

JAK 抑制剂托法替布治疗类风湿关节炎 相关间质性肺病的实验研究

蒋 总¹, 姚晓玲¹, 唐 芳², 马武开², 兰维娅², 姚血明², 安 阳², 刘正奇²

摘要 目的 观察托法替布通过调控 JAK-STAT 信号通路对间质性肺病(ILD)的影响。方法 Wistar 大鼠随机分为正常组、ILD 模型组、醋酸泼尼松组、托法替布组。除正常组外,其余 3 组予 3 mg/ml 博莱霉素溶液进行造模。灌胃干预 28 d 后收集所有大鼠肺组织行 HE 染色、Western blot 法检测 JAK1、STAT1 蛋白含量;ELISA 检测大鼠血清中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、IL-10、IL-1 β 水平。结果 ILD 模型组、醋酸泼尼松组、托法替布组肺组织 HE 染色均可见肺泡组织增厚,肺泡壁毛细血管充血、支气管管腔上皮细胞脱落、炎性细胞渗出。Western blot 结果显示 ILD 模型组 JAK1 和 STAT1 均升高;与 ILD 模型组比较,托法替布组、醋酸泼尼松组均有不同程度下降($P < 0.05$)。ELISA 结果显示 ILD 模型组血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达较正常组升高($P < 0.01$);与 ILD 模型组比较,托法替布组、醋酸泼尼松组表达

均下降($P < 0.05$),IL-10 表达与之相反。结论 托法替布通过抑制 JAK-STAT 通路并下调炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及上调抑炎因子 IL-10 的表达,减轻肺组织损伤,减轻炎症反应,治疗 ILD。

关键词 JAK-STAT;托法替布;类风湿关节炎;间质性肺病
中图分类号 R 593.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0819-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.019

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种多器官、多系统受累的免疫性疾病^[1]。普通型间质性肺炎(usual interstitial pneumonia, UIP)是 RA-间质性肺病(interstitial lung disease, ILD)中最常见的类型之一,也是 RA 死亡的主要原因之一^[2]。目前 RA-ILD 的发病机制尚不清楚,且缺乏有效的治疗手段。因此,探索 RA-ILD 的发病机制及寻求有效治疗药物尤为重要。目前研究证实 JAK 信号通路与 RA 密切相关,相关药物已经批准用于临床^[3]。临床中也发现托法替布(JAK 抑制剂)不仅能有效缓解 RA 病情,还能缓解 ILD 影像学表现。已有研究^[4]报道发现 ILD 与 JAK 信号通路有明显的相关性,但无明确的证据显示 JAK 信号通路与 RA-ILD 发病的关系。该研究通过建立 RA-ILD 动物模型,研究托法替布抑制 JAK 信号通路治疗 RA-ILD 的分子机制,为临床治疗 RA-ILD 提供新的方法。

2022-12-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160917);贵州省高层次创新型人才培养计划(编号:黔科合平台人[2016]5650);贵州省中医风湿免疫疾病临床研究中心项目(编号:黔科合平台人才[2020]2202号);贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(编号:黔教合 KY 字[2022]262号);贵州省卫健委科技基金(编号:gzwkj2021-142)

作者单位:¹ 贵州中医药大学第二临床医学院,贵阳 550002

² 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科,贵阳 550003

作者简介:蒋 总,男,住院医师;

唐 芳,女,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: 64550932@qq.com

of HGFs was significantly improved at the concentrations of 12.5, 25, 50 and 100 mg/L GsRg1 ($P < 0.05$), and the proliferation promotion effect of 100 mg/L GsRg1 was the strongest. There was no significant difference between the 6.25 mg/L GsRg1 group and the control group. After GsRg1 treatment, the migration ability of HGFs was enhanced and showed concentration dependence. Compared with the control group, the activity of ALP in 100 mg/L GsRg1 group significantly increased ($P < 0.01$). Alizarin red staining showed a significant increase in the number of calcium nodules ($P < 0.01$). The mRNA and egg white expression levels of osteogenic genes OCN, OPN and COL-1 increased ($P < 0.05$). The expression levels of p-PI3K and p-Akt were significantly up-regulated with time ($P < 0.05$), while the expression levels of PI3K and AKT had no significant changes. **Conclusion** GsRg1 can promote the proliferation and migration of HGFs, and 100 mg/L GsRg1 can promote the osteogenic differentiation of HGFs, which may be related to the activation of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words human gingival fibroblasts; ginsenoside Rg1; cell proliferation; cell migration; osteogenesis differentiation

