

穿山龙总皂苷对白介素-1 β 诱导大鼠成纤维样滑膜细胞 PI3K/AKT 的影响

于栋华¹, 刘磊¹, 卢芳¹, 杨超¹, 薛欢欢², 刘树民^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省中医研究院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 观察穿山龙总皂苷对重组白介素-1 β (rIL-1 β) 诱导的大鼠成纤维样滑膜细胞(FLS)的影响, 探讨其对 PI3K/AKT 通路的作用。方法: 原代培养滑膜细胞; 模型组给予 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ rIL-1 β , 给药组给予 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ rIL-1 β 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 穿山龙总皂苷共同孵育, 孵育 72 h 后用 Western blot 法测定穿山龙总皂苷对 rIL-1 β 诱导大鼠 FLS 中磷脂酰肌醇-3 激酶(p-PI3K)、蛋白激酶 B(p-AKT)表达的影响。结果: 与空白组比较, 模型组 p-PI3K, p-AKT 水平明显升高(分别为 162.66 \pm 2.34, 157.03 \pm 1.84)($P < 0.05$), 穿山龙总皂苷能显著降低 rIL-1 β 诱导下大鼠 FLS 中 p-PI3K, p-AKT 水平(分别为 67.84 \pm 1.24, 71.66 \pm 1.20)($P < 0.01$)。结论: 穿山龙总皂苷可抑制 PI3K/AKT 信号转导通路; 穿山龙总皂苷具有治疗痛风性关节炎(Gouty Arthritis, GA)的潜在价值。

[关键词] 穿山龙总皂苷; 白介素-1 β ; 成纤维样滑膜细胞; 痛风性关节炎

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0199-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.1006.031.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 10:06

Effect of Total Saponin of Dioscoreae Nipponicae Rhizoma on PI3K/AKT Signal Pathway by in rIL-1 β Induced Fibroblast-Like Synoviocytes

YU Dong-hua¹, LIU Lei¹, LU Fang¹, YANG Chao¹, XUE huan-huan², LIU Shu-min^{1*}

[收稿日期] 20120508(003)

[基金项目] 黑龙江省青年科学基金项目(QC2009C46, QC2011C109)

[第一作者] 于栋华, 博士研究生, 从事中药临床药效物质基础研究及中药药性理论研究, Tel: 0451-87266988, E-mail: liuleitcm@163.com

[通讯作者] * 刘树民, 教授, 博士生导师, 从事中药临床药效物质基础研究及中药药性理论研究, Tel: 0451-87266988, Fax: 0451-87266988, E-mail: lsm@hljucm.net

[2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理学实验方法[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002; 1042.

[3] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000; 462.

[4] 卢新政, 王连生, 黄峻, 等. 冠状动脉堵塞法建立猪心肌梗死模型[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(2): 218.

[5] 江文德, 徐端正, 胡国钧, 等. 冠心苏合丸的药理研究及其简化制剂—苏冰滴丸的理论基础[J]. 药理学报, 1979, 11(14): 655.

[6] 朱旭, 郑利平. 冠心病患者血清超敏 C 反应蛋白、肌钙蛋白、血脂水平变化及临床意义[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 258

[7] Bodor Gs, Poter S, Landt Y. The development of monoclonal antibodies and an assay for cardiac troponin I

with preliminary results in suspected myocardial infarction[J]. Chin Chem, 1992, 11: 2203.

[8] Wu A H. A comparison of cardiac tropomin T and cardiac tropomin I in patients with acute coronary syndromes syndromes [J]. Coron Artery Dis, 1999, 10: 69.

[9] 潘柏中. 心脏标志物的临床应用[J]. 中华医学检验杂志, 2005, 28: 134.

[10] 王利娜, 李忠信. 人心肌肌钙蛋白 T 及其在临床上的最新应用[J]. 医学综述, 2003, 9(4): 207.

[11] 瞿波, 于永群, 侯望平, 等. 参附注射液对下肢缺血再灌注诱发心肌损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 201.

[责任编辑] 聂淑琴

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

2. Heilongjiang Research Academy of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] Objective: To explore the effects of total saponin of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* (RDN) on *in vitro* apoptosis of rIL-1 β induced fibroblast-like synoviocytes (FLS), and further to investigate the PI3K/AKT signal mechanism. **Method:** FLS were primarily cultured. Model group: 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ rIL-1 β , RDN group: 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ rIL-1 β and 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RDN. Western blot method was applied to examine the expression of p-PI3K protein and p-AKT protein degradation in rIL-1 β induced FLS stimulated with total saponin of RDN. **Result:** Compared to control group, expression of p-PI3K and p-AKT protein increased in model group, respectively 162.66 \pm 2.34 and 157.03 \pm 1.84 ($P < 0.05$), total saponin of RDN inhibited rIL-1 β induced phosphorylation of AKT and PI3K in FLS, respectively 67.84 \pm 1.24 and 71.66 \pm 1.20 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Total saponin of RDN can inhibit FLS PI3K/AKT signal pathway. Total saponin of RDN may provide a new therapeutic approach in treatment of gouty arthritis.

