

- 1525–1536.
- [14] GU XH, ZHANG Q, CHU YB, *et al.* Cost-effectiveness of afatinib, gefitinib, erlotinib and pemetrexed-based chemotherapy as first-line treatments for advanced non-small cell lung cancer in China [J]. *Lung Cancer*, 2019, 127: 84–89.
- [15] FINN RS, MERLE P, GRANITO A, *et al.* Outcomes of sequential treatment with sorafenib followed by regorafenib for HCC: additional analyses from the phase III RESORCE trial [J]. *J Hepatol*, 2018, 69 (2): 353–358.
- [16] DING D, HU HB, LIAO MT, *et al.* Cost-effectiveness analysis of atezolizumab plus chemotherapy in the first-line treatment of metastatic non-squamous non-small cell lung cancer [J]. *Adv Ther*, 2020, 37 (5): 2116–2126.
- [17] 李美月. 肝动脉灌注化疗联合索拉非尼治疗晚期肝癌的成本-效用分析 [D]. 福州: 福建医科大学, 2021:16–17.
- LI MY. Cost-effectiveness analysis of hepatic arterial infusion of chemotherapy combined sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2021: 16–17.
- [18] CHISNG CL, CHAN SK, LEE SF, *et al.* First-line atezolizumab plus bevacizumab versus sorafenib in hepatocellular carcinoma: a cost-effectiveness analysis [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13 (5): 931.
- [19] 柴青青. 晚期非小细胞肺癌免疫治疗的药物经济学研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2020: 24.
- CHAI QQ. Treating advanced non-small cell lung cancer patients with immune checkpoint inhibitors: a pharmacoeconomic research [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2020: 24.
- [20] SU D, WU B, SHI LZ. Cost-effectiveness of atezolizumab plus bevacizumab vs sorafenib as first-line treatment of unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *JAMA Netw Open*, 2021, 4 (2): e210037.
- [21] 魏 媛, 陈东萍, 吴锐奇, 等. 肝细胞肝癌免疫微环境与治疗研究新进展 [J]. *药学进展*, 2022, 46 (8): 588–602.
- WEI Y, CHEN DP, WEI RQ, *et al.* Research progress in immune microenvironment and therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Prog Pharm Sci*, 2022, 46 (8): 588–602.

[文章编号] 1007-7669(2024)04-0279-06

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.04.08

## 基于 RhoA/ROCK 通路探讨桔梗提取物对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖及转移的影响

王 洋, 田伟峰, 毛文娟

(青海省第五人民医院 中医科, 青海 西宁 810001)

[关键词] 桔梗; 关节炎, 类风湿; 滑膜细胞; 肿瘤转移; 增殖; 桔梗提取物

[摘要] 目的 探讨桔梗提取物(PGE)对类风湿关节炎(RA)成纤维样滑膜细胞增殖和转移的影响及其作用机制。方法 将成纤维样滑膜细胞 MH7A 细胞分为对照组、PGE-L 组 (25 mg · L<sup>-1</sup> PGE)、PGE-M 组 (50 mg · L<sup>-1</sup> PGE)、PGE-H 组 (100 mg · L<sup>-1</sup> PGE)、PGE + 血管紧张素 (Ang) II 组 [100 mg · L<sup>-1</sup> PGE + 100 nmol · L<sup>-1</sup> Ras 同源基因家族成员 A (RhoA) / Rho 激酶 (ROCK) 通路激活剂 Ang II], 给予相应的处理。采用 CCK-8 法、流式细胞术、Transwell 实验分别检测细胞增殖、凋亡、迁移与侵袭情况, Western blot 法检测相关蛋白表达水平, GST-pull down 法检测细胞中 RhoA 活性。结果 与对照组比较, PGE-L 组、PGE-M 组、PGE-H 组的吸光度值 (PGE 处理 24、48、72h)、迁移及侵袭细胞数目、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9、ROCK1、ROCK2 蛋白表达及 RhoA 活性降低, p21 蛋白表达及细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ ), 且 PGE 的浓度越高, 对应的趋势越明显 ( $P < 0.05$ )。与 PGE-H 组比较, PGE+Ang II 组的吸光度值 (PGE 处理 24、48、72 h)、迁移及侵袭细胞数目、cyclin D1、MMP-2、MMP-9、ROCK1、ROCK2 蛋白表达及 RhoA 活性升高, p21 蛋白表达及细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ )。结论 PGE 可抑制 MH7A 细胞增殖与转移, 该机制可能与抑制 RhoA/ROCK 通路有关。

[收稿日期] 2022-02-26 [接受日期] 2023-11-27

[基金项目] 青海省科技项目 (2016-zj-936Q)

