

# 赤雹根总皂苷对 RA 大鼠足跖组织中核转录因子、白介素 6 和白介素 10 mRNA 表达水平的影响

顾士栋, 阎昊, 邹君, 佟继铭, 曹凯\*

(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

**[摘要]** **目的:** 研究赤雹根总皂苷(STDR)对类风湿性关节炎(RA)大鼠足跖组织中核转录因子(NF- $\kappa$ B)p65 mRNA、白介素 6(IL-6)mRNA、白介素 10(IL-10) mRNA 相对表达水平的影响。**方法:** 雄性 SD 大鼠 80 只, 随机取 10 只大鼠作为正常对照, 其余大鼠采用弗氏完全佐剂诱导佐剂性关节炎, 将造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组, 赤雹根总皂苷 160, 80, 40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组和雷公藤多苷 12 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组, 各组分别给予相应药物, 模型组 ig 蒸馏水, 连续 21 d。RT-PCR 法检测足跖组织中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA, IL-6 mRNA, IL-10 mRNA 表达水平。**结果:** 与对照组比较, 模型组 NF- $\kappa$ B p65 和 IL-6 的表达显著增高( $P < 0.01$ ), IL-10 的表达明显降低( $P < 0.01$ ); STDR 40, 80, 160 mg·kg<sup>-1</sup>剂量组大鼠足跖组织中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA, IL-6 mRNA 相对表达水平均显著低于模型对照组( $P < 0.01$ ); STDR 各剂量组大鼠足跖组织中 IL-10 mRNA 相对表达水平均显著高于模型对照组( $P < 0.01$ )。**结论:** 调节 NF- $\kappa$ B p65 mRNA, IL-6 mRNA 和 IL-10 mRNA 表达水平是 STDR 治疗 RA 的作用机制之一。

**[关键词]** 赤雹根总皂苷; 类风湿性关节炎; 核转录因子; 白介素 6; 白介素 10

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0202-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013180202

## Effect of Saponins of *Thladiantha dubia* on Expression Level of NF- $\kappa$ B, IL-6 and IL-10 mRNA in Paw Tissue of Rats with RA

GU Shi-dong, YAN Hao, ZOU Jun, TONG Ji-ming, CAO Kai\*

(Key Laboratory of Study and Exploiture for New Drugs of Traditional Chinese Medicine (TCM), Institute of TCM Medica of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of the saponins of *Thladiantha dubia* (STDR) on the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 mRNA, interleukin (IL)-6 mRNA and IL-10 mRNA expression in tissue of rheumatoid arthritis (RA) rat's paw. **Method:** Fifty male SD rats were randomly taked 10 as control group, and the rest used Freund's adjuvant induced adjuvant arthritis. Fifty rats which successfully induced by adjuvant were randomly divided into five groups: model group, SRTD 160, 80, 40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> groups and Tripterygium glycosides 12 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> group. Each group was given corresponding medicine, group model and control group was given distilled water, for 21 days. The expression of NF- $\kappa$ B p65 mRNA, IL-6 mRNA, IL-10 mRNA was detected by RT-PCR. **Result:** Compared with nomal control group, the expression of NF- $\kappa$ B p65 and IL-6 mRNA increased significantly ( $P < 0.01$ ), and the expression of IL-10 decreased significantly ( $P < 0.01$ ) in the model group group. The relative expression levels of NF- $\kappa$ B p65 mRNA IL-6 mRNA of the three STDR groups were significantly lower than the model group ( $P < 0.01$ ); while the relative expression levels of IL-10 mRNA of STDR

**[收稿日期]** 20130121(018)

**[基金项目]** 河北省自然科学基金项目(C200800655);河北省教育厅重大项目(ZD2010131)

**[第一作者]** 顾士栋, 硕士研究生, 从事药理学研究, E-mail:gsd82@163.com

**[通讯作者]** \*曹凯, 医学硕士, 硕士研究生导师, 从事中药生物化学研究, Tel:0314-2290999, E-mail:caokai58@163.com

groups were significantly higher than the model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The therapeutic effect on RA rats maybe related to decreasing the expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and IL-6 mRNA, and increasing IL-10 mRNA.

