

类风湿关节炎大鼠滑膜细胞凋亡基因调控的实验研究

周文旭, 谭湘淑, 余 君, 梁 熹, 魏 挺, 方 堃, 刘 江, 倪 宁

(西安交通大学医院内科, 陕西 西安 710049)

摘要:目的 观察甲氨蝶呤(MTX)对类风湿关节炎(RA)大鼠滑膜细胞凋亡及细胞凋亡调控基因的影响,探讨 MTX 的作用机制。方法 选择 SPF 级雌性健康 SD 大鼠 40 只,每只大鼠尾根部皮下多点注射 II 型胶原蛋白 0.2mg,造模后 10 d 将动物随机分为假模型组、模型组,高(30mg/kg)、中(3mg/kg)、低(0.3mg/kg)给药组,各 8 只,每组按 10 ml/kg MTX 灌胃,假模型组、模型组给予等量生理盐水灌胃,1.0 g/kg。分离培养大鼠膝关节滑膜组织,采用流式细胞术检测细胞凋亡率、WB 技术检测 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2 蛋白表达情况。结果 高、中、低剂量给药组抑制大鼠足肿胀的作用均优于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),且呈剂量依赖性;各组均能不同程度诱导 RA 滑膜细胞凋亡,高剂量给药组与模型组及假模型组比较,诱导 RA 滑膜细胞凋亡更明显($P<0.05$);高剂量给药组 Caspase-3、Caspase-9、Bax 蛋白表达量与模型组比较明显上调,Bcl-2 蛋白表达量下降($P<0.05$)。结论 MTX 诱导风湿性关节炎大鼠滑膜细胞凋亡,其机制可能与下调 Bcl-2 表达,上调 Caspase-3、Caspase-9 与 Bax 表达有关。

关键词: 关节炎, 类风湿; 甲氨蝶呤; 细胞凋亡; 滑膜; 大鼠; Bcl-2; Caspase-3

中图分类号: R593.22

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.05.021

文章编号: 1006-1959(2020)05-0071-03

Experimental Study on Regulation of Apoptosis Genes in Synovial Cells of Rats with Rheumatoid Arthritis

ZHOU Wen-xu, TAN Xiang-shu, SHE Jun, LIANG Xi, WEI Ting, FANG Kun, LIU Jiang, NI Ning

(Department of Internal Medicine, Xi'an Jiaotong University Hospital, Xi'an 710049, Shannxi, China)

Abstract: Objective To observe the effects of methotrexate (MTX) on the apoptosis of synovial cells and apoptosis-regulating genes in rats with rheumatoid arthritis (RA), and to explore the mechanism of action of MTX. Methods 40 SPF female healthy SD rats were selected. Each rat was injected subcutaneously with 0.2mg of type II collagen at the subcutaneous point. On the 10th d after modeling, the animals were randomly divided into a sham model group, a model group, a high (30 mg/kg), a medium (3 mg/kg), and a low (0.3 mg/kg) administration group. Each group consisted of 8 rats. Each group was administrated with 10 ml / kg MTX. The sham model group and model group were given the same amount of normal saline, 1.0 g/kg. The knee synovial tissue of rats was isolated and cultured, and the apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the expression of Caspase-3, Caspase-9, Bax, Bcl-2 was detected by WB technology. Results The high, medium and low dose groups were better than the model group in inhibiting the swelling of the rats' feet, the difference was statistically significant ($P<0.05$) and was dose-dependent; each group could induce RA synovial cells to varying degrees Apoptosis, compared with the model group and the pseudo-model group, the high-dose administration group induced apoptosis of RA synovial cells more significantly ($P<0.05$); the high-dose administration group expressed Caspase-3, Caspase-9, and Bax proteins with The model group was significantly up-regulated, and the expression of Bcl-2 protein decreased ($P<0.05$). Conclusion MTX induces apoptosis of synovial cells in rheumatoid arthritis rats. The mechanism may be related to down-regulating Bcl-2 expression, up-regulating Caspase-3, Caspase-9 and Bax expression.

