

· 基础研究 ·

藤莓汤对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 PPAR γ /NF- κ B 信号途径的影响

王 洁¹ 王亚南² 陆 妍³ 陈 祎⁴ 顾 文⁵ 王 康⁶ 沈志明¹
卜祥伟¹ 张红红¹ 张建萍¹ 陆清怡¹ 孟凤仙¹

摘要 目的 观察藤莓汤对胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠滑膜过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR γ)、核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)、IL-17 表达的影响,探讨该方抑制类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)滑膜免疫炎症性病理损伤的分子机制。方法 建立 SD 大鼠 CIA 模型,将成模大鼠随机分为模型组、西药组、中药高剂量组、中药低剂量组,并设正常组,每组 6 只。正常组与模型组予去离子水 10 mL/(kg·d)灌胃,西药组予来氟米特 1.87 mg/(kg·d)灌胃,中药高、低剂量组分别以藤莓汤生药量 31.8、15.9 g/(kg·d)灌胃,连续干预 12 周。干预结束后检测 PPAR γ 、P65、IL-17 蛋白及 mRNA 表达。结果 与正常组比较,模型组 PPAR γ 、P65、IL-17 mRNA 及蛋白表达上调($P < 0.01$)。与模型组比较,中药高剂量组 PPAR γ 蛋白表达上调, P65、IL-17 mRNA 及蛋白表达下调,差异有统计学意义($P < 0.01$);西药组及中药低剂量组 PPAR γ mRNA 及蛋白表达上调, P65、IL-17 mRNA 及蛋白表达下调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 藤莓汤可改善 CIA 大鼠关节滑膜病理损伤,抑制免疫炎症因子表达。

关键词 藤莓汤;胶原诱导性关节炎;滑膜;过氧化物酶体增殖物激活受体- γ ;核转录因子- κ B

Effects of Tengmei Decoction on the PPAR γ /NF- κ B Signaling Pathway in Synovium of Collagen-induced Arthritis Rats WANG Jie¹, WANG Ya-nan², LU Yan³, CHEN Yi⁴, GU Wen⁵, WANG Kang⁶, SHEN Zhi-ming¹, BU Xiang-wei¹, ZHANG Hong-hong¹, ZHANG Jian-ping¹, LU Qing-yi¹, and MENG Feng-xian¹ 1 Department of Rheumatology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 2 Department of Respiration, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing (100010); 3 Emergency Department, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091); 4 Department of Geriatrics, Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 5 Department of Rheumatology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing (100010); 6 Department of Tuina and Physiotherapy, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Tengmei Decoction (TMD) on the expressions of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ), nuclear factor kappa B (NF- κ B), and IL-17 in synovium of collagen-induced arthritis (CIA) rats, and to study its molecular mechanism of inhibiting synovial immune inflammatory injuries. Methods CIA model was established in Sprague-Dawley rats. Successfully modeled rats were randomly divided into the model group, the positive drug group, high and low dose TMD groups, 6 in each group. Besides, a normal group was set up ($n = 6$). Deionized water (10 mL·kg⁻¹·d⁻¹) was administrated to rats in the normal group and the model group by gastro-

基金项目:教育部高等学校博士学科专项科研基金(No. 20120013110006)

作者单位:1. 北京中医药大学东方医院风湿科(北京 100078); 2. 首都医科大学附属北京中医医院呼吸科(北京 100010); 3. 中国中医科学院西苑医院急诊科(北京 100091); 4. 北京中医药大学第三附属医院特需老年科(北京 100029); 5. 首都医科大学附属北京中医医院风湿科(北京 100010); 6. 北京中医药大学东方医院推拿理疗科(北京 100078)

通讯作者:孟凤仙, Tel:13520056890, E-mail:mfx0823@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20170207. 015

gavage. Leflunomide ($1.87 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was administrated to rats in the positive drug group by gastro-gavage. TMD ($31.8 \text{ g crude drugs} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $15.9 \text{ g crude drugs} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was administrated to rats in high and low dose TMD groups respectively by gastrogavage. The intervention lasted for 12 successive weeks. Protein and mRNA levels of PPAR γ , P65, and IL-17 were detected at the end of intervention. Results Compared with the normal group, mRNA and protein expression levels of PPAR γ , P65, and IL-17 were up-regulated in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, PPAR γ protein expression level was up-regulated, mRNA and protein expression levels of P65 and IL-17 were down-regulated in high dose TMD group ($P < 0.01$). mRNA and protein expression levels of PPAR γ were up-regulated, mRNA and protein expression levels of P65 and IL-17 were down-regulated in the positive drug group and low dose TMD group ($P < 0.01$). Conclusions TMD could ameliorate pathological damage of joint synovium, and inhibit expressions of immune inflammatory factors.

