

网络出版时间: 2018-3-16 9:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.003.html>

## 白花丹醌对 CIA 大鼠滑膜细胞增殖及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 MMP-3 表达的影响

钟毓娟<sup>1</sup>, 李 丽<sup>2</sup>, 李勇文<sup>3</sup>, 杨成芳<sup>3</sup>, 方舒萍<sup>4</sup>, 程 琪<sup>4</sup>

**摘要** 目的 研究白花丹醌对脂多糖(LPS)诱导的体外培养 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞(CIA-FLS)的增殖及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和基质金属蛋白酶-3(MMP-3)表达的影响。方法 采用Ⅱ型胶原蛋白+弗氏完全佐剂建立大鼠关节炎模型(CIA);原代培养 CIA-FLS, MTT 法检测药物对 CIA-FLS 增殖的影响;随机设立 CIA 对照组、LPS 对照组、甲氨蝶呤组、白花丹醌 1.0  $\mu\text{mol/L}$  组、白花丹醌 1.5  $\mu\text{mol/L}$  组、白花丹醌 2.0  $\mu\text{mol/L}$  组;各药物与细胞共同孵育 48 h 后, ELISA 法检测细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MMP-3 的含量; Western blot 检测细胞内 MMP-3 的蛋白含量。结果 MTT 显示, 白花丹醌能不同程度抑制 CIA-FLS 的增殖, 呈浓度和时间依赖性;与 LPS 对照组比较, 甲氨蝶呤或白花丹醌均能明显下调细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MMP-3 的含量( $P < 0.001$ ), 明显降低细胞中 MMP-3 的蛋白含量( $P < 0.001$ )。结论 白花丹醌能抑制 CIA-FLS 的增殖, 并能通过下调 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MMP-3 的表

达而抑制 LPS 诱导 CIA-FLS 的炎症反应。

**关键词** 白花丹醌; Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎; 滑膜细胞; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白介素-1 $\beta$ ; 基质金属蛋白酶-3; 脂多糖

**中图分类号** R 363.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0343-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.003

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节组织慢性炎症性病变为主要表现的自身免疫性疾病。RA 的特征性表现是:滑膜炎、滑膜增生, 软骨吸收和骨质破坏。大量研究<sup>[1-2]</sup>显示 RA 的病理过程及疾病的发生、发展与滑膜细胞、巨噬细胞和软骨细胞等分泌的高水平的肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)密切相关。

白花丹是白花丹科白花丹属植物。在我国, 主要生长于广西、广东、四川、福建等地区, 民间用于治疗风湿性关节疼痛、血瘀闭经和跌打损伤等。白花丹醌是白花丹的主要活性成分, 其具有很强的活血化瘀作用, 已证实其抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗纤维化等作用<sup>[3]</sup>。白花丹醌抗类风湿关节炎研究国内尚未

2017-11-27 接收

基金项目: 广西高校科学技术研究项目(编号: KY2015LX279)

作者单位: 桂林医学院<sup>1</sup> 免疫学教研室、<sup>2</sup> 生理学教研室、<sup>3</sup> 药理学教研室、<sup>4</sup> 研究生学院, 桂林 541001

作者简介: 钟毓娟, 女, 研究生, 实验师;

杨成芳, 女, 硕士研究生, 实验师, 责任作者, E-mail: 308823789@qq.com

lar smooth muscle cells), and then recombine these cells into vascular structures. The scarcity and heterogeneity of primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells (vSMCs) hinder the advancement of vascular tissue engineering. Therefore, we investigated whether vSMCs could be generated from human exfoliated deciduous teeth (SHED). **Methods** Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) was utilized to induce SHED differentiation into vSMCs. The mRNA and protein expression were analyzed using RT-PCR, flow cytometry, Western blot and immunostaining. Furthermore, *in vitro* Matrigel angiogenesis assay was used to examine whether those SHED-derived vSMCs possess the similar function as primary SMCs. **Results** The results of analysis of SMCs specific markers' (SM22 $\alpha$ ,  $\alpha$ -SMA, SM-MHC, and Calponin) expression confirmed that TGF- $\beta$ 1 could induce the differentiation of SMCs from SHED, and the efficiency of differentiation assessed by flow cytometry was relatively high ( $\alpha$ -SMA 86.1%, SM22 $\alpha$  93.9%, Calponin 56.8% and SM-MHC 88.2%). The results of *in vitro* Matrigel Angiogenesis Assay confirmed that SHED-derived SMCs possessed the similar function with primary SMCs in stabilizing the vascular structures generated by human umbilical vein endothelial cells. **Conclusion** SHED possesses the potential to generate functional SMCs, and could be a promising cell candidate in vascular tissue engineering.