[作者简介] 王 洋, 女, 主治医师, 学士, 主要从事中医综合治疗的研究, E-mail: wxeltj@163.com

[ 中图分类号 ] R282 ; R593.22

[ 文献标志码 ] A

## Effects of *Platycodon grandiflorum* extract on proliferation and metastasis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells based on RhoA/ROCK pathway

WANG Yang, TIAN Wei-feng, MAO Wen-juan

( Department of Traditional Chinese Medicine, Qinghai Fifth People's Hospital, Xining QINGHAI 810001, China )

[ KEY WORDS ] *Platycodonis* radix; arthritis, rheumatoid; synoviocytes; neoplasm metastasis; proliferation; *Platycodon grandiflorum* extract

[ ABSTRACT ] AIM To investigate the effects of *Platycodon grandiflorum* extract ( PGE ) on the proliferation and metastasis of fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis ( RA ) and its mechanism of action. METHODS Fibroblast-like synovial cells MH7A were divided into control group, PGE-L group (  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PGE ), PGE-M group (  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PGE ), PGE-H group (  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PGE ), PGE + angiotensin ( Ang ) II group (  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PGE +  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ras homologous gene family member A ( RhoA ) / Rho kinase ( ROCK ) pathway activator Ang II ), and treated accordingly. Cell proliferation, apoptosis, migration and invasion were detected by CCK-8 method, flow cytometry and Transwell, respectively. The expression levels of related proteins were detected by Western blot, and the RhoA activity in cells was detected by GST-pull down method. RESULTS Compared with the control group, absorbance value ( 24, 48 and 72 h after PGE treatment ), the number of migrating and invading cells, the expression of cyclin D1, matrix metalloproteinase ( MMP ) -2, MMP-9, ROCK1 and ROCK2 proteins, and the activity of RhoA were significantly reduced, and p21 protein expression and the apoptosis rate were increased in PGE-L group, PGE-M group, and PGE-H group, and the higher the concentration of PGE, the more obvious the corresponding trend was (  $P < 0.05$  ). Compared with the PGE-H group, the absorbance value ( 24, 48, 72 h after PGE treatment ), the number of migratory and invasive cells, the expression of cyclin D1, MMP-2, MMP-9, ROCK1, ROCK2 protein and RhoA activity were increased, and p21 protein expression and apoptosis rate decreased in PGE + Ang II group (  $P < 0.05$  ). CONCLUSION PGE can inhibit the proliferation and metastasis of MH7A cells, which may be related to the inhibition of RhoA/ROCK pathway.

类风湿关节炎 ( RA ) 是一种自身免疫病, 主要特征表现为肢体关节炎症持续时间长, 导致骨侵蚀, 甚至畸形和残疾<sup>[1]</sup>。大量研究证实, RA 成纤维样滑膜细胞参与了滑膜关节的慢性炎症, 可诱发软骨和骨骼损伤, 在 RA 进展中发挥关键作用<sup>[2]</sup>。在 RA 发病机制中, 激活的成纤维样滑膜细胞表现出与肿瘤细胞相似的增殖、转移特征, 这是异常增生和关节破坏的主要触发因素<sup>[3]</sup>, 因此寻找抑制 RA 成纤维样滑膜细胞增殖和转移的药物具有重要意义。桔梗是桔梗科多年生植物, 含有类黄酮、多酚和三萜皂苷等活性化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗癌、免疫调节等多种药理活性<sup>[4]</sup>。桔梗提取物 ( *Platycodon grandiflorum* extract, PGE ) 能减轻 RA 大鼠关节肿胀程度, 并抑制炎症反应<sup>[5]</sup>。有研究发现, Ras 同源基因家族成员 A ( RhoA ) / Rho 激酶 ( ROCK ) 通路对 RA 成纤维样

滑膜细胞分泌趋化因子具有一定的调控作用, 抑制该通路对于治疗 RA 是有利的<sup>[6]</sup>。但 PGE 对 RA 成纤维样滑膜细胞增殖及转移的影响以及可能机制尚不清楚, 因此本研究观察 PGE 对 RA 成纤维样滑膜细胞增殖、转移及 RhoA/ROCK 通路的影响。

### 材料与方法

细胞、试剂及仪器 RA 成纤维样滑膜细胞 MH7A 购自上海冠导生物公司。一年野生九桔兰花桔梗购自西宁市市场; CCK-8 试剂盒购自赛因百奥生物技术 ( 北京 ) 公司; 血管紧张素 ( angiotensin, Ang ) II 购自北京索莱宝科技有限公司; annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自武汉益普生物公司; BCA 试剂盒购自碧云天生物科技有限公司; ECL 化学发光试剂盒购自广州吉赛生物科技有限公司; 兔多克隆抗体

