

千斤拔总黄酮通过抑制 NF- κ B 信号通路增强自噬对抗 TNF- α 诱导的人风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症

张颖茵¹, 严雪梅^{1,2}, 陈凯然¹, 许俊雅¹, 王 嵩³, 陈颖楠¹, 李敏晶¹, 洪 筠¹, 段应红¹, 陈丰连¹, 张 蕾^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 乌鲁木齐市中医医院, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830000

3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 基于核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路研究千斤拔总黄酮 (total flavonoids of *Moghania philippinensis*, MPTF) 抗人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞 (rheumatoid arthritis-fibroblast-like synoviocyte, RA-FLS) 炎症的体外作用机制。方法 采用肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导 RA-FLS 炎症模型, 检测细胞活性及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-8、基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase 3, MMP3), MMP9, p62, Beclin-1 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 的蛋白表达, 探究 MPTF 的抗炎作用和对自噬的影响。通过使用自噬流抑制剂和激动剂来检测不同自噬流量对抗炎作用的潜在作用。通过 Western blotting 检测 NF- κ B 抑制因子 α (inhibitor of NF- κ B- α , I κ B α) 的蛋白表达及 p-p65/p65 的值, 并利用其抑制剂和激动剂探究 MPTF 是否通过 NF- κ B 信号通路介导的自噬发挥抗炎作用。结果 在 TNF- α 诱导的 RA-FLS 炎症模型中, MPTF 可以提高细胞活力 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低 IL-1 β 、IL-6、IL-8、MMP3、MMP9 和 p62 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提高 Beclin-1 的蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 的值 ($P < 0.05$ 、 0.01); 且 MPTF 可以显著提高 I κ B α 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 降低 p-p65/p65 的值 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 MPTF 通过抑制 NF- κ B 信号通路增强自噬, 从而发挥抗 RA-FLS 炎症的作用。

关键词: 千斤拔总黄酮; 人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞; NF- κ B 信号通路; 自噬; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)03-0877-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.014

Total flavonoids of *Moghania philippinensis* enhance autophagy against TNF- α induced human rheumatoid arthritis-fibroblast-like synoviocyte inflammation through inhibiting NF- κ B signaling pathway

ZHANG Yingyin¹, YAN Xuemei^{1,2}, CHEN Kairan¹, XU Junya¹, WANG Song³, CHEN Yingnan¹, LI Minjing¹, HONG Jun¹, DUAN Yinghong¹, CHEN Fenglian¹, ZHANG Lei¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Urumqi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, China

3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of the total flavonoids of *Moghania philippinensis* (MPTF) *in vitro* from the perspectives of human rheumatoid arthritis-fibroblast-like synoviocyte (RA-FLS) inflammation based on the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** The RA-FLS inflammation model was induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α). The cell viability and the expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), matrix metalloproteinase 3 (MMP3), MMP9, p62, Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) proteins were determined to assess the anti-inflammatory capabilities and the effects on autophagy of MPTF. The potential impact of different

收稿日期: 2024-10-21

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金-省企联合基金面上项目 (2023A1515220188)

作者简介: 张颖茵 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制。E-mail: 1049904606@qq.com

*通信作者: 张 蕾, 女, 硕士生导师, 教授, 从事中药药效物质基础及其作用机制研究。E-mail: zhangleic431@163.com

autophagy fluxes on the anti-inflammatory effects was detected by using the inhibitor and the agonist. Finally, the expressions of inhibitor of NF- κ B- α (I κ B α) and p-p65/p65 proteins were examined by Western blotting, and the inhibitor and agonist were utilized to make an inquiry of whether MPTF exerts anti-inflammatory effects through the autophagy mediated by the NF- κ B signaling pathway. **Results** MPTF could improve cell viability ($P < 0.05$, 0.01), significantly reduce the expression of IL-1 β 、IL-6、IL-8、MMP3、MMP9 and p62 ($P < 0.05$, 0.01), improve the expression of Beclin-1 and LC3II/LC3I ($P < 0.05$, 0.01). Moreover, MPTF could improve the expression of I κ B α ($P < 0.01$), and reduce the expression of p-p65/p65 ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** MPTF can increase autophagy by inhibiting the NF- κ B signaling pathway, thereby exerting an anti-RA-FLS inflammatory effect.

