

· 基础研究 ·

黄芩清热除痹胶囊含药血清对强直性脊柱炎患者
外周血单核细胞氧化应激的影响黄 旦¹ 刘 健¹ 万 磊¹ 方妍妍² 龙 琰¹

摘要 目的 探讨黄芩清热除痹胶囊(HQC)含药血清对强直性脊柱炎(AS)患者外周血单核细胞(PBMCs)氧化应激的影响。方法 将40只大鼠按随机数字表法分为HQC低、中、高剂量组,空白组、阴性组(生理盐水),其中HQC低、中、高3组大鼠连续给药7天处死取血清;采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测HQC含药血清对PBMCs增殖的影响;将PBMCs分为正常组、模型组、HQC组、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂(Compound C)组、HQC含药血清+Compound C组;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、脂质过氧化产物(LPO)、总抗氧化能力(TAOC)的表达;采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)及蛋白免疫印迹(Western Blot)检测AMPK/叉头转录因子O3a(FOXO3a)/锰超氧化物歧化酶(MnSOD)信号通路相关基因及蛋白的表达。结果 中剂量HQC含药血清具有显著抑制PBMCs增殖的作用,确定其最佳作用时间为24 h。与正常组比较,模型组MDA、LPO明显升高,SOD、TAOC明显降低($P<0.01$);与模型组比较,HQC、HQC+Compound C组MDA、LPO明显降低,SOD、TAOC明显升高($P<0.01$),Compound C组MDA、LPO明显升高,SOD、TAOC明显降低($P<0.01$);与Compound C组比较,HQC+Compound C组MDA、LPO明显降低,SOD、TAOC明显升高($P<0.01$);与正常组比较,模型组AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA及AMPK、p-AMPK、FOXO3a、p-FOXO3a、MnSOD蛋白表达水平明显降低($P<0.01$);与模型组比较,HQC组AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA及AMPK、p-AMPK、FOXO3a、p-FOXO3a、MnSOD蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),Compound C组AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA及AMPK、p-AMPK、FOXO3a、p-FOXO3a、MnSOD蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与Compound C组比较,HQC+Compound C组AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA及AMPK、p-AMPK、FOXO3a、p-FOXO3a、MnSOD蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。结论 HQC含药血清能通过活化AMPK、FOXO3a、MnSOD信号通路,改善AS患者PBMCs氧化应激。

关键词 黄芩清热除痹胶囊;含药血清;外周血单核细胞;氧化应激

Effects of Huangqin Qingre Chubi Capsule Containing Serum on Oxidative Stress in PBMCs of Patients with Ankylosing Spondylitis HUANG Dan¹, LIU Jian¹, WAN Lei¹, FANG Yan-yan², and LONG Yan¹ 1 Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230031); 2 Department of Clinical Data Center, First Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230031)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Huangqin Qingre Chubi Capsule (HQC) containing serum on oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with ankylosing spondylitis

基金项目:科技部国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(No.2018YFC1705204);国家自然科学基金面上项目(No.81973655);安徽省重点研究和开发计划对外科技合作项目(No.201904b11020011);安徽省名中医刘健工作室建设项目(No.中医药发展秘[2018]11号);新安医学教育部重点实验室开放项目(No.2020xayx08)

作者单位:1.安徽中医药大学第一附属医院风湿科(合肥230031);2.安徽中医药大学第一附属医院数据中心(合肥230031)

通讯作者:刘 健, Tel: 0551-62850053, E-mail:liujianahzy@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210630.308