[Key words] total saponin of RDN; rIL-1 β ; FLS; gouty arthritis

穿山龙 (*Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*) 为薯蓣科薯蓣属多年生藤本植物穿龙薯蓣 (*Dioscorea nipponica* Makino) 的根茎,具有祛风除湿、通络止痛功效,用于风湿、风湿性关节炎、手足麻木、咳嗽、跌打损伤等疾病。痛风性关节炎是嘌呤代谢障碍、尿酸增高所致。尿酸盐沉积于关节、关节周围组织和皮下组织,能促进致炎细胞因子白介素-1 β (IL-1 β) 分泌和成熟,引起关节炎的反复发作,有急性红、肿、剧痛,逐渐产生骨与关节破坏、畸形、关节强直和功能障碍。本实验的前期实验结果表明,穿山龙能够改善痛风性关节炎关节症状并降低尿酸水平^[1-2],并对其有效成分提取得到穿山龙总皂苷^[3-4],本研究拟观察穿山龙总皂苷对重组 IL-1 β (rIL-1 β) 诱导的大鼠成纤维样滑膜细胞 (FLS) 增生的影响,探讨其治疗痛风性关节炎作用机制。

1 材料

1.1 试剂 穿山龙 (*Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*, 产地黑龙江,经黑龙江中医药大学中医药研究院付克教授鉴定为合格品) 总皂苷,棕色粉末,由穿山龙经乙醇回流提取、大孔吸附树脂洗脱纯化后得到,主要含原薯蓣皂苷等成分,总苷含量 > 50%,由黑龙江中医药大学中医药研究院提供。AKT 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司)、PI3K 抗体 (美国 Bioworld 公司)。胎牛血清 (中国杭州四季青公司)。SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 (中国碧云天生物有限公司)。MTT (美国 Sigma 公司) 产品,其他常规化学试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 仪器 CO₂ 培养箱 (中国力康发展公司, Heal Force HF90), 医用型洁净工作台 (中国东联哈尔仪

器制造有限公司, HD-920HD-920), 酶标仪 (中国塞默飞世尔仪器有限公司, MK3), 垂直电泳仪及转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司), 凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 成纤维样滑膜细胞 (FLS) 的培养 颈椎脱臼法处死大鼠, 无菌取出大鼠双侧膝关节滑膜组织, 剪成 1 ~ 2 mm³ 大小的组织块, 以 DMEM 培养液洗涤 2 ~ 3 次。用弯头吸管吸取数小块均匀排列在培养瓶中的底壁上, 轻轻翻转培养瓶使瓶底朝上, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱内培养 2 h, 使其贴壁。取出培养瓶加入预温的含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液少许, 使液体刚刚覆盖组织块为宜, 再置培养箱中继续培养, 每隔 1 ~ 2 d 换营养液 1 次, 待有成纤维样滑膜细胞长出组织块后, 去除组织块继续培养^[5], 待细胞长满后用 0.25% 胰蛋白酶处理细胞并进行传代培养。

2.2 FLS 的鉴定 倒置显微镜观察滑膜细胞形态及生长情况; 免疫组化的方法检测滑膜细胞 Vimentin-1 蛋白, CD68 蛋白。

2.3 实验分组 实验过程中将成纤维样滑膜细胞 (FLS) 分为空白组细胞, 模型组细胞加入 IL-1 β (终质量浓度 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 给药组细胞加入 IL-1 β (终质量浓度 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 穿山龙总皂苷 (终质量浓度 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.4 检测穿山龙总皂苷对 rIL-1 β 诱导 FLS 中 p-PI3K, p-AKT 的影响 用 0.25% 胰蛋白酶消化对数生长期大鼠 FLS, 用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液, 接种于 10 cm 的细胞培养皿。按以上分组进行加药, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱中

