

• 实验研究 •

盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的影响

刘跃振¹ 张邦能^{2△} 汪丽娟² 孟祥云² 张磊² 李红专² 张效收¹

[摘要] 目的:探讨盐酸小檗碱对脂多糖诱导的强直性脊柱炎成纤维样滑膜(FLS)细胞增殖、迁移及侵袭的影响及分子机制。方法:从强直性脊柱炎患者滑膜组织活检中分离出成纤维样滑膜细胞进行培养。待成纤维样滑膜细胞传至第3代后,用脂多糖提前预处理细胞24 h,再用含有不同浓度盐酸小檗碱的培养基干预细胞24 h。随后,采用倒置显微镜观察盐酸小檗碱对成纤维样滑膜细胞的形态学变化,CCK-8检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激下成纤维样滑膜细胞增殖的影响,平板克隆形成实验和钙黄绿素/碘化丙啶(Calcein/PI)染色实验检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激下成纤维样滑膜细胞增殖的影响,Hoechst33342染色实验和 Annexin-V/PI 流式细胞仪检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激下成纤维样滑膜细胞凋亡的影响,ELISA 检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激下成纤维样滑膜细胞上清液中 IL-6、TNF- α 、IL-17、IL-23 表达水平的影响,Transwell 小室实验检测盐酸小檗碱对成纤维样滑膜细胞侵袭能力的影响,划痕实验检测盐酸小檗碱对成纤维样滑膜细胞迁移能力的影响,用蛋白质印迹技术检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激下成纤维样滑膜细胞中相关凋亡、迁移及通路蛋白表达水平的影响。结果:与空白组相比,盐酸小檗碱处理组(观察组)对脂多糖刺激下成纤维样滑膜细胞的增殖、侵袭、迁移力及炎性因子均具有一定的抑制作用,且诱导脂多糖刺激下成纤维样滑膜细胞的凋亡。盐酸小檗碱可以上调 Bax、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 的相对表达($P<0.01$),且下调 Bcl-2、IL-17、IL-23、c-Jun NH2 末端激酶和细胞外信号调节蛋白激酶、N-cadherin 的表达水平($P<0.01$)。结论:盐酸小檗碱抑制成纤维样滑膜细胞的增殖、侵袭及迁移能力并诱导其凋亡,该机制可能与抑制 p-JNK、p-ERK1/2 通路有关。

[关键词] 盐酸小檗碱;强直性脊柱炎;成纤维样滑膜细胞;增殖;侵袭;迁移

[中图分类号] R593.23 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)07-0001-10

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240701

Effects of Berberine Hydrochloride on Fibroblast-Like Synovial Cells of Ankylosing Spondylitis

LIU Yuezhen¹ ZHANG Bangneng^{2△} WANG Lijuan² MENG Xiangyun²
ZHANG Lei² LI Hongzhuan² ZHANG Xiaoshou²

¹Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

²Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China.

Abstract Objective: To investigate effect and molecular mechanisms of berberine hydrochloride on the proliferation, migration, and invasion of fibroblast-like synovial (FLS) cells in lipopolysaccharide induced ankylosing spondylitis. **Methods:** FLS cells were isolated from synovial tissue biopsy of patients with ankylosing spondylitis and cultured. After the FLS cells were transferred to the third generation, the cells were pre-treated with lipopolysaccharide for 24 h, and then dried with culture media containing different concentrations of berberine hydrochloride for 24 h. Subsequently, an inverted microscope was used to observe the morphological changes of berberine hydrochloride on FLS cells. CCK-8 was used to detect the effect of berberine hydrochloride on the proliferation of FLS cells under lipopolysaccharide stimulation. Plate clone

formation experiments and Calcein/PI staining experiments were used to examine the effect of berberine hydrochloride on the proliferation of FLS cells under lipopolysaccharide stimulation; Hoechst33342 staining experiment and Annexin-V/PI flow cytometry were used to detect the effect of berberine

基金项目:甘肃省科技重点研发项目(21YF5FA025)

¹甘肃中医药大学(兰州,730000)

²甘肃省中医院

△通信作者 E-mail:zbn81@163.com

hydrochloride on apoptosis of FLS cells stimulated by lipopolysaccharide. The effects of berberine hydrochloride on the expression levels of IL-6, TNF- α , IL-17 and IL-23 in the supernatant of FLS by lipopolysaccharide were detected by ELISA. Transwell chamber experiment was used to detect the effect of berberine hydrochloride on the invasive ability of FLS cells; scratch experiment was used to detect the effect of berberine hydrochloride on the migration ability of FLS cells, and protein blotting technology was used to detect the effect of berberine hydrochloride on apoptosis, migration, and pathway protein expression levels in FLS cells under lipopolysaccharide stimulation. **Results:** Compared with the blank group, the berberine hydrochloride treatment group had a certain inhibitory effect on the proliferation, invasion, migration, and inflammatory factors of FLS cells under lipopolysaccharide stimulation, and induced apoptosis of FLS cells under lipopolysaccharide stimulation. Berberine hydrochloride can up-regulate the relative expression of Bax, cleared casease-3, and E-cadherin ($P < 0.01$), and down-regulated the expression levels of Bcl-2, IL-17, IL-23, c-Jun NH2 terminal kinase, extracellular signal-regulated protein kinase, and N-cadherin ($P < 0.01$). **Conclusion:** BBR inhibits the proliferation, invasion, and migration ability of AS FLS cells and induces their apoptosis, which may be related to the inhibition of the p-JNK and p-ERK1/2 pathways.

Keywords: berberine hydrochloride; ankylosing-like spondylitis; proliferation; fibroblastic-like synovial cells proliferation; invasion; migration

强直性脊柱炎(Ankylosing Spondylitis, AS)是一种病变以骶髂关节和脊柱为主要部位的慢性炎症疾病,炎症、骨破坏和新骨形成是强直性脊柱炎的典型病理变化^[1]。近年来的研究发现,强直性脊柱炎主要表现在成骨和破骨细胞之间的不平衡,造成强直性脊柱炎残疾率较高,严重影响患者的生活质量,其致残率较高与滑膜细胞增生、侵袭迁移密切相关^[2]。因此,抑制成纤维样滑膜(FLS)细胞的增生、迁移侵袭,对控制强直性脊柱炎的发病与缓解强直性脊柱炎疾病进展具有重要意义。盐酸小檗碱(Berberine, BBR)是中草药黄连、黄柏的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化、抗菌抗感染、抗肿瘤、提高免疫力及改善心血管功能等多种生物学作用,对肠道内环境、多种炎症性皮肤病和自身免疫性疾病等具有良好的治疗效果^[3-4]。实验证明盐酸小檗碱可以通过抑制 TNF- α 、IL-1 等炎症因子,进而抑制成纤维样滑膜细胞的增殖,促进风湿性关节炎、脊柱炎关节炎等自身免疫性疾病的治疗^[5],但其作用机制仍不清楚。为探讨盐酸小檗碱的作用及其机制,本研究的研究对象是人类强直性脊柱炎成纤维样滑膜(AS FLS)细胞,通过观察盐酸小檗碱对脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移的影响,并进一步探讨其调控强直性脊柱炎发生发展的生物学分子机制,以期盐酸小檗碱治疗强直性脊柱炎的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系

细胞从强直性脊柱炎患者在甘肃省中医院行关节置换术或滑膜切除术中的滑膜组织中分离出成纤维样滑膜细胞进行培养,待成纤维样滑膜细胞传至第三代后备用。这些强直性脊柱炎患者均符合改良的纽约强直性脊柱炎标准^[6],且无感染性疾病、炎症性疾病或风湿性疾病史。按照标准化方案^[7],从滑膜组织活检中

