

肿瘤坏死因子- α 增强血管紧张素 II 对人成纤维样滑膜细胞的增殖、迁移与侵袭的作用及机制

罗学霞, 严尚学, 王颖, 吴华勋, 陈镜宇, 魏伟

摘要 目的 明确肿瘤坏死因子(TNF- α)增强血管紧张素 II(Ang II)对人成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖、迁移与侵袭的作用及其部分机制。方法 体外培养正常人 FLS,用 Ang II(10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)、TNF- α (20 ng/ml) 单用或联合使用,刺激 48 h 后,采用 CCK8 试剂盒检测 FLS 增殖功能; Transwell 小室法检测迁移与侵袭功能; 激光共聚焦、免疫荧光或蛋白免疫印迹法检测 Ang II 受体及 G 蛋白偶联受体激酶 2(GRK2) 的表达。结果 Ang II(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 能促进人 FLS 的增殖($P < 0.05$),最适浓度为 10^{-7} mol/L; TNF- α (20 ng/ml) 能显著增强 FLS 的增殖($P < 0.05$); Ang II(10^{-7} mol/L) 与 TNF- α (20 ng/ml) 联合使用可进一步促进 FLS 增殖($P < 0.05$); 单用 Ang II(10^{-7} mol/L)、TNF- α (20 ng/ml) 或者联合使用都能显著促进 FLS 的迁移($P < 0.01$) 与侵袭能力($P < 0.05$); 单用 Ang II 可显著升高 FLS 血管紧张素 II 1 型受体(AT1R) 的表达水平($P < 0.05$), GRK2 水平有上升趋势($P > 0.05$); 单用 TNF- α 可显著升高 FLS 的 AT1R 和 GRK2 的蛋白表达水平($P < 0.05$);

Ang II 与 TNF- α 联合使用, AT1R 与 GRK2 的表达水平显著升高($P < 0.05$); GRK2 抑制剂可以下调 Ang II 与 TNF- α 联合诱导的 FLS 迁移、侵袭功能($P < 0.01$)。结论 Ang II 促进 FLS 增殖、迁移和侵袭, TNF- α 可以促进 Ang II 介导的 FLS 增殖、侵袭和转移, 其机制可能与上调 FLS 的 AT1R 和 GRK2 表达有关。

关键词 血管紧张素 II; 肿瘤坏死因子; 滑膜细胞; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 977.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)09-1238-06

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA) 是一种严重危害人类健康的进展性、慢性自身免疫性疾病^[1]。RA 的成纤维样滑膜细胞(RA fibroblast-like synoviocyte, RA-FLS) 在 RA 的发生、发展中发挥重要作用^[2]。RA-FLS 与免疫细胞共同作用, 通过分泌炎症因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)、促血管生成因子或基质金属蛋白酶进入滑膜液中, 导致炎症加剧、血管翳形成、基质降解, 并最终引起关节骨与软骨破坏^[3], 抑制 RA-FLS 的增殖、侵袭和迁移是 RA 治疗的重要策略。血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II) 是血管紧张素-醛固酮系统中的重要组成部分, 有两型受体包括 1 型受体

2016-05-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81503084、81330081、81302784)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032

作者简介: 罗学霞, 女, 硕士研究生;

魏伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

The fresh slices were made from WT mice aged 4~6 weeks, and the neurons were identified by their shape, different reaction to noradrenaline(NA) and electrical characteristics. AP firings of neurons were recorded during 11:00~16:00 and 22:00~02:00 with patch-clamp recording. The firing rates of these neurons were analyzed using *t*-test. **Results** The neurons in VLPO were successfully identified into two types. One type neurons with triangular and multipolar shape could be hyperpolarized by NA and had the electrical property of low-threshold spike(LTS). The other type neurons with fusiform and bipolar shape could be depolarized by NA and lacked the electrical property of LTS(non-LTS). Of 59 recorded neurons in VLPO, 44 neurons had the character of LTS, and 15 neurons were non-LTS. Using *t*-test of statistics, AP firing rate of LTS neurons which were hyperpolarized by NA showed higher at day time than that at night($P < 0.01$). Non-LTS neurons which were depolarized by NA showed the similar tendency, that AP firing rate at day time was higher than that at night($P < 0.05$). **Conclusion** There are two types of neurons in VLPO. Both of them show high firing rate at day time and low firing rate at night time, which indicates they participate in regulating circadian rhythm.

