

# 全反式视黄酸和托法替尼在类风湿关节炎滑膜成纤维细胞中的联合作用及机制

朱虹蓓, 罗雅亭, 赵靖, 苏欣怡, 蔡秋莹, 李云

四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院, 四川 成都 610041

**摘要:**目的 探讨全反式视黄酸(ATRA)与托法替尼(Tofacitinib)联用对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞(HFLS-RA)的作用机制,及其自噬和凋亡在NF- $\kappa$ B信号通路中的影响。方法 采用肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )和白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )刺激HFLS-RA细胞,随后以ATRA、托法替尼及二者联合进行干预。检测细胞增长率、迁移能力、炎症因子IL-6、IL-10、IL-17和VEGF浓度及凋亡水平,评估干预效果。用不同浓度ATRA、自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)及两者联合处理细胞,通过Western Blotting技术检测Bcl-2、XIAP及NF- $\kappa$ B通路相关蛋白的表达水平。结果 ATRA与托法替尼联合应用显著抑制HFLS-RA细胞的增殖和迁移能力,上调抗炎因子IL-10的水平,同时下调促炎因子IL-17和血管生成因子VEGF的水平,并促进细胞的早期凋亡。ATRA单独作用时,不同浓度均可下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,上调NF- $\kappa$ B抑制蛋白I $\kappa$ B $\alpha$ 的水平;0.1  $\mu$ mol/L和1  $\mu$ mol/L的ATRA下调XIAP的表达;1  $\mu$ mol/L和10  $\mu$ mol/L的ATRA下调P65水平;10  $\mu$ mol/L的ATRA下调IKK $\alpha$ / $\beta$ 的表达。3-MA与ATRA的联合应用展现出更强的促进HFLS-RA细胞凋亡的作用。自噬抑制剂3-MA与ATRA联合使用,可进一步上调I $\kappa$ B $\alpha$ 的表达,同时下调Bcl-2、IKK $\alpha$ / $\beta$ 和P65的水平。结论 ATRA可能通过抑制细胞增殖和迁移、降低IL-6水平以及诱导细胞凋亡来抑制NF- $\kappa$ B通路的激活。

**关键词:** 类风湿性关节炎;滑膜成纤维细胞;全反式视黄酸;托法替尼;NF- $\kappa$ B

中图分类号:R-33 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2025)10-1879-08

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202501304

## Combined effects and mechanisms of all-trans-retinoic acid and tofacitinib on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis

ZHU Hong-bei, LUO Ya-ting, ZHAO Jing, SU Xin-yi, CAI Qiu-ying, LI Yun

West China School of Public Health/West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of the combination of all-trans retinoic acid and tofacitinib on human fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis and explore the mechanisms of autophagy and apoptosis in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Methods** Cells were adaptively cultured and stimulated with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Subsequently, HFLS-RA cells were intervened with ATRA, tofacitinib, and their combination. Cell proliferation rate, migration ability, inflammatory cytokine concentrations, and apoptosis levels were detected. Different concentrations of ATRA, autophagy inhibitor (3-MA), and their combination were also used to intervene, and relevant protein expressions were detected by Western Blotting. **Results**

The combined use of ATRA and tofacitinib inhibited the proliferation and migration of HFLS-RA cells, upregulated IL-6 and IL-10 levels, downregulated IL-17 and VEGF levels, and promoted early apoptosis. Different concentrations of ATRA downregulated Bcl-2, upregulated I $\kappa$ B $\alpha$ , and affected the expression of XIAP, P65, and IKK $\alpha$ / $\beta$ . The combination of autophagy inhibitor 3-MA and ATRA further upregulated I $\kappa$ B $\alpha$ , downregulated Bcl-2, IKK $\alpha$ / $\beta$ , and P65. **Conclusion** ATRA may inhibit the activation of the NF- $\kappa$ B pathway by suppressing cell proliferation and migration, downregulating IL-6 levels, and inducing apoptosis.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis; Synovial fibroblasts; All-trans retinoic acid; Tofacitinib; NF- $\kappa$ B

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种与慢性炎症过程相关的系统性自身免疫性病变<sup>[1]</sup>,

可损害关节和关节外器官,世界范围内RA的平均发病率为0.5%~2.0%<sup>[2]</sup>。RA的发病机制与遗传和环境因素密切相关,危险因素包括吸烟、肥胖、性激素和感染等<sup>[3]</sup>。影响RA的炎症介质种类繁多,肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF- $\alpha$ )是不可忽视

基金项目:国家自然科学基金(81372983)

作者简介:朱虹蓓(1999—),女,硕士在读,研究方向:营养与食品卫生

通信作者:李云, E-mail: liyun\_611@163.com

的一类<sup>[4]</sup>。TNF- $\alpha$  具备诱导炎性细胞因子(如 IL-6 和 IL-1 $\beta$ )分泌增多的能力,从而加剧炎症反应。Th17 细胞产生 IL-17A,一方面促使成骨细胞和滑膜细胞在内皮细胞和成纤维细胞引发的炎症反应刺激下产生核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体(Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand, RANK-L)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF)加强该过程<sup>[5]</sup>,另一方面中性粒细胞聚集<sup>[6]</sup>,血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)大量分泌<sup>[7]</sup>,共同促进 RA 患者骨侵蚀、软骨破坏和新生血管生成<sup>[8]</sup>。滑膜成纤维细胞在 RA 的发病中表现出过度增殖、生存期延长和凋亡抵抗<sup>[9]</sup>。共同维持促炎细胞因子高水平状态,导致全身性炎症<sup>[10]</sup>。类风湿关节炎滑膜成纤维(Human Fibroblast-Like Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis, HFLS-RA)细胞中基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)的表达增加,显著促进关节破坏<sup>[5]</sup>。有针对性地抑制 HFLS-RA 细胞过度增殖及炎症因子和金属蛋白酶分泌,促进 HFLS-RA 细胞凋亡可以达到治疗 RA 的良好效果<sup>[9,11]</sup>。

