

· 基础研究 ·

TLR4/NF- κ B 信号通路在佐剂性关节炎大鼠心肌组织的表达及新风胶囊对其影响汪元¹ 刘健¹ 黄传兵¹ 张皖东¹ 纵瑞凯¹
王桂珍¹ 孙玥² 王亚黎²

摘要 目的 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨新风胶囊对佐剂性关节炎(AA)大鼠心肌组织的保护机制。方法 建立 AA 大鼠模型,大鼠按随机数字表法分为模型组、新风胶囊(XFC)组、雷公藤多苷(TPT)组、甲氨喋呤(MTX)组,每组 10 只;另取 10 只 SD 大鼠为正常组。XFC 组给予 XFC 混悬液(浓度 0.24 g/mL)按 1 mL/100 g 灌胃,每天 1 次;TPT 组给予 TPT 混悬液(浓度 1 mg/mL)按 1 mL/100 g 灌胃,每天 1 次;MTX 组给予 MTX 混悬液(浓度 0.3 mg/mL)按 1 mL/100 g 灌胃,每周 1 次;正常组及模型组予生理盐水灌胃,每天 1 次。各组连续用药 30 天。观察新风胶囊对 AA 大鼠心功能的影响,并采用免疫组化法、Real-time PCR 法检测大鼠心肌组织 Toll 样受体 4(TLR4)、白细胞介素-1 受体相关激酶(IRAK1)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)、核转录因子 κ B(NF- κ B)及 TNF- α 的表达。结果 与正常组比较,模型组大鼠的左室收缩压(LVSP)、左室舒张末期压(LVEDP)、心率(HR)水平升高($P < 0.01$),左室内压上升/下降最大速率($\pm dp/dtmax$)、心肌收缩能力指数(CI)水平下降($P < 0.01$),TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α 蛋白及 mRNA 表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,XFC 组的 LVSP、LVEDP、HR 水平下降, $\pm dp/dtmax$ 、CI 水平提高,TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。TPT 组及 MTX 组 LVEDP 水平下降, $\pm dp/dtmax$ 、CI 水平升高,TLR4、IRAK1 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);TPT 组 NF- κ B、TNF- α 蛋白表达降低($P < 0.05$);3 组大鼠心肌组织各指标 mRNA 表达均显著下降($P < 0.01$)。与 XFC 组比较,TPT 组 LVSP 水平、IRAK1、TNF- α 蛋白表达及 TRAF6、TNF- α mRNA 表达升高,MTX 组 LVSP 水平、LVEDP 水平、TLR4、IRAK1、NF- κ B、TNF- α 蛋白及 IRAK1、TRAF6、TNF- α mRNA 表达升高, $dp/dtmax$ 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 新风胶囊可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活性,减少 TNF- α 等致炎因子的分泌,改善 AA 大鼠心肌损害。

关键词 TLR4/NF- κ B 信号通路;佐剂性关节炎;心肌组织;新风胶囊

Effect of Xinfeng Capsule on TLR4/NF- κ B Pathway in Myocardial Tissue of Adjuvant Arthritis Model Rats WANG Yuan¹, LIU Jian¹, HUANG Chuan-bing¹, ZHANG Wan-dong¹, ZONG Rui-kai¹, WANG Gui-zhen¹, SUN Yue², and WANG Ya-li² 1 Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230038); 2 Graduate Faculty, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230038)

ABSTRACT Objective To observe the protection mechanisms of Xinfeng Capsule (XFC) on myocardial tissue of adjuvant arthritis (AA) model rats via TLR4/NF- κ B signaling pathway. Methods AA rat model was established. All rats were divided into those groups: the model group, the XFC group, the tripterygium glycosides tablet (TPT) group, the methotrexate (MTX) group, and the normal group (10 in each group). The rats in XFC group were administered with XFC suspension (0.24 g/mL) by gastrogavage, once per day, while the TPT group with TPT suspension (1 mg/mL). MTX suspension

