

文章编号: 1004-7220(2016)05-0379-05

· “生物力学与组织修复”专栏 ·

# 鸦胆子苦醇通过调节细胞骨架力学性质抑制 类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的侵袭行为

余 璨<sup>a,b</sup>, 杨 力<sup>a,b</sup>

(重庆大学 生物工程学院 a. 生物流变科学与技术教育部重点实验室; b. 国家“111 计划”基地, 重庆 400044)

**摘要:** **目的** 研究鸦胆子苦醇对类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 细胞骨架力学性质的调控以及对 RA FLS 侵袭行为的影响。**方法** 细胞骨架染色法检测鸦胆子苦醇对 RA FLS 细胞骨架力学性质的调控; Transwell 小室法检测鸦胆子苦醇对 RA FLS 细胞骨架的调控和对 RA FLS 侵袭行为的影响; 酶谱和 Western blotting 法检测鸦胆子苦醇对 RA FLS 中 MMP-2、MMP-3 表达的影响。**结果** 通过细胞骨架染色并在显微镜下观察发现, 鸦胆子苦醇可显著减少 RA FLS 伪足数量的产生, 通过调节细胞骨架网络的力学性质抑制细胞的运动能力, 鸦胆子苦醇可抑制 RA FLS 的侵袭并能下调 MMP-2、MMP-3 的表达水平。**结论** 鸦胆子苦醇能调节 RA FLS 的细胞骨架的力学性质并抑制细胞的侵袭行为, 同时鸦胆子苦醇可通过降低 MMP-2、MMP-3 的表达抑制 RA FLS 的侵袭。研究结果为进一步开发治疗 RA 的新药物提供了相应实验依据。

**关键词:** 鸦胆子苦醇; 力学性质; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 细胞侵袭

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.05.379

## Brusatol inhibits the invasion behavior of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through regulating mechanical properties of cytoskeleton

YU Can<sup>a,b</sup>, YANG Li<sup>a,b</sup> (a. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, b. “111” Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of brusatol on mechanical properties of the cytoskeleton as well as the invasion behavior of rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS). **Methods** Cytoskeleton staining method was used to determine the regulatory effects of brusatol on mechanical properties of the RA FLS cytoskeleton. Transwell chamber assay was used to detect the effects of brusatol on the cytoskeleton and invasion behavior of RA FLS. The effects of brusatol on the expression of matrix metalloproteinase-2/3 (MMP-2/3) of RA FLS were measured by zymography and Western blotting methods. **Results** Cytoskeleton staining and microscope observation showed that brusatol could significantly reduce the formation number of RA FLS pseudopodia, thus inhibited cell movement ability via regulating mechanical properties of cytoskeleton. The invasion behavior of RA FLS was inhibited by brusatol, and brusatol could down-regulate the expression of MMP-2/3. **Conclusions** Brusatol plays an important role in regulating mechanical properties of cytoskeleton and inhibiting the invasion behavior of RA FLS. Meanwhile, brusatol can inhibit the invasion behavior of RA FLS through down-regulating the expression of MMP-2/3. The research findings provide the corresponding experimental basis for further development of new drugs for RA treatment.

**Key words:** Brusatol; Mechanical properties; Rheumatoid arthritis (RA); Fibroblast-like synoviocytes (FLS); Cell invasion

