

引用本文:郑茂,邹玉,王洁莹,等.瑞香素通过含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶通路对胶原诱导性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞增殖与凋亡的影响[J].安徽医药,2022,26(11):2198-2202. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.11.018.



◇ 药学研究 ◇

## 瑞香素通过含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶通路对胶原诱导性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞增殖与凋亡的影响

郑茂<sup>1,2</sup>, 邹玉<sup>1</sup>, 王洁莹<sup>3</sup>, 况南珍<sup>2</sup>, 傅颖媛<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>德阳市人民医院检验科,四川 德阳 618000;

<sup>2</sup>南昌大学基础医学院,江西 南昌 330006;

<sup>3</sup>海南医学院第二附属医院检验科,海南 海口 570100

通信作者:傅颖媛,女,教授,硕士生导师,研究方向为中药活性成分抗感染免疫,Email:fyyncu@outlook.com

基金项目:国家自然科学基金(31460239);德阳市科技计划重点研发项目(2020SZZ087)

**摘要:** **目的** 探讨瑞香素(DAP)通过含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)通路对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖与凋亡的影响。**方法** 体外培养CIA-FLS,选取对数生长期细胞以不同浓度DAP(0、5、10、20、40、80 mg/L)作用48 h后,倒置显微镜下观察细胞生长状态,并通过人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)检测CIA-FLS细胞活力;采用DAP(40 mg/L)作用48 h后,通过Real-time PCR检测CIA-FLS中caspase-3、caspase-8、caspase-9 mRNA相对表达量;采用特异性不可逆的caspase抑制剂(Casp3-In、Casp8-In、Casp9-In、Pancasp-In)以不同浓度、不同时间预处理CIA-FLS后,通过CCK-8检测DAP(40 mg/L)对CIA-FLS细胞活力的影响;采用不同caspase抑制剂预处理CIA-FLS 2 h后,再与DAP(40 mg/L)共处理48 h,通过Hoechst 33258荧光染色观察CIA-FLS凋亡形态以及Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测CIA-FLS凋亡率。**结果** 经DAP作用后CIA-FLS细胞活力下降,增殖明显受抑,并与DAP作用浓度呈剂量依赖性;经DAP作用后CIA-FLS中caspase-3、caspase-8、caspase-9 mRNA相对表达量分别为(3.07±0.43)、(1.67±0.09)、(2.35±0.20),与对照组相比明显增加( $P<0.05$ );各caspase抑制剂预处理均在不同程度上减弱DAP抑制CIA-FLS增殖的效应,但Casp8-In不如Casp3-In、Casp9-In、Pancasp-In效果明显;荧光染色显示,经DAP作用后CIA-FLS细胞核形状大小不一,细胞核固缩、碎裂明显,出现较多浓染致密的颗粒状、块状荧光,Casp3-In、Casp9-In、Pancasp-In预处理组,呈均匀蓝色荧光的正常细胞核较DAP组明显增多,Casp8-In预处理组与DAP组差异不明显;流式结果显示,经DAP作用后CIA-FLS凋亡率为(34.80±3.90)%,与对照组相比明显升高( $P<0.05$ ),Casp3-In、Casp8-In、Casp9-In、Pancasp-In预处理组CIA-FLS凋亡率分别为(18.09±2.50)%、(29.46±2.16)%、(20.41±3.53)%、(10.17±1.91)%,均明显低于DAP组( $P<0.05$ ),但Casp8-In预处理组CIA-FLS凋亡率明显高于Casp3-In、Casp9-In、Pancasp-In预处理组( $P<0.05$ )。**结论** DAP可呈剂量依赖性地抑制CIA-FLS增殖,并通过caspase依赖的途径诱导CIA-FLS发生凋亡,可能与线粒体凋亡途径密切相关。

