

# 雷公藤多苷片对胶原诱导性关节炎大鼠血清 HMGB1 和 IL-17 的影响

郑红梅\*, 晋松

(云南省第一人民医院风湿免疫科, 昆明 650032)

**[摘要]** 目的: 观察雷公藤多苷片对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠血清中高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box chromosomal protein 1, HMGB1) 及白介素 17(interleukin 17, IL-17) 含量的影响。方法: 40 只 SD 大鼠被随机分为正常对照组、模型对照组、甲氨喋呤对照组(3 mg·kg<sup>-1</sup>)、雷公藤多苷片低、高剂量组(5, 10 mg·kg<sup>-1</sup>)。用牛Ⅱ型胶原蛋白加不完全氟氏佐剂诱导大鼠关节炎模型, 于免疫 12 d 开始灌胃给药, 连续 4 周。CIA 大鼠模型建立后, 观察各组大鼠关节指数变化, 并采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中 HMGB1 和 IL-17 的含量。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠关节肿胀明显, 血清中 HMGB1 和 IL-17 含量明显升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 各治疗组大鼠关节肿胀程度均有一定程度缓解, 甲氨喋呤组和雷公藤多苷片高剂量组大鼠血清中 HMGB1 和 IL-17 的含量显著低于模型组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论: 雷公藤多苷片治疗 CIA 大鼠关节肿胀可能与降低血清中 HMGB1, IL-17 的含量相关。

**[关键词]** 雷公藤多苷片; 胶原诱导性关节炎; 高迁移率族蛋白 B1; 白介素 17

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0247-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013150247

## Effects of Glucosidorum Tripterygll Totorum Tablet on Serum HMGB1 and IL-17 in Rats with Collagen-induced Arthritis

ZHENG Hong-mei\*, JIN Song

(Department of Rheumatology, the First People's Hospital, Kunming 650032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of glucosidorum tripterygll totorum (GTT) tablet on serum high mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) and interleukin 17 (IL-17) in rats with collagen-induced arthritis. **Method:** Forty SD male rats were randomly divided into normal group, model group, methotrexate group (3 mg·kg<sup>-1</sup>), GTT tablet low dose group (5 mg·kg<sup>-1</sup>), and GTT tablet high dose (10 mg·kg<sup>-1</sup>) group. Collagen induced arthritis model was made by bovine type II collagen. The medicines were given to relevant groups 12 hours after the establishment of the model once a day for 4 weeks, then the changes of arthritis index (AI) were estimated, and the contents of HMGB1 and IL-17 were analyzed by ELISA. **Result:** The results showed that the AI of treated groups were significant different from CIA group. Compared with the normal control group rats, the contents of HMGB1 and IL-17 were increased significantly in CIA group rats ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Compared with the CIA group rats, the contents of HMGB1 and IL-17 were decreased significantly both in GTT tablet high dose group rats and methotrexate group rats ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** GTT tablet can improve the joint swell in CIA rats, it may be associated with lower HMGB1, IL-17 expression correlated.

**[Key words]** glucosidorum tripterygll totorum tablet; collagen induced arthritis; HMGB1; IL-17

关于雷公藤多苷片的研究现已比较广泛, 尤其在雷公藤多苷片对于类风湿性关节炎(RA)的治疗

方面。近年研究表明,高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)是 RA 和实验性关节炎动物中一种重要的新型晚期炎症介质<sup>[1-2]</sup>。降低 HMGB1 过度表达的干预治疗可能提供一种治疗 RA 等炎症性疾病的新方法。已有研究发现以 HMGB1 为靶点应用 HMGB1 抗体或重组 HMGB1 box A 蛋白在动物实验中取得了良好的疗效。白介素 17(IL-17)也在其中发挥重要作用,为了探究雷公藤多苷片在治疗 RA 过程中对 HMGB1,IL-17 的影响,此次研究通过 ELISA 方法,检测 CIA 大鼠血清中 HMGB1、IL-17 含量,探讨 RA 发病机理理论及雷公藤多苷片在治疗 RA 过程中的作用机理,为临床研究提供实验依据和参考。

