

• 实验研究 •

鼠尾草提取物对类风湿性关节炎的治疗作用及其机制研究

李磊¹ 吴昊¹ 杨安忠¹ 吴良绍^{1△}

[摘要] **目的:**探讨鼠尾草提取物对类风湿性关节炎的治疗作用及其机制。**方法:**选择6个月龄SD大鼠,采用胶原诱导法建立类风湿性关节炎(CIA)大鼠模型,并灌胃给予鼠尾草提取物(ST)治疗3周,测量大鼠的体质量变化、关节炎评分及踝关节肿胀度;采用病理苏木精-伊红(HE)染色和番红固绿染色检测大鼠踝关节组织的病理变化;采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠外周血液中炎症因子白细胞介素(IL)-1 β , IL-6和TNF- α 的含量;采用RT-PCR法检测大鼠滑膜组织中炎症因子IL-1 β , IL-6和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的表达水平;采用蛋白印迹法检测大鼠滑膜组织中TLR4, p-p65/p65和p-p50/p50的表达水平。**结果:**与模型组相比,ST组大鼠的体质量显著增加,且关节炎评分和关节肿胀度显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);同时,ST组大鼠的踝关节组织完整,软骨细胞排列规则且紧密,软骨基质损伤缓解,外周血液和滑膜组织中炎症因子IL-1 β , IL-6和TNF- α 的表达水平显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$);除此之外,ST组大鼠关节滑膜组织中TLR4, p-p65/p65和p-p50/p50的表达水平显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**鼠尾草提取物治疗类风湿性关节炎具有潜在价值,且这种作用可能与抑制TLR4-NF- κ B信号介导的炎症反应有关。

[关键词] 鼠尾草提取物;类风湿性关节炎;炎症反应

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)09-0006-06

The Effect and Mechanism of Salvia Japonica Thunb Extract on the Treatment of Rheumatoid Arthritis

LI Lei¹ WU Hao¹ YANG Anzhong¹ WU Liangshao^{1△}

¹ Joint Surgery Diagnosis and Treatment Center, Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Central Hospital, Enshi 445000, Hubei China.

Abstract Objective: To explore the effect and mechanism of Salvia japonica Thunb extract(ST) for the treatment of rheumatoid arthritis. **Methods:** Rheumatoid arthritis model were established by collagen induction method for 6-month-old SD rats selected. They were divided into model group, ST-L(200 mg/kg), ST-M(400 mg/kg), ST-H(800 mg/kg) and colchicine(MTX, 1 mg/kg) group for and administered for 3 weeks. The changes of body weight, arthritis score and swelling of ankle joints were documented. Pathological changes in ankle joint tissues of rats were detected by pathological HE and Safranin O staining. Inflammatory factor interleukin(IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor(TNF)- α in peripheral blood of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent(ELISA) method. The expression of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor TNF- α were detected by RT-PCR. The expression of TLR4, p-p65/p65 and p-p50/p50 protein expression levels in rat synovial tissue were detected by Western Blotting. **Results:** Compared with the model group, the weight of rats in ST group significantly increased, and arthritis scores and joint swelling decreased significantly ($P < 0.05$). Rats in the ST group showed intact ankle joint tissue arranged regularly and tightness chondrocytes, and the cartilage matrix damage also relieved. The expression levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α in peripheral blood and synovial tissue were significantly down-regulated from ST group ($P < 0.05$). In addition, the protein expression levels of the synovial membrane of the ST group rats TLR4, p-p65/p65 and p-p50/p50 were significantly down-regulated by

treatment of ST ($P < 0.05$). **Conclusion:** Salvia japonica Thunb extract ST has potential roles for the treatment of rheumatoid arthritis, and its effect may be related to the inhibition of TLR4-NF- κ B signal-mediated inflammation.

