

## 基于体外细胞模型的痹祺胶囊药效物质基础研究

宋紫腾<sup>1,2,3</sup>, 卜睿臻<sup>4</sup>, 韩彦琪<sup>1,2,3</sup>, 王磊<sup>5</sup>, 姚鹏飞<sup>1,2,3,6</sup>, 许浚<sup>1,2,3</sup>, 张铁军<sup>1,2,3\*</sup>, 刘昌孝<sup>1,2,3\*</sup>

1. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462
2. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300462
3. 天津药物研究院 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300462
4. 天津达仁堂京万红药业有限公司, 天津 300112
5. 津药达仁堂集团股份有限公司, 天津 300193
6. 天津中医药大学, 天津 301617

**摘要:** 目的 探究痹祺胶囊祛风除湿、活血止痛功能的药效物质基础。方法 通过建立脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 体外炎症模型、细胞核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, RANKL) 和巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-stimulating factor, M-CSF) 与 RAW264.7 细胞共培养建立破骨细胞分化模型、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 诱导的人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 RA-HFLS 增殖模型, 分别探讨痹祺胶囊发挥抗炎活性、抑制破骨细胞形成、抑制 RA-HFLS 细胞增殖的作用机制及药效物质基础。MTS 法检测细胞增殖活性, ELISA 法检测细胞上清中一氧化氮 (nitric oxide, NO)、TNF- $\alpha$  和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的含量, TRAP 染色法检测破骨细胞分化数量, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, RT-qPCR 法检测细胞中组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)、基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、RANKL mRNA 相对表达情况。**结果** 痹祺胶囊及其 19 个单体成分均能显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞内 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的释放, 推测 19 个化合物是痹祺胶囊发挥抗炎作用的药效物质基础。痹祺胶囊及其 13 个单体成分均能显著减少 RANKL 和 M-CSF 诱导 RAW264.7 分化为破骨细胞的数量, 并能明显降低破骨细胞标志基因 CTSK 和 TRAP 的相对表达量, 推测马钱子碱、土的宁、党参炔苷、茯苓酸、丹参素、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、藁本内酯、甘草次酸和甘草苷为痹祺胶囊发挥治疗骨破坏、缓解关节疼痛作用的主要物质基础。痹祺胶囊及其 9 个单体成分能明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞增殖, 并且能显著促进 RA-HFLS 细胞的凋亡以及明显降低 MMP-3 和 RANKL 基因的相对表达量, 推测马钱子碱、土的宁、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、阿魏酸、藁本内酯、蜕皮甾酮、次黄嘌呤、甘草次酸为痹祺胶囊中发挥抑制滑膜增生作用的药效物质基础。**结论** 通过体外细胞实验初步确定马钱子碱、土的宁、党参炔苷、白术内酯 III、茯苓酸、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、阿魏酸、藁本内酯、蜕皮甾酮、牛膝皂苷 D、次黄嘌呤、甘草次酸、甘草苷为痹祺胶囊主要药效物质基础。

**关键词:** 痹祺胶囊; 类风湿关节炎; 药效物质基础; 祛风除湿; 活血止痛; 马钱子碱; 土的宁; 丹参素; 丹参酮 II<sub>A</sub>; 阿魏酸; 藁本内酯; 蜕皮甾酮; 次黄嘌呤; 甘草次酸

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7673-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.008

## Study on pharmacodynamic material basis of Biqi Capsules based on *in vitro* cell model

SONG Zi-teng<sup>1,2,3</sup>, BU Rui-zhen<sup>4</sup>, HAN Yan-qi<sup>1,2,3</sup>, WANG Lei<sup>5</sup>, YAO Peng-fei<sup>1,2,3,6</sup>, XU Jun<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>1,2,3</sup>, LIU Chang-xiao<sup>1,2,3</sup>

1. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

收稿日期: 2023-07-10

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (U21A20406)

作者简介: 宋紫腾, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: songziteng@tipr.com.cn

\*通信作者 张铁军, 研究员。E-mail: zhangtj@tipr.com.cn

刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liucx@tipr.com.cn

2. National & Local Jointed Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
3. National Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
4. Tianjin Darentang Jingwanhong Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300112, China
5. Tianjin Pharmaceutical Darentang Group Co., Ltd., Tianjin 300193, China
6. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

**Abstract: Objective** To explore the pharmacological material basis of effects of dispelling wind and eliminating dampness, promoting blood circulation and relieving pain of Biqi Capsules (痹祺胶囊). **Methods** The mechanism and material basis of the anti-inflammatory activity, inhibition of osteoclast formation and inhibition of RA-HFLS cell proliferation of Biqi Capsules were respectively investigated based on the established lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 inflammation model *in vitro*, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and macrophage-stimulating factor (M-CSF) co-cultured with RAW264.7 cells to establish osteoclast differentiation model and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induced proliferation model of human fibroblast-like synoviocyte of rheumatoid arthritis (RA-HFLS). Cell proliferation was detected by MTS assay. The levels of nitric oxide (NO), TNF- $\alpha$  and interleukin-6 (IL-6) of cells in the supernatant were detected by ELISA. TRAP staining was used to detect the number of osteoclast differentiation, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. RT-qPCR was used to detect the mRNA relative expression of cathepsin K (*CTSK*), tartrate-resistant acid phosphatase (*TRAP*), matrix metalloproteinase-3 (*MMP-3*), and *RANKL*. **Results** Biqi Capsules and its 19 monomer components could significantly inhibit the release of NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 in RAW264.7 induced by LPS, suggesting that the 19 compounds were the material basis for the anti-inflammatory effect of Biqi Capsules. Biqi Capsules and 13 monomer compounds could significantly reduce the number of RAW264.7 differentiated into osteoclasts induced by RANKL and M-CSF, and remarkably reduce the relative expression of osteoclast marker genes *CTSK* and *TRAP*. It was speculated that brucine, strychnine, lobetyolin, pachymic acid, tanshinol, salvianolic acid B, rosmarinic acid, notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ligustilide, glycyrrhetic acid and liquiritin were the main material basis of Biqi Capsules for playing a role in treating bone destruction and relieving joint pain. Biqi Capsules and nine monomer components could significantly inhibit the proliferation of RA-HFLS cells induced by TNF- $\alpha$ , and obviously promote the apoptosis of RA-HFLS cells and reduce the relative expression of *MMP-3* and *RANKL* genes. It was speculated that brucine, strychnine, tanshinol, tanshinone II<sub>A</sub>, ferulic acid, ligustilide, ecdysterone, hypoxanthine and glycyrrhetic acid were the pharmacological material basis for the efficacy of Biqi Capsules in inhibiting synovial hyperplasia. **Conclusion** Through *in vitro* study, brucine, strychnine, lobetyolin, atractylenolide III, pachymic acid, tanshinol, tanshinone II<sub>A</sub>, salvianolic acid B, rosmarinic acid, notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ferulic acid, ligustilide, ecdysterone, *Cyathula officinalis* saponins D, hypoxanthine, glycyrrhetic acid, liquiritin were identified as the main pharmacological material basis of Biqi Capsules.

**Key words:** Biqi Capsules; rheumatoid arthritis; pharmacodynamic material basis; dispelling wind and eliminating dampness; promoting blood circulation and relieving pain; brucine; strychnine; tanshinol; tanshinone II<sub>A</sub>; ferulic acid; ligustilide; ecdysterone; hypoxanthine; glycyrrhetic acid

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜慢性炎症为主要特征的、导致多关节进行性破坏为特征的慢性自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。RA 在临床上的病理特征主要表现为 3 个方面: 炎症、滑膜增生、骨破坏<sup>[2]</sup>。因其发病机制尚不完全明确, 市面上没有治疗 RA 的特效药, RA 仍危害着大量人群的健康<sup>[3]</sup>。目前临床治疗 RA 的化学药主要用于减轻症状, 长期使用会产生不良反应, 包括呕吐、皮疹、白细胞减少和肝肾损伤<sup>[4]</sup>。相反, 中药不仅来源广泛、种类丰富、不良反应小, 且具有多成分、多环节、多

靶点、多通路综合作用的特点<sup>[5-6]</sup>, 因此中药在类风湿性关节炎的治疗上具有独特的优势。中医学认为 RA 属于“痹证”范畴, 中医经典中的“历节病”“骨痹”“顽痹”“尪痹”“鹤膝风”等均归于 RA<sup>[7]</sup>。其中, 风寒湿邪、经络不畅、痰瘀互结是导致 RA 发生、发展的关键病机。故 RA 的临床治疗亦遵循祛风除湿、散寒通络、扶正祛邪、祛痰化瘀、清热利湿、活血通络的治则<sup>[8]</sup>。中医药良好的控制炎症和免疫调节作用在治疗 RA 中得到了广泛研究与应用<sup>[9-10]</sup>。

