

本文引用:鲜瑶瑶,周俭,曾光,王莘智,刘沙,徐豫湘.熊果酸对胶原诱导性关节炎大鼠关节炎相关因子 mRNA 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(6):689-692.

熊果酸对胶原诱导性关节炎大鼠关节炎 相关因子 mRNA 表达的影响

鲜瑶瑶¹,周俭¹,曾光^{1*},王莘智²,刘沙¹,徐豫湘²

(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** 研究熊果酸(ursolic acid,UA)对胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠关节 X 线及关节炎相关因子 mRNA 表达的影响。**方法** SD 大鼠采取皮下注射牛 II 型胶原加弗氏不完全佐剂法建立 CIA 模型,取造模成功后大鼠随机分为 CIA 模型组、UA 低剂量组、UA 高剂量组、甲氨喋呤(methotrexate, MTX)组、UA+MTX 组并予以对应干预。另取 6 只正常大鼠为对照的空白组。初次免疫 30 d 断颈处死大鼠,关节行 X 线摄片,再取下大鼠炎症关节组织匀浆,提取 RNA,荧光定量 PCR 法检测 IL-17A、IL-10、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 的 mRNA 表达。**结果** 与 CIA 模型组相比,UA 高剂量组、MTX 组、UA+MTX 组 X 线评分减低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各治疗组 IL-17A、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);各治疗组 IL-10、TGF- β 因子的 mRNA 表达增高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** UA 可明显缓解 CIA 大鼠关节炎,改善关节 X 线评分,其机制可能与调节炎症因子的产生,维持组织促炎因子与抑炎因子的平衡有关。

[关键词] 熊果酸;类风湿关节炎;胶原诱导性关节炎;X 线评分;炎症因子

[中图分类号] R285.5;R593.22

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.06.003

Effects of Ursolic Acid on mRNA Expression of Joint Inflammation-related Factors in Collagen-induced Arthritis Rats

XIAN Yaoyao¹, ZHOU Jian¹, ZENG Guang^{1*}, WANG Shenchi², LIU Sha¹, XU Yuxiang²

(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 effects of ursolic acid (UA) on the articular X-ray and mRNA expressions of joint inflammation-related factors in collagen-induced arthritis (CIA) rats. **Methods** SD rats were given subcutaneous injection of bovine type II collagen plus Freund's incomplete adjuvant for modeling. After successful modeling, the rats were randomly divided into a CIA model group, a UA low-dose group, a UA high-dose group, a methotrexate (MTX) group and a UA + MTX group and they were given corresponding intervention. Another 6 normal rats were selected as the control group. Rats were sacrificed by neck breaking after 30 d of primary immunization, and the joints were taken X-ray. The tissue homogenate of rat's inflammatory joint was removed and RNA was extracted. The expressions of IL-17A, IL-10, IL-6, TNF- α , IL-1 β , TGF- β and mRNA were detected by fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with the CIA model group, the X-ray scores of the UA high-dose group, the MTX group, and the UA + MTX group were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the mRNA expressions of IL-17A, IL-6, TNF- α and IL-1 β in each treatment group were decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$); the mRNA expressions of IL-10 and TGF- β in each treatment group were increased ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** UA can significantly alleviate joint inflammation in CIA rats and

[收稿日期] 2018-09-19

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81403206);湖南省教育厅重点项目(18A209);湖南省中医药管理局重点项目(201919);中国博士后基金面上项目(2014M560646);湖南省研究生科研创新项目(CX2017B447)。

[作者简介] 鲜瑶瑶,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治风湿免疫性疾病。

[通讯作者] *曾光,女,副教授,硕士研究生导师,E-mail:626283882@qq.com。

improve the articular X-ray score. The mechanism may be related to regulating the production of inflammatory factors and maintaining the balance between tissue pro-inflammatory factors and anti-inflammatory factors.