细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、p21、基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9、ROCK1、ROCK2、GAPDH、RhoA 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗均购自英国 Abcam 公司。酶标仪购自上海研卉生物公司, FACSCanto II 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。**PGE 的制备**<sup>[5]</sup> 取新鲜桔梗 3 000 g, 置于水中浸泡 30 min 后, 清洗、晾干、切成薄片, 将薄片置于 70% 乙醇 50 L 中提取, 过滤、减压、浓缩, 乙醇蒸发后得浓度为  $5 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓缩液 600 mL 用于后续实验。经鉴定, PGE 主要成分包括桔梗皂苷 D、桔梗总皂苷以及其他黄酮类化合物。

**细胞培养与分组** 将 MH7A 细胞置于含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基, 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  下, 含有 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中进行常规传代培养。取对数生长期的 MH7A 细胞, 参考既往研究<sup>[7,8]</sup> 及前期预实验结果, 将细胞分为 5 组: 对照组 (细胞未经任何处理)、PGE-L 组 (给予终浓度为  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PGE 处理)、PGE-M 组 (给予终浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PGE 处理)、PGE-H 组 (给予终浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PGE 处理)、PGE+Ang II 组 (给予终浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PGE 和  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  RhoA/ROCK 通路激活剂 Ang II 共同处理)。

#### 观察指标

**1 细胞增殖** 采用 CCK-8 法检测。将 MH7A 细胞以  $2 \times 10^8$  个  $\cdot \text{L}^{-1}$  接种于 96 孔培养板中生长。24 h 后, 将 MH7A 细胞按照“细胞培养与分组”中进行处理, 分别在细胞处理的 0、24、48、72 h 时向每孔中加入 CCK-8 溶液  $10 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 h, 通过酶标仪测量 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

**2 细胞凋亡** 采用流式细胞术检测。收集处理 24 h 的各组细胞, 用 PBS 洗涤两次后, 加入结合缓冲液  $500 \mu\text{L}$  悬浮细胞, 随后加入 annexin V-FITC  $5 \mu\text{L}$  和 PI  $10 \mu\text{L}$  于避光条件下孵育 20 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

**3 细胞迁移与侵袭** 采用 Transwell 实验<sup>[9]</sup> 检测。细胞迁移: 以无 FBS 的 DMEM 培养基将 MH7A 细胞浓度调整为  $1 \times 10^9$  个  $\cdot \text{L}^{-1}$ , 取  $200 \mu\text{L}$  加入到 Transwell 上室中, 向下室中加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基  $500 \mu\text{L}$ , 孵育 48 h 后, 将迁移的细胞用多聚甲醛固定, 0.2% 结晶紫室温染色后, 在光学显微镜下观察细胞迁移情况。细胞侵袭: 将基质胶涂于 Transwell 上室中, 待其自然干燥后, 将各组 MH7A 细胞以无 FBS 的 DMEM 培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^9$  个  $\cdot \text{L}^{-1}$ , 剩余步骤同细胞迁移实验。

**4 相关蛋白的表达** 采用 Western blot 法检测。用

RIPA 裂解缓冲液提取蛋白质, 蛋白质经定量、电泳、转膜、封闭后, 加入一抗 cyclin D1 (1:2 000)、p21 (1:1 000)、MMP-2 (1:1 000)、MMP-9 (1:1 000)、ROCK1 (1:3 000)、ROCK2 (1:3 000)、GAPDH (1:2 000), 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下孵育过夜。次日, 用 TBST 洗涤 3 次后, 加入 HRP 偶联的羊抗兔二抗 (1:1 000), 在室温下孵育 1 h, 然后通过 ECL 试剂观察蛋白显色, 最后以 GAPDH 为内部参照, Image J 软件分析各个蛋白的灰度值。

**5 RhoA 活性** 采用 GST-pull down 方法<sup>[10]</sup> 检测。用裂解缓冲液裂解各组细胞, 收集裂解物并离心, 取上清液  $530 \mu\text{L}$  分成两份。(1) 取上清液  $30 \mu\text{L}$ , 通过 Western blot 法检测总 RhoA 蛋白表达水平; (2) 取上清液  $500 \mu\text{L}$ , 加入 Rho 结合域 (RBD)-GST 与琼脂糖珠混合, 冰浴中孵育 1 h 后, 将混合物离心并弃去上清液。洗涤 3 次后, 加入上样缓冲液重悬, 煮沸 5 min, 10% SDS-PAGE 电泳后电转至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭, 加入兔多克隆抗体 RhoA,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下孵育过夜。次日, 用 TBST 洗涤后, 加入二抗在室温下孵育 1 h, 用凝胶成像系统分析蛋白水平。以 GTP-RhoA 蛋白 / 总 RhoA 蛋白表示 RhoA 的活性。

