

桑黄多糖对类风湿性关节炎模型大鼠关节滑膜经典 Wnt 信号的影响*

缪成贵^{1,2,3}, 周国梁², 秦梅颂², 陈建中², 李成凤²

1. 安徽科技学院 食品药品学院(凤阳 233100); 2. 安徽医科大学 药学院(合肥 230032);

3. 安徽科技学院 家禽疫病监测安徽省重点实验室(凤阳 233100)

【摘要】 目的 研究中药桑黄中活性成分多糖(PPS)对类风湿性关节炎(RA)模型大鼠的治疗作用和对 RA 模型大鼠滑膜组织经典 Wnt 信号的影响。方法 将 SD 雄性大鼠随机分为 3 组:正常组、模型组和 PPS 组,每组 10 只。模型组和 PPS 组于每只大鼠右后足趾皮内注射 0.1 mL 完全弗氏佐剂致炎制作 RA 模型,正常组于相同部位注射等量 PBS;PPS 组在造模后第 8 d 给予 50 mg/kg PPS 灌胃治疗,每日 1 次,至第 32 d,其余两组代之以等量生理盐水灌胃。造模后第 16、20、24、28、32 d 对各组大鼠进行关节炎评分和足爪肿胀评分,造模后第 28 d 采用 real time qPCR 检测各组大鼠滑膜中 fibronectin 表达, Wnt 信号通路上游负调控基因 *SFRP1,2* 和通路关键基因 β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 的表达。结果 PPS 灌胃治疗后,RA 模型大鼠关节炎评分、足爪肿胀评分明显降低;与正常组相比,模型组大鼠滑膜中 *SFRP1,2* 表达明显降低, β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 和 fibronectin 表达明显升高;但经 PPS 灌胃治疗后,PPS 组滑膜中 *SFRP1,2* 表达明显升高, β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 和 fibronectin 表达明显降低。结论 PPS 对 RA 模型大鼠滑膜中 Wnt 信号具有抑制作用,对 RA 模型大鼠具有一定的治疗作用。

【关键词】 桑黄多糖 类风湿性关节炎 经典 Wnt 信号 β -catenin C-myc

Effect of Phellinus Polysaccharide on Canonical Wnt Signaling in Synovium in Rats with Rheumatoid Arthritis MIAO Cheng-gui^{1,2,3}, ZHOU Guo-liang², QIN Mei-song², CHEN Jian-zhong², LI Cheng-feng². 1. Food and Drug College, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China; 2. College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 3. Poultry Disease Monitoring Anhui Key Laboratory, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of Phellinus Polysaccharide (PPS) in activating canonical Wnt signaling in rats with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Male SD rats were randomly divided into three groups (normal group, RA model group and PPS treated RA group), each with 10 rats. The RA model rats were prepared through intradermal injection of 0.1 mL complete Freund's adjuvant into the right rear toes of the rats. The PPS treated RA rats were given 50 mg/kg PPS by gavage eight days after the introduction of RA. All rats were evaluated with arthritis score and paw swelling score at day 16, 20, 24, 28, 32. At day 28, the expressions of fibronectin gene, Wnt signal pathway negative regulation gene *SFRP1,2* and Wnt key gene β -catenin, *C-myc*, and *ccnd1* were detected by real time qPCR. **Results** PPS significantly reduced the arthritis score and paw swelling score of RA model rats. Lower levels of expression of *SFRP1,2* and higher levels of expression of β -catenin, *C-myc*, *ccnd1* and fibronectin were found in the RA model rats compared with the normal controls. PPS increased the expression of *SFRP1,2* and decreased the expression of β -catenin, *C-myc*, *ccnd1* and fibronectin in the RA rats. **Conclusion** PPS has significant therapeutic effect on RA model rats through inhibiting canonical Wnt signaling.

【Key words】 Phellinus polysaccharide Rheumatoid arthritis Canonical Wnt signaling β -catenin C-myc

类风湿性关节炎(RA)是一种以关节滑膜炎和软骨侵蚀为主要特征的慢性、全身性自身免疫性疾病,发病机制仍不清楚^[1,2]。多种信号通路调控 RA 发病机制,其中 Wnt 信号在 RA 中的作用研究起步

较晚,但研究证明其在 RA 发生过程中起重要调控作用,Wnt 通路相关分子可能是潜在的 RA 治疗靶点^[3,4]。桑黄是一种真菌,因寄生于桑树而得名。子实体无柄,菌盖扁半球形或马蹄形,木质浅肝褐色至暗灰色或黑色。桑黄主要分布于中国东北、华北、四川、云南等地,具有抑制尿酸、调节免疫力、诱导癌细胞凋亡、抑制癌细胞增殖及转移、减轻化疗和放疗的副作用,抗肝纤维化,促进肝细胞再生等药理作

