

网络出版时间: 2024-12-26 15:29:39 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1135.010>

白藜芦醇对类风湿性关节炎患者成纤维样滑膜细胞 cGAS-STING 信号通路的影响

汪陶荣¹, 邵玉宝¹, 刘楠楠², 李文昊³, 李 梦⁴, 陈晓宇^{1,2}(安徽医科大学¹ 形态学中心实验室、² 组织与胚胎学教研室, 合肥 230032; ³ 安徽医科大学
第一附属医院呼吸与危重症医学科, 合肥 230022; ⁴ 亳州职业技术学院药学系, 亳州 236800)

摘要 目的 探究白藜芦醇(Res)对类风湿性关节炎(RA)患者成纤维样滑膜细胞(FLS)的影响,并初步分析Res抑制FLS释放炎症因子的可能机制。方法 体外培养RA患者FLS细胞,采用不同浓度的Res(0、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$)进行处理,12、24 h后CCK-8法分别检测FLS细胞活力;采用不同浓度的Res(0、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)进行处理,FLS细胞24 h后,ELISA法分析FLS细胞分泌的炎症因子白细胞介素(IL)-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,Western blot测定细胞中环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cGAS)、干扰素刺激因子(STING)蛋白的表达水平;慢病毒感染FLS使其过表达cGAS,将细胞分为Control(对照)组、cGAS组(cGAS过表达)、Res+cGAS组(Res 160 $\mu\text{mol/L}$ +cGAS过表达)、Res组(Res 160 $\mu\text{mol/L}$)。Western blot测定各组细胞中STING蛋白的表达水平,CCK-8法检测各组FLS细胞活力,ELISA法检测各组细胞上清液中炎症因子IL-6和TNF- α 含量。结果 CCK-8实验结果显示,与0 $\mu\text{mol/L}$ Res组比较,使用40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的Res处理24 h后的三组FLS细胞活力下降($P < 0.01$);ELISA结果也表明与0 $\mu\text{mol/L}$ Res组比较,使用40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的Res处理后的三组FLS细胞上清液中IL-6和TNF- α 含量也降低($P < 0.01$)。同时,Western blot结果显示,与0 $\mu\text{mol/L}$ 的Res组相比,经过40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的Res处理后的三组FLS细胞中STING和cGAS蛋白表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与Control组相比,过表达cGAS后,cGAS组中FLS中STING蛋白表达水平增加($P < 0.05$),与Res组相比,Res+cGAS组中FLS细胞上清液中炎症因子含量及FLS中STING蛋白表达水平显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 适当剂量的Res能有效减少FLS细胞分泌炎症因子,而这一抑制作用机制可能源于其对cGAS-STING信号传导途径的阻断作用。

关键词 类风湿性关节炎;成纤维样滑膜细胞;白藜芦醇;cGAS-STING信号通路;白介素-6;肿瘤坏死因子- α

中图分类号 R 285

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0073-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.010

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为主要特征的慢性疾病,该病症的发展与成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synovocytes, FLS)的功能变化有着不可分割的联系^[1]。炎症因子白介素(interleukin, IL)-6和肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF)- α 不仅能够加剧关节的炎症和疼痛,还可能导致关节结构的持续损伤^[2]。因此,抑制IL-6和TNF- α 的水平可明显改善RA症状和体征^[3]。环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase, cGAS)-干扰素基因刺激因子

(stimulator of interferon gene, STING)信号通路是细胞内部的一种关键性免疫反应机制,对于维持机体的免疫平衡和抵御外来病原体侵袭具有重要意义^[4]。近年来的研究^[5-6]表明,cGAS-STING信号通路在RA的发病机制中扮演着重要角色。特别是在FLS中,cGAS蛋白的表达水平较高,这表明cGAS-STING信号通路可能在RA的滑膜炎中发挥着关键作用^[7-8]。白藜芦醇(resveratrol, Res)对自身免疫性疾病有突出疗效,其在免疫-炎症性疾病方面的作用强、疗效快在国内外得到公认^[9]。其具有抑制自身免疫性疾病作用使其逐渐展现出作为一类新型治疗药物的巨大潜力和价值。该实验探讨了Res对FLS内cGAS-STING信号通路传导途径的潜在影响,以期望揭示Res抑制炎症因子释放的分子机制,并为其作为治疗RA的药物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 慢病毒与实验细胞 cGAS过表达慢病毒(NM

