

◆ 实验研究 ◆

灵芝多糖抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖和炎性因子释放的实验研究

刘喆¹, 夏楠楠², 刘农军¹, 郝冬林³, 李宁宁⁴

1. 驻马店市中心医院风湿免疫科, 河南 驻马店 463000
2. 郑州大学附属郑州中心医院风湿免疫科, 河南 郑州 450007
3. 苏州市中医医院风湿免疫科, 江苏 苏州 215000
4. 大连市中心医院风湿免疫科, 辽宁 大连 116000

【摘要】目的: 观察灵芝多糖 (GLPs) 对类风湿关节炎 (RA) 成纤维样滑膜细胞 (RA-FLSs) 增殖和炎性因子释放的影响。**方法:** 体外分离培养 RA-FLSs 后, 设置两部分实验: ①观察白细胞介素 (IL)-17 对 RA-FLSs 增殖的影响, 分为阴性对照组 (未经处理的 RA-FLSs)、IL-17 组 (加 5 ng/mL IL-17) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 组 (加 10 ng/mL TNF- α , 阳性对照); ②观察 GLPs 对 RA-FLSs 增殖及 IL-1 β 、IL-6 表达的抑制作用, 分为阴性对照组 (未经处理的 RA-FLSs)、IL-17 组 (加 5 ng/mL IL-17) 和 IL-17+GLPs 组 (加 5 ng/mL IL-17 与 5 ng/mL GLP)。各组细胞处理 48 h 后, 采用后续逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 表达; 通过蛋白质印迹法分析检测 IL-6、IL-1 β 以及丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶 (MAPK/ERK) 信号通路关键蛋白 (p65、p50) 的表达及磷酸化水平; 应用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 IL-6 和 IL-1 β 的蛋白表达水平, 以 OD₄₅₀ 值表示吸光度变化, 反映细胞因子分泌量的相对差异; 通过 CCK-8 实验评估细胞的增殖能力。**结果:** ①IL-17 能否促进 RA-FLSs 增殖 (IL-17 组、TNF- α 组、阴性对照组): 3 组 0 h 的 OD₄₅₀ 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。96 h, 3 组 OD₄₅₀ 值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-17 组及 TNF- α 组的 OD₄₅₀ 值均高于阴性对照组 ($P < 0.05$), IL-17 组的 OD₄₅₀ 值与 TNF- α 组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组培养 2 周后的细胞集落数比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-17 组及 TNF- α 组的细胞集落数均多于阴性对照组 ($P < 0.05$); IL-17 组的细胞集落数与 TNF- α 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组 IL-6、IL-1 β mRNA 相对表达量分别比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。IL-17 组、TNF- α 组的 IL-6、IL-1 β mRNA 相对表达量均高于阴性对照组 ($P < 0.05$), IL-17 组的 IL-6、IL-1 β mRNA 相对表达量与 TNF- α 组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。IL-17 组及 TNF- α 组的 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量均高于阴性对照组 ($P < 0.05$); IL-17 组的 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量与 TNF- α 组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。②GLP 能否抑制 RA-FLSs 增殖 (IL-17 组、IL-17+GLPs 组、阴性对照组): 0 h, 3 组 OD₄₅₀ 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。96 h, 3 组 OD₄₅₀ 值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-17 组的 OD₄₅₀ 值均高于阴性对照组及 IL-17+GLPs 组 ($P < 0.05$); IL-17+GLPs 组的 OD₄₅₀ 值与阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组培养 2 周后的细胞集落数比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-17 组的细胞集落数均多于阴性对照组及 IL-17+GLPs 组 ($P < 0.05$); IL-17+GLPs 组的细胞集落数与阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

[收稿日期] 2022-12-15
[修回日期] 2025-11-11
[基金项目] 苏州市姑苏区卫生人才培养项目 (GSWS2020086)
[作者简介] 刘喆 (1983-), 男, 医学硕士, 副主任医师。
[通信作者] 李宁宁 (1981-), 女, 医学硕士, 主任医师。

3组IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。IL-17组的IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量均高于阴性对照组及IL-17+GLPs组 ($P < 0.05$); IL-17+GLPs组的IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量与阴性对照组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。3组IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。IL-17组的IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量均高于阴性对照组及IL-17+GLPs组 ($P < 0.05$); IL-17+GLPs组的IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量与阴性对照组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。③蛋白质印迹法结果显示, GLPs可抑制IL-17诱导的MAPK/ERK信号通路及NF- κ B信号通路的磷酸化激活。结论: GLPs可有效拮抗IL-17诱导的RA-FLSs增殖及炎性因子释放,其调控效应与TNF- α 相当,提示GLPs可能成为RA抗炎治疗的潜在候选药物。

〔关键词〕 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 灵芝多糖; 炎性因子

〔中图分类号〕 R285.5; R593.22 〔文献标志码〕 A 〔文章编号〕 0256-7415 (2026) 04-0093-09

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2026.04.016

Experimental Study on Ganoderma Lucidum Polysaccharides Inhibiting the Proliferation and Inflammatory Factor Release of Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes

LIU Zhe¹, XIA Nannan², LIU Nongjun¹, HAO Donglin³, LI Ningning⁴

1. Department of Rheumatology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian Henan 463000, China; 2. Department of Rheumatology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou Henan 450007, China; 3. Department of Rheumatology, Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou Jiangsu 215000, China; 4. Department of Rheumatology, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian Liaoning 116000, China

Abstract: **Objective:** To observe the effects of ganoderma lucidum polysaccharides (GLPs) on the proliferation and inflammatory factor release of rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (RA-FLSs). **Methods:** After isolating and culturing RA-FLSs in vitro, two experiments were set up: ①To observe the effect of interleukin (IL)-17 on the proliferation of RA-FLSs cells, the cells were divided into a negative control group (untreated RA-FLSs), an IL-17 group (with 5 ng/mL IL-17), and a tumor necrosis factor- α (TNF- α) group (with 10 ng/mL TNF- α , a positive control); ②To observe the inhibitory effect of GLPs on the proliferation of RA-FLSs and the expression of IL-1 β and IL-6, the cells were divided into a negative control group (untreated RA-FLSs), an IL-17 group (with 5 ng/mL IL-17), and an IL-17+GLPs group (with 5 ng/mL IL-17 and 5 ng/mL GLPs). After 48 h of treatment, the mRNA expression of IL-6 and IL-1 β was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Western blot analysis was performed to assess the expression and phosphorylation levels of IL-6, IL-1 β , and key components of the mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated protein kinase (MAPK/ERK) and Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathways, specifically p65 and p50. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the protein expression levels of IL-6 and IL-1 β , with OD₄₅₀ values representing absorbance changes to reflect the relative differences in cytokine secretion. Cell proliferation was assessed using a CCK-8 assay. **Results:** ① Whether IL-17 can promote the proliferation of RA-FLSs (IL-17 group, TNF- α group, negative control group): There was no statistically significant difference in OD₄₅₀ values among the three groups at 0 h ($P > 0.05$). At 96 h, there was a statistically significant difference in OD₄₅₀ values among the three groups ($P < 0.05$); the OD₄₅₀ values of the IL-17 group and TNF- α group were higher than those of the negative control group ($P < 0.05$), while there was no statistically significant difference in OD₄₅₀ values between the IL-17 group and the TNF- α group ($P > 0.05$). After two weeks in culture, The count of cell colonies in the three groups showed statistically significant differences ($P < 0.05$). The count of cell colonies in the IL-17 group and the TNF- α group was more than that in the negative control group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the count of cell colonies between the IL-17 group and the TNF- α

group ($P > 0.05$). The relative expression levels of IL-6 and IL-1 β mRNA among the three groups showed statistically significant differences ($P < 0.05$). The relative expression levels of IL-6 and IL-1 β mRNA in the IL-17 group and TNF- α group were higher than those in the negative control group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the relative expression levels of IL-6 and IL-1 β mRNA between the IL-17 group and the TNF- α group ($P > 0.05$). The relative expression levels of IL-6 and IL-1 β proteins among the three groups were all statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression levels of IL-6 and IL-1 β proteins in the IL-17 group and the TNF- α group were higher than those in the negative control group ($P < 0.05$), while there was no statistically significant difference in the relative expression levels of IL-6 and IL-1 β proteins between the IL-17 group and the TNF- α group ($P > 0.05$). ② Whether GLPs can inhibit RA-FLSs proliferation (IL-17 group, IL-17+GLPs group, negative control group): At 0 h, there was no statistically significant difference in OD₄₅₀ values among the three groups ($P > 0.05$). At 96 h, the OD₄₅₀ values of the three groups showed statistically significant differences ($P < 0.05$). The OD₄₅₀ values of the IL-17 group were higher than those of the negative control group and the IL-17+GLPs group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in OD₄₅₀ values between the IL-17+GLPs group and the negative control group ($P > 0.05$). After two weeks in culture, the count of cell colonies in the three groups showed statistically significant differences ($P < 0.05$). The count of cell colonies in the IL-17 group was higher than that in the negative control group and the IL-17+GLPs group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the count of cell colonies between the IL-17+GLPs group and the negative control group ($P > 0.05$). The relative expression levels of IL-6 and IL-1 β mRNA in the three groups also showed statistically significant differences ($P < 0.05$). The relative expression levels of IL-6 and IL-1 β mRNA in the IL-17 group were significantly higher than those in the negative control group and the IL-17+GLPs group ($P < 0.05$); however, there were no statistically significant differences in the relative expression levels of IL-6 and IL-1 β mRNA between the IL-17+GLPs group and the negative control group ($P > 0.05$). The relative expression levels of IL-6 and IL-1 β proteins in the three groups were statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression levels of IL-6 and IL-1 β proteins in the IL-17 group were significantly higher than those in the negative control group and the IL-17+GLPs group ($P < 0.05$); however, there were no statistically significant differences in the relative expression levels of IL-6 and IL-1 β proteins between the IL-17+GLPs group and the negative control group ($P > 0.05$). ③ Western blot results showed that GLPs could inhibit IL-17-induced phosphorylation activation of the MAPK/ERK signaling pathway and the NF- κ B signaling pathway. **Conclusion:** GLPs can effectively antagonize IL-17-induced proliferation and inflammatory factor release in RA-FLSs, with a regulatory effect comparable to that of TNF- α , suggesting that GLPs may be a potential candidate drug for anti-inflammatory therapy in RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis; Fibroblast-like synoviocytes; Ganoderma lucidum polysaccharides; Inflammatory factors

