DOI:10.16016/j.1000-5404.201503053

论著

脂氧素抑制关节炎大鼠滑膜及IL-1β刺激的RSC-364细胞中VEGF的表达

周 丹[1],代 洁[2],艾 青[3],林 玲[4],张 力[4] (408000 重庆,重庆市涪陵中心医院病理科[1];402160 重庆,重庆文理学院校医院[2];400016 重庆,重庆医科大学基础医学部:生理学教研室[3],病理生理学教研室[4])

[摘要] **目的** 探讨在体内外脂氧素 A_4(lipoxin A_4, LXA_4)对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响及其可能机制。**方法** SD雄性大鼠(6~8周龄,200~250 g,32只)分为正常对照组、BML-111单独处理组(BML-111)、佐剂诱导的关节炎(adjuvant arthritis, AA)模型组及BML-111干预组(AA+BML-111),每组8只。AA组通过左后足跖部注射弗氏完全佐剂诱导建立AA动物模型,AA+BML-111组于造模后每日腹腔注入LXA_4受体激动剂BML-111。28 d后,取病变关节滑膜组织,匀浆后ELISA法检测VEGF水平,免疫印迹法检测VEGF受体2(VEGFR2)总蛋白水平及磷酸化水平。体外培养RSC-364大鼠成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS),采用白细胞介素-1β(interleukin 1β, IL-1β)诱导VEGF表达,加入空白溶剂或不同浓度LXA_4(1~100 nmol/L)共同孵育24 h后,ELISA法检测上清液中VEGF水平,免疫印迹法检测P38、JNK和ERK的总蛋白水平及磷酸化水平,免疫印迹法检测缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factors 1α, HIF-1α)蛋白含量。**结果** 在AA大鼠滑膜组织,BML-111明显降低VEGF水平($P<0.01$),对VEGFR2表达无明显影响,但显著降低磷酸化VEGFR2的水平($P<0.01$)。在FLS细胞,LXA_4剂量依赖性抑制IL-1β诱导的VEGF表达($P<0.01$),显著降低P38($P<0.05$)、JNK和ERK磷酸化水平($P<0.01$),下调HIF-1α含量($P<0.01$)。**结论** LXA_4可能通过抑制MAPK、HIF-1α下调RSC-364细胞中IL-1β诱导的VEGF表达,影响AA大鼠模型中血管新生和血管翳的形成。

[关键词] 类风湿性关节炎;佐剂诱导的关节炎;血管内皮生长因子;血管新生
[中图法分类号] R322.72; R392.3; R977.6 [文献标志码] A

Lipoxin suppresses VEGF expression in synovium of adjuvant arthritis rats and in interleukin 1β-stimulated RSC-364 cells

Zhou Dan[1], Dai Jie[2], Ai Qing[3], Lin Ling[4], Zhang Li[4] ([1]Department of Pathology Fuling Centeral Hospital, Chongqing, 408000; [2]School Infirmary, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing, 402160; [3]Department of Physiology, [4]Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of lipoxin A_4 (LXA_4) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) *in vivo* and *in vitro* and investigate the possible underlying mechanism. **Methods** A total of 32 male SD rats (6 to 8 weeks old, weighing 200 to 250 g) were randomly and equally divided into 4 groups, that is, the normal control, BML-111 treatment group (LXA_4 receptor agonist), adjuvant arthritis model group (AA), and model plus BML-111 intervention group (AA+BML-111). The AA model was induced by intradermal injection of complete Freund's adjuvant into the left hind footpad of the rats. In the AA+BML-111 group, the rats were supplemented with BML-111 daily for 28 d. Then the synovium from injured joints were harvested, the level of VEGF in the homogenates was determined by ELISA,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071446)
[通信作者] 张 力, E-mail:zhanglcqmu@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150910.1105.005.html(2015-09-10)