KEYWORDS Tengmei Decoction; collagen-induced arthritis; synovium; peroxisome proliferator activated receptor gamma; nuclear factor kappa B

自身免疫性疾病是机体免疫系统对自身抗体发生识别,产生自身反应性 T 细胞或自身抗体,介导相关组织细胞破坏或功能异常,从而引起相应疾病。类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)为自身免疫性疾病。研究证实,过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)在炎症和免疫反应中发挥重要作用,可能通过调节失调 Th 细胞抑制自身免疫疾病,特别是 Th1 优势为主的自身免疫性疾病^[1]。而且证实 PPAR γ 通路在参与调控 RA 免疫炎性损伤中扮演重要角色^[2]。藤莓汤是治疗 RA 的经验处方,具有清热解毒、化瘀降浊、通络止痛功效,能有效改善活动期 RA 关节肿胀、灼热、疼痛等症状及 ESR、C-反应蛋白(C reactive protein, CRP)、类风湿因子(rheumatoid factors, RF)等炎性、免疫指标^[3]。动物实验显示,本方对 CIA 大鼠血清 IL-6、IL-2、TNF- α 等炎性细胞因子高表达有显著下调作用,改善模型大鼠关节滑膜炎性病理损伤^[1]。本实验通过观察藤莓汤对 CIA 模型大鼠 PPAR γ 、NF- κ B、IL-17 mRNA 转录及蛋白表达水平的影响,侧重探讨该方抑制 RA 滑膜炎性病理损伤的分子机制与其调控 PPAR γ /NF- κ B 信号途径的相关性。

材料与方法

1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 90 只,6 周龄,体重 200 ~ 220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。本实验通过北京中医药大学医学实验动物伦理委员会审查。

2 药物 藤莓汤(忍冬藤 30 g 蛇莓 15 g 乌梢蛇 10 g 没药 10 g 桑枝 15 g 穿山龙 15 g)浓

煎成 50 mL,由北京中医药大学东方医院药剂科提供;来氟米特片(10 mg,苏州长征-欣凯制药有限公司,批号:130126)。

3 试剂与仪器 牛 II 型胶原(type II collagen, C II),批号:130087,美国 Chondrex 公司;完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA),批号:CAS9007-81-2,美国 Sigma 公司;anti-PPAR gamma 抗体(批号:ab19481)及 anti-NF- κ B P65 抗体(批号:ab131485),英国 Abcam 公司;TRIzol(批号:66007),美国 Invitrogen 公司;One Step SYBR RT-PCR Kit(批号:BK1401),日本 TaKaRa 公司;GAPDH、目标基因上下游引物为美国 Invitrogen(上海)英骏生物技术有限公司合成;Tris、APS、SDS、TEMED、丙烯酰胺、丽春红等购自美国 Sigma 公司;氯仿、异丙醇、99%乙醇为市售分析纯。Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪,美国应用生物系统(ABI)公司;TC-96/G/H(b) 梯度 PCR 仪,杭州博日科技有限公司;HC-3018R 高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;AR1140 动物脏器电子天平,美国 Chaus 公司;UV-2000 紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;5810R 台式冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;DYY-10C 电泳仪,北京六一仪器厂;JY-2Y1 转膜仪,北京君意东方电泳设备有限公司;RT-6000 型酶标仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司。

4 模型制备、分组及干预方法 健康雄性 SD 大鼠 90 只,适应性喂养 1 周,采用随机抽样选取 6 只作为正常组,其余 84 只为造模组。取 114 μ L 冰醋酸放置于 50 mL 离心管,加 20 mL 灭菌注射用水,配成 0.1 mol/L 冰醋酸溶液,4 $^{\circ}$ C 冰箱降温。将 15 mL 冰