Keywords: Salvia japonica Thunb extract; rheumatoid arthritis; inflammatory response

基金项目:湖北省卫生健康委中医药科研项目(ZY2019M077)

¹ 恩施土家族苗族自治州中心医院关节外科诊疗中心

(湖北 恩施, 445000)

[△]通信作者 E-mail: longtaodee@163.com

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种具有高发病率和致残率的自身免疫系统性疾病,能够引起软骨基质和骨质破坏,严重影响患者的生活质量^[1-5]。鼠尾草(*Salvia japonica* Thunb)属唇形科,全草入药,具有清热利湿、活血调经、解毒消肿之功效,常用于解痉、抗菌、抗炎及神经疾病治疗,现代研究表明其提取物有抗氧化性、抗炎镇痛、降血糖及抗肿瘤等多种活性^[6]。鼠尾草提取物的抗 RA 作用研究较少,本研究采用类风湿关节炎(CIA)大鼠模型探讨了鼠尾草提取物的抗 RA 作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级别 6 个月龄雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 100~110 g,中位数 105 g,购买于武汉大学动物实验中心,实验动物许可证号为 SCXK(鄂)2019-0002。

1.2 实验药物与试剂

1.2.1 实验药物制备 称取干燥洁净的鼠尾草提取物 5 kg,用 75%乙醇渗漉,减压回收乙醇,得浓缩液,将浓缩液进一步浓缩蒸发得膏状物,于 4℃下储存。

1.2.2 实验试剂 完全弗氏佐剂(P2036),不完全弗氏佐剂(P2031),RIPA 蛋白裂解液(P0013C),蛋白酶抑制剂混合物(P1046)购自碧云天生物技术有限公司;Anti-TLR4(14358),Anti-NFκB p65(8242),Anti-p-p65(3033),Anti-NFκB p50(3035),Anti-p-p50(3035)及 Anti-GAPDH(5174)购自 Cell Signaling 生物公司(美国);秋水仙碱(C106739)购自阿拉丁(中国);Ⅱ型胶原蛋白(MB4791)购自大连美仑生物技术有限公司;IL-6(1310602),IL-1β(1110122)及 TNF-α(1317202)大鼠 ELISA 试剂盒购自达科为(中国)。

1.3 实验仪器

微孔板酶标仪 Varioskan™ LUX(赛默飞,美国);NanoDrop 2000 Spectrophotometer(赛默飞,美国);StepOnePlus™ Real-Time PCR(赛默飞,美国);SDS-PAGE 电泳设备及转膜仪(Bio-Rad 公司,美国)。

1.4 方法

1.4.1 胶原诱导型类风湿性关节炎大鼠模型建立 选择 6 个月龄 SD 大鼠建立 CIA 大鼠模型,大鼠麻醉,尾巴根部分三点皮下注射 250 μL 完全弗氏佐剂(含Ⅱ型胶原蛋白,2 mg/mL),在首次免疫后 2 周,再次注射 250 μL 不完全弗氏佐剂(含Ⅱ型胶原蛋白,2 mg/mL),对照组注射等体积生理盐水。

1.4.2 干预方法 待首次免疫后 3 周,明确成功建立类风湿性关节炎的大鼠,随机分为模型组、ST-L 组(200 mg/kg)、ST-M 组(400 mg/kg)、ST-H 组(800 mg/kg)及秋水仙碱组(MTX,1 mg/kg),测体质量,每周 1 次,灌胃给药 1 次/d,连续给药 3 周。

1.4.3 关节肿胀度检测 造模前后使用电子游标卡尺测定实验大鼠的踝关节直径,连续测量 3 次,取其平均值,计算踝关节肿胀度。

1.4.4 关节炎评分 CIA 评分标准(0~16):0 分为正常;1 分为轻微肿胀和红斑;2 分为明显肿胀;3 分为出现严重的红肿;4 分为出现溃烂。每周 1 次。

1.4.5 病理学检测 给药结束后,大鼠腹主动脉取血,脱颈椎处死,分离后肢大鼠踝关节组织,置于 4%多聚甲醛溶液固定 24 h,随后置于 EDTA 脱钙液(15%,pH 8.0)脱钙 15 d,隔 3 d 换液 1 次,5 μm 矢状切片并用苏森精-伊红(HE)染色,显微镜评估关节组织损伤及炎症情况,同时采用番红固绿染色确定软骨基质降解。

