

rhIL-1 α 和 rhTNF- α 对人成纤维滑膜细胞 PGE₂ 受体和 G α s 的影响及芍药苷的作用

戴杏 郭晓蓉 魏伟

摘要 目的 探讨 rhIL-1 α 和 rhTNF- α 对人成纤维样滑膜细胞(FLS) PGE₂ 受体(EP₂)及 G α s 表达的影响及芍药苷(Pae)的作用。方法 体外培养人 FLS,使用不同浓度的 rhIL-1 α 和 rhTNF- α 刺激人 FLS,观察 EP₂ 及 G α s 蛋白表达的情况,观察 Pae 对其的影响。采用免疫荧光标记法结合激光共聚焦显微镜分析技术检测人 FLS 的 EP₂ 表达,Western blot 检测 G α s 表达。结果 rhIL-1 α (0.1、1、10 μ g/L)和 rhTNF- α (0.2、2、20 μ g/L)明显降低人 FLS EP₂ 和 G α s 表达,Pae(10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)可上调人 FLS 的 EP₂ 和 G α s 表达。结论 Pae 恢复 rhIL-1 α 和 rhTNF- α 刺激后 EP₂ 和 G α s 的表达可能是其抑制滑膜细胞增殖和亢进分泌功能的分子机制之一。

关键词 rhIL-1 α ; rhTNF- α ; 成纤维样滑膜细胞; PGE₂ 受体; G α s 蛋白; 芍药苷

中图分类号 R 967; R 593.22; R 97.5; R 392.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1110-06

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜组织慢性炎症为主要特征的自身免疫性疾病,伴有血管翳形成、软骨缺失以及近关节处骨组织的侵蚀^[1]。成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)释放大量的炎症因子和基质降解酶,是炎症关节中关键的效应细胞。PGE₂、白介素 1(IL-1)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等炎症介质和细胞因子都可以引起 FLS 的异常活化。PGE₂ 通过 G 蛋白偶联的 4 个受体(EP₁₋₄)来发挥生物学功效。EP₂ 和 EP₄ 可以提高 AC 活性,升高 cAMP 水平活化 G 蛋白。二者在滑膜组织中均有表达,其中 EP₂ 与关节炎关系最为紧密且研究较多^[2]。芍药苷(Pae-

oniflorin, Pae)是白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)主要活性成分,经研究证实具有免疫调节、抗炎和镇痛等作用。该课题组前期研究^[3-4]表明:TGP 可以调节 rhIL-1 α 和 rhTNF- α 体外刺激的 CIA 大鼠 FLS 功能;Pae 与 rhIL-1 α 体外共同作用 12 h 后可升高 CIA 大鼠 FLS EP₄ 受体的表达。Pae 可抑制 rhIL-1 α 、rhTNF- α 诱导的人 FLS 异常增殖和产生 TNF- α 、IL-1 β 和 PGE₂ 的水平,提高细胞内 cAMP 水平^[5-6]。该研究在前期实验基础上利用 rhIL-1 α 和 rhTNF- α 体外刺激正常人 FLS 后观察 EP₂、G α s 的表达情况以及 Pae 对其的影响,进一步探讨 Pae 发挥抑制滑膜细胞增殖和亢进分泌功能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 组织来源 滑膜组织取自安徽医科大学第一附属医院骨科骨折患者,行膝关节置换术时留取滑膜标本分离培养滑膜组织,术前患者签署知情同意书。

1.2 药物 Pae(C₂₃H₂₈O₁₁):由安徽医科大学临床药理研究所提供。

1.3 试剂与仪器 rhIL-1 α 、rhTNF- α :美国 CYTO-LAB 公司;胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、DMEM 培养粉:美国 Gibco 公司;FITC 标记羊抗兔 IgG、Vimentin 抗体、CD68 抗体、辣根酶山羊抗兔 IgG(H+L):北京中杉金桥公司;兔抗人 Anti-G α s、Anti-EP₂:美国 Santa Cruz 公司; β -actin:美国 Sigma 公司;倒置相差显微镜、激光共聚焦显微镜:日本 OLYMPUS 公司。

