

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.20.016

实验研究

清热活血方对肿瘤坏死因子 α 诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞迁移和黏附的影响

智恺¹, 刘春芳², 曹炜[✉], 林娜², 郜亚茹¹, 王海霞¹, 武子英¹

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁 5 号, 100053; 2. 中国中医科学院中药研究所)

摘要 目的 观察清热活血方治疗活动期类风湿关节炎的可能作用机制。方法 分离类风湿关节炎患者的滑膜组织制备原代类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (RA-FLS), 采用肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导 RA-FLS 的迁移和黏附。设空白组 (不加药物及 TNF- α 干预)、诱导组 (10 或 20 ng/ml TNF- α 诱导)、清热活血方低、中、高剂量组 (20、100、500 ng/ml 清热活血方 + TNF- α 诱导)。检测各组细胞迁移距离及面积、细胞黏附 OD 值和黏附抑制率, 并检测细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白 (PI3K、p-Akt、Akt) 表达。结果 与空白组比较, 诱导组细胞迁移距离及面积增加、黏附 OD 值增大、PI3K 及 p-Akt 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与诱导组比较, 清热活血方各剂量组均可抑制细胞的迁移和黏附以及 PI3K、p-Akt 蛋白表达, 并以 500 ng/ml 效果最好 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 清热活血方可能通过下调 RA-FLS 中 PI3K、p-Akt 蛋白表达, 抑制 RA-FLS 的迁移和黏附, 从而减缓滑膜炎和关节破坏的进展。

关键词 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 清热活血方; 细胞迁移; 细胞黏附

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜慢性炎症为主要表现的自身免疫性疾病, 其病理特点是多种炎症细胞浸润、血管翳形成和滑膜增生, 最终导致骨质破坏和关节畸形等^[1]。受累滑膜组织成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 在 RA 发病中起关键作用, FLS 可产生促炎细胞因子、促血管生成因子和蛋白酶, 并且表现出“肿瘤样”异常增生, 能够迁移、黏附并侵袭软骨和骨, 参与滑膜血管翳的形成和关节的破坏^[2]。我们认为, 活动期 RA 的主要病因病机为风寒湿邪入侵, 郁而化热为毒, 导致气血壅滞不通, 痹阻络脉, 出现关节肿痛僵硬, 因此, 湿热瘀阻是活动期 RA 的关键病机^[3-4]。前期研究表明, 清热活血法治疗活动期 RA 疗效肯定^[5-7], 本研究观察清热活血方对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (RA-FLS) 迁移和黏附的影响, 以及对 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的调控作用, 探索其治疗活动期 RA 的可能机制。

1 材料

1.1 细胞

原代 RA-FLS 分离自中国中医科学院广安门医院风湿科类风湿关节炎患者的滑膜组织, 采用关节镜下滑膜切除术, 诊断符合 1987 年美国风湿病协会修订的标准^[8], 患者知情同意。RA 患者滑膜组织置于培养皿内, 去除表面血污和脂肪, 含双抗的 PBS 漂洗 2~3 次, 剪碎呈 1 mm³ 左右组织块, 均匀排列于培养瓶底部, 轻轻吸弃周围多余液体。将培养瓶倒置, 瓶底向上, 加入约 3 ml 含 20% FBS 的完全培养基, 放入 37℃、5% CO₂、饱和湿度孵箱中培养 3~4 h 后翻转培养瓶, 使培养基覆盖过组织块。每隔 3 天更换培养基, 待细胞长至 80%~90% 融合时, 0.25% 胰酶消化, 传代, 3~6 代细胞用于后续实验。

1.2 实验药品

清热活血方由土茯苓 30 g、金银花 30 g、苍术 15 g、黄柏 9 g、赤芍 15 g、丹参 15 g、薏苡仁 30 g、萆薢 15 g、青风藤 15 g、莪术 9 g、蜈蚣 2 条、蜂房 5 g 组成, 中药饮片由中国中医科学院广安门医院

基金项目: 国家自然科学基金 (81373592)

* 通讯作者: caowei6636@126.com, (010) 64089806

科研药房提供。10 倍量水煎煮 2 次, 每次 30 min, 合并水煎液, 8 层纱布过滤, 干燥成粉末, -20°C 储存。实验用三蒸水溶解冻干粉至含原药材 1 g/ml 的药液, 100°C 隔水煮 10 ~ 15 min 灭菌, 分装备用, -20°C 保存。