痹祺胶囊来源于汉代名医华佗传世验方“一粒

仙丹”，用于治疗水湿之地百姓常见的骨病，由马钱子、党参、丹参、白术、茯苓、川芎、三七、地龙、甘草、牛膝 10 味中药组成，具有益气养血、祛风除湿、活血止痛的功效，临床上用于治疗气血不足、风湿阻滞、肌肉关节酸痛、关节僵硬变形等，经多年临床使用证实其对 RA 有确切疗效<sup>[11-13]</sup>。然而，痹祺胶囊治疗 RA 的作用机制尚不完全明确，限制了其广泛应用。因此，本研究通过建立脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）诱导单核巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型、细胞核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体（receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, RANKL）和巨噬细胞集落刺激因子（macrophage-stimulating factor, M-CSF）与 RAW264.7 共孵育诱导破骨细胞分化模型以及肿瘤坏死因子- $\alpha$ （tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ）诱导人风湿性关节滑膜成纤维细胞 RA-HFLS 增殖模型，探究痹祺胶囊及其方中 19 个重要单体成分马钱子碱、土的宁、党参炔苷、白术内酯 III、茯苓酸、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、阿魏酸、藁本内酯、蜕皮甾酮、牛膝皂苷 D、次黄嘌呤、甘草次酸、甘草苷发挥抗炎镇痛、抑制破骨细胞形成及抑制滑膜增生的药效及相关作用机制，并确定痹祺胶囊的药效物质基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

BDS200 型倒置显微镜、311 型 MCO-5M CO<sub>2</sub> 细胞培养箱均购自赛默飞世尔科技公司；HFsafe-1200LC 型超净工作台购自上海 Heal Force 公司；Spectra Max M5 型酶标仪、T100 型 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司；BD FACSVerser 型分析型流式细胞仪购自美国 BD 公司；LightCycler480II 型荧光定量 PCR 仪购自 Roche 公司。

### 1.2 药品与试剂

痹祺胶囊（批号 311574，天津达仁堂京万红药业有限公司），地塞米松、LPS、抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP）染色试剂盒（批号分别为 WXB5583V、12190801、SLCK0288，美国 Sigma 公司），胎牛血清、双抗（批号分别为 2173968CP、2321126，美国 Gibco 公司），甲基三氯硅烷（methyltrichlorosilane, MTS）（批号 474372，美国 Promega 公司），小鼠白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）、TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附检测试剂盒（批号分别为 2105251、2110261，上海西塘生

物科技有限公司），一氧化氮（nitric oxide, NO）试剂盒（批号 120320210414，上海碧云天生物技术有限公司），人 TNF- $\alpha$ 、RANKL、M-CSF（批号分别为 021825、0319233、0419245，美国 Peprotech 公司），Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒（批号为 021921210512，上海碧云天生物技术有限公司），TRNzol Universal Reagent（批号为 W9623，北京天根科技生物公司），cDNA 合成反转录试剂盒、FastStart Universal SYBR Green Master（ROX）（批号分别为 54746820、57313500，瑞士 Roche 公司），定量聚合酶链反应（quantitative polymerase chain reaction, qPCR）引物（上海生工生物工程股份有限公司）。马钱子碱、土的宁、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>（批号分别为 110706-200505、110705-200306、110704-201827，质量分数分别为 95.9%、97.0%、91.2%，中国药品生物制品检定所），阿魏酸、牛膝皂苷 D、次黄嘌呤（批号分别为 L03A9D57744、S04GB159770、T13J11X107944，质量分数分别为  $\geq 98\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 98\%$ ，上海源叶生物科技有限公司），党参炔苷、白术内 III、茯苓酸、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、藁本内酯、蜕皮甾酮、甘草次酸、甘草苷（批号分别为 MUST-21061005、MUST-20110611、MUST-18072910、MUST-18060920、MUST-17101811、MUST-21030110、MUST-18053110、MUST-21011910、MUST-20110810、MUST-21090104、MUST-21060110、MUST-21030707、MUST-21052114，质量分数分别为 99.57%、99.97%、98.31%、98.38%、99.33%、98.60%、99.02%、98.12%、99.16%、 $\geq 98\%$ 、99.12%、99.10%、99.16%，成都曼斯特生物科技有限公司）。

### 1.3 细胞来源及培养

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7，购自中国科学院上海生命科学院研究院，于 DMEM 高糖完全培养基（含 1% 双抗和 10% 胎牛血清）置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养，2~3 d 传代 1 次。人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 RA-HFLS，购自赛百慷（上海）生物技术股份有限公司，于 DMEM/F12 完全培养基（含 1% 双抗和 10% 胎牛血清）置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养，2~3 d 传代 1 次。

## 2 方法

### 2.1 痹祺胶囊及单体化合物抗炎药效实验

**2.1.1 供试液的制备** 精确称取痹祺胶囊粉末 100 mg，加入 1 mL DMSO 超声提取 30 min，离心后过 0.2  $\mu$ m 的滤膜，得到质量浓度为 100 mg/mL 的高浓

度储存液。精确称取适量马钱子碱、土的宁、党参炔苷、白术内酯III、茯苓酸、丹参素、丹参酮II<sub>A</sub>、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、阿魏酸、藁本内酯、蜕皮甾酮、牛膝皂苷 D、次黄嘌呤、甘草次酸、甘草苷对照品，加入一定量 DMSO 同法配制成浓度为 100 mmol/L 的高浓度储存液，经梯度稀释得到供试溶液。

**2.1.2 对 RAW264.7 细胞存活率的影响** 取对数生长期的 RAW264.7 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL 均匀接种于 96 孔板，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育过夜。加入含不同浓度痹祺胶囊（4、20、100、200、500 μg/mL）或单体化合物（1、10、50、100 μmol/L）的培养基处理细胞，同时设对照组，继续培养 24 h 后每孔加 20 μL MTS 溶液置于培养箱孵育 2 h，测孔板 490 nm 处的吸光度值，计算细胞存活率。

**2.1.3 对 NO、TNF-α 及 IL-6 含量的影响** 取对数生长期的 RAW264.7 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL 均匀接种于 96 孔板，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育过夜后吸去上清，按实验分组，每组设 3 个复孔，空白组每孔加入 100 μL 含 2% 血清的 DMEM，模型组加入 100 μL 终质量浓度为 0.1 μg/mL 的 LPS，阳性药地塞米松组加入 100 μL 终浓度为 100 μmol/L 地塞米松和 0.1 μg/mL LPS 的混合溶液，痹祺胶囊组每孔加入 100 μL 终质量浓度为 200、20、2 μg/mL 的痹祺胶囊与 0.1 μg/mL LPS 混合溶液，马钱子碱、土的宁、党参炔苷、白术内酯 III、茯苓酸、丹参素、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、阿魏酸、蜕皮甾酮、牛膝皂苷 D、次黄嘌呤、甘草苷给药组分别加入 100 μL 终浓度为 100、10、1 μmol/L 供试品和 0.1 μg/mL 的 LPS 混合溶液，丹参酮 II<sub>A</sub>、甘草次酸溶液给药组分别加入 100 μL 终浓度为 50、10、2 μmol/L 供试品和 0.1 μg/mL 的 LPS 混合溶液，藁本内酯给药组分别加入 100 μL 终浓度为 10、2、0.4 μmol/L 供试品和 0.1 μg/mL 的 LPS 混合溶液。各组细胞处理后，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。收集细胞培养上清液，用试剂盒检测 NO、TNF-α、IL-6 的含量，具体实验步骤参照试剂盒说明书。

## 2.2 痹祺胶囊及单体化合物对破骨细胞分化的影响

**2.2.1 对破骨细胞形成的影响** 取生长至 80%~90% 的 RAW264.7 细胞，以  $5 \times 10^3$ /孔的密度接种于 24 孔板，8 h 后（已贴壁）吸去原培养基，按实验分组，每组设 3 个复孔，空白组每孔加入 500 μL

DMEM 完全培养基，模型组加入 500 μL 含 100 ng/mL RANKL、30 ng/mL M-CSF 的 DMEM 完全培养基，痹祺胶囊组每孔加入 500 μL 终质量浓度为 200、100、50 μg/mL 的痹祺胶囊及 100 ng/mL RANKL、30 ng/mL M-CSF 的 DMEM 完全培养基；马钱子碱、土的宁、党参炔苷、白术内酯 III、茯苓酸、丹参素、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、阿魏酸、蜕皮甾酮、牛膝皂苷 D、次黄嘌呤、甘草苷组每组加入 500 μL 终浓度为 100、10 μmol/L 的供试品及 100 ng/mL RANKL、30 ng/mL M-CSF 的 DMEM 完全培养基，丹参酮 II<sub>A</sub>、甘草次酸组每组加入 500 μL 终浓度为 50、5 μmol/L 的供试品及 100 ng/mL RANKL、30 ng/mL M-CSF 的 DMEM 完全培养基，藁本内酯组每组加入 100 μL 终浓度为 10、1 μmol/L 的供试品及 100 ng/mL RANKL、30 ng/mL M-CSF 的 DMEM 完全培养基。各组细胞处理后于培养箱孵育，隔天换液，共培养 5 d 后，进行 TRAP 染色，根据 TRAP 染色试剂盒说明书进行实验操作。

