

茜草醇提取物对佐剂性关节炎大鼠肝脏、脾脏损伤及 Foxp3 的影响

沈彩红^{1,2}, 刘云², 余宪文², 宋晓娟^{1,2}, 肖宗崇^{1,2}, 詹若挺^{1,2}, 严萍^{1,2*}

(1. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 国家中成药技术研究中心南药研发实验室, 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的:以茜草醇提取物干预 AIA 大鼠模型,探讨茜草醇提取物对佐剂性关节炎(AIA)大鼠模型肝脏、脾脏损伤及脾脏组织中叉状头/翅膀状螺旋转录因子 3(Foxp3)的影响。方法:将 72 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松($0.125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和茜草醇提取物低、中、高剂量组($2.5, 5, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组 12 只。适应性喂养 7 d 后,于其余 5 组大鼠右后足跖皮下注射弗氏完全佐剂(CFA)0.1 mL 致炎,复制 AIA 模型,正常组给予等体积的蒸馏水,连续灌胃给药 21 d。给药期间,用排水法测定致炎侧大鼠足体积,观察大鼠行为、体质量增长情况。给药 21 d 后,计算大鼠足肿胀度、脏器指数,检测肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),髓过氧化物酶(MPO),一氧化氮(NO)水平,苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏、脾脏病理组织学变化,免疫组化法检测大鼠脾脏组织内 Foxp3 蛋白表达情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠足肿胀显著升高,脾脏、肝脏脏器指数明显降低,肝脏组织中 MDA 和 MPO 含量明显增加,脾脏中 Foxp3 蛋白水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,茜草醇提取物中、高剂量组及地塞米松组大鼠足肿胀明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),但茜草醇提取物低剂量组无显著性差异;茜草醇提取物低、中、高剂量组大鼠脾脏、肝脏脏器指数显著增加($P < 0.01$);改善肝脏及脾脏组织炎症变化,茜草醇提取物低、高剂量组及地塞米松组均可以明显降低 MDA 和 MPO 的含量($P < 0.05, P < 0.01$),仅茜草醇提取物高剂量组及地塞米松组显著升高 SOD 活性和降低 NO 的含量($P < 0.01$),茜草醇提取物中、高剂量组及地塞米松组明显上调脾脏中 Foxp3 蛋白水平($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:茜草醇提取物具有较好的抗炎作用,表明茜草醇提取物可以改善 AIA 大鼠肝脏及脾脏损伤,增加肝脏中 MDA 和 MPO 的含量,并提高脾脏组织中 Foxp3 的表达水平来增强机体的免疫耐受能力。

[关键词] 茜草醇提取物; 佐剂性关节炎; 抗炎作用; 超氧化物歧化酶(SOD); 丙二醛(MDA); 髓过氧化物酶(MPO); 一氧化氮(NO); 叉状头/翅膀状螺旋转录因子 3(Foxp3)

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0147-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180726

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180112.1331.003.html>

[网络出版时间] 2018-01-15 14:57

Effect of Rubiae Radix et Rhizoma Extract on Liver, Spleen Injury and Expression of Foxp3 in Adjuvant-induced Arthritis Rats

SHEN Cai-hong^{1,2}, LIU Yun², YU Xian-wen², SONG Xiao-juan^{1,2}, XIAO Zong-chong^{1,2}, ZHAN Ruo-ting^{1,2}, YAN Ping^{1,2*}

(1. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine; Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources from Lingnan, Ministry of Education; Joint Laboratory of Nation Engineering Research Center for the Pharmaceuticals of Traditional Chinese Medicines, Guangzhou 510006, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Rubiae Radix et Rhizoma extract (RRE) on liver, spleen injury and the expression of forkhead box P3 (Foxp3) in adjuvant-induced arthritis (AIA) rats. **Method:**

[收稿日期] 20171108(010)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2016ZC0098);广州中医药大学 2017 年高水平大学建设面上项目(广中医研[2017]10号);广东省普通高校创新团队项目(2016KYTD02)

