

苗药黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类部位对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞MH7A增殖及炎症因子分泌的影响[△]

王霞^{1,2*}, 杨健^{2,3}, 宋菲^{1,2}, 董莉², 刘亭³, 郑林³, 马雪¹, 李勇军^{1#}(1.贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550004; 2.贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3.贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3949-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.17

摘要 目的:研究苗药黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类部位(CADF)对肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导的人类风湿性关节炎(RA)成纤维样滑膜细胞MH7A增殖及炎症因子分泌的影响,探讨CADF抗RA的作用机制。方法:将MH7A细胞分为空白组、TNF- α 模型组、甲氨蝶呤组(阳性对照,20 mg/L)和CADF不同质量浓度组(50、100、200、400 mg/L),除空白组外,其余各组均以50 μ g/L TNF- α 刺激活化MH7A细胞。以TNF- α 与相应药物的混合液共同作用24 h后,检测细胞的增殖情况和培养液中一氧化氮(NO)、前列腺素E₂(PGE₂)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)的含量。结果:与空白组比较,TNF- α 模型组细胞增殖活性显著增强($P < 0.01$),培养液中NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6含量显著增加($P < 0.01$);与TNF- α 模型组比较,各给药组细胞的增殖均受到显著抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),培养液中NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6含量均显著减少($P < 0.01$),且与CADF具有一定的量效关系。结论:CADF可通过抑制TNF- α 诱导的MH7A细胞增殖,减少炎症因子NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6的分泌,从而发挥其抗RA的作用。

关键词 苗药;黑骨藤;咖啡酰基奎宁酸类部位;人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞MH7A;炎症因子

Effects of Caffeoylquinic Acid Derivative Fractions in Miao Medicine *Periploca forrestii* on Proliferation and Secretion of Inflammatory Cytokines in Human Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes MH7A

WANG Xia^{1,2}, YANG Jian^{2,3}, SONG Fei^{1,2}, DONG Li², LIU Ting³, ZHENG Lin³, MA Xue¹, LI Yongjun¹(1.Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education/National Engineering Research Center of Miao Medicines, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2.School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3.Guizhou Provincial Key Laboratory of Preparations, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of caffeoylquinic acid derivative fractions (CADF) in Miao medicine *Periploca forrestii* on proliferation and secretion of inflammatory cytokines in tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced human rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes MH7A, and explore its mechanism on anti-RA. **METHODS:** MH7A cells were divided into blank group, TNF- α model group, methotrexate group (positive control, 20 mg/L) and CADF different mass concentrations groups (50, 100, 200, 400 mg/L). Except for blank group, other groups received 50 μ g/L of TNF- α to stimulate MH7A cells. After treated by suspension with TNF- α and related medicines for 24 h, the cell proliferation and contents of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) in culture medium were detected. **RESULTS:** Compared with blank group, cell proliferation activity in TNF- α model group was significantly enhanced ($P < 0.01$), contents of NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6 in culture medium were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with TNF- α model group, cell proliferation in each administration group were significantly inhibited ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), contents of NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6 in culture medium were significantly decreased ($P < 0.01$), showing certain dose-effect relationship with CADF. **CONCLUSIONS:** CADF can play the role in anti-RA by inhibiting the TNF- α -induced proliferation of MH7A cells and reducing the secretion of inflammatory cytokines NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6.

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460641、81660691);贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目(No.黔科合人字[2015]11号);贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2016]5677、黔科合平台人才[2016]5613);贵州省协同创新中心建设项目(No.黔教合协同创新字[2013]04);贵州省研究生卓越人才计划项目(No.ZYRC2014012)

* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质与质量控制。电话:0851-86908468。E-mail:948015901@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,硕士。研究方向:中药药效物质与质量控制。电话:0851-86908468。E-mail:liyongjun026@126.com

