

藏党参提取物对胶原诱导性关节炎模型大鼠的影响及机制研究^Δ

赵静^{1*}, 郭睿博², 罗布占堆¹, 丁亚丽¹, 普珍¹, 董海¹, 谢红军^{1#} (1. 西藏大学医学院, 拉萨 850000; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)08-0967-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.08.12

摘要 目的: 研究藏党参提取物(以下简称“ZDS”)对胶原诱导性关节炎(CIA)模型大鼠的影响及机制。方法: 在48只大鼠中随机选8只作为正常对照组(生理盐水), 剩余40只大鼠建立CIA模型。造模成功后, 将其随机分为模型组(生理盐水), ZDS低、中、高剂量组(0.44、0.88、1.76 g/kg, 以生药量计)和地塞米松组(阳性对照, 0.002 5 g/kg), 每组8只。灌胃给药, 灌胃体积为400 μL, 每天1次, 连续28天。分别于给药前(0天)及给药7、14、21、28天后称定大鼠体质量, 并进行关节炎指数评分; 末次给药后, 观察大鼠膝关节滑膜组织病理变化, 测定其胸腺指数、脾指数、血清中炎症因子[白细胞介素1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、IL-6]水平以及膝关节滑膜组织中核因子κB(NF-κB) p65、磷酸化NF-κB p65(p-NF-κB p65)、NF-κB抑制蛋白(IκB)、磷酸化IκB(p-IκB)蛋白表达水平。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠体质量(给药14、21、28天)显著降低($P < 0.05$), 关节炎指数评分(给药前及给药不同时间)显著升高($P < 0.05$), 关节滑膜组织病理损伤明显, 胸腺指数、脾指数、炎症因子水平以及p-NF-κB p65、p-IκB蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$), IκB蛋白的表达水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较, ZDS低剂量组大鼠IL-1β水平显著降低($P < 0.05$); ZDS中、高剂量组和地塞米松组大鼠的体质量(给药21、28天)均显著增加($P < 0.05$), 关节炎指数评分(给药14、21、28天)均显著降低($P < 0.05$), 关节滑膜组织病理损伤明显减轻, 胸腺指数、脾指数、炎症因子水平以及p-NF-κB p65、p-IκB蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$), IκB蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论: ZDS对CIA模型大鼠具有一定的改善作用, 其机制可能与抑制NF-κB信号通路有关。

关键词 类风湿关节炎; 藏党参; 提取物; 胶原诱导性关节炎; 核因子κB信号通路; 大鼠

Effects of Tibetan *Codonopsis tralictrifolia* Extract on Collagen-induced Arthritis Model Rats and Its Mechanism Study

ZHAO Jing¹, GUO Ruibo², Luobuzhandui¹, DING Yali¹, PU Zhen¹, DONG Hai¹, XIE Hongjun¹ (1. Medical College, Tibet University, Lhasa 850000, China; 2. School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Tibetan *Codonopsis tralictrifolia* extract (called “ZDS” for short) on collagen-induced arthritis (CIA) model rats and its mechanism. METHODS: Eight of 48 rats were randomly selected as normal control group (normal saline), and the remaining 40 rats were used to establish CIA model. After successful modeling, the rats were randomly divided into model group (normal saline), ZDS low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.44, 0.88, 1.76 g/kg, by crude drug), dexamethasone group (positive control, 0.002 5 g/kg), with 8 rats in each group. They were given relevant medicine intragastrically, the volume of 400 μL, once a day, for consecutive 28 days. The body weight of rats were weighed before medication (0 d), 7, 14, 21 and 28 days after medication; and arthritis indexes were scored. The pathological changes of the knee joint synovial tissue were observed after last medication. The thymus index, spleen index, the levels of serum inflammatory factors (IL-1β, TNF-α, IL-6), protein expressions of NF-κB p65, p-NF-κB p65, IκB and p-IκB in synovial tissue were detected. RESULTS: Compared with normal control group, the body weight (14, 21, 28 days after administration) of rats in model group was significantly reduced ($P < 0.05$); the arthritis index score (before administration and different administration time) was significantly increased ($P < 0.05$); the joint synovial tissue was pathologically damaged; the thymus and spleen index, inflammation factor level, the protein expression of p-NF-κB p65 and p-IκB were increased significantly ($P < 0.05$), while the protein expression of IκB was decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the level of IL-1β was decreased significantly in ZDS low-dose group ($P < 0.05$). Body weight of rats (21, 28 days after administration) were increased significantly

Δ 基金项目: 西藏自治区自然科学基金项目(No.XZ2019ZRG-19)