**关键词:** 关节炎,类风湿; 关节炎,实验性; 瑞香素; 成纤维样滑膜细胞; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶; 增殖; 凋亡

## Effects of daphnetin on the proliferation and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rats with collagen-induced arthritis through the cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme pathway

ZHENG Mao<sup>1,2</sup>, ZOU Yu<sup>1</sup>, WANG Jieying<sup>3</sup>, KUANG Nanzhen<sup>2</sup>, FU Yingyuan<sup>2</sup>

Author Affiliations:<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Deyang City, Deyang, Sichuan 618000, China;<sup>2</sup>Basic Medical College, Nanchang University, Jiangxi, Nanchang 330006, China;

<sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570100, China

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of daphnetin (DAP) on the proliferation and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in collagen-induced arthritic rats (CIA-FLS) through the cysteinyl aspartate specific proteinase (caspase) pathway. **Methods** CIA-FLSs were cultured *in vitro*, and cells in logarithmic growth phase were selected and treated with different concentrations of DAP (0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L) for 48 h. The cell growth state was observed under an inverted microscope, and the cell viability of CIA-FLSs was detected by the CCK-8 method. After treatment with DAP (40 mg/L), the relative expression levels of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 mRNA in CIA-FLSs were detected by real-time PCR. After CIA-FLS were pretreated with specific irreversible caspase inhibitors

(Casp3-In, Casp8-In, Casp9-In, and Pancasp-In) at different concentrations and for different times, the effect of DAP (40 mg/L) on the viability of CIA-FLS cells was detected by the CCK-8 method. CIA-FLSs were pretreated with different caspase inhibitors for 2 h, and then cotreated with DAP (40 mg/L) for 48 h. The apoptosis morphology of CIA-FLSs was detected by Hoechst 33258 fluorescence staining and Annexin V-FITC/PI double staining. **Results** The cell viability of CIA-FLSs decreased and the proliferation was significantly inhibited after DAP treatment, and the concentration was in a dose-dependent manner. The relative expression levels of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 mRNA in CIA-FLSs after DAP treatment were  $3.07 \pm 0.43$ ,  $1.67 \pm 0.09$ , and  $2.35 \pm 0.20$ , respectively, which were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). Pretreatment with each caspase inhibitor attenuated the effect of DAP on inhibiting the proliferation of CIA-FLSs to varying degrees, but Casp8-In was not as effective as Casp3-In, Casp9-In, or Pancasp-In. Fluorescence staining showed that after DAP treatment, the CIA-FLS nuclei had different shapes and sizes, with obvious pyknosis and fragmentation of the nuclei, and there was more dense granular and massive fluorescence, Casp3-In, Casp9-In and Pancasp-In. Compared with the DAP group, the number of normal cell nuclei with uniform blue fluorescence in the pretreatment group was significantly increased, and the difference between the Casp8-In pretreatment group and the DAP group was not significant, which was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rates of CIA-FLS in the Casp3-In, Casp8-In, Casp9-In, and Pancasp-In pretreatment groups were  $(18.09 \pm 2.50)\%$ ,  $(29.46 \pm 2.16)\%$ ,  $(20.41 \pm 3.53)\%$ , and  $(10.17 \pm 1.91)\%$ , respectively, which were significantly lower than those in the DAP group ( $P < 0.05$ ), but the CIA-FLS apoptotic rate in the Casp8-In pretreatment group was significantly higher than that in the Casp3-In, Casp9-In, or Pancasp-In pretreatment groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** DAP can inhibit the proliferation of CIA-FLSs in a dose-dependent manner and induce CIA-FLS apoptosis through a caspase-dependent pathway, which may be closely related to the mitochondrial apoptosis pathway.

