

新痹痛灵对胶原诱导性关节炎大鼠及其滑膜组织中 HMGB1 mRNA 表达的影响

景嵘月, 汪悦*

(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] 目的:观察新痹痛灵对胶原诱导性关节炎大鼠及其滑膜组织中 HMGB1 mRNA 的影响。方法:新痹痛灵方中饮片经相关工艺提取后制为浸膏;将 SD 大鼠 72 只随机分出 12 只为正常组,其余进行胶原诱导性关节炎(CIA)造模,再将造模大鼠随机分为模型组,新痹痛灵高、中、低剂量组(3.2, 1.6, 0.8 g·kg⁻¹·d⁻¹)以及雷公藤多苷片组(0.008 g·kg⁻¹·d⁻¹),各组大鼠于二次免疫后当天开始 ig 给药,连续给药 21 d。容积法测量大鼠关节体积,病理切片观察,RT-qPCR 检测滑膜组织 HMGB1 mRNA 的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠关节肿胀明显($P < 0.01$),滑膜组织 HMGB1 mRNA 的表达明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,新痹痛灵高剂量组的关节肿胀于 14, 21 d 明显减轻($P < 0.05, P < 0.01$),且滑膜组织 HMGB1 mRNA 的表达明显降低($P < 0.01$)。关节病理切片显示新痹痛灵各剂量组及雷公藤多苷片组病变较模型组均有不同程度减轻。结论:新痹痛灵可减轻 CIA 大鼠关节肿胀、降低滑膜组织中 HMGB1 mRNA 的表达,通过抑制 HMGB1 而减少相关炎症通路的激活可能是新痹痛灵治疗类风湿性关节炎的机制之一。

[关键词] 新痹痛灵;胶原诱导性关节炎大鼠;高迁移率族蛋白 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0159-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015050159

Effect of New Bitongling on HMGB1 mRNA Expression of Synovial Tissues in Collagen-induced Arthritis

Rats JING Rong-yue, WANG Yue* (Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of New Bitongling (NBTL) on collagen-induced arthritis (CIA) rats and to investigate its influence on the expression of high mobility group box 1 (HMGB1) mRNA in the synovial tissues. **Method:** NBTL extractum was made by a series of processing technology. 12 of 72 SD rats were assigned to the normal group. The CIA models were induced in other rats, then they were divided into the model group, the low-, moderate-, high-dose NBTL groups (3.2, 1.6, 0.8 g·kg⁻¹·d⁻¹) and tripterygium wilfordii Hook F (twHF) group (0.008 g·kg⁻¹·d⁻¹). All rats received the corresponding drugs at the day of secondary immune and continuously dosed for 21 days by intragastric administration. The joint volumes were measured, the pathological tissues were observed and HMGB1 mRNA in the synovial tissues were detected by quantitative real time PCR (RTq-PCR). **Result:** Compared with the normal group, the joints swelling was more obvious ($P < 0.01$) and the expression of HMGB1 mRNA was higher in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the joints swelling was improved at the 14th day ($P < 0.05$) and the 21th day ($P < 0.01$) and the expression of HMGB1 mRNA in the synovial tissues decreased ($P < 0.01$) in the NBTL group at high dose. The pathological section of joints showed the lesions were improved in the all doses of NBTL and twHF groups as compared with the model group. **Conclusion:** NBTL could reduce joints swelling of CIA rats and inhibit the expression of HMGB1 mRNA in the synovial tissues. The mechanism for therapy on rheumatoid arthritis of NBTL may be related to inhibiting the activation of inflammatory pathway through decreasing HMGB.