* 讲师, 硕士。研究方向: 藏医护理与藏药药效评价。E-mail: 4900766@qq.com

通信作者: 讲师, 硕士。研究方向: 藏药药效评价与物质基础。E-mail: hongjun_xie@126.com

in ZDS medium-dose and high-dose groups, dexamethasone group ($P < 0.05$), while arthritis index score (14, 21, 28 days after administration) was decreased significantly ($P < 0.05$). The pathological damage of joint synovial tissue was significantly relieved; thymus and spleen index, inflammation

factor level, the protein expression of p-NF- κ B p65 and p-I κ B were significantly reduced, while the protein expression of I κ B was significantly increased ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: ZDS can improve CIA model rats to some extent, and its mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS Rheumatoid arthritis; *Codonopsis talictrifolia*; Extract; Collagen-induced arthritis; NF- κ B signaling pathway; Rat

类风湿性关节炎(RA)是一种常见的慢性、炎症性、系统性自身免疫性疾病,以关节及其组织非化脓性炎症为主要特征,终致关节的各种组织以及多脏器损害^[1]。RA的基本病理特征为关节慢性滑膜炎、滑膜细胞增殖、炎性细胞浸润及血管翳的形成,以及可侵及下层的软骨或骨,可造成关节破坏甚至功能丧失^[2-3]。RA的发病机制复杂,涉及机体的多条信号转导途径,其中核因子 κ B(NF- κ B)被认为是重要的炎症信号通路,对RA的发生与发展具有核心的调节作用^[4]。目前,临床主要用于治疗RA的药物包括非甾体抗炎药、抗风湿药、糖皮质激素类和生物制剂类药物,这些药物虽可缓解疾病症状,但不能控制病情的进展,且其除了消化道、肾脏和心血管系统副作用外,还可引发感染、免疫缺陷、高血糖症等不良反应,不宜长时间使用^[5]。

藏党参始载于《晶珠本草》,为桔梗科植物长花党参 *Codonopsis thalictrifolia* Wall. var. *mollis* Chipp.的全草,其味苦、辛、涩,性凉,具有消炎散肿、祛风除湿等功效,主治风湿性关节炎、疮疖肿痛、麻风病等^[6-7]。藏党参的主要活性成分包括生物碱、酚性物质、挥发油、有机酸、甾醇和三萜类化合物^[8]。有研究表明,以藏党参为主药的罗堆多吉颗粒可通过抑制黄嘌呤氧化酶的活性而降低血尿酸水平,从而起到治疗痛风的作用^[9]。此外,藏党参还是藏医药中治疗风湿性关节肿痛的要药^[10],但其活性成分及作用机制尚未十分明确。本课题组前期研究发现,藏党参乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分对胶原诱导性关节炎(CIA)模型大鼠具有明显的改善作用。基于此,本研究拟通过建立CIA大鼠模型,从NF- κ B信号通路角度探讨藏党参提取物治疗RA的可能作用机制,为阐明藏党参对RA的疗效及其药效物质基础提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Ti-S型荧光倒置显微镜购自日本Nikon公司;RM2235型石蜡切片机购自德国Leica公司;HBS-1096A型酶标仪购自南京德铁实验设备有限公司;752型紫外-可见分光光度计购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司;Mini-Sub Cell GT Cell型Western blot电泳仪和转膜仪购自美国Bio-Rad公司;4100型凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

藏党参饮片(批号201902411)购自西藏白萨工贸有限公司,经西藏自治区藏医院藏药研究所扎西次仁教

授鉴定为真品;地塞米松注射液(批号2006031,规格1 mL:2 mg)购自西安高科陕西金方药业公司;鸡Ⅱ型胶原、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(批号分别为SLBT1422、SLBT1714、SLBV4134)均购自美国Sigma公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号MB9898Oct-23D)购自大连美仑生物有限公司;白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和总蛋白提取试剂盒(批号分别为20200512、20200516、20200601、20190816)均购自北京索莱宝科技有限公司;兔源NF- κ B p65、磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)、NF- κ B抑制蛋白(I κ B)、磷酸化I κ B(p-I κ B)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(货号分别为bs-23216R、bs-3485R、bs-10246R、bs-2513R、bsm-0978M)均购自北京博奥森生物有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号2019001004)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号121017200621)购自碧云天生物技术有限公司;其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

健康SPF级SD大鼠48只,雌雄各半,5~6周龄,体质量140~170 g,购自辽宁长生生物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(辽)2020-0001。大鼠购入后分笼饲养于辽宁中医药大学实验动物中心实验室内,实验室温度为20~25℃、相对湿度为55%~65%,饲养期间自由饮水、摄食。适应性饲养7天后进行实验。本研究所有实验方案均得到了辽宁中医药大学实验动物福利伦理委员会的批准。