Key words: total flavonoids of *Moghania philippinensis*; human rheumatoid arthritis-fibroblast-like synoviocyte; NF- κ B signaling pathway; autophagy; inflammation

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种全身性自身免疫性疾病, 其特征包括滑膜炎、骨质侵蚀、软骨和关节破坏。全球流行病学研究显示, 1990~2017 年, RA 的全球患病率达到了 0.25%, 女性发病率更高^[1]。非甾体抗炎药、糖皮质激素、生物制剂和其他常用的西药能有效减轻症状并减缓疾病进展, 但存在耐受性差、不良反应多、价格昂贵等缺点^[2]。

中医药 (traditional Chinese medicines, TCMs) 治疗 RA 具有悠久的历史, 取得较好的效果。TCMs 具有多层次、多靶点和多通路的作用特点, 有助于其调节免疫、消除炎症和减缓 RA 进展^[3]。千斤拔为豆科植物蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li 的干燥根, 被广泛用于治疗 RA、跌打损伤和妇科疾病^[4]。千斤拔抗 RA 的临床应用效果显著且不良反应少^[5], 但其作用机制尚未明晰。黄酮类成分是千斤拔主要的有效成分, 具有抗炎、抗风湿和免疫调节等生物活性^[6-7]。目前, 关于千斤拔总黄酮 (total flavonoids of *Moghania philippinensis*, MPTF) 对于胶原诱导性关节炎药效研究的文献报道较少, 且尚未对其治疗机制进行深入研究^[8]。研究表明, RA 的主要发病部位是滑膜^[9], 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是 RA 发病机制的核心细胞因子, 可以激活类风湿性滑膜成纤维细胞 (since rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, RASFs), 促进 RA 的发生。RASFs 的激活, 是 RA 发展的早期步骤, 可以通过释放大量的炎症细胞因子, 并导致持续的滑膜炎^[9]。随后, 大量产生的炎症蛋白金属基质蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 逐渐破坏关节, 最终导致不可逆的关节软骨和骨降解, 使患者致残或可能无法独立生活^[10]。自噬是一种细胞通过去除缺陷性细胞器, 允许蛋白质聚集并促进细胞器更新的过

程。研究表明, 自噬在 RASFs 死亡途径的调节中具有双重作用, 与 RA 密切相关^[11]。许多天然产物通过调节自噬发挥治疗 RA 的作用^[12]。此外, 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路在 RA 的形成中也具有关键的调节功能。NF- κ B 通路是促炎细胞因子产生的主要调节因子, 在 RASFs 中, 当信号转导分子 κ B 抑制因子激酶 β (inhibitor of kappa B kinase, IKK β) 受到外部刺激所触发时, NF- κ B 抑制因子 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 会被磷酸化并解离, 从而使 NF- κ B 进入细胞核以调节炎症因子^[13]。NF- κ B 信号通路是自噬的上游调节因子, 它们之间存在密切的相互调控的作用。研究表明, 抑制 NF- κ B 过程中会出现 NLRP3 炎症小体活性的抑制, 进而诱导自噬的增加^[14]。NF- κ B 通路的抑制可以上调自噬蛋白 Beclin-1 和 LC3II/LC3I 的蛋白表达, 激活自噬, 从而减轻炎症的发生^[15]。

据此, 本研究从炎症、自噬和 NF- κ B 信号通路的角度出发, 采用人风湿性关节炎成纤维样滑膜 rheumatoid arthritis-fibroblast-like synoviocyte, RA-FLS) 细胞炎症模型探讨 MPTF 治疗 RA 的作用机理, 为其临床应用提供理论支持。

1 材料

1.1 细胞株

RA-FLS 细胞 (批号 zs100557) 由上海子实生物科技有限公司提供, 来源于美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC) 细胞库。

1.2 药品与试剂

千斤拔 (批号 1100159) 购自中国广东省广州采芝林药店, 由广州中医药大学彭光天教授鉴定为豆科植物蔓性千斤拔 *M. philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li 的干燥根。

TNF- α (批号 100947) 购自美国 PeproTech 公

司; IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 ELISA 试剂盒(批号均为 202304)购自江苏酶免实业有限公司; Beclin-1 抗体(批号 86e1489)购自美国 Affinity Bioscience 公司; MTT 试剂盒(批号 20221009)购自北京索莱宝科技有限公司; p62、MMP9 抗体(批号 00005279、00058980)购自美国 Proteintech 公司; MMP9、MMP3、LC3A/B、I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、山羊抗兔二抗(批号分别为 1、3、12、10、17、13 和 27)购自美国 CST 公司; 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)和雷帕霉素(rapamycin, Rapa, 质量分数 $\geq$ 98%, 批号 20230301、J17GB155257)购自上海源叶生物科技有限公司; 吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(pyrrolidinedithiocarbamate ammonium, PDTCT)、佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA, 质量分数 $\geq$ 99%, 批号 CSN17286、CSN11701)购自美国 CSNpharm 公司; Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM, 批号 6124334)购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 04-01-1A)购自以色列 BI 公司; 放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白试剂盒和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(批号 01408/28223、P0009、Z918240807)购自上海碧云天生物技术有限公司; 聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(批号 0000258319)购自瑞士 Roche 公司; 化学发光试剂盒(批号 41116010)购自美国 Millipore 公司; AB-8 型大孔吸附树脂(批号 191002)购自天津海光化工有限公司; 染料木素和染料木苷对照品(质量分数 $\geq$ 98%, 批号 wkq18051601、wkq18031208)购自四川维克奇生物科技有限公司。