[第一作者] 沈彩红,在读硕士,从事中药质量评价研究,Tel:13430284573,E-mail:1575273391@qq.com

[通信作者] *严萍,博士,副研究员,从事中药质量评价研究,Tel:020-39358331,E-mail:yecyp22@163.com

Totally 72 Wistar rats were randomly divided into normal control (Con) group, model (AIA) group, dexamethasone (Dex) ($0.125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group and RRE low, medium and high dose groups ($2.5, 5, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 12 rats in each group. After 7 days of adaptive feeding, 0.1 mL Freund's complete adjuvant (CFA) solution was injected subcutaneously into the hind paw of each rat to establish AIA models, while the rats in normal control group were injected with an equal volume of distilled water. Drugs were given by intragastric administration for 21 consecutive days. During the administration, the volume of the inflammatory side of the paw was measured by the drainage method, and the behavior and weight gain of the rats were observed. After 21 days of administration, the swelling degree of paw and viscera index were calculated; the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and nitric oxide (NO) in liver tissues were detected; histopathological changes in liver and spleen tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; and the expression of Foxp3 protein in spleen tissues was detected by immunohistochemistry. **Result:** As compared with the normal group, the paw swelling was significantly increased; viscera indexes of spleen and liver were significantly decreased; levels of MDA and MPO were significantly increased, and Foxp3 protein expression in spleen tissues was significantly decreased in model group ($P < 0.05, P < 0.01$). As compared with the model group, the paw swelling was significantly reduced in RRE middle and high dose groups and Dex group ($P < 0.05, P < 0.01$), but RRE low dose group showed no significant difference; viscera indexes of spleen and liver were significantly increased in RRE low, medium and high dose groups ($P < 0.01$), with improvement in inflammation changes of in liver and spleen tissues. The levels of MDA and MPO were significantly decreased in RRE low, medium and high dose groups and Dex group ($P < 0.05, P < 0.01$), while the levels of SOD and NO were significantly decreased only in RRE high dose group and Dex group; Foxp3 protein expression was significantly up-regulated in RRE middle, high dose groups and Dex group ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** RRE has obvious anti-inflammatory activity, indicating that RRE can improve liver and spleen injury, increase the levels of MDA and MPO in liver tissues, and increase the expression of Foxp3 in the spleen tissues in AIA rats to enhance the body's immune tolerance ability.

[Key words] Rubiae Radix et Rhizoma extract; adjuvant-induced arthritis; anti-inflammatory activity; superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde (MDA); myeloperoxidase (MPO); nitric oxide (NO); forkhead box P3 (Foxp3)

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的慢性、炎症性、以疼痛、滑膜增生和关节软骨及骨的侵蚀为特征的系统性自身免疫性疾病。初期出现中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞等大量炎症性细胞的浸润,中晚期出现关节软骨和骨的损伤,导致关节畸形^[1],通常会引引起其他脏器病变,例如心脏、肺脏、肝脏、脾脏等器官^[2-3]。有关研究表明,氧化应激性反应是导致类风湿关节炎 (RA) 的一个重要因素,长期治疗、生活方式的改变、关节疼痛和功能受限等使 RA 患者处于应激状态,机体出现脂质过氧化反应,氧自由基 (ROS) 的生成增加,而清除 ROS 的能力下降。一氧化氮 (NO) 是生物体内一种反应性极强的自由基,丙二醛 (MDA) 的含量可以反映出组织细胞受自由基攻击后氧化损伤的程度,髓过氧化物酶 (MPO) 的活性是嗜中性粒细胞的组织清除自由基的能力标志,同时也能显示组织的损伤

程度,超氧化物歧化酶 (SOD) 为专一的超氧阴离子自由基清除剂,其活力大小间接反映机体组织清除氧自由基的能力,因此降低氧自由基的含量可以减轻肝脏组织损伤。另外,核转录因子叉状头/翅状螺旋转录因子 3 (Foxp3) 是一种具有抑制 T 细胞表达细胞因子能力的转录因子,可发挥调节细胞免疫的重要功能,引发机体的免疫耐受^[4-5]。

茜草性味苦寒,具有凉血止血、祛瘀通经等功效,用于关节痹痛、跌扑肿痛等。现代药理研究表明,茜草具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、护肝、免疫抑制等作用^[6-14]。本课题组前期研究表明,茜草总蒽醌是茜草醇提物的主要成分,而且毒性不大^[15]。前期研究结果还显示其对角叉菜胶致大鼠足肿胀模型也有显著的抗炎作用。但茜草对佐剂性关节炎 (AIA) 大鼠肝脏、脾脏损伤及 Foxp3 的影响研究不多。本研究以茜草醇提物干预 AIA 大鼠模型,观察其对大

鼠肝脏、脾脏组织形态的影响,测定肝脏组织中氧化应激指标及的含量,并结合免疫组化法测定脾脏组织中 Foxp3 的表达水平,探讨茜草醇提物对 AIA 大鼠肝脏、脾脏损伤及脾脏组织中 Foxp3 的表达影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 72 只,体质量 180 ~ 220 g,雄性,购自南方医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2016-0041,符合广州中医药大学实验动物伦理委员会规定,于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级实验条件下进行。