[Key words] New Bitongling; collagen induced arthritis; high mobility group box 1

[收稿日期] 20141006(001)

[基金项目] 康缘中医药科技创新基金项目(HZ1003KY)

[第一作者] 景嵘月,博士,从事类风湿性关节炎的发病机制研究,Tel:025-66173287,E-mail:jrongyue@163.com

[通讯作者] *汪悦,教授,主任医师,从事风湿免疫研究,Tel:025-51995160,E-mail:wangyuephd@126.com

新痹痛灵(NBTL)始于全国名老中医汪履秋教授的经验用方,用于类风湿关节炎疗效显著。经汪悦教授多年临床实践及诸多药效学研究、拆方配伍及剂量研究之后,新痹痛灵现由麻黄、桂枝、青风藤、防风等 6 味药组成,经相关工艺提取而制成浸膏,以利于更多实验研究的开展。

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以持续性关节炎甚至发生骨及软骨破坏为特征的一种自身免疫性疾病,其发病机制至今未明。近年来认为,高迁移率族蛋白 1(high mobility group box 1, HMGB1)在促进 RA 炎症发展中可能存在重要作用。研究发现在啮齿动物关节中单独注射 HMGB1 可诱导出长期毁损性关节炎^[1];而在关节炎动物模型上使用 HMGB1 的抑制剂,包括重组 HMGB1 box A 蛋白和 HMGB1 的抗体等,则对炎症起到抑制作用^[2-3]。因此,本研究为观察新痹痛灵浸膏对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠及其滑膜组织 HMGB1 mRNA 表达的影响作用,旨在探讨新痹痛灵治疗类风湿关节炎的作用机制与 HMGB1 的相关性。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 72 只,体重(150 ± 10) g,6 周龄,雌雄各半,上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2013-0016。

1.2 药物及试剂 新痹痛灵方中药物饮片,江苏省中医院中药房提供;完全弗氏 II 型(美国 Sigma 公司,批号 F5881-10ML),胶原(美国 Sigma 公司, C7806),雷公藤多苷片(浙江得恩德制药有限公司,批号 1311108B),总 RNA 抽提试剂(宝生物工程有限公司,批号 D9108A),逆转录试剂盒(日本 TAKARA 公司,批号 RR047A),引物系根据 GenBank 提供大鼠 mRNA 序列(HMGB1 序列上游引物:5'-GGCGGCTGTTTTGTTGACAT-3',下游引物:5'-ACCCAAAATGGGCAAAAGCA-3';GAPDH 序列上游引物:5'-CCTGGCCAAGTCATCCAT-3',下游引物:5'-GTCATGAGCCCTTCCACGAT-3',由金斯瑞公司合成。采用 Primer Express 2.0 软件进行设计。

1.3 仪器 DX45 型显微镜(日本 Olympus 公司),Step One Plus 型实时定量 PCR 仪(英国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 模型建立 将大鼠随机分出 12 只作为正常组,其余进行 CIA 造模,再将造模大鼠随机分为模型组、新痹痛灵高、中、低剂量组、雷公藤多苷片组,

每组各 12 只。无菌条件下,用 0.1 mol·L⁻¹冰醋酸在冰浴中充分溶解胶原,质量浓度为 4 g·L⁻¹,置于 4 ℃ 冰箱过夜后,与完全弗氏佐剂(CFA)等体积混合、振荡乳化,制成胶原乳剂,质量浓度为 2 g·L⁻¹。用注射器于大鼠尾根部及颈背部多部位进行皮内注射,每只大鼠注射 0.15 mL 胶原乳剂,14 d 后以同样方法同等剂量多点加强免疫 1 次(二次免疫)。正常组予注射等体积生理盐水。

2.2 药物制备及给药 新痹痛灵:于南京中医药大学药学院中药炮制实验室制备。取方中桂枝、防风用 10 倍量水,浸泡 2 h,水蒸气蒸馏 6 h,提取、收集挥发油,水提液及药渣,备用。取方中麻黄、青风藤用 16 倍量 50% 乙醇提取 3 次,每次 2 h,合并醇提液,过滤,收集醇提液及药渣,备用。方中余 2 味同以上麻黄等 4 味药药渣加 20 倍量水,提取 2 次,每次 2 h,合并水煎液,与挥发油水提液合并,加乙醇至含醇量 50%,静置 48 h,上清液与醇提液合并,减压回收乙醇至无醇味,再喷入挥发油,制得浸膏。其中每 1 mL 含生药 9.57 g。根据实验大鼠与人的体表面积系数比换算,确定大鼠每日给药剂量,具体方法为:正常组与模型组,均给予蒸馏水;新痹痛灵高、中、低剂量组,分别给予浸膏 3.2, 1.6, 0.8 g·kg⁻¹·d⁻¹;雷公藤多苷片组,给予剂量 0.008 g·kg⁻¹·d⁻¹。大鼠均 ig 给药,于二次免疫后当天给药,连续给药 21 d。