采集滑膜组织标本。本研究由甘肃省中医院医学伦理委员会支持和批准,并遵循《赫尔辛基宣言》原则。所有参与者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

盐酸小檗碱(纯度 $>97\%$)购自北京索莱宝科技有限公司(北京,批号为 25316-40-9)。RPMI 1640 培养基和磷酸盐缓冲盐水(PBS)均购自上海源培生物科技有限公司(上海,批号分别为 L110KJ, B320KJ)。胎牛血清(FBS)购自上海诺娃医药科技有限公司(上海,批号为 AB-FBS-1050S)。含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶、青-链霉素混合液、胶原酶 I 均购自北京索莱宝科技有限公司(北京,批号分别为 G4001, P1400, T2195)。细胞活力测定(CCK-8)试剂盒购自翊圣生物技术有限公司(上海,批号为 40203ES60)。4%组织细胞固定液、TritonX100 购自北京索莱宝科技有限公司(北京,批号分别为 P1110, T8200)。N-cadherin、E-cadherin 购自武汉三鹰生物技术有限公司(武汉,批号分别为 10026796, 10004426)。Transwell 小室购自广州洁特生物过滤股份有限公司(广州,批号为 210708-325)。彩色预染标准分子量蛋白 Marker、增强型化学发光(ECL)试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司(北京,批号分别为 KEB3022593, NMB3015103)。蛋白酶磷酸抑制剂混合物、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液购自北京索莱宝科技有限公司(北京,批号分别为 20230222, 20220909, 20220808)。PVDF 膜购自德国 Merck KGaA 公司(批号为 0000194582)。PAGE 凝胶快速制备试剂盒(10%)、免冰快速转膜缓冲液(10 \times)购自上海雅酶生物医药科技有限公司(上海,批号分别为 03745300, 03681200)。脂多糖购自北京索莱宝科技有限公司(北京,批号为 3230809001)。p-JNK、p-ERK1/2 购自美国 Immunoway 公司(批号分别为 Y185,

B2501)。Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3 购自武汉三鹰生物技术有限公司(武汉,批号分别为 00107829,00085540,B0601)。Annexin-V/PI 流式细胞仪试剂盒购自杭州联科生物科技股份有限公司(杭州,批号为 A30335)。Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司(上海,批号为 121522230328)。

1.3 仪器

倒置光学显微镜(Inverted Microscope, IM, 日本 Olympus 公司),倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),凝胶成像仪器(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的培养及分组

将滑膜组织切成规格小于 1 mm^3 的薄片,用生理盐水洗净。然后,用 1% 的胶原酶 I 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下分离 2 h。收集消化液于无菌的离心管中,并放置于离心机中离心(200 g , 10 min)。用新鲜的完全培养基(RPMI 1640, 20% 胎牛血清, 1% 非必需氨基酸, 1% 谷氨酰胺, 1% 丙酮酸钠, 1% 青-链霉素; Sigma-Aldrich)将离心管底部的沉淀进行重悬,将悬液转移至无菌的培养瓶中,并且放置在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的培养箱中进行孵育。当细胞的生长密度达到 95% 及以上的汇合度时,用含有 0.25% EDTA 的胰蛋白酶进行消化、传代。待细胞传至第 3 代后,剩余细胞主要为强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞,并用于后续实验。

将分离得到的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞转移至完全培养基(包括 RPMI 1640, 10% 胎牛血清, 1% 青-链霉素)中进行培养,并放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的培养箱中进行孵育。细胞分组:待细胞传至第 3 代后,以未加药物在脂多糖(终浓度为 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$)刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞作为空白组,而在脂多糖刺激存在时用盐酸小檗碱干预细胞作为观察组。

1.5 指标检测

1.5.1 CCK-8 法检测盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响 取对数生长期的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞以 3×10^4 个/mL 的密度接种于无菌的 96 孔板中,并将孔板放置于培养箱内培养 24 h。根据 1.4 节分组给予药物干预 24, 48, 72 h。每个处理设置 5 个平行孔,干预结束后,每个孔中加入 CCK-8 试剂 $10\text{ }\mu\text{L}$,并将孔板放置于培养箱中避光孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 处测定每孔的吸光度值。

1.5.2 倒置光学显微镜观察强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞形态 取第 3 代细胞,当强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长密度达到 95% 以上时,将细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于无菌的 6 孔板中,并将 6 孔板

置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞完全贴壁后,将其通过 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱干预 24 h,干预结束后,通过倒置光学显微镜观察和拍照强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的形态变化。

1.5.3 平板克隆形成实验观察盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响 取第 3 代细胞,当强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长密度达到 95% 以上时,将细胞以 1×10^3 个/mL 的密度接种于无菌的 6 孔板中,并将 6 孔板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞完全贴壁后,将其通过 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱干预 24 h。待强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞干预结束后,弃细胞培养液,同时用 PBS 轻轻冲洗,冲洗 2 次后加入新鲜的完全培养基。待细胞培养至 12 d 后,弃除原培养基,再用 PBS 轻轻摇晃冲洗细胞 2 次,冲洗结束后加入预冷的固定液进行固定,固定时间约 15 min,固定结束后再用 PBS 清洗细胞 2 次,每孔加入 0.1% 结晶紫染液染色,染色时间约 30 min,用流水冲洗染色的细胞,并将孔板倒置晒干。通过倒置光学显微镜进行观察,统计每组的细胞簇团。

1.5.4 Calcein/PI 实验观察盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞活力的影响 取第 3 代细胞,当强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长密度达到 95% 以上时,将细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于无菌的 6 孔板中,并将 6 孔板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞完全贴壁后,将其通过 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱干预 24 h。待强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞干预结束后,弃细胞培养液,同时用 PBS 轻轻冲洗。冲洗 2 次后,每孔加入 200 μL Calcein/PI 染色工作液,并将孔板放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育 15 min。通过倒置荧光显微镜观察和拍照强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞。

1.5.5 Hoechst33342 染色实验观察盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响 取第 3 代细胞,当强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长密度达到 95% 以上时,将细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于无菌的 6 孔板中,并将 6 孔板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞完全贴壁后,将其通过 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱干预 24 h。待强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞干预结束后,弃去细胞培养液,同时,用 PBS 轻轻冲洗,加入细胞固定液固定,固定时间约为 20 min,用 PBS 清洗细胞 2 次,在暗光下加入适量 Hoechst33342 工作液染色,染色时间约为 30 min,染色结束后用

PBS 轻轻冲洗细胞, 总共冲洗 3 次, 每次时间大约为 5 min, 最后每孔加入适量 PBS 溶液, 并在倒置荧光显微镜下观察和拍照染色的细胞。

1.5.6 Annexin-V/PI 流式细胞仪检测盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响 取第 3 代细胞, 当强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长密度达到 95% 以上时, 将细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种于无菌的 6 孔板中, 并将 6 孔板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞完全贴壁后, 将其通过 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱干预 24 h, 待强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞干预结束后, 弃去细胞培养液, 同时用 PBS 轻轻冲洗, 加入适量胰蛋白酶消化, 将其收集到 50 mL 离心管中, 加入适量 PBS 进行 1 200 r/min 离心, 离心时间为 5 min, 弃去 PBS 液体。再用 $1 \times$ Loading buffer 试剂冲洗细胞, 冲洗 2 次, 每次 3 min, 冲洗结束后, 在暗光下加入 5 μL 的膜联蛋白 V (Annexin V) 染液染色, 染色时间约 30 min, 待染色结束后, 用 PBS 轻轻冲洗 1~2 遍, 同时在暗光下再加入 5 μL 的碘化丙啶 (PI) 染液再次染色, 用尼龙目筛网过滤强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞悬液, 待过滤结束后用流式细胞仪分析结果并记录。