类风湿关节炎(RA)是一种以炎症、滑膜炎、关节软骨及骨损伤为主要表现的常见慢性炎性疾病,约有40%~70%的患者最终会发展为残疾^[1-2]。病程较长的患者除有局部关节表现外,还可引起间质性肺疾病、心血管疾病等多种关节外表现^[3-4]。

现有研究认为,活化的成纤维样滑膜细胞(FLSs)广泛参与RA病理过程^[5-6]。FLSs的主要功能是提供滑

膜组织结构支持,分泌滑膜液润滑关节,减少摩擦运动,滋养无血管的软骨^[7]。而在RA患者的关节滑膜中,FLSs被活化,表现出细胞凋亡减少、迁移与侵袭能力增强,呈现出类似肿瘤细胞的生物学特征,参与RA的炎症过程^[8]。活化态的FLSs可产生白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素-6(IL-6)等促炎细胞因子以及基质金属蛋白

酶(MMP)和血管生成因子(VEGF),这些分子共同促进滑膜增生、软骨破坏及新生血管形成,是RA病理发展的核心驱动因素之一^[9]。另一方面,有研究认为,RA的滑膜炎多由固有免疫细胞和适应性免疫细胞的异常浸润与活化共同引起,微环境中,免疫细胞的比例失衡能够促进白细胞介素-17(IL-17)的释放,加速自身免疫性疾病的发生^[10]。IL-17可直接作用于FLSs,促进其活化与炎性表型转变,并刺激其释放IL-6、IL-1 β 等炎性因子,同时协同TNF- α 进一步放大炎症反应;此外,IL-17还能诱导FLSs产生趋化因子、生长因子及破坏性介质如一氧化氮(NO),促进滑膜炎的持续活化,加速软骨与骨质破坏,通过直接作用或招募中性粒细胞、单核细胞等多重途径加重RA炎症反应^[11]。因此,有效抑制IL-17对FLSs的活化作用,减少炎性因子的释放可能是治疗RA的有效手段。

灵芝(GL)属担子菌纲多孔菌科真菌,灵芝多糖(GLPs)是GL中重要的生物活性化合物之一,具有免疫调节、降血糖、抗氧化、抗衰老、抗癌等多种药理功能^[12]。研究表明,GLPs发挥了积极的抗癌作用,能够显著抑制Lewis肺癌^[13]。从GL破壁孢子粉中提取的粗制GLPs能够通过诱导大肠癌细胞凋亡和自噬来抑制肿瘤生长^[14]。从GL子实体中分离和纯化的精制GLPs通过调控核因子 κ B(NF- κ B)信号通路,抑制骨髓来源的抑制细胞(MDSCs)在脾脏和肿瘤组织中的积累,从而增强抗肿瘤免疫反应^[15]。色氨酸代谢产物和芳香烃受体通过调节NF- κ B信号通路和丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶(MAPK/ERK)磷酸化来减轻RA大鼠的炎症和免疫反应^[16]。GLPs可以通过抑制NF- κ B通路,从而限制炎性因子的释放^[17]。尽管GLPs在免疫调节方面已被证实具有良好潜力,但其在RA患者体内是否可抑制IL-17诱导的FLSs活化及炎性因子释放尚不明确。本研究通过体外实验,探讨GLPs是否能够抑制IL-17诱导的RA-FLSs增殖与炎性因子分泌,分析其是否通过阻断NF- κ B与MAPK/ERK通路发挥作用,从而为GLPs在RA治疗中的潜在应用价值提供实验依据。TNF- α 是RA研究中公认的关键致炎因子之一,长期作为靶向治疗的经典分子,其致病作用已被广泛证实。本研究以TNF- α 处理组为阳性对照,旨在比较GLPs对IL-17诱导的生物学效应是否具有相似或优越的调控作用。

结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 组织样本 本研究经驻马店市中心医院医学伦理委员会批准(EC-2019-KS-023)。所有参与者均签署知情同意书。研究共纳入2017—2019年在驻马店市中心医院因RA接受手术治疗的25例患者,其中男14例,女11例,年龄37~71岁,平均年龄55岁,术中采集滑膜组织标本。所有病例均经术后病理检查确诊为RA。10例健康对照标本,均取自2017—2019年在驻马店市中心医院行关节置换手术的关节外伤患者,其中男5例,女5例,年龄27~67岁,平均年龄47岁。所有健康对照者无自身免疫性疾病、传染病和恶性肿瘤等基础疾病。

1.2 细胞培养 获取新鲜滑膜组织后2 h内,无菌条件下剪碎,胰蛋白酶10 mL(2.5 g/L)消化2 h,以转速1 000 r/min、离心半径10 cm离心10 min,获得目的细胞。DMEM培养基(Invitrogen,美国),加10%胎牛血清(Gibco,美国)、青霉素和链霉素(均购自P/S, Gibco,美国),于37℃、5% CO₂条件下培养细胞,细胞生长约80%时传代,选取传到3~5代的细胞进行实验。