黑骨藤为萝藦科杠柳属植物黑龙骨(*Periploca forrestii* Schltr.)的干燥根或全株,有通经、活血和祛风等功效,用于风湿关节痛、跌打损伤等症的治疗,被收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003年版)中,是贵州省苗族常用药材之一^[1]。临床应用结果也显示,黑骨藤及其复方制剂对风湿病和类风湿病有较好的疗效^[2]。本课题组前期的研究发现,黑骨藤水溶性部位为抗类风湿性关节炎(RA)的活性部位。对黑骨藤70%乙醇提取物用大孔树脂富集,80%乙醇洗脱并进行成分分析后发现,80%乙醇洗脱部位主要含有咖啡酰基奎宁酸类成分[将该部位记为咖啡酰基奎宁酸类部位(CADF)]^[3]。据文献报道,咖啡酰基奎宁酸类成分具有抗氧化、抗炎等作用^[4]。为探讨其抗RA活性,本研究在前期研究基础上,以黑骨藤中CADF为研究对象,考察其对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞MH7A的增殖及炎症因子分泌的影响,在细胞水平上探讨CADF抗RA的作用及机制,为黑骨藤的进一步开发应用提供研究基础。

1 材料

1.1 仪器

UV-2401 PC 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);TS100 倒置显微镜(日本Nikon公司);Fresco17 冷冻离心机(美国 Thermo 公司);680 酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

黑骨藤药材购自贵阳市万东中药材市场,经贵州医科大学药用植物学与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为真品;注射用甲氨蝶呤(MTX,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:16031416,规格:0.1 g/瓶);重组人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)蛋白(美国派普泰克公司,批号:300-01A);3-*O*-咖啡酰基奎宁酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:RO5F6F1,纯度: $\geq 98\%$);一氧化氮(NO)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:S0021-3);前列腺素 E_2 (PGE $_2$,批号:20161021)、白细胞介素 1β (IL- 1β ,批号:20161028)、白细胞介素6(IL-6,批号:20161027)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞

人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞MH7A购自广州吉尼欧生物有限公司(细胞来源于日本RIKEN研究所生物资源中心)。

2 方法

2.1 CADF的制备

取干燥黑骨藤药材粗粉15 kg,用70%乙醇回流提取3次,每次1.5 h,回收乙醇,干燥后得到70%乙醇提取物浸膏1 920.5 g。用水将浸膏溶解后用D101大孔树脂吸附,然后依次用水、80%乙醇洗脱,收集80%乙醇洗脱部位,回收乙醇,干燥得80%乙醇组分641.7 g,将该部

位记为CADF。以3-*O*-咖啡酰基奎宁酸为对照品,采用紫外-可见光分光光度法对CADF中总咖啡酰基奎宁酸酯类化合物进行含量测定,含量为61.5%。将CADF用二甲基亚砜(DMSO)制备成100 g/L的母液,于-20℃条件下保存,备用。临用前用培养液稀释至所需浓度。

2.2 细胞培养

将细胞培养于含有10%胎牛血清、100 mg/L链霉素和 1×10^5 u/L青霉素的DMEM高糖培养液中,于37℃、5%CO $_2$ 培养箱中培养。细胞隔天换液,每3~4天进行1次传代,选取5~10代生长良好的细胞进行后续试验。

2.3 细胞增殖抑制试验

采用MTS法测定细胞增殖活性。选取对数生长期细胞,用0.25%胰蛋白酶消化后,以含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液制成细胞密度为 1×10^5 mL $^{-1}$ 的单细胞悬液,接种于96孔板中,每孔100 μ L。将培养板置于37℃、5%CO $_2$ 培养箱中培养24 h,弃原培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞,将试验分为空白组(空白DMEM高糖培养液)、TNF- α 模型组(加入终质量浓度为50 μ g/L的TNF- α 溶液)、MTX组(阳性对照,加入终质量浓度为20 mg/L MTX与50 μ g/L TNF- α 的混合液)及CADF不同质量浓度组(加入终质量浓度为50、100、200、400 mg/L CADF与50 μ g/L TNF- α 的混合液),每孔100 μ L,每个质量浓度设置5个复孔。培养24 h后,弃培养液,加入新鲜培养液;每孔加入5 μ L的MTS,继续培养4 h后,于酶标仪490 nm波长处测定各孔的吸光度(A)。计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率(%)=(TNF- α 模型组 A 值-药物组 A 值)/TNF- α 模型组 A 值 $\times 100\%$ 。试验重复3次。

