

王枣子总黄酮对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用及机制研究*

缪成贵¹, 熊友谊^{1△}, 秦梅颂¹, 陈浩¹, 常俊²

1. 安徽科技学院生命与健康科学学院(凤阳 233100); 2. 安徽医科大学第四附属医院(合肥 230022)

【摘要】 目的 研究王枣子中总黄酮(TFIA)对佐剂性关节炎(AA)的治疗作用及机制。方法 采用注射完全弗氏佐剂制备 AA 模型大鼠后随机分为 4 组:AA 组、AA+TFIA 50 mg/kg 组、AA+TFIA 100 mg/kg 组、AA+TFIA 150 mg/kg 组,每组 10 只。另设空白对照组大鼠,不造模($n=10$)。造模后 4 d,TFIA 各剂量组大鼠采用 TFIA 灌胃治疗,分别按上述 3 个剂量灌胃,每天 1 次,共 24 d,空白对照组和 AA 组灌胃生理盐水。治疗第 12 天、16 天、20 天、24 天采用大鼠关节炎评分法评价 TFIA 对 AA 大鼠的治疗作用。治疗第 24 天处死各组大鼠,分离大鼠滑膜组织,原代培养各组大鼠成纤维样滑膜细胞(FLS),ELISA 检测各组 FLS 中白细胞介素(IL-1)表达,MTT 检测各组 FLS 增殖活力,real time qPCR 检测各组 FLS miR-152 和经典 Wnt 信号通路关键基因[β -catenin、细胞周期蛋白基因(*ccnd1*)]表达。向 AA 大鼠 FLS 转染 miR-152 mimics 和对照 NC mimics,向 TFIA 100 mg/kg 剂量组大鼠 FLS 转染 miR-152 inhibitors 和对照 NC inhibitors,36 h 后检测 miR-152、 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 表达和 FLS 的增殖。结果 TFIA 各剂量灌胃治疗均能抑制 AA 大鼠关节炎评分,抑制 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 表达和 FLS 增殖活力($P<0.05$),各剂量组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),与空白对照组相比,各剂量组均未恢复至正常水平($P<0.05$)。与空白对照组相比,AA 组 FLS 中 miR-152 表达降低($P<0.05$),向 AA 组 FLS 转染 miR-152 mimics 后,与对照组相比,过表达的 miR-152 抑制 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 表达,抑制 FLS 增殖($P<0.05$)。向 TFIA 100 mg/kg 剂量组 FLS 转染 miR-152 inhibitors,与对照组相比,抑制了 miR-152 的表达,促进了 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 表达,促进了 FLS 增殖($P<0.05$)。结论 TFIA 对 AA 大鼠有一定治疗作用,此作用可能通过上调 miR-152 的表达,影响经典 Wnt 信号通路实现。

【关键词】 王枣子总黄酮 佐剂性关节炎 miR-152 成纤维样滑膜细胞 IL-1

Effect of Flavonoids from Wang Zaizi on Adjuvant Arthritis in Rats and Its Mechanism MIAO Cheng-gui¹, XIONG You-yi^{1△}, QING Mei-song¹, CHENG Hao¹, CHANG Jun². 1. Food and Drug College, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China; 2. The Fourth Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

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

【Abstract】 Objective The therapeutic effect and mechanism of total flavonoids in *Isodon amethystoides* (Ben-th) Cy Wu et Hsuan (TFIA) on adjuvant arthritis (AA) were investigated. **Methods** AA model rats were set and complete Freund's adjuvant injection, randomly divided into 4 groups: AA group, AA+TFIA 50 mg/kg group, AA+TFIA 100 mg/kg group, AA+TFIA 150 mg/kg group, and each group has 10 rats. Blank control group was set without modeling ($n=10$). Four days post-modeling rats in each TFIA groups were treated once a day with TFIA at 50 mg/kg, 100 mg/kg and 150 mg/kg for 24 d, and rats in blank control and AA groups were given saline as control. At the 12th day, 16th day, 20th day and 24th day of treatment, the effect of TFIA on AA rats was evaluated by rat arthritis score. Then the rats were sacrificed on the 24th day of treatment, and the synovial tissue of rats was isolated and the fibroblast-like synoviocytes (FLS) were primary cultured. The expressions of IL-1 in FLS was detected by ELISA, the FLS proliferation activity was detected by MTT assay, and the expression of miR-152, β -catenin and cyclin D1 gene (*ccnd1*) were detected by real time qPCR. MiR-152 mimics and NC mimics (control) were transfected into FLS in AA rats, and miR-152 inhibitors and NC inhibitors (control) were transfected into FLS in AA+TFIA 100 mg/kg group rats. The expressions of miR-152, β -catenin, *ccnd1*, IL-1 and FLS proliferation were detected 36 h post-transfection. **Results** TFIA significantly inhibited the arthritis score of rats and the expressions of β -catenin, *ccnd1*, IL-1 and the proliferation of FLS in AA rats ($P<0.05$). There was no significant difference between the dose groups, all of which were significant when compared with the