**Key words** tissue engineering; angiogenesis; dental pulp stem cells; smooth muscle cells

见报道。CIA 大鼠模型已被公认为是研究人类类风湿性关节炎的经典动物模型。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为细菌内毒素,进入机体后可激活单核、巨噬细胞等,促进各种细胞因子的合成与释放,是一种能有效地刺激细胞产生炎症反应的物质,LPS广泛应用于体外细胞实验建立细胞炎症模型<sup>[4]</sup>。该实验采用 CIA 大鼠取滑膜组织作分离和原代培养,LPS 作为炎症刺激因子建立胶原诱导性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes of college induced arthritis, CIA-FLS)细胞炎症模型,探讨白花丹醌抗类风湿性关节炎可能的分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 8 周龄 SD 大鼠,购自桂林医学院,动物许可证号: SCXK 桂 2013-0001。

**1.2 药物与试剂** 白花丹醌(批号: 1001468662)、酸可溶性 II 型胶原蛋白(C II)、弗氏完全佐剂和 LPS(美国 Sigma 公司);胎牛血清、1640 培养基和 0.25% 胰蛋白酶(美国 HyClone 公司);总蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物技术研究);兔抗鼠 MMP-3 多克隆抗体(英国 Abcam 公司);兔抗鼠 GAPDH 一抗和 HRP 标记的山羊抗兔二抗(上海生工公司);大鼠 TNF- $\alpha$  ELISA kit(上海逸峰生物公司);IL-1 $\beta$  ELISA kit(南京森贝伽生物公司);MMP-3 ELISA kit(上海广锐生物公司)。

**1.3 主要仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(Model 311, 美国 Thermo 公司);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);倒置相差显微镜(德国 Zeiss 公司);Molecular Imager Chemi Doc XRS(美国 BIO-RAD 公司);Infinite M200 PRO Microplate reader(瑞士 Tecan 公司)。

## 1.4 方法

**1.4.1 CIA 大鼠模型制备** 按照参考文献<sup>[5]</sup>的方法,将酸性 C II 250  $\mu$ g 注射于大鼠后肢足跖皮内致炎,半个月后重复免疫 1 次,造模成功后 CIA 模型大鼠用于取滑膜细胞。

**1.4.2 CIA 大鼠滑膜细胞的分离和培养** 参照文献<sup>[6]</sup>,无菌条件下分离 CIA 大鼠膝关节滑膜,用 D-hanks 液冲洗 3 遍,洗去滑膜表面的血污及附着的脂肪组织,将滑膜剪成约 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm 的小块,2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 100  $\mu$ l 胎牛血清,混匀,将其平铺在培养皿中,放入培养箱

中培养 20 min 使其贴壁,然后轻轻加入适量 20% 血清 1640 培养基置于细胞培养箱中,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。48 h 后倒置显微镜下观察到组织块周围有 FLS 细胞爬出,呈三角形、椭圆形和不规则的梭形细胞等,待细胞融合成片后,剔除组织块,继续培养。每 2~3 d 换液 1 次。待细胞长至 70%~80% 密度时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,每 3~4 d 传代 1 次,取第 3~4 代的细胞进行实验<sup>[7]</sup>。

**1.4.3 MTT 法检测白花丹醌对 LPS 作用后 CIA-FLS 细胞增殖的影响** MTT 操作步骤参照文献<sup>[2]</sup>进行,LPS 对照组加入含终浓度为 100  $\mu$ g/L 的 LPS<sup>[8]</sup>,各给药组在 LPS 对照组加入 LPS 作用 12 h 后加入含各浓度的药物作用 24、48、72 h,甲氨蝶呤组浓度为 2.2  $\mu$ mol/L,各组白花丹醌终浓度分别为 0.125、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5  $\mu$ mol/L,每组设 6 个复孔。计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 给药组 OD 值) / 对照组 OD 值  $\times$  100%。根据 MTT 实验结果,以白花丹醌 1.0、1.5、2.0  $\mu$ mol/L 3 个浓度组进行下述实验。