**2.2.2 对破骨细胞形成相关基因 TRAP、组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK) 表达的影响** 取对数生长长期 RAW264.7 细胞，接种于 6 孔板，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 8 h 后，选取对破骨细胞分化有显著抑制作用的化合物，按照“2.2.1”项下进行分组和给药，培养 24 h，隔天换液，培养至第 5 天采用 TRIZOL 法提取细胞总 RNA 后，测定 RNA 浓度，按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA，于荧光定量 PCR 仪上检测 TRAP、CTSK 的 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 TRAP、CTSK 引物序列

Table 1 Primer sequences of TRAP and CTSK

| 基因    | 序列 (5'→3')  |
|-------|---|
| GAPDH | F: ACCACAGTCCATGCCATCAC<br>R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA        |
| CTSK  | F: AATACCTCCCTCTCGATCCTACA<br>R: TGGTTCCTTGACTGGAGTAACGTA |
| TRAP  | F: CACTCCCACCCTGAGATTTGT<br>R: CATCGTCTGCACGGTTCTG        |

## 2.3 痹祺胶囊及单体化合物对 TNF-α 诱导的 RA-HFLS 细胞增殖和凋亡的影响

**2.3.1 对 TNF-α 诱导的 RA-HFLS 细胞增殖的影响** 取生长至 80%~90% 的 RA-HFLS 细胞，调整细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/孔均匀接种于 96 孔板，于 37 °C、

5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 24 h 后给药处理, 实验设置空白组, 每孔加 100 μL 完全培养基; 模型组每孔加含 10 ng/mL TNF-α 的完全培养基; 痹祺胶囊组每孔加入 100 μL 终质量浓度为 1000、500、250 μg/mL 的痹祺胶囊和 10 ng/mL 的 TNF-α 混合溶液; 马钱子碱、土的宁、党参炔苷、白术内酯 III、茯苓酸、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、阿魏酸、藁本内酯、蜕皮甾酮、牛膝皂苷 D、次黄嘌呤、甘草次酸、甘草苷组每孔加入 100 μL 终浓度为 100、10、1 μmol/L 的供试品和 10 ng/mL 的 TNF-α 混合溶液。给药后于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 每孔加入 20 μL MTS, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的环境下孵育 2 h 后于 490 nm 下检测吸光度值, 计算细胞存活率。

**2.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡** 取对数生长期 RA-HFLS 细胞, 调整细胞密度为 1×10<sup>5</sup> 个/mL, 接种于 12 孔板, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 24 h 后, 设对照组和给药组, 对照组加入 1 mL 含 10 ng/mL TNF-α 的完全培养基, 给药组加入 1 mL 质量浓度分别为 1000、500、250 μg/mL 的痹祺胶囊或不同浓度的待测化合物 (除藁本内酯和甘草次酸浓度设为 50、5 μmol/L 外, 其余化合物浓度均设为 100、10 μmol/L) 与 10 ng/mL 的 TNF-α 混合溶液, 培养 24 h 后, 将所有细胞转移至离心管内, 1000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 取一定量细胞加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液, 混匀后加入 5 μL Annexin V-FITC 以及 10 μL 碘化丙啶染色液, 室温避光孵育 20 min 后用流式细胞仪检测细胞凋亡状况。

**2.3.3 对 RA-HFLS 细胞基质金属蛋白酶-3 (Matrix metalloproteinases-3, MMP-3)、RANKL 基因表达的**

**影响** 取对数生长期 RA-HFLS 细胞, 接种于 6 孔板, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 24 h 后, 按实验分组给药, 空白组加入 2 mL 完全培养基, 模型组加入 2 mL 含 10 ng/mL TNF-α 的完全培养基, 各给药组加入不同浓度的供试品溶液 (浓度设置同“2.3.2”项下) 与 10 ng/mL 的 TNF-α 混合溶液, 培养 24 h, 按照 TRIZOL 法提取细胞总 RNA 后, 测定 RNA 浓度, 按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA, 于荧光定量 PCR 仪上检测 MMP-3、RANKL 的 mRNA 相对表达量。引物序列见表 2。

表 2 MMP-3、RANKL 引物序列

Table 2 Primer sequences of MMP-3 and RANKL

| 基因    | 序列 (5'→3')                   |
|-------|------------------------------|
| GAPDH | F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT      |
|       | R: GAAGGCTGGGGCTCATT         |
| MMP-3 | F: TGGATTGGAGGTGACGGGGAAG    |
|       | R: ATGCCAGGAAAGGTTCTGAAGTGAC |
| RANKL | F: TTACCTGTATGCCAACATTTCG    |
|       | R: TTTGATGCTGGTTTTAGTGACC    |

2.4 统计分析

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计软件为 Graphpad Prism。组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 痹祺胶囊及单体化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的影响

**3.1.1 对 RAW264.7 细胞存活率的影响** 如图 1-A 所示, 痹祺胶囊质量浓度低于 200 μg/mL 时, 细胞存活率与空白组相比无显著性差异, 因此, 后续实验痹祺

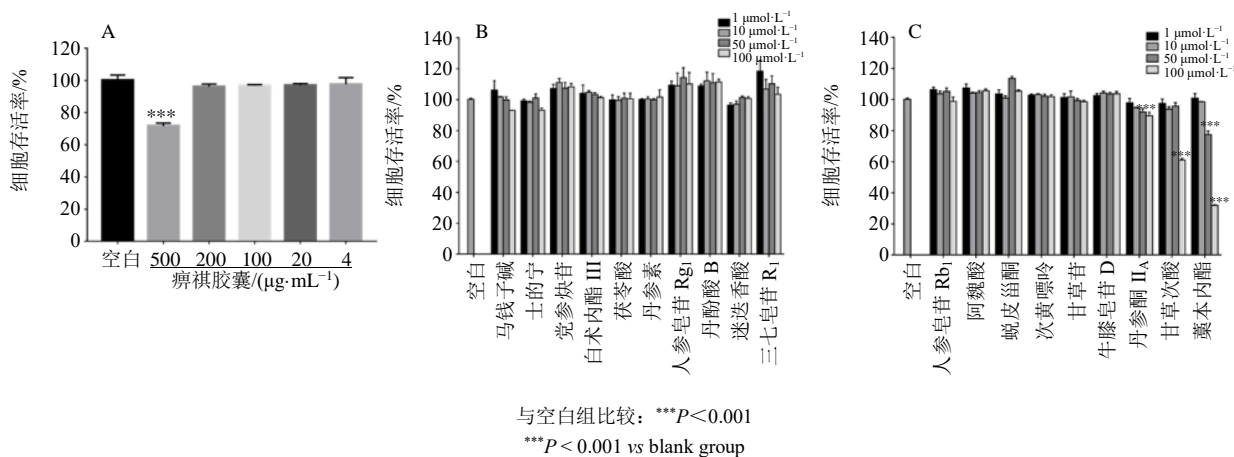


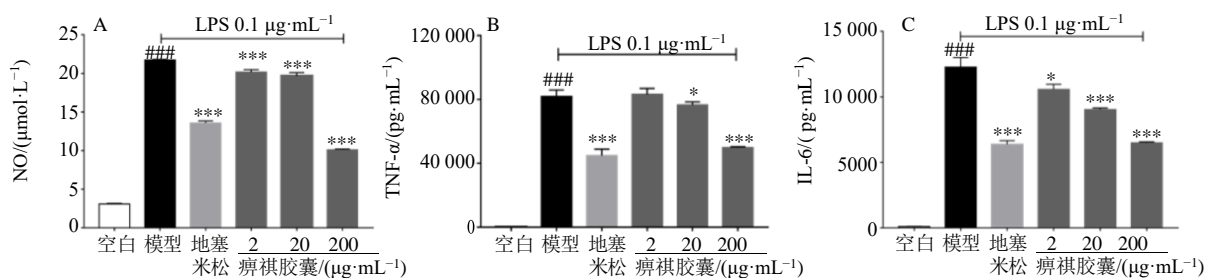
图 1 痹祺胶囊 (A) 及单体化合物 (B、C) 对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effects of Biqi Capsules (A) and its monomer compounds (B, C) on RAW264.7 cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