1 材料与方 法

1.1 材料 博来霉素[批号:60216ES60, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司];醋酸泼尼松片(批号:20200902, 华中药业股份有限公司);托法替布(批号:1H08112DC2, 齐鲁制药有限公司);伊红染色液、苏木精染色液、PBS 购自赛维尔生物科技有限公司;ELISA 试剂盒:肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-10 和 IL-1 β 购自瑞新生物科技有限公司;JAK1、STAT1、GAPDH 抗体、二抗购自爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 动物 24 只雄性 Wistar 大鼠,40~50 日龄,购于重庆恩斯维尔生物科技有限公司,在通风良好的房间内饲养,并在昼夜 12 h/12 h 的光照和黑暗循环中保持。所有实验方案按照《实验动物护理和使用指南》执行,动物实验经贵州中医药大学第二附属医院医学伦理委员会批准。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与建模 大鼠随机分为正常组、ILD 模型组、醋酸泼尼松组、托法替布组,每组 6 只。除正常组外,其余 3 组大鼠麻醉仰卧位固定于手术台上,经气管插入 18 号大鼠导管后注入博来霉素溶液 3 mg/(ml·kg)造模。造模 4 周后,正常组、ILD 模型组予 1 ml/100 g 生理盐水灌胃,醋酸泼尼松组(醋酸泼尼松用生理盐水溶解)以 6 mg/kg 的剂量、1 ml/100 g 的体质量灌胃;托法替布组以 1 mg/kg 的剂量、1 ml/100 g 的体质量灌胃,4 组灌胃均为每日 1 次,连续灌胃 28 d 后处死动物取材做后续实验。

1.3.2 HE 染色 将肺组织用 PBS 清洗后用多聚甲醛固定,分别置于不同浓度乙醇中脱水后予二甲苯浸泡,放置于融化的石蜡中,用切片机将石蜡块中的组织切成 2.5 μ m 厚的薄片,将切片放置于 55 $^{\circ}$ C 烤片机上,使组织片紧贴于防脱玻片上,再次脱蜡、复水,苏木精染色,盐酸乙醇溶液进行分脱色,伊红染色液染色,乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片,显微镜对切片进行图像采集。

1.3.3 ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 表达 按照试剂盒说明书:设置标准品孔和样本孔,加入不同浓度的标准品 50 μ l(样本孔先加待测样本 10 μ l 和释品 40 μ l),每孔加入检测抗体 100 μ l,用封板膜封住孔板,37 $^{\circ}$ C 放置 60 min 弃去板孔中液体加满洗涤液,静置后弃去洗涤液,重复 5 次,

每孔加入底物 A、B 各 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后,每孔加入终止液 50 μ l,在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度(optical density, OD)值。

1.3.4 Western blot 法检测肺组织中 JAK1、STAT1 蛋白表达 将组织放在研钵中,加入适量液氮冷冻组织后研磨组织成粉末,加入 RIPA 裂解液充分裂解细胞并提取上清,制胶,放入电泳槽。分别从各样本总蛋白中取出 500 μ g 与 5 \times SDS 上样缓冲液按 4:1 比例混合,混合后蛋白的浓度为 3.3 μ g/ μ l,金属浴加热 100 $^{\circ}$ C 6 min 使蛋白变性后上样进行电泳,电泳完毕后取出膜并做好正反面标记,在 TBST 中清洗 1 min,然后用 5% 脱脂牛奶封闭液室温封闭 1 h 后用 TBST 洗 3 次,用一抗稀释液按 1:1 000 稀释一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用封闭液将二抗稀释成一定的浓度(1:2 000),然后室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次,将曝光液均匀覆盖在整片膜上反应后放入曝光仪曝光检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析,图片使用 GraphPad 9.4.1 软件制作。计量资料符合正态分布及方差齐性采用单因素方差分析,非正态或方差不齐采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 正常组自实验开始至结束精神状态可,皮毛光泽,反应灵活,饮食、饮水量、呼吸频率均正常,体质量自然增长;ILD 模型组造模 1 d 后出现活动减少,毛色欠光泽、蜷缩,呼吸加快,耸毛、饮食和饮水减少,体质量减轻,实验后期体质量缓慢增长,饮食、饮水较少;醋酸泼尼松组造模后逐渐出现活动减少,毛色欠光泽,轻度耸毛、蜷缩、饮食减少,灌胃干预后体质量逐渐缓慢增长,呼吸频率逐渐缓慢至正常;托法替布组造模 1 d 后逐渐出现活动减少,毛色欠光泽,耸毛、蜷缩、饮食减少,灌胃干预后饮食逐渐恢复,体质量增长速度缓慢。

