

·基础研究·

低强度脉冲超声通过 p38/JNK-白细胞介素-6 抑制类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞增殖的研究*

卞铨意¹ 朱莹¹ 白定群^{1,2}

摘要

目的:探讨低强度脉冲超声(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)对类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis, RA-FLS)异常细胞表型的抑制作用及可能机制。

方法:酶消化法分离滑膜细胞,显微镜下观察细胞形态,同时用免疫荧光检测 Vimentin 蛋白表达来鉴定 RA-FLS。将细胞进行体外培养并分为4组:对照组、LIPUS组、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)组和 TNF- α +LIPUS组或3组:对照组、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)组和 IL-6+LIPUS组。CCK8 和 EDU 实验分别检测 LIPUS 对 RA-FLS 细胞活性和增殖的作用,划痕实验和 Transwell 迁移实验观察 LIPUS 对 RA-FLS 迁移能力的影响,RT-qPCR 检测 RA-FLS 中重要的细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的基因表达,ELISA 进一步检测 LIPUS 对 RA-FLS 中关键效应分子 IL-6 蛋白水平的作用,Western Blot 检测 LIPUS 对 RA-FLS 中丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的影响。

结果:分离得到较纯净的 RA-FLS。在体外培养的 RA-FLS 中,首先,LIPUS 可以抑制 TNF- α 诱导的细胞活性($P<0.001$)和增殖($P=0.007$),但它对其迁移及迁移相关 MMPs(MMP2 和 MMP9)转录水平的作用在组间无显著性差异($P>0.05$)。在 TNF- α 诱导的炎性环境下,LIPUS 能够抑制 IL-6 和白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)在 mRNA 水平上的高表达($P<0.001$),但其对白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、MMP1 和 MMP13 的抑制作用在组间无显著性差异($P>0.05$)。与未处理组相比,LIPUS 抑制 TNF- α 诱导的 RA-FLS 中 IL-6 的分泌($P<0.001$),同时也抑制 IL-6 诱导的 RA-FLS 增殖($P=0.003$)。LIPUS 能够抑制 MAPK 信号通路中 p38 MAPK($P=0.033$)的磷酸化和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)的磷酸化($P=0.019$),但其对细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2)蛋白的磷酸化则无显著作用($P>0.05$)。

结论:LIPUS 能够减少炎性状态下 RA-FLS 的异常增殖而不作用于其迁移,该作用可能与 p38/JNK-IL-6 信号通路的抑制有关。

关键词 低强度脉冲超声;类风湿性关节炎;滑膜成纤维细胞;白细胞介素6;增殖

中图分类号:R454.3;R593.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2024)-01-0004-11

Low intensity pulsed ultrasound suppressed the proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through p38/JNK-interleukin-6 trans-signaling pathway/BIAN Quanyi, ZHU Ying, BAI Dingqun// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2024, 39(1): 4-14

Abstract

Objective: To explore the effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on inhibiting the abnormal cell phenotype of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis(RA-FLS) and possible mechanism.

Method: Synoviocytes were isolated by using enzyme digestion, and the morphology of cells was observed under microscope. At the same time, the expression of Vimentin protein was detected by immunofluorescence

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2024.01.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(81871853, 82003306);重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxmX0397, cstc2020jcyj-msxmX0484);重庆医科大学附属第一医院培养基金项目(PYJJ2019-214)

1 重庆医科大学附属第一医院康复医学科,重庆市,400016; 2 通讯作者
第一作者简介:卞铨意,女,硕士研究生;收稿日期:2023-05-08

method to identify RA-FLS. Cells cultured in vitro were divided into four groups: control group, LIPUS group, tumor necrosis factor (TNF- α) group and TNF- α +LIPUS group or three groups: control group, interleukin-6 (IL-6) group and IL-6+LIPUS group. The effects of LIPUS on RA-FLS cell viability and proliferation were detected by CCK8 and EDU assay respectively, and the effects of LIPUS on RA-FLS migration were observed by scratch test and Transwell migration assay. RT-qPCR was used to detect the gene expression of important cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases (MMPs) in RA-FLS. ELISA was used to further detect the effect of LIPUS on the expression of IL-6, a key effector of RA-FLS, and the effects of LIPUS on mitogen-activated protein kinase(MAPK)signaling pathway in RA-FLS were detected by Western Blot.

Result: Purified RA-FLS were obtained. Firstly, LIPUS could suppress the cell activity ($P<0.001$) and proliferation ($P=0.007$) induced by TNF- α in RA-FLS cultured in vitro. However, the migration and the transcription levels of MMPs related to migration (MMP2 and MMP9)were not significantly different between groups ($P>0.05$). LIPUS could inhibit the high expression of IL-6 and interleukin-8 (IL-8) at the mRNA level in the inflammatory environment induced by TNF- α ($P<0.001$), but there was no significant difference in the suppression of interleukin-1 β (IL-1 β), MMP1 and MMP13 ($P>0.05$). In addition, compared with untreated group, LIPUS could inhibit the secretion of IL-6 in RA-FLS induced by TNF- α ($P<0.001$), and also inhibited the proliferation of RA-FLS induced by IL-6 ($P=0.003$). Finally, LIPUS could inhibit the phosphorylation of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in MAPK signaling pathway ($P=0.033$), but the effect on the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinas 1/2 (ERK1/2) was not significantly ($P>0.05$).

Conclusion: LIPUS could reduce the abnormal proliferation of RA-FLS in inflammatory state without affecting its migration, which might be related to the inhibition of p38/JNK-IL-6 signaling pathway.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing,400016

Key word low intensity pulsed ultrasound; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; interleukin-6; proliferation

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性关节炎^[1],可导致永久性关节损伤和残疾^[2]。根据2017年全球疾病负担报告,在1990年至2017年间,全球RA年龄标准化患病率增加了7.4%,发病率增加了8.2%^[3],并造成了较大的经济负担^[4]。目前,RA的治疗以改善病情的抗风湿药物(disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs)和生物制剂为主,但存在副作用大及价格昂贵等问题^[5-6]。与此同时,物理因子因其安全、经济等优点也被用于缓解RA症状和改善关节功能^[7-8]。其中,低强度脉冲超声(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)是一种非侵入性的物理因子,通过其空化效应、机械效应和热效应发挥治疗作用,可用于新鲜骨折的保守治疗和骨折不愈合^[9-10],也被证明可抑制骨性关节炎(osteoarthritis, OA)进展^[11-14],但其在RA中的应用尚未得到充分研究。