Key words ventrolateral preoptic nucleus; action potential; LTS; non-LTS

(angiotensin II type 1 receptors ,AT1R) 和 2 型受体 (angiotensin II type 2 receptors ,AT2R) ,二者均为 G 蛋白偶联受体。Ang II 与 AT1R 作用后 ,可以刺激血管生成 ,抑制 FLS 凋亡^[4]、胶原蛋白合成和生长因子的表达。研究^[5]表明 ,RA 患者的外周血单个核细胞和炎症滑膜组织中血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme ,ACE) 、Ang II 和 AT1R 表达升高 ,提示 Ang II 及其受体参与了 RA 疾病进程。该研究将观察 TNF- α 对 Ang II 促进人 FLS 增殖、迁移与侵袭能力的影响 ,并初步探讨其部分机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 Ang II、TNF- α (美国 Sigma 公司); G 蛋白偶联受体激酶 2 (G-protein-coupled receptor kinases 2 ,GRK2) 抑制剂 (C₁₂H₉NO₆ ,美国 Santa Cruz 公司); 兔来源抗人 AT1R 抗体、AT2R 抗体(美国 Abcam 公司); 兔来源抗 GRK2 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司); MH7A 细胞株 (FLS ,广州吉妮欧生物科技有限公司); BioTek Elx \times 808 酶标仪(美国 BioTek 公司); ImageQuant Las 4000mini 化学发光成像分析仪(武汉爱斯佩科学仪器有限公司); Sp8 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); SW-CJ-4F 超净工作台(苏州苏净集团安泰公司); 2306-2 型 CO₂ 培养箱(美国 SHELLAB 公司); IX-70 荧光倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司)

1.2 方法

1.2.1 FLS 的培养 FLS 培养于 50 ml 玻璃培养瓶中 ,待细胞长满至底面 90% 时 ,弃去培养液 ,用 PBS 液洗 2 遍 ,胰蛋白酶消化。显微镜下观察细胞变形后弃掉胰蛋白酶 ,加入含 20% 胎牛血清 (fetal bovine serum ,FBS) 的 DMEM 培养液 ,吹打混匀后 ,于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 48 h。根据细胞的生长情况及培养液的变化 ,每 2~3 d 更换培养液 1 次。

1.2.2 CCK8 法检测细胞的增殖 培养瓶中已经长满的 FLS 经消化、计数后 ,用 10% FBS 培养液稀释成 1×10^5 /ml 的细胞悬液 ,按每孔 100 μ l 加入 96 孔板 ,于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 6 h。显微镜下观察 ,待全部细胞贴壁后 ,按分组情况每孔加用 DMEM 培养液配制的 10 μ l Ang II (终浓度分别为 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 或 TNF- α (终浓度为 20 ng/ml) ,最终体积为 110 μ l 或 120 μ l ,不足的用 DMEM 培养液补足液体。在培养箱中培养 48 h 终止培养前每孔加入 10 μ l CCK8 试剂 ,室温下震荡混匀后继续培养 1~3 h。肉眼观察细胞孔中颜色

由黄色变成深橙色 ,于酶标仪中读取波长 450 nm 处的吸光度值 (optical density ,OD) 。OD 值 = 实验组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值 ,计算细胞增殖。

1.3 Transwell 小室检测 FLS 的迁移与侵袭功能

1.3.1 FLS 的迁移 24 孔板的 FLS 平铺至 50% 时 ,单独加入 Ang II (终浓度 10^{-7} mol/L) 、TNF- α (终浓度 20 ng/ml) 或两者联合加入培养 48 h。细胞消化后用含 10% FBS 的 DMEM 培养液制备成细胞悬液 (1×10^5 /ml) ,取 100 μ l 加入 Transwell 小室的上室 ,下室加入 600 μ l 含 20% FBS 的 DMEM 培养液。培养箱中培养过夜 ,棉签擦去内面未迁移的细胞 ,下室已迁移的细胞用 20% 甲醇溶液配制的结晶紫室温下染色 10 min。显微成像系统镜检迁移细胞数 ,4 倍镜视野统计细胞数目。