1.3 仪器

WFZ-UV-2100 型紫外-可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司); BXM-30R 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); CO $_2$ 恒温培养箱(新加坡 Esco 公司); Safire II 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); TGL-16R 型高速冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司); AL204 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); SDS-PAGE 垂直式电泳槽、垂

直式转印槽(美国 Bio-Rad 公司); 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 MPTF 的制备

2.1.1 MPTF 的提取和分离纯化 将千斤拔药材粉碎, 按物料比为 1:10、1:8 和 1:6 加入 70% 乙醇分别回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 滤过, 滤液减压回收乙醇。浓缩液加水稀释, 静置, 滤过, 收集滤液并用蒸馏水稀释成质量浓度 0.4 g/mL(生药量)的千斤拔供试品溶液。参考文献方法^[16]载荷参数和洗脱程序, 利用 AB-8 型大孔树脂对供试品溶液进行 MPTF 的分离和纯化。

2.1.2 总黄酮质量分数的测定 采用比色法对 MPTF 中总黄酮的质量分数进行测定。精密称取染料木素对照品 2.12 mg, 用 70%乙醇溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 用 70%乙醇定容, 摇匀。精密吸取质量浓度为 0.084 8 mg/mL 的染料木素对照品溶液 0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各加 70%乙醇定容, 在 262 nm 处测定吸光度(A)值, 以质量浓度为横坐标(X), 以 A 值为纵坐标(Y)建立标准曲线。对样品进行测定, 根据测得的黄酮含量和真空干燥后的固体干膏质量, 计算其纯度。

2.2 细胞培养

RA-FLS 细胞采用 10%FBS、1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养。实验所用细胞为第 5~15 代。

2.3 细胞活力的测定

采用 MTT 法测定细胞活力。取对数生长期的 RA-FLS 细胞, 以 5 000 个/孔密度接种于 96 孔板, 设对照组、MPTF 组(7.81、15.63、31.25、62.50 μ g/mL 和 0.125、0.250、0.500、1.000 mg/mL), 每组设 6 个复孔, MPTF 组预先用不同质量浓度的 MPTF 分别处理 24、48 h, 对照组则使用不含药物的相同基质进行处理。随后, 每孔加入 10 μ L MTT 溶液, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 使用酶标仪检测 490 nm 波长的吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 细胞造模、分组与给药

取对数生长期的细胞以 1.5×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板, 并用不同质量浓度的 TNF- α (2.5、5.0、10.0 和 20.0 ng/mL) 处理, 回收各孔细胞上清液, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 根据 ELISA 说

明书, 检测 IL-6 的表达以探究诱导模型的最佳浓度。

取对数生长期的细胞, 以 1.5×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板, 设对照组、模型组、MPTF (7.5、15.0 和 30.0 $\mu\text{g/mL}$) 组、3-MA (5 mmol/L) + MPTF (30 $\mu\text{g/mL}$) 组、3-MA (5 mmol/L) 组、Rapa (1 $\mu\text{mol/L}$) + MPTF (30 $\mu\text{g/mL}$) 组、Rapa (1 $\mu\text{mol/L}$) 组、PDTC (20 $\mu\text{mol/L}$) + MPTF (30 $\mu\text{g/mL}$) 组、PDTC (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、PMA (1 $\mu\text{mol/L}$) + MPTF (30 $\mu\text{g/mL}$) 组、PMA (1 $\mu\text{mol/L}$) 组, 每组设 3 个复孔。对照组给予不含药培养液, 其余组细胞给药预处理 24 h 后, 加入 TNF- α (10 ng/mL) 诱导 6 h。

2.5 ELISA 实验

取对数生长期的细胞, 以 1.5×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板, 设对照组、模型组、MPTF (7.5、15.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$) 组, 对照组、模型组给予不含药培养液, MPTF 组细胞给药预处理 24 h 后, 再加入 TNF- α (10 ng/mL) 诱导 6 h, 回收各孔细胞上清液, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 根据 ELISA 说明书, 检测 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的表达。

2.6 Western blotting 检测相关蛋白表达

各组细胞经预冷的 PBS 洗涤后, 用 RIPA 裂解液进行裂解。使用 BCA 蛋白质测定试剂盒, 测定总蛋白质的浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 用 5% 脱脂奶粉或 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 用二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次。以 β -actin 作为内参, 使用化学发光试剂盒进行显色, 并使用自动化化学发光图像分析系统进行成像。采用 Image-J 软件对各条带进行灰度分析。

2.7 统计学分析

每个实验至少重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 或 t 检验对不同组别进行统计比较。方差齐时进行 LSD 事后检验, 若方差不齐则进行 Dunnett's T3 事后检验。

3 结果

3.1 MPTF 的测定

标准曲线回归方程为 $Y=0.123\ 6\ X+0.013$, 相关系数 (r) 为 0.999 5, 表明在 1.696~5.936 $\mu\text{g/mL}$ 内染料木素对照品的 A 值具有良好的线性关系。计