2.3 治疗评价 观察大鼠的症状及治疗过程,使用容积法测量并计算大鼠关节肿胀度,具体为:在大鼠左后足踝关节突出部位划一条线作为标记,放入自制足容积测量装置管内,使水面与踝骨上的标记相平,所测量体积即为大鼠足踝关节体积。二次免疫当天记为 1 d,此后 7,14,21 d 均进行测量。

$$\text{肿胀度} = (\text{造模前容积} - \text{造模后容积}) / \text{造模前容积} \times 100\%$$

处死大鼠后,取左踝关节固定于 10% 福尔马林内,脱钙后常规石蜡包埋、制片、HE 染色,观察关节滑膜组织有无增生、滑膜细胞变性或坏死、纤维组织增生、血管翳生成、炎细胞浸润、关节软骨及骨组织破坏。“4 分(极重度)”,病变极轻度计为“0.5 分”,无病变组织计为“0 分”。累加所有分数,得出每组每只动物的均分,分值越高提示损伤越严重,反之则说明经药物处理后损伤减轻,治疗有效。结合病理切片评价模型是否建立成功以及药物疗效。

2.4 标本留取与 RT-qPCR 检测 处死大鼠取左后足踝关节滑膜组织,无菌生理盐水清洗,快速放入

0.1% DEPC 处理的 Eppendorf 管中,液氮保存。用 Trizol 法提取总 RNA,取纯度好的样品按试剂盒说明进行逆转录反应,cDNA 置 -20 °C 保存备用。PCR 反应体系为 20 μL,每个样品设 3 个平行复孔取均值。反应程序为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,扩增 40 个循环。为消除样本误差,同时检测管家基因 GAPDH mRNA,采用 2^{-ΔΔCt}法对基因表达进行相对定量分析。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件做统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用方差分析和两样本均数比较的 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

表 1 新痹痛灵对 CIA 踝关节肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of NBTL on joints swelling of CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模前 /%	造模后/%			
			1 d	7 d	14 d	21 d
正常	-	1.29 ± 0.11	6.45 ± 4.93	9.62 ± 5.49	12.40 ± 5.69	15.17 ± 6.69
模型	-	1.35 ± 0.14	20.02 ± 11.97 ²⁾	28.37 ± 11.30 ²⁾	32.98 ± 9.75 ²⁾	38.29 ± 9.62 ²⁾
新痹痛灵	3.2	1.42 ± 0.12	16.71 ± 3.91 ²⁾	22.06 ± 4.69 ²⁾	24.56 ± 7.41 ^{2,3)}	23.10 ± 6.93 ^{1,4)}
	1.6	1.42 ± 0.06	16.99 ± 3.46 ²⁾	27.25 ± 3.32 ²⁾	34.64 ± 3.12 ²⁾	32.02 ± 2.33 ²⁾
	0.8	1.36 ± 0.11	22.64 ± 9.41 ²⁾	26.72 ± 12.06 ²⁾	31.20 ± 12.56 ²⁾	32.18 ± 10.53 ²⁾
雷公藤多苷片	0.008	1.36 ± 0.18	16.36 ± 6.02 ²⁾	26.76 ± 10.38 ²⁾	28.23 ± 9.03 ²⁾	23.82 ± 9.20 ^{1,4)}

注:与正常组同期比较¹⁾*P* < 0.05,²⁾*P* < 0.01;与模型组同期比较³⁾*P* < 0.05,⁴⁾*P* < 0.01(表 2 同)。

3.2 对大鼠滑膜组织病变的影响 正常组滑膜组织无变性、坏死,未见充血、水肿和炎细胞浸润,关节骨、软骨无破坏;模型组主要表现为滑膜细胞变性,滑膜组织充血,有血管翳形成,关节周围皮下组织有大量中度、重度炎细胞浸润,主要为单核巨噬细胞、淋巴细胞及少量中性粒细胞,亦可见假结核样结节形成,假结核结节由单核巨噬细胞组成,内有 1 个或多个多核巨细胞,炎症严重区域形成由中性粒细胞组成的小脓肿;新痹痛灵各剂量组及雷公藤多苷片组病变类同模型组但较模型组均有不同程度减轻。见图 1。