1.2 药物及试剂 茜草由广东省药材公司中药饮片厂提供,经广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺研究员鉴定为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* 的干燥根及根茎。地塞米松(广东华南药业集团有限公司,批号 160401);弗氏完全佐剂(CFA,美国 Sigma 公司,批号 1002237101);超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),髓过氧化物酶(MPO),一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170614,20170613,20170609,20170613);一抗兔抗鼠 Foxp3(NOVUS,批号 F-1);二抗 DAB 试剂盒(美国 CST 公司,批号 11725),其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 Synergy2 型全波长扫描吸收光酶标仪(美国 BioTek 公司),EL204 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),BK-DM500 型数码显微镜(重庆奥体光学显微镜有限公司),LEICA2015-RM 型切片机(德国莱卡有限公司)。

2 方法

2.1 茜草醇提物的制备 取茜草粉末 600 g,分别加入 10,8,6 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,50 °C 减压干燥浓缩至 1 g·mL⁻¹,纯水稀释成不同浓度,4 °C 保存备用。

2.2 动物分组及给药 取 72 只雄性 Wistar 大鼠,按照大鼠体质量随机分为 6 组,分别为正常组、模型组、地塞米松组(0.125 mg·kg⁻¹),茜草醇提物高、中、低剂量(10,5,2.5 g·kg⁻¹)组,每组 12 只,适应性喂养 7 d 后,参考 AIA 造模方法^[16],除正常组外,模型组与各治疗组分别于大鼠右后足跖皮下注射的弗氏完全佐剂 0.1 mL,正常组大鼠相同位置皮下注射等量的生理盐水。造模期间,观察记录大鼠关节红肿、皮下结节、红斑等情况,每 3 d 测量 1 次大鼠体质量和足肿胀度。致炎 14 d 后,除模型组外,各治疗组开始给药,正常组给予等量的蒸馏水,连续灌胃给药 21 d。

2.3 观测指标 观察致炎后各组大鼠行走活动、精神状况、饮食、饮水、皮毛色泽、体质量及四肢关节肿胀情况。

2.4 足肿胀度的测定 分别在造模 0,7,14 d 及给药后每 3 d 测定各组大鼠致炎侧足体积,计算足跖肿胀度及肿胀抑制率。

$$\text{肿胀度 } E(\%) = (V_1 - V_0) / V_0 \quad (V_1, V_0 \text{ 分别代表给药后各时间点足跖体积和给药 } 0 \text{ d 的足跖体积})$$

2.5 脏器指数 末次给药 24 h 后,0.3% 的戊巴比妥腹腔注射麻醉,无菌分离肝脏和脾脏,用冰的生理盐水冲洗干净,称质量,计算脏器指数。

$$\text{肝脏/脾脏指数} = \text{肝脏/脾脏质量} / \text{各组大鼠体质量}$$

2.6 肝脏组织匀浆中过氧化物的测定 无菌分离完整肝脏,称取肝脏 1 g,按 1:9 的比例加入预冷生理盐水,在冰面上匀浆处理,离心(3 500 r·min⁻¹,10 min,4 °C),取肝脏匀浆上清。按照试剂盒操作测定 SOD,MDA,NO 和 MPO 的含量。

2.7 苏木素-伊红(HE)染色观察组织形态学改变 分别剪取 1 cm × 1 cm 大小的肝脏和完整脾脏,用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,脱蜡,HE 染色,脱水封片,于光学显微镜下观察组织形态学改变。

2.8 免疫组化法检测脾脏组织中 Foxp3 的表达情况 采用免疫组化二步法测定 Foxp3 蛋白表达,将石蜡切片脱蜡,由 3% 的过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,兔抗大鼠 Foxp3 多克隆抗体,4 °C 孵育过夜,洗涤后,用山羊抗兔二抗孵育 1 h,DAB 显色。Foxp3 蛋白阳性反应产物呈棕黄色颗粒,免疫组化切片用光学显微镜拍照,每张片随机选取 5 个视野,图片使用 IPP6.0 病理图像分析软件测定各组免疫阳性产物的积分吸光度 IA。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布数据,各组间比较采用单因素方差分析;非正态分布数据采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AIA 大鼠体质量和一般情况的影响 给药期间,与正常组比较,模型组大鼠体质量增长缓慢($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,在给药 6 d 后,地塞米松组大鼠体质量增长缓慢,部分大鼠出现腹泻,可能与地塞米松对胃肠道有一定的副作用有关($P < 0.01$),茜草醇提物高剂量组体质量增长缓慢($P < 0.05, P < 0.01$),而茜草醇提物低、中剂量组大鼠体质量增长率无统计学差异。见表 1。与正常

