

雷公藤甲素对类风湿关节炎患者滑膜成纤维样细胞增殖的体外抑制作用研究[△]

叶 蕾^{1*}, 贾 霜¹, 潘文萍^{2#}(1.山东省千佛山医院药学部, 济南 250014; 2.山东省千佛山医院风湿免疫科, 济南 250014)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4357-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.13

摘要 目的:研究雷公藤甲素(TP)对体外培养的类风湿关节炎(RA)患者成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖的影响。方法:从5例RA患者的膝关节置换术或滑膜切除术中获得滑膜组织,经分离、培养、鉴定得到FLS后分别与0(空白对照)、50、100、200 nmol/ml TP共孵育24、48、72 h。采用MTT法检测TP对FLS增殖的影响,计算增殖抑制率;流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。结果:50、100、200 nmol/ml TP对FLS的增殖抑制率为17.46%~52.56%,且抑制作用与药物浓度呈正相关。与空白对照组比较,100、200 nmol/ml TP作用后G₀/G₁期细胞比例增加,S期细胞比例减少,差异有统计学意义($P<0.05$);200 nmol/ml TP可诱导细胞凋亡。结论:TP对RA患者体外培养的FLS具有一定的增殖抑制作用并可诱导其凋亡,这可能是TP治疗RA的机制之一。

关键词 类风湿关节炎;滑膜成纤维细胞;雷公藤甲素;增殖;抑制;机制

Study on Inhibitory Effects of Triptolide on the Proliferation of Fibroblast-like Synovial Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis *in vitro*

YE Lei¹, JIA Shuang¹, PAN Wen-ping²(1.Dept. of Pharmacy, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China; 2.Dept. of Rheumatology, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of triptolide (TP) on the proliferation of fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with rheumatoid arthritis (RA) *in vitro*. METHODS: 5 RA patients received knee arthroplasty or synovectomy to obtain synovial tissue. FLS was isolated, cultured and identified, and then incubated in the presence of TP [0 (blank control), 50, 100 and 200 nmol/ml] for 24, 48 and 72 h. The effects of TP on FLS was evaluated by MTT, and then proliferation inhibitory rate was calculated; flow cytometry was used to detect the apoptosis and cell cycle of FLS. RESULTS: The inhibitory rates of TP (50, 100 and 200 nmol/ml) on the proliferation of FLS were 17.46%-52.56%, which was positively correlated with drug concentration. Compared with blank control group, 100 and 200 nmol/ml TP could increase the percentage of cells in G₀/G₁ phase and decrease the percentage of cells in S phase, with statistical significance ($P<0.05$); 200 nmol/ml TP could induce cell apoptosis. CONCLUSIONS: TP could inhibit the proliferation and also could induce the apoptosis of FLS in RA patients *in vitro*, which may be one of its mechanism for treating RA.

KEYWORDS Rheumatoid arthritis; Fibroblast-like synovial cells; Triptolide; Proliferation; Inhibitory; Mechanism

类风湿关节炎(RA)以关节慢性侵蚀性炎症为特征,基本病理变化为滑膜炎,表现为成纤维样滑膜细胞(Fibroblast-like synoviocytes, FLS)过度增生、大量T淋巴细胞和巨噬细胞浸润以及血管翳的形成。FLS作为炎症性滑膜炎中组织损伤和基质重塑的直接效应细胞,可通过诱导炎症反应、介导骨基质降解、促进破骨细胞分化或增殖等途径参与RA患者关节软骨、骨质的破坏^[1-3]。因此,抑制FLS的异常增殖或诱导FLS分化成熟成为治疗RA的新策略。

雷公藤是卫茅科植物,具有抗炎、抑制免疫的作用,临床上常用于治疗RA、肾病综合征、支气管哮喘等,但其作用机制尚不完全清楚^[4]。雷公藤甲素(Triptolide, TP)又称雷公藤内酯醇,是中药雷公藤的有效单体成分,是雷公藤中活性最高的环氧化二萜内酯化合物,临床上常用于治疗RA。有研究表明,

TP体外可诱导RA患者FLS的凋亡^[5],但相关的试验数据较少,故本试验研究TP对RA患者体外FLS增殖和细胞周期的影响,并探讨其可能的作用机制,以期能为TP治疗RA提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

3100 Series II 水套CO₂细胞培养箱、Labofuge 400 高速离心机、Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司);Epics XL 流式细胞仪(美国 Beckman coulter 公司);X70 倒置显微镜[Olympus(中国)有限公司]。

