

· 基础研究 ·

闹羊花毒素Ⅲ通过调控 Wnt1/Dvl1/ β -catenin 通路影响成纤维样滑膜细胞增殖凋亡的实验研究

刘笑蓉 刘湘丹 王 智 曾 娟 周日宝

摘要 目的 探讨闹羊花毒素Ⅲ对类风湿关节炎(RA)的治疗作用及其机制。方法 采用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导RA成纤维样滑膜细胞(RA-FLS细胞)作为RA的细胞模型。以雷公藤多苷作为阳性对照药物,过表达蓬乱蛋白1(Dvl1)后加入闹羊花毒素Ⅲ研究其作用机制。细胞增殖毒性检测法(CCK-8法)检测细胞活力,蛋白质免疫印迹(Western Blot)检测B淋巴细胞瘤-2蛋白(Bcl2)、Bcl2相关X蛋白(Bax)、无翅型MMTV整合位点家族成员1(Wnt1)、Dvl1、 β -连环蛋白(β -catenin)的表达量,实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测Wnt1、Dvl1、 β -catenin mRNA水平,酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞上清中IL-6、IL-8、IL-10、IL-4、CC趋化因子配体2(CCL2)、CC趋化因子配体5(CCL5)的含量。结果 RA细胞模型构建成功,随着闹羊花毒素Ⅲ浓度的增加,RA-FLS细胞增殖减缓($P<0.05$),凋亡增加($P<0.01$);闹羊花毒素Ⅲ与雷公藤多苷降低了RA-FLS细胞中IL-6、IL-8、CCL2、CCL5并且增加了IL-10、IL-4的含量($P<0.05$);降低了Wnt1、 β -catenin、Dvl1蛋白与mRNA的表达量($P<0.01$)。闹羊花毒素Ⅲ可以逆转由过表达Dvl1所造成的RA-FLS细胞增殖的增加($P<0.05$)、促炎因子(IL-6、IL-8)与趋化因子(CCL2、CCL5)的增加($P<0.05$),并逆转Wnt通路中Wnt1、Dvl1、 β -catenin蛋白与mRNA表达的增加($P<0.01$)。结论 闹羊花毒素Ⅲ通过调控Wnt1/Dvl1/ β -catenin通路影响TNF- α 诱导的RA-FLS细胞增殖凋亡及炎症因子等的变化,可能通过这种机制治疗RA。

关键词 类风湿关节炎;闹羊花毒素Ⅲ;蓬乱蛋白1;无翅型MMTV整合位点家族成员1; β -连环蛋白

Rhodojaponin Ⅲ Affected Fibroblast-like Synovial Cell Proliferation and Apoptosis by Regulating Wnt1/Dvl1/ β -catenin Pathway: an Experimental Research LIU Xiao-rong, LIU Xiang-dan, WANG Zhi, ZENG Juan, and ZHOU Ri-bao College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208

ABSTRACT Objective To observe the therapeutic effect and mechanism of rhodojaponin Ⅲ on rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The cell model of RA was induced by treating rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA-FLS) cells with tumor necrosis factor- α (TNF- α). Tripterygium polyglycosides were used as the positive control. Rhodojaponin Ⅲ was added after the overexpression of Dishevelled 1 (Dvl1) to study the mechanism. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was performed to detect cell vitality. Western Blot was used to detect the expressions of B-Cell CLL/lymphoma 2 (Bcl2), BCL2-associated X protein (Bax), wingless-type MMTV integration site family member 1 (Wnt1), Dishevelled 1 (Dvl1), and beta catenin (β -catenin). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain (RT-qPCR) was conducted to test the expressions of Wnt1, Dvl1, and β -catenin mRNA. ELISA was used to analyze the concentrations of interleukin 6 (IL-6), IL-8, IL-10,

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(No.19C1384);湖南省中医药管理局科研计划项目(No.2021161);湖南中医药大学中药学一级学科开放基金项目(No.2020ZYX01);湖南中医药大学青苗计划(No.校行人字[2017]25);湖南省一流学科中药学(No.校行科字[2018]3);2020年湖南省一流本科专业建设点(No.湘教通[2020]248号);2020年国家级一流本科专业建设点(No.教高厅函[2021]7号)

作者单位:湖南中医药大学药学院(长沙 410208)

通讯作者:刘笑蓉, Tel: 0731-88458233, E-mail: smile20211106@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220617.145

and IL-4, C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), and C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5). **Results** The cell model of RA was successfully established. With the increase of rhodajaponin III, RA-FLS cell vitality decreased ($P<0.05$), and cell apoptosis increased ($P<0.01$). Both Rhodajaponin III and tripterygium polyglycosides down-regulated IL-6, IL-8, CCL2, and CCL5 concentrations ($P<0.05$), up-regulated IL-10 and IL-4 contents ($P<0.05$), and down-regulated the expressions of Wnt1, β -catenin and Dvl1 ($P<0.01$). Rhodajaponin III reversed increased Dvl1 induced RA-FLS proliferation ($P<0.05$), increased proinflammatory factors IL-6 and IL-8 ($P<0.05$) and chemokines CCL2 and CCL5 ($P<0.05$), and reversed increased expressions of Wnt1, Dvl1, and β -catenin in RA-FLS ($P<0.01$). **Conclusion** Rhodajaponin III had an effect on proliferation, apoptosis, and inflammatory factors in TNF- α -induced RA-FLS cells by regulating the Wnt1/Dvl1/ β -catenin pathway, and might alleviated RA by this mechanism.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; Rhodajaponin III; Dishevelled 1; wingless-type MMTV integration site family member 1; beta catenin