**Key words:** Arthritis, rheumatoid; Arthritis, experimental; Daphnetin; Fibroblast-like synoviocytes; Cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme; Proliferation; Apoptosis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的全身性自身免疫性疾病,主要病理特征是骨与软骨组织受损,继而造成关节破坏<sup>[1]</sup>。RA病程长、预后差、致残性大,且病情进行性加重,一直以来是临床研究关注的重点。然而,RA确切的发病机制仍未完全阐明,目前的研究观点主要认为与滑膜细胞异常增生密切相关<sup>[2]</sup>。成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)是RA滑膜内膜衬里的主要填充细胞,在滑膜衬里层处于极度活跃的状态,呈肿瘤样增殖,在RA病人滑膜病变及关节损伤中起着关键作用<sup>[3]</sup>。因此,抑制FLS增生对控制RA发病及病情进展具有重要意义。

瑞香素(daphnetin, DAP),化学名7,8-二羟基香豆素,是金边瑞香、长白瑞香等瑞香属植物的主要活性成分,为我国自主研发的天然药物。文献报道显示,DAP具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多种药理作用<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究从金边瑞香中分离提纯出DAP,并发现DAP可抑制胶原诱导性关节炎大鼠(collagen-induced arthritis, CIA, 一种类风湿关节炎常用的动物模型)的关节炎症,改善关节病变,提高Foxp3<sup>+</sup> Treg细胞水平,使Th17/Treg趋于平衡<sup>[5-7]</sup>。体外实验还发现DAP能促使CIA大鼠成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes in collagen-induced arthritic rats, CIA-FLS)的促凋亡基因DR3、PDCD5、FasL、p53去甲基化,以及降低Bcl-2、STAT3基因的表达,使其出现凋亡现象<sup>[8-9]</sup>。然而,DAP诱导CIA-FLS凋亡的信号途径尚不清楚。为此,本研究自2018年3—9月利用DAP结合不同特

异性含半胱氨酸的胱天蛋白酶(cysteiny aspartate specific proteinase, caspase)抑制剂,观察DAP对CIA-FLS增殖与凋亡的影响,旨在初步探讨DAP诱导CIA-FLS凋亡的可能机制途径,为DAP用于临床治疗RA提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞系** CIA-FLS购于上海研生实业有限公司,许可证号J2900117872001。细胞采用含10%胎牛血清的双抗DMEM培养液,置于37℃、5%二氧化碳饱和湿度的培养箱内培养,CIA-FLS为贴壁生长。

**1.2 药物** DAP化学式C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>,纯度≥98%,购于北京索莱宝生物科技有限公司。将20 mg DAP溶于1 mL二甲亚砜(DMSO)配成20 g/L贮存液,使用时以培养液稀释至目标浓度。

**1.3 试剂** caspase-3抑制剂(Casp3-In,美国Selleck公司),caspase-8抑制剂(Casp8-In,美国Santa Cruz公司),caspase-9抑制剂(Casp9-In,美国Santa Cruz公司),泛caspase抑制剂(Pancasp-In,美国Selleck公司),人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(上海贝博生物公司),Hoechst 33258染液(上海贝博生物公司),Annexin V-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒(美国BD公司),离心柱型总RNA提取试剂盒(北京天根科技公司),PCR逆转录试剂盒(日本TOYOBO公司),Real-time PCR试剂盒(日本TOYOBO公司),PCR引物(北京华大基因公司),含链霉素青霉素的DMEM培养液(北京索莱宝生物公司),胎牛血清(天津灏洋生物公司),Accutase™细胞分离溶液(美国eBioscience公司)。

**1.4 仪器** 二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),超净工作台(上海博迅公司),水平摇床(海门其林贝尔公司),倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司),多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),PCR 热循环仪(美国 Thermo Scientific 公司),Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