RA引起的关节病变主要包括滑膜炎、软骨破坏和骨侵蚀^[2]。病变滑膜中滑膜成纤维细胞(fibro-

blast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis, RA-FLS)的过度增殖和异常活化在其病理过程中发挥着重要作用^[15],它分泌大量的炎性因子、趋化因子和促血管生成因子维持滑膜炎性环境,分泌基质金属蛋白酶破坏关节软骨等富含胶原的结构和非骨性支持结构,还能促进破骨细胞生成和抑制骨修复而导致骨侵蚀^[15-16],因此,靶向RA-FLS在RA的治疗中具有重要意义。

RA-FLS的信号传导涉及多条分子通路,其中,MAPK信号通路在其增殖、迁移和炎性活化等过程中发挥着关键作用^[17]。LIPUS通过力学触发细胞内的信号传导和随后的基因转录,进而影响细胞功能,且MAPK信号通路的抑制在LIPUS减轻OA炎症反应及预防炎症诱导的肌肉萎缩中的作用已得到验证^[18]。因此,我们推测LIPUS也可能通过MAPK信号通路来抑制RA-FLS异常的生物学功能。本研究将在细胞层面进一步探究LIPUS对RA-FLS增殖和迁移的影响及其相关机制,为LIPUS应用于RA治

疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK) 1/2 抗体、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphorylated extracellular regulated protein kinases, p-ERK) 1/2 抗体、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 抗体、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38 MAPK) 抗体、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 抗体、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 抗体(Cell Signaling Technology); CCK8 试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒、结晶紫染色液、RIPA 细胞裂解液(碧云天生物); 蛋白酶抑制剂(Roche); β -actin 抗体(Proteintech); Vimentin 抗体(Abcam); 人肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)重组蛋白(Sino Biological); 人白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)重组蛋白(Pepro Tech); RNA 提取试剂盒(磁珠法)(美吉逾华); 反转录试剂盒、RT-qPCR 试剂盒(TAKARA); 人 IL-6 ELISA 试剂盒(Solarbio); EDU 细胞增殖检测试剂盒(Invitrogen); I 型胶原酶(Gibico)。

低强度脉冲超声波治疗仪(Smith & Nephew, Exogen 4000); 倒置显微镜、荧光显微镜(Olympus); 酶标仪(Thermo Fisher Scientific); PCR 仪、Western Blot 蛋白转印系统、化学发光成像系统(Bio-Rad)。

1.2 细胞提取与培养

收集重庆医科大学附属第一医院骨科 RA 患者膝关节置换术中切除的滑膜组织,用于 RA-FLS 的提取与培养。用含 2%青/链霉素的杜氏磷酸缓冲盐溶液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)将滑膜组织清洗若干遍后将其转移至含 1mg/ml I 型胶原酶的 DMEM 培养基中,用眼科剪尽量剪碎,37°C 消化 4h,过滤、离心、重悬、接种后即可得到滑膜细胞。细胞在含 10%胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基,5% CO₂

的 37°C 孵箱中培养,第 3 至 6 代(passage, P)细胞用于后续实验。本研究经重庆医科大学附属第一医院医学伦理委员会批准(批准号 2021-456),并获得了所有研究参与者的知情同意。

1.3 实验分组及 LIPUS 处理

将细胞分为 4 组(对照组, LIPUS 组, TNF- α 组, TNF- α +LIPUS 组)或 3 组(对照组, IL-6 组, IL-6+LIPUS 组)。把细胞铺于 35mm 培养皿或 12 孔板中,次日更换含有(或不含有)TNF- α (10ng/ml)或 IL-6 (100ng/ml)的新鲜培养基。6h(除了增殖实验处理 24h 外,其余实验都处理 6h)后,将 LIPUS 的探头固定,并在其表面涂抹适量耦合剂,将孔板或培养皿置于探头上(注意探头不要空载,且孔板与耦合剂之间不要有气泡)。治疗参数设置为:强度 30mW/cm², 频率 1.5MHz, 20%占空比,持续时间 20min。根据不同的实验目的,继续培养相应时间后收集细胞进行后续实验。

1.4 免疫荧光实验

细胞接种于铺有无菌爬片的 12 孔板中,4%的多聚甲醛固定 20min, 0.1% Triton-X-100 通透 20min, 封闭液 37°C 封闭 1h, 抗 Vimentin 抗体(1:250)在 4°C 孵育 12h, Alexa Fluor[®]488 荧光二抗(1:1000)在 37°C 孵育 1h, DAPI(1:1000)孵育 15min, 实验过程中用 PBS 洗去多余试剂, 荧光显微镜下观察 RA-FLS 中 Vimentin 的表达情况。

1.5 CCK8 细胞增殖实验

将处于对数生长期的细胞接种于 96 孔板,每组设置 5 个复孔。根据 CCK8 试剂盒说明书操作,加入反应试剂后 37°C 孵育 1h, 5min 内用酶标仪于 A450nm 处检测吸光度值,使用 Graphpad Prism 9.0.0 进行统计分析。

1.6 EDU 细胞增殖实验

将细胞接种于铺有无菌爬片的 12 孔板,血清饥饿 6h(1%胎牛血清)后进行常规处理。弃完全培养基,使用 20 μ M 的 EDU 培养基混合液于培养箱中孵育 2h, 4%的多聚甲醛固定 15min, 0.5% Triton-X-100 通透 20min。依照说明书配置 EDU 检测试剂混合液,避光孵育 30min 后, DAPI (1:1000) 37°C 避光孵育 10min。实验过程中用 3%的牛血清白蛋白/PBS 洗去多余试剂。最后,使用荧光显微镜观察

RA-FLS中EDU阳性细胞的表达情况,使用软件Image J 1.51计数,并用Graphpad Prism 9.0.0进行统计分析。

1.7 划痕实验

将细胞接种于35mm培养皿,如前所述对细胞进行处理后,用200μl枪头比着直尺在培养皿中间划一条直线。PBS洗去脱落的细胞,换上含1%胎牛血清的DMEM高糖培养基以排除细胞增殖的影响。使用倒置显微镜于不同的时间点(0,12,24h)对划痕进行拍照,并用Image J 1.51统计划痕面积。

1.8 细胞迁移实验

用无血清培养基将细胞浓度调整至 2×10^5 个/ml,按200个/孔接种于12孔板,直径6.5mm,膜孔径为8.0μm的Transwell小室中。在孔板中加入500μl含10%胎牛血清的完全培养基,与小室一起在37°C培养24h后,4%的多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色液染色。用棉签除去小室内表面的未迁移细胞,用刀片小心将膜取下,中性树脂制片,显微镜下取6个随机视野拍照并计数。