1.3 主要试剂及仪器

PI3K 抑制剂 LY294002, Selleck Chemicals 公司, 货号 S1105; DMEM 培养基, Hyclone 公司, 货号 SH30022.01B; 胎牛血清 (FBS), Gibco 公司, 货号 16000-044; 0.25% 胰蛋白酶, Gibco 公司, 货号 25200-072; 双抗, Hyclone 公司, 货号 SV30010; 重组人肿瘤坏死因子 α (TNF- α), PeproTech 公司, 货号 300-01A; 纤连蛋白, Millipore 公司, 货号 FC010; 细胞增殖试剂盒 (MTS), PeproTech 公司, 货号 G3580; 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制、RIPA 裂解液, 普利莱基因技术有限公司, 货号 P1265、P1260、C1053; 兔抗人 PI3K 抗体, CST 公司, 货号 4249; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, 碧云天生物技术有限公司, 货号 P0012A; 兔抗人 Akt 抗体, CST 公司, 货号 9272; 兔抗人 p-Akt (Ser473) 抗体, CST 公司, 货号 4060; 兔抗人 GAPDH 抗体, CST 公司, 货号 2118; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体, 中杉金桥公司, 货号 ZB-2301; ECL 超敏发光液, 普利莱基因技术有限公司, 货号 P1010。CO₂ 细胞培养箱, Thermo Fisher 公司, 型号 3111; 光学倒置显微镜, Olympus 公司, 型号 CKX41; 高速低温离心机, Sigma 公司, 型号 3K15; 全自动酶标仪, Thermo 公司, 型号 MK3; 电泳仪, Bio-Rad 公司, 型号 PowerPac™ Basic; 电泳槽, Bio-Rad 公司, 型号 Mini-PROTEAN® Tetra Cell; 凝胶成像仪, Fusion Fx VILBER LOURMAT; Image-pro Plus6.0 软件, 美国 Media Cybernetics 公司。

1.4 划痕实验

消化生长至 70% ~ 80% 融合的 RA-FLS, 接种于 24 孔培养板, 待细胞贴壁后用 10 μl 枪头进行划痕, 吸弃培养基, PBS 清洗 3 次, 分为空白组, 诱导组及清热活血方低、中、高剂量组, 每组设 3 个复孔。清热活血方低、中、高剂量组分别加入含终浓度为 20、100、500 ng/ml 清热活血方的无血清 DMEM 培养基, 培养 1 h 后加入终浓度为 20 ng/ml 的 TNF- α ; 诱导组加等量含终浓度为 20 ng/ml TNF- α 的无血清 DMEM 培养基, 空白组加等量无血清 DMEM 培养基, 继续培养 24 h。0、24 h 观察

细胞迁移情况并在显微镜下拍照, 利用 Image-pro Plus 6.0 软件 (美国 Media Cybernetics 公司) 计算细胞迁移的距离和面积。实验重复 3 次。

1.5 黏附实验

消化生长至 70% ~ 80% 融合的 RA-FLS, 等密度接种至 6 孔培养板, 分为空白组, 诱导组及清热活血方低、中、高剂量组。待细胞贴壁后, 清热活血方低、中、高剂量组加入含终浓度为 20、100、500 ng/ml 清热活血方和 20% FBS 的 DMEM 培养基, 1 h 后加入终浓度为 10 ng/ml 的 TNF- α ; 诱导组加等量含 10 ng/ml 的 TNF- α 和 20% FBS 的 DMEM 培养基, 空白组加等量含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 24 h。将纤连蛋白用 PBS 配置成 20 mg/ml 工作液, 加入 96 孔培养板, 每孔 50 μl , 4°C 过夜后吸除多余液体, 每孔加入 1% BSA 100 μl 封闭, 置于 37°C 、5% CO₂、饱和湿度孵箱中 1 h, 用无血清培养基清洗 2 遍, 备用。消化各孔细胞, 调整各孔细胞密度至相等, 按 2×10^4 个/孔接种至纤连蛋白包被的 96 孔培养板, 设置用 1% BSA 100 μl 封闭孔 (不含纤连蛋白) 为阴性对照组, 接种不含诱导因子的细胞。每组设 3 个复孔。 37°C 、5% CO₂、饱和湿度孵箱培养 1 ~ 2 h, 吸弃上清, PBS 清洗 3 遍, 去除未黏附细胞, 加入 100 μl 无血清培养基和 20 μl MTS, 继续培养 1 ~ 4 h 后, 酶标仪上测 OD 值, 波长为 492 nm。细胞黏附抑制率 = $(1 - \text{药物组 OD 值} / \text{模型组 OD 值}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.6 Western Blot 法检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达