Key words: Arthritis, rheumatoid; Methotrexate; Apoptosis; Synovial membrane; Rat; Bcl-2; Caspase-3

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种临床常见的以侵犯关节滑膜、软骨及骨为主的自身免疫病,其发病机制复杂,病变过程涉及多种细胞和细胞因子,位于关节滑膜内层的成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)在 RA 病变中异常活化,是介导关节局部炎症的关键细胞之一。研究表明,类风湿关节炎的关节软骨和骨组织损害,与滑膜细胞的过度增生活化与凋亡不足密切相关^[1]。因此,抑制炎症性滑膜组织增生及诱导滑膜组织中各种细胞凋亡是类风湿性关节炎治疗的靶点^[2,3]。甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是传统的改善病情抗风湿药(DMARDs),近 20 多年来已成为 RA 临床治疗的基

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项科研项目(编号: SK2016037)

作者简介: 周文旭(1972.4-),女,湖南祁东人,硕士,副主任医师,主要从事老年病的发病机制及临床研究

通讯作者: 倪宁(1963.5-),男,福建福州人,硕士,主任医师,主要从事心血管病发病机制的临床与基础研究

石用药(Anchor drug)^[4],但其治疗 RA 的作用机制尚不明确。本研究采用 CIA 模型,观察 MTX 对大鼠整体疗效及对滑膜组织中 Bcl-2、Bax、caspase-3、9 蛋白的表达影响,进一步探讨 MTX 治疗 RA 的作用机制,以期寻找新的抗类风湿性关节炎药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验方案已通过西安交通大学医学院动物实验伦理审查委员会审查同意,审批许可号为 XJMU2018032。SPF 级雌性健康 SD 大鼠 40 只,体重 50~100 g,体重(120±20g),鼠龄 4~5 周,中国医学科学院生物制品研究所提供。实验开始前 1 周进行适应性饲养,保持室内 22℃,自由摄食。

1.2 药品与试剂 酸可溶性 II 型胶原蛋白(C II)与弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品,MTX 片(通化茂祥制药有限公司,国药准字 H22022674,规格: 2.5 mg×100 片),Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2

和 GAPDH 抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠 IgG 购自碧云天生物技术有限公司。Trizol 购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自美国 Thermo 公司;荧光定量试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司。引物由 Invitrogen 公司合成。药物均研磨成粉末,用生理盐水制成所需浓度。

1.3 方法

1.3.1 动物造模与分组 选取清洁级 Wistar 大鼠 40 只,用 0.1 mmol/L 醋酸溶解 II 型胶原蛋白(2 mg/ml, 4℃,过夜),再与等量的弗氏完全佐剂混合,于冰浴中充分乳化,除正常组外每只大鼠尾根部皮下多点注射胶原蛋白 0.2 mg。造模后 10 d 将动物随机分为假模型组、模型组、高、中、低给药组,各 8 只。各组给药(MTX)量如下:高剂量给药组 30 mg/kg,中剂量给药组 3 mg/kg,低剂量给药组 0.3 mg/kg,按 10 ml/kg 量灌胃,1 次/d。假模型组、模型组给予等量生理盐水灌胃,1.0 g/kg,1 次/d。各组给药频次按照药物的临床用药规格,连续用药 30 d。分别于致炎后第 14、16、18、20、24、28 天用毛细管放大测量法测右后足体积,求出肿胀增长百分率=[(给药后值-给药前值)/给药前值]×100%。并分别于造模前、造模后每天观察大鼠体毛的色泽改变、神志及活动状态、局部炎症红肿及全身迟发性变态反应等,并每周测 1 次体重。

1.3.2 滑膜细胞分离培养 各组大鼠末次给药后 24 h,无菌操作取大鼠膝关节滑膜组织,剪成 1 mm³ 大小后加 4 ml 0.4 mg/ml 的 II 型胶原酶(溶于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基),于 5% CO₂ 条件下孵育 3 h,离心收集未贴壁的细胞,将细胞重悬于含有 15%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基,置 37℃、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养。实验用第 2~4 代细胞。实验时用含 15%小牛血清的 DMEM 培养液将滑膜细胞数调整至每毫升 1×10⁶ 个细胞加入 6 孔培养板内,每孔 2 ml,于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 4 h。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 取对数生长期细胞,按细胞浓度为 2×10⁵/ml,每孔接种 1 ml 于 6 孔培养板。培养 24 h 后,吸弃残余培养基,根据动物造模结果选取大鼠足肿胀抑制作用最有效的药物浓度组(3 mg/kg MTX),与未给药的模型组共 3 个组。继续培养 24 h 后吸弃上清液,PBS 洗涤 2 次,胰酶消

化收集细胞,重悬于离心管中,室温下 2000 r/min 离心 5 min。用 Loading Buffer 悬浮细胞,制备细胞悬液,向悬液中加入 5 μl AnnexinV FITC 和 10 μl 碘化丙啶(PI),混匀。室温避光孵育 5 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率,重复 3 次。

