

引用本文:林朋朝,周晓彬,高伟静,等.盘龙七片调控Toll样受体4-骨髓样分化因子88-核因子- κ B通路保护佐剂性关节炎大鼠滑膜组织[J].安徽医药,2021,25(9):1713-1717.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.004.



◇ 药学研究 ◇

盘龙七片调控Toll样受体4-骨髓样分化因子88-核因子- κ B通路保护佐剂性关节炎大鼠滑膜组织

林朋朝¹,周晓彬¹,高伟静¹,姬艳林¹,冯建书¹,李静²

作者单位:¹石家庄市第三医院创伤三科,河北 石家庄050000;

²河北省老年病医院护理部,河北 石家庄050000

摘要: **目的** 研究盘龙七片通过调控Toll样受体4(TLR4)-骨髓样分化因子88(MyD88)-核因子- κ B(NF- κ B)信号通路保护类风湿关节炎(RA)大鼠滑膜组织的作用机制。**方法** 将50只SD大鼠以随机数字表法分为正常组、模型组、低、中、高盘龙七片组,每组10只,除正常组外,其余组均采用风、寒、湿环境结合弗氏完全佐剂注射的方式制备RA模型,RA大鼠模型制备成功后,低、中、高盘龙七片组分别灌胃给予盘龙七片溶液150 mg/kg、300 mg/kg、600 mg/kg,对照组与模型组大鼠给予等量生理盐水灌胃,连续灌胃处理15 d后,切片观察滑膜组织病理形态,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)水平,实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组大鼠滑膜组织细胞中TLR4 mRNA、MyD88 mRNA以及肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF-6)mRNA的表达水平,蛋白质印迹法检测滑膜组织中NF- κ B p65蛋白表达情况。**结果** 与正常组相比,模型组滑膜组织可见明显变性坏死,滑膜处可见中度充血水肿,且有大量炎细胞并伴随轻度滑膜增生,与模型组相比,不同剂量盘龙七片处理后关节变性坏死情况明显改善,滑膜组织充血水肿情况减轻,炎细胞浸润情况极大的改善,且呈浓度依赖;模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1分别为(1.26±0.11) μ g/L、(0.35±0.08) μ g/L,显著高于正常组的(0.68±0.05) μ g/L、(0.11±0.02) μ g/L,滑膜组织中TLR4、MyD88、TRAF-6的mRNA相对表达水平分别为(2.56±0.21)、(3.83±0.26)、(2.78±0.23),显著高于正常组(1.00±0.02)、(1.01±0.02)、(1.00±0.01)(P <0.05),NF- κ B p65蛋白磷酸化水平为(1.37±0.22),显著高于正常组(0.21±0.06)(P <0.05),与模型组相比,不同剂量盘龙七片组大鼠血清中TNF- α 、IL-1水平显著降低(P <0.05),滑膜组织中TLR4、MyD88、TRAF-6的mRNA相对表达水平显著降低(P <0.05),NF- κ B p65蛋白磷酸化水平也显著降低(P <0.05)。**结论** 盘龙七片通过抑制TLR4-MyD88-NF- κ B信号转导通路,降低滑膜组织处炎症反应,改善滑膜细胞增生,从而保护滑膜组织。

关键词: 关节炎,实验性; 盘龙七片; Toll样受体4; 骨髓样分化因子88; 核因子- κ B

Panlongqi tablets protect synovial tissue in rats with adjuvant arthritis by regulating Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-nuclear factor- κ B pathways