1.3.2 FLS 的侵袭 Transwell 小室内面预先铺上 20 μ l 已经稀释好的 Matrigel 基质胶 ,放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中凝固 1 h。取 100 μ l 已经用 Ang II (终浓度 10^{-7} mol/L) 、TNF- α (终浓度 20 ng/ml) 单独或联合作用 48 h 的浓度为 1×10^5 个/ml 的 FLS 细胞悬液 ,加入已经铺胶的 Transwell 上室 ,下室加入 600 μ l 含 20% FBS 的 DMEM 培养液。培养 24 h 后 ,棉签擦去内面未迁移的细胞 ,下室已迁移的细胞用 20% 甲醇配制的结晶紫室温下染色 10 min。显微镜检查侵袭细胞数 ,4 倍镜视野统计细胞数目。

1.4 激光共聚焦或免疫荧光定位受体的表达 经无菌处理后的载玻片放置于 6 孔板中 ,加入含 10% FBS 培养液稀释成 5×10^4 /ml 的 FLS 悬液 1 ml。待细胞贴壁于载玻片上后 ,分别加入 Ang II (终浓度 10^{-7} mol/L) 、TNF- α (终浓度 20 ng/ml) ,或联合使用培养 48 h。弃去培养液 ,PBS 洗 3 遍 ,经 4% 多聚甲醛固定、Triton 打孔、牛血清白蛋白 (BSA) 封闭后加入兔来源抗人 AT1R 抗体或抗 AT2R 抗体 ,4 $^{\circ}$ C 过夜后加入相应二抗室温孵育 1 h ,DIPA 染色后玻片固定 拍片。

1.5 Western blot 法检测受体及 GRK2 在 FLS 的表达情况 FLS 加入 6 孔板中培养至 90% 时 ,分别加入 Ang II (10^{-7} mol/L) 、TNF- α (20 ng/ml) 、Ang II + TNF- α 、Ang II + TNF- α + GRK2 抑制剂 (终浓度 50 μ mol/L) 后培养 48 h。弃去培养液 ,用裂解液裂解 FLS 并提取细胞中的总蛋白。蛋白定量后 ,每孔 30 μ g 蛋白加入 10% SDS-PAGE 凝胶电泳孔中按操作步骤电泳、转膜。室温封闭 2 h ,加入抗 AT1R 抗体、抗 AT2R 抗体、抗 GRK2 抗体或 β -actin 抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜。辣根过氧化物酶标记的相应二抗室温孵育 2 h 后在

化学发光成像分析仪中显影。Image 分析软件分析条带灰度值 β -actin 抗体的条带灰度值作为内参。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组样本间两两比较用单因素方差分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 和 TNF- α 对 FLS 增殖的影响 图 1 显示, Ang II (10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 作用于 FLS 48 h 后可显著促进 FLS 增殖 ($F = 2.545$, $P < 0.05$); TNF- α (20 ng/ml) 也可明显促进 FLS 的增殖 ($F = 8.491$, $P < 0.05$) 且 TNF- α 和 Ang II (10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 联合使用较 TNF- α 单一刺激更能促进 FLS 增殖 ($P < 0.05$)。根据增殖实验结果, 在后述实验中选定 10^{-7} mol/L 作为 Ang II 的体外刺激最适浓度。

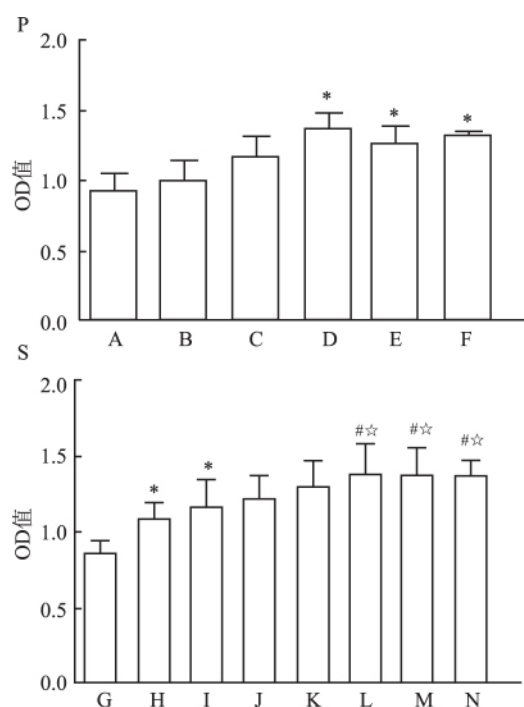


图 1 Ang II 与 TNF- α 诱导 FLS 的增殖 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

