

化痰通络方对 IL-1 β 刺激的 RA 滑膜成纤维细胞增殖及 TNF- α 和 aFGF 的影响

徐振兴 陈进春 邱明山 滕菁 徐明

摘要 **目的** 探讨化痰通络方对 IL-1 β 刺激的类风湿关节炎滑膜成纤维细胞(rheumatoid arthritis synovial fibroblast, RASFB)增殖及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)分泌的影响。**方法** 体外培养 RASFB 细胞株,加入终浓度为 1、5、10、20 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 β 24、48 h 以 WST-1 法检测 RASFB 增殖率;然后选择 20 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 β 为诱导剂量为 IL-1 β 组。在此基础上加入终浓度(V/V)为 5%、2%、1%的高、中、低浓度化痰通络方水煎液为高、中、低浓度化痰通络方组,培养 24、48 h,并设空白对照组。比较 RASFB 的增长率。ELISA 法检测各组 TNF- α 和 aFGF 含量,RT-PCR 检测 TNF- α 和 aFGF mRNA 表达。**结果** 24、48 h 时,与 IL-1 β 1 $\mu\text{g/L}$ 比较,IL-1 β 5、10、20 $\mu\text{g/L}$ RASFB 增殖率升高($P < 0.01$);与 IL-1 β 5 $\mu\text{g/L}$ 比较,IL-1 β 10、20 $\mu\text{g/L}$ RASFB 增殖率升高($P < 0.01$),且 IL-1 β 20 $\mu\text{g/L}$ RASFB 增殖率高于 IL-1 β 10 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.01$)。48 h 时各浓度的 RASFB 增殖率高于 24 h($P < 0.01$)。与高浓度化痰通络方组比较,中、低浓度化痰通络方组 RASFB 增殖率降低,且中浓度化痰通络方组对 IL-1 β 刺激的 RASFB 增殖率明显降低($P < 0.01$)。与空白对照组比较,IL-1 β 组 24、48 h 时 TNF- α 、aFGF mRNA 表达及含量均升高($P < 0.05$);与 IL-1 β 组比较,除 24 h 低浓度化痰通络方组 TNF- α mRNA 表达外,24、48 h 高、中、低浓度化痰通络方 TNF- α 、aFGF mRNA 表达及含量均降低($P < 0.05$);与高浓度化痰通络方组比较,24、48 h 时中、低浓度化痰通络方 TNF- α 、aFGF mRNA 表达升高,24 h 低浓度化痰通络方 TNF- α 含量以及 24、48 h 中、低浓度化痰通络方 TNF- α 、aFGF 含量升高($P < 0.05$)。**结论** 化痰通络方治疗 RA 的机理可能涉及抑制 RASFB 的增殖,降低 TNF- α 和 aFGF mRNA 的表达及其蛋白的分泌。

关键词 类风湿关节炎;滑膜细胞;化痰通络方;肿瘤坏死因子- α ;酸性成纤维细胞生长因子

Effects of Huatan Tongluo Recipe on IL-1 β -induced Proliferation of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts and the Production of TNF- α and aFGF XU Zhen-xing, CHEN Jin-chun, QIU Ming-shan, TENG Jing, and XU Ming Department of Clinical Testing, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Xiamen (361009)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Huatan Tongluo Recipe (HTTLR) on the proliferation of IL-1 β induced rheumatoid arthritis synovial fibroblast (RASFB) and secretion of necrosis factor α (TNF- α) and acidic fibroblast growth factor (aFGF) *in vitro*. **Methods** RASFB cell line was cultured *in vitro* and stimulated by IL-1 β . The proliferation of RASFB was detected using WST-1 after adding IL-1 β with final concentrations of 1, 5, 10, 20 $\mu\text{g/L}$ for 24 and 48 h respectively. Then 20 $\mu\text{g/L}$ IL-1 β recruited as induction dose was set up as IL-1 β group. High, middle, low dose HTTLR groups were set up by adding HTTLR decoction with final concentration of 5%, 2%, 1% (V/V), respectively for 24 and 48 h. A blank control group was also set up. The proliferation rates were compared. Contents of TNF- α and aFGF were detected in each group using ELISA. mRNA expressions of TNF- α and aFGF were detected using RT-PCR. **Results** The proliferation rates of RASFB at 24 h and 48 h were lower at 1 $\mu\text{g/L}$ IL-1 β than at 5, 10, 20 $\mu\text{g/L}$ IL-1 β ($P < 0.01$). The proliferation rate of RASFB was higher at 10 and 20 $\mu\text{g/L}$ IL-1 β than at 5 $\mu\text{g/L}$ IL-1 β ($P < 0.01$). Besides, the proliferation rate of RASFB was higher at 20 $\mu\text{g/L}$ IL-1 β than at 10