[**Key words**] STDR; rheumatoid arthritis; NF- $\kappa$ B; IL-6; IL-10

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜慢性炎症为主的全身性自身免疫性疾病,病变呈持续性、反复发作过程,具有极高的致残率,严重危害人民的身体健康。目前尚无根治性办法,是世界医学界公认难治性疾病之一<sup>[1-2]</sup>。传统 RA 治疗药有非甾体抗炎药、控制病情的抗风湿药及糖皮质激素三类,但存在治标不治本、起效慢或严重毒副作用等。由于存在用药几年后出现明显毒副作用以及逐渐失去临床疗效,导致多数患者病情得不到长期有效控制。本课题组前期研究发现,赤菴根总皂苷(saponins of *Thladiantha dubia* root, STDR)有明显的抗炎镇痛活性,可明显降低佐剂性关节炎大鼠血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)的含量<sup>[3-5]</sup>。本文探讨 STDR 对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用与炎症组织中核转录因子(NF- $\kappa$ B) p65 mRNA, IL-6 mRNA, IL-10 mRNA 表达水平的关系,进一步从分子机制调控方面探讨赤菴根总皂苷对 RA 治疗的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SD 大鼠(SPF 级),体重 160~180 g,购自购于北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK(京)2009-0007。

**1.2 药品与试剂** 赤菴根 2011 年 9 月采自河北省青龙满族自治县,由承德医学院中药研究所赵春颖副研究员鉴定为葫芦科多年蔓生草本植物赤菴的干燥成熟块根,STDR 由承德医学院中药研究所药理毒理实验室制备,紫外分光光度法测得 STDR 含量 55.2%;弗氏完全佐剂(FCA,美国 Sigma 公司, F5881 型,批号 100M8725);雷公藤多苷片(安徽新陇海药业有限公司,批号 110301);PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号 BK4501];DNA marker(北京天根生化科技有限公司,批号 k0228);PCR 扩增引物(美国 Invitrogen 生命技术公司,批号 HB120706536)。其他试剂均为市售分析纯。

**1.3 仪器** SORVALL Biofuge fresco 冷冻离心机(德国 Kendro Labrotary 公司);SIM-F124 制冰机(日本 SANYO 公司);DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 模型制备<sup>[6]</sup>与分组** 雄性 SD 大鼠 80 只,随机取 10 只为正常对照。其余 70 只,每只大鼠右后足跖皮下注射 FCA 0.1 mL。致炎后第 18 天,采用关节炎分数评分法计算关节炎指数 AI<sup>[7]</sup>。0 级:无红肿,0 分;1 级:跖关节稍肿,1 分;2 级:小趾关节及足跖关节肿胀,2 分;3 级:踝关节以下足爪肿胀,3 分;4 级:包括踝关节在内的全部关节肿胀,4 分。AI 值 = 非致炎 3 只肢体关节肿胀级之和(最高分为 12 分)。AI 值  $\geq 6$  为造模成功的标准,将造模成功大鼠随机分为模型对照组,STDR 低、中、高(40, 80, 160 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量组和雷公藤多苷(12 mg·kg<sup>-1</sup>)组,每组 10 只。空白组和模型组 ig 给予蒸馏水,其余各组灌胃给予相应药物,给药容积为 10 mL·kg<sup>-1</sup>,各组连续给药 21 d。于给药第 22 天,处死大鼠,取炎症组织。

**2.2 检测组织 NF- $\kappa$ B p65 mRNA, IL-6 mRNA, IL-10 mRNA 的表达**

**2.2.1 提取总 RNA** 采用 Trizol 一步法提取足趾组织的总 RNA 经紫外分光光度计测量 RNA 纯度及浓度,计算样品总 RNA 浓度,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。

**2.2.2 逆转录为 cDNA** 以此模版进行 PCR 扩增,引物序列及扩增产物长度见表 1。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外投影仪观察并摄取图像。应用 Quantity One 软件进行定量分析,以目的条带的吸光度与  $\beta$ -actin 条带吸光度的比值,作为目的基因 mRNA 表达的相对水平。

**2.3 统计学分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,经 SPSS 17.0 统计软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析。所有检验均以  $P < 0.01$  为有显著性差异。

## 3 结果

STDR 对各组大鼠足跖组织中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA, IL-6 mRNA, IL-10 mRNA 表达的影响 与对照组比较,模型组 NF- $\kappa$ B p65 和 IL-6 的表达显著增高( $P < 0.01$ ),IL-10 的表达明显降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,STDR 各剂量组 NF- $\kappa$ B p65, IL-6 mRNA 的表达显著降低( $P < 0.01$ ),并呈一定的剂量依赖关系,IL-10 mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ )。见表 2,图 1。