### 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体重(160 ± 10)g,由昆明医科大学实验动物中心提供 SCXK(滇)2005-2008),在昆明医科大学实验动物中心清洁级动物室喂养,实验动物室许可证号 SCXK(滇)2005-0024。

**1.2 试剂与药物** 牛 II 型胶原(美国 Chondrex 公司,批号 100028)和不完全弗氏佐剂(美国 Chondrex 公司,批号 100106);大鼠 IL-17 ELISA 试剂盒(eBioscience 公司,批号 E09421-1239),大鼠 HMGB1 ELISA 试剂盒(德国 IBL 公司,批号 K907),雷公藤多苷片(黄石飞云制药有限公司,批号 040701);甲氨喋呤(MTX,上海医药有限公司信谊制药总厂,批号 120501)。

**1.3 仪器** Leica DMZ 生物显微镜(德国 Leica 公司),RM2245 型切片机(德国 Leica 公司),T10 BASIC 手持式分散机(德国 IKA 公司),Multiskan Mk3 酶标仪,Wellwash 4 Mk2 洗板机(美国 Thermo 公司)。

### 2 方法

**2.1 动物分组** 适应性喂养 1 周后,将 40 只按体重匹配随机分为正常对照组和模型对照组、甲氨喋呤(MTX)3.0 mg·kg<sup>-1</sup>组、雷公藤多苷片低、高剂量组(5,10 mg·kg<sup>-1</sup>),每组 8 只。

**2.2 造模和药物干预** 除正常对照组外,其余各组大鼠全部造模。参考文献方法<sup>[3-4]</sup>,建立大鼠 CIA 模型。取适量 2 g·L 牛 II 型胶原与等量不完全弗氏佐剂混合,充分乳化后,以滴加于水中不扩散为度,取乳化后的混合物按每只大鼠 200 μg II 型胶原,于尾根部皮下免疫,1 周后每只按 100 μg II 型胶原于尾根部皮下加强免疫 1 次。正常组以等量生理盐水于尾根部皮下假免疫。于免疫 12 d 开始 ig 给药,连

续 4 周。各组按 10 mL·kg<sup>-1</sup>的体积 ig,其中 MTX 组每周 1 次,其余组每天 1 次,空白对照组和模型组大鼠 ig 等量的生理盐水。

**2.3 取材方法** 各组大鼠于末次给药后第 2 天用新鲜配置的 3% 戊巴比妥按 40 mg·kg<sup>-1</sup>麻醉,仰卧固定于洁净工作台,腹主动脉取血,血标本于 4 ℃,3 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min,分离血清,置 -20 ℃保存,以备 HMGB1 及 IL-17 检测。

**2.3.1 关节炎指数(arthritis index, AI) 评分方法** 参照 5 级评分法评价<sup>[5]</sup>,将大鼠关节的病变更程度累计积分,计算出关节炎指数。0 分:无关节炎;1 分:小趾关节轻度肿胀;2 分:小趾关节和足跖肿胀;3 分:踝关节以下的足爪肿胀;4 分:包括踝关节在内全部关节肿胀。把各个关节的积分累计起来,即为每只大鼠的 AI,每只动物最大为 16 分。

**2.3.2 外周 HMGB1 和 IL-17 含量测定** 采用酶联免疫吸附测定法进行检测,具体步骤按照试剂盒说明书进行测定。

**2.4 统计学处理** 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析处理,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠 AI 的影响** 免疫后第 7 天各组大鼠 AI 比较无显著差异,免疫后第 28 天甲氨喋呤组和雷公藤多苷片高剂量组大鼠 AI 明显低于模型对照组(*P* < 0.01),其中以甲氨喋呤组降低最为明显,但两者比较无统计学差异。