2.4 CADF对TNF- α 诱导的MH7A细胞释放NO的影响

取对数生长期细胞,按“2.3”项下方法分组、给药,每个质量浓度平行设置3个复孔。培养24 h后,分别吸取培养液上清50 μ L于酶标板中,先加入格里斯试剂I(Griess I)50 μ L,然后再加入Griess II 50 μ L,混匀后于酶标仪540 nm波长处测定 A 值,按照NO试剂盒说明书操作,测定培养液中NO的含量。试验重复3次。

2.5 CADF对TNF- α 诱导的MH7A细胞释放PGE $_2$ 、IL- 1β 、IL-6的影响

取对数生长期细胞,按“2.3”项下方法分组、给药,每个质量浓度平行设置3个复孔。培养24 h后,分别吸取培养液上清,按照相应的试剂盒说明书操作,测定培养液中PGE $_2$ 、IL- 1β 、IL-6的含量。试验重复3次。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率测定结果

与空白组比较, TNF- α 模型组细胞明显增殖($P < 0.01$)。与TNF- α 模型组比较, 各给药组细胞的增殖均受到明显抑制($P < 0.05$); 且CADF对细胞增殖的抑制作用具有浓度依赖性, 当CADF质量浓度为400 mg/L时, 其对细胞的增殖抑制率达30.8%, 结果见表1。

表1 各组细胞增殖抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Determination results of cell proliferation inhibitory rate in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

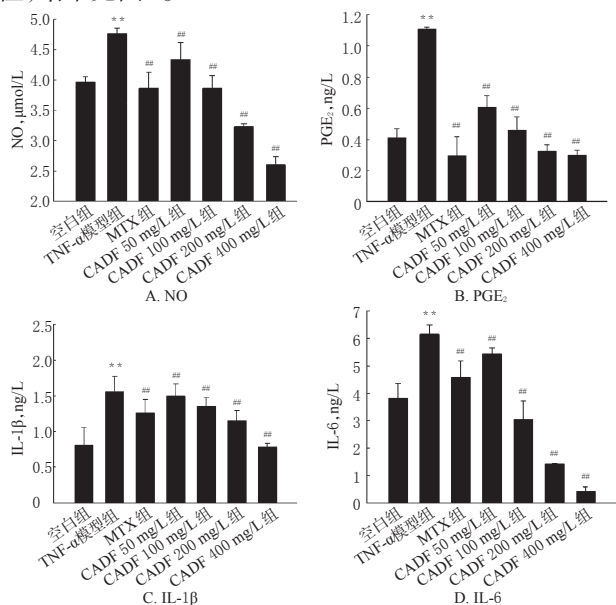
组别	A值	增殖抑制率, %
空白组	0.652 \pm 0.029	
TNF- α 模型组	0.734 \pm 0.028**	
MTX组	0.613 \pm 0.013 ^{##}	16.4
CADF 50 mg/L组	0.673 \pm 0.022 [#]	8.3
CADF 100 mg/L组	0.613 \pm 0.012 ^{##}	16.5
CADF 200 mg/L组	0.598 \pm 0.013 ^{##}	18.5
CADF 400 mg/L组	0.508 \pm 0.017 ^{##}	30.8

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与TNF- α 模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$; vs. TNF- α model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.2 培养液中NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6含量的测定结果

与空白组比较, TNF- α 模型组细胞培养液中NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6含量均显著增加($P < 0.01$); 与TNF- α 模型组比较, 各给药组细胞培养液中NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6含量均显著减少($P < 0.01$), 并呈现较好的浓度依赖性, 结果见图1。



注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与TNF- α 模型组比较, ^{##} $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$; vs. TNF- α model group, ^{##} $P < 0.01$

图1 各组细胞培养液中NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 1 Determination results of NO, PGE₂, IL-1 β and IL-6 contents in culture medium in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