(AS). **Methods** Forty rats were divided into low, middle, and high dose HQC groups, blank control group, and normal saline group. After 7 successive days of intragastric administration, serum was taken from mice in low, middle, and high HQC dose groups. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the effects of HQC containing serums on the proliferation of PBMCs. The cultured PBMCs were divided into the normal group, model group, HQC group, Compound C group, Compound C+HQC containing serum group. Contents of superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (TAOC), malondialdehyde (MDA), lipid peroxide (LPO) were detected using ELISA. mRNA and protein expressions of AMPK-FOXO3a-MnSOD were detected using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. **Results** The proliferation of PBMCs was significantly inhibited by middle dose HQC containing serum, and the optimal effect was achieved at 24 h treatment. Compared with the normal group, contents of MDA and LPO significantly increased, activities of SOD and TAOC significantly decreased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, contents of MDA and LPO significantly decreased, activities of SOD and TAOC significantly increased in the HQC group and Compound C+HQC containing serum group ($P<0.01$). Contents of MDA and LPO significantly increased, activities of SOD and TAOC significantly decreased in Compound C group ($P<0.01$). Compared with Compound C group, contents of MDA and LPO significantly decreased, activities of SOD and TAOC significantly increased in Compound C+HQC containing serum group ($P<0.01$). Compared with the normal group, mRNA expressions of AMPK, FOXO3a, MnSOD, and protein expressions of AMPK, p-AMPK, FOXO3a, p-FOXO3a, MnSOD significantly decreased in model group ($P<0.01$). Compared with the model group, mRNA expressions of AMPK, FOXO3a, MnSOD, and protein expressions of AMPK, p-AMPK, FOXO3a, p-FOXO3a, MnSOD significantly increased in HQC group ($P<0.01$); mRNA expressions of AMPK, FOXO3a, MnSOD, and protein expressions of AMPK, p-AMPK, FOXO3a, p-FOXO3a, MnSOD significantly decreased in Compound C group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with Compound C group, mRNA expressions of AMPK, FOXO3a, MnSOD, and protein expressions of AMPK, p-AMPK, FOXO3a, p-FOXO3a, MnSOD significantly increased in Compound C+HQC containing serum group ($P<0.01$). **Conclusion** HQC containing serum improved oxidative stress in PBMCs of AS patients possibly by activating AMPK-FOXO3a-MnSOD signaling pathways.

KEYWORDS Huangqin Qingre Chubi Capsule; drug containing serum; peripheral blood mononuclear cell; oxidative stress

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种严重威胁人类健康的免疫炎症性疾病, 具有慢性、进展性、难治性的特点, 疾病发展至中后期, 会出现脊柱和骶髂关节的融合, 导致脊柱活动性降低^[1]。我国 AS 患病率约为 0.3%, 该病通常出现在生命的第 3 个 10 年, 男性患病率较高^[2]。该病具体的发病原因不详, 目前尚无特效药可治愈。目前已有研究证实肿瘤坏死因子、IL-17 抑制剂有效, 但因其治疗靶点/通路相对单一, AS 患者又具有较强异质性, 所以仍有一部分患者通过上述治疗手段无法得到很好的缓解^[3]。相关研究发现, AS 患者存在明显的氧化应激损伤, 表现为抗氧化酶活性的显著降低, 氧自由基显著升高, 存在明显过氧化状态^[4], 且疾病活动高的患者氧化应激明显升高^[5]。本课题组前期临床观察发现湿热型 AS 患者外周血中总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, TAOC)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水

平明显降低, 丙二醇 (malondialdehyde, MDA)、脂质过氧化产物 (lipid peroxidation, LPO) 明显升高, 湿热型 AS 患者存在氧化应激状态, 且其与患者病情活动有一定的关联^[6], 黄芩清热除痹胶囊 (Huangqin Qingre Chubi Capsule, HQC) 能够显著升高 TAOC、SOD 水平, 降低 MDA、LPO 水平, 减轻氧化损伤, 改善患者临床症状^[7]。本实验在前期临床观察基础上, 通过观察 HQC 含药血清能否改善 AS 患者外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 氧化损伤, 以及这种抗氧化效应是否涉及腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)、叉头转录因子 O3a (fork head class box O3a, FOXO3a)、锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, MnSOD) 信号通路, 以寻求 HQC 抗氧化作用的细胞学机制, 为其临床上治疗 AS 提供实验依据。

