只需注射1次。这些优势决定了糖尿病患者使用地特胰岛素时依从性高、耐受性好,地特胰岛素即将成为临床治疗糖尿病的“新武器”。

参考文献:

[1] 中华医学会糖尿病分会. 中国2型糖尿病防治指南:2007年版[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(18):1227-1245.

[2] Philis-Tsimikas A, Charpentier G, Clauson P, *et al*. Comparison of once-daily insulin detemir with NPH insulin added to a regimen of oral antidiabetic drugs in poorly controlled type 2 diabetes[J]. Clin Ther, 2006, 28(10):1569-1581.

[3] Hermansen K, Davies M, Derezinski T, *et al*. A 26-week, randomized, parallel, treat-to-target trial comparing insulin detemir with NPH insulin as add on therapy to oral glucose-lowering drugs in insulin-naive people with 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2006, 29(6):1269-1274.

[4] Haak T, Tiengo A, Draeger E, *et al*. Lower within-subject variability of fasting blood glucose and reduced weight gain with insulin detemir compared to NPH insulin in patients with type 2 diabetes[J]. Deabetes Obes Metab, 2005, 7(1):56-64.

[5] 廖勤, 梁泽容, 屈春梅. 两种基础胰岛素类似物——地特胰岛素与甘精胰岛素治疗2型糖尿病临床效果比较[J]. 实用医院临床杂志, 2010, 7(4):42-44.

[6] Blonde L, Merilainen M, Karwe V, *et al*. Patient-directed titration for achieving glycaemic goals using a once-daily basal insulin analogue:an assessment of two different fasting plasma glucose targets-the TITRATE study[J]. Diabetes Obes Metab, 2009, 11(6):623-631.

[7] 杨文英. 糖尿病治疗新武器,胰岛素家族的生力军[N]. 中国医学论坛报, 2008-9-25.

[8] 高妍, 张俊清. 新型长效胰岛素——地特胰岛素减少体重增加[N]. 中国医学论坛报, 2009-01-15(1140).

(收稿:2010-05-10 修回:2010-07-19)

(编辑 王小宴)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)22-2452-03

丹参诱导类风湿关节炎患者成纤维样滑膜细胞中Fas/FasL的表达

刘青松[1,2],朱兴春[2],邢 艳[1,2,3],蒋 红[1,3],蔡 燕[1,2],雷佳红[1],赵明才[2,3],杨明辉[1,2,3],唐 中[1,2,3],袁国华[1,3]

(637000 四川南充,川北医学院附属医院:风湿免疫研究所[1],检验科[2],风湿与感染免疫实验室[3])

【摘要】 目的 观察丹参对类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)患者成纤维样滑膜细胞中Fas/FasL mRNA表达的影响。**方法** RA患者关节滑液经原代培养,获取成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes,FLSs),分别用终浓度为0、0.2 mg/ml和0.4 mg/ml的丹参作用24 h后,提取总RNA并逆转录成cDNA保存。随机选取正常人外周血,通过分离单个核细胞提取总RNA并逆转录成cDNA保存作为阳性对照。分别采用RT-PCR和SYBR Green适时荧光定量PCR方法检测Fas/FasL mRNA的表达。**结果** RT-PCR结果显示,FasL只在外周血标本上有表达,而在各浓度处理的RA FLSs没有检测到;Fas无论在外周血还是不同浓度处理的RA FLSs上均有表达。定量PCR结果显示,Fas的表达量随丹参浓度增加而增加,并且在丹参浓度为0.4 mg/ml时具有统计学差异($P<0.05$)。Fas mRNA的表达与相应浓度下RA FLSs的凋亡率存在相关性($r=0.998$, $P<0.05$)。**结论** 丹参可体外诱导RA患者成纤维样滑膜细胞Fas mRNA表达上调;未检测到FasL mRNA在RA患者FLSs中的表达。Fas mRNA的上调可能与丹参诱导RA FLSs凋亡有关。

