

·方药研究·

本文引用:曾光,陈芳,邵峰,夏帅帅,刘沙,鲜瑶瑶,周俭,黄惠勇.熊果酸对大鼠CIA模型关节TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(1):13-16.

## 熊果酸对大鼠CIA模型关节TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2表达的影响

曾光<sup>1</sup>,陈芳<sup>2</sup>,邵峰<sup>1</sup>,夏帅帅<sup>1</sup>,刘沙<sup>1</sup>,鲜瑶瑶<sup>1</sup>,周俭<sup>1</sup>,黄惠勇<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

**〔摘要〕**目的 探讨熊果酸(UA)对胶原诱导性关节炎(CIA)模型大鼠关节中TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2表达的影响。方法 首先随机选取8只作为正常对照组,其余复制SD大鼠CIA模型,造模成功后随机分为模型对照组、熊果酸组、甲氨蝶呤组、地塞米松组并予以相应处理。于给药35天后处死大鼠,取关节制作切片,进行HE染色,观察关节骨质的病理改变,免疫组化法检测关节中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2的表达。结果 与CIA模型组比较,UA大鼠组关节炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2的表达明显降低( $P < 0.01$ ),UA组效果不如甲氨蝶呤组、地塞米松组( $P < 0.01$ )。结论 UA能明显缓解CIA大鼠关节炎症及损伤,减少关节中相关炎症因子的表达。

**〔关键词〕**熊果酸;胶原诱导性关节炎;炎症因子;TNF- $\alpha$ ;IL-17;PGE2

**〔中图分类号〕**R255.6;R285 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.01.004

### Effects of Ursolic Acid on the Expression of TNF- $\alpha$ , IL-17 and PGE2 in Joints of CIA Model Rats

ZENG Guang<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>2</sup>, SHAO Feng<sup>1</sup>, XIA Shuaishuai<sup>1</sup>, LIU Sha<sup>1</sup>, XIAN Yaoyao<sup>1</sup>, ZHOU Jian<sup>1</sup>, HUANG Huiyong<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the effect of ursolic acid (UA) on the expression of TNF- $\alpha$ , IL-17 and PGE2 in the joints of rats with collagen-induced arthritis (CIA). **Methods** Eight rats as normal control group were randomly selected from the 60 SD rats, and the other rats were built for CIA models. Then the CIA models were randomly divided into model control group, ursolic acid group, methotrexate group and dexamethasone group. The rats were sacrificed 35 days after the administration, and the sections were harvested for HE staining to observe the pathological changes of the joint bone. The expression of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-17 and PGE2 were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with CIA model group, the expression of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-17 and PGE2 in UA rats significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the effects of UA were not as good as those in methotrexate and dexamethasone groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** UA can significantly relieve the inflammation and injury of joints in CIA rats and reduce the expression of related inflammatory factors in the joints.

**〔Keywords〕** ursolic acid; collagen-induced arthritis; inflammatory factors; TNF- $\alpha$ ; IL-17; PGE2

类风湿性关节炎是免疫介导的慢性炎症性疾病,多种细胞因子参与介导炎症和组织损伤<sup>[1]</sup>。熊果酸(ursolic acid,UA)是一种天然的三萜类化合物,

许多中草药如白花蛇舌草、络石藤、藤梨根、女贞子、五味子及某些水果中含有UA,是多种中药的重要或主要有效成分,研究表明UA具有抗氧化、抗变

〔收稿日期〕2017-10-25

〔基金项目〕国家自然科学基金青年项目(81403206);中国博士后基金委面上项目(2014M560646);湖南省科技厅社会发展项目(2014SK3042);湖南省教育厅青年项目(2014B131);湖南省研究生科研创新项目(CX2017B447);湖南中医药大学青年项目(2014-43)。