全反式视黄酸(All-Trans Retinoic Acid, ATRA)在体内参与正常细胞分化和广泛的生物过程<sup>[12]</sup>,在人体多个器官和系统的发育中发挥重要作用,并影响肿瘤的发生<sup>[13-14]</sup>。膳食维生素 A 日常摄入不够可增加 RA 的患病风险<sup>[15]</sup>。ATRA 通过抑制 HFLS-RA 细胞增殖和迁移及 TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌水平,减轻炎症和抑制滑膜增生,从而缓解 RA<sup>[16]</sup>。课题组前期发现 ATRA 可抑制 HFLS-RA 细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌水平,采用 TNF- $\alpha$  建立的诱导滑膜外植体培养模型中的核因子- $\kappa$ B(Nuclear Factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)家族 P65 蛋白表达增加<sup>[17]</sup>,通过 ATRA 处理后其表达水平降低,提示可能与 NF- $\kappa$ B 信号通路失活有关。透射电镜观察结果提示 ATRA 可明显诱导 HFLS-RA 细胞的自噬,上调自噬相关蛋白 LC3A/B、Beclin-1 的表达水平<sup>[17]</sup>,但 ATRA 诱导的自噬、凋亡与 NF- $\kappa$ B 信号通路是否有关及明确的机制还需进一步研究。

目前 RA 的临床治疗策略主要是非甾体抗炎药等<sup>[18]</sup>,这些药物可导致心血管和胃肠道出血、肝肾毒性、感染等风险增加<sup>[19]</sup>。托法替尼(Tofacitinib)是 RA 的二线治疗药物,可干扰炎症因子的信号转导<sup>[20]</sup>,使 RA 患者获得最佳治疗效果并最大限度减少不良反应。本研究拟采用全反式视黄酸联合托法替尼干预 TNF- $\alpha$  刺激的 HFLS-RA 细胞,阐述两者联用对 RA 的影响,观察 ARTA 是否能增强托法替尼缓

解 RA 的疗效。用 ATRA 联合自噬抑制剂干预 HFLS-RA 细胞,观察主要炎性细胞因子、血管生成因子的变化,探索 NF- $\kappa$ B 信号通路与自噬、凋亡在 ATRA 干预 RA 滑膜炎的机制中的作用。

## 1 实验材料与方法

**1.1 实验材料与试剂** HFLS-RA 细胞和 HFLS 细胞(广州吉妮欧生物科技有限公司);胰蛋白酶消化液、全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、超敏 ECL 化学发光底物(江苏凯基生物技术股份有限公司);双抗(青霉素-链霉素溶液)(美国 HyClone);IL-1 $\beta$ 、ThecellCountingKit-8(CCK-8)、全反式视黄酸 ATRA(Sigma 公司);托法替尼(GLP BIO 公司);人 TNF- $\alpha$ (Peprotech);IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10、IL-17、VEGF、MMP-9 ELISA 试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司)。

**1.2 细胞培养和 ATRA 溶液配制** HFLS-RA 细胞和 HFLS 细胞接种于含有 H-DMEM 培养基(含 20% FBS 和双抗)的培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养;避光条件下,将全反式视黄酸(ATRA)溶于二甲基亚砜(DMSO)中,充分混匀后得到 10  $\mu$ mol/L 的 ATRA 原液。使用时,用 DMEM 培养基稀释至所需浓度。

**1.3 CCK8 法细胞增殖实验** 取对数生长期细胞,胰酶消化后,以 H-DMEM 调至 1  $\times$  10<sup>4</sup> 个/ml,接种于 96 孔板(100  $\mu$ l/孔),37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。换液并 PBS 洗涤后,按组加入加药培养基(100  $\mu$ l/孔,5 复孔/组),继续培养 24 h。再向每孔加入含 CCK8 培养基 20  $\mu$ l,颜色变化后用酶标仪于 490 nm 测 OD 值,计算细胞增殖率。

**1.4 划痕实验** 选取对数生长期细胞,经胰酶消化后调整至 1  $\times$  10<sup>5</sup> 个/ml 密度,接种于六孔板,37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养 24 h。配制加药培养基备用。次日划痕处理,PBS 洗涤后拍摄初始照片。按组别加入加药培养基,继续培养 24 h 及 48 h 后,分别拍摄划痕照片并记录。

**1.5 酶联免疫吸附试验** 收集上清液,离心去除细胞和碎片后保存于 -80 $^{\circ}$ C。采用特异性酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10、IL-17、VEGF、MMP-9 和 TNF- $\alpha$  的浓度。实验按照生产厂家的说明书进行。

**1.6 流式细胞术** 细胞经无 EDTA 胰酶消化 1 min,离心(1 000 r/min,5 min)后调整浓度为 3 ~ 5  $\times$  10<sup>6</sup>/ml。按说明书进行抗体染色,每 100  $\mu$ l 细胞悬液加 5  $\mu$ l Annexin V/FITC,室温避光孵育 5 分钟。再加入

400  $\mu$ l PBS 和 10  $\mu$ l 碘化丙啶, 1 h 内上流式细胞仪检测。

**1.7 Western blotting 分析** 细胞预处理后冰上聚集, 以 RIPA 裂解, 经 10% SDS-PAGE 于 120V 分离蛋白, 电转至 NC 膜。膜以 5% BSA 或脱脂奶粉的 PBS 封闭 60 min, 再分别与一抗 Bcl-2、I $\kappa$ B $\alpha$ 、XIAP、IKK $\alpha$ / $\beta$ 、P65 及二抗 37  $^{\circ}$ C 孵育各 1 h。最后, 用 Image J 软件进行蛋白表达的可视化与定量分析。

**1.8 统计分析** 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用单因素方差分析并进行方差齐性检验, 方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett-T3 法进行组间两两比较, 检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

