

木瓜三萜对佐剂性关节炎大鼠关节滑膜组织中 Akt, NF- κ B 和促炎因子的表达影响

王海燕¹, 覃慧林², 张永峰², 颜为红², 贺海波^{2*}, 丁华丽², 汪鏊植²

(1. 三峡大学 中医临床医学院, 宜昌市中医医院, 湖南 宜昌 443001;

2. 三峡大学 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北省土家族医药研究所, 湖南 宜昌 443002)

[摘要] 目的:观察木瓜三萜对佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠关节滑膜组织中 Akt,核转录因子- κ B(NF- κ B)和炎症因子表达影响,在此基础上探讨其可能机制。方法:80 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、木瓜总三萜中、高剂量组(50,100 mg·kg⁻¹),除正常组外,其余大鼠右后足跖注射弗氏佐剂造模,木瓜三萜(50,100 mg·kg⁻¹)灌胃(ig)给药,足容积法测量致炎侧足肿胀、进行关节评分;光学显微镜观察关节滑膜病理变化;酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测大鼠关节滑膜组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-8(IL-8)含量,蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测关节滑膜组织中蛋白激酶 B(Akt),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)和人核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)表达水平。结果:与正常组比较,大鼠致炎后 14 d 关节肿胀度达峰值,可见模型组关节滑膜组织炎症反应,如滑膜组织增生,炎症细胞浸润;关节组织中 TNF- α ,IL-1 β ,IL-6 和 IL-8 含量明显上升,p-Akt 和 NF- κ B p65 表达增多($P < 0.01$);与模型组比较,木瓜三萜中、高剂量组能显著抑制 AA 大鼠足爪肿胀、降低多发性关节评分及改善关节滑膜组织病理变化,降低滑膜组织病理评分,降低关节滑膜组织中 TNF- α ,IL-1 β ,IL-6 和 IL-8 含量及 p-Akt 和 NF- κ B p65 蛋白表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:木瓜三萜具有显著的抗炎作用,抑制 Akt/NF- κ B 信号通路激活及促炎因子生成可能是其发挥抗炎作用的重要机制之一。

[关键词] 木瓜三萜;佐剂性关节炎;抗炎;Akt/NF- κ B 信号通路;促炎因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0141-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050141

Effect of Triterpene from Chaenomelis Fructus on Expression of Akt, NF- κ B and Inflammatory Factors in Adjuvant Arthritis Rats

WANG Hai-yan¹, QIN Hui-lin², ZHANG Yong-feng², YAN Wei-hong²,
HE Hai-bo^{2*}, DING Hua-li², WANG Jun-zhi²

(1. Yichang Hospital of Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Clinical Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443001, China;

2. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development & Hubei Research Institute of Tujia Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of triterpene from Chaenomelis Fructus on the expression levels of Akt, NF- κ B and inflammatory factors in synovial tissues of joint in adjuvant arthritis (AA) rats, and explore its possible mechanism. **Method:** Totally 80 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, triterpene from Chaenomelis Fructus high and middle dose groups (50, 100 mg·kg⁻¹). The models were established by injection of adjuvant on right hind paws of the rats. Triterpene from Chaenomelis Fructus (50, 100

[收稿日期] 20160606(014)

[基金项目] 湖北省民间药物现代工程研究技术中心项目(2015ZY007);三峡大学预研基金项目(Hy1402)

[第一作者] 王海燕,主管药师,从事中药质量标准研究,Tel:13032702815,E-mail:405016856@qq.com.