〔作者简介〕曾光,女,副教授,博士后,主要从事风湿免疫疾病的中医药防治研究。

〔通讯作者〕\*黄惠勇,男,教授,博士研究生导师,主要从事中医辨证学与数字中医药的研究,E-mail:tony427000@aliyun.com。

态反应、保护肝功能、抗糖尿病等药理学活性,还能抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路来诱导多种肿瘤细胞凋亡,抑制血管增生,是一种极具开发潜能的天然产物<sup>[2-5]</sup>,目前国内采用熊果酸脂质体治疗晚期癌症已进入临床研究<sup>[6]</sup>,除此之外,UA 的抗炎作用近年来逐渐成为研究热点<sup>[7-8]</sup>。为进一步探讨 UA 对关节炎的治疗机制,本实验以胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis,CIA)大鼠为模型,观察熊果酸对 CIA 大鼠关节中相关炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 动物 SPF 级健康 Sprague-Dawley(SD)大鼠(购于湖南中医药大学实验动物中心),8 周龄,雌性,体质量(150 $\pm$ 21) g,SPF 级实验室正常饲养一周后实验。

1.1.2 试剂 牛 II 型胶原(Chondrex);弗氏不完全佐剂(Sigma);熊果酸标准品(纯度 98%),Delta 标准品公司提供;地塞米松注射液:规格:0.5 mL:2.5 mg,吉林精优长白山药业有限公司生产;甲氨蝶呤片:规格:2.5 mg,上海信谊药厂有限公司生产。大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 抗体:博士德公司;免疫组化试剂盒:北京中杉金桥。

1.1.3 实验仪器 Shandon 切片机;Leica 双目显微镜;Motic 数码显微摄像系统;北航 MIAS 医学图像分析系统。

### 1.2 方 法

1.2.1 造模与评估 取 60 只雌性 SD 大鼠。随机选取 8 只作为正常对照组,其余大鼠均复制 CIA 模型,参考文献[9],将溶于醋酸的牛 II 型胶原(2 mg/mL)与弗氏不完全佐剂(IFA)等体积混合,冰上充分乳化,制成 II 型胶原乳剂。大鼠用 10%的水合氯醛(400 mg/kg)麻醉后,在无菌条件下,于大鼠背部及尾根部多点注射(每只 0.2 mL)配制好的 II 型胶原乳剂,以初次免疫当天作为 0 d,第 7 天按上述方法、相同剂量加强 1 次。正常对照组按注射等体积的生理盐水处理。用关节炎指数(AI)作为判断模型是否成功的标准。肢体关节肿胀按 0-IV 级评分:0,无红肿;I,趾关节稍肿;II,趾关节及足趾关节肿胀;III,踝关节以下足爪肿胀;IV,包括踝关节在内的全部足爪肿胀。AI 值=四肢肢体关节肿胀级评分之和(I 级为 1 分,总分为 16 分)。AI $\geq$ 4 分为造模成

功,本次成功率约为 80%左右。

1.2.2 分组与给药 将造模成功的 CIA 大鼠随机分为 CIA 模型组(CIA)、熊果酸组(UA)、甲氨蝶呤组(MTX)、地塞米松组(DXM),每组各 8 只。在初次免疫后 16 d 起,熊果酸组给予熊果酸 100 mg/(kg $\cdot$ d)灌胃,甲氨蝶呤组给予甲氨蝶呤 0.9 mg/(kg $\cdot$ w)灌胃,地塞米松组给予地塞米松 1 mg/(kg $\cdot$ 3d)腹腔注射,正常组和 CIA 模型组大鼠分别给予等体积生理盐水灌胃。观察大鼠体质量及一般情况。初次免疫前称重一次,从致炎后 7 d 天起,各组每隔 7 天,大鼠称质量。每天观察大鼠进食、大小便、精神状态及一般活动情况。于连续给药 35 天后处死动物,剪下踝关节制片进行研究。

### 1.3 指标检测

1.3.1 踝关节病理切片及观察 处死动物后剪下双后足炎性踝关节,福尔马林固定,10%EDTA 脱钙液中脱钙 21 天,乙醇逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切成 5  $\mu$ m 切片,脱蜡,进行苏木精-伊红(HE)染色,封片。光学显微镜下观察关节软骨的病理学改变。