1.4 人 FLS 的分离与培养 无菌取患者少许关节滑膜组织,用含有双抗的 PBS 洗涤 2~3 次后剪成 1 mm² 大小的组织块放置于 DMEM 培养液中,将组织块均匀排列在培养瓶底壁上,轻轻翻转使瓶底朝上,然后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养使其贴壁。6 h 后取出培养瓶加入少许预温的含 20% FBS 的 DMEM 培养液,以刚刚覆盖组织块为宜,继续培养,1~2 d 后更换培养液,3~5 d 后即会长出少量细胞,待有大量细胞长出后可去除组织块,细胞长满后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,并传代培养,取对数生

2014-03-20 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31200675、81173075、30973543、81330081);安徽省自然科学基金资助项目(编号:1208085QH158)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,安徽省中药研究与开发重点实验室,抗炎免疫药物安徽省工程技术研究中心,合肥 230032

作者简介:戴杏,女,博士研究生;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

长期3~5代细胞用于实验。

1.5 人 FLS 的免疫组化鉴定 将无菌小盖玻片泡酸消毒后置于6孔板中,细胞悬液接种于盖玻片上,待细胞爬满玻片后取出,按以下步骤操作:① PBS 洗涤玻片3次,每次洗3 min。② 4%多聚甲醇固定10 min,再用 PBS 冲洗3次,干燥。③ 正常羊血清封闭30 min, PBS 洗涤。④ 加入鼠抗人 Vimentin、CD68 单克隆抗体 20 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤。⑤ 滴加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温静置。⑥ DAB 显色 5 min, PBS 或蒸馏水冲洗 10 min 终止显色。⑦ 0.5% 苏木精复染,乙醇梯度脱水,中性树胶封片,镜下观察、拍照。

1.6 免疫荧光法测人 FLS EP₂ 表达及图像分析 取第3~5代人 FLS 用含20% FBS 的 DMEM 培养液制成 1×10^7 个/L 细胞悬液加入24孔培养板,每孔1 ml,置于培养箱中培养12 h 使其贴壁后弃上清液,分别加入含 rhIL-1 α (0.1、1、10 μ g/L)、rhTNF- α (0.2、2、20 μ g/L) 以及 rhIL-1 α (10 μ g/L)、rhTNF- α (20 μ g/L) 分别和不同浓度的 Pae (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 混合的 DMEM 培养24 h 后终止反应,用 PBS 洗涤3次,甲醇-20 °C 固定10 min,自然干燥10 min,用10%正常山羊血清室温封闭30 min,加入按1:100稀释的兔抗人 Anti-EP₂ 20 °C 过夜, PBS 液冲洗,再加入 FITC 标记的按1:100稀释的羊抗兔 IgG 37 °C 避光孵育1 h, PBS 冲洗后用 pH 值为8.5的封闭液封片。以 PBS 替代一抗作阴性对照,省略一抗作空白对照。激光共聚焦显微镜观察并采图。图像采用 Image Pro Plus 5.1 分析系统分析。显微镜下发出黄绿色荧光者为阳性细胞,取上、下、左、右、中5个显微镜视野采图,图像分析系统分析每个视野的光密度值,然后求平均光密度值。

1.7 Western blot 法测 Gas 蛋白表达 取第3~5代人 FLS 用含20% FBS 的 DMEM 培养液制成 1×10^7 个/L 细胞悬液加入6孔培养板,加入含 rhIL-1 α (10 μ g/L)、rhTNF- α (20 μ g/L) 和不同浓度的 Pae (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 培养24 h 后终止反应, PBS 充分洗涤后加入 RIRA 裂解液 200 μ l,裂解30 min,用细胞刮刮下细胞收集后移至 EP 管中,于-80 °C 冰箱反复冻融3次,冰浴超声降解1 min 后,14 000 r/min 离心20 min,取上清液,保存-80 °C 冰箱。制备电泳凝胶,将提取的蛋白样本进行 SDS-PAGE 转移至 PVDF 膜后,用5%脱脂奶粉/PBS 室温封闭2 h;将 PVDF 膜放入稀释一抗中室温孵育