1.4.6 ELISA 法 使用商用 ELISA 试剂盒,根据制造商说明书检测大鼠血液中 TNF-α,IL-6 和 IL-1β 的含量。

1.4.7 RT-PCR 法 分离和收集实验大鼠的踝关节滑膜组织,称取约 30 mg,加入 1 mL Trizol,组织研磨仪匀浆,提取组织总 RNA,用 NanoDrop 2000 Spectrophotometer 检测 RNA 的浓度和纯度,用 Prime-Script™ RT 试剂盒和 gDNA Eraser 将 RNA(1 μg)逆转录为 cDNA,使用配有 SYBRs Green Master Mix 的 CFX Connect™ Real-Time 系统进行 qRT-PCR 定量分析,计算 IL-6,IL-1β,TNF-α 及 GAPDH mRNA 的表达水平。RT-PCR 引物序列:

IL-6-Forward

5'-CACCCTGCCCCGTAGATGAAG-3';

IL-6-Reverse

5'-AGGGTACAGTCGTCGAACT CT-3';

IL-1β-Forward

5'-TGAGCCAAGACAGAAAA CCA-3';

IL-1β-Reverse

5'-GGGACATGAGTAAGGTTC CTGTT-3';

TNF-α-Forward

5'-TTGCTCTTATGGATTGT CCCC-3';

TNF-α-Reverse

5'-CATTGATGCAGCACAGTTGTC-3';

GAPDH-Forward

5'-GGAGCGAGATCCCTCC AAAAT-3';

GAPDH-Reverse

5'-GGCTGTTGTCATACTT CTCATGG-3'。

1.4.8 蛋白免疫印迹(Western Blot)法 分离收集实验大鼠的膝关节滑膜组织,称取约 30 mg,加入 1 mL RIPA 蛋白裂解液,研磨仪组织匀浆。根据制造商说明书操作提取组织总蛋白,采用 BCA 法蛋白定量,加入 Loading buffer(4×)于 100℃煮沸 5 min,然

后采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,电泳条件:80 V, 30 min;120 V,60 min。随后采用 100 V,90 min 将电泳分离后的蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜(Millipore,美国),用 5% BSA 室温封闭 60 min, TBST 洗涤 5 次,5 min/次,用一抗(TLR4, p65, p-p65, p50, p-p50 和 GAPDH,按 1:1 000 稀释)4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 5 次,5 min/次,用二抗(HRP 标记山羊抗兔 IG 和 HRP 标记山羊抗鼠 IG,按 1:10 000 稀释)室温孵育 90 min, TBST 洗涤 5 次,5 min/次,用 ECL 化学发光法(Millipore,美国)显影检测,用 ImageJ 分析灰度值。

1.5 统计学方法

所有数据均采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析,结果表示为 $\bar{x} \pm s$,用 One-Way ANOVA 进行多组数据的检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠体质量、关节炎评分、关节形态学及肿胀度的影响

体质量结果表明与对照组相比,模型组大鼠的体质量从第 3 周开始显著小于对照组大鼠,但灌胃给予鼠尾草提取物(ST)呈剂量依赖性增加 CIA 大鼠的体质量,差异有统计学意义($P < 0.05$,见图 1a)。关节炎评分结果表明:与对照组相比,模型组大鼠的关节炎评分从第 3 周开始显著增加,持续至实验结束,ST 组大鼠的关节炎评分呈剂量依赖性显著减小,差异有统计学意义($P < 0.05$,见图 1b)。实验结束时,形态学结果表明模型组大鼠的踝关节、脚掌及指头均有肿胀,灌胃给予 ST 明显缓解 CIA 大鼠的踝关节、脚掌及指头的肿胀症状,差异有统计学意义($P < 0.05$,见图 1c 和图 1d)。