表 1 雷公藤多苷对关节炎大鼠关节炎指数的变化影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ ) 分

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	AI	
		免疫后第 7 天	免疫后第 28 天
模型对照	-	6.50 ± 2.51	8.75 ± 2.55
甲氨喋呤	3	5.00 ± 3.07	4.88 ± 2.53 <sup>2)</sup>
雷公藤多苷	5	5.25 ± 2.71	6.63 ± 1.69
	10	5.13 ± 2.75	5.38 ± 1.77 <sup>2)</sup>

注:与模型对照组相比<sup>1)</sup>*P* < 0.05, <sup>2)</sup>*P* < 0.01(表 2 同)。

**3.2 对大鼠血清 HMGB1,IL-17 含量的影响** 采用 ELISA 法测定大鼠血清 HMGB1 含量,结果显示:模型对照组明显高于正常对照组(*P* < 0.01),甲氨喋呤组及雷公藤多苷片高剂量组大鼠血清 HMGB1 含量均明显低于模型对照组(*P* < 0.01),但两者比较无显著性差异;大鼠血清 IL-17 含量显示:模型对照

组大鼠血清中 IL-17 含量较空白对照组均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 甲氨喋呤组及雷公藤多苷片高剂量组均明显低于模型对照组 ( $P < 0.05$ ), 但两者比较无显著性差异 (表 2)。

表 2 雷公藤多苷对关节炎大鼠血清 HMGB1, IL-17 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	HMGB1/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-17/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照	-	$6.92 \pm 1.12^{(2)}$	$108.40 \pm 8.81^{(1)}$
模型对照	-	$10.88 \pm 1.96$	$227.45 \pm 28.52$
甲氨喋呤	3	$7.09 \pm 1.25^{(2)}$	$150.62 \pm 10.32^{(1)}$
雷公藤多苷	5	$9.42 \pm 1.53$	$206.68 \pm 20.62$
	10	$7.32 \pm 1.48^{(2)}$	$175.23 \pm 12.49^{(1)}$

#### 4 讨论

类风湿性关节炎是一种慢性免疫损伤导致的炎症性疾病, HMGB1 作为重要的晚期炎症因子, 可由损伤或坏死的细胞大量释放。近年来研究发现, RA 患者关节液和滑膜组织中 HMGB1 高表达, 并且在 RA 的发生发展中也起着重要作用, HMGB1 通过 RAGE 受体途径, 促进趋化作用, 并通过激活 NF- $\kappa$ B, 诱导炎症反应, 还可促进 IL-6 等分泌以加重炎症反应<sup>[6]</sup>。

作为新近研究热点的 IL-17, 其与 TNF- $\alpha$  和 IL-1 有着相同的特质, 相对于 TNF- $\alpha$  和 IL-1, IL-17 对 RA 局部炎症的作用更直接。IL-17 作用于成骨细胞, 增加 RANK 配体的表达, 后者刺激破骨细胞前体发育为成熟的破骨细胞, 也可以直接刺激成熟的破骨细胞发挥作用, 因此 IL-17 对炎症部位的持续性细胞浸润和诱导组织破坏具有更直接的作用, 是骨质吸收和骨质破坏的主要细胞因子之一<sup>[7-10]</sup>。此外, RA 患者的免疫状态呈现 Th1 细胞极化和 Th17 细胞水平的变化。免疫炎症过程中的机体免疫状态十分复杂, HMGB1 等介导炎症的效应分子与疾病状态下免疫细胞数量和功能变化的关系, 正引起人们的关注。有研究显示<sup>[11-12]</sup>, HMGB1 表达与 IL-17 的水平呈正相关, 说明 HMGB1 在调节 Th17 细胞分化中具有重要作用。