算得到 MPTF 质量分数约为 66%。

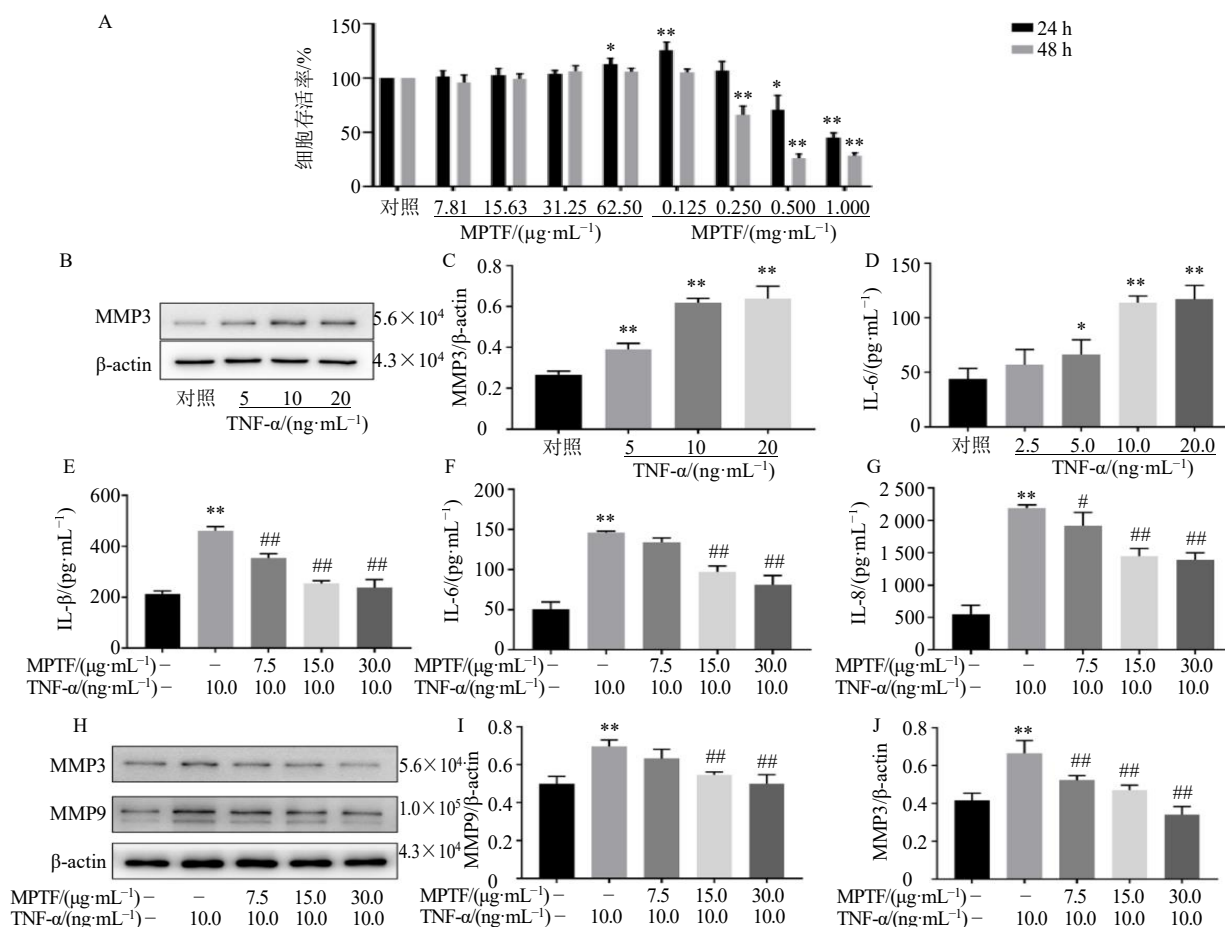
3.2 MPTF 抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 炎症

采用 MTT 法测定 RA-FLS 细胞存活率, 结果表明 MPTF 质量浓度 $\geq 62.5\ \mu\text{g/mL}$ 时对细胞存活率有影响 ($P<0.05$ 、0.01), 7.81、15.63 和 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 的 MPTF 对细胞存活率无显著影响 (图 1-A)。如图 1-B~D 所示, TNF- α (10 ng/mL) 诱导 6 h 可以增加 IL-6 和 MMP3 的蛋白表达水平 ($P<0.01$)。因此, 采用 TNF- α (10 ng/mL) 处理 6 h 诱导 RA-FLS 炎症模型, 并采用低、中和高剂量组 MPTF (7.5、15.0、30.0 $\mu\text{g/mL}$) 处理 24 h 以探究其药效作用。如图 2-E~J 所示, 与对照组比较, 模型组可显著增加 IL-1 β 、IL-6、IL-8、MMP3 和 MMP9 的蛋白表达 ($P<0.01$); 与模型组比较, MPTF 低剂量组可显著降低 IL-1 β 、IL-8 和 MMP3 的蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、0.01), 中、高剂量组 MPTF 可显著降低 IL-1 β 、IL-6、IL-8、MMP3 和 MMP9 的蛋白表达 ($P<0.01$) 水平。结果表明, 安全剂量的 MPTF 能够抑制 RA-FLS 的炎症反应。