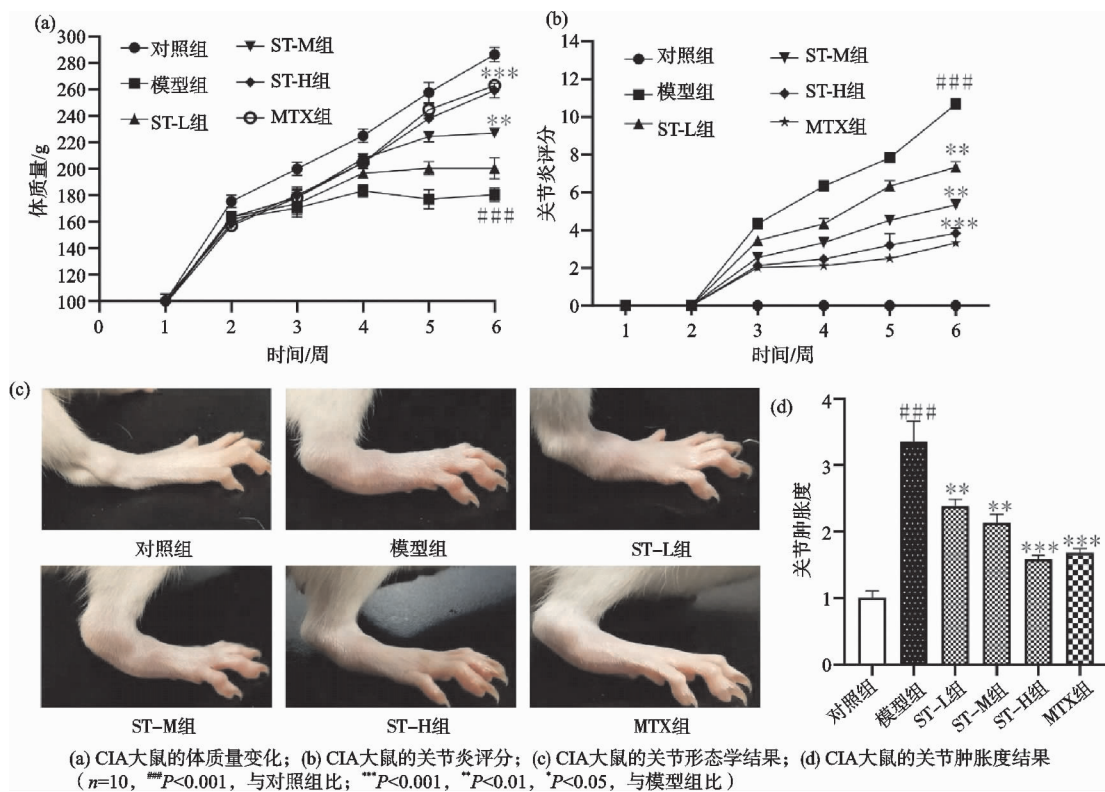


图 1 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠体质量、关节炎评分、关节形态学及肿胀的影响

2.2 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠关节和滑膜组织的病理影响

苏木精-伊红染色病理结果表明对照组大鼠的关节完整,无基质损害及炎性细胞浸润,模型组大鼠关节腔出现明显的软骨基质损伤和炎性细胞浸润滑膜组织及关节腔,灌胃给予 ST 能够显著缓解炎性细胞浸润关节腔和滑膜组织(见图 2a)。除此之外,番红固绿染色结果也表明对照组大鼠的关节完整,软骨细胞排列规则且紧密,软骨基质无损伤,模型组大鼠的软骨基质严重受损,软骨细胞排列疏松,灌胃给予 ST 能够明显

缓解 CIA 大鼠的软骨基质损伤及软骨细胞分布(见图 2b)。

2.3 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠外周血液炎症因子水平的影响

采用 ELISA 法检测了 CIA 大鼠外周血液炎症因子的含量,结果表明:与对照组相比,模型组大鼠外周血液炎症因子 TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 的含量显著增加,灌胃给予 ST 呈剂量依赖性显著下降 CIA 大鼠外周血液炎症因子 TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 的含量,差异有统计学意义($P < 0.05$,见图 3)。