基金项目:国家自然科学基金课题资助项目(No. 81473574);福建省卫生厅中医药课题资助项目(No.WST201212)

作者单位:福建中医药大学附属厦门市中医院检验科(厦门 361009)

通讯作者:陈进春, Tel: 0592-5579596, E-mail: zhenxing_112@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.01.0101

$\mu\text{g/L}$ IL-1 β ($P < 0.01$). The proliferation rate of RASFB was higher at 48 h than at 24 h ($P < 0.01$). Compared with the high dose HTTLR group, the proliferation rate of RASFB was lowered in middle and low dose HTTLR groups ($P < 0.01$). Besides, IL-1 β induced proliferation rate of RASFB was obviously reduced in the middle dose HTTLR group ($P < 0.01$). Compared with the blank control group, mRNA expressions of TNF- α and aFGF and their contents were elevated in the IL-1 β group at 24 and 48 h ($P < 0.05$). Compared with the IL-1 β group, mRNA expressions of TNF- α and aFGF and their contents, except TNF- α mRNA expression in the low dose HTTLR group at 24 h, were all obviously lowered in 3 dose HTTLR groups at 24 h and 48 h ($P < 0.05$). Compared with the high dose HTTLR group, mRNA expressions of TNF- α and aFGF increased in middle and low dose HTTLR groups at 24 h and 48 h; TNF- α content in the low dose HTTLR group at 24 h; contents of TNF- α and aFGF in middle and low dose HTTLR groups at 24 h and 48 h all increased ($P < 0.05$). Conclusion The mechanism of HTTLR treatment for RA might be related to inhibiting RASFB proliferation, and decreasing mRNA expressions of TNF- α and aFGF as well as their protein secretion.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; synoviocyte; Huatan Tongluo Recipe; tumor necrosis factor α ; acidic fibroblast growth factor

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜为主要靶组织的慢性系统性自身免疫性疾病,主要表现为反复发作的关节疼痛、肿胀、功能下降等。已有研究证据表明,RA患者滑膜成纤维细胞(RASFB)是遭侵犯的关节腔中的主要细胞,在RA相关的关节破坏和炎症反应的引发中起着重要作用^[1,2]。在某种意义上,RASFB的“肿瘤样”异常增生是RA区别于其它关节炎的重要特征,异常增生的RASFB过度分泌细胞因子参与RA的一系列病例过程^[3]。因此,RASFB的增生已成为RA领域研究的热点之一。我院风湿免疫科的中药组方化痰通络方经过动物实验和临床疗效观察,发现可明显减轻RA患者临床症状,降低其ACR50积分^[4,5]。本实验笔者从化痰通络方对RASFB的增殖及其分泌TNF- α 和aFGF的影响来探讨其治疗RA的可能机制。

材料和方法

1 细胞人RA滑膜成纤维细胞株(批号:408RA-05a,500 000cells/vial),购自美国cellapplications公司。

2 药物 化痰通络方组成:胆南星 10 g 桃仁 10 g 白芥子 10 g 僵蚕 10 g 白芍 15 g。生药购自厦门市中医院中药房,方剂以自动电煎药机水煎2次合并药液约200 mL,生物安全柜内以0.22 μm 生物膜过滤除菌。滤过除菌后分装小袋4 $^{\circ}\text{C}$ 储存1周。

3 试剂及仪器试剂 RASFB专用培养基(美国cellapplications公司,批号:415-GS);WST试剂盒(中国南京凯基生物公司,批号:KGA315);Trizol(美国In-

vitrogen,批号:15596-026);cDNA第一链合成试剂盒(美国Thermo Fisher,K1622);Real time PCR Master Mix (SYBR Green)(日本TOYOBO,批号:111860);TNF- α 试剂盒(中国南京凯基生物公司,批号:KGEHC103a-1);a-FGF试剂盒(中国武汉博士德生物工程研究所,批号:EK0339)。IL-1 β (北京三元基因工程有限公司)。仪器:紫外光度仪(日本岛津制作所,UV-2450);普通梯度PCR仪(美国ABI公司,Veriti 96 well Thermal cycler);荧光定量PCR循环仪(美国ABI公司,Step one plus Real time-PCR system);凝胶成像仪(美国BIO-RAD公司,Gel Doc XR)。

