

• 基础论著 •

Smoothened 表达对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 RhoA/ROCK 通路的影响

彭蔚湘 朱尚玲 冯晓雪 林灼锋 黄建林

【摘要】 目的 初步探讨 Sonic Hedgehog (Shh) 信号通路分子 Smoothened (Smo) 对类风湿关节炎(RA)成纤维滑膜细胞(FLS)RhoA/ROCK 通路相关分子的影响。方法 收集病情活动(DAS28 ≥ 3.2) RA 患者关节镜手术或关节置换术切除的滑膜组织, 组织块培养法培养 RA-FLS 作为细胞模型, 流式细胞术检测 CD55 阳性率鉴定细胞, 然后分别予 Smo 分子激动剂 Purmorphamine 或抑制剂 KAAD-Cyclopamine 处理, 应用 GST-pull down 法检测 RhoA 活性, Western blot 检测 ROCK 活性与 Smo 蛋白表达。结果 与对照组相比, RA-FLS 经 Purmorphamine 刺激后, 活性 RhoA 蛋白、磷酸化 MYPT1 蛋白及 Smo 蛋白均上调 ($P < 0.05$); 经 KAAD-Cyclopamine 处理后, 活性 RhoA 蛋白、磷酸化 MYPT1 蛋白及 Smo 蛋白均下调 ($P < 0.05$)。结论 RA-FLS Smo 表达可影响 RhoA/ROCK 信号的传导。Smo 可能参与了 RA-FLS 中 Shh 信号通路非经典途径的调控。

【关键词】 关节炎, 类风湿; Smoothened; 成纤维样滑膜细胞; RhoA/ROCK 信号通路

Influence of of Smoothened molecular expression on RhoA/ROCK signaling pathway in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis Peng Weixiang, Zhu Shangling, Feng Xiaoxue, Lin Zhuofeng, Huang Jianlin. Department of Rheumatology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China
Corresponding author: Huang Jianlin, Email: jianlin_h@163.com

【Abstract】 Objective By investigating the expression of Sonic Hedgehog signaling pathway-associated factor Smoothened (Smo) of fibroblast-like synoviocytes from active rheumatoid arthritis (RA-FLS) and its effect on RhoA/ROCK signaling pathway, to study the regulation of Smo in non-canonical Hh pathway. **Methods** The synovial tissue which was taken from surgery of RA patients was mechanically separated and used to establish the cell model of primary RA-FLS by using explants-culture. Furthermore, fibroblasts' cell purity was identified by testing positive expression of CD55 with flow cytometry. The RA-FLS was treated with Purmorphamine (Smo agonist), KAAD-Cyclopamine (Smo inhibitor) or DMSO (as blank control). The RhoA activity was measured by a pull-down assay; The ROCK activity (expression of MYPT1 protein) and the expression of Smo protein were assessed by Western blot. **Results** Compared with the control group, the protein expression of Smo, the activities of RhoA and ROCK (expression of MYPT1 protein) were increased in Purmorphamine group while decreased in KAAD-Cyclopamine groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Smo may contribute to the modulation of the RhoA/ROCK pathway and also be the keypoint which links the Shh signaling pathway and the Rho pathway together in RA-FLS.

【Key words】 Arthritis, rheumatoid; Smoothened; Fibroblast-like synoviocytes; RhoA/ROCK signaling pathway

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.04.020

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072480); 广东省自然科学基金资助项目(10151008901000210, S2012020010927)

作者单位: 510630 广州, 中山大学附属第三医院风湿免疫科(彭蔚湘、朱尚玲、冯晓雪、黄建林); 温州医科大学药学院(林灼锋)