[通讯作者] *贺海波,博士,副教授,硕士生导师,从事土家族药物活性评价与作用机制研究,Tel:0717-6397478,E-mail:hjy219@126.com

mg·kg⁻¹) was given by *ig* administration, and foot volume method was used to determine paw swelling and joint scores. The pathological changes of synovium were observed under optical microscope; and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 8 (IL-8) in joint synovial tissues were measured by using ELISA. The protein expression levels of protein kinase B (Akt), phospho-Akt (p-Akt) and nuclear transcription factor- κ B p65 (NF- κ B p65) in joint synovial tissues were measured by western blotting. **Result:** After 14 days of joint inflammation, paw swelling reached the peak as compared with the normal group. The joint synovial hyperplasia and cell infiltration were seen obviously in model rats; the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 in joint synovial tissues were significantly increased; the NF- κ Bp65 and p-Akt protein expression levels were increased ($P < 0.01$). As compared with the model group, triterpene from *Chaenomeles Fructus* (50 and 100 mg·kg⁻¹) significantly decreased arthritis score, alleviated paw swelling, decreased the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 in joint synovial tissues; and significantly down-regulated the protein expression levels of p-Akt and NF- κ B p65 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Triterpene from *Chaenomeles Fructus* has a significant anti-inflammatory effect. The mechanism maybe related to inhibiting Akt/NF- κ B signaling pathway and activating the pro-inflammatory cytokines production.

[**Key words**] triterpene from *Chaenomeles Fructus*; adjuvant arthritis; anti-inflammation; Akt/NF- κ B signaling pathway; pro-inflammatory cytokine

木瓜又名皱皮木瓜、铁脚梨、贴梗海棠、宣木瓜、酸木瓜、空儿木瓜、木瓜实等^[1]。木瓜作为一种常用中药,有平肝舒筋、和胃化湿之功效,可用于湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛、吐泻转筋、脚气水肿等。中医认为木瓜有舒筋、活络、健脾开胃、舒肝止痛、祛风除湿之功效,可用于预防和治疗风湿病、霍乱、痢疾、肠炎、脚气病及维生素 C 缺乏症等^[2]。《圣济总录》的木瓜茺萸汤以木瓜配吴茺萸、干姜、木香、槟榔等疏肝醒脾,治疗胸闷呕逆;以木瓜伍罌粟壳、车前子组成木瓜散,具有化湿和中、涩肠止痢之功效。《太平惠民和剂局方》六和汤以木瓜配伍赤茯苓、藿香、扁豆、砂仁、半夏、人参等健脾化湿,配伍牛膝、天麻、肉苁蓉、附子、豹骨等补肝肾、壮筋骨、祛风湿。《医学六要》补肝汤以木瓜配伍生地黄、当归、白芍、酸枣仁、川芎、炙甘草,养血滋阴、柔肝舒筋,主治虚劳肝血不足所致筋脉挛急、关节屈伸不利诸症^[3]。前期临床应用表明,该药对消化不良、急慢性胃炎及胃、十二指肠溃疡具有较好的疗效^[4]。本研究旨在通过弗氏佐剂致佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)模型,通过观察木瓜重要的活性组分木瓜三萜关节组织的形态学及滑膜组织中 Akt,核转录因子- κ B(NF- κ B)和炎症因子表达的影响,在此基础上探讨其可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 80 只雄性,SD 大鼠,SPF 级,体重 200 ~ 220 g,购于三峡大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(鄂)2008-0005。动物实验经三峡大学

伦理委员会批准(批准号 20151027)。

1.2 药物与试剂 木瓜果实采集于湖北省长阳县榔坪镇,经三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室汪鋆植教授鉴定为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* 的干燥近成熟果实。弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA, 美国 Sigma 公司,批号 130608);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-8(IL-8)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(深圳达科为生物技术有限公司,批号分别为 20151121, 20151012, 20150923, 20151027);蛋白激酶 B(Akt),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)和人核转录因子 κ Bp65(NF- κ Bp65)一抗(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 GR144944-1, GR144945-1, GR144949-1); β 肌动蛋白(β -actin)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 201508),羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 19U71);总蛋白抽提试剂盒, ECL 发光试剂盒,蛋白含量测定试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为 201512, 201510, 15060420);其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 YLS-7B 型足爪足趾容量测定仪(上海欣软信息科技有限公司),UV-2000 型紫外-可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司),LDZ5-2 型离心机(北京医用离心机厂),JY10001 电子称重器(上海精密科学仪器有限公司),万分之一电子分析天平(中国上海梅特勒-托利多有限公司),Q500 型图像