1.2 药品与试剂

雷公藤甲素(上海融禾医药科技发展有限公司,批号:071206,纯度:99.92%);高糖DMEM培养基(美国 Gibco BRL 公司);胎牛血清(FBS,美国 Gibco BRL 公司),Ⅲ型胶原酶(美国 Sigma 公司,批号:30H6812);胰蛋白酶(上海华美公司);二甲基亚砜(DMSO,上海生工生物工程有限公司)。

1.3 滑膜组织来源

△ 基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(No.2011-191)

* 主管药师。研究方向:临床药学。E-mail:sdcaiyi@163.com

通信作者:副主任医师,博士。研究方向:类风湿关节炎的发病机制。电话:0531-89268597。E-mail:wenping7622@sina.com

滑膜组织取自山东省千佛山医院骨关节科经关节镜行膝关节置换术或滑膜切除术的5例RA患者,RA诊断均符合1987年美国风湿病学会修订的类风湿关节炎分类标准。患者均为女性,年龄59~72岁,平均年龄61岁,X线分期均为IV期。5例患者均于术中切取膝关节滑膜组织。本试验经山东省千佛山医院伦理委员会批准。

2 方法

2.1 FLS的分离、培养与鉴定

采用组织块原代培养法进行FLS原代培养,具体方法见文献[5]。倒置显微镜下观察细胞生长情况,当细胞生长至覆盖底面>80%时,吸弃培养液,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2~3遍,加入胰蛋白酶/乙二胺四乙酸溶液于37℃消化约1min。倒置显微镜下观察,若大部分细胞胞质回缩、胞体变圆、细胞间隙增大,则加入少量含10%FBS的DMEM培养液终止消化,吸管吹打使细胞悬液混匀后移至15ml离心管中,以离心半径为17cm、1000r/min离心5min,弃上清,加入适量含10%FBS的DMEM培养液吹打均匀后,按1:3传代,分别接种到培养瓶中,置于含5%CO₂、37℃培养箱中培养。根据细胞的生长情况及培养液的变化,每1~3天更换培养液1次。细胞培养至3~4代后,加入CD55抗体,用流式细胞仪检测细胞表达CD55阳性率,检验细胞纯度。

2.2 台盼蓝法对体外FLS计数及活力检测

将第3~4代细胞消化、离心、重悬后,取等体积细胞悬液与5g/L的台盼蓝染液混匀,静置染色3~4min后计数。死细胞被染成淡蓝色,活细胞拒染。根据以下公式进行细胞计数并计算活细胞百分率:细胞总数=(4大格细胞总数/4)×10⁴×稀释倍数;活细胞百分率(%)=(4大格活细胞总数/4大格细胞总数)×100%。

2.3 MTT法检测细胞的增殖抑制率

取对数生长期细胞,用含10%FBS的DMEM制备成1×10⁵ml⁻¹的细胞悬液,接种于96孔培养板中,孵育24h后加入TP溶液,制成TP终浓度为0nmol/ml的空白对照组和50、100、200nmol/ml的低、中、高浓度组,每个浓度设6个复孔。分别置于37℃、5%CO₂的培养箱中继续培养24、48、72h后,加入5mg/mlMTT20μl,继续培养4h,弃去上清,每孔加DMSO200μl,振荡至结晶完全溶解。用酶标仪于490nm波长处测定吸光度A,细胞的增殖抑制率(SF,%)=(1-A_{试验组}/A_{空白对照组})×100%。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡和周期

取对数生长期细胞制成5×10⁵ml⁻¹的细胞悬液,将试验分为4组,TP浓度分别为0(空白对照)、50、100、200nmol/ml,每个浓度设6个复孔。各组细胞均于37℃、5%CO₂培养箱中培养48h后,取适量细胞,PBS洗涤2次,加入70%乙醇固定30min,离心后PBS洗2次,弃上清,加入10mg/ml的核糖核酸酶A100μl和10mg/ml的溴化丙啶(PI)2ml,4℃避光孵育30min,流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。

2.5 统计学方法

采用SPSS 6.12软件处理试验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均进行方差齐性检验,两组数值间的比较采用t检验,多组数值间的比较采用方差分析,并进行两两比较的q检验。标准检验 $\alpha=0.05, P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞的形态及鉴定结果

