

梓醇对类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞增殖和YAP/TAZ信号通路的影响

江忠英* 向刚 周晓莉

(资阳市雁江区人民医院, 风湿免疫内分泌科, 资阳 641300)

摘要 该文探究梓醇对类风湿性关节炎(RA)成纤维滑膜细胞增殖(FLS)和Yes相关蛋白(YAP)/PDZ结合基序转录共激活因子(TAZ)信号通路的影响。体外培养人类风湿关节炎成纤维滑膜细胞HFLS-RA并以20 ng/mL肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导建立RA细胞模型, 取SD大鼠采用II型胶原构建RA动物模型, 将其随机分为模型组、梓醇组、空载组、梓醇+YAP过表达组, 每组10只, 另选10只SD大鼠和正常培养HFLS-RA细胞设为对照组, 梓醇、空载质粒和YAP过表达质粒分组处理后以CCK-8法和TUNEL染色、流式细胞术分别检测各组HFLS-RA细胞增殖、凋亡情况; 足趾测量仪评测各组大鼠足容积并按5级评分法进行关节炎评分; HE染色检测各组大鼠关节滑膜组织病理形态; TUNEL染色检测各组大鼠关节滑膜组织细胞凋亡情况; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组HFLS-RA细胞与RA大鼠血清促炎因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、IL-6水平; 免疫印迹实验检测各组HFLS-RA细胞与RA大鼠关节滑膜组织增殖与YAP/TAZ信号相关蛋白表达情况。结果显示, 与对照组相比, 模型组HFLS-RA细胞存活率、大鼠足容积及关节炎评分、HFLS-RA细胞与RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL-1 β 水平、HFLS-RA细胞与RA大鼠关节滑膜组织Cyclin D1、YAP、TAZ蛋白表达水平升高($P < 0.05$), HFLS-RA细胞凋亡率、大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比降低($P < 0.05$)。与模型组相比, 梓醇组HFLS-RA细胞存活率、大鼠足容积及关节炎评分、HFLS-RA细胞与RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL-1 β 水平、HFLS-RA细胞与RA大鼠关节滑膜组织Cyclin D1、YAP、TAZ蛋白表达水平降低($P < 0.05$), HFLS-RA细胞凋亡率、大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比升高($P < 0.05$); 空载组各指标无明显变化($P > 0.05$)。与梓醇组相比, 梓醇+YAP过表达组HFLS-RA细胞存活率、大鼠足容积及关节炎评分、HFLS-RA细胞与RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL-1 β 水平、HFLS-RA细胞与RA大鼠关节滑膜组织Cyclin D1、YAP、TAZ蛋白表达水平升高($P < 0.05$), HFLS-RA细胞凋亡率、大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比降低($P < 0.05$)。总之, 梓醇可通过减弱YAP/TAZ信号活性而降低RA大鼠及细胞模型炎症水平, 进而抑制FLS增殖, 并减轻RA大鼠关节炎症状。

关键词 梓醇; 类风湿性关节炎; 成纤维滑膜细胞; 增殖; YAP/TAZ

Effects of Catalpol on the Proliferation of Rheumatoid Arthritis Fibroblast Synovial Cells and YAP/TAZ Signaling Pathway

JIANG Zhongying*, XIANG Gang, ZHOU Xiaoli

(Department of Rheumatology, Immunology and Endocrinology,
People's Hospital of Yanjiang District, Ziyang City, Ziyang 641300, China)

收稿日期: 2023-11-24 接受日期: 2024-05-14

四川省卫生健康委员会科研课题(批准号: 19PJ107)资助的课题

*通信作者: Tel: 18111108706, E-mail: j14j3x6@163.com

Received: November 24, 2023

Accepted: May 14, 2024

This work was supported by the Research Project of Sichuan Provincial Health Commission (Grant No.19PJ107)

*Corresponding author. Tel: +86-18111108706, E-mail: j14j3x6@163.com

Abstract This article explores the effects of catalpol on proliferation of FLS (fibroblast-like synoviocytes) and YAP (yes-associated protein)/TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) signaling pathway in RA (rheumatoid arthritis). Human arthritis fibroblast like synovial cells HFLS-RA were cultured *in vitro* and induced with 20 ng/mL TNF- α (tumor necrosis factor- α) to establish a RA cell model, SD rats were selected to construct an RA animal model using type II collagen, and then randomly grouped into model group, catalpol group, empty group, and catalpol+YAP overexpression group, 10 per group, another 10 SD rats and normal cultured HFLS-RA cells were selected as the control group, after grouping and treatment with catalpol, empty plasmid, and YAP overexpression plasmid, CCK-8 method and TUNEL staining, flow cytometry were applied to detect the proliferation and apoptosis of HFLS-RA cells in each group, respectively; the foot volume of rats in each group was measured by the toe measuring instrument and the arthritis score was performed according to the 5-level scoring method; TUNEL staining was applied to detect apoptosis in the synovial tissue of rats in each group; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was applied to detect the levels of pro-inflammatory factors IL-1 β (interleukin-1 β), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), and IL-6 in serum of HFLS-RA cells and RA rats in each group; immunoblotting experiments were applied to detect the expression of proliferation and YAP/TAZ signaling related proteins in HFLS-RA cells and synovial tissue of RA rats in each group. The results showed that, compared with the control group, the survival rate of HFLS-RA cells, rat foot volume and arthritis score, the levels of IL-6, MCP-1, IL-1 β in HFLS-RA cells and in serum of RA rats, and the expression of Cyclin D1, YAP and TAZ proteins in HFLS-RA cells and in synovial tissue of RA rats in the model group increased ($P<0.05$), while the apoptosis rate of HFLS-RA cells and the apoptosis ratio of synovial tissue cells in rat decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the survival rate of HFLS-RA cells, rat foot volume and arthritis score, the levels of IL-6, MCP-1, IL-1 β in HFLS-RA cells and in serum of RA rats, and the expression of Cyclin D1, YAP and TAZ proteins in HFLS-RA cells and in synovial tissue of RA rats in the catalpol group decreased ($P<0.05$), the apoptosis rate of HFLS-RA cells and the apoptosis ratio of synovial tissue cells in rat increased ($P<0.05$); there was no significant change in all indicators in the empty load group ($P>0.05$). Compared with the catalpol group, the survival rate of HFLS-RA cells, rat foot volume and arthritis score, the levels of IL-6, MCP-1, IL-1 β in HFLS-RA cells and in serum of RA rats, and the expression of Cyclin D1, YAP and TAZ proteins in HFLS-RA cells and in synovial tissue of RA rats in the catalpol+YAP overexpression group increased ($P<0.05$), while the apoptosis rate of HFLS-RA cells and the apoptosis ratio of synovial tissue cells in rat decreased ($P<0.05$). In short, catalpol can reduce inflammation levels in RA rats and cell models by weakening YAP/TAZ signaling activity, thereby inhibiting FLS proliferation and alleviating arthritis symptoms in RA rats.

