

附子汤对类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞MH7A增殖和miR-155表达的影响

覃万莉, 徐玉洁, 潘真真, 李小翠, 王振华, 宋健平, 徐勤, 黄新安, 李常青*
(广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的:观察附子汤对类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞MH7A增殖的影响,研究附子汤对miR-155表达的影响并进一步探讨其抗类风湿性关节炎的作用机制。方法:体外培养MH7A细胞,设空白组、附子汤高剂量组(25 g·L⁻¹)、低剂量组(12.5 g·L⁻¹)和硫酸羟氯喹阳性药组(0.006 25 g·L⁻¹),采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒法检测细胞增殖,流式细胞术检测MH7A细胞周期的改变;应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测药物处理后miR-155及其下游基因含SH2结构域的肌醇5-磷酸酶-1(SHIP-1)、蛋白激酶B3(Akt3)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR) mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、Akt3和mTOR的蛋白表达。结果:附子汤体外在质量浓度6.25 g·L⁻¹以上时,能明显抑制MH7A增殖,且呈明显的量-效关系和时-效关系。与空白组比较,附子汤高、低剂量组G₂/M期细胞比例均明显增加(P<0.05),高剂量组G₀/G₁期细胞比例明显降低(P<0.05),其细胞周期的阻滞作用呈明显的量效关系。与空白组比较,附子汤高、低剂量组miR-155的表达均明显下调(P<0.05);附子汤高剂量组SHIP1 mRNA表达明显上调、Akt3 mRNA表达明显下调(P<0.05),附子汤高、低剂量组mTOR mRNA表达均明显下调(P<0.05)。与空白组比较,附子汤高、低剂量组的PI3K、Akt3和mTOR的蛋白表达均明显下调(P<0.05)。结论:附子汤对MH7A细胞增殖具有显著的抑制作用,作用机制与下调miR-155的表达,从而促进SHIP-1的表达,抑制其下游PI3K/Akt3/mTOR信号通路的基因表达有关。

[关键词] 附子汤; 类风湿性关节炎; MH7A细胞; miR-155; 肌醇5-磷酸酶-1(SHIP-1); 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B3(Akt3)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0029-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220779

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220129.1522.016.html>

[网络出版日期] 2022-01-30 11:43

Effect of Fuzitang on Proliferation of Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblast Cell Line MH7A and Expression of miR-155

QIN Wanli, XU Yujie, PAN Zhenzhen, LI Xiaohui, WANG Zhenhua, SONG Jianping,
XU Qin, HUANG Xinan, LI Changqing*
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Fuzitang (FZT) on the proliferation of MH7A cells, the human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, and the expression of miR-155 and explore its anti-rheumatoid arthritis mechanism. **Method:** MH7A cells were cultured *in vitro* and divided into a blank group, high- (25 g·L⁻¹) and low-dose (12.5 g·L⁻¹) FZT groups, and a positive drug group (hydroxychloroquine, 0.006 25 g·L⁻¹). The cell proliferation was detected by cell counting kit-8(CCK-8) method, and the change in the MH7A cell cycle was detected by flow cytometry. The mRNA expression of miR-155 and its downstream genes, including SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase-1 (SHIP-1), protein kinase B 3 (Akt3), and

[收稿日期] 2021-11-09

[基金项目] 广州市科技计划重点项目(202002020057)

[第一作者] 覃万莉,在读硕士,从事肿瘤及类风湿性关节炎的药物治疗及作用机制研究,E-mail:5967416417@qq.com

[通信作者] *李常青,博士,研究员,从事肝癌及类风湿性关节炎药物治疗研究,E-mail:1106923438@qq.com

mammalian target of rapamycin(mTOR), was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt3, and mTOR was detected by Western blot. **Result:** FZT *in vitro* in a concentration of $6.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ above could inhibit the proliferation of MH7A cells in the significant dose- and time-effect manner. Compared with the blank group, the FZT groups showed increased proportions of cells in the G_2/M phase ($P < 0.05$), and the high-dose FZT group showed a decreased proportion of cells in the G_0/G_1 phase ($P < 0.05$). The arresting effect of FZT on the cell cycle was in a significant dose-effect manner. Compared with the blank group, the FZT groups showed down-regulated miR-155 and mTOR mRNA expression ($P < 0.05$), and the high-dose FZT group showed up-regulated SHIP1 mRNA expression and down-regulated Akt3 mRNA expression ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the FZT groups showed reduced protein expression of PI3K, Akt3, and mTOR ($P < 0.05$). **Conclusion:** FZT can significantly inhibit the proliferation of MH7A cells, and the mechanism is related to the promotion of the expression of SHIP-1 and down-regulation of the gene expression of the PI3K/Akt3/mTOR signaling pathway by down-regulating the expression of miR-155.