2 h, PBS 洗3次,每次10 min;加入稀释二抗室温孵育2 h,再 PBS 洗3次,每次10 min;加入显色液显色。结果采用凝胶成像系统扫描后,以特异性条带浓度与面积的乘积为有效值,反映蛋白表达水平。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 11.7 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 人 FLS 体外的培养及鉴定 将人的滑膜组织分离培养后,置于倒置显微镜下观察,发现细胞贴壁后逐渐伸展呈梭型、长条形生长。波形蛋白免疫组化染色结果发现胞质内见大量棕黄色颗粒,核呈蓝色。CD68 免疫组化染色第3代滑膜细胞呈阴性,纯度为90%以上,符合人 FLS 的特征,见图1。

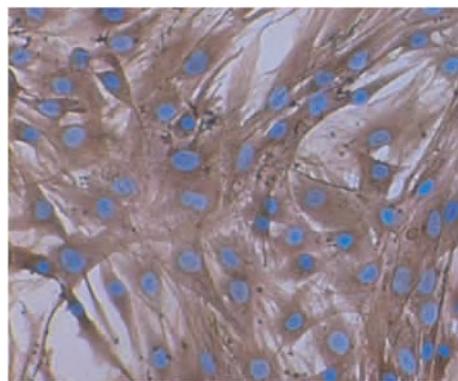


图1 人 FLS Vimentin 染色阳性 $\times 200$

2.2 荧光显微镜下人 FLS EP₂ 表达

2.2.1 不同浓度 rhIL-1 α 和 Pae 对人 FLS EP₂ 表达的影响 免疫荧光检测结果显示:人 FLS 在胞膜胞质可发出黄绿色荧光,EP₂ 主要定位于人 FLS 的胞质和胞膜。与未加刺激的人 FLS 相比,rhIL-1 α (0.1、1、10 μ g/L) 体外刺激24 h 后人 FLS 表现为荧光度不同程度降低,图像分析显示平均光密度值呈浓度依赖性降低 ($F = 14.044$, $P < 0.01$),提示 EP₂ 受体的表达减少。与未加刺激的人 FLS 相比,rhIL-1 α (10 μ g/L) 体外刺激24 h 后,荧光度降低,EP₂ 受体表达减少。Pae (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 体外培养24 h 后荧光度不同程度增强,图像分析显示平均光密度值呈浓度依赖性升高 ($F = 19.554$, $P < 0.01$),提示 Pae 可不同程度的升高 EP₂ 受体的表达。见图2、3。