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No. 81302967);国家临床重点专科建设项目(No. 财社[2013]239号);现代中医内科应用基础与开发研究安徽省重点实验室(No. 财教[2016]518);2015年技术创新服务体系专项(No. 财教[2015]1551)

作者单位:1.安徽中医药大学第一附属医院风湿病科(合肥 230031);2.安徽中医药大学研究生院(合肥 230031)

通讯作者:刘健, Tel:13955109537, E-mail:liujianahzy@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170327.068

(0.3 mg/mL) was administered by gastrogavage to the rats in MTX group, once per week. The rats in the model and normal group were administered with saline every day. The influence of XFC on AA rats' cardiac function indexes was observed, and the expression of toll-like receptors (TLR) 4, interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) 1, tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF) 6, nuclear factor of kappa B (NF- κ B), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in myocardial tissue were detected by immunohistochemistry and Real-time PCR method. Results Compared with the normal group, left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), heart rate (HR) were elevated in the model group ($P < 0.01$), and $\pm dp/dt_{max}$ and CI were reduced ($P < 0.01$). The proteins and mRNAs of TLR4, IRAK1, TRAF6, NF- κ B, TNF- α increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, LVSP, LVEDP and HR decreased, $\pm dp/dt_{max}$, CI improved in the XFC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The value of LVEDP reduced, $\pm dp/dt_{max}$, CI raised in the TPT and MTX groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Also compared with the model group, expression of TLR4, IRAK1, TRAF6, NF- κ B, TNF- α proteins were decreased in the XFC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). TLR4, IRAK1 proteins expressions were decreased in the TPT and MTX groups, and NF- κ B, TNF- α proteins were decreased in the TPT group respectively ($P < 0.05$, $P < 0.01$). All the mRNAs expressions were decreased distinctly in those three drug intervention groups ($P < 0.01$). Meanwhile, the improvements on LVEDP, IRAK1, TNF- α proteins, and TRAF6, TNF- α mRNAs in the TPT group were superior to the XFC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The MTX group was superior to the XFC group in increasing LVSP, LVEDP, expression of TLR4, IRAK1, NF- κ B, TNF- α proteins, and IRAK1, TRAF6, TNF- α mRNA, decreasing dp/dt_{max} ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion XFC could consequently reduce the damage of myocardial tissue in AA rats by interfering the activation of TLR4/NF- κ B signaling pathway and reducing inflammatory mediators secretion, such as TNF- α .

KEYWORDS TLR4/NF- κ B signaling pathway; adjuvant arthritis; Myocardial tissue; xinfeng capsule

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、炎症性、系统性自身免疫性疾病,除累及四肢大小关节外,尚可出现多种关节外表现,RA 心脏受累临床表现多样,如心包炎、心肌疾病、冠状动脉血管炎、舒张功能障碍、冠状动脉硬化、心脏瓣膜病变、缺血性心脏病、充血性心力衰竭等,心血管疾病是导致 RA 患者过早死亡的主要原因^[1]。RA 心脏病变的发病机制尚不明确,目前认为疾病本身的慢性炎症状态是导致 RA 心血管受累的重要始动因素^[2]。TLR4/NF- κ B 信号通路是机体各种炎症反应的共同通路,该通路能促进各种炎性细胞因子基因表达,在 RA 病变的多个环节发挥重要作用^[3]。本研究拟通过建立佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠模型,观察中药复方制剂新风胶囊对 AA 大鼠心功能的影响,并采用免疫组化法、RT-PCR 法检测大鼠心肌组织 Toll 样受体 4 (toll-like receptor, TLR4)、白细胞介素-1 受体相关激酶 (interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK1)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6)、核转录因子 kappa B (nuclear factor of kappa B, NF- κ B) 和 TNF- α 表达,探讨新风胶囊对

AA 大鼠心肌组织的保护机制。

材料与方法

1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠 50 只,70 ~ 100 天鼠龄,平均体重 (174 $\pm$ 20) g,由安徽省实验动物中心提供,许可证号:SCXK (皖) 2011-002。在室温 22 ~ 28 $^{\circ}$ C 下饲养,相对湿度 50% ~ 60%,自然光照周期,适应性喂养 1 周后造模分组。本实验通过安徽中医药大学第一附属医院伦理委员会审核。