醋酸溶液加入 30 mg 牛 C II 冻粉中使胶原完全溶解, 4 ℃ 避光过夜。次日取已配制的牛 C II 冰醋酸溶液及 CFA 各 15 mL, 用自制乳化器(输液器胶管连接 2 个注射器)在冰浴条件下将其充分乳化, 以滴入水中不扩散为度, 4 ℃ 避光储存储备用。取乳化后的混合物按 200 μ L/只于大鼠尾根部皮内注射, 9 天后按 100 μ L/只于尾根部皮内注射加强免疫 1 次, 正常组 2 次免疫时注射等体积的生理盐水。免疫 16 天时对模型进行评价。

模型成功判定标准^[4,5]: 于首次注射牛 C II 乳剂 16 天时, 根据关节炎指数(arthritis index, AI)评分进行模型成功评判。AI 评分分级标准如下: 0 分, 正常; 1 分, 明显可见的腕/踝关节轻度肿胀或局限于单个关节肿胀或少数几个关节受累; 2 分, 中度的腕/踝关节肿胀, 仅局限于单个腕/踝关节, 不累及其他指间关节; 3 分, 严重的腕/踝关节肿胀, 累及足爪(足背及掌指/跖趾关节); 4 分, 整个肢体肿胀累及多个关节。AI 评分 ≥ 4 分视为造模成功。共 70 只造模成功, 成模率为 83.33%。

采用随机数字表法选取成模大鼠 24 只, 按体重及 AI 评分随机分为模型组、西药组、中药高剂量组、中药低剂量组, 每组各 6 只, 并设正常组(6 只)。正常组与模型组予去离子水 10 mL/(kg · d)灌胃, 西药组予来氟米特 1.87 mg/(kg · d)灌胃, 中药高、低剂量组分别按照含生药量 31.8、15.9 g/(kg · d)藤莓汤制剂灌胃。各药物组药量相当于临床常人用药剂量 5.6、11.2、5.6 倍。连续干预 12 周。

5 检测指标及方法 干预 12 周后, 麻醉并腹主动脉取血 5~10 mL/只, 全部大鼠由于缺血性休克死亡。大鼠死亡后, 将其置于冰面, 摘取踝关节滑膜。全血静置后离心提取血清, 用于 ELISA 技术检测; 踝关节滑膜摘取后, 迅速放入冻存管中, 置于液氮中保存以备 Real-time PCR、Western Blot 技术检测。

5.1 一般情况 每日对大鼠一般情况包括毛发光泽、饮食摄水、精神状态等进行观察, 每周检测关节肿胀程度及关节炎症指数变化情况, 进行 AI 评分。

5.2 关节滑膜组织 PPAR γ 、P65、IL-17 基因转录水平检测 取大鼠踝关节滑膜组织标本, 使用 TRIzol 试剂提取 RNA 后, 进行一步法 Real-time PCR 反应。反应体积为 25 μ L, 反应体系含样本 RNA 2 μ L, POWER SYBR GREEN 17.2 μ L, 10 pmol 引物各 0.8 μ L。反应条件: 42 ℃ 灭活 5 min, 95 ℃ 变性 10 s, 95 ℃ 退火 5 s, 60 ℃ 延伸 34 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析, 以鉴定 PCR 产

物的特异性。使用 Sequence Detection System 软件分析 PCR 过程各检测样本的 Ct 值。引物设计及合成情况见表 1。

表 1 引物设计及合成情况

名称	引物序列	片段长度 (bp)
PPAR γ	上游引物 5'-CATTCTGGCCACCAACTTTGG-3'	229
	下游引物 5'-TGGAGATGCAGGCTCCACTTTG-3'	
P65	上游引物 5'-AACAAAATGCCCCACGGTTA-3'	125
	下游引物 5'-GGGACGATGCAATGGACTGT-3'	
IL-17	上游引物 5'-TACAACCTCCTTGACGCTCC-3'	180
	下游引物 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'	
GAPDH	上游引物 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	150
	下游引物 5'-TTTAATGTCACGCACGATTC-3'	