通讯作者: 黄建林, Email: jianlin_h@163.com

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以对称性多关节炎为主要表现的系统性、慢性自身免疫性疾病, 目前其发病机制尚未完全明确, 慢性滑膜炎和血管翳是其主要的病理改变^[1], 最终可造成关节软骨和骨破坏。RA 成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, RA-FLS) 是滑膜中特殊的细胞群, 具有自主增殖和侵袭的特性, 过度增殖造成滑膜增厚, 甚至迁移至远处关节侵蚀骨和软骨^[2], 被认为是介导 RA 关节破坏的主要细胞^[3]。RA-FLS 的转移与侵袭在慢性关节炎的发展中起着关键作用, 而 RhoGTP 酶类可通过细胞骨架重建促进细胞迁移, 对 RA-FLS 迁移起重要影响。RhoA 属于小分子 GTP 酶, Rho 激酶 (ROCK) 则是 RhoA 信号下游的一个关键性蛋白。RhoA/ROCK 通路不仅参与了调节细胞骨架形成、迁移等细胞活动, 而且对细胞增殖、免疫反应、血管新生^[4]也具有重要调控作用。

Hedgehog (Hh) 是一种共价结合胆固醇的分泌性蛋白, 对动物发育起重要作用。在人类, Hh 信号通路的 3 种配体中 Sonic Hedgehog (Shh) 表达最为广泛。Shh 与 Patched (Ptc) 蛋白结合后, 激活 Smoothed (Smo) 蛋白, 致使核转录因子 Glioblastoma (Gli) 蛋白水解被抑制, 从而激活目标基因的转录^[5], 此过程为 Shh 信号通路的经典途径。其中, Smo 与 G 蛋白偶联型受体同源, 激活后可致下游基因的稳定和活化, 在 Shh 通路中起着关键性作用。Rominger 等^[6]发现了依赖 Smo 与 G (i) 蛋白偶联, 通过刺激小 GTP 酶 RhoA 和 Rac1 改变肌动蛋白细胞骨架诱导迁移的 Shh 非经典途径。在 RA 的慢性滑膜炎中, Shh 信号通路是否也存在非经典途径, 以及 Smo 能否通过调控非经典途径中的 RhoA/ROCK 信号通路, 从而影响 RA-FLS 的迁移, 尚未见相关报道, 本文就此问题进行初步探讨, 现报道如下。

资料与方法

一、一般资料

收集 2013 年 1~8 月在我院骨关节外科行关节镜手术或关节置换术中切除的 RA 患者滑膜组织 6 例, 男女各 3 例, 年龄 38~67 岁。所有 RA 患者均符合美国风湿病学会 (American College of Rheumatology, ACR) 1987 年修订的 RA 诊断标准, 病情达到中度活动 (DAS28 \geq 3.2), 收集的标本均

获得患者的知情同意。

二、试剂与材料

南美胎牛血清和高糖 DMEM 培养液购自 Hyclone。Smo I 抗购自 Sant Cruz, 细胞蛋白裂解提取液、磷酸化 MYPT1 一抗 (Thr696) 及 MYPT1 一抗购自 CST, GAPDH 多克隆抗体购自武汉三鹰公司。兔二抗购自 Asbio。Rho Activation Assay Kit 购自 Millipore, Purmorphamine 购自美国 Cayman 公司, KAAD-Cyclopamine 购自德国 Merck 公司上海分公司。

三、方法

1. 滑膜细胞的分离培养和鉴定: 无菌条件下取得滑膜组织后, 超净台内将滑膜组织移至 50 mm 玻璃皿中, PBS 冲洗 3 遍, 锐性剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小, 均匀铺至细胞培养皿瓶底, 加入 4 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 培养瓶竖直放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱孵育 4 h 待组织块贴附后, 慢慢将培养瓶放平使培养液覆盖浸没组织, 继续静置培养, 每 4 d 更换培养液 1 次。待细胞从组织块中爬出, 生长成片后酶消化法去除组织块, 细胞继续生长到 80% 融合时消化传代, 根据细胞生长情况每 2~3 d 换液一次, 消化传代后获得较纯的成纤维滑膜细胞。细胞的鉴定包括光学相差显微镜下细胞生长形态观察和流式细胞术检测 CD55 阳性细胞率。本实验取 3~5 代细胞进行实验。