P: 不同浓度的 Ang II 对 FLS 增殖的影响; A: 正常组; B ~ F: Ang II (10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L) 对照组; S: 不同浓度的 Ang II 联合 TNF- α 对 FLS 增殖的影响; G: 正常组; H: TNF- α 对照组; I ~ N: Ang II (10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L) + TNF- α 对照组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与 TNF- α 组比较: # $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较: * $P < 0.05$

2.2 Ang II 和 TNF- α 对 FLS 迁移和侵袭能力的影响 与正常组相比, Ang II (10^{-7} mol/L)、TNF- α (20 ng/ml) 单用或者联合使用都可以增加 FLS 的迁移能力 ($F = 147.973$, $P < 0.01$) 和侵袭能力 ($F = 59.320$, $P < 0.05$)。但单用 TNF- α 明显比单用 Ang II 更能促进

FLS 的迁移与侵袭, Ang II 和 TNF- α 对 FLS 的迁移与侵袭能力存在显著性差异 ($P < 0.05$)。与单用相比, Ang II 和 TNF- α 联合使用可显著增加 FLS 迁移与侵袭的细胞数量, GRK2 抑制剂 ($50 \mu\text{mol/L}$) 可显著抑制 Ang II 和 TNF- α 诱导的 FLS 迁移与侵袭能力。见图 2、3。

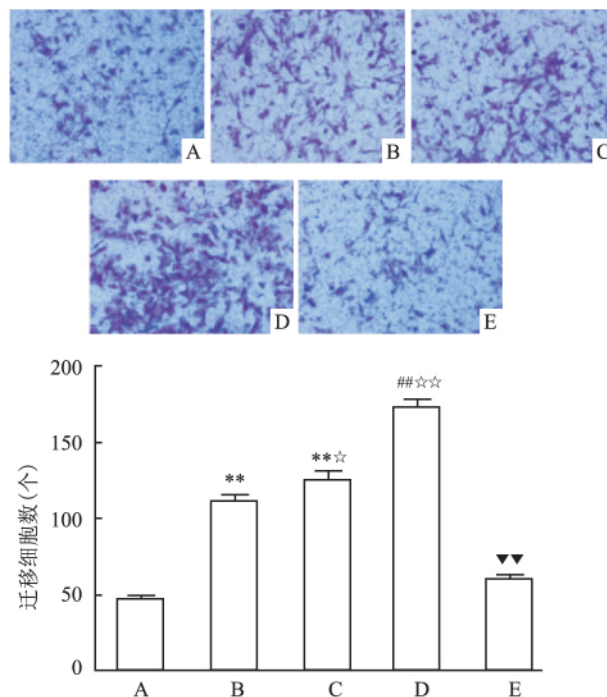


图 2 Transwell 小室检测 Ang II 和

TNF- α 对 FLS 迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$) $\times 10$

A: 正常组; B: Ang II (10^{-7} mol/L) 对照组; C: TNF- α 对照组; D: Ang II (10^{-7} mol/L) + TNF- α 对照组; E: Ang II (10^{-7} mol/L) + TNF- α + GRK2 对照组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 TNF- α 组比较: ## $P < 0.01$; 与 Ang II 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Ang II + TNF- α 组比较: $P < 0.01$

2.3 Ang II 和 TNF- α 对 FLS Ang II 受体表达的影响 AT1R 主要表达于 FLS 的胞膜和胞质, 部分表达于胞核; 免疫荧光结果也显示, AT2R 主要表达于 FLS 的胞膜、胞质, 部分表达在核内。见图 4。Ang II (10^{-7} mol/L)、TNF- α (20 ng/ml) 均可明显增加 FLS 上 AT1R 的蛋白表达水平, 二者联合使用可显著增高 Ang II 诱导的 AT1R 蛋白水平 ($F = 7.315$, $P < 0.05$)。单用 Ang II (10^{-7} mol/L)、TNF- α (20 ng/ml) 对 FLS 上 AT2R 的蛋白表达有上升趋势但差异无统计学意义, 二者联合使用可显著升高 FLS 上 AT2R 的表达 ($F = 6.036$, $P < 0.05$)。GRK2 抑制剂 ($50 \mu\text{mol/L}$) 可显著抑制 Ang II 和 TNF- α 刺激的 FLS 上 AT1R 和 AT2R 的表达 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.4 Ang II 和 TNF- α 对 FLS 的 GRK2 表达水平

