

参考文献:

[1] Callahan S J, Xia M, Murray S, *et al.* Clinical characteristics in patients with asymmetric idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Med*, 2016, 119: 96-101.

[2] 陈 乾,熊旭东. 免疫细胞在特发性肺纤维化中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(10): 1586-1590.

[3] 毕春宇. 高分辨率 CT 扫描在特发性肺间质纤维化诊断价值分析[J]. 影像研究与医学应用, 2018, 2(24): 167-168.

[4] D’Andrea A, Stanziola A, D’Alto M, *et al.* Right ventricular strain: an independent predictor of survival in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 222: 908-910.

[5] 吕恒娟,陈宝元,王合荣,等. 65 例间质性肺疾病临床特征分析[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(10): 1390-1392.

[6] Rabea A E M, Zidan M, Daabis R, *et al.* Prevalence of chronic hepatitis C virus (HCV) infection in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Egypt J Chest Dis Tuberc*, 2015, 64 (4): 907-913.

[7] 闫 巍,朱 翔,王建丽,等. 家族性特发性肺间质纤维化家系的临床特征及遗传学特点[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(11): 833-838.

[8] Enomoto N, Suda T, Kono M, *et al.* Amount of elastic fibers predicts prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Med*, 2013, 107(10): 1608-1616.

[9] Raghu G, Rochwerf B, Zhang Y, *et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline[J]. *Am J Respir Criti Care Med*, 2015, 192 (2): e3-e19.

[10] 张云松,朱晓林. 从解毒化痰扶正法论治重症特发性肺间质纤维化[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(1): 61-62.

[11] 蔡后荣. 间质性肺疾病的临床治疗进展[J]. 临床内科杂志, 2005, 22(4): 223-226.

[12] 邢 玮,高 鹏,郑 心. 间质流膏对特发性间质性肺炎患者血清 TGF-β1、TNF-α 水平变化的影响[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(3): 72-73.

[13] 郑 心,赵 粤. 特发性肺间质纤维化的中医病因病机及证治研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(18): 88-90.

[14] 郁万晓. 中西药三联法治疗肺间质纤维化临床观察[J]. 实用中西医结合临床, 2013, 13(6): 3-5.

[15] 赵改霞,郑 心. 特发性肺间质纤维化的中西医结合疗法研究概况[J]. 山东中医杂志, 2017, 36(1): 78-81.

刺山柑正丁醇部位对 MH7A 细胞增殖、凋亡的作用

金渭荃¹, 包晓玮^{1*}, 朱东亮², 白栋文¹, 刘晓禄¹

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆军区保障部药品仪器监督检验站, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: **目的** 研究刺山柑正丁醇部位对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞系 MH7A 细胞增殖和凋亡的影响, 以及对 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 及 p-STAT3 蛋白表达的影响。**方法** 采用 CCK-8 法检测 MH7A 细胞增殖抑制率, 使用流式细胞术检测 MH7A 凋亡, 采用 Western blot 法检测 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 及 p-STAT3 蛋白表达。**结果** 刺山柑正丁醇部位能抑制 MH7A 细胞增殖率 ($P<0.01$), 并能诱导细胞凋亡 ($P<0.01$), 降低 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 及 p-STAT3 蛋白表达。**结论** 刺山柑正丁醇部位可抑制 MH7A 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 可能通过 p-JNK 和 p-STAT3 信号通路进行调节。**关键词:** 刺山柑; MH7A; 增殖; 凋亡; JNK; STAT3

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)02-0578-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.046

刺山柑 *Capparis spinosa* L. 为山柑科山柑属植物, 俗称野西瓜^[1]。化学研究表明, 刺山柑中含有生物碱类^[2]、黄酮类^[3]、酚酸类^[4]等化学成分, 具有对关节软骨细胞的保护^[5]、抗炎镇痛^[6]、抑菌^[7]等作用。