[Keywords] Fuzitang; rheumatoid arthritis; MH7A cells; miR-155; SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase-1 (SHIP-1); phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B 3 (Akt3)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway

类风湿性关节炎(RA)是一种常见的慢性全身性自身免疫性疾病,其临床表现主要为慢性、对称性和周围多关节炎性病变,其主要病理特征是滑膜炎、滑膜增生、血管翳形成以及类风湿结节的形成。我国RA的患病率约为0.32%~0.36%,如果不经过积极正规的治疗,约75%的患者会在3年内出现残疾^[1]。

RA的发病机制尚未完全明确,目前公认与个体遗传易感性、环境因素和失调的免疫反应有关。目前已确立的相关发病机制包含辅助性T细胞(Th1)细胞/Th2细胞及Th17/调节性T细胞(Treg)细胞失衡,导致关节滑膜的炎症反应及滑膜成纤维细胞增殖激活,最终形成RA^[2-3]。近年来的研究显示miR-155在RA患者关节滑膜组织、滑膜液及外周血单核细胞均呈高表达,且在实验性关节炎中发挥促炎作用^[4],显示miR-155是治疗RA的潜在靶点。

RA在中国传统医学中称为“痹证”,类风湿性关节炎的病名最早载于《黄帝内经·素问》,其言“风寒湿三气杂至,合而为痹也”。附子汤来源于张仲景所著《伤寒论》,由炮附子、人参、白术、茯苓和白芍组成,具有温经助阳,祛寒化湿止痛之功,应用于寒湿痹阻肢体关节之证,包括类风湿性关节炎的治疗,长期的临床应用已经证实附子汤是安全有效治疗RA的经典名方^[5]。本实验采用人类类风湿关节炎滑膜成纤维细胞—MH7A细胞,由类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞(RA-FLS)细胞经过SV40T基因转染后转化而成的永生细胞株^[6],观察附子汤体外对

MH7A细胞的增殖和miR-155表达的影响,并进一步探讨其抗RA的作用机制。

1 材料

1.1 细胞 人类RA-FLS(MH7A细胞),购自广州吉妮欧生物科技有限公司(批号2021071231401)。

1.2 药物与试剂 附子汤饮片购自广州杏园春药店,所有饮片经广州中医药大学中药学院李小翠副教授鉴定。附子汤组成为炮附子15g、茯苓9g、人参6g、白术12g、白芍9g,水煎煮,每剂加水1600mL浸泡30min后熬至600mL,将水提液用旋转蒸发仪浓缩至含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度。经0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后,用离心管进行分装,置于-20℃保存;使用时于4℃溶解,加入完全培养基稀释成所需浓度用于实验。硫酸羟氯喹(上海上药中西制药有限公司,批号210268,简称羟氯喹),DMEM高糖培养基、0.25%胰酶、胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为8120321、2186974、2260087),磷酸盐缓冲液(PBS,武汉普诺赛生命科技有限公司,批号WH052E101),青-链霉素(美国Hyclone公司,批号J210011),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、BAC蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为702H011、PC0020),荧光染料碘化丙啶(PI,美国Sigma公司,批号81845),RNA酶(大连美仑生物技术有限公司,批号MB3087),EasyScript First-Strand cDNASynthesisSuperMix(北京全式金生物技术有限公司,批号P20329),焦碳酸二乙酯(DEPC)水(上海生工生物工程有限公司,批号H305KA9141),