分析及 DMR 多功能显微镜及图象分析系统(德国 Leica 公司), Vortex-Genie 2 型涡旋振荡器(美国奥然公司), DYY-6C/D 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司), GENios 酶标仪(瑞士 Tecan 公司), TS-2 型脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备及大鼠 AA 造模及分组给药 干燥的果实粉碎后经乙醇回流提取,回收乙醇后用水溶解,按极性依次由石油醚、乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯萃取部分通过聚酰胺柱层析,乙醇洗脱部位干燥,得木瓜三萜,其含量 85.4%,实验使用时用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液(CMC-Na)配制成所需的浓度。80 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 3 d,根据体重随机分为 4 组,每组 20 只,分别正常组、模型组、木瓜总三萜(50, 100 mg·kg⁻¹)。除正常组外,其他各组均注射 0.1 mL FCA 于大鼠右后足足爪中心。造模致炎后第 2 天开始给药,正常组和模型组大鼠均给予相应体积的 0.5% CMC,每天 1 次,连续给药 35 d。

2.2 指标检测 给药期间及给药 35 d 后,进行各项指标检测。

2.2.1 足肿胀度和关节炎指数检测 在致炎后第 7, 14, 21, 28, 35 天分别计算足肿胀度和关节炎指数。足肿胀度(Δ mL) = 致炎侧足容积-对侧足容积;关节炎指数(arthritis index, AI)的测定则按照 WU 等^[5]介绍的 AI 评分标准进行测定。

2.2.2 关节滑膜组织病理学检测 末次给药次日麻醉处死大鼠,每组随机选取 10 只大鼠,剪下踝关节取出滑膜组织,用 10% 甲醛固定 24 h 后,然后用 5% 硝酸脱钙 21 d,再用不同浓度梯度乙醇逐级脱水,石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色,观察滑膜病理组织学变化,并分别从滑膜细胞增生,炎细胞浸润,血管翳生成、炎症和骨质侵蚀对关节滑膜进行评分。具体方法按张玲玲等^[6]介绍的方法进行。

2.2.3 关节滑膜组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 含量测定 将每组余下大鼠致炎足趾关节去掉皮肉,置于在 -80 °C 冰箱保存。实验时,每只大鼠取 50 mg 关节组织按照组织-生理盐水 1:10) 在冰浴中研磨匀浆,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清,即得关节组织匀浆。根据 ELISA 试剂盒介绍的方法检测大鼠关节滑膜组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 含量。

2.2.4 关节滑膜组织中 NF- κ Bp65 和 p-Akt 蛋白表

达检测 取大鼠关节滑膜组织,按照细胞蛋白提取试剂盒说明,提取不同处理组别关节组织蛋白,进行蛋白定量后,加样品缓冲液煮沸 5 min,各取 20 μ L 加样;10% 聚丙烯酰胺凝胶,在 120 V, 28 mA 条件下电泳 1.5 h;100 mA 条件下 PVDF 膜转膜 3 h;5% 脱脂牛奶封闭,分别滴加 Akt(1:250), p-Akt(1:250), NF- κ B p65(1:200) 一抗,4 °C 过夜;用含 0.1% 聚山梨酯-20 的 TBS 冲洗 5 min \times 3 次,再加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000) 室温下孵育 2 h,用 0.1% TBST 冲洗 15 min \times 3 次,ECL 发光检测,X 光片显影,扫描图像,测得各条带的灰度值,以 β -肌动蛋白(β -actin) 为内对照标准化后,比较其表达量变化。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件对实验结果进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AA 大鼠关节炎指数的影响 大鼠右后足致炎后足发红肿并逐渐肿胀、表面皮肤绷紧发亮,触之有明显的躲避行为,模型组大鼠情绪暴躁,毛色暗淡;给药 14 d 后,模型组大鼠后肢踝关节和趾部关节均明显肿大,呈紫色,出现明显的红斑,AI 达到 3.53;木瓜三萜(50, 100 mg·kg⁻¹) 治疗后,踝关节和趾关节的肿胀明显缓解降低,颜色变淡,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);给药 35 d 后,模型组 AI 为 2.91;木瓜三萜(50, 100 mg·kg⁻¹) 治疗组 AI 均明显降低,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1 和图 1。