类风湿关节炎是以慢性、进行性周身多关节炎为特征的一种自身免疫性疾病^[8], 其病理过程为滑膜慢性炎症、增生, 形成血管翳; 持续的炎症破坏关节软骨、韧带及肌腱, 最终导致关节畸形和功能丧失^[9]。关节软骨被破坏的

收稿日期: 2020-12-02
基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81860766)
作者简介: 金渭荃 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为食品营养与安全。Tel: 15840012046, E-mail: 2352935040@qq.com
* 通信作者: 包晓玮 (1969—), 女, 副教授, 研究方向为食品营养与安全。Tel: 13899988973, E-mail: 408531623@qq.com

主要诱因是过度增殖的滑膜细胞和过度分泌的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)^[10]。MMPs 是一种几乎能降解所有软骨细胞外基质的一组蛋白酶^[11], 其高水平表达是慢性炎症疾病状态的标志^[12]。在类风湿关节炎发展过程中, 增加的 MMPs 导致过度的基质降解, 失去功能性软骨, 并损害关节完整性^[13]。p-JNK 在类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞中有促进滑膜细胞中炎症因子分泌和表达的作用^[14]。p-STAT3 对于细胞的存活、增殖及迁移起重要作用, 并且还可以介导炎症因子及趋化因子的释放^[15]。

类风湿关节炎滑膜成纤维细胞系 MH7A 细胞是研究类风湿关节炎公认的体外细胞模型^[16]。本实验通过观察刺山柑正丁醇部位对 MH7A 细胞增殖、凋亡及蛋白表达的影响, 为刺山柑正丁醇部位的深度研究与开发利用提供一定实验和理论基础。

1 材料

1.1 细胞 MH7A 细胞 (广州莱德盟生物科技有限公司)。

1.2 药物与试剂 刺山柑, 购自新疆乌鲁木齐市北园春市场, 经新疆农业大学马生军副教授鉴定为刺山柑 *Capparis spinosa* L. 胎牛血清、DMEM 高糖培养基、青链霉素、PBS 磷酸钾缓冲液 (美国 Hyclone 公司); HRP 标记的 GAPDH 内参 (上海康成生物工程有限公司); MMP-1、MMP-9、MMP-13 (英国 Abcam 公司); p-JNK、p-STAT3 (美国 Affinity Biosciences 公司); Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)、Mouse/Human ads-HRP (美国 Southern Biotech 公司)。

2 方法

2.1 刺山柑正丁醇部位的制备 取 200.00 g 刺山柑干燥果实, 进行粉碎, 过 60 目筛, 分别加入 80%、50% 乙醇, 分别超声提取 2 次, 提取时间为每次 50 min, 提取功率为 575 W, 料液比为 1 : 10, 合并醇提取液, 减压浓缩 (55 ℃) 至膏状, 得乙醇提取物, 以等量蒸馏水将其混悬, 随后按 1 : 2 的体积比, 依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇溶剂对乙醇提取物混悬液进行分级萃取, 各溶剂重复萃取 4 次, 收集萃取液, 减压浓缩 (55 ℃) 至 10 mL, 于真空干燥箱中干燥, 得刺山柑正丁醇部位。

2.2 细胞培养 将 MH7A 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基中, 置于 5% CO₂、37 ℃ 恒温培养箱中培养。将生长良好的 MH7A 细胞消化后, 利用细胞计数仪进行计数, 用 RPMI-1640 细胞培养液调整细胞密度为 1×10⁵/mL。

2.3 CCK-8 法检测 MH7A 细胞增殖抑制率 按“2.2”项下方法处理 MH7A 细胞, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板。细胞贴壁生长 12 h 后, 将原有培养基更换为含不同质量浓度刺山柑正丁醇部位的培养基, 每组质量浓度分别为 0、0.75、1.5、3.125、7.5、15、30 mg/mL, 分别培养 24、48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处检测光密度 (OD) 值, 并计算细胞增殖抑制率。实验重复 3 次。