1.5.7 Transwell 小室实验检测盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞侵袭能力的影响 取第 3 代细胞, 当强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长密度达到 95% 以上时, 将细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于无菌的 6 孔板中, 并将 6 孔板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞完全贴壁后, 将其通过 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱干预 24 h, 待细胞干预结束后, 将细胞浓度调整为 1×10^5 个/mL 备用。在制备好 Transwell 小室中, 分为上室和下室, 上室滴加不含胎牛血清的细胞悬液, 下室滴加含有胎牛血清的培养液, 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中孵育 48 h。待孵育结束后, 先用组织固定液固定 30 min, 固定结束后用 PBS 轻轻冲洗 3 次, 每次 3 min, 然后每孔加入 0.1% 结晶紫染液染色, 染色时间约 30 min, 用流水冲洗染色的细胞, 并将孔板倒置晒干, 通过倒置光学显微镜进行观察和计数拍照。

1.5.8 划痕实验检测盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞迁移能力的影响 取第 3 代细胞, 当强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长密度达到 95% 以上时, 将细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于无菌的做好标记的 6 孔板中, 并将 6 孔板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞完全贴壁后, 将其通过 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐

酸小檗碱干预 24 h, 待细胞干预结束后, 弃去旧培养基, 用 PBS 轻轻冲洗 3 次, 每次 3 min, 通过显微镜对细胞的位置变化进行观察并拍照。

1.5.9 ELISA 法检测盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中 IL-23、IL-17、IL-6、TNF- α 水平的影响 取第 3 代细胞, 当强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长密度达到 95% 以上时, 将细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于无菌的 6 孔板中, 并将 6 孔板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞完全贴壁后, 将其通过 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱干预 24 h, 待细胞干预结束后, 收集 6 孔板中的培养上清液, 1 000 r/min 离心 5 min, 轻轻吸取细胞上清液, 根据试剂盒说明书步骤, 测定强直性脊柱炎成纤维样滑膜上清液中 IL-23、IL-17、IL-6、TNF- α 的含量。

1.5.10 蛋白免疫印迹分析 用终浓度为 0, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的盐酸小檗碱处理强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞 24 h 后, 用胰蛋白酶消化, 将其收集到 50 mL 离心管中, 加入适量 PBS, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃去 PBS 液体, 采用 RIPA 裂解液裂解蛋白, 并通过 BCA 定量分析。采用蛋白免疫印迹法检测 Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3 相关凋亡蛋白, IL-23、IL-17、p-JNK、p-ERK1/2 相关通路蛋白以及 N-cadherin、E-cadherin 相关迁移蛋白相对表达水平。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 22 软件对结果进行统计学分析, 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义, $P < 0.01$ 组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 盐酸小檗碱抑制脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的增殖

首先, 采用 ELISA 法评估了在脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞炎症因子的影响, 结果如图 1 所示, 脂多糖刺激促进强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞炎症因子的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且在时间为 24 h、浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时炎症因子表达水平最高。为了保障细胞中炎症状态的持续, 后续实验所用到的细胞均用终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的脂多糖进行提前干预。

随后, 将脂多糖刺激下的细胞接种在 96 个孔板上, 用不同浓度的盐酸小檗碱 (0~300 $\mu\text{mol/L}$) 分别处理 24, 48, 72 h, 并采用 CCK-8 法评估了不同浓度盐酸小檗碱对脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞增殖能力的影响, 结果如图 2a 所示。与空白组相比, 盐酸小檗碱处理组中细胞的存活率随着

药物浓度的增加而降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。根据药物的有效性和半抑制浓度(IC_{50})值,将盐酸小檗碱浓度确定为 80,120,200 $\mu\text{mol/L}$,并将处理时间选为 24 h。为了让结果更有说服力,采用倒置光学显微镜观察不同浓度盐酸小檗碱(80,120,200 $\mu\text{mol/L}$)对脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞生长的影响,结果如图 2b 所示。与空白

组相比,经盐酸小檗碱处理细胞 24 h 后呈浓度依赖性地增加了细胞之间的间隙以及圆形凋亡细胞的数量。同时,平板克隆形成实验的结果如图 2c 所示,与空白组相比,80,120,200 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱处理组的细胞簇团呈浓度依赖性地缩小。总之,这些结果均表明,盐酸小檗碱可抑制脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的增殖情况。

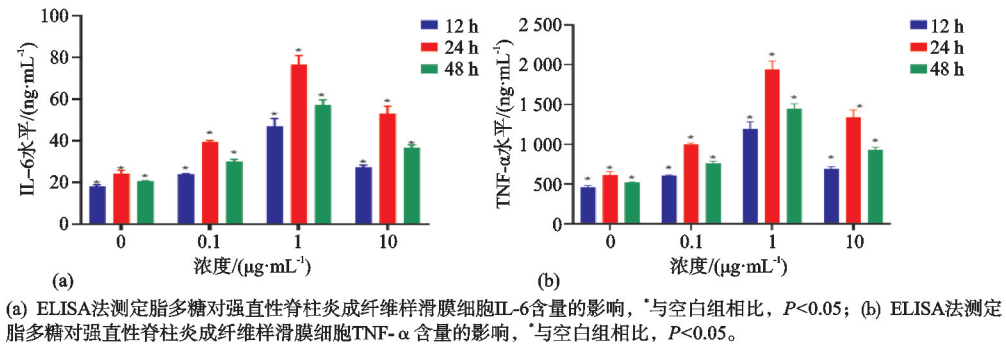
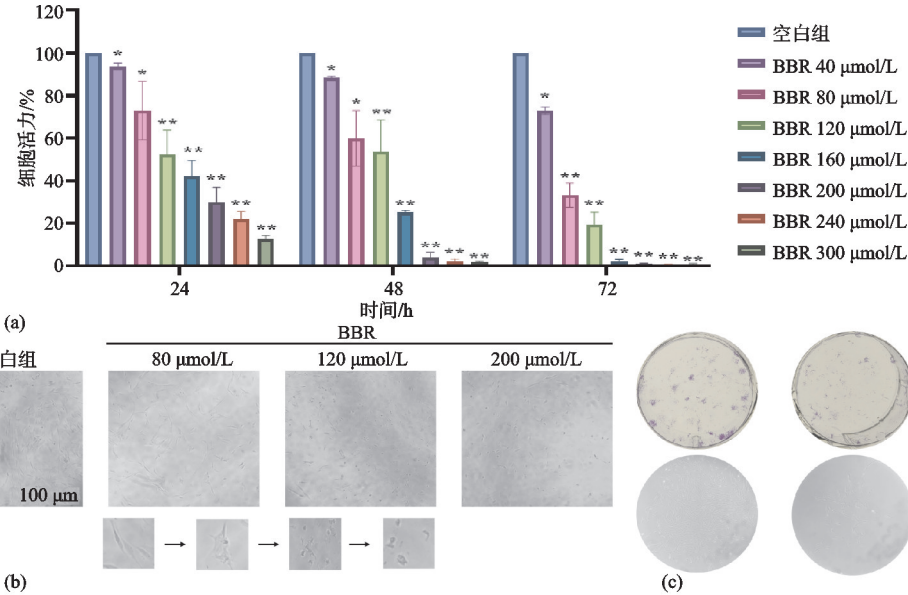


图 1 通过 ELISA 法检测脂多糖对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中炎症因子的影响



注: (a) 用CCK-8法检测BBR对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响,与空白组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; (b) 用倒置光学显微镜($\times 100$)观察BBR对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响; (c) 用平板克隆形成检测BBR对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响。