1.3.2 大鼠踝关节 TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 表达的免疫组化染色检测 取切片进行免疫组化染色,按照试剂盒说明书操作。光镜下观察,显微图像摄影,MIAS 医学图像系统分析。测定 TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 表达阳性细胞的平均灰度值;阳性细胞确定条件:胞浆染色或棕黄色。细胞核比较清晰,形状比较规则,轮廓比较清楚,完全具备上述条件方确定为阳性表达细胞。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件处理,对两个变量之间计量资料的比较行 *t* 检验。以  $P < 0.01$  为差异具有统计学意义。

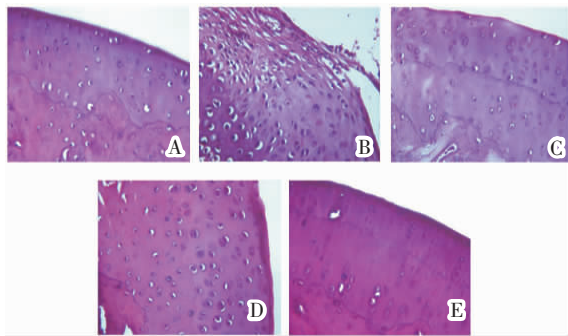
## 2 结 果

### 2.1 炎症关节软骨的病理形态学结果

如图 1 所示,正常组大鼠关节面光滑,软骨细胞排列有序,潮线清楚;CIA 模型组大鼠软骨关节面变薄,软骨成骨化,纤维组织增生,炎细胞浸润,潮线消失;熊果酸组大鼠关节面光滑,软骨关节轻度增生,潮线清楚;甲氨蝶呤组大鼠关节面增厚,软骨增生增厚,潮线消失;地塞米松组大鼠关节面变薄,潮线清楚。

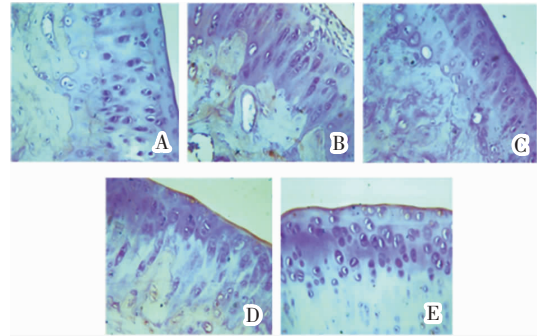
### 2.2 大鼠踝关节免疫组化结果

正常组关节切面中可见棕黄色 TNF- $\alpha$ 、IL-17、



注:A.正常对照组;B.模型大鼠组;C.UA 组;D.甲氨蝶呤组;E.地塞米松组

图 1 各组大鼠关节软骨病理改变(HE, $\times 400$ )



注:A.正常对照组;B.模型大鼠组;C.UA 组;D.甲氨蝶呤组;E.地塞米松组

图 4 大鼠关节表达 PGE2 的免疫组化结果( $\times 400$ )

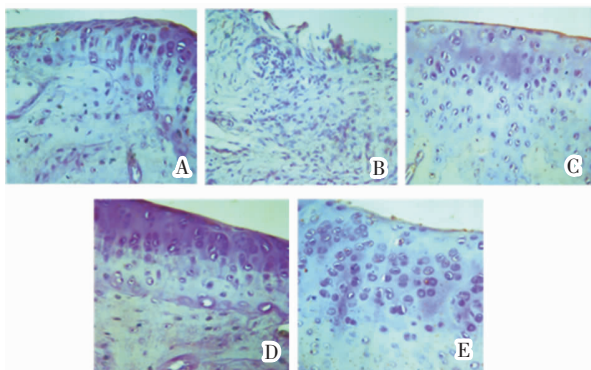
PGE2 弱阳性染色,模型组可见软骨细胞紊乱,TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 强阳性染色,各给药组软骨细胞清楚,呈黄色 TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 染色。免疫组化结果( $\times 400$ )见图 2-图 4。

TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 表达较正常组明显上调 ( $P < 0.01$ ),各给药组表达均较模型组明显下调( $P < 0.01$ )。