3.3 对大鼠滑膜组织 HMGB1 mRNA 表达的影响 模型组滑膜组织 HMGB1 mRNA 的表达明显高于正常组(*P* < 0.01);新痹痛灵高剂量组 HMGB1 表达明显低于模型组(*P* < 0.01);雷公藤多苷片组 HMGB1 表达低于模型组(*P* < 0.05);新痹痛灵高剂量组 HMGB1 mRNA 表达与雷公藤多苷片组两两相比无显著性差异。见表 2。

4 讨论

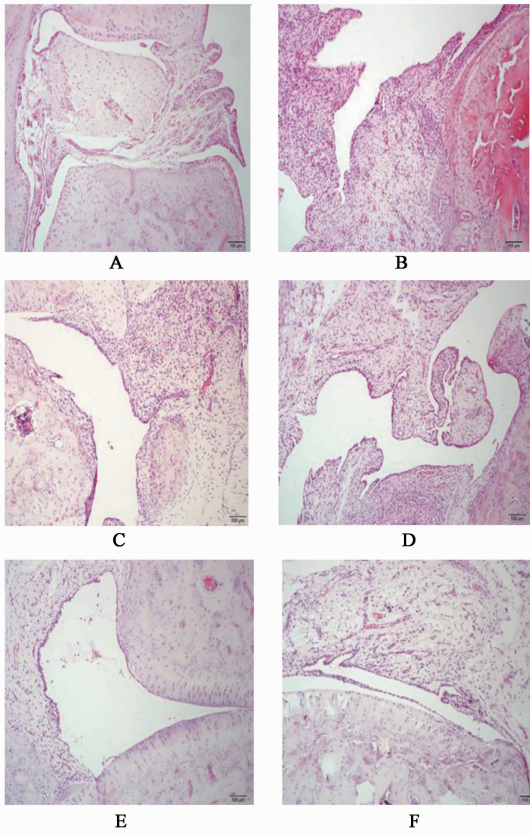
细胞外的 HMGB1 可以启动固有和适应性免疫,参与败血症、感染和自身免疫等急性慢性炎症过

3 结果

3.1 对大鼠足踝关节肿胀度的影响 与正常组比较,模型组、新痹痛灵各剂量组及雷公藤多苷片组关节肿胀明显(*P* < 0.05,*P* < 0.01)。随着免疫时间的延长,模型组大鼠关节肿胀度呈递增趋势,而给药后新痹痛灵各剂量组及雷公藤多苷片组关节肿胀有不同程度减轻,其中,14 d 新痹痛灵高剂量组与模型组相比肿胀明显减轻,且有统计学意义(*P* < 0.05);21 d 新痹痛灵高剂量组、雷公藤多苷片组与模型组相比肿胀明显减轻,有统计学意义(*P* < 0.01);21 d 新痹痛灵高剂量组与雷公藤多苷片组相比无显著性差异。见表 1。

程。CIA 大鼠中, HMGB1 在细胞外间隙及巨噬细胞、滑膜成纤维样细胞、血管内皮细胞的细胞质中都有显著表达^[1]。对 RA 患者血清、滑膜组织及滑膜液的检测均可发现异常增高的 HMGB1^[4]。近年来研究认为, HMGB1 可直接作为一种细胞因子调节细胞代谢和免疫反应^[5];亦可能更多是与相关物质形成复合物后促进了 RA 炎症的发生与发展。如 Hreggvidsdettir H S 等^[6]研究指出, HMGB1 促进炎症的发展是因为形成了具有独特分子特性的免疫刺激复合物,与单独配体相比, HMGB1 复合物可以显著增强免疫反应。而当细胞外的 HMGB1 与其 3 种主要受体,晚期糖基化终末产物受体, Toll 样受体 2 及 Toll 样受体 4 结合后将最终导致核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 的活化及转录,这可能是 HMGB1 参与炎症反应的关键环节。RA 中, NF-κB 诱导的 TNF-α 和 IL-1β 等细胞因子又可成为 NF-κB 的刺激剂,形成互为靶基因和激动剂的一种双向反馈调节作用,最终造成持续、放大的炎症反应^[7]。

