

白藜芦醇抑制低浓度 H₂O₂ 处理佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞增殖的机制研究

李娜^{1,2}, 张俊强¹, 曹威¹, 殷瞳昕³, 胡永涛³, 陈晓宇¹

摘要 目的 探讨抗氧化剂白藜芦醇(Res)对低浓度 H₂O₂ 处理的佐剂性关节炎(AA)大鼠成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖的抑制作用。方法 弗氏完全佐剂足趾皮下注射 SD 雄性大鼠,建立 AA 模型,14 d 后股动脉放血处死 AA 大鼠,取血清检测氧化应激指标,组织块培养法培养大鼠滑膜细胞, CCK-8 法观察不同浓度的 H₂O₂ 对 FLS 的增殖影响, Western blot 法检测氧化应激相关蛋白去乙酰化酶 3(SIRT3)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)蛋白的表达。结果 AA 模型大鼠血清氧化应激指标升高,体外实验表明,随着 Res 的浓度增加,低浓度 H₂O₂ 处理的 AA 大鼠 FLS 增殖受抑制, SIRT3、MnSOD 蛋白表达降低。结论 Res 可减轻 AA 大鼠体内的氧化应激状态,机制与降低抗氧化应激蛋白 SIRT3、MnSOD 的表达有关。

关键词 佐剂性关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 白藜芦醇; 去乙酰化酶 3; 锰超氧化物歧化酶

2017-05-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81373421); 安徽医科大学七年制临床医学专业学生“早期接触科研”训练计划项目(编号: 2016-ZQKY-57)

作者单位: 安徽医科大学¹ 组织学与胚胎学教研室、³ 第二临床医学院, 合肥 230032

² 安徽省体育科学技术研究所, 合肥 230001

作者简介: 李娜, 女, 硕士, 检验师;

陈晓宇, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: cxyayd@163.com

中图分类号 R 332.72

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1446-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.007

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属于自身免疫性关节疾病,病理表现为关节滑膜慢性炎症,RA 主要表现为成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)异常增殖和大量炎细胞(如淋巴细胞和巨噬细胞等)浸润,关节结构破坏^[1]。研究^[2]显示,活性氧(reactive oxygen, ROS)的增加与 FLS 的异常增殖有一定的联系。白藜芦醇(resveratrol, Res)为多元酚类植物,能够显著降低大鼠体内应激状态,其抑制 FLS 增殖作用机制与抗氧化应激蛋白去乙酰化酶 3(sirtuin3, SIRT3)、锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)的降低密切相关^[3]。该研究旨在体外探讨抗氧化剂 Res 对佐剂性关节炎(adjunct arthritis, AA)大鼠 FLS 增殖影响及是否通过 SIRT3-MnSOD-ROS 而抑制 FLS 增殖。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠,重(170 ± 10)g,饲养于安徽医科大学动物实验中心。饲养于

was used to transfect human gastric epithelial GES-1 cells *in vitro*. After transfection, GES-1 cells were first selected in cell-cultured medium containing puromycin, and then the selected GES-1 cells were replated into 100 mm dishes for clonal cell culture. Protein samples extracted from individual cell clones were used for Western blot analysis of KLF4 expression. Biological assays of plate clone formation, MTT cell proliferation, and transwell cell migration were used to compare the cellular behavior changes among GES-1 cells of parental, control clone or clone with KLF4 gene knockdown. **Results** DNA sequence analysis confirmed that KLF4 targeting sgRNA sequences were successfully constructed into of pX459 vector. Transfection of the resultant vector of pX459-KLF4-sgRNA into GES-1 cells led to KLF4 gene knockdown indicated by drastic reduction of KLF4 protein expression, significant biological behavior changes including increased cell proliferation, clone formation, and migration abilities. **Conclusion** We successfully constructed human KLF4 gene editing plasmid vector based on CRISPR/Cas9 technique, and the biological behavior changes of the established GES-1 cell line with drastic KLF4 knockdown confirmed the tumor suppressive function of KLF4.

Key words KLF4; CRISPR/Cas9; gastric cancer; GES-1

室温(25±2)℃,每天光照/黑暗为12 h/12 h,自由饮食水。

1.2 试剂和主要仪器 Res 纯度超过99%、弗氏完全佐剂(美国Sigma公司);30% H₂O₂(北京万佳首化生物科技有限公司);SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathion peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(江苏南京建成生物工程研究所);DMEM高糖培养基、胎牛血清 FBS(美国Gibco公司);BCA蛋白定量试剂盒(美国Pierce公司);一抗:羊抗大鼠多克隆抗体血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecular-1, VCAM-1)、SIRT3、MnSOD(美国Abcam公司);CCK-8试剂盒、青链霉素溶液、辣根过氧化物酶兔抗羊标记的二抗、DAB显色试剂盒(江苏碧云天生物有限公司);BCA蛋白测定试剂盒、ECL化学发光液硝酸纤维素膜(美国Millipore公司)。