1.9 RT-qPCR

根据说明书提取RA-FLS中的总RNA,使用日本TAKARA公司的反转录试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒进行后续实验。每个样本设置3个复孔,以人GAPDH作为内参,计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。引物序列见表1。

表1 引物序列

引物	序列
GAPDH	5'-GTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3' 5'-ACCACCTTCTTGATGTCATCAT-3'
IL-1β	5'-GCCAGTGAAATGATGGCTTATT-3' 5'-AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG-3'
IL-6	5'-CACTGGTCTTTTGGAGTTGAG-3' 5'-GGACTTTTGTACTCATCTGCAC-3'
IL-8	5'-CATACTCCAAACCTTTCCACCCC-3' 5'-TCAGCCCTCTCAAAAACCTTCCA-3'
MMP1	5'-AAAATTACACGCCAGATTTGCC-3' 5'-GGTGTGACATTACTCCAGAGTTG-3'
MMP2	5'-GATACCCCTTTGACGGTAAGGA-3' 5'-CCTTCTCCAAGGTCCATAGC-3'
MMP9	5'-AGACCTGGGCAGATTCCAAAC-3' 5'-CGGCAAGTCTCCGAGTAGT-3'
MMP13	5'-ACTGAGAGGCTCCGAGAAATG-3' 5'-GAACCCGCATCTTGGCTT-3'

注:甘油醛-3-磷酸脱氢酶:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH;白细胞介素:interleukin-, IL;基质金属蛋白酶:matrix metalloproteinases, MMPs。

1.10 ELISA

收集各组细胞培养上清,低温离心20min(2000—3000r/min)后备用。根据试剂盒说明书操作,用酶标仪于A450nm处检测吸光度值(5min内)。根据标准曲线和样品吸光度值计算各组浓度,使用Graphpad Prism 9.0.0进行统计分析。标准曲线由ELISA Calc 2.0软件拟合。

1.11 Western Blot

使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解细胞,用BCA蛋白检测试剂盒来测蛋白浓度,并将各样本浓度调齐。用12%的SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,转至PVDF膜,8%脱脂牛奶37°C封闭1h。随后ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK、JNK、p-JNK(1:1000)和β-actin(1:50000)等一抗在4°C孵育过夜,二抗(1:5000)在37°C孵育1h,期间用TBST清洗。条带用ECL化学发光法曝光成像,Image J 1.51软件分析灰度值,以β-actin作为内参。计算磷酸化蛋白与总蛋白的灰度比值作为相对表达量。

1.12 统计学分析

应用Graphpad Prism 9.0.0软件进行统计分析。计量资料服从正态分布且方差齐,结果以均值±标准差表示。两组间差异使用独立样本t检验,多组间比较则通过单因素方差分析实现,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RA-FLS的提取与鉴定

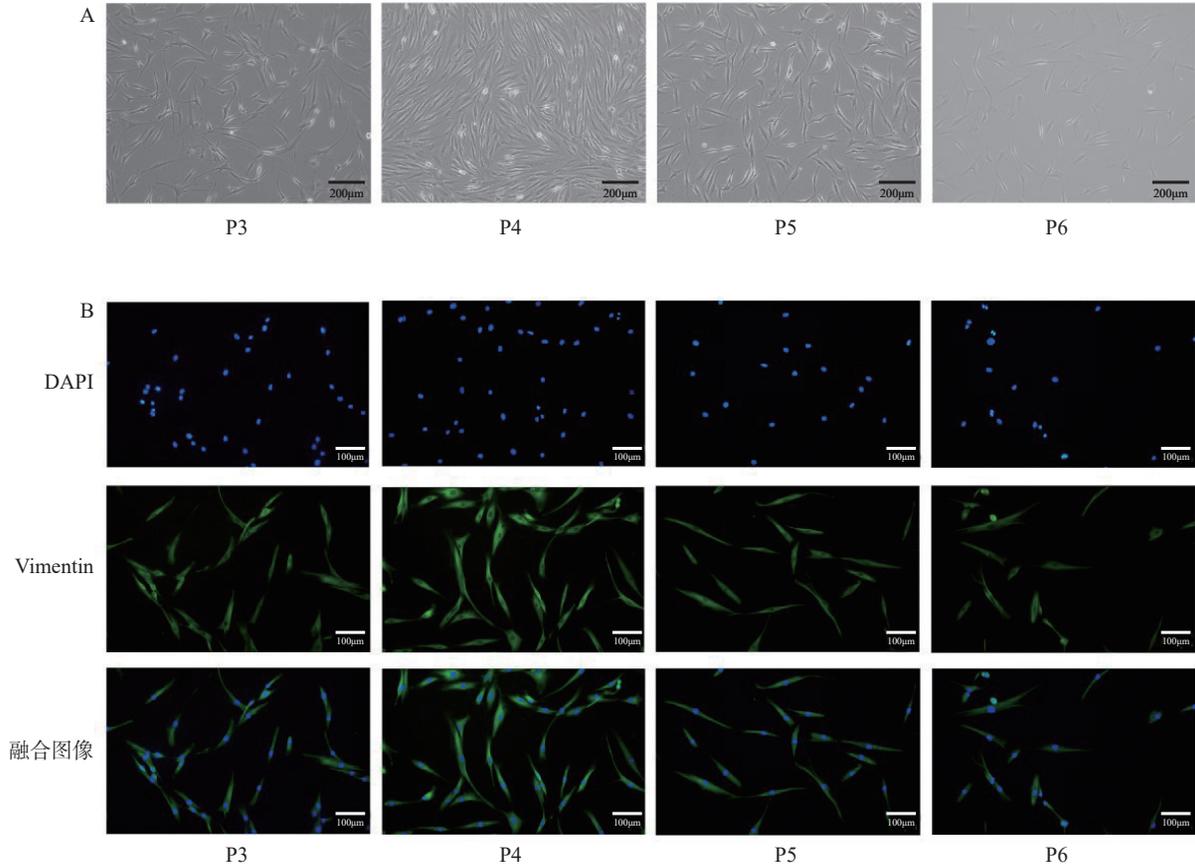
倒置显微镜下可见P3—P6代细胞呈典型长梭形,符合成纤维细胞的形态学特征(图1A);Vimentin是FLS的特异性标志物^[19],免疫荧光结果显示提取的细胞培养至P3代起为较明显的Vimentin阳性(图1B),使用P3—P6代RA-FLS用于后续实验。