材料与方法

1 动物及细胞 清洁级 4~5 月龄, 雄性 SD 大鼠, 购于安徽省实验动物中心 [许可证号: SCXK (皖) 2017-001], 体重 (220 ± 20) g。AS 患者 PBMCs 来源于安徽中医药大学第一附属医院就诊的诊断明确的 AS 患者, 符合 1984 年美国风湿病协会提出的 AS 诊断标准^[8]; 健康人 PBMCs 来源于安徽中医药大学第一附属医院健康管理中心, 且未患 AS 及其他自身免疫性疾病。本研究方案经安徽中医药大学第一附属医院伦理学委员会批准 (No.2015AH-20)。

2 药物 HQC 由安徽中医药大学第一附属医院制剂室生产, 专利号: ZL201110095718. X。主要成分为薏苡仁、黄芩、栀子、威灵仙、桃仁, 每粒胶囊含生药浸出物 0.4 g。

3 试剂及仪器 DMEM 培养基 (NZD1131, Hyclone 公司); 胎牛血清 (货号: 20170403, 浙江天杭生物公司); DMSO (货号: D8370, 北京索莱宝公司); 单核细胞分离液 (货号: 20180509, 天津市灏洋生物科技公司); 逆转录试剂盒 (货号: 00340489, 美国赛默飞世尔科技公司); Trizol 试剂盒 (货号: 15596026, 美国 Life Technologies 公司); QuantiNova SyBr Green PCR kit (货号: 208054, 德国 Qiagen 公司); 山羊抗小鼠 IgG (货号: ZB2305, 北京中杉生物技术公司); 山羊抗兔 IgG (货号: ZB2301, 北京中杉生物技术公司); β -actin (TA-09, 北京中杉生物技术公司); AMPK (ab32047)、p-AMPK (ab92701) 均为英国 Abcam 公司; p-FOXO3a (BS4713)、FOXO3a (BS3574) 均为美国 Bioworld 公司; MnSOD (bs-1080R, 北京博奥森生物技术有限公司); SOD 试剂盒 (货号: 20171116)、MDA 试剂盒 (货号: 20171118)、LPO 试剂盒 (货号: 20171128)、TAOC 试剂盒 (货号: 201711222) 均为北京安迪华泰生物科技有限公司。高速台式冷冻离心机 (Centrifuge 5417R, 德国 Eppendorf); 酶标仪 (Spectra Max MZe, 美国 MD 公司); 自动制冰机 (AF-10, 意大利 SCOTSMAN 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (PIKOREAL 96, 美国赛默飞世尔科技公司); 电泳仪 (EPS 300 型, 上海天能科技有限公司)。

4 方法

4.1 含药血清的制备 将 40 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 5 组, 空白组、阴性组、HQC 高剂量组 (临床给药剂量的 2 倍)、中剂量组 (等量临床给

药剂量)、低剂量组 (临床给药剂量的 0.5 倍), 每组 8 只, 采用经人-大鼠体表面积比值折算成相当于人临床等效用量为每天 378 mg/kg 为基础给药剂量^[9], 生理盐水组灌服同体积的生理盐水。每天灌胃 2 次。连续给药 7 天, 末次给药 1 h 后, 腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清, 56 °C 水浴 30 min 灭活, 过 0.22 μ m 的滤膜, -80 °C 保存备用。

4.2 细胞培养、分组 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离 AS 患者 PBMCs, 在培养基中于 37 °C, 5% CO₂ 恒温孵箱中培养, 细胞生长密度达到 80% 左右收集。将细胞分为正常组 (N 组): 健康人 PBMCs; 模型组 (M 组): AS 患者 PBMCs; HQC 组: AS 患者 PBMCs+HQC (最佳浓度) 含药血清; Compound C 组: AS 患者 PBMCs 加 AMPK 阻断剂 (Compound C); HQC+Compound C 组: AS 患者 PBMCs+HQC (最佳浓度) 含药血清 +Compound C。

4.3 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 比色法 PBMCs 以 1×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ L, 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养 24 h, 加入不同浓度 HQC 含药血清。并设空白组 6 孔 (无细胞及血清, 只加培养基) 和阴性对照组 6 孔 (加细胞及培养基不加血清)。孵育 24 h 后, 每孔加 20 μ L MTT 溶液, 孵育 4 h, 小心吸弃溶液, 每孔中加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min。酶标仪测定 OD 值, 记录结果, 重复 3 次。计算公式为: 抑制率 (%) = (OD 阴性对照组 - OD 实验组) / (OD 阴性对照组 - OD 空白对照组) $\times$ 100%。