and the total level and phosphorylated level of VEGF receptor 2 were determined by Western blot analysis. The rat fibroblast-like synoviocyte (FLS) RSC-364 was cultured *in vitro* and stimulated with interleukin-1β (IL-1β) in the absence or presence of LXA_4 (1 to 100 nmol/L) for 24 h. The concentrations of VEGF in the supernatant were determined by ELISA, the total levels and phosphorylated levels of p38, JNK and ERK, and the protein level of hypoxia-inducible factors 1α (HIF-1α) were determined by Western blotting. **Results** In the synovium from AA rats, LXA_4 down-regulated the generation of VEGF. It did not alter the total level of VEGFR2 but significantly suppressed the phosphorylation of VEGFR2. LXA_4 suppressed IL-1β-induced production of VEGF in FLS in a dose-dependent manner, reduced the levels of phosphorylated P38, JNK and ERK, and decreased the protein content of HIF-1α. **Conclusion** LXA_4 might down-regulate IL-1β-induced VEGF expression in RSC-364 cells *via* suppression of MAPK and HIF-1, which might regulate the angiogenesis and the formation of pannus during the progression of AA in rats, which may be a novel underlying mechanism of protective effects of LXA_4 on arthritis.

[**Key words**] lipoxin; rheumatoid arthritis; adjuvant arthritis; vascular endothelial growth factor; angiogenesis

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81071446). Corresponding author: Zhang Li, E-mail: zhanglcqmu@aliyun.com

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是临床常见的慢性系统性多关节炎,其病变特征包括进行性滑膜炎、血管翳形成并侵袭破坏关节组织。我们前期研究发现脂性抗炎介质脂氧素 A_4(lipoxin A_4, LXA_4)可在RA动物模型中显著抑制自身免疫反应并减轻关节损伤[1-2]。除自身免疫攻击外,失控的滑膜血管新生也是RA发生、发展的关键环节[3]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管新生的最主要刺激因子,是RA的关键潜在干预靶点[4]。本研究首先在佐剂诱导的关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠模型中观察 LXA_4 受体激动剂对滑膜组织中VEGF表达的影响,随后在体外培养的大鼠成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)中观察 LXA_4 对白细胞介素-1β(interleukin 1β, IL-1β)诱导的VEGF表达的影响,探讨相关信号机制,以期进一步揭示 LXA_4 减轻RA的药理机制。

1 材料与方法

1.1 动物及实验材料

SD大鼠,雄性,32只,6~8周龄,体质量200~250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。大鼠RSC-364 FLS株购自中国科学院上海细胞生物学研究所,LXA_4、弗氏完全佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)及结核杆菌为Sigma公司产品,LXA_4 受体激动剂BML-111为Biomol公司产品,重组大鼠IL-1β为R&D公司产品,大鼠VEGF ELISA试剂盒为欣博盛生物科技有限公司产品,兔抗大鼠p38、JNK、ERK及磷酸化p38、JNK、ERK抗体为CST公司产品,兔抗大鼠VEGF受体2(VEGFR2)及VEGFR2抗体、小鼠抗大鼠缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factors 1α, HIF-1α)抗体为Abcam公司产品,小鼠抗大鼠β-actin抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗购自碧云天生物技术有限公司,增强化学发光试剂(ECL)、BCA蛋白定量试剂盒为Pierce公司产品。

1.2 细胞培养及分组

大鼠RSC-364细胞株用DMEM培养液培养在6孔培养板中,加入10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素,置于37 ℃、5% CO_2 培养箱。实验分组($n=8$):①空白对照组,无特殊处理;②LXA_4 单独处理组:培养液中加入100 nmol/L LXA_4;③IL-1β刺激组:培养液中加入10 ng/mL IL-1β;④LXA_4 干预组Ⅰ:培养液中加入10 ng/mL IL-1β及1 nmol/L LXA_4;⑤LXA_4 干预组Ⅱ:培养液中加入10 ng/mL IL-1β及10 nmol/L LXA_4;⑥LXA_4 干预组Ⅲ:培养液中加入10 ng/mL IL-1β及100 nmol/L LXA_4。各组细胞处理24 h后收集培养上清液及细胞用于后续实验。