表 1 大鼠关节 TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 阳性表达的平均灰度值

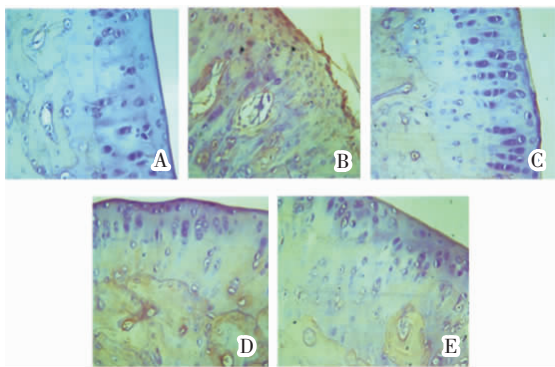
		比较结果		
		$(\bar{x} \pm s, n=8)$		
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-17	PGE2
正常对照组	-	111.86 $\pm$ 12.84	118.6 $\pm$ 29.21	134.77 $\pm$ 14.96
CIA 模型组	-	207.53 $\pm$ 14.69**	205.03 $\pm$ 10.85**	217.4 $\pm$ 11.68**
UA 组	100	166.23 $\pm$ 12.51 $\Delta\Delta$	165.4 $\pm$ 4.36 $\Delta$	168.63 $\pm$ 9.38 $\Delta\Delta$
甲氨蝶呤组	0.9	161.43 $\pm$ 14.88 $\Delta\Delta$	167.86 $\pm$ 13.6 $\Delta\Delta$	164.12 $\pm$ 12.91 $\Delta\Delta$
地塞米松组	1	157.63 $\pm$ 21.65 $\Delta\Delta$	167.63 $\pm$ 7.66 $\Delta\Delta$	160.96 $\pm$ 14.3 $\Delta\Delta$

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



注:A.正常对照组;B.模型大鼠组;C.UA 组;D.甲氨蝶呤组;E.地塞米松组

图 2 大鼠关节表达 TNF- $\alpha$  的免疫组化结果( $\times 400$ )



注:A.正常对照组;B.模型大鼠组;C.UA 组;D.甲氨蝶呤组;E.地塞米松组

图 3 大鼠关节表达 IL-17 的免疫组化结果( $\times 400$ )

### 2.3 免疫组化图像分析结果

各组关节软骨 TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 阳性表达的平均灰度值比较见表 1。由表 1 可见,模型组

### 3 讨论

RA 患者外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 Th17 细胞的比率增加而 Treg 细胞的比率降低,导致 Th17/Treg 细胞比例失衡<sup>[10]</sup>。Th17 细胞生成 IL-17,IL-17 是一种强大的促炎性因子,在 RA 发病中能上调免疫应答,上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在滑膜组织中的表达,从而加强基质代谢和软骨破坏,IL-17 还诱导滑膜成纤维细胞(FLS)在侵袭部位分泌核因子  $\kappa$ B 受体活化剂配体(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL),作用于破骨细胞的前体,使破骨细胞分化成熟,促进骨侵蚀<sup>[11-12]</sup>。

TNF- $\alpha$  是 RA 病程中最早由 T 细胞产生的细胞因子之一,TNF- $\alpha$  刺激核因子  $\kappa$ B ( nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路激活在 RA 炎性反应、血管形成中发挥重要作用。造成关节软骨的损伤、关节破坏<sup>[13]</sup>。PGE2 是在致炎因子作用下,局部组织产生和释放的、具有致炎致痛作用的炎症介质。PGE2 尚能激活或致敏外周痛觉感受器,传递痛觉信号,产生疼痛过敏,是重要的疼痛介质<sup>[13]</sup>。有研究显示甲氨蝶