胶囊最大质量浓度设为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。19 个化合物不同浓度下对 RAW264.7 细胞存活率的影响如图 1-B、C 所示, 丹参酮 II<sub>A</sub> 和甘草次酸溶液浓度为 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  时细胞存活率显著低于空白组 ( $P < 0.001$ ), 藁本内酯溶液浓度高于 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  时细胞存活率显著低于空白组 ( $P < 0.001$ ), 其余 16 个化合物在 1~100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  对 RAW264.7 细胞增殖均无显著影响。因此, 丹参酮 II<sub>A</sub> 和甘草次酸活性检测最大浓度设为 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 藁本内酯活性检测最大浓度设为 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 其余 16 个化合物活性检测最大浓度设为 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

**3.1.2 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的影响** 结果如图 2、3 所示, LPS 作用于细胞后, 细胞上清液中的 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌量明显增加, 与空白组比较有显著性差异 ( $P < 0.001$ ), 阳性药地塞米松给药浓度为 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  时能显著抑制 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6

的释放 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 除 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  痹祺胶囊对细胞上清液中 TNF- $\alpha$  的分泌量无显著差异外, 各浓度痹祺胶囊能明显降低细胞上清液中的 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量 ( $P < 0.05$ 、0.001), 并且呈剂量相关性。与模型组比较, 0.4  $\mu\text{mol}/\text{L}$  藁本内酯对细胞上清中 NO 的释放无显著抑制作用; 低浓度士的宁和丹参素、低浓度和中浓度马钱子碱和人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 以及 3 个浓度党参炔苷给药组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  的含量无显著性差异; 低浓度次黄嘌呤和牛膝皂苷 D, 低浓度和中浓度士的宁、白术内酯 III、茯苓酸和丹参素以及 3 个浓度丹参酮 II<sub>A</sub>、甘草次酸和藁本内酯给药组细胞上清液中 IL-6 的含量无显著性差异, 其他单体化合物在高、中、低浓度时对细胞上清液中 NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量均有显著性抑制作用 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 并且呈现剂量相关性。



与空白组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 图 3~8、11、12 同  
### $P < 0.001$  vs blank group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as below figures 3~8, 11, 12

图 2 痹祺胶囊对 RAW264.7 细胞上清液中 NO (A)、TNF- $\alpha$  (B) 和 IL-6 (C) 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effects of Biqi Capsules on release of NO (A), TNF- $\alpha$  (B) and IL-6 (C) in supernatant of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.2 痹祺胶囊及单体化合物对 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的抑制作用

**3.2.1 对破骨细胞形成的影响** 通过对各组 RAW264.7 细胞进行 TRAP 染色, 研究痹祺胶囊及 19 个单体化合物对 RANKL 和 M-CSF 诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的影响。从图 4 可以看出, 空白组中没有观察到破骨细胞分化, 而添加 RANKL 和 M-CSF 的模型组破骨细胞数显著增多 ( $P < 0.001$ ), 说明模型建立成功。与模型组相比, 痹祺胶囊各浓度均能显著抑制破骨细胞分化的数量 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈剂量相关关系。如表 3 所示, 与模型组相比, 阿魏酸和丹参酮 II<sub>A</sub> 低浓度给药组, 白术内酯 III、蛻皮甾酮、次黄嘌呤和牛膝皂苷 D 低浓度和高浓度给药组破骨细胞数均无显著性差异, 其余化合物低浓度和高浓度给药组均能显著抑制破骨细胞的分化, 破骨细胞数显著减少 ( $P < 0.05$ 、

0.01、0.001), 且呈剂量相关性。

**3.2.2 对破骨细胞形成相关基因 TRAP、CTSK 表达的影响** 如图 5、6 所示, RAW264.7 细胞与 RANKL 和 M-CSF 共孵育后, 与空白组相比, 破骨细胞标志性基因 CTSK 和 TRAP 表达量显著升高 ( $P < 0.001$ ), 痹祺胶囊各浓度给药处理后 CTSK 和 TRAP 的基因表达量均显著减少 ( $P < 0.001$ ), 且呈剂量相关性。与模型组相比, 马钱子碱、党参炔苷、丹酚酸 B、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和藁本内酯低浓度给药组 CTSK 基因相对表达量无显著性差异, 丹酚酸 B 低浓度给药组 TRAP 基因相对表达量无显著性差异, 其余化合物低浓度和高浓度给药组 CTSK、TRAP 基因均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈剂量相关性。

### 3.3 痹祺胶囊及单体化合物对 TNF- $\alpha$ 诱导 RA-HFLS 细胞增殖和凋亡的影响

**3.3.1 对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞增殖的影响**

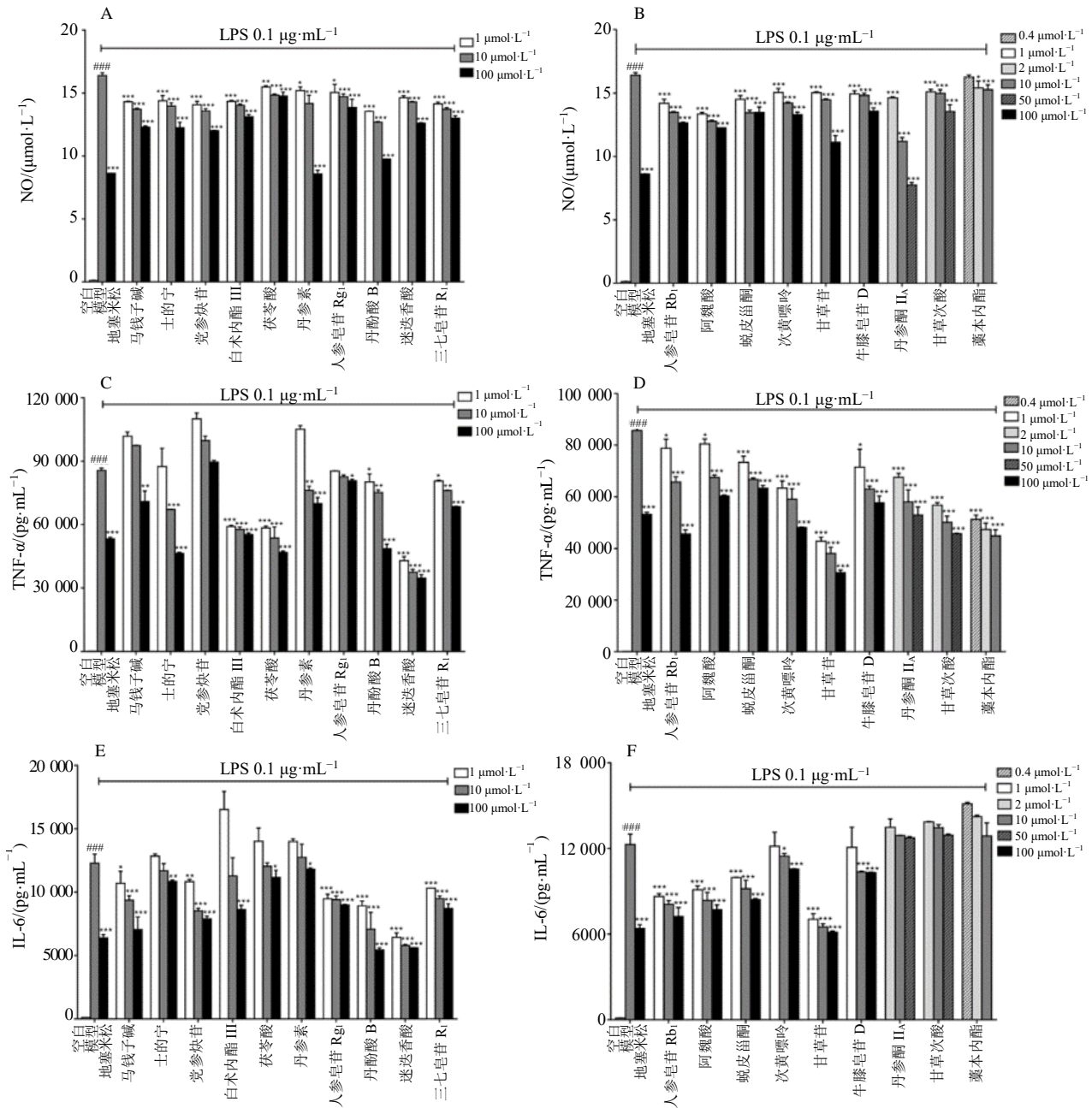


图 3 单体化合物对 RAW264.7 细胞上清液中 NO (A、B)、TNF- $\alpha$  (C、D) 和 IL-6 (E、F) 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 3 Effects of monomer compounds on release of NO (A, B), TNF- $\alpha$  (C, D) and IL-6 (E, F) in supernatant of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