2 方法

2.1 藏党参提取物的制备

称取藏党参饮片300 g,粉碎,过40目筛,以10倍量(mL/g)30%乙醇浸泡60 min,随后加热回流提取2次,每次2 h;滤过,合并2次滤液,减压回收溶剂,得浸膏78.42 g,得率为26.14%。将浸膏用等量乙酸乙酯萃取2次,合并萃取液,减压回收溶剂,得浸膏19.50 g。将浸膏用水溶解制成终质量浓度为1.0 g/mL(以生药量计)的药液,置于4℃冰箱中保存。临用时取出,用水稀释成不同质量浓度的药液。

2.2 分组、造模与给药

取鸡Ⅱ型胶原20 mg溶于0.1 mol/L乙酸溶液10 mL中,使前者终质量浓度为2 mg/mL,于4℃下以磁力搅拌

器搅拌过夜,使胶原充分溶解。次日,于4℃下将上述胶原溶液逐滴滴加至等体积的弗氏完全佐剂中(边滴加边搅拌,直到乳化至油包水状态,且以在水中不扩散为宜),将此作为初次免疫乳化剂;由弗氏不完全佐剂替换弗氏完全佐剂制备继发免疫乳化剂,制备步骤同前。在48只大鼠中随机选8只作为正常对照组(雌雄各半);剩余40只大鼠先在尾根部皮下单次注射初次免疫乳化剂100 μL,初次免疫7天后,再于每只大鼠尾根部皮下单次注射继发免疫乳化剂100 μL,以建立CIA模型^[1];正常对照组大鼠同步注射无菌生理盐水。利用大鼠关节炎指数评分(标准详见“2.3”项下)评价造模情况:4个关节评分相加,累积评分≥4分则表示CIA模型制备成功^[2]。

将造模成功的40只大鼠随机分为模型组,党参提取物低、中、高剂量组(0.44、0.88、1.76 g/kg,以生药量计)和地塞米松组(阳性对照,0.002 5 g/kg),每组8只(雌雄各半)。地塞米松组大鼠给药剂量根据成人(体质量70 kg)临床用量按人与大鼠体质量系数换算后得到;藏党参提取物低、中、高剂量分别根据成人(70 kg)藏党参临床用量(10 g)按人与大鼠体质量系数换算后得到,分别为成人临床给药量的1、2、4倍。各给药组大鼠均灌胃相应药物,灌胃体积400 μL,每天1次,连续28天;正常对照组和模型组大鼠同步灌胃等体积生理盐水。

2.3 大鼠体质量和关节炎指数评分测定

分别于给药前(记为0天)和给药7、14、21、28天后称定各组大鼠体质量,并对其左后足关节进行关节炎指数评分。评分标准如下:0分为关节无肿胀;1分为关节轻微肿胀;2分为关节中度肿胀;3分为关节严重肿胀;4分为关节严重肿胀并影响运动^[1]。本指标评判由3人完成,并取平均值作为最终评分结果。

2.4 样本采集及处理

末次给药1 h后,将各组大鼠麻醉,于腹主动脉采血,然后以3 000 r/min离心5 min,吸取上层血清,置于-20℃冰箱中保存,备用。取血后,沿大鼠膝关节正中切开皮肤,暴露膝关节中心,提起髌骨,剥离完整的膝关节滑膜组织。将一部分滑膜组织置于脱钙液中进行脱钙处理,用于HE染色;另一部分置于-80℃冰箱中保存,用于蛋白检测。完整摘取大鼠胸腺和脾脏,以生理盐水漂洗,用滤纸吸干多余水分后,称定质量,用于计算胸腺指数和脾指数。

2.5 大鼠滑膜组织病理变化观察

将经脱钙处理后的大鼠膝关节滑膜组织置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,随后分别用不同体积分数乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并进行常规石蜡切片(厚度约为4 μm),行常规HE染色,并置于显微镜下观察各组大鼠滑膜组织病理变化情况。

2.6 大鼠胸腺指数和脾指数测定

取大鼠胸腺和脾脏,根据如下公式计算其胸腺指数和脾指数:胸腺指数=胸腺质量(mg)/大鼠体质量(g);脾指数=脾质量(mg)/大鼠体质量(g)。

2.7 大鼠血清中IL-1β、TNF-α和IL-6水平测定

取大鼠血清适量,采用ELISA法以酶标仪测定各组大鼠血清中IL-1β、TNF-α、IL-6水平。实验严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.8 大鼠滑膜组织中NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκB、p-IκB蛋白表达水平测定

采用Western blot法进行测定。取各组大鼠膝关节滑膜组织,匀浆后,采用总蛋白提取试剂盒提取组织中的总蛋白,采用BCA蛋白定量试剂盒说明书方法测定蛋白浓度。将蛋白变性常规加热变性后,取20 μg于100 V电压下进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳60 min,然后在300 mA恒流下转移至聚偏二氟乙烯膜2 h,用5%脱脂牛奶在室温下封闭2 h;加入NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκB、p-IκB、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000),4℃孵育过夜;以TBST溶液洗涤5 min×3次,加入二抗(稀释比例均为1:1 000),室温孵育1 h。以TBST溶液洗涤5 min×3次,用ECL化学发光液显色后,置于凝胶成像仪上成像。用Image J v1.8.0软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.9 统计学方法

