

齐墩果酸抑制肿瘤坏死因子- α 诱导的成纤维细胞样滑膜细胞炎症因子表达及其机制研究

邓莉¹,冯健^{2*},何成松¹

¹西南医科大学附属医院风湿免疫科;²西南医科大学附属医院心血管内科,泸州 646000

摘要:探讨齐墩果酸(Oleanolic acid,OA)对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导成纤维细胞样滑膜细胞的炎症因子表达的影响及其机制。首先复苏培养人成纤维细胞样滑膜细胞(FLS),通过RT-PCR检测细胞IL-6及IL-1 β mRNA表达,采用Western blot方法检测p38MAPK及NF- κ B蛋白表达变化,通过ELISA法检测细胞上清液中IL-6及IL-1 β 浓度。与对照组比较,TNF- α 明显诱导FLS细胞IL-6及IL-1 β mRNA的表达及上清液中IL-6及IL-1 β 的分泌($P < 0.05$),同时磷酸化p38蛋白和核NF- κ B明显增加($P < 0.05$),且p38MAPK阻断剂SB203580能抑制TNF- α 诱导的核NF- κ B增加。OA呈浓度依赖性抑制TNF- α 诱导的FLS细胞p38蛋白磷酸化和核NF- κ B增加($P < 0.05$)。且OA、p38MAPK通路抑制剂SB203580或NF- κ B阻断剂BAY 11-7082均能抑制TNF- α 诱导的IL-6及IL-1 β 分泌增加($P < 0.05$)。综上所述,OA能抑制TNF- α 诱导的FLS细胞炎症因子IL-6及IL-1 β 的产生,其机制可能与抑制p38MAPK/NF- κ B信号通路有关。

关键词:齐墩果酸;滑膜细胞;炎症因子;肿瘤坏死因子- α ;p38MAPK;NF- κ B

中图分类号:R593.22

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.7.007

Oleanolic Acid Inhibit Tumor Necrosis Factor Alpha-induced Inflammatory Cytokines Production of Synovial Cells and Its Mechanism

DENG Li¹, FENG Jian^{2*}, HE Cheng-song¹

¹Department of rheumatology, the Affiliated Hospital of southwest Medical University,

²Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: In the study, the effects of oleanolic acid(OA) on tumor necrosis factor alpha(TNF- α)-induced inflammatory cytokines production and the related mechanism in synovial cells were investigated. After culture of human fibroblast like synoviocytes(FLS), RT-PCR was used to detect the expression of IL-6 and IL-1 β , and western blot method was used to detect the expression of p38MAPK and NF- κ B. ELISA was used to detect the levels of IL-6 and IL-1 β in cell supernatant. Compared to control group, TNF- α significantly induced the production of IL-6 and IL-1 β in FLS, increased the protein expression of P-p38MAPK and NF- κ B($P < 0.05$), and a p38MAPK antagonist SB203580 can inhibit TNF- α -induced the protein expression of NF- κ B. OA concentration dependently inhibited TNF- α -induced protein expression of P-p38MAPK and NF- κ B in FLS cells. OA, a p38MAPK antagonist SB203580 or a NF- κ B antagonist BAY 11-7082 can inhibit TNF- α -induced the production of IL-6 and IL-1 β in FLS($P < 0.05$). Collectively, these findings suggested that OA can inhibit TNF- α -induced the production of IL-6 and IL-1 β , which may be through inhibiting p38MAPK/NF- κ B pathway.