4 细胞培养 液氮中取出冻存管立即投入37 $^{\circ}\text{C}$ 温水中迅速晃动,直至冻存液完全溶解;将细胞冻存悬液转移到离心管内,加入约5 mL培养液,轻轻吹打混匀,800~1 000 r/min离心5 min,弃上清液后加入完全培养液吹打混匀,将细胞悬液转移到培养瓶内,补足培养液进行培养。培养瓶中的细胞覆盖率达到80%~90%时,按常规方法胰酶消化后进行细胞传代。取传2~3代的细胞进行实验。

5 观察指标及方法

5.1 RASFB增殖检测 采用WST-1法检测细胞增殖。细胞消化、计数、配制成浓度为 5×10^4 个/mL的细胞悬液,96孔细胞培养板中,每孔加入100 μL 细胞悬液于培养箱中培养24 h;弃去培养基,PBS清洗2次,用完全培养基稀释药物至所需浓度,每孔加入200 μL 相应的含药培养基,将96孔细胞培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养24,48 h;96孔板进行WST染色, $\lambda = 450\text{nm}$,测定OD值。增长率 = (试验OD值/对照组OD值 - 1) $\times 100\%$,抑制

率 = $-(\text{试验 OD 值}/\text{对照组 OD 值} - 1) \times 100\%$ 。

5.1.1 IL-1 β 对 RASFB 增殖的影响 设对照组和 IL-1 β 组。每组 3 个复孔。对照组不加干预的 RASFB。IL-1 β 组在细胞过夜贴壁后分别加入终浓度为 1、5、10、20 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 β , 继续培养 24、48 h, 同时观察细胞形态变化。比较各组 RASFB 的增长率。

5.1.2 化痰通络方对 RASFB 增殖的影响 分为化痰通络方高、中、低浓度组: 细胞过夜贴壁后, 分别加入终浓度为 5%、2%、1% 的高、中、低浓度化痰通络方水煎液, 继续培养 24 h、48 h。比较各组 RASFB 的增长率。在高浓度的化痰通络方作用 48 h 后, 细胞形态仍正常; 选择高、中浓度组, 观察撤除药物后细胞的生长情况。比较撤药后抑制率。

5.1.3 化痰通络方对 IL-1 β 刺激 RASFB 增殖的影响 实验分 5 组。空白对照组: 不加任何干预的 RASFB; IL-1 β 组: 细胞过夜贴壁后加入终浓度为 20 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 β , 继续培养 24 h、48 h。高、中、低浓度化痰通络方组: 细胞过夜贴壁后加入终浓度为 20 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 β 继续培养 24 h 后, 分别加入终浓度为 5%、2%、1% 的高、中、低浓度化痰通络方水煎液, 继续培养 24、48 h。比较各组 RASFB 的抑制率。

5.2 TNF- α 、aFGF mRNA 及含量 检测分组 同 5.1.3

5.2.1 RASFB 内 TNF- α 、aFGF mRNA 检测 培养的 RASFB 细胞中提取总 RNA, Real time-PCR 检测 TNF- α 、aFGF mRNA, 以 GAPDH 为内对照, 未加任何药物的 RASFB 为空白对照, 计算实验各组 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值。Real time-PCR 所用引物序列如下(南京金斯瑞科技有限公司合成): GAPDH: 5'-CATCT TCT T T T GCGTCGCCA-3', 5'-T TAAAAGCAGC-CCTGGTGACC-3', 115 bp; TNF- α : 5'-GCCCGAC-TATCTCGACT T TGC-3', 5'-AGGT TGGATGT TCGTCCTCCT-3', 81 bp; αFGF : 5'-GGGAGT-GGGCGGT TGTCTA-3', 5'-TGTGGGAAATCGAG-GTGGG-3', 121 bp。反应条件为: 2X Realltime PCR Master Mix (SYBR Green) 10 μL 、模板 (cDNA 稀释 10 倍 1 μL 、引物各 2 μL 、0.1% DEPC 水 7 μL , 总体积为 20 μL ; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共 40 个循环。

5.2.2 TNF- α 、aFGF 含量的检测 按试剂盒说明书, ELISA 法检测 RASFB 细胞上清中 TNF- α 、aFGF 含量。严格按照说明书说明进行。

6 统计学方法 采用 SPSS 12.0 软件进行分析, 所有实验均为 3 复孔, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间