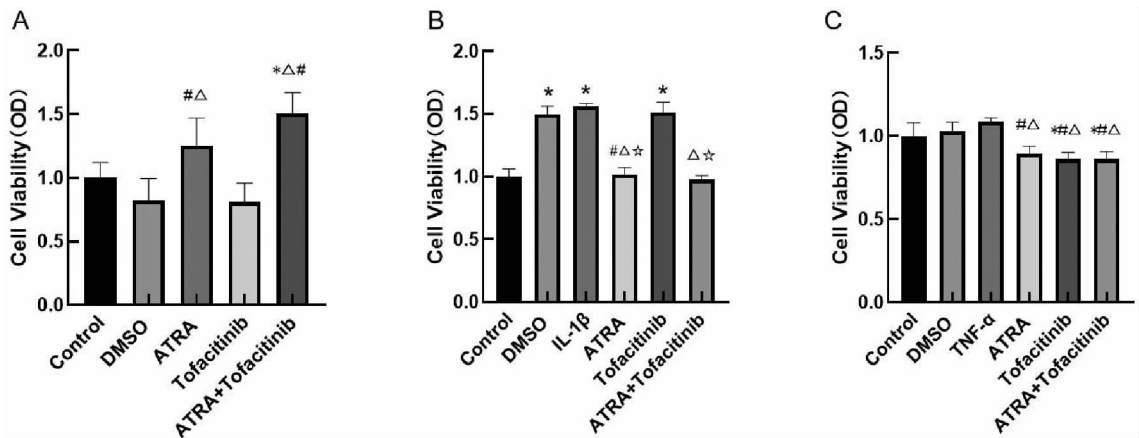
### 2.1 ATRA 对 HFLS 和 HFLS-RA 细胞增殖的影响

与 DMSO 组和托法替尼组相比, ATRA 组和联合干预组在 HFLS 细胞中的增殖率均显著增加 (见图 1A)。进一步探究 ATRA 及联合干预对 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  诱导下 HFLS-RA 细胞的作用差异, 发现 IL-1 $\beta$  干预实验中, IL-1 $\beta$  组、DMSO 组、托法替尼组增殖率高于对照组; ATRA 组和联合干预组的增殖率较 IL-1 $\beta$  组降低 (见图 1B)。TNF- $\alpha$  诱导实验中, 联合干预组、托法替尼组及 ATRA 组的细胞增殖率显著

低于 TNF- $\alpha$  组 (见图 1C)。结果提示, 10  $\mu$ mol/L 的 ATRA 单独使用或与托法替尼联用, 均能够显著促进 HFLS 细胞的增殖, 抑制 HFLS-RA 细胞的生长。

**2.2 ATRA 及联合干预对 HFLS-RA 细胞迁移水平及凋亡的影响** 前期研究发现 20 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  能提升 HFLS-RA 细胞的增殖率, 后续实验选用其为诱导因子。划痕实验表明对照组划痕变窄, 细胞迁移能力增强; ATRA 组抑制划痕变窄; 托法替尼组划痕较 ATRA 组更宽, 联合干预组划痕最宽, 表明 ATRA 能增强托法替尼对 HFLS-RA 细胞迁移的抑制, 且随时间推移, 增强作用更明显, 两组划痕变化趋势一致 (见图 2)。

流式细胞术检测发现, 与对照组比较, TNF- $\alpha$  和 DMSO 组 HFLS-RA 细胞早期凋亡降低 (见图 3)。与 TNF- $\alpha$  组相比, ATRA、托法替尼及联合干预组早期凋亡率升高。且联合干预组的早期凋亡率高于 ATRA 组和托法替尼组。ATRA 组晚期凋亡率高于 TNF- $\alpha$  组; 托法替尼和联合干预组晚期凋亡率低于 TNF- $\alpha$  组, 但差异无统计学意义。结果表明, 10  $\mu$ mol/L 的 ATRA 和托法替尼能促进 HFLS-RA 细胞早期凋亡, 联合干预能够显著提升早期凋亡率, 但对晚期凋亡率有抑制作用。



注: A 与对照组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 DMSO 组比较, #  $P < 0.001$ ; 与托法替尼组比较,  $\Delta P < 0.001$ ; B 与对照组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 DMSO 组比较, #  $P < 0.001$ ; 与 IL-1 $\beta$  组比较,  $\Delta P < 0.001$ ; 与托法替尼组比较, ☆  $P < 0.001$ ; C 与对照组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 DMSO 组比较, #  $P < 0.001$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较,  $\Delta P < 0.001$ 。

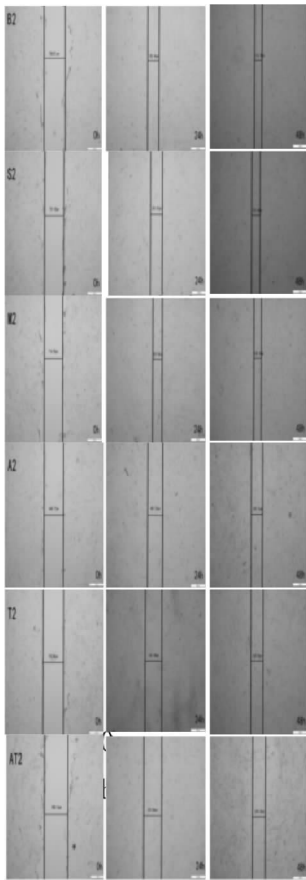
图 1 使用 CCK-8 试剂盒检测各组 HFLS 细胞 (A) 和 HFLS-RA 细胞 (B-C) 的增殖情况

Fig. 1 CCK-8 assay measuring the proliferation of HFLS (A) cells and HFLS-RA (B-C) cells in each group

**2.3 ATRA 及联合干预对 HFLS-RA 细胞血管内皮生长因子和炎症因子的影响** 20 ng/ml TNF- $\alpha$  刺激 48 h 后, 联合干预组 IL-6 浓度显著高于 ATRA 组、托法替尼组和 TNF- $\alpha$  组 (见图 4A)。与 TNF- $\alpha$  组相比, ATRA 组、托法替尼组和联合干预组 IL-1 $\beta$  浓