Keywords catalpol; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; proliferation; YAP/TAZ

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是发病率较高的一种自身免疫性慢性疾病, 关节炎症、滑膜过度增生、软骨损伤等是其主要病理特征, 可导致患者关节酸胀疼痛、关节功能损伤和活动受限等, 致畸、致残率高, 给患者生活中造成极大不便和痛苦^[1-2]。成纤维滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 是 RA 的直接效应细胞, 促炎因子侵袭引发的 FLS 细胞高度活化、炎症及凋亡受阻是 RA 发展的重要病理机制, 通过抑制关节滑膜炎症及其异常增生可有效改善 RA 症状^[3-4]。Yes 相关蛋白 (yes-

associated protein, YAP)/PDZ 结合基序转录共激活因子 (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ) 是调控细胞活化、增殖及炎症的重要信号, 敲除 Yap、Taz 可消除梗死心脏中巨噬细胞极化引发的炎症, 并通过抑制成纤维细胞活化、增殖而减轻心肌梗死后心脏纤维化^[5], 研究显示, YAP 在骨关节炎软骨中表达水平升高^[6], 且 YAP 和 TAZ 在 RA-FLS 细胞中表达水平上调, 敲低 YAP 或 TAZ 可抑制 RA-FLS 细胞迁移和侵袭^[7], 因此 YAP 和 TAZ 可作为治疗 RA 的潜在靶点。梓醇是中药材地黄的一种有效成

分,具有较强的抗氧化和抗炎特性,可通过抑制氧化应激和神经炎症而减轻创伤性脑损伤后神经损伤^[8],可显著抑制白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)诱导的软骨细胞炎症损伤^[9],还可通过抑制Th17细胞的分化而缓解RA小鼠关节炎症^[10],由此推测梓醇可能是治疗RA的有效药物。本文通过构建RA细胞及大鼠模型,基于YAP/TAZ信号探究梓醇对RA-FLS细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD健康大鼠(SPF级,52只,周龄为6~7周,体质量为205~240 g),购自南通药明康德医药科技有限公司,生产许可证号SCXK(苏)2019-0008。所有大鼠在屏障环境动物房(温度22~25℃、湿度55~65%)中适应饲养1周后用于实验,且实验符合3R原则。本研究获得资阳市雁江区人民医院伦理委员会审批通过(批件号:2023-02031)。

1.1.2 主要试剂 人类风湿关节炎成纤维滑膜细胞HFLS-RA、DMEM基础培养基购于长沙艾碧维生物科技有限公司;人重组肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)蛋白因子(纯度>95%,批号PME30019)购于缔码生物科技(武汉)有限公司;梓醇(纯度99.6%,批号110808-202313)购于中国食品药品检定研究院;牛II型胶原(纯度>99%,批号20021)购于上海牧荣生物科技有限公司;弗氏不完全佐剂(批号SLCB8702)、弗氏完全佐剂(批号SLCC6223)购于美国Sigma公司;YAP过表达质粒、空载质粒购于北京靖瑞百康生物技术有限公司;Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;CCK-8试剂盒、HE染色试剂盒、TUNEL测定试剂盒(HRP-DAB)、大鼠IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和IL-6酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、兔源抗人Anti-TAZ、YAP及 β -actin一抗、兔源抗大鼠Anti-TAZ、YAP、Cyclin D1及 β -actin一抗、HRP偶联山羊抗兔二抗购于英国Abcam公司等。

1.1.3 主要仪器 足趾容积测量仪(型号PV-200)购于成都泰盟软件有限公司;酶标仪(型号EnVision Nexus)购于瑞孚迪生物医学(上海)有限公司;生物显

微镜(型号LB102)购于广州市莱特光电技术有限公司;冷冻切片机(型号LD-4080)购于山东海卓尔光电科技有限公司;电泳仪(型号V-GES)、湿式转膜仪(型号E-Blotter)、电泳仪电源(型号ELITE HC 2.0)购于北京好亿科技发展有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 建立RA细胞模型并筛选细胞实验中梓醇最佳作用浓度 在37.8℃左右温水浴内快速解冻HFLS-RA细胞,并采用DMEM完全培养基(DMEM基础培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素双抗)进行复苏培养,传代后接种在2个96孔板内培养,等细胞进行对数生长期后其中一板细胞均以终浓度20 ng/mL的TNF- α 诱导建立RA细胞模型^[11]的同时以梓醇进行处理,终浓度分别为0、2.5、5、10、20、30 μ g/mL^[10],另一板细胞正常培养的同时以相同终浓度的梓醇进行处理,24 h后以CCK-8试剂孵育两板细胞,依照CCK-8试剂盒说明书中的方法测出各处理组细胞吸光度(D)值,设不接种细胞的孔为空白对照组,不做任何处理的细胞为对照组,根据公式算出各组细胞存活率,存活率(%)=(药物处理组吸光 D 值-空白对照组吸光 D 值)/(对照组吸光 D 值-空白对照组吸光 D 值) $\times$ 100%,选出可最大限度抑制TNF- α 诱导的HFLS-RA细胞增殖且对正常培养的HFLS-RA细胞无毒性的梓醇浓度,即为细胞实验中梓醇最佳作用浓度。

1.2.2 分组处理RA细胞 HFLS-RA细胞传代后接种在24孔板内培养,等细胞进行对数生长期后将其随机分为对照组、模型组、梓醇组、空载组、梓醇+YAP过表达组,除对照组外其余各组细胞建立RA细胞模型的同时进行分组处理:模型组细胞不做其余处理,梓醇组细胞以终浓度20 μ g/mL的梓醇处理,空载组细胞以脂质体2000转染空载质粒,梓醇+YAP过表达组细胞以终浓度20 μ g/mL的梓醇处理的同时转染YAP过表达质粒,转染步骤按脂质体2000说明书中指导进行,各组细胞均处理24 h后进行后续实验检测。

1.2.3 建立RA大鼠模型并分组处理 采用II型胶原构建RA动物模型,具体操作参考文献[12]:将牛II型胶原溶于醋酸制为2 mg/mL的溶液,以1:1的比例与弗氏完全佐剂混合制成乳剂I,以1:1的比例与弗氏不完全佐剂混合制成乳剂II,取42只SD大鼠于其尾根部皮下注射0.1 mL乳剂I,6天后于其尾根部皮下注射0.1 mL乳剂II,2周后若大鼠踝关节明显肿大,后肢

足趾红肿,即表示RA大鼠造模成功,共成功造模40只,将其随机分为模型组、梓醇组、空载组、梓醇+YAP过表达组,另选10只SD大鼠在相同时间于其尾根部皮下注射0.1 mL醋酸,作为对照组。造模成功后分组处理大鼠:梓醇组大鼠灌胃20.8 mg/kg梓醇(溶于生理盐水制为2.08 mg/mL的药液,注射10 mL/kg,1次/天)^[10],同时尾静脉注射与梓醇+YAP过表达组相同剂量的生理盐水(2次/周);空载组大鼠灌胃10 mL/kg生理盐水(1次/天),同时尾静脉注射空载质粒(溶于生理盐水,剂量参照质粒说明书,2次/周);梓醇+YAP过表达组大鼠灌胃20.8 mg/kg梓醇(溶于生理盐水制为2.08 mg/mL的药液,注射10 mL/kg,1次/天),同时尾静脉注射YAP过表达质粒(溶于生理盐水,剂量参照质粒说明书,2次/周),模型组、对照组大鼠在相同时间灌胃与尾静脉注射等剂量生理盐水,各组大鼠均处理2周。

