

赤菴根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠血清 OPG/RANKL 水平的影响

邹君, 刘永平, 顾士栋, 阎昊, 佟继铭*

(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: 观察赤菴根总皂苷(TSTR)对佐剂性关节炎(AA)模型大鼠血清骨保护素(OPG)、核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)表达水平的影响, 探讨TSTR治疗类风湿性关节炎的机制。方法: SD大鼠, 随机取10只作为空白对照, 其余大鼠采用弗氏完全佐剂制备关节炎模型, 将造模成功的关节炎大鼠随机分为模型对照组、TSTR 40, 80, 160 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量组、雷公藤多苷 $12 \text{mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 阳性对照组。各组分别ig给予相应的药物, 模型对照组ig等容积的水。连续ig给药21 d后处死。采用ELISA法检测血清OPG, RANKL水平。结果: TSTR各剂量组大鼠血清RANKL水平分别为(98.74 \pm 10.17), (87.81 \pm 17.78), (77.75 \pm 14.61) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 均显著低于模型组(120.80 \pm 12.14) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); TSTR各剂量组血清OPG水平分别为(71.67 \pm 2.62), (77.50 \pm 0.93), (91.04 \pm 7.26) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 均显著高于模型组(53.64 \pm 3.46) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); TSTR各剂量组OPG/RANKL比值分别为0.71 \pm 0.08, 0.89 \pm 0.17, 1.13 \pm 0.24, 显著高于模型对照组0.43 \pm 0.06 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: TSTR可能通过影响OPG/RANKL系统而对破骨细胞功能产生影响, 从而防治骨破坏。

[关键词] 赤菴根总皂苷; 类风湿性关节炎; 骨保护素; 核因子- κ B受体活化因子配体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0218-03

[doi] 10.11653/syjf2013080218

Effect of Saponins from *Thladiantha dubia* Roots on Levels of OPG/RANKL in Serum of Rat with Rheumatoid Arthritis

ZOU Jun, LIU Yong-ping, GU Shi-dong, YAN Hao, TONG Ji-ming*

(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 study the effect of Saponins from *Thladiantha dubia* roots (TSTR) on serum levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in serum of rat with rheumatoid arthritis (RA). **Method:** SD rats were randomly taken ten rats as blank control group, the rest of the rats were prepared to RA rat model, which was established by freund's complete adjuvant. RA model rats were randomly divided into model group, positive control group, high dosage TSTR group, middle dosage TSTR group and low dosage TSTR group. TSTR groups were fed with TSTR (40, 80, 160 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), positive control group were fed with tripterygium (12 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). After intragastric administration for 21 days, serum levels of OPG and RANKL were evaluated by ELISA. **Result:** The levels of RANKL of the three TSTR groups (98.74 \pm 10.17), (87.81 \pm 17.78), (77.75 \pm 14.61) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ were significantly lower than the model group (120.80 \pm 12.14) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the levels of OPG (71.67 \pm 2.62), (77.50 \pm 0.93), (91.04 \pm 7.26) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ were significantly higher than the model group (53.64 \pm 3.46) $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$

[收稿日期] 20120912(018)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C200600863);河北省教育厅重大项目(ZD2010131)

[第一作者] 邹君,在读硕士研究生,从事中药药理毒理学研究

[通讯作者] *佟继铭,教授,硕士生导师,从事中药新药研究与开发研究,E-mail:tongjiming@163.com

($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared to the model group (0.43 ± 0.06), the ratio of OPG/RANKL (0.71 ± 0.08 , 0.89 ± 0.17 , 1.13 ± 0.24) were increased significantly in the three TSTR groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion: The prevention and therapeutic effect of TSTR on rheumatoid arthritis may be via the up-regulation of OPG and down-regulation of RANKL. This would affect the function of osteoclast.

[**Key words**] saponins from *Thladiantha dubia* roots; rheumatoid arthritis; OPG; RANKL

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性、全身性、自身免疫性综合征,其特征是外周关节的非特异性、对称性炎症,关节滑膜的慢性炎症、增生,形成血管翳,侵犯关节软骨、软骨下骨,韧带和肌腱,造成关节软骨、骨和关节囊破坏,最终导致关节畸形和功能丧失。在 RA 患者最为显著的病理特征就是持久性的关节滑膜炎引起的关节骨质破坏,现代研究已经证实破骨细胞参与了该病理过程,而骨保护素(OPG)/核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)系统在促进破骨细胞分化成熟的过程中起着重要的作用。赤菴(*Thladiantha dubia* Bunge, TDB)为葫芦科多年蔓生草本植物^[1],赤菴根为赤菴的干燥成熟块根,味苦性寒,主要用于治疗跌打损伤、瘰疬、臃肿、关节肿痛、行经腹痛、气滞胸痛、乳房胀痛等^[2],疗效显著,且无明显副作用。本课题组经前期研究证实赤菴根主要有效部位(TSTR)有很好的抗炎和镇痛作用,治疗 RA 疗效显著^[3,4]。本文旨在探讨 TSTR 治疗 RA 作用与调节 OPG/RANKL 系统的关系。