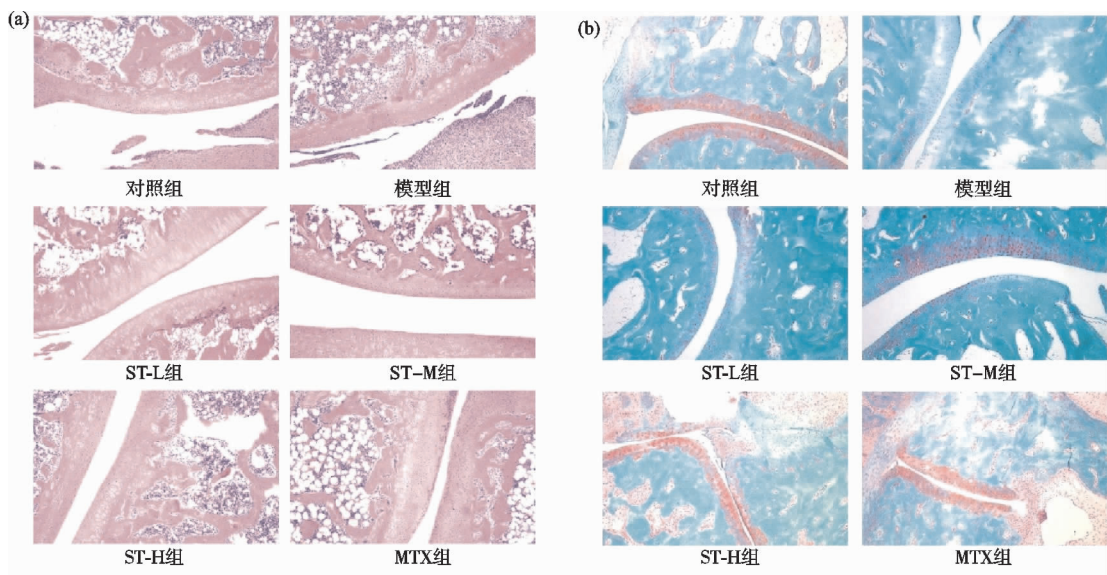


图 2 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠关节和滑膜组织的病理影响(100×)

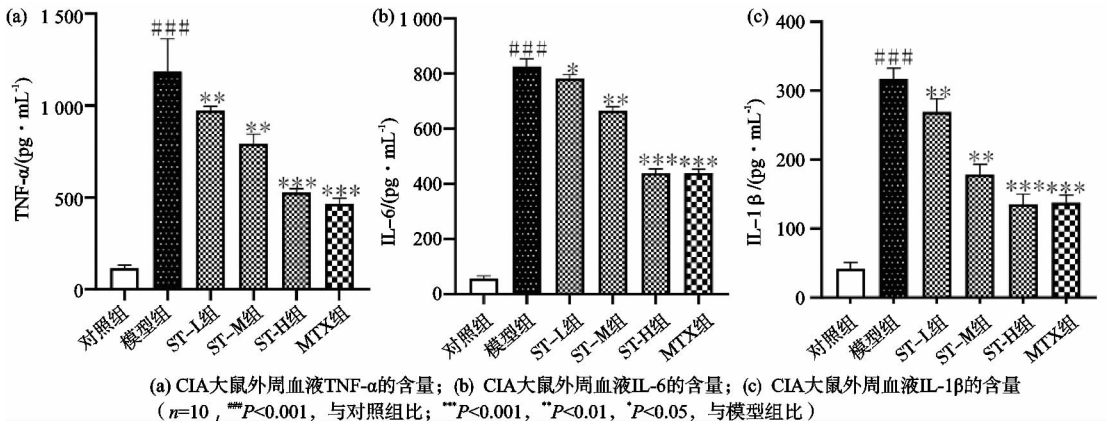


图 3 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠外周血液炎症因子水平的影响

2.4 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠滑膜组织炎症因子水平的影响

采用 RT-PCR 法检测 CIA 大鼠滑膜组织炎症因子的表达水平,结果表明:与对照组相比,模型组大鼠

滑膜组织中 TNF- α ,IL-6 和 IL-1 β 的表达水平显著上调,灌胃给予 ST 呈剂量依赖性显著下调 CIA 大鼠滑膜组织中 TNF- α ,IL-6 和 IL-1 β 的表达水平,差异有统计学意义($P<0.05$,见图 4)。

