

· 基础研究 ·

## 蛇床子素对Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎大鼠软骨损伤的改善及免疫调节作用

贝宇飞<sup>1</sup>,朱清<sup>2</sup>,王静<sup>1</sup>,范震宇<sup>1</sup>,殷晓芹<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南通大学附属医院药学部,江苏 南通 266001;<sup>2</sup>南通大学药学院,江苏 南通 266001

**[摘要]** 目的:研究蛇床子素对Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎大鼠软骨损伤的改善及免疫调节作用。方法:用牛Ⅱ型胶原诱导构建类风湿性关节炎大鼠模型,在造模完成1周后以不同浓度(10、20、40 mg/kg)蛇床子素灌胃给药。每4 d测定大鼠的爪子体积并评定关节炎指数。30 d后,称重测定脾脏指数和胸腺指数,HE染色观察软骨损伤情况,ELISA检测白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量,qRT-PCR检测基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-3和MMP-13 mRNA表达,Western blot检测Ki67、PCNA、Caspase-3、Caspase-9、MMP-1、MMP-3、MMP-13、Wnt1、 $\beta$ -catenin和LRP5表达。结果:与模型组相比,各给药组大鼠的爪子体积、关节炎指数、脾脏指数和胸腺指数均降低,软骨细胞排列紊乱程度减轻,炎性细胞数量减少,Ki67和PCNA表达均上调,Caspase-3和Caspase-9表达均下调,IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 含量降低,MMP-1、MMP-3、MMP-13、Wnt1、 $\beta$ -catenin和LRP5表达均下调,其中以40 mg/kg组的作用最显著( $P < 0.01$ )。结论:蛇床子素能够减轻类风湿性关节炎大鼠的软骨损伤、炎症反应及关节软骨基质胶原的破坏,该作用可能是通过抑制Wnt信号通路的激活来实现的。

**[关键词]** 蛇床子素;关节炎;软骨损伤;免疫调节

**[中图分类号]** R593

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)04-521-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20200411

## Improvement of cartilage damage and immunomodulatory effects of osthole on type II collagen-induced arthritis rats

BEI Yufei<sup>1</sup>, ZHU Qing<sup>2</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, FAN Zhenyu<sup>1</sup>, YIN Xiaojin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 266001; <sup>2</sup>School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 266001, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the improvement of cartilage damage and immunomodulatory effects of osthole on type II collagen-induced arthritis rats. **Methods:** A rheumatoid arthritis rat model was induced by bovine type II collagen. Osthole was administered by intragastric injection one week after the modeling was established. The paw volume of each group and the arthritis index were evaluated every 4 days. After 30 days, the spleen index and thymus index were determined by weighing method. Cartilage damage was observed by HE staining. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in peripheral blood were measured by ELISA. The expressions of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 mRNA were determined by qRT-PCR. The levels of Ki67, PCNA, Caspase-3, Caspase-9, MMP-1, MMP-3, MMP-13, Wnt1,  $\beta$ -catenin and LRP5 were detected by Western blot. **Results:** Compared with the model group, the paw volume, arthritis score, spleen index and thymus index of the osthole treated group were decreased, the degree of chondrocyte arrangement disorder and inflammatory cells were reduced, the expressions of Ki67 and PCNA were up-regulated, and Caspase-3 and Caspase-9 were down-regulated, the contents of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were decreased, the expressions of MMP-1, MMP-3, MMP-13, Wnt1,  $\beta$ -catenin and LRP5 were down-regulated, and the effects were greatest in the Ost 40 mg/kg group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Osthole can alleviate cartilage damage, inflammation, and destruction of collagen in the articular cartilage matrix of rats with rheumatoid arthritis, which may be achieved by inhibiting the activation of the Wnt signaling pathway.

**[Key words]** osthole; arthritis; cartilage damage; immune regulation

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04):521-527]