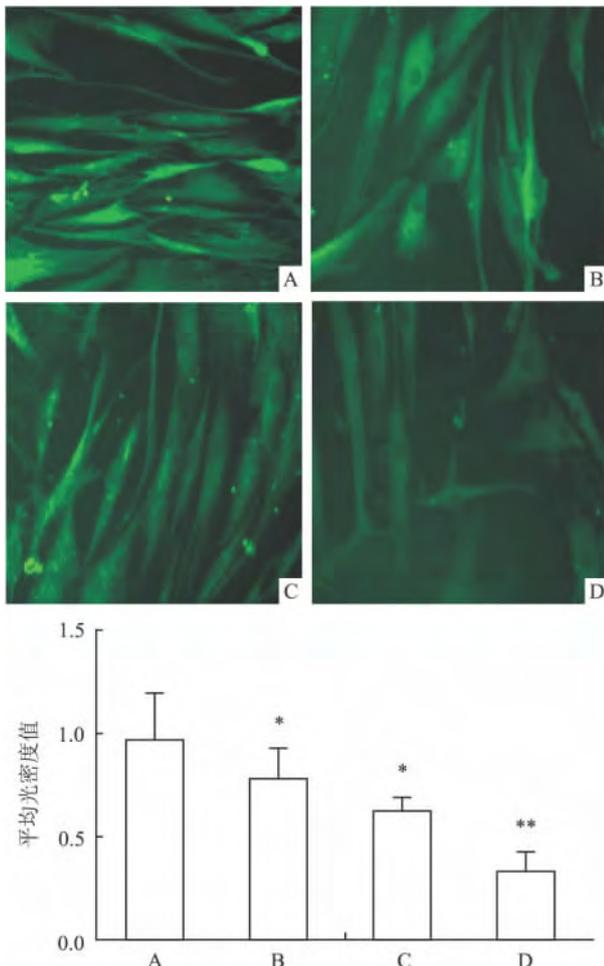


图2 rhIL-1α体外刺激人 FLS 24 h EP₂ 的表达 ×200 (n=4 $\bar{x} \pm s$)

A:正常组;B、C、D:rhIL-1α(0.1、1、10 μg/L)刺激组;与正常组比较:* P<0.05,** P<0.01

2.2.2 不同浓度 rhTNF-α 和 Pae 对人 FLS EP₂ 表达的影响 免疫荧光检测结果显示:与未加刺激的人 FLS 相比,rhTNF-α (0.2、2、20 μg/L) 体外刺激 24 h 后人 FLS 表现为荧光度不同程度降低,图像分析显示平均光密度值呈浓度依赖性降低 ($F = 16.36, P < 0.01$),提示 EP₂ 受体的表达减少。与未加刺激的人 FLS 相比,rhTNF-α (20 μg/L) 体外刺激 24 h 后,荧光度降低,EP₂ 受体表达减少。Pae (10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L) 体外培养 24 h 后荧光度不同程度增强,图像分析显示平均光密度值呈浓度依赖性升高 ($F = 18.866, P < 0.01$),提示 Pae 可不同程度的升高 EP₂ 受体的表达。见图 4、5。

2.3 Pae 对人 FLS Gαs 蛋白表达的影响 分别用 rhIL-1α(10 μg/L) 和 rhTNF-α (20 μg/L) 体外刺激人 FLS 24 h 后,Western blot 法检测 Gαs 表达水平。结果表明,与正常组相比,刺激后 Gαs 表达明显降

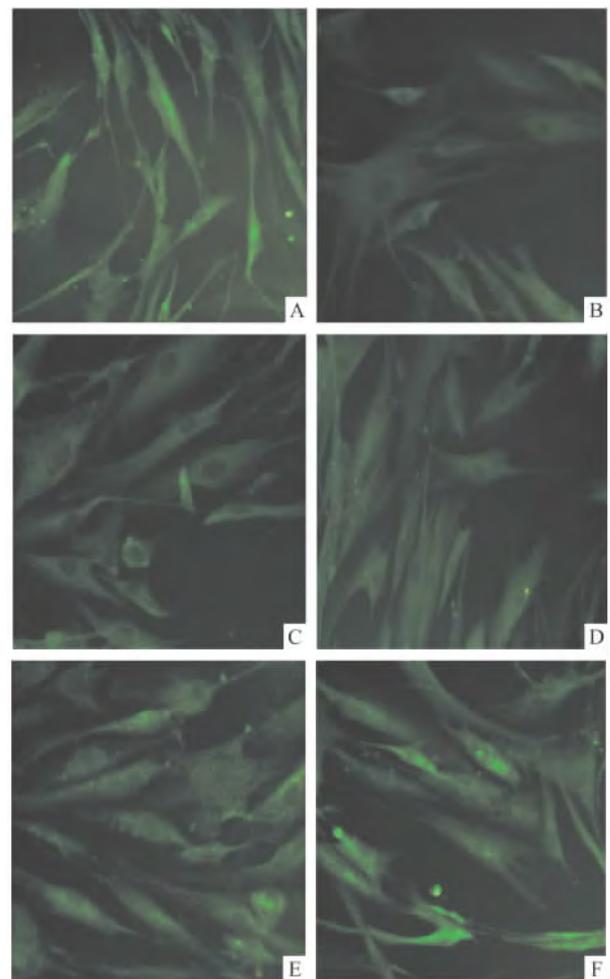


图3 Pae对 rhIL-1α体外刺激后人 FLS EP₂ 受体的表达 ×200 (n=4 $\bar{x} \pm s$)