图 2 通过 CCK-8 法、倒置光学显微镜观察和平板克隆形成实验检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响

2.2 盐酸小檗碱诱导脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的凋亡

如图 3 所示,根据细胞钙黄绿素/碘化丙啶(Calcein/PI)染色实验显示,空白组中强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的形态呈现长梭状。然而经过 80,120,200 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱处理细胞 24 h 后,视野中的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞开始呈现多边形,逐渐变成圆形,圆形为凋亡细胞,且凋亡细胞的数量呈浓度依赖性增加。

核染色凝聚现象也是凋亡的经典形态特征之一。通过 Hoechst33342 染色实验观察不同浓度的盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中核染色质状况的影响,结果如图 4 所示,与空白组相比,盐酸小檗碱处理的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中核染色质

凝聚现象呈浓度依赖性增多。

流式细胞仪检测结果如图 5 所示,与空白组相比,强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞经盐酸小檗碱处理后,总凋亡率呈浓度依赖性明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$),80,120,200 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱处理组中的总凋亡率分别为 16.40% \pm 0.95%,21.20% \pm 1.77%,29.60% \pm 0.95%。

2.3 Transwell 小室实验检测盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞侵袭能力的影响

与空白组比较,盐酸小檗碱处理组(80,120,200 $\mu\text{mol/L}$)中能够穿过 Transwell 小室中 Matrigel 基质胶的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞数量减少,且呈浓度依赖性下降,见图 6。

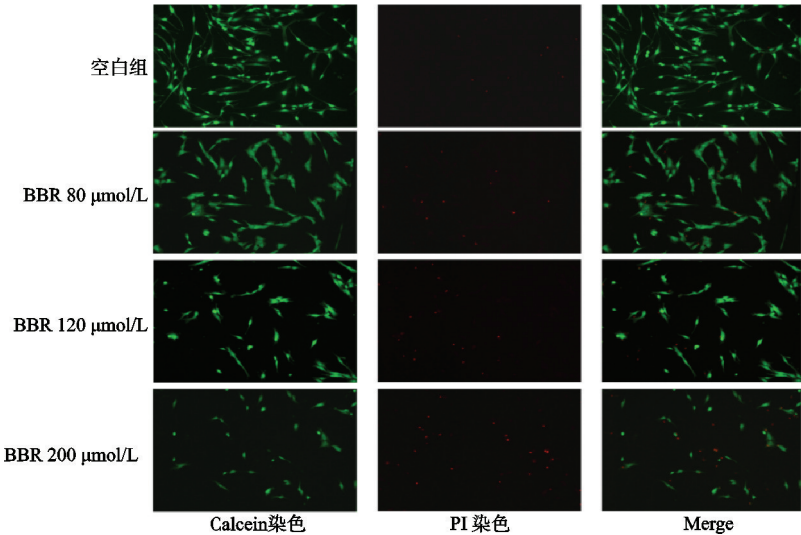
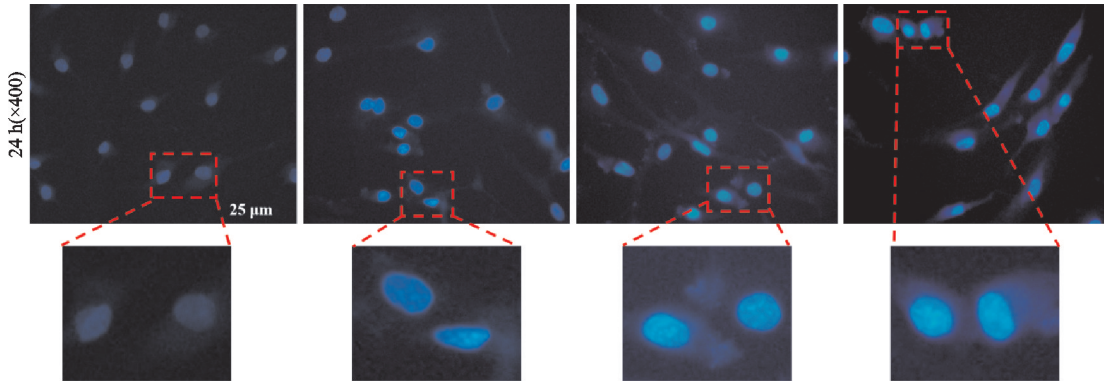
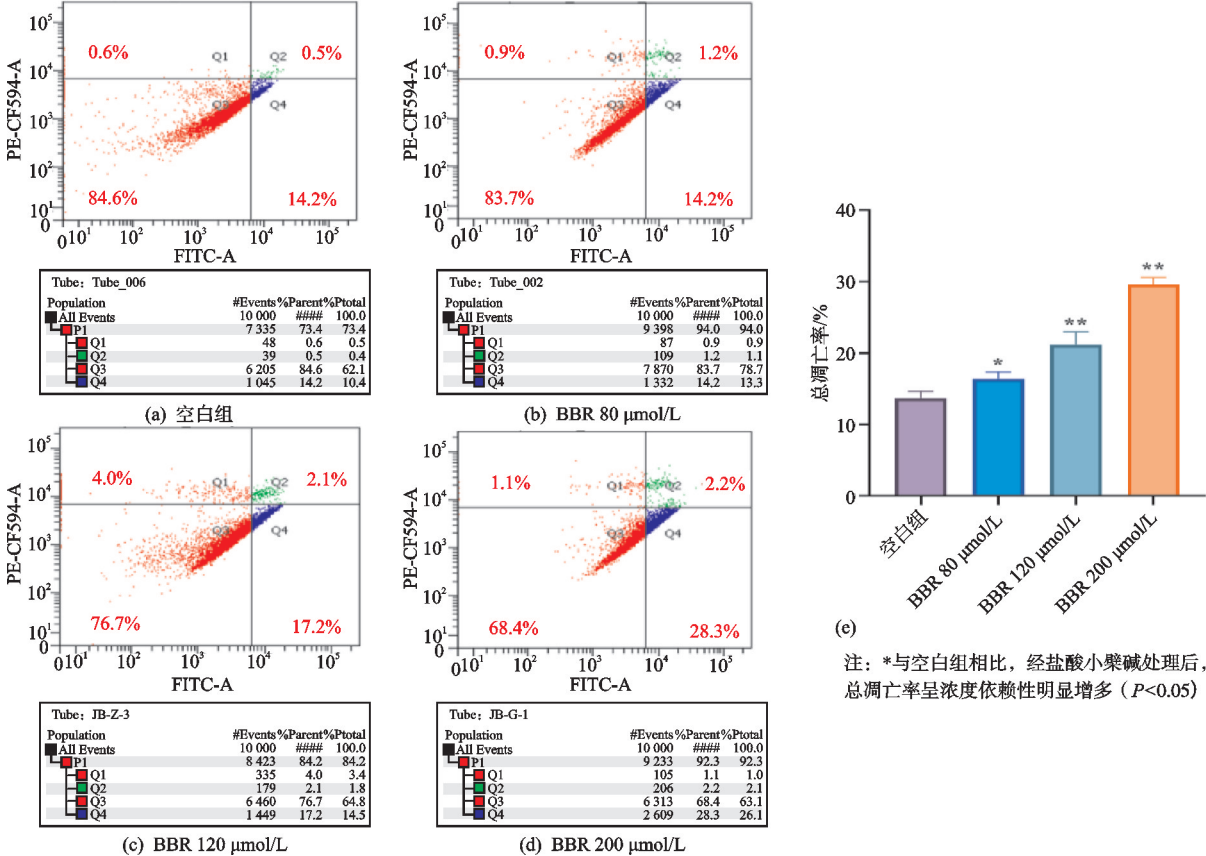