**[基金项目]** 江苏省科技项目基础研究计划项目(BK20181459)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: brj1950@163.com

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种顽固性自身免疫性疾病,可导致严重且不可逆转的关节软骨破坏<sup>[1]</sup>,还可引起全身器官,包括心脏、肺、肾脏和动脉等损伤<sup>[2]</sup>。目前很少有有效、可靠、低毒的类风湿性关节炎治疗策略,临床常用糖皮质激素(如地塞米松)、抗风湿药物(如甲氨蝶呤)、非甾体类抗炎药物(如布洛芬)来缓解类风湿性关节炎患者的炎症反应<sup>[3]</sup>。但是,长期使用这些药物会导致严重的不良反应,如消化道溃疡、心脏病等<sup>[4]</sup>。从植物或草药中分离出的天然单体或提取物已被证明能够有效治疗各种疾病,且毒性相对较低<sup>[5]</sup>。蛇床子素(osthole, Ost)是从伞形科草本植物蛇床果实中提取的一种香豆素,具有抗癌、抗炎和保护心脏等多种生理作用<sup>[6]</sup>,且已有研究表明蛇床子对关节炎具有改善作用<sup>[7]</sup>。本文通过Ⅱ型胶原蛋白诱导构建大鼠关节炎模型,以地塞米松为阳性参照,研究蛇床子素对Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎大鼠软骨损伤的改善及免疫调节作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级SD大鼠120只,体重(170±10)g,购自四川夏派森医药科技有限公司,许可证号:SYXK(川)2017-203。动物处理符合实验动物伦理学原则。蛇床子素(西安天丰生物科技有限公司),弗氏完全佐剂(北京华中海威基因科技有限公司),牛Ⅱ型胶原(北京博雷德生物科技有限公司),RIPA裂解缓冲液(南京海克尔生物科技有限公司),BCA试剂盒(上海易色医疗科技有限公司),增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体、Caspase-9抗体(沈阳万类生物科技有限公司),Caspase-3抗体(杭州碧云天生物技术有限公司),地塞米松、白细胞介素(interleukin, IL)-6 ELISA试剂盒、IL-1 $\beta$  ELISA试剂盒、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA试剂盒(上海联硕生物科技有限公司),基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1抗体(上海沪尚生物科技有限公司),MMP-3抗体(上海恪敏生物科技有限公司),Ki67抗体、MMP-13抗体(上海信裕生物科技有限公司),低密度脂蛋白受体相关蛋白-5(LDL receptor associated protein-5, LRP5)抗体(Abcam公司,英国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模型构建

大鼠关节炎模型参考文献[8]构建:将牛Ⅱ型

胶原溶于醋酸,终浓度为4 mg/mL,再加入等量的弗氏完全佐剂对溶液进行乳化。在造模的每只大鼠的尾根部注入100 mL牛Ⅱ型胶原乳液。2周后,同等方法同剂量再注射牛Ⅱ型胶原乳液;对照组注射等量生理盐水。大约20 d后,模型大鼠表现出明显的活动不灵活,关节肿胀等类风湿性关节炎症状。

#### 1.2.2 分组及给药

将SD大鼠随机分为正常对照组(Norm组)、模型对照组(Model组)、地塞米松组(Dex组)、蛇床子素低剂量组(Ost 10 mg/kg组)、蛇床子素中剂量组(Ost 20 mg/kg组)、蛇床子素高剂量组(Ost 40 mg/kg组),每组20只。在造模完成1周后,蛇床子素低、中、高剂量组大鼠分别灌胃10、20、40 mg/kg的蛇床子素,地塞米松组大鼠灌胃0.05 mg/kg地塞米松,对照组灌胃等量生理盐水。

#### 1.2.3 爪子体积及关节炎指数的测定

给药后每4 d用爪肿测量仪测定各组大鼠的爪子体积,按照Zheng等<sup>[9]</sup>关节炎指数评分标准评定各组大鼠的关节炎指数:0分,未受影响;1分,影响1种关节类型;2分,影响2种关节类型;3分,影响3种关节类型;4分,影响3种以上关节类型。

#### 1.2.4 脾脏和胸腺指数

治疗后30 d,处死大鼠并解剖胸腺和脾脏,称取重量;脾脏指数(mg/g)=脾脏湿重/体重,胸腺指数(mg/g)=胸腺湿重/体重。

#### 1.2.5 HE染色观察软骨损伤

将软骨组织用石蜡包埋切片,然后按照HE染色液说明书进行染色:切片脱蜡、水洗、苏木精液染色、水洗;然后用1%盐酸酒精分化,水洗;0.6%氨水返蓝,水洗;0.5%伊红液染色,水洗;接着脱水,二甲苯透明;最后中性树脂胶封片,在400倍显微镜观察肾组织损伤情况。

#### 1.2.6 Western blot检测蛋白表达

采用含有蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA裂解缓冲液提取总蛋白,并用BCA试剂盒测定蛋白浓度;总蛋白经SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜上,加入Ki67、PCNA、Caspase-3、Caspase-9、MMP-1、MMP-3、MMP-13、Wnt1、 $\beta$ -catenin和LRP5的一抗,在4℃下过夜;用TBST冲洗后,在37℃条件下,加入二抗孵育60 min;用TBST冲洗后,蛋白条带在暗室梯度暴露,结果分析使用Image J软件。