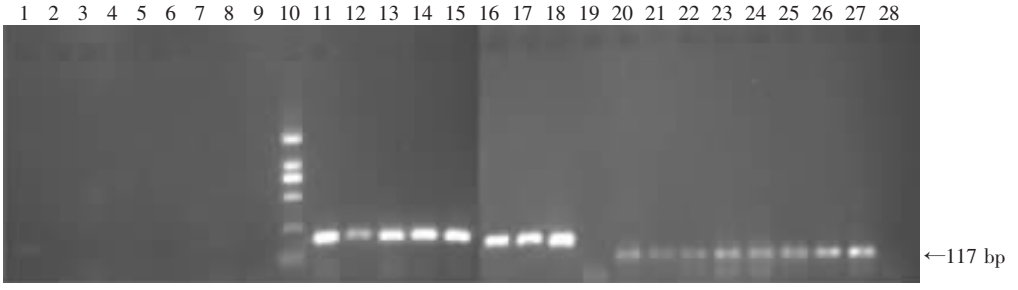
【关键词】 丹参;类风湿关节炎;成纤维样滑膜细胞;凋亡;Fas;FasL

【中图法分类号】 R282.71;R285.5;R593.22 **【文献标志码】** A

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种常见的以小关节受累为主要表现的自身免疫性疾病。RA的发病与细胞凋亡异常密切相关,其滑膜细胞过渡增生源于滑膜细胞凋亡的相对不足,因此诱导滑膜细胞凋亡对治疗RA有积极意义。成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes,FLSs)是直接和关节腔接触的滑膜内存组织的重要组成成分,通过分泌各种蛋白酶类、花生四烯酸代谢产物及其他细胞因子,可以不依靠免疫系统对软骨进行侵蚀,在关节破坏过程中发挥着重要作用[1]。丹参为中国的传统中药,具有通经活络功效。近年来,已有利用丹参治疗RA的报道,并取得满意的效果[2,3]。我们前期研究表明,丹参可促进滑膜细胞的凋亡[4],但对于其机制还不了解。为此,我们在前期的研究基础上,研究不同浓度丹参作用后的RA FLSs Fas/FasL mRNA表达,探讨丹参诱导RA FLSs凋亡的可能途径。

【基金项目】 四川省卫生厅科研项目(060085)

【通信作者】 唐 中,E-mail:tz5331@163.com



1-9:FasL;10:DNA标准(DL 2000);11-19:β-actin;20-28:Fas;1,2,11,12,20,21:阳性对照;3,4,13,14,22,23:0 mg/ml;5,6,15,16,24,25:0.2 mg/ml;7,8,17,18,26,27:0.4 mg/ml;9,19,28:空白对照

图1 外周血和不同浓度丹参作用后Fas和FasL mRNA在FLSs中的表达

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2009年3月至2010年4月在川北医学院附属医院类风湿科就诊的、有膝关节积液的RA患者5例,其中男性1例,女性4例,年龄41~72岁,平均60岁。所有RA患者符合美国风湿病学会1987年的RA诊断标准。滑膜细胞分离于患者膝关节腔积液,经体外培养获得。

1.2 仪器与试剂

PCR仪(Bio-Rad Mycycler),定量PCR仪(ABI 7900^{HT}),倒置显微镜(OLYMPUS IX71),DMEM培养基(Gibco BRL公司),胎牛血清(HyClone),胰蛋白酶(Amreso),PCR试剂(天根,2×*Taq* PCR Master Mix),定量PCR试剂盒(ABGAB),注射用丹参(冻干,哈药集团中药二厂,产品批号D90313)。

1.3 方法

1.3.1 滑膜细胞的分离与培养 采用膝关节液中的游离滑膜细胞进行培养。具体方法参见文献[5]。

1.3.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 具体方法参见文献[5]。

1.3.3 总RNA提取和逆转录 用Trizol试剂,按照说明书所述程序提取FLSs总RNA。使用分光光度计进行RNA定量及纯度鉴定,采用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其质量。采用Bio-BRK Rever Tra Ace以Random Primer为引物合成cDNA。

1.3.4 RT-PCR Fas、FasL和β-actin引物由上海生工公司合成,序列及扩增长度见表1。25 μl反应体系中加2×Master Mix 12.5 μl,cDNA 2 μl,上下游引物各0.5 μl(10 pmol/L),反应条件:94 ℃ 4 min预变性,95 ℃ 30 s,51 ℃ 30 s,72 ℃40 s,40个循环,72 ℃终止平衡5 min。PCR扩增产物在1%琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