Key words: oleanolic acid; synoviocytes; inflammatory cytokines; tumor necrosis factor alpha; p38MAPK; NF- κ B

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)作为一种自身免疫性慢性疾病,累及多个系统,尤其以累及周围关节为主,呈对称性多关节及小关节病变。

RA主要特征为滑膜组织的炎性增生及关节软骨的进行性破坏。而成纤维细胞样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)的异常增殖及其炎症因子的分泌加速了上述进程^[1]。因此抑制FLS炎症因子的分泌对类风湿关节炎的治疗至关重要。

虽然目前临床上已有抗RA药物针对FLS发挥作用,如非甾体类抗炎药、免疫抑制剂、生物制剂及

收稿日期:2017-12-25 接受日期:2018-04-20

基金项目:国家自然科学基金(31300946);泸州市-泸州医学院联合课题(2015LZCYD-S03)

*通信作者 Tel:86-830-3165314; E-mail:415623fj@163.com

糖皮质激素等,但上述药物多存在较多的不良反应或者治疗费用较高,所以寻找高效低毒经济实用的药物十分重要。齐墩果酸(oleanolic acid, OA)是木犀科植物女贞子的主要成分,以游离或结合成苷的形式存在,既往报道有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用。近来研究发现 OA 及其衍生物具有显著抗炎镇痛作用,而且其衍生物能抑制 RA 大鼠足肿胀及炎症因子的释放^[2,3],提示 OA 具有抗 RA 的作用。然而 OA 是否通过抑制 FLS 炎症因子分泌发挥作用,以及其具体机制如何,目前国内外尚无相关研究报道。因此,本实验中我们以 FLS 为主要研究对象,探讨 OA 对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导 FLS 的炎症因子表达的影响及相关信号通路,为 OA 在类风湿关节炎中的应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验细胞

人成纤维细胞样滑膜细胞购自北京清源浩生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

齐墩果酸(Sigma, 美国);重组人 TNF- α (Pepro- tech, 美国);IL-6 ELISA 试剂盒、IL-1 β ELISA 试剂盒(均购自武汉博士德生物工程有限公司);总 RNA 提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司);PCR 逆转录试剂盒(东洋纺(上海)生物科技有限公司);P-p38MAPK 及 p38MAPK 抗体(南京巴傲得生物科技有限公司);NF- κ B-p65 及 Histone 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);SB203580、MTT 细胞毒性检测试剂盒(均购自碧云天生物技术有限公司)。

1.3 细胞分组

FLS 经复苏传代后,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,每组细胞按 5 \times 10⁵ cells/mL 接种于培养瓶中,将 FLS 细胞分组如下:对照组:不加任何干预因素。TNF- α 组:给予 10 μ g/L TNF- α 培养细胞 24 小时。TNF- α + 不同浓度齐墩果酸组(5、10、20 μ mol/L):同时加入 TNF- α 及不同浓度的齐墩果酸,培养 24 小时。TNF- α + SB203580 组:先加入 p38MAPK 阻断剂 SB203580 预处理 1 小时,再加入 TNF- α 培养 24 小时。

1.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞基因表达

各组细胞经干预后,提取各组总 RNA,按照每 10 cm² 加入 1 mL Buffer RLT 裂解液,充分裂解细

胞,按 1 mL Trizol Reagent 裂解液加入 200 μ L 氯仿抽提,70% 的乙醇等体积混匀,经去蛋白液、漂洗液提纯回收总 RNA,采用紫外分光光度计(A260/A280)及 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行浓度和纯度的检测,冻存于-80 $^{\circ}$ C 备用。取 500 ng 的总 RNA 加入 5 \times RT Master Mix 逆转录酶、ddH₂O 共 10 μ L 逆转录为 cDNA,取 1 μ L 的 DNA 加入对应的上下游特异性引物,2 \times Taq PCR Master Mix 及 ddH₂O,进行聚合酶链式反应,取 10 μ L 的扩增产物以 2% 的琼脂糖凝胶电泳、凝胶成像系统拍照并分析结果,以 GAPDH 为内参,结果以目的基因与 GAPDH 的比值表示。

1.5 Western blot 检测蛋白表达

参考文献^[4]实验方法:细胞干预 24 小时后提取各组细胞总蛋白或细胞核蛋白,测定样品浓度,灌胶并上样后,电泳槽电泳,转膜,加入相应的一抗及二抗后用凝胶扫描成像,进行图像分析。