* 国家自然科学基金(No. 81302783)资助

△ 通信作者, E-mail: youyixiongah@126.com

blank control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of miR-152 in AA group was significantly decreased ($P < 0.05$). After transfection of miR-152 mimics into AA FLS, overexpression of miR-152 significantly inhibited the expressions of β -catenin, *ccnd1*, IL-1 and the proliferation of FLS ($P < 0.05$). After transfection of miR-152 inhibitors into FLS from AA+TFIA 100 mg/kg group, inhibition of miR-152 significantly promoted the expressions of β -catenin, *ccnd1*, IL-1 and the proliferation of FLS. **Conclusion** TFIA has a certain therapeutic effect on AA rats via the up-regulation of miR-152 expression, possibly affecting the classical Wnt signaling pathway.

【Key words】 Total flavonoids of *Isodon amethystoides* (Ben-th) Cy Wu et Hsuan Adjuvant arthritis
miR-152 Fibroblast like synoviocytes IL-1

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 以滑膜炎及关节软骨损伤为主要特征, 是一种病因未能完全阐明的慢性、系统性、自身免疫性疾病^[1-2]。王枣子 (*Isodon amethystoides* (Benth) Cy Wu et Hsuan) 为香茶菜属草本植物^[3], 其根茎中天然化学成分复杂, 其中黄酮类成分是含量较高的天然有效成分^[4], 关于王枣子总黄酮 (TFIA) 对 RA 的治疗作用, 国内外均未开展过此类研究。研究 TFIA 对 RA 的治疗作用及其分子机制对 RA 病理机制研究和王枣子药材的开发都有重要的意义。佐剂性关节炎大鼠 (adjuvant arthritis, AA) 具有和 RA 相似的病理特点, 是常用的 RA 研究动物模型^[5]。课题组前期研究发现^[6] miR-152 在 AA 大鼠病理中显著低表达, 过表达的 miR-152 以分泌型卷曲相关蛋白 4 (secreted frizzled-related protein 4, SFRP4) 为靶点抑制经典 Wnt 信号通路, 抑制 AA 病理发展。鉴于 TFIA 对 AA 大鼠具有一定的治疗作用, 本研究从大体评分、细胞水平、蛋白质水平和基因水平等多个角度, 研究 TFIA 对 AA 大鼠的治疗作用及机制, 为 RA 治疗提供新思路、新方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 倒置荧光显微镜: 日本 OLYMPUS 公司; 酶标仪: 美国 BioTek 公司; 实时定量 PCR 仪: 美国 ABI 公司; 细胞培养箱: 美国热电公司; 超纯水系统: 美国密理博 Milli-Q Reference; 台式冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰柜: 日本三洋公司; 超净工作台: 上海智城 ZHJH-C1214C。

1.1.2 试剂 TFIA 由安徽科技学院药学院天然药物化学室制备。取王枣子干燥茎叶, 95% 乙醇提取后减压浓缩, 水溶后调 pH 至 2.0 后乙醚萃取, 得到有机相再精制浓缩备用。水相经大孔树脂吸附, 与有机相浓缩物混合得 TFIA, 经测定 TFIA 占提取物总质量的 85.61%; miR-152 引物: 德国 Qiagen