组比较,模型组大鼠致炎侧关节红肿明显,甚者足跖底部溃烂,膝关节变性严重,足跖关节有结节产生,行动迟缓,毛色光泽变暗且有少许脱落;与模型组比

较,茜草各剂量组大鼠足关节肿胀减轻,行动有所改善,地塞米松组大鼠足肿胀显著减轻,足跖关节结节减少,行动正常。

表 1 茜草醇提物对 AIA 大鼠体质量增长率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	给药 3 d	给药 6 d	给药 9 d	给药 12 d	给药 15 d	给药 18 d	给药 21 d	%
正常	-	44.21 ± 5.40	50.32 ± 7.31	57.20 ± 6.91	60.04 ± 7.26	62.50 ± 8.14	65.52 ± 8.64	67.81 ± 9.26	
模型	-	43.12 ± 6.01	46.64 ± 7.80	50.02 ± 7.81	54.44 ± 8.62	53.77 ± 8.91 ¹⁾	54.10 ± 8.72 ²⁾	57.90 ± 8.94 ¹⁾	
地塞米松	1.25×10^{-4}	39.40 ± 7.12	33.11 ± 8.72 ⁴⁾	31.70 ± 8.01 ⁴⁾	31.37 ± 8.94 ⁴⁾	28.40 ± 9.02 ⁴⁾	28.14 ± 9.02 ⁴⁾	27.32 ± 9.27 ⁴⁾	
茜草醇提物	2.5	43.13 ± 3.22	42.60 ± 5.54	49.83 ± 4.23	54.30 ± 4.22	53.91 ± 6.83	59.16 ± 7.30	62.60 ± 6.93 ³⁾	
	5	42.14 ± 5.72	44.23 ± 5.01	48.02 ± 6.61 ³⁾	54.24 ± 5.31 ⁴⁾	56.72 ± 6.56	56.50 ± 9.50	61.27 ± 9.13	
	10	36.11 ± 3.20 ³⁾	39.22 ± 3.81 ³⁾	39.16 ± 4.21	43.76 ± 4.82	44.34 ± 5.12 ⁴⁾	46.22 ± 6.56	48.42 ± 5.33	

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

3.2 对 AIA 大鼠足肿胀的影响 与正常组比较,在造模 7 d,模型组大鼠右后足肿胀显著($P < 0.01$),造模 14 d 大鼠足肿胀显著($P < 0.01$);与模型组比较,在给药 3 d,地塞米松组大鼠右后足肿胀度显著下降($P < 0.01$),并持续到给药 21 d($P <$

0.01),在给药 6 d,茜草醇提物高、中剂量组大鼠致炎侧足肿胀度明显下降($P < 0.05$),给药 12 d 后,茜草醇提物中、高剂量组大鼠足肿胀明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),茜草醇提物低剂量组大鼠足肿胀度下降,但无显著性差异。见表 2。

表 2 茜草醇提物对 AIA 大鼠足肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	造模 7 d	造模 14 d	给药 3 d	给药 6 d	给药 9 d	mL
正常	-	0.06 ± 0.11	0.06 ± 0.10	0.06 ± 0.09	0.02 ± 0.09	0.06 ± 0.11	
模型	-	0.69 ± 0.09 ²⁾	0.68 ± 0.14 ²⁾	0.68 ± 0.17 ²⁾	0.83 ± 0.07 ²⁾	0.71 ± 0.15 ²⁾	
地塞米松	1.25×10^{-4}	0.68 ± 0.11	0.56 ± 0.10	0.23 ± 0.09 ⁴⁾	0.21 ± 0.10 ⁴⁾	0.09 ± 0.08 ⁴⁾	
茜草醇提物	2.5	0.76 ± 0.12	0.64 ± 0.14	0.61 ± 0.12	0.65 ± 0.14	0.65 ± 0.14	
	5	0.70 ± 0.11	0.54 ± 0.14	0.58 ± 0.18	0.52 ± 0.17 ³⁾	0.44 ± 0.14	
	10	0.72 ± 0.08	0.63 ± 0.10	0.52 ± 0.19	0.51 ± 0.06 ³⁾	0.39 ± 0.10 ³⁾	

