

· 基础研究 ·

藤莓汤对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜 TRAF3/NF- κ B 信号途径的影响

卜祥伟¹ 张红红^{1*} 张建萍^{1 Δ} 王 康² 何毓奎¹ 张笑翔¹
王达利¹ 张正菊¹ 杨 蕾¹ 相瑞阳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)大鼠关节滑膜及血清肿瘤坏死因子受体作用因子 3(tumor necrosis factor receptor-associated factor 3, TRAF3)、白细胞介素-23(interleukin-23, IL-23)、白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)、核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达及踝关节病理的影响,探讨该方抑制类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)滑膜免疫炎性损伤的分子机制。**方法** 建立 CIA 大鼠模型,将成模大鼠随机分为模型组,阳性对照组,藤莓汤大、中、小剂量组,每组各 6 只,另设正常组 6 只。正常组与模型组予去离子水 10 mL/(kg·d)灌胃,阳性对照组予来氟米特 1.87 mg/(kg·d)灌胃,藤莓汤大、中、小剂量组分别按照含生药量 28、14、7 g/(kg·d)藤莓汤制剂灌胃,连续干预 12 周。分别采用 Real-time PCR、Western blot、ELISA 技术检测 TRAF3、IL-23、IL-17、NF- κ B、TNF- α mRNA 及蛋白表达水平,采用光镜观察踝关节病理改变。**结果** 与正常组比较,模型组 TRAF3 mRNA 转录及蛋白表达水平下调($P < 0.01$),IL-23、IL-17、NF- κ B 及 TNF- α mRNA 转录及蛋白表达水平上调($P < 0.01$)。与模型组比较,藤莓汤中剂量组 TRAF3 mRNA 转录及蛋白表达水平上调($P < 0.01$, $P < 0.05$),藤莓汤大、中剂量组 IL-23、NF- κ B、IL-17、TNF- α mRNA 转录及蛋白表达水平下调($P < 0.01$),藤莓汤小剂量组 NF- κ B、IL-17、TNF- α 蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。藤莓汤各剂量组 CIA 大鼠踝关节病理改变有不同程度改善。**结论** 藤莓汤改善 CIA 模型大鼠滑膜免疫炎性损伤的机制可能与调节 TRAF3/NF- κ B 信号通路相关。

关键词 藤莓汤;胶原诱导性关节炎;TRAF3/NF- κ B 信号途径

Effects of Tengmei Decoction on TRAF3/NF- κ B Signaling Pathway in Synovial Membrane of Collagen-Induced Arthritis Rats BU Xiang-wei¹, ZHANG Hong-hong¹, ZHANG Jian-ping¹, WANG Kang², HE Yu-xi¹, ZHANG Xiao-xu¹, WANG Da-li¹, ZHANG Zheng-ju¹, YANG Lei¹, XIANG Rui-yang¹, and MENG Feng-xian¹ 1 Department of Rheumatology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 2 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 pathology of ankle joint and expressions of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3), IL-23, IL-17, nuclear factor-kappa B (NF- κ B), and tumor necrosis factor α (TNF- α) in the synovium and serum of collagen-induced arthritis (CIA) rats, and to study the molecular mechanism of TMD on immunoinflammatory injury of the synovium in rheumatoid arthritis (RA) rats. **Methods** A CIA rat model was established, and rats were randomly divided into a model group, a positive drug group, and large, medium, and small dose TMD groups, 6 in each group. Another normal group ($n=6$) was also set up as the control. Rats in

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 51772032);北京中医药大学基本科研业务费在读研究生项目(No. 2017-JYB-XS-107)

作者单位:1.北京中医药大学东方医院风湿科(北京 100078);2.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

* 现在北京中医医院顺义医院风湿科(北京 101300); Δ 现在贵州省兴义市人民医院中医科(贵州 562400)