培养,72 h 后,终止培养。重悬计数,移入 1.5 mL EP 管,离心弃去培养基,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。离心去上清,将 EP 管口倒置于吸水纸上吸干残留液体。按 5×10^6 个细胞加入 0.1 mL RIPA 强裂解液,并剧烈振荡后置冰上 120 min [裂解液在使用前按每毫升加入 $10 \mu\text{L}$ PMSF ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 配制,冰浴预冷后使用]。4 $^{\circ}\text{C}$ $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,将上清液转移至另一 1.5 mL EP 管中。每个样本中各取少量蛋白,通过 BCA 法测定蛋白样品浓度,并将蛋白样品浓度调成一致,每组取 50 μg 的总蛋白按 1:4 加入 $5 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液沸水浴中加热 5 min,然后进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,0.3% 的 BSA 封闭 1 h 加入 PI3K/AKT 和内参 GAPDH 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, DAB 显色液 A, B, C 液各一滴加入 1 mL 三蒸水中混匀取 1 mL 将膜浸在其中 5 min 流水冲洗。扫描后用 Quantity One 灰度分析软件进行吸光度 (A) 计算。以目的蛋白条带与内参 GAPDH A 的比值作为相应目的蛋白的表达量指标。每个样本重复 3 次。

2.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 18.0 统计分析软件进行统计学分析,组间比较行单因素方差分析,有显著性差异者进一步用最小显著性极差法检验 (least significant difference, LSD) 进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

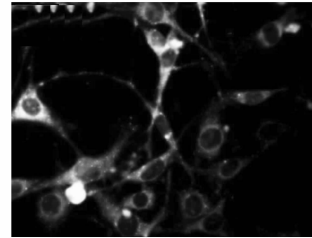
3 结果

3.1 FLS 的形态及鉴定 对原代培养的滑膜细胞进行贴壁分离纯化,细胞培养成功,倒置显微镜下观察细胞形态结果 (图 1A),从图中可以看出长梭形和多角形细胞,滑膜细胞单个排列。培养 3 d 后平铺贴壁生长。大鼠滑膜细胞免疫组化鉴定结果显示 Vimentin-1 表达呈阳性 (图 1B), CD68 表达呈阴性 (图片未附),表明培养的细胞以成纤维样细胞为主,可用于实验。

3.2 Western blot 分析 p-AKT, p-PI3K 表达 通过 Western blot 检测大鼠 FLS 中 p-AKT, p-PI3K 蛋白相对表达量 (表 1)。在 rIL-1 β 的刺激下,成纤维样滑膜细胞 (FLS) 中的蛋白磷酸化水平升高,模型组 p-AKT, p-PI3K 相对表达分别为 157.03 ± 1.84 , 162.66 ± 2.33 , 与空白组相比差异显著 ($P < 0.05$); 在穿山龙总皂苷的干预下,成纤维样滑膜细胞 (FLS) 中的蛋白磷酸化水平下调,给药组 p-AKT, p-PI3K 表达分别为 71.66 ± 1.20 , 67.84 ± 1.24 , 与模型组相比差异显著 ($P < 0.01$)。



A



B

- A. 倒置显微镜下细胞形态;
- B. Vimentin-1 抗原表达呈阳性

图 1 原代培养的滑膜细胞形态及鉴定

表 1 穿山龙总皂苷干预 IL-1 β 诱导 FLS 中 p-PI3K, p-AKT 相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	p-PI3K	p-AKT
空白	159.38 ± 1.15	135.59 ± 0.62
模型 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ rIL-1 β)	$162.66 \pm 2.33^{1)}$	$157.03 \pm 1.84^{1)}$
给药 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ rIL-1 β + $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RDN)	$67.84 \pm 1.24^{2, 4)}$	$71.66 \pm 1.20^{2, 4)}$

注: ¹⁾ 与空白组比较 $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

滑膜细胞是构成滑膜组织的主要成分,主要分为两种类型:巨噬细胞样滑膜细胞 (macrophage-like synoviocytes, MLC) 和 FLS^[6]。Vimentin-1 蛋白表达呈阳性, CD68 蛋白表达呈阴性^[7], 说明培养的细胞以 FLS 为主, 可以用于实验。

穿山龙总皂苷主要含原薯蓣皂苷, 伪原薯蓣皂苷, 甲基原薯蓣皂苷, 薯蓣皂苷等。有研究表明穿山龙总皂苷对体液免疫、细胞免疫有明显的抑制作用, 可以增强巨噬细胞的吞噬功能^[8], 并可以改善佐剂性关节炎大鼠炎性细胞浸润、关节软骨破坏, 说明穿山龙总皂苷有很好的抗炎作用^[9]。本实验正是从这个角度探讨其治疗痛风性关节炎的治疗机制。