2024-11-16 接收

基金项目:安徽省高校科研计划项目(编号:2023AH050607);安徽医科大学校科研基金(编号:2021xkj004)

作者简介:汪陶荣,女,助理实验师;

陈晓宇,男,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: cxyayd@163.com

_138441.3) 购于上海吉凯基因科技有限公司。RA 患者的 FLS 细胞株, 购于上海冠导生物有限公司, 编号: C0495。

1.2 主要试剂 Res (美国 Sigma 公司, 批号: R5010, 分子量 228.24); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂、胰酶细胞消化液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司); 胎牛血清(美国 BI 公司)、DMEM 培养基(美国 HyClone 公司); 脱脂奶粉(黑龙江完达山乳业股份有限公司)、二甲亚砜(上海 Biosharp 公司); cGAS、STING 抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab252416、ab288257); IL-6、TNF- α 的 ELISA 试剂盒(上海酶联生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器 全自动酶标仪(型号: Multiskan FC)、低温高速离心机(型号: Rfesco 21)(美国赛默飞世尔公司); 二氧化碳培养箱(美国热电公司, 型号: HERAcCell 150i); 倒置显微镜(奥林巴斯, 型号: CKX53); 电泳仪(北京六一仪器厂, 型号: ECP3000); 凝胶成像仪(上海培清科技有限公司, 型号: JS-680D); 超净工作台(苏州净化设备有限公司, 型号: SW-CJ-2FD); 电子天平(德国 satorius 公司, 型号: Bsa-124s); 恒温水浴锅(江苏常州环宇仪器厂, 型号: HH-2)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 将 FLS 在完全的培养基中进行复苏处理, 随后将其置于设定温度为 37 °C 且含有 5% CO₂ 的细胞培养箱内进行培养。当细胞达到约 80% 的融合状态时, 利用 0.25% 的胰蛋白酶溶液对细胞进行消化处理, 以便将细胞从培养容器上分离下来。之后, 按照 1:3 的比例将细胞稀释并接种到新的培养皿中以进行传代培养。

1.4.2 慢病毒感染细胞及分组 在进行实验之前, 首先通过预实验确定了复感染指数(MOI)为 100。接着用完全培养基制备密度为 1×10^5 个/ml 的细胞混悬液, 接种到 6 孔板中进行培养, 24 h 后换液, 向培养系统加入 100 μ l 1×10^8 转导单位病毒、40 μ l 25 $\times$ HitransG 慢病毒感染试剂、860 μ l 完全培养基。经过 12 h 后, 将培养基更换为完全培养基。48 h 后, 引入嘌呤霉素进行筛选, 通过绘制杀灭曲线来确定最佳筛选浓度为 1×10^{-5} g/ml。继续培养至 72 h 后, 成功获得 cGAS 过表达稳定细胞系。细胞稳转株构建成功后, 按是否过表达 cGAS 基因和培养液中是否加 Res 刺激, 将细胞分为 Control(对照)组(均不添加)、cGAS 组(cGAS 过表达)、Res + cGAS

组(Res 160 μ mol/L + cGAS 过表达)、Res 组(Res 160 μ mol/L)。

1.4.3 CCK-8 法检测细胞存活率 使用胰酶对 FLS 进行消化, 镜下控制消化时间大约为 1 min, 之后立即加入完全培养基终止消化并收集细胞, 接种对数生长期 FLS 细胞于 96 孔板, 每个孔中加入 100 μ l 的细胞悬液, 确保每个孔为 2 000 个细胞。24 h 后, 细胞贴壁汇合达 70% 左右后进行给药, 设置不同浓度 Res 给药组(终浓度为 0、20、40、80、160、320 μ mol/L), 每组各设 3 个复孔, 继续培养 12 h 或 24 h 后, 每组更换 100 μ l 培养基, 并在每孔分别加入 10 μ l CCK-8 溶液, 轻轻混匀, 放回细胞培养箱继续孵育 2 h。用全自动酶标仪在 450 nm 处测定各孔吸光度(absorbance, A)值, 记录 A 值。计算细胞活力: 细胞活力 = $(A_{\text{测定组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.4.4 ELISA 法检测 FLS 上清液炎症因子含量 同前方法制备细胞混悬液, 将 FLS 以 1×10^5 个/ml 接种于 6 孔板中, 待细胞汇合度至 80% 左右时可进行实验。分组给药方法同 1.4.2, 24 h 后吸取细胞上清液, 将收集到的上清液转移到适当的低温存储管中, 并将其存放在 -20 °C 的冷冻环境中以保持样本的稳定性。根据 ELISA 试剂盒说明书定量测定炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的含量。