* 国家自然科学基金(No. 81302783)、安徽科技学院科研项目(No. ZRC2014473)、滁州市科技局科研项目(No. 201306)和安徽省优秀青年人才项目(No. 98)资助

用^[5-9]。鉴于真菌多糖具有调节免疫力等作用,本实验以桑黄多糖(phellinus polysaccharide, PPS)为实验药物,研究其对 RA 模型大鼠的治疗作用和对 RA 模型大鼠滑膜中 Wnt 信号的影响,为 RA 治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器设备 Applied Biosystems Gene Amp StepOne™ Real-Time qPCR System; 美国 ABI 公司; 超净工作台, 江苏净化仪器设备有限公司; CO₂ 培养箱, Thermo; 倒置显微镜, 倒置荧光显微镜, 奥林巴斯; ChemiScope3400 Mini 化学发光成像, 上海勤翔科学仪器有限公司; 101AS-3 型数显恒温干燥箱, 上海浦东跃欣科学仪器厂。

1.1.2 药品试剂 PPS, 由安徽科技学院药学系药物化学实验室制备; 逆转录试剂盒, Fermentas; QuantiFast® SYBR® Green PCR 试剂盒, Qiagen; β -catenin, *C-myc*, *ccnd1*, *SFRP1*、*2* 等定量 PCR 引物均来自上海生工。

1.2 方法

1.2.1 PPS 制备 称取桑黄粉末置圆底烧瓶中, 按 1:20 的比例加入蒸馏水, 80 °C 恒温水浴锅中回流提取 2.5 h。抽滤, 取上清液。浓缩上清液, 加入 3 倍体积的 95% 乙醇(体积分数), 4 °C 冰箱中醇析 24 h, 3 000 r/min 离心 10 min。Savage 法除蛋白质, 所得沉淀物依次用无水乙醇和丙酮各洗涤 2 次。沉淀物于 70 °C 恒温箱中干燥至恒重, 即得 PPS。

1.2.2 动物分组及 RA 模型大鼠制备 SD 雄性大鼠, 体质量 180~200 g, 安徽医科大学实验动物中心提供(合格证号: 皖医动准 01 号), 随机分为 3 组: 正常组、模型组、PPS 组, 每组 10 只。模型组和 PPS 组于每只大鼠右后足趾皮内注射 0.1 mL 完全弗氏佐剂致炎, 正常组注射 0.1 mL PBS。PPS 组大鼠在造模后第 8 d 按 50 mg/kg 剂量灌胃给药 PPS, 每天 1 次, 给药至第 32 d, 其余 2 组代之以等量生理盐水灌胃。

1.2.3 RA 模型大鼠关节炎评分和足爪肿胀评分 在造模后第 16、20、24、28、32 d 5 个时间点对各组大鼠进行关节炎评分和足爪肿胀评分。大鼠关节炎评分对象包括 2 只耳朵, 1 只鼻子, 1 条尾巴, 4 只足爪共 8 个观测对象。每个观测对象出现结节或红肿记 1 分, 无结节和红肿记 0 分, 每只 RA 模型大鼠最高评分为 8 分。足爪肿胀评分对象包括 5 只指关节

或趾关节, 1 只腕关节或踝关节, 每只 RA 模型大鼠的足爪肿胀评分最大值为 24。模型组评分与正常组评分比较, 经统计学检验差异有统计学意义作为模型制备成功的依据。

1.2.4 Real time qPCR 检测大鼠滑膜中 fibronectin 的表达 各组大鼠造模后第 28 d 股动脉放血处死, 在超净台内分离大鼠膝关节滑膜组织, 采用 Trizol 法(Qiagen)提取滑膜总 RNA, 逆转录酶逆转录得到 cDNA。Real time qPCR 检测大鼠滑膜 RA 疾病相关基因 fibronectin mRNA 的表达。PCR 反应条件为: 94 °C, 15 s; 60 °C, 30 s, 72 °C, 30 s。共 40 个循环。引物序列见表 1。内参为 β -actin。

1.2.5 Real time qPCR 检测大鼠滑膜中 SFRP1、2 表达 取各组大鼠膝关节滑膜, 采用 real time qPCR 检测 *SFRP1*、*2* mRNA。*SFRP1*、*2* 定量 PCR 扩增反应条件为: 94 °C, 15 s; 60 °C, 30 s, 72 °C, 30 s。共 40 个循环。引物序列见表 1。