表1 RT-PCR引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
Fas	上游:CCTCCCATCCTCCTGACCACCG	117
	下游:CTGGTTGCCTTGGTAGGATTG	
FasL	上游:TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	182
	下游:TCACTCGTAAACCGCTTCCCTC	
β-actin	上游:CCTGTTAAATGGGCCACTTTC	194
	下游:AGCACTGTGTTGGCGTACAG	

1.3.5 Q-PCR 采用SYBR Green实时荧光定量技术相对法进行目的基因的检测,引物同1.3.3。反应体系为20 μl,取样本cDNA 1.5 μl、上游和下游引物各0.5 μl,加入试剂盒其他成分。反应条件:50 ℃ 2 min,1个循环;94 ℃ 5 min,1个循环;94 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40个循环;用ABI 7900^{HT}荧光PCR仪检测,全程采集荧光。

1.4 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示。采用SPSS 10.0统计软件作explore检测对数据行正态性分析和方差齐性分析;采用单因数方差分析,用最小显著差法作两两比较;相关性分析采用Pearson相关性分析。

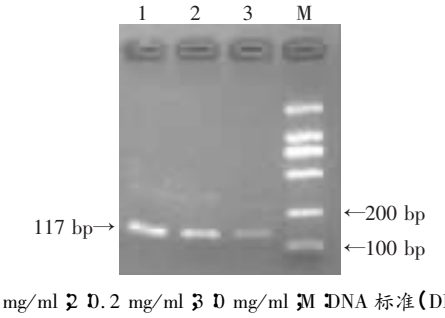
2 结果

2.1 Fas和FasL mRNA在FLSs中的表达

我们采用RT-PCR方法检测了Fas和FasL mRNA在FLSs中的表达,采用外周血单个核细胞cDNA作为阳性对照。结果显示,FasL mRNA在FLSs中没有检测到PCR扩增产物,而Fas mRNA在FLSs中有表达,并且有随丹参浓度增加而表达增加趋势(图1)。

2.2 丹参诱导RA FLSs Fas mRNA表达的影响

根据RT-PCR结果,我们采用定量PCR检测不同浓度丹参对RA FLSs Fas mRNA表达的影响,结果显示在丹参浓度分别为0、0.2 mg/ml和0.4 mg/ml时,Fas mRNA的相对表达量分别为-(3.20±0.16)、-(2.88±0.28)和-(2.03±0.64),并在丹参浓度为0.4 mg/ml时具有统计学差异($P<0.01$,图2)。



1:0.4 mg/ml;2:0.2 mg/ml;3:0 mg/ml;M:DNA标准(DL 2000)

图2 RT-PCR检测不同浓度丹参对Fas mRNA表达的影响

2.3 Fas表达与RA FLSs凋亡关系

取浓度为0、0.2 mg/ml和0.4 mg/ml丹参作用后的细胞凋亡结果[0 mg/ml (3.74±2.81)%，0.2 mg/ml (6.29±2.40)%，0.4 mg/ml (11.31±3.59)%][5]和Fas mRNA表达结果进行分析，发现在此浓度范围内，细胞凋亡率随Fas表达增加而增加($r=0.998$，$P<0.05$)。

3 讨论

正常人关节滑膜主要生理功能是产生滑液、润滑关节及供给关节营养，并排除滑液及脱落的软骨碎屑等。RA病变时，大量炎性细胞在滑膜的浸润和渗出，由此导致的滑膜增生、血管翳形成，最终造成关节软骨破坏。越来越多研究表明引起RA关节膜组织过度增生导致关节畸形的基本原因可能是由于滑膜细胞凋亡障碍导致滑膜组织内细胞的增殖和死亡间的平衡失调而引起的[6,7]。FLSs作为RA滑膜细胞中最主要的一种，它的凋亡不足与RA滑膜增生密切相关，在RA发病中起重要作用。FLSs异常增生类似于局限性侵袭生长的肿瘤，对关节软骨、骨可造成进行性破坏，最终导致关节畸形和不同程度的功能障碍。

