

赤菴根总皂苷对佐剂性关节炎大鼠IL-1 β 活性的影响^Δ

洪文婷^{1*},刘永平¹,梅爱敏²,刘春楠¹,马 帅¹,阎 浩¹,陈建双¹,佟继铭^{1#}(1.承德医学院中药研究所/河北省中药研究与开发重点实验室,河北承德 067000;2.河北工程大学医学院,河北邯郸 056002)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4368-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.16

摘要 目的:研究赤菴根总皂苷(TSTR)对佐剂性关节炎(AA)大鼠血清中白细胞介素1 β (IL-1 β)活性的影响。方法:将60只SD大鼠随机均分为正常对照(等体积蒸馏水)组,模型(等体积蒸馏水)组,TSTR低、中、高剂量(40、80、160 mg/kg)组和雷公藤多苷(TG,12 mg/kg)组。除正常对照组外,其余各组大鼠均于右后足跖部ih弗氏完全佐剂0.1 ml复制大鼠AA模型。于造模后第18天,分别ig相应药物,每天1次,给药21 d。采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠血清中IL-1 β 含量;半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测大鼠足趾中IL-1 β mRNA表达水平;免疫组化法检测足趾和脾脏中IL-1 β 蛋白表达水平。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β 含量增加,足趾中IL-1 β mRNA、足趾和脾脏中IL-1 β 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组比较,TG组及TSTR各剂量组大鼠上述指标均降低,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:TSTR可降低AA大鼠血清中IL-1 β 活性。

关键词 赤菴根总皂苷;佐剂性关节炎;白细胞介素1 β ;免疫组化法;大鼠

Effect of Total Saponins from *Thladiantha dubia* Root on the Activity of IL-1 β in Adjuvant Arthritis Rats

HONG Wen-ting¹, LIU Yong-ping¹, MEI Ai-min², LIU Chun-nan², MA Shuai¹, YAN Hao¹, CHEN Jian-shuang¹, TONG Ji-ming¹ (1. Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical College/Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation of TCM, Hebei Chengde 067000, China; 2. Medical College, Hebei University of Engineering, Hebei Handan 056002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of total saponins from *Thladiantha dubia* root (TSTR) on IL-1 β activity in adjuvant arthritis (AA) rat's serum. METHODS: 60 SD rats were randomly divided into normal control group (equal volume of distilled water), model group (equal volume of distilled water), TSTR low-dose, medium-dose and high-dose groups (40, 80, 160 mg/kg) and tripterygium (TG) group (12 mg/kg). Except for normal control group, those groups were ih plantar subcutaneous injection of FCA 0.1 ml in the right hindpaw to induce AA rat model. On 18th day after modeling, the rats of TSTR groups and TG group were lavaged with corresponding drugs, once a day. After 21 days of treatment, the content of IL-1 β in serum was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); the mRNA expression level of IL-1 β by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); the protein expression level of IL-1 β in paw and spleen by immunohistochemistry. RESULTS: Compared with normal control group, the content of IL-1 β in serum, the mRNA expression level of IL-1 β in paw, and the protein expression level of IL-1 β in paw and spleen were all increased, with statistical significance ($P<0.01$ or $P<0.05$); compared with model group, above index of TG group and TSTR groups were all decreased, with statistical significance ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: TSTR can decrease the activity of IL-1 β in rat's serum.

KEYWORDS Total saponins from *Thladiantha dubia* root; Adjuvant arthritis; IL-1 β ; Immunohistochemistry; Rats

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种全身性自身免疫性疾病,具有慢性、进行性、侵袭性等特点,主要临床表现为多滑膜关节炎和关节病变^[1],致残率极高。据报道,白细胞介素1 β (IL-1 β)大量存在于RA患者关节炎滑膜液及血液中,其过度分泌可刺激滑膜和软骨细胞合成并释放前列腺素E₂(PGE₂)和胶原酶,从而引发滑膜炎反应,且PGE₂合成分泌量与RA的严重程度呈正相关^[2]。

满药赤菴根是葫芦科植物赤菴(*Thladiantha dubia* Bunge., TDB)的干燥根,民间用于治疗跌打损伤、肌肉痛、腰腿痛、风

湿痛、RA等疾病,疗效显著且无明显毒副作用,具有重要的开发利用价值^[3]。相关研究表明,赤菴根镇痛、抗炎作用的有效部位为赤菴根总皂苷(TSTR),且TSTR对RA的治疗作用显著,但其具体作用机制不明^[4]。故笔者以发病机制与人类RA相似的佐剂性关节炎(AA)大鼠为模型^[5-6],研究TSTR对AA大鼠血清中IL-1 β 水平的影响,进一步探讨TSTR治疗RA可能的作用机制,为TSTR临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