痹祺胶囊及 19 个单体化合物对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞增殖活性影响结果如图 7、8 所示。与空白组相比，TNF- $\alpha$  诱导后细胞增殖能力显著增高 ( $P < 0.001$ )，表明造模成功。痹祺胶囊在 3 个给药浓度下均能显著降低 TNF- $\alpha$  诱导的细胞增殖活性 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )，且呈剂量相关性。与模型组相比，马钱子碱、士的宁、丹参素、阿魏酸、藜本内酯、次黄嘌呤在 3 个给药浓度下均能显著降低 TNF-

$\alpha$  诱导的细胞增殖活性 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )，丹参酮 II<sub>A</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、甘草次酸、牛膝皂苷 D 在高浓度和中浓度下能显著降低 TNF- $\alpha$  诱导的细胞增殖活性 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )，三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和蜕皮甾酮仅在高浓度给药时显著降低 TNF- $\alpha$  诱导的细胞增殖活性 ( $P < 0.01, 0.001$ )，其中藜本内酯、甘草次酸在 100  $\mu\text{mol/L}$  浓度下有很强的抑制活性，细胞存活率均低于 50%，因此后续实

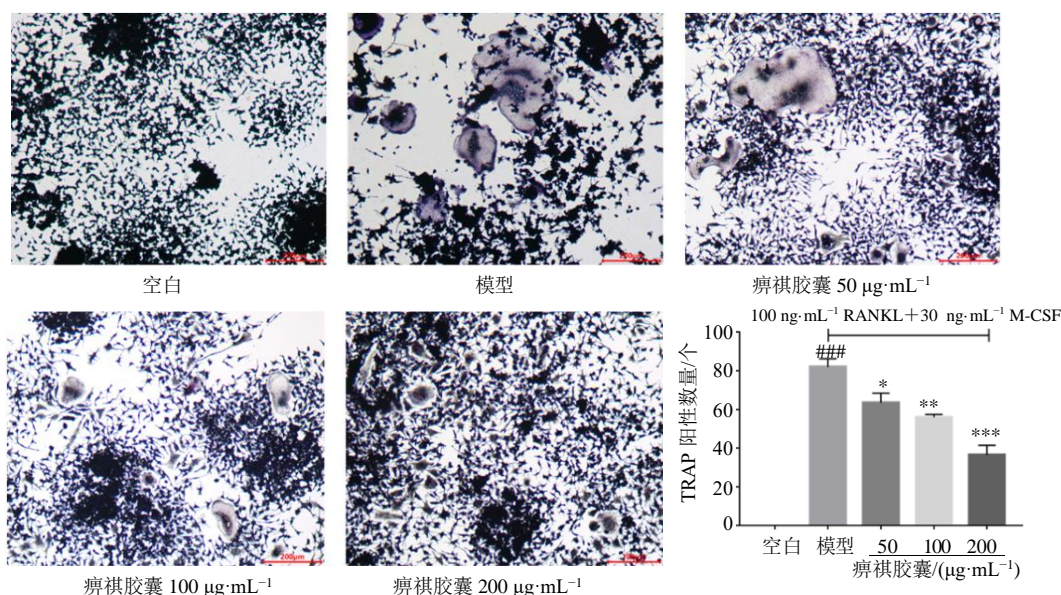


图 4 痹祺胶囊对 RAW246.7 细胞分化为破骨细胞的影响 (×500,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of Biqi Capsules on differentiation of RAW246.7 cells into osteoclasts (×500,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

表 3 不同浓度化合物给对 RAW246.7 细胞分化为破骨细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of compounds on differentiation of RAW246.7 cells into osteoclasts ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别      | 浓度/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 破骨细胞数/个       | 组别                   | 浓度/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 破骨细胞数/个       |
|---------|--|---------------|----------------------|--|---------------|
| 空白      | —  | 0             | 三七皂苷 R <sub>1</sub>  | 100                                      | 15.5 ± 2.1*** |
| 模型      | —  | 91.5 ± 3.5### |                      | 10                                       | 20.0 ± 1.4*** |
| 藁本内酯    | 10                                       | 7.0 ± 1.4***  | 人参皂苷 Rg <sub>1</sub> | 100                                      | 51.5 ± 3.5*** |
|         | 1  | 55.5 ± 5.0**  |                      | 10                                       | 66.0 ± 2.8**  |
| 马钱子碱    | 100                                      | 39.0 ± 2.8**  | 人参皂苷 Rb <sub>1</sub> | 100                                      | 56.5 ± 2.1*** |
|         | 10                                       | 63.0 ± 5.7*   |                      | 10                                       | 69.5 ± 2.1**  |
| 土的宁     | 100                                      | 33.0 ± 2.8*** | 阿魏酸                  | 100                                      | 77.0 ± 2.8*   |
|         | 10                                       | 50.5 ± 3.5**  |                      | 10                                       | 88.0 ± 1.4    |
| 党参炔苷    | 100                                      | 52.0 ± 2.8**  | 蛻皮甾酮                 | 100                                      | 83.5 ± 2.1    |
|         | 10                                       | 71.0 ± 5.7*   |                      | 10                                       | 87.5 ± 3.5    |
| 白术内酯III | 100                                      | 89.5 ± 2.1    | 次黄嘌呤                 | 100                                      | 86.0 ± 1.4    |
|         | 10                                       | 90.0 ± 4.2    |                      | 10                                       | 89.0 ± 1.4    |
| 茯苓酸     | 100                                      | 45.0 ± 4.2**  | 甘草苷                  | 100                                      | 7.0 ± 1.4***  |
|         | 10                                       | 63.5 ± 4.9*   |                      | 10                                       | 65.5 ± 3.5**  |
| 丹参素     | 100                                      | 13.5 ± 2.1*** | 牛膝皂苷 D               | 100                                      | 82.5 ± 4.9    |
|         | 10                                       | 37.0 ± 2.8*** |                      | 10                                       | 89.5 ± 3.5    |
| 丹酚酸 B   | 100                                      | 18.5 ± 2.1*** | 丹参酮II <sub>A</sub>   | 50                                       | 7.0 ± 1.4***  |
|         | 10                                       | 61.0 ± 2.8**  |                      | 5  | 74.0 ± 7.1    |
| 迷迭香酸    | 100                                      | 16.0 ± 1.4*** | 甘草次酸                 | 50                                       | 6.0 ± 1.4***  |
|         | 10                                       | 57.0 ± 4.2**  |                      | 5  | 77.5 ± 3.5*   |

与空白组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

### $P < 0.001$  vs blank group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

验最大浓度设为 50  $\mu\text{mol/L}$ , 其余化合物抑制细胞增殖活性不明显。

### 3.3.2 痹祺胶囊及单体化合物对 TNF- $\alpha$ 诱导的 RA-

HFLS 细胞凋亡的影响 通过流式细胞仪检测痹祺胶囊及抑制细胞增殖活性较好的 9 个单体化合物对 RA-HFLS 细胞凋亡的影响, 结果如图 9、10 所示。



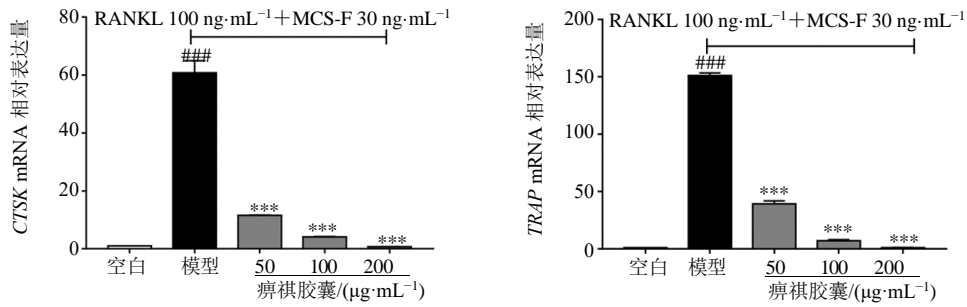


图5 痹祺胶囊对 RAW264.7 细胞与 RANKL 和 M-CSF 共孵育后 *CTSK*、*TRAP* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 5 Effect of Biqi Capsules on mRNA expression of *CTSK* and *TRAP* in RAW264.7 cells after co-incubation with RANKL and M-CSF ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