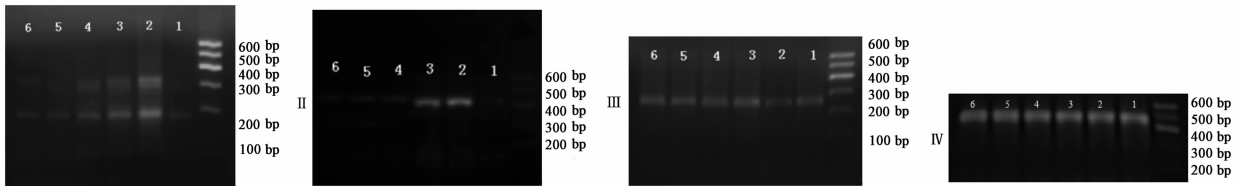
表 1 PCR 引物序列及扩增条件

基因	引物序列	退火温度/°C	产物长度/bp
NF- $\kappa$ B p65	上游 5'-ATCTGTTTCCCCTCATCTTTCC-3'	59	170
	下游 5'-TGGGTGCGTCTTAGTGGTATCT-3'		
IL-6	上游 5'-GAGAAAAGAGTTGTGCAATGGC-3'	62	444
	下游 5'-ACTAGGTTTCCGACTAGACC-3'		
IL-10	上游 5'-GATTCCATCCGGGTGACAA-3'	55	252
	下游 5'-GATTTCTGGGCCATGGTTCTCTG-3'		
$\beta$ -actin	上游 5'-CATCCTGCGTCTGGACCT-3'	53	480
	下游 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'		

表 2 STDR 对 RA 大鼠 NF- $\kappa$ B p65 mRNA, IL-6 mRNA, IL-10 mRNA 相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin	IL-6/ $\beta$ -actin	IL-10/ $\beta$ -actin
空白对照	-	0.096 $\pm$ 0.010 <sup>1)</sup>	0.144 $\pm$ 0.021 <sup>1)</sup>	0.295 $\pm$ 0.034
模型对照	-	0.615 $\pm$ 0.073	0.706 $\pm$ 0.074	0.153 $\pm$ 0.022
STDR	40	0.405 $\pm$ 0.048 <sup>1)</sup>	0.536 $\pm$ 0.050 <sup>1)</sup>	0.272 $\pm$ 0.024 <sup>1)</sup>
	80	0.164 $\pm$ 0.017 <sup>1)</sup>	0.115 $\pm$ 0.022 <sup>1)</sup>	0.280 $\pm$ 0.029 <sup>1)</sup>
	160	0.063 $\pm$ 0.009 <sup>1)</sup>	0.081 $\pm$ 0.014 <sup>1)</sup>	0.254 $\pm$ 0.026 <sup>1)</sup>
雷公藤多苷	12	0.062 $\pm$ 0.008 <sup>1)</sup>	0.055 $\pm$ 0.011 <sup>1)</sup>	0.254 $\pm$ 0.018 <sup>1)</sup>

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。



1. 空白对照组; 2. 模型对照组; 3. STDR 40 mg·kg<sup>-1</sup>组; 4. STDR 80 mg·kg<sup>-1</sup>组;  
5. STDR 160 mg·kg<sup>-1</sup>组; 6. 雷公藤多苷 12 mg·kg<sup>-1</sup>组(图 2~4 同)

图 1 STDR 对 RA 大鼠足跖组织中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA ( I ), IL-6 mRNA ( II ), IL-10 mRNA ( III ), A-actin mRNA ( IV ) 的影响

#### 4 讨论

大量研究发现,在 RA 炎性反应中 NF- $\kappa$ B 表达和活化水平显著升高,激活这一途径对 RA 的发生、发展有重要意义。NF- $\kappa$ B 活化后可增强 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, 黏附分子、粒单集落刺激因子、环氧酶 2 等基因的转录水平,同时 NF- $\kappa$ B 活化又是 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等表达增强的正反馈结果,两者构成一反馈机制,使类风湿关节炎炎症反应和结构破坏得以维持与进展<sup>[8]</sup>。Benito 等<sup>[9]</sup> 研究显示,RA 患者 NF- $\kappa$ B 活化细胞数显著高于关节内其他非软骨与血管翳部位,提示 NF- $\kappa$ B 与血管翳的行成、软骨侵蚀密切相关,在 RA 患者的关节破坏中起重要作用。本研究结果证实,模型对照组中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达较空白对照组明显增高,STDR 各剂量组均能显著下调 RA 大鼠足跖组织 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达,且有