2. RhoA 活性检测: 采用 GST-pull down 方法检测, 将 RA-FLS 接种于 15 cm 培养皿, 无血清 DMEM 液培养饥饿 16 h, 待细胞长至 80% 融合, 按以下分组进行处理: (1) A 组: Purmorphamine (终浓度 5 μ mol/L) 处理 10 min; (2) B 组: KAAD-Cyclopamine (终浓度 1 μ mol/L) 处理 45 min^[7]; (3) C 组: 对照组: 只加入与稀释药物相同剂量的 DMSO 1 μ l, 消除溶剂影响。处理结束后用 MLB 液裂解, 收集细胞并离心, 取上清共 525 μ l 分成 2 份: (1) 取 25 μ l 直接用于检测总 RhoA 蛋白量; (2) 剩余 500 μ l 加入 RBD-GST 与琼脂糖珠混合后 4 $^{\circ}$ C 悬混 45 min, 后离心吸弃上清, MLB 洗 3 次后加入 2 \times laemmli buffer 上样缓冲液重悬, 混匀并煮沸 5 min, 12% SDS-PAGE 电泳, 湿法转膜。TBS 缓冲液洗膜, 5% BSA 封闭, 加入兔抗人 RhoA 多抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBS 洗膜后, 置于兔 II 抗中室温摇床孵育 1 h。TBS 洗膜后, 凝胶自动曝光分析仪自动曝光, AlphaView SA 软件分析比较蛋白的相对定量。

3. Western blot 检测 Smo 蛋白表达与 ROCK 活性: RA-FLS 于含 10%FBS 的 DMEM 培养液中贴壁培养, 取对数生长期的 RA-FLS 以 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 密度接种于 6 孔板, 每孔 2 ml。12 h 后换液, 处理分组同上述, 处理时间均为 24 h。24 h 后提取细胞总蛋白, 使用上述 Western blot 方法检测 Smo、磷酸化 MYPT1 及总 MYPT1 蛋白的表达量。

四、统计学分析

数据统计分析使用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多个样本均数比较采用 One-Way ANOVA 分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. RA-FLS 培养及鉴定: RA-FLS 贴壁生长于含 10%FBS 的 DMEM 培养液中, 可见细胞呈梭形、漩涡状生长 (图 1)。

2. 流式细胞术鉴定 RA-FLS: 流式细胞术检测细胞表面标记 CD55 表达, 结果显示培养第三代 RA-FLS 细胞表面 CD55 表达率达 93.81% (图 2)。

3. Pull-down 法检测 RhoA 活性: Purmorphamine 或 KAAD-Cyclopamine 分别处理后, RA-FLS 活性 RhoA 蛋白 (GTP-RhoA) 及总 RhoA 蛋白的表达和灰度值分析结果见图 3。三组间具有统计学差异 ($F = 39.98$, $P = 0.0003$), 与对照组相比, Purmorphamine ($5 \mu\text{mol/L}$) 处理组细胞总 RhoA 蛋白中 GTP-RhoA 表达比例增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); KAAD-Cyclopamine ($1 \mu\text{mol/L}$) 处理组细胞 GTP-RhoA 蛋白表达比例则减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4. Western blot 检测 Smo 蛋白表达: Purmorphamine 或 KAAD-Cyclopamine 分别处理 24 h 后, RA-FLS Smo 蛋白的表达和灰度值分析结果如图 4 所示。三组间具有统计学差异 ($F = 19.39$, $P = 0.0024$), 与对照组相比, Purmorphamine ($5 \mu\text{mol/L}$) 处理组细胞 Smo 蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 KAAD-Cyclopamine ($1 \mu\text{mol/L}$) 处理组细胞 Smo 蛋白表达减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