2.2 HE 染色 正常组肺泡结构清晰,肺泡壁结构完整正常。ILD 模型组肺组织对比正常组趋向实化,大多数肺泡壁毛细血管充血,肺泡壁增宽增厚;血管及支气管周围淋巴细胞浸润,肺泡腔内有炎性渗出物;支气管管腔内有大量脱落的上皮细胞及炎症细胞;可见少量心衰细胞。与 ILD 模型组比较,醋酸泼尼松组肺泡壁增厚现象减轻,肺组织实化有所改善,但仍可见大量肺泡壁毛细血管充血、支气管管腔上皮细胞脱落及少量炎症细胞浸润。与 ILD 模型

组比较,托法替布组肺泡壁增厚现象减轻,肺泡组织结构较为清晰,趋向正常组;少量肺泡壁毛细血管充血,支气管管腔内可见少量脱落的上皮细胞及炎症细胞,偶见炎性渗出物分布于肺泡腔内。见图1。

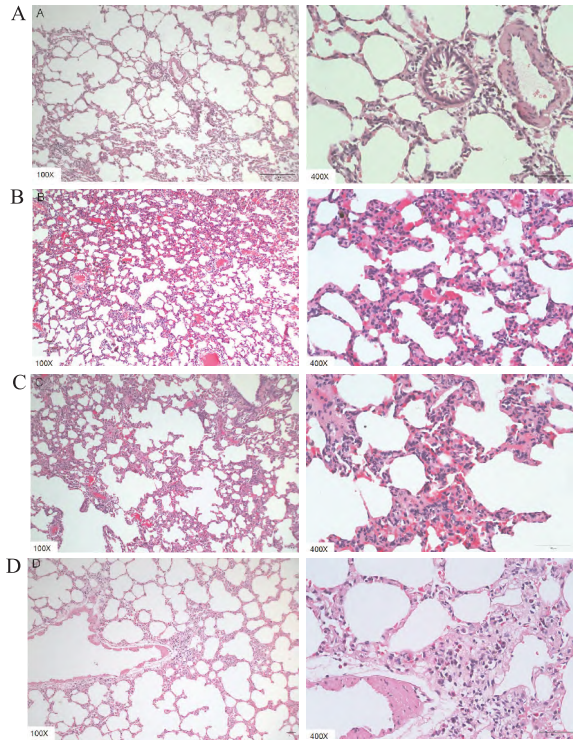


图1 各组大鼠肺组织病理切片

A: 正常组; B: ILD 模型组; C: 醋酸泼尼松组; D: 托法替布组

2.3 Western blot 法检测肺组织中 JAK1 和 STAT1 的蛋白表达 ILD 模型组中 JAK1 和 STAT1 的总蛋白水平高于正常组 ($P < 0.01$), 经药物干预治疗后 JAK1 和 STAT1 的总蛋白水平低于 ILD 模型组 ($P < 0.01$); 两组药物治疗比较: JAK1 在醋酸泼尼松组与托法替布组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), STAT1 在醋酸泼尼松组与托法替布组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图2。

2.4 ELISA 测定大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-1 β 含量 与正常组、醋酸泼尼松组、托法替布组比较, ILD 模型组中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 浓度增高 ($P < 0.01$), IL-10 浓度降低 ($P < 0.01$); 与醋酸泼尼松组比较, 托法替布组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 浓度增高 ($P < 0.05$), IL-10 浓度降低 ($P < 0.01$)。以上结果表明托法替布可有效降低 ILD 血清水平 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及上调抑炎因子 IL-10 的表达发挥抗炎作用。见图3。

