

青藤碱对胶原诱导性关节炎小鼠肿瘤坏死因子- α 、白介素-17 及核因子- κ B 的影响

张玉萍,姚茹冰,赵智明,蔡辉

(南京军区南京总医院中西医结合科,江苏 南京 210002)

摘要:目的 观察青藤碱(SIN)对胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠关节炎指数(AI)评分、血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-17(IL-17)及滑膜核因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达的影响。方法 将30只DBA/1小鼠用随机数字表法分为正常组、CIA组、SIN组3组,每组各10只,诱导CIA组与SIN组小鼠建立CIA模型,予青藤碱(SIN)药物干预SIN组,对三组分别进行AI评分,测定血清TNF- α 、IL-17的水平及滑膜NF- κ B蛋白的表达。结果 SIN组和CIA组TNF- α 、IL-17的水平及滑膜NF- κ B蛋白的表达均较正常组升高,且SIN组小鼠的AI评分较CIA组明显降低,血清TNF- α [(170.73 $\pm$ 11.05)pg $\cdot$ mL $^{-1}$ 比(347.97 $\pm$ 13.45)pg $\cdot$ mL $^{-1}$, $F=1\,021.67$, $P<0.01$]、IL-17[(470.30 $\pm$ 122.02)pg $\cdot$ mL $^{-1}$ 比(621.78 $\pm$ 48.96)pg $\cdot$ mL $^{-1}$, $F=184.42$, $P<0.01$]水平明显减少,滑膜NF- κ B[(0.53 $\pm$ 0.04)pg $\cdot$ mL $^{-1}$ 比(0.84 $\pm$ 0.04)pg $\cdot$ mL $^{-1}$, $F=804.05$, $P<0.01$]蛋白的表达下调。结论 SIN能改善CIA小鼠关节肿胀,降低血清TNF- α 、IL-17的分泌,这可能与其下调了滑膜NF- κ B的表达有关。

关键词:关节炎,实验性;青藤碱;NF- κ B;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素17

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.06.004

Effects of Sinomenine on TNF- α , IL-17 and NF- κ B in CIA mice

ZHANG Yuping, YAO Rubing, ZHAO Zhiming, CAI Hui

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

Abstract: Objective To explore the effect of Sinomenine (SIN) on arthritis index (AI) scores, the serum level of tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-17 (IL-17) and the protein expression of synovium nuclear factor- κ B (NF- κ B) in collagen-induced arthritis (CIA) mice. Methods The mice were assigned into the normal group, the CIA group and the SIN group by using a random number table method, ten mice in each group. CIA group and SIN group were induced to establish a CIA model, and the mice in the SIN group were given Sinomenine drug intervention. The AI scores, the levels of serum TNF- α , IL-17 and synovium NF- κ B of the three groups were measured. Results In group SIN and group CIA, the levels of TNF- α , IL-17 and the expression of NF- κ B in synovium were higher than those in normal group. The AI scores and the level of TNF- α [(170.73 $\pm$ 11.05)pg $\cdot$ mL $^{-1}$ vs (347.97 $\pm$ 13.45)pg $\cdot$ mL $^{-1}$, $F=1\,021.67$, $P<0.01$], IL-17 [(470.30 $\pm$ 122.02)pg $\cdot$ mL $^{-1}$ vs (621.78 $\pm$ 48.96)pg $\cdot$ mL $^{-1}$, $F=184.42$, $P<0.01$] and synovium NF- κ B [(0.53 $\pm$ 0.04)pg $\cdot$ mL $^{-1}$ vs (0.84 $\pm$ 0.04)pg $\cdot$ mL $^{-1}$, $F=804.05$, $P<0.01$] in SIN group were significantly decreased compared to those of CIA group. Conclusions SIN can improve the joint swelling of CIA mice and reduce the secretion of serum TNF- α , IL-17, which may be related to downregulating the protein expression of synovium NF- κ B.