SORVALL Biofuge Fresco型冷冻离心机(德国Kendro Labrotary公司);Excelsior™ ES型自动组织脱水机、Histocentre 3™型组织包埋机(美国Thermo Scientific公司);RM2125型常规轮转石蜡切片机(德国Leica公司);TK-218型恒温摊片烤

^Δ 基金项目:河北省科技计划项目(No.14272502D)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理与毒理。E-mail:839483932@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药药理与毒理。电话:0314-2290076。E-mail:tongjiming@163.com

片机(湖北泰维医疗科技有限责任公司);BH-2型显微镜及摄像装置(日本Olympus公司);T-100型聚合酶链反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

TSTR(承德医学院中药研究所制备,批号:2010918,纯度:54.14%);雷公藤多苷片(TG,安徽新陇海药业有限公司,批号:100301,规格:每片10mg);弗氏完全佐剂(FCA,美国Sigma公司,批号:100M8725,规格:1mg/ml);兔抗鼠一抗、酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒、内参 β -actin(美国Biorworld公司,批号:BD10699、201106、201109);兔免疫组化试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司,批号:20110712);甲醛溶液、二甲苯(天津市福晨化学试剂厂);总mRNA提取剂(Trizol,美国Invitrogen公司,批号:66218);DNA上样缓冲液(北京天根生化科技有限公司,批号:N2910)。

1.3 动物

健康SD大鼠60只,8周龄,体质量180~200g,♂,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[动物使用合格证号:SCXK(京)100M8725]。

2 方法

2.1 模型复制、分组及给药

取健康SD大鼠60只,除正常对照组外,其余各组大鼠均于右后足跖部注射FCA 0.1ml复制AA大鼠模型,注射点周围出现明显白疱为佳,以建模后第18天大鼠关节炎指数(AI)值 ≥ 6 为模型建立成功。建模成功后,将大鼠随机分为正常对照组、模型组和TSTR低、中、高(40、80、160mg/kg)剂量组(以体表面积换算,分别相对人等效剂量的0.5、1、2倍)和雷公藤多苷(TG,12mg/kg)组(相对人的等效剂量),每组10只。于建模后第18天,各组大鼠分别给予相应药物,正常对照组及模型组大鼠分别给予等体积蒸馏水,每天1次。给药21d后,取血、左足跖、脾脏备用。

2.2 各组大鼠血清中IL-1 β 含量的测定

采用ELISA法。将血液以3500r/min离心10min(离心半径为4cm,下同),取上清,按ELISA试剂盒说明书操作,检测大鼠血清中IL-1 β 的含量。

2.3 各组大鼠足跖中IL-1 β mRNA水平的测定

采用半定量逆转录(RT)-PCR法。取足跖部组织200mg,加Trizol 1ml,低温研磨,4℃、12000r/min离心15min,取上清液,加入0.2ml三氯甲烷,按上述条件离心15min,取上清液,加等体积异丙醇,混匀,-20℃静置后再次离心(条件同上),弃上清液。取沉淀加入75%乙醇1ml,充分混匀,洗涤沉淀后即得总mRNA。紫外分光光度法测定总mRNA纯度及浓度,甲醛变性后琼脂糖凝胶电泳法检测总mRNA完整性,-80℃保存。用mRNA逆转录合成cDNA第一链,逆转录反应程序为:30℃、10min,42℃、30min,99℃、5min,5℃、5min。产物cDNA于-20℃保存。PCR扩增反应程序为94℃预变性2min;94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸1min,共30个循环。产物DNA于-20℃保存。PCR反应产物分析:取5 μ l PCR产物与2 μ l 6 \times DNA上样缓冲液混匀,上样于2%琼脂糖凝胶,120V电压电泳,采用Quantity One 4.6.2凝胶定量分析软件测定图像的光密度(OD)值进行定量分析。以 β -actin作

为内参照,以目的基因与 β -actin内参条带IOD的比值(Relative optical density, ROD)表示各目的基因mRNA表达的相对水平。引物序列及退火温度见表1。

表1 引物序列及退火温度

Tab 1 Primer sequences and annealing temperature

引物	引物序列	产物大小, bp	退火温度, °C
IL-1 β	上游:5'-GGCATAACAGGCTCATCTGG-3'	414	58
	下游:5'-CATCATCCCACGAGTCACAG-3'		
β -actin	上游:5'-CATCTGCGTCTGGACCT-3'	480	53
	下游:5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'		