1.6 ELISA 法测定细胞上清液中 IL-6 及 IL-1 β 水平

按照试剂盒说明书操作,反应终止后 20 min 内用酶标仪在 450 nm 处测量各组 OD 值。

1.7 MTT 检测细胞毒性

参照试剂盒说明书操作,酶标仪检测各组吸光度值。

1.8 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件,数据均采用均数 \pm 标准差表示,多组间采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OA 对 TNF- α 诱导的 FLS 细胞 IL-6 及 IL-1 β 表达的影响

各组细胞给予刺激因素干预后,提取各组细胞 mRNA,结果如图 1 和 2 显示:与正常对照组比较,TNF- α 组 IL-6 及 IL-1 β mRNA 表达明显增加($P < 0.05$)。加入齐墩果酸后,随着齐墩果酸浓度增加,IL-6 及 IL-1 β mRNA 表达逐渐减弱(与 TNF- α 组比较,各浓度组 $P < 0.05$)。

2.2 OA 对 TNF- α 诱导的 FLS 细胞 p38MAPK 蛋白表达变化的影响

各组细胞给予刺激因素干预后,提取各组细胞蛋白,结果如图 3 显示:与正常对照组比较,TNF- α 组 P-p38MAPK 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。加入齐墩果酸后,随着齐墩果酸浓度增加,P-p38MAPK 蛋白表达逐渐减弱(与 TNF- α 组比较,各浓度组 P

< 0.05, 见图 3)。

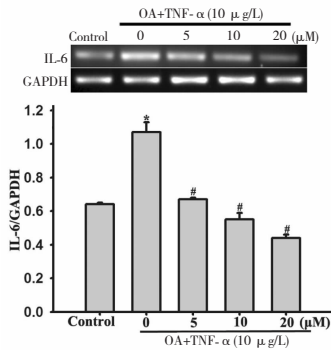


图 1 齐墩果酸对人成纤维样滑膜细胞 IL-6 mRNA 表达的影响

Fig. 1 The effect of OA on the mRNA expression of IL-6 in human fibroblast-like synoviocytes

注: * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较。

Note: * $P < 0.05$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with TNF- α group.

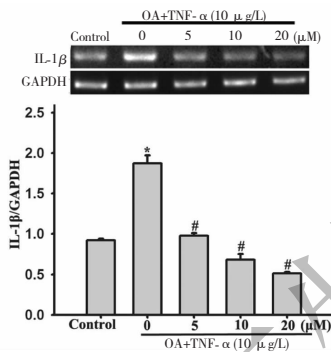


图 2 齐墩果酸对人成纤维样滑膜细胞 IL-1 β mRNA 表达的影响

Fig. 2 The effect of OA on the mRNA expression of IL-1 β in human fibroblast-like synoviocytes

注: * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较。

Note: * $P < 0.05$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with TNF- α group.

2.3 OA 对 TNF- α 诱导的 FLS 细胞核 NF- κ B-p65 蛋白表达的影响

各组细胞给予刺激因素干预后,提取各组细胞核蛋白,结果如图 4 显示:与正常对照组比较,TNF- α 组 p65 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。加入齐墩果酸后,随着齐墩果酸浓度增加,p65 蛋白表达逐渐减弱(与 TNF- α 组比较,各浓度组 $P < 0.05$)。

2.4 p38MAPK 阻断剂对 FLS 细胞核 NF- κ B-p65 蛋白表达的影响

各组细胞给予刺激因素干预后,提取各组细胞

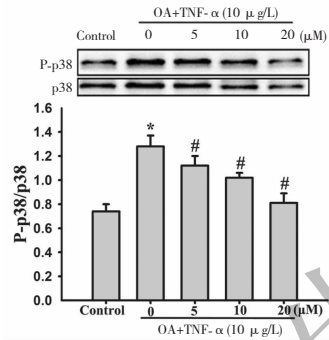


图 3 齐墩果酸对人成纤维样滑膜细胞 P-p38MAPK 蛋白表达的影响

Fig. 3 The effect of OA on the protein expression of P-p38MAPK in human fibroblast-like synoviocytes

注: * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较。

Note: * $P < 0.05$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with TNF- α group.