利用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 藏党参提取物对CIA模型大鼠体质量的影响

给药前(0天),各组大鼠的体质量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与正常对照组比较,模型组大鼠在给药14、21、28天后的体质量均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,藏党参提取物中、高剂量组和地塞米松组大鼠在给药21、28天后的体质量均显著升高($P < 0.05$),但藏党参提取物低剂量组大鼠在给药不同时间后的体质量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠给药前和给药不同时间后的体质量测定结果见表1。

3.2 藏党参提取物对CIA模型大鼠关节炎指数评分的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠的关节炎指数评分在给药前(0天)和给药不同时间后均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,藏党参提取物中、高剂量组和地塞米松组大鼠在给药14、21、28天后的关节炎指数评分均显著降低($P < 0.05$),但藏党参提取物低剂量组大鼠在给药前和给药不同时间后的关节炎指数评分差异均无

统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠给药前和给药不同时间后的关节炎指数评分结果见表2。

表1 各组大鼠给药前和给药不同时间后的体质量测定结果($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab 1 Results of body weight of rats in each group before administration and after administration of different time($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	0天	7天	14天	21天	28天
正常对照组	216.03±4.39	225.55±8.22	238.01±8.66	247.90±8.59	258.65±7.46
模型组	197.98±6.84	207.85±6.90	213.28±9.04 [*]	222.26±8.77 [*]	233.70±7.06 [*]
藏党参提取物低剂量组	199.96±6.97	204.88±8.93	215.25±7.15	225.44±10.64	234.88±7.24
藏党参提取物中剂量组	193.65±6.61	205.09±8.72	218.64±6.63	234.98±10.83 [*]	244.64±6.58 [*]
藏党参提取物高剂量组	195.64±6.27	211.28±11.46	219.25±5.69	235.49±9.39 [*]	246.65±9.70 [*]
地塞米松组	201.46±6.97	210.30±8.74	221.50±16.36	236.41±8.85 [*]	245.96±7.64 [*]

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

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

0.05

表2 各组大鼠给药前和给药不同时间后的关节炎指数评分结果($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab 2 Results of arthritis index score of rats in each group before administration and after administration of different time($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	0天	7天	14天	21天	28天
正常对照组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	1.50±0.93 [*]	2.63±0.74 [*]	3.63±0.52 [*]	4.00±0.00 [*]	3.88±0.35 [*]
藏党参提取物低剂量组	1.38±0.74	2.50±0.71	3.25±0.71	3.38±0.52	2.88±0.92
藏党参提取物中剂量组	1.63±0.92	2.25±1.20	2.88±0.35 [#]	2.50±0.75 [#]	2.13±0.83 [#]
藏党参提取物高剂量组	1.75±0.89	2.25±1.16	2.75±0.71 [#]	2.38±1.19 [#]	2.00±0.76 [#]
地塞米松组	1.63±0.74	2.13±0.83	2.50±0.53 [#]	2.00±0.76 [#]	1.38±0.74 [#]

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

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

0.05

3.3 藏党参提取物对CIA模型大鼠膝关节滑膜组织病理损伤的影响

正常对照组大鼠膝关节滑膜细胞排列紧凑、整齐,未见炎性细胞浸润;模型组大鼠膝关节滑膜细胞增生、呈5~6层分布,可见大量单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润;藏党参提取物低剂量组与模型组大鼠膝关节结构类似,可见膝关节滑膜细胞增生以及大量单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润;藏党参提取物中、高剂量组和地塞米松组大鼠的滑膜病理损伤均有不同程度改善,表现为滑膜增生减轻、表面较光滑、炎性细胞浸润减少等,其中以藏党参提取物高剂量组和地塞米松组大鼠的改善较为明显。各组大鼠膝关节滑膜组织HE染色显微图见图1(图中,箭头所指为炎性细胞)。

3.4 藏党参提取物对CIA模型大鼠胸腺指数和脾指数的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠的胸腺指数、脾指数均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,藏党参提取物