1.3 动物模型及分组

参照文献[5]方法建立AA模型,实验共分4组($n=8$):①正常对照组:0.1 mL生理盐水左后足跖皮内注射;②BML-111单独处理组(BML-111):每日以3 mg/kg BML-111腹腔注射;③AA模型组:左后足跖皮内注射CFA 0.1 mL;④BML-111干预组(AA+BML-111):CFA诱导AA后,每日以3 mg/kg BML-111腹腔注射。各组大鼠在CFA致炎后第28天取病变部位关节滑膜组织,匀浆后离心后取上清用于后续实验。

1.4 ELISA检测VEGF水平

检测细胞培养上清液或滑膜组织匀浆中的VEGF

水平。按说明书方法依次加入样品/标准品、生物素化抗体、酶结合物工作液、显色剂,最后加入终止液后酶标仪450 nm测吸光度值[$D(450)$]。根据标准曲线计算各样品中VEGF浓度。检测滑膜匀浆中的VEGF水平时,采用BCA蛋白定量试剂盒测定各样本蛋白浓度,计算各样本VEGF浓度与同一样本的蛋白浓度的比值以标准化滑膜匀浆中的VEGF水平。

1.5 免疫印迹检测蛋白的表达

细胞或组织经裂解液裂解、超声破碎,离心取上清液。用BCA蛋白定量试剂盒进行定量。蛋白煮沸变性后经电泳分离、转膜并封闭,加入一抗4 ℃孵育过夜;洗膜后,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h;充分洗膜后,化学发光法显影。

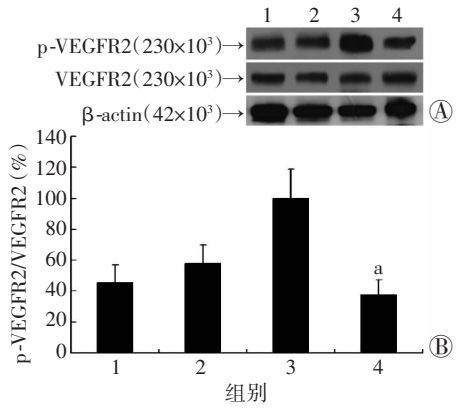
1.6 统计学分析

采用SPSS 12.0统计软件,计量数据以$\bar{x} \pm s$表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,随后采用LSD法进行两两比较。

2 结果

2.1 LXA_4抑制AA大鼠VEGF的生成及其受体激活

AA大鼠滑膜中VEGF含量为(51.2±9.2)pg/g,BML-111干预[(30.4±5.1) pg/g]可显著降低AA大鼠滑膜中VEGF含量($P < 0.01$)。检测滑膜组织中VEGFR2的含量及其磷酸化水平,结果显示与VEGF的表达水平一致。BML-111干预对VEGFR2含量无明显影响,但BML-111干预则可显著降低AA大鼠滑膜中VEGFR2磷酸化水平($P < 0.01$,图1)。



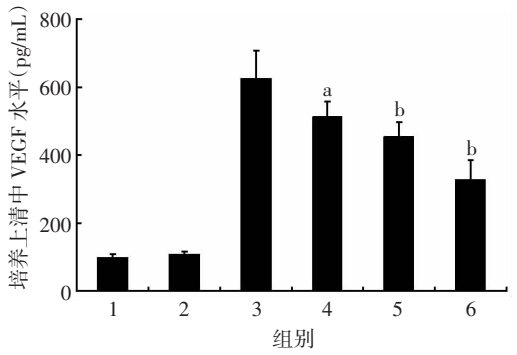
1:正常对照组;2:BML-111单独处理组;3:AA模型组;4:BML-111干预组