**统计学分析** 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 数据以均值  $\pm$  标准差表示, 多组数据间的比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 SNK-*q* 检验。  $P < 0.05$  为差异有显著意义。

## 结 果

**细胞增殖能力** 与对照组比较, PGE-L 组、PGE-M 组、PGE-H 组在细胞处理 24、48、72 h 时的 A 值均显著降低; 且随着 PGE 浓度的升高, A 值显著降低 ( $P < 0.05$ )。与 PGE-H 组比较, PGE+Ang II 组 24、48、72 h 时的 A 值显著升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组 MH7A 细胞处理 0、24、48、72 h 时的吸光度值比较  
 $n=6, \bar{x} \pm s$

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
对照	$0.20 \pm 0.03$	$0.59 \pm 0.06$	$0.87 \pm 0.11$	$1.25 \pm 0.16$
PGE-L	$0.24 \pm 0.05^a$	$0.51 \pm 0.05^b$	$0.74 \pm 0.09^b$	$1.04 \pm 0.09^b$
PGE-M	$0.23 \pm 0.06^{ad}$	$0.42 \pm 0.03^{bc}$	$0.62 \pm 0.06^{bc}$	$0.83 \pm 0.07^{bc}$
PGE-H	$0.22 \pm 0.04^{adg}$	$0.29 \pm 0.01^{bc}$	$0.49 \pm 0.03^{bc}$	$0.65 \pm 0.07^{bc}$
PGE+Ang II	$0.23 \pm 0.05^i$	$0.48 \pm 0.03^k$	$0.73 \pm 0.05^k$	$0.93 \pm 0.10^k$

PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素。经方差分析: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 PGE-L 组比较, <sup>d</sup> $P > 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$ ; 与 PGE-M 组比较, <sup>g</sup> $P > 0.05$ , <sup>h</sup> $P < 0.05$ ; 与 PGE-H 组比较, <sup>i</sup> $P > 0.05$ , <sup>j</sup> $P < 0.05$ 。

**细胞凋亡情况** 与对照组比较, PGE-L 组、PGE-M 组、PGE-H 组的 MH7A 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ); 且

随着 PGE 浓度的升高,细胞凋亡率显著升高 ( $P<0.05$ )。与 PGE-H 组比较, PGE+Ang II 组 MH7A 细胞凋亡率显著降低 ( $P<0.05$ ), 见表 2 和图 1。

表 2 各组 MH7A 细胞凋亡、迁移与侵袭情况比较  $n=6, \bar{x} \pm s$

组别	细胞凋亡率/%	迁移细胞/个	侵袭细胞/个
对照	8.7 ± 1.2	156.5 ± 18.7	96.7 ± 11.2
PGE-L	14.7 ± 2.0 <sup>b</sup>	116.7 ± 10.8 <sup>b</sup>	71.9 ± 9.4 <sup>b</sup>
PGE-M	26.6 ± 4.2 <sup>bc</sup>	86.4 ± 9.2 <sup>bc</sup>	49.5 ± 6.0 <sup>bc</sup>
PGE-H	39.6 ± 5.1 <sup>bch</sup>	43.7 ± 5.9 <sup>bch</sup>	24.6 ± 3.7 <sup>bch</sup>
PGE+Ang II	16.3 ± 2.3 <sup>k</sup>	108.8 ± 12.6 <sup>k</sup>	68.7 ± 2.5 <sup>k</sup>

PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素。经方差分析: 与对照组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与 PGE-L 组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; 与 PGE-M 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与 PGE-H 组比较, <sup>k</sup> $P<0.05$

**细胞迁移与侵袭能力** 与对照组比较, PGE-L 组、PGE-M 组、PGE-H 组 MH7A 细胞迁移、侵袭数目显著降低 ( $P<0.05$ ); 且随着 PGE 浓度的升高, MH7A 细胞迁移、侵袭数目显著降低 ( $P<0.05$ )。与 PGE-H 组比较, PGE+Ang II 组 MH7A 细胞迁移、侵袭数目显著升高 ( $P<0.05$ )。见表 2 和图 2。