LIN Pengzhao¹, ZHOU Xiaobin¹, GAO Weijing¹, JI Yanlin¹, FENG Jianshu¹, LI Jing²

Author Affiliations:¹The Third Department of Trauma, Shijiazhuang Third Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; ²Department of Nursing, Hebei Geriatrics Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Abstract: **Objective** To study the mechanism of *Panlongqi* tablets on protecting synovial tissue in rats with rheumatoid arthritis (RA) by regulating Toll-like receptor 4 (TLR4)-myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathways. **Methods** According to random number table method, 50 SD rats were randomly assigned into normal group, model group, low-dose, medium-dose and high-dose *Panlongqi* tablets groups, with 10 cases in each group. Except for normal group, the other groups were given wind-cold-wet environment and Freund's complete adjuvant injection to prepare RA models. After successful preparation of RA rat models, low-dose, medium-dose and high-dose *Panlongqi* tablet groups were intragastrically administered with *Panlongqi* tablet solutions of 150 mg/kg, 300 mg/kg and 600 mg/kg, respectively. The control group and model group were given the same amount of normal saline. After 15d of continuous intragastric administration, slice observation was performed on pathological morphology of synovial tissue. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect levels of serum tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1) in each group. The real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was applied to detect the expression levels of TLR4 mRNA, MyD88 mRNA and TNF- α receptor associated factor 6 (TRAF-6) mRNA in synovial tissue cells of each group. Western blotting was applied to detect the expression of NF- κ B p65 protein in synovial tissue. **Results** Compared with normal group, there was significant degenerative necrosis of synovial tissue in model group. Moderate congestive edema could be found at synovium site, and there was a large number of inflammatory cells, accompanied with mild synovial hyperplasia. Compared with mod-

el group, after treatment with different doses of *Panlongqi* tablets, degenerative necrosis of joints was significantly improved, congestive edema of synovial tissue was alleviated, and inflammatory cells infiltration was greatly improved, showing concentration-dependence. The levels of serum TNF- α and IL-1 in model group rats were (1.26 \pm 0.11) μ g/L and (0.35 \pm 0.08) μ g/L, significantly higher than those in normal group [(0.68 \pm 0.05) μ g/L, (0.11 \pm 0.02) μ g/L], relative expression levels of TLR4, MyD88 and TRAF-6 mRNA in synovial tissue were (2.56 \pm 0.21), (3.83 \pm 0.26) and (2.78 \pm 0.23), significantly higher than those in normal group [(1.00 \pm 0.02), (1.01 \pm 0.02), (1.00 \pm 0.01), respectively] (P <0.05), and phosphorylation level of NF- κ B p65 protein was significantly higher than that in normal group [(1.37 \pm 0.22) vs. (0.21 \pm 0.06), P <0.05]. Compared with model group, levels of serum TNF- α and IL-1 were significantly decreased in groups with different doses of *Panlongqi* tablets (P <0.05), relative expression levels of TLR4, MyD88 and TRAF-6 mRNA in synovial tissue were significantly decreased (P <0.05), and phosphorylation level of NF- κ B p65 protein was also significantly decreased (P <0.05). **Conclusion** *Panlongqi* tablets decrease inflammation reaction in synovial tissue and improve synovial cell hyperplasia by inhibiting TLR4-MyD88-NF- κ B signal transduction pathways, thereby protecting synovial tissue.

Key words: Arthritis, experimental; *Panlongqi* tablets; Toll-like receptor 4; Myeloid differentiation factor 88; Nuclear factor- κ B

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)作为一种免疫性全身性疾病,其病理基础为滑膜炎,随着疾病的进展会引起关节畸形进而致残^[1-2]。目前RA的具体发病机制仍未阐明,但相关研究证实Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)-髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)-核因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路在RA的发展进程中发挥着重要的作用^[3],TLR4是最早发现的Toll蛋白受体家族成员,能够识别抗原分子从而介导机体的固有免疫及获得性免疫来参与多种疾病的发生,其被激活后会诱导下游MyD88大量合成,继续激活下游炎性细胞递质白细胞介素-1(IL-1)受体,并最终激活NF- κ B进入细胞核内,调控炎症反应的发生^[4-5]。RA属于中医学中的“痹症”范畴,中医认为痹症是由风寒湿邪所致,应当以祛风除湿散寒为主治^[6]。盘龙七片是中医骨伤科专家王家成先生所献秘方,主要发挥补血活血、行气止痛、祛风散寒、除湿补肝肾强筋骨等作用^[7]。目前研究表明盘龙七片治疗RA效果良好,但其具体的作用机制尚未有研究报道,本次研究于2018年5月至2019年6月通过建立RA模型大鼠后,给予不同剂量盘龙七片处理,来观察其对TLR4-MyD88-NF- κ B信号通路的影响,旨在为盘龙七片治疗RA的具体作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源 8周龄清洁级雄性SD大鼠50只,体质量范围为160~200 g,购于中国食品药品检定研究院[SCXK(京)2014-0013],饲养于中国检验检疫科学研究院屏障环境动物房[SYXK(京)2014-0033],光照12 h/黑暗12 h,室温(25 \pm 1) $^{\circ}$ C,相对湿度50%~65%,全天自由饮水,常规饲料饲养。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 主要试剂及仪器 盘龙七片(陕西盘龙药业集