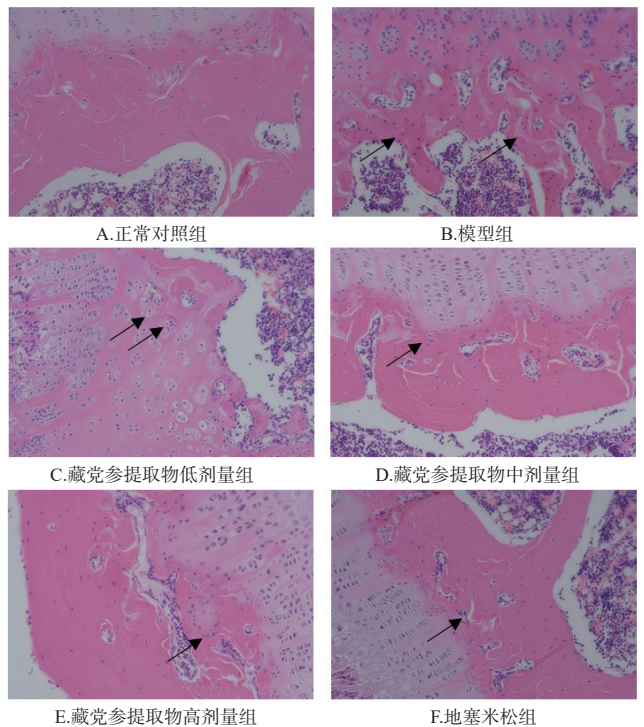


图1 各组大鼠膝关节滑膜组织HE染色显微图($\times 200$)
Fig 1 HE staining micrographs of synovial tissue of the knee joint of rats in each group ($\times 200$)

中、高剂量组和地塞米松组大鼠的胸腺指数、脾指数均显著降低($P<0.05$),但藏党参提取物低剂量组大鼠上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠胸腺指数、脾指数测定结果见表3。

表3 各组大鼠胸腺指数、脾指数测定结果($\bar{x}\pm s, n=8, \text{mg/g}$)

Tab 3 Results of thymus index and spleen index of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=8, \text{mg/g}$)

组别	胸腺指数	脾指数
正常对照组	1.35±0.07	1.62±0.15
模型组	2.65±0.24 [*]	3.05±0.38 [*]
藏党参提取物低剂量组	2.74±0.13	2.98±0.36
藏党参提取物中剂量组	1.89±0.12 [#]	2.60±0.22 [#]
藏党参提取物高剂量组	1.95±0.15 [#]	2.37±0.15 [#]
地塞米松组	1.73±0.13 [#]	2.04±0.20 [#]

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

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

0.05

3.5 藏党参提取物对CIA模型大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中IL-1 β 水平以及藏党参提取物中、高剂量组和地塞米松组大鼠血清中TNF- α 、IL-6水平均显著降低($P<0.05$),但藏党参提取物低剂量组大鼠血清中TNF- α 、IL-6水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平测定结果见表4。

表4 各组大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8, \text{ng/L}$)

Tab 4 Results of serum levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8, \text{ng/L}$)

组别	IL-1 β	TNF- α	IL-6
正常对照组	52.62 \pm 2.04	11.80 \pm 0.52	1.56 \pm 0.14
模型组	119.29 \pm 16.67*	70.59 \pm 3.28*	6.17 \pm 0.79*
藏党参提取物低剂量组	94.84 \pm 13.36*	64.83 \pm 3.44	4.24 \pm 0.29
藏党参提取物中剂量组	87.73 \pm 5.33*	42.71 \pm 2.62*	3.16 \pm 0.28*
藏党参提取物高剂量组	78.84 \pm 2.04*	38.17 \pm 3.44*	2.62 \pm 0.22*
地塞米松组	65.07 \pm 3.53*	30.29 \pm 3.78*	2.82 \pm 0.34*

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

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

0.05

3.6 藏党参提取物对CIA模型大鼠膝关节滑膜组织中NF- κ B信号通路相关蛋白表达水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠膝关节滑膜组织中p-NF- κ B p65、p-I κ B蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$),而I κ B蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,藏党参提取物中、高剂量组和地塞米松组大鼠膝关节滑膜组织中p-NF- κ B p65、p-I κ B蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$),而I κ B蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$);但各组大鼠膝关节滑膜组织中NF- κ B p65蛋白的表达水平以及藏党参提取物低剂量组大鼠滑膜组织中p-NF- κ B p65、I κ B、p-I κ B蛋白的表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠膝关节滑膜组织中NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B、p-I κ B蛋白表达的电泳图见图2,表达水平测定结果见表5。

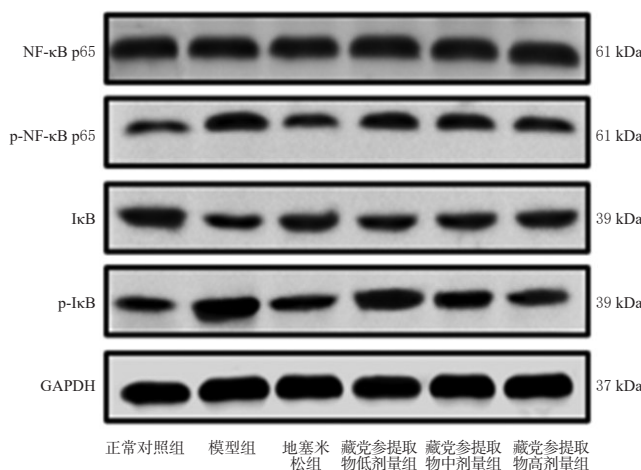


图2 各组大鼠膝关节滑膜组织中NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B、p-I κ B蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of the protein expression of NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, I κ B and p-I κ B in the knee joint synovial tissue of rats in each group