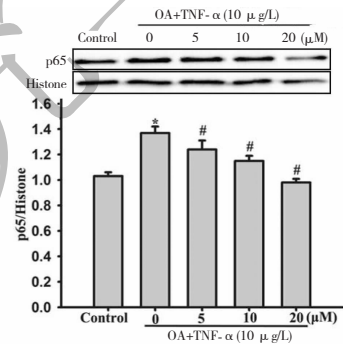


图 4 齐墩果酸对人成纤维样滑膜细胞 NF- κ B-p65 蛋白表达的影响

Fig. 4 The effect of OA on the protein expression of NF- κ B-p65 in human fibroblast-like synoviocytes

注: * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较。

Note: * $P < 0.05$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with TNF- α group.

核蛋白,结果如图 5 显示:与正常对照组比较,TNF- α 组 p65 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。加入 p38MAPK 阻断剂 SB203580,p65 核蛋白表达明显减弱(与 TNF- α 组比较, $P < 0.05$)。

2.5 信号通路阻断剂对 FLS 细胞上清液中 IL-6 及 IL-1 β 的影响

各组细胞给予刺激因素干预后,收集各组上清液,ELISA 结果如表 1 显示:与正常对照组比较,TNF- α 组上清液中 IL-6 及 IL-1 β 浓度明显增加($P < 0.05$)。与 TNF- α 组比较,TNF- α + OA 组、TNF- α + SB203580 组及 TNF- α + BAY 11-7082 组细胞上清液中 IL-6 及 IL-1 β 浓度均明显降低,差异具有统

计学意义($P < 0.05$)。

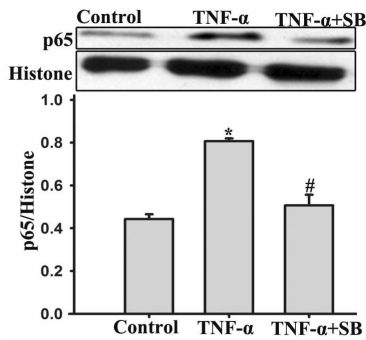


图5 p38MAPK 阻断剂对人成纤维样滑膜细胞 NF- κ B-p65 蛋白表达的影响

Fig. 5 the inhibition of p38MAPK on the protein expression of NF- κ B-p65 in human fibroblast-like synoviocytes

注: * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较。

Note: * $P < 0.05$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with TNF- α group.

表1 人成纤维样滑膜细胞上清液中 IL-6 及 IL-1 β 分泌变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 The changes of interleukin-6 and interleukin-1 β in supernatant of human fibroblast-like synovial cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组 Group	IL-6 (ng/L)	IL-1 β (ng/L)
对照组 Control	32.33 \pm 0.75	30.76 \pm 0.78
TNF- α	41.24 \pm 1.35*	38.71 \pm 0.46*
TNF- α + OA (20 μ mol/L)	34.81 \pm 0.33#	33.64 \pm 0.45#
TNF- α + SB203580	35.39 \pm 0.68# $\&$	33.66 \pm 0.56# $\&$
TNF- α + BAY 11-7082	35.12 \pm 0.99#	33.72 \pm 0.46# $\&$

注: * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较; $\&$ $P > 0.05$, 与 TNF- α + OA 组比较。

Note: * $P < 0.05$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with TNF- α group; $\&$ $P > 0.05$, compared with TNF- α + OA group.

