

雷公藤甲素调节佐剂关节炎大鼠滑膜、脾脏、 胸腺组织细胞自噬的实验研究*

万磊¹, 刘健^{1△}, 黄传兵¹, 张晓军², 王亚黎³, 章平衡⁴, 孙玥¹, 刘磊¹

1. 安徽中医药大学第一附属医院 风湿免疫科(合肥 230031); 2. 安徽中医药大学中医临床学院(合肥 230038);
3. 安徽医科大学第四附属医院 中医科(合肥 230022); 4. 安徽中医药大学研究生院(合肥 230038)

【摘要】 目的 观察雷公藤甲素(TP)对佐剂关节炎(AA)大鼠滑膜脾脏胸腺自噬相关基因(Atg)/自噬标记蛋白(LC3-II)、Beclin1 表达和血清细胞因子水平的影响。方法 将大鼠随机分为4组:正常对照(NC)组,模型对照(MC)组,来氟米特(LEF)组,雷公藤甲素(TP)组,每组12只,后3组复制成AA大鼠模型。致炎后第13 d开始给药。NC组、MC组给予生理盐水灌胃,每天1次;LEF组按5 mg/kg的剂量灌胃,每天1次;TP组按50 μg/kg的剂量,每天1次。连续给药30 d。观察大鼠关节及其病理形态学变化,ELISA法检测血清细胞因子B淋巴细胞刺激因子(BAFF)、白介素(IL)-1、肿瘤坏死因子(TNF)-α、IL-15、IL-10 表达,RT-PCR法检测大鼠滑膜、脾脏、胸腺组织 Atg5、Atg7、Atg12 mRNA,Western blot法检测大鼠滑膜、脾脏、胸腺组织 LC3-II、Beclin1 蛋白表达。结果 治疗后,TP组和LEF组大鼠足趾肿胀度(E)和关节炎指数较MC组降低。与NC组比较,MC组大鼠血清BAFF、IL-1、TNF-α升高,IL-15、IL-10降低,滑膜 Atg5、Atg12 mRNA降低,脾脏 Atg5 mRNA降低,脾脏 Atg7、Atg12 mRNA及胸腺 Atg12 mRNA升高,滑膜、脾脏、胸腺组织 LC3-II、Beclin1 下降($P<0.05$ 或 0.01)。与MC组比较,TP组滑膜 Atg7、Atg12 mRNA降低,脾脏 Atg5、Atg7、Atg12 mRNA及胸腺中 Atg5、Atg7 mRNA降低,Atg12 mRNA升高;滑膜、脾脏、胸腺组织 LC3-II、Beclin1 升高($P<0.05$)。与LEF组比较,TP组TNF-α、BAFF降低,E、IL-15升高($P<0.05$ 或 0.01)。TP组滑膜 Atg7 mRNA及胸腺 Atg5、Atg7 mRNA表达降低,胸腺 Atg12 mRNA及脾脏 Atg5、Atg7、Atg12 mRNA表达升高。结论 TP通过调节滑膜、胸腺、脾脏组织细胞自噬,改善关节滑膜炎反应。

【关键词】 佐剂关节炎 细胞自噬 Atg LC3-II Beclin1 滑膜炎 雷公藤甲素

Effects of Triptolide on the Autophagy in Synovial, Spleen and Thymus of Rats with Adjuvant Arthritis WAN Lei¹, LIU Jian^{1△}, HUANG Chuan-bing¹, ZHANG Xiao-jun², WANG Ya-li³, ZHANG Ping-heng⁴, SUN Yue¹, LIU Lei¹. 1. Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Clinical Medicine College, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 3. Department of Chinese Medicine, the Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 4. Graduate College, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