TRIzol 试剂(美国 Life Technologies 公司,批号 260710),琼脂糖(西班牙琼脂糖,批号 QZT-100),ECL 发光液(美国 MerckMillipore 公司,批号 WBKLS0100),磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K) inase p110 α (C73F8) Rabbit mAb、蛋白激酶 B3 (Akt3) (E1Z3W) Rabbit mAb、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)(7C10)Rabbit mAb、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔多克隆抗体(美国 CST 公司,批号分别为 4249T、14982S、2983T、5174),引物序列所用引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
miR-155 上游	ACACTCCAGCTGGGTTAATGCTAATCGTGAT	73
下游	CTCAACTGGTGTCTGTGGA	
SHIP-1 上游	CAACAGCCACTTGACTTCAG	170
下游	GCAGATCCACACGGTAGTTA	
Akt3 上游	GGGCGAGCTGTTTTTCCAT	120
下游	CGGTACACAATCTTTCCGGAAT	
mTOR 上游	TTTGACGGTGTGGAACCTTG	295
下游	CATCTGGGCCTCCAGTTAC	
U6 上游	GGGCGAGCTGTTTTTCCAT	94
下游	CGGTACACAATCTTTCCGGAAT	
18s 上游	CCTGGATACCGCAGCTAGGA	112
下游	GCGGCGCAATACGAATGCCCC	

1.3 仪器 AC2-3A1 型超净工作台(新加坡 ESCO 公司),CB150 型 BINDER 二氧化碳培养箱(德国 Binder 公司),Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司),DMi1 型倒置生物显微镜(德国 Leica 公司),32R 型冷冻离心机(德国 Hettich 公司),CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)、PRISM[®] 7500 Sequence Detection System 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司),BioPhotometer-plus 型核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司),BSD-YX(F)3200 型恒温摇床(上海博迅实业公司),HWS-5A 型恒温水浴锅(上海百典仪器设备有限公司),VE-180 型湿转膜仪、EPS-200 型电泳仪(中国 Tanon 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 MH7A 细胞复苏后,置于培养瓶中(含 15% 胎牛血清、1% 青-链霉素的完全培养液),在

5% CO₂、37 °C 饱和湿度的培养箱中培养,隔天换液 1 次;待细胞生长至 80%~90% 时,按 1:2 传代,细胞传 3 代以后选择对数生长期细胞进行实验。

2.2 CCK-8 法检测附子汤及羟氯喹对 MH7A 细胞增殖的影响 取对数生长期的 MH7A 细胞,按 1×10⁵ 个/mL 细胞密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,设空白组、细胞空白组、附子汤药物各浓度组(100、50、25、12.5、6.25 g·L⁻¹),每组 6 个复孔。硫酸羟氯喹各质量浓度组(50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 mg·L⁻¹),其余同上。细胞培养 24 h 后按上述分组,空白组、细胞空白组加入完全培养基,附子汤、羟氯喹各浓度组加入用完全培养液稀释的相应浓度的药液。继续培养 48 h 后,吸弃上清,采用 CCK-8 法,用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度 *A*。计算细胞抑制率(%)=(空白组 *A*-实验组 *A*)/空白组 *A*×100%,采用 Logit 法计算药物的半数抑制浓度(IC₅₀)。根据药物 IC₅₀ 的结果,设置附子汤高剂量组(25 g·L⁻¹)、低剂量组(12.5 g·L⁻¹),并设空白组。按上述方法操作,分别于加药培养 24、48、72 h 后,吸弃上清,加入 CCK-8 孵育 2 h,用酶标仪检测 450 nm 波长下的 *A*,取各组平均 *A*,计算各组药物对细胞的抑制率,以观察附子汤对 MH7A 细胞增殖的影响。

2.3 流式细胞术检测附子汤对 MH7A 细胞周期的影响 取对数生长期 MH7A 细胞,以 1×10⁵ 个/mL 细胞密度接种于 6 孔板中,每孔 2 mL;设置空白组、附子汤高剂量组(25 g·L⁻¹)、低剂量组(12.5 g·L⁻¹),羟氯喹阳性药组(0.006 25 g·L⁻¹),每组设 3 个复孔;置于 37 °C、含 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。培养 24 h 后,吸弃上清,附子汤高、低剂量组及阳性药组分别加入相应浓度的药物稀释液,空白组加入完全培养液,培养 48 h 后每孔 0.5 mL 胰酶消化收集细胞。PBS 润洗细胞 2 次,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,离心半径为 97 mm,弃上清,75% 冰乙醇 500 μ L 于 4 °C 固定过夜;离心收集细胞,PBS 润洗细胞两次,加入 PI 工作液 300 μ L (PI 50 mg·L⁻¹、RNase 100 mg·L⁻¹) 温室避光孵育 30 min 后上机检测。

