论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.22.004
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211029.1659.022.html(2021-11-01)

和厚朴酚通过上调 TRAF3 表达对类风湿关节炎滑膜细胞活化的影响*

吕昌伟,和 晶,张 乾,郝海涛,强 毅,张静涛△
(西北大学附属医院/西安市第三医院骨科,西安 710018)

[摘要] **目的** 研究和厚朴酚(HNK)对类风湿关节炎滑膜细胞(FLS)活化的抑制作用及其分子机制。**方法** 将肿瘤坏死因子(TNF)-α 处理 MH7A 细胞建立 FLS 活化模型,细胞外调节激酶(ERK)抑制剂 MK-8353(MK)抑制 ERK 激活,siRNA 干扰抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 3(TRAF3)表达。采用 CCK-8 检测细胞增殖,ELISA 检测白细胞介素(IL)-6 和 CXC 趋化因子配体 10(CXCL10)分泌情况,Western blot 检测基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、TRAF3 和 p-ERK 蛋白表达,Real-time PCR 检测 TRAF3 mRNA 表达。**结果** TNF+HNK 组细胞增殖较 CON 组和 TNF 组明显降低,且 IL-6、CXCL10 分泌和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达较 TNF 组明显降低($P<0.05$)。与 CON 组和 TNF 组相比,TNF+HNK 组 TRAF3 mRNA 和蛋白表达均明显升高($P<0.05$)。si-TRAF3 组 TRAF3 蛋白表达较 si-CON 组明显降低($P<0.05$),TNF+HNK+si-TRAF3 组 IL-6、CXCL10 分泌和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达较 TNF+HNK 组明显升高($P<0.05$)。与 CON 组和 TNF 组比较,TNF+HNK 组 p-ERK1/2 蛋白表达明显升高($P<0.05$),TNF+HNK+MK 组 p-ERK1/2、TRAF3 蛋白表达明显低于 TNF+HNK 组($P<0.05$)。**结论** HNK 可能通过激活 ERK 信号通路引起 TRAF3 表达上调,进而抑制 FLS 活化。

[关键词] 类风湿性关节炎;滑膜细胞;和厚朴酚
[中图法分类号] R593.22 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2021)22-3797-06

Effect of honokiol on synoviocyte activation in rheumatoid arthritis by up-regulating TRAF3 expression*

LYU Changwei, HE Jing, ZHANG Qian, XI Haitao, QIANG Yi, ZHANG Jingtao△
(*Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Northwestern University/Xi'an Municipal Third Hospital, Xi'an, Shaanxi* 710018, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To explore the inhibiting effect of honokiol (HNK) on fibroblast-like synoviocyte (FLS) activation and its molecular mechanism. **Methods** The MH7A cells were treated by TNF-α to establish the FLS activation model, the extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor MK-8353 was used to inhibit the ERK activation, and siRNA was used to inhibit TNF-α receptor associated factor 3 (TRAF3) expression. Then the cellular proliferation was detected by CCK-8, the secretion of interleukin (IL)-6 and CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) was detected by ELISA, the expression of matrix met alloproteinase (MMP)-2, MMP-9, TRAF3 and p-ERK protein was detected by Western blot, and the mRNA expression of TRAF3 was measured by real-time PCR. **Results** The cellular proliferation in the TNF+HNK group was significantly decreased compared with the group CON and TNF ($P<0.05$), moreover the excretion of IL-6 and CXCL10 and expressions of MMP-2 and MMP-9 proteins were significantly decreased compared with the group TNF ($P<0.05$). Compared with the group CON and TNF, the TRAF3 mRNA and protein expression in the group TNF+HNK were significantly increased ($P<0.05$). The TRAF3 protein expression in the group si-TRAF3 was significantly decreased compared with the group si-CON ($P<0.05$), the secretion of IL-6 and CXCL10 and expressions of MMP-2 and MMP-9 proteins in the group TNF+HNK+si-TRAF3 were significantly increased

* **基金项目**:陕西省重点研发计划项目(2019SF-194)。 **作者简介**:吕昌伟(1976-),副主任医师,博士,主要从事类风湿性关节炎和骨代谢性疾病研究。 △ **通信作者**,E-mail:84046418@qq.com。

compared with the group TNF+HNK ($P<0.05$). Compared with the group CON and TNF, the p-ERK1/2 protein expression in the group TNF+HNK was significantly increased ($P<0.05$), the p-ERK1/2 and TRAF3 proteins expression in the group TNF+HNK+MK was significantly lower than that in the group TNF+HNK. **Conclusion** HNK causes the up-regulation of TRAF3 expression by activating ERK signal, thus inhibits the FLS activation.