收稿日期: 2016-04-13; 修回日期: 2016-06-25

基金项目: 国家 111 计划项目 (B06023), 国家自然科学基金项目 (11532004, 31270990)。

通信作者: 杨力, 教授, Tel: (023) 65102507; E-mail: yanglibme@cqu.edu.cn。

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以滑膜炎为主要特征的慢性自身免疫性疾病。RA 的病理情况通常表现为滑膜增生、软骨和骨的破坏、大量炎性细胞浸润以及血管翳的形成, 可以引起关节的疼痛、僵硬甚至破坏关节。RA 的发病机制复杂, 涉及的细胞种类多样, 其中 RA 成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 异常的侵袭能力以及其对软骨的破坏是导致 RA 发生和发展的关键因素。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 在细胞侵袭行为中占有重要的地位, MMPs 可以通过降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和促进血管翳的形成两方面对关节造成破坏。鸦胆子苦醇 (Brusatol) 是鸦胆子的主要成分之一, 具有较强的抗癌、抗炎症作用, 在我国中医药中有着广泛的应用<sup>[1]</sup>。RA FLS 异常的侵袭行为与肿瘤细胞具有相似性, 因而 RA FLS 也被称为“类肿瘤样”细胞<sup>[2-3]</sup>。鸦胆子苦醇在抑制肿瘤方面有一定疗效, 提示鸦胆子苦醇在减缓 RA 的发生中也可能具有重要作用。因此, 本文以 RA FLS 为研究对象, 采用不同浓度鸦胆子苦醇处理 RA FLS, 并检测其对 RA FLS 细胞骨架力学性质、侵袭行为以及 MMPs 表达水平的影响, 为 RA 治疗提供新的方法和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

人 RA 滑膜组织取自重庆西南医院关节外科进行膝关节置换手术的 RA 患者, 患者均签署知情同意书, RA 患者的临床诊断均符合美国风湿病协会修订的 RA 分类标准<sup>[4]</sup>。实验试剂与仪器包括: 鸦胆子苦醇 (上海同田生物)、DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司)、胎牛血清 (Gibco 公司)、Transwell 小室 (Millipore 公司)、Matrigel (Corning 公司)、结晶紫染色液 (碧云天生物公司)、FITC-鬼笔环肽 (Enzo 公司)、DAPI 染色液 (碧云天生物公司)、明胶 (Sigma-Aldrich 公司)、兔抗人 MMP-3 一抗 (Cell Signaling Technology 公司)、小鼠抗人  $\beta$ -actin 一抗 (中杉金桥公司)、辣根过氧化物酶标记二抗 (联科生物公司)、凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)、GS-800 光密度扫描仪 (Bio-Rad 公司)、细胞培养箱 (Thermo 公司)、倒置相差显微镜 (Leica 公司)、倒置荧光显微镜 (Olympus 公司)、细胞培养皿 (Corning 公司)、细胞培养孔板 (Corning 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 RA FLS 的分离和培养** 细胞的分离和培养方式参考文献<sup>[5]</sup>。手术中从 RA 患者取出滑膜组织, 于无菌条件下对组织进行冲洗并剪至小块, 将组织小块放入含 10% 血清 DMEM 高糖培养基中进行培养。待细胞从组织块爬出后移除组织块, 用胰蛋白酶消化细胞, 离心弃上清, 加入含 10% 血清的 DMEM 高糖培养基制成细胞悬液, 转入培养瓶中并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。当细胞的密度达到 80% ~ 90% 后即可进行传代培养并鉴定。实验中所用的 RA FLS 为 3 ~ 6 代。

**1.2.2 细胞骨架染色法** 将对数生长期的 RA FLS 用胰蛋白酶消化后离心弃上清, 用含 10% 血清培养基将 RA FLS 悬液密度调整成  $5 \times 10^3$  个/mL, 接种于 48 孔板中, 每孔 1 mL, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 ~ 48 h。然后用含不同浓度 (0、10、20、40、80 nmol/L) 鸦胆子苦醇培养基继续培养 RA FLS 12 h, 吸除上清液, PBS 清洗细胞, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 清洗后再用 0.25% Triton X-100 在室温条件下透膜处理 10 min, PBS 清洗细胞并用 1% BSA 进行封闭, 室温条件下处理 20 min, 用 FITC-鬼笔环肽对细胞进行染色, 室温染色 60 min, PBS 清洗细胞后用 DAPI 染色液对细胞进行染色, 室温染色 20 min, PBS 清洗细胞后于荧光显微镜下拍照, 观察细胞骨架和形态。

**1.2.3 Transwell 小室法** 取对数生长期的 RA FLS, 用胰蛋白酶消化后离心弃上清, 用含 2% 血清的培养基将 RA FLS 悬液密度调整成  $1.25 \times 10^5$  个/mL。预先将 Matrigel 用无血清培养基进行稀释, 并将其均匀地铺满 Transwell 小室上室, 将小室放入 24 孔板中备用。在小室下部中加入 1 mL 含 10% 血清的 DMEM 培养基。小室上部中分别接种 400  $\mu$ L 用不同浓度 (0、10、20、40、80 nmol/L) 鸦胆子苦醇处理的 RA FLS 悬液, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 48 h。培养结束后, 取出 Transwell 小室, 用棉棒将上部小室内部的 Matrigel 和细胞擦干净, 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 1 h, 结晶紫染色液染色 5 min 后于显微镜下拍照, 观察穿过 Transwell 膜的细胞数。