消化生长至 70% ~ 80% 融合的 RA-FLS, 等密度接种于 10 cm 培养皿中, 分为空白对照组, TNF- α 诱导组及清热活血方低、中、高剂量组和 LY294002 组。待细胞贴壁后, 清热活血方低、中、高剂量组加入终浓度为 20、100、500 ng/ml 清热活血方, LY294002 组加入终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 LY294002, 培养 1 h 后加入终浓度为 10 ng/ml TNF- α , 诱导组加入含终浓度为 10 ng/ml 的 TNF- α 的等量培养基, 空白对照组加入等量培养基, 共同孵育 24 h。弃去培养基, 预冷的 PBS 清洗 2 次, 各组 RA-FLS 用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上处理 1 h (每隔 10 min 漩涡振荡 15 s), 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清即为提取总蛋白, Bradford 法进行蛋白定量, 60 μg 蛋白上样, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜至聚偏二

氟乙烯膜 (PVDF) 上, 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h, 加 1 : 1000 稀释的兔抗人 PI3K、Akt 抗体及 1 : 2000 稀释的兔抗人 p-Akt (Ser473) 抗体, 4℃ 孵育过夜, 洗膜, 加辣根酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 5000), 室温摇床孵育 2 h, 洗膜后加入 ECL 超敏发光液, 凝胶成像仪进行成像, 以蛋白条带 IOD 值代表蛋白表达量, 运用 Image-Pro Plus6.0 软件进行分析, 最终以目的蛋白与 GAPDH 比值来评估蛋白表达水平。实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计分析处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞迁移距离和面积比较

表 1 示, 与空白组比较, 诱导组细胞迁移距离及迁移面积明显增大 ($P < 0.01$)。与诱导组比较, 清热活血方各剂量组细胞迁移距离及迁移面积均明显减小 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并随清热活血方剂量升高, 迁移距离及迁移面积逐渐减小 ($P < 0.01$), 呈现量效相关性。

表 1 各组细胞迁移距离和面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	迁移距离 (μm)	迁移面积 (μm^2)
空白组	3	19.09 $\pm$ 5.91	7679.79 $\pm$ 2278.31
诱导组	3	70.48 $\pm$ 4.39*	29997.98 $\pm$ 3861.45*
清热活血方低剂量组	3	50.16 $\pm$ 10.6 $^{\Delta}$	20521.97 $\pm$ 3603.73 $^{\Delta\Delta}$
清热活血方中剂量组	3	46.00 $\pm$ 4.96 $^{\Delta\Delta}$	17832.02 $\pm$ 1567.40 $^{\Delta\Delta\Delta}$
清热活血方高剂量组	3	13.11 $\pm$ 6.24 $^{\Delta\Delta\Delta\#}$	5269.52 $\pm$ 2660.65 $^{\Delta\Delta\Delta\#}$

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与诱导组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与清热活血方低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$; 与清热活血方中剂量组比较, $\#P < 0.01$

2.2 各组细胞黏附 OD 值及黏附抑制率比较

表 2 示, 与空白组比较, 阴性对照组细胞黏附 OD 值明显减小, 诱导组显著增大 ($P < 0.01$); 与

诱导组比较, 清热活血方各剂量组细胞黏附 OD 值明显降低, 且清热活血方中、高剂量组 OD 值明显低于清热活血方低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与诱导组比较, 清热活血方各剂量组细胞黏附抑制率明显升高 ($P < 0.01$), 并且清热活血方高剂量组细胞黏附抑制率明显高于清热活血方低剂量组 ($P < 0.01$)。

表 2 各组细胞黏附 OD 值及黏附抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	OD 值	黏附抑制率 (%)
空白组	3	0.48 $\pm$ 0.03	—
阴性对照组	3	0.37 $\pm$ 0.03*	—
诱导组	3	0.84 $\pm$ 0.02*	0 $\pm$ 2.65
清热活血方低剂量组	3	0.68 $\pm$ 0.02 $^{\Delta}$	18.54 $\pm$ 2.75 $^{\Delta}$
清热活血方中剂量组	3	0.64 $\pm$ 0.01 $^{\Delta\Delta}$	23.54 $\pm$ 1.75 $^{\Delta\Delta}$
清热活血方高剂量组	3	0.62 $\pm$ 0.05 $^{\Delta\Delta\Delta}$	35.69 $\pm$ 5.44 $^{\Delta\Delta\Delta}$