本研究结果表明, 大鼠 CIA 模型血清中 HMGB1 与 IL-17 均显著升高, 提示 HMGB1 除作为致炎分子直接参与炎症损伤外, 可能也发挥着对 Th17 等免疫细胞的调节作用, 从而加重炎症损伤。根据本研究的结果, 作者认为 Th17 在大鼠 CIA 模型发病过程中分泌高水平炎症因子 IL-17, 后者又促进了其他炎症因子 (如 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) 的释放, 通过某种方

式导致单核巨噬细胞等主动分泌晚期炎症因子 HMGB1, 使已经存在的因炎症致损的细胞所被动释放的 HMGB1 得以进一步积累。本研究显示, 中药雷公藤多苷片治疗 RA 有显著效果, 其作用机制可能是其中所含雷公藤多苷片甲素、雷公藤多苷片多苷等有效成分对炎性细胞因子在局部组织中含量的影响、炎性细胞因子受体的上调或下调以及与炎性细胞因子相关的表达有关, 也可能与其调节免疫功能, 纠正免疫异常相关。高表达的 HMGB1 可刺激滑膜巨噬细胞分泌 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  等炎性分子, 引起关节炎的临床症状, 而雷公藤多苷片可以降低 HMGB1 和 IL-17 的表达, 使 HMGB1 及 IL-17 在组织中的水平接近或者达到正常标准, 从而起到治疗 RA 的作用, 同时 HMGB1 与细胞因子 IL-17 在炎症反应中的相互作用及其机制尚需进一步的研究证实。

总之, 作为迄今为止惟一一个在 RA 中大量存在的 T 细胞来源的细胞因子, IL-17 可能成为评价 RA 病情和治疗疗效的一个新的免疫学指标, 并且和 HMGB1 关联密切。在雷公藤多苷片治疗 CIA 大鼠过程中对 HMGB1, IL-17 水平的检测, 有助于探讨 HMGB1 和 IL-17 在类风湿关节炎发病过程中的病理生理作用, 而且对 HMGB1, IL-17 的深入研究必将有助于对 RA 发生机制的进一步认识, 为 RA 治疗, 尤其是具有独特优势的天然药物方面提供更加科学的实验依据, 为 RA 的临床治疗开辟新的思路和研究领域。

#### [参考文献]

- [1] Pullerits R, Brisslert M, Jonsson I M, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1 [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(12): 3898.
- [2] Ulloa L, Batliwalla F M, Andersson U, et al. HMGB1 as a nuclear protein, cytokine and potential therapeutic target in arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(4): 876.
- [3] Xiao C, Li J, Dong X, et al. Anti-oxidative and TNF- $\alpha$  suppressive activities of puerarin derivative (4AC) in RAW264.7 cells and collagen-induced arthritic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 666(1/3): 242.
- [4] 赵宏艳, 王燕, 肖诚, 等. 不同品系、不同性别对大鼠 CIA 发病情况的比较研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(9): 761.

## 补骨脂生品及炮制品抗氧化活性

张伟,尹震花,彭涛,康文艺\*  
(黄河科技学院,郑州 450063)