△ Corresponding author, E-mail: liujianahzy@126.com

【Abstract】 Objective To determine the effect of triptolide (TP) on the expression of ATG /LC3-II Beclin1 in synovial, spleen, and thymus of rats with adjuvant arthritis (AA). **Methods** Rats were divided for four groups: normal control (NC), model control (MC), leflunomide (LEF) treatment, and triptolide (TP) treatment, with 12 rats in each group. The AA model was established through Freund's complete adjuvant (0.1 mL each) injection into the right foot plantar skin to introduce inflammation and 10 days of tail root injection of 0.05 mL Freund's complete adjuvant for immunity strengthening. Drug administration started 13 days after induction of inflammation. Rats in the NC and MC groups were given normal saline (1 mL/100 g) once a day for 30 days, compared with 5 mg/kg of oral LEF for the rats in the LEF group and 50 μg/kg of oral TP for the rats in the TP group. Paw swelling (E), joint arthritis index (AI) and joint pathological changes of the rats were recorded. The serum expressions of cytokines B lymphocyte stimulating factor (BAFF), interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF) alpha, IL-15, and IL-10 were detected by ELISA. The expressions of Atg5, Atg7, and Atg12 mRNA in synovial, spleen, and thymus of the rats were detected by RT-PCR. The expressions of LC3-II and Beclin1 in synovial, spleen, and

* 国家自然科学基金青年项目(No. 81403388)、安徽省自然科学基金项目(No. 1508085QH159)、安徽省重点实验室(No. 1606c08238)、安徽中医学院科技创新团队项目(No. 2010TD005)和安徽中医药大学校级基金(No. 2014qn025)资助

△ 通信作者, E-mail: liujianahzy@126.com

thymus of the rats were detected by Western blot assay. **Results** The AA model rats had lower serum BAFF, IL-1, TNF alpha, IL-15, and IL-10; lower *Atg5* and *Atg12* mRNA in synovial; lower *Atg5* mRNA, *Atg7*, and *Atg12* mRNA in spleen; higher *Atg12* mRNA in thymus; and lower LC3-II and Beclin1 in synovial, spleen and thymus ($P < 0.05$ or 0.01). TP treatment led to reduced paw swelling and arthritis index; declined *Atg7* and *Atg12* mRNA in synovial; declined *Atg5*, *Atg7* mRNA and *Atg12* mRNA in spleen; decreased *Atg5* and *Atg7* mRNA in thymus; increased *Atg12* mRNA in thymus; and increased LC3-II and Beclin1 in synovial, spleen and thymus ($P < 0.05$ or 0.01). Compared with rats treated with LEF, TP treated rats had lower TNF- α and BAFF and higher E and IL-15 ($P < 0.05$ or 0.01); as well as decreased expressions of *Atg7* mRNA (synovial) and *Atg5*, *Atg7* mRNA (thymus), and increased expressions of *Atg12* mRNA (thymus) and *Atg5*, *Atg7*, *Atg12* mRNA (spleen). **Conclusion** TP regulates autophagy in synovial, thymus and spleen of AA rats, and improves their joint inflammatory response.

[Key words] Adjuvant arthritis Autophagy Atg LC3-II/Beclin1 Synovial inflammation Triptolide

类风湿关节炎(RA)是一种以关节病变为主的慢性全身自身免疫性疾病。RA临床表现为关节肿痛、软骨破坏、关节间隙变窄,晚期会出现关节僵直、畸形、功能障碍^[1]。B细胞在RA的病理过程中具有重要作用。B细胞通过提供共刺激信号协助激活T细胞,进而分泌肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素(IL)-1、IL-6、IL-8、IL-17等炎症因子^[2]。RA患者的B细胞可出现在高度炎症分级的滑膜组织中^[3]。而细胞自噬同样在调节B细胞活化和RA炎症发生发展中起重要作用^[4]。来氟米特是目前治疗RA公认的有效药物。来氟米特可影响活化淋巴细胞的嘧啶合成,抑制T细胞、B细胞及非免疫细胞的增殖。不仅具有免疫抑制作用,还有明显的抗炎作用。雷公藤临床上常用来治疗RA^[5]。雷公藤可阻断嘧啶核苷酸的生物合成,具有抗炎、抑制免疫的作用。故本次研究选择来氟米特和雷公藤甲素作为研究药物。为进一步探讨细胞自噬在RA炎性反应中表达及雷公藤的作用机制,本研究采用佐剂关节炎(AA)大鼠模型,用雷公藤甲素进行干预,观察雷公藤甲素对AA大鼠滑膜形态学,细胞因子IL-15、IL-10、IL-1、TNF- α 、B淋巴细胞刺激因子(BAFF),自噬相关基因*Atg5/7/12*,自噬标记蛋白LC3-II、Beclin1蛋白表达。旨在探讨中药雷公藤治疗RA的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD雄性大鼠48只,由安徽省实验动物中心提供,5~6月龄、体质量(150±15)g,动物许可证号:scxk(皖)2011-002。