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性炎症性自身免疫性疾病, 受遗传、表观遗传和环境等因素的影响^[1]。RA 的发病率约为 0.5%, 与年龄无关, 女性更易罹患此病, 其病理机制为内皮细胞被激活, 然后滑膜与关节中的免疫细胞发生浸润, 形成血管翳, 后期导致骨侵蚀和骨降解^[2]。RA 患者常伴有心血管疾病等并发症, 导致患者病死率增加^[3]。除了关节, RA 对身体的影响还体现在其他部位, 比如肺部损伤、口腔干燥、角膜结膜发炎等^[4]。

RA 发病机制可能与滑膜细胞的异常激活有关, 在 RA 中滑膜会增生, 组成滑膜的成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 响应促炎因子, 分泌 CC 趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2)、CC 趋化因子配体 5 (C-C motif chemokine ligand 5, CCL5) 等趋化因子募集单核细胞和巨噬细胞^[5]。RA 中活化的滑膜和巨噬细胞进一步扩张变成血管翳, 侵入骨骼破坏软骨^[6]。活化的 RA 成纤维样滑膜细胞 (rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes, RA-FLS) 会产生大量的核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 受体活化因子配体, 把巨噬细胞诱导为破骨细胞。此外, RA-FLS 还会直接分泌一些蛋白酶, 对关节造成破坏^[7]。

闹羊花毒素 III (rhodajaponin III), 是一种天然的、非鸦片类的镇痛剂^[8], 是中草药羊躑躅 (*Rhododendron molle* G.) 的重要组成部分之一^[9]。已有研究表明, 闹羊花毒素 III 等二萜类化合物可以有效治疗大鼠的关节炎症状^[10], 并且闹羊花毒素 III 是羊躑躅 95% 乙醇提取部位中含量最高的二萜类化合物^[11], 可以抑制 T、B 淋巴细胞的异常增殖, 降低促炎因子的表达^[10]。但并未对闹羊花毒素 III 治疗 RA 的机制进行深入探讨。本研究旨在阐明闹羊花毒素 III 通过调控

无翅型 MMTV 整合位点家族成员 1 (wingless-type MMTV integration site family member 1, Wnt1) / 蓬乱蛋白 1 (Dishevelled 1, Dvl1) / β -连环蛋白 (beta catenin, β -catenin) 通路治疗 RA 的作用机制。

材料与方法

1 细胞 人 RA-FLS 细胞购自长沙艾碧维生物科技有限公司, 货号: AW-CCH087, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 在 37℃ 和含 5%CO₂ 的培养箱中培养。培养液中加入 1% 青霉素-链霉素溶液以防止杂菌污染。当细胞汇合度为 80% 时, 用胰酶处理传代培养, 或用于后续实验。

2 药物 闹羊花毒素 III (货号: B20895) 购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 货号: P1001) 购自美国 ApexBio; 雷公藤多苷片购自贵州汉方药业有限公司, 生产批号: 2003006; 其中每片含雷公藤多苷 10 mg。TNF- α 与雷公藤多苷片在处理 RA-FLS 细胞之前分别溶于无血清的 DMEM 高糖培养液中定容至 1 mg/mL (闹羊花毒素 III 则使用 DMSO 作为溶剂), 并经 0.22 μ m 微孔滤器除菌作为母液备用。Dvl1 的过表达载体质粒及其对照空白质粒从 Abiowell 公司定制。

3 主要试剂及仪器 胎牛血清 (货号: 10099141)、Lipofectamine 2000 转染试剂 (货号: 11668019)、Trizol 试剂 (货号: 15596026) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; DMEM 高糖培养液 (货号: D5796)、0.22 μ m 微孔滤器 (货号: SLGPR33RB) 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 青霉素-链霉素溶液 (货号: C0222)、胰酶消化液 (货号: C0201)、10% SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (货号: P0690) 购自上海碧云天生物技术有限公司; IL-6 (货

号: CSB-E04638h)、IL-8 (货号: CSB-E04641h)、IL-10 (货号: CSB-E04593h)、IL-4 (货号: CSB-E04633h)、CCL2 (货号: CSB-E04655h)、CCL5 (货号: CSB-E17375h) 的酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司; 反转录试剂盒 (货号: CW2569) 和荧光定量 PCR 试剂盒 (货号: CW2601) 购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司; Bax 抗体 (货号: ab32503)、Wnt1 抗体 (货号: ab63934)、 β -catenin 抗体 (货号: ab68183) 购自英国 Abcam 公司, Bcl2 抗体 (货号: 60178-1-Ig)、Dvl1 抗体 (货号: 67672-1-Ig)、 β -actin 抗体 (货号: 66009-1-Ig) 购自武汉三鹰生物 (Proteintech) 技术有限公司; 二抗 (羊抗兔) 抗体 (货号: AWS0002b)、二抗 (羊抗鼠) 抗体 (货号: AWS0001b) 和细胞增殖毒性检测试剂 (cell counting kit-8, CCK-8, 货号: AWC0119c) 购自长沙艾碧维生物 (Abiowell) 科技有限公司。实时荧光定量 PCR 仪 (型号: QuantStudio1, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司); 多功能酶标分析仪 (型号: MB-530, 深圳市汇松科技发展有限公司); 化学发光成像系统 (型号: Chemiscope6100, 上海勤翔科学仪器有限公司)。