1.3 GLPs制备 GL破壁孢子粉购自浙江寿仙谷植物药研究院有限公司。通过热水提取法从GL的破壁孢子粉中提取GLPs。将5 g GLPs置于100 mL超纯水中去除脂质,然后在70℃下振荡(300 r/min)12 h。以转速4 000 r/min离心15 min去除溶液中的不溶性物质。采用溶剂萃取法中的Sevage法进一步纯化以去除蛋白质,并再次离心,收集上清液。将上清液浓缩,使用H051冷冻干燥机(LaboGene,丹麦)进行冷冻干燥以获得GLPs用于后续实验。

1.4 实验分组 ①在观察IL-17能否促进RA-FLSs增殖的实验中,未处理的RA-FLSs作为阴性对照组,加入人重组IL-17(PeproTech,美国,货号AF-200-17,浓度为5 ng/mL)的组别设为IL-17组;加入10 ng/mL人重组TNF- α (PeproTech,美国,货号300-01A,浓度为20 ng/mL)的组别设为TNF- α 组,作为阳性对照。②在观察GLPs能否抑制RA-FLSs增殖,抑制IL-1 β 和IL-6表达的实验中,未处理的RA-FLSs作为阴性对照组,加入5 ng/mL IL-17的组别设为IL-17组,同时加入5 ng/mL IL-17、5 ng/mL GLPs的组别设为IL-17+GLPs组。相应处理48 h后,收集各

组细胞,用于后续逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质印迹法和酶联免疫吸附法(ELISA)检测。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 RT-PCR 用于检测目标基因在转录水平的表达。从细胞中分离得到总RNA。使用Super RT cDNA合成试剂盒(Thermo Fisher Scientific,日本)将RNA模板逆转录为cDNA。以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参,采用特异性引物对目的mRNA进行扩增和检测(7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems,美国)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量,重复3次。引物信息如下,IL-6: Forward, AGACA GCCACTCACCTCTTCAG, Reverse: TTCTGCCAGTG C CTCTTTGCTG; IL-1 β : Forward, CCACAGACCTTCC AGGAGAATG, Reverse: GTGCAGTTCAGTGATCGTA CAGG; β -actin: Forward, CACCATTTGGCAATGAGC GGTTC, Reverse: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT。记录各组IL-6、IL-1 β 的mRNA相对表达量。

1.5.2 蛋白质印迹法 提取总蛋白,经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(上海起发实验试剂有限公司),随后转移到硝基纤维素膜(Millipore Corporation,美国)。膜在室温下用5%脱脂牛奶封闭1 h,然后加入IL-6(1:1 000, Abcam,美国),IL-1 β (1:1 000, Abcam,美国)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)(1:1 000, Abcam,美国)、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)(1:1 000, Abcam,美国)、甲基乙基酮(MEK)(1:1 000, Cell Signaling Technology,美国)、人磷酸化甲基乙基酮激酶(p-MEK)(1:1 000, Cell Signaling Technology,美国)、高尔基体外周膜蛋白(p65)(1:1 000, Cell Signaling Technology,美国)、人源重组蛋白NF- κ B(p50)(1:1 000, Cell Signaling Technology,美国)、组蛋白3(Histone3)(1:1 000, Abcam,美国)和 β -actin(1:1 000, Proteintech Group,美国)孵育过夜。膜洗涤3次,二抗(1:5 000, Proteintech Group,美国)室温下孵育1 h,显影成像。该方法可检测IL-6、IL-1 β 、MAPK/ERK信号通路[细胞外信号调节激酶(ERK)、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)、丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶激酶(p-MEK)]以及NF- κ B信号通路关键蛋白(p65、p50)的表达及磷酸化水平,从而评估以上各项处理对RA-FLSs炎症反应和信号通路激活情况的影响。

1.5.3 ELISA 使用ELISA试剂盒(R&D Systems,美国)检测细胞因子表达水平。实验分组同前,取培养液上清,各组样品一式两份进行检测,用ELISA试剂盒提供的免疫测定标准作为阳性对照。使用美国Thermo Labsystems公司生产的Labsystems Multiscan MS比色板读数器,在450 nm波长下检测吸光度(OD₄₅₀),并根据空白孔进行校正。使用美国Thermo Labsystems公司生产的Ascent Software v.2.6进行计算。ELISA可定量检测RA-FLSs上清液中IL-6与IL-1 β 的蛋白水平,以OD₄₅₀值反映蛋白相对表达量,从而判断GLPs是否能抑制IL-17诱导的炎症因子释放。

1.5.4 细胞增殖情况 实验分组同前。各组均于相应处理结束后,在6孔板中培养细胞,每孔接种2 000个细胞(2 mL)。培养2周后,用PBS缓冲液(Gibco,美国)洗涤细胞集落3次,4%多聚甲醛(武汉博士德生物工程有限公司,中国)固定,0.1%结晶紫溶液(Sigma-Aldrich,美国)染色。通过ImageJ软件记录各组的细胞集落数。