[**Keywords**] ursolic acid; rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; X-ray score; inflammatory factor

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以侵蚀性关节炎为主要临床特征的慢性自身免疫性疾病,其基本病理改变为滑膜炎、血管翳形成,可侵犯关节软骨、软骨下骨、韧带和肌腱等,造成关节软骨、骨和关节囊破坏。随着病程的进展,RA患者残疾和功能受限发生率升高^[1],及早发现并进行干预治疗,延缓患者病情进展以及减轻患者痛苦,具有重要意义。RA的西医发病机制尚不明确,目前多采用非甾体类抗炎药(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)联合改善病情的抗风湿药物(disease modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)治疗,长期使用不良反应较多。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。

熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌苏酸、乌索酸,主要存在女贞子、山楂、陆英、夏枯草、车前草、白花蛇舌草、连翘、苦丁茶、甘草、连翘等药用植物中,在夹竹桃、连翘叶、枇杷叶和白花蛇舌草中UA的含量最高^[2]。研究表明UA具有广泛而温和的抗炎^[3]、抗病毒、抗变态反应、保护胃黏膜和免疫调节等药理作用^[4-5],UA也显示出抗抑郁、心脏保护、肾保护、神经保护、胃肠保护、平喘、抗激素、抗关节炎和抗诱变作用^[3]。RA是一种慢性炎症性自身免疫性疾病,胶原诱导性关节炎(collageninduced arthritis, CIA)是最经典应用最广泛的RA模型复制方法^[6],本实验通过大鼠CIA模型来研究UA对关节炎影响,现具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级健康SD大鼠,8周龄,雌性,体重(120±10)g,购于斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SYXK(湘)2018-0005,实验动物质量合格证号:11400700151972;饲养处及实验基地:湖南中医药大学实验动物中心SPF级实验室,正常饲养一周后实验。

1.1.2 试剂 牛Ⅱ型胶原(美国Chondrex,货号:20021);弗氏不完全佐剂(Sigma,批号:BJ-012-0392);熊果酸标准品(质量分数98%),Delta标准品公司提供,货号:110742,采用二甲基亚砜(DMSO,阿拉丁,货号:D103283)溶解;甲氨喋呤(methotrexate, MTX)注射液(规格:5 mg/支,山西普德药业有限公司,批号02180101);RNA提取液trizol(Invitrogen, 货号:

15596018)。引物:生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR Mix试剂盒(立陶宛Fermentas)。

1.1.3 仪器 MF-150G型Digital Diagnose X线片摄片机(美国BENNETT公司);7500PCR仪(美国ABI);T10 basic匀浆机(德国IKA)。

1.2 方法

1.2.1 造模与评估 取70只雌性SD大鼠,随机取6只作为正常对照组(空白组),其余大鼠均复制CIA模型^[7],将溶于醋酸的牛Ⅱ型胶原(浓度为2 mg/mL)与弗氏不完全佐剂(IFA)等体积混合,充分乳化,制成Ⅱ型胶原乳剂(1 mg/mL)。在无菌条件下,于大鼠尾根部皮下注射(0.2 mL/只)配制好的Ⅱ型胶原乳剂,初次免疫当天作为0 d,第7天按上述方法、相同剂量(0.2 mL/只)加强1次。空白组注射等体积的生理盐水。用关节炎指数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≥4分为造模成功,本次成功率70%(于初次免疫12 d时造模成功)。

1.2.2 分组与干预 将造模成功的CIA大鼠随机分为CIA模型组、UA低剂量组、UA高剂量组、MTX组、UA+MTX组,每组各6只。在初次免疫12 d时,UA低剂量组给予每天50 mg/kg灌胃,UA高剂量组给予每天100 mg/kg灌胃,MTX组每3天给予1 mg/kg灌胃,UA+MTX组予以每天UA 50 mg/kg、每3天予以MTX 1 mg/kg灌胃,空白组和CIA模型组大鼠分别给予等体积生理盐水灌胃。每天观察大鼠进食、大小便、精神状态及一般活动情况。于初次免疫30 d断颈处死大鼠,四肢行X线摄片,再取下大鼠炎症的后足进行研究。

1.3 观察指标

1.3.1 关节炎X线评分^[8] X线评分从软组织肿胀、骨侵蚀和关节间隙改变3个方面综合进行评价。初次免疫30 d时将各组大鼠的四肢关节置X线成像系统下摄片(湖南中医药大学附属第一医院放射科)进行X线评分计分。

1.3.2 大鼠关节软组织中炎症相关分子IL-17A、IL-10、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 因子的mRNA表达检测 于初次免疫30 d,取大鼠炎症的后足,组织匀浆,按说明书提取各组RNA。使用Nanodrop2000