#### 1.2.7 ELISA检测外周血细胞因子含量

眼眶采血,离心分离血清,然后将样品加入各反应孔,37℃反应45 min。接着用洗涤液洗涤4次,再

加入生物素标记的IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 抗体,37℃孵育30 min。洗涤后加链霉亲和素-HRP混合均匀,37℃反应30 min。接着加入显色剂避光显色。最后加终止液终止反应,检测结果。

### 1.2.8 qRT-PCR检测MMP-1、MMP-3和MMP-13 mRNA表达

用TRIzol试剂提取RNA并逆转录为cDNA,进行qRT-PCR检测。反应条件为:96℃预变性30 s;96℃变性10 s,56℃退火30 s,72℃延伸10 s,共30个循环;4℃保存。以 $\beta$ -actin作为内参。MMP-1上游引物:5'-CGACTCTAGAAACACAAGAGCAAGA-3',下游引物:5'-AAGGTTAGGTTACTGTCACACGCTT-3';MMP-3上游引物:5'-GGTCTCCATTCTTGTATGGGGGAAAAG-3',下游引物:5'-CTTCCTGGAATTCACATCGAAACCACT-3';MMP-13上游引物:5'-CTTAGAGGTGACTGGCAAAC-3',下游引物:5'-GCCCATCAAATGGGTAGAAG-3'。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行统计分析。定量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。足肿胀程度、关节炎指数采用两因素方差分析,其余多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。两两比较采用LSD-*t*检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 蛇床子素降低关节炎大鼠的足肿胀、关节炎指数及脾脏、胸腺指数

与Norm组相比,Model组大鼠的爪子体积明显变大,关节炎指数、脾脏指数和胸腺指数明显升高,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,图1);与Model组相比,Dex组和Ost各组大鼠的爪子体积、关节炎指数、脾脏指数和胸腺指数均有不同程度的降低( $P < 0.01$ ,图1),其中以Ost 40 mg/kg组的作用最明显。

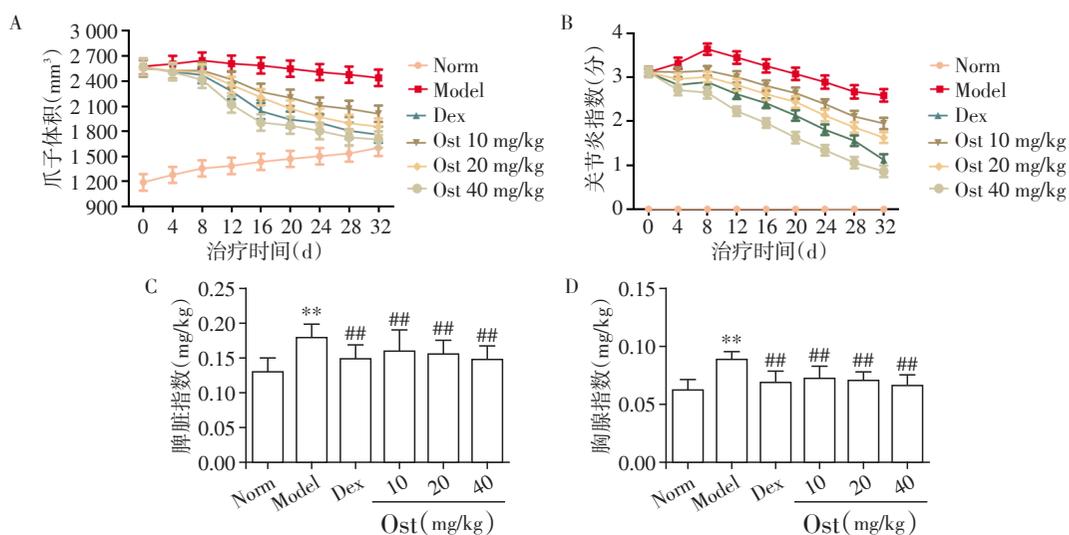
### 2.2 蛇床子素减轻关节炎大鼠的软骨损伤

Norm组大鼠软骨细胞无减少,排列整齐;Model组大鼠软骨细胞减少,排列紊乱并见大量炎性细胞浸润;与Model组相比,Dex组和Ost各组大鼠的软骨细胞排列紊乱程度减轻,且炎性细胞数量均有不同程度的减少,其中以Ost 40 mg/kg组的作用最明显(图2)。