2.4 Real-time PCR 检测附子汤对 MH7A 细胞 miR-155 及下游肌醇 5-磷酸酶-1 (SHIP-1)、PI3K/Akt/mTOR 信号通路基因 mRNA 表达的影响 细胞培养、分组、给药同 2.3 项。收集细胞后,用 TRIzol 法提取总 RNA,Dnase I (RNase-free) 去除基因组 DNA,测定 260 nm 和 280 nm 处的 *A*,计算 *A*₂₆₀/*A*₂₈₀ 比值>1.8;凝胶成像系统检测该样品总 RNA 的 5 s、18 s、28 s 条带的完整性。根据逆转录反应试剂盒说

说明书,每个样本取RNA 1 μL进行逆转录反应,合成cDNA;再以cDNA为模板,各样本基因检测按20 μL体系进行PCR反应。目的片段:miR-155、SHIP-1、Akt3、mTOR。内参片段:U6、18 s。反应条件:50 °C反应2 min,95 °C反应15 s,60 °C反应32 s,40个循环;于60~95 °C进行融解曲线分析;各个样品重复实验3次。利用Real-time PCR仪自带软件观察扩增曲线,并计算样本所得的 $\Delta\Delta C_t$ 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行各样本之间的比较。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测附子汤对MH7A细胞miR-155下游信号通路基因PI3K、Akt3及MTOR蛋白表达的影响 细胞培养、分组、给药同2.3项。加药培养48 h后,吸弃上清,收集细胞,提取总蛋白,用BCA蛋白定量检测试剂盒进行样品蛋白定量。每孔上样总蛋白20 μL进行SDS-PAGE电泳;转膜后用5%脱脂奶粉常温封闭2 h;加一抗(1:1 000)常温摇床中振荡孵育2 h;加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:5 000)常温振荡孵育1 h;洗膜,按照ECL荧光底物试剂盒中的步骤操作,进行发光、显影、定影,检测条带灰度值。实验重复3次。

2.6 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件对所得的实验数据进行统计学分析。计量资料表示为 $\bar{x}\pm s$,多个样本均数采用单因素方差分析(One-way ANOVA 检验)进行组间比较,方差齐时,多重比较采用最小显著性差异法(LSD),方差不齐时采用Dunnett's *t*, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 附子汤及羟氯喹对MH7A细胞IC₅₀的测定

将MH7A细胞经不同浓度药物及阳性药处理48 h后,采用CCK-8测定其A,由此测得附子汤对MH7A细胞的IC₅₀为24.1 g·L⁻¹,羟氯喹对MH7A细胞的IC₅₀为0.005 6 g·L⁻¹。随着药物质量浓度的升高,附子汤对MH7A细胞的抑制作用明显增加,呈明显的量效关系,见表2和表3。

3.2 附子汤对MH7A细胞增殖的影响 与空白组比较,附子汤高、低剂量组作用MH7A细胞48 h后,镜下可见细胞增殖明显被抑制;加药后48、72 h,与低剂量组比较,附子汤高剂量对MH7A细胞的增殖抑制作用更加明显($P<0.05$)。见图1、表4。

3.3 附子汤对MH7A细胞周期的影响 附子汤作用于MH7A细胞48 h后,对MH7A细胞的周期有明显的阻滞作用,与空白组比较,附子汤高剂量组G₀/G₁期细胞比例明显降低($P<0.05$),附子汤高、低剂