2.2 LIPUS抑制炎症状态下的RA-FLS增殖

异常增殖是RA-FLS活化的重要特征^[20]。CCK8和EDU的结果表明,在TNF-α(10ng/ml)的作用下,RA-FLS的活性($P<0.001$)和增殖水平明显升高($P=0.025$),而LIPUS能够抑制TNF-α诱导的RA-FLS细胞活性($P<0.001$)和增殖($P=0.007$)(表2、图2、表3)。

2.3 LIPUS对RA-FLS迁移能力的影响

图1 分离培养RA-FLS



注:A:显微镜下P3-P6代RA-FLS的形态;B:RA-FLS中Vimentin的表达情况(细胞的免疫荧光,×200)。

表2 TNF-α处理后各组CCK8结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活率
对照组	1.000±0.000
LIPUS组	0.927±0.064
TNF-α组	1.351±0.041 ^①
TNF-α+LIPUS组	1.013±0.074 ^②
F值	38.430
P值	<0.001

注:与对照组相比,①P<0.05;与TNF-α组相比,②P<0.05。统计学方法为单因素方差分析。

表3 各组EDU阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞增殖率
对照组	0.038±0.007
TNF-α组	0.067±0.014 ^①
TNF-α+LIPUS组	0.028±0.006 ^②
F值	12.800
P值	0.007

注:与对照组相比,①P<0.05;与TNF-α组相比,②P<0.05。统计学方法为单因素方差分析。

过度迁移和侵袭是RA-FLS的另一重要特征^[21]。划痕实验提示,在TNF-α预处理或不处理的情况下,无论是在LIPUS后12h还是24h,RA-FLS的迁移都不能得到显著抑制(P>0.05)(图3A、表4)。此外,Transwell结果也提示,LIPUS不能显著抑制RA-FLS的迁移(P>0.05)(图3B、表5)。

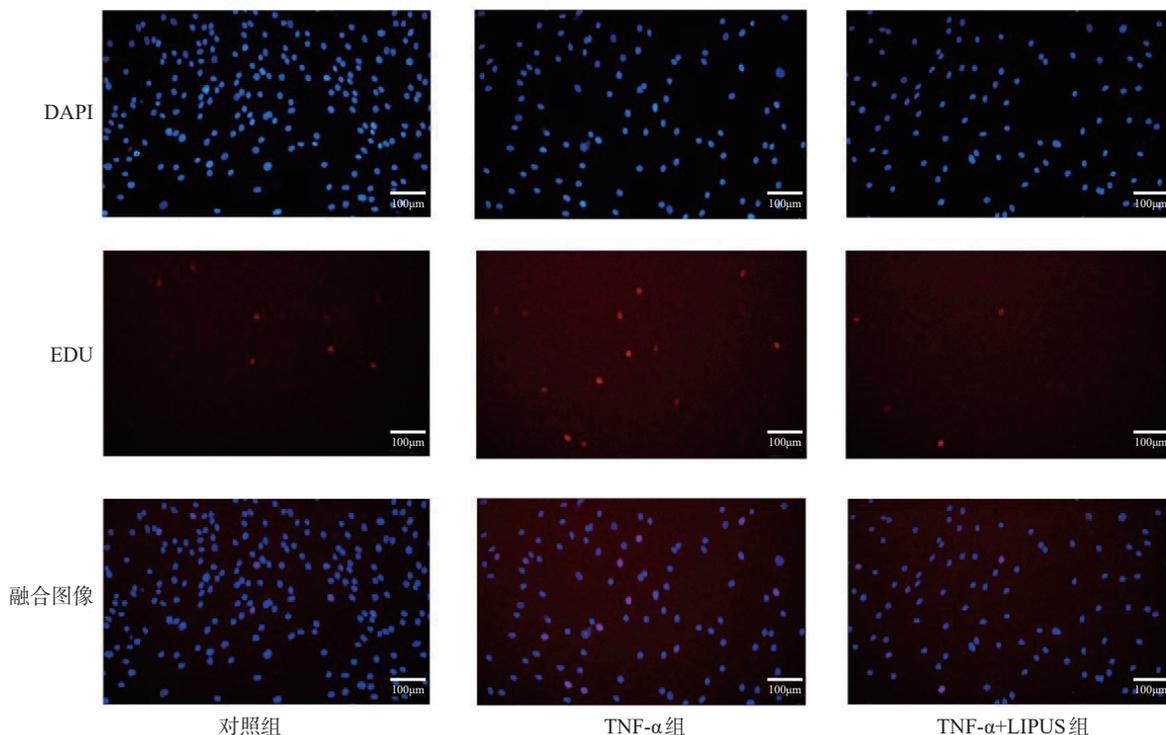
MMP2和MMP9在RA-FLS的迁移和侵袭中发挥关键作用^[22]。为了进一步探究LIPUS不能显著抑制RA-FLS迁移的原因,用RT-qPCR检测上述

表4 划痕实验各组细胞迁移率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	12h	24h
对照组	0.153±0.106	0.311±0.080
LIPUS组	0.127±0.029	0.238±0.024
TNF-α组	0.218±0.024	0.384±0.020
TNF-α+LIPUS组	0.150±0.032	0.292±0.045
F值	0.614	2.289
P值	0.635	0.196

注:统计学方法为单因素方差分析。

图2 LIPUS抑制炎症状态下的RA-FLS增殖 (EDU增殖实验,×200)



MMPs的mRNA表达后发现,与对照组相比,TNF- α 上调了MMP9的mRNA水平($P<0.001$),但LIPUS对其的抑制作用并不显著($P>0.05$)。对于MMP2,TNF- α 和LIPUS都不能显著改变其mRNA水平($P>0.05$)(表6)。

2.4 LIPUS抑制增殖相关细胞因子的表达

TNF- α 能够激活RA-FLS并引起持续的滑膜炎^[23]。使用TNF- α (10ng/ml)维持其炎症活化后用LIPUS处理,RT-qPCR结果提示,与对照组相比,TNF- α 上调了IL-1 β ($P<0.001$)、IL-6($P<0.001$)、IL-8($P=0.001$)、MMP1($P<0.001$)和MMP13($P=0.036$)的mRNA水平,而LIPUS抑制TNF- α 诱导的IL-6 mRNA($P=0.022$)和IL-8 mRNA的表达($P=0.020$),但其对IL-1 β 、MMP1和MMP13无显著抑制作用($P>0.05$)(表7)。