4 细胞分组及处理方法

4.1 闹羊花毒素 III 影响 RA-FLS 细胞的效果实验 将 RA-FLS 细胞分为 6 组: 对照组、模型组、雷公藤多苷组、闹羊花毒素 III 低、中、高浓度组。除对照组不做处理外, 其余各组按照 Kong L 等^[12-14]的研究, 用 10 ng/mL 浓度的 TNF- α 处理 RA-FLS 细胞作为 RA 的细胞模型。雷公藤多苷组的细胞用 30 μ g/mL 的雷公藤多苷处理^[15]作为阳性对照。参照文献 [11, 16] 向闹羊花毒素 III 低、中、高浓度组中分别加入 9、18、36 μ g/mL 的闹羊花毒素 III。通过分析 RA-FLS 细胞的增殖和凋亡情况, 36 μ g/mL 被选作闹羊花毒素 III 最适浓度组进行后续实验。

4.2 闹羊花毒素 III 影响 RA-FLS 细胞的作用机制研究 将 RA-FLS 细胞分为 4 组: 模型组、空载体组、过表达组、联合处理组。模型组使用 10 ng/mL TNF- α 处理, 空载体组在模型组的基础上转染空白质粒, 而过表达组则是在模型组的基础上转染 Dvl1 的过表达质粒。联合处理组是在过表达组的基础上, 在转染质粒的同时加入 36 μ g/mL 的闹羊花毒素 III。需要转染的 RA-FLS 细胞以 1.5×10^4 个/孔的密度接种到 6 孔板中。按说明书的比例和用量把 Lipofectamine 2000 转染试剂与质粒加入到离心管中

并混匀。接着, 混合液被加入 6 孔板中, 用无血清的 DMEM 高糖培养液定容至 2 mL。4 h 后换成普通的培养液。

5 观察项目及检测方法

5.1 CCK-8 检测 RA-FLS 细胞增殖 将 RA-FLS 细胞按 5×10^3 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L。按对应的分组处理 24、48 h 后, 换成含 10% 浓度 CCK8 试剂的完全培养液, 继续孵育 4 h。用酶标仪测定 450 nm 处的光密度值 (optical density, OD)。OD 值越高即表示细胞数量越多, 反映细胞的增殖能力越强。

5.2 Western Blot 检测 Bcl2、Bax 的蛋白质含量 以反映 RA-FLS 细胞的凋亡情况; 检测 Wnt 通路中 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 蛋白质含量探究闹羊花毒素 III 作用机制。各组样本处理 24 h 后, 用 RIPA 细胞裂解液并收集细胞。BCA 试剂盒用于测定蛋白质浓度。向上述裂解液中加入蛋白上样缓冲液, 隔水煮沸后超声处理, 使蛋白变性。SDS-PAGE 电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜, 常温封闭 2 h, 分别加入 Bcl2 (1:500)、Bax (1:2 000)、Wnt1 (1:500)、Dvl1 (1:5 000)、 β -catenin (1:1 000)、 β -actin (1:5 000) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBST 漂洗 3 次后按上述一抗的种属特异性加入有 HRP 标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗 (1:5 000) 常温孵育 1 h 再用 PBST 漂洗 3 次。硝酸纤维素膜加入 ECL 化学发光液共同孵育 1 min 后, 放入化学发光成像系统拍摄条带。用 BandScan 5.0 软件进行灰度值分析。

5.3 ELISA 检测促炎因子 (IL-6、IL-8)、抗炎因子 (IL-10、IL-4) 及趋化因子 (CCL2、CCL5) 表达 各组样本处理 24 h 后, 收集 RA-FLS 细胞上清, 采用 ELISA 检测, 按相应试剂盒的说明书操作, 使用酶标仪分别测定 450 nm 处的 OD 值, 根据标准曲线计算各成分浓度。

5.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain, RT-qPCR) 检测 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 mRNA 水平 各组样本处理 24 h 后, 用 Trizol 提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 仪用于检测 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 mRNA 水平, 以 β -actin 作为内参, 使用的引物如表 1 所示。上述反应中试剂的用量和 PCR 循环条件遵照相应的试剂盒说明书。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。

6 统计学方法 使用 GraphPad 8.0.2 软件进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。服从正态分

布的多组间数据比较采用单因素方差分析, 再进行 *Tukey's* 检验。不同时间点的各组间数据比较, 采用双因素方差分析, 再采用 *Bonferroni* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度 (bp)
Wnt1	F: 5'-CAAGATCGTCAACCGAGGCT-3' R: 5'-TCACACGTGCAGGATTCGAT-3'	120
β -catenin	F: 5'-ATTCTTGGCTATTACGACAGACT-3' R: 5'-AGCAGACAGATAGCACCTT-3'	176
Dvl1	F: 5'-TGCTACTACGTCTTCGGGGA-3' R: 5'-TTGCTCCCTTCACTCTGCTG-3'	245
β -actin	F: 5'-ACCCTGAAGTACCCCATCGAG-3' R: 5'-AGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'	224