1.2 主要药品及试剂

1.2.1 药品 来氟米特片(LEF):10 mg/片,苏州长征-欣凯制药有限公司生产,批号2013102503;雷

公藤甲素(TP):100 mg/瓶(纯度>90%),上海源叶生物科技有限公司,批号20120802。

1.2.2 试剂 弗氏完全佐剂:10 mL/瓶, SIGMA公司,批号1001541106;细胞因子(IL-15、IL-10、BAFF、IL-1、TNF- α):上海源叶生物技术公司,批号:1305726R, 1305176R, 1307136R, 1307184R, 1307415R; PCR试剂盒: Thermo公司,批号:T00156032;引物及探针合成:美国 invitrogen公司;兔抗LC3-II:美国SA NTA公司,批号:Sc-271625;兔抗Beclin1:美国 abcam公司,批号:ab 62472。

1.3 主要仪器设备

足趾容积测量仪(上海欣软公司,型号:XR-YLS-7B);荧光定量PCR仪(Thermo,型号:PIKO REAL)。

1.4 建立AA模型及分组给药

将大鼠随机分为4组:正常对照(NC)组,模型对照(MC)组, LEF组, TP组,每组12只。除NC组外,其余3组均将弗氏完全佐剂(0.1 mL/只)注射于每只大鼠右后足跖皮内以致炎,制成AA模型,第10天将弗氏完全佐剂0.05 mL注射于尾根部加强免疫^[6]。第二次注射后第13天开始给药。NC组、MC组给予生理盐水,1次/d; LEF组:将LEF配制成混悬液(5 mg/kg)灌胃,1次/d; TP组:将TP粉末配制成混悬液(50 μ g/kg)灌胃,1次/d。连续给药30 d。

1.5 观察指标

1.5.1 大鼠足跖肿胀度(E)、关节炎指数(AI)的测算 给药前(0 d)和给药后第30天,按文献方法^[7-8]测量大鼠E和AI。给药前E为(给药前足容积-一致炎前足容积)/致炎前足容积 $\times 100\%$;给药后E为(给药后足容积-一致炎后足容积)/致炎后足容积 $\times 100\%$ 。大鼠足容积测定采用数字化压力容积法。AI评分:0分,无红肿;1分,小趾关节红肿;2

分,趾关节和足跖肿胀;3分,踝关节以下足爪肿胀。

1.5.2 大鼠关节滑膜病理观察 末次用药 24 h 后,处死大鼠,各组大鼠用 10%水合氯醛溶液于腹腔内注射麻醉(0.3 mL/100 g),大鼠取后足远端趾间关节,脱钙、石蜡包埋、切片。采用 HE 染色方法观察大鼠关节滑膜病理学变化。

1.5.3 ELISA 法检测大鼠血清中细胞因子的表达 末次用药 24 h 后,用 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉,行腹主动脉采血,将所采集血液 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液(血清),用 ELISA 法测定大鼠血清 BAFF、IL-15、IL-10、IL-1、TNF- α 表达量。用酶联仪在 450 nm 波长依序测量 BAFF、IL-15、IL-10、IL-1、TNF- α 的光密度值。根据 BAFF、IL-15、IL-10、IL-1、TNF- α 的光密度值测算其表达水平。

1.5.4 Real-time PCR 测定大鼠滑膜、脾脏、胸腺组织 *Atg5*、*Atg7*、*Atg12* mRNA 表达水平 末次用药 24 h 后,用 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉,选取大鼠滑膜、脾脏及胸腺组织。取组织 50~100 mg,剪碎,加入 1 mL TRIzol,使用组织匀浆器在冰上进行匀浆。提取 RNA。使用 Primer Premier5 软件设计并分析引物。序列见表 1。荧光定量 PCR 反应。PCR 反应体系:cDNA 5.0 μ L, SYBR Green Master(ROX)25.0 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,用 DEPC H₂O 补足至 50 μ L 体积。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环。以 β -actin 为内参基因,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值代表 mRNA 测定结果。