A:免疫印迹检测;B:半定量分析 a:$P < 0.01$,与AA模型组比较

图1 免疫印迹法检测大鼠滑膜中VEGFR2蛋白水平及其磷酸化水平

2.2 LXA_4抑制IL-1β诱导的VEGF表达

LXA_4可剂量依赖性抑制IL-1β诱导的VEGF表达(图2)。



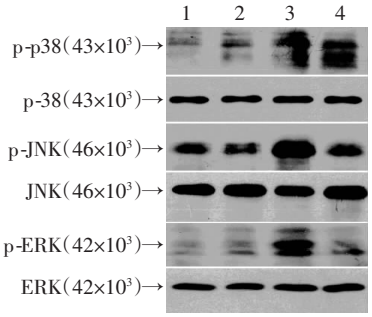
1:空白对照组;2:LXA_4单独处理组;3:IL-1β刺激组;4:LXA_4干预组Ⅰ;5:LXA_4干预组Ⅱ;6:LXA_4干预组Ⅲ

a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与IL-1β刺激组比较

图2 ELISA法检测RSC-364细胞中VEGF的表达

2.3 LXA_4抑制IL-1β诱导的MAPK活化

LXA_4处理可显著抑制IL-1β诱导的p38、JNK和ERK磷酸化(图3、表1),提示LXA_4可通过调节MAPK通路的信号转导过程而影响VEGF的表达。



1:空白对照组;2:LXA_4单独处理组;3:IL-1β刺激组;4:LXA_4干预组Ⅲ

图3 免疫印迹法检测IL-1β诱导的RSC-364细胞中MAPK通路的磷酸化激活

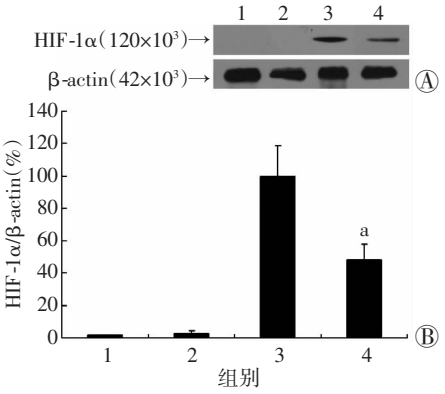
表1 MAPK通路的磷酸化水平灰度扫描结果($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-p38/p38	p-JNK/JNK	p-ERK/ERK
空白对照组	0.29±0.07	0.11±0.06	0.21±0.06
LXA_4单独处理组	0.32±0.12	0.11±0.07	0.22±0.07
IL-1β刺激组	1.00±0.22	1.00±0.23	1.00±0.18
LXA_4干预组Ⅲ	0.60±0.11[a]	0.15±0.08[b]	0.31±0.07[b]

a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与IL-1β刺激组比较

2.4 LXA_4抑制IL-1β诱导的HIF-1α上调

LXA_4处理可明显抑制IL-1β诱导的HIF-1α上调($P<0.01$,图4),提示LXA_4也可通过抑制转录因子HIF-1而下调VEGF表达。



1:空白对照组;2:LXA_4单独处理组;3:IL-1β刺激组;4:LXA_4干预组Ⅲ

A:免疫印迹检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与IL-1β刺激组比较

图4 免疫印迹法检测RSC-364细胞中HIF-1α的蛋白水平

3 讨论

LXA_4是由花生四烯酸代谢而来的脂性生物活性分子,具有独特的抗炎促消退效应,在肾缺血再灌注损伤、脑梗死、急性肺损伤等急性炎症损伤过程中可发挥有效的保护作用[6-7]。我们前期研究发现:LXA_4可抑制树突状细胞的分化成熟[8]、抑制T淋巴细胞的增殖及IL-2的产生[9];在RA小鼠及大鼠模型中,LXA_4受体激动剂可有效减轻自身免疫应答及关节组织病变[1-2];提示LXA_4在RA等慢性炎症性疾病中有潜在应用价值,但其药理学机制仍有待进一步的研究。