当 GA 发生时, 细胞因子释放 IL-1、IL-6 等, 从而引起局部血管扩张, 细胞释放内源因子刺激外周神经末梢, 引起剧烈疼痛。急性痛风性关节炎的动物模型中检测出 IL-1 mRNA 的高表达^[10]。也有研究认为 IL-1 是痛风性关节炎中的重要炎症介质, 在痛风性关节炎的发病过程起到重要作用^[11], 认为 IL-1

在炎症初起阶段介导了炎症的发生。IL-1 β 实验证实是一种很强的致炎介质^[12]。

细胞内信号途径是细胞的重要调节通路,各种刺激均能通过不同信号转导通路调节细胞的生物学行为,如 PI3K(3-磷酸肌醇激酶)/AKT 信号通路作为细胞内主要信号转导通路之一,在细胞的生长、增殖、生存、凋亡、黏附和迁移中起着重要的作用^[13-14]。PI3K/AKT 信号通路广泛存在于滑膜组织,与滑膜细胞凋亡、分化、黏附、血管形成及基质降解等有关;其过量产生可抑制细胞凋亡,本实验研究过程中发现穿山龙总皂苷可以降低 p-PI3K, p-AKT 的水平,从而使滑膜细胞的增生得到抑制。

当 GA 发生时刺激 IL-1 β 的合成与释放,IL-1 β 最终可使 AKT 活化发挥作用。PI3K/AKT 还参与滑膜炎中白细胞趋化、吞噬过程,以及炎性因子分泌及 NF-kb 的活化,在促进滑膜新生血管形成及基质降解中起重要作用。GA 发生后,机体产生大量炎性因子,当炎性因子与细胞表面结合后就可以激活不同的细胞信号通路,将信息传递到胞核,从而可以调控各种生物学功能发生。本研究中大鼠在造模后滑膜细胞中的 p-AKT, p-PI3K 表达明显增高,结合 Western blot 结果分析,在 rIL-1 β 刺激下 PI3K/AKT 通路被异常活化,细胞凋亡受阻,滑膜细胞增生。在穿山龙总皂苷干预下,PI3K, AKT 表达基本无明显变化,而其磷酸化形式 p-AKT, p-PI3K 的表达量降低。因此,我们认为穿山龙总皂苷能够调节 PI3K/AKT 通路,可使炎症细胞的生物学功能得到一定的好转。

[参考文献]

[1] 姚丽,刘树民. 中药穿山龙新的药理作用及其有效部位的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 8: 1979.
[2] 姚丽,刘树民. 穿山龙治疗急性痛风性关节炎有效部位的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 8: 1724.
[3] 刘颖,刘树民,于栋华,等. 大孔树脂纯化穿山龙总皂苷的工艺优化[J]. 医药导报,2011,5:635.

[4] 刘颖,刘树民,刘磊,等. 正交设计法优选穿山龙总皂苷的提取工艺[J]. 医学信息,2011,5:1247.
[5] 常燕,魏伟,张磊,等. 白芍总皂苷对 IL-1 α 诱导胶原性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2007, 2:185.
[6] 张晓明,陈飞虎,黄学应,等. 佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞的体外培养与鉴定[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(6): 770.
[7] 蒋建平,杨铁城,侯凡凡,等. 人类关节滑膜 A 型和 B 型细胞的分离和体外培养[J]. 第一军医大学学报,2001, 21(1):52.
[8] 于海荣,王济兴,陈建双. 穿山龙总皂苷含药血清对小鼠脾淋巴细胞增殖及 IL-6 产生影响的实验研究[J]. 江苏中医药,2007, 39(1): 57.
[9] 谢守军,宋鸿儒,彭兴荣. 穿山龙总皂苷对佐剂性关节炎大鼠病理改变的影响[J]. 四川中医, 2007, 25(8): 10.
[10] Matsukawa A, Yoshimura T, Maeda T, et al. Neutrophil accumulation and activation by homologons IL-8 in rab2 bit: IL-8 induced destruction of cartilage and produced of IL-1 and IL-1 Ra *in vivo* [J]. J Immunol, 1995, 154: 5418.
[11] Di Giovine F S, Malawista S E, Nuki G, et al. Interleukin-(IL-1) as mediator of crystal arthritis: Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL-1 [J]. J immunol, 1987, 138:3213.
[12] 王秀华,张治宇,侯斌,等. 清热祛湿法对兔膝关节急性痛风性关节炎细胞因子 IL-1 β 和 NO 的影响[J]. 中医正骨,2001,13(4):3.
[13] Haagenson K K, Wu G S. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment [J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(1):143.
[14] Morales-Ducret J, Wayner E, Wlives M J, et al. Alpha 4/beta1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes [J]. J Immunol, 1992, 149(4):1424.

[责任编辑 聂淑琴]