公司; 逆转录试剂盒: 美国 Fermentas; QuantiFast[®] SYBR[®] Green PCR 试剂盒: 德国 Qiagen 公司; miR-152 mimics、NC mimics、miR-152 inhibitors、NC inhibitors (序列见表 1): 上海吉玛制药技术有限公司; MTT: Sigma 公司; ELISA: 上海源叶生物科技有限公司; 脂质体 Lipofectamine[™] 2000、Opti-MEM: 美国 Invitrogen 公司; 新生胎牛血清 (fetal bovin serum, FBS): 美国 Hyclone 公司。经典 Wnt 信号通路关键基因 [β -catenin、细胞周期蛋白基因 (*ccnd1*)] 引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 AA 大鼠制备和分组 采用完全弗氏佐剂足趾底部注射法制备 AA 大鼠。雄性 SD 大鼠购自安徽医科大学实验动物中心 (皖医实动准字第 01 号), 大鼠体质量 160~180 g。新购大鼠适应性饲养 4 d 后随机分为 5 组, 分别是空白对照组、AA 组、AA+TFIA 50 mg/kg 组、AA+TFIA 100 mg/kg 组、AA+TFIA 150 mg/kg 组, 每组 10 只。空白对照组大鼠足趾底部一次性注射生理盐水 0.1 mL, 其余 4 组大鼠足趾底部一次性注射完全弗氏佐剂 0.1 mL 制备 AA 大鼠模型。注射后 4 d 各组开始灌胃给药: TFIA 各剂量组大鼠采用 TFIA 灌胃治疗, 分别按大鼠体质量以 50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg 3 个剂量灌胃, 每天 1 次, 共灌胃治疗 24 d, 空白对照组和 AA 组同时点灌胃生理盐水。

1.2.2 AA 大鼠关节炎评分评价模型和治疗效果 AA 大鼠关节炎评分是基于实验大鼠不同部位是否出现 AA 症状进行量化评分的方法, 一只耳朵出现结节或红肿为 1 分, 最多 2 分; 鼻子出现症状为 1 分, 最多 1 分; 尾巴出现症状为 1 分, 最多 1 分; 足爪出现症状为 1 分, 最多 4 分。总评最高为 8 分。

AA 组大鼠关节炎评分与空白对照组同时点相比, 差异有统计学意义说明模型制备成功, 测量时点为开始治疗后的第 12 天、16 天、20 天、24 天; 同时

于上述时点测量 TFIA 各剂量组的大鼠关节炎评分,与前两组比较,评价 TFIA 对 AA 大鼠的治疗作用。

1.2.3 大鼠滑膜成纤维样滑膜细胞(FLS)原代培养 治疗 24 d 后处死大鼠,分离大鼠两只后腿大膝关节中滑膜部分,剔除附带的软骨组织。关节滑膜剪碎至 1~3 cm³,移液管转移滑膜组织块至一次性无菌细胞培养瓶内,贴壁放置后加含有胎牛血清的细胞培养基 3 mL,转移至细胞培养箱内培养,每隔 3 d 更换 1 次培养基。第 6 天弃净细胞培养基后加胰酶 0.5 mL 消化细胞,移液枪吹散细胞后按 1:2 比例传代培养,实验所用细胞为第 3~5 代 FLS。

表 1 miR-152 mimics, inhibitors 及定量引物的碱基序列

Table 1 Base sequences of miR-152 mimics, inhibitors and quantitative primers

Sequence	Sense (5' to 3')	Anti-sense (5' to 3')	Length/bp
miR-152 mimics	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	AAGUUCUGUCAUGCACUGAUU	—
NC mimics	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	—
miR-152 inhibitors	GAUGCCUCCAUAUUCUUAGATT	UCUUGCAAUUGUAGGCCUCAU	—
NC inhibitors	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	—
miR-152	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	—	21
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	70
β -catenin	CTTACGGCAATCAGGAAAGC	ACAGACAGCACCTTCAGCACT	128
<i>ccnd1</i>	GCCCTCCGTTTCTTACTTCAA	CTCTTCGCACTTCTGCTCCTC	141
β -actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTTC	136

1.2.6 Real time qPCR 检测 TFIA 各剂量组大鼠 FLS 的 miR-152、 β -catenin、*ccnd1* 表达 Trizol 试剂消化 5 组 FLS,常规方法提取各组 FLS 总 RNA,参照逆转录试剂盒提供的方法逆转录总 RNA 得到各组大鼠 FLS 的 cDNA。参照 real time qPCR 试剂盒提供的方法进行操作。MiR-152 的扩增条件:95 °C 条件下变性 3 min,然后在 95 °C,12 s;62 °C,40 s 条件下扩增 40 个循环,U6 为内参基因。 β -catenin 和 *ccnd1* 的扩增条件:95 °C 条件下变性 10 min,然后在 95 °C,15 s;60 °C,30 s;72 °C,30 s 条件下扩增 40 个循环, β -actin 为内参基因。各引物序列见表 1,以公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组基因的相对表达量。