图3 Calcein/PI细胞活性和细胞毒性实验检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激的成纤维样滑膜细胞活力的影响(×200)



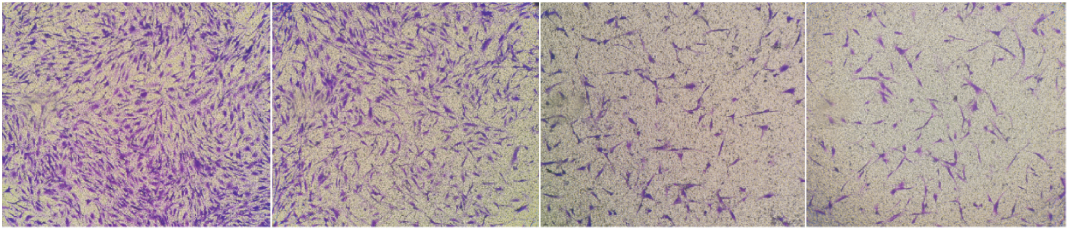
注：经处药物理的细胞中核染色质凝聚现象呈浓度依赖性地增多。

图4 Hoechst33342染色分析盐酸小檗碱对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞核染色质的影响(24 h, ×400)



注：*与空白组相比，经盐酸小檗碱处理后，总凋亡率呈浓度依赖性明显增多 (P<0.05)。

图5 流式细胞仪检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响



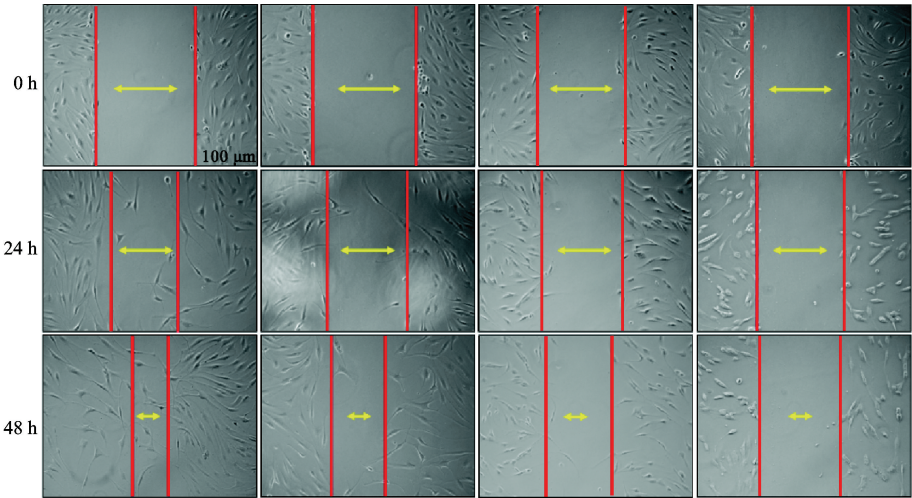
空白组 BBR 80 $\mu\text{mol/L}$ BBR 120 $\mu\text{mol/L}$ BBR 200 $\mu\text{mol/L}$
注：与空白组相比，盐酸小檗碱处理组(80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$)可通过Transwell隔室基质凝胶的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞数量呈浓度依赖性下降。

图 6 Transwell 检测盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞侵袭能力的影响

2.4 划痕实验检测盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞迁移能力的影响

与空白组比较，盐酸小檗碱处理组(80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$)愈合面积均明显增加，差异有统计学意义($P<0.05$)，且呈时间和浓度依赖性，见图 7。与空

白组比较，盐酸小檗碱处理组(80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$)强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞 E-cadherin 蛋白表达明显升高，差异有统计学意义($P<0.05$)，N-cadherin蛋白水平明显降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。



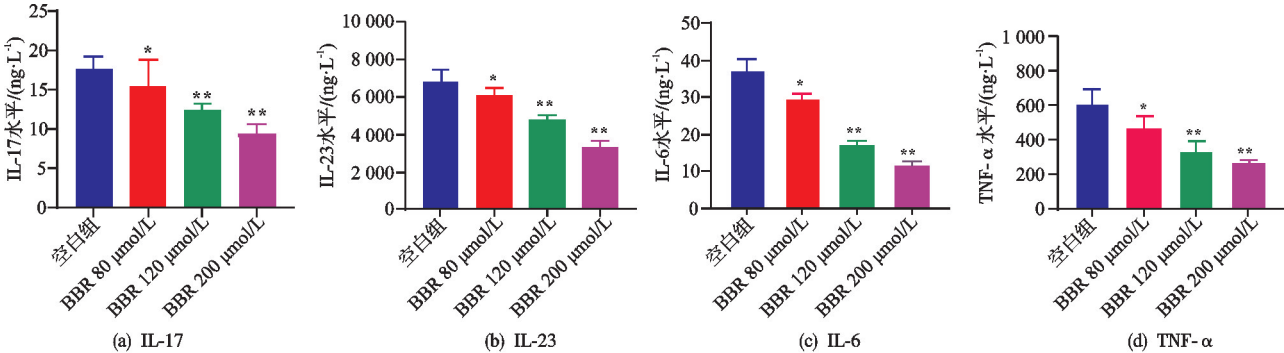
空白组 BBR 80 $\mu\text{mol/L}$ BBR 120 $\mu\text{mol/L}$ BBR 200 $\mu\text{mol/L}$
注：与空白组比，盐酸小檗碱处理组(80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$)的愈合面积显著增加，具有时间依赖性和浓度依赖性($P<0.05$)。

图 7 盐酸小檗碱对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞迁移能力影响的划痕实验

2.5 盐酸小檗碱抑制脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的炎症反应

强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞受到脂多糖刺激后，空白组中的促炎因子(包括 IL17、IL-23、IL-6、

TNF- α)的含量均呈现高水平。用不同浓度的盐酸小檗碱干预处理后，与空白组相比，盐酸小檗碱处理组中 IL-17、IL-23、IL-6 和 TNF- α 的含量呈浓度依赖性降低，差异有统计学意义($P<0.05$)，见图 8。



注：与空白组相比，盐酸小檗碱处理组中 IL-17、IL-23、IL-6 和 TNF- α 的含量呈浓度依赖性降低($P<0.05$)。

图 8 ELISA 法检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中炎症细胞因子的影响

2.6 盐酸小檗碱对脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

蛋白免疫印迹法检测结果显示，与空白组相比，

80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱干预后，细胞中 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白的表达均呈浓度依赖性升高，差异有统计学意义($P<0.01$)，而 Bcl-2 蛋白的表达水

平呈浓度依赖性降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图9。这些蛋白表达的变化说明盐酸小檗碱可通过线粒体途径来诱导强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞凋亡,抑制强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞在脊柱关节部位异常增生,促进细胞凋亡,进而控制强直性脊柱炎病变进程。