检测 RNA 浓度及纯度,将浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释,使其终浓度为 500 ng/ μ L。按照 RT-PCR 试剂盒说明书将 RNA 反转录合成 cDNA,各引物序列见表 1。取上述反应产物 2.0 μ LcDNA。配制如下反应体系,每个反转录产物配制 3 管:2 \times qPCR Mix 125 μ L;上游引物 2.0 μ L;下游 2.5 μ L;ddH₂O 8.0 μ L。反应条件:预变性:95 $^{\circ}$ C 10 min;循环(40 次)95 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 60 s;熔解曲线,65 $^{\circ}$ C \rightarrow 95 $^{\circ}$ C,每 15 秒升温 0.3 $^{\circ}$ C。在美国 ABI7500 荧光定量扩增仪上完成荧光实时监测 PCR 扩增,作出溶解曲线,收集荧光得到的曲线图,用实时荧光定量 PCR 分析程序分析。 $\Delta\Delta$ CT 法:A=CT(目的基因,待测样本)-CT(内标基因,待测样本),B=CT(目的基因,对照样本)-CT(内标基因,对照样本),K=A-B(mean),表达水平以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

表 1 PCR 引物序列

| 基因 | 引物序列(5'-3') | 引物长度/bp |
|------------------|------------------------------|---------|
| IL10-F | GCCACTGGAGCAGGTGAAGAATG | 109 |
| IL10-R | TGTCACGTAGGCTTCTATGCAGTTG | 109 |
| IL17A-F | TGCCTGATGCTGTTGCTGCTAC | 199 |
| IL17A-R | GTGAAGTGGAAACGGTTCAGGTAGTC | 199 |
| IL1 β -F | GACAAGAGCTTCAGGAAGGCAGTG | 109 |
| IL1 β -R | CACACTAGCAGGTCGTCATCATCC | 109 |
| IL6-F | AAGCCAGAGTCATTTCAGAGCAATACTG | 167 |
| IL6-R | GATGACTTGGATGGTCTTGGCTCCTTAG | 167 |
| TGF- β 1-F | GACCGCAACAACGCAATCTATGAC | 155 |
| TGF- β 1-R | TGCTCCACAGTTGACTTGAATCTCTG | 155 |
| TNF- α -F | TCCAGAACTCCAGCGGGTGTGTC | 86 |
| TNF- α -R | GTTCACTAGACAGAAGAGCGCTGCTG | 86 |

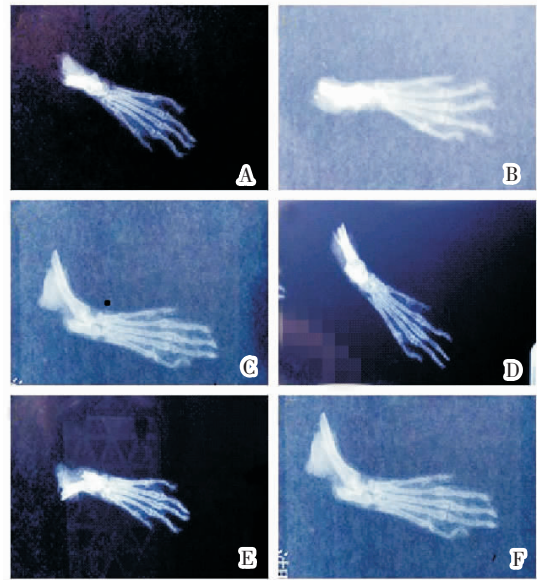
1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学分析软件进行数据处理,计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,行方差齐性检验,组间比较采用 LSD-t 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

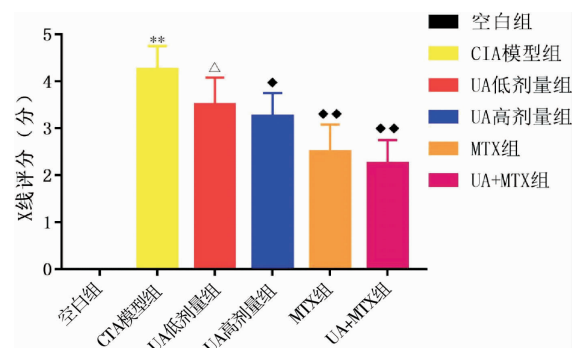
2.1 UA 对 CIA 大鼠的关节 X 线评分的影响

CIA 模型组大鼠出现骨质疏松,足趾各关节空隙狭窄且模糊关节变形,关节 X 线评分增高。与空白组相比,CIA 模型组大鼠关节 X 线评分明显增高($P<0.01$)。与 CIA 模型组相比,UA 高剂量组 X 线评分降低($P<0.05$),MTX 组、UA+MTX 组大鼠关节 X 线评分明显降低($P<0.01$)。与 MTX 组相比,UA 低剂量组大鼠关节 X 线评分较高($P<0.05$),见图 1-2。