DOI: 10.7661/j.cjim.20180907.150

the normal and model groups were administered with deionized water ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gastrogavage. Rats in the positive drug group and large, medium, and small dose TMD groups were respectively administered with leflunomide ($1.87 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and 28, 14, and $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ TMD by gastrogavage. All interventions lasted for 12 successive weeks. After intervention Real-time PCR, Western blot, and ELISA were used to detect mRNA and protein expression levels of TRAF3, IL-23, IL-17, NF- κ B, and TNF- α in the synovium or serum of CIA rats. The pathological changes of ankle joint were observed under light microscope. Results Compared with the normal group, mRNA transcription and protein expression levels of TRAF3 in the model group were significantly down-regulated ($P < 0.01$), mRNA transcription and protein expression levels of IL-23, IL-17, NF- κ B, and TNF- α were significantly up-regulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, mRNA transcription and protein expression levels of TRAF3 in the medium dose TMD group were significantly up-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and mRNA and protein levels of IL-23, IL-17, NF- κ B and TNF- α in both large and medium dose TMD groups were significantly down-regulated ($P < 0.01$). In addition, protein levels of IL-17, NF- κ B, and TNF- α in the small dose TMD group were significantly down-regulated ($P < 0.01$). The pathological changes of ankle joint were improved to different degrees in all 3 TMD-treated groups. Conclusion TMD improved immunoinflammatory injury of synovium in CIA model rats, which might be associated with regulating TRAF3/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS Tengmei Decoction; collagen-induced arthritis; TRAF3/NF- κ B signaling pathway

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性关节滑膜炎为主要病理表现的自身免疫疾病。关节滑膜大量免疫炎性细胞浸润,炎性细胞因子释放形成网络环路,是 RA 滑膜炎加重的主要原因。藤莓汤(Tengmei Decoction, TMD)是导师孟凤仙教授临床治疗热毒瘀滞型活动期 RA 常用经验处方,临床疗效确切,可有效控制活动期 RA 患者疾病活动度,降低 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、类风湿因子(rheumatoid factor, RF)等免疫炎性指标^[1],改善胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型大鼠关节肿胀程度及关节病理损伤^[2],并证实 TMD 可上调 CIA 模型大鼠关节滑膜组织过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR γ)的表达,通过激活 PPAR γ 生物学活性抑制核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、IL-6、TNF- α 等炎性细胞因子生成^[2,3]。研究发现,肿瘤坏死因子受体作用因子 3(tumor necrosis factor receptor-associated factor 3, TRAF3)基因敲除小鼠会导致 PPAR γ 基因表达显著受抑制^[4],因此推测,TRAF3 可作为 PPAR γ 重要上游环节,并且关于 TRAF3 在 RA 中生物学活性研究报道甚少。因此,本实验通过观察 TMD 对 CIA 大鼠关节滑膜及血清 TRAF3、IL-23、IL-17、NF- κ B、TNF- α 表达及踝关节病理改变的影响,旨在探讨 TRAF3 在 RA 炎性抑制方面的生物学活性,以及 TMD 抑制 CIA 大鼠滑膜免疫炎性损伤的分子机制是

否通过调节 TRAF3/NF- κ B 信号通路完成。

材料与方法

1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 108 只,6 周龄,体重(198 ± 6)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。本实验通过中国中医科学院中药研究所动物实验伦理委员会审查(No. 20162009)。

2 药物 TMD:由忍冬藤 30 g、蛇莓 15 g、乌梢蛇 10 g、白芥子 10 g、乳香 10 g、没药 10 g、桑枝 30 g、穿山龙 30 g 等组成,饮片为北京中医药大学东方医院中药房标准饮片,由煎药室统一制成浓煎袋装剂。来氟米特片:10 mg/片,苏州长征-欣凯制药有限公司(批号:151024)。

3 主要试剂与仪器 牛 II 型胶原(type II collagen, C II),美国 Chondrex 公司(批号:150521);完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA),美国 Sigma 公司(批号:SLBQ1106V);TRIzol,美国 Invitrogen 公司(批号:149105);One Step SYBR RT-PCR Kit,日本 TaKaRa 公司(批号:RR086A);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;TRAF3 抗体,美国 Origene 公司(批号:TA322871);NF- κ B 抗体,英国 Abcam 公司(批号:ab86299);IL-17 ELISA 试剂盒,美国 Invitrogen 公司(批号:147424015);10%中性福尔马林溶液,北京益利精细化学品有限公司。Piko Real-time 荧光定量 PCR 检

测系统,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;JY-2Y1 转膜仪,北京君意东方电泳设备有限公司;PerkinElmer 型多功能酶标仪,美国 EnSpire 公司;RM2235 病理切片机,德国徕卡公司;NIKON CI-S 倒置显微镜,日本尼康仪器有限公司。