2 药物 新风胶囊由安徽中医药大学第一附属医院制剂中心提供,由黄芪、薏苡仁、雷公藤、蜈蚣组成,0.4 g/粒,批号:2011050701;甲氨喋呤片为上海信谊制药厂生产,2.5 mg/片,批号:2011102503;雷公藤多苷片为上海红旗制药厂生产,10 mg/片,批号:2010120404。

3 试剂及仪器 弗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA) 购自 Sigma 公司 (批号:1001541106);PV-6000 二步法免疫组化检测试剂购自北京中杉公司 (批号:K134525F);DAB 显色剂 (ZLI-9018) 购自北京中杉公司 (批号:K135260H);逆转录试剂盒 (RevertAidTM first Strand cDNA

Synthesis Kit) 购自美国 Thermo 公司(批号: 00145205);Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司(批号: 14105);引物由 Invitrogen 公司合成;染料 Quanti-Fast SyBr Green PCR kit 购自德国 Qiagen 公司(批号: 145049083)。切片机(德国 Leica 公司, RM2135);PowerLab 数据采集分析系统(包括 Quad Bridge Amp 桥式放大器, Dual Bio Amp 双通道生物放大器, Stimulus Isolator 刺激隔离器)为澳大利亚 AD Instruments 公司产品;显微摄像系统为 OLYMPUS CX41RF,分析软件为捷达 801D 形态学图像分析系统软件 Version 1.0;荧光定量 PCR 仪为美国 Thermo PIKOREAL 96;紫外凝胶成像系统为北京科创锐新生物科技有限公司产品。

4 模型制备、分组及给药方法 按 0.1 mL/100 g 剂量向大鼠右后足跖皮内注射 FCA 致炎,复制 AA 大鼠模型,造模 2 周后出现继发性的关节肿痛为模型成功标志,分组给药前剔除造模欠佳者 7 只,造模成功率 86%,确保分组时每组有 10 只大鼠^[4]。40 只造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组,新风胶囊(XFC)组、雷公藤多苷(TPT)组、甲氨喋呤(MTX)组,每组 10 只;另取 10 只 SD 大鼠为正常组。致炎后第 19 天后开始给药,剂量相当于临床用量的 10 倍。各组给药量如下: XFC 组:将 XFC 混悬液(浓度 0.24 g/mL)按 1 mL/100 g 的剂量灌胃,每天 1 次;TPT 组:将 TPT 研成细末,加生理盐水制成混悬液(浓度 1 mg/mL),按 1 mL/100 g 的剂量灌胃,每天 1 次;MTX 组:将 MTX 研成细末,加生理盐水制成混悬液(浓度 0.3 mg/mL),按 1 mL/100 g 的剂量灌胃,每周 1 次,未给药的实验日,给予生理盐水灌胃,1 mL/100 g,每天 1 次;正常组及模型组予生理盐水灌胃,1 mL/100 g,每天 1 次。各组连续用药 30 天。

5 检测指标及方法

5.1 有创血流动力学大鼠心功能测定 参考相关文献[5],于给药 30 天后行有创血流动力学大鼠心功能测定。10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定,备皮,以双前肢上缘 5 mm 处垂直向上剪开 1 cm 皮肤,止血钳钝性分离,从左胸锁乳突肌内侧依次游离出气管、左颈动脉、左侧颈外动脉、左侧颈内动脉,在近心端用动脉夹夹闭阻断血流。挑起颈外动脉,在动脉壁上作一“V”形切口,用大鼠 PE50 多聚乙烯导管从切口处置入并前行至颈总动脉,肝素生理盐水冲管,撤去动脉夹,观察显示器上的波形为动脉血压波形。结扎左侧颈外动脉,导管由缺口缓慢插入左心室,动脉血压波形突然变为心室内压