5. ROCK 活性检测: 因为肌球蛋白磷酸酶靶亚基 1 (myosine phosphatase target subunit 1, MYPT1) 是 ROCK 的主要底物之一, 其磷酸化被认为是 ROCK 活化的重要标志, 所以 ROCK 的活性用磷酸

化 MYPT1 蛋白表达来表示。Purmorphamine 或 KAAD-Cyclopamine 分别处理后, RA-FLS 磷酸化 MYPT1 蛋白 (p-MYPT1) 及总 MYPT1 蛋白的表达和灰度值分析结果见图 5。从图中分析可见, 三组具有统计学差异 ($F = 44.26$, $P = 0.0003$), 与对照组相比, Purmorphamine ($5 \mu\text{mol/L}$) 处理组 RA-FLS 细胞 p-MYPT1 蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 KAAD-Cyclopamine ($1 \mu\text{mol/L}$) 处理组 RA-FLS 细胞 p-MYPT1 蛋白表达则减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

Shh 信号通路对正常个体的胚胎发育起着重要作用, 发育完成后在成人表达则大为减少^[8]。以往的研究表明 Shh 通路的异常激活可通过多种机制参与多种肿瘤的发病与侵袭^[9]。Smo 作为 Shh 通路中的关键分子, 其活化可正向调控 Shh 信号通路, 过度表达可激活 Shh 通路进而促进肿瘤的生长, 因此 Smo 也成为抑制 Shh 信号通路最常见的靶点^[10]。本课题组前期研究^[11-12]结果表明, RA 患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 与滑膜组织中 Shh 通路相关信号分子 Shh、Smo 和 Gli 表达明显增高, Smo 蛋白在关节滑膜组织尤其 RA-FLS 和血管内皮细胞中表达明显。但异常激活的 Shh 信号通路尤其 Smo 的表达对控制 RA-FLS 迁移起重要作用的 RhoA/ROCK 信号通路是否存在影响目前仍然不清楚。

Cyclopamine 是最早发现的 Smo 抑制剂, 其作用主要是导致 Smo 构象的改变, 从而达到抑制 Shh 信号通路的作用^[13]。本实验采用具有更高效、更高细胞渗透性与低毒性的 Cyclopamine 类似物 KAAD-Cyclopamine 作为 Smo 蛋白抑制剂, 同时使用 Purmorphamine 作为 Smo 激动剂, 观察此抑制剂和激动剂对 RA-FLS Smo 蛋白表达的影响^[14]。实验结果表明, 加入 Purmorphamine 处理后细胞 Smo 蛋白表达水平上调, 而 KAAD-Cyclopamine 处理组 Smo 蛋白表达则明显下降, 提示所用激动剂和抑制剂对 Smo 蛋白的调控作用发挥充分。

RhoGTP 酶是细胞内多条信号转导通路的关键分子, 作为分子开关在胞内信号转导中发挥桥梁作用, 而多项研究^[15-16]发现 RA 患者滑膜存在 RhoA/ROCK 信号通路的异常激活。同时最新也有研究显示 Shh 通过 G 蛋白和 PI3K 依赖的机制刺激小 RhoGTP 酶、Rac1 和 RhoA 产生, 导致肌动蛋白