Keywords: Arthritis, experimental; Sinomenium acutum; NF-kappa B; Tumornecrosis factor-alpha; Interleukin-17

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关

节滑膜炎为基本病理表现的自身免疫性疾病,可引起受累关节的肿胀疼痛、活动受限,炎症持续进展可造成对软骨及骨的破坏,造成关节畸形和功能丧失,具有高度的致残性。青藤碱(sinomenine, SIN)

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81303124)

通信作者:蔡辉,男,主任医师,研究方向:中西医结合风湿免疫病方向, E-mail:962516239@qq.com

[20] CHEN MC, HSU WL, CHANG WL, et al. Antiangiogenic activity of phthalides-enriched Angelica Sinensis extract by suppressing WSB-1/pVHL/HIF-1 α /VEGF signaling in bladder cancer [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):5376.

[21] KIM MH, JEONG YJ, CHO HJ, et al. Delphinidin inhibits angiogenesis through the suppression of HIF-1 α and VEGF expression in A549 lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2017, 37(2):777-784.

[22] SHAIK AB, RAO GK, KUMAR GB, et al. Design, synthesis and bi-

ological evaluation of novel pyrazolochalcones as potential modulators of PI3K/Akt/mTOR pathway and inducers of apoptosis in breast cancer cells [J]. Eur J Med Chem, 2017, 139:305-324.

[23] LI K, WANG F, CAO WB, et al. TRIB3 promotes APL progression through stabilization of the oncoprotein PML-RAR α and inhibition of p53-mediated senescence [J]. Cancer Cell, 2017, 31(5):697-710.

(收稿日期:2017-10-16,修回日期:2018-03-20)

是从中药青风藤中提取的生物碱单体,药理研究发现其具有抗炎、免疫抑制等作用,对 RA 有较好的疗效^[1]。胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis,CIA)模型是目前公认的 RA 动物模型之一,本研究建立 CIA 小鼠模型,通过观察小鼠关节炎指数(arthritis index,AI)评分、血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)及白细胞介素-17(Interleukin-17,IL-17)、滑膜核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)蛋白的变化及 SIN 的干预作用,以探索 SIN 治疗 RA 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 DBA/1 小鼠 30 只,6 周龄,雄性,购于常州卡文斯实验动物有限公司,使用许可证:SCXK(苏)2011-0003。青藤碱(正清风痛宁片),湖南正清制药股份有限公司产品;牛 II 型胶原、完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA),美国 Chondrex 公司产品;小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒,小鼠 IL-17 ELISA 试剂盒,深圳欣博盛生物科技有限公司产品;NF- κ B p65 抗体,英国 Abcam 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 30 只 DBA/1 小鼠用随机数字表法分成 3 组:即正常组、CIA 组、SIN 组,每组各 10 只,其中 CIA 组和 SIN 组的 20 只小鼠均先诱导建立 CIA 模型(正常组除外),在造模及给药过程中每组小鼠均有意外死亡,至最后实验数据统计,正常组剩余小鼠 9 只,CIA 组 9 只,SIN 组 8 只。

1.2.2 造模 参照文献^[2]方法诱导建立 CIA 小鼠模型。将牛 II 型胶原与完全弗氏佐剂等体积研磨配置牛 II 型胶原乳剂,待乳剂乳化完全,于小鼠尾根部皮内免疫注射,分 2 次注射,每次各 100 μ L,初次免疫当天记为 d 1,d21 给予加强免疫注射。

1.2.3 关节炎指数评分 d 27 开始根据各组小鼠关节肿胀情况进行 AI 评分,每周一次,评分标准^[3]:0 分,无关节肿胀;1 分,足趾关节肿胀;2 分,趾关节和足趾肿胀;3 分,踝关节以下的足爪肿胀;4 分,包括踝关节在内整个足爪严重红肿。各关节累计积分为各小鼠的 AI 评分,每只最高分为 16 分。

1.2.4 给药 d 28 开始根据组别予不同处理,SIN 组予每日青藤碱药液 100 mg $\cdot$ kg⁻¹灌胃,正常组及 CIA 组予生理盐水作为对照,连续给药 20 d。

1.2.5 外周血采集及酶联免疫吸附测定(ELISA) 采取摘眼球法收集小鼠全血,静置离心,收集血清,放置-20 $^{\circ}$ C 储存备用。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测血清 TNF- α 、IL-17 水平。

1.2.6 滑膜采集及蛋白质印迹法(Western Blot)