RA是一种常见的慢性全身性自身免疫性疾病^[5]。

RA的病理特点就是滑膜长期的慢性炎症, 并逐渐增生形成血管翳, 造成骨与软骨的破坏, 晚期还可导致关节强直、畸形甚至残疾^[6-7]。滑膜增生是RA病理过程中的一个重要特征, 其侵蚀骨与软骨后直接导致关节功能障碍, 特点是产生肿瘤样增殖。故有研究认为, 抗滑膜细胞增殖可能是一种有效治疗RA的手段^[8]。

原代RA滑膜细胞RAFLSs来源有限, 受代数限制, 用于科研有一定困难。MH7A细胞属于RAFLSs的一种成熟细胞系, 该细胞具有增殖速度快、可多次传代、贴近病患体内状态等特点^[9-10]。因此, 本研究选择MH7A细胞作为RA研究的细胞模型。在前期预试验中, 本课题组考察了6.25、12.5、25、50、100、200、400、800、1 000 mg/L的CADF对MH7A细胞增殖的影响。结果, 当CADF质量浓度低于50 mg/L时, 其对MH7A细胞增殖无明显影响; 当CADF质量浓度高于400 mg/L时, 其对MH7A细胞增殖有非常明显的抑制作用; 当CADF质量浓度在50~400 mg/L时, 对细胞增殖的抑制具有浓度依赖性。故在本研究中设置50、100、200、400 mg/L这4个药物浓度进行考察。

TNF- α 是RA中重要的细胞因子之一, 可使细胞产生肿瘤样增殖, 并产生大量的炎症因子^[11]。IL-1 β 是促使RA免疫应答放大, 并转为破坏反应的主要细胞因子。IL-6是一种重要的炎症细胞因子, 与RA的发展有关。NO是炎症反应与免疫调节的效应因子, 在炎症级联反应中起着关键的调节作用; 其还能促进PGE₂、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的释放, 当产生过量炎症因子时则会导致一系列的炎性损伤。其中, PGE₂作为第三信使, 是炎症反应的重要介质, 炎症的发生发展与局部PGE₂的含量密切相关^[12]。本研究结果显示, 50 μ g/L的TNF- α 可明显诱导MH7A细胞增殖, 促进细胞分泌细胞因子NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6。50~400 mg/L的CADF对细胞增殖和炎症细胞因子的分泌均有明显的抑制作用, 且具有浓度依赖性。

综上所述, CADF可呈浓度依赖性地抑制MH7A细胞的增殖, 抑制细胞因子NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6的分泌, 这可能是其抗RA的作用机制之一, 但其更多的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准: 2003年版[S]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 381.
- [2] 廖作庄, 杨风莲, 王俊莉. 黑骨藤药理作用研究进展[J]. 右江医学, 2014, 42(3): 361-363.
- [3] 赵珊, 张宝, 熊丹丹, 等. 苗药黑骨藤的化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1513-1518.
- [4] 柯细彤, 章瑜芳, 朱兆云, 等. 灯盏细辛中咖啡酰奎宁酸防治缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(3): 609-615.
- [5] Han BK, Sang WL, Mun CH, et al. O-linked N-acetylglu-

回药核心方油溶液对离体大鼠胸主动脉血管环的舒张作用及机制研究[△]

张鹏^{1*}, 郝银菊², 任俊², 韩亮娟², 余建强², 张万年², 周茹^{2,3,4,5#} (1.宁夏医科大学总医院药剂科, 银川 750004; 2.宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 3.宁夏回药现代化工程技术研究中心, 银川 750004; 4.宁夏回医药协同创新中心, 银川 750004; 5.宁夏医科大学回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 银川 750004)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3952-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.18