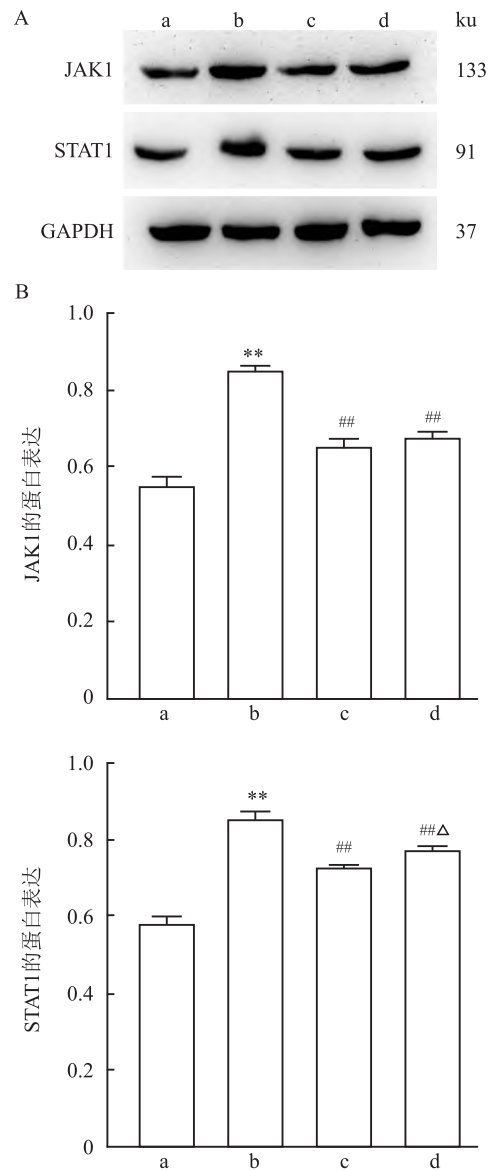


图2 各组肺组织中 JAK1 和 STAT1 的蛋白表达

A: 各指标条带图; B: JAK1、STAT1 的蛋白表达量; a: 正常组; b: ILD 模型组; c: 醋酸泼尼松组; d: 托法替布组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 ILD 模型组比较: ## $P < 0.01$; 与醋酸泼尼松组比较: $\Delta P < 0.05$

3 讨论

RA 发病过程中的关键细胞因子包括干扰素 (interferons, INF)- α/β 、IL-1、IL-6、IL-10 和 TNF 等^[5]。正常情况下, 这些被分泌至胞外的细胞因子或促进炎症或抑制炎症, 相互调节, 最终维持机体的免疫稳态。然而, 在 RA 患者体内的促炎/抑炎因子稳态被打破, 最终导致疾病的发展^[6]。

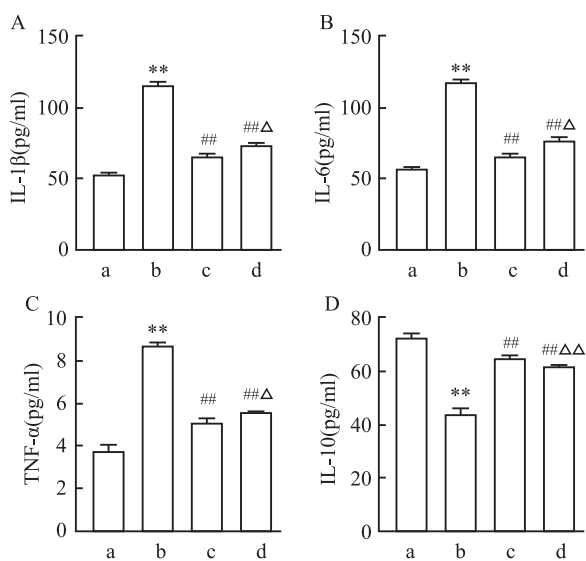


图3 血清中 TNF-α、IL-6、IL-10、IL-1β 表达

A: 各组血清中 IL-1β 的含量; B: 各组血清中 IL-6 的含量; C: 各组血清中 TNF-α 的含量; D: 各组血清中 IL-10 的含量; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 ILD 模型组比较: ### $P < 0.01$; 与醋酸泼尼松组比较: Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$