1.5.5 CCK-8实验 评估细胞的增殖能力。按照CCK-8试剂盒(MCE,中国)说明书进行检测。将各组细胞接种于96孔板(1×10^5 个/mL, 200 μ L/孔),于接种24 h、48 h、72 h、96 h加入CCK-8试剂(10 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C,5% CO₂条件下培养2 h,使用多功能酶标仪在450 nm波长下检测OD,通过OD₄₅₀值评估细胞的增殖情况。实验重复3次。

1.6 统计学方法 本研究使用SPSS22.0软件进行统计分析。符合正态分布和方差齐性的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。3组计量资料比较采用单因素方差分析,若方差分析结果显示组间差异有统计学意义,则采用Holm-Sidak法进行事后两两组间比较。 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 研究结果

2.1 IL-17能否促进RA-FLSs增殖的实验结果

2.1.1 3组OD₄₅₀值及培养2周后的细胞集落数比较 见表1。经CCK-8实验,3组0 h的OD₄₅₀值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。96 h,3组OD₄₅₀值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);IL-17组及TNF- α 组的OD₄₅₀值均高于阴性对照组($P < 0.05$),IL-17组的OD₄₅₀值与TNF- α 组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。3组培养2周后的细胞集落数比较,差

异有统计学意义($P<0.05$)；IL-17组及TNF- α 组的细胞集落数均多于阴性对照组($P<0.05$)；IL-17组的细胞集落数与TNF- α 组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。提示IL-17及TNF- α 均可促进RA-FLSs增殖。从图1可见，IL-17组与TNF- α 组的细胞密度及集落面积均高于阴性对照组，提示IL-17可促进RA-FLSs增殖。

组别	样本量	OD ₄₅₀		细胞集落数(个)
		0h	96h	
阴性对照组	3	0.20±0.02	0.66±0.03	217±15
IL-17组	3	0.18±0.02	0.88±0.04 ^①	452±23 ^①
TNF- α 组	3	0.21±0.03	0.91±0.04 ^①	462±30 ^①

注：①与阴性对照组比较， $P<0.05$ 。

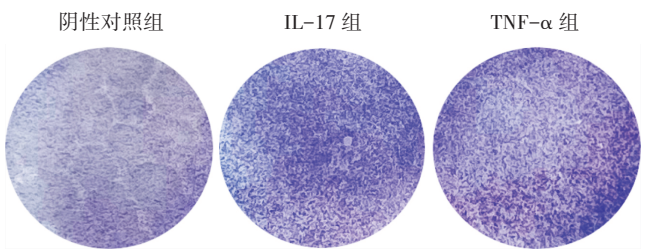


图1 3组RA-FLSs增殖情况

2.1.2 3组IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量比较 见表2。3组IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量比较，差异均有统计学意义($P<0.05$)。IL-17组及TNF- α 组的IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量均高于阴性对照组($P<0.05$)，IL-17组的IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量与TNF- α 组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。提示GLPs可有效下调IL-17诱导的炎症因子基因表达。

组别	样本量	IL-6	IL-1 β
阴性对照组	3	1.00±0.10	1.00±0.12
IL-17组	3	3.75±0.22 ^①	4.17±0.46 ^①
TNF- α 组	3	4.10±0.22 ^①	4.53±0.44 ^①

注：①与阴性对照组比较， $P<0.05$ 。

2.1.3 3组IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量比较 见表3。3组IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量比较，差异均有统计学意义($P<0.05$)。IL-17组及TNF- α 组的IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量均高于阴性对照组($P<0.05$)；

IL-17组的IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量与TNF- α 组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。提示IL-17与TNF- α 均可促进炎症因子蛋白的分泌。图2显示，IL-17组的IL-6、IL-1 β 蛋白条带灰度加深，提示IL-17可诱导炎症因子蛋白表达上调，但与TNF- α 组的条带灰度相似，说明二者促炎效果接近。

组别	样本量	IL-6	IL-1 β
阴性对照组	3	100±30	100±41
IL-17组	3	420±70 ^①	530±70 ^①
TNF- α 组	3	350±50 ^①	450±65 ^①

注：①与阴性对照组比较， $P<0.05$ 。

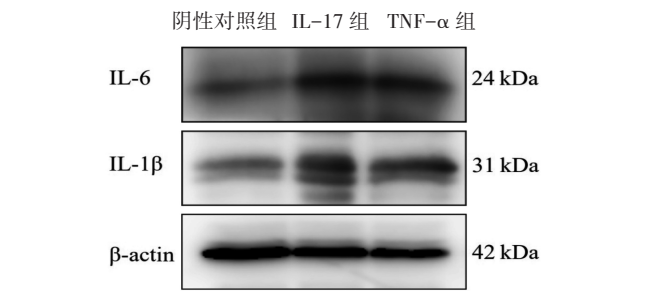


图2 3组IL-6、IL-1 β 蛋白表达条带图

2.2 GLPs能否抑制RA-FLSs增殖的实验结果

2.2.1 3组OD₄₅₀值及培养2周后的细胞集落数比较 见表4。经CCK-8实验，0 h，3组OD₄₅₀值比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。96 h，3组OD₄₅₀值比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；IL-17组的OD₄₅₀值均高于阴性对照组及IL-17+GLPs组($P<0.05$)；IL-17+GLPs组的OD₄₅₀值与阴性对照组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。3组培养2周后的细胞集落数比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；IL-17组的细胞集落数均多于阴性对照组及IL-17+GLPs组($P<0.05$)；IL-17+GLPs组的细胞集落数与阴性对照组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。提示GLPs能够抑制IL-17对RA-FLSs增殖能力的促进作用。从图3可见，IL-17组细胞密度增加，而GLPs干预后，细胞数量明显减少，提示GLPs可抑制IL-17诱导的细胞增殖。