4.4 ELISA 检测氧化应激相关指标 取培养上清液, 运用 ELISA 试剂盒检测 SOD、MDA、LPO、TAOC, 具体操作按说明书进行。

4.5 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA 表达 基因序列由 Invitrogen 公司提供并由 Primer 5 软件设计并分析引物 (表 1)。采用 Trizol 法提取 RNA, 反转录合成 cDNA。主要有反转录产物、正向及反向引物、SYBR Green 染料依次为 2、1、1、10 μ L, 且 DEPC 水需增加到 20 μ L。具体的反应条件为: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s; 60 °C 10 s; 40 循环。研究运用相对量化分析方法, 采用指标为: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

4.6 采用蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测 AMPK、FOXO3a、MnSOD 相关蛋白表达 提取蛋白, 按照 1:4 的配比, 加入 5 倍 SDS-PAGE。沸水加热 10 min 后, 经电泳分离、转膜后加入脱脂奶粉, 封

表 1 引物序列及扩增长度

基因	引物序列 (5' → 3')	长度 (bp)
β-actin	上游 GGGAAATCGTGCGTGACATTAAGG	180
	下游 CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG	
AMPK	上游 CCTGCTTGATGCACACATGA	147
	下游 TCTGGGCTGCATACAATCT	
FOXO3a	上游 CGTGCCCTTGTCGAATTCTGT	107
	下游 AGGGTTTGCATAGACTGGCT	
MnSOD	上游 AAGCGGTGTGTGTATGTGTG	176
	下游 TCCACCTTGCCCGTCTATTT	

闭 2 h。参考一抗的说明书,用一抗稀释液进行稀释 (AMPK 为兔抗 1:2 000; p-AMPK 为兔抗 1:1 000; FOXO3a 为兔抗 1:500; p-FOXO3a 为兔抗 1:500; MnSOD 为兔抗 1:300),慢慢摇动孵育,添加 PBST 进行洗涤。根据对应的比例 1:10 000 (p-FOXO3a、FOXO3a); 1:2 000 (AMPK、p-AMPK); 1:5 000 (MnSOD) 用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶标记的二抗。使用 ECL 发光试剂盒检测,分析吸光度值。

4.7 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用随机区组设计的单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 PBMCs 抑制率比较 (表 2) 与空白组比较, HQC 低、中、高剂量组细胞生长受到明显抑制 ($P < 0.01$)。在给药 24 h, 中剂量 HQC 含药血清细胞抑制率达到 50%, 随着含药血清浓度的增加, 抑制率增长不明显, 因此本研究采用给药 24 h, 中剂量 HQC 含药血清为后续实验的给药方法。

表 2 各组 PBMCs 抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	抑制率 (%)		
		12 h	24 h	48 h
空白	6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
阴性	6	-1.22 ± 0.10	-1.34 ± 0.08	-1.46 ± 0.04
HQC 低剂量	6	6.03 ± 0.09 [△]	11.75 ± 0.08 [*]	18.63 ± 0.08 [△]
HQC 中剂量	6	36.02 ± 0.08 [△]	50.32 ± 0.07 [*]	51.91 ± 0.07 [*]
HQC 高剂量	6	38.68 ± 0.05 [△]	58.88 ± 0.06 [*]	61.02 ± 0.07 [*]

注: 与空白组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, [△] $P < 0.01$

2 各组 PBMCs 中 MDA、LPO、SOD、及 TAOC 水平比较 (表 3) 与 N 组比较, M 组 PBMCs 中 MDA、LPO 明显升高, SOD、TAOC 明显降低 ($P < 0.01$); 与 M 组比较, HQC、HQC+Compound C 组 MDA、LPO 明显降低, SOD、TAOC 明显升高