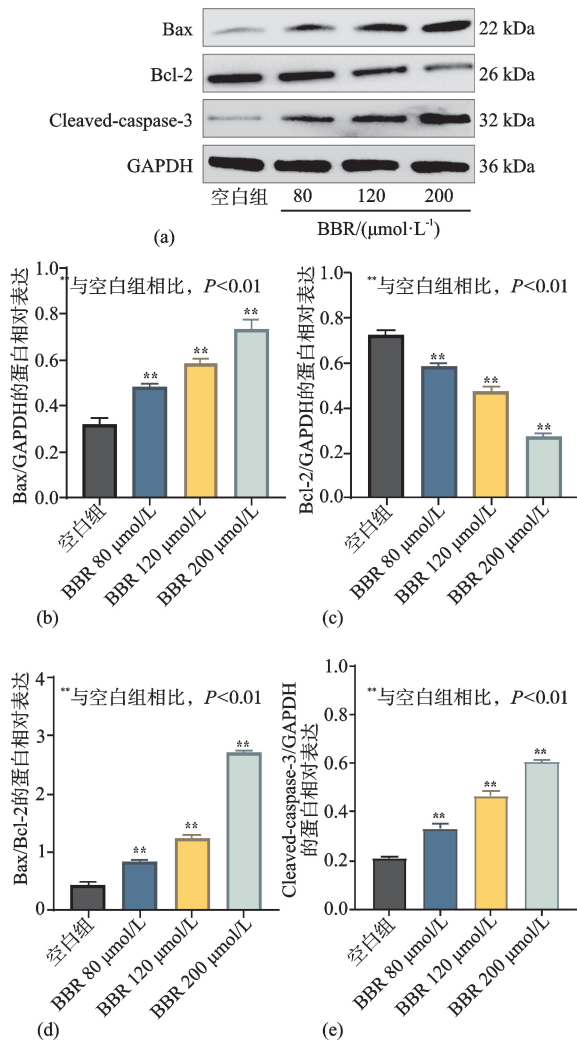


图9 蛋白免疫印迹法检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2和Cleaved-caspase-3)表达水平的影响

2.7 盐酸小檗碱对脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞 p-JNK、p-ERK1/2 蛋白表达的影响

蛋白免疫印迹法检测结果显示,与空白组相比,经80,120,200 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱分别干预处理后,细胞中 p-JNK、p-ERK1/2 蛋白的表达水平随着盐酸小檗碱浓度的增加而降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图10。

2.8 盐酸小檗碱对脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中迁移蛋白表达的影响

蛋白免疫印迹法检测结果显示,与空白组比较,盐酸小檗碱处理组(80,120,200 $\mu\text{mol/L}$)强直性脊柱炎

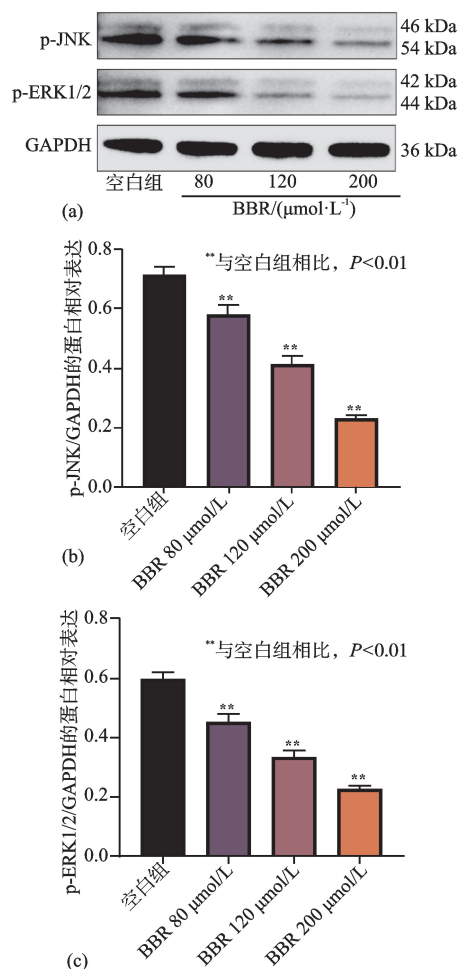


图10 蛋白免疫印迹法检测盐酸小檗碱对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中通路相关蛋白(p-JNK和p-ERK1/2)表达水平的影响

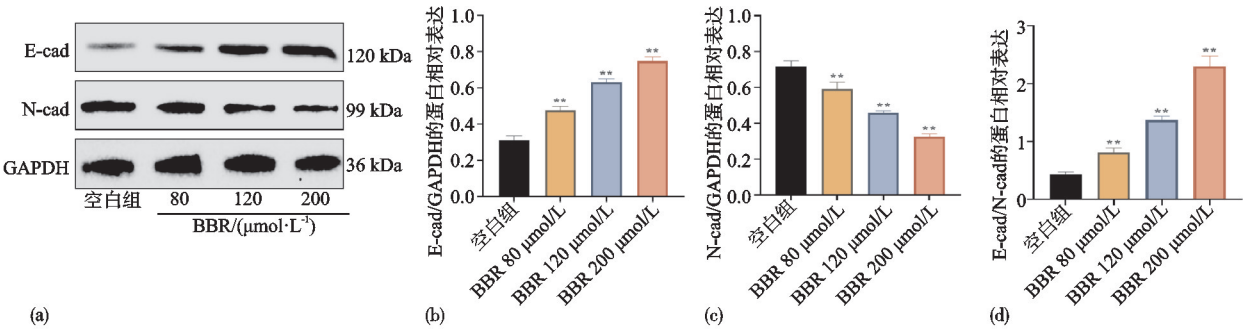
成纤维样滑膜细胞 E-cadherin 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),N-cadherin蛋白水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图11。

2.9 盐酸小檗碱对脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中炎症因子相关蛋白表达的影响

蛋白免疫印迹分析显示,与空白组相比,盐酸小檗碱处理组中 IL-17、IL-23 蛋白的表达水平呈浓度依赖性降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图12。

3 讨论

强直性脊柱炎是一种病因不明的慢性炎症疾病,病理因素表现为脊柱关节滑膜增生增厚,主要特征是慢性炎症和异位骨化^[8]。现代研究发现,在强直性脊柱炎产生炎症反应的过程中,成纤维样滑膜细胞释放大量细胞促炎性因子,导致滑膜细胞增生异常及炎性细胞因子浸润,进而侵蚀关节软骨及脊柱骨骼等,最终导致脊柱关节侵蚀破坏、硬化和畸形^[9]。因此,抑制强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的过度增殖和炎症反应,诱导强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞发生凋亡,可能会控制滑膜炎的进展,进而缓解强直性脊柱炎病情。而盐酸小檗碱是中草药黄连、黄柏的主要有效成



注：与空白组比较，盐酸小檗碱组(80, 120, 200 μmol/L)强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞E-cadherin蛋白表达明显升高($P<0.05$)，N-cadherin蛋白水平明显降低($P<0.05$)。

图 11 盐酸小檗碱对脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中通路相关蛋白表达的影响

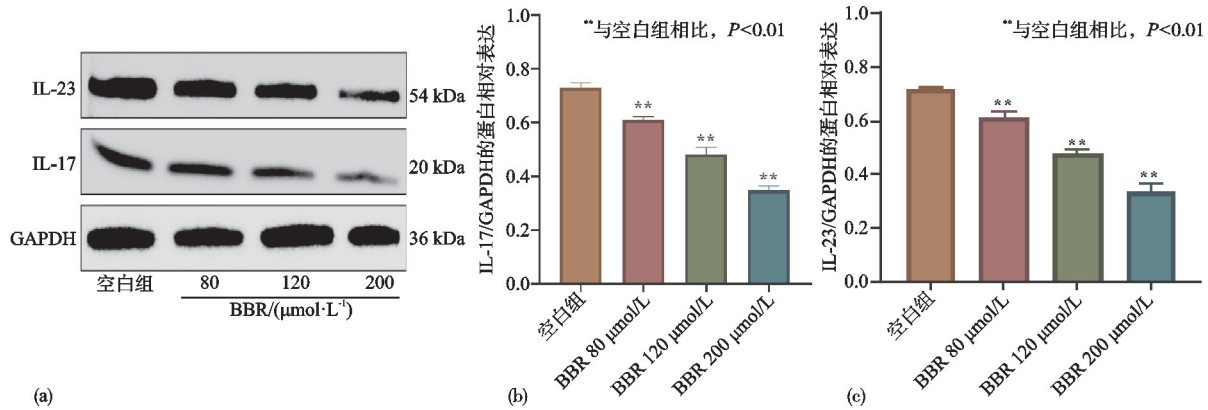


图 12 盐酸小檗碱对脂多糖刺激的强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中炎症细胞因子相关蛋白(IL-17 和 IL-23)表达水平的影响

