

# 风湿宁胶囊对活性氧介导的 T 细胞活化和滑膜凋亡的影响

马艳苗<sup>1,2</sup> 李艳彦<sup>2</sup> 王永辉<sup>2</sup> 闫润红<sup>2</sup> 陈文超<sup>2</sup> 周 然<sup>2</sup>

**摘要 目的** 研究细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠 T 细胞活化和滑膜细胞凋亡的影响,探讨风湿宁胶囊(FSN)在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)治疗中的作用机制。**方法** 将 60 只大鼠随机分为正常对照组, CIA 模型组, 雷公藤多苷片组, FSN 低、中、高剂量组[剂量分别为 0.33、0.66、1.32 g/(kg·d)], 每组 10 只。采用流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群水平, ELISA 法检测干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)含量,紫外分光光度法检测羟自由基水平, Western blot 法检测滑膜天冬氨酸特异的半胱氨酸酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase)-3、9 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, FSN 各给药组均可升高 ROS 水平( $P < 0.01$ ), FSN 中剂量组能够显著降低 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 水平( $P < 0.01$ ), FSN 各组的 IFN- $\gamma$  含量明显降低( $P < 0.01$ ), FSN 高剂量组的 IL-4 含量明显升高( $P < 0.01$ )。同时, FSN 各给药组的 Caspase-9、Caspase-3 表达亦显著上升, 与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 且 FSN 低、中剂量组 Caspase-9 蛋白平均灰度值显著高于雷公藤多苷组( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论** FSN 调节 CIA 大鼠免疫功能亢进及抑制滑膜细胞增殖的机制可能与上调体内 ROS 水平有关。

**关键词** 风湿宁胶囊; 类风湿关节炎; 活性氧; 免疫亢进; 凋亡

Effect of Fengshining Capsule on Reactive Oxygen Species-mediated T Cell Activation and Apoptosis of Synovium MA Yan-miao<sup>1,2</sup>, LI Yan-yan<sup>2</sup>, WANG Yong-hui<sup>2</sup>, YAN Run-hong<sup>2</sup>, CHEN Wen-chao<sup>2</sup>, and ZHOU Ran<sup>2</sup> 1 Department of Postgraduate, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430065), China; 2 Department of Prescription, Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan (030024), China

**ABSTRACT Objective** To study the effect of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels on T cell activation and apoptosis of synovial cells in collagen induced arthritis (CIA) rats, and to explore the mechanism of Fengshining Capsule (FSN) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Sixty rats were randomly divided into the normal control group, the CIA model group, the Tripterygium Poly-glycoside Tablet (TPT) group, the low dose FSN group (at the daily dose of 0.33 g/kg), the middle dose FSN group (at the daily dose of 0.66 g/kg), and the high dose FSN group (at the daily dose of 1.32 g/kg), 10 in each group. T lymphocyte subsets were detected by flow cytometry. The content of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-4 (IL-4) in plasma of rats were detected by ELISA. Its expression of hydroxyl radicals was detected by ultraviolet spectrophotometry. Caspase-3 and Caspase-9 protein expressions were measured by Western blot. **Results** Compared with the CIA model group, the levels of ROS were elevated in each dose FSN group ( $P < 0.01$ ). The level of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was significantly reduced in the middle dose FSN group ( $P < 0.01$ ). The content of IFN- $\gamma$  was obviously lowered in each dose FSN group ( $P < 0.01$ ), while that of IL-4 was obviously elevated in the high dose FSN group ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, the expression of Caspase-9 and Caspase-3 significantly increased in each dose FSN group ( $P < 0.05$ ). Besides, the average gray scale of Caspase-9 was significantly higher in the low and middle FSN

基金项目: 国家科技重大专项(重大新药创制项目) - 风湿宁胶囊治疗痹症的临床前研究资助项目(No. 2010ZX09102-210)

作者单位: 1. 湖北中医药大学研究生处(武汉 430065); 2. 山西中医学院方剂教研室(太原 030024)

通讯作者: 周 然, Tel: 0351-2272276, E-mail: zhour58@sohu.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.11.1552

groups than in the TPT group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Conclusion The mechanism of FSN for regulating the immune hyperfunction and inhibiting the proliferation of synovial cells in CIA rats might be associated with up-regulating *in vivo* ROS levels.