度差异无统计学意义 (见图 4B)。联合干预组 IL-10 浓度均高于 TNF- $\alpha$  组, 差异有统计学意义 (见图 4C)。ATRA 组、托法替尼组和联合干预组的 IL-17 浓度均低于 TNF- $\alpha$  组, 但差异无统计学意义 (见图 4D)。结果表明, ATRA 和托法替尼对 IL-6 的抑制

作用相当,联合干预可显著提高 IL-6 和 IL-10 的分泌水平。且 ATRA 能增强托法替尼降低 IL-17 水平的功效。



注: B2 对照组; S2: DMSO 组; M2: TNF-α 组; A2: ATRA 组; T2 托法替尼组; AT2: 联合干预组。

图 2 HFLS-RA 细胞在不同时间点的划痕图片

Fig. 2 Pictures of scratches of HFLS-RA cells at different times in each group

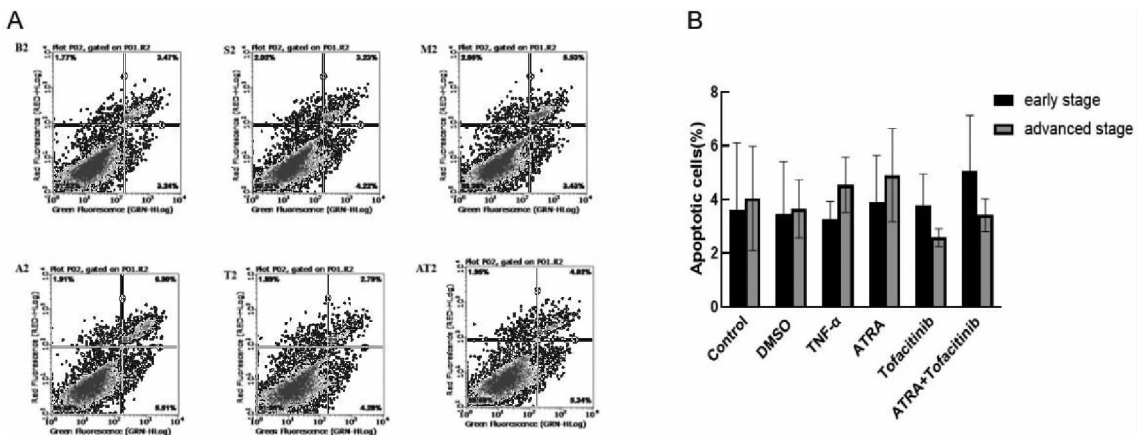
干预 24 h 后, ATRA 组与联合干预组的 VEGF 浓度较对照组、DMSO 组及 TNF-α 组上升, 但联合干预组 VEGF 表达显著低于 ATRA 组(见图 5A)。48 h 后, 两组 VEGF 浓度仍高, 但联合干预组升高幅度更大, 表明托法替尼能抑制 ATRA 诱导的 VEGF 过表达, 但此效应随时间减弱(见图 5A)。

干预 24 h 后, ATRA 组、托法替尼组及联合干预组 MMP-9 浓度低于 TNF-α 组, 但差异无统计意义(见图 5B)。48 h 后, 各组浓度均低于对照组, 联合干预组 MMP-9 浓度相对更低, 但差异不显著。这表明 ATRA 对 MMP-9 的抑制作用与课题组此前动物实验结果不符。结合前期研究, 推测 ATRA 可能通过失活 NF-κB 信号通路抑制 HFLS-RA 细胞中 TNF-α 和 IL-6 分泌。鉴于 ATRA 的治疗作用涉及自噬、凋亡及细胞增殖抑制, 故进一步探究 ATRA 对 NF-κB 通路的影响及其与细胞过程的关系。实验采用不同浓度 ATRA 及 ATRA 联合自噬抑制剂 3-MA 进行。

ATRA 组、3-MA 组和联合干预组的增殖率低于 TNF-α、DMSO 和对照组(见图 6)。表明, ATRA 和 3-MA 可抑制 TNF-α 诱导的 HFLS-RA 细胞过度生长, 且 ATRA 对 HFLS-RA 细胞的抑制作用是 3-MA 无法替代的。

干预 24 h 后, 与 TNF-α 组相比, ATRA 组和 3-MA 组的 IL-6 浓度显著降低。ATRA 和联合干预组的 IL-6 浓度显著低于 3-MA 组(见图 7A)。干预 48 h 后, 与 TNF-α 组相比, ATRA 组、3-MA 组和联合干预组 IL-6 浓度均显著降低。

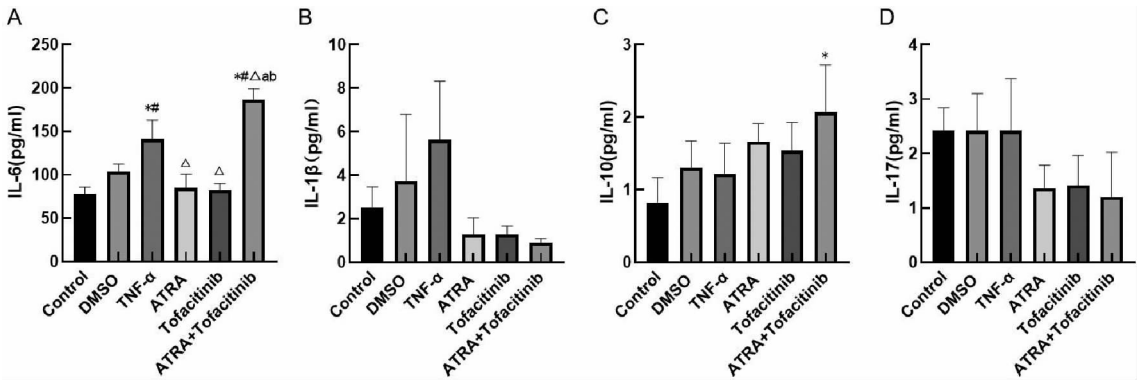
干预 24 h 后, TNF-α 组 VEGF 浓度较对照组和 DMSO 组升高(见图 7B), ATRA 组的 VEGF 浓度高于 3-MA 组和联合干预组。干预 48 h 后, 与对照组和 DMSO 组以及 TNF-α 组相比, ATRA 组的 VEGF 浓