[**Key words**] rheumatoid arthritis; synoviocyte; honokiol

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种炎性自身免疫性疾病,病程长、预后差、致残率高,严重影响患者生活质量[1]。然而,RA 的发病机制目前仍不完全清楚,尚无有效的根治方法。类风湿关节炎滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte,FLS)在 RA 的病理发展中起到了重要作用[2]。研究表明,FLS 的异常增生和活化,是导致 RA 患者滑膜增生、滑膜炎症和软骨损伤的重要原因[3-5]。活化的 FLS 发生过度增殖,并通过产生大量炎症因子和基质金属蛋白酶(matrix met alloproteinase,MMP),如肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(IL)-6、IL-8、CXC 趋化因子配体 10(CXCL10)、MMP-2 和 MMP-9,募集和激活免疫细胞和关节细胞,触发并维持关节的慢性炎症和进行性损坏[6]。

和厚朴酚(honokiol,HNK)是木兰科植物厚朴中提取的主要药效成分之一,具有抗炎、镇痛、抗氧化、免疫调节等作用[7-8]。虽然治疗 RA 的中医验方中使用了厚朴[9],但目前并无 NHK 对 RA 治疗的研究。本研究探讨 HNK 通过上调肿瘤坏死因子受体相关因子 3(TRAF3)表达对 FLS 活化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

MH7A 细胞株(日本 Riken cell bank 公司);1%青链霉素、CCK-8 试剂盒(碧云天生物科技有限公司);人重组 TNF-α(BBI 生命科学有限公司);RNAiso Plus、PrimeScriptRT Master Mix 试剂盒、TB Green Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒(日本 TaKaRa 公司);细胞外调节激酶(ERK)抑制剂 MK-8353(MK)、HNK(美国 MCE 公司);si-TRAF3(美国 Santa Cruz 公司);人 IL-6、CXCL10 ELISA 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);lipofectamin 2000、opti-MEM(美国 Invitrogen 公司);酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组

MH7A 细胞株采用 RPMI-1640 培养基添加 10%胎牛血清和 1%青链霉素培养。对照(CON)组无处理,TNF-α(TNF)组采用 5 ng/mL TNF-α 处理 24 h,TNF+HNK 组、TNF+HNK+MK 组、TNF+HNK+siTRAF3 组分别采用 5 ng/mL TNF-α 分别复合 10 μmol/L HNK、1 μmol/L MK 或 si-TRAF3 干扰处理 24 h,同时设立二甲亚砜(DMSO)溶剂对照。

1.2.2 siRNA 转染

将 si-TRAF3 和 si-CON 同 lipofectamin 2000 溶解于 optiMEM,室温稳定 20 min 制成转染液。细胞用转染液培养 6 h,换回正常培养基,用于后续实验。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活力

各组处理细胞结束后,采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖。用正常培养基按照 1∶9 体积配制 CCK-8 溶液,每孔加入 100 μL CCK-8 溶液,37 ℃孵育 1 h,于酶标仪测定 450 nm 吸光度。

1.2.4 ELISA 检测 IL-6、CXCL10 表达

收取细胞培养上清液,采用人 IL-6、CXCL10 ELISA 检测试剂盒,按照产品说明书,进行操作和检测。

1.2.5 Real-time PCR 检测 TRAF3 mRNA 表达

采用 RNAiso Plus 提取细胞总 RNA,PrimeScript^{RT} Master Mix 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,采用 TB Green Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒进行 Real-time PCR 检测,引物序列如下:TRAF3:forward 5′-ACA TCC GCC TAG CCG ACA TGG-3′,reverse 5′-CTG CTT CCG CCG CTT GTA GTC-3′;GAPDH:forward 5′-AGG TCG GTG TGA ACGGAT T-3′,reverse 5′-AAT CTC CAC TTT GCC ACT GC-3′,于 CFX96 Real-Time System 上机检测。全部操作按照使用说明书进行。