4 模型制备、分组及干预方法 健康雄性 SD 大鼠 108 只,适应性喂养 1 周后,随机选取 6 只作为正常组,其余 102 只为造模组。参照文献及课题组前期实验方法进行造模^[2,5,6],取 228.8 μL 冰醋酸放置于 50 mL 离心管,加 40 mL 灭菌注射用水,配成 0.1 mol/L 冰醋酸溶液,4℃冰箱降温。将 20 mL 冰醋酸溶液加入 40 mg 牛 CⅡ冻粉,使胶原完全溶解,4℃避光过夜。次日取已配制的牛 CⅡ冰醋酸溶液及 CFA 各 20 mL 用自制乳化器(输液器胶管连接 2 个 50 mL 注射器)在冰浴条件下充分乳化,配成牛 CⅡ浓度为 1 mg/mL 的造模剂,以造模剂滴在水面不扩散为度,4℃避光储存储备用。造模时将造模剂避光置于冰浴中,造模组每只大鼠尾根部皮内注射 0.2 mL 造模剂,正常组大鼠相同部位注射等体积生理盐水,10 天后进行加强免疫,方法同初次免疫,造模剂剂量为 0.1 mL/只。加强免疫后第 7 天根据关节炎指数(arthritis index, AI)评分进行造模评价。AI 评分标准^[7,8]:0 分,无关节炎;1 分,1 个趾(指)间关节或趾跖(掌指)关节红肿,或只有踝(腕)关节红肿;2 分,大于 1 个趾(指)间关节或趾跖(掌指)关节红肿,或踝(腕)关节以及足跗(前足掌)近身体端一半区域红肿;3 分,踝(腕)关节、趾跖关节(掌指关节)以及之间的整个区域红肿,或踝(腕)关节以及趾(指)间关节红肿;4 分,整个足爪严重发红肿胀并且累及多个关节。AI 评分≥4 分者视为模型成功。102 只造模大鼠中共 89 只造模成功,成模率为 87.3%。采用随机数字表法选取成模大鼠 30 只(剩余 59 只成模大鼠用于其他研究观察,本研究仅对 TMD 进行观察),按体重及 AI 评分随机分为模型组,阳性对照组, TMD 大、中、小剂量组,每组各 6 只,另设正常组 6 只。

正常组与模型组予去离子水 10 mL/(kg·d)灌胃,阳性对照组予来氟米特 1.87 mg/(kg·d)灌胃, TMD 大、中、小剂量组分别按照含生药量 28、14、7 g/(kg·d) TMD 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、2.8 倍。TMD 大剂量组每日灌胃剂量分 2 次给药,余组每日灌胃 1 次,连续干预 12 周。

5 检测指标及方法 干预 12 周结束,腹腔麻醉,腹主动脉取血,静置后离心提取血清用于 ELISA

技术检测。麻醉状态下取血处死大鼠后,分离双侧膝关节滑膜,液氮保存,用于 Real-time PCR、Western blot 技术检测。摘取踝关节,放入 10% 中性福尔马林溶液中固定,以备光镜观察。

5.1 关节滑膜组织 TRAF3、IL-23、IL-17、NF-κB 及 TNF-α 基因转录水平检测 使用 TRIzol 试剂提取大鼠膝关节滑膜组织中的 RNA 后,进行一步法 Real-time PCR 反应。反应体积为 20 μL,反应体系含 2x RT-PCR 缓冲液 10 μL, PrimeScript 1 step Enzyme Mix 0.8 μL,上下游引物各 0.8 μL, ROX 参比染料 0.4 μL,总 RNA 2 μL, RNase Free dH₂O 5.2 μL。反应条件为: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(Threshold of cycle)值。引物设计及合成情况见表 1。

表 1 引物设计及合成情况

引物名称		引物序列	引物长度(bp)
TRAF3	Upstream	5'-TGAGGAAGTCGGAGTAAATG-3'	246
	Downstream	5'-AAGAACACGGGACGCTAA-3'	
IL-23	Upstream	5'-ACCTGCTGGACTCGGACAT-3'	199
	Downstream	5'-CTGCGAAGGATCTTGAACG-3'	
IL-17	Upstream	5'-TACCTCAACCGTTCCACT-3'	188
	Downstream	5'-TTCTCAGGCTCCCTCTTC-3'	
NF-κB	Upstream	5'-CCCCTGTACGATAGTCGG-3'	185
	Downstream	5'-AGGAGCGTTGCTTTGGAT-3'	
TNF-α	Upstream	5'-CCACGCTCTTCTGTCTACTG-3'	101
	Downstream	5'-GCTACGGGCTTGCTCACTC-3'	
GAPDH	Upstream	5'-GCAAGTTCAACGGCACAG-3'	140
	Downstream	5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'	