1.2.4 CCK-8法和TUNEL染色、流式细胞术分别检测各组HFLS-RA细胞增殖、凋亡 CCK-8法: HFLS-RA细胞传代后接种在96孔板内培养,等细胞进行对数生长期后按照1.2.2中方法分组处理,并按1.2.1中CCK-8实验方法检测各组细胞增殖率,重复3次。TUNEL染色: 1.2.2中分组处理后的各组HFLS-RA细胞,吸出培养基后以PBS漂洗,加入4%多聚甲醛溶液覆没细胞于室温下进行固定2 h,再次漂洗后滴加染液覆没细胞行TUNEL染色、DAB染色,具体染色方法如TUNEL测定试剂盒说明书中所示,最后在生物显微镜下观察并采集各组细胞图像,用ImageJ软件定量图像中各组细胞总数目及被染为棕色的凋亡细胞数目,根据公式算出各组细胞凋亡率,凋亡率(%)=(凋亡细胞数目/细胞总数目)×100%,重复3次。流式细胞术: 1.2.2中分组处理后的各组HFLS-RA细胞经胰酶消化、PBS洗涤、重悬、计数后,分别制成 1×10^6 个/mL的单细胞悬液,每组取0.5 mL,按照Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书,加入FITC和PI各5 μ L,混匀,室温避光反应5 min,用PBS重悬细胞,上机在流式细胞仪中检测细胞凋亡情况,用FlowJo软件分析得出各组细胞凋亡率,重复3次。

1.2.5 足趾测量仪检测各组大鼠足容积并按5级评分法进行关节炎评分 各组大鼠于末次给药结束后24 h进行足容积测定: 将大鼠踝关节以下部位浸入足趾测量仪的容量杯内读取数值,足容积以每只大鼠后足双侧足跖的平均值表示。参考文献[13]中

方法对各组大鼠进行关节炎评分: 0分,大鼠关节无红肿;1分,大鼠小趾关节红肿;2分,大鼠足跖和趾关节肿胀;3分,大鼠踝关节以下足爪肿胀;4分,大鼠包括踝关节在内的足爪全部肿胀。

1.2.6 HE染色、TUNEL染色分别检测各组大鼠关节滑膜组织病理形态及细胞凋亡并采集标本 足容积及关节炎评分结束后以乙醚麻醉各组大鼠,用注射器采集大鼠尾静脉血约1.5 mL,离心(4 $^{\circ}$ C、1 500 r/min),10 min后收集上清得到各组大鼠血清标本,保存在-20 $^{\circ}$ C冰箱内备用;断头处死各组大鼠,剪下其后足踝关节,剥离出滑膜组织,取约0.3 g保存在液氮备用,剩余滑膜组织进行包埋后速冻,将所得冷冻组织放入冷冻切片机内进行连续切片,取出所得滑膜组织冷冻切片(约4 μ m厚)在室温下静置,5 min后浸入预冷丙酮内于4 $^{\circ}$ C下固定10 min,取出分别行HE、TUNEL染色(每只大鼠两种染色各染3张切片),具体方法参照各自试剂盒说明书,在生物显微镜下观察并采集各组大鼠滑膜组织切片图像,并以ImageJ软件定量TUNEL染色后的切片图像中各组大鼠关节滑膜组织细胞总数目及被染为棕色的凋亡细胞数目,根据公式算出各组关节滑膜组织细胞凋亡比,凋亡比(%)=(关节滑膜组织凋亡细胞数目/关节滑膜组织细胞总数目)×100%。

1.2.7 ELISA检测各组HFLS-RA细胞与RA大鼠血清促炎因子水平 1.2.2中分组处理后的各组HFLS-RA细胞,吸出培养基后进行离心(4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min),10 min后收集上清,采用ELISA试剂盒测定其中IL-6、MCP-1、IL-1 β 水平,测量方法如ELISA试剂盒说明书中所示,重复3次。取1.2.6中的各组大鼠血清在4 $^{\circ}$ C下慢慢解冻,然后每组取0.3 mL以上述相同方法测定其中IL-6、MCP-1、IL-1 β 水平。

1.2.8 免疫印迹实验检测各组HFLS-RA细胞与RA大鼠关节滑膜组织增殖与YAP/TAZ信号相关蛋白表达情况 收集1.2.2中分组处理后的各组HFLS-RA细胞,分别与RAPI裂解液混匀后在冰水浴内裂解,取1.2.6的各组大鼠关节滑膜组织分别与RAPI裂解液混匀后在冰水浴内高速研磨,所得细胞裂解液和组织匀浆液均在4 $^{\circ}$ C下离心(20 min、3 000 r/min),收集上清得到细胞和组织样品液,以BCA法测出其中蛋白总浓度,于沸水浴内加热变性后每组取细胞与组织蛋白样品各20 μ g,在120 V恒定电压下电泳80 min分离各组蛋白,然后在40 mA恒定电流下湿转

90 min将蛋白全部转印到PVDF膜上,于3%牛血清白蛋白溶液内封闭蛋白非特异位点,根据分子量将YAP、Cyclin D1、 β -actin、TAZ蛋白自膜上剪下,分别浸入稀释比为1:1 000的对应一抗溶液内,在4 °C下摇动孵育,14 h后洗膜,再浸入稀释比为1:2 000的相应二抗溶液内,在37 °C下摇动孵育,2 h后洗膜、化学发光法显色、拍照,用ImageJ软件定量膜上各蛋白灰度值,将YAP、Cyclin D1、TAZ蛋白灰度值与内参 β -actin蛋白相比即可得到其相对表达量。

1.2.9 统计分析 本文实验数据以SPSS 26.0软件行统计学分析,并用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)进行表示,采用单因素方差分析比较多组间差异,两两之间进一步差异比较行SNK-*q*检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度梓醇对HFLS-RA细胞及其RA模型细胞存活率的影响

2.5、5、10、20、30 $\mu\text{g/mL}$ 梓醇均可降低HFLS-RA细胞RA模型的细胞存活率,且在20 $\mu\text{g/mL}$ 时达到平台期,另外此浓度的梓醇对HFLS-RA正常细胞无细胞毒性,因而本文选择20 $\mu\text{g/mL}$ 的梓醇进行后续实验(图1)。

2.2 梓醇对HFLS-RA细胞增殖及凋亡的影响

与对照组相比,模型组HFLS-RA细胞存活率升高($P<0.05$),凋亡率降低($P<0.05$)。与模型组相比,梓醇组HFLS-RA细胞存活率降低($P<0.05$),凋亡率升高($P<0.05$);空载组HFLS-RA细胞存活率与凋亡率无明显变化($P>0.05$)。与梓醇组相比,梓醇+YAP过表达组HFLS-RA细胞存活率升高($P<0.05$),凋亡率降低($P<0.05$)(图2~图4)。

2.3 梓醇对RA大鼠足容积及关节炎评分的影响

与对照组相比,模型组大鼠足容积及关节炎评分升高($P<0.05$)。与模型组相比,梓醇组大鼠足容积及关节炎评分降低($P<0.05$);空载组大鼠足容积及关节炎评分无明显变化($P>0.05$)。与梓醇组相比,梓醇+YAP过表达组大鼠足容积及关节炎评分升高($P<0.05$)(图5、图6)。