一定的剂量依赖关系。提示 STDR 对类风湿性关节炎大鼠治疗作用与抑制 NF- $\kappa$ B 活化途径有关,可能是 STDR 治疗 RA 的机制之一。

IL-6 是由免疫应答中活化的单核细胞产生的一种多效性细胞因子,在自身免疫疾病中起到诱发和维持免疫炎症反应的功能,是引起 RA 滑膜炎及关节损伤的重要介质之一。IL-6 的水平变化不仅与类风湿关节炎免疫炎症及骨质破坏有关,其水平高低还反应了类风湿关节炎的病情活动变化<sup>[10]</sup>。IL-10 是一种具有很强免疫调控和在炎症发生发展过程中有重要抑制作用的抗炎性细胞因子,可抑制多种促炎性细胞因子的表达和产生而表现其抗炎作用<sup>[11-12]</sup>。本实验结果证实,与空白组比较,模型对照组 IL-6 的表达显著升高,IL-10 的表达明显降低,与文献报道一致。经 STDR 治疗后,STDR 各剂量

组均能明显降低 IL-6 mRNA 表达水平,并显著提高 IL-10 mRNA 表达水平,差异具有统计学意义。且 IL-6 与 IL-10 表达降低或升高的程度与模型大鼠关节炎症状改善程度呈正相关,提示 STDR 治疗类风湿关节炎作用可能与其抑制促炎性因子 IL-6 和升高炎性抑制因子 IL-10 表达有关。

本课题组前期研究发现,STDR 有明显的抗炎镇痛活性,对 RA 大鼠具有治疗作用,可明显降低 RA 大鼠血清中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 的含量<sup>[3,4]</sup>。本研究结果表明,经 STDR 治疗后,与模型对照组比较,各给药组 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 及促炎性因子 IL-6 mRNA 表达水平显著降低,且呈一定的剂量依赖关系,而炎性抑制因子 IL-10 mRNA 表达水平显著升高。结果提示,STDR 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,并诱导炎性细胞因子网络趋于平衡,而达到抑制 RA 病程,改善关节炎症状,降低关节炎指数,发挥治疗作用。

#### [参考文献]

[1] 陈曦,张成义. 类风湿关节炎的研究发展[J]. 中国老年杂志,2006,26(3):426.  
[2] 蒋红,焦娟. 中医外治类风湿性关节炎的研究进展[J]. 中国中医急症,2011,20(4):618.  
[3] 张玉玲,赵波,陈建双,等. 赤菴根镇痛作用及有效部位研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2483.  
[4] 陈建双,于海荣,张玉玲,等. 赤菴根总皂苷对类风湿

性关节炎大鼠血清细胞因子的影响[J]. 时珍国医国药,2010,23(5):1097.

[5] 于晓敏,刘玉玲,刘永平,等. 满药赤菴根总皂苷抗炎作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):227.  
[6] 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.  
[7] 徐叔云,卞如濂. 陈修. 药理实验方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,1991:70.  
[8] Bai S, Liu H, Chen K H, et al. NF- $\kappa$ B-regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(12):3844.  
[9] Benito M J, Murphy E, Murphy E P, et al. Increased synovial tissue NF-kappaB1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(6):1781.  
[10] 李强. 类风湿性关节炎患者 IL-6 水平的变化[J]. 广东医学,2007,28(5):712.  
[11] Isomaki P, Luukkainen R, Saario R, et al. Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium[J]. Arthritis Rheum, 1996, 39(12):386.  
[12] 范雪亮,肖金鱼. 关节炎大鼠模型血清中 IL-4、IL-10 表达的检测[J]. 中国中医急症,2011,20(7):1102.

[责任编辑 聂淑琴]

## 天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊,每期 8 元,年定价 96 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-83 电子邮件:zhongyiyao@vip.126.com, xuebaobj@126.com,网址:http://www.tjzhongyiyao.com,地址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。

《天津中医药大学学报》双月刊,每期 6 元,年定价 36 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-153,电子邮件:xuebaobj@vip.126.com, xuebaotxd@126.com,网址:http://www.tjzhongyiyao.com,地址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。