2.4 流式细胞术检测 MH7A 细胞凋亡率 按“2.2”项下

方法处理 MH7A 细胞, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板。待细胞贴壁生长 12 h 后, 将原有培养基更换为含刺山柑正丁醇部位的培养基。将细胞分为 5 组, 每组质量浓度分别为 0、0.75、1.5、3.125、7.5 mg/mL。将 6 孔板置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中, 培养 24 h。使用 AnnexinV-FICT/PI 进行染色, 避光反应后, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 Western blot 检测 MH7A 细胞中 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 和 p-STAT3 的蛋白表达 按“2.2”项下方法处理 MH7A 细胞。稀释实验样品, 每个样品取 2 μL, 稀释 20 倍, BCA 法检测样品浓度。电泳, 转膜, TBST 漂洗 5 min, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h, 加入 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 及 p-STAT3 一抗, 4 ℃ 过夜孵育, TBST 洗膜, 加入相应二抗 37 ℃ 孵育 1 h, TBST 洗膜, 在膜的表面均匀加入化学荧光底物, 反应持续 5 min。放至暗盒, 显影, 通过 Image J 软件统计各蛋白条带的灰度值。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 Duncan's 法, 图表采用 Graphpad 8 软件绘制。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

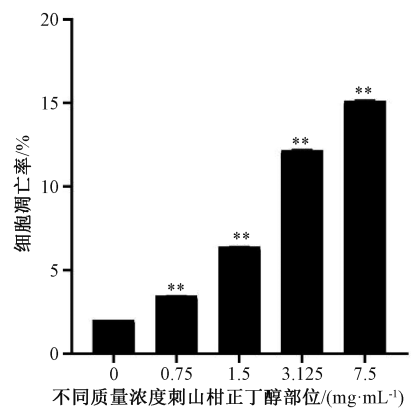
3.1 刺山柑正丁醇部位对 MH7A 细胞增殖的影响 如图 1 所示, 与空白对照组 (0 mg/mL) 比较, 刺山柑正丁醇部位各质量浓度处理对 MH7A 细胞的增殖均有抑制作用, 作用 24 h 后细胞增殖抑制率均升高 (P<0.01), 0.75 mg/mL 组细胞增殖抑制率最低为 12.76%, 7.5 mg/mL 组细胞增殖抑制率最高为 74.38%; 作用 48 h 后各质量浓度组细胞抑制率均升高 (P<0.01), 0.75 mg/mL 组细胞增殖抑制率最低为 29.08%, 7.5 mg/mL 组细胞增殖抑制率最高为 85.07%。结果表明, 随着刺山柑正丁醇部位质量浓度升高对细胞增殖的抑制率增加, 且 7.5 mg/mL 时细胞增殖抑制率达到稳定, 随着刺山柑正丁醇部位干预时间的增加细胞增殖抑制率呈现升高趋势。因此, 选择 0、0.75、1.5、3.125、7.5 mg/mL 质量浓度进行后续实验。

Time (h)	0 mg/mL	0.75 mg/mL	1.5 mg/mL	3.125 mg/mL	7.5 mg/mL	15 mg/mL	30 mg/mL
24 h	0	12.76	22.15	68.45	74.38	74.38	74.38
48 h	0	29.08	60.12	85.07	85.07	85.07	85.07

注: 与空白对照组 (0 mg/mL) 比较, ** P<0.01。

图 1 不同质量浓度刺山柑正丁醇部位对 MH7A 细胞的增殖作用 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3.2 刺山柑正丁醇部位对 MH7A 细胞凋亡的影响 如图 2~3 所示, 与空白对照组比较, 刺山柑正丁醇部位各质量浓度组均能诱导 MH7A 细胞发生凋亡 (P<0.01), 且细胞凋亡率随着质量浓度的增加而升高, 呈现剂量依赖性。质