波图。固定动脉插管,行血流动力学检测后缝合颈部切口,记录左室收缩压(left ventricular systolic pressuer, LVSP)、左室舒张末期压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、心率(heart rate, HR)、左室内压上升/下降最大速率(the max rate of left ventricle diastolic pressure change, ± dp /dt-max)、心肌收缩能力指数(contractility index, CI)。

5.2 免疫组化法检测心肌组织 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF-κB、TNF-α 蛋白表达 取大鼠左心室靠近心尖处心肌组织,采用免疫组织化学检测技术,参照 PV-6000 二步法免疫组化检测试剂进行操作,一抗 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF-κB、TNF-α 用抗体稀释液按照 1:150 稀释。采用平均光密度(MOD)表示各指标的相对表达量。MOD 值越大,阳性反应越强,表示蛋白表达量越高。

5.3 实时荧光聚合酶链方法(Real-time PCR)检测心肌组织 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF-κB、TNF-α mRNA 表达 取大鼠左心室靠近心尖处心肌组织 100 mg 至去酶冷冻管,液氮研磨,提取总 RNA 3 μg,按照逆转录试剂盒说明书方法进行逆转录。使用 Primer Premier 5 软件根据 Invitrogen 公司提供的基因序列号设计引物。各引物序列见表 1。循环扩增结束后,取反应产物上机行凝胶电泳,利用紫外凝胶成像系统对条带进行密度分析,以 β-actin 为内参,计算电泳各条带的光密度(IOD),以 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF-κB、TNF-α 与 β-actin 的 IOD 的比值作为表达的相对含量,以 2^{-ΔΔCt} 计算目标基因相对表达量。

表 1 荧光定量引物序列及扩增长度

基因	引物序列(5'-3')	扩增长度 (bp)
β-actin	上游: CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游: TTTAATGTGCACGCACGATTTC	
NF-κB	上游: GATCTCATCCCCACCAAGGC	88
	下游: TTTTGATAACCGTGCCCCCA	
TNF-α	上游: AGCAAACCACCAAGCGGAGG	156
	下游: CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAAC	
TRAF6	上游: CTGCTTGA TGGCTTTACGGGA	104
	下游: CTGGGCACCTTGTCACCTGCAT	
IRAK1	上游: CAGTGGAGAGTGATGAGAGTGTTTC	129
	下游: CTC TGGTAGTGCCCTCCTTGTTGA	
TLR4	上游: AACATGAGTCACAACAACCTAC	182
	下游: TATTCACATATACAAGCAACAG	

6 统计学方法 实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANONA)、组间两两比较

采用 *LSD* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠心功能参数比较(表 2) 与正常组比较,模型组大鼠的 LVSP、LVEDP、HR 水平升高($P < 0.01$), $\pm dp/dtmax$ 、CI 水平下降($P < 0.01$)。与模型组比较,XFC 组的 LVSP、LVEDP、HR 水平下降, $\pm dp/dtmax$ 、CI 水平提高($P < 0.01$), TPT 组及 MTX 组 LVEDP 水平下降, $\pm dp/dtmax$ 、CI 水平提高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 XFC 组比较,TPT 组及 MTX 组 LVSP 水平升高,MTX 组 LVEDP 水平升高, $dp/dtmax$ 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2 各组大鼠心肌组织 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α 蛋白表达比较(图 1,表 3) 正常组大鼠心肌组织棕黄色染色多见于间质区域,细胞核极少见到各指标的阳性表达;而模型组大鼠心肌组织结构紊乱,细胞核处可见较多棕黄色染色;各治疗组大鼠心肌组织中棕黄色阳性表达有不同程度的减少。采用形态学图像分析系统软件分析,结果显示:与正常组比较,模型组 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α 蛋白表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,XFC 组各指

标表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), TPT 组及 MTX 组 TLR4、IRAK1 蛋白表达降低,TPT 组 NF- κ B、TNF- α 蛋白表达降低($P < 0.05$);与 XFC 组比较,TPT 组的 IRAK1、TNF- α 蛋白表达升高($P < 0.05$), MTX 组 TLR4、IRAK1、NF- κ B、TNF- α 蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 各组大鼠心肌组织 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α mRNA 的表达(表 4) 与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α mRNA 表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,3 组大鼠心肌组织各指标表达均显著下降($P < 0.01$);与 XFC 组比较,TPT 组 TRAF6、TNF- α 及 MTX 组 IRAK1、TRAF6、TNF- α mRNA 表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