5.3 关节滑膜组织 PPAR γ 、P65 蛋白表达水平检测 取关节滑膜组织 30 mg, 加入 200 μ L 蛋白裂解液, 彻底混匀。冰上组织裂解 15 min。匀浆后, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。取上清, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后, 将各样本蛋白浓度调整至相同, 将定量好的各样本按 1:1 比例加入 2 × loading buffer 混匀, 煮沸变性 5 min 后, 保存于 -20 ℃ 备用。采用 SDS 聚丙烯酰胺电泳, 电泳时依次配制 12% 分离胶, 5% 浓缩胶, 加定量后蛋白样本, 电泳, 浓缩胶 80 V, 分离胶 150 V, 待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。湿法电转移至 PVDF 膜, 约 120 min, 放入 TBST 中洗 1 次, 5 min。将 PVDF 膜放入封闭袋中, 根据膜面积以 0.1 mL/cm² 量加入封闭液 TBST(含 5% 脱脂奶粉), 将膜浸入后, 在水平摇床上缓缓摇动, 室温 2 h。用封闭液将一抗按照 1:1 000 比例稀释, 与膜共同孵育, 4 ℃ 过夜。孵育结束, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。用封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的二抗, 稀释比例 1:5 000, 将稀释后的二抗与膜共同孵育 2 h。孵育结束, TBST 洗 4 次, 每次 10 min。ECL 化学发光显色液曝光, 采用凝胶图像分析系统对 Western Blot 蛋白杂交条带进行扫描, 并用 gel-pro 软件对图像进行灰度分析。相对含量的变化 = 目的蛋白灰度/actin 灰度。

5.4 血清 IL-17 蛋白表达水平检测 严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时, 各组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时, 则采用 Tamhane's T2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 正常组大鼠毛色光亮,精神良好,饮食摄水正常;模型组毛色暗淡,精神萎靡,饮食减少,所有大鼠均有多关节或单关节肿大,行动受限;西药组及中药各组随治疗周期关节肿大减轻或消退,行动受限明显改善,AI 评分较模型组降低。

2 各组大鼠关节滑膜组织 PPAR γ 、P65、IL-17 mRNA 水平比较(表 2) 与正常组比较,模型组 PPAR γ 、P65、IL-17 mRNA 水平上调($P<0.01$)。与模型组比较,西药组 PPAR γ mRNA 水平上调,P65、IL-17 mRNA 水平下调($P<0.01$);中药高剂量组 P65、IL-17 mRNA 水平下调($P<0.01$);中药低剂量组 PPAR γ mRNA 水平上调,P65、IL-17 mRNA 水平下调($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠关节滑膜组织 PPAR γ 、P65、IL-17 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PPAR γ	P65	IL-17
正常	6	-	167 $\pm$ 37	100 $\pm$ 13
模型	6	106 $\pm$ 7*	643 $\pm$ 20*	544 $\pm$ 24*
西药	6	150 $\pm$ 9 Δ	471 $\pm$ 19 Δ	163 $\pm$ 13 Δ
中药高剂量	6	103 $\pm$ 13	444 $\pm$ 17 Δ	256 $\pm$ 20 Δ
低剂量	6	137 $\pm$ 17 Δ	577 $\pm$ 9 Δ	279 $\pm$ 14 Δ

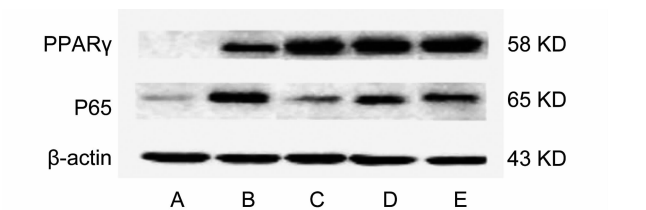
注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$

3 各组大鼠关节滑膜组织 PPAR γ 、P65 蛋白表达水平比较(表 3,图 1) 与正常组比较,模型组 PPAR γ 、P65 蛋白表达水平上调($P<0.01$)。与模型