注：与空白对照组（0 mg/mL）比较，** $P<0.01$ 。

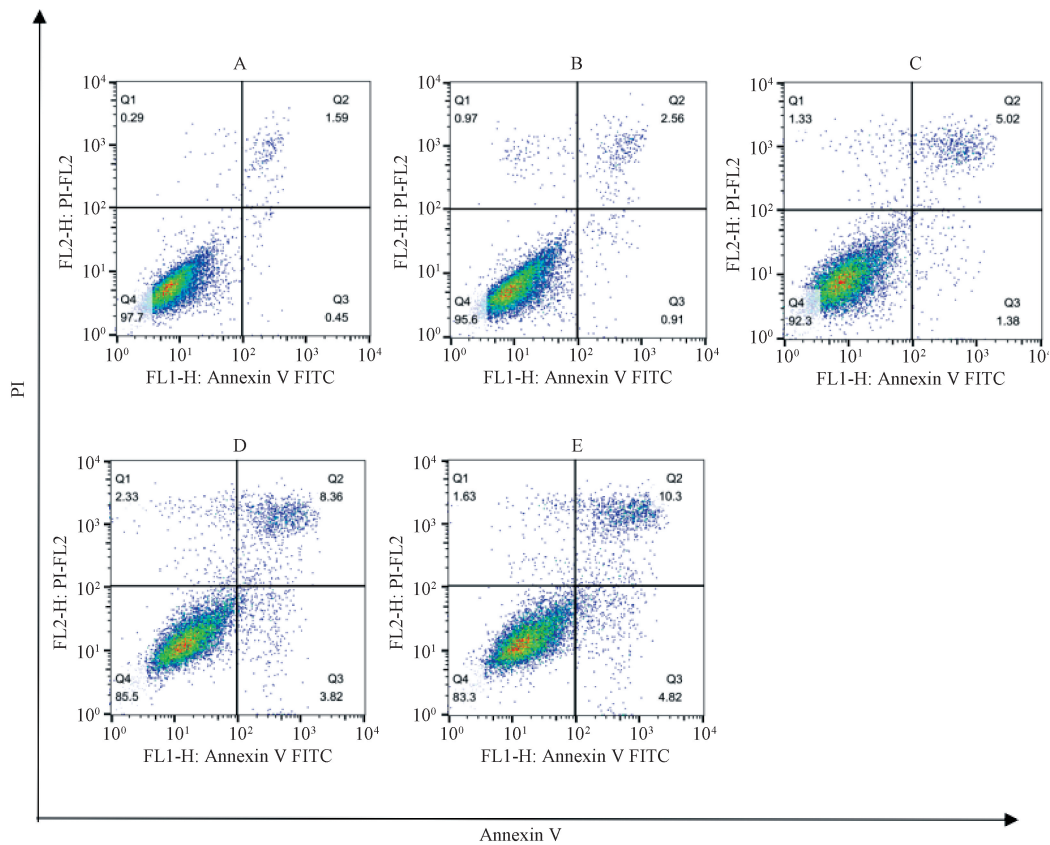
图 2 不同质量浓度刺山柑正丁醇部位对 MH7A 细胞的凋亡作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

量浓度为 0.75 mg/mL 时细胞凋亡率最低为 3.47%，质量浓度为 7.5 mg/mL 时细胞凋亡率最高为 15.12%。结果表明，刺山柑正丁醇部位能够诱导 MH7A 细胞的凋亡，并且随着质量浓度的增加抑制率呈现升高趋势。

3.3 刺山柑正丁醇部位对 MH7A 细胞中 MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 如表 1、图 4 所示，与空白对照组比较，随着刺山柑正丁醇部位质量浓度的升高，MMP-1、MMP-9、MMP-13、p-JNK 及 p-STAT3 的蛋白表达均降低，说明刺山柑正丁醇部位对 MMP-1、MMP-9、MMP-13 蛋白表达有抑制作用，对 p-JNK 及 p-STAT3 通路蛋白也有抑制作用。