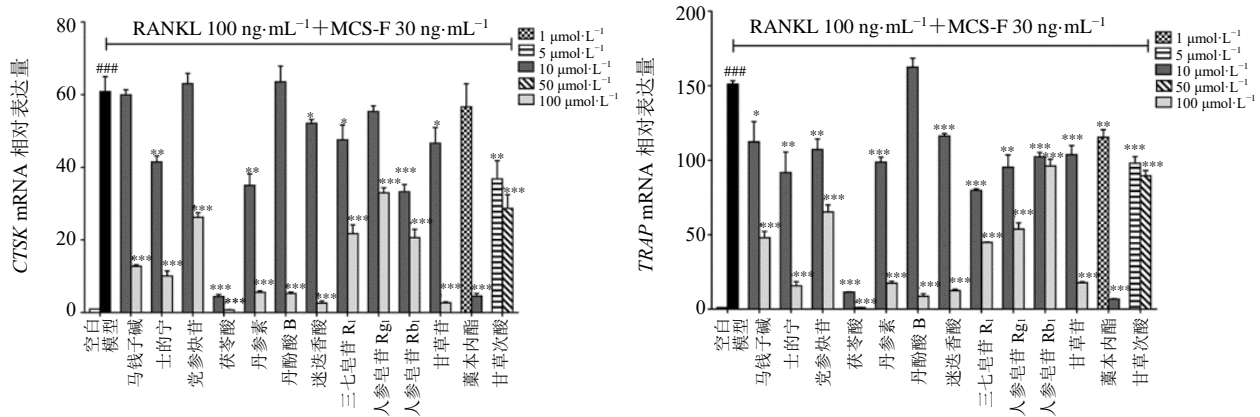


图6 13个化合物对 RAW264.7 细胞与 RANKL 和 M-CSF 共孵育后 *CTSK*、*TRAP* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 6 Effects of 13 compounds on mRNA expression of *CTSK* and *TRAP* in RAW264.7 cells after co-incubation with RANKL and M-CSF ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

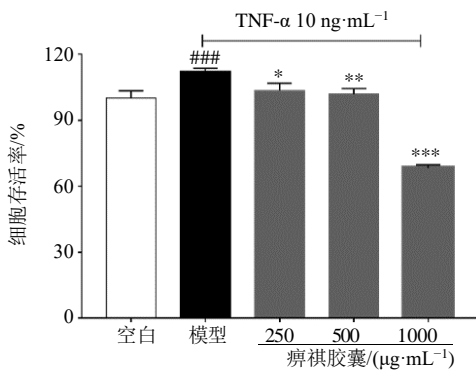


图7 不同浓度痹祺胶囊对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 7 Effects of Biqi Capsules at different concentrations on TNF- $\alpha$ -induced RA-HFLS cell proliferation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

与对照组相比,痹祺胶囊高浓度和中浓度给药组均能显著促进 RA-HFLS 细胞的凋亡 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ),且呈剂量相关关系。与对照组相比,马钱子碱、士的宁、丹参素、阿魏酸、蜕皮甾酮、次黄嘌呤和甘草次酸在低浓度

和高浓度给药时均能明显促进 RA-HFLS 细胞的凋亡 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。

**3.3.3 对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞 *MMP-3*、*RANKL* 基因表达的影响** 痹祺胶囊及 9 个单体化合物对 *MMP-3* 和 *RANKL* 基因表达的影响结果如图 11、12 所示。与空白组相比, TNF- $\alpha$  作用于 RA-HFLS 细胞后 *MMP-3* 和 *RANKL* 基因的表达量显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比,痹祺胶囊高、中、低浓度组 *MMP-3* 基因的表达量均显著减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),且呈剂量相关关系;痹祺胶囊高、中浓度也同样能显著抑制 *RANKL* 基因的表达 ( $P < 0.001$ ),抑制活性随浓度的增大而升高。与模型组相比,马钱子碱、士的宁、丹参素、阿魏酸、蜕皮甾酮、次黄嘌呤和甘草次酸在高、低浓度给药时均能显著抑制 *MMP-3* 基因的表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),丹参酮 II<sub>A</sub> 和藜本内酯在高浓度给药时显著抑制 *MMP-3* 基因的表达 ( $P < 0.001$ );马钱子碱、丹参素、阿魏酸、藜本内酯、次黄嘌呤和甘草次酸

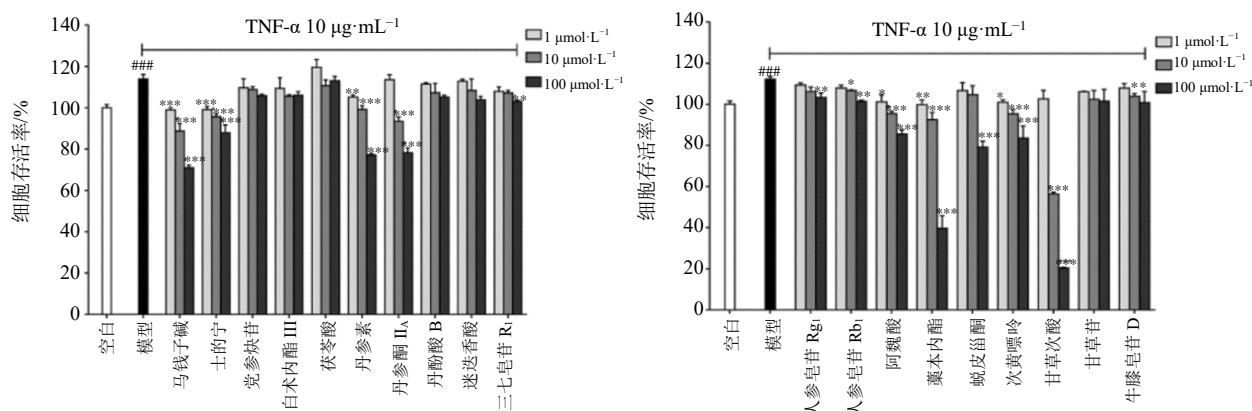


图 8 不同浓度单体化合物对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Effects of different concentrations of monomer compounds on TNF- $\alpha$ -induced RA-HFLS cell proliferation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

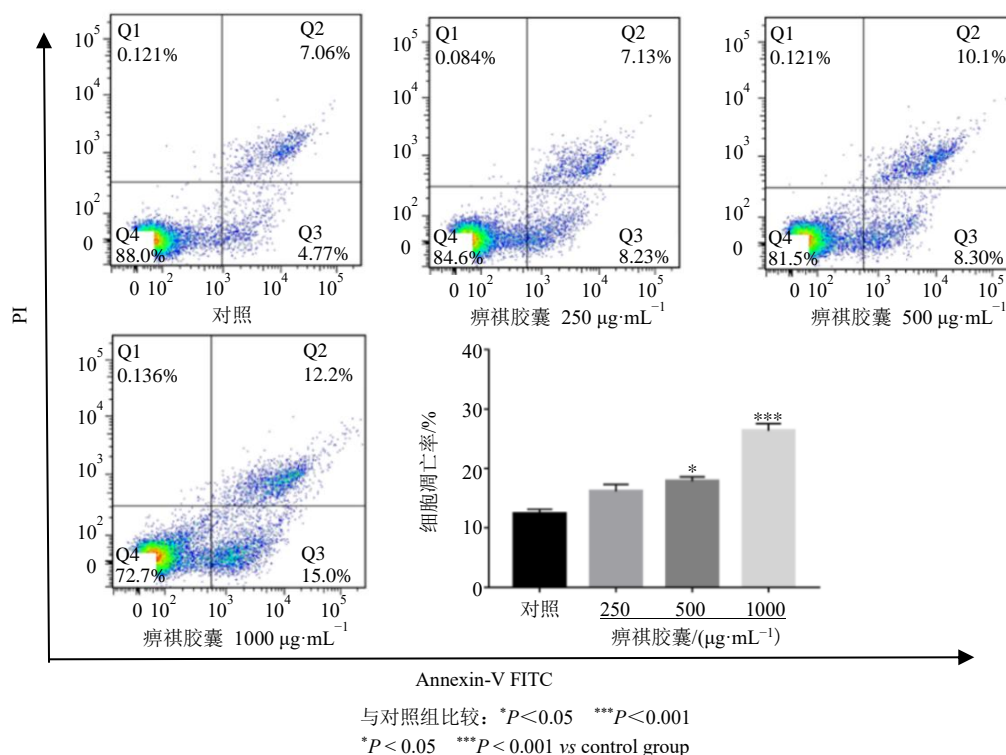


图 9 不同浓度痹祺胶囊对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Effects of Biqi Capsules at different concentrations on TNF- $\alpha$ -induced apoptosis of RA-HFLS cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

在高、低浓度给药后均能显著抑制 RANKL 基因的表达 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), 士的宁、丹参酮 II<sub>A</sub> 和蜕皮甾酮高浓度给药时对 RANKL 基因表达的抑制效果显著 ( $P < 0.001$ )。