1.5.5 Western blot 法检测大鼠滑膜、脾脏、胸腺组织 LC3-II、Beclin1 蛋白表达 末次用药 24 h 后,用 10%水合氯醛(0.35 mL/100g)腹腔注射麻醉,选取大鼠滑膜、脾脏及胸腺组织。每个样品质量在

表 1 荧光定量 PCR 受体及配体引物序列与预扩增长度

Table 1 Primer sequence, preamplification length in fluorescence quantitative PCR receptors and ligands

Gene	Sequence	Length
<i>Atg5</i>	F 5'-ATTCCAACGTGCTTTACTCTCTATC-3'	165 bp
	R 5'-AAACCAAATCTCACTAACATCTTCT-3'	
<i>Atg7</i>	F 5'-GTGTACGATCCCTGTAACCTAACCC-3'	116 bp
	R 5'-CGAAAGCAGAGAAGCTTCAACAGACT-3'	
<i>Atg12</i>	F 5'-GGCACCAGCTCTAGGCTTATAGTTG-3'	124 bp
	R 5'-GTTGTTCCACAGCATTTTCCATG-3'	
β -actin	F 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	150 bp
	R 5'-TTAATGTTCACGCACGATTTTC-3'	

100 mg 左右,加入 RIPA 细胞裂解液 1 mL(内含 1 mmol/L PMSF)进行裂解。12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液,即含有组织总蛋白。提取滑膜、脾脏、胸腺组织组织总蛋白,分别电泳分离、转膜、封闭。一抗(兔抗 LC3-II 为 1:1 000、Beclin1 为 1:800)孵育抗兔二抗(1:10 000)孵育。以 β -actin 为内参蛋白。ECL 发光试剂盒显示;用扫描仪对胶片进行扫描、摄像;采用 Quantity one 软件测量灰度值,以目的条带与内参蛋白灰度值比值为 LC3-II、Beclin1 蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间差异比较采用 t 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 治疗前后大鼠 E 和 AI 的变化

给药前,MC、LEF、TP 组大鼠 E 和 AI 较 NC 组高($P<0.01$)。连续给药 30 d 后,MC 组大鼠 E、AI 较 NC 组升高($P<0.01$),LEF、TP 组 E 恢复至 NC 组水平($P>0.05$),但 AI 仍高于 NC 组($P<0.01$);LEF、TP 组大鼠 E、AI 较 MC 组降低($P<0.01$);LEF 组 E 较 TP 组降低($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠足跖肿胀度和关节炎指数的比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Paw swelling and arthritis index of AA rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Group	n	E/%		AI	
		Pre-dose	Both day after treatment	Pre-dose	Both day after treatment
NC	12	38.61 \pm 9.87	36.48 \pm 12.68	0	0
MC	12	59.04 \pm 19.23**	80.28 \pm 26.57**	5.70 \pm 1.91**	6.45 \pm 2.45**
LEF	12	65.96 \pm 21.35**	38.67 \pm 14.35 $\Delta\Delta$	5.48 \pm 1.97**	3.60 \pm 1.25** $\Delta\Delta$
TP	12	64.05 \pm 22.07**	49.78 \pm 12.97 $\Delta\Delta$ 、#	5.57 \pm 1.87**	3.97 \pm 1.13** $\Delta\Delta$

** $P<0.01$, vs. NC group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$, vs. MC group; # $P<0.05$, vs. LEF group

2.2 大鼠关节病理形态学变化

给药 30 d 后,通过光镜观察各组大鼠关节病变。MC 组大鼠关节面模糊,部分关节软骨表面毛糙或缺如,关节滑膜大量炎性细胞浸润,滑膜血管翳

增多,关节腔内可见呈绒毛状突起状的滑膜组织增生;药物治疗后,与 MC 组比较,TP 组大鼠滑膜组织增生改善,部分血管翳减轻。LEF 组与 TP 组比较无明显差异。见图 1。