($P < 0.01$), Compound C 组 MDA、LPO 明显升高, SOD、TAOC 明显降低 ($P < 0.01$); 与 Compound C 组比较, HQC+Compound C 组 MDA、LPO 明显降低, SOD、TAOC 明显升高 ($P < 0.01$)。

3 各组 PBMCs 中 AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA 表达水平比较 (表 4) 与 N 组比较, M 组 AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与 M 组比较, HQC 组 AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA 明显升高 ($P < 0.01$), Compound C 组 AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 Compound C 比较, HQC+Compound C 组 AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA 明显升高 ($P < 0.01$)。

4 各组 PBMCs 中 AMPK、FOXO3a、MnSOD 蛋白表达水平比较 (图 1, 表 5) 与 N 组比较, M 组 AMPK、p-AMPK、FOXO3a、p-FOXO3a、MnSOD 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与 M 组比较, HQC 组 AMPK、p-AMPK、FOXO3a、p-FOXO3a、MnSOD 蛋白水平明显升高 ($P < 0.01$), Compound C 组 AMPK、AMPK、FOXO3a、p-FOXO3a、MnSOD 蛋白水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 Compound C 组比较, HQC+Compound C 组 AMPK、p-AMPK、FOXO3a、p-FOXO3a、MnSOD 蛋白水平明显升高 ($P < 0.01$)。

讨 论

AS 是一种难治性、进展性的风湿免疫性疾病, 近年来的研究表明, 免疫和氧化应激因素可能是其发病机制之一^[10]。SOD、TAOC 是主要的氧化应激生物标志物, SOD 可通过歧化作用消除生物细胞中的超氧自由基, 产生 H_2O_2 和 O_2 , 而 H_2O_2 可能被 CAT 催化产生 H_2O 和 O_2 , 从而降低自由基对机体的毒性^[11]。MDA、LPO 是脂质过氧化产物, 反应氧化损伤的程度^[12]。AMPK 参与机体的许多代谢及炎症反应, 是存在于真核细胞内重要的能量感受器和调节器, 对能量调节有着极其重要的作用, 在炎症介质的刺激下 AMPK 的磷酸化水平降低, 进而影响生物学功能的正常发挥^[13]。AMPK 对细胞内的能量代谢具有高度感应能力^[14], 其活化能够降低一氧化氮合成酶的表达水平, 从而降低活性氧的积累, 对抵抗机体的氧化、炎症反应有重要作用^[15], 细胞内 AMPK 蛋白的激活减少导致 SOD 的下降, MDA 水平的升高^[16]。FOXO3a 参与机体的一系列生理病理活动, 如: 能量代谢、细胞凋亡、氧化应激等^[17, 18]。机体在外界

表 3 各组 PBMCs 中 MDA、LPO、SOD、TAOC 水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA	LPO	SOD	TAOC
N	6	1.75 ± 0.10	142.02 ± 5.49	157.34 ± 10.47	5.94 ± 0.24
M	6	4.24 ± 0.16*	480.86 ± 20.53*	99.86 ± 5.99*	2.57 ± 0.16*
HQC	6	2.79 ± 0.09 [△]	296.29 ± 16.91 [△]	129.86 ± 4.33 [△]	4.29 ± 0.25 [△]
Compound C	6	5.32 ± 0.13 [△]	538.47 ± 15.68 [△]	69.02 ± 7.48 [△]	1.32 ± 0.10 [△]
HQC+Compound C	6	3.77 ± 0.18 ^{△▲}	436.03 ± 15.69 ^{△▲}	107.55 ± 2.70 ^{△▲}	3.35 ± 0.28 ^{△▲}

注: 与 N 组比较, * $P < 0.01$; 与 M 组比较, [△] $P < 0.01$; 与 Compound C 组比较, [▲] $P < 0.01$

表 4 各组 PBMCs 中 AMPK、FOXO3a、MnSOD mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