前期新痹痛灵的相关研究,包括可显著抑制 AIA 大鼠刀豆蛋白 A 诱导的脾 T 淋巴细胞增殖和脂多糖诱导的脾 B 淋巴细胞增殖^[8];抑制关节滑膜



A. 正常组; B. 模型组; C. 新痹痛灵 0.8 g·kg⁻¹ 组; D. 新痹痛灵 1.6 g·kg⁻¹ 组; E. 新痹痛灵 3.2 g·kg⁻¹ 组; F. 雷公藤多苷片 0.008 g·kg⁻¹ 组
图 1 新痹痛灵对大鼠滑膜组织病变的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effects of NBTL on synovial tissue lesions(HE, ×100)

表 2 新痹痛灵对大鼠滑膜组织 HMGB1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of NBTL on the expression of HMGB1 mRNA in synovial tissues of CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	2 ^{-ΔΔCt}
正常	-	1.00 ± 0.00
模型	-	4.66 ± 2.27 ²⁾
新痹痛灵	3.2	2.17 ± 0.11 ⁴⁾
	1.6	3.21 ± 1.37
	0.8	3.39 ± 1.46
雷公藤多苷片	0.008	2.82 ± 0.68 ³⁾

组织血管内皮细胞生长因子(VEGF)mRNA 的过量表达^[9];可降低造模大鼠关节滑膜组织微血管密度,下调关节滑膜组织白细胞介素-17(IL-17)mRNA 的过量表达^[10]等,均证实了此方具有一定的免疫抑制作用。

研究用提取有效成分后的新痹痛灵浸膏对 CIA 大鼠进行干预,结果表明新痹痛灵可减轻 CIA 大鼠关节肿胀、降低其滑膜组织中 HMGB1 mRNA 的表

达,同时提示,新痹痛灵对 CIA 大鼠关节炎症的抑制可能与降低其滑膜组织中 HMGB1 mRNA 的表达相关。这一研究结果为新痹痛灵临床治疗 RA 的作用机制提供了新依据。而新痹痛灵是否参与了促发 RA 炎症的 HMGB1/NF-κB 信号通路,对 HMGB1 与相关受体的结合有无影响则有待于更深入的研究。

[参考文献]

[1] Palmblad K, Sundberg E, Diez M, et al. Morphological characterization of intra-articular HMGB1 expression during the course of collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(2) : R35.

[2] Schierbeck H, Lundbäck P, Palmblad K, et al. Monoclonal anti-HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) antibody protection in two experimental arthritis models [J]. Mol Med, 2011, 17(9/10) : 1039-1044.

[3] Evankovich J, Cho S W, Zhang R, et al. High mobility group Box 1 release from hepatocytes during ischemia and reperfusion injury is mediated by decreased histone deacetylase activity [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (51) : 39888-39897.

[4] Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(9) : 2675-2685.

[5] Kokkola R, Sundberg E, Ulfqren A K, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) : A novel proinflammatory mediator in synovitis [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(10) : 2598-2603.

[6] Hreggvidsdóttir H S, Lundberg A M, Aveberqer A C, et al. HMGB1-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor [J]. Mol Med, 2012, 18 : 224-230.

[7] Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling [J]. Immunol Rev, 2006, 210 : 171-186.

[8] 汪悦,郭海英,耿元卿,等.痹痛灵颗粒对佐剂性关节炎大鼠脾淋巴细胞增殖的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(7) : 595-597.

[9] 吴素玲,汪悦,夏卫军.痹痛灵颗粒对胶原诱导类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织中 VEGF mRNA 表达的影响 [J]. 新中医, 2009, 41(12) : 98-100.

[10] 樊任珠,汪悦,徐建亚,等.痹痛灵颗粒对胶原诱导关节炎滑膜白介素-17 mRNA 表达的影响 [J]. 中医学报, 2011, 26(5) : 581-583.

[责任编辑 周冰冰]