2.4 梓醇对RA大鼠关节滑膜组织病理形态的影响

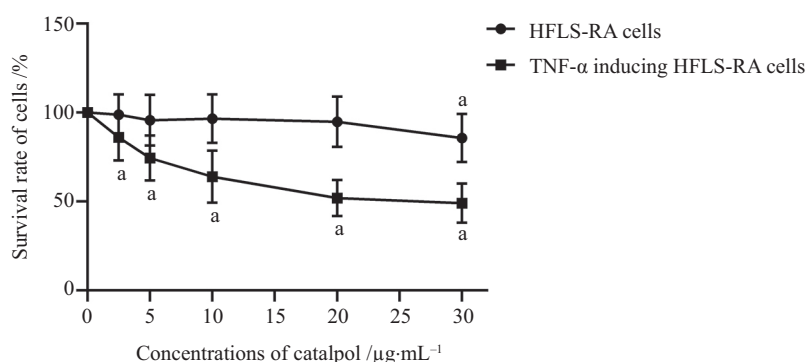
对照组大鼠关节滑膜组织形态正常,无病理损伤症状。与对照组相比,模型组大鼠关节滑膜组织呈现滑膜层增厚、滑膜细胞弥漫性增生、炎性细胞大量浸润等明显病理损伤症状。梓醇组大鼠关节滑膜组织病理损伤症状相比模型组明显减轻,空载组大鼠关节滑膜组织病理损伤症状与模型组相比无明显变化。梓醇+YAP过表达组大鼠关节滑膜组织病理损伤症状相比梓醇组加重(图7)。

2.5 梓醇对RA大鼠关节滑膜组织细胞凋亡的影响

与对照组相比,模型组大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比降低($P<0.05$)。与模型组相比,梓醇组大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比升高($P<0.05$);空载组大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比无明显变化($P>0.05$)。与梓醇组相比,梓醇+YAP过表达组大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比升高($P<0.05$)(图8、图9)。

2.6 梓醇对HFLS-RA细胞与RA大鼠血清促炎因子水平的影响

与对照组相比,模型组HFLS-RA细胞与RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL-1 β 水平升高($P<0.05$)。与模型组相比,梓醇组HFLS-RA细胞与RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL-1 β 水平降低($P<0.05$);空载组HFLS-RA细胞与RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL-1 β



^a $P<0.05$, 与0 $\mu\text{g/mL}$ 梓醇比较。

^a $P<0.05$ compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ catalpol.

图1 不同浓度梓醇对HFLS-RA细胞及其RA模型细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of catalpol on the survival rate of HFLS-RA cells and their RA model cells