**KEYWORDS** Fengshining Capsule; rheumatoid arthritis; reactive oxygen species; immune hyperfunction; apoptosis

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种 T 淋巴细胞介导的, 以多个关节慢性炎症和关节软骨损伤为主要特征的系统性自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>, 其病理特征为关节滑膜的淋巴细胞浸润及活化, 最终导致滑膜异常增殖、血管翳形成、软骨和骨的破坏。RA 的发病机制非常复杂, 至今尚未完全阐明, 目前最受重视的是 T 淋巴细胞活化与滑膜细胞凋亡受阻学说。近年来研究发现, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 与 RA 关系密切<sup>[2]</sup>。在许多组织中, ROS 引发的氧化应激破坏线粒体呼吸链, 损伤线粒体并导致细胞衰老和死亡<sup>[3]</sup>。而对于 RA 类肿瘤样增生的滑膜组织而言, 诱导 ROS 表达或生物活性的发挥, 能够上调促凋亡蛋白的表达, 促进线粒体通透性转运孔的开放, 激活 Caspase, 诱导过度增殖的滑膜细胞走向凋亡, 这无疑将成为遏制 RA 病情发展的一个重要环节, 有利于 RA 的防治<sup>[4,5]</sup>。风湿宁胶囊 (FSN) 为使用已有十余年的临床经验方, 临床观察显示, 其能显著减轻 RA 的主要症状和体征积分, 降低红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 水平, 且无明显的不良反应<sup>[6]</sup>。前期的实验研究也表明<sup>[7,8]</sup>, FSN 具有良好的抗炎与镇痛作用, 可通过抑制滑膜细胞 Bcl-2 蛋白表达, 促进 Cytochrome C 释放入胞浆来诱导胶原诱导性关节炎 (collagen induced arthritis, CIA) 大鼠滑膜细胞凋亡。本研究将进一步从 T 淋巴细胞亚群、Th1、Th2 及滑膜细胞凋亡过程中细胞内 ROS 水平的变化角度入手, 探讨风湿宁胶囊治疗 RA 的作用机制。

## 材料与方 法

**1 动物** SD 大鼠 60 只, 雄性, 体质量 (180 ± 20)g, 许可证号: SCXK-(军)2007-004, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

**2 药品、试剂与仪器** 药品: 风湿宁胶囊 (由山西仁源堂药业有限公司提供, 生产批号: 20110329, 规格: 0.4 g/粒); 雷公藤多苷片 (上海复旦复华药业有限公司, 生产批号: Z31020415, 规格: 10 mg/片)。试剂: Freund's 完全佐剂 (批号: F5881), 美国 Sigma

公司; 牛 II 型胶原 (批号: 100258), 美国 Chondrex 公司; FITC-anti-CD3 mAb (批号: 72026)、PERCP-anti-CD8amAb (批号: 03676)、PE-anti-CD4 mAb (批号: 80268), 美国 BD 公司; 羟自由基测定试剂盒 (批号: 20120605), 南京凯基生物科技发展有限公司; Caspase-3 (批号: L1610)、Caspase-9 (批号: G2711) 多克隆抗体, 美国 Santacruz 公司; 红细胞裂解液 (批号: 110512)、IFN- $\gamma$  (批号: E-30652)、IL-4 ELISA R&D 进口分装试剂盒 (批号: E-30645), 均购自上海生工生物工程有限公司。仪器: FACSCalibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; SPECTRA max190 型全波长酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Cary 50 型紫外可见分光光度计, 美国 Varian 公司; JY300C 型电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; DYY-III 型电泳槽, 北京六一仪器厂; GDS-8000 型凝胶成像分析仪, 美国 UVP 公司。

**3 分组、造模及给药** 60 只 SD 大鼠随机分为 6 组: 正常对照组, CIA 模型组 (模型组), 雷公藤多苷片组 [0.03 g/(kg·d)], FSN 低、中、高剂量组 [剂量分别为 0.33、0.66、1.32 g/(kg·d)]。将 II 型胶原醋酸溶液 4 °C 过夜后, 按 1:1 的比例加至 Freund's 完全佐剂中, 充分乳化。于模型组、雷公藤多苷片组、FSN 各剂量组大鼠右后足跖、背部、尾根 3 点各注射乳化剂 0.1 mL, 正常对照组大鼠于相同部位 3 点各注射 0.9% 氯化钠溶液 0.1 mL。7 天后所有造模大鼠以 0.1 mL 乳化剂加强免疫 1 次<sup>[9]</sup>, 造模成功率为 95%, 并开始灌胃给药, 正常对照组和模型组给予蒸馏水, 其余各组给予相应的药物, 连续 4 周。