表 1 Real time qPCR 引物序列

Table 1 The primer sequence of real time qPCR

	5' to 3'	Product length (bp)
β -catenin	F:CTTACGGCAATCAGGAAAGC R:ACAGACAGCACCTTCAGCACT	133
<i>C-myc</i>	F:ATTTCTATCACCAGCAACAGCA R:ATTTCTATCACCAGCAACAGCA	138
<i>ccnd1</i>	F:GCCCTCCGTTTCTTACTTCAA R:CTCTTCGCACTTCTGTCTCCTC	109
<i>SFRP1</i>	F:GTGGGCTACAAGAAGATGGTG R:GAAGAGCGAGCAGAGGAAGAC	141
<i>SFRP2</i>	F:GGAGACAAAGAGCAAGACCATT R:GACCAGATAGGGAGCGTTGAT	136
Fibronectin	F:GACACTATGCGGGTCACTTG R:CCCAGGCAGGAGATTTGTTA	153
β -actin	F:CCCATCTATGAGGGTTACGC R:TTTAATGTACGC ACGATTTC	150

1.2.6 Real time qPCR 检测大鼠滑膜中 β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 表达 取各组大鼠膝关节滑膜, 采用 real time qPCR 检测 β -catenin、*C-myc* 和 *ccnd1* mRNA 的表达。 β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 定量 PCR 扩增反应条件为: 94 °C, 15 s; 60 °C, 30 s, 72 °C, 30 s。共 40 个循环。引物序列见表 1。

1.2.7 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 One-Way ANOVA 检验, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPS 对 RA 模型大鼠的治疗作用

如图 1 所示,在 5 个观测时间点,与正常组大鼠相比,模型组大鼠关节炎评分和足爪肿胀评分均增高($P < 0.05$);与模型组大鼠相比,PPS 组大鼠关节炎评分和足爪肿胀评分均降低($P < 0.05$)。

2.2 PPS 对 RA 模型大鼠滑膜 fibronectin 表达的影响

由图 2 可见,模型组大鼠滑膜中 fibronectin 表达较正常组升高($P < 0.05$);PPS 组大鼠滑膜中 fibronectin 表达较模型组降低($P < 0.05$)。

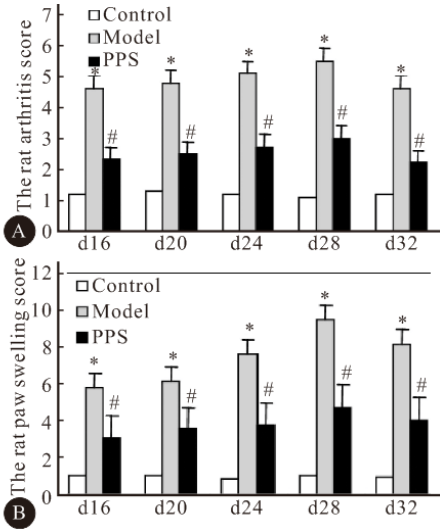


图 1 各组大鼠关节炎评分(A)和足爪肿胀评分(B)

Fig 1 Arthritis score (A) and paw swelling score (B) of rats

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. model group

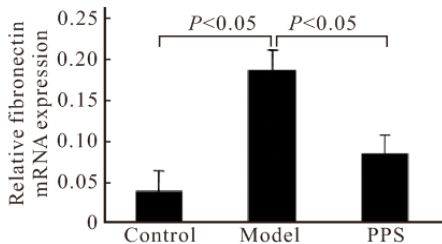


图 2 PPS 对 RA 模型大鼠 fibronectin 表达的影响

Fig 2 Effect of PPS on the expression of fibronectin in RA model rats

2.3 PPS 对 RA 模型大鼠滑膜 SFRP1、2 表达的影响

Real time qPCR 检测结果(图 3)显示,模型组 SFRP1 和 SFRP2 表达低于正常组($P < 0.05$), PPS 组大鼠 SFRP1 和 SFRP2 表达较模型组高($P < 0.05$)。