A:正常组;B:rhIL-1α(10 μg/L)刺激组;C、D、E、F: rhIL-1α(10 μg/L)和 Pae(10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L)共同作用组;与正常组比较:##P<0.01;与 rhIL-1α(10 μg/L)刺激组比较:* P<0.05,** P<0.01

低,Pae(10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L) 体外培养 24 h 后可明显提升 Gαs 表达 ($F = 7.747、9.476, P < 0.01$)。见图 6。

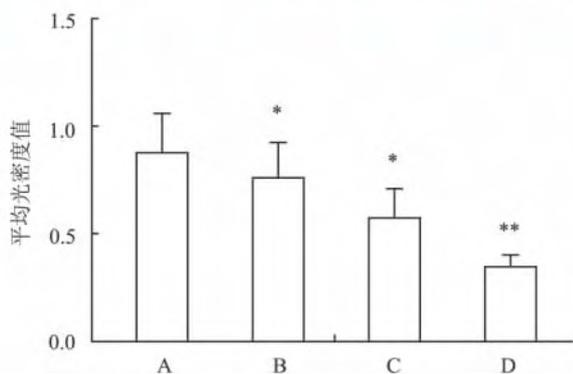
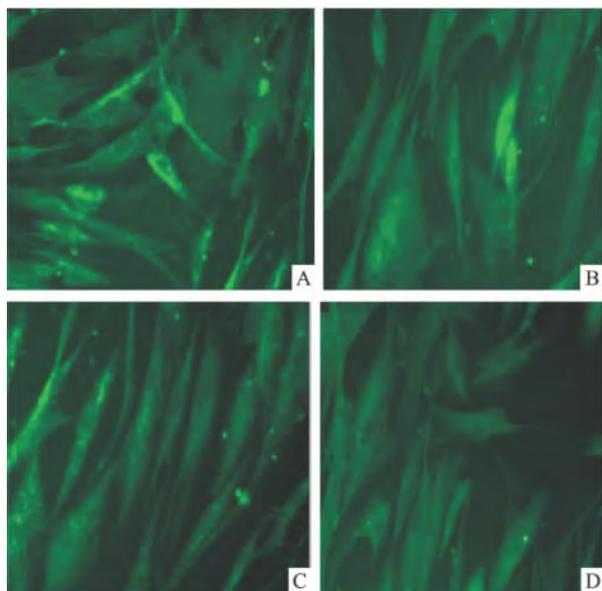


图4 rhTNF- α 体外刺激人FLS 24 h EP₂

受体的表达 $\times 200 (n=4 \bar{x} \pm s)$

A: 正常组; B、C、D: rhTNF- α (0.2、2、20 $\mu\text{g/L}$) 刺激组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

RA 的主要病理特点为慢性滑膜炎,血管翳形成, 侵及关节软骨和软骨下骨, 使关节畸形并失去功能。炎症因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6、PGE₂ 高表达于滑膜细胞, 在 RA 的发生、发展中起着重要作用。IL-1 可以引起 RA 骨破坏和软骨基质降解^[7]。TNF- α 可刺激滑膜细胞和软骨细胞合成 PGE₂ 和胶原酶, 促进 FLS 活化、破坏关节^[8]。EP₂ 参与调节促炎因子 IL-1、IL-6 和 TNF- α 分泌^[9]。PGE₂ 参与 RA 发病的多个环节, 与水肿、软骨和近关节骨的侵蚀都有关联。PGE₂ 通过与细胞膜上相应的 EP 受体结合而发挥作用。EP₂ 与 PGE₂ 结合后激活 G α s 并与其偶联, 启动 PGE₂-EP-G 蛋白-cAMP 信号通路来发挥其生理和病理效应。