**cyclin D1、p21 和 MMP 的表达水平** 与对照组比较, PGE-L 组、PGE-M 组、PGE-H 组 MH7A 细胞中 p21 蛋白表达升高, cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低, 差异均有显著意义 ( $P<0.05$ ); 且 PGE 浓度越高, 对应蛋白变化的趋势越明显 ( $P<0.05$ )。与 PGE-H 组比较, PGE+Ang II 组 MH7A 细胞中 p21 蛋白表达显著降低, cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达显著升高 ( $P<0.05$ )。见表 3 和图 3。

表 3 各组 MH7A 细胞中 cyclin D1、p21、MMP-2、MMP-9 蛋白表达比较  $n=6, \bar{x} \pm s$

组别	cyclin D1	p21	MMP-2	MMP-9
对照	0.85 ± 0.13	0.25 ± 0.02	0.79 ± 0.12	0.86 ± 0.14
PGE-L	0.71 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.11 <sup>b</sup>
PGE-M	0.58 ± 0.05 <sup>bc</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>bc</sup>	0.46 ± 0.06 <sup>bc</sup>	0.51 ± 0.12 <sup>bc</sup>
PGE-H	0.27 ± 0.04 <sup>bch</sup>	0.72 ± 0.08 <sup>bch</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>bch</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>bch</sup>
PGE+Ang II	0.63 ± 0.04 <sup>k</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>k</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>k</sup>	0.68 ± 0.05 <sup>k</sup>

PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素。经方差分析: 与对照组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与 PGE-L 组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; 与 PGE-M 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与 PGE-H 组比较, <sup>k</sup> $P<0.05$

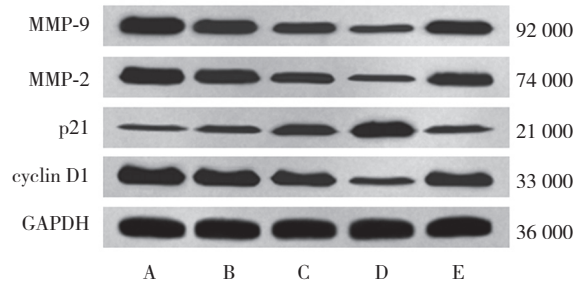


图 3 Western blot 法检测各组 MH7A 细胞中 cyclin D1、p21、MMP-2、MMP-9 蛋白表达

A: 对照组, B: PGE-L 组, C: PGE-M 组, D: PGE-H 组, E: PGE+Ang II 组, MMP: 基质金属蛋白酶, cyclin: 细胞周期蛋白, PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素

**RhoA/ROCK 通路相关蛋白的表达** 与对照组比较, PGE-L 组、PGE-M 组、PGE-H 组 MH7A 细胞中 RhoA 活性和 ROCK1、ROCK2 蛋白表达降低, 总 RhoA 蛋白表达水平无显著变化, 且随着 PGE 浓度的升高, MH7A 细胞中 RhoA 活性和 ROCK1、ROCK2 蛋白

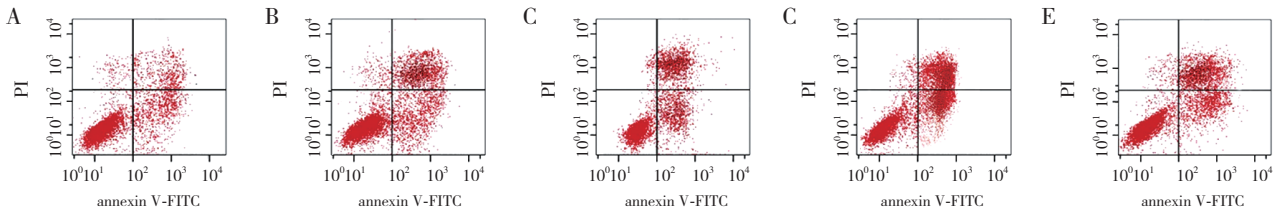


图 1 流式细胞术检测各组 MH7A 细胞凋亡

A: 对照组, B: PGE-L 组, C: PGE-M 组, D: PGE-H 组, E: PGE+Ang II 组, PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素