2.2.2 3组IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量比较 见表5。3组IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量比较，差异均有统计学意义($P<0.05$)。IL-17组的IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量均高于阴性对照组及IL-17+GLPs

组($P<0.05$); IL-17+GLPs 组的 IL-6、IL-1 β mRNA 相对表达量与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。提示 GLPs 可有效下调 IL-17 诱导的炎症因子基因表达。

表4 3组OD₄₅₀值及培养2周后的细胞集落数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	OD ₄₅₀		细胞集落数 (个)
		0h	96h	
阴性对照组	3	0.19 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.04 ^①	212 $\pm$ 12 ^①
IL-17组	3	0.20 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.05	449 $\pm$ 28
IL-17+GLPs组	3	0.18 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.03 ^①	247 $\pm$ 29 ^①

注: ①与 IL-17 组比较, $P<0.05$ 。

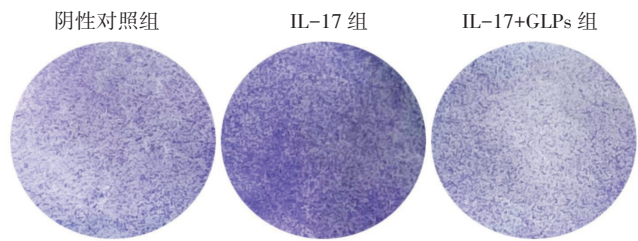


图3 3组RA-FLSs增殖情况

表5 3组IL-6、IL-1 β mRNA相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	IL-6	IL-1 β
阴性对照组	3	1.00 $\pm$ 0.10 ^①	1.00 $\pm$ 0.13 ^①
IL-17组	3	4.10 $\pm$ 0.22	4.30 $\pm$ 0.51
IL-17+GLPs组	3	0.89 $\pm$ 0.07 ^①	0.73 $\pm$ 0.10 ^①

注: ①与 IL-17 组比较, $P<0.05$ 。

2.2.3 3组 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量比较 见表6。3组 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。IL-17组的 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量均高于阴性对照组及 IL-17+GLPs 组($P<0.05$); IL-17+GLPs 组的 IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。图4显示, IL-17组的 IL-6、IL-1 β 蛋白条带灰度加深, GLPs 干预后, IL-17+GLPs 组的蛋白条带灰度减弱, 提示 GLPs 可抑制 IL-17 诱导炎症因子释放。

表6 3组IL-6、IL-1 β 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	IL-6	IL-1 β
阴性对照组	3	100 $\pm$ 35 ^①	100 $\pm$ 41 ^①
IL-17组	3	430 $\pm$ 75	520 $\pm$ 75
IL-17+GLPs组	3	72 $\pm$ 15 ^①	110 $\pm$ 20 ^①

注: ①与 IL-17 组比较, $P<0.05$ 。

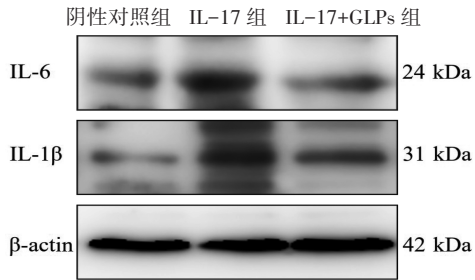
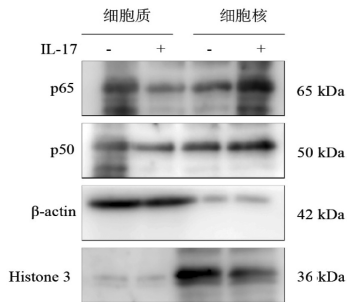


图4 3组IL-6、IL-1 β 蛋白表达条带图

2.2.4 NF- κ B 及 MAPK/ERK 信号通路关键蛋白表达结果 图5显示, 与阴性对照组相比, IL-17组细胞核组分的 p65、p50 蛋白条带灰度加深, 提示 NF- κ B 信号通路被激活。2组细胞质组分的 p65、p50 蛋白条带灰度相比, 均未见明显差异。

图6显示, 3组 MEK、ERK 蛋白条带灰度相比, 未见明显差异; IL-17组的 p-MEK、p-ERK 蛋白条带灰度较阴性对照组、IL-17+GLPs 组加深, 提示 MAPK/ERK 信号通路被激活。IL-17+GLPs 组的 p-MEK、p-ERK 蛋白条带灰度较 IL-17 组明显减弱, 提示 GLPs 抑制了 MAPK/ERK 信号通路的磷酸化激活。