团股份有限公司,批号Z61020050);弗氏完全佐剂(美国Sigma公司,批号068K8761);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1酶联免疫试剂盒(上海恒斐生物科技有限公司,批号20160128、20151210);TLR4、MyD88、肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF-6)、 β 肌动蛋白(β -actin)引物均由上海生工合成;兔抗大鼠NF- κ B p65、p-p65、 β -actin抗体(美国Abcam公司购买);Revertaid First Strand cDNA Kit试剂盒(美国Thermo公司,批号00145205);PCR仪(PIKOREAL 96型)由美国Thermo公司提供;酶标分析仪(RI-6000型)由美国雷杜公司提供;台式离心机(TDL-4型)由上海安亭科学仪器厂提供;凝胶自动成像仪由瑞典Pharmacia公司提供;光学显微镜(BX 51型)由日本Olympus公司提供。

1.3 实验动物分组及模型制备处理 将50只SD大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、低、中、高盘龙七片组,每组10只,除正常组外,其余组大鼠均放置在特制的装置中,保持装置内温度为(4 \pm 2) $^{\circ}$ C,风扇风力4级,湿度保持在85%~90%,连续饲养20 d后,在每组大鼠右后足垫部位注射0.15 mL的弗氏完全佐剂,注射24 h后大鼠右足踝部出现急性炎性肿胀,48 h后注射侧及非注射侧前肢关节均出现肿胀,表明造模成功,正常组大鼠在室温18~20 $^{\circ}$ C条件下正常饲养。造模成功后3 d开始,低、中、高盘龙七片组大鼠灌胃给予150 mg/kg、300 mg/kg、600 mg/kg剂量的盘龙七片溶液,1次/天,连续15 d。

1.4 血液样本及滑膜组织样本收集 末次处理后,10%水合氯醛麻醉,取腹主动脉血5 mL,3 000 r/min离心10 min后收集上清,保存于-20 $^{\circ}$ C待测;各组大鼠取血后处死,沿右侧膝关节上方正中行纵向切口,取出滑膜组织后,一部分4%甲醛固定用于病理学观察,一部分立刻装入RNase free的离心管中,于液氮中快速冷冻后,保存于-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱中。

1.5 滑膜组织病理形态学观察 将“1.4”收集的甲醛固定好的滑膜组织经过脱钙、脱水、石蜡包埋后,连续切片成厚度为4 μm 的切片,经烤片、脱蜡后进行常规苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜观察滑膜组织病理形态学变化,并拍照记录。