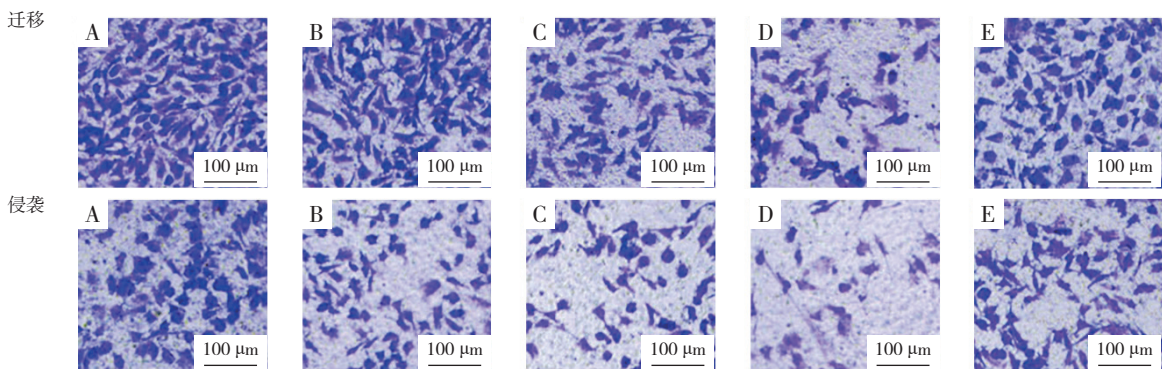
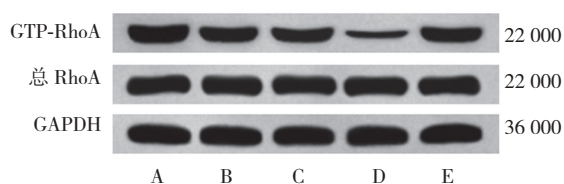


图 2 Transwell 检测各组 MH7A 细胞迁移与侵袭情况

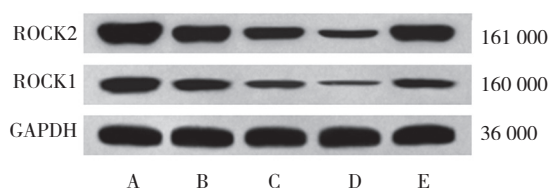
A: 对照组, B: PGE-L 组, C: PGE-M 组, D: PGE-H 组, E: PGE+Ang II 组, PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素

A: 对照组, B: PGE-L 组, C: PGE-M 组, D: PGE-H 组, E: PGE+Ang II 组, PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素

表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与 PGE-H 组比较, PGE+Ang II 组 MH7A 细胞中 RhoA 活性和 ROCK1、ROCK2 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 总 RhoA 蛋白表达无显著变化, 见图 4、图 5 和表 5。



**图 4 GST-pull down 法检测各组 MH7A 细胞中 RhoA 活性**  
A: 对照组, B: PGE-L 组, C: PGE-M 组, D: PGE-H 组, E: PGE+Ang II 组, RhoA: Ras 同源基因家族成员 A, PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素



**图 5 Western blot 法检测各组 MH7A 细胞中 ROCK1、ROCK2 蛋白表达**  
A: 对照组, B: PGE-L 组, C: PGE-M 组, D: PGE-H 组, E: PGE+Ang II 组, ROCK: Rho 激酶, PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素

**表 5 各组 MH7A 细胞中 RhoA 活性、ROCK1、ROCK2 蛋白表达比较**  
 $n=6, \bar{x} \pm s$

组别	RhoA 活性	ROCK1/GAPDH	ROCK2/GAPDH
对照	0.98 ± 0.11	1.01 ± 0.08	0.75 ± 0.06
PGE-L	0.77 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.04 <sup>b</sup>
PGE-M	0.56 ± 0.06 <sup>bc</sup>	0.52 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>bc</sup>
PGE-H	0.32 ± 0.05 <sup>bcd</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>bcd</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>bcd</sup>
PGE+Ang II	0.71 ± 0.05 <sup>k</sup>	0.68 ± 0.05 <sup>k</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>k</sup>

PGE: 桔梗提取物, Ang: 血管紧张素, RhoA: Ras 同源基因家族成员 A, ROCK: Rho 激酶。经方差分析: 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 PGE-L 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 PGE-M 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与 PGE-H 组比较, <sup>k</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

RA 是一种慢性自身免疫病, 由于目前使用的抗 RA 药物会引起较严重的不良反应, 因此, 迫切需要研发一些毒性较小的药物来治疗 RA, 以期提高 RA 患者的生活质量<sup>[11]</sup>。桔梗作为草药可用来治疗呼吸系统疾病、哮喘和糖尿病, 有研究发现 PGE 通过抑制炎症反应而发挥治疗鸡传染性喉气管炎的作用<sup>[12, 13]</sup>。本研究结果显示, PGE 可显著抑制 MH7A 细胞增殖、迁移与侵袭, 诱导细胞凋亡, 且 PGE 浓度越高, 对应的趋势越明显, 提示 PGE 可通过影响 MH7A 细胞行为来改善 RA。cyclin D1 可与细胞周期蛋白依赖性激酶相结合, 促进 RA 成纤维样滑膜细胞