表 1 木瓜三萜对 AA 大鼠 AI 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of triterpene from Chaenomelis Fructus on AA rat joint AI($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 14 天	第 35 天
模型组	-	3.53 \pm 0.52	2.91 \pm 0.58
木瓜三萜	50	2.84 \pm 0.41 ¹⁾	2.02 \pm 0.53 ¹⁾
	100	2.06 \pm 0.37 ²⁾	1.71 \pm 0.45 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 AA 大鼠足肿胀度的影响 实验大鼠致炎后第 7 天,模型组大鼠平均足肿胀度显著升高;第 14 天足肿胀度达到最大值,其平均足肿胀度显著升高,然后足肿胀度开始出现不同程度的降低,但与同时时间点的正常组比较具有显著性差异($P < 0.01$);



A. 第 14 天模型组; B. 第 14 天木瓜三萜 50 mg·kg⁻¹ 组; C. 第 14 天木瓜三萜 100 mg·kg⁻¹ 组; D. 第 35 天模型组; E. 第 35 天木瓜三萜 50 mg·kg⁻¹ 组; F. 第 35 天木瓜三萜 100 mg·kg⁻¹ 组

图 1 木瓜三萜对 AA 大鼠踝关节外观形态的影响

Fig.1 Effect of triterpene from Chaenomelis Fructus on AA rat ankle morphology

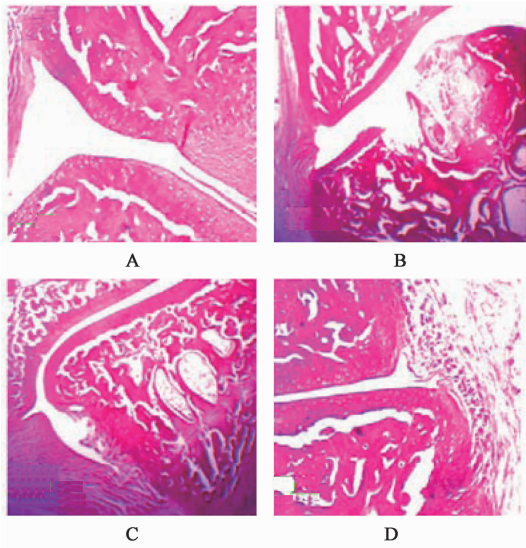
表 2 木瓜三萜对 AA 大鼠足肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of triterpene from Chaenomelis Fructus on AA rat foot swelling degree ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天
正常	-	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01
模型	-	0.63 ± 0.05 ¹⁾	0.95 ± 0.06 ¹⁾	0.84 ± 0.06 ¹⁾	0.74 ± 0.05 ¹⁾	0.63 ± 0.08 ¹⁾
木瓜三萜	50	0.47 ± 0.06 ²⁾	0.52 ± 0.03 ³⁾	0.49 ± 0.02 ³⁾	0.48 ± 0.01 ³⁾	0.46 ± 0.03 ²⁾
	100	0.37 ± 0.04 ³⁾	0.43 ± 0.05 ³⁾	0.41 ± 0.04 ³⁾	0.38 ± 0.06 ³⁾	0.32 ± 0.05 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3,4 同)

与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。见图 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 木瓜三萜 50 mg·kg⁻¹ 组; D. 木瓜三萜 100 mg·kg⁻¹ 组 (图 3 同)

图 2 木瓜三萜对 AA 大鼠关节滑膜组织组织形态学的影响 (HE, × 100)

Fig.2 Effect of triterpene from Chaenomelis Fructus on AA rat joint synovial tissue morphology (HE, × 100)