注: B2 对照组; S2: DMSO 组; M2: TNF-α 组; A2: ATRA 组; T2 托法替尼组; AT2: 联合干预组。

图 3 各组 HFLS-RA 细胞 AnnexinV-FITC/PI 参数图

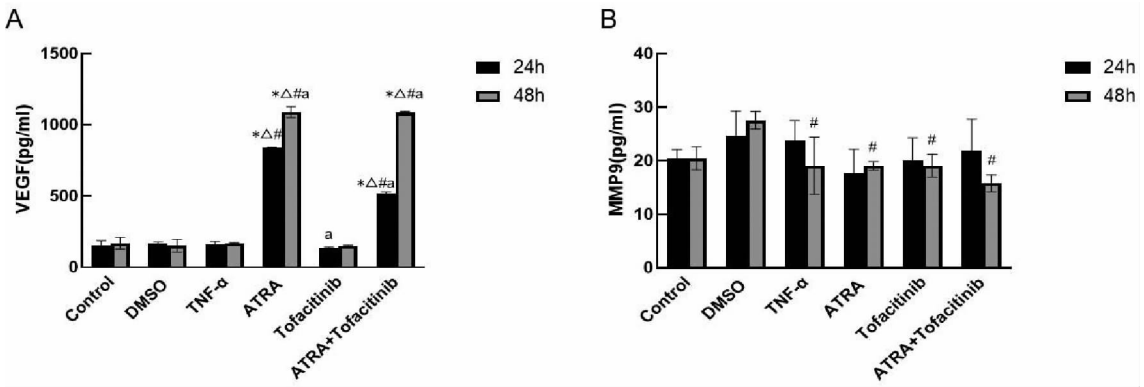
Fig. 3 Annexin V FITC/PI staining was used to determine cell apoptosis(A) and apoptosis rate(B)



注:与对照组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 DMSO 组比较, #  $P < 0.001$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较,  $\Delta P < 0.001$ ; 与 ATRA 组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与托法替尼组比较,  $^b P < 0.001$ 。

图 4 各组 IL-6(A)、IL-1 $\beta$ (B)、IL-10(C)、IL-17(D)的表达水平(pg/ml)

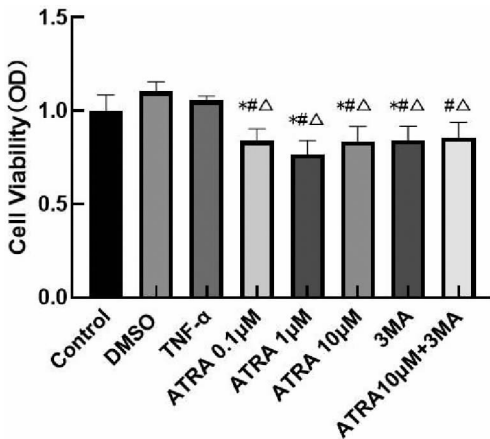
Fig. 4 The concentrations (pg/ml) of cytokines including IL-6(A), IL-1 $\beta$ (B), IL-10(C) and IL-17(D) in ATRA-experiment



注:与对照组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 DMSO 组比较, #  $P < 0.001$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较,  $\Delta P < 0.001$ ; 与 ATRA 组比较,  $^a P < 0.001$ 。

图 5 各组 VEGF(A)和 MMP9 (B)的表达水平 (pg/ml)

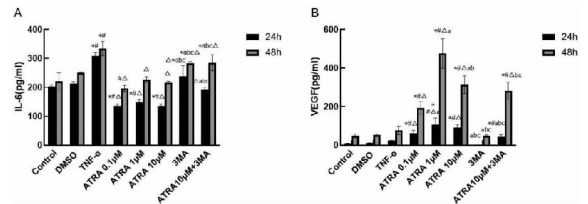
Fig. 5 The concentrations (pg/ml) of VEGF (A) and MMP9(B)



注:与对照组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 DMSO 组比较, #  $P < 0.001$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较,  $\Delta P < 0.001$ 。

图 6 使用 CCK-8 试剂盒检测各组 HFLS-RA 细胞的增殖情况

Fig. 6 CCK-8 assay measuring the proliferation of HFLS-RA cells



注:与对照组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 DMSO 组比较, #  $P < 0.001$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较,  $\Delta P < 0.001$ ; 与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组比较,  $^b P < 0.001$ ; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组比较,  $^c P < 0.001$ 。

图 7 各组 IL-6(A)和 VEGF(B)在干预 24h 和 48h 的表达水平 (pg/ml)

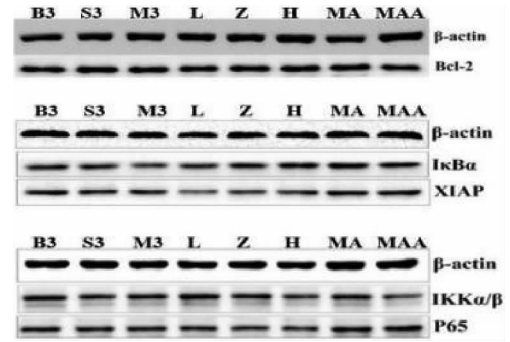
Fig. 7 The concentrations (pg/ml) of cytokines including IL-6 (A) and VEGF (B) in ATRA-experiment

度显著升高,而 3-MA 组的 VEGF 浓度明显低于 10 $\mu\text{mol/L}$  ATRA 组和联合干预组。

**2.4 ATRA 对 HFLS-RA 细胞 NF-κB 通路相关蛋白的影响** 评估各组 HFLS-RA 细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2、XIAP、IκBα、IKKα/β 和 P65 的表达水平 (见图 8 和图 9)。对于凋亡相关蛋白 Bcl-2,与 TNF-α 组相比,3-MA 组 Bcl-2 表达上调;0.1 μmol/L 和 10 μmol/L ATRA 组 Bcl-2 水平均下调,联合干预组表达最低 (见图 9A),提示 TNF-α 下调 Bcl-2 的表达被 3-MA 逆转,但 3-MA 并未抑制 ATRA 下调 Bcl-2 的作用,ATRA 协同 3-MA 促进细胞凋亡。