细胞周期从 G1 期转向 S 期, 具有促进细胞增殖的作用, 而 p21 在细胞生命活动中具有抗增殖作用<sup>[14]</sup>。当 RA 发生时, 成纤维样滑膜细胞会分泌大量的促炎性细胞因子以及 MMPs, MMPs 通过降解细胞外基质进而引发软骨和骨骼损伤<sup>[15]</sup>。本研究结果发现, PGE 可明显抑制 MH7A 细胞中 cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达, 上调 p21 蛋白的表达, 且 PGE 浓度越高, MH7A 细胞中对应蛋白变化趋势越明显, 提示 PGE 可通过调控 cyclin D1、MMP-2、MMP-9、p21 蛋白表达影响 MH7A 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡进而改善 RA, PGE 可能成为治疗 RA 的潜在有效药物。

RhoA 是小分子 GTP 酶, 而 ROCK 为 RhoA 信号通路下游的一个靶标, 有 ROCK1 和 ROCK2 两种亚型, RhoA/ROCK 通路参与细胞的生长、分化、迁移和发育<sup>[16]</sup>。有研究证明, 欧前胡素通过抑制 RhoA/ROCK1 通路抑制人前列腺癌 PC3 细胞恶性生物学行为<sup>[17]</sup>; 温针灸通过抑制 RA 大鼠膝关节滑膜组织中 RhoA 蛋白表达, 可减轻 RA 大鼠关节炎性损伤状况<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, PGE 可明显抑制 MH7A 细胞中 RhoA 活性及 ROCK1、ROCK2 蛋白的表达, 且 PGE 浓度越高, 对应的趋势越明显。推测 PGE 可能通过抑制 RhoA/ROCK 通路来抑制 MH7A 细胞的增殖、迁移与侵袭。为了进一步证实该推测, 本研究用 PGE 和 RhoA/ROCK 通路激活剂 Ang II 共同干预 MH7A 细胞, 结果发现, Ang II 减弱了高剂量 PGE 对 MH7A 细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用以及对细胞凋亡的促进作用, 提示 PGE 对 MH7A 细胞的影响可能与抑制 RhoA/ROCK 通路有关。

综上所述, PGE 可抑制 MH7A 细胞的增殖与转移, 该作用可能与抑制 RhoA/ROCK 通路有关, 但 PGE 抑制 MH7A 细胞增殖与转移的作用机制较为复杂, 且具体通过 RhoA/ROCK 通路下游的哪些蛋白来发挥作用有待进一步深入研究。

## [ 参考文献 ]

- [1] DU H, ZHANG X, ZENG Y, *et al.* A novel phytochemical, DIM, inhibits proliferation, migration, invasion and TNF- $\alpha$  induced inflammatory cytokine production of synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients by targeting MAPK and AKT/mTOR signal pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10 (1): 1620-1632.
- [2] GUO T, DING H, JIANG H, *et al.* miR-338-5p Regulates the viability, proliferation, apoptosis and migration of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by targeting NFAT5 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49 (3): 899-910.