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与诱导组比较, $\Delta P < 0.01$; 与清热活血方低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 各组细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达比较

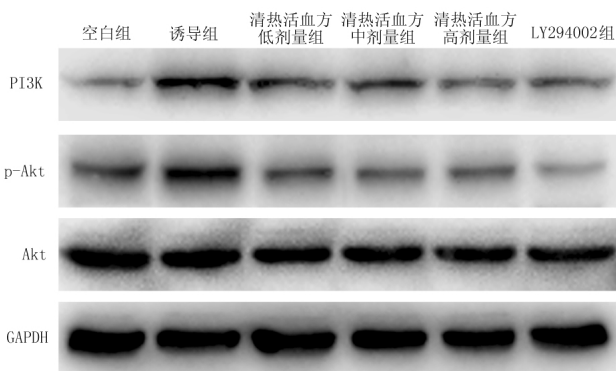


图 1 各组细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达电泳图

表 3 示, 与空白组比较, 诱导组 PI3K 与 p-Akt 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与诱导组比较, LY294002 组与清热活血方各剂量组 PI3K、p-Akt 表达均明显降低, 且 LY294002 组较清热活血方各剂量组降低更明显 ($P < 0.01$); 清热活血方各剂

表 3 各组细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达比较 ($/\text{GAPDH}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	PI3K	p-Akt	Akt
空白组	3	0.11 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.70 $\pm$ 0.02
诱导组	3	0.36 $\pm$ 0.02*	0.45 $\pm$ 0.05*	0.72 $\pm$ 0.00
LY294002 组	3	0.04 $\pm$ 0.00 $^{\Delta}$	0.08 $\pm$ 0.01 $^{\Delta}$	0.69 $\pm$ 0.02
清热活血方低剂量组	3	0.10 $\pm$ 0.00 $^{\Delta\Delta}$	0.16 $\pm$ 0.00 $^{\Delta\Delta}$	0.70 $\pm$ 0.05
清热活血方中剂量组	3	0.09 $\pm$ 0.01 $^{\Delta\Delta\#}$	0.13 $\pm$ 0.01 $^{\Delta\Delta\#}$	0.70 $\pm$ 0.02
清热活血方高剂量组	3	0.08 $\pm$ 0.01 $^{\Delta\Delta\#\nabla}$	0.11 $\pm$ 0.00 $^{\Delta\Delta\#\nabla}$	0.73 $\pm$ 0.04

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与诱导组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 LY294002 组比较, $\Delta P < 0.01$; 与清热活血方低剂量组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$; 与清热活血方中剂量组比较, $\nabla P < 0.05$

量组间比较, 清热活血方中、高剂量组 PI3K、p-Akt 表达低于清热活血方低剂量组, 清热活血方高剂量组 p-Akt 表达低于清热活血方中剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组细胞 Akt 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞中 PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达电泳图见图 1。

3 讨论

类风湿关节炎属中医学“痹证”范畴, 活动期 RA 主要由湿浊、热毒、瘀血等病因导致气血不通, 痹阻络脉, 出现关节肿、胀、痛等。基于湿热瘀阻的病机, 提出“清热活血利湿”的治法, 拟清热活血方, 方中以土茯苓、金银花为君, 清热解毒、除湿、通利关节; 苍术、黄柏清热利湿, 赤芍、丹参清热凉血, 共为臣药; 薏苡仁、萆薢、青风藤清热利湿、通经除痹, 莪术活血行气, 与虫类药并用通络止痛, 治疗活动期 RA 取得良好疗效^[9]。