**1.4.4 ELISA 法检测白花丹醌对 LPS 作用后细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MMP-3 含量的影响**

将第 3~4 代的滑膜细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,调整细胞悬液为  $3 \times 10^7$  /L,接种细胞至直径为 10 cm 的培养皿中,细胞数为  $30 \times 10^4$  /皿。培养过夜,细胞贴壁良好后,CIA 对照组:加入 10% 胎牛血清的 1640 培养液;LPS 对照组:加入含 LPS 终浓度为 100  $\mu$ g/L 10% 胎牛血清 1640 培养液孵育 24 h;甲氨蝶呤组:先加入含甲氨蝶呤终浓度为 2.2  $\mu$ mol/L 的培养液 24 h,再加入终浓度为 100  $\mu$ g/L LPS 共孵育 24 h;白花丹醌 1.0、1.5、2.0  $\mu$ mol/L 浓度组:先加入终浓度分别为 1.0、1.5、2.0  $\mu$ mol/L 的白花丹醌孵育 24 h,再加入终浓度为 100  $\mu$ g/L LPS 共孵育 24 h。收集细胞培养上清液按各细胞因子的 ELISA 试剂盒说明书进行检测。实验重复 3 次取平均值。

**1.4.5 Western blot 检测白花丹醌对 LPS 作用后 CIA-FLS 细胞内 MMP-3 蛋白表达的影响** 同 1.4.4 分组给药后,低温提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每孔上样 50  $\mu$ g 蛋白,10% SDS-PAGE 分离样品,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别滴加 GAPDH (1:1 000)、MMP-3 (1:1 000) I 抗,4  $^{\circ}$ C 摇床过

夜,洗膜,加 II 抗(1:8 000)室温孵育 1 h,洗膜后将超敏 ECL 发光液滴加到膜上,当条带充分显色后,压 X 光片,暗室曝光 5~10 s,将 X 胶片进行显影、定影后可见到清晰条带。所得胶片经 Molecular Imager Chemi Doc XRS 分析系统进行灰度值分析。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,各组均数间两两比较采用 Student-Newman-Keuls(SNK- $q$ ) 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 白花丹醌对 LPS 作用后 CIA-FLS 增殖的影响

MTT 结果所示,白花丹醌在 0.125~0.5  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内对 CIA-FLS 细胞的抑制作用较小,与阳性药物甲氨蝶呤组比较,浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$  时对细胞的增殖抑制作用相当,差异无统计学意义;浓度为 1.5~3.5  $\mu\text{mol/L}$  范围对细胞的抑制作用较好( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),呈浓度和时间依赖性。故选取 1.0、1.5、2.0  $\mu\text{mol/L}$  3 个浓度组进行后续实验。

见表 1。

**2.2 白花丹醌对细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MMP-3 含量的影响** LISA 结果所示,与 CIA 对照组比较, LPS 明显上调了细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MMP-3 的表达( $P < 0.001$ ),提示 CIA-FLS 细胞炎症模型复制成功;与 LPS 对照组比较,阳性药物甲氨蝶呤或白花丹醌 3 个浓度组均能明显降低细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MMP-3 的含量( $P < 0.001$ );而与阳性药物甲氨蝶呤组比较,白花丹醌 2.0  $\mu\text{mol/L}$  组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的含量降低差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ );白花丹醌 1.5 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  组 MMP-3 含量降低差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。见表 2。

### 2.3 白花丹醌对 LPS 作用后 CIA-FLS 内 MMP-3 蛋白表达的影响

Western blot 结果所示,与 CIA 对照组比较, LPS 对照组 MMP-3 蛋白表达明显增加( $P < 0.001$ );与 LPS 对照组比较,阳性药物甲氨蝶呤或白花丹醌作用 48 h 后,能明显降低细胞内 MMP-3 的蛋白含量( $P < 0.001$ );而与阳性药物甲氨蝶呤组