1.2.7 转染 miR-152 mimics 后 AA 大鼠 FLS 中 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 的表达和 FLS 增殖检测 培养空白对照大鼠和 AA 大鼠 FLS,AA 大鼠 FLS 随机分为 AA 组、AA+miR-152 mimics 组、AA+NC mimics 阴性对照组。待 FLS 细胞长至细胞培养瓶瓶底 90% 面积后,弃净瓶内培养基,每瓶加无菌超纯水 3 mL 洗涤 2 次,弃净洗涤液,每瓶再加胰酶 0.5 mL 消化细胞 0.5 min。弃净胰酶,每瓶加入含 FBS 的细胞培养基 3 mL,使用移液枪充分吹打细胞

1.2.4 ELISA 检测 TFIA 治疗后大鼠滑膜 FLS 的白细胞介素(IL-1)表达 取 5 组 FLS 上清,500×g 离心 5 min 取上清,用 ELISA 试剂盒,按说明书操作说明检测 IL-1 表达,在 450 nm 波长处测定各孔光密度(OD)值。

1.2.5 MTT 检测 TFIA 治疗后大鼠滑膜 FLS 的增殖活力 取 5 组 FLS,参照 MTT 说明书提供的方法于 96 孔板中每孔加入 20 μ L 0.5% MTT 溶液后继续培养 4 h,终止培养,弃净液体,然后每孔加二甲基亚砷 150 μ L,置低速摇床上孵育 10 min,酶标仪 490 nm 检测各组 FLS 的 MTT 值。MTT 值越高,增殖活力越高。

制备 1×10^5 mL⁻¹ 细胞浓度的细胞悬液接种于 96 孔板内,计算细胞浓度使每孔细胞密度达到 1 000~10 000/孔。采用 lipofetaminTM 2000 试剂,并按照说明书提供的转染方法向 AA 组 FLS 转染对照试剂,向 AA+miR-152 mimics 组转染 miR-152 mimics (转染组),向 AA+NC mimics 组转染 NC mimics (阴性对照组),空白对照组 FLS 不作转染(空白对照组)。转染 36 h 后,采用 real time qPCR 检测 miR-152 表达(方法同 1.2.6),当其表达高于 AA 组且差异有统计学意义时,判定转染成功。real time qPCR 检测 β -catenin、*ccnd1* 表达方法同 1.2.6。检测 IL-1 表达(方法同 1.2.4)和 FLS 的增殖(方法同 1.2.5)。

1.2.8 转染 miR-152 inhibitors 后 AA+TFIA 100 mg/kg 剂量组大鼠 FLS 中 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 和 FLS 增殖检测 培养 AA 大鼠和 AA+TFIA 100 mg/kg 剂量组大鼠 FLS,AA+TFIA 100 mg/kg 剂量组大鼠 FLS 随机分为 AA+TFIA 100 mg/kg 组、AA+TFIA 100 mg/kg+miR-152 inhibitors 组、AA+TFIA 100 mg/kg+NC inhibitors 组。待各组 FLS 长至细胞培养瓶瓶底 90% 面积后,采用 lipofetaminTM 2000 试剂,并按照说明书提供的转染

方法向 AA+TFIA 100 mg/kg 组 FLS 转染对照试剂, 向 AA+TFIA 100 mg/kg+miR-152 inhibitors 组 FLS 转染 miR-152 inhibitors(转染组), 向 AA+TFIA 100 mg/kg+NC inhibitors 组 FLS 转染 NC inhibitors(阴性对照组), AA 组 FLS 不作转染。转染 36 h 后, 采用 real time qPCR 检测 miR-152、 β -catenin、*ccnd1* 表达, 方法同 1.2.6。IL-1 检测方法同 1.2.4, FLS 增殖检测同 1.2.5。