3.3 MPTF 通过激活自噬抑制 RA-FLS 炎症

如图 2-A~D 所示, 与对照组比较, 模型组中 Beclin-1 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), p62 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, MPTF 不同剂量组细胞中 Beclin-1 的蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 值均显著升高 ($P<0.05$ 、0.01), p62 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与 MPTF 组比较, 3-MA+MPTF 组细胞中 Beclin-1 蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 值降低 ($P<0.05$), p62 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)。结果表明, MPTF 可以恢复 TNF- α 诱导降低的 RA-FLS 细胞自噬通量。

如图 2-E~J 所示, 与对照组比较, 模型组 MMP3、MMP9、p62 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、0.01), Beclin-1 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 高剂量 MPTF 能通过降低 MMP-3、MMP-9 的蛋白表达水平 ($P<0.01$) 减轻炎症诱导的损伤, 并且能通过提高 Beclin-1 的蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 值 ($P<0.01$), 同时降低 p62 的蛋白表达水平 ($P<0.01$) 来增加 RA-FLS 中的自噬通量。使用激动剂 Rapa 和抑制剂 3-MA 探究自噬的作用, 与 MPTF 组比较, Rapa+MPTF 组 Beclin-1 的蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 值显著增加 ($P<0.05$ 、0.01), 导致炎症水平进一步降低, 表现为 MMP3 和 MMP9 的蛋白表达水平



A-不同质量浓度 MPTF 处理细胞 24、48 h 对细胞存活率的影响；B、C-Western blotting 检测不同质量浓度 TNF- α 对 MMP3 蛋白表达的影响；D-ELISA 检测不同质量浓度 TNF- α 对 IL-6 蛋白表达的影响；E~G-ELISA 检测不同质量浓度 MPTF 对 RA-FLS 炎症细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 蛋白表达的影响；H~J-Western blotting 检测不同质量浓度 MPTF 对 RA-FLS 炎症细胞中 MMP3、MMP9 蛋白表达的影响；与对照组比较： $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ ；与模型组比较： $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ 。

A-effect on cell viability with 24 and 48 h of different concentrations of MPTF treatment; B, C- effect of different concentrations of TNF- α on expression of MMP3 detected by Western blotting; D- effect of different concentrations of TNF- α on expression of IL-6 detected by ELISA. E~G- effect of different concentrations of MPTF on expression of IL-1 β , IL-6 and IL-8 in RA-FLS inflammatory cells detected by ELISA. H~J- effect of different concentrations of MPTF on the expression of MMP3 and MMP9 in RA-FLS inflammatory cells detected by Western blotting. $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs model group.

图 1 MPTF 抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 炎症 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

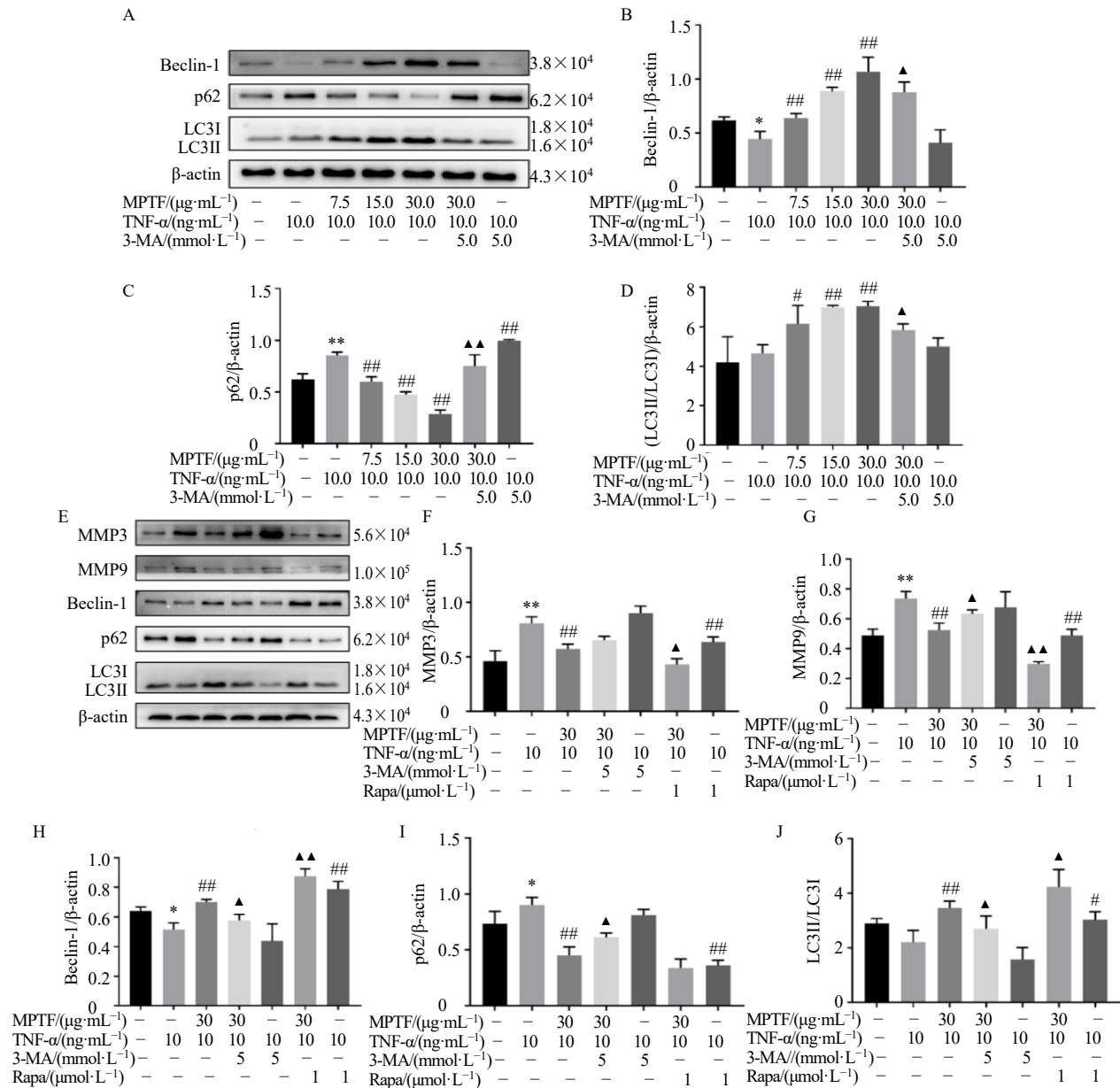
Fig. 1 MPTF inhibited TNF- α -induced inflammation of RA-FLS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。上述结果表明，MPTF 引起的自噬激活可以减轻炎症反应。