### 2.3 蛇床子素可能诱导关节炎大鼠的软骨细胞增殖并抑制软骨细胞凋亡

与Norm组相比,Model组大鼠的Ki67和PCNA蛋白表达明显下调,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,图3A);与Model组相比,Dex组和Ost各组大鼠的Ki67和PCNA蛋白表达均有不同程度的上调( $P < 0.01$ ,图3A),且Ost 40 mg/kg组与Ost 10 mg/kg、Ost 20 mg/kg剂量组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ,图3A),提示Ost 40 mg/kg作用效果优于其他剂量组;Ost 40 mg/kg组与Dex组之差异间具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图3A),提示Ost 40 mg/kg作用效果优于地塞米松。

与Norm组相比,Model组大鼠的Caspase-3和Caspase-9蛋白表达明显上调,差异具有统计学意义



A: 爪肿测量仪测定各组大鼠的爪子体积;B: 各组大鼠关节炎指数;C: 各组大鼠脾脏指数;D: 各组大鼠胸腺指数。与正常对照组比较, $^{**}P < 0.01$ ,与模型对照组比较, $^{##}P < 0.01$ ( $n=20$ )。

图1 大鼠的足肿胀程度、关节炎指数及脾脏和胸腺指数

Figure 1 Degree of paw swelling, arthritis score, spleen index and thymus index in rats

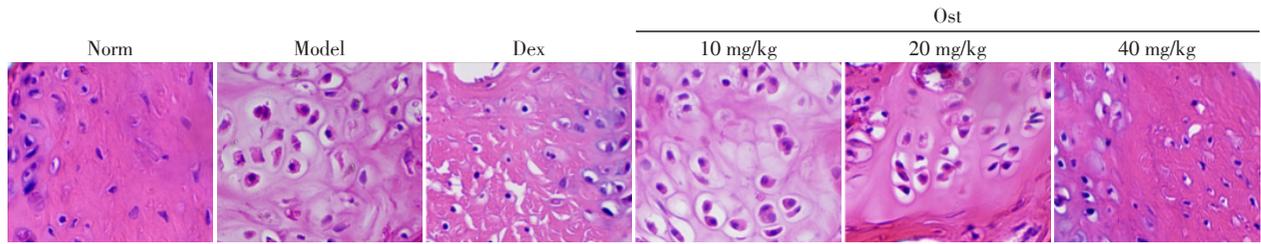
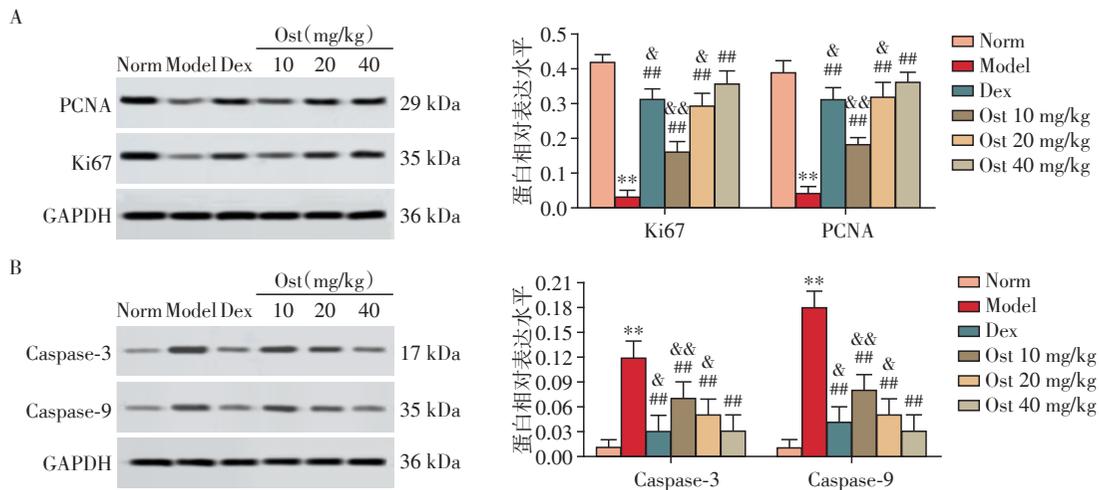


图2 HE染色观察软骨损伤程度(×400)

Figure 2 Degree of cartilage damage observed by HE staining(×400)