1.2.6 Western blot 检测 TRAF3、MMP-2、MMP-9、p-ERK 蛋白表达

RIPA 裂解液收集细胞蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,加入 4×Laemmli 缓冲液,97 ℃加热 10 min。10% SDS-PAGE 凝胶电泳,250 mA 转至 PVDF 膜。分别孵育 TRAF3 一抗、MMP-2 一抗、MMP-9 一抗、ERK 一抗、p-ERK 一抗、β-actin 一抗,4 ℃过夜,室温孵育羊抗兔二抗。化学发光后,置于 ChemiDoc XRS+凝胶成像系统检测。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行分析。

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组比较采用 Student's t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 HNK 对 MH7A 细胞活化的影响

与 CON 组比较，TNF 组细胞 IL-6、CXCL10 分泌明显增加（$P<0.05$），MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达明显升高（$P<0.05$）。TNF＋HNK 组细胞活力较 CON 组和 TNF 组明显降低，且 IL-6、CXCL10 分泌和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达较 TNF 组明显降低（$P<0.05$），见图 1。

2.2 HNK 对 MH7A 细胞 TRAF3 表达的影响

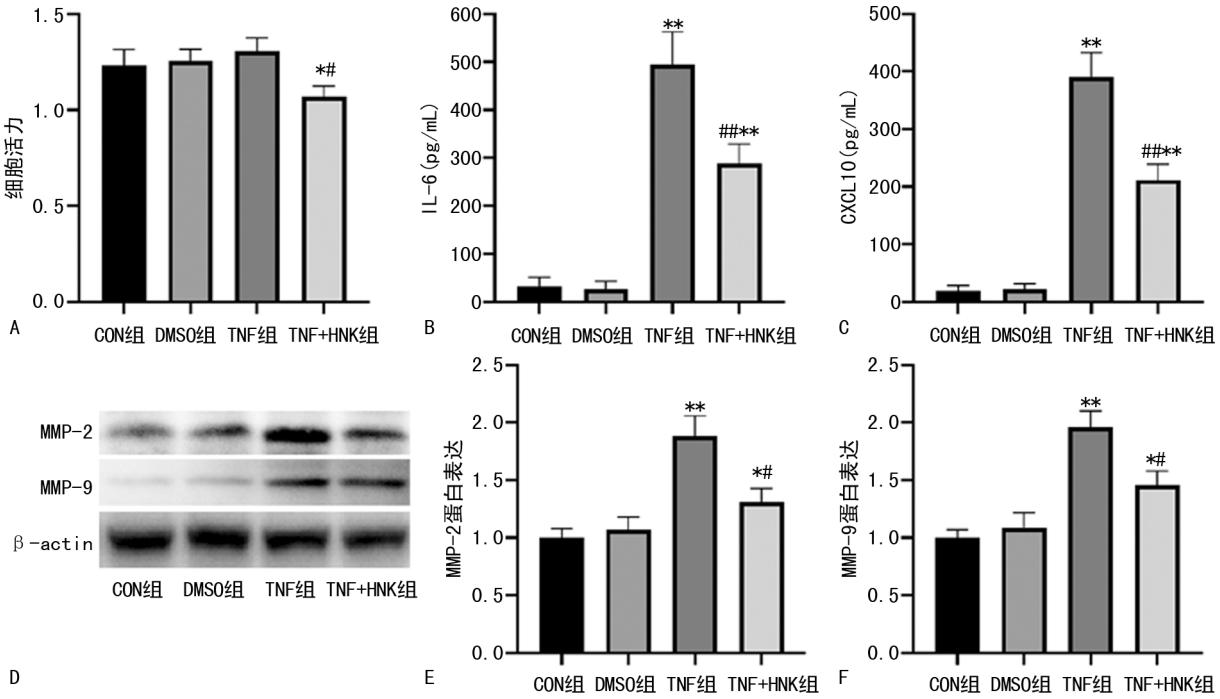
与 CON 组和 TNF 组比较，TNF＋HNK 组 TRAF3 mRNA 和蛋白表达明显升高（$P<0.05$），见图 2。