## 2 方法

**2.1 CCK-8 检测 DAP 对 CIA-FLS 增殖的影响** 取生长良好的对数期 CIA-FLS,加入 Accutase™ 细胞分离液消化,低速离心收集细胞,再加入培养液重悬后计数细胞浓度,将细胞接种于 96 孔板(每孔约  $8 \times 10^3$  个细胞)。培养 12 h 后,加入不同浓度 DAP(终浓度分别为 0、5、10、20、40、80 mg/L),每个浓度设 3 个平行孔,对照孔(含细胞)和空白孔(不含细胞)加入等体积培养液。培养 48 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L,轻轻混匀,并放回培养箱继续培养 1 h 再取出,在酶标仪上测定各孔 450 nm 处的吸光度(OD)。CIA-FLS 细胞活力(%)=(实验孔 OD 值-空白孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白孔 OD 值)×100%。

**2.2 Real-time PCR 检测 DAP 对 CIA-FLS 中 caspase 基因的影响** 取 CIA-FLS 接种于 24 孔板(每孔约  $5 \times 10^4$  个细胞),培养 12 h 后,加入 DAP(终浓度为 40 mg/L)处理 48 h,并设细胞对照孔。培养结束后提取 CIA-FLS 的总 RNA,并进行逆转录反应(逆转录反应体系:11  $\mu$ L RNase-free Water,4  $\mu$ L RT Buffer,1  $\mu$ L RT Enzyme Mix,1  $\mu$ L Primer Mix,3  $\mu$ L Total RNA)。将逆转录好的 cDNA 继续进行实时荧光定量 PCR 扩增反应(扩增反应体系:6.4  $\mu$ L RNase-free Water,10  $\mu$ L Master Mix,0.8  $\mu$ L Forward primer,0.8  $\mu$ L Reverse primer,2  $\mu$ L cDNA)。每个基因设 3 个平行管,采用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算目标基因 caspase-3、caspase-8、caspase-9 mRNA 相对表达量。

**2.3 caspase 抑制剂不同条件预处理后,CCK-8 检测 DAP 对 CIA-FLS 增殖的影响** 取 CIA-FLS 接种于 96 孔板(每孔约  $8 \times 10^3$  个细胞),培养 12 h 后,分别加入不同浓度的各 caspase 抑制剂预处理 1、2、4 h,再加入 DAP 共处理 48 h,其中 Casp3-In、Casp8-In、Casp9-In 终浓度为 0、1.25、2.5、5、10、20  $\mu$ mol/L, Pancasp-In 终浓度为 0、1.25、2.5、5、10、20、40  $\mu$ mol/L, DAP 终浓度为 40 mg/L。其余实验步骤同 2.1,最后计算各孔 CIA-FLS 细胞活力。

**2.4 Hoechst 33258 荧光染色观察 CIA-FLS 凋亡形态** 取 CIA-FLS 接种于 24 孔板(每孔约  $5 \times 10^4$  个细胞),培养 12 h 后,分别加入各 caspase 抑制剂预处理 2 h,再加入 DAP 共处理 48 h,其中 Casp3-In、Casp8-

In、Casp9-In 终浓度为 5  $\mu$ mol/L, Pancasp-In 终浓度为 20  $\mu$ mol/L, DAP 终浓度为 40 mg/L,并设细胞对照孔。培养结束后,吸去各孔培养液,加入 PBS 洗涤 1 min。将 Hoechst 33258 染液稀释 30 倍制成染色工作液,每孔加入 200  $\mu$ L 染色工作液,室温避光染色 10 min。吸去染色液,加入 PBS 水平缓摇洗涤 3 min,重复 3 次。染色完成后尽快置于荧光显微镜下,选择 340 ~ 350 nm 蓝色激发光观察细胞凋亡形态,并拍照留存。

**2.5 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测 CIA-FLS 凋亡率** 细胞分组同“2.4”,CIA-FLS 培养 48 h 后,加入 Accutase™ 细胞分离液,室温消化后低速离心,使用流式管收集细胞。每管加入预冷 PBS 洗涤 2 次,低速离心后弃尽上清,加入 200  $\mu$ L Binding Buffer 重悬细胞,再分别加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI,室温避光孵育 15 min,最后上流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

