax 的表达, 抑制抗凋亡因子 Bcl-2 的表达, 来促进滑膜细胞的凋亡而起到治疗作用。



注: 与空白组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图 8 CRME 对 TNF- α 诱导的 MH7A 分泌 FasL 的影响

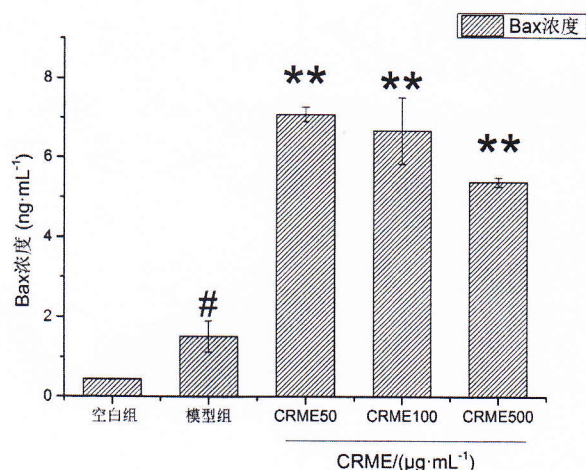
Figure 8 Effect of CRME on FasL secretion in TNF- α -induced MH7A cells



注: 与空白组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图 9 CRME 对 TNF- α 诱导的 MH7A 分泌 Bax 的影响

Figure 9 Effect of CRME on Bax secretion in TNF- α -induced MH7A cells



注: 与空白组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图 10 CRME 对 TNF- α 诱导的 MH7A 分泌 Bcl-2 的影响

Figure 10 Effect of CRME on Bcl-2 secretion in TNF- α -induced MH7A cells

3 讨论

RA 目前无特效治疗措施, 临床主要以非甾体抗炎药物和糖皮质激素等药物来治疗, 虽能够暂时缓解症状, 却依然存在着患者耐受性差, 不良反应多等问题。从传统中医药宝库中开发抗 RA 新药成为一大研究热点。CRME 是类叶牡丹中抗 RA 的有效部位, 为了新药研究的需要, 本文采用 CRME 的有效治疗浓度观察其对 MH7A 细胞中与 RA 相关的因子的影响。由于 RA 核心病理过程主要表现为滑膜细胞的炎性损伤, 本文选择人类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞模型来探讨类叶牡丹抗 RA 的其他分子机制。

成纤维样滑膜细胞 (FLS) 是一种具有分泌功能的梭形多核细胞, 通过分泌滑液使关节的润滑, 从而防止关节粘连, 在维持正常的关节活动中起着重要的作用。MH7A 细胞是一种从 RA 患者体内分离出来的类风湿性关节炎成纤维细胞 (RAFLS) 成熟细胞系, 具有更贴近病患体内状态的特性。在研究过程中, MH7A 细胞对胎牛血清的质量和浓度要求较高, 其生长速度较慢, 周期较长, 有效传代次数在 10 代以内。TNF- α 为功能较强致炎因子, 可以加剧炎症的产生。TNF- α 刺激 MH7A 细胞后, 炎症因子的分泌量会显著增加, 从而可能导致滑膜的增生肥厚, 血管翳生成, 软骨及软骨下骨侵蚀^[10]。因此调控 MH7A 细胞炎症因子的分泌、抑制其增殖和关节软骨的破坏是防治 RA 的关键环节。

CRME 是类叶牡丹中抗 RA 的有效部位, 为了新药研究的需要, 本文采用 CRME 的有效治疗浓度观

察其对 MH7A 细胞中与 RA 相关的因子的影响。

在炎症细胞中, IL-6 是炎症起始阶段的一个重要致炎因子, 在急性期炎症反应中可以促进反应蛋白的产生、关节软骨组织的损伤。IL-4 是一种抗炎细胞因子, 可抑制促炎因子的表达。从本实验结果可以看出, 高、中、低剂量的 CRME 都可下调 IL-6、IL-4 含量, 具有显著地抗炎活性, 低剂量的 CRME 即可极显著降低 IL-6 水平及升高 IL-4 的水平, 这与其含有大量的生物碱和皂苷成分密切相关^[11-12]。

滑膜细胞大量增殖会导致局部毛细血管造成一个低氧微环境^[13]。VEGF 是功能最强的促血管生成因子, 直接参与新生血管的形成。VEGF 的过度表达会促使 RA 滑膜形成血管翳。此外, 反复存在的滑膜炎及软骨破坏也与其过度表达有关。本实验表明, 通过降低 VEGF 的表达也是 CRME 抗 RA 机制之一。

在 RA 病人病灶部位中, 发现 OPG/RANKL/RANK(骨保护素/核因子- κ B 受体活化因子配体/核因子- κ B 受体活化因子)信号通路与 RA 的发生和发展有着密不可分的联系。RANKL 异常升高会导致破骨细胞大量增殖并增加其活性, 进而破坏骨的形成及骨吸收平衡, 促进骨分解代谢, 造成骨质破坏。OPG 与 RANK 竞争性结合 RANKL, 从而抑制破骨细胞分化和成熟。研究发现 RA 患者关节中 RANKL 含量升高, 而 OPG 水平下降, 这可能是 RA 骨质破坏的分子生物学基础^[14]。研究中发现对 VEGF 和 RANKL 因子的调控需要中高剂量的 CRME 才能实现, 推测具有上述活性的成分在 CRME 中含量较低, 或已知成分需在剂量累积之后才具有上述活性, 有待进一步研究与验证。