#### 4 讨论

RA 是一种由自身免疫功能障碍引起的疾病, 具体以关节病变为主, 常伴有其他脏器功能受损的慢性炎症疾病。RA 患者的主要症状是滑膜增生、关节窝炎性细胞浸润、关节破坏、严重者功能丧失

等, 其特征是手、腕及对称足关节炎<sup>[14]</sup>。目前 RA 的发病机制尚不明确, 但多数研究认为 T 淋巴细胞及巨噬细胞释放大量炎症细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和 IL-6 等引起骨关节破坏是 RA 发病的主要机制<sup>[15-16]</sup>。除了 T 细胞及巨噬细胞外, 成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 是 RA 中引起滑膜炎病变及关节破坏的主要效应细胞<sup>[17]</sup>, 炎症反应产生的大量 TNF- $\alpha$  在 RA 患者滑液、血清、关节滑膜等

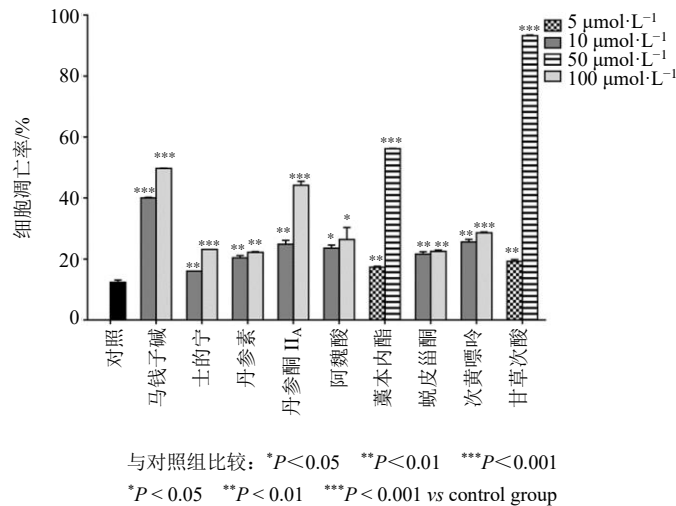
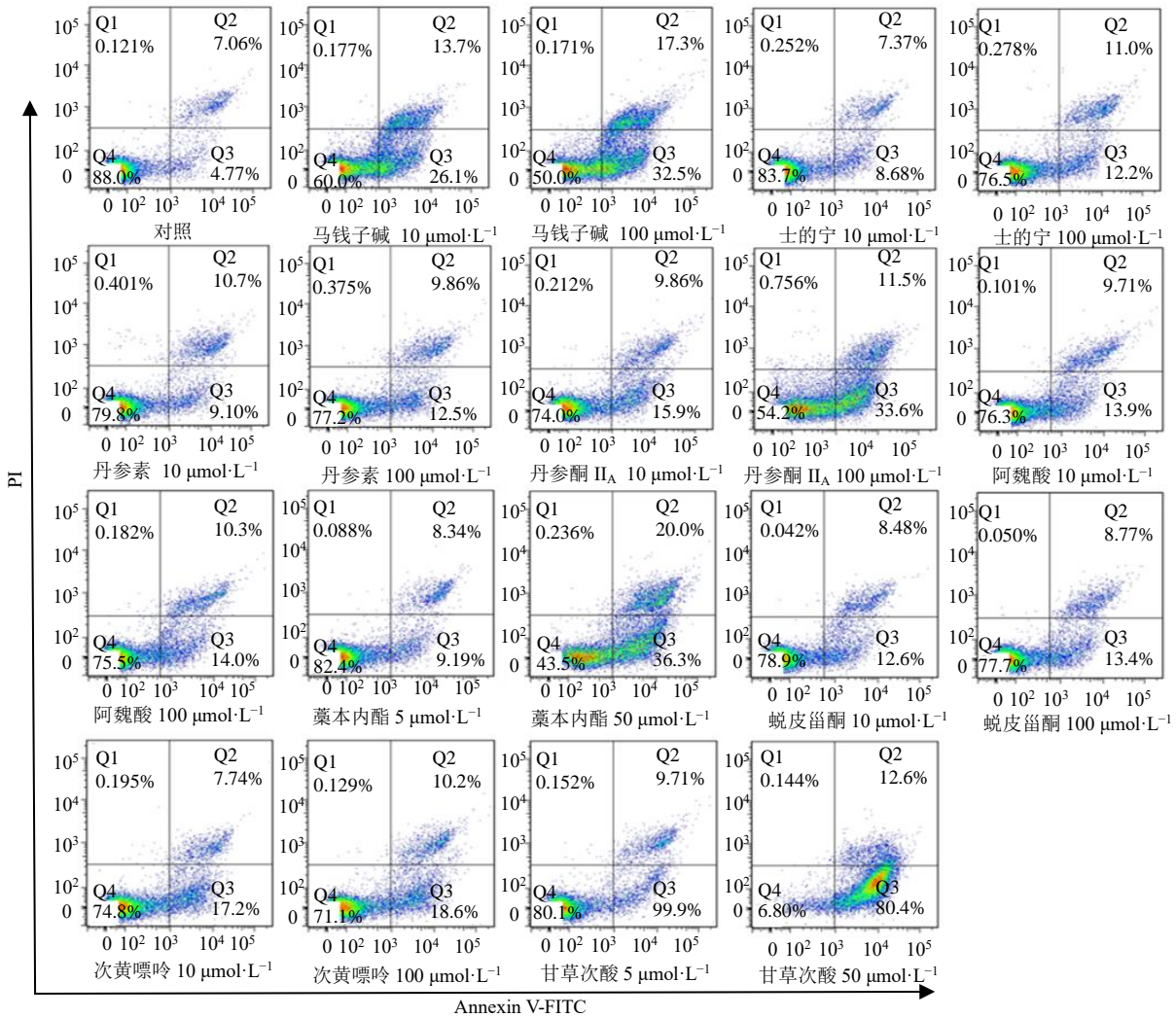


图 10 不同浓度单体化合物对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effects of different concentrations of compounds on TNF- $\alpha$ -induced apoptosis of RA-HFLS cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组织中表达异常升高, 且一定浓度的 TNF- $\alpha$  能刺激 FLS 大量增殖并分泌炎症细胞因子 (IL-6、TNF- $\alpha$  等)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth

factor, FGF)、趋化因子、MMPs 等, 进一步导致局部炎症反应、滑膜细胞增殖与凋亡平衡失调、血管翳生成、软骨破坏及骨侵蚀<sup>[18]</sup>。FLS 的过度增殖

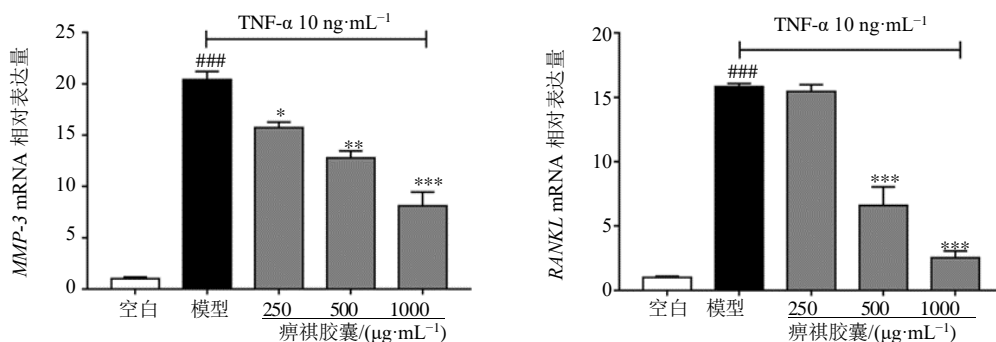


图 11 痹祺胶囊对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞 *MMP-3*、*RANKL* 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effects of Biqi Capsules on TNF- $\alpha$ -induced expression of *MMP-3* and *RANKL* in RA-HFLS cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

