

去甲斑蝥素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡和炎症因子释放的影响和机制

杨 洋， 刘佳佳*， 薛建华， 虞俊波
(南通大学附属医院急诊外科, 江苏 南通 226001)

摘要：目的 研究去甲斑蝥素对类风湿关节炎(RA)滑膜成纤维细胞凋亡和炎症因子释放的影响和机制。方法 分离培养人RA滑膜成纤维细胞，分为对照组和去甲斑蝥素组，MTT法检测细胞增殖，流式细胞术检测细胞凋亡，ELISA法检测细胞分泌白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)水平，Western blot检测Bcl-2相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、 κ B抑制蛋白激酶 α (IKK- α)、核因子- κ Bp65(NF- κ Bp65)蛋白表达。NF- κ B信号激活剂和去甲斑蝥素共同处理RA滑膜成纤维细胞，检测IL-6、IL-8水平及Bax、Bcl-2、IKK- α 、NF- κ Bp65蛋白表达。**结果** 与对照组比较，去甲斑蝥素组细胞增殖能力、IL-6和IL-8水平及Bcl-2、IKK- α 、NF- κ Bp65蛋白表达降低，细胞凋亡率、Bax蛋白表达升高。NF- κ B激活剂能逆转去甲斑蝥素对RA滑膜成纤维细胞凋亡，IL-6、IL-8水平及Bax、Bcl-2、IKK- α 、NF- κ Bp65蛋白表达的影响。**结论** 去甲斑蝥素具有促进RA滑膜成纤维细胞凋亡、抑制细胞分泌炎症因子的作用，其机制与下调NF- κ B信号通路激活水平有关。
关键词：去甲斑蝥素；类风湿关节炎(RA)；核因子- κ B信号；凋亡
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2021)11-3191-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.050

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属于慢性自身免疫性疾病，其以骨侵蚀和慢性滑膜炎为主要病理特征，临床上表现为小关节畸形、肿胀、疼痛，严重者可导致残疾^[1]。滑膜成纤维细胞是RA发生的核心细胞，其与正常的滑膜成纤维细胞比较，具有过度增殖、凋亡减少以及分泌大量的炎症因子等特点^[2]。去甲斑蝥素属于斑蝥素的衍生物，其是由呋喃和马来酸酐按照Diel-Alder加成反应而合成的，去甲斑蝥素具有明显的抗肿瘤活性，能够诱导细胞凋亡发生^[3]。研究报道显示，去甲斑蝥素治疗后的RA大鼠关节炎评分得到明显改善，去甲斑蝥素具有保护RA的功效^[4]。在肿瘤细胞的研究报道显示，去甲斑蝥素作用机制与NF- κ B有关，其可以通过下调NF- κ B信号的激活水平发挥诱导细胞凋亡的作用^[5]。NF- κ B激活后可以诱导细胞凋亡和炎症反应，NF- κ B信号在RA滑膜成纤维细胞过度激活^[6]。目前对于去甲斑蝥素对RA滑膜成纤维细胞凋亡和炎症因子释放的作用还不清楚。本次实验探讨去甲斑蝥素处理对人RA滑膜成纤维细胞凋亡和炎症因子分泌的影响和机制，为RA的治疗提供理论资料。

1 材料与方法

1.1 材料 收集2018年10月于南通大学附属医院行关节置换术、滑膜切除术RA患者的滑膜组织，患者及其家属

知情同意。去甲斑蝥素(纯度 $\geq 98\%$ ，上海伊奥生物科技有限公司)，RPMI1640溶解，现配现用。NF- κ B p65抗体(上海时代生物科技有限公司)；白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)测定试剂盒(上海康朗生物科技有限公司)； κ B抑制蛋白激酶 α (IkB kinase α , IKK- α)抗体(上海研晶生物技术有限公司)；B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)抗体(青岛捷世康生物科技有限公司)；II型胶原酶(美国Sigma公司)；Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 Associated X Protein, Bax)抗体(上海泽叶生物科技有限公司)；白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)测定试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司)。
1.2 RA滑膜成纤维细胞分离培养和分组 取滑膜组织，放在PBS中反复洗涤3次，小心将滑膜组织中的脂肪、软骨组织、骨片清除干净，用眼科剪将滑膜组织剪碎后放在培养瓶中，添加4 mg/mL II型胶原酶，置于37℃摇床中孵育振荡反应4 h，100目滤网过滤消化液，离心10 min，置于37℃培养箱中培养，观察细胞融合以后用胰蛋白酶消化传代^[7]，取第4代细胞用于后续实验。RA滑膜成纤维细胞分为对照组、去甲斑蝥素组，在细胞增殖检测过程中去甲斑蝥素组又分为4个质量浓度，分别为5、10、20、40 μ g/mL，其余实验选用20 μ g/mL。