2.4 大鼠足跖、脾脏中IL-1 β 蛋白水平的测定

采用免疫组化SP法。取大鼠左足跖及脾脏组织,10%甲醛固定,24h后病理制片,常规脱水包埋,二甲苯脱蜡,梯度乙醇(100%、95%、80%、70%)脱水;二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,4 μ m厚度切片。免疫组化步骤按免疫组化试剂盒说明书进行,抗体浓度为1:100,染色后以细胞质中出现淡黄至褐黄色颗粒状着色者为阳性细胞。光镜下观察IL-1 β 表达情况,摄取图像,采用IPP 6.0软件测定IOD值,进行半定量分析。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血清中IL-1 β 含量测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β 含量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,TG组及TSTR各剂量组大鼠血清中IL-1 β 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。随着给药剂量的增加,血清中IL-1 β 含量呈降低的趋势,结果见表2。

表2 各组大鼠血清中IL-1 β 含量、足跖中IL-1 β mRNA水平及足跖和脾脏中IL-1 β 蛋白水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 The content of IL-1 β in serum, the mRNA expression of IL-1 β in paw, and the protein expression of IL-1 β in paw and spleen ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	IL-1 β , ng/ml	IL-1 β mRNA, ROD	足跖中IL-1 β 蛋白水平, IOD	脾脏中IL-1 β 蛋白水平, IOD
正常对照组		0.11 \pm 0.01	0.106 \pm 0.017	0.19 \pm 0.04	0.11 \pm 0.03
模型组		0.49 \pm 0.01*	1.112 \pm 0.157*	2.23 \pm 0.46*	1.61 \pm 0.34*
TSTR 低剂量组	40	0.29 \pm 0.02**	0.825 \pm 0.106*	1.13 \pm 0.32*	0.98 \pm 0.29*
TSTR 中剂量组	80	0.17 \pm 0.01**	0.820 \pm 0.118*	0.65 \pm 0.22**	0.49 \pm 0.18**
TSTR 高剂量组	160	0.13 \pm 0.01**	0.712 \pm 0.128*	0.63 \pm 0.24**	0.35 \pm 0.11**
TG组	12	0.14 \pm 0.01**	0.701 \pm 0.184*	0.51 \pm 0.17**	0.41 \pm 0.12**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.2 各组大鼠足跖中IL-1 β mRNA水平测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠足跖中IL-1 β mRNA水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,TG组及TSTR低、中、高剂量组大鼠足跖中IL-1 β mRNA水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着TSTR剂量的增加,IL-1 β mRNA水平呈降低的趋势,但都高于TG组,结果见表2。

3.3 各组大鼠足跖及脾脏中IL-1 β 蛋白水平测定结果

SP染色结果显示,大鼠足跖及脾脏中IL-1 β 表达的阳性产物呈明显的棕黄色或深棕色颗粒,分布于细胞质和细胞核中(见图1、图2)。与正常对照组比较,模型组大鼠足跖及脾脏中IL-1 β 蛋白水平升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,TG组及TSTR低、中、高剂量组大鼠足跖及脾脏中IL-1 β 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),结果见表2。

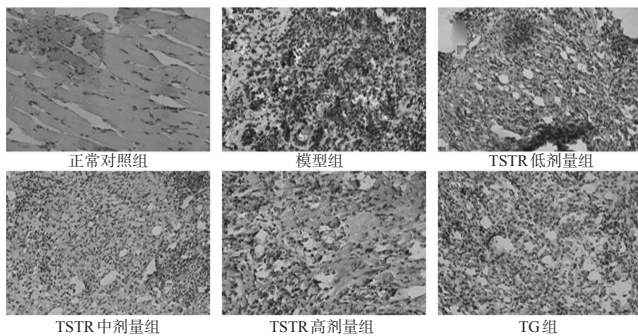


图1 各组大鼠足跖组织SP染色结果($\times 200$)

Fig 1 Results of SP staining of rat's paw tissue in all groups ($\times 200$)

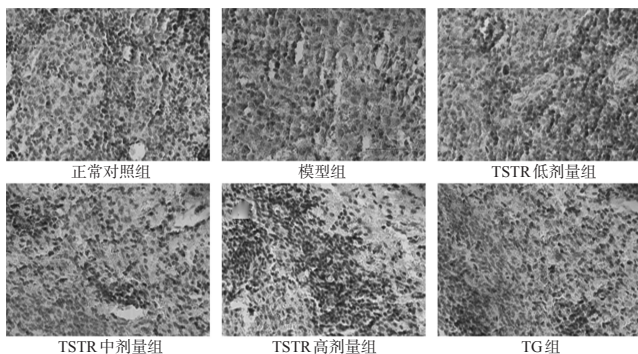


图2 各组大鼠脾脏组织SP染色结果($\times 200$)