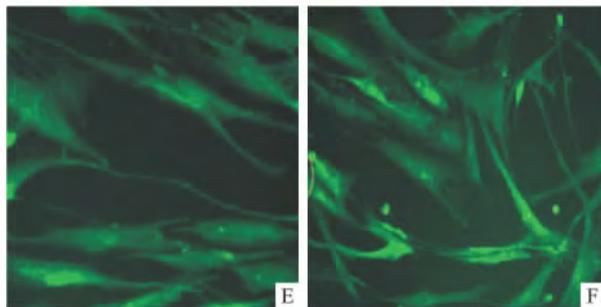
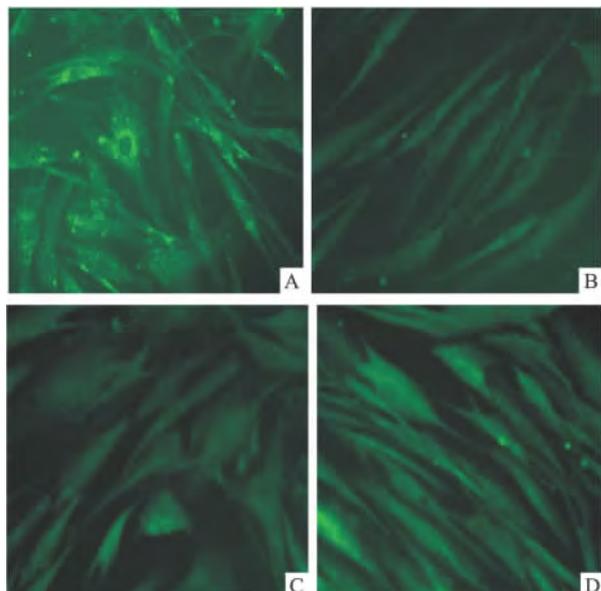


图5 Pae对rhTNF- α 体外刺激后人FLS EP₂

的表达 $\times 200 (n=4 \bar{x} \pm s)$

A: 正常组; B: rhTNF- α (20 $\mu\text{g/L}$) 刺激组; C、D、E、F: rhTNF- α (20 $\mu\text{g/L}$) 和 Pae (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 共同作用组; 与正常组比较: ## $P < 0.01$; 与 rhTNF- α (20 $\mu\text{g/L}$) 刺激组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

G 蛋白由 α 、 β 、 γ 3 个亚基组成, α 亚基是特异性 GTP、GDP 结合位点, 具有 GTP 酶活性, G α s 和 G α i 的平衡是维持细胞正常生理功能的基础, G α s 激活 AC, 升高 cAMP 水平; G α i 则抑制 AC, 降低 cAMP 水平, G α s/G α i 失衡时, 会导致细胞功能异常^[10]。该课题组前期研究^[4, 11] 结果显示: G 蛋白-

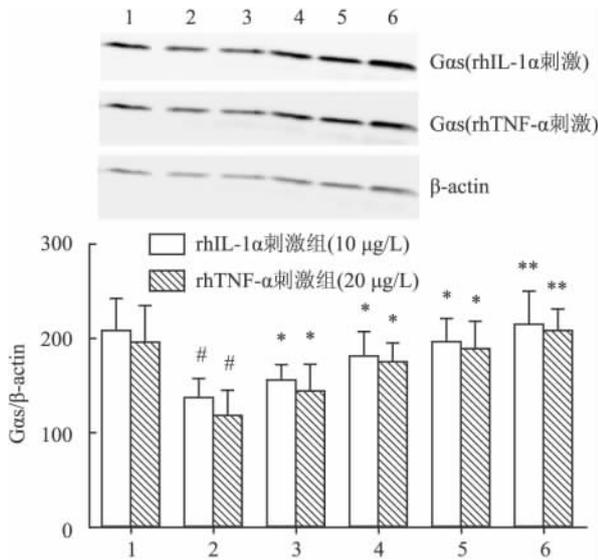


图6 Pae对rhIL-1α和rhTNF-α体外刺激后人FLS Gas的表达 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

1:正常组;2:刺激组;3~6:刺激剂与Pae(10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L)作用组;与正常组比较:#P<0.05;与刺激组比较:*P<0.05,**P<0.01

