

蜂毒注射液对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 Bax、Bcl-2 的影响

罗晓光, 张洁瑶, 黎德育

华中科技大学协和深圳医院, 广东 深圳 518052

摘要: 目的 观察蜂毒注射液对人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (类风湿关节炎-FLS) B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) mRNA 和蛋白的影响, 探讨蜂毒注射液治疗类风湿关节炎的作用机制。方法 滑膜组织取自行关节置换或关节镜手术的 4 名活动期类风湿关节炎患者, 分离出 FLS 并原代培养, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 观察 Bax、Bcl-2 mRNA 表达的变化, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测 Bax、Bcl-2 蛋白水平的变化。结果 与对照组比较, 蜂毒注射液 4、8、16 mg/L 组能促进 Bax mRNA 表达 ($P < 0.05$), 蜂毒注射液 8、16 mg/L 组抑制 Bcl-2 mRNA 表达 ($P < 0.05$, 0.01); 蜂毒注射液 4、8、16 mg/L 组提高 Bax 蛋白水平, 降低 Bcl-2 蛋白水平 ($P < 0.05$, 0.01), 且有一定的剂量相关性。结论 蜂毒注射液可能通过抑制 Bcl-2 蛋白、促进 Bax 蛋白的表达, 达到促进类风湿关节炎-FLS 凋亡的作用。

关键词: 蜂毒注射液; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; B 淋巴细胞瘤-2 基因; Bcl-2 相关 X 蛋白

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)02-0202-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.02.002

Effect of Apistoxin Injection on Bax and Bcl-2 expression in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis

LUO Xiao-guang, ZHANG Jie-yao, LI De-yu

Shenzhen Union Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Shenzhen 518052, China

Abstract: Objective To observe the effect of Apistoxin Injection on B-lymphoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2-related X protein (Bax) mRNA and protein in human rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes (RA-FLS), and to explore the mechanism of Apistoxin Injection in treatment of rheumatoid arthritis. **Methods** FLS was isolated from synovium of 4 active RA patients who underwent arthroscopic surgery or joint replacement. The expression of Bax and Bcl-2 mRNA was observed by Real time-PCR (RT-PCR) method, and the contents of Bax and Bcl-2 protein were detected by ELISA method. **Results** Compared with the control group, Apistoxin Injection 4, 8, and 16 mg/L groups could promote the expression of Bax mRNA ($P < 0.05$), and Apistoxin Injection 8 and 16 mg/L groups could inhibit the expression of Bcl-2 mRNA ($P < 0.05$, 0.01). Apistoxin Injection 4, 8, and 16 mg/L groups could increase the content of Bax protein and decrease the content of Bcl-2 protein ($P < 0.05$, 0.01), which was dose-dependent. **Conclusion** Apistoxin injection may promote the apoptosis of RA-FLS by inhibiting the expression of Bcl-2 protein and promoting the expression of Bax protein.

Key words: Apistoxin Injection; rheumatoid arthritis; fibroblast like synoviocytes; B-lymphoma-2 gene; Bcl-2 related X protein

类风湿关节炎是以对称性多关节炎为主要临床表现的一种系统性自身免疫性疾病, 病理改变为滑膜炎, 滑膜增生形成血管翳, 侵蚀关节导致关节毁损、致残。研究表明细胞凋亡在自身免疫病的发病机制中起重要作用^[1]。类风湿关节炎滑膜细胞凋亡率极低, 衬里层滑膜成纤维细胞 (FLS) 几乎无凋亡现象, 而衬里下层 FLS 凋亡率仅 3%, 并且 FLS 从原来的 1~3 层增殖到 5~6 层甚至更多, 表明类

风湿关节炎-FLS 增殖可能与凋亡不足有关^[2]。类风湿关节炎患者的滑膜细胞凋亡异常, 致使类风湿关节炎滑膜过度增殖, 从而促进类风湿关节炎发生, 引起关节侵蚀破坏, 滑膜细胞凋亡异常与某些凋亡相关基因表达异常相关, 如 Fas 基因、Bcl-2 基因、Caspase-3, 尤其是 Bcl-2 基因在类风湿关节炎-FLS 中的过度表达^[3-5]。前期研究证实蜂毒注射液可诱导类风湿关节炎-FLS 细胞凋亡^[6]。因此, 本研究进一

收稿日期: 2019-12-22

基金项目: 深圳市南山区技术研发和创意设计项目 (2014046)