**1.2.4 酶谱法** 采用对数生长期的 RA FLS, 胰蛋白酶消化, 离心弃上清后用含 10% 血清的培养基调整 RA FLS 悬液密度至  $1 \times 10^5$  个/mL, 将 2 mL 细胞悬液接种于 6 cm 细胞培养皿中。待细胞生长至密度

约为80%后用含不同浓度(0、10、20、40、80 nmol/L)鸦胆子苦醇培养基培养 RA FLS 12 h。收集细胞上清液,采用 SDS-PAGE(含明胶)进行电泳。电泳完成后,将凝胶放置于2.5% Triton X-100 中洗脱3次,每次30 min,然后将凝胶置于蛋白裂解液中,37℃ 孵育16 h。孵育结束后,用2.5% Triton X-100 再次洗涤凝胶后用考马斯亮蓝染色液进行染色。染色结束后用脱色液进行清洗,直到白色条带清晰可见,并将凝胶保存在含有丙三醇的双蒸水中。用 GS-800 光密度扫描仪分析读取条带宽度、面积和灰度值。

**1.2.5 Western blotting 法** 将培养至对数生长期的 RA FLS 用胰蛋白酶进行消化,离心弃上清,用含10%血清的培养基调整 RA FLS 悬液密度至  $1 \times 10^5$  个/mL,将2 mL 细胞悬液接种于6 cm 细胞培养皿中。待细胞生长至密度约为80%后用含不同浓度(0、10、20、40、80 nmol/L)鸦胆子苦醇培养基培养 RA FLS 12 h。去上清,收集细胞和裂解细胞并制备样品,采用 SDS-PAGE 进行电泳,电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上。用5% 蛋白封闭液 37℃ 封闭1 h, TBST 清洗膜3次,加入按照比例稀释后的一抗并4℃ 孵育过夜,次日 TBST 洗膜3次后加入二抗 37℃ 孵育1 h。洗膜后显影并成像分析。实验中以  $\beta$ -actin 作为内参照。

### 1.3 统计学处理

本实验均重复3次或以上( $n \geq 3$ ),所有数据均用统计软件 Origin Pro 处理。数据以均数  $\pm$  标准差表示。多组样本间两两比较用单因素方差分析及  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异具有显著性,  $P < 0.01$  为差异具有高度显著性。

## 2 实验结果

### 2.1 鸦胆子苦醇调节 RA FLS 细胞骨架

鸦胆子苦醇对 RA FLS 细胞骨架的影响结果如图1所示。绿色荧光指示细胞骨架,蓝色荧光指示细胞核,红色箭头指示板状伪足。与对照组相比,鸦胆子苦醇处理 RA FLS 后,鸦胆子苦醇能显著减少 RA FLS 的丝状伪足和板状伪足的形成,从而调节细胞骨架网络的力学性质并抑制细胞的运动能力。