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

表 2 各组大鼠关节炎评分比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Rat arthritis score in all groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	12 d	16 d	20 d	24 d
Control	0.4±0.48 Δ	0.4±0.58 Δ	0.6±0.55 Δ	0.4±0.62 Δ
AA	3.7±0.91	3.9±0.72	3.9±0.93	4.6±0.68
AA+TFIA 50 mg/kg	2.8±0.84 $\#$	2.9±0.88 $\#$	3.0±0.74 $\#$	3.6±0.66 $\#$
AA+TFIA 100 mg/kg	2.6±0.81 $\#$	2.9±0.82 $\#$	3.1±0.82 $\#$	3.2±0.83 $\#$
AA+TFIA 150 mg/kg	2.7±0.75 $\#$	2.7±0.79 $\#$	3.0±0.76 $\#$	3.2±0.73 $\#$

$\#P < 0.05$, vs. AA group; $\Delta P < 0.05$, vs. other groups at the same time point

2.2 TFIA 对 AA 大鼠 IL-1 表达和 FLS 增殖的影响

见图 1。治疗 24 d, 与空白对照相比, AA 组大鼠 FLS 中 IL-1 表达升高($P < 0.05$), FLS 增殖活力增强($P < 0.05$)。与 AA 组相比, 经 TFIA 各剂量灌胃治疗后, IL-1 表达均下降($P < 0.05$), FLS 增殖活力均减弱($P < 0.05$), 各剂量组组间比较差异无统计学意义。与空白对照组相比, 各剂量组未恢复至正常水平(P 均 < 0.05)。

2.3 TFIA 对 AA 大鼠 FLS miR-152 表达及经典 Wnt 信号通路的影响

见图 2。与正常对照组相比, miR-152 在 AA

2 结果

2.1 各组大鼠关节炎评分比较

AA 大鼠成模率 100%。与正常对照组比较, AA 组大鼠各时点的关节炎评分均值增加(P 均 < 0.05), 各剂量组关节炎评分均低于 AA 组($P < 0.05$), 但均值也未恢复至正常水平(P 均 < 0.05), 见表 2。AA 组和各剂量组大鼠病情随时间进行性加重, 但每个时点, 各剂量组评分均较 AA 组有所下降(P 均 < 0.05), 且同一时点各剂量组评分差异无统计学意义。

大鼠 FLS 中表达降低。与 AA 大鼠相比, TFIA 的 3 个剂量都能上调 miR-152 表达($P < 0.05$), 抑制经典 Wnt 信号通路关键基因 β -catenin、*ccnd1* 表达($P < 0.05$), 各剂量组组间比较均差异无统计学意义。与正常对照组相比, 各剂量组的 miR-152 表达、 β -catenin 表达、*ccnd1* 表达均未恢复至正常水平(P 均 < 0.05)。

2.4 miR-152 过表达对 AA 大鼠 FLS 经典 Wnt 信号通路、IL-1 表达和 FLS 增殖的影响

见图 3。miR-152 mimics 转染 AA 大鼠 FLS 后 miR-152 表达高于 AA 组, 说明转染成功。与 AA 组和阴性对照组相比, 转染 miR-152 mimics

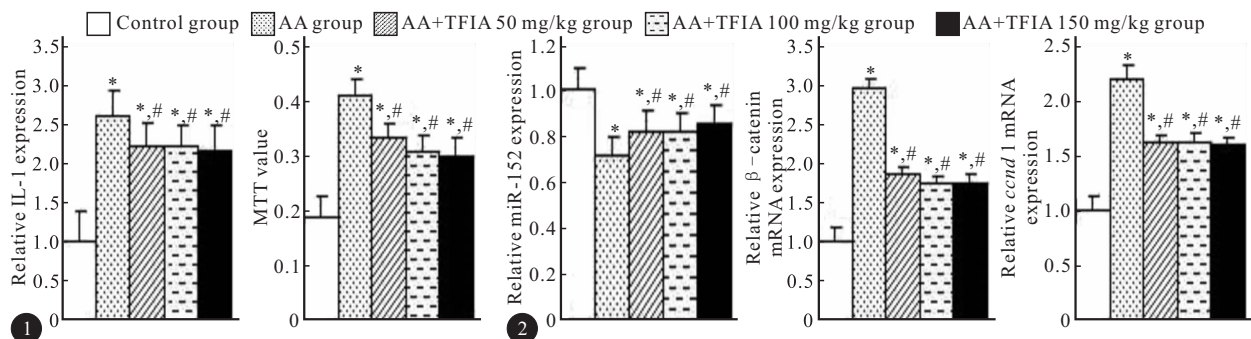


图 1 TFIA 对 AA 大鼠 IL-1 表达和 FLS 增殖的影响

图 2 TFIA 对 AA 大鼠 miR-152 表达及经典 Wnt 信号通路 β -catenin 基因、*ccnd1* 基因表达的影响

Fig 1 Effect of TFIA on IL-1 expression and FLS proliferation in AA rats

Fig 2 Effect of TFIA on miR-152 expression and the canonical Wnt signaling pathway genes (β -catenin, *ccnd1*) in AA rats