2.3 大鼠血清 BAFF、IL-1、IL-15、IL-10、TNF- α 表达水平

与 NC 组比较, MC 组 BAFF、IL-1、TNF- α 升高 ($P < 0.01$), IL-15、IL-10 降低 ($P < 0.01$); 与 MC 组相比, LEF 组、TP 组 IL-15、IL-10 升高 ($P < 0.01$); IL-1、BAFF 降低。与 LEF 组比较, TP 组 TNF- α 、BAFF、IL-15 升高 ($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 3。

2.4 大鼠滑膜、胸腺、脾脏组织自噬相关基因 Atg5/7/12 mRNA 表达变化

与 NC 组比较, MC 组滑膜 Atg5、Atg12 mRNA 降低 ($P < 0.05$); 脾脏 Atg5 mRNA 降低,

Atg7、Atg12 mRNA 表达及胸腺 Atg12 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与 MC 组比较, TP 组滑膜 Atg7、Atg12 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 脾脏 Atg5、Atg7、Atg12 mRNA 及胸腺中 Atg5、Atg7 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), Atg12 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与 LEF 组比较, TP 组滑膜 Atg7 mRNA 及胸腺 Atg5、Atg7 mRNA 表达降低, 胸腺 Atg12 mRNA 及脾脏的 Atg5、Atg7、Atg12 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.5 大鼠滑膜、胸腺、脾脏组织自噬标记蛋白 LC3-II、Beclin1 表达变化

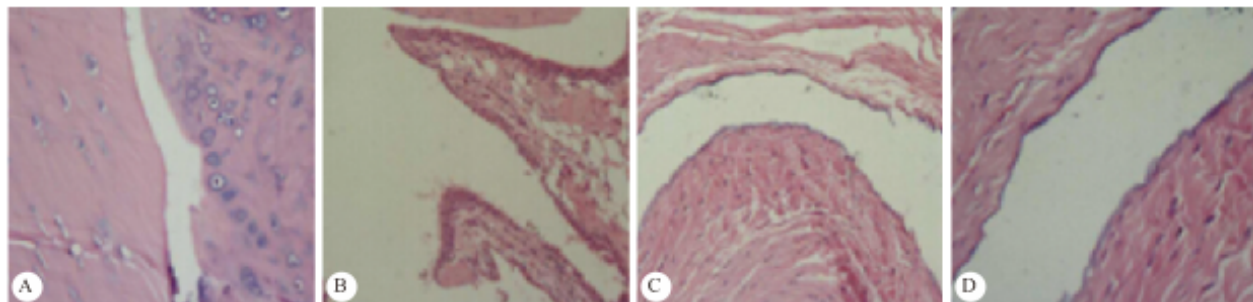


图 1 关节病理形态学观察。HE $\times 200$

Fig 1 Pathological observations of joints. HE $\times 200$

A: NC group; B: MC group; C: TP group; D: LEF group

表 3 各组大鼠细胞因子 IL-1、TNF- α 、IL-15 和 IL-10 的比较/(pg/mL)

Table 3 Serum TNF- α , IL-15 and IL-10 in rats/(pg/mL)

Group	n	IL-1	TNF- α	IL-15	IL-10	BAFF
NC	12	87.34 \pm 15.76	170.75 \pm 51.89	95.28 \pm 19.63	106.63 \pm 30.85	281.89 \pm 50.77
MC	12	101.64 \pm 27.35**	200.58 \pm 66.04**	36.86 \pm 18.77**	59.86 \pm 13.49**	362.34 \pm 92.74**
LEF	12	98.56 \pm 19.85 Δ	195.77 \pm 42.69	59.48 \pm 19.87** $\Delta\Delta$	74.75 \pm 11.33** Δ	235.75 \pm 77.39 $\Delta\Delta$
TP	12	102.96 \pm 20.72	166.57 \pm 75.75* $\Delta\Delta$,##	70.74 \pm 13.39** $\Delta\Delta$	86.30 \pm 9.13* $\Delta\Delta$	274.08 \pm 81.75* $\Delta\Delta$,#

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. NC group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, vs. MC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. LEF group