表2 附子汤对MH7A细胞生长的影响

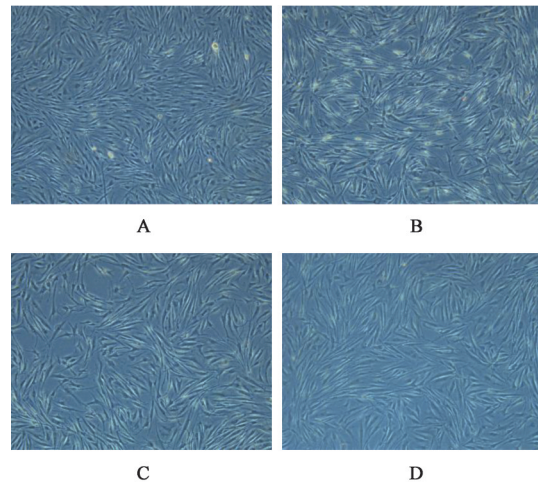
Table 2 Effect of Fuzitang(FZT) inhibition of MH7A cell

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A($\bar{x}\pm s, n=6$)	抑制率/%
空白组		0.714 4±0.056 7	0.00
附子汤组	100	0.003 4±0.001 1	99.52
	50	0.004 5±0.003 8	99.36
	25	0.411 2±0.039 1	29.14
	12.5	0.607 9±0.054 1	14.55
	6.25	0.639 2±0.079 0	10.14

表3 硫酸羟氯喹对MH7A细胞生长的影响(n=6)

Table 3 Effect of hydroxychloroquine sulfate on inhibition of MH7A cell (n=6)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%
空白组		0.993 7±0.059 0	0.00
羟氯喹组	0.05	0.018 7±0.002 4	98.12
	0.025	0.060 2±0.024 0	93.94
	0.012 5	0.404 2±0.168 1	59.33
	0.006 25	0.522 8±0.175 3	47.38
	0.003 125	0.603 2±0.152 7	39.30
	0.001 562 5	0.778 2±0.145 0	21.69



注:A. 空白组;B. 羟氯喹组;C. 附子汤高剂量组;D. 附子汤低剂量组

图1 显微镜下MH7A细胞形态图(倒置显微镜,×100)

Fig. 1 Morphology of MH7A cells under microscope (inverted microscope, ×100)

量组G₂/M期细胞比例明显增加($P<0.05$)。见表5。

3.4 附子汤对MH7A细胞miR-155及SHIP-1、Akt3、mTOR基因mRNA表达的影响 与空白组比较,附子汤高、低剂量组的miR-155的表达均明显下调($P<0.05$);与空白组比较,附子汤高剂量组的SHIP-1 mRNA表达升高($P<0.05$),附子汤高剂量组

表4 附子汤对MH7A细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of FZT on proliferation of MH7A cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	A		
		24 h	48 h	72 h
空白组		0.53±0.17	0.97±0.02	1.32±0.05
附子汤高剂量组	25	0.47±0.12	0.73±0.05 ^{1,2)}	0.96±0.06 ^{1,2)}
附子汤低剂量组	12.5	0.46±0.06	0.91±0.06 ¹⁾	1.19±0.06 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与附子汤低剂量组比较²⁾P<0.05(表5-表7同)

的Akt3 mRNA表达明显下调(P<0.05),附子汤高、低剂量的mTOR mRNA组表达明显下调(P<0.05)。

表5 附子汤对MH7A细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of FZT on MH7A cell cycle ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
空白组		75.77±0.47	13.70±0.26	10.14±0.34
附子汤高剂量组	25	50.50±1.10 ^{1,2)}	14.80±1.20	36.83±1.05 ^{1,2)}
附子汤低剂量组	12.5	63.37±3.10	14.88±2.93	21.57±0.35 ¹⁾
羟氯喹组	0.006 25	52.23±0.97 ¹⁾	19.17±1.10 ¹⁾	25.63±2.37 ¹⁾