### 2.2 鸦胆子苦醇抑制 RA FLS 侵袭行为

鸦胆子苦醇对 RA FLS 侵袭行为的影响结果如图2所示。采用鸦胆子苦醇处理 RA FLS 后,与对照组相比,鸦胆子苦醇处理组中细胞穿过铺有

Matrigel 的 Transwell 的膜的细胞数量下降,提示鸦胆子苦醇能抑制细胞的侵袭行为,并且该抑制作用具有一定的药物浓度依赖性。

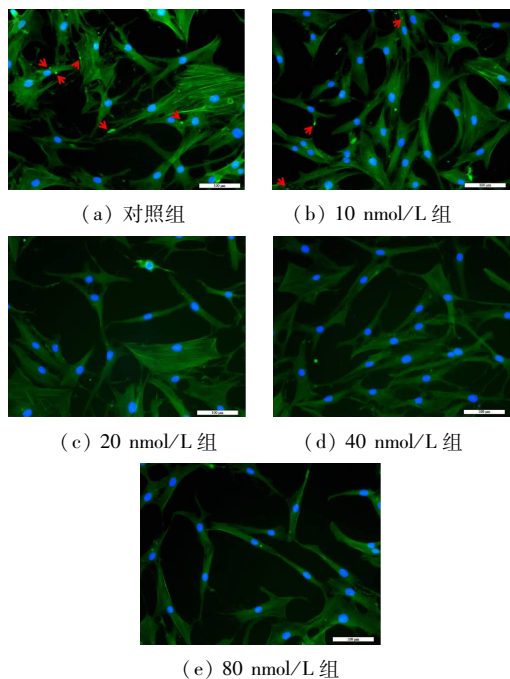


图1 鸦胆子苦醇对 RA FLS 细胞骨架的影响(标尺 = 100  $\mu$ m)

Fig. 1 The effects of brusatol on cytoskeleton of RA FLS

(a) Control group, (b) 10 nmol/L group, (c) 20 nmol/L group, (d) 40 nmol/L group, (e) 80 nmol/L group

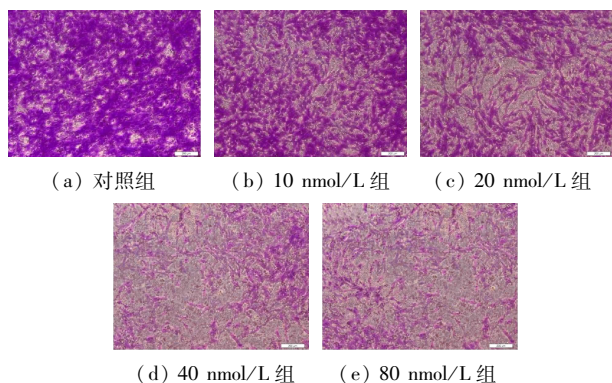


图2 鸦胆子苦醇对 RA FLS 侵袭行为的影响(标尺 = 200  $\mu$ m)

Fig. 2 The effects of brusatol on the invasion behavior of RA FLS

(a) Control group, (b) 10 nmol/L group, (c) 20 nmol/L group, (d) 40 nmol/L group, (e) 80 nmol/L group

### 2.3 鸦胆子苦醇降低 RA FLS 中 MMP-2 表达

鸦胆子苦醇处理 RA FLS 后, RA FLS 中 MMP-2 的表达情况如图3所示。与对照组相比,用20、40和80 nmol/L 的鸦胆子苦醇处理细胞后, RA FLS 中

MMP-2 的表达量分别为对照组中的 0.74、0.59、0.34 倍,提示鸦胆子苦醇可以显著降低 MMP-2 蛋白水平的表达,呈现一定的药物浓度的依赖性。

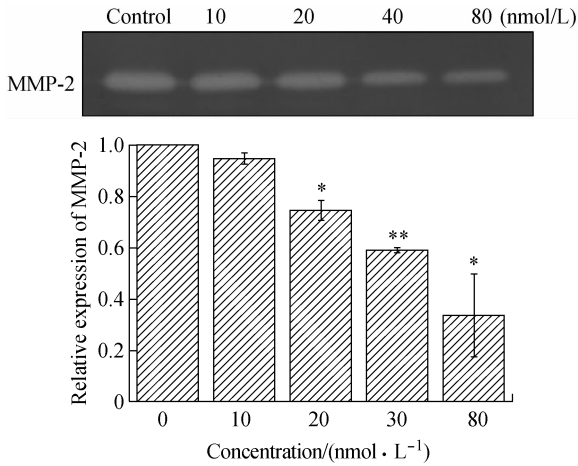


图3 鸦胆子苦醇对 RA FLS 中 MMP-2 表达的影响

(\*  $P < 0.05$  vs 对照组, \*\*  $P < 0.01$  vs 对照组)

Fig.3 The effects of brusatol on the expression of MMP-2 of RA FLS

#### 2.4 鸦胆子苦醇下调 RA FLS 中 MMP-3 表达

用鸦胆子苦醇处理 RA FLS 后 MMP-3 的表达情况如图 4 所示。与对照组相比,用 20、40 和 80 nmol/L 的鸦胆子苦醇处理细胞后,RA FLS 中 MMP-3 的表达量分别为对照组中的 0.59、0.59、0.65 倍,提示鸦胆子苦醇可以显著下调 MMP-3 蛋白水平的表达,呈现一定的药物浓度的依赖性。