作者简介: 罗晓光, 主治医师, 硕士, 研究方向为中西医结合治疗风湿免疫性疾病。E-mail: 273324474@qq.com

步探讨蜂毒注射液对类风湿关节炎-FLS 促凋亡基因 Bcl-2 相关 X 蛋白和抗凋亡基因 Bcl-2 的影响,为蜂毒注射液治疗类风湿关节炎的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 滑膜组织来源

取自于华中科技大学协和深圳医院骨科行关节置换或关节镜手术的 4 名活动期类风湿关节炎患者,诊断均符合 2009 年 ACR/EULAR 联合颁布的类风湿关节炎诊断标准^[7],术前患者均知情同意。

1.2 成纤维样滑膜细胞的分离培养

将术后类风湿关节炎滑膜组织放入盛有 DMEM/F12 培养基的 15 mL 离心管内低温保存,除去附着的脂肪组织和血块,用预冷 PBS 液冲洗 3 次,将组织块修剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块,放置于培养瓶中,加入 DMEM/F12 完全培养基,放置于细胞培养箱内培养,每 3 天更换培养基,观察滑膜细胞生长情况,待成纤维样滑膜细胞长满至覆盖瓶底细胞>80%,按 1:2 进行传代。用第 3~5 代的 FLS 进行实验。

1.3 仪器和试剂

恒温 CO₂ 细胞培养箱,蜂毒注射液(长春博奥生化药业有限公司,规格 2 mL:0.5 mg,批号

20120301),DMEM/F12 细胞培养基(Hyclone 公司),RT-Reagent 逆转录酶试剂盒(日本 TaKa 类风湿关节炎公司),人 Bax、Bcl-2 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 RD 公司)。

1.4 分组及给药

根据 MTT 实验结果^[6]选择最佳浓度设置 4、8、16 mg/L 组和对照组(完全培养基)。

1.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 FLS Bax、Bcl-2 mRNA 的表达

选取第 3~5 代对数生长期的 FLS 细胞,按 5×10⁴ 个/mL 浓度每孔 2 mL 接种入 6 孔板中,分组处理同前。每组各设 3 个复孔,作用 24 h。药物作用后的细胞用 PBS 冲洗,收集细胞,按照 Trizol 常规方法提取细胞 RNA,反转录得到 cDNA。Bcl-2、Bax 定量 PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。定量 PCR 扩增反应条件如下:94 ℃、15 s,60 ℃、30 s,72 ℃、30 s。共 40 个循环。RT-PCR 检测类风湿关节炎-FLS 中 Bax、Bcl-2 mRNA 的表达。实验重复 3 次,取其平均值。计算 Bax、Bcl-2 mRNA 表达相对水平,目的基因 mRNA 的相对表达量以公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{对照基因}}$ 。RT-PCR 基因扩增所需引物名称和序列见表 1。

表 1 用于 RT-PCR 的引物名称和序列

Table 1 Name and sequence of primers for RT-PCR

基因	上游引物	下游引物	扩增长度/bp
Bax	5-GTGCACCAAGGTGCCGGAAC-3	5-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3	205
Bcl-2	5-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3	5-AGATCATCTCTGCCTGAGTATGCTT-3	318
β-action	5-CCTAGAAGCATTTGCGGTGC-3	5-TCATGAAGTGTGACGTTGAC-3	250

1.6 ELISA 法检测 FLS Bax、Bcl-2 蛋白的水平

调整细胞浓度为 5×10⁴ 个/mL,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中培养,细胞同期化后分组处理,作用 24 h。按照试剂盒说明书 ELISA 法测定上清液中 Bax、Bcl-2 蛋白的水平。

1.7 统计学处理方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 蜂毒注射液对 FLS Bax、Bcl-2 mRNA 的影响

与对照组比较,蜂毒注射液 4、8、16 mg/L 组 Bax mRNA 表达明显上升($P<0.05$),蜂毒注射液 8、

16 mg/L 组 Bcl-2 mRNA 表达明显下降($P<0.05$ 、 0.01);与蜂毒注射液 4 mg/L 组比较,蜂毒注射液 16 mg/L 组可明显促进 Bax mRNA 的表达($P<0.01$),明显抑制 Bcl-2 mRNA 的表达($P<0.01$)。见表 2。