## 4 观察指标及方法

**4.1 流式细胞术检测** CIA 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 大鼠末次给药 24 h 后, 水合氯醛麻醉, 真空采血管腹主动脉取抗凝血 80  $\mu$ L, 加入测定管后, 依次加入 2  $\mu$ L FITC-CD3、5  $\mu$ L PE-CD4、5  $\mu$ L PerCP-CD8 抗体, 漩涡混匀, 室温孵育 20 min, 加入红细胞裂解液 3 mL, 振荡混匀, 室温孵育 10 min, 再加入 PBS 反复洗涤 3 次,  $1 \times 10^3$  r/min 离心 4 min, 倒去上清液, 将细胞悬浮于 150  $\mu$ L PBS 液中, 振荡混匀后进行 FACS 检测。

4.2 ELISA 法检测血清 IFN- $\gamma$ 、IL-4 表达 大鼠灌胃给药 4 周后取血,离心,按照 ELISA 试剂盒检测说明书测定血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 含量。

4.3 紫外分光光度法检测 CIA 大鼠滑膜羟自由基表达 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量和 Fenton 反应产生的 OH<sup>-</sup> 量成正比,当给予电子受体后,通过 gress 试剂显色,生成红色物质,其呈色程度与 OH<sup>-</sup> 的多少成正比。Fenton 反应体系包括 0.2 mL 的底物工作液,0.2 mL 的样本,0.4 mL 的试剂 C 工作液,混匀,37 °C 反应 1 min 后,立即加入 gress 试剂终止反应。其余各管不加样本,标准管另加 0.2 mL 的 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准工作液,标准空白管不加标准工作液。测定 550 nm 处的吸光度值。

4.4 Western blot 检测 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达 在 50 mg 滑膜组织中加入蛋白裂解液超声匀浆,离心后取上清液,加入等体积的 2 × SDS buffer,收集上清,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。每一泳道依次加样,SDS-PAGE 电泳分离后,电转印至 PVDF 膜上,5% BSA 溶液封闭过夜。分别加入 Caspase-3、Caspase-9 一抗(1:1 000),以  $\beta$ -actin (1:1 000) 作为内参,4 °C 过夜,洗膜,再以 1:1 000 稀释的二抗室温孵育 2 h, ECL 底物化学发光显色,X 胶片曝光、显影、定影,凝胶图像分析系统观察,扫描胶片,分析目标条带的分子量和精光密度值。

5 统计学方法 用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 One-way ANOVA 检验,组间两两比较用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群表达比较(表 1) 与正常对照组比较,模型组大鼠的 CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著升高,CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数量明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ), CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞数量无明显变化( $P > 0.05$ )。与模型组比较,FSN 中剂量组及雷公藤多

苷组能显著降低 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $P < 0.01$ ),上调 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平( $P < 0.01$ )。

2 各组大鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平比较(表 2) 模型组大鼠 IFN- $\gamma$  水平较正常对照组显著上升( $P < 0.01$ ),IL-4 水平无明显变化( $P > 0.05$ )。与模型组比较,雷公藤多苷片组及 FSN 各剂量组的 IFN- $\gamma$  水平均明显降低( $P < 0.01$ ),IL-4 水平显著升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),其中以雷公藤多苷组、FSN 高剂量组升高最为明显( $P < 0.01$ )。

表 2 各组大鼠血浆 IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平及羟自由基表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IFN- $\gamma$ (ng/L)	IL-4 (ng/L)	羟自由基 (U/mgprot)
正常对照	10	428.61 ± 22.14	25.03 ± 1.72	18.63 ± 4.21
模型	10	492.43 ± 35.41*	24.34 ± 0.93	6.56 ± 2.31*
雷公藤多苷	10	445.35 ± 27.16 <sup>△△</sup>	26.93 ± 1.19 <sup>△△</sup>	30.35 ± 1.9 <sup>△△</sup>
FSN 低剂量	10	449.23 ± 19.12 <sup>△△</sup>	25.70 ± 1.36 <sup>△</sup>	23.15 ± 4.39 <sup>△△△</sup>
FSN 中剂量	10	445.67 ± 19.71 <sup>△△</sup>	26.00 ± 1.39 <sup>△</sup>	29.86 ± 4.41 <sup>△△</sup>
FSN 高剂量	10	448.56 ± 26.86 <sup>△△</sup>	26.36 ± 1.01 <sup>△△</sup>	28.87 ± 4.11 <sup>△△</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与雷公藤多苷组比较,<sup>△△</sup> $P < 0.05$