5.2 关节滑膜组织 TRAF3、NF-κB 蛋白表达水平检测 取膝关节滑膜组织 50 mg,检测方法同参考文献^[3]。

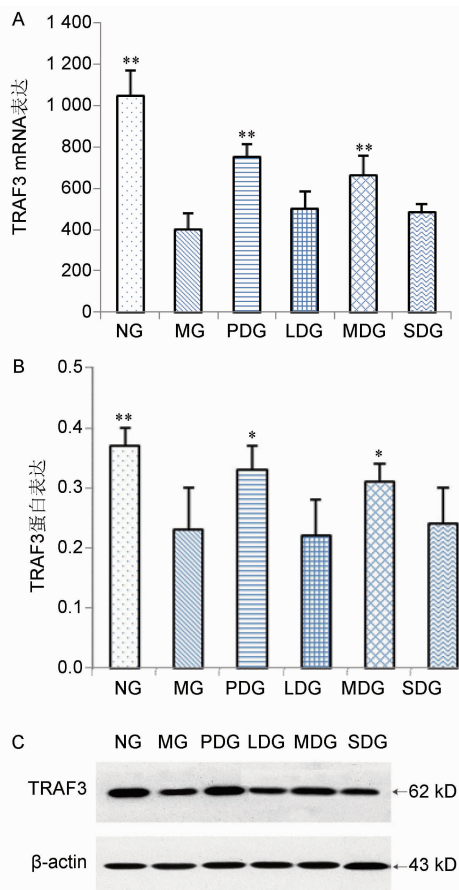
5.3 血清 IL-23、IL-17 及 TNF-α 蛋白表达水平检测 按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

5.4 踝关节组织形态学观察 将踝关节放于 10% 中性福尔马林溶液中固定 4 天,换 10% EDTA 脱钙液进行脱钙,每日更换 1 次,至脱钙完全后,石蜡包埋,常规切片,采用 HE 染色,封片后镜下观察踝关节病理改变。

6 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐的采用 LSD 检验,方差不齐采用 Tamhance's T2 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

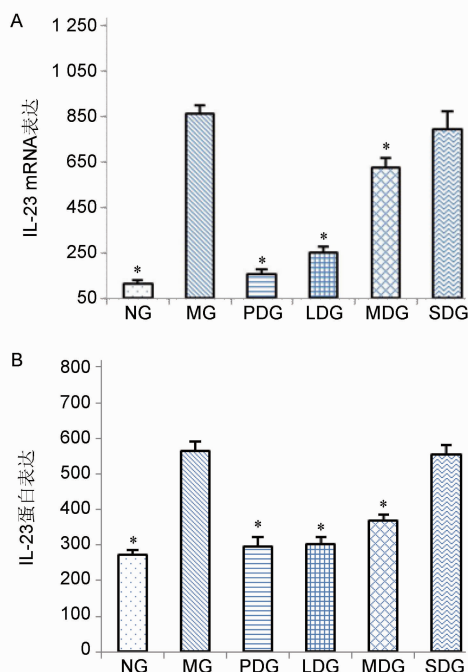
1 各组大鼠关节滑膜组织 TRAF3 mRNA 转录及蛋白表达水平比较(图 1) 与正常组比较,模型组 TRAF3 mRNA 转录及蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组、中剂量组 TRAF3 mRNA 转录及蛋白表达水平上调($P < 0.01$, $P < 0.05$),TMD 大小剂量组 TRAF3 mRNA 转录水平有上调趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: A 为 TRAF3 mRNA 表达;B 为 TRAF3 蛋白表达;C 为 TRAF3 Western blot 结果;NG 为正常组;MG 为模型组;PDG 为阳性对照组;LDG 为 TMD 大剂量组;MDG 为 TMD 中剂量组;SDG 为 TMD 小剂量组;下同;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 各组大鼠关节滑膜组织 TRAF3 mRNA 转录及蛋白表达水平比较

2 各组大鼠关节滑膜组织 IL-23 mRNA 转录及血清 IL-23 蛋白表达水平比较(图 2) 与正常组比较,模型组关节滑膜组织 IL-23 mRNA 转录及血清 IL-23 蛋白表达水平上调($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组、TMD 大、中剂量组关节滑膜组织 IL-23 mRNA 转录及血清 IL-23 蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。