1.3 动物建模、滑膜细胞培养、鉴定 SD大鼠分为两组:对照组(10只)、模型组(10只)。模型组大鼠右后足趾皮内注射0.1 ml 弗氏完全佐剂致炎,建立AA大鼠模型。致炎14 d后,SD大鼠股动脉放血处死,收集血清。按照本实验室常规方法进行组织块培养法培养大鼠FLS,方法如下^[4]:无菌条件下,钝性分离踝关节周围的肌腱、韧带和脂肪组织等,剥离滑膜组织,组织剪剪碎,D-Hank's液漂洗,将组织块放置于含少许20%胎牛血清的DMEM细胞培养基液的培养瓶壁上,置37℃、饱和湿度、5% CO₂培养箱中培养,组织块周围长出FLS并逐渐排满后,移除组织块,继续FLS培养,0.5 g/L胰蛋白酶消化传代。传代3次后,免疫荧光细胞化学染色,选用羊抗大鼠VCAM-1多克隆抗体鉴定。

1.4 分光光度计检测大鼠血清抗氧化指标 取置于-20℃冰箱中保存待测的血清样本,按照使用说明书,运用分光光度计检测大鼠血清抗氧化指标,硫代巴比妥酸法检测MDA含量、羟胺法检测SOD活性和比色法测定GSH-Px活性。

1.5 CCK-8法测定Res对低浓度H₂O₂处理的AA大鼠滑膜FLS增殖的作用 依据本课题组前期结果,低浓度H₂O₂溶液(≤5 μmol/L)处理FLS,可促进FLS增殖,本课题组选择5 μmol/L H₂O₂处理FLS^[5]。密度为1×10⁵/L的对数生长期的AA大鼠FLS细胞,100 μl接种于96孔培养板中,加入100 μl的H₂O₂溶液(终浓度5 μmol/L),每组设4个复孔,37℃、含10% FBS的DMEM培养基、5% CO₂培养箱中培养48 h; Res处理(终浓度10、50、100、

200、400 μmol/L),以DMSO为对照组,处理24 h;每孔加入CCK-8溶液20 μl继续培养4 h。取出培养板,全自动酶标仪(芬兰雷勃公司)450 nm波长处测吸光度(absorbance, A)值,测定AA大鼠FLS增殖情况,实验重复3次,以3次试验均值为所得结果。

1.6 Western blot法检测氧化应激相关蛋白的表达 2×10⁵/孔AA大鼠FLS细胞接种于6孔板,加入终浓度5 μmol/L H₂O₂溶液培养24 h后,再加入Res处理(终浓度50、200 μmol/L),以DMSO为对照组,处理24 h;蛋白酶抑制剂RIPA裂解液提取总蛋白,4℃、12 000 r/min离心5 min,取上清液,蛋白定量采取BCA蛋白试剂盒,行SDS-PAGE凝胶电泳,半干转膜仪转膜1 h,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,4℃孵育SIRT3、MnSOD抗体孵育过夜,含0.05% Tween-20上午TBST洗膜3次,每次10 min,二抗室温孵育2 h, ECL化学发光、曝光压片、显影、定影。

1.7 统计学处理 采用SPSS 19.0软件进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较多组间均数差异性,两组间差异比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AA大鼠血清氧化应激指标 与对照组比较,模型组的MDA含量、GSH-Px含量、SOD活性均显著升高($P < 0.01$)。见表1。

表1 大鼠血清中MDA、GSH-Px含量和SOD活性活性的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

项目	对照组	模型组	t 值	P 值
MDA(μmol/L)	4.56±0.63	11.33±0.86	6.708	0.001
GSH-Px(μmol/L)	187.16±6.87	141.82±9.23	5.341	0.004
SOD(U/ml)	218.62±5.04	137.24±8.73	5.682	0.003

2.2 FLS培养、传代和鉴定 按本课题组常规方法组织块培养法培养大鼠FLS,待FLS长出组织块后,去除组织块,继续培养,胰酶消化并传代培养,取3~5代细胞用于实验,FLS其分子标记之一为羊抗大鼠多克隆抗体VCAM-1在FLS上大量表达,而来源于身体其他组织细胞不表达VCAM-1,结合形态学观察,可见培养细胞主要为FLS(图1)。

2.3 Res对低浓度H₂O₂处理的AA大鼠FLS增殖的作用 预先在培养的FLS中加入5 μmol/L H₂O₂处理48 h,然后Res处理(终浓度10、50、100、200、400 μmol/L),以DMSO为对照组,处理24 h,加

入 50 ~ 400 $\mu\text{mol/L}$ Res 能够显著抑制低浓度 H_2O_2 处理的 FLS 增殖,与对照组比较差异有统计学意义 ($F = 9.521$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 2。