对原代培养的FLS进行贴壁分离纯化,细胞传代培养,试验各阶段均在倒置显微镜观察细胞形态。结果显示,活细胞百分率>98%,流式细胞仪鉴定细胞表面CD55阳性表达率大于95%,因此可用3~4代细胞进行试验。

3.2 各组细胞增殖抑制率检测结果

与空白对照组比较,各给药组作用24、48、72h后SF值均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);作用时间相同时,随着药物浓度的增加,SF值增加;当药物浓度相同时,适当延长作用时间,SF值略有升高(除中浓度组72hSF值较48h略有下降),平均在24~48h达抑制最大值。增殖抑制率测定结果见表1。

表1 增殖抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 The results of proliferation inhibitory rates($\bar{x} \pm s, n=6$)

TP浓度, nmol/ml	24 h		48 h		72 h	
	A	SF, %	A	SF, %	A	SF, %
0(空白对照)	1.225±0.320	0	1.291±0.321	0	1.289±0.453	0
50	1.011±0.451	17.46±2.3*	1.058±0.431	18.02±2.6*	1.049±0.452	18.62±2.1*
100	0.755±0.324	38.43±3.2*	0.775±0.218	40.02±5.4*	0.782±0.302	39.63±4.2*
200	0.616±0.210	49.71±4.3*	0.618±0.182	52.10±6.2*	0.609±0.203	52.56±4.9*

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$

3.3 各组细胞凋亡和细胞周期检测结果

与空白对照组比较,中、高浓度TP作用后G₀/G₁期细胞比例增加,S期细胞比例减少,差异有统计学意义($P<0.05$);且高浓度时可诱导细胞凋亡,作用48h后出现显著凋亡峰(见图1)。各组细胞周期检测结果见表2。

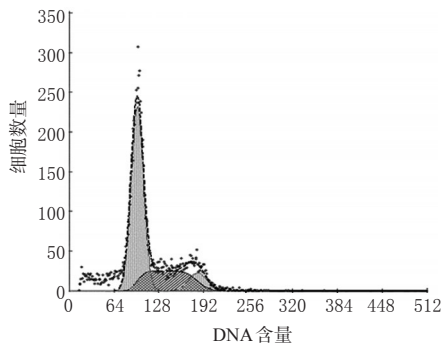


图1 高浓度TP对FLS的流式细胞凋亡图

Fig 1 Flow cytometry apoptosis of FLS after treated with high concentration of TP

表2 细胞周期检测结果($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

Tab 2 The results of cell cycle test($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

TP浓度, nmol/ml	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0(空白对照)	59.2±3.34	23.3±3.13	17.2±1.89
50	61.2±3.28	18.8±2.87	19.9±2.16
100	63.1±2.92*	17.1±3.01*	15.5±1.34
200	72.9±3.51*	15.3±3.24*	13.2±1.68*

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$

4 讨论

正常情况下,FLS可分泌纤维蛋白、胶原蛋白、软骨素蛋白聚糖等多种结缔组织的组成成分,在保持关节内环境稳态中发挥重要作用^[6]。大量的研究表明,RA患者的FLS在慢性炎

症过程中被激活后出现细胞表型的显著改变,在连续培养中这些细胞表现出高增殖率、接触抑制缺失、组成性表达细胞因子 mRNA 和锚定非依赖性细胞生长等特性^[7]。FLS 为 RA 患者炎症性滑膜炎中组织损伤和基质重塑的关键效应细胞,抑制 FLS 增殖可有效减轻关节炎和减少骨侵蚀,从而达到治疗 RA 的效果。

研究证明,TP 可抑制炎症关节滑膜组织中多种趋化因子、细胞因子 mRNA 及其相应受体的表达^[8-11],抑制血清中炎症细胞因子的表达,促进抗炎细胞因子的水平升高^[11],抑制滑膜细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)、金属基质蛋白酶 9(MMP-9)等从而抑制血管翳增殖^[12]。

笔者从 RA 患者膝关节分离滑膜组织,采用组织块培养法得到的 FLS,经原代培养后,取第 3~4 代 FLS 用于试验。加入 TP 作用 24 h 后 FLS 即开始出现生长明显减慢,光镜下可见细胞突触回缩,细胞形态变不规则,细胞变圆甚至皱缩变小,核分裂相细胞较少,有的可见凋亡小体。这与周光伟等^[9]研究结果相一致。不同浓度对 FLS 的增殖均有抑制作用,并随浓度的加大抑制作用增强,呈浓度依赖性;而与作用时间并无明显的正相关关系,平均 24~48 h 均达作用最高峰。低剂量 TP 虽对 FLS 细胞增殖有抑制作用,但对其细胞周期无明显影响。加大药物浓度可诱导细胞凋亡,使 S 期细胞比例降低,G₀/G₁ 期细胞比例增加,抑制细胞有丝分裂,促进细胞分化。