1.4.5 Western blot 法检测 FLS 细胞 cGAS、STING 蛋白表达水平 分组给药方法同前, 全程冰上操作, 使用 PBS 清洗细胞两遍, 加入 RIPA 裂解液, 待细胞充分裂解后收集细胞, 低温高速离心机 4 °C 以 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 使用 BCA 进行蛋白浓度定量, 100 °C 水浴锅中煮沸 15 min 使蛋白变性, 待恢复常温后放入 -80 °C 冰箱保存备用。之后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗(GAPDH 1:500、cGAS 1:1 000、STING 1:1 000), 放入 4 °C 冰箱过夜, 恢复常温后洗膜, 加入二抗封闭 1 h, 曝光显影。使用 Image J 软件分析图像灰度值, 定量检测蛋白质表达水平。

1.5 统计学处理 利用 GraphPad Prism 7 软件进行数据的统计分析和图形绘制, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同处理组数据之间差异性采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行比较, 组间的两两比较使用 SNK- q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Res 对 FLS 的细胞活力的影响 与 0 μ mol/L

Res 组比较,处理 12 h 后,Res 浓度在 40 ~ 320 $\mu\text{mol/L}$ 时,FLS 细胞活力差异均无统计学意义($F = 1.79, P = 0.19$);然而,当处理 24 h 后,Res 浓度在 40 ~ 320 $\mu\text{mol/L}$ 时各组 FLS 细胞活力随浓度升高而逐渐下降($F = 69.38, P < 0.01$),其中 Res 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度对 FLS 细胞活力的抑制作用均在 60% 左右。见图 1。提示此 3 个浓度 Res 显著抑制 FLS 细胞活力。以上结果表明 Res 对 FLS 细胞活力具有浓度依赖性抑制作用。综合考虑 Res 的细胞毒性和对细胞活力的影响,选择 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 这 3 个浓度作为后续实验的实验浓度。

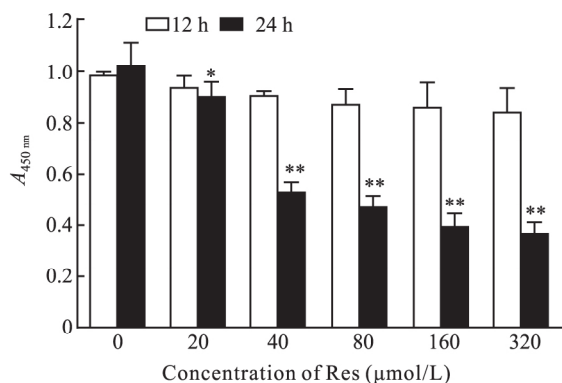


图 1 不同浓度 Res 和不同给药时间对 FLS 细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of different concentration and administration time of Res on the viability of FLS

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Res group.

2.2 Res 对 FLS 细胞上清液炎症因子水平的影响

ELISA 检测结果显示,不同浓度 Res 对 FLS 分泌 IL-6 ($F = 41.69, P < 0.01$) 及 TNF- α ($F = 86.29, P < 0.01$) 的抑制作用随浓度增加逐渐增强。提示 Res 对 FLS 分泌 IL-6、TNF- α 有抑制作用。见图 2。

2.3 Res 对 FLS 细胞 cGAS、STING 蛋白表达水平的影响 如图 3 所示,Res (0、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 处理 FLS 细胞 24 h 后,Western blot 结果显示,与 0 $\mu\text{mol/L}$ Res 组比较,Res 处理后的 FLS 细胞中 cGAS ($F = 56.59, P < 0.01$) 与 STING ($F = 40.86, P < 0.05$) 蛋白含量呈剂量依赖性降低。说明 Res 可明显抑制 FLS 的 cGAS-STING 信号通路。

2.4 过表达 cGAS 对 FLS 细胞 cGAS-STING 信号通路影响 方差分析结果显示,4 组间细胞的 STING 蛋白相对表达(图 4B)、细胞活力(图 4C)、上清液细胞因子 IL-6 水平(图 4D)和 TNF- α 水平(图 4E)均差异有统计学意义($F = 37.05、50.73、48.45、179.9$ 均 $P < 0.05$)。两两比较结果显示,与 Control 组相比,cGAS 组 FLS 中 STING 蛋白表达水平、炎症