摘要 目的:研究回药核心方油溶液对离体大鼠胸主动脉血管环的舒张作用及机制,为其用于心血管疾病的治疗提供参考。方法:取出大鼠胸主动脉血管环后浸泡于克氏营养液(K-H)中,以 1×10^{-6} mol/L去甲肾上腺素(PE)或60 mmol/L氯化钾(KCl)致血管环收缩,采用生物信号采集分析系统测定0.020 4、0.040 8、0.061 2、0.081 6、0.102 0 mg/mL核心方油溶液对血管环的舒张作用,计算舒张率;分别以0.1 mmol/L一氧化氮合酶抑制剂左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)、环氧合酶抑制剂吲哚美辛(INDO)、钾离子通道阻滞剂格列本脲(Gli)孵育血管环20 min后,测定上述5种质量浓度核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用,计算舒张率;试验均以K-H溶液为空白对照。结果:与空白对照比较,0.020 4~0.102 0 mg/mL核心方油溶液对PE、KCl预收缩血管环均有明显的舒张作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且具有浓度依赖性。INDO预处理后可减弱核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用,舒张率较空白对照组差异无统计学意义($P > 0.05$);而Gli、L-NAME预处理不影响核心方油溶液对PE预收缩血管环的舒张作用,舒张率较空白对照组仍明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:核心方油溶液可呈浓度依赖性地舒张PE、KCl预收缩的胸主动脉血管环,其作用机制可能与激活环氧合酶途径有关。

关键词 回药;核心方油溶液;离体胸主动脉血管环;血管舒张;环氧合酶抑制剂;钾离子通道阻滞剂;一氧化氮合酶抑制剂

Study on the Diastolic Effect and Mechanism of Hui Medicine Hexin Oil Solution on Isolated Thoracic Aortic Vascular Rings of Rats

ZHANG Peng¹, HAO Yinju², REN Jun², HAN Liangjuan², YU Jianqiang², ZHANG Wannian², ZHOU Ru^{2,3,4,5} (1. Dept. of Pharmacy, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Ningxia Modernization Engineering Technology Research Center for Hui Medicine, Yinchuan 750004, China; 4. Ningxia Collaborative Innovation Center for Hui Medicine, Yinchuan 750004, China; 5. Modernization Key Laboratory for Hui Medicine Co-founded by Ningxia Province and Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

cosamine glycosylation of p65 aggravated the inflammation in both fibroblast-like synoviocytes stimulated by tumor necrosis factor- α and mice with collagen induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 1-8.

[6] 汪永忠, 邓龙飞, 韩燕全, 等. 成纤维样滑膜细胞原代培养及其在类风湿关节炎治疗机制研究中的应用进展[J]. 中国药房, 2016, 27(7): 966-969.

[7] Jia Q, Cheng W, Yue Y, et al. Cucurbitacin E inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokine production in human synoviocyte MH7A cells via suppression of PI3K/Akt/NF- κ B pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 884-890.

[△] 基金项目: 国家科技支撑计划课题(No.2013BAI11B07); 宁夏回族自治区科技攻关计划项目(No.2012); 大学生创新/创业计划项目(No.201510752008)

* 副主任药师。研究方向: 临床药学。电话: 0951-6743353。E-mail: 13895182622@163.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 心脑血管药理学。电话: 0951-6980192。E-mail: zhour-ru926@163.com

[8] Zuo J, Xia Y, Li X, et al. Selective modulation of MAPKs contribute to the anti-proliferative and anti-inflammatory activities of 1, 7-dihydroxy-3, 4-dimethoxyxanthone in rheumatoid arthritis-derived fibroblast-like synoviocyte MH7A cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, doi: 10.1016/j.jep.

[9] 贾庆运, 葫芦素E通过PI3K/Akt/NF- κ B信号通路抑制TNF- α 诱导的MH7A细胞炎症因子的分泌[D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.

[10] 蔡文虹, 孙保东, 张宝凤, 等. 原代类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞及成熟细胞系生长特性的比较[J]. 中国当代医药, 2012, 19(20): 8-9.

[11] 林云斌. 昆母汤对RA滑膜成纤维细胞增殖及细胞因子表达的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.

[12] 王斌, 侯建平, 李敏, 等. 虎杖提取物对急性痛风性关节炎大鼠血清中PEG₂水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 9(1): 152-153.

(收稿日期: 2017-03-04 修回日期: 2017-07-14)

(编辑: 林静)