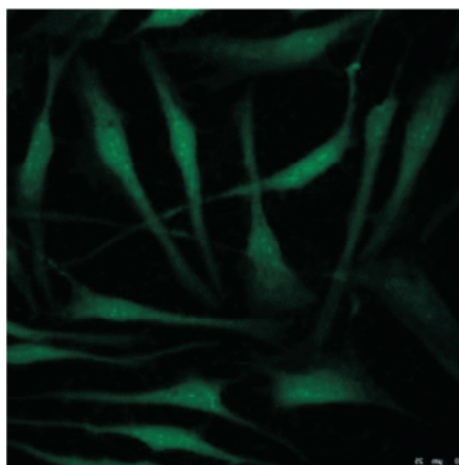


图1 滑膜细胞 VCAM-1 表达 免疫荧光化学染色 $\times 400$

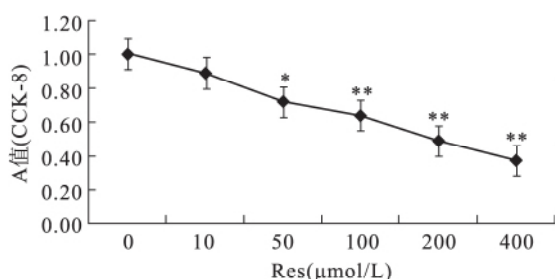


图2 不同浓度 Res 抑制低浓度 H_2O_2 的 AA 大鼠 FLS 增殖情况
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 Res 对低浓度 H_2O_2 处理的 AA 大鼠 FLS 线粒体氧化应激蛋白表达的影响 Western blot 结果表明,与对照组比较,5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后, MnSOD、SIRT3 蛋白的表达量增加 ($t = 3.572$, $P < 0.01$); 加入 Res 不同浓度 (50、200 $\mu\text{mol/L}$) 后, MnSOD、SIRT3 蛋白随着 Res 浓度的增加, 表达量逐渐降低。经统计学分析, 与 5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后的比较, 差异有统计学意义 ($F = 8.073$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 3。

3 讨论

影响 RA 的一个重要因素是氧化应激性反应, 长期关节疼痛、功能受限和治疗等刺激使 RA 患者处于应激状态, 机体出现脂质过氧化反应, ROS 的生成增加, 而清除 ROS 的能力下降^[5]。因与 RA 在形态学上相似, 且 AA 大鼠模型造模简单, 是目前较

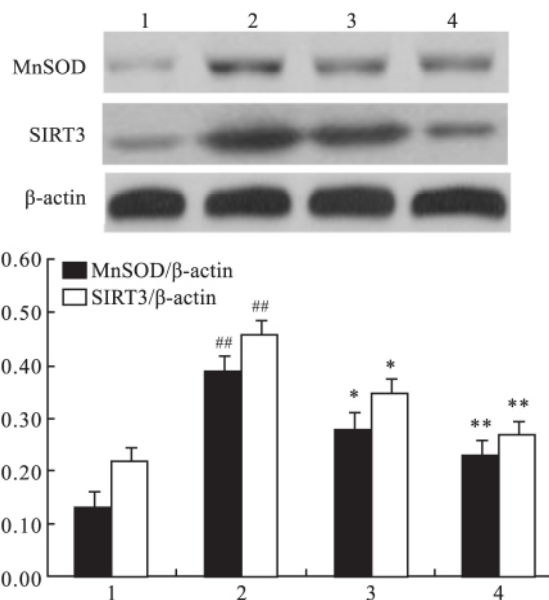


图3 Western blot 法检测 MnSOD、SIRT3 蛋白在移植瘤组织中的表达

1: 对照组; 2: 5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理组; 4: 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理组; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

为理想的 RA 动物模型, 在 RA 药物筛选模型中常常使用; MDA 是生物膜脂质过氧化产物, 反映机体在自由基 ROS 损害后细胞氧化损伤的程度, GSH-Px 和 SOD 是机体抗氧自由基损伤的酶类, 具有保护细胞膜结构和功能的完整性^[6]。本研究通过 SD 大鼠足趾皮下注射弗氏完全佐剂制备 AA 模型大鼠, 成模 14 d 后, 血清学研究显示, 与对照组比较, 模型组氧化指标 MDA、GSH-Px 含量明显升高, SOD 活力明显下降, 因此, 进一步证实 AA 大鼠体内存在氧化应激。