3.4 对 AA 大鼠关节滑膜组织中 TNF- α , IL-1 β ,

用木瓜三萜 (50, 100 mg·kg⁻¹) 治疗后, 治疗组与各对应时间点的模型组比较均具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 AA 大鼠关节滑膜组织组织形态学的影响

模型组大鼠滑膜组织中滑膜细胞明显增生; 体积增大, 层次增多, 排列紊乱; 有大量炎性细胞浸润; 新生血管增加、充血, 血管内膜增厚; 滑膜下层纤维组织增生, 炎性细胞浸润, 血管翳形成, 软骨中炎性细胞浸润, 并破坏软骨组织。通过从滑膜细胞增生, 炎性细胞浸润, 血管翳生成, 炎症和骨质侵蚀对关节滑膜进行评分, 结果显示, 模型组大鼠病变关节评分指数显著升高, 与正常组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$); 用木瓜三萜 (50, 100 mg·kg⁻¹) 治疗后, 关节滑膜组织病变程度明显减轻, 关节评分指数明显降低,

IL-6 和 IL-8 含量的影响 模型组大鼠关节滑膜组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-8 含量显著升高, 与正常组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$); 木瓜三萜 (50, 100 mg·kg⁻¹) 可显著降低上述炎症因子水平, 与模型组比较具有显著差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

3.5 对 AA 大鼠关节滑膜组织中 Akt, p-Akt, NF- κ B p65 蛋白表达的影响

模型组大鼠病变关节中 p-Akt, NF- κ B p65 蛋白表达水平显著增加, 与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$); 用木瓜三萜 (50, 100 mg·kg⁻¹) 治疗后, 其 p-Akt, NF- κ B p65 蛋白表达水平明显降低, 与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$), 但各组间 Akt 的蛋白表达水平未见明显不同。见表 4, 图 3。

4 讨论

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种 T, B 淋巴细胞参与, 以损害滑膜、软骨和骨的慢性系统性自身免疫病。病变核心部位在滑膜关节, 以滑膜炎为特征, 其主要的病理学改变有: 滑膜内层细胞 (成纤维样细胞和巨噬样细胞) 增生、滑膜内层下层炎性细胞 (巨噬细胞、淋巴细胞等) 浸润, 侵

表 3 木瓜三萜对 AA 大鼠关节滑膜组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-8 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of triterpene from *Chaenomelis Fructus* on levels of joint synovial tissue TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-8
正常	-	46.23 \pm 5.32	10.21 \pm 4.19	2.37 \pm 0.35	5.67 \pm 2.35
模型	-	164.31 \pm 4.25 ¹⁾	57.62 \pm 3.74 ¹⁾	34.62 \pm 1.94 ¹⁾	26.13 \pm 5.01 ¹⁾
木瓜三萜	50	120.32 \pm 3.65 ³⁾	43.18 \pm 5.37 ²⁾	26.21 \pm 1.32 ³⁾	18.97 \pm 4.62 ²⁾
	100	87.85 \pm 2.68 ³⁾	31.53 \pm 4.05 ³⁾	9.58 \pm 1.65 ³⁾	10.35 \pm 3.41 ³⁾

表 4 木瓜三萜对 AA 大鼠关节滑膜组织中 Akt, p-Akt, NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of triterpene from *Chaenomelis Fructus* on protein expressions of joint synovial tissue Akt, p-Akt, NF- κ B p65 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Akt/ β -actin	p-Akt/ β -actin	NF- κ B p65/ β -actin
正常	-	0.78 \pm 0.06	0.19 \pm 0.06	0.17 \pm 0.03
模型	-	0.82 \pm 0.05	0.90 \pm 0.09 ¹⁾	1.13 \pm 0.06 ¹⁾
木瓜三萜	50	0.84 \pm 0.08	0.55 \pm 0.07 ³⁾	1.02 \pm 0.03 ³⁾
	100	0.80 \pm 0.09	0.25 \pm 0.06 ³⁾	0.23 \pm 0.04 ³⁾