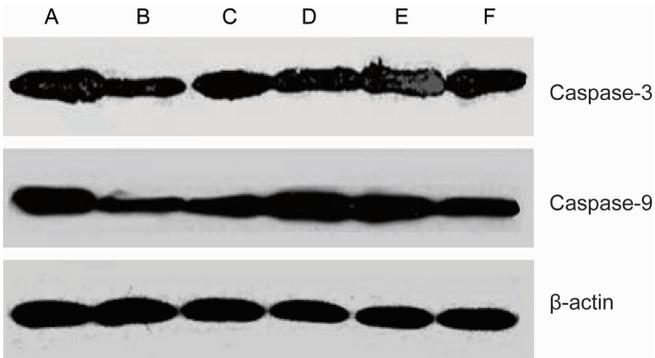
3 各组大鼠羟自由基表达比较(表 2) 模型组大鼠羟自由基的表达较正常对照组显著降低( $P < 0.01$ ),而在给予 FSN 治疗后,FSN 低、中、高剂量组羟自由基表达均呈现不同程度的上升,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。FSN 低剂量组低于雷公藤多苷片组( $P < 0.05$ )。

4 各组大鼠 Caspase-3 及 Caspase-9 表达比较(图 1、2) Western blot 结果显示,与正常对照组比较,CIA 模型组的 Caspase-3、Caspase-9 蛋白平均光密度值明显降低( $P < 0.05$ );雷公藤多苷片组及 FSN 各剂量组 Caspase-3、Caspase-9 蛋白平均灰度值均较模型组显著上调,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ );且 FSN 低、中剂量组 Caspase-9 蛋白平均灰度值显著高于雷公藤多苷组( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 1 各组大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

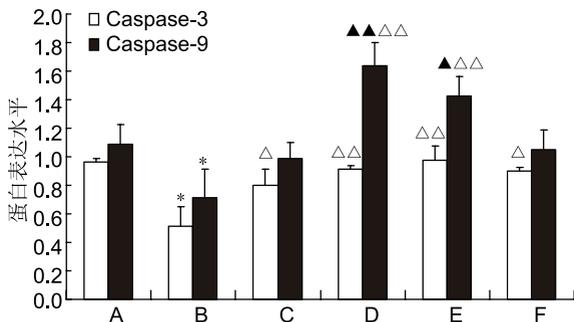
组别	n	CD3 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
正常对照	10	42.28 ± 3.15	47.37 ± 2.60	17.24 ± 2.13	2.84 ± 0.60
模型	10	40.48 ± 3.32	51.03 ± 2.12*	11.66 ± 0.64**	4.39 ± 0.33**
雷公藤多苷	10	42.06 ± 2.25	45.39 ± 2.00 <sup>△</sup>	16.43 ± 1.99 <sup>△△</sup>	2.78 ± 0.22 <sup>△△</sup>
FSN 低剂量	10	41.16 ± 3.11	50.41 ± 3.76	14.46 ± 1.28 <sup>△△</sup>	3.67 ± 0.89
FSN 中剂量	10	40.09 ± 3.15	46.07 ± 2.93 <sup>△</sup>	14.71 ± 2.72 <sup>△△</sup>	3.26 ± 0.62 <sup>△△</sup>
FSN 高剂量	10	43.57 ± 2.92	46.12 ± 2.69 <sup>△</sup>	13.27 ± 1.41	3.76 ± 0.78

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为雷公藤多苷组;D 为 FSN 低剂量组;E 为 FSN 中剂量组;F 为 FSN 高剂量组

图 1 各组大鼠滑膜组织 Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达的 Western 印迹条带



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为雷公藤多苷组;D 为 FSN 低剂量组;E 为 FSN 中剂量组;F 为 FSN 高剂量组;与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,△ $P < 0.05$ ,△△ $P < 0.01$ ;与雷公藤多苷片组比较,▲ $P < 0.05$ ,▲▲ $P < 0.01$