4 讨论

RA在藏医中被称为“真布”“痹症”。《四部医典》中记载,“因缘湿腴境与油腻食,未转轻未熟黄水盛,黄水

表5 各组大鼠膝关节滑膜组织中NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B和p-I κ B蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 5 Results of protein expressions of NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, I κ B and p-I κ B in the knee joint synovial tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	NF- κ B p65/GAPDH	p-NF- κ B p65/GAPDH	I κ B/GAPDH	p-I κ B/GAPDH
正常对照组	0.72 \pm 0.08	0.34 \pm 0.04	0.59 \pm 0.04	0.38 \pm 0.05
模型组	0.72 \pm 0.03	0.81 \pm 0.04*	0.32 \pm 0.01*	0.73 \pm 0.02*
藏党参提取物低剂量组	0.72 \pm 0.06	0.70 \pm 0.06	0.39 \pm 0.02	0.62 \pm 0.03
藏党参提取物中剂量组	0.68 \pm 0.04	0.53 \pm 0.04*	0.43 \pm 0.01*	0.54 \pm 0.01*
藏党参提取物高剂量组	0.74 \pm 0.09	0.50 \pm 0.03*	0.48 \pm 0.03*	0.51 \pm 0.02*
地塞米松组	0.71 \pm 0.08	0.48 \pm 0.03*	0.49 \pm 0.02*	0.45 \pm 0.04*

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

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

0.05

成驻于骨肉筋腱生湿痹”,故藏医认为RA是由于长期暴露于潮湿、寒凉之地,或长期食用油腻之饮食及心理创伤、外伤等其他因素导致胃火衰竭、精华不化、清浊不分,使机体代谢失常,引起未成熟的黄水偏盛而浸驻于骨肉关节所导致的^[13-14]。

现代医学认为,RA属于慢性、全身性、自身免疫性疾病,其主要临床表现包括进行性、对称性以及侵蚀性的外周关节破坏等,该症可侵袭全身多个关节,出现增生性滑膜炎,破坏关节结构,最终导致关节畸形^[15]。CIA模型是一种免疫性炎症模型,表现为多发性末端关节炎^[16]。II型胶原蛋白存在于哺乳动物关节软骨中,但当其作为外源性抗原侵入机体时,可诱导机体产生II型胶原蛋白抗体,而该抗体可通过与软骨结合后激活T淋巴细胞和B淋巴细胞,从而产生关节炎性质的自身免疫反应,且此免疫反应可持续发展,最终出现关节红肿、滑膜增生、血管翳形成、关节结构破坏及全身性炎症反应等症状,与人类RA的临床症状相似,故CIA模型是研究RA发生发展以及筛选治疗药物的理想动物模型^[17]。地塞米松属于糖皮质激素类药物,具有强大的抗炎与免疫调节作用,被广泛用于自身免疫系统疾病、过敏性疾病及炎症性疾病的治疗^[18]。美国风湿学会曾将地塞米松等糖皮质激素类药物作为风湿性关节炎治疗的首选药物^[19]。因此,本研究选择其作为阳性对照药物。

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官,一些免疫抑制剂可使胸腺指数和脾指数降低,而免疫增强剂可使胸腺指数和脾指数升高,因此胸腺指数、脾指数是观察药物对免疫功能影响的重要指标之一^[20]。本研究结果显示,模型组大鼠关节炎指数评分以及胸腺指数、脾指数均显著升高,说明模型大鼠的免疫系统处于异常状态;给予中、高剂量的藏党参提取物后,模型大鼠的关节炎指数评分及胸腺指数、脾指数均显著降低,说明藏党参提取

物改善了CIA模型大鼠的免疫异常。此外,CIA病变过程与淋巴细胞、巨噬细胞和滑膜细胞的过度活化和增殖有关,这些细胞可大量释放炎症因子,从而引起炎症反应和氧化应激^[21]。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎因子在CIA的发展中发挥着重要的作用,其释放量增加可加重炎症细胞浸润并破坏关节组织^[22]。本研究结果显示,中、高剂量藏党参提取物能够显著改善CIA模型大鼠关节滑膜病理损伤、降低其血清中炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-6)水平,说明藏党参提取物可抑制CIA模型大鼠的炎症反应。