1.3.4 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2 蛋白表达测定 提取细胞总蛋白,然后取蛋白质样品 50 μg 加上样缓冲液煮沸变性后,进行 10% SDS PAGE;电转移至 PVDF 膜;用含 5%脱脂奶粉的 TBS(pH 8.0)封闭 2 h;分别加入适量 Bcl-2、Bax 鼠单抗 IgG (1:400)、Caspase-3 兔多抗 IgG(1:400),摇床上室温反应 2 h,洗膜 3 次,20 min/次;加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1:6000),室温反应 2 h;洗膜后作 ECL 化学发光,X 光显影。图像经扫描仪扫描后,用图像分析软件 Band Scan 5.0 进行吸收度积分值分析,计算目的蛋白与内参照 GAPDH 蛋白表达量的吸收度积分值之比作为目的蛋白表达量的相对含量,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法 本研究全部数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析,计数资料以($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTX 对 II 型胶原蛋白诱导大鼠足肿胀的抑制作用 与模型组比较,MTX 抑制大鼠足肿胀的作用呈剂量依赖性,模型的足肿胀度越高,MTX 的抑制作用越强,药物在致炎后 28 d 左右抑制作用达到峰值,见图 1。其中,以高剂量给药组最为明显($P < 0.01$),与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 MTX 对 RA 滑膜细胞凋亡的影响 细胞分离后培养 48 h 经 Annexin V/PI 染色,用流式细胞术检测各组凋亡细胞,结果见图 2,以右上和右下象限为凋亡细胞,统计各组凋亡细胞百分率。各组均能不同程度诱导 RA 滑膜细胞凋亡,以高剂量给药组的作用最明显。与模型组及假模型组比较,高剂量给药组明显诱导 RA 滑膜细胞凋亡($P < 0.05$)。

2.3 对大鼠关节滑膜细胞中 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 高剂量给药组的 Caspase-3、Caspase-9、Bax 蛋白表达量与模型组比较明显上调;而与模型组相比较,Bcl-2 蛋白表达量下降($P < 0.01$),见图 3。

表 1 II 型胶原蛋白诱导大鼠致炎后右后足肿胀率($\bar{x} \pm s$, %)

组别	剂量	第 14 天	第 16 天	第 18 天	第 20 天	第 24 天	第 28 天
假模型组	NT	2.39±0.20	4.59±0.50	3.09±0.30	4.59±0.20	5.49±0.70	5.69±0.20
模型组	NT	30.41±6.12	45.71±6.52	73.81±5.52	82.81±9.52	91.21±8.62	96.31±8.52
低剂量给药组	0.3 mg/kg	28.43±7.54	40.53±8.44	63.53±9.24	72.63±6.54	83.53±8.14	86.33±6.74
中剂量给药组	3 mg/kg	20.45±5.16	35.25±4.36	37.45±4.16	43.35±3.16	44.45±5.46	45.15±3.46
高剂量给药组	30 mg/kg	19.37±3.68	30.57±3.88	32.17±4.68	33.37±4.28	37.17±3.68	40.27±4.88