2.3 TRAF3 介导 HNK 对 MH7A 细胞活化的影响

与 si-CON 组比较，si-TRAF3 组 TRAF3 蛋白表达明显降低（$P<0.05$）。TNF＋HNK＋siTRAF3 组 IL-6、CXCL10 分泌和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达较 TNF＋HNK 组明显升高（$P<0.05$），见图 3。

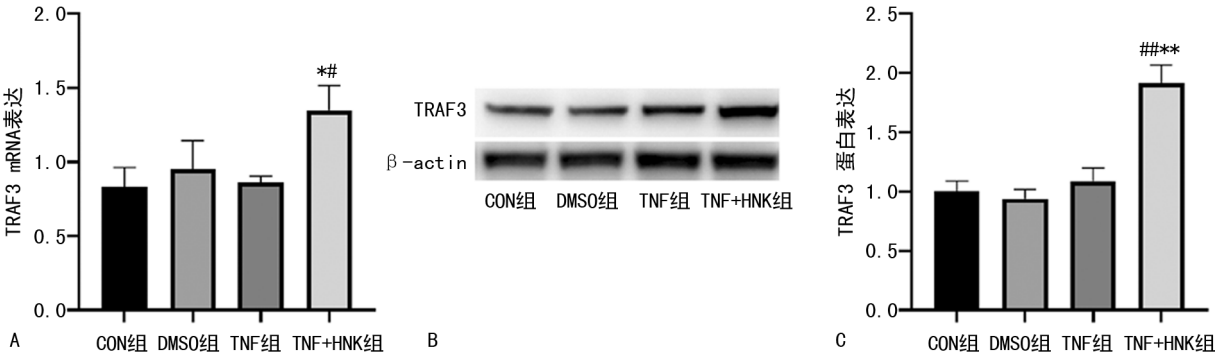
2.4 ERK 信号通路在 HNK 调控 TRAF3 表达中的作用

与 CON 组和 TNF 组比较，TNF＋HNK 组 p-ERK1/2 蛋白表达明显升高（$P<0.05$），TNF＋HNK＋MK 组 p-ERK1/2、TRAF3 蛋白表达明显低于 TNF＋HNK 组（$P<0.05$），见图 4。



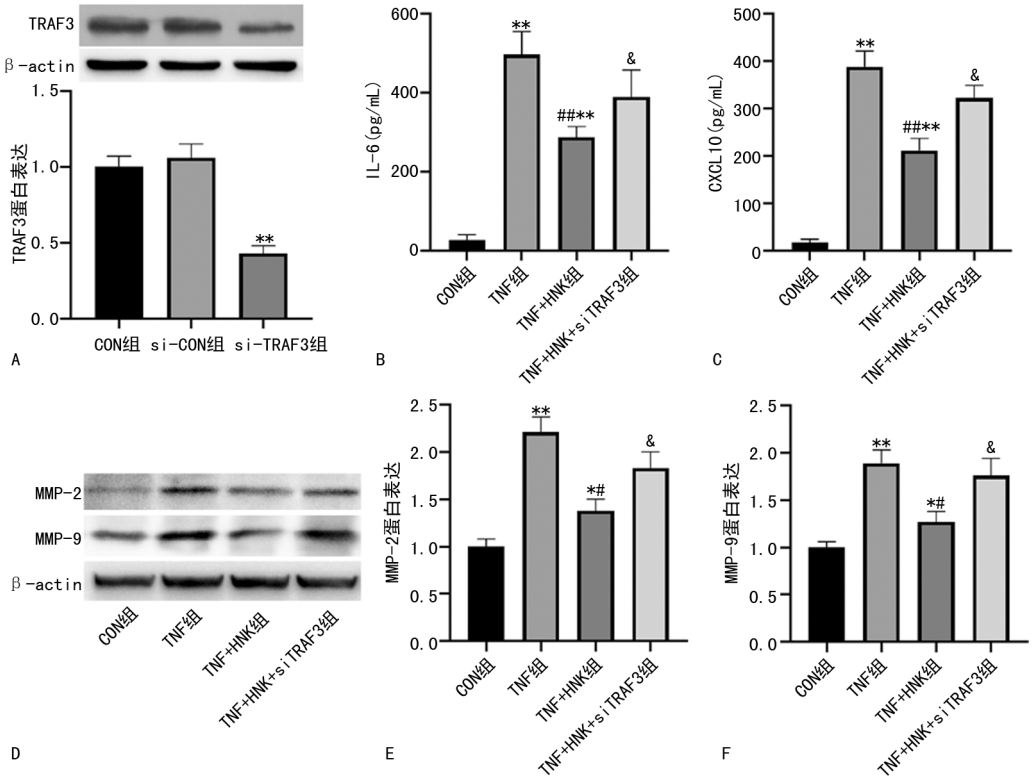
A：各组 MH7A 细胞增殖情况；B：各组细胞 IL-6 水平；C：各组细胞 CXCL10 水平；D：各组细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白印迹图；E：各组细胞 MMP-2 蛋白表达；F：各组细胞 MMP-9 蛋白表达；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，与 CON 组比较；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，与 TNF 组比较。