收稿日期: 2020-03-25
基金项目: 南通市科技项目(MS12018057)
作者简介: 杨 洋(1985—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为创伤骨科及骨生物力学。Tel: 13773641251, E-mail: yo6aju1@163.com
* 通信作者: 刘佳佳(1988—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为腕关节运动力学。E-mail: juibi11@163.com

1.3 MTT 法 将 RA 滑膜成纤维细胞密度调整到 $4\times 10^5/\text{mL}$ ，取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 种植到 96 孔板上，按“1.2”项下方法分离培养和分组，置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h ，取出培养板，添加 MTT 溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ ，继续放在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 4 h ，将孔内上清弃掉，添加 $150\text{ }\mu\text{L}$ DMSO 溶液，孵育 10 min ，酶标仪检测光密度 (OD) 值。

1.4 流式细胞术 收集已经培养 24 h 后的对照组、去甲斑蝥素组细胞，胰蛋白酶消化，添加 PBS 缓冲液至细胞，离心 10 min 。加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ Binding Buffer 充分混合，移液器吸弃 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-FITC、PI 溶液至细胞，用流式细胞仪检测前添加 $100\text{ }\mu\text{L}$ Binding Buffer 混匀。

1.5 Western blot 法 收集培养 24 h 的对照组、去甲斑蝥素组细胞，PBS 洗涤 2 次，添加 RIPA 蛋白抽提试剂，细胞培养板放在冰上孵育 30 min ，将细胞裂解液转移到离心管中，在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min ，吸取蛋白上清分装至 EP 管中保存，蛋白样品在上样前与 Loading Buffer 混合煮沸 5 min ，SDS-PAGE 凝胶电泳每孔蛋白上样量为 $30\text{ }\mu\text{g}$ ，以 12% 分离胶、5% 浓缩胶进行电泳，SDS-PAGE 电泳电压设置为恒压 100 V ，取出分离胶，在 90 V 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下转膜 40 min ，取出转膜后的 NC 膜，放在含有封闭液的平皿内，在室温环境中结合反应 1 h ，然后将 NC 膜取出，以 TBST 溶液洗 3 次，放在含有一抗稀释液的平皿内，在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中结合反应过夜，TBST 洗涤，NC 膜放在含有二抗稀释液的平皿内，在室温下反应 1 h ，ECL 法显色，内参为 β -actin。根据条带的灰度值，分析目的蛋白 Bax、Bcl-2、IKK- α 、NF- κ B p65 表达量。

1.6 ELISA 法 收集培养 24 h 的对照组、去甲斑蝥素组细胞培养液上清，ELISA 法检测 IL-6、IL-8 水平，按照相关

检测试剂盒说明书进行。

1.7 NF- κ B 信号激活剂对去甲斑蝥素的影响检测 RA 滑膜成纤维细胞接种到 6 孔细胞培养板中，同时添加含有 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 去甲斑蝥素、 $1\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$ NF- κ B 信号激活剂佛波醇脂的细胞培养液培养，作为去甲斑蝥素+佛波醇脂组，以去甲斑蝥素组（按“1.2”项下方法处理）为对照，检测细胞凋亡，Bax、Bcl-2、IKK- α 、NF- κ B p65 蛋白表达及 IL-6、IL-8 水平。

1.8 统计学分析 通过用 SPSS 21.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，2 组间比较采用 t 检验，多组间比较用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