注:A.空白组;B.CIA 模型组;C.UA 低剂量组;D.UA 高剂量组;E.MTX 组;F.UA+MTX 组

图 1 造模后大鼠四肢关节 X 线成像图



注:与空白组比较,** $P<0.01$;与 CIA 模型组比较,◆ $P<0.05$,◆◆ $P<0.01$;与 MTX 组比较,△ $P<0.05$

图 2 UA 对 CIA 大鼠的关节 X 线评分的影响

2.2 UA 对 CIA 大鼠关节软组织炎症相关分子 IL-17A、IL-10、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 因子的 mRNA 表达影响

与空白组相比,CIA 模型组 IL-6 表达较高($P<0.05$),IL-17A、TNF- α 、IL-1 β 表达明显增高($P<0.01$),抑炎因子 TGF- β 、IL-10 表达明显降低($P<0.01$)。与 CIA 模型组相比,UA 低剂量组 IL-17A、TNF- α 、IL-1 β 降低($P<0.05$);UA 高剂量组 IL-6、IL-17A、TNF- α 、IL-1 β 降低($P<0.05$),抑炎因子 TGF- β 、IL-10 表达升高 ($P<0.05$);MTX 组 IL-6、IL-1 β 表达降低($P<0.05$),IL-17A、TNF- α 表达明显降低($P<0.01$),抑炎因子 TGF- β 升高($P<0.05$)、IL-10 明显升高($P<0.01$);UA+MTX 组 IL-6 表达降低($P<0.05$),IL-17A、TNF- α 、IL-1 β 表达明显降低($P<0.01$),IL-10 表达升高($P<0.05$),TGF- β 明显升高($P<0.01$)。与 MTX 相比,UA+MTX 组 TGF- β 1 表达升高($P<0.05$),UA 低剂量组 IL-17A 明显增高($P<0.01$)。见表 2。

表 2 UA 对 CIA 大鼠关节软组织炎症相关分子 IL-17A、IL-10、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 因子的 mRNA 表达影响 ($\bar{x}\pm s, n=6, 2^{-\Delta\Delta CT}$)

| 组别 | IL-6 | IL-17A | TNF- α | IL-1 β | TGF- β 1 | IL-10 |
|----------|---------------------------------|--|--|--|--|--|
| 空白组 | 1.90 \pm 0.17 | 0.92 \pm 0.31 | 0.96 \pm 0.29 | 1.02 \pm 0.21 | 1.95 \pm 0.12 | 1.76 \pm 0.17 |
| CIA 模型组 | 3.52 \pm 0.87* | 2.65 \pm 0.71** | 2.62 \pm 0.33** | 2.31 \pm 0.51** | 1.40 \pm 0.14** | 1.31 \pm 0.08** |
| MTX 组 | 2.20 \pm 0.36 \blacklozenge | 1.25 \pm 0.09 $\blacklozenge\blacklozenge$ | 1.82 \pm 0.20 $\blacklozenge\blacklozenge$ | 1.53 \pm 0.35 \blacklozenge | 1.67 \pm 0.08 \blacklozenge | 1.54 \pm 0.07 $\blacklozenge\blacklozenge$ |
| UA 低剂量组 | 2.67 \pm 0.44 | 1.70 \pm 0.20 $\blacktriangle\blacktriangle$ | 1.99 \pm 0.32 \blacklozenge | 1.57 \pm 0.23 \blacklozenge | 1.49 \pm 0.19 | 1.45 \pm 0.18 |
| UA 高剂量组 | 2.30 \pm 0.43 \blacklozenge | 1.49 \pm 0.25 \blacklozenge | 1.64 \pm 0.49 \blacklozenge | 1.39 \pm 0.54 \blacklozenge | 1.68 \pm 0.12 \blacklozenge | 1.69 \pm 0.20 \blacklozenge |
| UA+MTX 组 | 2.04 \pm 0.33 \blacklozenge | 1.16 \pm 0.19 $\blacklozenge\blacklozenge$ | 1.50 \pm 0.32 $\blacklozenge\blacklozenge$ | 1.32 \pm 0.09 $\blacklozenge\blacklozenge$ | 1.83 \pm 0.05 $\blacklozenge\blacklozenge\blacktriangle$ | 1.58 \pm 0.15 \blacklozenge |

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 CIA 模型组比较, \blacklozenge $P<0.05$, $\blacklozenge\blacklozenge$ $P<0.01$;与 MTX 组比较, \blacktriangle $P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$