1.6 血清中 TNF- α 、IL-1 水平的检测 取“1.4”中抽提的血液样本,由严格按照试剂盒说明书检测血清 TNF- α 、IL-1 水平。

1.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测各组大鼠滑膜组织中细胞中 TLR4、MyD88、TRAF-6 的 mRNA 表达水平 取“1.4”中收取的各组大鼠滑膜组织 50 g,采用 Trizol 试剂提取总 RNA, Revertaid First Strand cDNA 合成试剂盒将 RNA 中反转录合成 cDNA, SYBR-Green PCR Mix 检测 mRNA 的表达水平。PCR 参数设置:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s、40 个循环。所用引物(上海生工)信息如下: β -actin 内参基因,正向引物 5'-CCCATCTAATGAGGGTTACGC-3'、反向引物 5'-TTTAATGTGACGCACGATTTTC-3'; TLR4, 正向引物 5'-AACATGAGTCACAACAACCTAC-3'、反向引物 5'-TATTCACATATACAAGCAACAG-3'; MyD88, 正向引物 5'-ATTGAGAAAAGGTGTCGTCGCAT-3'、反向引物 5'-TCGCAGATAGTGATGAACCGTAGG-3'; TRAF-6, 正向引物 5'-CTGCTTGATGGCTTTACGGGA-3'、反向引物 5'-CTGGGCACTTGTGACCTGCAT-3'。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析相关基因表达数据。

1.8 蛋白质印迹法检测各组滑膜组织中 NF- κB p65 蛋白表达水平 取“1.4”中收取的各组大鼠滑膜组织 100 g,加入胰蛋白酶消化后,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,调整各组蛋白浓度一致后电泳、转膜、封闭,加入兔抗鼠 NF- κB p65、p-p65、 β -actin 一抗(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗(1:500)孵育 2 h,显色后暗室曝光到 X 线片上,分析各组条带灰度值,计算目标蛋白相对内参 β -actin 的表达量。

1.9 统计学方法 实验数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析+两两比较 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 盘龙七片对 RA 模型大鼠滑膜组织病理结构的影响 HE 染色结果显示:正常组大鼠关节滑膜细胞连续平整,结构层次清晰,无滑膜肿胀、组织坏死及炎细胞浸润情况发生,与正常组相比,模型组滑膜组织可见明显变性坏死,滑膜处可见中度充血水肿,且有大量炎细胞并伴随轻度滑膜增生,与模型

组相比,不同剂量盘龙七片处理后关节变性坏死情况明显改善,滑膜组织充血水肿情况减轻,炎细胞浸润情况极大的改善,且呈浓度依赖。见图 1。

2.2 盘龙七片对各组 SD 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 水平的影响 模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 水平显著高于对照组,不同剂量盘龙七片组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 水平均低于正常组,且呈浓度依赖($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 SD 大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)水平比较($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-1
正常组	10	0.68 \pm 0.05 ^①	0.11 \pm 0.02 ^①
模型组	10	1.26 \pm 0.11	0.35 \pm 0.08
低盘龙七片组	10	1.12 \pm 0.08 ^①	0.26 \pm 0.04 ^①
中盘龙七片组	10	0.87 \pm 0.04 ^①	0.17 \pm 0.03 ^①
高盘龙七片组	10	0.75 \pm 0.03 ^①	0.15 \pm 0.03 ^①
F 值		129.426	45.686
P 值		<0.001	<0.001

注:①与模型组相比, $P < 0.05$ 。

2.3 盘龙七片对各组 SD 大鼠滑膜组织中 TLR4、MyD88、TRAF-6 的 mRNA 表达水平的影响 模型组滑膜组织中 TLR4、MyD88、TRAF-6 的 mRNA 相对表达水平高于正常组,不同剂量盘龙七片组滑膜组织中 TLR4、MyD88、TRAF-6 的 mRNA 相对表达水平低于模型组,且呈浓度依赖($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 SD 大鼠滑膜组织中 Toll 样受体 4(TLR4)、骨髓样分化因子 88(MyD88)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF-6)的 mRNA 表达水平/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	TLR4	MyD88	TRAF-6
正常组	10	1.00 \pm 0.02 ^①	1.01 \pm 0.02 ^①	1.00 \pm 0.01 ^①
模型组	10	2.56 \pm 0.21	3.83 \pm 0.26	2.78 \pm 0.23
低盘龙七片组	10	1.82 \pm 0.16 ^①	2.42 \pm 0.19 ^①	2.12 \pm 0.15 ^①
中盘龙七片组	10	1.34 \pm 0.09 ^①	1.89 \pm 0.13 ^①	1.87 \pm 0.12 ^①
高盘龙七片组	10	1.05 \pm 0.05 ^①	1.35 \pm 0.06 ^①	1.51 \pm 0.06 ^①
F 值		261.698	490.570	237.449
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与模型组相比, $P < 0.05$ 。