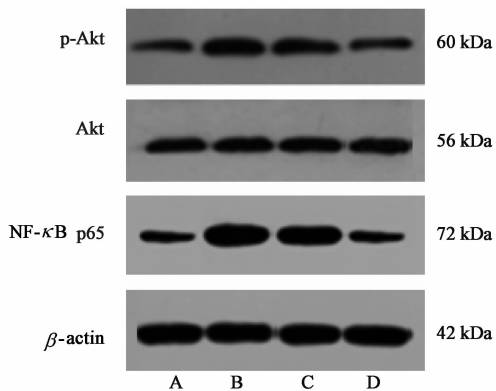


图 3 AA 大鼠关节滑膜组织中 Akt, p-Akt, NF- κ B p65 蛋白的表达
Fig. 3 Protein expressions of joint synovial tissue Akt, p-Akt, NF- κ B p65

蚀关节面的血管翳形成,破骨细胞活化并介导矿化软骨和软骨下骨侵蚀。这种慢性疾病会因关节痛楚及磨损造成关节变形,丧失部分活动能力,甚至残废,严重危害患者健康和生活质量,给社会和家庭带来了沉重负担。

大量的临床和动物实验研究证实,细胞因子特别是一些具有促炎作用的细胞因子,如 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-8 等,它们常常在关节炎的发生、发展过程中扮演着极为重要角色^[7]。当机体炎症反应发生时,机体组织会分泌一系列的抗炎因子用来保护组织免受损伤,如 IL-4, IL-10 等。在正常情况下,促炎症因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-8 等)和抗炎因子(IL-4, IL-10 等)在体内保持着动态平衡状态;然而,持续过量促炎症因子的产生会使得机体炎症因子调节网络平衡被打破,引起炎症级联反应,形成恶性循环,导致炎症疾病发生和恶化。因此,抑制

炎性介质的分泌,减轻关节炎反应成为治疗 RA 的主要方法之一。在实验中,笔者发现,AA 模型大鼠关节滑膜组织促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-8 含量较正常组显著性升高,这与有关文献报道是一致^[8-11]。在木瓜三萜(50, 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)治疗 35 d 后,木瓜三萜可显著抑制 AA 大鼠关节滑膜组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-8 含量。实验结果提示,木瓜三萜对 AA 大鼠具有较好的治疗作用,抑制促炎因子生成可能是其治疗 RA 的作用机制之一。

近年来研究发现, NF- κ B 是炎症发生、发展的重要启动因子,炎症反应发生发展的一条重要的炎性细胞信号转导途径,它控制着各种炎症介质基因的信号表达,活化的 NF- κ B 可与多种炎症因子基因启动子中的 κ B 序列结合,参与炎症介质(TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8)等细胞因子的分泌。TNF- α 和 IL-1 β 是很重要的 2 种 NF- κ B 诱导剂,可将 NF- κ B 活化成 NF- κ B p65,并核移位, NF- κ B p65 可增强各种炎症介质基因的信号表达,上调炎症反应^[12]。NF- κ B 的激活主要存在 2 种调节机制:① NF- κ B 的激活可增强 TNF- α , iNOS, IL-1 β 转录, TNF- α , iNOS, IL-1 β 水平的升高可进一步增高 NF- κ B 的激活,作用是增强炎症信号;② NF- κ B 激活的同时, I κ B- α 和 p105 的基因转录增强,这 2 个基因均含有 NF- κ B 反应元件^[13],抑制成分增多使活化的 NF- κ B 水平下调,细胞因子转录被终止而限制炎症反应。这 2 种调节同时存在, NF- κ B 的状态取决于占优势的调节方式。炎性细胞大量分泌 TNF- α , iNOS 和 IL-1 β 可诱导 NF- κ B 核移位,加速促炎症因子的转录,形成恶性循环。通过增加 NF- κ B 信号转导通路的抑制