图 1　HNK 对 MH7A 细胞活化的影响



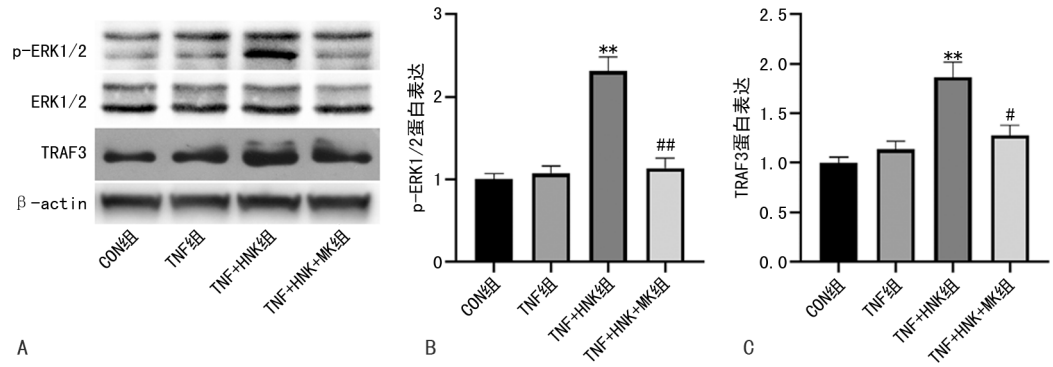
A：各组细胞 TRAF3 mRNA 表达；B：各组细胞 TRAF3 蛋白印迹图；C：各组细胞 TRAF3 蛋白表达；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，与 CON 组比较；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，与 TNF 组比较。

图 2　HNK 对 MH7A 细胞 TRAF3 表达的影响



A:各组细胞 TRAF3 蛋白表达;B:各组细胞 IL-6 水平;C:各组细胞 CXCL10 水平;D:各组细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白印迹图;E:各组细胞 MMP-2 蛋白表达;F:各组细胞 MMP-9 蛋白表达;*:$P<0.05$,**:$P<0.01$,与 CON 组比较;#:$P<0.05$,##:$P<0.01$,与 TNF 组比较;&:$P<0.05$,与 TNF+HNK 组比较。

图 3　TRAF3 介导 HNK 对 MH7A 细胞活化的影响



A:各组细胞 p-ERK1/2、ERK1/2、TRAF3 蛋白印迹图;B:各组细胞 p-ERK1/2 蛋白表达;C:各组细胞 TRAF3 蛋白表达;**:$P<0.01$,与 TNF 组比较;#:$P<0.05$,##:$P<0.01$,与 TNF+HNK 组比较。

图 4　ERK 信号通路在 HNK 调控 TRAF3 表达中的作用

3　讨　论

目前,临床治疗 RA 的主要药物包括糖皮质激素和非甾体消炎药,以及甲氨蝶呤等,而这些药物往往不能实际缓解病情[10]。中药用于 RA 治疗具有悠久的历史并多能缓解病情进展[11]。中药厚朴在治疗 RA 的中药复方中亦被广泛配伍使用[9],其中 HNK 是厚朴中主要有效成分之一,具有广泛的抗炎活性[12]。FLS 的异常活化在 RA 的发病中发挥了关键作用[13-14]。本研究显示,HNK 可明显抑制 FLS 的增殖,并抑制了 TNF-α 所致的促炎因子 IL-6、CXCL10 的分泌,以及 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达。提示 HNK 可有效抑制 FLS 活化,降低 FLS 增殖、炎性反应和侵袭能力,其具有治疗 RA 的潜在价值。