在 RA 发病过程中, 关节滑膜炎是最具特征性的病理改变, 表现为滑膜衬里层的增生性侵蚀性生长, 其生长性质和病理学行为类似肿瘤组织的特性。滑膜细胞可分泌多种细胞因子和蛋白酶直接或间接参与血管新生、软骨和骨质破坏。FLS 作为滑膜炎中主要的效应细胞, 其异常增殖与滑膜炎进展密切相关, 但是越来越多研究表明, RA 病程中细胞的迁移和黏附同样可导致疾病的进展^[10]。细胞迁移是许多生理过程的重要部分, 然而在病理状态下, 经刺激的细胞可能由病变部位向健康部位迁移, 并附着、侵入健康组织, 使微环境紊乱; 在 RA 发病中, 炎症因子等可促进 RA-FLS 向软骨和骨表面迁移、附着, 在软骨表面形成增生组织; RA 是一种全身性的疾病, RA-FLS 的远距离迁移可能导致其介导的侵蚀和炎症影响到未被疾病累及的关节, 而且 RA-FLS 可以通过黏附于内皮细胞或细胞外基质层进行迁移^[11], 因此, 抑制 RA-FLS 的异常迁移和黏附, 可减缓软骨破坏和保护未受累关节。

本研究划痕实验模拟细胞横向迁移, 实验结果显示, 一定浓度 TNF- α 诱导能促进 RA-FLS 向划痕区域迁移, 清热活血方不同剂量均能对细胞迁移有抑制作用, 且呈量效相关性。细胞外基质对细胞起支撑和固定作用, 调节细胞的存活、增生、迁移、形态等, 纤连蛋白是细胞外基质的重要成分之一, 可增强细胞间黏着及细胞与胞外基质的黏着^[12]。本研究结果显示, 用纤连蛋白包被后的培养板中 RA-FLS 细胞数显著增多, 表明 RA-FLS 对纤连蛋

白有一定的黏附作用; TNF- α 可诱导 RA-FLS 向纤连蛋白黏附作用增强, 清热活血方各剂量组能显著抑制其黏附作用, 阻止 RA-FLS 向软骨、内皮细胞迁移和黏附, 从而抑制滑膜炎症和软骨破坏。

PI3K/Akt 信号通路在 RA 发病中异常活化, 可促进滑膜细胞异常增殖和抑制凋亡^[13]。近年有研究表明, 炎症因子刺激 PI3K/Akt 信号途径活化, 可促进滑膜细胞迁移、侵袭和黏附等^[14]。本研究结果表明, TNF- α 诱导可促进 RA-FLS 中 PI3K、p-Akt 表达升高, Akt 不改变, 不同剂量清热活血方干预后, 可下调 PI3K、p-Akt 的表达, 且高剂量的清热活血方效果更好。由此可推测, PI3K/Akt 途径可能是参与 TNF- α 诱导 RA-FLS 迁移、黏附功能紊乱的途径之一, 清热活血方通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制其迁移和黏附。

综上所述, 清热活血方可有效抑制 TNF- α 诱导 RA-FLS 的迁移和黏附, 同时下调 PI3K、p-Akt 蛋白表达, 以 500 ng/ml 剂量效果最好, 这可能是其抑制滑膜炎症和软骨破坏的分子机制之一。

参考文献

- [1] MIOSEC P. Rheumatoid arthritis: still a chronic disease [J]. Lancet, 2013, 381(9870): 884-886.
- [2] BARTOK B, FIRESTEIN GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 233-255.
- [3] 姜泉, 蒋红, 曹炜, 等. 475 例类风湿关节炎患者中医临床证候分析 [J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 253-255.
- [4] 巩勋, 姜泉, 曹炜, 等. 湿热瘀阻与活动期类风湿关节炎骨侵蚀 [J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1189-1192.
- [5] 姜泉, 冯兴华, 王承德, 等. 清热活血方治疗类风湿关节炎患者 71 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2012, 53(6): 488-491.
- [6] 刘鹏霄, 曹炜, 姜泉, 等. 清热活血方抑制 II 型胶原诱导型关节炎大鼠滑膜组织血管新生的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(10): 686-690.
- [7] 姜泉, 周新尧, 唐晓颖, 等. 清热活血方在类风湿关节炎相关动物实验和体外研究中对白介素 17 的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(8): 907-909.
- [8] 陆再英, 钟南山. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 852.
- [9] NAM EJ, SA KH, YOU DW, et al. Up-regulated transforming growth factor beta-inducible gene h3 in rheumatoid arthritis mediates adhesion and migration of synoviocytes through alpha v beta3 integrin: Regulation by cytokines [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(9): 2734-2744.
- [10] NEUMANN E, LEFÈVRE S, Zimmermann B, et al. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated

synovial fibroblasts [J]. Trends Mol Med, 2010, 16(10): 458-468.

[1] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2011: 372-376.