均数比较用方差分析, 多组间均数两两比较用 SNK 检验; 两独立样本均数比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 IL-1 β 对 RASFB 增殖的影响 (表 1) 24、48 h 时, 与 IL-1 β 1 $\mu\text{g/L}$ 比较, IL-1 β 5、10、20 $\mu\text{g/L}$ RASFB 增值率升高 ($P < 0.01$); 与 IL-1 β 5 $\mu\text{g/L}$ 比较, IL-1 β 10、20 $\mu\text{g/L}$ RASFB 增值率升高 ($P < 0.01$), 且 IL-1 β 20 $\mu\text{g/L}$ RASFB 增值率高于 IL-1 β 10 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.01$)。48 h 时各浓度 RASFB 增值率高于 24 h ($P < 0.01$)。

表 1 IL-1 β 对 RASFB 增殖的影响呈剂量和时间依赖性 ($\bar{x} \pm s$)

IL-1 β ($\mu\text{g/L}$)	RASFB 增值率 (%)	
	24 h	48 h
1	4.71 $\pm$ 0.41	6.59 $\pm$ 0.41 [○]
5	10.93 $\pm$ 1.05 [*]	17.23 $\pm$ 1.11 ^{*○}
10	12.79 $\pm$ 1.15 ^{*△}	20.55 $\pm$ 1.79 ^{*△○}
20	17.63 $\pm$ 1.20 ^{*△▲}	29.77 $\pm$ 2.32 ^{*△▲○}

注: 与 IL-1 β 1 $\mu\text{g/L}$ 比较, $^*P < 0.01$; 与 IL-1 β 5 $\mu\text{g/L}$ 比较, $^{\Delta}P < 0.01$; 与 IL-1 β 10 $\mu\text{g/L}$ 比较, $^{\Delta}P < 0.01$; 与同浓度 24 h 比较, $^{\circ}P < 0.01$

2 化痰通络方对 RASFB 增殖的影响 (表 2) 与高浓度化痰通络方组比较, 中、低浓度化痰通络方组 RASFB 增殖率降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 且低浓度化痰通络方组 RASFB 增殖率低于中浓度化痰通络方组 ($P < 0.01$)。各浓度化痰通络方组 48 h RASFB 抑制率均高于同组 24 h ($P < 0.01$)。

表 2 化痰通络方对 RASFB 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

化痰通络方浓度	RASFB 抑制率 (%)	
	24 h	48 h
高	20.12 $\pm$ 2.06	35.40 $\pm$ 2.84 [○]
中	11.48 $\pm$ 1.11 [*]	15.75 $\pm$ 1.61 ^{*○}
低	2.70 $\pm$ 0.33 ^{*△}	5.35 $\pm$ 0.39 ^{*△○}

注: 与高浓度化痰通络方组比较, $^*P < 0.01$; 与中浓度化痰通络方组比较, $^{\Delta}P < 0.01$; 与同浓度 24 h 比较, $^{\circ}P < 0.01$

表 3 化痰通络方对 IL-1 β 刺激的 RASFB 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	RASFB 抑制率 (%)	
	24 h	48 h
IL-1 β	-17.54 $\pm$ 1.23	-28.47 $\pm$ 2.6 [○]
高浓度化痰通络方	13.13 $\pm$ 1.24 [*]	20.52 $\pm$ 1.89 ^{*○}
中浓度化痰通络方	6.48 $\pm$ 0.57 ^{*△}	9.13 $\pm$ 0.77 ^{*△○}
低浓度化痰通络方	-9.61 $\pm$ 0.82 ^{*△▲}	-4.91 $\pm$ 0.29 ^{*△▲○}

注: 与 IL-1 β 比较, $^*P < 0.01$; 与高浓度化痰通络方组比较, $^{\Delta}P < 0.01$; 与中浓度化痰通络方组比较, $^{\Delta}P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, $^{\circ}P < 0.01$

3 化痰通络方对 IL-1 β 刺激的 RASFB 增殖的影响(表 3) 与高浓度化痰通络方组比较,与 IL-1 β 组比较,化痰通络方各浓度组 RASFB 抑制率明显增加($P < 0.01$);与高浓度化痰通络方组比较,中、低浓度化痰通络方组 RASFB 抑制率降低($P < 0.01$),且低浓度化痰通络方组 RASFB 抑制率低于中浓度化痰通络方组($P < 0.01$)。与本组 24 h 比较,化痰通络方各浓度组 RASFB 抑制率明显增加($P < 0.01$),IL-1 β 组 RASFB 抑制率降低($P < 0.01$)。