注: F: 上游引物; R: 下游引物

结 果

1 各组 TNF- α 刺激的 RA-FLS 细胞增殖及凋亡蛋白 Bcl2、Bax 表达水平比较 (表 2、3, 图 1) 模型组 RA-FLS 细胞比对照组增殖显著加快 ($P<0.01$), 雷公藤多苷组和不同浓度闹羊花毒素 III 组中 RA-FLS 细胞 48 h 的增殖较模型组有所减慢 ($P<0.01$)。随着闹羊花毒素 III 浓度增加, RA-FLS 细胞的增殖能力降低。与对照组比较, 模型组 RA-FLS 细胞的 Bcl2 蛋白明显增多 ($P<0.01$), Bax 蛋白的表达显著减少 ($P<0.01$), 即凋亡增加。雷公藤多苷组或不同浓度闹羊花毒素 III 组凋亡减少 ($P<0.01$), 且呈闹羊花毒

表 2 各组 TNF- α 刺激的 RA-FLS 细胞 24、48 h 后细胞增殖水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

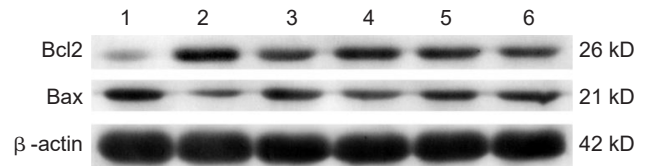
组别	n	OD 值	
		24 h	48 h
对照	4	0.61 $\pm$ 0.09	1.10 $\pm$ 0.06
模型	4	0.79 $\pm$ 0.09*	1.50 $\pm$ 0.07*
雷公藤多苷	4	0.64 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$	1.18 $\pm$ 0.05 $^{\Delta\Delta}$
闹羊花毒素 III 低浓度	4	0.71 $\pm$ 0.04	1.41 $\pm$ 0.05
闹羊花毒素 III 中浓度	4	0.68 $\pm$ 0.05	1.33 $\pm$ 0.08 $^{\Delta\Delta}$
闹羊花毒素 III 高浓度	4	0.67 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.07 $^{\Delta\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$

表 3 各组 RA-FLS 细胞中 Bcl2、Bax 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl2	Bax
对照	4	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.04
模型	4	4.09 $\pm$ 0.15*	0.36 $\pm$ 0.01*
雷公藤多苷	4	1.96 $\pm$ 0.07 $^{\Delta}$	0.82 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$
闹羊花毒素 III 低浓度	4	3.49 $\pm$ 0.22 $^{\Delta}$	0.57 $\pm$ 0.05 $^{\Delta}$
闹羊花毒素 III 中浓度	4	2.93 $\pm$ 0.16 $^{\Delta}$	0.75 $\pm$ 0.03 $^{\Delta}$
闹羊花毒素 III 高浓度	4	2.27 $\pm$ 0.11 $^{\Delta}$	0.85 $\pm$ 0.02 $^{\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.01$



注: 1 为对照组; 2 为模型组; 3 为雷公藤多苷组; 4 为闹羊花毒素 III 低浓度组; 5 为闹羊花毒素 III 中浓度组; 6 为闹羊花毒素 III 高浓度组

图 1 各组 RA-FLS 细胞中 Bcl2、Bax 蛋白表达电泳图

素 III 浓度依赖性。

2 各组 TNF- α 刺激的 RA-FLS 细胞上清中细胞因子的表达比较 (表 4) 与对照组比较, 模型组 RA-FLS 细胞上清中 IL-6、IL-8、CCL2、CCL5 含量增加 ($P<0.01$), IL-10、IL-4 含量减少 ($P<0.01$)。加入闹羊花毒素 III 或雷公藤多苷处理后, IL-8 含量减少 ($P<0.05$), IL-10、IL-4 增加 ($P<0.05$), CCL2、CCL5 减少 ($P<0.01$)。加入闹羊花毒素 III 后 IL-6 含量有所降低, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 各组 RA-FLS 细胞中 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 mRNA 及蛋白表达比较 (表 5、6, 图 2) 与对照组比较, 模型组 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 mRNA 及蛋白的表达量均显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较, 加入闹羊花毒素 III 或雷公藤多苷处理能够下调 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 mRNA 及蛋白的表达量 ($P<0.01$); 与雷公藤多苷组比较, 闹羊花毒素 III 组 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 蛋白及 mRNA 表达量均升高 ($P<0.01$)。

4 各组 RA-FLS 细胞的增殖凋亡、Dv1 蛋白表达及炎症因子水平比较 (表 7-9, 图 3) 与模型组比较, 空载体组 Dvl1 的表达差异无统计学意义

表 4 各组 RA-FLS 细胞上清中 IL-6、IL-8、IL-10、IL-4、CCL2、CCL5 水平比较 (pg/mL , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6	IL-8	IL-10	IL-4	CCL2	CCL5
对照	4	80.72 $\pm$ 5.10	23.64 $\pm$ 3.36	47.78 $\pm$ 6.96	14.26 $\pm$ 2.80	32.71 $\pm$ 3.94	52.24 $\pm$ 5.04
模型	4	129.14 $\pm$ 9.13*	44.39 $\pm$ 5.03*	14.44 $\pm$ 2.35*	3.67 $\pm$ 0.62*	55.43 $\pm$ 3.79*	103.59 $\pm$ 8.57*
雷公藤多苷	4	99.28 $\pm$ 10.01 $^{\Delta}$	28.42 $\pm$ 3.45 $^{\Delta\Delta}$	33.40 $\pm$ 5.21 $^{\Delta\Delta}$	9.67 $\pm$ 1.83 $^{\Delta}$	39.22 $\pm$ 2.49 $^{\Delta\Delta}$	63.56 $\pm$ 6.06 $^{\Delta\Delta}$
闹羊花毒素 III	4	122.81 $\pm$ 9.13 $^{\Delta}$	35.37 $\pm$ 4.35 $^{\Delta}$	25.87 $\pm$ 4.97 $^{\Delta}$	7.95 $\pm$ 1.21 $^{\Delta}$	45.23 $\pm$ 3.26 $^{\Delta\Delta}$	76.44 $\pm$ 8.48 $^{\Delta\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$; 与雷公藤多苷组比较, $^{\Delta}P<0.05$