( $P < 0.01$ , 图3B);与Model组相比,Dex组和Ost各  
组大鼠的Caspase-3和Caspase-9蛋白表达均有不同  
程度的下调( $P < 0.01$ ,图3B),且Ost 40 mg/kg组与  
Ost 10 mg/kg、Ost 20 mg/kg组之间差异有统计学意

义( $P < 0.05, P < 0.01$ ,图3B),提示Ost 40 mg/kg的  
作用效果优于其他剂量组;Ost 40 mg/kg组与Dex组  
之间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图3B),提示  
Ost 40 mg/kg的作用效果优于地塞米松。



A: Western blot检测增殖相关蛋白表达;B:Western blot检测凋亡相关蛋白表达;与Norm组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与Model组比较,## $P < 0.01$ ;与  
Ost 40 mg/kg比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=20$ )。

图3 Western blot检测Ki67、PCNA、Caspase-3和Caspase-9的表达水平

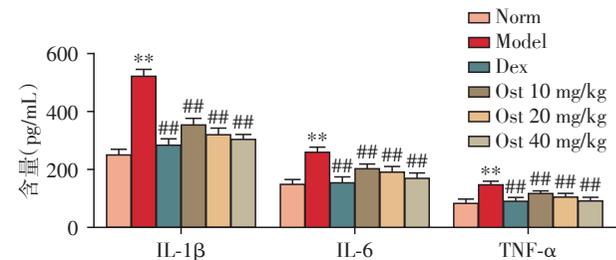
Figure 3 Expression levels of Ki67,PCNA,Caspase-3 and Caspase-9 detected by Western blot

#### 2.4 蛇床子素减轻关节炎大鼠的炎症反应

与Norm组相比,Model组大鼠的IL-1 $\beta$ 、IL-6和  
TNF- $\alpha$ 含量明显升高,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,图4);与Model组相比,Dex组和Ost各  
组大鼠的IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 含量均有不同程度的降低  
( $P < 0.01$ ,图4),且Ost 40 mg/kg组与Ost 10 mg/kg  
组、Ost 20 mg/kg组及Dex组之间差异没有统计学意  
义,提示Ost 40 mg/kg时具有类似地塞米松的效能。

#### 2.5 蛇床子素抑制关节炎大鼠的MMP-1、MMP-3 和MMP-13的表达

与Norm组相比,Model组大鼠的MMP-1、MMP-3  
和MMP-13 mRNA和蛋白表达量明显上调,且差异  
具有统计学意义( $P < 0.01$ ,图5);与Model组相比,  
Dex组和Ost各组大鼠的MMP-1、MMP-3和MMP-  
13 mRNA和蛋白表达量均有不同程度的下调( $P <$



与Norm组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与Model组比较,## $P < 0.01$ ( $n=20$ )。

图4 ELISA检测外周血IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 的含量

Figure 4 IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in peripheral blood detected by ELISA

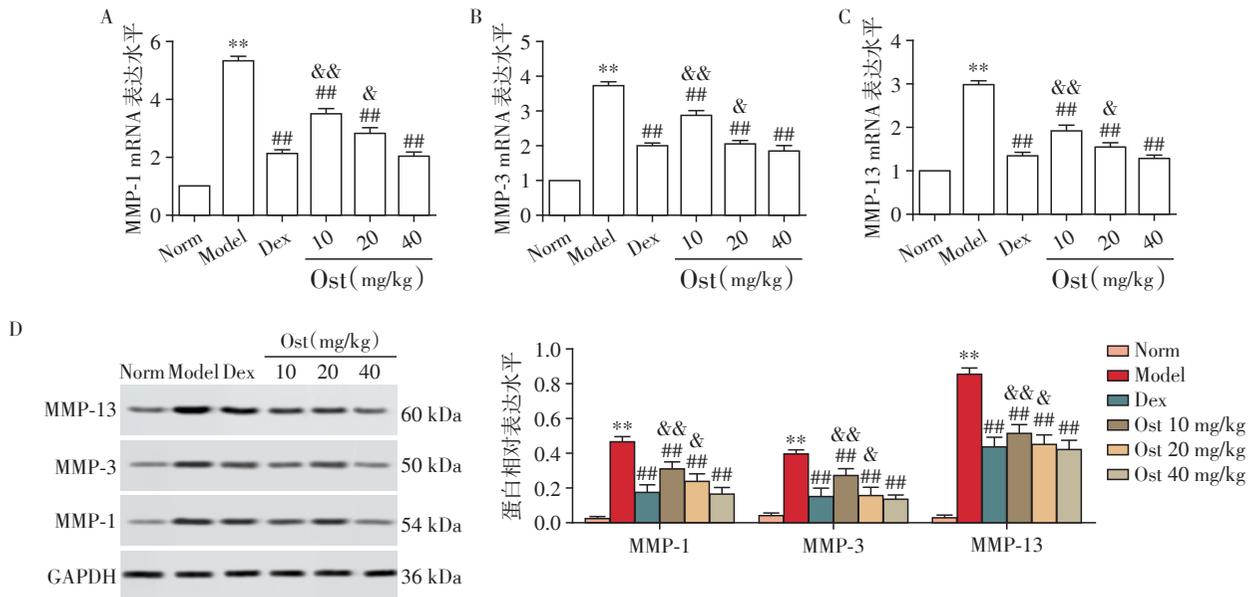
0.01,图5),且Ost 40 mg/kg组与Ost 10 mg/kg、Ost  
20 mg/kg组之间差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ ,图5),提示Ost 40 mg/kg作用效果优于其他剂  
量组;Ost 40 mg/kg组与Dex组之间差异没有统计学