注: “-”代表阴性对照组, “+”代表 IL-17 组

图5 阴性对照组与 IL-17 组的 NF- κ B 通路关键蛋白表达结果

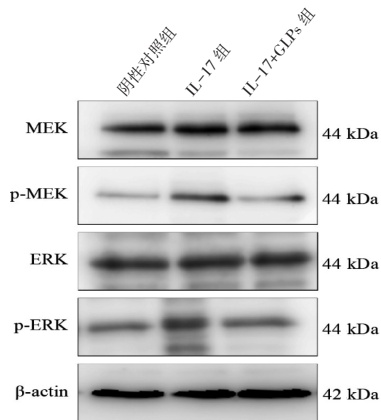


图6 3组 MAPK/ERK 信号通路关键蛋白表达结果

3 讨论

RA是一种自身免疫性疾病,可导致关节滑膜组织的慢性炎症,进而发展为不可逆的关节破坏,包括细胞侵袭性生长,滑膜增生,关节肿胀、疼痛和关节炎,以及软骨和滑膜损伤等^[18]。与其他具有恶性肿瘤表型的细胞类似,RA-FLSs可抵抗氧自由基和其他有毒代谢物对滑膜的损伤^[19]。因此,RA-FLSs表型的改变,可促进滑膜血管翳的形成并侵犯邻近的软骨和骨组织,也是RA发病的关键,现有的RA药物不能直接针对紊乱的RA-FLSs表型进行治疗。RA-FLSs具体的激活机制尚不清楚,但近期有研究发现,TNF等炎症因子在RA的发生发展中发挥重要的促进作用,TNF抑制剂在临床中取得了积极的治疗效果,但由于其费用高昂,限制了临床应用^[20]。另一方面,在RA的发病机制中,免疫细胞Th17/Treg失调也是导致RA发病的重要原因,Th17细胞主要通过分泌IL-17促进炎症反应,从而加速自身免疫性疾病的发生,同时加速了炎症细胞因子的释放^[21]。

目前已有许多关于GLPs相关机制的研究,如抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗糖尿病和免疫调节等活性,在治疗自身免疫性疾病和肿瘤的过程中发挥重要作用^[22-23]。GL具有抗过敏特性,可抑制肥大细胞释放组胺^[24-25],并减少免疫球蛋白G的产生^[26]。此外,GL还对血小板和单核细胞具有抑制作用^[27-28],可减少炎症因子的释放,从而抑制RA等自身免疫性疾病的免疫炎症反应,因此广泛应用于炎症性疾病的治疗。有研究结果显示,GL的提取物可以通过下调细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)表达,提高PD-L1单克隆抗体的抗肿瘤疗效,并减轻其引起的体重减轻和脾萎缩等不良反应^[29]。关于GLPs在RA治疗中作用的相关研究报道,目前仅检索到1篇,研究者认为GLPs可显著抑制RA-FLSs中IL-1 β 的表达^[17]。

本研究结果显示,IL-17可促进RA-FLSs的增殖及炎症因子IL-6、IL-1 β 的表达,而GLPs干预能有效逆转此效应。IL-17是RA发病中的关键促炎细胞因子,可通过激活MAPK/ERK信号通路及NF- κ B信号通路促进滑膜细胞增殖和炎症因子释放。本研究结果显示,IL-17组的OD₄₅₀值、细胞集落数与IL-6、IL-1 β 的mRNA相对表达量及蛋白相对表达量均高于阴性对照组,提示IL-17可促进细胞活化与炎症反应。GLPs处理后,上述指标均下降,说明其可拮抗

IL-17诱导的炎症反应。蛋白质印迹法结果进一步证实GLPs可降低p-MEK、p-ERK的表达水平,促进p50和p65向细胞核迁移,提示其可通过抑制MAPK/ERK及NF- κ B信号通路的激活发挥抗炎作用,减少RA-FLSs的增殖与炎症因子释放,显示出良好的抗炎潜力。与TNF- α 组相比,GLPs对IL-17诱导的炎症因子分泌的抑制效应相近,提示GLPs在信号通路调控上可能具有与生物制剂类似的潜在作用机制。GLPs作为天然多糖,安全性高、不良反应小,在抑制炎症、调节免疫方面具有显著优势,为RA的治疗提供新的候选分子。未来研究应进一步解析GLPs的主要活性成分、作用靶点及体内药效,并探讨其与IL-17拮抗剂或TNF- α 拮抗剂联合应用的可能性。

综上所述,本研究证明了GLPs治疗RA的潜在效果和价值,但仍有几点需在后续研究中继续补足。首先,目前还未明确GLPs治疗RA的具体有效成分,这也限制了对GLPs治疗RA相关分子机制的深入探讨。第二,目前的研究主要集中在体外实验部分,已建立小鼠RA模型并采用GLPs进行抗RA治疗。通过对GLPs治疗小鼠RA模型的病灶组织样本进行分析,有望为临床转化提供更有意义的参考。第三,本研究只进行了单药治疗,联合阿达木单抗等药物的综合治疗也是有价值的研究方向。

[参考文献]