2.2 蜂毒注射液对类风湿关节炎-FLS 上清液 Bax、Bcl-2 蛋白的影响

与对照组比较,蜂毒注射液 4、8、16 mg/L 组 Bax 蛋白水平升高($P<0.05$ 、 0.01),Bcl-2 蛋白水平下降($P<0.05$ 、 0.01);与蜂毒注射液 4 mg/L 组比较,蜂毒注射液 8、16 mg/L 组可提高 Bax 蛋白水平($P<0.05$ 、 0.01),蜂毒注射液 16 mg/L 组可降低 Bcl-2 蛋白水平($P<0.05$)。见表 3。

表 2 蜂毒注射液对类风湿关节炎-FLS Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 2 Effect of Apistoxin Injection on Bax and Bcl-2 mRNA expression in FLS of rheumatoid arthritis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(mg L ⁻¹)	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA
对照	—	1.000±0.000	1.000±0.000
蜂毒注射液	4	0.683±0.100*	0.943±0.038
	8	0.737±0.081*	0.893±0.032*
	16	1.367±0.237**#	0.777±0.100***#

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与蜂毒注射液 4 mg L⁻¹ 组比较: # $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.01$ vs Apistoxin Injection 4 mg L⁻¹ group表 3 蜂毒注射液对类风湿关节炎-FLS Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Effect of Apistoxin Injection on Bax and Bcl-2 protein expression in FLS of rheumatoid arthritis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(mg L ⁻¹)	Bax/(ng mL ⁻¹)	Bcl-2/(ng mL ⁻¹)
对照	—	31.890±1.593	73.173±6.687
蜂毒注射液	4	35.673±0.770*	62.213±3.516*
	8	40.207±2.752**#	56.007±5.039**
	16	41.800±1.204***#	51.010±2.614***#

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与蜂毒注射液 4 mg L⁻¹ 组比较: # $P<0.05$ # $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ # $P<0.01$ vs Apistoxin Injection 4 mg L⁻¹ group

3 讨论

细胞增殖、凋亡是最基本的生命活动,二者相辅相成,当增殖与凋亡的协调、平衡出现障碍时,机体的内在平衡得以打破,最终引起疾病的发生^[8],其中 Bcl-2 家族起着十分重要的作用^[9-10]。Bcl-2 家族作为与凋亡相关的基因,主要可分为 3 大类:抗凋亡基因,如 Bcl-xl、Bcl-2 等;促细胞凋亡成员,如 Bax、Bcl-xs、Bad、Bak 等;死亡蛋白,如 BH3-only。作为 Bcl-2 家族中最具有代表性的抑制凋亡基因,Bcl-2 是在滤泡性淋巴瘤细胞中染色体易位 t(14:18)的断点上发现的一种原癌基因,Bcl-2 蛋白是由 B 淋巴细胞瘤-2 基因编码的产物,相对分子质量 26,属于膜整合蛋白,定位于线粒体、内质网和核周膜上,其主要作用靶点是线粒体,通过影响线粒体的膜电位、通透性来调控细胞凋亡^[11-12]。Bcl-2 的生物学作用是调控细胞的存活期并通过参与信号传递而抑制细胞凋亡^[13-14]。Sugiyama 等^[15]证实在类风湿关节炎滑膜细胞过度表达 Bcl-2、p53、p21、c-myc,而正常人滑膜细胞中上述蛋白均不表达,认为类风湿关节炎患者滑膜增殖可能是 FLS 中过度表达抗凋亡基因 Bcl-2 所致。Bax 是最早发现的促凋亡因子,与 Bcl-2 基因同源,二者可形成异二聚体或 Bax 与自身形成二聚体;促凋亡蛋白 Bax 通过形成同源二聚体并移位至线粒体膜上后,释放

促凋亡因子,经细胞信号转导途径放大,诱导细胞凋亡;抑凋亡蛋白 Bcl-2 则与 Bax 形成异源二聚体,对 Bax 诱发的凋亡过程进行限制^[11,16]。

大量临床研究证实蜂毒注射液确可改善类风湿关节炎的临床症状。研究表明蜂毒注射液治疗类风湿性关节炎取得了满意的疗效^[17-18];蜂针可能通过抑制 TNF- α 、IL-1B 等细胞因子水平明显改善类风湿关节炎的关节腔积液深度、滑膜厚度和 ESR、CRP 等指标^[19-20]。李亚非等^[21]使用纯化蜂毒肽对兔免疫性关节炎的研究发现,蜂毒肽能显著抑制滑膜炎,改善兔免疫性关节炎的关节肿胀症状。