差异,提示 Ost 40 mg/kg 的作用效果类似地塞米松。

### 2.6 蛇床子素抑制关节炎大鼠的 Wnt 通路

与 Norm 组相比, Model 组大鼠的 Wnt1、 $\beta$ -catenin 和 LRP5 蛋白表达明显上调,且差异具有统

计学意义( $P < 0.01$ ,图6);与 Model 组相比,Dex 组和 Ost 各组大鼠的 Wnt1、 $\beta$ -catenin 和 LRP5 蛋白表达均有不同程度的下调( $P < 0.01$ ,图6),且 Ost 40 mg/kg 组与 Ost 10 mg/kg 组、Ost 20 mg/kg 组之间差异有统计



A: qRT-PCR 检测 MMP-1 mRNA 表达; B: qRT-PCR 检测 MMP-3 mRNA 表达; C: qRT-PCR 检测 MMP-13 mRNA 表达; D: Western blot 检测 MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 蛋白表达;与 Norm 组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与 Model 组比较, ## $P < 0.01$ ;与 Ost 40 mg/kg 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ( $n=20$ )。

图5 各组大鼠 MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 的表达情况

Figure 5 Expression levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 in each group of rats

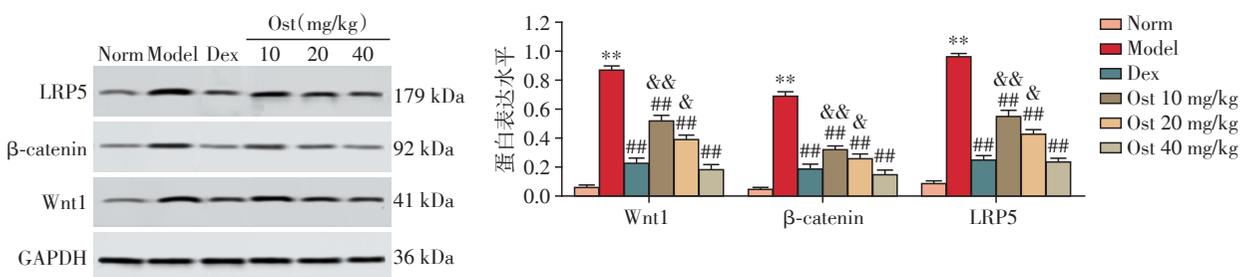
学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,图6),提示 Ost 40 mg/kg 的作用效果优于其他剂量组; Ost 40 mg/kg 组与 Dex 组之间差异没有统计学差异,提示 Ost 40 mg/kg 的作用效果类似地塞米松。

### 3 讨论

Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型在病理学的诱因和变化与人类风湿性关节炎极为相似,因此,Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型是研究类风湿性关节炎最理想也是最常用的动物模型,本实验也选

取Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型<sup>[10-11]</sup>。通过实验发现,Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型大鼠的爪子体积明显变大,关节炎指数、脾脏指数和胸腺指数明显升高,这说明关节炎模型构建成功;与Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型大鼠相比,灌胃 Ost 的大鼠的爪子体积、关节炎指数、脾脏指数和胸腺指数均有不同程度的降低,这说明 Ost 能够改善关节炎的病理特征。