4 各组 RASFB 分泌 TNF- α 、aFGF mRNA 表达及含量比较(表 4、5) 与空白对照组比较,IL-1 β 组 24、48 h 时 TNF- α 、aFGF mRNA 表达及含量均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 IL-1 β 组比较,除 24 h 低浓度化痰通络方组 TNF- α mRNA 表达外,24、48 h 高、中、低浓度化痰通络方 TNF- α 、aFGF mRNA 表达及含量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与高浓度化痰通络方组比较,24、48 h 时中、低浓度化痰通络方 TNF- α 、aFGF mRNA 表达升高,24 h 低浓度化痰通络方 TNF- α 含量以及 24、48 h 中、低浓度化痰通络方 TNF- α 、aFGF 含量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

RA 是一类慢性自身免疫性疾病,其具体的发病机制至今尚未完全清楚。近年来的研究证据表明,RASFB 在 RA 相关的关节破坏和炎症反应的引发中

起着重要作用。RA 的主要病理特点是滑膜组织的增生,其主要原因是滑膜组织内 SFB 细胞过度增殖造成细胞数量的大量增加^[1,2]。体外实验表明,RASFB 的增殖速率要高于非 RA 和骨关节炎病人的 SFB,在部分患者中,SFB 的“肿瘤样”增殖出现在炎症细胞聚集之前,表明 SFB 在炎症反应初期发挥着重要功能^[3]。本研究显示化痰通络方能有效抑制 IL-1 刺激的 RASFB 的增殖。

细胞因子在 RA 病理进程中的作用已较为明确。其中 TNF- α 、IL-1 β 的异常表达是 RA 的典型特征之一,它们在 RA 的细胞因子网络中起中心作用,与 RA 发病机制直接相关^[6]。IL-1 β 能促进滑膜细胞和淋巴细胞的增殖和分化,促进滑膜细胞和软骨细胞合成并释放前列腺素 E(PGE2)和胶原酶,造成关节损伤;同时 IL-1 β 能活化 RASFB,活化的 RASFB 又可以产生 TNF- α 和 IL-1 β 等细胞因子和相关酶类,促进炎症免疫进程^[6]。TNF- α 在活动性 RA 中能提高血小板的活性和聚积,促进成纤维细胞释放细胞黏附分子,在 RA 的发病中起着重要作用。成纤维细胞生长因子(FGF)家族是生理功能较广泛的生长因子,它们在促进细胞生长、组织形成与修复、胚胎发育、血管形成等方面具有非常重要的作用^[6]。研究结果表明,aFGF 可提高小鼠皮肤成纤维细胞 β_1 整合素的表达,促进大鼠皮肤成纤维细胞增殖^[7]。已有研究报道体外培养的 RAFLS 也能够合成并释放大量的 aFGF,并且与 TGF- β_1 相互作用促进 RAFLS 增殖^[8]。

表 4 各组 TNF- α 及 aFGF mRNA 相对定量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α mRNA		aFGF mRNA	
	24 h	48 h	24 h	48 h
空白对照	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.11
IL-1 β	2.37 $\pm$ 0.26 *	3.32 $\pm$ 0.19 *	2.55 $\pm$ 0.27 *	3.36 $\pm$ 0.09 *
高浓度化痰通络方	1.42 $\pm$ 0.06 Δ	1.48 $\pm$ 0.08 Δ	1.46 $\pm$ 0.21 Δ	1.63 $\pm$ 0.07 Δ
中浓度化痰通络方	1.99 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	2.30 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$	2.07 $\pm$ 0.24 $\Delta\Delta$	2.31 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$
低浓度化痰通络方	2.26 $\pm$ 0.06 Δ	2.39 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	2.27 $\pm$ 0.24 $\Delta\Delta$	2.53 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 IL-1 β 组比较, $\Delta P < 0.05$;与高浓度化痰通络方组比较, $\Delta P < 0.05$

表 5 各组 TNF- α 及 aFGF 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α		aFGF	
	24 h	48 h	24 h	48 h
空白对照	302 $\pm$ 11	301 $\pm$ 11	51 $\pm$ 2	51 $\pm$ 3
IL-1 β	405 $\pm$ 18 *	421 $\pm$ 24 *	82 $\pm$ 4 *	100 $\pm$ 6 *
高浓度化痰通络方	340 $\pm$ 15 Δ	331 $\pm$ 20 Δ	55 $\pm$ 3 Δ	54 $\pm$ 4 Δ
中浓度化痰通络方	362 $\pm$ 14 Δ	360 $\pm$ 13 $\Delta\Delta$	61 $\pm$ 3 $\Delta\Delta$	65 $\pm$ 4 $\Delta\Delta$
低浓度化痰通络方	371 $\pm$ 16 Δ	381 $\pm$ 16 $\Delta\Delta$	66 $\pm$ 4 $\Delta\Delta$	62 $\pm$ 3 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 IL-1 β 组比较, $\Delta P < 0.05$;与高浓度化痰通络方组比较, $\Delta P < 0.05$