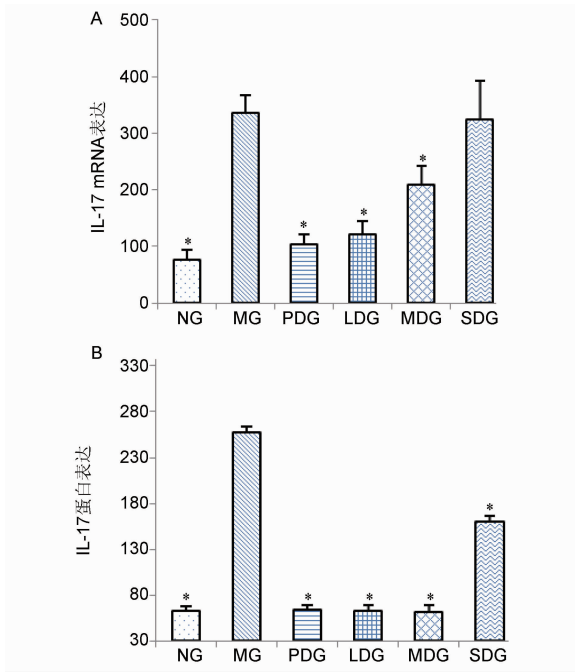
注: A 为 IL-23 mRNA 表达;B 为 IL-23 蛋白表达;与模型组比较, * $P < 0.01$

图 2 各组大鼠关节滑膜组织 IL-23 mRNA 转录及血清 IL-23 蛋白表达水平比较

3 各组大鼠关节滑膜组织 IL-17 mRNA 转录及血清 IL-17 蛋白表达水平比较(图 3) 与正常组比较,模型组关节滑膜组织 IL-17 mRNA 转录及血清 IL-17 蛋白表达水平上调($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组、TMD 大、中剂量组关节滑膜组织 IL-17 mRNA 转录及血清 IL-17 蛋白表达水平下调($P < 0.01$),TMD 小剂量组血清 IL-17 蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。

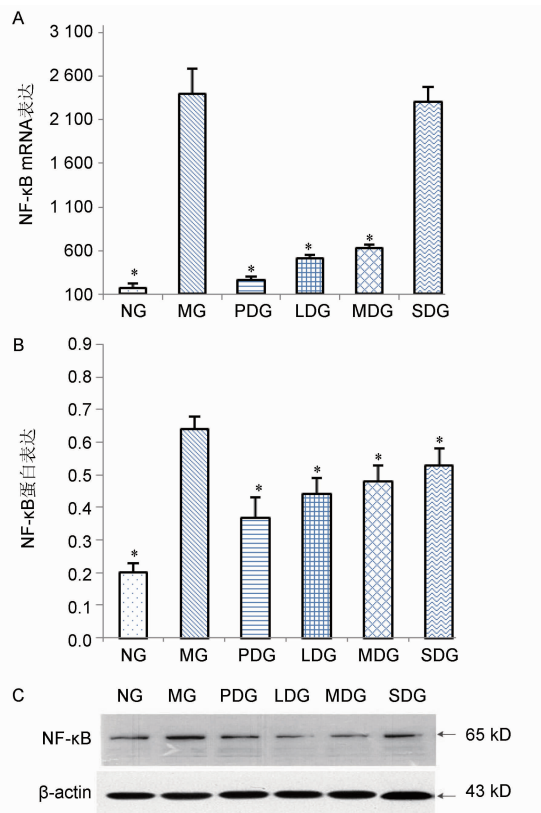
4 各组大鼠关节滑膜组织 NF- κ B mRNA 转录及蛋白表达水平比较(图 4) 与正常组比较,模型组 NF- κ B mRNA 转录及蛋白表达水平上调($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组、大、中剂量组 NF- κ B mRNA 转录及蛋白表达水平下调($P < 0.01$),TMD 小剂量组 NF- κ B 蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。

5 各组大鼠关节滑膜组织 TNF- α mRNA 转录及血清 TNF- α 蛋白表达水平比较(图 5) 与正常组比较,模型组关节滑膜组织 TNF- α mRNA 转录及血清 TNF- α 蛋白表达水平上调($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组、TMD 大、中剂量组关节滑膜组织 TNF- α mRNA 转录及血清 TNF- α 蛋白表达水平下调($P < 0.01$),TMD 小剂量组血清 TNF- α 蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。