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	给药 12 d	给药 15 d	给药 18 d	给药 21 d
正常	-	0.02 ± 0.08	0.02 ± 0.07	0.02 ± 0.09	0.05 ± 0.09
模型	-	0.62 ± 0.12 ²⁾	0.57 ± 0.08 ²⁾	0.53 ± 0.08 ²⁾	0.66 ± 0.13 ²⁾
地塞米松	1.25×10^{-4}	0.13 ± 0.08 ⁴⁾	0.11 ± 0.07 ⁴⁾	0.08 ± 0.11 ⁴⁾	0.08 ± 0.07 ⁴⁾
茜草醇提物	2.5	0.53 ± 0.11	0.48 ± 0.07	0.48 ± 0.11	0.49 ± 0.11
	5	0.44 ± 0.14	0.33 ± 0.14 ³⁾	0.34 ± 0.12 ³⁾	0.33 ± 0.08 ³⁾
	10	0.34 ± 0.06 ⁴⁾	0.31 ± 0.06 ⁴⁾	0.28 ± 0.05 ⁴⁾	0.24 ± 0.07 ⁴⁾

3.3 对 AIA 大鼠脾脏和肝脏脏器指数的影响 与正常组比较,模型组 AIA 大鼠脾脏与肝脏指数明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松组、茜草醇提物低、中、高剂量组 AIA 大鼠脾脏、肝脏指数均显著升高,差异有显著性意义($P < 0.01$)。见表 3。

3.4 对 AIA 大鼠肝脏组织中 SOD, NO, MDA 和 MPO 的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织

中 MDA 与 MPO 水平明显增加($P < 0.05, P < 0.01$),而 SOD 与 NO 水平无显著性差异;与模型组比较,茜草醇提物低、高剂量组及地塞米松组大鼠肝脏组织中 MDA 和 MPO 水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),茜草醇提物高剂量组和地塞米松组中大鼠肝脏组织中 SOD 水平显著升高($P < 0.01$),而 NO 的水平仅在茜草醇提物高剂量组中显著减少($P < 0.01$)。见表 4。

表 3 茜草醇提取物对 AIA 大鼠脾脏和肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 3 Effect of Rubiae Radix et Rhizoma extract on spleen and liver viscera index in AIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	脾脏指数	肝脏指数
正常	-	2.15 ± 0.23	31.43 ± 3.23
模型	-	1.78 ± 0.07 ¹⁾	25.50 ± 1.00 ²⁾
地塞米松	1.25 × 10 ⁻⁴	2.15 ± 0.18 ⁴⁾	35.07 ± 3.03 ⁴⁾
茜草醇提取物	2.5	2.09 ± 0.24 ⁴⁾	33.14 ± 2.46 ⁴⁾
	5	2.14 ± 0.21 ⁴⁾	35.22 ± 2.11 ⁴⁾
	10	2.11 ± 0.26 ⁴⁾	33.77 ± 2.48 ⁴⁾

表 4 茜草醇提取物对 AIA 大鼠肝脏组织中 SOD, NO, MDA 和 MPO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	NO/ $\mu mol \cdot g^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot g^{-1}$	MPO/ $U \cdot L^{-1}$
正常	-	576.08 ± 168.49	0.08 ± 0.02	3.10 ± 1.51	0.20 ± 0.03
模型	-	369.75 ± 154.78	0.13 ± 0.04	6.00 ± 2.27 ¹⁾	0.31 ± 0.05 ²⁾
地塞米松	1.25 × 10 ⁻⁴	707.65 ± 95.84 ⁴⁾	0.21 ± 0.04	3.19 ± 0.78 ³⁾	0.20 ± 0.04 ⁴⁾
茜草醇提取物	2.5	565.29 ± 185.23	0.08 ± 0.03	3.46 ± 1.22 ³⁾	0.19 ± 0.05 ⁴⁾
	5	568.15 ± 211.56	0.12 ± 0.02	3.89 ± 1.33	0.31 ± 0.05
	10	719.17 ± 218.38 ⁴⁾	0.04 ± 0.01 ⁴⁾	2.85 ± 0.80 ⁴⁾	0.2 ± 0.080 ³⁾

脾小体结构清晰,未见萎缩,脾索及脾窦结构完整,其中可见巨噬细胞,未见明显充血性改变;模型组大鼠脾脏组织被膜不光滑,脾小体结构不清晰,发生明显的萎缩,淋巴细胞明显减少,脾窦发生明显的充血性改变;茜草醇提取物低、中、高剂量组大鼠脾脏组织可见,脾小体结构清晰,但有轻微的萎缩,脾窦发生轻微充血,病理损伤情况较模型组均有明显改变,其中以茜草醇提取物高剂量组较为明显。见图 2。