1 材料

1.1 药品与试剂 弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司,批号 100M8725),雷公藤多苷片(安徽新陇海药业有限公司,批号 110301),大鼠 OPG ELISA 试剂盒(上海索宝公司,批号 DRE20631),大鼠 RANKL ELISA 试剂盒(上海索宝公司,批号 DRE20520)。TSTR 由承德医学院中药研究所药理毒理研究室制备。

1.2 动物 6 周龄 SD 大鼠(雄性),体重 180 ~ 220 g,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。

1.3 仪器 Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo)。

2 方法

2.1 RA 模型的制备 雄性 SD 大鼠 60 只,随机抽取 10 只作为空白对照组,其余 50 只每只大鼠左后足跖皮内注射 0.1 mL 弗氏完全佐剂($12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)致炎,以在注射点周围出现明显的突起白泡为佳。致炎后第 18 天,采用关节炎分数评分计算关节炎指数(AI):0 级:无红肿,0 分;1 级:足小趾关节红肿,1

分;2 级:趾关节足跖部均红肿,2 分;3 级:踝关节以下均红肿,3 分;4 级:包括踝关节全部红肿,4 分。AI = 非致炎侧 3 只肢体关节肿胀级之和(最高分为 12 分)。AI ≥ 6 为造模成功标准,最终 30 只大鼠符合标准。将造模成功的大鼠随机分为模型组, TSTR 160, 80, 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组和阳性对照组(雷公藤多苷 12 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组 6 只。

2.2 给药 各组大鼠分别 ig 给予相应的药物,连续给药 21d,给药容积 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。模型组和空白对照组给予等体积蒸馏水。

2.3 指标的检测 于给药结束后第 2 天经腹主动脉采血,离心($3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),取血清, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存待测。采用 ELISA 法,按试剂盒操作步骤测定大鼠血清 RANKL 和 OPG 水平。

2.4 统计学分析 使用 SPSS 17.0 统计软件统计分析所有数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析。方差分析前进行齐性检验,采用 LSD 进行统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

各组大鼠血清 RANKL, OPG 水平的比较 TSTR 各剂量组大鼠血清 RANKL 水平均显著低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TSTR 各剂量组血清 OPG 水平均显著高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TSTR 各剂量组 OPG/RANKL 显著高于模型对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

4 讨论

目前大量研究证实破骨细胞的增殖和活化在 RA 关节内软骨和骨的破坏过程中起着核心作用^[5]。一般认为破骨细胞增殖活化的信号传导有两个途径:分别是 RANKL/RANK/NF- κ B 通路和炎症因子介导的非 RANKL/RANK/NF- κ B 依赖通路^[6-7]。Gravallese 等利用 RANKL 基因敲除小鼠模型诱发关节炎,发现虽然炎症仍然继续发展,但是基因敲除组小鼠骨质损伤比对照组显著减少^[8],这说明在这两条通路中 RANKL 介导的通路在 RA 关节炎骨破坏中起主要作用。RANKL 与 RANK 结合促进破骨细胞及其前体细胞分化成熟和活化,并阻止破骨细胞凋亡。OPG 是 RANKL 的天然阻滞受体,

表 1 赤菴根总皂苷 (TSTR) AA 模型大鼠血清 RANKL, OPG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	OPG/pmol·L ⁻¹	RANKL/pmol·L ⁻¹	OPG/RANKL
空白对照	-	98.34 ± 3.80	47.26 ± 4.87	2.04 ± 0.31
模型对照	-	53.64 ± 3.46 ²⁾	120.80 ± 12.14 ²⁾	0.43 ± 0.06 ²⁾
TSTR	40	71.67 ± 2.62 ^{2,3)}	98.74 ± 10.17 ^{2,3)}	0.71 ± 0.08 ^{2,3)}
	80	77.50 ± 0.93 ^{2,4)}	87.81 ± 17.78 ^{2,4)}	0.89 ± 0.17 ^{2,4)}
	160	91.04 ± 7.26 ^{1,4)}	77.75 ± 14.61 ^{2,4)}	1.13 ± 0.24 ^{2,4)}
雷公藤多苷	12	83.33 ± 3.97 ^{2,4)}	88.60 ± 9.02 ^{2,4)}	0.93 ± 0.13 ^{2,4)}