NF-κB 通路相关蛋白方面,0.1 μmol/L 和 1 μmol/L ATRA 组 XIAP 表达低于 TNF-α 组,3-MA 及联合干预组高于 TNF-α 组,且显著高于 ATRA 各组 (见图 9B)。与 TNF-α 组相比,ATRA 组、3-MA 组和联合干预组中 IκBα 的表达水平显著升高。与 0.1 μmol/L ATRA 组相比,10 μmol/L ATRA 组 IκBα 的表达水平显著升高,但联合干预组使 IκBα 上调水平降低,提示 IκBα 表达在 ATRA、3-MA 及联合干预组中均升高,且随 ATRA 浓度增加而升高 (见图 9C)。与 TNF-α 组相比,0.1 μmol/L ATRA 组 IKKα/β 表达水平显著升高,10 μmol/L ATRA 组 IKKα/β 表达

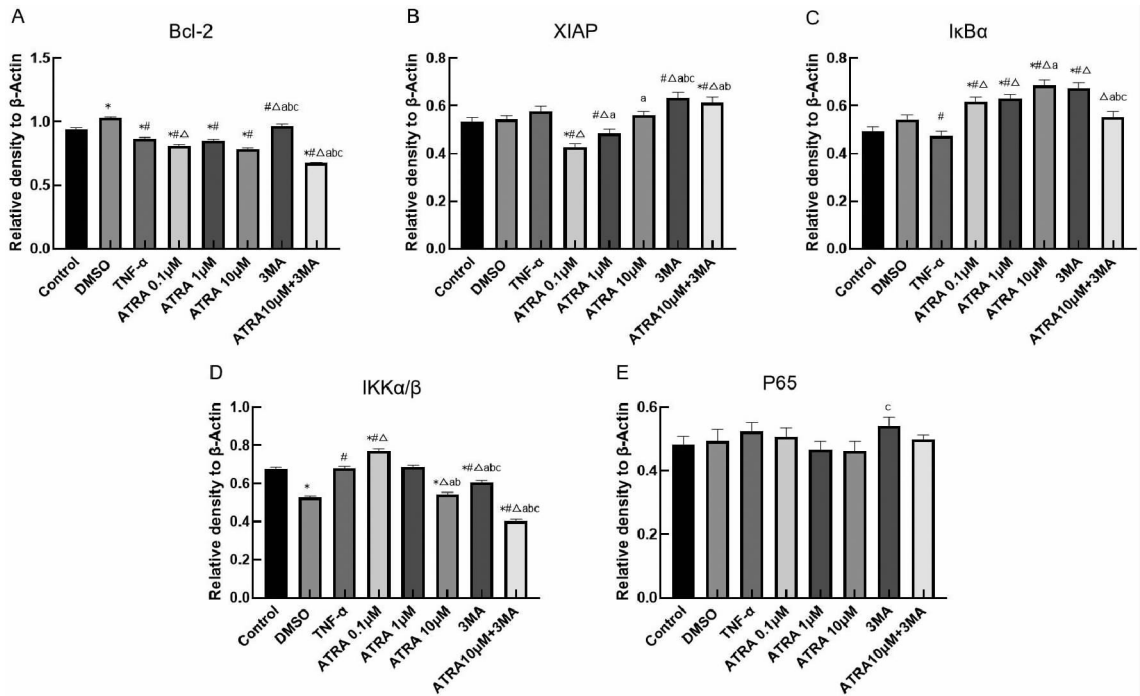
水平显著降低,提示 IKKα/β 表达随 ATRA 浓度变化呈先升后降趋势 (见图 9D)。此外,所有干预组的 P65 表达均低于 3-MA 干预组,且显著高于 0.1 μmol/L ATRA 干预组 (见图 9E),提示 ATRA 下调 P65 水平,且呈浓度依赖性。



注: B3: 对照组; S3: DMSO 组; M3: TNF-α 组; L: 0.1 μmol/L ATRA 组; Z: 1 μmol/L ATRA 组; H: 10 μmol/L ATRA 组; MA: 3-MA 组; MAA: 联合干预组。

**图 8** HFLS-RA 细胞 NF-κB 通路相关蛋白表达情况

**Fig. 8** Effect of different interventions on NF-κB/P65/IκB signaling pathway



注:与对照组比较,\* $P < 0.001$ ;与 DMSO 组比较,# $P < 0.001$ ;与 TNF-α 组比较,△ $P < 0.001$ ;与 0.1 μmol/L ATRA 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.001$ ;与 1 μmol/L ATRA 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.001$ ;与 10 μmol/L ATRA 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.001$ 。

**图 9** HFLS-RA 细胞 NF-κB 通路相关蛋白 Bcl-2 (A)、XIAP (B)、IκBα (C)、IKKα/β (D) 和 P65 (E) 表达水平

**Fig. 9** The expression levels of NF-κB pathway-related proteins in HFLS-RA cells, including Bcl-2 (A), XIAP (B), IκBα (C), IKKα/β (D), and P65 (E)

### 3 讨论

促炎因子 TNF-α 和 IL-1β 在 RA 的发病和进

展中至关重要,可刺激 HFLS-RA 细胞过度增殖。其中,20 ng/ml IL-1β 刺激后细胞增殖率上升更显著,但联合干预效果与 TNF-α 刺激一致。此外,HFLS-

RA 细胞通过迁移和侵袭骨与软骨,导致骨关节的损害<sup>[2]</sup>。本研究中,模型对照组细胞迁移能力增强,而 ATRA 能抑制细胞迁移,与前期研究结果相符。托法替尼干预组效果优于 ATRA 组,联合干预组效果最显著,且抑制作用随时间增强。