NF- κ B信号通路与CIA炎症反应的关系非常密切^[23]。静息状态下,NF- κ B p50与p65形成的异源二聚体和I κ B结合,形成NF- κ B-I κ B复合物,该复合物以无活性状态存在于细胞质中。当受到上游信号刺激后,I κ B发生磷酸化从复合物中解离出来并发生降解,使NF- κ B p65发生磷酸化而激活。激活的NF- κ B p65会暴露核定位序列,从而转入细胞核内,与特定位点结合,启动基因转录,诱导大量炎症因子(如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)的生成并释放,引发炎症级联反应,最终导致炎症的发生和关节滑膜的损伤^[24]。有研究表明,RA患者和动物模型中NF- κ B信号通路相关蛋白水平均显著升高^[25]。因此,NF- κ B通路已经成为RA治疗药物研发的主要靶点之一,通过抑制NF- κ B信号通路活性,可减少炎症因子的诱导与生成,从而减轻RA的炎症反应^[26-28]。本研究结果显示,中、高剂量藏党参提取物可显著降低CIA模型大鼠滑膜组织中p-NF- κ B p65、p-I κ B蛋白的表达水平,显著升高I κ B蛋白的表达水平,而无活性的NF- κ B p65蛋白的表达水平无明显变化,说明藏党参提取物改善CIA的作用机制可能与抑制NF- κ B信号通路有关。

综上所述,藏党参提取物能够增加CIA模型大鼠体质质量,降低其关节炎指数评分,改善其关节滑膜病理损伤,降低其胸腺指数、脾指数及血清中炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-6)水平,其作用可能是通过抑制NF- κ B信号通路来实现的,但其发挥RA治疗作用的具体活性物质及更多作用机制仍需进行深入研究。

参考文献

[1] NAIR N, PLANT D, VERSTAPPEN S M, et al. Differential DNA methylation correlates with response to methotrexate in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2020, 59(6): 1364-1371.

[2] ITOH Y. Metalloproteinases in rheumatoid arthritis: potential therapeutic targets to improve current therapies[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148: 327-338.

[3] MARTIN G V, KANAAN S B, HEMON M F, et al. Mosaicism of XX and XXY cells accounts for high copy number of Toll like receptor 7 and 8 genes in peripheral blood of men with rheumatoid arthritis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):

12880.

[4] 闫慧明,张雪,安燕,等.分子信号通路在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J].*风湿病与关节炎*, 2020, 9(9): 76-80.

[5] 磨红,马宗伯,吴成龙.类风湿关节炎治疗研究进展[J].*内科*, 2017, 12(3): 334-337.

[6] 罗达尚.新秀晶珠本草[M].成都:四川科学技术出版社, 2004: 134-136.

[7] 杨永昌.藏药志[M].西宁:青海人民出版社, 1991: 65-66.

[8] 孙杰,聂丽娟,郭桅,等.藏党参对黄嘌呤氧化酶活性的影响[J].*西藏医药*, 2015, 36(2): 11-13.

[9] 卓玛东智,孙杰,袁瑞瑛,等.罗堆多吉颗粒及组方成分陆额对黄嘌呤氧化酶活性的影响研究[J].*西藏大学学报(自然科学版)*, 2015, 30(1): 58-62.

[10] 孙杰.藏药陆额对黄嘌呤氧化酶活性的影响及其化学成分研究[D].拉萨:西藏大学, 2016.

[11] 冯悦,钟萌,罗见春,等.¹⁸F-FDG PET/CT技术监测雷公藤甲素对类风湿关节炎模型大鼠关节损伤的改善作用[J].*中国药房*, 2018, 29(22): 3059-3062.

[12] 刘青,万碧江.针刀治疗胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织Bcl-2/Bax的表达[J].*中国组织工程研究*, 2021, 25(5): 729-734.

[13] 卓玛措.藏医对类风湿性关节炎的病理机制探讨[J].*中国民族医药杂志*, 2016, 22(8): 45-46.

[14] 王静,赵可惠,更藏加,等.藏医真布病与中医痹症的对比探讨[J].*世界科学技术:中医药现代化*, 2015, 17(10): 2167-2171.

[15] MOLLARD E, MICHAUD K. Mobile apps for rheumatoid arthritis: opportunities and challenges[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2019, 45(2): 197-209.

[16] 于坤,徐枝芳,余楠楠,等.佐剂性和胶原诱导性关节炎模型比较分析[J].*辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(1): 106-109.

[17] CHOUDHARY N, BHATT L K, PRABHAVALKAR K S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2018, 40(3): 193-200.

[18] HAJIALILO M, GHORBANIHAGHIO A, VALAEE L, et al. A double-blind randomized comparative study of triamcinolone hexacetonide and dexamethasone intra-articular injection for the treatment of knee joint arthritis in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2016, 35(12): 2887-2891.