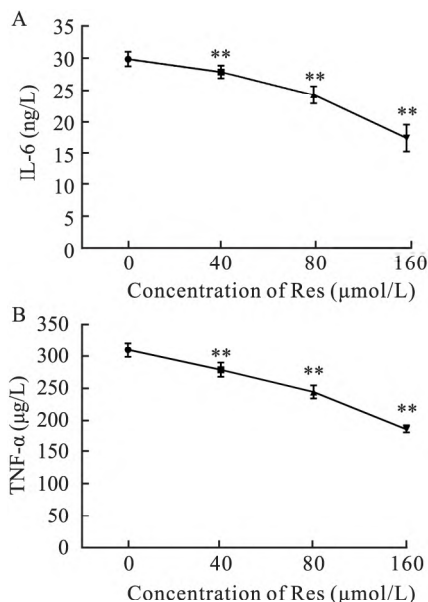


图 2 不同浓度 Res 对 FLS 分泌 IL-6 及 TNF- α 的影响($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects of Res at different concentrations on the secretion of IL-6 and TNF- α by FLS ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

A: IL-6; B: TNF- α ; ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Res group.

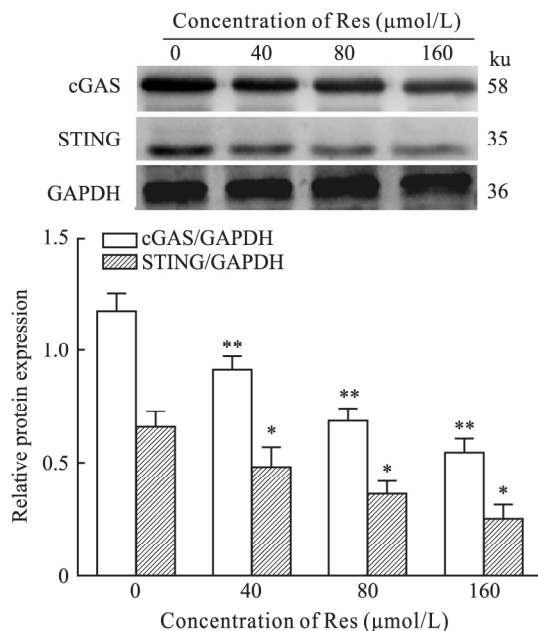


图 3 不同浓度 Res 对 FLS cGAS、STING 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of Res at different concentrations on expression of FLS cGAS and STING proteins

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Res group.

因子 IL-6 和 TNF- α 含量增加($q = 16.74、7.957、15.19; P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$),与 Res 组相比,Res + cGAS 组 FLS 细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 含量及 FLS 中 STING 蛋白表达水平增加($q = 13.21、$