Wnt signaling pathway genes (β -catenin, *ccnd1*) in AA rats

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

后, β -catenin 表达、*ccnd1* 表达和 IL-1 表达均降低, FLS 增殖活力被抑制 (P 均 < 0.05)。与空白对照组相比, 其余 3 组的 β -catenin 表达、*ccnd1* 表达、IL-

1 表达和 FLS 的增殖差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 转染 miR-152 mimics 可拮抗 AA 的指标改变, 但均未恢复至正常水平。

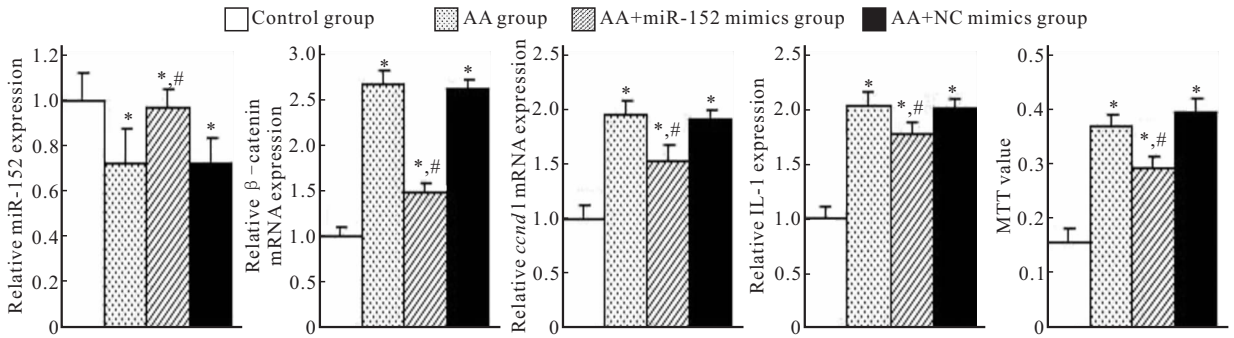


图 3 miR-152 mimics 转染 AA 大鼠 FLS 对 miR-152、 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 表达和 FLS 增殖的影响

Fig 3 The effect of miR-152 mimics on the expressions of miR-152, β -catenin mRNA, *ccnd1* mRNA, IL-1 and FLS proliferation after transfection into AA FLS

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

2.5 miR-152 抑制和 TFIA 治疗对 AA 大鼠 FLS 经典 Wnt 信号通路、IL-1 表达和 FLS 增殖的影响

见图 4。与 AA+TFIA 100 mg/kg 组相比, 转染 AA+TFIA 100 mg/kg+miR-152 inhibitors 组 FLS 后 miR-152 表达降低 ($P < 0.05$), 说明转染成

功, miR-152 被抑制。与 AA+TFIA 100 mg/kg 组相比, 转染 miR-152 inhibitors 后, miR-152 的抑制上调了 β -catenin、*ccnd1* 表达, 促进了 IL-1 表达和 FLS 增殖。与 AA 组相比, 其余 3 组的 β -catenin 表达、*ccnd1* 表达、IL-1 表达和 FLS 的增殖差异均有