已有研究显示,HNK 可通过阻断核因子(NF)-κB 信号通路抑制炎性反应,降低 IL-6 和 MMP-9 的表达[15]。但是,HNK 抑制 NF-κB 信号通路激活的机制并不清楚。TRAF3 作为细胞内一种重要的负性炎症调控因子,其高表达可有效阻止 NF-κB 信号的激活[6,16]。NF-κB 信号的激活可促进 FLS 的异常活化[6],诱发 IL-6、MMP-2、MMP-9 和 CXCL10 表达升高[17-19]。本研究显示,HNK 可上调 TRAF3 蛋白表达。因此,HNK 可能通过上调 TRAF3 表达,抑制

NF-κB 激活，进而抑制 FLS 活化。这些结果也与先前的研究一致，即 TRAF3 和 NF-κB 与细胞增殖、迁移、侵袭和炎性反应相关[6,20-21]。

HNK 已在多个细胞内被证明可以激活 ERK1/2 信号抑制细胞迁移，并引起细胞自噬和凋亡[22-23]。但 HNK 是否能通过激活 ERK1/2 信号，进而上调 TRAF3 表达尚不清楚。本研究结果表明，ERK1/2 信号激活介导了 HNK 对 TRAF3 表达的上调作用。前期有研究报道 miRNA-17-92 靶向干扰 TRAF3 翻译表达，引起了细胞迁移和侵袭能力的增强，并且导致了 ERK 信号的激活[24]，表明 ERK 信号和 TRAF3 之间可能存在双向作用。

目前，RA 的临床治疗仍面临诸多问题。本研究提示了中药厚朴成分 HNK 对 RA 的潜在治疗价值，对降低目前临床药物用量，减少并发症提供了一种可能途径。

参考文献

[1] LO J, CHAN L, FLYNN S. A systematic review of the incidence, prevalence, costs, and activity and work limitations of amputation, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, back pain, multiple sclerosis, spinal cord injury, stroke, and traumatic brain injury in the United States: a 2019 update[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2021, 102(1): 115-131.

[2] MENG Q, QIU B. Exosomal microRNA-320a derived from mesenchymal stem cells regulates rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing CXCL9 expression [J]. Front Physiol, 2020, 11: 441.

[3] YANG R, ZHANG Y, WANG L, et al. Increased autophagy in fibroblast-like synoviocytes leads to immune enhancement potential in rheumatoid arthritis[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15420-15430.

[4] WEI X, LI X, LU J, et al. MiR-20a regulates fibroblast-like synoviocyte proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(14): 7578.

[5] NYGAARD G, FIRESTEIN G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(6): 316-333.

[6] ZHANG L, ZHOU J, LUO C. CYLD suppression enhances the pro-inflammatory effects and hyperproliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by enhancing NF-kappaB activation [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 219.

[7] ZHAN L, PENG X, LIN J, et al. Honokiol reduces fungal load, toll-like receptor-2, and Inflammatory cytokines in aspergillus fumigatus keratitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(4): 48.

[8] PARK C, CHOI S H, JEONG J W, et al. Honokiol ameliorates oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis of c2c12 myoblasts by ROS generation and mitochondrial pathway [J]. Anim Cells Syst (Seoul), 2019, 24(1): 60-68.

[9] 谢志忠. 三妙散联合西药治疗类风湿关节炎(湿热痹阻)随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(10): 64-67.

[10] ABBASI M, MOUSAVI M, JAMALZEHI S, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy: the old and the new[J]. J Cell Physiol, 2018, 243(7): 10018-10031.

[11] LU M, LIVNEH H, CHIU L, et al. A survey of traditional Chinese medicine use among rheumatoid arthritis patients: a claims data-based cohort study[J]. Clin Rheumatol, 2019, 38(5): 1393-1400.

[12] XIA S, LIN H, LIU H, et al. Honokiol attenuates sepsis-associated acute kidney injury via the inhibition of oxidative stress and inflammation[J]. Inflammation, 2019, 42(3): 826-834.

[13] TU J, HONG W, ZHANG P, et al. Ontology and function of fibroblast-like and macrophage-like synoviocytes: how do they talk to each other and can they be targeted for rheumatoid arthritis therapy[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1467.