3.4 MPTF 通过抑制 NF- κ B 信号通路激活自噬

如图 3-A~C 所示，与对照组比较，模型组中 I κ B α 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)，而 p-p65/p65 值显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，MPTF 中、高剂量组预处理可以显著提高 I κ B α 的蛋白表达水平 ($P<0.01$)，并降低 p-p65/p65 值 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明，MPTF 可以抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 炎症细胞中的 NF- κ B 信号通路。如图 3-D~I 所示，与对照组比较，模型组中 I κ B α

和 Beclin-1 的蛋白表达水平降低 ($P<0.01$)，p-p65/p65 和 p62 的蛋白表达水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，MPTF 高剂量组可以通过提高 Beclin-1 的蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 值 ($P<0.01$)，并降低 p62 的蛋白表达水平 ($P<0.01$) 来改善自噬通量，同时通过提高 I κ B α 的蛋白表达水平 ($P<0.01$) 和降低 p-p65/p65 的蛋白表达水平 ($P<0.01$) 来抑制 NF- κ B 信号通路。使用抑制剂 PDTC 和激动剂 PMA 来探究 NF- κ B 信号通路的作用，与 MPTF 组比较，PMA+MPTF 组中 I κ B α 、Beclin-1 的蛋白表达水平和 LC3II/LC3I 值显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)，



A~D-Western blotting 检测不同质量浓度 MPTF 及 3-MA 对 RA-FLS 炎症细胞中 Beclin-1、p62 蛋白表达及 LC3II/LC3I 值的影响；E~J-Western blotting 检测 MPTF 与 3-MA 或 Rapa 联合处理对 RA-FLS 炎症细胞中 MMP3、MMP9、Beclin-1、p62 蛋白表达及 LC3II/LC3I 值的影响；与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与 MPTF 组比较：▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ ，图 3 同。

A—D: effect of different concentrations of MPTF and 3-MA on expression of Beclin-1, p62 and LC3II/LC3I in RA-FLS inflammatory cells detected by Western blotting. E—J: effect of different concentrations of MPTF combined with 3-MA or Rapa on expression of MMP3, MMP9, Beclin-1, p62 and LC3II/LC3I in RA-FLS inflammatory cells detected by Western blotting; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs TNF- α group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs MPTF group, same as Fig. 3.

图 2 MPTF 通过激活自噬抑制 RA-FLS 炎症 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