图 2 大鼠滑膜组织 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达比较

## 讨 论

RA 是一种由于滑膜组织炎症和增殖造成的慢性关节功能障碍,并引起骨骼和软骨破坏的自身免疫性疾病<sup>[10]</sup>,其中,T 细胞过度活化和滑膜细胞异常增殖在 RA 中起关键性作用<sup>[11,12]</sup>。本实验发现,FSN 能够纠正 CIA 大鼠  $CD4^+/CD8^+$  及 Th1/Th2 细胞失衡所致的机体免疫功能亢进状态,同时能够激活凋亡相关蛋白 Caspase-9、Caspase-3,诱导线粒体依赖性的滑膜细胞凋亡,而 FSN 促进 ROS 合成可能为其发挥治疗作用的机制之一。

ROS 是生物体内一类活性含氧化合物的总称,主要来源于线粒体,是有氧细胞的毒性副产物。在稳态平衡失调的情况下,体内自由基和 ROS 的产生与许多疾病的发生、发展密切相关,其中羟自由基的活性

最高且影响最大<sup>[13]</sup>。本实验观察到 FSN 各用药浓度均可升高 CIA 大鼠滑膜细胞的羟自由基水平,特别是 FSN 中、高剂量组滑膜细胞羟自由基的表达明显高于 CIA 模型组,大鼠体内羟自由基蓄积浓度升高,机体处于氧化应激状态。研究表明,机体的氧化还原状态可以影响机体免疫应答类型<sup>[14]</sup>:氧化应激能够促进 Th2 细胞的分化而抑制 Th1 细胞的分化。本实验结果也表明,FSN 各剂量组均可降低 CIA 大鼠升高的 Th1 型细胞因子  $INF-\gamma$  水平,其中以 FSN 中剂量组减少最为明显;与 CIA 模型组比较,FSN 各剂量组的 Th2 型细胞因子 IL-4 含量均有不同程度地升高,提示 FSN 在 RA 的治疗过程中发挥着类似  $INF-\gamma$  拮抗剂和 IL-4 激动剂的作用。除参与免疫应答中 Th 细胞的极化外,ROS 还直接或间接参与 T 淋巴细胞的活化。我们用流式细胞术检测到 CIA 大鼠外周血中有大量浸润的  $CD4^+$  T 淋巴细胞,其  $CD4^+/CD8^+$  较正常对照组显著升高,同时抑制性 T 淋巴细胞数量明显下降,提示机体免疫应答亢进,处于炎症状态。而给予 FSN 治疗后,能显著下调 CIA 大鼠辅助 T 淋巴细胞和  $CD4^+/CD8^+$  比值,升高抑制性 T 淋巴细胞水平,使 CIA 大鼠免疫系统恢复平衡,从而达到治疗目的。综合以上结果,说明 FSN 可以通过调节 T 淋巴细胞免疫功能,恢复细胞因子网络平衡来发挥对 RA 的治疗作用,而这与以往研究发现一致<sup>[15]</sup>。

除了对免疫功能产生影响外,FSN 还可通过增加 ROS 的释放来触发滑膜细胞凋亡的级联反应<sup>[5,16]</sup>。曾慧兰等<sup>[17]</sup>证实,ROS 中度升高则诱导细胞凋亡,而更高水平则直接导致细胞坏死。ROS 促进凋亡的机制可能是通过直接损伤线粒体膜导致线粒体膜通透性改变、释放细胞色素 C、激活 Caspase-9、Caspase-3,从而对整个凋亡过程起到正反馈的放大作用,使线粒体膜电位的下降进入不可逆过程,最终发生凋亡。本实验表明,FSN 低、中、高剂量组均能显著上调凋亡执行蛋白 Caspase-9、Caspase-3 的表达,诱导滑膜细胞凋亡,但从蛋白平均灰度值反应的情况来看,起始蛋白 Caspase-9 与效应蛋白 Caspase-3 的表达量之间并无显著性关系。

FSN 主要由羌活、独活、青风藤、防风、麻黄、生姜、川芎、血竭、元胡等组成,方中羌活与独活相伍,能祛一身之风寒湿邪,故用为君药。由于痹证日久入络,故又用通经入络、善治风疾的青风藤为臣药,祛风除湿,温通经络,助羌活搜风散寒祛湿、通络止痛。防风、麻黄、生姜发汗散湿使邪从汗解,川芎、血竭、元胡等活血行气、通络止痛,诸药合用,共奏祛风散寒,除湿通