注:与空白对照组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01。

可阻断其与 RANK 的结合,发挥抑制作用。AA 模型小鼠 OPG 阻滞实验发现 OPG 能显著减轻关节软骨和软骨下骨的破坏^[9]。

本实验所选的阳性对照药雷公藤多苷是公认疗效显著的抗风湿药,临床应用广泛。有研究证实雷公藤多苷能抑制关节炎骨破坏,而且抑制 RANKL 的表达是其可能的机制之一^[10]。赤菴根作为疗效确切的抗风湿药,本多年来从多方面研究赤菴根对 RA 的治疗作用,研究表明赤菴根对 AA 模型大鼠疗效显著,能明显减轻 AA 模型大鼠的疼痛反应和炎症反应^[3-4]还能影响多种炎症因子在血清和组织中的表达^[11]。本研究对实验大鼠关节组织病理检查发现治疗组组织的破坏程度显著轻于模型组,由此推测赤菴根可能有阻止骨破坏的作用,而本课题组选取 OPG/RANKL 这对与骨破坏关系最为密切的因子也证实了这个观点。

本研究结果显示 AA 模型大鼠血清 OPG 水平明显下降,RANKL 水平明显升高,OPG/RANKL 比值明显下降。查阅有关文献发现 OPG 水平降低和升高都有报道^[12-13],但是 OPG 升高程度较 RANKL 低,最终结果都是 RANKL 水平和 OPG/RANKL 降低,所以 OPG/RANKL 才是关键。本实验中 TSTR 各组 and 阳性对照组 OPG/RANKL 与模型组相比均显著升高,但还是不能恢复到正常组水平,由此揭示 TSTR 和雷公藤多苷一样,都只能改善 RA 大鼠骨破坏,不能完全阻止。总之,本课题组研究发现 TSTR 是一个全方位多靶点的抗 RA 药。

[参考文献]

[1] 宋立人,红恂,丁绪亮,等. 现代中药大辞典(上册) [M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1022.
[2] 河北省革命委员会. 河北中草药 [M]. 石家庄:河北人民出版社,1977:741.
[3] 刘永平,陈建双,赵波,等. 赤菴根总皂苷对实验性佐剂型关节炎镇痛作用的研究 [J]. 辽宁中医杂志,

2011,38(8):1659.
[4] 佟继铭,赵波,张玉玲. 赤菴果水提物对佐剂性关节炎大鼠抗炎作用及机制研究 [J]. 承德医学院学报, 2010,27(4):348.
[5] Nosaka K, Miyamoto T, Sakai T, et al. Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia: overexpression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand on adult T-cell leukemia cells [J]. Blood, 2002, 99:634.
[6] Sabokbar A, Kudo O, Athanasou N A. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis [J]. Orthop Res, 2003, 21:73.
[7] Zhang Y H, Heulsmann A, Tondravi M M, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways [J]. Biol Chem, 2001, 76:563.
[8] Gravallesse E M. Bone destruction in arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61:84.
[9] Koch A, Campagnuolo G, Bolon, et al. Kinetics of bone protection by recombinant osteoprotegerin (OPG) therapy in Lewis rats with mycobacteria-induced adjuvant arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44:S267.
[10] 罗波,胡永红,张明敏,等. 雷公藤多苷对佐剂性关节炎模型大鼠关节中核因子 κ B 受体激活剂配基表达的影响 [J]. 医药导报, 2006, 25(5):395.
[11] 陈建双,张玉玲,李莎莎,等. 赤菴根总皂苷对佐剂性关节炎大鼠脾淋巴细胞及腹腔巨噬细胞的影响 [J]. 山东医药, 2011, 51(44):22.
[12] 樊秋贵,郭钧,杨民. OPG RANKL RANK 等因子在类风湿关节炎患者血清及滑膜液中的变化及意义 [J]. 中华风湿病学杂志, 2007, 11(1):38.
[13] Feuerherm A J, Borset M, Seidel C, et al. Elevated levels of osteoprotegerin and hepatocyte growth factor in rheumatoid arthritis stand [J]. Rheumatol, 2001, 30(4):229.

[责任编辑 聂淑琴]