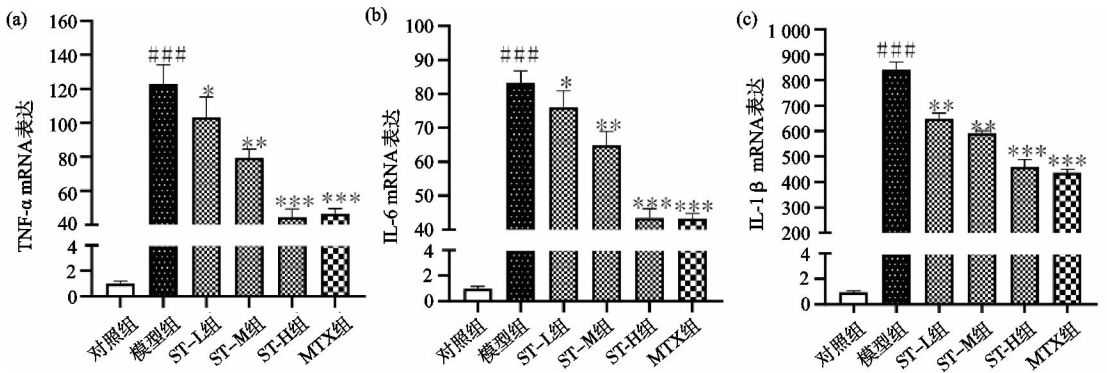


图 4 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠滑膜组织炎症因子水平的影响

2.5 鼠尾草提取物对 CIA 大鼠滑膜组织 TLR4-NF- κ B 信号通路的影响

采用 Western Blot 法检测 TLR4-NF- κ B 通路相关信号分子的蛋白表达水平,结果表明:与对照组相

比,模型组 TLR4,p-p65/p65 和 p-p50/p50 的表达水平显著上调,但灌胃给予 ST 呈剂量依赖性下调 CIA 大鼠滑膜组织中 TLR4,p-p65/p65 和 p-p50/p50 的表达水平,差异有统计学意义($P<0.05$,见图 5)。

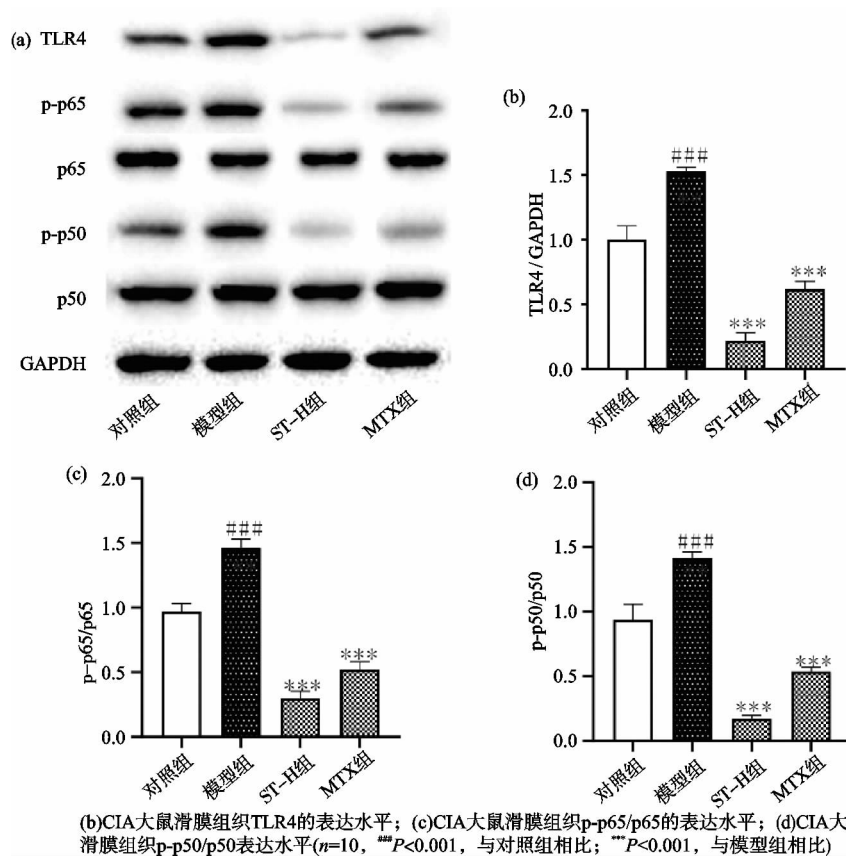


图5 鼠尾草提取物对CIA大鼠滑膜组织TLR4-NF-κB信号通路的影响

3 讨论

鼠尾草(*Salvia japonica* Thunb)作为一种传统中药,现代研究表明其含有挥发油、黄酮类和酚类、酚酸衍生物等多种活性成分,其提取物具有抗氧化性、抗菌、抗炎镇痛及抗肿瘤等多种活性^[6]。本研究采用CIA大鼠模型表明鼠尾草提取物(ST)能够产生抗类风湿性关节炎作用,且这种作用与抑制滑膜组织中TLR4-NF-κB介导的炎症反应有关。