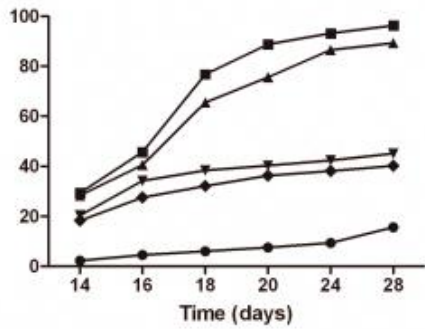


图 1 MTX 对 II 型胶原蛋白诱导大鼠足肿胀的抑制作用

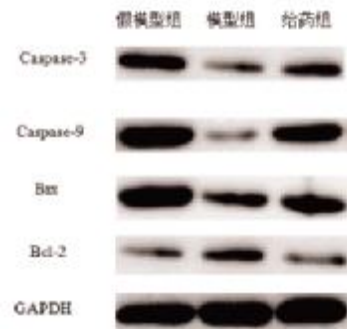


图 3 线粒体凋亡途径凋亡蛋白水平

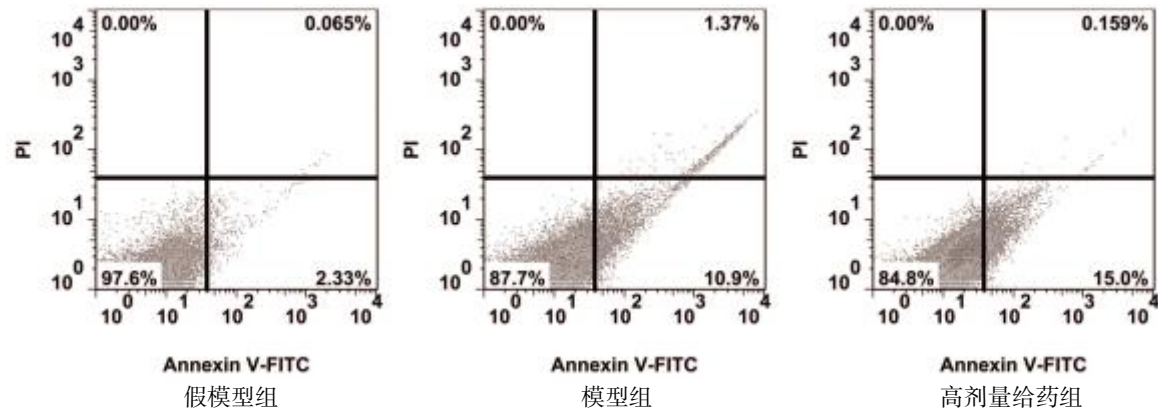


图 2 细胞分离后培养 48 h 各组细胞凋亡情况

3 讨论

RA 是一种病变累及周围关节的多系统炎症性的自身免疫病,主要表现为慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变^[1]。常因没有早期诊断和治疗,而在发病两年内即可出现不可逆的骨关节破坏,造成关节畸形以及功能丧失,最终残疾^[2]。研究表明^[3],类风湿关节炎的关节软骨和骨组织损害,与滑膜细胞的过度增生活化与凋亡不足密切相关。因此,抑制自身免疫反应的细胞增殖及促进该免疫反应的细胞凋亡,阻止关节滑膜中炎症细胞的浸润可减轻关节炎病变,是治疗关节炎的一条重要途径^[4]。

MTX 是目前公认的治疗 RA 有效的免疫抑制剂,通过对腺苷诱导的免疫抑制作用、对炎症细胞增殖和凋亡的影响及对单核细胞和淋巴细胞因子及其抑制因子的作用等,以及使滑膜组织金属蛋白酶水平降低,从而发挥抗炎及免疫抑制作用^[5-10]。有研究表明,许多 RA 患者单用 MTX 即可使炎症缓解,疾病活动性得到明显的控制,且单药治疗除了极高的卫生经济学价值外,还有相当好的安全性。另有研究对服用 MTX 的类风湿关节炎患者的长期随访研究发现患者的关节肿痛晨僵血沉及 C-反应蛋白的指标在 6 个月左右开始显著改善。本研究中 CIA 大鼠造模后关节出现明显肿胀,以后肢最为明显,在第 28 天达到了高峰。治疗后,高剂量治疗组肢体炎症的肿胀程度与模型组相比均有改善。结果表明 MTX 的应用对局部关节炎症均有明显控制作用,这与文献报道相一致^[11]。

本研究还发现给药组滑膜细胞的凋亡幅度明显上升,与模型组差异显著,进一步研究发现,模型组

型滑膜细胞凋亡基因调控的实验研究,初步证明了 MTX 对 RA 滑膜细胞较强的诱导凋亡作用。MTX 在诱导 RA 滑膜细胞凋亡的作用机制较为复杂,涉及体液、内分泌、免疫网络中的多种调节因子、多种转录、代谢调控因素,故还需从其他相关基因或蛋白表达方面做进一步研究。

参考文献:

- [1]Seca S,Kirch S,Cabrita AS,et al.Evaluation of the effect of acupuncture on hand pain,functional deficits and health-related quality of life in patients with rheumatoid arthritis-A study protocol for a multicenter,double-blind,randomized clinical trial[J].J Integr Med,2016,(3):219-227.
- [2]Derk CT.Rheumatoid arthritis: an update [J].Del Med J, 2015,77(2):59-63.
- [3]Kawai S.Current drug therapy for rheumatoid arthritis [J].J Orthop Sci,2013,8(2):259-263.
- [4]Isom?ki P,Junttila I,Vidqvist KL,et al.The activity of JAK-STAT pathways in rheumatoid arthritis: constitutive activation of STAT3 correlates with interleukin 6 levels[J].Rheumatology (Oxford),2015,54(6):1103-1113.?
- [5]Vaddi K,Luchi M.JAK inhibition for the treatment of rheumatoid arthritis: a new era in oral DMARD therapy[J].Expert Opin Investig Drugs,2012,21(7):961-973.?
- [6]李娟.艾拉莫德与甲氨蝶呤配伍治疗老年类风湿关节炎 84 例[J].陕西医学杂志,2016,45(1):120-121.
- [7]Basso DM,Beattie MS,Bresnahan JC.A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J].J Neurotrauma,1995,12(1):1-21.
- [8]S?rbulescu RF,Zupanc GK.Inhibition of caspase-3-mediated apoptosis improves spinal cord repair in a regeneration-competent vertebrate system[J].Neuroscience,2010,171(2):599-612.?