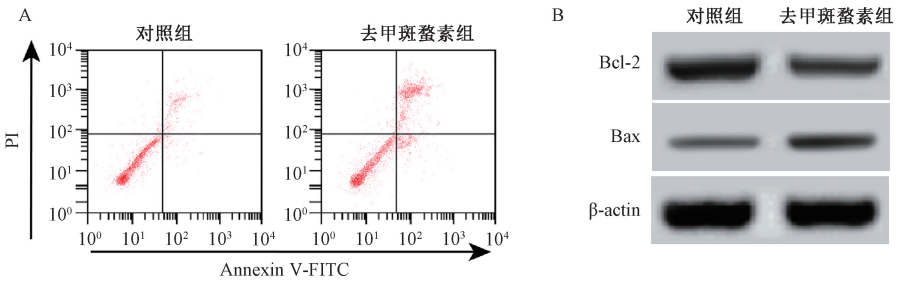
2 结果

2.1 去甲斑蝥素对 RA 滑膜成纤维细胞增殖影响 经 5、10、20、 $40\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 去甲斑蝥素处理后，RA 滑膜成纤维细胞增殖能力降低 ($P<0.01$)，在 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 下抑制率接近 50%，故后续选用该质量浓度进行实验，见表 1。

表 1 各组 RA 滑膜成纤维细胞 OD 值 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)		
组别	去甲斑蝥素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	OD 值
对照组	0	0.86 ± 0.08
去甲斑蝥素组	5	$0.68\pm 0.05^{**}$
去甲斑蝥素组	10	$0.53\pm 0.06^{**}$
去甲斑蝥素组	20	$0.40\pm 0.02^{**}$
去甲斑蝥素组	40	$0.29\pm 0.04^{**}$

注:与对照组比较, $^{**}P<0.01$ 。

2.2 去甲斑蝥素对 RA 滑膜成纤维细胞凋亡影响 去甲斑蝥素处理后，RA 滑膜成纤维细胞凋亡率升高 ($P<0.01$)，细胞 Bax 蛋白表达增加 ($P<0.01$)，Bcl-2 蛋白表达减少 ($P<0.01$)，见图 1、表 2。



注: A 为细胞凋亡, B 为 Bcl-2、Bax 蛋白表达。

图 1 各组 RA 滑膜成纤维细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达

表 2 各组 RA 滑膜成纤维细胞凋亡率及 Bcl-2、Bax 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	凋亡率/%	Bcl-2	Bax
对照组	10.23 ± 1.25	0.86 ± 0.07	0.25 ± 0.04
去甲斑蝥素组	$25.36\pm 2.14^{**}$	$0.47\pm 0.05^{**}$	$0.42\pm 0.03^{**}$

注:与对照组比较, $^{**}P<0.01$ 。

2.3 去甲斑蝥素对 RA 滑膜成纤维细胞 IL-6、IL-8 水平的影响 去甲斑蝥素处理后，RA 滑膜成纤维细胞 IL-6、IL-8 水平减少 ($P<0.01$)，见表 3。

2.4 去甲斑蝥素对 RA 滑膜成纤维细胞 NF- κ B 信号通路激活的影响 去甲斑蝥素处理后，RA 滑膜成纤维细胞 IKK-

表 3 各组 RA 滑膜成纤维细胞 IL-6、IL-8 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	IL-6/ $(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$	IL-8/ $(\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$
对照组	428.73 ± 32.07	305.64 ± 35.68
去甲斑蝥素组	$261.81\pm 20.43^{**}$	$196.45\pm 15.27^{**}$

注:与对照组比较, $^{**}P<0.01$ 。

α 、NF- κ B p65 蛋白表达下降 ($P<0.01$)，见图 2、表 4。

2.5 NF- κ B 信号激活剂对去甲斑蝥素影响 RA 滑膜成纤维细胞 IKK- α 、NF- κ B p65 蛋白表达的干预作用 与未经 NF- κ B 信号激活剂处理比较，NF- κ B 信号激活剂与去甲斑蝥素共同处理后 RA 滑膜成纤维细胞 IKK- α 、NF- κ B p65 蛋白表