表 3 各组大鼠关节滑膜组织 PPAR γ 、P65 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PPAR γ	P65
正常	6	-	26.9 $\pm$ 2.0
模型	6	12.77 $\pm$ 0.45*	62.2 $\pm$ 1.5*
西药	6	31.50 $\pm$ 2.11 Δ	40.9 $\pm$ 2.3 Δ
中药高剂量	6	28.08 $\pm$ 0.09 Δ	44.8 $\pm$ 1.7 Δ
低剂量	6	27.50 $\pm$ 1.87 Δ	50.1 $\pm$ 2.6 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为西药组;D 为中药高剂量组;E 为中药低剂量组

图 1 各组大鼠关节滑膜组织 PPAR γ 、P65 蛋白表达

组比较,西药组、中药高剂量组、中药低剂量组 PPAR γ 蛋白表达水平上调,P65 蛋白表达水平下调($P<0.01$)。

4 各组大鼠血清 IL-17 蛋白表达水平比较(表 4) 与正常组比较,模型组 IL-17 蛋白表达水平上调($P<0.01$)。与模型组比较,西药组、中药高剂量组、中药低剂量组 IL-17 蛋白表达水平下调($P<0.01$)。

表 4 各组大鼠血清 IL-17 蛋白表达水平比较 (ng/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-17
正常	6	6.9 $\pm$ 1.8
模型	6	14.8 $\pm$ 2.0*
西药	6	6.0 $\pm$ 3.4 Δ
中药高剂量	6	4.1 $\pm$ 1.4 Δ
低剂量	6	5.0 $\pm$ 4.3 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$

讨 论

RA 属中医学“痹证”范畴,其发生发展与外因风寒湿热之毒,内因机体先后天禀赋失调,邪盛正虚,浊毒瘀闭留于经络骨节相关。中医学认为 RA 活动期多以湿热瘀毒痹阻,关节红、肿、热、痛为特点,当浊毒不化,交阻骨节,病深入络,渐见肢体屈伸不利,关节肿大变形等特征。而且瘀浊蕴久,化热成毒,作为伏邪,反复诱发急性发作进程,周而复始的恶性循环,波及机体、器官,病至晚期,乃至终末。

藤莓汤可明显改善 RA 患者关节红肿灼热,痛不可近,或暗红漫肿不消,痛无缓息等症状,及 ESR、CRP、RF 等炎性及免疫指标。方中忍冬藤,味苦,性寒,为君药,取其清热解毒、通络、祛风湿之功。中医学认为“藤”、“花”功效相近,“主寒热身肿热毒”,“一切风湿气,及诸肿毒”。药理研究证明,忍冬藤抗炎,既能抑制炎性渗出,又能抑制炎性增生^[6]。蛇莓微苦,寒,清热解毒,疗痈肿疔毒,湿疹及血热出血者。今人有用于癌症治疗^[7]。穿山龙、桑枝祛风除湿、活血通络,有抗炎,抗过敏,抗肿瘤,有抑制小鼠细胞免疫和体液免疫等药理作用^[8,9]。没药活血止痛,辛香温通走窜,内能宣通脏腑之气,外能透达疏利经络,活血祛瘀,行气散滞,“疗风湿入络,百节痛,昼夜不可忍者”。药理研究具有明显镇痛及抗炎作用^[10]。乌梢蛇祛风通络,宜于风湿之痹日久不愈,善治热毒风,有抗炎镇痛的药理作用^[11]。综上所述,诸药配伍,相辅相成,针对本病热毒内蕴,痰瘀互结的病机特点,治以清热解毒,化瘀降浊,通络止痛。