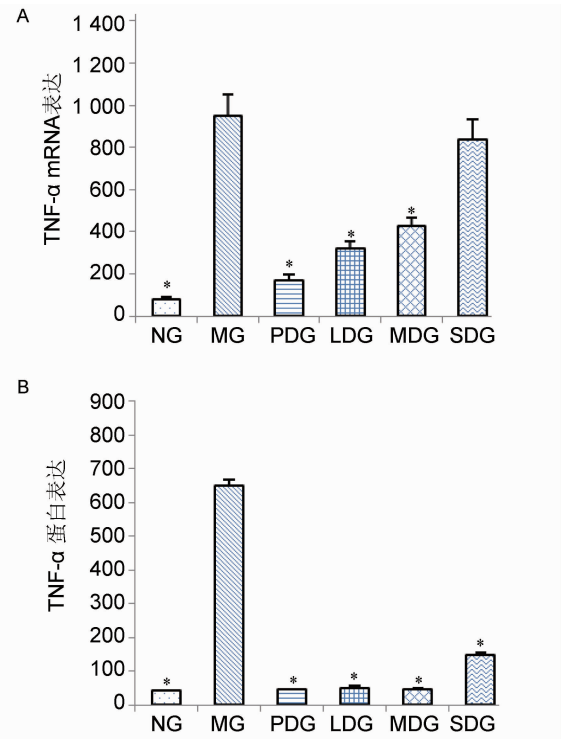
注: A 为 IL-17 mRNA 表达;B 为 IL-17 蛋白表达;与模型组比较, * $P < 0.01$

图 3 各组大鼠关节滑膜组织 IL-17 mRNA 转录及血清 IL-17 蛋白表达水平比较



注: A 为 NF-κB mRNA 表达;B 为 NF-κB 蛋白表达;C 为 NF-κB Western blot 结果;与模型组比较, * $P < 0.01$

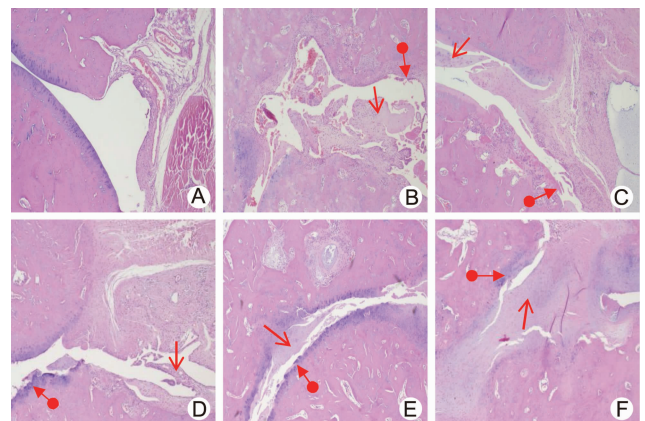
图 4 各组大鼠关节滑膜组织 NF-κB mRNA 转录及蛋白表达水平比较



注: A 为 TNF-α mRNA 表达;B 为 TNF-α 蛋白表达;与模型组比较, * $P < 0.01$

图 5 各组大鼠关节滑膜组织 TNF-α mRNA 转录及血清 TNF-α 蛋白表达水平比较

6 各组踝关节组织形态学观测结果比较(图 6) 正常组可见关节面光滑,滑膜未见增生,未见炎症细胞浸润。模型组可见关节软骨破坏;滑膜中重度增生;间质内可见不同程度的炎症细胞浸润。阳性对照组、TMD 各剂量组骨质破坏、滑膜增生及炎症细胞浸润情况较模型组有不同程度改善。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为阳性对照组;D 为 TMD 大剂量组;E 为 TMD 中剂量组;F 为 TMD 小剂量组;图中滑膜增生(→),软骨破坏(●)

图 6 各组大鼠踝关节病理学改变 (HE, ×40)

讨 论

TMD 是孟凤仙教授临床治疗热毒瘀滞型活动期 RA 常用经验方,其临床疗效确切^[1]。方中忍冬藤,清热解毒,疏风通络。现代药理学研究证实,忍冬藤中主要活性成分绿原酸可抑制 IL-6 介导的滑膜成纤维细胞增殖,还能抑制 JAK/STAT 和 NF- κ B 信号通路中关键分子的表达,抑制这些信号通路在炎症反应的激活^[9]。蛇莓清热解毒,散瘀消肿。药理研究证实,蛇莓乙醇提取物不仅可下调诱导型一氧化氮合酶(iNOS)等炎症细胞因子表达,阻断 NF- κ B 信号通路,还可促进抗炎介质 HO-1 释放,发挥抗炎作用^[10]。穿山龙、桑枝性平,祛风除湿,活血通络,舒筋止痛。药理研究发现二药有效成分具有较好的抗炎、免疫调节、抗风湿的作用^[11, 12]。乳香、没药活血祛瘀,消肿止痛,疏利经络。白芥子化痰散结,通络止痛。乌梢蛇祛风通络,宜于风湿之痹日久不愈,善治热毒风。因此,诸药合用,以达清热解毒,化瘀通络止痛之功效。