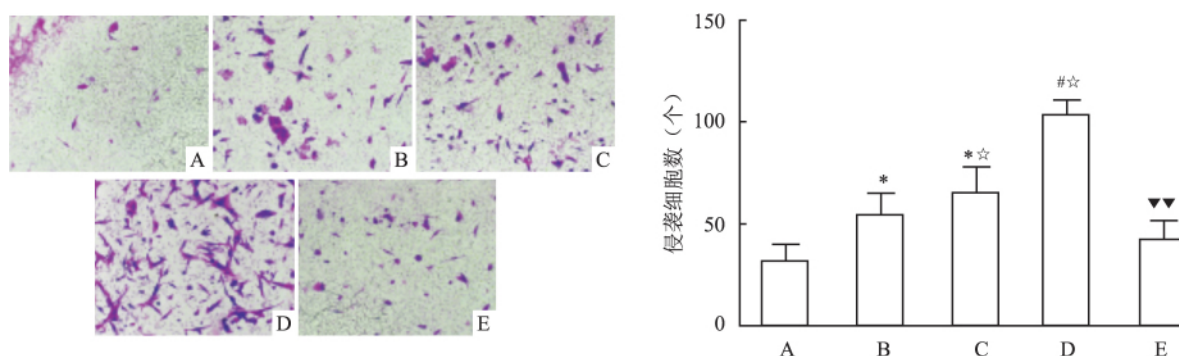


图3 Transwell 小室检测 Ang II 和 TNF- α 对 FLS 侵袭的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$) $\times 10$

A: 正常组; B: Ang II (10^{-7} mol/L) 对照组; C: TNF- α 对照组; D: Ang II (10^{-7} mol/L) + TNF- α 对照组; E: Ang II (10^{-7} mol/L) + TNF- α + GRK2 对照组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与 TNF- α 组比较: # $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较: ☆ $P < 0.05$; 与 Ang II + TNF- α 组比较: ▼ $P < 0.01$