表 1 不同浓度的白花丹醌对 LPS 作用后 CIA-FLS 增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别     | 浓度( $\mu\text{mol/L}$ ) | 24 h 抑制率(%)        | 48 h 抑制率(%)        | 72 h 抑制率(%)        |
|--------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| LPS 对照 | —                       | —                  | —                  | —                  |
| 甲氨蝶呤   | 2.2                     | 9.30 $\pm$ 1.35    | 23.86 $\pm$ 2.91   | 32.80 $\pm$ 3.02   |
| 白花丹醌   | 0.125                   | 3.52 $\pm$ 0.56*   | 6.59 $\pm$ 0.98**  | 7.42 $\pm$ 1.06**  |
|        | 0.25                    | 5.22 $\pm$ 0.82    | 8.81 $\pm$ 1.17**  | 10.86 $\pm$ 1.12** |
|        | 0.5                     | 7.92 $\pm$ 1.13    | 13.99 $\pm$ 2.35** | 15.32 $\pm$ 2.14** |
|        | 1                       | 13.50 $\pm$ 2.06   | 22.18 $\pm$ 2.76   | 28.40 $\pm$ 3.29   |
|        | 1.5                     | 19.79 $\pm$ 2.97** | 33.04 $\pm$ 3.73*  | 45.32 $\pm$ 4.82** |
|        | 2                       | 25.45 $\pm$ 4.53** | 41.20 $\pm$ 3.32** | 58.71 $\pm$ 4.12** |
|        | 2.5                     | 39.04 $\pm$ 4.45** | 61.96 $\pm$ 4.36** | 77.40 $\pm$ 5.94** |
|        | 3                       | 51.84 $\pm$ 5.93** | 71.89 $\pm$ 6.94** | 85.32 $\pm$ 6.36** |
|        | 3.5                     | 59.53 $\pm$ 6.30** | 85.12 $\pm$ 8.67** | 87.69 $\pm$ 6.22** |
| F 值    | —                       | 183.28             | 238.07             | 314.53             |
| P 值    | —                       | <0.01              | <0.01              | <0.01              |

与甲氨蝶呤组比较: \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$

表 2 白花丹醌对 CIA-FLS 细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MMP-3 含量改变的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别     | 浓度( $\mu\text{mol/L}$ ) | TNF- $\alpha$ (pg/ml)            | IL-1 $\beta$ (pg/ml)       | MMP-3(pg/ml)                       |
|--------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| CIA 对照 | —                       | 24.46 $\pm$ 5.12                 | 35.72 $\pm$ 6.39           | 81.57 $\pm$ 9.03                   |
| LPS 对照 | —                       | 104.20 $\pm$ 10.94*              | 135.33 $\pm$ 12.41*        | 307.09 $\pm$ 16.69*                |
| 甲氨蝶呤   | 2.2                     | 60.10 $\pm$ 7.42#                | 75.22 $\pm$ 10.62#         | 178.01 $\pm$ 12.12#                |
| 白花丹醌   | 1.0                     | 70.51 $\pm$ 9.31#                | 84.88 $\pm$ 9.99#          | 188.70 $\pm$ 9.77#                 |
|        | 1.5                     | 52.61 $\pm$ 8.60#                | 67.13 $\pm$ 8.55#          | 152.58 $\pm$ 11.28# $\Delta$       |
|        | 2.0                     | 34.74 $\pm$ 7.84# $\Delta\Delta$ | 51.08 $\pm$ 8.37# $\Delta$ | 120.48 $\pm$ 12.29# $\Delta\Delta$ |
| F 值    | —                       | 56.65                            | 64.37                      | 193.50                             |
| P 值    | —                       | <0.01                            | <0.01                      | <0.01                              |

与 CIA 对照组比较: \*  $P < 0.001$ ; 与 LPS 对照组比较: #  $P < 0.001$ ; 与甲氨蝶呤组比较:  $\Delta$   $P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.001$

比较,白花丹醌 1.5 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  组 MMP-3 的蛋白含量明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1。

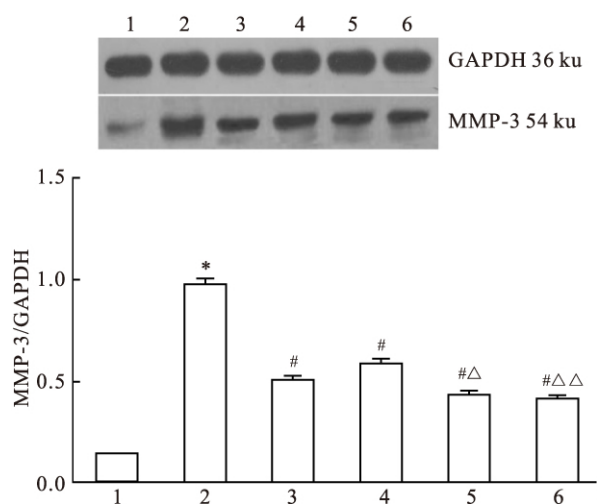


图1 白花丹醌对 LPS 作用后 CIA-FLS 中的 MMP-3 表达的影响

1: CIA 对照组; 2: LPS 对照组; 3: 甲氨蝶呤组; 4: 白花丹醌 1.0  $\mu\text{mol/L}$  组; 5: 白花丹醌 1.5  $\mu\text{mol/L}$  组; 6: 白花丹醌 2.0  $\mu\text{mol/L}$  组; 与 CIA 对照组比较: \*  $P < 0.001$ ; 与 LPS 对照组比较: #  $P < 0.001$ ; 与甲氨蝶呤组比较:  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