2.4 PPS 对 RA 模型大鼠滑膜 β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 表达的影响

结果(图 4)显示,与正常组相比,模型组大鼠滑膜中 β -catenin、*C-myc* 和 *ccnd1* 表达均升高($P < 0.05$),与模型组相比,PPS 组大鼠滑膜中 β -

catenin、*C-myc* 和 *ccnd1* 表达均降低($P < 0.05$)。

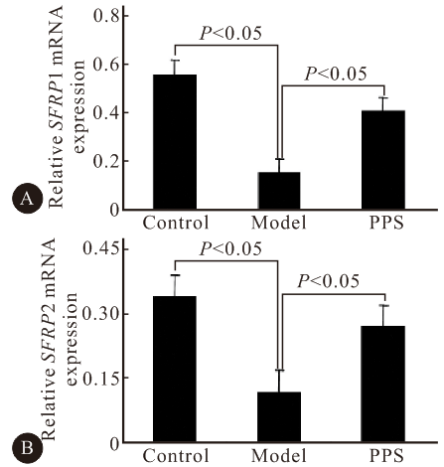


图 3 PPS 对 RA 模型大鼠 SFRP1(A)、2(B)表达的影响

Fig 3 Effect of PPS on the expression of SFRP1 (A), 2 (B) in RA model rats

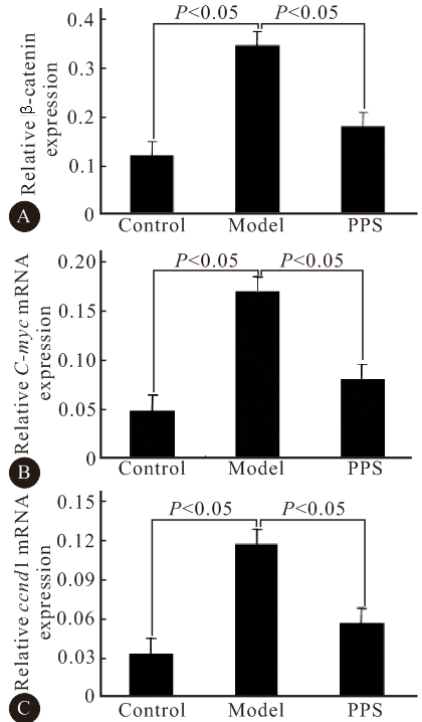


图 4 PPS 对 RA 模型大鼠 β -catenin(A)、*C-myc*(B)和 *ccnd1*(C)表达的影响

Fig 4 Effect of PPS on the expression of β -catenin (A), *C-myc* (B) and *ccnd1* (C) in RA model rats

3 讨论

RA 表现为持续慢性的滑膜炎症、软骨侵蚀和骨的不可逆性破坏。RA 病理机制与炎症因子过表达紧密相关,例如肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1、IL-6 等^[10]。TNF- α 在 RA 病理机制中发挥重要的作用。TNF- α 诱导其他炎症因子和黏附分子表达,增

加血管内皮层通透性, 诱发白细胞向关节滑膜的募集和渗入^[11]。有报道发现在 RA 发病机制中 TNF- α 上调破骨细胞和金属蛋白酶表达, 诱发骨的侵蚀, 造成骨的不可逆性破坏, 引发关节变形。Fibronectin 能促进异常增生滑膜与软骨表面的黏附, 促进成纤维样滑膜细胞增殖, 是 RA 病理相关基因^[12]。为研究 PPS 对 RA 模型大鼠的治疗作用, 本课题组分离正常组、模型组和 PPS 治疗组大鼠关节滑膜组织, real time qPCR 检测各组大鼠滑膜中 fibronectin 表达, 评价 PPS 对 RA 模型大鼠的治疗作用。结果表明, 50 mg/kg PPS 即能显著降低 fibronectin 表达。本实验共设计了 PPS 50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg 3 个剂量, 分别作为低剂量、中剂量、高剂量。通过预实验, PPS 低剂量即能显著影响 fibronectin 等研究指标表达, 因此本文只采用 50 mg/kg PPS 作为研究的药物剂量。