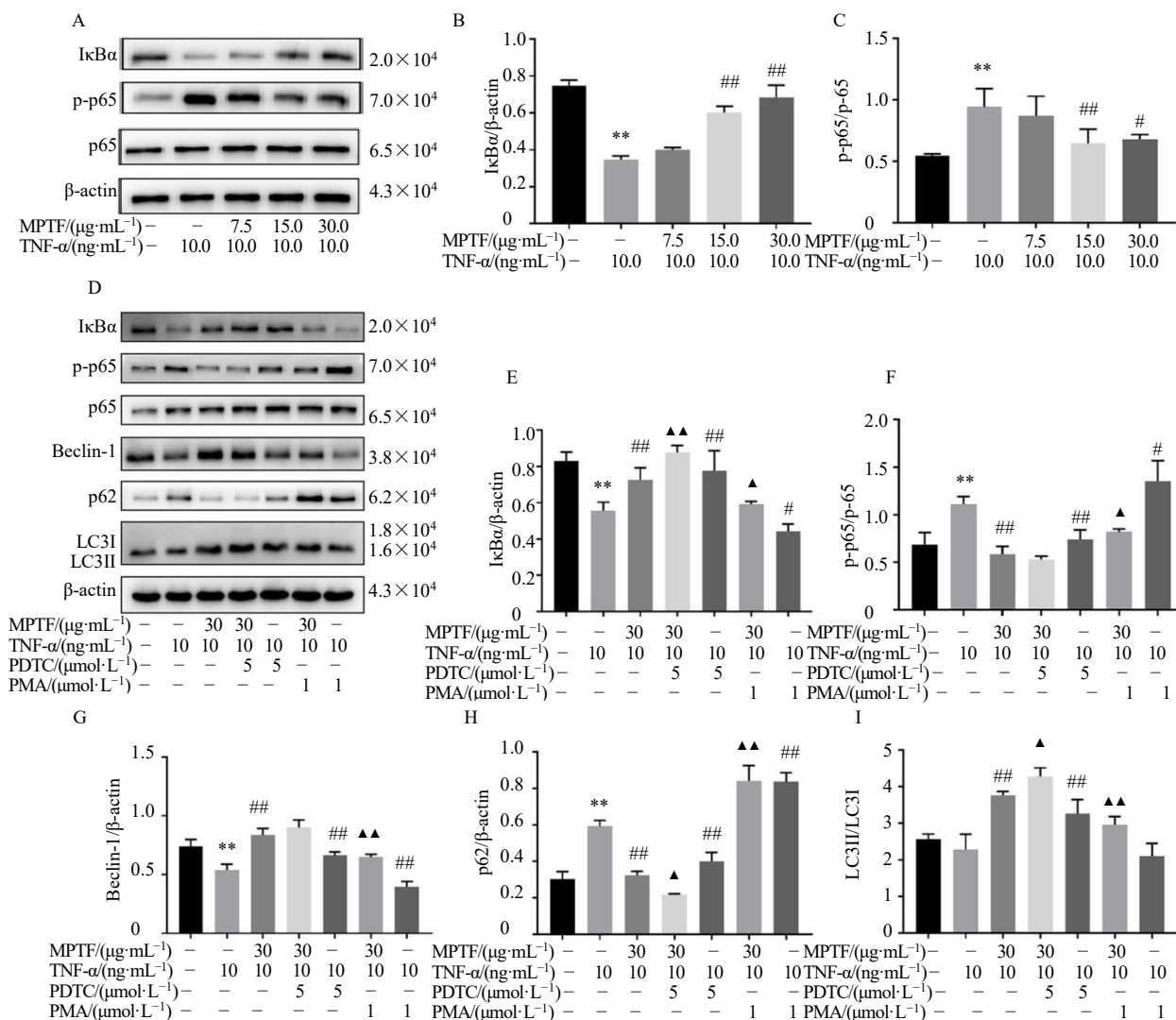
Fig. 2 MPTF inhibited inflammation of RA-FLS by activating autophagy ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

而 p-p65/p65 和 p62 的蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，MPTF 诱导的 NF- κ B 信号通路抑制被抵消，所导致自噬通量降低；与 MPTF 组比较，PDTC + MPTF 组的 I κ B α 水平进一步升高 ($P < 0.01$)，导致自噬通量进一步增强，表现为 LC3II/LC3I 的蛋白表达水

平升高 ($P < 0.05$) 和 p62 的蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明，MPTF 诱导的自噬活化是通过调节 NF- κ B 信号通路实现的，从而发挥抗炎作用。

4 讨论

研究表明，在 RA 发展过程中，RASfs 可以产



A~C-Western blotting 检测不同质量浓度 MPTF 对 RA-FLS 炎症细胞中 IκBα 的蛋白表达和 p-p65/p65 值的影响；D~I-Western blotting 检测 MPTF 与 PDTC 或 PMA 联合处理对 RA-FLS 炎症细胞中 IκBα、Beclin-1、p62 的蛋白表达和 p-p65/p65、LC3II/LC3I 值的影响。
A—C-effect of different concentrations of MPTF on expression of IκBα and p-p65/p65 in RA-FLS inflammatory cells detected by Western blotting;
D—I-effect of different concentrations of MPTF combined with PDTC or PMA on expression of IκBα, Beclin-1, p62, p-p65/p65 and LC3II/LC3I in RA-FLS inflammatory cells detected by Western blotting.