2.6 MTT 检测齐墩果酸对 FLS 细胞的毒性作用

在细胞中加入实验所用各浓度齐墩果酸(5、10、20 μ mol/L)培养 24 小时后,采用 MTT 进行检测,结果发现:与正常对照组比较,5、10、20 μ mol/L 齐墩果酸组吸光度值无显著统计学差异($P > 0.05$),提示以上浓度齐墩果酸对 FLS 细胞无毒性作用。

3 讨论

临床上应用的 RA 药物主要包括非甾体类抗炎药、免疫抑制剂、生物制剂及糖皮质激素等。这些药

表2 齐墩果酸对人成纤维样滑膜细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 The effect of OA on the activity of human fibroblast-like synovial cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	吸光度值 Absorbance
对照组 Control	0.970 \pm 0.032
5 μ mol/L OA	0.938 \pm 0.028*
10 μ mol/L OA	0.929 \pm 0.031*
20 μ mol/L OA	0.939 \pm 0.029*

注: * $P > 0.05$, 与对照组比较。

Note: * $P > 0.05$, compared with the control group.

物主要用于控制并缓解患者病情及症状,但存在较多的不良反应或者治疗费用较高。目前越来越多的研究报道,许多天然产物具有抗 RA 作用,且副作用小,价格低廉。齐墩果酸是一种从天然植物女贞子中提取的五环三萜类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用^[5-7]。虽然有研究发现 OA 及其衍生物具有抗 RA 的作用,但其通过何种机制发挥作用,其对 FLS 炎症因子的分泌是否有抑制作用,均不清楚。

FLS 在 RA 的发生发展中扮演着重要角色,FLS 增殖和炎症因子分泌是 RA 主要病理特征^[8]。本实验采用 10 μ g/L TNF- α 刺激 FLS 细胞 24 小时,从而建立 FLS 炎症释放模型。结果发现,经上述处理后,FLS 细胞 IL-6 及 IL-1 β mRNA 表达明显增加,且细胞上清液中 IL-6 及 IL-1 β 浓度也增加,表明在此条件下 TNF- α 能成功诱导滑膜细胞炎症因子的产生,与此前的文献报道一致^[9,10]。虽然有报道 OA 具有抗炎作用,但 OA 是否能抑制 FLS 的炎症因子表达和分泌尚不清楚,我们的研究发现,OA 能抑制 TNF- α 诱导的炎症因子 IL-6 及 IL-1 β mRNA 表达,且呈浓度依赖性。说明 OA 可能是通过抑制 FLS 炎症因子的分泌从而发挥抗 RA 的作用的。

为了更深入地了解 OA 通过何种信号途径发挥抑制 FLS 炎症因子分泌的作用,我们进一步采用蛋白电泳及 ELISA 的方法来探讨 OA 发挥抗炎作用相关机制。核转录因子 κ B (NF- κ B) 在众多慢性炎症疾病的发生发展中均扮演着重要的角色,同时也是与炎症相关的经典信号通路^[11,12]。本研究发现 TNF- α 能促进核 NF- κ B p65 活化,伴随着炎症因子分泌的增加,而给予 NF- κ B 阻断剂 BAY 11-7082,则抑制了 TNF- α 导致的炎症因子的分泌。同时我们给予 OA 干预后,其抑制 TNF- α 导致的炎症因子的分泌的作用与 BAY 11-7082 是相似的,因此,抑制

NF- κ B 核转录可能是 OA 抑制 FLS 炎症因子分泌的机制。

p38MAPK 信号通路是介导炎症因子生成的上游信号通路。大量的研究表明 p38MAPK 信号通路也是 RA 患者滑膜炎的发生发展重要机制之一^[13-15]。炎症因子(如 IL-1 β 或 TNF- α)也可以刺激 p38MAPK 发生磷酸化,促进 NF- κ B 核转录,导致炎症因子表达增加。而增加的炎症因子又会促进信号通路的激活,加重炎症反应,由此导致滑膜炎迁延不愈。因此本研究继续探讨了 OA 是否能通过影响 p38MAPK 信号通路而影响下游 NF- κ B 的核转录,从而抑制炎症因子的表达。研究证实,OA 呈浓度依赖性抑制 p38MAPK 的磷酸化;而给予 p38MAPK 信号通路的阻断剂后,发挥了与 OA 相似的抑制炎症因子分泌的作用。并且用 p38MAPK 信号通路的阻断剂 SB203580 干预后细胞核 NF- κ B p65 也受到了抑制。由此,提示 OA 可能通过抑制 p38MAPK/NF- κ B 信号通路从而抑制 TNF- α 诱导的 IL-6 及 IL-1 β 的产生。最后为明确实验中所用浓度范围齐墩果酸是否对 FLS 产生毒性作用,我们采用了 MTT 来检测细胞吸光度值。结果显示 0 ~ 20 μ mol/L 的齐墩果酸不会对 FLS 产生细胞毒性作用。