本研究结果显示,蜂毒注射液 4、8、16 mg/L 组均可以促进 Bax mRNA 的表达,蜂毒注射液 8、16 mg/L 组抑制 Bcl-2 mRNA 表达;对类风湿关节炎-FLS 上清液 Bax、Bcl-2 蛋白作用,蜂毒注射液 4、8、16 mg/L 均可提高 Bax 蛋白水平,均降低 Bcl-2 蛋白的水平,且这些作用有一定的剂量相关性,说明蜂毒注射液可能通过抑制 Bcl-2 蛋白、促进 Bax 蛋白的表达,达到促进类风湿关节炎-FLS 凋亡的作用。前期研究提示蜂毒注射液可诱导类风湿关节炎-FLS 凋亡,结合本实验结果,其机制可能与抑制 Bcl-2、促进 Bax 表达有关^[6]。本实验探讨了蜂毒注射液治疗类风湿关节炎的部分作用机制,为蜂毒注射液治疗类风湿关节炎提供了一定的理论实验依据。

参考文献

- [1] 张学军, 郭礼和. 细胞凋亡失调与疾病关系的研究 [J]. 中华医学杂志, 1998, 78(8): 565-567.
- [2] 张绍龙, 关振鹏, 王军锋, 等. 类风湿关节炎患者程序化死亡基因 5 与肿瘤坏死因子- α 的表达及其相关性分析 [J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(11): 746-748.
- [3] Perlman H, Georganas C, Pagliari L J, et al. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability [J]. *J Immunol*, 2000, 164(10): 5227-5235.
- [4] Baier A, Meine K I, Gay S, et al. Apoptosis in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15: 274-279.
- [5] 刘继红, 李卫东, 林志彬. 类风湿性关节炎细胞凋亡的研究现状 [J]. 中国临床药理学和治疗学, 2003, 8(2): 232-236.
- [6] 谭宁, 王科澎, 贺守第, 等. 蜂毒注射液对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡影响的研究 [J]. 新中医, 2015, 47(6): 280-283.
- [7] American college of rheumatology subcommittee on rheumatoid arthritis guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(2): 328-346.
- [8] Green D R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 1-4.
- [9] Kuo P L, Chiang L C, Lin C C. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells [J]. *Life Sci*, 2002, 72(1): 23-34.
- [10] Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, et al. Resveratrol blocks interleukin-1 beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappa B inhibits proliferation, cause S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells [J]. *Blood*, 2003, 102(3): 987-995.
- [11] 林昌松, 陈秀敏, 刘清平, 等. 昆母汤对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 bax、bcl-2 的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(6): 656-659.
- [12] 张慧, 郑纪容, 郭潮. miR-630 调控 BCL2 抑制肺癌细胞的生长 [J]. 中国热带医学, 2018, 18(1): 22-27.
- [13] Conti A, Majorini M T, Fontanella E, et al. Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) is a determinant of cell sensitivity to apoptosis by regulating the levels of the BCL2 family members [J]. *Cancer Lett*, 2017, 389: 59-69.
- [14] Song W, Song C, Chen Y, et al. Polysaccharide-induced apoptosis in H22 cells through G2/M arrest and BCL2/BAX caspase-activated Fas pathway [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2015, 61(7): 88-95.
- [15] Sugiyama M, Tsukazaki T, Yonekura A, et al. Location of apoptosis and related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 1996, 55(7): 442-449.
- [16] 杨连君, 曹雪涛, 于益芝. bcl-2、bax 与肿瘤细胞凋亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3): 232-234.
- [17] 张秀兰, 苏和祖. 蜂毒疗法配合中药治疗类风湿性关节炎 90 例 [J]. 山东中医杂志, 1997, 16(5): 205-206.
- [18] 鲍庆祥. 穴位注射蜂毒治疗风湿性类风湿性关节炎 172 例疗效观察 [J]. 针灸临床杂志, 1999, 15(6): 38-39.
- [19] 张金禄, 刘喜德, 叶丽红, 等. 蜂针疗法治疗类风湿关节炎膝关节滑膜炎的临床随机对照研究 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(8): 1904-1906.
- [20] 刘喜德, 张金禄, 郑汉光, 等. 蜂针疗法对类风湿关节炎患者外周血 TNF- α 、IL-1 β 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(5): 996-997.
- [21] 李亚非, 时述山, 李欣, 等. 纯化蜂毒肽对兔免疫性关节炎的抑制作用 [J]. 中华风湿病学杂志, 2000, 4(5): 293-295.