IL-6是RA-FLS重要的效应分子^[24],也是其增殖相关的关键因子^[25]。ELISA结果提示,除了在转录层面,LIPUS也在翻译层面抑制TNF- α 诱导的IL-6分泌($P<0.001$)(表8)。

为了进一步验证IL-6在LIPUS抑制RA-FLS增

殖中的作用,使用IL-6(100ng/ml)诱导RA-FLS增殖并用LIPUS处理,结果提示,与对照组相比,IL-6能够促进其增殖,而LIPUS能够抑制这一作用($P=0.003$)(表9)。综上,LIPUS可能通过调控IL-6来抑制RA-FLS增殖。

2.5 LIPUS抑制MAPK信号通路

以往的研究表明MAPK信号通路参与RA-FLS

表5 各组每个视野下的平均迁移细胞数 ($\bar{x}\pm s$,个)

组别	迁移细胞
对照组	58.000±9.000
LIPUS组	56.000±3.000
<i>t</i> 值	0.356
<i>P</i> 值	0.740

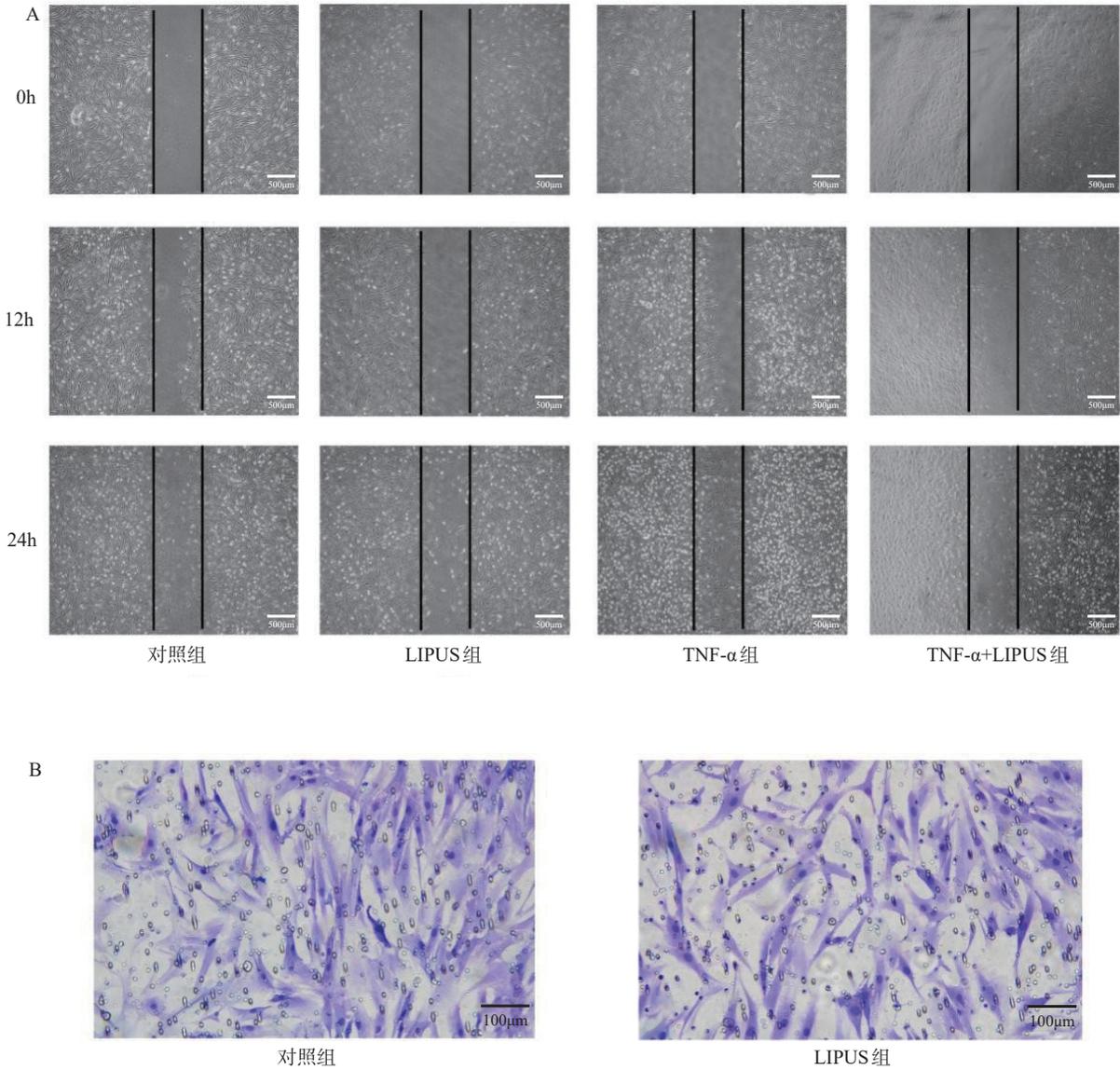
注:统计学方法为独立样本*t*检验。

表6 各组MMP2、MMP9的mRNA水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $2^{-\Delta\Delta CT}$)

组别	MMP2	MMP9
对照组	1.000±0.156	1.000±0.147
LIPUS组	0.877±0.073	1.411±0.477
TNF- α 组	0.973±0.167	8.023±1.192 ^①
TNF- α +LIPUS组	1.005±0.257	7.959±1.752
<i>F</i> 值	0.342	38.930
<i>P</i> 值	0.796	<0.001

注:与对照组相比,① $P<0.05$ 。统计学方法为单因素方差分析。

图3 LIPUS对RA-FLS迁移的作用



注:A:划痕实验结果($\times 40$);B:Transwell实验结果($\times 200$)。

表7 各组促炎因子和MMPs的mRNA水平比较

($\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta CT}$)

组别	IL-1 β	IL-6	IL-8	MMP1	MMP13
对照组	1.000 \pm 0.283	1.000 \pm 0.145	1.000 \pm 0.397	1.000 \pm 0.353	1.000 \pm 0.244
LIPUS组	1.278 \pm 0.503	1.312 \pm 0.351	0.792 \pm 0.300	0.177 \pm 0.080	1.138 \pm 0.277
TNF- α 组	508.813 \pm 87.209 ^①	19.694 \pm 4.167 ^①	288.012 \pm 104.638 ^①	10.120 \pm 2.220 ^①	3.907 \pm 1.342 ^①
TNF- α +LIPUS组	373.714 \pm 131.630	10.891 \pm 3.819 ^②	112.528 \pm 36.227 ^②	7.632 \pm 2.598	4.023 \pm 1.536
F值	32.540	29.750	17.990	24.430	7.824
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.009