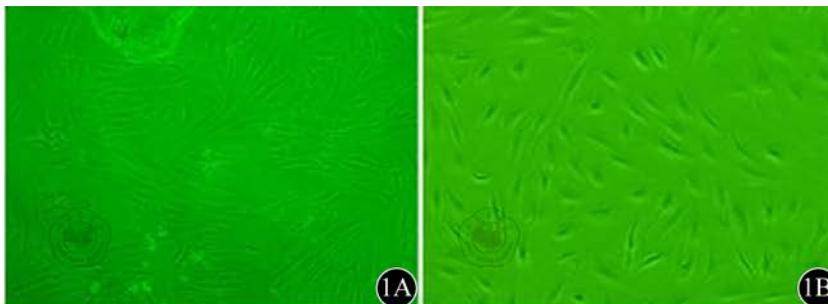


图1 光学显微镜下观察RA-FLS (×100)。注: 镜下滑膜细胞呈纤维样长梭形, 漩涡状; 1A: 原代细胞; 1B: 第三代细胞

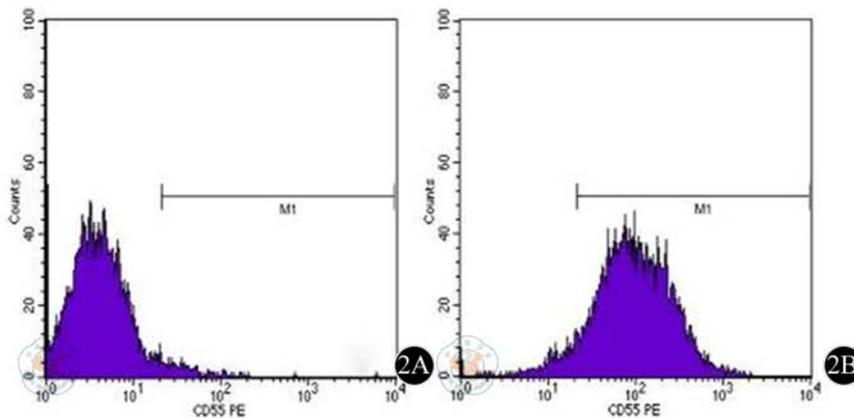


图2 流式细胞术检测第三代RA-FLS表面CD55表达。注: 细胞表面CD55表达率达93.81%; 2A: 同型对照图; 2B: CD55标记图

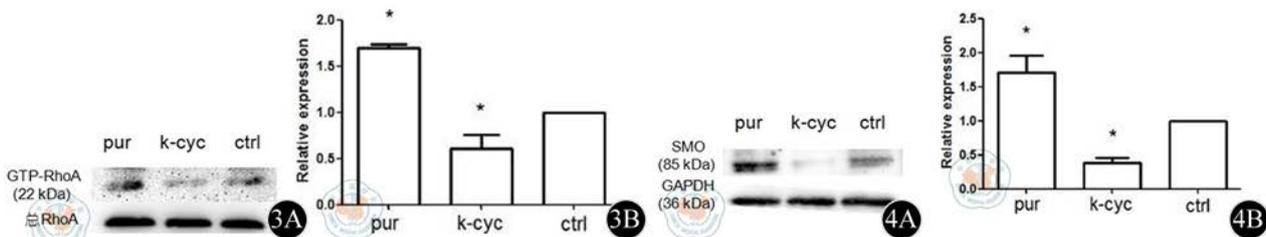


图3 Purmorphamine或KAAD-Cyclopamine处理RA-FLS活性RhoA蛋白与总RhoA蛋白的表达情况。注: pur: Purmorphamine (5 μmol/L) 组; k-cyc: KAAD-Cyclopamine (1 μmol/L) 组; ctrl: 对照组; 与对照组相比, * $P < 0.05$ 图4 Purmorphamine或KAAD-Cyclopamine处理24 h后RA-FLS Smo蛋白表达情况。注: pur: Purmorphamine (5 μmol/L) 组; k-cyc: KAAD-Cyclopamine (1 μmol/L) 组; ctrl: 对照组; 与对照组相比, * $P < 0.05$

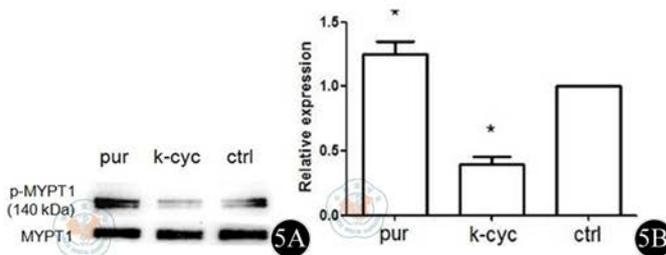


图5 Purmorphamine或KAAD-Cyclopamine处理24 h后RA-FLS磷酸化MYPT1蛋白与总MYPT1蛋白的表达情况。注: pur: Purmorphamine (5 μmol/L) 组; k-cyc: KAAD-Cyclopamine (1 μmol/L) 组; ctrl: 对照组; 与对照组相比, * $P < 0.05$