近年研究表明,IL-17/NF- κ B 免疫炎症通路的激活在 RA 滑膜炎反应、骨及软骨破坏中起重要作用。IL-17 主要来源于 CD4⁺ Th17 细胞,而 Th17 细胞主要在 IL-23、IL-6 等诱导下由初始 T 细胞分化而来。IL-23 在 Th17 细胞的稳定、存活中起关键作用,IL-23 可通过正反馈上调 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的表达,参与 Th17 细胞的维持和扩增^[13]。IL-17 可与滑膜细胞表面受体 IL-17R 结合后,通过激活 NF- κ B 上调下游 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8、COX-2、PGE2 等多种炎症因子在滑膜细胞中的表达,一方面,产生的 TNF- α 可与 IL-17 协同诱导 IL-6 的产生,而 IL-6 又可诱导维持 Th17 分化,维持 IL-17 数量^[14];另一方面,产生的 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子可与 IL-17 共同激活 NF- κ B,因而形成正反馈环路导致炎症持续或放大^[15]。IL-17 可刺激滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)、巨噬细胞分泌 IL-8、CCL20/MIP-3 α 等趋化因子^[16],介导滑膜炎。IL-17 还可通过上调 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)/ κ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK),破坏骨代谢平衡中关键的信号通路——骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/RANKL/RANK 通路,促进破骨细胞(osteoclast, OC)发育、分化,参与 RA 骨破坏。IL-17 可诱导 FLS 表达大量 RANKL 蛋白,并能以剂量依赖性的方式刺激 CD4⁺ T 细胞表达 RANKL, RANKL 通过与

RANK 结合后,可募集 TRAF6 并与之形成三聚体,激活 NF- κ B 等信号通路,进而促进 OC 的增殖、分化、成熟^[17]。从而打破骨代谢平衡,使骨吸收增加,骨重建不足,导致骨量丢失。本研究结果显示,CIA 模型大鼠关节滑膜组织及血清中 IL-23、IL-17、NF- κ B、TNF- α mRNA 转录及蛋白表达水平显著上调,与文献报道一致^[14, 18],证实 IL-17/NF- κ B 通路的激活在 CIA 模型免疫炎症性损伤中发挥的重要作用。干预治疗 12 周后,TMD 各剂量组 IL-23、IL-17、NF- κ B、TNF- α mRNA 转录及蛋白表达水平明显下调,表明 TMD 对 IL-17/NF- κ B 炎症信号通路有确切的抑制作用。

TRAF3 是 TRAF 家族重要的炎症反应负调控因子。TRAF3 主要通过 NF- κ B 诱导激酶(NF- κ B inducing kinase, NIK)相互作用,抑制 NF- κ B 非经典通路激活。研究发现,TRAF3 可与 NIK 结合,其相互作用可使 NIK 被蛋白酶体降解,而敲除 TRAF3 基因能够促进 NIK 在细胞中积累,进而通过非经典途径激活 NF- κ B 信号通路^[19]。TRAF3 表达下调可抑制 TNF- α 引起的 NF- κ B p100 的聚集并激活 IKK 复合物,引起 NIK 表达增加^[20]。TRAF3 的过表达能显著抑制经 IL-17 刺激软骨细胞中丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)和 NF- κ B 信号通路,使下游炎症因子 IL-6 及相关基质降解酶类 MMP13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 mRNA 的表达显著下调,且 TRAF3 转基因小鼠 IL-17 引起的关节软骨降解显著较野生型小鼠减轻^[21]。TRAF3 过表达能显著抑制 NF- κ B 信号通路,使下游抗凋亡因子 Bcl-2、Bcl-xl 表达显著下调,抑制细胞增殖^[22]。研究证实,TRAF3 可通过其 TRAF 结构域竞争性结合 IL-17R,从而干扰 IL-17R-Act1-TRAF6 信号复合体的形成,抑制 IL-17 信号转导及其下游炎症因子的诱导^[23]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组 TRAF3 mRNA 转录和蛋白表达水平显著下调,提示 CIA 大鼠滑膜免疫炎症性损伤与 TRAF3 低表达相关。与模型组比较,TMD 中剂量组滑膜组织 TRAF3 mRNA 转录和蛋白表达水平显著上调,表明 TMD 抑制 CIA 大鼠滑膜炎反应可能与其上调免疫炎症抑制蛋白 TRAF3 的表达相关。因此推测,TMD 可能通过上调炎症反应负调控因子 TRAF3 表达抑制 NF- κ B 信号通路激活,进而抑制下游炎症介质基因的过度表达,改善 CIA 模型大鼠滑膜免疫炎症性损伤。但该方对 TRAF3/NF- κ B 信号通路具体影响机制有待进一步研究。