4 讨论

现代医学认为类风湿关节炎主要是关节滑膜中的里层细胞异常增殖、炎性细胞浸润、血管翳生成、软骨基质降解，最终导致关节变形及功能障碍^[17]。



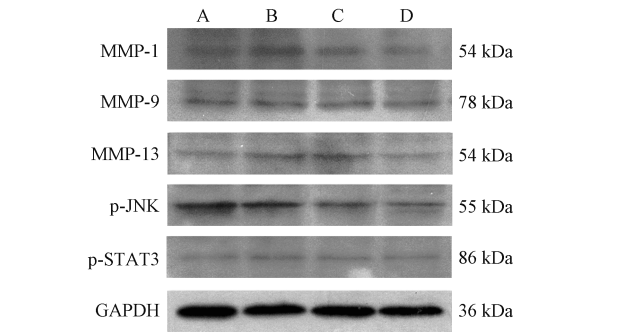
注：A 为空白对照组，B 为 0.75 mg/mL 刺山柑正丁醇部位组，C 为 1.5 mg/mL 刺山柑正丁醇部位组，D 为 3.125 mg/mL 刺山柑正丁醇部位组，E 为 7.5 mg/mL 刺山柑正丁醇部位组。

图 3 各组 MH7A 细胞凋亡情况

表 1 各组 MH7A 细胞中相关蛋白的灰度值 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	药物质量浓度	MMP-1	MMP-9	MMP-13	p-JNK	p-STAT3	GAPDH
1	0 mg/mL	812.23	878.71	568.83	1 552.83	583.00	5 409.87
2	0.75 mg/mL	324.95	577.84	609.06	899.31	346.13	6 391.72
3	1.5 mg/mL	157.80	667.17	172.91	96.37	379.29	5 691.79
4	3.125 mg/mL	117.99	425.46	118.23	96.99	91.71	4 429.57

在病理状态下，类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞（RAFLSs）会表现出异常增殖以及凋亡不足的情况，但多种细胞因子由 RAFLS 释放，如炎性介质、MMPs、趋化因子等，这些因子均可引起软骨破坏，因此需促进滑膜细胞



注：A 为空白对照组，B 为 0.75 mg/mL 刺山柑正丁醇部位组，C 为 1.5 mg/mL 刺山柑正丁醇部位组，D 为 3.125 mg/mL 刺山柑正丁醇部位组。

图 4 各组相关蛋白表达条图

的凋亡，抑制滑膜组织的增生^[18]。MH7A 细胞作为 RAFLS 中的一种成熟细胞系，其作用和 RAFLSs 基本类似，但可以多次传代不影响细胞活性，因此本研究选择 MH7A 细胞作为类风湿关节炎研究的细胞模型^[19]。本研究用不同质量浓度刺山柑正丁醇部位干预 MH7A 细胞，发现刺山柑正丁醇部位可以抑制 MH7A 细胞增殖，并能够有效诱导 MH7A 细胞的凋亡。

在病理状态下，RAFLSs 表现为“类肿瘤样”，多条信号通路的异常激活，异常增厚的细胞包裹关节软骨，致使其不能正常代谢并且分泌大量 MMPs 降解软骨，导致关节活动度降低甚至永久性损伤^[20]。在类风湿关节炎中，MMPs 水平高并且几乎可降解软骨基质中所有成分，若要保护软骨，应抑制其活性或表达。本研究的结果显示刺山柑正丁醇部位可以抑制 MMP-1、MMP-9、MMP-13 的表达，可通过负调控 MMPs 来保护关节软骨。p-JNK 可促进滑膜细胞中炎症因子分泌和表达；p-STAT3 可促进炎症因子及趋化因子的释放，抑制这 2 个信号通路后，可降低炎症因子的分泌，能有效抑制类风湿性关节炎发生发展^[21]。本研究的结果显示刺山柑正丁醇部位可以抑制 p-JNK、p-STAT3 的表达，可通过负调控 p-JNK、p-STAT3 来抑制炎症分子的分泌和表达。

综上所述，刺山柑正丁醇部位可负调控 JNK、STAT3 信号通路，抑制 MH7A 细胞增殖，诱导 MH7A 细胞凋亡，并抑制 MMP-1、MMP-9、MMP-13 蛋白表达，为开发刺山柑作为防治类风湿关节炎提供一定理论基础。

参考文献：

[1] 何江波, 欧阳 芬, 张 燊, 等. 刺山柑化学成分研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2018, 33 (3): 558-562.