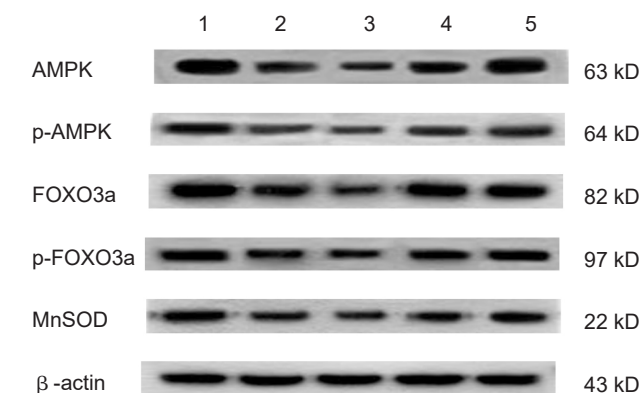
组别	n	AMPK	FOXO3a	MnSOD
N	6	1.00 ± 0.12	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.14
M	6	0.22 ± 0.04*	0.68 ± 0.09*	0.64 ± 0.08*
HQC	6	0.42 ± 0.08 ^{△△}	0.88 ± 0.12 ^{△△}	0.90 ± 0.08 ^{△△}
Compound C	6	0.11 ± 0.03 [△]	0.49 ± 0.04 ^{△△}	0.42 ± 0.07 ^{△△}
HQC+Compound C	6	0.28 ± 0.04 [▲]	0.75 ± 0.08 [▲]	0.75 ± 0.08 [▲]

注: 与 N 组比较, * $P < 0.01$; 与 M 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与 Compound C 组比较, [▲] $P < 0.01$

表 5 各组 PBMCs 中 AMPK、FOXO3a、MnSOD 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMPK	p-AMPK	FOXO3a	p-FOXO3a	MnSOD
N	6	1.16 ± 0.02	1.02 ± 0.05	1.15 ± 0.02	0.99 ± 0.04	1.18 ± 0.04
M	6	0.63 ± 0.05*	0.60 ± 0.06*	0.69 ± 0.03*	0.53 ± 0.05*	0.67 ± 0.05*
HQC	6	0.96 ± 0.09 ^{△△}	0.90 ± 0.08 ^{△△}	0.93 ± 0.06 ^{△△}	0.77 ± 0.04 ^{△△}	1.03 ± 0.06 ^{△△}
Compound C	6	0.44 ± 0.08 [△]	0.43 ± 0.03 [△]	0.44 ± 0.02 ^{△△}	0.40 ± 0.03 ^{△△}	0.55 ± 0.03 ^{△△}
HQC+Compound C	6	0.72 ± 0.05 [▲]	0.69 ± 0.09 [▲]	0.81 ± 0.05 [▲]	0.62 ± 0.07 [▲]	0.88 ± 0.05 [▲]

注: 与 N 组比较, * $P < 0.01$; 与 M 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与 Compound C 组比较, [▲] $P < 0.01$



注: 1 为 N 组; 2 为 M 组; 3 为 Compound C 组; 4 为 HQC+Compound C 组; 5 为 HQC 组

图 1 各组 PBMCs 中 AMPK、FOXO3a、MnSOD 蛋白表达电泳图

各种因素刺激过程中, 体内活性氧造成的氧化应激损伤会激活 FOXO3a 转录产生抗氧化酶以减轻氧化应激。MnSOD 是一种重要的内源性抗氧化蛋白, 是 SOD 其中的一种类型, 属于金属抗氧化酶。激活 AMPK 能够诱导 FOXO3a 发生磷酸化并从细胞质转移到细胞核, 调节下游基因 MnSOD 表达而发挥抗氧化作用^[19,20], 氧化应激指标水平的紊乱又与 AMPK-