络,活血止痛之功。本次实验结果表明,风湿宁胶囊具有抑制关节炎症及诱导过度增殖的滑膜细胞凋亡的作用,这可能与 FSN 复方中祛风湿药的非特异性抗炎、镇痛、调节免疫和活血化瘀药的改善微循环、抑制滑膜细胞增殖的药理基础有关。

RA 的发病机制可谓是一个千丝万缕的网络,其中免疫功能紊乱和滑膜细胞凋亡受阻之间很可能存在某种联系,而 ROS 可能是两者联系的一个节点。从本实验的结果来看,FSN 通过升高细胞内 ROS 水平,主要产生两方面的影响:一方面 ROS 产生过多时可促进 T 淋巴细胞亚群恢复平衡和调节免疫应答中 Th 细胞的极化;另一方面,高表达的 ROS 氧化攻击线粒体,引起线粒体肿胀,线粒体膜电位下降,最终导致 Caspase-9、Caspase-3 的激活,诱导滑膜细胞的凋亡,从而从平衡机体免疫功能及抑制滑膜过度增生两方面,防止 RA 的发生发展,有望为 RA 治疗提供新思路。

#### 参 考 文 献

- [1] Nakayama H, Yaguchi T, Yoshiya S, et al. Resveratrol induces apoptosis MH7A human rheumatoid arthritis synovial cells in a sirtuin-dependent manner [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32 (1): 151-157.
- [2] Cha HS, Bae EK, Ahn JK, et al. Slug suppression induces apoptosis via Puma transactivation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes treated with hydrogen peroxide [J]. *Exp Molec Med*, 2010, 42(6): 428-436.
- [3] 贺牡丹,王小平,陈同生.白介素-1 $\beta$  诱导关节软骨细胞凋亡的分子机理[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(1): 49-54.
- [4] Agnieszka S, Grzegorz M, Maria KM. Oxidative stress in erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32 (2): 331-334.
- [5] Massaoka MH, Matsuo AL, Figueiredo CR, et al.

Jacaranone induces apoptosis in melanoma cells via ROS-mediated down-regulation of akt and p38 MAPK activation and displays antitumor activity *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38698.

- [6] 赵建平,刘光珍,王裕颐.风湿宁胶囊治疗类风湿关节炎疗效观察[J]. *山西中医*, 1999, 15(6): 8-10.
- [7] 马艳苗,王永辉,李艳彦,等.风湿宁胶囊的主要药理学研究. *世界中西医结合杂志*, 2012, 7(9): 806-809.
- [8] 马艳苗,王永辉,李艳彦,等.风湿宁胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞超微结构及细胞凋亡相关基因表达的影响[J]. *中医杂志*, 2013, 54(4): 326-329.
- [9] 宋姗姗,张玲玲,魏伟.实验性关节炎动物模型建立及病理机制研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(12): 1648-1653.
- [10] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003, 423(15): 356-361.
- [11] 李妍,康辉.Th1、Th2 和 Th17 型细胞在类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮中的活化特点[J]. *微生物学杂志*, 2008, 28(5): 98-101.
- [12] Wang Q, Ma Y, Liu D, et al. The roles of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 155 (3): 205-211.
- [13] 王书芳,王勤,潘静,等.吡咯啉氮氧自由基及衍生物抗大鼠不同组织脂质过氧化损伤[J]. *中国药理学通报*, 2001, 17(4): 424-427.
- [14] 张秋玉.活性氧—适应性免疫应答的调节分子[J]. *现代免疫学*, 2008, 28(1): 75-78.
- [15] 李景怡,方勇飞,邹丽云,等.Th1/Th2 细胞因子谱在类风湿关节炎患者外周血和关节积液中的表达及意义[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(18): 1921-1924.
- [16] 余妙容,郭坤元,牛新,等.氧化还原状态的改变控制手霉素诱导 HL-60 白血病细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(6): 772-777.
- [17] 曾慧兰,韩新爱,古晨,等.6-姜酚诱导白血病细胞凋亡中细胞内活性氧及线粒体跨膜电位的改变[J]. *中药材*, 2010, 33(4): 584-587.

(收稿:2012-07-06 修回:2013-07-22)