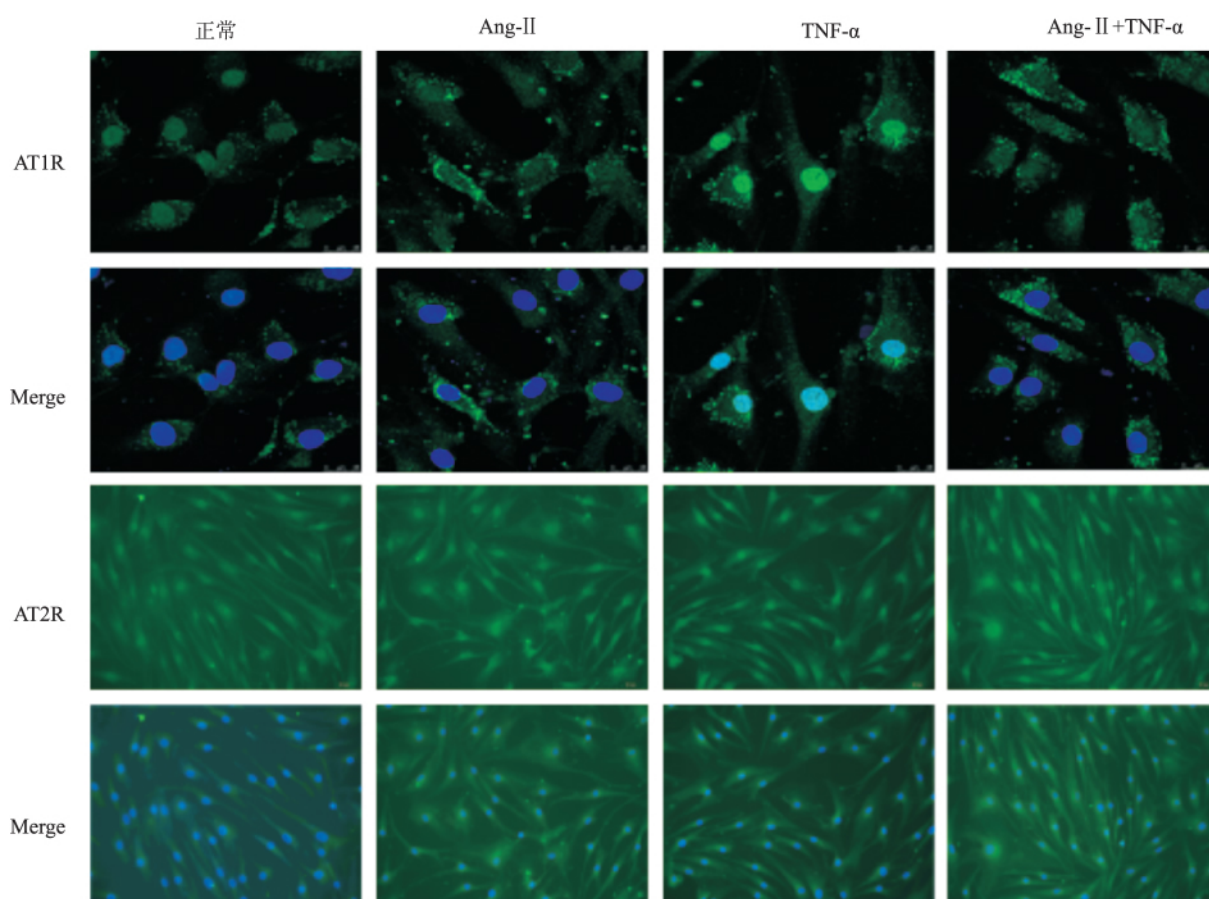


图4 激光共聚焦(上两排)和免疫荧光(下两排)定位 FLS 上的血管紧张素受体 $\times 10$

的影响 Ang II (10^{-7} mol/L) 刺激对 FLS 上 GRK2 的蛋白表达水平无明显影响, TNF- α (20 ng/ml) 则可明显增加 FLS 上 GRK2 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$), Ang II 与 TNF- α 联合使用也能显著升高 GRK2 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 但与 TNF- α 单一刺激相比差异无显著性。GRK2 抑制剂 (50 μ mol/L) 可显著抑制 Ang II 和 TNF- α 诱导的 FLS 上 GRK2 蛋白的表达 ($F=4.383$, $P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

RA-FLS 是一类有“类肿瘤细胞样”侵袭的生物学特性的细胞^[6], 在内皮细胞、巨噬细胞、B 细胞、T 细胞等多种炎性细胞及其分泌的炎症因子作用下活化, 位于滑膜衬里层的 FLS 移动到软骨表面, 通过增加基质金属蛋白酶类和组织蛋白酶的产生, 对软

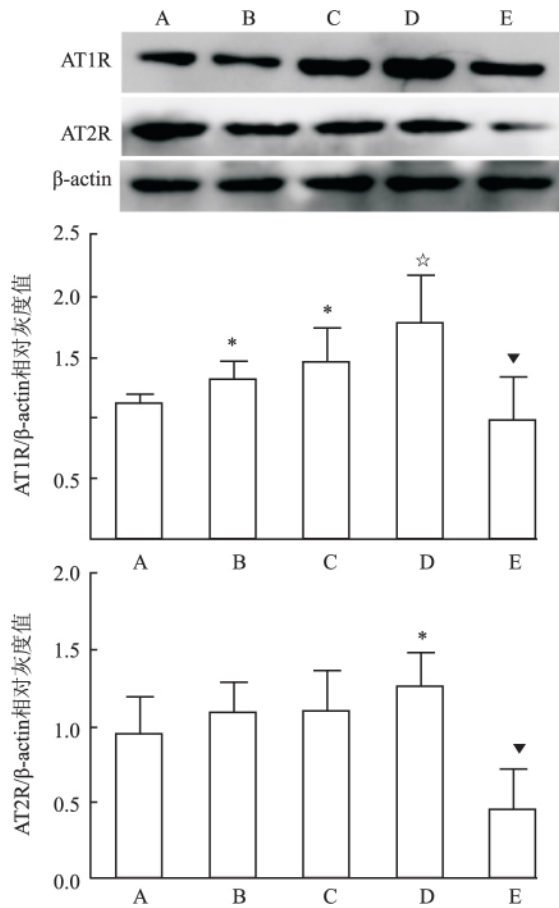


图5 Ang II和TNF-α对

FLS上血管紧张素受体表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: 正常组; B: Ang II (10⁻⁷ mol/L) 对照组; C: TNF-α 对照组; D: Ang II (10⁻⁷ mol/L) + TNF-α 对照组; E: Ang II (10⁻⁷ mol/L) + TNF-α + GRK2 对照组; 与正常组比较: * P < 0.05; 与 TNF-α 组比较: # P < 0.05; 与 Ang II 组比较: ☆ P < 0.05; 与 Ang II + TNF-α 组比较: P < 0.05