近年来,胶原诱导性关节炎模型被广泛应用于RA的病理机制和药物干预研究^[7-8],因此,本研究首先建立了CIA大鼠模型,结果表明在首次免疫后3周,模型组大鼠的关节炎评分显著增加,同时大鼠体质量显著下降,并且实验结束后关节出现红肿,这表明本研究成功建立了CIA大鼠模型,为后面的药物干预研究奠定了基础。同时,连续3周灌胃给予鼠尾草提取物能够显著增加CIA大鼠的体质量,但是仍然小于对照组,灌胃给予ST组大鼠的关节炎评分也显著减小,关节肿胀度显著减小,这些结果表明鼠尾草提取物对RA治疗具有潜在价值。

虽然RA的发病机制依然不太清晰,但是研究表明巨噬细胞、中性粒细胞及淋巴细胞均有参与RA的病理发展^[9]。巨噬细胞能够释放炎症因子募集其他免疫细胞浸润RA患者关节组织,通过分泌大量的炎症因子及基质金属蛋白酶(MMP)引起关节软骨基质降

解,最终导致患者关节不可逆性损伤^[10]。本研究结果表明鼠尾草提取物能够抑制炎症细胞浸润关节滑膜及关节腔,同时,其也能够抑制关节软骨组织基质降解。更重要的是,炎症因子的大量产生在RA病理发展过程中起着至关重要的作用,白细胞介素(IL)-1β作为机体免疫的重要细胞因子,具有广泛的全身和局部作用,并且其还能够调节机体细胞免疫和非细胞免疫功能^[11]。除此之外,IL-6和肿瘤坏死因子(TNF)-α也在RA的病理机制中起着至关重要的作用^[12]。本研究结果表明鼠尾草提取物能够降低CIA大鼠外周血液中IL-1β,IL-6和TNF-α的含量。除此之外,滑膜炎在RA的病理发展过程中具有重要影响,本研究结果表明鼠尾草提取物也能够抑制CIA大鼠关节滑膜炎和下调滑膜组织IL-1β,IL-6和TNF-α表达,这些结果表明鼠尾草能够抑制CIA大鼠的炎症反应。

Toll样受体(Toll Like Receptor, TLR)是一种细胞模式识别受体,能够通过识别脂多糖、膜脂蛋白等分子参与机体先天性免疫和适应性免疫反应^[13]。TLR4是Toll样受体家族重要的成员之一,其能够与相应的配体结合,通过激活核因子-κB(NF-κB)信号通路介导促炎因子的产生和释放等过程^[14]。正常情况下,NF-κB p65与p50以共聚体形式与IκB-α共存于细胞质,炎症情况下,IKKs能够诱导IκB-α发生磷酸化并降解,引起NF-κB p65与p50发生核易位进入细胞核,

其与启动子结合促进炎症因子的转录表达^[15-17]。在本研究中,鼠尾草提取物能够下调 CIA 大鼠滑膜组织中 TLR4, p-p65/p65 和 p-p50/p50 的蛋白表达,上述表明鼠尾草提取物能够抑制 TLR4-NF- κ B 信号通路产生抗炎作用。

总的来说,本研究表明鼠尾草提取物灌胃给予 CIA 大鼠能够缓解关节肿胀,对 RA 治疗具有潜在的价值,同时,这种抗类风湿性作用可能与抑制滑膜组织 TLR4-NF- κ B 信号介导的炎症反应有关。但是,鼠尾草提取物成分复杂,其具体活性单体成分依然是未知的,因此,仍需在后续研究中探讨。