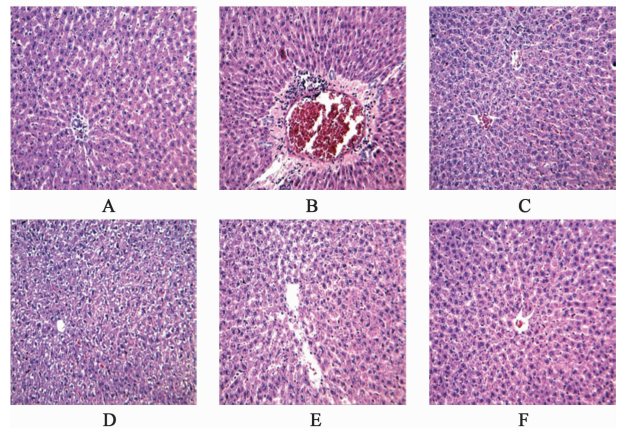
3.6 对 AIA 大鼠脾脏组织中 Foxp3 表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠脾脏组织中 Foxp3 表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,茜草醇提取物中、高剂量组及地塞米松组大鼠脾脏中 Foxp3 的表达明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),茜草醇提取物低剂量组大鼠肝脏中 Foxp3 的表达降低,但无显著性差异。见表 5,图 3。

4 讨论

RA 作为一种慢性、炎症性、系统性自身免疫性疾病,在世界范围内普遍存在,其中我国的患病率为 0.32% ~ 0.36%,是造成我国人群丧失劳动力和致残的主要病因之一^[17]。近几年研究表明,氧化应激在 RA 的发生发展中起到重要作用。由于氧化应激而产生过量的自由基,可通过脂质过氧化等途径诱导组织细胞损伤,引起氧化应激^[18]。茜草作为一种

3.5 茜草醇提取物对 AIA 大鼠肝脏、脾脏组织形态的影响 正常组大鼠肝脏肝小叶中央静脉周围肝板结构排列规则整齐,小叶结构完整;模型组大鼠肝板结构不清,肝小叶周边汇管区周围肝细胞发生明显肿胀及坏死,大量炎性细胞浸润;茜草醇提取物低、中、高剂量组肝小叶中央静脉周围少量肝细胞发生轻微的肿胀,少量肝细胞核发生固缩,但未见明显的坏死细胞,肝板结构排列基本规则,病理损伤情况较模型组有明显改善。见图 1。

正常组大鼠脾脏组织中红、白髓边缘带清晰,



A. 正常组; B. 模型组; C. 地塞米松组; D. 茜草醇提取物 2.5 $g \cdot kg^{-1}$ 组; E. 茜草醇提取物 5 $g \cdot kg^{-1}$ 组; F. 茜草醇提取物 10 $g \cdot kg^{-1}$ 组(图 2, 3 同)
图 1 茜草醇提取物对 AIA 大鼠肝脏组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Rubiae Radix et Rhizoma extract on pathological changes of liver tissues in AIA rats (HE, ×100)

传统的中药,对其抗炎、抗氧化作用研究比较多,并且发挥抗炎、抗氧化作用成分主要是蒽醌类,有研究表明茜草 70% 乙醇提取物中主要含蒽醌类化合物,故本实验选择用 70% 乙醇提取物,前期研究显示其对角叉菜胶致大鼠足肿胀模型也有显著的抗炎作用。

机体内常见的自由基包括,NO,MDA 和 MPO,

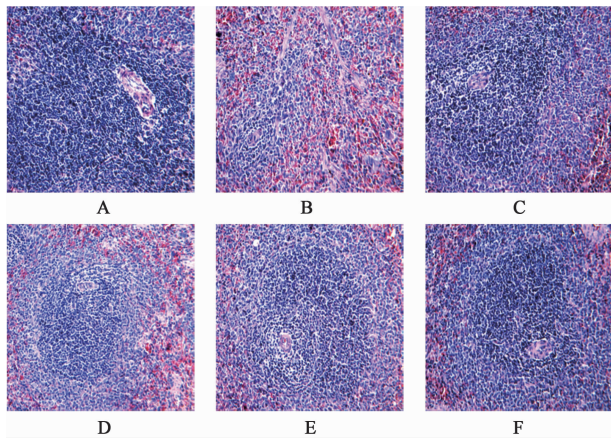


图 2 茜草醇提取物对 AIA 大鼠脾脏组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effect of Rubiae Radix et Rhizoma extract on pathological changes of spleen tissues in AIA rats (HE, ×100)