注:与对照组相比,① $P < 0.05$;与TNF- α 组相比,② $P < 0.05$ 。统计方法为单因素方差分析。

中增殖和IL-6的表达调控^[26-28],这提示LIPUS的生物学功能可能也涉及该通路。Western Blot结果表明,与对照组相比,LIPUS抑制p-p38 MAPK($P=$

0.033)及p-JNK($P=0.019$)的表达,而对p-ERK1/2则无显著作用($P > 0.05$)(图4、表10)。这证实了我们的假设。

图4 LIPUS对MAPK信号通路的影响

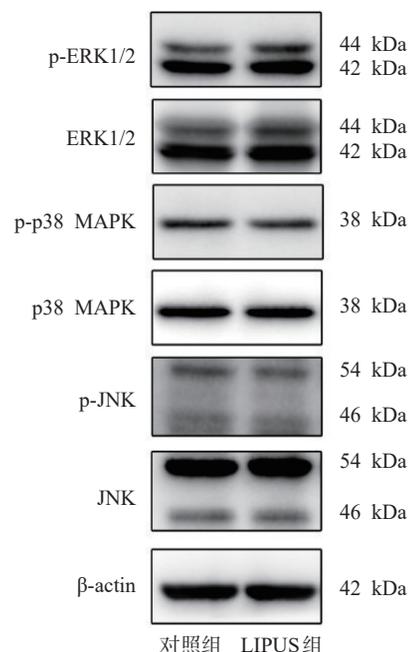


表8 各组中IL-6分泌水平的比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/ml)

组别	IL-6
对照组	106.800±3.173
LIPUS组	83.660±3.736
TNF-α组	8285.000±620.000 ^①
TNF-α+LIPUS组	6103.000±335.600 ^②
F值	424.700
P值	<0.001

注:与对照组相比,①P<0.05;与TNF-α组相比,②P<0.05。统计方法为单因素方差分析。

表9 IL-6处理后各组CCK8结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞活率
对照组	1.000±0.000
IL-6组	1.274±0.123 ^①
IL-6+LIPUS组	1.010±0.101 ^②
F值	11.390
P值	0.003

注:与对照组相比,①P<0.05;与IL-6组相比,②P<0.05。统计方法为单因素方差分析。

表10 各组MAPK信号通路相关蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	p-ERK1/2/ ERK1/2	p-p38MAPK/ p38 MAPK	p-JNK/ JNK
对照组	0.830±0.169	0.758±0.079	1.036±0.071
LIPUS组	0.842±0.190	0.478±0.129 ^①	0.668±0.151 ^①
t值	0.081	3.200	3.826
P值	0.940	0.033	0.019

注:与对照组相比,①P<0.05。统计方法为独立样本t检验。

3 讨论

本研究发现LIPUS显著抑制RA-FLS增殖而不影响其迁移,为LIPUS在治疗RA滑膜炎中的应用提供了理论依据。进一步探究发现,LIPUS能够显著抑制RA-FLS增殖相关细胞因子IL-6的表达,此外,LIPUS也抑制了由IL-6诱导的RA-FLS增殖。最后,我们探究了其中的分子机制,结果提示LIPUS可能部分通过p38/JNK信号通路抑制IL-6功能及其相关的RA-FLS增殖。

LIPUS作为一种非侵入性的物理因子治疗方式,被广泛用于骨性关节炎领域的研究,但在RA领域的研究仍较为缺乏。在本研究中,我们根据不同的实验目的使用细胞因子TNF-α或IL-6将细胞处理一段时间,随后进行LIPUS并获取相应结果。

RA滑膜中TNF-α和IL-1β的主要来源是巨噬细胞,TNF-α和IL-1β生成后可诱导RA-FLS活化并产生IL-6、IL-8和MMPs,从而行使RA-FLS的效应功能^[23]。因此,在本研究中,我们选用TNF-α来维持其炎性活化,探究LIPUS对RA-FLS中重要分子的作用,进而阐明LIPUS作用于炎性环境下RA-FLS增殖的可能机制。而IL-6的主要来源则是滑膜衬里层中的RA-FLS^[29],IL-6在RA中除了引起系统性反应外也参与关节局部症状的维持,其中就包括通过自分泌或旁分泌的方式促进RA-FLS增殖^[30]。因此,本研究在探究LIPUS抑制RA-FLS增殖的部分选用了IL-6来处理细胞。

本研究所用的LIPUS参数为:强度30mW/cm²,频率1.5MHz,20%占空比,持续时间20min,是临床上治疗骨折的参数^[31],也是研究LIPUS治疗骨关节病的常用参数。通过查阅文献,在LIPUS通过减少巨噬细胞中SQSTM1依赖的PKM2自噬降解来阻止成熟IL-1β生成进而抑制OA滑膜炎^[32],LIPUS通过上调人软骨细胞中SOX9的表达来促进胞外基质的合成,抑制细胞凋亡^[33]等研究中所用参数与本研究一致。此外,本课题组前期的工作通过此参数揭示了LIPUS通过OA-FLS或软骨细胞延缓OA进展的相关机制^[34-35],因此在本研究也继续沿用。但由于不同的细胞对LIPUS的反应性可能存在差异,本研究缺乏对最佳参数组合的探索,因此仍存在一定局限性。

正常情况下关节滑膜衬里层由2—3个细胞层组成,但在RA滑膜炎中可增加至10—20个细胞层,FLS的增殖、凋亡比例失衡是其主要原因^[16]。根据文献报道,对于不同的细胞,LIPUS对其增殖的作用不同。在一项研究中LIPUS处理提高了L929成纤维细胞的活性^[36];在另一项研究中,LIPUS则不能显著影响人牙龈成纤维细胞的增殖^[37]。而在本研究中,LIPUS抑制TNF- α 诱导的RA-FLS增殖。此外,RA-FLS可直接破坏邻近的和远处的关节,这与它异常活化的迁移和侵袭能力有关^[38—39]。然而,本实验结果显示LIPUS对RA-FLS迁移的抑制不具有显著性意义,进一步的实验表明LIPUS对MMP2和MMP9的影响也不显著,这提示LIPUS在RA治疗中的作用有限,可能与本研究使用的细胞来源为疾病晚期的患者有关,在未来的研究中细化患者的疾病分级可能会更好地回答这个问题。