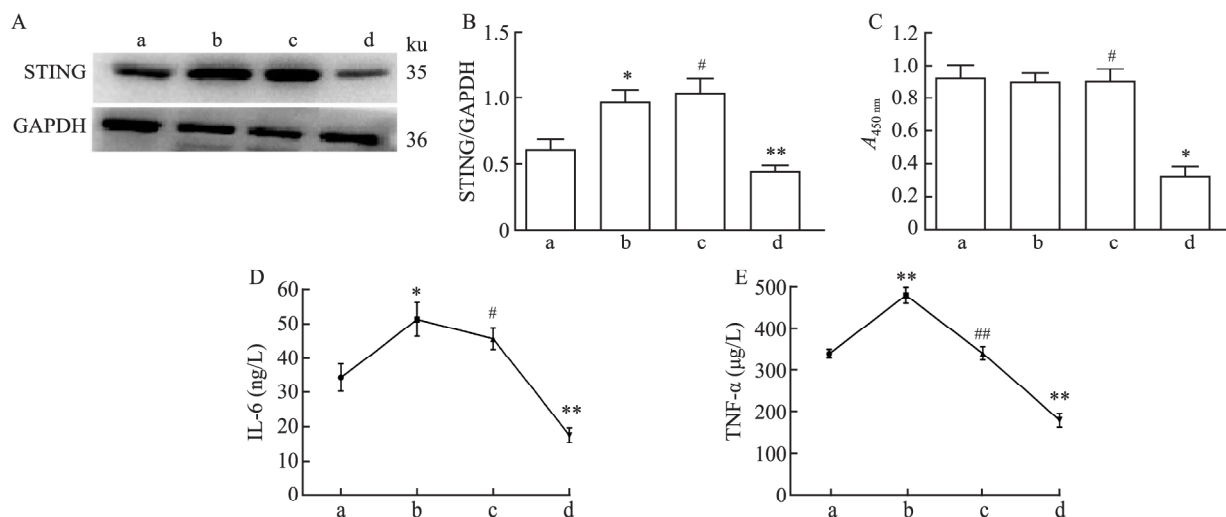


图4 过表达 cGAS 对 FLS cGAS-STING 信号通路的影响

Fig. 4 Effects of overexpression of cGAS on FLS cGAS-STING signaling pathway

A: Western blot results; B: Comparison of the relative expression of STING protein in each group; C: Comparison of the cell viability in each group; D, E: The levels of cytokines IL-6 and TNF- α in the supernatant of FLS in each group; a: Control group; b: cGAS group; c: Res + cGAS group; d: Res group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Res group.

17.71、11.24; $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果表明 Res 可抑制 FLS 炎症因子水平可能与其抑制 cGAS-STING 信号传导途径有关。

3 讨论

RA 是一种慢性、全身性自身免疫性疾病,其具体的病因和详细的发病机制尚未完全明确^[10]。病变早期,RA 患者发生关节炎性改变,随着病程进展,患者因滑膜持续性炎症引起关节僵硬甚至畸形。关节滑膜是关节内部的一层薄膜,它对维持关节的正常功能至关重要^[11]。FLS 是滑膜组织的重要组成部分,正常关节滑膜衬里层细胞仅由 1~2 层细胞构成,70%~80% 为 B 型 FLS。FLS 在关节健康中扮演着重要角色,它们通过分泌透明质酸和润滑素等物质,形成一种保护性屏障,有助于维持关节内部环境的稳定,减少摩擦,保护关节免受损伤^[8]。然而,RA 患者在慢性炎症的影响下,FLS 细胞被激活并表现出一系列病理特征^[12]。这些活化的 FLS 细胞不仅细胞活力增强,而且迁移和侵袭能力也显著增强,它们可以从原有的位置迁移到其他区域,加剧炎症反应^[13]。此外,这些细胞还异常分泌炎症因子,如 IL-6,进一步促进炎症过程和关节组织的破坏^[2]。活化的 FLS 细胞还参与滑膜的增生,形成所谓的“血管翳”,这是一种异常的组织增生,会导致关节结构的破坏和功能障碍。以上病理变化导致的

滑膜增生和炎症不仅引起关节疼痛和肿胀,还可能导致关节僵硬和运动范围受限,严重影响患者的生活质量^[14]。因此,控制 FLS 细胞的活化和炎症反应对于 RA 的治疗至关重要。

本课题组前期研究结果显示,Res 可抑制佐剂性关节炎大鼠炎症反应,对关节炎症状具有明显改善作用^[12-13]。Res 对 RA 患者关节滑膜组织中异常增多的炎症因子具有显著的抑制效果。通过减少这些炎症因子的产生,Res 有助于缓解 RA 患者的关节炎症状,减缓疾病进展,并可能对改善患者的生活质量产生积极影响^[9]。鉴于 FLS 细胞在 RA 的发病过程中扮演的关键角色,本实验采用体外培养的 FLS 细胞株进行实验,观察 Res 对其分泌细胞因子的作用及机制。观察到 Res 能够有效地抑制 FLS 在体外的增殖能力,且这种抑制效果与 Res 的使用剂量密切相关,即随着 Res 浓度的增加,对 FLS 增殖的抑制作用也相应增强,呈现出明显的剂量依赖性特征。在对已有的研究成果进行综合分析之后,选取 Res 的 40、80、160 nmol/L 三个不同浓度,作用 24 h 作为后续实验的条件。

近年来, cGAS-STING 通路被发现在 RA 这样的自身免疫疾病中起到一定作用^[15]。该通路通过识别细胞内的异常 DNA,激活一系列分子事件,从而触发炎症反应^[16]。激活的 cGAS-STING 信号通路会促进多种促炎细胞因子的表达和释放,如干扰素、