JAK-STAT 信号通路具有广泛的功能,是细胞外促炎因子通过膜受体向核内传导炎性信号的重要信号通路^[7]。JAK 是酪氨酸激酶的一种非跨膜形式,包括 JAK1、JAK2、JAK3, STAT 为信号转导和转录激活因子,在信号转导和基因转录中起着关键作用, JAK3 主要通过 IL2 γ 链的细胞因子 (IL-2、IL-4、IL-7、IL-9) 结合从而活化 T 细胞, JAK1 则主要与 γ 链的细胞因子结合,如 IL-6、IL-10、IL-13 及 INF γ ^[8]。而 T 细胞及其分泌的 TNF- α 、IL-17 等炎性因子在 RA 的发生发展过程中发挥重要的作用^[9]。

在 ILD 患者体内存在大量的炎症因子,如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10,而 IL-1 β 、IL-6 可以同时激活 JAK1 和 JAK2 通路,与受体耦联的 JAK 相互靠近并激活^[10]。STAT1 是成纤维细胞生长停滞的重要调节器,异常表达的 JAK/STAT1 信号通路在早期肺泡炎症及肺纤维化的形成过程中发挥重要作用^[11], STAT1 诱导炎症细胞在肺内聚集,引起血小板源性生长因子大量分泌,刺激平滑肌细胞、成纤维细胞增殖,从而导致肺纤维化形成。而 TNF- α / β 、IL-6、IL-10 作为 STAT1 的重要始动因子,能激活 STAT1 并发生磷酸化,而 TNF- α 已被证明能增强炎症反应,促进纤维化,并推动肺炎性疾病的进展,IL-6 作为促炎因子和促纤维化因子在肺纤维化中发挥作用,并在早期中和 IL-6 可改善肺纤维化^[12]。相反,IL-10

作为一种抗炎细胞因子,已经被证明对 RA 和 ILD 有保护作用^[13]。Nakagome et al^[14]报道小鼠静脉注射 IL-10 表达质粒可抑制博来霉素诱导 ILD 小鼠 TGF- β 的产生,改善纤维化,从而诱导肺成纤维细胞的增殖, JAK/STAT 信号通路的激活上调了 TNF- α 、IL-6 等促炎性细胞因子的表达,导致炎症反应,说明 JAK/STAT 信号通路与肺纤维化密切相关^[15]。

托法替布是作用于 JAK-STAT 信号通路的小分子 JAK 抑制剂(主要抑制 JAK1 和 JAK3,轻度抑制 JAK2),是近年来治疗 RA 的新型药物。本研究发​​现托法替布可通过抑制 JAK/STAT 使下游炎性细胞因子的合成减少起到治疗 RA-ILD 的作用。在本研究中,托法替布可有效改善 ILD 肺部组织病理及血清中炎症因子表达,有望在今后的 RA-ILD 临床治疗提供新的方案。但本研究药物干预仅为 28 d,希望在今后的研究中能有更长的周期进一步观察托法替布对 RA-ILD 的有效性及其安全性。此外,鉴于构建 RA-ILD 动物模型均为先构建 RA 动物模型后再予博来霉素构建 ILD 模型,并不能代表 RA-ILD 模型,因此,对 RA-ILD 动物模型的构建同样也是一个值得探索的方向。

综上所述,本研究表明,托法替布通过调控 JAK/STAT 信号通路,抑制下游炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及上调抑炎因子 IL-10 的表达,显著减轻 ILD 肺部炎症。托法替布通过调控 JAK/STAT 信号通路治疗 ILD 是一种很有前途的新方法,值得临床进一步推广应用。

参考文献

[1] Favalli E G, Biggioggero M, Crotti C, et al. Sex and management of rheumatoid arthritis [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2019, 56(3): 333-45.

[2] Suda T. Up-to-date Information on rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease [J]. Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med, 2016, 9(Suppl 1): 155-62.

[3] Fitton J, Melville A R, Emery P, et al. Real-world single centre use of JAK inhibitors across the rheumatoid arthritis pathway [J]. Rheumatology, 2020, 60(9): 4048-54.