处死小鼠后,仰卧位固定其头部和四肢,沿膝关节正中纵行切开皮肤,暴露膝关节中心约 3 cm $\times$ 3 cm 的区域,用齿镊提起髌骨,剥离完整的膝关节滑膜组织,参照说明书提取滑膜蛋白,经电泳、转膜、封闭、一抗及二抗孵育完成滑膜 NF- κ B 蛋白检测。

1.3 统计学方法 本研究采用 SPSS 22.0 统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间整体分析为单因素方差分析,组间多重比较,满足方差齐性检验者用 SNK 法比较,不满足方差齐性检验者用 Dunnett T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠关节炎指数比较 造模 d 24 小鼠关节开始发红肿胀,关节炎发病,随着时间的延长,小鼠关节红肿情况加重,伴关节活动受限,无法承重。CIA 组小鼠较正常组 AI 评分均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 CIA 组比较,造模 d 41 和 d 48,SIN 组小鼠 AI 评分则明显下降,差异有统计学意义(d 41, $P < 0.01$;d 48, $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠 AI 评分比较/(分, $\bar{x} \pm s$)					
组别	鼠数	d27	d34	d41	d48
正常组	9	0	0	0	0
CIA 组	9	3.33 $\pm$ 2.12 ^a	9.50 $\pm$ 2.81 ^a	9.67 $\pm$ 2.34 ^a	3.33 $\pm$ 1.21 ^a
SIN 组	8	3.25 $\pm$ 2.05	8.83 $\pm$ 2.23	5.50 $\pm$ 1.38 ^b	1.67 $\pm$ 0.52 ^c
F 值		11.21	18.35	23.28	20.80
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与 CIA 组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

2.2 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-17 及滑膜 NF- κ B 蛋白比较 各组间血清 TNF- α 表达水平有明显差异,其中 CIA 组较正常组和 SIN 组均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),SIN 组 TNF- α 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组间血清 IL-17 表达水平有明显差异,其中 CIA 组较正常组和 SIN 组均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),SIN 组 IL-17 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组间滑膜 NF- κ B 蛋白表达差异显著,其中 CIA 组 NF- κ B 蛋白表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.01$);SIN 组 NF- κ B 蛋白的表达显著下调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

3 讨论

本实验采用 DBA/1 小鼠的 CIA 模型,系因 CIA 模型是研究 RA 最常用的模型之一,且其发病机制与 RA 有多方面的共同之处,包括滑膜增生、单核细

表 2 各组小鼠血清 TNF-α、IL-17 及滑膜 NF-κB 蛋白比较/(pg·mL ⁻¹ , $\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	TNF-α	IL-17	NF-κB
正常组	9	126.62±8.11	347.60±14.66	0.17±0.02
CIA 组	9	347.97±13.45 ^a	621.78±48.96 ^c	0.84±0.04 ^c
SIN 组	8	170.73±11.05 ^b	470.30±122.02 ^b	0.53±0.04 ^b
<i>F</i> 值		1 021.67	184.42	804.05
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组比较,^a*P*<0.01,^c*P*<0.05;与 CIA 组比较,^b*P*<0.05

胞浸润、软骨破坏等^[2],DBA/1 小鼠是诱导 CIA 模型的敏感种系,关节炎的发生率可达 80%~100%,造模成功率高。本实验观察造模小鼠 d 24 关节炎开始发病,d 40 左右关节肿胀达到高峰,本次造模的成功率为 80%。SIN 是从中药青风藤中提取的有效成分,研究发现,SIN 可降低佐剂性关节炎大鼠的关节肿胀,降低关节炎大鼠的机械痛和热痛^[4],并能降低 CIA 小鼠血清 IL-1β、IL-6 的水平^[5]。本实验结果显示,造模 d 27 CIA 组小鼠的 AI 评分较正常组显著升高,d 28 开始予 SIN 治疗 2 周后,SIN 组小鼠的 AI 评分较 CIA 组明显降低,结果发现 SIN 能明显改善 CIA 小鼠的关节肿胀,对关节炎有较好的治疗作用。