**2.6 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 DAP 对 CIA-FLS 增殖的影响** 如图 1 所示,倒置显微镜下可观察到 CIA-FLS 为成纤维样生长形态,贴壁状态良好,细胞排列均匀;经 DAP 作用后 CIA-FLS 生长状态受到抑制,细胞数量明显减少,细胞皱缩变形且贴壁能力下降。经 DAP 作用后 CIA-FLS 细胞活力明显下降,并与 DAP 作用浓度呈剂量依赖性。当 DAP 浓度为 40 mg/L 时,CIA-FLS 细胞活力在 50% 左右,故后续实验选择此浓度继续研究。

**3.2 DAP 对 CIA-FLS 中 caspase 基因的影响** 如表 1 所示,经 DAP(终浓度为 40 mg/L)作用 48 h 后,与对照组相比,CIA-FLS 的 caspase-3、caspase-8、caspase-9 mRNA 相对表达量明显增加( $P < 0.05$ )。由此可见,DAP 可以激活 CIA-FLS 的 caspase 通路。

表 1 DAP 对 CIA-FLS 中 caspase 基因 mRNA 相对表达量的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别    | caspase-3   | caspase-8   | caspase-9   |
|-------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组   | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| DAP 组 | 3.07 ± 0.43 | 1.67 ± 0.09 | 2.35 ± 0.20 |
| F 值   | 69.47       | 171.29      | 131.85      |
| P 值   | 0.001       | <0.001      | <0.001      |

**3.3 caspase 抑制剂不同条件预处理后,DAP 对 CIA-FLS 增殖的影响** 与单独 DAP 作用组相比,各 caspase 抑制剂预处理均在不同程度上影响 DAP 抑

制 CIA-FLS 增殖的效应。当 Casp3-In、Casp9-In 浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ , Pancasp-In 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 预处理 CIA-FLS 2 h 或 4 h, 均可明显提高 CIA-FLS 细胞活力; 当 Casp8-In 浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  时亦可在一定程度上提高 CIA-FLS 细胞活力, 但不如 Casp3-In、Casp9-In、Pancasp-In 效果明显, 而当 Casp8-In 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时, CIA-FLS 细胞活力却低于单独 DAP 作用组。见图 2。

**3.4 DAP 对 CIA-FLS 凋亡形态的影响** 根据 CCK-8 实验和初期预实验, 选择 Casp3-In、Casp8-In、Casp9-In 浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ , Pancasp-In 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 预处理 CIA-FLS 2 h, 再与 DAP (终浓度为 40 mg/L) 共处理 48 h。如图 3 所示, 对照组细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光, 细胞排列均匀, 未见明显的凋亡荧光; DAP 组细胞核形状大小不一, 出现较多浓染致密的颗粒状、块状荧光, 细胞核固缩、碎裂明显, 细胞数量明显少于对照组; Casp3-In、Casp9-In、Pancasp-In 预处理组, 呈均匀蓝色荧光的正常细胞核较 DAP 组明显增多, 但仍可见到少量散在分布的颗粒状荧光, 少数细胞核碎裂; Casp8-In 预处理组与 DAP 组差异不明显, 细胞数量较少。

**3.5 DAP 对 CIA-FLS 凋亡率的影响** 与对照组相比, 经 DAP 作用后 CIA-FLS 凋亡率明显升高  $[(34.80 \pm 3.90)\% \text{ 比 } (5.68 \pm 1.35)\%, P < 0.05]$ ; 各 caspase 抑制剂预处理组 CIA-FLS 凋亡率均明显低于 DAP 组 ( $P < 0.05$ ); 各 caspase 抑制剂预处理组中, Casp8-In 预处理组 CIA-FLS 凋亡率明显高于 Casp3-In、Casp9-In、Pancasp-In 预处理组  $[(29.46 \pm 2.16)\% \text{ 比 } (18.09 \pm 2.50)\%、(20.41 \pm 3.53)\%、(10.17 \pm 1.91)\%, P < 0.05]$ 。