表 5 各组 RA-FLS 细胞中 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 mRNA

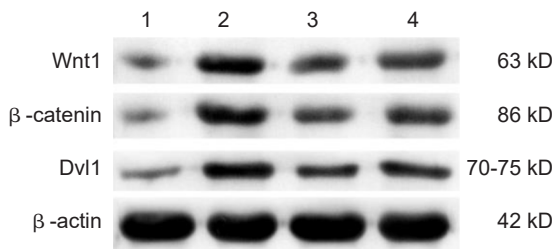
表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	Wnt1	β -catenin	Dvl1
对照	3	0.99 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.02
模型	3	4.10 $\pm$ 0.24*	4.58 $\pm$ 0.20*	3.13 $\pm$ 0.28*
雷公藤多苷	3	1.60 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$	1.85 $\pm$ 0.15 $^{\Delta}$	1.37 $\pm$ 0.17 $^{\Delta}$
闹羊花毒素 III	3	2.38 $\pm$ 0.30 $^{\Delta\Delta}$	2.61 $\pm$ 0.28 $^{\Delta\Delta}$	2.07 $\pm$ 0.08 $^{\Delta\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.01$; 与雷公藤多苷组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

表 6 各组 RA-FLS 细胞中 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 蛋白

表达比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	Wnt1	β -catenin	Dvl1
对照	3	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.07
模型	3	3.11 $\pm$ 0.16*	3.88 $\pm$ 0.23*	3.16 $\pm$ 0.14*
雷公藤多苷	3	1.62 $\pm$ 0.10 $^{\Delta}$	1.95 $\pm$ 0.18 $^{\Delta}$	1.71 $\pm$ 0.10 $^{\Delta}$
闹羊花毒素 III	3	2.13 $\pm$ 0.04 $^{\Delta\Delta}$	2.57 $\pm$ 0.07 $^{\Delta\Delta}$	2.16 $\pm$ 0.04 $^{\Delta\Delta}$

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.01$; 与雷公藤多苷组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$



注: 1 为对照组; 2 为模型组; 3 为雷公藤多苷组; 4 为闹羊花毒素 III 组

图 2 各组 RA-FLS 细胞中 Wnt1、 β -catenin、Dvl1 蛋白表达电泳图 ($P > 0.05$), 而过表达组中 Dvl1 的表达量比空载体组显著增加 ($P < 0.01$), Dvl1 在 RA-FLS 细胞中过表达成功。联合处理组 Dvl1 表达量比过表达组显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 空载体组 RA-FLS 细胞的增殖能力和各种细胞因子的含量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 而与空载体组比较, 过表达组的 RA-FLS 细胞增殖能力及 IL-6、IL-8、CCL2、CCL5 表达显著增加 ($P < 0.01$), IL-10 含量降低 ($P < 0.05$), IL-4 只是比空载体组稍有降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。联合处理组 RA-FLS 细胞 48 h 的增殖能力比过表达组低 ($P < 0.01$), IL-6、CCL5、IL-8、CCL2 的表达显著降低 ($P < 0.05$), 抗炎因子 IL-4、

表 7 各组 RA-FLS 细胞中 Dvl1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

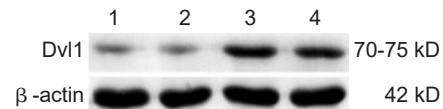
组别	<i>n</i>	Dvl1
模型	3	1.00 $\pm$ 0.08
空载体	3	1.04 $\pm$ 0.05
过表达	3	2.73 $\pm$ 0.05*
联合处理	3	2.33 $\pm$ 0.08 $^{\Delta}$

注: 与空载体组比较, * $P < 0.01$; 与过表达组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

表 8 各组 RA-FLS 细胞 24、48 h 后细胞增殖

水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	OD 值	
		24 h	48 h
模型	4	0.78 $\pm$ 0.08	1.44 $\pm$ 0.05
空载体	4	0.78 $\pm$ 0.08	1.46 $\pm$ 0.09
过表达	4	0.98 $\pm$ 0.09*	1.86 $\pm$ 0.05*
联合处理	4	0.88 $\pm$ 0.06	1.63 $\pm$ 0.10 $^{\Delta}$

注: 与空载体组比较, * $P < 0.01$; 与过表达组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