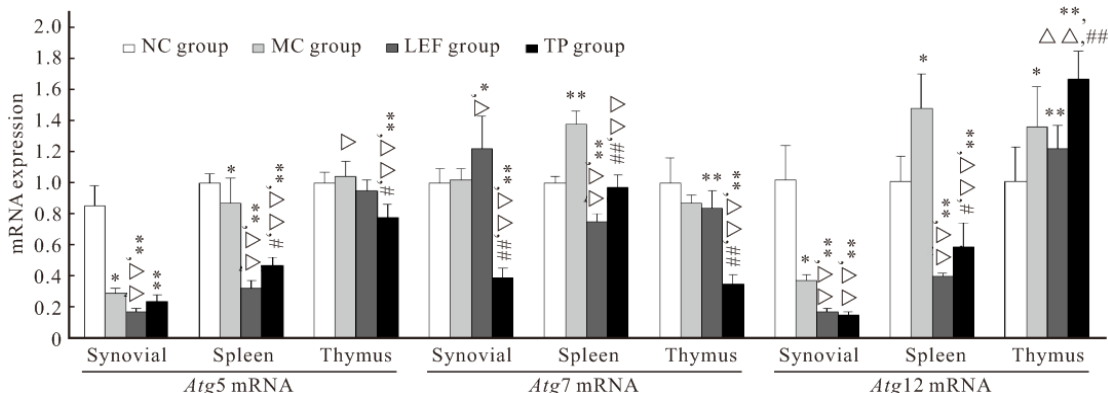


图 2 自噬相关基因的比较(n=8)

Fig 2 Autophagy-related genes (n=8)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. NC group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, vs. MC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. LEF group

Western blot 检测结果显示(图 3),在滑膜组织中,与 NC 组比较,MC 组 LC3-II (NC: 0.94 ± 0.04 , MC: 0.18 ± 0.03)、Beclin1 (NC: 1.48 ± 0.12 , MC: 0.34 ± 0.04) 表达下降 ($P < 0.01$); 与 MC 组比较,LEF 组和 TP 组 LC3-II (LEF: 0.96 ± 0.01 , TP: 0.75 ± 0.15)、Beclin1 (LEF: 0.95 ± 0.28 , TP: 0.85 ± 0.36) 表达升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。在脾脏组织中,与 NC 组比较,MC 组 LC3-II (NC: 0.86 ± 0.16 , MC: 0.21 ± 0.04)、Beclin1 (NC: 1.62 ± 0.12 , MC: 0.32 ± 0.08) 表达下降 ($P <$

0.01); 与 MC 组比较,LEF 组、TP 组 LC3-II (LEF: 0.32 ± 0.04 , TP: 0.63 ± 0.35)、Beclin1 (LEF: 1.20 ± 0.15 , TP: 1.20 ± 0.20) 表达升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。在胸腺组织中,与 NC 组比较,MC 组 LC3-II (NC: 1.48 ± 0.09 , MC: 0.36 ± 0.13)、Beclin1 (NC: 1.51 ± 0.01 , MC: 0.26 ± 0.01) 表达下降 ($P < 0.01$); 与 MC 组比较,LEF 组、TP 组 LC3-II 表达 (LEF: 0.69 ± 0.37 , TP: 0.83 ± 0.37)、Beclin1 (LEF: 0.84 ± 0.20 , TP: 0.64 ± 0.21) 升高 ($P < 0.01$)。

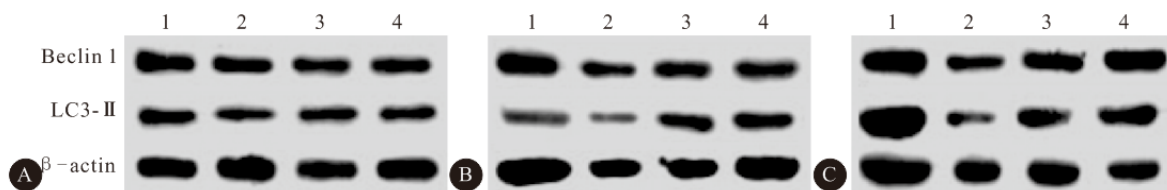


图 3 大鼠滑膜、胸腺、脾脏组织自噬标记蛋白 LC3-II、Beclin1 表达

Fig 3 Expressions of autophagic marker protein LC3-II, Beclin1 in synovial, thymus and spleen of rats

A: Synovialis; B: Spleen; C: Thymus; 1: NC group; 2: MC group; 3: TP group; 4: LEF group