TNF-α 是 NF-κB 活化后产生的重要炎症介质,具有广泛的生物学效应,其能诱导其他前炎症细胞因子如 IL-1、IL-6 的产生,促使趋化因子的释放,活化蛋白水解酶和金属蛋白酶,破坏关节软骨等,在 RA 关节炎中发挥重要作用^[6-7]。IL-17 是较晚发现的炎症细胞因子,有强大的致炎作用。IL-17 在 RA 患者滑膜中表达水平升高,且会刺激多种趋化因子的表达,募集嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞至关节滑膜,加重关节炎症和损伤^[8-9]。有研究发现 SIN 能下调血清 IL-17 的表达以改善 CIA 大鼠关节炎症^[10]。NF-κB 是广泛表达的核转录因子,在多种疾病的炎性位点高度活化,与关节炎的发生密切相关^[11]。研究发现,NF-κB 在 CIA 大鼠关节滑膜中的表达明显升高,NF-κB 的活化能抑制 RA 成纤维样滑膜细胞(RA-FLS)的凋亡,促进 RA-FLS 相关细胞因子和蛋白酶的分泌^[12]。口服 NF-κB 抑制剂咪唑啉可明显改善关节炎模型小鼠的关节炎症、血管翳形成、软骨损伤等症状^[13]。本研究发现,CIA 组小鼠血清 TNF-α、IL-17 及滑膜 NF-κB 蛋白的表达均明显升高(*P*<0.01 或<0.05),与既往的研究结果一致,且 SIN 干预后,可显著抑制血清 TNF-α、

IL-17 及滑膜 NF-κB 蛋白的表达(*P*<0.05),减轻 CIA 小鼠的关节炎症。

综上所述,本研究发现 SIN 可下调 CIA 小鼠滑膜 NF-κB 的表达,抑制血清 TNF-α、IL-17 的分泌,改善小鼠关节炎症,其可能是 SIN 治疗 RA 作用机制之一,为 SIN 治疗 RA 提供一定的实验依据。

参考文献

[1] WANG Q,LI XK. Immunosuppressive and anti-inflammatory activities of sinomenine[J]. *Int Immunopharmacol*,2011,11(3):373-376.

[2] BRAND DD,LATHAM KA,ROSLONIEC EF. Collagen-induced arthritis[J]. *Nat Protoc*,2007,2(5):1269-1275.

[3] SUN Y,YAO Y,DING CZ. A combination of sinomenine and methotrexate reduces joint damage of collagen induced arthritis in rats by modulating osteoclast-related cytokines[J]. *Int Immunopharmacol*,2014,18(1):135-141.

[4] MU H,YAO RB,ZHAO LJ,et al. Sinomenine decreases MyD88 expression and improves inflammation-induced joint damage progression and symptoms in rat adjuvant-induced arthritis[J]. *Inflammation*,2013,36(5):1136-1144.

[5] ZHOU YR,ZHAO Y,BAO BH,et al. SND-117, a sinomenine bivalent alleviates type II collagen-induced arthritis in mice[J]. *Int Immunopharmacol*,2015,26(2):423-431.

[6] MOELANTS EA,MORTIER A,VAN DAMME J,et al. Regulation of TNF-α with a focus on rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Cell Biol*,2013,91(6):393-401.

[7] 姚茹冰,郭郡浩,胡兵,等. 三七总苷对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用[J]. *医学研究生学报*,2008,21(1):34-36.

[8] IWAKURA Y,NAKAE S,SAIJO S,et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens[J]. *Immunol Rev*,2008,226(1):57-79.

[9] AZIZI G,JADIDI-NIARAGH F,MIRSHAFIEY A. Th17 Cells in immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Int J Rheum Dis*,2013,16(3):243-253.

[10] TONG B,YU J,WANG T,et al. Sinomenine suppresses collagen-induced arthritis by reciprocal modulation of regulatory T cells and Th17 cells in gut-associated lymphoid tissues[J]. *Mol Immunol*,2015,65(1):94-103.

[11] SCHEINMAN R. NF-κB and rheumatoid arthritis: Will understanding genetic risk lead to a therapeutic reward? [J]. *For Immunopathol Dis Therap*,2013,4(2):93-110.

[12] XU W,CHU K,LI H,et al. Bauhinia championii extraction treatment of collagen-induced arthritis via downregulation of the expression of TLR4, MyD88 and NF-κB[J]. *Am J Chin Med*,2013,41(2):379-390.

[13] LANSDELL TA,OREILLY S,WOOLLISCROFT T,et al. Attenuation of collagen-induced arthritis by orally available imidazoline-based NF-κB inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2012,22(14):4816-4819.