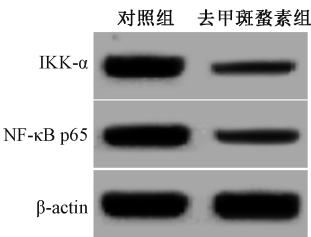


图 2 各组 RA 滑膜成纤维细胞 IKK-α、NF-κB p65 蛋白表达

表 4 各组 RA 滑膜成纤维细胞 IKK-α、NF-κB p65 蛋白 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	IKK-α	NF-κB p65
对照组	0.96±0.09	0.87±0.08
去甲斑蝥素组	0.42±0.05**	0.46±0.06**

注:与对照组比较,** $P<0.01$ 。
达升高 ($P<0.01$), 见图 3、表 5。
2.6 NF-κB 信号激活剂对去甲斑蝥素影响 RA 滑膜成纤维细胞凋亡及 IL-6、IL-8 水平的干预作用 与未经 NF-κB 信号激活剂处理比较, NF-κB 信号激活剂与去甲斑蝥素共同处理后 RA 滑膜成纤维细胞凋亡率降低 ($P<0.01$), Bax 蛋

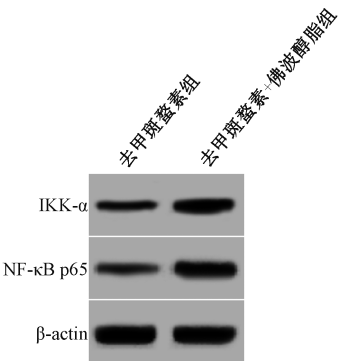
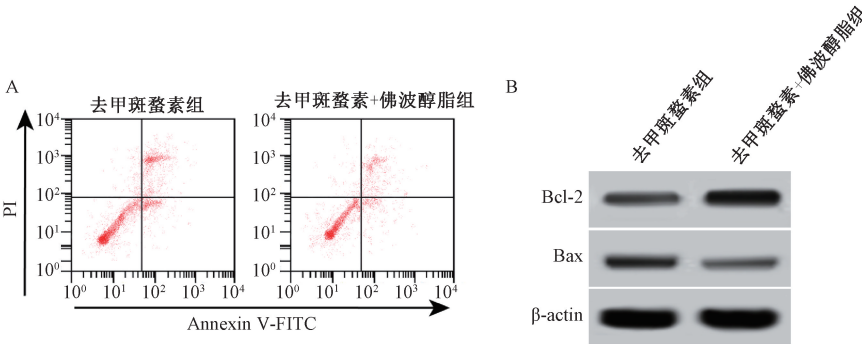


图 3 共同处理后各组 RA 滑膜成纤维细胞 IKK-α、NF-κB p65 蛋白表达

表 5 共同处理后各组 RA 滑膜成纤维细胞 IKK-α、NF-κB p65 蛋白 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	IKK-α	NF-κB p65
去甲斑蝥素组	0.43±0.04	0.40±0.07
去甲斑蝥素+佛波醇脂组	0.89±0.08**	0.82±0.06**

注:与去甲斑蝥素组比较,** $P<0.01$ 。
白表达减少 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达升高 ($P<0.01$), IL-6、IL-8 水平增加 ($P<0.01$), 见图 4、表 6。



注: A 为细胞凋亡, B 为 Bcl-2、Bax 蛋白表达。

图 4 共同处理后 RA 滑膜成纤维细胞凋亡和 Bcl-2、Bax 蛋白表达

表 6 共同处理后各组 RA 滑膜成纤维细胞凋亡率, Bcl-2、Bax 蛋白及 IL-6、IL-8 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	凋亡率/%	Bcl-2	Bax	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-8/(pg·mL ⁻¹)
去甲斑蝥素组	23.58±1.30	0.46±0.04	0.45±0.05	271.34±23.76	199.84±13.28
去甲斑蝥素+佛波醇脂组	14.62±1.26**	0.95±0.10**	0.30±0.04**	394.21±18.72**	267.41±18.34**