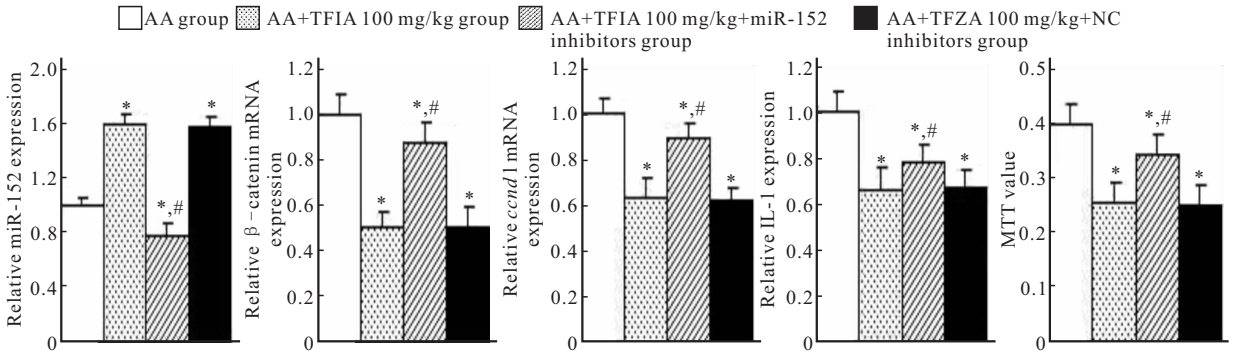


图 4 miR-152 inhibitors 转染和 TFIA 治疗对 AA 大鼠 FLS miR-152、 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 表达和 FLS 增殖的影响

Fig 4 The effect of miR-152 inhibitors and TFIA on the expressions of miR-152, β -catenin mRNA, *ccnd1* mRNA, IL-1 and FLS proliferation in AA FLS

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

统计学意义 (P 均 < 0.05)。

3 讨论

王枣子是唇形科香茶菜属草本植物, 广泛分布于安徽、江苏、湖北等地, 具有抗菌、消炎和抗肿瘤等作用, 特别是在安徽省宿州市埇桥区一带, 民间常用王枣子汤剂治疗急性传染性肝炎、腹泻等症, 治疗效果良好^[7]。研究表明王枣子含有丰富的五环三萜类化合物齐墩果酸, 齐墩果酸以游离或结合成苷的形式存在于王枣子根茎中, 发挥着重要的药效作用, 主要药效包括保肝、降血糖、降血脂、强心、抗心律失常

等, 同时还具有抗炎、免疫调节、抗病毒、抑制血小板聚集等药理作用^[8]。黄酮类成分是中草药中含量较高的天然产物, 在中草药药效中发挥重要作用^[9-10]。王枣子研究较少涉及总黄酮成分, 本研究以王枣子茎叶中主要天然产物 TFIA 为切入点, 采用 real time qPCR、ELISA、MTT 等方法研究 TFIA 对 AA 模型大鼠的治疗作用及部分机制。本研究表明 TFIA 对 AA 大鼠具有一定的治疗作用, 并探讨了其可能存在的分子机制。

本文研究发现与空白对照相比, miR-152 在 AA 大鼠 FLS 中表达降低。与 AA 大鼠相比,

TFIA 三个剂量都能上调 miR-152 表达,提示 TFIA 可能通过对 miR-152 表达的上调影响 AA 大鼠病理发展。IL-1 和 FLS 异常增殖是 RA 发病机制的重要指标,本文试验结果表明与空白对照相比,AA 组大鼠 FLS 中 IL-1 表达升高,FLS 增殖活力增强,与 AA 组相比,经 TFIA 三个剂量灌胃治疗后,大鼠关节炎评分降低,IL-1 表达下降,FLS 增殖减弱,说明 TFIA 具有抑制 AA 大鼠病理变化的作用,提示 TFIA 对 RA 有治疗作用。同时 miR-152 mimics 转染 AA 大鼠 FLS 后过表达的 miR-152 抑制 β -catenin 表达、*ccnd1* 表达、IL-1 表达和 FLS 的增殖。miR-152 inhibitors 转染 AA+TFIA 100 mg/kg 剂量组大鼠 FLS 后,miR-152 的表达抑制上调 β -catenin、*ccnd1* 表达,促进 IL-1 表达和 FLS 增殖。提示 TFIA 通过对 miR-152 表达的上调,抑制 AA 大鼠病理发展。