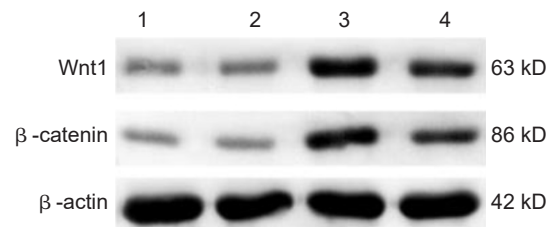


注: 1 为模型组; 2 为空载体组; 3 为过表达组; 4 为联合处理组

图 3 各组 RA-FLS 细胞中 Dvl1 蛋白表达电泳图

IL-10 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

5 各组 RA-FLS 细胞中 Wnt1、 β -catenin mRNA 及蛋白表达水平比较 (表 10、11, 图 4) 与模型组比较, 空载体组 Wnt1、 β -catenin 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而过表达组比空载体组 Wnt1、 β -catenin 明显增加 ($P < 0.01$), 联合处理组 Wnt1、 β -catenin 的表达比过表达组明显降低 ($P < 0.01$)。



注: 1 为模型组; 2 为空载体组; 3 为过表达组; 4 为联合处理组

图 4 各组 RA-FLS 细胞中 Wnt1、 β -catenin 蛋白表达电泳图表 9 各组 RA-FLS 细胞上清中 IL-6、IL-8、IL-10、IL-4、CCL2、CCL5 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-6	IL-8	IL-10	IL-4	CCL2	CCL5
模型	4	126.85 $\pm$ 9.25	48.55 $\pm$ 4.95	16.83 $\pm$ 3.44	3.26 $\pm$ 0.67	55.52 $\pm$ 6.81	105.39 $\pm$ 8.87
空载体	4	128.33 $\pm$ 6.43	47.71 $\pm$ 4.54	16.46 $\pm$ 3.75	3.27 $\pm$ 0.64	58.36 $\pm$ 4.37	104.25 $\pm$ 10.54
过表达	4	175.27 $\pm$ 8.88**	67.57 $\pm$ 5.19**	9.79 $\pm$ 1.78*	2.23 $\pm$ 0.40	74.28 $\pm$ 2.79**	155.36 $\pm$ 7.40**
联合处理	4	148.41 $\pm$ 10.18 $^{\Delta\Delta}$	54.75 $\pm$ 4.66 $^{\Delta}$	11.09 $\pm$ 1.36	2.94 $\pm$ 0.31	64.02 $\pm$ 1.72 $^{\Delta}$	123.79 $\pm$ 9.15 $^{\Delta\Delta}$

注: 与空载体组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与过表达组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

表 10 各组 RA-FLS 细胞中 Wnt1、 β -catenin mRNA

表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	Wnt1	β -catenin
模型	4	1.01 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.06
空载体	4	0.94 $\pm$ 0.21	0.94 $\pm$ 0.12
过表达	4	2.93 $\pm$ 0.23*	3.03 $\pm$ 0.12*
联合处理	4	2.08 $\pm$ 0.13 $^{\Delta}$	1.98 $\pm$ 0.11 $^{\Delta}$

注:与空载体组比较,* $P < 0.01$;与过表达组比较, $^{\Delta} P < 0.01$

表 11 各组 RA-FLS 细胞中 Wnt1、 β -catenin 蛋白

表达比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	Wnt1	β -catenin
模型	3	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.09
空载体	3	1.31 $\pm$ 0.08	1.25 $\pm$ 0.06
过表达	3	4.15 $\pm$ 0.28*	3.28 $\pm$ 0.25*
联合处理	3	2.82 $\pm$ 0.25 $^{\Delta}$	2.49 $\pm$ 0.15 $^{\Delta}$

注:与空载体组比较,* $P < 0.01$;与过表达组比较, $^{\Delta} P < 0.01$

讨 论

临床常用雷公藤多苷和甲氨蝶呤等药物治疗 RA^[17]。甲氨蝶呤可以通过诱导 T 细胞增殖的减少和细胞凋亡等多种机制治疗 RA,但需要患者每日服用维生素 B9 来缓解不良反应^[18],雷公藤多苷可以通过调节免疫细胞平衡、抗炎、抗血管生成、调节软骨和滑膜等机制治疗 RA,但可能出现生殖毒性、肝肾毒性、血液毒性等不良反应^[19]。笔者探讨了闹羊花毒素Ⅲ对 TNF- α 处理 RA-FLS 细胞的影响及其机制,为其以后单独或者与其他药物联合闹羊花毒素Ⅲ治疗 RA 提供了理论依据。

临床上羊躑躅曾被中医用于治疗 RA^[20, 21]。但作为中药材,无法保证其品质的稳定,即使同一成分,不同部位、批次羊躑躅中闹羊花毒素Ⅲ等有效成分的含量也不尽相同^[22],而且作为有毒中药,羊躑躅成分复杂,用药剂量不当很容易造成患者中毒^[23],近几年在临床中使用和研究的报道越来越少。因此从相对容易定量的闹羊花毒素Ⅲ入手对羊躑躅进行研究,可以避免对这种有毒中草药资源的浪费。况且目前人们已经可以实现闹羊花毒素Ⅲ的从头合成^[8],因此这种药物后续一定会有更广阔的应用前景。本研究为人们了解闹羊花毒素Ⅲ或者羊躑躅如何治疗 RA 的机制提供了一个新的方向。

RA 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 等炎症因子可以激活破骨细胞、延长破骨细胞寿命并促进骨吸收^[24]。而趋化因子在各种生理病理过程中调节免疫细胞的迁移。在 RA 患者中,CCL2 水平升高。CCL2 可以激活 Th17 细胞,而 Th17 细胞会进一步