注:与去甲斑蝥素组比较,** $P<0.01$ 。

3 讨论

RA 是由多种因素诱发而形成的, RA 发生时, 滑膜组织中巨噬细胞、CD4⁺T 细胞以及 B 细胞浸润导致滑膜内层增生, 而滑膜成纤维细胞是滑膜内层的主要组成部分^[8]。RA 滑膜成纤维细胞过度增殖、凋亡减少, 同时能够分泌大量的炎症因子, 促进关节功能丧失和破坏^[9]。IL-6、IL-8 是常见的 RA 滑膜成纤维细胞分泌的炎症因子, 二者可以诱导组织炎症发生^[10]。Bax 和 Bcl-2 分别为促细胞凋亡和抗细胞凋亡蛋白, 其表达的高低与细胞凋亡密切相关^[11]。本实验发现, 去甲斑蝥素处理后的 RA 滑膜成纤维细胞增

殖能力下降, 细胞凋亡水平增加, 细胞分泌的 IL-6、IL-8 减少, 说明去甲斑蝥素具有诱导 RA 滑膜成纤维细胞凋亡和抑制炎症因子分泌的作用。
去甲斑蝥素是我国研发的抗肿瘤药物, 其可以诱导肿瘤细胞凋亡^[12]。另外, 去甲斑蝥素还具有改善缺血性心脏病、狼疮性肾炎、肾炎等功效^[13-15]。研究显示去甲斑蝥素具有保护 RA 的作用^[4]。本实验证实去甲斑蝥素抗 RA 机制与诱导滑膜成纤维细胞凋亡和抑制炎症因子分泌有关, 提示去甲斑蝥素具有明确的抗 RA 功效。

目前对于去甲斑蝥素在疾病治疗中的作用机制还不明

确，已知其可以通过调控下游复杂的信号通路或蛋白表达而发挥作用^[16]。去甲斑蝥素通过抑制多发性骨髓瘤、白血病等细胞 NF- κ B 信号通路发挥抗肿瘤作用^[17-18]。在超负荷肾病大鼠模型中发现去甲斑蝥素能够抑制 NF- κ Bp65 蛋白表达^[19]。NF- κ B 是一个广泛参与细胞正常生理和疾病发生过程的信号转导通路，NF- κ B 参与人类自身免疫疾病发生，与细胞凋亡、增殖和炎症反应有关^[20]。NF- κ B 在静息状态下以复合物的形式存在，而外界信号刺激后可以诱导 IKK 激活而促进 NF- κ B 同靶基因的结合，从而促进靶基因的表达^[21]。IKK- α 是 IKK 催化亚基，其表达增多是 NF- κ B 信号通路激活的启动步骤^[22]。NF- κ B p65 是 NF- κ B 的亚单位，也是 NF- κ B 发挥生物学作用的必需分子^[23]。本实验显示，去甲斑蝥素处理后的 RA 滑膜成纤维细胞 IKK- α 、NF- κ B p65 表达下降，并且 NF- κ B 信号激活剂可以逆转去甲斑蝥素对 RA 滑膜成纤维细胞凋亡促进和炎症因子分泌的抑制作用，证实去甲斑蝥素作用机制与下调 NF- κ B 信号有关。

去甲斑蝥素具有促进 RA 滑膜成纤维细胞凋亡和抑制细胞分泌炎症因子的作用，其机制与下调 NF- κ B 信号通路激活水平有关。这为研究去甲斑蝥素在 RA 中的作用提供了参考。

参考文献：

[1] Shim J, Stavre Z, Gravallese E M. Bone loss in rheumatoid arthritis; basic mechanisms and clinical implications[J]. *Calcif Tissue Int*, 2018, 102(5) : 533-546.

[2] Zimmermann-Geller B, Köppert S, Kesel N, *et al.* Interactions between rheumatoid arthritis synovial fibroblast migration and endothelial cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2019, 97 (2) : 178-189.

[3] 高 杨, 程 毅, 任明媛, 等. 去甲斑蝥素抑制黑色素瘤 M14 细胞增殖和诱导细胞凋亡的研究 [J]. 天津医药, 2018, 46(12) : 1273-1276; 1377.