Fig 2 Results of SP staining of rat's spleen tissue in all groups ($\times 200$)

4 讨论

IL-1 β 主要由单核细胞或巨噬细胞产生,与滑膜细胞的分泌功能异常有关,可诱导IL-6和环氧酶2的产生,其活性可被IL-1 β 受体拮抗药抑制,若不予控制则可能发展为慢性炎症性关节炎^[7]。可见,IL-1 β 在炎症和自身免疫性疾病中发挥着重要作用,IL-1 β 的异常对研究RA的发病机制有着十分重要的意义。研究表明,IL-1 β 是破坏关节软骨的细胞因子之一,可促使成骨细胞或骨衬里细胞表达细胞表面分子,从而促进破骨细胞的吸收,并通过刺激关节内滑膜细胞和软骨细胞释放PGE₂和胶原酶^[8]。PGE₂和胶原酶的释放又可以引发滑膜的炎症反应、软骨基质的崩解,而IL-1 β 又受到游离的胶原和局部免疫复合物等分解产物的刺激进一步增加含量,形成恶性循环,最终加速关节炎的发生^[9-10]。

陈建双等^[11-13]证实了TSTR对AA大鼠足肿胀有抑制作用,可减轻AA大鼠滑膜炎症反应,对RA大鼠有很好的治疗作用。结合本实验结果,TSTR组大鼠足跖及脾脏中IL-1 β 蛋白表达水平显著低于正常对照组。这提示TSTR治疗AA的机制可能与抑制IL-1 β 的表达有关:TSTR通过降低AA模型大鼠体

内IL-1 β 的含量,抑制骨滑膜组织增生,减轻软骨和骨破坏,从而发挥抗RA的作用。相比TSTR,TG虽然具有较强的免疫抑制作用,但安全范围较窄,且有较强的生殖毒性^[14]。因此,TSTR有望开发为安全性能良好的抗RA药物,但需要进一步研究。

参考文献

- [1] 刘嘉玲,王美美.风湿性疾病的诊断与治疗[M].北京:军事医学科学出版社,2007:7.
- [2] 陈建双,于海荣,张玉玲,等.赤甯根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠血清细胞因子的影响[J].时珍国医国药,2012,23(5):1097.
- [3] 宋立人,红恂,丁绪亮,等.现代中药大辞典:上册[M].北京:人民卫生出版社,2001:1022.
- [4] 张玉玲,赵波,陈建双,等.赤甯根镇痛作用及有效部位研究[J].时珍国医国药,2010,21(10):2483.
- [5] 于晓敏,刘玉玲,刘永平,等.满药赤甯根总皂苷抗炎作用实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):227.
- [6] 奚正德,杨军军.治疗类风湿性关节炎新药的临床应用进展[J].中国药房,2005,16(11):871.
- [7] 王伟钢,赵颖,赵舒安对CIA大鼠症状及血清IL-1、TNF- α 水平的影响[C]//中华中医药学会风湿病分会2010年学术会议论文集.北京:中华中医药学会,2011:81-86.
- [8] Bao L, Zhu Y, Elhassan AM, et al. Adjuvant-induced arthritis: IL-1 β , IL-6 and TNF- α are up-regulated in the spinal cord[J]. Neuroreport, 2001, 12(8):3905.
- [9] Cohen S, Hurd E, Cush J, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(3):614.
- [10] Conway JG, Andrews RC, Beaudet B, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of TNF- α -converting enzyme and matrix metalloproteinases[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 298(3):900.
- [11] 陈建双,张玉玲,李莎莎,等.赤甯根总皂苷对佐剂性关节炎大鼠脾淋巴细胞及腹腔巨噬细胞的影响[J].山东医药,2011,51(44):22.
- [12] 刘永平,陈建双,赵波,等.赤甯根总皂苷对实验性佐剂型关节炎镇痛作用的研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(8):1659.
- [13] 陈建双,张玉玲,赵波,等.赤甯根总皂苷抗炎作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):163.
- [14] 李莉霞,金若敏,李仪奎,等.雷公藤多苷抗炎作用的安全范围及抗炎机制[J].中国新药与临床杂志,2006,25(2):91.

(收稿日期:2015-03-13 修回日期:2015-05-04)

(编辑:林静)