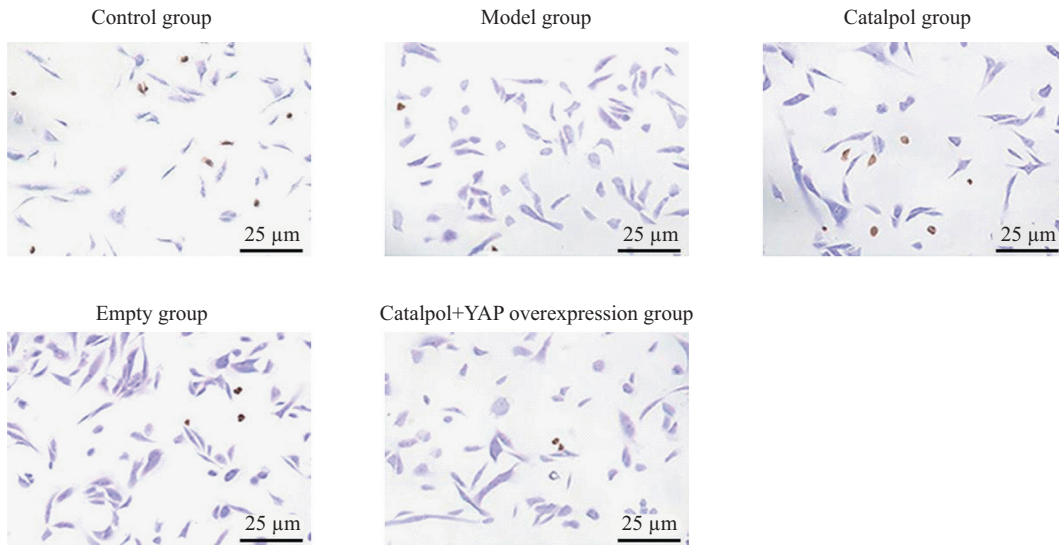


图2 TUNEL染色检测各组HFLS-RA细胞凋亡

Fig.2 TUNEL staining detection of HFLS-RA cell apoptosis in each group

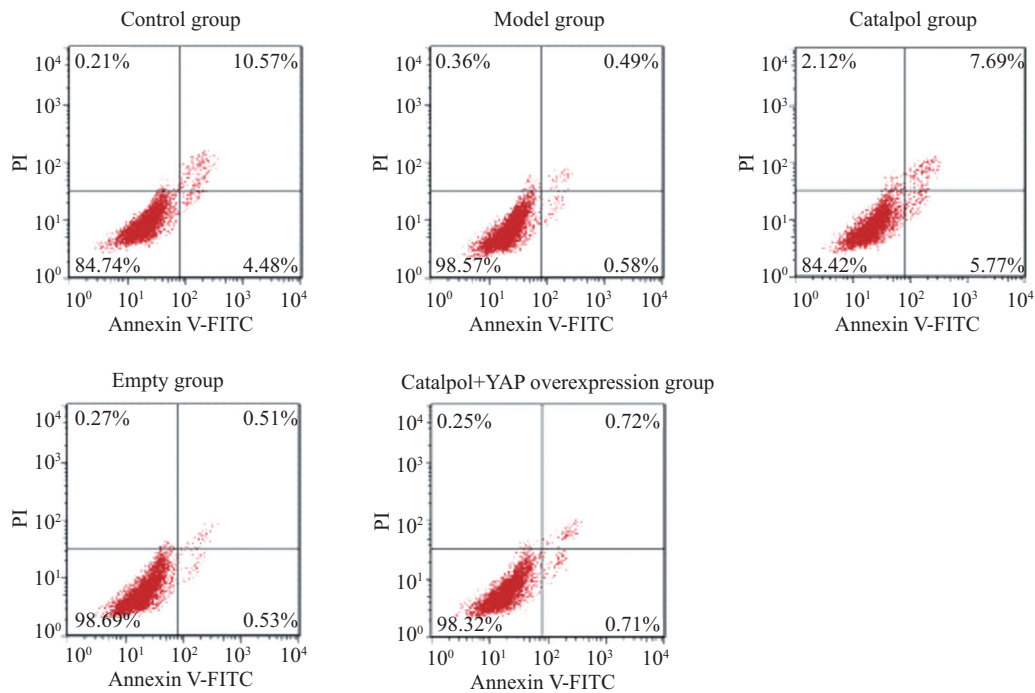


图3 流式细胞术检测各组HFLS-RA细胞凋亡

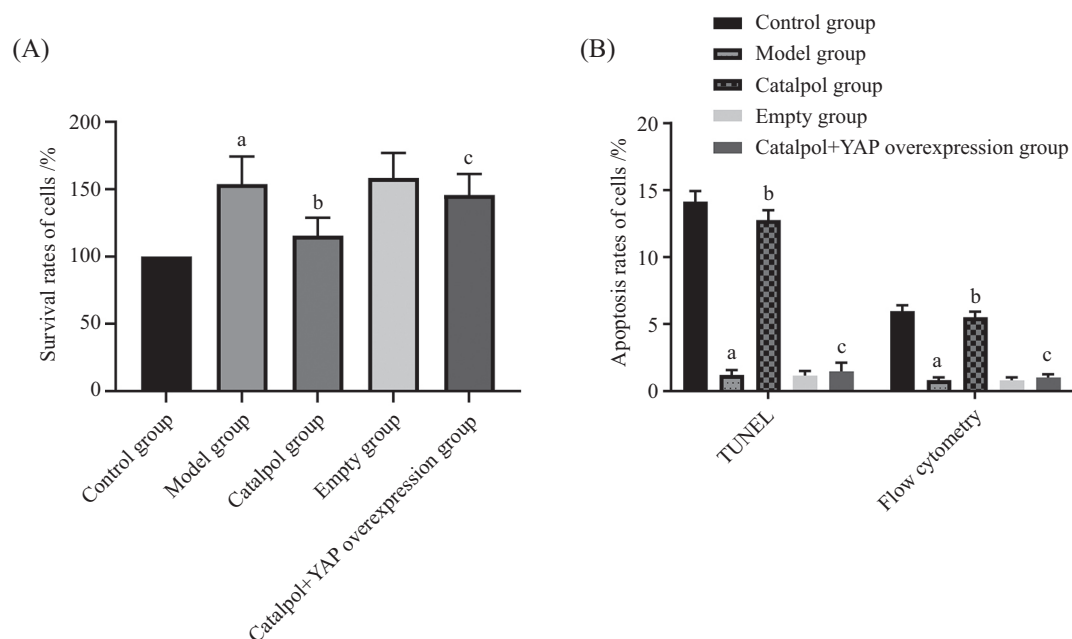
Fig.3 Detection of HFLS-RA cell apoptosis in each group by flow cytometry

水平无明显变化 ($P>0.05$)。与梓醇组相比, 梓醇+YAP过表达组 HFLS-RA 细胞与 RA 大鼠血清 IL-6、MCP-1、IL-1 β 水平升高 ($P<0.05$) (图10)。

2.7 梓醇对大鼠 HFLS-RA 细胞与 RA 大鼠关节滑膜组织增殖与 YAP/TAZ 信号相关蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组 HFLS-RA 细胞与 RA 大鼠关节滑膜组织 Cyclin D1、YAP、TAZ 蛋白表达水

平升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, 梓醇组 HFLS-RA 细胞与 RA 大鼠关节滑膜组织 Cyclin D1、YAP、TAZ 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), 空载组 HFLS-RA 细胞与 RA 大鼠关节滑膜组织 Cyclin D1、YAP、TAZ 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$); 与梓醇组相比, 梓醇+YAP 过表达组 HFLS-RA 细胞与 RA 大鼠关节滑膜组织 Cyclin D1、YAP、TAZ 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)



A: 各组HFLS-RA细胞存活率统计图; B: 各组HFLS-RA细胞凋亡率统计图。^a $P<0.05$, 与对照组比较; ^b $P<0.05$, 与模型组比较; ^c $P<0.05$, 与梓醇组比较。

A: the statistical chart of survival rate of HFLS-RA cells in each group; B: the statistical chart of apoptosis rate of HFLS-RA cells in each group. ^a $P<0.05$ compared with the control group; ^b $P<0.05$ compared with the model group; ^c $P<0.05$ compared with the catalpol group.

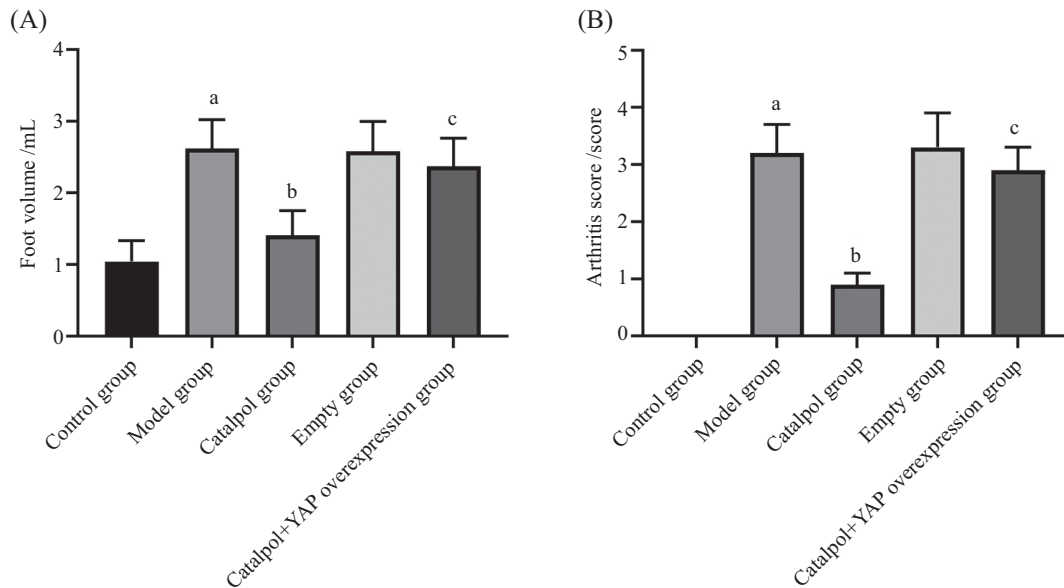
图4 各组HFLS-RA细胞存活率与凋亡率

Fig.4 Survival and apoptosis rates of HFLS-RA cells in each group



图5 各组大鼠足关节图片

Fig.5 Pictures of foot joints of rats in each group



A: 各组大鼠足容积统计图; B: 各组大鼠关节炎评分统计图。^a $P<0.05$, 与对照组比较; ^b $P<0.05$, 与模型组比较; ^c $P<0.05$, 与梓醇组比较。

A: the statistical chart of foot volume in each group of rats; B: the statistical chart of arthritis scores in each group of rats. ^a $P<0.05$ compared with the control group; ^b $P<0.05$ compared with the model group; ^c $P<0.05$ compared with the catalpol group.