2.4 盘龙七片对各组 SD 大鼠滑膜组织中 NF- κB p65 蛋白表达水平的影响 各组大鼠滑膜组织中 NF- κB p65 蛋白磷酸化水平整体比较,差异有统计学意义($F = 118.023$, $P < 0.001$)。其中模型组(1.37 \pm 0.22)高于正常组(0.21 \pm 0.06),低、中、高盘龙七片组分别为(0.95 \pm 0.14)、(0.75 \pm 0.12)、(0.33 \pm 0.09),均低于模型组,且呈浓度依赖($P < 0.05$)。见图 2。

3 讨论

目前研究结果表明,RA 滑膜组织处大量合成



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—磷酸化 p65 蛋白;3—p65 蛋白;
4—正常组;5—模型组;6—低盘龙七片组;7—中盘龙七片组;8—高
盘龙七片组。

图2 各组SD大鼠滑膜组织中NF- κ B p65蛋白表达图谱

炎性细胞因子被认为是引起RA炎性反应和滑膜损伤的重要因素^[8]。TNF- α 和IL-1是RA发病机制中研究最多的2个促炎性细胞因子,当机体处于RA病理状态时,机体产生的大量炎性递质会进入滑膜组织,引起滑膜组织中细胞因子平衡失调,IL-1、TNF- α 等促炎性因子水平升高,抑炎性因子水平降低,诱导机体炎症反应发生^[9-10]。本研究结果显示,RA模型大鼠可见关节滑膜明显的变性坏死,并伴有中度充血肿胀,同时可见大量炎性细胞浸润及滑膜轻度增生,同时腹主动脉血清中IL-1、TNF- α 水平也显著升高,表明RA模型大鼠病变过程会导致细胞因子平衡失调,而IL-1、TNF- α 水平升高会促进胶原酶及自由基的产生,进一步损伤关节软骨。经过盘龙七片治疗后,主动脉血清中IL-1、TNF- α 水平显著降低,关节变性坏死情况明显改善,滑膜组织充血水肿情况减轻,炎细胞浸润情况极大的改善,其中盘龙七片600 mg/kg治疗缓解效果最好,这是因为盘龙七片药方中的川乌、草乌能够刺激垂体-肾上腺皮质系统,具有较强的表面麻醉作用,可用于止痛^[11],而盘龙七具有补脾健胃、除湿利水活血功效,能够改善循环,促进炎性细胞递质的代谢,来达到抗炎镇痛、调节免疫的作用^[12],丹参具有抗氧化、抗炎的功效,还可以抑制CRP蛋白的合成^[13],牛膝中富含阿魏酸能够提高细胞免疫功能^[14],秦艽主祛风除湿之效,常用于骨性关节炎、类风湿关节炎等的治疗^[15],因此对于RA模型大鼠的滑膜组织损伤可以起到很好的保护作用。

RA作为一种系统性、自身免疫性疾病,其具体发病机制仍未研究清楚,但炎症反应过程对RA的发病及病理过程影响巨大。TLR4-MyD88-NF- κ B作为研究RA最多的一个经典通路,在RA发生发展中起到重要作用^[16],Toll样受体在很多免疫细胞上均可检测到,其中TLR4在早期和持续期RA病人的滑膜组织中表达水平显著升高^[17],而活化的TLR4通过MyD88依赖途径首先活化IL-1受体激酶(IRAK),活化后的IRAK又会与TRAF6结合,激活TAK1激酶,继续作用于NF- κ B上游抑制蛋白I κ B使其降解,