呤给药能抑制 CIA 大鼠关节 TNF- $\alpha$ 、IL-17、PGE2 的表达<sup>[14-15]</sup>。以甲氨蝶呤为基础的多种抗风湿药联合、中西药联合治疗是目前临床主要治疗手段。从传统中药中寻找和开发高效、低毒的抗风湿新药是临床的迫切需求<sup>[16]</sup>。项目组前期从多种抗风湿中药提取物中筛选出熊果酸(ursolic acid, UA)等活性成分进行体内外实验,发现 UA 能明显抑制体外 T 细胞激活与增殖,抑制胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠关节肿胀、减轻骨质破坏<sup>[17-19]</sup>,为进一步探讨其分子机制,本实验研究了 UA 对 CIA 大鼠关节炎因子的作用,发现 UA 体内给药 100 mg/(kg·w)明显减轻关节的病理改变,减少大鼠关节中 TNF- $\alpha$ 、IL-17 和 PGE2 的表达,其效应不差于地塞米松 1 mg/(kg·d)和甲氨蝶呤 0.9 mg/(kg·3d)。本项研究结果提示,UA 有一定的抗炎效果,是一种有潜力的高效、低毒的炎症调节剂。

#### 参考文献:

- [1] 邝涛,李鑫,王宝新,等.湖南地区类风湿关节炎中医证型与临床检测指标关系研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(7):745-748.
- [2] 孟英才,詹济华,肖水平,等.熊果酸衍生物的合成及其抗菌活性评价[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):493-498.
- [3] LUO J, HU YL, WANG H. Ursolic acid inhibits breast cancer growth by inhibiting proliferation, inducing autophagy and apoptosis, and suppressing inflammatory responses via the PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B signaling pathways in vitro[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4): 3623-3631.
- [4] KASHYAP D, TULI H S, SHARMA A K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential [J]. *Life Sci*, 2016, 146: 201-13.
- [5] WOZNIAK L, SKAPSKA S, MARSZA łek K. Ursolic acid—a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities[J]. *Molecules*, 2015, 20: 20614-20641.
- [6] KONG L, LI S, LIAO Q, et al. Oleanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity [J]. *Antiviral Res.* 2013, 98(1): 44-53.
- [7] WANG X H, ZHOU S Y, QIAN Z Z, et al. Evaluation of toxicity and single-dose pharmacokinetics of intravenous ursolic acid liposomes in healthy adult volunteers and patients with advanced solid tumors[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9(2): 117-125.
- [8] NELSON A T, CAMELIO A M, CLAUSSEN K R, et al. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 4342-4346.
- [9] 孔薇. II 型胶原诱导性关节炎大鼠模型的制备、评价及部分机制的研究[D].合肥:安徽医科大学,2008.
- [10] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. *Nature*, 2006, 441(7090):235-238.
- [11] HONORATI MC, NERI S, CATTINI L, et al. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(4):345-352.
- [12] COOLES F A, ISAACS J D. Pathophysiology of rheumatoid arthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2011, 23(3):233-240.
- [13] VAN L G, BEYAERT R. Negative regulation of NF- $\kappa$ B and its involvement in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(3): 221.
- [14] 陈纪藩,叶柳忠,陈光星,等.通痹灵对 CIA 大鼠关节软骨病变影响的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,2003, 9(5):32-35.
- [15] 陈纪藩,叶柳忠,陈光星,等.通痹灵对胶原诱导性关节炎大鼠软骨破坏的对抗作用[J].广州中医药大学学报,2003,20(1):8-12, 91.
- [16] 曹艳红,胡建东.湿热痹阻与寒湿痹阻型类风湿关节炎相关细胞因子客观化研究[J].湖南中医药大学学报,2016,36(10):61-71.
- [17] 曾光,梁清华,吴汉军,等.熊果酸对刀豆蛋白 A 诱导小鼠 T 细胞增殖与激活的影响[J].湖南中医药大学学报,2008,28(2):16-18.
- [18] ZENG G, LIANG Q H, YOU W H, et al. Ursolic acid inhibits T cell activation through modulating NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2012, 18(1):34-37.
- [19] 曾光,陈芳,熊新贵,等.熊果酸对 CIA 大鼠关节炎及骨质破坏的影响[J].湖南中医药大学学报,2013,33(7):3-7.

(本文编辑 李杰)