3 讨论

RA 病变过程中炎症性细胞因子具有调节机体免疫反应的作用^[9-11]。细胞因子的分泌与 BAFF 表达密切相关。TNF- α 、IL-1、IL-10、IL-15 参与了众多的炎症反应过程,对炎性细胞的增殖、活性有着重要的调节作用。IL-15 对肥大细胞、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞具有调节作用。细胞自噬可能与 BAFF 共同调控诸多细胞因子的分泌,影响 RA 关节滑膜炎反应。通过佐剂复制关节炎模型可模拟体内炎性细胞因子表达^[12-13]。本研究发现与 NC 组相比,给药 30 d,MC 组在发生足趾关节炎升高时,其血清细胞因子 TNF- α 、IL-1 和 BAFF 水平升高,IL-10、IL-15 降低,滑膜、胸腺、脾脏细胞自噬泡减少,自噬小体形状不规则;滑膜、胸腺、脾脏 *Atg5*、*Atg7*、*Atg12* mRNA 表达改变;且滑膜、脾脏、胸腺组织 LC3-II、Beclin 1 亦下降。说明细胞自噬可能参与滑膜炎反应的过程。其过程可能是关节滑膜的细胞自噬水平的下降,自噬不能正常进行,从而使 BAFF 表达升高,释放促炎因子如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 等,引起炎症反应。BAFF 是机体免疫机能异常的标志,为 B 淋巴细胞激活的始动因素^[14-16]。BAFF 表达的升高可进一步促进包括 IL-1、TNF- α 等前炎症细胞因子的分泌,而 IL-1、TNF- α 是导致 RA 关节软骨破坏和关节局部病变的主要原因^[17]。

因此,细胞自噬功能紊乱,导致细胞因子表达失衡是造成滑膜炎反应升高的因素之一,这与既往研究结果相似^[12]。

本研究发现,TP 治疗后,大鼠关节症状改善(E 和 AI 明显降低),效果与 LEF 组相当;滑膜炎反应降低,且滑膜、胸腺及脾脏组织自噬体及自噬溶酶体较 MC 组稍有增加;滑膜 *Atg7*、*Atg12* mRNA 表达明显降低,脾脏 *Atg5*、*Atg7*、*Atg12* mRNA 及胸腺中 *Atg5*、*Atg7* mRNA 表达改变,*Atg12* mRNA 表达升高;滑膜、脾脏、胸腺组织 LC3-II、Beclin1 明显升高。说明 TP 可能通过促进免疫器官的细胞自噬水平上升,而细胞自噬可能通过阻止有凝集倾向的蛋白、脂质和细胞器等毒性产物的积聚来减轻细胞的损伤,缓解 B 细胞介导的免疫反应为特征的慢性炎症反应;抑制 IL-1、TNF- α 的释放,促使 IL-15、IL-10 增加,从而减少 RA 关节的破坏。TP 由中药雷公藤中分离而来,具有抑制免疫、炎症反应、血管增生、诱导淋巴细胞凋亡的作用^[18]。研究表明^[19-20],RA 患者关节症状与 TNF- α 的分泌及基因位点多态性密切相关,而 TP 能够抑制 RA 患者外周血单核细胞活化,减少 IL-1、TNF- α 的分泌,TP 能够通过调节外周血清和关节滑液中多种细胞因子的水平,从而减少致炎细胞的浸润,进而抑制血管翳的形成,滑膜组织的增生,达到延缓 RA 炎症的发生发展,最终改善软骨和骨的破坏^[21-22]。而本次

研究结果也显示 TP 可以上调滑膜细胞自噬的水平,调节自噬相关基因表达,进而影响 B 细胞表达和细胞因子的分泌。

综上所述,滑膜自噬水平的提高可以有效的减少沉积在关节滑膜内的免疫复合物,减轻关节滑膜炎炎症。脾脏、胸腺自噬水平的调节可以稳定机体体液免疫与细胞免疫,提高机体的中枢和外周免疫耐受;TP 通过调节滑膜、胸腺、脾脏组织细胞自噬,改善关节滑膜炎炎症反应。