[14] ZHANG Y, JI T, MA S, et al. MLL1 promotes migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis by activating the TRIF/NF-kappaB signaling pathway via H3K4me3 enrichment in the TLR4 promoter region [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 82: 106220.

[15] WU H, YIN Z, WANG L, et al. Honokiol improved chondrogenesis and suppressed inflam-

mation in human umbilical cord derived mesenchymal stem cells via blocking nuclear factor-kappaB pathway[J]. BMC Cell Biol, 2017, 18(1):29.

[16] ZHOU Y, TAO T, LIU G, et al. TRAF3 mediates neuronal apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage via targeting TAK1-dependent MAPKs and NF-κB pathways[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(1):10.

[17] DING H, GAO G, ZHANG L, et al. The protective effects of curculigoside A on adjuvant-induced arthritis by inhibiting NF-κB/NLRP3 activation in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 30:43-49.

[18] EID R A, ALHARBI S A, EL-KOTT A F, et al. Exendin-4 ameliorates cardiac remodeling in experimentally induced myocardial infarction in rats by inhibiting PARP1/NF-κB axis in a sirt1-dependent mechanism [J]. Cardiovasc Toxicol, 2020, 20(4):401-418.

[19] ZHANG L, LUO J, WEN H, et al. MDM2 promotes rheumatoid arthritis via activation of MAPK and NF-κB[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 30:69-73.

[20] DING J, QIN D, ZHANG Y, et al. SMAC mimetic birinapant inhibits hepatocellular carcinoma growth by activating the cIAP1/TRAF3 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(3):1251-1257.

[21] YANG F, LI S, CHENG Y, et al. Karyopherin alpha 2 promotes proliferation, migration and invasion through activating NF-kappaB/p65 signaling pathways in melanoma cells[J]. Life Sci, 2020, 252:117611.

[22] HUANG K, CHEN Y, ZHANG R, et al. Honokiol induces apoptosis and autophagy via the ROS/ERK1/2 signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2):157.

[23] WU F, YAO H, ZHENG F, et al. Protective effects of honokiol against oxidative stress-induced apoptotic signaling in mouse podocytes treated with H_2O_2[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(2):1278-1284.

[24] ZHANG X, WANG K, ZHAO W, et al. TRAF3IP3 at the trans-Golgi network regulates NKT2 maturation via the MEK/ERK signaling pathway[J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(4):395-406.

(收稿日期:2021-03-18 修回日期:2021-07-26)

(上接第 3796 页)

C C, et al. MiR-134 targets PDCD7 to reduce E-cadherin expression and enhance oral cancer progression[J]. Int J Cancer, 2018, 143(11):2892-2904.

[9] SU S C, HSIEH M J, YANG W E, et al. Cancer metastasis: mechanisms of inhibition by melatonin[J]. J Pineal Res, 2017, 62(1):112-115.

[10] CHAO W, DENG J S, LI P Y, et al. Inotilone from Inonotus linteus suppresses lung cancer metastasis in vitro and in vivo through ROS-mediated PI3K/AKT/MAPK signaling pathways[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):2344-2346.

[11] EIRO N, CARRION J F, CID S, et al. Toll-like receptor 4 and matrix met alloproteases 11 and 13 as predictors of tumor recurrence and survival in stage Ⅱ colorectal cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2019, 25(4):1589-1597.

[12] ZHANG R, ZHU Z, SHEN W, et al. Golgi membrane protein 1 (GOLM1) promotes growth and metastasis of breast cancer cells via regulating matrix met alloproteinase-13 (MMP13)[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:847-855.

[13] ZHOU Z, MA X, WANG F, et al. A matrix met alloproteinase-1 polymorphism, MMP1-1607 (1G>2G), is associated with increased cancer risk: a meta-analysis including 21,327 patients[J]. Dis Markers, 2018, 2018:7565834.

[14] HUI L, YANG N, YANG H, et al. Identification of biomarkers with a tumor stage-dependent expression and exploration of the mechanism involved in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2015, 34(5):2627-2635.

[15] ORIA V O, LOPATTA P, SCHILLING O. The pleiotropic roles of ADAM9 in the biology of solid tumors[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(13):2291-2301.

(收稿日期:2021-02-26 修回日期:2021-07-21)