FOXO3a-MnSOD 信号通路的下调密切相关。

基于 AS 活动期“脾虚湿热、痰瘀痹阻”基本病机研制的具有清热化湿、健脾通络作用的中药 HQC, 临床疗效显著^[7]。方中黄芩、栀子为君药, 清热燥湿, 泻火解毒以除湿、热之标实。现代药理研究发现黄芩中活性最强的黄酮类化合物黄芩苷和黄芩素均能通过调节 AMPK 发挥抗炎抗氧化作用^[21-23]。栀子苷及其代谢产物京尼平均能激活 AMPK 信号通路, 在糖尿病肾病、肝病及心肌损伤等疾病中发挥抗氧化应激作用^[24,25]。威灵仙祛风湿; 桃仁活血化瘀, 清除过多的氧自由基, 这与 AS 病程中医学风湿痹阻理论相符; 薏苡仁健脾化湿清热通络以治脾虚之本, 提高机体抗氧化能力, 有研究显示薏苡仁多糖能够增强 SOD 活力, 清除体内 LPO, 对抗糖代谢衰老, 薏苡仁油可通过 FOXO 转录因子同系物 DAF-16 调控下游靶基因^[26]。本研究以 AS 患者 PBMCs 为研究对象, 以 HQC 含药血清干预, 发现 HQC 含药血清能提高 AMPK-FOXO3a-MnSOD 信号通路中相关基因及蛋白的表达, 提高 TAOC、SOD 抗氧化酶的表达, 抑制 PBMCs 中 MDA、LPO 等氧自由基的生成。同时, 抑制剂 Compound C 组中加入 HQC 含药血清后,

AMPK-FOXO3a-MnSOD 信号通路中相关基因及蛋白表达都较单纯抑制剂组明显升高,且 TAOC、SOD 表达明显升高,MDA、LPO 含量明显降低,说明 HQC 含药血清能通过活化 AMPK-FOXO3a-MnSOD 信号通路,改善 PBMCs 氧化应激。然而 HQC 作为中药复方通过多靶点多机制发挥药理学作用,本研究的结果只能说明 HQC 发挥抑制 PBMC 氧化应激的作用可能与 AMPK-FOXO3a-MnSOD 信号通路有关,而 HQC 中具体哪些活性成分直接靶向 AMPK-FOXO3a-MnSOD 信号通路或者有其他抗氧化应激的机制则需要进一步的研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Kiltz U, van der Heijde D, Boonen A, et al. Measurement properties of the ASAS Health Index: results of a global study in patients with axial and peripheral spondyloarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77 (9): 1311-1317.
- [2] Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, et al. Global prevalence of ankylosing spondylitis[J]. *Rheumatology*, 2014, 53 (4): 650-657.
- [3] Liu J, Qi Y, Zheng L, et al. Xinfeng Capsule improves pulmonary function in ankylosing spondylitis patients via NF-KB-iNOS-NO signaling pathway[J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34 (6): 657-665.
- [4] Ye G, Xie Z, Zeng H, et al. Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction facilitates mesenchymal stem cell senescence in ankylosing spondylitis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (9): 775-788.
- [5] 包乾录,王力军,杨豪.强直性脊柱炎患者血清 SOD、CAT、TAS 水平与活动度的相关性[J]. *中国实用医刊*, 2020, 47 (13): 56-59.
- [6] 黄旦,刘健,纵瑞凯,等.湿热型强直性脊柱炎患者氧化应激相关指标的变化及相关性研究[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (2): 995-998.
- [7] 黄旦,刘健,万磊,等.黄芩清热除痹胶囊对强直性脊柱炎患者疗效及氧化应激的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35 (12): 1448-1452.
- [8] 蒋明,David Yu,林孝义,等主编. *中华风湿病学* [M]. 北京:华夏出版社,2004: 1018-1019.
- [9] 徐淑云,卞如濂,陈修主编. *药理实验方法学* [M]. 第 3 版,北京:人民卫生出版社,2002: 238.
- [10] Pishgahi A, Abolhasan R, Danaii S, et al. Immunological and oxidative stress biomarkers in ankylosing spondylitis patients with or without metabolic syndrome[J]. *Cytokine*, 2020, 128 (2020): 155002.
- [11] Liu K, Wu L, Shi X, et al. Protective effect of naringin against ankylosing spondylitis via ossification, inflammation and oxidative stress in mice[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12 (2): 153-1158.
- [12] Lorente L, Martin MM, Abreu-Gonzalez P, et al. Serum malondialdehyde levels in patients with malignant middle cerebral artery infarction are associated with mortality[J]. *PLoS One*, 2015, 10 (5): e0125893.
- [13] Biggioggero M, Favalli EG. Ten-year drug survival of anti-TNF agents in the treatment of inflammatory arthritides [J]. *Drug Dev Res*, 2014, 75 (suppl 1): S38-S41.
- [14] Hardie DG. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole body levels[J]. *Annu Rev Nutr*, 2014, 34 (1): 31-55.
- [15] Yang M, Huang Y, Chen J, et al. Activation of AMPK participates hydrogen sulfide-induced cyto-protective effect against dexamethasone in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454 (1): 42-47.
- [16] 孔怡琳,张玉佩,杨钦河,等.磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 α 在脂肪变性人肝癌 HepG2 细胞中的表达及其意义[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36 (22): 5496-5498.
- [17] Kim J, Choi H, Cho EG, et al. FoxO3a is an anti-melanogenic factor that mediates antioxidant-induced depigmentation[J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134 (5): 1378-1388.
- [18] Samarin J, Wessel J, Cicha I, et al. FoxO proteins mediate hypoxic induction of connective tissue growth factor in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (7): 4328-4336.
- [19] Li L, Hong HH, Chen SP, et al. Activation of AMPK/MnSOD signaling mediates anti-apoptotic effect of hepatitis B virus in hepatoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22 (17): 4345-4353.