利益冲突:无

参 考 文 献

- [1] 卜祥伟, 张红红, 张建萍, 等. 藤莓汤联合传统改善病情抗风湿药治疗中高活动度类风湿关节炎患者的疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(11): 1320-1324.
- [2] 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.
- [3] 王洁, 王亚南, 陆妍, 等. 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[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(4): 458-463.
- [4] Wang PX, Zhang XJ, Luo P, et al. Hepatocyte TRAF3 promotes liver steatosis and systemic insulin resistance through targeting TAK1-dependent signaling[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10592.
- [5] 张云, 吴振宇, 姜泉. II型胶原诱导的类风湿关节炎模型的制作[J]. 国际免疫学杂志, 2009, 32(6): 450-453.
- [6] Zhang P, Han DT, Zhang X, et al. The destruction evaluation in different foot joints: new ideas in collagen-induced arthritis rat model[J]. Rheumatol Int, 2009, 29(6): 607-613.
- [7] Urushima H, Fujimoto M, Mishima T, et al. Leucine-rich α_2 glycoprotein promotes Th17 differentiation and collagen-induced arthritis in mice through enhancement of TGF- β -Smad2 signaling in naïve helper T cells[J]. Arthritis Res Therapy, 2017, 19(1): 137.
- [8] Shi M, Cui F, Liu AJ, et al. The protective effects of chronic intermittent hypobaric hypoxia pretreatment against collagen-induced arthritis in rats[J]. J Inflamm, 2015, 12(1): 23.
- [9] Lou L, Zhou J, Liu Y, et al. Chlorogenic acid induces apoptosis to inhibit inflammatory proliferation of IL-6-induced fibroblast-like synoviocytes through modulating the activation of JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways[J]. Exp Therapeutic Med, 2016, 11(5): 2054-2060.
- [10] 庞然, 张淑玲, 赵雷, 等. 蛇莓乙醇提取物的体外抗炎机制研究[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2009, 38(4): 481-485.
- [11] 于浩, 杜建玲. 穿山龙皂苷的药理作用及机制的研究现状[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4694-4699.
- [12] 张丹丹. 桑枝化学成分黄酮的药理作用及其应用研究进展[J]. 中医临床研究, 2017, 9(30): 146-147.
- [13] 王冬梅, 王久敏, 刘桂芝. IL-23/IL-17 炎性通路的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(6): 674-677.
- [14] Kugyelka R, Kohl Z, Olsasz K, et al. Enigma of IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis and in autoimmune animal models of arthritis[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016(2): 6145810.
- [15] 袁洪峰, 贺翔鸽. 核因子- κ B 与眼科疾病的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2008, 8(1): 132-136.
- [16] Shahrara S, Pickens SR, Mandelin AM, et al. IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction[J]. J Immunol, 2010, 184(8): 4479-4487.
- [17] Quinn JM, Saleh H. Modulation of osteoclast function in bone by the immune system[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 310(1-2): 40-51.
- [18] 姜申易, 鲁静. NF- κ B 在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(1): 119-122.
- [19] Liao G, Zhang M, Harhaj EW, et al. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 26243-26250.
- [20] Hu H, Brittain GC, Chang JH, et al. OTUD7B controls non-canonical NF- κ B activation through deubiquitination of TRAF3[J]. Nature, 2013, 494(7437): 371-374.
- [21] 张宁, 刘宏强, 赵小英. TRAF3 抑制 IL-17 引起的软骨破坏作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2014, 34(7): 984-989, 996.
- [22] Sun L, Hu C, Zhang X. TRAF3 delays cyst formation induced by NF- κ B signaling[J]. IUBMB Life, 2017, 69(3): 170-178.
- [23] 施沛青, 朱书, 钱友存. IL-17 的信号传导及功能研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(4): 345-357.

(收稿: 2018-08-01 在线: 2018-10-09)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