类风湿性关节炎会导致软骨和骨组织的破坏,最终导致关节畸形和功能丧失<sup>[12]</sup>。本研究发现,Ⅱ



与 Norm 组比较, \*\* $P < 0.01$ ,与 Model 组比较, ## $P < 0.01$ ;与 Ost 40 mg/kg 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ( $n=20$ )。

图6 Western blot 检测 Wnt1、 $\beta$ -catenin 和 LRP5 表达水平

Figure 6 Expression levels of Wnt1,  $\beta$ -catenin and LRP5 detected by Western blot

型胶原蛋白诱导的关节炎模型大鼠细胞减少,排列紊乱并见大量炎性细胞浸润,增殖标志物Ki67和PCNA蛋白表达明显下调,凋亡标志物Caspase-3和Caspase-9蛋白表达明显上调,说明关节炎促使大鼠软骨组织受损,诱导软骨细胞凋亡、抑制软骨细胞增殖;与Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型大鼠相比,灌胃蛇床子素的大鼠软骨细胞排列紊乱程度和炎性细胞浸润程度均有不同程度的减轻,Ki67和PCNA蛋白表达均有不同程度的上调,Caspase-3和Caspase-9蛋白表达均有不同程度的下调,说明蛇床子素能够减轻类风湿性关节炎大鼠的软骨损伤,提示其可能诱导软骨细胞增殖、抑制软骨细胞凋亡。

炎症参与类风湿性关节炎的发生和发展,促炎细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-17A等刺激关节炎关节和滑膜组织的炎症反应<sup>[13]</sup>。已有众多研究报道,IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 是骨关节炎发病过程中起主要作用的炎性介质,能刺激软骨细胞、滑膜细胞分泌胶原酶等物质,并破坏软骨细胞周围环境,促进软骨细胞的凋亡<sup>[14]</sup>。本研究发现,Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型大鼠IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 含量明显升高,说明类风湿性关节炎大鼠体内炎症反应增强;与Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型相比,灌胃蛇床子素大鼠的IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 含量均有不同程度的降低,说明蛇床子素能够减轻类风湿性关节炎大鼠的炎症反应。

类风湿性关节炎主要病理改变是关节软骨基质胶原的破坏,主要是由于软骨基质的降解和合成失衡引起的<sup>[15]</sup>。已有研究表明,导致软骨细胞外基质合成与降解失衡的重要原因之一是软骨基质金属蛋白酶MMP的异常增高<sup>[16]</sup>。MMP是一类降解细胞外基质分子的酶,是生理组织重构的有效调节因子。MMP-1降解Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型胶原蛋白,在健康环境下表达水平较低,在关节炎条件下,MMP-1表达显著上调,在胶原蛋白降解中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。MMP-3具有降解Ⅱ型、Ⅲ型、Ⅳ型、Ⅸ型、Ⅹ型胶原蛋白的能力,并具有降解纤连蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白和各种蛋白聚糖的能力<sup>[18]</sup>。MMP-13具有强大的降解Ⅱ型胶原蛋白的能力,也能降解蛋白聚糖、蛋白聚糖和基底膜聚糖能等基质分子,在关节炎的发生中具有重要作用<sup>[19]</sup>。本研究发现,Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型大鼠MMP-1、MMP-3和MMP-13 mRNA和蛋白表达量明显上调,说明类风湿性关节炎引起大鼠关节软骨基质胶原的破坏;与Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型相比,灌胃蛇床子素大鼠的

MMP-1、MMP-3和MMP-13 mRNA和蛋白表达量均有不同程度的下调,说明蛇床子素能够减轻类风湿性关节炎大鼠关节软骨基质胶原的破坏,从而减轻关节炎。

已有报道Wnt信号通路的异常使骨骼系统代谢失衡,可导致类风湿性关节炎的发生<sup>[20]</sup>。本研究发现,Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型大鼠Wnt1、 $\beta$ -catenin和LRP5蛋白表达明显上调,说明类风湿性关节炎激活大鼠的Wnt通路,加剧关节炎的发生;与Ⅱ型胶原蛋白诱导的关节炎模型相比,灌胃蛇床子素大鼠的Wnt1、 $\beta$ -catenin和LRP5蛋白表达均有不同程度的下调,说明蛇床子素能够抑制类风湿性关节炎大鼠的Wnt信号通路激活,从而减轻关节炎。