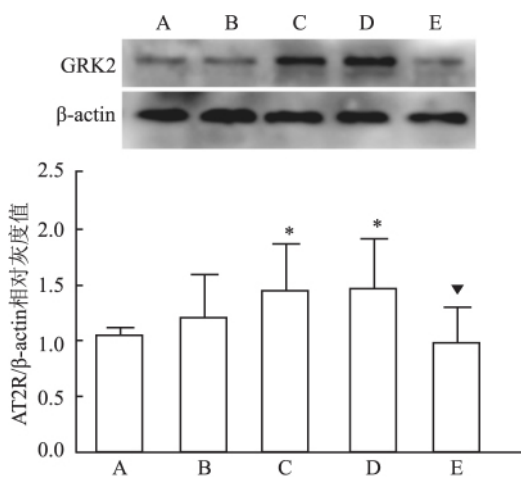


图6 Ang II和TNF-α对FLS上GRK2表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: 正常组; B: Ang II (10⁻⁷ mol/L) 对照组; C: TNF-α 对照组; D: Ang II (10⁻⁷ mol/L) + TNF-α 对照组; E: Ang II (10⁻⁷ mol/L) + TNF-α + GRK2 对照组; 与正常组比较: * P < 0.05; 与 Ang II + TNF-α 组比较: P < 0.05

骨造成破坏并迁移到骨,活化破骨细胞,增强骨质侵蚀和破坏^[6-8]。FLS 侵袭的机制十分复杂,迄今尚未完全阐明。一般认为 RA 关节局部低氧环境中,FLS 与大量浸润的炎性细胞及其分泌的炎症因子相互接触、相互作用构成了一个错综复杂的网络,激活炎症信号通路并调控侵袭相关基因的表达,这可能是 FLS 侵袭的重要机制之一^[9]。

研究^[3-5]表明,Ang II 及 TNF-α 都参与了 RA 疾病的病理进程。本实验结果显示,经 Ang II (10⁻⁷ mol/L) 和 TNF-α (20 ng/ml) 处理后的 FLS 的增殖、迁移与侵袭能力显著增强,且 Ang II 和 TNF-α 联合作用后 FLS 的增殖、迁移与侵袭能力比单独作用更强。提示 Ang II、TNF-α 均可以促进 FLS 的增殖、迁移与侵袭,且 TNF-α 可以促进 Ang II 诱导的 FLS 增殖、迁移与侵袭。

进一步研究表明,Ang II 和 TNF-α 均可显著提高 FLS 的 AT1R 表达水平,联合使用进一步提升了 AT1R 的表达,但 Ang II 和 TNF-α 单一作用对 AT2R 的表达无明显作用,联合使用也没有增高 Ang II 诱导的 AT2R 蛋白水平; Ang II 不能促进 FLS 的 GRK2 表达,但 TNF-α 可显著升高 FLS 的 GRK2 表达水平;抑制 GRK2 活性可显著抑制 FLS 的增殖、迁移与侵袭能力。有研究^[10-12]表明,TNF-α 可以通过其相应受体招募肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 活化 NF-κB 从而增强 RA-FLS 的侵袭性; Ang II 也可通过 AT1R 激活 NF-κB 信号途径,激活下游丝裂原激活的蛋白激酶家族成员,抑制体外培养的 FLS 凋亡,促进其对关节软骨的破坏^[5] 以及 RA-FLS 的迁移与侵袭^[13]。GRK 是一组与 GPCR 磷酸化脱敏相关的激酶,活化后可以磷酸化受体,使受体与 β-arrestins 形成复合体与 G 蛋白解偶联,从而使受体介导的信号转导效应消失或降低,GRK2 也可与 TRAF2 相互作用调节 cAMP-PKA 通路和 ERK 信号影响 FLS 的功能^[14-15]。以上结果提示,TNF-α 可以增强 Ang II 诱导的 FLS 增殖、迁移与侵袭能力,而 GRK2 可能是其作用的关键分子。

参考文献

[1] Scott D L, Wolfe F, Huizinga T W. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2010, 376(9746): 1094-108.