- [20] Kim AD, Kang KA, Piao MJ, et al. Cytoprotective effect of eckol against oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction: involvement of the FoxO3a/AMPK pathway[J]. J Cell Biochem, 2014, 115 (8): 1403-1411.
- [21] Yuan Y, Men W, Shan X, et al. Baicalein exerts neuroprotective effect against ischaemic/reperfusion injury via alteration of NF- κ B and LOX and AMPK/Nrf2 pathway[J]. Inflammopharmacology, 2020, 28 (5): 1327-1341.
- [22] Tsai KL, Hung CH, Chan SH, et al. Baicalein protects against oxLDL-caused oxidative stress and inflammation by modulation of AMPK- α [J]. Oncotarget, 2016, 7 (45): 72458-72468.
- [23] Li S, Sun X, Xu L, et al. Baicalin attenuates *in vivo* and *in vitro* hyperglycemia-exacerbated ischemia/reperfusion injury by regulating mitochondrial function in a manner dependent on AMPK[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815 (23): 118-126.
- [24] Li FT, Chen Y, Li YJ, et al. Geniposide alleviates diabetic nephropathy of mice through AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 886 (5): 173449.
- [25] Meng YY, Yuan YP, Zhang X, et al. α protection against doxorubicin-induced cytotoxicity by geniposide involves AMPK signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019: 7901735.
- [26] Chen XY, Liao DC, Yu YT, et al. Coix seed oil prolongs lifespan and enhances stress resistance in *Caenorhabditis elegans*[J]. Biogerontology, 2020, 21 (2): 245-256.

(收稿: 2020-10-14 在线: 2021-08-11)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶

欢迎订阅 2022 年 *Chinese Journal of Integrative Medicine*

Chinese Journal of Integrative Medicine 《中国结合医学杂志》是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊, 旨在促进结合医学及替代医学的国际交流, 及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、病例报道、综述、药物相互作用、法规指南、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录, 如: Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/Medline、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excerpta Medica (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于 2007 年被 SCI-E 收录, 2021 年 6 月底科睿唯安公布 2020 年本刊 SCI 影响因子为 1.978。2010 年 10 月 1 日与汤森路透集团签约, 正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

Chinese Journal of Integrative Medicine 为大 16 开本, 铜版纸印刷, 彩色插图, 2011 年改为月刊, 80 页, 国内定价, 60.00 元/期, 全年定价: 720.00 元。国际标准刊号: ISSN 1672-0415, 国内统一刊号: CN 11-4928/R, 国内邮发代号: 82-825, 海外发行由 Springer 公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62876547-815; E-mail: cjim_en@cjim.cn; 网址: <http://www.cjim.cn>。