有临床研究发现 RA 心血管疾病的病发率为普通人群的 3.96 倍,其作为心血管疾病一种独立的危险因素与糖尿病相当^[6]。Meta 分析结果显示:RA 患者突发致死或非致死性心血管疾病(包括急性心肌梗死、脑血管意外和充血性心力衰竭)的风险比普通人群高 48%^[7],严重影响患者生活质量及预后。但 RA 心

表 2 各组大鼠心功能参数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	HR (次/分)	dp/dtmax	- dp/ dtmax	CI
正常	116.93 $\pm$ 11.26	2.80 $\pm$ 0.36	347.00 $\pm$ 11.33	12 291.71 $\pm$ 1 167.64	8 207.71 $\pm$ 188.27	138.86 $\pm$ 6.93
模型	152.31 $\pm$ 8.98 *	5.30 $\pm$ 0.39 *	389.26 $\pm$ 8.34 *	6 751.44 $\pm$ 364.34 *	6 809.79 $\pm$ 65.80 *	110.93 $\pm$ 8.48 *
XFC	124.07 $\pm$ 5.84 $\Delta\Delta$	3.12 $\pm$ 0.33 $\Delta\Delta$	360.00 $\pm$ 2.00 $\Delta\Delta$	10 812.53 $\pm$ 500.73 $\Delta\Delta$	8 069.65 $\pm$ 55.69 $\Delta\Delta$	131.38 $\pm$ 3.50 $\Delta\Delta$
TPT	141.60 $\pm$ 3.30 Δ	3.62 $\pm$ 0.39 $\Delta\Delta$	369.67 $\pm$ 15.70	8 862.42 $\pm$ 87.25 $\Delta\Delta$	8 014.41 $\pm$ 221.01 $\Delta\Delta$	125.39 $\pm$ 3.00 $\Delta\Delta$
MTX	145.05 $\pm$ 5.57 $\Delta\Delta$	3.94 $\pm$ 0.70 $\Delta\Delta\Delta$	384.67 $\pm$ 15.27	7 552.95 $\pm$ 411.37 $\Delta\Delta$	7 588.75 $\pm$ 619.10 Δ	122.01 $\pm$ 7.57 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 XFC 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 各组大鼠心肌组织 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