AC-cAMP信号通路介导了AA和CIA大鼠FLS的异常增殖;TGP能明显抑制AA大鼠滑膜组织中Gαi的表达,促进Gαs的表达,恢复Gαs/Gαi的平衡;促进EP₂和EP₄的表达;提高细胞内cAMP水平,从而降低FLS的增殖与分泌^[12]。动物实验研究^[4,12]显示:TGP可能是通过影响PGE₂-EP-G蛋白-cAMP信号通路来发挥治疗作用的。人FLS细胞水平的前期研究^[5-6]已经显示不同浓度rhIL-1α和rhTNF-α体外刺激可以促进人FLS的异常增殖,升高TNF-α、IL-1β和PGE₂,降低FLS产生的cAMP,Pae则能明显逆转rhIL-1α和rhTNF-α对人FLS的影响。为了进一步明确Pae抑制人FLS增殖和亢进分泌功能的作用机制,本实验以人FLS为研究对象,深入研究Pae对rhIL-1α和rhTNF-α体外刺激后人FLS EP₂和G蛋白表达的影响,明确Pae调节PGE₂-EP-G蛋白-cAMP信号通路可能作用的靶点。

Pae为天然药物TGP的活性单体,已经证明具有抗炎、抗过敏、免疫调节、神经保护、抗肿瘤等作用^[13-15]。本研究通过免疫荧光标记法结合激光共聚焦显微镜分析技术发现:rhIL-1α和rhTNF-α体外刺激使人FLS EP₂蛋白表达明显降低。Pae(10⁻⁸~10⁻⁵ mol/L)可上调EP₂的表达。Western blot结果表明:rhIL-1α和rhTNF-α使人FLS Gαs蛋白表达明显降低,Pae(10⁻⁸~10⁻⁵ mol/L)可提升Gαs蛋白表达,结合前期的实验结果可以提示:恢复rhIL-1α

和rhTNF-α刺激后EP₂和Gαs蛋白的表达,恢复滑膜细胞PGE₂-EP-G蛋白-cAMP信号的正常转导可能是Pae发挥抑制滑膜细胞增殖和亢进分泌功能的重要分子机制之一。

参考文献

- [1] Yamamoto K. Genetics analyses of rheumatoid arthritis[J]. Nihon Rinsho, 2013, 71(7):1155-9.
- [2] Foudi N, Gomez I, Benyahia C, et al. Prostaglandin E2 receptor subtypes in human blood and vascular cells[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 695(1-3):1-6.
- [3] 张磊,魏伟,常艳,等. 肿瘤坏死因子-α对胶原性关节炎大鼠滑膜细胞功能的影响及芍药总苷的作用[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(7):519-22.
- [4] Chang Y, Zhang L, Wang C, et al. Paeoniflorin inhibits function of synoviocytes pretreated by rIL-1α and regulates EP4 receptor expression[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(3):1275-82.
- [5] 郭晓蓉,戴杏,魏伟. 芍药苷对rIL-1α诱导的人成纤维样滑膜细胞功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4):1261-5.
- [6] 戴杏,郭晓蓉,魏伟. 芍药苷对肿瘤坏死因子-α诱导的人成纤维样滑膜细胞功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25(1):58-62.
- [7] Allam I, Djidjik R, Ouikhlef N, et al. Interleukin-1 and the interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms study in patients with rheumatoid arthritis[J]. Pathol Biol (Paris), 2013, 61(6):264-8.
- [8] Jia T, Pan Y, Li J, et al. Strategies for active TNF-α vaccination in rheumatoid arthritis treatment[J]. Vaccine, 2013, 31(38):4063-8.
- [9] Treffkorn L, Scheibe R, Maruyama T, et al. PGE₂ exerts its effect on the LPS-induced release of TNF-alpha, ET-1, IL-1 alpha, IL-6 and IL-10 via the EP₂ and EP4 receptor in rat liver macrophages[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2004, 74(1-4):113-23.
- [10] Johnson E N, Drucy K M. Heterotrimeric G protein signaling: role in asthma and allergic inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109(4):592-602.
- [11] Chen Q, Wei W. Effects and mechanisms of glucosides of chaenomeles speciosa on collagen-induced arthritis in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(4):593-608.
- [12] Xu H M, Wei W, Jia X Y, et al. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on adjuvant arthritis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 109(3):442-8.
- [13] Kim I D, Ha B J. The effects of Paeoniflorin on LPS-induced liver inflammatory reactions[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(6):959-66.
- [14] Lee B, Shin Y W, Bae E A, et al. Antiallergic effect of the root of Paeonia lactiflora and its constituents Paeoniflorin and paeonol[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(4):445-50.
- [15] Jiang W L, Chen X G, Zhu H B, et al. Paeoniflorin inhibits systemic inflammation and improves survival in experimental sepsis[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2009, 105(1):64-71.