- [ 3 ] LIU Y, PAN YF, XUE YQ, *et al.* uPAR promotes tumor-like biologic behaviors of fibroblast-like synoviocytes through PI3K/Akt signaling pathway in patients with rheumatoid arthritis [ J ] . Cell Mol Immunol, 2018, 15 ( 2 ) : 171–181.
- [ 4 ] NOH EM, KIM JM, LEE HY, *et al.* Immuno-enhancement effects of *Platycodon grandiflorum* extracts in splenocytes and a cyclophosphamide-induced immunosuppressed rat model [ J ] . BMC Complement Altern Med, 2019, 19 ( 1 ) : 322–333.
- [ 5 ] 杨欣, 王乐. 桔梗提取物对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用 [ J ] . 现代食品科技, 2020, 36 ( 1 ) : 22–27. YANG X, WANG L. Anti-inflammatory effects of an extract from *Platycodon platycodon* on rats with rheumatoid arthritis [ J ] . Mod Food Sci Technol, 2020, 36 ( 1 ) : 22–27.
- [ 6 ] 梁柳琴, 肖游君, 付迪, 等. RhoA/ROCK 信号通路对 TLR-2 配体诱导的类风湿关节炎患者成纤维滑膜细胞分泌趋化因子的调控作用 [ J ] . 中华医学杂志, 2011, 91 ( 11 ) : 742–745. LIANG LQ, XIAO YJ, FU D, *et al.* Modulation of RhoA/ROCK pathway on TLR-2 ligand-induced chemokine secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [ J ] . Chin Med J, 2011 ( 11 ) : 742–745.
- [ 7 ] PARK EJ, LEE HJ. Immunomodulatory effects of fermented *Platycodon grandiflorum* extract through NF- $\kappa$ B signaling in RAW 264.7 cells [ J ] . Nutr Res Pract, 2020, 14 ( 5 ) : 453–462.
- [ 8 ] QI Y, LIANG X, DAI F, *et al.* RhoA/ROCK pathway activation is regulated by AT1 receptor and participates in smooth muscle migration and dedifferentiation via promoting actin cytoskeleton polymerization [ J ] . Int J Mol Sci, 2020, 21 ( 15 ) : 5398–5412.
- [ 9 ] GUO Q, XU J, HUANG Z, *et al.* ADMA mediates gastric cancer cell migration and invasion via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [ J ] . Clin Transl Oncol, 2021, 23 ( 2 ) : 325–334.
- [ 10 ] 彭蔚湘, 朱尚玲, 冯晓雪, 等. Smoothened 表达对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 RhoA/ROCK 通路的影响 [ J ] . 中华临床医师杂志 ( 电子版 ), 2014, 8 ( 4 ) : 661–665. PENG WX, ZHU SL, FENG XX, *et al.* Influence of Smoothened molecular expression on RhoA/ROCK signaling pathway in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis [ J ] . Chin J Clinicians ( Electronic Edition ), 2014, 8 ( 4 ) : 661–665.
- [ 11 ] BA X, HUANG Y, SHEN P, *et al.* WTD attenuating rheumatoid arthritis via suppressing angiogenesis and modulating the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 $\alpha$  pathway [ J ] . Front Pharmacol, 2021, 12 ( 1 ) : 696802.
- [ 12 ] CHO BO, CHOI J, KANG HJ, *et al.* Anti-obesity effects of a mixed extract containing *Platycodon grandiflorum*, *Apium graveolens* and green tea in high-fat-diet-induced obese mice [ J ] . Exp Ther Med, 2020, 19 ( 4 ) : 2783–2791.
- [ 13 ] 郭文洁, 康宏玲, 胡爽, 等. 桔梗提取物对鸡传染性喉气管炎的治疗作用研究 [ J ] . 黑龙江畜牧兽医, 2018, ( 13 ) : 176–179.
- [ 14 ] 李萍, 孙敏, 吴伟. lncRNA HOXB-AS3 靶向 miR-379-5p 调节类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究 [ J ] . 河北医药, 2021, 43 ( 11 ) : 1616–1620. LI P, SUN M, WU W. The effects of lncRNA HOXB-AS3 on the proliferation, migration and invasion of synovial fibroblasts in patients with RA by targeting miR-379-5p [ J ] . Hebei Med J, 2019, 43 ( 11 ) : 1616–1620.
- [ 15 ] 梁菁菁, 肖涟波, 陈勇, 等. 环指蛋白 43 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞基质金属蛋白酶的影响 [ J ] . 中华风湿病学杂志, 2019, 23 ( 4 ) : 217–219. LIANG JJ, XIAO LB, CHEN Y, *et al.* Effects of ring finger protein 43 on matrix metalloproteinases secreted by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis [ J ] . Chin J Rheumatol, 2019, 23 ( 4 ) : 217–219.
- [ 16 ] DENG Z, JIA Y, LIU H, *et al.* RhoA/ROCK pathway: implication in osteoarthritis and therapeutic targets [ J ] . Am J Transl Res, 2019, 11 ( 9 ) : 5324–5331.
- [ 17 ] 刘明娟, 韩瑞霞, 李铁, 等. 欧前胡素对人前列腺癌 PC3 细胞增殖凋亡及 RhoA/ROCK1 信号通路的影响 [ J ] . 河北医学, 2021, 27 ( 3 ) : 362–367. LIU MJ, HAN RX, LI T, *et al.* Effects of imperatorin on proliferation, apoptosis and RhoA/ROCK1 signaling pathway in human prostate cancer PC3 cells [ J ] . Hebei Med J, 2019, 27 ( 3 ) : 362–367.
- [ 18 ] 王萌, 李佳, 李静, 等. 温针灸足三里、肾俞对类风湿性关节炎模型 RhoA 蛋白表达的影响 [ J ] . 湖北中医药大学学报, 2016, 18 ( 6 ) : 17–20. WANG M, LI J, LI J, *et al.* Effects of warm acupuncture on the expression of protein RhoA protein in rheumatoid arthritis rats [ J ] . J Hubei Univ Chin Med, 2016, 18 ( 6 ) : 17–20.