NF- κ B被释放激活后,转位进入细胞核内,启动炎症反应免疫相关基因转录,完成炎症反应信号的传递^[18]。本研究结果中,RA模型大鼠TLR4、MyD88、TRAF6的mRNA相对表达水平及p65蛋白磷酸化均显著升高,表明RA病理变化过程与自身免疫相关,同时NF- κ B信号通路激活后下游炎性相关因子表达增强,使得前炎性细胞因子水平迅速升高,这些前炎性细胞因子能通过与巨噬细胞上的特异性受体结合,诱发级联瀑布反应,诱导更多促炎性因子合成,形成级联放大反应,使关节滑膜处持续保存过度炎症反应,引起滑膜组织的持续性损伤^[19]。盘龙七片处理后,TLR4、MyD88、TRAF6的mRNA相对表达水平及p65蛋白磷酸化水平均显著降低,表明盘龙七片可能是通过抑制TLR4的识别过程,中断与MyD88的转导,抑制了NF- κ B信号通路的激活,减少前炎性因子合成,缓解炎症反应,从而保护滑膜组织的破坏及异常增生。

综上所述,盘龙七片可能通过下调TLR4、MyD88、TRAF6的mRNA相对表达水平,抑制下游信号原件NF- κ B激活,使得促炎性因子IL-1、TNF- α 合成减少,炎症反应减轻从而保护滑膜组织。但盘龙七片是否还可以通过其他信号转导途径的多靶点促进或抑制来治疗RA还不清楚,还需要继续的深入研究。

(本文图1见插图9-1)

参考文献

- [1] MCINNES IB, SCHEFF G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10086): 2328-2337.
- [2] BURMESTER GR, POPE JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10086):2338-2348.
- [3] MARSHAK-ROTHSTEIN A, RIFKIN IR. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25 (25):419-441.
- [4] 雷升萍,王靓,龙子江,等.黄精多糖通过TLR4-MyD88-NF- κ B通路抑制缺氧/复氧H9c2心肌细胞炎性因子释放[J].*中国药理学通报*, 2017, 33(2):255-260.
- [5] 郝健,许丽萍,吕铁钢.制大黄-川芎药对通过TLR4/Myd88/NF- κ B信号对造影剂诱导大鼠肾小管上皮细胞凋亡及肾组织炎症因子IL-6、IL-1 β 的影响[J].*中国老年学杂志*, 2018, 38 (23):5772-5775.
- [6] 姜萍,马洪美,蒋雪梅,等.类风湿关节炎中医证型与肌骨超声改变的关系[J].*中国中西医结合杂志*, 2018, 38(6): 658-661.
- [7] 李军锋,王晓峰,卫志刚.盘龙七片治疗膝骨关节炎的临床观察[J].*中国中医骨伤科杂志*, 2015, 23(8):65-67.
- [8] HONG H, ZENG Y, JIAN W, et al. CDK7 inhibition suppresses rheumatoid arthritis inflammation via blockage of NF- κ B activa-

- tion and IL-1 β /IL-6 secretion[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(2): 1292-1301.
- [9] XU Y, HONG S, ZHAO X, et al. Acupuncture alleviates rheumatoid arthritis by immune-network modulation[J]. Am J Chin Med, 2018, 46(5):997-1019.
- [10] ZHANG H, XIAO W. TNFR1 and TNFR2 differentially mediate TNF- α -induced inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. Cell Biol Int, 2017, 41 (4) : 415-422.
- [11] 郑世超, 严小英, 陈菊, 等. 基于蛋白互作网络分析祛风湿药川乌的抗炎机制[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9):1747-1751.
- [12] 罗强, 吉海旺, 曹小菊, 等. 盘龙七片治疗寒湿阻络型类风湿性关节炎43例[J]. 陕西中医, 2007, 28(10):1341-1343.
- [13] 李巧玉, 刘杨, 包华音. 近5年丹参化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16(2):145-146.
- [14] 那莎, 段陈方圆, 王璐, 等. 牛膝总皂苷对大鼠急性痛风性关节炎的防治作用及机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(9):966-971.
- [15] 聂安政, 林志健, 王雨, 等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(3):597-608.
- [16] YAO RB, ZHAO ZM, ZHAO LJ, et al. Sinomenine inhibits the inflammatory responses of human fibroblast-like synoviocytes via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in rheumatoid arthritis [J]. Pharmazie, 2017, 72(6):355-360.
- [17] 吴燕燕, 王易. Toll样受体信号通路中MyD88的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(3):262-265.
- [18] 袁娟, 胡玲, 宋小鸽, 等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织Toll样受体4-骨髓样分化因子88-核转录因子- κ B信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2015, 40(3):199-204.
- [19] KIM SH, BANG J, SON CN, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates murine autoimmune arthritis through regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Korean J Intern Med, 2018, 33(3):612-621.
- (收稿日期:2019-08-23, 修回日期:2019-10-23)