表 5 茜草醇提取物对 AIA 大鼠脾脏组织中 Foxp3 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Rubiae Radix et Rhizoma extract on level of Foxp3 of spleen tissues in AIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Foxp3
正常	-	0.27 ± 0.01
模型	-	0.14 ± 0.01 ²⁾
地塞米松	1.25×10^{-4}	0.28 ± 0.01 ⁴⁾
茜草醇提取物	2.5	0.18 ± 0.01
	5	0.21 ± 0.01 ³⁾
	10	0.31 ± 0.05 ⁴⁾

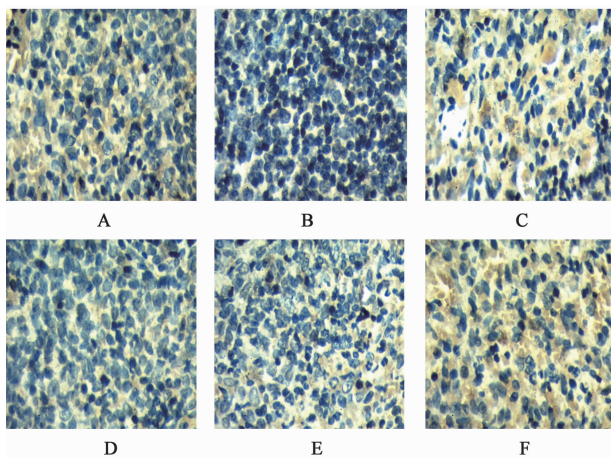


图 3 AIA 大鼠脾脏组织中 Foxp3 的表达 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Expression of Foxp3 in spleen tissues in AIA rats (IHC, ×400)

其中 MDA 的含量可以反映组织细胞受自由基攻击后氧化损伤的程度, MPO 的活性是嗜中性粒细胞的标志, 同时也能显示组织的损伤程度。SOD 是一种

清除超氧阴离子自由基的重要抗氧化酶, 其活力的高低可以间接反映清除自由基的能力。RA 不仅引起关节部位的病变, 通常还会累及肝脏、脾脏等器官。本研究结果表明, 模型组大鼠致炎侧关节红肿明显, 足跖关节有结节产生, 甚者足跖底部溃烂, 膝关节变性严重, 行动迟缓, 提示造模成功; 经茜草醇提取物及地塞米松处理后, 茜草醇提取物中、高剂量组大鼠足肿胀显著降低, 证明茜草醇提取物能抑制 AIA 大鼠足肿胀。

为探讨茜草醇提取物对 AIA 大鼠肝脏损伤的影响, 通过计算大鼠肝脏指数, 测定肝脏组织中过氧化物指标的含量及观察组织形态学变化, 结果表明给药组肝脏指数显著升高, MDA 和 MPO 的含量显著上升, 茜草醇提取物各剂量组及地塞米松组脏器指数显著下降, MDA 和 MPO 的含量显著降低, 肝窦充血、肝细胞肿胀及坏死情况较模型组有明显改善, 说明茜草醇提取物改善 AIA 大鼠肝脏损伤机制之一可能是抗脂质过氧化作用, 减轻氧化应激程度。

Foxp3 是具有免疫抑制功能的免疫调节细胞的重要标志, 存在于 CD4⁺, CD25⁺ 和 Treg 细胞上特异性表达的一种核转录因子, 在维持机体免疫耐受状态、控制感染以及肿瘤免疫中发挥着重要作用^[19-20]。在多种自身免疫性疾病中, Treg 的数量明显减少, Foxp3 的表达降低^[21]。为了探讨茜草醇提取物对 AIA 大鼠脾脏功能和 Foxp3 表达的影响, 通过计算大鼠脾脏指数、脾脏组织 HE 染色、免疫组化测定 Foxp3 蛋白表达情况。本研究结果表明, 茜草醇提取物可以明显降低脾脏指数, 组织病理损伤情况较模型组显著改善, 茜草醇提取物各剂量组及地塞米松组 Foxp3 的表达显著增加, 表明茜草醇提取物在体内可以通过刺激 Foxp3 的表达, 使机体调节 T 细胞的发育, 进一步减轻局部炎症的发生, 最终达到抑制细胞免疫的作用。