本实验研究发现,藤莓汤对 CIA 模型大鼠关节滑

膜组织表达 PPAR γ 、P65、IL-17 等蛋白有很好的调节作用。PPAR γ 表达于多种细胞。在免疫调节中, PPAR γ 参与固有性免疫应答的发生^[12]; 影响抗原递呈过程^[13,14]; 抗 T 细胞增殖^[15]; 促进活化的 T 细胞凋亡^[16]; 调节 Th 细胞的平衡^[17]。在炎症反应中, PPAR γ 通过抑制 NF- κ B、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)激活蛋白 1(activating protein1, AP-1)、环氧合酶(cyclooxygenase, COX)等多途径, 抑制一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 降低干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、TNF- α 、细胞间黏附分子-1(inter cellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)等促炎因子产生及炎性介质的释放及表达^[18,19]。由此可见, PPAR γ 作为重要的调节分子, 在抑制免疫性疾病中具有多环节、多作用机制的生物学功能。近年研究发现 PPAR γ 与 RA 发病相关。有报道表明 PPAR γ 配体抑制 RA 骨破坏, 以及炎性骨丢失^[20]。THR0921 不仅降低 CIA 大鼠关节炎程度, 并且抑制滑膜侵蚀性血管翳及关节破坏, 以及抑制 RA-FLS 产生 TNF- α , 抑制单核细胞分泌 TNF- α 。PPAR γ 配体 KR62776 可通过抑制 P38、细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated protein kinase, ERK)、JNK、NF- κ B, 从而抑制核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)诱导的骨髓单核细胞向破骨细胞分化和活化^[21]。Cuzzocrea S 等^[22]报道, 罗格列酮改善 CIA 小鼠关节炎及组织病理学改变, 抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平。大鼠与人的 PPAR γ 具有高度同源性。Shahin D 等^[23]认为 PPAR γ 的天然激动剂 15-脱氧-A12,14-前列腺素 J2 和吡格列酮可以诱导 RA 患者的滑膜细胞凋亡, 抑制滑膜细胞表达的 NF- κ B 途径以及 IL-1 β 、TNF- α 的表达^[24,25]。虽然上述相关研究尚处于早期, 但相信 PPAR γ 的靶向调节作用在 RA 免疫炎性病理损伤防治中具有潜力。本实验结果显示, 中药各组 CIA 模型大鼠关节滑膜组织中 PPAR γ 蛋白呈高表达水平, 与模型组比较, 差异有统计学意义。而且炎症反应通路的核心因子 NF- κ B 及介导 RA 发病的重要炎性因子 IL-17 表达下调。NF- κ B 存在于所有细胞中, 是复杂炎症反应放大环路的重要转录因子, 在炎症应答, 以及应激反应、细胞调控、病毒复制中具有关键作用, 多种炎性介质受 NF- κ B 调控^[26]。IL-17 是人类 T 细胞来源的细胞因子, 是强大的致炎因子, 能诱导关节炎因

子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1 等表达。在 RA 中 IL-17 诱导 IL-6, 维持 Th17 细胞数量, 从而形成正反馈确立和慢性炎症状态^[27]。而且研究发现, 核因子 κ B 激活剂 1(nuclear factor Kappa B activator 1, Act-1)是 IL-17 受体唯一的衔接蛋白^[28], 位于 NF- κ B 通路上游。这一重要的信号传导调节子, 介导从 IL-17 及复合物的 IL-17A 亚基到 NF- κ B 和其他转录因子的活化, 证明 IL-17 与 NF- κ B 在 RA 发病中有相互协同的分子机制。而且 NF- κ B 是多种信号转导途径的汇聚点, 在细胞核中能与许多基因启动子的固定核苷酸序列结合而启动多种炎性介质的转录, 参与 RA 关节病理损伤过程。PPAR γ 抑制 IKK 的活性, 抑制 NF- κ B DNA 合成。由此推测, 藤莓汤改善 CIA 模型大鼠关节滑膜免疫炎性病理损伤的机制可能是该方活化并上调 CIA 模型大鼠关节滑膜组织 PPAR γ 的表达, 通过 PPAR γ 抑制与炎症相关的基因表达及负性调节 NF- κ B 信号转录, 减少炎性因子生成的多生物活性完成的。关于藤莓汤对 PPAR γ /NF- κ B 信号途径在 RA 发病中的上游调节机制, 后续研究在进行中。

实验结果表明各给药组血清 IL-17 蛋白表达低于模型组, 提示治疗药物或对 CIA 模型大鼠 IL-17 蛋白表达有明显抑制作用, 或及对 IL-17 高表达相关的其他因素有调节作用。课题组目前进行的后续实验, 进一步优化了药物使用剂量, 及增设了半量治疗剂量组, 以明确影响的原因及机制。

参 考 文 献

- [1] Lovett-Racke AE, Hussain RZ, Northrop S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease[J]. J Immunol, 2004, 172(9): 5790-5798.
- [2] Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, et al. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synovial cell apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats[J]. J Clin Invest, 2000, 106(2): 189-197.
- [3] 陆妍, 王亚南, 刘慧, 等. 中药藤莓汤对 II 型胶原诱导性大鼠关节炎性病理损伤的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(4): 48-57.
- [4] Baharav E, Mor F, Halpern M, et al. Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats[J]. J Nutr, 2004, 134(8): 1964-1969.
- [5] Shou J, Bull CM, Li L, et al. Identification of blood biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(1): R28.