性卡巴蛋白 (inhibitor κ B- α , I κ B- α) 靶基因的转录可降低炎性细胞因子如 TNF- α , iNOS, IL-1 β 的合成, 发挥抗炎作用^[13-15]。而在这个过程中, NF- κ B 作为 Akt 所调控的下游信号分子, 其活性有受 Akt 所调控, 研究发现活化后的 Akt 通过调控多种转录因子, 增强转录因子 NF- κ B 的表达^[16]。实际上抑制 Akt/NF- κ B 信号通路来引发凋亡也是治疗风湿关节炎的有效方法之一。因此, 研究 Akt/NF- κ B 信号转导通路来寻找治疗类风湿关节炎的方法是非常有意义的。实验中, 笔者发现 AA 大鼠病变关节组织中活化的 NF- κ B p65 和 p-Akt 蛋白表达水平明显高于正常组, 用木瓜三萜治疗后, 其表达水平显著降低。由此表明, Akt/NF- κ B 信号通路增强与 AA 大鼠炎症发生发展密切相关; 木瓜三萜可通过抑制 Akt/NF- κ B 信号通路激活发挥对 AA 大鼠治疗作用。

综上所述, 本实验证实, 木瓜总三萜能显著抑制 AA 大鼠足爪肿胀、降低多发性关节评分及改善关节滑膜组织病理变化, 降低了滑膜组织病理评分, 降低 AA 大鼠关节滑膜组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IL-8 含量及 NF- κ B p65 和 p-Akt 蛋白表达水平, 实验结果提示, 木瓜三萜具有显著的抗炎作用, 其抗炎作用可能是通过抑制 Akt/NF- κ B 信号通路激活来实现。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 61.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1997: 349-350.
[3] 张凤, 俞振霞. 木瓜效用及其临床应用分析[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(5): 81-82.
[4] 覃慧林, 邓为, 孙文军, 等. 木瓜乙酸乙酯萃取部位对小鼠急性胃溃疡保护作用实验研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 45-49.
[5] WU H, WEI W, SONG L H, et al. Paeoniflorin induced immune tolerance of mesenteric lymph node lymphocytes via enhancing beta 2-adrenergic receptor desensitization in rats with adjuvant arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(5): 662-673.

[6] 张玲玲, 魏伟, 汪庆童, 等. 芍药苷对胶原性关节炎大鼠滑膜细胞 G 蛋白偶联信号的调节作用[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(3): 330-335.
[7] 吴虹, 陈尹, 魏伟, 等. 栀子总苷对大鼠佐剂性关节炎治疗作用及部分机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(11): 49-53.
[8] Rajan M, Anne C, John W, et al. The significance of determination of tumor necrosis factor in patients with chronic infection [J]. Ann Rheum Dis, 1993, 52(3): 232-234.
[9] Feldmann M, Maini R N. Lasker clinical medical research award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases [J]. Nat Med, 2003, 9(10): 1245-1250.
[10] Hua J, Sakamoto K, Kikukawa T, et al. Evaluation of the suppressive actions of glucosamine on the interleukin-1 β -mediated activation of synoviocytes [J]. Inflamm Res, 2007, 56(10): 432-438.
[11] Blackwell T S, Christman J W. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(1): 3-9.
[12] 吴湘慧, 李娟, 庞捷. 类风湿性关节炎大鼠模型的构建及昆明山海棠对大鼠佐剂性关节炎的干预研究[J]. 中药材, 2009, 32(5): 758-761.
[13] Noort A R, Tak P P, Tas S W. Non-canonical NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis: Dr Jekyll and Mr Hyde? [J]. Arthritis Res Ther, 2015, doi: 10.1186/s13075-015-0527-3.
[14] Alghasham A, Rasheed Z. Therapeutic targets for rheumatoid arthritis: progress and promises [J]. Autoimmunity, 2014, 47(2): 77-94.
[15] LIU W, ZHANG X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5): 3212-3218.
[16] van Loo G, Beyaert R. Negative regulation of NF- κ B and its involvement in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(3): 221.

[责任编辑 周冰冰]