[2] 康小龙, 何承辉, 刘 晶, 等. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠Ⅲ型胶原表达的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2016, 45 (8): 688-691.

[3] 张轩晨, 杨伟俊, 何 江, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用分析刺山柑果不同生长期挥发性成分 [J]. 食品与发酵科技, 2017, 53 (3): 70-73; 77.

[4] 买地哪木·色迪克, 李 俊, 王 梅. 刺山柑化学成分及其功能性的研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10 (18): 6165-6170.

[5] 霍新慧, 王延蛟, 李 盼, 等. 刺山柑果风湿止痛贴对类风湿关节炎大鼠滑膜组织 MMP-9 表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54 (1): 80-83.

[6] 张 瑜, 张 华, 韩 博, 等. 刺山柑多糖提取及其抗炎镇痛作用研究 [J]. 石河子大学学报 (自然科学版), 2011, 29 (2): 205-209.

[7] 包晓玮, 赵文燕, 曾兰君, 等. HPLC 法同时测定刺山柑果实正丁醇部位中 3 种成分及该部位抑菌活性 [J]. 中成药, 2021, 43 (9): 2567-2569.

[8] 贾庆运, 王拥军, 梁倩倩, 等. 槲皮素对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子和基质金属蛋白酶的表达的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25 (6): 738-741.

[9] 赵 晶. 化痰解毒补肾方对类风湿关节炎骨病变治疗作用的临床研究 [D]. 保定: 河北大学, 2016.

[10] 黄 英. 从 H3K27 甲基化修饰探讨雷公藤甲素对软骨破坏的作用及可能机制 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.

[11] 肖智伟. COX-2、MMP-14 的相互作用在食管癌细胞增殖、侵袭及凋亡中的研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2017.

[12] Tatematsu N, Waguri-Nagaya Y, Kawaguchi Y, et al. Mithramycin has inhibitory effects on gliostatin and matrix metalloproteinase expression induced by gliostatin in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. *Mod Rheumatol*, 2018, 28 (3): 495-505.

[13] Ni S, Li C K, Xu N W, et al. Follistatin-like protein 1 induction of matrix metalloproteinase 1, 3 and 13 gene expression in rheumatoid arthritis synoviocytes requires MAPK, JAK/STAT3 and NF-κB pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234 (1): 454-463.

[14] 左瑞庭, 王西彬. 枳酮对 LPS 介导 MH7A 细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中成药, 2019, 41 (8): 1806-1810.

[15] Kim W H, An H J, Kim J Y, et al. Apamin inhibits TNF-α- and IFN-γ-induced inflammatory cytokines and chemokines via suppressions of NF-κB signaling pathway and STAT in human keratinocytes [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69 (5): 1030-1035.

[16] 武璐璐. 湖北枫杨提取物对 MH7A 细胞增殖和凋亡的影响及其机制初探 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2018.

[17] 苏 杉. 秦艽不同配伍药对对风寒湿痹 RA 模型大鼠 NF-κB、VEGF、MMP-3、TIMP-1 表达的影响 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2019.

[18] 郝润璇. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨刺老苞抑制 RA 滑膜增殖的作用及机制 [D]. 恩施: 湖北民族大学, 2020.

[19] 杨 爽. 基于 JAK/STAT 通路探讨桂枝芍药知母汤对 TNF-α 诱导的 MH7A 细胞的抗炎作用 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.

[20] 黄同列. CYR61 介导 DDR2 过分泌 MMP1 的分子机制及其在 RA 滑膜细胞侵袭中的作用研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.

[21] 陈 英, 张文玲, 黄 涛, 等. 炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-17 与类风湿关节炎并发动脉粥样硬化的关系 [J]. 免疫学杂志, 2017, 33 (3): 268-272.