### 3 讨论

RA 是一种慢性进行性的自身免疫障碍性疾病,在世界范围内的平均患病率约 1%,我国患病率为 0.35%<sup>[9]</sup>。RA 晚期可出现不同程度的关节畸形和功能障碍,是一种致残率较高的疾病,严重危害人类健康。目前尚无根治的方法,常用的治疗药物主要有非甾体类抗炎药、糖皮质激素、改善病情的抗风湿药和生物制剂。

目前认为在 RA 发病机制中,滑膜细胞中的成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)是 RA 关节损伤的最终效应细胞,通过表达细胞因子和趋化因子等效应信号的精细调节,以自分泌和旁分泌方式刺激或抑制炎症反应,成为关节炎和关节破坏的直接效应者<sup>[10]</sup>。滑膜细胞的增生是 RA 一个突出的特征。RA 滑膜细胞的异常增殖能分泌大量的细胞因子是滑膜增生的主要原因。本研究结果显示,与阳性药物甲氨蝶呤组相比较,白花丹醌在浓度为 1.5 ~ 3.5  $\mu\text{mol/L}$  范围对 CIA-FLS 细胞的增殖有很好的抑制作用( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),表明白花丹醌能直接和间接抑制滑膜的增生。

研究<sup>[11]</sup>显示,导致 RA 关节内炎性细胞聚集,滑膜组织增生、软骨及骨降解和破坏的主要因素在

于成纤维样滑膜细胞具有的转化细胞的特征及其所分泌的大量促炎性细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶 MMPs,其中由单核细胞、巨嗜细胞、关节组织中的滑膜细胞和软骨细胞分泌的 IL-1 $\beta$  及由主要由单核巨嗜细胞产生的 TNF- $\alpha$  在 RA 的病程进展中处于中心地位。IL-1 $\beta$  是炎症的始动因素,过度分泌的 IL-1 $\beta$  可以刺激滑液和软骨细胞合成并释放前列腺素 E2 和胶原酶,引发滑膜炎反应、软骨基质崩解。IL-1 $\beta$  还作用于内皮细胞,促进嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨嗜细胞聚集,加重关节局部炎症反应<sup>[12-13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>显示,RA 患者血清中 TNF- $\alpha$  呈高水平分泌与疾病活动性或严重性增强密切相关。TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  的效应与靶细胞相似, TNF- $\alpha$  也可以刺激滑膜细胞和软骨细胞合成前列腺素 E2 和胶原酶,引起骨和软骨吸收的破坏,促进成纤维细胞增生。TNF- $\alpha$  的分泌不但可以刺激巨嗜细胞增加自身的产生,而且也促进 IL-1 $\beta$  的合成和分泌,呈正反馈调节。因此,抑制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌对控制 RA 的病情和改善预后非常重要。

基质金属蛋白酶是一组需要  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等金属离子作为辅助因子的蛋白水解酶, MMPs 几乎能水解细胞外基质的各种蛋白成分,导致关节韧带、骨和软骨的破坏。MMPs 广泛存在于各种结缔组织中, MMP-3 被认为与类风湿性关节炎关系最为密切。Ma et al<sup>[15]</sup> 研究发现, RA 患者血清中 MMP-3 异常增高,是类风湿性关节炎诊断的一种生物标志物。MMP-3 这一系统性的炎症标志物,现已被认为是诱导软骨降解最重要的蛋白酶,并可作为类风湿关节炎患者滑膜损伤以及预后的指标<sup>[2]</sup>。

本实验结果显示,白花丹醌能有效抑制 CIA-FLS 的增殖,明显降低 CIA-FLS 培养上清液中细胞炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的分泌和 MMP-3 的表达,降低 CIA-FLS 中 MMP-3 的蛋白表达,这可能是白花丹醌抑制 CIA-FLS 炎症模型的重要作用机制之一,也可能是白花丹醌民间用于治疗风湿性疼痛的有效途径。本实验为白花丹醌治疗类风湿性关节炎的临床应用提供实验依据。

### 参考文献

- [1] Feldmann M, Brennan F M, Foxwell B M, et al. The role of TNF- $\alpha$  and IL-1 in rheumatoid arthritis [J]. Curr Dir Autoimmun, 2001, 3: 188 - 99.
- [2] 向导, 袁林, 苏林冲, 等. 金边祛风饮对类风湿性关节炎滑膜细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 MMP-3 表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(9): 952 - 4.