[4] Shen H, Huo Z, Bai Y, *et al.* Protective effect of norcantharidin on collagen-induced arthritis rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(4) : 278-283.

[5] 刘晓燕, 李 娟, 甘 淋, 等. 去甲斑蝥素体外抑制人胰腺癌细胞株 PANC-1 增殖的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(13) : 1-4.

[6] Zhang L M, Zhou J J, Luo C L. CYLD suppression enhances the pro-inflammatory effects and hyperproliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by enhancing NF- κ B activation [J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1) : 219.

[7] McGarry T, Orr C, Wade S, *et al.* JAK/STAT blockade alters synovial bioenergetics, mitochondrial function, and proinflammatory mediators in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(12) : 1959-1970.

[8] Araki Y, Aizaki Y, Sato K, *et al.* Altered gene expression profiles of histone lysine methyltransferases and demethylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(2) : 314-316.

[9] Neumann E, Schwarz M C, Hasseli R, *et al.* Tetraspanin CD82

affects migration, attachment and invasion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77 (11) : 1619-1626.

[10] Hong H, Zeng Y, Jian W, *et al.* CDK 7 inhibition suppresses rheumatoid arthritis inflammation *via* blockage of NF- κ B activation and IL-1 β /IL-6 secretion [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2) : 1292-1301.

[11] Kumar R, Sharma A, Kumari A, *et al.* Epigallocatechin gallate suppresses premature senescence of preadipocytes by inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and induces senescent cell death by regulation of Bax/Bcl-2 pathway [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(2) : 171-189.

[12] 殷世亮, 张 弘, 贾丽娜, 等. 去甲斑蝥素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡 [J]. 沈阳医学院学报, 2019, 21(6) : 500-504.

[13] 黄亚萍, 肖惠玲, 李艳红. 去甲斑蝥素介导 NOD2/RIP2/NF- κ B 通路对新生大鼠缺血缺血性脑损伤的保护作用 [J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(17) : 1800-1804.

[14] 陈东军, 谭红印, 石 伟, 等. 去甲斑蝥素联合传统方案治疗狼疮性肾炎 50 例临床评价 [J]. 中国药业, 2018, 27(7) : 35-38.

[15] 黄云峰, 伍秋霞, 韦俏宇, 等. 去甲斑蝥素对系膜增生性肾炎大鼠干预的研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4) : 61-65.

[16] 庞长河, 薛亚轲, 董 阳, 等. 去甲斑蝥素通过丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶信号通路对胶质瘤 U87 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(6) : 1080-1082.

[17] 宋晓宁, 杜恒飞, 于路佳, 等. 去甲斑蝥素通过 NF- κ B/I κ B α 途径增强阿霉素的抗骨髓瘤效应 [J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(12) : 809-813.

[18] 姚铠涛, 陈江声, 陈春莉. 去甲斑蝥素对白血病细胞系 K562 的增殖, 凋亡, 细胞周期及 NF- κ B 活性的影响 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2015, 20(5) : 406-410.

[19] 叶 琨, 刘伏友, 李 瑛, 等. 去甲斑蝥素对蛋白超负荷肾病大鼠 CTGF 及 NF- κ Bp65 表达的影响 [J]. 中国血液净化, 2008, 7(4) : 198-202.

[20] Yamanaka K, Fujisawa T, Kusagaya H, *et al.* IL-13 regulates IL-17C expression by suppressing NF- κ B-mediated transcriptional activation in airway epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 495(1) : 1534-1540.

[21] Liu M, Xiao C, Sun M, *et al.* Xanthatin inhibits STAT3 and NF- κ B signalling by covalently binding to JAK and IKK kinases [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6) : 4301-4312.

[22] Samidurai M, Ramasamy V S, Jo J. β -amyloid inhibits hippocampal LTP through TNFR/IKK/NF- κ B pathway [J]. *Neurol Res*, 2018, 40(4) : 268-276.

[23] Singh A K, Fechtner S, Chourasia M, *et al.* Critical role of IL-1 α in IL-1 β -induced inflammatory responses; cooperation with NF- κ Bp65 in transcriptional regulation [J]. *FASEB J*, 2018, 33 (2) : 2526-2536.