综上,TP 对 RA 患者体外培养的 FLS 具有良好的抑制作用,高浓度 TP 可诱导 FLS 凋亡,但其作用机制不明,有待进一步研究。

参考文献

[1] Jackson JR, Minton JA, Ho ML, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin-1 β [J]. *J Rheumatol*, 1997,24(7):1 253.

[2] Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Funa K, *et al.* Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental ar-

thritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2002,46(2):507.

[3] Lories RJ, Derese I, Ceuppens JL, *et al.* Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2003,48(10):2 807.

[4] 姚金成,刘颖,胡领,等.雷公藤甲素诱导肝细胞 L-02 凋亡的作用机制研究[J]. *中国药房*, 2013,24(11):964.

[5] 周光伟,沈权,金若珏,等.雷公藤多苷对类风湿关节炎患者滑膜细胞凋亡的影响[J]. *浙江临床医学*, 2007,9(8):1 034.

[6] Ospelt C, Neidhart M, Gay RE, *et al.* Synovial activation in rheumatoid arthritis[J]. *Front Biosci*, 2004,1(9):2 323.

[7] Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Rev*, 2010,233(1):233.

[8] 陈宗良.雷公藤多苷对滑膜细胞趋化因子 RANTES、MCP-1 影响的研究[J]. *中国医疗前沿*, 2009,13(4):125.

[9] Li H, Zhang YY, Tan HW, *et al.* Therapeutic effect of tripterine on adjuvant arthritis in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008,118(3):479.

[10] 陈学晏,刘扬,李振英.雷公藤多苷治疗佐剂关节炎大鼠对 TH1/TH2 细胞平衡的影响[J]. *黑龙江医科大学*, 2009,32(2):95.

[11] 毛晓丹,孙赛君,裴紫燕,等.雷公藤内酯醇对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 IL-18 及其受体表达的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009,25(7):606.

[12] 张前德,时彦标,谈文峰,等.雷公藤甲素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞系 MH7A 中 VEGF、MMP-9 水平变化的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2008,28(7):902.

(收稿日期:2015-02-25 修回日期:2015-04-29)

(编辑:林 静)

国家食品药品监督管理总局食品安全总监郭文奇出席 2015 年第十届石龙食品药品安全与法治会议

本刊讯 2015 年 9 月 22 日,第十届石龙食品药品安全与法治会议在广州召开。本次会议由广东省食品药品监督管理局、法制日报社、广东省公安厅、东莞市人民政府联合主办,主题是深入贯彻习近平总书记提出的“四个最严”,即最严谨的标准、最严格的监管、最严厉的处罚、最严肃的问责,依法保障食品药品安全。国家食品药品监督管理总局党组成员、食品安全总监郭文奇出席会议并讲话。

郭文奇在讲话中指出,全国食品药品稽查系统联合公安机关,不辱使命,依法履职,积极推进稽查工作体制机制建设,全面夯实稽查工作基础,着力提升行政执法能力和水平,始终保持对食品药品违法犯罪行为的严打高压态势,取得了明显成效。郭文奇强调,在当前食品药品安全问题易发多发的形势下,保障食品药品安全需要企业、政府、公众等社会各界齐

抓共管、形成社会共治的良好氛围。一是企业要增强诚信守法意识,熟悉法律法规对生产经营的各项要求,自觉履行第一法定责任和义务,建立保证质量安全的内控、溯源、召回等制度,把好产品质量安全关,严密防范各种安全风险,加强对从业人员的诚信教育和技能培训。二是政府要提高依法监管水平,各级监管部门要坚持有法必依、执法必严、违法必究的要求,完善食品药品信息发布制度;各级地方政府要认真落实属地责任、加强对食品药品安全工作的组织领导,切实做到“四有两责”,保障食品药品监管工作有责、有岗、有人、有手段,组织履行好日常检查职责和监督抽检职责。三是引导社会各界积极参与食品药品安全社会共治,搭建各界参与的平台桥梁,充分发挥行业协会等社会组织的作用,要注重发挥专家学者的作用,支持新闻媒体开展舆论监督。