- [3] 王玖恒,李景强,彭岳,等. 白花丹醌的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2012,30(7):1626-8.
- [4] 徐婧秋,吴丽萍. 脂多糖和白细胞介素-1 $\beta$  对人牙周膜细胞中诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2011,29(4):415-9.
- [5] Zhu L, Wei W, Zheng Y Q, et al. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on joint damage in rat collagen-induced arthritis[J]. Inflamm Res, 2005, 54(5): 211-20.
- [6] 黄宪章,王 前,郑 磊,等. 人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞培养及生物学特性研究[J]. 南方医科大学学报,2009,29(3):462-5.
- [7] 蔡文虹,孙保东,张宝凤,等. 两种方法分离培养类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞的比较[J]. 中国当代医药,2012,19(21):13-4.
- [8] 孔静静. TLR4 对脂多糖诱导的大鼠颞下颌关节滑膜成纤维细胞分泌 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的影响[D]. 济南: 山东大学,2015.
- [9] 陈慧丽,姜明华,王 新,等. 护理干预对类风湿性关节炎患者疼痛的影响研究[J]. 现代生物医学进展,2012,12(6):1157-9.
- [10] Noss E H, Brenner M B. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis[J]. Immunol Rev, 2008, 223: 252-70.
- [11] 陈晓宇,陈 明,李 俊. MAPKs 信号转导在类风湿性关节炎滑膜细胞中作用[J]. 中国药理学通报,2006,22(12):1424-8.
- [12] Jeong J G, Kim J M, Cho H, et al. Effects of IL-1 beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(1): 3-7.
- [13] Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, et al. Prostaglandin E2 is an enhancer of interleukin-1 beta-induced expression of membrane-associated prostaglandin synthase in rheumatoid synovial fibroblasts[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(10): 2819-28.
- [14] 朱 江,谢文利,晋玉章,等. 栀子对类风湿性关节炎大鼠血清 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响[J]. 中成药,2005,27(7):801-3.
- [15] Ma J D, Wei X N, Zheng D H, et al. Erratum to: continuously elevated serum matrix metalloproteinase-3 for 3 ~ 6 months predict one-year radiographic progression in rheumatoid arthritis: a prospective cohort study[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17: 311.

## Effect of plumbagin on proliferation and the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and MMP-3 in CIA-FLS in rat

Zhong Yujuan<sup>1</sup>, Li Li<sup>2</sup>, Li Yongwen<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Immunology, <sup>2</sup>Dept of Physiology, <sup>3</sup>Dept of Pharmacology, Guilin Medical University, Guilin 541001)

**Abstract Objective** To observe the effects of plumbagin on proliferation and the expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in fibroblast-like synoviocytes (FLS) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Using type II collagen and Freund's complete adjuvant to make arthritis model in rat. CIA-FLS were primary cultured *in vitro*, the effect of drug on proliferation of CIA-FLS was detected by MTT method. CIA-FLS were divided into CIA control group, LPS control group, methotrexate group, three concentration groups of plumbagin 1.0, 1.5 or 2.0  $\mu\text{mol/L}$ ; after being incubated with each drug for 48 hours, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MMP-3 in cell culture supernatant were assayed by ELISA; the protein content of MMP-3 in CIA-FLS was measured by Western blot. **Results** The result of MTT showed that plumbagin could inhibit the proliferation of CIA-FLS in different degrees, presenting in a concentration and time dependence manner. Compared with LPS control group, the contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MMP-3 in cell culture supernatant were significantly decreased in methotrexate, the 1.0, 1.5 and 2.0  $\mu\text{mol/L}$  of plumbagin groups ( $P < 0.001$ ); methotrexate or plumbagin could also significantly reduce the protein expression of MMP-3 in CIA-FLS ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Plumbagin can inhibit the proliferation of CIA-FLS and the inflammatory reaction induced by LPS *via* decreasing the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MMP-3.

**Key words** plumbagin; CIA; FLS; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; MMP-3; LPS