## 4 讨论

FLS 异常增生引发的持续性滑膜炎症和软骨破坏, 是 RA 最显著的病理特征<sup>[10]</sup>。研究表明 FLS 具有类肿瘤样增殖和抗凋亡的特性, 增生活化的 FLS 产生多种促炎细胞因子与基质破坏性酶类, 促进了 FLS 侵袭和破坏关节<sup>[11]</sup>。目前尚无根治 RA 的方法, 临床上常用的治疗药物包括非甾体抗炎药、免疫抑制剂、糖皮质激素等, 虽然具有明显对症及抗炎效果, 但相应毒副作用大, 不适合长期使用; 新兴生物靶向制剂如利妥昔单抗, 具有一定疗效, 但价格昂贵且仅对部分难治性 RA 有效<sup>[12]</sup>。天然植物来源的活性单体药物, 具有来源广泛、易于获得、价格相对低廉、作用靶点多等优势, 在临床应用方面日益受到关注, 也是人类从自然界获取新药的重要途径<sup>[13]</sup>。既往文献报道中国传统中药活性成分如雷公藤多苷<sup>[14]</sup>、姜黄素<sup>[15]</sup>、白藜芦醇<sup>[16]</sup>、青藤碱<sup>[17]</sup>等, 治疗 RA 病人或关节炎大鼠表现出较好疗效, 极大

拓展了学者们对 RA 的研究思路。鉴于 FLS 存在异常增生和凋亡不足的特性, 利用中药活性单体成分干预来抑制 FLS 增殖、诱导其凋亡, 有望成为一种治疗 RA 行之有效的临床方案<sup>[18]</sup>。

细胞凋亡是一种高度有序、受基因精细调控以及一系列酶参与的细胞自主性死亡方式, caspase 家族是其中非常关键的调控因子。根据 caspase 在凋亡通路所处位置及执行功能的不同, 可将其分为两大类, 第一类是凋亡启动因子 (包括 caspase-2/8/9/10), 第二类是凋亡效应因子 (包括 caspase-3/6/7)<sup>[19]</sup>。细胞凋亡主要有两条经典的介导通路, 分别是死亡受体途径和线粒体途径。死亡受体途径中, 死亡受体与相应配体结合后发生多聚化, 募集 FADD, 再与 caspase-8 结合, 形成死亡诱导信号复合体, 活化 procaspase-8, 激活下游效应 caspase-3, 导致细胞凋亡<sup>[20]</sup>。线粒体途径由细胞内死亡信号如病毒、射线、化疗药物等激活, 使线粒体膜通透性增加, 造成 Cyt-c 等释放入胞质, 在 ATP/dATP 存在情况下, Cyt-c 与 Apaf-1 等结合形成多聚复合体, 活化 procaspase-9, 激活下游效应 caspase-3, 导致细胞凋亡<sup>[21]</sup>。由此可见, caspase-8、caspase-9 分别是两条凋亡途径的上游启动因子, 而 caspase-3 是凋亡途径末端共同的效应因子。caspase 贯穿这两条途径的始终, 使其互相联系、彼此影响, 共同调节细胞凋亡过程。为此, 本研究重点聚焦于 caspase 通路来探讨 DAP 对 CIA-FLS 增殖与凋亡的影响。