综上所述,本研究表明 OA 能抑制 TNF- α 诱导的滑膜细胞炎症因子的分泌(IL-6 和 IL-1 β),其机制可能与抑制 p38MAPK/NF- κ B 信号通路有关。上述研究为开发 OA 作为治疗类风湿关节炎的药物提供实验依据,为寻求廉价、副作用小且高效的治疗类风湿关节炎药物提供新的方向。但 OA 在动物模型中是否通过相同的机制发挥作用,仍有待我们进一步的研究证实。

参考文献

- 1 Yamannishi Y, Firestein GS. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes [J]. *Arthritis rheum*, 2001, 27: 355-368.
- 2 Choi J, Lee KT, Jung H, et al. Anti-rheumatoid arthritis effect of the *Kochia scoparia* fruits and activity comparison of momordin lc, its prosapogenin and sapogenin [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25: 336-342.
- 3 Choi JK, Kim SW, Kim DS, et al. Oleanolic acid acetate inhibits rheumatoid arthritis by modulating T cell immune responses and matrix-degrading enzymes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 290: 1-9.
- 4 Feng J, Zhang P, Chen X, et al. PI3K and ERK/Nrf2 path-

ways are involved in oleanolic acid-induced heme oxygenase-1 expression in rat vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 1524-1531.

- 5 Rodriguez-Rodriguez R. Oleanolic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: molecular mechanisms and therapeutic perspectives [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22: 1414-1425.
- 6 Lin C, Wen X, Sun H. Oleanolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26: 643-655.
- 7 Feng J (冯健), Zuo YM (左玉梅), Xu L (徐亮), et al. Study of oleanolic acid in inhibiting rat cardiac fibroblasts proliferation induced by angiotensin II through ROS-CTGF Pathway [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm* (中药新药与临床药理), 2014, 25: 564-567.
- 8 Zeng CY (曾聪彦), Wu FR (吴凤荣), Dai WB (戴卫波), et al. Effects of *Caulis Tinosporae sinensis* on histopathology of ankle tissue in rheumatoid arthritis rats [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 147-151.
- 9 Fox DA. Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis: Inhibition of tumor necrosis factor [J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160: 437-444.
- 10 Wang RS (汪荣盛), Liu J (刘佳), Tong P (童萍), et al. Hydroxytriptolide inhibits inflammatory cytokines and promotes apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by TNF- α Induced via Ras-MAPKs signaling pathway [J]. *Acta Univ Trad Med Sin Pharm Shanghai* (上海中医药大学学报), 2016, 30(3): 82-87.
- 11 Qi L, Zhang X, Wang X. Heparin inhibits the inflammation and proliferation of human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through the NF- κ B pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14: 3743-3748.
- 12 Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches [J]. *Cells*, 2016, 5(2): E15.
- 13 Wendling D, Prati C, Toussiot E, et al. Targeting intracellular signaling pathways to treat rheumatoid arthritis: Pandora's box [J]. *Joint Bone Spine*, 2010, 77(2): 96-98.
- 14 Lin YP, Su CC, Huang JY, et al. Aberrant integrin activation induces p38MAPK phosphorylation resulting in suppressed Fas-mediated apoptosis in T cells: Implications for rheumatoid arthritis [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46: 3328-3335.
- 15 Ren Q (任茜), He CS (何成松). P38MAPK Signaling pathways are involved in rheumatoid arthritis by regulating inflammatory factor [J]. *J Mod Med Health* (现代医药卫生), 2015, 31: 3744-3747.