3 讨论

RA 临床表现为关节肿胀、疼痛、变形,滑膜持续炎症致骨骼破坏及软骨降解为特征^[9],炎症细胞因子激活破骨细胞是局部骨破坏的重要原因之一^[10]。目前 RA 的致病原因尚未十分明确,故而无法采取针对性的根治措施。临床治疗的主要目标是缓解关节症状,控制病情进展,防止关节残疾的发生,从而改善生活质量,但无法做到根除。CIA 模型能显示 RA 的慢性病变特征如关节滑膜增生、软骨和骨破坏,关节功能障碍,是研究人类 RA 的理想模型。课题组前期研究发现,UA 能明显抑制体外 T 细胞激活与增殖^[11],降低 Th17,升高 Treg,维持 Th17/Treg 平衡^[12-13],UA 体内给药 100 mg/kg 一周,明显减轻 CIA 大鼠关节的病理改变,减少大鼠关节中 TNF- α 、IL-17 和 PGE2 的表达^[14]。UA 能明显抑制 CIA 大鼠关节肿胀程度,抑制关节滑膜组织增生,减轻关节的病理改变,改善骨质破坏^[15]。

基于 UA 的抗炎、抗肿瘤、免疫调节等多种生物学活性。推测 UA 能够调节 RA 的免疫性炎症。本文复制 CIA 模型,研究 UA 对实验性 RA 大鼠关节炎相关因子及关节 X 线评分影响,发现 UA(100 mg/kg·d) 给药能降低 CIA 关节 X 线综合评分,减少炎症因子 IL-17A、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 因子的 mRNA 表达,升高抑炎因子 IL-10、TGF- β 因子的 mRNA 表达。MTX 是目前治疗 RA 的基础性药物,其作用是抑制二氢叶酸还原酶以及甲酰基转移酶的活性,具有免疫抑制以及迅速的抗炎作用^[16]。以 MTX 为基础的多种抗风湿药物的联合使用是临床研究的主要方向。UA 来源广范,生物活性多,本实验研究表明 UA 可以改善 CIA 大鼠关节肿胀程度,缓解 CIA 大鼠关节炎炎症损伤,调节炎症因子在关节组织中的表达及改善关节 X 线评分,具有炎症的作用,作为一种有潜力的高效、低毒的中药炎症调节剂值得深入研究。

参考文献

- [1] 朱洁宜,吴鑫宇,周海纯,等.中医药治疗类风湿关节炎的研究进展[J].中医药信息,2015,(1):115-117.
- [2] 陶渊博,邢雅丽,方芝娟,等.生物活性物质熊果酸资源分布状况研究进展[J].林产化学与工业,2012,32(1):119-126
- [3] KASHYAP D, TULIH S, SHARMA A K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential[J]. Life Sciences,2016,146:201-213.
- [4] NELSON A T, CAMELIO A M, CLAUSSENK R, et al. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015,25(19):4342-4346.
- [5] WUPP, ZHANGK, LU Y J, et al. In vitro and in vivo evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives.[J]. European Journal of Medicinal Chemistry,2014,80:502-508.
- [6] 李艳玲,祁芳,许明,等.常用类风湿关节炎动物模型研究概况及展望[J].湖南中医药大学学报,2015,35(4):63-66.
- [7] 孔薇. II 型胶原诱导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.
- [8] 李培培,解国雄,宋姗姗,等.大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J].中国免疫学杂志,2012,28(5):453-457.
- [9] 陈志强,杨关林.中西医结合内科学[M].北京:中国中医药出版社,2016:601-608.
- [10] 赵晓菲,安高,郭亚春,等.细胞因子在类风湿性关节炎中的研究进展[J].承德医学院学报,2016,33(1):53-56.
- [11] ZENG G, CHEN J, LIANG Q H, et al. Ursolic acid inhibits T cell activation through modulating NF- κ B signaling[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2012,18(1): 34-37.
- [12] 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.
- [13] 鲜瑶瑶,周俭,曾光,等.熊果酸对胶原诱导性关节炎大鼠外周血 Th17/Treg 细胞比例失衡的影响[J/OL].中华中医药学刊:1-7[2019-04-17].
- [14] 曾光,陈芳,邵峰,等.熊果酸对大鼠 CIA 模型关节 TNF- α 、IL-17、PGE2 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(1):13-16.
- [15] 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.
- [16] 毕丹艳,李芹,张虹,等.雷公藤多苷联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的临床疗效研究[J].中国临床药理学杂志,2016,32(10):880-882.

(本文编辑 杨 璞)