本研究首先明确 DAP 对 CIA-FLS 增殖的影响, 结合倒置显微镜下观察细胞生长状态和 CCK-8 试验, 证实 DAP 能以剂量依赖性的方式降低 CIA-FLS 细胞活力, 抑制其增殖。此外, DAP 促使 CIA-FLS 的 caspase 相关基因表达增加, 说明这个过程中 caspase 通路激活。当采用不同 caspase 抑制剂预处理 CIA-FLS 后, DAP 的抑制作用不同程度减弱, 这与 caspase 抑制剂的种类、浓度、预处理时间均存在关联, 特别是抑制剂种类。细胞发生凋亡时会出现一系列形态学变化, 如细胞核碎裂、细胞质浓缩等, 本研究利用 Hoechst 33258 荧光染色观察到 CIA-FLS 呈均匀弥散荧光, 而经 DAP 作用后 CIA-FLS 细胞核形态发生明显改变, 出现较多典型的凋亡荧光, Casp3-In、Casp9-In、Pancasp-In 预处理组的凋亡现象较 DAP 组有不同程度改善。因此, 我们推测 DAP 可能通过诱导 CIA-FLS 凋亡, 从而抑制其增殖, 这一过程中 caspase 通路起着重要作用。

为了进一步明确 DAP 诱导 CIA-FLS 凋亡的特性, 并探讨其主要参与哪条凋亡途径, 本研究还采用双染流式细胞术检测 CIA-FLS 凋亡率, 发现各

caspase 抑制剂预处理组凋亡率较 DAP 组均明显降低,以 Pancasp-In 预处理组降低最为明显,但 Casp8-In 预处理组凋亡率却明显高于其他抑制剂预处理组。不难看出,通过荧光染色观察到的凋亡情况与流式检测结果基本一致,DAP 可诱导 CIA-FLS 发生明显凋亡改变。当抑制 caspase 通路后,可有效阻断 DAP 诱导 CIA-FLS 凋亡的效应,并且抑制线粒体途径的凋亡启动因子对凋亡阻断效果,明显优于抑制死亡受体途径的凋亡启动因子,说明线粒体途径在这一过程中起着重要作用。文献报道<sup>[22]</sup>RA 病人的 FLS 在线粒体凋亡途径中,可出现多种方式抵抗相关受体介导的凋亡,包括 Bcl-2 家族蛋白的功能失调、NF- $\kappa$ B 信号转导通路失调、p53 突变等,表明线粒体凋亡途径是 FLS 出现凋亡抵抗的重要原因,亦是天然药物诱导 FLS 凋亡的重要潜在靶点。

综上所述,本研究发现 DAP 可呈剂量依赖性抑制 CIA-FLS 增殖,并通过 caspase 依赖的途径诱导 CIA-FLS 发生凋亡,其中主要涉及线粒体凋亡途径,表明 DAP 有望作为治疗 RA 的一种天然候选药物。值得注意的是,caspase 通路涉及的调控基因众多,以及其他少见凋亡通路的存在,如内质网凋亡通路<sup>[23]</sup>、非 caspase 依赖的凋亡通路<sup>[24]</sup>,故仍有待于我们后续的实验研究来进一步剖析 DAP 诱导 CIA-FLS 凋亡的精细机制,特别是线粒体途径中具体作用的分子靶位。

(本文图 1~3 见插图 11-1)