分泌趋化因子募集其他免疫细胞,如此恶性循环,造成免疫细胞在关节的浸润增加^[25]。此次实验发现闹羊花毒素Ⅲ可以减轻 TNF- α 所引起的 RA-FLS 细胞炎症(减少 IL-8、CCL2、CCL5 的产生,并增加 IL-10、IL-4),因此这种药物或许可以通过改变细胞因子的分泌水平以调节其他细胞,比如降低破骨细胞的活性、减少免疫细胞浸润,从而治疗 RA。

成纤维样滑膜细胞的凋亡是治疗 RA 的重要机制之一^[26],在滑膜细胞中抑制 Wnt 通路促进凋亡^[27]。在本研究中,闹羊花毒素Ⅲ可以抑制 Wnt1、Dvl1、 β -catenin 的表达($P < 0.01$),同时也使 RA-FLS 细胞的凋亡程度增加($P < 0.01$),说明闹羊花毒素Ⅲ可能通过调节滑膜细胞的凋亡来治疗 RA。

Wnt 信号通路是最主要的细胞信号转导通路之一,在发育、癌症和进化等各种生命过程中起到重要作用,与细胞的再生能力密切相关。Wnt 通路的激活主要分为经典和非经典两种途径^[28]。 β -catenin 信号级联放大是 Wnt 通路的经典途径。 β -catenin 是 Wnt 通路的关键开关,它的失调与慢性炎症、纤维化以及癌症有关^[29]。当细胞外没有 Wnt 信号时, β -catenin 会被磷酸化并诱导胞内其他 β -catenin 的降解,保持总量处于一个低的水平;而 Wnt 存在时,Wnt 信号会由 Dvl 介导,阻断 β -catenin 的泛素化与磷酸化。随后,去磷酸化的 β -catenin 入核与转录因子结合,使下游靶蛋白的转录开启^[30]。而非经典途径虽然不涉及 β -catenin,但仍需要 Dvl。Wnt 通过将 Dvl 磷酸化,调节下游 Ca^{2+} 等一系列信号实现 Wnt 的靶基因表达^[24]。Wnt 蛋白家族有许多不同的亚型,其中的 Wnt1 主要在滑膜细胞中表达^[31],且 Wnt1 介导的 Wnt/ β -catenin 信号传导在 RA-FLS 中具有组成性活性^[32]。激活大鼠滑膜中的 Wnt/ β -catenin 信号通路,比如使用激活剂氯化锂,可使 Wnt1 和 β -catenin 增多,进而导致凋亡减少,炎症增加^[33, 34]。小分子药物乙酰唑胺^[33]、小檗碱^[35],沉默长非编码 RNA HOTAIR^[34],过表达小 RNA miR-145-5p^[36]等均通过 Wnt1/Dvl1/ β -catenin 这一信号通路对关节炎起治疗作用。本研究中,RA-FLS 细胞中过表达 Dvl1,发现 RA-FLS 细胞增殖能力、促炎因子、趋化因子增加,而在此基础上加入闹羊花毒素Ⅲ不仅可以逆转这些效应,还分别从转录和翻译水平减少了 Wnt1/Dvl1/ β -catenin 的表达,从而证实了闹羊花毒素Ⅲ也是通过 Wnt1/Dvl1/ β -catenin 这个通路进行调节从而抑制 RA-FLS 细胞的炎症。

为探讨闹羊花毒素Ⅲ治疗 RA 的机制,本研究

仅使用了 RA-FLS 细胞, 后续还需要进一步在动物模型上验证。另外, 据 Kong L 等^[12]报道, 闹羊花毒素 II 通过使 Akt, NF- κ B 和 TLR4/MyD88 途径失活而抑制 RA, 而 WISP1 (Wnt1 诱导信号通路蛋白 1) 可以通过激活下游 PI3K/Akt 信号通路来促进 RA-FLS 细胞生长和抑制细胞凋亡^[37]。闹羊花毒素 II 与闹羊花毒素 III 仅相差了 1 个官能团 (前者有乙酰氧基结构, 而后者此处为羟基)^[9], 提示闹羊花毒素 III 调控的 Wnt1 通路或许可能与下游 Akt 通路在治疗 RA 过程中存在某些联系, 但因为不同信号通路之间的串扰存在复杂性, 这个猜测有待进一步探讨。