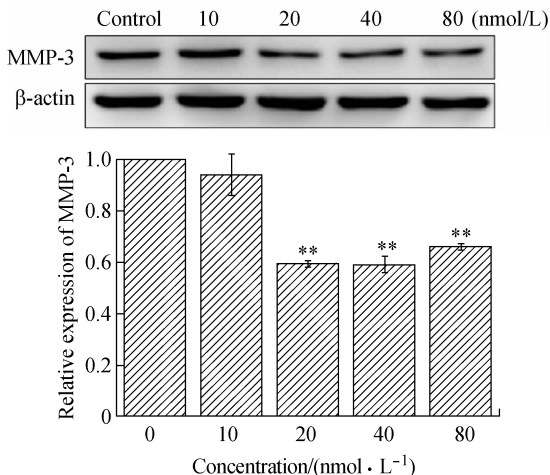


图4 鸦胆子苦醇对 RA FLS 中 MMP-3 表达的影响

(\*\*  $P < 0.01$  vs 对照组)

Fig.4 The effects of brusatol on the expression of MMP-3 of RA FLS

### 3 讨论

RA 是一种以关节软骨及骨质破坏为病理特征的炎性自身免疫性疾病。现已有研究表明,RA FLS 异常的侵袭行为以及分泌大量与软骨及骨破坏相关的蛋白酶类对 ECM 进行降解与 RA 的发生和发展有着极为紧密的联系。纤丝状肌动蛋白 (filamentous actin, F-actin) 细胞骨架网络在决定细胞的力学性质方面也有非常重要的作用。细胞骨架网络力学行为的时空调控可以调节细胞的形态和细胞应力的产生,与细胞运动过程中伪足的形成和细胞黏附等有着紧密关系,F-actin 骨架网络的力学特性在细胞的运动力学行为如侵袭、迁移方面有着重要的指示作用<sup>[6]</sup>。同时,作为 F-actin 聚合形态的板状伪足和丝状伪足可以通过调节细胞应力来改变细胞的形态并调节细胞的运动能力。对于细胞的侵袭行为而言,通常分为 4 个步骤,即细胞首先黏附在侵袭位点上形成相关的侵袭结构并分泌蛋白酶类对胞外基质进行降解,并且最终完成进一步的迁移和侵袭等运动<sup>[7]</sup>。因此,从调节 RA FLS 细胞骨架的力学性质和抑制细胞侵袭行为等运动力学行为角度出发,寻找缓解甚至治疗 RA 的新药物是近年来 RA 相关研究的热点。

鸦胆子苦醇是近几年肿瘤相关研究中的具有良好抑癌作用的潜力药物,可以有效地抑制肿瘤的形成和生长,并具有良好的抗炎症的作用。RA FLS 现已被认为是一类“类肿瘤样”细胞,能在非依附的情况下生长,并且失去接触抑制<sup>[8]</sup>。在联合免疫缺陷小鼠的动物模型中发现,向关节内移植 RA FLS 和软骨后,RA FLS 生物学行为发生改变并且侵入到软骨<sup>[9]</sup>。此外,类似于其他肿瘤相关疾病,在 RA 的滑膜组织内出现血管翳的形成<sup>[10]</sup>。本研究将鸦胆子苦醇运用到 RA 的治疗和研究当中,探究鸦胆子苦醇对具有异常侵袭行为的 RA FLS 生物学行为的影响。

在细胞侵袭的过程中,细胞通过调节细胞骨架网络产生应力以达到侵袭入 ECM 的目的,同时改变的 ECM 也会影响细胞的力学性质。大量研究表明,MMPs 在多种疾病的发生中都占有重要的地位,如癌症、RA 和心血管疾病等。MMPs 是一类锌离子依赖性的内肽酶组成的内源性蛋白水解酶,它能降解细胞外基质成分,在细胞的运动中扮演着重要的角

色<sup>[11]</sup>。RA 中 MMPs 的表达量显著增加,可以导致软骨连接蛋白、纤维连接素和多种胶原的降解,直接参与软骨和骨质的降解并促进血管翳的形成,从而造成 RA 病理过程中关节的破坏<sup>[12-14]</sup>。现已发现 MMPs 有 20 余种,其中 MMPs 家族中 MMP-2、MMP-3 与 RA 中关节的病理性破坏有着非常密切的关系<sup>[15-16]</sup>。