过度的血管新生是RA病情进展的关键环节,而VEGF是促进血管新生的最主要调控因子[3]。在RA病变关节局部,滑膜细胞受到IL-1β等炎症因子的刺激,可大量表达VEGF等促血管生成因子,这些因子可强烈诱导血管内皮细胞增殖并形成大量的新生血管,从而为炎症细胞的浸润活化及滑膜细胞的迅速增殖提供充足的血液供应[10]。由于天然LXA_4在体内半衰期极短[1],我们首先在AA大鼠模型中采用LXA_4受体激动剂BML-111初步探讨LXA_4对VEGF表达的影响。结果显示,LXA_4受体激动剂可显著降低AA大鼠滑膜组织中VEGF含量。目前发现的VEGF受体至少包含VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3,其中VEGFR2主要表达于血管内皮细胞,是介导VEGF促血管生成作用的主要受体[4]。与配体结合后,VEGFR2发生磷酸化,进而通过激活多条下游通路传递增殖信号[4]。本研究发现LXA_4受体激动剂处理后,AA大鼠滑膜组织中VEGFR2的磷酸化水平显著降低,这也与VEGF表达受抑相吻合。

IL-1β是RA发生、发展过程中极为重要的炎症因子,可通过诱导VEGF、基质金属蛋白酶等多种机制促进关节损伤[11]。进一步在体外培养的FLS中观察LXA_4对IL-1β诱导的VEGF表达的影响,发现LXA_4可在FLS中显著抑制IL-1β诱导的VEGF表达。与这一发现相似,LXA_4也可抑制白三烯D_4或VEGF诱导的内皮细胞增殖[12];在小鼠角膜损伤后,敲除LXA_4合成关键酶15-脂加氧酶(15-lipoxygenase,15-LO)可引起角膜组织VEGF表达及血管新生增强,而局部应用LXA_4可逆转这些改变[13]。由此可见,LXA_4可能也通过调节血管新生过程在RA中发挥保护效应。

研究发现,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)系统是IL-1β诱导VEGF表达的重要信号转导通路,MAPK通路的激活状态与VEGF的表达水平密切相关[14]。本研究发现,LXA_4在抑制IL-1β诱导的VEGF表达的同时,p38、JNK和ERK这三种MAPK的磷酸化水平均显著降低。与此一致,LXA_4也可在BV-2小鼠胶质细胞及大鼠肺微血管内皮细胞中抑制脂多糖诱导的ERK、p38磷酸化激活及炎症因子的表达[15-16],LXA_4还可抑制肿瘤坏死因子刺激的人肺微血管内皮细胞中p38的磷酸化及多种粘附分子的表达[17]。可见,LXA_4可能通过抑制MAPK通路的活化而抑制VEGF表达。

除炎症刺激外,快速增殖的滑膜细胞往往处于相对缺氧状态,这可通过激活HIF-1而诱导VEGF表达[18]。HIF-1由α和β亚单位所组成,其活性主要受HIF-1α的调节。在常氧状态下,HIF-1α上的脯氨酸残基被羟基化,这可迅速导致HIF-1α的泛素化降解;在缺氧状态下,HIF-1α的羟基化及降解受抑,在细胞内积聚,转入细胞核内后启动VEGF等基因的表达[19]。在氯化钴诱导的化学性缺氧的人脐静脉内皮细胞,LXA_4可抑制HIF-1核转位及VEGF表达[20]。HIF-1也可被IL-1β等炎症因子激活,在IL-1β诱导

VEGF 表达中发挥重要作用[21]。本研究发现 LXA_4 可明显下调 IL-1β 刺激的 FLS 中 HIF-1α 的蛋白水平，提示 LXA_4 可通过抑制转录因子 HIF-1 而调节 VEGF 表达。

综上所述，本研究发现 LXA_4 可在体内外抑制 VEGF 这一关键促血管生成因子的表达，这一效应与其抑制 MAPK、HIF-1 的激活有关。提示，除其强大的抗炎及免疫调节效应外，LXA_4 可能也通过抑制血管新生过程而在 RA 发生、发展过程中发挥重要调节效应，这可能是 LXA_4 减轻 RA 的药理新机制。LXA_4 可从多个方面控制 RA 的发生、发展，有望成为 RA 防治的新靶点。

参考文献：

[1] Zhang L, Zhang X, Wu P, *et al*. BML-111, a lipoxin receptor agonist, modulates the immune response and reduces the severity of collagen-induced arthritis [J]. Inflamm Res, 2008, 57(4): 157 – 162.