参 考 文 献

- [1] RYAN S, MCGUIRE B. Psychological predictors of pain severity, pain interference, depression, and anxiety in rheumatoid arthritis patients with chronic pain. *Br J Health Psychol*, 2016, 21(2): 336-350.
- [2] MANDIK-NAYAK L, RIDGE N, FIELDS M, *et al.* Role of B cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(6): 639-645.
- [3] BUGATTI S, CODULLO C, CAPORALI R, *et al.* B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 2007, 7(2): 137-142.
- [4] 亢君君, 黄晓峰, 韩英, 等. 自噬在自身免疫性疾病中的作用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(8): 892-895.
- [5] 曹蕾, 林佳. 雷公藤甲素治疗老年类风湿关节炎的疗效及其对生存质量的影响. *中国老年学杂志*, 2012, 32(6): 1302-1304.
- [6] 姬洁莹, 李晋奇, 郭阿霞. 类风湿性关节炎动物模型复制与评价. *山西中医学院学报*, 2013, 14(3): 73-76.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. *药理实验方法学*. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 919-921.
- [8] 张钧田. *现代药理实验方法*. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1383.
- [9] MCINNES IB, BUCKLEY CD, ISAACS JD. Cytokines in rheumatoid arthritis-shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(1): 63-68.
- [10] SANTOS SAVIO A, MACHADO DIAZ AC, CHICO CAPOTE A, *et al.* Differential expression of pro-inflammatory cytokines IL-15 α , IL-15, IL-6 and TNF α in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord*, 2015, 16: 51.
- [11] OSIRI M, WONGPIYABOVORN J, SATTAYASOMBOON Y, *et al.* Inflammatory cytokine levels, disease activity, and function of patients with rheumatoid arthritis treated with combined conventional disease-modifying antirheumatic drugs or biologics. *Clin Rheumatol*, 2016, 35(7): 1673-1681.
- [12] 张晓军, 刘健, 万磊, 等. 佐剂关节炎大鼠滑膜血管新生与 PTEN/PI3K/AKT 信号传导通路的关系. *中国骨伤*, 2015, 28(1): 71-74.
- [13] 张薇, 李涛, 李萍, 等. 祛风止痛胶囊对关节炎模型大鼠抗炎作用及机制的实验研究. *中国骨伤*, 2009, 22(11): 848-851.
- [14] WEI F, CHANG Y, WEI W. The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015, 76(2): 537-544.
- [15] PUTHENPARAMPIL M, MIANTE S, FEDERLE L, *et al.* BAFF is decreased in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis at clinical onset. *J Neuroimmunol*, 2016, 297: 63-67.
- [16] DING J, ZHANG W, HASKETT S, *et al.* BAFF overexpression increases lymphocytic infiltration in Sjögren's target tissue, but only inefficiently promotes ectopic B-cell differentiation. *Clin Immunol*, 2016, 169: 69-79.
- [17] LEANDRO MJ, CAMBRIDGE G. Expression of B cell activating factor (BAFF) and BAFF-binding receptors in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2013, 40(8): 1247-1250.
- [18] 赵钟文, 吴宽裕. 雷公藤甲素治疗类风湿性关节炎作用机理的研究现状. *按摩与康复医学*, 2012, 3(4): 36-37.
- [19] CARRON P, LAMBERT B, VAN PRAET L, *et al.* Scintigraphic detection of TNF-driven inflammation by radiolabelled certolizumab pegol in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *RMD Open*, 2016, 2(1): e000265. <http://rmdopen.bmj.com/content/2/1/e000265>. doi: 10.1136/rmdopen-2016-000265.
- [20] 毛晓丹, 孙赛君, 裴紫燕, 等. 雷公藤内酯醇对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 IL-18 及其受体表达的影响. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(7): 606-611.
- [21] 赵太平, 邱佰房, 徐玉东, 等. 雷公藤治疗大鼠类风湿性关节炎的效果及其免疫机制. *广东医学*, 2011, 32(30): 2642-2644.
- [22] 王伟东, 陈如平, 肖鲁伟, 等. 雷公藤甲素对类风湿关节炎滑膜新生血管中血管内皮生长因子、白细胞介素 6 抑制机理的探讨. *中医正骨*, 2012, 24(2): 3-5.

(2016-11-07 收稿, 2017-03-15 修回)

编辑 汤洁