[2] MALEMUD CJ. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid

arthritis? [J]. Future Med Chem, 2015, 7(9): 1137-1147.

[3] XING R, JIN Y, SUN L, et al. Interleukin-21 Induces Migration and Invasion of Fibroblast-like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis [J]. Clin Exp Immunol, 2016, 184(2): 147-158.

The Effect of *Qingre Huoxue Fang* (清热活血方) on Migration and Adhesion of Fibroblast-like Synoviocytes of Rheumatoid Arthritis Induced by Tumor Necrosis Factor α

ZHI Kai¹, LIU Chunfang², CAO Wei¹, LIN Na², GAO Yaru¹, WANG Haixia¹, WU Ziyang¹

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053; 2. Institution of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To observe the possible functional mechanism of *Qingre Huoxue Fang* (清热活血方) in treating rheumatoid arthritis in active phase. **Methods** Synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis were separated to prepare primary generation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA-FLS). Tumor necrosis factor α (TNF- α) was adopted to induce migration and adhesion of RA-FLS. A blank group (without medicine and TNF- α intervention), an induced group (induced by TNF- α of 10 or 20 ng/mL), and the *Qingre Huoxue Fang* low, middle and high dose groups (*Qingre Huoxue Fang* of 20, 100, 500 ng/mL respectively and induced by TNF- α) were set. Migration distance and square, OD value of adhesion and adherence inhibition rate of cells in each group were examined. And the expression of related proteins in PI3K/Akt signal pathway, including PI3K, p-Akt and Akt, was tested. **Results** Migration distance and square, adhesion OD value, as well as the expression of PI3K and p-Akt protein increased in the induced group compared with those in the blank group ($P < 0.01$); Compared with the induced group, each *Qingre Huoxue Fang* dose group could all restrain cell migration and adhesion, as well as the expression of PI3K and p-Akt protein. It had the best effects when the dose was of 500 ng/mL ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** By lowering the expression of protein PI3K and p-Akt in RA-FLS, *Qingre Huoxue Fang* could relieve synovial inflammation and destruction of joint; thereby restrain migration and adhesion of RA-FLS.

Keywords rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; *Qingre Huoxue Fang*; cell migration; cell adhesion

(收稿日期: 2016-01-18; 修回日期: 2016-05-29)

编辑: 邓 媛

第 31 次全国特色医疗名医学术交流暨肝病糖尿病论坛通知

为总结交流中医药特色医疗在治疗肝病、糖尿病方面的新经验新成果,由中国民间中医药研究开发协会特色医疗分会和北京聚医杰医药科学研究院联合主办,定于 2016 年 12 月 17 日—18 日(16 日报到)在广东深圳市召开本次会议,特邀请有特色医疗技术的名医、乡村中医、民间中医,尤其是在肝病、糖尿病方面有专长者参会交流。

一、会议内容: 1) 特邀肝病、糖尿病专家作中医药治疗肝病、糖尿病的学术讲座及培训; 2) 成立本会“中医药防治糖尿病研究专家委员会”,补充调整本会“中医药防治肝病研究专家委员会”成员; 3) 举行《中医药治疗糖尿病经验荟萃》一书的首发; 4) 评选表彰优秀学术论文、优秀学术成果; 5) 参会代表学术交流; 6) 会后组织代表赴香港澳门地区考察学习。

二、征文要求: 运用中医药治疗肝病、糖尿病的经验总结或治疗其他常见病、多发病的特色医疗经验,稿件需打印,附 200 字以内作者简介,邮寄或发电子邮件至信箱 13366005273@163.com。

三、有关说明: 1) 向参会代表颁发“积极参与肝病糖尿病研究”纪念奖章及纪念品; 2) 具有副高以上职称或对肝病糖尿病有专长者可申请加入专家委员会; 3) 请参加考察的代表在当地公安局办好港澳通行证。

四、会议费用: 参会报名费 300 元,会务、资料及培训费 1500 元; 会议食宿统一安排,费用自理,港澳地区考察参观三晚四天。

五、报名方法: 请在 11 月 30 日前报名,将报名费 300 元、交流论文(无论文也可报名)、个人技术简介、聘任专家委员会申请、二寸蓝底像片 4 张用快递寄至: 北京市 100036-98 信箱,深圳会议会务组,叶续宗收,邮编: 100036,电话: 010-83210238、18600893817、18515917952。