RA 患者关节的滑膜组织内激活的滑膜细胞与浸润细胞能够成组性地表达 Fas 及 FasL^[15]。FasL 主要表达于胞膜, FasL 结合 Fas 抗原后, 细胞内转导凋亡信号, 使细胞凋亡。Bax/Bcl-2 为一对经典的凋亡因子, Bcl-2 最初是在滤泡淋巴细胞中发现的原癌基因, 是典型的抗凋亡因子, 它能够阻断细胞凋亡的过程。实验发现 RA 患者滑膜细胞上 Bcl-2 表达上调, 通过核因子 κ B 通路活化来抑制凋亡, 促进滑膜细胞的增生与增殖, Bax 自身能形成同源二聚体, 促进细胞凋亡^[16]。本实验结果表明, CRME 具有极显著地促凋亡作用, 其对 Bcl-2 和 FasL 具有调控作用弱于 Bax, 提示 CRME 的促凋亡作用主要是通过上调 Bax 因子的表达来实现的。此外, 类叶牡丹中含有大

量的五环三萜类皂苷类成分, 五环三萜类皂苷类成分如常春藤皂苷^[17]有显著地促凋亡作用, 推断类叶牡丹中的皂苷类成分可能是其促凋亡的有效成分。

综上所述, 减轻炎症、降低血管翳形成、增加骨保护, 促进异常增生的滑膜细胞的凋亡可能是 CRME 抗类风湿性疾病的机理之一。

参考文献:

- [1] 吕邵娃, 苏红, 于风明, 等. 类叶牡丹提取物对大鼠佐剂性关节炎治疗作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(2): 164-171.
- [2] 梁俊玉, 周峰, 陈明忠, 等. 红毛七的研究进展[J]. 中华实用医药杂志, 2007, 7(6): 75-77.
- [3] 李国玉. 类叶牡丹抗风湿有效部位化学成分研究[D]. 黑龙江: 黑龙江中医药大学, 2006.
- [4] 焦淑萍, 于铁力, 姜虹, 等. 类叶牡丹根茎水煎剂抗炎作用研究[J]. 吉林医学院学报(自然科学版), 1997, 17(1): 8-9.
- [5] 姜虹, 焦淑萍, 任庆林, 等. 类叶牡丹根茎水煎剂镇痛作用研究[J]. 吉林医学院学报(自然科学版), 1997, 17(2): 8-9.
- [6] 杨苹, 陈森州, 杨红要, 等. 三种红毛七提取物的抗炎镇痛作用实验研究[J]. 中国实用医药, 2007, 2(32): 1-3.
- [7] LEE Y, JUNG J C, ALI Z, et al. Anti-Inflammatory Effect of Triterpene Saponins Isolated from Blue Cohosh (*Caulophyllum thalictroides*) [J]. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2012, 2012(3): 798192.
- [8] 蔡正军, 但飞君, 陈国华, 等. 红毛七的体外抑菌试验[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35): 15541-15543.
- [9] 孙静, 薛瑞, 刘洁琼. 太白祛风湿“七”药药理作用研究进展[J]. 中南药学, 2011, 9(4): 278-281.
- [10] NOSS E H, BRENNER M B. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis[J]. Immunological reviews, 2008, 223(1): 252-270.
- [11] LI C Y, ZHANG Y H, YANG B Y, et al. Leiyemudanosides A-C, three new bidesmosidic triterpenoid saponins from the roots of *Caulophyllum robustum*[J]. Fitoterapia, 2010, 81(3): 200-204.
- [12] WANG X L, LIU B R, CHEN C K, et al. Four new fluorenone alkaloids and one new dihydroafluranthene alkaloid from *Caulophyllum robustum* Maxim[J]. Fitoterapia, 2011, 82(6): 793-797.
- [13] RUDOLPH E H, WOODS J M. Chemokine expression and regulation of angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(5): 613-631.
- [14] WRIGHT H L, MCCARTHY H S, MIDDLETON J, et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease[J]. Curr Rev Musculoskelet Med, 2009, 2(1): 56-64.
- [15] CHOU C T, YANG J S, LEE M R, et al. Apoptosis in rheumatoid arthritis-expression of Fas, FasL, p53, and Bcl-2 in rheumatoid synovial tissues[J]. J Pathol, 2001, 193(1): 110-116.
- [16] CALICH A L, VIANA V S, CANCADO E, et al. Anti-ribosomal

P protein: a novel antibody in autoimmune hepatitis[J]. Liver Int, 2013, 33(6): 909-913.

Alleviates the Pro-Inflammatory and Apoptotic Response to Alcohol in Rat[J]. Nutrients, 2017, 9(1): 41.

[17] KIM G J, SONG D H, YOO H S, et al. Hederagenin Supplementation

(编辑: 李昕)

吕印姣·崔杰 段继新 李国玉 郭云岩 王海学