参考文献

- [1] 郭锦晨,刘健,万磊,等.氧化应激及炎症反应在类风湿关节炎中的研究进展[J].风湿病与关节炎,2016,5(9):68-76.
- [2] PISETSKY D S. Advances in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. NC Med J,2017,78(5):337-340.
- [3] 元晓龙,曾晨,姚血明,等.中医药治疗类风湿关节炎的研究进展[J].贵阳中医学院学报,2018,40(3):89-100.
- [4] 陈慕芝,吕蕾,照日格图.老年类风湿关节炎 56 例临床特点分析[J].风湿病与关节炎,2018,7(7):36-38.
- [5] JONES G, NASH P, HALL S. Advances in rheumatoid arthritis[J]. Med J Aust,2017,206(5):221-224.
- [6] 白小荣,马岩,李旻辉,等.药用鼠尾草传统应用调查与研究进展[J].中国现代中药,2019,21(2):271-278.
- [7] HALEAGRAHARA N, MIRANDA H S, ALIM M A, et al. Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis[J]. Biomed Pharmacother,2017,90:38-46.
- [8] 朱健,武璐璐,张全书,等.枫杨乙醇提物对胶原诱导性关节炎大鼠的治疗作用及其机制研究[J].中国药理学通报,2019,35(1):117-123.

- [9] DECKER E, MÜLLER-LADNER U. Rheumatoide arthritis[J]. Der Internist,2013,54(4):434-440.
- [10] 汪灿锋,叶正从,沈钦荣,等.五福饮含药血清对大鼠软骨细胞肿瘤坏死因子- α 诱导凋亡软骨细胞活性及基质金属蛋白酶表达的影响[J].浙江中西医结合杂志,2019,29(9):718-723.
- [11] 程苏云,陈香元,李洪伟,等.胶原诱导关节炎模型中髓系来源抑制细胞通过白细胞介素-1 β 促进 Th17 细胞分化的作用[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2018,12(2):141-150.
- [12] RANNIKKO E H, WEBER S S, KAHLE P J. Exogenous α -synuclein induces toll-like receptor 4 dependent inflammatory responses in astrocytes [J]. Bmc Neuroscience, 2015,16:57.
- [13] 单佳铃,程虹毓,文乐,等. TLR/MyD88/NF- κ B 信号通路参与不同疾病作用机制研究进展[J].中国药理学通报,2019,35(4):451-455.
- [14] KARIN M, DELHASE M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signaling[J]. Semin Immunol,2000,12(1):85-98.
- [15] WANG J, HUANG J, WANG L, et al. Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF- κ B signaling pathway[J]. J Thorac Dis,2017,9(11):4398-4412.
- [16] 黄洁媛,刘文明.白细胞介素-4 负调控 NF- κ B 通路抑制炎症反应的机制研究[J].天津医药,2019,47(10):1025-1029.
- [17] FULENWIDER H D, SMITH B M, NICHENKO A S, et al. Cellular and behavioral effects of lipopolysaccharide treatment are dependent upon neurokinin-1 receptor activation[J]. J Neuroinflammation,2018,15(1):60.

(收稿日期:2020-03-18)

(上接第 5 页)

- [20] 王欢,王庆甫,杨黎黎,等.桂皮醛对滑膜成纤维细胞增殖、凋亡及周期影响的实验研究[J].天津中医药,2017,34(1):54-58.
- [21] 石鑫超,吴忌,王庆甫,等.桂皮醛对人膝关节滑膜成纤维细胞增殖的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(9):1-3.
- [22] 王欢,王庆甫,史榕荇,等.桂皮醛及白芍总苷对骨关节炎滑膜炎性反应的影响[J].中华中医药杂志,2018,35(8):3356-3360.
- [23] 王庆甫,马玉峰,殷岳衫,等.低频超声促透中药对兔膝关

- 节炎细胞因子的影响[J].北京中医药大学学报,2013,36(2):108-112.
- [24] 王庆甫,祁印泽,陈兆军,等.超声电导透射通络止痛中药外治膝骨性关节炎的临床观察[J].北京中医药大学学报,2010,33(4):283-285.
- [25] 张晓哲,张栋,马玉峰,等.通络止痛凝胶制剂对膝关节关节炎大鼠的影响[J].中华中医药杂志,2019,36(5):2184-2188.

(收稿日期:2020-03-16)