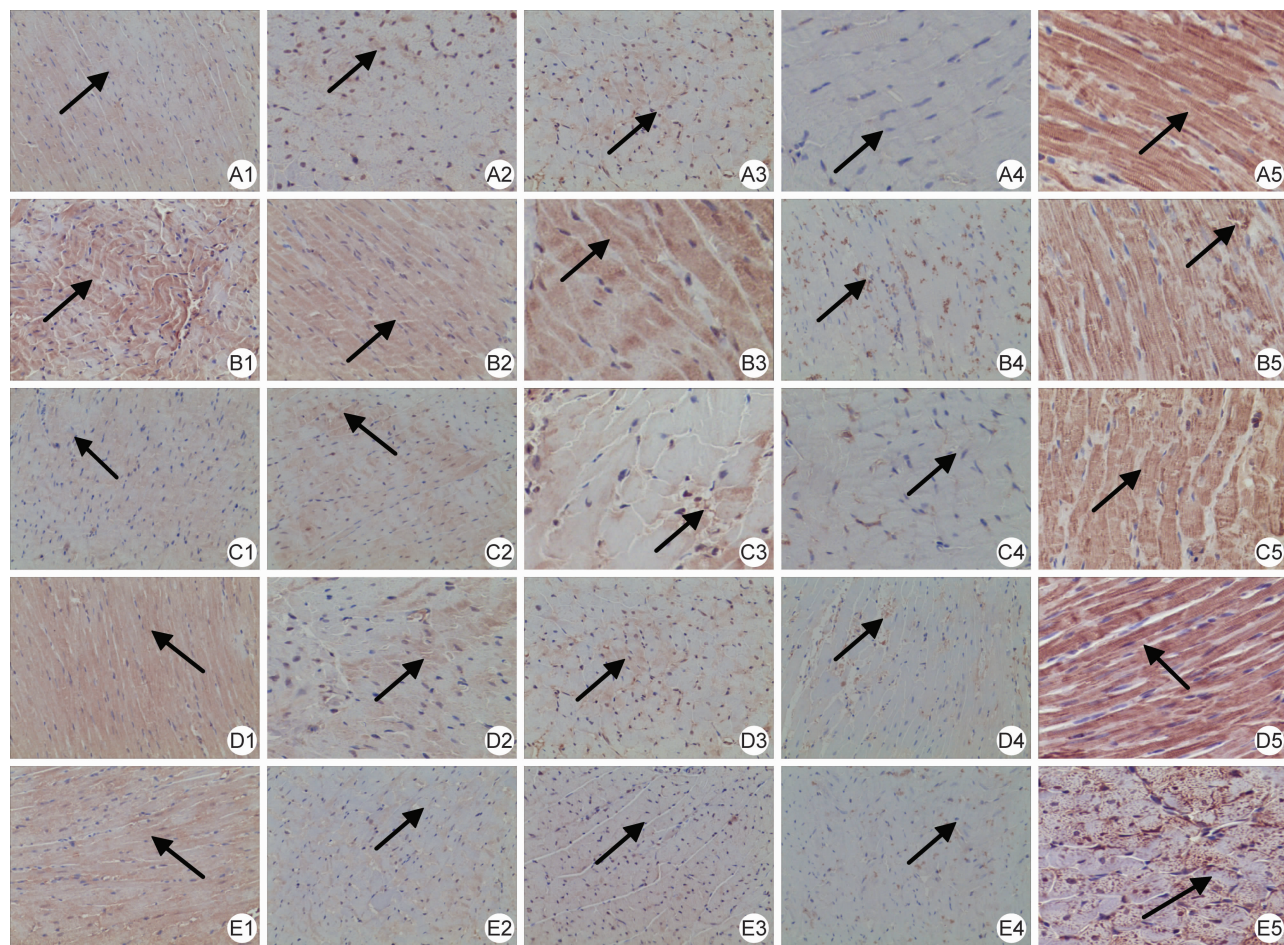
组别	<i>n</i>	TLR4	IRAK1	TRAF6	NF- κ B	TNF- α
正常	10	0.38 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.03
模型	10	0.49 $\pm$ 0.06 *	0.50 $\pm$ 0.02 *	0.49 $\pm$ 0.03 *	0.49 $\pm$ 0.05 *	0.52 $\pm$ 0.02 *
XFC	10	0.39 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	0.42 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$	0.43 $\pm$ 0.02 Δ	0.39 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	0.44 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$
TPT	10	0.43 $\pm$ 0.03 Δ	0.46 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	0.47 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.05 Δ	0.48 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$
MTX	10	0.44 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	0.46 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	0.47 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	0.49 $\pm$ 0.03 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 XFC 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 4 各组大鼠心肌组织 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TLR4	IRAK1	TRAF6	NF- κ B	TNF- α
正常组	10	1.11 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.09
模型	10	4.79 $\pm$ 0.20 *	4.78 $\pm$ 0.24 *	3.61 $\pm$ 0.31 *	3.44 $\pm$ 0.26 *	3.32 $\pm$ 0.23 *
XFC	10	1.95 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta$	2.01 $\pm$ 0.15 Δ	1.88 $\pm$ 0.06 Δ	1.68 $\pm$ 0.08 Δ	2.08 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$
TPT	10	1.94 $\pm$ 0.16 Δ	2.24 $\pm$ 0.18 Δ	2.45 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta$	1.94 $\pm$ 0.04 Δ	2.36 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$
MTX	10	2.12 $\pm$ 0.28 Δ	2.49 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	2.64 $\pm$ 0.41 $\Delta\Delta\Delta$	2.01 $\pm$ 0.39 Δ	2.65 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与 XFC 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为 XFC 组;D 为 TPT 组;E 为 MTX 组;1 为 TLR4;2 为 IRAK1;3 为 TRAF6;4 为 NF- κ B;5 为 TNF- α ;
箭头所指为典型病变处