FLS 在 RA 的发病过程中起着至关重要的作用, 增生的滑膜细胞可产生促炎性因子, 如白介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 等, 刺激和活化中性粒细胞和巨噬细胞, 分泌 ROS, 使其成为关节损伤的中介^[7]。前期体外实验^[6]表明, 在 H_2O_2 较低浓度 ($\leq 5 \mu\text{mol/L}$) 范围内, 可促进 AA 大鼠 FLS 生长, 当 $\text{H}_2\text{O}_2 > 5 \mu\text{mol/L}$ 时, 抑制 FLS 增殖, 其凋亡数明显升高。多元酚类化合物 Res 分布广泛, 具有显著的抗炎、抗氧化作用^[8]。因此, 本研究成功分离、培养并鉴定为 FLS, 选择 5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 模拟体内滑膜细胞生长氧化应激状态, CCK-8 细胞增殖实验表明, Res 可以抑制 FLS 增殖, 且随着 Res 浓度的升高, 其抗增殖抑制作用更加明显。

线粒体是细胞内氧化代谢和产生能量、自由基的重要场所, MnSOD 是存在于真核细胞线粒体中的金属抗氧化酶, 可将超氧阴离子自由基(O_2^-)₂ 转化为 H_2O_2 和 O_2 , 故其在抗氧化损伤中作用显著; SIRT3 是 SIRTs 家族中位于线粒体中, 调节抗氧化应激和线粒体能量代谢^[9]。本文血清学研究表明, AA 大鼠机体存在氧化应激; 体外研究通过 Western blot 法检测证实, 通过低浓度 H_2O_2 (5 μ mol/L) 处理后, 线粒体氧化应激蛋白 MnSOD 和 SIRT3 表达显著增加, 而 Res (50、200 μ mol/L) 处理后, MnSOD、SIRT3 蛋白表达明显下降; 灰度比值半定量分析表明, 随着 Res 浓度的增加, MnSOD/ β -actin、SIRT3/ β -actin 表达量降低更加明显, 表明随着 Res 的浓度增加, 其抗氧化能力增强。

综上所述, AA 大鼠体内存在氧化应激状态, Res 对 AA 大鼠 FLS 的异常增殖起抑制作用, Res 对 FLS 的抑制作用可能与抑制线粒体 MnSOD-SIRT3 通路作用有关。

参考文献

- [1] Wendling D, Vidon C, Abbas W, et al. Sirt1 activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2014, 81(5): 462-3.
- [2] 俞晨, 张俊强, 储海峰, 等. 白藜芦醇对过氧化氢诱导滑膜细胞凋亡的作用及机制[J]. *解剖学杂志*, 2016, 39(4): 431-5.
- [3] Kim H Y, Park S Y, Lee S W, et al. Inhibition of HMGB1-induced angiogenesis by cilostazol via SIRT1 activation in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104743.
- [4] 杨珺, 张俊强, 赵欢, 等. 白藜芦醇诱导佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞凋亡[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(1): 41-4.
- [5] Zhang J, Song X, Cao W, et al. Autophagy and mitochondrial dysfunction in adjuvant-arthritis rats treatment with resveratrol [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32928.
- [6] Chen X, Lu J, An M, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adjuvant arthritis rats with abnormal immunological function via the reduction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2592-8.
- [7] Chen X Y, Wang Z C, Li J, et al. Regulation of synoviocyte activity by resveratrol in rats with adjuvant arthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(1): 172-6.
- [8] Valcárcel-Ares M N, Riveiro-Naveira R R, Vaamonde-García C, et al. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(7): 1332-43.
- [9] 苏会萍, 张俊强, 曹威, 等. MnSOD-SIRT3 在佐剂性关节炎大鼠肝组织中的表达和意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(9): 1268-72.

Resveratrol inhibits low concentration of H_2O_2 treatment of fibroblast-like synoviocytes proliferation and the possible mechanism in adjuvant arthritis rats

Li Na^{1,2}, Zhang Junqiang¹, Cao Wei¹, et al

(¹Dept of Histology & Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²The Anhui Province Sports Institute of Science and Technology, Hefei 230001)

Abstract Objective To explore antioxidant resveratrol inhibits low concentration of H_2O_2 treatment of fibroblast-like synoviocytes (FLS) proliferation and the possible mechanism in adjuvant arthritis (AA) rats. **Methods** Freund's complete adjuvant (FCA) injected subcutaneously into SD rats induced by AA, the AA rats were sacrificed in 14th days, serum oxidative stress indicators were checked, different concentrations of H_2O_2 proliferation effect of FLS CCK₈ was observed, oxidative stress related protein expression of SIRT3, MnSOD were detected by Western blot. **Results** Serum levels of oxidative stress indicators increased in AA model rats, *in vitro* experiments showed that with the concentration of Res increased, low concentration of H_2O_2 -treated AA rats FLS proliferation was inhibited, SIRT3, MnSOD protein expression decreased. **Conclusion** Res can reduce the oxidative stress status in AA rats, and its mechanism is related to the decrease of anti-oxidative stress protein SIRT3 and MnSOD.

Key words adjuvant arthritis; fibroblast-like synoviocytes; resveratrol; SIRT3; MnSOD