丹参系唇形科多年生草本植物，为我国代表性的活血化淤中药，其已知的药效成分有丹参酮、丹参酚和丹参素等[8]。顾健等[9]报道，丹参可上调Ⅱ型胶原诱导的类风湿关节炎(CIA)大鼠血清MMP-9表达，并减轻了关节症状。这证明了丹参在RA治疗上的潜在作用。研究已证明丹参对肿瘤细胞具有促凋亡作用[10]，并且目前认为RA关节软骨和骨组织的损害主要是由于滑膜细胞的活化和增生引起，RA滑膜组织表现为增生性侵蚀性生长，它的生长及病理学行为在许多方面类似于肿瘤细胞的特性，因此推测丹参可能通过类似机制抑制RA滑膜细胞的生长。我们前期研究发现，丹参可诱导滑膜细胞发生凋亡样的形态学改变，并且在高剂量(50 mg/ml)丹参作用后，采用ELISA方法检测其培养上清，发现TNF-α表达显著降低[11]。

本研究根据前期实验结果和临床丹参用量，调整了丹参作用的浓度范围，同时根据本实验形态学结果，选取0、0.2、0.4 mg/ml丹参作用RA FLSs，采用流式细胞术进行细胞凋亡检测，结果发现，虽然0.2 mg/ml丹参作用的细胞相对对照组发生凋亡的情况变化不明显，但当丹参浓度增加到0.4 mg/ml后，其凋亡率显著增加。充分说明丹参具有诱导RA FLSs凋亡的作用。

Fas又称Apo21/CD95，是一种在多种细胞系中均存在的细胞表面受体分子，FasL为其配体，同属TNF家庭的跨膜糖蛋白。Fas与FasL结合，是Fas在体内发挥作用的唯一途径，并可诱导表达Fas的细胞发生凋亡[12]。虽然我们在本实验中没有发现FasL在RA FLSs中表达，但发现丹参可上调RA FLSs中Fas mRNA表达。在丹参浓度为0.2 mg/ml时，Fas的表达变化不具有统计学意义，当丹参浓度达到0.4 mg/ml及以上，其表达显著增加，这与流式分析细胞凋亡结果有着很高的相关性($r=0.998$，$P<0.01$)。由此可见丹参诱导的RA FLSs凋亡与高表达的Fas相关。

参考文献：

[1] Yamanishi Y, Firestein G S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2001, 27 (2): 355-371.

[2] 何维夏. 复方丹参注射液治疗类风湿性关节炎25例[J]. 中国中医急症, 2005, 14(8): 746.

[3] 苏建明, 陆双军, 纪伟. 丹参黄芪注射液治疗类风湿性关节炎42例总结[J]. 湖南中医杂志, 2002, 18(5): 9, 14.

[4] 刘青松, 朱兴春, 蒋红, 等. 丹参诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞bcl-2、bax基因表达研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(21): 2620-2622.

[5] 蒋红, 刘青松, 凡瞿明, 等. 丹参体外抑制类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的研究[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2010, 4(4): 425-429.

[6] Cha H S, Bae E K, Ahn J K, *et al*. Slug suppression induces apoptosis *via* Puma transactivation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes treated with hydrogen peroxide [J]. Exp Mol Med, 2010, 42 (6): 428-436.

[7] Garcia S, Liz M, Gomez-Reino J J, *et al*. Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(1): R33.

[8] 柴瑞震. 丹参的药理研究近况[J]. 中国中医药科技, 2003, 10 (6): 390-392.

[9] 顾健, 韩乔燕, 薛永骥, 等. 丹参影响CIA大鼠血清MMP-9水平与易栓关系[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(10): 50-52.

[10] 何立丽, 孙桂芝. 中药在诱导肿瘤细胞凋亡方面的机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1818-1820.

[11] 刘青松, 蒋红, 唐中. 丹参对类风湿关节炎患者滑膜细胞肿瘤坏死因子α表达的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2009, 3(8): 1354-1358.

[12] 王晓园, 许西琳, 关键, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血清Fas/Apo-1及TNF-α与细胞凋亡的相关性研究[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(10): 1294-1295.

(收稿 2010-06-04 修回 2010-08-11)

(编辑 张 维)