[4] Malik S, Saravanan V, Kelly C. Interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: an update on diagnosis and management [J]. Int J Clin Rheumatol, 2012, 7(3): 297-308.

[5] Srirangan S, Choy E H. The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis [J]. Ther Adv Musculoskelet Di, 2010, 2(5): 247-56.

[6] Markovics A, Rosenthal K S, Mikecz K, et al. Restoring the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the treatment of rheumatoid arthritis: new insights from animal models

- [J]. Biomedicines, 2021, 10(1): 44–61.
- [7] Yue Y, Zhang Q, Wu S, et al. Identification of key genes involved in JAK/STAT pathway in colorectal cancer [J]. Mol Immunol, 2020, 128(2): 287–97.
- [8] Romana S F, Colbert R A, Massimo G. JAK1; number one in the family; number one in inflammation? [J]. Rheumatology, 2021, 60 (Suppl 2): ii3–10.
- [9] Dhaouadi T, Chahbi M, Haouami Y, et al. IL-17A, IL-17RC polymorphisms and IL17 plasma levels in tunisian patients with rheumatoid arthritis [J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194883.
- [10] Gono T, Kawaguchi Y, Kaneko H, et al. SAT0185 Characteristics of cytokine profiles and prognostic factors in interstitial lung disease with polymyositis/dermatomyositis [J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72 (Suppl 3): A643–4.
- [11] 范贤明, 王曾礼. STAT1 对实验性肺纤维化大鼠肺组织炎症的调控作用 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2004, 35(3): 343–6.
- [12] Wendel S, Venhoff N, Frye B C, et al. Successful treatment of extensive calcifications and acute pulmonary involvement in dermatomyositis with the Janus-Kinase inhibitor tofacitinib - a report of two cases [J]. J Autoimmun, 2019, 100 (5): 131–6.
- [13] Yuba E, Budina E, Katsumata K, et al. Suppression of rheumatoid arthritis by enhanced lymph node trafficking of engineered interleukin-10 in murine models [J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73(5): 769–78.
- [14] Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, et al. *In vivo* IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung [J]. Thorax, 2006, 61(10): 886–94.
- [15] Wilson M S, Madala S K, Ramalingam T R, et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent [J]. J Exp Med, 2010, 207(3): 535–52.

Experimental study on the treatment of rheumatoid arthritis associated interstitial pulmonary disease with JAK inhibitor tofacitinib

Jiang Zong¹, Yao Xiaoling¹, Tang Fang², Ma Wukai², Lan Weiya², Yao Xueming², An Yang², Liu Zhengqi²
(¹Second School of Clinical Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002;
²Dept of Rheumatology and immunology, the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003)

Abstract Objective To observe the effects of the tofacitinib on interstitial lung disease (ILD) by regulating the JAK-STAT signaling pathway. **Methods** Wistar rats were randomly divided into 4 groups: normal group, ILD group, prednisone acetate group, and tofacitinib group. Except for the normal group, the other three groups were given 3 mg/ml bleomycin solution for modeling. After 28 days of intragastric administration, the lung tissues of all rats were collected for hematoxylin-eosin staining (HE) and Western blot (WB) to detect the protein levels of JAK1 and STAT1; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect tumor necrosis factor in rat serum (TNF- α , interleukin (IL)-6, IL-10, IL-1 β). **Results** HE staining of lung tissue in ILD, prednisone acetate group and tofacitinib group showed alveolar tissue thickening, alveolar wall capillary congestion, bronchial luminal epithelial cells shedding, and inflammatory cell exudation. The results of WB showed that JAK1 and STAT1 significantly increased in ILD group, and decreased in different degrees compared with ILD group, tofacitinib group and prednisone acetate group ($P < 0.05$). The ELISA results showed that the expressions of serum TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the ILD group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.01$). The expression of pine group decreased ($P < 0.05$), and the expression of IL-10 was the opposite. **Conclusion** Tofacitinib reduces lung tissue damage and the inflammatory response in the treatment of ILD by inhibiting the JAK-STAT pathway and down-regulating the expression of inflammatory factors TNF- α , IL-6, IL-1 β and up-regulating the anti-inflammatory factor IL-10.

Key words JAK-STAT; tofacitinib; rheumatoid arthritis; interstitial lung disease