细胞骨架重建而诱导细胞迁移, Smo 作为 G 蛋白偶联受体发挥重要作用^[7]。本实验的研究结果也可发

现, 与对照组相比, Purmorphamine 激动剂组上调 Smo 蛋白的表达, RhoA 活性以及 ROCK 活性升高;

而 KAAD-Cyclopamine 抑制剂组则相反, Smo 蛋白表达下调后, RhoA 活性以及 ROCK 活性减弱。可见通过调控 Smo 的表达, RhoA/ROCK 信号通路相关分子表达也发生了相应变化, Smo 可能成为连接异常激活的 Shh 信号通路与 Rho 信号通路的分子桥梁, 并且通过自身表达的变化进而影响 RA-FLS 的细胞迁移能力。但是除了 RhoA/ROCK 通路, 通过调控 Smo, Rho 酶类相关的其他调节细胞骨架重排与黏附的信号通路是否也发生变化以及对细胞迁移能力的具体影响仍需要进一步探索。

总之, 本研究发现 RA 患者慢性滑膜炎中, 作为关键角色的滑膜成纤维细胞中 Shh 信号通路的非经典途径 RhoA/ROCK 存在激活, 同时, 本实验也表明, 通过调控 Smo 的表达, 可以调节 RA-FLS RhoA/ROCK 通路的变化, 以此可能进一步影响细胞迁移的能力, 通过抑制 Smo 的表达从而阻断 RhoA/ROCK 信号传导, 减弱 RA-FLS 的迁移能力, 可能成为治疗 RA 的新靶点, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Scott DL, Wolfe F, Huizinga H, et al. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [2] Lefevre S, Knedla A, Tennie C, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints[J]. Nat Med, 2009, 15(12): 1414-1420.
- [3] Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis[J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 233-255.
- [4] Hoang MV, Whelan MC, Senger DR. Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(7): 1874-1879.
- [5] Chari NS, McDonnell TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia[J]. Adv Anat Pathol, 2007, 14(5): 344-352.
- [6] Rominger CM, Bee WL, Copeland RA, et al. Evidence for allosteric interactions of antagonist binding to the smoothed receptor[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 329(3): 995-1005.
- [7] Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, et al. Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration[J]. J Biol Chem, 2011, 286(22): 19589-19596.
- [8] Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer[J]. Oncogene, 2009, 28(40): 3513-3525.
- [9] Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer[J]. Nature, 2008, 455(7211): 406-410.
- [10] Walter K, Omura N, Hong SM, et al. Overexpression of smoothed activates the sonic hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer-associated fibroblasts[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(6): 1781-1789.
- [11] 王明霞, 黄建林, 朱尚玲, 等. 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞 Sonic Hedgehog 信号通路表达的初步研究[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(3): 483-487.
- [12] 朱尚玲, 彭蔚湘, 罗敏琪, 等. 类风湿关节炎滑膜血管内皮细胞 Smoothened 表达及其生物学意义的初步探讨[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(2): 225-230.
- [13] Chen JK, Taipale J, Cooper MK, et al. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened[J]. Genes Dev, 2002, 16(21): 2743-2748.
- [14] Sinha S, Chen JK. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened[J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(1): 29-30.
- [15] Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(9): 690-701.
- [16] Nakayama S, Kurose H, Saito K, et al. Small GTP-binding protein Rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(3): R476-484.

(收稿日期: 2014-01-08)

(本文编辑: 张志巍)

彭蔚湘, 朱尚玲, 冯晓雪, 等. Smoothened 表达对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 RhoA/ROCK 通路的影响 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (4): 661-665.