◇ 临床医学研究 ◇

CXCR4 在急性髓系白血病骨髓间充质干细胞内的表达及分布

桂 钰,葛 健,夏瑞祥

摘要 目的 探讨 CXCR4 在初治急性髓系白血病(AML)患者骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)中的分布、表达及其临床意义。方法 通过提取初次诊断的 AML 患者化疗前后骨髓单个核细胞,进行 BM-MSCs 体外分离与培养;用免疫荧光共聚焦的方法观察各组 P2 代细胞中 CXCR4 的亚细胞器定位以及在细胞膜上的分布;采用 Western blot 法检测各组细胞 CXCR4 的蛋白表达量的变化。结果 在初治组 AML 患者 BM-MSCs 内,CXCR4 较缓解组及对照组分布异常,未在

高尔基体内蓄积,多分布在细胞膜上,并且 CXCR4 蛋白含量明显低于其他两组。结论 初治 AML 患者 BM-MSCs 内 CXCR4 分布和含量改变可能与骨髓造血微环境改变有关,并且对白血病细胞的髓外浸润有协同作用。

关键词 急性髓系白血病;骨髓间充质干细胞;高尔基体;CXCR4

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1115-05

2014-03-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81200371);高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(新教师类联合资助课题,编号:20123420120011);安徽省自然科学基金(编号:1208085QH154)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:桂 钰,女,硕士研究生;

葛 健,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:gejian77@medmail.com.cn

夏瑞祥,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:xrx2041@163.com

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)具有多向分化潜能、支持造血,促进干细胞植入以及分泌各种细胞因子及蛋白,能够同时表达基质细胞衍生因子-1(SDF-1)及其受体 CXCR4,二者特异性结合能够促进干细胞动员、迁移和归巢。研究^[1]表明,在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者骨髓中,白血病细胞表面 CXCR4 的表达量增加,这与白血病细胞的增殖、浸润、化疗药物作用的形成有着重要的关系,而在

Effects of paeoniflorin on prostaglandins E₂ receptor and G α s on fibroblast-like synoviocytes of human under the stimulation of rhIL-1 α and rhTNF- α

Dai Xing, Guo Xiaorong, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology of Anhui Medical University Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immunopharmacology of Education Ministry of China Anhui Key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine Anhui Engineering Research Center of Anti-inflammatory and Immune Drugs Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the effects of paeoniflorin (Pae) on expression of EP₂ and G α s of human fibroblast-like synoviocytes (FLS) under the stimulation of rhIL-1 α and rhTNF- α . **Methods** FLS of human were cultured *in vitro*. The expression of EP₂ on human FLS under the stimulation of rhIL-1 α and rhTNF- α and the effect of Pae were observed by immunofluorescence, analyzed by confocal laser microscopy, the expression of G α s was detected by Western blot. **Results** rhIL-1 α (0.1, 1, 10 μ g/L) and rhTNF- α (0.2, 2, 20 μ g/L) significantly inhibited the expression of EP₂ and G α s, Pae (10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ mol/L) could improve the expression of EP₂ and G α s. **Conclusion** Improving the abnormal expression of EP₂ and Gas on human FLS under the stimulation of rhIL-1 α and rhTNF- α is probably one of the most important molecule mechanisms of Pae preventing RA.

Key words rhIL-1 α ; rhTNF- α ; fibroblast-like synoviocytes; prostaglandins E₂ receptor; G α s; paeoniflorin