[2] 张力，万敬员，叶笃筠，等. 脂氧素受体激动剂 BML-111 减轻佐剂诱导的关节炎[J]. 中国药理学通报，2009，25(3)：304 – 307.

[3] Marrelli A, Cipriani P, Liakouli V, *et al*. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation? [J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(10): 595 – 598.

[4] Azizi G, Boghozian R, Mirshafiey A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis[J]. Int J Rheum Dis, 2014, 17(4): 369 – 383.

[5] Wang D, Hu S, Zhu J, *et al*. Angiotensin II type 2 receptor correlates with therapeutic effects of losartan in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(12): 1577 – 1587.

[6] Serhan C N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology [J]. Nature, 2014, 510(7503): 92 – 101.

[7] Romano M, Cianci E, Simiele F, *et al*. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 760: 49 – 63.

[8] Zhang L, Wu P, Jin S W, *et al*. Lipoxin A4 negatively regulates lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophages into dendritic-like cells [J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(11): 981 – 987.

[9] 张力，吴萍，万敬员，等. 脂氧素对 Jurkat T 细胞增殖和白细胞介素-2/白细胞介素-2 受体表达的影响[J]. 中国病理生理杂志，2008，24(1)：162 – 164.

[10] Grochot-Przeczek A, Dulak J, Jozkowicz A. Therapeutic angiogenesis for revascularization in peripheral artery disease [J]. Gene, 2013, 525(2): 220 – 228.

[11] Shiozawa S, Tsumiyama K, Yoshida K, *et al*. Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011, 59(2): 89 – 95.

[12] Baker N, O'Meara S J, Scannell M, *et al*. Lipoxin A4: anti-inflammatory and anti-angiogenic impact on endothelial cells [J]. J Immunol, 2009, 182(6): 3819 – 3826.

[13] Leedom A J, Sullivan A B, Dong B, *et al*. Endogenous LXA4 circuits are determinants of pathological angiogenesis in response to chronic injury[J]. Am J Pathol, 2010, 176(1): 74 – 84.

[14] Choe J Y, Lee S J, Park S H, *et al*. Tacrolimus (FK506) inhibits interleukin-1β-induced angiopoietin-1, Tie-2 receptor, and vascular endothelial growth factor through down-regulation of JNK and p38 pathway in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. Joint Bone Spine, 2012, 79(2): 137 – 143.

[15] Wang Y P, Wu Y, Li L Y, *et al*. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF-κB and MAPKs in BV-2 microglial cells[J]. J Neuroinflammation, 2011, 8: 95.

[16] Wu S H, Liao P Y, Dong L, *et al*. Signal pathway involved in inhibition by lipoxin A(4) of production of interleukins induced in endothelial cells by lipopolysaccharide[J]. Inflamm Res, 2008, 57(9): 430 – 437.

[17] Lv W, Lv C, Yu S, *et al*. Lipoxin A4 attenuation of endothelial inflammation response mimicking pancreatitis-induced lung injury [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2013 238(12): 1388 – 1395.

[18] Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog E M. Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(3): 153 – 162.

[19] Lokmic Z, Musyoka J, Hewitson T D, *et al*. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 296: 139 – 185.

[20] Liu S, Wu P, Ye D, *et al*. Effects of lipoxin A(4) on CoCl(2)-induced angiogenesis and its possible mechanisms in human umbilical vein endothelial cells[J]. Pharmacology, 2009, 84(1): 17 – 23.

[21] Lee Y A, Choi H M, Lee S H, *et al*. Hypoxia differentially affects IL-1β-stimulated MMP-1 and MMP-13 expression of fibroblast-like synoviocytes in an HIF-1α-dependent manner [J]. Rheumatology, 2012, 51(3): 443 – 450.

（**收稿**：2015-03-04；**修回**：2015-06-01）

（编辑 栾 嘉）