图 1 各组大鼠心肌组织 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B、TNF- α 蛋白表达 (DAB, $\times 400$)

脏病变的发病机制尚不明确,除传统的心血管危险因素(如高血压、吸烟、2 型糖尿病等)之外,越来越多的研究显示 RA 本身的慢性炎症状态可能是导致 RA 心血管病变的重要始动因素之一^[8]。

TLR 家族参与免疫系统对微生物的识别,TLRs 都能够激活髓样分化蛋白 88 依赖性的通路诱发炎症反应^[9]。TLR4 的胞内 Toll/IL-1 受体 (Toll/IL-1 receptor domain, TIR) 结构域与 MyD88 的羧基端结合,MyD88 的氨基端再与 IL-1 受体相关激酶 (IL-1 receptor associated kinase, IRAK) 氨基端结合,激活 IRAK。激活的 IRAK 再激活 TRAF-6, TRAF-6 激活 NF- κ B 抑制物的激酶 (inhibitor of NF- κ B kinases, IKKs) 复合物。NF- κ B 抑制物在 IKKs 复合物的作用下磷酸化并降解,IKKs 的降解使 NF- κ B 激活,转入细胞核中诱导特定基因的表达,激活细胞因子 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 等的表达^[10]。TLR4/NF- κ B 信号通路是机体各种炎症反应的共同通路,在 RA 病变的多个环节发挥重要作用。RA 滑膜细胞增

生和炎症细胞因子分泌是造成患者关节破坏的直接免疫病理机制,其中 TNF- α 与 RA 的关系最为密切。动物实验证实, TNF- α 过表达可致小鼠发生严重关节炎,抑制 TNF- α 可以阻止其发生^[11]。TLR4/NF- κ B 信号通路激活后产生大量致炎因子,如 TNF- α 、IL-1 等与心脏病变密切相关, TNF- α 能降低左室功能,导致心肌肥厚、肺水肿、左室重塑及导致代谢消耗、微血管内凝血、低血压和发热, TNF- α 与心功能不全特别是充血性心力衰竭有十分密切的关系。NF- κ B 也是动脉粥样硬化发生的始动机理之一,动脉粥样硬化的病理基础是单核细胞与内皮细胞黏附和向内皮下迁移及泡沫化,而细胞黏附分子受 NF- κ B 调控,几乎参与单核细胞浸润与迁移的整个过程^[12]。

RA 属中医学“痹证”、“尪痹”等病证范畴,本课题组在长期的理论研究与临床实践基础上提出了 RA “从脾论治”的观点,认为脾虚湿盛,气血亏虚,痰瘀互结是 RA 的基本病机,贯穿疾病的始终。RA 心脏病变涉及心脾两脏,心与脾乃母子关系,在生理上相互滋

生,病理上相互影响。本课题组提出“益气健脾通络”的治疗方法,并且创制了中药制剂“新风胶囊”,应用于临床数年,疗效显著。该药由黄芪、薏苡仁、雷公藤、蜈蚣四味药物组成,方中黄芪益气强心、扶正固表,鼓舞气血运行,能保护心肌细胞线粒体结构,减轻氧自由基对心肌细胞的损害,改善心肌缺血,保护心功能^[13];薏苡仁利水消肿、健脾化湿,其浸出液能显著降低心肌炎小鼠的血清心肌酶,提高 SOD 含量,减轻心肌细胞的免疫病理损伤^[14];雷公藤具有较强的抗炎免疫作用,雷公藤甲素可有效抑制大鼠心肌纤维化进程^[15];蜈蚣中所含的蜈蚣酸性蛋白也可明显改善心肌细胞的变性坏死,改善心肌的收缩功能^[16]。前期研究亦表明,新风胶囊能够降低类风湿因子、CRP、 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白、血沉、免疫球蛋白 G、TNF- α 、IL-17 等炎症因子水平,减轻免疫炎症对心肌的损伤^[17];能够上调 AA 大鼠心脏组织金属蛋白酶组织抑制剂-1,下调基质金属蛋白酶-9 的水平,恢复细胞外基质的平衡,改善心肌结构^[18];新风胶囊还能显著降低 AA 大鼠血清脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)及心肌 BNP mRNA 表达,减轻心室容积扩张和心室压力,降低心脏负荷^[19]。