RA 属于中医“痹证”(“尪痹”、“顽痹”)、“历节风”范畴。其基本病机是气血不足、肝肾亏损、风寒(热)湿邪痹阻脉络、流注关节;而闽南地区气候潮湿,居民喜食甘凉厚味,致机体气机郁滞或阳气衰微,不能正常运化水湿津液,滞而为痰,阻碍气血运行而成顽痹。笔者结合历代医家对痰瘀致痹的认识,将疏畅气机、化痰活血通络作为 RA 治疗的思路,总结出了化痰通络方,并在临床及动物实验上加以实践,均取得了一定效果^[4,5]。该方由胆南星、桃仁、白芥子、僵蚕、白芍五味药组成。胆南星为南星经过牛胆汁制,专主经络风痰,与桃仁共为君药,有化痰祛风、消肿散结、活血化瘀、通络止痛之功;白芥子温通经脉、消肿散结,与僵蚕同用可加强胆南星的作用,共为臣药;白芍具有抗炎镇痛和免疫调节的作用,可有效地抑制滑膜细胞分泌 IL-1、FGF 等炎症介质,对 RA 具有确切的疗效^[9,10]。

本实验以 IL-1 β 刺激 RASFB 后,加入不同浓度化痰通络方水煎液,观察化痰通络方对 RASFB 增殖及其分泌 TNF- α 和 aFGF 的影响。结果显示化痰通络方能剂量依赖地抑制 RASFB 的增殖,而且在体外细胞培养中加入该方出现生长抑制后,撤除该方能使细胞增殖速度恢复。这提示一定剂量内的化痰通络方对 RASFB 的作用是可逆的,也提示该抑制作用是非细胞毒作用,显微镜下的细胞形态正常也支持这一观点。鉴于 IL-1 是 RASFB 的强刺激因子,我们观察了化痰通络方对 IL-1 刺激后的 RASFB 的影响,结果显示化痰通络方也剂量依赖地抑制了 RASFB 增殖,并在转录和含量上降低了 TNF- α 和 aFGF 的分泌。这进一步阐明了化痰通络方治疗 RA 的作用机制,为该方剂的临床应用奠定了一定的基础。

参 考 文 献

[1] Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synovio-

cytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 233-255.

- [2] Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors [J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(1): 24-33.
- [3] Huber LC, Distler O, Tarnier I, et al. Synovial fibroblasts: key players in reumatoid arthritis [J]. Rheumatology, 2006, 45(6): 669-675.
- [4] 张怡燕, 陈进春, 邱明山, 等. 化痰通络方治疗痰瘀痹阻型类风湿关节炎的临床观察 [J]. 中医药通报, 2012, 11(1): 49-52.
- [5] 邱明山, 陈进春, 张怡燕, 等. 化痰通络方对大鼠胶原诱导性关节炎作用的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(2): 127-130.
- [6] Hu W, Xia U, Chen FH, et al. Recombinant human endostatin inhibits adjuvant arthritis by down-regulating VEGF expression and suppression of TNF- α , IL-1 β production [J]. Inflammation Res, 2012, 61(8): 827-835.
- [7] 靳波, 徐盈斌, 刘旭盛, 等. aFGF、bFGF 和 EGF 对小鼠皮肤成纤维细胞生长及蛋白酶活化受体 1 的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(3): 180-182.
- [8] Thomas JW, Thieu TH, Byrd VM, et al. Acidic fibroblast growth factor in synovial cells [J]. Arthritis Rheumatism, 2000, 43(10): 2152-2159.
- [9] Chen JY, Wu HX, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2 [J]. Planta Med, 2012, 78(7): 665-671.
- [10] 吴华勋, 陈镜宇, 汪庆童, 等. 白芍总苷对胶原性关节炎大鼠滑膜 β 抑制蛋白的影响与其抑制滑膜细胞增殖的关系 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(7): 934-937.

(收稿:2015-03-02 修回:2016-05-12)