在本研究中,LIPUS抑制TNF- α 诱导的IL-6表达,这与一项关于LIPUS干预牙周韧带成纤维细胞炎性反应的研究结果一致^[40]。RA患者的关节滑液和血清中有大量的IL-6表达^[41],它与RA的活动程度呈正相关^[42]。IL-6是一种分泌蛋白,它通过与膜表面受体或可溶性受体结合来发挥作用^[24],且靶向IL-6/IL-6受体(interleukin-6 receptor,IL-6R)已被用于RA的治疗^[30]。IL-6是RA-FLS的关键效应分子,它能够调节Th17细胞与Treg细胞之间的平衡,促进T细胞向Th17细胞分化,并诱导RA-FLS表达IL-6、IL-8、MMP1和MMP3^[43];能够上调RA-FLS中血小板反应蛋白解整合素金属肽酶4(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 4, ADAMTS4)和MMPs的表达^[44—46];能够刺激RA-FLS产生核因子- κ B受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand,RANKL)来促进破骨细胞形成,参与骨破坏^[47];此外,IL-6/可溶性IL-6受体(soluble interleukin-6 receptor,sIL-6R)复合物也促进RA-FLS中重要的促血管生成因子VEGF的产生,参与血管生成^[48]。同时,IL-6可通过促进富含半胱氨酸蛋白61的合成来促进RA-FLS的迁移和侵袭,通过自分泌的方式促进RA-FLS增殖活化^[25,30];IL-6-gp130系统可通过蛋白酪氨酸激酶-信号转导子和转录活化子(janus kinase- signal transducer

activator of transcription,JAK-STAT)信号通路上调B淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2,Bcl-2)基因的表达,进而抑制滑膜细胞的正常凋亡^[49],在滑膜异常增生中发挥关键作用。

除了RA-FLS的增殖、凋亡失调,滑膜衬里层中T细胞和B细胞的浸润,新生血管的形成也是滑膜增生的原因,且IL-6也参与了这些过程^[50]。在本研究中,LIPUS能够同时抑制IL-6和IL-8在mRNA水平上的表达,因为IL-8是重要的促血管生成因子^[51],这提示LIPUS可能也参与调控RA滑膜中FLS相关的血管生成。然而,想要更全面更深入地了解LIPUS与IL-6相关的滑膜增生之间的关联及机制,仍需要更多的研究。

RA-FLS的信号传导涉及MAPK、JAK-STAT、PI3K-AKT、SYK、Wnt、Notch和NF- κ B等分子通路^[52]。其中,MAPK是重要的生物反应性信号通路,它与细胞的增殖、迁移、侵袭和炎症因子的产生等相关^[53],是RA-FLS常见的药物干预靶点,比如二喹啉甲烷可部分通过MAPK信号通路抑制RA-FLS的增殖、迁移和炎症因子的表达^[27]。根据报道,LIPUS主要通过MAPK、PI3K-AKT和NF- κ B信号通路来发挥其抗炎作用,与化学药物相比,LIPUS不会造成肝肾负担^[18],如在非RA领域的研究中,LIPUS通过抑制软骨细胞中p38MAPK的磷酸化进而延缓相关疾病进展^[34]。在本研究中,LIPUS能够抑制RA-FLS中p38 MAPK和JNK的磷酸化,进而抑制IL-6的产生和RA-FLS增殖,有趣的是,在另一项研究中,单独的LIPUS能够激活HIG-82细胞中的整合素/FAK/MAPK信号通路^[54],这与本结果存在差异。该研究使用的HIG-82为兔膝关节滑膜细胞系,与RA疾病状态下的人滑膜成纤维细胞存在较大差异。加之该研究使用的LIPUS频率为3MHz,而我们使用的LIPUS频率为1.5MHz,这也可能是造成结果差异的原因。事实上,LIPUS对RA-FLS的作用可能是多条信号传导通路共同作用的结果,而p38/JNK只是其中的一条可能途径,还需要更多的研究来阐明LIPUS在RA-FLS中的作用方式。

综上所述,LIPUS作为一种安全有效的物理因子,它能够抑制RA-FLS中促炎因子,尤其是IL-6的表达,进而抑制RA-FLS的增殖而不影响其迁移。

进一步的探究发现,LIPUS可能部分通过抑制p38/JNK信号通路调控RA-FLS的上述功能。本研究在LIPUS抑制IL-6及其相关途径的分子机制、LIPUS的最佳参数选择、疾病的分期和缺乏动物实验验证等方面存在一定的局限性,但同时也为RA的非药物靶向治疗提供了新的探索思路。

参考文献

- [1] Sparks JA. Rheumatoid arthritis[J]. *Ann Intern Med*, 2019, 170(1): Itc1—itc16.
- [2] Smith MH, Berman JR. What is rheumatoid arthritis? [J]. *JAMA*, 2022, 327(12): 1194.
- [3] Safiri S, Kolahi AA, Hoy D, et al. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990—2017: a systematic analysis of the global burden of disease study 2017 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(11): 1463—1471.
- [4] Hu H, Luan L, Yang K, et al. Burden of rheumatoid arthritis from a societal perspective: A prevalence-based study on cost of this illness for patients in China [J]. *Int J Rheum Dis*, 2018, 21(8): 1572—1580.
- [5] 王静, 赵庆杰, 卓小斌, 等. 类风湿性关节炎的治疗药物研究进展 [J]. *药学实践杂志*, 2019, 37(6): 485—490.
- [6] Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 880.
- [7] Kükükdeveci AA. Nonpharmacological treatment in established rheumatoid arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2019, 33(5): 101482.
- [8] 沈抒, 孙启良. 类风湿性关节炎的康复 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(12): 1143—1146.
- [9] Jiang X, Savchenko O, Li Y, et al. A review of low-intensity pulsed ultrasound for therapeutic applications [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2019, 66(10): 2704—2718.
- [10] Harrison A, Lin S, Pounder N, et al. Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair [J]. *Ultrasonics*, 2016, 70: 45—52.
- [11] Xia P, Wang Q, Song J, et al. Low-intensity pulsed ultrasound enhances the efficacy of bone marrow-derived MSCs in osteoarthritis cartilage repair by regulating autophagy-mediated exosome release [J]. *Cartilage*, 2022, 13(2): 19476035221093060.
- [12] Sang F, Xu J, Chen Z, et al. Low-intensity pulsed ultrasound alleviates osteoarthritis condition through focal adhesion kinase-mediated chondrocyte proliferation and differentiation [J]. *Cartilage*, 2021, 13(2_suppl): 196s—203s.
- [13] Yi X, Wu L, Liu J, et al. Low-intensity pulsed ultrasound protects subchondral bone in rabbit temporomandibular joint osteoarthritis by suppressing TGF- β 1/Smad3 pathway [J]. *J Orthop Res*, 2020, 38(11): 2505—2512.
- [14] 张斌, 倪振洪, 杨鹏, 等. 低强度脉冲超声调控滑膜巨噬细胞极化抑制关节滑膜炎 [J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(8): 747—756.
- [15] Nygaard G, Firestein GS. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(6): 316—333.
- [16] Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233—255.
- [17] Ralph JA, Morand EF. MAPK phosphatases as novel targets for rheumatoid arthritis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(7): 795—808.
- [18] Li X, Zhong Y, Zhang L, et al. Recent advances in the molecular mechanisms of low-intensity pulsed ultrasound against inflammation [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2023, 101(4): 361—374.
- [19] Fang Z, Lv J, Wang J, et al. C-reactive protein promotes the activation of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 958.
- [20] Smith MD. The normal synovium [J]. *Open Rheumatol J*, 2011, 5(1): 100—106.
- [21] Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(1): 24—33.
- [22] Ma JD, Jing J, Wang JW, et al. A novel function of artesunate on inhibiting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 153.
- [23] Brennan FM, Chantry D, Jackson A, et al. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 1989, 2(8657): 244—247.
- [24] Narazaki M, Tanaka T, Kishimoto T, et al. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(6): 535—551.
- [25] Choi C, Jeong W, Ghang B, et al. Cyr61 synthesis is induced by interleukin-6 and promotes migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 275.
- [26] Chen X, Lin H, Chen J, et al. Paclitaxel inhibits synovio-cyte migration and inflammatory mediator production in rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 714566.
- [27] Du H, Zhang X, Zeng Y, et al. A novel phytochemical, DIM, inhibits proliferation, migration, invasion and TNF- α induced inflammatory cytokine production of synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients by targeting MAPK and AKT/mTOR signal pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1620.
- [28] Meng Y, Ji J, Xiao X, et al. Ononin induces cell apoptosis and reduces inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-