分,具有抗炎、抗氧化、抗菌抗感染、抗肿瘤、提高免疫力及改善心血管功能等多种生物学作用,已有研究证实,盐酸小檗碱可通过 NF- κ B/NLRP3 信号通路缓解急性肺损伤所起的炎症反应^[10]。另外,在脂多糖刺激的 Raw264.7 巨噬细胞中,盐酸小檗碱可通过 Sirt7/NF- κ B 信号通路发挥抗炎的作用^[11],由此可见盐酸小檗碱具有天然的抗炎效果。然而盐酸小檗碱对于强直性脊柱炎的治疗效果及潜在分子机制尚不清楚,因此探究盐酸小檗碱对于强直性脊柱炎发生发展的影响是非常有研究前景的。

实验发现强直性脊柱炎患者的滑膜组织及血液细胞中存在大量炎症因子 TNF- α 和 IL-6,且与强直性脊柱炎患者的病情息息相关^[12]。李家江等^[13]以健康人为对照组,采用 ELISA 法检测 IL-1、IL-6、IL-17、IL-23 的含量水平,与正常空白组组比较,强直性脊柱炎患者血清中 IL-1、IL-6、IL-17、IL-23 的含量水平明显升高。Heijde 等^[14]报告 IL-17 抑制剂可治疗关节炎及减轻关节炎症状。Liao 等^[12]通过调节细胞因子的正反馈来诱导更多 T-reg 产生和抗炎细胞因子分泌,从而抑制这种炎症状态,并且可以通过抗 TNF- α 治疗逆转,炎症反应也得到改善。与他们的结果相似,本研究通过 ELISA 实验发现,盐酸小檗碱治疗在体外降低了强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞中促炎因子 IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 的含量水平。同时,本研究通过 CCK-8 法和平板克隆形成实验发现盐酸小檗碱能够

抑制脂多糖刺激下强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的增殖能力。

细胞侵袭是细胞通过一个区域穿过基地膜基质层(BME)到另一个新的区域,常发生于炎症反应、伤口修复及癌细胞转移等过程中,与细胞迁移密不可分^[15]。Sun 等^[16]通过实验证明,盐酸小檗碱可以通过抑制 TGF- β 1/COL11A1 信号通路激活,抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭。同时,实验表明通过盐酸小檗碱干预处理 AGS 和 SGC7901 胃癌细胞,不仅抑制胃癌细胞的增殖,还减弱了胃癌细胞的迁移侵袭,其作用机制与 AMPK-HNF4 α -WNT5 有关^[17]。本实验通过侵袭和划痕实验结果表明,盐酸小檗碱可以抑制强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的侵袭力和迁移,进一步通过蛋白免疫印迹法表明盐酸小檗碱可以促进上皮钙黏蛋白(E-cadherin)的表达,抑制神经钙黏蛋白(N-cadherin),进而抑制强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的侵袭迁移。

研究发现 Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白,Bax 是一种促凋亡蛋白,Bcl-2 和 Bax 活化后,通过异二聚体的形式相结合,然后通过某种方式进入细胞核内,导致核内的细胞蛋白骨架分离、DNA 降解和核碎裂等现象,最后促进细胞的凋亡^[18]。本研究首先通过倒置光学显微镜观察、Calcein/PI 染色、Hoechst33342 染色及流式细胞仪观察发现,盐酸小檗碱确实能够诱导强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞凋亡,并且进一步通过蛋白免

疫印迹技术发现,盐酸小檗碱可以升高 Bax 和 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平,同时降低 Bcl-2 蛋白的表达水平,表明盐酸小檗碱可通过线粒体途径来诱导强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞凋亡,抑制强直性脊柱炎成纤维样滑膜在关节部位异常增生,进而缓解强直性脊柱炎病变。

实验研究显示, TNF- α 可诱导成纤维样滑膜细胞中 p38 和细胞外信号调节激酶(ERK)的磷酸化和活化,进而激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号途径^[19]。MAPK 通路是多种信号通路的重要中心环节,主要参与调控细胞的增殖、凋亡、炎症等^[20]。在哺乳动物中,根据其特有的结构和功能,可将 MAPK 的亚型划分为 ERK、JNK 和 p38 MAPK 三种^[21]。其中,ERK 主要与癌症细胞的增殖、生长最为密切^[22], ERK 激活也参与促进强直性脊柱炎中成骨细胞和成纤维细胞的骨化^[23], ERK 抑制剂抑制 ERK 磷酸化,降低炎症因子的分泌^[24]。而 JNKs 和 p38 MAPK 信号通路则在细胞增殖、分化、凋亡、迁移以及炎症等应激反应中发挥重要作用。在正常生理状态下, MAPK 处于静默状态,在细胞受到炎症细胞因子和氧化应激等因素的刺激之后, MAPK 信号通路可被激活,此时 MAPK 蛋白处于磷酸化状态,从而介导转化生长因子- β -活化蛋白激酶 1/结合蛋白 1 与 p38 相互作用,进而导致 p38-MAPK 信号通路被激活,下调嘌呤能配体门控离子通道 7 受体(P2X7R)、TNF- α 、IL-1 β 因子的表达,抑制炎症反应^[25]。近年的研究表明, ERK 和 p38 MAPK 能活化不同信号转导路径,在滑膜组织导致的炎性反应和氧化应激中,可参与各种因素导致的刺激细胞的信号转导^[26]。因此, p38 MAPK 和 ERK 介导并调控强直性脊柱炎滑膜炎症的核心机制,能被炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-23 等细胞因子刺激并激活,且活化后的 p38 MAPK 和 ERK 又可能产生炎性细胞因子,进一步促进炎症反应发展,从而使关节炎迁延难愈。如果能够阻断 TNF- α 激活的 p38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路,就能抑制成纤维样滑膜细胞增殖,从而抑制脊柱关节滑膜组织增生,最后控制并缓解强直性脊柱炎发生发展。本研究采用蛋白免疫印迹技术发现,盐酸小檗碱能够抑制 p-JNK 和 p-ERK1/2 蛋白的表达水平。