- [6] 武雪芬, 白雁. 金银花叶药用成分的提取及抑菌试验研究[J]. 中成药, 2001, 23(6): 448-449.
- [7] 刘玉勤, 李慧杰, 齐元富. 齐元富运用蛇莓配伍白英治疗肿瘤经验[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(2): 22, 28.
- [8] 张宁, 于栋华, 周琦, 等. 穿山龙药理作用的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(4): 547-550.
- [9] 邢冬杰, 项东宇, 张彩坤. 桑枝活性成分提取及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2014, 16(11): 957-960.
- [10] 韩璐, 孙甲友, 周丽, 等. 没药化学成分和药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(3): 38-42.
- [11] 马哲龙, 梁家红, 陈金印, 等. 乌梢蛇的抗炎镇痛作用[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6): 58-60.
- [12] Zhang X, Rodriguez-Galán MC, Subleski JJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its ligands attenuate biologic functions of human natural killer cells[J]. Blood, 2004, 104(10): 3276-3284.
- [13] Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is required for regulatory CD4⁺ T cell-mediated protection against colitis[J]. J Immunol, 2007, 178(5): 2940-2949.
- [14] Han X, Osuntokun B, Benight N, et al. Signal transducer and activator of transcription 5b promotes mucosal tolerance in pediatric Crohn's disease and murine colitis[J]. Am J Pathol, 2006, 169(6): 1999-2013.
- [15] Racke MK, Gocke AR, Muir M, et al. Nuclear receptors and autoimmune disease: the potential of PPAR agonists to treat multiple sclerosis[J]. J Nutr, 2006, 136(3): 700-703.
- [16] Soller M, Tautenhahn A, Brune B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to T lymphocyte apoptosis during sepsis[J]. J Leukoc Biol, 2006, 79(1): 235-243.
- [17] Culver DA, Barna BP, Raychaudhuri B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity is deficient in alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(1): 1-5.
- [18] Shimizu T, Szalay L, Hsieh YC, et al. A role of PPAR gamma in androstenediol-mediated salutary effects on cardiac function following trauma-hemorrhage[J]. Ann Surg, 2006, 244(1): 131-138.
- [19] Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 598-606.
- [20] Tomita T, Kakjuchi Y, Tsao PS. THR921, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(1): R7.
- [21] Park JY, Bae MA, Cheon HG, et al. A novel of PPAR gamma agonist, KR62776, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and activity by inhibiting MAP kinase pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(3): 645-649.
- [22] Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, et al. Reduction in the evolution of murine type II collagen-induced arthritis by treatment with rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(12): 3544-3556.
- [23] Shahin D, Toraby EE, Abdel-Malek H, et al. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist (pioglitazone) and methotrexate on disease activity in rheumatoid arthritis (experimental and clinical study)[J]. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord, 2011, 4(1): 1-10.
- [24] Hounoki H, Sugiyama E, Mohamed SG, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression[J]. Bone, 2008, 42(4): 765-774.
- [25] 徐蓓, 厉小梅. 过氧化物酶体增殖物激活受体与自身免疫性疾病[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(3): 197-200.
- [26] Hayden MS, Ghosh S. NF-κB in immunobiology[J]. Cell Res, 2011, 21(2): 223-244.
- [27] Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction[J]. Immunity, 2008, 29(4): 628-636.
- [28] 张春红, 杨平, 马毅. 自身免疫病治疗的新型靶点: Act1 介导的 IL-17 信号通路[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(5): 441-444.

(收稿: 2016-07-04 修回: 2016-12-24)

责任编辑: 赵芳芳

英文责编: 张晶晶