综上所述, 茜草醇提取物具有显著的抗炎作用, 并通过降低肝脏中氧化应激指标, 减轻氧化应激程度来改善肝脏损伤, 上调 Foxp3 的表达水平改善脾脏损伤, 增强机体的免疫耐受能力。RA 的发生发展过程比较复杂, 炎症反应一直伴随始终, 急、慢炎症发作持续反复交替, 导致关节、肝脏及脾脏组织损伤, Foxp3 如何调控 T 淋巴细胞分化、增殖, 还有待进一步研究。另有研究证明茜草具有明显的抗炎、抗氧化作用, 并且对多种急慢性炎症均有较好的作用, 毒副作用较小, 在一些自身免疫性疾病的治疗上

具有良好的前景,但其抗炎机制还有待更深入地探讨。

[参考文献]

[1] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. Nature, 2003, 423(6937):356-361.

[2] 刘健, 万磊, 盛长健, 等. 佐剂性关节炎大鼠肺功能变化与 Foxp3、TGF- β_1 /Smads 信号传导通路的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(3):258-263.

[3] 纵瑞凯, 刘健. 类风湿关节炎关节外病变研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2010, 22(9):833-836.

[4] Regateiro F S, Chen Y, Kendal A R, et al. Foxp3 expression is required for the induction of therapeutic tissue tolerance [J]. J Immunol, 2012, 189(8):3947-3956.

[5] Andersen M H. FOXP3-specific immunity [J]. Oncoimmunology, 2013, 2(10):e26247.

[6] 王玖. 基于数据挖掘的溃疡性结肠炎核心方药分析及苦参、茜草对细胞炎性因子的影响[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.

[7] Shilpa P N, Sivaramakrishnan V, Niranjali D S. Induction of apoptosis by methanolic extract of *Rubia cordifolia* Linn in HEp-2 cell line is mediated by reactive oxygen species[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6):2753-2758.

[8] 王艳双, 罗速. 茜草蒽醌诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及其分子机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6):763-767.

[9] ZHU Z G, JIN H, YU P J, et al. Mollugin inhibits the inflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages by blocking the Janus kinase-signal transducers and activators of transcription signaling pathway[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(3):399-406.

[10] Lee Y M, Auh Q S, Lee D W, et al. Involvement of Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1 in mollugin-induced growth inhibition and apoptosis in human oral cancer cells[J]. Biomed Res Int, 2013, doi:10.1155/2013/210604.

[11] Lopez-Exposito I, Castillo A, Yang N, et al. Chinese

herbal extracts of *Rubia cordifolia* and *Dianthus superbus* suppress IgE production and prevent peanut-induced anaphylaxis[J]. Chin Med, 2011, 6(1):35.

[12] Lodi S, Sharma V, Kansal L. The protective effect of *Rubia cordifolia* against lead nitrate-induced immune response impairment and kidney oxidative damage[J]. Indian J Pharmacol, 2011, 43(4):441-444.

[13] Shilpa P N, Venkatabalasubramanian S, Devaraj S N. Ameliorative effect of methanol extract of *Rubia cordifolia* in *N*-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma [J]. Pharm Biol, 2012, 50(3):376-383.

[14] 单鸣秋, 陈星, 李娟, 等. 茜草与茜草炭对大鼠急性性血瘀模型的影响比较研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3):493-497.

[15] 郑作亮, 李盛青, 钟瑜萍, 等. 茜草醇提物对大鼠肝、肾及结肠的毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12):151-156.

[16] Moudgil K D, Kim P, Brahn E. Advances in rheumatoid arthritis animal models[J]. Curr Rheumatol Rep, 2011, 13(5):456-463.

[17] Williams R O. What have we learned about the pathogenesis of rheumatoid arthritis from TNF-targeted therapy [J]. Isrn Immunol, 2012, doi: 10.5402/2012/652739.

[18] 齐亚军, 刘健, 郑力, 等. 基于 B、T 淋巴细胞衰减因子及氧化应激探讨新风胶囊治疗强直性脊柱炎的作用机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(1):25-32.

[19] 范晓彬, 李文星, 陈炳合, 等. 连翘对重症急性胰腺炎大鼠肝组织中 NF- κ B 和 Foxp3 表达的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(7):503-507.

[20] 杨爽, 汤玉瑜. FOXP3 在调节免疫应答中的作用[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(3):262-268.

[21] 姜婷, 纪文岩, 隋永妮, 等. 新血府逐瘀汤对动脉粥样硬化模型大鼠主动脉形态及免疫调节因子 HMGB-1、Foxp3 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(4):480-483.

[责任编辑 周冰冰]