本研究结果提示 AA 大鼠存在心功能异常,可能与 TLR4/NF- κ B 信号通路的过度活化有关。在给予新风胶囊治疗后,AA 大鼠各指标改善,提示新风胶囊还可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活性,减少 TNF- α 等致炎因子的分泌,改善 AA 大鼠心肌损害。

参 考 文 献

- [1] Corrao S, Messina S, Pistone G, et al. Heart involvement in rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(5): 2031–2038.
- [2] Choy E, Ganeshalingam K, Semb AG, et al. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: recent advances in the understanding of the pivotal role of inflammation, risk predictors and the impact of treatment [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(12): 2143–2154.
- [3] Noort AR, Tak PP, Tas SW. Non-canonical NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis: Dr Jekyll and Mr Hyde? [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 15–24.
- [4] 徐叔云, 陈修主编. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 919–921.
- [5] 刘子泉, 佟长青, 王义和. 大鼠行左心室插管术的改进

- 方法 [J]. 武警医学院学报, 2005, 14(1): 50–51.
- [6] Růček V, Němec P. Rheumatoid arthritis-an independent risk factor for cardiovascular disease [J]. *Vnitr Lek*, 2012, 58(11): 834–838.
- [7] Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, et al. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: meta-analysis of observational studies [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(9): 1524–1529.
- [8] Crowson CS, Liao KP, Davis JM, et al. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease [J]. *Am heart J*, 2013, 166(4): 622–628.
- [9] 高东, 王晓冬, 靳广毅, 等. Toll 样受体与配体复合物结构的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(4): 553–556.
- [10] 常晓彤, 鞏晓峰, 王振辉. Toll 样受体信号转导途径研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2011, 42(5): 340–346.
- [11] Geurts J, van den Brand BT, Wolf A, et al. Toll-like receptor 4 signalling is specifically TGF-beta-activated kinase 1 independent in synovial fibroblasts [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50(7): 1216–1225.
- [12] Yang S, Li R, Tang L, et al. TLR4-mediated anti-atherosclerosis mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitor-fosinopril [J]. *Cell Immunol*, 2013, 285(1–2): 38–41.
- [13] 王滨, 姜博仁, 周苏宁. 黄芪防治心血管疾病的临床研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3(2): 162–164.
- [14] 李大鹏. 注射用薏苡仁油药效学及临床研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2007, 26(10): 778–782.
- [15] 徐朝军, 宋岚, 尹晓清, 等. 雷公藤甲素抑制血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞增殖及胶原合成的研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2008, 13(5): 499–501.
- [16] 赵志国, 李军云, 蒋晔, 等. 蜈蚣酸性蛋白对急性心力衰竭大鼠心功能的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31(2): 106–109.
- [17] 曹云祥, 刘健, 朱艳. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠心功能及血清细胞因子、调节 T 细胞的影响 [J]. *中国临床保健杂志*, 2010, 13(5): 503–506.
- [18] 刘健, 曹云祥, 黄传兵, 等. 佐剂性关节炎大鼠心功能及心肌 MMP-9、TIMP-1 变化 [J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(3): 251–256.
- [19] 曹云祥, 刘健, 朱艳. 新风胶囊对 AA 大鼠心功能及血清和心肌 BNP 的影响 [J]. *安徽中医学院学报*, 2011, 30(1): 46–50.

(收稿: 2015–11–03 修回: 2017–02–24)

责任编辑: 汤 静