[19] JINAGAL J, GUPTA G, AGARWAL A, et al. Safety and efficacy of dexamethasone implant along with phacoemulsification and intraocular lens implantation in children with juvenile idiopathic arthritis associated uveitis[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2019, 67(1): 69-74.

[20] SU J, LI Q, LIU J, et al. Ethyl acetate extract of Tibetan medicine rhamnella gilgitica ameliorated type II collagen-induced arthritis in rats via regulating JAK-STAT sig-

HPLC法测定贝林司他中有关物质的含量^Δ

孙朋杰^{1*}, 张莉¹, 杜超^{1,2}, 李伟², 卓秋琪^{1#}(1.深圳万乐药业有限公司, 深圳 518000; 2.宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)08-0973-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.08.13

摘要 目的:建立贝林司他中有关物质的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱法检测并以加校正因子的主成分自身对照法进行计算。以 ODS-AM 为色谱柱,以 1.02% 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调节 pH 值至 3.5)-乙腈(85:15, V/V)为流动相 A、1.02% 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调节 pH 值至 3.5)-乙腈(30:70, V/V)为流动相 B 进行梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 °C,检测波长为 220 nm,进样量为 10 μL。结果:贝林司他及杂质 A、D、F、G、H 的线性范围分别为 0.113~1.693、0.050~1.496、0.117~1.750、0.098~1.471、0.120~1.799、0.100~1.506 μg/mL($r \geq 0.9997$),后 5 个杂质的校正因子分别为 1.0、1.0、1.2、1.5、1.0;检测限分别为 0.250、0.590、0.490、0.600、0.500 ng,定量限分别为 0.500、1.170、0.980、1.200、1.000 ng,回收率为 90.18%~111.48% (RSD 为 1.52%~4.78%, $n=9$),稳定性(100 h)、精密度试验的 RSD 均不大于 16%,耐用性良好。3 批贝林司他原料药中检测出杂质 A、D、H,含量分别为 0.030%~0.038%、0.019%~0.022%、0.012%~0.013%,其他最大单体杂质含量为 0.012%~0.013%,总杂质含量为 0.075%~0.084%,未检出杂质 B、C、F、G。结论:成功建立了测定贝林司他中有关物质含量的方法,且方法准确、专属性好。

关键词 贝林司他;有关物质;高效液相色谱法;加校正因子的主成分自对照法

Content Determination of Related Substances in Belinostat by HPLC

SUN Pengjie¹, ZHANG Li¹, DU Chao^{1,2}, LI Wei², ZHUO Qiuqi¹(1. Shenzhen Wanle Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518000, China; 2. School of Chemistry and Biological Engineer, Yichun University, Jiangxi Yichun 336000, China)

- naling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113514.
- [21] DA FONSECA L J S, NUNES-SOUZA V, GOULART M O F, et al. Oxidative stress in rheumatoid arthritis: what the future might hold regarding novel biomarkers and add-on therapies[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 7536805.
- [22] ZHENG Y, SUN L, JIANG T, et al. TNF α promotes Th17 cell differentiation through IL-6 and IL-1 β produced by monocytes in rheumatoid arthritis[J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 385352.
- [23] LI G, XIA Z, LIU Y, et al. SIRT1 inhibits rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte aggressiveness and inflammatory response via suppressing NF- κ B pathway[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(3): BSR 20180541.
- [24] KARWASRA R, SINGH S, SHARMA D, et al. Pomegranate supplementation attenuates inflammation, joint dysfunction via inhibition of NF- κ B signaling pathway in experimental models of rheumatoid arthritis[J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(8): e12959.
- [25] TIAN R, LI X, LI Y, et al. 1, 25(OH)D promotes chondrocyte apoptosis and restores physical function in rheumatoid arthritis through the NF- κ B signal pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 149-155.
- [26] HONG H, ZENG Y, JIAN W, et al. CDK7 inhibition suppresses rheumatoid arthritis inflammation via blockage of NF- κ B activation and IL-1 β /IL-6 secretion[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 222(2): 1-10.
- [27] PENG S, HU C, LIU X, et al. Rhoifolin regulates oxidative stress and proinflammatory cytokine levels in Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis via inhibition of NF- κ B[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53(6): e9489.
- [28] XIA Z B, YUAN Y J, ZHANG Q H, et al. Salvianolic acid B suppresses inflammatory mediator levels by downregulating NF- κ B in a rat model of rheumatoid arthritis[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 2524-2532.

^Δ 基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(No.GJJ190856); 深圳市科技研发资金资助项目(No.JSGG20180507183659905)

* 中级工程师, 硕士。研究方向: 新药研发。电话: 0755-25848784。E-mail: 845162115@qq.com

通信作者: 高级工程师, 硕士。研究方向: 新药研发。电话: 0755-25848784。E-mail: 243643597@qq.com

(收稿日期: 2020-12-04 修回日期: 2021-02-03)

(编辑: 林静)