图6 各组足容积及关节炎评分

Fig.6 Foot volume and arthritis score in each group

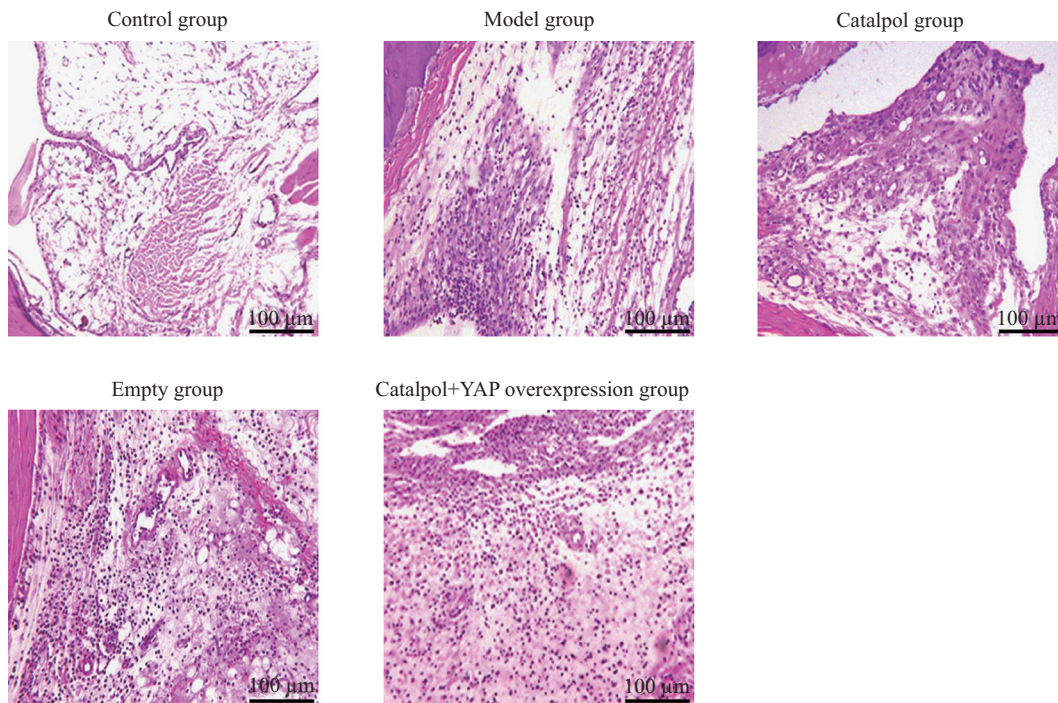


图7 HE染色检测各组大鼠关节滑膜组织病理形态

Fig.7 HE staining was used to detect the pathological morphology of synovial tissue in each group of rats

(图11、图12)。

3 讨论

目前RA的临床治疗以西药为主, 包括甲氨喋呤

和来氟米特等, 但此类药物不仅价格昂贵, 还会造成很多不良反应, 患者难以坚持长期应用治疗, 因此还需深入研究RA发病机制并找到更安全有效的新型治疗手段^[14-15]。本文以20 ng/mL的TNF- α 诱导建立

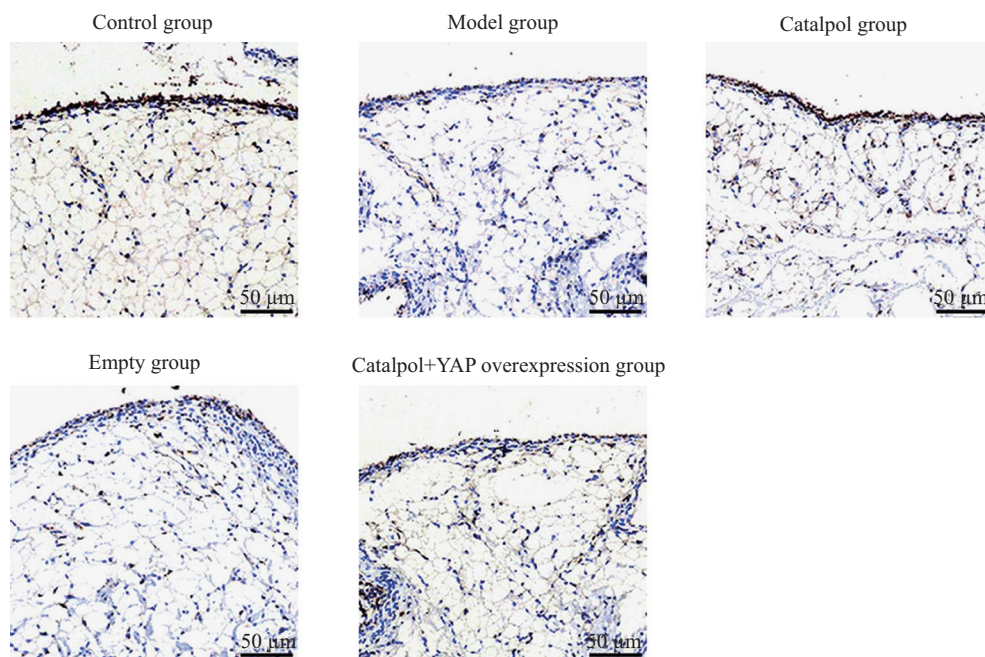
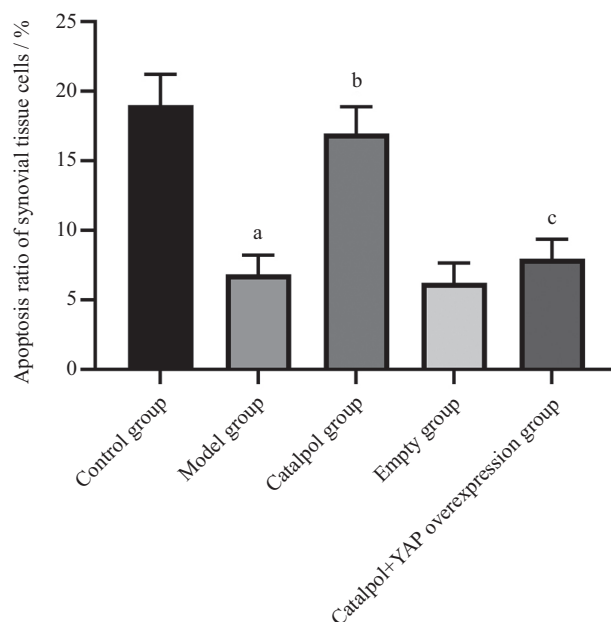


图8 TUNEL染色检测各组大鼠关节滑膜组织细胞凋亡

Fig.8 TUNEL staining detection of apoptosis in synovial tissue cells of rats in each group



^a $P<0.05$, 与对照组比较; ^b $P<0.05$, 与模型组比较; ^c $P<0.05$, 与梓醇组比较。

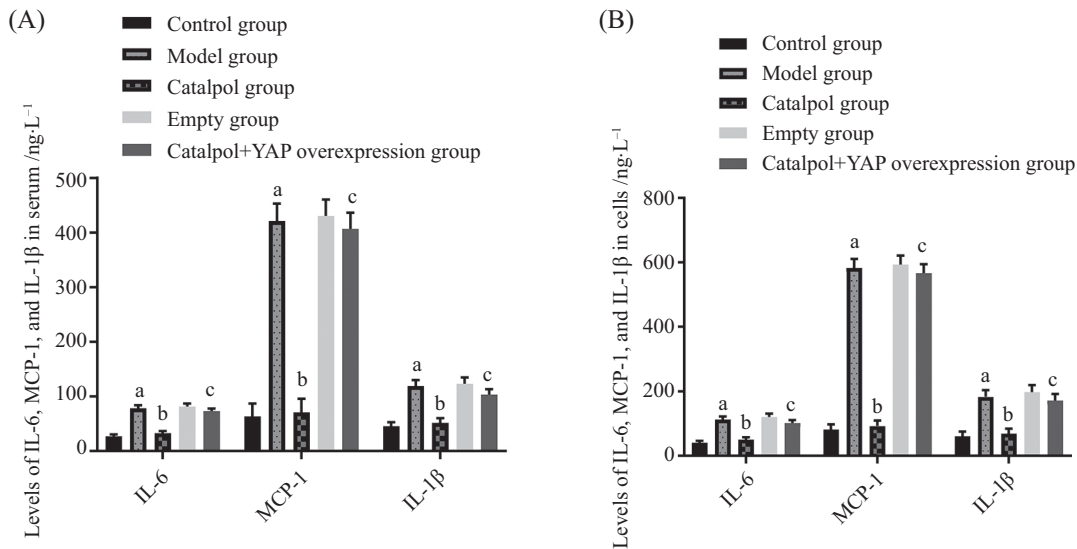
^a $P<0.05$ compared with the control group; ^b $P<0.05$ compared with the model group; ^c $P<0.05$ compared with the catalpol group.