在本研究中,利用不同浓度鸦胆子苦醇作用 RA FLS 后,从改变细胞骨架网络的力学性质方面来看,与对照组相比,鸦胆子苦醇能够显著抑制 F-actin、板状伪足和丝状伪足的形成,从而改变细胞的力学性质并影响细胞的形态、应力的产生和运动能力,同时鸦胆子苦醇可以有效地抑制 RA FLS 异常的侵袭能力。鸦胆子苦醇下调 RA FLS 中 MMP-2 和 MMP-3 的表达水平,并呈现一定的浓度依赖性。综上所述,鸦胆子苦醇在缓解 RA 病发的过程中起着重要作用,它能够通过调节细胞骨架网络的力学性质抑制 RA FLS 的侵袭以及 MMP-2 和 MMP-3 的表达,故其有望成为治疗 RA 的新药物。

## 参考文献:

- [1] ZHAO M, LAU ST, LEUNG PS, *et al.* Seven quassinoids from fructus bruceae with cytotoxic effects on pancreatic adenocarcinoma cell lines [J]. *Phytother Res*, 2011, 25 (12): 1796-1800.
- [2] AUO R, COMBE B, COULET B, *et al.* The pleiotropic effect of TRAIL on tumor-like synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients is mediated by caspases [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(9): 1227-1237.
- [3] GUIDUCCI S, DEL ROSSO A, CINELLI M, *et al.* Rheumatoid synovial fibroblasts constitutively express the fibrinolytic pattern of invasive tumor-like cells [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2005, 23(3): 364-372.
- [4] ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA, *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(3): 315-324.
- [5] 黄杨河, 罗自维, 李海滨, 等. TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  通过 PKA 通路诱导成纤维样滑膜细胞中力生长因子表达[J]. *医用生物力学*, 2014, 29(3): 276-280.
- [6] HUANG YH, LUO ZW, LI HB, *et al.* TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  induce mechano growth factor expression in human fibroblast-like synoviocytes through the PKA pathway [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(3): 276-280.
- [6] STRICKER J, FALZONE T, GARDEL ML. Mechanics of the F-actin cytoskeleton [J]. *J Biomech*, 2010, 43(1): 9-14.
- [7] SHELEF MA, BENNIN DA, YASMIN N, *et al.* Focal adhesion kinase is required for synovial fibroblast invasion, but not murine inflammatory arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(5): 1-10.
- [8] FIRESTEIN GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356-361.
- [9] LEFÈVRE S, KNEDLA A, TENNIE C, *et al.* Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints [J]. *Nat Med*, 2009, 15(12): 1414-1420.
- [10] HUH YH, LEE G, LEE KB, *et al.* HIF-2 $\alpha$ -induced chemokines stimulate motility of fibroblast-like synoviocytes and chondrocytes into the cartilage-pannus interface in experimental rheumatoid arthritis mouse models [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 302.
- [11] 吴克熹, 郭庆, 罗庆, 等. 骨髓间充质干细胞的迁移及其相关力/化学因素调控[J]. *医用生物力学*, 2015, 30(1): 83-88.
- [12] WU KW, GUO Q, LUO Q, *et al.* Migration and mechanochemical regulation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(1): 83-88.
- [12] XING R, JIN Y, SUN L, *et al.* Interleukin-21 induces migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exper Immun*, 184 (2): 147-158.
- [13] YOON HY, LEE EG, LEE H, *et al.* Kaempferol inhibits IL-1 $\beta$ -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE2 and MMPs [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4): 971-977.
- [14] TOLBOOM TC, PIETERMAN E, VAN DER LAAN WH, *et al.* Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: Correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(11): 975-980.
- [15] YUAN H, YANG P, ZHOU D, *et al.* Knockdown of sphingosine kinase 1 inhibits the migration and invasion of human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by down-regulating the PI3K/AKT activation and MMP-2/9 production *in vitro* [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(8): 5157-5165.
- [16] LI D, XIAO Z, WANG G, *et al.* Knockdown of ADAM10 inhibits migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5517-5523.