图 3 MPTF 通过抑制 NF-κB 信号通路激活自噬 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 MPTF inhibited NF-κB signaling pathway by activating autophagy ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

生细胞因子和蛋白酶，介导软骨破坏和驱动关节炎[17]。TNF-α是最常用的 RA-FLS 炎症模型诱导剂。本研究发现在 TNF-α 诱导的 RA-FLS 炎症中，MPTF 可以下调促炎因子（IL-6、IL-1β 和 IL-8）和 MMPs（MMP-3 和 MMP-9）的蛋白表达，降低 RA-FLS 炎症水平。MPTF 确切的抗炎特性表明它对 RA 的治疗作用。本研究还将自噬与 RA 联系起来。在自噬发展过程中，伴随着 Beclin-1 的生成、p62 的降解和 LC3I 到 LC3II 的转化[18]。通过对这些蛋白的表达水平进行检测，本研究发现 MPTF 可以诱导自噬，当自噬流抑制剂 3-MA 与 MPTF 联合使用时，炎性

细胞因子的表达增强，而激动剂 Rapa 与 MPTF 联合使用时炎症水平进一步降低，表明 MPTF 引起的自噬激活可以减轻炎症反应。此外，进一步探究了 MPTF 的潜在信号传导途径机制。研究表明，NF-κB 信号通路在 RA 发展中起着重要作用[13]，也是许多中药作用的重要靶途径之一，中药活性成分可以通过抑制 NF-κB 信号通路介导自噬以减轻炎症[15]。IκBα 是 NF-κB 信号通路中的重要成员，主要调控 NF-κB 的激活和转录[23]。MPTF 通过提高 IκBα 的表达，抑制了 NF-κB 的活性，从而减少了炎症因子的生成。同时，MPTF 降低 p-p65/p65 的表达，进一

步阻断了 NF- κ B 信号通路的激活, 发挥抗炎作用。此外, 通过阻断 NF- κ B 信号通路, MPTF 可以刺激 RA-FLS 自噬以减轻炎症反应。

综上, 本研究结果表明 MPTF 诱导的自噬使 RA-FLS 在炎症损伤后维持稳态, 且 NF- κ B 信号通路在这一过程中发挥着不可或缺的调节作用, 本研究初步为 MPTF 的抗 RA 机制研究提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Favalli E G, Biggioggero M, Crotti C, *et al.* Sex and management of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2019, 56(3): 333-345.
- [2] Prasad P, Verma S, Surbhi, *et al.* Rheumatoid arthritis: Advances in treatment strategies [J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(1): 69-88.
- [3] Wang L, Pu X L, Nie X, *et al.* Integrated serum pharmacochimistry and network pharmacological analysis used to explore possible anti-rheumatoid arthritis mechanisms of the Shentong-Zhuyu decoction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 273: 113988.
- [4] 严东, 夏伯候, 李春, 等. 千斤拔属药用植物的研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(24): 4456-4471.
- [5] 杜战国. 四物五藤汤加千斤拔治疗类风湿性关节炎 76 例 [J]. *实用中医药杂志*, 2017, 33(9): 1031-1032.
- [6] 李华, 杨美华, 斯建勇, 等. 千斤拔化学成分研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(4): 512-516.
- [7] Wang J X, Zhang Q Y, Jin S, *et al.* Genistein modulate immune responses in collagen-induced rheumatoid arthritis model [J]. *Maturitas*, 2008, 59(4): 405-412.
- [8] Sun G C, Xing C C, Zeng L T, *et al.* *Flemingia philippinensis* flavonoids relieve bone erosion and inflammatory mediators in CIA mice by downregulating NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 5790291.
- [9] Huber L C, Distler O, Tarner I, *et al.* Synovial fibroblasts: Key players in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2006, 45(6): 669-675.
- [10] Malemud C J. Matrix metalloproteinases and synovial joint pathology [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148: 305-325.
- [11] Kato M, Ospelt C, Gay R E, *et al.* Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(1): 40-48.
- [12] Wang X H, Shen C P, Wang T T, *et al.* Shikonin suppresses rheumatoid arthritis by inducing apoptosis and autophagy via modulation of the AMPK/mTOR/ULK-1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155512.
- [13] Bottini N, Firestein G S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(1): 24-33.
- [14] Gong Y Q, Li S, Wu J H, *et al.* Autophagy in the pathogenesis and therapeutic potential of post-traumatic osteoarthritis [J]. *Burns Trauma*, 2023, 11: tkac060.
- [15] Yao M J, Zhang C H, Ni L Z, *et al.* Cepharanthine ameliorates chondrocytic inflammation and osteoarthritis via regulating the MAPK/NF- κ B-autophagy pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 854239.
- [16] 陈帅, 王慧竹, 姜昆, 等. 大孔吸附树脂分离纯化千斤拔总黄酮的工艺研究 [J]. *黑龙江农业科学*, 2014(10): 115-119.
- [17] Fang Q H, Zhou C, Nandakumar K S. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 3830212.
- [18] Meng Q L, Du X Z, Wang H L, *et al.* *Astragalus* polysaccharides inhibits cell growth and pro-inflammatory response in IL-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes by enhancement of autophagy via PI3K/AKT/mTOR inhibition [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(9): 1138-1146.

[责任编辑 罗 曦]