ILs 等,这些细胞因子在细胞间的通讯和免疫细胞的激活中起到关键作用,从而引发和放大炎症反应^[17]。因此,对 cGAS-STING 信号通路的调控对于疾病的治疗具有潜在的意义。在 RA 中,有证据^[6]表明 cGAS-STING 信号通路的激活可能参与到炎症反应和自身免疫过程。通过抑制或敲除 cGAS 或 STING,研究者们观察到炎症因子的分泌显著减少^[7]。这一发现揭示了 cGAS-STING 信号通路在调控炎症反应中的重要作用,特别是在 RA 等自身免疫性疾病中。因此,针对 cGAS-STING 信号通路的干预,如通过药物抑制 cGAS 或 STING 的活性,可能为 RA 患者提供新的治疗选择。通过降低炎症因子的分泌,可以有效地减轻 RA 患者的炎症症状,改善关节功能,提高生活质量^[18]。

该研究中,通过应用不同浓度的 Res 对 FLS 进行处理,观察到其能有效减少这些细胞释放的 IL-6 和 TNF- α 。这一结果表明,Res 可能通过调节这些关键的炎症介质来缓解 RA 患者的关节炎症状。尽管 Res 的这一潜在治疗作用已经显现,但其具体如何通过分子层面的相互作用来抑制细胞因子的释放,目前尚待进一步探索。本研究在此基础上通过慢病毒感染 FLS,使其 cGAS 过表达,结果显示 Res 对 cGAS-STING 信号通路抑制作用减弱,这些可能表明,Res 能够通过调节 cGAS-STING 信号通路来减少炎症因子的释放。深入探讨 Res 与 cGAS-STING 信号通路之间的相互作用,可能有助于揭示新的 RA 治疗靶点,并进一步阐明 Res 抑制炎症因子释放的分子机制。然而,需要注意的是,虽然 Res 显示出了抑制 cGAS-STING 信号通路和减少炎症因子分泌的能力,但其在体内的具体作用效果以及可能的副作用仍需进一步的研究和验证。此外,Res 的最佳使用浓度、作用时间及长期应用的安全性等问题也需要在未来的研究中加以探讨。

参考文献

- [1] Tsaltzkan V, Firestein G S. Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2022, 67: 102304. doi: 10.1016/j.coph.2022.102304.
- [2] Miao P, Zhou X W, Wang P, et al. Regulatory effect of anti-gp130 functional MAb on IL-6 mediated RANKL and Wnt5a expression through JAK-STAT3 signaling pathway in FLS [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(29): 20366 - 76. doi: 10.18632/oncotarget.23917.
- [3] McInnes I B, Buckley C D, Isaacs J D. Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(1): 63 - 8. doi: 10.1038/nrrheum.2015.171.
- [4] Decout A, Katz J D, Venkatraman S, et al. The cGAS - STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21: 548 - 69. doi: 10.1038/s41577-021-00524-z.
- [5] Gu L, Sun Y, Wu T, et al. A novel mechanism for macrophage pyroptosis in rheumatoid arthritis induced by Pol β deficiency [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 583. doi: 10.1038/s41419-022-05047-6.
- [6] Xu A, Yang R, Zhang M, et al. Macrophage targeted triptolide micelles capable of cGAS-STING pathway inhibition for rheumatoid arthritis treatment [J]. *J Drug Target*, 2022, 30(9): 961 - 72. doi: 10.1080/1061186X.2022.2070173.
- [7] Wang J, Li R, Lin H, et al. Accumulation of cytosolic dsDNA contributes to fibroblast-like synoviocytes-mediated rheumatoid arthritis synovial inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105791. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105791.
- [8] Jin L, Chen Q, Hu K, et al. The FTO-CMPK2 pathway in Fibroblast-like synoviocytes modulates rheumatoid arthritis synovial inflammation and cartilage homeostasis via mtDNA regulation [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(5): 1617 - 33. doi: 10.7150/ijbs.90677.
- [9] Sheng S, Wang X, Liu X, et al. The role of resveratrol on rheumatoid arthritis: from bench to bedside [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 829677. doi: 10.3389/fphar.2022.829677.
- [10] Chapa-Villarreal F A, Stephens M, Pavlicin R, et al. Therapeutic delivery systems for rheumatoid arthritis based on hydrogel carriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2024, 208: 115300. doi: 10.1016/j.addr.2024.115300.
- [11] Ngian G S. Rheumatoid arthritis [J]. *Aust Fam physician*, 2010, 39(9): 626 - 8.
- [12] Cao W, Zhang J, Wang G, et al. Reducing-autophagy derived mitochondrial dysfunction during resveratrol promotes fibroblast-like synovial cell apoptosis [J]. *Anat Rec*, 2018, 301(7): 1179 - 88. doi: 10.1002/ar.23798.
- [13] Zhang J, Song X, Cao W, et al. Autophagy and mitochondrial dysfunction in adjuvant-arthritis rats treatment with resveratrol [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32928. doi: 10.1038/srep32928.
- [14] 李梅, 蒋锦梅, 欧大明, 等. 白术多糖对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(4): 552 - 7. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.009.
- [14] Li M, Jiang J M, Ou D M, et al. Effect of polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* koidz on anti-inflammatory effects and TPLR4/NF- κ B signaling pathway in rats with rheumatoid arthritis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(4): 552 - 7. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.009.
- [15] Hu Y, Chen B, Yang F, et al. Emerging role of the cGAS-STING signaling pathway in autoimmune diseases: biologic function, mechanisms and clinical prospection [J]. *Autoimmun Rev*, 2022, 21(9): 103155. doi: 10.1016/j.autrev.2022.103155.
- [16] Kwon J, Bakhoun S F. The cytosolic DNA-sensing cGAS-STING