本研究报告了闹羊花毒素 III 可能通过下调 Dvl1 抑制 Wnt1/Dvl1/ β -catenin 信号通路, 从而抑制滑膜细胞增殖和细胞炎症的产生, 为闹羊花毒素 III 治疗 RA 从机制水平提供了理论依据。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Testa D, Calvacchi S, Petrelli F, et al. One year in review 2021: pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2021, 39 (3): 445–452.
- [2] Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review[J]. JAMA, 2018, 320 (13): 1360–1372.
- [3] England BR, Thiele GM, Anderson DR, et al. Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications[J]. BMJ, 2018, 361: k1036.
- [4] Conforti A, Di Cola I, Pavlych V, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20 (2): 102735.
- [5] An Q, Yan W, Zhao Y, et al. Enhanced neutrophil autophagy and increased concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and MCP-1 in rheumatoid arthritis[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65: 119–128.
- [6] Rana AK, Li Y, Dang Q, et al. Monocytes in rheumatoid arthritis: circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65: 348–359.
- [7] Yoshitomi H. Regulation of immune responses and chronic inflammation by fibroblast-like synoviocytes[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1395.
- [8] Webster CG, Park H, Ennis AF, et al. Synthetic efforts toward the bicyclo[3.2.1]octane fragment of rhodojaponin III [J]. Tetrahedron Lett, 2021, 71: 153055.
- [9] Cai YQ, Hu JH, Qin J, et al. *Rhododendron Molle* (Ericaceae): phytochemistry, pharmacology, and toxicology[J]. Chin J Nat Med, 2018, 16 (6): 401–410.
- [10] He YC, Yao YM, Xue QW, et al. Anti-rheumatoid arthritis potential of diterpenoid fraction derived from *Rhododendron molle* fruits[J]. Chin J Nat Med, 2021, 19 (3): 181–187.
- [11] 姚禹民, 房鑫, 李俊, 等. 羊躑躅二萜类成分和各极性部位的体内外抗炎活性研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33 (4): 84–88.
- [12] Kong L, Wang L, Zhao Q, et al. Rhodojaponin II inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokine secretion in MH7A human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2020, 34 (10): e22551.
- [13] Tao Y, Ge G, Wang Q, et al. Exenatide ameliorates inflammatory response in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. IUBMB Life, 2019, 71 (7): 969–977.
- [14] Wang T, Jia Q, Chen T, et al. Alleviation of synovial inflammation of Juanbi-Tang on collagen-induced arthritis and TNF-Tg mice model[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 45.
- [15] 李蓉, 姚血明, 宁乔怡, 等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜细胞 IL-17/IL-17R 的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29 (5): 546–551.
- [16] Sun YW, Bao Y, Yu H, et al. Anti-rheumatoid arthritis effects of flavonoids from *Daphne genkwa*[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 83: 106384.
- [17] Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16 (3): 145–154.
- [18] Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis[J]. Joint Bone Spine, 2019, 86 (3): 301–307.

- [19] Zhang Y, Mao X, Li W, et al. *Tripterygium wilfordii*: An inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41 (3): 1337–1374.
- [20] 罗永焱, 查加权, 李焰卿, 等. 羊躑躅根治疗类风湿性关节炎 114 例 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1993, 13 (8): 489–490.
- [21] 孙健, 孙炜, 孙希亨. 闹羊花治疗类风湿性关节炎 258 例疗效观察 [J]. *新医学*, 1989, 21 (11): 575.
- [22] 陈琪琪, 房鑫, 薛秋雯, 等. 基于 HPLC 测定闹羊花毒素Ⅲ、Ⅵ含量的羊躑躅不同药用部位质量研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2020, 34 (6): 75–80.
- [23] 郭小红, 冯靖雯, 尤强, 等. 有毒中药闹羊花的现代研究进展 [J]. *中国药业*, 2020, 29 (23): 96–104.
- [24] Cici D, Corrado A, Rotondo C, et al. Wnt signaling and Biological Therapy in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (22): 5552.
- [25] Elemam NM, Hannawi S, Maghazachi AA. Role of chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis[J]. *Immunotargets Ther*, 2020, 9: 43–56.
- [26] Zhang Q, Liu J, Zhang M, et al. Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis[J]. *Biomolecules*, 2019, 9 (12): 795.
- [27] Liang JJ, Li HR, Chen Y, et al. Diallyl trisulfide can induce fibroblast-like synovial apoptosis and has a therapeutic effect on collagen-induced arthritis in mice via blocking NF- κ B and Wnt pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 71: 132–138.
- [28] Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, et al. The regulation of bone metabolism and disorders by Wnt signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (22): 5525.
- [29] Katoh M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42 (2): 713–725.
- [30] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169 (6): 985–999.
- [31] Shen P, Jiao Y, Miao L, et al. Immunomodulatory effects of berberine on the inflamed joint reveal new therapeutic targets for rheumatoid arthritis management[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (21): 12234–12245.
- [32] Wehmeyer C, Pap T, Buckley CD, et al. The role of stromal cells in inflammatory bone loss[J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 189 (1): 1–11.
- [33] Mu YR, Cai L, Zhou MY, et al. Acetazolamide ameliorates the severity of collagen-induced arthritis in rats: Involvement of inducing synovial apoptosis and inhibiting Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107214.
- [34] Mao T, He C, Wu H, et al. Silencing lncRNA HOTAIR declines synovial inflammation and synoviocyte proliferation and promotes synoviocyte apoptosis in osteoarthritis rats by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18 (22): 3189–3205.
- [35] Sujitha S, Dinesh P, Rasool M. Berberine encapsulated PEG-coated liposomes attenuate Wnt1/ β -catenin signaling in rheumatoid arthritis via miR-23a activation[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, 149: 170–191.
- [36] Dinesh P, Kalaiselvan S, Sujitha S, et al. MiR-145-5p mitigates dysregulated Wnt1/ β -catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 82: 106328.
- [37] Cai D, Hong S, Yang J, et al. The effects of microRNA-515-5p on the toll-Like receptor 4 (TLR4) / JNK signaling pathway and WNT1-inducible-signaling pathway protein 1 (WISP-1) expression in rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial (RAFLS) cells following treatment with receptor activator of nuclear factor-kappa-B ligand (RANKL) [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e920611.

(收稿: 2022-03-01 在线: 2022-07-12)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