地塞米松是一种糖皮质激素,用于类风湿性关节炎急性发作时的对症治疗,起到抗炎、抗风湿、止痛等作用,效果较好,可以在短期减轻红肿热痛等症状。因此,本研究选用地塞米松作为阳性对照药物,发现蛇床子素在治疗类风湿性关节炎的效果和作用与地塞米松相似。但是长期服用地塞米松会造成过敏性休克、呼吸困难、低钾血症、肌无力、精神恍惚、消化不良等症状,而蛇床子素作为植物提取物,不良反应小。因此,有望成为治疗类风湿性关节炎的新药。

综上所述,蛇床子素能够降低类风湿性关节炎大鼠的爪子体积、关节炎指数、脾脏指数和胸腺指数,减轻类风湿性关节炎大鼠的软骨损伤,并诱导软骨细胞增殖、抑制软骨细胞凋亡,减轻炎症反应和关节软骨基质胶原的破坏,其可能是通过抑制类风湿性关节炎大鼠Wnt信号通路的激活来实现的。这为蛇床子素的综合利用开发提供参考,并为类风湿性关节炎的预防和治疗积累实验数据。

#### [参考文献]

- [1] NAKKEN B, PAPP G, BOSNES V, et al. Biomarkers for rheumatoid arthritis: From molecular processes to diagnostic applications-current concepts and future perspectives[J]. Immunol Lett, 2017, 189(9):13-18
- [2] KIM S C, SOLOMON D H, JUN L, et al. Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis: Initiating disease-modifying antirheumatic drugs[J]. Am J Med, 2015, 128(5):539
- [3] BATHON J M, MARTIN R W, FLEISCHMANN R M, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2016, 343(22):1586-1593
- [4] 高恺言,陈海凤,邹敏超,等. 副肿瘤风湿征73例临床

- 分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(9):130-134
- [5] WANG Q, KUANG H, SU Y, et al. Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(1):9-39
- [6] JARZAB A, GRABARSKA A, SKALICKA-WOZNIAK K, et al. Pharmacological features of osthole [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2017, 71(1):411-421
- [7] XU R, ZHEN L, HOU J, et al. Osthole improves collagen-induced arthritis in a rat model through inhibiting inflammation and cellular stress [J]. *Cell Mol Bio Lett*, 2018, 23(1):19
- [8] PU J, FANG F F, LI X Q, et al. Matrine exerts a strong anti-arthritic effect on type II collagen-induced arthritis in rats by inhibiting inflammatory responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9):1410
- [9] ZHENG C J, ZHAO X X, AI H W, et al. Therapeutic effects of standardized vitex negundo seeds extract on complete freund's adjuvant induced arthritis in rats [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(6):838-846
- [10] SUN F, GU W. Baicalin attenuates collagen-induced arthritis via inhibition of JAK2-STAT3 signaling and regulation of TH17 cells in mice [J]. *J Cell Commun Signal*, 2019, 13(1):65-73
- [11] KELLY C, GRIFFITHS I D. Dapsone in rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 19(5):25
- [12] SAKTHISWARY R, RAJALINGAM S, HUSSEIN H, et al. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and its correlation with sonographic knee cartilage thickness and disease activity [J]. *Clin Rheumatol*, 2017, 36(12):1-6
- [13] BARRANCO C. Rheumatoid arthritis: Anti-TNF agent choice impacts cardiovascular risk [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(3):132
- [14] MOLLER B, VILLIGER P M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 2006, 27(4):391-408
- [15] ARAKI Y, MIMURA T. Matrix metalloproteinase gene activation resulting from disordred epigenetic mechanisms in rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5):905
- [16] KUMAR R, GUPTA Y K, SINGH S, et al. Picrorhiza kurroa inhibits experimental arthritis through inhibition of pro-inflammatory cytokines, angiogenesis and MMPs [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(1):112-119
- [17] AGERE S A, AKHTAR N, WATSON J M, et al. Rantes/CCL5 induces collagen degradation by activating MMP-1 and MMP-13 expression in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(10):1341
- [18] SHIOZAWA K, YAMANE T, MURATA M, et al. MMP-3 as a predictor for structural remission in RA patients treated with MTX monotherapy [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1):1-9
- [19] LIANG Y, LI D, XIONG J, et al. E2 regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1 $\beta$ -induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1):105
- [20] OZ B, YILDIRIM A, YOLBAS S, et al. Resveratrol inhibits src tyrosine kinase, STAT3, and Wnt signaling pathway in collagen induced arthritis model [J]. *BioFactors*, 2018, 45(12):1463

[收稿日期] 2019-09-29



欢迎关注本刊微博、微信公众号!