图9 各组大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比

Fig.9 Apoptosis ratio of synovial tissue cells in each group of rats

RA细胞模型, 并采用II型胶原构建RA动物模型, 结果显示, TNF- α 诱导的HFLS-RA细胞相比正常培养的HFLS-RA细胞促炎因子水平明显增加, 引发细胞炎症, 导致其存活率升高及凋亡率降低, 表明TNF- α

可诱导HFLS-RA细胞炎症与过度增殖, 提示RA细胞模型构建成功; 造模大鼠体内促炎因子大量产生, 引发大鼠机体炎症, 进而造成大鼠关节滑膜组织细胞凋亡减少, 踝关节明显肿大及后肢足趾红肿, 关节炎

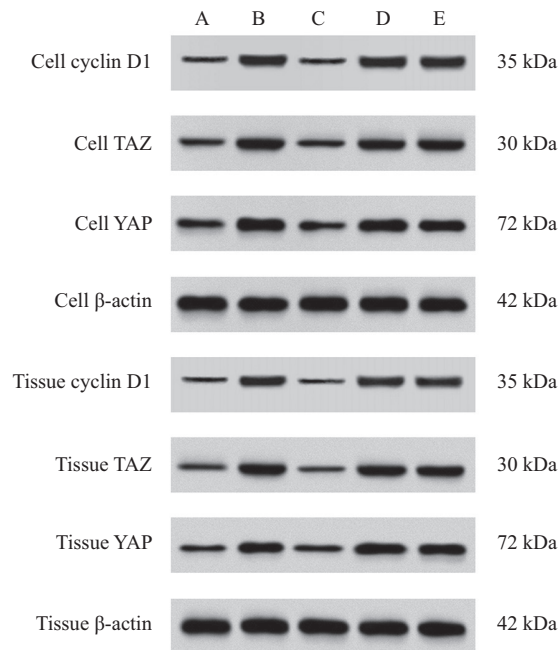


A: 各组HFLS-RA细胞IL-6、MCP-1、IL-1β水平统计图(n=6); B: 各组RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL-1β水平统计图(n=10)。^a*P*<0.05, 与对照组比较; ^b*P*<0.05, 与模型组比较; ^c*P*<0.05, 与梓醇组比较。

A: the statistical chart of IL-6, MCP-1, and IL-1β levels in HFLS-RA cells of each group (n=6); B: the statistical chart of IL-6, MCP-1, and IL-1β levels in serum of RA rats of each group (n=10). ^a*P*<0.05 compared with the control group; ^b*P*<0.05 compared with the model group; ^c*P*<0.05 compared with the catalpol group.

图10 各组HFLS-RA细胞与RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL-1β水平

Fig.10 Levels of IL-6, MCP-1, and IL-1β in serum of RA rats and HFLS-RA cells in each group



A: 对照组; B: 模型组; C: 梓醇组; D: 空载组; E: 梓醇+YAP过表达组。

A: control group; B: model group; C: catalpol group; D: empty group; E: catalpol+YAP overexpression group.

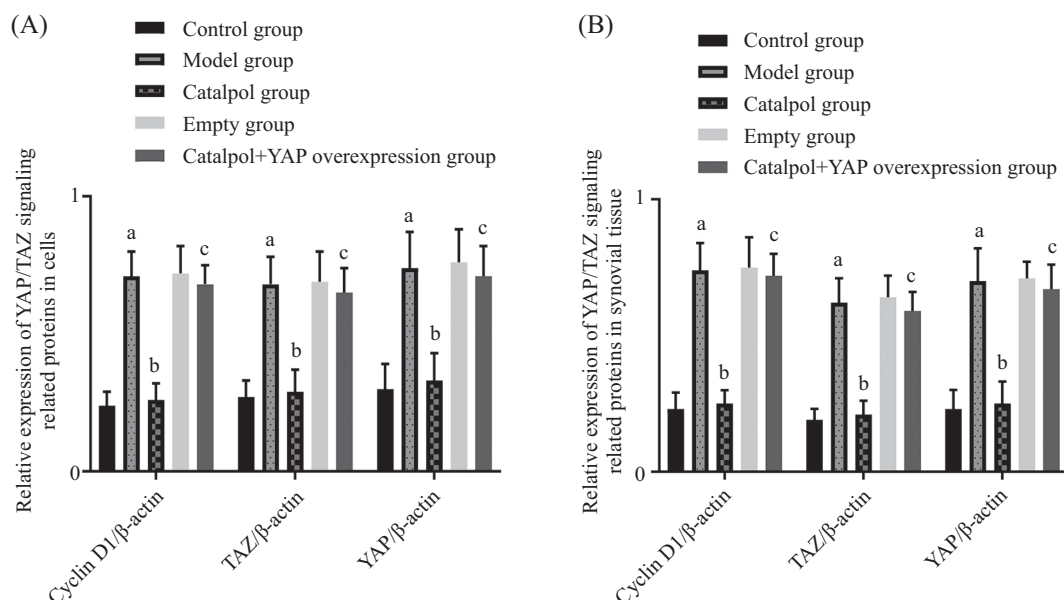
图11 免疫印迹检测各组HFLS-RA细胞与RA大鼠关节滑膜组织YAP/TAZ信号相关蛋白表达

Fig.11 Immunoblotting detection of YAP/TAZ signaling related protein expression in HFLS-RA cells and synovial tissue of RA rats in each group

评分升高, 提示RA大鼠模型构建成功。

研究认为, FLS细胞炎症与过度增殖参与贯穿RA的整个病程, 在软骨破坏及其关节功能障碍等过

程中发挥着重要作用, 因此RA的治疗可从限制炎症、滑膜增生方面入手^[3-4]。梓醇是一种从传统草药地黄中提取的生物活性环烯醚萜, 具有抗氧化、抗



A: 各组HFLS-RA细胞增殖与YAP/TAZ信号相关蛋白相对表达统计图($n=6$); B: 各组RA大鼠关节滑膜组织增殖与YAP/TAZ信号相关蛋白相对表达统计图($n=10$)。^a $P<0.05$, 与对照组比较; ^b $P<0.05$, 与模型组比较; ^c $P<0.05$, 与梓醇组比较。

A: the relative expression statistics of proliferation and YAP/TAZ signaling related proteins in HFLS-RA cells of each group ($n=6$); B: the relative expression statistics of proliferation and YAP/TAZ signaling related proteins in the synovial tissue of RA rats in each group ($n=10$). ^a $P<0.05$ compared with the control group; ^b $P<0.05$ compared with the model group; ^c $P<0.05$ compared with the catalpol group.