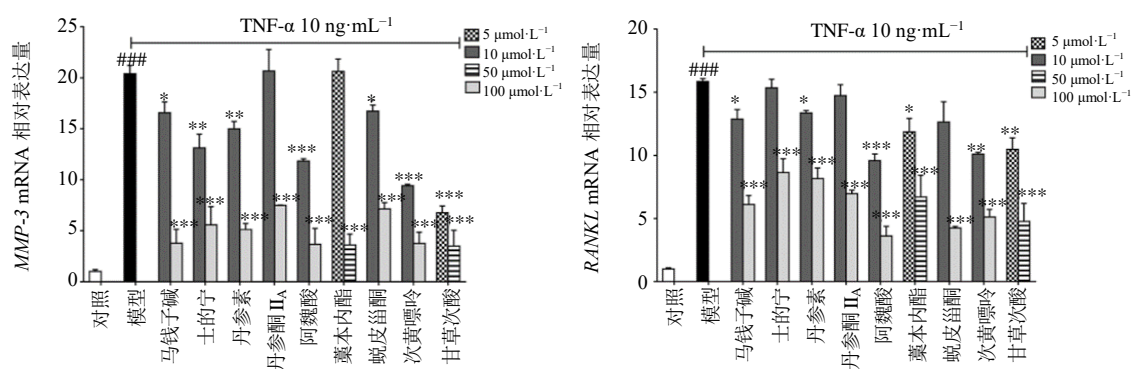


图 12 单体化合物对 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞 *MMP-3*、*RANKL* 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 12 Effects of compounds on TNF- $\alpha$ -induced expression of *MMP-3* and *RANKL* in RA-HFLS cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

使其通过类肿瘤细胞样方式侵蚀组织，是 RA 滑膜炎及最终导致骨破坏的重要机制<sup>[19-20]</sup>。关节骨质破坏是关节畸形的重要因素，而破骨细胞是引起骨破坏的关键细胞之一，破骨细胞是体内唯一负责吸收骨质的巨大多核细胞，其起源于骨髓单核-巨噬细胞谱系细胞，由单核前体细胞通过多种方式融合而形成<sup>[21]</sup>，受 M-CSF 和 RANKL 2 个细胞因子调控。M-CSF 结合其受体巨噬细胞集落刺激因子受体 (macrophage-stimulating factor receptor, c-Fms)，在加快破骨细胞分化中具有重要的生物学功能<sup>[22]</sup>。RANKL 结合破骨细胞前体细胞或者破骨细胞的膜蛋白 RANK，可激活一系列下游信号通路，促进破骨细胞分化<sup>[23-24]</sup>。另外，滑膜大量的炎症因子，如 TNF- $\alpha$  可促进破骨细胞生成和提高活性，最终使骨重建的天平失衡，介导骨破坏。因此，抑制破骨细胞的生成和功能，有助于改善 RA 的病程发展<sup>[25]</sup>。

本研究利用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞作为炎症模型，对痹祺胶囊及 19 个关键化学成分的抗炎

活性进行验证，结果表明痹祺胶囊及马钱子碱、士的宁、党参炔苷、白术内酯 III、茯苓酸、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、阿魏酸、藜本内酯、蜕皮甾酮、牛膝皂苷 D、次黄嘌呤、甘草次酸、甘草苷 19 个成分均表现出显著的抗炎活性，均能显著抑制 LPS 诱导的细胞内 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的释放，因此推测，该 19 个单体成分可能为痹祺胶囊发挥抗炎作用的关键药效物质基础。进一步通过体外小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 与 M-CSF 和 RANKL 因子共培养，建立体外破骨细胞分化模型，探究痹祺胶囊及 19 个单体化合物对破骨细胞分化的抑制作用，TRAP 染色结果表明痹祺胶囊及马钱子碱、士的宁、党参炔苷、茯苓酸、丹参素、丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、藜本内酯、甘草次酸和甘草苷 13 个化合物均能显著抑制破骨细胞的分化，其作用可能是通过抑制破骨细胞发挥骨吸收作用的关键靶标酶 *CTSK* 和 *TRAP* mRNA 的相对表达实现的<sup>[26-27]</sup>，

因此推测该 13 个单体成分是痹祺胶囊抑制破骨细胞分化的关键药效物质基础。通过建立 TNF- $\alpha$  诱导的 RA-HFLS 细胞增殖模型检测痹祺胶囊及 19 个单体化合物对 RA-HFLS 细胞增殖和凋亡的影响, 结果表明痹祺胶囊及马钱子碱、土的宁、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、阿魏酸、藁本内酯、蜕皮甾酮、次黄嘌呤和甘草次酸 9 个化合物对 RA-HFLS 细胞的增殖均有显著的抑制作用, 进一步流式细胞检测结果表明痹祺胶囊和 9 个化合物均能不同程度促进细胞的凋亡, 且均能显著抑制 RA-HFLS 细胞中参与骨破坏相关因子 MMP-3 和 RANKL 基因的表达<sup>[28-29]</sup>, 因此推测该 9 个化合物是痹祺胶囊中发挥抑制滑膜增生作用的药效物质基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 蒋叶珂, 陈燕, 潘凌宇, 等. 基于网络药理学和分子对接探究威灵仙治疗类风湿性关节炎的作用机制 [J]. 山东科学, 2022, 35(6): 42-49.
- [2] Williams B, Dharmapatni A, Crotti T. Intracellular apoptotic pathways: A potential target for reducing joint damage in rheumatoid arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(3): 219-231.
- [3] Scott D L, Wolfe F, Huizinga T W J. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [4] Jiao Y Y, Xu J, Chen H, et al. Identification of the main active components and mechanism of Wang Bi tablet in treating rheumatoid arthritis based on integrative pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 669551.
- [5] Jing R, Ban Y F, Xu W H, et al. Therapeutic effects of the total lignans from *Vitex negundo* seeds on collagen-induced arthritis in rats [J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152825.
- [6] Cao F, Cheng M H, Hu L Q, et al. Natural products action on pathogenic cues in autoimmunity: Efficacy in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis as compared to classical treatments [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105054.
- [7] 杨会军, 郭响, 李伟青, 等. 靶向铜死亡相关基因治疗类风湿性关节炎生物信息学分析及干预中药的预测 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4253-4265.
- [8] 肖红, 姜泉, 唐晓娟, 等. 姜泉治疗类风湿关节炎组方用药规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 381-387.
- [9] Chang Y W, Zhao Y F, Cao Y L, et al. Bufalin exerts inhibitory effects on IL-1 $\beta$ -mediated proliferation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1552-1559.
- [10] 文军, 荣晓凤. 复方大黄散对类风湿关节炎大鼠 MMP-10 及 IL-33 的影响 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(1): 41-46.
- [11] 张冬梅, 李宝丽. 痹祺胶囊治疗胶原诱导型关节炎大鼠的作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1059-1062.
- [12] 白海涛, 李剑. 痹祺胶囊治疗类风湿性关节炎 50 例临床观察 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(11): 1489-1490.
- [13] 刘素芳, 赵阳, 贾彬, 等. 痹祺胶囊联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎的临床研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1727-1731.
- [14] Gordon D A. Rheumatoid arthritis: New treatments, and a new look at medical ethics [J]. *J Rheumatol*, 1998, 25(11): 2049.
- [15] Levi M, Grange S, Frey N. Exposure-response relationship of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in a large population of patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 53(2): 151-159.
- [16] 杨艳妮, 袁培培, 冯敖梓. 基于网络药理学和分子对接技术探讨巴戟天治疗类风湿性关节炎的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1463-1470.
- [17] Logan C Y, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 781-810.
- [18] Gaur U, Aggarwal B B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(8): 1403-1408.
- [19] Meinecke I, Rutkauskaite E, Gay S, et al. The role of synovial fibroblasts in mediating joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(5): 563-568.
- [20] Guiducci S, del Rosso A, Cinelli M, et al. Rheumatoid synovial fibroblasts constitutively express the fibrinolytic pattern of invasive tumor-like cells [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2005, 23(3): 364-372.
- [21] Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology [J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(4): 325-341.
- [22] Biskobing D M, Fan X, Rubin J. Characterization of MCSF-induced proliferation and subsequent osteoclast formation in murine marrow culture [J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(7): 1025-1032.

- [23] Dougall W C, Glaccum M, Charrier K, *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(18): 2412-2424.
- [24] Boyce B F, Xing L P. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2): 139-146.
- [25] Gennari L, Merlotti D, Falchetti A, *et al.* Emerging therapeutic targets for osteoporosis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(2): 115-130.
- [26] 蒋益萍, 吴岩斌, 秦路平, 等. 墨旱莲组分中组织蛋白酶 K 非活性位点抑制剂研究 [J]. *药学学报*, 2017, 52(6): 936-942.
- [27] 李忠浩, 丁宁, 杨全增, 等. 破骨细胞中 NFATc1 相关调节研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(5): 695-700.
- [28] 刘杨, 王永萍, 刘明, 等. 异绿原酸 A 抑制 TNF- $\alpha$  引起的 MH7A 人成纤维细胞样滑膜细胞的增殖和迁移并促进其凋亡 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(8): 693-698.
- [29] 李振彬, 辛立波, 徐铮, 等. 雷公藤多苷对 rmMIF 诱导大鼠成纤维样滑膜细胞增殖及 RANKL/OPG 表达的影响 [J]. *解放军医药杂志*, 2013, 25(4): 10-14.

[责任编辑 潘明佳]