- [1] BURMESTER G R, POPE J E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2017, 389(10086): 2338-2348.
- [2] SMOLEN JS, ALETAHA D, MCINNES IB. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [3] RADNER H, LESPERANCE T, ACCORTT N A, et al. Incidence and Prevalence of Cardiovascular Risk Factors Among Patients With Rheumatoid Arthritis, Psoriasis, or Psoriatic Arthritis[J]. *Arthritis Care Res(Hoboken)*, 2017, 69(10): 1510-1518.
- [4] ZAMORA-LEGOFF J A, KRAUSE M L, CROWSON C S, et al. Patterns of interstitial lung disease and mortality in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2017, 56(3): 344-350.
- [5] BARTOK B, FIRESTEIN G S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.
- [6] MALEMUD C J. Intracellular Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis[J]. *J Clin Cell Immunol*, 2013, 4: 160.
- [7] ELSHABRAWY H A, CHEN Z, VOLIN M V, et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(4): 433-448.

- [8] QIAN H Y, DENG C Q, CHEN S J, et al. Targeting pathogenic fibroblast-like synoviocyte subsets in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2024, 26(1): 103.
- [9] FAVA R A, OLSEN N J, SPENCER-GREEN G, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue[J]. *J Exp Med*, 1994, 180(1): 341-346.
- [10] PARADOWSKA-GORYCKA A, WAJDA A, ROMANOWSKA-PRÓCHNICKA K, et al. Th17/Treg-Related Transcriptional Factor Expression and Cytokine Profile in Patients With Rheumatoid Arthritis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 572858.
- [11] YASUDA K, TAKEUCHI Y, HIROTA K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases[J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(3): 283-297.
- [12] GUO C L, GUO D D, FANG L, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 267: 118231.
- [13] LIAO S F, LIANG C H, HO M Y, et al. Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(34): 13809-13814.
- [14] PAN H T, WANG Y J, NA K, et al. Autophagic flux disruption contributes to Ganoderma lucidum polysaccharide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells via MAPK/ERK activation[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 456.
- [15] WANG Y Y, FAN X W, WU X W. Ganoderma lucidum polysaccharide (GLP) enhances antitumor immune response by regulating differentiation and inhibition of MDSCs via a CARD9-NF- κ B-IDO pathway[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(6): BSR20201170.
- [16] JIANG Z M, ZENG S L, HUANG T Q, et al. Sinomenine ameliorates rheumatoid arthritis by modulating tryptophan metabolism and activating aryl hydrocarbon receptor via gut microbiota regulation[J]. *Sci Bull(Beijing)*, 2023, 68(14): 1540-1555.
- [17] HO Y W, YEUNG J S L, CHIU P K Y, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 301(1-2): 173-179.
- [18] HALEAGRAHARA N, HODGSON K, MIRANDA-HERNANDEZ S, et al. Flavonoid quercetin-methotrexate combination inhibits inflammatory mediators and matrix metalloproteinase expression, providing protection to joints in collagen-induced arthritis[J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(5): 1219-1232.
- [19] JANCZI T, BÖHM B B, FEHRL Y, et al. ADAM15 in Apoptosis Resistance of Synovial Fibroblasts: Converting Fas/CD95 Death Signals Into the Activation of Prosurvival Pathways by Calmodulin Recruitment[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71(1): 63-72.
- [20] ATZENI F, BATTICCIOTTO A, MASALA I F, et al. Infections and Biological Therapy in Patients with Rheumatic Diseases[J]. *Isr Med Assoc J*, 2016, 18(3-4): 164-167.
- [21] NOACK M, MIOSEC P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(6): 668-677.
- [22] SOHRETOGLU D, HUANG S L. Ganoderma lucidum Polysaccharides as An Anti-cancer Agent[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(5): 667-674.
- [23] LU J H, HER J, SUN P L, et al. Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from Ganoderma lucidum (Lingzhi), a review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 150: 765-774.
- [24] BHARDWAJ N, KATYAL P, SHARMA A K. Suppression of inflammatory and allergic responses by pharmacologically potent fungus Ganoderma lucidum[J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2014, 8(2): 104-117.
- [25] TASAKA K, AKAGI M, MIYOSHI K, et al. Anti-allergic constituents in the culture medium of Ganoderma lucidum. (I). Inhibitory effect of oleic acid on histamine release[J]. *Agents Actions*, 1988, 23(3-4): 153-156.
- [26] LIU Q, TIE L. Preventive and Therapeutic Effect of Ganoderma (Lingzhi) on Diabetes[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1182: 201-215.
- [27] ENDALE M, LEE W M, KAMRUZZAMAN S M, et al. Ginsenoside-Rp1 inhibits platelet activation and thrombus formation via impaired glycoprotein V signalling pathway, tyrosine phosphorylation and MAPK activation[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(1): 109-127.
- [28] JANG K J, CHOI S H, YU G J, et al. Anti-inflammatory potential of total saponins derived from the roots of Panax ginseng in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(3): 1109-1115.
- [29] HE J M, ZHANG W K, DI T Y, et al. Water extract of sporoderm-broken spores of Ganoderma lucidum enhanced pd-11 antibody efficiency through downregulation and relieved complications of pd-11 monoclonal antibody[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110541.

[责任编辑: 吴凌, 蒋维超(英文)]