Wnt 信号通路参与了 RA 发病机制的调控, 在 RA 发生发展过程中发挥了重要作用。Wnt 蛋白能够与靶细胞胞外的 Fz/低密度脂蛋白受体蛋白复合物结合, 激动该受体复合物引发一系列的细胞内信号的传导^[13]。Wnt 通路关键分子 β -catenin、腺瘤性结肠息肉病蛋白 (APC)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)、酪蛋白激酶 1 (CK1)、散乱蛋白 (Dvl) 参与了 Wnt 通路胞内信号的传导。Wnt 信号通路激活状态下, Wnt 蛋白结合到 Fz 胞外区残基上, 胞内 Dvl 激活导致 GSK3 β 失活, 去磷酸化的 β -catenin 在细胞质中蓄积并进入细胞核中, 结合到淋巴细胞增强因子 (LEF)/TCF 转录因子上, 导致 *C-myc*、*ccnd1* 等靶基因的转录^[14]。*SFRP* 是 Wnt 信号上游负调控基因, 通过与细胞表面 Fz 受体竞争结合抑制 Wnt 蛋白与 Fz 结合引发的 Wnt 信号激活。*SFRP* 含 *SFRP1*、*2*、*3*、*4*、*5* 五个成员, 其中 *SFRP1*、*2*、*4*、*5* 含有丰富的甲基 CpG 岛, 能发生甲基化修饰致其表达降低^[15]。通过我们的研究发现, 与正常组相比, 模型组大鼠滑膜组织中 *SFRP1*、*2* 表达明显降低, 与模型组相比, PPS 治疗组大鼠滑膜中 *SFRP1*、*2* 表达显著升高, 我们同时也检测了 *SFRP4*、*5* 的表达, 但 *SFRP4*、*5* 的表达变化不显著 (文内未给出), 提示 *SFRP1*、*2* 与 PPS 对 RA 模型大鼠的治疗作用相关。Real time qPCR 同时检测 β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 在各组大鼠滑膜中的表达, 与正常组相比, 模型组大鼠滑膜组织中 β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 表达明显升高, 与模型组相比, PPS 治疗组大鼠滑膜中 β -catenin、*C-myc*、*ccnd1* 表达显著降

低, 提示 PPS 对 RA 模型大鼠滑膜中 Wnt 信号通路的激活有影响, PPS 可能通过抑制 Wnt 信号起到治疗 RA 模型大鼠的作用。

本实验提取分离桑黄主要化学成分多糖, 发现桑黄多糖对 RA 模型大鼠具有较好的治疗作用, 对 RA 模型大鼠滑膜经典 Wnt 信号具有抑制作用, 桑黄多糖对 RA 模型大鼠的治疗作用可能是通过对其 Wnt 信号的抑制实现的。本研究结果为桑黄的综合开发和 RA 中药治疗提供了新思路。

参 考 文 献

- Huang YJ, Shiao AL, Chen SY, *et al.* Multivalent structure of galectin-1-nanogold complex serves as potential therapeutics for rheumatoid arthritis by enhancing receptor clustering. *Eur Cell Mater*, 2012; 13(23): 170-181.
- Tedesco A, D' Agostino D, Soriente I, *et al.* A new strategy for the early diagnosis of rheumatoid arthritis: a combined approach. *Autoimmun Rev*, 2009; 8(3): 233-237.
- Miao CG, Yang YY, He X, *et al.* Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal*, 2013; 25(10): 2069-2078.
- Sen M, Reifert J, Lauterbach K, *et al.* Regulation of fibronectin and metalloproteinase expression by Wnt signaling in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum*, 2002; 46(11): 2867-2877.
- 汪雯翰, 张劲松, 杨焱等. Neuro-2A 神经元衰老细胞模型的构建及桑黄活性成分的筛选研究. *营养学报*, 2012; 34(2): 172-180.
- 戈延茹, 潘如, 傅海珍等. 离子液体双水相溶剂浮选法分离/富集桑黄黄酮类成分. *分析化学*, 2012; 40(2): 317-320.
- 张林芳, 邹莉. 桑黄多糖的研究进展. *中国食用菌*, 2012; 31(4): 1-4.
- 闫景坤, 马海乐, 祝子坪等. 桑黄菌胞内多糖的理化性质和体外抗氧化活性. *食品科学*, 2012; 33(9): 36-40.
- 孙军德, 张倩月. 桑黄菌丝体提取物的抗氧化活性研究. *农业科技与装备*, 2012; 216(6): 4-6.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, *et al.* Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*, 2008; 117(6): 244-279.
- Chang JT, Lichtenstein GR. Drug insight: antagonists of tumor-necrosis factoralpha in the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006; 3(2): 220-228.
- Feldmann M, Brennan FM, Williams RO, *et al.* The transfer of a laboratory based hypothesis to a clinically useful therapy: the development of anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2004; 18(8): 59-80.
- Stock M, Böhm C, Scholtyssek C, *et al.* Wnt inhibitory factor 1 deficiency uncouples cartilage and bone destruction in tumor necrosis factor α -mediated experimental arthritis. *Arthritis Rheum*, 2013; 65(9): 2310-2322.
- Lories RJ, Corr M, Lane NE. To Wnt or not to Wnt: the bone and joint health dilemma. *Nat Rev Rheumatol*, 2013; 9(6): 328-339.
- Lazarova DL, Chiaro C, Bordonaro M. Butyrate induced changes in Wnt-signaling specific gene expression in colorectal cancer cells. *BMC Res Notes*, 2014; 7: 226. doi:10.1186/1756-0500-7-226.

(2014-09-16 收稿, 2015-01-31 修回)

编辑 汤洁