托法替尼通过抑制 JAK 通路间接抑制 IL-10 和 IL-6 的分泌<sup>[20]</sup>。研究发现,ATRA 和托法替尼对 IL-6 的抑制作用相当,但联合使用可显著提高 IL-6 和 IL-10 水平。IL-17 家族是促进 RA 的炎症网络的中心部分<sup>[21]</sup>,RA 患者 IL-17 水平显著高于对照人群<sup>[22]</sup>。早期干预中,托法替尼可显著降低 IL-17 分泌<sup>[20]</sup>,本研究中虽不显著。但联合干预进一步降低了 IL-17 分泌,提示 ATRA 可能增强托法替尼降低 IL-17 水平的能力。

许多研究都表明抑制 VEGF 的表达可缓解 RA。本研究发现,ATRA 上调 VEGF 水平,但联合干预能有效降低其表达。提示托法替尼可抑制 ATRA 诱导的 VEGF 过度上调,但这种效应在 48 h 后消失。考虑到 VEGF 在 RA 中的表达受多因素影响,ATRA 在 RA 中上调 VEGF 与促进血管生成是否是完全的正向关系还有待进一步研究。此外,基质金属蛋白酶 MMPs 家族在 RA 的进展中起重要作用,其过度分泌会加速骨质流失<sup>[8]</sup>。本研究表明,ATRA 和托法替尼单独对 MMP-9 的抑制作用随时间减弱,但联合干预在 48 h 时对 MMP-9 的抑制作用强于 24 h 干预组。

HFLS-RA 细胞抵抗细胞凋亡导致滑膜持续增生并迁移侵袭邻近关节<sup>[9]</sup>,导致损伤加剧。流式细胞术显示,10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 和托法替尼均能促进 HFLS-RA 细胞早期凋亡,联合干预时早期凋亡率最高,ATRA 及联合干预对 HFLS-RA 细胞总凋亡率的影响基本与对早期凋亡率的影响一致,可以认为 ATRA 在早期和晚期都能增强托法替尼促进细胞凋亡的能力。

通过对 ATRA 诱导的 HFLS-RA 细胞高水平自噬凋亡与 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路关系的研究发现,不同浓度的 ATRA 和 3-MA 均可抑制 HFLS-RA 细胞增殖并下调 IL-6 水平。两者作用相互独立。此外,ATRA 上调 VEGF 表达,而 3-MA 下调 VEGF 表达,从而减弱 ATRA 的影响,这些发现与 Fang 等<sup>[23]</sup>的研究一致,表明 3-MA 可以逆转 ATRA 对细胞增殖、凋亡和分化的影响。

研究表明,诱导自噬能拮抗 RA 中 HFLS-RA 细胞的凋亡,且高水平自噬常伴随 AKT/IKK/NFKBIA/NF- $\kappa\text{B}$  信号通路激活。HFLS-RA 高表达导致激酶上调和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加,从而抑制 HFLS-RA 细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本研究发现,0.1  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 均下调 Bcl-2 的表达,且 3-MA 对

Bcl-2 表达的促进作用被 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 逆转,提示 ATRA 协同 3-MA 能促进细胞凋亡。

对 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路相关蛋白的研究显示,TNF- $\alpha$  可下调 I $\kappa\text{B}\alpha$  的表达;而 ATRA 和 3-MA 导致其上调,但联合干预可降低其上调的程度,与 Rao 等研究结果一致<sup>[25]</sup>。不同浓度的 ATRA 下调 P65 的水平,呈浓度依赖性,与前期动物实验结果一致。ATRA 干预后,HFLS-RA 细胞中 XIAP 表达下降,与自噬增强时 XIAP 下调的相关性研究相悖。RA 患者 HFLS-RA 细胞高表达 Fas 抗原后,多种激酶(ERK、PI3K、JNK)信号通路被激活,导致抑制 HFLS-RA 细胞凋亡的抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加。在 TNF- $\alpha$  诱导下,Bcl-2 表达上调,但 3-MA 可以逆转此效应。虽然不同浓度 ATRA 均下调 Bcl-2 表达,但 3-MA 下调 Bcl-2 的表达被 10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 逆转,提示 ATRA 与自噬抑制剂联合时,ATRA 介导的 Bcl-2 下调,仍促进细胞凋亡。此外,XIAP 表达在低浓度 ATRA 下调,在高浓度 ATRA 时不受影响。而 3-MA 或两者联合治疗后上调,此变化与 NF- $\kappa\text{B}$  通路中涉及的其他蛋白质不一致。

在 ATRA 和托法替尼联合作用的研究中,我们假设其能通过抑制 HFLS-RA 细胞的增殖和迁移、促进细胞凋亡、减少促炎因子分泌、增加抗炎因子分泌来缓解 RA 滑膜炎。研究发现,TNF- $\alpha$  激活 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路后,HFLS-RA 细胞的自噬水平升高。10  $\mu\text{mol/L}$  ATRA 可下调 IL-6、Bcl-2 及 IKK $\alpha/\beta$ 、P65,上调 I $\kappa\text{B}\alpha$ ,抑制 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路。自噬抑制剂 3-MA 虽抑制 ATRA 诱导的 HFLS-RA 细胞的高自噬水平,但不影响 ATRA 对 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的作用;且通过下调 Bcl-2 水平促进细胞凋亡。这表明 ATRA 对 HFLS-RA 细胞的影响主要通过 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路,与自噬水平无直接关联。结合课题组前期研究发现 ATRA 可明显诱导 HFLS-RA 细胞的自噬,上调自噬相关蛋白 LC3A/B、Beclin-1 的表达水平<sup>[17]</sup>进一步验证该机制。本研究为探索 ATRA 联合自噬调节剂在 RA 治疗中的潜在价值提供了实验依据,但需进一步体内实验和临床研究验证其安全性和有效性。

**利益冲突声明** 本研究不存在任何利益冲突

#### 参考文献

- [1] Di Matteo A, Bathon JM, Emery P. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2023, 402(10416): 2019-2033.
- [2] Wu D, Luo YH, Li T, et al. Systemic complications of rheumatoid arthritis: Focus on pathogenesis and treatment [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 1051082.