- like synoviocytes by alleviating MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. *Acta Biochim Pol*, 2021, 68(2): 239—245.
- [29] Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS, et al. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. IV. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-mediated induction of class II MHC antigen on human monocytes: a possible role in rheumatoid arthritis[J]. *J Exp Med*, 1989, 170(3): 865—875.
- [30] Ogata A, Kato Y, Higa S, et al. IL-6 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis: A comprehensive review[J]. *Mod Rheumatol*, 2019, 29(2): 258—267.
- [31] Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, et al. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83(2): 259—270.
- [32] Zhang B, Chen H, Ouyang J, et al. SQSTM1-dependent autophagic degradation of PKM2 inhibits the production of mature IL1 β /IL-1 β and contributes to LIPUS-mediated anti-inflammatory effect[J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1262—1278.
- [33] Ding W, Du D, Chen S, et al. LIPUS promotes synthesis and secretion of extracellular matrix and reduces cell apoptosis in human osteoarthritis through upregulation of SOX9 expression[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(4): 810—817.
- [34] Guan M, Zhu Y, Liao B, et al. Low-intensity pulsed ultrasound inhibits VEGFA expression in chondrocytes and protects against cartilage degeneration in experimental osteoarthritis[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(3): 434—443.
- [35] Liao B, Guan M, Tan Q, et al. Low-intensity pulsed ultrasound inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation and reduces synovial fibrosis by regulating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Orthop Translat*, 2021, 30: 41—50.
- [36] de Oliveira Perrucini PD, Poli-Frederico RC, de Almeida Pires-Oliveira DA, et al. Anti-inflammatory and healing effects of pulsed ultrasound therapy on fibroblasts[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2020, 99(1): 19—25.
- [37] Mostafa NZ, Uludağ H, Dederich DN, et al. Anabolic effects of low-intensity pulsed ultrasound on human gingival fibroblasts[J]. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(8): 743—748.
- [38] Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice[J]. *Am J Pathol*, 1996, 149(5): 1607—1615.
- [39] Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints[J]. *Nat Med*, 2009, 15(12): 1414—1420.
- [40] Kusuyama J, Nakamura T, Ohnishi T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes bone morphogenic protein 9-induced osteogenesis and suppresses inhibitory effects of inflammatory cytokines on cellular responses via Rho-associated kinase 1 in human periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14657—14669.
- [41] Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, et al. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides[J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(6): 784—788.
- [42] 冯玉才, 邹瑞, 李艳. IL-6、抗CCP抗体在类风湿性关节炎中的诊断价值[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2022, 19(2): 199—202.
- [43] Zhang T, Li H, Shi J, et al. p53 predominantly regulates IL-6 production and suppresses synovial inflammation in fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 271.
- [44] Mimata Y, Kamataki A, Oikawa S, et al. Interleukin-6 upregulates expression of ADAMTS-4 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis[J]. *Int J Rheum Dis*, 2012, 15(1): 36—44.
- [45] Hashizume M, Hayakawa N, Suzuki M, et al. IL-6/sIL-6R trans-signaling, but not TNF-alpha induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system[J]. *Rheumatol Int*, 2009, 29(12): 1449—1454.
- [46] Pandolfi F, Franza L, Carusi V, et al. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5238.
- [47] Chen YJ, Wu JY, Leung WC, et al. An herbal formula inhibits STAT3 signaling and attenuates bone erosion in collagen-induced arthritis rats[J]. *Phytomedicine*, 2020, 76: 153254.
- [48] Srivastava S, Samarpita S, Ganesan R, et al. CYT387 inhibits the hyperproliferative potential of fibroblast-like synoviocytes via modulation of IL-6/JAK1/STAT3 signaling in rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Invest*, 2022, 51(6): 1582—1597.
- [49] Miao P, Zhou XW, Wang P, et al. Regulatory effect of anti-gp130 functional mAb on IL-6 mediated RANKL and Wnt5a expression through JAK-STAT3 signaling pathway in FLS[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(29): 20366—20376.
- [50] Yoshitomi H. Regulation of immune responses and chronic inflammation by fibroblast-like synoviocytes[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1395.
- [51] Matsushima K, Yang D, Oppenheim JJ, et al. Interleukin-8: an evolving chemokine[J]. *Cytokine*, 2022, 153: 155828.
- [52] Ding Q, Hu W, Wang R, et al. Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 68.
- [53] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911—1912.
- [54] Sato M, Nagata K, Kuroda S, et al. Low-intensity pulsed ultrasound activates integrin-mediated mechanotransduction pathway in synovial cells[J]. *Ann Biomed Eng*, 2014, 42(10): 2156—2163.