### 参考文献

- [1] SPARKS JA. Rheumatoid arthritis[J]. Ann Intern Med, 2019, 170(1): ITC1-ITC16. DOI: 10.7326/AITC201901010.
- [2] LEFEVRE S, MEIER FM, NEUMANN E, et al. Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis[J]. Current Pharmaceutical Design, 2015, 21(2): 130-141.
- [3] BOTTINI N, FIRESTEIN GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2013, 9(1): 24-33.
- [4] 郑茂, 邹玉, 傅颖媛. 瑞香素药理作用的研究进展[J]. 中成药, 2017, 39(4): 790-794.
- [5] YAO RF, FU YY, LI S, et al. Regulatory effect of daphnetin, a coumarin extracted from *Daphne odora*, on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 670(1): 286-294.
- [6] TU LN, LI S, FU YY, et al. The therapeutic effects of daphnetin in collagen-induced arthritis involve its regulation of Th17 cells[J]. International Immunopharmacology, 2012, 13(4): 417-423.
- [7] 王洁莹, 刘玮, 郑茂, 等. 瑞香素对 CIA 大鼠脾 T 淋巴细胞杀瘤效应的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 33-35.
- [8] SHU KY, KUANG NZ, ZHANG ZQ, et al. Therapeutic effect of daphnetin on the autoimmune arthritis through demethylation of proapoptotic genes in synovial cells[J/OL]. J Transl Med, 2014, 12: 287. DOI: 10.1186/s12967-014-0287-x.
- [9] CHEN XY, KUANG NZ, ZENG XP, et al. Effects of daphnetin combined with Bcl2-siRNA on antiapoptotic genes in synovial fibroblasts of rats with collagen-induced arthritis[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(1): 884-890.
- [10] HARRE U, SCHETT G. Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis[J]. Seminars in Immunopathology, 2017, 39(4): 355-363.
- [11] BARTOK B, FIRESTEIN GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis[J]. Immunological Reviews, 2010, 233(1): 233-255.
- [12] ABBASI M, MOUSAVI MJ, JAMALZEHI S, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(7): 10018-10031.
- [13] 金文澜, 刘育辰, 张安英, 等. 抗类风湿关节炎天然产物研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1851-1857.
- [14] ZHOU YZ, ZHAO LD, CHEN H, et al. Comparison of the impact of Tripterygium wilfordii Hook F and Methotrexate treatment on radiological progression in active rheumatoid arthritis: 2-year follow up of a randomized, non-blinded, controlled study[J]. Arthritis Research & Therapy, 2018, 20(1): 70.
- [15] DAI QD, ZHOU D, XU LP, et al. Curcumin alleviates rheumatoid arthritis-induced inflammation and synovial hyperplasia by targeting mTOR pathway in rats[J]. Drug Design Development and Therapy, 2018, 12: 4095-4105.
- [16] 宋先兵, 黄焱平, 方安宁, 等. 白藜芦醇对 AA 大鼠关节成纤维样滑膜细胞凋亡诱导作用及可能机制[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(5): 660-665.
- [17] 张群燕, 赵智明, 姚茹冰, 等. 青藤碱抑制类风湿关节炎滑膜细胞增殖与诱导凋亡的研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(1): 53-55.
- [18] ZHANG Q, LIU J, ZHANG MM, et al. Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis[J]. Biomolecules, 2019, 9(12): 9120795. DOI: 10.3390/biom9120795.
- [19] KOPEINA GS, PROKHOROVA EA, LAVRIK IN, et al. Alterations in the nucleocytoplasmic transport in apoptosis: Caspases lead the way[J/OL]. Cell Proliferation, 2018, 51(5): e12467. DOI: 10.1111/cpr.12467.
- [20] CHAN LP, TSENG YP, DING HY, et al. Tris(8-Hydroxyquinoline)iron induces apoptotic cell death via oxidative stress and by activating death receptor signaling pathway in human head and neck carcinoma cells[J]. Phytomedicine, 2019, 63: 153005. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.153005.
- [21] CHEN W, LIU YX, ZHANG LM, et al. Nocardia cyriacigeorgica from bovine mastitis induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells via activation of mitochondrial-caspase pathway[J/OL]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 194. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00194.
- [22] HONG SS, MAROTTE H, COURBON G, et al. PUMA gene delivery to synoviocytes reduces inflammation and degeneration of arthritic joints[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 146.
- [23] LI X, YANG XR, CHANG LJ, et al. Endoplasmic reticulum rather than mitochondria plays a major role in the neuronal apoptosis induced by polybrominated diphenyl ether-153[J]. Toxicology Letters, 2019, 311: 37-48.
- [24] QU XY, DING XR, DUAN M, et al. Influenza virus infection induces translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) in A549 cells: role of AIF in apoptosis and viral propagation[J]. Archives of Virology, 2017, 162(3): 669-675.

(收稿日期: 2020-10-22, 修回日期: 2020-12-09)