综上所述,盐酸小檗碱抑制强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的增殖、侵袭及迁移能力并诱导其凋亡,该机制可能与抑制 p-JNK 和 p-ERK1/2 通路有关,但盐酸小檗碱抑制强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的增殖、侵袭及迁移能力作用机制较为复杂,且具体通过 p-JNK 和 p-ERK1/2 通路下游的哪些蛋白发挥作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] KIM S H, LEE S H. Updates on ankylosing spondylitis: pathogenesis and therapeutic agents[J]. J Rheum Dis, 2023, 30(4): 220-233.
- [2] 邹佳, 尧章洪, 郑其祥, 等. 盐酸小檗碱对芍药苷的经皮促透规律及促透机制研究[J]. 中草药, 2023, 54(22): 7412-7420.
- [3] 胡威, 方满新, 刘彝, 等. 小檗碱的生物学功能及其在动物生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2023, 10(30): 1-13.
- [4] LI S, LIU X, CHEN X, et al. Research progress on anti-inflammatory effects and mechanisms of alkaloids from Chinese medical herbs[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 18: 1303524.
- [5] YANG F J, GAO R M, LUO X X, et al. Berberine influences multiple diseases by modifying gut microbiota[J]. Front Nutr, 2023, 10: 1187718.
- [6] VAN DER LINDEN S, VALKENBURG H A, CATS A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria[J]. Arthritis Rheum, 1984, 27(4): 361-368.
- [7] BAETEN D, VAN DEN BOSCH F, ELEWAUT D, et al. Needle arthroscopy of the knee with synovial biopsy sampling: technical experience in 150 patients[J]. Clin Rheumatol, 1999, 18(6): 434-441.
- [8] RAMIRO S, NIKIPHOROU E, SEPRIANO A, et al. ASAS-EULAR recommendations for the management of axial spondyloarthritis: 2022 update[J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(1): 19-34.
- [9] CHEN S, PAVELEY R, KRAAL L, et al. Selective targeting of PI3K δ suppresses human IL-17-producing T cells and innate-like lymphocytes and may be therapeutic for IL-17-mediated diseases[J]. J Autoimmun, 2020, 111: 102435.
- [10] CHEN J, HUANG Y, BIAN X, et al. Berberine ameliorates inflammation in acute lung injury via NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. Front Nutr, 2022, 9: 851255.
- [11] ZHANG H, SHAN Y, WU Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- κ B signaling pathway in RAW264. 7 cells[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 52: 93-100.
- [12] LIAO H T, TSAI C Y. Cytokines and regulatory T cells in ankylosing spondylitis[J]. Bone Joint Res, 2023, 12(2): 133-137.
- [13] 李家江, 王守鹏, 张兆川, 等. 微小 RNA-146a 靶向调控 Krüppel 样转录因子 7 对强直性脊柱炎 T 细胞炎症反应及自噬的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(8): 1611-1614.
- [14] VAN DER HEIJDE D, DEODHAR A, BARALIAKOS X, et al. Efficacy and safety of bimekizumab in axial spondyloarthritis: results of two parallel phase 3 randomised controlled trials[J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(4): 515-526.

- attenuated PI3KCA/Akt/GSK3 β signaling[J]. *Metabolism*, 2021,118:154730.
- [4] VANOVA M M, DAO J, KASACI N, et al. Wnt signaling pathway inhibitors, sclerostin and DKK-1, correlate with pain and bone pathology in patients with Gaucher disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022,13:1029130.
- [5] FAN M, SHI H, YAO H, et al. Glutamate regulates gliosis of BMSCs to promote ENS regeneration through α -KG and H3K9/H3K27 demethylation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022,13(1):255.
- [6] QIN W, SCICLUNA B P, VAN DER POLL T. The role of host cell DNA methylation in the immune response to bacterial infection[J]. *Front Immunol*, 2021,12:696280.
- [7] SHEN H X, YANG E S, CONRY M, et al. Predictive biomarkers for immune checkpoint blockade and opportunities for combination therapies[J]. *Genes Dis*, 2019,6(3):232-246.
- [8] 王建勇, 黄诗诗, 金婉君, 等. DNA 甲基化和羟甲基化在帕金森病发病机制中的研究进展[J]. *浙江医学*, 2023,45(3):315-318.
- [9] TAIRA A, PALIN K, ANNA K K, et al. Vitamin C boosts DNA demethylation in TET2 germline mutation carriers[J]. *Clin Epigenetics*, 2023,15(1):7.
- [10] KAASINEN E, KUISMIN O, RAJAMÄKI K, et al. Impact of constitutional TET2 haploinsufficiency on molecular and clinical phenotype in humans[J]. *Nat Commun*, 2019,10(1):1252.
- [11] LI R, ZHENG C, WANG Q, et al. Identification of an immunogenic DKK1 long peptide for immunotherapy of human multiple myeloma[J]. *Haematologica*, 2021,106(3):838-846.
- [12] 王童瑶, 李思源, 李军, 等. 绝经后女性 2 型糖尿病合并骨质疏松与 DKK1 基因多态性关系的研究[J]. *糖尿病新世界*, 2022,25(7):10-12.
- [13] JANECZEK A A, TARE R S, SCARPA E, et al. Transient canonical Wnt stimulation enriches human bone marrow mononuclear cell isolates for osteoprogenitors[J]. *Stem Cells*, 2016,34(2):418-430.
- [14] SUN T, YAN Z, CAI J, et al. Effects of mechanical vibration on cell morphology, proliferation, apoptosis, and cytokine expression/secretion in osteocyte-like MLO-Y4 cells exposed to high glucose[J]. *Cell Biol Int*, 2020,44(1):216-228.
- [15] HE C, ZHANG H Y, ZHANG Y X, et al. Cytosine methylations in the promoter regions of genes involved in the cellular oxidation equilibrium pathways affect rice heat tolerance[J]. *BMC Genomics*, 2020,21(1):560.
- [16] AIVALIOTI M M, BARTHOLDY B A, PRADHAN K, et al. PU. 1-dependent enhancer inhibition separates TET2-deficient hematopoiesis from malignant transformation[J]. *Blood Cancer Discov*, 2022,3(5):444-467.
- (收稿日期:2024-01-13)
-
- (上接第 10 页)
- [15] CAI L, ZHOU M Y, HU S, et al. Umbelliferone inhibits migration, invasion and inflammation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and relieves adjuvant-induced arthritis in rats by blockade of Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Am J Chin Med*, 2022,50(7):1945-1962.
- [16] SUN Y, HUANG H, ZHAN Z, et al. Berberine inhibits glioma cell migration and invasion by suppressing TGF- β 1/COL11A1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022,625:38-45.
- [17] HU Q, LI L, ZOU X, et al. Berberine attenuated proliferation, invasion and migration by targeting the AMPK/HNF4 α /WNT5A pathway in gastric carcinoma[J]. *Front Pharmacol*, 2018,9:1150.
- [18] 宗世烨, 周静, 蔡伟伟, 等. 小檗碱抑制类风湿关节炎患者的成纤维样滑膜细胞的自噬并促进其凋亡: 基于下调 ROS/mTOR 信号通路[J]. *南方医科大学学报*, 2023,43(4):552-559.
- [19] HUI W, ZHAO C, BOURGOIN S G. Differential effects of inhibitor combinations on lysophosphatidic acid-mediated chemokine secretion in unprimed and tumor necrosis factor- α -primed synovial fibroblasts [J]. *Front Pharmacol*, 2017,8:848.
- [20] FARKHONDEH T, MEHRPOUR O, BUHRMANN C, et al. Organophosphorus compounds and MAPK signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(12):4258.
- [21] IJOMONE O M, IROEGBU J D, ASCHNER M, et al. Impact of environmental toxicants on p38-and ERK-MAPK signaling pathways in the central nervous system[J]. *Neurotoxicology*, 2021,86:166-171.
- [22] ROVIDA E, TUSA I. Targeting MAPK in cancer 2.0[J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(10):5702.
- [23] LI J Z, CHEN Z H, LIAO H, et al. Anti-osteogenic effect of Danshensu in ankylosing spondylitis: an in vitro study based on integrated network pharmacology[J]. *Front Pharmacol*, 2021,12:772190.
- [24] SHARMA A R, JAGGA S, CHAKRABORTY C, et al. Fibroblast-like-synoviocytes mediate secretion of pro-inflammatory cytokines via ERK and JNK MAPKs in ti-particle-induced osteolysis [J]. *Materials (Basel)*, 2020,13(16):3628.
- [25] CZARNECKA A M, SYNORADZKI K, FIRLEJ W, et al. Molecular biology of osteosarcoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2020,12(8):2130.
- [26] LEONE G M, MANGANO K, PETRALIA M C, et al. Past, present and (foreseeable) future of biological anti-TNF- α therapy[J]. *J Clin Med*, 2023,12(4):1630.
- (收稿日期:2024-01-02)