MiRNA 是基因表达调控研究的热点领域,miRNA 是大约含有 21 个核苷酸的非编码小 RNA,大量研究表明 miRNA 在体内通过对靶 mRNA 的结合或降解,在基因后转录水平影响基因表达,即基因的碱基没有变化,但改变了基因的表达调控^[11]。大量研究及本课题组研究都表明 miRNA 参与了 RA 发病机制的调控,在 RA 病理机制中发挥重要的调控作用,对紊乱表达的 miRNA 及其下游信号通路影响的研究有利于 RA 病理机制的阐明^[12]。例如,本课题组研究发现^[13],在 RA 病理中 miR-152 表达显著降低,低表达的 miR-152 与异常高表达的 DNMT1 和 MeCP2 有关。miR-152 与 DNMT1 和 MeCP2 构成双向负调控环路以 SFRP4 为靶点,影响经典 Wnt 信号通路,通过对 Wnt 信号通路的激活或抑制影响 RA 发病机制^[13]。本研究肯定了 miR-152 在 AA 大鼠 FLS 治疗中的关键地位。具体表现为:各实验中 miR-152 与 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 表达和 FLS 增殖的同向改变,miR-152 正向转染和负向阻断后,这种同向变化的关系依然存在。向 AA+TFIA 100 mg/kg 剂量组大鼠 FLS 转染 miR-152 inhibitors 可拮抗 TFIA 对 AA 大鼠的治疗作用至 AA 组水平,提示阻断 miR-152 的表达即可阻断 TFIA 的治疗作用,miR-152 位于 TFIA 治疗机制的核心位置,验证了 miR-152 在 RA 发病机制中的重要作用,进一步提示 TFIA 可能通过影响 miR-152 表达抑制 RA 病理发展。但是与正常对照组相比,各剂量组的 miR-152、 β -catenin、*ccnd1* 表达

均未恢复至正常水平(P 均 <0.05)。TFIA 即使增加剂量也无法调动更多的 miR-152,可能与 AA 大鼠的 TFIA 胃肠道吸收有关,也可能与 AA 大鼠体内 miR-152 表达调控的复杂机制有关^[13]。

此外,miR-152 mimics 转染 AA 大鼠 FLS 可拮抗 AA 的 β -catenin、*ccnd1*、IL-1 表达和 FLS 增殖的改变,但这些指标均未恢复至正常水平。提示在 AA 大鼠 FLS 中可能还存在其他的信号通路,例如 PTEN、mTOR,影响 AA 病理变化。此类研究为 RA 的防治提供新的思路,也为王枣子这种地方特色药材新功效研究与开发提供了依据。

参 考 文 献

- [1] KRAUSE ML, MATTESON EL. Perioperative management of the patient with rheumatoid arthritis. *World J Orthop*, 2014,5(3):283-291.
- [2] YOSHIDA K, HASHIMOTO T, SAKAI Y, *et al.* Involvement of the circadian rhythm and inflammatory cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol Res*, 2014,2014(6):282495-282503.
- [3] 翟科峰,段红,曹稳根,等. HPLC 法测定王枣子中齐墩果酸的含量. *宿州学院学报*, 2015,30(6):93-95.
- [4] 陈晓宇,李俊,解雪峰. 野菊花总黄酮诱导佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞凋亡. *解剖学报*, 2007,38(5):569-571.
- [5] STANCZYK J, OSPELT C, KAROUZAKIS E, *et al.* Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum*, 2011,63(2):373-381.
- [6] MIAO CG, YANG YY, HE X, *et al.* MicroRNA-152 modulates the canonical Wnt pathway activation by targeting DNA methyltransferase 1 in arthritic rat model. *Biochimie*, 2014,106(8):149-156.
- [7] 崔佳,施务务,宿玉,等. 王枣子三萜成分的研究. *安徽中医药大学学报*, 2011,30(3):57-59.
- [8] 施务务,崔佳,冉帆,等. 王枣子总黄酮聚乳酸纳米粒的制备与质量评价. *安徽中医药大学学报*, 2011,30(1):75-77.
- [9] VANDIE MD, BONE KM, WILLIAMS SG, *et al.* Soy and soy isoflavones in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BJU Int*, 2014,113(5b):119-130.
- [10] MASKARINEC G. The human mammary gland as a target for isoflavones: how does the relation vary in individuals with different ethnicity? *Planta Med*, 2013,79(7):554-561.
- [11] STANCZYK J, PEDRIOLI DM, BRENTANO F, *et al.* Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008,58(4):1001-1009.
- [12] FULCI V, SCAPPUCCI G, SEBASTIANI GD, *et al.* miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*, 2010,71(2):206-211.
- [13] MIAO CG, QIN D, DU CL, *et al.* DNMT1 activates the canonical Wnt signaling in rheumatoid arthritis model rats via a crucial functional crosstalk between miR-152 and the DNMT1, MeCP2. *Int Immunopharmacol*, 2015,28(1):344-353.

(2017-11-05 收稿,2018-03-17 修回)

编辑 吕熙