- pathway in cancer[J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(1): 26 – 39. doi: 10.1158/2159 – 8290.cd – 19 – 0761.
- [17] Ke X, Hu T, Jiang M. cGAS-STING signaling pathway in gastrointestinal inflammatory disease and cancers[J]. *FASEB J*, 2022, 36(1): e22029. doi: 10.1096/fj.202101199R.
- [18] Willemsen J, Neuhoff M T, Hoyler T, et al. TNF leads to mtDNA release and cGAS-STING-dependent interferon responses that support inflammatory arthritis[J]. *Cell Rep*, 2021, 37(6): 109977. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109977.

Effects of resveratrol on cGAS-STING signaling pathway in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis

Wang Taorong¹, Shao Yubao¹, Liu Nannan², Li Wenhao³, Li Meng⁴, Chen Xiaoyu^{1,2}

(¹*Microscopic Morphological Center Laboratory*, ²*Dept of Histology and Embryology*, *Anhui Medical University, Hefei 230032*; ³*Dept of Respiratory and Critical Care Medicine*, *The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*; ⁴*Dept of Pharmacy*, *Bozhou Vocational and Technical College, Bozhou 236800*)

Abstract Objective To investigate the effects of resveratrol (Res) on fibroblast-like synoviocytes (FLS) in patients with rheumatoid arthritis (RA), and to explore the possible mechanism of Res inhibiting the release of inflammatory factors from FLS. **Methods** FLS from RA patients were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of Res (0, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{mol/L}$). The viability of FLS cells was detected by CCK-8 assay after 12 and 24 h. The contents of inflammatory factor interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cell supernatant were detected by ELISA. The expression levels of cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase (cGAS) and stimulator of interferon gene (STING) were measured by Western blot; After lentivirus infection with FLS caused the cells to overexpress cGAS, the cells were divided into Control group (blank control), cGAS group (cGAS overexpression), Res + cGAS group (Res 160 $\mu\text{mol/L}$ + cGAS overexpression) and Res group (Res 160 $\mu\text{mol/L}$). The expression level of STING protein in cells of each group was determined by Western blot, the viability of FLS cells in each group was detected by CCK-8, and the contents of inflammatory factor IL-6 and TNF- α in the supernatant of cells of each group were detected by ELISA method. **Results** The results of CCK-8 experiment showed that under 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$ Res treatment, FLS viability decreased significantly after 24 h compared with blank control group ($P < 0.01$). ELISA results showed that the contents of IL-6 and TNF- α in cell supernatant were also significantly decreased after treatment with Res of 40, 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). Meanwhile, Western blot results showed that Res could significantly decrease the protein expression levels of STING and cGAS in FLS cells after treatment of 40, 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the Control group, the expression level of STING protein in FLS increased after overexpression of cGAS ($P < 0.05$); compared with the Res group, the content of inflammatory factors in the supernatant of FLS and the expression level of STING protein in FLS significantly increased after overexpression of cGAS ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** The appropriate concentration of Res can inhibit the release of inflammatory cytokines in FLS cells, which may be related to the blocking of cGAS-STING signaling pathway.

Key words rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; resveratrol; cGAS-STING signaling pathway; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH050607); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2021xkj004)

Corresponding author Chen Xiaoyu, E-mail: cxyayd@163.com