图12 各组HFLS-RA细胞与RA大鼠关节滑膜组织增殖与YAP/TAZ信号相关蛋白相对表达

Fig.12 Relative expression of proliferation and YAP/TAZ signaling related proteins in HFLS-RA cells and synovial tissue of RA rats of each group

炎、抗糖尿病、股保护等多种药理特性,可通过协同抗氧化和抗炎作用在一定程度上减轻败血症引起的急性肾损伤^[16],可通过抑制破骨细胞的过度激活而对骨质疏松症、RA和牙周炎等骨病发挥潜在的治疗作用,并可通过抑制破骨细胞活性而保护小鼠免受炎症和卵巢切除术诱导的骨丢失^[17],此外,梓醇可阻碍Th17细胞的分化来抑制RA小鼠体内免疫炎症,进而改善其关节炎症^[10]。本文结果显示,以梓醇处理RA细胞及大鼠模型,可降低HFLS-RA细胞存活率、大鼠足容积及关节炎评分、HFLS-RA细胞与RA大鼠血清IL-6、MCP-1、IL1 β 水平,并升高HFLS-RA细胞凋亡率、大鼠关节滑膜组织细胞凋亡比,表明梓醇可减少促炎因子产生分泌,抑制炎症反应发生发展,抑制TNF- α 诱导的HFLS-RA细胞过度增殖与RA大鼠滑膜细胞增生并促进其凋亡,改善大鼠关节炎症,揭示梓醇在RA的临床治疗中具有很好的应用前景。

YAP/TAZ是重要的炎症调控信号,与肾损伤、RA等炎性疾病的发生发展关系密切,沉默YAP可通过抑制肾脏炎症及肾组织纤维化而减轻高血压早期肾损伤^[18],敲低Yap可阻止RA小鼠FLS细胞侵袭^[19],

抑制YAP/TAZ转录活性可减轻RA-FLS细胞凋亡抵抗、增殖、侵袭和炎症反应,减缓RA动物模型滑膜增生及关节炎症进展^[20]。本文结果显示,RA细胞及大鼠关节滑膜组织YAP、TAZ蛋白表达相比对照组细胞和大鼠升高,以梓醇处理可逆转以上蛋白变化趋势,表明YAP/TAZ信号参与梓醇对RA-FLS细胞增殖的抑制作用;以梓醇和YAP过表达质粒联合处理RA细胞与大鼠模型,可减弱梓醇单独处理对TNF- α 诱导的HFLS-RA细胞与RA大鼠的抗炎作用,削弱其对HFLS-RA细胞过度增殖及对大鼠关节滑膜细胞增生的抑制作用,逆转其对大鼠关节炎症的改善作用,揭示梓醇抑制RA-FLS细胞增殖是通过下调YAP实现的。

总之,本研究表明梓醇可减弱YAP、TAZ蛋白表达能力,降低促炎因子产生水平,进而抑制TNF- α 诱导的HFLS-RA细胞炎症及过度增殖并促进其凋亡,还可减轻RA大鼠关节炎症与抑制滑膜细胞增生,改善其关节肿胀等关节炎症,阻断YAP/TAZ信号转导可能是其作用机制之一,本文证实了梓醇在RA临床治疗中的治疗潜力与应用前景,对于提高RA治疗效果及改善患者预后可起到一定积极作用。

参考文献 (References)

- [1] FINCKH A, GILBERT B, HODKINSON B, et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(10): 591-602.
- [2] DE STEFANO L, D'ONOFRIO B, GANDOLFO S, et al. Sero-negative rheumatoid arthritis: one year in review 2023 [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2023, 41(3): 554-64.
- [3] SIEGEL R J, SINGH A K, PANIPINTO P M, et al. Extracellular sulfatase-2 is overexpressed in rheumatoid arthritis and mediates the TNF- α -induced inflammatory activation of synovial fibroblasts [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(10): 1185-95.
- [4] TU J, CHEN W, FANG Y, et al. PU.1 promotes development of rheumatoid arthritis via repressing FLT3 in macrophages and fibroblast-like synoviocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(2): 198-211.
- [5] MIA M M, CIBI D M, GHANI S A B A, et al. Loss of Yap/Taz in cardiac fibroblasts attenuates adverse remodelling and improves cardiac function [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(7): 1785-804.
- [6] CUI Y, MIAO M Z, WANG M, et al. Yes-associated protein nuclear translocation promotes anabolic activity in human articular chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2023, 31(8): 1078-90.
- [7] ZHOU W, SHEN Q, WANG H, et al. Knockdown of YAP/TAZ inhibits the migration and invasion of fibroblast synovial cells in rheumatoid arthritis by regulating autophagy [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020(7): 9510594-604.
- [8] NI H, RUI Q, KAN X, et al. Catalpol ameliorates oxidative stress and neuroinflammation after traumatic brain injury in rats [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(2): 681-95.
- [9] PANG Y, ZHAO L, JI X, et al. Analyses of transcriptomics upon IL-1 β -stimulated mouse chondrocytes and the protective effect of catalpol through the NOD2/NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Molecules*, 2023, 28(4): 1606-19.
- [10] DI Y, ZHANG M, CHEN Y, et al. Catalpol inhibits tregs-to-Th17 Cell Transdifferentiation by up-regulating Let-7g-5p to reduce STAT3 protein levels [J]. *Yonsei Med J*, 2022, 63(1): 56-65.
- [11] 田乐, 朴松兰, 何艳新, 等. 红景天含药血清对肿瘤坏死因子 α 诱导的人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响[J]. 中药新药与临床药理(TIAN L, PIAO S L, HE Y X, et al. Effect of Serum Containing herba rhodiola on the proliferation of human fibroblast-like synoviocytes rheumatoid arthritis induced by tumor necrosis factor- α [J]. *Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology*), 2022, 33(3): 287-92.
- [12] 李梅, 蒋锦梅, 欧大明, 等. 白术多糖对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用及TLR4/NF- κ B信号通路的影响[J]. 安徽医科大学学报(LI M, JIANG J M, OU D M, et al. Effect of polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* koidzon anti-inflammatory effects and TPLR4/NF- κ B signaling pathway in rats with rheumatoid arthritis [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*), 2022, 57(4): 552-7.
- [13] 李树岗, 贾超, 宋远瑛. IL-37b作用于树突状细胞CD39/ATP轴抑制类风湿性关节炎大鼠炎症反应的作用及机制[J]. 免疫学杂志(LI S G, JIA C, SONG Y Y. IL-37b inhibits the inflammatory reaction of rheumatoid arthritis by regulating dendritic cells CD39/ATP axis [J]. *Immunological Journal*), 2022, 38(1): 51-8.
- [14] LI C, HAN Y, LUO X, et al. Immunomodulatory nano-preparations for rheumatoid arthritis [J]. *Drug Deliv*, 2023, 30(1): 9-19.
- [15] GRAVALLESE E M, FIRESTEIN G S. Rheumatoid arthritis-common origins, divergent mechanisms [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(6): 529-42.
- [16] ZHANG M, QIANG Y. Catalpol ameliorates inflammation and oxidative stress via regulating Sirt1 and activating Nrf2/HO-1 signaling against acute kidney injury [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(9): 2182-91.
- [17] MENG J, ZHANG W, WANG C, et al. Catalpol suppresses osteoclastogenesis and attenuates osteoclast-derived bone resorption by modulating PTEN activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 171(6937): 113715-57.
- [18] XU S B, XU B, MA Z H, et al. Peptide 17 alleviates early hypertensive renal injury by regulating the Hippo/YAP signalling pathway [J]. *Nephrology*, 2022, 27(8): 712-23.
- [19] SYMONS R A, COLELLA F, COLLINS F L, et al. Targeting the IL-6-Yap-Snail signalling axis in synovial fibroblasts ameliorates inflammatory arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2022, 81(2): 214-24.
- [20] CAIRE R, AUDOUX E, COURBON G, et al. YAP/TAZ: key players for rheumatoid arthritis severity by driving fibroblast like synoviocytes phenotype and fibro-inflammatory response [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 791907-22.