**[摘要]** 目的:筛选补骨脂生品及 5 种炮制品(雷公法制补骨脂、炒盐补骨脂、酒炒补骨脂、炒补骨脂和盐蒸补骨脂)各石油醚(PE)部位、乙酸乙酯(EA)部位和正丁醇(BU)部位的体外抗氧化活性,并比较不同炮制方法对补骨脂抗氧化活性的影响。**方法:**以二丁基羟基甲苯(BHT)为阳性对照,利用清除二苯代苦味酰基(DPPH)和[2,2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐](ABTS)自由基以及铁离子还原/抗氧化(ferricreducing/antioxidant power assay, FRAP)3 种方法对补骨脂生品及炮制品各部位抗氧化活性进行评价。**结果:**雷公法补骨脂、炒盐补骨脂、酒炒补骨脂和炒补骨脂各 PE 部位清除 DPPH 自由基的能力( $IC_{50}$ 分别为 97.1,97.7,99.9 和 95.7  $mg \cdot L^{-1}$ )均低于补骨脂生品 PE 部位( $IC_{50} = 77.3 mg \cdot L^{-1}$ );补骨脂生品 PE 部位清除 ABTS 自由基的能力( $IC_{50} = 1.8 mg \cdot L^{-1}$ )强于阳性对照 BHT( $IC_{50} = 2.3 mg \cdot L^{-1}$ ),酒炒补骨脂和盐蒸补骨脂 BU 部位清除 ABTS 自由基的能力( $IC_{50}$ 为 5.8  $mg \cdot L^{-1}$ 和 5.1  $mg \cdot L^{-1}$ )均高于补骨脂生品正丁醇部位( $IC_{50} = 6.8 mg \cdot L^{-1}$ );5 种补骨脂炮制品各部位还原  $Fe^{3+}$  的能力均比补骨脂生品各部位低。**结论:**补骨脂生品及炮制品各部位显示出不同的抗氧化活性,且不同炮制方法抗氧化活性差距较大。

**[关键词]** 补骨脂; 抗氧化活性; 二苯代苦味酰基(DPPH); 2, 2'-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS); 铁离子还原/抗氧化(FRAP)

**[中图分类号]** R285.5,R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0250-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013150250

## Antioxidant Activity of *Psoralea corylifolia* and Different Processed Products

ZHANG Wei, YIN Zhen-hua, PENG Tao, KANG Wen-yi\*

**[收稿日期]** 20130206(009)

**[基金项目]** 河南省教育厅重点科学技术研究重点项目(13B360981);河南省科技厅重点项目(132102310261)

**[第一作者]** 张伟,硕士,副教授,从事中药活性成分研究,Tel: 0371-66607902, E-mail: zzzwwwqq@126.com

**[通讯作者]** \*康文艺,博士,教授,从事中药活性成分及新药研究,Tel: 0378-3880680, E-mail: kangwenyi@ hot.mail.com

- [ 5 ] Xiao C, Zhao L, Liu Z, et al. The effect of triptolide on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the Peyer's patch of DA rats with collagen induced arthritis [ J ]. Nat Prod Res, 2009, 23 ( 18 ): 1699.
- [ 6 ] Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, et al. RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease [ J ]. Curr Med Chem, 2010, 17 ( 21 ): 2232.
- [ 7 ] Schett G, Middleton S, Bolon B, et al. Additive bone-protective effects of anabolic treatment when used in conjunction with RANKL and tumor necrosis factor inhibition in two rat arthritis models [ J ]. Arthritis Rheum, 2005, 52 ( 5 ): 1604.
- [ 8 ] Shi L, Li X, Li B, et al. Expression of IL-17 and TNF- $\alpha$  in collagen-induced arthritis rats model [ J ]. Chin J Allergy Clin Immunol, 2009, 3 ( 2 ): 100.
- [ 9 ] Chao C, Chen S, Adamopoulos I, et al. Anti-IL-17A therapy protects against bone erosion in experimental models of rheumatoid arthritis [ J ]. Autoimmunity, 2011, 44 ( 3 ): 243.
- [ 10 ] Shi Y, Sandoghchian Shotorbani S, Su Z, et al. Enhanced HMGB1 expression may contribute to Th17 cells activation in rheumatoid arthritis [ J ]. Clin Dev Immunol, 2012 ( ID 295081 ): 1.
- [ 11 ] 贾瑛,郑健. 类风湿性关节炎患者血清 HMGB1 水平与其他炎症因子的相关性 [ J ]. 陕西医学杂志, 2011, 40 ( 3 ): 296.
- [ 12 ] Zhang F, Shi Y, Song Y, et al. The association of HMGB1 expression and neutrophil account or IL-17 level in the lung of asthmatic mouse [ J ]. Geriatrics & Health CARE, 2012, 18 ( 3 ): 144.

[责任编辑 聂淑琴]