- [16] 姚亚萍,付国华,顾丽华,等. 犬伤门诊疫苗全程冷链温度监测结果分析[J]. 预防医学,2018,30(11):1169-1171.  
Yao YP, Fu GH, Gu LH, et al. Analysis of cold chain temperature monitoring results for canine injury outpatient vaccines throughout the whole process[J]. Journal of Preventive Medicine, 2018, 30(11): 1169-1171. (In Chinese)
- [17] 梁海峰,刘禹,张萍. 太原市疫苗冷链管理存在的问题及建议[J]. 实用医技杂志,2022,29(2):210-213.  
Liang HF, Liu Y, Zhang P. Problems and suggestions on vaccine cold chain management in Taiyuan[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2022, 29(2): 210-213. (In Chinese)
- [18] 丁小磊,胡冉,方蕾. 江苏省疫苗冷链设备和监测系统建设现状与评价[J]. 江苏预防医学,2021,32(5):639-641.  
Ding XL, Hu R, Fang L. Status and evaluation of vaccine cold chain equipment and monitoring system construction in Jiangsu Province[J]. Jiangsu Journal of Preventive Medicine, 2021, 32(5): 639-641. (In Chinese)

收稿日期:2025-02-06

(上接第 1885 页)

- [3] Venetsanopoulou AI, Alamanos Y, Voulgari PV, et al. Epidemiology of rheumatoid arthritis: genetic and environmental influences[J]. Expert Review of Clinical Immunology, 2022, 18(9): 923-931.
- [4] Díaz-González F, Hernández-Hernández MV. Rheumatoid arthritis[J]. Medicina Clinica, 2023, 161(12): 533-542.
- [5] Berry SPDG, Dossou C, Kashif A, et al. The role of IL-17 and anti-IL-17 agents in the immunopathogenesis and management of autoimmune and inflammatory diseases [J]. International Immunopharmacology, 2022, 102: 108402.
- [6] Frade-Sosa B, Sanmartí R. Neutrophils, neutrophil extracellular traps, and rheumatoid arthritis: An updated review for clinicians [J]. Reumatologia Clinica, 2023, 19(9): 515-526.
- [7] Anjiki K, Hayashi S, Ikuta K, et al. JAK inhibitors inhibit angiogenesis by reducing VEGF production from rheumatoid arthritis-derived fibroblast-like synoviocytes [J]. Clinical Rheumatology, 2024, 43(11): 3525-3536.
- [8] Malemud CJ. Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis[J]. Clinica Chimica Acta, 2007, 375(1-2): 10-19.
- [9] 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 Research and Therapy, 2019, 21(1): 153.
- [10] Korb-Pap A, Bertrand J, Sherwood J, et al. Stable activation of fibroblasts in rheumatic arthritis - causes and Consequences[J]. Rheumatology (Oxford, England), 2016, 55(suppl 2): ii64-ii67.
- [11] Jang S, Kwon EJ, Lee JJ. Rheumatoid arthritis: pathogenic roles of diverse immune cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(2): 905.
- [12] Brown G. Retinoic acid receptor regulation of decision-making for cell differentiation [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2023, 11: 1182204.
- [13] Dembitz V, Lalic H, Tomic B, et al. All-trans retinoic acid induces differentiation in primary acute myeloid leukemia blasts carrying an inversion of chromosome 16[J]. International Journal of Hematology, 2022, 115(1): 43-53.
- [14] Kirchmeyer M, Koufany M, Sebillaud S, et al. All-trans retinoic acid suppresses interleukin-6 expression in interleukin-1-stimulated synovial fibroblasts by inhibition of ERK1/2 pathway independently of RAR activation [J]. Arthritis Research and Therapy, 2008, 10(6): R141.
- [15] Philippou E, Nikiphorou E. Are we really what we eat? Nutrition and its role in the onset of rheumatoid arthritis[J]. Autoimmunity Reviews, 2018, 17(11): 1074-1077.
- [16] Zhang YQ, Luo YT, Shi JC, et al. All-trans retinoic acid alleviates collagen-induced arthritis and promotes intestinal homeostasis[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 1811.
- [17] Cai QY, Li YL, Lyu F, et al. Effects of All-Trans retinoic acid on the optimization of synovial explant induced by tumor necrosis factor alpha[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2020, 66(4): 300-310.
- [18] Zhang M, Hu WH, Cai CH, et al. Advanced application of stimuli-responsive drug delivery system for inflammatory arthritis treatment[J]. Materials Today. Bio, 2022, 14: 100223.
- [19] Panchal NK, Prince sabina E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): A current insight into its molecular mechanism eliciting organ toxicities[J]. Food and Chemical Toxicology, 2023, 172: 113598.
- [20] Harrington R, Harkins P, Conway R. Janus kinase inhibitors in rheumatoid arthritis: an update on the efficacy and safety of tofacitinib, baricitinib and upadacitinib[J]. J Clin Med, 2023, 12(20): 6690.
- [21] Chen TF, Li SH, Lian DY, et al. Integrated network pharmacology and experimental approach to investigate the protective effect of Jin Gu Lian capsule on rheumatoid arthritis by inhibiting inflammation via IL-17/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2023, 17: 3723-3748.
- [22] Lee YH, Bae SC. Associations between circulating IL-17 levels and rheumatoid arthritis and between IL-17 gene polymorphisms and disease susceptibility: a meta-analysis [J]. Postgraduate Medical Journal, 2017, 93(1102): 465-471.
- [23] Fang SY, Hu CQ, Xu L, et al. All-trans-retinoic acid inhibits the malignant behaviors of hepatocarcinoma cells by regulating autophagy[J]. American Journal of Translational Research, 2020, 12(10): 6793-6810.
- [24] Aihaiti YRX, Song cai Y, Tuerhong X, et al. Therapeutic effects of naringin in rheumatoid arthritis: network pharmacology and experimental validation[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 672054.
- [25] Rao JH, Qian XF, Wang P, et al. All-trans retinoic acid preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury by inhibiting the nuclear factor kappa B signaling pathway[J]. Journal of Surgical Research, 2013, 180(2): e99-e106.

收稿日期:2025-01-17