其中附子汤高剂量组的SHIP-1 mRNA表达明显高于低剂量组、而Akt3 mRNA的表达明显低于低剂量组(P<0.05),呈明显的量效关系。见表6。

表6 附子汤对MH7A细胞miR-155及SHIP-1、Akt3、mTOR mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of FZT on mRNAs expression of miR-155, SHIP1, Akt3 and mTOR in MH7A cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	miR-155	SHIP-1	Akt3	mTOR
空白组		1.00±0.24	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.06
附子汤高剂量组	25	0.33±0.04 ¹⁾	4.18±0.28 ^{1,2)}	0.53±0.08 ^{1,2)}	0.65±0.13 ¹⁾
附子汤低剂量组	12.5	0.56±0.04 ¹⁾	1.51±0.44	0.90±0.05	0.74±0.17 ¹⁾
羟氯喹组	0.006 25	0.37±0.05 ¹⁾	2.73±0.68 ^{1,2)}	0.40±0.04 ^{1,2)}	0.49±0.07 ^{1,2)}

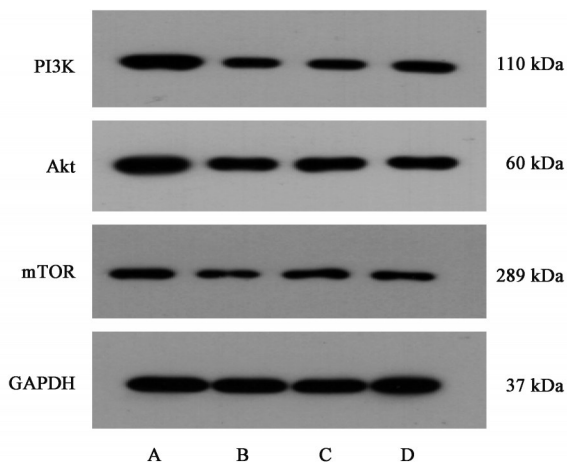
3.5 附子汤对MH7A细胞PI3K/Akt3/mTOR信号通路蛋白表达的影响 与空白组比较,附子汤高、

低剂量组的PI3K、Akt3和mTOR蛋白表达均明显下调(P<0.05)。见表7、图2。

表7 附子汤对MH7A细胞信号通路PI3K/Akt3/mTOR蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of FZT on expression of PI3K/Akt3/mTOR protein in MH7A cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	PI3K/GAPDH	Akt3/GAPDH	mTOR/GAPDH
空白组		1.282±0.170	1.038±0.123	0.788±0.081
附子汤高剂量组	25	0.559±0.015 ¹⁾	0.780±0.095 ¹⁾	0.555±0.105 ¹⁾
附子汤低剂量组	12.5	0.579±0.026 ¹⁾	0.794±0.080 ¹⁾	0.613±0.028 ¹⁾
羟氯喹组	0.006 25	0.632±0.062 ¹⁾	0.714±0.075 ¹⁾	0.561±0.068 ¹⁾



注:A. 空白组;B. 附子汤高剂量组;C. 附子汤低剂量组;D. 羟氯喹组

图2 各组MH7A细胞PI3K/Akt3/mTOR信号通路蛋白电泳
Fig. 2 Electrophoresis of PI3K/Akt3/mTOR protein expression in MH7A cells of each groups

4 讨论

RA-FLS激活是RA发展的早期步骤,以T和B淋巴细胞为代表的免疫细胞浸润关节滑膜组织,并促进促炎性细胞因子的释放,使RA-FLS异常增殖并产生大量白细胞介素-6(IL-6)、IL-8和环氧合酶-2(COX-2)及基质金属蛋白酶(MMP)^[7-8]。细胞因子和趋化因子的产生进而吸引更多的炎症细胞。活化的成纤维细胞,连同活化的T细胞、B细胞、单核细胞和巨噬细胞,通过滑膜细胞上表达的核转录因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)的受体活化剂触发破骨细胞的生成,导致骨侵蚀发生、软骨退化从而形成关节破坏^[9-10]。RA-FLS与血管生成也有紧密联系,血管生成后,进一步提高这些细胞的增殖率^[11-13],导致慢性炎症形成。