[2] Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G, et al. New insights in synovial angiogenesis [J]. Joint Bone Spine, 2010, 77(1): 13-9.

[3] Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, et al. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts [J]. Trends Mol Med, 2010, 16(10): 458-68.

- [4] Pattacini L, Casali B, Boiardi L, et al. Angiotensin II protects fibroblast-like synoviocytes from apoptosis *via* the AT1-NF- κ B pathway [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, 46(8): 1252–7.
- [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): 1577–87.
- [6] Bartok B, Firestein G S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233–55.
- [7] Niedermeier M, Pap T, Korb A. Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2010, 24(4): 527–40.
- [8] Perlman H, Pope R M. The synovial lining micromass system: toward rheumatoid arthritis in a dish [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(3): 643–6.
- [9] Li G, Liu D, Zhang Y, et al. Celastrol inhibits lipopolysaccharide-stimulated rheumatoid fibroblast-like synoviocyte invasion through suppression of TLR4/ NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression [J]. 2013, 8(7): e68905.
- [10] Li Y, Sheng K, Chen J, et al. Regulation of PGE2 signaling pathways and TNF-alpha signaling pathways on the function of bone marrow-derived dendritic cells and the effects of CP-25 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 769: 8–21.
- [11] Hot A, Zrioual S, Lenief V, et al. IL-17 and tumour necrosis factor α combination induces a HIF-1 α -dependent invasive phenotype in synoviocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(8): 1393–401.
- [12] Li G, Zhang Y, Qian Y, et al. Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- κ B/HIF-1 α pathway [J]. *Mol Immunol*, 2013, 53(3): 227–36.
- [13] Wang C, Chang Q, Sun X, et al. Angiotensin II induces an increase in matrix metalloproteinase 2 expression in aortic smooth muscle cells of ascending thoracic aortic aneurysms through JNK, ERK1/2, and p38 MAPK activation [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66(3): 285–93.
- [14] Chen J Y, Wu H X, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2 [J]. *Planta Med*, 2012, 78(7): 665–71.
- [15] 黄蓓. 重组人 TNF- α 受体融合蛋白联合甲氨蝶呤对小鼠胶原性关节炎的作用及 TNF- α 调节人滑膜细胞 EP4 信号的机制 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.

Tumor necrosis factor α enhances human fibroblast-like synoviocyte proliferation, migration, and invasion induced by angiotensin II and the mechanisms

Luo Xuexia, Yan Shangxue, Wang Ying, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology of Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To identify the effects and mechanisms of tumor necrosis factor α (TNF- α) enhances human fibroblast-like synoviocyte (FLS) proliferation, migration, and invasion induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** FLS was stimulated by different concentrations of Ang II (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L) combined with or without TNF- α (20 ng/ml) for 48 h, and then CCK8 assay and Transwell chamber were used to test FLS proliferation, migration and invasion. The expressions of Ang II receptors (AT1R and AT2R) and GRK2 were measured by immunofluorescence, laser confocal or Western blot. **Results** Ang II (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L) could promote the proliferation of FLS ($P < 0.05$), 10^{-7} mol/L was the optimum concentration. TNF- α (20 ng/ml) significantly enhanced the proliferation of FLS ($P < 0.05$). Ang II (10^{-7} mol/L) combined with TNF- α (20 ng/ml) had a further promotion on FLS proliferation ($P < 0.05$). The migration and invasion of FLS were significantly increased by Ang II, TNF- α or their combination (migration: $P < 0.01$, and invasion: $P < 0.05$). The expression of AT1R was increased ($P < 0.05$), but the expression of GRK2 only had a rising trend induced by Ang II ($P > 0.05$). The expressions of AT1R and GRK2 on FLS were increased significantly induced by TNF- α ($P < 0.05$) and their combination group ($P < 0.05$). GRK2 inhibitor could down-regulate the combination group effects on FLS such as migration and invasion ($P < 0.01$). **Conclusion** Ang II promotes FLS proliferation, migration and invasion. TNF- α could promote FLS proliferation, migration and invasion induced by Ang II through up-regulating the expressions of AT1R and GRK2 on FLS.

Key words Angiotensin II; TNF- α ; synovial fibroblasts; migration; invasion