引用本文:卿海辉, 张小舟, 胡敏. 蒲公英提取物调控程序化死亡基因5对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的影响及其机制研究[J]. 安徽医药, 2021, 25(9): 1717-1722. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.005.

◇ 药学研究 ◇



蒲公英提取物调控程序化死亡基因5对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的影响及其机制研究

卿海辉, 张小舟, 胡敏

作者单位: 武汉科技大学附属孝感医院骨科三病区, 湖北 孝感 432000

摘要: **目的** 探究蒲公英提取物通过调控程序化死亡基因5(PDCD5)的表达对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。**方法** 选取2018年1月至2019年6月武汉科技大学附属孝感医院获得接受关节置换的5例骨关节炎病人骨组织, 从中分离、培养骨关节炎软骨细胞, 蒲公英提取物高、中、低剂量组处理软骨细胞, MTT法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 蛋白质印迹法检测细胞中细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(P21)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X(Bax)和PDCD5蛋白表达水平, 实时荧光定量PCR检测细胞PDCD5 mRNA表达水平; 过表达或者沉默PDCD5基因, 检测其对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡的影响。**结果** 与对照组相比, 蒲公英提取物2.5 g/L、5.0 g/L、10.0 g/L组软骨细胞活性升高[48 h: (0.68 \pm 0.05)、(0.83 \pm 0.06)、(1.06 \pm 0.06)比(0.56 \pm 0.03); 72 h: (0.97 \pm 0.07)、(1.42 \pm 0.07)、(1.89 \pm 0.07)比(0.79 \pm 0.05)], 细胞凋亡率降低[(19.40 \pm 1.10)%、(12.31 \pm 0.59)%、(7.68 \pm 0.54)%比(22.10 \pm 1.20)%]; P21、Bax表达水平降低, cyclin D1、Bcl-2表达水平升高, PDCD5 mRNA和蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。与si-NC组比较, si-PDCD5组软骨细胞活性升高[48 h: (0.86 \pm 0.05)比(0.56 \pm 0.03); 72 h: (1.33 \pm 0.07)比(0.79 \pm 0.05)], 细胞凋亡率降低[(14.23 \pm 1.02)%比(21.98 \pm 1.12)%]; P21、Bax表达水平降低, cyclin D1、Bcl-2表达水平升高($P < 0.05$)。与蒲公英提取物5 g/L+pcDNA3.1组比较, 蒲公英提取物5 g/L+pcDNA-PDCD5组软骨细胞活性降低[48 h: (0.70 \pm 0.05)比(0.86 \pm 0.06); 72 h: (1.15 \pm 0.07)比(1.51 \pm 0.07)], 细胞凋亡率升高[(16.88 \pm 1.02)%比(9.56 \pm 0.63)%]; P21、Bax表达水平升高, cyclin D1、Bcl-2表达水平降低($P < 0.05$)。**结论** 蒲公英提取物可促进软骨细胞的增殖, 抑制其凋亡, 其可能通过调控PDCD5基因的表达发挥对骨关节炎软骨细胞的增殖促进、凋亡抑制作用。

关键词: 蒲公英; 程序化死亡基因5; 骨关节炎; 软骨细胞; 增殖; 凋亡

Effect of dandelion extract on proliferation and apoptosis of chondrocyte in osteoarthritis by regulation of PDCD5 and its mechanism

QING Haihui, ZHANG Xiaozhou, HU Min

Author Affiliation: Department of Orthopaedics Ward Three, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan, Hubei 432000, China