miR-155作为一种多功能miRNA,参与多种疾

病的发生过程,包括癌症、炎症和免疫异常疾病。miR-155在不同的细胞类型和组织环境中表达均有所不同,并且受到多种信号途径的影响和调节。在RA中,miR-155和miR-146可以交叉调节炎症反应^[14]。miR-155可影响RA患者不同类型的细胞及细胞因子。例如,单核细胞、巨噬细胞、B细胞、T细胞和成纤维细胞等多种细胞产生多向性细胞因子。高表达的miR-155,在RA发病过程中,发挥促炎及促进RA-FLS的异常增殖作用^[15]。在RA患者的关节和滑膜成纤维细胞中检测到miR-155的表达高于正常滑膜组织,且TNF- α 、IL-1 β 、脂多糖、poly(IC)可以进一步诱导miR-155的表达。在正常滑膜细胞中,TNF- α 刺激后,miR-155表达没有变化。而下调miR-155的表达可中和TNF- α 诱导的RA-FLS的增殖和侵袭^[16]。实验研究显示敲除miR-155基因的小鼠,可以完全免于胶原刺激诱导产生的关节炎^[17],提示miR-155有可能成为RA治疗的理想靶标^[18]。

SHIP-1是肌醇5-磷酸酶家族成员之一^[19],基因定位于2q36~37,能够负调控细胞增殖,是除了PTEN以外发现的另外一种肌醇磷酸酶^[20]。已证实SHIP-1是miR-155的靶基因,SHIP-1的表达受miR-155负调控。miR-155的过度表达可导致SHIP-1的表达下调,致使PI3K/Akt/mTOR信号通路活化^[4],SHIP-1通过负调控PI3K/Akt/mTOR信号通路,影响细胞的增殖和凋亡,并调节T细胞分化及细胞因子的分泌,从而影响RA炎症反应^[21]。

PI3K/Akt/mTOR信号级联与RA的发生发展密切相关。RA患者滑膜组织中PI3K/Akt/mTOR信号通路处于异常激活状态^[22],其可抑制RA-FLS自噬并促进RA-FLS持续增生,加重RA病情^[23]。研究表明PI3K抑制剂能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号转导有效抑制MH7A增殖,还可降低MH7A的IL-6水平,从而降低RA-FLS的炎症反应^[24]。在RA整个发生过程中,PI3K/Akt信号通路与滑膜炎^[25-28]、软骨破坏与骨侵蚀^[29-32]、血管翳^[33-34]三大病理改变都密切相关。

本实验证实附子汤具有较好的抑制MH7A细胞增殖的作用,研究结果显示附子汤包括但不限于通过调整细胞周期及下调miR-155的表达,从而上调SHIP-1的表达,进而抑制下游PI3K/Akt/mTOR信号通路基因表达,发挥抑制MH7A细胞增殖作用。提示附子汤可能通过抑制RA-FLS的增殖从而阻止类风湿性关节炎的持续发生进而治疗类风湿性关节炎。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PICERNO V, FERRO F, ADINOLFI A, et al. One year in review: The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33(4): 551-558.
- [2] LEE S Y, CHO M L, OH H J, et al. Interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody immune complex suppresses collagen-induced arthritis in mice by fortifying interleukin-2/STAT5 signalling pathways [J]. *Immunology*, 2012, 137(4): 305-316.
- [3] COOLES F A, ISAACS J D, ANDERSON A E. Treg cells in rheumatoid arthritis: An update [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2013, 15(9): 352.
- [4] KUROWSKA-STOLARSKA M, ALIVERNINI S, BALLANTINE L E, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(27): 11193-11198.
- [5] 李赛美, 李宇航. “十二五”普通高等教育本科国家级规划教材. 伤寒论讲义 [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 208-209.
- [6] MIYAZAWA K, MORI A, OKUDAIRA H. Establishment and characterization of a novel human rheumatoid fibroblast-like synoviocyte line, MH7A, immortalized with SV40 T antigen [J]. *J Biochem*, 1998, 124(6): 1153-1162.
- [7] HUBER L C, DISTLER O, TARNER I, et al. Synovial fibroblasts: Key players in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(6): 669-675.
- [8] MEINECKE I, RUTKAUSKAITE E, GAY S, et al. The role of synovial fibroblasts in mediating joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(5): 563-568.
- [9] SMOLEN J S, ALETAHA D, KOELLER M, et al. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2007, 370(9602): 1861-1874.
- [10] MCINNES I B, SCHEFF G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [11] FIRESTEIN G S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(11): 1781-1790.
- [12] FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 27-31.
- [13] KOCH A E, HARLOW L A, HAINES G K, et al.

- Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol*, 1994, 152(8):4149-4156.
- [14] MANN M, MEHTA A, ZHAO J L, et al. An NF- κ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):851.
- [15] SHARMA A R, SHARMA G, LEE S S, et al. miRNA-regulated key components of cytokine signaling pathways and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(3):425-439.
- [16] WANG J, ZHAO Q. LncRNA LINC-PINT increases SOCS1 expression by sponging miR-155-5p to inhibit the activation of ERK signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts induced by TNF- α [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84:106497.
- [17] BLÜMLS, BONELLIM, NIEDERREITERB, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(5):1281-1288.
- [18] SU L C, HUANG A F, JIA H, et al. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis [J]. *Int J Rheum Dis*, 2017, 20(11):1631-1637.
- [19] NAKANO N, NISHIYAMA C, YAGITA H, et al. Notch signaling enhances Fc ϵ RI-mediated cytokine production by mast cells through direct and indirect mechanisms [J]. *J Immunol*, 2015, 194(9):4535-4544.
- [20] XIONG Y, MEDVEDEV A E. Induction of endotoxin tolerance *in vivo* inhibits activation of IRAK4 and increases negative regulators IRAK-M, SHIP-1, and A20 [J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 90(6):1141-1148.
- [21] 张妍, 陆芸. 磷酸酶 SHIP-1 对 T 细胞分化、稳态和免疫应答的调控效应 [J]. *复旦学报:医学版*, 2014, 41(3):412-415, 426.
- [22] SMITH M D, WEEDON H, PAPANGELIS V, et al. Apoptosis in the rheumatoid arthritis synovial membrane: Modulation by disease-modifying anti-rheumatic drug treatment [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, 49(5):862-875.
- [23] QU Y, WU J, DENG J X, et al. MicroRNA-126 affects rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation and apoptosis by targeting PIK3R2 and regulating PI3K-Akt signal pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(45):74217-74226.
- [24] KIM J, JUNG K H, YOO J, et al. PBT-6, a novel PI3KC2 γ inhibitor in rheumatoid arthritis [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2020, 28(2):172-183.
- [25] KIM K W, CHO M L, PARK M K, et al. Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor kappaB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(1):R139-R148.
- [26] TSAI C H, LIU S C, WANG Y H, et al. Osteopontin inhibition of miR-129-3p enhances IL-17 expression and monocyte migration in rheumatoid arthritis [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861(2):15-22.
- [27] DINESH P, RASOOL M. Berberine inhibits IL-21/IL-21R mediated inflammatory proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the attenuation of PI3K/Akt signaling pathway and ameliorates IL-21 mediated osteoclastogenesis [J]. *Cytokine*, 2018, 106:54-66.
- [28] MITRA A, RAYCHAUDHURI S K, RAYCHAUDHURI S P. IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade [J]. *Cytokine*, 2012, 60(1):38-42.
- [29] WU L, GUO Q, YANG J, et al. Tumor necrosis factor alpha promotes osteoclast formation via PI3K/Akt pathway-mediated blimp1 expression upregulation [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(6):1308-1315.
- [30] CHOE J Y, HUN KIM J, PARK K Y, et al. Activation of dickkopf-1 and focal adhesion kinase pathway by tumour necrosis factor α induces enhanced migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2016, 55(5):928-938.
- [31] LIACINI A, SYLVESTER J, LI W Q, et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 288(1):208-217.
- [32] XUAN W, FENG X, QIAN C, et al. Osteoclast differentiation gene expression profiling reveals chemokine CCL4 mediates RANKL-induced osteoclast migration and invasion via PI3K pathway [J]. *Cell Biochem Funct*, 2017, 35(3):171-177.
- [33] WANG C H, CHEN L N, ZHU P, et al. CD147 stimulates the angiogenesis in rheumatoid synovium via the activation of vascular endothelial growth factor [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2007, 23(5):426-428.
- [34] ZOU L, ZHANG G, LIU L, et al. Relationship between PI3K pathway and angiogenesis in CIA rat synovium [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7):3141-3147.

[责任编辑 周冰冰]